


E-PREST-48	Fiche prestation	Date : 09/07/25 Version 8
	Construction de banque RNA-seq	Page 1/4

Le RNA-Seq permet de réaliser l'étude du transcriptome d'un échantillon. Cette technique peut être utilisée pour (entre autres) :

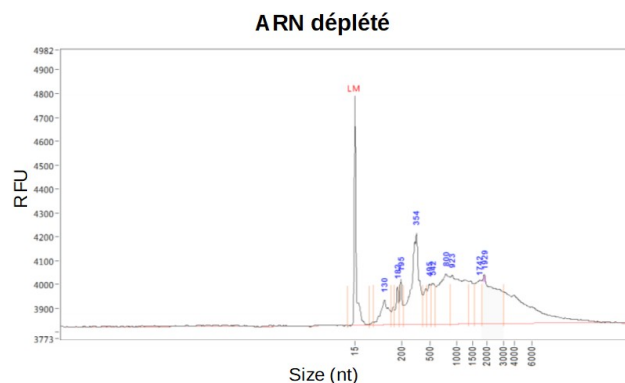
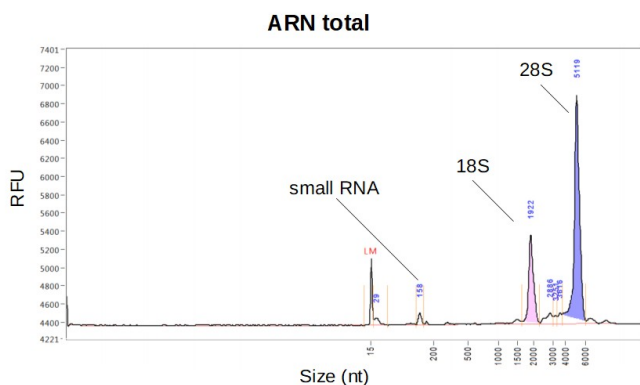
- mesurer les variations d'expression génique entre différents échantillons.
- construire un transcriptome de référence.
- caractériser des phénomènes d'épissage alternatif.
- découvrir et annoter de nouveaux transcrits.

La plateforme MGX propose une méthode de construction des librairies de manière automatisé et miniaturisé sur l'automate mosquito® HV (SPT labtech) à l'aide du kit NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep. Se basant sur la capture des ARN polyadénylés, la construction des librairies utilise le module NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation. Il est néanmoins également possible d'utiliser des ARNs déjà déplétés en ARN ribosomaux (par exemple quand l'étude porte sur un transcriptome bactérien). Les librairies produites sont dites directionnelles car elles conservent l'information du brin d'ADN à partir duquel le transcrit a été codé.

Prestation proposée

À partir des échantillons fournis par le client, le plateau technique réalise les étapes de :

1. Contrôle et validation de l'échantillon sur Fragment Analyzer (Agilent).

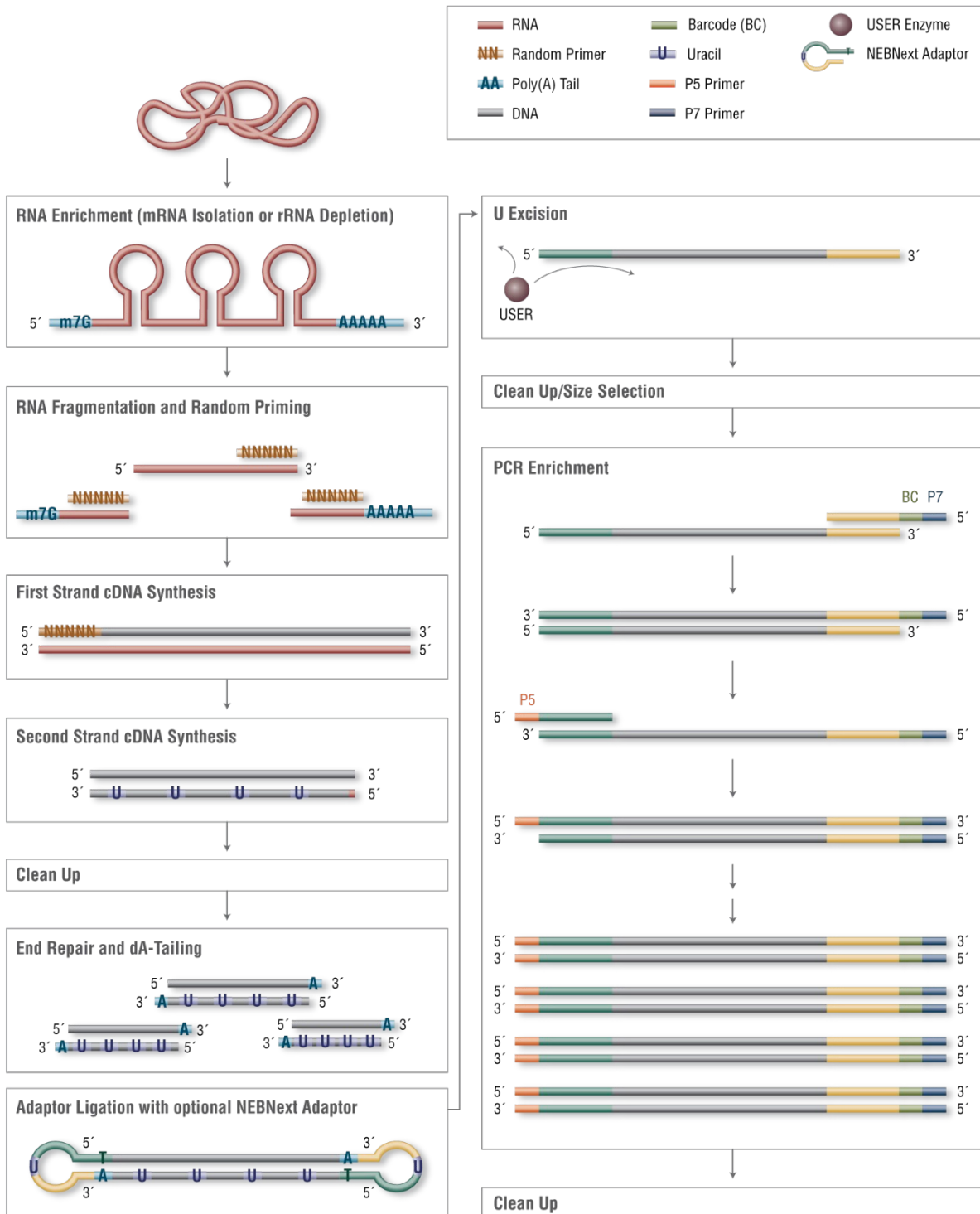



2. Construction des banques :

- Sélection des ARN polyadénylés sur billes magnétiques NEBNext oligo(dT) (sauf si ARN déjà déplété) et fragmentation chimique des ARN sélectionnés
- Synthèse du premier brin de cDNA (random primers +) en présence d'actinomycine D afin de bloquer la synthèse du second brin
- Synthèse du second brin de cDNA en remplaçant le dTTP par du dUTP afin de bloquer la synthèse du second brin lors de l'étape d'amplification par PCR
- Ajout d'une base A à ces extrémités
- Ligation d'adaptateurs à ces extrémités
- Une étape d'amplification par PCR. Cette étape permet aussi une sélection puisque seuls les fragments portant les deux types d'adaptateurs seront amplifiés

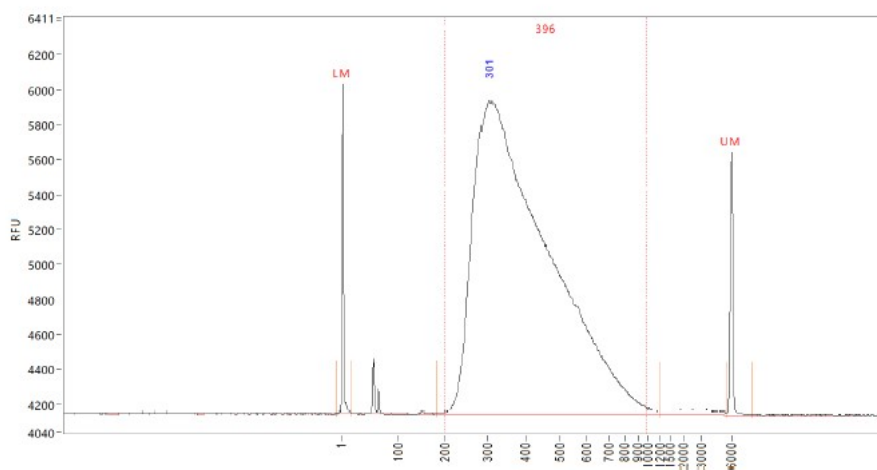


Construction de banque RNA-seq



E-PREST-48	Fiche prestation	Date : 09/07/25 Version 8
	Construction de banque RNA-seq	Page 3/4

3. Validation des banques par quantification (concentration et taille des fragments) de l'ADN sur Fragment Analyzer (Agilent) et par microfluorimétrie au DeNovix-11 FX (DeNovix).



Séquençage

Le séquençage est réalisé sur Novaseq (Illumina) ou Miseq (Illumina) par la méthode de Sequence By Synthesis (SBS).

Cf fiche E-PREST-31 Séquençage Illumina sur Novaseq.

E-PREST-30 Séquençage Illumina sur Miseq.


Matériel initial

La qualité du résultat final étant très fortement liée à la qualité des échantillons initiaux. Il est donc important d'éviter toute dégradation des ARN.

Type	ARN total	ARN déplété en ARNr
Quantité	2 µg	20 ng
Concentration	100 ng/µl dans 20µl*	2 ng/µl dans 10µl
Particularités	ARN traité à la DNase, ratio 28s/18s>1,6	Efficacité de la déplétion vérifiée sur Fragment Analyzer

* Dans le cas où l'extraction d'ARN ne permet pas d'obtenir de telles concentrations, il faut contacter la plateforme pour connaître les solutions techniques disponibles pour réaliser la construction des banques.

Les tubes doivent être bien identifiés et correspondre aux informations notées sur la fiche échantillon dont une version vierge sera envoyée par le plateau technique.

E-PREST-48	Fiche prestation	Date : 09/07/25 Version 8
	Construction de banque RNA-seq	Page 4/4

Contrôle qualité

Tout au long de l'expérimentation, des tests sont réalisés par le personnel habilité pour valider ou non les différentes étapes. Ces tests sont les suivants :

Quantité d'échantillons	
Dosage échantillon	2 µg (ARN total) ou 20 ng (ARN total déplétés)
Qualité des échantillons	
Qualité ARN	ARN total : RIN ≥ 8 et/ou ratio 28S/18S $\geq 1,6$ ARN déplétés : smear, pic majoritaire vers les petites tailles et absence/peu de pic des ARNr
Efficacité de la fabrication des banques	
Taille moyenne	400 pb
Concentration	3 nM

Dans la mesure où le plateau technique constate que l'un des contrôles qualité donnés ci-dessus n'est pas rempli, le client sera contacté le plus rapidement possible pour déterminer avec lui la meilleure solution à apporter au problème.

Gestion du projet

Tout au long de l'expérimentation, vous pourrez suivre l'avancement du traitement de vos échantillons sur notre gestionnaire de projet (connexion sécurisée avec login et mot de passe) : les différentes étapes du traitement seront validées par l'opérateur séquençage au fur et à mesure de l'avancement.

Conditions et durées de conservation des échantillons et des données

Les échantillons d'ARN sont conservés à -80°C dans nos congélateurs, avec un système de congélateur de secours en cas de problème.

Une fois l'analyse réalisée et les données transférées au client, les reliquats d'échantillon et les banques produites seront éliminés.