


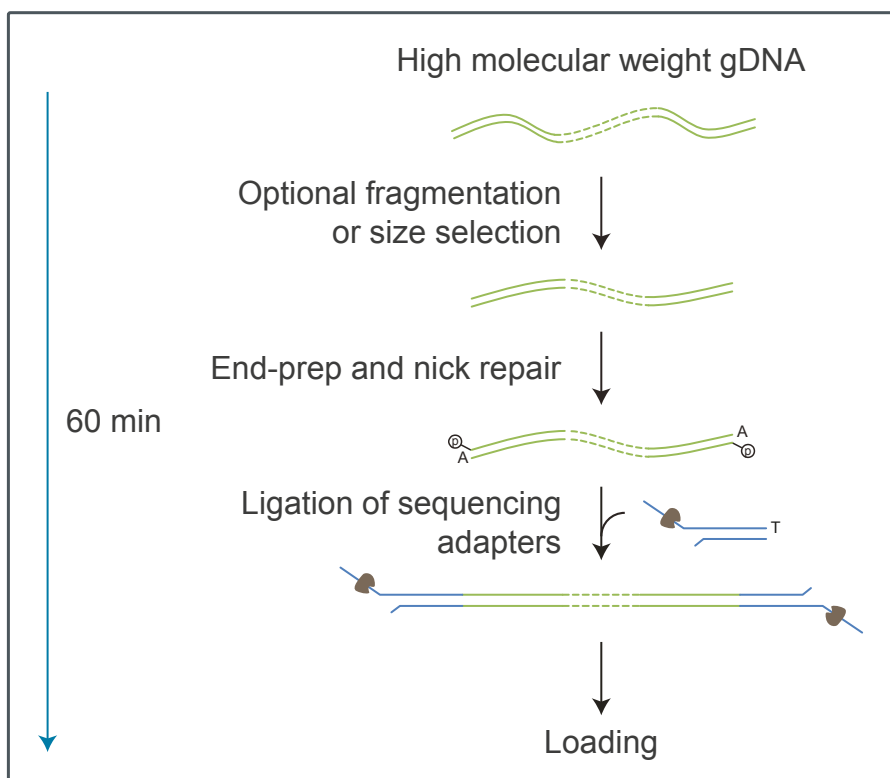
E-EXP-10	Fiche prestation	Date de création: 12/03/2020 Version 2
	Construction par ligation et séquençage de banques d'ADN génomique MinION	Page 1/5


La technique de séquençage d'ADN sur séquenceur MinION permet de générer des longues lectures de séquences d'ADN.

Prestation proposée

A partir des ADN fournis par le client, le plateau technique réalise les étapes de construction et séquençage de la banque ADN :

1. Réparation de l'ADN (pour l'ADN génomique).
2. Réparation des extrémités des molécules d'ADN.
3. Ajout d'un A à l'extrémité 3' de la molécule d'ADN.
4. Ligation d'adaptateurs 1D spécifique Oxford Nanopore.



E-EXP-10	Fiche prestation	Date de création: 12/03/2020 Version 2
	Construction par ligation et séquençage de banques d'ADN génomique MinION	Page 2/5

5. Séquençage.

Le séquençage est réalisé à l'aide d'une flow cell sur un séquenceur MinION d'Oxford Nanopore Technologies.



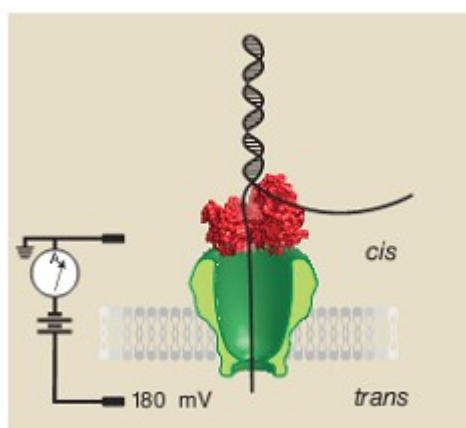
Flow cell et séquenceur MinION


La flow cell contient tous les composants permettant la détection des acides nucléiques grâce à des protéines nanopores (lipoprotéine CsgG mutée d'E. coli).

Les nanopores sont insérés dans une membrane. Cette membrane est elle-même formée dans un micro-support. Ce micro-support permet à chaque nanopore d'être placé au dessus d'une électrode afin de détecter individuellement le signal provenant de chaque nanopore. En présence de cette membrane imperméable au courant électrique, un voltage est appliqué. Le courant ionique résultant ne pourra passer qu'à travers les nanopores. Les modifications de ce courant seront détectées par l'électrode.

Chaque nanopore va lire une molécule d'ADN à la fois. Cette molécule est présentée au nanopore par la protéine moteur (une hélicase, représentée en rouge sur le schéma) fixée à l'ADN lors de l'étape de construction de banque.

Lors du séquençage, le nanopore accueille un hexamère (6 bases) de la molécule d'ADN ce qui fait varier le courant électrique à l'intérieur du nanopore et génère une signature électrique spécifique de la séquence de l'hexamère.




E-EXP-10	Fiche prestation	Date de création: 12/03/2020 Version 2
	Construction par ligation et séquençage de banques d'ADN génomique MinION	Page 3/5

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 ADN et d'utiliser un protocole qui permet de produire des ADN sans impuretés. Nous conseillons de resuspendre les ADN dans du TE.

Type de contrôle	Vérification des ADN
Quantité	<ul style="list-style-type: none"> -Détermination de la quantité d'ADN par fluorimétrie -200 fmoles minimum d'ADN pour la construction -2µg pour des fragments de 8kb par exemple -Si un sizing est nécessaire, il faut doubler les quantités de départ
Qualité	<ul style="list-style-type: none"> -Évaluation des contaminants par spectrophotométrie : rapport 260/230=2-2,2 et 260/280 = 1,8
Intégrité -Taille des fragments	<ul style="list-style-type: none"> -Profil électrophorèse pour la vérification de l'intégrité et de la taille des ADN

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.

E-EXP-10	Fiche prestation	Date de création: 12/03/2020 Version 2
	Construction par ligation et séquençage de banques d'ADN génomique MinION	Page 4/5

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

Dosage de la construction	
Quantité déterminée par fluorimétrie sur Qbit	Selon l'application de 5 à 50 fmoles

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 plate forme 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.

Restitution des résultats


Une fois l'expérimentation terminée et les différentes étapes de contrôle validées, les séquences brutes de vos échantillons sont disponibles sous forme de fichiers texte au format fastq et fast5.

Un rapport de contrôle qualité du séquençage est également remis au moment de la livraison des séquences.

Ces données sont récupérables sur un serveur sftp dont le nom et les modalités d'accès vous seront communiqués via le gestionnaire de projet une fois vos résultats disponibles.

Conditions et durée de conservation des échantillons et des données

Les échantillons d'ADN sont conservés à 4°C dans notre réfrigérateur. Une fois l'analyse réalisée et les données transférées au client, les reliquats d'échantillon, les banques ainsi que la flow cell utilisée seront éliminés.

E-EXP-10	Fiche prestation	Date de création: 12/03/2020 Version 2
	Construction par ligation et séquençage de banques d'ADN génomique MinION	Page 5/5

Analyses complémentaires disponibles

Suite au séquençage, le plateau technique peut vous proposer des prestations d'analyse bioinformatique.

Pour en savoir plus, vous pouvez consulter la fiche prestation en bioinformatique correspondant à votre application ou contacter le plateau technique.