Compléter les parties en jaune

* + - 1. **Projet**

- **Acronyme et objectif du projet** : xx

- Taxon étudié : xx

- Risques chimiques, biologiques ou autres, précisez ? xxx

- Cadre du projet (thèse, projet financé, projet récurrent d'équipe, premier pas…) : xxx

1. **Utilisateur du plateau**

- NOM Prénom : xx

- E-mail **institutionnel**: xxx@

- Tél. : xx

- Statut : xxx

- Stage, thèse, cdd (préciser) : xxx Date de fin de contrat : xx

- UMR : xxx Equipe : xxx

1. **Porteur scientifique du projet (responsable des crédits)**

- NOM Prénom: xxx

- E-mail i**nstitutionnel**: xxx@

- Statut : xxx

- Tél. : xxx

- Laboratoire et Equipe: xxx

- Adresse : xxx

1. **Crédits utilisés pour régler la prestation**

Origine des crédits (privés UM, CNRS, …) : xxx

1. **Remerciements GenSeq**

*“Data presented in this publication were partly produced through the GenSeq technical facilities of MEEB (CNRS and University of Montpellier) hosted by ISEM (CNRS, University of Montpellier and IRD).”*

**Merci de nous envoyer les publications correspondantes !**

# Check-list (avant début du projet)

🞎 Il n’y a plus de suivi de modification dans le la fiche projet, je n’ai plus de question et je suis d’accord avec tout ce qui est écrit

🞎 J’ai commandé les amorces avec les N et les adaptateurs Illumina (6 amorces par locus)

🞎 J’ai envoyé un fichier excel avec mes plans de plaque

🞎 J’ai envoyé les photos des gels d’agarose de mes PCR

🞎 J’ai laissé un puit par plaque vide pour le contrôle négatif de GenSeq

Une fois **toutes** les informations recueillies et les PCR réceptionnées à GenSeq, le projet rentrera dans la file d’attente de production des projets.

# Description du projet

**Remarques :**

**1. Nombre d’échantillons par locus** : xxxxx + 1 contrôle négatif GenSeq par plaque

**Nombre total de plaques** :

**Nombre total de run de séquençage** :

**2. Nombre de locus**: xxx

**3. Description des locus :**

1. **Locus 1 : Région ITS.**

ITS1 : 5’ TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3’

ITS4 : 5’ TCCTCCGCTTATTGATATGC 3’

La taille attendu : environ **600 pb.**

1. **Région SSU Région V3-V4 16S**

341F : 5’ CCTACGGGNGGCWGCAG 3’

805R : 5’ GACTACHVGGGTATCTAATCC 3’

La taille attendu : **464 pb**.

**4. Amorces à commander par l’utilisateur :**

- Pour l’amorce amont :

5’TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG**N**-[séquence locus spécifique]3’

5’TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG**NN**-[séquence locus spécifique]3’

5’TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG**NNN**-[séquence locus spécifique]3’

- Pour l’amorce aval :

5’GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG**N**-[séquence locus spécifique]3’

5’GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG**NN**-[séquence locus spécifique]3’

5’GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG**NNN**-[séquence locus spécifique]3’

**5. Profondeur moyenne de séquençage visée** : 20 000X par échantillon.

**6. Longueur de séquençage** : 150, 300, 500 ou 600pb

🞎Single end 🞎 Paired end

**7. Normalisation ou pas avant pool des échantillons**

🞎 Pas de normalisation des échantillons 🞎 Dosage Qubit et normalisation des PCR indexées

# Déroulement des opérations :

\* Les extractions des ADN et les premières PCR locus spécifiques seront effectuées **par le demandeur**. Un volume de 25 µL est nécessaire pour la suite du protocole.

\* La qualité et la quantité des produits d’amplification seront contrôlées sur gel agarose avant qu’ils ne soient apportés dans une plaque 96 puits à GenSeq, accompagnés des photos des gels.

\* Les produits de PCR seront purifiés avant de procéder à la deuxième PCR **par le plateau GenSeq**.

\* Une deuxième PCR sera réalisée avec des amorces fournies par GenSeq pour rendre le locus séquençable.

\* Un dosage par qPCR de ce multiplexe (banque finale) sera alors réalisé pour optimiser la quantité de produit à déposer sur le séquenceur. Après avoir éventuellement ré-équilibré les échantillons

\*

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

\* Le séquençage sera réalisé sur le MiSeq du plateau GenSeq.

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

# Information pour comprendre l’expérience et aide au choix

**1.** Par run de séquençage nous ne pouvons indexer que **maximum 380 échantillons différents**.

Selon l’objectif du projet, il est conseillé de procéder à des duplicats des échantillons, voire des triplicats. GenSeq inclura également au minimum **un témoin négatif** pour chaque plaque d’échantillons traitée.

**2.** **Une taille minimale de 140 pb** est souhaitable afin de pouvoir purifier efficacement les produits d’amplification et les différencier d’éventuels dimères d’amorces.

**4.** **Séquences à ajouter aux amorces spécifiques pour ancrage des amorces d’indexation :**

Création de fragments d’ADN compatibles avec le séquençage sur MiSeq avec un protocole à deux étapes de PCR, selon **l’approche préconisée par Illumina : 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (ref. 15044223**). Le logiciel du séquenceur se base sur une lecture de différences de séquence au cours des premiers cycles de séquençage pour délimiter les îlots de séquence unique à la surface de la flow-cells. S’il n’y a pas de différences de signal ou si celles-ci ne sont pas assez importantes, le séquenceur aura du mal à identifier les clusters et le séquençage échouera.

Pour remédier à ce problème lorsque l’on séquence des amplicons, le moyen le plus efficace est de créer un décalage de lecture des séquences en rajoutant quelques bases aléatoires à la charnière entre la partie 5’ des amorces de PCR.

**5. Profondeur attendue et rendement de séquençage** :

Deux versions de kit sont disponibles sur MiSeq : les kit V2 (12 M de reads en moyenne) et V3 (17M de reads en moyenne), ces valeurs sont valable pour de l’amplicons.

Longueur séquençage possible Kits version 2 : 50, 300, 500 nt

Longueur séquençage possible Kits version 3 : 150, 600 nt

Le rendement est très variable et dépends de nombreux facteurs allant du locus, à la quantité de banque chargée. La surcharge du séquenceur peut causer la perte totale des résultats.

**6.** Il n’est pas possible de séquencer plus long que le nombre de cycle du kit, mais on peut séquencer moins. On peut séquencer en paired end ou single end selon les besoins du projet

**7. Le** protocole utilisé ne permet pas d’établir une corrélation exacte entre le nombre initial de copies de cibles -dans le milieu naturel- et le nombre final de séquences obtenues après séquençage.

*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.*