

Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT			
Évaluation de la qualité des acides nucléiques			
Numéro de PNF:	5.1.002	Version	f1.0
Remplace:	SR 001.001	Date d'entrée en vigueur	09 Jan 08
Objet:	Évaluation de la qualité des acides nucléiques	Catégorie	Assurance de qualité

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
QA 001.001	2005	JdSH	Document initial
5.1.002 e1.0	2008	JdSH	Ajout de l'évaluation de la qualité pour l'ADN et l'ARN seulement
5.1.002 f1.0	2008	LC	Traduction française de 5.1.002 e1.0

1.0 INTENTION

Le contrôle de la qualité est fondamental pour le succès des opérations d'une banque de tissus offrant des spécimens tissulaires et leurs dérivés à des fins de recherche. Un haut niveau d'intégrité moléculaire est essentiel pour éviter l'incohérence et la variabilité dans les projets de recherche. La qualité des acides nucléiques est d'une importance capitale pour plusieurs techniques utilisées dans des analyses génomiques. Les banques du RCBT doivent être confiantes qu'elles fournissent des acides nucléiques qui sont appropriés pour les importantes études d'expression de gènes. Des procédures de tests doivent être en place pour contrôler et évaluer la qualité des échantillons dans la collection.

L'intention de cette procédure est de tracer les grandes lignes d'un minimum de tests et d'évaluations auxquels les dérivés de tissus (ADN et ARN) doivent être soumis pour maintenir la qualité et la standardisation du matériel.

2.0 PORTÉE

Cette procédure normalisée de fonctionnement (PNF) trace les grandes lignes d'un minimum d'évaluations et de tests qui doivent être mis en place pour évaluer la qualité de l'ADN et de l'ARN extraits, dans le but de fournir aux investigateurs un produit qui correspond à leurs besoins. Les mêmes mesures peuvent aussi être utilisées pour évaluer l'intégrité des échantillons de tissus sélectionnés.

Cette PNF ne couvre pas les procédures détaillées de sécurité pour la manipulation du matériel biologique humain (MBH) ou des risques chimiques. 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 007.001 Manipulation du matériel et de l'information
3. PNF générique du RCBT # QA 001.001 Évaluation de la qualité des échantillons de tissus
4. PNF du RCBT # 8.2.003 Extraction d'ARN à partir d'échantillons de sang
5. PNF du RCBT # 8.2.004 Extraction d'ADN à partir d'échantillons de sang
6. PNF du RCBT # 8.2.008 Extraction d'ADN à partir d'échantillons de tissu
7. PNF du RCBT # 8.2.009 Extraction d'ARN à partir d'échantillons de tissu

4.0 RÔLES ET RESPONSABILITÉS

Cette procédure s'adresse à tout le personnel des banques membres du RCBT qui est responsable d'évaluer la qualité des acides nucléiques.

Personnel de la banque de tumeurs	Responsabilité/rôle	Site personnel spécifique et coordonnées de contact
Technicien de laboratoire	Supervise et assiste avec des procédures d'assurance qualité. Enregistre et documente les résultats.	

5.0 ÉQUIPEMENTS, MATÉRIEL DE RÉACTION 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)
Tubes appropriés	
Spectrophotomètre UV et cuvettes au quartz	
Bioanalyser Agilent 2100	
Nano Kit d'ARN 6000	
Thermocycle pour réactions PCR	
Réactifs pour réaction PCR	
Réactifs pour Bioanalyser	
Matériel pour gel	
Matériel pour photos	

6.0 DÉFINITIONS ET ABRÉVIATIONS

ADN: Acide déoxyribonucléique

Électrophorégramme: Le Bioanalyser Agilent 2100 fournit une plateforme qui utilise un essai fluorescent impliquant la séparation électrophorétique pour évaluer qualitativement les échantillons d'ARN. Le logiciel du Bioanalyser crée un graphique appelé électrophorégramme avec des diagrammes de fluorescence en temps réel.

PCR: (Polymerase Chain Reaction) : amplification en chaîne par polymérase

Qualité: Conformité d'un spécimen ou d'un procédé avec des spécifications ou des standards pré-établis.

Assurance qualité (AQ): Tout ce qui est planifié et les actions systématiques qui sont établies pour assurer que le programme de banque de tumeurs est performant et que les données sont générées, documentées (archivées) et reportées en conformité avec les exigences légales applicables.

Contrôle de qualité: Le contrôle de qualité est le système d'activités techniques qui mesure les attributs et les performances d'un procédé, ou malgré les standards définis, vérifie que les exigences établies sont entièrement rencontrées.

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.

UV: Ultraviolet

7.0 PROCÉDURES

La recherche et l'utilité scientifique des données obtenues à partir de l'analyse des acides nucléiques corrélient spécifiquement avec l'intégrité de l'ADN ou de l'ARN extrait. Les échantillons d'acides nucléiques dégradés ou contaminés conduiront à des résultats incohérents ou peu fiables. Différents facteurs influencent la qualité des acides nucléiques, dont l'état physiologique du tissu avant la collecte, les intervalles post-résection de la collecte au traitement pour la préservation, les conditions d'entreposage, etc.

Ces procédures tracent les grandes lignes des étapes minimales qui doivent être suivies pour assurer le calibre moléculaire des échantillons de la collection.

7.1 Évaluation de la qualité – Considérations générales pour l'évaluation moléculaire des acides nucléiques.

1. L'évaluation de l'intégrité moléculaire des échantillons de la collection doit être réalisée sur un pourcentage des échantillons entreposés tel que jugé approprié.
2. L'évaluation de l'intégrité moléculaire doit être réalisée par un laboratoire désigné utilisant des procédures établies développées dans ce but.
3. Utiliser les commentaires des chercheurs sur la qualité de l'échantillon pour affiner les pratiques et guider l'évolution des procédures du contrôle de la qualité.
4. Développer un système défini de points qui sont alloués comme «points de qualité» à être assignés à un tissu ou un échantillon moléculaire qui a subi une évaluation dans un laboratoire désigné pour le contrôle de qualité.
5. Utiliser l'échelle de points dans l'interprétation des résultats de l'évaluation de la qualité.

7.2 Évaluation de la qualité de l'ADN par mesures spectrophotométriques, digestion enzymatiques et électrophorèse sur gel.

1. La qualité de l'ADN doit être évaluée dans 1% des échantillons de sang et de tissus tumoraux entreposés aussi bien que dans 1% de l'ADN extrait du sang ou des échantillons tumoraux (en utilisant les PNFs du RCBT pour l'extraction d'ADN).
2. Prendre les mesures spectrophotométriques pour déterminer la concentration de l'ADN.
3. Développer un standard de mesures avec lesquelles une dégradation relative d'ADN peut être comparée. Développer un standard d'ADN comme de l'ADN génomique humain disponible commercialement qui a été aliquoté et entreposé de façon appropriée (pour prévenir la dégradation de l'ADN à partir des cycles congélation/décongélation).
4. L'évaluation de la qualité inclut de tester les échantillons d'ADN à être utilisés dans des réactions enzymatiques (comme une digestion Hind III) et l'évaluation visuelle qui suit l'électrophorèse sur gel d'agarose. Utiliser un échantillon contrôle comme référence.
5. Assigner un pointage de qualité aux échantillons testé sur une base d'analyse de quantification d'ADN (ratio de D.O. 260/280, électrophorèse sur gel d'agarose et digestion de restriction):

Qualité de l'ADN basée sur spectrophotométrie UV

260/280 ratio de D.O.	Valeur assignée
1.8-2	4
1.6-1.8	3
1.4-1.6	2
1.2-1.4	1
Moins que 1.2	0

Qualité de l'ADN basée sur l'électrophorèse de l'ADN génomique

Intégrité électrophorétique	Valeur assignée
Unique bande de poids moléculaire élevée	4
traînée de 10kb	3
traînée de 5kb	2
traînée de 2kb	1

Moins qu'une traînée de 2kb	0
-----------------------------	---

Qualité de l'ADN basée sur la digestion enzymatique de l'ADN génomique

Intégrité électrophorétique	Valeur assignée
Discret patron de bande de digestion	2
Pas de patron de bande	0

6. Totaliser les valeurs assignées. Une valeur de 10 est une indication de la haute qualité de l'ADN, une valeur plus basse que 7 est une indication de la pauvre qualité de l'ADN.

7.3 Évaluation de la qualité de l'ADN par PCR

1. La méthode consiste à amplifier différentes longueurs du gène B-Globine. La taille maximum de l'amplicon corrèle positivement avec la qualité de l'ADN.
2. Le test et l'évaluation doivent être réalisés par une personne qualifiée et formée de façon appropriée.
3. Utiliser les amorces suivantes:

B-Globine: GH20 GAAGAGCCAAGGACAGGTAC
 B-Globine: PC04 CAACTTCATCCACGTTCCACC
 B-Globine: RS42 GCTCACTCAGTGTGGCAAAG
 B-Globine: KM29 GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG
 B-Globine: RS40 ATTTTCCCACCCTTAGGCTG
 B-Globine: RS80 TGGTAGCTGGATTGTAGCTG

Paires d'amorces et tailles des amplicons attendus:

GH20 + PC04 = 268 paires de bases (pb)
 RS42 + KM29 = 536 pb
 RS40 + RS80 = 989 pb
 KM29 + RS80 = 1327 pb

4. Utiliser les réactifs suivants pour le mélange de la réaction PCR principale (ajuster le volume total pour accommoder le nombre total d'échantillons à être testés):

Mélange principal:

2.5 µL 10X tampon Taq (comme celui d'Amersham #27-0799-05)
 4.0 µL dNTP (1,25 mM de chaque, comme ceux d'Amersham # 27-2035-01)
 1.0 µL paires d'amorces (diluées à 20pM chacune)
 15.0 µL H₂O

0.5 µL Taq DNA polymerase 5X (comme celle d'Amersham #27-0799-05)
 23.0 µL Total du mélange principal + 2 µL d'ADN (50-100 ng/µL) = 25µL par réaction

5. Utiliser les conditions de PCR suivantes:

(3 min à 95°) 1 cycle

(1 min à 95°, 1 min à 55°, 1.5 min à 72°) 40 cycles

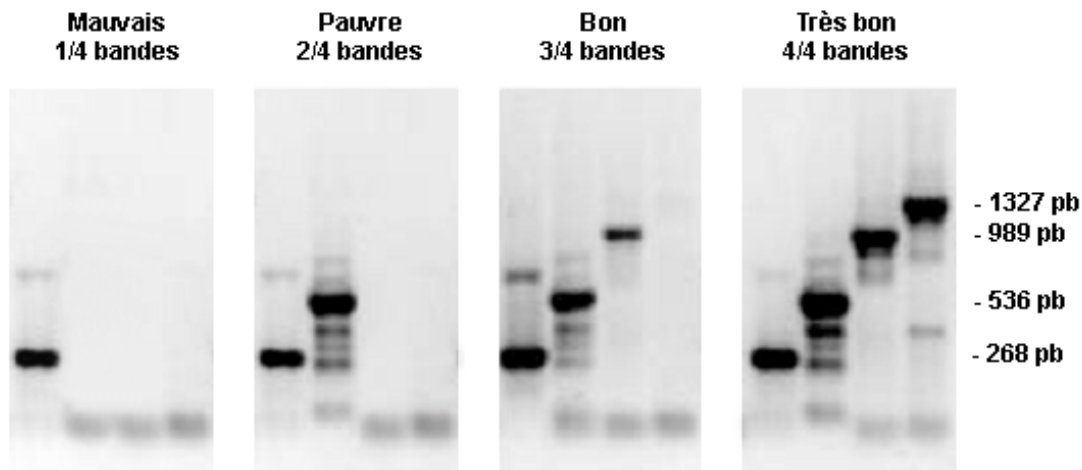
(5 min à 72°) 1 cycle

(Conditions optimisées pour le PCR Thermo Hybaid MBS # HBMBKIT2; ajuster pour convenir à des marques et des modèles de thermocycles alternatifs)

6. Analyser sur gel d'agarose 1.2%.

7. Résultat d'un échantillon et système de valeur pour 4 paires d'amorces:

Exemples de résultats:



7.4 Évaluation de la qualité de l'ARN par mesures spectrophotométriques et gel d'électrophorèse.

1. La qualité de l'ARN doit être évaluée sur 1% des échantillons de sang et des tissus tumoraux entreposés et sur 1% des extractions d'ARN faites à partir des échantillons de sang et de tissus tumoraux.
2. Utiliser un spectrophotomètre UV pour mesurer la DO à 260 pour déterminer la concentration d'ARN.
3. Utiliser la DO au ratio 260/280 pour évaluer la pureté.
4. Faire migrer une petite quantité de l'échantillon dans un gel dénaturé d'agarose pour visualiser les bandes d'ARN ribosomiaux (28s et 18s). Des bandes nettes de 28s et de 18s indiquent que l'ARN est intact. De plus, un ratio 2 :1 de 28s :18s est considéré

comme une référence pour de l'ARN intact (pour plus de détails sur l'évaluation de la qualité de l'ARN voir la référence #8). Cette méthode consommant une quantité importante de l'échantillon, la méthode de la section 7.5 ci-dessous est recommandée.

7.5 Évaluation de la qualité de l'ARN en utilisant le Bioanalyser.

L'évaluation visuelle décrite plus haut est subjective et l'utilisation d'un outil analytique comme le Bioanalyser Agilent 2100 (avec le kit de nanoessais ARN 6000) est une manière optimale de déterminer la concentration et la pureté/intégrité des échantillons d'ARN. Il fournit une lecture pour la pureté et la qualité de l'échantillon, possède l'avantage de demander de faibles quantités d'échantillons. De plus, une valeur de qualité peut lui être assignée, basée sur la valeur numérique de l'intégrité de l'ARN du Bioanalyser.

7.5.1 Décontaminer les électrodes du Bioanalyser

1. Remplir la puce de nettoyage spécifique avec 350 µl de ARNase ZAP et placer dans le Bioanalyser pour 1 minute.
2. Enlever et remplacer avec une autre puce de nettoyage remplie avec de l'eau exempte d'RNase (RNase-free) pour 10 secondes.
3. Enlever et attendre 10 secondes que l'eau sur l'électrode soit évaporée avant de refermer le couvercle du Bioanalyser.

7.5.2 Préparer le gel

1. S'assurer que les solutions sont à température ambiante depuis au moins 30 minutes avant utilisation.
2. Placer 550 µl de gel matrice dans la partie supérieure d'une colonne de filtration "spin filter" et centrifuger pendant 10 minutes à 1500 g.
3. Aliquoter 65 µl du gel filtré dans des tubes à microcentrifugeuse exempts de RNase et entreposer à 4° C jusqu'à ce que nécessaire.

7.5.3 Préparation du mélange "gel-dye"

1. Permettre aux réactifs de s'équilibrer avec la température de la pièce 30 minutes avant de les utiliser.
2. Mélanger à l'aide d'un vortex le concentré "dye" pendant 10 secondes.
3. Ajouter 1 µl de "dye" à un aliquot de 65 µl de gel filtré et bien mélanger à l'aide d'un vortex.
4. Centrifuger pendant 10 minutes à la température de la pièce à 13 000g dans une microcentrifugeuse.

7.5.4 Chargement du mélange "gel dye"

1. Placer une nouvelle nanopuce d'ARN dans la "chip priming station".
2. Pipetter 9 µl du mélange "gel-dye" au fond du puit marqué par un G.
3. Fermer la "chip priming station" et presser le piston jusqu'à ce qu'il soit retenu par le clip de fermeture.
4. Attendre exactement 30 secondes et relâcher le piston.
5. Ouvrir la "chip priming station" et pipetter 9 µl du "gel-dye" dans chacun des 2 puits marqués G.

7.5.5 Chargement du marqueur

1. Pipetter 5 µl du "RNA Nano Marker" au fond du puit marqué avec le symbole "marqueur" et dans chacun des 12 puits échantillons.

7.5.6 Chargement du marqueur de poids moléculaire et des échantillons.

1. Pipetter 1µl du marqueur de poids moléculaire dénaturé au fond du puit marqué avec le symbole marqueur.
2. Pipetter 1 µl de chacun des échantillons dénaturés dans chaque puit échantillon.
3. Mélanger à l'aide d'un vortex la puce pendant 1 minute à 2400 rpm.
4. Insérer la puce dans le Bioanalyser et démarrer l'appareil.

Pour plus d'informations au sujet de l'utilisation du Bioanalyser pour évaluer la qualité de l'ARN, voir :

<http://www.hcnr.med.harvard.edu/programs/atrc/online%20library%20PDFs/Character%20of%20RNA%20quality%20using%20the%20Agilent%202100%20Bioanalyzer.pdf>

Pour l'interprétation des graphiques générés, voir l'annexe 1

7.6 Évaluation de la qualité - archives

1. Archiver les résultats des tests pour chaque échantillon testé pour l'assurance qualité dans la base de données de l'institution ou dans un système informatisé.
2. Utiliser les bandes d'ARN ribosomiaux (par électrophorèse et Bioanalyser) pour qualifier l'ARN. (Voir la section 7.4.4 plus haut et l'annexe 1). Présenter ces résultats aux chercheurs pour leur permettre de déterminer si la qualité de l'échantillon est adéquate pour leur projet de recherche particulier.

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. Alberta Research Tumor Bank, Best Practices Guide, Version 2. 2006
8. Ambion TechNotes 11(1) Assessing RNA quality.
<http://www.ambion.com/techlib/tn/111/8.html>
9. Character of RNA quality using the Agilent 2100 Bioanalyzer. Application notes. Agilent technologies. Accessed at:
<http://www.hcnr.med.harvard.edu/programs/atrc/online%20library%20PDFs/Character%20of%20RNA%20quality%20using%20the%20Agilent%202100%20Bioanalyzer.pdf>
10. RNA Quality Control with the Bioanalyzer. Fonds de la recherche en santé Quebec Tissue Bank Protocol. Version 4. 27/01/2006.
11. DNA quality control using PCR. Fonds de la recherche en santé Quebec Tissue Bank Protocol.
12. Interpreting Agilent Bioanalyzer Results. Version 1, November 2003, Oregon Health and Sciences University.
http://www.ohsu.edu/gmsr/amc/info_docs/AMC_Bioanalyzer_Interpret.pdf

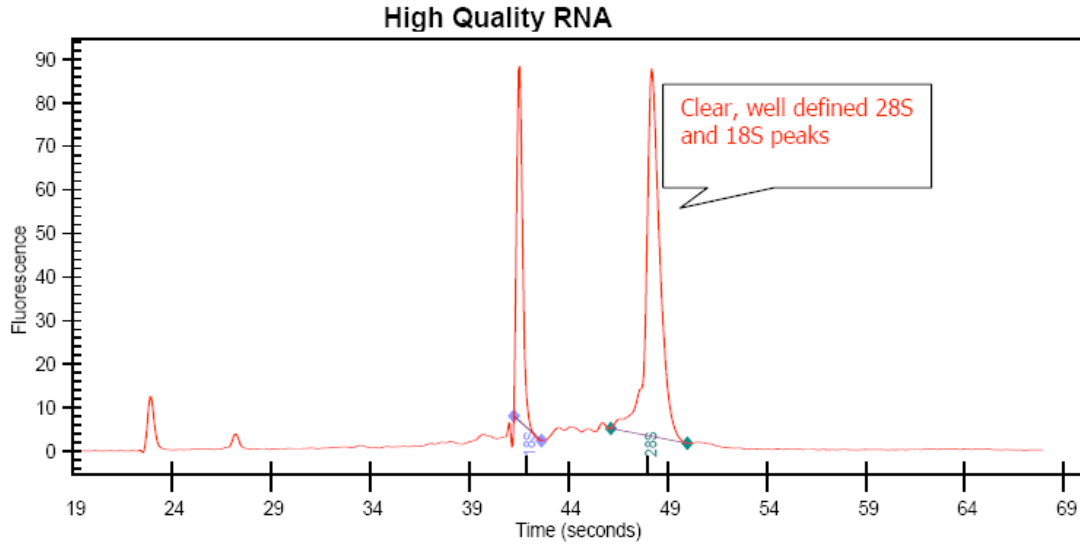
Annexe 1.

Interprétation des résultats du Bioanalyser Agilent

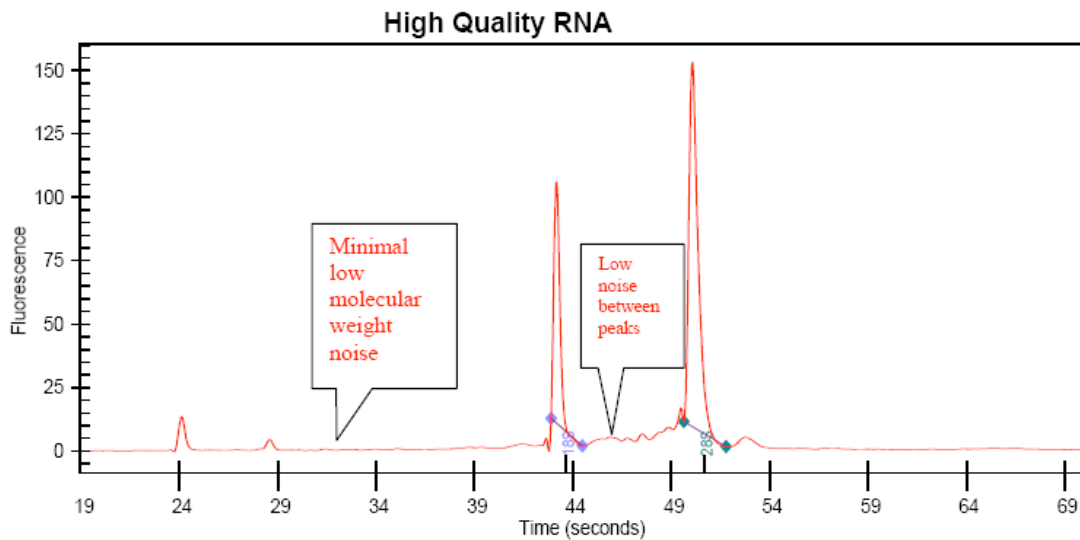
Les diagrammes ci-dessous montrant une haute qualité d'ARN, de l'ARN partiellement dégradé et de l'ARN hautement dégradé.

A. Électrophorégramme montrant une haute qualité d'ARN

Une haute qualité d'ARN est caractérisée par des pics 28s et 18s distincts, peu de bruit entre ces pics et une contamination minimale de faibles poids moléculaires.



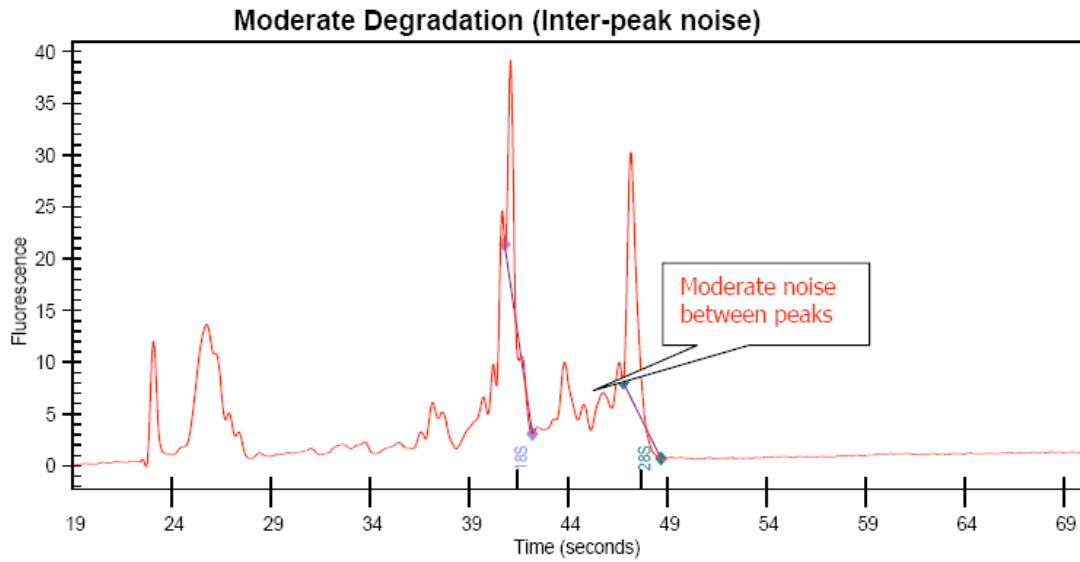
RNA Area 360.81
rRNA Ratio [28S / 18S] 1.92



RNA Area 398.29
rRNA Ratio [28S / 18S] 1.71

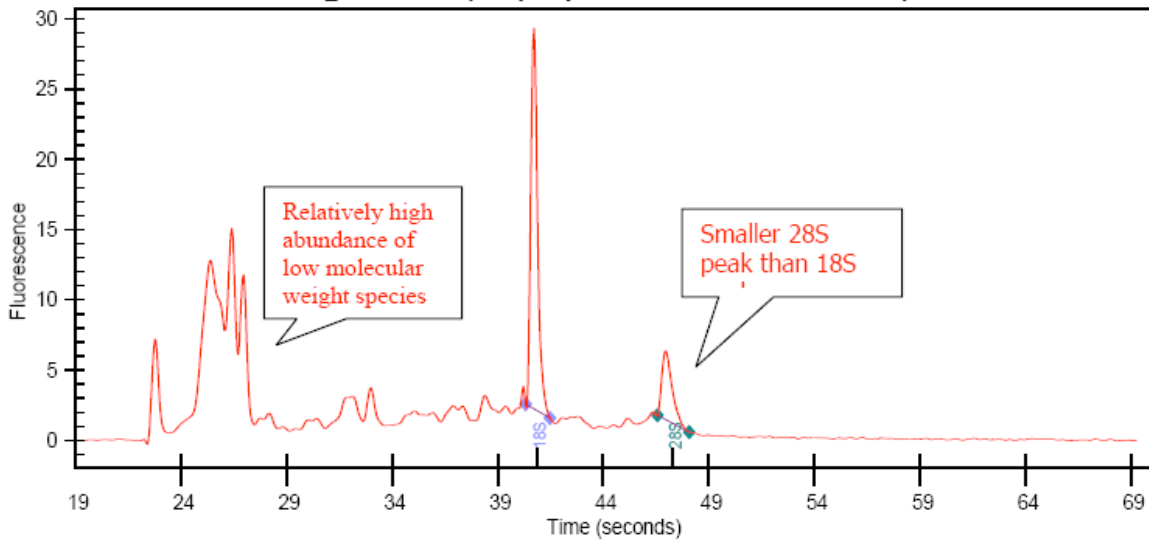
B. Electrophorégramme montrant de l'ARN partiellement dégradé

Caractérisé par la présence d'espèces de faibles poids moléculaires, un bruit de fond entre le 28s et le 18 s et un 28s avec un pic plus petit que le 18s.



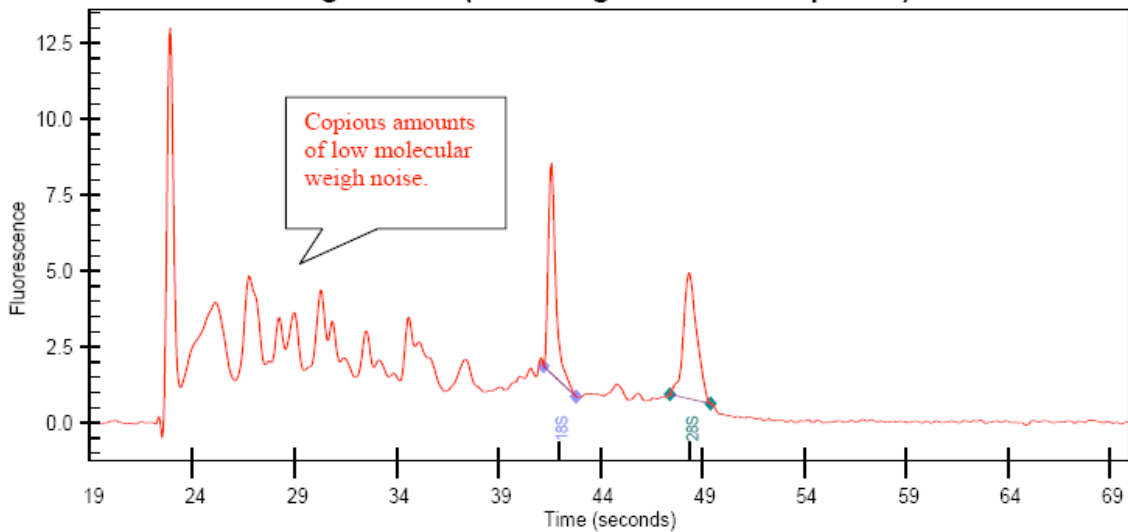
RNA Area 309.05
rRNA Ratio [28S / 18S] 1.70

Moderate Degradation (disproportionate 28S/18S ratio)



RNA Area 227.06
rRNA Ratio [28S / 18S] 0.24

Moderate Degradation (Low Weight Molecular Species)



RNA Area 161.17
rRNA Ratio [28S / 18S] 0.91

C. Electrophorégramme montrant une haute dégradation de l'ARN

Caractérisé par l'absence de pic de 28S et de 18S et consistant uniquement en espèces de faibles poids moléculaires.

