



Guide d'utilisation TELL-Seq™ WGS Library Prep

Pour une taille de génome comprise entre 1 Mb et 5 Gb

À des fins de recherche seulement. Ne pas utiliser dans les procédures diagnostiques.

Document # 100005 v8

Mars 2022

Ce document est la propriété d'Universal Sequencing Technology Corporation et est destiné exclusivement à l'utilisation de ses clients dans le cadre de l'utilisation des produits décrits dans le présent document et à aucune autre fin.

Les instructions contenues dans ce document doivent être suivies avec précision par du personnel correctement formé pour assurer une utilisation correcte et sûre du kit TELL-Seq.

UNIVERSAL SEQUENCING TECHNOLOGY CORPORATION N'ASSUME AUCUNE RESPONSABILITÉ EN CAS D'UTILISATION INCORRECTE DU KIT TELL-SEQ.

©2022 Universal Sequencing Technology Corporation. Tous droits réservés.

TELL-Seq est une marque de commerce de Universal Sequencing Technology Corporation. Tous les autres noms, logos et autres marques sont la propriété de leurs détenteurs respectifs.

Historique des révisions

Doc #C01K001 Rev. A	Octobre 2019	Version initiale
Doc #CO1K001 Rév. B	Décembre 2019	Ajout d'instructions de stockage
Doc #CO1K001 Rév. C	Février 2020	Ajout d'instructions de stockage
Doc #100005 v4	Juin 2020	Changements de volume de réaction
Doc #100005 v5	Août 2020	Kit Haut débit inclus et modification du nombre de cycles d'amplification des libraries.
Doc #100005 v6	Novembre 2020	Mise à jour des instructions sur les amorces de séquençage pour réactifs NovaSeq v1.5
Doc #100005 v7	Mars 2022	Volume de réaction plus important, option de double cleanup SPRI pour les libraries de grande taille, séquences des index 2 pour la feuille d'échantillons.
Doc #100005 v8	Mars 2022	Mise à jour de la manipulation de 2x PCR MMx de "vortex mixing" à "carefully mixing".

Table des matières

1. Introduction	5
Recommandations sur la quantité d'ADNg de départ.....	5
2. Contenu du kit	6
Kit de préparation de library TELL-Seq™ WGS, taille standard	6
Boîte 1 de 2 : Réactif TELL-Seq™ WGS Library Boîte 1	6
Boîte 2 de 2 : Réactif TELL-Seq™ WGS Library Boîte 2	6
TELL-Seq™ Library Multiplex Primer (1-8)	7
TELL-Seq™ Library Multiplex Primer (9-16)	7
TELL-Seq™ Library Multiplex Primer (17-24)	7
TELL-Seq™ Illumina® sequencing Primer Kit.....	8
Kit de préparation de library TELL-Seq™ WGS, HT24	8
Boîte 1 de 2 : TELL-Seq™ WGS Library Reagent, Boite 1, HT24.....	8
Boîte 2 de 2 : TELL-Seq™ WGS Library Reagent, Boite 2, HT24	9
TELL-Seq™ Illumina® Sequencing Primer Kit, HT	9
3. Consommables et équipement (non fournis)	10
Consommables	10
Équipement	10
4. Workflow de préparation de la library TELL-Seq™	11
5. Protocole.....	12
Barcode ADN.....	12
Stabilisation de l'ADN	15
Tagmentation de l'ADN	15
Lavage avec des billes.....	16
Amplification de la library	18
Nettoyage de la library	20
Qualification et quantification la library.....	23
6. Annexes.....	26
Préparation de la library TELL-Seq™ pour très faible quantité d'input	26
Structure et séquençage de la library TELL-Seq™	26
Exemple de figure du % de base par cycle de séquençage Illumina®	27
Guide de séquençage Illumina®	27

Recommandation de longueur de séquençage Illumina®	28
Prise En Compte De La Profondeur De Séquençage.....	28
Séquences d'index d'amorce multiplex de library (c.-à-d. séquences d'index 2).....	29

1. Introduction

Ce protocole explique comment préparer des librairies de séquençage du génome entier (WGS) TELL-Seq™ indexées en paires à l'aide d'un kit de préparation de librairies TELL-Seq WGS à partir d'un échantillon d'ADN génomique dont la taille du génome varie de 1 Mb à 5 Gb pour un séquençage ultérieur sur un système de séquençage Illumina®.

Le kit de préparation de librairies TELL-Seq WGS utilise une technologie innovante : Transposase Enzyme Linked Long-read Sequencing (TELL-Seq™)† pour préparer une librairie paired-end afin de générer des lectures liées (Linked Reads) à un code-barres à partir d'un système de séquençage Illumina®. Couplés au logiciel d'analyse spécifique TELL-Seq, les reads liés peuvent être facilement utilisés pour la recherche de variants à l'échelle du génome, le phasage des haplotypes, la détection de variants de structure, les études métagénomiques et l'assemblage de séquençage de novo.

Un kit et un protocole TELL-Seq™ WGS Library Prep peuvent :

- Générer des libraries TELL-Seq WGS pour une taille de génome comprise entre 1 Mb et 5 Gb
 - **Kit de taille standard**
 - 12 libraries TELL-Seq à partir d'échantillons avec de petits génomes (1 Mb à 200 Mb)
 - ou
 - 6 libraries TELL-Seq à partir d'échantillons avec des génomes de taille moyenne (200 Mb à 1 Gb)
 - ou
 - 4 libraries TELL-Seq à partir d'échantillons avec des génomes de grande taille (1 Gb à 5 Gb)
 - **Kit HT24**
 - 72 libraries TELL-Seq à partir d'échantillons avec de petits génomes (1 Mb à 200 Mb)
 - ou
 - 36 libraries TELL-Seq à partir d'échantillons avec des génomes de taille moyenne (200 Mb à 1 Gb)
 - ou
 - 24 libraries TELL-Seq à partir d'échantillons avec des génomes de grande taille (1 Gb à 5 Gb)
 - Utiliser 0,5 ng à 5 ng d'ADN génomique pour la procédure standard d'input (qté de départ)
 - Utiliser aussi peu que 0,1 ng d'ADN pour les applications à entrée ultra-faible (annexe)
 - Produire des lectures de code à barres liées en utilisant un système de séquençage Illumina®

Recommandations pour la quantité d'ADN génomique de départ :

La quantité d'ADN génomique de départ varie de 0,1 ng à 5 ng en fonction de la taille du génome. Utiliser une méthode fluorométrique pour quantifier l'ADN de départ. Éviter les méthodes qui ne mesurent que l'acide nucléique total, comme le NanoDrop ou d'autres méthodes d'absorbance UV. Si vous utilisez le kit de test Qubit dsDNA BR ou le kit HS, utiliser au moins 2µL de chaque échantillon d'ADN avec 198µL de mix Qubit. L'ADN génomique doit être conservé dans un tampon Tris dont le pH est compris entre 7,5 et 8,0.

† Brevet en instance.

Le ratio entre la mesure d'absorbance à 260 nm et l'absorbance à 280 nm est utilisé comme une indication de la pureté de l'échantillon. Ce protocole est optimisé pour l'ADN avec des valeurs de ratio d'absorbance de 1,8-2,0. S'il y a un excès d'ARN dans l'échantillon d'ADN, il faut l'éliminer avec un traitement à la RNase.

Pour l'analyse par lecture liée (Linked-Read), plus la longueur de l'ADN génomique au départ est importante, meilleurs sont les résultats pour la mise en phase et l'assemblage. L'ADN génomique de Haut Poids Moléculaire (supérieur à 20 Kb) est préférable dans ce protocole. Éviter de casser l'ADN à haut poids moléculaire pendant la manipulation. Éliminer l'ADN de faible poids moléculaire (présence d'un smear de moins de 10 Kb sur un gel) si nécessaire.

2. Contenu du kit

Kit TELL-Seq™ WGS Library Prep Kit,, taille standard (2 boîtes)

Boîte 1 de 2 : Réactifs TELL-Seq™ WGS Library Boîte 1 (PN 100001)

NOTE : Ne pas congeler et décongeler les réactifs de la boîte 1 plus de 6 fois.

Nom du composant	Couleur du bouchon	Volume (μ L)	Température de stockage
5x Reaction Buffer	bouchon Bleu	120	-25°C à -15°C
Barcode Enzyme	bouchon Noir	24	-25°C à -15°C
Cofactor II	bouchon Ambre	120	-25°C à -15°C
Exonucléase	bouchon Jaune	12	-25°C à -15°C
Stabilizer	bouchon Violet	12	-25°C à -15°C
Suspension Buffer	bouchon Naturel	84	-25°C à -15°C
Tagging Enzyme	bouchon Rouge	24	-25°C à -15°C
2x PCR Master Mix	bouchon Rose	150	-25°C à -15°C
Enhancer	bouchon Vert	18	-25°C à -15°C
10x Primer I a	bouchon Blanc	30	-25°C à -15°C

À utiliser avec le 10x Primer II de n'importe quel kit *TELL-Seq Library Multiplex Primer* pour l'amplification de la library.

Boîte 2 de 2: Réactifs TELL-Seq™ WGS Library Box 2 (PN 100002)

Nom du composant	Couleur du bouchon	Volume (µL)	Température de stockage
TELL-Bead	bouchon Orange	76	2°C à 8°C
Wash Solution	bouchon Blanc	4740	2°C à 8°C
Stop Solution ^b	bouchon Naturel	960	2°C à 25°C

^b Avant utilisation, si la solution Stop n'est pas limpide, réchauffer le tube à 37 C. Agiter au vortex pour dissoudre le précipité éventuel. Après la première utilisation, conserver la solution stop remise en suspension à température ambiante pour une utilisation ultérieure.

CONSEIL : QUATRE kits TELL-Seq™ WGS Library Prep de taille Standard comprenant les boîtes 1 et 2, peuvent s'apparier avec UN TELL- Seq Library Multiplex Primer Kit.

TELL-Seq™ Library Multiplex Primer (1-8) Kit (PN 100003)

Nom du composant	Couleur du bouchon	Volume (µL)	Température de stockage
10x Primer II, T501	bouchon Bleu	15	-25°C à -15°C
10x Primer II, T502	bouchon Noir	15	-25°C à -15°C
10x Primer II, T503	bouchon Vert	15	-25°C à -15°C
10x Primer II, T504	bouchon Jaune	15	-25°C à -15°C
10x Primer II, T505	bouchon Violet	15	-25°C à -15°C
10x Primer II, T506	bouchon Naturel	15	-25°C à -15°C
10x Primer II, T507	bouchon Rouge	15	-25°C à -15°C
10x Primer II, T508	bouchon Orange	15	-25°C à -15°C

CONSEIL : Un kit TELL-Seq Library Multiplex Primer (1-8) contient suffisamment d'amorces pour être utilisée avec QUATRE Kits TELL-Seq™ WGS Library Prep de taille standard.

TELL-Seq™ Library Multiplex Primer (9-16) Kit (PN 100009)

Nom du composant	Couleur du bouchon	Volume (µL)	Température de stockage
10x Primer II, T509	BOUCHON Bleu	15	-25°C à -15°C
10x Primer II, T510	BOUCHON Ambre	15	-25°C à -15°C
10x Primer II, T511	BOUCHON Vert	15	-25°C à -15°C
10x Primer II, T512	BOUCHON Jaune	15	-25°C à -15°C
10x Primer II, T513	BOUCHON Violet	15	-25°C à -15°C
10x Primer II, T514	BOUCHON Orange	15	-25°C à -15°C
10x Primer II, T515	BOUCHON Rouge	15	-25°C à -15°C
10x Primer II, T516	BOUCHON Naturel	15	-25°C à -15°C

CONSEIL : Un kit *TELL-Seq Library Multiplex Primer (9-16)* contient suffisamment d'amorces pour être utilisée avec **QUATRE Kits TELL-Seq™ WGS Library Prep** de taille standard.

TELL-Seq™ Library Multiplex Primer (17-24) Kit (PN 100010)

Nom du composant	Couleur du bouchon	Volume (µL)	Température de stockage
10× Primer II, T517	BOUCHON Ambre	15	-25°C à -15°C
10× Primer II, T518	BOUCHON Bleu	15	-25°C à -15°C
10× Primer II, T519	BOUCHON Jaune	15	-25°C à -15°C
10× Primer II, T520	BOUCHON Vert	15	-25°C à -15°C
10× Primer II, T521	BOUCHON Noir	15	-25°C à -15°C
10× Primer II, T522	BOUCHON Violet	15	-25°C à -15°C
10× Primer II, T523	BOUCHON Orange	15	-25°C à -15°C
10× Primer II, T524	BOUCHON Rouge	15	-25°C à -15°C

CONSEIL DE PRO : Un kit *TELL-Seq Library Multiplex Primer (17-24)* contient suffisamment d'amorces pour être utilisée avec **QUATRE Kits TELL-Seq™ WGS Library Prep** de taille standard.

TELL-Seq™ Illumina® Sequencing Primer Kit (PN 100004)

Nom du composant	Couleur du bouchon	Concentration	Volume (µL)	Stockage Température
Read 1 Primer	BOUCHON Noir	100 µM	50	-25°C à -15°C
Read 2 Primer	BOUCHON Blanc	100 µM	50	-25°C à -15°C
Index 1 Primer	BOUCHON Rouge	100 µM	50	-25°C à -15°C
Index 2 Primer	BOUCHON Jaune	100 µM	50	-25°C à -15°C

CONSEIL: Le nombre minimum de séquences qui peuvent être effectuées à l'aide de la quantité de Primer de séquençage fournis varie en fonction du système de séquençage (voir ci-dessous).

Séquenceur	Nombre de run	Primer custom de l'Index 2 est-il nécessaire ?
NovaSeq	4	Réactif v1 : Non; réactif v1.5 : Oui
HiSeq 3000/4000	2	Oui
HiSeq 2000/2500	5	Non
ProchaineSéq	8	Oui
MiSeq	16	Non
MiniSeq	8	Oui

Kit TELL-Seq™ WGS Library Prep, HT24 (2 boîtes)

Boîte 1 de 2 : Réactif TELL-Seq™ WGS Library Box 1, HT24 (PN 100011)

NOTE : Ne pas congeler et décongeler les réactifs de la boîte 1 plus de 6 fois.

Nom du composant	Couleur du bouchon	Volume (µL)	Température de stockage
5× Reaction Buffer	BOUCHON Bleu	720	-25°C à -15°C
Barcode Enzyme	BOUCHON Noir	144	-25°C à -15°C
Cofactor II	BOUCHON Ambre	720	-25°C à -15°C
Exonuclease	BOUCHON Jaune	72	-25°C à -15°C
Stabilizer	BOUCHON Violet	72	-25°C à -15°C
Suspension Buffer	BOUCHON Naturel	504	-25°C à -15°C
Tagging Enzyme	BOUCHON Rouge	144	-25°C à -15°C
2× PCR Master Mix	BOUCHON Rose	900	-25°C à -15°C
Enhancer	BOUCHON Vert	108	-25°C à -15°C
10× Primer I ^a	BOUCHON Blanc	180	-25°C à -15°C

^a À utiliser avec le 10× Primer II de n'importe quel kit *TELL-Seq Library Multiplex Primer* pour l'amplification de la library.

Boîte 2 de 2 : Réactif TELL-Seq™ WGS Library Box 2, HT24 (PN 100012)

Nom du composant	Couleur du bouchon	Volume	Température de stockage
TELL-Bead	BOUCHON Orange	456 µL	2°C à 8°C
Wash Solution	BOUCHON Bleu	28,5 mL	2°C à 8°C
Stop Solution ^b	BOUCHON Blanc	5,76 mL	2°C à 25°C

^b Avant utilisation, si la *Stop Solution* n'est pas limpide, réchauffer le tube à 37°C. Agiter au vortex pour dissoudre le précipité éventuel. Après la première utilisation, conserver la *Stop Solution* remise en suspension à température ambiante pour une utilisation ultérieure.

CONSEIL : DEUX Kits TELL-Seq™ WGS Library Box 1, HT24 comprenant la boîte 1 et la boîte 2 peuvent s'apparier avec TROIS de tous les Kits *TELL-Seq Library Multiplex Primer Kits*.

Kit TELL-Seq™ Illumina® Sequencing Primer, HT (PN 100013)

Nom du composant	Couleur de la bouchon	Concentration	Volume (µL)	Stockage Température
Read 1 Primer	BOUCHON Noir	100 µM 100 µM	300	-25°C à -15°C
Read 2 Primer	BOUCHON Blanc		300	-25°C à -15°C
Index 1 Primer	BOUCHON Rouge	100 µM	300	-25°C à -15°C
Index 2 Primer	BOUCHON Jaune	100 µM	300	-25°C à -15°C

CONSEIL : Le nombre minimum de séquences qui peuvent être effectuées à l'aide de la quantité de Primer de séquençage fournies varie en fonction du système de séquençage (voir ci-dessous).

Séquenceur	Nombre de run	Primer custom de l'Index 2 est-il nécessaire ?
NovaSeq	24	Réactif v1 : Non; réactif v1.5 : Oui
HiSeq 3000/4000	12	Oui
HiSeq 2000/2500	30	Non
ProchaineSéq	48	Oui
MiSeq	96	Non
MiniSeq	48	Oui

3. Consommables et équipement (non fournis)

Consommables

Consommable	Fournisseur
Tube PCR 0,2 mL ou barrette de tubes 0,2 mL	Fournisseur général de laboratoire
Cônes de pipette de 20µL (standard et embout large)	Fournisseur général de laboratoire
Cônes de pipette de 200µL (standard et embout large)	Fournisseur général de laboratoire
Éthanol 200 degrés (absolu) pour biologie moléculaire (500 mL)	Sigma-Aldrich, # E7023
Eau Nucléase-free	Fournisseur général de laboratoire
Billes AMPure XP	Beckman, # A63880
Kit Agilent High Sensitivity DNA*	Agilent, # 5067-4626
TapeStation High Sensitivity D5000 ScreenTape Assay *	Agilent, # 5067-5592, # 5067-5593
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, # Q32851 ou Q32854
Tampon TE, pH 8,0	Fournisseur général de laboratoire

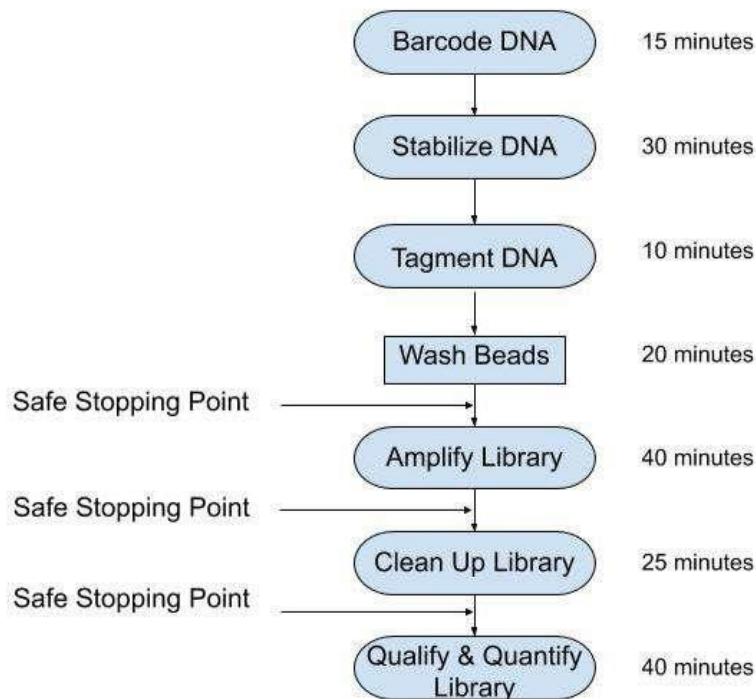
*Selon le système disponible dans le laboratoire de l'utilisateur.

Équipement

Équipement	Fournisseur
Thermocycleur	Applied Biosystems
Support magnétique pour tubes PCR de 0,2 ml	Fournisseur général de laboratoire
Rotateur À Tube	Fournisseur général de laboratoire
Incubateur (pour 35°C)	Fournisseur général de laboratoire
Vortex	Fournisseur général de laboratoire
Microcentrifugeuse	Fournisseur général de laboratoire
Bioanalyseur Agilent*	Agilent
Agilent TapeStation*	Agilent
Fluorimètre Qubit® 3.0	Thermo Fisher Scientific, # Q33216, Q33217 ou Q33218
Seau À Glace	Fournisseur général de laboratoire

*Selon le système disponible dans l'installation utilisateur.

Workflow de préparation de la library TELL-Seq™



5. Protocole

Les kits de préparation de library TELL-Seq WGS sont conçus pour générer jusqu'à 12 libraries TELL-Seq à l'aide d'un kit de taille standard et jusqu'à 72 libraries TELL-Seq à l'aide d'un kit HT24 (voir le tableau ci-dessous). Le protocole suivant décrit des procédures de préparation de libraries basé sur des tailles de génomes d'échantillons spécifiés. Toutes les autres conditions non précisées s'appliqueront à toutes les tailles du génome.

Barcode de l'ADN

I. Échantillons

➤ ADN génomique de départ (utilisateur)

Taille du génome	Entrée Montant	Réaction Vol (μL)	Preps/ Kit de taille standard	Preps/ Kit HT24
1 Mb - 50 Mb	0,5 ng	50	12	72
50 Mb - 100 Mb	1 ng	50	12	72
100 Mb - 200 Mb	1,5 ng	50	12	72
200 Mb - 1 Gb	2-3 ng	100	6	36
1 Gb - 5 Gb	3-5 ng	150	4	24

CONSEIL : Utiliser 4-5 ng d'ADN de départ pour un génome humain.

REMARQUE :

1. L'ADN génomique doit être stocké et dilué dans un tampon Tris avec un pH compris entre 7,5 et 8,0 ou un tampon faiblement concentré en TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0)
2. La quantité recommandée d'ADN génomique de départ est basée sur une taille moyenne de fragments ≥ 30 Kb. Si la taille moyenne de l'ADN génomique est seulement ~ 15 Kb, réduire la quantité de départ de moitié par rapport aux recommandations.

II. Préparation

1. Préparer les consommables suivants :

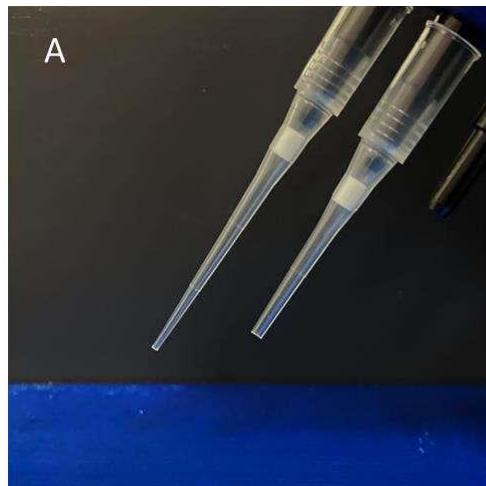
Élément	Localisation	Stockage	Instruction
5x Reaction Buffer	BOUCHON	Boite 1	Décongeler à température ambiante. Mélanger au vortex, puis centrifuger brièvement. Conserver sur la glace.
Cofacteur II	BOUCHON	Boite 1	Mélanger au vortex, puis centrifuger brièvement. Conserver à température ambiante mais éviter la lumière. Bien fermez le bouchon du tube après chaque utilisation.
Barcoding Enzyme	BOUCHON	Boite 1	Centrifuger brièvement. Conserver sur la glace.
TELL Bead	BOUCHON	Boite 2	Centrifuger brièvement. Conserver sur la glace. Bien refermer le bouchon du tube hermétiquement après chaque utilisation pour éviter toute évaporation.
Suspension Buffer	BOUCHON	Boite 1	Décongeler à température ambiante. Mélanger au vortex, puis centrifuger brièvement. Conserver à température ambiante .
Eau Nucléase-free		Utilisateur	Conserver à température ambiante.
Tube PCR ou tubes en barrette de 0,2 mL		Utilisateur	Température ambiante.
Cônes de pipette de 20 µL à bout large		Utilisateur	Température ambiante.
Cônes de pipette de 200 µL à bout large		Utilisateur	Température ambiante.

2. Placer un rotateur à tube dans un incubateur à 35 C.

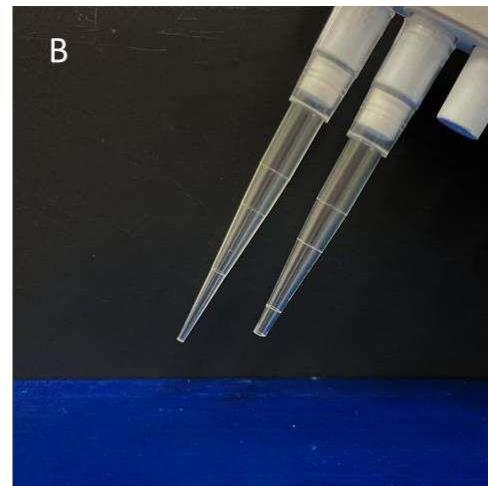


ATTENTION

Utiliser des cônes de pipette à embouts larges pour transférer et mélanger l'ADN génomique de haut poids moléculaire d'éviter de le casser. Si des cônes de pipette à embouts larges ne sont pas disponibles, couper 4 mm-5 mm sur un embout de pipette standard avec une lame de rasoir propre avant utilisation.



A. 20uL pipette tips (uncut and cut)



B. 200uL pipette tips (uncut and cut)

III. Procédure

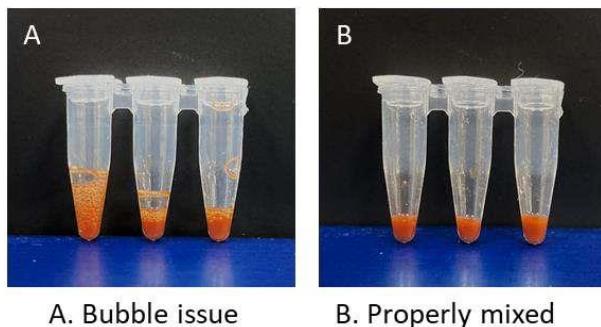
- Vortexer vigoureusement les TELL-beads pendant au moins 30 secondes. Centrifuger ensuite pas plus d'1 seconde pour faire redescendre la solution. Juste avant l'utilisation, homogénéiser à la pipette les TELL Beads avec un cône de 200µL en aspirant/refoulant 5 fois pour s'assurer que toutes les billes soient correctement remises en suspension.
- Dans un tube PCR de 0,2 mL, assembler chaque réaction dans l'ordre suivant.

Réactif	Volume par réaction (µL)		
	Petit Génome (50µL)	Génome Moyen (100µL)	Grand génome (150µL)
5× Reaction Buffer	BOUCHON	10	20
Eau Nuclease-free		15 - X (X est le volume d'ADN)	30 - Y (Y est le volume d'ADN)
Cofacteur II	BOUCHON	10	20
TELL Bead (~0.5M barcodes/µL)	BOUCHON	6	12
			19

- Bien mélanger à la pipette ou en vortexant vigoureusement puis centrifuger pendant 1 seconde pour faire descendre la solution au fond. Ajouter la Barcoding Enzyme.

Réactif	Volume par réaction (µL)		
	Petit Génome	Génome Moyen	Grand génome
Barcoding Enzyme	BOUCHON	2	4
			6

- Bien mélanger en pipettant et éviter de faire des bulles pendant le mélange.



- Utiliser un cône de pipette à embout large, ajouter le réactif suivant.

Réactif	Volume par réaction (L)		
	Petit Génome	Moyen Génome	Grand génome
Échantillon d'ADN génomique	X µL(\leq 5µL)	Y µL(\leq 10µL)	Z µL(\leq 15µL)
Suspension Buffer BOUCHON	7	14	21

- Utiliser un cône de pipette à embout large ; régler le volume de la pipette en fonction de la taille du génome de l'échantillon (petit-35µL, moyen-70µL, grand-110µL); mélanger doucement la solution à la pipette en aspirant/refoulant **lentement** 6 à 8 fois. Evitez de créer des bulles.
- Placer le tube sur un rotateur de tube dans un incubateur à 35°C et faire tourner lentement (10-15 rpm) pendant 15 minutes.

Stabilisation de l'ADN

I. Préparation

- Préparer les consommables suivants :

Élément	Localisation	Stockage	Instruction
Stabilizer BOUCHON	Boite 1	-25°C à -15°C	Centrifuger brièvement. Conserver sur la glace.

- Utiliser le même rotateur de tube dans l'incubateur à 35 C.

II. Procédure

- Sortir le tube PCR de l'incubateur à 35°C.
- Ajouter le Stabilizer dans le tube.

Réactif	Volume par réaction (µL)		
	Petit Génome	Génome Moyen	Grand génome
Stabilizer BOUCHON	1	2	3

- Utiliser un cône de pipette à embout large ; régler le volume de la pipette en fonction de la taille du génome de l'échantillon (petit-35µL, moyen-70µL, grand-110µL) ; mélanger doucement la solution à la pipette en aspirant/refoulant lentement 6 à 8 fois. Evitez de créer des bulles
- Remettre le tube sur le rotateur de tube dans l'incubateur à 35°C et le faire tourner lentement (10 - 15 rpm) pendant 30 minutes.

Tagmentation de l'ADN

I. Préparation

1. Préparer les consommables suivants :

Élément	Localisation	Stockage	Instruction
Tagging Enzyme	BOUCHON	Boite 1	Centrifuger brièvement. Conserver sur la glace.
Exonucléase	BOUCHON	Boite 1	Centrifuger brièvement. Conserver sur la glace.

2. Utiliser le même rotateur de tube dans l'incubateur à 35°C.

II. Procédure

1. Sortir le tube PCR de l'incubateur à 35°C.
2. Ajouter la Tagging Enzyme et l'Exonucléase dans le tube.

Réactif	Volume par réaction (μ L)		
	Petit Génome	Génome Moyen	Grand génome
Tagging Enzyme	BOUCHON	1	2
Exonucléase	BOUCHON	1	3

3. Utiliser un embout de pipette à large orifice, régler le volume en fonction de la taille du génome de l'échantillon (petit-35 L, moyen-70 L, grand-110 L) ; mélanger doucement la solution à la pipette en aspirant/refoulant **lentement** 8 à 10 fois. Pour cette étape, le mélange doit être très rigoureux.
4. Remettre le tube sur le rotateur du tube dans l'incubateur à 35°C et le faire tourner lentement pendant 10 minutes. Si nécessaire, une quantité différente d'enzyme de marquage peut être utilisée pour ajuster la taille de la library.

REMARQUE : Si une taille d'insert plus longue dans les libraries est préférée, une quantité moindre de Tagging Enzyme peut être utilisée dans la réaction. A l'inverse, si une taille d'insert plus courte dans les libraries est préférée, utiliser deux fois plus de Tagging Enzyme dans la réaction.

5. Passer à l'étape suivante immédiatement après l'incubation.

Lavage avec billes

I. Préparation

1. Préparer les consommables suivants :

Élément	Localisation	Stockage	Instruction
Stop Solution			Vérifier la présence de précipité. Le cas échéant, incuber le tampon à 37°C pendant 10 minutes et vortexer jusqu'à ce qu'il se dissolve.
BOUCHON Naturel dans kit standard BOUCHON Blanc dans kit HT24	Boite 2	2°C à 25°C	Conserver à température ambiante pour une utilisation future.
Wash Solution			
BOUCHON Blanc dans kit standard BOUCHON Bleu dans kit HT24	Boite 2	2°C à 8°C	Ramener à température ambiante.
Tube PCR ou tube en barrette de 0,2 mL	Utilisateur		Température ambiante.

2. Préparer un thermocycleur avec le programme suivant :

- Préchauffer le couvercle en option à 100°C
- 63 °C à l'infini

II. Procédure

1. Placer le tube PCR sur un support magnétique pendant 1 minute ou jusqu'à ce que la solution soit limpide.
2. Laisser le tube sur le support magnétique, aspirer et jeter le surnageant sans perturber les billes.
3. Retirez le tube du support magnétique. Ajouter 125µL de Wash Solution dans le tube PCR. Pipetter pour remettre les billes en suspension. Si nécessaire, centrifuger rapidement (environ 1 seconde) pour faire redescendre la solution.
4. Remettre le tube PCR sur le support magnétique pendant 1 minute ou jusqu'à ce que la solution soit limpide.
5. Laisser le tube sur le support magnétique et aspirer puis jeter le surnageant sans perturber les billes.
6. Retirer le tube du support magnétique. Ajouter 80µL de Stop Solution dans tube.
7. Pipetter plusieurs fois pour remettre les billes en suspension. Si nécessaire, centrifuger rapidement (environ 1 seconde) pour faire redescendre la solution.
8. Incuber le tube PCR à température ambiante pendant 5 minutes.
9. Remettre le tube PCR sur le support magnétique pendant 1 minute ou jusqu'à ce que la solution soit limpide.
10. Laisser le tube sur le support magnétique, et aspirer puis jeter le surnageant sans perturber les billes.
11. Retirer le tube du support magnétique. Ajouter 125µL de Wash Solution au tube PCR. Pipetter pour remettre les billes en suspension.

12. Transférer toute la solution de billes dans un nouveau tube PCR.
13. Incuber le tube à 63°C dans le thermocycleur pendant 3 minutes.
14. Placer le tube PCR sur le support magnétique à température ambiante pendant 1 minute ou jusqu'à ce que la solution soit limpide.
15. Laisser le tube sur le support magnétique, aspirer puis jeter le surnageant sans perturber les billes.
16. Retirer le tube du support magnétique. Ajouter 125µL de Wash solution dans le tube PCR. Pipetter pour remettre les billes en suspension. Centrifuger pendant 1 seconde pour faire descendre toute la solution au besoin.
17. Incuber le tube à 63°C sur le thermocycleur PCR pendant 3 minutes.
18. Placer le tube PCR sur le support magnétique à température ambiante pendant 1 minute ou jusqu'à ce que la solution soit limpide.
19. Laisser le tube sur le support magnétique, aspirer puis jeter le surnageant sans perturber les billes.
20. Retirer le tube du support magnétique. Remettre les billes en suspension dans 20µL de Wash Solution.

REMARQUE :

C'est un **POINT D'ARRÊT SÉCURISÉ**. Les billes lavées peuvent être conservées entre 2°C et 8°C pendant deux semaines.

Amplification de la library

I. Préparation

1. Préparer les consommables suivants :

Élément	Localisation	Stockage	Instruction
2× PCR Master Mix	BOUCHON	Boite 1	-25°C à -15°C Décongeler à température ambiante. Mélanger soigneusement, puis centrifuger brièvement. Conserver sur la glace.
10x Primer I	BOUCHON	Boite 1	-25°C à -15°C Décongeler à température ambiante. Mélanger au vortex, puis centrifuger brièvement. Conserver sur la glace.
10x Primer II, T5##	Multiplex	Primer Kit	-25°C à -15°C Décongeler à température ambiante. Mélanger au vortex, puis centrifuger brièvement. Conserver sur la glace.
Enhancer	BOUCHON	Boite 1	-25°C à -15°C Décongeler à température ambiante. Mélanger au vortex, puis centrifuger brièvement. Conserver à température ambiante
Eau Nucléase Free	Utilisateur	Température ambiante	Conserver à température ambiante.
Tube PCR ou tube en barrette de 0,2 mL	Utilisateur		Température ambiante.

2. Configurer le programme d'amplification de library (**LAP**) sur un thermocycleur ci-dessous :

- 63°C 2 minutes
- 72°C 2 minutes
- 98°C 30 secondes
- [98°C 15 secondes, 63°C 20 secondes, 72°C 30 secondes] x Numéro de cycle
- 72°C 3 minutes
- 4 °C à l'infini

REMARQUE :

Plus la profondeur de séquençage est importante pour chaque TELL-Bead, plus la densité de lecture liée (Linked Read) est élevée et meilleures sont les performances. Par conséquent, pour un nombre fixe de read en sortie de séquençage, moins il y a de TELL Beads utilisées pour l'amplification de la library, plus la profondeur de séquençage par bille est importante, ce qui permet d'obtenir un meilleur résultat de lecture liée. Cependant, si trop peu de TELL Beads sont utilisées pour l'amplification de la library, la complexité de la library sera faible et le niveau de duplication des lectures de séquençage sera élevé.

Pour les génomes riches en GC (GC>60%), amplifiez un cycle de plus que ce qui serait fait pour les échantillons à faible teneur en GC

Taille du génome	Vol des billes utilisées (B) pour la PCR	Volume PCR	Nombre de cycle
1 Mb - 50 Mb	1-12 µL	25µL	14-11
50 Mb - 100 Mb	6-10 µL	25µL	12-10
100 Mb - 200 Mb	10-20 µL	25µL	12-10
200 Mb - 1 Gb	15-20 µL	50µL	11-9
1 Gb - 5 Gb	12-20 µL	75µL	10-9

CONSEIL :

- a) Pour *E. coli* (4,6 Mb), utiliser 1,5µL de TELL Beads et 13 cycles.
- b) Pour l'humain (3 Gb), utiliser 20µL de TELL Beads et 9 cycles.

II. Procédure

1. Vortexer vigoureusement les billes pendant 10 secondes pour les remettre en suspension. Centrifuger rapidement, environ 1 seconde pour faire redescendre le liquide. À l'aide d'un cône de 20µL, aspirer/refouler les billes 5 fois pour s'assurer qu'elles soient toutes bien remises en suspension. Transférer immédiatement la quantité de billes appropriée (B dans le tableau ci-dessus) dans un nouveau tube PCR.
2. Si B ≤ 2µL, aller directement à l'étape 5.
3. Si B > 2µL, placer le tube PCR sur un support magnétique pendant 1 minute ou jusqu'à ce que la solution soit limpide.
4. Pendant que le tube est sur le support magnétique, aspirer et jeter le surnageant (B-2) µL sans perturber les billes. Retirer le tube PCR du support magnétique.
5. Ajouter les réactifs suivants dans le tube PCR contenant les billes, en fonction de la taille du génome de l'échantillon.

Réactif	Volume par réaction (L)		
	Petit Génome (25µL)	Génome Moyen (50µL)	Grand génome (75µL)
Eau Nucléase Free	4µL	10 µL	16 µL
2× Mélange principal de PCR	BOUCHON	12,5 µL	37,5 µL
		2,5 µL	7,5 µL
10× Amorce I	BOUCHON		
10× Primer II, T5##		2,5 µL	7,5 µL
Enhancer	BOUCHON	1,5 µL	4,5 µL

6. Bien mélanger au vortex ou par pipetage. Centrifuger rapidement (≈ 1sec) pour faire redescendre le liquide.
7. Placer le tube dans le thermocycleur et démarrer le programme **LAP** (voir ci-dessus) en effectuant le nombre de cycles approprié.
8. Après l'amplification PCR, conserver 2µL de produit PCR pour le contrôle de qualité sur un Bioanalyzer ou une TapeStation. Pour plus d'informations, voir la section Qualifier et quantifier la library.

REMARQUE :

C'est un **POINT D'ARRÊT SÉCURISÉ**. Le produit PCR peut être conservé entre -25°C et -15°C pendant un mois.

Nettoyage de la library

I. Préparation

1. Préparer les consommables suivants :

Élément	Localisation	Stockage	Instruction
Éthanol absolu pour la biologie moléculaire	Utilisateur	Température ambiante	Prévoir 400µL par échantillon. Mélanger 1,5 mL d'éthanol absolu avec 0,5 mL d'eau Nucléase-free.
Éthanol à 75 % (v/v) fraîchement préparé	Utilisateur	Température ambiante	Mélanger au vortex. Conserver à température ambiante
AMPure XP	Utilisateur	2°C à 8°C	Ramener à température ambiante pendant au moins 20 minutes puis vortexer vigoureusement pour resuspendre les billes avant utilisation.
Eau Nucléase-free	Utilisateur	Température ambiante	Conserver à température ambiante.
Tampon TE, pH 8,0	Utilisateur	Température ambiante	Conserver à température ambiante.
Tube PCR ou tube en barrettes de 0,2 mL	Utilisateur		Température ambiante

REMARQUE :

Il existe deux procédures de nettoyage différentes basées sur le profil de taille des libraries.

1. Les tailles des libraries TELL-Seq sont plus larges que les libraries Illumina standard, mais généralement inférieures à 1 Ko. Un nettoyage SPRI unique à l'étape II est suffisant pour supprimer les dimères d'adaptateurs dans la library.
2. Pour les échantillons avec génome de grande taille, la taille des libraries peut parfois être beaucoup plus grande. Lorsque plus de 40 % des molécules de la library dépassent 1 kb, un double nettoyage SPRI à l'étape III est recommandé pour éliminer les dimères d'adaptateurs et les produits de la library > 1 kb.

II. Procédure standard (nettoyage SPRI unique)

1. Centrifuger brièvement (1 seconde) le tube PCR afin de faire redescendre le liquide dans le fond tube.
2. Placer le tube PCR sur le support magnétique pendant 1 minute ou jusqu'à ce que la solution soit limpide.
3. Tout en gardant le tube sur le support magnétique, transférer le surnageant dans un nouveau tube PCR de 0,2 mL sans perturber les billes.

4. Mesurer le volume de surnageant transféré (produit PCR) à l'aide d'une pipette.
5. Ajouter les réactifs suivants dans le produit PCR jusqu'à un volume total de 100µL.

Réactif	Volume par réaction
produit PCR	Volume mesuré
Eau Nucléase-free	Au total final de 100 L

6. Vortexer vigoureusement les billes AMPure XP pour les remettre en suspension et ajouter 78µL d'AMPure XP dans les 100µL le produit PCR.
7. Mélanger à la pipette en aspirant/refoulant 10 fois.
8. Incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
9. Placer le tube sur le support magnétique pendant 1 minute ou jusqu'à ce que la solution soit limpide.
10. Aspirer et jeter le surnageant sans perturber les billes d'AMPure.
11. Tout en maintenant le tube sur le support magnétique, ajouter 200µL d'éthanol à 75 % fraîchement préparé dans le tube. Laisser-le reposer pendant 30 secondes.
12. Aspirer et éliminer le surnageant sans perturber les billes.
13. Répéter les étapes 11 et 12 une fois de plus, en maintenant le tube sur le support magnétique pendant tout le temps.
14. Laisser le tube sur le support magnétique avec le bouchon ouvert et laisser le tube sécher pendant 1-2 minutes pour évaporer les traces d'éthanol. NE PAS trop sécher les billes.
15. Retirer le tube du support magnétique et ajouter 25µL de tampon TE aux billes.
16. Pipetter ou agiter au vortex pour remettre les billes en suspension. Laisser reposer pendant 5 minutes.
17. Placer le tube sur le support magnétique pendant 1 minute ou jusqu'à ce que la solution soit limpide.
18. Récupérer 23µL de surnageant, le transférer dans un nouveau tube. Faites attention à ne pas perturber les billes.
19. Le surnageant contient la library TELL-Seq. Procéder à la **qualification et quantification de la library**.

REMARQUE :

C'est un **POINT D'ARRÊT SÉCURISÉ**. La library TELL-Seq purifiée peut être conservée entre -25°C et -15°C pendant six mois.

III. Double procédure de nettoyage SPRI (pour les libraries avec molécules de plus de 1 kb > 40%)

1. Centrifuger brièvement (1 seconde) le tube PCR afin de faire redescendre le liquide dans le fond du tube.
2. Placer le tube PCR sur le support magnétique pendant 1 minute ou jusqu'à ce que la solution soit limpide.
3. Tout en gardant le tube sur le support magnétique, transférer le surnageant dans un nouveau tube PCR de 0,2 mL sans perturber les billes.
4. Mesurer le volume de surnageant transféré (produit PCR) à l'aide d'une pipette.
5. Ajouter les réactifs suivants dans le produit de PCR jusqu'à un volume total de 100µL.

Réactif	Volume par réaction
produit PCR	Volume mesuré
Eau Nucléase-free	Au total final de 100µL

6. Vorterexer les billes AMPure XP pour remettre en suspension et ajouter 50µL de billes AMPure XP dans le produit PCR de 100µL.
7. Mélanger à la pipette en aspirant/refoulant 10 fois.
8. Incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
9. Placer le tube sur le support magnétique pendant 1 minute ou jusqu'à ce que la solution soit limpide.
10. Transférer le surnageant dans un nouveau tube PCR de 0,2 mL sans perturber les billes AMPure.
11. Ajouter 28µL de billes AMPure XP dans le surnageant transféré dans le nouveau tube PCR.
12. Mélanger à la pipette en aspirant/refoulant
13. Incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
14. Placer le tube sur le support magnétique pendant 1 minute ou jusqu'à ce que la solution soit limpide.
15. Aspirer et jeter le surnageant sans perturber les billes AMPure.
16. Tout en maintenant le tube sur le support magnétique, ajouter 200µL d'éthanol à 75 % fraîchement préparé dans le tube. Laissez-le reposer pendant 30 secondes.
17. Aspirer et éliminer le surnageant sans perturber les billes.
18. Répéter les étapes 16 et 17 une fois de plus, en maintenant le tube sur le support magnétique pendant tout le temps.
19. Laisser le tube sur le support magnétique avec le bouchon ouvert et laisser le tube sécher pendant 1-2 minutes pour évaporer les traces d'éthanol. NE PAS trop sécher les billes.
20. Retirer le tube du support magnétique et ajouter 25µL de tampon TE aux billes.
21. Pipetter ou vortexer pour remettre les billes en suspension. Laisser reposer pendant 5 minutes.
22. Placer le tube sur le support magnétique pendant 1 minute ou jusqu'à ce que la solution soit limpide.
23. Récupérer 23µL du surnageant dans un nouveau tube. Faites attention à ne pas perturber les billes.
24. Le surnageant contient la library TELL-Seq.

REMARQUE

C'est un **POINT D'ARRÊT SÉCURISÉ**. La library TELL-Seq purifiée peut être conservée entre -25°C et -15°C pendant six mois.

Qualification et quantification de la library

I. Consommables

- Kit ADN agilent haute sensibilité ou TapeStation haute sensibilité D5000 (utilisateur)
- Qubit dsDNA HS Assay Kit (Utilisateur)
- Tampon TE, pH 8,0 (utilisateur)

REMARQUE :

La quantification par qPCR pour library Illumina fonctionne sur la library TELL-Seq, mais il n'est pas obligatoire.

II. Préparation

1. Préparer les consommables nécessaires tel que requis pour Bioanalyzer ou TapeStation et Qubit.

III. Procédure

1. Utiliser 1 μ L de library pour le kit d'ADN haute sensibilité Agilent ou 2 μ L de library pour le kit High Sensitivity D5000 ScreeTape Assay de la TapeStation.
2. Vérifier en même temps le produit PCR non purifié sauvegardé à la fin de l'étape d'amplification de la library. Un produit PCR non purifié peut contenir une quantité élevée de dimères d'amorce et de dimères d'adaptateur. Il faudra le diluer 2 fois avec de l'eau Nucléase-free avant chargement sur une puce de bioanalyseur ou TapeStation pour éviter d'interférer avec le signal de marqueur inférieur.
3. Pour déterminer la concentration de la library, régler la région sur le logiciel d'analyse Bioanalyzer ou TapeStation entre 150 à 1000 bp. Noter la concentration de l'échantillon (nM) pour cette région (voir la figure 1). Pour déterminer la taille de la library, définir la région de 150 à 3 000 bp. Enregistrer la taille moyenne (bp) de l'échantillon comme taille de la library. Une library de bonne taille doit avoir la plupart des fragments de library inférieurs à 1000 bp.



ATTENTION

La concentration lue à partir du bioanalyseur (ou de la TapeStation) doit être utilisée comme point de départ pour effectuer la dilution ou le pool des libraries nécessaires au séquençage. Vérifier la concentration finale de la library diluée ou du pool de libraries à l'aide du kit dsDNA HS Assay sur le Qubit (voir étape 6).

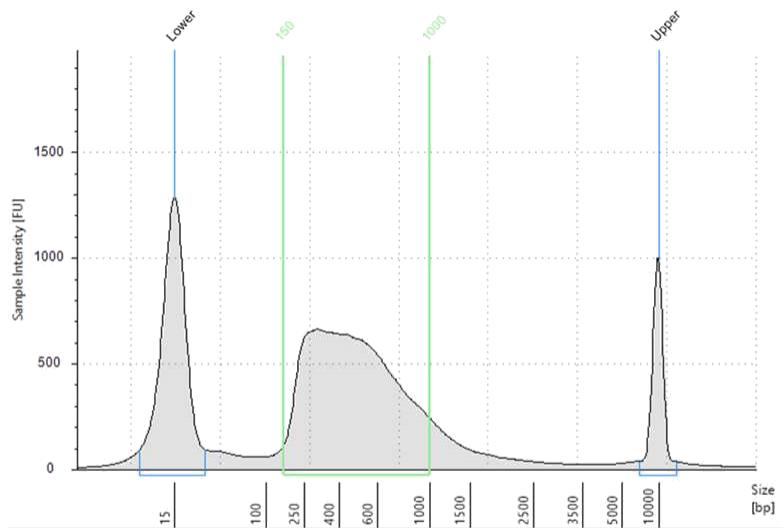


Figure 1. An example of cleaned up library profile from a TapeStation High Sensitivity D5000 ScreenTape assay.

4. La library peut être séquencée immédiatement ou conservée entre -25°C et -15°C.

REMARQUE :

Parfois, il peut y avoir un niveau résiduel détectable de dimères d'adaptateurs dans une library nettoyée (voir Figure 2). Dans ce cas, il est recommandé de procéder à un cycle supplémentaire de nettoyage SPRI comme décrit dans la section « Nettoyage de la Library ».

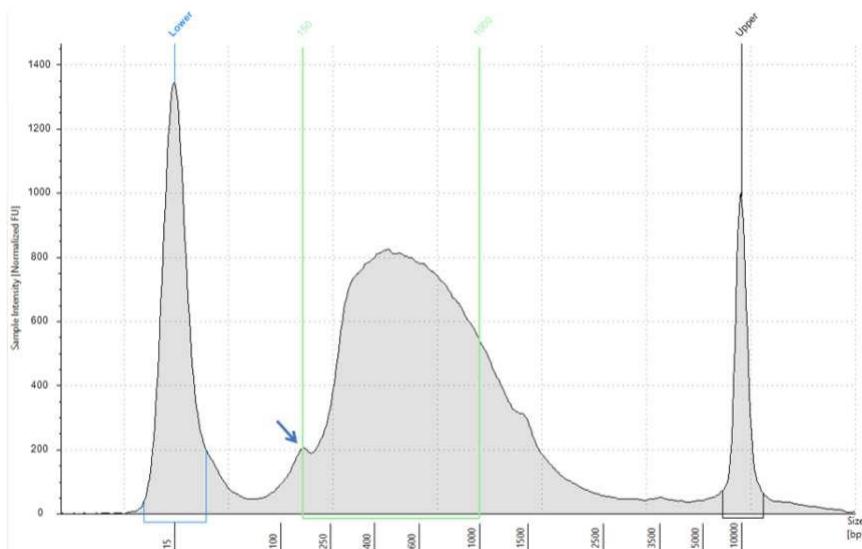


Figure 2. A library with detectable residual adapter dimer (arrow) after cleanup (TapeStation High Sensitivity D5000 ScreenTape assay).

5. Lors du séquençage, diluer la Library à l'aide du tampon TE jusqu'à la concentration recommandée par chaque système de séquençage Illumina®. Créer un pool de libraries diluées pour le séquençage si plusieurs libraries sont séquencées dans la même série.
6. Utiliser **4µL** de library de séquençage **dilué** ou un pool de libraries pour vérifier la concentration avec le kit Qubit dsDNA HS Assay. Utiliser la taille de la library mesurée à partir du Bioanalyzer (ou de la TapeStation) pour convertir la concentration de masse en concentration molaire.

A = concentration de masse(ng/µL)

S = taille de la library (bp)

$$\text{Concentration molaire (nM)} = (A * 1\ 000\ 000) / (S * 650)$$

7. Ajuster le volume nécessaire à la préparation du séquençage si la concentration de la library mesurée au Qubit est différente de la concentration recommandée de plus de 10 %.

6. Annexe

Préparation de library TELL-Seq™ à partir d'ultra-faible quantité d'ADN de départ.

Dans la procédure standard de library TELL-Seq ci-dessus, il y aura 3 à 8 fragments d'ADN de haut poids moléculaire capturés par TELL Bead en moyenne. Lorsque la quantité d'ADN disponible dans l'échantillon est rare ou dans certains cas, comme les échantillons mixtes ou un séquençage ciblé, préférer un fragment d'ADN HPM par TELL Bead (c'est-à-dire un code à barres unique), le protocole de library standard peut être ajusté avec une quantité d'ADN de départ plus faible et/ou plus de TELL Beads pour diminuer le ratio ADN HPM/TELL-Beads. Vous trouverez ci-dessous les conditions modifiées pour la préparation de libraries TELL-Seq à ultra-faible quantité de départ pour les petits génomes. Toutes les autres étapes doivent suivre la procédure standard de préparation de libraries pour les petits génomes sans modification.



Apport d'ADN pour le génome de petite taille

Taille du génome	Quantité entrée	Réaction Vol (µL)
1 Mb - 15 Mb	0,1 ng	50
16 Mb - 30 Mb	0,2 ng	50

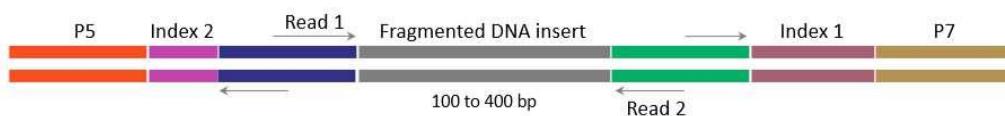


Volume de TELL Beads utilisées dans l'étape d'amplification de library pour les génomes de petite taille

Taille du génome	Vol des billes utilisées (B)		Nombre de cycle
	pour la PCR	Volume PCR	
1 Mb - 15 Mb	5-20 µL	25 µl	14
16 Mb - 30 Mb	10-20 µL	25 µl	13

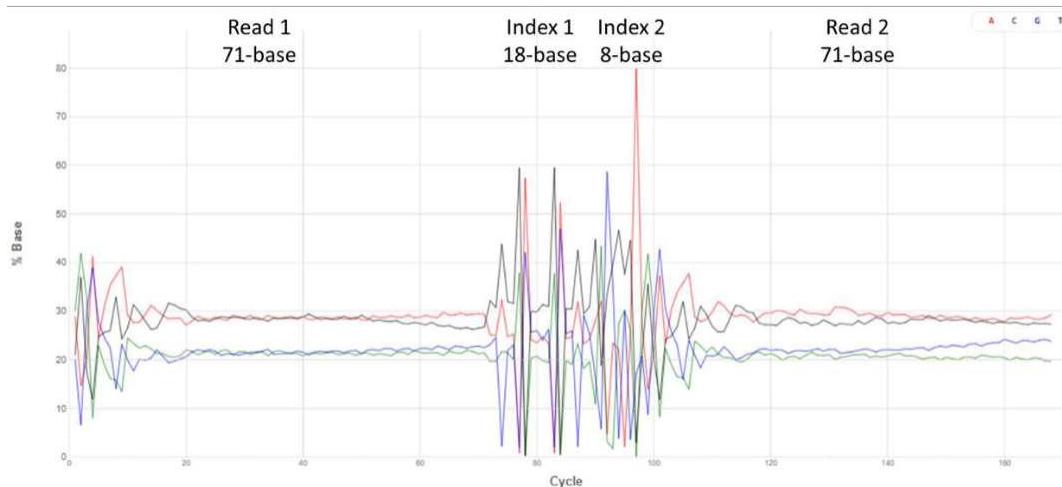
CONSEIL : Pour *E. coli* (4,6 Mb), utiliser 7,5µL de TELL Beads et 14 cycles.

Structure de la library TELL-Seq™ et schéma de séquençage



L'index 1 contient des séquences TELL Bead de 18 bases, qui doivent être entièrement séquencées. L'index 2 contient des séquences d'index de 8 bases utilisées lors de l'amplification des libraries. Le séquençage Paired end est préféré. La longueur minimale de lecture requise est 2x96 ; la longueur maximale de lecture requise est 2x150.

Exemple figure % de base par cycle du séquençage Illumina®



Guide de séquençage Illumina®

1. Diluer la library TELL-Seq selon la concentration et le volume spécifiques à la plate-forme de séquençage Illumina® utilisée.
2. Des libraries peuvent être poolées ensemble pour le séquençage lorsque différents index (multiplex primers) sont utilisés dans l'étape d'amplification des libraries.
3. Des primers custom de séquençage sont nécessaires pour séquencer les libraries TELL-Seq et sont fournies dans la Kit *TELL-seq Illumina Sequencing Primer*.

TELL-seq Illumina Sequencing Primer Kits

Nom du composant	Concentration	Stockage Température
Read 1 Primer	100 µM	-25°C à -15°C
Read 2 primer	100 µM	-25°C à -15°C
Index 1 Primer	100 µM	-25°C à -15°C
Index 2 primer	100 µM	-25°C à -15°C

4. Ces Primer Custom peuvent être chargées dans les puits spécifiques pour primer custom. Ou bien, ils peuvent également être chargés dans des puits d'amorces de séquençage Illumina® standard correspondants lorsqu'une Library de contrôle Illumina® PhiX est ajoutée à une série de séquençage.
5. Le « custom Index 2 Primer » n'est nécessaire que lorsque plusieurs libraries TELL-Seq avec différents index sont regroupées pour le séquençage et lorsqu'un séquenceur nécessite une amorce de séquençage d'index i5. **Pour les MiSeq, HiSeq 2000/2500 et NovaSeq v1, l'amorce personnalisée Index 2 n'est pas nécessaire.**

6. Le nombre minimum de cycles de séquençage pouvant être réalisés à l'aide de la quantité d'amorces de séquençage fournie varie en fonction du système de séquençage.

Système De Séquencement	Une amorce d'index 2 personnalisée est-elle nécessaire ?
NovaSeq	Réactif v1 : Non; réactif v1.5 : Oui
HiSeq 3000/4000	Oui
HiSeq 2000/2500	Non
ProchaineSéq	Oui
MiSeq	Non
MiniSeq	Oui

Recommandation sur la longueur de lecture de séquençage Illumina®

1. Le séquençage Paired end est recommandé.
2. L'index 1 de librairie TELL-Seq est de 18 bases, l'index 2 est de 8 bases. Il y a un total de 26 bases pour les deux index, comparé à un total de 16 bases pour un séquençage Illumina standard avec double index. Les 10 cycles supplémentaires requis pour le séquençage de l'index des libraries TELL-Seq doivent être déduits des cycles de séquençage du read 1 et du read 2 de manière égale. Étant donné que les réactifs de séquençage Illumina garantissent 2 cycles supplémentaires (sauf les réactifs NovaSeq v1.5), 4 cycles pour le read 1 et 4 cycles pour read 2 doivent être respectivement déduits. La longueur de séquençage recommandée est 2×96 PE avec un kit de 200 cycles ou 2×146 PE avec un kit de 300 cycles pour un run à double index ; 2 x 100 PE ou 2 x 150 PE pour le run d'un échantillon unique sans avoir besoin de lire l'index 2.
3. Pour les réactifs NovaSeq v1.5, des réactifs supplémentaires sont inclus pour le séquençage d'index. La longueur de séquençage recommandée est 2×100 PE avec un kit de 200 cycles ou 2×150 PE avec un kit de 300 cycles pour run double index.

Prise En Compte De La Profondeur De Séquençage

Une profondeur de séquençage adéquate est nécessaire pour obtenir une couverture suffisante des TELL Beads. Plus le nombre de TELL Beads utilisées lors de l'amplification de la library est élevé, plus le nombre de lectures de séquençage nécessaires pour obtenir la profondeur de séquençage souhaitée est important. Cependant, moins il y a de TELL Beads utilisées pour l'amplification de la library, plus la complexité de la library sera faible, ce qui peut entraîner à un taux de duplication plus élevé des lectures de séquençage. L'équilibre entre les TELL Beads utilisées et la complexité de la library TELL-Seq requise peut dépendre de la taille du génome et de l'application.

Pour l'assemblage *de novo*, une couverture génomique d'au moins 60× de l'échantillon est recommandée en général. Pour une application de scaffolding, une couverture génomique de 30× est recommandée. Pour les applications de phasing du génome humain, il est recommandé d'effectuer au moins 500 millions de cluster par échantillon à partir d'un run 2x146 PE ou 2x150PE.

Séquences des index (c.-à-d. séquences d'index 2)

Library Multiplex Primer	Pour la sample sheet NovaSeq v1, MiSeq, HiSeq2000/2500	Pour la sample Sheet NovaSeq v1.5, Next Seq, MiniSeq, HiSeq3000/4000
T501	TGAACCTT	AGGTTCA
T502	TGCTAAGT	ACTTAGCA
T503	TTTTCTCT	AGAGAACAA
T504	TAAGACAC	GTGTCTTA
T505	CTAATCGA	TCGATTAG
T506	CTAGAACAA	TGTTCTAG
T507	TAAGTTCC	GGAACCTTA
T508	TAGACCTA	TAGGTCTA
T509	CATCCGAA	TTCGGATG
T510	TTATGAGT	ACTCATAA
T511	AGAGGCAC	GCGCCTCT
T512	TAGCCGCG	CGCGGCTA
T513	ACGAATAA	TTATTCGT
T514	TTCGTAGG	CCTACGAA
T515	GATCTGCT	AGCAGATC
T516	CGCTCCGC	CGGGAGCG
T517	AGGCTATA	TATAGCCT
T518	GCCTCTAT	ATAGAGGC
T519	AGGATAGG	CCTATCCT
T520	TCAGAGCC	GGCTCTCTGA
T521	CTTCGCCT	AGGCGAAG
T522	TAAGATTA	TAATCTTA
T523	AGTAAGTA	TACTIQUES
T524	GACTTCCT	AGGAAGTC