



SERVICES DE METHYLATION

Centre d'expertise et de services Génome Québec

Guide de l'utilisateur : Technologie Illumina Infinium HD

Version 7.0

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 PROVENANT DE BLOC DE PARAFFINE (FFPE)	3
PRÉPARATION DES PLAQUES D'ADN	4
MISE EN PLAQUE DES ECHANTILLONS	4
EXIGENCES DE MISE EN PLAQUE	6
DEMANDE DE SERVICE ET SOUMISSION DES ECHANTILLONS	7
FORMULAIRE DE DEMANDE DE SERVICE ET SOUMISSION DES ECHANTILLONS (NOUVELLE REQUETE)	7
FORMULAIRE DE DEMANDE DE SERVICE ET SOUMISSION DES ECHANTILLONS (REQUETE EXISTANTE)	7
PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR ENVOI	7
ADRESSES POUR L'ENVOI DES ÉCHANTILLONS	8
PLAN D'ACCÈS DU CENTRE D'EXPERTISE ET DE SERVICES GÉNOME QUÉBEC	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

Directives générales pour la préparation d'échantillons

Ce document décrit les procédures à suivre pour soumettre des échantillons qui seront analysés sur les puces Infinium II d'Illumina contenant des sites de méthylation d'ADN.

Préparation d'échantillons d'ADN génomique

Les études sont uniquement réalisées avec des échantillons d'ADN génomique (ADNg) non-amplifiés.

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

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.

Tous les échantillons doivent être dilués à une concentration de 100 ng/μL.

Un volume minimum de 35 μL doit être envoyé pour chaque échantillon.

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

Préparation d'échantillons provenant de bloc de paraffine (FFPE)

Le protocole Illumina permet d'utiliser des échantillons d'ADN provenant de blocs de paraffine (FFPE). Le traitement au bisulfite doit être obligatoirement fait avant les autres étapes pour ne pas « perdre » la méthylation, qui disparaît après une amplification PCR standard.

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.

Les recommandations en termes de concentration et de volume sont les suivantes :

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

Les kits suivant vous sont suggérés pour l'extraction d'ADN de bloc de paraffine :

- Qiagen QiaAmp DNA FFPE Tissue kit (#56404) combiné avec la solution de déparaffinisation suivante en remplacement du xylène <https://www.qiagen.com/us/products/catalog/lab-essentials-and-accessories/deparaffinization-solution/>
- Thermo Scientific™ GeneJET FFPE DNA : <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/K0881>

Préparation des plaques d'ADN

Mise en plaque des échantillons

Un minimum de 24 échantillons est requis par projet.

Les échantillons d'ADN doivent être envoyés en plaques 96-puits dans le format approprié. Les plaques utilisées doivent être 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 complétées, celles-ci doivent être scellées correctement. Les films adhésifs recommandés sont:

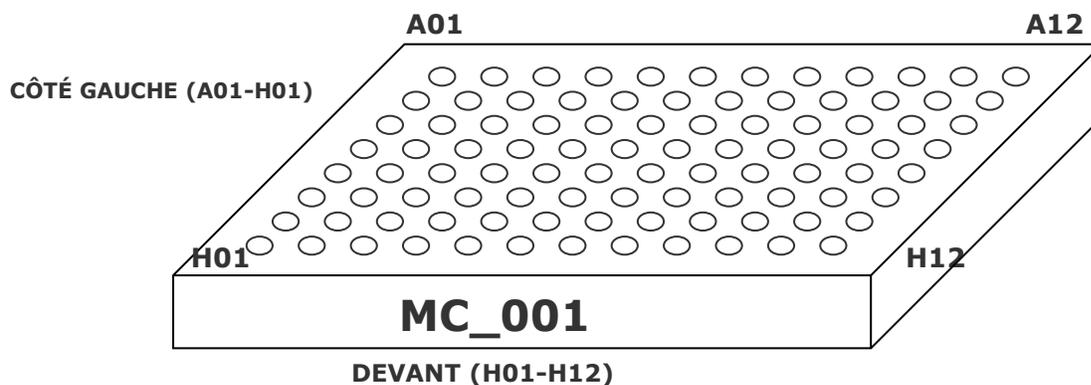
- MicroSeal 'F' Foil (Bio-Rad, cat# MSF-1001)
- MicroAmp Clear Adhesive Films (Applied Biosystems, cat# 4306311)

Note: les capuchons en bandes (*strip-caps*) ne doivent pas être utilisés pour sceller les plaques.

Les échantillons doivent être organisés en lignes et non en colonnes (e.g. les 12 premiers échantillons doivent être placés dans les puits A1 à A12).

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

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



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 d'individu (*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).
- La colonne 'experimental group' est obligatoire (non montrée sur la figure ici-bas).

Genotyping 96 well plate template EXAMPLE

The purpose of this example is to help you to properly fill out various fields of this template.
Format may be different from the most recent version; therefore, it is not recommended to copy-paste this example.

Type*	dna
Taxon*	Homo sapiens
Pedigree Prefix	
Plate Barcode*	
Plate Name	MyProjectName_Plate_001
Plate Description	DNA for MyProjectName; any comment.
Parent Container Barcode	
Parent Container Coordinate	

Coord*	Sample Name*	Individual ID*	Sex (m, f, unknown)	Pedigree*	Mother ID	Father ID	Volume (ul)	Concentration (ng/ul)	Contact ID	Alias	Site of Origin	Issue Source	Sample Blank?	Default Control
A01	ABI233-1	ABI233-1	m	ABI233			30	25						
A02	ABI233-1a	ABI233-1	m	ABI233			30	25						
A03	ABI233-1b	ABI233-1	m	ABI233			30	25						
A04														
A05														
A06	ABI235-1	ABI235-1	f	ABI235	ABI235-2	ABI235-3	30	89						
A07	ABI235-2	ABI235-2	f	ABI235			30	87						
A08	ABI235-3	ABI235-3	m	ABI235			30	56						
A09														
A10														
A11														

Les réplicats peuvent se retrouver sur différentes plaques
Les réplicats doivent avoir le même 'Individual ID' et 'Pedigree'; seul le 'Sample Name' varie

Seuls des nombres sont acceptés dans les colonnes 'Volume' et 'Concentration'

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 d'erreur apparaîtra lors de la soumission du fichier
Le pedigree doit être identique pour tous les échantillons du même groupe ou famille

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

Le format accepté est .xls et non .xlsx.

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 ne débutera qu'une fois toute la documentation fournie.

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 (*Recipient*) ainsi que le nom de la Plateforme (*Platform*; Illumina Infinium) 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).

Les échantillons doivent être expédiés congelés sur glace sèche.

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.