



SERVICES DE GENOTYPAGE

Centre d'expertise et de services Génome Québec

Guide de l'utilisateur : Technologies de génotypage ThermoFisher Scientific et Illumina

Version 8.0

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES	2
DIRECTIVES GÉNÉRALES POUR LA PRÉPARATION D'ÉCHANTILLONS	3
PREPARATION D'ÉCHANTILLONS D'ADN GENOMIQUE	3
PREPARATION D'ÉCHANTILLONS D'ADN AMPLIFIÉ PAR WGA	3
PREPARATION D'ÉCHANTILLONS PROVENANT DE BLOC DE PARAFFINE (FFPE) (SEULEMENT POUR ILLUMINA)	4
PRÉPARATION DES PLAQUES D'ADN	4
MISES-EN-PLAQUE DES ÉCHANTILLONS	4
EXIGENCES DE MISE-EN-PLAQUE	5
SOUMISSION DES LISTES DE MARQUEURS	6
CREATION DES LISTES DE MARQUEURS	6
CREATION DES LISTES DE MARQUEURS	7
DEMANDE DE SERVICE ET SOUMISSION DES ÉCHANTILLONS	8
FORMULAIRE DE DEMANDE DE SERVICE ET SOUMISSION DES ÉCHANTILLONS (NOUVELLE REQUÊTE)	8
FORMULAIRE DE DEMANDE DE SERVICE ET SOUMISSION DES ÉCHANTILLONS (REQUÊTE EXISTANTE)	8
PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR ENVOI	9
ADRESSES POUR L'ENVOI DES ÉCHANTILLONS	10
POUR PLUS D'INFORMATION	10
BUREAU DE GESTION DES CLIENTS	10

Directives générales pour la préparation d'échantillons

Les instructions détaillées pour la soumission des échantillons et des marqueurs pour le génotypage, ainsi que des informations sur la technologie et ses produits disponibles sont fournies dans ce document.

Les projets peuvent être réalisés sur des biopuces commerciales, semi-personnalisées (*semi-custom*) ou personnalisées (*custom*).

Pour les projets sur biopuces personnalisées ou semi-personnalisées, une liste de marqueurs doit d'abord être fournie. Un guide pour la soumission des listes de marqueurs est disponible.

Pour le service de génotypage avec les technologies ThermoFisher Scientific ou Illumina, il est recommandé de soumettre des échantillons d'ADN génomique (ADNg).

Cependant, il est aussi possible de soumettre des échantillons d'ADN amplifiés grâce à une réaction de WGA (whole genome amplification). Il est recommandé de consulter le personnel de l'unité des biopuces afin de s'assurer si l'amplification WGA est requise dans le cadre du projet.

Préparation d'échantillons d'ADN génomique

La méthode de quantification PicoGreen est recommandée pour mesurer la concentration des échantillons d'ADN.

Tous les échantillons doivent être dilués à une concentration de 100 ng/μL. Il est recommandé de diluer les échantillons dans du tampon TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,0 / 1 mM EDTA) ou dans une eau exempte de nucléase.

Un volume minimum de 20 μL doit être envoyé pour chaque échantillon.

Si le même échantillon est destiné à être analysé sur des puces différentes, un volume minimum de 50 μL doit être envoyé pour chaque échantillon.

Préparation d'échantillons d'ADN amplifié par WGA

Les technologies WGA recommandées pour l'amplification d'ADN génomique sont REPLI-g (Qiagen) ou OmniPlex (Rubicon Genomics).

Il est recommandé d'utiliser un minimum de 50 ng d'ADN intact ou de 100-200 ng pour les échantillons d'ADN dégradés ou soupçonnés de l'être pour l'amplification.

Il est recommandé de tester par (PCR ou Taqman) les échantillons WGA avant de les génotyper.

Il est recommandé de mesurer la quantité d'ADN de façon précise (e.g. avec le PicoGreen).

Tous les échantillons doivent être dilués à une concentration de 100 ng/μL. Il est recommandé de diluer les échantillons dans du tampon TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,0 / 1 mM EDTA) ou dans une eau exempte de nucléase.

Un volume minimum de 20 μL doit être envoyé pour chaque échantillon.

Si le même échantillon est destiné à être analysé sur des puces différentes, un volume minimum de 50 μL doit être envoyé pour chaque échantillon.

Préparation d'échantillons provenant de bloc de paraffine (FFPE) (seulement pour Illumina)

Le protocole d'Illumina permet d'utiliser des échantillons d'ADN provenant de blocs de paraffine (FFPE).

Pour cela une étape de contrôle de la qualité (real time PCR) est faite pour valider l'intégrité de l'échantillon. Ensuite une étape de « [restauration](#) » est faite avant de procéder au protocole standard.

Si vous soumettez un mélange d'échantillons FFPE et non FFPE, il faut les mettre dans deux plaques distinctes et faire une randomisation séparée. Les échantillons doivent être identifiés clairement dans le nom (Ex.: FFPE_échantillon1 etc.) du fichier FORMULAIRE.

La méthode PicoGreen est recommandée pour mesurer la concentration des échantillons.

Un volume minimum de 20 µL est nécessaire à une concentration de 60 ng/µL (PicoGreen).

Préparation des plaques d'ADN

Mises-en-plaque des échantillons

Un minimum d'échantillons est requis pour les projets avec des puces personnalisées ou semi-personnalisées.

- 1152 pour la technologie Illumina
- 1920 pour la technologie ThermoFisher Scientific (si $\leq 50K$ SNPs)
- 480 pour la technologie ThermoFisher Scientific (si $\geq 50K$ SNPs)

Les échantillons d'ADN doivent être envoyés en plaques 96-puits transparentes ou claires.

Les plaques de 96-puits recommandées sont :

- Plaques PCR à embase plein (full-skirt; Bio-Rad, cat# MSP9601)
- Plaques PCR à demi-embase (half-skirt)
- Plaques à puits profonds (e.g. ABgene, cat#AB-0859)

Une fois la mise en plaques complétée, celles-ci doivent être scellées adéquatement. Les films adhésifs recommandés sont:

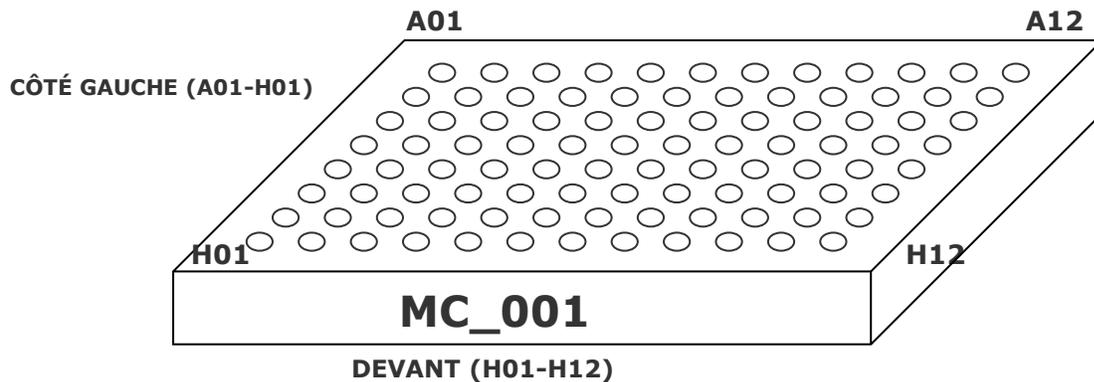
- MicroSeal 'F' Foil (Bio-Rad, cat# MSF-1001)
- MicroAmp Clear Adhesive Films (Applied Biosystems, cat# 4306311)

Note: Les capuchons en bandes (strip-caps) et les films d'aluminium ne doivent pas être utilisés pour sceller les plaques.

Les échantillons ayant des caractéristiques communes (e.g. ethnicité, source d'ADN, source de tissus, etc.) doivent être organisés en lignes ou plaques consécutives.

Les plaques doivent être clairement identifiées au crayon marqueur sur le côté gauche (A01-H01) et sur le devant (H01-H12) de la plaque (même si des auto-collants ou codes barres ont été apposés sur la plaque).

Il est suggéré d'identifier les plaques en incorporant le nom du projet. Par exemple, pour des échantillons reliés aux maladies du cœur, une façon de numérotter les plaques serait MC_001 (Maladie Cardiaque 1) jusqu'à MC_(n), selon le nombre de plaques existantes pour ce projet.



Le puit H12 de chaque plaque doit être réservés pour l'ajout interne d'un témoin positif.

Ainsi, une soumission pour l'analyse de 96 échantillons comprend le génotypage d'un témoin positif et de 95 échantillons de l'étude.

Dans le cas de projet sur des espèces autres que l'humain, le témoin positif doit être ajouté par le client dans le puit H12.

Exigences de mise-en-plaque

Chaque formulaire Plan de plaques contient des informations pertinentes sur les échantillons.

Un formulaire peut contenir les informations d'un maximum de 12 plans de plaques.

Les directives principales pour remplir le formulaire sont mentionnées ci-dessous :

- Les champs obligatoires sont indiqués par un astérisque (*) ou un signe plus (+).
- Chaque individu doit avoir un nom d'identification (*Individual_ID*) unique.
- Les noms d'identification d'individus des parents doivent être indiqués: *Mother_ID* (*Mother Individual ID*) et *Father_ID* (*Father Individual ID*) (colonnes F et G) (si applicable).
- Si l'échantillon est un témoin fourni par le client, l'identification doit être faite en écrivant "YES" sous "Default Control?" (colonne N).

Contact ID *	
Type *	dna
Taxon *	Homo sapiens
Individual ID Prefix	
Pedigree Prefix	

Plate #1	
Plate Barcode *	
Plate Name *	MyProjectName_Plate_001
Plate Description	DNA for MyProjectName: any comment
Parent Container Barcode	
Parent Container Coordinate	

Les répliques peuvent se retrouver sur différentes plaques

Coord *	Sample Name *	Individual ID *	Gender *	Pedigree *	Mother ID	Father ID	Vol. (ul) *	Conc. (ng/ul)	Alias	Site of Origin	Tissue Source	Sample Blank?	Default Control
A01	AB1233-1	AB1233-1	m	AB1233			30	25					
A02	AB1233-1a	AB1233-1	m	AB1233			30	25					
A03	AB1233-1b	AB1233-1	m	AB1233			30	25					
A04													
A05													
A06	AB1235-1	AB1235-1	f	AB1235	AB1235-2	AB1235-3	30	89					
A07	AB1235-2	AB1235-2	f	AB1235			30	87					
A08	AB1235-3	AB1235-3	m	AB1235			30	66					
A09													
A10													

Pour les enfants, entrer l'information dans la colonne appropriée
S'assurer que le genre (f ou m) de chaque parent est exact, sinon un message

Le fichier doit être nommé de la manière suivante : Nom_de_Projet-Plan_de_plaque-00X (e.g.MC_001).
Le format doit être .xls et non .xlsx.

Soumission des listes de marqueurs

Création des listes de marqueurs

Seuls les marqueurs bi-alléliques tels les SNPs (polymorphismes à nucléotide simple) et les indels (polymorphismes d'insertion/délétion) avec une seule localisation peuvent être génotypés.

Par contre, les MNPs (polymorphismes à nucléotides multiples), SSRs (séquences répétitives simples) ou les SNPs à localisation ambiguë ou multiple ne peuvent être génotypés.

Le nombre de loci pouvant être génotypés sur les biopuces personnalisées d'Illumina est de:

- iSelect-24: de 3,072 à 90,000 marqueurs peuvent être choisis pour la composition du panel.
- iSelect-12: de 90,001 à 250,000 marqueurs peuvent être choisis pour la composition du panel.
- iSelect-4 : de 250,001 à 1,000,000 marqueurs peuvent être choisis pour la composition du panel.

Pour les biopuces semi-personnalisées, le nombre de loci est de :

BeadChip	Nb marqueurs par échantillon	Nb de marqueurs personnalisés pouvant être ajouté à un panel déjà existant
GSA (Global Screening Array)	~ 640,000	50,000
GSA-MD (Global Screening Array + Multi Disease)	~ 670,000	20,000
GDA (Global Diversity Array)	~1,800,000	N/A
OncoArray	~ 499,000	120,000
CanineHD	~ 172,000	N/A
BovineHD	~ 777,000	N/A
BovineSNP50	~ 53,000	600,000
BovineLD	~ 8,000	80,000
PorcineSNP60	~ 64,000	25,000
MaizeSNP50	~ 56,000	N/A

Le nombre de loci pouvant être génotypés sur les biopuces personnalisées de ThermoFisher est de:

- 384 biopuces par plaque: de 1,500 à 50K marqueurs peuvent être choisi pour le panel.
- 1x96 biopuces par plaque: de 50K à 675K marqueurs peuvent être choisi pour le panel.
- 2x48 biopuces par plaque: de 675K à 1.3M marqueurs peuvent être choisi pour le panel.
- 3x32 biopuces par plaque: de 1.3M à 2M marqueurs peuvent être choisi pour le panel.
- 4x24 biopuces par plaque: de 2M à 2.6M marqueurs peuvent être choisi pour le panel.

Création des listes de marqueurs

Un Guide de l'utilisateur pour l'élaboration d'une liste de marqueurs est disponible.

Demande de service et soumission des échantillons

Formulaire de demande de service et soumission des échantillons (nouvelle requête)

L'option « nouvelle requête » est utilisée uniquement pour les nouveaux projets.

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

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 est complétée uniquement lorsque le bouton « soumettre » a été utilisé. Sinon, elle demeure un brouillon.

Les brouillons sont accessibles via l'option « [liste des requêtes](#) ».

Le travail dans le laboratoire débutera lorsque toute la documentation sera fournie et approuvée.

Formulaire de demande de service et soumission des échantillons (requête existante)

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

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

Les requêtes existantes sont ré-ouvertes afin de 1) soumettre de nouveaux échantillons ou des échantillons de remplacement à un projet en cours ou 2) continuer à remplir un brouillon.

Pour soumettre de nouveaux échantillons, aller à la section « soumission d'échantillons » afin de :

- Télécharger le gabarit pour la soumission des échantillons
- Revisiter des fichiers déjà remplis et soumis

Ne pas ajouter de nouveaux échantillons à un fichier déjà soumis.

Ne pas utiliser le bouton « retour » de votre navigateur pour revenir en arrière.

Préparation des échantillons pour envoi

Le Nom du Project (**Project Name**), le nom du Destinataire (**Daniel Vincent**) ainsi que le nom de la Plateforme (**Génotypage haut débit**) doivent être indiqués clairement à l'extérieur de la boîte.

Les plaques d'ADN doivent être correctement scellées et insérées dans un sac de plastique à fermeture glissière à pression (de type Ziploc). Conserver les plaques au congélateur afin que les échantillons demeurent congelés jusqu'à l'expédition.

Remplir les espaces dans la boîte isolante avec de la glace sèche pour que les échantillons d'ADN demeurent congelés et que les sacs ou contenant soient sécurisés durant l'expédition.

Les frais d'expédition sont payés par le client. Prévoir l'envoi pour qu'il n'arrive pas à nos installations durant la fin de semaine.

Bien vouloir inclure une lettre de déclaration des douanes à vos documents d'envoi. Un modèle est fourni pas le transporteur.

Le numéro de suivi de coli doit être envoyé par courrier électronique à **dvincent@genomequebec.com**

Si les échantillons nous sont envoyés, assurez-vous de joindre le bordereau de livraison à votre envoi.

Pour imprimer le bordereau :

- Aller à la section soumission d'échantillon du formulaire de requête
- Sélectionner le formulaire correspondant à l'envoi en cochant la case à gauche du fichier
- Cliquer sur « Imprimer Bordereau »

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.

Pour plus d'information

Bureau de gestion des clients

Frédéric Robidoux, B.Sc.
Sharen Roland B.Sc.
Philippe Daoust M.Sc.

Téléphone : 514-398-7211
Courriel : infoservices@genomequebec.com