

# Single Molecule Real Time (SMRT) Sequencing : PacBio RS II

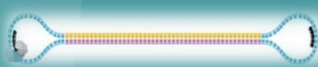
## Work Flow



### Input sample

- Genome DNA, Amplicons, cDNA
- Input sample amounts according to the protocols (10ng-10µg)
- High Input sample quality (integrity and purity)

### Library preparation



- Accepts inserts from 250 bp to 40 kb
- No amplification required
- Multiplexing and barcoding solutions available



### Instrument Run PacBio RSII – P6C4

- Flexible sequencing time per SMRTCell (0,5-6 hrs)
- One run : up to 16 SMRT Cells



1 SMRTCell containing 150 000 ZMWs (Zero-Mode Waveguides)

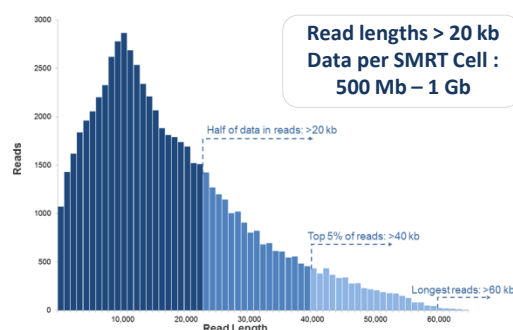
### Data Analysis

- Variety of analysis methods available through SMRT Software Suite and community
- Open source software
- Advanced data visualization and mining



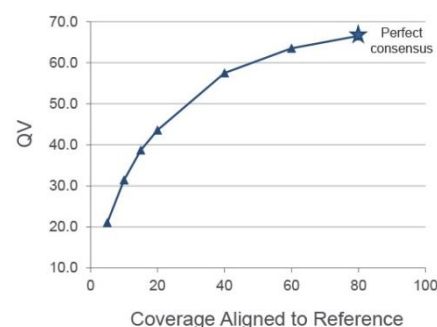
## Spécifications

### Longest Read Lengths



### Highest Consensus Accuracy

Free of systematic errors. Achieves >99,999% (QV50)



### Simultaneous Epigenetic Characterization

Directly detect DNA base modifications using polymerase kinetics

### Least Biased

Even coverage across GC content

## Applications

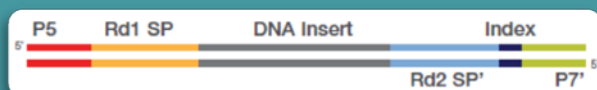
- Whole genome sequencing
- Targeted sequencing
- Complex populations
- RNA sequencing
- Epigenetics

# Séquençage Haut-Débit : HiSeq 2500 et HiSeq 3000 (Illumina)

## Work Flow



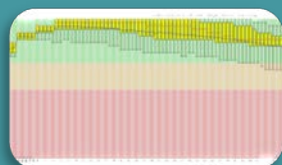
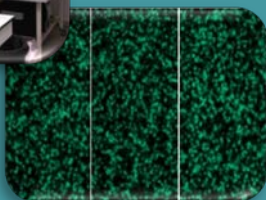
Préparation des  
bibliothèques



avec  
automatisation sur  
robots Tecan  
EVO200 et EVO150



Séquençage  
par synthèse  
(SBS) sur HiSeq  
2500 ou 3000



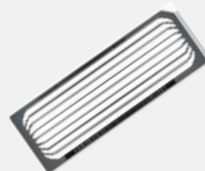
Analyse qualité  
des données,  
mise à disposition

[ng6.toulouse.inra.fr](http://ng6.toulouse.inra.fr)

## Spécifications

### HiSeq 2500

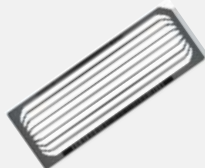
Run : 11 jours



- 2 Flowcells, 8 lanes / flowcell
- **Paired-End**
- 2 x 100 pb max
  - ⇒ **> 300 millions de reads** / lane
  - ⇒ **240-300 Gb** / flowcell
- Multiplexage bibliothèques possible

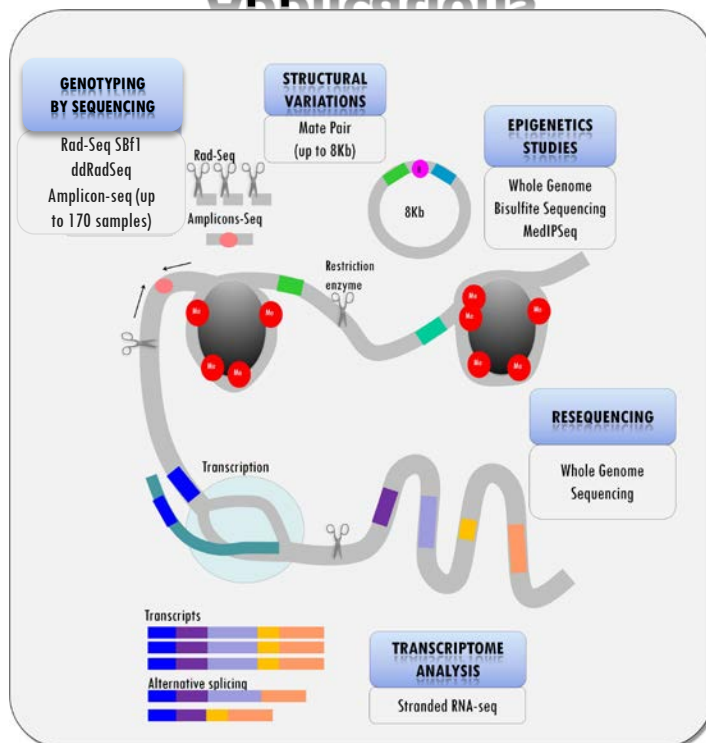
### HiSeq 3000

Run : 2,5 jours



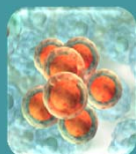
- 1 Flowcell, 8 lanes / flowcell
- **Paired-End**
- 2 x 150 pb max
  - ⇒ **> 600 millions de reads** / lane
  - ⇒ **650-750 Gb** / flowcell
- Multiplexage bibliothèques possible

## Applications



# Analyses sur cellule unique : C1 (Fluidigm)

## Work Flow



Isolation et  
enrichissement



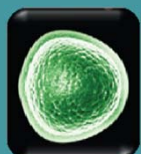
Pipetage dans la  
**C<sub>1</sub> Array**



Chargement et  
coloration dans le C1



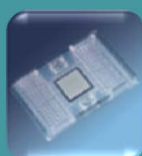
**Capture des  
cellules uniques**



Visualisation / microscopie



Lyse, RT, pré-amplification  
spécifique et récupération



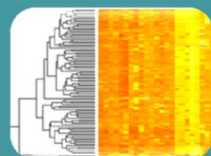
Pipetage dans la  
Dynamic Array



Chargement  
de l'IFC



**Run sur  
Biomark**



Analyse des données

## Spécifications

- Matériel de départ :
  - ✓ Cellules en suspension isolées à partir de FACS ou en culture
  - ✓ Taille : **5-25 µm**
  - ✓ Quantité : **10 µl à 250 cells/µL**
  - ✓ Suspension homogène et sans agrégat
- **Capture de 96 à 800 cellules** (selon application)
- **3 taille de puces** :
  - ✓ 5 à 10 µm
  - ✓ 10 à 17 µm
  - ✓ 17 à 25 µm

## Applications

- **Analyse d'expression de gènes sur cellules uniques**
- **Régulation de l'expression** :
  - Single-Cell miRNA analysis
- **2 types de puces pour séquençage NGS** :
  - RNAseq (disponible)
  - Whole genome (disponible)

## Tarifs

| Applications                                 | Coût HT 2015<br>(prix public) |
|----------------------------------------------|-------------------------------|
| Puce C1 seule<br>(expression)                | 610 €                         |
| Puce d'analyse<br>d'expression 96.96         | 850 €                         |
| Projets Agronomiques,<br>autres applications | contacter<br>get@genotoul.fr  |

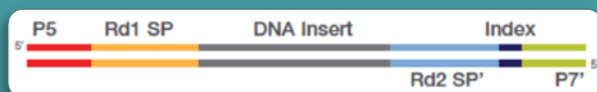
*Les prix n'incluent pas les prix des amorces et des échantillons ni de la formation*

# Séquençage Haut-Débit : MiSeq (Illumina)

## Work Flow



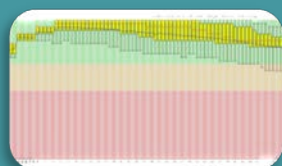
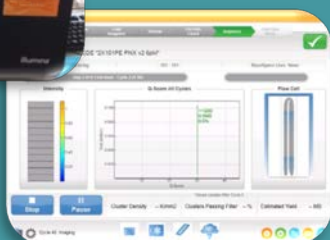
Préparation des  
bibliothèques



avec  
automatisation sur  
robots Tecan  
EVO200 et EVO150



Séquençage  
par synthèse  
(SBS) sur MiSeq



Analyse qualité  
des données,  
mise à disposition

[ng6.toulouse.inra.fr](http://ng6.toulouse.inra.fr)

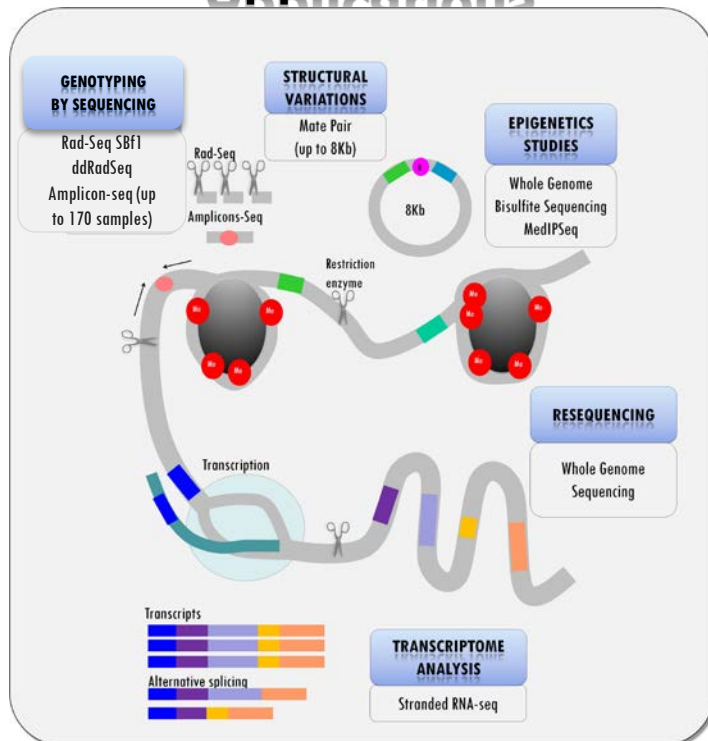
## Spécifications



1 Lane  
1 Flowcell  
Multiplexage possible

- ✓ Run **2x250 pb** version **V2** → **39h**  
Jusqu'à **8 Gb** de données  
**20 Millions** de séquences
- ✓ Run **2x300 pb** nouvelle version **V3** → **55h**  
Jusqu'à **15 Gb** de données  
**40 Millions** de séquences

## Applications



<http://get.genotoul.fr>  
[get-plage@genotoul.fr](mailto:get-plage@genotoul.fr)

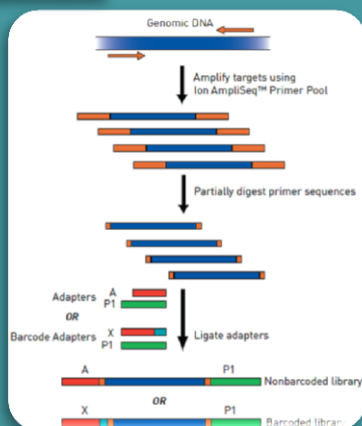
# Séquençage Haut-Débit : PGM (Ion Torrent)

## Work Flow



Welcome to Ion Ampliseq Designer

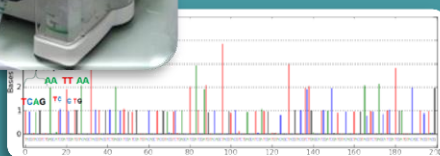
### Design des panels de gènes



### Préparation des bibliothèques



### Séquençage par semi-conduction sur Ion PGM

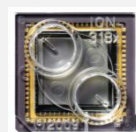
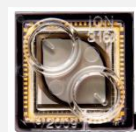
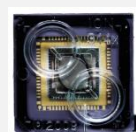


### Analyse qualité des données



Mise à disposition

## Spécifications



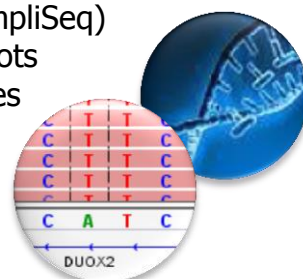
|                                      | Chip 314 | Chip 316   | Chip 318   |
|--------------------------------------|----------|------------|------------|
| # Reads                              | 500 000  | 3 millions | 5 millions |
| <i>Quantité de données produites</i> |          |            |            |
| Run 200 pb                           | 50 Mb    | 600 Mb     | 1 Gb       |
| Run 400 pb                           | 100 Mb   | 1 Gb       | 2 Gb       |

--- Durée d'un run PGM : 2h30 → 7h30 ---

## Applications

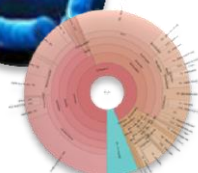
### ■ Séquençage ciblé

- Amplicons DNA / RNA (AmpliSeq)
- Régions (gènes) ou hotspots
- PCR hautement multiplexes
- 10 ng de matrice



### ■ Séquençage microbien

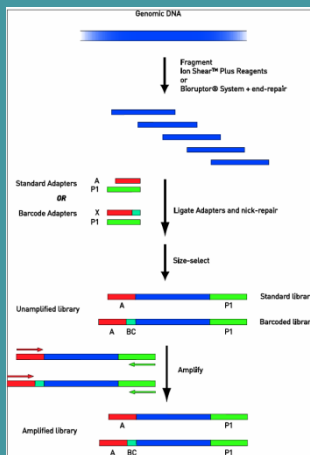
- Séquençage petits génomes
- Métagénomique 16S
- Typage bactérien / viral



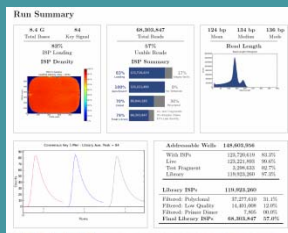
# Séquençage Haut-Débit : Ion Proton (Life Technologies)

## Work Flow

### Préparation des librairies

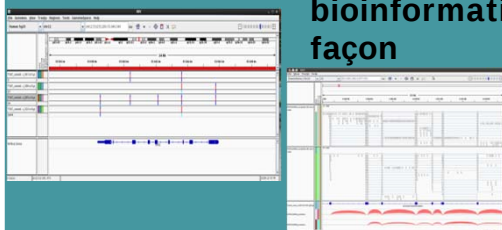


### Séquençage sur Ion Proton



Analyse qualité des données, mise à disposition

Analyses bioinformatiques à façon



## Spécifications



*1 puce  
Multiplexage possible*

✓ Run **200 pb** → **4h**

Jusqu'à **10 Gb** de données  
**100 Millions** de séquences

## Applications

- SEQ** Séquençage de novo et reséquençage
- AMP** Séquençage d'amplicons
- TARG** Reséquençage de régions d'intérêts par un enrichissement ciblé
- RNA SEQ** Transcriptome ou RNA-Seq  
Séquençage d'exome  
Séquençage des micro-ARNs
- ChIP Seq** Chip-Seq
- COPY #** Détection du nombre de copie d'un gène  
Recherche de SNP et In/Del

# Génotypage, PCR quantitative & Digital PCR : BioMark (Fluidigm)

## Work Flow



ARN  $\Rightarrow$  Retro Transcription



Pré-amplification

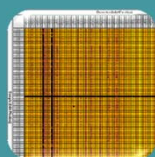
Pipetage dans  
Dynamic Array



Chargement de la  
puce dans l'IFC



Run sur  
Biomark



Analyse des données

## Spécifications



- Puce 48x48 puits (2304 réactions/run)
- Puce 96x96 puits (9216 réactions/run)
- Digital PCR (48.765 réactions/run)
- Volumes de réaction < 10 nL
- 3 puces/jour

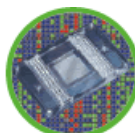
## Applications



Gene Expression

### ➤ PCR Quantitative

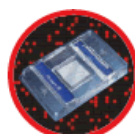
Intercalants EvaGreen, SYBRGreen  
Sondes TaqMan, EXIQON, UPL...  
Analyses d'expressions d'ARNs,  
miRNAs, lncRNA...  
1.3  $\mu$ L de cDNA à 5ng/ $\mu$ L



Genotyping

### ➤ Génotypage

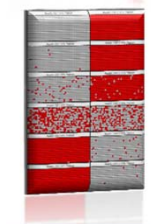
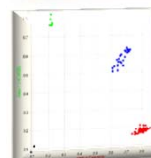
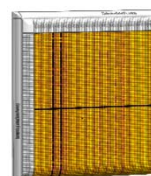
Sondes TaqMan, KASPAR  
1.5  $\mu$ L d'ADN à 2-10 ng/ $\mu$ L



Digital PCR

### ➤ Digital PCR

Détermination très précise du  
nombre de copies



## Tarifs

| Applications      | Puces FLDM                       | Coût total HT 2015 avec préamp.<br>(publics / privés) | Coût / point<br>(publics / privés) |
|-------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Génotypage*       | 48.48<br>96.96                   | 475 € / 805 €<br>745 € / 1085 €                       | 0.21 € / 0.35 €<br>0.08 € / 0.12 € |
| PCR quantitative* | 48.48 EvaGreen<br>96.96 EvaGreen | 600 € / 970 €<br>1185 € / 1545 €                      | 0.26 € / 0.42 €<br>0.13 € / 0.17 € |
| Digital PCR       | 48.765                           | 344 € / -                                             |                                    |

\* Une pré-amplification spécifique est recommandée avant le passage sur le BioMark  
Les prix n'incluent pas les prix des amorces, sondes et échantillons, ni de la formation