# Optimización de la extracción y el análisis de ADN circulante en el seno de la Plataforma de la Red Nacional de Biobancos

**Anna Bosch-Comas[1], Mercedes González-Ruiz[1], María Ruiz-Miró[2], Mª Isabel García-Sánchez[3], Maria José Rios[3], Teresa Escámez[4], Esperanza García-Molina[4], Ana Silvente Llorente[4], Pablo Conesa[5], Mª Ángeles Ros[5], Oihana Belar[6], Raquel Coya[6], Erika Castro[6], Rocío Aguilar[7], Raúl de la Puente[7], Verónica Fernandez[1].**

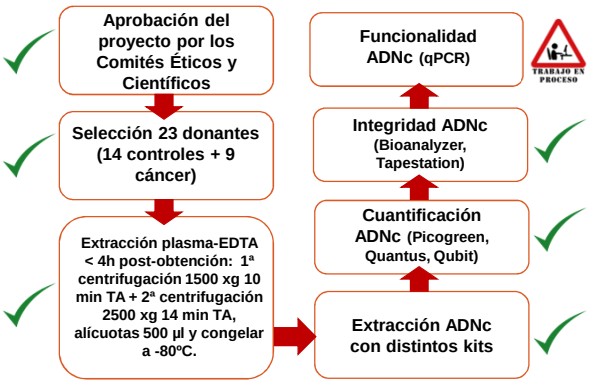
[1]Banco de sangre y otros fluidos, Biobanco HCB-IDIBAPS, Barcelona; [2]Biobanc IRBLleida, Lleida; [3]BBSSPA, Nodo Hospitalario Virgen Macarena, Sevilla; [4]Biobanc-Mur (IMIB), Nodo 1-HCU Virgen de la Arrixaca, El Palmar; [5]Biobanc-Mur (IMIB), Nodo 2-HGU Santa Lucia, Cartagena; [6]Biobanco Vasco, Barakaldo; [7]BBSSPA, Granada.

## 1. INTRODUCCIÓN

**1.1. Antecedentes.** El avance de la medicina personalizada ha propiciado el impulso de novedosos métodos de diagnóstico cada vez menos invasivos, más rápidos y baratos. Con ello se ha permitido el desarrollo de la metodología de la "**biopsia líquida**", que es el análisis de los ácidos nucleicos circulantes presentes en plasma y suero, especialmente del ADN circulante (ADNc).

**1.2. ¿Cuál es el objetivo de esta comunicación?** Presentar el desarrollo del **proyecto piloto** en el seno de la **Plataforma Red Nacional de Biobancos (PRNB)** para la puesta a punto y comparación de distintos métodos de extracción de ADNc a partir de **muestras de pequeño volumen (500 µl)**, iniciado en el año 2016.

## 2. ¿QUÉ FASES TIENE EL PROYECTO?




## 3. KITS USADOS

**AUTOMATIZADOS**

**BOLAS MAGNÉTICAS**

- Perkin Elmer: Chemagic (*Chemagic Circulating NA Kit special*)
- Promega: Maxwell (*Maxwell RSC ccfDNA*)

**MEMBRANAS DE SÍLICA**

- QIAgen: EZ1 Bio-Robot (*EZ1 DNA Blood 350µl kit*)
- QIAgen: QIAcube (*QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit*)
- QIAgen: QIAcube (*DNA Blood Minikit*)
- QIAgen: QIASymphony (*DNA Minikit*)

**MANUALES**

- Macherey-Nagel (*NucleoSpin Plasma XS*)
- Zymo Research (*Quick-cfDNASerum & Plasma Kit*)

## 4. RESULTADOS

**4.1. ¿Qué kit tiene mayor rendimiento?** Medición por Picogreen (*Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit, ThermoFisher Scientific, S.L.*), QuantiFluor (*Quantus™ Fluorometer & QuantiFluor ® dsDNA System, Promega Corporation*) y Qubit (*Qubit™ 1.0 & Qubit™ dsDNA HS Assay Kit, ThermoFisher Scientific, S.L.*).

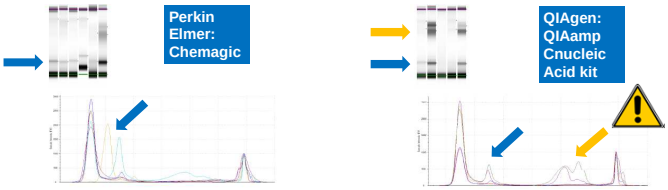
| Kit usado | nº ADNc obtenidos | nº ADNc medidos Picogreen | Media Picogreen (pg/µl) | nº ADNc medidos QuantiFluor | Media QuantiFluor (pg/µl) | nº ADNc total medidos Qubit | ADNc detectados Qubit | Media Qubit (pg/µl) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Promega: Maxwell (Maxwell RSC ccfDNA)*** | 19 | 19 | *No detectable* | 19 | 796 ± 714 | 10 | **3 (30%)** | **659 ± 207** |
| ***QIAgen: EZ1 Bio-Robot (EZ1 DNA Blood 350µl kit)*** | 23 | 23 | *No detectable* | - | - | 10 | 0 | 0 |
| ***QIAgen: QIAcube (DNA Blood Minikit)*** | 43 | 43 | *No detectable* | - | - | 22 | 0 | 0 |
| ***QIAgen: QIASymphony (DNA Minikit)*** | 23 | 23 | *No detectable* | - | - | 10 | 2 (20%) | 329 ± 351 |
| ***Macherey-Nagel (NucleoSpin Plasma XS)*** | 23 | 23 | *No detectable* | - | - | 10 | 4 (40%) | 230 ± 323 |
| ***Zymo Research (Quick-cfDNASerum & Plasma Kit)*** | 23 | 23 | *No detectable* | - | - | 12 | **7 (58,33%)** | **230 ± 360** |
| ***Perkin Elmer: Chemagic (Chemagic Circulating NA Kit special)*** | 23 | - | - | - | - | 12 | **11 (91,67%)** | **398 ± 418** |
| ***QIAgen: QIAcube (QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit)*** | 22 | 22 | *No detectable* | - | - | 10 | **8 (80%)** | **328 ± 325** |

**4.2. ¿Hay diferencias de cantidad entre donantes control y con cáncer?** Si, en los donantes con cáncer hay **2,8 veces más** ADNc.

| Tipo de muestra origen | nº ADNc total medidos Qubit | ADNc detectados Qubit | Media Qubit (pg/µl) |
|---|---|---|---|
| Cáncer | 38 | 20 (52,63%) | 480±420 |
| Control | 58 | 16 (27,59%) | 170±90 |

**4.3. ¿Hay diferencias en los perfiles de electroforesis automatizada según el kit usado?** Medición por Bioanalyzer (*Bioanalyzer 2100 & High Sensitivity DNA assay, Agilent Technologies*) y Tapestation (*TapeStation 2200 & High Sensitivity D5000 kit, Agilent Technologies*). Las dos plataformas dan resultados coincidentes.

| Kit usado | Resultados electroforesis |
|---|---|
| ***Promega: Maxwell (Maxwell RSC ccfDNA)*** | OK! Pico específico 100-200 pb |
| ***QIAgen: EZ1 Bio-Robot (EZ1 DNA Blood 350µl kit)*** | No hay pico |
| ***QIAgen: QIAcube (DNA Blood Minikit)*** | No hay pico |
| ***QIAgen: QIASymphony (DNA Minikit)*** | OK! Pico específico 100-200 pb |
| ***Macherey-Nagel (NucleoSpin Plasma XS)*** | OK! Pico específico 100-200 pb |
| ***Zymo Research (Quick-cfDNASerum & Plasma Kit)*** | OK! Pico específico 100-200 pb |
| ***Perkin Elmer: Chemagic (Chemagic Circulating NA Kit special)*** | OK! Pico 100-200 pb |
| ***QIAgen: QIAcube (QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit)*** | OK! Pico 100-200 pb, pero posible contaminación ADN genómico |




## 5. CONCLUSIONES

1) Para medir ADNc de muy baja concentración, es más sensible la cuantificación por QuantiFluor y Qubit.
2) Para analizar la integridad de ADNc, es equivalente usar tanto el equipo Bioanalyzer como el Tapestation.
3) Los mejores kits para la extracción de ADNc a partir de muestras de pequeño volumen, según criterios de capacidad y rendimiento de extracción de los kits usados e integridad de las muestras, son por orden:

- **Perkin Elmer: Chemagic (Chemagic Circulating NA Kit special)** – automatizado, bolas magnéticas
- **Zymo Research (Quick-cfDNASerum & Plasma Kit)** – manual, membranas de sílica
- **Promega: Maxwell (Maxwell RSC ccfDNA)** – automatizado, bolas magnéticas

## 6. ¿QUÉ NOS QUEDA POR HACER?

**1) Comprobar la funcionalidad de los ADNc** extraídos con los 3 kits seleccionados por PCR cuantitativa.

**2) Redacción y difusión PNT de extracción ADNc:** para su aplicación en la PRNB.

## 7. EMPRESAS Y ENTIDADES COLABORADORAS

CONTACTO: veronica.fernandez@idibaps.org