

Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT			
Création de dérivés: extraction d'ADN à partir d'échantillons de sang			
Numéro de PNF:	8.2.004	Version	f1.0
Remplace:		Date d'entrée en vigueur	09 Jan 08
Objet:	Extraction d'ADN 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
8.2.004	2008	JdSH	Réviser pour couvrir l'extraction d'ARN seulement
8.2.004 f1.0	2008	LC	Traduction française de 8.2.004 e1.0

1.0 INTENTION

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

2.0 PORTÉE

La 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 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 PNF générique du RCBT pour la collecte et le traitement du sang
6. 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'ADN 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 ÉQUIPEMENT, RÉACTIFS, MATÉRIEL 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	
Tubes pour isoler la couche de globules blancs des échantillons sanguins	

Tubes de 2 ml pour centrifugeuse	
Tubes de 1.5 ml pour centrifugeuse	
Cryotubes de 2 ml	
Portoirs pour les tubes à microcentrifugeuse	
Portoirs pour tubes dans le bain d'eau	
Mélangeur de type Vortex	
Microcentrifugeuse	
Pipettes	
Pipettes stériles avec embouts aérosol-résistants	
Micropipetteurs	
Pipettes de transfert	
Isopropanol	
Kit d'extraction d'ADN comme Qiagen Flexgene	
Bloc chauffant oscillant comme le Thermomixer d'Eppendorf ou un bloc chauffant normal ou un bain d'eau	
Congélateur à -80° C et -20°	
Boîtes d'entreposage	
Gants jetables	
Bain d'eau chaude (fixé à 55° C)	
Phénol saturé au TRIS	
Portoir oscillant (mélangeur Nutator)	
Pipettes de verre pour le transfert du phénol et du chloroforme (ne pas utiliser de polystyrène)	
Pipetteurs pour larges pipettes de verre	
Éthanol à 95%	
Éthanol à 70%	
Tampon A*	
Protéïnase K*	
Solution de 20% SDS*	
Tampon TRIS*	
Tampon TRIS EDTA (TE) *	
Phénol chloroforme/isoamyle alcool*	
Chloroforme/isoamyle alcool*	
Réfrigérateur à 4° C	

* Voir annexe 1

6.0 DÉFINITIONS

ADN: Acide déoxyribonucléique. Une longue molécule présente chez tous les organismes vivants. L'ADN est présent dans le noyau des cellules eucaryotes. L'ADN se trouve sous une forme de double hélice et est composé de quatre éléments de base qui définissent le code génétique.

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.

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. 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 des échantillons de sang en utilisant un kit comme le Flexgene de Qiagen.

NOTE: Les volumes indiqués sont uniquement recommandés et doivent être mis à l'échelle selon le volume de l'échantillon. Ce protocole est adapté pour un volume de couche de globules blancs de 100-500 µl.

1. Traiter le sang 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. Décongeler la couche de globules blancs préalablement congelée dans un bain d'eau à 37°C par une agitation légère.
5. Garder le tube décongelé sur glace jusqu'au début de la procédure.
6. Utiliser le kit d'extraction d'ADN comme le kit Flexgene de Qiagen et suivre le protocole décrit pour le produit :
http://www.ebiotrade.com/buyf/products/qiagen/1019478HBQAFlexiGene_0102W.pdf
7. L'ADN génomique peut être entreposé à 4°C.
8. L'ADN est un acide faible et à 4°C peut être sujet à de l'hydrolyse acide. Pour un entreposage à long terme, garder l'ADN à -80° C. Éviter d'exposer l'ADN à des cycles de congélation/décongélation pour prévenir la fragmentation de l'ADN génomique.
9. Placer l'ADN dans des boîtes d'entreposage et enregistrer l'emplacement.

7.2 Extraction de l'ADN à partir d'échantillons de sang en utilisant la méthode du phénol/chloroforme.

NOTE: Les volumes indiqués sont uniquement recommandés et doivent être mis à l'échelle selon le volume de l'échantillon. Il est possible de garder le surnageant à 4°C entre chaque étape. Pour les recettes de tampon, voir l'annexe 1.

1. Traiter tous les échantillons de sang 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. Resuspendre les cellules du sang (couche de globules blancs) dans 500 µl de tampon A, 20 µl de 20% SDS et 20 µl de protéinase K (10 mg/ml).
4. Mélanger à l'aide d'une pipette. Afin de prévenir la fragmentation de l'ADN génomique, **ne pas** vortexer pour mélanger.
5. Incuber de 3 à 24 heures dans un bain d'eau à 55° C.
6. Ajouter 500 µl de phénol saturé de TRIS.
7. Mélanger 10 min. sur un portoir oscillant (Nutator) à température de pièce.
8. Centrifuger à 18 000 x g pour 10 min. dans une microcentrifugeuse à température de pièce.
9. Transférer la phase supérieure dans un tube à microcentrifugeuse.
10. Ajouter 500 µl de phénol/chloroforme/alcool isoamyle.
11. Mélanger par inversion.
12. Centrifuger à 18 000 x g pendant 10 min. dans une microcentrifugeuse à température de pièce.
13. Transférer la phase supérieure dans un tube à microcentrifugeuse propre.
14. Ajouter 500 µl de chloroforme/alcool isoamyle.
15. Mélanger par inversion.
16. Centrifuger à 18 000 x g pendant 10 min. dans une microcentrifugeuse à température de pièce.
17. Transférer la phase supérieure dans un tube à microcentrifugeuse propre.
18. Ajouter 1 ml d'éthanol à 95% froid (gardé à -20° C).
19. Incuber à -20° C pour 2 à 12 heures
20. Prendre l'ADN avec un embout de pipette et transférer dans 500 µl d'éthanol à 70% pour un lavage.
21. Centrifuger à 18 000 x g pour 5 min. dans une microcentrifugeuse à température de pièce.

22. Se débarrasser du surnageant et permettre à l'ADN de sécher pour 10 min.
23. Resuspendre le culot d'ADN dans un tampon TE.
24. Incuber dans un bain d'eau à 55° C pour permettre de dissoudre l'ADN si nécessaire.
25. Entreposer l'ADN à -80° C ou à 4° C si à court terme ou pour conserver l'intégrité 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. SOP #: BIO-SOP-BLD-PRO-DNA. Blood Sample Processing November 20, 2006 Procure, Quebec Prostate Cancer Biobank
7. Qiagen Flexigene DNA Kit Handbook

ANNEXE 1.

**PRÉPARATION DES TAMPONS ET DES 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 : 10mM TRIS pH 7,9
 2 mM EDTA pH 8
 40mM NaCl

Protéinase K : 20 unités/mg (Invitrogen # 25530-015)
 Resuspendu dans 10mL de solution d'entreposage
 Dilution = 10mg/mL

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

Phénol saturé de TRIS:

- Mettre à 55°C pour liquéfier le phénol cristallisé
- Ajouter 0,1% de 8-hydroxyquinoline ⇒ inhibiteur de ARNase
- Mélanger
- Ajouter un volume égal de TRIS 1M pH8
- Mélanger 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 ne laissant pas passer la lumière

Phénol/Chloroforme/Iso : garder à 4°C dans une bouteille ne laissant pas passer la lumière

Mélanger dans le ratio suivant : (25:24:1)
Pour un volume final de 200 ml :
Phénol – 100 ml
Chloroforme – 96 ml
Alcool-isoamyl– 4 ml

Chloroforme/Iso : Garder à température de pièce dans une bouteille ne laissant pas passer la lumière

Ratio (24:1)

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

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