

E-EXP-05	Fiche prestation	Date : 08/04/20 Version 5
	Construction de banques de Small RNA	Page 1/4

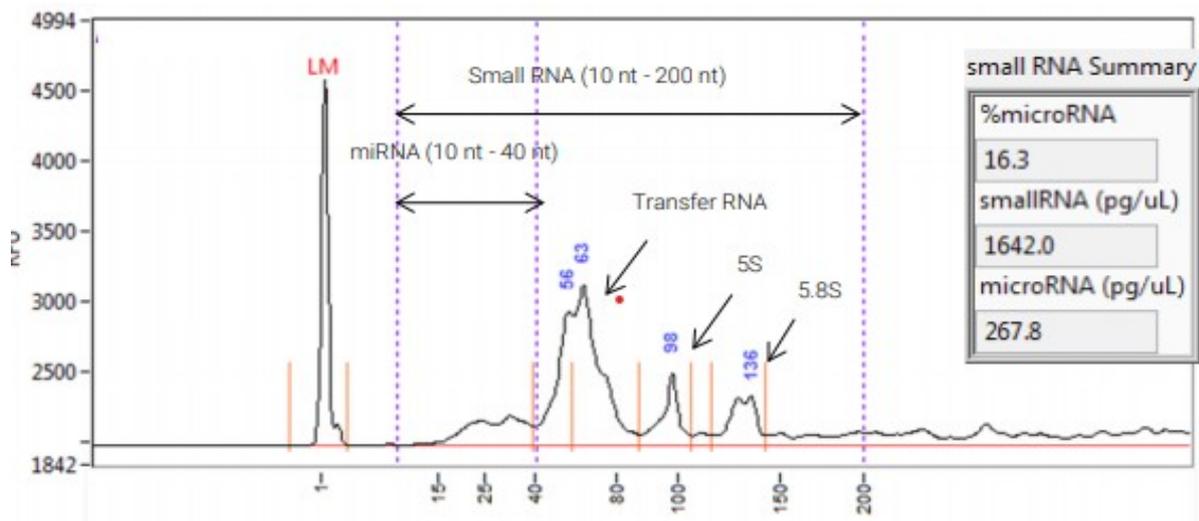
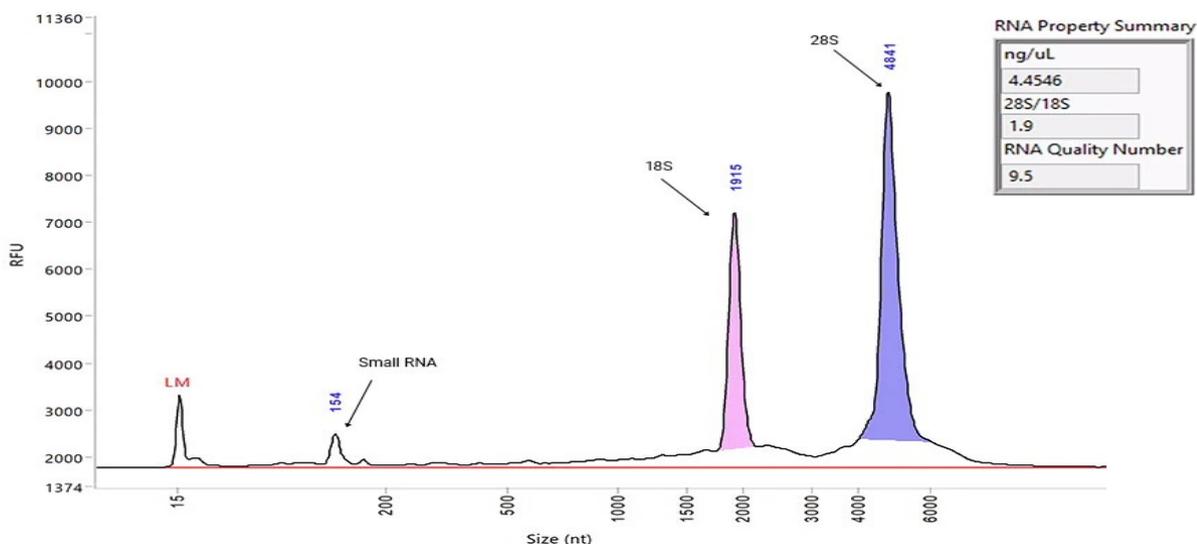
Cette technique permet une analyse quantitative et qualitative des small RNA contenus dans un échantillon.

Prestation proposée

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

1. Contrôle et validation des échantillons :

Cette étape est réalisée par électrophorèse capillaire (e.g Fragment Analyzer) grâce au kit total RNA afin de voir la qualité et la quantité des ARN totaux ainsi que le kit small RNA afin de voir la quantité des petit fragment d'ARN.



E-EXP-05	Fiche prestation	Date : 08/04/20 Version 5
	Construction de banques de Small RNA	Page 2/4

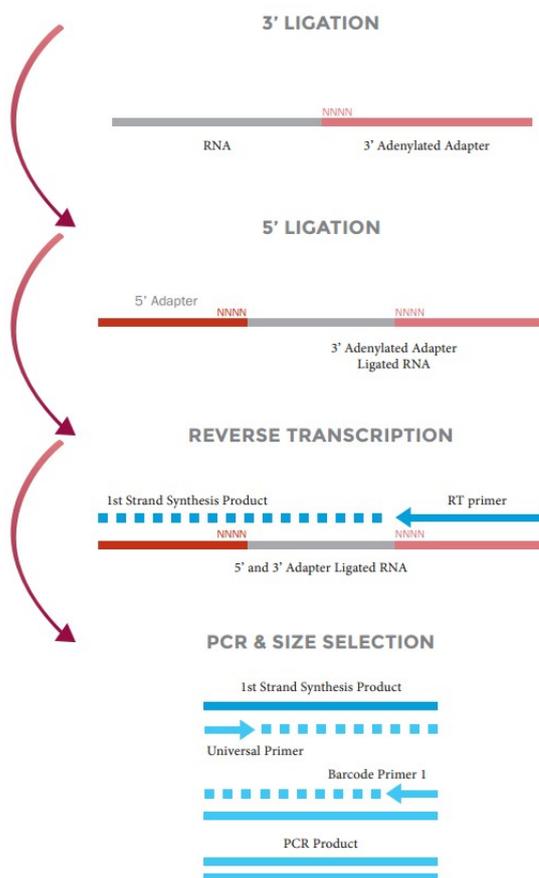
2. Construction des banques :

La préparation des banques se fait à l'aide d'un kit NEXTflex™ Small RNA-Seq Kit v3 de Bioo Scientific.

Elle comprend 8 étapes :

1. Ligation d'un adaptateur à l'extrémité 3' de l'ARN
2. Suppression de l'excès d'adaptateur 3', suivi d'une déplétion de l'excès d'adaptateur,
3. Inactivation de l'excès d'adaptateur restant,
4. Ligation de l'adaptateur à l'extrémité 5' de l'ARN,
5. Transcription inverse,
6. Purification sur billes,
7. Amplification par PCR,
8. Sélection de taille entre 137 pb et 183 pb sur le PippinHT à l'aide d'une cassette à 3 %,

Figure 1: Sample flow chart.



rq :

Les adaptateurs utilisés possèdent 4 bases dégénérées qui vont permettre de minimiser les biais lors des ligation.

E-EXP-05	Fiche prestation	Date : 08/04/20 Version 5
	Construction de banques de Small RNA	Page 3/4

3. Séquençage :

Le séquençage est réalisé sur un Novaseq 6000 (Illumina) par la méthode de Sequencing By Synthesis (SBS) en Paire End 50nt ou en single read 100nt.
Cf fiche EXP-50 Séquençage Illumina sur Novaseq.

Matériel initial

La qualité du résultat final étant très fortement liée à la qualité des échantillons initiaux, il est très important d'éviter toutes possibilité de dégradation des ARN.

Type	ARN totaux
Quantité	2 ng à 4 µg
Volume	max. 21µl
Concentration	Max 200ng/µl
Particularités	RIN (Bioanalyzer Agilent) ≥ 8

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.

Il est également possible d'utiliser des petits ARN déjà purifiés pour construire les librairies. Dans ce cas, le plateau technique aura besoin de 2 à 50 ng de petits ARNs repris dans de l'eau ultrapure ou du Tris-Hcl 10mM PH 8,5.

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

E-EXP-05	Fiche prestation	Date : 08/04/20 Version 5
	Construction de banques de Small RNA	Page 4/4

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 (ARN totaux)	≥ 2 ng
Qualité des échantillons	
Qualité ARN totaux	RQN ≥ 8 et/ou ratio 28S/18S ≥ 1,6
Efficacité de la fabrication des banques	
Taille Concentration	Env. 170 pb (variable suivant l'organisme étudié) 1 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 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

Nous conservons les ARN à -80°C, avec un dispositif d'alarme sur nos congélateurs et de gardiennage, pour garantir la sécurité de vos échantillons dans nos locaux.