

2020

# Guide de l'utilisateur plateforme de génomique



# Table des matières

<b><u>Préparation des échantillons</u></b> .....	<b>2</b>
1. Extraction des acides nucléiques .....	2
2. Quantification et analyse de la pureté des acides nucléiques .....	2
3. Bioanalyzer 2100 d'Agilent .....	2
<b><u>Préparation des librairies</u></b> .....	<b>3</b>
1. Librairies d'amplicons (16S, ITS, etc.) .....	3
2. Librairies - <i>barcoding</i> d'amplicons .....	5
3. Librairies d'ADN de type <i>shotgun</i> .....	6
4. Librairies d'ARN .....	7
<b><u>Librairies prêtes au séquençage</u></b> .....	<b>8</b>
<b><u>Génotypage de souris</u></b> .....	<b>9</b>
<b><u>Envoi des échantillons</u></b> .....	<b>10</b>
1. Adresse de la plateforme de génomique .....	10
2. Directives et recommandations pour l'envoi des échantillons .....	11

# Préparation des échantillons

## 1. Extraction des acides nucléiques

La plateforme de génomique travaille continuellement sur l'élaboration de nouveaux protocoles d'extraction des acides nucléiques.

Pour tous projets impliquant l'extraction d'ADN ou d'ARN, veuillez communiquer directement avec nous : [genomique.cermofc@courrier.ugam.ca](mailto:genomique.cermofc@courrier.ugam.ca)

Les échantillons soumis doivent être exempts de pathogènes pour l'humain.

## 2. Quantification et analyse de la pureté des acides nucléiques

Un service de quantification d'ADN et d'ARN est disponible.

**Appareil** : fluorimètre **Qubit** d'Invitrogen.

Le volume de l'échantillon nécessaire pour la quantification peut varier entre : 1-20 ul. Fournir un minimum de 2 ul.

**Appareil** : **NanoDrop One**, ThermoFisher

La pureté des acides nucléiques en solution peut être évaluée via le **NanoDrop One** en mesurant les rapports des densités optiques obtenues : 260/280 et 260/230.

Le volume minimum à fournir d'un échantillon pour vérifier sa pureté est de 1 ul.

## 3. Bioanalyzer 2100 d'Agilent

Le bioanalyzer permet de faire un contrôle de qualité des échantillons d'ADN ou d'ARN et est approprié dans les protocoles de séquençage de nouvelle génération. Cet instrument permet de :

- Mesurer la concentration de l'ARN ou ADN
- Visualiser le profil de migration de l'ADN ou de l'ARN
- Vérifier l'intégrité de l'ARN (RIN)

































































































Il est possible de traiter de 11 à 12 échantillons par puce (selon le type de puce utilisée). Fournir un minimum de 1 ul par échantillon.

# Préparation des librairies

## 1. Librairies d'amplicons (16S, ITS, ...)

Le service de préparation de librairies d'amplicons inclut les PCR, la préparation de la librairie et le séquençage Miseq (kit V3, 600 cycles). Les amplicons seront multiplexés (jusqu'à 384 échantillons par Miseq, incluant les contrôles positif et négatif). Si vous désirez une profondeur de séquençage plus élevée (moins d'échantillons par Miseq) veuillez nous contacter avant de soumettre vos échantillons, des frais supplémentaires peuvent être appliqués : [genomique.cermofc@courrier.uqam.ca](mailto:genomique.cermofc@courrier.uqam.ca).

Pour la préparation de librairies d'amplicons, vous devez remplir un formulaire de soumission des échantillons. Les échantillons doivent être soumis en plaque de 96 puits (disposition en colonnes) :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Les deux derniers puits (G12 et H12) doivent être laissés vides pour les contrôles positif et négatif. Mettre un bon scellant qui résistera au transport et empêchera le mélange et la fuite des échantillons entre les puits.

La plateforme fournit les amorces pour l'amplification 16S et ITS (voir plus bas les paires d'amorces disponibles). Il est aussi possible de commander des amorces personnalisées (frais supplémentaires applicables) si celles-ci ne figurent pas sur la liste.

Tableau 1 : Liste des amorces disponibles pour l'amplification des régions 16S et ITS.

Région	Amorce sens : séquence 5'→3'		Amorce anti-sens : séquence 5'→3'	
V5-V6 (Cyano-excluding)	799F	AACMGGATTAGATACCKG	1115R	AGGGTTGCGCTCGTTG
V4-V5* (Bacteria+Archaea)	515F	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA ( <a href="#">Parada et al. 2015</a> )	926R	CCGYCAATTYMTTTRAGTTT
ITS1	ITS1F	CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA	ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC

\* Noter que les amorces V4-V5 amplifient aussi le 18S. Cette paire d'amorces n'est donc pas recommandée pour les échantillons contenant une contamination substantielle avec de l'ADN de l'hôte. [Parada et al. 2015](#)

Voir le tableau ci-dessous pour les spécifications requises pour la soumission des échantillons.

Tableau 2 : Liste des spécifications requises des échantillons soumis pour la production de bibliothèques d'amplicons.

Volume (ul)	Concentration (ng/ul)	Ratio 260/280	Ratio 260/230	Autre(s)
≥ 10	≥ 1	n/a	n/a	Exempt d'inhibiteurs de PCR

Les échantillons non conformes seront acceptés, mais peuvent entraîner un délai et/ou des frais supplémentaires (ex. optimisation des protocoles, quantification des échantillons, purification des échantillons, etc.). Un test de qualité sera effectué sur les échantillons. Vous serez contacté en cas de problème.

Remplir le formulaire de soumission des échantillons et le faire parvenir avec vos échantillons et par courriel à l'adresse suivante : [genomique.cermofc@courrier.uqam.ca](mailto:genomique.cermofc@courrier.uqam.ca)

## 2. Librairies – *barcoding* d'amplicons

Le service de *barcoding* permet le séquençage simultané d'un grand nombre d'échantillons (jusqu'à 384) sur un Miseq. Le multiplexage d'échantillons peut être utile lorsque l'on cible plusieurs régions spécifiques du génome. Des *barcodes* individuels sont ajoutés à chaque échantillon par PCR durant la préparation de la librairie pour le séquençage de nouvelle génération (NGS). Les *barcodes* sont ensuite utilisés pour démultiplexer ou différencier les *reads* de chacun des échantillons.

Vous devez alors nous fournir des amplicons contenant les adaptateurs Nextera d'Illumina afin que nous puissions faire l'étape du *barcoding*. Voici les adaptateurs à ajouter à vos amorces spécifiques :

<b>Adaptateur amorce sens (5'→3')</b>
---------------------------------------

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG
-----------------------------------

<b>Adaptateur amorce anti-sens (5'→3')</b>
--

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG
------------------------------------

Voir le tableau ci-dessous pour les spécifications requises pour la soumission des échantillons.

Tableau 3 : Liste des spécifications requises des échantillons soumis pour le service de *barcoding* d'amplicons.

Volume (ul)	Concentration (ng/ul)	Ratio 260/280	Ratio 260/230	Autre(s)
≥ 10	n/a	n/a	n/a	Photo de gel des amplicons soumis requise

Les amplicons fournis devront être exempts de produits d'amplification non spécifique et de dimère d'amorces. Les échantillons non conformes seront acceptés, mais peuvent entraîner un délai et/ou des frais supplémentaires (ex. optimisation des protocoles, purification des échantillons, etc.). Un test de qualité sera effectué sur les échantillons. Vous serez contacté en cas de problème.

Remplir le formulaire de soumission des échantillons et le faire parvenir avec vos échantillons et par courriel à l'adresse suivante : [genomique.cermofc@courrier.ugam.ca](mailto:genomique.cermofc@courrier.ugam.ca)

### **3. Librairies d'ADN de type *shotgun***

Les librairies d'ADN de type *shotgun* sont produites avec le kit *QIAseq FX DNA Library* de Qiagen. Ce kit permet une grande flexibilité quant à la quantité d'ADN requise pour la production de librairie. Il est possible d'obtenir des librairies d'ADN *shotgun* avec PCR avec aussi peu que 5 ng d'ADN (tableau 4) et des librairie d'ADN *shotgun* sans PCR avec aussi peu que 100 ng d'ADN (tableau 5).

Tableau 4 : Liste des spécifications requises des échantillons soumis pour la production de librairies d'ADN ***shotgun* avec PCR**

Quantité (ng)	Concentration (ng/ul)	Ratio 260/280	Ratio 260/230	Autre(s)
≥ 5	≥ 0.15	1.8-2.0	≥ 2.0	Tampon d'élution sans EDTA

Tableau 5 : Liste des spécifications requises des échantillons soumis pour la production de librairies d'ADN ***shotgun* sans PCR**

Quantité (ng)	Concentration (ng/ul)	Ratio 260/280	Ratio 260/230	Autre(s)
≥ 100	≥ 3.0	1.8-2.0	≥ 2.0	Tampon d'élution sans EDTA

Dans tous les cas voici les recommandations générales de la plateforme de génomique pour la soumission de vos échantillons d'ADN pour la production de librairie d'ADN de type *shotgun* :

- Fournir des échantillons d'ADN de haute qualité et exempts de protéines, de sels, de cations, d'agents chélatants ou d'autres contaminants.
- Quantifier votre ADN avec une méthode fluorométrique (ex. Qubit, Picogreen) plutôt qu'une méthode spectrophotométrique (ex. Nanodrop).
- Fournir 5 ul d'ADN supplémentaire pour permettre un contrôle de qualité sur les échantillons soumis.
- Ressuspendre l'ADN extrait dans un tampon exempt d'EDTA (ex. 10 mM Tris-HCl pH 8.0, tampon EB de Qiagen).

Les échantillons non conformes peuvent entraîner un délai et/ou des frais supplémentaires (ex. optimisation des protocoles, quantification des échantillons,

purification des échantillons, etc.). Un test de qualité sera effectué sur les échantillons. Vous serez contacté en cas de problème.

Remplir le formulaire de soumission des échantillons et le faire parvenir avec vos échantillons et par courriel à l'adresse suivante : [genomique.cermofc@courrier.ugam.ca](mailto:genomique.cermofc@courrier.ugam.ca)

## **4. Librairies d'ARN**

La plateforme de génomique travaille présentement sur l'élaboration de nouveaux protocoles pour la production de librairie d'ARN.

Il est possible de faire un enrichissement des ARNm ou une déplétion des ARNr avant la préparation des librairies. Les librairies produites sont compatibles avec n'importe quel séquenceur Illumina.

Pour des études de *profiling* nous pouvons produire des librairies 3' mRNA seq qui nécessitent moins de *reads*/échantillon qu'un RNA-seq régulier.

Pour tous projets impliquant la production de librairies d'ARN, veuillez communiquer directement avec nous : [genomique.cermofc@courrier.ugam.ca](mailto:genomique.cermofc@courrier.ugam.ca)



# Librairies prêtes au séquençage

La plateforme de génomique offre un service de séquençage Miseq pour des librairies produites par l'utilisateur. Un contrôle de qualité des librairies sera effectué avant le séquençage :

- Quantification par Qubit
- Quantification par qPCR
- Évaluation de la taille de la librairie sur bioanalyzer

Quelques informations sur les librairies prêtes à séquencer sont à fournir tel que :

- Type de séquençage (SR ou PE) et nombre de cycles
- Taille attendue de la librairie
- Complexité de la librairie (diversité des bases)
- Type de librairie (amplicons, conversion bisulfite, *shogun*, ...)
- Séquences des index (i5 et/ou i7)

Si des amorces de séquençage personnalisées sont nécessaires, l'utilisateur devra fournir un aliquot de ces amorces à la plateforme.

Prendre note que pour aider au balancement des bases de certains types de librairies (tel que les librairies d'amplicons), une librairie contrôle provenant d'Illumina (phiX) sera ajoutée, jusqu'à concurrence de 25%, pour compenser la faible diversité. Pour le séquençage de librairies diversifiées, du phiX sera ajouté (autour de 1%) à des fins de contrôle de qualité.

La plateforme de génomique ne peut être tenue responsable de problèmes liés au design expérimental, à la collision d'index, à la complexité et à la qualité des séquences obtenues.

Tableau 6 : Liste des spécifications requises pour les librairies prêtes au séquençage.

Volume (ul)	Concentration (ng/ul)
≥25	≥0.5

Remplir le formulaire de soumission des librairies prêtes au séquençage et le faire parvenir avec les échantillons et par courriel à l'adresse suivante : [genomique.cermofc@courrier.ugam.ca](mailto:genomique.cermofc@courrier.ugam.ca)

# Génotypage de souris

Le service de génotypage de souris inclut l'extraction de l'ADN, une PCR et la génération d'un rapport des résultats.

L'extraction de l'ADN se fait à partir d'une lyse avec du NaOH (méthode HotSHOT).

Référence : [BioTechniques 29:52-54 \(July 2000\)](#)

Les poinçons d'oreille de souris devront être envoyés dans une bande de tubes PCR (*strip tubes*) avec capuchons bien identifiés.

Remplir le formulaire de soumission des échantillons (génotypage) et le faire parvenir avec vos échantillons et par courriel à l'adresse suivante : [genomique.cermofc@courrier.ugam.ca](mailto:genomique.cermofc@courrier.ugam.ca)

# Envoi des échantillons

Le transport des échantillons se fait aux frais du demandeur. La plateforme de génomique du CERMO-FC n'est pas responsable des dommages ou pertes des échantillons occasionnés lors du transport.

## 1. Adresse de la plateforme de génomique

- Vous pouvez venir porter vos échantillons en personne à l'adresse suivante :

**Plateforme de génomique CERMO-FC**  
Pavillon des sciences biologiques UQAM SB-2130  
141 avenue du Président-Kennedy  
Montréal (Québec)  
H2X 1Y4

Il est conseillé d'annoncer votre visite au préalable afin de s'assurer la présence d'une personne pour la réception de vos échantillons.

- Vous pouvez faire livrer vos échantillons par un transporteur à l'adresse suivante :

**Plateforme de génomique CERMO-FC**  
Quai de réception PK, UQAM SB-2130  
2005 rue Jeanne-Mance  
Montréal (Québec)  
H2X 2J6

## **2. Directives et recommandations pour l'envoi des échantillons**

- L'utilisateur doit s'assurer que les tubes et/ou les plaques sont correctement scellés afin d'éviter l'évaporation et la contamination croisée entre les échantillons lors du transport.
- L'utilisateur doit s'assurer de bien identifier les tubes et/ou plaques contenant les échantillons et de joindre le formulaire de soumission des échantillons avec ceux-ci.
- Il est recommandé de n'envoyer qu'un aliquot des échantillons à analyser.
- Les échantillons d'ARN et les tissus doivent être impérativement envoyés sur glace sèche. La glace sèche est aussi recommandée pour l'envoi des échantillons d'ADN.

En cas de doute, veuillez communiquer avec la plateforme avant l'envoi de vos échantillons : [genomique.cermofc@courrier.uqam.ca](mailto:genomique.cermofc@courrier.uqam.ca)