



bancó·adn

**BANCO NACIONAL DE ADN CARLOS III
(Universidad de Salamanca)**

Edificio MULTIUSOS I+D+i

Calle Espejo, s/n

37007 Salamanca

Tel. 923 294 500, ext. 5473

www.bancoadn.org

bancoadn@usal.es



PROGRAMA CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS

El Banco Nacional de ADN 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 260 nm. Mientras que la relación de absorbancias $A_{260}/280$ y $A_{260}/230$ se utilizan para evaluar la pureza de las muestras.

La relación $A_{260}/280$ 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 $A_{260}/280 > 1.6$. Un valor $A_{260}/280 < 1.6$ indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Un ratio $A_{260}/280 > 2.1$ podría deberse a la presencia de ARN en la muestra.

A 230 nm absorben contaminantes como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos. En general, se considera que el ADN es puro cuando el ratio $A_{260}/230$ se sitúa en torno 1.5-2.2. Un ratio menor de 1.5 indicaría presencia de contaminantes en la muestra. No obstante, esta relación resulta mucho más variable que la relación $A_{260}/280$ 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:

Radio	valor	pureza
260/280	1.8-2	ADN de pureza óptima
	1.6-1.8	ADN pureza aceptable
	< 1,6	presencia de compuestos aromáticos
	> 2.1	contaminación con ARN
A260/230	< 1,5	contaminación con sales, carbohidratos, fenoles



bancó·adn

**BANCO NACIONAL DE ADN CARLOS III
(Universidad de Salamanca)**

Edificio MULTIUSOS I+D+i

Calle Espejo, s/n

37007 Salamanca

Tel. 923 294 500, ext. 5473

www.bancoadn.org

bancoadn@usal.es



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.

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 (basada en espectrofotometría) 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).

Esta cuantificación se llevará a cabo con un proceso automatizado utilizando un robot de alicuotado para volúmenes pequeños.

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 25 µl puesto que es el volumen mínimo requerido por el robot para realizar un pipeteo de precisión sin que detecte un bajo volumen de muestra. No obstante, el volumen de muestra restante tras la cuantificación puede ser reenviado al investigador.

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.



bancó·adn

**BANCO NACIONAL DE ADN CARLOS III
(Universidad de Salamanca)**

Edificio MULTIUSOS I+D+i

Calle Espejo, s/n

37007 Salamanca

Tel. 923 294 500, ext. 5473

www.bancoadn.org

bancoadn@usal.es



Puntuación asignada según la integridad observada en gel de agarosa:

Integridad observada en agarosa	Puntuación
Banda íntegra	3
Banda mayoritaria menos definida y acompañada de un leve <i>smear</i>	2
Desaparición de banda definida y aparición de un <i>smear</i> de intensidad predominante concentrado en la parte superior del gel	1
Desaparición de banda definida y aparición de un <i>smear</i> a lo largo de todo el gel	0,5

5. 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.



bancó·adn

**BANCO NACIONAL DE ADN CARLOS III
(Universidad de Salamanca)**

Edificio MULTIUSOS I+D+i

Calle Espejo, s/n

37007 Salamanca

Tel. 923 294 500, ext. 5473

www.bancoadn.org

bancoadn@usal.es



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 (cromosoma Y)	fuerte	3
	débil	2,5

6. 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)	puntuación
600	3
300	2
200	1
no amplificación	0

7. 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.

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.

La relación A260/230 en una muestra 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:

Radio	valor	pureza
260/280	2.0-2.2	ARN de pureza óptima
	> 1.7	ARN pureza aceptable
	< 1.7	presencia de compuestos aromáticos
A260/230	< 1.5	contaminación con sales, carbohidratos, fenoles

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 electroforesis capilar 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 6 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 y finalmente, muestras con un RIN entre 1 y 4 se pueden utilizar como molde en reacciones de RT-PCR con



bancó·adn

**BANCO NACIONAL DE ADN CARLOS III
(Universidad de Salamanca)**

Edificio MULTIUSOS I+D+i

Calle Espejo, s/n

37007 Salamanca

Tel. 923 294 500, ext. 5473

www.bancoadn.org bancoadn@usal.es



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
> 6	estudios de expresión génica
4-6	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 20 µl.

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.