

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 (Biooptics 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 (**Figura 1**).

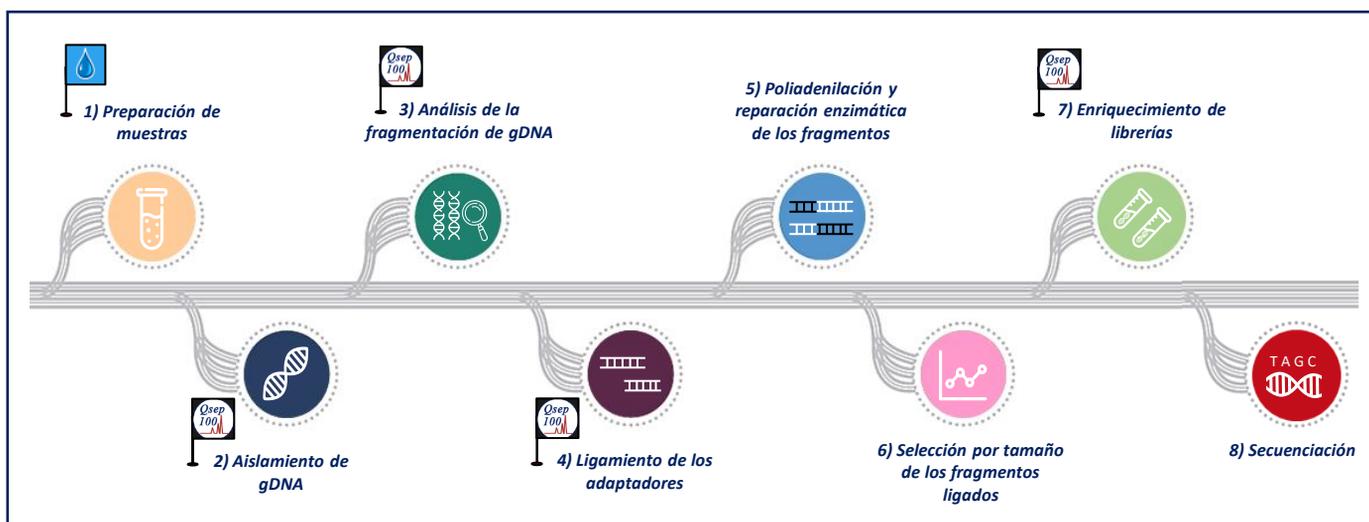


Figura 1. Workflow de NGS. Las banderas con los iconos y indican los pasos en los que se requieren los equipos *NanoDrop-One* y *Qsep100*, respectivamente, para el control de calidad de las muestras destinadas a secuenciación.

Resultados y discusión

A continuación, se recogen algunos ejemplos de control de calidad de las muestras involucradas en los pasos clave del workflow de NGS (**Figura 1**), cuyos análisis se han llevado a cabo con los equipos *NanoDrop-One* (**Figura 2**) y *Qsep100* (**Figura 3**).

1. Análisis de la pureza de las muestras y detección de contaminantes

El software *Acclaro* (**Figura 2**) emplea algoritmos matemáticos para detectar la presencia de contaminantes en las muestras de ácidos nucleicos y proporciona información acerca de su identidad, su contribución en la absorbancia de la muestra y los valores de concentración tanto originales (con contaminante) como corregidos (sin contaminante). Entre los contaminantes que puede predecir el equipo se encuentran el fenol, las sales de guanidina, proteínas y RNA en muestras de DNA de mamífero.

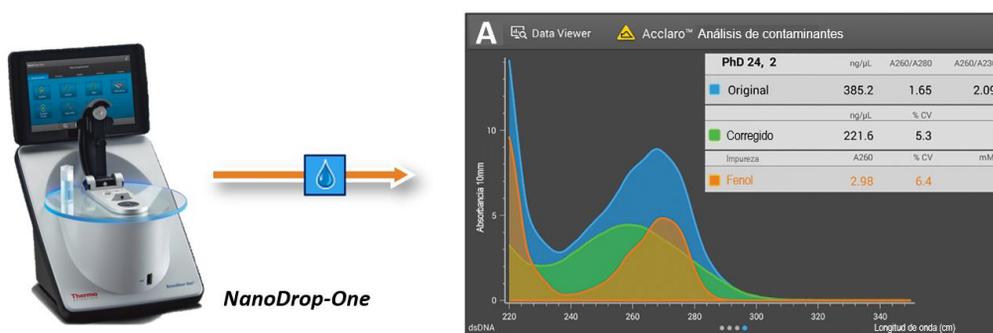


Figura 2. Análisis de la pureza de una muestra de DNA de doble cadena y detección de contaminantes, llevado a cabo con el equipo *NanoDrop-One* (ThermoFisher Scientific). Se detecta la presencia de un contaminante, en este caso fenol (espectro naranja) y se obtiene un valor de concentración corregida de 221,6 ng/μL. Imágenes y datos extraídos del software *Acclaro* (ThermoFisher Scientific).

2. Análisis de la integridad del DNA genómico (gDNA)

Con los cartuchos de kilobases y de 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 (**Figura 3A**). También genera información relativa al tamaño de los fragmentos y sus valores de concentración, entre otros.

3. 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, es decir, las que no presentan fragmentación; y el índice DV200 (porcentaje de fragmentos con más de 200 nucleótidos) para ensayos de RNA FFPE (**Figura 3B**). En este caso, el software también proporciona información acerca del ratio 28S/18S, cuyo valor es mayor que 2 en muestras con RNA intacto.

4. 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, pues ambos deben ubicarse dentro de un rango crítico, que puede ser uno u otro dependiendo de la plataforma de NGS que se utilice. Los cartuchos cuantitativos estándar (S2-Q) permiten realizar análisis cuantitativos y cualitativos de gran fiabilidad en pocos minutos y generar resultados como los de la **Figura 3C**, que recogen los valores de DQN, tamaño medio de los fragmentos y concentración media, y una tabla con información relativa a la proporción en la que se encuentra cada fragmento en función de su tamaño (pb).

Resultados y discusión

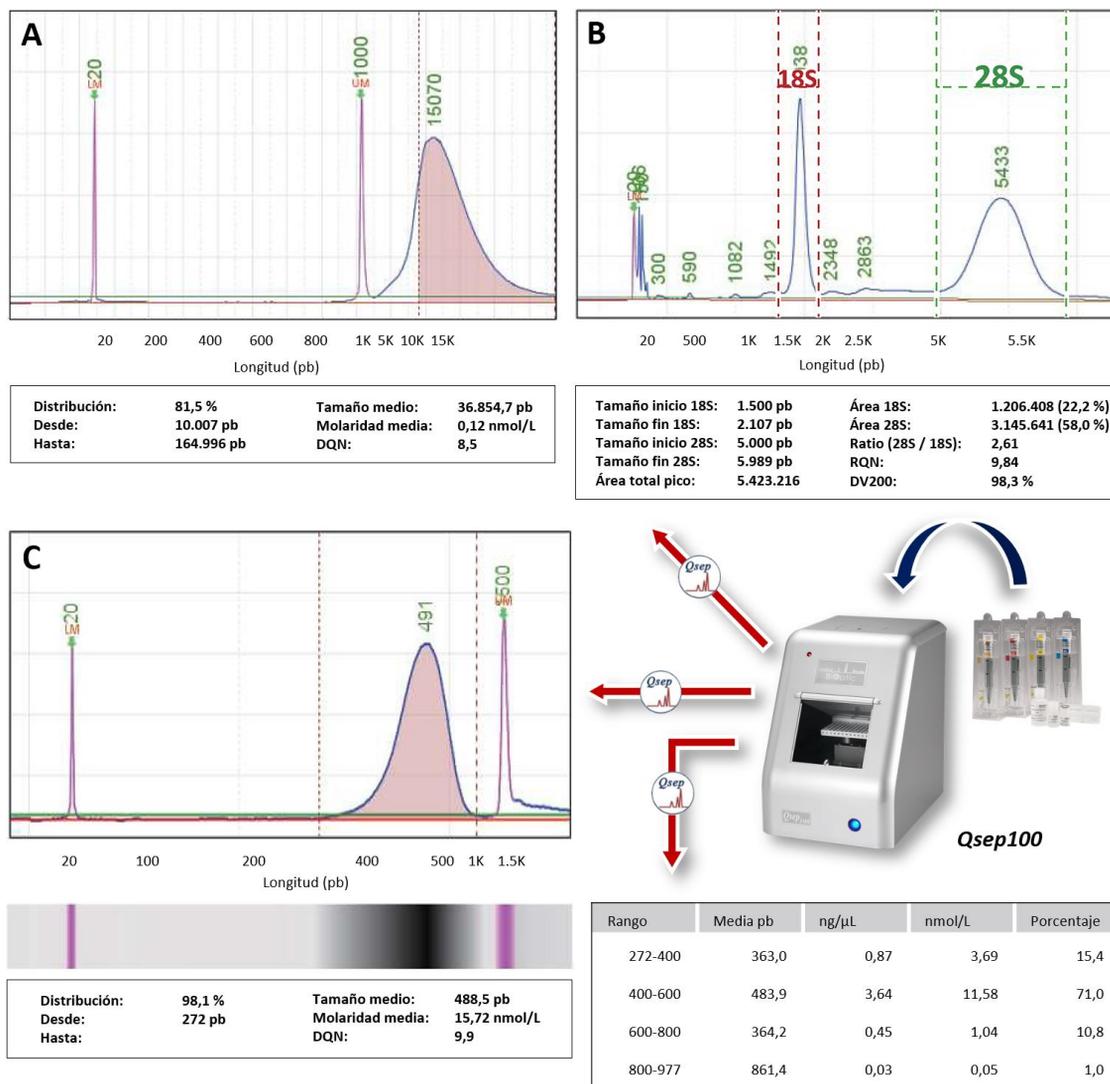


Figura 3. Resultados obtenidos tras el análisis de muestras de DNA/RNA destinadas a NGS, empleando el equipo Qsep100 (Bioptic Inc.). **A)** Análisis de la integridad de gDNA. Electroferograma y tabla de resultados: tamaño medio = 36.854,7 pb; concentración media = 0,12 nmol/L; DQN = 8,5 (muy buena calidad). **B)** Control de calidad del RNA total. Electroferograma y tabla de resultados: ratio 28S/18S = 2,61 (RNA intacto); RQN = 9,84 y DV200 = 98,3% (muy buena calidad). **C)** Fragmentación y validación de una librería de DNA. Electroferograma, gel y tablas resumen: concentración media = 15,75 nmol/L; DQN = 9,9 (muy buena calidad); tamaño medio de los fragmentos = 483,9 pb (71%). Imágenes y datos extraídos del software Q-Analyzer (Bioptic Inc.).

Resumen

La preparación de librerías representa un paso crítico en el *workflow* de NGS. Por ello, los equipos *Nanodrop-One* y *Qsep100* son dos plataformas óptimas que permiten llevar a cabo el control de calidad de las muestras de DNA/RNA, contribuyendo así mismo al ahorro de tiempo y recursos de sus usuarios al identificar de primera mano las muestras ideales para el protocolo de NGS.