

E-PREST-54	Fiche prestation	Date : 21/07/25 Version 1
	Construction de banques Chromium Single Cell Gene Expression Flex	Page 1/6

La méthode Chromium Fixed RNA Profiling pour échantillons multiplexés offre un moyen efficace et économique d'augmenter la taille des expériences et le nombre de cellules en permettant d'analyser jusqu'à 4 ou 16 échantillons au sein d'une seule réaction.

Les kits de sondes pour transcriptome humain/souris compatibles avec le multiplexage contiennent 4 ou 16 ensembles de sondes, chaque ensemble comprenant un code-barres de sonde permettant le multiplexage des échantillons et la démultiplexage en aval. Le multiplexage permet de marquer jusqu'à 16 échantillons uniques grâce à 16 ensembles de sondes portant chacun un code-barres distinct.

Pour ce protocole, les échantillons fixés sont d'abord hybridés avec des sondes barcodées. Ensuite à l'aide d'une puce microfluidique, les échantillons hybridés sont ensuite répartis dans des nanogouttelettes de type Gel Beads-in-emulsion (GEM). Un ensemble d'environ 737 000 codes-barres GEM 10x (aussi appelés codes-barres 10x) est utilisé séparément pour indexer le contenu de chaque compartiment.

À l'intérieur des GEM, les sondes sont liguées et le code-barres GEM 10x est ajouté ; toutes les sondes liguées dans un même GEM partagent ainsi un code-barres GEM 10x commun. Les sondes liguées et codées sont ensuite pré-amplifiées en vrac, ensuite des banques d'expression génique sont générées et séquencées.

Prestation proposée

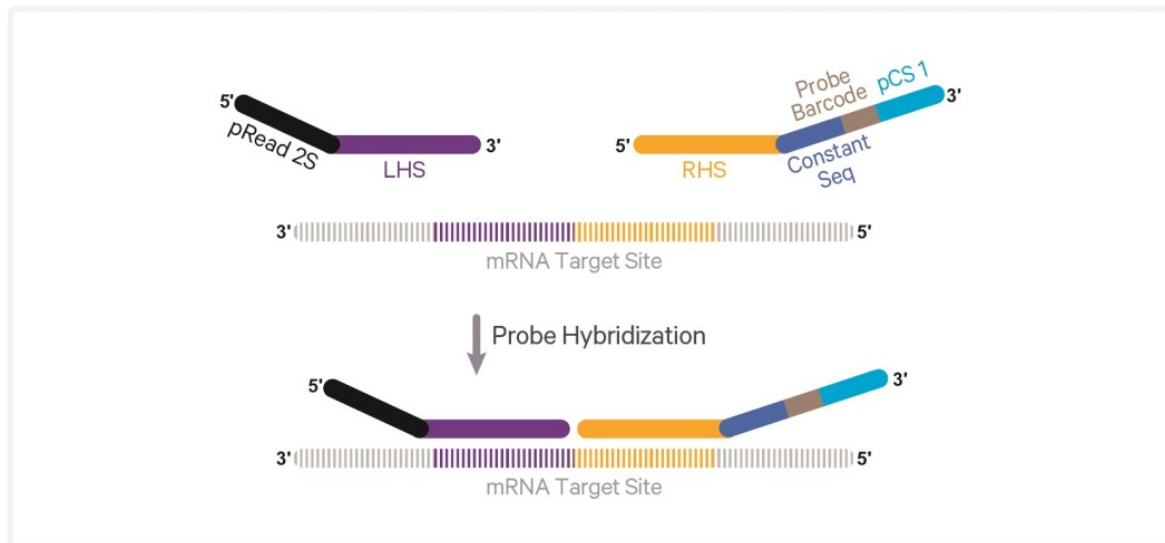
A partir des cellules fixées par le client avec le kit GEM-X Flex Sample Preparation V2, le plateau technique réalise les étapes suivantes :

Étape :1

- Hybridation des sondes
Des paires de sondes spécifiques à chaque gène ciblé, composées d'un bras gauche et d'un bras droit, sont ajoutées à l'échantillon préalablement fixé. Ces sondes s'hybrident de manière spécifique à leurs séquences cibles d'ARN messenger au cours d'une longue incubation.

E-PREST-54	Fiche prestation	Date : 21/07/25 Version 1
	Construction de banques Chromium Single Cell Gene Expression Flex	Page 2/6

Probe Hybridization



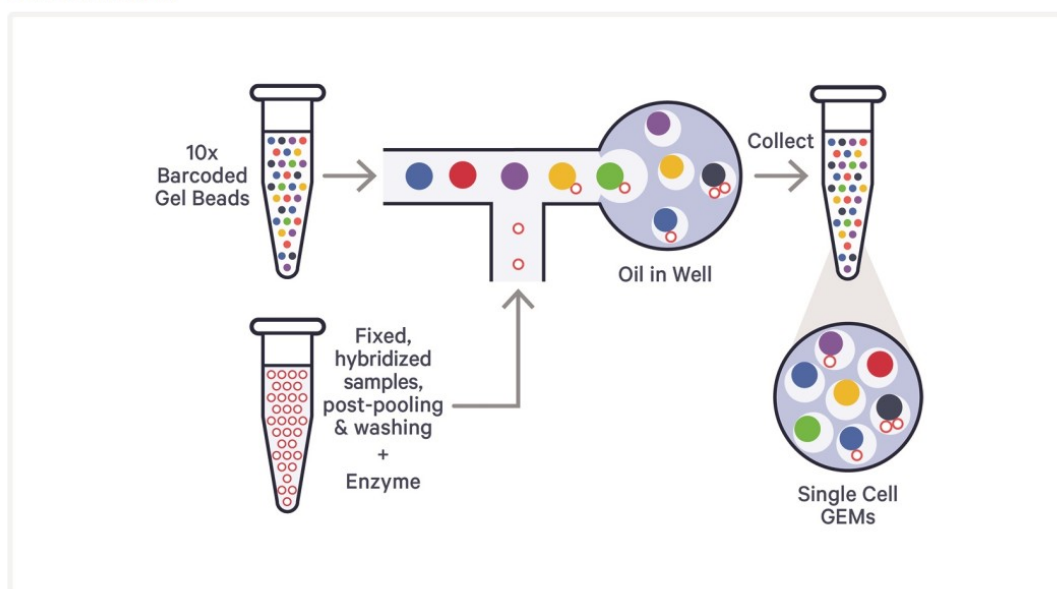
Étape 2 : Mélange et lavage

- Les cellules sont comptés puis les échantillons sont mélangés. Ensuite le pool est lavé pour éliminer les sondes non hybridées.

Étape 3. Génération des GEM et barcodage

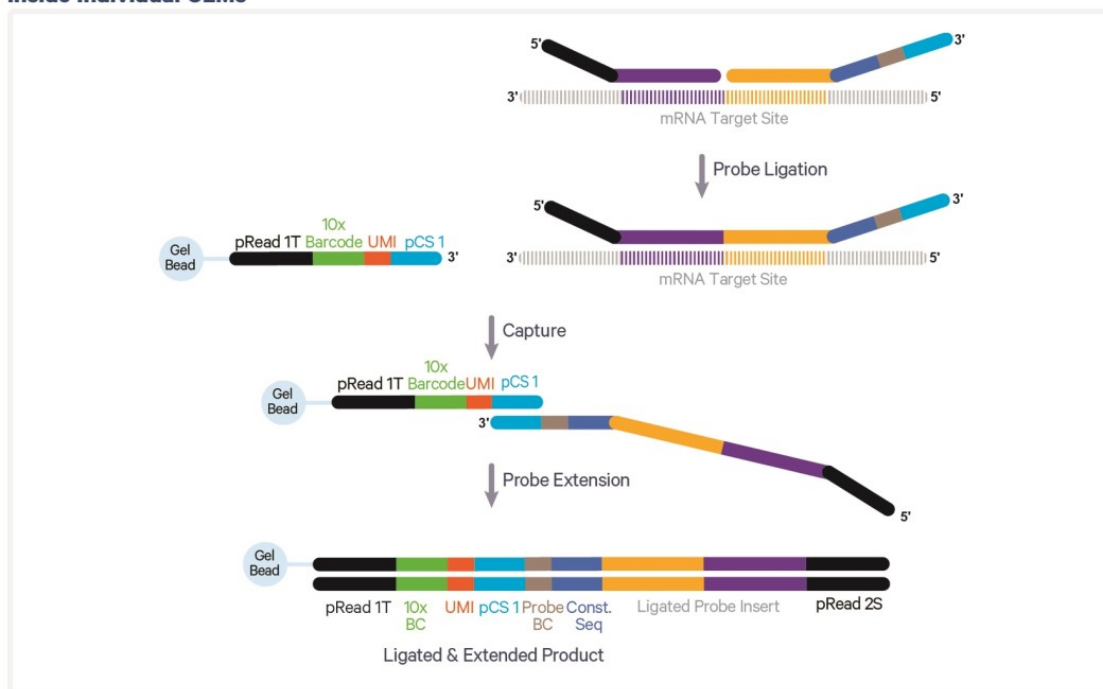
Cette étape permet de partitionner des milliers de cellules dans des émulsions (2000 à 20 000 cellules par échantillon). Chaque émulsion va contenir une bille sous forme de gel portant des oligonucléotides afin de barcoder chaque sonde.

GEM Generation



E-PREST-54	Fiche prestation	Date : 21/07/25 Version 1
	Construction de banques Chromium Single Cell Gene Expression Flex	Page 3/6

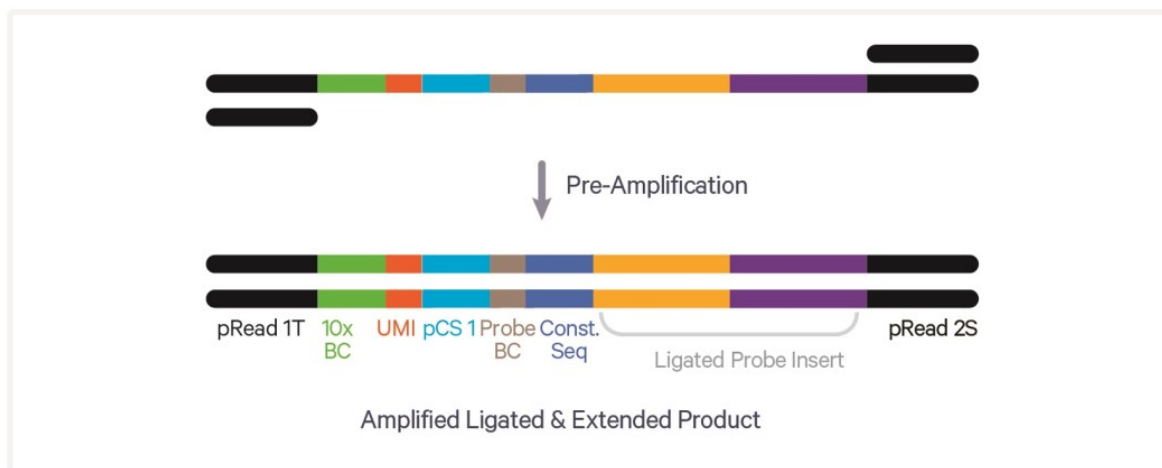
Inside Individual GEMs



Étape 4. Purification des GEM et amplification

Les GEMs sont rompues par l'ajout d'un agent de récupération. Une PCR est ensuite réalisée afin de pré-amplifier les sondes liguées.

DNA Pre-Amplification

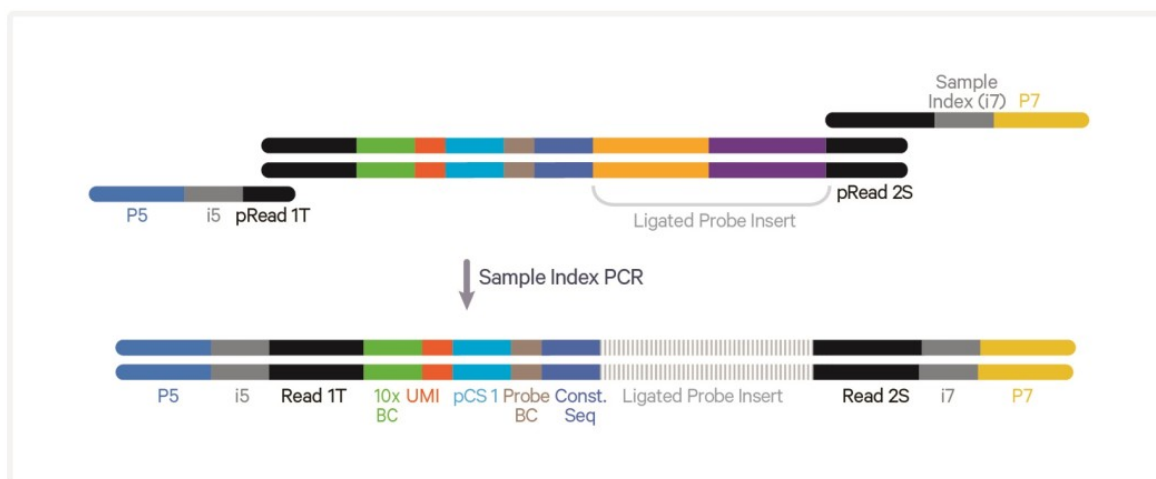


E-PREST-54	Fiche prestation	Date : 21/07/25 Version 1
	Construction de banques Chromium Single Cell Gene Expression Flex	Page 4/6

Étape 5. Construction de la banque

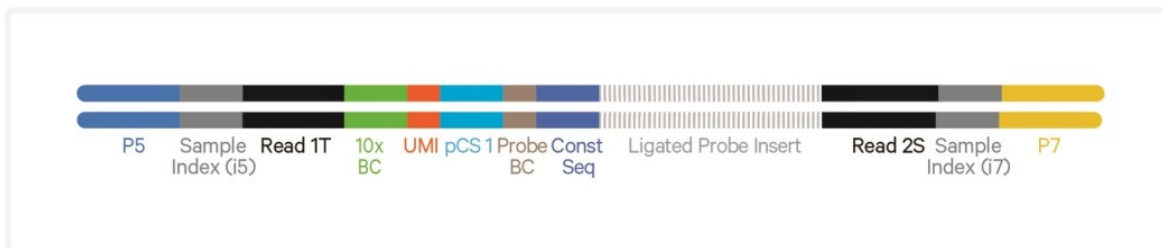
Les produits de sonde ligués et barcodés sont indexés par PCR. Les séquences P5, P7, i5, i7 et les séquences illumina Truseq read 1 et small RNA read 2 sont ajoutées via la PCR d'indexage.

Pooled Amplified DNA Processed in Bulk



Structure de la banque d'ADN

Chromium Fixed RNA Profiling – Gene Expression Library



Séquençage

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

E-PREST-54	Fiche prestation	Date : 21/07/25 Version 1
	Construction de banques Chromium Single Cell Gene Expression Flex	Page 5/6

Les banques sont séquencées en Pair End.

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

-L'index de l'échantillon est lu via l'index i7 et comporte 8 paires de bases.

-Le Read2 permet de lire la séquence de la sonde et les 8 paires de bases du barcode de la sonde.

Un pre-run de séquençage a faible profondeur est réalisé sur Miseqi100+ 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.

Cf fiche E-PREST-30 Séquençage Illumina sur Miseqi100+.

Le séquençage est réalisé sur un Novaseq XP+ (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.

Cf fiche E-PREST-31 Séquençage Illumina sur NovaseqX+.

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
Quantités	300 000-500 000
Volume	1000 µl de cellules diluées dans du Quenching buffer
Particularités	Cellules parfaitement dissociées sans débris, viabilité >90 % Cellules fixées avec le kit GEM-X Flex Sample Preparation V2 kit ref 1000781

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-54	Fiche prestation	Date : 21/07/25 Version 1
	Construction de banques Chromium Single Cell Gene Expression Flex	Page 6/6

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 :

Efficacité de la fabrication des banques	
Taille moyenne **	250 pb $\pm$ 50 pb
Concentration	2 nM
Qualité de la banque vérifiée sur MiniSeq	
% de reads dans les cellules	≥ 60
Nombres de cellules estimées	1000-20 000

** 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.

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.

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