

GUIDE D'USAGE

**Solutions de Séquençage Sanger
Protocoles One-Shot & Optimized**

A – INFORMATIONS GENERALES

Descriptif technique :

- Réception et contrôle de la qualité des échantillons (en tubes, plaques incomplètes et/ou plaques complètes).
- Purification des produits PCR.
- Quantification de tous les échantillons.
- Séquençage sur séquenceur 3730XL.
- Lecture des séquences jusqu'à 1000pb.
- Validation du processus de séquençage par analyse des résultats des contrôles de qualité (T+/T-).

Spécificités de l'option Optimized :

- *Analyse du profil de chaque séquence par le service Sanger de GenoScreen.*
- *Retraitements gratuits de séquences sous certaines conditions.*

Vous obtenez :

- Des chromatogrammes (.abi files) et des séquences au format fasta.
- Le détail des résultats par mail et/ou par transfert sur un serveur FTP sécurisé par un identifiant et un mot de passe.

Spécificités de l'option Optimized :

- *Compte rendu spécifique contenant un commentaire détaillé de chaque profil de séquence.*
- *Suivi personnalisé de votre projet.*

Délai de rendu :

- Délai des rendus de 24h à 48h jusqu'à 8 plaques reçues en un seul lot.

Services inclus :

- Confidentialité des informations reçues et des résultats obtenus.
- Accès direct aux ingénieurs et experts de notre plate-forme, et ce, du lundi au vendredi de 9h00 à 17h30.
- Assistance téléphonique gratuite.
- Stockage des échantillons et amorces spécifiques durant 15 jours ouvrés (ou plus sur demande).
- GenoScreen fournit gratuitement les amorces universelles.
- Acheminement gratuit des échantillons sous certaines conditions (voir rubrique D – Envoi des échantillons).

Conditionnements possibles :

- Echantillons reçus en tubes.
- Echantillons reçus en plaques 96 puits incomplètes :
 - Fournir 24 à 94 échantillons par plaque,
 - Maximum de 4 amorces par plaque à fournir en tubes,
 - Pour plus de 4 amorces, fournir une plaque miroir contenant les amorces correspondantes.
- Echantillons reçus en plaques 96 puits complètes :
 - Fournir 94 échantillons par plaque,
 - 1 seule amorce autorisée par plaque, à fournir dans un tube.

Les échantillons reçus en barrettes fixées sur un support annoté seront considérés comme étant en plaque à partir de 24 échantillons.

B – FORMULAIRE DE DEMANDE DE SEQUENCAGE D'ADN

1/ Remplir entièrement et informatiquement le formulaire de demande de séquençage

Le service Sanger étant en partie automatisé, il est donc demandé aux clients de porter une attention particulière au remplissage du formulaire de demande de séquençage :

- Compléter l'ensemble des colonnes ; chacune ayant son importance pour la gestion de la demande de séquençage
- Faire correspondre chaque ligne du tableau à une seule réaction de séquençage.

Remarque : certaines cellules sont limitées en nombre de caractères (10 à 15 caractères maximum).

Pour des échantillons fournis en tubes :

Exemple de formulaire pour un échantillon A à séquencer avec deux amorces spécifiques (1 et 2)

QUANTITÉ												
Quantité nécessaire pour UNE réaction de séquençage : Produit PCR : 50 à 200ng (selon la taille) - Plasmide : 500ng - Cosmide ou BAC : 2µg - Amorce : 2,5 à 5µM												
Merci de fournir une quantité adaptée au nombre de séquences souhaité ainsi que pour les éventuels retraitements												
FORMAT D'ENVOI												
<input checked="" type="radio"/> Tube(s) <input type="radio"/> Plaque												
Nom demandeur	Tube	ÉCHANTILLONS					AMORCES				COMMENTAIRES	
		Nom de l'échantillon	Nature de l'échantillon	Taille du produit	Conc. (ng/µL)	Vol. (µL)	Amorce universelle	Amorce spécifique	Conc. (µM)	Vol. (µL)		
1	Genoscreen	-	A	PCR	900 à 1000	40	20		1	5	10	
2	Genoscreen	-	A	PCR	900 à 1000	40	20		2	5	10	
3		-										
4		-										
5		-										
6		-										
7		-										
8		-										
9		-										
10		-										
11		-										
12		-										
13		-										
14		-										
15		-										
16		-										
17		-										
18		-										
19		-										
20		-										
21		-										
22		-										
23		-										
24		-										
25		-										
26		-										
27		-										

Pour des échantillons fournis en plaques :

Dans le cas d'une plaque avec un nombre « n » d'amorces à utiliser pour un même échantillon, « n » formulaires devront être remplis (un formulaire par amorce) en conservant le même nom de plaque, et ce, afin de conserver la référence des puits.

Aussi, veuillez préférer l'organisation en colonnes plutôt qu'en lignes et éviter les puits vides entre les échantillons.

Exemple de formulaire pour l'échantillon B à séquencer avec l'amorce 3

QUANTITÉ												
Quantité nécessaire pour UNE réaction de séquençage : Produit PCR : 50 à 200ng (selon la taille) - Plasmide : 500ng - Cosmide ou BAC : 2µg - Amorce : 2,5 à 5µM												
Merci de fournir une quantité adaptée au nombre de séquences souhaité ainsi que pour les éventuels retraitements												
FORMAT D'ENVOI												
<input type="radio"/> Tube(s) <input checked="" type="radio"/> Plaque Nom de la plaque: <u>Genoscreen-Plaque1</u>												
Nom demandeur	ÉCHANTILLONS							AMORCES				COMMENTAIRES
	Tube	Nom de l'échantillon	Nature de l'échantillon	Taille du produit	Conc. (ng/µL)	Vol. (µL)	Amorce universelle	Amorce spécifique	Conc. (µM)	Vol. (µL)		
1	Genoscreen	A1	B	PCR	900 à 1000	40	20		3	5	10	
2		B1										
3		C1										
4		D1										
5		E1										
6		F1										
7		G1										
8		H1										
9		A2										
10		B2										
11		C2										
12		D2										
13		E2										
14		F2										
15		G2										
16		H2										
17		A3										
18		B3										
19		C3										
20		D3										
21		E3										
22		F3										
23		G3										
24		H3										
25		A4										
26		B4										
27		C4										

Exemple de formulaire pour l'échantillon B à séquencer avec l'amorce 4

QUANTITÉ												
Quantité nécessaire pour UNE réaction de séquençage : Produit PCR : 50 à 200ng (selon la taille) - Plasmide : 500ng - Cosmide ou BAC : 2µg - Amorce : 2,5 à 5µM												
Merci de fournir une quantité adaptée au nombre de séquences souhaité ainsi que pour les éventuels retraitements												
FORMAT D'ENVOI												
<input type="radio"/> Tube(s) <input checked="" type="radio"/> Plaque Nom de la plaque: <u>Genoscreen-Plaque1</u>												
Nom demandeur	ÉCHANTILLONS							AMORCES				COMMENTAIRES
	Tube	Nom de l'échantillon	Nature de l'échantillon	Taille du produit	Conc. (ng/µL)	Vol. (µL)	Amorce universelle	Amorce spécifique	Conc. (µM)	Vol. (µL)		
1	Genoscreen	A1	B	PCR	900 à 1000	40	20		4	5	10	
2		B1										
3		C1										
4		D1										
5		E1										
6		F1										
7		G1										
8		H1										
9		A2										
10		B2										
11		C2										
12		D2										
13		E2										
14		F2										
15		G2										
16		H2										
17		A3										
18		B3										
19		C3										
20		D3										
21		E3										
22		F3										
23		G3										
24		H3										
25		A4										
26		B4										
27		C4										

2/ Renvoyer par mail le formulaire complété informatiquement le jour de l'envoi des échantillons à l'adresse du support technique Sanger :

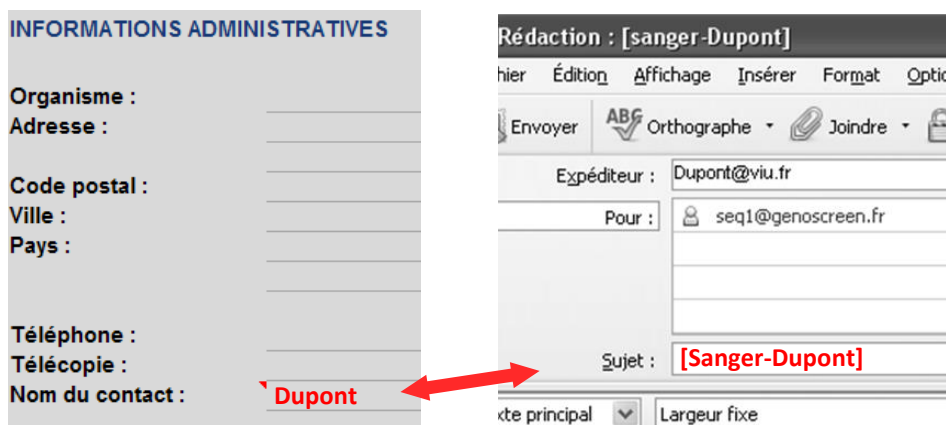
seq1@genoscreen.fr

L'objet de votre mail devra être sous la forme suivante : **[Sanger – Nom du contact]**.

Le nom du contact figurant dans votre mail doit correspondre au nom de contact figurant sur votre formulaire.

Exemple :

Nom du contact : Mr Dupont



3/ Imprimer le formulaire rempli informatiquement et l'envoyer avec les échantillons correspondants

La prestation de séquençage ne sera engagée qu'à réception du formulaire de demande de séquençage dûment rempli. GenoScreen se réserve le droit de mettre en attente toute prestation dont le formulaire ne respecte pas les points exposés ci-dessus.

C – CONDITIONNEMENT DES ECHANTILLONS

1/ Conditionnements en plaques et/ou tubes :

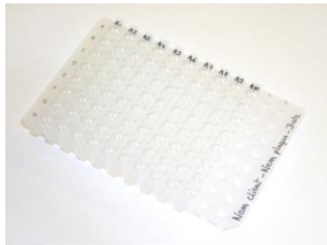
GenoScreen recommande les références suivantes (distribuées par la société Dutsher) :

- **Plaques 96 puits** : Sorenson Bioscience, Imc
0.2mL Rigid PCR Ultra Plate 96 Well
Référence 26190
- **Films adhésifs thermoscellables** : 4titude
Adhesive film PCR Cseal
Référence 016028F
- **Films thermoscellables** : 4titude
Sealable film Peel Seal
Référence 016279F
- **Caps strips** : Thermo Scientific
Domed Caps Strip
Référence AB-0265
- **Tubes 1,7mL** : Sorenson Bioscience, Imc
Tubes 1,7mL Multi
Référence 017040A

Remarques techniques pour le conditionnement des échantillons :

- Pour un envoi d'échantillons en plaque 96 puits, merci de laisser 2 puits vides réservés à GenoScreen (pour les contrôles de qualité internes).
- Diluer vos échantillons et amorces dans l'eau (pas dans de l'EDTA ni du TE).
- Merci d'annoter vos tubes et plaques à l'aide d'un marqueur indélébile afin d'éviter tout effacement (ne pas apposer de bandes adhésives autour des tubes).
- Vos échantillons peuvent être envoyés à température ambiante dans des conditionnements adaptés, tels que des enveloppes à bulles.
- Pour vos envois en plaque : veuillez insérer une séparation rigide (du type carton) entre 2 plaques, et ce, afin d'éviter tout risque de perçage des plaques entres-elles.

GENOSCREEN ACCEPTE VOS ECHANTILLONS DANS LES CAS SUIVANTS :



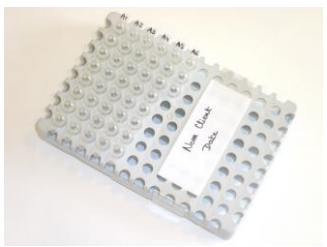
Plaques annotées scellées par des caps strip



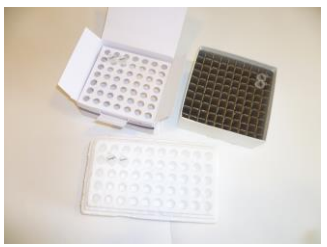
Plaques annotées
thermoscellées
(voir Annexe 1)



Tubes de 1,5 ou 2mL annotés
(type Eppendorf ou bouchon à pas de vis)

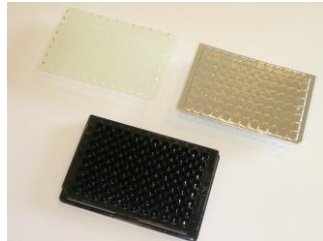


Microtubes en barrettes annotés et fixés sur un
support annoté



Tubes annotés rangés dans l'ordre sur un portoir
ou dans une boîte (du type Genobox)

GENOSCREEN N'ACCEPTE PAS VOS ECHANTILLONS DANS LES CAS SUIVANTS :



Plaques à fond rond/plat, avec film adhésif, avec film aluminium, ou non thermoscellées



Microtubes en vrac ou en barrettes non fixés sur un support



Parafilm, tubes mal fermés, tubes inférieurs à 1.5mL (ex : microtubes), tubes larges (type culture)



Tubes en vrac

- ATTENTION, GENOSCREEN N'ACCEPTE PAS LES ECHANTILLONS NON ANNOTES -

2/ Quantités à fournir :

	PLASMIDE	PRODUIT PCR	COSMIDE	BAC
QUANTITES A FOURNIR	500ng	PCR < 500pb : 50ng 500 < PCR < 1000pb : 100ng PCR > 1000pb : 200ng	2µg	2µg
CONCENTRATION	50 à 200ng/µL	5ng/µL/100pb	200 à 300ng/µL	200 à 300ng/µL
<u>VOLUME MINIMAL</u>	10µL	20µL	10µL	10µL

Les quantités indiquées sont celles requises pour la réalisation d'une réaction de séquençage.

Pour tout échantillon à séquencer avec plusieurs amorces, veuillez multiplier les quantités indiquées par le nombre de séquençages que vous souhaitez réaliser, et ce, en tenant compte des éventuels retraitements.

3/ Préparation des amorces :

Si vous souhaitez réaliser les réactions de séquençage avec vos propres amorces, nous recommandons de suivre les indications suivantes :

- Volume et concentration : 10µL d'amorce minimum, entre 2.5pmol/µL et 5pmol/µL,
- Absence de sites d'hybridation secondaires (sites secondaires d'accroche),
- Pas de mismatches,
- Longueur de 18-25 bases,
- Pourcentage de GC compris entre 40% et 60%,
- Tm (température de fusion moléculaire) entre 50°C et 60°C,
- Pas d'épingles (hairpins) > 3pb,
- Sans sels, EDTA ou autres contaminants.

**Volume minimal :
1µL/réaction**

D – ENVOI DES ECHANTILLONS

Les enveloppes Chronopost et les boîtes Genobox sont disponibles sur simple demande au service de support technique Sanger, et ce, à partir d'une quantité donnée d'échantillons.

1/ Services de transport des échantillons de GenoScreen :

GenoScreen prend en charge gratuitement l'envoi des échantillons suivant ces conditions :

- un minimum de 20 séquences par envoi pour les clients basés en France Métropolitaine*.
- un minimum de 48 à 96 séquences par envoi pour les clients en provenance d'autres pays** et pour les DOM-TOM**.

** Si le colis ne contient pas le minimum de séquences indiqué dans le devis, le coût du transport sera facturé au client (à titre indicatif, et sauf conditions particulières, un envoi depuis la France métropolitaine sera facturé 15,00€ HT)*

*** Se rapprocher du service commercial afin de connaître les conditions d'envoi minimum à partir de votre pays ou DOM-TOM (à titre indicatif, si les conditions d'envoi ne sont pas respectées, un envoi depuis un autre pays sera facturé 25,00€ HT, et un envoi depuis les DOM-TOM sera facturé 45,00€ HT).*

Pour bénéficier de ce service depuis la France :

1 / GenoScreen vous fera parvenir des enveloppes prépayées et pré-remplies du transporteur ainsi que des boîtes Genobox pour l'envoi de vos échantillons, et ce, sur simple demande au service Sanger (par mail ou téléphone).

2 / Le client envoie le colis par voie postale et nous le recevrons sous 24h.

Pour bénéficier de ce service depuis un autre pays ou des DOM-TOM :

1 / Le client nous informe de son envoi par mail (seq2@genoscreen.com) en précisant l'adresse exacte pour l'enlèvement des échantillons

2 / GenoScreen se charge de planifier l'enlèvement directement auprès de son transporteur agréé.

3/ Le client reçoit un mail avec un formulaire à remplir en ligne sur l'interface web du transporteur.

4/ Nous recevrons votre envoi dans les 24h après sa collecte.

2/ Envois postaux par le client :

Merci d'adresser vos colis à l'adresse suivante :

GENOSCREEN/Service SANGER
1 rue du professeur Calmette
59000 LILLE- France

Veillez à noter visiblement le numéro de devis correspondant à la prestation sur votre colis et y joindre le formulaire imprimé. Les contacts figurant sur le formulaire recevront un mail d'accusé de réception de la part du service de support Sanger.

3/ Dépôts d'échantillons dans les laboratoires de GenoScreen :

Afin de maintenir des services de qualité et d'assurer des délais de réalisation courts, **merci de déposer vos échantillons avant 12h00.**

Les échantillons déposés après 12h00 seront considérés comme étant réceptionnés le jour suivant.

Nous conservons vos échantillons 15 jours ouvrés.
Ce délai peut être prolongé sur simple demande du client (la durée sera à préciser par mail ou téléphone)

E – MODALITES ADMINISTRATIVES

La prestation sera entreprise à réception des échantillons/données, du formulaire de séquençage et du bon de commande.

Le bon de commande devra mentionner les informations suivantes :

- Numéro du devis faisant référence à la prestation,
- Coordonnées de l'organisme destinataire de la facture (adresse, numéro de téléphone et e-mail, contact, numéro de TVA intracommunautaire),
- Coordonnées du laboratoire de livraison des résultats (adresse, numéro de téléphone et e-mail, contact).

La facturation de notre prestation se fera dans les conditions suivantes :

- Facturation unique : si l'exécution des travaux dure moins d'un mois (durée mentionnée sur le devis), Genoscreen adressera au client une facture unique correspondant au travail réalisé et livré.
- Facturation échelonnée : si l'exécution des travaux dure plus d'un mois (durée mentionnée sur le devis), Genoscreen pourra adresser au client des factures échelonnées, chacune d'elle ayant trait aux travaux réalisés, conformément aux étapes de réalisation mentionnées au devis.

Le délai accordé pour le règlement de nos factures est de 30 jours nets.

30,00€ HT de frais de dossiers seront facturés pour tout BDC reçu dont le montant à facturer est inférieur à 250,00€ HT.

ANNEXE 1 : PROTOCOLE DE SCELLAGE

Pour thermosceller vos plaques, deux solutions s'offrent à vous :

- Le thermoscellage par thermoscelleuse : 3 sec à 180°C avec un film adapté (voir la rubrique C – Conditionnement des échantillons).
- Le thermoscellage par thermocycleur : 5 min à 80-100°C avec un film adapté (voir la rubrique C – Conditionnement des échantillons) en ne faisant chauffer que le couvercle de l'appareil.