

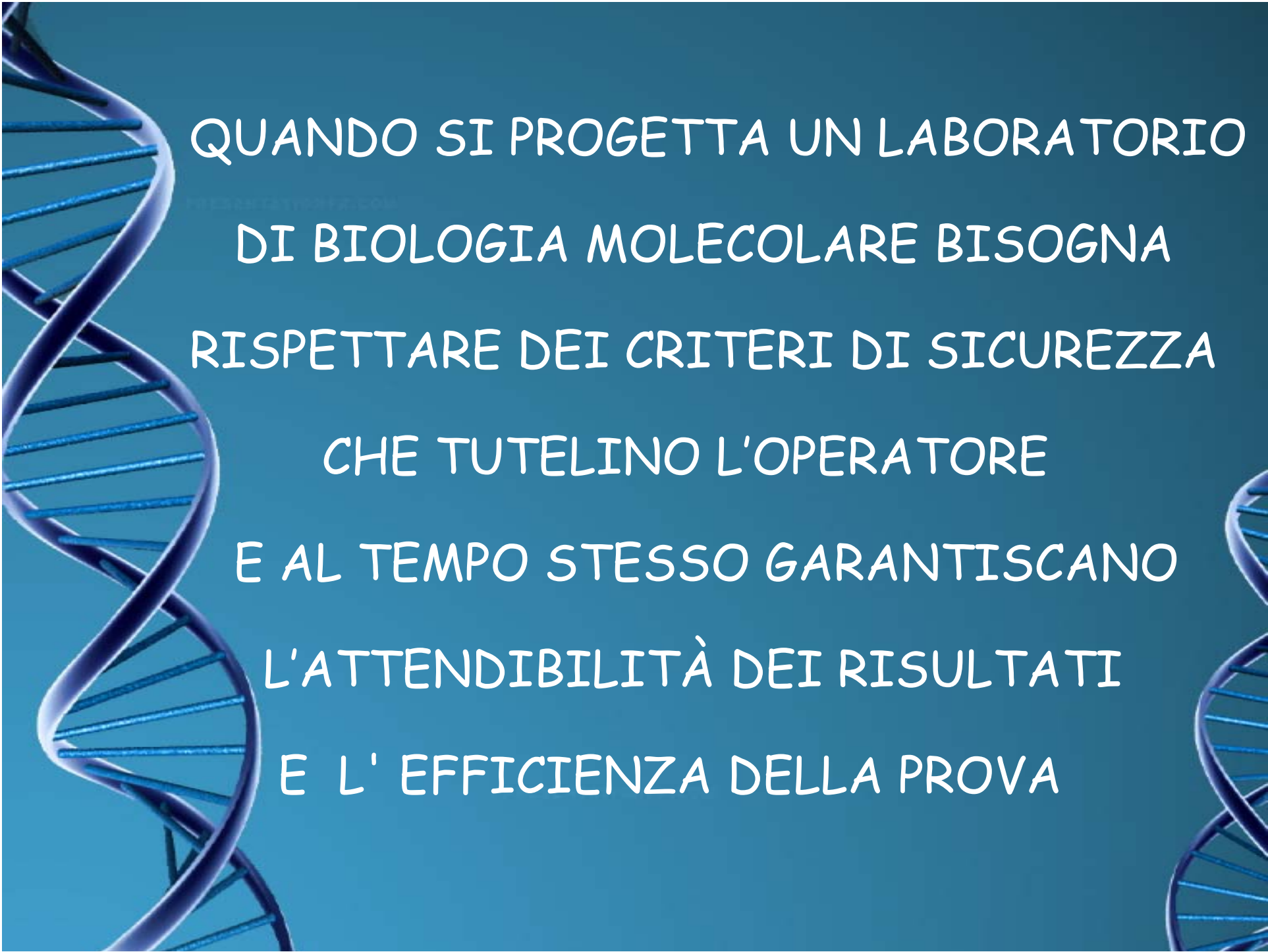


IL LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE

L'ORGANIZZAZIONE DEGLI SPAZI

I PERCORSI

I CONTROLLI



QUANDO SI PROGETTA UN LABORATORIO
DI BIOLOGIA MOLECOLARE BISOGNA
RISPETTARE DEI CRITERI DI SICUREZZA
CHE TUTELINO L'OPERATORE
E AL TEMPO STESSO GARANTISCANO
L'ATTENDIBILITÀ DEI RISULTATI
E L' EFFICIENZA DELLA PROVA



SUDDIVISIONE DEGLI AMBIENTI DI LAVORO E DELLE ATTIVITÀ SVOLTE

Un modello base di Laboratorio di Biologia Molecolare deve prevedere la disponibilità di 2 differenti aree:

A) un'area riservata alle fasi di **PRE-AMPLIFICAZIONE** suddivisa in:

1. ambiente per la **preparazione del campione**
2. ambiente per la preparazione della **miscela di reazione**

B) un'area di **POST-AMPLIFICAZIONE** riservata all'**amplificazione / rilevazione** dei prodotti PCR



SUDDIVISIONE DEGLI AMBIENTI DI LAVORO E DELLE ATTIVITÀ SVOLTE

Le due aree dovrebbero essere mantenute distinte, ad es. con aree diverse e dedicate, non comunicanti distribuite lungo un corridoio comune.

**Il lavoro va organizzato seguendo il
sistema di flusso a senso unico
dalla zona PRE amplificazione
↓
alla zona POST amplificazione**



A) zona PRE amplificazione (1)

1. Ambiente per la preparazione del campione nel quale si compiono le operazioni di:

- Preparazione e conservazione del campione (separazione delle matrici biologiche, isolamento cellulare, concentrazione cellulare). I campioni di DNA o RNA devono essere preparati in un'area distinta da quella in cui vengono manipolati i reagenti e da quella in cui vengono analizzati gli amplificati.
- Lisi ed estrazione degli acidi nucleici dalle diverse matrici biologiche con metodiche diverse.
- Conservazione degli acidi nucleici.

A) zona PRE amplificazione (2)

1. Ambiente per la preparazione del campione nel quale si compiono le operazioni di:

- Gli acidi nucleici (DNA o RNA) possono essere quantificati, con metodi spettrofotometrici o fluorimetrici, al fine di verificarne la purezza
- Aggiunta del DNA o dell'RNA estratto e dei controlli negativo e positivo alla miscela di reazione (per PCR o retro trascrizione)

Area pre-PCR: dotazione ambiente per la preparazione del campione



- cappa a flusso laminare
- centrifughe
- vortex
- blocco termostato
- una serie di micropipette dedicate con puntali dotati di filtro
- provette sterili e porta provette
- camice
- guanti

A) zona PRE amplificazione (3)

2. Ambiente per la preparazione della Master Mix nel quale si compiono le operazioni di:

- Suddivisione in aliquote e stoccaggio dei reagenti di amplificazione
E' necessario aliquotare e stoccare i reagenti utilizzati per la PCR (tampone, primer, nucleotidi, enzima) in quest'area.
- Preparazione della miscela di reazione (Master Mix).

Area pre-PCR: dotazione ambiente per la preparazione della Master Mix



- una serie di micropipette dedicate con puntali dotati di filtro
- provette sterili e porta provette
- camice
- guanti

B) zona POST amplificazione

Ambiente deputato alle operazioni di:

- Amplificazione mediante PCR classica e/o real-time
- Dopo la fase di amplificazione si deve effettuare una centrifugazione (5 sec) per evitare l'effetto aerosol (condensa) sulla superficie interna dei tappi, determinato dai cicli termici
- Rilevazione (elettroforesi su gel, sequenziamento, etc.)
- Gestione dati ed archiviazione

Area PCR/post-PCR: dotazione ambiente



- thermal cycler e real-time cycler
- sequenziatore
- cella elettroforetica e transilluminatore
- centrifughe
- vortex
- blocco e bagno termostato
- una serie di micropipette dedicate con puntali dotati di filtro
- provette sterili e porta provette
- camice
- guanti

Percorsi consigliati in un laboratorio di biologia molecolare



Ogni stanza o zona dedicata deve essere attrezzata con tutto ciò che necessita (strumenti e materiale) al completamento della procedura prevista in quella stanza o zona.

Per nessuna ragione, strumentazione o materiale dedicato ad una stanza o area, va trasportato o utilizzato in un'altra.



Strumenti, reagenti, pipette e puntali dedicati nelle diverse aree

- Cappa a flusso laminare
- Microcentrifuga
- Vortex
- Blocco termostato
- Spettrofotometro
- Frigorifero, congelatore -20 °C
- Thermal-cycler
- Sistema elettroforetico
- Timer
- Pipette variabili autoclavabili (0,5-1000 μ L) con supporti
- Puntali con filtro in porta puntali
- Tubi di biologia molecolare (0.2/0.5/1.5/2.0 ml)
- Rack porta tubi (anche refrigerati)
- Guanti in lattice
- Cilindri e Becker
- Reagenti aggiuntivi (alcool etilico - ipoclorito)



IMPORTANTE:

- IDENTIFICA, PREPARA E CONSERVA CORRETTAMENTE I CAMPIONI**

Ogni laboratorio deve dotarsi di un protocollo scritto che contiene le norme di preparazione ed estrazione del campione biologico da esaminare ai fini della massima standardizzazione e, quindi, di una più precisa riproducibilità dei risultati.

E' indispensabile una corretta identificazione e conservazione dei campioni, aliquotati negli appositi tubi di raccolta sterili, in frigo e/o congelatore.

- CAMBIA FREQUENTEMENTE I GUANTI IN LATTICE**

E' consigliabile cambiare i guanti per lo meno ogni volta che si accede all'area pulita in modo da ridurre le possibilità di trasferimento di DNA amplificabile.

- CONSENTI UN CORRETTO E AGEVOLE SPOSTAMENTO DELL'OPERATORE**



IMPORTANTE:

- **SUDDIVIDI I REAGENTI IN PICCOLE ALIQUOTE**

Scongellare e ricongellare ripetutamente nucleotidi, enzimi e primers porta, inevitabilmente, al loro deterioramento. È, pertanto, intuitivo il vantaggio di aliquotare i reagenti in maniera adeguata

- **APRI ED ETICHETTA CON ATTENZIONE I TUBI DI REAZIONE STERILI DNAsi E RNAsi FREE**

- **PREPARA IN MANIERA COMPLETA LA MIX DI REAZIONE PRIMA DELL'AGGIUNTA DEL DNA O cDNA**

- **CHIUDI SEMPRE IL TUBO DI REAZIONE, DOPO L'AGGIUNTA DEL CAMPIONE PRIMA DI PASSARE AL CAMPIONE SUCCESSIVO**



IMPORTANTE:

- **USA PUNTALI CON FILTRO POSTI SU SUPPORTI PORTAPUNTALI**

Le normali pipette per puntali monouso usate comunemente in laboratorio sono fonte di contaminazione. Si possono formare infatti aerosol contenenti frammenti di DNA che possono essere trasportati in campioni negativi. Per eliminare questa cross-reazione è necessario l'uso di pipette con puntali contenenti un filtro (barriera tra campione e pipetta) o pipette ad espulsione positiva con puntali dotati di pistone.

- **UTILIZZA SET DI PIPETTE DISTINTI NELLE DIVERSE AREE**

- **PULISCI LE SUPERFICI DI LAVORO CON PRODOTTI SPECIFICI** (ipoclorito di sodio 10% e alcool etilico al 70%).

NORME DI SICUREZZA

In laboratorio bisogna utilizzare sempre:

- ❖ guanti monouso;
- ❖ occhiali di protezione (sempre ben puliti);
- ❖ camici;
- ❖ adeguata ventilazione dei locali;
- ❖ manutenzione delle apparecchiature;
- ❖ addestramento specifico;
- ❖ adozione, aggiornamento e divulgazione del protocollo per la sicurezza.



CONTROLLO DELLE CONTAMINAZIONI

L'estrema sensibilità della PCR, reazione che consente di generare quantità enormi di ampliconi a partire da una sequenza bersaglio di DNA o RNA, rappresenta l'aspetto che maggiormente deve essere tenuto in considerazione nell'applicazione della metodica.

Le contaminazioni (carry over), intese non nel senso classico in termini di inquinamento microbiologico ma come propagazione di DNA precedentemente amplificato nei campioni in trattamento, sono sempre in agguato.



CONTROLLO DELLE CONTAMINAZIONI

Possono essere di natura diversa:

- **Carry-over derivante da amplificazioni precedenti:**

Il saggio è pericolosamente sensibile alla presenza di molecole di DNA provenienti da precedenti amplificazioni, disperse nell'ambiente, sull'operatore e sugli strumenti; l'apertura di una provetta contenente l'amplificato può dar luogo ad un effetto aerosol che rende l'ambiente inutilizzabile per l'allestimento di ulteriori reazioni di PCR.



CONTROLLO DELLE CONTAMINAZIONI

- **DNA esogeno:**

DNA stampo per la PCR può essere presente nell'ambiente di lavoro (ad esempio, nel caso in cui vengano amplificate regioni del genoma umano, l'operatore può essere fonte di contaminazione con le proprie cellule di desquamazione)

- **Cross-contaminazione tra campioni:**

Si verifica durante la preparazione dei campioni o durante l'allestimento della reazione tra campioni positivi e negativi.



CONTROLLO DELLE CONTAMINAZIONI

- **Contaminazione in fase di rilevazione del prodotto amplificato.**

La riduzione del rischio di contaminazione si ottiene agendo su diversi livelli:

- suddivisione fisica degli ambienti di lavoro (consente di garantire gli obiettivi di *specificità*, *sensibilità* e *riproducibilità*, necessari per una perfetta resa della reazione)
- uso dedicato di strumenti, reagenti, pipette, puntali nelle diverse aree
- adozione di una prassi di laboratorio appropriata (Buona Prassi di Laboratorio).



CONTROLLI

Come in tutte le tecniche laboratoristiche è necessario allestire sia un C+ che un C- per evidenziare eventuali falsi positivi.

- **IL CONTROLLO POSITIVO :**

La positività di questo campione attesta la corretta esecuzione della reazione di amplificazione.

Il controllo positivo è costituito da un plasmide o da un campione di DNA/RNA contenente la sequenza bersaglio.

Sono sufficienti poche molecole di target per ottenere un segnale positivo dopo l'amplificazione.

Non deve avere troppe copie bersaglio o costituirebbe una fonte di contaminazione (generando quantità enormi e non necessarie di sequenze di DNA)



CONTROLLI

- **IL CONTROLLO NEGATIVO :**

Nell'allestimento di ogni reazione è necessario aggiungere uno o più controlli negativi, interposti fra i campioni.

I controlli negativi devono contenere sequenze di DNA che non corrispondono alla sequenza da amplificare.



GRAZIE
PER
L'ATTENZIONE!