

University of Mosul
College of Veterinary Medicine



A Comparison of DNA preservation and Immunohistochemistry of tissue specimens fixed in Different Fixatives

Amani Abdulbasit Abdullah Helal Al-Ayash

MSc/Thesis

Veterinary Medicine / Veterinary Pathology

**Supervised by
Lecturer
Dr. Firas Mohammad Abed**

Abstract

The study was conducted by using three fixatives with 45 samples taken from three organs (liver, kidney, and lymph nodes) in each adult male rat. The study was divided into two parts: the first was the effect of fixatives on the preservation and integrity of DNA. The second part was regarding whether these fixations affect the specific anti-genetic determinants of three markers (CD4, pax8, and CD68). Genomic DNA extraction was successfully performed on all samples with variable concentrations. A total of fifteen liver samples were subjected to the extraction technique, with five liver samples utilized from each fixative.

This comparative study aimed to assess DNA integrity across different fixatives, regardless of their varying quantities. Each sample yielded at least one motif with a length of 100 base pairs. All 15 samples (100%) produced a 100-bp amplicon for the IRBP gene. Additionally, all 15 samples (100%) generated a 200-bp amplicon from neutral buffer formalin (NBF), Bouins fluid (BS), and zinc formalin (ZF). The success proportion dropped with growing amplicon length, by which 66.6% (10/15) of 300 bp amplicons were successfully produced from NBF and ZF, showing significant differences at $P < 0.05$ than BS, while no other amplicon length obtained 0% for 400, 500, and 750 bp, respectively. On the other hand, frozen tissue samples used as a control were able to produce all amplicon lengths from 100 bp to 750 bp. Only samples from NBF and ZF consistently yielded larger amplicon ranges compared to BS. BS was unable to keep intact DNA fragments longer than 200 bp.

Regarding the assessment of these fixatives (NBF, ZF, and BS) on the specified anti-genetic determinants CD4, CD68, and Pax8 involved in this study, fifty-one fields were analyzed for each fixative marker. A hundred fifty-three fields were scored (0, 1, 2, and 3). With a significance threshold

of $p < 0.05$, the comparison of scores in the detection of CD4 epitopes shows that BS fluid was significantly different from NBF and ZF, whereas NBF was ranked lower than ZF. The lack of a meaningful score for ZF in the context of CD4 identification is surprising. However, when CD68 detection was performed at the score one level, it was shown that NBF and ZF exhibited substantial CD68 antigenic determinants, but BS fluid did not display any significant CD68 epitopes. Ultimately, both NBF and BS successfully identified Pax8 epitopes, unlike ZF. Nevertheless, there is no notable difference between the two methods. In terms of the scores from the 3 comparisons made with different fixatives, it was seen that BS fluid had a superior expression of the CD4 marker compared to NBF and ZF. Nonetheless, neither CD68 nor Pax8 showed any notable relevance in this context.

The investigation of this study found that various fixatives may generate fragments of at least 100 bp and 200 bp. Yet, ZF and NBF are more reliable than BS in creating 300 bp fragments for further analysis using advanced next generation methods. Besides, NBF and ZF excel in generating superior quality DNA fragments compared to BS. In addition, the findings of this study indicate that NBF had outstanding accuracy in detecting all epitopes. However, BS fluid outperformed NBF in detecting the anti-genetic determinants of CD4 and Pax8 epitopes, achieving a score of 3. In addition, ZF successfully differentiated between CD68 and Pax8, but it was unable to identify CD4. But there were no notable changes seen when compared to both B and NBF.



جامعة الموصل
كلية الطب البيطري

مقارنة حفظ الـ DNA وكيمياء النسيج المناعية لعينات الأنسجة المثبتة في مثبتات مختلفة

أمانى عبد الباسط عبد الله هلال العياش

رسالة ماجستير
الطب البيطري / الأمراض البيطرية

بإشراف
المدرس الدكتور
فراس محمد عبد

الخلاصة

تلخصت الدراسة الحالية بتقييم ثلاثة محاليل مختلفة مستخدمة في المجالات العلمية البيطرية الحيوية حيث قسمت الدراسة الى جزئين اثنين: الأول، كان تأثير المثبتات على حفظ وسلامة الحمض النووي، والجزء الثاني كان فيما يتعلق بما اذا كانت تلك المثبتات لها تأثير على المحددات المستضدية CD4 و pax8 و CD6.

تم اجراء هذه الدراسة وكان عدد العينات المستخدمة 45 عينة شملت كل من الجزئين حيث جمعت العينات من ثلاث أعضاء (كبد وكلية وعقد لمفاوية) من ذكور الجرذان البالغين.

تم استخلاص الحمض النووي الجيني من العينات بنجاح وبتركيز مختلفة. استخدمت 15 عينة من الكبد بواقع خمس عينات من كل مثبت. هدفت الدراسة لمقارنة سلامة الحمض النووي للمثبتات المستخدمة وأنتجت كل عينة تسلسل ثابت من القواعد النتروجينية بطول 100 قاعدة من البادئ حيث أنتجت جميع العينات الـ 15 (100%) 100 قاعدة نتروجينية من التسلسل الجيني ل-IRBP، أنتجت جميع العينات الـ 15 (100%) 200 قاعدة نتروجينية من العينات في جميع المثبتات (محلول الدارئ والزنك فورمالين و محلول باونز). بينما انخفضت نسبة النجاح مع طول التسلسل الجيني. حيث تم إنتاج 66.6% (15/10) بطول تسلسلي من القواعد النتروجينية المحددة بـ 300 قاعدة بنجاح من كل من الدارئ المتعادل والزنك فورمالين مما يظهر اختلافات كبيرة عند مستوى معنوية $P < 0.05$ بالمقارنة مع محلول باونز ومن ناحية اخرى كانت النسبة 0% للأطوال المصممة مع البادئ من طول التسلسل الجيني لـ 400، 500، و750 أما العينات المجمدة المستخدمة كعينات سيطرة فقد أعطت نتائج مبهرة من خلال القدرة على انتاج جميع التسلسلات للأطوال المختلفة من التسلسل الجيني من 100 الى 750 قاعدة نتروجينية. أما محلول باونز فقد تعذر في الحفاظ على أجزاء الحمض النووي سليمة لأكثر من 200 من القواعد النتروجينية .

فيما يخص المحددات المستضدية وهي الجزء الثاني من الدراسة حيث تم استخدام تقنية الكيمياء النسجية المناعية في هذا التقييم ومدى تاثير هذه المحاليل (المثبتات) على المحددات المستضدية لكل من (CD4, CD68, Pax8) وحيث تم فحص 51 مقطع نسيجي لجميع العينات المفحوصة ولكل محدد، حيث بلغ العدد الكلي للمقاطع النسيجية 153 مقطعا نسيجيا ولتقييم تأثير المثبتات المستخدمة في الدراسة على سلامة المحمض النووي تم تصميم معيار لكل قراءة (1و2و3). اظهرت مقارنة الدرجات الخاصة بحواتم (CD4) بوجود فرق معنوي بين كل من محلول بونز ومحلول الفورمالين المتعادل وكذلك بين البونز والزنك فورمالين عند مستوى معنويه

$p < 0.05$ حيث احتل المحلول الدارئ المرتبة الثانية بعد ذلك الزنك فورمالين. ومن المفاجئ ان الزنك فورمالين لم يظهر أي فرق معنوي بين درجات التقييم. CD4 ومن ناحية أخرى لوحظ ان CD68 قد أحرز فرقا معنويا في المعيار 1 لدى كل من المحلول المتعادل وكذلك بالنسبة للزنك فورمالين لكن لا يوجد أي فرق معنوي في محلول بونز. ومن ناحية أخرى اظهر كل من المحلول الدارئ ومحلول بونز نتائج جيدة في حواتم الـ Pax8 مقارنة بالزنك فورمالين، لكن لم يسجل أي فرق معنوي بينهما. بالرغم من ذلك عند المقارنة بين (المعيار الثالث) بين جميع المثبتات فان محلول بونز اظهر كفاءة عالية في إيجاد حواتم CD4 عكس المحلول الدارئ والزنك فورمالين، ومع ذلك، لم يظهر CD68 ولا Pax8 أي فرقا يذكر.

خلصت دراستنا إلى أن المثبتات المستخدمة في الدراسة (محلول الدارئ والزنك فورمالين ومحلول باونز) يمكن أن تنتج ما لا يقل عن 100 و 200 تسلسل سليم، إضافة الى ذلك فقد تميز كل من محلول الدارئ والزنك فورمالين في الحفاظ على تسلسل سليم وصلت الى 300 قاعدة نتروجينية. فان الاطوال السليمة من التسلسل الجيني يستفاد منها للدراسات الجينية. إن المحلول الدارئ والزنك فورمالين يتفوقان في إنتاج أجزاء من الحمض النووي ذات جودة أفضل من محلول باونز. يضاف الى ذلك وفيما يخص تقييم المحاليل على المحددات المستضدية أن المحلول الدارئ المتعادل كان جيدا في إيجاد جميع الحواتم. ان محلول بونز كان متفوقا في اظهار حواتم كل CD4 و Pax8 في الـ (معيار 3). بالإضافة الى ذلك فان الزنك فورمالين كان قادرا على إيجاد حواتم CD68 و Pax8 بينما تعذر في إيجاد حواتم CD4 وعلى العكس فانه لم يسجل أي فرقا معنويا مع المحلول الدارئ ومحلول بونز.