

<i>Pré-requis ADN ONT et PACBIO</i>	
Qté min. de matrice (Qubit) :	10µg pour une Flowcell ONT ou une SMRTcell PACBIO en simplex 4µg par échantillons pour un multiplex
concentration min-max :	30 - 500 ng/µl
Pureté 260/280 :	1,8-2
Pureté 260/230 :	2-2,2
Taille ADN minimum :	>20kb

Qualité/Quantité échantillons

Les ADN doivent être d'une qualité et quantité suffisantes.

- Pour cela nous demandons à ce que le laboratoire réalise une mesure de la qualité des ADN, par une lecture en absorbance sur instrument type Nanodrop et une quantification par un dosage avec des agents intercalants de type Picogreen ou Qubit.
- L'intégrité et la taille de l'ADN devront être également contrôlées par une technique de type champs pulsé. A défaut, nous demandons de réaliser au minimum un dépôt sur gel ou un profil de migration lisible avec marqueur de taille annoté.
- Quantité (Picogreen/QuBit) : **10 µg** d'ADN pour 1 librairie simplex ou **4µg** d'ADN pour 1 librairie multiplex
- **Sans contaminations ARN, Sans dégradation**
- La différence entre la concentration Nanodrop et celle du Qubit doit être **< à un facteur 2.5**

Bonnes pratiques d'extraction

- Utiliser du tissu frais ou qui ont été placé dans de l'azote immédiatement après prélèvement
- La conservation des tissus au froid se fait à -80°C, éviter les cycles de congélation / décongélation
- Ne pas stocker les échantillons de sang plus longtemps qu'une semaine à 4-8°C avant l'extraction d'ADN
- Moudre les tissus en une poudre fine dans de l'azote liquide
- Inactiver les nucleases et les protéines liées à l'ADN avec une protease comme la protéinase K
- Enlever tout l'ARN avec la RNase A
- Eviter le guanidinium ou la guanidine thiocyanate (utiliser préférentiellement des proteases par rapport au agents chaotropiques)
- Eviter les agents oxydatifs comme le phenol/chlo pour éviter d'endommager l'ADN

Nous recommandons de resuspendre vos échantillons dans du tampon à faible teneur en sel comme le **tampon EB** (Qiagen), 10 mM Tris-Cl, pH8.5.

Un contrôle qualité complet (Nanodrop, Qubit, Fragment analyser, Femto pulse) des ADN sera systématiquement réalisé sur la Plateforme. Les données seront partagées avec l'équipe de recherche et les décisions concernant leur utilisation seront prises collégalement.

Tout échantillon qui ne respecte pas les critères de qualité ou de quantité ou qui nécessite une adaptation de protocole ne nous permet pas de garantir la réalisation d'une librairie de taille attendue et la production quantitative et qualitative de séquences.

Le protocole d'extraction ne doit pas utiliser de vortex, d'aspiration/refoulement, de CTAB, de colonnes.

Minimisez les cycles congélation-décongélation.

La solution d'ADN doit être incolore, limpide.

Le matériel ne doit pas être exposé à des températures > 65°C (préférez le séchage par air plutôt que par chauffage), ni à des pH forts (<6 ou >9).

L'ADN ne doit pas être exposé à un intercalant fluorescent (**BET**, ...) ou à des radiations ultraviolettes.

Il ne doit pas contenir : Des agents chélatants (EDTA, ...)

Des cations divalents (Mg²⁺, ...)

Des dénaturants (sel de guanidium, phénol...)

Des détergents (SDS, Triton, ...)

Des contaminants organiques (hème, polyphénol, **polysaccharides**, ...)

Des éléments insolubles.

Vous trouverez à ce lien : <https://extractdnaforpacbio.com/> un ensemble de protocoles d'extraction d'ADN de haut poids moléculaire adaptés au séquençage PACBIO, et par extension au séquençage ONT.

Conditionnement des échantillons

Vous pouvez envoyer vos échantillons en tube Safe Lock de type Eppendorf **sans parafilm**.

Les tubes doivent être mis dans une boîte compartimentée dans l'ordre indiqué dans la fiche échantillons. La boîte doit être bien fermée afin qu'elle ne s'ouvre pas durant le transport.

Ecrire les noms d'échantillons sur le bouchon et la tranche. **Merci de vérifier la correspondance avec les noms écrits sur la fiche échantillons.**

Bien identifier votre projet sur la boîte contenant les tubes.

Fiche échantillons

Choisir des noms d'échantillons courts (max 20 caractères) sans caractères spéciaux (espaces, virgules, point, underscore, slash, antislash, parenthèse ...). Le tiret (-) est accepté.

Si votre nom d'échantillon apparaît en rouge, merci de bien vouloir le changer en respectant les consignes ci-dessus. Si le nom est vert, vous pouvez continuer.

Pour faciliter la lecture du nom de l'échantillon, nous vous conseillons d'écrire l'acronyme de votre projet suivi d'un numéro. (EX : projet : Exemple-> nom échantillon : Exemple-1 ; Exemple-2 ...)

Joindre la fiche échantillon regroupant les informations des échantillons dans le colis et l'envoyer par mail avant tout envoi de colis (MODELE_PROJET_Fiche_échantillon_ADNg_LongReads.xlsm)

Envoi échantillons

Nous recommandons un envoi par colis contenant des blocs froids (échantillons réfrigérés) ou de la carboglace (échantillons congelés), via un transporteur (Transportéo, Cryoexpress, ...) les Lundi et Mardi à l'adresse suivante :

Plateforme Génomique GeT-PlaGe US1426 Bât G2
Centre INRAE de Toulouse Occitanie
24 Chemin de Borde Rouge
31320 Auzeville-Tolosane

Il ne faut pas qu'il y ait de contact direct entre vos plaques ou vos tubes et la carboglace. Les tubes ou les puits des plaques peuvent casser. Pour finir, bien caler la plaque ou la boîte de tubes afin de les maintenir en place, pour cela vous pouvez utiliser du papier bulle.

Nous nous engageons à vous prévenir lors de la réception des échantillons, mais nous ne pouvons assurer le suivi de votre colis avant sa prise en charge sur la plateforme.

Merci de respecter ces consignes afin que votre projet se déroule dans les meilleures conditions sur la plateforme.