

PacBio Sequel : derniers développements et perspectives

Michaela WEST



PacBio Sequel : description



- ❖ Séquenceur de 3^{ème} génération
 - Lectures dites longues : moyenne 10 Kb (18 Kb actuellement)
 - Au-delà de 80Kb
- ❖ Rendement : 5 - 10 Gb par SMRTCell
- ❖ Pas d'amplification de l'ADN
- ❖ Possibilité de séquencer 8 SMRTCells (80h)
- ❖ Détection de l'épigénome simultanément

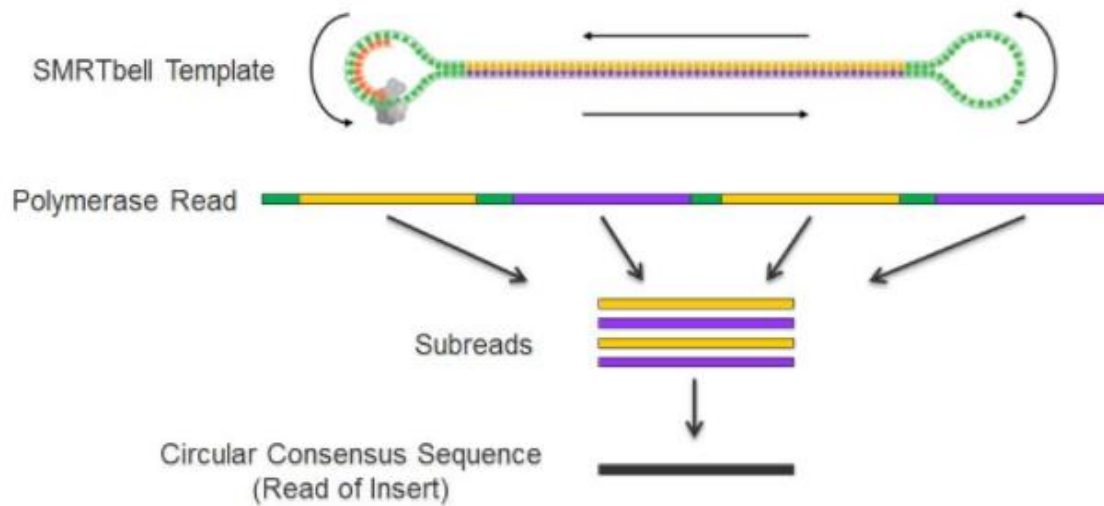
PacBio Sequel : applications



- ❖ séquençage *de novo* ou re-séquençage : Lupin, melon, vigne, tabac, chicorée, tomate ...
- ❖ séquençage en multiplex de génomes bactériens : jusqu'à 30 Mb en pool soit environ 6 *E. Coli*
- ❖ séquençage d'amplicons pour la découverte de SNP : multiplexage jusqu'à 384
- ❖ séquençage de l'ARN 16S pleine longueur
- ❖ Iso-Seq™, séquençage de cDNA pleine longueur
- ❖ Épigénétique : détection de bases modifiées par la mesure de la variation de la cinétique d'incorporation de bases

Principe du séquençage « SMRT Sequencing technology »

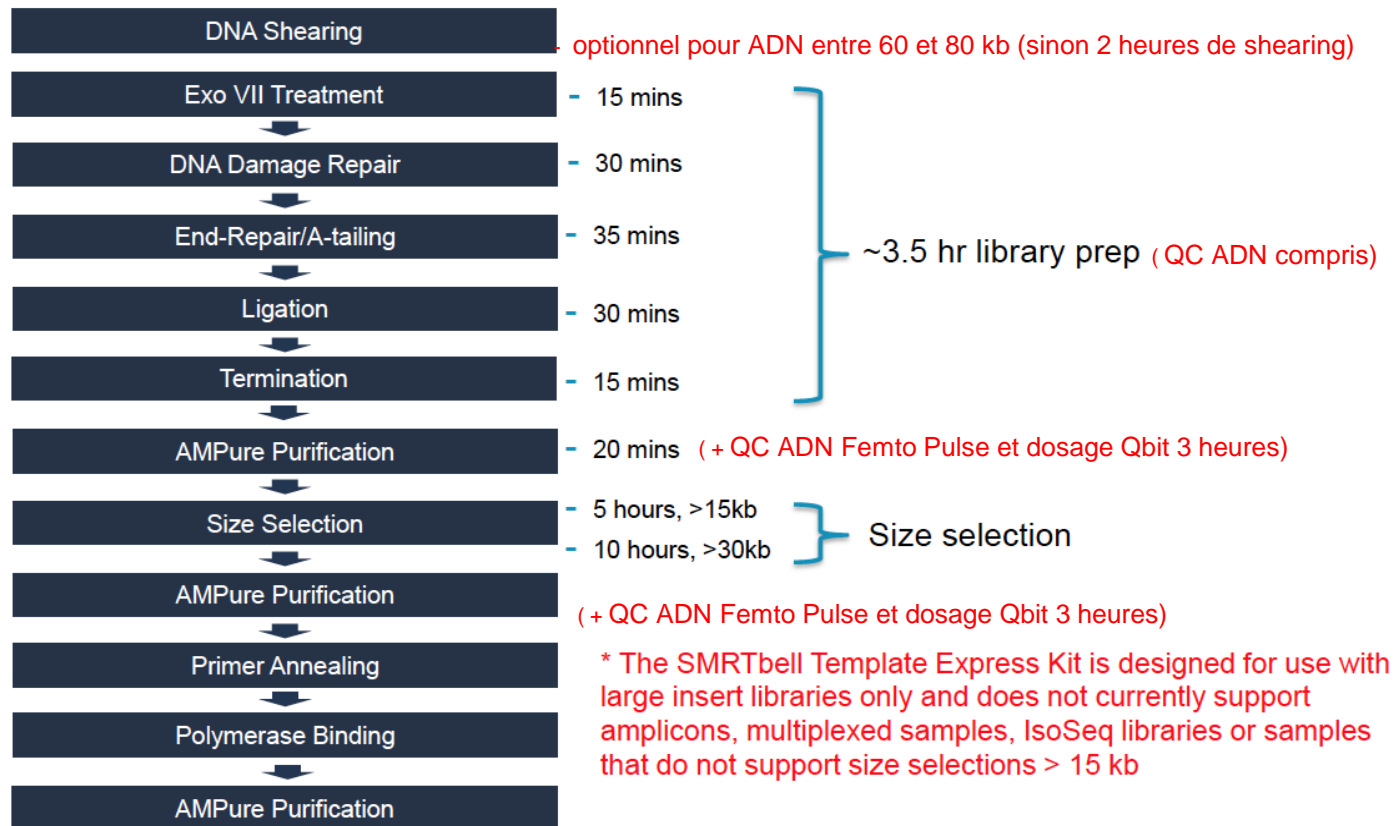
- ❖ Préparation des bibliothèques : on obtient des SMRTbell™ Template



Principe du séquençage « SMRT Sequencing technology »

- ❖ Préparation des bibliothèques : on obtient des SMRTbell™ Template

SMRTBELL EXPRESS TEMPLATE PREP WORKFLOW DETAILS*



Projets de séquençage de génome entier

Mars 2018 : Sequel System v5.1

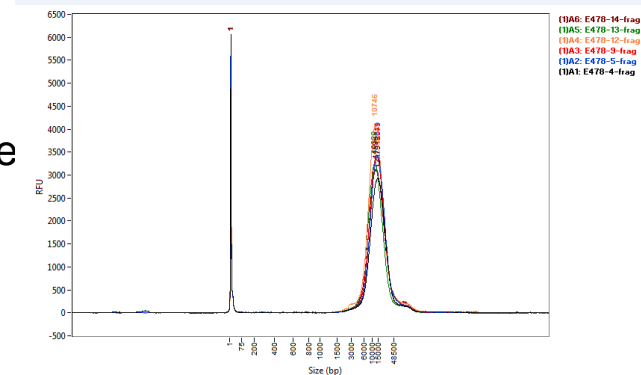
Nouvelle Polymerase (v2.1), nouveau primer de séquençage (v4), nouvelle SMRTCell v2 LR pour des films de 20h

Espèce	Taille génome	Rdt / SMRTCell (Gb)	Taille moyenne de l'insert (kb)	N50 Kb	
Vigne 1	500 Mb	4,7	7,8	11,9	V5
Melon 1	450 Mb	3,5	11,5	17,3	
Blé Renan	17 Gb	3,7	7,7	12,5	
Tabac <i>N. Sylvestris</i>	500 Mb	4,78	9,3	14,6	
Lupin	500 Mb	3,1	9,4	15	
Tomate 1	900 Mb	5,54	14,1	24,5	V5.1
Tomate 2	900 Mb	5,02	17,15	28,3	
Coccinia	450 Mb	7,54	17,2	30,1	
Vigne 2	500 Mb	8,9	11,9	21,25	
Chicorée	1,2 Gb	10	16	29,3	

Projets de séquençage multiplexes

❖ sur une SMRTCell, séquençage de pools de 6 ou 8 bactéries

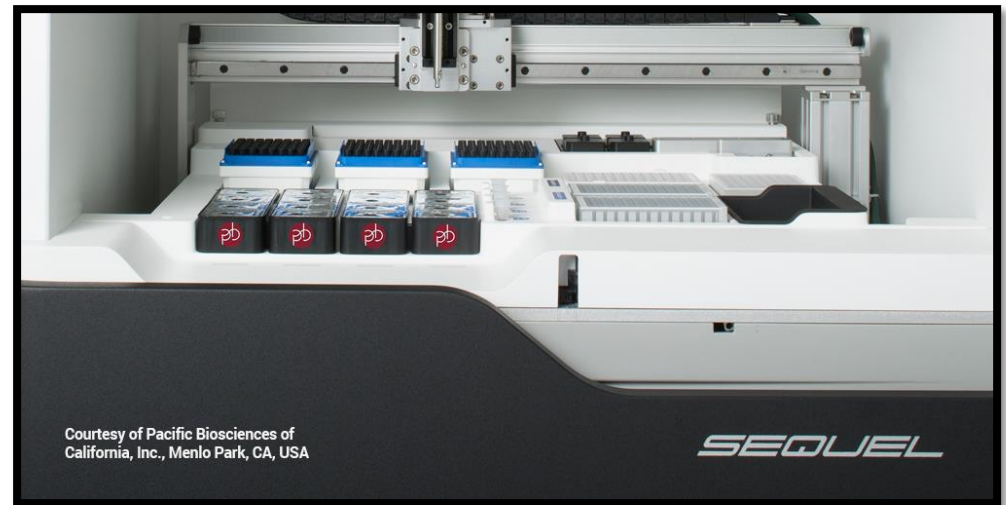
- ❖ Fragmentation aux alentours de 10 kb
- ❖ Ligation des barcodes et préparation de la librairie
- ❖ Séquençage
- ❖ Démultiplexage avec SMRT Analysis



Barcode Index	Barcode Name	Polymerase Reads	Subreads	Bases	Mean Read Length	Longest Subread Length	Mean Barcode Quality	Rank Order (Num. Reads)
0--0	bc1001_BAK8A- -bc1001_BAK8A	46,262	149,124	939,143,470	36,828	45,596	67.0	2
1--1	bc1002_BAK8A- -bc1002_BAK8A	41,696	135,183	840,803,389	36,758	40,834	68.0	5
2--2	bc1004_BAK8A- -bc1004_BAK8A	46,220	148,725	926,875,960	36,285	46,523	69.0	3
3--3	bc1008_BAK8A- -bc1008_BAK8A	46,747	154,657	954,583,523	37,223	37,916	70.0	1
4--4	bc1009_BAK8A- -bc1009_BAK8A	37,476	124,856	759,188,780	37,201	49,367	69.0	6
5--5	bc1010_BAK8A- -bc1010_BAK8A	43,684	142,519	887,921,794	37,001	39,151	68.0	4

Perspectives

- ❖ Iso-Seq pour l'annotation de génomes
- ❖ Sortie d'une nouvelle chimie pour la fin du mois d'octobre (v6)
 - ❖ Nouvelle polymérase
 - ❖ Nouveaux réactifs de séquençage
 - ❖ Nouvelle SMRTCell
 - ❖ Nouveau SMRTLink

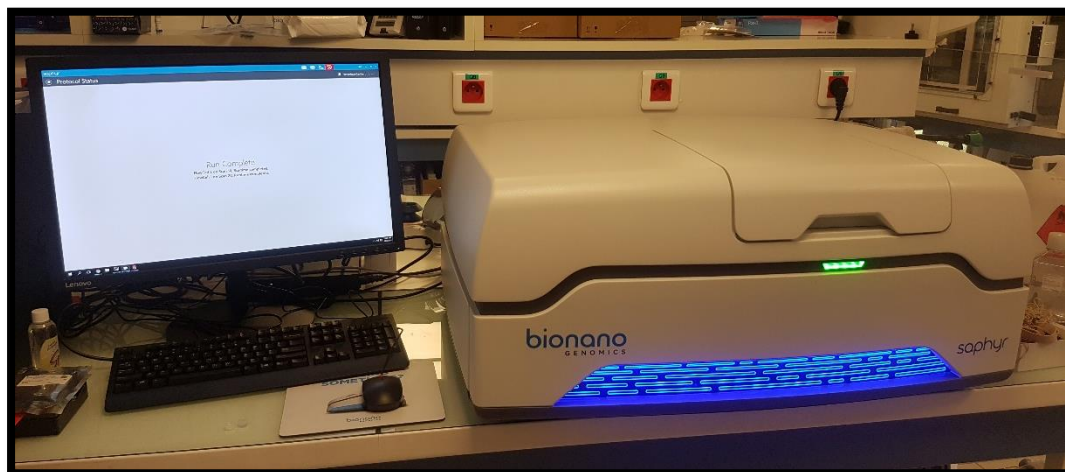


<http://www.earlham.ac.uk/pacific-biosciences-sequel>

Nouveaux équipements

Saphyr Bionanogenomics
Carte optique

Assemblage de génome
Détection variants structuraux



i7 Beckman

Extraction Haut débit

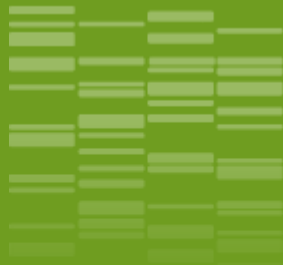
Méthodes en cours de développement



3 ingénieurs (2 CDD)
1 assistante ingénieur,
3 techniciennes



- Charles Poncet : manager plateforme
- Véronique Gautier : AI RMQ et spécialiste NGS (PacBio et Illumina)
- Michaela West et Elodie Belmonte : IE chargées de projet (Prest. Et R/D)
- Lydia Jaffrelo et Carole Confolent : TR chargées de projets prestation génotypage
- Delphine Boyer : TR chargée de projets et gestion



Merci !

