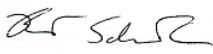


Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT Dérivés de tissu – Extraction d'ADN			
Numéro de PNF:	08.03.008	Version:	f2.0
Remplace:	8.3.008 e1.0	Catégorie:	Manipulation du matériel et de la documentation – Tissu solide
Approuvée par:	Le groupe administratif du RCBT		01 juin 2012
	Par: Brent Schacter 		28 juin 2012

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) ou des produits chimiques et il est recommandé que le personnel suive les guides de biorisques des institutions.

3.0 RÉFÉRENCES À D'AUTRES PNFs OU POLITIQUES

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 Éthiques*
- 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 08.03.003 Congélation en tube du tissu*
- 3.6 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: PNF 08.03.004 Congélation des tissus dans l'OCT*
- 3.7 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: PNF 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 de l'extraction d'ADN à partir de tissu.

Personnel de la banque de tumeurs	Responsabilité/rôle
Technicien de laboratoire	Responsable de l'étiquetage des tubes, de l'extraction de l'ADN des tissus et de l'entreposage.

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 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	

*Voir 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 8.10

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'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 protocoles d'extraction pour le contrôle de la qualité suivis par le RCBT.

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.

- 7.1.1 Traiter tous les tissus comme potentiellement infectieux.
- 7.1.2 L'extraction d'ADN est effectuée par un technicien de laboratoire ou un membre du personnel formé et désigné par la banque de tumeurs.
- 7.1.3 Avoir le matériel et l'équipement prêts. Avoir la quantité de tubes et de vials à congélation nécessaires étiquetés et prêts.
- 7.1.4 Suspending 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.
- 7.1.5 Ajouter 20 µl de SDS 20% et 20 µl de protéinase K (10 mg/ml).
- 7.1.6 Incuber de 3 à 24 heures dans un bain d'eau à 55° C (avec agitateur).
- 7.1.7 Ajouter 500 µl de phénol saturé de TRIS.
- 7.1.8 Mélanger 10 min. sur un portoir oscillant (Nutator) à température de pièce.
- 7.1.9 Centrifuger à 18 000 x g pour 10 min. dans une microcentrifugeuse à température de pièce.
- 7.1.10 Transférer la phase supérieure dans un tube à microcentrifugeuse.
- 7.1.11 Ajouter 500 µl de phénol/chloroforme/alcool isoamyle.
- 7.1.12 Mélanger par inversion.
- 7.1.13 Répéter les étapes 7.1.9 et 7.1.10.
- 7.1.14 Ajouter 500 µl de chloroforme/alcool isoamyle
- 7.1.15 Mélanger par inversion.
- 7.1.16 Répéter les étapes 7.1.9 et 7.1.10.
- 7.1.17 Ajouter 1 ml d'éthanol à 95% froid (gardé à -20° C).
- 7.1.18 Incuber à -80° C de 30 minutes à 2 heures ou à -20° C pendant 24 heures.
- 7.1.19 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%.
- 7.1.20 Centrifuger à 18 000 x g pour 5 minutes à température de la pièce.
- 7.1.21 Enlever le surnageant et laisser l'ADN sécher pendant 10 minutes à température de la pièce (ou sous les vapeurs d'alcool).
- 7.1.22 Resuspendre le culot d'ADN dans le tampon TE pour avoir une concentration appropriée ou désirée d'ADN dans la solution.
- 7.1.23 Incuber le tube dans un bain d'eau à 55° C (avec agitation) pendant 1 heure pour dissoudre le culot.
- 7.1.24 L'ADN peut être entreposé à 4° C.
- 7.1.25 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, 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 Guideline – Fresh Tissue Working Group of BIG and NCI breast cancer Cooperative Groups
- 8.8 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.
- 8.9 DNA Extraction Procedure by Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).
- 8.10 Sambrook, Fitch, Maniatis. Molecular Cloning – A Laboratory Manual, 2nd Edition, Preparation of Reagents and Buffers used in molecular cloning. Appendix B

9.0 ANNEXE

- 9.1 Annexe A – Préparation des tampons et réactifs requis pour l'extraction de l'ADN

10.0 HISTORIQUE DES RÉVISIONS

Numéros des PNFs	Dates des modifications	Auteurs	Résumé des modifications
LP 002.001	2005		PNF générique du RCBT pour la collecte et le traitement des tissus
8.3.008	08-01-2008		Révisée pour couvrir seulement l'extraction d'ADN
8.3.008 e1.0	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

PRÉPARATION DES TAMPONS ET RÉACTIFS REQUIS POUR L'EXTRACTION DE L'ADN

NOTE: Les fournisseurs et les marques de commerce sont ceux utilisés par le RRCancer du Fonds de la recherche du Québec - Santé 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