
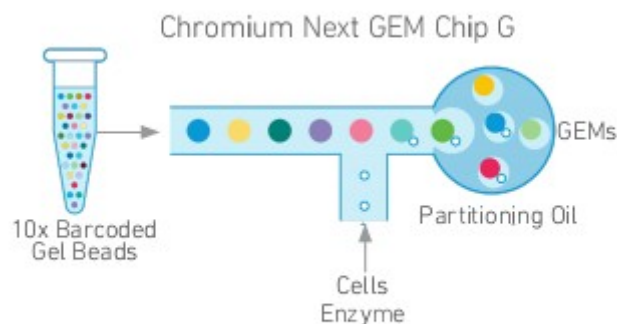



E-EXP-02	Fiche prestation	Date : 2/3/2022 Version 2
	Chromium Single Cell	Page 1/7

La technique de DGE sur la technologie 10X Genomics permet l'étude de l'expression de gènes dans 500 à 10000 cellules (ou noyaux cellulaire) individuelles par échantillon. La technologie 10X GemCode permet grâce à un pool de 750 000 code-barres d'indexer le transcriptome d'un ensemble de cellules ou noyaux d'un échantillon. Cette indexage est réalisé en isolant des cellules dans des émulsions ou nano gouttelettes de billes de gel. Chaque cellule ou noyaux dans les nano gouttelettes va générer des ADNc qui vont partager le même code-barres 10X. Les banques ADN sont construites et séquencées à partir des ADNc et le code-barre 10X est utilisé pour assigner chaque séquences à une cellule.

Afin d'obtenir une résolution cellulaire, les cellules sont distribuées dans le système à une dilution limite. La majorité des nano gouttelettes ne contiennent pas de de cellules, les 1 à 10% des nano gouttelettes restantes contiendront une seule cellule.

Une fois dissoutes les billes de gel vont relarguées dans chaque nano gouttelettes des amorces contenant : la séquence du primers de séquençage du Read 1, un code-barres 10X de 16 nucléotides, un code-barres random de 12 nucléotides et un primer poly-dT. Toutes ces amorces vont être mélangées avec le lysat cellulaire et le mélange réactionnel pour la transcription inverse. L'incubation des nano gouttelettes de gel produit des ADNc pleine longueur indexés et synthétisés à partir de l'ARN poly-dA. Après incubation les nano gouttelettes sont cassées et les ADNc sont purifiés.



E-EXP-02	Fiche prestation	Date : 2/3/2022 Version 2
	Chromium Single Cell	Page 2/7

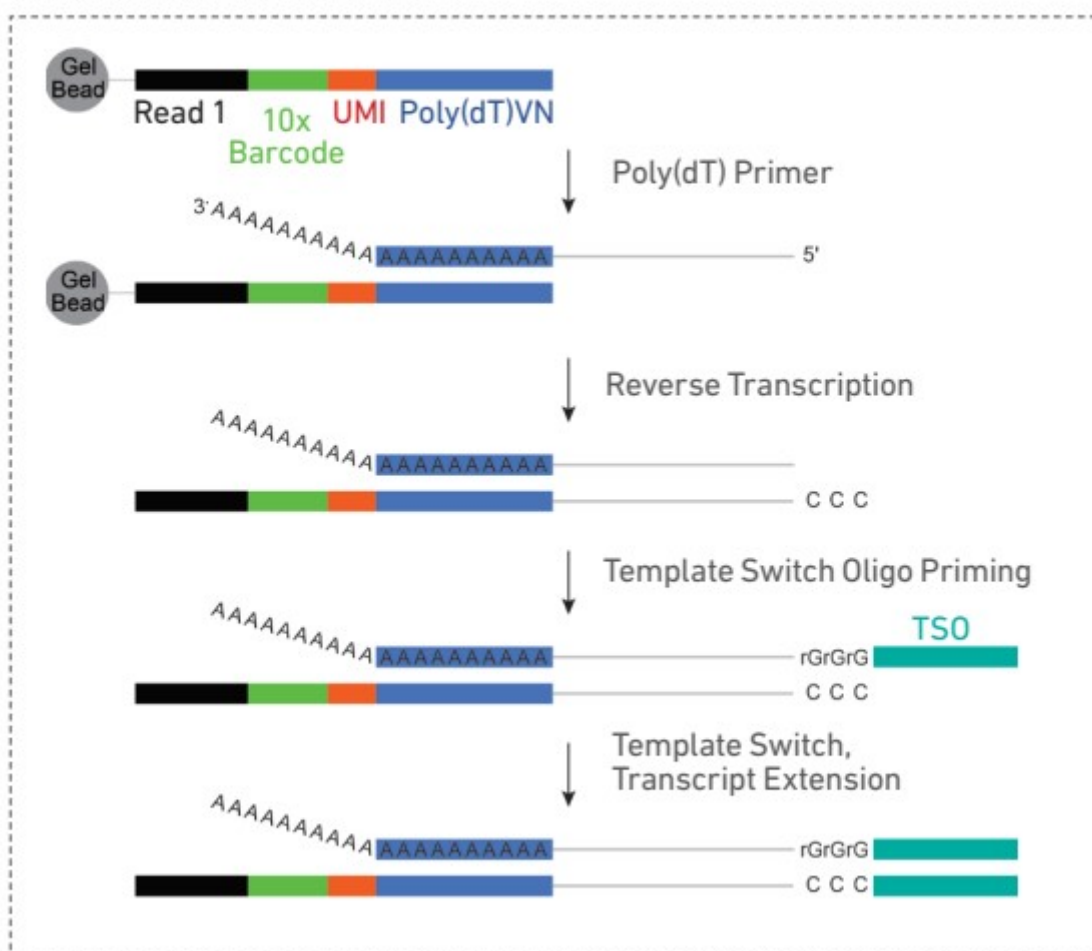
Prestation proposé


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

Etape : 1 et 2

- Génération des nano gouttelettes ou émulsions
- Reverse transcription des ARN polyadénylés

Inside individual GEMs

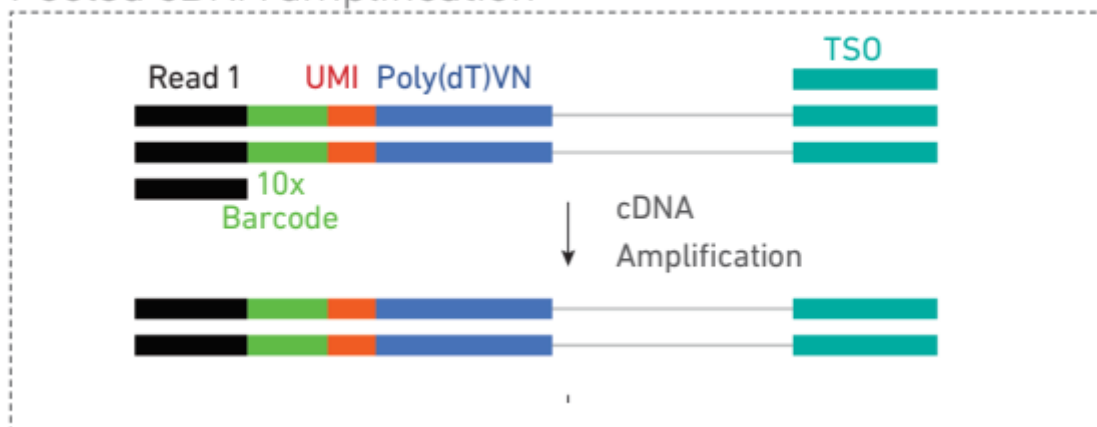


E-EXP-02	Fiche prestation	Date : 2/3/2022 Version 2
	Chromium Single Cell	Page 3/7

Etape 3: Purification et amplification


- Lyse des nano gouttelettes et purification des ADNc
- Amplification des ADNc

Pooled cDNA amplification

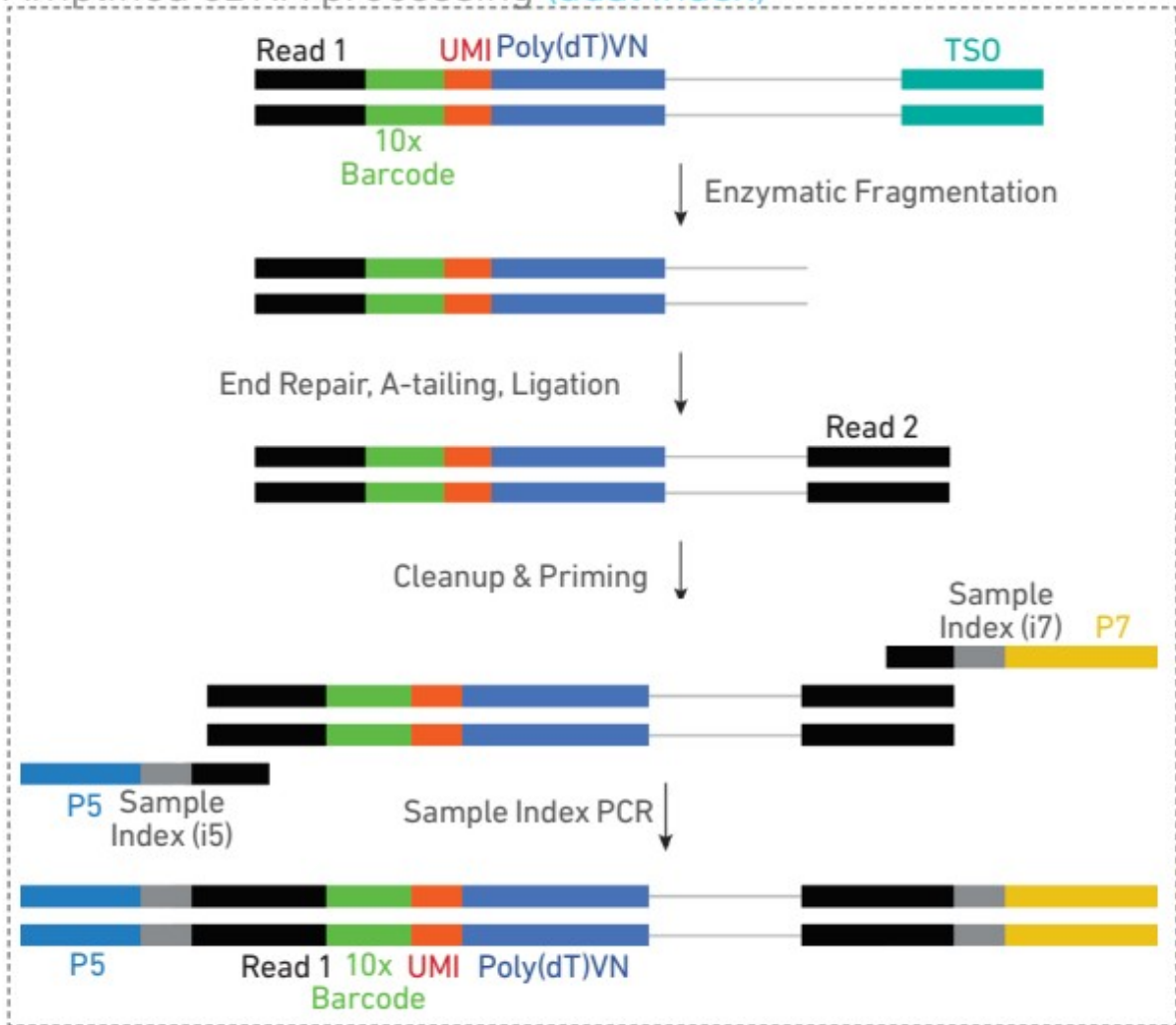


Etape 4 : Construction des banques

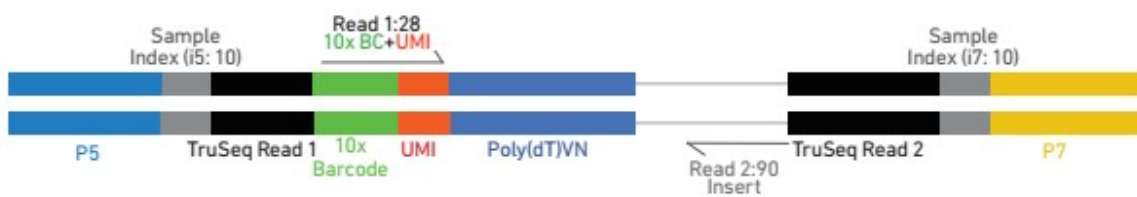
- Fragmentation des ADNc
- Réparation des extrémités
- Ajout d'un A en 3' de ces extrémités
- Ligation d'adaptateurs indexés
- Amplification par PCR
- Vérification sur Fragment Analyzer et quantification par qPCR


E-EXP-02	Fiche prestation	Date : 2/3/2022
	Chromium Single Cell	Version 2
		Page 4/7

Amplified cDNA processing (dual index)



Structure de la banque d'ADN



E-EXP-02	Fiche prestation	Date : 2/3/2022 Version 2
	Chromium Single Cell	Page 5/7

Séquençage

Le mode de séquençage est spécifique à la construction des banques Single cell 10XGenomics.

Les banques sont séquencées en Pair End.

-Le Read1 permet la lecture des 16 nucléotides correspondant à l'index des cellules et 12 nucléotides de l'index codant pour une molécule de transcrit.

-L'index de l'échantillon est lu via l'index i7 et i5 et comporte 10 nucléotides.

-Le Read2 permet de lire la séquence de l'ADNc sur 86 nucléotides

Un pre-run de séquençage a faible profondeur est réalisé sur Miniseq (Mid output) pour vérifier la qualité des banques et estimer le nombre de cellules. Ceci afin d'équilibrer le mélange des banques en prenant en compte le nombre de reads par cellules.


Le séquençage est réalisé sur un Novaseq 6000 (Illumina) par la méthode de Sequence By Synthesis (SBS). Pour obtenir une bonne profondeur de lecture 10xgenomics recommande de produire entre 30k et 50K reads par cellules.

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 cellules.

Type	Cellules ou noyaux
Quantités	20 000 au minimum
Viabilité cellulaire	>90%
Pureté de la préparation	Limiter au maximum les débris cellulaires
Concentration	700 cellules / μ l à 1400 cellules/ μ l 1600 noyaux / μ l à 3200 noyaux/ μ l selon le nombre de noyaux capturés
Particularités	Cellules parfaitement dissociées

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-02	Fiche prestation	Date : 2/3/2022 Version 2
	Chromium Single Cell	Page 6/7

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 :

Quantification de l'amplification des ADNc	
Quantité et qualité de l' ADNc	Profil électrophorèse, détermination de la quantité d'ADNc
Efficacité de la fabrication des banques	
Taille moyenne ** Concentration	450 pb ± 50 pb 2 nM
Qualité de la banque vérifiée sur MiniSeq	
% de reads dans les cellules	≥ 60
Nombres de cellules estimées	500-10 000

** en incluant les adaptateurs.

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.

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.

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-02	Fiche prestation	Date : 2/3/2022 Version 2
	Chromium Single Cell	Page 7/7

Conditions et durée de conservation des échantillons et des données

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 sauf demande express du client.

De la même façon, nous nous engageons à conserver les données issues du séquençage uniquement jusqu'à la fin de l'analyse.

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.