

E-EXP-14	Fiche prestation	Date : 17/1/20 Version 4
	Construction d'une banque de RAD-tag	Page 1/3

La technique de "Restriction site Associated DNA (RAD) tag sequencing" est une technique qui permet d'identifier et de génotyper des polymorphismes de séquence d'ADN dans de nombreux échantillons pour un coût moins élevé que le séquençage de génome total et ce, sans avoir besoin d'un génome de référence.

Cette technique se base sur le séquençage des zones flanquantes des sites de restriction d'une enzyme dans un génome d'intérêt.

Prestation proposée

Vérification des échantillons :

Chaque échantillon est dosé par microfluorimétrie et, si cela n'a pas été fait par le laboratoire demandeur, sa pureté est vérifiée par spectrophotométrie.

Construction de la banque :

Le protocole utilisé par la plateforme est issu de l'article "Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers" de Baird et al. publié dans la revue PLoS One en octobre 2008.

Pour générer les banques de RADtag, nous utilisons l'enzyme Sbf1 ou un isoschizomère (ex : PstI) et nous disposons d'une collection d'adaptateurs P1 portant 96 tags différents.

La construction de la banque se décompose comme suit :

- Digestion de 500 ng à 1 µg d'ADN par échantillon à l'aide de l'enzyme Sbf1.
- Ligation d'un adaptateur indexé complémentaire du site de coupure de l'enzyme sur chaque échantillon (adaptateur P1).
- Dosage individuel des échantillons par microfluorimétrie puis pooling en proportions égales.
- Sonication.
- Sélection de taille sur Pippin HT ou sur gel d'agarose (entre 300 et 500pb).
- Réparation des extrémités et ajout d'un A en 3'
- Ligation de l'adaptateur P2.
- Amplification PCR (12 cycles) avec une amorce complémentaire de l'adaptateur P1 et une amorce complémentaire de l'adaptateur P2.
- Validation de la librairie par électrophorèse capillaire (Fragment Analyzer, Agilent).

Séquençage :

Le séquençage est réalisé sur Novaseq (Illumina).
Cf fiche EXP-50 Séquençage Illumina sur Novaseq.

Matériel initial

La pureté des ADNs est prépondérante pour la bonne marche de l'expérience, notamment lors de la digestion enzymatique. Les ADNs doivent également être traités à la RNase et celle-ci doit être correctement inactivée.

E-EXP-14	Fiche prestation	Date : 17/1/20 Version 4
	Construction d'une banque de RAD-tag	Page 2/3

Type	ADN
Quantité	<ul style="list-style-type: none"> • 5 à 10 µg par échantillon (dosage par spectrophotométrie) • 2 µg par échantillon (dosage par microfluorimétrie)
Concentration	<ul style="list-style-type: none"> • 200 ng/µl (dosage par spectrophotométrie) • 25 ng/µl (dosage par microfluorimétrie)
Particularités	<ul style="list-style-type: none"> • Ratio 260/230 > 2 et ratio 260/280 > 1,8. • Traitement RNase. • Intégrité vérifiée sur gel

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 par microfluorimétrie	≥ 2 µg
Qualité des échantillons	
Qualité ADN	ADN non dégradé (vérification sur gel par le client)
Efficacité de la fabrication des banques	
Taille	Entre 300 et 500pb (en fonction de la taille de découpe)
Concentration	≥ 3 ng/µl

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

E-EXP-14	Fiche prestation	Date : 17/1/20 Version 4
	Construction d'une banque de RAD-tag	Page 3/3

passee) : 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.