


E-EXP-13	Fiche prestation	Date : 11/03/2020
	<h2>Construction de banque gDNA-seq</h2>	Version 4
		Page 1/4

La technique d'analyse gDNA-seq est un processus de détermination de l'ordre précis des nucléotides dans une molécule d'ADN.

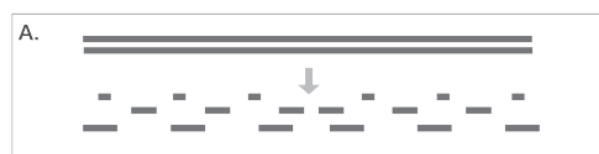
Prestation proposée

A partir des échantillons fournis par le client, le plateau technique réalise les étapes de contrôle et de validation de l'échantillon. Puis il se charge de la construction des bibliothèques. Le plateau technique propose 2 modes de construction :

1. Fragmentation mécanique (Kit illumina « TruSeq DNA Nano ») :

Ce mode de construction se compose des étapes suivantes :

- Sonication de l'ADN génomique sur Covaris (si non soniqué par le client)
- Construction des banques :



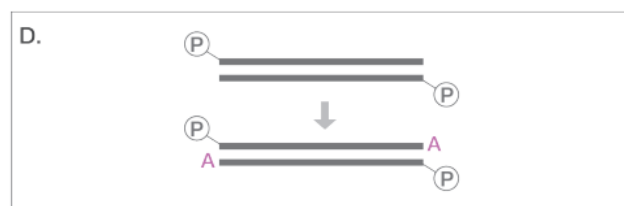
Library construction begins with genomic DNA that is subsequently fragmented.



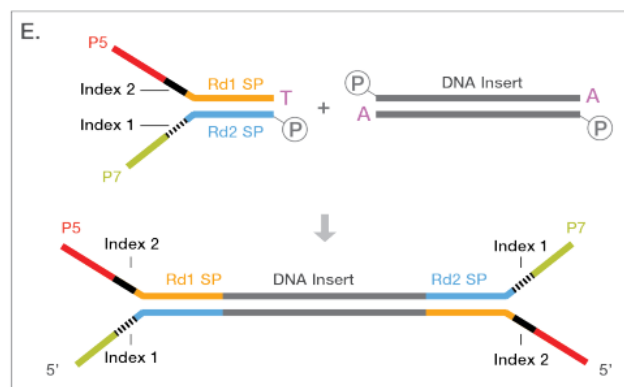
Blunt-end fragments are created.



Fragments are narrowly size selected with sample purification beads.




A-base is added.



Dual-index adapters are ligated to the fragments* and final product is ready for cluster generation.

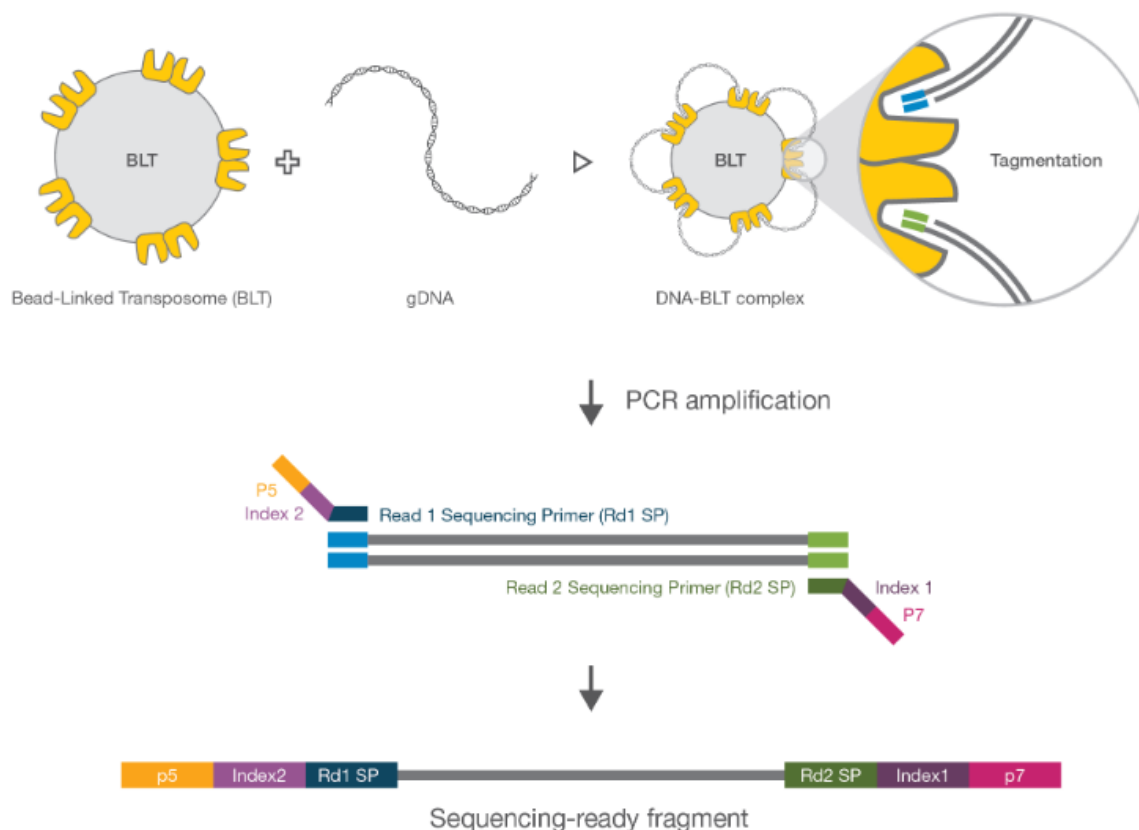


Ligated product is amplified and ready for cluster generation.

E-EXP-13	Fiche prestation	Date : 11/03/2020 Version 4
	Construction de banque gDNA-seq	Page 2/4

2. Fragmentation par transposase (Kit illumina « Nextera DNA Flex Library Prep Kit ») :

Dans ce mode de construction, la fragmentation de l'ADN et l'incorporation des adaptateurs se fait en une seule et même étape dite de « tagmentation » grâce à une transposase. Cette étape est suivie d'une amplification par PCR qui permet l'indexage de la librairie.



Quel que soit le mode de construction, les librairies sont vérifiées par électrophorèse et validées sur des critères de taille et de concentration.


Les librairies sont ensuite multiplexées si nécessaire.

Séquençage :

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

Cf fiche EXP-50 Séquençage Illumina sur Novaseq.

EXP-51 Séquençage Illumina sur Miniseq.

E-EXP-13	Fiche prestation	Date : 11/03/2020 Version 4
	Construction de banque gDNA-seq	Page 3/4

Matériel initial

ADN génomique				
	Fragmentation par sonication		Tagmentation	
	Quantité	Concentration	Quantité	Concentration
Dosage par microfluorimétrie	2 µg	200 ng/µl	500 ng	25 ng/µl
Dosage par spectrophotométrie	5 µg	400 ng/µl	1 µg	100 ng/µl

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.

Le plateau technique propose des analyses à partir d'un échantillon.

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	500ng à 2µg
Efficacité de la fabrication des banques	
Taille moyenne Concentration	≥ 350 pb ou ≥ 550 pb ≥ 2ng/µl

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.

Dans la mesure où le plateau technique constaterait 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.

E-EXP-13	Fiche prestation	Date : 11/03/2020 Version 4
	Construction de banque gDNA-seq	Page 4/4

Restitution des résultats

Une fois l'expérimentation terminée et les différentes étapes de contrôle validées, les séquences brutes de vos échantillons sont disponibles sous forme de fichiers texte au format fastq.

Un rapport de contrôle qualité du séquençage est également remis au moment de la livraison des séquences.

Ces données sont récupérables sur un serveur ftp dont le nom et les modalités d'accès vous seront communiquées par mail une fois vos résultats disponibles.

Conditions et durées de conservation des échantillons et des données

Les échantillons d'ADN sont conservés à 20°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.

Analyses complémentaires disponibles

Suite au séquençage, le plateau technique peut vous proposer des prestations d'analyse bio-informatique.

Pour en savoir plus, vous pouvez consulter la fiche prestation en bio-informatique correspondant à votre application ou contacter le plateau technique.