

Servicio nCounter

Consideraciones según el tipo de muestra de partida

Las recomendaciones relativas a la muestra de partida para ensayos nCounter se han desarrollado utilizando ARN total purificado a partir de una variedad de tejidos, de los cuales el ARNm normalmente constituye entre el 5 y el 10% (~5-10 ng en una muestra de ARN total de 100 ng).



Muestras de sangre

Las **muestras de sangre** se pueden analizar utilizando ARN total purificado, lisados sanguíneos no purificados o fracciones sanguíneas específicas, como PBMCs aisladas de sangre entera. NanoString recomienda el uso de kits disponibles comercialmente para recoger y purificar el ARN de sangre de partida, aunque también se pueden usar kits para otros fluidos biológicos como esputo u orina. Para ARNs no purificados, NanoString recomienda recoger muestras de lisado sanguíneo en tubos PAXgene® especializados.



Muestras parafinadas o FFPE

Para **muestras parafinadas o FFPE**, se puede partir de secciones de 5 μm , aunque el **rendimiento** es generalmente **óptimo con secciones de 10-20 μm de espesor** debido al mayor porcentaje de células intactas en secciones más grandes. NanoString recomienda que se tomen secciones seriadas para la evaluación histológica o patológica antes y después de cortar las secciones que se utilizarán para la extracción de ácidos nucleicos.

Se puede emplear una amplia variedad de métodos de extracción para aislar los ácidos nucleicos de las muestras parafinadas. Independientemente del método de extracción empleado, **es importante cuantificar y comprobar la calidad del ARN del material extraído antes de la hibridación**. Consulte Anexo 1 para más información de extracción de ARN a partir de tejido parafinado.

Cuantificación del ARN usando espectrometría (Nanodrop) y fluorescencia (Qubit o similar)

Utilice un **NanoDrop™** u otro espectrofotómetro para medir la pureza de la muestra de ARN. NanoString recomienda **una relación A260/A280 de 1,7–2,3** y una **relación A260/A230 de 1,8–2,3**. Además, se recomienda comprobar la cantidad mediante algún **método fluorimétrico** (Qubit Life technologies o similar) para confirmar **>20ng/μL**.

Cantidad requerida para el servicio (ng de ARN de muestra de partida):

Tipo de muestra	Volumen mínimo (μL)	Concentración mínima (ng/μL)	Cantidad mínima TOTAL (ng)
ARN de FFPE	15	60	900
ARN total (paneles CodeSets <400 genes)	15	30	450
ARN total (paneles CodeSets >400 genes)	15	20	300

Además, **es necesario evaluar la calidad del ARN utilizando un sistema de análisis de fragmentos para medir el estado de fragmentación del material si proviene de tejido FFPE**. NanoString recomienda que al menos **el 50% de la muestra sea superior a 200 nucleótidos (nt)** de longitud para un rendimiento óptimo de la hibridación. Las muestras de ARN que exhiben mayores niveles de fragmentación se pueden utilizar, pero la cantidad de partida tiene que ser incrementada/corregida.

La cantidad adecuada puede estimarse con la siguiente ecuación:

$$100/\% \text{ muestra } >200 \text{ nt}) \times 100 \text{ ng}$$

El porcentaje de muestra superior a 200 nt se puede estimar en el BioAnalyzer/TapeStation o similar. Este cálculo es una herramienta para ayudar a incrementar la cantidad de muestra idónea, aunque no un predictor completo de éxito (sobre todo para aquellos casos de menos del 25% de fragmentos superiores a 200 nt y con una concentración extremadamente baja (<20 ng/μL).

Para muestras que no lleguen a esta concentración indicada, se puede intentar realizar una concentración mediante columnas (como Amicon Ultra YM-3, 3000 kDa MWCO por Millipore).

Algunos paneles permiten menos ARN total de partida (desde 10-50ng) y tienen disponible un reactivo adicional "Low RNA Input kit" para realizar una amplificación antes de la hibridación y lectura en nCounter. Consúltenos para este caso particular o revise el manual [MAN-10046](#) para el uso del nCounter Low RNA Input Amplification Kit.



Guarde siempre el ARN a -80°C hasta su uso/envío.

NanoString no recomienda un kit específico de extracción de ARN, pero si recomienda eluir siempre en un volumen de elución <30 µL. así como, volver a pasar el eluido por la columna, ya que puede incrementarse la concentración final.

NanoString recomienda la digestión con Proteinasa K durante 2-3 horas. Ciertos tejidos grasos (mama, piel, etc) pueden requerir una digestión más prolongada, incluso de hasta 24 horas más, si el tejido aguanta.

ARN previamente extraído, pero no tratado con Proteinasa K puede utilizarse; sin embargo, contaminantes del método de preservación pueden disminuir la eficiencia del ensayo. El paso de tratamiento con ADNasa no es necesario, pero es altamente recomendado para eliminar el ADN genómico de las muestras que puede causar una sobreestimación en la cantidad de ARN de partida y conllevar a una reducida detección de los genes que se expresan menos.



Control de calidad del ARN

Envío de 15 µL a 20-100ng/ µL según DV200.

- *Concentración:* >20 ng/µL (método fluorimétrico).
- *Pureza:* Ratios A260/A280 y A260/230 entre 1.7 - 2.3 (espectrofotómetro).

Si, FFPE, valor DV200 (% >200nts) mediante analizador de fragmentos.

Anexo 1: Recomendaciones adicionales para la extracción de material de tejido FFPE

La superficie mínima de material de partida para secciones de 5 μm de grosor de cara a obtener una concentración de 10 ng/ μL y 50 ng de ARN es de 48 mm^2 , aunque un aumento en el número de secciones de tejido mejora la probabilidad de obtener las concentraciones de ARN recomendadas para estos ensayos. Consulte la Tabla 1 para recomendaciones mínimas del número de secciones y tamaños.

Tabla 1. Número de cortes mínimo según área y grosor del tejido

Área de superficie del tumor (mm^2)	Número mínimo de cortes (asumiendo 5 μm ** de tejido)
2-4	12
5-7	8
8-15	6
16-23	3
24-27	2
>48	1

Tabla 1 **Muestras con superficie tumoral <50% (por superficie total) deben ser macrodisseccionadas para eliminar el tejido no tumoral. Del mismo modo, las estructuras linfoides no tumorales o normales que contengan estructuras linfoides anatómicas no contiguas deben eliminarse mediante macrodissección antes de la extracción de ARN.