

Modulo 3

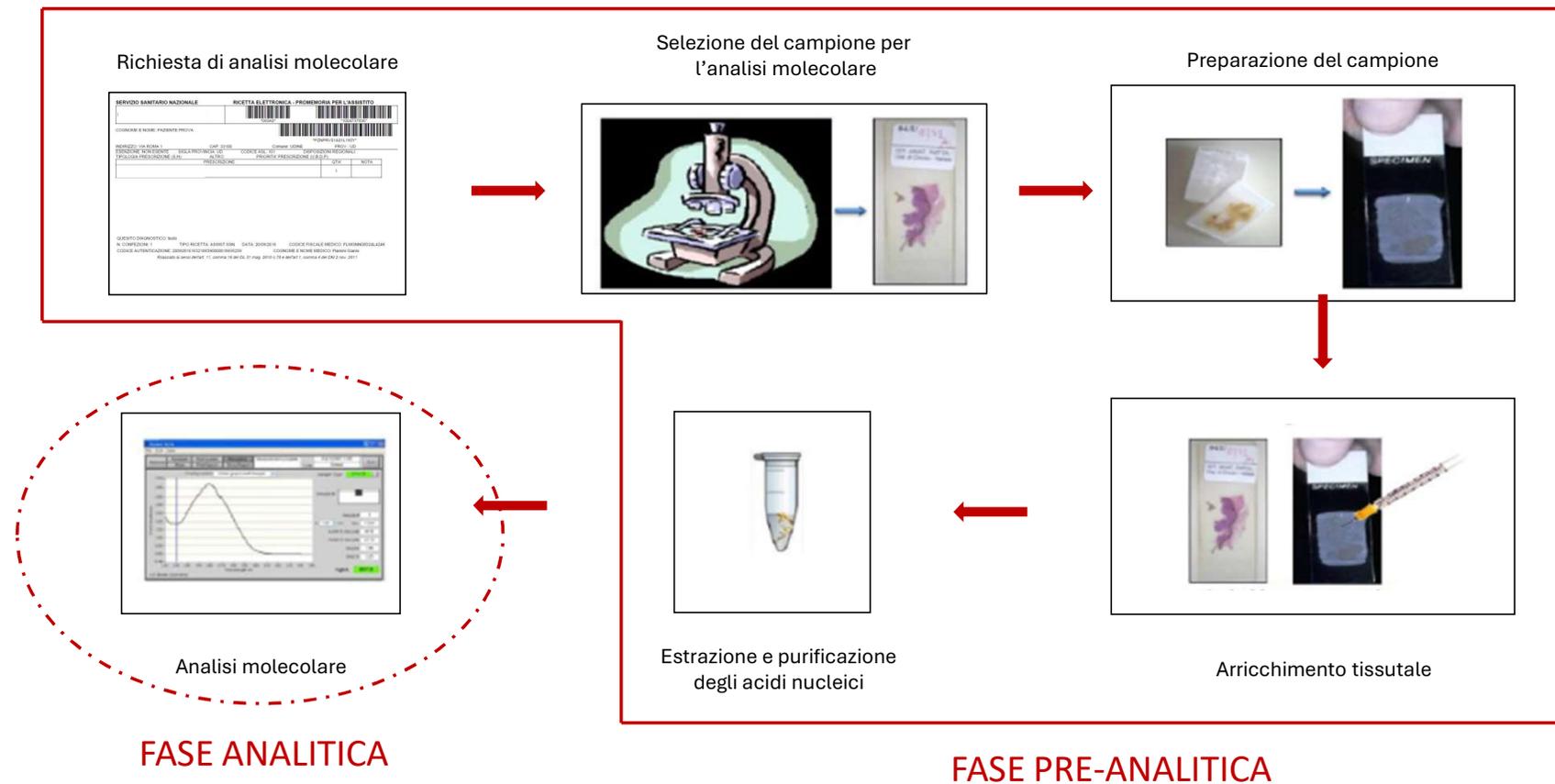
IL LABORATORIO DI DIAGNOSTICA MOLECOLARE

Il laboratorio di diagnostica molecolare in anatomia patologica:
il flusso di lavoro

Il laboratorio di diagnostica molecolare

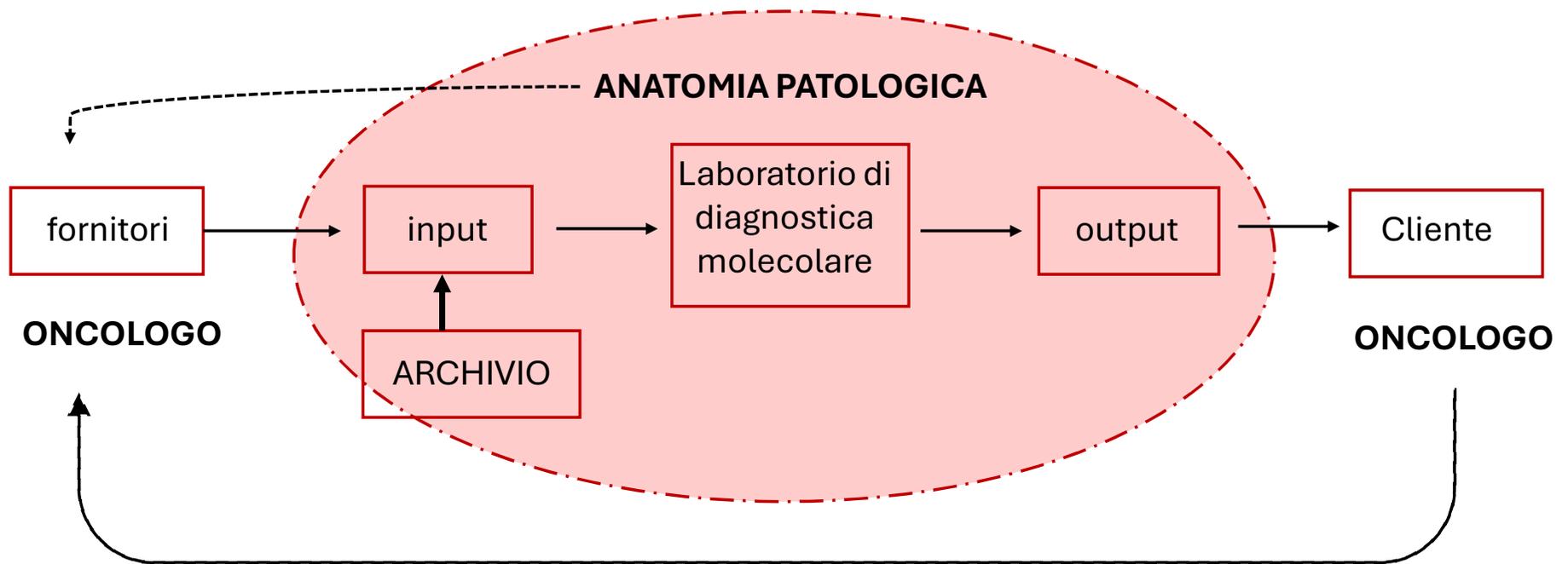
IL FLUSSO DI LAVORO

Nel laboratorio di diagnostica molecolare possiamo distinguere una **FASE PRE-ANALITICA** e una **FASE ANALITICA**



Il laboratorio di diagnostica molecolare

Il laboratorio di **diagnostica molecolare** è parte integrante della comunità biomedica a cui afferisce.



La fase pre-analitica

1. Richiesta dell'esame molecolare

La fase pre-analitica ha inizio con la richiesta dell'esame molecolare.

FORNITORE:

1. ONCOLOGO, che intende trattare il paziente oncologico con una terapia farmacologica mirata;
2. GRUPPO MULTIDISCIPLINARE (GOM oppure MTB)
3. ANATOMO PATOLOGO (**reflex testing**), che avvia la procedura dell'esame molecolare al momento della diagnosi di patologie neoplastiche in fase avanzata di malattia

Una buona **comunicazione** tra gli oncologi, i patologi ed il laboratorio molecolare è fondamentale per ottenere esami appropriati in tempi rapidi. → rilevante nel caso di piccole biopsie o di campioni citologici, soprattutto quando vi è necessità di eseguire molteplici analisi (analisi di più geni, o determinazioni diverse) clinicamente rilevanti.

La fase pre-analitica

1. Richiesta dell'esame molecolare

La fase **pre-analitica** ha inizio con la richiesta dell'esame molecolare.

Richiesta di esame molecolare

- informazioni cliniche pertinenti
- il referto patologico
- soprattutto nel caso di ribiopsie, l'indicazione di precedenti trattamenti chemioterapici
- Indicazioni dell'INPUT (dove deve essere eseguita l'analisi)

La fase pre-analitica

1. Richiesta dell'esame molecolare

La fase pre-analitica ha inizio con la richiesta dell'esame molecolare.

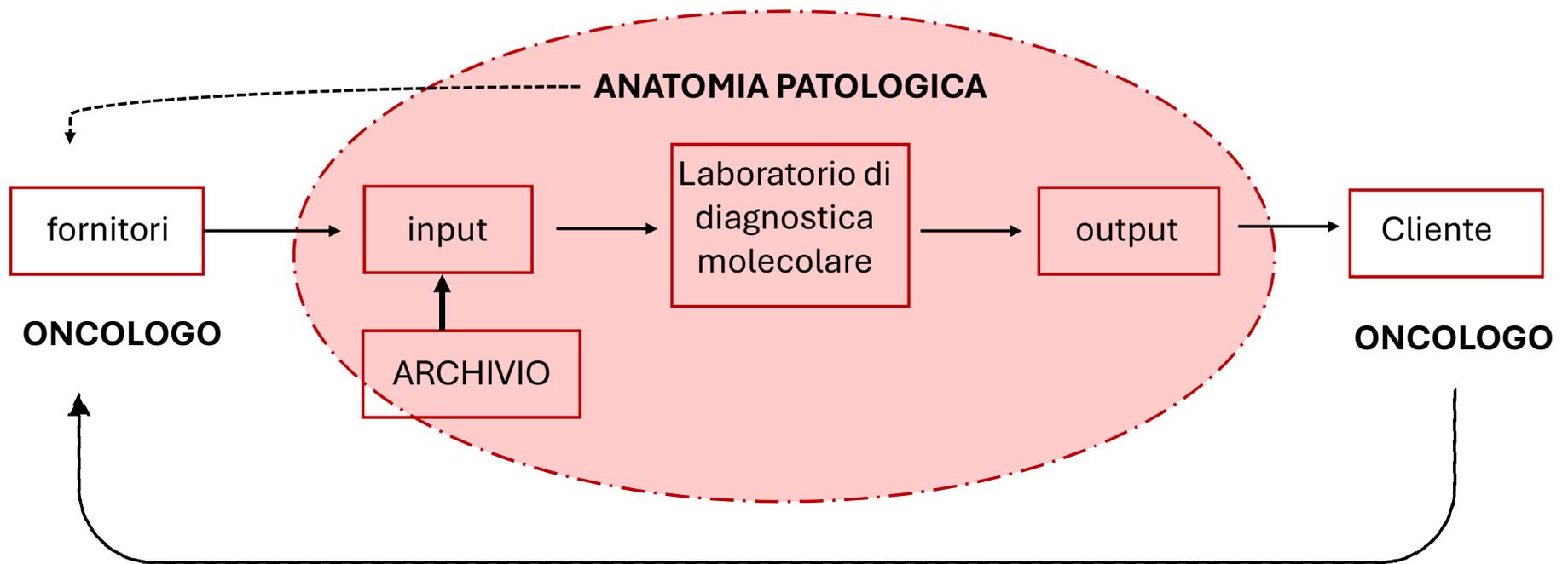
Una buona comunicazione tra gli oncologi, i patologi ed il laboratorio molecolare è fondamentale per ottenere esami appropriati in tempi rapidi. → rilevante nel caso di piccole biopsie o di campioni citologici, soprattutto quando vi è necessità di eseguire molteplici analisi clinicamente rilevanti.

Esempi di molteplici analisi

- NSCLC in stadio avanzato:
valutazione dello status mutazionale dei geni *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *ERBB2*, *ALK*, *ROS*, *RET*, *MET* + IHC PD-L1
- Neoplasia cerebrale:
valutazione dello status mutazionale del promotore del gene *TERT* + status di metilazione del promotore del gene *MGMT*
- Adenocarcinomi dell'intestino con alterazioni delle proteine del MMR
valutazione dello status mutazionale del gene *BRAF* + status mutazione di metilazione del promotore del gene *MLH1*

Il laboratorio di diagnostica molecolare

Il laboratorio di **diagnostica molecolare** è parte integrante della comunità biomedica a cui afferisce.



La fase pre-analitica

2. Valutazione della adeguatezza del campione

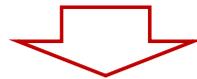
Il patologo ha il compito di valutazione dell'ADEGUATEZZA DEL CAMPIONE e stabilire la QUALITA' e il contenuto tumorale (% TUMORALE).

PERCHE'? A COSA SERVE?

1. Il patologo effettua la SELEZIONE DELL'AREA TUMORALE (o delle aree tumorali più ricche in cellule neoplastiche), dando indicazioni per una eventuale successiva **MACRODISSEZIONE manuale**, che sarà eseguita da parte di un tecnico esperto



arricchimento della componente tumorale



ridurre eventuali risultati sia falsi-negativi

La fase pre-analitica

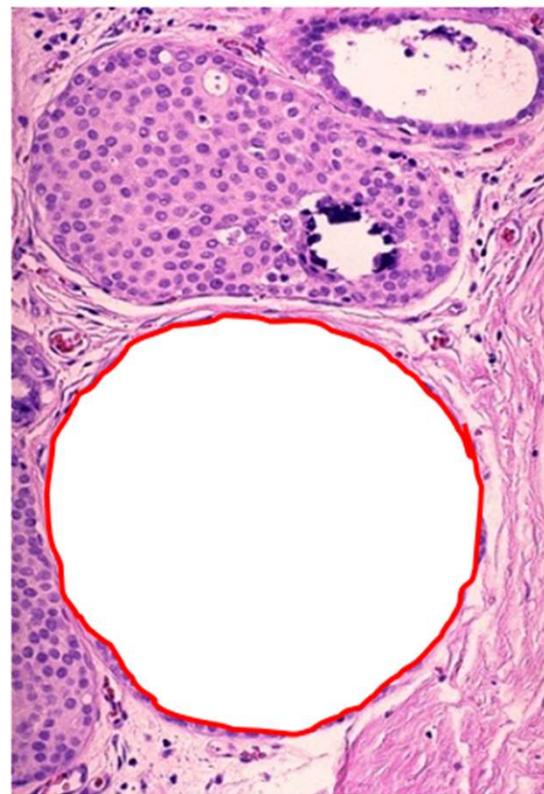
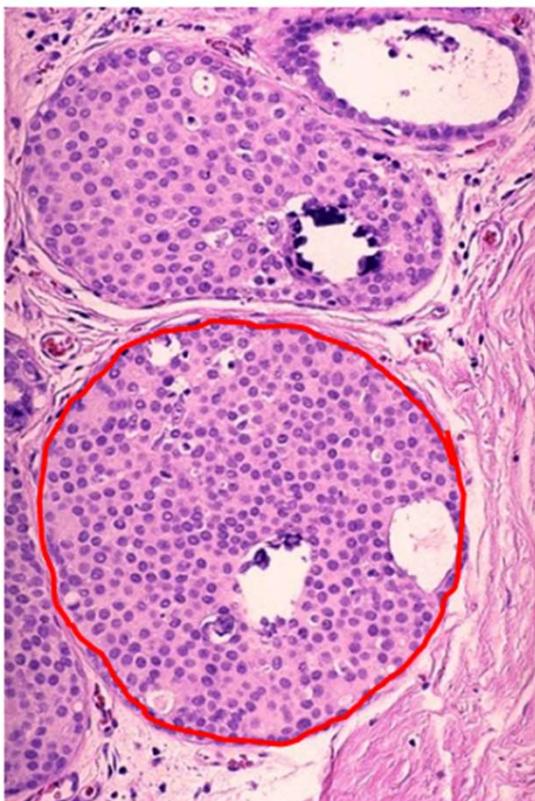
2. Valutazione della adeguatezza del campione

VALUTAZIONE dell'adeguatezza del campione e **SELEZIONE** dell'area tumorale per la successiva eventuale **MACRODISEZIONE** manuale



La fase pre-analitica

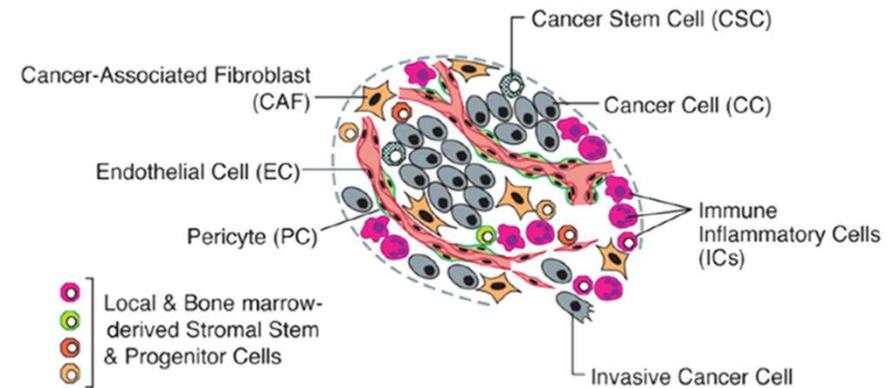
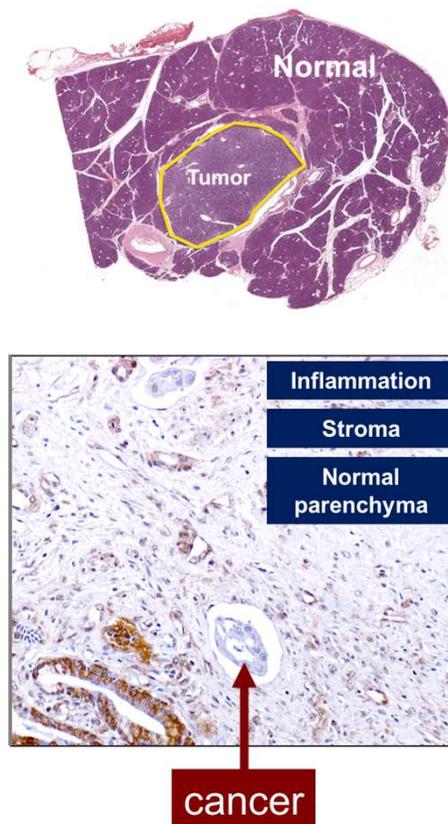
2. Valutazione della adeguatezza del campione



La fase pre-analitica

2. Valutazione della adeguatezza del campione

Il tumore è un tessuto eterogeno

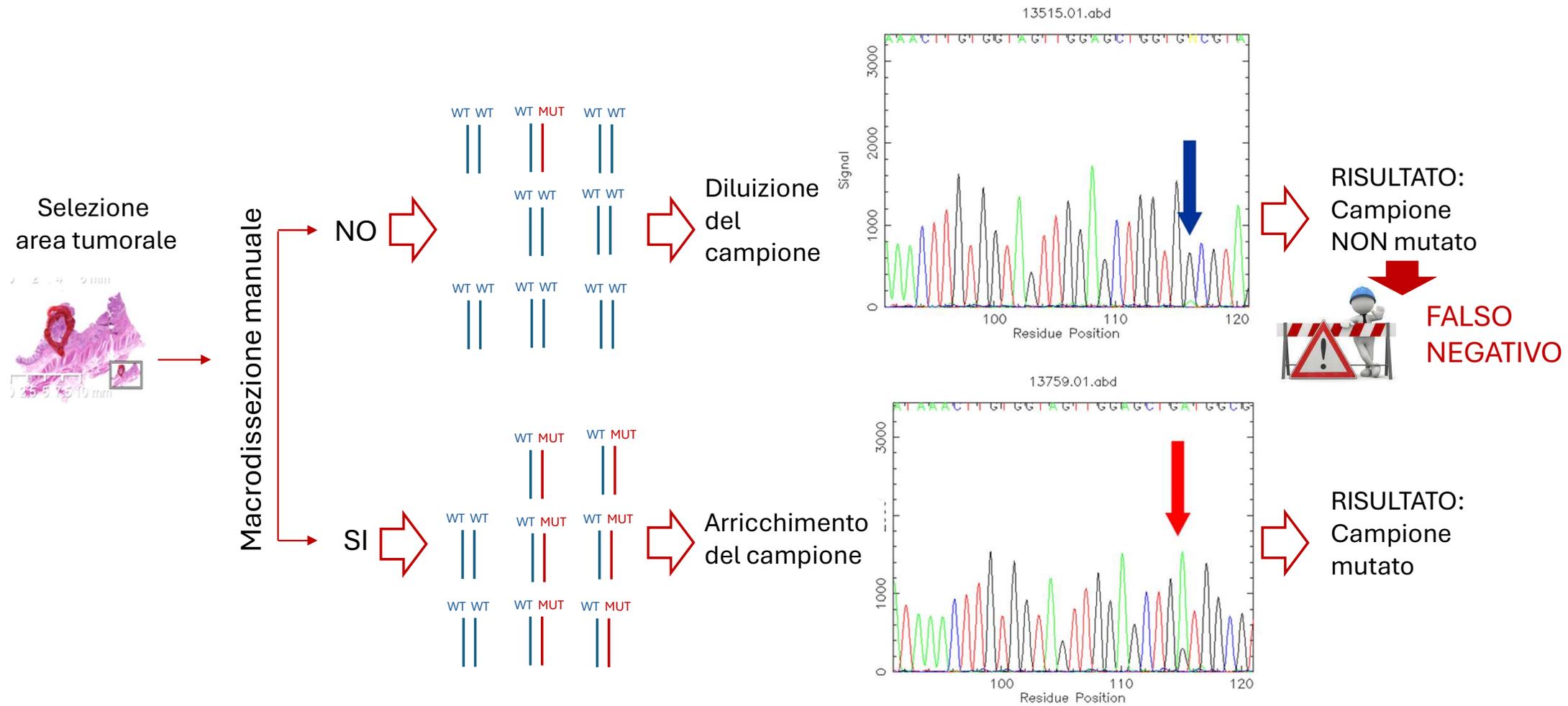


STROMA: tessuto che sostiene il tumore

- vasi sanguigni (cellule endoteliali: EC)
- cellule del sistema immunitario
- Cellule infiammatorie (granulociti, monociti, macrofagi)
- cellule connettivali (es. fibroblasti: CAF);
- matrice extracellulare del tumore (ECM)

La fase pre-analitica

2. Valutazione della adeguatezza del campione



La fase pre-analitica

2. Valutazione della adeguatezza del campione

Il patologo effettua la SELEZIONE DELL'AREA TUMORALE (o delle aree tumorali più ricche in cellule neoplastiche), dando indicazioni per una eventuale successiva **MACRODISSEZIONE manuale**, che sarà eseguita da parte di un tecnico esperto



arricchimento della componente tumorale



Ridurre problemi da amplificazione
(dovuti ad esempio alla presenza di mucina,
melanina o altri inibitori)

Take home message



- ✓ Consente l'arricchimento con tessuto tumorale
- ✓ **La mancata selezione può portare a falsi negativi!**
- ✓ Evitare l'invio delle sezioni in eppendorf!



La fase pre-analitica

2. Valutazione della adeguatezza del campione

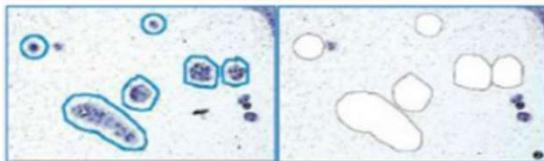
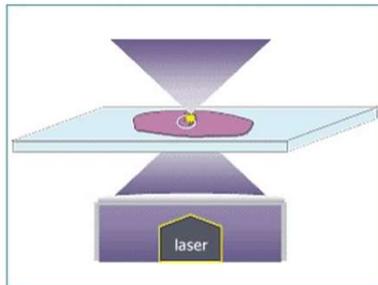
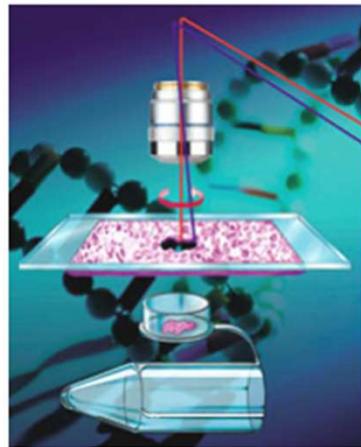
Macrodissezione manuale: Permette di arricchire notevolmente il campione di cellule tumorali e di raggiungere, nella maggior parte dei casi, la percentuale di cellule neoplastiche richiesta per le principali metodiche attualmente impiegate in biologia molecolare.

Carotaggio: non comune, richiede un'apparecchiatura per allestimento di tissue microarray (TMA) e consiste nel "carotare" l'area identificata del tumore, dalla relativa inclusione in paraffina, dopo selezione effettuata su specifica sezione colorata con EE. Questa procedura consente di ottenere, per un carotaggio del diametro di 1 mm, un quantitativo di DNA congruo per le indagini molecolari.

Microdissezione laser: utilizzata in ambito di ricerca scientifica, offre potenzialmente il vantaggio di poter selezionare in modo mirato singole cellule tumorali in campioni poco rappresentativi e/o molto eterogenei. Nel contesto clinico-diagnostico tale metodica ha scarsa applicazione.

La fase pre-analitica

2. Valutazione della adeguatezza del campione



Microdissezione laser

VANTAGGI

- selezione in modo mirato di singole cellule tumorali in campioni poco rappresentativi e/o molto eterogenei

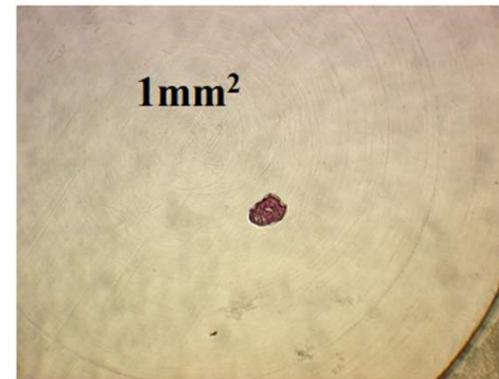
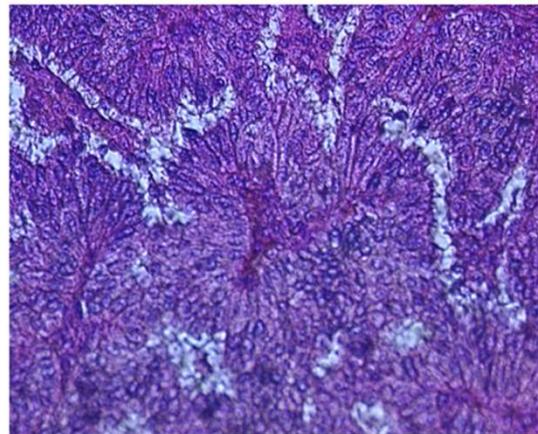
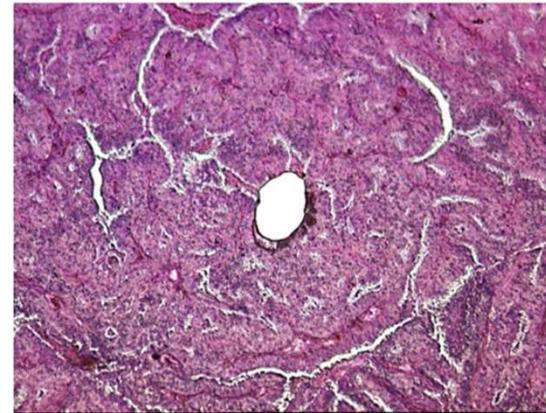
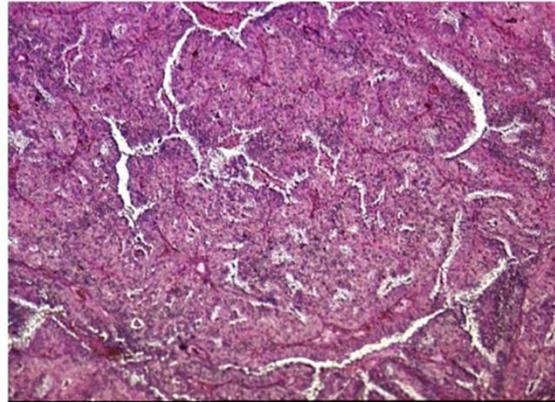
SVANTAGGI

- costi elevati della strumentazione
- lunghi tempi di esecuzione
- necessità di personale altamente qualificato
- insorgenza di artefatti conseguenti alla scarsa quantità e alla qualità sub-ottimale del DNA estratto

La fase pre-analitica

2. Valutazione della adeguatezza del campione

Microdissezione laser



La fase pre-analitica

2. Valutazione della adeguatezza del campione

Il patologo ha il compito di Valutazione dell'adeguatezza del campione e stabilire la QUALITA' e il contenuto tumorale (% TUMORALE).

PERCHE'? A COSA SERVE?

2. La **percentuale di cellule neoplastiche** recuperata per l'analisi deve essere conforme alla **sensibilità** della tecnica adoperata.



La valutazione microscopica della percentuale di cellule neoplastiche è relativamente riproducibile, e la selezione può essere entro certi limiti operatore dipendente.

le tecnologie più sensibili (come quelle basate su real time PCR, spettrometria di massa, sequenziamento di nuova generazione), devono essere impiegate qualora la percentuale di cellule neoplastiche sia dubbia o limitata.

La fase pre-analitica

2. Valutazione della adeguatezza del campione

COME SI ESEGUE LA MACRODISEZIONE MANUALE?

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1. Raccogliere 5 sezioni di 10 micron su vetrini porta-oggetto NON POLARIZZATO in acqua distillata.
2. Essiccare le sezioni sul vetrino a temperatura ambiente.
3. Selezionare l'area tissutale prescelta da analizzare (anatomopatologo)
4. Confrontare le sezioni “in bianco” adese al vetrino con l'area selezionata in EE ed opportunamente “dissezionare” l'area stessa (ovvero distaccate dal vetrino portaoggetto) con la lama da bisturi.
5. Raccogliere il tessuto dissezionato in un tubo Eppendorf, sottoposto a deparaffinizzazione in appropriato solvente, prima di procedere con l'estrazione.

La fase pre-analitica

2. Valutazione della adeguatezza del campione

COME SI ESEGUE LA MACRODISEZIONE MANUALE?

- ✓ **CAMPIONI ISTOLOGICI:** eseguire la microdissezione dell'area neoplastica con l'ausilio di **strumenti monouso** (bisturi o aghi) utilizzando come guida la sezione in ematossilina ed eosina adoperata per la valutazione della cellularità neoplastica. → si consiglia di riportare l'area selezionata sul retro del vetrino con un pennarello
- ✓ **CAMPIONI CITOLOGICI,** che giungono allestiti nel laboratorio di Patologia Molecolare: una delle fasi critiche è rappresentata dalla rimozione del vetrino coprioggetto → si consiglia di riportare con una **smerigliatrice sul retro** del vetrino l'area selezionata, prima di immergere il campione in una soluzione di **xilolo** (tempo medio di 2 giorni).



La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici

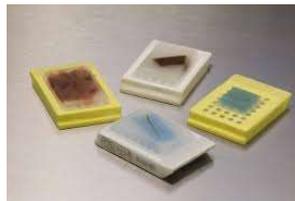
L'**ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI** rappresenta il momento conclusivo della fase pre – analitica.

Gli acidi nucleici possono idealmente essere estratti da qualsiasi tessuto e cellula nucleata

Da materiale fresco e/o congelato
(es. agoaspirati, prodotti e di esfoliazione-
pap-test)



Da materiale fissato in formalina e
incluso in paraffina-FFPE



Altro (sangue, plasma, capelli,
frammenti di tessuto, etc)



La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici

IL DNA

- ✓ Molecola molto lunga soggetta a frammentazioni
- ✓ Difficile da estrarre in forma intatta
- ✓ Frammenti di 50-100 kb sono ottimali per estrarre tutte le indagini di biologia molecolare
- ✓ Da materiale FFPE il DNA si presenta a molto degradato ed è consigliato amplificare al massimo frammenti di 300 bp

Fresco

-  Minore frammentazione
-  Difficoltà di selezione area
-  Conservazione

FFPE

-  Selezione area più precisa
-  Facilità di conservazione
-  Maggiore frammentazione
-  Deamminazione

La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici

MATERIALE DI PARTENZA



Formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks



Unstained tissue sections



Cytological samples



Hematoxylin-eosin-stained slides



Immunohistochemistry-stained slides

Stained glass slides

La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici (DNA/RNA) da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina

FASI DI LAVORO

1. Taglio di fette in bianco dello spessore di 10 mm
 - 10 fette da biopsia,
 - 3-4 fette da pezzo operatorio
 2. Sparaffinatura/digestione ON con tampone di lisi + proteinasi k
-
1. Isolamento del DNA
 2. Valutazione quantitativa e qualitativa del materiale estratto e conservazione

La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici (DNA/RNA) da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina

METODI DI ESTRAZIONE

L'estrazione di acidi nucleici è il primo passo nelle applicazioni di biologia molecolare.

Esistono numerosi metodi di estrazione, e la scelta si effettua in base a:

- tipo di acido nucleico (ssDNA, dsDNA, RNA totale, DNA e RNA)
- materiale di partenza (pezzo operatorio, piccola biopsia, sangue, etc.)
- risultato desiderato (quantità, purezza, tempo richiesto/a disposizione)
- applicazione prevista post-estrazione (digestione con enzimi di restrizione, Southern blotting, PCR, clonaggio)

La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici (DNA/RNA) da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina

METODI DI ESTRAZIONE

L'estrazione di acidi nucleici è il primo passo nelle applicazioni di biologia molecolare.

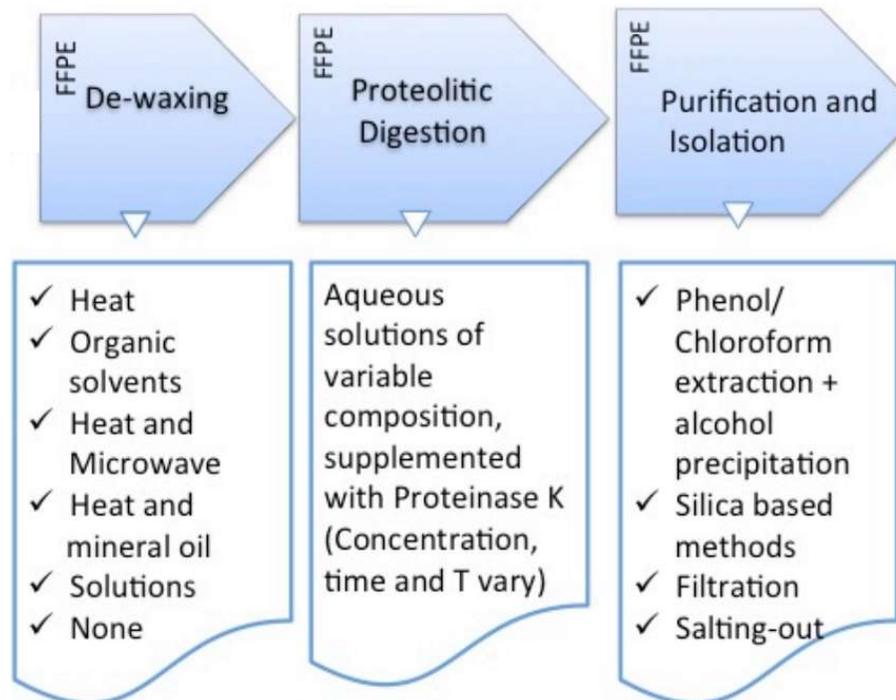
Esistono numerosi metodi di estrazione:

1. Procedure basate sull'uso di **solventi chimici** quali fenolo e cloroformio (miscela fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1) → tradizionalmente utilizzate nei laboratori di ricerca, mal si adattano ai campioni della routine diagnostica anatomo-patologica.
2. Sistemi commerciali basati su colonnine **a setto poroso** per esclusione o **a separazione magnetica su biglie metalliche** → consentono di recuperare acidi nucleici di qualità adeguata alle indagini molecolari;
3. Sistemi **automatizzati** di estrazione → consentono in laboratori ad alta processività di standardizzare la procedura e minimizzare il rischio di contaminazioni.

La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici (DNA/RNA) da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina

STEP CONDIVISI



La paraffina è sciolta
in xylene o
deparaffinante
commerciale

La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici (DNA/RNA) da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina

DIGESTIONE PROTEOLITICA – PROTEINASI K

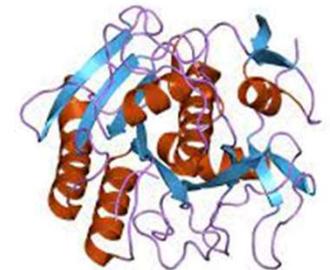
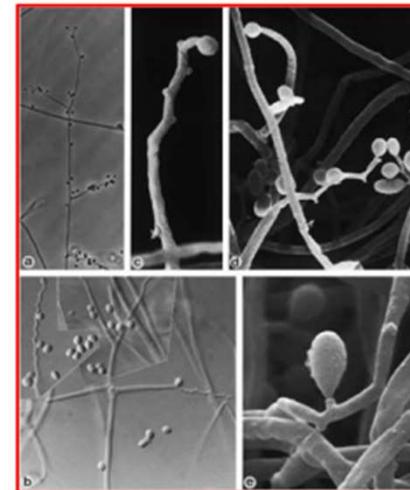
La digestione proteolitica si esegue con **proteinas K** per eliminare i **cross-legami** e consentire la solubilizzazione del DNA. La proteinasi K ha la specifica funzione di **digerire le proteine**.

La Proteinasi K è una proteasi isolata da un fungo *Tritirachium album* adatta per digestioni che avvengono in tempi brevi. Possiede un'alta attività, che aumenta ed è **stabile all'aumentare della temperatura**. Un incremento della temperatura da 37°C a 50–60°C può aumentare l'attività dell'enzima.

Digestione con Proteinasi K a 55°C (almeno ON):

- 50 mM Tris HCl pH 8,
- 1 mM EDTA,
- 0.5% Tween 20,
- Proteinasi K **1 mg/ml** finale

L'enzima fu scoperto nel 1974



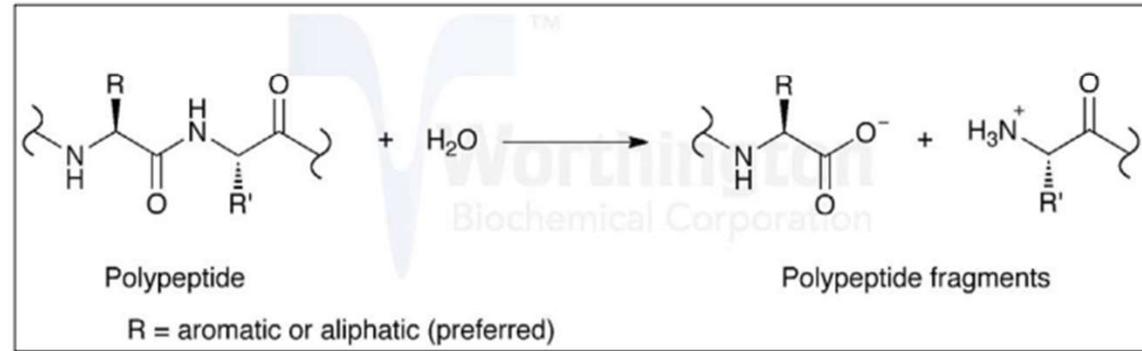
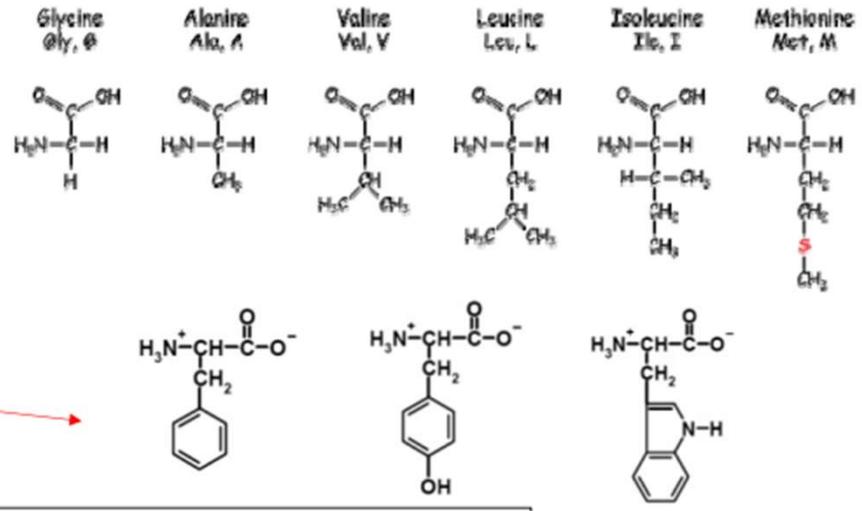
La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici (DNA/RNA) da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina

DIGESTIONE PROTEOLITICA – PROTEINASI K

È comunemente usato per la ampia specificità.
Il sito predominante di taglio è il legame peptidico adiacente:

- il gruppo alifatico carbossilico di....
- e aminoacidi aromatici (fenilalanina; tirosina; triptofano) con gruppi alfa-amminici boccati

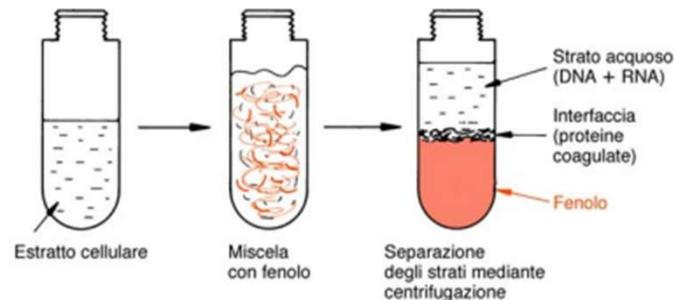


La fase pre-analitica

3. Estrazione del DNA da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina

Estrazione di DNA mediante Fenolo/Cloroformio

Questa procedura permette di separare una **componente organica** (inferiore) **contenente proteine**, da una **fase acquosa** (superiore) **contenente gli acidi nucleici**. All'interfaccia, le proteine denaturate e in parte dissolte dal fenolo, formano uno strato bianco.



- L'RNA viene eliminato mediante trattamento con RNasi.
- Il **DNA viene precipitato in etanolo assoluto** in presenza di sali: tale precipitazione in presenza di concentrazioni relativamente alte di ioni monovalenti (NaCl 100-500 mM) è indispensabile per concentrare le soluzioni di DNA ed eliminare i residui di Fenolo e Cloroformio.
- Segue un breve lavaggio in etanolo al 70% che permette di rimuovere gran parte dei cationi monovalenti che possono interferire nell'attività di enzimi utilizzati nelle successive analisi molecolari.

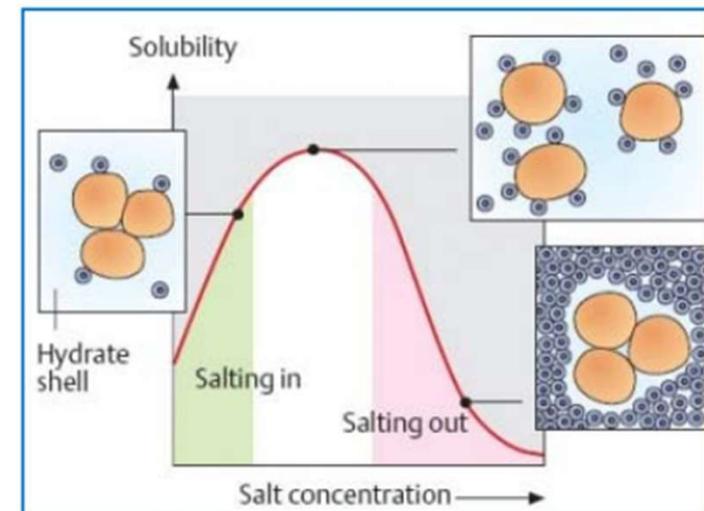
La fase pre-analitica

3. Estrazione del DNA da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina

Estrazione di DNA mediante Salting Out

Questo metodo prevede l'estrarre gli acidi nucleici e la **rimozione delle proteine** presenti mediante **precipitazione con i sali**. La precipitazione delle proteine mediante "salting out" sfrutta il principio secondo il quale la solubilità delle proteine in soluzione dipende dalle loro caratteristiche chimico-fisiche, dalla temperatura, dal pH e dalla concentrazioni salina (o forza ionica). A basse concentrazioni di sali, la solubilità delle proteine aumenta lentamente (salting in), mentre ad **alte concentrazioni di sali**, la **solubilità delle proteine diminuisce** bruscamente (salting out) causando la precipitazione delle stesse. Infine, mediante trattamento con etanolo si ottiene la precipitazione del DNA.

PRINCIPIO DEL "SALTING OUT". La solubilità delle proteine dipende fortemente dalla concentrazione salina (forza ionica) della soluzione. Esse sono scarsamente solubili nell'acqua pura e la loro solubilità aumenta man mano che si instaurano delle interazioni tra gli ioni e la superficie delle proteine (salting in). **Ad elevate concentrazioni di sali**, a causa delle interazioni tra gli ioni salini e l'acqua diminuisce l'idratazione sulla superficie delle proteine, portando alla loro **aggregazione ed precipitazione** (salting out). Quindi, aggiungendo un sale come l'ammonio solfato $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ è possibile separare le proteine (che precipitano) da una miscela sfruttando la diminuzione della loro solubilità (frazionamento).



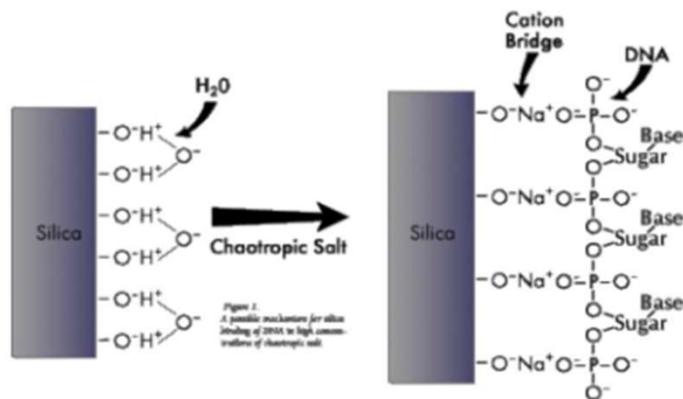
La fase pre-analitica

3. Estrazione del DNA da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina

Estrazione di DNA mediante supporto solido: MEMBRANA DI SILICE

Silice: membrana di **esclusione dimensionale carica positivamente** per intrappolare gli acidi nucleici

Gli acidi nucleici sono relativamente grandi e cariche negativamente. Il lavaggio di altri componenti cellulari richiede la **disidratazione degli acidi nucleici** prima del legame alla membrana di silice

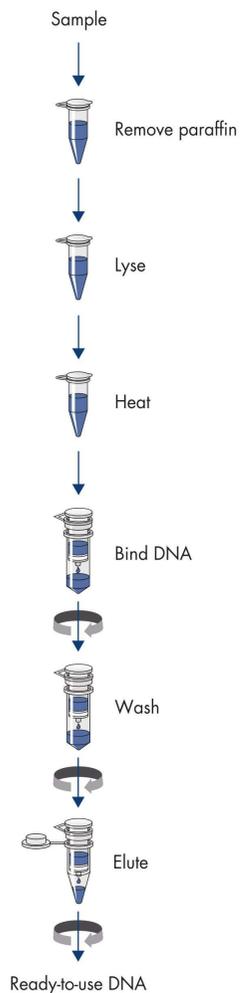


1. **L'Etanolo e i Sali chaotropici** rimuovono lo stato di idratazione che circondano l'acido nucleico e rompono i legami idrogeno delle molecole di acqua tra loro
2. Le **cariche negative** sugli acidi nucleici sono esposte
3. Il sodio svolge un ruolo come ponte cationico in condizioni di «high salt» (pH<7)
4. L'acido nucleico è strettamente ancorato e si eseguono lavaggi estesi per rimuovere tutte le contaminazioni
5. L'acido nucleico purificato viene eluito con bassa forza ionica (pH>7) utilizzando **tampone TE o acqua distillata**

La fase pre-analitica

3. Estrazione del DNA da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina

QIAamp DNA FFPE Tissue Procedure



PURIFICAZIONE DEL DNA: PROCEDURA MANUALE

Il kit combina le proprietà di legame selettivo della membrana a base di silice con volumi di eluizione flessibili.

1. Rimozione della paraffina: la paraffina viene disciolta in xilene e rimossa
2. Lisi: il campione viene lisato a 56°C in condizioni di denaturazione con proteinasi K
3. Riscaldamento: incubazione a 90°C al fine di invertire i legami crociati della formalina
4. Legame: il DNA si lega alla membrana e i contaminanti la attraversano
5. Lavaggio: i contaminanti residui vengono rimossi mediante lavaggio
6. Eluizione: il DNA puro concentrato viene eluito dalla membrana

Può essere utile il trattamento con RNAsi in fase di estrazione, per rimuovere tracce di RNA

Vantaggi: metodo semplice, veloce; nessun solvente organico, no tossicità; permette di ottenere DNA di alta qualità

CONSERVAZIONE DNA: In H₂O sterile o TE (10 mM Tris, pH 7.5-8.0, 1 mM EDTA), Temperatura -20°C, alcuni mesi, poca degradazione

La fase pre-analitica

3. Estrazione del DNA da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina

PURIFICAZIONE DEL DNA: PROCEDURA AUTOMATICA

Purificazione del DNA totale da tessuti FFPE senza alcun intervento da parte dell'operatore.

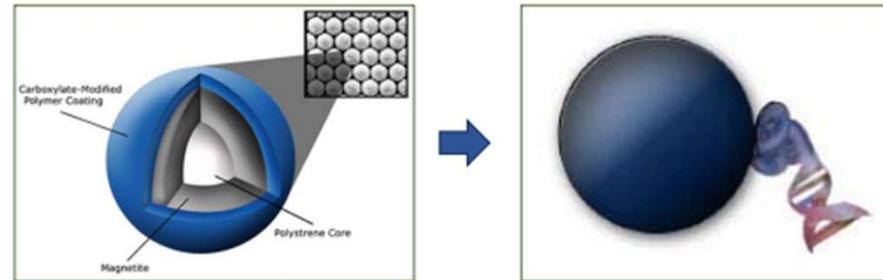
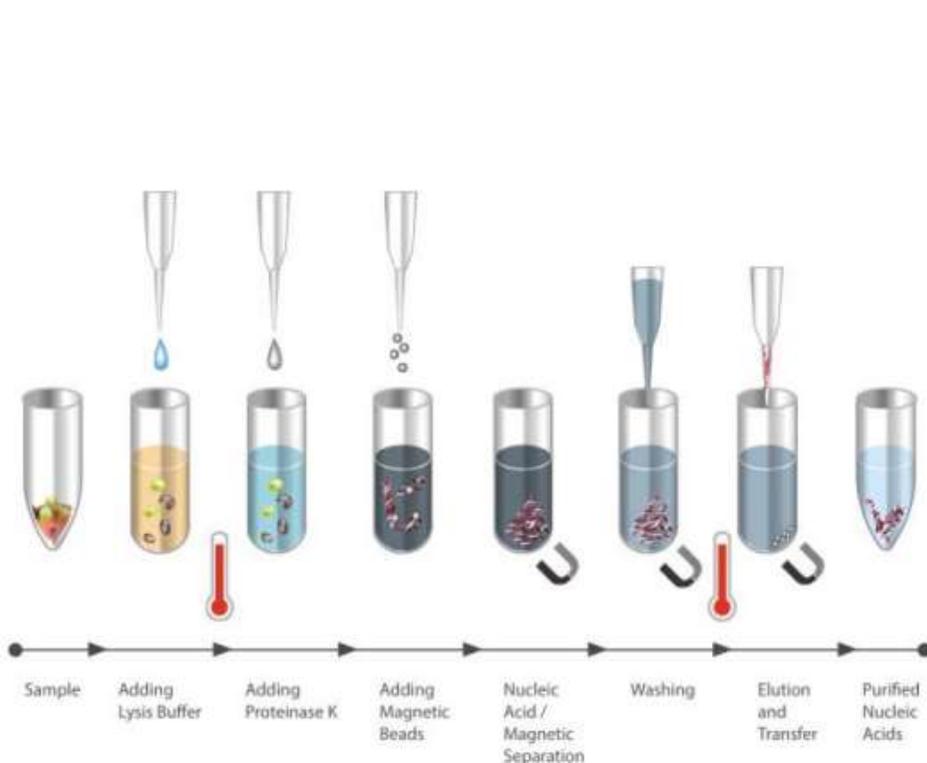
- Soluzione di **deparaffinizzazione** non tossica (con olio minerale es. sula oil) senza xilene.
- Compatibile con applicazioni a valle come PCR, Real Time, Pyrosequencing, sequenziamento Sanger, NGS
- Il tessuto viene inserito in **cartucce prealiquotate** per impedire la contaminazione.
- Il DNA viene estratto e poi purificato con **biglie magnetiche** ricoperte cellulosa.
- Il processo completo dura circa 3 ore.



La fase pre-analitica

3. Estrazione del DNA da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina

PURIFICAZIONE DEL DNA: PROCEDURA AUTOMATICA



Metodi commerciali che utilizzano **particelle magnetiche** che agiscono come fase solida attorno alla quale si lega l'acido nucleico e non necessitano quindi di alcun passaggio di centrifugazione e filtrazione.

- fase iniziale di lisi,
- digestione con proteinasi K
- legame tra le molecole di DNA e le biglie magnetiche
- Attivazione di una piastra magnetica, che attira a se le biglie caricate con il DNA, mantenendole sul fondo del tubo, in modo da poter aspirare agevolmente il surnatante contenente i contaminanti da buttare.
- Lavaggio delle biglie per eliminare ulteriori contaminanti e sali.
- Eluizione del DNA dalle biglie.

La fase pre-analitica

3. Estrazione dell'RNA da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina

PURIFICAZIONE DEL RNA

RNA è più sensibile alla **degradazione** rispetto al DNA:

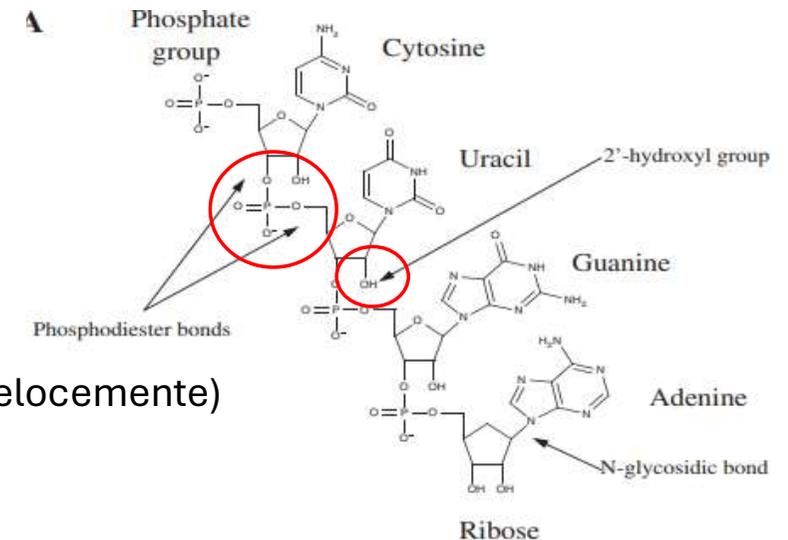
- ✓ OH libero in posizione 2 del ribosio: può essere facilmente idrolizzato
- ✓ Possibile rottura del legame fosfodiesterico

La degradazione del RNA in tessuto FFPE è data

- ✓ Dall'azione delle RNAsi pre e durante la fissazione
- ✓ Dall'idrolisi e dalla rottura meccanica dovuta all'irrigidimento della struttura durante la formazione di legami cross-link

RNAsi sono piccoli polipeptidi (catene singole di 15 kDa che rinaturano velocemente)

- non necessitano di cofattori
- sono molto resistenti alle alte temperature
- sono attive in un ampio range di pH
- fonti: esterne (operatore), interne (lo stesso tessuto)
- autoclavare non inattiva le RNAsi
- soluzioni per lavorare con RNA in aliquote
- area di lavoro separata, dedicata all'RNA

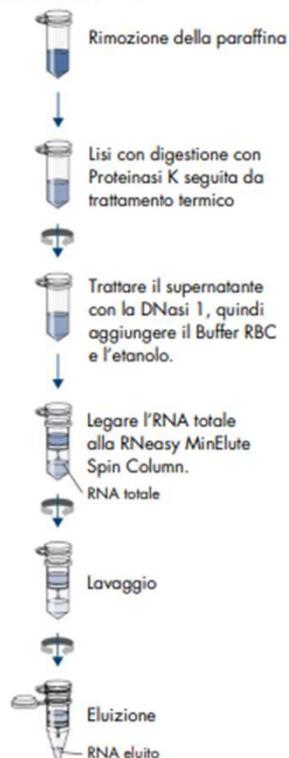


La fase pre-analitica

3. Estrazione dell'RNA da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina

Procedura RNeasy DSP FFPE

Sezioni di tessuto FFPE



PURIFICAZIONE DELL'RNA: PROCEDURA MANUALE

Il kit consente la purificazione dell'RNA totale di sezioni FFP, e di isolare molecole di RNA più lunghe di 70 nucleotidi, utilizzabili per applicazioni come la RT-PCR.

- Rimozione dalla paraffina trattandole con la Deparaffinization Solution.
- Incubazione in tampone di lisi, che contiene proteinasi K per rilasciare l'RNA dalle sezioni.
- breve incubazione a una temperatura più elevata inverte parzialmente il legame crociato in formalina degli acidi nucleici rilasciati, migliorando la resa e la qualità dell'RNA
- trattamento con DNasi I per eliminare il DNA genomico, compresi i piccolissimi frammenti di DNA spesso presenti nei campioni FFPE dopo una prolungata fissazione con formalina e/o lunghi tempi di conservazione.
- Aggiunta di Buffer ed etanolo per creare le condizioni di legame appropriate (fase successiva)
- trasferimento dell'RNA a una RNeasy MinElute Spin Column, dove l'RNA totale si lega alla membrana e i contaminanti vengono lavati via in modo efficiente.
- Eluizione dell'RNA in un minimo di 14 µl di acqua priva di RNasi.

La fase pre-analitica

3. Estrazione dell'RNA da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina

PURIFICAZIONE DEL RNA: PROCEDURA MANUALE e AUTOMATICA

Precauzioni:

- Reagenti RNase free
- Trattamento con DEPC, inibitori di RNAsi
- Guanti
- Vetreria Rnase free/materiale usa e getta
- Lavorare a basse temperature



Conservazione in H₂O DEPC a **-80°C** (più comune, compatibile con tutte le applicazioni)

L'RNA conservato in H₂O tende a degradare a causa del pH poco favorevole e/o delle tracce di RNAsi presenti.

DEPC (dietilpirocarbonato): un **agente alchilante** molto reattivo che reagisce con le proteine determinando la perdita dell'attività enzimatica. Si usa alla concentrazione finale dello 0,1% per inattivare le RNAsi contaminanti presenti nelle soluzioni. Al termine del trattamento deve essere inattivato in autoclave

La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici (DNA/RNA) da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina

PROCEDURA AUTOMATICA

Manual DNA purification techniques

Pre-lyse sample		100 µl T1 25 µl Proteinase K 55°C 1 - 3h
Lysis sample		200 µl D2 70°C 10 min
Adjust DNA binding conditions		250 µl 95 - 100% ethanol
Bind DNA	 	Load off 11,000 x g 1 min
Wash silica membrane	 	1 st wash: 500 µl D4 2 nd wash: 600 µl D5 11,000 x g 1 min
Dry silica membrane		11,000 x g 1 min
Elute highly pure DNA	 	100 µl D6 (70°C) RT 1 min 11,000 x g 1 min

Automated DNA purification techniques



VANTAGGI

- Ampia gamma di protocolli per l'isolamento e l'estrazione di DNA e/o RNA
- Protocolli rapidi
- Permettono di tracciare i campioni che vengono estratti
- Decontaminazione con UV
- Riproducibilità
- Sistema sicuro per l'operatore

SVANTAGGI

- Ridotta possibilità di cambiare il volume di eluizione del campione
- Richiesta di maggiore quantità di tessuto rispetto alle tecniche di estrazione manuali

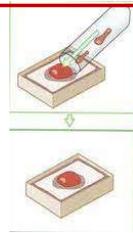
La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici (DNA/RNA) da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina

Tipologie di campioni:



▪ FFPE



▪ Citoincluso



▪ Sangue

La resa dipende da:

➤ Qualità del campione

FFPE: alta componente mucinosa (interferisce con PCR), flogosi, trattamento chemioterapico

Sangue solo K₂EDTA (alcuni anticoagulanti interferiscono con PCR)

➤ Quantità del campione

- **Pezzo operatorio**
- **Biopsia tissutale**

Se il campione è scarso....**SI DEVONO DARE DELLE PRIORITA'!**

- Colorazioni
- Immunoistochimica
- Molecolare
 - Qual è l'informazione più utile
 - Numero di informazioni che ottengono
 - La qualità e quantità di materiale che ho è sufficiente per quella metodica (sensibilità del metodo)

La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici (DNA/RNA) da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina

CAMPIONI FISSATI E INCLUSI IN PARAFFINA (FFPE)

VANTAGGI

- La formalina interrompere velocemente e completamente i processi autolitici che si sviluppano nella cellula e nei tessuti non più nutriti ed ossigenati;
- La formalina ha il pregio di formare **legami crociati** con le strutture intracellulari, e quindi anche tra DNA e proteina.
- La paraffina serve a dare consistenza al tessuto, caratteristica essenziale nel momento in cui il tessuto stesso dovrà essere tagliato
- La fissazione e l'inclusione rappresentano un vantaggio perché **mantengono la CITOARCHITETTURA cellulare** nella sua conformazione, conservando al meglio la morfologia strutturale ed ultrastrutturale del tessuto e della cellula.
- L'inclusione preserva i campioni dall'attacco di muffe e batteri che potrebbero proliferare nutrendosi delle strutture non più in grado di proteggersi.

SVANTAGGI

La formalina e la paraffina sono inibitori per la PCR

- I legami crociati che la formalina forma tra il DNA e le proteine alterano la doppia elica e la rendono più sensibile a rotture e alla formazione di legami difficili da rompere (→ contaminazione proteica)
- Campioni FFPE molto vecchi → la formalina si ossida → si produce acido formico → depurinazione del DNA e doppia elica sensibile alla rottura → DNA molto frammentato

La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici (DNA/RNA) da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina

CAMPIONI FISSATI IN FORMALINA E INCLUSI IN PARAFFINA (FFPE)

La deaminazione consiste nella perdita di un residuo amminico \implies la citosina sia trasformata in uracile.



\implies Durante le fasi di amplificazione di PCR avviene la conseguente sostituzione **C:G > T:A**.

La deaminazione idrolitica avviene naturalmente \rightarrow i campioni più vecchi sono più inclini a questo tipo di errore, e il processo è favorito da lunghi periodi di fissazione, e da lunghi periodi di permanenza in paraffina \rightarrow se possibile, prediligere l'analisi in materiale (blocchetti) più recenti

Le deaminazioni avvengono in modo **casuale e a frequenza molto bassa**

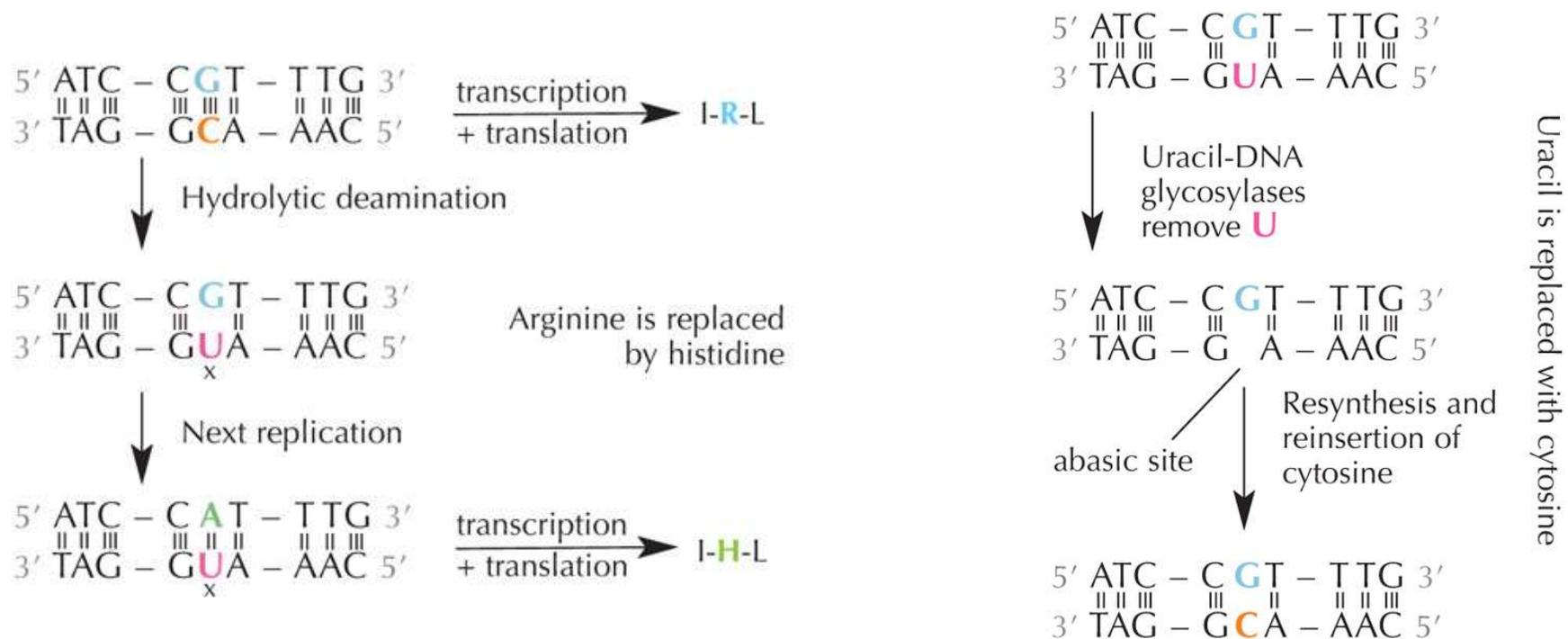
Gli errori di deaminazione sono presenti **solo su un filamento di DNA** di senso o antisenso

La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici (DNA/RNA) da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina

Possibile soluzione → pre-trattamento del DNA con enzima **Uracil-DNA-glicosilasi** che individua l'uracile e lo elimina dalla sequenza di DNA; intervengono successivamente **la DNA Pol e l'enzima ligasi** che risintetizzano la parte di DNA, senza influenzare la capacità di rilevare le vere mutazioni.

Berra, C.M., Torrezan, G.T., de Paula, C.A. et al. Use of uracil-DNA glycosylase enzyme to reduce DNA-related artifacts from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues in diagnostic routine. *Appl Cancer Res* 39, 7 (2019). <https://doi.org/10.1186/s41241-019-0075-2>



La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici (DNA/RNA) da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina



Confronto tra strategie di decontaminazione

- ✓ Etanolo 70%
- ✓ UV (20 min at a distance of 60 to 70 cm, 254 nm)
- ✓ Etanolo 70% + UV
- ✓ Candeggina diluita fresca (commerciale 3.6% diluita in acqua fino al 0,5%)
- ✓ Candeggina diluita stock (commerciale 3.6% diluita in acqua fino al 0,5%)
- ✓ Soluzioni commerciali in grado di rimuovere DNA

The most efficient cleaning strategies for cell-free DNA were the different **sodium hypochlorite solutions**

Cell-Free DNA/Surface	PLASTIC			METAL			WOOD		
	Mean	SD	Yield	Mean	SD	Yield	Mean	SD	Yield
No-treatment controls	9,396,667	4,074,633		5,701,333	4,395,753		4,792,667	3,528,892	
EtOH	131,640	120,771	1.4%	655,333	78,520	11.4%	63,460	45,714	1.3%
UV	1,136,000	361,494	12.1%	115,507	84,110	2.0%	3,500,000	1,530,768	73.0%
EtOH+UV	4724	3020	0.1%	42,567	1570	0.7%	11,480	8569	0.2%
Fresh bleach	1991	2900	0.0%	23	30	0.0%	15,313	8443	0.3%
Stored bleach	918	1238	0.0%	85	77	0.0%	4337	5040	0.1%

La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici → QUANTIFICAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

La quantificazione di acidi nucleici viene comunemente eseguita per determinare la **concentrazione di DNA (o RNA)** presenti in soluzione, così come la loro **purezza**.

Spectrophotometry
(Nanodrop1000)

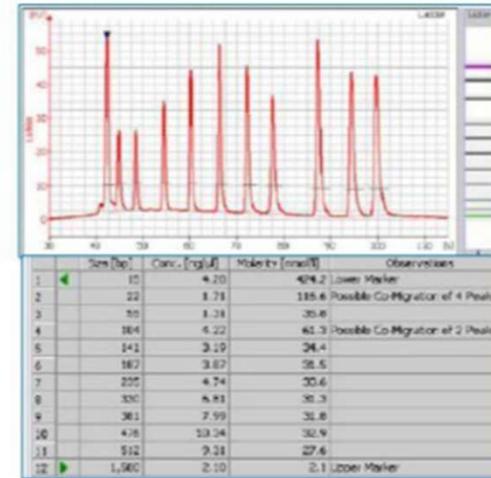
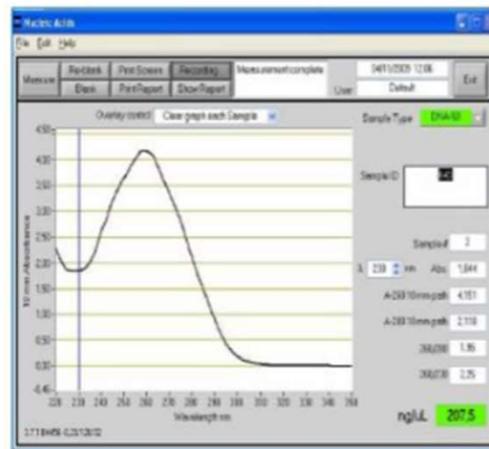


NanoDrop 2000 spectrophotometer for life sciences

Fluorometry



Bioanalyzer instrumentation
(Agilent Tehnologies)



La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici → QUANTIFICAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

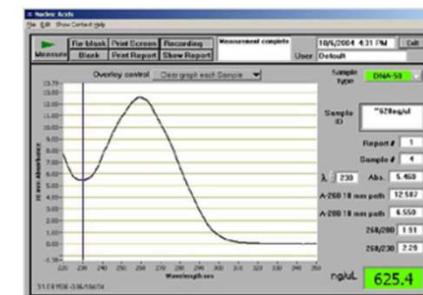
METODI BASATI SULL'ASSORBANZA

Spettrofotometria UV utilizzando l'assorbanza a 260 nm

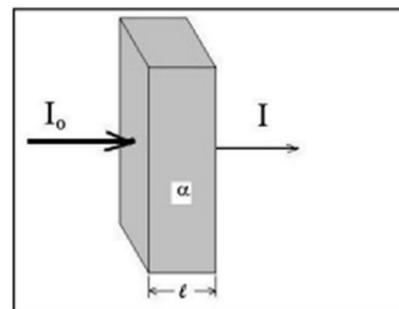
Gli acidi nucleici assorbono la luce ultravioletta in modo specifico.

Quantificazione spettrofotometrica all'UV, analizzando la fluorescenza dopo eccitazione con lampada UV

In uno spettrofotometro, un campione viene esposto a luce UV con lunghezza d'onda di 260 nm, un foto-rilevatore misura la luce che passa attraverso il campione. Più luce viene assorbita dal campione, maggiore è la concentrazione di acido nucleico nel campione. Un'assorbanza (A) = 1 corrisponde ad una concentrazione di 50 µg/ml di DNA a doppio filamento



La **Legge di Lambert-Beer**: quantificazione della luce assorbita da una sostanza in soluzione è **DIRETTAMENTE PROPORZIONALE** alla sua concentrazione nella soluzione (considerando costante il percorso della luce che l'attraversa).



dsDNA: 1.0 A = 50 µg/mL
ssDNA: 1.0 A = 33 µg/mL
RNA: 1.0 A = 40 µg/mL
oligo: 1.0 A = 33 µg/mL

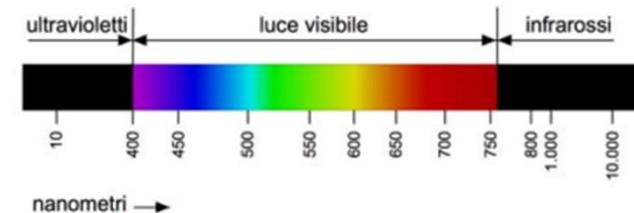
La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici → QUANTIFICAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

E' frequente per i campioni di acidi nucleici essere contaminati con altre molecole (cioè proteine, composti organici, altro). Il rapporto tra l'assorbanza a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}) viene utilizzato per valutare la purezza di acidi nucleici. Per **il DNA puro, A_{260}/A_{280} è ~ 1.6-1.8** e per **puro RNA A_{260}/A_{280} è ~ 1.8-2**. Il rapporto A_{260}/A_{280} viene comunemente utilizzato per valutare la **contaminazione di soluzioni di DNA da parte di proteiche**, poiché le proteine (in particolare, gli amminoacidi aromatici) assorbono la luce a 280 nm. rapporto A_{260}/A_{280} = indice della contaminazione da proteine(rapporti superiori indicano una contaminazione da proteine

Altri contaminanti comuni

- Contaminazione da fenolo, che è comunemente usato nella purificazione degli acidi nucleici, può alterare in modo significativo le stime di quantificazione. **Il Fenolo assorbe con un picco a 270 nm e un rapporto A_{260}/A_{280} di 1.2.** rappresenta una contaminazione da fenolo e può contribuire in modo significativo alla sovrastima della concentrazione del DNA. ?
- Un assorbimento a 230 nm può essere causata dalla contaminazione da ioni fenolato, tiocianati, e altri composti organici. **Per un campione di RNA puro, l' $A_{230}: A_{260}: A_{280}$ dovrebbe essere circa 1: 2: 1, e per un campione di DNA puro, l' $A_{230}: A_{260}: A_{280}$ dovrebbe essere di circa 1: 1,8: 1.** Il rapporto A_{260}/A_{230} = indice della contaminazione da carboidrati e fenoli (solventi): il valore ottimale di questo rapporto è di circa 2.2, rapporti inferiori indicano contaminazione da solventi
- Valori negativi potrebbero indicare che una soluzione non corretta è stata usata come «bianco».



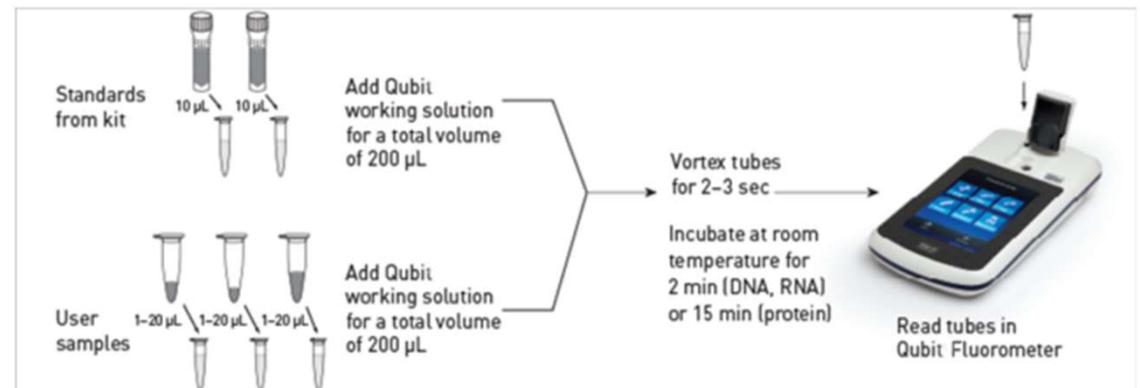
La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici → QUANTIFICAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

METODI BASATI SULLA FLUORESCENZA

L'utilizzo di **coloranti fluorescenti** consente la quantificazione del DNA con sensibilità molto più elevata rispetto alla misura dell'assorbanza del DNA stesso (tipicamente 10-100 volte superiore, a seconda dei metodi specifici confrontati). Inoltre, coloranti specifici possono essere utilizzati per colorare solo tipi specifici di acido nucleico, come dsDNA o RNA, aumentando così la specificità della quantificazione e riducendo l'effetto dei contaminanti. Tuttavia, i metodi basati sulla fluorescenza sono più costosi della misura dell'assorbanza a 260 nm e spesso richiedono la preparazione di una curva standard. La misura della fluorescenza viene eseguita utilizzando un lettore di micropiastre o un fluorimetro a tubo singolo.

Campioni di piccole dimensioni, a partire da 1 μL



La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici → QUANTIFICAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

METODI BASATI SULL'ELETTROFORESI

Consentono di valutare le **dimensioni, la qualità e la quantità degli acidi nucleici**, utilizzando la tecnologia basata sulla microfluidica per analizzare i profili di RNA e DNA fino a 60kb. Vengono utilizzati per verificare **l'integrità dei campioni** di RNA e DNA per il **controllo di qualità delle librerie** per il sequenziamento.

Il sistema TapeStation 2200 effettua la separazione elettroforetica di acidi nucleici e proteine.

Il sistema rileva: • DNA a doppio filamento reso fluorescente, incluso DNA genomico.

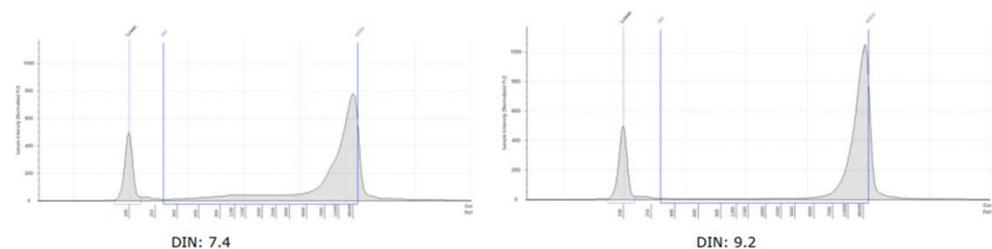
- RNA totale reso fluorescente
- Proteine con marcatura fluorescente



Example Sample Trace – Below is an example of a genomic DNA sample. A Lower Marker (LM) is included with each sample to align to the ladder data.

DIN: DNA Integrity Number: Used to assess genomic DNA degradation.

DIN is on a scale of 1-10 with 1 indicating severe degradation.



	NanoDrop 2000™	Qubit 2.0® fluorometer	Bioanalyzer 2100®
Quantification method	UV absorbance measurements	Fluorescence-based dye that binds specifically to DNA, RNA or protein	Fluorescence-based dye that binds specifically to DNA, RNA or protein
Specificity for DNA or RNA	Non-discriminatory – cannot distinguish between nucleic acid species	Accurately quantifies DNA and RNA independently. Accurately quantifies dsDNA in the presence of ssDNA	Accurately quantifies DNA and RNA independently
Accuracy at low concentrations	Significantly overestimates concentration	Sufficiently sensitive to accurately quantify 10 pg/μl	Sufficiently sensitive to accurately quantify 5 pg/μl
Sensitivity and range	2-15,000 ng/μl	Effective sample concentration range of 1-500 ng/ml	Listed as 5-500 pg/μl but up to 5 ng/μl for fragmented DNA
Additional data generated	Purity indication from 260:280 nm ratio	None	Qualitative information about fragment sizes and concentration within a specific size range
Standard curve	Not required. Beer-Lambert equation used	Single-point standard curve	Ladder and upper and lower markers included in each run
Unit	Requires PC with software	Standalone	Requires PC with software
Footprint/weight	14 cm x 20 cm / 2.1 kg	13 cm x 21 cm / 0.3 kg	16 cm x 41 cm / 10 kg

La fase pre-analitica

3. Estrazione degli acidi nucleici → CONSERVAZIONE

CONSERVAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

Il **DNA** estratto e purificato è generalmente risospeso in H₂O distillata sterile ultrapura o in soluzioni a bassa concentrazione salina a pH 7,4 (TE buffer)

+4°C: stabile per alcune settimane

-20°C: stabile per alcuni mesi

(evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento che possono danneggiare il DNA)

-80°C: stabile per molti anni

RNA: conservare sempre a **-80°C**