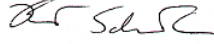


Procédure normalisée de fonctionnement Évaluation de la qualité des acides nucléiques			
Catégorie:	Assurance de la qualité		
Numéro de PNF:	05.002	Version:	f2.0
Remplace:	5.1.002 f1.0	Date d'entrée en vigueur:	31 mai 2012
Approuvée par:	Comité administratif du RCBT (CAR)		01 mai 2012
	Par: Brent Schacter 		31 mai 2012

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, pour que l'interprétation des résultats soit valable et pour faciliter leur comparaison entre les laboratoires indépendants. Toutes les biobanques doivent avoir l'assurance qu'elles fournissent des échantillons adéquats pour les fins de recherche spécifiée. Idéalement, des procédures de tests doivent être en place pour contrôler et évaluer la qualité des échantillons dans la collection.

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 et ce, dans le but de fournir aux investigateurs un produit qui correspond à leurs besoins.

3.0 RÉFÉRENCES À D'AUTRES PNFs OU POLITIQUES DU RCBT

Remarque: Lors de l'adoption de cette PNF pour un usage local, s'il vous plaît faire référence au RCBT.

- 3.1 *Politique du RCBT: POL 5 Registres et documentation*
- 3.2 *Politique du RCBT: POL 7 Manipulation du matériel et de l'information*
- 3.3 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT : SOP 08.02.003 Dérivés du sang : extraction d'ARN*
- 3.4 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: SOP 08.02.004 Dérivés du sang : Extraction d'ADN*
- 3.5 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: SOP 08.03.008 Dérivés des tissus : Extraction d'ADN*
- 3.6 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: SOP 08.03.009 Dérivés des tissus – extraction d'ARN*
- 3.7 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: SOP 08.01.002 Gestion des déchets à biorisques*

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
Technicien de laboratoire	Supervise et assiste avec des procédures d'assurance qualité. Enregistre et documente les résultats.

5.0 ÉQUIPEMENT, 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	

6.0 DÉFINITIONS

Voir le programme du RCBT : <http://www.ctrnet.ca/glossary>

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 des tissus avant la collecte, les intervalles post-résection de la collecte au traitement afin de les préserver ainsi que les conditions d'entreposage.

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

Évaluation de la qualité des acides nucléiques

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

- 7.1.1 Évaluer l'intégrité moléculaire des échantillons de la collection sur un pourcentage des échantillons entreposés tel que jugé approprié.
- 7.1.2 Évaluer l'intégrité moléculaire par un laboratoire désigné utilisant des procédures établies développées dans ce but.
- 7.1.3 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.
- 7.1.4 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.
- 7.1.5 Utiliser l'échelle de points dans l'interprétation des résultats de l'évaluation de la qualité.

7.2 Création et gestion du dossier du participant

- 7.2.1 Extraire/isoler l'ADN et documenter le protocole utilisé.
- 7.2.2 Les mesures spectrophotométriques pour déterminer la concentration de l'ADN et le ratio de D.O. 260/280.

7.3 Évaluation de la qualité – ADN par réaction en chaîne de polymérase (PCR)

Le centre de contrôle de la qualité du RCBT utilise la procédure suivante :

- 7.3.1 La méthode consiste à amplifier différentes longueurs du gène B-globin. La taille maximum de l'amplicon corrèle positivement avec la qualité de l'ADN.
- 7.3.2 Le test et l'évaluation doivent être réalisés par une personne qualifiée et formée de façon appropriée.
- 7.3.3 Utiliser les amorces suivantes:
 - B-Globine: GH20 GAAGAGCCAAGGACAGGTAC
 - B-Globine: PC04 CAACTTCATCCACGTTACCC
 - 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 base pairs (pb)
- RS42 + KM29 = 536 pb
- RS40 + RS80 = 989 pb
- KM29 + RS80 = 1327 pb

Évaluation de la qualité des acides nucléiques

7.3.4 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	H ₂ O
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

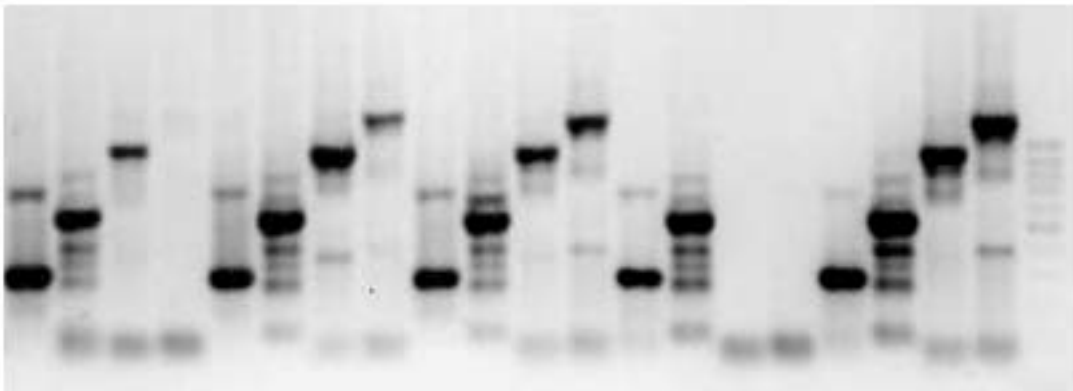
7.3.5 Utiliser les conditions de PCR suivantes:

- 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)

7.3.6 Analyser sur gel d'agarose 1.2% agarose.

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

Bon 3 bandes	Très bon 4 bandes	Très bon 4 bandes	Pauvre 2 bandes	Très bon 4 bandes
-----------------	----------------------	----------------------	--------------------	----------------------



7.4 Évaluation de la qualité – ARN par mesures spectrophotométriques

7.4.1 Extraire/isoler l'ARN et documenter le protocole utilisé.

7.4.2 Effectuer des mesures spectrophotométriques pour déterminer la concentration de l'ARN et le ratio de D.O. 260/280.

7.5 Évaluation de la qualité – ARN en utilisant le Bioanalyseur

Évaluation de la qualité des acides nucléiques

La procédure suivante est utilisée par le centre de contrôle de la qualité du RCBT et est basée sur l'utilisation du Bioanalyseur Agilent 2100 (avec le nano kit d'ARN 6000 ou un kit commercial approprié) afin de déterminer la concentration ainsi que la pureté/intégrité des échantillons d'ARN. Il fournit une lecture pour la pureté et la qualité de l'échantillon et possède également 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 Bioanalyseur.

7.5.1 Décontaminer les électrodes du Bioanalyseur

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

7.5.2 Préparer le gel

- a. Permettre aux réactifs de s'équilibrer avec la température de la pièce 30 minutes avant de les utiliser.
- b. 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.
- c. Aliquoter 65 µl du gel filtré dans des tubes à microcentrifugeuse exempts d'RNase et entreposer à 4° C jusqu'à ce que nécessaire.

7.5.3 Préparer le "gel-dye"

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

7.5.4 Charger le mélange "gel dye"

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

7.5.5 Charger le marqueur

- a. 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 Charger le marqueur de poids moléculaire et les échantillons

- a. Pipetter 1µl du marqueur de poids moléculaire dénaturé au fond du puit marqué avec le symbole marqueur.
- b. Pipetter 1 µl de chacun des échantillons dénaturés dans chaque puit échantillon.
- c. Mélanger la puce à l'aide d'un vortex pendant 1 minute à 2400 rpm.
- d. 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 consulter la référence 8.9.

7.6 Évaluation de la qualité - Archives

- 7.6.1 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.
- 7.6.2 Inclure la PNF utilisée dans les résultats des tests.

8.0 RÉFÉRENCES, RÈGLEMENTS ET LIGNES DIRECTRICES

- 8.1 Déclaration d'Helsinki.
<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>
- 8.2 Tri-Council Policy Statement 2; 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, December 2010.
<http://www.pre.ethics.gc.ca/eng/policy-politique/initiatives/tcps2-eptc2/Default/>
- 8.3 Human Tissue and Biological Samples for use in Research. Operational and Ethical Guidelines. Medical Research Council Ethics
<http://www.mrc.ac.uk/Utilities/Documentrecord/index.htm?d=MRC002420>
- 8.4 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/Search/search.asp?zoom_query=best+practices+for+repositories
- 8.5 US National Biospecimen Network Blueprint
<http://biospecimens.cancer.gov/resources/publications/reports/nbn.asp>
- 8.6 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.
- 8.7 Alberta Research Tumor Bank, Best Practices Guide, Version 2. 2006.
- 8.8 Ambion TechNotes 11(1) Assessing RNA quality.
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Ambion-Tech-Support/rna-isolation/tech-notes/assessing-rna-quality.html>
- 8.9 Characterization of RNA quality using the Agilent 2100 Bioanalyzer. Application Note.
http://www.neurodiscovery.harvard.edu/images/stories/HND/for_research/atrc/atrc_downloads/online_library/PDFs/Character_of_RNA_quality_using_the_Agilent_2100_Bioanalyzer.pdf
- 8.10 RNA Quality Control with the Bioanalyzer. Fonds de la recherche en santé Québec Tissue Bank Protocol. Version 4. 27/01/2006.
- 8.11 DNA quality control using PCR. Fonds de la recherche en santé Québec Tissue Bank Protocol.
- 8.12 Interpreting Agilent Bioanalyzer Results. Version 1, November 2003, Oregon Health and Sciences University.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16448564>

9.0 ANNEXES

9.1 Annexe A: Interprétation du bioanalyseur Agilent

10.0 HISTORIQUE DES RÉVISIONS

Numéros des PNFs	Dates des modifications	Auteurs	Résumé des modifications
QA 001.001	2005	JdSH	Version initiale
5.1.002 e1.0	2008	JdSH	Ajout de l'évaluation de la qualité de l'ADN et de l'ARN seulement
5.1.002 e1.0	Mai 2012	CMC	<ul style="list-style-type: none"> • Grammaire et mise en page • Retrait des définitions • Historique des révisions déplacé au bas du document • Mise à jour des liens pour les références • Mise à jour des références aux PNFs • Section 1 : Révision de l'intention. Suppression du deuxième paragraphe • Section 2: Révision de la portée. Suppression du deuxième paragraphe. • Section 3: Ajout de la référence 3.8. Suppression de la référence à la PNF générique sur le CQ 001.001 (Évaluation de la qualité des échantillons tissulaires) • Sections 7.1-7.6 Révision des procédures. • Section 7.5 – Suppression de “Pour l'interprétation des graphiques générés, voir l'annexe A).” • Annexe : Inclusion des nombres d'intégrité d'ARN (RIN)

Interprétation des résultats du bioanalyseur Agilent

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

A. Electrophérogramme montrant une haute qualité d'ARN (RIN 9)

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.

