

CÀLCUL DEL DV200 PER A MOSTRES DE FFPE AMB LA TS4200 APLICAT A nCOUNTER (Nanosttring)

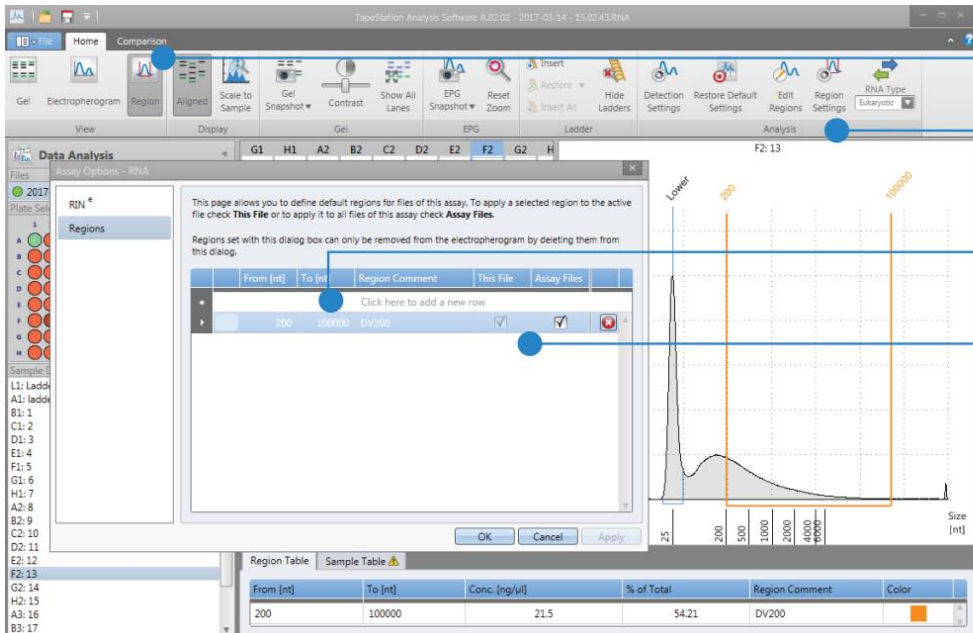
Rev.05/05/2025

La qualitat de l'RNA és un factor crític en qualsevol estudi de biologia molecular que impliqui l'expressió gènica.

El DV₂₀₀ és un indicador clau de la integritat de l'RNA, especialment en mostres degradades. A diferència del RIN (*RNA Integrity Number*), que pot ser poc fiable en aquestes condicions, el DV₂₀₀ proporciona una mesura més precisa de la quantitat d'RNA útil per a aplicacions com la seqüenciació o la transcriptòmica.

El DV₂₀₀ d'una mostra es defineix com el percentatge de fragments majors de 200 nucleòtids (*nt*) i es pot calcular mitjançant un sistema d'electroforesi capil·lar com la *TapeStation* (TS4200). Aquest valor s'obté a partir de l'anàlisi del perfil de fragmentació de l'RNA seguint els següents passos:

1. Instalar el programa: **Agilent TapeStation System Software**. Aquest programa es pot descarregar de la pàgina web d'Agilent o demanar la instal·lació a SAU.
<https://explore.agilent.com/Software-Download-TapeStation-Systems>
2. Obrir l'arxiu amb l'anàlisi de la qualitat de l'RNA (HS RNA o RNA Screentape) facilitat per la plataforma amb el **Agilent TapeStation System Software**
3. Clicar a *Region*
4. Clicar a *Region Settings*
5. Escriure 200 a la casella *from (nt)* i 100.000 a la casella de *To (nt)*
6. Escriure DV200 a la casella de *Region comment*
7. Clicar a *This File* per aplicar aquest càlcul a totes les mostres de l'arxiu obert
8. Clicar *Apply*
9. Obtenim el valor del DV200 a la columna *% of total* de la *Region table* de cada mostra



The screenshot shows the 'Region Settings' dialog box in the Agilent TapeStation Analysis Software. The dialog box has a table with the following data:

From [nt]	To [nt]	Region Comment	This File	Assay Files
200	100000	DV200	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Below the dialog box, the 'Region Table' is visible, showing the calculated DV200 value for the active file:

From [nt]	To [nt]	Conc. [ng/μl]	% of Total	Region Comment	Color
200	100000	21.5	54.21	DV200	Orange

Four numbered callouts point to the following elements in the software interface:

1. Click *Region* (in the top toolbar)
2. Click *Region Settings* (in the top toolbar)
3. Click, and enter region borders (pointing to the 'From [nt]' and 'To [nt]' fields in the dialog box)
4. Apply to the active file, or to all files (pointing to the 'This File' and 'Assay Files' checkboxes in the dialog box)

Per determinar l'**Input Real ajustat per el DV200** (ng) que haurem d'utilitzar en un experiment per a l'nCounter s'ha d'aplicar la fórmula:

$$\text{Input Real * ajustat per DV200} = \frac{\text{Input Teòric}}{\left(\begin{array}{c} \% \text{ mostra} \\ >200 \end{array} \right)} \times 100$$

Exemple:

FÓRMULA:
Input teòric / (DV200 *100)

MOSTRA	DV200 (%)	INPUT TEÒRIC (100 ng)	Qubit ng/μl	INPUT REAL AJUSTAT PER DV200	μL mostra	QC
1	50	100	250	200,0	0,8	PASS
2	12	100	104	833,3	8,0	FAIL
3	48	100	103	208,3	2,0	PASS
4	60	100	110	166,7	1,5	PASS
5	23	100	67	434,8	6,5	FAIL
6	55	100	87,2	181,8	2,1	PASS
7	70	100	20	142,9	7,1	FAIL

Volum > 5μl (CodeSet) i a >7μl (TagSet)

Volum > 5μl (CodeSet)

Volum > 5μl (CodeSet) i a >7μl (TagSet)

DV200: valor obtingut per la TS4200 (recomanat > 50%).

INPUT TEÒRIC: valor fixe 100 ng. Es pot modificar si l'IP té mostres més diluïdes (parlar amb Genòmica).

Qubit (ng/μl): concentració de la mostra mesurada amb Qubit.

INPUT REAL AJUSTAT PER DV200: ng totals que cal hibridar, valor que surt d'aplicar la fórmula (*).

μl mostra: volum de mostra a la reacció d'hibridació de nCounter (màxim 5μl per a Panels/CodeSets i 7μl per a TagSets).

QC: Pass o Fail segons la quantitat i volum de la mostra. Si el volum de mostra excedeix el volum màxim d'hibridació l'investigador o es posa el màxim possible o es descarta la mostra (decisió de l'IP).

ATENCIÓ: Un cop calculat el volum de mostra (μl), afegir **2μl més de mostra** al mateix tub, per controls de qualitat interns de la plataforma.