


Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT Dérivés du sang – extraction de l'ADN			
Numéro de PNF:	08.02.004	Version:	f2.0
Remplace:	8.2.004 e1.0	Catégorie:	Manipulation et documentation du matériel – sang
Approuvée par:	Comité administratif du RCBT (CAR)	01-juin-2012	
	Par: Brent Schacter 	13-juin-2012	

1.0 BUT

Les échantillons de tissus sont collectés des patients qui ont donné un consentement éclairé et qui ont accepté de participer au programme de banque de tumeurs. Les études génomiques utilisent souvent des acides nucléiques (ADN et ARN) dérivés de ces échantillons. Durant l'extraction et l'entreposage de l'ADN à partir des échantillons de sang, tous les efforts doivent être faits pour éviter la contamination, prévenir la dégradation et préserver l'intégrité moléculaire. Le but de ce document est de tracer les grandes lignes des procédures normalisées des banques du RCBT à suivre pour l'extraction de l'ADN des échantillons sanguins.

2.0 PORTÉE

Cette procédure normalisée de fonctionnement (PNF) décrit comment l'ADN doit être extrait à partir des échantillons de sang. Cette PNF ne couvre pas les procédures de sécurité détaillées pour la manipulation du matériel biologique humain (MBH) ou les produits chimiques à biorisques et il est recommandé que le personnel suive les guides de sécurité des institutions.

3.0 RÉFÉRENCES À D'AUTRES POLITIQUES ET PNFs DU RCBT

Remarque: Lors de l'adoption de cette PNF pour un usage local, s'il vous plaît faire référence au RCBT.

3.1 Politique du RCBT : POL 5 Registres et documentation

3.2 Politique du RCBT : POL 2 Éthique

3.3 Politique du RCBT : POL 4 Vie privée et sécurité

3.4 Politique du RCBT : POL 7 Manipulation du matériel et de l'information

3.5 Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: PNF 08.02.001 Collecte du sang

3.6 Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: PNF 08.01.002 Gestion des déchets du matériel à biorisque

4.0 RÔLES ET RESPONSABILITÉS

Cette PNF s'adresse à tout le personnel des banques membres du RCBT qui est responsable des extractions de l'ADN à partir du sang.

Personnel de la banque de tumeurs	Responsabilité/rôle
Technicien de laboratoire	Responsable de l'étiquetage des tubes et de l'extraction de l'ARN à partir des échantillons sanguins

5.0 MATÉRIEL, RÉACTIFS, ÉQUIPEMENT ET FORMULAIRES

Le matériel, l'équipement et les formulaires inscrits dans la liste suivante ne sont que recommandés et peuvent être substitués par des produits alternatifs/équivalents plus appropriés aux tâches ou aux procédures spécifiques aux sites.

Matériel et équipement	Matériel et équipement (spécifiques au site)
Marqueurs, encre et crayons	
Étiquettes appropriées pour les tubes	
Tubes pour isoler la couche de globules blancs des échantillons sanguins	
Contenant pour les déchets biologiques et sacs autoclavables	
Tubes de 2 ml pour centrifugeuse	
Tubes de 1.5 ml pour centrifugeuse	
Cryotubes de 2 ml	
Portoirs pour les tubes à microcentrifugeuse	
Portoirs pour tubes dans le bain d'eau	
Mélangeur de type Vortex	
Microcentrifugeuse	
Pipettes	
Pipettes stériles avec embouts aérosol-résistants	
Micropipetteurs	
Pipettes de transfert	
Isopropanol	
Kit d'extraction d'ADN comme celui de Qiagen Flexgene	
Bloc chauffant oscillant comme le Thermomixer d'Eppendorf ou un bloc chauffant normal ou un bain d'eau	
Congélateur à -80° C et -20°C	
Boîtes d'entreposage	
Gants jetables	
Bain d'eau chaude (fixé à 55° C)	
Portoir à roulement (mélangeur rotatif)	
Éthanol à 95%	
Éthanol à 70%	
Réfrigérateur à 4° C	

6.0 DÉFINITIONS

Voir le glossaire du programme du RCBT: <http://www.ctrnet.ca/glossary>

7.0 PROCÉDURES

Cette procédure a été développée pour s'assurer que l'ADN est extrait des échantillons de sang de manière sécuritaire et constante, tout en éliminant les risques de contamination et la perte de l'intégrité moléculaire et structurale. La constance dans la procédure est importante pour obtenir des résultats de tests comparables et fiables. Travailler avec les tubes dans le même ordre tout au long de la procédure afin de minimiser le risque de mélanger les échantillons.

7.1 Extraction de l'ADN à partir des échantillons de sang en utilisant un kit à base de colonnes

- 7.1.1 Documenter la méthode d'extraction de l'ADN. Il existe plusieurs kits commerciaux d'extraction d'ADN disponibles ; suivre la procédure détaillée décrite dans les instructions appropriées du kit commercial.
- 7.1.2 Traiter le sang comme potentiellement infectieux.
- 7.1.3 L'extraction d'ADN est effectuée par un technicien de laboratoire ou un membre du personnel formé et désigné par la banque de tumeurs.
- 7.1.4 Avoir le matériel et l'équipement prêts. Avoir la quantité de tubes et de cryotubes nécessaires étiquetés et prêts.
- 7.1.5 Décongeler la couche de globules blancs préalablement congelée dans un bain d'eau à 37°C par une agitation légère.
- 7.1.6 Garder les tubes décongelés sur glace jusqu'au début de la procédure.
- 7.1.7 Utiliser un kit d'extraction d'ADN, suivre le protocole et documenter le processus.
- 7.1.8 L'ADN génomique peut être entreposé à 4°C.
- 7.1.9 Quantifier l'ADN par spectrophotométrie et/ou fluorométrie. Enregistrer la concentration sur le tube d'entreposage.
- 7.1.10 L'ADN est un acide faible et peut être sujet à de l'hydrolyse acide à 4°C. Pour un entreposage à long terme, garder l'ADN à -80° C. Éviter d'exposer l'ADN à des cycles de congélation-décongélation pour prévenir la fragmentation de l'ADN génomique.
- 7.1.11 Placer l'ADN dans des boîtes d'entreposage et enregistrer l'emplacement.

7.2 Éléments de données à enregistrer

- 7.2.1 Numéro d'identification de l'échantillon d'origine et le type (sang entier, couche leucocytaire, etc) et le volume
- 7.2.2 Numéro d'identification de l'échantillon d'ADN
- 7.2.3 Date de l'extraction
- 7.2.4 Méthode d'extraction de l'ADN
- 7.2.5 Volume de l'ADN
- 7.2.6 Concentration de l'ADN et la méthode de quantification
- 7.2.7 Ratio de A260nm/A280nm

8.0 RÉFÉRENCES, RÈGLEMENTS ET DIRECTIVES

- 8.1 Déclaration d'Helsinki
<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>
- 8.2 *Tri-Council Policy Statement 2; Ethical Conduct for Research Involving Humans; Medical Research Council of Canada; Natural Sciences and Engineering Council of Canada; Social Sciences and Humanities Research Council of Canada, December 2010.*
<http://www.pre.ethics.gc.ca/eng/policy-politique/initiatives/tcps2-eptc2/Default/>
- 8.3 Human Tissue and Biological Samples for use in Research. Operational and Ethical Guidelines. Medical Research Council Ethics
<http://www.mrc.ac.uk/Utilities/Documentrecord/index.htm?d=MRC002420>
- 8.4 Best Practices for Repositories I. Collection, Storage and Retrieval of Human Biological Materials for Research. International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER).
http://www.isber.org/Search/search.asp?zoom_query=best+practices+for+repositories
- 8.5 US National Biospecimen Network Blueprint
<http://biospecimens.cancer.gov/resources/publications/reports/nbn.asp>
- 8.6 SOP #: BIO-SOP-BLD-PRO-DNA. Blood Sample Processing November 20, 2006 Procure, Quebec Prostate Cancer Biobank

9.0 ANNEXES

- 9.1 Annexe A – Préparation des solutions tampons et des réactifs requis pour l'extraction d'ADN.

10.0 HISTORIQUE DES RÉVISIONS

Numéros des PNFs	Dates des modifications	Auteurs	Résumé des modifications
LP 001.001	2005	JdSH	PNF générique du RCBT pour la collecte et le traitement du sang
8.2.004	Jan 2008	JdSH	Révision pour couvrir l'extraction d'ARN seulement
8.2.004	Avril 2009	JdSH	Suppression de la congélation alternative sans l'isopentane. Mise à jour de la version f1.1 (modifications mineures)
8.2.004		TS	Les méthodes au phénol-chloroforme et celles à base de colonnes ont été séparées en 2 PNFs Voir 8.2.005. Renommée : extraction d'ADN du sang par la méthode des colonnes Suppression des fournitures etc concernant la méthode d'extraction de l'ADN par le phénol-chloroforme Suppression de la section concernant les étapes de la méthode d'extraction de l'ADN par phénol-chloroforme Ajout de la section pour les éléments de données à enregistrer.
8.2.004 e1.1	Juin 2012	CMG	Grammaire et mise en page

Dérivés du sang – extraction de l'ADN

			<p>Retrait des définitions</p> <p>Historique des révisions déplacé au bas du document</p> <p>Mise à jour des liens pour les références</p> <p>Mise à jour des références aux PNFs</p> <p>Section 5.0: Ajout de "Contenants pour..." et suppression des items de matériel et d'équipement.</p> <p>Section 7.0: Ajout de "travailler avec des tubes..." au paragraphe d'introduction.</p> <p>Révision du titre de la section 7.1 en utilisant un kit "à base de colonnes".</p> <p>Suppression du premier paragraphe à 7.1. Ajout de 7.1.9 "Quantifier l'ADN..."</p> <p>Suppression de 7.2. Création d'un nouveau 7.2 "Éléments de données à enregistrer"</p> <p>Suppression de la référence "aux instructions du kit pour l'ADN de Qiagen Flexigene"</p>

Préparation des solutions tampons et des réactifs requis pour l'extraction de l'ADN

PRÉPARATION DES SOLUTIONS TAMPONS ET DES RÉACTIFS REQUIS POUR L'EXTRACTION DE L'ADN

NOTE: Les fournisseurs et les marques de commerce peuvent être substitués par d'autres marques appropriées.

Tampon A (pour 500 mL):

10mM TRIS pH 7,9
2 mM EDTA pH 8
40mM NaCl

Protéinase K:

20 unités/mg (Invitrogen # 25530-015)
Resuspendu dans 10mL de solution d'entreposage
Dilution = 10mg/mL

Solution d'entreposage pour protéinase K (pour 50mL):

10 mM TRIS pH7,5
20 mM CaCl₂
50% Glycerol (Life Technologies cat# 25530-015)

Phénol saturé de TRIS

- Mettre à 55°C afin de liquéfier le phénol cristallisé.
- Ajouter 0,1% of 8-hydroxyquinolin ⇒ inhibiteur d'ARNase
- Mélanger
- Ajouter un volume égal de TRIS 1M pH8
- Mélanger 30 minutes
- Laisser les phases se séparer (3 à 24 heures, à 4°C)
- Enlever le surnageant
- Ajouter 500 mL TRIS 0,1M pH8
- Répéter jusqu'à ce que le pH de la phase phénolique soit > 7.6
- Entreposer à 4°C dans une bouteille ne laissant pas passer la lumière

Phénol/chloroforme/iso: (garder à 4°C dans une bouteille ne laissant pas passer la lumière)

Mélanger dans le ratio suivant : (25:24:1)

Pour un volume final de 200 ml :

Phénol – 100 ml
Chloroforme – 96 ml
Alcool-isoamyl – 4 ml

Chloroforme/Iso: (Garder à température de pièce dans une bouteille ne laissant pas passer la lumière)

Ratio (24:1)

Pour une solution d'un volume de 200 ml, utiliser 192 ml de chloroforme et 8 ml d'alcool-isoamyl.

Tampon TE:

10mM TRIS pH 7,6
1mM EDTA pH 8