



## SERVICES DE SÉQUENÇAGE

---

### Guide de l'utilisateur

# Technologie Pacific Biosciences

Version 7.0

# Table des matières

<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>2</b>
<b>INFORMATIONS GÉNÉRALES</b> .....	<b>3</b>
<b>PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS</b> .....	<b>3</b>
MATÉRIEL DE DÉPART .....	3
DISPOSITION DES ÉCHANTILLONS .....	6
TUBES .....	6
PLAQUES ET FILMS ADHÉSIFS .....	6
REQUIS .....	7
<b>REQUÊTE DE SERVICE ET SOUMISSION DES ÉCHANTILLONS</b> .....	<b>9</b>
REQUÊTE DE SERVICE .....	9
SOUMISSION D'ÉCHANTILLONS .....	10
<b>PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR ENVOI</b> .....	<b>10</b>
BORDEREAU D'EXPÉDITION .....	10
PRÉPARATION DU COLIS .....	10
ENVOI DES ÉCHANTILLONS .....	11
<b>POUR PLUS D'INFORMATION</b> .....	<b>11</b>
BUREAU DE GESTION DES CLIENTS .....	11
HISTORIQUE DES VERSIONS .....	11
<b>INFORMATIONS ADDITIONNELLES</b> .....	<b>12</b>
SÉQUENÇAGE AVEC LA TECHNOLOGIE SMRT DE PACIFIC BIOSCIENCES .....	12
DIRECTIVES POUR LES AMPLICONS AVEC CODES À BARRES .....	12

## Informations générales

Ce document décrit la procédure à suivre lors d'une demande de service de séquençage avec la technologie Pacific Biosciences (également appelée PacBio). Les instructions détaillées pour la préparation, la soumission des échantillons, 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.

L'ADN doit être de poids moléculaire élevé et de haute qualité. Une bande (pas de trainée) de fragments de 45-50 kb ou plus indique des échantillons d'ADN de haute taille, ce qui est souhaité pour la génération de librairies de taille d'insert longue.

Tout dommage à l'ADN génomique (présence de coupures sur un brin, de sites abasiques, de bases modifiées ou des liaisons intra-brins et/ou inter-brins), ainsi que la présence de contaminants d'extraction résiduels ou polysaccharides pourrait nuire au séquençage avec cette technologie. Aucun contrôle de qualité ne permet actuellement de détecter de tels phénomènes.

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

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 technologie Pacific Biosciences est de l'ADN ou de l'ARN.

Les échantillons ne doivent pas avoir été exposés à de hautes températures (ex. : >65 °C pour 1 heure peut entraîner une diminution détectable de la qualité de la séquence) et à des pH extrêmes (< 6 ou > 9).

Les échantillons ne doivent pas contenir de particules insolubles, d'agents chélateurs (ex. : EDTA), d'ions métalliques (ex. : Mg<sup>2+</sup>), d'agents dénaturants (ex. sels de guanidinium, phénol) ou de détergents (ex. : SDS, Triton-X100). La présence de détergents peut nuire aux réactions enzymatiques.

Les échantillons ne doivent pas contenir de contaminants provenant du tissu à partir duquel il a été extrait (hème, acide humique, polyphénols, polysaccharides, etc.).

#### ADN

L'ADN simple-brin n'est pas compatible avec le processus de préparation de librairies. Les échantillons d'ADN ne doivent pas contenir de trace d'ARN.

Noter que pour l'extraction d'ADNg microbien, il est recommandé d'éviter l'incubation dans des milieux complexes ou riches. De plus, la récolte de plusieurs cultures (réplicats) au début/milieu de la phase logarithmique de croissance est préférable.

L'utilisation de produits d'amplicon extraits sur gel peut entraîner une baisse des performances de séquençage en raison des dommages intrinsèquement causés par l'intercalation de colorants tels que le bromure d'éthidium et l'exposition aux rayons UV. Le séquençage des amplicons colorés avec des colorants *SYBR safe* n'a pas été testé et ne peut donc pas être recommandé. Si l'utilisation d'un produit d'amplicon extrait d'un gel qui a été coloré avec un colorant ne peut être évité, il est recommandé de le faire passer par des cycles d'amplification supplémentaires pour éliminer les dommages et/ou les colorants avant la préparation et le séquençage de la bibliothèque.

Consulter la [note technique](#) de Pacific Biosciences pour connaître les trousseaux d'extraction recommandés ainsi que les trucs et astuces pour une extraction efficace d'ADN de haut poids moléculaire.

Consulter la page [Circulomics](#) du site web de Pacific Biosciences pour des informations sur les kits d'extractions offerts.

Consulter le site [www.extractdnaforpacbio.com](http://www.extractdnaforpacbio.com) pour des méthodes alternatives d'extraction d'ADN.

Lors de l'extraction de l'ADN, suivre les recommandations suivantes :

- Il est préférable de faire l'extraction à partir de petits volumes à plusieurs reprises plutôt que de grands volumes afin d'éviter l'accumulation de fortes concentrations de composants secondaires potentiellement inhibants.
- Le phénol doit être frais (<3 mois post-ouverture) et non oxydé lorsque la méthode d'extraction au phénol-chloroforme est utilisée.
- Éviter l'utilisation de bromure d'éthidium et des rayons UV qui endommagent l'ADN.
- Éviter l'utilisation de vortex et d'embouts à pointe étroite qui fragmentent l'ADN. Préconiser les inversions de tubes, le tapotage ainsi que l'utilisations d'embouts à pointe large.
- Le séchage du culot des échantillons extraits doit se faire à l'air libre plutôt que par séchage thermique ou par un concentrateur à vide (speed-vac).
- Éluer l'ADN dans une solution neutre et tamponnée (ex. Tris 10 mM, pH 7.0-8.0). Ne pas éluer l'ADN dans l'eau ou des solutions non-tamponnées, car cela inhibe le séquençage ou ne permet pas la stabilisation de l'ADN à long terme.
- Laisser l'ADN se resuspendre dans le tampon à 25 °C durant la nuit.

Afin de réduire partiellement les impacts de la présence de contaminants/inhibiteurs potentiels, procéder à une purification de l'ADN avec les billes AMPure®. S'assurer qu'il n'y a pas de billes résiduelles avec les échantillons car celles-ci pourraient affecter le séquençage.

En cas de suspicion d'ADN fortement contaminé, purifier l'ADN avec :

- La trousse DNeasy PowerClean Pro Cleanup Kit ([Product Information](#)) en suivant les modifications suggérées ci-dessous. Attention de ne pas surcharger les colonnes. La récupération de l'ADN est faible (10-30%) à la suite à cette purification.
  - Après l'ajout de la Solution CU (étape 2), mélanger rapidement et ajouter la solution IR (étape 3). Minimiser le temps d'exposition à la Solution CU pour prévenir des dommages à l'ADN.
  - Au cours de la dernière étape d'élution (étape 13), éluer avec 10 µL de tampon et centrifuger pendant une seconde (*quick spin*) dans la microcentrifugeuse pour mouiller le filtre puis incubé pendant 1 minute à température ambiante. Ajouter le volume d'élution restant à la membrane et incubé pendant 15 minutes à température ambiante. Procéder ensuite comme indiqué dans le protocole.
- Le protocole de [nettoyage au phénol-chloroforme à haut sel](#) pour les échantillons de couleur inhabituelles ou en cas de contamination suspectée par des polysaccharides.

Entreposer l'ADN à 4°C pour du court terme (jusqu'à 4 semaines) et à -20 °C ou -80 °C pour du long terme (> de 4 semaines). Les échantillons ne doivent pas avoir subi plusieurs cycles de gel-dégel.

Soumettre des échantillons de la plus grande qualité et pureté possible. Le ratio de densité optique 260/280 doit être entre 1.8 et 2.0, tandis que le ratio 260/230 doit être égal ou supérieur à 2.0.

## ARN

Recommandations pour la manipulation des échantillons ARN :

- Porter des gants neufs et garder les échantillons sur la glace en tout temps.
- Resuspendre les échantillons dans de l'eau commerciale sans RNase.
- Éviter l'eau traitée au DEPC (diéthylpyrocarbonate).
- 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.
- Évitez le pipetage excessif et le vortex lorsque vous travaillez avec de l'ARN.
- Ne pas exposer les échantillons d'ARN à des colorants fluorescents intercalants ou à un rayonnement ultraviolet. Les colorants SYBR n'endommagent pas l'ARN, mais il faut éviter le bromure d'éthidium.

L'ARN lyophilisé n'est pas accepté.

Le ratio de densité optique 260/280 doit être ~2.0, tandis que le ratio 260/230 doit être égal ou supérieur à 2.0.

Les trousse d'extraction répertoriées dans le Tableau 1, n'ont pas été testées ou validées par PacBio mais sont répertoriées ici comme exemples de trousse de tierce partie utilisées par d'autres clients PacBio pour isoler l'ARN total pour la préparation de la librairie Iso-Seq SMRTbell.

Tableau 1 – Options de trousse d'extraction d'ARN pour la préparation de librairie Iso-Seq SMRTbell

Type de trousse	Nom du produit
isolement de l'ARNm	<a href="#">Ambion Poly(A) Purist MAG Kit</a>
Isolement de l'ARN total	<a href="#">Qiagen RNeasy Plus Kits</a>
Isolement de l'ARN total	<a href="#">Sigma Spectrum Plant Total RNA Kit</a>
Isolement de l'ARN total	<a href="#">iNtRON Easy Spin Total RNA</a>
Isolement de l'ARN total	Le réactif <a href="#">TRIzol</a> peut être utilisé pour isoler l'ARN total des tissus ou des cellules, y compris les échantillons difficiles et riches en lipides
Stabilisation et stockage de l'ARN	<a href="#">RNALater</a> est un réactif de stockage tissulaire aqueux et non toxique qui imprègne rapidement les tissus pour stabiliser et protéger l'ARN cellulaire

Toujours entreposer l'ARN à -80 °C, peu importe le temps de conservation.

## Disposition des échantillons

Pour un envoi de moins de 12 échantillons, mettre les échantillons en tubes 1.5 mL. Sinon, envoyer les échantillons en plaque.

## Tubes

### Tubes recommandés

- Tube de 1.5 mL  
Tout type de tube d'un volume de 1.5 mL avec le couvercle attaché (*snap cap*)  
Exemple: *DNA LoBind Tubes*, 1.5 mL, *PCR clean, colorless*; Eppendorf, Cat # 022431021

### Tubes non acceptés

- Tube de 0.5 mL

## Plaques et films adhésifs

Chaque plaque doit contenir que les échantillons appartenant à un seul projet. Les plaques doivent être correctement scellées.

## Plaque 96 puits recommandés

- Plaque PCR à demi-jupe  
Tout type de plaque PCR claire à 96 puits à demi-jupe (half-skirt 96-well PCR plate).  
Exemple: *Thermo-Fast 96 PCR detection plate with flat deck: Life Technologies, Cat # AB1400L*

## Plaque 96 puits non acceptés

- Plaque à 96 puits pour culture cellulaire
- Plaque PCR à 96 puits à jupe pleine (full-skirt)
- Plaque PCR à 96 puits sans jupe (*no-skirt*)
- Plaque PCR à 96 puits opaques

## Films adhésifs recommandés

- Film adhésif clair  
Life Technologies MicroAmp® Clear Adhesive Film, Cat# 4306311

## Requis

### Volume et concentration des échantillons

Des frais supplémentaires pour contrôle de qualité s'appliqueront à chaque échantillon de remplacement envoyé. La décision de procéder à la préparation de librairie et/ou au séquençage avec une quantité ou qualité sous-optimale d'échantillon vient avec l'acceptation par le client de tous les risques inhérents.

### ADN

La quantité et la concentration des échantillons à soumettre sont dépendants du type de librairie, voir le Tableau 2. Si nécessaire, diluer l'ADN dans une solution neutre et tamponnée (ex : Tris 10 mM, pH 7.0-8.0).

Tableau 2 - Quantités d'ADN requises pour la construction des librairies PacBio

Source d'acide nucléique	Type de librairie	Quantité	Volume (µL)
ADNg, amplicons	fragments courts	2 µg	30-60

ADNg	petits genomes (jusqu'à 100 Mb)	4 µg	40-120
ADNg	Fragments longs HiFi larges genomes (> 100 Mb)	6 µg	60-120
ADNc	Iso-Seq	160-500 ng*	30-50

\*Les échantillons avec des concentrations >40 ng/µL peuvent entraîner des données sous-optimales due à une suramplification de l'ADNc. Des bibliothèques optimales peuvent être obtenues en répétant la génération d'ADNc avec moins d'ARN de départ ou en diminuant le nombre de cycles de PCR.

Le volume minimal accepté par échantillon est de 30 µL. Tout volume inférieur sera dilué au volume requis. L'échantillon ne respectant pas ce requis pourrait être refusé.

Le volume maximal ne doit pas dépasser le volume indiqué dans le Tableau 2. Tout volume supérieur sera concentré au volume requis à l'aide d'une purification par billes AMPure XP. Noter qu'il y a des frais supplémentaires pour l'étape de concentration.

Le volume de chaque échantillon doit être indiqué dans le formulaire de [Soumission d'échantillons](#).

Un gel d'agarose standard peut donner une indication de l'intégrité de l'ADN mais ne permet pas une bonne séparation pour les fragments de hauts poids moléculaires (≥ 20KB).

Il est recommandé de vérifier la taille de l'ADN à l'aide d'une des méthodes suivantes, si possible :

- gel à champ pulsé (Pippin Pulse System ([Sage Science](#)))
- CHEF Mapper XA System ([Bio-Rad](#))
- [Femto Pulse](#) ou [Fragment Analyzer](#) System (Agilent)

Il est recommandé de quantifier l'ADN par une méthode de dosage fluorimétrique de l'ADN double brin, par exemple la méthode utilisant le PicoGreen ou le Qubit, et non par absorbance aux UV.

## ARN

Tableau 3 - Quantités d'ARN requises pour la construction des bibliothèques Iso-Seq PacBio

Application	Quantité minimale (ng)	Concentration minimale (ng/µL)	Volume minimal (µL)	RIN*
Iso-Seq standard	500	45	15	>7.0

\* RIN = RNA Integrity Number

Un RIN plus bas constitue un indicateur que les séquences pourraient être limitées à la région 3' des gènes.



Les échantillons avec un RIN <7.0 peuvent être traités, mais le risque de sous-performance significative ou même d'échec est considérablement augmenté.

La valeur RIN peut être diminuée avec la présence d'ARN chloroplastique ribosomal abondant même si l'ARN est intact.

## Identification

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

Toutes les plaques devraient être identifiées de façon claire, par exemple, avec le numéro de soumission, le nom du chercheur principal (PI) et la date d'envoi.

## Requête de service et soumission des échantillons

Toute requête de service et soumission d'échantillon 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.

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.
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

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

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

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.

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 ou ARN purifié de [espèces] », « pour recherche seulement » et « aucune valeur commerciale » sur la facture commerciale aidera à accélérer le dédouanement.

## ADN

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.

## ARN

Les échantillons d'ARN doivent être envoyés sur glace sèche. L'envoi doit contenir suffisamment de glace sèche pour que les échantillons demeurent congelés jusqu'à destination sans quoi, la qualité peut être compromise.

## **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](mailto:infoservices@genomequebec.com)

### **Historique des versions**

Version	Sommaire des changements	Rédigé par	Date d'entrée en vigueur (aaaa-mm-jj)
06	Identification du document et utilisation du gabarit Ajout des requis pour les librairies HiFi et IsoSeq Mise-à-jour des informations et spécification pour la préparation des échantillons ADN et ARN	G. Geneau	2022-06-03
07	Mise à jour Tableau 2 exigences - Quantités d'ADN et ajout note pour les amplicons extraits sur gel pour la préparation des échantillons	G. Geneau	2023-06-29

### Séquençage avec la technologie SMRT de Pacific Biosciences

Contrairement aux autres technologies de séquençage nouvelle-génération, la technologie de Pacific Biosciences (PacBio) Single Molecule Real Time Sequencing (SMRT) ne requiert pas d'amplification lors de la préparation de la librairie. La technologie utilise le processus naturel de réplication de l'ADN pour séquencer de longs fragments d'ADN natif afin de produire des séquences longues très précises ou des séquences HiFi. En tant que tel, un ADN génomique (ADNg) de départ de haute qualité et de poids moléculaire élevé se traduira par des bibliothèques plus longues et de meilleures performances lors du séquençage.

Si des petits plasmides ou petits éléments extra-chromosomiques sont présents dans les échantillons, SVP noter qu'ils pourraient être sous-représentés ou peuvent même ne pas être détectés avec la technologie PacBio puisque la préparation de la librairie cible les fragments de ~15-20kb.

### Directives pour les amplicons avec codes à barres

Un ensemble de 384 codes à barres, chacun composé de 16 pb, est conçu sur mesure pour le système PacBio. En ajoutant ces codes à barres aux amorces PCR, les utilisateurs peuvent effectuer un séquençage parallèle ou multiplex en utilisant SMRT Analysis v1.4 ou une version ultérieure. Cet ensemble de codes à barres est conçu pour une discrimination optimale avec la technologie SMRT Sequencing.

Voir la section [multiplexing sequencing](#) du site web de Pacific Biosciences pour plus d'informations sur le design des amorces PCR avec codes à barres.