



# Applied Biosystems StepOne™ Système de PCR en temps réel

Guide des réactifs



# **Applied Biosystems StepOne™ Système de PCR en temps réel**

Guide des réactifs

© Copyright 2006, 2010 Applied Biosystems. All rights reserved.

Information in this document is subject to change without notice. Applied Biosystems assumes no responsibility for any errors that may appear in this document.

APPLIED BIOSYSTEMS DISCLAIMS ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. IN NO EVENT SHALL APPLIED BIOSYSTEMS BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

**NOTICE TO PURCHASER: Label License**

The StepOne™ Real-Time PCR System is covered by US patents and corresponding claims in their non-US counterparts, owned by Applied Biosystems. No right is conveyed expressly, by implication, or by estoppel under any other patent claim, such as claims to apparatus, reagents, kits, or methods such as 5' nuclease methods. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

**NOTICE TO PURCHASER:**

PLEASE REFER TO THE USER'S GUIDE OR PRODUCT INSERT OF THE REAGENTS NAMED HEREIN FOR LIMITED LABEL LICENSE OR DISCLAIMER INFORMATION.

**TRADEMARKS:**

Applera, Applied Biosystems, AB (Design), MicroAmp, Primer Express, and VIC are registered trademarks, and FAM, JOE, MultiScribe, NED, ROX, StepOne, TAMRA, and TET are trademarks of Applied Biosystems or its subsidiaries in the U.S. and/or certain other countries.

AmpErase, AmpliTaq Gold, and TaqMan are registered trademarks of Roche Molecular Systems, Inc.

SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc.

All other trademarks are the sole property of their respective owners.

Référence 4377720 Rév. B  
06/2010

# Table des matières

## Préface

Utilisation de ce guide .....	vii
Informations supplémentaires .....	ix
Comment obtenir une assistance .....	xi

## Chapitre 1 Introduction

À propos du système StepOne™ .....	1-2
Configuration des expériences sur le système StepOne™ .....	1-4
Sélection de l'application .....	1-5
Sélection du type de réactif .....	1-6
Sélection du type d'essai .....	1-7

## Chapitre 2 Présentation des réactifs

Présentation .....	2-2
Réactifs TaqMan® .....	2-2
Réactifs SYBR® Green .....	2-4
Sélection du type de réactif .....	2-5
Limitation des contaminations d'ADN .....	2-7

## Chapitre 3 Expériences de quantification

<b>Section 3.1 : À propos des expériences de quantification</b> .....	<b>3-3</b>
Présentation .....	3-4
Sélection de la méthode de quantification .....	3-5
Sélection de la RT-PCR 1 ou 2 étapes .....	3-8
Sélection de la PCR simplex ou multiplex .....	3-10
Sélection du type de réactif .....	3-12
Sélection du type d'essai .....	3-12
<b>Section 3.2 : Instructions de préparation</b> .....	<b>3-15</b>
Essais en stock/fabriqués sur commande .....	3-16
Essais TaqMan® Gene Expression Assays .....	3-16
Essais Custom TaqMan® Gene Expression Assays .....	3-18

Sélection du master mix .....	3-19
Conception de l'expérience .....	3-20
Essais personnalisés .....	3-20
Création d'amorces et de sondes à l'aide du logiciel Primer Express® .....	3-21
Sélection des réactifs .....	3-24
Utilisation des conditions de thermocyclage recommandées .....	3-26
Optimisation des concentrations d'amorces .....	3-29
Optimisation de la concentration de sonde .....	3-33
Pour plus d'informations .....	3-35

## Chapitre 4 Réactions de génotypage

<b>Section 4.1 : À propos des réactions de génotypage .....</b>	<b>4-3</b>
Présentation .....	4-4
Sélection du type d'essai .....	4-6
<b>Section 4.2 : Instructions de préparation .....</b>	<b>4-9</b>
Essais préconçus/validés .....	4-10
Essais TaqMan® SNP Genotyping Assays .....	4-10
Essais TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays .....	4-11
Réactifs Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents for Allelic Discrimination .....	4-12
Sélection du master mix .....	4-13
Conception de l'expérience .....	4-14
Essais personnalisés .....	4-15
Essais Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays .....	4-15
Sélection du master mix .....	4-17
Conception de l'expérience .....	4-17

## Chapitre 5 Expériences de présence/absence

<b>Section 5.1 : À propos des expériences de présence/absence .....</b>	<b>5-3</b>
Présentation .....	5-4
Sélection du type d'essai .....	5-5
<b>Section 5.2 : Instructions de préparation .....</b>	<b>5-9</b>
Essais en stock/fabriqués sur commande .....	5-10
Essais TaqMan® Gene Expression Assays .....	5-10
Essais Custom TaqMan® Gene Expression Assays .....	5-12
Réactifs TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents .....	5-13
Sélection du master mix .....	5-14
Conception de l'expérience .....	5-15
Essais personnalisés .....	5-15

---

Annexe A    Formule

Formule pour les expériences de quantification relative par la méthode  
de comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) ..... A-1

Annexe B    Limitation des amorces dans la PCR multiplex

Annexe C    Instructions de préparation des essais

Bibliographie

Glossaire

Index





# Préface

## Utilisation de ce guide

- Objectif de ce guide** Ce guide fournit des informations sur les réactifs compatibles avec le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ (le système StepOne™). Contenu du guide :
- Introduction aux réactifs TaqMan® et SYBR® Green
  - Description et instructions pour les applications suivantes :
    - Expériences de quantification
    - Réactions de génotypage
    - Expériences de présence/absence
- Public concerné** Ce guide est destiné aux personnels de laboratoire et aux directeurs de recherche qui effectuent des expériences de PCR en temps réel sur le système StepOne.
- Prérequis** Le contenu de ce guide s'appuie sur les prérequis suivants :
- L'utilisateur possède une connaissance pratique du processus de réaction de polymérisation en chaîne (PCR).
  - L'utilisateur sait comment manipuler les échantillons d'ADN/ARN et les préparer pour la PCR.
- Conventions typographiques** Ce guide utilise les conventions suivantes :
- Le texte en **gras** indique une action de l'utilisateur. Par exemple : Taper **0**, puis appuyer sur **Entrée** pour chaque champ restant.
  - Le texte en *italique* est utilisé pour signaler des termes nouveaux ou importants et pour mettre un élément en valeur. Par exemple : Avant l'analyse, *toujours* préparer une matrice fraîche.
  - Une flèche vers la droite ( ▶ ) sépare des commandes successives à sélectionner dans un menu déroulant ou un ensemble de raccourcis. Par exemple : Sélectionner **File** (Fichier) ▶ **Open** (Ouvrir).
- Mises en garde à l'attention des utilisateurs** Deux types de mises en garde apparaissent dans la documentation destinée aux utilisateurs des produits Applied Biosystems. Chaque mention implique un degré de mise en garde particulier ou l'une des actions décrites ci-dessous :
- Remarque** : – Fournit des informations potentiellement utiles mais non critiques pour l'utilisation du produit.
- IMPORTANT** ! – Fournit des informations nécessaires au bon fonctionnement de l'instrument, à un usage précis du kit de réactifs ou à la manipulation d'un produit chimique en toute sécurité.

Exemples de mises en garde à l'attention des utilisateurs :

**Remarque :** La fonction Calibrate (Calibrer) est également disponible dans la console de commande.


**IMPORTANT !** Pour vérifier la connexion client, il est impératif de posséder un ID utilisateur valide.


## Alertes à la sécurité


Quatre alertes à la sécurité apparaissent dans la documentation destinée aux utilisateurs des produits Applied Biosystems. Elles sont insérées à des endroits spécifiques pour attirer l'attention du lecteur sur des risques importants. Chaque alerte – **IMPORTANT, ATTENTION, AVERTISSEMENT, DANGER** – implique un degré de mise en garde ou une action spécifique.

### Définition

**IMPORTANT !** – Fournit des informations nécessaires au bon fonctionnement de l'instrument, à un usage précis du kit de réactifs ou à la manipulation d'un produit chimique en toute sécurité.

 **ATTENTION** – Indique une situation potentiellement dangereuse susceptible d'entraîner des blessures légères ou mineures si elle n'est pas évitée. Ce message peut aussi servir de mise en garde contre les pratiques dangereuses.


 **AVERTISSEMENT** – Indique une situation potentiellement dangereuse susceptible d'entraîner des blessures graves voire la mort si elle n'est pas évitée.


 **DANGER** – Indique une situation dangereuse imminente qui entraînera des blessures graves voire la mort si elle n'est pas évitée. Cette mise en garde est limitée aux situations les plus extrêmes.


À l'exception d'IMPORTANT, chaque alerte à la sécurité présente dans un document Applied Biosystems est accompagnée d'un panneau triangulaire contenant un symbole de danger. Ces symboles sont identiques à ceux figurant sur les instruments Applied Biosystems.

### Exemples

**IMPORTANT !** Il convient de créer un tableur distinct pour la saisie des échantillons de chaque plaque de réactions de 96 puits.

 **ATTENTION DANGER CHIMIQUE.** Le réactif **TaqMan® Universal PCR Master Mix** peut provoquer une irritation des yeux et de la peau. Toute exposition peut entraîner un malaise en cas d'ingestion ou d'inhalation. Lire la fiche de données de sécurité applicable et suivre les consignes de manipulation. Porter des protections oculaires, des gants et des vêtements appropriés.

 **AVERTISSEMENT DANGER DE BLESSURE CORPORELLE.** Lorsque l'instrument est en fonctionnement, la température du couvercle chauffant et du bloc peut dépasser 100 °C (212 °F).

 **DANGER DANGER ÉLECTRIQUE.** L'usage permanent d'un dispositif de mise à la terre est crucial pour la sécurité. Ne jamais utiliser le système lorsque le dispositif de mise à la terre est déconnecté.

## Informations supplémentaires

### Documentation relative

Le système StepOne est fourni avec les documents suivants :

Document	Réf. EN	Réf. FR
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Genotyping Experiments</i>	4376786	4377727
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments</i>	4376787	4377726
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Relative Standard Curve and Comparative C<sub>T</sub> Experiments</i>	4376785	4377744
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Standard Curve Experiments</i>	4376784	4377738
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation, Networking, and Maintenance Guide</i>	4376782	4377800
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation Quick Reference Card</i>	4376783	4377794
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Site Preparation Guide</i>	4376768	4378361
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software Help</i>	—	—


Les documents suivants sont disponibles auprès de Applied Biosystems :

Document	Réf.
<i>Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol</i>	4375575
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation Performance Verification Protocol</i>	4376791
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation Qualification-Operation Qualification Protocol</i>	4376790
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Planned Maintenance Protocol</i>	4376788
<i>Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4334429
<i>Custom TaqMan® Genomic Assays Protocol: Submission Guidelines</i>	4367671
<i>Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol</i>	4334431
<i>Power SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR Protocol</i>	4367218
<i>Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Allelic Discrimination Protocol</i>	4312214
<i>Primer Express® Software Version 3.0 Getting Started Guide</i>	4362460
<i>SYBR® Green PCR and RT-PCR Reagents Protocol</i>	4304965
<i>SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR Reagents Protocol</i>	4310251
<i>TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays Protocol</i>	4362038
<i>TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents Protocol</i>	4308335
<i>TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X) Protocol</i>	4351891
<i>TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4333458
<i>TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol</i>	4332856
<i>TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol</i>	4304449
<i>User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression</i>	4303859
<i>Using TaqMan® Endogenous Control Assays to Select an Endogenous Control for Experimental Studies Application Note</i>	127AP08

**Remarque :** Pour plus de renseignements sur la documentation, voir « Comment obtenir une assistance » à la page xi.

### Obtention d'informations dans l'aide du logiciel

Le document Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software Help (l'aide du logiciel StepOne™) décrit l'utilisation de chaque fonction de l'interface utilisateur. Pour accéder à l'aide depuis le logiciel StepOne, procéder comme suit :

- Appuyer sur **F1**.
- Cliquer sur  dans la barre d'outils.
- Sélectionner **Help (Aide) ▶ StepOne Help (Aide de StepOne)** dans le menu.

Pour localiser un thème dans l'aide :

- Consulter la table des matières.
- Rechercher un thème spécifique.
- Rechercher dans un index alphabétique.

## Envoi de commentaires

Dans le but d'améliorer sa documentation, Applied Biosystems invite les utilisateurs à lui faire part de leurs commentaires et suggestions. Merci de les envoyer par courrier électronique à l'adresse :

**techpubs@appliedbiosystems.com**

**IMPORTANT !** Cette adresse électronique est uniquement destinée à l'envoi de commentaires et de suggestions sur la documentation. Pour commander des documents, télécharger les fichiers PDF ou obtenir de l'aide sur une question technique, visiter le site **http://www.appliedbiosystems.com** et cliquer sur le lien **Support** (Assistance). (Voir « Comment obtenir une assistance » ci-dessous.)

## Comment obtenir une assistance

Pour obtenir les dernières informations sur les services et le support technique dans tous les pays, visiter le site **http://www.appliedbiosystems.com** et cliquer sur le lien **Support** (Assistance).

La page Support (Assistance) permet d'effectuer les actions suivantes :

- Rechercher un sujet dans le forum aux questions (FAQ)
- Poser une question directement au support technique
- Commander des documents utilisateur Applied Biosystems, des fiches de données de sécurité, des certificats d'analyse et d'autres documents relatifs
- Télécharger des documents au format PDF
- Obtenir des informations sur les formations proposées à nos clients
- Télécharger des mises à jour et correctifs de logiciels

La page Support (Assistance) présente également les numéros de téléphone et de télécopie qui permettent de contacter le support technique et les sites commerciaux Applied Biosystems partout dans le monde.

**IMPORTANT !** Sur instruction de ce guide, ou pour programmer la maintenance de l'instrument StepOne™ (par exemple les opérations de maintenance planifiée annuelle ou de contrôle/calibration de la température), contacter le Centre de service clientèle Applied Biosystems. Pour obtenir un numéro de téléphone ou envoyer un e-mail au Centre, visiter le site **http://www.appliedbiosystems.com/support/contact**.



Sommaire du chapitre :

À propos du système StepOne™ .....	1-2
Configuration des expériences sur le système StepOne™ .....	1-4
Sélection de l'application .....	1-5
Sélection du type de réactif .....	1-6
Sélection du type d'essai .....	1-7

## À propos du système StepOne™

Le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ (système StepOne™) s'appuie sur le principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Il utilise des réactifs PCR basés sur le principe de la fluorescence pour assurer :

- La détection quantitative des séquences cible d'acide nucléique (cibles) par une analyse en temps réel.
- La détection qualitative des séquences cible d'acide nucléique (cibles) par une analyse en point final et une analyse de la courbe de fusion.

### À propos de la collecte de données

Pendant la PCR, le système StepOne collecte les données de fluorescence brutes en plusieurs points selon le type d'application :

Type d'application		Point de collecte de données
Analyses en temps réel	Quantification absolue par les courbes standard	L'instrument collecte les données après chaque étape d'extension de la PCR.
	Quantification relative par les courbes standard	
	Comparaison des valeurs de $C_T$ ( $\Delta\Delta C_T$ )	
Analyses en point final	Génotypage	L'instrument collecte les données avant et après la PCR. Il peut également collecter les données pendant la PCR (en temps réel), ce qui s'avère parfois utile pour corriger les imprécisions.
	Présence/absence	L'instrument collecte les données avant et après la PCR.

Indépendamment du type d'application, chaque point de collecte de données ou *lecture* comporte trois phases :

1. **Excitation** – L'instrument StepOne™ illumine tous les puits de la plaque, ce qui excite les fluorophores dans chaque réaction.
2. **Émission** – L'optique de l'instrument StepOne collecte la fluorescence résiduelle émise par les puits de la plaque de PCR. L'image résultante, recueillie par le dispositif, est uniquement composée de la lumière correspondant à l'intervalle des longueurs d'ondes d'émission.
3. **Collecte** – L'instrument StepOne crée une représentation numérique de la fluorescence résiduelle recueillie sur une période déterminée. Le logiciel StepOne™ conserve l'image fluorescente brute en vue de l'analyse.

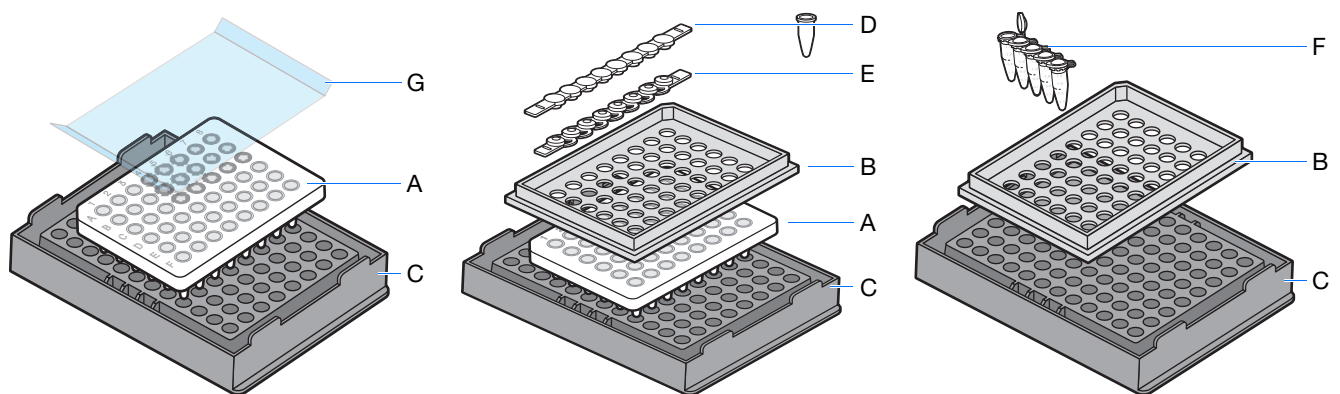
Après une réaction de PCR, le logiciel StepOne utilise les données de calibration (spatiale, spectrale et du bruit de fond) pour déterminer l'emplacement et l'intensité des signaux fluorescents à chaque lecture, le fluorophore associé à chaque signal fluorescent et l'amplitude du signal.



### Consommables compatibles


Le système StepOne est compatible avec les consommables et accessoires répertoriés ci-dessous. Ils peuvent être utilisés avec les protocoles et réactifs standard et Fast.

Consommable	Référence
<ul style="list-style-type: none"> <li>• MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plates</li> <li>• MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Cover</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4375816</li> <li>• 4375323</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• MicroAmp™ Fast 8-Tube Strips</li> <li>• MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4358293</li> <li>• 4323032</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Caps</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4358297</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• MicroAmp™ Fast 48-Well Trays</li> <li>• MicroAmp™ 48-Well Base Adaptor</li> <li>• MicroAmp™ Splash Free 96-Well Base</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4375282</li> <li>• 4375284</li> <li>• 4312063</li> </ul>



Réf.	Consommable
A	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
B	MicroAmp™ Fast 48-Well Tray
C	MicroAmp™ Splash Free 96-Well Base
D	MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip
E	MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip
F	MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Caps
G	MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Cover

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur l'un des sujets abordés dans ce guide, consulter l'aide dans le logiciel du système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ en appuyant sur **F1**, en cliquant sur  dans la barre d'outils ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

# Configuration des expériences sur le système StepOne™

**Workflow général** Avant de démarrer une expérience sur le système StepOne, elle doit être préparée comme suit :

1. Sélectionner une application (page 1-5).
2. Sélectionner le type de réactif (page 1-6).
3. Sélectionner le type d'essai (page 1-7).

**Contenu du guide** Ce chapitre fournit des informations générales sur les applications, de réactifs et d'essais compatibles avec le système StepOne.

Les chapitres suivants fournissent des informations spécifiques :

Chapitre	Description
Chapitre 2, Présentation des réactifs	<ul style="list-style-type: none"><li>• Décrit et compare les réactifs TaqMan® et SYBR® Green.</li><li>• Fournit des informations sur la limitation des contaminations d'ADN.</li></ul>
Chapitre 3, Expériences de quantification	<ul style="list-style-type: none"><li>• Explique le fonctionnement de l'application.</li><li>• Fournit un workflow spécifique de l'application.</li><li>• Fournit des instructions de préparation pour chaque type d'essai.</li></ul>
Chapitre 4, Réactions de génotypage	
Chapitre 5, Expériences de présence/absence	

## Sélection de l'application

Il est possible de mettre en œuvre les applications suivantes sur le système StepOne :

- Quantification, notamment :
  - Quantification absolue par les courbes standard
  - Quantification relative par les courbes standard
  - Comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ )
- Génotypage
- Présence/absence

**Remarque :** Le système StepOne permet également d'effectuer une analyse de la courbe de fusion.

### Analyses en point final vs analyses en temps réel

Comme décrit ci-dessous, les trois applications peuvent être classées selon qu'elles sont réalisées en temps réel ou en point final.

Catégorie	Propriétés	Application
Temps réel	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'instrument mesure la progression de la PCR.‡</li> <li>• Les données sont collectées tout au long de la réaction de PCR.</li> <li>• Les réactions sont caractérisées par le moment où l'amplification d'une cible est détectée pour la première fois pendant le thermocyclage.§</li> </ul>	Quantification
Point final	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les données sont collectées à la fin du processus PCR.</li> <li>• Les réactions sont caractérisées par la quantité de cible accumulée à la fin de la PCR.§</li> <li>• Le point de données est l'intensité normalisée du reporter ou de la valeur <math>R_n</math>.</li> </ul> <p><b>Remarque :</b> Certaines analyses en point final incluent également des points de données pré-PCR. Si tel est le cas, le système calcule la valeur delta <math>R_n</math> (<math>\Delta R_n</math>) avec la formule suivante :</p> $R_n \text{ post-PCR} - R_n \text{ pré-PCR} = \Delta R_n$	Génotypage
		Présence/absence

‡ Kwok and Higuchi, 1989.

§ Saiki *et al.*, 1985.

## Sélection du type de réactif

Les types de réactifs suivants (chimies) sont compatibles avec le système StepOne :

- Les réactifs TaqMan®
- Les réactifs SYBR® Green
- Les autres réactifs basés sur le principe de la fluorescence

### Réactifs TaqMan

Les réactifs TaqMan incluent les essais TaqMan® [mix prêts à l'emploi contenant les amorces et la/les sonde(s)] et les master mix TaqMan®. Les réactifs TaqMan sont compatibles avec les applications suivantes :

- Quantification, notamment :
  - Quantification absolue par les courbes standard
  - Quantification relative par les courbes standard
  - Comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ )
- Génotypage
- Présence/absence

**IMPORTANT !** Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA™ comme reporter ou quencher avec le système StepOne.

### Réactifs SYBR Green

Les réactifs SYBR Green incluent des amorces et des master mix contenant le fluorophore SYBR® Green. Les réactifs SYBR Green sont compatibles avec les expériences de quantification de type :

- Quantification absolue par les courbes standard
- Quantification relative par les courbes standard
- Comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ )

**Remarque :** Il n'est pas possible d'effectuer la PCR multiplex avec les réactifs SYBR Green. Pour plus d'informations, voir « Sélection de la PCR simplex ou multiplex » à la page 3-10.

### Autres réactifs

Il est possible d'utiliser d'autres réactifs basés sur le principe de la fluorescence sur le système StepOne, sans toutefois perdre de vue les points suivants :

- Le logiciel StepOne calcule automatiquement les volumes réactionnels pour les réactifs TaqMan et SYBR Green, mais pas pour les autres réactifs.
- L'expérience doit être créée à l'aide du workflow Advanced Setup (Configuration avancée), plutôt qu'avec l'assistant de programmation Design Wizard.

## Sélection du type d'essai

Dans le logiciel StepOne, il est possible de sélectionner les types d'essais suivants pour les expériences de quantification, de présence/absence et de génotypage :

Application	Type d'essai	Voir...
Quantification <sup>‡</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En stock/fabriqué sur commande</li> <li>• Personnalisé</li> </ul>	ci-dessous
Présence/absence		
Génotypage	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Préconçu/validé</li> <li>• Personnalisé</li> <li>• Conçu par l'utilisateur</li> </ul>	page 1-8

<sup>‡</sup> Les expériences de quantification incluent les expériences de quantification absolue par les courbes standard, de quantification relative par les courbes standard et par la comparaison des valeurs de C<sub>T</sub>.

### Expériences de quantification et de présence/absence

#### Essais en stock/fabriqués sur commande

Pour les expériences de quantification ou de présence/absence, sélectionner le type d'essai **Inventoried/Made to Order** (En stock/Fabriqué sur commande) dans le logiciel StepOne si les essais suivants sont utilisés :

- Essais **TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays, en stock** – Ensembles préconçus d'amorces et de sondes TaqMan<sup>®</sup> MGB (ligand du petit sillon) marquées par un fluorophore FAM<sup>™</sup> en stock. Le mix primers-sonde est disponible dans un tube unique préformulé à 20X.
- Essais **TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays, fabriqués sur commande** – Ensembles préconçus d'amorces et de sondes TaqMan MGB marquées par un fluorophore FAM, fabriqués au moment de la commande. Le mix primers-sonde est disponible dans un tube unique préformulé à 20X.
- Essais **Custom TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays** – Ensembles d'amorces et de sondes TaqMan MGB marquées par un fluorophore FAM, conçus, synthétisés et formulés par le service Custom TaqMan<sup>®</sup> Genomic Assays d'après les informations de séquence transmises par l'utilisateur. Le mix primers-sonde est disponible dans un tube unique, préformulé à 20X ou 60X.

**Remarque :** Pour sélectionner le type d'essai dans le logiciel StepOne, accéder à l'écran Reaction Setup (Préparation des réactions) dans le workflow de l'assistant de programmation Design Wizard ou Advanced Setup (Configuration avancée), puis sélectionner **Inventoried/Made to Order** (En stock/Fabriqué sur commande) dans le menu déroulant Assay Type (Type d'essai).

### Essais personnalisés

Pour les expériences de quantification et de présence/absence si les essais TaqMan ou SYBR Green (amorces et sondes) ont été dessinés avec le logiciel Primer Express<sup>®</sup>, sélectionner le type d'essai Custom (Personnalisé) dans le logiciel StepOne. Lors de la préparation des essais personnalisés, suivre les instructions de préparation des essais d'Applied Biosystems pour optimiser les résultats.

**IMPORTANT !** Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA<sup>™</sup> comme reporter ou quencher avec le système StepOne.

**Remarque :** Pour sélectionner le type d'essai dans le logiciel StepOne, accéder à l'écran Reaction Setup (Préparation des réactions) dans le workflow de l'assistant de programmation Design Wizard ou Advanced Setup (Configuration avancée), puis sélectionner **Custom** (Personnalisé) dans le menu déroulant Assay Type (Type d'essai).

### Réactions de génotypage

#### Essais préconçus/validés

Pour les réactions de génotypage, le type d'essai préconçu/validé inclut les essais suivants :

- Essais **TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays** – Ensembles préconçus d'amorces et de sondes TaqMan<sup>®</sup> MGB (ligand du petit sillon) marquées par des fluorophores FAM<sup>™</sup> et VIC<sup>®</sup>, classés en deux catégories :
  - Essais TaqMan<sup>®</sup> Validated & Coding SNP Genotyping Assays en stock. Le mix primers-sonde est disponible dans un tube unique préformulé à 20X.
  - Essais TaqMan<sup>®</sup> Pre-Designed SNP Genotyping Assays, fabriqués au moment de la commande (sur demande). Le mix primers-sonde est disponible dans un tube unique préformulé à 20X.
- Essais **TaqMan<sup>®</sup> Drug Metabolism Genotyping Assays** – Ensembles préconçus d'amorces et de sondes TaqMan MGB marquées par des fluorophores FAM et VIC en stock. Le mix primers-sonde est disponible dans un tube unique préformulé à 20X.
- **Essais Pre-Developed TaqMan<sup>®</sup> Assay Reagents for Allelic Discrimination (TaqMan<sup>®</sup> PDARs for AD)** – Ensembles préconçus d'amorces et de sondes TaqMan MGB marquées par des fluorophores FAM et VIC en stock. Le mix primers-sonde est disponible dans un tube unique préformulé à 10X.

**Remarque :** Pour sélectionner un essai SNP dans le logiciel StepOne, accéder à l'écran SNP Assays (Essais SNP) dans le workflow de l'assistant de programmation Design Wizard ou à l'écran Plate Setup (Configuration de la plaque) dans le workflow Advanced Setup (Configuration avancée). Dans l'écran SNP Assays (Essais SNP) ou Plate Setup (Configuration de la plaque), il est possible de sélectionner un essai dans la bibliothèque ou d'en créer un nouveau.

### Essais personnalisés

Pour les réactions de géotypage, le type d'essai Custom (Personnalisé) inclut les essais Custom TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays. Ces essais sont des ensembles d'amorces et de sondes TaqMan MGB marquées par des fluorophores FAM et VIC conçus, synthétisés et formulés par le service Custom TaqMan<sup>®</sup> Genomic Assays d'après les informations de séquence transmises par l'utilisateur. Le mix primers-sonde est disponible dans un tube unique, préformulé à 40X ou 80X.

**Remarque :** Pour sélectionner un essai SNP dans le logiciel StepOne, accéder à l'écran SNP Assays (Essais SNP) dans le workflow de l'assistant de programmation Design Wizard ou à l'écran Plate Setup (Configuration de la plaque) dans le workflow Advanced Setup (Configuration avancée). Dans l'écran SNP Assays (Essais SNP) ou Plate Setup (Configuration de la plaque), il est possible de sélectionner un essai dans la bibliothèque ou d'en créer un nouveau.

### Essais conçus par l'utilisateur

Pour créer des amorces et des sondes personnalisées destinées aux essais SNP, voir le document *Primer Express<sup>®</sup> Software Version 3.0 Getting Started Guide*.

**IMPORTANT !** Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA<sup>™</sup> comme reporter ou quencher avec le système StepOne.





Sommaire du chapitre :

Présentation .....	2-2
Réactifs TaqMan® .....	2-2
Réactifs SYBR® Green .....	2-4
Sélection du type de réactif .....	2-5
Limitation des contaminations d'ADN .....	2-7

## Présentation

Applied Biosystems a développé deux types de réactifs (chimies) compatibles avec la détection des produits de PCR sur le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ :

- Les réactifs TaqMan® (ci-dessous)
- Les réactifs SYBR® Green (page 2-4)

## Réactifs TaqMan®

**Applications** Les réactifs TaqMan® incluent les essais TaqMan® [mix prêts à l'emploi contenant les amorces et la/les sonde(s)] et les master mix TaqMan®. Les essais sont spécifiques de la cible étudiée. Les master mix contiennent les autres composants nécessaires à la réaction de PCR. Les réactifs TaqMan sont compatibles avec les applications suivantes :

- Quantification, notamment :
  - Quantification absolue par les courbes standard
  - Quantification relative par les courbes standard
  - Comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ )

- Génotypage
- Présence/absence

**IMPORTANT !** Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA™ comme reporter ou quencher avec le système StepOne.

**Développement des réactifs TaqMan** Auparavant, des intercalants étaient utilisés pour quantifier les produits de PCR en temps réel. Cette méthode avait pour inconvénient principal de détecter l'accumulation des produits de PCR spécifiques et non spécifiques.

Les systèmes de PCR en temps réel ont été améliorés par l'introduction de sondes marquées par un fluorophore qui utilisent l'activité 5' nucléase de la Taq polymérase. Ces sondes ont permis de développer une méthode qui ne détecte en temps réel que les produits d'amplification spécifiques.

**Fonctionnement des réactifs TaqMan** Les réactifs TaqMan utilisent une sonde marquée par un fluorophore pour détecter un produit de PCR spécifique accumulé pendant la PCR. Ils fonctionnent d'après le principe suivant :

1. Une sonde oligonucléotidique est marquée par un reporter fluorescent lié à l'extrémité 5' et un quencher lié à l'extrémité 3'.  
Lorsque la sonde est intacte, la proximité du quencher réduit fortement la fluorescence émise par le reporter du fait d'un transfert d'énergie dans l'espace (technologie de FRET) (FRET; Förster resonance, Förster, V. T. 1948).
2. Si la séquence cible est présente, la sonde s'hybride entre les amorces, puis elle est clivée par l'activité 5' nucléase de la Taq polymérase pendant l'extension.

3. Le clivage de la sonde :
  - Sépare le reporter du quencher en augmentant le signal du premier.
  - Supprime la sonde du brin cible et permet à l'amorce de poursuivre son extension jusqu'à la fin du brin modèle. Ainsi, l'ajout de la sonde ne bloque pas le processus général de PCR.
4. Une quantité croissante des molécules du reporter est libérée à chaque cycle, ce qui augmente l'intensité de la fluorescence proportionnellement à la quantité d'amplicon produite. Plus le nombre de copies de la séquence cible est élevé au départ, plus l'augmentation de la fluorescence est précoce.

La Figure 2-1 illustre ce processus.

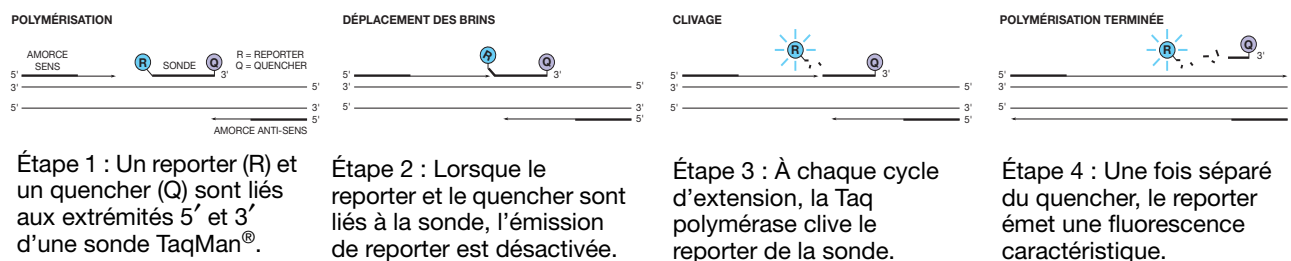


Figure 2-1 Fonctionnement des réactifs TaqMan

### Sondes TaqMan MGB

D'une manière générale, Applied Biosystems recommande d'utiliser les sondes TaqMan® MGB, surtout lorsque les sondes TaqMan® classiques dépassent 30 nucléotides. Les sondes TaqMan MGB contiennent :

- **Un reporter fluorescent lié à l'extrémité 5'**, qui génère un signal lorsqu'il est clivé par l'activité 5' nucléase de la Taq polymérase.
- **Un quencher non fluorescent (NFQ) lié à l'extrémité 3'**, qui permet aux systèmes PCR en temps réel de mesurer les contributions du reporter de manière plus précise car le quencher n'émet pas de fluorescence.
- **Un ligand du petit sillon (MGB) lié à l'extrémité 3'**, qui augmente la température de fusion ( $T_m$ ) de la sonde sans accroître sa longueur (Afonina *et al.*, 1997 ; Kutuyavin *et al.*, 1997), ce qui permet de créer des sondes plus courtes. Par conséquent, les sondes TaqMan MGB présentent de plus grandes différences de valeurs de  $T_m$  entre les sondes spécifiques et non spécifiques, ce qui permet d'obtenir un génotypage précis.

Applied Biosystems propose les sondes TaqMan MGB prédessinées suivantes, compatibles avec le système StepOne™ :

		Fluorophore 5'	Fluorophore 3'	Autres caractéristiques
Essais TaqMan® (sonde TaqMan® MGB)	Expression génétique	Fluorophore FAM™	NFQ	MGB
	Génotypage des SNP	Fluorophores FAM™ et VIC®	NFQ	MGB
Essais TaqMan® personnalisés (sonde TaqMan® MGB)	Expression génétique	Fluorophore FAM™	NFQ	MGB
	Génotypage des SNP	Fluorophores FAM™ et VIC®	NFQ	MGB
Sondes personnalisées	Sonde TaqMan® MGB personnalisée	Fluorophore FAM™, TET™, NED™ ou VIC®	NFQ	MGB

**IMPORTANT !** Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA™ comme reporter ou quencher avec le système StepOne.

## Réactifs SYBR® Green

**Applications** Les réactifs SYBR® Green incluent des amorces et des master mix contenant le fluorophore SYBR® Green. Les réactifs SYBR Green sont compatibles avec les expériences de quantification de type :

- Quantification absolue par les courbes standard
- Quantification relative par les courbes standard
- Comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ )

**Remarque :** Il n'est pas possible d'effectuer la PCR multiplex avec les réactifs SYBR Green. Pour plus d'informations, voir « Sélection de la PCR simplex ou multiplex » à la page 3-10.

**Développement des réactifs SYBR Green** Les petites molécules qui se lient à l'ADN double brin se classent en deux catégories : celles qui s'intercalent dans l'ADN et celles qui se lient au petit sillon de l'ADN. Higuchi (Higuchi *et al.*, 1992) utilisait le bromure d'éthidium comme intercalant pour détecter les produits de PCR en temps réel. Hoechst 33258 est un exemple de fluorophore ligand du petit sillon dont la fluorescence augmente lorsqu'il est lié à l'ADN double brin (Higuchi *et al.*, 1993).

Quelle que soit la méthode de liaison, au moins deux conditions sont requises pour qu'un fluorophore ligand d'ADN mette en évidence les produits de PCR en temps réel :

- Augmentation de la fluorescence lors de la liaison à l'ADN double brin
- Aucune inhibition de la PCR

Applied Biosystems a développé des conditions qui permettent d'utiliser le fluorophore SYBR® Green I dans la PCR sans l'inhiber et pour lesquelles la détection est plus sensible qu'avec le bromure d'éthidium.

## Fonctionnement des réactifs SYBR Green

Les réactifs SYBR Green utilisent le fluorophore SYBR Green I pour détecter les produits de PCR en créant une liaison avec l'ADN double brin formé pendant la PCR. Ils fonctionnent d'après le principe suivant :

1. Lorsque le master mix SYBR<sup>®</sup> Green PCR est ajouté à un échantillon, le fluorophore SYBR Green I est immédiatement lié à tous les ADN double brin.
2. Pendant la PCR, la polymérase AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA Polymerase amplifie la cible, ce qui crée le produit de PCR appelé « amplicon ».
3. Le fluorophore SYBR Green I se lie alors à chaque nouvelle copie d'ADN double brin.
4. À mesure que la PCR progresse, le nombre d'amplicons créé augmente. Puisque le fluorophore SYBR Green I se lie à tous les ADN double brin, l'intensité de la fluorescence s'accroît proportionnellement à la quantité de produit de PCR double brin obtenue.

La Figures 2-2 ci-dessous illustre ce processus.

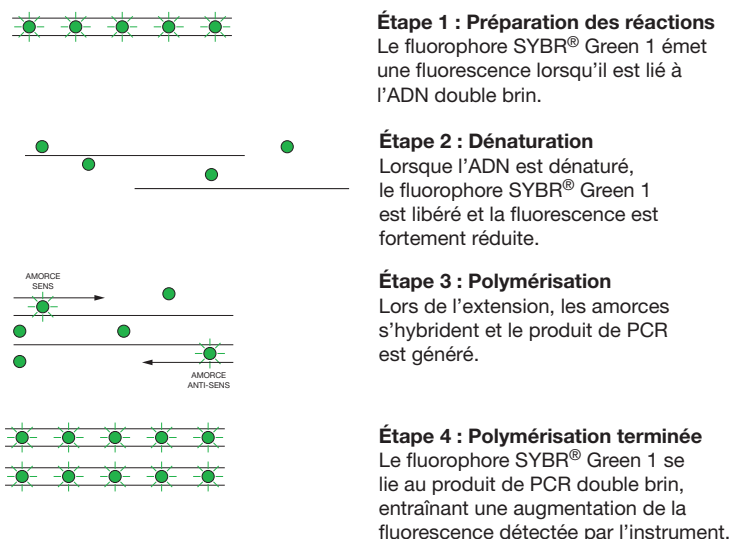


Figure 2-2 Fonctionnement des réactifs SYBR Green

## Sélection du type de réactif

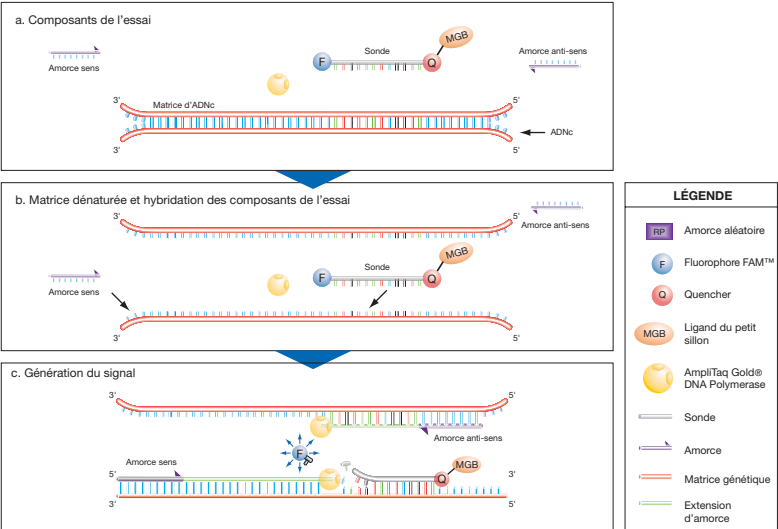
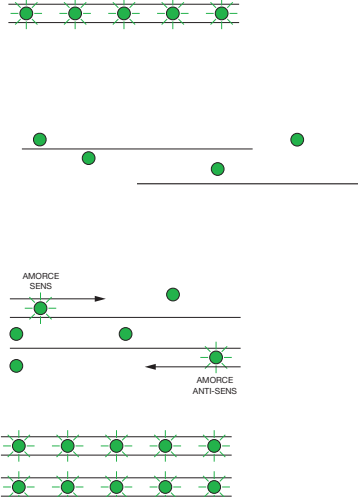
Les réactifs TaqMan et SYBR Green sont compatibles avec les applications indiquées ci-dessous.

Type de réactif	Application		
	Quantification <sup>‡</sup> (chapitre 3)	Génotypage (chapitre 4)	Présence/absence (chapitre 5)
Réactifs SYBR <sup>®</sup> Green	Oui	Déconseillé	Déconseillé
Réactifs TaqMan <sup>®</sup>	Oui	Oui	Oui

<sup>‡</sup> Inclut les expériences de quantification absolue par les courbes standard, de quantification relative par les courbes standard et par la comparaison des valeurs de C<sub>T</sub>.

**Éléments à prendre en compte pour les expériences de quantification**

Les expériences de quantification peuvent être effectuées avec les réactifs TaqMan ou SYBR Green. Prendre en compte les éléments suivants lors de la sélection du type de réactif :

Type de réactif	Processus
<p><b>Réactifs ou kits TaqMan®</b></p> <p><b>Description</b></p> <p>Les réactifs TaqMan utilisent une sonde marquée par un fluorophore pour faciliter la détection d'un produit de PCR spécifique accumulé pendant les cycles de PCR.</p> <p><b>Avantages</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentent la spécificité avec une sonde. L'hybridation spécifique entre la sonde et la cible génère le signal de fluorescence.</li> <li>• Permettent l'utilisation de la PCR multiplex.</li> <li>• Des essais préformulés et optimisés pour des conditions de thermocyclage universelles sont disponibles.</li> <li>• Compatibles avec la RT-PCR 1 ou 2 étapes.</li> </ul> <p><b>Inconvénients</b></p> <p>Nécessitent la synthèse d'une sonde unique</p>	<p><b>PCR et détection de l'ADNc</b></p> 
<p><b>Réactifs SYBR® Green</b></p> <p><b>Description</b></p> <p>Les réactifs SYBR Green utilisent le fluorophore SYBR® Green I, un fluorophore de liaison à l'ADN double brin, pour détecter les produits de PCR accumulés pendant les cycles de PCR.</p> <p><b>Avantages</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Économiques (aucune sonde requise).</li> <li>• Permettent, grâce à l'analyse de la courbe de fusion, de mesurer le Tm de tous les produits de PCR.</li> <li>• Compatibles avec la RT-PCR 1 ou 2 étapes.</li> </ul> <p><b>Inconvénients</b></p> <p>Se lie de manière non spécifique à toutes les séquences d'ADN double brin. Pour éviter les signaux faux positifs, vérifier qu'aucun produit non spécifique ne se forme en analysant la courbe de fusion ou le dépôt sur le gel.</p>	 <p><b>Étape 1 : Préparation des réactions</b> Le fluorophore SYBR® Green 1 émet une fluorescence lorsqu'il est lié à l'ADN double brin.</p> <p><b>Étape 2 : Dénaturation</b> Lorsque l'ADN est dénaturé, le fluorophore SYBR® Green 1 est libéré et la fluorescence est fortement réduite.</p> <p><b>Étape 3 : Polymérisation</b> Lors de l'extension, les amorces s'hybrident et le produit de PCR est généré.</p> <p><b>Étape 4 : Polymérisation terminée</b> Le fluorophore SYBR® Green 1 se lie au produit de PCR double brin, entraînant une augmentation de la fluorescence détectée par l'instrument.</p>

**IMPORTANT !** Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA™ comme reporter ou quencher avec le système StepOne.

## Limitation des contaminations d'ADN

Le processus d'amplification d'ADN par PCR impose des pratiques de laboratoires précises lors de la préparation d'une expérience avec les réactifs TaqMan ou SYBR Green. Les contaminations peuvent provenir d'échantillons aux concentrations d'ADN élevées, tels que les échantillons d'ADN contrôle ou les produits de PCR.

En outre, en raison de la nature non spécifique du fluorophore SYBR Green I, tout ADN double brin sera détecté. Lorsque les réactifs SYBR Green sont utilisés, vérifier qu'aucun produit non spécifique ne se forme en analysant la courbe de fusion ou le dépôt sur le gel. Éviter toute contamination par l'ADN cible. Les essais d'expression génétique ciblant les jonctions exon-exon limitent les effets dus à l'ADNg (ADN génomique) contaminant.

### Utilisation de l'UNG pour limiter la réamplification des produits de PCR contaminants

L'AmpErase<sup>®</sup> uracil-N-glycosylase (UNG) est une enzyme recombinante de 26-kDa codée par le gène *Escherichia coli* uracil-N-glycosylase. Ce gène a été inséré dans un hôte *E. coli* pour induire l'expression de la forme native de l'enzyme (Kwok and Higuchi, 1989).

L'UNG agit sur l'ADN simple et double brin qui contient des dUTP. Il hydrolyse les liaisons uracil-glycosidiques sur les sites d'ADN contenant des dUTP. L'enzyme libère l'uracile, ce qui crée un site apyrimidique sensible aux alcalins dans l'ADN. L'enzyme n'a pas d'activité sur l'ARN ou l'ADN contenant des dTTP (Longo *et al.*, 1990).

#### Essais TaqMan

Avec les essais TaqMan<sup>®</sup>, le traitement par l'AmpErase<sup>®</sup> UNG peut empêcher la réamplification des produits de PCR contaminants provenant des réactions de PCR précédentes. Lorsque le dUTP remplace le dTTP durant l'amplification par PCR, l'AmpErase UNG peut supprimer jusqu'à 200 000 copies d'amplicon par 50- $\mu$ L de réaction.

**Remarque :** Le master mix TaqMan<sup>®</sup> 2X Universal PCR est disponible avec ou sans l'enzyme AmpErase UNG. Si l'expérience est réalisée avec le master mix TaqMan<sup>®</sup> Fast Universal PCR (2X), No AmpErase<sup>®</sup> UNG, l'AmpErase UNG doit être achetée séparément.

#### Essais SYBR Green I

Avec les essais SYBR Green I, le traitement par l'AmpErase UNG peut empêcher la réamplification des produits de PCR contaminants provenant des réactions de PCR précédentes. Bien que les master mix Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR et SYBR<sup>®</sup> Green PCR ne contiennent pas l'enzyme AmpErase UNG, ils contiennent du dUTP et sont donc compatibles avec l'AmpErase UNG. En cas de suspicion de contamination par transfert de produits de PCR, utiliser l'AmpErase UNG pour remédier au problème.

**Remarque :** L'AmpErase UNG peut être achetée séparément ou avec le kit SYBR<sup>®</sup> Green PCR Core Reagents Kit.

**Pratiques  
générales de la  
PCR**

Respecter les précautions suivantes pour limiter la contamination des échantillons et le transfert de produits de PCR :

- Porter une blouse de laboratoire propre (non utilisée précédemment pendant la manipulation de produits de PCR amplifiés ou la préparation des échantillons) et des gants propres lors de la préparation des échantillons pour l'amplification par PCR. Changer de gants chaque fois qu'il existe une suspicion de contamination.
- Utiliser des zones séparées, du matériel dédié et des accessoires distincts pour :
  - La préparation des échantillons.
  - La préparation de la réaction de PCR. Ne jamais introduire de produit de PCR dans la zone de préparation de la réaction de PCR.
  - L'amplification par PCR.
  - L'analyse des produits de PCR.
- Ouvrir et fermer soigneusement tous les tubes d'échantillons. Éviter toute projection ou émanation des produits de PCR.
- Utiliser des multipipettes à piston ou à air comprimé avec des cônes filtrés. Changer les cônes après chaque utilisation.
- Maintenir autant que possible les réactions et les composants fermés.
- Nettoyer régulièrement les paillasses et équipements de laboratoire avec une solution à 10 % d'eau de javel ou à 70 % d'éthanol.



# Expériences de quantification

---

# 3

Sommaire du chapitre :

Section 3.1 À propos des expériences de quantification . . . . . 3-3

Section 3.2 Instructions de préparation . . . . . 3-15



## Section 3.1 À propos des expériences de quantification

---

Sommaire de la section :

Présentation .....	3-4
Sélection de la méthode de quantification .....	3-5
Sélection de la RT-PCR 1 ou 2 étapes .....	3-8
Sélection de la PCR simplex ou multiplex .....	3-10
Sélection du type de réactif .....	3-12
Sélection du type d'essai .....	3-12

## Présentation

### Qu'est-ce qu'une expérience de quantification ?

Une expérience de quantification est une expérience en temps réel qui mesure la quantité d'une séquence d'acide nucléique cible (cible) à chaque cycle d'amplification de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). La cible peut être l'ADN, l'ADNc ou l'ARN.

Trois applications de quantification sont traitées dans ce guide :

- Quantification absolue par les courbes standard (page 3-5)
- Quantification relative par les courbes standard (page 3-5)
- Comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) (page 3-6)

### Fonctionnement d'une expérience de quantification

Dans les expériences de quantification en temps réel, les réactions sont caractérisées par le moment du thermocyclage où l'amplification d'un produit de PCR atteint un niveau de fluorescence défini, plutôt que par la quantité finale de produit de PCR accumulée après un nombre de cycles défini. Une courbe d'amplification affiche sous forme graphique la fluorescence détectée en fonction du nombre de cycles effectués.

Les premiers cycles de PCR ne comportent aucune modification significative du signal de fluorescence. Cet intervalle de cycles de PCR prédéfini est appelé *ligne de base*. Le logiciel commence par générer une courbe d'amplification soustraite de la ligne de base en calculant la tendance mathématique du signal du reporter fluorescent normalisé (valeurs  $R_n$  pour les cycles définissant la ligne de base). Un algorithme recherche ensuite le point d'intersection entre la courbe d'amplification représentant le signal du reporter fluorescent normalisé, corrigé d'après la ligne de base (valeur delta  $R_n$  [ $\Delta R_n$ ]), et le seuil. Le nombre de cycles pour lequel la valeur  $\Delta R_n$  croise le seuil est défini comme valeur  $C_T$ .

### Workflow

Avant d'effectuer une expérience de quantification sur le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™, elle doit être préparée comme suit :

1. Sélectionner une méthode de quantification (page 3-5).
2. Sélectionner la RT-PCR 1 ou 2 étapes (page 3-8).
3. Sélectionner des réactions de PCR simplex ou multiplex (page 3-10).
4. Sélectionner le type de réactif (page 3-12).
5. Sélectionner le type d'essai (page 3-12).
6. Consulter les instructions de préparation selon le type d'essai sélectionné (Section 3.2 à la page 3-15).

## Sélection de la méthode de quantification

### À propos des expériences de quantification absolue par les courbes standard

Les expériences de quantification absolue par les courbes standard déterminent la quantité absolue d'une cible dans un échantillon. Une courbe standard créée à partir d'une gamme de dilutions de quantité connue est utilisée pour obtenir les résultats.

#### Composants

Les réactions de PCR pour les expériences de quantification absolue par les courbes standard incluent les composants suivants :

- **Échantillon** – Échantillon dans lequel la quantité de cible est inconnue.
- **Standard** – Échantillon de quantité connue.
- **Gamme de dilutions standard** – Gamme de dilutions du standard (par exemple 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) utilisé pour établir une courbe standard.
- **Réplicats** – Réactions identiques contenant des composants et des volumes identiques.
- **Contrôles négatifs** – Échantillons qui contiennent de l'eau ou du tampon à la place de l'échantillon, également appelés contrôles sans échantillon (NTC – No Template Control). Les contrôles négatifs ne doivent pas être amplifiés.

### À propos des expériences de quantification relative par les courbes standard

Les expériences de quantification relative par les courbes standard déterminent les variations d'expression d'une cible dans un échantillon comparé à un échantillon de référence. Une courbe standard créée à partir d'une gamme de dilutions de quantité connue est utilisée pour obtenir les résultats.

Les expériences de quantification relative par les courbes standard sont couramment utilisées pour :

- Comparer les niveaux d'expression d'un gène dans différents tissus.
- Comparer les niveaux d'expression d'un gène entre un échantillon traité et un échantillon non traité.
- Comparer les niveaux d'expression entre des allèles sauvages et des allèles mutés.

#### Composants

Les réactions de PCR pour les expériences de quantification relative par les courbes standard incluent les composants suivants :

- **Échantillon** – Échantillon dans lequel la quantité de cible est inconnue.
- **Échantillon de référence** – Échantillon utilisé comme base de comparaison des résultats. Par exemple, dans une étude relative aux effets des médicaments sur l'expression génétique, un contrôle non traité peut constituer un bon échantillon de référence.
- **Standard** – Échantillon de quantité connue.
- **Gamme de dilutions standard** – Gamme de dilutions du standard (par exemple 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) utilisé pour établir une courbe standard. Pour tous les échantillons, la quantité de cible est déterminée en interpolant la courbe standard, puis en divisant par la quantité de cible de l'échantillon de référence.

L'échantillon de référence étant l'échantillon 1X, toutes les autres quantités sont exprimées sous la forme d'une variation d'expression d'un facteur  $n$  comparé à celui-ci. En outre, l'unité de la courbe standard n'est pas prise en compte car la quantité de l'échantillon est divisée par la quantité de l'échantillon de référence. Par conséquent, il suffit juste de connaître la dilution relative des standards. Tout ADNc, ARN ou ADN contenant la cible appropriée peut être utilisé comme standard.

- **Contrôle endogène** – Gène présent à un niveau d'expression similaire dans tous les échantillons. Le contrôle endogène est utilisé pour normaliser les éventuelles variations, liées à une imprécision de pipetage, de la quantité d'ADNc ajoutée à chaque réaction.
- **Réplicats** – Réactions identiques contenant des composants et des volumes identiques.
- **Contrôles négatifs** – Échantillons qui contiennent de l'eau ou du tampon à la place de l'échantillon, également appelés contrôles sans échantillon (NTC – No Template Control). Les contrôles négatifs ne doivent pas être amplifiés.

### À propos des expériences de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de $C_T$

Les expériences de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) déterminent les variations d'expression d'une cible dans un échantillon comparé à un échantillon de référence. Une formule arithmétique est utilisée pour obtenir les résultats (voir « Formule pour les expériences de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) » à la page A-1).

Les expériences de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  sont couramment utilisées pour :

- Comparer les niveaux d'expression d'un gène dans différents tissus.
- Comparer les niveaux d'expression d'un gène entre un échantillon traité et un échantillon non traité.
- Comparer les niveaux d'expression entre des allèles sauvages et des allèles mutés.

### Composants

Les réactions de PCR pour les expériences de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  incluent les composants suivants :

- **Échantillon** – Échantillon dans lequel la quantité de cible est inconnue.
- **Échantillon de référence** – Échantillon utilisé comme base de comparaison des résultats. Par exemple, dans une étude relative aux effets des médicaments sur l'expression génétique, un contrôle non traité peut constituer un bon échantillon de référence.
- **Contrôle endogène** – Gène présent à un niveau d'expression similaire dans tous les échantillons. Le contrôle endogène est utilisé pour normaliser les éventuelles variations, liées à une imprécision de pipetage, de la quantité d'ADNc ajoutée à chaque réaction.
- **Réplicats** – Réactions identiques contenant des composants et des volumes identiques.

- **Contrôles négatifs** – Échantillons qui contiennent de l'eau ou du tampon à la place de l'échantillon, également appelés contrôles sans échantillon (NTC – No Template Control). Les contrôles négatifs ne doivent pas être amplifiés.

**Comparaison des méthodes de quantification** Prendre en compte les éléments suivants lors du choix entre expérience de quantification absolue par les courbes standard, de quantification relative par les courbes standard et par la comparaison des valeurs de  $C_T$  :

Application	Description	Avantages	Inconvénients
Quantification absolue par les courbes standard	Utilise une courbe standard pour déterminer la quantité absolue d'une cible dans un échantillon. Généralement utilisée pour quantifier la charge virale.	Permet de comparer avec des quantités de standard connues.	Une courbe standard doit être créée pour chaque cible, ce qui nécessite davantage de réactifs et d'espace dans la plaque de réactions.
Quantification relative par les courbes standard	Utilise une courbe standard pour déterminer les variations d'expression d'une cible dans un échantillon comparé à un échantillon de référence. Recommandée pour les essais dont l'efficacité PCR n'est pas optimale.	Nécessite le moins d'efforts de validation car l'efficacité PCR ne doit pas nécessairement être équivalente pour la cible et le contrôle endogène.	Une courbe standard doit être créée pour chaque cible, ce qui nécessite davantage de réactifs et d'espace dans la plaque de réactions.
Comparaison des valeurs de $C_T$ ( $\Delta\Delta C_T$ )	Utilise des formules arithmétiques pour déterminer les variations d'expression d'une cible dans un échantillon comparé à un échantillon de référence. Recommandée pour la quantification relative de l'expression génétique de plusieurs gènes dans de nombreux échantillons.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les niveaux relatifs de cible des échantillons peuvent être déterminés sans utiliser de courbe standard, sous réserve que l'efficacité PCR soit à peu près équivalente pour la cible et le contrôle endogène.</li> <li>• Quantité limitée de réactifs utilisés.</li> <li>• Plus d'espace disponible dans la plaque de réactions.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Des essais suboptimaux (efficacité PCR faible) peuvent donner des résultats imprécis.</li> <li>• Avant d'utiliser la méthode de comparaison des valeurs de <math>C_T</math>, Applied Biosystems recommande de déterminer si l'efficacité de la PCR est à peu près équivalente pour le gène cible et le gène de référence endogène.</li> </ul>

**Pour plus d'informations** Pour plus d'informations sur les méthodes de quantification, voir le document *User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression*.

## Sélection de la RT-PCR 1 ou 2 étapes

La RT-PCR (rétro-transcription-réaction de polymérisation en chaîne) est utilisée pour quantifier l'ARN. La RT-PCR peut être effectuée en 1 ou 2 étapes.

### À propos de la RT-PCR 1 étape

Dans la RT-PCR 1 étape, effectuer la rétro-transcription et la PCR dans un système à tampon unique (Figure 3-1). La réaction se produit sans ajout de réactifs entre les étapes RT et PCR. La RT-PCR 1 étape permet de ne préparer qu'un seul tube pour la RT et l'amplification par PCR. Toutefois, il n'est pas possible d'utiliser l'enzyme de prévention des contaminations par transfert, l'AmpErase® uracil-N-glycosylase (UNG), avec la RT-PCR 1 étape. En effet, la présence de l'UNG détruirait l'ADNc à mesure de sa formation. Pour plus d'informations sur l'UNG, voir « Utilisation de l'UNG pour limiter la réamplification des produits de PCR contaminants » à la page 2-7.

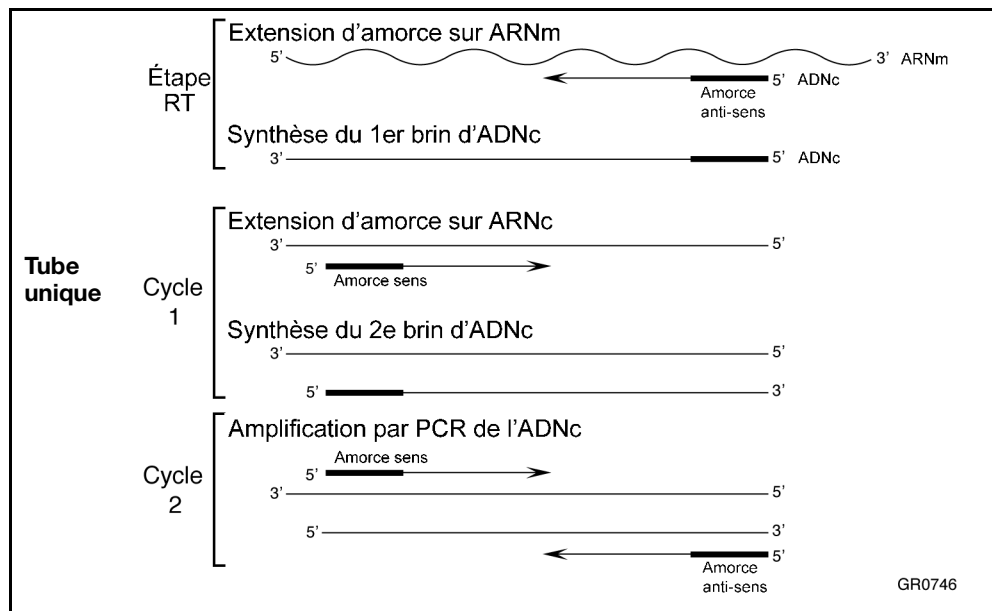


Figure 3-1 Représentation schématique de la RT-PCR 1 étape

### À propos de la RT-PCR 2 étapes

La RT-PCR 2 étapes est effectuée dans deux réactions distinctes : une pour la RT et une pour la PCR (Figure 3-2). La RT-PCR 2 étapes permet de détecter plusieurs transcrits d'une même réaction d'ADNc ou de stocker une partie de l'ADNc pour une utilisation ultérieure. Lors de la réalisation de la PCR en présence de dUTP, il est possible d'utiliser l'enzyme AmpErase® UNG pour empêcher la contamination par transfert. Pour plus d'informations sur l'UNG, voir « Utilisation de l'UNG pour limiter la réamplification des produits de PCR contaminants » à la page 2-7.



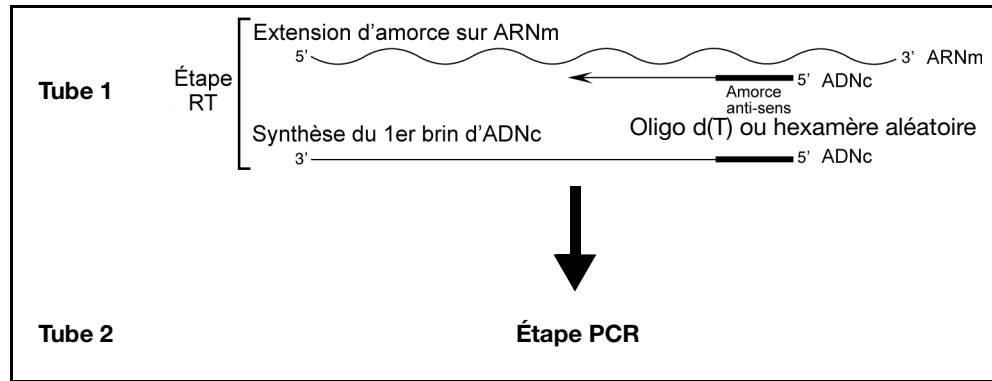


Figure 3-2 Représentation schématique de la RT-PCR 2 étapes

### Amorces utilisées pour la synthèse de l'ADNc

Dans la RT-PCR 1 étape, les amorces anti-sens spécifiques de la séquence peuvent être utilisées pour la synthèse de l'ADNc.

Dans la RT-PCR 2 étapes, les amorces suivantes peuvent être utilisées pour la synthèse de l'ADNc :

- Oligo d(T)<sub>16</sub>
- Amorces aléatoires
- Amorces anti-sens spécifiques de la séquence

Le choix des amorces pour la rétro-transcription est facilité par l'évaluation expérimentale des trois systèmes d'amorçage. Pour les séquences ARN courtes sans structure secondaire, les trois systèmes d'amorçage produisent des résultats équivalents. Pour les transcrits ARN plus longs ou les séquences présentant des structures secondaires, voir les instructions suivantes :

Amorces	Instructions de sélection
Oligo d(T) <sub>16</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• S'utilise pour effectuer une transcriptase inverse des ARNm eucaryotes et des rétrovirus avec queue poly-A uniquement</li> <li>• Évite les transcrits ARNm longs ou les amplicons supérieurs à 2 kilobases en amont du site poly-A</li> </ul>
Amorces aléatoires	<ul style="list-style-type: none"> <li>• S'utilisent d'abord avec les transcrits inverses longs ou ceux qui contiennent des structures secondaires</li> <li>• S'utilisent pour transcrire tous les ARN (ARNr, ARNm et ARNt)</li> </ul>
Amorces anti-sens spécifiques de la séquence	<ul style="list-style-type: none"> <li>• S'utilisent pour effectuer la transcriptase inverse des ARN contenant les séquences complémentaires uniquement</li> <li>• S'utilisent dans la RT-PCR 1 étape</li> </ul>

**Comparaison des méthodes de RT-PCR**

Méthode	Amorce utilisée pour la synthèse de l'ADNc	Commentaires
RT-PCR 1 étape	Amorce anti-sens spécifique de la séquence	Nécessite un seul mélange réactionnel L'enzyme AmpErase® UNG ne peut pas être utilisée
RT-PCR 2 étapes	Hexamères aléatoires	L'ADNc peut être conservé pour une utilisation ultérieure
	Oligo d(T) <sub>16</sub>	L'enzyme AmpErase® UNG peut être utilisée
	Amorces anti-sens spécifiques de la séquence	Nécessite deux mélanges réactionnels

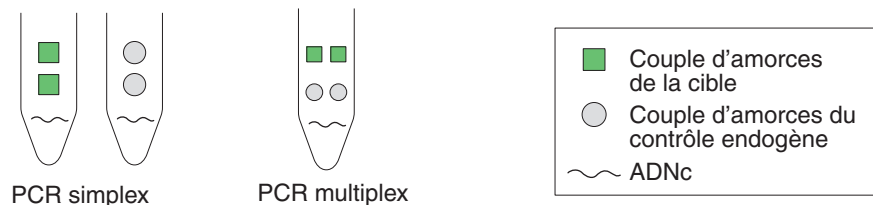
## Sélection de la PCR simplex ou multiplex

Il est possible d'effectuer une réaction de PCR sous la forme d'une réaction :

- **PCR simplex** – Pour les expériences de quantification absolue par les courbes standard, de quantification relative par les courbes standard et par la comparaison des valeurs de C<sub>T</sub>. Dans la PCR simplex, un ensemble d'amorces unique est présent dans le tube de réaction ou le puits. Une seule cible ou un seul contrôle endogène peut être amplifié par réaction.

ou

- **PCR multiplex** – Pour les expériences de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de C<sub>T</sub>. Dans la PCR multiplex, au moins deux ensembles d'amorces sont présents dans le puits ou le tube de réaction. Chaque ensemble amplifie spécifiquement une cible ou un contrôle endogène. Généralement, une sonde marquée par un fluorophore FAM™ détecte la cible et une sonde marquée par un fluorophore VIC® détecte le contrôle endogène. **IMPORTANT !** Les réactifs SYBR® Green ne sont pas validés pour la PCR multiplex. **IMPORTANT !** Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA™ comme reporter ou quencher avec le système StepOne™.



**PCR multiplex pour les expériences de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$**

Pour effectuer la PCR multiplex dans les expériences de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  :

- Vérifier que le contrôle endogène sélectionné est plus abondant (valeur  $C_T$  inférieure) que toutes les cibles à quantifier, quelles que soient les conditions.
- Quantifier le contrôle endogène avec un essai limité en amorces. L'essai du contrôle endogène (pour le modèle le plus abondant) de chaque réaction doit contenir une quantité d'amorces limitée pour éviter la PCR compétitive qui peut altérer la valeur  $C_T$  du gène le moins abondant.

**Limitation de l'amorce dans la PCR multiplex**

Pour générer une quantification en multiplex précise, il est important que l'amplification d'une espèce ne domine pas l'autre. Sinon, l'amplification d'une espèce très abondante peut empêcher celle de l'espèce moins abondante.

Si l'espèce la moins abondante n'est pas amplifiée efficacement, l'expérience peut produire des résultats imprécis ou, dans les cas extrêmes, la détection de l'espèce la moins abondante peut être totalement inhibée. Cette situation peut être évitée en limitant la concentration des amorces utilisées pour amplifier l'espèce la plus abondante, ce qui « désamorce » l'amplification aussitôt après la détermination de la valeur  $C_T$ . Toutefois, un essai limité en amorces peut être plus sensible aux fluctuations selon les conditions de réaction que l'essai cible non limité en amorces qu'il normalise. Pour plus d'informations, voir Annexe B, « Limitation des amorces dans la PCR multiplex. ».

**PCR simplex vs PCR multiplex**

La limitation des amorces dans la PCR multiplex devient de plus en plus complexe à mesure que le nombre de cibles à quantifier augmente. Lors de l'analyse de plusieurs cibles, il est parfois plus simple d'utiliser la PCR simplex pour les raisons suivantes :

- Dans la PCR multiplex, il peut être difficile de trouver un contrôle endogène adéquat :
  - plus abondant que toutes les cibles à quantifier ;
  - qui ne modifie pas les niveaux d'expression selon les conditions d'expérience ou avec différents échantillons.

Il convient d'effectuer d'abord toutes les quantifications de la cible et du contrôle endogène dans les PCR multiplex et simplex, puis de comparer les valeurs  $C_T$  des deux méthodes afin de déterminer les conséquences du multiplexage sur les valeurs  $C_T$ .

- Dans la PCR simplex, les cibles qui ne modifient pas les niveaux d'expression selon les conditions d'expérience ou sur plusieurs échantillons peuvent servir de contrôle endogène. Par conséquent, plus le nombre de cibles étudiées en simplex est important, plus la probabilité est élevée d'avoir au moins un contrôle endogène adéquat pour normaliser les cibles restantes.

Prendre en compte les éléments suivants au moment de choisir entre PCR multiplex et PCR simplex pour les expériences de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  :

PCR	Description	Avantages	Inconvénients
Simplex	Réaction dans laquelle une cible ou un contrôle endogène unique est amplifié dans le puits ou le tube de réaction.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ne requiert pas d'optimisation pour les essais TaqMan®.</li> <li>• Les cibles qui ne modifient pas les niveaux d'expression selon les conditions d'expérience ou sur plusieurs échantillons peuvent servir de contrôle endogène.</li> <li>• Possibilité d'utiliser des réactifs TaqMan® ou SYBR® Green.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requier un échantillon pour la cible et un pour le contrôle endogène.</li> </ul>
Multiplex	Réaction dans laquelle plusieurs cibles ou contrôles endogènes sont amplifiés dans le puits ou le tube de réaction.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Réduit les coûts et la nécessité d'un pipetage précis lors de la séparation d'un échantillon dans deux tubes distincts.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La quantification du contrôle endogène doit être exécutée sous la forme d'un essai limité en quantité d'amorces.</li> <li>• Requier une validation et une optimisation.</li> <li>• Peut s'avérer moins simple que la PCR simplex lors de l'analyse de plusieurs cibles.</li> <li>• Les réactifs SYBR® Green ne sont pas compatibles.</li> </ul>

## Sélection du type de réactif

### Réactifs TaqMan vs réactifs SYBR Green

Les expériences de quantification sont possibles sur le système StepOne avec :

- Les réactifs TaqMan®
- Les réactifs SYBR® Green

Pour plus d'informations sur le choix entre réactif TaqMan ou SYBR Green, voir « Éléments à prendre en compte pour les expériences de quantification » à la page 2-6.

## Sélection du type d'essai

Lors de la création d'une expérience avec le logiciel StepOne, il est possible de sélectionner les types d'essais suivants pour les expériences de quantification :

- En stock/fabriqués sur commande (page 3-13)
- Personnalisés (page 3-14)

Cette section répertorie les produits disponibles pour chaque type d'essai.

**Remarque :** Les essais sont spécifiques de la cible étudiée. Les master mix contiennent les autres composants nécessaires à la réaction de PCR.

### Essais en stock/fabriqués sur commande

Produit	Attributs
Essais TaqMan® Gene Expression Assays	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ensembles préconçus d'amorces et de sondes spécifiques pour les gènes de l'homme, de la souris, du rat, de <i>Arabidopsis</i>, <i>Drosophila</i>, <i>C. elegans</i>, <i>C. familiares</i> (chien) et Rhésus.</li> <li>Format prêt à l'emploi en un seul tube, disponible sous la forme d'essais en stock ou fabriqués sur commande.</li> </ul>
Essais TaqMan® Endogenous Control Assays <b>Remarque :</b> Les essais TaqMan Endogenous Control Assays existent sous la forme d'essais TaqMan Gene Expression en stock.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Essais de contrôle endogène optimisés, préformulés et prêts à l'emploi.</li> <li>Quantification économique de l'expression génétique pour l'homme, la souris, le rat, les espèces <i>Arabidopsis</i>, <i>Drosophila</i> et toutes les espèces eucaryotes.</li> <li>Choix entre les fluorophores FAM™ et VIC® (limité en amorces).</li> </ul>
Essais Custom TaqMan® Gene Expression Assays	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tous les organismes ou espèces.</li> <li>Choix de la cible.</li> <li>Format prêt à l'emploi en un seul tube.</li> </ul>
Master mix TaqMan® 2X Universal PCR (avec ou sans AmpErase® UNG)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Performances optimales pour les quantifications en TaqMan® à partir d'échantillons d'ADNc ou d'ADN.</li> <li>Contient des composants qui assurent d'excellentes performances aux essais.</li> <li>L'utilisation d'un seul réactif pour tous les essais simplifie le processus expérimental.</li> </ul>
Master mix TaqMan® Fast Universal PCR (2X), No AmpErase® UNG	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mêmes attributs que le master mix TaqMan® 2X Universal PCR (voir ci-dessus).</li> <li>Permet d'effectuer une expérience de quantification sur le système StepOne™ en 35 min environ.</li> </ul>

**IMPORTANT !** Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA™ comme reporter ou quencher avec le système StepOne.

Pour obtenir des instructions de préparation des expériences avec des essais en stock/fabriqués sur commande, voir page 3-16.

**Essais personnalisés**

Produit	Attributs
Sondes et amorces TaqMan® personnalisées	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tous les organismes ou espèces.</li> <li>• Choix des fluorophores, quencher et échelles de synthèse.</li> <li>• Compatibles avec le logiciel Primer Express® et les instructions de préparation des essais d'Applied Biosystems.</li> </ul>
Logiciel Primer Express®	Logiciel de dessin d'amorces et de sondes pour la PCR en temps réel.
Master mix TaqMan® 2X Universal PCR (avec ou sans AmpErase® UNG)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Performances optimales pour les quantifications en TaqMan® à partir d'échantillons d'ADNc ou d'ADN.</li> <li>• Contient des composants qui assurent d'excellentes performances aux essais.</li> <li>• L'utilisation d'un seul réactif pour tous les essais simplifie le processus expérimental.</li> </ul>
Master mix TaqMan® Fast Universal PCR (2X), No AmpErase® UNG	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mêmes attributs que le master mix TaqMan® 2X Universal PCR (voir ci-dessus).</li> <li>• Permet d'effectuer une expérience de quantification sur le système StepOne™ en 35 min environ.</li> </ul>
Power SYBR® Green PCR Master Mix	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quantification particulièrement sensible permettant la détection d'un faible nombre de copies (à partir de deux copies d'un gène cible).</li> <li>• Détecte l'ADN double brin, une sonde spécifique n'est donc pas requise.</li> <li>• Contient la polymérase AmpliTaq Gold® DNA Polymerase LD hautement purifiée pour limiter la formation de produit non spécifique (notamment les dimères d'amorces).</li> <li>• Compatible avec le logiciel Primer Express® et les instructions de préparation des essais d'Applied Biosystems.</li> </ul>
SYBR® Green PCR Master Mix	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Détecte l'ADN double brin, une sonde spécifique n'est donc pas requise.</li> <li>• Pour les applications standard qui ne requièrent pas de sensibilité élevée.</li> <li>• Contient la polymérase AmpliTaq Gold® DNA Polymerase pour limiter la formation de produit non spécifique (notamment les dimères d'amorces).</li> <li>• Compatible avec le logiciel Primer Express® et les instructions de préparation des essais d'Applied Biosystems.</li> </ul>

**IMPORTANT !** Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA™ comme reporter ou quencher avec le système StepOne.

Pour obtenir des instructions de préparation des expériences avec des essais personnalisés, voir page 3-20.

---

## Section 3.2 Instructions de préparation

---

Sommaire de la section :

Essais en stock/fabriqués sur commande .....	3-16
Essais TaqMan® Gene Expression Assays .....	3-16
Essais Custom TaqMan® Gene Expression Assays .....	3-18
Sélection du master mix .....	3-19
Conception de l'expérience .....	3-20
Essais personnalisés .....	3-20
Création d'amorces et de sondes à l'aide du logiciel Primer Express® .....	3-21
Sélection des réactifs .....	3-24
Utilisation des conditions de thermocyclage recommandées .....	3-26
Optimisation des concentrations d'amorces .....	3-29
Optimisation de la concentration de sonde .....	3-33
Pour plus d'informations .....	3-35

## Essais en stock/fabriqués sur commande

**Workflow** Si le type d'essai sélectionné dans le logiciel StepOne™ est Inventoried/Made to Order (En stock/Fabriqué sur commande), Applied Biosystems recommande de suivre le workflow ci-dessous :

1. Sélectionner l'essai :
  - Essais TaqMan® Gene Expression Assays (ci-dessous).
  - Essais Custom TaqMan® Gene Expression Assays (page 3-18).
2. Sélectionner le master mix (page 3-19).
3. Créer l'expérience à l'aide du logiciel StepOne (page 3-20).

## Essais TaqMan® Gene Expression Assays

**Description des produits** Les essais TaqMan® Gene Expression Assays comprennent une gamme complète d'ensembles d'amorces et de sondes en stock et fabriqués sur commande pour effectuer des expériences de quantification sur les gènes de l'homme, de la souris, du rat, de *Arabidopsis*, *Drosophila*, *C. elegans*, *C. familiares* (chien) et Rhésus.

Chaque essai est créé à l'aide d'un processus automatisé soumis à des contrôles qualité. Les essais en stock sont fabriqués et intégrés aux réserves. Les essais fabriqués sur commande sont préconçus et fabriqués lors de la commande.

**Propriétés des produits** Tous les essais TaqMan Gene Expression Assays :

- Nécessitent trois composants :
  - 1 à 100 ng d'échantillon d'ADNc (converti à partir d'ARN) par puits, avec la même quantité d'ADNc dans chaque puits de l'étude.
  - Mélange 20X Gene Expression Assay Mix (spécifique de chaque cible). Chaque mix primers-sonde contient deux amorces PCR non marquées et une sonde TaqMan® MGB (ligand du petit sillon) marquée par le fluorophore FAM™ dans un mix prêt à l'emploi à 20X. Les concentrations finales à 1X sont de 250 nM pour la sonde et de 900 nM pour chaque amorce.
  - Master mix TaqMan® Universal PCR (avec ou sans AmpErase® UNG) ou TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG.
- Sont conçus et optimisés pour fonctionner avec un master mix TaqMan®, dans des conditions de thermocyclage universelles.
- Requièrent une seule étape d'amplification par PCR et une lecture simultanée en temps réel pour obtenir des résultats.
- Si possible, amplifier l'ADNc cible sans amplifier l'ADN génomique (suffixe *m* dans l'ID de l'essai) en créant des sondes spécifiques des jonctions exon-exon.



**Essais disponibles**

Les essais TaqMan Gene Expression Assays sont disponibles pour les gènes de l'homme, de la souris, du rat, de *Arabidopsis*, *Drosophila*, *C. elegans*, *C. familiares* (chien) et Rhésus. Numéros de référence :

- Réf. 4331182 pour les essais en stock
- Réf. 4351372 pour les essais fabriqués sur commande

Le préfixe du nom de l'essai indique l'espèce pour laquelle il a été conçu : *Hs* pour *Homo sapiens* (homme), *Mm* pour *Mus musculus* (souris), *Rn* pour *Rattus norvegicus* (rat), *At* pour *Arabidopsis thaliana*, *Dm* pour *Drosophila melanogaster*, *Ce* pour *C. elegans*, *Cf* pour *C. familiares* (chien) et *Rh* pour Rhésus.

Le suffixe du nom de l'essai indique sa position, comme décrit dans le tableau ci-dessous.

Suffixe	Description
<i>_m</i>	La sonde de l'essai porte sur une jonction d'exons, l'essai ne détecte pas l'ADN génomique.
<i>_s</i>	Les amorces et les sondes de l'essai sont définies dans un exon unique, l'essai détecte l'ADN génomique.
<i>_g</i>	Il est possible que les amorces et les sondes de l'essai se situent dans un exon unique, l'essai peut détecter l'ADN génomique.
<i>_mH</i>	L'essai a été conçu pour un transcrit d'une famille de gènes présentant une homologie de séquence élevée. L'essai prévoit une différence de 10 C <sub>T</sub> à 15 C <sub>T</sub> entre le gène cible et le gène ayant l'homologie de séquence la plus proche. Par conséquent, l'essai détecte le transcrit cible avec une discrimination (sensibilité) 1 000 à 3 000 fois supérieure au transcrit homologue le plus proche s'ils présentent le même nombre de copies dans l'échantillon.
<i>_sH</i>	
<i>_gH</i>	
<i>_u</i>	L'amplicon de l'essai porte sur une jonction d'exons et la sonde se situe entièrement dans l'un des exons concernés.

**Essais TaqMan® Endogenous Control Assays**

Les essais TaqMan® Endogenous Control Assays existent sous la forme d'essais TaqMan Gene Expression Assays en stock (réf. 4331182). Les essais TaqMan Endogenous Control Assays sont :

- Disponibles sous la forme d'un essai TaqMan Gene Expression Assay avec une sonde TaqMan MGB marquée par le fluorophore FAM™ dans un tube unique, préformulé à 20X.
- Disponibles pour l'homme, la souris et le rat, avec des sondes TaqMan MGB marquées par le fluorophore VIC® ou FAM™. Les contrôles endogènes TaqMan marqués par le fluorophore VIC sont limités en amorces.

**IMPORTANT !** Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA™ comme reporter ou quencher avec le système StepOne.

### Pour plus d'informations

- Pour plus d'informations sur les derniers produits disponibles et sur leurs recommandations d'utilisation, consulter le site Internet d'Applied Biosystems : <http://www.appliedbiosystems.com/>
  - a. Sur la page d'accueil, sous TaqMan® Products (Produits TaqMan), sélectionner **TaqMan® Gene Expression Assays** (Essais TaqMan Gene Expression Assays).
  - b. Sur la page Gene Expression Assays & Arrays (Essais et puces Gene Expression Assays & Arrays), sélectionner **TaqMan® Gene Expression Assays** (Essais TaqMan Gene Expression Assays) sous Individual Assays (Essais individuels).
- Pour plus d'informations sur les essais Custom TaqMan Endogenous Control Assays, voir le document *Using TaqMan® Endogenous Control Assays to Select an Endogenous Control for Experimental Studies Application Note*.
- Pour plus d'informations sur la préparation des réactions de PCR en utilisant les essais TaqMan Gene Expression Assays, voir le document *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*.

## Essais Custom TaqMan® Gene Expression Assays

### Description des produits

Les essais Custom TaqMan® Gene Expression Assays sont des ensembles d'amorces et de sondes TaqMan conçus, synthétisés et formulés par le service Custom TaqMan® Genomic Assays d'après les informations de séquence transmises par l'utilisateur. Ils permettent d'effectuer des expériences de quantification sur tous les gènes ou variants d'épissage dans n'importe quel organisme.

Les essais utilisent des réactifs TaqMan pour amplifier et détecter la cible dans les échantillons d'ADNc. Tous les essais sont développés au moyen d'un logiciel de création exclusif.

### Propriétés des produits

Tous les essais Custom TaqMan Gene Expression Assays :

- Requièrent la création d'un fichier de soumission (à l'aide du logiciel gratuit File Builder) avec la séquence cible et l'envoi du fichier au service Custom TaqMan Genomic Assays.
- Nécessitent trois composants :
  - 1 à 100 ng d'échantillon d'ADNc (converti à partir d'ARN) par puits, avec la même quantité d'ADNc dans chaque puits de l'étude.
  - Mélange 20X ou 60X d'essai Gene Expression Assay (spécifique de chaque cible). Chaque essai contient deux amorces spécifiques de la cible et une sonde TaqMan MGB marquée par le fluorophore FAM™ dans un mis prêt à l'emploi à 20X ou à 60X. Les concentrations finales à 1X sont de 250 nM pour la sonde et de 900 nM pour chaque amorce.
  - Master mix TaqMan® Universal PCR (avec ou sans AmpErase® UNG) ou TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG.
- Sont conçus et optimisés pour fonctionner avec un master mix TaqMan, dans des conditions de thermocyclage universelles.
- Requièrent une seule étape d'amplification par PCR et une lecture simultanée en temps réel pour obtenir des résultats.

**Pour plus d'informations**

- Pour plus d'informations sur les derniers produits disponibles et sur leurs recommandations d'utilisation, consulter le site Internet d'Applied Biosystems : <http://www.appliedbiosystems.com/>
  - a. Sur la page d'accueil, sous TaqMan® Products (Produits TaqMan), sélectionner **TaqMan® Gene Expression Assays** (Essais TaqMan Gene Expression Assays).
  - b. Sur la page Gene Expression Assays & Arrays (Essais et puces Gene Expression Assays & Arrays), sélectionner **Custom TaqMan® Gene Expression Assays** (Essais Custom TaqMan Gene Expression Assays) sous Individual Assays (Essais individuels).
- Pour plus d'informations sur la commande d'essais Custom TaqMan Gene Expression Assays, voir le document *Custom TaqMan® Genomic Assays Protocol: Submission Guidelines*.
- Pour plus d'informations sur la préparation des réactions de PCR en utilisant les essais Custom TaqMan Gene Expression Assays, voir le document *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*.

**Sélection du master mix****Master mix disponibles**

Les essais en stock/fabriqués sur commande d'Applied Biosystems pour les expériences de quantification sont conçus pour fonctionner avec les master mix TaqMan® suivants :

Master mix	Référence
Master mix TaqMan® Fast Universal PCR (2X), No AmpErase® UNG, 250 réactions	4352042
Master mix TaqMan® 2X Universal PCR, 200 réactions	4304437
Master mix TaqMan® 2X Universal PCR, 2 000 réactions	4326708
Boîte de 10, master mix TaqMan® 2X Universal PCR	4305719
Master mix TaqMan® 2X Universal PCR, No AmpErase® UNG, 200 réactions	4324018
Master mix TaqMan® 2X Universal PCR, No AmpErase® UNG, 2 000 réactions	4326614
Boîte de 10, master mix TaqMan® 2X Universal PCR, No AmpErase® UNG	4324020

**Pour plus d'informations**

Pour plus d'informations sur l'utilisation des réactifs TaqMan, voir les documents :

- *TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X) Protocol*
- *TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol*

## Conception de l'expérience

### Utilisation du logiciel StepOne

Pour les essais en stock/fabriqués sur commande d'Applied Biosystems, utiliser le logiciel StepOne afin de créer l'expérience de quantification. Il calcule automatiquement les volumes pour les :

- Composants du mélange réactionnel
- Dilutions d'échantillons
- Gammes de dilutions standard (*expériences de quantification absolue et de quantification relative par les courbes standard uniquement*)

**Remarque :** Pour sélectionner le type d'essai (en stock/fabriqués sur commande) dans le logiciel StepOne, accéder à l'écran Reaction Setup (Préparation des réactions) dans le workflow de l'assistant de programmation Design Wizard ou Advanced Setup (Configuration avancée), puis sélectionner **Inventoried/Made to Order** (En stock/Fabriqués sur commande) dans le menu déroulant Assay Type (Type d'essai).

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur la création et la réalisation des expériences de quantification sur le système StepOne, voir les documents :

- *Guide de mise en route pour les expériences de quantification absolue par les courbes standard sur le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™*
- *Guide de mise en route pour les expériences de quantification relative par les courbes standard et par la comparaison des valeurs de  $C_T$  sur le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™*

## Essais personnalisés

### Workflow

Si le type d'essai Custom (Personnalisé) est sélectionné dans le logiciel StepOne™ pour une expérience de quantification (c'est-à-dire pour créer des amorces et des sondes personnalisées), il est recommandé de suivre le workflow des instructions de préparation des essais d'Applied Biosystems :

1. Créer des amorces et des sondes à l'aide du logiciel Primer Express® (ci-dessous).
2. Sélectionner les réactifs adéquats (page 3-24).  
**IMPORTANT !** Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA™ comme reporter ou quencher avec le système StepOne.
3. Utiliser les conditions de thermocyclage recommandées (page 3-26).
4. Commencer avec les concentrations d'amorce et de sonde par défaut. Si nécessaire, optimiser les concentrations d'amorce (page 3-29) et de sonde (page 3-33).

**IMPORTANT !** Ces étapes permettent de concevoir et d'optimiser les essais de manière fiable et rapide uniquement lorsqu'elles sont utilisées dans leur globalité. Respecter l'ensemble du processus pour atteindre des résultats optimaux. Pour obtenir une description plus détaillée des instructions de préparation des essais d'Applied Biosystems, voir l'Annexe C.

**Remarque :** Pour sélectionner le type d'essai Custom (Personnalisé) dans le logiciel StepOne, accéder à l'écran Reaction Setup (Préparation des réactions) dans le workflow de l'assistant de programmation Design Wizard ou Advanced Setup (Configuration avancée), puis sélectionner **Custom** (Personnalisé) dans le menu déroulant Assay Type (Type d'essai).

## Création d'amorces et de sondes à l'aide du logiciel Primer Express®

Le logiciel Primer Express® utilise les paramètres recommandés pour sélectionner les amorces et les sondes en fonction de la séquence ADN fournie.

Si un essai personnalisé est créé, suivre le résumé des instructions de préparation d'amorces et de sondes pour les expériences de quantification à la page 3-23. Pour obtenir une explication détaillée de ces instructions, voir « À propos des instructions de préparation d'amorces et de sondes » à la page 3-22.

**IMPORTANT !** Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA™ comme reporter ou quencher avec le système StepOne.

**Remarque :** Même si aucune sonde n'est requise pour la détection du fluorophore SYBR® Green I, il est préférable d'utiliser le logiciel Primer Express pour sélectionner un ensemble d'amorces et de sondes lors de la création d'un essai pour les réactifs SYBR® Green. Aucune sonde n'est utilisée, mais les amorces seront conformes à tous les critères requis. Si l'essai doit être adapté aux réactifs TaqMan pour obtenir une spécificité supérieure, le fichier d'origine du logiciel Primer Express permet de trouver immédiatement la sonde adéquate.

### Sélection d'une région d'amplification pour les essais de quantification

La sélection d'une région d'amplification appropriée garantit l'amplification de l'ARNm/ADNc cible sans coamplification de la séquence génomique, des pseudogènes et des autres gènes associés. Les réactifs SYBR Green peuvent s'avérer utiles lors de la recherche de sites d'amplicon pour l'expression génétique.

#### Instructions

- L'amplicon doit couvrir un ou plusieurs introns pour éviter d'amplifier le gène cible dans l'ADN génomique.
- La paire d'amorces doit être spécifique du gène cible pour éviter d'amplifier les pseudogènes ou d'autres gènes associés.
- Lors de la création des amorces, suivre les instructions du logiciel Primer Express.
- Si aucune séquence convenable n'est trouvée, il peut être nécessaire d'examiner la séquence et de redéfinir l'amplicon ou simplement de rechercher plus de sites.

Si le gène étudié ne possède pas d'intron, il n'est pas possible de créer un amplicon qui amplifiera la séquence ARNm sans amplifier la séquence génomique. Dans ce cas, contrôler l'échantillon d'ARN qui n'a pas subi de rétro-transcription (contrôles sans RT).

## À propos des instructions de préparation d'amorces et de sondes

### Sélection de petits amplicons

La sélection d'amplicons compris dans un intervalle de 50 à 150 paires de bases est un paramètre par défaut important du logiciel Primer Express. Les petits amplicons sont préférables car ils favorisent une amplification hautement efficace.

En outre, les essais hautement efficaces permettent d'effectuer une quantification relative en utilisant la comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) (Livak and Schmittgen, 2001). Cette méthode augmente le débit expérimental car il n'est pas nécessaire d'utiliser des courbes standard lors de l'étude des niveaux d'expression d'une cible comparé à un échantillon de référence.

### Contenu G/C

Dans la mesure du possible, sélectionner des amorces et des sondes dans une zone où le contenu G/C est de 30 à 80 %. Il est possible que les zones ayant un contenu G/C >80 % ne soient pas correctement dénaturées pendant le thermocyclage, ce qui peut nuire à l'efficacité de la réaction. Les séquences riches en G/C sont sensibles aux interactions non spécifiques, lesquelles peuvent réduire l'efficacité de la réaction et produire un signal non spécifique dans les essais utilisant des réactifs SYBR Green. Éviter d'utiliser des séquences d'amorces et de sondes qui contiennent des séries d'au moins quatre bases G.

### Température de fusion

Lors de la sélection d'amorces et de sondes avec la température de fusion ( $T_m$ ) recommandée, les conditions de thermocyclage universelles peuvent être utilisées. Applied Biosystems recommande d'utiliser pour la sonde un  $T_m$  de 10 °C supérieur à celui des amorces.

### Extrémité 5' des sondes

Le logiciel Primer Express ne sélectionne pas les sondes avec une base G à l'extrémité 5'. L'effet quencher d'une base G à cette position persiste même après le clivage de la sonde, ce qui peut limiter les niveaux de fluorescence produits ( $\Delta R_n$ ) et nuire aux performances de l'essai. Il n'a pas été démontré que des bases G situées à proximité de l'extrémité 5', mais pas directement dessus, avaient une influence négative sur les performances de l'essai.

### Extrémité 3' des amorces

Pour réduire la formation éventuelle de produit non spécifique, vérifier que les cinq dernières bases sur l'extrémité 3' des amorces ne contiennent pas plus de deux bases C et/ou G. Dans certaines circonstances, telles qu'une séquence de cible riche en G/C, il est possible d'ignorer cette recommandation pour que la longueur de l'amplicon ne dépasse pas 150 paires de bases. D'une manière générale, éviter d'utiliser les extrémités 3' de l'amorce extrêmement riches en bases G et/ou C.

**Résumé des  
instructions de  
préparation  
d'amorces et de  
sondes MGB**

Instructions pour les sondes	Instructions pour les amorces
Sélectionner d'abord la sonde, puis créer les amorces aussi près que possible de la sonde sans la chevaucher (des amplicons de 50 à 150 paires de bases sont fortement recommandés).	
Le contenu G/C doit se situer dans un intervalle de 30 à 80 %.	
Éviter les répétitions d'un même nucléotide, en particulier la guanine, les séries d'au moins quatre G devant être proscrites.	
Lors de l'utilisation du logiciel Primer Express®, le T <sub>m</sub> doit être compris entre 68 et 70 °C (154,4 et 158 °F).	Lors de l'utilisation du logiciel Primer Express®, le T <sub>m</sub> doit être compris entre 58 et 60 °C (136,4 et 140 °F).
Aucune base G à l'extrémité 5'.	Les cinq nucléotides de l'extrémité 3' doivent avoir au maximum deux bases G et/ou C.
Créer des sondes TaqMan® MGB aussi courtes que possible, avec un minimum de 13 nucléotides.	

## Sélection des réactifs

Plusieurs réactifs TaqMan et SYBR Green sont disponibles pour les expériences de quantification. Les réactifs utilisés dépendent de la cible :

- ADN ou ADNc (ci-dessous).
- ARN avec RT-PCR 1 étape (page 3-25).
- ARN avec RT-PCR 2 étapes (page 3-25).

**Remarque :** Si des réactifs SYBR Green sont utilisés, Applied Biosystems recommande vivement les réactifs *Power* SYBR Green.

### Quantification de l'ADN ou de l'ADNc

Réactif	Kit	Référence
Réactifs TaqMan®	Master mix TaqMan® Fast Universal PCR (2X), No AmpErase® UNG, 250 réactions	4352042
	Master mix TaqMan® 2X Universal PCR, 200 réactions	4304437
	Master mix TaqMan® 2X Universal PCR, 2 000 réactions	4326708
	Boîte de 10, master mix TaqMan® 2X Universal PCR	4305719
	Master mix TaqMan® 2X Universal PCR, No AmpErase® UNG, 200 réactions	4324018
	Master mix TaqMan® 2X Universal PCR, No AmpErase® UNG, 2 000 réactions	4326614
	Boîte de 10, master mix TaqMan® 2X Universal PCR, No AmpErase® UNG	4324020
	TaqMan® PCR Core Reagents Kit, 200 réactions	N808-0228
Réactifs SYBR® Green	Master mix <i>Power</i> SYBR® Green PCR (1 mL), 40 réactions	4368577
	Master mix <i>Power</i> SYBR® Green PCR (5 mL), 200 réactions	4367659
	Master mix <i>Power</i> SYBR® Green PCR (10 × 5 mL), 2 000 réactions	4368708
	Master mix <i>Power</i> SYBR® Green PCR (50 mL), 2 000 réactions	4367660
	Master mix SYBR® Green PCR (1 mL), 40 réactions	4344463
	Master mix SYBR® Green PCR (5 mL), 200 réactions	4309155
	Master mix SYBR® Green PCR (50 mL), 2 000 réactions	4334973
	Réactifs SYBR® Green PCR Core Reagents, 200 réactions	4304886



**Quantification de  
l'ARN avec la  
RT-PCR  
1 étape**

Réactif	Kit	Référence
Réactifs TaqMan®	TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit	4309169
	TaqMan® EZ RT-PCR Core Reagents <b>Remarque :</b> Utiliser les TaqMan® EZ RT-PCR Core Reagents lorsqu'une étape RT à température élevée est requise.	N808-0236
Réactifs SYBR® Green	Power SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit	4368711
	SYBR® Green RT-PCR Reagents	4310179

**Quantification de  
l'ARN avec la  
RT-PCR  
2 étapes**

Réactif	Étape	Kit	Référence
Réactifs TaqMan®	Étape PCR uniquement	TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix	4304437
		TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase® UNG	4352042
	Étape RT uniquement	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4374966
		TaqMan® Reverse Transcription Reagents	N808-234
	Étapes RT et PCR	TaqMan® Gold RT PCR Kit	N808-232
	Réactifs SYBR® Green	Étape PCR uniquement	Master mix Power SYBR® Green PCR
Master mix SYBR® Green PCR			4309155
Étape RT uniquement		High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4374966
		TaqMan® Reverse Transcription Reagents	N808-234
Étapes RT et PCR		Power SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit	4368711
		SYBR® Green RT-PCR Reagents	4310179

**À propos de la polymérase AmpliTaq Gold DNA Polymerase**

L'utilisation de l'enzyme d'amorçage à température élevée AmpliTaq Gold® DNA Polymerase pour les réactifs TaqMan et SYBR Green est traitée en intégralité dans les instructions de préparation des essais d'Applied Biosystems. L'enzyme AmpliTaq Gold DNA Polymerase garantit une réaction fiable. Elle peut réduire de manière significative la formation de produits non spécifiques. En outre, elle simplifie la préparation de la réaction, qui peut être effectuée à température ambiante.

**Remarque :** L'ADN polymérase inclus dans le master mix TaqMan Fast Universal PCR (2X), No AmpErase UNG peut, à haute température, amorcer très rapidement la PCR. Les performances sont identiques à celles de l'enzyme AmpliTaq Gold DNA Polymerase.

**À propos de la transcriptase inverse MultiScribe**

La transcriptase inverse MultiScribe™ est une transcriptase inverse du virus recombinant de la leucémie murine de Moloney (MuLV), qui rétro-transcrit l'ARN en ADN complémentaire (ADNc).

**Utilisation des conditions de thermocyclage recommandées**

Utiliser les conditions de thermocyclage recommandées pour l'échantillon :

- ADN ou ADNc (ci-dessous).
- ARN avec RT-PCR 1 étape (page 3-27).
- ARN avec RT-PCR 2 étapes (page 3-28).

**Remarque :** Les réactifs Fast et standard nécessitent des conditions de thermocyclage différentes.

**Quantification de l'ADN ou de l'ADNc**

Pour le master mix TaqMan Fast Universal PCR (2X), No AmpErase UNG, utiliser les conditions suivantes :

Durée et température			
Étapes initiales		PCR (40 cycles)	
Activation de l'AmpErase® UNG‡	Activation	Dénaturation	Hybridation/extension
MAINTIEN	MAINTIEN	CYCLE	
2 min à 50 °C	20 s à 95 °C	3 s à 95 °C	30 s à 60 °C

‡ Requisite uniquement si l'AmpErase® UNG est ajoutée aux réactions.

Pour les master mix TaqMan 2× Universal PCR et Power SYBR Green PCR, utiliser les conditions suivantes :

Durée et température			
Étapes initiales		PCR (40 cycles)	
Activation de l'AmpErase® UNG‡	Activation de l'AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase	Dénaturation	Hybridation/extension
MAINTIEN	MAINTIEN	CYCLE	
2 min à 50 °C	10 min à 95 °C	15 s à 95 °C	1 min à 60 °C

‡ Requisite uniquement si l'AmpErase® UNG est ajoutée aux réactions ou incluse dans le master mix.

### Quantification de l'ARN avec la RT-PCR 1 étape

Pour le TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit ou Power SYBR Green RT-PCR Reagents Kit, utiliser les conditions suivantes :

Durée et température			
Étapes initiales		PCR (40 cycles)	
Rétro-transcription	Activation de l'AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase	Dénaturation	Hybridation/extension
MAINTIEN	MAINTIEN	40 CYCLES	
30 min à 48 °C	10 min à 95 °C	15 s à 95 °C	1 min à 60 °C

**Remarque :** Ces conditions ne s'appliquent pas au TaqMan EZ RT-PCR Kit. Voir le document *TaqMan® EZ RT-PCR Kit Protocol* pour connaître les conditions adéquates.

**Quantification de l'ARN avec la RT-PCR 2 étapes**

Pour le High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, utiliser les conditions suivantes :

Étape	Durée et température	
<b>1. Étape RT</b>	Étape 1	Étape 2
	MAINTIEN	MAINTIEN
	10 min à 25 °C	120 min à 37 °C
Après la transcriptase inverse de l'ARN en ADNc (étape RT), les échantillons peuvent être conservés ou utilisés pour l'étape PCR suivante décrite ci-dessous.		

**IMPORTANT !** Pour la majorité des applications, et lorsque de grandes quantités d'ADNc sont requises, Applied Biosystems recommande une rétro-transcription de 120 min à 37 °C pour obtenir une conversion optimale.

Pour les master mix TaqMan 2X Universal PCR (avec AmpErase UNG) ou Power SYBR Green PCR, utiliser les conditions suivantes :

Étape	Durée et température			
<b>2. Étape PCR</b>	Étapes initiales		PCR (40 cycles)	
	Activation de l'AmpErase® UNG	Activation de l'AmpliTaq Gold® DNA Polymerase	Dénaturation	Hybridation/extension
	MAINTIEN	MAINTIEN	CYCLE	
	2 min à 50 °C	10 min à 95 °C	15 s à 95 °C	1 min à 60 °C

Pour le master mix TaqMan Fast Universal PCR (2X), No AmpErase UNG, utiliser les conditions suivantes :

Étape	Durée et température			
<b>2. Étape PCR</b>	Étapes initiales		PCR (40 cycles)	
	Activation de l'AmpErase® UNG‡	Activation de l'AmpliTaq Gold® DNA Polymerase	Dénaturation	Hybridation/extension
	MAINTIEN	MAINTIEN	CYCLE	
	2 min à 50 °C	20 s à 95 °C	3 s à 95 °C	30 s à 60 °C

‡ Requisite uniquement si l'AmpErase® UNG est ajoutée aux réactions.

## Optimisation des concentrations d'amorces

En faisant varier indépendamment les concentrations d'amorces sens et anti-sens, il est possible d'identifier celles qui offrent aux essais des performances optimales. Les amorces sont toujours présentes en excès de quantité au cours de la phase exponentielle de l'amplification par PCR.

Lorsque le master mix TaqMan 2X Universal PCR est utilisé, Applied Biosystems recommande les concentrations d'amorces répertoriées dans le paragraphe « Concentrations d'amorces par défaut » ci-dessous. Ce guide contient des explications détaillées pour :

- La matrice d'optimisation des amorces (ci-dessous)
- Les réactifs TaqMan (ci-dessous)
- Les réactifs SYBR Green (à la page 3-31)

### Concentrations d'amorces par défaut

Les concentrations d'amorces initiales recommandées, indiquées dans le tableau ci-dessous, sont destinées aux essais de quantification de l'ADN et de l'ADNc.

Réactif	Concentrations (nM)	
	Amorce sens	Amorce anti-sens
Réactifs TaqMan®	900	900
Réactifs SYBR® Green	50	50

### Matrice d'optimisation des amorces

Une matrice d'optimisation des amorces permet de déterminer la concentration d'amorce minimale qui produira la valeur  $C_T$  la plus basse et la valeur  $\Delta R_n$  la plus haute.

Elle peut aider à compenser la l'hybridation non spécifique des amorces, ce qui peut réduire la quantité d'amorce disponible pour l'hybridation au site spécifique.

### Réactifs TaqMan

Pour obtenir des performances optimales avec les essais de quantification qui utilisent les réactifs TaqMan, sélectionner les concentrations d'amorces qui produisent la valeur  $C_T$  la plus faible et la valeur  $\Delta R_n$  la plus élevée pour une quantité fixe de séquence cible.

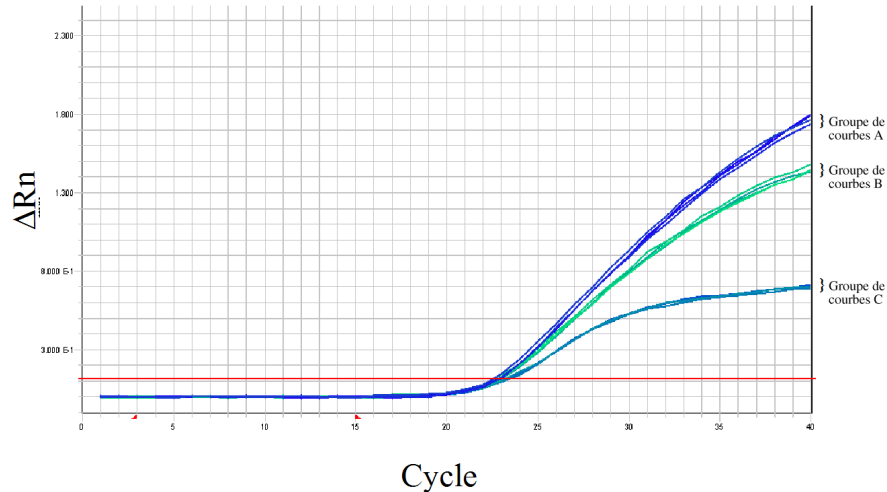
**Remarque :** Bien que les valeurs  $C_T$  soient le paramètre qui permet d'affecter les valeurs quantitatives lors d'une expérience de quantification en temps réel, les valeurs  $\Delta R_n$  sont également importantes pour obtenir une sensibilité et une reproductibilité maximales.

La Figure 3-3 à la page 3-30 montre les résultats d'une expérience standard de matrice d'optimisation des amorces avec un réactif TaqMan :

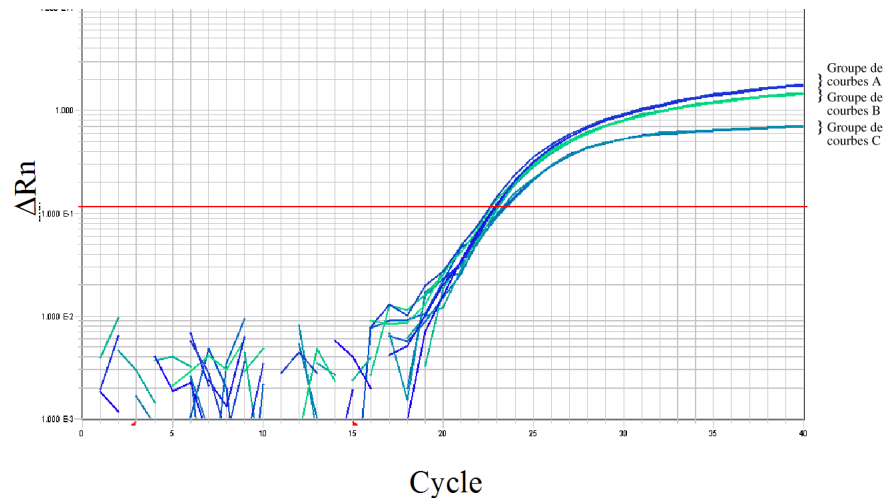
- La Figure 3-3a montre les courbes d'amplification de toutes les combinaisons de concentrations d'amorces dans un graphique linéaire.
- La Figure 3-3b montre les mêmes données dans un graphique de type log.

La combinaison d’amorces anti-sens et sens à 50 nM (courbe du groupe C) produit la valeur  $\Delta Rn$  la plus faible et la valeur  $C_T$  la plus élevée. Toutes les combinaisons d’amorces qui contiennent une concentration à 150 nM de l’amorce sens ou anti-sens (courbe du groupe B) produisent une valeur  $\Delta Rn$  réduite. Toutes les combinaisons d’amorces qui contiennent des amorces sens et anti-sens à 300 nM minimum (courbe du groupe A) produisent la valeur  $\Delta Rn$  la plus élevée et la valeur  $C_T$  la plus faible. Par conséquent, les combinaisons représentées par les courbes de groupe A et B produisent des performances optimales.

**a) Graphique linéaire**



**b) Graphique log**



**Figure 3-3 Résultats de l'expérience d'optimisation des amorces montrant les courbes d'amplification (graphiques linéaire et log) des combinaisons d'amorces**  
**Légende :**

- A :** Combinaisons qui contiennent des amorces sens et anti-sens à 300 nM minimum
- B :** Combinaisons qui contiennent des amorces sens et anti-sens à 150 nM minimum
- C :** Combinaisons qui contiennent des amorces sens et anti-sens à 50 nM minimum

**Réactifs SYBR Green**

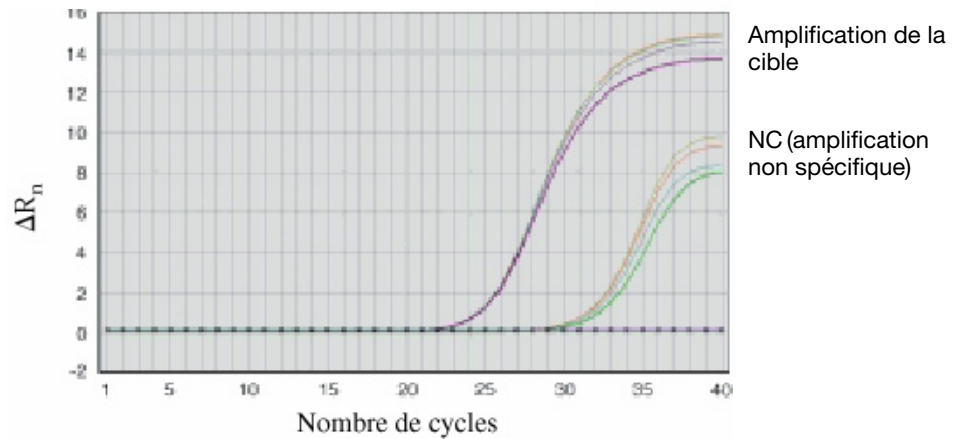
L'optimisation des concentrations d'amorces est légèrement plus complexe pour les essais de quantification qui utilisent les réactifs SYBR Green. Il est possible d'employer la même matrice d'optimisation des amorces qu'avec les réactifs TaqMan. Toutefois, il est nécessaire d'ajouter des contrôles négatifs pour les réactifs SYBR Green. Les concentrations d'amorces sélectionnées doivent produire une valeur  $C_T$  faible et une valeur  $\Delta R_n$  élevée lorsqu'elles sont en présence de la séquence cible, mais elles ne doivent pas générer de produit non spécifique dans les contrôles négatifs.

L'analyse de la courbe de fusion ou du dépôt sur gel peut s'avérer très utile lors de la détermination des concentrations d'amorces optimales pour les essais de quantification utilisant des réactifs SYBR Green. La Figure 3-4 à la page 3-32 montre les résultats d'une matrice d'optimisation des amorces avec des concentrations d'amorces sens et anti-sens à 900 nM :

- La Figure 3-4a montre une forte amplification dans les puits de contrôle négatif, ce qui témoigne d'une amplification non spécifique importante.
- La Figure 3-4b montre que la température de fusion du produit généré en l'absence d'échantillon est inférieure à celle du produit spécifique généré en présence d'échantillon, ce qui témoigne d'une amplification non spécifique importante.

Les résultats affichés dans la Figure 3-4 sont typiques d'une formation de dimères d'amorces. Ils attestent que les concentrations d'amorces inférieures peuvent fournir de meilleurs résultats. En outre, il est possible de redéfinir un autre ensemble d'amorces pour la cible concernée.

a) Courbe d'amplification, graphique linéaire



b) Analyse de la courbe de fusion

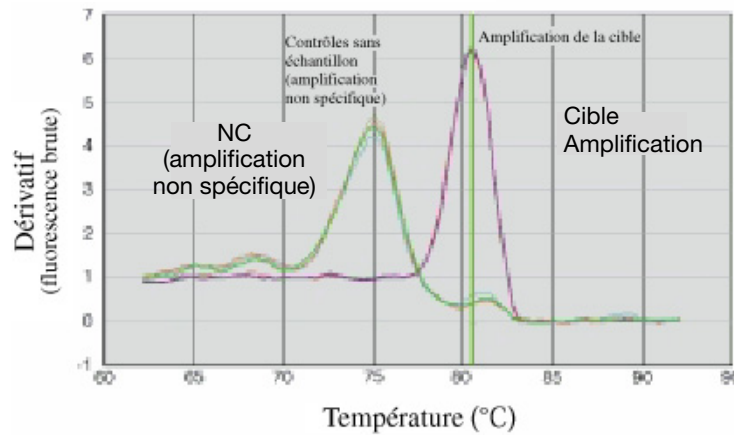


Figure 3-4 Données d'amplification avec les réactifs SYBR® Green  
(a) Courbe d'amplification (graphique linéaire) montrant une suspicion d'amplification non spécifique dans les puits de contrôle négatif (NC).  
(b) Analyse de la courbe de fusion confirmant que les puits NC et le produit spécifique ont une température de fusion différente.



## Optimisation de la concentration de sonde

Lors d'une détection à l'aide de sondes TaqMan<sup>®</sup>, la concentration de sonde recommandée (250 nM) garantit d'excellentes performances aux essais. Toutefois, selon les besoins de l'essai, une expérience d'optimisation de la sonde peut s'avérer utile.

**Remarque :** Aucune sonde n'est requise pour la détection du fluorophore SYBR Green I.

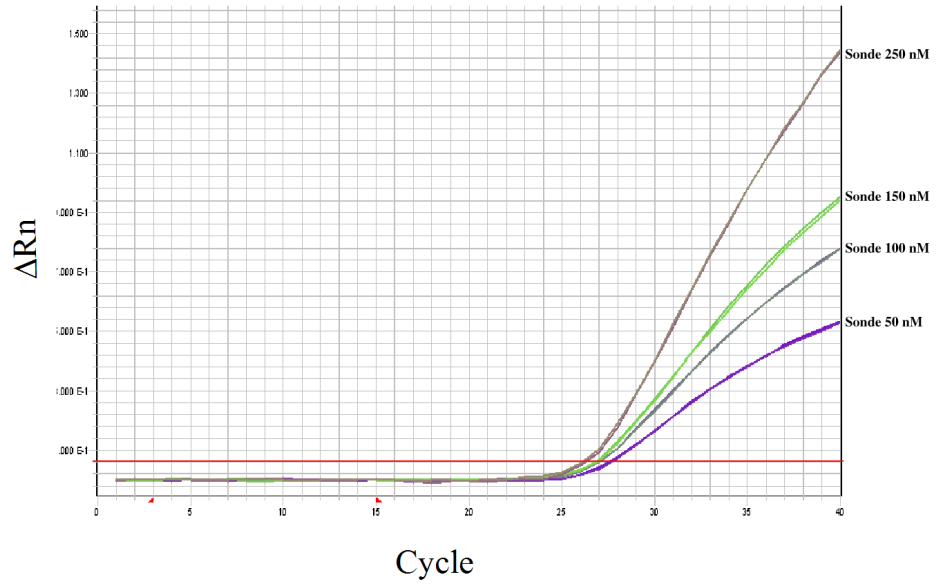
### Concentrations de sonde recommandées

La concentration de sonde recommandée pour les essais de quantification de l'ADN et de l'ADNc avec les réactifs TaqMan est de 250 nM. La Figure 3-5 montre les résultats d'une expérience d'optimisation de sonde dans laquelle la concentration de sonde varie de 50 à 250 nM :

- La Figure 3-5a montre un accroissement de la valeur  $\Delta R_n$  à mesure que la concentration de sonde augmente.
- La Figure 3-5b montre que la valeur  $C_T$  varie selon les concentrations de sonde.

Pour garantir une reproductibilité optimale, en particulier pour détecter un faible nombre de copies d'une cible, éviter les concentrations limitant la sonde. Réaliser l'expérience à une concentration de sonde de 250 nM. L'utilisation d'une concentration à 250 nM évite de limiter la sonde et garantit des valeurs  $\Delta R_n$  importantes. Des valeurs  $\Delta R_n$  élevées indiquent un essai robuste à efficacité élevée, ce qui permet d'obtenir beaucoup de produit et d'effectuer des mesures de pics précises.

a) Graphique linéaire



b) Graphique log

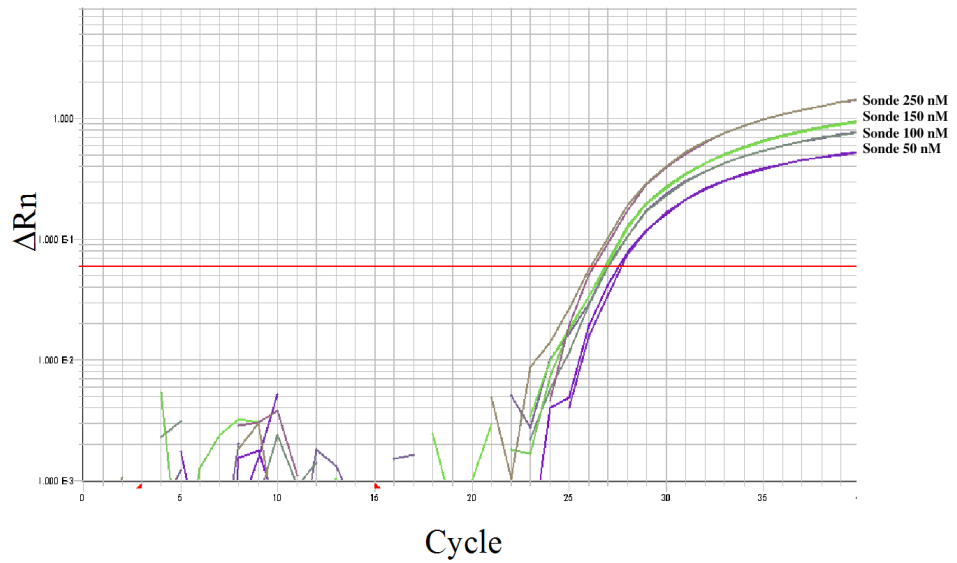


Figure 3-5 Courbe d'amplification (graphiques linéaire et log) du titrage de concentration de la sonde entre 50 et 250 nM

## Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur :

- L'utilisation des réactifs TaqMan, voir les documents :
  - *TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X) Protocol*
  - *TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol*
- L'utilisation des réactifs SYBR Green, voir les documents :
  - *Power SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR Protocol*
  - *SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR Reagents Protocol*
  - *SYBR® Green PCR and RT-PCR Reagents Protocol*
- La réalisation d'expériences de quantification sur le système StepOne, voir les documents :
  - *Guide de mise en route pour les expériences de quantification absolue par les courbes standard sur le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™*
  - *Guide de mise en route pour les expériences de quantification relative par les courbes standard et par la comparaison des valeurs de  $C_T$  sur le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™*
- La réalisation d'expériences de présence/absence sur le système StepOne, voir le document *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments*.



# Réactions de génotypage

---

# 4

Sommaire du chapitre :

Section 4.1 À propos des réactions de génotypage . . . . .	4-3
Section 4.2 Instructions de préparation . . . . .	4-9



## Section 4.1 À propos des réactions de génotypage

---

Sommaire de la section :

Présentation . . . . .	4-4
Sélection du type d'essai . . . . .	4-6

## Présentation

### Qu'est-ce qu'une réaction de génotypage ?

Une réaction de génotypage est réalisée en point final pour déterminer le génotype d'échantillons inconnus. Avec cette application, il est possible de différencier un polymorphisme de nucléotide unique (SNP).

Une réaction de génotypage détermine si les échantillons inconnus sont :

- Homozygotes (échantillons avec l'allèle 1 uniquement)
- Homozygotes (échantillons avec l'allèle 2 uniquement)
- Hétérozygotes (échantillons avec l'allèle 1 et l'allèle 2)

### Composants

Les réactions de PCR pour les réactions de génotypage incluent les composants suivants :

- **Échantillon** – Échantillon dans lequel le génotype de la cible est inconnu.
- **(Facultatif) Réplicats** – Réactions identiques contenant des composants et des volumes identiques.
- **Contrôles négatifs** – Échantillons qui contiennent de l'eau ou du tampon à la place de l'échantillon, également appelés contrôles sans échantillon (NTC – No Template Control). Les contrôles négatifs ne doivent pas être amplifiés.
- **(Facultatif) Contrôles positifs** – Échantillons qui contiennent des génotypes connus (homozygotes pour l'allèle 1, homozygotes pour l'allèle 2 et hétérozygotes pour les allèles 1 et 2).

### Instruments

Les réactions de génotypage requièrent deux étapes : le thermocyclage (amplification par PCR) et la détection en point final des signaux fluorescents produits. L'étape de thermocyclage (amplification par PCR) peut être effectuée sur le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ ou sur un thermocycleur autonome.

Sur le système StepOne™ :

- Il est possible d'analyser la PCR, ce qui peut s'avérer utile pour corriger les imprécisions.
- Effectuer la lecture en point final de la plaque séparément.

### Fonctionnement d'une réaction de génotypage

Dans une réaction de génotypage, la PCR inclut une sonde spécifique marquée par un fluorophore particulier pour chaque allèle. Les sondes contiennent des reporters différents pour discriminer chaque allèle.

Les sondes TaqMan® MGB (ligand du petit sillon) sont compatibles avec le système StepOne. Chaque sonde TaqMan® MGB contient :

- Un reporter à l'extrémité 5' de chaque sonde
  - Le fluorophore VIC® est lié à l'extrémité 5' de la sonde pour l'allèle 1
  - Le fluorophore FAM™ est lié à l'extrémité 5' de la sonde pour l'allèle 2



- Un ligand du petit sillon (MGB)  
Cette modification augmente la température de fusion ( $T_m$ ) des sondes sans augmenter leur longueur (Afonina *et al.*, 1997; Kutuyavin *et al.*, 1997) ce qui permet de créer des sondes plus courtes. Par conséquent, les sondes TaqMan MGB présentent de plus grandes différences de valeurs de  $T_m$  entre les sondes spécifiques et non spécifiques, ce qui permet d'obtenir un génotypage précis.
- Un quencher non fluorescent (NFQ) à l'extrémité 3' de la sonde  
Puisque le quencher n'émet pas de fluorescence, les systèmes PCR en temps réel peuvent mesurer plus précisément les contributions du reporter.

Pendant la PCR, chaque sonde s'hybride spécifiquement sur sa séquence complémentaire entre les sites d'amorces sens et anti-sens. La polymérase AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA Polymerase ne peut cliver que les sondes qui s'hybrident sur la séquence allélique (spécificité). Le clivage sépare le reporter du quencher, ce qui augmente la fluorescence du reporter. Ainsi, les signaux de fluorescence générés pendant l'amplification par PCR indiquent les allèles présents dans l'échantillon.

#### Non-spécificités entre les séquences de sonde et d'allèle

Les non-spécificités entre une sonde et un allèle (Figure 4-1) réduisent l'efficacité de l'hybridation de la sonde. En outre, la polymérase AmpliTaq Gold DNA Polymerase peut déplacer la sonde non spécifique plutôt que de la cliver afin de libérer le reporter.

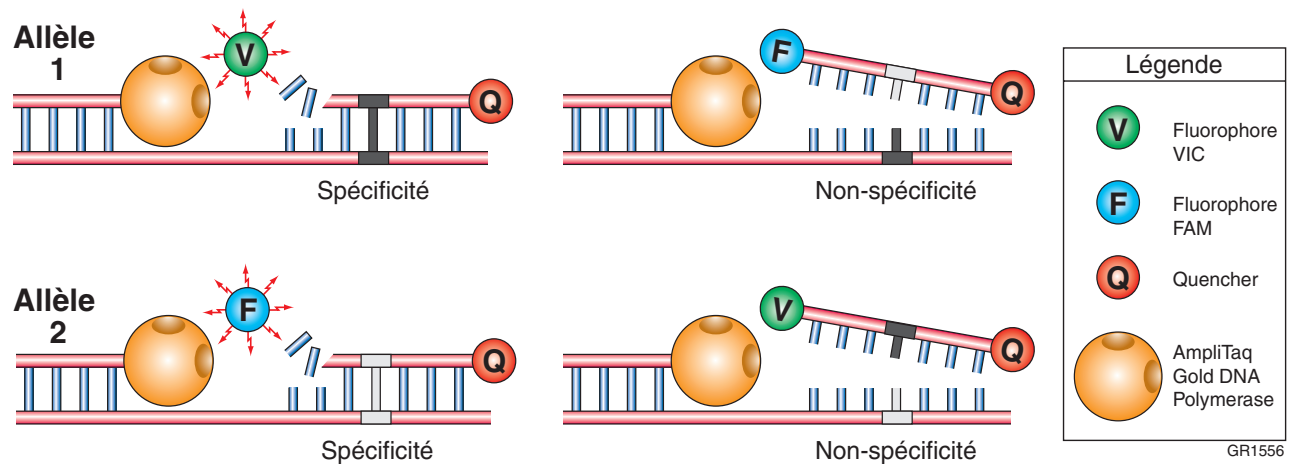


Figure 4-1 Résultats de spécificité et de non-spécificité entre les séquences d'allèle et de sonde dans une réaction de génotypage

Le Tableau 4-1 résume les résultats possibles de l'exemple de réaction de génotypage indiqué ci-dessus.

**Tableau 4-1 Résultats de la réaction de génotypage**

Une augmentation importante...	Indique...
De la fluorescence du fluorophore VIC® uniquement	Une homozygotie pour l'allèle 1
De la fluorescence du fluorophore FAM™ uniquement	Une homozygotie pour l'allèle 2
Des deux signaux fluorescents	Une hétérozygotie

**Workflow** Avant de démarrer une réaction de génotypage sur le système StepOne, elle doit être préparée comme suit :

1. Sélectionner le type d'essai (ci-dessous).
2. Consulter les instructions de préparation selon le type d'essai sélectionné (Section 4.2 à la page 4-9).

## Sélection du type d'essai

Lors de la création d'une expérience avec le logiciel StepOne, il est possible de sélectionner les types d'essais suivants pour les réactions de génotypage :

- Préconçus/validés (ci-dessous)
- Personnalisés (page 4-7)

Cette section répertorie les produits disponibles pour chaque type d'essai.

**Remarque :** Les essais sont spécifiques de la cible étudiée. Les master mix contiennent les autres composants nécessaires à la réaction de PCR.

**Remarque :** Les réactifs TaqMan® Fast et SYBR® Green ne sont pas validés pour les réactions de génotypage.

**Essais  
préconçus/  
validés**

<b>Produit</b>	<b>Attributs</b>
Essais TaqMan® SNP Genotyping Assays	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Essais préconçus pour la couverture des reporters haute densité à l'échelle du génome.</li> <li>• Pour les études de dépistage, d'association, de zone candidate, de gène candidat ou de cartographie fine.</li> <li>• Format prêt à l'emploi en un seul tube.</li> </ul>
Essais TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Détectent les polymorphismes dans 220 gènes qui codent divers enzymes du métabolisme des médicaments et transporteurs de médicaments.</li> <li>• Pour l'étude des polymorphismes de nucléotides simples (SNP), des insertions/délétions (in/del) et des polymorphismes de multinucléotides (MNP).</li> </ul>
Réactifs Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents for Allelic Discrimination	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Génotypent les échantillons d'ADN purifié pour des mutations spécifiques. La plupart des essais distinguent deux allèles de polymorphismes de nucléotides simples (SNP).</li> <li>• Ligand du petit sillon (MGB) ajouté pour un meilleur génotypage.</li> <li>• ADN de contrôle des allèles 1 et 2 inclus pour faciliter la génération de chaque signal homozygote à chaque réaction.</li> <li>• Le système en tube fermé ne nécessite pas de manipulation ou de gel après la PCR.</li> </ul>
Master mix TaqMan® 2X Universal PCR (avec ou sans AmpErase® UNG)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Performances optimales pour les quantifications en TaqMan® à partir d'échantillons d'ADNc ou d'ADN.</li> <li>• Contient des composants qui assurent d'excellentes performances aux essais.</li> <li>• L'utilisation d'un seul réactif pour tous les essais simplifie le processus expérimental.</li> </ul>

Pour obtenir des instructions de préparation des expériences avec des essais préconçus/validés, voir page 4-10.

**Essais  
personnalisés**

<b>Produit</b>	<b>Attributs</b>
Essais Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tous les polymorphismes de nucléotides simples (SNP) possibles dans n'importe quel organisme.</li> <li>• Détectent les insertions/délétions (in/del) de six bases maximum.</li> <li>• Détectent les polymorphismes de nucléotides multiples (MNP) jusqu'à six bases maximum.</li> <li>• Format prêt à l'emploi en un seul tube.</li> </ul>
Master mix TaqMan® 2X Universal PCR (avec ou sans AmpErase® UNG)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Performances optimales pour les quantifications en TaqMan® à partir d'échantillons d'ADNc ou d'ADN.</li> <li>• Contient des composants qui assurent d'excellentes performances aux essais.</li> <li>• L'utilisation d'un seul réactif pour tous les essais simplifie le processus expérimental.</li> </ul>

Pour obtenir des instructions de préparation des expériences avec des essais personnalisés, voir page 4-15.



---

## Section 4.2 Instructions de préparation

---

Sommaire de la section :

Essais préconçus/validés . . . . .	4-10
Essais TaqMan® SNP Genotyping Assays . . . . .	4-10
Essais TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays . . . . .	4-11
Réactifs Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents for Allelic Discrimination . . . . .	4-12
Sélection du master mix . . . . .	4-13
Conception de l'expérience . . . . .	4-14
Essais personnalisés . . . . .	4-15
Essais Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays . . . . .	4-15
Sélection du master mix . . . . .	4-17
Conception de l'expérience . . . . .	4-17

## Essais préconçus/validés

**Workflow** Si une réaction de génotypage est créée avec les essais préconçus/validés d'Applied Biosystems, il est recommandé de suivre le workflow ci-dessous :

1. Sélectionner l'essai :
  - Essais TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays (ci-dessous).
  - Essais TaqMan<sup>®</sup> Drug Metabolism Genotyping Assays (page 4-11).
  - Réactifs Pre-Developed TaqMan<sup>®</sup> Assay Reagents for Allelic Discrimination (page 4-12).
2. Sélectionner le master mix (page 4-13).
3. Créer l'expérience à l'aide du logiciel StepOne<sup>™</sup> (page 4-14).

## Essais TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays

**Description des produits** Les essais TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays comprennent une gamme complète d'ensembles d'amorces et de sondes destinés au génotypage des polymorphismes de nucléotides simples (SNP) dans des études sur l'homme.

Ils utilisent les réactifs TaqMan<sup>®</sup> pour amplifier et détecter les allèles SNP spécifiques dans les échantillons d'ADN génomique purifié. Tous les essais sont conçus au moyen des processus et logiciels bioinformatiques d'Applied Biosystems, ainsi qu'avec les données génomiques de Celera Genomics et des bases de données publiques.

**Propriétés des produits** Tous les essais TaqMan SNP Genotyping Assays :

- Nécessitent trois composants :
  - 1 à 20 ng d'échantillon d'ADN génomique purifié
  - Mélange 20X, 40X ou 80X d'essai SNP Genotyping Assay Mix (spécifique de chaque polymorphisme). Chaque essai est composé d'amorces sens et anti-sens spécifiques de la séquence pour amplifier le SNP concerné et de deux sondes TaqMan MGB : une sonde marquée avec le fluorophore VIC<sup>®</sup> détecte la séquence d'allèle 1, une sonde marquée avec le fluorophore FAM<sup>™</sup> détecte la séquence d'allèle 2.
  - Master mix TaqMan<sup>®</sup> 2X Universal PCR (avec ou sans AmpErase<sup>®</sup> UNG).
- Sont conçus et optimisés pour fonctionner avec le master mix TaqMan 2X Universal PCR (avec ou sans AmpErase UNG) dans des conditions de thermocyclage universelles.
- Requièrent l'amplification par PCR et une lecture en point final pour obtenir des résultats.

**Essais disponibles**

Les essais TaqMan SNP Genotyping Assays sont disponibles en deux catégories :

Catégorie	Description
Essais TaqMan® Validated & Coding SNP Genotyping Assays	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Environ 5 000 essais SNP à petite échelle, dont 2 000 environ sont des essais SNP codants.</li> <li>• En stock.</li> </ul>
Essais TaqMan® Pre-Designed SNP Genotyping Assays	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plus de 4,5 millions d'essais SNP préconçus, dont 3,5 millions d'essais HapMap et environ 68 000 essais SNP codants.</li> <li>• Disponibles à petite, moyenne et grande échelle.</li> <li>• Fabriqués sur commande (c'est-à-dire au moment de la commande).</li> </ul>

**Pour plus d'informations**

- Pour plus d'informations sur les derniers produits disponibles et sur leurs recommandations d'utilisation, consulter le site Internet d'Applied Biosystems : <http://www.appliedbiosystems.com/>
  - a. Sur la page d'accueil, sous TaqMan® Products (Produits TaqMan), sélectionner **TaqMan® SNP Genotyping Assays** (Essais TaqMan SNP Genotyping Assays).
  - b. Sur la page SNP Genotyping Assays (Essais SNP Genotyping Assays), sous Pre-Designed/Validated Assays (Essais préconçus/validés), sélectionner **TaqMan® SNP Genotyping Assays** (Essais TaqMan SNP Genotyping Assays).
- Pour plus d'informations sur la préparation des réactions de PCR avec les essais TaqMan SNP Genotyping Assays, voir le document *TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol*.

**Essais TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays****Description des produits**

Les essais TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays comprennent une gamme complète d'ensembles d'amorces et de sondes en stock destinés au génotypage des SNP, des insertions et délétions (in/del) et des polymorphismes de nucléotides multiples (MNP) dans les gènes associés au métabolisme des médicaments.

Les essais utilisent les réactifs TaqMan pour amplifier et détecter les polymorphismes spécifiques dans les échantillons d'ADN génomique purifié. Tous les essais sont conçus au moyen des processus et logiciels bioinformatiques d'Applied Biosystems, ainsi qu'avec les données génomiques des bases de données SNP publiques et des assemblages de génome publics.

**Propriétés des produits**

Tous les essais TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays :

- Nécessitent trois composants :
  - 3 à 30 ng d'échantillon d'ADN génomique purifié
  - Mélange 20X d'essai Drug Metabolism Genotyping Assay Mix (spécifique de chaque polymorphisme). Chaque essai est composé d'amorces sens et anti-sens spécifiques de la séquence pour amplifier la séquence polymorphique concernée et de deux sondes TaqMan MGB : une sonde marquée avec le fluorophore VIC détecte la séquence d'allèle 1, une sonde marquée avec le fluorophore FAM détecte la séquence d'allèle 2.
  - Master mix TaqMan<sup>®</sup> 2X Universal PCR (avec ou sans AmpErase<sup>®</sup> UNG).
- Sont conçus et optimisés pour fonctionner avec le master mix TaqMan 2X Universal PCR (avec ou sans AmpErase UNG) dans des conditions de thermocyclage universelles.
- Requièrent l'amplification par PCR et une lecture en point final pour obtenir des résultats.

**Pour plus d'informations**

- Pour plus d'informations sur les derniers produits disponibles et sur leurs recommandations d'utilisation, consulter le site Internet d'Applied Biosystems : <http://www.appliedbiosystems.com/>
  - a. Sur la page d'accueil, sous TaqMan<sup>®</sup> Products (Produits TaqMan), sélectionner **TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays** (Essais TaqMan SNP Genotyping Assays).
  - b. Sur la page SNP Genotyping Assays (Essais SNP Genotyping Assays), sous Pre-Designed/Validated Assays (Essais préconçus/validés), sélectionner **TaqMan<sup>®</sup> Drug Metabolism Genotyping Assays** (Essais TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays).
- Pour plus d'informations sur la préparation des réactions de PCR avec les essais TaqMan SNP Genotyping Assays, voir le document *TaqMan<sup>®</sup> Drug Metabolism Genotyping Assays Protocol*.

## Réactifs Pre-Developed TaqMan<sup>®</sup> Assay Reagents for Allelic Discrimination

**Description des produits**

Les réactifs Pre-Developed TaqMan<sup>®</sup> Assay Reagents for Allelic Discrimination (TaqMan<sup>®</sup> PDARs for AD) sont des essais en stock optimisés pour la discrimination d'allèles spécifiques.

**Propriétés des produits**

Les réactifs TaqMan PDARs for AD requièrent trois composants :

- 2 à 20 ng d'échantillon d'ADN génomique purifié
- Mélange 10X d'essai Allelic Discrimination Assay Mix (spécifique de chaque polymorphisme). Chaque essai est composé d'amorces sens et anti-sens spécifiques de la séquence pour amplifier la séquence polymorphique concernée et de deux sondes TaqMan MGB : une sonde marquée avec le fluorophore VIC détecte la séquence d'allèle 1, une sonde marquée avec le fluorophore FAM détecte la séquence d'allèle 2.
- Master mix TaqMan<sup>®</sup> 2X Universal PCR (avec AmpErase<sup>®</sup> UNG)

**Remarque :** ADN de contrôle des allèles 1 et 2 inclus avec chaque essai pour faciliter la génération de tous les signaux homozygotes à chaque réaction.



**Pour plus d'informations**

- Pour plus d'informations sur les derniers produits disponibles et sur leurs recommandations d'utilisation, consulter le site Internet d'Applied Biosystems : <http://www.appliedbiosystems.com/>
  - a. Sur la page d'accueil, sous TaqMan® Products (Produits TaqMan), sélectionner **TaqMan® SNP Genotyping Assays** (Essais TaqMan SNP Genotyping Assays).
  - b. Sur la page SNP Genotyping Assays (Essais SNP Genotyping Assays), sous Pre-Designed/Validated Assays (Essais préconçus/validés), sélectionner **TaqMan® Pre-Developed Assay Reagents for Allelic Discrimination (TaqMan® PDARs for AD)**.
- Pour plus d'informations sur la préparation des réactions de PCR avec les réactifs TaqMan PDARs for Allelic Discrimination, voir le document *Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Allelic Discrimination Protocol*.

**Sélection du master mix****Master mix disponibles**

Les essais préconçus/validés d'Applied Biosystems pour les réactions de génotypage sont conçus pour fonctionner avec les master mix TaqMan® suivants :

- Les réactifs TaqMan PDARs for AD contiennent le master mix TaqMan® 2X Universal PCR (avec AmpErase® UNG).
- Les essais TaqMan SNP Genotyping Assays et Custom TaqMan SNP Genotyping Assays sont compatibles avec :

Master mix	Référence
Master mix TaqMan® 2X Universal PCR, 200 réactions	4304437
Master mix TaqMan® 2X Universal PCR, 2 000 réactions	4326708
Boîte de 10, master mix TaqMan® 2X Universal PCR	4305719
Master mix TaqMan® 2X Universal PCR, No AmpErase® UNG, 200 réactions	4324018
Master mix TaqMan® 2X Universal PCR, No AmpErase® UNG, 2 000 réactions	4326614
Boîte de 10, master mix TaqMan® 2X Universal PCR, No AmpErase® UNG	4324020

**Remarque :** Les réactions de génotypage ne sont pas validées avec le master mix TaqMan® Fast Universal PCR.

**Pour plus d'informations**

Pour plus d'informations sur l'utilisation des master mix TaqMan, voir le document *TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol*.

## Conception de l'expérience

**Utilisation du logiciel StepOne** Pour les essais préconçus/validés d'Applied Biosystems, utiliser le logiciel StepOne afin de créer la réaction de génotypage. Il calcule automatiquement les volumes pour les :

- Composants du mélange réactionnel
- Dilutions d'échantillons

**Remarque :** Pour sélectionner un essai SNP dans le logiciel StepOne, accéder à l'écran SNP Assays (Essais SNP) dans le workflow de l'assistant de programmation Design Wizard ou à l'écran Plate Setup (Configuration de la plaque) dans le workflow Advanced Setup (Configuration avancée). Dans l'écran SNP Assays (Essais SNP) ou Plate Setup (Configuration de la plaque), il est possible de sélectionner un essai dans la bibliothèque ou d'en créer un nouveau.

**Pour plus d'informations** Pour plus d'informations sur la création et la réalisation de réactions de génotypage sur le système StepOne, voir le *Guide de mise en route pour les réactions de génotypage sur le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™*.

## Essais personnalisés

**Workflow** Si une réaction de génotypage est créée avec les essais personnalisés d'Applied Biosystems, il est recommandé de suivre le workflow ci-dessous :

1. Commander l'essai : Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays (ci-dessous).
2. Sélectionner le master mix (page 4-17).
3. Créer l'expérience à l'aide du logiciel StepOne (page 4-17).

### Essais Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays

**Description des produits** Les essais Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays sont des ensembles d'amorces et de sondes TaqMan conçus, synthétisés et formulés par le service Custom TaqMan® Genomic Assays d'après les informations de séquence transmises par l'utilisateur. Ils servent à :

Action	Exemple
Effectuer des études de génotypage concernant tous les polymorphismes de nucléotides simples (SNP) possibles dans tous les organismes	AGTTCATCCATGGTCA --> AGTTCATACATGGTCA Annoté : AGTTCAT[C/A]CATGGTCA
Détecter les insertions/délétions (in/del) de six bases maximum pour les études de génotypage	AGTTCATCCATGGTCA --> AGTTCATGGTCA Annoté : AGTTCAT[CCAT/*]GGTCA
Détecter les polymorphismes de nucléotides multiples (MNP) jusqu'à six bases maximum pour les études de génotypage	AGTTCATCCGGTCA --> AGTTCATATGGTCA Annoté : AGTTCAT[CC/AT]GGTCA

Les essais utilisent les réactifs TaqMan pour amplifier et détecter les polymorphismes spécifiques dans l'ADN génomique purifié (ADNg). Tous les essais sont développés au moyen d'un logiciel de dessin exclusif.

### Propriétés des produits

Tous les essais Custom TaqMan SNP Genotyping Assays :

- Requièrent la création d'un fichier de soumission (à l'aide du logiciel gratuit File Builder) avec la séquence SNP cible et l'envoi du fichier au service Custom TaqMan® Genomic Assays.
- Nécessitent trois composants :
  - 1 à 20 ng d'échantillon d'ADNg purifié par puits.

**Remarque :** Il est possible d'utiliser des échantillons d'ADNc. Toutefois, Applied Biosystems ne recommande actuellement pas d'utiliser l'ADNc avec les essais Custom TaqMan SNP Genotyping Assays.

- Essai 40X ou 80X SNP Genotyping Assay (spécifique de chaque polymorphisme). Chaque essai est composé d'amorces sens et anti-sens spécifiques de la séquence pour amplifier le SNP concerné et de deux sondes TaqMan MGB : une sonde marquée avec le fluorophore VIC détecte la séquence d'allèle 1, une sonde marquée avec le fluorophore FAM détecte la séquence d'allèle 2.
- Master mix TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR (avec ou sans AmpErase<sup>®</sup> UNG).
- Sont conçus et optimisés pour fonctionner avec le master mix TaqMan Universal PCR (avec ou sans AmpErase UNG), dans des conditions de thermocyclage universelles.
- Requièrent l'amplification par PCR et une lecture en point final pour obtenir des résultats.

**Pour plus  
d'informations**

- Pour plus d'informations sur les derniers produits disponibles et sur leurs recommandations d'utilisation, consulter le site Internet d'Applied Biosystems :  
**<http://www.appliedbiosystems.com/>**
  - a. Sur la page d'accueil, sous TaqMan<sup>®</sup> Products (Produits TaqMan), sélectionner **TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays** (Essais TaqMan SNP Genotyping Assays).
  - b. Sur la page SNP Genotyping Assays (Essais SNP Genotyping Assays), sous Custom Assays (Essais personnalisés), sélectionner **Custom TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays** (Essais Custom TaqMan SNP Genotyping Assays).
- Pour plus d'informations sur la commande d'essais Custom TaqMan SNP Genotyping Assays, voir le document *Custom TaqMan<sup>®</sup> Genomic Assays Protocol: Submission Guidelines*.
- Pour plus d'informations sur la préparation des réactions de PCR avec les essais Custom TaqMan SNP Genotyping Assays, voir le document *Custom TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays Protocol*.

## Sélection du master mix

**Master mix disponibles** Les essais fabriqués sur commande d'Applied Biosystems pour les réactions de génotypage sont conçus pour fonctionner avec les master mix TaqMan suivants :

Master mix	Référence
Master mix TaqMan® 2X Universal PCR, 200 réactions	4304437
Master mix TaqMan® 2X Universal PCR, 2 000 réactions	4326708
Boîte de 10, master mix TaqMan® 2X Universal PCR	4305719
Master mix TaqMan® 2X Universal PCR, No AmpErase® UNG, 200 réactions	4324018
Master mix TaqMan® 2X Universal PCR, No AmpErase® UNG, 2 000 réactions	4326614
Boîte de 10, master mix TaqMan® 2X Universal PCR, No AmpErase® UNG	4324020

**Remarque :** Les réactions de génotypage ne sont pas validées avec le master mix TaqMan® Fast Universal PCR.

**Pour plus d'informations** Pour plus d'informations sur l'utilisation des master mix TaqMan, voir le document *TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol*.

## Conception de l'expérience

**Utilisation du logiciel StepOne** Pour les essais personnalisés d'Applied Biosystems, utiliser le logiciel StepOne afin de créer la réaction de génotypage. Il calcule automatiquement les volumes pour les :

- Composants du mélange réactionnel
- Dilutions d'échantillons

**Remarque :** Pour sélectionner un essai SNP dans le logiciel StepOne, accéder à l'écran SNP Assays (Essais SNP) dans le workflow de l'assistant de programmation Design Wizard ou à l'écran Plate Setup (Configuration de la plaque) dans le workflow Advanced Setup (Configuration avancée). Dans l'écran SNP Assays (Essais SNP) ou Plate Setup (Configuration de la plaque), il est possible de sélectionner un essai dans la bibliothèque ou d'en créer un nouveau.

**Pour plus d'informations** Pour plus d'informations sur la création et la réalisation de réactions de génotypage sur le système StepOne, voir le *Guide de mise en route pour les réactions de génotypage sur le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™*.



# Expériences de présence/absence

---

# 5

Sommaire du chapitre :

Section 5.1 À propos des expériences de présence/absence . . .	5-3
Section 5.2 Instructions de préparation . . . . .	5-9





## Section 5.1 À propos des expériences de présence/absence

---

Sommaire de la section :

Présentation .....	5-4
Sélection du type d'essai .....	5-5

## Présentation

### Qu'est-ce qu'une expérience de présence/absence ?

Une expérience de présence/absence est réalisée en point final pour indiquer la présence ou l'absence d'une séquence d'acide nucléique spécifique (cible) dans un échantillon. La quantité réelle de cible n'est pas déterminée.

Les expériences de présence/absence sont couramment utilisées pour détecter la présence ou l'absence d'un pathogène, notamment de type viral ou bactérien. Par exemple, une expérience de présence/absence peut être utilisée pour déterminer si la bactérie *Salmonella* est présente dans la viande d'un hamburger. Les résultats montrent si la bactérie *Salmonella* est présente ou non, mais la quantité n'est pas déterminée.

### Composants

Les réactions de PCR pour les expériences de présence/absence incluent les composants suivants :

- **Échantillon** – Échantillon dans lequel la présence de la cible est inconnue.
- **Réplicats** – Réactions identiques contenant des composants et des volumes identiques.
- **Contrôle positif interne (IPC)** – Échantillon d'ADN synthétique court ajouté aux réactions de PCR. L'IPC peut être utilisé pour distinguer les vrais résultats négatifs et les réactions affectées par les inhibiteurs de PCR, une préparation incorrecte de l'expérience ou une défaillance du réactif ou de l'instrument.
- **Puits de contrôle négatif avec IPC bloqué** – Puits qui contient un agent de blocage de l'IPC à la place de l'échantillon dans la réaction de PCR. Aucune amplification ne doit se produire dans les puits de contrôle négatif avec IPC bloqué car la réaction ne contient pas d'échantillon et l'amplification de l'IPC est bloquée.
- **Puits IPC à contrôle négatif** – Puits qui contient un échantillon d'IPC et du tampon ou de l'eau à la place de l'échantillon dans la réaction de PCR. Seul l'échantillon d'IPC doit être amplifié dans les puits IPC à contrôle négatif car la réaction ne contient pas d'échantillon.

**Remarque :** Les expériences de présence/absence peuvent être effectuées sans IPC. Toutefois, celui-ci garantit qu'une PCR erronée n'est pas considérée comme un résultat de test négatif.

### Détection en point final et lecture de plaque post-PCR

Les expériences de présence/absence sont réalisées en point final pour collecter les données de fluorescence une fois la PCR terminée.

Pour faciliter l'identification des causes d'erreurs dans les expériences de présence/absence, il est possible d'utiliser le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ afin de réaliser une PCR en temps réel. Si le système StepOne™ est utilisé pour l'amplification par PCR, effectuer séparément les lectures pré-PCR et post-PCR.

## Fonctionnement des expériences de présence/absence

Pendant la PCR, les sondes marquées par un fluorophore s'hybrident spécifiquement sur la cible complémentaire entre les sites d'amorces sens et anti-sens de l'échantillon d'ADN. Pendant l'extension, la polymérase AmpliTaq Gold® DNA Polymerase clive les sondes hybridées dans chaque échantillon contenant la cible. Le clivage de chaque sonde spécifique sépare le reporter du quencher, ce qui augmente la fluorescence du reporter.

Après la réaction de PCR, l'instrument StepOne™ lit la fluorescence générée pendant l'amplification par PCR. Les signaux fluorescents sont utilisés pour déterminer la présence ou l'absence de la cible dans chaque échantillon. Les signaux du reporter sont normalisés sur l'émission d'une référence passive, comme suit :

$$R_{n(TT)} = \frac{\text{Intensité de l'émission de la séquence du gène cible}}{\text{Intensité de l'émission de la référence passive}}$$

$$R_{n(IPC)} = \frac{\text{Intensité de l'émission du contrôle positif interne}}{\text{Intensité de l'émission de la référence passive}}$$

### Incorporation d'un IPC

Un IPC est un deuxième ensemble d'amorces et de sondes TaqMan® ajouté à la plaque de réactions pour détecter un acide nucléique constitutif présentant un faible nombre de copies. L'IPC et la cible sont amplifiés simultanément dans le même puits de réaction. Si un puits ne présente pas d'amplification, le logiciel StepOne™ utilise le signal positif de l'IPC pour confirmer l'amplification nulle du puits par absence de séquence cible, et non à cause d'une imprécision de pipetage ou d'une inhibition.

**Remarque :** Les expériences de présence/absence peuvent être effectuées sans IPC. Toutefois, celui-ci garantit qu'une PCR erronée n'est pas considérée comme un résultat de test négatif.

### Workflow

Avant de démarrer une expérience de présence/absence sur le système StepOne, elle doit être préparée comme suit :

1. Sélectionner le type d'essai (ci-dessous).
2. Consulter les instructions de préparation selon le type d'essai sélectionné (Section 5.2 à la page 5-9).

## Sélection du type d'essai

Lors de la création d'une expérience avec le logiciel StepOne, il est possible de sélectionner les types d'essais suivants pour les expériences de présence/absence :

- En stock/fabriqués sur commande (page 5-6)
- Personnalisés (page 5-7)

Cette section répertorie les produits disponibles pour chaque type d'essai.

**Remarque :** Les essais sont spécifiques de la cible étudiée. Les master mix contiennent les autres composants nécessaires à la réaction de PCR.

**Remarque :** Les réactifs TaqMan® Fast et SYBR® Green ne sont pas validés pour les expériences de présence/absence.

**Essais en stock/fabriqués sur commande**

Produit	Attributs
Essais TaqMan® Gene Expression Assays	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ensembles préconçus d'amorces et de sondes spécifiques pour les gènes de l'homme, de la souris, du rat, de <i>Arabidopsis</i>, <i>Drosophila</i>, <i>C. elegans</i>, <i>C. familiares</i> (chien) et Rhésus.</li> <li>• Format prêt à l'emploi en un seul tube, disponible sous la forme d'essais en stock ou fabriqués sur commande.</li> </ul>
Essais TaqMan® Endogenous Control Assays <b>Remarque :</b> Les essais TaqMan Endogenous Control Assays existent sous la forme d'essais TaqMan Gene Expression en stock.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Essais de contrôle endogène optimisés, préformulés et prêts à l'emploi.</li> <li>• Quantification économique de l'expression génétique pour l'homme, la souris, le rat, les espèces <i>Arabidopsis</i>, <i>Drosophila</i> et toutes les espèces eucaryotes.</li> <li>• Choix entre les fluorophores FAM™ et VIC® (limité en amorces).</li> </ul>
Essais Custom TaqMan® Gene Expression Assays	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tous les organismes ou espèces.</li> <li>• Choix de la cible.</li> <li>• Format prêt à l'emploi en un seul tube.</li> </ul>
Master mix TaqMan® 2X Universal PCR (avec ou sans AmpErase® UNG)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Performances optimales pour les quantifications en TaqMan® à partir d'échantillons d'ADNc ou d'ADN.</li> <li>• Contient des composants qui assurent d'excellentes performances aux essais.</li> <li>• L'utilisation d'un seul réactif pour tous les essais simplifie le processus expérimental.</li> </ul>

**IMPORTANT !** Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA™ comme reporter ou quencher avec le système StepOne.

Pour obtenir des instructions de préparation des expériences avec des essais en stock/fabriqués sur commande, voir page 5-10.

**Essais personnalisés**

<b>Produit</b>	<b>Attributs</b>
Sondes et amorces TaqMan® personnalisées	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tous les organismes ou espèces.</li> <li>• Choix des fluorophores, quenchers et échelles de synthèse.</li> <li>• Compatibles avec le logiciel Primer Express® et les recommandations de préparation des essais d'Applied Biosystems.</li> </ul>
Logiciel Primer Express®	Logiciel de dessin d'amorces et de sondes pour la PCR en temps réel.
Master mix TaqMan® 2X Universal PCR (avec ou sans AmpErase® UNG)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Performances optimales pour les quantifications en TaqMan® à partir d'échantillons d'ADNc ou d'ADN.</li> <li>• Contient des composants qui assurent d'excellentes performances aux essais.</li> <li>• L'utilisation d'un seul réactif pour tous les essais simplifie le processus expérimental.</li> </ul>

**IMPORTANT !** Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA™ comme reporter ou quencher avec le système StepOne.

Pour obtenir des instructions de préparation des expériences avec des essais personnalisés, voir page 5-15.



## Section 5.2 Instructions de préparation

---

Sommaire de la section :

Essais en stock/fabriqués sur commande . . . . .	5-10
Essais TaqMan® Gene Expression Assays . . . . .	5-10
Essais Custom TaqMan® Gene Expression Assays . . . . .	5-12
Réactifs TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents . . . . .	5-13
Sélection du master mix . . . . .	5-14
Conception de l'expérience . . . . .	5-15
Essais personnalisés . . . . .	5-15

## Essais en stock/fabriqués sur commande

**Workflow** Si le type d'essai sélectionné dans le logiciel StepOne™ est Inventoried/Made to Order (En stock/Fabriqué sur commande), Applied Biosystems recommande de suivre le workflow ci-dessous :

1. Sélectionner l'essai :
  - Essais TaqMan® Gene Expression Assays (ci-dessous).
  - Essais Custom TaqMan® Gene Expression Assays (page 5-12).
2. Utiliser les réactifs TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents (page 5-13).

**Remarque** : Les expériences de présence/absence peuvent être effectuées sans IPC. Toutefois, celui-ci garantit qu'une PCR erronée n'est pas considérée comme un résultat de test négatif.

3. Sélectionner le master mix (page 5-14).
4. Créer l'expérience à l'aide du logiciel StepOne (page 5-15).

## Essais TaqMan® Gene Expression Assays

**Description des produits** Les essais TaqMan® Gene Expression Assays comprennent une gamme complète d'ensembles d'amorces et de sondes en stock et fabriqués sur commande compatibles avec les expériences de présence/absence sur les gènes de l'homme, de la souris, du rat, de *Arabidopsis*, *Drosophila*, *C. elegans*, *C. familiares* (chien) et Rhésus.

Chaque essai est créé à l'aide d'un processus automatisé soumis à des contrôles qualité. Les essais en stock sont fabriqués et intégrés aux réserves. Les essais fabriqués sur commande sont préconçus et fabriqués lors de la commande.

**Propriétés des produits** Tous les essais TaqMan Gene Expression Assays :

- Nécessitent trois composants :
  - 1 à 100 ng d'échantillon d'ADNc (converti à partir d'ARN) par puits, avec la même quantité d'ADNc dans chaque puits de l'étude.
  - Mélange 20X d'essai Gene Expression Assay Mix (spécifique de chaque cible). Chaque mix primers-sonde contient deux amorces PCR non marquées et une sonde TaqMan® MGB (ligand du petit sillon) marquée par le fluorophore FAM™ dans un mix prêt à l'emploi à 20X. Les concentrations finales à 1X sont de 250 nM pour la sonde et de 900 nM pour chaque amorce.
  - Master mix TaqMan® Universal PCR (avec ou sans AmpErase® UNG).
- Sont conçus et optimisés pour fonctionner avec le master mix TaqMan Universal PCR (avec ou sans AmpErase UNG), dans des conditions de thermocyclage universelles.
- Si possible, amplifier l'ADNc cible sans amplifier l'ADN génomique (suffixe *m* dans l'ID de l'essai) en créant des sondes spécifiques des jonctions exon-exon.



**Essais disponibles**

Les essais TaqMan Gene Expression Assays sont disponibles pour les gènes de l'homme, de la souris, du rat, de *Arabidopsis*, *Drosophila*, *C. elegans*, *C. familiares* (chien) et Rhésus. Numéros de référence :

- Réf. 4331182 pour les essais en stock
- Réf. 4351372 pour les essais fabriqués sur commande

Le préfixe du nom de l'essai indique l'espèce pour laquelle il a été conçu : *Hs* pour *Homo sapiens* (homme), *Mm* pour *Mus musculus* (souris), *Rn* pour *Rattus norvegicus* (rat), *At* pour *Arabidopsis thaliana*, *Dm* pour *Drosophila melanogaster*, *Ce* pour *C. elegans*, *Cf* pour *C. familiares* (chien) et *Rh* pour Rhésus.

Le suffixe du nom de l'essai indique sa position, comme décrit dans le tableau ci-dessous.

Suffixe	Description
<i>_m</i>	La sonde de l'essai porte sur une jonction d'exons, l'essai ne détecte pas l'ADN génomique.
<i>_s</i>	Les amorces et les sondes de l'essai sont définies dans un exon unique, l'essai détecte l'ADN génomique.
<i>_g</i>	Il est possible que les amorces et les sondes de l'essai se situent dans un exon unique, l'essai peut détecter l'ADN génomique.
<i>_mH</i>	L'essai a été conçu pour un transcrite d'une famille de gènes présentant une homologie de séquence élevée. L'essai prévoit une différence de 10 C <sub>T</sub> à 15 C <sub>T</sub> entre le gène cible et le gène ayant l'homologie de séquence la plus proche. Par conséquent, l'essai détecte le transcrite cible avec une discrimination (sensibilité) 1 000 à 3 000 fois supérieure au transcrite homologue le plus proche s'ils présentent le même nombre de copies dans l'échantillon.
<i>_sH</i>	
<i>_gH</i>	
<i>_u</i>	L'amplicon de l'essai porte sur une jonction d'exons et la sonde se situe entièrement dans l'un des exons concernés.

**Essais TaqMan® Endogenous Control Assays**

Les essais TaqMan® Endogenous Control Assays existent sous la forme d'essais TaqMan Gene Expression Assays en stock (réf. 4331182). Les essais TaqMan Endogenous Control Assays sont :

- Disponibles sous la forme d'un essai TaqMan Gene Expression Assay avec une sonde TaqMan MGB marquée par le fluorophore FAM™ dans un tube unique, préformulé à 20X.
- Disponibles pour l'homme, la souris et le rat, avec des sondes TaqMan MGB marquées par le fluorophore VIC® ou FAM™. Les contrôles endogènes TaqMan marqués par le fluorophore VIC sont limités en amorces.

**IMPORTANT !** Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA™ comme reporter ou quencher avec le système StepOne.

### Pour plus d'informations

- Pour plus d'informations sur les derniers produits disponibles et sur leurs recommandations d'utilisation, consulter le site Internet d'Applied Biosystems : <http://www.appliedbiosystems.com/>
  - a. Sur la page d'accueil, sous TaqMan® Products (Produits TaqMan), sélectionner **TaqMan® Gene Expression Assays** (Essais TaqMan Gene Expression Assays).
  - b. Sur la page Gene Expression Assays & Arrays (Essais et puces Gene Expression Assays & Arrays), sélectionner **TaqMan® Gene Expression Assays** (Essais TaqMan Gene Expression Assays) sous Individual Assays (Essais individuels).
- Pour plus d'informations sur les essais Custom TaqMan Endogenous Control Assays, voir le document *Using TaqMan® Endogenous Control Assays to Select an Endogenous Control for Experimental Studies Application Note*.
- Pour plus d'informations sur la préparation des réactions de PCR en utilisant les essais TaqMan Gene Expression Assays, voir le document *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*.

## Essais Custom TaqMan® Gene Expression Assays

### Description des produits

Les essais Custom TaqMan® Gene Expression Assays sont des ensembles d'amorces et de sondes TaqMan conçus, synthétisés et formulés par le service Custom TaqMan® Genomic Assays d'après les informations de séquence transmises par l'utilisateur. Ils permettent d'effectuer des expériences de présence/absence sur tous les gènes ou variants d'épissage dans n'importe quel organisme.

Les essais utilisent des réactifs TaqMan pour amplifier et détecter la cible dans les échantillons d'ADNc. Tous les essais sont développés au moyen d'un logiciel de dessin exclusif.

### Propriétés des produits

Tous les essais Custom TaqMan Gene Expression Assays :

- Requièrent la création d'un fichier de soumission (à l'aide du logiciel gratuit File Builder) avec la séquence cible et l'envoi du fichier au service Custom TaqMan Genomic Assays.
- Nécessitent trois composants :
  - 1 à 100 ng d'échantillon d'ADNc (converti à partir d'ARN) par puits, avec la même quantité d'ADNc dans chaque puits de l'étude.
  - Essai 20X Gene Expression Assay ou 60X Gene Expression Assay (spécifique de chaque cible). Chaque essai contient deux amorces spécifiques de la cible et une sonde TaqMan MGB marquée par le fluorophore FAM™ dans un mix prêt à l'emploi à 20X ou à 60X. Les concentrations finales à 1X sont de 250 nM pour la sonde et de 900 nM pour chaque amorce.
  - Master mix TaqMan® Universal PCR (avec ou sans AmpErase® UNG).
- Sont conçus et optimisés pour fonctionner avec le master mix TaqMan Universal PCR (avec ou sans AmpErase UNG), dans des conditions de thermocyclage universelles.

**Pour plus d'informations**

- Pour plus d'informations sur les derniers produits disponibles et sur leurs recommandations d'utilisation, consulter le site Internet d'Applied Biosystems : <http://www.appliedbiosystems.com/>
  - a. Sur la page d'accueil, sous TaqMan® Products (Produits TaqMan), sélectionner **TaqMan® Gene Expression Assays** (Essais TaqMan Gene Expression Assays).
  - b. Sur la page Gene Expression Assays & Arrays (Essais et puces Gene Expression Assays & Arrays), sélectionner **Custom TaqMan® Gene Expression Assays** (Essais Custom TaqMan Gene Expression Assays) sous Individual Assays (Essais individuels).
- Pour plus d'informations sur la commande d'essais Custom TaqMan Gene Expression Assays, voir le document *Custom TaqMan® Genomic Assays Protocol: Submission Guidelines*.
- Pour plus d'informations sur la préparation des réactions de PCR en utilisant les essais Custom TaqMan Gene Expression Assays, voir le document *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*.

**Réactifs TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents****Description des produits**

Les réactifs Applied Biosystems TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents contiennent :

- Un contrôle positif interne (IPC) avec des amorces et sondes préconçues
- Un échantillon d'ADN pour l'IPC
- Un contrôle de blocage pour l'IPC

Les réactifs sont conçus pour :

- Distinguer les différents types de résultats négatifs :
  - Une assignation négative pour la cible et une assignation positive pour l'IPC indiquent qu'aucune cible n'est présente.
  - Une assignation négative pour la cible et pour l'IPC suggère l'inhibition de la PCR.
- Remplacer les contrôles endogènes.
- Permettre la coamplification de l'IPC et de la cible sans compromettre l'amplification de la cible.
- Détecter l'IPC en utilisant une sonde marquée par le fluorophore VIC®.
- Détecter la cible en utilisant une sonde marquée par le fluorophore FAM™.

**Propriétés des produits**

Les TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents Kits :

- Nécessitent les composants suivants :
  - Échantillon d'ADN.
  - Essai TaqMan pour la cible concernée.
  - Master mix TaqMan® 2X Universal PCR.
- Sont conçus et optimisés pour fonctionner avec le master mix TaqMan 2X Universal PCR, dans des conditions de thermocyclage universelles.

**Kits disponibles** Les TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents Kits suivants sont disponibles auprès d'Applied Biosystems :

Kit	Référence
TaqMan <sup>®</sup> Exogenous Internal Positive Control Reagents with TaqMan <sup>®</sup> 2X Universal PCR Master Mix (with VIC <sup>®</sup> dye)	4308320
TaqMan <sup>®</sup> Exogenous Internal Positive Control Reagents <b>Remarque</b> : Si ce kit est utilisé, un de ces réactifs TaqMan <sup>®</sup> doit être acheté séparément : <ul style="list-style-type: none"> <li>• TaqMan<sup>®</sup> 2X Universal PCR Master Mix (réf. 4304437)</li> <li>• TaqMan<sup>®</sup> PCR Core Reagents Kit (réf. N808-0228)</li> </ul>	4308323

**Pour plus d'informations** Pour plus d'informations sur la préparation des réactions de PCR avec les réactifs TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagents, voir le document *TaqMan<sup>®</sup> Exogenous Internal Positive Control Reagents Protocol*.

## Sélection du master mix

**Master mix disponibles** Les essais en stock/fabriqués sur commande d'Applied Biosystems pour les expériences de présence/absence sont conçus pour fonctionner avec les master mix TaqMan<sup>®</sup> suivants :

Master mix	Référence
Master mix TaqMan <sup>®</sup> 2X Universal PCR, 200 réactions	4304437
Master mix TaqMan <sup>®</sup> 2X Universal PCR, 2 000 réactions	4326708
Boîte de 10, master mix TaqMan <sup>®</sup> 2X Universal PCR	4305719
Master mix TaqMan <sup>®</sup> 2X Universal PCR, No AmpErase <sup>®</sup> UNG, 200 réactions	4324018
Master mix TaqMan <sup>®</sup> 2X Universal PCR, No AmpErase <sup>®</sup> UNG, 2 000 réactions	4326614
Boîte de 10, master mix TaqMan <sup>®</sup> 2X Universal PCR, No AmpErase <sup>®</sup> UNG	4324020
TaqMan <sup>®</sup> PCR Core Reagents Kit	N808-0228

**Remarque** : En cas d'achat du TaqMan<sup>®</sup> Exogenous Internal Positive Control Reagents with TaqMan<sup>®</sup> 2X Universal PCR Master Mix (réf. 4308320), il n'est pas nécessaire de se procurer le master mix séparément.

**Remarque** : Les expériences de présence/absence ne sont pas validées avec le master mix TaqMan<sup>®</sup> Fast Universal PCR.

**Pour plus d'informations** Pour plus d'informations sur l'utilisation des réactifs TaqMan, voir le document *TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix Protocol*.

## Conception de l'expérience

**Utilisation du logiciel StepOne** Pour les essais en stock/fabriqués sur commande d'Applied Biosystems, utiliser le logiciel StepOne afin de créer l'expérience de présence/absence. Il calcule automatiquement les volumes pour les :

- Composants du mélange réactionnel
- Contrôles et échantillons
- Dilutions d'échantillons

**Remarque :** Pour sélectionner le type d'essai (en stock/fabrique sur commande) dans le logiciel StepOne, accéder à l'écran Reaction Setup (Préparation des réactions) dans le workflow de l'assistant de programmation Design Wizard ou Advanced Setup (Configuration avancée), puis sélectionner **Inventoried/Made to Order** (En stock/Fabrique sur commande) dans le menu déroulant Assay Type (Type d'essai).

**Pour plus d'informations** Pour plus d'informations sur la création et la réalisation des expériences de présence/absence sur le système StepOne, voir le document *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments*.

## Essais personnalisés

**Workflow** Si le type d'essai Custom (Personnalisé) est sélectionné dans le logiciel StepOne™ pour une expérience de présence/absence (c'est-à-dire pour créer des amorces et des sondes personnalisées), il est recommandé de suivre le workflow des instructions de préparation des essais d'Applied Biosystems :

1. Créer des amorces et des sondes à l'aide du logiciel Primer Express® (page 3-21).
2. Sélectionner les réactifs adéquats (page 3-24).

**IMPORTANT !** Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA™ comme reporter ou quencher avec le système StepOne.

**Remarque :** Les réactifs TaqMan® Fast et SYBR® Green ne sont pas validés pour les expériences de présence/absence.

3. Utiliser les conditions de thermocyclage recommandées (page 3-26).
4. Commencer avec les concentrations d'amorce et de sonde par défaut. Si nécessaire, optimiser les concentrations d'amorce (page 3-29) et de sonde (page 3-33).

**IMPORTANT !** Ces étapes permettent de concevoir et d'optimiser les essais de manière fiable et rapide uniquement lorsqu'elles sont utilisées dans leur globalité. Respecter l'ensemble du processus pour atteindre des résultats optimaux. Pour obtenir une description plus détaillée des instructions de préparation des essais d'Applied Biosystems, voir l'Annexe C.

**Remarque :** Pour sélectionner le type d'essai Custom (Personnalisé) dans le logiciel StepOne, accéder à l'écran Reaction Setup (Préparation des réactions) dans le workflow de l'assistant de programmation Design Wizard ou Advanced Setup (Configuration avancée), puis sélectionner **Custom** (Personnalisé) dans le menu déroulant Assay Type (Type d'essai).

## Formule pour les expériences de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de $C_T$ ( $\Delta\Delta C_T$ )

**Formule** La quantité de cible, normalisée sur un contrôle endogène et par rapport un échantillon de référence, est calculée par la formule suivante :

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

**Dérivée de la formule** L'équation qui décrit l'amplification exponentielle de la PCR est :

$$X_n = X_o \times (1 + E_X)^n$$

où :

- $x_n$  = nombre de molécules de cible au cycle n
- $x_o$  = nombre initial des molécules de cible
- $E_x$  = efficacité de l'amplification de la cible
- n = nombre de cycles
- $X_o$  = nombre initial des molécules de cible

Le cycle seuil ( $C_T$ ) indique le nombre de cycles où la quantité de cible amplifiée atteint un seuil défini. Ainsi,

$$X_T = X_o \times (1 + E_X)^{C_{T,X}} = K_X$$

où :

- $x_T$  = nombre seuil de molécules de cible
- $C_{T,X}$  = cycle seuil pour l'amplification de la cible
- $K_X$  = constantes

Une équation identique est utilisée pour la réaction du contrôle endogène :

$$R_T = R_o \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R$$

où :

- $R_T$  = nombre seuil des molécules de référence
- $R_o$  = nombre initial des molécules de référence
- $E_R$  = efficacité de l'amplification de la référence

- $C_{T,R}$  = cycle seuil pour l'amplification de la référence
- $K_R$  = constantes

La division de  $X_T$  par  $R_T$  produit l'expression suivante :

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_o \times (1 + E_X)^{C_{T,X}}}{R_o \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_X}{K_R} = K$$

Les valeurs exactes de  $X_T$  et  $R_T$  dépendent de plusieurs facteurs, notamment :

- Le reporter utilisé dans la sonde
- Les effets contextuels de la séquence sur les propriétés de fluorescence de la sonde
- L'efficacité du clivage de la sonde
- La pureté de la sonde
- Le paramétrage du seuil de fluorescence

Par conséquent, la constante  $K$  ne doit pas nécessairement être égale à 1.

Les efficacités supposées de la cible et de la référence sont les mêmes :

$$E_X = E_R = E$$

$$\frac{X_o}{R_o} \times (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K$$

Ou

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_T} = K$$

où :

- $X_N = X_O/R_O$ , quantité de cible normalisée
- $\Delta C_T = C_{T,X} - C_{T,R}$ , différence de cycle seuil pour la cible et la référence

La réorganisation produit l'expression suivante :

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_T}$$



L'étape finale consiste à diviser la valeur  $X_N$  d'un échantillon (q) par la valeur  $X_N$  de l'échantillon de référence (cb) :

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T}$$

où :

- $\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb}$

Pour les amplicons générés et optimisés selon les instructions de préparation des essais d'Applied Biosystems (taille d'amplicon <150 pb), l'efficacité est proche de 1. Par conséquent, la quantité de cible, normalisée sur un contrôle endogène et par rapport à un échantillon de référence, est calculée par la formule :

$$2^{-\Delta \Delta C_T}$$



# Limitation des amorces dans la PCR multiplex

# B

Pour générer une quantification en multiplex précise, il est important que l'amplification d'une espèce ne domine pas l'autre. Sinon, l'amplification d'une espèce très abondante peut empêcher celle de l'espèce moins abondante. Si l'espèce la moins abondante n'est pas amplifiée correctement, l'expérience peut produire des résultats imprécis. Dans les cas extrêmes, la détection de l'espèce la moins abondante peut être totalement inhibée. Cette situation peut être évitée en limitant la concentration des amorces utilisées pour amplifier l'espèce la plus abondante, ce qui « désamorce » l'amplification aussitôt après la détermination de la valeur  $C_T$ .

La limitation des amorces n'épuise pas les composants de la réaction communs aux deux essais, ce qui permet à l'amplification de l'espèce la moins abondante de se poursuivre très efficacement. Si l'espèce la plus abondante n'est pas choisie, il convient de la déterminer avant d'effectuer la PCR multiplex en séparant les deux cibles dans des tubes distincts. Les deux amplifications doivent être limitées en amorces si aucune des espèces n'est constamment plus abondante que l'autre.

## Prise en compte de l'abondance relative de la cible et de la référence

En appliquant la limitation des amorces aux amplifications de la cible et du contrôle endogène, l'abondance relative des deux espèces doit être prise en compte. Pour les expériences de quantification, il est possible d'utiliser l'ARNr comme contrôle endogène. La concentration d'ARNr dans l'ARN total est toujours supérieure à celle de l'ARNm cible. Par conséquent, dans les réactions multiplex qui amplifient la cible et l'ARNr, seule la concentration des amorces d'ARNr doit être limitée.

## Matrice de limitation des amorces

Pour définir les concentrations de limites des amorces, réaliser une matrice des concentrations d'amorces sens et anti-sens. L'objectif est d'identifier les concentrations d'amorces qui réduisent la valeur  $\Delta R_n$  de l'essai sans affecter la valeur  $C_T$ . Le tableau ci-dessous montre une matrice recommandée pour les amorces sens et anti-sens dont les concentrations varient de 20 à 100 nM.

**Remarque :** Bien que le respect de tous les critères de conception facilite l'identification des concentrations limites des amorces, ce n'est pas forcément applicable à tous les essais. Si une expérience de matrice de limitation des amorces ne permet pas d'identifier les concentrations requises, il est nécessaire de redéfinir au moins une amorce ou d'effectuer les réactions dans des tubes distincts.

Amorce sens : Amorce anti-sens :	100 nM 100 nM	100 nM 80 nM	100 nM 60 nM	100 nM 40 nM	100 nM 20 nM
Amorce sens : Amorce anti-sens :	80 nM 100 nM	80 nM 80 nM	80 nM 60 nM	80 nM 40 nM	80 nM 20 nM
Amorce sens : Amorce anti-sens :	60 nM 100 nM	60 nM 80 nM	60 nM 60 nM	60 nM 40 nM	60 nM 20 nM

Amorce sens :	40 nM	40 nM	40 nM	40 nM	40 nM
Amorce anti-sens :	100 nM	80 nM	60 nM	40 nM	20 nM
Amorce sens :	20 nM	20 nM	20 nM	20 nM	20 nM
Amorce anti-sens :	100 nM	80 nM	60 nM	40 nM	20 nM

**Exemple** Les résultats d'une expérience de matrice de limitation des amorces sont indiqués dans la Figure B-1 à la page B-3 :

- La Figure B-1a montre que la valeur  $C_T$  n'est notablement affectée que si la concentration des amorces est réduite sous la barre des 50 nM environ. La zone de plateau montre la région dans laquelle la concentration limite des amorces adéquate est possible. Dans cette zone, la valeur  $C_T$  (et par conséquent la valeur de quantification correspondante) reste inchangée, tandis que la valeur  $\Delta R_n$  et le rendement du produit correspondant sont considérablement réduits.
- La Figure B-1b montre la relation entre la concentration des amorces et la valeur  $\Delta R_n$ . La figure démontre qu'il est possible d'atteindre des rendements de produit inférieurs en diminuant la concentration des amorces sens et anti-sens.

Dans cet exemple, la concentration des amorces limitées doit être d'au moins 50 nM pour les amorces sens et anti-sens afin de produire les meilleurs résultats. La concentration de sonde doit rester à un niveau optimal même lorsque l'essai est limité en amorces afin de garantir un signal suffisant pour que le logiciel obtienne des données multicomponentielles précises.

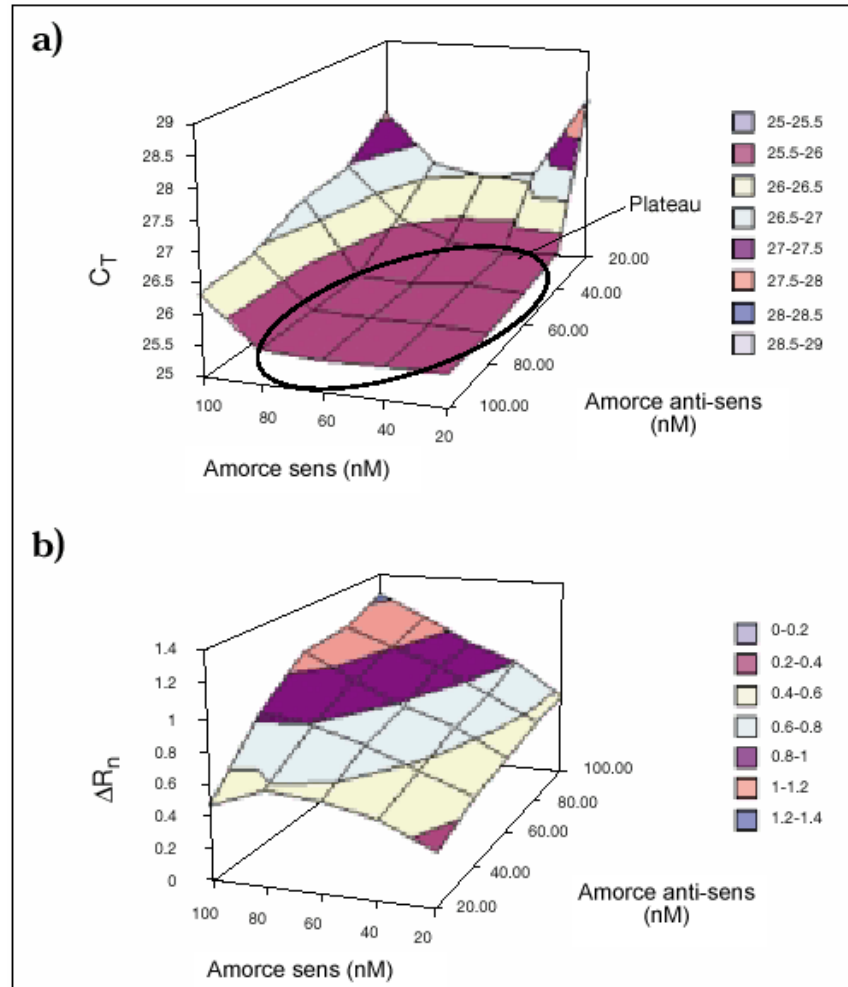


Figure B-1 Résultats de l'expérience de matrice de limitation des amorces  
 (a) Montre dans quelle mesure la valeur  $C_T$  est affectée par l'écart de concentration des amorces sens et anti-sens. La zone de plateau montre la région où la valeur  $C_T$  reste constante.  
 (b) Montre la réduction des valeurs de  $\Delta R_n$  lorsque la concentration des amorces diminue.



# Instructions de préparation des essais



## À propos des instructions de préparation des essais

Si des essais (amorces et sondes) personnalisés sont créés, il est recommandé de suivre les instructions de préparation des essais d'Applied Biosystems. Les instructions de préparation des essais expliquent la marche à suivre :

1. **Créer des amorces et des sondes à l'aide du logiciel Primer Express®** – Le logiciel Primer Express utilise une série de paramètres par défaut permettant la sélection automatique des ensembles d'amorces et de sondes.
2. **Sélectionner les réactifs appropriés** – Plusieurs réactifs TaqMan® et SYBR® Green sont disponibles. Les réactifs utilisés dépendent du type d'essai.
3. **Utiliser les conditions de thermocyclage recommandées** – Appliquer ces conditions selon l'échantillon (ADN/ADNc, ARN avec PCR 1 étape et ARN avec PCR 2 étapes).

**Remarque :** Les réactifs Fast et standard nécessitent des conditions de thermocyclage différentes.

4. **Utiliser les concentrations d'amorces et de sonde par défaut ou les optimiser** – D'après les instructions de préparation des essais d'Applied Biosystems, il est possible d'utiliser les concentrations d'amorces et de sonde par défaut pour les essais optimisés en simplex ou d'optimiser les concentrations d'amorces et de sonde.

**IMPORTANT !** Ces étapes permettent de concevoir et d'optimiser les essais de manière fiable et rapide uniquement lorsqu'elles sont utilisées dans leur globalité. Respecter l'ensemble du processus pour atteindre des résultats optimaux.

**Remarque :** Les instructions de préparation des essais d'Applied Biosystems ne garantissent pas les mêmes niveaux de performances et de sensibilité pour tous les essais. Même les critères de conception les plus scrupuleux ne peuvent pas anticiper toutes les éventuelles variations entre deux systèmes d'essai.

## Conclusions pour les expériences de quantification

En règle générale, l'utilisation des instructions de préparation des essais pour les expériences de quantification permet d'arriver aux conclusions suivantes :

- Avec la plupart des essais TaqMan, des concentrations de 900 nM pour les amorces et de 250-nM pour la sonde permettent d'obtenir un essai à reproductibilité et à sensibilité très fortes lorsque l'ADN ou l'ADNc est utilisé comme matrice génétique.
- Du fait d'une détection non spécifique, l'utilisation du fluorophore SYBR® Green I nécessite souvent une étape d'optimisation de la concentration en amorces. Toutefois, si les instructions sont suivies en intégralité, la concentration des amorces sens et anti-sens à 50 nM produisent généralement une forte amplification avec un bon niveau de spécificité lorsque l'ADN ou l'ADNc est utilisé comme matrice génétique. Vérifier ce résultat en analysant la courbe de fusion ou le dépôt sur gel pour contrôler si un produit non spécifique se forme.

- La plupart des essais TaqMan doivent permettre la détection et la quantification précise de <50 copies d'une cible, avec la plus grande sensibilité possible.
- Les essais SYBR Green fournissent des performances similaires. Toutefois, il est possible que la formation de produit non spécifique augmente la limite de détection minimale.

**Conclusions pour les réactions de génotypage**

En règle générale, l'utilisation des instructions de préparation des essais pour les réactions de génotypage permet d'arriver à la conclusion suivante :

Des amorces à 900 nM, des sondes à 200 nM et de 1 à 20 ng d'ADN génomique permettent d'obtenir des essais aux résultats reproductibles et sensibles.



# Bibliographie




- Afonina, I., Zivarts, M., Kutyavin, I., *et al.* 1997. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* 25:2657–2660.
- Förster, V. T. 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Physics (Leipzig)* 2:55–75.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10:413–417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. 1993. Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11:1026–1030.
- Kutyavin, I.V., Lukhtanov, E.A., Gamper, H.B., and Meyer, R.B. 1997. Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res.* 25:3718–3723.
- Kwok, S. and Higuchi, R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237–238.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *Methods* 25:402–408.
- Longo, M.C., Berninger, M.S., and Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93:125–128.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., *et al.* 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354.



# Glossaire

<b>Advanced Setup</b>	(Configuration avancée) Fonction du logiciel StepOne™ qui permet de configurer l'expérience selon le modèle expérimental établi.
<b>Agent de blocage d'IPC</b>	Réactif ajouté aux réactions de PCR pour bloquer l'amplification du contrôle positif interne (IPC).
<b>AIF</b>	Acronyme de « assay information file » (fichier d'informations sur l'essai).
<b>Allèles</b>	Pour une cible donnée, toutes les séquences différentes présentes dans une population.
<b>Amorce anti-sens</b>	Oligonucléotide homologue à l'extrémité 3' de la cible. L'amorce anti-sens et l'amorce sens sont utilisées simultanément dans les réactions de PCR pour amplifier la cible.
<b>Amorce sens</b>	Oligonucléotide homologue à l'extrémité 5' de la cible. L'amorce anti-sens et l'amorce sens sont utilisées simultanément dans les réactions de PCR pour amplifier la cible.
<b>Amplicon</b>	Segment d'ADN amplifié pendant la PCR.
<b>Amplification</b>	Période d'activité de l'instrument pendant laquelle la PCR est en phase d'élongation de la cible. Dans les expériences de quantification, les données de fluorescence collectées durant l'amplification sont affichées dans une courbe d'amplification et utilisées pour calculer les résultats. Si l'amplification est incluse dans les réactions de génotypage ou les expériences de présence/absence réalisées sur l'instrument StepOne™, les données de fluorescence collectées pendant l'amplification sont affichées dans une courbe d'amplification et peuvent être utilisées pour identifier les causes des erreurs.
<b>Amplification non conforme</b>	Pour un ensemble de données, point de données de valeur considérablement inférieure ou supérieure aux autres.
<b>Analyse en point final</b>	Expérience dans laquelle les données de fluorescence collectées dans une lecture post-PCR sont utilisées pour calculer le résultat des réactions de génotypage ou des expériences de présence/absence.

<b>Application</b>	<p>Fait référence au processus complet de l'activité du système StepOne™, notamment la configuration, la réalisation et l'analyse. Le système StepOne™ peut réaliser plusieurs applications :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Quantification absolue par les courbes standard</li><li>• Quantification relative par les courbes standard</li><li>• Quantification – Comparaison des valeurs de <math>C_T</math> (<math>\Delta\Delta C_T</math>)</li><li>• Courbe de fusion</li><li>• Génotypage</li><li>• Présence/absence</li></ul>
<b>Application</b>	<p>Le système StepOne™ peut réaliser plusieurs applications :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Quantification absolue par les courbes standard</li><li>• Comparaison des valeurs de <math>C_T</math> (<math>\Delta\Delta C_T</math>)</li><li>• Quantification relative par les courbes standard</li><li>• Courbe de fusion (non disponible dans l'assistant de programmation Design Wizard)</li><li>• Génotypage</li><li>• Présence/absence</li></ul> <p>L'application sélectionnée détermine le contenu des écrans Setup (Configuration), Run (Démarrer) et Analysis (Analyse).</p>
<b>Auto<math>\Delta</math></b>	<p>Réglage qui sert à augmenter ou à diminuer la température et/ou la durée de chaque cycle postérieur dans une phase de thermocyclage. Lorsque le réglage Auto<math>\Delta</math> est activé, les paramètres sont indiqués par une icône dans le profil thermique :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Auto<math>\Delta</math> activé : ▲</li><li>• Auto<math>\Delta</math> désactivé : ▲</li></ul>
<b>Bibliothèque d'échantillons</b>	<p>Ensemble des échantillons enregistrés dans le logiciel StepOne™. La bibliothèque contient le nom et la couleur de chaque échantillon.</p>
<b>Bibliothèque d'essais SNP</b>	<p>Ensemble des essais SNP enregistrés dans le logiciel StepOne™.</p>
<b>Bibliothèque de cibles</b>	<p>Ensemble des cibles enregistrées dans le logiciel StepOne™.</p>
<b>Calibrateur</b>	<p>Voir échantillon de référence.</p>
<b>Calibration spatiale</b>	<p>Type de calibration du système StepOne™ dans lequel le système analyse les positions des puits sur le bloc. Les données de calibration spatiale sont utilisées pour que le logiciel puisse associer les augmentations de fluorescence pendant une réaction de PCR à des puits spécifiques de la plaque de réactions.</p>
<b>Chimie</b>	<p>Voir réactif.</p>
<b>Cible</b>	<p>Séquence d'acide nucléique à amplifier et à détecter.</p>

<b>Coefficient de régression</b>	Valeur calculée à partir de la droite de régression dans les courbes standard, notamment la valeur $R^2$ , la pente et l'intersection avec l'axe Y. Les valeurs du coefficient de régression permettent notamment d'évaluer la qualité des résultats par rapport aux standards. Voir aussi courbe standard.
<b>Collecte des données</b>	<p>Pendant la réaction de PCR, processus au cours duquel un des composants recueille les données de fluorescence dans chaque puits de la plaque de réactions. L'instrument transforme le signal en données électroniques, lesquelles sont enregistrées dans le fichier de l'expérience. Un point de collecte des données est indiqué par une icône dans le profil thermique :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Collecte des données activée : </li> <li>• Collecte des données désactivée : </li> </ul>
<b>Comparaison des valeurs de <math>C_T</math> (<math>\Delta\Delta C_T</math>)</b>	Une des méthodes utilisées pour les expériences de quantification. Avec la comparaison des valeurs de $C_T$ ( $\Delta\Delta C_T$ ), les résultats par rapport à un échantillon de référence et à un contrôle endogène sont utilisés pour déterminer les quantités relatives d'une cible dans les échantillons.
<b>Configuration autonome</b>	Disposition du système dans laquelle l'instrument StepOne™ <i>n'est pas</i> connecté à un ordinateur par le câble jaune du système StepOne™. À la place, une clé USB (  ) est utilisée pour transférer les données entre les composants du système StepOne™. Dans cette disposition, l'instrument StepOne™ est contrôlé par l'écran tactile de l'instrument.
<b>Configuration co-localisée</b>	Disposition du système dans laquelle l'instrument StepOne™ est directement connecté à un ordinateur co-localisé par le câble jaune du système StepOne™. Dans cette disposition, l'instrument StepOne™ est contrôlé par l'intermédiaire du logiciel StepOne™ installé sur l'ordinateur co-localisé.
<b>Contrôle endogène</b>	Cible qui doit exister à des niveaux identiques dans tous les échantillons testés. Ce contrôle est utilisé dans les expériences de quantification relative par les courbes standard et par la comparaison des valeurs de $C_T$ ( $\Delta\Delta C_T$ ) pour normaliser les signaux de fluorescence de la cible quantifiée. Également appelé « gène de ménage ».
<b>Contrôle négatif (NC)</b>	Dans les expériences du système StepOne™, fonction attribuée aux cibles ou aux essais SNP dans les puits qui contiennent de l'eau ou du tampon à la place de l'échantillon. Aucune amplification de la cible ne doit se produire dans les puits de contrôle négatif.
<b>Contrôle positif</b>	Dans les réactions de génotypage, fonction attribuée à l'essai SNP dans les puits qui contiennent un échantillon de génotype connu.
<b>Contrôle positif interne (IPC)</b>	Dans les expériences de présence/absence, échantillon d'ADN synthétique court ajouté aux réactions de PCR. L'IPC peut être utilisé pour distinguer les vrais résultats négatifs et les réactions affectées par les inhibiteurs de PCR, une configuration d'essai incorrecte ou une défaillance du réactif ou de l'instrument.
<b>Contrôle sans amplification (NAC)</b>	Voir puits de contrôle négatif avec IPC bloqué.

---

<b>Contrôle sans échantillon (NTC)</b>	Voir contrôle négatif (NC).
<b>Couleur de la cible</b>	Couleur attribuée à une cible pour l'identifier dans le plan de plaque et dans les courbes d'analyse.
<b>Courbe d'amplification</b>	Affichage des données collectées pendant la phase de thermocyclage de l'amplification par PCR. La courbe peut représenter : <ul style="list-style-type: none"><li>• Le reporter normalisé corrigé d'après la ligne de base (<math>\Delta R_n</math>) en fonction des cycles</li><li>• Le reporter normalisé (<math>R_n</math>) en fonction des cycles</li><li>• Le cycle seuil (<math>C_T</math>) en fonction des puits</li></ul>
<b>Courbe de dissociation</b>	Voir courbe de fusion.
<b>Courbe de fusion</b>	Affichage des données collectées pendant la phase de courbe de fusion. Les pics de la courbe de fusion peuvent indiquer la température de fusion ( $T_m$ ) de la cible ou identifier une amplification par PCR non spécifique. Il est possible d'afficher la courbe de fusion comme un marqueur normalisé ( $R_n$ ) par rapport à la température ou comme un marqueur dérivatif ( $-R_n'$ ) toujours par rapport à la température.
<b>Courbe des données brutes</b>	Affichage de l'amplitude de fluorescence des puits sélectionnés pour tous les filtres. Montre l'amplitude de fluorescence de tous les points de collecte des données pendant la réaction.
<b>Courbe des multicomposantes</b>	Affichage des données collectées pendant la phase de thermocyclage de la PCR en temps réel. La courbe des multicomposantes montre la fluorescence pour tous les cycles de la réaction.
<b>Courbe des températures</b>	Affichage des températures de l'échantillon, du couvercle de l'instrument et du bloc pendant la réaction.
<b>Courbe standard</b>	Dans les expériences de quantification absolue et de quantification relative par les courbes standard : <ul style="list-style-type: none"><li>• Droite moyenne sur un graphique représentant les valeurs de <math>C_T</math> des échantillons standard en fonction de leur quantité. Voir aussi droite de régression.</li><li>• Ensemble des standards contenant un intervalle de quantités connues. Les données des réactions de la courbe standard sont utilisées pour générer la courbe standard. La courbe standard est définie par le nombre de points dans la gamme, le nombre de réplicats standard, la quantité de départ et le facteur de dilution. Voir aussi gamme de dilutions standard.</li></ul>
<b><math>C_T</math></b>	Acronyme de « cycle threshold » (cycle seuil).
<b><math>C_T</math> automatique</b>	Paramètre d'analyse selon lequel le logiciel calcule automatiquement le seuil et la ligne de base dans la courbe d'amplification. Le logiciel utilise le seuil et la ligne de base pour calculer le cycle seuil ( $C_T$ ).

<b>C<sub>T</sub> manuel</b>	Paramètre d'analyse selon lequel l'utilisateur entre la valeur de seuil et sélectionne le mode de calcul de la ligne de base (automatique ou manuelle). Le logiciel utilise la valeur de seuil saisie et la ligne de base pour calculer le cycle seuil (C <sub>T</sub> ).
<b>Cycle seuil (C<sub>T</sub>)</b>	Nombre de cycles de PCR pour lequel le ΔRn correspond au seuil dans la courbe d'amplification.
<b>Delta Rn (ΔRn)</b>	Abréviation utilisée pour « reporter normalisé corrigé d'après la ligne de base ».
<b>Design Wizard</b>	(Assistant de programmation) Fonction du logiciel StepOne™ qui permet de configurer l'expérience avec par défaut les recommandations de configuration.
<b>Diluant</b>	Réactif utilisé pour diluer un échantillon ou un standard avant de l'ajouter à la réaction de PCR. Le diluant peut être constitué d'eau ou de tampon.
<b>Diluted Sample Concentration (10X for Reaction Mix)</b>	[Concentration de l'échantillon dilué (10X pour le mélange réactionnel)] Champ du logiciel affiché dans l'onglet Sample Dilution Calculations (Calcul de dilution de l'échantillon) de l'écran Reaction Setup (Préparation des réactions). Dans ce champ, entrer la concentration de l'échantillon à ajouter au mélange réactionnel pour tous les échantillons de l'expérience. « 10X for Reaction Mix » (10X pour le mélange réactionnel) signifie que, pour le logiciel, l'échantillon ou le composant standard du mélange réactionnel est à une concentration de 10X. Par exemple, si la concentration de l'échantillon dilué est de 50 ng/μL (10X), la concentration de l'échantillon final dans la réaction est de 5 ng/μL (1X).
<b>Droite de régression</b>	<p>Dans les expériences de quantification absolue et de quantification relative par les courbes standard, ligne la plus proche de la courbe standard. Formule de la droite de régression :</p> $C_T = m [\log (Qté)] + b$ <p>où m est la pente, b est l'intersection avec l'axe Y et Qté est la quantité standard.</p> <p>Voir aussi coefficient de régression.</p>
<b>Échantillon</b>	Cible testée.
<b>Échantillon de référence</b>	Dans les expériences de quantification relative par les courbes standard et par la comparaison des valeurs de C <sub>T</sub> (ΔΔC <sub>T</sub> ), échantillon utilisé comme base pour les résultats de quantification relative. Également appelé « calibrateur ».
<b>Échantillon d'ADN (10X)</b>	Composant de la réaction affiché sur l'écran Reaction Setup (Préparation des réactions). Le logiciel considère que l'échantillon d'ADN ajouté au mélange réactionnel est à une concentration de 10X. Par exemple, si le volume réactionnel est de 20 μL, le volume d'échantillon calculé pour une réaction est de 2 μL.
<b>Échantillon ou standard (10X)</b>	Composant de réaction affiché dans l'onglet Reaction Mix Calculations (Calcul du mélange réactionnel) de l'écran Reaction Setup (Préparation des réactions). Le logiciel considère que l'échantillon ou le standard ajouté au mélange réactionnel est à une concentration de 10X. Par exemple, si le volume réactionnel est de 20 μL, le volume d'échantillon ou de standard calculé pour une réaction est de 2 μL.
<b>Écran tactile</b>	Écran dont les touches tactiles permettent de contrôler l'instrument.

<b>EFF%</b>	Voir efficacité de l'amplification (EFF%).
<b>Efficacité de l'amplification (EFF%)</b>	<p>Calcul de l'efficacité de l'amplification par PCR. L'efficacité de l'amplification est calculée en utilisant la pente de la droite de régression dans la courbe standard. Une pente proche de <math>-3,3</math> indique une efficacité optimale (100 %) de l'amplification par PCR. Plusieurs facteurs affectent l'efficacité de l'amplification :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Intervalle des quantités standard</b> – Pour obtenir des mesures d'efficacité plus précises, utiliser un grand intervalle des quantités standard, de 5 à 6 logs (<math>\times 10^5</math> à <math>10^6</math>).</li><li>• <b>Nombre de réplicats standard</b> – Pour obtenir des mesures d'efficacité plus précises, inclure les réplicats afin de diminuer les effets des imprécisions de pipetage.</li><li>• <b>Inhibiteurs de PCR</b> – Présents dans la réaction, ils peuvent réduire l'efficacité de l'amplification.</li></ul>
<b>Essai</b>	Dans le système StepOne™, réaction de PCR qui contient des amorces pour amplifier une cible et un réactif pour détecter la cible amplifiée.
<b>Essai SNP</b>	Utilisée dans les réactions de génotypage, cette réaction de PCR contient deux amorces pour amplifier le produit de la PCR et deux sondes pour détecter les différents allèles du SNP.
<b>Essais en stock</b>	(Inventoried Assays) Essais TaqMan® Genomic Assays précédemment fabriqués, conformes aux spécifications de contrôle qualité et conservés en stock.
<b>Essais fabriqués sur commande</b>	(Custom Assays) Essais TaqMan® Genomic Assays fabriqués au moment de la commande. Seuls les essais qui répondent aux spécifications de contrôle qualité pour la fabrication sont fournis.
<b>Étape</b>	Composant du profil thermique. Une étape est définie par la température, la durée, la variation de la température et l'état de la collecte des données. Dans les phases de thermocyclage, une étape est également définie par l'état AutoΔ.
<b>Exclure un puits</b>	Action effectuée après l'analyse pour exclure un ou plusieurs puits de toutes les analyses avant de réanalyser les données.
<b>Facteur de dilution</b>	Valeur numérique qui définit la séquence des quantités dans la courbe standard. Le facteur de dilution et la quantité de départ sont utilisés afin de calculer la quantité standard pour chaque point de la courbe standard. Par exemple, si la courbe standard est définie avec un facteur de dilution de 1:10 ou 10, la différence entre deux points adjacents dans la courbe possède un facteur de 10.
<b>Facteur de dilution sérielle</b>	Voir facteur de dilution.
<b>Fichier d'informations sur l'essai (AIF)</b>	Fichier de données inclus sur un CD-Rom expédié avec chaque commande d'essai. Le nom du fichier inclut le numéro du code-barres inscrit sur la plaque de réactions. Les informations contenues dans le fichier AIF sont délimitées par des tabulations.



<b>Fluorophore du système</b>	<p>Fluorophore fabriqué par Applied Biosystems et précalibré sur le système StepOne™.</p> <p>Fluorophores du système :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Fluorophore FAM™</li><li>• Fluorophore JOE™</li><li>• Fluorophore ROX™</li><li>• Fluorophore SYBR® Green</li><li>• Fluorophore VIC®</li></ul> <p><b>IMPORTANT !</b> Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA™ comme reporter ou quencher avec le système StepOne™.</p>
<b>Fluorophore personnalisé</b>	<p>Fluorophore non fabriqué par Applied Biosystems. Il est possible d'utiliser des fluorophores personnalisés pour effectuer des expériences de PCR en temps réel sur le système StepOne™. Avant d'employer un fluorophore personnalisé, effectuer une calibration spectrale des fluorophores personnalisés.</p> <p><b>IMPORTANT !</b> Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA™ comme reporter ou quencher avec le système StepOne™.</p>
<b>Fluorophore pur</b>	<p>Réactif qui contient le fluorophore. Les fluorophores purs sont utilisés pour effectuer une calibration spectrale des fluorophores purs sur le système StepOne™. Voir aussi fluorophore du système.</p>
<b>Fonction</b>	<p>Type de réaction effectuée dans le puits pour la cible ou l'essai SNP. Fonctions disponibles dans les expériences du système StepOne™ :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Inconnue</li><li>• Contrôle négatif</li><li>• Standard (expériences de quantification absolue et de quantification relative par les courbes standard)</li><li>• Contrôle positif (réactions de génotypage)</li><li>• IPC (expériences de présence/absence)</li><li>• IPC bloqué (expériences de présence/absence)</li></ul>
<b>Gamme</b>	<p>Voir gamme de dilutions standard.</p>
<b>Gamme de dilutions standard</b>	<p>Dans les expériences de quantification absolue et de quantification relative par les courbes standard, ensemble de standards contenant un intervalle de quantités connues. La gamme de dilutions standard est préparée en diluant des standards en série. Par exemple, la solution de standard est utilisée pour préparer le premier point de dilution, le premier point de dilution est utilisé pour préparer le deuxième point de dilution, etc. Les volumes nécessaires à la préparation d'une gamme de dilutions standard sont calculés en fonction du nombre de points de dilution, du nombre de réplicats standard, de la quantité de départ, du facteur de dilution et de la concentration du standard dans la solution mère. Voir aussi courbe standard.</p>
<b>Gène de ménage</b>	<p>Voir contrôle endogène.</p>

<b>Graphique de discrimination allélique</b>	Affichage des données collectées pendant la lecture post-PCR. Le graphique de discrimination allélique met en rapport le signal du reporter normalisé de la sonde spécifique de l'allèle 1 et celui du reporter normalisé de la sonde spécifique de l'allèle 2.
<b>ID d'essai</b>	Valeur attribuée par Applied Biosystems aux essais TaqMan® Gene Expression Assays et TaqMan® SNP Genotyping Assays.
<b>Inconnue</b>	(Unknown) Dans les expériences de quantification, fonction attribuée à la cible dans les puits qui contiennent un échantillon avec des quantités de cible inconnues.  Dans les réactions de génotypage, fonction attribuée à l'essai SNP dans les puits qui contiennent un échantillon avec un génotype inconnu.  Dans les expériences de présence/absence, fonction attribuée à la cible dans les puits qui contiennent un échantillon pour lequel la présence de la cible n'est pas connue.
<b>Intersection avec l'axe Y</b>	Coefficient de régression calculé d'après la droite de régression de la courbe standard. L'intersection avec l'axe Y de cette droite correspond à la valeur Y au point d'intersection entre la droite et l'axe Y.
<b>IPC</b>	Acronyme de « internal positive control » (contrôle positif interne). Dans les expériences de présence/absence, fonction attribuée à la cible IPC dans les puits qui contiennent un échantillon d'IPC.
<b>IPC bloqué</b>	Dans les expériences de présence/absence, fonction attribuée à la cible IPC dans les puits qui contiennent un agent de blocage de l'IPC à la place de l'échantillon. Voir aussi puits de contrôle négatif avec IPC bloqué.
<b>IPC+</b>	Assignation de présence/absence lorsque le contrôle positif interne (IPC) est amplifié.
<b>Lecture en point final</b>	Voir lecture post-PCR.
<b>Lecture post-PCR</b>	Utilisée dans les réactions de génotypage et les expériences de présence/absence, collecte des données de fluorescence qui se produit après l'amplification. Dans les réactions de génotypage, les données de fluorescence collectées pendant la lecture post-PCR sont affichées sur le graphique de discrimination allélique et utilisées pour produire des assignations d'allèles. Dans les expériences de présence/absence, les données de fluorescence collectées pendant la lecture post-PCR sont affichées sur la courbe de présence/absence et utilisées pour produire des assignations de détections. Également appelée « lecture en point final ».
<b>Lecture pré-PCR</b>	Utilisée dans les réactions de génotypage et les expériences de présence/absence, collecte des données de fluorescence qui se produit avant l'amplification. Les données de fluorescence collectées pendant la lecture pré-PCR sont utilisées pour normaliser les données de fluorescence en lecture post-PCR.
<b>Ligne de base</b>	Dans la courbe d'amplification, une ligne correspond aux niveaux de fluorescence d'un intervalle de cycles défini. Si la ligne de base est déterminée manuellement, Applied Biosystems recommande de sélectionner les cycles de PCR précédents pour déterminer la ligne de base.

<b>Ligne de base automatique</b>	Paramètre d'analyse selon lequel le logiciel calcule les valeurs de début et de fin de la ligne de base de la courbe d'amplification. Le logiciel utilise la ligne de base et le seuil pour calculer le cycle seuil ( $C_T$ ).
<b>Ligne de base manuelle</b>	Paramètre d'analyse selon lequel l'utilisateur entre les valeurs de début et de fin de la ligne de base de la courbe d'amplification. Le logiciel utilise la ligne de base et le seuil pour calculer les valeurs $C_T$ .
<b>Matrice génétique</b>	Type d'acide nucléique à ajouter à la réaction de PCR. La matrice génétique recommandée varie en fonction de l'application.
<b>Mélange amorce/sonde</b>	Composant de la réaction de PCR constitué des amorces visant à amplifier la cible et de la sonde TaqMan <sup>®</sup> conçue pour détecter l'amplification de la cible.
<b>Mélange d'amorces</b>	Composant de la réaction de PCR qui contient les amorces sens et anti-sens visant à amplifier la cible.
<b>Mélange de sonde</b>	Composant de la réaction de PCR qui contient une sonde TaqMan <sup>®</sup> conçue pour détecter l'amplification de la cible.
<b>Mélange réactionnel</b>	Solution qui contient tous les composants nécessaires à la réalisation de la réaction de PCR, hormis la matrice génétique (échantillon, standard ou contrôle).
<b>Méthode de quantification</b>	Lors des expériences de quantification, méthode utilisée pour déterminer la quantité de cible des échantillons. Trois types de méthodes sont disponibles pour les expériences de quantification : quantification absolue par les courbes standard, méthode de comparaison des valeurs de $C_T$ ( $\Delta\Delta C_T$ ) et quantification relative par les courbes standard.
<b>Mix primers-sonde</b>	Composant de réaction de PCR dans les essais Applied Biosystems TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression Assays et TaqMan <sup>®</sup> SNP Genotyping Assays. Il contient des amorces conçues pour amplifier une cible et une sonde TaqMan <sup>®</sup> conçue pour détecter l'amplification de la cible.
<b>NFQ-MGB</b>	De l'anglais « nonfluorescent quencher-minor groove binder » (quencher non fluorescent – ligand du petit sillon). Molécules liées à l'extrémité 3' des sondes TaqMan <sup>®</sup> . Lorsque la sonde est intacte, le quencher non fluorescent (NFQ) empêche le reporter d'émettre un signal de fluorescence. Puisque le NFQ n'émet pas de fluorescence, il produit des signaux de bruit de fond plus faibles qui donnent une quantification plus précise. Le ligand du petit sillon (MGB) augmente la température de fusion ( $T_m$ ) sans accroître la longueur de la sonde. Il permet également de concevoir des sondes plus courtes.
<b>Nom de l'expérience</b>	Nom saisi pendant la configuration de l'expérience, utilisé pour identifier cette dernière. Le nom d'une expérience ne peut ni dépasser 100 caractères, ni comporter les caractères suivants : barre oblique (/), barre oblique inverse (\), signe supérieur à (>), signe inférieur à (<), astérisque (*), point d'interrogation (?), guillemets ("), ligne verticale ( ), deux-points (:), et point-virgule (;).
<b>Numéros</b>	Voir refSNP ID.

<b>PCR en temps réel</b>	Processus de collecte des données de fluorescence pendant l'amplification par PCR. Les données de PCR en temps réel sont utilisées pour calculer le résultat des expériences de quantification ou pour vérifier le résultat des réactions de génotypage ou des expériences de présence/absence.
<b>Pente</b>	Coefficient de régression calculé d'après la droite de régression de la courbe standard. La pente indique l'efficacité de l'amplification par PCR pour l'essai. Une pente de -3,3 indique une efficacité d'amplification de 100 %. Voir aussi efficacité de l'amplification (EFF%).
<b>Phase</b>	Composant du profil thermique. Une phase est composée d'au moins une étape.
<b>Phase de courbe de fusion</b>	Phase du profil thermique avec une incrémentation de température pour générer une courbe de fusion.
<b>Phase de maintien de la température</b>	Phase du profil thermique qui inclut au moins une étape. Par exemple, il est possible d'ajouter une phase de maintien de la température au profil thermique pour activer/désactiver les enzymes ou incubé une réaction.
<b>Phase de thermocyclage</b>	Phase répétée du profil thermique. Si la phase de thermocyclage est utilisée pour effectuer la PCR, elle est appelée « phase d'amplification ».
<b>Plan de plaque</b>	Représentation de la grille de 48 puits (6 × 8) et du contenu de la plaque de réactions. Le logiciel peut utiliser le plan de plaque comme outil de sélection pour attribuer des contenus de puits, afficher des attributions de puits et montrer les résultats. Le plan de plaque est affiché dans les écrans Design Wizard (Assistant de programmation), Advanced Setup (Configuration avancée), Run (Démarrer) et Analysis (Analyse). Le plan de plaque peut être imprimé, inclus dans un rapport, exporté ou enregistré sous la forme d'une diapositive en vue de préparer une présentation.
<b>Point</b>	Point standard d'une courbe standard. La quantité standard de chaque point de la courbe standard est calculée en fonction de la quantité de départ et du facteur de dilution.
<b>Profil de thermocyclage</b>	Définition du volume réactionnel et du profil thermique pour l'activité de l'instrument.
<b>Profil thermique</b>	Partie du profil de thermocyclage qui précise la température, la durée, la variation de la température et les points de collecte des données pour toutes les étapes et phases de l'activité de l'instrument.
<b>Puits de contrôle négatif avec IPC bloqué</b>	Dans les expériences de présence/absence, puits qui contient un agent de blocage de l'IPC à la place de l'échantillon dans la réaction de PCR. Aucune amplification ne doit se produire dans les puits de contrôle négatif avec IPC bloqué car la réaction ne contient aucun échantillon et l'amplification de l'IPC est bloquée. Également appelé « contrôle sans amplification » (NAC).
<b>Puits IPC à contrôle négatif</b>	Dans les expériences de présence/absence, puits qui contient un échantillon d'IPC et un tampon ou de l'eau à la place de l'échantillon dans la réaction de PCR. Seul l'échantillon d'IPC doit être amplifié dans les puits IPC à contrôle négatif car la réaction ne contient aucun échantillon. Voir aussi IPC+.

<b>Quantification absolue par les courbes standard</b>	Une des méthodes utilisées pour les expériences de quantification. Avec la quantification absolue par les courbes standard, les résultats par rapport aux standards sont utilisés pour déterminer les quantités absolues d'une cible dans les échantillons.
<b>Quantification relative par les courbes standard</b>	Une des méthodes utilisées pour les expériences de quantification. Avec la quantification relative par les courbes standard, les résultats par rapport aux standards, à un échantillon de référence et à un contrôle endogène sont utilisés pour déterminer les quantités relatives d'une cible dans les échantillons.
<b>Quantité</b>	Dans les expériences de quantification, quantité de cible dans les échantillons. La quantité absolue peut faire référence au nombre de copies, à la masse, à la molarité ou à la charge virale. La quantité relative fait référence au facteur de variation entre la quantité de cible normalisée dans l'échantillon et dans l'échantillon de référence.
<b>Quantité de départ</b>	Lors de la définition d'une courbe standard ou d'une gamme de dilutions standard, correspond à la quantité la plus élevée ou la plus faible.
<b>Quantité normalisée</b>	Quantité de cible divisée par la quantité de contrôle endogène.
<b>Quantité standard</b>	Quantité connue dans la réaction de PCR. <ul style="list-style-type: none"><li>• Dans les expériences de quantification absolue par les courbes standard, quantité de cible connue. Les quantités standard sont définies en plusieurs unités : la masse, le nombre de copies, la charge virale ou d'autres unités de mesure de la quantité de cible.</li><li>• Dans les expériences de quantification relative par les courbes standard, quantité connue dans le standard. Par exemple, la quantité standard peut faire référence à la quantité d'ADNc ou à la quantité de solution mère. Les unités ne sont pas pertinentes pour les expériences de quantification relative par les courbes standard car elles s'annulent dans les calculs.</li></ul>
<b>Quencher</b>	Molécule liée à l'extrémité 3' des sondes TaqMan <sup>®</sup> pour empêcher le reporter d'émettre un signal de fluorescence lorsque la sonde est intacte. Avec les réactifs TaqMan <sup>®</sup> , la molécule NFQ-MGB peut être utilisée comme quencher. Avec les réactifs SYBR <sup>®</sup> Green, aucun quencher n'est utilisé. <b>IMPORTANT !</b> Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA <sup>™</sup> comme reporter ou quencher avec le système StepOne <sup>™</sup> .
<b>QuickStart</b>	(Démarrage rapide) Fonction du système StepOne <sup>™</sup> qui permet de démarrer l'expérience sans entrer les informations de configuration de la plaque.
<b>Réactif</b>	Composant de la réaction de PCR utilisé pour amplifier la cible et détecter l'amplification. Plusieurs types de réactifs sont utilisés sur le système StepOne <sup>™</sup> : <ul style="list-style-type: none"><li>• Les réactifs TaqMan<sup>®</sup></li><li>• Les réactifs SYBR<sup>®</sup> Green</li><li>• Les autres réactifs</li></ul>

<b>Réactif SYBR® Green</b>	Composant de la réaction de PCR constitué de deux amorces visant à amplifier la cible et du fluorophore SYBR® Green conçu pour détecter l'ADN double brin.
<b>Réactif TaqMan®</b>	Composant de la réaction de PCR constitué des amorces visant à amplifier la cible et de la sonde TaqMan® conçue pour détecter l'amplification de la cible.
<b>Réaction échantillon/cible</b>	Combinaison d'un échantillon et d'une cible dans une même réaction de PCR. Dans l'assistant de programmation Design Wizard, chaque réaction de PCR ne peut contenir qu'un échantillon et une cible.
<b>Réaction échantillon/essai SNP</b>	Combinaison d'un échantillon et d'un essai SNP dans une même réaction de PCR. Chaque réaction de PCR ne peut contenir qu'un échantillon et un essai SNP.
<b>Référence passive</b>	Fluorophore qui émet un signal de fluorescence. Puisque le signal de référence passive doit être cohérent sur tous les puits, il est utilisé pour normaliser le signal du reporter afin de représenter les fluctuations de fluorescence provoquées par les différences mineures de concentration ou de volume entre les puits. La normalisation du signal de référence passive permet d'obtenir des données très précises.
<b>refSNP ID</b>	Numéro qui identifie le SNP de référence (refSNP). Généré par la base de données des polymorphismes de nucléotides simples (dbSNP) de la variation de séquence nucléotidique. Peut être utilisé pour rechercher un essai Applied Biosystems SNP Genotyping Assay dans la boutique Applied Biosystems. Également appelé « numéro rs ».
<b>Rejeter un puits</b>	Action effectuée par le logiciel pendant l'analyse pour retirer un ou plusieurs puits de l'analyse en cours si une alerte spécifique est appliquée au puits.
<b>Remote Monitoring</b>	(Surveillance à distance) Fonction du logiciel qui permet d'afficher l'état d'un instrument mis en réseau, d'envoyer des expériences à l'instrument et de télécharger des expériences effectuées sur l'ordinateur.
<b>Réplicat</b>	Ensemble de réactions identiques dans une expérience.
<b>Réplicats</b>	Nombre total de réactions identiques contenant des composants et des volumes identiques.
<b>Reporter</b>	Fluorophore utilisé pour détecter l'amplification. Si des réactifs TaqMan® sont utilisés, le reporter est lié à l'extrémité 5'. Si des réactifs SYBR® Green sont utilisés, le reporter est le fluorophore SYBR® Green.
<b>Reporter dérivatif (-Rn')</b>	Rapporté sur l'axe Y de la courbe de fusion. Le signal du reporter dérivatif est la dérivée première négative de la fluorescence normalisée du reporter.
<b>Reporter normalisé (Rn)</b>	Signal de fluorescence émis par le reporter normalisé par le signal de fluorescence de la référence passive.
<b>Reporter normalisé corrigé d'après la ligne de base (ΔRn)</b>	Amplitude du signal de fluorescence normalisé généré par le reporter pendant l'amplification par PCR. $\Delta Rn = Rn (\text{valeur seuil}) - Rn (\text{ligne de base}), \text{ où } Rn = \text{reporter normalisé.}$

---

<b>Rn</b>	Abréviation utilisée pour « reporter normalisé ».
<b>Seuil</b>	Niveau de fluorescence situé au-dessus de la ligne de base et dans la zone d'amplification exponentielle de la courbe d'amplification. Le seuil peut être déterminé automatiquement (voir valeur $C_T$ automatique) ou défini manuellement (voir valeur $C_T$ manuelle).
<b>Seuil de cycle</b>	Voir cycle seuil ( $C_T$ ).
<b>SNP</b>	Acronyme de « single nucleotide polymorphism » (polymorphisme de nucléotide unique). Les SNP peuvent comporter une base de différence ou une indel (insertion/délétion).
<b>Standard</b>	Échantillon qui contient des quantités standard connues. Les réactions standard sont utilisées dans les expériences de quantification pour générer des courbes standard. Voir aussi courbe standard et gamme de dilutions standard.
<b>Température de fusion (<math>T_m</math>)</b>	Point de la courbe de fusion pour lequel la valeur du reporter dérivatif est maximale, signalant que l'ADN double brin amplifié se dissocie en ADN simple brin.
<b><math>T_m</math></b>	Acronyme de « melting temperature » (température de fusion).
<b>Transcriptase inverse</b>	Composant de la réaction de PCR qui convertit l'ARN en ADNc. La transcriptase inverse est ajoutée à la réaction de PCR pour effectuer la RT-PCR 1 phase.
<b>Valeur <math>R^2</math></b>	Coefficient de régression calculé d'après la droite de régression de la courbe standard. La valeur $R^2$ indique la proximité entre la droite de régression de la courbe standard et les points de données $C_T$ des réactions standard. Par exemple, la valeur 1,00 indique une corrélation parfaite entre la droite de régression et les points de données.
<b>Variation de la température</b>	Vitesse de variation de la température pendant la réaction de PCR. Excepté pour la phase de courbe de fusion, la variation de la température est définie en pourcentage. Pour la phase de courbe de fusion, la variation de la température est définie en incréments de température. Dans la vue graphique du profil thermique, la variation de la température est indiquée par une diagonale.
<b>Vitesse de variation de la température</b>	Vitesse à laquelle la variation de la température se produit pendant la réaction de PCR. Deux vitesses de variation de la température sont disponibles : Fast (Rapide) et Standard.





# Index

## A

- amorçage
  - concentration par défaut 3-29
  - résumé des instructions de préparation 3-23
  - RT-PCR 1 étape 3-9
  - RT-PCR 2 étapes 3-9
  - structure secondaire 3-9
- amplicon, sélection d'un petit 3-22
- analyses en point final
  - présence/absence 5-4
- autres réactifs basés sur le principe de la fluorescence 1-6

## C

- collecte des données 1-2
- comparative CT experiments
  - Voir aussi expérience de quantification 3-6
- conception d'une expérience
  - génotypage 4-14, 4-17
  - présence/absence 5-15
  - quantification 3-20
- conditions de thermocyclage
  - quantification de l'ADN/ADNc 3-26
  - quantification de l'ARN 3-27
  - RT-PCR 1 étape 3-27
  - RT-PCR 2 étapes 3-28
- consommables, compatibles 1-3
- contamination d'ADN, limitation 2-7
- contamination par transfert, limitation par l'UNG 2-7
- contenu G/C et région d'amplification 3-22
- contrôle endogène 3-6
- contrôle négatif 3-5, 3-6, 3-7, 4-4, 5-4
- contrôle positif 4-4

## E

- échantillon 3-5, 3-6, 4-4, 5-4
- échantillon de référence 3-5, 3-6
- essai Custom TaqMan Gene Expression Assay 3-18, 5-12
- essai en stock 1-7
- essai fabriqué sur commande 1-7
- essai préconçu/validé 1-8
- essai TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assay 4-11
- essai TaqMan Endogenous Control Assay 3-17

- essai TaqMan Gene Expression Assay 3-16, 5-10
- essai TaqMan PDARs for AD 4-12
- essai TaqMan SNP Genotyping Assay 4-10
- Essais Custom TaqMan SNP Genotyping Assays 4-15
- expérience de présence/absence
  - composants 5-4
  - conception 5-15
  - définition 5-4
  - fonctionnement 5-5
  - incorporation d'un IPC 5-5
  - instructions de préparation des essais pour le type d'essai Custom (Personnalisé) 5-15
  - réactif TaqMan 2-2
  - réalisation sans IPC 5-4
  - sélection des réactifs pour le type d'essai Custom (Personnalisé) 3-24
  - sélection du master mix 5-14
  - type d'essai 5-5
- expérience de quantification
  - comparaison 3-7
  - comparaison des valeurs de CT 3-6
  - conception 3-20
  - conclusions des instructions de préparation des essais C-1
  - courbe standard 3-5
  - description 3-4
  - instructions de préparation des essais pour le type d'essai Custom (Personnalisé) 3-20
  - PCR en temps réel 3-4
  - quantification relative par les courbes standard 3-5
  - réactif SYBR Green 2-4, 3-31
  - réactif TaqMan 2-2
  - sélection de la méthode de quantification 3-5
  - sélection des réactifs pour le type d'essai Custom (Personnalisé) 3-24
  - sélection du master mix 3-19
  - sélection du type de réactif 3-12
  - type d'essai 3-12
- expérience de quantification absolue par les courbes standard
  - à propos de 3-5
  - composants 3-5
  - Voir aussi expérience de quantification 3-5
- expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de CT
  - à propos de 3-6
  - composants 3-6

expérience de quantification relative par les courbes standard  
à propos de 3-5  
composants 3-5  
Voir aussi expérience de quantification 3-5  
expérience en point final  
génotypage 4-4

## G

gamme de dilutions standard 3-5

## I

instructions de préparation des essais  
à propos de C-1  
amorces et sonde 3-21, 3-23  
conditions de thermocyclage 3-26  
expérience de présence/absence 5-15  
expérience de quantification 3-20, C-1  
optimiser la concentration de sonde 3-33  
optimiser les concentrations d'amorces 3-29  
réaction de génotypage C-2  
sélection des réactifs 3-24

IPC 5-4, 5-5

## L

liaison de fluorophore, méthodes de 2-4  
limitation de l'amorce, essai multiplex 3-11  
logiciel Primer Express  
essai SNP 1-9  
expérience de présence/absence 5-15  
expérience de quantification 3-20  
petit amplicon 3-22

## M

master mix  
sélection pour une expérience de présence/absence 5-14  
sélection pour une expérience de quantification 3-19  
sélection pour une réaction de génotypage 4-13, 4-17  
matrice d'optimisation des amorces  
utilisation 3-29  
matrice de limitation des amorces  
définition des limites B-1  
exemple de limitation B-2

## N

non-spécificité, dans une réaction de génotypage 4-5

## O

optimisation 3-33

## P

PCR en temps réel  
expérience de quantification 3-4  
processus de détection TaqMan 2-2  
PCR multiplex  
amorces d'ARNr B-1  
comparaison simplex 3-11  
description 3-10  
limitation de l'amorce 3-11  
PCR, pratiques générales 2-8  
petit amplicon, sélection 3-22  
produit non spécifique, contamination avec le fluorophore SYBR Green 2-7

## Q

quantification de l'ADN/ADNc, conditions de thermocyclage 3-26  
quantification de l'ARN  
conditions de thermocyclage 3-27, 3-28  
RT-PCR 1 étape 3-25  
RT-PCR 2 étapes 3-25

## R

réactif  
autres réactifs basés sur le principe de la fluorescence 1-6  
éléments à prendre en compte 2-6  
réactif SYBR Green 1-6  
réactif TaqMan 1-6, 2-2  
sélection 1-6, 2-5  
sélection du type d'essai Custom (Personnalisé) 3-24  
réactif SYBR Green  
développement 2-4  
éléments à prendre en compte pour la sélection 2-6  
fonctionnement 2-5  
optimisation d'une expérience de quantification 3-31  
réactif TaqMan  
application 2-2  
développement 2-2  
éléments à prendre en compte pour la sélection 2-6  
fonctionnement 2-2  
réactif TaqMan Exogenous Internal Positive Control Reagent 5-13  
réactif Universal Master Mix  
polymérase, avantages 3-26  
réaction de génotypage  
composants 4-4  
conception 4-14, 4-17  
conclusions des instructions de préparation des essais C-2  
description 4-4  
fonctionnement 4-4  
instrument 4-4  
non-spécificité 4-5

réactif TaqMan 2-2  
sélection du master mix 4-13, 4-17  
type d'essai 4-6

région d'amplification  
contenu G/C 3-22  
extrémité 3' de l'amorce 3-22  
extrémité 5' de la sonde 3-22  
recherche 3-21  
sélection 3-21  
température de fusion 3-22

réplicats 3-5, 3-6, 4-4, 5-4

RT-PCR  
1 étape 3-8  
2 étapes 3-8  
comparaison des méthodes 3-7, 3-10

RT-PCR 1 étape  
à propos de 3-8  
amorces utilisées 3-9  
quantification de l'ARN 3-25

RT-PCR 2 étapes  
à propos de 3-8  
amorces utilisées 3-9  
quantification de l'ARN 3-25

**S**

sonde  
optimisation de la concentration de sonde 3-33  
résumé des instructions de préparation 3-23  
sonde TaqMan MGB disponible 2-4

sonde TaqMan MGB 2-3

standard 3-5

structure secondaire et choix de l'amorce 3-9

système StepOne  
application 1-5  
collecte des données 1-2  
consommables 1-3  
type d'essai 1-7  
type de réactif 1-6

**T**

température de fusion et région d'amplification 3-22

transcriptase inverse MultiScribe, définition 3-26

type d'essai  
essai en stock/fabriqué sur commande 1-7  
essai personnalisé 1-8, 1-9  
essai préconçu/validé 1-8  
expérience de présence/absence 5-5  
expérience de quantification 3-12  
réaction de génotypage 4-6  
sélection 1-7

type d'essai Custom (Personnalisé) 1-8, 1-9  
expérience de présence/absence 5-15  
expérience de quantification 3-20

**U**

UNG, limitation de la contamination par transfert 2-7

**W**

workflow Advanced Setup (Configuration avancée) 1-6, 1-7, 1-8  
workflow de l'assistant de programmation Design Wizard 1-6, 1-7, 1-8





#### **Worldwide Sales and Support**

Applied Biosystems vast distribution and service network, composed of highly trained support and applications personnel, reaches 150 countries on six continents. For sales office locations and technical support, please call our local office or refer to our Web site at [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com).

Applied Biosystems is committed to providing the world's leading technology and information for life scientists.

#### **Headquarters**

850 Lincoln Centre Drive  
Foster City, CA 94404 USA  
Phone: +1 650.638.5800  
Toll Free (In North America): +1 800.345.5224  
Fax: +1 650.638.5884

06/2010