

Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT			
Dérivés de tissus: extraction d'ARN			
Numéro de PNF:	8.3.009	Version	f1.0
Remplace:	LP 002.001	Date d'entrée en vigueur	09 janv 2008
Objet:	Dérivés de tissus : extraction d'ARN	Catégorie	Manipulation et documentation du matériel

Préparée par:		Jean de Sousa-Hitzler		
	Signature	Nom	Titre	jjmmaa
Approuvée par:		Peter Geary	CEO	
	Signature	Nom	Titre	jjmmaa
Approuvée par:				
	Signature	Nom	Titre	jjmmaa

Historique des révisions

Numéro de PNF	Date des modifications	Auteur (Initiales)	Résumé des révisions
LP 002.001	2005	JdSH	PDF générique du RCBT pour la collecte et le traitement des tissus
8.3.009	2008	JdSH	Révisée pour couvrir l'extraction d'ARN seulement
8.3.009 f1.0	2008	LC	Traduction française de 8.3.009 e1.0

1.0 INTENTION

Les échantillons de tissus sont collectés de patients qui ont accepté de participer au programme de banque de tumeurs après avoir passé à travers le processus de consentement éclairé. Les études génomiques utilisent souvent les acides nucléiques (ADN et ARN) dérivés de ces échantillons. Pendant l'extraction et l'entreposage de l'ARN à partir des spécimens de tissus, tous les efforts doivent être faits pour éviter la contamination et préserver l'intégrité moléculaire. L'intention de ce document est de tracer les grandes lignes des procédures normalisées pour les banques du RCBT afin de suivre l'extraction d'ARN des échantillons de tissus.

2.0 PORTÉE

Cette procédure normalisée de fonctionnement (PNF) décrit comment l'ARN doit être extrait des tissus fraîchement congelés et des tissus congelés dans l'OCT. Cette

PNF ne couvre pas les procédures de sécurité détaillées pour la manipulation du matériel biologique humain (MBH) et il est recommandé que le personnel suive les guides de biorisques des institutions.

3.0 RÉFÉRENCES À D'AUTRES POLITIQUES ET PNFS

1. Politique du RCBT: POL 005.001 Registres et documentation
2. Politique du RCBT: POL 002.001 Éthique
3. Politique du RCBT: POL 004.001 Vie privée et sécurité
4. Politique du RCBT: POL 007.001 Manipulation du matériel et de l'information
5. Procédure générique du RCBT: LP 002.001 PNF générique du RCBT pour la collecte et le traitement des tissus
6. PNF du RCBT: 8.3.003 Préservation des tissus: congélation rapide
7. PNF du RCBT: 8.3.004 Préservation des tissus: congélation dans l'OCT
8. PNF du RCBT: 8.3.006 Sectionnement du tissu paraffiné et enrobé d'OCT
9. PNF du RCBT: 8.1.002 Gestion des déchets du matériel à biorisque

4.0 RÔLES ET RESPONSABILITÉS

Cette politique s'adresse à tout le personnel des banques membres du RCBT qui est responsable de l'extraction d'ARN à partir de tissus.

Personnel de la banque de tumeurs	Responsabilité/rôle	Site personnel spécifique et coordonnées de contact
Technicien de laboratoire	Responsable de l'étiquetage des tubes, de l'extraction de l'ARN à partir du tissu, de l'entreposage des échantillons et de la documentation de l'entreposage de l'ARN.	

5.0 ÉQUIPEMENTS, RÉACTIFS, MATÉRIEL ET FORMULAIRES

Le matériel, l'équipement et les formulaires inscrits sur 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 à microcentrifugeuse	
Support pour tubes à microcentrifugeuse	
Homogénéisateur de tissu comme le Polytron ou un homogénéisateur verre-Teflon	
Microcentrifugeuse réfrigérée	
Cryotome	
Micropipetteurs	
Embouts de pipettes stériles et exempts d'ARNase	
Réactif TRIZOL®	
RNeasy Micro Kit (Qiagen)	
Eau exempte d'ARNase	
Alcool d'isopropyle	
Chloroforme	
Éthanol 75%	
Congélateur à -80° C ou -20° C	
Glace pour refroidir le TRIZOL, les tubes et l'eau	
Glace sèche pour le transport des blocs d'OCT et des tissus congelés	

*Consulter l'annexe 1 pour la préparation des solutions d'extraction d'ARN et des tampons. Pour des détails additionnels sur la préparation des tampons, voir la référence #10 (Section 8)

6.0 DÉFINITIONS

Cryotome: Un appareil qui consiste en un microtome placé à l'intérieur d'un congélateur et utilisé pour sectionner les tissus congelés.

ADN Acide déoxyribonucléique.

Microtome: Appareil utilisé pour couper des sections à partir d'un bloc placé sur lame.

OCT: Composé "Optimal Cutting Temperature" est le nom utilisé pour le milieu de congélation à base de polyéthylène glycol/sucrose. L'OCT préserve l'ultrastructure et protège les tissus de la dessiccation, de la dégradation, agit comme un isolant des variations thermales et minimise la formation des cristaux. Il est spécialement utile pour préserver les tissus fraîchement congelés qui peuvent être sectionnés.

Préservation: Utilisation d'agents chimiques, d'altérations dans les conditions environnementales ou autres moyens durant le processus pour prévenir ou retarder la détérioration biologique ou physique du spécimen.

ARN: Acide ribonucléique

Ribonucléases (RNases): Ce sont des enzymes très stables et actives qui ne requièrent habituellement pas de co-facteur pour fonctionner. Elles sont difficiles à inactiver et quelques minutes leurs suffisent pour dégrader l'ARN

7.0 PROCÉDURES

Cette procédure a été développée pour s'assurer que l'ARN est extrait des échantillons de tissus 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. Les étapes suivantes sont basées sur les procédures suivies par le Réseau de recherche sur le cancer (RRCancer) du Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

7.1 Extraction d'ARN à partir de tissu congelé

NOTE: Les volumes indiqués sont uniquement recommandés et doivent être mis à l'échelle selon le volume de l'échantillon de tissu. Être certain que tous les tubes, homogénéisateurs etc. utilisés dans le processus d'extraction d'ARN sont exempts de RNases ou traités avec des inhibiteurs de RNases.

1. Traiter tous les tissus comme potentiellement infectieux.
2. L'extraction d'ARN est effectuée par un technicien de laboratoire ou un membre du personnel formé et désigné par la banque de tumeurs.
3. Avoir le matériel et l'équipement prêts. Avoir la quantité de tubes et de cryotubes nécessaires étiquetés et prêts. Tout l'équipement et les réactifs qui viennent en contact avec l'échantillon devraient être exempts de RNases.
4. **Homogénéisation.** Les tissus sont gardés congelés à -80°C jusqu'à homogénéisation.
5. Homogénéiser les échantillons de tissus dans 1 ml de réactif TRIZOL pour 50-100 mg de tissu en utilisant un homogénéisateur. Des méthodes alternatives pour l'homogénéisation des tissus congelés peuvent être utilisées si un homogénéisateur n'est pas disponible.
6. Le volume de l'échantillon ne devrait pas dépasser 10% du volume de TRIZOL utilisé pour l'homogénéisation.
7. **Phase de séparation.** Incuber l'échantillon homogénéisé pendant 5 minutes à température de la pièce pour permettre la dissociation complète des complexes de nucléoprotéines.
8. Ajouter 0.2 ml de chloroforme par 1 ml de réactif TRIZOL. Fermer les tubes de façon sécuritaire et brasser les tubes vigoureusement à la main pendant 15 secondes.

9. Incuber à température de pièce pendant 2-3 minutes.
10. Centrifuger l'échantillon à pas plus de 12,000 x g pendant 10 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée (2-8° C).
11. Après la centrifugation, le mélange est séparé en phases distinctes : une phase rouge phénol-chloroforme au fond, une interphase et une phase d'eau moins colorée.
12. L'ARN demeure exclusivement dans la phase aqueuse et cette phase est environ 60% du volume des réactifs TRIZOL utilisés pour l'homogénéisation.
13. **Précipitation de l'ARN.** Transférer la phase aqueuse dans un tube propre (la phase organique pourrait être gardée si l'isolation de l'ADN ou des protéines est requise à partir de cet échantillon).
14. Précipiter l'ARN de la phase aqueuse en mélangeant avec l'alcool d'isopropyle. Utiliser 0.5 ml d'alcool d'isopropyle pour 1 ml de réactif TRIZOL utilisé pour l'homogénéisation originale.
15. Incuber à température de pièce pendant 10 minutes.
16. Centrifuger l'échantillon à 18 000 x g pendant 10 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée (2-8° C).
17. L'ARN précipité forme un culot ressemblant à un gel dans le fond et le bas du côté du tube.
18. **Étape de lavage.** Enlever le surnageant.
19. Laver le culot d'ARN avec de l'éthanol 75%, en ajoutant au moins 1 ml d'éthanol 75% par 1 ml de réactif TRIZOL initialement utilisé pour l'homogénéisation.
20. Mélanger l'échantillon en vortexant légèrement.
21. Centrifuger à 7,500 x g pendant 5 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée (2-8° C).
22. **Redissolution de l'ARN précipité.** Sécher brièvement le culot d'ARN. Sécher à l'air ou au vacuum pendant 5-10 minutes. Prendre soin de ne pas complètement sécher le culot parce que cela entraînera de la difficulté à dissoudre l'ARN.
23. Dissoudre le culot dans un volume approprié d'eau exempte de RNases.
24. Entreposer l'ARN dissoute à -80° C ou à plus basse température. Éviter d'exposer l'ARN à des cycles de congélation/décongélation pour prévenir la fragmentation de l'ARN.
25. Enregistrer l'emplacement de l'entreposage.

7.2 Extraction d'ARN à partir du tissu congelé dans l'OCT

NOTE: Les volumes indiqués sont uniquement recommandés et doivent être mis à l'échelle selon le volume de l'échantillon du tissu. Le «RNease Kit» est la méthode

choisie pour l'extraction d'ARN spécialement lorsque les échantillons sont petits ou dans le cas d'extraction d'ARN à partir de sections d'OCT.

1. Traiter tous les tissus comme potentiellement infectieux.
2. L'extraction d'ARN à partir de tissu enrobé dans l'OCT est effectuée par un technicien de laboratoire ou un membre du personnel formé et désigné par la banque de tumeurs.
3. Avoir le matériel et l'équipement prêts. Avoir la quantité de tubes et de cryotubes nécessaires étiquetés et prêts. Tout l'équipement et les réactifs qui viennent en contact avec l'échantillon devraient être exempts de RNases.
4. Utiliser le kit d'extraction «Qiagen's RNeasy Micro» pour l'isolement de l'ARN à partir du tissu enrobé dans l'OCT.
5. Prendre quelques (5-10) sections d'OCT de 3µm en utilisant un cryostat et les placer dans un tube à microcentrifugeuse pré-refroidi. S'assurer que les sections ne décongèlent pas avant la prochaine étape.
6. Ajouter 600µl de tampon RLT* et ramener à la température de la pièce.
7. Centrifuger pendant 12 minutes à vitesse maximum (>18 000 x g).
8. Enlever le surnageant fluide, mais pas la couche de surface, dans un nouveau tube. Se débarrasser du reste.
9. Ajouter 600µl d'éthanol 70%, mélanger en utilisant une pipette.
10. Prendre 700µl of cette solution et passer à travers une mini-colonne fournie dans le kit, centrifuger pendant 15 secondes à 8 000 x g.
11. Répéter cette dernière étape jusqu'à ce que toute la solution ait passé à travers la mini-colonne.
12. Passer 700µl de tampon RW1* à travers la mini-colonne, centrifuger 15 secondes à 8 000 x g.
13. Changer le tube de collecte sous la mini-colonne.
14. Passer 500µl de tampon RPE* à travers la mini-colonne, centrifuger 15 secondes à 8 000 x g.
15. Centrifuger un autre 500µl de tampon RPE* à travers la colonne, mais cette fois pendant 2 minutes à vitesse maximum.
16. Changer le tube de collecte, centrifuger pendant 1 minute ou plus à vitesse maximum pour s'assurer que la colonne soit sèche. Si du liquide se retrouve dans le tube, centrifuger pour une autre minute ou deux.
17. Ajouter 30µl d'H₂O, exempte de RNases directement sur le filtre de la colonne, laisser incubé pendant 5 à 10 minutes et centrifuger pendant 1 minute à 8 000 x g.

18. Entreposer l'ARN dissout à -80° C ou à plus basse température. Éviter d'exposer l'ARN à des cycles de congélation/décongélation pour prévenir la fragmentation de l'ARN.

19. Enregistrer l'emplacement de l'entreposage

*Les réactifs (RLT, RW1 et RPE) sont tous fournis dans le kit RNeasy (Voir réf. 12 pour les détails)

8.0 RÉFÉRENCES, RÈGLEMENTS ET LIGNES DIRECTRICES

1. Declaration of Helsinki. <http://ohsr.od.nih.gov/helsinki.php3>
<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>
2. Tri-Council Policy Statement; 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, August 1998. <http://www.pre.ethics.gc.ca/english/policystatement/policystatement.cfm>
3. Human Tissue and Biological Samples for use in Research. Operational and Ethical Guidelines. Medical Research Council Ethics Series.
http://www.mrc.ac.uk/pdf-tissue_guide_fin.pdf
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>
5. US National Biospecimen Network Blueprint
http://www.ndoc.org/about_ndc/reports/NBN_comment.asp
6. Jewell, S. et al. 2002, Analysis of the Molecular Quality of Human Tissues, an experience from the Cooperative Human Tissue Network. Am. J. Clin. Pathol. 118:733-741.
7. Guideline – Fresh Tissue Working Group of BIG and NCI breast cancer Cooperative Groups http://ctep.cancer.gov/forms/guidelines_fresh_tissue.pdf
8. Snell L. and P. H. Watson. 2006, Breast Tissue Banking: Collection, Handling, Storage and Release of Tissue for Breast Cancer Research. Methods Mol Med. 120:3-24.
9. RNA Extraction procedure from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

10. Procedure for the RNA Extraction from tissues in OCT - from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).
11. Product Sheet for TRIZOL® Reagent. Form No. 18057N. INVITROGEN Life Technologies.
12. RNeasy Micro Handbook
http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/RNAStabilizationAndPurification/FromAnimalAndPlantTissuesBacteriaYeastAndFungi/RNY_Micro/1023761_HBRNY_Micro0403.pdf