Compléter les parties en jaune

* + - 1. **Projet**

- Titre 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 les factures des prestations**

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 !**

# 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 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.

*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.*

**Facturation** :

La grille tarifaire ci-dessous est basée sur le calcul du coût complet d’un séquençage. Le coût complet englobe non seulement les réactifs mais aussi le temps machine et certains frais environnementaux. Le montant réel de la prestation sera calculé à l’aide du tableau ci-dessous dès que toutes les parties seront d’accord sur son contenu.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Coût unitaire** | **Quantité** | **Total** |
| Normalisation automatisée de 96 échantillons |  |  |  |
| Dosage fluorescent d’une plaque 96 ADN |  |  |  |
| Préparation d'une banque « shot-gun » Réactifs Illumina |  |  |  |
| Préparation d'une banque « shot-gun » Réactifs GenSeq |  |  |  |
| Vérification de 12 échantillons sur FA (kit 474) |  |  |  |
| Dosage qualitatif et quantitatif d'un pool (Fragment Analyzer + qPCR) |  |  |  |
| Vérification équilibre index sur Run Nano 300 |  |  |  |
| Séquençage MiSeq 50 cycles (kit compris) |  |  |  |
| Séquençage MiSeq 150 cycles (kit compris) |  |  |  |
| Séquençage MiSeq 300 cycles (kit compris) |  |  |  |
| Séquençage MiSeq 500 cycles (kit compris) |  |  |  |
| Séquençage MiSeq 600 cycles (kit compris) |  |  |  |
| Séquençage MiSeq sans kit (50-150 cycles) |  |  |  |
| Séquençage MiSeq sans kit (300 cycles) |  |  |  |
| Séquençage MiSeq sans kit (500 cycles) |  |  |  |
| Séquençage MiSeq sans kit (600 cycles) |  |  |  |