



FICHE SERVICE

RNA-SEQ

La plateforme GenomiqueENS est spécialisée en génomique fonctionnelle **eucaryote**.

Comment préparer mon dessin expérimental ?

Nous vous recommandons très fortement de faire des réplicats biologiques de vos conditions afin de pouvoir tirer des conclusions qui soient généralisables et fiables. En outre, il est indispensable que ces réplicats soient réalisés dans les mêmes conditions (même protocole de préparation, expérimentateur et conditions expérimentales identiques), ceci afin de ne pas fausser les analyses statistiques. Lors de l'analyse, les comparaisons se font deux à deux.

Comment préparer les ARNs ?

Nous n'avons pas de recommandation particulière pour l'extraction d'ARN, aucun kit n'ayant montré d'incompatibilité avec le séquençage pour le moment.

Comment envoyer les ARNs ?

Les échantillons doivent être apportés dans des **tubes de 1,5mL avec un volume minimum de 15µL avec une quantité maximale**. Afin d'éviter toute dégradation, nous recommandons de transporter les échantillons dans de la **carboglace**. Les **échantillons peuvent être récupérés** à la fin du projet **si et seulement si** la plateforme en a été **avertie en amont du projet**.

Comment se passe le contrôle des ARNs ?

Un contrôle des ARN est effectué sur un Nanodrop pour la quantité mais également sur un Fragment Analyzer pour la qualité. Les échantillons sont considérés de bonne qualité si le **RIN est supérieur à 7** avec de **beaux profils** (pics visibles), nous continuons le projet en vous prévenant que les ARN ont passé l'étape de contrôle. Les échantillons sont considérés comme dégradés lorsque le **RIN est inférieur à 7** et ont des **profils discutables**, nous prenons contact avec le porteur du projet afin d'en discuter et de prendre la meilleure solution. En effet, si les échantillons ont des profils avec un **RIN entre 4 et 7 mais homogènes** et que les ARNs sont rares, il est parfois possible de continuer le projet.

Quels sont les protocoles disponibles en RNA-seq ?

Pour le séquençage Illumina (lectures courtes) :

- Petites quantités ARNm (**10 pg – 100ng**) - **Pas de conservation du sens des transcrits**
- Purification des ARNm polyA+ (**25 ng – 1 µg**) - **Conservation du sens des transcrits**

Pour le séquençage Nanopore (lectures longues) :

- Purification des ARNm polyA+ (10 pg – 10 ng) - **Pas de conservation du sens des transcrits**
- ARN direct poly A+ grande **longueur** (moyenne 1000 pb) (**1 000 ng- min 500 ng**) - **Conservation du sens des transcrits**

Quel type de séquençage choisir ?

La plateforme propose du single read (SR) et du pair-end (PE). Le SR permet de lire dans un sens le brin et le PE permet de lire le brin dans les deux sens. Le type de séquençage dépend de la **longueur** des transcrits et de la **profondeur** (nombre de lectures par échantillon) désirées.

Les différents types de séquençage que nous proposons sur la plateforme sont décrits sur notre site web:

https://genomique.biologie.ens.fr/fr/offres_et_services/prestations#sequencage

Après analyse différentielle, quelles données / quel type de fichier récupère-t-on ?

L'analyse des données de séquençage par notre outil Eoulsan produit les fichiers suivants:

- Contrôle qualité FastQC (fichiers HTML) (seulement avec séquençage illumina)
- Contrôle qualité de l'analyse MultiQC (fichiers HTML)
- Fichiers d'alignements filtrés (fichiers BAM et BAI)
- Fichiers pour les visualiseurs de génomes (ex : IGV) (fichiers BedGraph + Bed)
- Fichiers et matrices de comptages (fichiers XLSX)
- Résultats DESeq2 (fichiers XLSX + PNG)
- Génome de référence utilisé pour l'analyse (fichier FASTA)
- Annotations de référence utilisées pour l'analyse (fichiers GTF et GFF)
- Génome et annotation de référence prêts à l'emploi pour IGV

Que veut dire le terme banque ?

Une banque est une séquence d'intérêt (ADNc) avec les adaptateurs qui permettent le séquençage. La préparation de la banque se fait donc après la préparation et le contrôle qualité des ARN, mais avant le séquençage. Nous optimisons les banques pour chaque protocole, et au type de séquençage choisi pour le projet.

Exemple d'une banque pour un séquençage Illumina :

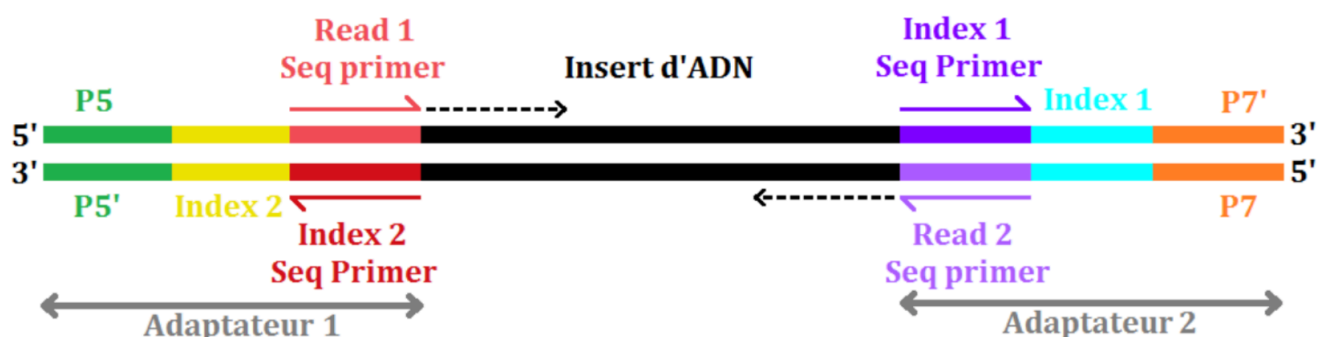


Schéma d'une banque type pour le séquençage Illumina® (modifié à partir d'illumina.com)

P5' et P7' : Adaptateurs Illumina® complémentaires des sondes sur la Flow Cell

Seq primer : Amorce de séquençage