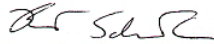


Procédure normalisée de fonctionnement Dérivés du sang : extraction de l'ARN			
Catégorie:	Manipulation et documentation du matériel - sang		
Numéro de PNF:	08.02.003	Version:	f2.0
Remplace:	8.1.003 f1.1	Date d'entrée en vigueur:	
Approuvée par:	Comité administratif du RCBT (CAR)	01 juin 2012	
	Par: Brent Schacter 	13 juin 2012	

1.0 BUT

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 afin de suivre l'extraction de l'ARN à partir des échantillons de sang.

2.0 PORTÉE

Cette procédure normalisée de fonctionnement (PNF) décrit la façon dont 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 SOPs 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 2 Éthique*

3.3 *Politique du RCBT: POL 4 Vie privée et sécurité*

3.4 *Politique du RCBT: POL 7 Manipulation du matériel et de l'information*

3.5 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: PNF 08.02.001 Collecte du sang*

3.6 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: SOP 08.02.002 Traitement et entreposage du sang*

3.7 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: SOP 08.01.002 Gestion des déchets du matériel à biorisque*

4.0 RÔLES ET RESPONSABILITÉS

Cette procédure 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
Technicien de laboratoire	Responsable de l'étiquetage des tubes et de l'extraction de l'ARN à partir des échantillons sanguins

5.0 MATÉRIEL, ÉQUIPEMENT 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	
Kit d'extraction d'ARN et instructions	
Contenant pour les déchets biologiques et sacs autoclavables	
Boîte d'entreposage	
Inhibiteur d'ARNase pour nettoyer les surfaces	

6.0 DÉFINITIONS

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

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

7.1.1 Éviter la contamination croisée

- a. En raison de la sensibilité des technologies d'amplification des acides nucléiques, certaines précautions doivent être prises pour éviter la contamination croisée des échantillons.
- b. Plusieurs protocoles d'extraction d'ARN utilisent des colonnes de centrifugation. 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.
- c. Toujours utiliser des embouts aérosol-résistants.

Dérivés du sang: extraction de l'ARN

- d. 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.
- e. Fermer les couvercles des colonnes de centrifugation avant de les placer dans la microcentrifugeuse.
- f. L'effluent généré après chaque étape de centrifugation peut contenir du matériel à biorisques et doit être disposé de façon appropriée.
- g. Ouvrir seulement une colonne de centrifugation à la fois et éviter de créer un effet d'aérosol.
- h. Jeter les tubes de traitement utilisés contenant l'effluent dans des contenants à déchets biologiques appropriés.

7.1.2 Éviter la dégradation de l'ARN

- a. Travailler sur des surfaces nettoyées et le cas échéant, essuyer avec un inhibiteur d'ARNase.
- b. Ne pas utiliser aucun article de plastique ou de verre dont on n'a pas éliminé la contamination à la RNase.
- c. Prendre soin de ne pas introduire des RNases dans l'échantillon durant et après la procédure de purification.
- d. 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.
- e. 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.
- f. Changer de gants fréquemment.
- g. Garder les tubes fermés autant que possible.
- h. Garder l'ARN purifié sur glace sèche durant le processus d'extraction et lors de l'aliquotage.
- i. Garder les échantillons congelés au-dessous de -80°C ou à plus basse température pour un entreposage à long terme.

7.2 Extraction d'ARN à partir des échantillons de sang

- 7.2.1 Traiter tous les échantillons de sang comme potentiellement infectieux.
- 7.2.2 L'extraction d'ARN est effectuée par un technicien de laboratoire ou un membre du personnel formé et désigné par la banque de tumeurs.
- 7.2.3 Avoir le matériel et l'équipement prêts. Avoir la quantité de tubes et de cryotubes nécessaires étiquetés et prêts.
- 7.2.4 Documenter la méthode d'extraction d'ARN. Il existe plusieurs kits commerciaux d'extraction d'ARN disponibles ; suivre la procédure détaillée décrite dans les instructions du kit commercial.
- 7.2.5 Immédiatement après la procédure, placer l'ARN extrait et resuspendu sur glace.
- 7.2.6 Il est préférable d'aliquoter l'ARN en plusieurs plus petits aliquots afin de limiter les cycles de congélation-décongélation.
- 7.2.7 Un petit aliquot doit être retiré avant l'entreposage à long terme pour un contrôle quantitatif et qualitatif.

- 7.2.8 Placer les échantillons d'ARN extrait dans les boîtes d'entreposage et enregistrer l'emplacement.
- 7.2.9 Placer les échantillons à -80° C ou à plus basse température.

8.0 RÉFÉRENCES, RÈGLEMENTS ET DIRECTIVES

- 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>

9.0 ANNEXES

Aucune

10.0 HISTORIQUE DES RÉVISIONS

Numéros des PNFs	Dates des modifications	Auteurs	Résumé des modifications
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 à partir des cellules sanguines
8.2.003	2011	TS	Section 5.0: Ajout des supports pour les tubes PAXgene, les cryoyubes et les colonnes Quiagen. Ajout des contenants à déchets biologiques, des sacs autoclavables. Ajout de la glace sèche. Section 7.1: Étape 8: Ajout du commentaire sur la manière de jeter les déchets. Étape 7: Ajout de la glace sèche. Section 7.2: Étapes 6 et 7: Ajout des étapes concernant les aliquots pour l'entreposage et le contrôle de la qualité. Section 7.3: Étape 3: Documenter le nombre de cycles de congélation-décongélation.



Dérivés du sang: extraction de l'ARN

8.2.003 e1.1	Juin 2012	CMG	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 Révision du tableau de la section 5.0 Révisions mineures à la section 7.1 Section 7.2.4 : suppression du lien de la référence Fusionnement de la section 7.3 avec la 7.4.