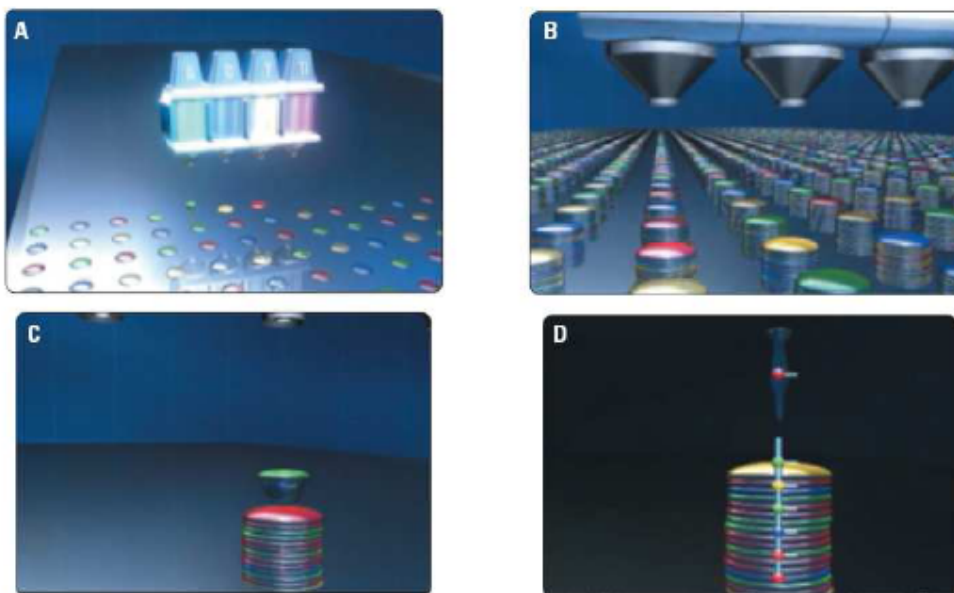


UNIDAD DE GENÓMICA CABIMER

Guía de usuario de Microarray Agilent

La Unidad de Genómica de Cabimer se ha mejorado con la incorporación de la tecnología de microarrays en portas, utilizando fluorocromos para marcar las muestras problemas. Para ello, se ofrece la posibilidad de utilizar Microarrays de Agilent que den respuesta a una gran cantidad de aplicaciones destacando los estudios de expresión génica y el análisis de microRNAs.

Agilent cuenta con Microarrays prediseñados de diversos organismos y para diversas aplicaciones. Todos presentan sondas sensibles y selectivas de al menos 60 pb (60-mer) sintetizados *in situ* mediante la tecnología SurePrint. La longitud de dichas sondas permite una mayor sensibilidad en el resultado de la detección ya que permite cierto desapareamiento (*mismatch*) entre las sondas y la muestra marcada.



Además, la plataforma Agilent permite de forma económica la síntesis de cualquier tipo de microarray adaptado a las necesidades particulares de cada proyecto de investigación: Custom Gene Expression Microarrays. El usuario puede diseñarse su propio microarray a través del software gratuito y vía web eMicroarray 5.0, y enviar el diseño a través de la web a Agilent para su fabricación eArray para su posterior procesamiento en la Unidad de Genómica de Cabimer.

Para todo esto las muestras de ácidos nucleicos (ADN o ARN) se marcan con un fluoróforo (normalmente Cy-3) y se hibridan con los arrays dispuestos en el porta (horno de hibridación Agilent G2545A). La intensidad específica de la hibridación es detectada y cuantificada por un escáner GenePix 4100A de Axon. Posteriormente se generan unos datos numéricos que corresponden a las intensidades relativas de cada array, y éstos son normalizados y tratados estadísticamente para su comparación.

➤ **Formatos Microarrays de Agilent**

En esta plataforma se pueden elegir hasta 4 formatos diferentes de slides:

- 1 x 244K: 1 array/slide en el porta con una densidad de ~244.000 sondas.
- 2 x 105K: 2 arrays/slide idénticos de ~105.000 sondas cada uno.
- 4 x 44K: 4 arrays/slide idénticos, con una densidad de ~ 44.000 sondas.
- 8 x 15K: 8 arrays/slides idénticos, con una densidad de ~15.000 sondas.

Esto permite hibridar en la misma superficie muestras control y muestras problemas, para comparar directamente.



➤ **El servicio de Microarrays para la Plataforma de Agilent incluye**

1. Orientación en la planificación del diseño experimental a realizar
2. Control de calidad de las muestras con el Bioanalyzer 2100.
3. Marcaje de muestras experimentales de RNA para posterior hibridación y lavado (Reactivos Agilent).
4. Lectura con el escáner GenePix 4100A de Axon. Análisis de imagen y cuantificación de datos de fluorescencia con el Software GenePix Pro 6.0
5. Análisis estadístico de resultados por LIMMA (Linear Models for Microarray Analysis).

➤ **Recomendaciones para el Diseño del experimento**

Antes de utilizar el Servicio de Genómica hay algunos requisitos importantes de los que depende la obtención de resultados fiables y reproducibles, dado la gran inversión de tiempo y dinero en estos experimentos:

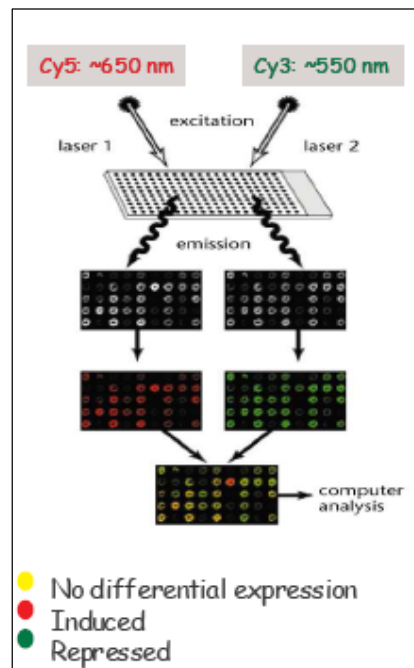
- Cuál es el objetivo de dicho experimento, es decir, qué respuestas son las que buscamos.
- Establecer los controles más apropiados para las muestras a estudiar (mismo fondo genético, mismo sexo...).

- Definir nº de réplicas por cada condición experimental para promediar los resultados y que éstos sean estadísticamente significativos. Como mínimo son necesarias 3/4. En caso de que el usuario solicite un número inferior de réplicas, la Unidad **NO realizará el análisis estadístico** dado que no procede.
- En el caso de estudios de expresión, para disminuir la variabilidad de cada individuo es recomendable hacer mezclas ("pooles") de las muestras.

Para cualquier duda puede ponerse en contacto con el Servicio de Genómica a través de las siguientes direcciones de correo electrónico: Eloísa Andújar, Mónica Pérez, Andrés Aguilera o en el teléfono 954 467 828.

Según las necesidades experimentales hay dos posibilidades en el marcaje de las muestras que hay que considerar:

- Marcaje de dos colores (Cy-5/Cy-3)**, en el que la muestra experimental se marca con un fluorocromo (generalmente Cy5) y la muestra de referencia o control se marca con otro (generalmente Cy3) y ambas muestras se hibridan conjuntamente sobre el mismo microarray (hibridación competencia).



- Marcaje de un color (Cy-3)**, en el que todas las muestras se marcan con el fluorocromo Cy-3 y se hibridan el experimental y el control en distintos microarrays del mismo o distinto portaobjetos.

Ambas técnicas presentan ventajas y desventajas; en el caso de marcaje de un color, el diseño experimental es más sencillo, y es el método **recomendado en caso de proyectos abiertos**, ya que es posible incluir nuevas muestras en el proyecto en el futuro. La técnica de marcaje de doble color, es más sensible y potente y permite detectar pequeños cambios de expresión génica, pero el diseño experimental es más complicado, principalmente referente al tipo de muestra utilizada como muestra de referencia. En general se recomienda utilizar una muestra de referencia biológicamente cercana a la muestra experimental, por lo que los RNAs

comerciales no son la mejor opción, aunque puede considerarse su utilización en el caso de hibridar tanto las muestras control como las experimentales con el mismo RNA



Actualmente, la Unidad de Genómica de CABIMER ofrece el marcaje de un color. Si estuviese interesado en el marcaje de 2 Colores, consultar con la Unidad.

> **Requisito de las muestras**


Para el estudio de los perfiles de expresión, se necesitan muestras de **RNA total** de calidad de las distintas condiciones con los siguientes requisitos:

- a. **Aislamiento del RNA total:** Es imprescindible que el usuario obtenga un de un RNA TOTAL de alta calidad y pureza. El método que da mejores resultados es la extracción con TRIzol (Invitrogen cat: 15596-026) según recomienda Agilent, con una o dos extracciones extras con cloroformo antes de la precipitación con etanol. La purificación por Kits de extracción de RNA de Qiagen son igualmente recomendables, fiables y productivas, recomendando especialmente el miRNeasy Mini kit (Qiagen p/n 217004) usando el protocolo de extracción de RNA total.
- b. **Cantidades requeridas:**
 - **Expresión Génica:** mínimo de **500 ng RNA total resuspendido en Agua libre de RNAsas** a una concentración mínima de 100 ng/μl.
 - **miRNA:** mínimo **250 ng RNA total resuspendido en Agua libre de RNAsas** a una concentración mínima de 50 ng/μl.

No existe ningún inconveniente en mandar más cantidad de RNA o más concentrada. Si la cantidad de muestra que se puede obtener es problemática o hay cualquier duda sobre ella o la concentración de la misma, ponerse en contacto con la Unidad.

- d. **Todas las muestras deberán estar correctamente identificadas** (mínimo de 3 caracteres) y acorde a la **Hoja de solicitud** debidamente cumplimentada que debe acompañar a las muestras. 
- e. **Calidad de las muestras. El análisis de Calidad de las muestras está incluido en el servicio.** Al llegar las muestras a la Unidad se procederá a la cuantificación de éstas así como a la determinación de su integridad por medio del Bioanalyzer 2100. Se informará al usuario de **las muestras que no pasen un mínimo de calidad exigida** junto con una explicación y recomendaciones para la obtención de muestras adecuadas. **Si no es posible obtener muestras apropiadas** y se abandonara el proyecto, se facturará este servicio (análisis de calidad).
- f. Todas las muestras deberán estar correctamente identificadas (mínimo de 3 caracteres) y acorde a la **Hoja de solicitud** debidamente cumplimentada que debe acompañar a las muestras. 

> **Envío de muestras**

Las muestras de RNA/DNA, una vez purificadas y en las concentraciones indicadas en los apartados anteriores se enviarán congeladas en nieve carbónica **en tubos Eppendorf® de 1,5 mL en Agua libre de RNAsas** , junto con una copia original impresa del **Formulario de Solicitud** cumplimentado correctamente. 

Si por algún motivo ajeno a la Unidad, una vez realizada la solicitud, el usuario cancelara la misma, el material fungible correspondiente le será facturado.

La dirección a la cual pueden ser remitidas es:

Unidad de Genómica
Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa
(Cabimer)
Avda. Américo Vespucio s/n
Parque Tecnológico Cartuja 93
41.092 SEVILLA

Horario de recepción de muestras: 9:00 h a 17:00 h.

El envío de las muestras debe ser comunicado previamente por teléfono (**954-467828**) o por e-mail (**eloisa.andujar@cabimer.es/monica.perez@cabimer.es**).

Por su parte, la Unidad de Genómica comunicará vía e-mail la recepción de las mismas así como cualquier problema que pueda surgir tras los controles de calidad realizados sobre éstas.

➤ **Entrega de los Resultados**

Una vez terminado el experimento y obtenidos los datos de su análisis los resultados se le enviarán al usuario vía e-mail o ftp junto con un informe final. Se les enviará los ficheros *.gpr que contienen toda la información de cada Microarray y un documento Excel en el que se incluyen los datos normalizados. Dependiendo del experimento, se elegirán distintos parámetros y métodos de análisis.

Esta información se ofrece en un **plazo máximo de 15 días** desde el comienzo del análisis. Para proyectos de más de 20 muestras, consultar con la Unidad.

➤ **Tarifas**

Dado la complejidad de los experimentos, marcajes y tipos de arrays, así como la presentación de los mismos, consultar con la Unidad para conocer los precios de cada proyecto.