

INDICACIONES PARA EL ENVÍO DE MUESTRAS DE DNA Y RNA A LA UNIDAD DE GENÓMICA DE LA FUNDACIÓN PARQUE CIENTÍFICO DE MADRID

Generalidades

La cuantificación espectrofotométrica del DNA y el RNA se basa en la detección de los nucleótidos que componen dichas moléculas. Por tanto, su detección espectrométrica es de amplio espectro, no discrimina la posible presencia de otras especies moleculares, está sujeta a la presencia de contaminantes y suele sobreestimar la concentración real de los ácidos nucleicos.

Como alternativa se utiliza la medida basada en técnicas indirectas (fluorimetría), con los agentes PicoGreen o RiboGreen, interpolando los datos dentro de una recta patrón. Las concentraciones requeridas en los distintos procedimientos que se señalan a continuación se basan en medidas de fluorescencia. La diferencia entre ambas determinaciones puede ser de un orden de magnitud de 2x – 5x o superior.

Cada IP debe proporcionar la siguiente información junto con sus muestras:

- Nombre identificativo.
- Medio en el que están disueltas las muestras (H₂O, TE, EB, otros tampones...).
- Concentración (al menos estimada mediante Nanodrop, con indicación de las ratios 260/280 y 260/230).
- Toda otra información adicional disponible (geles de agarosa, perfiles de bioanizador, medidas de fluorimetría, PCRs previas, porcentaje extremo de GC, etc.) o la indicación de que no se dispone de dicha información.
- Confirmación de que las muestras de DNA se han tratado con RNAsa y que las muestras de RNA se han tratado con DNAsa.

DNA genómico para NGS

Las cantidades y concentraciones varían en función del procesamiento al que se va a someter a la muestra:

- Librerías de DNA para fragmentación: 0.5 – 2 µg a una concentración mínima de 10 ng/µl. Las muestras pueden entregarse en TE.
- Librerías de transposones: 100-500 ng de DNA, preparado en H₂O libre de nucleasas. Opcional para genomas poco complejos: hasta 1 ng de DNA.
- DNA fragmentado (ChIPseq): 1 – 1000 ng de DNA. El DNA puede estar resuspendido en TE, Tris 10 mM pH 8 o 0,1x TE. Volumen máximo = 50 µl.

Productos de PCR para NGS

La concentración y cantidad dependen de cada aplicación. De forma general se aportará una imagen de las muestras analizadas mediante electroforesis en gel, con indicación de la cantidad cargada de cada muestra. El gel debe incluir marcadores de peso molecular y se indicará una estimación de la concentración de dichos marcadores. Los productos específicos deben estar libres de dímeros de primers y otros productos secundarios, y se debe hacer una descripción clara de cuáles son las especies que se deben secuenciar.

NOTA: La Unidad de Genómica no tiene preferencias por el sistema de extracción de DNA. Deberá ser el más adecuado en función del tipo de muestra de origen e incluir la eliminación de RNA contaminante.

RNA total para RNAseq

- Para depleción de RNA ribosomal: 100 – 1000 ng RNA, volumen de 10 µl. El RNA debe estar resuspendido en H₂O, libre de sales y de compuestos orgánicos.
- Para selección de RNA poliA+: 10 – 1000 ng de RNA total, en un volumen máximo de 50 µl. La muestra de RNA debe venir preparada en H₂O.

smallRNAs para smallRNAseq

- Se necesita una cantidad de 100 – 1000 ng totales de RNA total. El volumen máximo es de 4 µl (concentración > 25 ng/µl). La muestra debe venir preparada en H₂O.

Condiciones para análisis mediante PCR a tiempo real

Análisis de expresión génica RNA:

- RNA total, 250 ng @ 50 ng/ul
- Protocolo química Advanced: 1-10 ng de RNA total
- miRNAs: 2 µl @ 5 ng/µl (en función de la química de cuantificación)

Análisis de miRNAs:

- Plataforma Open Array. Química Advanced: 10 ng de RNA total (2 µl)
- Química Megaplex: 350 – 1000 ng / Con PreAmplificación: 1-350 ng

Análisis de Genotipado (DNA)

- Ensayos individuales: 10-50 ng/µl
- Plataforma Open Array: 5 µl 50 ng/µl gDNA / Con PreAmp: 0.4-4 ng/µl.
- Análisis de CNVs: 150 ng (5 ng/µl)

Tabla resumen

TIPO DE MUESTRA	APLICACIÓN	CANTIDAD REQUERIDA	OBSERVACIONES
DNA genómico	DNaseq (fragmentación mecánica)	500 – 2000 ng, > 10 ng/µl	Tratado con RNAsas
DNA fragmentado	ChIPseq o similar	1 – 1000 ng. máx. 50 µl	0,1x TE pH8
RNA total	RNAseq	10-1000 ng; > 20 ng/µl	RNA resuspendido en H ₂ O
RNA total	Secuenciación de smallRNAs/microRNAs	10-1000 ng, > 25 ng/µl	RNA resuspendido en H ₂ O
RNA (qPCR)	GEx	250 ng, 50 ng/µl	variable
miRNAs (qPCR)	GEx	10 ng, 5 ng/µl	En función del sistema de cuantificación
gDNA	Genotipado	5-50 ng/ul	Posibilidad de preAmplificación
gDNA	CNV	>100 ng, 50 ng/ul	En función de réplicas y nº de ensayos
DNA, RNA	Medida fluorimétrica	< 200 ng/ µl	FORMATO PLACA-96
DNA	Bioanalizador	5-50 ng/ µl 0,1–2.5 ng/ µl	Standard High Sensitivity
RNA	Bioanalizador	25-250 ng/ µl 0,2–5 ng/ µl	Standard NANO High Sensitivity PICO

NOTA: La unidad de Genómica no tiene preferencias por el sistema de extracción de RNA. Deberá ser el más adecuado en función del tipo de muestra de origen. La integridad del RNA debe ser alta (RIN > 8) y se debe excluir la presencia de DNA contaminante (tratamiento con DNaseI).