


E-EXP-18	Fiche prestation	Date : 24/03/20 Version 3
	Construction de banque Targeted-seq	Page 1/3

Contrairement au séquençage de génome complet, cette technique permet de choisir les régions du génome que l'on désire séquencer et donc de minimiser les coûts.

La capture des régions d'intérêts est réalisée en hybridant la librairie avec une collection de sondes d'ARN fixées sur billes magnétiques. Ces sondes d'ARN sont complémentaires des régions d'intérêts. De nombreux fournisseurs proposent de synthétiser les sondes « à façon » et donc d'adapter le protocole à la région d'intérêt du laboratoire.

Cette technique est notamment utilisées pour isoler et séquencer l'exome complet d'un organisme (WES : Whole Exome Sequencing).

Prestation proposée

Il existe de nombreux fournisseurs de kit de capture. La prestation décrite ci-dessous est basée sur le kit SureSelect XT d'Agilent. Il est cependant possible d'utiliser un kit différent en fonction des besoins du laboratoire.

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


1. Contrôle et validation des échantillons

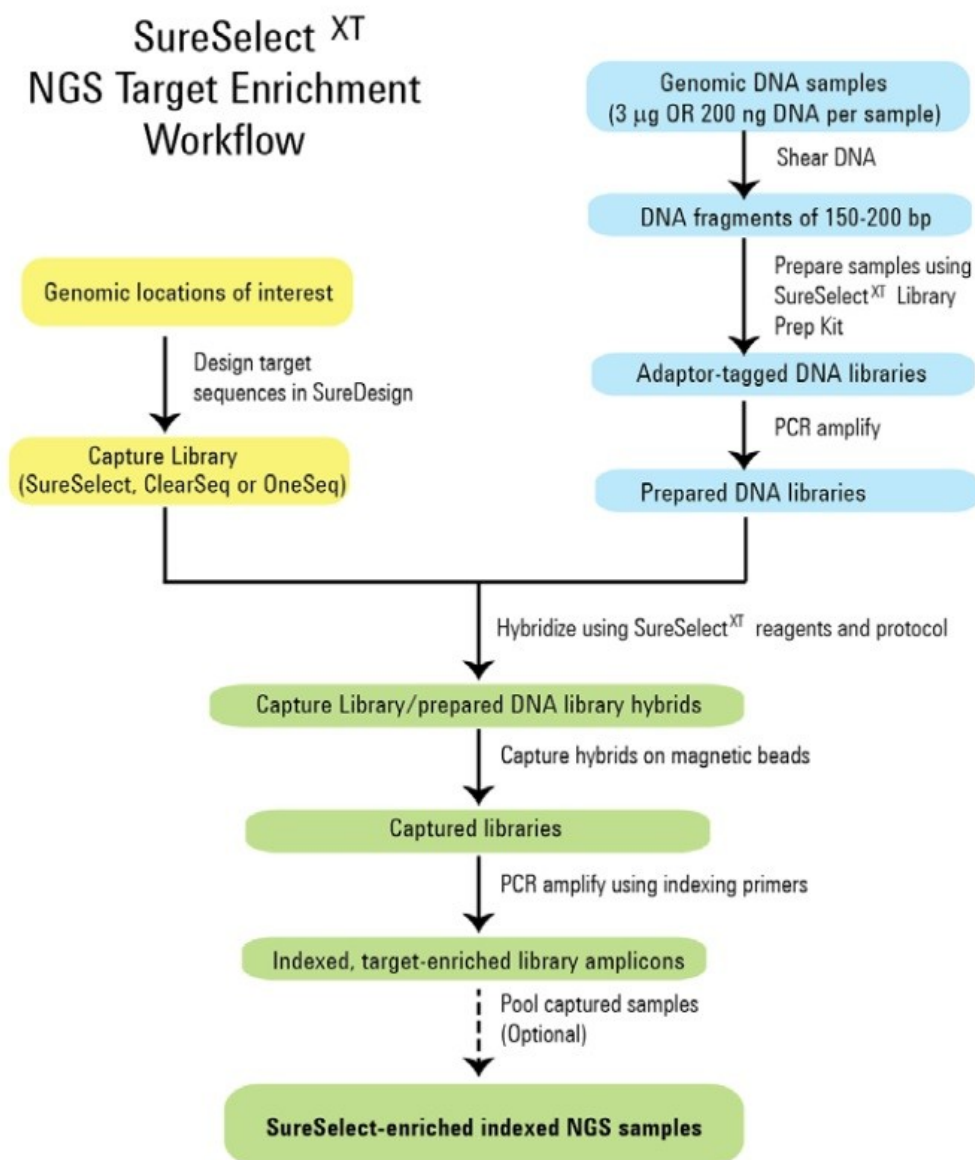
Cette validation est réalisée par microfluorimétrie et se base sur des critères quantitatif (6 µg d'ADN par échantillon à une concentration minimale de 50 ng/µl ou 400 ng d'ADN à une concentration de 8 ng/µl). La quantité de matériel initial influe directement sur le nombre de cycles de PCR que subira l'échantillon lors de la construction de la librairie.

Rq : L'intégrité du matériel de départ est également importante. Il revient cependant au laboratoire demandeur de la vérifier. Cette vérification de l'intégrité peut être réalisée en faisant migrer une fraction de l'échantillon sur gel d'agarose 0,8 % et en mesurant les ratios A260/A280 et A260/A230 par spectrophotométrie.

2. Construction des banques

- Fragmentation de l'ADN, en général par sonication pour obtenir des fragments d'une taille moyenne de 180pb
- Réparation de l'ADN fragmenté
- Adénylation en 3' de l'ADN réparé
- Ligation d'un adaptateur sur l'ADN adénylé
- Amplification par PCR
- Vérification sur Fragment Analyzer
- Capture de la région d'intérêt grâce à des sondes ARNs portées par des billes magnétiques
- Indexation des librairies capturées par PCR

E-EXP-18	Fiche prestation	Date : 24/03/20 Version 3
	Construction de banque Targeted-seq	Page 2/3



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)/Miniseq (Illumina) par la méthode de Sequence By Synthesis (SBS) ou Minion (Oxford Nanopore)

Cf fiche EXP-50 Séquençage Illumina sur Novaseq.
EXP-51 Séquençage Illumina sur Miniseq.
EXP-52 Séquençage sur MinION.

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 excessive de l'ADN.

E-EXP-18	Fiche prestation	Date : 24/03/20 Version 3
	Construction de banque Targeted-seq	Page 3/3

Type	ADN
Quantité	400 ng ou 6 µg par échantillon
Concentration	8 ng/µl ou 120 ng/µl dans 50 µl
Particularités	DNA traité à la RNase

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	400 ng à 8 ng/µl ou 6 µg à 50 ng/µl minimum
Efficacité de la fabrication des banques	
Taille moyenne (adaptateurs inclus)	~ 250 -350 pb
Concentration	30 nM*

* Concentration pour la librairie d'un exome complet humain.

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'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.