

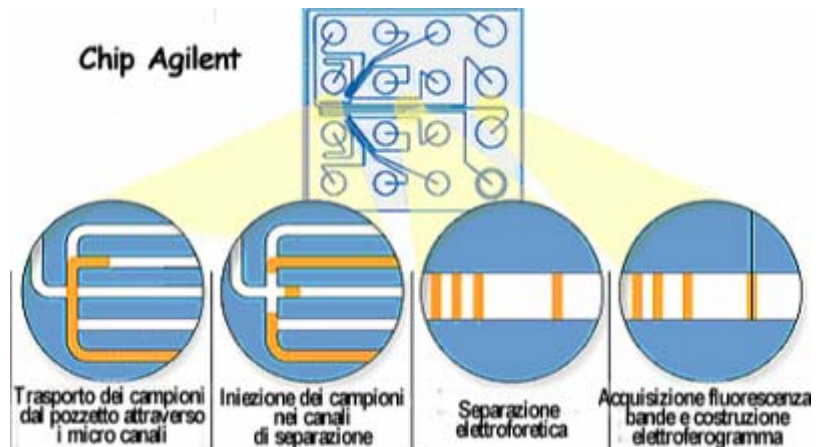
Il Servizio di Biologia Molecolare si è di recente dotato di uno strumento per l'analisi qualitativa e quantitativa degli acidi nucleici Agilent Bioanalyzer 2100 e ha implementato tale tecnologia nell'offerta di Servizi all'utenza. Tale tecnologia si realizza prevalentemente nell'analisi qualitativa (QC) dei campioni di RNA da utilizzare in applicazioni sensibili (qPCR, microarray, next gen seq, libraries generation, etc)

Analisi qualitativa con Agilent BioAnalyzer

cDNA, RNA Totale e Messaggero e small RNA

Il servizio consiste nella lettura di campioni di cDNA e RNA, sia esso RNA totale, mRNA o RNA inferiore ai 200 nucleotidi (microRNA, siRNA, scRNA, snoRNA, piRNA, 5S rRNA, 5.8S rRNA) con l'**Agilent Bioanalyzer 2100** che permette di caratterizzare qualitativamente e quantitativamente il campione mediante un'elettroforesi capillare. A seconda della quantità di RNA a disposizione dell'utente, si potrà utilizzare il **NANO chip**, il **PICO chip** o, nel caso di RNA inferiori a 200 nt, lo "**Small RNA chip**". L'Agilent Bioanalyzer 2100, nel caso dei RNA chip, restituisce un valore definito **R.I.N.** (RNA Integrity Number) che permette di attribuire un indice qualitativo all'RNA totale esaminato. Tale parametro presenta una scala che va da 10, RNA di ottima qualità, a zero che indica invece RNA completamente degradato. Lo Small RNA chip, invece, è in grado di fornire la percentuale di arricchimento dei frammenti di RNA lunghi circa 20-40 nt ossia quelli corrispondenti alla popolazione dei miRNA. Ogni chip contiene una serie di microcanali strettamente interconnessi: i frammenti di acidi nucleici vengono così separati in base al loro peso molecolare come in una normale elettroforesi in gel di agarosio.

I microcanali di ogni chip sono riempiti con una matrice ed un fluorocromo: 1. I campioni si muovono attraverso i microcanali a partire dal pozzetto di caricamento; 2. Ogni campione è inserito nel canale di separazione; 3. Il campione viene separato mediante una corsa elettroforetica; 4. Al termine della corsa elettroforetica i campioni sono letti in base alla loro fluorescenza e tale informazione è tradotta in una tipica immagine di gel elettroforesi e in elettroferogrammi.



Le seguenti tabelle permettono di valutare quale sia il prodotto che meglio soddisfa le esigenze dell'utente.

RNA

Analytical Specifications	RNA 6000 Nano Total RNA Assay	RNA 6000 Nano mRNA Assay	RNA 6000 Pico Total RNA Assay	RNA 6000 Pico mRNA Assay	Small RNA Assay
Quantitative range	25–500 ng/μL	25–250 ng/μL	–	–	50–2000 pg/μL of purified miRNA in water
Qualitative range	5–500 ng/μL	25–250 ng/μL	50–5000 pg/μL in water	250–5000 pg/μL in water	50–2000 pg/μL of purified miRNA in water
Sizing range	–	–	–	–	6–150 nt

DNA

Analytical Specifications	DNA 1000 Assay	DNA 7500 Assay	DNA 12000 Assay	High Sensitivity DNA Assay
Sizing range	25–1000 bp	100–7500 bp	100–12000 bp	50–7000 bp
Sizing resolution	25–100 bp: 5 % 100–500 bp: 5 % 500–1000 bp: 10 %	100–1000 bp: 5 % 1000–7500 bp: 15 %	100–1000 bp: 5 % 1000–12000 bp: 10 %	50–600 bp: ±10 % 600–7000 bp: ±20 %

Termini e modalità del servizio

Per accedere al Servizio è necessario:

1. Prenotarsi sull'apposito registro presso l'SBM.
2. Fornire all'SBM il materiale necessario per l'analisi (Kit e Chip) che al momento il Servizio non fornisce in attesa di concordare con l'utenza una più funzionale organizzazione.
3. Consegnare i campioni secondo le modalità di seguito indicate al personale dell'SBM.

Le letture verranno realizzate dal personale del Servizio ed i risultati inviati via mail, salvo situazioni eccezionali, entro i quattro giorni successivi alla ricezione dei campioni in formato pdf. Il personale del Servizio è a disposizione per eventuali chiarimenti nell'interpretazione dei dati.

Preparazione dei campioni

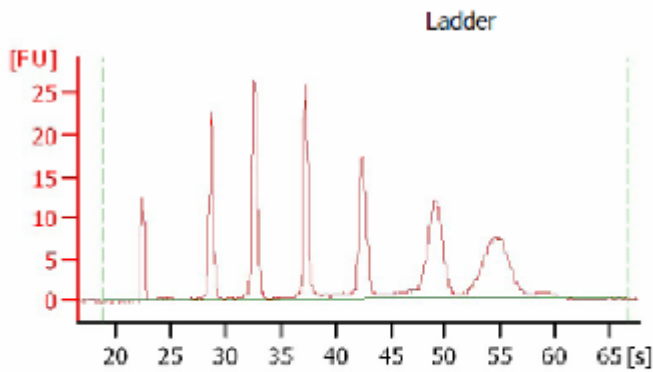
I campioni di RNA da analizzare dovranno essere forniti in Eppendorf da 1.5 ml, diluiti in acqua RNase free. Nella tabella seguente, a seconda del tipo di chip che si intende utilizzare, sono riassunte le quantità consigliate per ottenere una buona lettura sia in termini quantitativi che soprattutto qualitativi.

Tipo di RNA	NANO Chip	PICO Chip	Small RNA Chip
RNA Totale	100 – 200 ng/μl	400 – 800 pg/μl	30 – 100 ng/μl
mRNA	50 – 100 ng/μl	700 – 1000 pg/μl	///
Small RNA < 150 nt	///	///	5 – 20 ng/μl
Oligonucleotidi	///	///	500 – 1.500 pg/μl

Ogni campione dovrà essere costituito da almeno 3.0 ul in modo da consentire al personale del Servizio di ripetere la lettura nel caso in cui si verificassero dei problemi tecnici. Su ogni singola provetta deve essere indicato chiaramente il nome del campione.

Interpretazione dei risultati

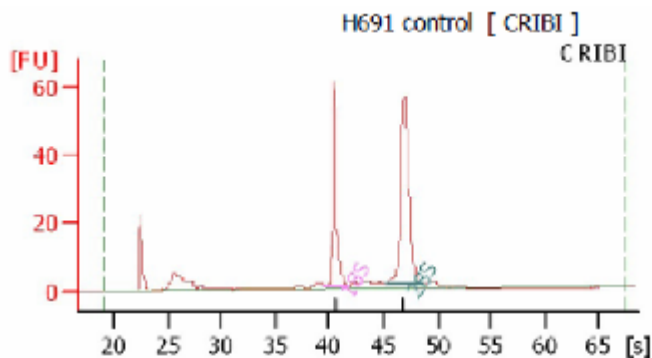
L'Agilent Bioanalyzer 2100 per ogni singolo campione fornisce, come risultato, un elettroferogramma e l'immagine virtuale di un tipico gel di agarosio. Per aiutare l'utente nell'interpretazione dei profili ottenuti elenchiamo una serie di elettroferogrammi peculiari per l'RNA totale, per l'mRNA e per l'RNA inferiore i 150 nt.



RNA 6000 ladder

Overall Results for Ladder

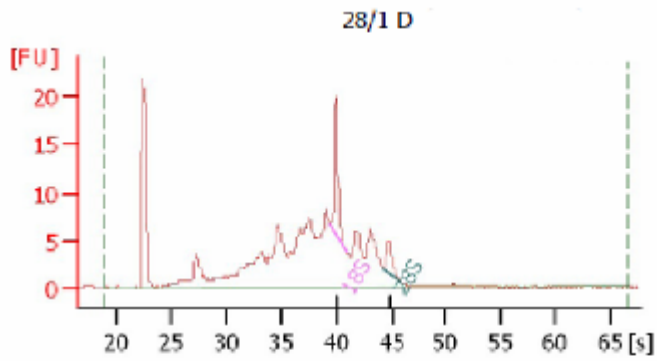
RNA Area: 245.1
RNA Concentration: 150 ng/ μ l
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: All Other Samples



RNA Totale di Ottima Qualità

Overall Results for sample 1 : H691 control

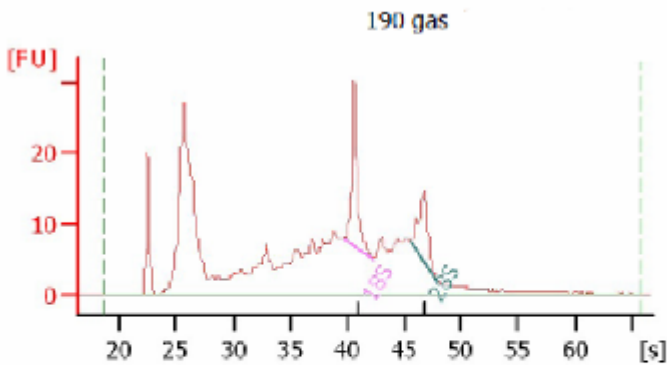
RNA Area: 240.5
RNA Concentration: 104 ng/ μ l
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.9
RNA Integrity Number (RIN): 9.8 (8.02.05)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9.80



RNA Totale parzialmente degradato

Overall Results for sample 4 : 28/1 D

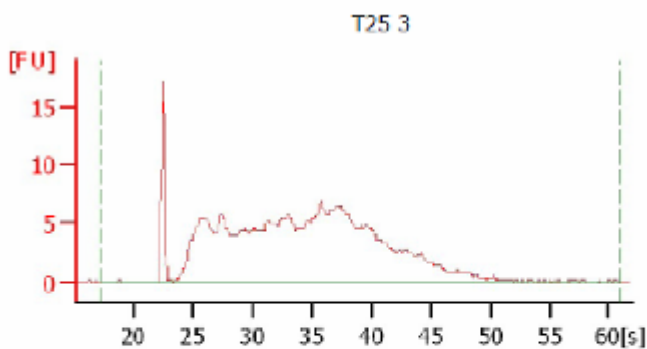
RNA Area: 206.1
 RNA Concentration: 89 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0.3
 RNA Integrity Number (RIN): 5.1 (B.02.05)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 5.10



RNA Totale parzialmente degradato

Overall Results for sample 7 : 190 gas

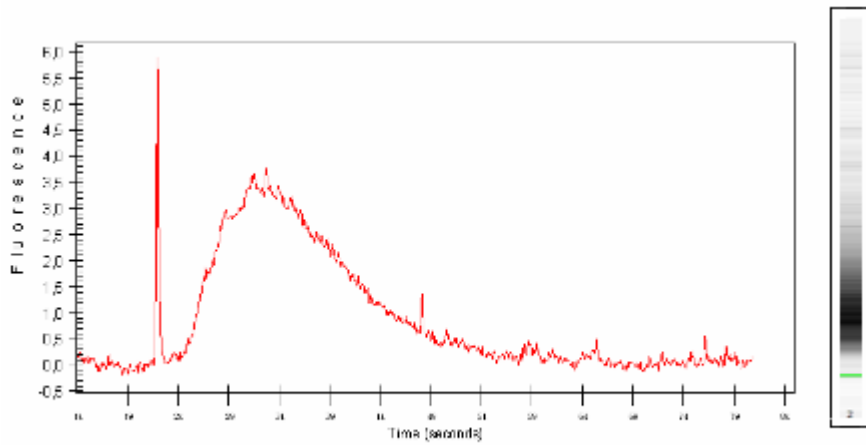
RNA Area: 488.6
 RNA Concentration: 236 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0.6
 RNA Integrity Number (RIN): 5.4 (B.02.05)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 5.40



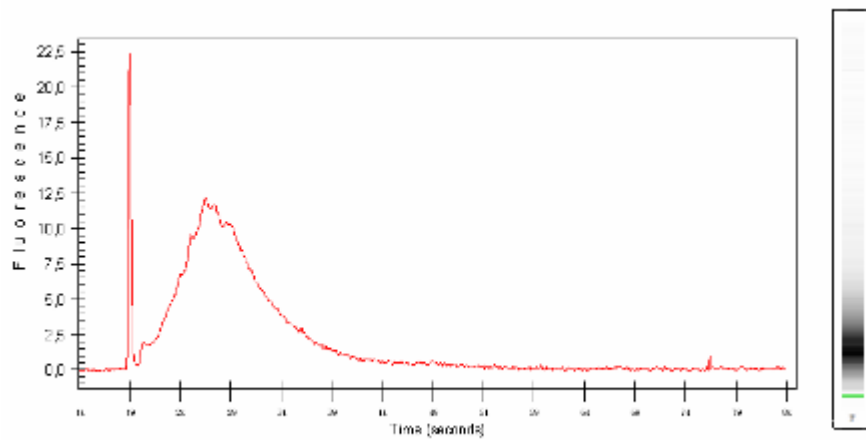
RNA Totale completamente degradato

Overall Results for sample 3 : T25 3

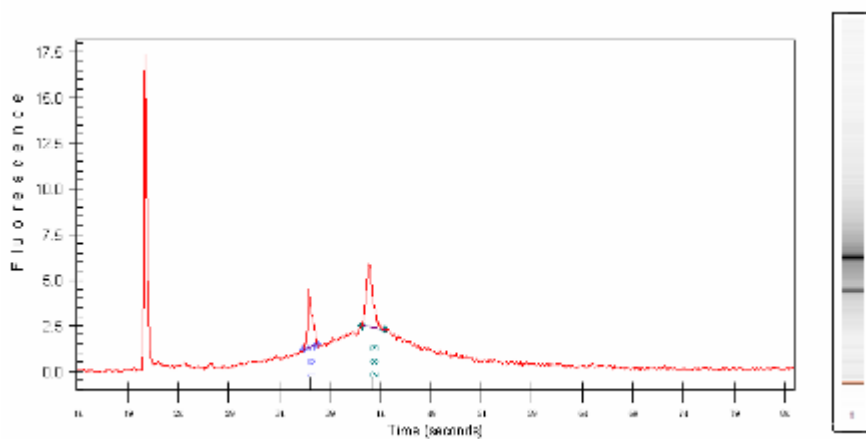
RNA Area: 284.4
 RNA Concentration: 186 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0.0
 RNA Integrity Number (RIN): 2.3 (B.02.06)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 2.30



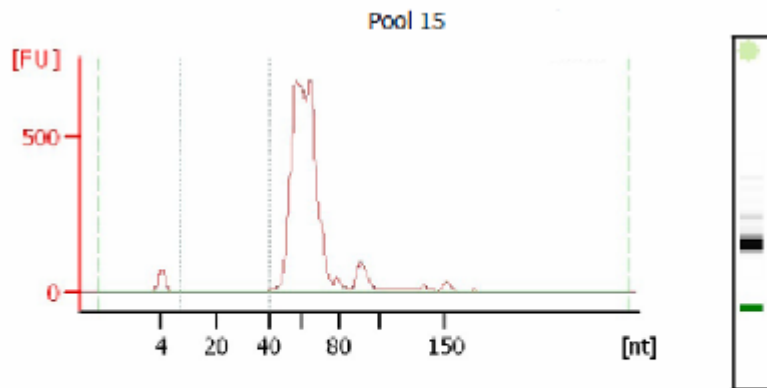
mRNA di buona qualità



mRNA sintetico



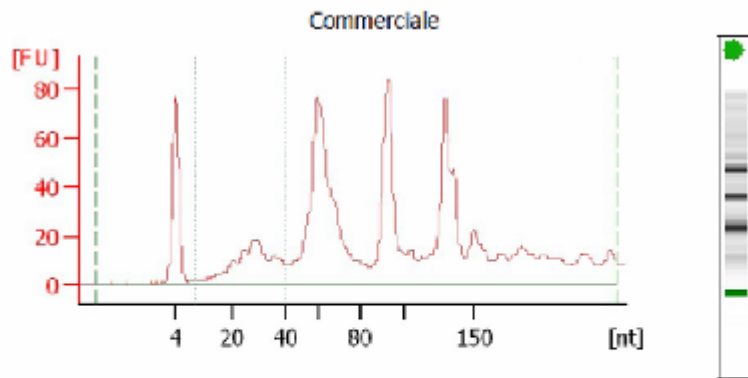
mRNA con evidente
contaminazione di RNA
ribosomale 18S e 28S



Valutazione dell'RNA < 150 nt con lo Small RNA chip (% miRNA = 3%)

Overall Results for sample 2 : Pool 15

Small RNA Concentration [pg/μl]: 12.350,3
 miRNA Concentration [pg/μl]: 312,9
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 3
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: 3 % miRNA; Concentration: 312.90 pg/μl



Valutazione dell'RNA < 150 nt con lo Small RNA chip (% miRNA = 37%)

Overall Results for sample 1 : Commerciale

Small RNA Concentration [pg/μl]: 3.397.0
 miRNA Concentration [pg/μl]: 1.250.0
 miRNA / Small RNA Ratio [%]: 37
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: 37 % miRNA; Concentration: 1250 pg/μl