

Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT Dérivés de tissu: extraction d'ADN			
Numéro de PNF:	8.3.008	Version	f1.0
Remplace:	LP 002.001	Date d'entrée en vigueur	09 janv 2008
Objet:	Dérivés de tissus :extraction d'ADN	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
8.3.008	2008	JdSH	Révisée pour couvrir seulement l'extraction d'ADN
8.3.008 f1.0	2008	LC	Traduction française de 8.3.008 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'ADN 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'ADN à partir des échantillons de tissus.

2.0 PORTÉE

Cette procédure normalisée de fonctionnement (PNF) décrit comment l'ADN doit être extrait des tissus. 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: FS 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: 8.1.002 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'ADN à partir de tissu.

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'ADN des tissus et de l'entreposage.	

5.0 MATÉRIEL, RÉACTIFS, ÉQUIPEMENTS 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 appropriés pour les tubes	
Tubes à microcentrifugeuse	

Support pour tubes à microcentrifugeuse	
Bain d'eau (fixé à 55°C)	
Support à tubes pour le bain d'eau	
Phénol saturé de TRIS	
Support oscillant (Nutator mixer)	
Microcentrifugeuse	
Pipetteurs pour grosses pipettes de verre	
Pipettes de verre pour transférer le phénol et le chloroforme (ne pas utiliser de polystyrène)	
Micropipetteur	
Pipette avec embouts stériles	
Tampon A*	
Protéinase K*	
SDS 20%*	
Tampon TRIS*	
Tampon TRIS EDTA (TE) *	
Phénol chloroforme/isoamyl alcool*	
chloroforme /isoamyl alcool*	
Éthanol 95%	
Congélateur à -80° C ou -20° C	

*Consulter l'annexe1 pour la préparation des solutions d'extraction d'ADN et des tampons. Pour des détails additionnels sur la préparation des tampons, voir la référence #10 (Section 8)

6.0 DÉFINITIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique

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

7.0 PROCÉDURES

Cette procédure a été développée pour s'assurer que l'ADN 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'ADN à partir du tissu

NOTE: Les volumes indiqués sont uniquement recommandés et doivent être mis à l'échelle selon le volume de l'échantillon de tissu.

1. Traiter tous les tissus comme potentiellement infectieux.
2. L'extraction d'ADN 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. Suspendre le tissu congelé dans 500 µl de tampon A. Couper le tissu (amincir) en de petites pièces avec des ciseaux ou une lame de scalpel stérile. On pourrait également envelopper le tissu de papier aluminium et le fragmenter avec un petit marteau.
5. Ajouter 20 µl de SDS 20% et 20 µl de protéinase K (10 mg/ml).
6. Incuber de 3 à 24 heures dans un bain d'eau à 55° C (avec agitateur).
7. Ajouter 500 µl de phénol saturé de TRIS
8. Mélanger 10 min. sur un portoir oscillant (Nutator) à température de pièce.
9. Centrifuger à 18 000 x g pour 10 min. dans une microcentrifugeuse à température de pièce.
10. Transférer la phase supérieure dans un tube à microcentrifugeuse.
11. Ajouter 500 µl de phénol/chloroforme/alcool isoamyle.
12. Mélanger par inversion.
13. Répéter les étapes # 9 et 10.
14. Ajouter 500 µl de chloroforme/alcool isoamyle.
15. Mélanger par inversion.
16. Répéter les étapes # 9 et 10.
17. Ajouter 1 ml d'éthanol à 95% froid (gardé à -20° C).
18. Incuber à -20° C pour 2 à 12 heures
19. L'ADN précipité ressemblera à une fibre gélatineuse blanche. Ramasser-le avec un embout de pipette propre et le déposer dans un tube à microcentrifugeuse contenant 500µl d'éthanol 70%.
20. Centrifuger à 18 000 x g pour 5 minutes à température de la pièce.
21. Enlever le surnageant et laisser l'ADN sécher pendant 10 minutes à température de la pièce (ou sous les vapeurs d'alcool).
22. Resuspendre le culot d'ADN dans le tampon TE pour avoir une concentration appropriée ou désirée d'ADN dans la solution.

23. Incuber le tube dans un bain d'eau à 55° C (avec agitation) pendant 1 heure pour dissoudre le culot.
24. Entreposer l'ADN à -80° C ou à 4° C si à court terme ou pour conserver l'intégrité de l'ADN.
25. Pour un long terme, entreposer l'ADN à -20° C ou à plus basse température. Éviter d'exposer l'ADN à des cycles de congélation/décongélation afin de prévenir la fragmentation de l'ADN.

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. 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. DNA Extraction procedure from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

10. Sambrook, Fitch, Maniatis. Molecular Cloning – A Laboratory Manual, 2nd Edition, Preparation of Reagents and Buffers used in molecular cloning. Appendix B.

Annexe 1.

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

NOTE: Les fournisseurs et les marques de commerce sont ceux utilisés par le RRCancer du Fonds de la recherche en santé du Québec et 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)
Resuspendre dans 10mL de solution d'entreposage
Dilution = 10mg/mL

Solution d'entreposage pour protéinase (pour 50mL) :
10 mM TRIS pH7,5
20 mM CaCl₂
50% Glycérol (Life Technologies cat# 25530-015)

Phénol saturé de TRIS :

- Mettre le phénol à 55°C pour liquéfier le phénol cristallisé.
 - Ajouter 0,1% of 8-hydroxyquinolin ⇒ Inhibiteur de ARNse
 - Mélanger
 - Ajouter un égal volume de TRIS 1M pH8
 - Mélanger pendant 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 foncée.
-
- Phénol/Chloroforme/Iso : Garder à 4°C dans une bouteille foncée
Mélanger dans un ratio 25:24:1
Pour une solution de 200 ml :
Phénol – 100 ml
Chloroforme – 96 ml
Isoamyl Alcool – 4 ml
-
- Chloroforme/Iso : Garder à température de pièce dans une bouteille foncée

Ratio (24:1)

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

Tampon TE : 10mM TRIS pH 7,6
 1mM EDTA pH 8