


E-EXP-06	Fiche prestation	Date : 20/03/20 Version 6
	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 autre) :

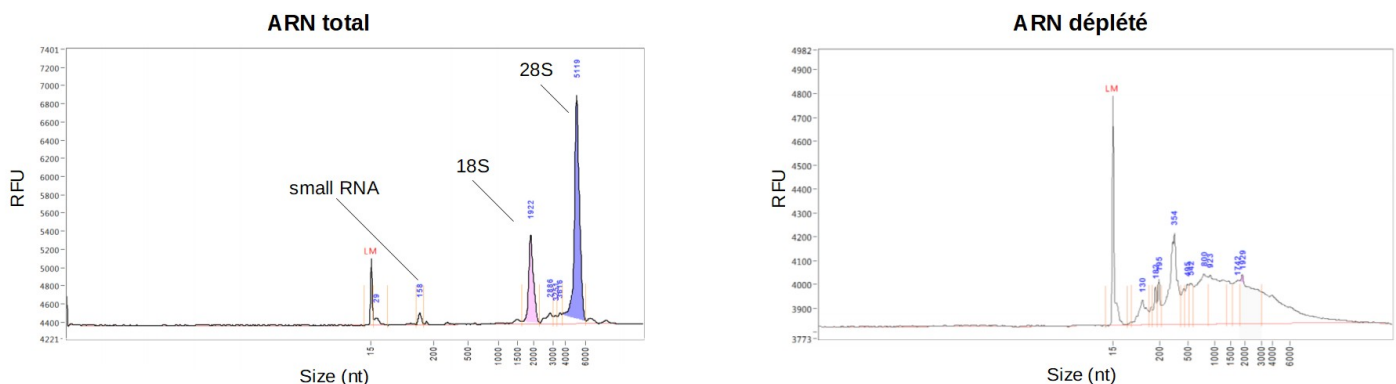
- mesurer les variations d'expression génique entre différents échantillons.
- construire un transcriptome de référence.
- caractériser des phénomènes d'épissage alternatif.
- découvrir et annoter de nouveaux transcrits.

La plateforme MGX propose une méthode de construction des bibliothèques basée sur la capture des ARN polyadénylés à l'aide du kit Truseq stranded mRNA d'Illumina. 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 bibliothèques 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 :

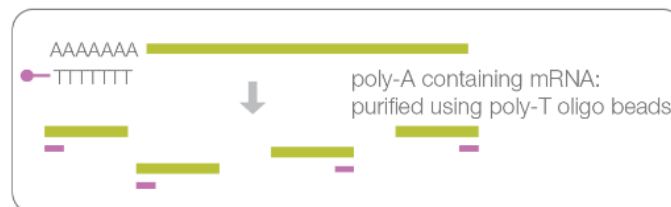
1. Contrôle et validation de l'échantillon sur Fragment Analyzer (Agilent).



2. Construction des banques :

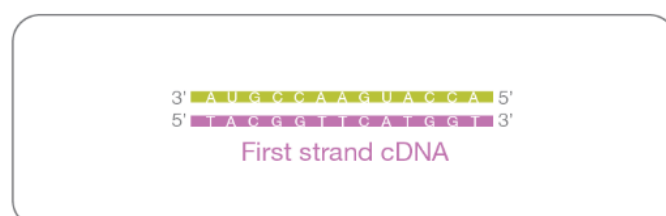
- Sélection des ARN polyadénylés sur billes magnétiques oligo(dT) (sauf si ARN déjà déplété) et fragmentation chimique des ARN sélectionnés


Figure 1 Purifying and Fragmenting mRNA



- Synthèse du premier brin de cDNA (random primers + SuperScript II) en présence d'actinomycine D afin de bloquer la synthèse du second brin

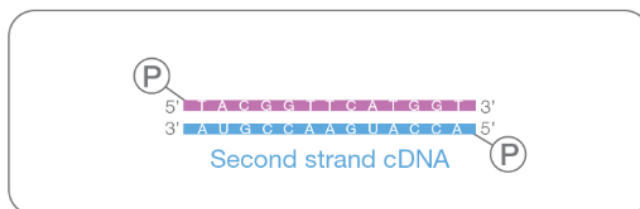
Figure 2 Synthesizing First Strand cDNA



E-EXP-06	Fiche prestation	Date : 20/03/20 Version 6
	<h2>Construction de banque RNA-seq</h2>	Page 2/4

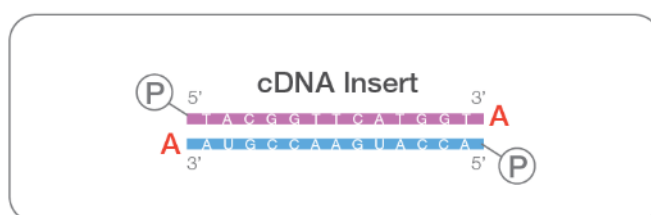
- Synthèse du second brin de cDNA en remplaçant le dTTP par du dUTP afin de bloquer la synthèse du second brin lors de l'étape d'amplification par PCR

Figure 3 Synthesizing Second Strand cDNA



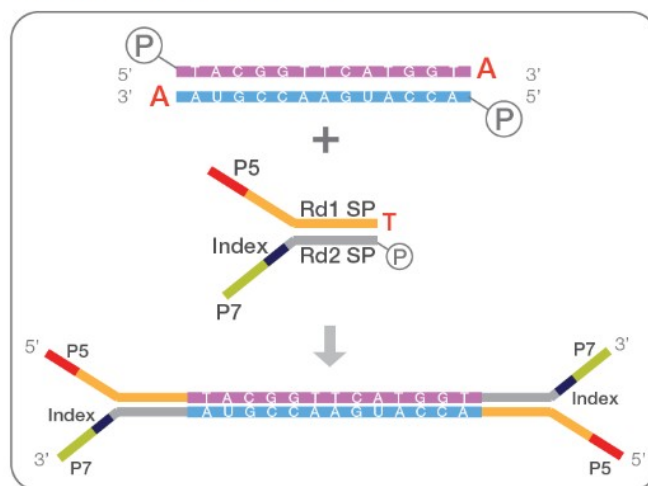
- Ajout d'une base A à ces extrémités

Figure 4 Adenylyating 3' Ends



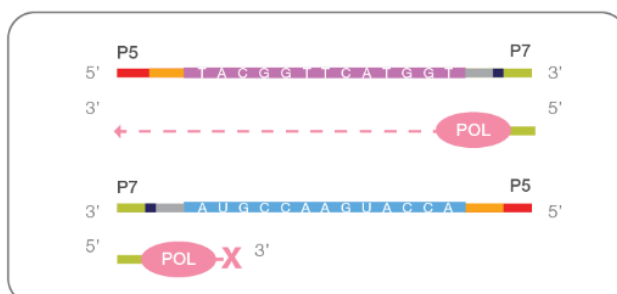
- Ligation d'adapateurs à ces extrémités


Figure 5 Ligating Adapters



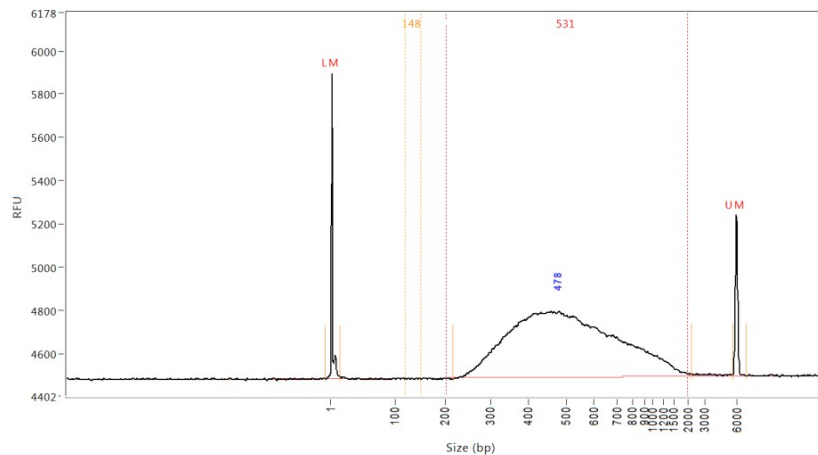
- Une étape d'amplification par PCR. Cette étape permet aussi un aussi une sélection puisque seuls les fragments portant les deux types d'adapateurs seront amplifiés

Figure 6 Enriching DNA Fragments



E-EXP-06	Fiche prestation	Date : 20/03/20 Version 6
	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 qPCR (Roche)



Séquençage

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

Cf fiche EXP-50 Séquençage Illumina sur Novaseq.

EXP-51 Séquençage Illumina sur Miniseq.

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*	200 ng
Concentration	200 ng/µl dans 10µl*	20 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.

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 200 ng (ARN total déplétés)

E-EXP-06	Fiche prestation	Date : 20/03/20 Version 6
	Construction de banque RNA-seq	Page 4/4

Qualité des échantillons	
Qualité ARN	ARN total : RIN \geq 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	500 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.