UNIDAD DE GENÓMICA. CABIMER

Guía de usuario de Análisis de Calidad y/o Cantidad de Ácidos Nucleicos

A. Bioanalyzer 2100/TapeSation 4200

La Unidad dispone de 2 plataformas para realizar de forma automatizada electroforesis de ácidos nucleicos:

- Bioanalyzer 2100
- TapeStation 4200

Ambas están diseñadas para determinar la calidad, tamaños, etc… de ácidos nucléicos (ARN y ADN) de una forma más fiable y rigurosa que los sistemas tradicionales. Consiste en un sistema de microelectroforesis mediante el uso de nanocapilares. Es por ello, que este sistema minimiza la cantidad de muestra (1-2 µL) que se usa para este control, además del tiempo empleado en ello. Actualmente, estos equipos han pasado a ser un requerimiento imprescindible en la determinación de la calidad de muestras de **RNA y DNA** dada su mayor fiabilidad frente a los clásicos geles de poliacrilamida y agarosa.

Además, en el caso concreto de muestras de RNA, el software del Bioanalyzer incorpora un algoritmo denominado RIN (RNA Integrity Number), que permite determinar la calidad de las muestras de RNA eucariótico total en base a un rango numérico del 1 al 10, siendo 1 el valor para una muestra de RNA totalmente degradada y 10 el valor obtenido para una muestra intacta.

- **EL SERVICIO OFRECE**

  - Análisis de calidad RNA/DNA (Bioanalyzer/TapeStation). El usuario debe entregar las muestras cuantificadas (NanoDrop, Qubit, etc..) y resuspendidas en H_2O-miliQ libre de ARNsas, DNAsas, etc.
  - Cálculo RIN (RNA Integrity Number) para el RNA, distribución y rango de tamaños de ADN.
  - Resultados de la electroforesis nanocapilar en archivo *.PDF para determinar visualmente la integridad del RNA, ausencia de DNA genómico contaminante, rango de tamaños, etc. (y archivo .XAD si el usuario lo solicita)

Actualmente existen varias posibilidades para el **Análisis de RNA y de DNA** utilizando este sistema siendo, las que a continuación se detallan, las más usadas en esta unidad:

- Para **Análisis de RNA y mRNA**:
  - **RNA 6000 Nano**. Para **concentraciones medias** de RNA total.
    - Rango cualitativo: 5-500 ng/µl de RNA total, 25-250 ng/µl de mRNA.

Genómica Cabimer

- Rango cuantitativo: 25-500 ng/µl de RNA total, 25-250 ng/ µl de mRNA.

- **RNA 6000 Pico.** Para **concentraciones bajas** de RNA total.
  - Rango cualitativo: 50-5000 pg/µl de RNA total, 250-5000 pg/µl de mRNA.

- Para **Análisis de DNA y Librerías de DNA**:
  - **High Sensitivity DNA.** Para concentraciones bajas de dsDNA.
    - Rango cualitativo desde 5 pg/µl (5-5000 pg/µl).
    - Rango cuantitativo:5–500 pg/ µl.
    - Rango de tamaños: 50-7000bp.

    NOTA: es muy importante para este uso tener bien cuantificado el ADN. Si es ADN genómico es suficiente con cuantificar por Nanodrop (siempre que esté en rango fiable, ≤ 40-50 ng/µ); si el ADN proviene de una purificación, ChIP o rescate, debe estar cuantificado fluorimétricamente o solicitar esta cuantificación a la unidad.

Para más información sobre los kits comercializados por Agilent, visite los siguientes links:

- Bioanalyzer 2100. Agilent Technologies.
  - Bioanalyzer DNA kits. y RNA kits
- TapeStation 4200. Agilent Technologies.
  - TapeStation DNA ScreenTape y RNA ScreenTape

Para el uso de otros chips y/o tarjetas, o cualquier otra duda, contactar con la Unidad (eloisa.andujar@cabimer.es, monica.perez@cabimer.es o 954467828).

Genómica Cabimer

REQUISITOS DE LAS MUESTRAS

- Todas las muestras deben estar identificadas correctamente y acorde con la **Hoja de Solicitud** adjunta y debidamente cumplimentada. PDF . Es importante indicar el tipo de muestra (ARN total, *small* RNA, Librería NGS, DNA inmunoprecipitado,….) y si se espera algún rango de tamaño concreto.

- Las muestras deben estar cuantifcadas por Nanodrop® (cantidad y ratios 260/280-260/230) o Fluorimetría (cantidad) y dicha cuantificación debe ser anotada en el Formulario de solicitud. Si no hay la suficiente cantidad de RNA/DNA no se procederá al estudio de su calidad.

- Cantidad de RNA: Entre 50 ng mínimo y 1000 ng/ µl de RNA en un volumen NO inferior a 2 µl de **Agua libre de RNasas** (dilución mínima de 25 ng/µl para RNA total o mRNA en el caso de RNA 6000 Nano) o **Low-TE**

RNA Kit Specifications

	RNA 6000 Nano total RNA	RNA 6000 Nano mRNA	RNA 6000 Pico total RNA	RNA 6000 Pico mRNA	Small RNA Assay
Analytical Specifications					
Quantitative range	25–500 ng/µL	25–250 ng/µL			50-2000 pg/µL of purified miRNA in water
Qualitative range	5–500 ng/µL	25–250 ng/µL	50–5000 pg/µL in water	250–5000 pg/µL in water	50-2000 pg/µL of purified miRNA in water
Sensitivity (S/N>3)	5 ng/µL in water	25 ng/µL in water	50 pg/µL in water 200 pg/µL in TE	250 pg/µL in water 500 pg/µL in TE	50 pg/µL in water**
Quantitation reproducibility	10% CV (within a chip)	10% CV (within a chip)	20 % CV (within a chip)	20 % CV (within a chip)	25 % CV (within a chip)
Quantitation accuracy	20 % CV*	20 % CV*	30 % CV*	30 % CV*	
Maximum sample buffer strength	100 mM Tris, 0.1 mM EDTA or 125 mM NaCl or 15 mM $MgCl_2$	100 mM Tris, 0.1 mM EDTA or 125 mM NaCl or 15 mM $MgCl_2$	50 mM Tris, 0.1 mM EDTA or 50 mM NaCl or 15 mM $MgCl_2$	50 mM Tris, 0.1 mM EDTA or 50 mM NaCl or 15 mM $MgCl_2$	10 mM Tris, 0.1 mM EDTA

- Cantidad de DNA: Se requiere el envío de AL MENOS 2 µl a una concentración de mínima de 10 pg/µl para DNA o librerías de DNA en **Agua libre de DNasas** o **Low-TE.**

Analytical Specifications	
Specification	**Agilent High Sensitivity DNA assay**
Sizing range	50 – 7000 bp
Sizing resolution	50 – 600 bp: ± 10 % 600 – 7000 bp: ± 20 %
Sizing accuracy	± 10 %
Sizing reproducibility	5 % CV

Analytical Specifications	
Specification	**Agilent High Sensitivity DNA assay**
Quantitation reproducibility[1]	50 – 2000 bp: 15 % CV 2000 – 7000 bp: 10 % CV
Quantitative range[1]	5 – 500 pg/µL
Maximum salt concentration in sample	10 mM Tris and 1 mM EDTA

- Las muestras deben estar **eluidas en Agua mili-Q o *Low TE***, libre de contaminantes (EDTA, Glucógeno, enzimas, etc…). **Importante: Las muestras eluidas en Buffer con concentración de EDTA más alta de las indicadas (ver tablas anteriores), con otros contaminantes y sobre todo si tienen *Glycol-blue* (o similares) NO PODRÁN SER ANALIZADAS con éxito.**

ENVÍO DE MUESTRAS

- Los RNAs/DNAs para análisis de calidad, una vez purificados y disueltos en Agua libre de RNasas/DNasas, deben ser enviados en **tubos eppendorf (o similar) de 1,5 mL** y **correctamente identificadas.**

- Congelados en nieve carbónica, junto con el formulario cumplimentado correctamente. Dicho formulario debe ser enviado también vía email. SI son muchas las muestras, la identificación y datos de las mismas puede ser remitida en documento independiente del formulario (*.doc, *.xlsx).

- Pueden ser enviados por correo a la siguiente dirección:

  Unidad de Genómica. Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (Cabimer). Avda. Américo Vespucio nº 24. arque Tecnológico Cartuja´93
  41092 SEVILLA

- Horario de recepción de muestras:
  - Lunes a Jueves: 9:00 h a 16:00 h (9:00h a 14:00h Julio y Agosto)
  - Viernes : 9:00 h a 14:00 h

- El **envío de las muestras** debe ser **comunicado previamente** por teléfono (954-467828) o **preferiblemente** 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.

- En algunas ocasiones, previo al análisis se procederá a la cuantificación de las muestras y si no hay suficiente cantidad, se notificará al usuario junto con algunas recomendaciones para la obtención de muestras adecuadas. NO se examinará su integridad.

ENTREGA DE LOS RESULTADOS

Una vez finalizado el experimento, se le comunicará al usuario vía email y se adjuntarán:

- Los resultados en un archivo *.pdf con los resultados del análisis (concentración, relación 28S/18S, RIN), las imágenes (gel, electroferogramas) correspondientes a la migración de las muestras.

- Una guía para la Interpretación de los de Análisis de Calidad de muestras de ARN mediante Bioanalyzer 2100 de Agilent.

Genómica Cabimer

B. CUANTIFICACIÓN FLUORIMÉTRICA de ADN y ARN (Qubit 2.0)

Cuantificación de ácidos nucleícos mediante fluorometría (Qubit 2.0, Life Tecnologies). El fluorímetro Qubit mide concentraciones de ADN, ARN, y proteínas con una alta precisión y sensibilidad. Se basa en la utilización de fluoróforos que se intercalan específicamente entre las moléculas de interés, minimizando así los efectos de los contaminantes. La precisión de las mediciones incluso a bajas concentraciones (Rango de efectividad de 10 pg a 1 ug) hace que el fluorímetro Qubit sea la herramienta ideal para aplicaciones tales como PCR en tiempo real y secuenciación masiva (NGS).

Actualmente, en la Unidad se ofrecen ensayos de:

- **Cuantificación de DNA** (Qubit™ dsDNA HS Assay Kits):
  - Rango Alta Exactitud: **1ng/ml a 500ng/ml**
  - Rango Exactitud Moderada: 0.5ng/ml–**1ng/ml** a **500ng/ml**-600ng/ml
  - Precisión aún en presencia de contaminantes tales como: RNA, sales, disolventes, proteínas, nucleótidos libres.
- **Cuantificación de RNA** (Qubit™ RNA HS Assay Kits):
  - Rango Alta Exactitud: **25ng/ml a 500ng/ml**
  - Rango Exactitud Moderada: 20ng/ml–**25ng/ml** a **500ng/ml**-1000ng/ml

En el plazo de dos días máximo tras la cuantificación, se enviarán los datos en formato *.xlsx, junto con las indicaciones de diluciones hechas si se diera el caso. Para Envío y Requisitos de las muestras y/o Recepción de resultados contactar con la Unidad (eloisa.andujar@cabimer.es, monica.perez@cabimer.es o 954467828).

➢ **TARIFAS**

Consultar con la Unidad.

➢ **INFORMACIÓN DE INTERÉS**

- Bioanalyzer 2100. Agilent Technologies.
- TapeStation 4200. Agilent Technologies.
- **Applications for DNA, RNA and Protein Analysis**. Agilent 2100 Bioanalyzer System and Agilent 4200 TapeStation System. https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-8974EN_Bioanalyzer-TapeStation_appcompendium.pdf
- **RNA Integrity Number** (RIN)**- Standardization of RNA Quality Control.** https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-1165EN.pdf

Genómica Cabimer

- **DV200** Analysis with the Agilent TapeStation systems. https://www.agilent.com/en/promotions/tapestation-dv200-determination

- **Softwares de Análisis**

  - Bioanalyzer software. https://www.agilent.com/en/product/automated-electrophoresis/bioanalyzer-systems/bioanalyzer-software.

  - TapeStation software. https://www.agilent.com/en/product/automated-electrophoresis/tapestation-systems/tapestation-software/tapestation-software-379381.

- Ensayos Qubit. Thermofisher.

Genómica Cabimer