


Extraction de l'ADN à partir du sang

Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT Extraction de l'ADN à partir du sang			
Numéro de PNF:	08.02.005	Version:	f2.0
Remplace:	8.2.005 f1.0	Catégorie:	Manipulation et documentation du matériel – sang
Approuvée par:	Comité administratif du RCBT (CAR)	01 juin 2012	
	Par: Brent Schacter 	26 juin 2012	

1.0 BUT

Des échantillons de tissus sont prélevés de patients qui ont accepté de participer au programme de banques de tumeurs et qui ont donné leur consentement éclairé. Les études génomiques utilisent souvent des acides nucléiques (ADN et ARN) dérivés de ces échantillons. Lors de l'extraction et l'entreposage de l'ADN des échantillons sanguins, tous les efforts devraient être déployés pour éviter la contamination, prévenir la dégradation et préserver l'intégrité moléculaire. Le but de ce document est de définir les procédures normalisées à suivre pour les banques du RCBT lors de l'extraction de l'ADN des cellules blanches du sang obtenues à partir de 5 à 10 ml d'un échantillon de sang total (EDTA ou ACD) utilisant la méthode au phénol/chloroforme (solvant organique).

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 RÉFÉRENCE 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 Éthiques*
- 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'ADN à partir des échantillons sanguins

5.0 MATÉRIELS, 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	
Tube de cellules blanches précédemment isolées à partir de 5 à 10 ml d'un échantillon de sang total	
Tubes de polypropylène de 14 ml	
Tubes de 1.5 ml pour centrifugeuse	
Cryotubes de 2 ml	
Pipettes de transfert (3 ml)	
Portoirs pour les tubes à microcentrifugeuse	
Centrifugeuse	
Portoirs pour les tubes de 14 ml	
Microcentrifugeuse	
Pipettes stériles avec embouts aérosol-résistants	
Micropipetteurs	
Congélateur à -80° C et -20° C	
Boîtes d'entreposage	
Gants jetables	
Bain d'eau (fixé à 60° C)	
Portoirs pour tubes de 14 et 2 ml dans le bain d'eau	
Portoir à roulement pour mélanger l'ADN purifié	
Pipettes de verre de 10 ml pour transférer le phénol et le chloroforme (ne pas utiliser de polystyrène)	
Pipetteur pour pipettes de verre de 10 ml	
Éthanol à 95% - refroidi sur glace	
Éthanol à 70% - refroidi sur glace	
Solution de lyse*	
Protéinase K 20 mg/ml	
Tampon TRIS saturé au phénol	
Chloroforme /alcool isoamyl*	
NaCl 5 M	
Tampon TRIS EDTA (TE) pH 8.0	

Extraction de l'ADN à partir du sang

Réfrigérateur à 4° C	
----------------------	--

* Voir annexe A – Préparation des tampons et des réactifs requis à l'extraction de l'ADN.

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.

7.1 Extraction de l'ADN à partir d'un échantillon de sang en utilisant la méthode du phénol/chloroforme

NOTE: Les volumes indiqués sont recommandés seulement et doivent être mis à l'échelle selon la taille de l'échantillon. Il est possible de garder le surnageant à 4° C entre chaque étape. Pour les solutions de tampons, voir l'annexe A.

- 7.1.1 Traiter le sang total comme potentiellement infectieux.
- 7.1.2 Le phénol et le chloroforme sont des solvants organiques et doivent être utilisés sous une hotte. Tous les déchets de phénol et de chloroforme doivent être éliminés dans des contenants appropriés aux solvants organiques.
- 7.1.3 L'extraction de l'ADN est effectuée par un technicien/assistant de recherche ou du personnel formé et désigné par la biobanque.
- 7.1.4 Resuspendre le culot de cellules blanches dans 2 ml de tampon de lyse en utilisant une pipette de transfert de 3 ml.
- 7.1.5 En utilisant cette même pipette, transférer les cellules et le tampon de lyse dans un tube de polypropylène à bouchon vissé de 14 ml. Si le culot est plus petit ou plus gros que celui généralement obtenu, ajuster le volume du tampon de lyse en conséquence.
- 7.1.6 Ajouter la solution de protéinase K de 20 ug/ml pour une concentration finale de 200 ug/ml. Pipetter de façon à faire monter et descendre le liquide en utilisant une pipette de transfert de 3 ml. Afin d'éviter des bris dans l'ADN génomique, ne pas vortexer pour mélanger.
- 7.1.7 Incuber 2 à 4 heures ou toute la nuit dans un bain d'eau à 60° C. Effectuer une inversion des tubes à toutes les 30 minutes si possible.
- 7.1.8 Ajouter un volume égal de TRIS saturé au phénol.
- 7.1.9 Mélanger le contenu des tubes par un mouvement d'avant-arrière sur une plaque basculante à un rythme de 70 bascules/minute pendant au moins 2 minutes.
- 7.1.10 Centrifuger à 900 g pendant 5 minutes à température de la pièce.
- 7.1.11 Étiqueter un nouveau tube de 14 ml.
- 7.1.12 En utilisant une pipette de 1 ml, transférer le surnageant (phase aqueuse contenant l'ADN) dans le nouveau tube de 14 ml en prenant soin de ne pas enlever la couche laiteuse de l'interphase.
- 7.1.13 Ajouter un volume égal de phénol:chloroforme/isoamyl 50 :50.

Extraction de l'ADN à partir du sang

- 7.1.14 Mélanger le contenu des tubes par un mouvement d'avant-arrière sur une plaque basculante à un rythme de 70 bascules/minute pendant au moins 2 minutes.
- 7.1.15 Centrifuger à 900 g pendant 5 minutes à température de la pièce.
- 7.1.16 Étiqueter un nouveau tube de 14 ml.
- 7.1.17 En utilisant une pipette de 1 ml, transférer le surnageant (phase aqueuse contenant l'ADN) dans le nouveau tube de 14 ml en prenant soin de ne pas enlever la couche laiteuse de l'interphase.
- 7.1.18 Répéter les étapes 13 à 17 pour la deuxième extraction avec la solution de phénol:chloroforme/isoamyl 50 :50.
- 7.1.19 Répéter les étapes 13 à 17 une troisième fois si l'interphase est encore très épaisse et laiteuse.
- 7.1.20 Ajouter un volume égal de phénol:chloroforme/isoamyl 50 :50.
- 7.1.21 Mélanger le contenu des tubes par un mouvement d'avant-arrière sur une plaque basculante à un rythme de 70 bascules/minute pendant au moins 2 minutes.
- 7.1.22 Centrifuger à 900 g pendant 5 minutes à température de la pièce.
- 7.1.23 Étiqueter un nouveau tube de 14 ml.
- 7.1.24 En utilisant une pipette de 1 ml, transférer le surnageant dans le nouveau tube de 14 ml. Il devrait y avoir peu ou pas de couche laiteuse à l'interphase.
- 7.1.25 Faire une solution aqueuse d'ADN 1M en utilisant du NaCl 5M. Mélanger délicatement.
- 7.1.26 Ajouter 2.5 fois en volume d'éthanol 95% froid (solution gardée à -20° C) et laisser agiter sur la plaque oscillante pour précipiter l'ADN.
- 7.1.27 En utilisant une pipette de 1 à 3 ml, transférer l'ADN dans un tube à microcentrifugeuse de 1.5 ml.
- 7.1.28 Centrifuger à 180 000 x g pendant 1 minute dans une microcentrifugeuse à température de la pièce.
- 7.1.29 Éliminer le surnageant.
- 7.1.30 Ajouter 500 ul d'éthanol 70% froid et chiquenauder jusqu'à ce que le culot d'ADN se déloge du fond du tube.
- 7.1.31 Centrifuger à 180 000 x g pendant 1 minute dans une microcentrifugeuse à température de la pièce.
- 7.1.32 Éliminer le surnageant.
- 7.1.33 Ajouter 500 ul d'éthanol 70% froid et chiquenauder jusqu'à ce que le culot d'ADN se déloge du fond du tube
- 7.1.34 Centrifuger à 180 000 x g pendant 1 minute dans une microcentrifugeuse à température de la pièce. Éliminer le surnageant.
- 7.1.35 Resuspendre le culot d'ADN dans 500 ml d'une solution tampon TE. Ajuster le volume du tampon en fonction de la taille du culot d'ADN.
- 7.1.36 Transférer l'ADN dans un cryotube de 2 ml pour un entreposage de longue durée.
- 7.1.37 Afin de s'assurer que l'ADN est uniformément dissout, incubé dans un bain d'eau à 60 ° C avec agitation toute la nuit.
- 7.1.38 Entreposer l'ADN -80° C.
- 7.1.39 Éliminer tous les déchets de phénol et de chloroforme dans des contenants appropriés pour les déchets de solvants organiques.

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 tampons des réactifs requis pour l'extraction de l'ADN.

10.0 HISTORIQUE DES RÉVISIONS

Numéros des PNFs	Dates des modifications	Auteurs	Résumé des modifications
8.2.005 f1.0	Juin 2011	TS	Méthode au phénol/chloroforme et à base de colonne ont été séparées en 2 PNFs. Voir <i>PNF 08.02.004 Dérivés du sang – extraction d'ADN</i> .
8.2.005 f1.0	Juin 2012	CMG	<ul style="list-style-type: none"> • Grammaire et mise en page • Retrait des définitions • Historique des révisions déplacé au bas du document • Mise à jour des liens pour les références • Mise à jour des références aux PNFs

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

Tampon de lyse : 5% Sarkosyl
 10 mM TRIS-HCl pH 8.0
 10 mM EDTA pH 8
 75 mM NaCl

Alcool :Chloroforme/isoamyl : Garder à température de la pièce dans une bouteille
foncée à l'intérieur d'une armoire pour produits inflammables. Ratio (28:1)