

## CÀLCULO DEL DV200 PARA MUESTRAS DE FFPE CON LA TS4200 APLICADO A nCOUNTER (Nanostring)

Rev.05/05/2025

La calidad del RNA es un factor crítico en cualquier estudio de biología molecular que implique la expresión génica. El DV200 es un indicador clave de la integridad del RNA, especialmente en muestras degradadas. A diferencia del RIN (RNA Integrity Number), que puede ser poco fiable en estas condiciones, el DV200 proporciona una medida más precisa de la cantidad de RNA útil para aplicaciones como secuenciación o transcriptómica.

El DV200 de una muestra se define como el porcentaje de fragmentos mayores de 200 nucleótidos (nt) y puede calcularse mediante un sistema de electroforesis capilar como la TapeStation (TS4200). Este valor se obtiene a partir del análisis del perfil de fragmentación del RNA siguiendo los siguientes pasos:

1. Instalar el programa: **Agilent TapeStation System Software**. Este programa se puede descargar de la página web de Agilent o solicitar la instalación en SAU. <https://explore.agilent.com/Software-Download-TapeStation-Systems>
3. Abrir el archivo con el análisis de la calidad del RNA (HS RNA o RNA Screentape) facilitado por la plataforma con el Agilent TapeStation System Software
4. Hacer clic en Region
5. Hacer clic en Region Settings
6. Escribir 200 en la casilla from (nt) y 100.000 en la casilla de To (nt)
7. Escribir DV200 en la casilla de Region comment
8. Hacer clic en This File para aplicar este cálculo a todas las muestras del archivo abierto
9. Pulsar Apply
10. Obtenemos el valor del DV200 en la columna % of total de la región table de cada muestra

1. Click Region

2. Click Region Settings

3. Click, and enter region borders

4. Apply to the active file, or to all files

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

Para determinar el **Input Real ajustado para el DV200** (ng) que tendremos que utilizar en un experimento para nCounter se debe aplicar la fórmula:

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

Ejemplo:

**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

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

Volúmens > 5µl (CodeSet)

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

**DV200:** valor obtenido por la TS4200 (recomendado > 50%).

**INPUT TEÓRICO:** valor fijo 100 ng. Se puede modificar si el IP tiene muestras más diluidas (hablar con Genómica).

**Qubit (ng/µl):** concentración de la muestra cuantificada con Qubit.

**INPUT REAL AJUSTADO POR DV200:** ng totales que se hibridaran, valor que sale de aplicar la fórmula (\*).

**µl muestra:** volumen de muestra en la reacción de hibridación de nCounter (máximo 5µl para Panels/CodeSets y 7µl para TagSets).

**QC:** Pass o Fail según la cantidad y volumen de la muestra. Si el volumen de muestra excede el volumen máximo de hibridación, o se pone el máximo posible o se descarta la muestra (decisión del IP).

**ATENCIÓN:** Una vez calculado el volumen de la muestra (µl), añadir **2µl más de muestra** al mismo tubo, para controles de calidad internos de la plataforma.