إعادة استخدام الحمض النووي المستخرج من عينات الصبغة المناعية المستعملة من الشرائح الشمعية :

تحسين تقنية الإستخراج والإستخدام في التحاليل الجزيئية لدراسة بيولوجيا السرطان

مقدمة من منى بنت سالم عبيد الشيخ

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات درجة الماجستير في العلوم
(علم الوراثة / وراثة جزيئية)

المشرفين على الرسالة
د. منى محمد الشريف
أ. د . عبدالباسط بوحميده

المستخلص

حتى الآن، تعتبرتقنية الشرائح الشمعية الطريقة التقليدية (البارافين المثبّت بالفورمالين) هى المعيار الذهبى (القيّم) للحفاظ على شكل الخلايا والأنسجة، بينما يعتبر حفظ الأنسجة بالتبريد هو المعيار الذهبى للحفاظ على الجزيئات الحيوية. فبمجرد صبغ هذه الأنسجة ، تتم أرشفة (حفظ) الشرائح بشكل روتيني جنبا إلى جنب مع كتل البارافين المثبت بالفورمالين لفترة طويلة في البنوك الحيوية/المستشفيات. ومع ذلك، فإن عملية إعادة إستخدام العينات البيولوجية المثبتة بالفعل والمصبوغة لإستخراج الحمض النووي ليست عملية شائعة في جميع أنحاء العالم. حيث ركزت هذه الدراسة على الفائدة من إستخراج الحمض النووي من الشرائح المصبوغة بطريقة الكيمياء المناعية النسيجية لتقييم الجودة والفائدة التى ستتحقق عند القيام بالمزيد من التحليل الجزيئية والتحقق من صحة الحمض النووى على المستوى الوراثي (الجينى). تم إستخراج الحمض النووي وإعادة إستخدامه لتقييم الصورة الكلية للجين الورمى KRAS ، والذى يلعب البروتين الخاص به دوراً حاسما في إعطاء الإشارات للأنسجة الطبيعية، وحدوث طفرة فى تركيبه يعتبر خطوة حيوية في

حدوث العديد من أنواع السرطان مثل سرطان القولون والمستقيم. ومع النقص في العينات الحيوية عالية الجودة والمفسرة تفسيرا كاملا، فنحن نعتقد أن هذه التقنية سوف تحسن لدينا الأعمال المرتبطة باستخدام العينات الحيوية في المستودعات الحيوية والبحوث الطبية بشكل افضل.وقد أُعدَّت الشرائح المأخوذة من مرضى سرطان القولون والمستقيم والتى تم صبغها CEGMR بواسطة البارافين المثبت بالفورمالين بطريقة الكيمياءالمناعية النسيجية وخُزِّنت في البنك الحيوي لجامعة الملك عبدالعزيز ويتكون سير العمل الذي صممته مجموعتنا تباعا من إزالة غطاء الشريحة ثم وضع ٤٤ من خطوط الأنابيب، والتي كانت مزيجاً من ١١ مادة كيميائية، ودرجة حرارتها (درجة حرارة الغرفة مقابل ٣٧ درجة مئوية)، والاهتزاز (اهتزاز مقابل عدم اهتزاز). تم إختيار سبعة من خطوط الأنابيب والتي تم بواسطتها إزالة الغطاء المنزلق عن الشريحة فى نحو٢٤ إلى ٣٠ ساعة للدراسة, ثم تلا ذلك شرائح البارافين المثبت بالفورمالين غير المغطاة بطريق سلخ النسيج الخام للأنسجة الخام المصبوغة بطريقةالكيمياء المناعية النسيجية بإستخدام QIAamp DNA FFPE Tissue Kitوفقا لإرشادات الشركة المصنعة. وقد تم الحصول على حمض نووي ذو جودة عالية يمكننا من خلاله معرفة أنماط التسلسل الجيني لجينKRASوقد اظهرت قمم متباعدة بشكل متساوي, وقد لوحظ وجود كل منها بلون واحد فقط.

ولقد اقترحت الدراسة تقنية واعدة لإعادة تدوير وإعادة استخدام الحمض النووي من الشرائح المصبوغة بطريقة الكيمياء المناعية النسيجية بتركيز مناسب وقوام مكتمل كبداية لتطبيق المزيد من التحاليل الجزيئية.

Reuse of DNA Extracted from Already Immunostained Formalin Fixed Paraffin Embedded (FFPE) Slides: Technique Refinement and Use in Downstream Molecular Analysis to study Cancer Biology

By

Mona Salem Obaid Al-Shaikh

A Thesis Submitted for the Requirements of the Degree of Master of Science [Genetics / Molecular Genetics]

Supervised By

Dr. Mona M. Al-Sharif

Prof. Abdelbaset Buhmeida

Abstract

So far, the conventional (FFPE) Formalin Fixed Paraffin Embedded technique is the gold standard for preserving histomorphology, while cryopreservation of tissue is the gold standard for biomolecules' preservation. Once these tissues stained, the slides are routinely archived along with FFPE blocks for long in biobanks/hospitals. However, the reuse of already fixed and stained biospecimens to extract DNA is not a common practice worldwide. This study focused on the feasibility of extracting DNA from already immunohistochemistry (IHC) stained slides to assess its quality and usefulness for further downstream molecular analysis and validation at genetic level. DNA was extracted and reused to evaluate the mutational profile of selected proto-oncogene *KRAS*, which its

protein plays a crucial role in normal tissue signaling, and its mutation is a vital footstep in the development and progression of many cancer types such as colorectal carcinoma (CRC). With the shortage in high-quality and fully annotated biospecimens, we believe that this technique will improve our best practices associated with the use of biospecimens in biorepositories and medical research. FFPE IHC slides from CRC consented patients were made and stored in the CEGMR Biobank, King Abdulaziz University. A workflow designed by our group consists successively of removing the slide cover-slip by applying 44 pipelines, which were a combination of 11 chemicals, temperature (room temperature versus 37°C) and shaking (shaking versus no shaking). Seven pipelines that showed a cover-slip removal time around 24 to 30 hours were selected for the study, then the non-covered FFPE slides were followed by crude dissection of the IHC stained tissue and DNA extraction using the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit according to manufacturer's instructions . After DNA quality assessment, downstream mutational analysis of *KRAS* was analysed. A high quality DNA was obtained allowing *KRAS* gene sequencing patterns, clean DNA chromatograms with evenly-spaced peaks, each with only one color were achieved. The study suggested a promising technique to reuse DNA from IHC stained slides with obtaining a suitable DNA concentration and integrity as starting biomolecule for further downstream molecular applications.