


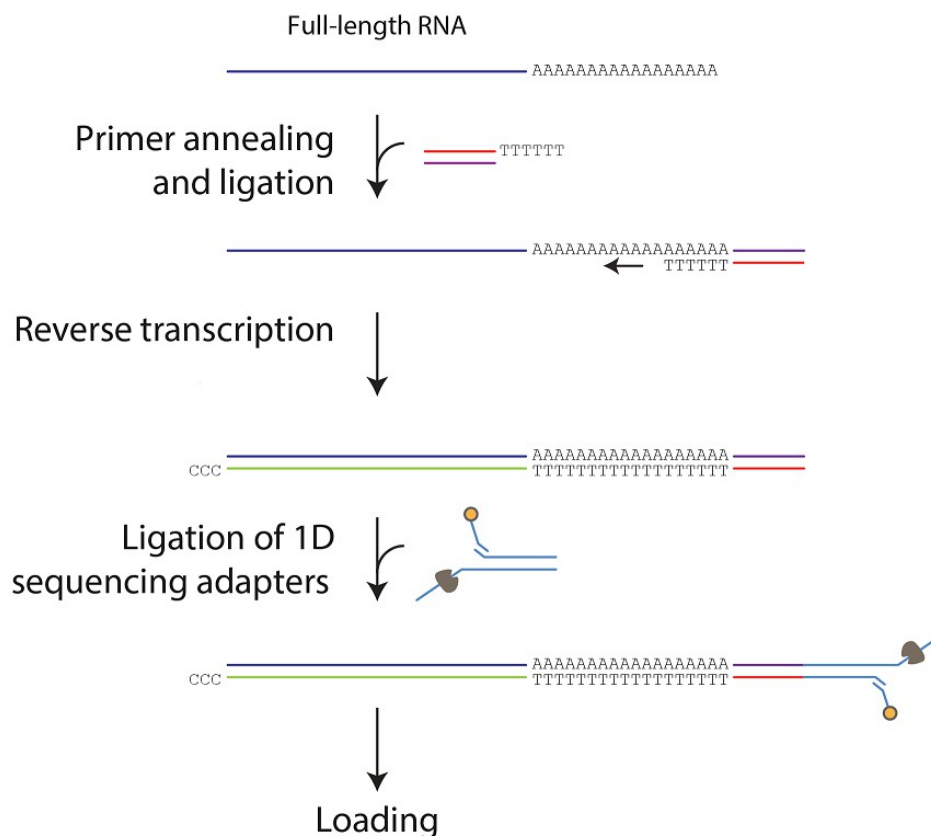
E-EXP-07	Fiche prestation	Date : 12/3/2020 Version 2
	Construction et séquençage de banques Direct RNA MinION	Page 1/5


La technique de séquençage d'ARN sur séquenceur MinION permet de générer des longues lectures de séquences d'ARN messenger. Ces longues lectures sont utiles pour caractériser les transcrits isoformes, leurs abondances et permettent l'assemblage de novo du transcriptome.

Prestation proposée

A partir des ARN totaux fournis par le client, le plateau technique réalise les étapes de construction la banque ARN :

1. Purification des ARN polyA.
2. Reverse transcription des ARN polyadénylés.
3. Ligation d'un Adaptateur 1D spécifique Oxford Nanopore Technologies.
4. Dosage de la construction sur Qbit.



E-EXP-07	Fiche prestation	Date : 12/3/2020 Version 2
	Construction et séquençage de banques Direct RNA 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 Minlon

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'ARN à la fois. Cette molécule est présentée au nanopore par la protéine moteur (une hélicase, représentée en vert 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'ARN 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-07	Fiche prestation	Date : 12/3/2020 Version 2
	Construction et séquençage de banques Direct RNA MinION	Page 3/5

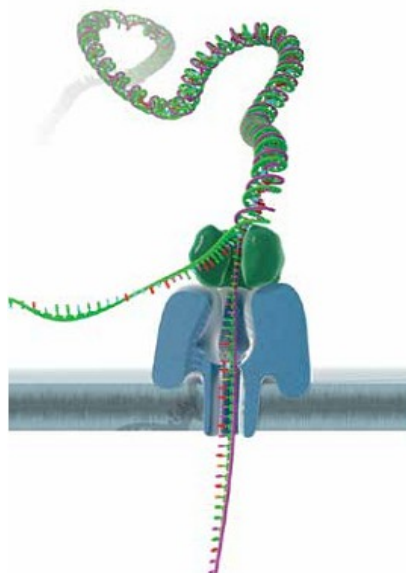



Figure : Une molécule d'ARN passant à travers le pore de la flow cell. La synthèse du premier brin d'ADNc permet d'augmenter l'efficacité du séquençage mais cet ADNc ne passera pas à travers le pore.

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 ARN totaux.

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.

Quantification et qualification des ARN totaux	
Quantité et qualité de l'ARN total	Profil électrophorèse pour la qualité des ARN totaux Quantité minimale : 80 µg Quantité optimale : 160 µg

E-EXP-07	Fiche prestation	Date : 12/3/2020 Version 2
	Construction et séquençage de banques Direct RNA 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 :

Vérification et dosage des ARN polyA	
Quantité et qualité de l'ARN messenger	Profil électrophorèse pour la qualité des ARNm : smear avec une taille moyenne des ARNs autour de 2 000 nucléotides Quantité : 250 -1000 ng

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.

E-EXP-07	Fiche prestation	Date : 12/3/2020 Version 2
	Construction et séquençage de banques Direct RNA MinION	Page 5/5

Conditions et durée de conservation des échantillons et des données

Les échantillons ARN sont conservés à -80°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, les banques ainsi que la flow cell utilisée seront éliminés.

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.