

Standard qPCR gblocks

Début : 12/2019

Fin :

Recherche d'un standard pour qPCR

Exemple de Formulaire pour les Projets DEV. Tous documents/liens jugés nécessaires par le personnel en charge du projet peuvent y être ajoutés.

Contact/Date/Coordonnées : **Philippe VDK**

Demande (application, techno, protocole, échantillons, ...) :

Pour ses travaux et ceux de ses doctorant(e)s, axé sur les amplicons 16S et 18S, PVDK souhaite connaître le nombre de cibles dans l'échantillon à partir duquel il obtient son nombre de reads au séquençage. PVDK a présenté le principe lors de rdv en réunion mais également par [mail](#). Cela leur permettrait donc de faire une correction en bioinfo, sachant que le nombre de reads obtenus a tendance à fluctuer. Plutôt que de se baser sur le nombre de reads (et donc partir du principe que + de reads = + de cibles donc + d'abondance de l'sp.), ils pourront corriger leurs tables en normalisant le nombre de reads en fonction du nombre de cibles initiales qui sera alors connu.

Fiche contact/Type de contrat (si applicable) : Le standard sera appliqué dans divers projet VANPH ou MOCEN dans un premier temps.

Faisabilité : Oui. L'utilisateur doit cependant nous fournir une séquence 16S et une séquence 18S.

Coût estimé : Les renseignements de HEMJU ont permis d'arrêter un choix sur les gblocks proposés par IDT. Les gblocks sont en fait des standards dans des concentrations connus qui sont

synthétisés par IDT. Le coût varie selon la taille. Il semblerait que nous partions sur des gblocks de 500-750 bp, soit 120 euros le standard.

<https://eu.idtdna.com/pages/products/genes-and-gene-fragments/double-stranded-dna-fragments/gblocks-gene-fragments>

Devis/Fiche d'engagement (si applicable) : **nan**

Project Plan/Date envisagée :

- Commande du produit
- Calcul à réception du nombre de copies des produits selon protocoles (voir ci dessous)
- Tests (LC480) des gblocks commandés en parallèle de quelques échantillons pour voir si ça rentre bien dans la gamme (MOCEN?), pour mesurer l'efficacité de la gamme (large) qu'on mettra au point (éventuellement utiliser la solution "pour les nuls": <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/qpcr-efficiency-calculator.html>)
- Tests grandeur nature en smartchip.

09-10/09/2021:

MOCEN compte réaliser un projet de smartchip avec gblocks. VANPH nous a transmis une séquence. Nous allons commander cela chez IDT, sous la forme d'un unique standard qui couvrira la zone AMF et la zone FG.

voici la séquence à commander:

```
GAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATA
TTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTTGGCCTGGCTGGCAGGTCCGCCT
CACCGCGTGCACTTGTCCCTTCCTGAAGAACCGTAATGCCATTAATTTGGTGTTCGCGGGAA
```

ACAGGACTGTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTTAAAGCAAGCTAACGCTTGAATACATTAG
CATGGAATAATGAAATAGGACGATCGATCCTATTTTGTGGTTTCTAGGATTGACGTAATGA
TTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATT
GAAGACTAACTACTACGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTA
GGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTGACCATAAACTATGCCGACTAGGGATC
GGATGATGTTAATTTTATAATGACTCATTGCGCCTTACGGGAAACCAAAGTGTTTGGGT
CCGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGG
GTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTCACCAGGTCCAGACATAGTAAG
GATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTT
GGTGGAGTGATTTGTCTGcTTAATTCCGATA

En annexe de cette fiche dev se trouve [le fichier reprenant toutes les informations et la localisations des primers](#).

MICS0 va contacter Nolan Talhi d'IDT pour obtenir un cadeau sur ce gblocks.

A reception nous penserons à tester la gamme avec quelques échantillons que MOCEN doit nous amener.

13/09/2021:

Extrait réponse de Nolan: "Nous conseillons de **rajouter au minimum 15 nucléotides de part** et d'autre afin d'éviter une dégradation du gBlocks au fil des congélations / décongélations.

Vous pouvez effectivement bénéficier d'un gBlocks gratuit < 1,000 pb. '

Soit on commande la séquence:

CTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAA
TAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTTGGCCTGGCTGGCA
GGTCCGCCTCACCGCGTGCACTTGTCCCTTCTGAAGAACCGTAATGCCATTAATTTGGTGT
TGCGGGGAAACAGGACTGTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTTAAAGCAAGCTAACGCTTGA
ATACATTAGCATGGAATAATGAAATAGGACGATCGATCCTATTTTGTGGTTTCTAGGATTG
ACGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGCATTAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCTT

GGATTTATTGAAGACTAACTACTACGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAA
CGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTGACCATAAACTATGCCGA
CTAGGGATCGGATGATGTTAATTTTATAATGACTCATTTGGCGCCTTACGGGAAACCAAAGT
GTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCA
CCACCAGGGGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCCAGA
CATAGTAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCG
TTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTCCGATAACGAACGAG

27/09/2021:

Standard reçu.

Il est prévu de resuspendre les 1000ng dans 102,1µL au lieu de 100µL pour obtenir un mélange final à 9.794ng/µL et 2000 fmol/µL (plutôt que 2042). Cela correspond à 20.000 pmol/L.

Pour obtenir un point haut de la gamme (20pM), il faut le diluer 1000 fois (1*10 et 1*100 par ex.).

Le nombre de copie a été calculé selon la page indiqué plus bas (protocoles réalisés)

$9.764(\text{ng}/\mu\text{L}) * 2.042(\text{fmol}/\text{ng}) * 10^{-15}(\text{mol}/\text{fmol}) * 6.022 * 10^{23} = 1.2044 * 10^{10} \text{ copies}/\mu\text{L}$

Soit $1.2044 * 10^7$ copies/µL pour le point haut de la gamme à 20pM

Protocoles réalisés (Si Applicable) :

<https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/tips-for-working-with-gblocks-gene-fragments>

en complément, [petit document](#) sur la qPCR.

Résultats :

Pour applications/Technos :

Validation Technique : Oui/non

Pour automates :

Qualification Opérationnelle Validée : Oui/Non

Qualification de Performance Validée : Oui/Non

Conclusions :

Passage en prestation CPG : Oui/Non

Kestafé/Mode Opérateur rédigé (si applicable) : Oui/Non (*Lien vers Kestafé/Mode Opérateur*)

Documents Externes (*publications, manuels, protocoles fournisseurs, ...*) :

Suivi du projet (si applicable : amélioration, ajustement, ...)
: