

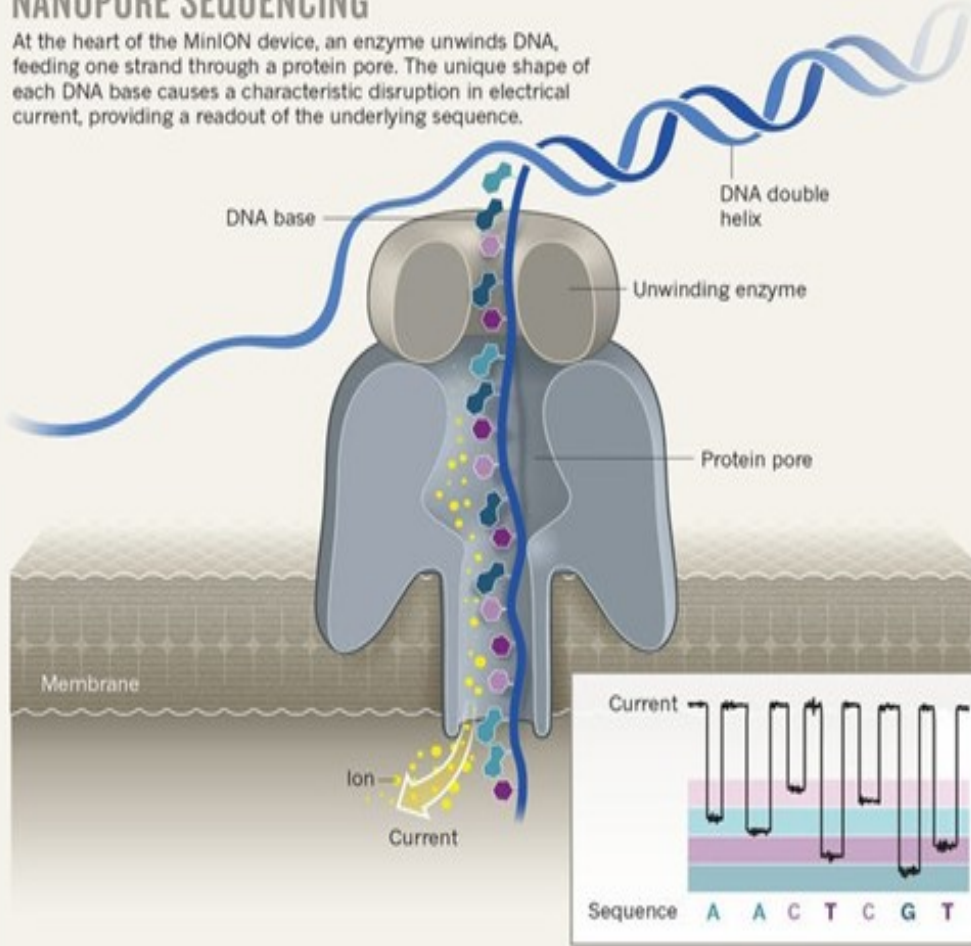
Technologie de séquençage par nanopore



This channel is offline

NANOPORE SEQUENCING

At the heart of the MinION device, an enzyme unwinds DNA, feeding one strand through a protein pore. The unique shape of each DNA base causes a characteristic disruption in electrical current, providing a readout of the underlying sequence.



- Pore protéique transmembranaire (MSPA : micobactérie smegmatis porine)
- liquide conducteur avec passage des ions dans les nanopores
- Enzyme de déroulement fixée à une chaîne nucléotidique.
- Passage des nucléotides par translocation régulée.
- Modification de la conductance du courant lors du passage d'un nucléotide.
- Modification du courant dépendant de la taille et la forme de la chaîne de nucléotides.

Utilisations

- Identification rapide de souche viral ou bactérienne
- Recherche des variants d'antibiorésistance
- Séquençage de novo par long fragment
- Recherche de base modifiée (épigénétique)
- Expression des gènes
- ...

Le Gridion



- Capacité de 5 flow cell minion
50Go de données par flow cell
- Ordinateur haute performance
- Capacité d'analyse différente en parallèle ADN, ARN
- Calcul intégré - infrastructure informatique minimale requise
- Logiciel de contrôle d'instruments et d'analyse de données

Protocole Artic SARS COV2 V3

- Étapes :

- Dilution en fonction de CT
- La transcription
- L'Amplification
- End repair, dA-tailing, Nick repair
- Ligation des codes barres, pooling des échantillons et nettoyage
- Ligation des adaptateurs, nettoyage
- Quantification
- Mise en concentration de la librairie
- Dépôt sur la flowcell

durée de réalisation entre
6 et 7 heures

Protocole Artic SARS COV2 V3

Directive de dilution ARTIC

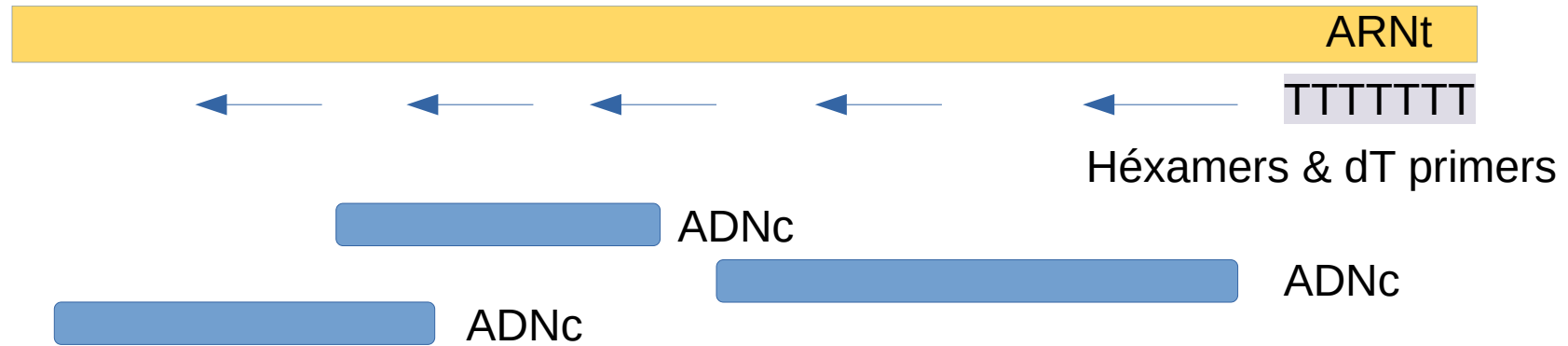
En fonction du résultat des Ct lors de la qPCR

qPCR Ct	Facteur de dilution
18–35	rien
15 à 18	1:10
12-15	1: 100

Mise au point par Josh Quick et son équipe lors de l'étude du Zicka sur séquenceur Minion nanopore. Mise au point à finaliser

Protocole Artic SARS COV2 V3

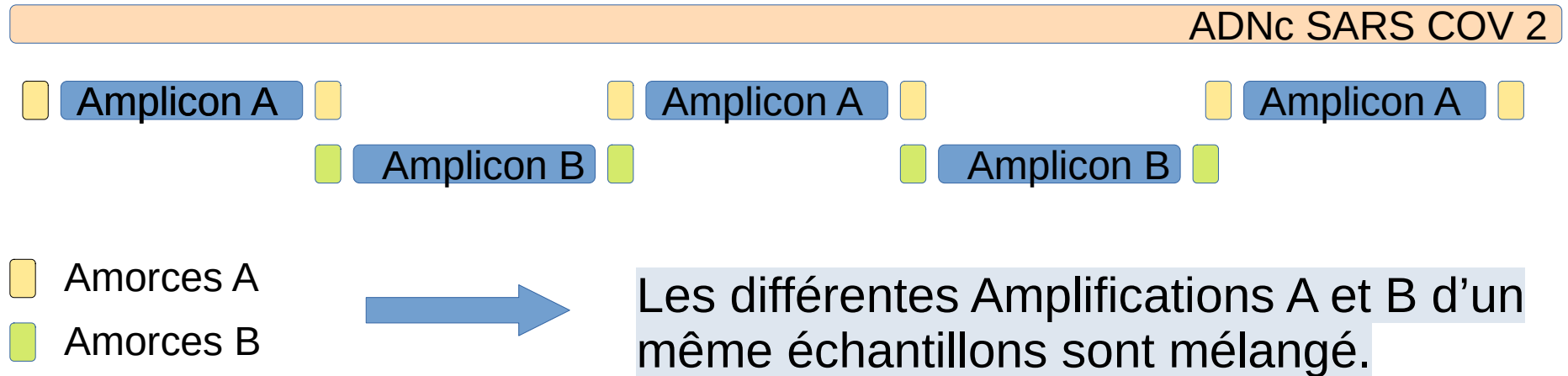
Reverse transcriptase de l'ARN total de l'échantillon.



Protocole Artic SARS COV2 V3

Amplification des ADNc du SARS COV 2

- 2 pools d'amorces Multiplexé A et B pour une couverture des 30 kb du SARS COV 2 par fragment de 400 pb se chevauchant sur 20 pb



Protocole Artic SARS COV2 V3

End repair, dA-tailing, Nick repair du mélange d'amplicons



End repair



dA-tailing

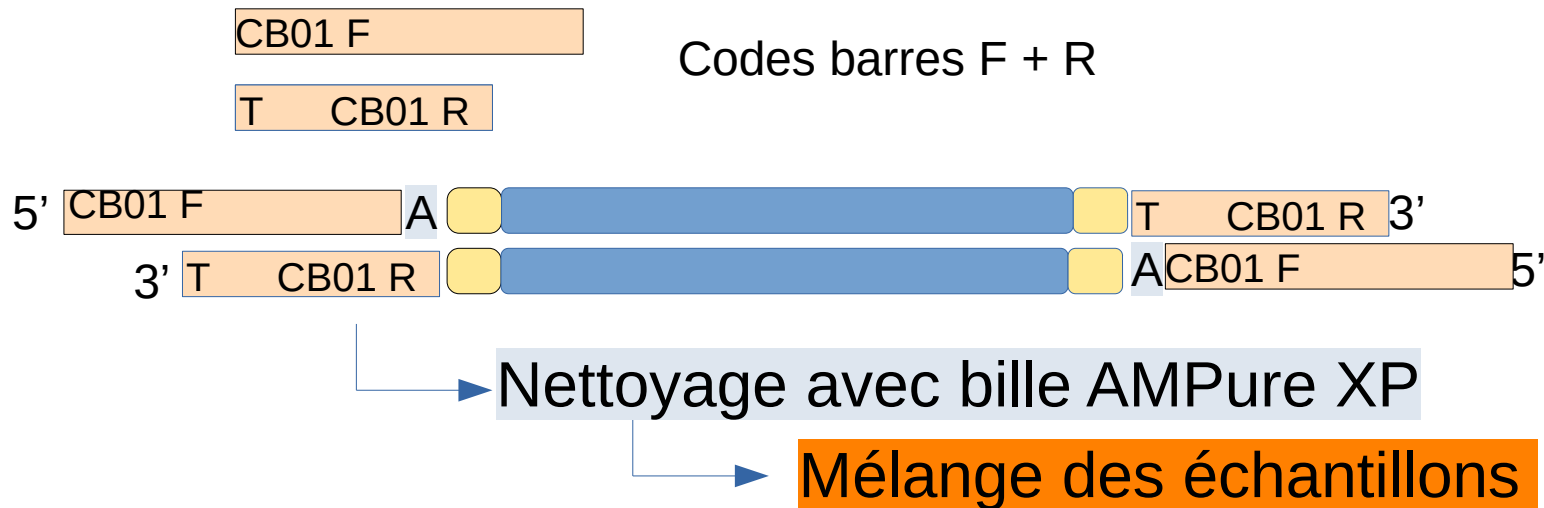


Nick repair



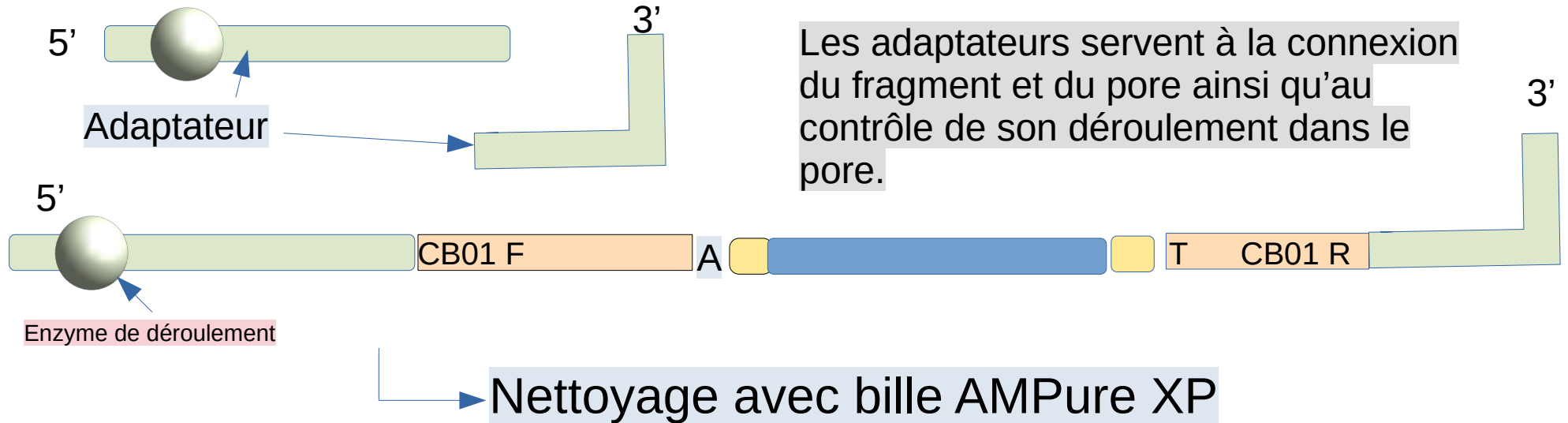
Protocole Artic SARS COV2 V3

Ligation des codes barres : un par échantillons



Protocole Artic SARS COV2 V3

Ligation des adaptateurs



Protocole Artic SARS COV2 V3

Quantification, dilution et dépôt sur flow cell



Dosage de la librairie par fluorescence, à l'aide d'un Qubit4 et d'un kit HS (haute sensibilité)

Dilution de la librairie à 15 ng

Préparation de la flow cell et dépôt de la librairie



Point de vocabulaire

- Basecaller : Conversion des données ioniques en base nucléotidique
- Démultiplexage : Répartition des fragments en fonction de leur code barre
- Read : fragment
- Alignement : Reconstruction d'un génome avec l'ensemble des reads séquencés, en comparaison avec une séquence de référence.
- couverture : % de séquence couvrant le génome étudié ou parti d'un génome étudié
- Profondeur : Nombre de read couvrant une même région

