

 Vall d'Hebron Institut de Recerca	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE DIFERENTES TÉCNICAS	Código: VHIR-UAT-DOC-013	Revisión: 01
		Data de redacción: 01/04/2020	Página: 1 de 17

CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE DIFERENTES TÉCNICAS

APROBACIÓN

REDACTADO POR	REVISADO POR	APROBADO POR:
Nombre: Pilar Mancera Cargo: Gestora Plataforma Genòmica UAT	Nombre: Mònica Anglada Cargo: Responsable Calidad	Nombre: Rosa Prieto Cargo: Responsable UAT

Firmas: *(se harán en formato digital en el aplicativo de gestión documental HACQLT)*

	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE DIFERENTES TÉCNICAS	Código: VHIR-UAT-DOC-013	Revisión: 01
		Data de redacción: 01/04/2020	Página: 2 de 17

TABLA DE CONTENIDOS:

1.	Espectrofotometría	Pág 3
2.	Electroforesis microfluídica	Pág 6
3.	Fluorimetría	Pág 9
	Quant-iT Picogreen/Quant-iT Ribogreen	Pág 9
	Qubit	Pág 11
4.	PCR cuantitativa (o a tiempo real)	Pág 12
5.	Resumen de las ventajas e inconvenientes de las diferentes técnicas	Pág 14
6.	Conclusiones	Pág 16
7.	Bibliografía	Pág 16

	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE DIFERENTES TÉCNICAS	Código: VHIR-UAT-DOC-013	Revisión: 01
		Data de redacción: 01/04/2020	Página: 3 de 17

1. ESPECTROFOTOMETRÍA

Un espectrofotómetro (por ejemplo, el NanoDrop® de Thermo Fisher) es capaz de determinar las **concentraciones** promedio de los ácidos nucleicos de ADN o ARN presentes en una mezcla, así como su **pureza**.

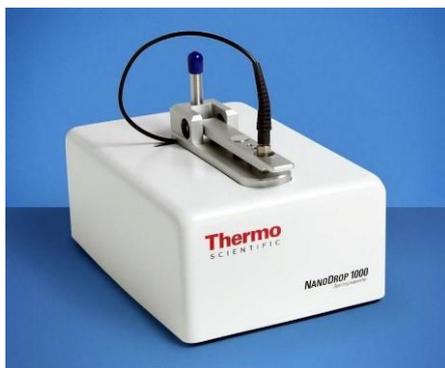
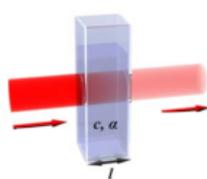


Imagen 1. Espectrofotómetro Nanodrop

Cada molécula absorbe la energía radiante a una longitud de onda específica, a partir de la cual es posible extrapolar la concentración de un soluto en una solución.



Ley de Lambert-Beer: una relación lineal entre absorbancia A (DO) y concentración

$$A = DO = \alpha lc \quad (1)$$

α : coeficiente de extinción molar (probabilidad de que el fotón sea absorbido por el material a esa λ)

l : distancia que recorre la luz para atravesar el material

c : concentración

1 unidad de absorbancia en 1 cm de trayectoria óptica para **ADN de doble cadena= 50ug/ml** y para **ARN= 40 ug/ml**.

Las especificaciones del Nanodrop 1000 (ND-1000) de que disponemos en la UAT son:

Detection Limit (ng/ul)	Approx. Upper Limit (ng/ul)	Typical Reproducibility (minimum 5 replicates) (SD= ng/ul; CV= %)
2	3700 ng/ul (dsDNA) 3000 (RNA) 2400 (ssDNA)	sample range 2-100 ng/ul: ± 2 ng/ul sample range >100 ng/ul: $\pm 2\%$

	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE DIFERENTES TÉCNICAS	Código: VHIR-UAT-DOC-013	Revisión: 01
		Data de redacción: 01/04/2020	Página: 4 de 17

Es bastante común que, durante el proceso de extracción, las muestras de ácido nucleico se contaminen con otras moléculas (proteínas, compuestos orgánicos, etc). Una de las ventajas de usar el análisis espectrofotométrico es la capacidad de determinar la pureza de la muestra usando la relación de absorbancia a 260nm y 280nm (**A260/280**):

- **ADN puro: A260/280 ~ 1.8**
- **ARN puro: A260/280 ~ 2.0**

Estas proporciones se usan para evaluar la presencia de contaminantes después del proceso de aislamiento de ácido nucleico, ya que las proteínas y fenol absorben a 280 nm (absorbancia < 1.6). Si la relación es > 2.1, indica contaminación del ADN con ARN. El valor de esta ratio se ve afectado también por el pH de la solución (pH ácido baja el valor; pH básico incrementa el valor).

Otra relación a tener en cuenta es **A260/230**, que debería > **2.0**. Si fuese inferior se debería a contaminación por compuestos orgánicos: EDTA, TRIzol, derivados de guanidina, fenoles, sales caotrópicas o hidratos de carbono.

Ejemplos de imágenes de NanoDrop:

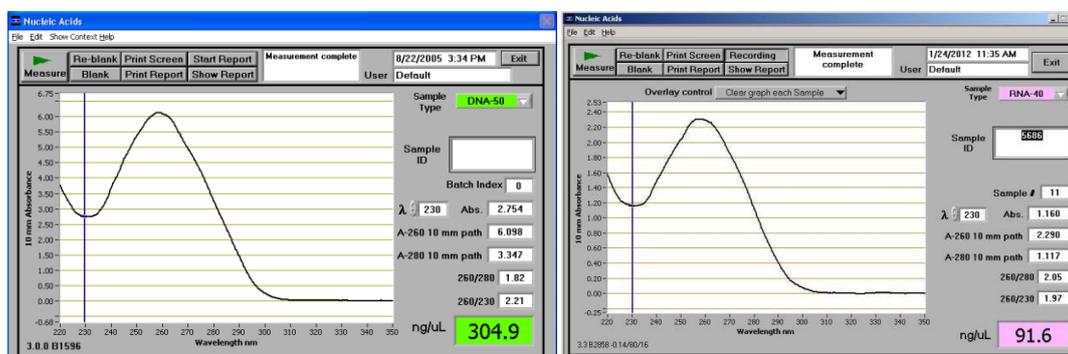


Imagen 2. Muestra de ADN (izquierda) y de ARN (derecha) de buena calidad.

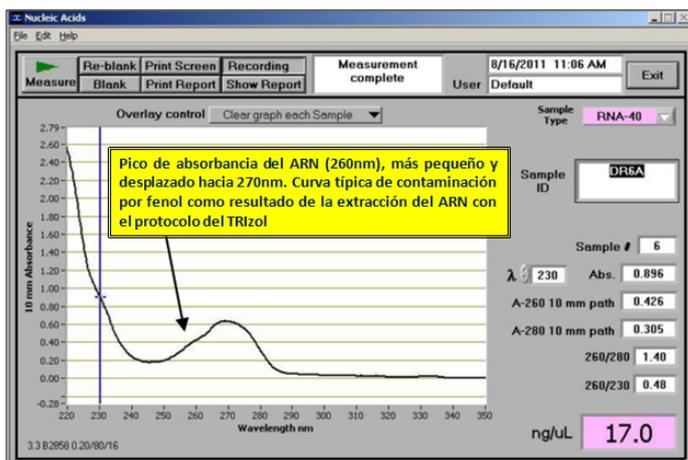


Imagen 3. Muestra de ARN con pico elevado a 270nm típico de contaminación por fenol (o sales caotrópicas). Debido a la baja pureza se debería de repurificar por columna o utilizar otro método de extracción.

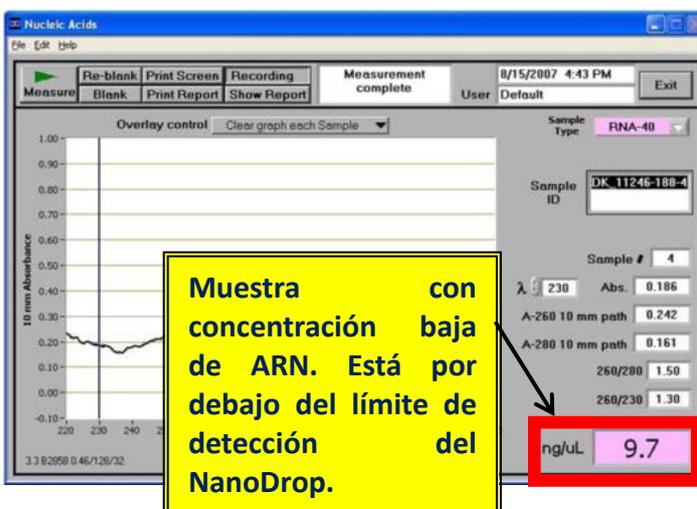


Imagen 4. Muestra de ARN con concentración por debajo del límite de detección del NanoDrop. Es difícil evaluar la pureza analizando los ratios A260/280 y A260/230. Se debería utilizar un método más sensible como el Bioanalyzer o el Qubit.

Finalmente, cabe recordar que los ácidos nucleicos absorben a 260nm. Solo por el hecho de tener absorbancia a 260nm no significa que el ARN esté intacto: podría estar completamente degradado o podría ser ADN (si se requiere ARN puro para alguna técnica como microarrays, siempre es recomendable tratar con DNAsa).

2. ELECTROFORESIS MICROFLUÍDICA

El **Bioanalyzer 2100[®] de Agilent** está diseñado para determinar la **concentración e integridad** de ácidos nucleicos (ARN y ADN). Consiste en un sistema de electroforesis en un chip microfluídico mediante el uso de nanocapilares y un marcador fluorescente que se une al ARN o ADN.



Imagen 5. Equipo y material de Bioanalyzer

Existen diferentes **kits para la cuantificación del ARN y ADN**, los más utilizados en nuestra unidad son:

TIPO DE MUESTRA	KIT AGILENT	CARACTERÍSTICAS
ARN	RNA 6000 Nano Kit	Análisis y cuantificación de ARN total o mARN de una concentración de 25 a 500 ng/ul
	RNA 6000 Pico Kit	Análisis de ARN total o mARN de una concentración de 50pg/ul a 5000pg/ul
	Small RNA Kit	Análisis de fragmentos pequeños de ARN, desde 6 a 150 nt y una concentración de 50 a 2000 pg/ul
ADN	DNA 1000/7500/12000	Separación y cuantificación de fragmentos de dsDNA de 25 a 1000 pb , de 100 a 7500 pb y de 100 a 12000 pb respectivamente. Concentración de 0.5-50ng/ul
	DNA High Sensitivity	Separación, y cuantificación de muestras de dsDNA de cantidad limitada (100pg/ul) y de 50 a 7000 pb

Tabla 1. Kits para el análisis de ARN y ADN mediante el Bioanalyzer 2100[®] de Agilent

Los kits de ADN se utilizan para analizar y cuantificar el tamaño de los fragmentos de ADN, siendo muy útiles como control de calidad para la preparación de librerías de *NGS*. El kit de *ADN de alta sensibilidad* es especialmente útil para este propósito, debido a la mayor sensibilidad en el rango de pg/μl de ADN.

	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE DIFERENTES TÉCNICAS	Código: VHIR-UAT-DOC-013	Revisión: 01
		Data de redacción: 01/04/2020	Página: 7 de 17

Los kits de ARN se utilizan para determinar la concentración y la integridad de la muestra mediante el número de integridad, *RIN* (se explica más adelante). Es muy útil para estudios de expresión génica (por ejemplo, para microarrays o qPCR) ya que permite medir de manera objetiva la calidad del ARN.

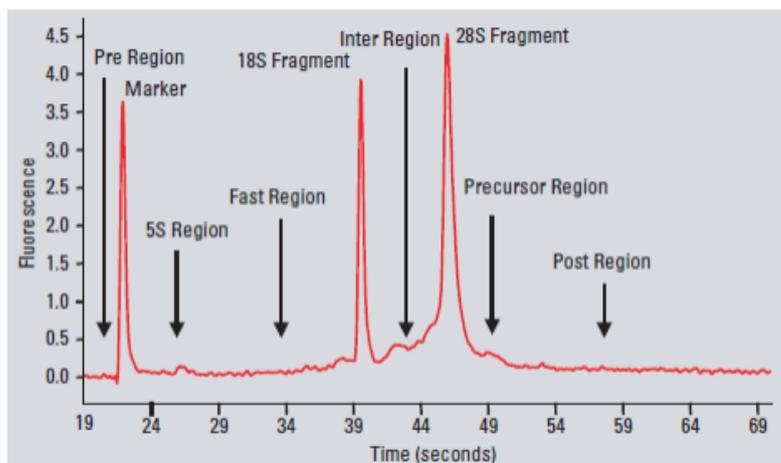


Imagen 6. Perfil típico de un electroferograma de bioanalyzer para muestra de ARN

La integridad del ARN viene dada por el ratio de las bandas del rARN **28S/18S**: si es **2**, se considera que el ARN es de buena calidad.

Para estandarizar el proceso de interpretación de integridad del ARN, Agilent Technologies[®] introdujo el **número de integridad (RIN)**. El RIN se basa en un algoritmo que tiene en cuenta todo el perfil electroforético. Permite asignar un valor numérico objetivo a la calidad del ARN eucariota en una escala de 1 a 10, siendo **1** el perfil más **degradado** y **10** el más **intacto**.

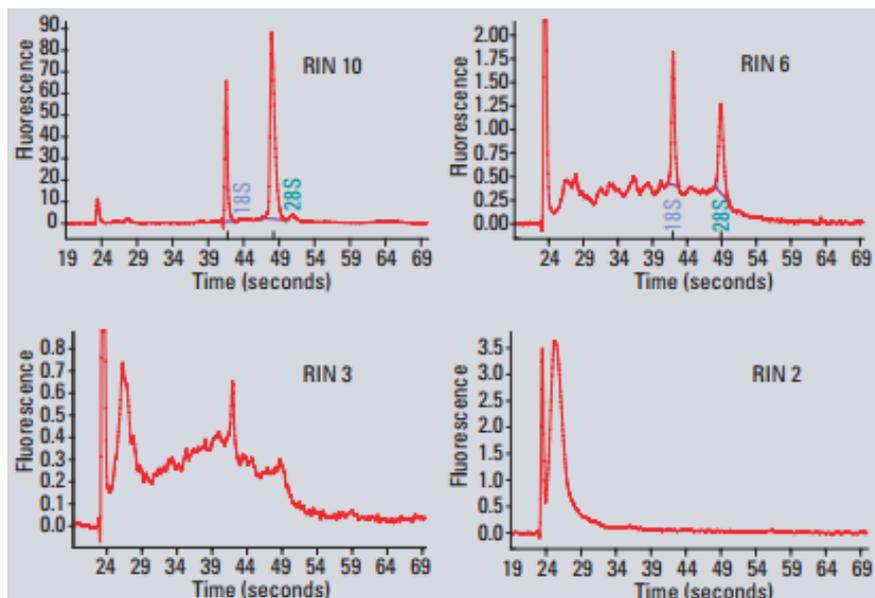


Imagen 7. Electroferogramas de muestras de ARN, donde se observan muestras de muy buena calidad (RIN 10) y muestras muy degradadas (RIN2). En las muestras degradadas ya no se observan los picos del RNA ribosomal.

A pesar que el **RIN** facilita la evaluación de la integridad del ARN y hace más fácil comparar muestras o métodos de extracción de ARN, no es posible determinar de antemano si el experimento funcionará o no. Por ejemplo, un RIN de 5 podría no funcionar para un experimento de microarrays pero sí para un experimento de qRT-PCR. En general, muestras con RIN más altos de 8 deberían funcionar para la mayoría de los experimentos. Por lo tanto, según la técnica que queramos utilizar después, muestras con un RIN u otro podrán ser utilizadas con buenos resultados. Resumiendo:

- RIN \leq 4: baja calidad (habitual en muestras FFPE)
- RIN 4-7: calidad media (OK para RT-qPCR)
- RIN \geq 7: buena calidad (por ejemplo apropiadas para microarrays)

Aunque recientemente se han desarrollado kits para amplificar ARN degradado para analizarlo mediante diferentes técnicas, hay que tener en cuenta que los resultados probablemente serán diferentes a los que se obtendrían con muestras de buena calidad, debido a los sesgos introducidos durante los diferentes pasos de la amplificación. En este tipo de experimentos es importante que el RIN de todas las muestras sea lo más parecido posible, ya que la calidad del material de partida introduce una gran variabilidad.

	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE DIFERENTES TÉCNICAS	Código: VHIR-UAT-DOC-013	Revisión: 01
		Data de redacción: 01/04/2020	Página: 9 de 17

En el caso de muestras muy degradadas de ARN para RNASeq (por ejemplo muestras FFPE), en vez del RIN se recomienda utilizar el parámetro DV200, que también se puede calcular a partir del perfil de bioanalyzer. El DV200 representa el porcentaje de fragmentos de tamaño superior a 200 nucleótidos. A partir del valor del DV200 se determina la cantidad inicial de RNA para la generación de librerías. No se recomienda utilizar muestras que tengan un valor inferior al 30%.

Es importante tener en cuenta también que el coeficiente de variación de esta técnica es bastante elevado, tanto intra-chip como inter-chip, por lo que se puede considerar un método exacto pero menos preciso que otros como la absorbancia o las medidas basadas en fluorimetría:

Analytical specifications	RNA 6000 Nano Total RNA	RNA 6000 Pico Total RNA	Small RNA
Sizing range	-	-	6 – 150 nt
Sensitivity ¹	5 ng/μL in water	50 pg/μL in water 200 pg/μL in TE	50 pg/μL in water ²
Quantitative precision (within a chip)	10 % CV	20 % CV	25 % CV
Quantitative accuracy ²	±20 %	±30 %	-
Quantitative range	25 – 500 ng/μL	-	50 – 2,000 pg/μL of purified miRNA in water
Qualitative range	5 – 500 ng/μL	50 – 5,000 pg/μL in water	50 – 2,000 pg/μL of purified miRNA in water

Tabla 2. Especificaciones de los kits de ARN del Bioanalyzer 2100[®] de Agilent

3. FLUORIMETRÍA

Dentro de las técnicas de fluorimetría podemos destacar el Quant-iT PicoGreen[®] (ADN)/ Quant-iT Ribogreen[®] (ARN) y el Qubit[®].

- **Quant-iT PicoGreen[®]/Quant-iT RiboGreen[®] (Thermo Fisher):** permiten determinar la concentración de ácidos nucleicos (cadena doble y sencilla respectivamente) en función de la emisión de un fluoróforo que actúa como agente intercalante. La unión del fluoróforo es específica para el ácido nucleico a determinar, por lo que esta técnica permite una cuantificación muy exacta, sin interferencia de otras moléculas presentes (nucleótidos libres, proteínas....) como ocurre con la absorbancia.

Este método de cuantificación es mucho más sensible y preciso que las medidas basadas en absorbancia, por lo que se recomienda para detectar y cuantificar pequeñas cantidades de ADN/ARN, o bien cuando se necesita una cuantificación

	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE DIFERENTES TÉCNICAS	Código: VHIR-UAT-DOC-013	Revisión: 01
		Data de redacción: 01/04/2020	Página: 10 de 17

muy exacta y precisa, por ejemplo para preparación de librerías de ADNc, fragmentos de ADN purificados para subclonaje, determinar la concentración de ARN antes de realizar un Northern blot, RT-qPCR, etc.

- **Picogreen**®: es un fluorocromo que se une selectivamente al ADN de doble cadena y tiene características similares al SYBR-Green I. Tiene un máximo de excitación a 480 nm y un pico de emisión a 520 nm. Su fluorescencia cuando está unido al DNA es muy elevada, mientras que cuando está libre en solución prácticamente es inexistente (imagen 7A). El rango de cuantificación es lineal de 25 pg/ml a 1000 pg/ml. La linealidad se mantiene en presencia de contaminantes comunes en las preparaciones de ADN, como sales, urea, etanol, cloroformo, detergentes, proteínas y agarosa (imagen 7B). Se pueden generar dos curvas estándar, una para concentraciones altas (de 1 ng/ml a 1000 ng/ml), y otra para concentraciones bajas (de 25 pg/ml a 25 ng/ml), en función de la concentración problema esperada.

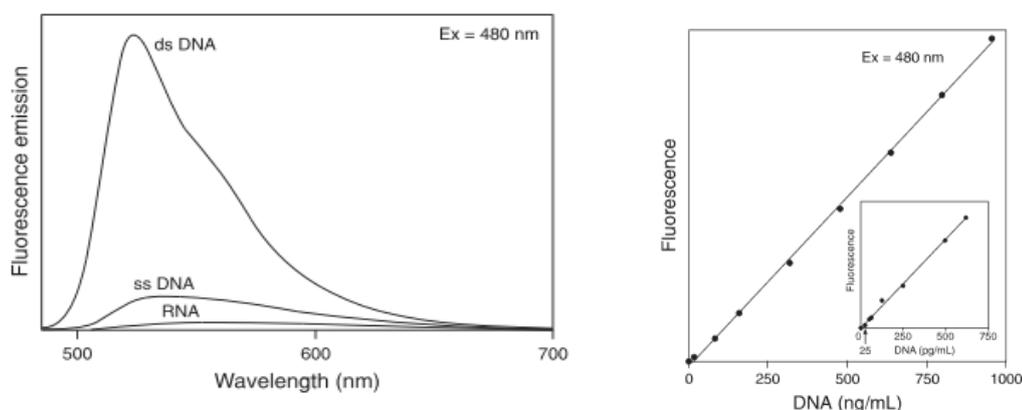


Imagen 8. (A) Espectro de emisión para muestras de ADN utilizando el Quant-iT Picogreen ADN, donde se observa la poca fluorescencia para ADN de cadena simple o ARN. (B) Rango dinámico y sensibilidad del ensayo.

- **Ribogreen**®: es un fluorocromo que se une selectivamente a los ácidos nucleicos de cadena sencilla, por lo que puede usarse para cuantificar ARN y ADN de cadena sencilla. Tiene un máximo de excitación a 500 nm y un pico de emisión a 525 nm. Como en el caso anterior, la emisión de fluorescencia es específica cuando el compuesto está unido al ácido nucleico, siendo muy baja en solución. El rango de cuantificación lineal es de 1 ng/ml a 1 µg/ml de

ARN, pudiendo utilizar dos rangos para la recta de cuantificación: el rango bajo permite cuantificar de 1 a 50 ng/ml, mientras que el rango alto permite cuantificar de 20 ng/ml a 1 µg/ml. La linealidad también se mantiene en presencia de los contaminantes anteriormente mencionados.

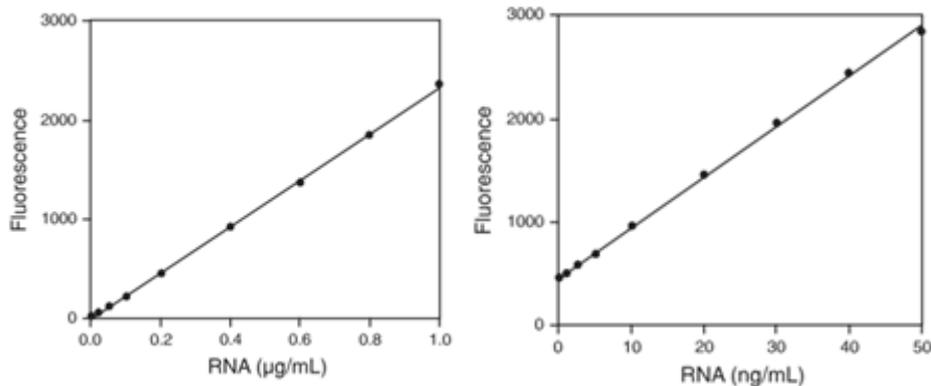


Imagen 9. Rango dinámico y sensibilidad del ensayo de Quant-iT RiboGreen RNA, para el rango bajo (izquierda) y rango alto (derecha).

Estos ensayos se hacen normalmente en placa, ya que requieren siempre hacer una recta patrón (en duplicado), además de las muestras problema (generalmente también en duplicado, como mínimo). Para la lectura se necesita un lector de fluorescencia en formato placa con los filtros adecuados de excitación y emisión.

- **Qubit®**: estos ensayos se basan en el mismo principio anterior, pero están adaptados a un fluorímetro especial (Qubit Fluorometer®) para automatizar el proceso.

A diferencia del Quant-it Picogreen/Ribogreen no se necesita hacer una recta patrón, sino que el propio aparato calcula la concentración e integridad utilizando dos estándares y un algoritmo matemático, lo que minimiza el error introducido por el pipeteo.

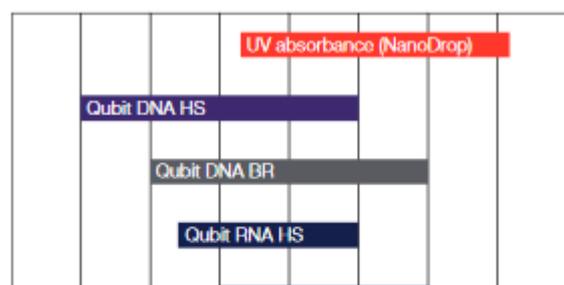


Imagen 10. Fluorímetro para realizar los ensayos Qubit y rangos cuantificables que comparan kits de análisis de ARN (Qubit) con absorbancia UV (NanoDrop)

Existen diferentes kits **para el análisis de ADN y ARN**, incluyendo kits de rango amplio (BR) y de alta sensibilidad (HS):

Kit	Sample starting concentration range
Qubit dsDNA HS assay	10 pg/μL–100 ng/μL
Qubit dsDNA BR assay	100 pg/μL–1,000 ng/μL
Qubit ssDNA assay	50 pg/μL–200 ng/μL
Qubit RNA assay	250 pg/μL–100 ng/μL
Qubit RNA BR assay	1 ng/μL–1,000 ng/μL
Qubit RNA XR assay	1 ng/μL–8 μg/μL
Qubit protein assay	12.5 μg/mL–5 mg/μL

Tabla 3. Diferentes kits de ensayo para el Qubit

Si se compara el PicoGreen dsDNA assay con los resultados obtenidos con los kits del Qubit, se observa que los valores del Qubit en el rango de concentraciones más bajas son más precisos, puesto que en el PicoGreen dependen de la curva generada manualmente por el usuario en el momento de la medida y en el Qubit se emplean algoritmos (puede mejorarse utilizando el rango bajo de concentraciones de la recta estándar del Picogreen).

4. PCR CUANTITATIVA (O A TIEMPO REAL)

La **PCR cuantitativa** es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente **cuantificar** de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN. Por lo tanto, los datos se recopilan durante el proceso de la PCR, en lugar de al finalizar ésta.

	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE DIFERENTES TÉCNICAS	Código: VHIR-UAT-DOC-013	Revisión: 01
		Data de redacción: 01/04/2020	Página: 13 de 17

Los termocicladores miden la acumulación de producto de ADN después de cada ronda de amplificación por PCR utilizando *reporters* fluorescentes. Hay dos tipos de composiciones químicas para detectar productos de PCR, el SYBR® green o sondas TaqMan®.

Los datos primarios de un experimento de PCR en tiempo real son una curva de amplificación, que muestra la señal fluorescente en unidades fluorescentes relativas (RFU) frente al número de ciclo y registra la acumulación del producto amplificado. La línea de base se mide de forma temprana en el proceso de amplificación antes de que el instrumento pueda detectar la formación del producto. A medida que el producto se acumula, llega a un punto en el que el instrumento puede detectar el cambio en la señal por encima del nivel de fondo: esta es la porción exponencial de la curva.

El umbral de detección es el nivel de fluorescencia donde la acumulación de producto se puede distinguir del fondo. Este umbral se establece automáticamente por encima de la línea de base, dentro de la región exponencial de la curva de amplificación. El número de ciclo donde el producto de amplificación cruza ese umbral de detección es el ciclo de cuantificación (Ct o Cq).

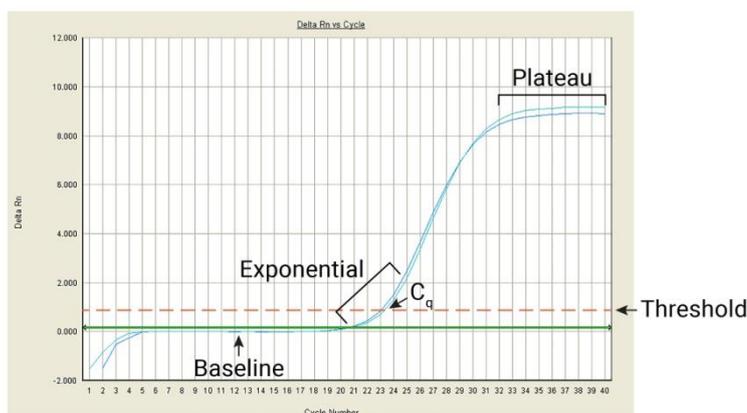


Imagen 11. Gráfico de amplificación de una PCR a tiempo real, mostrando la relación entre la línea base, umbral de detección y ciclo de cuantificación (Cq)

Una muestra de concentración desconocida se puede estimar a partir de su número de Cq cuando lo comparamos con los Cq de una curva estándar de concentración conocida.

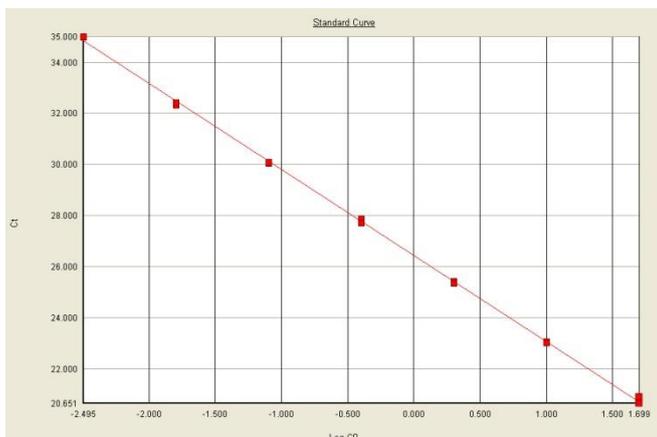


Imagen 12. Curva estándar para un experimento de PCR a tiempo real. Los valores de C_q de los estándares se representan gráficamente frente a su concentración correspondiente. Los valores de C_q de cualquier muestra desconocida se pueden interpolar a partir de esta curva mediante regresión lineal.

Esta técnica tiene un límite de detección muy bajo (picogramos). Se considera el “gold-standard” por su elevada sensibilidad, especificidad y precisión. Dado que los cebadores o sondas se diseñan frente a regiones específicas del DNA, esta técnica es altamente específica, ya que sólo mide aquellas moléculas que son amplificables, pero no ADN degradado ni nucleótidos libres que, por tanto, no contribuirán a la estimación de la concentración.

Por otro lado, esta técnica requiere instrumentación más costosa y consume más tiempo (ya que a menudo requiere optimización). Es especialmente útil para cuantificación de librerías generadas para NGS, donde la normalización es un paso esencial para conseguir una cobertura de secuenciación apropiada cuando se hace multiplexado.

5. RESUMEN DE LAS VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LAS DIFERENTES TÉCNICAS:

MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Spectrofotometría: NanoDrop ND-1000® Spectrophotometer (Thermo Fisher)	Medida rápida de la concentración (límite de detección de 2ng/ul), absoluta, independiente de estándares	Medida poco específica: la cuantificación está basada en la medida de absorbancia a 260nm de todos los nucleótidos (ya sea ADN degradado, ADN monocatenario, oligonucleótidos, ARN)
	Determinación de la pureza y detección de posibles contaminantes a través de las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230.	No discrimina entre ARN y ADN
	Poca cantidad de muestra (volumen de 1ul)	No proporciona información sobre la integridad
	Buena precisión (CV +/- 2% a conc>100 ng/ul) No requiere utilizar reactivos extras (barato)	Baja sensibilidad (concentración poco fiable por debajo de 10ng/ul)
Electroforesis microfluidica: Bioanalyzer 2100® (Agilent)	Alta sensibilidad, límite de detección bajo: 50 pg/ul (ARN) o 100 pg/ul (ADN)	No da información sobre la pureza
	ARN: valoración de la integridad mediante el valor del RIN (RIN 10 muestra de muy buena calidad, RIN 1 muestra muy degradada). El RIN es reproducible entre muestras analizadas en diferentes días.	ARN: cuantificación con CV alto, tanto dentro de un chip como inter-chip (depende del tipo de chip)
	ADN: permite conocer el tamaño y la distribución de los fragmentos	
	Requiere poca cantidad de muestra (volumen de 1 µl) Rápido (30 minutos el "run" de 11 o 12 muestras)	Se requiere equipamiento y reactivos específicos
Fluorimetría: Quant-iT PicoGreen® ADN /Quant-iT RiboGreen® ARN (Thermo Fisher)	Alta sensibilidad: determinación de concentraciones muy bajas de ADN (25pg/ml) y de ARN (1ng/ml) . .	Metodología más compleja, es necesario realizar una recta patrón con un ADN íntegro estándar o un ARN ribosomal estándar de concentración conocida, se necesita trabajar de manera precisa
	Alta especificidad (unión solamente a cadenas íntegras, distingue entre cadena sencilla y doble)	No aporta información sobre la pureza
	Linealidad en un rango amplio de concentraciones, utilizando dos curvas estándar según la concentración esperada. La linealidad se mantiene incluso en presencia de contaminantes (nucleótidos, sales, proteínas, detergentes, cloroformo, etanol...)	Requiere disponer de los reactivos y de un fluorímetro con los filtros adecuados.
	Requiere poca cantidad de muestra (volumen de 1 µl) Rápido, permite analizar muchas muestras por ensayo (placas)	
Fluorimetría: Qubit® (Thermo Fisher)	Alta sensibilidad, determina concentraciones muy bajas de ADN (10 pg/ul) y de ARN (250 pg/ul).	No aporta información sobre la pureza
	En general, mismas ventajas que el PicoGreen/Ribogreen	Pocas muestras por ensayo (<20)
	Permite analizar una muestra cada vez. No requiere una curva estándar para la cuantificación (se basa en un algoritmo)	Requiere disponer del fluorímetro y de kits específicos.
	Disminución de la variabilidad introducida por la generación manual de la curva estándar. Más reproducible que Pico/Ribogreen a concentraciones bajas.	
PCR cuantitativa	Muy sensible (detección de picogramos)	Requiere una recta patrón (calibración con estándares)
	Muy específica (diseño de cebadores)	Requiere reactivos costosos e instrumentación avanzada
	Medida de calidad: sólo detecta muestras amplificables (no muestras degradadas)	Compleja, generalmente requiere optimización
	Posibilidad de multiplexar para detectar diferentes secuencias en una sola reacción	La PCR es sensible a la presencia de contaminantes en la muestra

Tabla 4. Ventajas e inconvenientes de las diferentes técnicas para el análisis de los ácidos nucleicos

	CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE DIFERENTES TÉCNICAS	Código: VHIR-UAT-DOC-013	Revisión: 01
		Data de redacción: 01/04/2020	Página: 16 de 17

6. CONCLUSIONES:

- Cada técnica de análisis se basa en unos principios físico/químicos diferentes, por lo que el resultado obtenido si se mide la misma muestra utilizando varias técnicas probablemente no será el mismo.
- Como **los resultados entre diferentes técnicas habitualmente no son comparables**, es importante seleccionar la técnica más apropiada en función de sus características (selectividad, especificidad, exactitud, precisión, linealidad, información sobre integridad o pureza) y de los requerimientos de cada ensayo “downstream”. Puede estar indicado utilizar más de una técnica, ya que aportan datos que son complementarios.
- Por este mismo motivo, **si se quieren comparar resultados de diferentes cuantificaciones, es importante utilizar siempre el mismo método**, conociendo sus ventajas y limitaciones.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Website Thermo Scientific: Manual NanoDrop® 1000 Spectrophotometer:
<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf>
- Website Thermo Scientific: Qubit® Assays:
<https://www.thermofisher.com/es/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit.html?SID=fr-qubit-main>
- Website Agilent: Datasheet de los kits del Bioanalyzer 2100® Agilent:
<https://www.agilent.com/en/product/automated-electrophoresis/bioanalyzer-systems>
- Website Thermo Scientific: Quant-it Picogreen® dsDNA Assay kit / Quant-it Ribogreen® RNA Assay kit:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P7589?SID=srch-srp-P7589#/P7589?SID=srch-srp-P7589>
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R11491?SID=srch-srp-R11491#/R11491?SID=srch-srp-R11491>
- PDF de Banco Nacional de ADN Carlos III/ Universidad de Salamanca. Dra. Rosa María pinto Labajo dentro del VI Congreso Red Nacional de Biobancos:
<http://www.vhir.org/portal1/QC%20of%20nucleic%20acids.pdf>
- <https://www.promega.es/resources/pubhub/choosing-the-right-method-for-nucleic-acid-quantitation/>
- Analysis of DNA fragments using the Agilent 2100 Bioanalyzer:

 <p>Vall d'Hebron Institut de Recerca</p>	<p>CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE DIFERENTES TÉCNICAS</p>	<p>Código: VHIR-UAT-DOC-013</p>	<p>Revisión: 01</p>
		<p>Data de redacción: 01/04/2020</p>	<p>Página: 17 de 17</p>

<https://covaris.com/wp-content/uploads/M020039.pdf>

- Comparison of Quant-iT and Qubit DNA quantitation assays for accuracy and precision:

<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/comparison-quantit-qubit-dna-quantitation-app-note.pdf>

- Comparison of fluorescence-based quantitation with UV absorbance measurements:

<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/fluorescence-UV-quantitation-comparison-tech-note.pdf>