

# 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 $\mu$ 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?

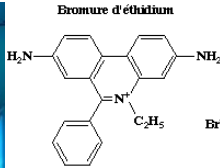
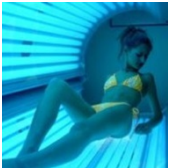
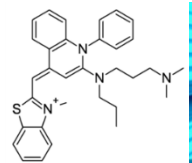


Polysaccharides  
 Lypopolysaccharides  
 Residus de milieu de culture

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 départs  
+ résistance

Dépasser les zones difficiles

Zones répétées

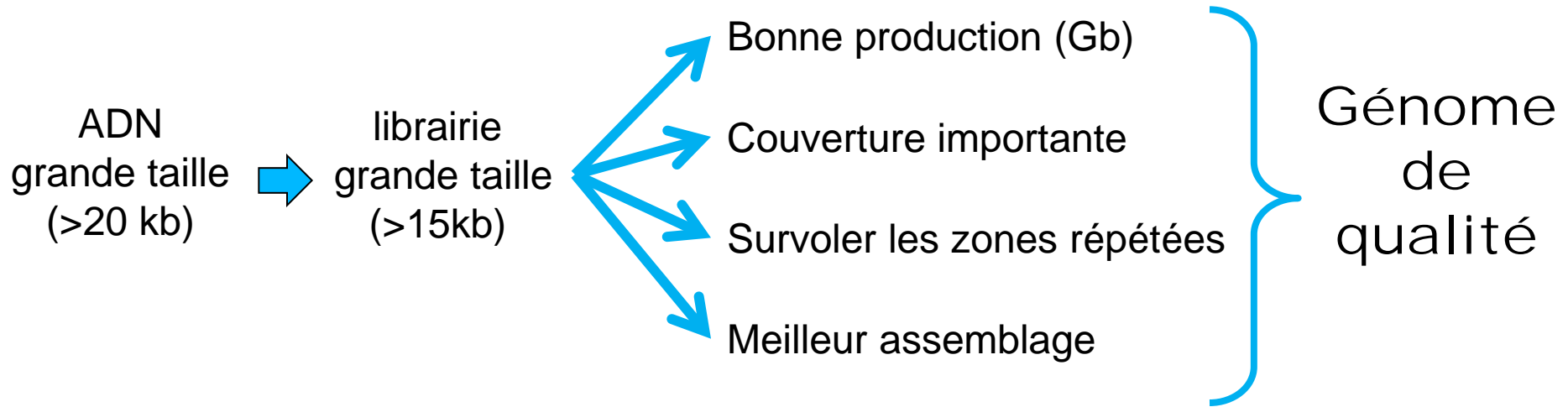
Microsatellites

Centromères

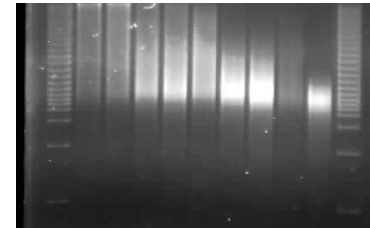
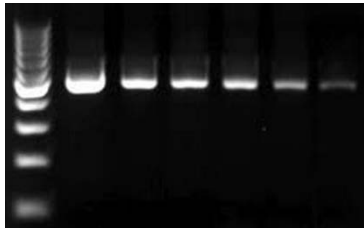
Assembleurs = Utilisation des + longues séquences corrigées



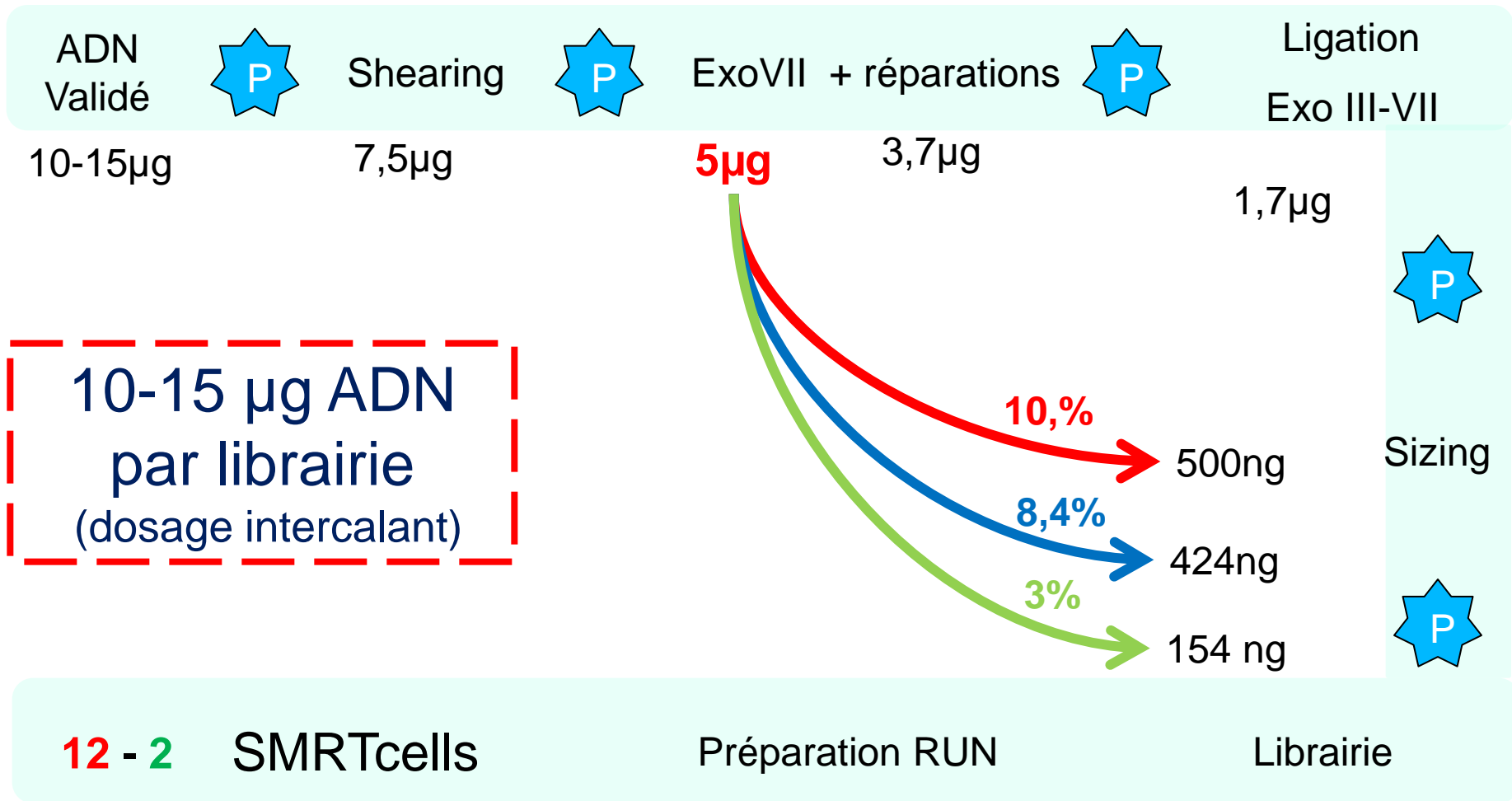
# Pourquoi viser haut ?



ADN peu dégradé > 20 kb  
Photo Gel /champs pulsé



# Pourquoi des tonnes?

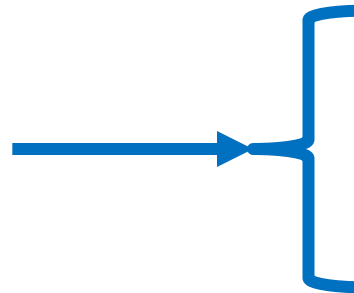


# Le graal n'existe pas !



## Protocole/kit magique

Presque rien  
de  
matériel

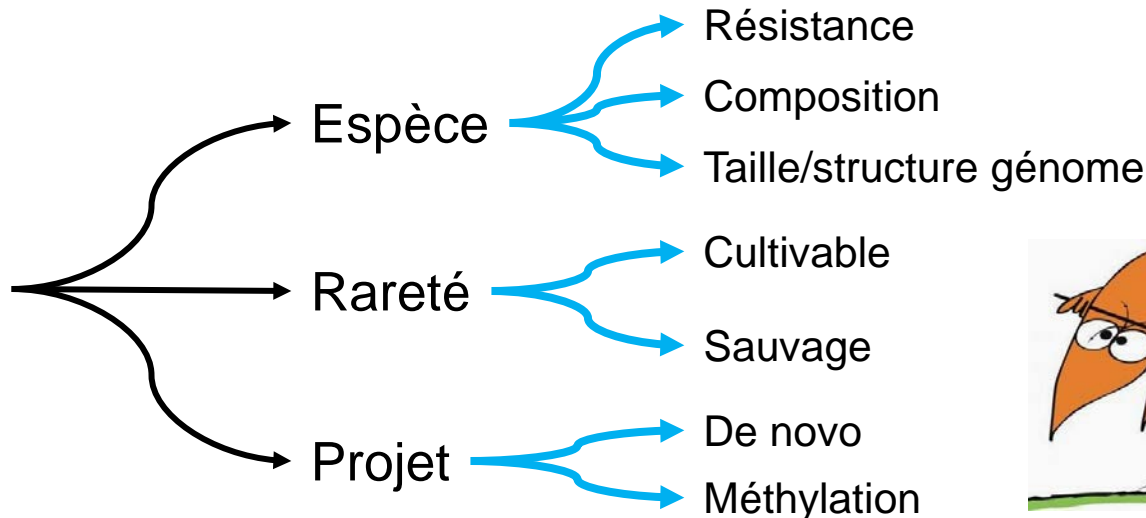


Pureté fantastique

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 »

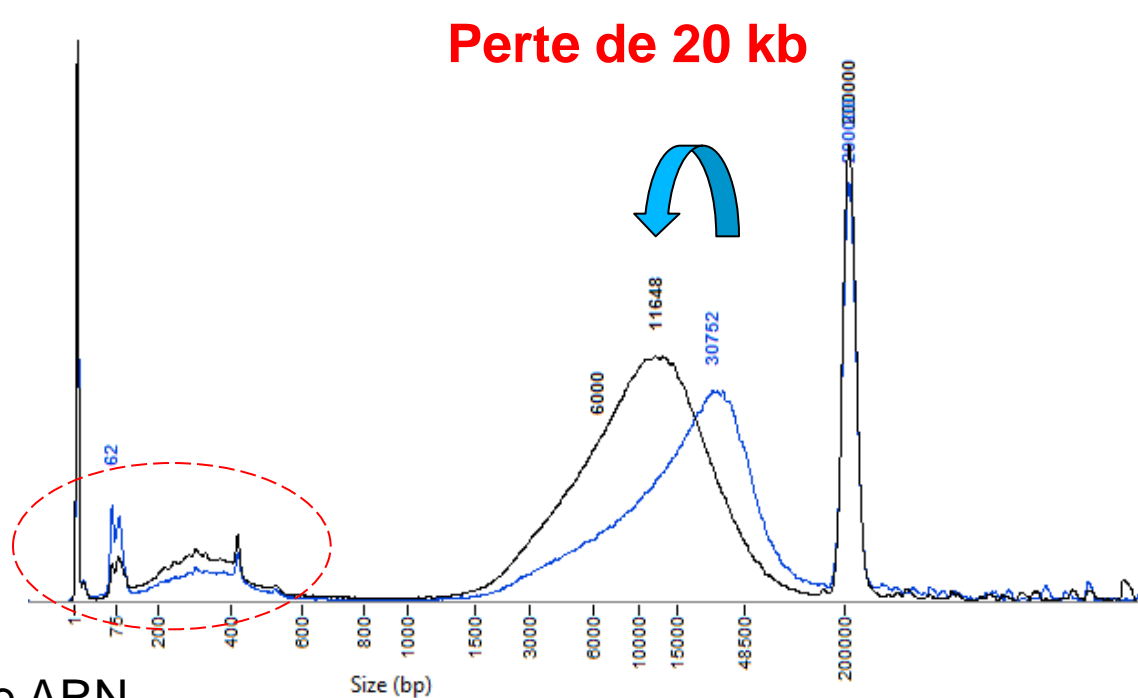
Contactez nous très tôt



# Quelques écueils!

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

Effet dévastateur d'une purification sur colonne

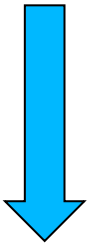


Présence ARN

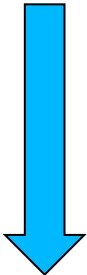
# Résistance et fragilité!

Résistance de l'ADN = Protocole extraction

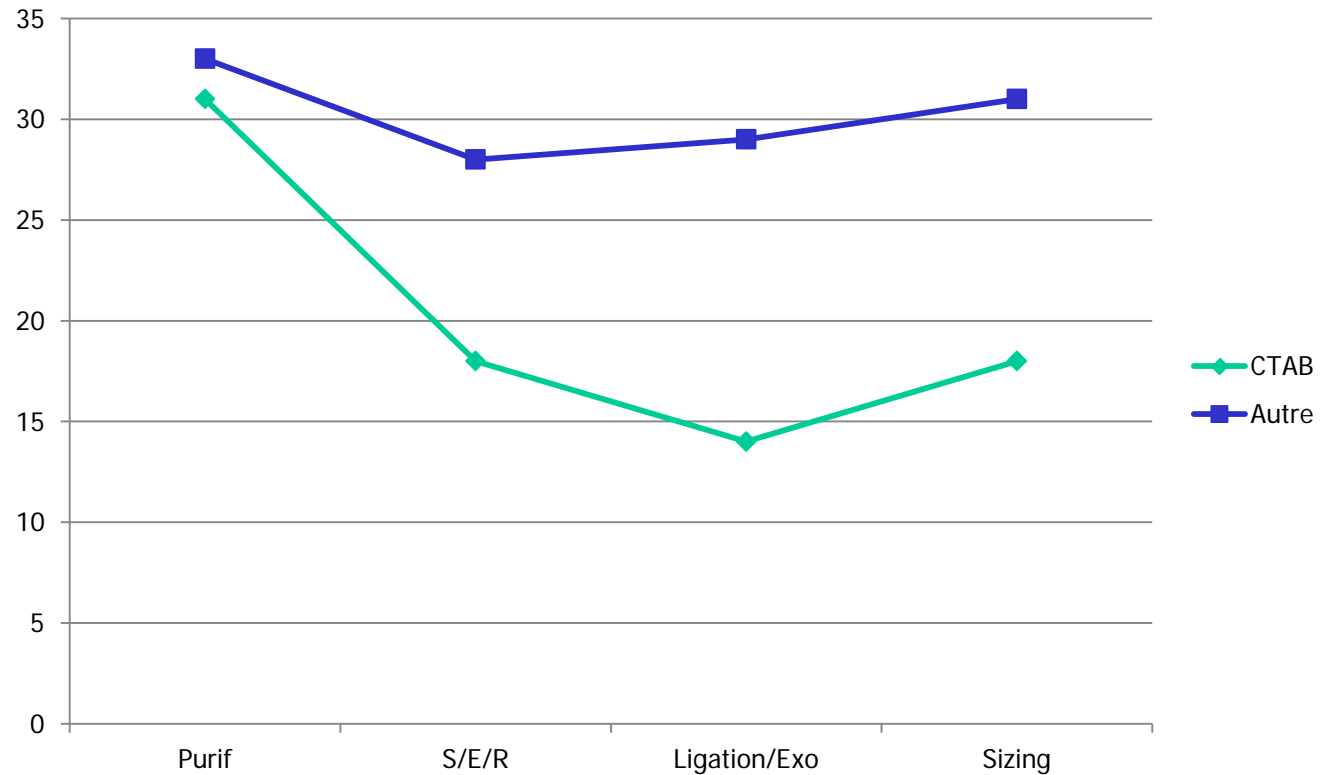
Effet du CTAB



Fragilisation



Librairie + petite



# Conclusion

## Nos prérequis

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

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

>10 $\mu$ 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**