



SERVICES DE SÉQUENÇAGE

Guide de l'utilisateur

Librairies prêtes à être séquencées

Technologie Illumina

Version 09

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES.....	2
INFORMATIONS GÉNÉRALES	3
PRÉPARATION DES LIBRAIRIES	3
MATÉRIEL DE DÉPART	3
DISPOSITION DES LIBRAIRIES	4
PLAQUES ET FILMS ADHÉSIFS	4
REQUIS	5
REQUÊTE DE SERVICE ET SOUMISSION DES LIBRAIRIES	6
REQUÊTE DE SERVICE	6
SOUMISSION DE LIBRAIRIE.....	7
PRÉPARATION DES LIBRAIRIES POUR ENVOI	8
BORDEREAU D'EXPÉDITION.....	8
PRÉPARATION DU COLIS	8
ENVOI DES LIBRAIRIES.....	9
POUR PLUS D'INFORMATION.....	9
BUREAU DE GESTION DES CLIENTS	9
INFORMATIONS ADDITIONNELLES.....	10

Informations générales

Ce document décrit la procédure à suivre lors d'une demande de service de séquençage de librairie avec la technologie Illumina. Les instructions détaillées pour la préparation, la soumission des librairies, les exigences d'envoi ainsi que des informations additionnelles sont fournies dans ce guide.

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

Toutes les librairies qui ne se conforment pas à ces recommandations pourraient être refusées sans compensation.

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](#).

Les directives décrites dans ce guide s'appliquent également aux projets de contrôle qualité de librairies.

Le logiciel d'Illumina qui identifie les regroupements de fragments d'ADN et effectue l'assignement des bases est dépendant de la complexité des séquences, principalement des premières douze bases qui sont séquencées de chaque côté du fragment.

Pour cette raison, tout type de librairie qui ne contient pas une distribution de bases aléatoire dite complexe doit être clairement identifié sans quoi les données de séquençage pourraient être sous-optimales. Ces types de librairie incluent notamment :

- Amplicons (PCR)
- Librairies BD Rhapsody Single-Cell libraries
- Librairies RAD (restriction site-associated DNA)
- Librairies avec complexité réduite telles que les librairies converties par le bisulfite.

Pour compenser la faible complexité, une librairie contrôle, tel que le phiX174 fournie par Illumina, pourrait être ajoutée jusqu'à un niveau de 10 à 50% dépendant de la complexité de la librairie initiale. L'ajout de phiX dans la ligne de séquençage peut réduire significativement le nombre de lectures générées pour les librairies d'intérêt.

Cette note s'applique également à la diversité des index lorsque des librairies sont multiplexées. Afin d'obtenir les meilleurs résultats, il est recommandé de combiner au moins trois (3) librairies indexées par ligne de séquençage.

Les résultats de séquençage seront fournis tels quels. Le Centre d'expertise et de services ne peut être tenu responsable de problèmes liés au design, à la qualité ou à la complexité de séquence des librairies.

Préparation des librairies

Matériel de départ

Le matériel de départ est une librairie ou un pool de librairies.

Les amorces de séquençage personnalisées (si requises) doivent être envoyées dans des tubes 1.5 mL. Pour des informations supplémentaires sur les séquences personnalisables et l'utilisation d'amorces de séquençage personnalisées, consulter la section [Informations additionnelles](#).

Les tubes doivent être correctement identifiés:

- Nom de l'investigateur principal et nom distinct de l'amorce
- Concentration de l'amorce
- Utilisation au séquençage (*Read 1*, *Read 2*, *Index 1* ou *Index 2*)

La concentration des amorces doit être de **100 µM**.

Il n'est pas possible d'utiliser des amorces personnalisées sur le NextSeq 2000.

Tableau 1 - Résumé des besoins en amorces personnalisées

Type de séquençage	Volume d'amorce personnalisée à 100 µM nécessaire par ligne de séquençage (µL)			
	Read 1	Index 1	Index 2	Read 2
MiSeq	≥ 5 µL	≥ 5 µL	N/A	≥ 5 µL
NovaSeq	≥ 30 µL	≥ 30 µL	≥ 30 µL	≥ 30 µL
NextSeq	N/A	N/A	N/A	N/A

Disposition des bibliothèques

Les bibliothèques doivent être envoyées en plaques 96 puits, peu importe le nombre.

Chaque plaque doit contenir uniquement les bibliothèques appartenant à un seul projet.

Chaque puits doit contenir seulement une bibliothèque individuelle ou un pool.

Plaques et films adhésifs

Plaques 96 puits recommandées

Les procédures ont été optimisées afin de traiter un haut débit de bibliothèques. Tout autre format de plaques pourrait endommager les robots manipulateurs de liquide utilisés pendant les procédures. Par conséquent, les bibliothèques soumises 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 des plaques à jupe pleine.

Cinq types de plaques sont acceptés:

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

Plaques 96 puits non acceptées

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

Films adhésifs recommandés

- Film adhésif clair
Life Technologies MicroAmp® Clear Adhesive Film, Cat# 4306311
- Film adhésif en aluminium
VWR Aluminum Foils for PCR and Cold Storage, Cat# 60941-074

Requis

Volume et concentration des librairies

Les librairies doivent être diluées dans du tampon Tris-HCl (10 mM) ou de l'eau ultrapure sans nucléase. Les librairies ne doivent pas contenir d'agents chélatants (ex. EDTA) ou la concentration doit être réduite à 0.1mM.

La concentration et le volume de chaque librairie à soumettre sont dépendants du type de séquençage, voir Tableau 2.

Tableau 2 – Requis de concentration en nM et volume en μL à soumettre selon le type de séquençage

Type de séquençage	Concentration requise (nM)	Volume requis (μL)
NovaSeq	≥ 3 nM	≥ 25 μL
NextSeq	≥ 2 nM	≥ 25 μL
MiSeq	≥ 2 nM	≥ 25 μL
QC seulement	NA	≥ 25 μL

* librairie: librairie individuelle ou pool (correspond à 1 puits de la soumission d'échantillons)

Mesurer la concentration des librairies en utilisant une méthode de quantification par qPCR pour ainsi s'assurer de la présence des adaptateurs nécessaires au séquençage. Les méthodes de quantification par absorbance aux UV, par exemple la méthode utilisant le Nanodrop, ou par dosage fluorimétrique de l'ADN double brin, par exemple la méthode utilisant le PicoGreen, ne permettent pas de quantifier les molécules productives lors du séquençage (séquences P5 et P7).

La concentration des librairies ne doit pas être supérieure à 60 ng/ μL ou 120 nM. Les librairies trop concentrées devront être diluées et le contrôle de qualité (QC) sera repris. Des délais et frais supplémentaires de QC peuvent s'appliquer.

Si le volume minimal de librairie n'est pas respecté, un diluant sera ajouté pour atteindre le volume requis sans aucun préavis.

Tout volume excédant 110 µL sera jeté sans préavis.

Envoyer que des aliquotes des librairies. Les librairies ne seront pas retournées et elles seront jetées 3 mois après la complétion du projet, sans préavis.

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

Des frais supplémentaires de QC s'appliqueront pour chaque librairie de remplacement envoyée.

Identification

L'identification de chaque plaque doit correspondre exactement à ce qui est indiqué dans la [Soumission de librairies](#).

Requête de service et soumission des librairies

Toute requête de service et soumission de librairies doivent se faire via l'interface web Nanuq 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 [Nanuq](#).
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.

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 de librairie

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

1. Ouvrir une session dans [Nanuq](#).
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.

Voici des explications supplémentaires concernant le formulaire de soumission :

- **Colonne Pool/Lib seul.** : Choisir Lib seul. pour une librairie individuelle. Entrer les attributs pour cette librairie. Choisir Pool pour un pool de librairies dont les données doivent être démultiplexées par le CES. Dans ce cas, une nouvelle fenêtre apparaît où les attributs du pool sont définis. À la suite de l'entrée de données, une deuxième fenêtre apparaît permettant d'entrer les attributs de chaque librairie faisant partie du pool. Lorsque tous les attributs sont définis, la première ligne du formulaire de soumission définit les attributs du pool alors que les lignes subséquentes définissent chacune des librairies présente dans le pool. Une nouvelle librairie individuelle ou un nouveau pool peut être ajouté à la suite.
- **Nombre/Fraction d'unité de séquençage** : Fraction d'une ligne qui doit être attribuée à la librairie ou au pool. Par exemple, si 4 librairies sont à séquencer sur la même ligne, la fraction associée à chaque librairie est de 0,25.

Ce champ est rempli automatiquement avec les informations de la section Informations Générales remplies plus haut. Les valeurs sont éditables pour ajuster les proportions et les nombres de lectures requises pour chacune des librairies.

- **Adaptateur** : choisir l'adaptateur de séquençage qui a été utilisé pour la préparation des librairies. Le menu déroulant contient plusieurs adaptateurs qui portent le nom de trousse de préparation de librairies. Consulter la section [Informations additionnelles](#) pour plus de détails sur les adaptateurs et les index.
- **Nom index-séquence 1** : index i7 ajouté au fragment d'ADN d'intérêt lors de la préparation des librairies (voir section [Informations additionnelles](#)).

Il s'agit d'un champ à complétion automatique. Lorsque quelques caractères sont inscrits dans le champ, Nanuq propose une liste de choix contenant ces caractères.

Vous pouvez entrer le nom ou la séquence de l'index.

Le choix d'index du menu est déterminé en fonction de l'adaptateur choisi. Si les index des librairies ne se trouvent pas dans liste, les chances sont que le mauvais adaptateur ait été sélectionné. Faire une autre sélection d'adaptateur afin de trouver les noms des index à soumettre.

- **Nom index-séquence 2** : index i5 ajouté au fragment d'ADN d'intérêt lors de la préparation des librairies. Voir **Nom index-séquence 1** pour plus d'explications.

Contactez le [Bureau de gestion des clients](#) pour toute question qui persiste quant à l'entrée des informations dans le formulaire de soumission, en particulier, ce qui concerne les adaptateurs, les index et si des index personnalisés ont été utilisés pour la construction des librairies.

S'assurer que la concentration et le volume correspondent aux requis spécifiés dans le Tableau 2.

Le volume inscrit doit correspondre exactement au volume physique dans la plaque.

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 nouvelles librairies à la requête ou pour envoyer des échantillons de remplacement.

En raison du nombre élevé de librairies traitées par l'unité de service, il n'est pas garanti que des demandes particulières quant au mélange des librairies pour le séquençage soient honorées et ce, afin de maximiser la capacité sur les instruments.

L'unité de service 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 lors de la soumission des librairies.

Pour ajouter des commentaires à des librairies, cliquer sur le nom du formulaire de soumission déjà soumis puis sur le bouton « Commenter ».

Préparation des librairies pour envoi

Bordereau d'expédition

À la suite de la soumission des librairies, 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 de librairies doivent être envoyées sur glace sèche. 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 le protéger contre les impacts.

Le colis doit contenir suffisamment de glace sèche pour que les librairies demeurent congelées jusqu'à destination. Le dégel pendant le transport peut causer une perte d'adhérence du scellant sur la plaque, ce qui peut mener à la perte de librairie ou en à une contamination croisée.

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

Les librairies 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 librairies

L'adresse de livraison ainsi que des directives concernant l'acheminement des librairies 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

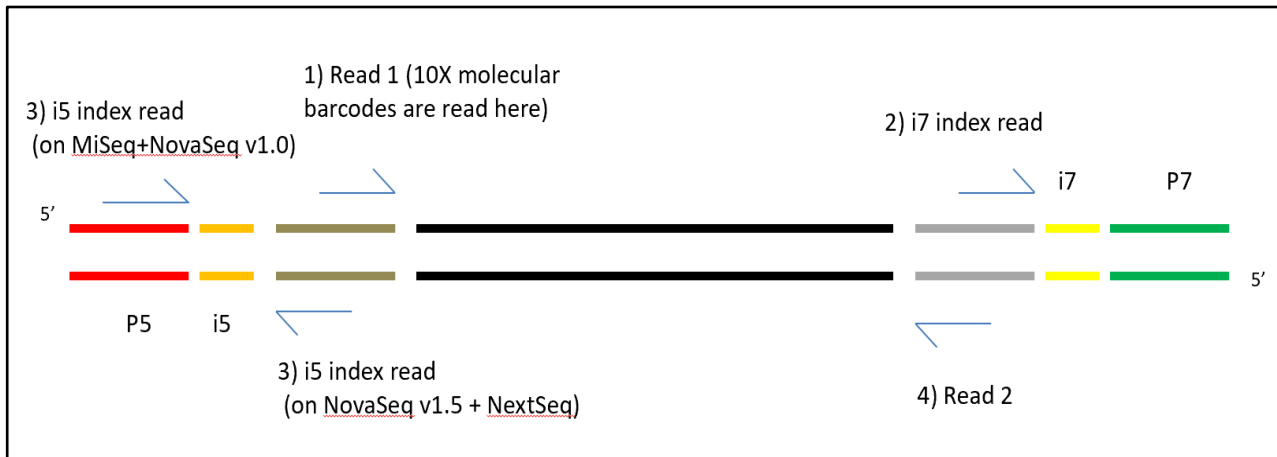
Téléphone : 514-398-7211

Courriel : infoservices@genomequebec.com

Informations additionnelles

La préparation de bibliothèques pour séquençage Illumina peut être effectuée en utilisant des trousseaux commerciaux. Il est possible d'utiliser un protocole adapté avec des séquences d'amorces personnalisables.

Figure 1 - Construction d'une bibliothèque pour séquençage avec la technologie Illumina



Les adaptateurs de la bibliothèque sont des séquences de 58-64 bases situées aux 2 extrémités de l'insert et qui contiennent :

- Séquences permettant l'attachement de la bibliothèque à la flowcell (P5 forward et P7 reverse); en rouge et vert, respectivement
- Amorces de séquençage; en brun et gris
- Séquence(s) d'index (i5 et i7), en orange et jaune, respectivement

Adaptateurs de la flowcell : deux oligonucléotides dont les séquences sont de 24 et 25 bases, attachés à la surface de la *flowcell* et dont les séquences complémentaires font partie de l'adaptateur de la bibliothèque.

Amorces de séquençage : séquences de 30-35 bases qui permettent le séquençage des *reads* 1 et 2 et aussi des index 1 et 2. Ces séquences peuvent être standards (présentes dans les réactifs Illumina) ou personnalisées (les amorces personnalisées doivent être fournies à la soumission de bibliothèques prêtes-à-séquencer).

Il n'est pas possible d'utiliser d'amorces de séquençage personnalisées pour la lecture de l'Index 2 (i5) en séquençage MiSeq puisque l'amorce P5 greffée à la surface de la *flowcell* est utilisée.

Index : séquence, généralement de 6-10 bases, qui permet de distinguer les lectures (*read*) d'une même ligne (*lane*) et de les assigner au bon échantillon.

L'index 1, i7 (ou *reverse*), situé sur l'adaptateur P7, est lu en premier et est l'unique index des adaptateurs *single index*. L'index 2, i5 (ou *forward*), situé sur l'adaptateur P5, est lu en second et est utilisé seulement pour les adaptateurs dual-index. Les deux index sont séquencés séparément de la lecture de l'insert.

L'index doit être distingué du barcode in-line, qui n'est pas situé dans l'adaptateur mais dans le *read* 1 ou 2, et de l'index moléculaire (*unique molecular index* ou *molecular barcode*). Ceux-ci ne peuvent être utilisés pour discriminer les lectures avec les outils Illumina (et intégrés dans Nanuq).

Index moléculaires (UMI : *unique molecular index* ou *molecular barcode*) : séquence, généralement de 10-18 bases, qui est ajoutée au fragment d'ADN à la ligation et qui permet de distinguer chaque fragment d'ADN indépendant d'un échantillon (permet de discriminer les duplicats PCR). Celui-ci peut être retrouvé tout juste après l'index 1, à la place de l'index 2 ou au début du *read* 1.

Tableau 3 - Séquences des adaptateurs et amorces nécessaires pour le séquençage Illumina

	Adapteur P5	index i5 (6, 8 ou 10 bases)	Amorce de séquençage du Read 1 (Séquence personnalisable, des amorces de séquençage personnalisées doivent être fournies)
Dual index			
Nextera	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC	NNNNNNNN	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACA
TruSeq HT		NNNNNNNN	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT
Single index			
TruSeq LT	AATGATACGGCGACCACCGAGATCT		ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT
TruSeq Small RNA			ACACGTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATC
NEB Small RNA			ACACGTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATC

	Adapteur P7	index i7 (6, 8 ou 10 bases)	Amorce de séquençage du Read 2 (Séquence personnalisable, des amorces de séquençage personnalisées doivent être fournies)
Dual index			
Nextera	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	NNNNNNNN	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA
TruSeq HT		NNNNNNNN	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT
Single index			
TruSeq LT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	NNNNNN	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT
TruSeq Small RNA		NNNNNN	GTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
NEB Small RNA		NNNNNN	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT