

E-EXP-16	Fiche prestation	Date : 07/02/2020 Version 3
	Construction de banque de Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS)	Page 1/3

La méthylation de l'ADN est une modification chimique des cytosines qui a un rôle essentiel dans la régulation de l'expression génique, la spécification des cellules et le développement du cancer.

La technique de RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) combine :

- une digestion enzymatique par MspI qui reconnaît et clive la séquence CCGG, que la cytosine du CG central soit méthylée ou pas
- un traitement bisulfite qui convertit les cytosines non méthylées des CpG en thymidine et laisse intactes les cytosines méthylées
- le séquençage des banques ainsi construites.

L'utilisation de MspI permet de cibler les régions riches en CpG et le traitement au bisulfite de déterminer les cytosines qui étaient méthylées (ou non) dans l'échantillon initial.

Prestation proposée

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

1. Contrôle et validation des échantillons :

Cette validation est réalisée par microfluorimétrie pour les critères quantitatifs (200 ng par échantillon à une concentration minimale de 4ng/μl) et par spectrophotométrie pour les critères qualitatifs (ratio 260/230>2 et 260/280>1,8).

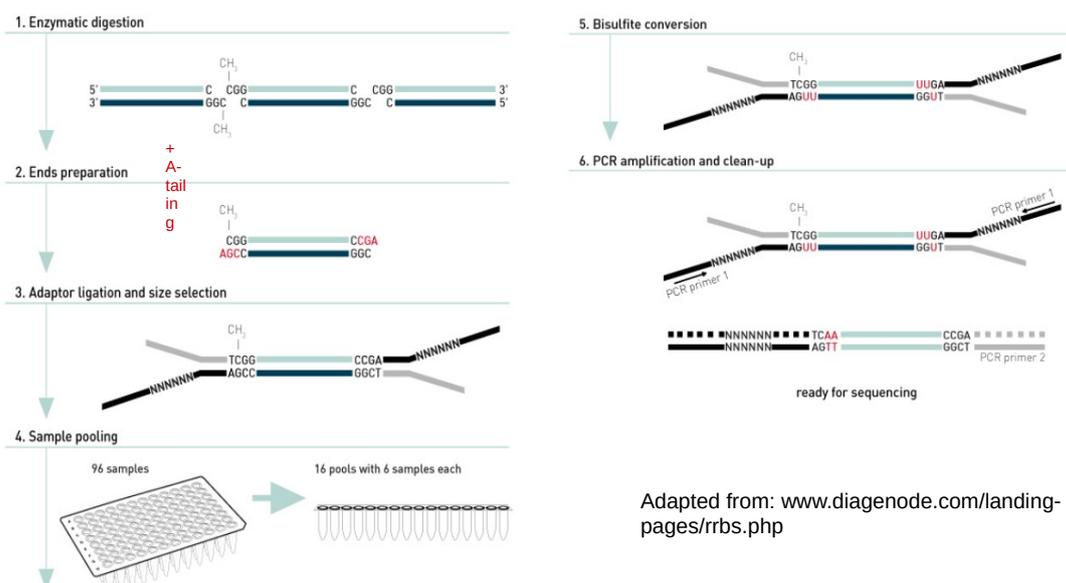
Rq : L'intégrité du matériel de départ est également importante. Il revient cependant au laboratoire demandeur de la vérifier. Cette vérification de l'intégrité peut être réalisée en faisant migrer une fraction de l'échantillon sur gel d'agarose 0,8 %.

2. Construction des banques :

Elle se déroule en 7 à 8 étapes :

- Digestion enzymatique de l'ADN par l'enzyme MspI
- Réparation des extrémités de l'ADN digéré et adénylation en 3'.
- Ligation d'adaptateurs indexés et méthylés.
- Une quantification par qPCR suivi d'un pooling équimolaire des librairies.
- Traitement bisulfite.
- Amplification par PCR.
- Vérification sur Fragment Analyzer et quantification par qPCR.

(*) Optionnel.



Adapted from: www.diagenode.com/landing-pages/rrbs.php

E-EXP-16	Fiche prestation	Date : 07/02/2020 Version 3
	Construction de banque de Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS)	Page 2/3

Séquençage

Le séquençage est réalisé sur Novaseq (Illumina) ou sur 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 excessive de l'ADN.

Quantités minimale	200 ng par échantillon
Concentration	4 ng/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	200 ng à 4ng/μl minimum
Efficacité de la fabrication des banques	
Taille moyenne (adaptateurs inclus)	300 pb env.
Concentration	3 nM

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 identifiant 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 la plateforme 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-16	Fiche prestation	Date : 07/02/2020 Version 3
	Construction de banque de Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS)	Page 3/3

Conditions et durée 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.