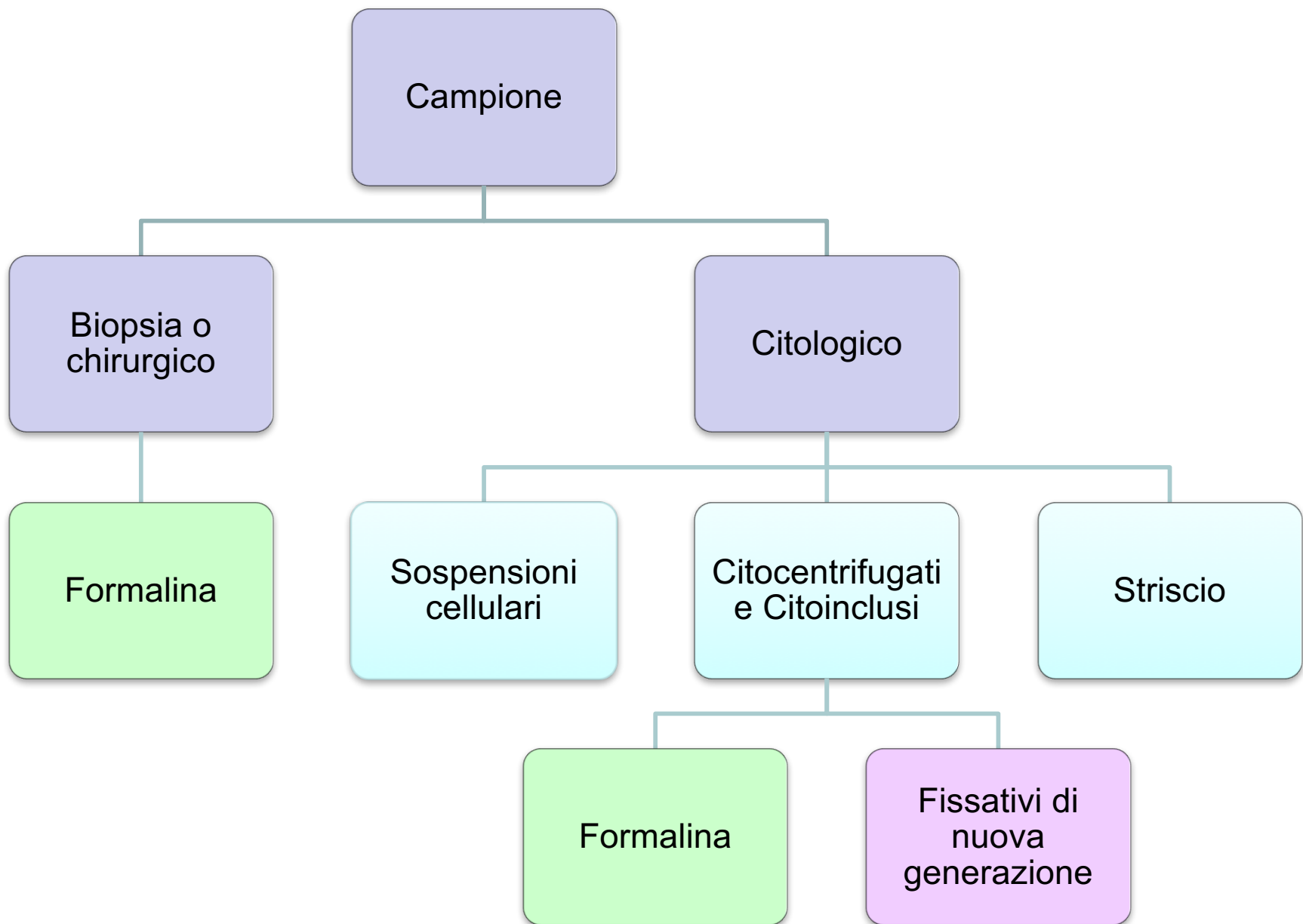


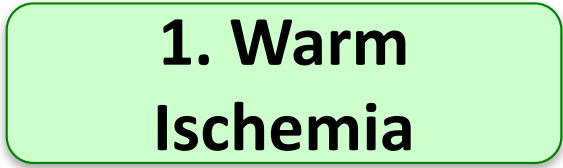
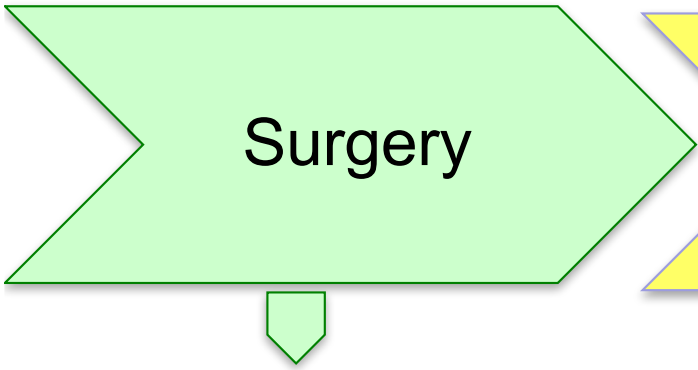


ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI DA TESSUTI D'ARCHIVIO

Serena Bonin

DSM – Università degli Studi di Trieste
Lab. di Istopatologia Molecolare - ICGEB - Trieste





Surgery

Hospital Organization

Pathology Department

The use of formalin leads to various reaction within the tissue, including the **crosslinking** of proteins through **methylene** bridge formation among proteins and nucleic acids.

Nucleic acids are degraded.

The longer is the permanence period in formalin the higher is the degradation.

3. Grossing

4. Fixation

5. Embedding

6. Archive

Macromolecole in FFPE

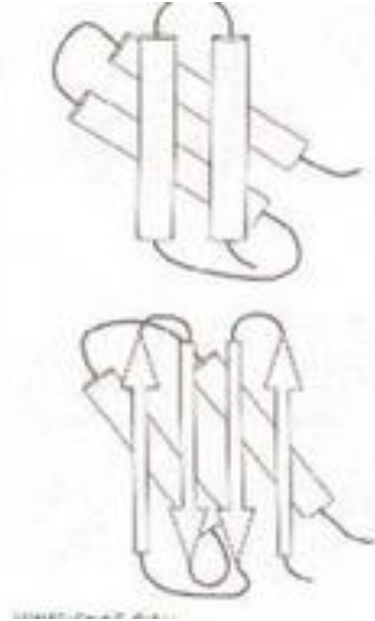
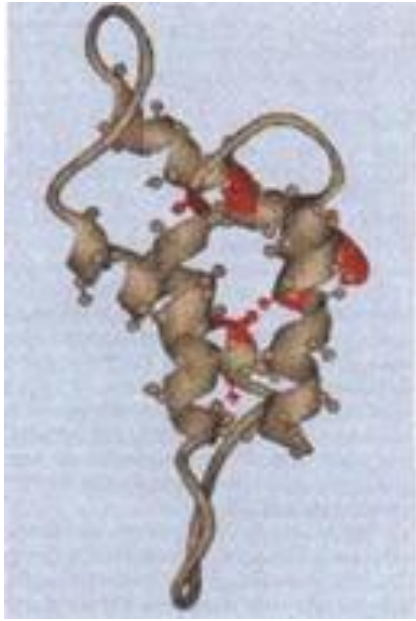
La formalina induce diverse reazioni nei tessuti, incluso il **crosslinking** delle proteine grazie alla formazione di **ponti metilenici** tra le proteine e gli acidi nucleici. Maggiore è il tempo di permanenza in formalina maggiore è il numero di legami crociati.

Gli acidi nucleici sono degradati

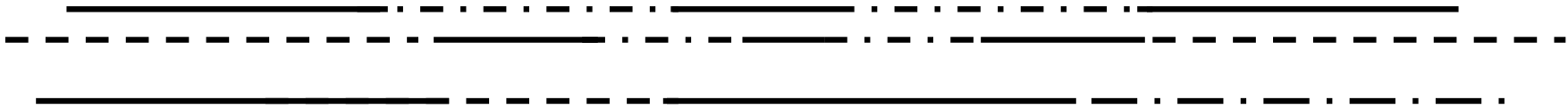
> è il tempo di fissazione > è il livello di degradazione

La presenza dei crosslegami determina i processi estrattivi nei tessuti d'archivio → la **proteolisi** è indispensabile per l'estrazione degli ac. Nucleici, ma determina la **perdita delle proteine**.

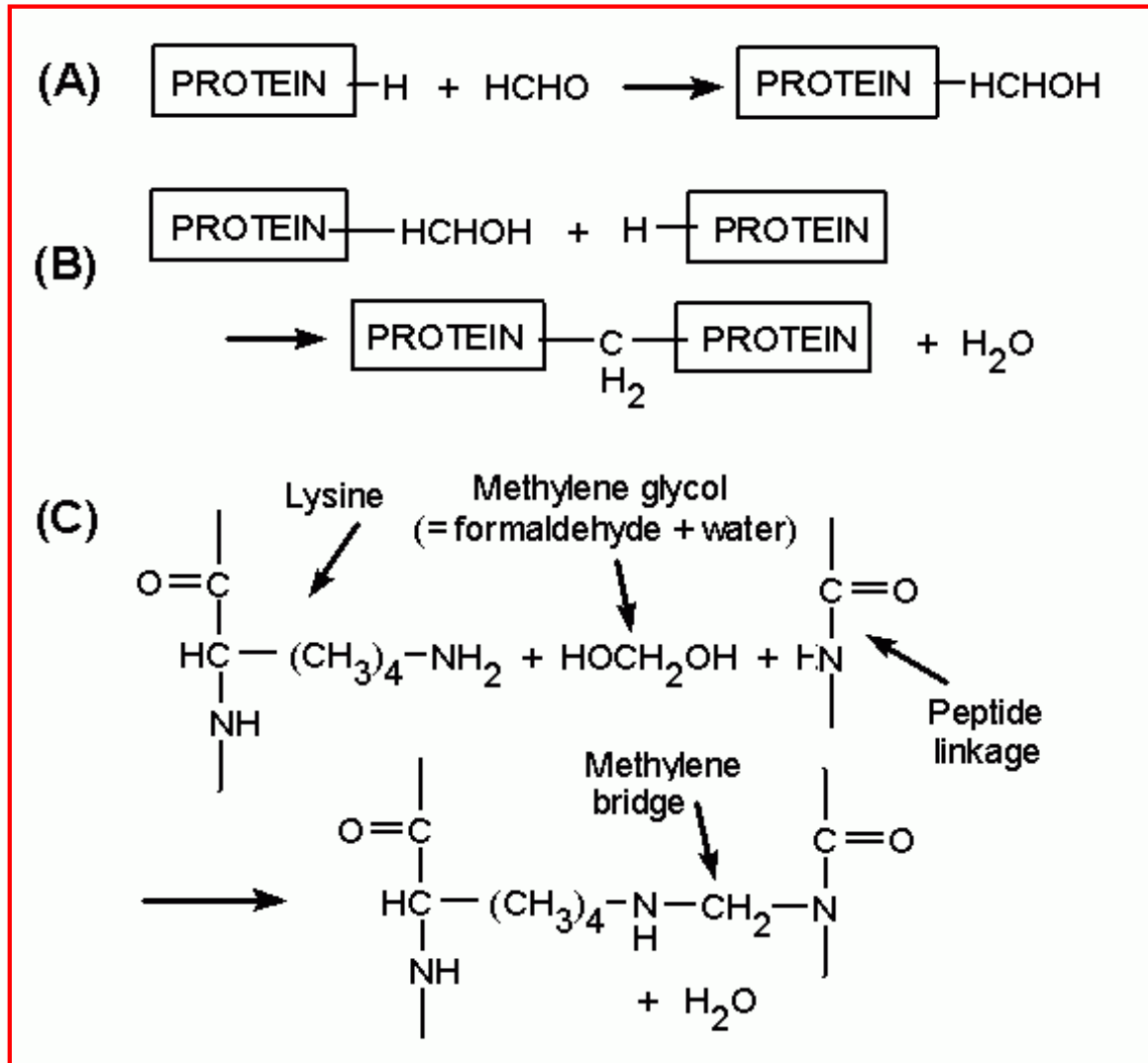
Formalina è un reagente **tossico e irritante** e recentemente definita possibile **cancerogene per l'uomo** (IARC 2004).



Acidi nucleici degradati!

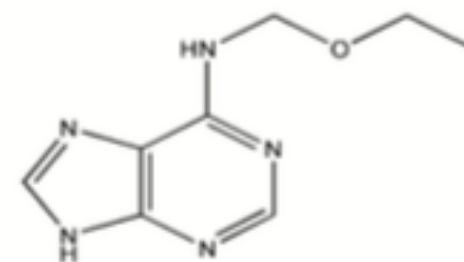
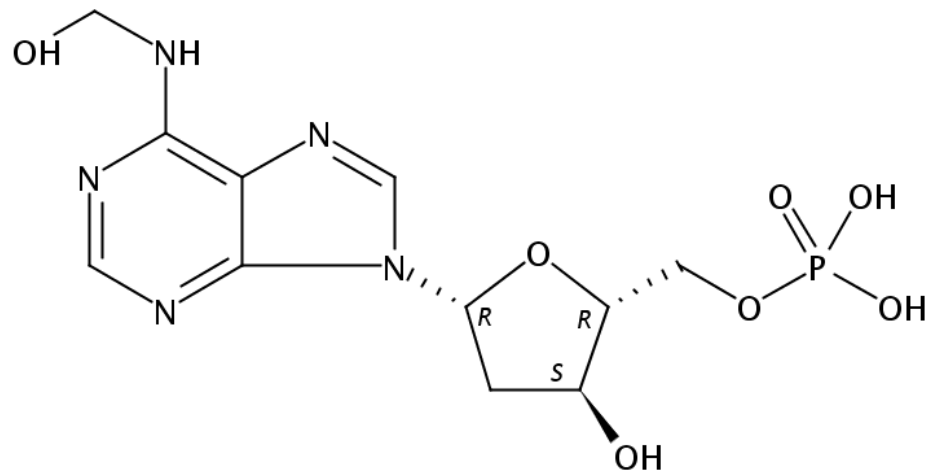


Effetti della formalina

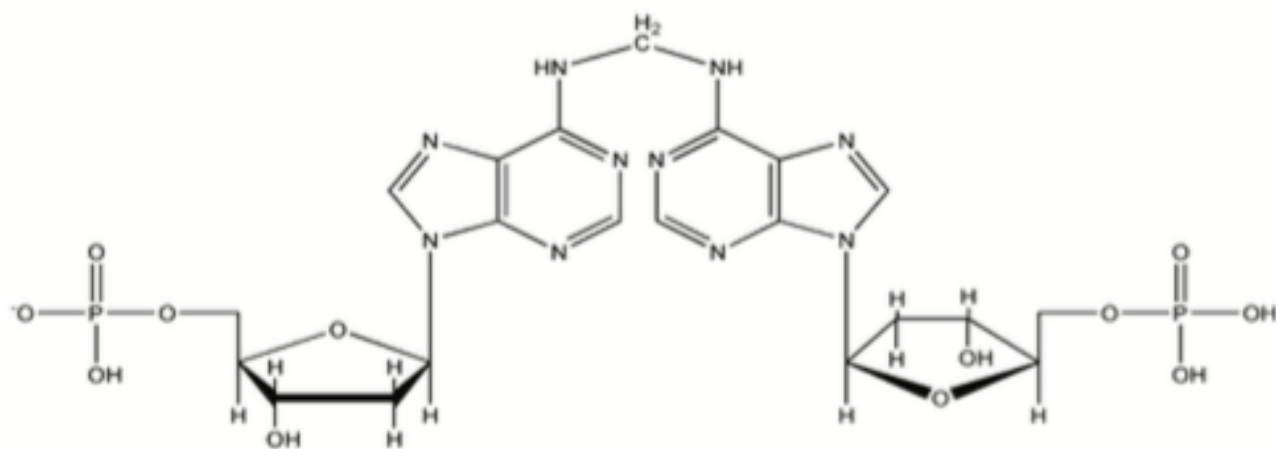


- (A) Addizione di una molecola di formaldeide alla proteina
- (B) Formazione del ponte metilenico fra 2 proteine
- (C) Formazione del crosslegame fra un residuo di lisina il metilen glicole formato dal primo step di reazione.

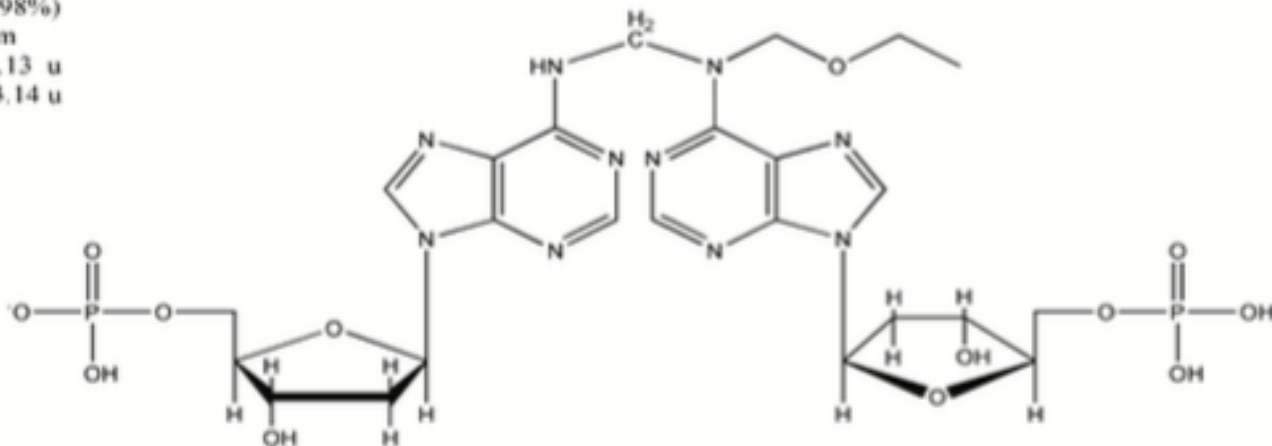
Kiernan,JA. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. Microscopy Today 00-1 pp. 8-12 (2000).



t_R 16.74 min (1.46%)
 λ_{max} 263.8 nm
Exact Mass 193.10 amu
Found Mass 193.10 amu



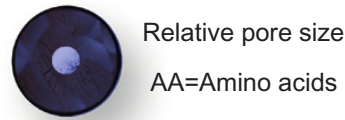
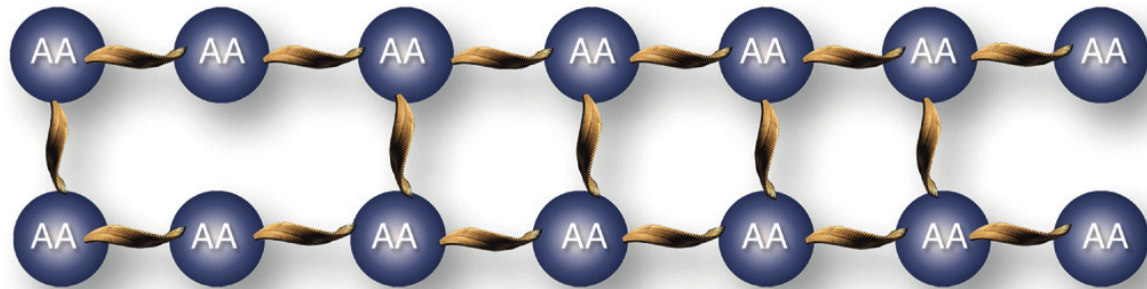
t_R 27.14 min (1.98%)
 λ_{max} 271.4 nm
Exact Mass 673.13 u
Found Mass 673.14 u



t_R 37.71 min (0.40%)
 λ_{max} 272.4 nm
Exact Mass 731.17 u

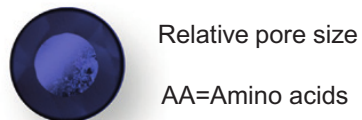
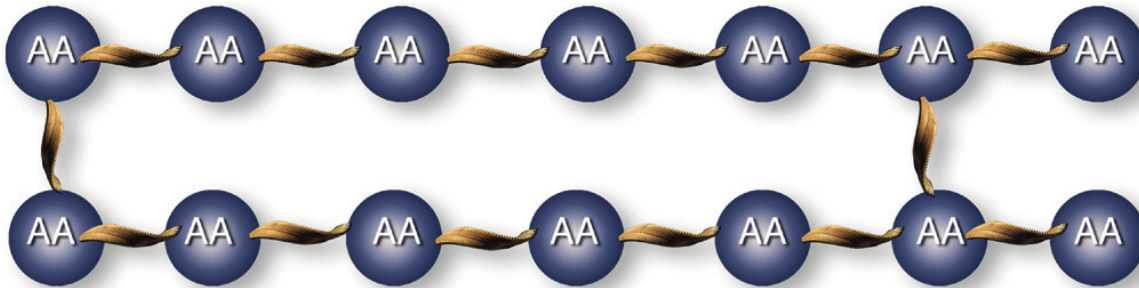
A

Many cross-links
Small pore size



B

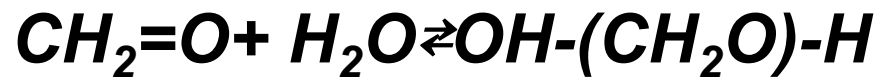
Few cross-links
Large pore size



The longer is fixation the higher is number of crosslinks

Is it possible to ameliorate formalin fixation for molecular diagnostics?

- ❖ Controlled fixation time
- ❖ Cold fixation (Longer fixation at low T)*
- ❖ Warm 2+2 fixation = 2h 4° C formalin + 2h 40° C formalin



Heat likely speeds fixation : first, the formaldehyde-methylene glycol equilibrium shifts towards formaldehyde at higher temperatures and raises the effective concentration of the active molecule and, second, protein crosslinking should proceed more quickly at elevated temperatures.



RNA degradation would be inhibited by maintaining low temperature through all the process of fixation.

RNA degradation in FFPE is the cumulative effect of RNAses activity during pre- and fixation, hydrolysis and mechanical rupture due to molecule stiffening from crosslinking. Every treatment which reduces those effects contributes to a better RNA preservation

Surgery

Hospital
Organization

Pathology
Department

Even with extended processing times, at elevated storage temperatures and dry conditions, tissue sections demonstrate degradation.

Improper tissue processing leads to inadequate replacement of water by paraffin and retaining of endogenous water in FFPE tissue. Nucleic acids in tissue blocks degrade!

Is it better to store paraffin blocks or nucleic acids? And for RNA is cDNA preferable?

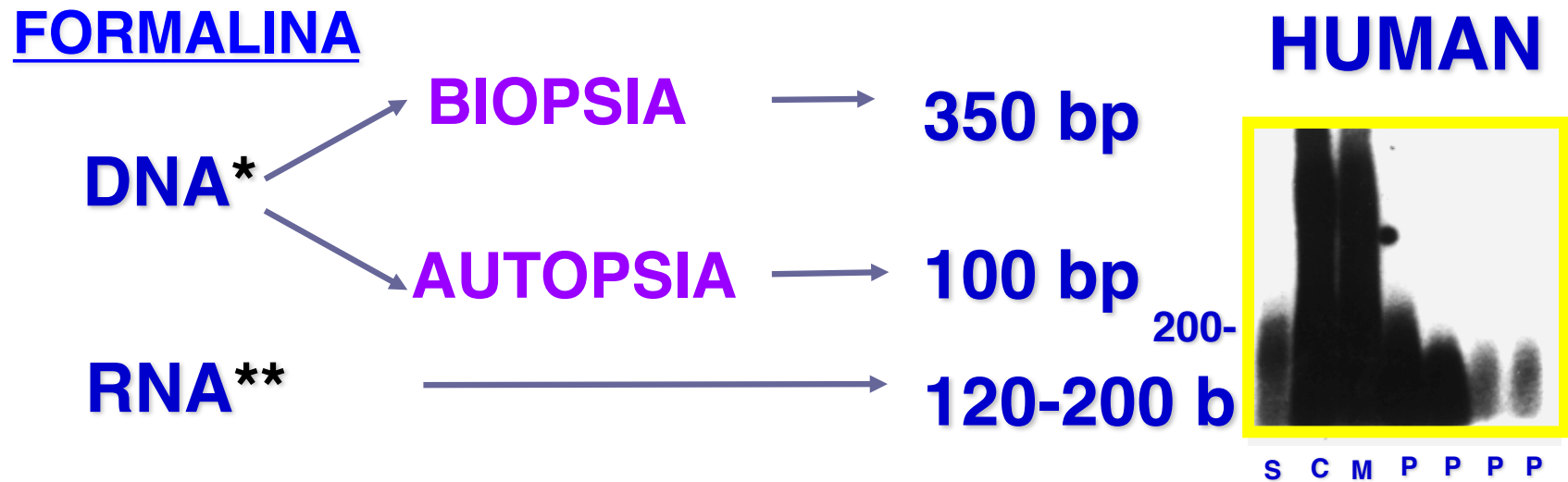
3. Grossing

4. Fixation

5. Embedding

6. Archive

Gli acidi nucleici presentano un ampio range di degradazione nei tessuti FFPE dovuta ai processi di fissazione

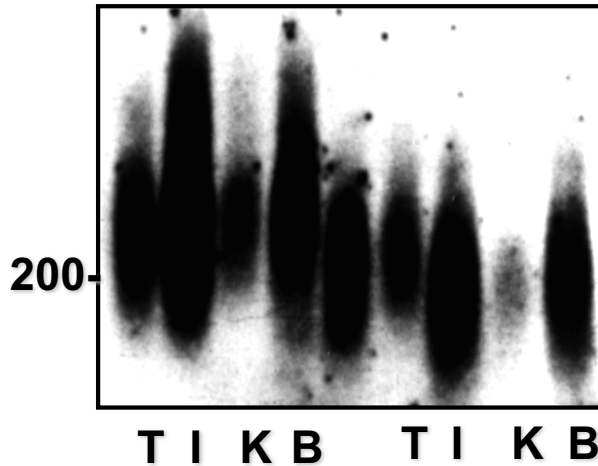


*-Bonin S., Petrera F., Stanta G. PCR and RT-PCR Analysis In Archival Postmortem Tissues. In Fuchs J, Podda M. Encyclopedia Of Diagnostic Genomics And Proteomics. M. Dekker, New York: 985-988; 2005

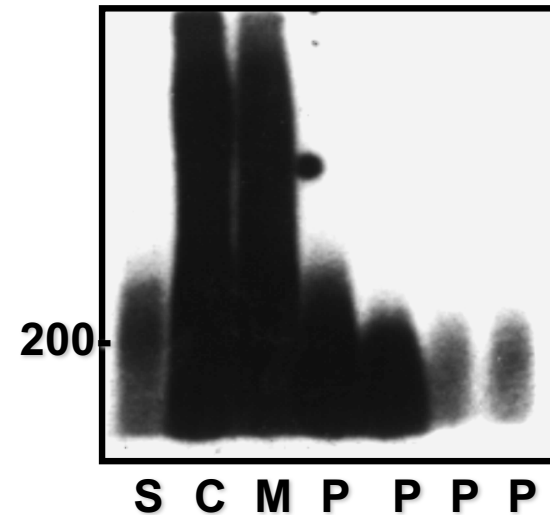
** -G. Stanta and C. Schneider, RNA extracted from paraffin-embedded human tissues is amenable to analysis by PCR amplification. Biotechniques, 11:304-308,1991.

RNA DA TESSUTI FISSATI E INCLUSI

MOUSE



HUMAN



Il tipo di fissazione e di tessuto determinano la lunghezza dell'RNA disponibile:

*-Formalina: Biopsia ~ 120-200 basi**

*Autopsia ~ 90 basi**

*-Fissativo di Bouin: ~ 75 basi**

*Fissativi alcolici: circa 600 basi**

•Bonin S., Petrer F., Stanta G. PCR and RT-PCR Analysis In Archival Postmortem Tissues. In Fuchs J, Podda M. Encyclopedia Of Diagnostic Genomics And Proteomics.

M. Dekker, New York: 985-988; 2005

G. Stanta and C. Schneider, RNA extracted from paraffin-embedded human tissues is amenable to analysis by PCR amplification. Biotechniques, 11:304-308,1991.

S Bonin, F Petrer, J Rosai, G Stanta, "DNA and RNA obtained from Bouin fixed tissues" J Clin Path , 58:313-316; 2005

Dotti I., Bonin S. et al. Effects of formalin, methacarn, and fineFIX fixatives on RNA preservation. Diagn Mol Patho, 19: 112-122; 2010

Estrazione di acidi nucleici da Tessuti FFPE

- ☞ *Taglio delle sezioni e microdissazione*
- ☞ *Deparaffinizzazione con xilene o calore*
- ☞ *Lavaggi in EtOH e reidratazione*
- ☞ *Digestione con Proteinasi K*
- ☞ *Isolamento degli acidi nucleici*

* Stanta G et al, Biotechniques 1991, 11: 304-308
Specht K et al. Am J Pathol 2001, 158: 419-429
Nortvig Abrahamsen H et al. J Mol Diagn 2003, 5: 34-41.

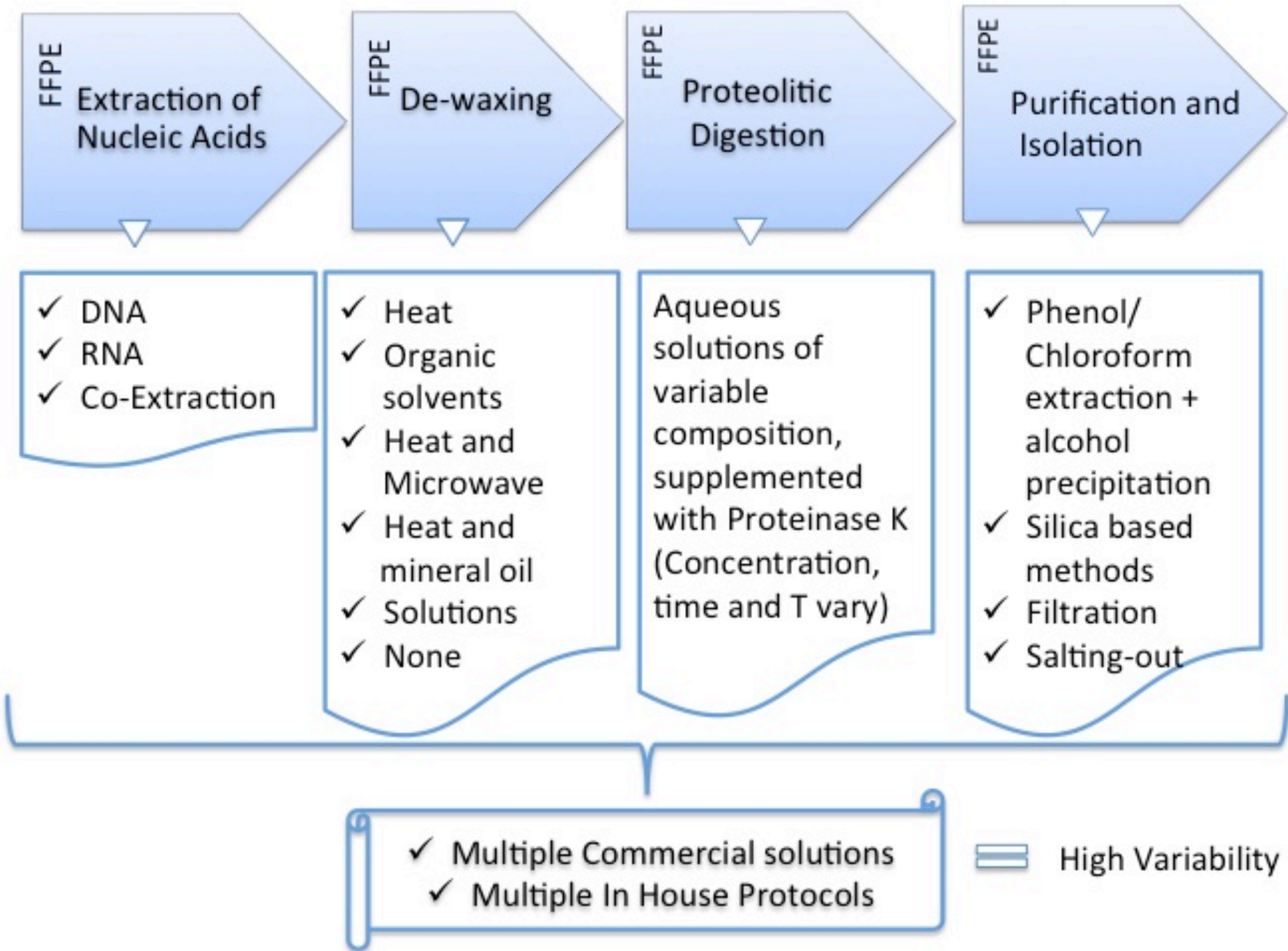


Table 1. Methods for DNA extraction compared in the literature and analyzed in the present study.

| Study (year) | Methods, kit and manufacturer | Notes | Ref. |
|------------------------------------|--|-----------------------------|------|
| Bonin <i>et al.</i> (2010) | QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen, CA, USA), in-house method (PCI), NucleoSpin® Tissue kit (Macherey Nagel, Düren, Germany), DNeasy FFPE kit (Qiagen) | | [25] |
| Dedhia <i>et al.</i> (2007) | QIAamp DNA Mini kit, in-house method (PCI) | | [53] |
| Funabashi <i>et al.</i> (2012) | In-house method (PCI), QIAamp DNA Mini kit | | [26] |
| Huijsmans <i>et al.</i> (2010) | Heat treatment, QIAamp® DNA Blood Mini kit (Qiagen), easyMAG® (NucliSens, Biomerieux, NC, USA), Gentra-capture-column-kit (Gentra Systems, Qiagen) | | [27] |
| Kotorashvili <i>et al.</i> (2012) | Trizol® (Invitrogen, Life Technologies Ltd, Paisley, UK), All Prep DNA/RNA FFPE kit (Qiagen), RecoverAll™ (Ambion, TX, USA), QIAamp® DNA FFPE kit (Qiagen) | Coextraction of RNA and DNA | [30] |
| Ludyga <i>et al.</i> (2010) | QIAamp DNA FFPE kit, in-house method (PCI), FFPE RNA/DNA purification kit (Norgen, Biotek Corp, ON, Canada) | Long-term preserved tissues | [28] |
| Munoz-Cadavid <i>et al.</i> (2010) | QIAamp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen), TaKaRaDexpat (Takara Bio Inc., Otsu, Japan), PureLink® Genomic DNA Mini kit (Invitrogen, Life Technologies Ltd, Paisley, UK), Wax Free™ DNA (TrimGen, MA, USA), QuickExtract FFPE DNA Extraction kit (Epicenter Biotechnologies, WI, USA) | For detection of fungal DNA | [29] |
| Okello <i>et al.</i> (2012) | Mammalian Genomic DNA Miniprep kit (Sigma-Aldrich, MO, USA), TRI Reagent® solution (Ambion, TX, USA), RecoverAll, in-house method (PCI) | Archival autopsy tissues | [22] |
| Torrente <i>et al.</i> (2011) | In-house method (PCI), QIAamp DNA FFPE kit | | [93] |
| Turashvili <i>et al.</i> (2012) | QIAamp DNA FFPE kit, RecoverAll, Wax Free DNA, in-house method (PCI) | | [12] |

FFPE: Formalin-fixed paraffin-embedded; PCI: Phenol chloroform isolation.

Bonin S and Stanta G. Nucleic acid extraction methods from fixed & paraffin-embedded tissues. Expert Rev. Mol. Diagn. 13(3), (2013)

METODI PER L'ESTRAZIONE DEL DNA DA FFPE

Ci sono diversi metodi per estrarre il DNA da tessuti FFPE, che possono essere classificati in 3 tipi di protocolli :

1. Estrazione del DNA senza ulteriori purificazioni (crudo di reazione)
2. Estrazione del DNA seguita da precipitazione con alcoli DNA (NaAc/EtOH o isopropanolo)
3. Estrazione del DNA con kit commerciali basati sull'impiego di colonnine di silica per la purificazione.

DNA

Ogni procedura prevede uno step di digestione proteolitica con **proteinasasi K** per eliminare i crosslegami e consentire la **solubilizzazione del DNA**.

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

50 mM Tris HCl pH 8,

1 mM EDTA,

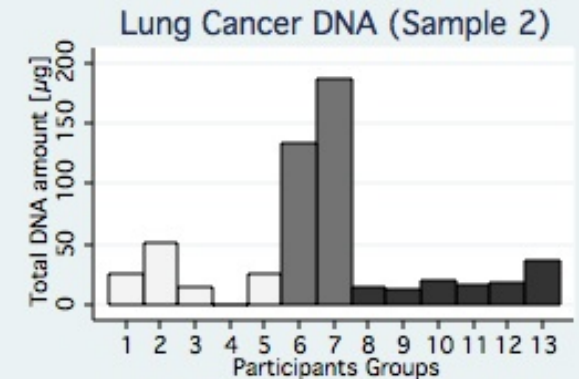
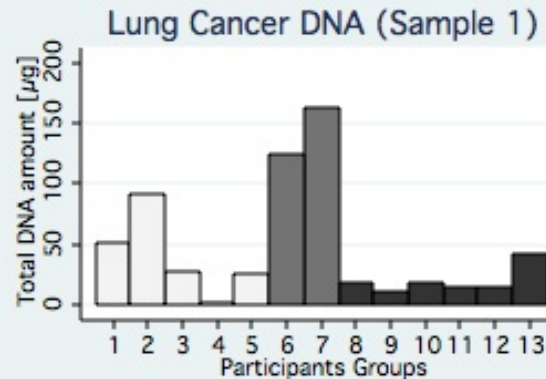
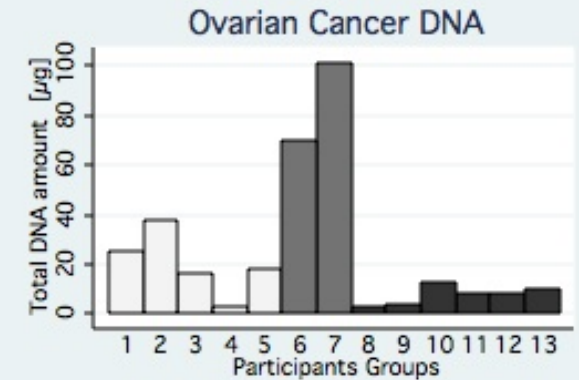
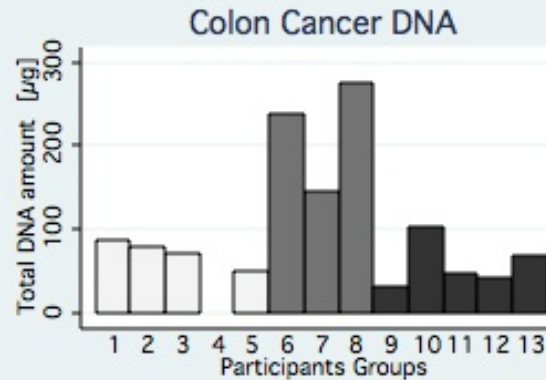
0.5% Tween 20, (l'impiego di detergenti non ionici è fondamentale nel caso non si proceda con ulteriori purificazioni)

Proteinasi K 1 mg/ml finale.

La quantità totale di DNA dipende dal **metodo** usato e dal **tipo di tessuto**. In generale la purificazione determina una perdita di materiale a fronte di una maggior purezza.

Da uno studio multicentrico di validazione

Ca Colico: 100-200 basi; ca ovarico 100 basi; ca polmonare 300-400 basi.

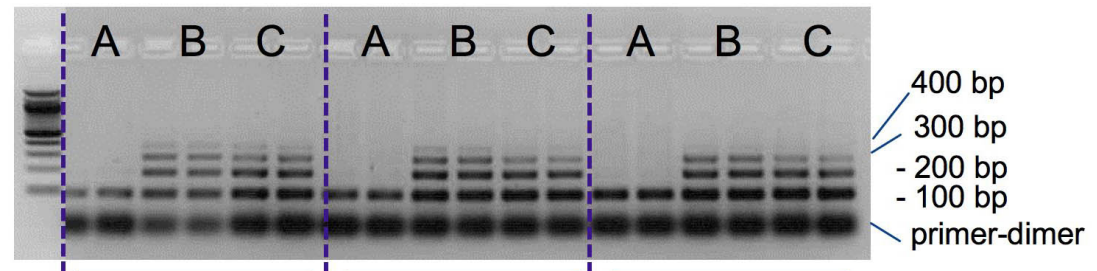


Virchows Arch (2010) 457:309–317
DOI 10.1007/s00428-010-0917-5

ORIGINAL ARTICLE

Multicentre validation study of nucleic acids from FFPE tissues

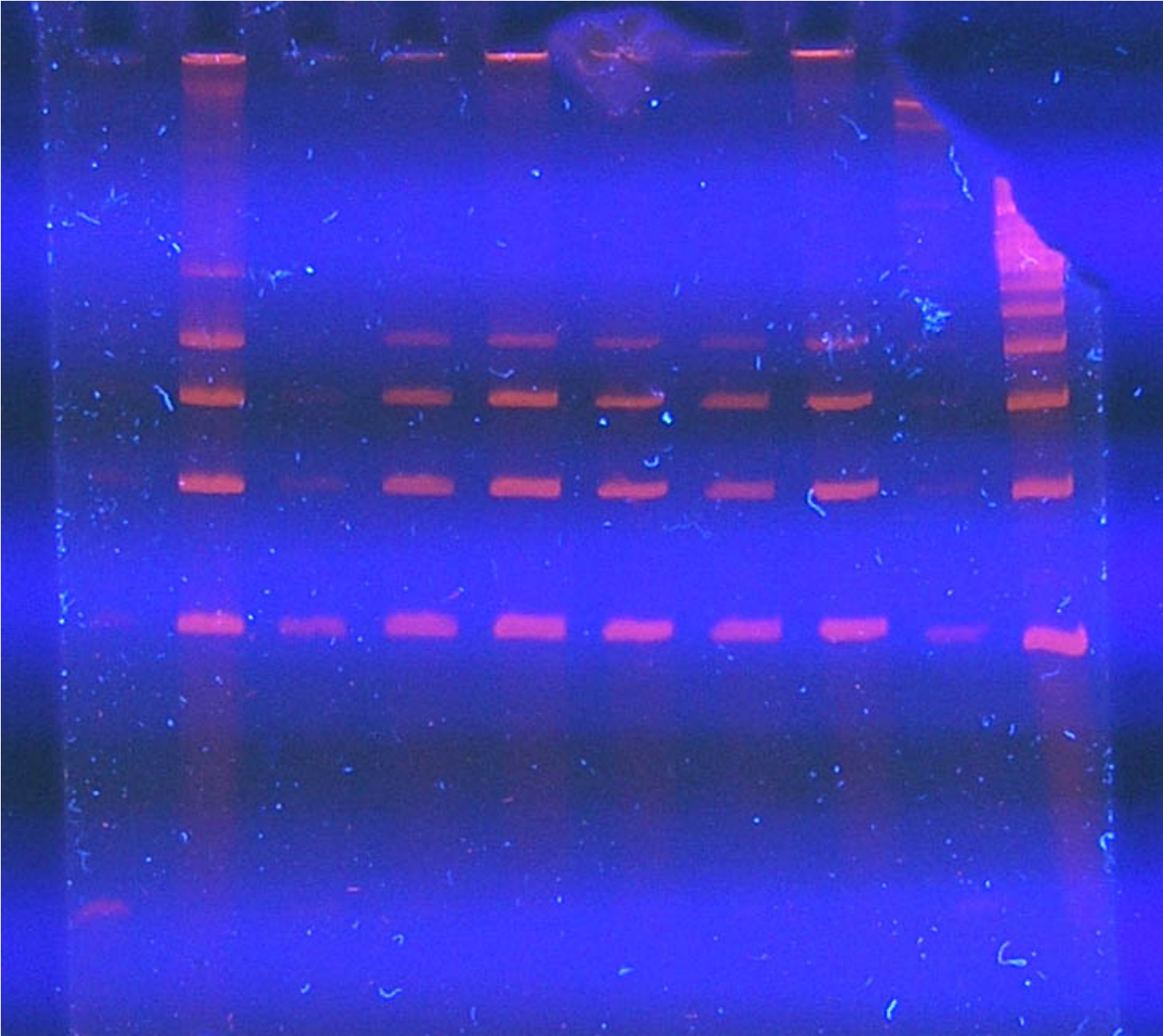
Serena Bonin · Falk Hlubek · Jean Benhattar · Carsten Denkert · Manfred Diet Pedro L. Fernandez · Gerald Höfler · Hannelore Kothmaier · Bozo Kruslin · Chiara Maria Mazzanti · Aurel Perren · Helmuth Popper · Aldo Scarpa · Paula Soares · Giorgio Stanta · Patricia J. T. A. Groenen



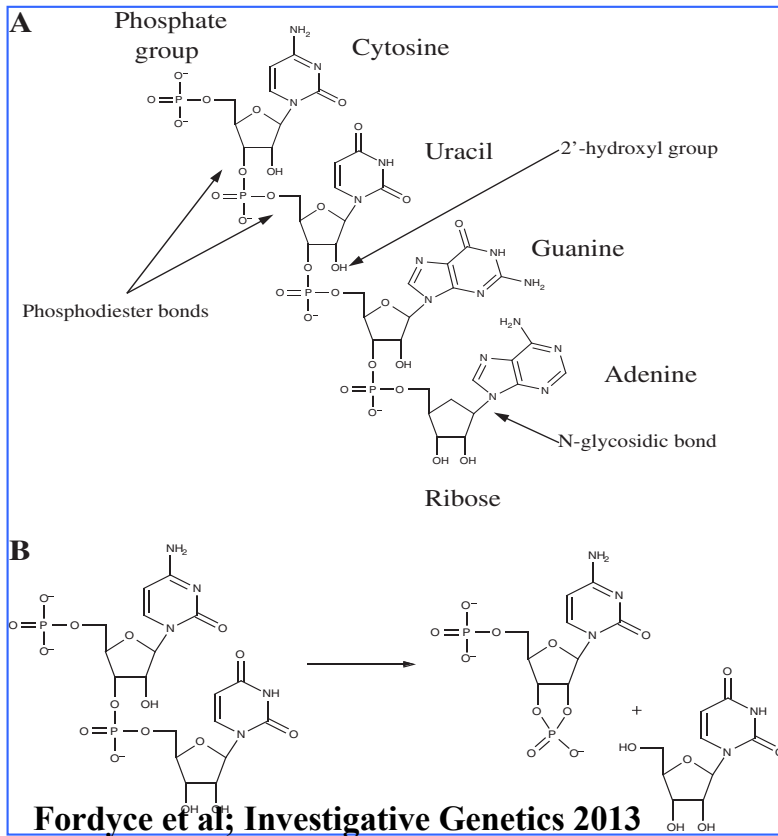
COME STANDARDIZZARE?

- o La quantità del DNA estratto varia molto da protocollo a protocollo, ma non è in relazione alla qualità in termini di massima lunghezza amplificabile.
- o La purezza dalle misure spettrofotometriche non è in relazione al qualità intesa come massima lunghezza amplificabile
- o Considerando quindi la qualità come amplificabilità non c'è un singolo protocollo estrattivo che prevale sull'altro. La scelta dipende dalle analisi da svolgere. Quando è richiesta una buona quantificazione del DNA vanno scelti protocolli estrattivi con step di purificazione.
- o Più che valutare un singolo test estrattivo da considerare come standard è più importante considerare un test standard di valutazione della qualità:
Campioni al di performance inadatta vanno ri-estratti o esclusi dallo studio

DNA FROM FFPE W/O PURIFICATION PROCEDURE

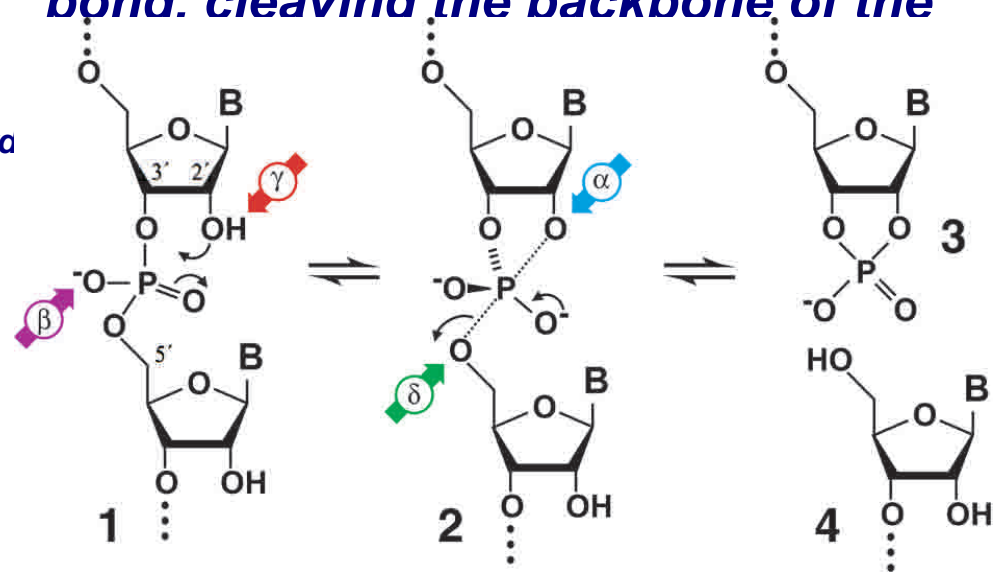


RNA degrades differently from DNA



- The 2'-OH allows the RNA molecule to be more easily degraded via hydrolysis than DNA.
- The phosphodiester bond in RNA can be broken during hydrolysis.
- The N-glycosidic bond is stronger in RNA than DNA
- The chemical process of hydrolysis, where the 2'-hydroxyl group has attacked the adjacent phosphodiester bond, cleaving the backbone of the

Fora



RNAse A increases the rate of RNA cleavage by internal phosphoester transfer

CONSERVAZIONE DEL DNA: meccanismi di degradazione e perdita

La degradazione o perdita del DNA nella conservazione può avvenire :

- per depurinazione / β eliminazione

In soluzione acquosa degrada in un processo a due steps di depurinazione / β eliminazione. E' una reazione catalizzata da acidi in condizioni fisiologiche. Al sito di depurinazione si ha rottura del legame e β -eliminazione. Il pH della soluzione di conservazione gioca un ruolo importante nella stabilità del DNA in soluzione.

- per meccanismi di ossidazione da radicali liberi

Le basi + deossiribosio \rightarrow suscettibili alla degradazione per ossidazione da radicali liberi.

- per azione di nucleasi endogene, esogene

T, pH, concentrazione salina influenzano l'attività enzimatica.

MECCANISMI DI DEGRADAZIONE DEL DNA

• il DNA può legarsi alla plastica della provetta dove viene conservato.

Per valori di forza ionica bassa o moderata (condizioni comuni di conservazione del DNA) le comuni provette di polipropilene legano meno del 5% di DNA, ma esistono provette che legano anche più del 25%.

La conservazione di frammenti corti di DNA in provette di polipropilene comporta separazione dei due filamenti e per elevati valori di forza ionica si ha la formazione di complessi di polifilamenti.

CONSERVAZIONE DEGLI ESTRATTI DI DNA

•Tradizionalmente:

In H₂O sterile o TE (10 mM Tris, pH 7.5-8.0, 1 mM EDTA), T: 4 ÷ -20° C, alcuni mesi, poca degradazione.

In TE T: -70 ÷ 37° C, 6 mesi, poca degradazione, mentre T: -45 ÷ 65° C dopo 24h segni di degradazione, dopo 8 giorni completamente degradato. Congelamenti e scongelamenti ripetuti non sembrano dare ulteriore degradazione.

•DNA precipitato:

Conservato in EtOH ricoperto da CHCl₃ a Tamb o 4° C, a -20 problemi con la reidratazione dopo tempi lunghi di conservazione.

•In soluzione di Buffers con EDTA:

Tamb, t>2 anni poca degradazione. Elevate concentrazioni di EDTA con l'aggiunta di EtOH incrementano la stabilità del DNA.

ESTRAZIONE DEGLI RNA



Scarsa quantità e qualità degli estratti



RNA può degradare nel corso dell'estrazione!

Precauzioni:

- ☞ Reagenti RNase free (trattamento con DEPC, inibitori di RNAsi)
- ☞ Guanti
- ☞ Vetreria RNase free.....
- ☞ Uso di materiale usa e getta

RNAsi

Per estrarre l'RNA è indispensabile non avere contaminazioni con RNAsi esogene!

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

✓ non necessitano di cofattori

✓ sono molto resistenti alle alte T e sono attive in un ampio range di pH

FONTI: esterne (laboratori), interne (lo stesso tessuto).

INIBITORI DI RNAsi

Specifico: Rnasina (40 kDa da placenta umana o fegato di ratto).

Aspecifici: eparina, DEPC, polivinilsolfato.

Trattamento dell' H₂O con DEPC: 0.1% finale in H₂O a 37° C O.N.

Autoclavare, il DEPC degrada ad alte T a EtOH+CO₂ ☼.

-DEPC reagisce con il Tris

-DEPC reagisce con residui di adenina

-Vetreria: trattamento in stufa a 250 - 300° C per almeno 3 h .

RNA

Ci sono 3 tipi di protocolli, tutti basati su proteolisi:

- 1) **HOMEMADE-Estrazione degli RNA seguiti da purificazione con fenolo e precipitazione con alcoli**
- 2) **Uso di Soluzioni Commerciali-con purificazione degli RNA con soluzioni monofasiche**
- 3) **Uso di KIT commerciali dedicati purificazione con colonnine di adsorbimento**

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

La resa in termini di quantità è tessuto dipendente.

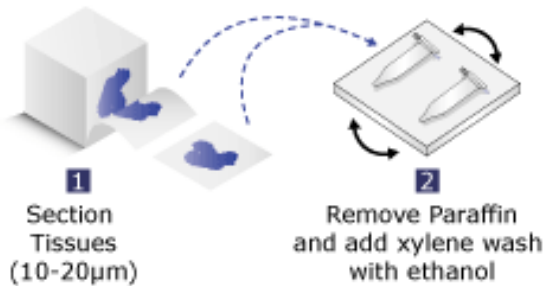
Lo step di digestione non influisce sulla qualità dell'RNA estratto, ma consente una più efficiente estrazione

Table 2. Methods for RNA extraction compared in the literature analysed in the present study.

| Study (year) | Methods, kit and manufacturer | Note |
|------------------------------------|--|-------------------------------|
| Abramoviz <i>et al.</i> (2008) | RecoverAll™(Ambion, TX, USA), High Pure Paraffin kit (Roche, NJ, USA), RNeasy® FFPE (Qiagen, CA, USA), ArrayGrade™ FFPE RNA isolation (SuperArray, Qiagen) | Application to DASL assay |
| Bonin <i>et al.</i> (2010) | RNeasy FFPE kit, High Pure FFPE RNA (Roche), in-house methods (PCI and Trizol® [Invitrogen Life Technologies Ltd, Paisley, UK] purification) | |
| Doleshal <i>et al.</i> (2008) | RNeasy FFPE kit, Absolutely RNA® FFPE kit (Stratagene, Agilent Technologies, CA, USA), High Pure FFPE RNA Micro (Roche), PureLink® RNA Isolation kit (Invitrogen), RecoverAll | For miRNA expression analyses |
| Jacobson <i>et al.</i> (2011) | RNeasy FFPE kit, High Pure FFPE RNA, RecoverAll | Application to microarray |
| Kotorashvili <i>et al.</i> (2012) | Trizol, All Prep DNA/RNA FFPE kit (Qiagen), RecoverAll | Coextraction of RNA and DNA |
| Linton <i>et al.</i> (2009) | Optimum FFPE RNA isolation (Ambion), RNeasy FFPE kit | Optimized |
| Ludyga <i>et al.</i> (2012) | RNeasy FFPE kit, in-house method (PCI); FFPE RNA/DNA purification kit (NorgenBiotek Corp, ON, Canada) | Long-term preserved tissues |
| Okello <i>et al.</i> (2012) | Absolutely RNA FFPE kit, TRI Reagent® solution (Ambion), High Pure FFPE RNA, High Pure FFPE RNA Micro kit (Roche), in-house method (PCI), Wax Free™ RNA kit (TrimGen, MA, USA), RecoverAll | Archival autopsy tissues |
| Ribeiro-Silva <i>et al.</i> (2007) | RecoverAll, High Pure FFPE RNA, Absolutely RNA FFPE kit, FormaPure kit (Agencourt Bioscience Corporation, MA, USA) | |
| Roberts <i>et al.</i> (2009) | RecoverAll, Paradise® Whole Transcript RT reagent system (Arcturus Bioscience, CA, USA), High Pure FFPE RNA, PureLink® FFPE RNA (Invitrogen), FormaPure RNA (Agencourt Bioscience Corporation) | |
| Ton <i>et al.</i> (2011) | RNeasy FFPE kit, High Pure FFPE RNA | Application to DASL assay |
| Turashvili <i>et al.</i> (2012) | RNeasy FFPE kit, Wax Free RNA kit, RecoverAll, in-house method (PCI) | |

DASL: cDNA-mediated annealing, selection, extension and ligation; PCI: Phenol chloroform isolation.

Tissue Prep



ESTRAZIONE DI RNA DA FFPE kits commerciali

☞ *Digestione con Proteinasi K*

☞ *Purificazione con Microfiltri o colonnine **

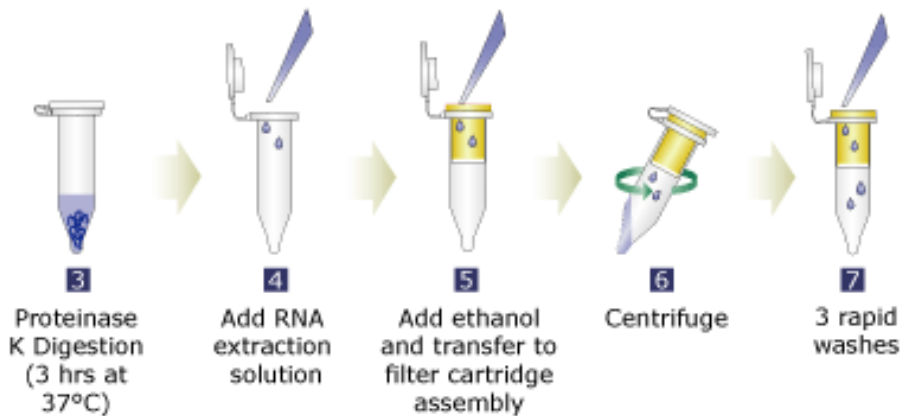
☞ *Eluizione degli RNA*

☞ *Lisi di cellule e tessuti con Proteinasi K*

☞ *Precipitazione selettiva di DNA e proteine***

☞ *Raccolta degli RNA*

RNA Extraction



RT-PCR Ready RNA



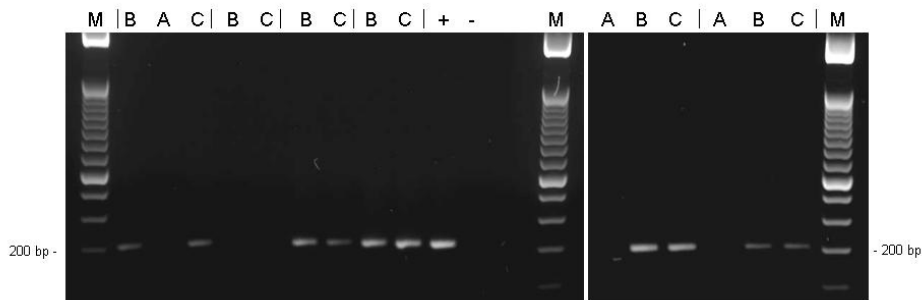
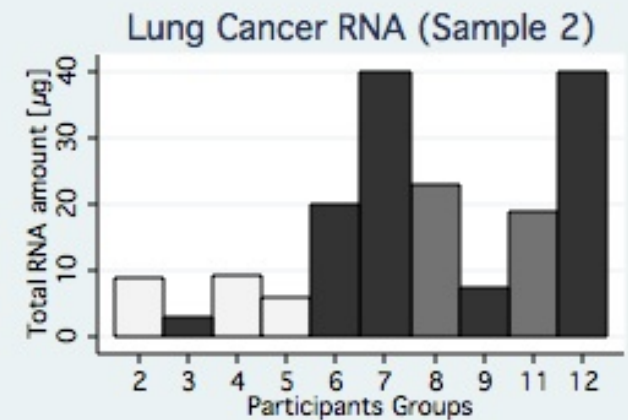
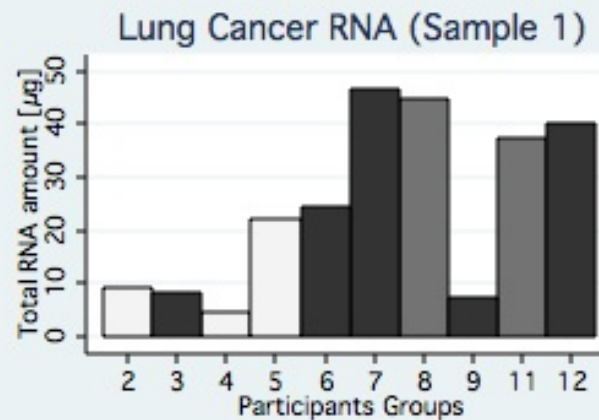
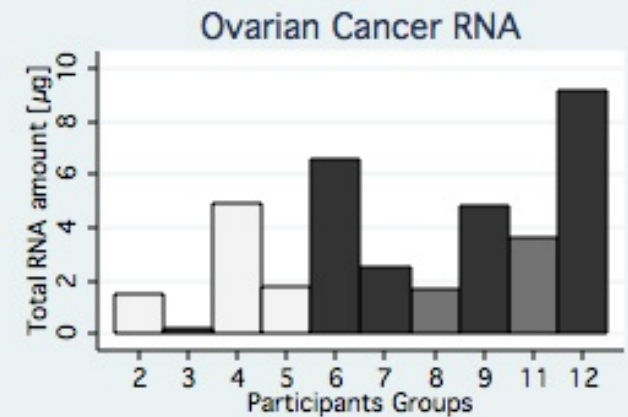
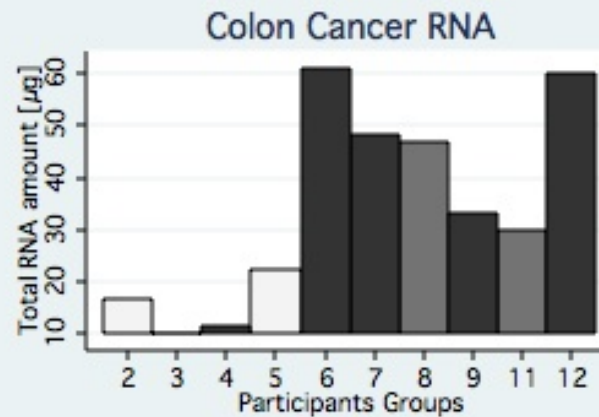
*RNA: Arcturus, Ambion; DNA: Qiagen, Roche, Intergen....

**Gentra Systems

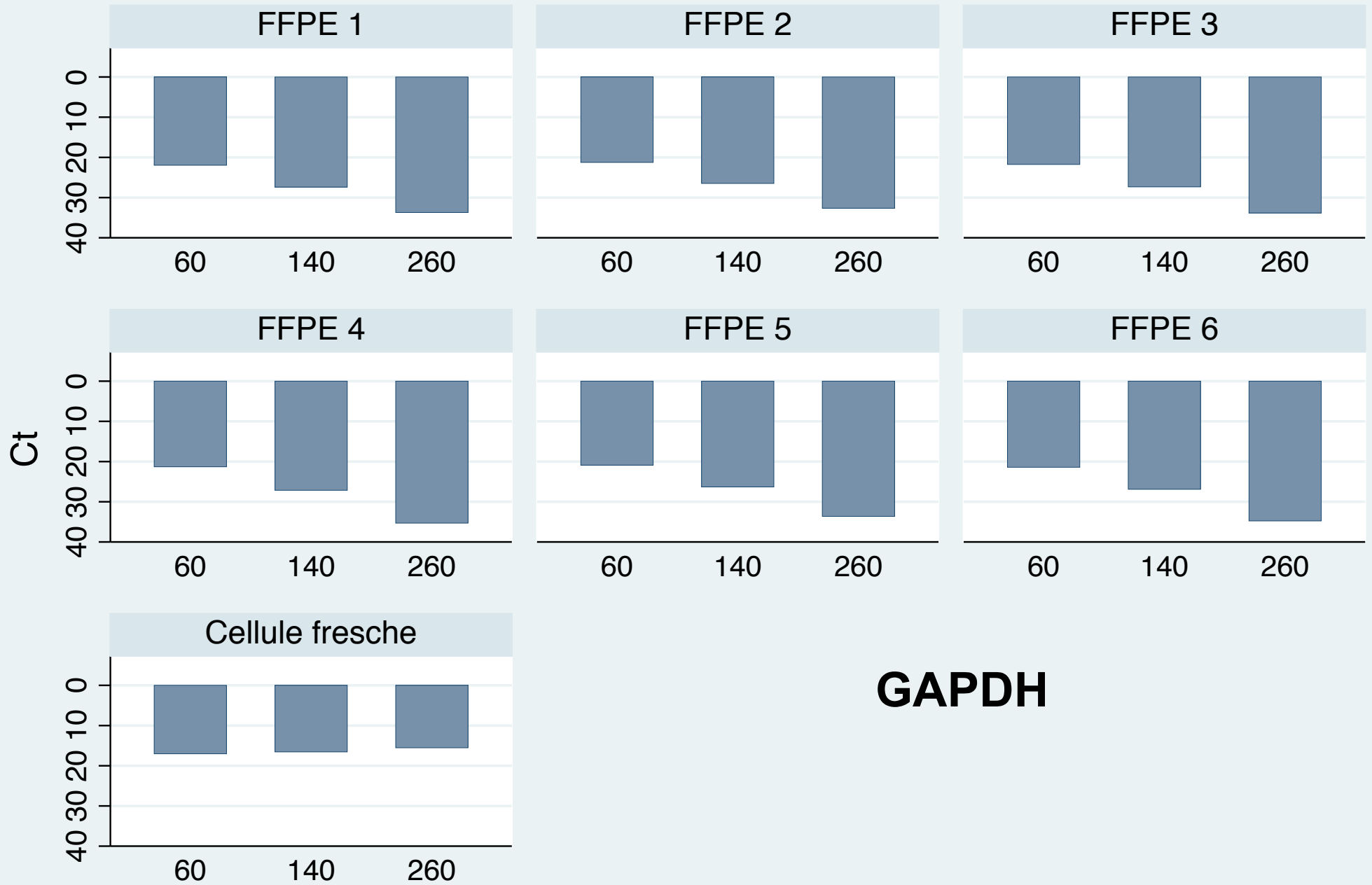
DA UNO STUDIO MULTICENTRICO DI VALIDAZIONE

L'uso di kit commerciali consente mediamente di ottenere RNA di **qualità migliore**.

S. Bonin et al. (2010) Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues. *Virchows Arch.* 457:309–317.



Real time PCR da cDNA



GAPDH

COME STANDARDIZZARE?

- o La quantità dell' RNA estratto varia da protocollo a protocollo, si ottengono mediamente rese maggiori con l'uso di kit commerciali .
- o La purezza dalle misure spettrofotometriche non è in relazione al qualità intesa come massima lunghezza amplificabile.
- o Considerando la qualità come amplificabilità l'impiego di kit commerciali consente di estrarre più RNA e più integro, ma non è SUFFICIENTE PER AVERE UNA STANDARDIZZAZIONE DEL METODO.
- o Anche utilizzando lo stesso prodotto commerciale si possono avere delle variazioni in termini di quantità, ma anche qualità dovute a piccoli aggiustamenti e/o all'operatore.
- o È indispensabile utilizzare un metodo comune per testare la qualità dell'estratto per standardizzare i risultati. NO AGILENT BIOANALYZER!!!
- o Campioni al di performance inadatta vanno ri-estratti o esclusi dallo studio

CONSERVAZIONE DELL'RNA

- Conservazione dell'estratto dissolto in H₂O DEPC a -70° C.

Metodo più comune, ma l'RNA conservato in H₂O tende a degradare a causa del pH poco favorevole e/o delle tracce di RNAsi presenti. Meglio in sodio citrato 1mM o TE a pH<7. Si previene l'idrolisi delle basi chelando cationi liberi in soluzione.

- Formamide stabilizzata:

si dissolve il pellet di RNA e consente di conservare l'RNA a -20° C per ~1 anno. Successivamente, prima dell'uso la formamide deve esser risostituita con H₂O per qualunque reazione enzimatica in vitro.

- A -20° C o anche a temperatura ambiente come precipitato in alcool.

•Come polvere liofilizzata : Dopo quantificazione dell'RNA un certo volume di soluzione può esser liofilizzato (non a caldo) in uno speed-vac fino a secchezza completa dell'RNA. La polvere può esser mantenuta a rt o a 4° C per settimane. Prima di usare l'RNA basta aggiungere l' H₂O in quantità uguale a quella evaporata.

PERDITA DEGLI ESTRATTI DI RNA

- ⇒ Attenzione deve esser posta per non ricontaminare i campioni con RNAsi.
- ⇒ Per evitare degradazioni dell'RNA per continui congelamenti e scongelamenti è bene conservarlo in piccole aliquote, piuttosto che una singola grande

RNA DA FISSATIVI CROSSLINCANTI

- Modificato dall'aggiunta di gruppi monometilici alle basi. Come risultato le molecole sono rigide e più prone alla rottura.
- Degradato con riduzione di resa e qualità in confronto al tessuto fresco.
- Inadatto alle tradizionali metodiche come il Northern Blot.
- Necessita di standardizzazione nei metodi analitici quantitativi, sia in real-time ed end-point PCR.
- Quantificazione relativa.

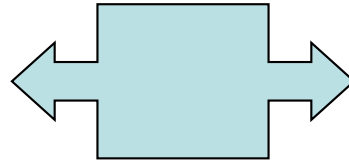
DNA E RNA IN TESSUTI AUTOPTICI: PARAMETRI COINVOLTI NELLA DEGRADAZIONE

- La fissazione dei tessuti autoptici avviene generalmente per tempi piuttosto lunghi in confronto alle biopsie.**
- L'intervallo di Postmortem (PMI - t fra la morte e la raccolta del tessuto) è spesso lungo e variabile-autolisi.**
- Il livello di degradazione degli ac. Nucleici è dipendente dalla durata del PMI (specialmente per il **DNA**) e ai tempi più lunghi di fissazione.**

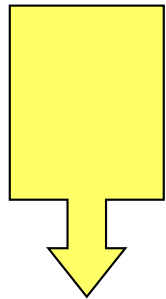
-Bonin S., Petrera F., Stanta G. PCR and RT-PCR Analysis In Archival Postmortem Tissues. In Fuchs J, Podda M. "Encyclopedia Of Diagnostic Genomics And Proteomics". (Pp. 985-988). New York: Marcel Dekker Inc (United States) 2005.

È possibile migliorare la qualità degli estratti?

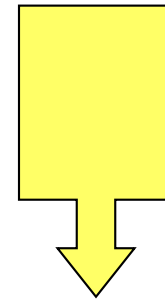
RNA



DNA

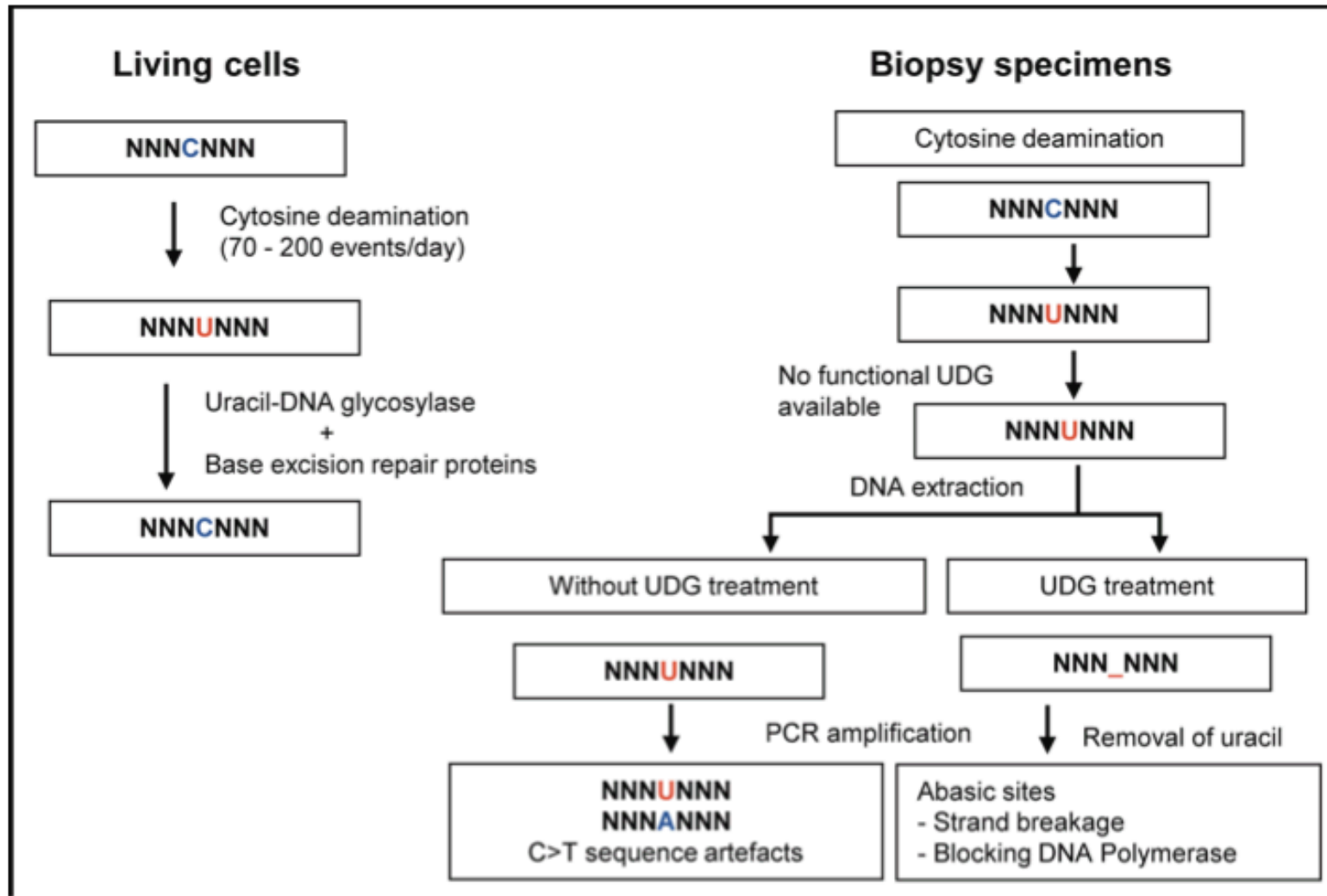


DEMODIFICAZIONE



RICOSTRUZIONE

- Cytosine deamination to uracil is a common form of DNA damage in ancient DNA
- Treatment of FFPE DNA with uracil-DNA glycosylase (UDG) would lead to the reduction of C>T (and G>A) sequence artefacts



RICOSTRUZIONE DEL DNA-1

- La degradazione del DNA è legata a rotture random su un singolo filamento.
- Per avere frammenti più lunghi di DNA basta reibridare il DNA con se stesso in modo tale da utilizzare l'altro filamento come stampo.
- Pretrattamento prima della PCR** →DNA incubato a 55° C, 1h in Tris HCL pH 8.3, 10 mM, 1.5 mM MgCl₂, 2% Triton X100, e 200 μM dNTPs..
- Si aggiunge poi 1 unità di Taq per la “ricostruzione” → 20 minuti, 72° C.
- I campioni possono esser conservati a -20° C.
- Prima della PCR** è necessario denaturare 95° C per 5 min

-S Bonin,F Petrera,B Niccolini,G Stanta, “PCR analysis in archival postmortem tissues.” Mol Pathol.:56:184-186;2003

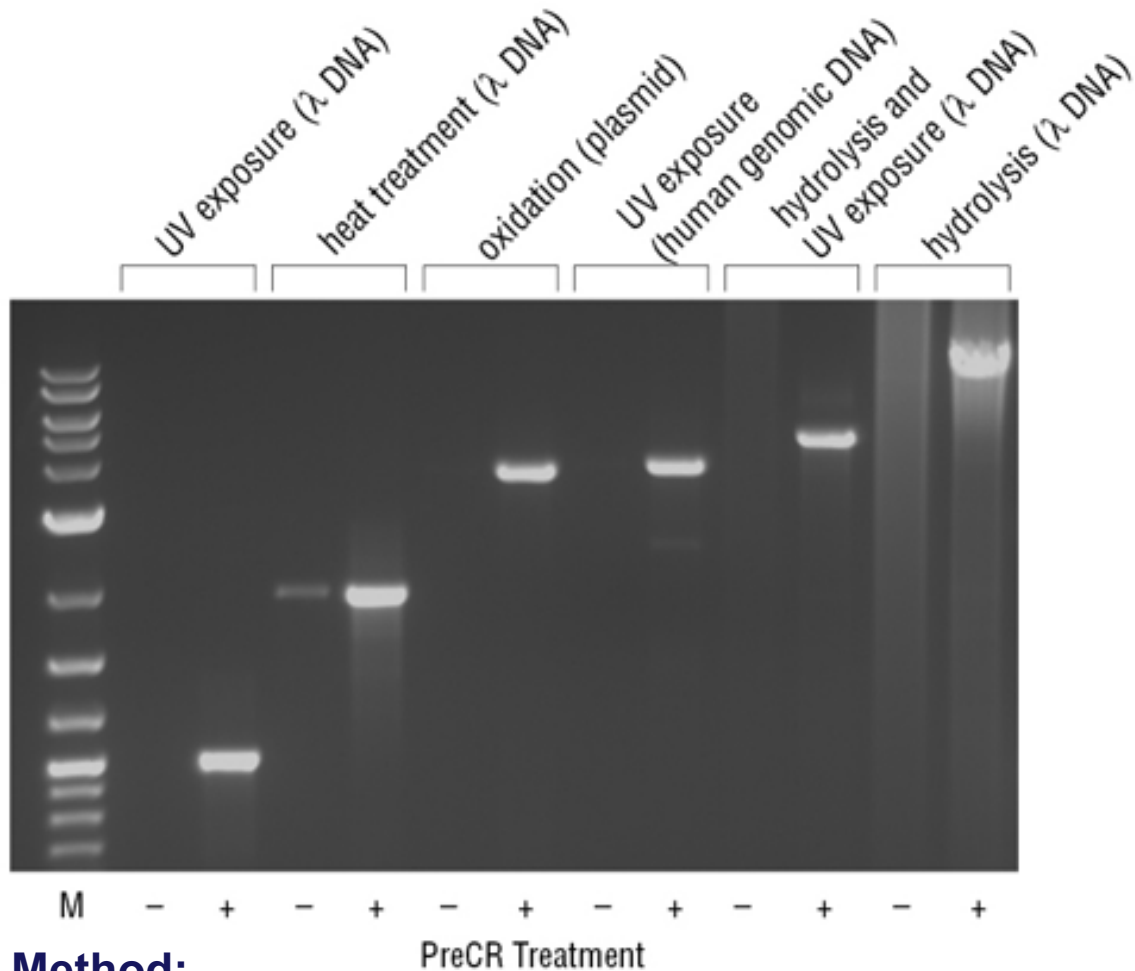
DNA RECONSTRUCTION-2

•**PreCR repair Mix is an enzyme cocktail to repair damaged template DNA prior to its use in PCR, microarrays or other techniques.**

•**It repairs damaged template DNA prior to its use in the PCR, microarrays or other DNA technologies. PreCR is active on a broad range of DNA damages, including those that block PCR (e.g. apurinic/aprimidinic sites, thymine dimers, nicks and gaps) and those that are mutagenic (e.g. deaminated cytosine and 8-oxo-guanine). In addition, it will remove a variety of moieties from the 3' end of DNA leaving a hydroxyl group. The Mix will not repair all damages that inhibit/interfere with PCR.**

| Enzyme | Substrate | Function |
|---|---------------------------------------|--|
| Endonuclease IV | AP sites in ss or dsDNA | Cleaves phosphodiester bond at 5' of AP site; removes unsaturated aldehyde and phosphate from 3' termini; leaves 5' deoxyribose-5-phosphate and 3' hydroxyl groups |
| T4 Pyrimidine-dimer-glycosylase (T4 PDG) | Cis-syn-cyclobutane pyrimidine dimers | Cleaves N-glycosydic bond at 5' end of dimer to create AP site; removes one thymine from dimer (second thymine remains as first base at 3' end of AP site) |
| Endonuclease VIII | Damaged pyrimidines in dsDNA | Cleaves N-glycosydic bond at 5' end of damaged base to create AP site; cleaves at 5' and 3' end of AP site to create 3' phosphate (via 3' a,b-unsaturated aldehyde) and 5' phosphate termini, respectively |
| Formaminidopyrimidine-DNA-glycosylase (FPG) | Damaged purines in ss or dsDNA | Cleaves N-glycosydic bond at 5' end of damaged base to create AP site; cleaves at 5' and 3' end of AP site to create 3' phosphate (via 3' a,b-unsaturated aldehyde) and 5' phosphate termini, respectively |
| Taq Ligase | dsDNA | Catalyzes formation of phosphodiester bond between juxtaposed 5' phosphate and 3' hydroxyl termini in dsDNA; cannot repair ss nicks; activity less optimal at 37°C |
| Bst DNA Polymerase | dsDNA | DNA polymerase with 5'-3' exonuclease nick translation; no 3'-5' exonuclease proof-reading; no strand displacement |
| Uracil-DNA-glycosylase (UDG) | Deaminated cytosines in ss or dsDNA | Cleaves N-glycosydic bond of uracil to create AP site |

DNA RECONSTRUCTION-2



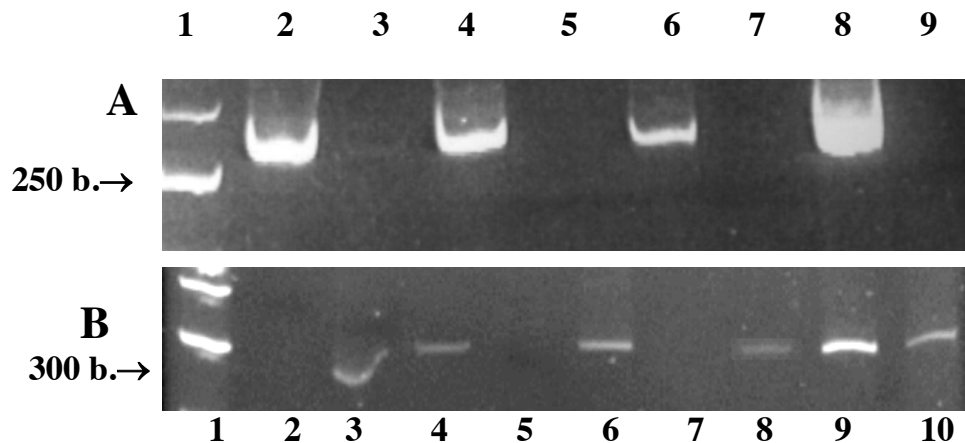
Method:

- At rt, combine 1X Buffer, 100 μ M dNTPs, 1X NAD⁺, damaged template DNA and H₂O to 46 μ l.
- Add 1 μ l of the PreCR Repair Mix, and mix gently.
- Incubate the repair reaction for 15-20 minutes at 37° C.
- Place the reactions on ice.
- Add the primers, a second aliquot of dNTPs (another 100 μ M) and the PCR polymerase directly to the repair reaction mix.
- Proceed with the PCR amplification protocol.

| DNA Damage | Cause | Can it be repaired by the PreCR Repair Mix? |
|-------------------------|-------------------------------------|---|
| abasic sites | hydrolysis | yes |
| nicks | hydrolysis nucleases shearing | yes |
| thymidine dimers | UV radiation | yes |
| blocked 3'-ends | multiple | yes |
| oxidized guanine | oxidation | yes |
| oxidized pyrimidines | oxidation | yes |
| deaminated cytosine | hydrolysis | yes |
| fragmentation | hydrolysis nucleases shearing | no |
| Protein-DNA cross-links | formaldehyde | no |

ANALISI DEL DNA NEI TESSUTI AUTOPTICI

PCR ANALYSIS IN BIOPSY AND AUTOPSY TISSUES



Prodotti di PCR relativi a DNA da tessuti autoptici fissati e inclusi. (A) Amplificazione di un frammento di Apolipoproteina E gene (287 bp). Ladder (linea 1), campioni autoptici ricostruiti (linee 2, 4, 6 e 8), gli stessi autoptici senza ricostruzione (lanee 3, 5, 7 e 9). (B) Amplificazione di un frammento del gene TTR (291 bases). Ladder (linea 1), campioni autoptici ricostruiti (linee 2-10).

Table 1: PCR amplification of DNA of autopsy and biopsy origin

| Amplicon | Restored and denatured autopsy DNA | No restored biopsy DNA |
|----------------------------|------------------------------------|------------------------|
| ApoE ¹ (287 bp) | 4/4 | 4/4 |
| TTR1 ² (291 bp) | 6/9 | 9/9 |
| TTR1 (339 bp) | 1/9 | 9/9 |

1 Apolipoprotein E

2 Human prealbumin gene

-Bonin S., Petrera F., Stanta G. "Encyclopedia Of Diagnostic Genomics And Proteomics". (Pp. 985-988). New York: Marcel Dekker Inc (United States) 2005.

ANALISI DEGLI RNA IN TESSUTI AUTOPTICI E BIOPTICI

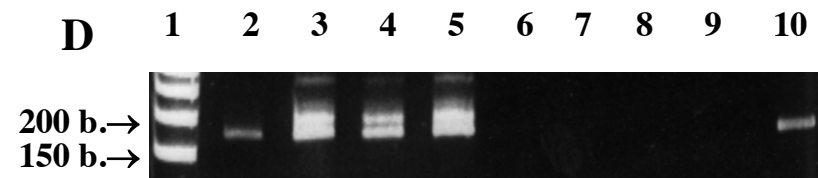
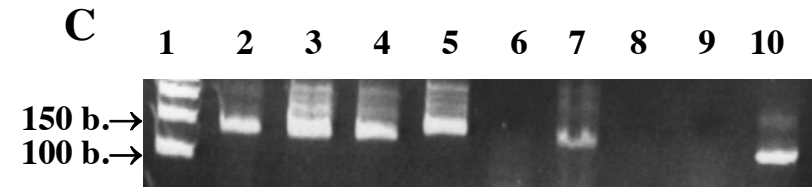
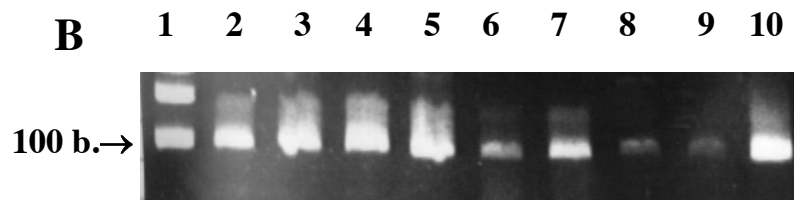
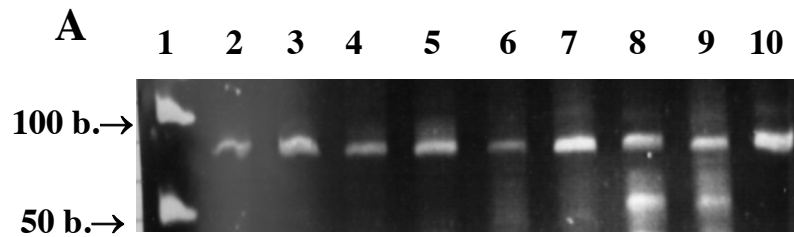
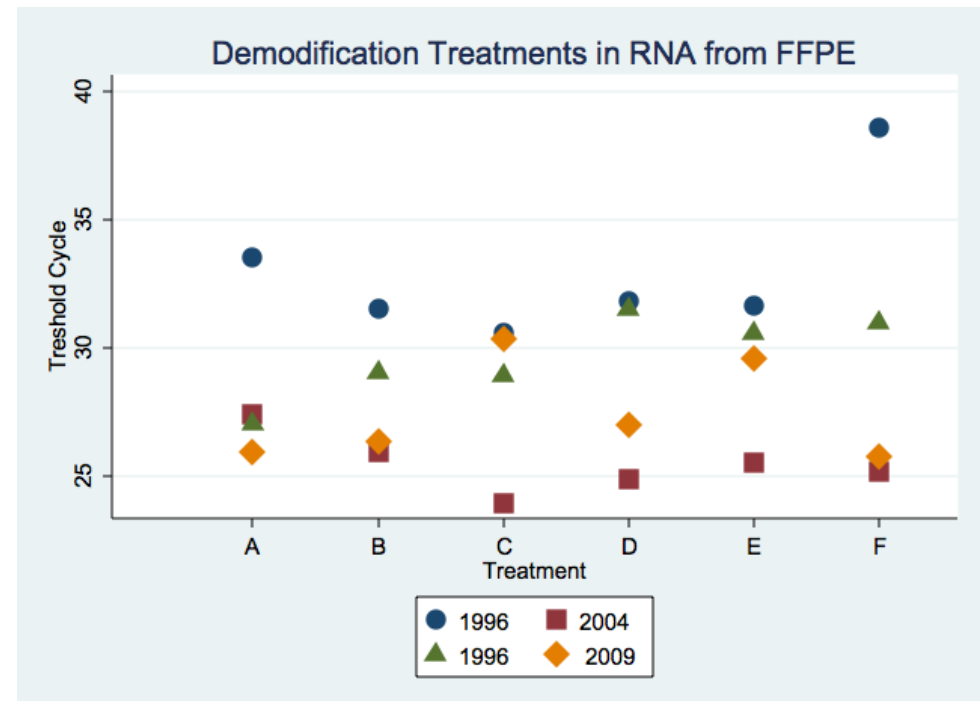


Table 2: RT-PCR amplification of β -Actin RNA of autopsy and biopsy origin

| β Actin Amplicon size | Autopsy RNA | Biopsy RNA |
|-----------------------------|-------------|------------|
| 77 bp | 4/4 | 4/4 |
| 100 br | 4/4 | 4/4 |
| 120 bp | 1/4 | 4/4 |
| 170 bp | 0/4 | 4/4 |

DEMODOFICAZIONE DELL'RNA

- L'addizione di $\text{CH}_2\text{-OH}$ alle basi dell'RNA lo rende resistente all'RT.
- Tutte e 4 le basi presentano questa modificazione ma con \neq livelli (40% A \div 4% U).
- Questi gruppi possono essere rimossi per semplice riscaldamento in tamponi senza formalina.
- Metodo:** risospendere l'estratto in TE buffer 1X pH 7.5 e incubare per 20 min. a 70° C. La tecnica consente di migliorare la performance della realtime PCR, ma è consigliata solo per **campioni datati**.



ESTRAZIONE

DI

miRNA

🔒 I Metodi per RNA da FFPE sono stati ottimizzati per estrarre RNAs più lunghi.

🔒 Il crosslinking estensivo dei miRNA con le proteine nella fissazione rende i miRNA più resistenti all' estrazione. La degradazione enzimatica, prima e durante la fissazione e la degradazione chimica comportano una riduzione in quantità e integrità degli RNA.

🔒 L' accessibilità dei miRNA da FFPE sembra non dipenda dalla fissazione e sembra esser simile a quella dei tessuti freschi.

Si analizzano dopo RT in relative con:

-TaqMan MicroRNA reverse transcriptase kit o il TaqMan MicroRNA assay kit (Applied Biosystems, California, CA)

-In alternativa: il Locked nucleic acid (LNA) based miRNA array .

CONCENTRATION OF NUCLEIC ACIDS

For ds DNA $[DNA] = A_{260} * \text{dilution factor} * 50 * 10^{-3} (\mu\text{g}/\mu\text{l})$

For ss DNA $[DNA] = A_{260} * \text{dilution factor} * 33 * 10^{-3} (\mu\text{g}/\mu\text{l})$

For RNA $[RNA] = A_{260} * \text{dilution factor} * 40 * 10^{-3} (\mu\text{g}/\mu\text{l})$

The ratio A_{260} / A_{280} is used to evaluate the purity level of nucleic acids with respect to proteins, phenol, etc. Contamination by other nucleic acids is not considered. A ratio higher than 1.5 and ≤ 2 means good purity.

The ratio A_{260} / A_{230} is used to evaluate the contamination level by carbohydrates and salts. A ratio higher than 1.5 means that A_{260} reflects the real concentration of the nucleic acid.

FLUOROMETRIC METHOD FOR DNA OR RNA

Incubation with fluorochrome (Hoechst 33258 or PicoGreen for DNA and RiboGreen for RNA) and comparison with standard curve. Fluorimeter based.

ETHIDIUM BROMIDE METHODS

Agarose plate or minigel (comparison with known standards). Spotting directly the tested DNA on agarose gel prepared in a small Petri capsule together with 4 or 5 reference DNAs, of known concentration. Evaluation at a UV transilluminator by direct comparison.

QUALITY OF NUCLEIC ACIDS

Electrophoresis:

Agarose gel electrophoresis for DNA and denaturing agarose gel electrophoresis for RNA

PCR based methods

Amplification of fragments of increasing length (both for DNA and RNA).

3':5' assay using a highly expressed housekeeping gene (only for RNA) (RNA from FFPE could be deaminated!)

LAB on a chip methods

Agilent Bioanalyser 2100: electropherogram (manual method); for RNA, 28S/18S ratio (ratio method-it is the ratio of the 28S peak value to the 18S peak value. A proportion of the ribosomal bands (28S:18S) between 0.7 and 2.5 is considered to be typical of good quality RNA. The second one is the RIN number (RIN 10 is referred to intact RNA).

APPLICAZIONI

Gli acidi nucleici da FFPE possono essere impiegati sia per analisi qualitative che quantitative mediante l'uso di metodi molto sensibili come:

1. End point PCR
2. Real-time PCR
3. In situ Hybridization
4. Microarrays (solo per ricerca, non diagnostica)