


E-PREST-41	Fiche prestation	Date : 12/03/25 Version 3
	Construction de banque pour le séquençage d'amplicon	Page 1/3

Le séquençage d'amplicon est une approche hautement ciblée qui permet d'analyser des variations génétiques dans une ou des régions spécifiques du génome. Cette approche est par exemple utile dans la recherche et la découverte de mutation somatiques rares dans des échantillons complexes. Elle est également utilisée en métagénomique (séquençage 16S) pour les études de phylogénie et de taxonomie.

Préparation de l'amplicon :

Lors de la génération de l'amplicon, il est nécessaire d'utiliser des amorces de PCR qui vont permettre la seconde étape de la construction de la banque.

Ces amorces doivent avoir la structure suivante :

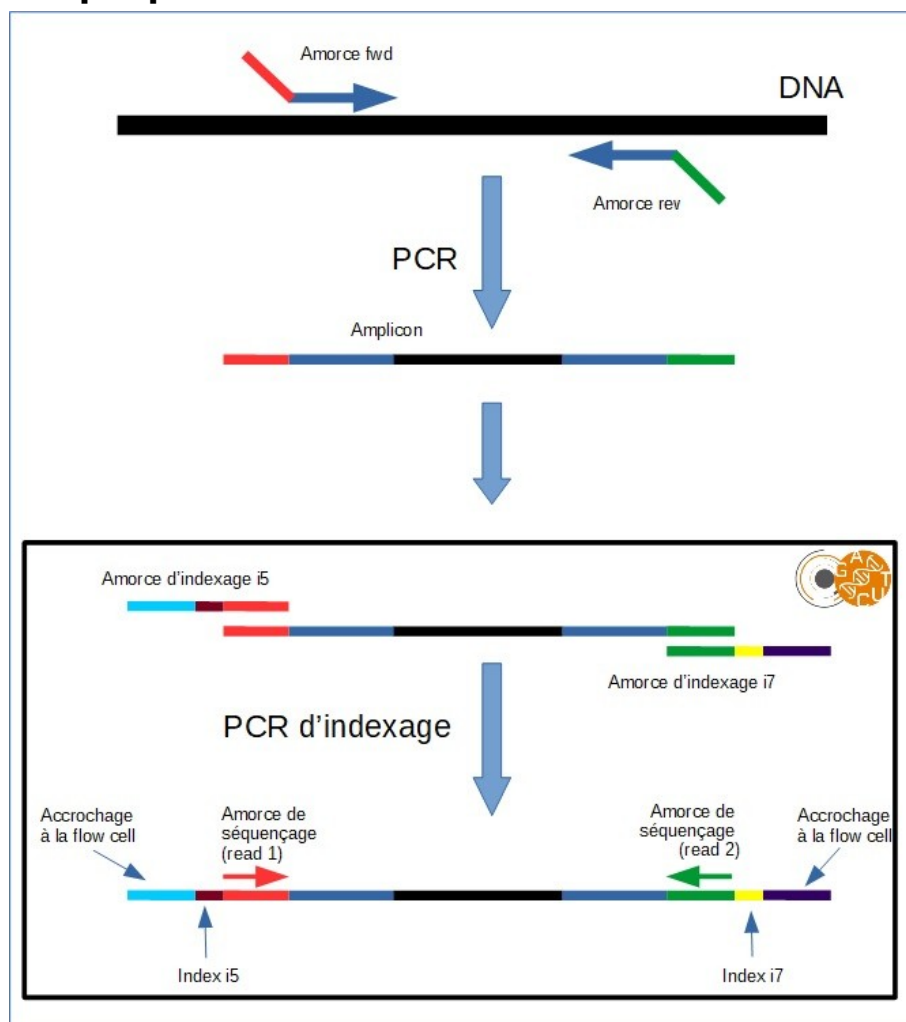
Amorce fwd :


5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-[séquence locus spécifique] 3'

Amorce rev :

5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-[séquence locus spécifique] 3'

Prestation proposée :



E-PREST-41	Fiche prestation	Date : 12/03/25 Version 3
	Construction de banque pour le séquençage d'amplicon	Page 2/3

1. Contrôle et validation des échantillons :

Cette validation est réalisée par microfluorimétrie pour les critères quantitatifs (20 ng par échantillon à une concentration minimale de 1 ng/μl) et par électrophorèse capillaire (Fragment Analyzer, Agilent).

2. Construction des banques :

Elle se déroule en 3 étapes :

- Amplification de l'amplicon par PCR. Cette étape permet de compléter les adaptateurs nécessaires au séquençage sur machine Illumina et d'indexer la banque.
- Purification du produit de PCR sur billes magnétiques.
- Vérification sur Fragment Analyzer et quantification par qPCR.

Séquençage

Le séquençage est réalisé sur Novaseq 6000 (Illumina) ou sur Miniseq (Illumina) par la méthode de Sequence By Synthesis (SBS).

Cf fiche E-PREST-31 Séquençage Illumina sur NovaSeq.

E-PREST-30 Séquençage Illumina sur MiniSeq.

Les banques d'amplicon sont en général constituées de séquences d'ADN très conservées d'une molécule à l'autre. Afin d'éviter tout problème de saturation du signal lors du séquençage, les banques d'amplicons sont clusterisées à une concentration plus faible que les banques classiques.

Qui plus est, la banque contrôle de PhiX habituellement spikée à 1 % dans chaque piste de séquençage sera cette fois spikée à une hauteur variant entre 10 et 20 % pour apporter de la diversité aux séquences présentes sur la flow cell.


Du fait de ces 2 particularités, le nombre de séquences issues de la ou des banques d'amplicons représenteront 50 à 60 % du nombre de séquences produites de façon standard.

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 excessive de l'ADN.

Quantités minimale	20 ng d'amplicon
Concentration	1 ng/μl
Particularités	Taille de l'amplicon < 650 pb.

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-PREST-41	Fiche prestation	Date : 12/03/25 Version 3
	Construction de banque pour le séquençage d'amplicon	Page 3/3

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	20 ng à 1 ng/µl minimum
Efficacité de la fabrication des banques	
Taille moyenne (adaptateurs inclus)	Taille amplicon + 60 pb.
Concentration	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.

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'ADN sont conservés à -20°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.