
GUIDE DE SOUMISSION D'ÉCHANTILLONS POUR LE SÉQUENÇAGE SANGER

L'inscription est obligatoire

Nous utilisons OTRS comme système de gestion sécurisé de laboratoire. Il sert pour la gestion des clients, échantillons, facturation et livraison des résultats. Pour ces raisons, l'inscription est obligatoire à l'adresse suivante:

<https://pag.ibis.ulaval.ca/seq/fr/enregistrer.php>

Une fois l'inscription complétée, vous recevrez un nom d'utilisateur et un mot de passe qui sera requis pour accéder à vos résultats. Les données sont organisées par chercheur principal dans notre système et toute personne inscrite avec le même chercheur aura accès aux données du groupe. L'inscription est gratuite, nous encourageons toutes les personnes qui soumettent des échantillons et/ou doivent accéder aux données à s'enregistrer.

Comment faire une demande de séquençage ?

Pour placer une commande, **téléchargez** [ce fichier Excel](#) et complétez-le avec les informations nécessaires au séquençage de vos échantillons.

Envoyez par courriel le formulaire EXCEL complété à seq-request@bioinfo.ulaval.ca. Après quelques minutes, vous recevrez un courriel de confirmation.

Inscrivez le numéro de ticket fourni par le courriel de confirmation dans la case prévue à cet effet dans le formulaire EXCEL et **imprimez** le formulaire EXCEL complété.

Aucune commande ne sera traitée si le mode de paiement des services n'est pas clairement indiqué. Pour les clients externes à l'Université Laval, nous acceptons les bons de commandes et les cartes de crédit VISA/Mastercard. Les clients de l'Université Laval doivent nous fournir la combinaison comptable du compte à facturer.

Préparation des échantillons

Instructions générales pour la préparation de l'ADN

- Le processus de séquençage requiert des exigences particulières quant à la préparation de l'ADN et des amorces utilisées. Vous trouverez donc ici les instructions à suivre avant de soumettre vos échantillons. Il est primordial de bien suivre ces consignes afin d'assurer la réussite de vos réactions de séquençage.
- L'ADN source ainsi que les amorces doivent être préparés de manière à respecter des standards élevés de qualité et de quantité.
- **La qualité de l'ADN source** est le facteur prépondérant pour assurer le succès du séquençage. Des préparations de mauvaise qualité contenant une quantité inacceptable de sels, de protéines, d'ARN ou autres contaminants vont inévitablement donner de mauvais résultats de séquençage.
- Les échantillons d'ADN doivent être en solution dans de **l'eau nanopure** ou dans une solution tampon (10 mM Tris-HCl pH 8.0). Ne jamais utiliser de solution tampon TE car l'EDTA qu'il contient peut inhiber les réactions.
- Pour la préparation des plasmides, nous conseillons les souches bactériennes suivantes: DH5 α , HB101 OU XL-1 Blue.
*Nous déconseillons la souche **JM101** et les autres souches de la même série.*
- Nous réalisons les réactions de séquençage à partir d'amorces **universelles** ou **spécifiques**.

Protocoles suggérés

- **Purification**
 - Plasmides, clones dans lambda (phages), clones M13 (ADNs simple brin): trousses commerciales (eg : trousses de la compagnie Qiagen ou l'équivalent), gradient de chlorure de césium, protocoles ABI (disponibles sur demande).

- Produits PCR: trousse commerciales (eg : trousse de la compagnie Qiagen ou l'équivalent). Si le produit PCR n'est pas unique, une purification sur gel d'agarose est fortement recommandée.
- **Dosage de la quantité d'ADN**
 - Pour les plasmides et les phages: densité optique à 260 nm (**attention! cette méthode n'est pas recommandée pour les produits PCR et les produits PCR non-purifiés, voir plus-bas pour ce type**)
La solution doit être exempte d'ARN, de protéines ou autres contaminants qui pourraient interférer avec la mesure d'absorbance. Il est important de vérifier les rapports de DO 260/280 et 260/230 afin de s'assurer de la pureté de chaque échantillon.
 - Fluorométrie
 - Gel d'agarose (méthode recommandée pour les produits PCR)
Par comparaison avec des standards d'ADN quantitatifs (low ou high DNA mass ladder). Pour les plasmides, il est recommandé de linéariser l'ADN avec une enzyme de restriction avant d'en faire le dosage sur gel à cause des différentes conformations (topoisomères) que peuvent prendre les plasmides circulaires ce qui peut rendre difficile l'estimation de la quantité d'ADN.
- **Vérification de la qualité de l'ADN**
 - Il est fortement recommandé de vérifier la qualité de l'ADN sur gel d'agarose. Cette étape permet aussi de vérifier l'absence de contaminants pouvant interférer avec la réaction de séquençage et le dosage, tels que ADN génomique, ARN, amorces, primer-dimers, sels (les échantillons seront retardés lors de l'entrée dans le gel).

Préparation des échantillons pour expédition

- **Responsabilité**
 - Le client est responsable de faire parvenir ses échantillons selon les spécifications exigées par la Plateforme ;
 - La Plateforme n'est pas responsable des bris ou perte durant le transport ;
 - La Plateforme pourrait refuser d'analyser des échantillons qu'elle jugerait non-conformes ;
 - Des frais seront exigés pour toute opération d'ajustement (changement de tubes, dosages, dilutions, etc.)
- **Choix des tubes**
 - Les échantillons **d'ADN purifiés** doivent être fournis dans des plaques PCR à 96 puits ou dans des tubes de 1,5 ml pour vos commandes de moins de 8 échantillons.
 - Dans le cas de **produits PCR non-purifiés**, les plaques doivent être à demi-jupe (semi-skirted) compatible avec les

thermocycleurs ABI. Un exemple est donné ci-dessous. Elles seront utilisées directement pour le traitement ExoProStar™.



- Toujours identifier vos plaques sur le côté et nous encourageons nos clients à utiliser une nomenclature qui rendra chaque soumission unique. Une manière de rendre les noms uniques est d'utiliser une combinaison du nom du chercheur principal, de la date et du numéro de plaque, par exemple : BBBoyle_20170824_Plate1.
- Pour des plaques incomplètes, S.V.P. utilisez une disposition en colonnes plutôt qu'une disposition en rangée comme dans l'exemple ci-dessous :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○

- Assurez-vous que les plaques sont scellées correctement avant de nous les faire parvenir. A cet effet, nous recommandons

l'utilisation du scellant Abgene 0558 sealing films (AB-0558) ou l'équivalent. Le scellant doit prévenir l'évaporation et empêcher la contamination des échantillons pendant le transport. De plus, on doit pouvoir l'enlever pour avoir accès aux échantillons.

- Ne laissez pas de puits vides entre les échantillons.

○ **Concentration et volumes**

- Le tableau suivant présente les concentrations et volumes requis selon le type d'ADN à séquencer. Les volumes demandés sont toujours par réaction/échantillon. Ajustez le volume en fonction du nombre de réaction pour chaque échantillon.

Type d'ADN	Concentration	Volume
Clones dans lambda (phages)	100 ng/μl	10 μl
Plasmides	100 ng/μl	10 μl
Produits PCR purifiés		
- fragments de <1 kbp	2 ng/μl	10 μl
- fragments de 1-2kbp	5 ng/μl	10 μl
- fragments de >2kbp	10 ng/μl	10 μl
Produits PCR non-purifiés ¹	>10 ng/μl	5 μl précisément
Clones m13 (ADNs simple brin)	25 ng/μl	10 μl

Note 1 : Nous pouvons faire 4 réactions avec 5 μl

Amorces universelles et spécifiques

- **Amorces universelles**

Voici la liste des amorces universelles fréquemment utilisées et disponibles sans frais à notre service :

Nom	Séquence 5'-3'	Tm
M13 Reverse (-20) ¹	CAG GAA ACA GCT ATG AC	48.5°C
M13 Reverse (-48) ¹	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA	69.4°C
M13 Forward (-21) ¹	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	59.8°C
M13 Forward (-47) ¹	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC	79.0°C
T3 promoteur	CGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG G	62.5°C
T7 promoteur ²	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	51.4°C
T7 terminator	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G	60.5°C
SP6 promoteur	TAT TTA GGT GAC ACT ATA G	43.5°C
(T) ₂₄ (A/C/G) ³	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT (A/C/G)	53.5°C

¹Pour les amorces M13 forward et M13 reverse, il est obligatoire de spécifier la position des amorces. Si elle n'est pas indiquée, nous utiliserons les amorces M13 Reverse(-48) et M13 Forward(-47) par défaut

²les vecteurs pCI et pSI de la compagnie Promega, ont une amorce T7 promoteur différente de celle que nous fournissons. La dernière base en 3' est différente entre les deux amorces.

³Pour le séquençage de clones d'ADNc du côté de la queue de polyA(>18As)

- **Amorces spécifiques**

Ce type d'amorce doit être fourni par le client. Il faut suivre les consignes suivantes :

- La concentration des amorces doit être de 1.5 μ M et vous devez fournir 5 μ l par réaction.

- **Conseils pour la création d'amorces spécifiques**

Il existe plusieurs logiciels permettant de sélectionner des amorces spécifiques. Voici quelques règles de base pour obtenir des amorces efficaces pour le séquençage:

- Bonne pureté : > 95% pleine longueur
- Longueur: 18-24 bases avec un contenu en GC supérieur à 50%
- Température de fusion (T_m) entre 50°C et 60°C
- Aucune structure secondaire
- Aucun site alternatif de fixation sur l'ADN
- Aucun mésappariement ("mismatch")
- Éviter les répétitions (4 et plus) d'une même base

Instructions pour l'envoi

Protégez vos plaques adéquatement. Nous recommandons l'envoi des plaques dans une glacière en styromousse et l'utilisation de "ice Packs" comme réfrigérant.

Expédiez vos échantillons **accompagnés** de votre formulaire EXCEL à l'adresse suivante:

Plate-forme d'analyses génomiques
Pavillon Charles-Eugène-Marchand
1030, rue de la Médecine
local 0147 (Réception des marchandises)
Université Laval
Québec (Québec) G1V 0A6
CANADA

Au Canada

Utilisez un transporteur pouvant livrer avant midi le lendemain.

A l'international

Utilisez le transporteur le plus rapide possible. Il est important de nous aviser pour que l'on puisse faire les arrangements nécessaires pour faciliter le dédouanement de vos échantillons. Un document pro-forma doit absolument accompagner vos échantillons. Nous pouvons vous fournir une ébauche de pro-forma sur demande. Envoyez l'information sur le transporteur et le numéro de suivi à brian.boyle@ibis.ulaval.ca.