



**METODI DI RACCOLTA E CONSERVAZIONE DI CAMPIONI DI SANGUE PER LE ANALISI GENETICHE MOLECOLARI**

**1) TUTTI I SOGGETTI: CAMPIONI DI SANGUE PER ANALISI DNA**

Prelevare circa 20ml di sangue venoso periferico in 1 o più tubi contenenti una opportuna quantità di soluzione anticoagulante (es. 3 tubi Vacutainer da 6 ml tappo giallo con EDTA, sol. B). Mescolare bene invertendo il tubo più volte (8-10), per evitare la formazione di coaguli che renderebbero difficoltosa l'estrazione del DNA. Congelare i campioni subito dopo il prelievo a -20°C. E' possibile conservare i campioni fino a -80°C.

Non utilizzare porta-provette in polistirene per congelare i tubi.

EVITARE assolutamente l'uso di EPARINA perchè è un inibitore degli enzimi usati per l'analisi del DNA.

**2) 50 SOGGETTI RANDOM: 13 con ASMA LIEVE, 13 con ASMA GRAVE RESISTENTE AL TRATTAMENTO, 13 con BPCO, 11 CONTROLLI:**

**2.1) CAMPIONI DI SANGUE PER ANALISI RNA**

Raccogliere 5 ml di sangue in 2 tubi da 2.5ml contenenti additivo specifico per la conservazione dell'RNA. Capovolgere delicatamente 8-10 volte il tubo per mescolare bene sangue e additivo. Le operazioni successive di inattivazione delle RNAsi e di congelamento dipendono dal tipo di additivo contenuto nel tubo usato\* e vanno eseguite scrupolosamente in quanto decisive per conservare l'integrità del campione.

Essendo l'RNA molto delicato, è assolutamente importante che il campione di sangue non subisca scongelamenti, anche parziali, nel periodo di conservazione e durante la spedizione al laboratorio.

**\* TUBI PER PRELIEVO**

Es. "PAXgene Blood RNA tube" (cod. 762165; PreAnalytiX – QIAGEN / BD Company): per la procedura di prelievo vedi istruzioni allegate: "PAXgene-Blood RNA tubes; pag. 21-22 x la versione italiana" e "How to collect blood with PAXgene tube".

Incubare a temperatura ambiente almeno due ore (max 24h) in modo che vengano inattivate le RNAsi prima di congelare il campione a -20°C.

E' possibile conservare i tubi fino a -80°C, ma è importante che stiano almeno 24h a -20°C prima di raffreddarli ulteriormente. Il congelamento diretto a -80°C può danneggiare i tubi e causare la perdita del campione.

Non utilizzare porta-provette in polistirene per congelare i tubi (es. quelli forniti dalla ditta con le provette).



## 2.2) CAMPIONI DI SANGUE PER ANALISI PROTEINE

Raccogliere 6 ml di sangue in tubi contenenti EDTA (es. Vacutainer tappo lavanda/lilla; evitare eparina), in modo da ottenere almeno 2 ml di plasma. Mescolare gentilmente il tubo e lasciare a +4°C per un tempo massimo di 20 min. Centrifugare a 2000 x g +4°C per 10 min. Dividere il plasma così ottenuto in aliquote di 0,2 ml in tubi sterili da 2 ml e congelare a -80°C. Tenere anche la provetta di sangue originale con la frazione cellulare rimasta e congelarla a -20°C. (è possibile conservarla fino a -80°C, come le provette con il sangue per il DNA).

Non utilizzare porta-provette in polistirene per congelare la provetta con la frazione cellulare rimasta.

### PER TUTTI I PRELIEVI:

Utilizzare preferibilmente aghi di grosso calibro (20-21G), per evitare il danneggiamento delle cellule ematiche.

Al fine di poter eseguire il prelievo di sangue in una unica soluzione per tutti e tre i tipi di analisi è possibile utilizzare il sistema Vacutainer con la stessa camicia monouso, collegando nell'ordine indicato i seguenti tubi:

- a) eventuali tubi senza anticoagulante (es. nel centro di Verona: 3 ml per emocromo e 12 ml per sierologia)
- b) 1 o + Vacutainer tappo giallo (per DNA, es. nel centro di Verona: 3 da 6 ml)
- c) 1 o + Vacutainer tappo lilla (per proteine, es. nel centro di Verona: 1 da 6 ml)
- d) 2 PAXgene RNA tube (per RNA)

Il PAXgene RNA tube non va mai utilizzato come primo tubo, per evitare di perdere il volume di sangue corrispondente al volume d'aria del tubicino che collega l'ago alla provetta.

Ove possibile scegliere tubi in polipropilene che resiste meglio del vetro al congelamento.

### INVIO DEI CAMPIONI AL LABORATORIO

I campioni di sangue devono assolutamente pervenire congelati al laboratorio; occorre perciò evitare che scongelino durante il tragitto. Questo soprattutto per quelli destinati all'estrazione di RNA o proteine. E' quindi opportuno spedirli in scatole di polistirolo con ghiaccio secco (solo i campioni di sangue destinati all'estrazione del DNA possono essere trasportati per brevi tragitti, entro la giornata, con mattonelle refrigeranti). Per le provette "PAXgene RNA tube" non utilizzare per il congelamento supporti porta provette di polistirene (es. quelli forniti dalla ditta con le provette)

Si prega di avvisare il laboratorio quando viene spedito il materiale, in modo che il personale possa controllarne l'arrivo