

Évaluation de la qualité de l'ADN

Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT			
Évaluation de la qualité de l'ADN			
Numéro de PNF:	05.004	Version:	f1.0
Remplace:		Catégorie:	Assurance qualité

Approuvée par:	Conseillers du RCBT	
	Par: Peter Watson et Anne-Marie Mes-Masson	

1.0 INTENTION

L'assurance qualité est essentielle au bon fonctionnement d'une biobanque offrant des échantillons de tissus et ses dérivés à des fins de recherche. Un niveau élevé d'intégrité moléculaire est essentiel afin d'éviter les incohérences et les variations dans les projets de recherche. La qualité des acides nucléiques est d'une importance cruciale pour de nombreuses techniques utilisées dans l'analyse génomique, pour l'interprétation pertinente des résultats ainsi que pour faciliter la comparaison des résultats entre laboratoires indépendants. Les biobanques inscrites au RCBT doivent être certaines de fournir des échantillons adéquats pour les objectifs recherche désignés. Idéalement, des procédures de contrôle devraient être mises en place afin de surveiller et d'évaluer la qualité des échantillons de la collection.

2.0 PORTÉE

Cette procédure normalisée de fonctionnement (PNF) décrit les évaluations minimales et les tests qui doivent être mis en place pour évaluer la qualité de l'acide désoxyribonucléique (ADN) extrait d'une biobanque afin de fournir aux chercheurs un produit qui conforme 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 : PNF 05.001 Évaluation de la qualité des spécimens tissulaires

Évaluation de la qualité de l'ADN

3.4 Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT : PNF 05.002 Évaluation de la qualité des acides nucléiques

3.5 Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT : PNF 08.02.004 Dérivés du sang : extraction d'ADN

3.6 Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: PNF 08.03.008 Dérivés des tissus – extraction d'ADN

3.7 Procédure normalisée de fonctionnement du RCBT: PNF 08.01.002 Gestion des déchets à biorisques

4.0 RÔLES AND RESPONSABILITÉS

Cette PNF s'applique à tout le personnel de la biobanque impliqué dans la rédaction, la révision, la révision, l'approbation et la mise à jour des PNFs.

Personnel de la banque de tumeurs	Responsabilité/rôle
Technicien de laboratoire	Effectuer des procédures d'assurance de la qualité et y contribuer. Enregistre et documente les résultats.

Évaluation de la qualité de l'ADN

5.0 ÉQUIPEMENT, MATÉRIEL DE RÉACTION ET FORMULAIRES

Le matériel, les équipements et les formulaires énumérés dans la liste suivante ne sont que des recommandations et peuvent être remplacés par des produits alternatifs/ équivalents qui seraient plus adaptés à la tâche ou à la procédure spécifique au site.

Matériel et équipement	Matériel et équipement (spécifiques au site)
Système Agilent TapeStation 4200 ou 4150	
Embout pointes de chargement (5067-5598, 1 paquet ou 5067-5599, 10 paquets)	
Barrettes de 8 tubes optiques (401428) et barrettes de 8 capuchons optiques (401425)	
Support pour barrettes de tubes	
Agitateur vortex IKA MS3 avec adaptateur de plaque d'échantillons à 96 puits	
Plaques d'échantillons à 96 puits (5042-8502) et pellicules scellantes pour plaques à 96 puits (5067-5154) (seulement pour le système TapeStation 4200)	
Micropipettes volumétriques pour la manipulation de volumes de 1 à 15 µL	
Centrifugeuses pour les barrettes de tubes et pour les plaques d'échantillons à 96 puits	
5067-5365 Test ScreenTape pour ADN génomique (incluant 7 dispositifs ScreenTape)	
5067-5366 réactifs pour ADN génomique (incluant l'échelle de poids moléculaire pour ADN génomique et le tampon d'échantillon pour ADN génomique)	
5067-5630 Test ScreenTape ADN libre circulant (incluant 7 dispositifs ScreenTape)	
5067-5631 réactifs ADN libre circulant (incluant l'échelle de poids moléculaire ADN libre circulant et le tampon d'échantillon ADN libre circulant)	

Évaluation de la qualité de l'ADN

6.0 DÉFINITIONS

Consultez le glossaire du programme du RCBT : <https://biobanking.org/webs/glossary>

7.0 PROCÉDURES

7.1 Évaluation de la qualité – ADN génomique à l'aide du système TapeStation Agilent 4200 ou 4150

La procédure suivante est basée sur l'utilisation des systèmes TapeStation Agilent 4150 (G2992AA) et 4200 (G2991AA) avec des tests ScreenTapes et des réactifs ADN génomique pour déterminer la concentration et l'intégrité des échantillons d'ADN génomique. Ce type de système fournit une lecture de la quantité ainsi que la qualité de l'échantillon en n'utilisant qu'une petite quantité d'ADN. Un ratio de qualité, le numéro d'intégrité ADN (DIN), est automatiquement calculé et peut être utilisé pour établir des seuils.

7.1.1 Préparer l'exécution

- Laisser les réactifs ADN génomique (5067-5366) s'équilibrer à température ambiante pendant 30 minutes.
- Lancer le logiciel de contrôle Agilent TapeStation.
- Taper légèrement sur le dispositif ScreenTape ADN génomique (5067-5365) et l'insérer dans le réceptacle ScreenTape de l'instrument TapeStation.
- Sélectionner les positions d'échantillons requises dans le logiciel de contrôle TapeStation.
- À titre informatif, les consommables et quantité de réactifs nécessaires (embouts, autres dispositifs ScreenTape) sont affichés dans le logiciel TapeStation. S'assurer que le matériel et les réactifs requis sont adéquats.
- Mélanger les réactifs et les échantillons à l'aide d'un vortex. Centrifuger brièvement avant utilisation.

7.1.2 Préparer l'échelle de poids moléculaire

- Pour 1 ou 2 dispositifs ScreenTape : pipeter 10 µL de tampon d'échantillon ADN génomique et 1 µL de l'échelle de poids moléculaire ADN génomique en position A1 dans une barrette de tubes reposant sur un support pour tubes de 100uL ou de la plaque 96 puits le cas échéant.
- Pour plus de 2 dispositifs ScreenTape : pipeter 20 µL de tampon d'échantillon ADN génomique et 2 µL d'échelle de poids moléculaire ADN génomique en position A1 dans une barrette de tubes reposant sur un support pour tubes de 100uL ou de la plaque 96 puits le cas échéant.

Évaluation de la qualité de l'ADN

7.1.3 Préparer les échantillons

- a. Pour chaque échantillon, pipeter 10 µL de tampon d'échantillon ADN génomique et 1 µL d'échantillon d'ADN dans une barrette de tubes ou une plaque d'échantillons à 96 puits.
- b. Appliquer des capuchons sur les barrettes de tubes et/ou des pellicules scellantes sur les plaques d'échantillons à 96 puits.
- c. Mélanger les liquides à 2 000 rpm pendant 1 minute avec l'agitateur vortex IKA MS3 muni de l'adaptateur de plaque à 96 puits.
- d. Centrifuger brièvement les échantillons et l'échelle de poids moléculaire pendant 1 minute.

7.4.4 Analyse des échantillons

- a. Charger les échantillons dans l'instrument TapeStation.
- b. Placer l'échelle de poids moléculaire en position A1 dans le support pour barrettes de tubes ou de la plaque à 96 puits.
- c. Retirer délicatement les capuchons des barrettes de tubes. Confirmer visuellement que le liquide est positionné au fond.
- d. Fermer le couvercle de l'appareil
- e. Cliquer sur Démarrer (Start) dans le logiciel et suivre les instructions apparaissant à l'écran.
- f. Le logiciel TapeStation Analysis s'ouvre automatiquement après l'analyse et affiche les résultats.

Pour plus d'informations sur l'utilisation des systèmes TapeStation 4200 et 4150 pour évaluer la qualité de l'ADN génomique, reportez-vous à la section 8.1.

Pour l'utilisation avec le système Agilent 2200 TapeStation, un guide de consultation rapide est disponible en ligne

7.2 Évaluation de la qualité – ADN libre circulant (ADNlc) à l'aide du système TapeStation Agilent 4200 ou 4150

La procédure suivante est utilisée par le centre de contrôle qualité du RCBT et est basée sur l'utilisation des systèmes TapeStation Agilent 4150 (G2992AA) et 4200 (G2991AA) avec des tests ScreenTapes et des réactifs ADN libre circulant pour déterminer la concentration et l'intégrité d'échantillons d'ADN libre circulant. Il fournit une lecture de la quantité et de la qualité de l'échantillon en n'utilisant qu'une petite quantité d'échantillon. Un score de qualité, le % d'ADNlc, est automatiquement calculé et peut être utilisé pour établir des seuils.

Évaluation de la qualité de l'ADN

7.1.1 Préparer l'exécution

- a. Laisser les réactifs ADN libre circulant s'équilibrer à température ambiante pendant 30 minutes.
- b. Lancer le logiciel de contrôle Agilent TapeStation.
- c. Taper légèrement sur le dispositif ScreenTape ADN libre circulant et l'insérer dans le réceptacle ScreenTape de l'instrument TapeStation.
- d. Sélectionner les positions d'échantillon requises dans le logiciel de contrôle TapeStation.
- e. À titre informatif, les consommables et quantité de réactifs nécessaires (embouts, autres dispositifs ScreenTape) sont affichés dans le logiciel TapeStation. S'assurer que le matériel et les réactifs requis sont adéquats.
- f. Mélanger les réactifs et les échantillons à l'aide d'un vortex. Centrifuger brièvement avant utilisation.

7.1.2 Préparer l'échelle de poids moléculaire

- a. Pour 1 dispositif ScreenTape : pipeter 2 μ L de tampon d'échantillons ADN libre circulant et 2 μ L d'échelle de poids moléculaire ADN libre circulant en position A1 dans une barrette de tubes ou de la plaque à 96 puits.
- b. Pour 2 dispositifs ScreenTape : pipeter 4 μ L de tampon d'échantillon ADN libre circulant et 4 μ L de l'échelle de poids moléculaire ADN libre circulant en position A1 dans une barrette de tubes ou de la plaque à 96 puits.
- c. Pour plus de 2 dispositifs ScreenTape : pipeter 15 μ L de tampon d'échantillon ADN libre circulant et 15 μ L d'échelle de poids moléculaire ADN libre circulant en position A1 dans une barrette de tubes ou de la plaque à 96 puits.

7.1.3 Préparer les échantillons

- a. Pour chaque échantillon, pipeter 2 μ L de tampon d'échantillon ADN libre circulant et 2 μ L d'échantillon d'ADN libre circulant dans une barrette de tubes ou de la plaque à 96 puits.
- b. Appliquer des capuchons sur les barrettes de tubes et/ou des pellicules scellantes sur des plaques d'échantillons à 96 puits.
- c. Mélanger les liquides à 2 000 rpm pendant 1 minute avec l'agitateur vortex IKA MS3 muni de l'adaptateur de plaque à 96 puits.
- d. Centrifuger brièvement les échantillons et l'échelle de poids moléculaire pendant 1 minute.

7.4.4 Analyse des échantillons

- a. Charger les échantillons dans l'instrument TapeStation.

Évaluation de la qualité de l'ADN

- b. Placer l'échelle de poids moléculaire en position A1 sur le support pour barrette de tubes.
- c. Retirer délicatement les capuchons des barrettes de tubes. Confirmer visuellement que le liquide est positionné au fond.
- d. Fermer le couvercle de l'appareil
- e. Cliquer sur Démarrer (Start) dans le logiciel et suivre les instructions apparaissant à l'écran.
- f. Le logiciel TapeStation Analysis s'ouvre automatiquement après l'analyse et affiche les résultats

Pour plus d'informations sur l'utilisation des systèmes TapeStation 4200 et 4150 pour évaluer la qualité de l'ADN libre circulant, reportez-vous à la section 8.2.

Le test Agilent ScreenTape ADN libre circulant est exclusivement disponible pour une utilisation avec les systèmes Agilent 4150 ou 4200 TapeStation et non pas avec le système 2200 TapeStation.

8.0 RÉFÉRENCES, RÈGLEMENTS ET LIGNES DIRECTRICES

8.1 Évaluation de la qualité – ADN génomique à l'aide du système TapeStation Agilent 4200 ou 4150

- Guide de consultation rapide Agilent ScreenTape ADN génomique pour les systèmes TapeStation:
https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/gDNA_QuickGuide.pdf
- Guide de consultation rapide Agilent ScreenTape ADN génomique (spécifique pour le système TapeStation 2200):
https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/ScreenTape_gDNA_OG.pdf
- Caractéristiques de performance du test ScreenTape ADN génomique pour le système TapeStation 4150 :
<https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/technicaloverview-gdna-4150-tapestation-5994-0497en-agilent.pdf>
- Évaluation de l'ADN génomique à rendement élevé par le système TapeStation Agilent 4200 :
<https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5991-6629EN.pdf>

Évaluation de la qualité de l'ADN

- Suivi de l'entreposage à long terme de l'ADN dans les biobanques de l'Institut Coriell :
<https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-coriell-biorepositories-din-tapestation-5994-1362en-agilent.pdf>
- Analyse rétrospective de la qualité des échantillons d'ADN de la CardioBiobank de Heidelberg :
<https://www.agilent.com/cs/library/applications/application-dna-quality-heidelberg-cardiobiobank-4150-tapestation-5994-0811en-agilent.pdf>
- Contrôle de qualité standardisé des échantillons d'ADN et d'ARN :
https://www.agilent.com/cs/library/posters/public/Copy%20of%20Standardized_DNA_RNA_sample_quality_control_PR7000-1612_poster_Agilent.pdf

8.2 Évaluation de la qualité – ADN libre circulant à l'aide du système TapeStation Agilent 4200 ou 4150

- Guide de consultation rapide Agilent ScreenTape ADN libre circulant pour les systèmes TapeStation :
https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/cfDNA_QuickGuide.pdf
- Caractéristiques de performance du test ScreenTape ADN libre circulant :
<https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/technicaloverview-cfdna-assay-tapestation-5994-1390EN-agilent.pdf>
- Évaluation de la qualité et de la quantité de l'ADN libre circulant – Une comparaison des méthodes :
https://www.preanalytix.com/storage/download/PAXgene_Blood_ccfDNA_Tube_RUO/Posters/PROM-15083-001_POS_PX_ccfDNA_RUO_QualQuantAssess_CNAPS_0919_ROW.pdf
- Contrôle-qualité des échantillons avec le test ScreenTape ADN libre circulant:
<https://www.agilent.com/cs/library/posters/public/poster-cfdna-assay-tapestation-5994-0337en-agilent.pdf>

Évaluation de la qualité de l'ADN

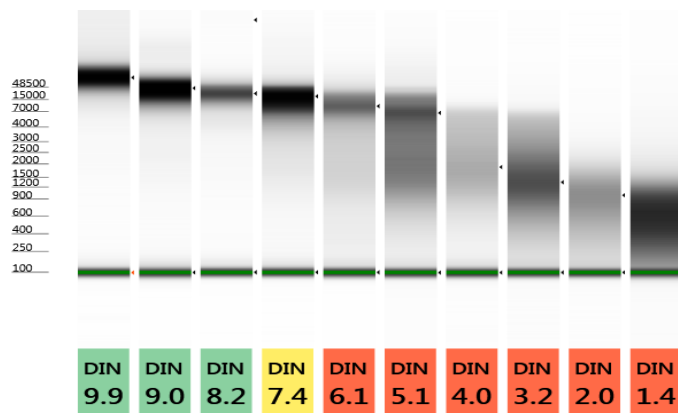
- Suivi de l'impact des paramètres pré-analytiques sur la qualité de l'ADN libre circulant :
<https://www.agilent.com/cs/library/posters/public/PR7000-7173%20cfDNA%20quality%20parameters.pdf>

Évaluation de la qualité de l'ADN

9.0 ANNEXES

9.1 Annexe A – Interprétation de résultats de qualité d'échantillons d'ADN génomique analysés sur un système TapeStation avec le DIN

Le score DIN d'intégrité de l'ADN va de 1 pour de l'ADN génomique dégradé à 10 pour de l'ADN génomique intact. Le DIN est automatiquement calculé et affiché sous l'image du gel. En fonction des seuils définis, un code couleur peut être appliqué.

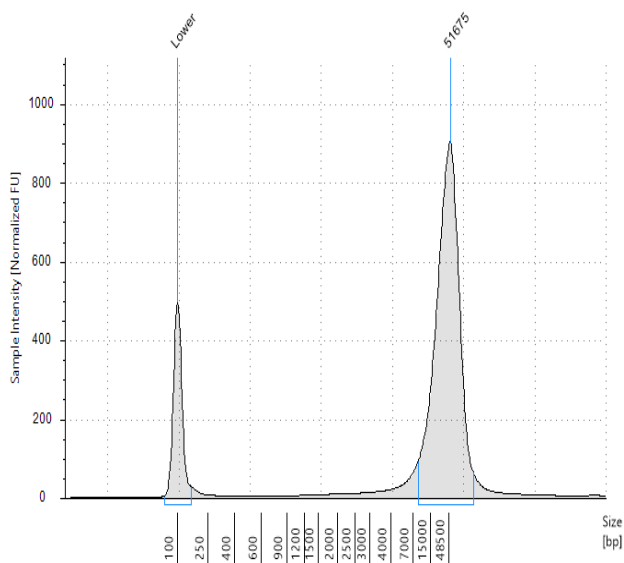


Vous trouverez ci-dessous des diagrammes affichant un ADN de haute qualité et un ADN hautement dégradé.

A. Électrophérogramme montrant un ADN intact avec un DIN de 9,1

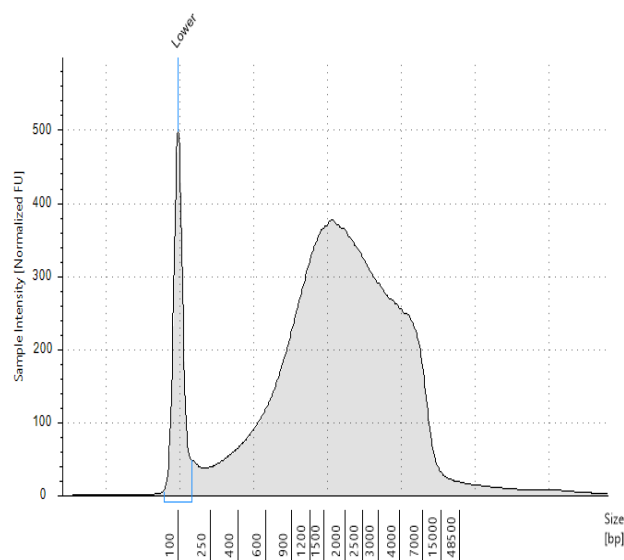
L'ADN intact se caractérise par un pic d'ADN de poids moléculaire élevé, supérieur à 60 000 pb et une faible quantité de fragments d'ADN plus petits.

Évaluation de la qualité de l'ADN



B. Électrophérogramme montrant un ADN dégradé avec un DIN de 3,9

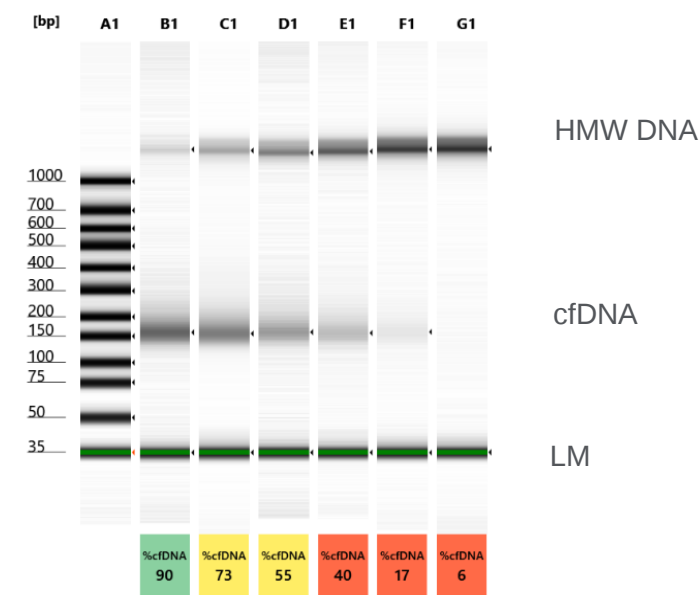
L'ADN de haut poids moléculaire supérieur à 60 000 pb est complètement dégradé en fragments d'ADN plus petits.



Évaluation de la qualité de l'ADN

9.2 Appendix B – Interprétation de résultats de qualité d'échantillons d'ADN libre circulant (ADNlc) analysés sur un système TapeStation avec le % d'ADNlc

Le % d'ADNlc varie entre 0 en absence d'ADN libre circulant et 100 % pour un ADN libre circulant pur, sans contamination par de l'ADN de haut poids moléculaire. Le % d'ADNlc est automatiquement calculé pour une quantité d'échantillon entre 50 et 700 pb et est affiché sous l'image du gel. En fonction des seuils définis, un code de couleur peut être appliqué.

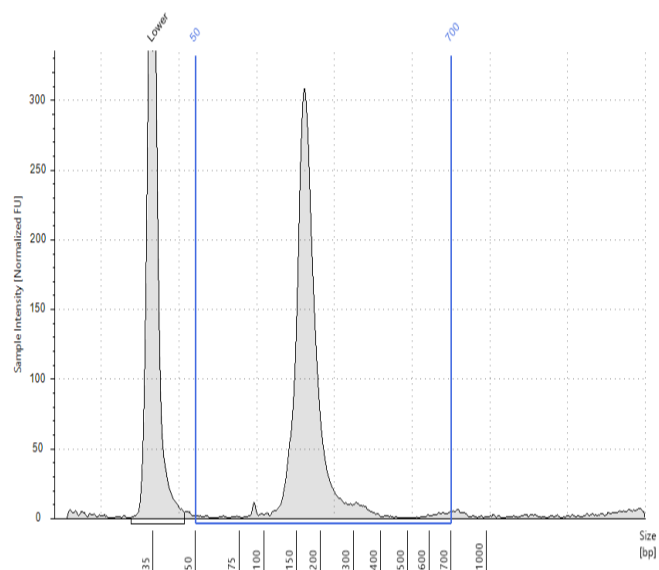


Vous trouverez ci-dessous des diagrammes illustrant l'ADN libre circulant pur et l'ADN libre circulant avec une quantité accrue d'ADN de poids moléculaire élevé.

- A. Électrophérogramme montrant un ADN libre circulant (ADNlc) pur avec un % d'ADNlc de 90.

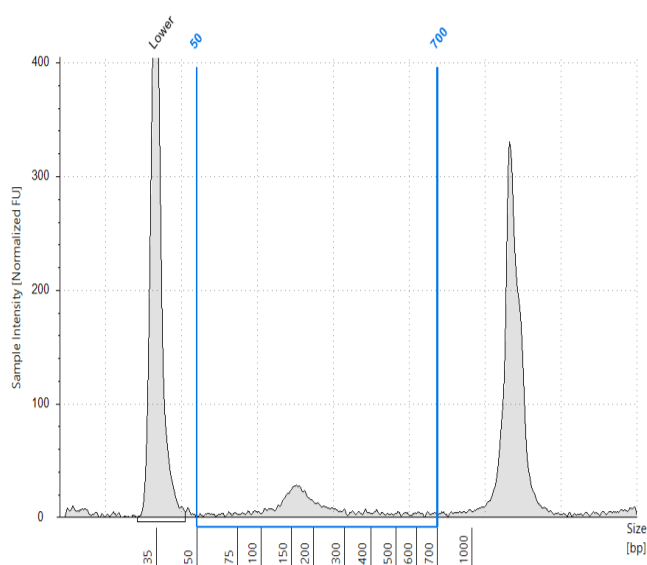
L'ADN libre circulant pur est caractérisé par un fragment d'environ 170 pb représentant l'ADN enroulé autour d'une histone (ADN mononucléosomal). Dans certains cas, des pics supplémentaires d'environ 370 et 510 pb peuvent être présents représentant l'ADN enroulé autour de 2 ou 3 histones (ADN multinucléosomal).

Évaluation de la qualité de l'ADN



B. Électrophérogramme montrant un ADN libre circulant avec une énorme quantité de contamination par de l'ADN de haut poids moléculaire et un % d'ADNlc de 17.

L'ADN de haut poids moléculaire provenant de cellules en apoptose peut contaminer des échantillons d'ADN libre circulant. L'ADN de haut poids moléculaire est supérieur à 800 pb.



Évaluation de la qualité de l'ADN

10.0 HISTORIQUE DES RÉVISIONS

PNF numéro	Date révisée	Auteur	Sommaire des révisions
15.004 f1.0	2024	KLD	Version initiale