


Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT Dérivés de tissus – Extraction d'ARN			
Numéro de PNF:	08.03.009	Version:	f2.0
Remplace:	8.3.009 f1.0	Catégorie:	Manipulation et documentation du matériel – 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 prélevés 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'ARN à partir des spécimens de tissus, tous les efforts doivent être faits pour éviter la contamination et préserver l'intégrité moléculaire.

2.0 PORTÉE

Cette procédure normalisée de fonctionnement (PNF) décrit comment l'ARN doit être extrait des tissus congelés dans les tubes et ceux dans l'OCT. Cette PNF ne couvre pas les procédures de sécurité détaillées pour la manipulation du matériel biologique humain (MBH) et il est recommandé que le personnel suive les guides de biorisques des institutions.

3.0 RÉFÉRENCES À D'AUTRES PNFs ET 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 005.001 Registres et documentation*
- 3.2 *Politique du RCBT: POL 002.001 Éthique*
- 3.3 *Politique du RCBT: POL 004.001 Vie privée et sécurité*
- 3.4 *Politique du RCBT: POL 007.001 Manipulation du matériel et de l'information*
- 3.5 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: PNF 08.03.003 Congélation en tubes du tissu*
- 3.6 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: PNF 08.03.004 Congélation du tissu dans l'OCT*
- 3.7 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCB : PNF 08.03.006 Sectionnement des tissus enrobés de paraffine et d'OCT*
- 3.8 *Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: PNF 06.002 Gestion des déchets à biorisques*

4.0 RÔLES ET RESPONSABILITÉS

Cette politique s'adresse à tout le personnel des banques membres du RCBT qui est responsable de l'extraction d'ARN à partir de tissus.

Personnel de la banque de tumeurs	Responsabilité/rôle
Technicien de laboratoire	Responsable de l'étiquetage des tubes, de l'extraction de l'ARN à partir du tissu, de l'entreposage des échantillons et de la documentation de l'entreposage de l'ARN.

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	
Tubes à microcentrifugeuse	
Support pour tubes à microcentrifugeuse	
Homogénéisateur de tissu comme le TissueRuptor ou un homogénéisateur verre-Teflon	
Extracteur automatique Qiacube	
Microcentrifugeuse réfrigérée	
Cryotome	
Micropipetteurs	
Embouts de pipettes stériles et exempts d'ARNase	
RNeasy Mini Kit	
RNeasy Micro Kit	
14.3M β -Mercaptoéthanol (β -Me) ou 2 M dithiothreitol (DTT)	
Éthanol 96-100%	
Gants jetables	
Éthanol 70%	
Congélateur à -80° C ou -20° C	
Glace pour refroidir les tubes et l'eau	
Glace sèche pour le transport des blocs d'OCT et des tissus congelés	

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 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 qualité effectué par le RCBT.

7.1 Extraction d'ARN à partir de tissu congelé

NOTE: Les volumes indiqués sont uniquement recommandés et doivent être mis à l'échelle selon le volume de l'échantillon de tissu. S'assurer que tous les tubes, homogénéisateurs etc. utilisés dans le processus d'extraction d'ARN sont exempts de RNases ou traités avec des inhibiteurs de RNases. Ce protocole est basé sur celui du *RNeasy Mini kit*.

- 7.1.1 Traiter tous les tissus comme potentiellement infectieux.
- 7.1.2 L'extraction d'ARN est effectuée par un technicien de laboratoire ou un membre du personnel formé et désigné par la banque de tumeurs.
- 7.1.3 Avoir le matériel et l'équipement prêts. Avoir la quantité de tubes et de cryotubes nécessaires étiquetés et prêts. Tout l'équipement et les réactifs qui viennent en contact avec l'échantillon devraient être exempts de RNases.
- 7.1.4 Homogénéisation. Les tissus sont gardés congelés à -80°C jusqu'à homogénéisation.
- 7.1.5 Homogénéiser les échantillons de tissus (maximum 30 mg) dans 600 μL de tampon RLT* en utilisant un homogénéisateur verre-Teflon ou électrique. D'autres méthodes peuvent être utilisées pour homogénéiser le tissu si un homogénéisateur n'est pas disponible. (Se référer à l'étape 3 du manuel d'instructions du *RNeasy Mini* dans la section intitulée 'Tissus animaux').
- 7.1.6 Centrifuger le lysat pendant 3 min à vitesse maximum ($>18,000 \times g$). Enlever soigneusement le surnageant à l'aide d'une pipette et le transférer dans un nouveau tube à microcentrifugeuse.
- 7.1.7 Procéder avec le protocole ou le manuel d'instructions du *Rneasy Mini Qiacube* pour les étapes 5-12 qui y sont décrites.
- 7.1.8 Entreposer l'ARN dissout à -80°C ou à plus basse température.
- 7.1.9 Enregistrer l'emplacement de l'entreposage.

7.2 Extraction d'ARN à partir du tissu congelé dans l'OCT

NOTE: Ce protocole est basé sur celui du kit *RNeasy Mini* ; il est favorisé lorsque les échantillons sont petits. Toutefois, pour les échantillons plus gros, utiliser le kit *RNeasy Mini* tel que décrit ci-dessus.

- 7.2.1 Traiter tous les tissus comme potentiellement infectieux.
- 7.2.2 L'extraction d'ARN à partir de tissu enrobé dans l'OCT 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 tubes à congélation nécessaires étiquetés et prêts. Tout l'équipement et les réactifs qui viennent en contact avec l'échantillon devraient être exempts de RNases.
- 7.2.4 Utiliser le kit d'extraction *Qiagen's RNeasy Micro* pour l'isolement de l'ARN à partir du tissu enrobé dans l'OCT.
- 7.2.5 Prendre quelques (5-10) sections d'OCT de $3\mu\text{m}$ en utilisant un cryostat et les placer dans un tube à microcentrifugeuse pré-refroidi. S'assurer que les sections ne décongèlent pas avant la prochaine étape.
- 7.2.6 Ajouter $600\mu\text{L}$ de tampon RLT* et ramener à la température de la pièce.
- 7.2.7 Centrifuger pendant 12 minutes à vitesse maximum ($>18\ 0000 \times g$).
- 7.2.8 Enlever le surnageant fluide, mais pas la couche de surface, et le placer dans un nouveau tube. Se débarrasser du reste.

- 7.2.9 Ajouter 600µl d'éthanol 70%, mélanger en utilisant une pipette.
- 7.2.10 Prendre 700µl of cette solution et passer à travers une mini-colonne fournie dans le kit, centrifuger pendant 15 secondes à 8 000 x g.
- 7.2.11 Répéter cette dernière étape jusqu'à ce que toute la solution ait passé à travers la mini-colonne.
- 7.2.12 Passer 700µl de tampon RW1* à travers la mini-colonne, centrifuger 15 secondes à 8 000 x g.
- 7.2.13 Changer le tube de collecte sous la mini-colonne.
- 7.2.14 Passer 500µl de tampon RPE* à travers la mini-colonne, centrifuger 15 secondes à 8 000 x g.
- 7.2.15 Centrifuger un autre 500µl de tampon RPE* à travers la colonne, mais cette fois pendant 2 minutes à vitesse maximum.
- 7.2.16 Changer le tube de collecte, centrifuger pendant 1 minute ou plus à vitesse maximum pour s'assurer que la colonne soit sèche. Si du liquide se retrouve dans le tube, centrifuger pour une autre minute ou deux.
- 7.2.17 Ajouter 30µl d'H₂O, exempte de RNases directement sur le filtre de la colonne, laisser incubé pendant 5 à 10 minutes et centrifuger pendant 1 minute à 8 000 x g.
- 7.2.18 Entreposer l'ARN dissout à -80° C ou à plus basse température.

*Les réactifs (RLT, RW1 et RPE) sont tous fournis dans le kit *RNeasy* (voir les réf. 8.11, 8.12 et 8.13 pour les détails).

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
http://ctep.cancer.gov/forms/guidelines_fresh_tissue.pdf

- 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 RNA Extraction procedure from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).
- 8.10 Procedure for the RNA Extraction from tissues in OCT - from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).
- 8.11 Rneasy Mini Handbook
<http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=352>
- 8.12 Rneasy Mini Qiacube Handbook
<http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=200915>
- 8.13 RNeasy Micro Handbook – <http://www.qiagen.com>

9.0 ANNEXE

Aucune

10.0 HISTORIQUE DES RÉVISIONS

Numéros des PNFs	Dates des modifications	Auteurs	Résumé des modifications
LP 002.001	2005	JdSH	PNF générique du RCBT pour la collecte et le traitement des tissus
8.3.009	2008	JdSH	Révisée pour couvrir l'extraction d'ARN seulement
8.3.009 f1.0	Mai 2012	CMG	<ul style="list-style-type: none"> • Grammaire et mise en page • Historique des révisions déplacé au bas du document • Mise à jour des liens pour les références • Mise à jour des références aux PNFs • Section 1.0 – Suppression de “Le but de cette...” • Section 5.0 – Mise à jour du tableau • Section 7.0 – Modification des procédures