



NOVEMBER 15, 2010

SERVICES DE SEQUENÇAGE

Centre d'Innovation Génome Ouébec et Université McGill

Séquençage de type Sanger Guide de l'utilisateur

Version 3.1









Table des matières

TABLE DES MATIÈRES	2
DEMANDE DE SERVICE	4
DEMANDE DE SOUMISSION. DEMANDE DE SERVICE. POLITIQUE DE FACTURATION. MODE DE PAIEMENT. PREPARATION ET SOUMISSION D'ECHANTILLONS — CONSIDERATIONS GENERALES.	4 4 5
EXIGENCES DE SOUMISSION D'ÉCHANTILLONS	6
Modeles de tubes et plaques acceptes. Seuls formats acceptés. Produits recommandés. Organisation des échantillons et des amorces Tube PCR en « strip ». Plaque de 96 puits. Plaque de 384 puits. Preparation des echantillons d'ADN. Preparation des amorces.	
SOUMISSION D'ÉCHANTILLONS	18
SOUMISSION ELECTRONIQUE D'ECHANTILLONS	
TRANSMISSION DES RÉSULTATS	19
TROUBLESHOOTING ET POLITIQUE DE RE-SÉQUENÇAGE	20
POUR PLUS D'INFORMATION	21
Bureau de gestion des clients	

ATTENTION!

Le service de séquençage se réserve le droit de refuser les soumissions d'échantillons qui ne respectent pas les exigences décrites dans le présent document et ce sans aucune compensation.

Demande de service

Demande de soumission

Pour connaître les prix ou obtenir un devis pour un service, communiquer avec le bureau de gestion des clients :

Téléphone: 514-398-7211 **Télécopieur**: 514-398-1790

Courriel: infoservices@genomequebec.com

Note: Un contrat signé est requis si le montant de la soumission est égal ou supérieur à 25 000 \$ (avant taxes).

Demande de service

Pour effectuer une demande de services :

- 1. Télécharger le formulaire de demande de services de séquençage.
- 2. Remplir le formulaire en prenant soin de suivre les instructions mentionnées dans celui-ci.
- 3. Si applicable, faire parvenir au bureau de gestion des clients:
 - a. Une copie des formulaires d'approbation d'un comité d'éthique si les échantillons soumis ont été obtenus à partir de sujets humains.
 - b. Un bon de commande, s'il s'agit du mode de paiement choisi.
- 4. Envoyer par courriel le formulaire complété au bureau de gestion des clients.
- 5. Imprimer, signer et faxer le formulaire à l'attention du bureau de gestion des clients au 514-398-1790.

Note:

Dans un délai de 24 heures, un nom d'utilisateur et un mot de passe seront envoyés au client par courriel pour accéder à Nanuq, l'application Web du Centre d'Innovation, afin de pouvoir soumettre des échantillons en ligne.

Politique de facturation

Les projets de séquençage d'une durée de 3 mois ou moins seront facturés à la fin du projet. Les projets plus importants seront facturés à intervalles réguliers. Dans les deux cas, les informations nécessaires à la facturation doivent être indiquées sur le <u>formulaire de demande de services de séquençage</u>.

Mode de paiement

Le paiement de factures peut se faire par chèque (bon de commande obligatoire) ou carte de crédit. Le chèque doit être fait à l'ordre de Génome Québec et envoyé à l'adresse suivante :

Génome Québec

630 boulevard René-Lévesque ouest, suite 2660, Montréal (Québec) Canada H3B 1S6

Important:

- Un bon de commande est requis pour tout montant égal ou supérieur à 2 500 \$ (avant taxes).
- Dans le cas de paiement par carte de crédit, par mesure de sécurité, ne pas inscrire de numéro de carte de crédit dans le formulaire de demande de service. Un formulaire sera fourni lors de la facturation à cet effet.

Préparation et soumission d'échantillons - Considérations générales

Il est indispensable de suivre attentivement les instructions de préparation et de soumission des échantillons mentionnées dans ce guide de l'utilisateur afin d'éviter tout délai dans le traitement des demandes.

Il est à noter que le délai de séquençage est de 2 à 4 jours ouvrables suivant la réception des échantillons. Toutefois, la vitesse de traitement des échantillons varie en fonction de la demande.

Exigences de soumission d'échantillons

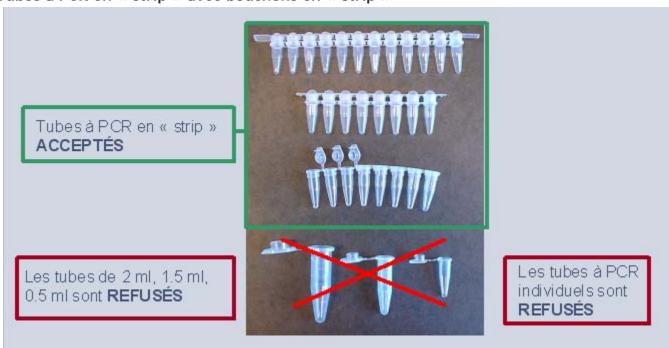
Modèles de tubes et plaques acceptés

Seuls certains modèles de tubes et de plaques sont acceptés afin d'être compatible avec les procédures du service de séquençage.

Seuls formats acceptés

- Tubes PCR en « strip »
- Plaques PCR de 96 puits
- Plaques PCR de 384 puits

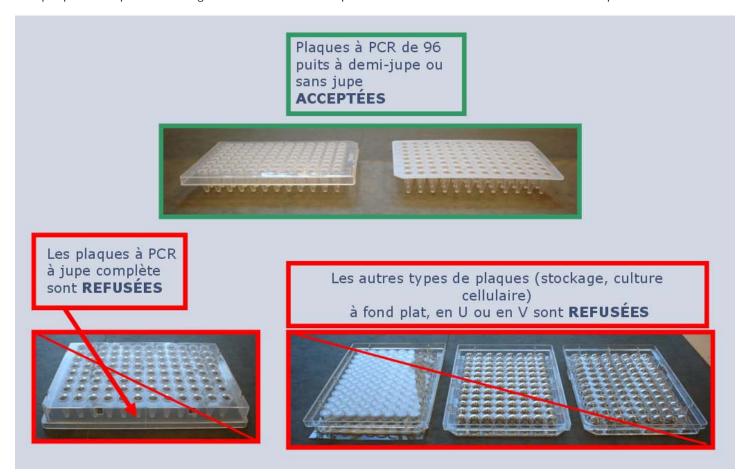
Tubes à PCR en « strip » avec bouchons en « strip »



Plaques à PCR de 96 puits à demi-jupe ou sans jupe

IMPORTANT!

Une plaque de 96 puits doit obligatoirement être utilisée pour toutes soumissions de 48 échantillons et plus.



Plaques à PCR de 384 puits

Les plaques à PCR de 384 puits sont à utiliser seulement dans le cas de soumission de plaques pleines.



Produits recommandés

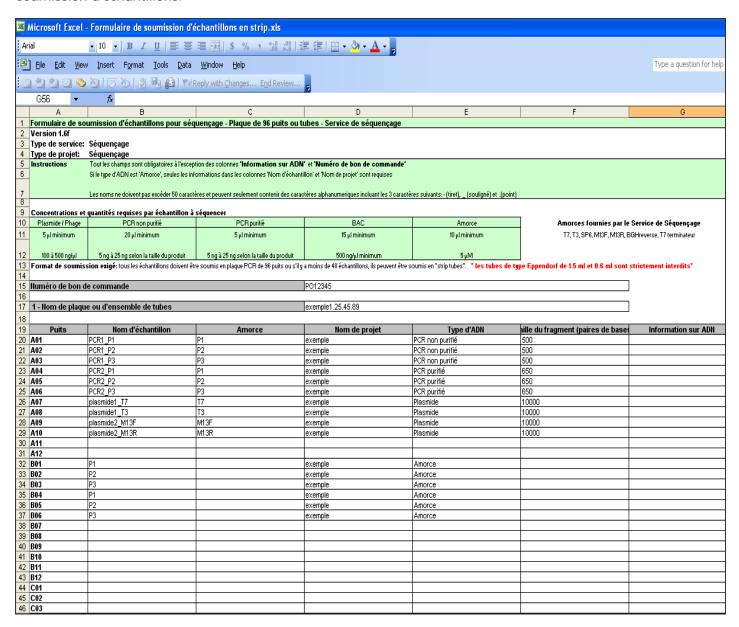
- Tubes PCR en « strip » : UltiDent Scientific, 0,2 ml thin-walled 12 tube and domed cap strips, numéro de catalogue: AB-1113
- Plaques PCR de 96 puits : Axygen Scientific, 96 well half-skirt PCR microplate clear, numéro de catalogue: CA47743-952
- Plaques PCR de 384 puits : Corning, Thermowell Gold PCR Plates, numéro de catalogue: 3757
- Scellant pour plaque: Applied Biosystems, MicroAmp Clear Adhesive Films, numéro de catalogue: 4306311

Organisation des échantillons et des amorces

Tube PCR en « strip »

Regrouper tous les échantillons les uns à la suite des autres en identifiant les tubes par le nom des puits correspondants sur le formulaire de soumission d'échantillons : A01, A02, A03, etc.

Procéder de la même façon avec les amorces qui doivent être aliquotées dans autant de tubes PCR en « strip » qu'il y a d'échantillons à séquencer et ceci dans le même ordre que les échantillons auxquels elles correspondent. Les tubes doivent être identifiés par le nom des puits correspondant sur le formulaire de soumission d'échantillons.



Plaque de 96 puits

Placer les échantillons les uns à la suite des autres en commençant par les puits A01 à A12, puis B01 à B12, etc., en suivant l'ordre de la plaque.

Les amorces doivent être aliquotées dans autant de puits qu'il y a d'échantillons à séquencer et ceci dans le même ordre que les échantillons auxquels elles correspondent.

Elles peuvent être placées dans la même plaque que les échantillons. Cependant les amorces doivent être aliquotées à la suite du lot complet d'échantillons, en commençant dans la rangée au-dessous des derniers échantillons. Pour une soumission de plus de 48 échantillons, elles seront placées dans une autre plaque. (Voir fichiers d'exemple ci-après)

La plaque 1 du formulaire de soumission d'échantillons doit être remplie avant de placer des échantillons dans la plaque 2.

Télécharger les fichiers d'exemple

[Excel] <u>Formulaire de soumission d'échantillons - Organisation des échantillons et des amorces en plaques de 96 puits</u>

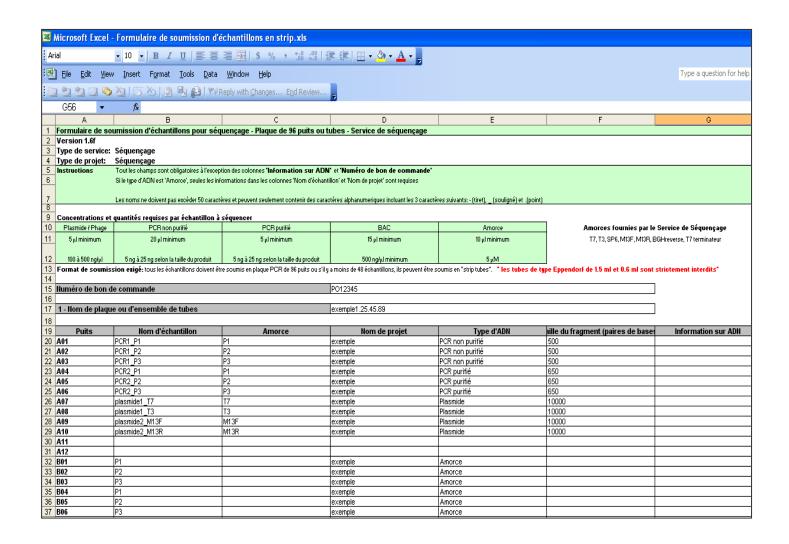
[Excel] <u>Formulaire de soumission d'échantillons - Organisation des échantillons et des amorces en tubes à PCR en « strip »</u>

Si un échantillon doit être séquencé avec deux amorces ou plus, l'échantillon doit être aliquoté dans autant de tubes (ou puits) qu'il y a d'amorces. (Voir <u>image ci-après</u>)

Si une amorce doit être utilisée pour deux échantillons ou plus, l'amorce doit être aliquotée dans autant de tubes (ou puits) qu'il y a d'échantillons à séquencer. (Voir <u>image ci-après</u>)

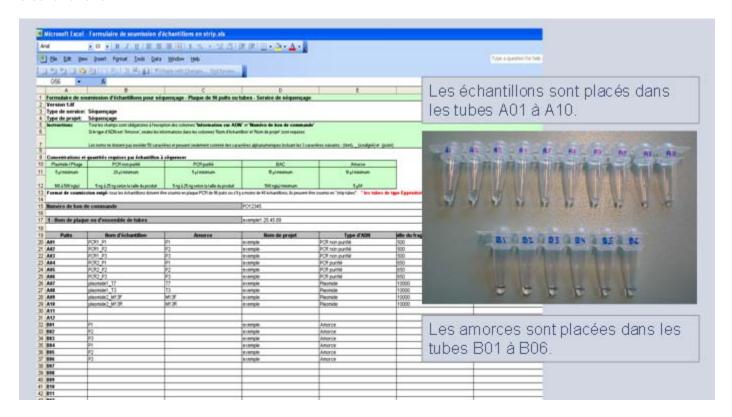
Si les échantillons soumis sont de différents types (plasmides, PCR purifies, PCR non purifies, phage ou BAC), les échantillons doivent être regroupés par type d'ADN soumis. (Voir <u>image ci-après</u>)

Si une partie des amorces requises sont des amorces fournies par le service de séquençage (voir section <u>Préparation des amorces</u>), les échantillons correspondants doivent être regroupés. (Voir <u>image ci-après</u>)



Organisation physique des échantillons et des amorces

Les échantillons et les amorces doivent être organisés exactement comme sur le formulaire de soumission d'échantillons.



Identifier clairement les échantillons et bien sceller les plaques et/ou les tubes.

Identifier clairement le numéro du puits sur chaque tube : A01, A02, A03, etc.

Comment identifier et fermer vos plaques et tubes à PCR

Les tubes d'échantillons et d'amorces doivent être identifiés avec le nom des puits correspondant sur le formulaire de soumission d'échantillons: A01, A02, A03, etc.

Les tubes à PCR en « strip » doivent être correctement fermés de façon à éviter l'évaporation qui pourrait nuire à vos résultats de séquençage. Pour cela, utiliser les bouchons en « strip » adéquats.



Pour 48 échantillons et plus, vous devez obligatoirement soumettre en plaques de 96 puits.



Identifier les plaques (et pas le couvercle ou le scellant) avec le même nom que celui sur votre formulaire de soumission d'échantillons.

Les plaques doivent être correctement scellées de façon à éviter l'évaporation qui pourrait nuire à vos résultats de séquençage. Pour cela utiliser du « scotch tape » ou un scellant pour plaque suffisamment adhésifs et qui résistent à la congélation que vous aurez pris soin de coller au niveau de chaque puits.

ATTENTION!

Ne pas utiliser de parafilm, ni de ruban adhésif pour sceller ou grouper ensemble des plaques et/ou des tubes.



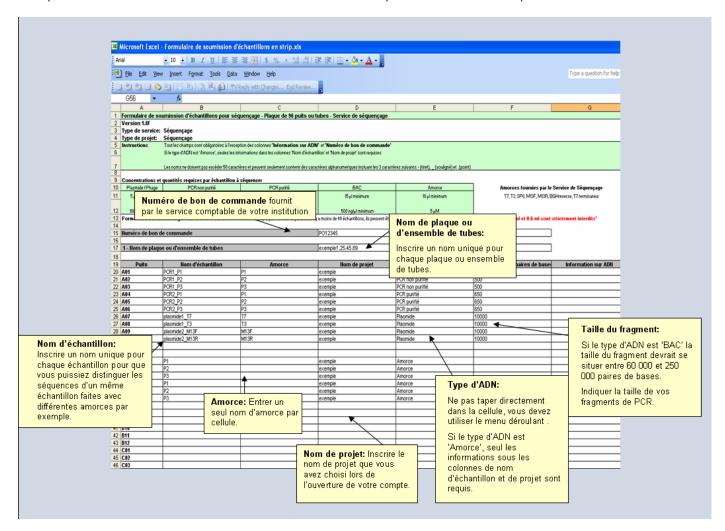
Plaque de 384 puits

Seules les plaques pleines de 384 échantillons peuvent être soumises en plaques de 384 puits.

Les amorces doivent être aliquotées dans une plaque de 384 puits dans le même ordre que les échantillons auxquels elles correspondent.

Formulaire de soumission d'échantillons

Compléter le formulaire de soumission d'échantillons tel que recommandé ci-après.



Préparation des échantillons d'ADN

Volumes et quantités requis par échantillon à séquencer :

	Volume	Concentration	
		Longueur du produit PCR	Concentration estimée sur gel d'agarose
Produits de PCR non purifiés*	20 µl minimum	100–200 pb	0.5 –1.5 ng/μl
Produits de 5 µl minimu PCR purifiés	5 µl minimum	200–500 pb	1.5–5 ng/μl
		500–1000 pb	2–10 ng/μl
		1000–2000 pb	5–20 ng/μl
		>2000 pb	20–50 ng/μl
ADN plasmidique ou phage	5 μl minimum	100–500 ng/μl	
Extrémités de BAC/PAC	20 μl minimum	500 ng/µl minimum	

- * La purification des produits de PCR pour enlever les dNTPs non-incorporés et les amorces résiduelles est incluse dans le service de séquençage.
 - Pour les <u>produits de PCR</u> à purifier, il est de la responsabilité du client de s'assurer de fournir un produit de PCR ne comprenant qu'un seul produit d'amplification (une bande unique sur gel) car les fragments contaminants ne sont pas éliminés lors de la purification.
 - Pour <u>l'ADN plasmidique</u>, attention de ne laisser aucune trace de phénol/chloroforme ou d'éthanol lors de l'extraction. Éviter absolument les solutions contenant de l'EDTA. Pour resuspendre l'ADN, il est recommandé d'utiliser du 10 mM Tris-HCl pH 8 ou de l'eau.
 - Il est très important de vérifier la qualité et la concentration des échantillons, même si la plupart des kits commerciaux d'extraction d'ADN donnent de bons résultats lorsqu'ils sont utilisés selon les directives du manufacturier. Le rapport DO260/DO280 doit être compris entre 1,9 et 1,7.

IMPORTANT!

Il est de la responsabilité du client de fournir des échantillons de bonne qualité et en quantité suffisante (Voir <u>Troubleshooting</u>).

Préparation des amorces

Volume et quantité requis par échantillon à séquencer:

	Volume	Concentration
Amorce	10 μΙ	5 μΜ

Le service de séquençage offre gratuitement les amorces universelles suivantes:

Т7	5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3'
Т3	5' - AATTAACCCTCACTAAAGGG - 3'
SP6	5' - TATTTAGGTGACACTATAG - 3'
M13 forward	5' - GTAAAACGACGGCCAGT - 3'
M13 reverse	5' - GGAAACAGCTATGACCATG - 3'
BGH reverse	5' - TAGAAGGCACAGTCGAGG - 3'
T7 terminateur	5' - GCTAGTTATTGCTCAGCGG - 3'
pGEXF	5' – GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG - 3'
pGEXR	5' – CCGGGAGCTGCATGTCAGAGG - 3'

Prendre en considération les éléments suivants lors du choix de l'amorce à utiliser pour le séquençage :

- Les séquences obtenues ne sont clairement lisibles que 30 à 60 bases après l'amorce.
- A partir d'échantillons de bonne qualité et en quantité suffisante, des séquences de bonne qualité de 800 pb peuvent être obtenues.
- Il est de la responsabilité du client de déterminer quelles sont les amorces requises pour le séquençage des échantillons.

Le design de l'amorce peut avoir un impact significatif sur la qualité des séquences:

- La taille de l'amorce devrait être entre 18 et 24 bases
- Le ratio G/C devrait être de 40 à 60%.
- La température d'hybridation de l'amorce doit être supérieure à 50°C.
- Le design d'amorces en amont de régions homo ou hétéropolymériques (répétition de A, C, G ou T) doit être évité car ces régions sont extrêmement difficiles à séquencer.

Le site suivant est recommandé pour le design des amorces: http://frodo.wi.mit.edu/primer3/

Note:

Le service de séquençage n'offre pas de service de synthèse d'amorces.

Soumission d'échantillons

Soumission électronique d'échantillons

Tous les échantillons à séquencer doivent être soumis via l'application Web Nanuq pour laquelle le client aura obtenu un accès lors de l'ouverture de son compte de séquençage.

[PDF] « Comment soumettre des échantillons »

Envoi d'échantillons

Les échantillons peuvent être envoyés par courrier ou apportés en personne entre 9h00 et 17h00, du lundi au vendredi.

Les échantillons pour le service <u>BaseXpress</u> doivent impérativement arriver au service de séquençage avant 11h00, du lundi au vendredi.

Les échantillons doivent être adressés à:

Service de séquençage

Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill 740, Avenue Dr Penfield, salle 7300 Montréal, QC, H3A 1A4 Tel: 514-398-3311, poste 00522

Ferr 514 000 1705

Fax: 514-398-1795

IMPORTANT!

Tous les échantillons doivent obligatoirement être accompagnés du bordereau d'expédition obtenu lors de la soumission en ligne.

Le service de séquençage n'est pas responsable du délai d'acheminement, des échantillons réceptionnés dans un mauvais état (tubes « strip » ou plaques brisés, échantillons évaporés, *etc.*), ni du délai supplémentaire de traitement occasionné par des envois mal identifiés.

Tous les échantillons seront conservés à 4°C pour un maximum de 2 semaines après le séquençage. Les échantillons non-réclamés seront détruits après ce délai.

Transmission des résultats

Les résultats de séquençage sont directement accessibles par l'application Web <u>Nanuq</u>. Les chromatogrammes et les séquences textes peuvent y être visualisés (format FASTA ou GenBank) et être téléchargés localement.

Les séquences téléchargées peuvent être visualisées en utilisant une version gratuite de Chromas pour PC disponible sur internet: http://www.technelysium.com.au/chromas.html

Un message automatisé provenant de Nanuq est envoyé à la personne ayant effectué la soumission dès que les séquences sont disponibles.

Le délai de séquençage est de 2 à 4 jours ouvrables suivant la réception des échantillons. Toutefois, la vitesse de traitement des échantillons varie en fonction de la demande. Il est indispensable de suivre les directives afin d'éviter tout délai dans le traitement de la demande.

Toutes les séquences seront conservées et accessibles par l'application Nanuq pour une durée minimale d'un an. Les séquences seront par la suite archivées mais resteront accessibles sur demande. Les fichiers peuvent également être retirés de Nanuq à la demande du client.

Troubleshooting et politique de re-séquençage

A partir d'échantillons de bonne qualité et en quantité suffisante, les séquences obtenues devraient être de bonne qualité jusqu'à 800 pb.

Les petits produits de PCR (moins de 250 pb) donnent des séquences de moindre qualité en raison d'un phénomène de saturation (plus les fragments sont petits plus les séquences obtenues sont intenses) et du phénomène de compression des bases qui se retrouve au début de toutes les séquences (phénomène relié à l'électrophorèse en capillaires des séquenceurs 3730xl d'ABI).

Pour en savoir davantage sur le « troubleshooting », consulter le tutoriel suivant:

[PDF] Tutoriel d'interprétation des résultats et « troubleshooting »

Note: en cas d'échec du séquençage, un nombre limité d'échantillons sera répété à la demande du client sans frais à fin de test.

S'il est déterminé que les réactions n'ont pas fonctionné en raison d'un problème d'équipement, de la trousse de réaction de séquençage ou d'une erreur humaine, les réactions seront répétées sans frais.

Si les échecs sont dus à :

- Non respect des exigences
- Piètre qualité de l'ADN
- Piètre qualité de l'amorce
- Présence de structures secondaires
- Présence de régions homo ou hétéropolymériques
- Échantillons ayant subi un traitement particulier (ex.: ADN traité au bisulfite)

Les réactions mêmes échouées sont de la responsabilité du client et seront facturées.

Pour toutes questions concernant les résultats, contacter le service de séquençage.

Pour plus d'information

Bureau de gestion des clients

Fanny Chagnon, Ph.D. Julie Vallée, B.Sc. Frédérick Robidoux, B.Sc.

Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill

740, avenue du Docteur Penfield, bureau 7104 Montréal (Québec) Canada H3A 1A4

Téléphone : 514-398-7211 Télécopieur : 514-398-1790

Courriel: infoservices@genomequebec.com

Services de séquençage

Pierre Lepage, Ph.D., Directeur

Téléphone: 514-398-3311 Ext.: 00346

Télécopieur: 514-398-1795

Courriel: pierre.lepage@mail.mcgill.ca

Service de séquençage de type Sanger

Téléphone : 514-398-3311 Ext.: 00522

Télécopieur : 514-398-1795

Courriel: sequencing.service@mail.mcgill.ca