



SERVICES DE SÉQUENÇAGE

Guide de l'utilisateur

Préparation de bibliothèques d'amplicons

Technologie Illumina

Version 06

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES.....	2
INFORMATIONS GÉNÉRALES	3
PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS	3
MATÉRIEL DE DÉPART	3
DISPOSITION DES ÉCHANTILLONS	3
PLAQUES ET FILMS ADHÉSIFS	3
REQUIS	4
REQUÊTE DE SERVICE ET SOUMISSION DES ÉCHANTILLONS.....	5
REQUÊTE DE SERVICE	5
SOUMISSION D'ÉCHANTILLONS	5
PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR ENVOI.....	6
BORDEREAU D'EXPÉDITION	6
PRÉPARATION DU COLIS	6
ENVOI DES ÉCHANTILLONS	6
POUR PLUS D'INFORMATION.....	7
BUREAU DE GESTION DES CLIENTS	7

Informations générales

Ce document décrit la procédure à suivre lors d'une demande de service de séquençage haut débit (technologies Illumina) nécessitant la préparation de librairie d'amplicons (PCR multiplex Juno™, 16S, ITS, 18S, etc.) ou uniquement l'indexation d'amplicons (produits PCR fournis par le client).

Afin d'éviter tout délai dans le traitement de la requête, les instructions du présent guide doivent être suivies attentivement.

Noter que les délais d'exécution peuvent varier selon l'ampleur du projet. Il est recommandé de s'informer des délais de traitement auprès du [Bureau de gestion des clients](#).

Préparation des échantillons

Matériel de départ

- Le matériel de départ pour la préparation de librairie d'amplicons est de l'ADN génomique (ADNg).
- Le matériel de départ pour l'indexation d'amplicons est un produit de PCR non-purifié.

Les échantillons doivent être de la plus grande qualité et pureté possible. Resuspendre l'ADN dans l'eau pure ou dans 10 mM Tris-HCl pH 7.5-8.5 (sans EDTA car sa présence peut inhiber certaines réactions enzymatiques). Ne pas resuspendre l'ADN dans des tampons contenant des détergents (ex. : SDS) ou autres additifs qui pourraient inhiber des réactions enzymatiques lors de la préparation de la librairie.

Disposition des échantillons

- Les échantillons doivent être envoyés en plaques 96 puits, peu importe le nombre.
- Chaque plaque doit contenir uniquement les échantillons appartenant à un seul projet.
- Disposer les échantillons dans la plaque dans le même ordre que la soumission.

Plaques et films adhésifs

Plaque 96 puits recommandés

Les procédures ont été optimisées afin de traiter un haut débit d'échantillons. Tout autre format de plaques pourrait endommager les robots manipulateurs de liquide utilisés pendant les procédures ainsi que d'augmenter les délais. Par conséquent, les échantillons soumis dans des plaques ne se conformant pas aux exigences seront transférées dans une plaque acceptable. Des frais seront facturés à l'utilisateur.

Les plaques PCR doivent être à jupe pleine (*full-skirt*).

Cinq types de plaques sont acceptés:

- Eppendorf twin.tec, Cat# 951020401
- Corning Thermowell GOLD, Cat# 3752
- Axygen 96-well PCR Microplate, Cat# PCR96FSC
- BioRad Hard-Shell 96-Well PCR Plates, skirted, Cat# HSP9601
- 96 well 0.2mL Skirted PCR plate - Grey ultra rigid frame, Cat# IST-601-096GCT

Plaque 96 puits non acceptés

- Plaque à 96 puits pour culture cellulaire
- Plaque PCR à 96 puits sans jupe (*no-skirt*)
- Plaque PCR à 96 puits demi-jupé (*half-skirt*)

Films adhésifs recommandés

- Film adhésif clair
Adhesive PCR Films; Thermo Fisher Scientific, Cat#AB-0558
- Film adhésif en aluminium
Aluminum Foils for PCR and Cold Storage; VWR, Cat# 60941-074

Requis

Volume et concentration des échantillons

Pour les échantillons d'ADNg destinés à une préparation de bibliothèques d'amplicons (16S, ITS, 18S, etc) il est important de fournir une quantité suffisante de bonne qualité afin de pouvoir effectuer le projet en entier, soit 10 µL à analyser par fragment. Aucune valeur de concentration n'est nécessaire.

Pour les échantillons de produits de PCR non-purifié destinés à l'indexation d'amplicons, un volume entre 20 et 25 µL doit être envoyé pour chaque échantillon. Aucune valeur de concentration n'est nécessaire. Aucune purification n'est nécessaire. Si le volume minimal d'échantillon n'est pas respecté, un diluant sera ajouté pour atteindre le volume requis sans aucun préavis.

Pour les échantillons nécessitant des PCR multiplex Juno™ il est important de fournir une quantité minimale de 6 µL d'ADN génomique de bonne qualité afin de pouvoir effectuer le projet en entier. La concentration des échantillons d'ADN génomique doit être au moins à 25 ng/µL.

Identification

Toutes les plaques doivent être identifiées clairement et l'identification doit correspondre exactement à ce qui est indiqué dans la [Soumission d'échantillons](#) (champ : « *Plate Name* »).

L'identification doit être fait sur un coté de la plaque et non sur le scellant.

Requête de service et soumission des échantillons

Toute requête de service et soumission d'échantillon doivent se faire via l'interface web Nanug en utilisant un compte d'utilisateur. Pour obtenir un compte, contacter le [Bureau de gestion des clients](#).

Le travail dans le laboratoire ne débutera qu'une fois toute la documentation soumise. Une documentation incomplète occasionnera des délais d'attente.

Requête de service

1. Ouvrir une session dans [Nanug](#).
2. Cliquer sur « [Ajouter une nouvelle requête](#) » dans la section « Requêtes » et suivre les instructions.

L'option « nouvelle requête » ne doit pas être utilisée pour compléter une requête existante.

Ne pas utiliser le bouton « Retour » du navigateur pour revenir en arrière. Utiliser les choix de pages du menu de gauche pour naviguer dans le formulaire.

Cliquer sur « Suivant » pour passer à la page suivante de la requête.

En tout temps, il est possible de sauvegarder les informations en cliquant sur « Sauvegarder et continuer plus tard ». Les brouillons sont accessibles via l'option « [Ma liste de requêtes](#) » dans la section « Requêtes ». La requête demeure en brouillon jusqu'à ce qu'elle soit soumise. Pour modifier une requête ayant le statut de brouillon, cliquer sur « Modifier » dans le menu de gauche.

Pour demander le retour des échantillons à la fermeture du projet, l'indiquer sous l'onglet « Information sur les échantillons » et fournir les informations demandées.

3. Cliquer sur « Soumettre » pour que la requête soit approuvée par le [Bureau de gestion des clients](#). Les requêtes non soumises ne seront pas traitées.

Soumission d'échantillons

Une fois la requête de service complète et soumise, soumettre les échantillons.

1. Ouvrir une session dans [Nanug](#).
2. Le cas échéant, retrouver la requête via l'option « [Ma liste de requêtes](#) » et l'ouvrir.
3. Cliquer sur l'onglet « Soumission d'échantillons », puis sur « Ajouter de nouveaux échantillons ».
4. Suivre les instructions à l'écran.
 - Choisir « Séquençage de nouvelle génération » comme type de service, et ensuite la technologie requise.
 - Pour l'envoi de produits de PCR (indexation d'amplicons), choisir « Amplicon » comme Catégorie d'échantillons.

- Pour l'envoi d'ADN requérant des PCR de types 16S, 18S, ITS (ou autres), choisir « ADN métabarcoding » comme Catégorie d'échantillons.
 - Pour l'envoi d'ADN requérant des PCR multiplex (Juno – Fluidigm), choisir « ADN non-métabarcoding » comme Catégorie d'échantillons.
5. Vérifier que l'état de la soumission est à « Soumis » dans l'onglet « Soumission d'échantillons » dans la Requête de service.

Suivre les mêmes étapes pour ajouter de nouveaux échantillons à la requête ou pour envoyer des échantillons de remplacement.

Préparation des échantillons pour envoi

Bordereau d'expédition

À la suite de la soumission des échantillons, retourner dans l'onglet « Soumission d'échantillons », sélectionner la ou les soumission(s) d'échantillons reliée(s) à l'envoi à préparer, puis cliquer sur « Imprimer Bordereau ». Par défaut une seule copie est imprimée, cependant deux copies du bordereau d'expédition doivent être imprimées.

Préparation du colis

Les plaques doivent être correctement scellées et insérées dans un sac de plastique à fermeture à glissière (de type Ziploc).

Les plaques doivent être mis dans un contenant résistant au transport.

Si l'expédition est faite à partir du Canada pour un trajet de nuit ou pour le jour même et que les échantillons ne sont pas congelés, mettre suffisamment de blocs refroidissant pour garder le contenu au froid. Cependant, si les échantillons sont déjà congelés, envoyer le contenu sur suffisamment de glace sèche pour que les échantillons demeurent congelés jusqu'à destination et ainsi minimiser les cycles de gel-dégel.

Si l'expédition est faite à partir de l'extérieur du Canada, le colis doit contenir suffisamment de glace sèche pour que les échantillons demeurent congelés jusqu'à destination et ainsi minimiser les cycles de gel-dégel. Aussi le dégel pendant le transport peut causer une perte d'adhérence du scellant sur la plaque, si celle-ci est utilisée, ce qui peut mener à la perte d'échantillons ou en à une contamination croisée.

Si l'envoi contient des objets lourds qui peuvent endommager le contenu pendant le transport (ex. : blocs de glace sèche, bloc réfrigérant), il est recommandé de protéger les échantillons contre les impacts.

Une copie du bordereau doit accompagner les échantillons. S'assurer que la copie demeure au sec en la mettant dans un sac de plastique à fermeture à glissière (de type Ziploc).

Les échantillons devant traverser la frontière canadienne devraient être envoyés en début de semaine afin d'éviter tout risque que ceux-ci soient retardés et conservés à l'entrepôt du transporteur durant la fin de semaine. L'utilisation d'expressions claires telles que « échantillons biologiques non biohazards », « ADN purifié de [espèces] », « pour recherche seulement » et « aucune valeur commerciale » sur la facture commerciale aidera à accélérer le dédouanement.

Envoi des échantillons

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

Une copie du bordereau doit obligatoirement être en évidence à l'extérieur du colis. Elle peut être collée ou mise dans une enveloppe protectrice transparente.

Pour plus d'information

Bureau de gestion des clients

Téléphone : 514-398-7211

Courriel : infoservices@genomequebec.com