

Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT			
Création de dérivés: extraction d'ARN à partir d'échantillons de sang			
Numéro de PNF:	8.2.003	Version	f1.0
Remplace:		Date d'entrée en vigueur	09 Jan 08
Objet:	Extraction d'ARN à partir d'échantillons de sang	Catégorie	Manipulation et documentation du matériel

Préparée par:		Jean de Sousa-Hitzler		
	Signature	Nom	Titre	jjmmaa
Approuvée par:		Peter Geary	CEO	09 Jan 08
	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 001.001	2005	JdSH	PNF générique du RCBT pour la collecte et le traitement du sang
8.2.003	2008	JdSH	Réviser pour couvrir l'extraction d'ARN seulement
8.2.003 f1.0	2008	LC	Traduction française de 8.2.003 e1.0

1.0 INTENTION

Les études génomiques utilisent les acides nucléiques (ADN et ARN) dérivés des échantillons des patients. Pendant l'extraction et l'entreposage de l'ARN des échantillons sanguins, tous les efforts doivent être faits pour éviter la contamination, prévenir la dégradation et préserver l'intégrité moléculaire. La dégradation de l'ARN est le problème majeur durant la collecte, le traitement et l'entreposage des échantillons cliniques. L'intention de ce document est de tracer les grandes lignes des procédures normalisées pour les banques du RCBT pour suivre l'extraction de l'ARN à partir des échantillons de sang.

2.0 PORTÉE

La procédure normalisée de fonctionnement décrit (PNF) comment l'ARN 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

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. PNF du RCBT 8.2.001: Collecte du sang
6. PNF du RCBT 8.2.002: Traitement et entreposage du sang
7. 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 des extractions de l'ARN à partir du sang.

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

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	

1 tube PAXgene pour l'ARN de sang (rempli)	
Kit Quiagen d'extraction d'ARN	
2 cryotubes	
Éthanol (100%) grade pur	
Pipettes	
Embouts et pipettes stériles, aérosol-résistants, exempts de RNases	
mélangeur de type Vortex	
Microcentrifugeuse à vitesses variables (à capacité de 1000-8000 x g) qui peut contenir des tubes à microcentrifugeuse de 2ml	
Centrifugeuse capable d'atteindre 3000-5000g équipée de seau balançant pour tenir les tubes Paxgen pour ARN de sang	
Bloc chauffant oscillant comme le Thermomixer d'Eppendorf ou un bloc chauffant normal ou un bain d'eau	
Gants jetables	
Boîte d'entreposage	
Inhibiteur de RNases pour essuyer le dessus de la surface de travail (comme RNaseZap d'Ambion)	

6.0 DÉFINITIONS

Couche de globules blancs «buffy coat» Une mince couche grisâtre de cellules blanches de sang (leucocytes et plaquettes) trouvée à la surface de la densification des érythrocytes (cellules rouges de sang) d'un hématocrite.

ARN: Une molécule qui convertit l'information génétique dérivée de l'ADN aux ribosomes dans la cellule.

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 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 d'ARN à partir des échantillons de sang– considérations générales d'extraction

Éviter la contamination croisée

1. En raison de la sensibilité des technologies d'amplification des acides nucléiques, certaines précautions doivent être prises pour éviter la contamination croisée des échantillons.
2. Éviter d'humidifier le bord des colonnes de centrifugation avec le bout des pipettes et éviter de toucher la colonne avec le bout des pipettes.
3. Toujours utiliser des embouts aérosol-résistants.
4. Éviter la contamination croisée après chaque étape de vortex, centrifuger brièvement les tubes pour enlever les gouttelettes qui pourraient se retrouver sous le couvercle des tubes.
5. Fermer les couvercles des colonnes de centrifugation avant de les placer dans la microcentrifugeuse.
6. L'effluent généré après chaque étape de centrifugation peut contenir du matériel à biorisques et doit être disposé de façon appropriée.
7. Ouvrir seulement une colonne de centrifugation à la fois et éviter de créer un effet d'aérosol.
8. Écarter les tubes usagés utilisés pour le processus de séparation et placer les tubes contenant les colonnes de centrifugation PAXgene directement dans la microcentrifugeuse.

Éviter la dégradation de l'ARN

1. Ne pas utiliser aucun article de plastique ou de verre dont on n'a pas éliminé la contamination à la RNase.
2. Prendre soin de ne pas introduire des RNases dans l'échantillon durant et après la procédure de purification.
3. Il est recommandé d'utiliser des solutions et des récipients jetables stériles exempts de RNases lorsqu'on travaille avec l'ARN. Une technique aseptisée au niveau microbiologique est toujours recommandée lorsque l'on travaille avec l'ARN.
4. Porter des gants de latex ou de vinyle durant la manipulation des réactifs, des tubes et des échantillons afin de prévenir la contamination à l'ARNase à partir de la peau ou des surfaces du laboratoire.
5. Changer de gants fréquemment.
6. Garder les tubes fermés autant que possible.
7. Garder l'ARN purifié sur glace.

8. Garder les échantillons congelés au-dessous de -80°C ou à plus basse température pour un entreposage à long terme. Éviter d'exposer l'ARN à des cycles de congélation/décongélation pour prévenir la fragmentation de l'ARN.

7.2 Extraction d'ARN à partir des échantillons de sang– procédure

1. Traiter tous les échantillons de sang 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.
4. Décongeler les tubes du kit de PaxGene toute la nuit à 4°C, puis les laisser à la température de la pièce 2 heures. Les tubes sont délicats et risquent d'éclater lors de la décongélation; il est recommandé d'utiliser un support de métal.
5. Suivre la procédure détaillée décrite dans le manuel d'instruction du kit d'extraction d'ARN à partir du sang de Paxgene. Les instructions sont fournies avec le produit ou peuvent être obtenues à partir de :
http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/DSP/PaxGene/1028434_Qiag_PAXgene.pdf
6. Immédiatement après la procédure, placer l'ARN extrait et resuspendu sur glace.

7.3 Extraction de l'ARN à partir des échantillons de sang - entreposage des échantillons

1. Placer les échantillons d'ARN extraits dans des boîtes d'entreposage.
2. Placer les échantillons à -80° C ou à plus basse température.
3. Éviter les cycles de congélation/décongélation.
4. Enregistrer l'emplacement de l'entreposage.

8.0 RÉFÉRENCES APPLICABLES, 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. SOP #: BIO-SOP-BLD-PRO-RNA. Blood Sample Processing November 20, 2006 Procure, Quebec Prostate Cancer Biobank
7. Qiagen PAXgene Blood RNA Kit Handbook