

FICHE PRODUIT : RNA-SEQ

Le RNA-Seq permet d'étudier qualitativement et quantitativement le transcriptome grâce au séquençage à haut débit.

1 Protocoles de préparation de bibliothèques et options de séquençage proposés

1.1 Protocoles de préparation de bibliothèques

Sept protocoles de préparation de bibliothèques différents sont actuellement proposés par la plateforme. Le choix du protocole le plus adapté dépend principalement de la quantité d'ARN total disponible ainsi que des types d'ARN étudiés, comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

#	Protocole de préparation de bibliothèque	Kit utilisé par la plateforme	Quantité d'ARN total		Type d'ARN étudiés	Directionnel*
			Minimale	Optimale		
1†	mRNAseq/ standard quantity	TruSeq RNA SamplePrep	200 ng	1 µg	ARN polyA+ de taille > 100b	Non
2	Stranded mRNAseq/ standard quantity	Directional mRNA-Seq SamplePrep	200 ng	1µg	ARN polyA+ de taille > 100b	Oui
3	mRNAseq/ low input (Smarter)	SMART-Seq v4 UltraLow Input RNA kit + Nextera XT DNA sample preparation Kit	100 cellules	10 ng	ARN polyA+ de taille > 100b	Non
4	mRNA-seq/ single cell	SMARTer Ultra Low RNA Kit for the Fluidigm C1 System + Nextera XT DNA sample preparation Kit	1 cellule	1 cellule	ARN polyA+ de taille > 100b	Non
5	Total RNAseq Ribozero/ standard quantity	Truseq Stranded Total RNA SamplePrep	100 ng	1 µg	Tous les ARN de taille > 100b	Oui
6	Total RNAseq/low input (Ovation)	Ovation RNA-Seq System V2 + Ovation SP Ultralow Library systems	500 pg	10 ng	Tous les ARN de taille > 100b	Non
7‡	Small RNA-seq	Truseq SmallRNA SamplePrep	1 µg	2 µg	Tous les petits ARN avec 5'P et 3'OH (la taille désirée peut être choisie par le porteur de projet)	Oui

* Les protocoles directionnels conservent l'information du sens de transcription : les lectures résultantes sont dans le sens inverse comparé au sens de transcription pour les protocoles 2 et 5 ou dans le même sens que la transcription pour le protocole 7. Au contraire, les protocoles non directionnels ne conservent pas l'information du sens de transcription.

† Ce protocole peut être utilisé sur demande spécifique, pour d'anciens projets initiés avec ce protocole. Nous ne recommandons pas ce protocole pour un nouveau projet, dans la mesure où le protocole #2 a les mêmes propriétés et fournit en plus l'information du sens de transcription.

‡ Nous encourageons les porteurs de projet intéressés à lire notre fiche produit dédiée à cette application.

Nous recommandons de choisir le même protocole au sein d'un projet. Ainsi, si vous souhaitez comparer vos données à des jeux de données préalablement obtenus, nous vous recommandons de choisir, si possible, le même protocole.

1.2 Options de séquençage

Les bibliothèques seront séquençées à l'aide de la technologie HiSeq 4000 d'Illumina. Nous pouvons générer des lectures simples (single-read) ou paires (paired-end) de 50 ou 100 pb. Le tableau ci-dessous fournit des recommandations de longueur de séquençage en fonction des objectifs du projet. Ce tableau ne liste qu'un sous-ensemble des questions possibles pouvant être étudiées par RNA-seq. Nous encourageons les porteurs de projet à nous contacter afin d'obtenir plus d'informations sur ces différentes options de séquençage si nécessaire.

Finalité du projet		Recommandations		
But de l'expérience	Types d'ARN étudiés	Protocole de préparation de librairie*	Type de séquençage	Taille de lecture
Quantification de l'expression de gènes annotés	polyA+	Stranded mRNAseq/ standard quantity	Single-read	50 pb
	tous	Total RNA Ribozero/ standard quantity	Single-read	50 pb
Analyse d'évènements d'épissage alternatif avec un génome de référence, identification de nouveaux transcrits ou assemblage de transcriptome <i>de novo</i>	polyA+	Stranded mRNAseq/ standard quantity	Paired-end	100 pb
	tous	Total RNA Ribozero/ standard quantity	Paired-end	100 pb

* En considérant que la quantité de matériel de départ est suffisante. Si ce n'est pas le cas se référer au tableau précédent pour des protocoles alternatifs.

Ces recommandations concernent un nouveau projet. Si vous souhaitez comparer vos données avec d'autres jeux de données de RNA-seq précédemment obtenus, nous vous recommandons de conserver le même protocole.

La **profondeur de séquençage** dépend de la finalité du projet, de la nature des échantillons et du protocole de préparation de bibliothèques. Ainsi, avec les protocoles de préparation de bibliothèques permettant l'étude de tous les ARN (protocoles #5 et #6), davantage de molécules d'ARN différentes seront séquençées par rapport à ce qui est réalisé avec des protocoles ciblant les ARN polyadénylés. Ainsi, davantage de lectures seront nécessaires pour obtenir la même couverture sur les ARN polyadénylés. Pour des tissus de mammifères nous recommandons de multiplexer jusqu'à 8 bibliothèques par ligne préparées avec un protocole polyA+ (protocoles #1 à #3) ou jusqu'à 5 bibliothèques par ligne préparées avec des protocoles permettant d'étudier l'ensemble des ARN (protocoles #5 et #6), lorsque la finalité du projet est la quantification de l'expression des gènes annotés. Une plus grande profondeur de séquençage est nécessaire pour les expériences où la sensibilité de détection est importante, par exemple pour la découverte de nouveaux transcrits ou pour quantifier de manière précise différentes isoformes.

1.3 Plan d'expérience

Il est particulièrement important d'inclure des **réplicats** dans votre planification expérimentale (cf. Hansen et al., Nature Biotechnology 29:572-573, 2011). Nous vous recommandons de définir un plan expérimental aléatoire et équilibré, ainsi que d'essayer de réduire au maximum les effets lots durant la préparation des échantillons. Nous vous encourageons à nous contacter avant de commencer vos expériences pour toute question relative à votre planification expérimentale.

2 Services proposés

1. La vérification des échantillons :
 - Quantification et vérification des ARN totaux par fluorimétrie (Qubit ou Varioskan) et électrophorèse capillaire (Bioanalyzer, Agilent), lorsque la quantité de matériel de départ le permet.
2. La préparation de bibliothèques :
 - Préparation des bibliothèques et ligation d'adaptateurs de séquençage possédant un index. Les index sont des séquences d'ADN utilisées pour identifier chaque échantillon. L'utilisation d'index permet de séquencer plusieurs échantillons sur une même piste de flow cell.
 - Quantification et vérification de la qualité des bibliothèques par électrophorèse capillaire (Bioanalyzer d'Agilent ou Fragment Analyzer d'AATI).
3. Le séquençage avec le séquenceur HiSeq 4000 d'Illumina :
 - Chargement des bibliothèques sur la flow cell et génération de clusters avec la Cbot (Illumina).
 - Séquençage simple ou paillé avec des tailles de lectures de 50 ou 100 pb selon les options choisies par le porteur de projet.
4. L'analyse primaire des données :
 - Démultiplexage et création des fichiers FASTQ.
 - Suppression des dimères d'adaptateur.
 - Contrôle de la qualité des séquences.
 - Détection d'éventuelles contaminations.
 - Création d'un rapport synthétisant les méthodes utilisées par le pipeline d'analyse primaire et les résultats obtenus (un rapport détaillé pour chaque échantillon et un rapport global plus synthétique pour chaque projet).
5. L'analyse ultérieure des données (optionnelle, voir le paragraphe 6 pour plus d'informations).

3 Préparation des échantillons par le porteur de projet

Le porteur de projet réalise la préparation des échantillons d'ARN totaux. Le succès final de l'expérience est étroitement lié à la qualité des échantillons d'ARN totaux de départ. Un soin tout particulier doit être pris pour éviter toute trace de contamination (phénol, DEPC, ADN génomique, etc.) ou de dégradation.

Caractéristiques des échantillons à fournir	
Quantité	En fonction du protocole de préparation des bibliothèques.
Volume minimal	10 µl.
Qualité	DO260/DO280 ≥ 1,8 Absence de signe de dégradation sur un gel d'agarose <i>ou</i> ratio 28S/18S ≥ 1,6 et/ou RIN ≥ 8 sur un profil du Bioanalyzer d'Agilent.
Conditions d'envoi	En solution dans de l'eau sur de la carboglace. Les noms des échantillons doivent être clairement identifiés sur les tubes et dans le LIMS de la plateforme.

4 Contrôles qualité réalisés par la plateforme

Les contrôles qualité listés ci-dessous sont effectués par la plateforme. Les résultats sont envoyés par e-mail au porteur de projet à l'issue de chacune des étapes. Les contrôles qualité des étapes 1 et 2 sont également accessibles sur le LIMS de la plateforme (<http://ngs-lims.igbmc.fr>).

1. Vérification des échantillons	
Quantité (Fluorimétrie)	≥ quantité minimale requise (dépend du protocole)
Qualité (électrophorèse capillaire)	Ratio 28S/18S ≥ 1,6 et/ou RIN ≥ 8
2. Préparation des librairies	
Profil de la librairie (électrophorèse capillaire)	Taille moyenne comprise entre 200 et 600 pb
Pureté de la librairie (électrophorèse capillaire)	Présence minoritaire de dimères d'adaptateur (bande à 120-130pb).
3. Séquençage et analyse primaire des données	
Nombre total de clusters (i.e. nombre de reads en single-read et nombre de reads ÷ 2 en paired-end)	≥ 250 x L millions où L est le nombre total de lignes demandées par le porteur de projet
Scores de qualité (Phred score) > 30	≥ 85% des bases pour des lectures de 50 b. ≥ 75% des bases pour des lectures de 100 b.

5 Livraison des résultats par la plateforme

Pour chaque échantillon, les résultats suivants sont mis à la disposition du porteur du projet :

- Les données brutes de séquençage (séquences nucléotidiques au format FASTQ ayant passé le filtre qualité et ne correspondant pas à des dimères d'adaptateur).
- Un rapport présentant les contrôles qualité de séquençage (au format PDF).

Deux fichiers additionnels sont fournis par projet :

- Un rapport (fichier PDF) présentant le nombre de lectures brutes, le pourcentage de bases ayant un score de qualité Phred supérieur à 30 et la taille de tous les fichiers bruts (FASTQ) à télécharger.
- Un fichier texte fournissant la chaîne de caractère MD5 associée à chaque fichier FASTQ à télécharger. Le porteur de projet peut utiliser ces informations pour vérifier l'intégrité des fichiers après leur téléchargement (une documentation est disponible à l'adresse suivante : <http://genomeast.igbmc.fr/wiki/doku.php?id=help:md5>).

Un e-mail de livraison des données informe le porteur de projet qu'il peut télécharger ses données de séquences en utilisant un login et un mot de passe sur le serveur FTP de la plateforme.

Conformément aux « Conditions Générales de la Plateforme GenomEast », il est rappelé que le porteur du projet est responsable de la sauvegarde et de l'archivage de ses données. La plateforme s'engage à les conserver que pour une durée limitée de six mois après leur mise à disposition.

6 Analyse ultérieure des données (optionnelle)

L'analyse ultérieure des données n'est pas prise en charge dans la prestation standard. Néanmoins, elle peut être réalisée sous la forme d'une collaboration avec des membres de la plateforme. Elle peut comprendre :

- L'alignement sur un génome de référence en prenant en compte les lectures localisées sur des jonctions d'épissage (à cheval sur plusieurs exons).
- La quantification de l'expression des gènes en utilisant des annotations connues.
- La normalisation, l'analyse exploratoire des données et les analyses statistiques afin de mettre en évidence les gènes significativement différentiellement exprimés entre plusieurs conditions.

- Des analyses fonctionnelles.
- La prédiction de transcrits.
- L'analyse d'évènements d'épissage alternatif.

La liste ci-dessus n'est pas exhaustive et nous recommandons aux porteurs de projet qui souhaiteraient initier une collaboration avec la plateforme de nous contacter avant de commencer leur projet pour que nous puissions les aider à définir les analyses qui pourraient répondre au mieux aux questions biologiques posées.