

PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN Y ARN

El Banco Nacional de ADN Carlos III oferta un control de calidad de muestras de ADN y ARN.

El programa completo de control de calidad de muestras de ADN y ARN engloba diferentes técnicas que aportan una información objetiva sobre la concentración de las muestras, pureza, integridad y funcionalidad garantizando en todo momento la trazabilidad de las mismas.

No obstante, cada una de estas técnicas también se oferta como servicio individual.

CONTROL DE CALIDAD MUESTRAS DE ADN EN SOLUCIÓN.

1. Concentración y pureza de las muestras mediante espectrofotometría.

Mediante espectrofotometría se puede determinar la concentración y la pureza de una muestra de ADN basándose en la capacidad de absorbancia de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada.

De este modo la concentración de la muestra de ADN se calcula teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260nm. Mientras que la relación de absorbancias A260/280 y A260/230 se utilizan para evaluar la pureza de las muestras.

La relación A260/280 es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0. Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación A260/280 > 1.6. Un valor A260/280 < 1.6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Un ratio A260/280 > 2.1 podría deberse a la presencia de ARN en la muestra.

A 230nm absorben contaminantes como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos. En general, se considera que el ADN es puro cuando el ratio A260/230 se sitúa en torno 1.8-2.2. Un ratio menor de 1.8 se relaciona con presencia de contaminantes en la muestra. Cuanto menor sea este ratio la presencia de contaminantes en la muestra será mayor. Un ratio < 1.5 estaría indicando una impureza relevante en la muestra que podría comprometer su funcionalidad.

No obstante, esta relación resulta mucho más variable que la relación A260/280 dependiendo de factores como la concentración de ADN o de la composición del tampón de resuspensión de la muestra.

Valores indicativos de pureza en muestras de ADN:

Técnica de análisis	Analisis	Parámetros	Criterios validez
Espectrofotometría	A260/280	Pureza	≥1,8-2,1. Pureza óptima
			≥1,6-1,7. Pureza aceptable
			< 1,6 . ADN contaminado con compuestos aromáticos
			>2,1. ADN contaminado con ARN
	A260/230	Pureza	> 2-2,2. Pureza óptima*
			> 1,8. Pureza aceptable*
			< 1,8. ADN contaminado con sales, fenol, hidratos de carbono...
			< 1,5. ADN altamente contaminado con sales, fenol, hidratos de carbono...

*Estos ratios sólo tendrían validez con concentraciones altas de ADN (aprox > 50ng/μl)

Para poder realizar una buena interpretación de los valores de absorbancia obtenidos es importante indicar la composición del tampón de resuspensión de la muestra así como el protocolo de extracción utilizado.

Referencias:

- **260/280 and 260/230 Ratios.** NanoDrop. Technical Support Bulletin. (Available at: <https://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf>).
- **Collaborative Design for Automated DNA Storage That Allows for Rapid, Accurate, Large-Scale Studies.** Scott Mahan, Kristin G. Ardlie, Kevin F. Krenitsky, Gary Walsh and Graham Clough. ASSAY and Drug Development Technologies Volume 2, Number 6, 2004.
- **60/280 and 260/230 Ratios.** NanoDrop. Technical Support Bulletin. (Available at: <https://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf>).
- **DNA/ RNA extraction & Qualification.** Quality Control Platform of the CIT Program (Carte d'Identité de Tumeurs). (Available at: https://cit.ligue-cancer.net/CIT_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite%20CIT-%20QC%20PF%20Saint-Louis%207%20avril%2009.pdf).
- **The Significance of the 260/230 Ratio in Determining Nucleic Acid Purity.** Hillary Luebbehusen, 2010. The Significance of the 260/230 Ratio in Determining Nucleic Acid Purity. (Available at: <http://www.bcm.edu/mcfweb/?PMID=3100>).

2. Normalización de muestras de ADN.

Como servicio complementario a la determinación de la concentración y pureza se ofrece la posibilidad de normalización de la concentración de las muestras de ADN. Esta normalización se realizará con un robot de alicuotado automático con el fin de garantizar la trazabilidad de las muestras.

3. Concentración e integridad de las muestras mediante fluorimetría.

Esta metodología se basa en la estimación de la concentración de ADN mediante la medida de fluorescencia emitida por un fluoróforo de unión exclusiva al ADN de doble cadena (ADN íntegro).

Requisitos de las muestras:

Muestras en placas de 96 pocillos (también válido formato micronic®) dispuestas en columnas. El volumen mínimo de muestra ha de ser al menos de 5-10 µl. El volumen de muestra restante tras la cuantificación puede ser reenviado al investigador. Sería conveniente que se indicase una concentración aproximada de la muestra con espectrofotometría así como el método de extracción utilizado.

Nº máximo de muestras por placa: 88

4. Integridad de ADN por electroforeris de agarosa.

La electroforesis en gel de agarosa al 0,7% (p/v) permite la valoración de la integridad de la muestra de ADN. Se considera que una muestra de ADN es íntegra cuando su perfil en una electroforesis en gel de agarosa se corresponde a una banda discreta. El nivel de degradación de una muestra está determinado por la pérdida de definición de la banda predominante y el acompañamiento de una estela o *smear* a lo largo del gel.

Con el fin de determinar de una manera objetiva y estandarizada la integridad de la muestra se ha definido una puntuación para los diferentes perfiles de ADN observados tras la carrera electroforética.

Criterios de validez y puntuación asignada según la integridad observada en gel de agarosa:

Técnica de análisis	Párametro	Criterios validez	Puntuación
Electroforesis gel de agarosa	Integridad del ADN	banda definida en la parte superior del gel. Integridad alta	3
		presencia simultánea de la banda en la parte superior del gel y un ligero <i>smear</i> . Integridad adecuada	2
		ausencia banda definida y presencia de <i>smear</i> concentrado en la parte superior del gel. Parcialmente degradado	1
		<i>smear</i> concentrado en la parte inferior del gel. Totalmente degradado	0

Referencias:

- **DNA/ RNA extraction & Qualification. Quality Control Platform of the CIT Program (Carte d'Identité de Tumeurs).**

(Available at: https://cit.ligue-cancer.net/CIT_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite%20CIT-%20QC%20PF%20Saint-Louis%207%20avril%2009.pdf).

- **Genomic DNA Sample QC. Standard Operating Procedure. Joint Genome Institute (JGI).** (Available at:

<https://1ofdmq2n8tc36m6i46scovo2e-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2014/02/Genomic-DNA-Sample-QC-2016.pdf> version e1.0). (Available at: <http://rrcancer.ca/wp-content/uploads/2018/02/ctrnet-sop-5.1.002-e1.0-assessing-quality-of-nucleic-acids.pdf>)

5. Análisis de la integridad de ADN por Agilent 2200 TapeStation System de Agilent Technologies.

El equipo Agilent 2200 TapeStation se basa en una tecnología combinada de microelectroforesis automatizada y fluorescencia. Pequeñas cantidades de muestra de ADN son separadas por su tamaño molecular y detectadas mediante fluorescencia. El resultado se visualiza en un electroferograma donde la cantidad de fluorescencia medida se correlaciona con la cantidad de ADN de un tamaño determinado.

El software del equipo calcula un algoritmo a partir de la información obtenida del análisis electroforético teniendo en cuenta el electroferograma resultante. El valor obtenido se denomina DIN (*DNA Integrity Number*) y proporciona un valor numérico a la integridad del ADN.

En la siguiente tabla se relaciona el valor de DIN con la integridad del ADN según las referencias bibliográficas indicadas en la página web de Agilent Technologies y los resultados obtenidos en pruebas de validación llevadas a cabo en el

Banco Nacional de ADN Carlos III en los que se compara el valor de DIN de una muestra con su capacidad de amplificación por *Long PCR* múltiple (técnica que se describe más adelante:

Criterios de validez según la integridad observada en gel de agarosa:

Técnica de análisis	Párametro	Criterios validez	Resultados observados en PCR
Microelectroforesis automatizada	Integridad del ADN (DIN, DNA Integrity Number)	> 8,5 Integridad alta	Amplifica bandas PCR de 17,5 kb. (BNADN)
		≥ 6-7 Integridad adecuada	Amplifica ≥5 kb en una PCR múltiple de gran tamaño (BNADN). DIN > 7 aceptable para la construcción de librerías genómicas para WGS (Available at: https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-5442EN.pdf)
		>3-6 Parcialmente degradado	DIN >4 : amplifica 2 kb; DIN >5: amplifica 3 kb (BNADN). DIN > 3 utilizadas para NGS (Available at: https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-5360EN.pdf)
		<3 Totalmente degradado	

El equipo TapeStation está diseñado para ser utilizado con diferentes tarjetas que permiten la valoración de integridad y cuantificación de muestras de ADN de tamaño y concentración variable.

6. Funcionalidad e integridad de ADN por *Long PCR* múltiple.

El hecho de que una muestra de ADN en electroforesis de agarosa no se observe como una única banda definida no significa que dicha muestra no sea funcional o presente una integridad suficiente para poder ser utilizada en la mayoría de estudios genómicos.

Para comprobar la funcionalidad y determinar con mayor exactitud el grado de integridad de las muestras de ADN que tras ser analizadas en agarosa hayan obtenido una puntuación menor de dos se va a llevar a cabo una PCR múltiple de gran tamaño molecular o *Long PCR* múltiple.

Esta PCR combina simultáneamente 5 parejas de oligonucleótidos que amplifican en diferentes cromosomas fragmentos de ADN de tamaños comprendidos entre 17.5 y 2 kb. Una de las parejas de oligonucleótidos amplifica en los cromosomas sexuales dando como resultado la amplificación de una banda de 2.4 kb en el cromosoma X y 2.0 kb en el cromosoma Y. Para hacer esta PCR aún más restrictiva se utilizará como molde 10 ng de ADN ya que es la cantidad mínima requerida por la ADN polimerasa para llevar a cabo la reacción.

Puntuación definida en función del tamaño e intensidad de los fragmentos amplificados:

tamaño amplificado (kb)	intensidad	puntuación
17,5	fuerte	10
	débil	9,5
7	fuerte	8
	débil	7,5
5	fuerte	7
	débil	6,5
3	fuerte	5
	débil	4,5
2,4 (cromosoma X) 2,0 (cromosma Y)	fuerte	3
	débil	2.5

7. Funcionalidad e integridad de ADN por PCR múltiple de pequeño tamaño.

Para aquellas muestras que presentan un alto grado de fragmentación en gel de agarosa (p.e: muestras extraídas de tejido parafinado) con una puntuación ≤ 0.5 la integridad puede ser determinada por una PCR que incluye tres parejas de oligonucleótidos que amplifican 600, 300 y 200 pb. Para esta PCR se utilizarán 100 ng como ADN molde.

Puntuación asignada según el número de bandas amplificadas:

tamaño amplificado (pb)
600
300
200
no amplificación

8. Identificación del sexo de un individuo.

El sexo de un individuo puede ser identificado mediante una reacción de PCR con una pareja de oligonucleótidos que amplifican en los cromosomas X e Y pero que dan como resultado dos fragmentos de tamaño diferente en cada cromosoma. La diferencia de 400 pb entre ambos cromosomas permite una identificación inequívoca del sexo de la muestra tras visualizar el resultado de la PCR en gel de agarosa. Esta PCR se realiza con una cantidad de ADN molde de 20-30 ng.

SERVICIOS control de calidad de ADN:

- **Programa de calidad completo:** incluye determinación de la concentración y pureza por espectrofotometría, valoración de la integridad observada en gel de agarosa y aplicación de *Long* PCR múltiple en aquellas muestras en las que se observe una pérdida de integridad. En las muestras con una puntuación <2 en gel de agarosa se valorará la sustitución de la técnica *Long* PCR múltiple por la PCR múltiple de pequeño tamaño.
- **Otros servicios:** estos servicios puede ser complementarios al control de calidad o realizarse de manera independiente.
 - Normalización de muestras de ADN
 - Concentración e integridad de las muestras por fluorimetría.
 - Identificación del sexo de un individuo.
 - Análisis de integridad (valor de DIN) con la tarjeta Genomic DNA ScreenTape con TapeStation.
 - Análisis de la concentración de ADN en orden de pg/μl mediante la tarjea DNA High sensitivity con TapeStation.
 - Análisis del % y concentración de ADN libre circulante con la tarjeta Cell-free DNA ScreenTape Analysis con TapeStation.

CONTROL DE CALIDAD MUESTRAS DE ARN EN SOLUCIÓN.

1. Concentración y pureza de las muestras mediante espectrofotometría.

La concentración y pureza de una muestra de ARN se evaluará por espectrofotometría. En el caso del ARN la relación de absorbancias A260/280 con un valor entre 2.0-2.2 se considera indicativa de un ARN de pureza óptima. Valores A260/280 > 1.7 se corresponden a una muestra de ARN con una pureza aceptable. Un ratio A260/280 < 1.7 sería indicativo de contaminación por la presencia de compuestos aromáticos.

Al igual que en muestras de ADN la relación A260/230 en muestras de ARN se corresponde a un valor de 2 o ligeramente superior. Sin embargo, no existe una opinión consensuada sobre el valor mínimo en la relación A260/230 que una muestra debe tener para ser considerada funcional. En general se considera que el ARN es aceptable si A260/230 es > 1.5.

Valores indicativos de pureza en muestras de ARN:

Ratio	valor	pureza
260/280	2.0-2.2	ARN de pureza óptima
	> 1.7	ARN pureza aceptable
	< 1.7	ARN contaminado con compuestos aromáticos
A260/230	> 2	ARN de pureza óptima
	<1,8	ARN contaminado con sales, carbohidratos, fenoles
	<1,5	ARN altamente contaminado con sales, carbohidratos, fenoles

Referencias:

Referencias incluidas en el apartado pureza de muestras de ADN.

2. Análisis de la integridad de ARN por Agilent 2200 TapeStation System de Agilent**Technologies.**

El análisis de la muestra de ARN mediante el equipo Agilent 2200 TapeStation proporciona una determinación objetiva de la **concentración** y de la **integridad** de la muestra utilizando una cantidad muy pequeña de ARN.

Agilent 2200 TapeStation es un equipo de análisis automatizado basado en una tecnología combinada de microelectroforesis y fluorescencia. Pequeñas cantidades de muestra de ARN son separadas por su peso molecular y detectadas mediante fluorescencia. El resultado se visualiza en un electroferograma donde la cantidad de fluorescencia medida se correlaciona con la cantidad de ARN de un tamaño determinado.

El software del equipo calcula un algoritmo a partir de la información obtenida del análisis electroforético y teniendo en cuenta el electroferograma resultante. El valor obtenido se denomina RIN^e (*RNA Integrity Number*). Los valores de RIN^e permiten determinar la calidad de las muestras de una manera objetiva en base a un rango numérico del 1 al 10. Un valor de 10 corresponde a una muestra intacta y un valor de 1 a una muestra de ARN totalmente degradada. Un ARN se considera degradado si su RIN es < 6 (Dumur *et al.*; 2004). Muestras con un RIN mayor de 7 son aptas para llevar a cabo estudios de expresión génica mediante *arrays* (Fleige *et al.*; 2006; Strand *et al.*; 2007; Hong *et al.*; 2010). Muestras con un RIN entre 4 y 6 pueden ser utilizadas en experimentos de RT-PCR cuantitativa, si bien se aconseja que el valor de RIN sea > 5 para obtener unos resultados reproducibles (Pfallf *et al.*; 2006). Finalmente, muestras con un RIN entre 1 y

4 se pueden utilizar como molde en reacciones de RT-PCR con amplificación de pequeñas regiones génicas. En este último caso conviene tener una gran cautela y una considerable repetición del número de ensayos para efectuar una correcta interpretación de los resultados (Hong *et al.*; 2010).

Valores de RIN^e indicativos para la utilización de la muestra de ARN:

valores de RIN ^e	utilidad de la muestra
≥ 7	estudios de expresión génica
5-6	RT-PCR cuantitativa
< 4	RT-PCR de pequeñas regiones génicas

3. Conversión de ARN genómico a cDNA.

La obtención de ADN complementario (cDNA) a partir de ARN se llevará a cabo con una retrotranscriptasa de alta capacidad que permite utilizar una cantidad de ARN molde de entre 1 pg y 2 µg en un volumen final de reacción de 20µl.

Es necesario garantizar la ausencia de ADN genómico en la muestra de ARN previamente a la obtención de cDNA. Desde el BNADN se ofrece la posibilidad de realizar un tratamiento previo de la muestra de ARN con DNAsa.

4. Funcionalidad y pureza del cDNA.

La funcionalidad del cDNA se comprobará con una PCR que utiliza una pareja de oligonucleótidos diseñados en una región interexónica del genoma. Con esta PCR se comprobará tanto la funcionalidad como la pureza de la muestra ya que si la muestra estuviese contaminada por ADN genómico se obtendría además del fragmento esperado de 400 pb otro fragmento de 1.5 kb como resultado de la amplificación del exón.

Técnica de análisis	Párametro	Criterios validez	Bibliografía
RT-PCR	Funcionalidad y contaminación con ADN	amplifica banda cDNA . Pureza y funcionalidad óptimas	Experiencia Banco Nacional de ADN Carlos III
		amplifica banda cDNA y débilmente banda ADN genómico. Pureza comprometida	
		amplifica banda ADN genómico y débilmente banda cDNA. Alta contaminación por ADN	
		no amplificación por PCR. Muestra no funcional	

SERVICIOS control de calidad de ARN:

- Concentración y pureza por espectrofotometría.
- Concentración e integridad por análisis con Agilent 2200 TapeStation System de Agilent Technologies. Se pueden utilizar diferentes tipos de tarjetas en función de la concentración que se pretenda utilizar.
- Obtención de cDNA.
- Tratamiento de la muestra de ARN con DNAsa.
- Comprobación de la funcionalidad y pureza del cDNA.