Fiche projet de séquençage Shot-Gun sur MiSeq.

En rouge, des exemples de réponses pour chaque partie à renseigner : à remplacer par vos propres informations.

# Projet : (génome bactérien, génome viral, longues PCR,…)

**Objectif** : Séquençage de novo du génome de la sale bestiole qui infecte mes pauvres petits poissons !.

**Réalisation du projet (opérateurs) :** Josephine DUPONT

- Organisme de rattachement, unité (+équipe) : xxx

- Statut (date fin de contrat/stage/thèse) : xx

- Messagerie institutionnelle : xxx@xxx

- Téléphone : xxx

**Collaboration** :

**Cadre du projet** (thèse,projet financé, projet récurrent d’équipe, premier pas…) :

**Responsable et origine des crédits** : Toto (messagerie institutionnelle)- Laboratoire, crédits ANR-UM

**Date prévisionnelle de réalisation du projet** :

**Risques associés à la manipulation des échantillons (chimique, biologique, autres)** :

*Les données recueillies sur ce formulaire seront utilisées dans le cadre du traitement de votre projet scientifique : pour contact en cas de problème avec les échantillons, restitution des résultats et facturation des prestations réalisées. Elles permettent également votre inscription sur notre site de réservation et notre liste de diffusion. Elles seront conservées pendant la durée du projet. Vous pouvez également vous désinscrire sur simple demande.*

# Description du projet

**Espèce(s) séquencée(s)** : Le génome de l’espèce E. coli sera séquencé dans son intégralité.

**Taille du/des génome(s) ciblé(s) :** 10 Mb

**Nombre d’échantillons séquencés :** 48 échantillons

**Profondeur moyenne souhaitée** : 20 X par échantillon.

**Choix du séquençage** :

🞎 MiSeq GenSeq ⌧ NovaSeq MGX 🞎 Autre :

**Choix méthode construction librairie :**

⌧ Protocole GenSeq 🞎 Protocole Illumina DNA Prep

**Remarques éventuelles** :

# Organisation

**Fait par l’utilisateur :**

1. Extractions des ADN.

2. Vérifier la qualité et la quantité des ADN est évalué par Qubit et Nanodrop

3. Préparer une plaque avec **20µl d’ADN** par échantillon à une concentration **supérieure à 10ng/µl**

**⌧ Déroulement des opérations selon protocoles GenSeq** :

Le protocole est compatible avec des quantités d’ADN initiales allant de 1 à quelques dizaines de ng, mais **la concentration idéale est de 10ng/µl**. Les conditions de l’étape d’enrichissement par PCR incluse dans le protocole sont ajustées en fonction de la quantité initiale d’ADN. Le nombre de cycles est toutefois maintenu au plus bas possible afin de limiter la quantité de dupliqua de PCR.

**Fait par GenSeq :**

4. Normaliser des ADN sur robot d’après les valeurs Qubit fournie par l’utilisateur.

5. Fabrication des banques individuelles par tagmentation avec un protocole maison. Nos index UDP d’IDT sont compatibles avec tous les séquenceurs Illumina. Deux contrôles sont ajoutés aux échantillons (un positif et un négatif) qui seront vérifiés mais pas séquencés (sauf demande).

5. Contrôle des banques individuelles sur Fragment Analyzer (FA) pour vérifier la taille des fragments obtenus et la bonne élimination des amorces de PCR.

6. En cas d’élimination insuffisante des dimères d’amorces, une nouvelle purification sera réalisée suivie d’un nouveau passage sur Fragment Analyzer.

7. Dosage par Qubit-Flex des banques individuelles et préparation d’un pool équimolaire de tous les échantillons.

8. Vérification qualitative et quantitative du pool sur FA et par qPCR.

9. Vérification de l’équilibre index dans le pool sur un run Nano 300 sur MiSeq avec lecture des index seulement.

10. Les étapes 7 à 9 seront éventuellement refaites si le premier pool n’est pas satisfaisant

**Fait par MGX :**

11. La banque sera séquencée à MGX à qui l’on transmettra le résultat de la qPCR et les Fragment Analyzer.

**🞎 Déroulement des opérations selon protocole Illumina :**

**Fait par GenSeq :**

4. Normaliser des ADN sur robot d’après les valeurs Qubit fournie par l’utilisateur.

5. Les banques individuelles de fragments génomiques seront fabriquées par GenSeq sur la base du protocole Illumina avec un kit Illumina et les amorces Genseq afin de réduire les coûts.

5. Contrôle des banques individuelles sur Fragment Analyzer (FA) pour vérifier la taille des fragments obtenus et la bonne élimination des amorces de PCR.

6. En cas d’élimination insuffisante des dimères d’amorces, une nouvelle purification sera réalisée suivie d’un nouveau passage sur Fragment Analyzer.

7. Dosage par Qubit-Flex des banques individuelles et préparation d’un pool équimolaire de tous les échantillons. La molarité est estimée en fonction des résultats FA et Qubit

8. Vérification qualitative et quantitative du pool sur FA et par qPCR.

9. Vérification de l’équilibre index dans le pool sur un run Nano 300 sur MiSeq avec lecture des index seulement.

10. Le multiplexage et la qPCR du mélange sera éventuellement refait si le premier n’est pas satis-faisant

**Fait par MGX :**

11. La banque sera séquencée à MGX à qui l’on transmettra le résultat de la qPCR et les Fragment Analyzer.

**Restitution des résultats de séquençage** : Le plateau GenSeq mettra à disposition les résultats de séquençage fait à GenSeq.

 Les résultats obtenus sur notre séquenceur haut-débit sont stockés sur notre système de sauvegarde pendant **3 mois.** Nous ne conservons jamais les résultats obtenus sur la plateforme MGX.