

Espectrofotometría UV-Vis y Electroforesis Capilar para Control de Calidad en NGS

NGS Y FACTORES A TENER EN CUENTA PARA GARANTIZAR SU ÉXITO

Las técnicas de NGS son un grupo de tecnologías diseñadas para secuenciar gran cantidad de DNA de forma masiva y en paralelo, en un tiempo reducido y a bajo coste. Actualmente, su uso está extendido en todos los laboratorios de investigación básica, industria biotecnológica y diagnóstico clínico. Existen múltiples plataformas de NGS disponibles y en todas ellas la preparación de librerías es el paso clave en el workflow de NGS. Por lo tanto, es muy importante tener un control de calidad atendiendo a la pureza, cantidad y calidad de las muestras, desde su preparación hasta la validación de la librería final y la secuenciación.

■ **Pureza:** las impurezas como el fenol y las sales de guanidina interfieren en la sensibilidad y eficiencia de las reacciones enzimáticas, además de afectar a los valores de concentración.

■ **Cantidad/concentración:** una estimación errónea de DNA/RNA puede alterar las interacciones muestra-enzima y producir, como resultado, inhibiciones no deseadas y malos resultados en la preparación de las librerías.

■ **Integridad:** una alta proporción de fragmentos degradados influye significativamente, no solo en los

valores de concentración de las muestras, sino también en el proceso de ligamiento de los adaptadores durante la preparación de librerías.

EQUIPOS ÓPTIMOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE SUS MUESTRAS

Los bioanalizadores de fragmentos Qsep100 (Bioptic Inc.), basados en la última tecnología de electroforesis capilar en cartuchos de gel combinada con la detección por fluorescencia, y los espectrofotómetros UV-Vis de microvolúmenes NanoDrop-One (ThermoFisher Scientific), equipados con el potente software Acclaro, representan equipos de alta calidad que, combinados, proveen una solución simple y efectiva para determinar la pureza, concentración e integridad del DNA/RNA y asegurar el éxito de la secuenciación.

A continuación, se recogen algunos ejemplos de estos análisis mencionados (*Figura 1*), llevados a cabo con los equipos NanoDrop-One (A) y Qsep100 (B-D).

A) Análisis de la pureza de las muestras y detección de contaminantes. El software Acclaro emplea algoritmos matemáticos para detectar la presencia de contaminantes en las muestras y proporciona información acerca de su identidad, su contribución en la absorbancia de la muestra y los valores de concentración tanto originales (con contami-

nante) como corregidos (sin contaminante).

B) Análisis de la integridad del DNA genómico (gDNA). Con los cartuchos de kilobases y alta sensibilidad (S3 y N3) es muy sencillo detectar qué muestras presentan un gDNA intacto y cuáles presentan degradación. El software Q-Analyzer, además, facilita el índice de calidad del DNA (DNA Quality Number, DQN), que permite determinar su nivel de fragmentación.

C) Control de calidad del RNA total. Con los cartuchos de RNA (R1 y NR1), el software Q-Analyzer asigna automáticamente las regiones correspondientes a las subunidades 18S/28S para facilitar el análisis. Además, proporciona el índice de calidad de RNA (RNA Quality Number, RQN), que permite seleccionar las muestras de mayor calidad; y el índice DV200 (porcentaje de fragmentos > 200 nucleótidos) para ensayos de RNA FFPE.

D) Fragmentación y validación de librerías. La proporción de cada uno de los fragmentos de DNA y su concentración son dos factores determinantes para obtener librerías de calidad. Los cartuchos cuantitativos estándar (S2-Q) permiten realizar análisis cuantitativos y cualitativos de gran fiabilidad en pocos minutos.

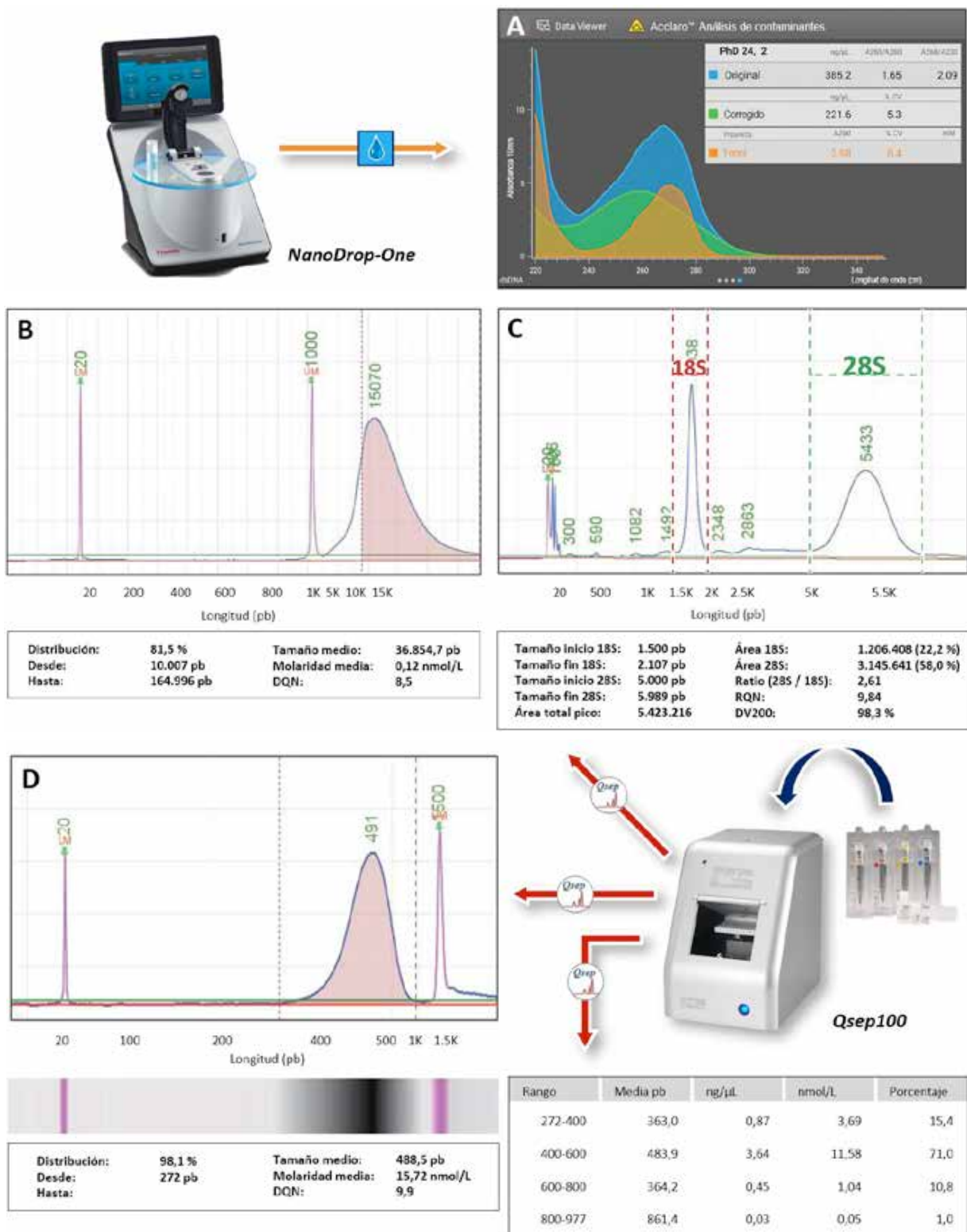


Figura 1. Resultados obtenidos tras el análisis de muestras de DNA/RNA destinadas a NGS, utilizando los equipos NanoDrop-One (ThermoFisher Scientific) y Qsep100 (Bioptic Inc.). A) Análisis de la pureza de una muestra de DNA de doble cadena y detección de contaminantes. Se detecta la presencia de fenol (espectro naranja) y se obtiene un valor de concentración corregida de 221,6 ng/μL. B) Análisis de la integridad de gDNA. Electroferograma y tabla de resultados: DQN = 8,5 (muy buena calidad). C) Control de calidad del RNA total. Electroferograma y tabla de resultados: RQN = 9,84 y DV200 = 98,3%, (muy buena calidad). D) Fragmentación y validación de una librería de DNA. Electroferograma, gel y tablas resumen: DQN = 9,9 (muy buena calidad); tamaño medio de los fragmentos = 483,9 pb (71%). Imágenes y datos extraídos del software Acclaro (ThermoFisher Scientific) y Q-Analyzer (Bioptic Inc.).