

INSTITUT PASTEUR DE TUNIS

IPT-Omics Plateforme
Service de Génomique et Bioinformatique

GUIDE DU SÉQUENÇAGE SANGER

TABLE DES MATIÈRES

01	Introduction au Séquençage Sanger	2
02	Nos Services — 5 options disponibles	3
03	Spécifications des Échantillons	4
04	Procédure de Soumission	6
05	Livraison des Résultats	7
06	Tarifcation	8
07	Contact et Support	9

01 INTRODUCTION AU SÉQUENÇAGE SANGER

1.1 Principe de la méthode

Le séquençage Sanger, également appelé méthode de terminaison de chaîne par didéoxynucléotides (ddNTPs), est une technique de biologie moléculaire développée par le biochimiste britannique Frederick Sanger et ses collaborateurs en 1977. Cette méthode lui a valu le Prix Nobel de Chimie en 1980, qu'il partageait ainsi avec Walter Gilbert et Paul Berg.

La méthode repose sur l'incorporation sélective de didéoxynucléotides (ddNTPs) lors de la synthèse d'ADN. Ces ddNTPs, dépourvus du groupement hydroxyle en 3', provoquent l'arrêt de l'élongation de la chaîne d'ADN de manière aléatoire, générant ainsi des fragments de toutes les tailles possibles. Les fragments sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire et détectés par fluorescence.

Le saviez-vous ? Le séquençage Sanger a permis de décrypter le premier génome humain complet dans le cadre du Projet Génome Humain (1990–2003), une avancée scientifique majeure du XX^e siècle.

1.2 Étapes clés du processus

- ▶ Dénaturation de l'ADN double brin pour obtenir des matrices simple brin
- ▶ Hybridation d'une amorce (primer) spécifique à la région cible
- ▶ Synthèse d'ADN par la Taq polymérase en présence de dNTPs et de ddNTPs fluorescents
- ▶ Génération de fragments de tailles variables avec terminaisons fluorescentes
- ▶ Séparation par électrophorèse capillaire dans l'analyseur génétique
- ▶ Détection laser et génération d'un chromatogramme interprétable

1.3 Applications cliniques et de recherche

La plateforme IPT-Omics met à votre disposition un équipement Sanger de dernière génération (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer) pour répondre à vos besoins dans les domaines suivants :

Domaine	Application	Type d'échantillon
Génétique médicale	Diagnostic de mutations, validation de variants SNP/INDEL	ADN génomique, produit PCR
Microbiologie	Identification bactérienne, séquençage 16S rRNA, typage moléculaire	ADN bactérien, colonies
Biologie végétale	Barcoding moléculaire, phylogénie, marqueurs chloroplastiques	ADN végétal, chloroplaste
Biotechnologie	Vérification de constructions, confirmation de clones, mutagenèse dirigée	Plasmides, vecteurs recombinants
Écologie moléculaire	Études de biodiversité, métabarcoding, identification d'espèces	ADN environnemental (eDNA)
Médecine légale	Analyse de profils génétiques, identification d'individus	Échantillons biologiques divers

02 NOS SERVICES

La plateforme IPT-Omics propose cinq (5) options de service adaptées à votre niveau de préparation et à votre budget. Chaque option est conçue pour offrir flexibilité et qualité optimale.

2.1 Présentation des options de service

Option 1 — Service Complet (Extraction + PCR + Séquençage) (Délai : 5–7 jours ouvrés)

Idéal pour les laboratoires souhaitant externaliser l'ensemble du processus. Nous prenons en charge l'extraction d'ADN depuis votre échantillon brut, l'amplification PCR, la réaction de séquençage et l'analyse bioinformatique des données.

Option 2 — PCR + Séquençage (Délai : 3–5 jours ouvrés)

Vous fournissez l'ADN extrait et purifié. Nous réalisons l'amplification PCR, la réaction de séquençage et vous livrons les chromatogrammes accompagnés d'un rapport de qualité.

Option 3 — Mix & Run (PCR purifiée fournie) (Délai : 2–3 jours ouvrés)

Vous fournissez votre produit PCR purifié et vos amorces. Nous préparons le mix de séquençage BigDye, effectuons la réaction et l'électrophorèse capillaire.

Option 4 — Run Only (Mix de séquençage fourni) (Délai : 1–2 jours ouvrés)

Vous préparez votre mix de séquençage complet selon notre protocole. Nous effectuons uniquement l'électrophorèse capillaire sur notre séquenceur.

Option 5 — Analyse Bioinformatique Seule (Délai : 1 jour ouvré)

Vous fournissez vos fichiers .ab1 bruts. Nous réalisons le trimming, l'assemblage, l'alignement et la mise en forme des séquences avec rapport de qualité PHRED.

2.2 Tableau comparatif des services

Étape / Option	Option 1	Option 2	Option 3	Option 4	Option 5
Extraction ADN	✓	✗	✗	✗	✗
Amplification PCR	✓	✓	✗	✗	✗
Réaction de séquençage	✓	✓	✓	✗	✗
Électrophorèse capillaire	✓	✓	✓	✓	✗
Analyse bioinformatique	✓	✓	✓	✗	✓
Délai (jours ouvrés)	5–7	3–5	2–3	1–2	1

03 SPÉCIFICATIONS DES ÉCHANTILLONS

Le respect des spécifications suivantes est indispensable pour garantir des résultats de séquençage de haute qualité. Des échantillons non conformes peuvent entraîner des chromatogrammes de mauvaise qualité ou l'impossibilité de réaliser la réaction de séquençage.

⚠ IMPORTANT : Tout échantillon ne respectant pas les critères de qualité minimum sera retourné au client ou fera l'objet d'une consultation préalable avant traitement.

3.1 Concentration et qualité de l'ADN

Paramètre	Spécification	Notes
Concentration ADN génomique	20–50 ng/μL	Minimum 20 ng/μL — mesure spectrophotométrique recommandée (NanoDrop)
Concentration produit PCR	5–20 ng/μL	Bande unique sur gel d'agarose 1,5 % — purifier si bandes multiples
Concentration plasmide	100–200 ng/μL	Mini-prep ou midi-prep recommandée — éviter les maxi-prep diluées
Ratio A260/A280	1,8 – 2,0	Indicateur de pureté protéique — valeur < 1,7 indique une contamination
Ratio A260/A230	2,0 – 2,2	Absence de contaminants (phenol, EDTA, sels) — critique pour la réaction BigDye
Volume minimum	10 μL par échantillon	Prévoir un surplus pour les contrôles qualité internes
Tampon recommandé	Eau ultra-pure ou TE (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA)	Éviter l'EB buffer (Qiagen) pour les PCR — teneur en EDTA perturbatrice

3.2 Spécifications des amorces (primers)

Paramètre	Spécification	Recommandation
Concentration de travail	10 μM	Diluer dans eau ultra-pure ou TE buffer — stocker à –20 °C
Volume à fournir	≥ 20 μL par primer	Par réaction — prévoir surplus pour contrôles
Longueur optimale	18–25 nucléotides	Température de fusion (T _m) comprise entre 55 et 60 °C
Purification minimale	Dessalage (salt removal)	HPLC recommandé pour les régions GC-riches ou structures secondaires
Vérification BLAST	Spécificité confirmée in silico	Utiliser NCBI BLAST ou Primer-BLAST pour valider la spécificité

Paramètre	Spécification	Recommandation
GC content	40–60 %	Éviter les homopolymères (AAAA, CCCC) et les répétitions en tandem

3.3 Préparation du mix de séquençage (Options 3 et 4)

Pour les options Mix & Run, préparez votre mix de séquençage selon le protocole BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) :

Composant	1 réaction	8 réactions	96 réactions
BigDye Terminator v3.1	2,0 µL	16,0 µL	192 µL
5X Sequencing Buffer	2,0 µL	16,0 µL	192 µL
Primer (10 µM)	1,6 µL	12,8 µL	153,6 µL
Template ADN	1–2 µL (variable)	—	—
Eau ultra-pure (qsp 10 µL)	qsp 10 µL	—	—
VOLUME FINAL	10 µL	80 µL	960 µL

Protocole thermique BigDye : 96 °C / 1 min → [96 °C / 10 s → 50 °C / 5 s → 60 °C / 4 min] × 25 cycles → 4 °C (pause). Le produit doit être conservé à –20 °C avant soumission.

04 PROCÉDURE DE SOUMISSION

4.1 Étapes de commande

1	<p>Demande de devis</p> <p>Contactez la plateforme par email ou via le lien du site web pour discuter de vos besoins. Indiquez le type de service souhaité, le nombre d'échantillons et les délais attendus. Un devis personnalisé vous sera transmis sous 24h ouvrées.</p>
2	<p>Validation et bon de commande</p> <p>Après validation du devis, un bon de commande officiel est émis.</p>
3	<p>Préparation des échantillons</p> <p>Préparez vos échantillons selon les spécifications de la section 3. Remplissez impérativement le formulaire de soumission (3 exemplaires). Vérifiez la qualité et la concentration avant envoi.</p>
4	<p>Soumission physique</p> <p>Déposez vos échantillons à la plateforme IPT-Omics (rez-de-chaussée) du lundi au vendredi, de 8h à 12h. Les échantillons doivent être conditionnés sur glace et accompagnés du formulaire signé.</p>
5	<p>Réception des résultats</p> <p>Les résultats sont transmis par email sécurisé sous forme de fichiers compressés (.zip) incluant les chromatogrammes, séquences et rapport de qualité.</p>

4.2 Formulaire de soumission

Toute soumission doit impérativement être accompagnée du formulaire de demande de séquençage dûment complété (formulaire 1 2 3 s. LeS formulaireS sont téléchargeables sur notre site web (www.pasteur.tn) ou disponible sur demande par email.

Section du formulaire	Informations à renseigner
Informations client	Nom complet, laboratoire/institution, adresse postale, email professionnel, numéro de téléphone
Type de service	Option choisie (1 à 5), nombre total de réactions, délai souhaité
Description des échantillons	Type d'ADN (génomique / PCR / plasmide), nombre, concentration, volume, référence interne
Informations primers	Nom de l'amorce, séquence 5'→3', concentration, Tm calculée
Spécifications de lecture	Longueur de lecture souhaitée, région cible, organisme, numéro d'accession de référence
Mentions légales	Signature du responsable, accord d'utilisation des données, numéro de projet (si applicable)

05 LIVRAISON DES RÉSULTATS

Les résultats de séquençage sont livrés exclusivement sous forme électronique, par email sécurisé, dans un délai de 1 à 7 jours ouvrés selon l'option de service choisie. Un lien de téléchargement sécurisé (valide 30 jours) est également disponible sur demande.

Fichier livré	Extension	Description
Chromatogramme brut	.ab1	Fichier brut du séquenceur — visualisable avec FinchTV, Chromas ou SeqTrace (logiciels gratuits)
Séquence texte	.seq / .txt	Séquence nucléotidique en clair, trimée des régions de mauvaise qualité
Séquence FASTA	.fasta	Format standard pour les analyses BLAST, alignements et dépôts GenBank
Rapport de qualité	.pdf	Rapport détaillé incluant scores PHRED, graphique de qualité par position et statistiques de lecture
Alignement (si demandé)	.aln / .pdf	Alignement de la séquence sur la référence fournie, avec mise en évidence des variants

5.1 Interprétation des scores de qualité PHRED

Le score PHRED (Q-score) est l'indicateur de qualité de base de chaque nucléotide séquencé. Il est calculé selon la formule $Q = -10 \times \log_{10}(P)$, où P est la probabilité d'erreur d'appel de base.

Score PHRED	Probabilité d'erreur	Précision	Interprétation
Q10	1 sur 10	90 %	Qualité insuffisante — résultat à rejeter
Q20	1 sur 100	99 %	Qualité acceptable — à interpréter avec prudence
Q30	1 sur 1 000	99,9 %	Haute qualité — standard de publication
Q40	1 sur 10 000	99,99 %	Qualité exceptionnelle — séquençage Sanger optimal

Objectif de qualité IPT-Omics : Nos séquences présentent en moyenne un score PHRED \geq Q30 sur plus de 80 % des bases appelées, avec une longueur de lecture utile de 600 à 900 paires de bases selon le template.

06 TARIFICATION

Les tarifs sont établis selon le type de service et le volume d'échantillons soumis.

Devis personnalisé : Contactez la plateforme pour obtenir un devis adapté à votre projet. Toute prestation fait l'objet d'un bon de commande officiel.

07 CONTACT ET SUPPORT

Notre équipe est à votre disposition pour vous accompagner à chaque étape de votre projet de séquençage. N'hésitez pas à nous contacter pour toute question technique, demande de devis ou consultation scientifique.

<p> Email sinda.zarrouk@pasteur.utm.tn GEN.IPT@pasteur.tn</p> <p> Site web www.pasteur.tn</p> <p> Téléphone +216 71 783 022</p>	<p>Adresse Institut Pasteur de Tunis IPT-Omics Platform — Aile B, 1er étage 13, Place Pasteur — BP 74 1002 Tunis Belvédère — Tunisie</p> <p>Horaires d'accueil Lundi – Vendredi : 8h00 – 16h00</p>
---	--

7.1 Support technique et FAQ

? Mon chromatogramme présente des pics superposés, que faire ?

Ce phénomène indique souvent la présence de plusieurs templates dans votre réaction (hétérozygotie, contamination ou séquence répétée). Purifiez votre produit PCR sur colonne et retentez. Si le problème persiste, contactez-nous pour une analyse bioinformatique dédiée.

? Quelle est la longueur de lecture maximale obtenue ?

Avec le BigDye Terminator v3.1 et notre séquenceur ABI 3500, nous obtenons typiquement des lectures de 600 à 900 pb de haute qualité ($Q \geq 30$). Les régions proches du primer (< 30 pb) peuvent présenter une qualité réduite.

? Puis-je soumettre des échantillons congelés ?

Oui. L'ADN peut être conservé à -20 °C ou -80 °C. Lors de la soumission, utilisez de la glace sèche pour les transports longue distance et évitez les cycles répétés de congélation-décongélation (max. 3 cycles).

? Les données de séquençage sont-elles confidentielles ?

Oui, toutes les données sont traitées de manière confidentielle conformément à notre politique de protection des données. Elles ne sont ni partagées ni publiées sans votre consentement explicite.