



GUÍA PARA EL USUARIO:

Recomendaciones previas para
ensayos NanoString de nCounter.

Servicio nCounter

Para realizar un diseño experimental adecuado y la consiguiente aceptación por parte del laboratorio para su ejecución, es necesario que conozca la siguiente información.

Este esquema representa de forma simplificada el proceso de los ensayos GeoMx:



1. Consideraciones previas

Al laboratorio debe ser enviado el RNA cumpliendo los siguientes criterios de aceptación para el ensayo.

EVALUACIÓN CUALITATIVA:

Es necesario utilizar **NanoDrop** para conocer los ratios 260/280 y 260/230. Los ratios recomendados para RNA son:

- 260/280: ~2.0
- 260/230: 2.0

EVALUACIÓN CUANTITATIVA:

Es necesario utilizar **Qubit** para la cuantificación.

Tipo de muestra	Volumen mínimo	Rangos de concentración	Concentración recomendada
RNA de tejido en parafina	15 µL	20 - 60 ng/µL	60 ng/µL
RNA de sangre, plasma, células, tejido, etc. (paneles CodeSets <400 genes)	15 µL	20 - 40 ng/µL	40 ng/µL
RNA de sangre, plasma, células, tejido, etc. (paneles CodeSet >400 genes)	15 µL	20 - 40 ng/µL	40 ng/µL

DV200

Para extracciones de tejido en parafina, es necesario realizar una evaluación de la métrica de calidad **DV200**, que representa el porcentaje de fragmentos de RNA por encima de 200 nucleótidos y muestra una alta correlación con el rendimiento de la muestra. **NanoString recomienda que el DV200 sea al menos el 50% de la muestra** para un rendimiento óptimo de la hibridación. 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).

Debido a la gran variedad de casos, un valor inferior al 50% de DV200 puede ser estudiado y evaluado para continuar con el estudio. Contacte con el Especialista para evaluar su caso.

1.1. Cantidad requerida para el servicio

Al laboratorio deben enviarse las muestras de RNA cuantificadas mediante Nanodrop, incluyendo su concentración y los ratios A260/A280 y A260/A230. El volumen mínimo a enviar al laboratorio es de 15 μ l. Este excedente facilita nuestro control de calidad mediante la cuantificación por Qubit y DV200. Aunque la cuantificación por NanoDrop es útil para analizar los ratios, siempre cuantificamos las muestras debido a posibles discrepancias con los resultados de Qubit. El excedente de las muestras se devuelve al concluir el estudio. En caso de tener muestras limitadas y no poder enviar este volumen, por favor, póngase en contacto con el laboratorio para comentar su caso particular (laboratorio@cagt.es).

Tipo de muestra	Volumen mínimo (μ L)	Concentración mínima (ng/ μ L)	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

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.



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

CITOGEN realiza controles de viabilidad a las muestras recibidas para confirmar que cumplen los requisitos para el ensayo. Si cualquiera de estos controles indica que las muestras no son conformes para continuar el ensayo, se le avisará para confirmar los pasos a seguir.

1.2. 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 100ng).



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, aunque también se pueden utilizar tubos EDTA o Tempus.



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.

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 5µm** 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.

Otras muestras

Contacte con el Especialista para evaluar su caso.

1.3. Otras consideraciones

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.

2. Confirmación del laboratorio

Una vez recopilada toda la información sobre las muestras y el diseño experimental del estudio, el laboratorio se encargará de coordinar la recogida de las muestras. Siempre deben ir acompañadas del Formulario de Envío de Muestras nCounter.

3. Realización del ensayo

Las muestras recibidas pasan los controles de calidad del ARN anteriormente mencionados. En caso de muestras de FFPE, se analiza el valor DV200 mediante analizador de fragmentos. Si los controles de viabilidad son correctos y cumplen con los requisitos, se lleva a cabo el estudio en nCounter.

4. QC y envío de datos

Una vez finalizado el ensayo, el laboratorio realizará un control de calidad de los datos obtenidos y éstos se envían en formato RCC (Reporter Code Count), para su posterior análisis en nSolver.

nSolver es una plataforma de análisis integrado para el almacenamiento, control de calidad/normalización y análisis de datos nCounter. Es de acceso gratuito y se puede descargar fácilmente a través de este enlace (<https://nanosttring.com/products/ncounter-analysis-system/ncounter-analysis-solutions/>).

Genera exportaciones personalizadas, resultados estadísticos básicos y figuras de calidad de publicación de manera rápida y fácil, sin necesidad de experiencia en bioinformática.

5. Disposición de las muestras post-análisis

Una vez finalizado el análisis, si hay un exceso de muestra, por favor indique su preferencia respecto a:

- Devolución de las muestras a la misma dirección.
- Devolución de las muestras a otra dirección.
- Destrucción de las muestras.

Nos pondremos en contacto con usted para coordinar los detalles del envío.

Si tiene alguna pregunta o necesita más información, no dude en ponerse en contacto con nosotros a través del correo electrónico laboratorio@cagt.es.

6. Notas sobre la Responsabilidad del Usuario

Esta guía de usuario ha sido proporcionada con el propósito de asistirle con la utilización de la plataforma nCounter. Al haber llegado al final de esta guía, se asume que el usuario la ha leído en su totalidad. El laboratorio advierte que el logro de resultados óptimos está directamente relacionado con la comprensión y aplicación adecuada de las instrucciones proporcionadas en esta guía. Cualquier desviación de las indicaciones o los procedimientos puede afectar negativamente los resultados. Por lo tanto, el laboratorio no se hace responsable de los resultados no óptimos o problemas derivados de no haber leído y seguido adecuadamente esta guía de usuario. Se recomienda encarecidamente seguir todas las instrucciones detalladas para garantizar un uso correcto y obtener los mejores resultados posibles.

Gracias por su comprensión y cooperación.