

Qualité des matrices et Prérequis Pour le séquençage PacBio

Alain Roulet
27 Mai 2016



Une matrice de qualité: la bête noire

Nos prérequis

1 Librairie

Pureté

$$260/280 = 1,8-2$$

$$260/230 = 2-2,2$$

Quantité

>10 μ g (intercalant)

Qualité

Pic majoritaire > 20kb

Vérifiés par des contrôles qualité

(Nanodrope, Qubit, fragment analyser...)

Troubles, sueurs froides
chez les chercheurs



Pourquoi tant de pureté?

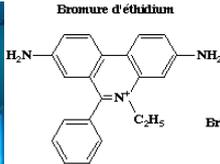
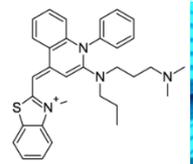


Polysaccharides
 Lypopolysaccharides
 Residus de milieu de culture

Polyphenols
 Proteines
 Lipides

Metabolites secondaires
 Résidus de l'extraction
 Chitines / Pigments


 Inhibe certaines étapes de la création de la librairie



Inhibe
 la polymérase



Ratios 260/280 = 1,8-2 et 230/260 = 2-2,2

Pourquoi viser haut ?

Production (Mb) = Nbre puits X longueur librairie

Nbre puits = 33-50% des 155000 puits

Longueur de la librairie = Taille ADN de départ
+ résistance

Dépasser les zones difficiles

Zones répétées

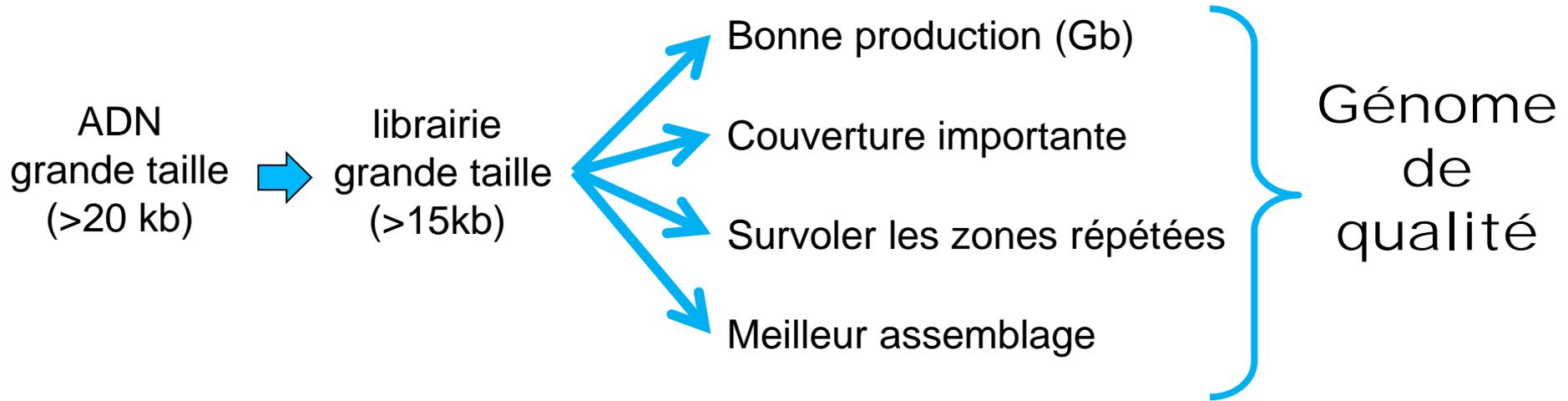
Microsatellites

Centromères

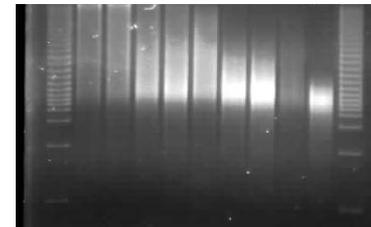
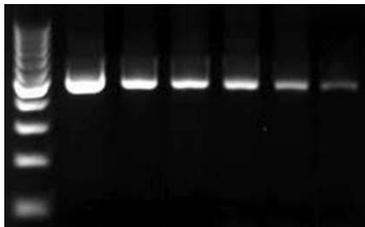
Assembleurs = Utilisation des + longues séquences corrigées



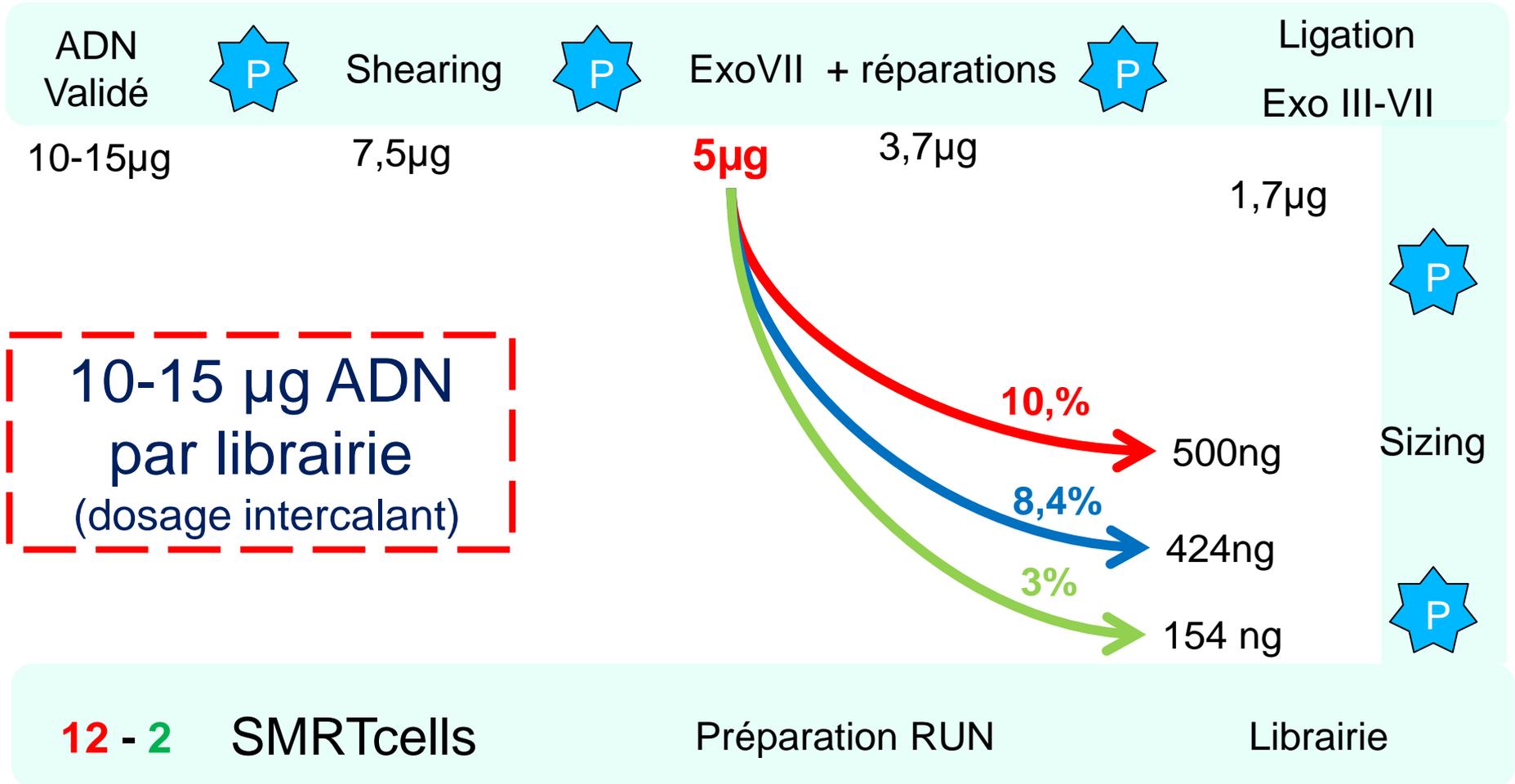
Pourquoi viser haut ?



ADN peu dégradé > 20 kb
Photo Gel /champs pulsé



Pourquoi des tonnes?

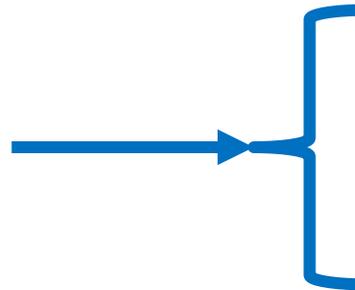


Le graal n'existe pas !



Protocole/kit magique

Presque rien
de
matériel

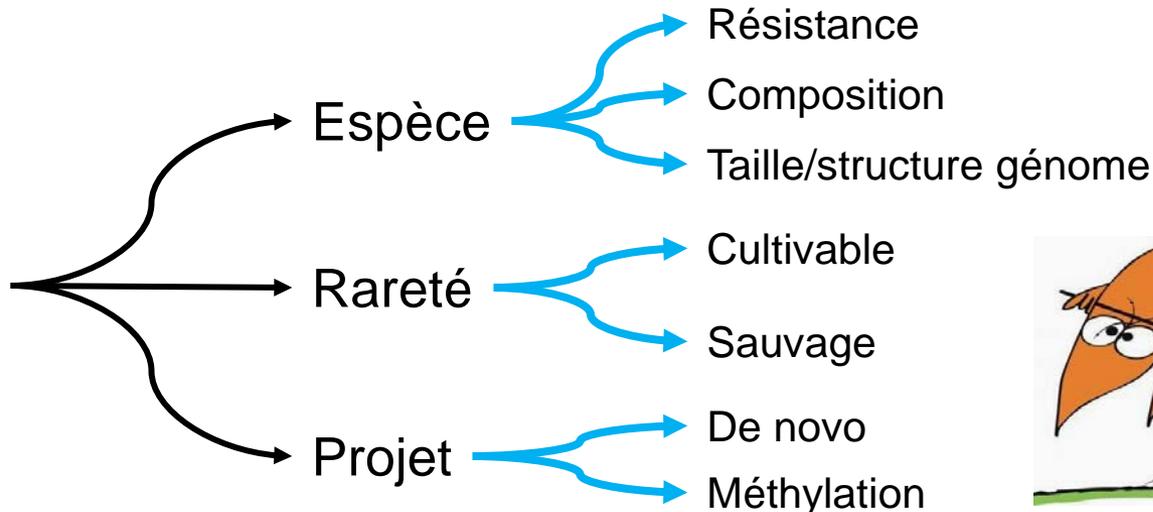


Pureté fantastique

Quantité importante

Haut poids moléculaire

Protocole
adapté



Nos conseils!

Limitier la dégradation

Prélèvement



Congélation
Traitement



Lyse chimique douce



Lyse chimique forte



Lyse mécanique



De la douceur



Eviter les centrifugations sur colonne

No Vortex

Augmenter temps de solubilisation

Choisir le bon tissu

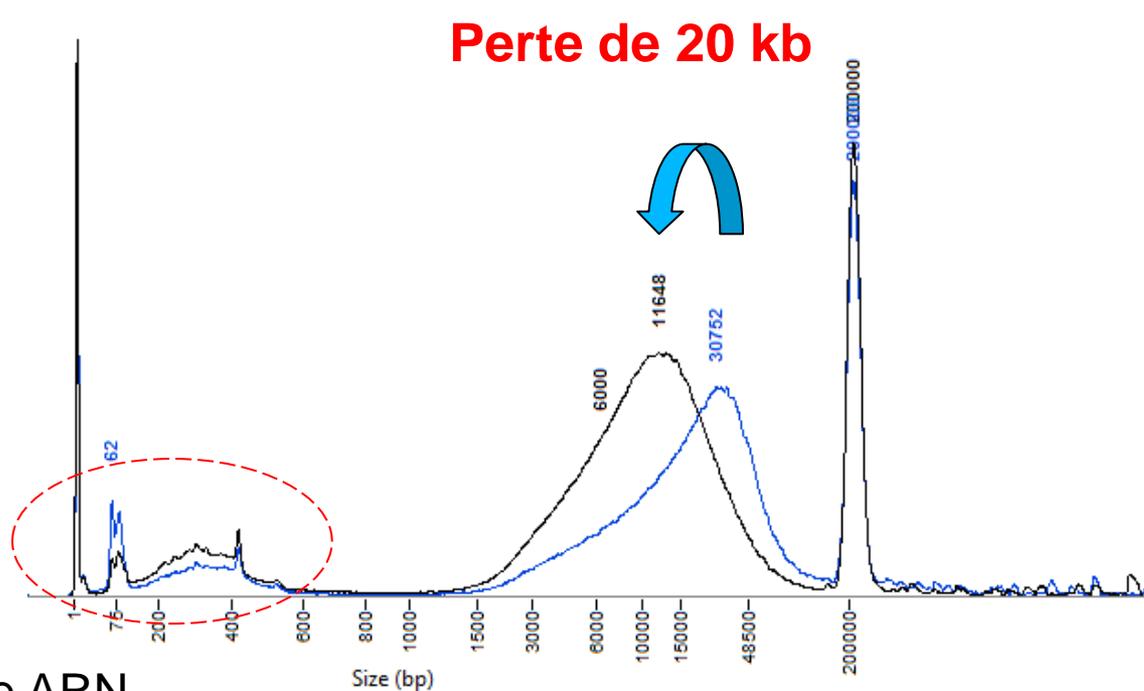
Réessayer les « anciens » protocoles de « Current protocols of Biology »

Contactez nous très tôt

Quelques écueils!

« Aïe !! Aïe!! mes ratios sont pas terribles!! vite une purification »

Effet dévastateur d'une purification sur colonne

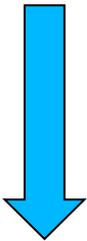


Présence ARN

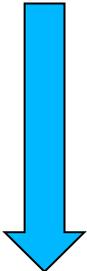
Résistance et fragilité!

Résistance de l'ADN = Protocole extraction

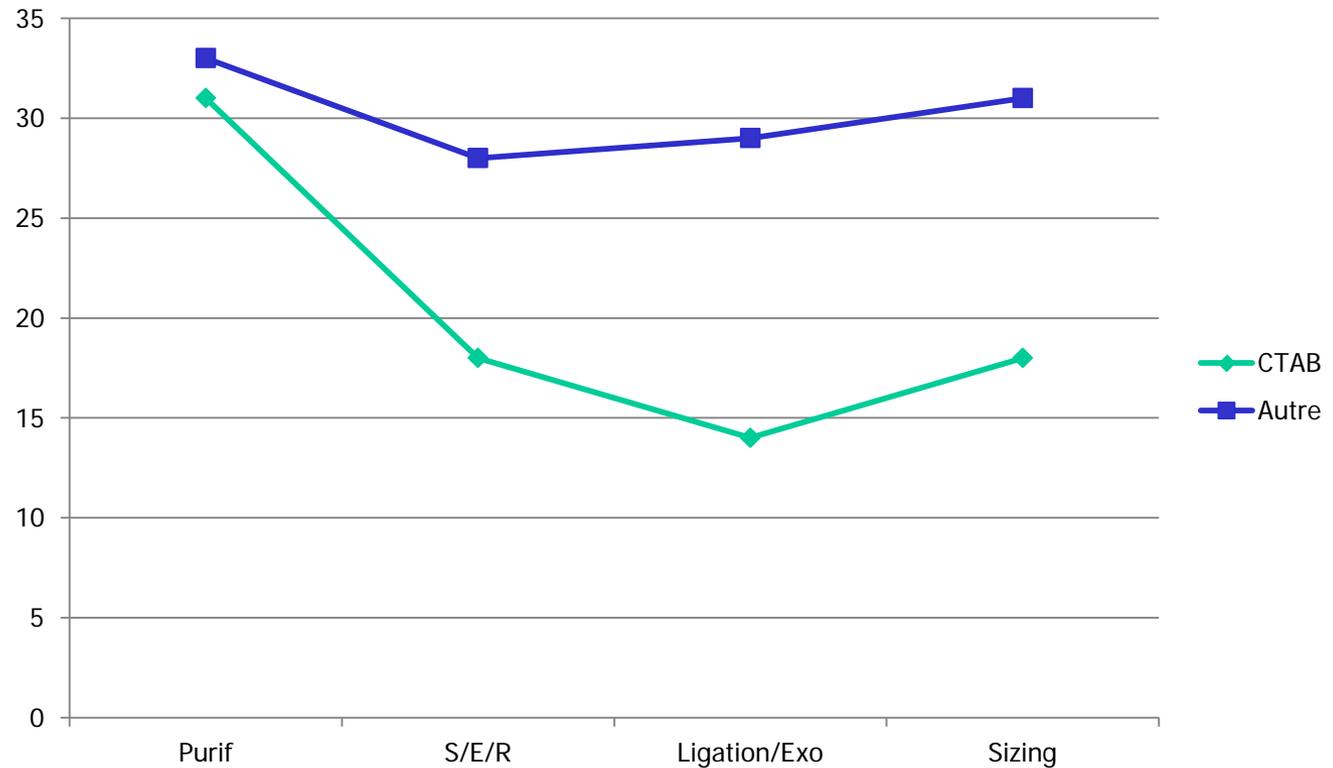
Effet du CTAB



Fragilisation



Librairie + petite



Conclusion

Nos prérequis

$$260/280 = 1,8-2$$

$$260/230 = 2-2,2$$

>10 μ g (intercalant)

Pic majeur > 20kb

Meilleur résultat
possible
pour vos projets

ICI
LE POSSIBLE
EST DÉJÀ FAIT
—
L'IMPOSSIBLE
EST EN COURS
—
POUR LES
MIRACLES
PRÉVOIR **48H**
DE DÉLAI

Vos projets



Leurs spécificités



Leurs limites



Vous accompagner
Essayer/tester



Meilleur résultat
possible

Merci de votre attention