Date d'entrée en vigueur: 2022-05-26

SERVICES D'EXTRACTION

Guide de l'utilisateur

Extraction de l'ARN

Version 01

© Copyright 2021 Centre d'expertise et de services Génome Québec
Tous droits réservés

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES **2**
INFORMATIONS GÉNÉRALES **3**
PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS **3**
TUBES 3
REQUIS 3
REQUÊTE DE SERVICE ET SOUMISSION DES ÉCHANTILLONS **5**
REQUÊTE DE SERVICE 5
SOUMISSION D'ÉCHANTILLONS 5
PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR ENVOI **6**
BORDEREAU D'EXPÉDITION 6
PRÉPARATION DU COLIS 6
ENVOI DES ÉCHANTILLONS 7
POUR PLUS D'INFORMATION **7**
BUREAU DE GESTION DES CLIENTS 7
HISTORIQUE DES VERSIONS 7
INFORMATIONS ADDITIONNELLES **8**
INSTRUCTIONS POUR LA MANIPULATION DE L'ARN 8
ÉCHANTILLONNAGE (*SAMPLING*) ET ENTREPOSAGE 8
ÉCHANTILLONS FFPE POUR EXTRACTION ARN 9

Informations générales

Ce document décrit la procédure à suivre lors d'une demande de service d'extraction de l'ARN. Les instructions détaillées pour la préparation, la soumission des échantillons, les exigences d'envoi ainsi des informations additionnelles sont fournies dans ce guide.

Il est préférable de contacter le Bureau de gestion des clients avant la collecte des échantillons afin de recevoir des recommandations pertinentes propres au projet.

L'ARN est très sensible à la dégradation et la qualité de l'extraction repose en grande partie sur la manipulation pré-extraction. Voir la section Informations additionnelles pour obtenir des renseignements sur la manipulation, l'échantillonnage et l'entreposage de l'ARN.

Des consignes particulières doivent être suivies pour les échantillons FFPE. Voir la section Informations additionnelles, Échantillons FFPE pour extraction ARN.

Préparation des échantillons

Tubes

Pour l'extraction de l'ARN, les formats de microtubes suivants sont acceptés, mais seul le premier choix (tubes RB) ne génèrera pas de frais supplémentaires dans le cas d'un transfert pour la procédure.

- Premier choix :
  Tubes RB pour échantillons, 2 mL, Qiagen, Cat# 990381

- Deuxième choix :
  Tubes pour microcentrifuge gradué, 2 mL, clair, Progene, Cat# 87-B200-C

- Troisième choix :
  Tubes pour microcentrifuge, 1.5 mL, certifié sans RNase, DNase, DNA et inhibiteurs de PCR, Progene, Cat# 87-B150-C

Requis

Volume et quantité des échantillons

Type de matériel	Quantité[1] et température d'entreposage	Commentaire
Tissu animal	50 mg dans 900 µL TRIzol[2], -80°C	Lors de la demande initiale, spécifier l'espèce et le type de tissu, car les recommandations pour l'échantillonnage peuvent différer.
Sang		Contacter le Bureau de gestion des clients pour de plus amples informations.
Cellules animales (culot)	1 à 10 millions dans 900 µL TRIzol[2], -80°C	Tout traitement (par ex. mécanique comme le FACS) affectera le rendement de l'extraction. Contacter le Bureau de gestion des clients pour de plus amples informations.
Tissu végétal	50 mg, -80°C	Lors de la demande initiale, spécifier l'espèce et le type de tissu, car les recommandations pour l'échantillonnage peuvent différer.

[1] L'utilisation de plus ou moins de matériel de ce qui est recommandé (+/- 10 %) affecte la qualité de l'extraction; le respect des ratios matériel/chimie du kit et de la capacité des filtres utilisés lors de l'extraction sont critiques.
[2] Suivre les recommandations du fournisseur sur l'utilisation optimale du réactif.

Identification

Les échantillons sont identifiés avec un nom provenant du client et un code-barres unique provenant de Génome Québec.

Nom des échantillons

Le nom des échantillons doit être facile à écrire et à lire et ne dépassant pas 5 caractères (ex : L1, L2, L3, L4).

Si les noms des échantillons sont illisibles ou portent à confusion (ex : plusieurs codes sur un même tube), les échantillons pourraient être retournés moyennement des frais afin d'être identifiés adéquatement.

Chaque nom doit être unique. Ne pas utiliser le même nom pour 2 tubes même s'il s'agit d'un duplicata d'expérience.

Le nom indiqué sur le tube doit correspondre exactement à ce qui a été soumis dans le formulaire de Soumission d'échantillons.

L'utilisation d'une imprimante pour étiquettes à microtubes, avec étiquettes résistantes à la congélation, est à privilégier à l'écriture manuelle.

Les étiquettes doivent être collées dans une orientation de haut en bas du tube et non pas autour, doivent ne pas contenir de plis ou être obstruées de manière à nuire à la lecture par scan. Le nom de l'échantillon peut être inscrit en lettres, en chiffres, en code 1D ou 2D. Voir la Figure 1 pour un exemple sur l'orientation de l'étiquette.

Figure 1 – Exemple d'étiquette d'identification pour un échantillon soumis au service d'extraction

Dans le cas où un accès à une imprimante n'est pas possible, utiliser un marqueur permanent foncé à pointe fine. Le nom doit être inscrit sur le bouchon et le côté du microtube.

Code-barres : pour un envoi de moins de 48 échantillons

Dans la Soumission d'échantillons de la Requête Nanuq, inscrire le nom d'échantillons dans la colonne « Nom de l'échantillon ». La colonne « code-barre » doit rester vide. Le code-barres sera apposé sur le tube de l'échantillon par un technicien de Génome Québec lors de la réception.

Code-barres : pour un envoi de plus de 48 échantillons

Les codes-barres sont fournis par Génome Québec. Il est requis de les apposer sur le tube avant l'envoi.

Contacter le Bureau de gestion des clients pour obtenir le nombre d'étiquettes nécessaires.

Le code-barres est un code 1D, scannable et lisible. Le nombre est incrémental.

Voici les recommandations à suivre pour coller les codes-barres sur les microtubes :

1. Placer les microtubes sur glace humide. Il est recommandé de travailler avec un petit nombre d'échantillon à la fois pour éviter de longue période de dégel.
2. Essuyer les tubes avec un linge sec, par exemple un Kimwipe, puis apposer l'étiquette tel que décrit plus haut.
3. S'assurer de la concordance entre le nom de l'échantillon et le code-barres. Si une erreur de concordance survenait lors de l'identification des tubes, l'identité de l'échantillon serait liée au code-barres apposé sur le tube.

Requête de service et soumission des échantillons

Toute requête de service et soumission d'échantillon doivent se faire via l'interface web Nanuq en utilisant un compte d'utilisateur. Pour obtenir un compte, contacter le Bureau de gestion des clients.

Le travail dans le laboratoire ne débutera qu'une fois toute la documentation soumise. Une documentation incomplète occasionnera des délais d'attente.

Requête de service

1. Ouvrir une session sur votre compte dans Nanuq.

2. Cliquer sur « Ajouter une nouvelle requête » dans la section « Requêtes » et suivre les instructions.

   L'option « nouvelle requête » ne doit pas être utilisée pour compléter une requête existante.

   Ne pas utiliser le bouton « Retour » du navigateur pour revenir en arrière. Utiliser les choix de pages du menu de gauche pour naviguer dans le formulaire.

   Cliquer sur « Suivant » pour passer à la page suivante de la requête.

   En tout temps, il est possible de sauvegarder les informations en cliquant sur « Sauvegarder et continuer plus tard ». Les brouillons sont accessibles via l'option « Ma liste de requêtes » dans la section « Requêtes ». La requête demeure en brouillon jusqu'à ce qu'elle soit soumise. Pour modifier une requête ayant le statut de brouillon, cliquer sur « Modifier » dans le menu de gauche.

   Pour demander le retour des échantillons à la fermeture du projet, l'indiquer sous l'onglet « Information sur les échantillons » et fournir les informations demandées.

3. Cliquer sur « Soumettre » pour que la requête soit approuvée par le Bureau de gestion des clients. Les requêtes non soumises ne seront pas traitées.

Soumission d'échantillons

Une fois la requête de service complète et soumise, soumettre les échantillons.

1. Ouvrir une session sur votre compte dans Nanuq.

2. Le cas échéant, retrouver la requête via l'option « Ma liste de requêtes » et l'ouvrir.

3. Cliquer sur l'onglet « Soumission d'échantillons » puis sur « Ajouter de nouveaux échantillons ».

4. Suivre les instructions à l'écran.

5. Vérifier que l'état de la soumission est à « Soumis » dans l'onglet « Soumission d'échantillons » dans la Requête de service.

Suivre les mêmes étapes pour ajouter de nouveaux échantillons à la requête ou pour envoyer des échantillons de remplacement.

Préparation des échantillons pour envoi

Bordereau d'expédition

À la suite de la soumission des échantillons, retourner dans l'onglet « Soumission d'échantillons », sélectionner la ou les soumission(s) d'échantillons reliée(s) à l'envoi à préparer, puis cliquer sur « Imprimer Bordereau ». Par défaut une seule copie est imprimée, cependant deux copies du bordereau d'expédition doivent être imprimées.

Préparation du colis

Ne pas envoyer de tubes « flottants » directement sur la glace sèche ou seulement dans un sac de plastique. Il pourrait y avoir un bris du tube, un décollement de l'étiquette ou une perte de tubes.

Envoyer les tubes contenant les échantillons dans des boites de carton ayant des diviseurs pour un format 9x9 ou 10x10, voir Figure 2.

Figure 2 – Exemple de boîte à utiliser pour l'envoi des microtubes

Identifier la boîte de carton comme suit : le nom du chercheur principal, la date de l'envoi et le nom du projet indiqué dans la Requête de service.

Placer les tubes dans un ordre de gauche à droite en suivant le même ordre que dans le formulaire Soumission d'échantillons.

La boîte doit être tenue fermée par un élastique ou du ruban de laboratoire.

Les boîtes d'échantillons doivent être envoyées sur glace sèche. Si l'envoi contient des objets lourds qui peuvent endommager le contenu pendant le transport (ex. : blocs de glace sèche), il est recommandé de le protéger contre les impacts.

Le colis doit contenir suffisamment de glace sèche pour que les échantillons demeurent congelés jusqu'à destination.

Une copie du bordereau doit accompagner les échantillons. S'assurer que la copie demeure au sec en la mettant dans un sac de plastique à fermeture à glissière (de type Ziploc).

Les échantillons devant traverser la frontière canadienne devraient être envoyés en début de semaine afin d'éviter tout risque que ceux-ci soient retardés et conservés à l'entrepôt du transporteur durant la fin de semaine. L'utilisation d'expressions claires telles que « échantillons biologiques non biohazards », « pour recherche seulement » et « aucune valeur commerciale » sur la facture commerciale nécessaire pour les transports internationaux aidera à accélérer le dédouanement.

Envoi des échantillons

L'adresse de livraison ainsi que des directives concernant l'acheminement des échantillons se trouvent sur le bordereau d'expédition.

Une copie du bordereau doit obligatoirement être en évidence à l'extérieur du colis. Elle peut être collée directement ou mise dans une enveloppe protectrice transparente.

Pour plus d'information

Bureau de gestion des clients

Téléphone : 514-398-7211
Courriel : infoservices@genomequebec.com

Historique des versions

Version	Sommaire des changements	Rédigé par	Date d'entrée en vigueur (aaaa-mm-jj)
01	Première version	V. Arsenault	2022-05-26

Informations additionnelles

Instructions pour la manipulation de l'ARN

L'ARN étant facilement dégradé, il est important de faire la manipulation en respectant les bonnes pratiques de laboratoire, incluant l'échantillonnage et l'entreposage.

Le technicien doit porter un sarreau propre (utilisé exclusivement pour les manipulations ARN et lavé fréquemment) et changer régulièrement de gants surtout lorsqu'il doit manipuler du matériel pouvant contenir des RNases.

Il est préférable de réserver une partie de la paillasse (*bench*) au travail avec l'ARN. Les surfaces de travail, les pipettes, les supports à tubes, etc. doivent être régulièrement lavés avec un produit de type TriGene ou RNaseZap™, sinon avec de l'éthanol 70%.

Tous les consommables et les réactifs (tubes de plastiques, embouts, eau, éthanol, etc.) doivent être certifiés « RNAse-free ». Les embouts doivent contenir un filtre. Lorsque la certification n'est pas possible (ex : gants), utilisez une boîte neuve, conservée dans un endroit prédéterminé, et identifiez pour l'utilisation exclusive au travail avec l'ARN.

Les facteurs précédant l'extraction de l'ARN et influençant le rendement (quantité et qualité) :

- Environnement RNase-free
- Type de matériel à extraire (ex : animal/végétal, pancréas/cœur)
- Suivi du protocole
- Qualité de l'échantillonnage et de l'entreposage
- Suivi des recommandations pour le format, volume et/ou quantité du matériel et l'envoi

Lors de l'extraction de l'ARN, il y aura de la variabilité et dans le cas d'échantillons de qualités compromises, il est possible que l'ARN récolté ne puisse être utilisé pour une utilisation subséquente.

Échantillonnage (*sampling*) et entreposage

Il est préférable de congeler la quantité exacte demandée dans le présent guide afin d'éviter un cycle de gel/dégel lors d'une pesée subséquente et/ou des frais supplémentaires si la pesée se fait par le service d'extraction.

Il est important que les tubes soient congelés en position debout (le capuchon vers le haut) afin que s'il y a du liquide (TRIzol), il ne congèle pas en poussant contre le capuchon et crée une ouverture.

Deux méthodes sont recommandées pour la préparation et la conservation des échantillons selon le type de matériel. Contacter le Bureau de gestion des clients pour connaître la méthode appropriée selon le type de matériel.

- Méthode *snap-freeze*
  Plonger les tubes avec le matériel dans l'azote liquide (position debout). Lorsque congelés, transférer à -80°C.

- Méthode TRIzol
  Suivre les recommandations du fournisseur, mais utiliser 900 µL au lieu de 1000 µL.
  https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15596026
  Au *stopping point*, mettre les échantillons (position debout) à -80°C.
  Le tissu doit être entièrement immergé dans le TRIzol.

Il n'est pas permis d'envoyer des échantillons dans de l'éthanol. Le service d'extraction n'offre pas le service de lavage et/ou d'évaporation de l'éthanol avant extraction. Ces étapes doivent être effectuées avant l'envoi du matériel. Toute trace d'éthanol affectera le rendement de l'extraction et aura des impacts sur les étapes subséquentes. Si un tel médium est utilisé pour la conservation, les résultats ne sont pas garantis.

Échantillons FFPE pour extraction ARN

La nature de l'échantillon FFPE pose des défis supplémentaires lors de l'extraction. Le taux de succès pour une extraction ADN est généralement élevé, tandis que pour une extraction ARN le taux de succès peut varier de 50-80%, dépendamment des critères établis pour les analyses en aval.

Par ailleurs, le taux de succès dépend des conditions et du temps de conservation du matériel de même que le suivi des recommandations pour le format du matériel à envoyer pour l'extraction.

Envoyer les échantillons FFPE à la température pièce (sans glace sèche ou autre).

Toutes les autres recommandations concernant l'identification des échantillons et l'envoi doivent être respectées.

Si le matériel est d'origine humaine, un témoin positif sera ajouté à chaque tranche de 23 échantillons pour un total de 24 extractions. Celui-ci sert à comparer la qualité de l'extraction vs la qualité des échantillons. L'extraction de ce témoin sera facturée.

Un minimum d'échantillons peut être requis (facturés).

Quantité[1] et température d'entreposage	**Format[2]**	**Commentaire**
Tranches d'une superficie de 150 mm^2, soit 2 sections de 20 um d'épaisseur ou 4 sections de 10 um d'épaisseur.	Tubes RB pour échantillons, 2 mL (Qiagen #990381)	Ne pas envoyer les tranches qui ont été en contact avec l'air.

[1] L'utilisation de plus ou moins de matériel de ce qui est recommandé (+/- 10%) affecte la qualité de l'extraction; les ratios matériel/chimie du kit et la capacité des filtres.
[2] Aucun autre format de microtube ne sera accepté puisque l'extraction débute directement dans ce tube et qu'aucun transfert ne sera effectué.