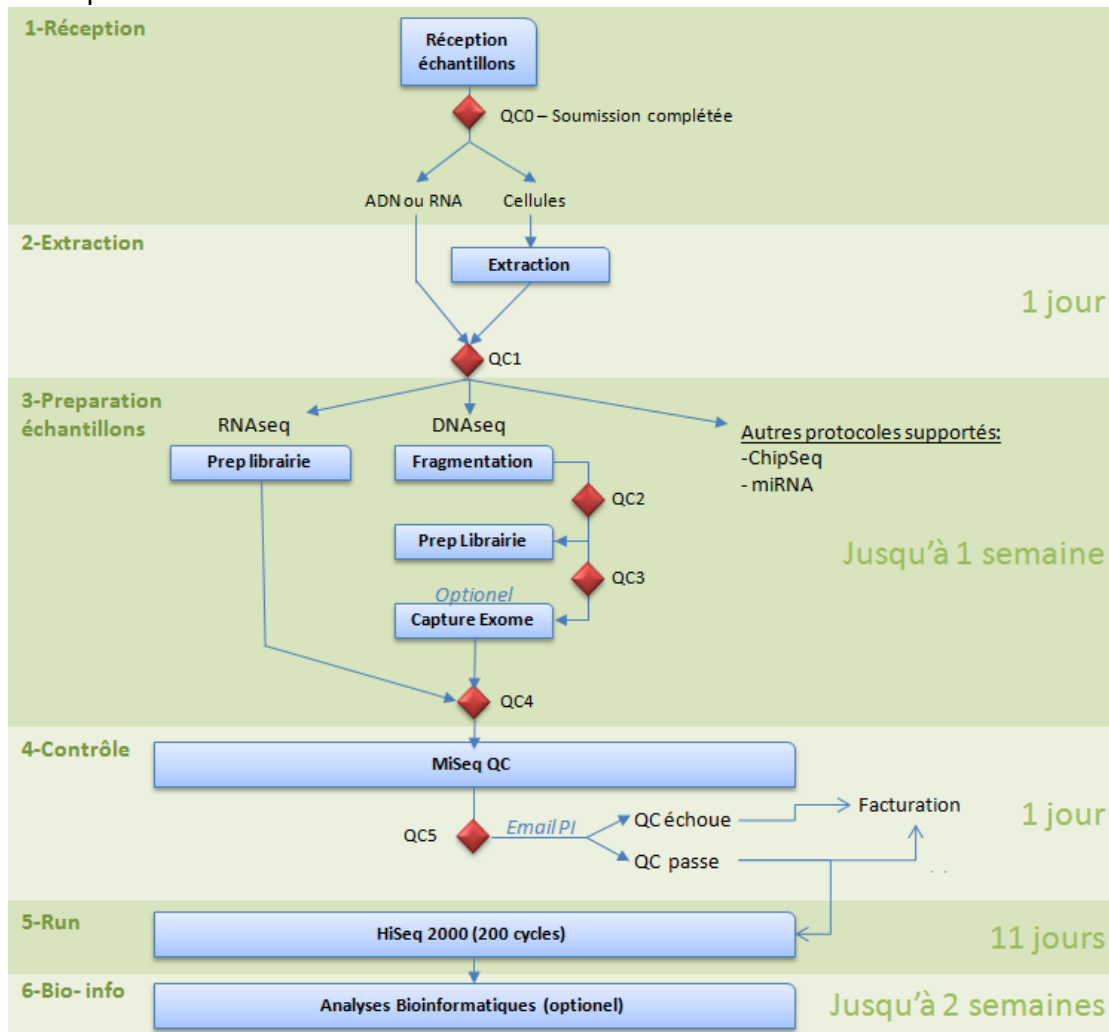


Procédure de soumission de projet pour séquençage nouvelle génération

Les projets de séquençage sur HiSeq se font en 6 étapes : 1- Soumission du projet et des échantillons, 2- Extraction de l'ARN ou de l'ADN (optionnel), 3- Préparation des échantillons (bibliothèques), 4- Contrôles, 5- Roulement sur l'appareil (HiSeq2000) et finalement 6- Analyses bioinformatiques (optionnel).

À chaque étape, des contrôles de qualité sont effectués avant de passer à l'étape suivante. Si l'un des contrôles échoue, vous serez automatiquement avisé et la décision d'arrêter le protocole ou de poursuivre vous reviendra. Dans l'un ou l'autre des cas, vous serez facturé seulement pour le travail qui aura été fait.

Voici la procédure détaillée :





Soumission du projet

Pour soumettre un projet de séquençage Next Generation sur HiSeq2000 (Illumina) il suffit de vous connecter à votre compte de la plateforme génomique. Sous l'onglet « Séquençage Nouvelle Génération », sélectionner « Nouveau Projet NGS ». Assurez-vous d'indiquer toutes les informations demandées par le formulaire.

Matériel de départ

Il est possible de soumettre des cellules à la plateforme pour que l'extraction d'ARN ou d'ADN soit faite par la plateforme génomique, ou de soumettre directement l'ADN ou l'ARN. Dans les deux cas, l'ADN ou l'ARN sera contrôlé pour vérifier que la qualité et la concentration sont suffisantes pour procéder au séquençage.

Quantité nécessaire †:

Cellules : entre 100 000 et 5 millions de cellules dans 1,5 ml de Trizol (ARN) ou DMSO (ADN) sur glace sèche

ARN : 0.5 µg à 4 µg dans environ 50 µl (viser 4 µg si possible)

ADN : 1 à 2 µg dans environ 50 µl (5 µg pour le séquençage du génome complet)

ChIP : 5 à 10 ng ADN dans 50 µl

† Notez qu'il s'agit seulement de lignes directrices et que les quantités requises peuvent varier selon le protocole demandé

Qualité nécessaire :

ARN : DO_{260/280} : environ 1.8, DO_{260/230} : entre 1.8 et 2.0

RNA Integrity Number (RIN) entre 9 et 10 (Bioanalyseur fait à la plateforme)

ADN : DO_{260/280} : environ 1.8, DO_{260/230} : entre 1.8 et 2.0

Type de projets présentement disponibles

ADN (DNA-Seq / Séquençage du génome)

ADN (Capture d'exome)

ADN (ChIP-Seq)

ADN (PCR-Seq / Amplicons)

ARN (RNA-Seq / Transcriptome)

ARN (petits ARNs, miRNAs, etc.)

Pour avoir de l'information sur d'autres protocoles que ceux mentionnés ici, veuillez communiquer avec la plateforme génomique.



Couverture des échantillons

Le nombre d'échantillon par ligne détermine la couverture de celui-ci. La couverture est définie par le nombre de fois que l'échantillon sera séquencé en moyenne. Plus on met d'échantillon dans une ligne, plus on réduit la couverture par échantillon. Pour 1 ligne sur HiSeq2000 on obtient généralement entre 350 et 450 millions de lectures (reads). Avec 2 échantillons par ligne on obtient donc entre 175 et 225 millions de reads par échantillon (la moitié si on met 4 échantillons par ligne et ainsi de suite).

En général, on suggère 2 transcriptomes (RNAseq) par ligne lors de la recherche de SNP, ce qui donne une couverture d'environ 150 à 200 X (175-225 millions de reads). Pour l'analyse d'expression (RPKM) des transcriptomes, on peut facilement aller jusqu'à 4 échantillons par ligne, ce donne une couverture d'environ 75 à 100 X (87-113 millions de reads). On peut mettre plus de 4 échantillons par ligne pour l'analyse d'expression d'un transcriptome si une couverture moindre est requise. La couverture ciblée doit choisie en fonction de l'information que vous recherchez. Pour les captures d'exome nous allons généralement jusqu'à 10 échantillons par ligne, ce qui donne une couverture d'environ 30 X (60 millions de reads).

Contrôles de qualité

Nous contrôlons toutes les étapes des projets afin de s'assurer de la qualité des échantillons est optimale tout au long du protocole. Nous contrôlons l'ARN de départ sur Bioanalyseur et l'ADN par NanoDrop (spectrophotomètre). Toutes les étapes de préparation des échantillons (librairies) sont aussi contrôlées par Bioanalyseur.

Lorsque les échantillons sont prêts à être séquencés, nous procédons à un ultime contrôle des pools de librairies sur un séquenceur MiSeq. Cette étape permet de s'assurer de la présence des index, de la qualité de la lecture et du mapping ainsi que de la densité des clusters générés. Ce contrôle est optionnel, cependant il est **fortement** recommandé puisque si cette étape n'est pas effectuée nous ne pourrions pas garantir les résultats du HiSeq pour lesquels vous serez chargés.

Noter que pour les projets de CHIP-seq il nous est impossible de procéder à un contrôle de qualité satisfaisant sur le matériel de départ. Nous ne pouvons donc pas garantir que la préparation des librairies sera efficace. Advenant que la librairie échoue, l'utilisateur paie uniquement pour les préparations et contrôles qui ont été réalisés.



Séquençage nouvelle génération

Plateforme Génomique

Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie

Université de Montréal

Délais

Le délai entre la soumission des échantillons et la réception des résultats est généralement d'environ 5 à 7 semaines. Le délai peut cependant être plus long si nous avons un plus grand nombre de projets en cours.

Références

Site web de la compagnie Illumina pour les protocoles des kits utilisés à la plateforme (TruSeq RNA, TruSeq DNA, TruSeq exome enrichment, TruSeq small RNA), http://www.illumina.com/applications/detail/sequencing/dna_sequencing.ilmn

ENCODE consortium (may 2011), Guidelines for Experiments: RNA Standards v1.0, http://genome.ucsc.edu/encode/experiment_guidelines.html

Pour plus d'information sur le séquençage nouvelle génération vous pouvez contacter la plateforme génomique à l'adresse suivante : nextgen@iric.ca