


E-EXP-15	Fiche prestation	Date : 14/05/2022 Version 1
	Construction de banque BRB-seq	Page 1/4

Le BRB-seq (Bulk RNA Barcoding and sequencing) est une alternative économique au RNA-seq.

Elle consiste à indexer les échantillons au moment de la transcription inverse puis à construire une banque sur un pool constitué des cDNA indexés.

Elle permet d'obtenir des informations sur la partie 3' des cDNA et nécessite un volume de données de séquençage moindre que le RNA-seq (5 à 10 millions de séquences par échantillon).

En contrepartie, cette technique est moins sensible que le RNA-seq et nous recommandons d'augmenter le nombre de replicats par condition étudiée à 6 au minimum.

Prestation proposée :

1. Contrôle et validation des échantillons :

La vérification de la pureté des ARNs doit être réalisée par le laboratoire demandeur. Cette vérification peut-être réalisée par spectrophotométrie en s'assurant que le ratio 260/230 est supérieur ou égal à 1,5.

Le plateau technique vérifie l'intégrité et la concentration de chaque ARN par électrophorèse capillaire.

Pour les espèces modèles (humain, souris, rat, etc.), le RQN (RNA Quality Number) doit être supérieur ou égal à 6.

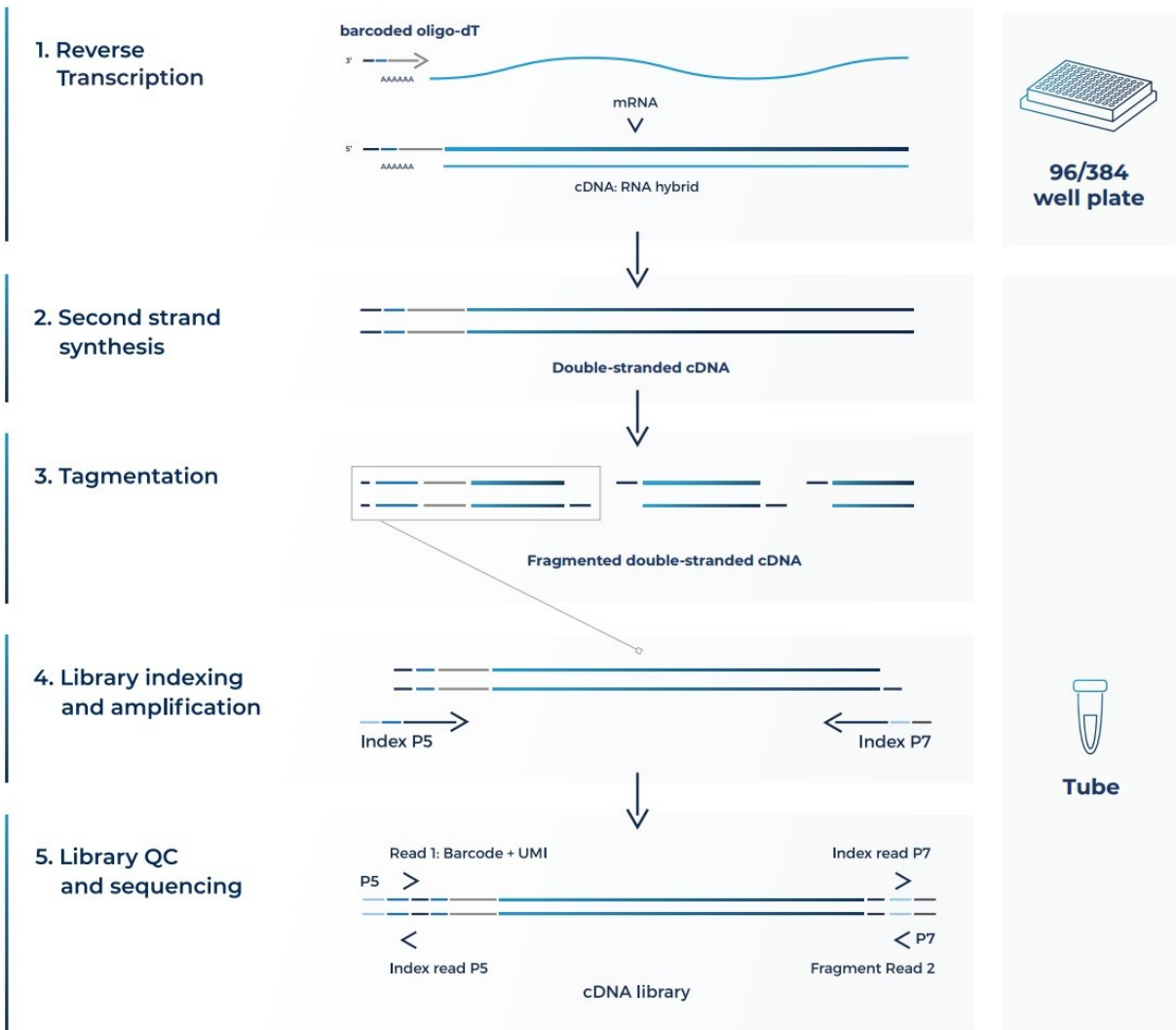
Pour les espèces non modèles, la validation se fera en collaboration avec le laboratoire demandeur. On s'attend néanmoins à obtenir un profil exempt de signe de dégradation marquée.

La mesure de concentration obtenue lors de cette électrophorèse capillaire doit être supérieure ou égale à 25 ng/μl.

2. Construction des banques :

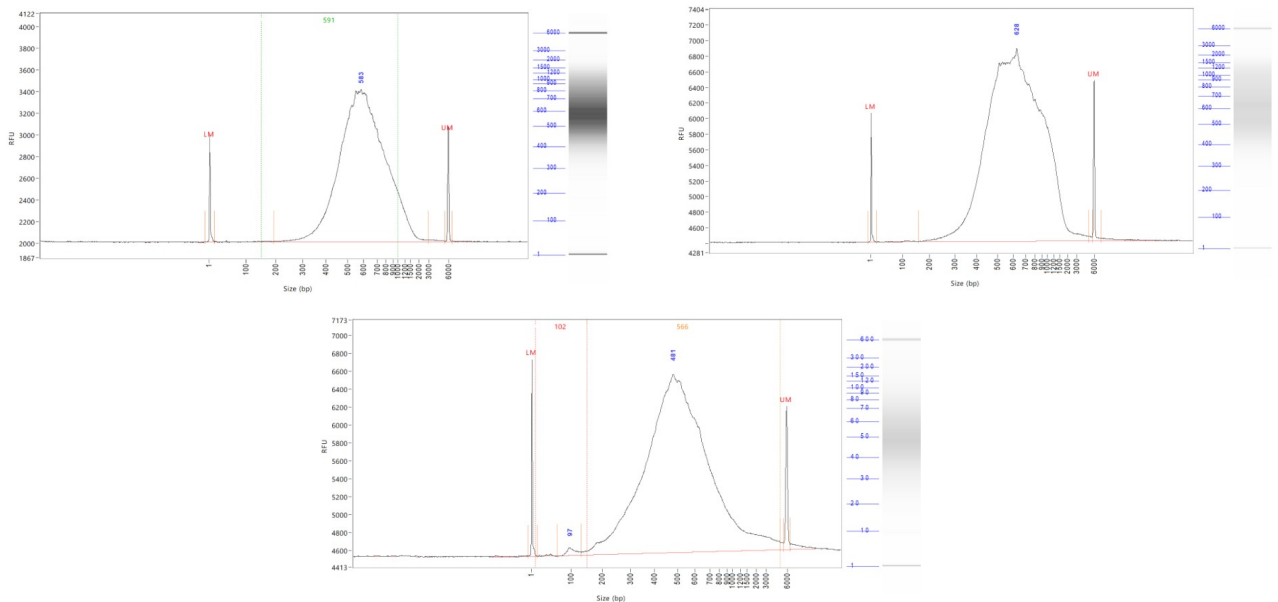
La construction des banques se déroule en 6 étapes :


- Une transcription inverse en utilisant une amorce polyT comportant un fragment de l'adaptateur P5, un index propre à chaque échantillon et un UMI.
- La synthèse du second brin de cDNA complémentaire des cDNA pleine longueur générés lors de l'étape précédente.
- Le mélange des différents cDNA double brin.
- L'action d'une transposase pour fragmenter les cDNA double brin et ajouter une partie de l'adaptateur P7.
- Une PCR pour amplifier les fragments portant à la fois un fragment d'adaptateur P5 et un fragment d'adaptateur P7. Cette PCR permet également d'indexer la banque (double index uniques) et de compléter les adaptateurs P5 et P7 pour rendre la banque compatible avec un séquençage Illumina.
- La validation de la banque par électrophorèse capillaire.



3. Validation de la banque :

Voici quelques exemples de profil de banque vérifiée par électrophorèse capillaire :



E-EXP-15	Fiche prestation	Date : 14/05/2022 Version 1
	Construction de banque BRB-seq	Page 3/4

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 des ARN.

Quantité minimale	500 ng
Concentration	Min. 25 ng/μl
Particularités	Bonne intégrité (RIN ou RQN ≥ 6) Ratio 260/280 ≥ 2 Ratio 260/230 ≥ 1,5 Bonne uniformité de ces valeurs entre les échantillons

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	Électrophorèse capillaire Concentration ≥ 25 ng/μl RQN ≥ 6
Efficacité de la fabrication des banques	
Taille moyenne (adaptateurs inclus) et concentration	Comprise entre 400 et 700 pb 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.

E-EXP-15	Fiche prestation	Date : 14/05/2022 Version 1
	Construction de banque BRB-seq	Page 4/4

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.

Conditions et durée de conservation des échantillons et des données

Les échantillons d'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 et les banques produites seront éliminés.