



SERVICES DE SÉQUENÇAGE DE NOUVELLE GÉNÉRATION

Centre d'expertise et de services Génome Québec

Guide de l'utilisateur: Technologies de séquençage Illumina – RNA-Seq

Version 7.0

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES	2
DIRECTIVES GÉNÉRALES POUR LA PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS D'ARN	3
CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES	3
QUANTITÉ D'ÉCHANTILLONS D'ARN À FOURNIR	4
DEMANDE DE SERVICE ET SOUMISSION DES ÉCHANTILLONS	5
CREATION D'UN FORMULAIRE DE DEMANDE DE SERVICE.....	5
FORMULAIRE DE SOUMISSION DES ECHANTILLONS.....	5
PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS	6
ADRESSES POUR L'ENVOI DES ÉCHANTILLONS	7

Directives générales pour la préparation des échantillons d'ARN

Considérations générales

Contactez libprepservices@genomequebec.com pour toute question technique.

Les échantillons biologiques qui sont destinés à être soumis à la définition du profil d'ARN (c'est-à-dire transcriptomique ou RNA-Seq), il est recommandé de:

- Porter des gants neufs et garder les échantillons sur la glace.
- Resuspendre les échantillons dans de l'eau commerciale sans RNase.
- Éviter l'eau traitée au DEPC.
- Éviter de resuspendre l'ARN dans des solutions contenant des détergents (ex. SDS) puisque ceux-ci peuvent nuire aux réactions enzymatiques. Si le Trizol est utilisé pour extraire les échantillons d'ARN, il est recommandé de procéder à un nettoyage final (ex. avec le kit de nettoyage Qiagen mRNA) avant la soumission.

Les échantillons doivent être acheminés dans des tubes Eppendorf 1,5 ml.

L'identification des échantillons sur les tubes doit correspondre exactement avec ce qui est écrit dans le formulaire de demande de service.

Quantité d'échantillons d'ARN à fournir

L'ARN total est utilisé comme matériel de départ pour les protocoles.

Un volume de 2-4 µL est d'abord utilisé pour le contrôle de qualité (QC) d'ARN.

Le QC est fait sur l'ARN total et ce, même pour les échantillons destinés à des bibliothèques de petits transcrits. Par conséquent, la plateforme ne peut garantir de pouvoir générer des bibliothèques de petits transcrits.

Il est préférable de diluer des échantillons concentrés (ex. 1 µg/µL à 100 ng/µL) et de fournir le volume minimal requis plutôt que de soumettre des échantillons concentrés mais en trop petit volume.

Tableau 1. Sommaire des conditions à remplir pour la soumission d'échantillons d'ARN

Application	Quantité minimale (ng)	Concentration minimale (ng/µL)	Volume minimal (µL)	RIN*
Expression génique eucaryotes (mRNA stranded)	500	30	15	>6.5
Expression génique procaryotes (déplétion rRNA bactériens)	750	50	15	>6.5
Méta-transcriptomique (plusieurs espèces)	1000	63	25	>6.5
Profilage transcrits codants et longs transcrits non codants > 200 nt (déplétion rRNA)	500	63	12	>6.5
Profilage petits ARNs (<200 nt)**	1600	160	10	>6.5
QC seulement		5	5	

*RIN = RNA Integrity Number, un RIN plus bas constitue un indicateur que les séquences pourraient être limitées à la région 3' des gènes.

**Le protocole permet la ligation d'adapteurs sur des molécules ayant les mêmes extrémités 5' et 3' que les miRNA matures. La présence/absence de d'autres types de petits transcrits dans la bibliothèque est difficile à prévoir.

Les échantillons de remplacement doivent avoir la quantité totale requise. Les remplacements partiels (« top-ups ») seront refusés.

Des frais supplémentaires de QC s'appliqueront à chaque échantillon de remplacement.

Demande de service et soumission des échantillons

Notez que le travail dans le laboratoire ne débutera qu'une fois toute la documentation fournie.

Création d'un formulaire de demande de service

Ouvrir une session dans le compte [Nanuq](#).

Cliquer sur « [ajouter une nouvelle requête](#) » dans la section « Requête » et suivre les instructions.

Ne pas utiliser le bouton « retour » de votre navigateur pour revenir en arrière. Utiliser les choix de pages à gauche.

La requête demeure un brouillon jusqu'à ce qu'elle soit soumise. Les brouillons sont accessibles via l'option « [liste des requêtes](#) ». Vous devez cliquer sur Soumettre pour que votre requête soit approuvée par le bureau de gestion client. Les requêtes non soumises ne sont pas traitées ou peuvent voir leurs délais allongés.

Formulaire de soumission des échantillons

Ouvrir une session dans le compte [Nanuq](#).

Cliquer sur « [liste des requêtes](#) » dans la section « Requête » et choisir la bonne requête.

Pour soumettre de nouveaux échantillons, aller à la section « soumission d'échantillons » et cliquer sur le bouton « + Ajouter des nouveaux échantillons ADN/ARN/Cellule ».

Dans la Catégorie d'échantillons : choisir « ARN ». Si les échantillons doivent être extraits chez Génome Québec, choisir « oui » à la question : est-ce que vos échantillons ont besoin d'extraction. Si les échantillons sont extraits par le client, choisir « non ».

Remplir le reste du questionnaire et le tableau de soumission des échantillons. Cliquer sur «soumettre».

Pour revisiter des fichiers déjà remplis et soumis, cliquer sur le nom du formulaire déjà soumis.

Ne pas ajouter de nouveaux échantillons à un tableau déjà soumis. Recommencer à l'étape « +Ajouter de nouveaux échantillons ADN/ARN/Cellule.

Ne pas se servir du bouton « retour » de votre navigateur pour revenir en arrière.

Veillez noter que les échantillons seront entrés dans notre base de données et traités dans le même ordre que celui indiqué dans le formulaire de soumission d'échantillons. Ainsi, il est de votre responsabilité de disposer les échantillons de manière à minimiser la variabilité technique engendrée par le séquençage en randomisant les échantillons selon le groupe expérimental auquel ils appartiennent.

Par ailleurs, il n'est pas garanti que des demandes particulières quant au mélange des bibliothèques pour le séquençage soient honorées et ce, afin de maximiser la capacité sur les instruments. La plateforme se réserve le droit de modifier les schémas de multiplexage sans en aviser l'utilisateur. Les demandes particulières doivent être indiquées dans la colonne des commentaires du formulaire de soumission des échantillons.

Préparation des échantillons

Les envois doivent inclure une copie du bordereau.

Les échantillons d'ARN doivent être envoyés sur glace sèche.

Les tubes (ARN) doivent être ordonnés dans une boîte si la soumission comprend plus de 24 tubes. Si l'envoi contient des objets lourds qui peuvent endommager les tubes durant le transport (ex. bloc de glace sèche, ice pack), il est recommandé de les protéger contre les impacts. Pour les projets de moins de 24 échantillons, les tubes (ARN) peuvent être scellés dans un sac de type Ziploc.

Un envoi doit contenir suffisamment de glace sèche pour que les échantillons demeurent congelés jusqu'à destination sans quoi, la qualité peut être compromise.

Les échantillons devant traverser la frontière canadienne devraient être envoyés en début de semaine afin d'éviter tout risque que ceux-ci soit retardés et conservés à l'entrepôt du transporteur durant la fin de semaine. L'utilisation de phrases claires telles que: "*Non-biohazardous biological sample*", "*Purified RNA from [species]*", "*For research use only*", et "*Of no commercial value*" aidera à accélérer le dédouanement.

Les échantillons peuvent être apportés directement au Centre, mais ces envois doivent être coordonnés avec le personnel autorisé avant la livraison. Les heures d'ouvertures pour le dépôt d'échantillons sont de 8h00 à 12h00 et 13h00-16h00 du lundi au jeudi et de 13h00-16h00 le vendredi.

N'envoyez que des aliquots de vos échantillons. Ceux-ci seront conservés pendant environ 3 mois après la complétion du service. Ils seront détruits par la suite à moins que la réponse « Oui » à la question « Désirez-vous que vos échantillons et vos oligos originaux vous soient retournés? » dans le champs « Destruction des échantillons originaux » de l'onglet « Information sur échantillons » du formulaire de requête ait été choisie.

Adresses pour l'envoi des échantillons

L'adresse de livraison ainsi que des directives concernant l'acheminement de vos échantillons se trouvent sur le bordereau d'expédition.