

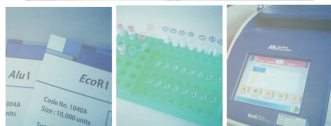
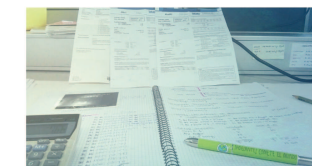
Protocolo para la evaluación de la calidad del ADN obtenido de muestras biológicas para su uso en diagnóstico e investigación biomédica

Cortell Granero MI, Iborra-Rico P, Rubio L, Carretero Hinojosa P, García Flores M, Mazcuñán T, García-Casado Z, Fernández-Serra A, Casanova-Salas I, Ramírez-Calvo M, López Pérez-Madero N, Calatrava A, López Guerrero JA.

Biobanco de la Fundación del Instituto Valenciano de Oncología (Biobanco FIVO)

INTRODUCCIÓN:

Debido a que en el contexto de un biobanco hospitalario en el que se reciben muestras de distinta naturaleza y orientadas a distintos fines, la calidad del ADN es un factor que va a condicionar el tipo de aplicaciones que se puedan desarrollar tanto a nivel diagnóstico como de investigación.



OBJETIVOS:

El propósito de este trabajo es definir una metodología para evaluar la calidad del ADN obtenido de muestras biológicas a partir de parámetros como la pureza, integridad y funcionalidad, para así definir qué tipo de aplicaciones son más adecuadas. Para ello se propone instaurar un sistema de puntuación de calidad que ayudará a la selección del método analítico más apropiado así como la caracterización de la muestra.

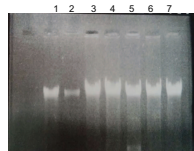
MATERIAL Y MÉTODOS:

- Medidas espectrofotométricas con Nanodrop® 1000 para determinar la pureza, usando como indicador la relación de absorbancias a las longitudes de onda de 260nm y 280nm (ratio A260/A280).
- Medidas de fluorescencia con PicoGreen® (Quant-it PicoGreen ds DNA Assay Kit ref: p7589), para determinar la concentración del ADN de doble cadena.
- Electroforesis en gel de agarosa, para determinar la integridad y el tamaño de la molécula de ADN y/o productos de amplificación.
- Amplificación mediante Long Amplification PCR (LA-PCR) del gen de la β -globina (ADN de alto rendimiento) y de un fragmento del mismo (ADN de bajo rendimiento) (Takara, ref RR013A).
- Digestión con enzimas de restricción (*EcoRI* y *AluI*), para determinar la funcionalidad del ADN en muestras de alto rendimiento.

RESULTADOS

ADN ALTO RENDIMIENTO

Integridad



Electroforesis en gel de agarosa (0,8% - 1h)

Cuantificación

Muestra	(ng/ μ l)
1	54,26
2	62,38
3	54,84
4	36,54
5	65,36
6	56,54
7	47,99

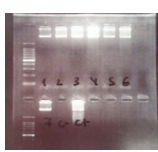
Cuantificación PicoGreen®

Pureza

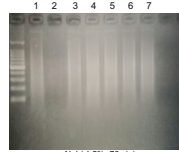
Muestra	(ng/ μ l)	Ratio (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
1	99,2	1,91
2	113,5	2
3	90,1	1,96
4	78,8	2,01
5	86,8	1,91
6	87,1	1,93
7	73,1	1,90

Cuantificación y ratio con Nanodrop®

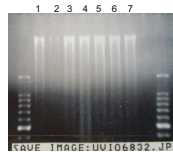
Funcionalidad



Amplificación gen β -globina



AluI (1,5% - 76min)



EcoRI (1% - 3h 30 min)

Característica	Prueba	Valores de Referencia	Puntuación
Pureza	Relación A260/A280	1,75-2	2
		1,74-1,8	1
Cuantificación	PicoGreen (ng/ μ l)	>18	0
	PicoGreen (ng/ μ l)	>18	1
Integridad	Bandas en gel de agarosa	Bandas en gel de agarosa	0
	Bandas en gel de agarosa	Bandas en gel de agarosa	1
Funcionalidad	PCR con enzimas de restricción	PCR con enzimas de restricción	2
	PCR con enzimas de restricción	PCR con enzimas de restricción	1
Funcionalidad	PCR con enzimas de restricción	PCR con enzimas de restricción	0
	PCR con enzimas de restricción	PCR con enzimas de restricción	1

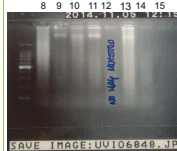
Tabla 1: Valores de puntuación

Puntuación	Cuantificación	Integridad	Funcionalidad	Puntuación
1	2	1	3	2
2	1	3	2	1
3	2	1	3	2
4	1	3	2	1
5	2	1	3	2
6	1	3	2	1
7	2	1	3	2

Tabla 2: Puntuación calidad

ADN BAJO RENDIMIENTO

Integridad



Electroforesis en gel de agarosa (1,5% - 1h)

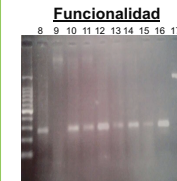
Cuantificación

Muestra	(ng/ μ l)
8	60,51
9	12,6
10	27,39
11	41,29
12	23,47
13	13,75
14	69,02
15	7,52

Cuantificación PicoGreen

Característica	Prueba	Valores de Referencia	Puntuación
Pureza	Relación A260/A280	1,75-2	2
		1,74-1,8	1
Cuantificación	PicoGreen (ng/ μ l)	>18	0
	PicoGreen (ng/ μ l)	>18	1
Integridad	Bandas en gel de agarosa	Bandas en gel de agarosa	0
	Bandas en gel de agarosa	Bandas en gel de agarosa	1
Funcionalidad	PCR con enzimas de restricción	PCR con enzimas de restricción	2
	PCR con enzimas de restricción	PCR con enzimas de restricción	1

Tabla 3: Valores de puntuación



Amplificación fragmento β -globina

Pureza

Muestra	(ng/ μ l)	Ratio (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
8	214,1	1,95
9	102,9	2,09
10	105,9	2
11	150,5	2,04
12	134,2	1,9
13	104,6	2,03
14	389,5	1,98
15	98,5	2,03

Cuantificación y ratio con Nanodrop

Puntuación	Cuantificación	Integridad	Funcionalidad	Puntuación
8	2	0	1	2
9	2	0	2	0
10	2	0	2	0
11	2	0	2	0
12	2	0	2	0
13	2	0	2	0
14	2	0	2	0
15	2	0	2	0

Tabla 4: Puntuación calidad

Fragmento	pb
A	1500
B	1000
C	900
D	800
E	700
F	600
G	500
H	400
I	300
J	200
K	100

Tabla 5: Patrón de marcador de pesos moleculares

Conclusiones:

En conclusión, y teniendo en cuenta la exigencia que algunas técnicas imponen en la calidad del ADN, como las tecnologías de alto rendimiento, este sistema propuesto clasifica con detalle el ADN y ayuda a conocer de antemano qué tipo de aplicaciones podrían realizarse con posterioridad facilitando la tarea del investigador.