

Applied Biosystems StepOne™

Système de PCR en temps réel

Réactions de génotypage



Applied Biosystems StepOne™

Système de PCR en temps réel

Réactions de génotypage

Prise en main

1

Conception de l'expérience

2

Préparation des réactions

3

Réalisation de l'expérience

4

Analyse de l'expérience

5

© 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.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

NOTICE TO PURCHASER: Label License

The Système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ 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.

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

A license to perform the patented 5' Nuclease Process for research is obtained by the purchase of (i) both Licensed Probe and Authorized 5' Nuclease Core Kit, (ii) a Licensed 5' Nuclease Kit, or (iii) license rights from Applied Biosystems.

The TaqMan® SNP Genotyping and TaqMan® Drug Metabolizing Genotyping Assays contain Licensed Probe. Use of these products is covered by US patent claims and corresponding patent claims outside the US. The purchase of these products includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. Separate purchase of an Authorized 5' Nuclease Core Kit would convey rights under the applicable claims of US patents, and corresponding patent claims outside the United States, which claim 5' nuclease methods. No right under any other patent claim and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche.

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

A license to perform the patented 5' Nuclease Process for research is obtained by the purchase of (i) both Authorized 5' Nuclease Core Kit and Licensed Probe, (ii) a Licensed 5' Nuclease Kit, or (iii) license rights from Applied Biosystems.

TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG is an Authorized 5' Nuclease Core Kit. Use of this product is covered by US patent claims and corresponding patent claims outside the US. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. Separate purchase of a Licensed Probe would convey rights under the applicable claims of US patents, and corresponding claims outside the United States. No right under any other patent claim and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche.

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.

TRADEMARKS:

Applera, Applied Biosystems, AB (Design), MicroAmp, and VIC are registered trademarks, and FAM, StepOne, and TAMRA 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.

Excel, Microsoft and Windows are registered trademarks of Microsoft Corporation.

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

Référence 4377727 Rév. B
06/2010

Table des matières

Préface	v
Utilisation de ce guide	v
Informations supplémentaires	vii
Comment obtenir une assistance	viii
Conventions de sécurité utilisées dans ce document	x
Symboles sur les instruments	xii
Étiquettes de sécurité sur les instruments	xiv
Sécurité générale de l'instrument	xv
Sécurité chimique	xvi
Sécurité des déchets chimiques	xviii
Sécurité électrique	xix
Sécurité des diodes électroluminescentes	xx
Sécurité des dangers biologiques	xx
Sécurité de la station de travail	xxi
Normes de sécurité et de compatibilité électromagnétique (CEM)	xxii
Chapitre 1 Prise en main	1
À propos du système StepOne™	2
À propos des expériences de génotypage	4
Utilisation de ce guide	8
À propos de l'exemple	9
Workflow de l'exemple	11
Chapitre 2 Conception de l'expérience	13
Présentation du chapitre	14
Création d'une expérience	15
Définition des propriétés de l'expérience	16
Définition des méthodes et des matériels nécessaires	17
Configuration des essais SNP	19
Configuration des échantillons et des réplicats	22
Configuration du profil de thermocyclage	24
Vérification de la préparation des réactions	26
Commande des matériels nécessaires pour l'expérience	29
Finalisation du workflow de l'assistant de programmation Design Wizard	31

Chapitre 3	Préparation des réactions	33
	Présentation du chapitre	34
	Préparation des dilutions d'échantillons	35
	Préparation du mélange réactionnel	36
	Préparation de la plaque	38
Chapitre 4	Réalisation de l'expérience	43
	Présentation du chapitre	44
	Préparation de la réaction de PCR	45
	(Facultatif) Activation des notifications	47
	Démarrage de la réaction	49
	Surveillance de la réaction de PCR	53
	Retrait de la plaque de réactions et transfert des données	63
Chapitre 5	Analyse de l'expérience	67
	Présentation du chapitre	68
	Ouverture de l'expérience en vue de l'analyse	69
	Affichage du graphique de discrimination allélique	70
	Affichage du plan de plaque	74
	Affichage du tableau des résultats	77
	Affichage de la synthèse CQ	80
	Affichage de la courbe des données brutes	82
	Affichage de la courbe des multicomposantes	84
	Affichage de la courbe d'amplification	86
	Affichage des paramètres d'analyse	91
	Exportation des données	96
Appendix A	Autres workflows d'expérience	97
	Workflow Advanced Setup (Configuration avancée)	98
	Workflow QuickStart (Démarrage rapide)	104
	Workflow Template (Modèle)	109
	Workflow Export/Import (Exportation/Importation)	110
	Bibliographie	113
	Glossaire	115
	Index	129

Utilisation de ce guide

- Objectif de ce guide** Ce guide explique comment effectuer des réactions de génotypage sur le Système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™. Il possède deux utilisations :
- Tutoriel, grâce aux données de l'exemple fourni avec le logiciel du système Système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™.
 - Aide-mémoire, pour réaliser des expériences sur la base de connaissances pratiques.
- Public concerné** Ce guide est destiné aux personnels de laboratoire et aux directeurs de recherche qui effectuent des réactions de génotypage à l'aide du système StepOne™.
- Prérequis** Le contenu de ce guide s'appuie sur les prérequis suivants :
- L'utilisateur est familier du système d'exploitation Microsoft Windows® XP.
 - L'utilisateur est familier d'Internet et des navigateurs Web.
 - L'utilisateur sait comment manipuler les échantillons d'ADN et les préparer pour la PCR.
 - L'utilisateur comprend les procédures de stockage de données, de transfert de fichiers et de copier-coller.
 - L'utilisateur possède une expérience de la mise en réseau s'il souhaite intégrer le système StepOne™ au réseau de données de son laboratoire.
- 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 chimique 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

La documentation destinée aux utilisateurs comporte également des alertes à la sécurité. Pour plus d'informations, voir « Alertes à la sécurité » à la page x.

Informations supplémentaires

Documentation relative Le système StepOne™ est fourni avec les documents suivants :

Document	Réf.
<i>Système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ Getting Started Guide for Genotyping Experiments</i>	4376786
<i>Système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments</i>	4376787
<i>Système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ Getting Started Guide for Relative Standard Curve and Comparative C_T Experiments</i>	4376785
<i>Système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ Getting Started Guide for Standard Curve Experiments</i>	4376784
<i>Système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ Installation, Maintenance, and Networking Guide</i>	4376782
<i>Système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ Installation Quick Reference Card</i>	4376783
<i>Système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ Site Preparation Guide</i>	4376768
<i>Système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ Software Help</i>	—

Les documents suivants sont disponibles à l'achat auprès de Applied Biosystems :

Document	Réf.
<i>Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol</i>	4375575
<i>Système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ Installation Performance Verification Protocol</i>	4376791
<i>Système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ Installation Qualification-Operation Qualification Protocol</i>	4376790
<i>Système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ Planned Maintenance Protocol</i>	4376788
<i>Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol</i>	4334431
<i>Custom TaqMan® Genomic Assays Protocol</i>	4367671
<i>TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol</i>	4332856
<i>TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays Protocol</i>	4362038
<i>Ordering TaqMan® SNP Genotyping Assays Quick Reference Card</i>	4374204
<i>Performing a Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay for 96-Well Plates Quick Reference Card</i>	4371394
<i>Performing a TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay for 96-Well Plates Quick Reference Card</i>	4367636
<i>Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Allelic Discrimination Protocol</i>	4312214
<i>Allelic Discrimination Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Quick Reference Card</i>	4312212

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

Obtention d'informations dans l'aide du logiciel

L'aide du logiciel StepOne™ décrit l'utilisation de chaque fonction disponible dans 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 **www.appliedbiosystems.com/support/contact**.

Conventions de sécurité utilisées dans ce document

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 chimique 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 (voir « Symboles de sécurité » à la page xii).

Exemples

IMPORTANT ! Il convient de créer un tableur distinct pour chaque plaque 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.

Symboles sur les instruments

Symboles électriques sur les instruments

Les symboles électriques suivants peuvent apparaître sur les instruments Applied Biosystems.

Symbole	Description	Symbole	Description
	Position Marche de l'interrupteur d'alimentation principale.		Borne pouvant être connectée à la mise à la terre d'un autre instrument. Ce n'est pas une borne de mise à la terre protégée.
	Position Arrêt de l'interrupteur d'alimentation principale.		Borne de mise à la terre de protection devant être reliée à la terre avant d'effectuer tout autre raccordement électrique à l'instrument.
	Commutateur permettant de mettre l'instrument en Veille . Lorsqu'il est en position Veille, l'instrument présente un risque d'électrocution.		Borne pouvant recevoir ou envoyer une tension ou un courant alternatif.
	Position Marche/Arrêt de l'interrupteur d'alimentation principale à bouton poussoir.		Borne pouvant recevoir ou envoyer une tension ou un courant direct ou alternatif.

Symboles de sécurité

Les *symboles* de sécurité suivants peuvent apparaître sur les instruments Applied Biosystems. Ces symboles de sécurité peuvent être apposés seuls ou accompagnés d'un texte expliquant le risque correspondant (voir « Étiquettes de sécurité sur les instruments » à la page xiv). Ils peuvent également apparaître à côté des mises en garde DANGER, AVERTISSEMENT et ATTENTION incluses dans les documents, ce guide compris.

Symbole	Description	Symbole	Description
	Avertit l'utilisateur de la nécessité de consulter le manuel pour obtenir davantage d'informations et de procéder avec les précautions qui s'imposent.		Indique la présence de pièces en mouvement et la nécessité de procéder avec les précautions qui s'imposent.
	Indique la présence d'une surface chaude ou un risque de température élevée, ainsi que la nécessité de procéder avec les précautions qui s'imposent.		Indique un risque d'électrocution et la nécessité de procéder avec les précautions qui s'imposent.
			Indique la présence d'un laser à l'intérieur de l'instrument et la nécessité de procéder avec les précautions qui s'imposent.

Symboles environnementaux sur les instruments

Le symbole suivant s'applique à tous les produits électriques et électroniques commercialisés par Applied Biosystems sur le marché européen après le 13 août 2005.

Symbole	Description
	<p>Ne pas éliminer ce produit avec les déchets usuels non soumis au tri sélectif. Se conformer à la réglementation locale relative à l'élimination des déchets usuels pour réduire l'impact environnemental des résidus provenant des équipements électriques et électroniques.</p> <p>Utilisateurs de l'Union européenne : Appeler le bureau local du Service clientèle Applied Biosystems pour connaître les procédures d'enlèvement et de recyclage des équipements. Consulter le site www.appliedbiosystems.com pour obtenir la liste des bureaux du Service clientèle dans l'Union européenne.</p>

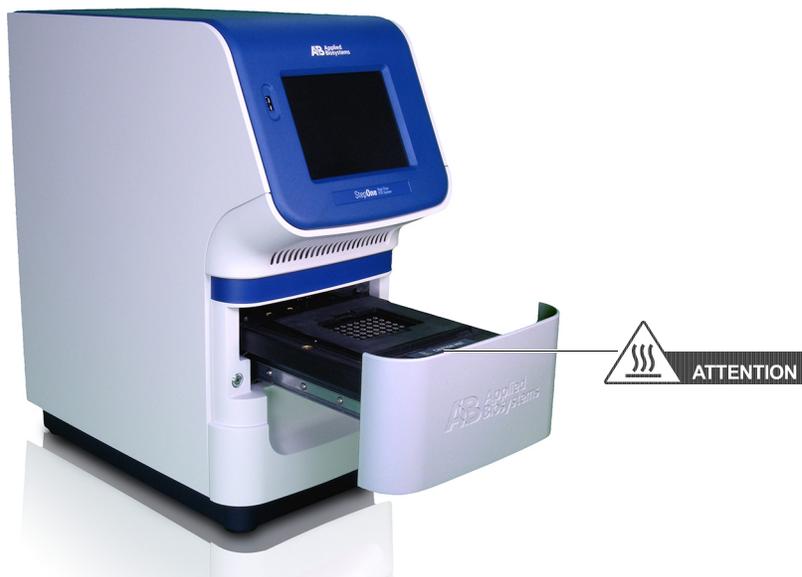
Étiquettes de sécurité sur les instruments

Les mentions ATTENTION, AVERTISSEMENT et DANGER peuvent apparaître sur les instruments Applied Biosystems accompagnées des symboles de sécurité décrits dans la section précédente.

English	Français
CAUTION Hazardous chemicals. Read the Material Safety Data Sheets (MSDSs) before handling.	ATTENTION Produits chimiques dangereux. Lire les fiches de données de sécurité des matériels avant la manipulation des produits.
CAUTION Hazardous waste. Refer to MSDS(s) and local regulations for handling and disposal.	ATTENTION Déchets dangereux. Lire les fiches de données de sécurité des matériels et les réglementations locales en matière de manipulation et d'élimination des déchets.
CAUTION Hot surface.	ATTENTION Surface brûlante.
DANGER High voltage.	DANGER Haute tension.
WARNING To reduce the chance of electrical shock, do not remove covers that require tool access. No user-serviceable parts are inside. Refer servicing to Applied Biosystems qualified service personnel.	AVERTISSEMENT Pour éviter les risques d'électrocution, ne pas retirer les capots dont l'ouverture nécessite l'utilisation d'outils. L'instrument ne contient aucune pièce réparable par l'utilisateur. Toute intervention doit être effectuée par le personnel de service qualifié d'Applied Biosystems.
CAUTION Moving parts.	ATTENTION Parties mobiles.
DANGER Class 3B (III) visible and/or invisible LED radiation present when open and interlocks defeated. Avoid exposure to beam.	DANGER Rayonnement visible ou invisible d'un faisceau DEL de Classe 3B, (III) en cas d'ouverture et de neutralisation des dispositifs de sécurité. Eviter toute exposition au faisceau.

Emplacement des avertissements

Le système StepOne™ contient un avertissement à l'emplacement indiqué ci-dessous :



Sécurité générale de l'instrument



AVERTISSEMENT

DANGER DE BLESSURE CORPORELLE. Toute utilisation non conforme avec les indications fournies par Applied Biosystems peut provoquer des blessures corporelles ou endommager l'instrument.

Déplacement et levée de l'instrument



ATTENTION

DANGER DE BLESSURE CORPORELLE. L'instrument doit être déplacé et positionné uniquement par le personnel ou le fournisseur indiqué dans le guide de préparation du site. Ne pas tenter de soulever ou de déplacer l'instrument après l'installation sans l'aide d'une tierce personne. Toujours utiliser le matériel de transport et les techniques de levée appropriés. En soulevant incorrectement l'appareil, l'opérateur risque de se blesser au dos de façon permanente. En fonction du poids de l'instrument, le déplacement et/ou la levée peuvent nécessiter la présence d'au moins deux personnes.

Déplacement et levée d'ordinateurs et de moniteurs



AVERTISSEMENT

Ne pas tenter de lever ou de déplacer l'ordinateur ou le moniteur sans l'aide d'une tierce personne. En fonction du poids de l'ordinateur et/ou du moniteur, le déplacement peut nécessiter la présence d'au moins deux personnes.

Éléments à prendre en compte avant la levée de l'ordinateur et/ou du moniteur :

- Avant la levée de l'ordinateur ou du moniteur, s'assurer d'une prise en main ferme, confortable et sûre.
- Vérifier que le parcours emprunté pour déplacer l'objet est dégagé de tout obstacle.
- Ne pas soulever un objet et effectuer en même temps une rotation du torse.
- Garder le dos bien droit et soulever en poussant uniquement avec les jambes.
- Les différents intervenants doivent coordonner leurs mouvements de levée et de déplacement avant chaque manœuvre.
- Au lieu de soulever l'objet alors qu'il se trouve dans le carton, basculer délicatement ce dernier sur le côté, puis le maintenir en position pendant qu'une autre personne en fait glisser le contenu.

Utilisation de l'instrument

Chaque utilisateur de l'instrument doit :

- Être informé des pratiques de sécurité générales des laboratoires et spécifiques de l'instrument.
- Lire et comprendre toutes les fiches de données de sécurité concernées. Voir « À propos des fiches de données de sécurité » à la page xvi.

Nettoyage ou décontamination de l'instrument



ATTENTION

Avant d'utiliser une méthode de nettoyage ou de décontamination autre que celles recommandées par le fabricant, vérifier auprès de celui-ci qu'elle ne risque pas d'endommager l'appareil.

Sécurité chimique

Mise en garde sur les dangers chimiques



DANGER CHIMIQUE. Avant de manipuler des produits chimiques, se référer à la fiche de données de sécurité fournie par le fabricant et respecter toutes les précautions d'usage.



DANGER DE STOCKAGE CHIMIQUE. En raison des risques de bris ou d'éclatement du verre, ne jamais recueillir ou entreposer les déchets dans un récipient en verre. Les bouteilles de déchets ou de réactifs composées de verre peuvent se fendre et fuir. Chaque bouteille de déchets doit être sécurisée dans un conteneur de protection en polyéthylène à faible densité dont le couvercle doit être fixé et les poignées verrouillées en position verticale. Porter des gants, des vêtements et des protections oculaires appropriés en manipulant les bouteilles de déchets et de réactifs.

Instructions de sécurité chimique

Pour limiter les dangers chimiques :

- Lire et comprendre les fiches de données sur la sécurité des produits chimiques fournies par le fabricant avant de stocker, manipuler ou utiliser les matériaux dangereux ou les produits chimiques. (Voir « À propos des fiches de données de sécurité » à la page xvi.)
- Limiter les contacts avec les produits chimiques. Porter des équipements de protection appropriés lors de la manipulation des produits chimiques (par exemple : lunettes de sûreté, gants ou vêtements de protection). Pour obtenir d'autres consignes de sécurité, consulter les fiches de données de sécurité.
- Limiter l'inhalation des produits chimiques. Ne pas laisser les récipients des produits chimiques ouverts. Ils ne doivent être utilisés qu'avec une ventilation adéquate (par exemple sous une hotte fermée). Pour obtenir d'autres consignes de sécurité, consulter les fiches de données de sécurité.
- Vérifier régulièrement l'absence de fuite ou d'écoulement des produits chimiques. En cas de fuite ou d'écoulement d'un produit, respecter les directives de nettoyage du fabricant recommandées sur la fiche de données de sécurité.
- Respecter toutes les réglementations locales, nationales et communautaires quant au stockage, à la manipulation et à l'élimination des produits chimiques.

À propos des fiches de données de sécurité

Les fabricants fournissent à leurs *nouveaux* clients des fiches de données de sécurité avec les produits chimiques dangereux. Ils transmettent également des fiches de données de sécurité avec la première livraison d'un produit chimique dangereux dès que ces documents sont mis à jour. Les fiches de données de sécurité incluent les consignes de sécurité destinées au stockage, à la manipulation, au transport et à la mise au rebut des produits chimiques dans des conditions sécurisées.

À chaque nouvelle fiche de données de sécurité fournie avec un produit chimique dangereux, nous recommandons fortement de mettre à jour les archives.

Obtention de fiches de données de sécurité

La fiche de données de sécurité des produits chimiques fournis par Applied Biosystems est disponible gratuitement 24 h/24. Pour obtenir des fiches de données de sécurité :

1. Aller à la page <https://docs.appliedbiosystems.com/msdssearch.html>.
2. Dans le champ Search (Rechercher) de la page MSDS Search (Rechercher une fiche de données de sécurité) :
 - a. Taper le nom du produit chimique, le numéro de référence ou toute autre information susceptible de distinguer la fiche de données de sécurité.
 - b. Sélectionner la langue du document.
 - c. Cliquer sur **Search** (Rechercher).
3. Pour afficher, télécharger ou imprimer le document requis :
 - a. Effectuer un clic droit sur le titre du document.
 - b. Sélectionner :
 - **Open** (Ouvrir) pour afficher le document
 - **Save Target As** (Enregistrer la cible sous) pour télécharger une version PDF du document vers n'importe quel emplacement
 - **Print Target** (Imprimer la cible) pour imprimer le document
4. Pour recevoir une fiche de données de sécurité par télécopie ou par courrier électronique, procéder comme suit dans la page Search Results (Résultats de la recherche) :
 - a. Sélectionner **Fax** ou **Email** (Courrier électronique) sous le titre du document.
 - b. Cliquer sur **RETRIEVE DOCUMENTS** (Obtenir les documents) à la fin de la liste de documents.
 - c. Entrer les informations requises.
 - d. Cliquer sur **View/Deliver Selected Documents Now** (Afficher/Envoyer les documents sélectionnés maintenant).

Remarque : Pour obtenir la fiche de données de sécurité des produits chimiques non distribués par Applied Biosystems, contacter le fabricant.

Sécurité des déchets chimiques

Déchets chimiques dangereux



DÉCHETS DANGEREUX. Consulter les fiches de données de sécurité et les réglementations locales en matière de manipulation et d'élimination des déchets.



DÉCHETS CHIMIQUES DANGEREUX. Les déchets produits par les instruments Applied Biosystems sont potentiellement dangereux ; ils peuvent entraîner des blessures, des maladies, voire la mort.



DANGER DE STOCKAGE CHIMIQUE. En raison des risques de bris ou d'éclatement du verre, ne jamais recueillir ou entreposer les déchets dans un récipient en verre. Les bouteilles de déchets ou de réactifs composées de verre peuvent se fendre et fuir. Chaque bouteille de déchets doit être sécurisée dans un conteneur de protection en polyéthylène à faible densité dont le couvercle doit être fixé et les poignées verrouillées en position verticale. Porter des gants, des vêtements et des protections oculaires appropriés en manipulant les bouteilles de déchets et de réactifs.

Instructions de sécurité des déchets chimiques

Pour limiter les dangers liés aux déchets chimiques :

- Lire et comprendre les fiches de données de sécurité du fabricant des produits chimiques présents dans le récipient de stockage des déchets avant d'entreposer, de manipuler ou d'éliminer les déchets chimiques.
- Se procurer des récipients à déchets primaire et secondaire. Le récipient primaire contient les déchets immédiats, le récipient secondaire contient les fuites et les écoulements du récipient primaire. Les deux récipients doivent être compatibles avec les matériaux mis au rebut et conformes aux exigences locales, nationales et communautaires en matière de confinement des récipients.
- Limiter les contacts avec les produits chimiques. Porter des équipements de protection appropriés lors de la manipulation des produits chimiques (par exemple : lunettes de sûreté, gants ou vêtements de protection). Pour obtenir d'autres consignes de sécurité, consulter les fiches de données de sécurité.
- Limiter l'inhalation des produits chimiques. Ne pas laisser les récipients des produits chimiques ouverts. Ils ne doivent être utilisés qu'avec une ventilation adéquate (par exemple sous une hotte fermée). Pour obtenir d'autres consignes de sécurité, consulter les fiches de données de sécurité.
- Manipuler les déchets chimiques dans une hotte fermée.
- Une fois le récipient à déchets vidé, il doit être refermé hermétiquement avec le couvercle fourni.
- Éliminer le contenu du bac et de la bouteille à déchets conformément aux bonnes pratiques de laboratoire et aux réglementations environnementales et sanitaires locales, nationales et communautaires en vigueur.

Élimination des déchets

Si l'instrument produit des déchets potentiellement dangereux lors de son fonctionnement, il convient de :

- caractériser (par une analyse si nécessaire) les déchets générés par les applications, les réactifs et les substrats particuliers utilisés dans le laboratoire ;
- veiller à protéger la santé et la sécurité de tous les personnels du laboratoire ;
- vérifier que les déchets de l'instrument sont convenablement stockés, transférés, transportés et éliminés en respectant toutes les réglementations locales, nationales et/ou communautaires en vigueur.

IMPORTANT ! Les matériaux qui représentent un danger biologique ou radioactif nécessitent parfois une manipulation spéciale, et des limitations peuvent s'appliquer à leur élimination.

Sécurité électrique



DANGER DANGER D'ÉLECTROCUTION. L'utilisation du système StepOne™ sans ses panneaux entraîne un risque d'électrocution grave. Ne pas retirer les panneaux de commandes sous risque d'exposer à l'air libre les contacts haute tension.

Fusibles



AVERTISSEMENT DANGER D'INCENDIE. L'utilisation de fusibles ou d'une alimentation haute tension inadaptés peut endommager le circuit électrique de l'instrument et provoquer un incendie. Avant de mettre l'instrument sous tension, vérifier que les fusibles sont correctement insérés et que la tension de l'instrument correspond à celle fournie par le circuit d'alimentation du laboratoire.



AVERTISSEMENT DANGER D'INCENDIE. Pour assurer une protection permanente contre le risque d'incendie, remplacer les fusibles uniquement par des modèles de type et de puissance spécifiés pour l'instrument.

Alimentation



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



DANGER DANGER ÉLECTRIQUE. Utiliser des cordons d'alimentation adaptés et approuvés pour raccorder l'instrument au circuit électrique du site.



DANGER DANGER ÉLECTRIQUE. Brancher le système sur une prise électrique correctement mise à la terre et de puissance adéquate.

Catégorie de surtension

Le système StepOne™ est répertorié dans la catégorie de surtension (classe d'installation) II et désigné en tant que dispositif portable.

Sécurité des diodes électroluminescentes

Pour assurer le bon fonctionnement des diodes électroluminescentes (LED) :

- L'entretien du système doit être confié à un technicien Applied Biosystems.
- Pendant son utilisation, l'instrument doit être équipé de tous ses panneaux de commandes. Lorsque tous les panneaux sont en place, aucune radiation détectable n'est présente. Si l'un des panneaux est retiré lorsque les LED sont activées (durant l'entretien avec les verrouillages de sécurité neutralisés), l'opérateur risque d'être exposé à des émissions supérieures aux limites de la catégorie **3B**.
- Ne pas retirer les étiquettes de sécurité ni neutraliser les verrouillages de sécurité.

Sécurité des dangers biologiques

Risque biologique général



RISQUE BIOLOGIQUE. Les échantillons biologiques tels que les tissus, les fluides corporels, les agents infectieux et le sang humain ou animal présentent un risque de transmission de maladies infectieuses. Suivre toutes les réglementations locales, nationales et/ou communautaires en vigueur. Porter des équipements de protection appropriés, notamment, sans s'y limiter : protections oculaires et faciales, gants et blouse/vêtements de laboratoire. Toutes les opérations doivent être réalisées dans des installations équipées de manière adéquate en utilisant les équipements de sécurité appropriés (par exemple, des dispositifs de confinement physique). Avant toute manipulation de matières potentiellement infectieuses, il convient de former les opérateurs conformément aux réglementations en vigueur et aux besoins de l'entreprise/institution. Lire et respecter les instructions applicables et/ou les exigences réglementaires issues des ressources suivantes :

- Instructions de l'U.S. Department of Health and Human Services (Ministère de la santé et des Services sociaux des États-Unis), publiées dans le document *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (réf. 017-040-00547-4 ; <http://bmbi.od.nih.gov>).
- Occupational Safety and Health Standards, Bloodborne Pathogens (29 CFR§1910.1030 ; http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_01/29cfr1910a_01.html).
- Protocoles du programme de biosécurité de l'entreprise/institution pour la manipulation et l'utilisation des matières potentiellement infectieuses.

Des informations complémentaires à propos des instructions sur les risques biologiques sont disponibles à l'adresse :

<http://www.cdc.gov>

Sécurité de la station de travail

Une bonne ergonomie de la station de travail peut limiter ou empêcher les effets tels que la fatigue, les douleurs et les tensions. Il convient de réduire ou d'éliminer ces effets en configurant la station de travail de façon à promouvoir des postures neutres ou détendues.



ATTENTION

DANGERS LIÉS À L'APPAREIL SQUELETTO-MUSCULAIRE ET À LA GESTUELLE ARTICULAIRE. Ces dangers sont provoqués par des facteurs de risque potentiels qui incluent, sans s'y limiter, la gestuelle articulaire répétée, les positions inconfortables, les efforts trop poussés, le maintien de postures statiques contraignantes, la pression de contact et d'autres facteurs liés à l'environnement des stations de travail.

Pour limiter les dangers liés à l'appareil squeletto-musculaire et à la gestuelle articulaire répétée :

- Utiliser des équipements qui maintiennent confortablement l'opérateur dans des postures de travail neutres et offrent un accès adéquat au clavier, au moniteur et à la souris.
- Positionner le clavier, la souris et le moniteur de façon à promouvoir des postures détendues du corps et de la tête.

Normes de sécurité et de compatibilité électromagnétique (CEM)

Normes de sécurité aux États-Unis et au Canada



Le système StepOne™ a été testé et certifié conforme aux normes :

UL 61010A-1/CAN/CSA C22.2 No. 1010.1-92, « Safety Requirements for Electrical Equipment for Measurement, Control, and Laboratory Use, Part 1: General Requirements ».

UL 61010A-2-010/CAN/CSA 1010.2.010, « Particular Requirements for Laboratory Equipment for the Heating of Materials ».

FDA « Radiation Control for Health and Safety Act of 1968 Performance Standard 21 CFR 1040.10 et 1040.11 », selon le cas.

Norme CEM au Canada

L'instrument a été testé et certifié conforme à la norme ICES-001, 3e édition : « Industrial, Scientific, and Medical Radio Frequency Generators » (Générateurs de fréquence radio industriels, scientifiques et médicaux).

Normes de sécurité et CEM en Europe



Sécurité

Cet instrument est conforme aux exigences de l'Union européenne en matière de sécurité (Directive 73/23/CEE relative aux équipements basse tension). Il a été testé et certifié conforme aux normes EN 61010-1:2001, « Règles de sécurité pour appareils électriques de mesure, de contrôle et de laboratoire, Partie 1 : Prescriptions générales ».

EN 61010-2-010, « Exigences particulières pour appareils de laboratoire utilisés pour l'échauffement des matières ».

EN 61010-2-081, « Prescriptions particulières pour les appareils de laboratoire, automatiques et semi-automatiques, destinés à l'analyse et autres usages ».

CEM

Cet instrument est conforme aux exigences de l'Union européenne en matière d'émission et d'immunité (Directive 89/336/CEE relative à la compatibilité électromagnétique). Il a été testé et certifié conforme à la norme EN 61326 (Groupe 1, Classe B), « Règles de sécurité pour appareils électriques de mesure, de contrôle et de laboratoire : exigences relatives à la CEM ».

Normes CEM en Australie



Cet instrument a été testé et certifié conforme à la norme AS/NZS 2064, « Limits and Methods Measurement of Electromagnetic Disturbance Characteristics of Industrial, Scientific, and Medical (ISM) Radio-frequency Equipment ».

Sommaire du chapitre :

■ À propos du système StepOne™	2
■ À propos des expériences de génotypage	4
■ Utilisation de ce guide	8
■ À propos de l'exemple	10
■ Workflow de l'exemple	11

Remarque : Pour plus d'informations sur l'un des sujets abordés dans ce guide, consulter l'aide du 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.

À propos du système StepOne™

À propos du système

Le Système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ (système StepOne™) emploie des chimies PCR basées sur le principe de la fluorescence pour assurer :

- la détection quantitative des séquences d'acide nucléique par une analyse PCR en temps réel ;
- la détection qualitative des séquences d'acide nucléique 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. Pour les réactions de génotypage, le logiciel StepOne™ peut également collecter les données pendant la PCR (en temps réel), ce qui est souvent 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™ se concentre sur 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 étroit de longueurs d'ondes.
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. Si nécessaire, il effectue les lectures supplémentaires requises par les réactifs fluorescents utilisés dans l'expérience.

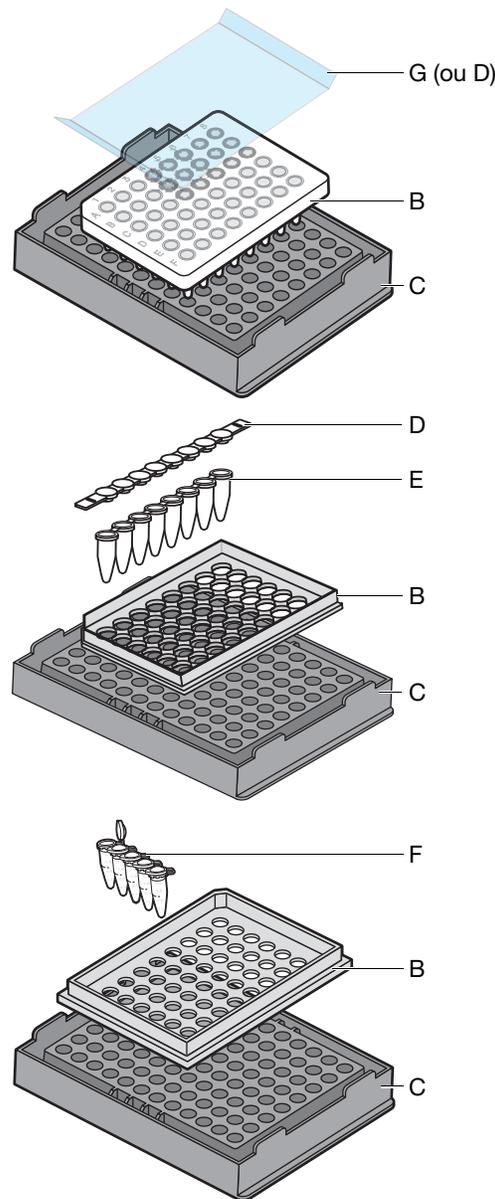
Après une réaction de PCR, le logiciel StepOne™ utilise les données de calibration (spatiale, spectrale et du bruit de fond) pour déterminer l'emplacement et l'intensité des signaux fluorescents à chaque lecture, le fluorophore associé à chaque signal fluorescent et l'amplitude du signal.

Remarques

Essais et consommables compatibles

Le système StepOne™ est compatible avec les réactions de génotypage qui utilisent des réactifs et des protocoles standard avec les MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plates, les MicroAmp™ Fast 8-Tube Strips ou les MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Caps et les MicroAmp™ Fast 48-Well Trays.

IMPORTANT ! Utiliser seulement les consommables Fast (plaques de réactions, barrettes de tubes et tubes) avec le système StepOne™, même lorsque l'expérience utilise des réactifs standard. Bien que les essais TaqMan® SNP Genotyping Assays n'utilisent ni master mix Fast, ni protocole Fast, il convient d'utiliser les consommables Fast pour les réactions de génotypage.



Réf.	Consommable
A	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plates
B	MicroAmp™ Fast 48-Well Tray
C	MicroAmp™ 96-well Splash-free Support Base
D	MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips
E	MicroAmp™ Fast 8-Tube Strips
F	MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Caps
G	MicroAmp Optical 48-Well Adhesive Cover

Remarques

À propos des expériences de génotypage

Analyse en point final

Les réactions de génotypage sont réalisées en point final. Dans les analyses en point final :

- les données sont collectées à la fin du processus PCR ;
- les réactions sont caractérisées par la quantité de séquence cible accumulée à la fin de la PCR (Saiki *et al.*, 1985) ;
- le point de données est l'intensité normalisée du reporter ou de la valeur R_n .

Certaines analyses en point final incluent également des points de données pré-PCR. Si tel est le cas, le système calcule la valeur delta R_n (ΔR_n) avec la formule suivante :

$$R_n(\text{post-PCR}) - R_n(\text{pré-PCR}) = \Delta R_n$$

Remarque : Dans ce guide, le terme *expérience* fait référence au processus complet d'expérience, depuis la création jusqu'à l'analyse des données.

Données PCR en temps réel pour les analyses en point final

Le logiciel StepOne™ offre la possibilité de collecter des données en temps réel pour les expériences de présence/absence et de génotypage. Si une expérience échoue, les données en temps réel peuvent aider à déterminer les causes du problème.

À propos des essais TaqMan® SNP Genotyping Assays

Un essai de génotypage détecte les variantes d'une séquence d'acide nucléique unique sans quantifier la cible. La présence de deux sondes dans chaque réaction permet de génotyper les deux variantes possibles sur le site du polymorphisme de nucléotide unique (SNP) dans une séquence cible.

Chaque essai TaqMan® SNP Genotyping Assay comporte un tube unique prêt à l'emploi qui contient :

- Deux amorces spécifiques de la séquence pour amplifier le polymorphisme concerné
- Deux sondes TaqMan® MGB spécifiques des allèles pour détecter les allèles du polymorphisme spécifique concerné

À propos des sondes TaqMan® MGB

Chaque sonde TaqMan® MGB spécifique d'un allèle possède :

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

La sonde pour l'allèle 1 marquée par le fluorophore VIC® correspond au premier nucléotide entre crochets de la séquence contexte dans le fichier AIF (Assay Information File – fichier d'informations sur l'essai) fourni avec chaque commande. La sonde pour l'allèle 2 marquée par le fluorophore FAM™ correspond au deuxième nucléotide entre crochets de la séquence contexte dans le fichier AIF. Pour la séquence contexte ATCGATT[G/T]ATCC, la sonde marquée par le fluorophore VIC® se lie à l'allèle G et la sonde marquée par le fluorophore FAM™ se lie à l'allèle T.

Remarques

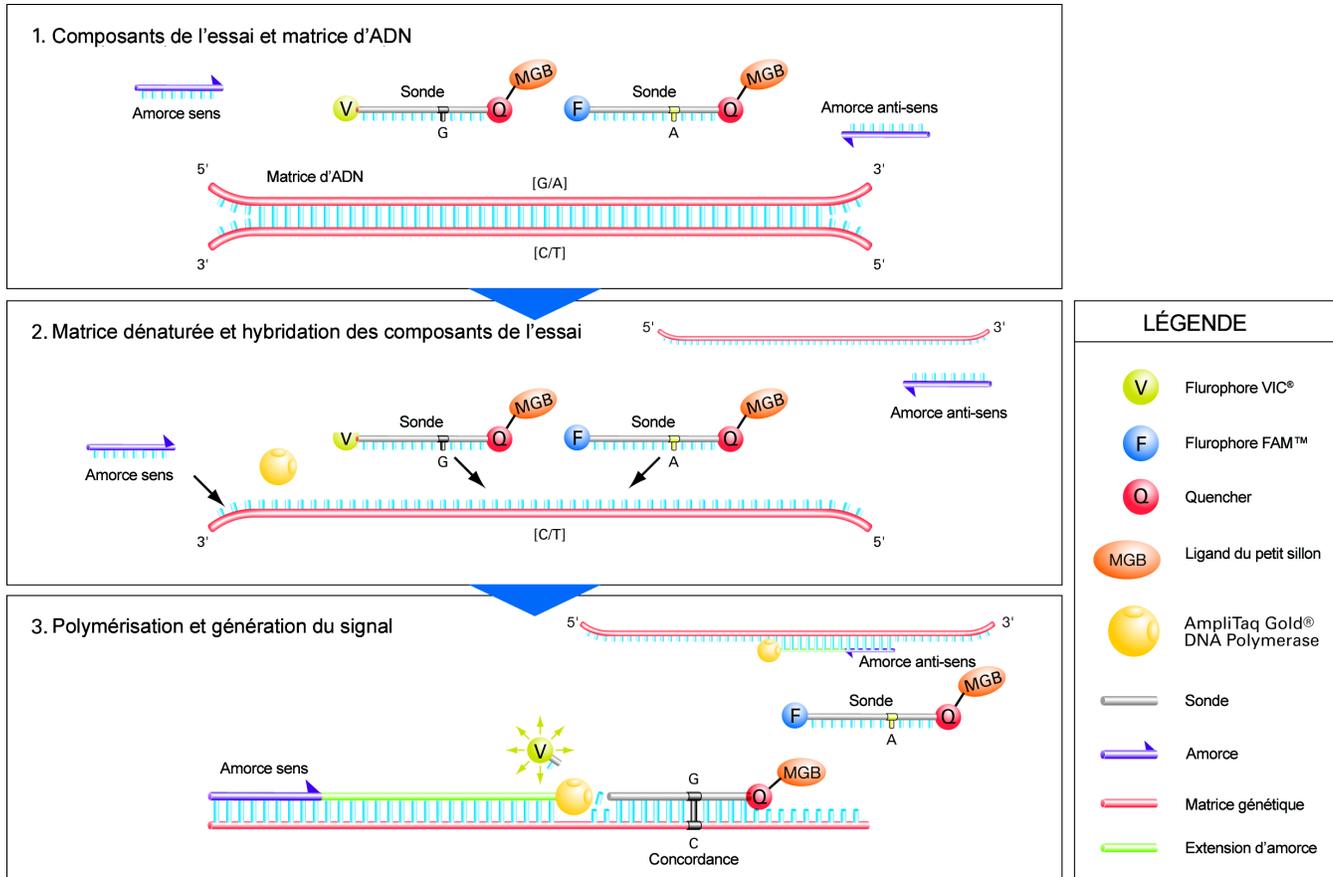
- Un ligand du petit sillon (MGB) augmente la température de fusion (T_m) pour une longueur de sonde donnée et permet de concevoir des sondes plus courtes (Alfonina *et al.*, 1997, Kutuyavin *et al.*, 1997). L'utilisation de sondes plus courtes produit des différences de valeurs de T_m plus importantes entre les sondes spécifiques et non spécifiques, ainsi qu'un génotypage plus efficace.
- Un quencher non fluorescent (NFQ) à l'extrémité 3' de la sonde permet une détection plus sensible de la fluorescence du reporter qu'avec un quencher fluorescent.

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

Essai 5' nucléase La figure ci-dessous représente de manière schématique la détection 5' nucléase. Pendant la PCR :

- Chaque sonde TaqMan® MGB s'hybride spécifiquement sur sa séquence complémentaire entre les amorces sens et anti-sens.
- Lorsque la sonde oligonucléotidique est intacte, la proximité entre le fluorophore du quencher et le reporter empêche le reporter d'émettre son signal.
- La polymérase AmpliTaq Gold® DNA Polymerase étend les amorces liées à l'ADN génomique.
- La polymérase AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (5' nucléase) clive les sondes qui s'hybrident sur la séquence cible.
- Le clivage des sondes hybridées sur la séquence cible sépare le quencher du reporter, ce qui augmente la fluorescence du reporter. Le signal de fluorescence généré par l'amplification par PCR indique les allèles présents dans l'échantillon.

Remarques _____



Limitation de la fluorescence non spécifique

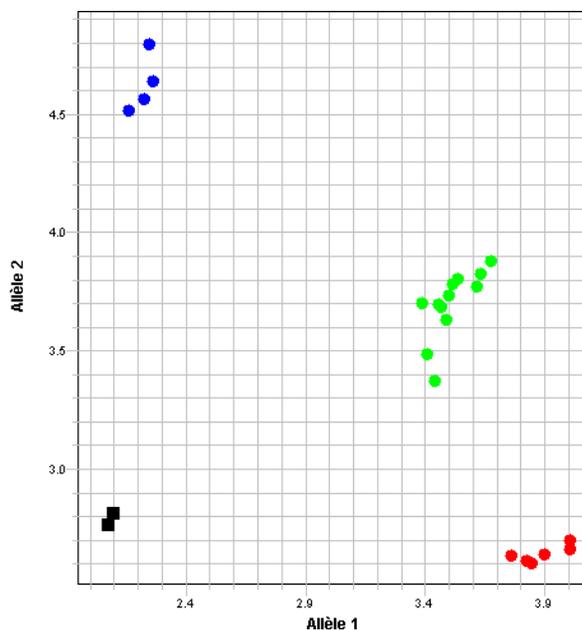
Dans les essais TaqMan®, la fluorescence provenant de sondes liées de manière non spécifique diminue, car les non-spécificités de nucléotides entre une sonde et une séquence réduisent les possibilités de clivage de la sonde. Avec une sonde courte, la non-spécificité d'une paire de bases possède un effet négatif plus important sur la liaison. La sonde non spécifique n'est pas parfaitement liée à l'allèle, ce qui permet à la polymérase AmpliTaq® Gold DNA Polymerase de déplacer la sonde sans cliver le fluorophore.

Lecture et analyse des plaques

Le logiciel StepOne™ géotype simultanément les échantillons d'ADN présents sur la plaque de réactions. D'abord, il normalise la fluorescence des reporters sur la fluorescence du fluorophore de référence passive dans chaque puits. Ensuite, il trace les intensités normalisées (R_n) des reporters dans chaque puits d'échantillon sur un graphique de discrimination allélique, ce qui met en évidence l'intensité des reporters pour les sondes spécifiques des allèles. Enfin, le logiciel StepOne™ utilise un algorithme pour regrouper ces données à chaque échantillon et leur attribuer un génotype d'après leur position sur le graphique.

Remarque : L'algorithme d'analyse des génotypes du logiciel StepOne™ ne désigne pas plusieurs génotypes lorsque l'expérience n'en comporte qu'un.

Remarques



Le nuage de points de données peut s'étaler sur l'axe horizontal (allèle 1), l'axe vertical (allèle 2) ou en diagonale (allèle 1/allèle 2). Cette variation provient des différences d'intensité de la fluorescence des reporters après l'amplification par PCR. Le tableau ci-dessous montre la corrélation entre les signaux de fluorescence et les séquences dans un échantillon.

Une augmentation importante...	Indique...
De la fluorescence de la sonde marquée par le fluorophore VIC® uniquement	Une homozygotie pour l'allèle 1
De la fluorescence de la sonde marquée par le fluorophore FAM™ uniquement	Une homozygotie pour l'allèle 2
De la fluorescence des sondes marquées par les fluorophores VIC® et FAM™	Une hétérozygotie des allèles 1 et 2

Remarques _____

Utilisation de ce guide

Utilisation de ce guide comme tutoriel

Les données de l'exemple fourni avec le logiciel StepOne™ permettent d'utiliser ce guide comme tutoriel pour réaliser une réaction de génotypage sur le système StepOne™. Voir les procédures décrites aux chapitres 2 à 5 :

- Chapitre 2 – Création d'une expérience à l'aide de l'assistant de programmation Design Wizard du logiciel.
- Chapitre 3 – Préparation de l'expérience en utilisant les réactifs et volumes calculés par l'assistant de programmation Design Wizard au Chapitre 2.
- Chapitre 4 – Réalisation de l'expérience sur un instrument StepOne™.
- Chapitre 5 – Analyse des résultats.

Pour plus d'informations, voir « À propos de l'exemple » à la page 10.

Les données de l'exemple fourni avec le logiciel StepOne™ permettent d'utiliser ce guide comme tutoriel pour réaliser une réaction de génotypage sur le système StepOne™. Voir les procédures décrites dans les chapitres appropriés :

Chapitre	Procédure
2	Création d'une expérience à l'aide de l'assistant de programmation Design Wizard du logiciel StepOne™.
3	Préparation de l'expérience en utilisant les réactifs et volumes calculés par l'assistant de programmation Design Wizard au Chapitre 2.
4	Réalisation de l'expérience sur un instrument StepOne™.
5	Analyse des résultats.

Pour plus d'informations, voir « À propos de l'exemple » à la page 10.

Utilisation de ce guide avec des connaissances pratiques

Une fois que les exercices du tutoriel présentés aux chapitres 2 à 5 sont terminés, ce guide permet d'utiliser l'assistant de programmation Design Wizard pour créer des réactions de génotypage. Les procédures des chapitres 2 à 5 contiennent des instructions détaillées sur la manière de créer des expériences spécifiques. En outre, il est possible d'utiliser l'un des autres workflows fournis dans le logiciel StepOne™ pour effectuer des expériences. Le tableau ci-dessous rappelle tous les workflows disponibles dans le logiciel StepOne™.

Workflow	Description	Voir...
Design Wizard (Assistant de programmation)	L'utilisateur entre les paramètres de l'expérience à mesure que l'assistant lui demande les informations pratiques de l'expérience.	Chapitre 2
Advanced Setup (Configuration avancée)	L'utilisateur configure une nouvelle expérience en s'appuyant sur ses connaissances pratiques. Il permet aux utilisateurs expérimentés de créer des expériences conformes à leurs besoins.	Page 98

Remarques

Workflow	Description	Voir...
QuickStart (Démarrage rapide)	L'utilisateur démarre une nouvelle expérience sans les informations de configuration de la plaque.	Page 104
Template (Modèle)	L'utilisateur configure une nouvelle expérience en utilisant les informations de configuration d'un modèle.	Page 109
Export/Import (Exportation/ Importation)	L'utilisateur importe des modèles existants d'expériences à partir de fichiers texte ASCII contenant des informations de configuration.	Page 110

Remarques _____

À propos de l'exemple

Pour illustrer la réalisation d'une expérience de génotypage, ce guide décrit les étapes de création et d'analyse d'un exemple. La configuration de l'exemple est tout à fait classique, ce qui permet de se familiariser rapidement avec le système StepOne™.

Description L'objectif de l'exemple de réaction de génotypage est d'étudier l'essai SNP rs8039 dans lequel les génotypes possibles sont AA, AC et CC. Dans l'exemple, 20 échantillons inconnus d'ADN génomique (ADNg) ont été génotypés avec l'essai TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay ID C__11711420_30. Les réactions ont été configurées pour que les amorces et les sondes PCR qui ciblent les deux allèles de l'essai SNP rs8039 soient présentes dans le même puits. La PCR a été préparée avec le master mix TaqMan® Universal PCR et exécutée d'après le protocole décrit dans le document *Performing a TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay for 96-Well Plates Quick Reference Card* (réf. 4367636A).

Plan de la plaque de réactions L'illustration ci-dessous montre le plan de la plaque de réactions utilisée pour l'expérience donnée en exemple.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	U C__11711420_30	N C__11711420_30	Sample 1 U C__11711420_30	Sample 2 U C__11711420_30	Sample 3 U C__11711420_30	Sample 4 U C__11711420_30	Sample 5 U C__11711420_30	Sample 6 U C__11711420_30
B	Sample 7 U C__11711420_30	Sample 8 U C__11711420_30	Sample 9 U C__11711420_30	Sample 10 U C__11711420_30	Sample 11 U C__11711420_30	Sample 12 U C__11711420_30	Sample 13 U C__11711420_30	Sample 14 U C__11711420_30
C	Sample 15 U C__11711420_30	Sample 16 U C__11711420_30	Sample 17 U C__11711420_30	Sample 18 U C__11711420_30	Sample 19 U C__11711420_30	Sample 20 U C__11711420_30	Sample 19 P C__11711420_30	Sample 20 P C__11711420_30
D								
E								
F								

Wells: U 20 Unknown N 2 Negative Control P 2 Positive Control 24 Empty

À propos des données de l'exemple

L'exemple décrit dans ce guide est inclus avec le logiciel StepOne™. Le fichier de l'exemple (Genotyping Example.eds) est disponible à l'emplacement suivant :

<lecteur>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments\examples

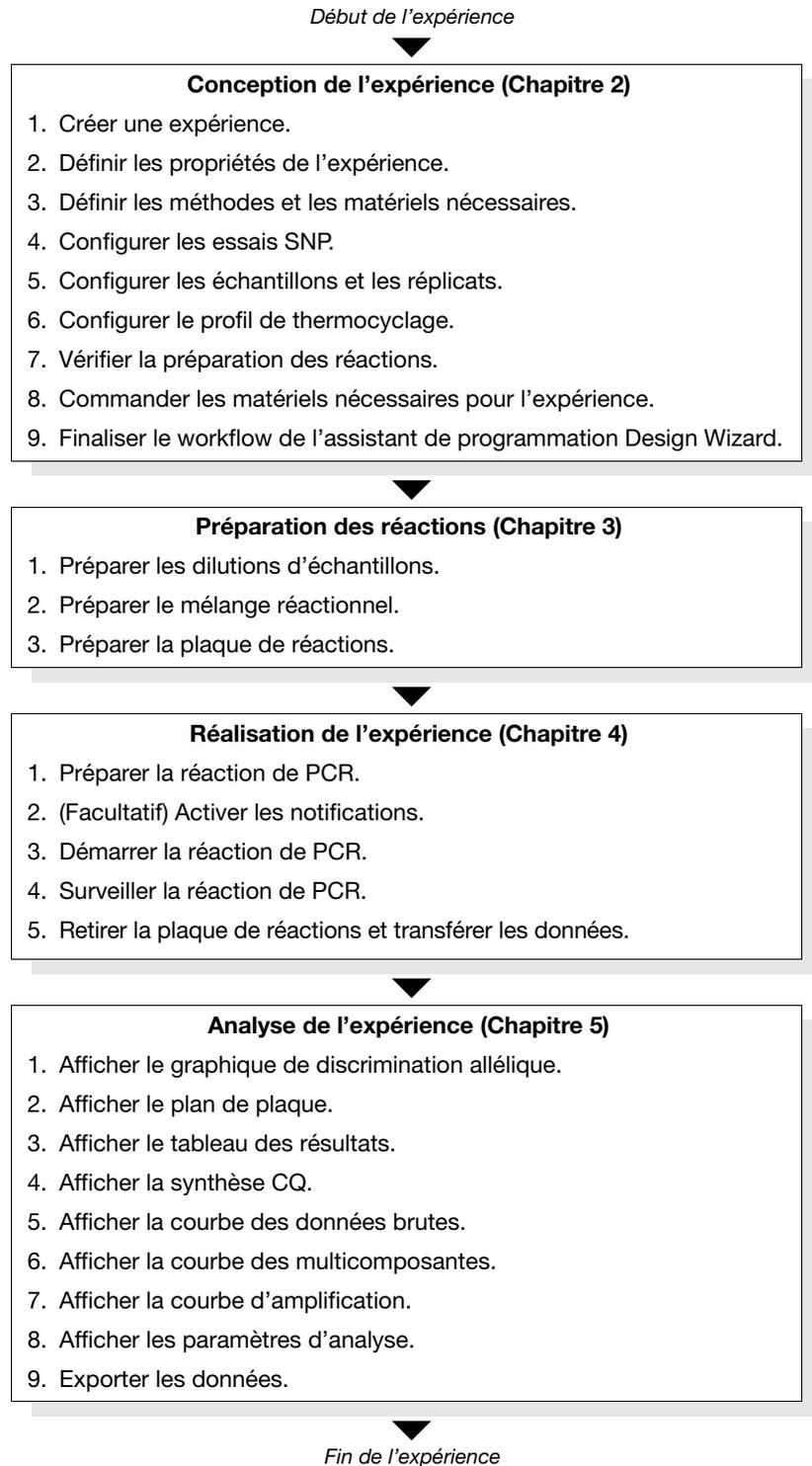
où <lecteur> est le disque dur de l'ordinateur sur lequel le logiciel StepOne™ est installé. Le disque d'installation par défaut est le lecteur C.

Remarques

Workflow de l'exemple

À propos du workflow de l'expérience

L'illustration suivante montre le workflow de l'exemple de réaction de génotypage.



Remarques

Remarques _____

2

Conception de l'expérience

Sommaire du chapitre :

■ Présentation du chapitre	14
■ Création d'une expérience	15
■ Définition des propriétés de l'expérience	16
■ Définition des méthodes et des matériels nécessaires	17
■ Configuration des essais SNP	19
■ Configuration des échantillons et des réplicats	22
■ Configuration du profil de thermocyclage	24
■ Vérification de la préparation des réactions	26
■ Commande des matériels nécessaires pour l'expérience	29
■ Finalisation du workflow de l'assistant de programmation Design Wizard	31

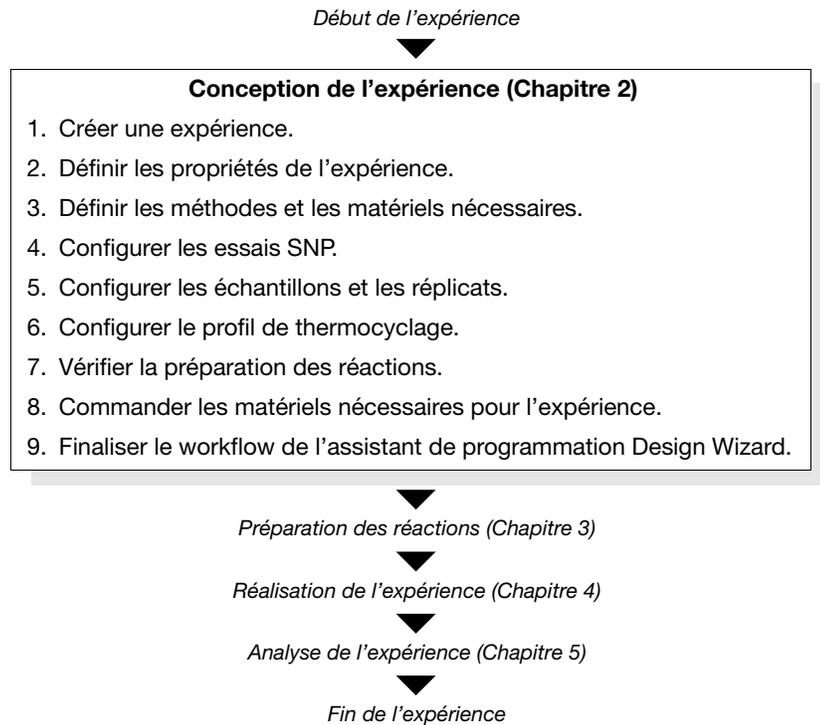
Remarque : Pour plus d'informations sur l'un des sujets abordés dans ce guide, consulter l'aide dans le logiciel du système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ en appuyant sur **F1**, en cliquant sur  dans la barre d'outils ou en sélectionnant **Help (Aide) ▶ StepOne Help (Aide de StepOne)**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

Remarques _____

Présentation du chapitre

Ce chapitre explique comment utiliser l'assistant de programmation Design Wizard pour configurer l'exemple de réaction de génotypage. L'assistant de programmation présente les meilleures pratiques de conception d'une expérience.

Workflow Créer l'expérience à l'aide du workflow suivant :



Remarque : Ce workflow n'est que l'un des nombreux processus utilisés par le logiciel StepOne™ pour configurer les réactions de génotypage. Pour plus d'informations, voir « Utilisation de ce guide avec des connaissances pratiques » à la page 8.

Remarques

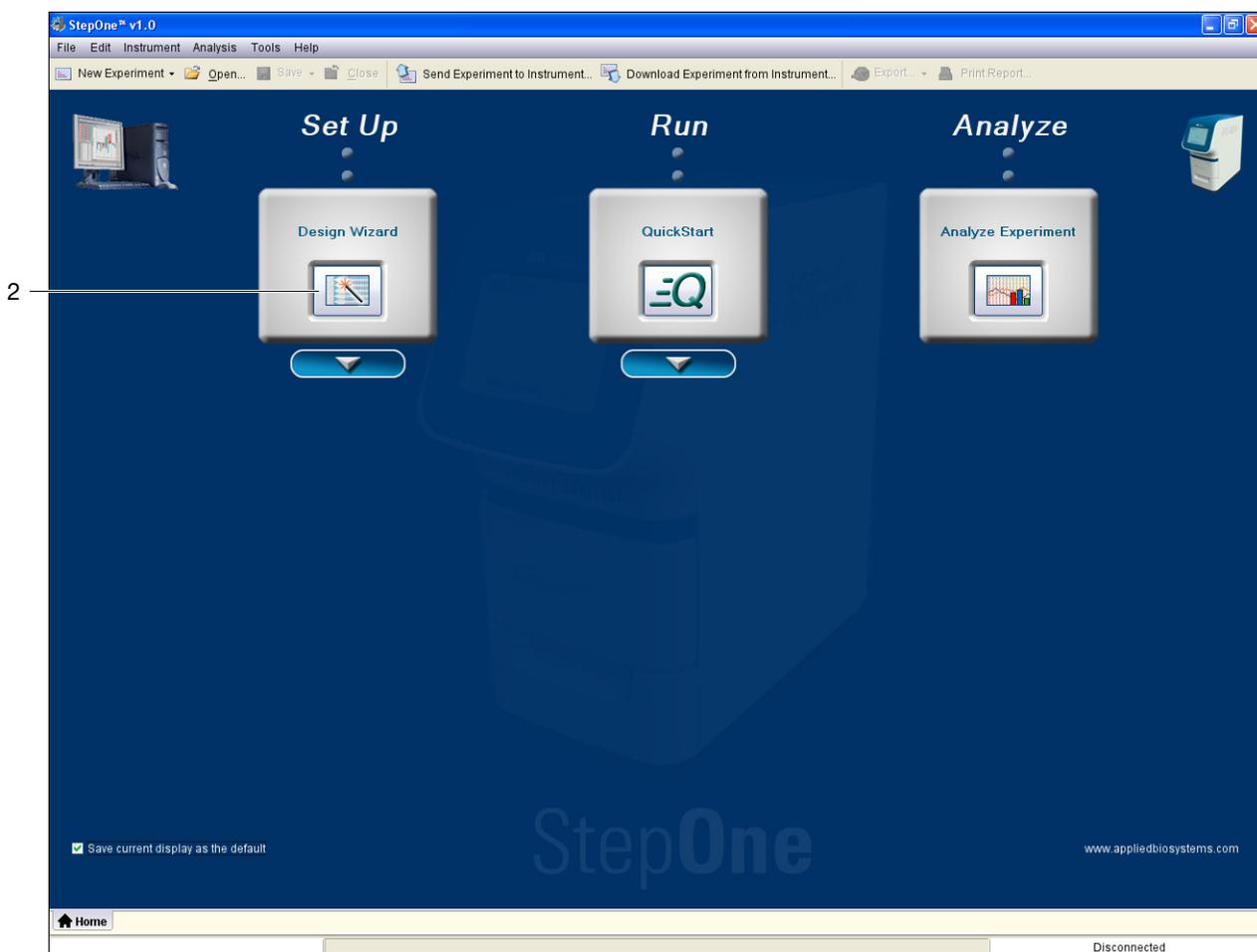
Création d'une expérience

Démarrer le logiciel StepOne™, puis ouvrir l'assistant de programmation Design Wizard pour créer une réaction de génotypage.

Création d'une expérience

1. Double-cliquer sur  ou sélectionner **Start** (Démarrer) ▶ **All Programs** (Tous les programmes) ▶ **Applied Biosystems** ▶ **StepOne** ▶ **StepOne v1.0** pour démarrer le logiciel StepOne™.
2. Dans l'écran Home (Accueil), cliquer sur  **Design Wizard** (Assistant de programmation) pour ouvrir l'assistant de programmation.

Remarque : Pour créer une expérience à l'aide du workflow Advanced Setup (Configuration avancée) ou QuickStart (Démarrage rapide) et d'un modèle d'expérience, voir Annexe A, « Autres workflows d'expérience », à la page 97.



Pour plus d'informations Pour plus d'informations, consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur  ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

Remarques _____

Définition des propriétés de l'expérience

Dans l'écran Experiment Properties (Propriétés de l'expérience), entrer les informations d'identification de l'expérience, puis sélectionner l'application à créer.

Paramètres de l'écran

1. Cliquer dans le champ **Experiment Name** (Nom de l'expérience), puis entrer **Genotyping Example** (Exemple de réaction de génotypage).
2. Cliquer dans le champ **Barcode** (Code-barres), puis entrer **Example** (Exemple).
3. Cliquer dans le champ **User Name** (Nom d'utilisateur), puis entrer **Example User** (Exemple d'utilisateur).
4. Cliquer dans le champ **Comments** (Commentaires), puis entrer **Genotyping Getting Started Guide** (Exemple de réaction de génotypage du guide de mise en route).
5. Sélectionner l'application **Genotyping** (Génotypage).
6. Cliquer sur **Suivant >**.

1A. Define: Experiment Properties Experiment Properties Help

Instructions: Enter identifying information, then select the type of experiment to design.

How do you want to identify this experiment? * = Required

1 * Experiment Name:

2 Barcode (Optional):

3 User Name (Optional):

4 Comments (Optional):

What type of experiment do you want to design?

5 Quantitation Genotyping Presence / Absence

Design a genotyping experiment to detect single nucleotide polymorphism variants of a target nucleic acid sequence in a sample.

Remarques

Instructions de préparation

Lors de la création d'une expérience :

- Entrer un nom descriptif et facile à retenir pour l'expérience.
- (*Facultatif*) Entrer un code-barres de 100 caractères maximum pour identifier la plaque de réactions utilisée dans l'expérience.
- (*Facultatif*) Entrer le nom d'utilisateur du créateur de l'expérience (100 caractères maximum).
- Sélectionner l'application **Genotyping** (Génotypage).

Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur les paramètres de l'écran Experiment Properties (Propriétés de l'expérience), consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur  ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

Définition des méthodes et des matériels nécessaires

Dans l'écran Methods and Materials (Méthodes et matériels), définir les matériels suivants :

- les réactifs utilisés pour génotyper les échantillons ;
- l'état (déshydraté ou hydraté) de la matrice d'ADN génotypée ;
- la vitesse de variation de la température la mieux adaptée aux réactions de PCR ;
- les phases à inclure dans la méthode de thermocyclage.

À propos de la création de l'exemple

L'exemple utilise des réactifs TaqMan® et une matrice d'ADN génomique (ADNg) hydratée dans les réactions de PCR. Puisque les réactions ne contiennent pas de réactif TaqMan® Fast, le système StepOne™ effectue la réaction en utilisant la vitesse de variation de la température standard. En outre, puisque le système StepOne™ effectue le thermocyclage pour la PCR, le profil de thermocyclage de l'expérience comporte les phases de lecture pré-PCR, d'amplification et de lecture post-PCR.

Paramètres de l'écran

1. Sélectionner les réactifs **TaqMan® Reagents** (Réactifs TaqMan).
2. Sélectionner le type de matrice **Wet DNA (gDNA or cDNA)** (ADN hydraté (ADNg ou ADNc)).
3. Sélectionner la vitesse de variation de la température **Standard (~2 hours to complete a run)** (Standard (env. 2 h pour réaliser la réaction)).
4. Sélectionner **Pre-PCR Read** (Lecture pré-PCR) et **Amplification** pour ajouter ces phases au profil de thermocyclage.

Remarque : La lecture post-PCR est obligatoire.

5. Sélectionner **Suivant** >.

Remarques _____

1B. Define: Methods & Materials Methods & Materials Help

Instructions: Select the reagents, select the type of DNA template to use, select the stages for the instrument run, then review the instrument ramp speed for this genotyping experiment.

Which reagents do you want to use for genotyping?

1 TaqMan® Reagents Other

The PCR reactions contain two primers and two TaqMan® probes. The primers are designed to amplify the sequence containing the SNP. Each TaqMan probe is designed to hybridize to one allele sequence and generate fluorescence signal when the allele sequence is amplified.

What type of template do you want to use in the PCR reactions?

2 Wet DNA (gDNA or cDNA) Dry DNA (gDNA or cDNA)

You are adding the purified, resuspended DNA to the final reaction mix. Use an optimized protocol to extract the DNA. Then, make sure the A260/280 ratio is greater than 1.7, the DNA does not contain PCR inhibitors, agarose gel electrophoresis shows the DNA is intact, and the DNA has not been heated above 60 °C.

Use the standard ramp speed in the instrument run for this genotyping experiment.

3 Standard (~ 2 hours to complete a run)

For optimal results using the standard ramp speed, Applied Biosystems recommends standard reagents for your PCR reactions.

Which stages do you want to include in the instrument run?

4 Pre-PCR Read Amplification Post-PCR Read

Instructions de préparation

Lors de la création d'une expérience :

- Sélectionner **Other** (Autre) si les réactifs TaqMan® ne sont pas utilisés pour amplifier et détecter les séquences cible dans l'expérience.

Remarque : L'écran Reaction Setup (Préparation des réactions) n'est pas disponible avec la sélection Other (Autre).

- Si une matrice autre que l'ADN génomique (ADNg) ou l'ADNc est utilisée, sélectionner l'option qui décrit l'état des échantillons (**Wet DNA** (ADN hydraté) ou **Dry DNA** (ADN déshydraté)).

Remarques

- Sélectionner la vitesse de variation de la température **Standard** adaptée à l'activité de l'instrument.

IMPORTANT ! Les essais TaqMan[®] SNP Genotyping Assays ne sont pas compatibles avec les réactifs Fast. Par conséquent, l'assistant de programmation Design Wizard ne prend pas en charge la vitesse de variation de la température Fast (Rapide) pour les réactions de génotypage. Pour utiliser la vitesse de variation de la température Fast (Rapide), utiliser le workflow Advanced Setup (Configuration avancée) afin de configurer la réaction de génotypage.

- Pour effectuer l'amplification par PCR sur un thermocycleur autre que le système StepOne[™], désactiver l'option **Amplification**.

Remarque : La lecture pré-PCR est facultative, mais recommandée. Le logiciel StepOne[™] utilise la lecture pré-PCR pour normaliser les données post-PCR.

Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur l'écran Materials & Methods (Méthodes et matériels), consulter l'aide du logiciel StepOne[™] en cliquant sur  ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

Configuration des essais SNP

Dans l'écran Set Up SNP Assays (Configurer les essais SNP), entrer le nombre d'essais SNP inclus dans l'expérience, puis définir leurs propriétés.

À propos de la création de l'exemple

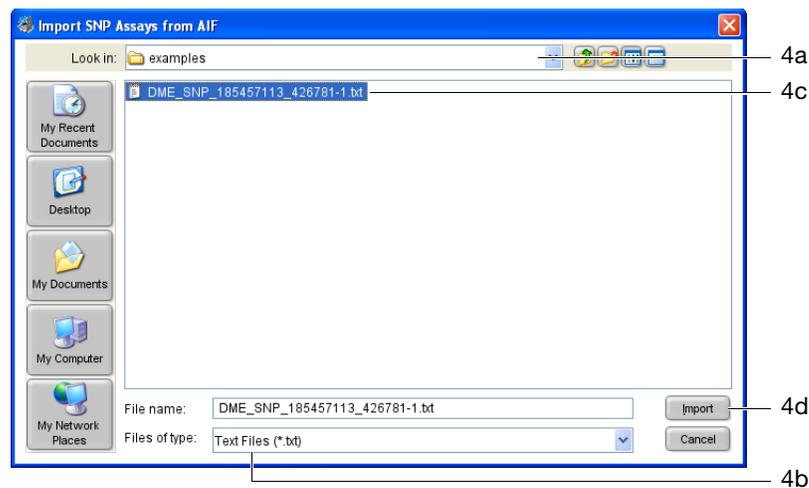
L'exemple évalue les échantillons pour l'essai SNP rs8039. L'essai étant de type TaqMan[®] Drug Metabolism Genotyping Assay (ID C__11711420_30), les informations sur l'essai SNP peuvent être importées à partir du fichier AIF (fichier d'informations sur l'essai) fourni avec l'essai ou téléchargé sur le site Web d'Applied Biosystems.

Paramètres de l'écran SNP Assays (Essais SNP)

1. Entrer **1** pour le nombre d'essais SNP étudiés.
2. Cliquer sur **Yes (Select SNP Assay from SNP Assay Manager)** (Oui (Sélectionner l'essai SNP dans le gestionnaire des essais SNP)).
3. Cliquer sur **Select SNP Assay(s) from Library** (Sélectionner les essais dans la bibliothèque).

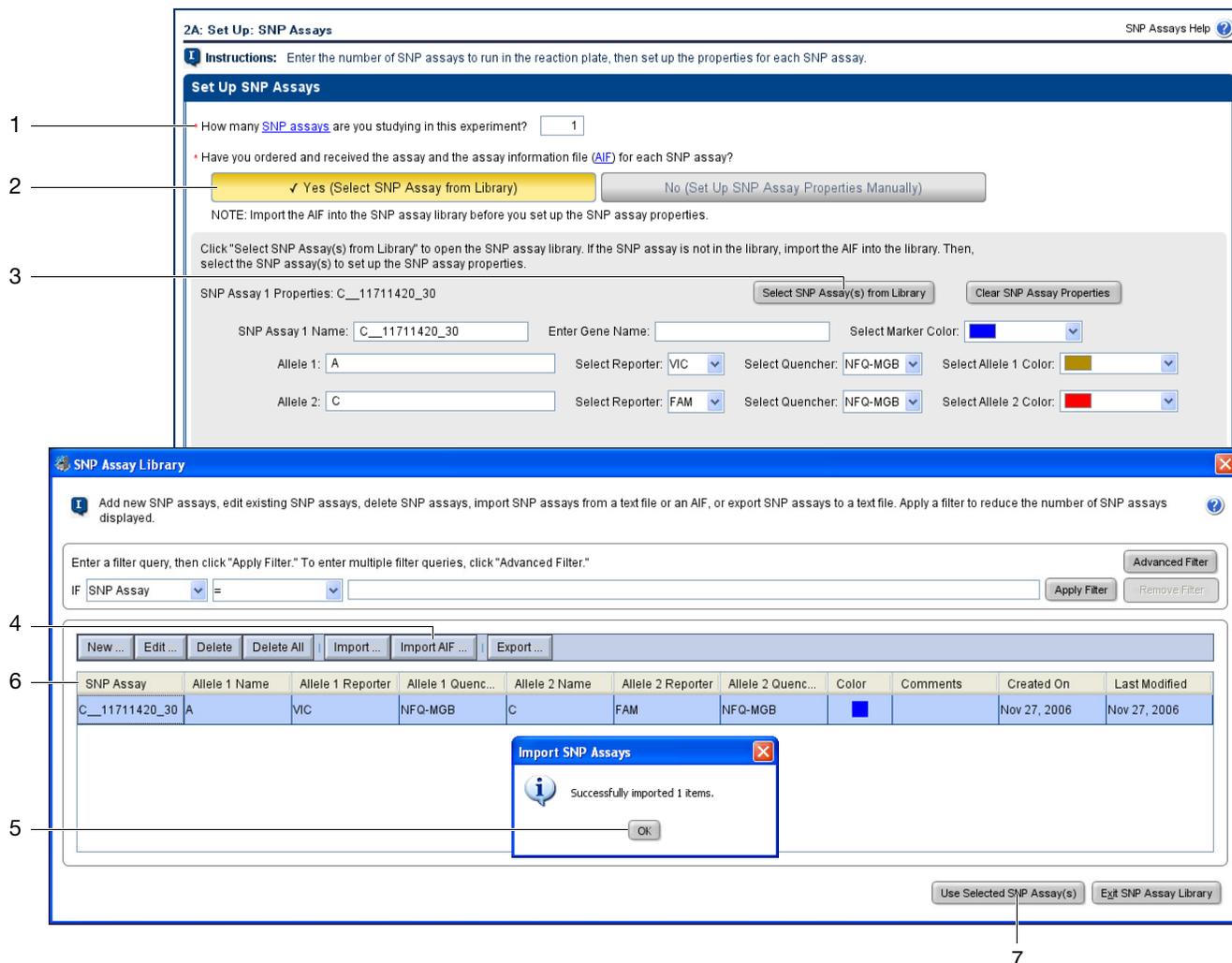
Remarques _____

4. Cliquer sur **Import AIF** (Importer le fichier AIF), puis utiliser la fenêtre Import SNP Assays from AIF (Importer les essais SNP à partir du fichier AIF) pour importer l'essai SNP à partir du fichier AIF :
 - a. Atteindre l'emplacement :
<lecteur>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments\examples
 - b. Dans la liste déroulante Files of type (Types de fichiers), sélectionner **Text Files (*.txt)** (Fichiers texte (*.txt)).
 - c. Sélectionner **DME_SNP_185457113_426781-1.txt**.
 - d. Cliquer sur **Import** (Importer).



5. Dans la fenêtre SNP Import Properties (Propriétés d'importation de SNP), cliquer sur **OK**.
6. Sélectionner l'essai SNP **C__11711420_30**.
7. Cliquer sur **Use Selected Marker(s)** (Utiliser les reporters sélectionnés).
8. Cliquer sur **Suivant >**.

Remarques



Instructions de préparation

Lors de la création d'une expérience :

- Applied Biosystems recommande de ne pas évaluer plus de 6 SNP sur une même plaque de réactions.

Remarque : L'assistant de programmation Design Wizard autorise deux SNP maximum par plaque. Les workflows Advanced Setup (Configuration avancée) et QuickStart (Démarrage rapide) ne limitent pas le nombre de SNP pouvant être évalués.

- Attribuer à chaque essai SNP un nom et une couleur univoques.
- Si les essais SNP ne sont pas configurés manuellement, vérifier que les reporters attribués à chaque allèle sont corrects.

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

Remarques

**Pour plus
d'informations**

Pour plus d'informations sur l'écran Targets SNP Assays (Essais SNP cibles), consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur  ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

Configuration des échantillons et des réplicats

Dans l'écran Set Up Samples and Replicates (Configurer les échantillons et les réplicats), entrer le nombre d'échantillons de l'expérience, le nom des échantillons, puis le nombre de contrôles positifs et négatifs.

**À propos de la
création de
l'exemple**

L'exemple évalue :

- 20 échantillons inconnus
- 2 contrôles négatifs
- 2 contrôles positifs (un hétérozygote et un homozygote allèle 2).

**Paramètres de
l'écran Samples
and Replicates
(Échantillons et
réplicats)**

1. Entrer **20** pour le nombre d'échantillons.
2. Entrer **1** pour le nombre de réplicats.
3. Cliquer sur **All Sample/ SNP Assay Reactions** (Toutes les réactions échantillon/essai SNP).
4. Entrer **2** pour le nombre de contrôles négatifs (puits sans matrice).
5. Entrer **2** pour le nombre de contrôles positives (puits avec des échantillons de génotype connu).
6. Pour le contrôle positif 1, sélectionner **Allele 1/Allele 2 Heterozygous** (Hétérozygote allèle 1/allèle 2).
7. Pour le contrôle positif 2, sélectionner **Allele 2 Homozygous** (Homozygote allèle 2).
8. Cliquer sur **Suivant >**.

Remarques _____

2B. Set Up: Samples & Replicates Samples & Replicates Help

Instructions: Enter the number of samples to test in the reaction plate, enter sample names, then enter the number of negative and positive controls.

1 How many **samples** do you want to test in the reaction plate?

2 How many **replicates** do you need?

For each sample in the reaction plate, enter a sample name and select a sample color.

Enter Sample Name	Color
Sample 1	■
Sample 2	■
Sample 3	■
Sample 4	■
Sample 5	■
Sample 6	■

3 Which **sample/SNP assay reactions** do you want to set up?

All Sample/SNP Assay Reactions Specific Sample/SNP Assay Reactions

4 How many **negative controls** do you need for each SNP assay?

5 How many **positive controls** do you need for each SNP assay? (optional)

6 Select Positive Control 1 Genotype: Allele 1/Allele 2 Heterozygous

7 Select Positive Control 2 Genotype: Allele 2 Homozygous

Well Count

U 20 - Unknown P 2 - Positive Control N 2 - Negative Control 24 - Empty

View Plate Layout

Arrange Plate By: Rows Place Controls in: Upper Left

Show in Wells View Legend

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	N c_1	N c_1	Sample... U c_1	Sample... U c_1	Sample... U c_1	Sample... U c_1	Sample... U c_1	Sample... U c_1
B	Sample... U c_1	Sample 2 U c_1	Sample... U c_1	Sample 3 U c_1	Sample 4 U c_1			
C	Sample 5 U c_1	Sample 6 U c_1	Sample 7 U c_1	Sample 8 U c_1	Sample 9 U c_1	Sample 1 U SNP	P c_1	P c_1
D								
E								
F								

Instructions de préparation

Lors de la création d'une expérience :

- Utiliser de 1 à 48 échantillons. Donner un nom et une couleur univoques à chaque échantillon.
- Applied Biosystems recommande d'utiliser au moins un contrôle négatif pour chaque essai SNP.
- Limiter à 48 le nombre de réactions totales dans chaque expérience. Si le nombre de réactions totales requis est supérieur à 48, réduire le nombre d'essais SNP, d'échantillons, de réplicats ou de contrôles positifs et négatifs, sinon répartir les réactions sur au moins deux plaques.

Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur l'écran Samples & Replicates (Échantillons et réplicats), consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur ? ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

Remarques

Configuration du profil de thermocyclage

Dans l'écran Set Up Run Method (Configurer le profil de thermocyclage), vérifier le volume réactionnel et le profil de thermocyclage par défaut. Si nécessaire, modifier le volume réactionnel, le profil de thermocyclage par défaut ou les remplacer en chargeant un profil de thermocyclage à partir de la bibliothèque.

À propos de la création de l'exemple

L'exemple utilise des réactions de 25 µL avec la méthode TaqMan[®] Drug Metabolism Genotyping Assay indiquée ci-dessous. Le système StepOne[™] étant utilisé pour effectuer le thermocyclage, le profil de thermocyclage contient une phase de thermocyclage pour la PCR.

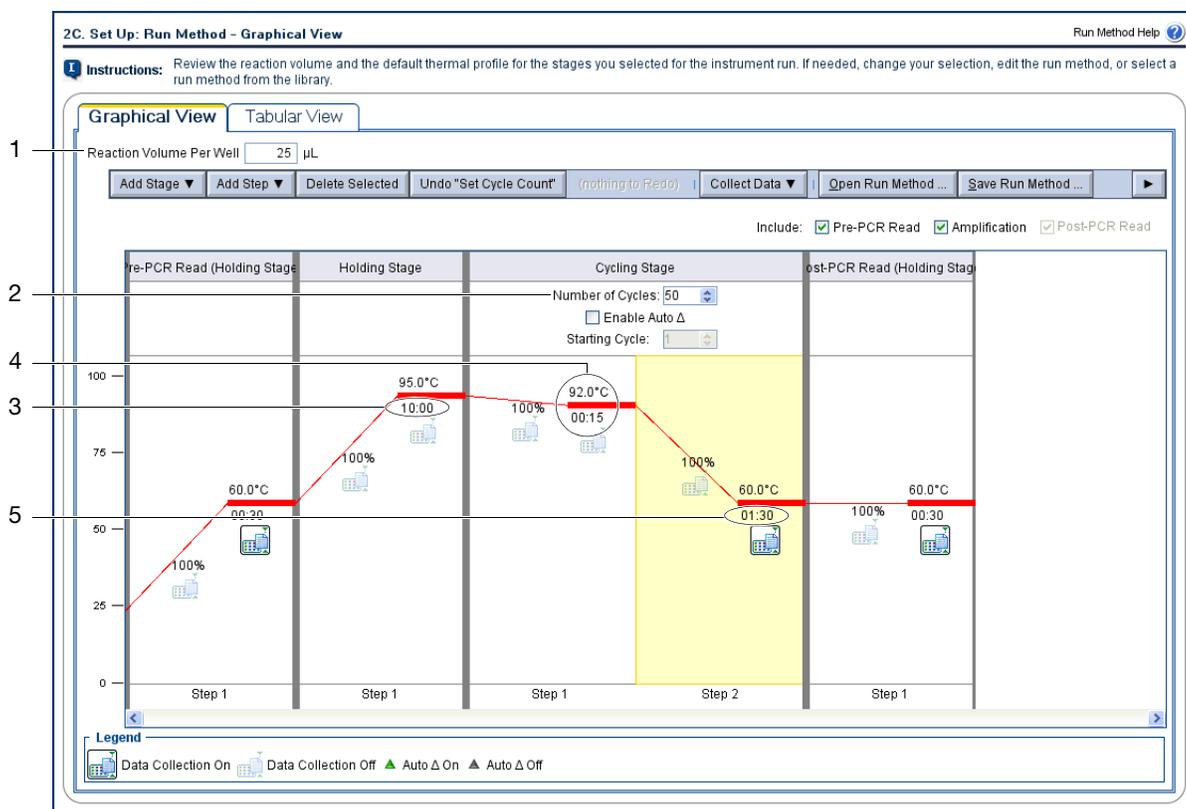
Phase/étape	Lecture pré-PCR	Thermocyclage		Lecture post-PCR	
	Phase de maintien de la température	Phase de maintien de la température	Thermocyclage (50 cycles)		Phase de maintien de la température
			Dénaturation	Hybridation/extension	
Température	60 °C	95 °C	92 °C	60 °C	60 °C
Durée (hh:mm:ss)	00:00:30	00:10:00	00:00:15	00:01:00	00:00:30
Collecte des données	Oui	Non	Non	Oui	Oui

Remarque : Dans la méthode ci-dessus, la collecte des données est activée pour l'étape d'hybridation/extension de sorte que le système StepOne[™] collecte les données en temps réel pendant la PCR. Bien que les données en temps réel ne soient pas nécessaires pour le génotypage, elles peuvent être utiles pour déterminer les causes d'une PCR ayant échoué.

Consultation de l'écran Run Method (Profil de thermocyclage)

1. Cliquer dans le champ **Reaction Volume Per Well** (Volume réactionnel par puits), puis entrer **25**.
2. Cliquer dans le champ **Number of Cycles** (Nombre de cycles) de la colonne Cycling Stage (Phase de thermocyclage), puis entrer **50**.
3. Cliquer sur la durée de la première étape dans la colonne Cycling Stage (Phase de thermocyclage) (95 °C/00:20), puis entrer **10:00**.
4. Ajuster la première étape de la phase de thermocyclage :
 - a. Cliquer sur la température de la première étape (95 °C), puis entrer **92 °C**.
 - b. Cliquer sur la durée de la première étape (92 °C/00:30), puis entrer **00:15**.
5. Cliquer sur la durée de la deuxième étape (60 °C/01:00) dans la colonne Cycling Stage (Phase de thermocyclage), puis entrer **01:30**.
6. Cliquer sur **Suivant >**.

Remarques



Instructions de préparation

Lors de la création d'une expérience :

- Entrer un volume réactionnel/puits de 10 à 30 µL. Applied Biosystems recommande d'utiliser un volume réactionnel de 25 µL pour les réactions de génotypage.
- Vérifier le profil de thermocyclage par défaut. Si l'expérience nécessite d'autres paramètres, modifier la méthode par défaut selon les besoins.
- Cliquer sur **Open Run Method** (Ouvrir le profil de thermocyclage) pour afficher la bibliothèque des profils de thermocyclage. Celle-ci contient peut-être un profil de thermocyclage adapté à l'expérience.
- Penser à inclure l'amplification dans le profil de thermocyclage. Les données en temps réel peuvent être utiles lors de l'identification des causes d'erreurs d'une réaction de génotypage.

Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur l'écran Run Method (Profil de thermocyclage), consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur  ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

Remarques _____

Vérification de la préparation des réactions

Dans l'écran Set Up Reaction Setup (Configuration des paramètres de réactions), entrer le volume réactionnel et le volume excédentaire à préparer, puis vérifier les paramètres de concentration pour le master mix de la PCR, le mix primers-sonde, la cible de l'échantillon dilué et les solutions d'échantillon, puis procéder aux modifications nécessaires.

À propos de la création de l'exemple

L'exemple nécessite un mélange réactionnel suffisant pour 24 réactions et un excédent de 10 % pour compenser les imprécisions de pipetage. Chaque 25 µL de réaction comprend les éléments suivants :

Composant	µL/puits
2X TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	12,50
20X TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay	1,25
Matrice d'ADN génomique (3 à 20 ng) + eau sans DNase	11,25
Volume total	25,00

Paramètres de l'écran Reaction Setup (Préparation des réactions)

1. Cliquer dans le champ **Reaction Volume Per Well** (Volume réactionnel par puits), puis entrer **25 µL**.
2. Cliquer dans le champ **Excess Reaction Volume** (Volume excédentaire), entrer **10%**.
3. Vérifier que la concentration du master mix est de **2X**.
4. Vérifier que la concentration du mix primers-sonde TaqMan® est de **20X**.

2D. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations Reaction Setup Help

Instructions: For each SNP assay in the reaction plate, review the calculated volumes for preparing the PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.

Print Reaction Setup

1 Reaction Volume Per Well: µL

2 Excess Reaction Volume: %

Reaction Mix Calculations | Sample Dilution Calculations

Select SNP Assay: **C_11711420_30**

Reactions for SNP Assay 1

3 Master Mix Concentration: x

4 Assay Mix Concentration: x

Component	Volume (µL) for 1 Reaction	Volume (µL) for 8 Reactions (Including Exc...
Master Mix (2x)	10.00	88.00
Assay Mix (20x)	1.00	8.00
Sample (10x)	2.00	17.60
Water	7.00	61.60
Total Volume	20.00	176.00

Remarques

5. Sélectionner l'onglet **Sample Dilutions Calculations** (Calcul de dilution de l'échantillon).
6. Cliquer dans le champ **Diluted Sample Concentration (10X for Reaction Mix)** (Concentration de l'échantillon dilué (10X pour le mélange réactionnel)), puis entrer **30 ng/μL**.
7. Vérifier que la concentration de la solution mère est de **100 ng/μL** pour tous les échantillons.
8. Imprimer un rapport sur le plan de plaque et le conserver pour référence :
 - a. Cliquer sur **Print Reaction Setup** (Imprimer la préparation des réactions).
 - b. Dans la fenêtre, sélectionner :
 - **Detailed Pipetting Instructions (Instructions de pipetage détaillées)**
 - **Include Plate Layout in the Instructions (Inclure le plan de plaque dans les instructions)**
 - **Use sample color as well color (Utiliser la couleur de l'échantillon comme couleur de puits)**
 - c. Cliquer sur **Print** (Imprimer).
 - d. Dans la fenêtre Print (Imprimer), sélectionner l'imprimante et les options d'impression, puis cliquer sur **OK**.
9. Cliquer sur **Suivant >**.

Remarques _____

2D. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations Reaction Setup Help

Instructions: For each SNP assay in the reaction plate, review the calculated volumes for preparing the PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.

Print Reaction Setup

Reaction Volume Per Well: 25 μ L

Excess Reaction Volume: 10 %

Reaction Mix Calculations **Sample Dilution Calculations**

Diluted Sample Concentration (10 \times for Reaction Mix): 30.0 ng/ μ L

Sample Name	Stock Concentration (ng/ μ L)	Sample Volume (μ L)	Diluent Volume (μ L)	Total Volume of Diluted Sample ...
Sample 1	100.00	0.66	1.54	2.20
Sample 10	100.00	0.66	1.54	2.20
Sample 11	100.00			
Sample 12	100.00			
Sample 13	100.00			
Sample 14	100.00			
Sample 15	100.00			
Sample 16	100.00			
Sample 17	100.00			
Sample 18	100.00			
Sample 19	100.00			
Sample 2	100.00			
Sample 20	100.00			
Sample 3	100.00	0.66	1.54	2.20
Sample 4	100.00	0.66	1.54	2.20
Sample 5	100.00	0.66	1.54	2.20

Print Pipetting Report

You can use pipetting instructions to guide your pipetting and plate setup process. Select the type of pipetting instructions to be printed.

Summary Pipetting Instructions

Detailed Pipetting Instructions

Include Plate Layout in the Instructions

Plate Layout Options

Use sample color as well color

Use task color as well color

Preview Print Cancel

Instructions de préparation

Lors de la création d'une expérience :

- Entrer un volume réactionnel/puits de 10 à 30 μ L. Applied Biosystems recommande d'utiliser un volume réactionnel de 25 μ L pour les réactions de génotypage.
- Entrer un volume excédentaire d'au moins 10 % pour compenser les imprécisions de pipetage et toute autre erreur expérimentale.
- Si une matrice d'ADN déshydraté est utilisée, les composants et volumes sont recalculés.

Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur l'écran Reaction Setup (Préparation des réactions), consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur  ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

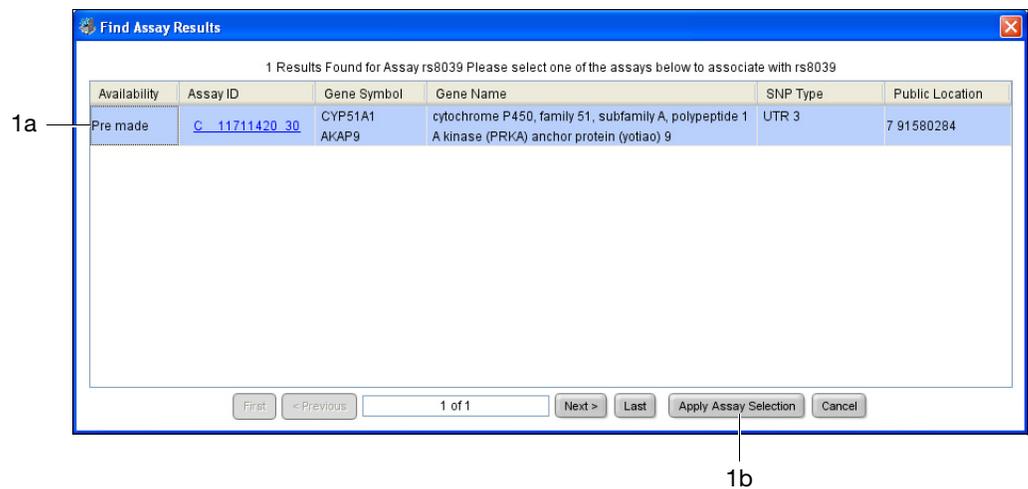
Remarques

Commande des matériels nécessaires pour l'expérience

Dans l'écran Order Materials List (Commande : Liste des matériels), consulter la liste des matériels recommandés pour la préparation de la plaque, ajouter à la commande les articles à acheter, puis commander les articles.

Paramètres de l'écran Ordering Materials (Commande de matériels)

1. Cliquer dans le champ Enter Gene Name or RS Number (Entrer le nom du gène ou le numéro rs), entrer **rs8039**, puis cliquer sur **Find Assay** (Rechercher l'essai) pour obtenir l'essai sur le site Web d'Applied Biosystems :
 - a. Dans la fenêtre Find Assay Results (Résultats de la recherche d'essais), sélectionner l'essai **C__11711420_30**.
 - b. Cliquer sur **Apply Assay Selection** (Utiliser l'essai sélectionné).



2. Dans le panneau Experiment Materials (Matériels de l'expérience), sélectionner :
 - **C__11711420_30**
 - **MicroAmp Optical 48-Well Adhesive Cover**
 - **MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plates**
 - **TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG**
3. Cliquer sur **Add Selected Items to Shopping List** (Ajouter les articles sélectionnés à la liste d'achats).
4. Cliquer dans le champ **Shopping Basket Name** (Nom du panier), puis entrer **Example Experiment** (Exemple).
5. Vérifier que la section Experiment Shopping List (Liste d'achats pour l'expérience) contient les matériels nécessaires dans les quantités adéquates.
6. Cliquer sur **Order Materials in List** (Commander les matériels de la liste).

Remarques _____

7. Entrer les informations de connexion à la boutique Applied Biosystems, puis cliquer sur **Login and Submit** (Se connecter et envoyer) ou sur **Register Now** (S'inscrire maintenant) et suivre le processus d'inscription.
8. Une fois la commande passée, cliquer sur **Finish Designing Experiment** (Finaliser la création de l'expérience).

3A. (Optional) Order: Materials List Materials List Help

Instructions: Review the list of materials recommended to prepare the PCR reaction plate. To create a shopping basket on the Applied Biosystems Store, add items to the shopping list, enter a name for the shopping basket, click "Order Materials in List," then log in.

Find Assay

1 Enter Gene Name or RS Number Enter a gene name or RS number to search the Applied Biosystems Store for a SNP assay.

Experiment Materials List

3 Display:

<input type="checkbox"/> Check All	Item	Part Number	Description
<input checked="" type="checkbox"/>	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate	4375816	The MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate, constructed from a single rigid piece of polypropylene in a 48-well format. Increased thermal contact for faster, more uniform heating.
<input checked="" type="checkbox"/>	MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film	4375928	An optically-clear adhesive film used to seal the samples into the wells of a 48-well microplate. This will reduce the possibility of cross-contamination between sample wells and help ensure consistent real-time PCR data.
<input type="checkbox"/>	TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X)	4304437	One ready-to-use premix. Contains components needed to perform 5' nuclease assays using TaqMan probes with the standard ramp speed. Also contains AmpErase® UNG.

2

Experiment Shopping List (4 items)

<input type="checkbox"/> Check All	Item	Part Number	Quantity
<input type="checkbox"/>	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate	4375816	<input type="text" value="1"/>
<input type="checkbox"/>	MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film	4375928	<input type="text" value="1"/>
<input type="checkbox"/>	TaqMan® Universal PCR Master Mix, No Amp...	4324018	<input type="text" value="1"/>
<input type="checkbox"/>	C__11711420_30	C__11711420_30	<input type="text" value="1"/>

4 6 5

Instructions de préparation

Lors de la création d'une expérience :

- Vérifier que l'ordinateur dispose d'une connexion Internet sans restriction.
- Sélectionner tous les matériels nécessaires à l'expérience et les ajouter à la liste d'achats.

IMPORTANT ! Le système StepOne™ emploie seulement les consommables Fast (plaques de réactions, barrettes de tubes et tubes). Lors de la réalisation d'une réaction de génotypage, utiliser les réactions préparées avec le master mix standard TaqMan® Universal PCR sur un consommable Fast dans des conditions de PCR standard.

Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur l'écran Materials List (Liste des matériels), consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur  ou en sélectionnant **Help** (Aide) ► **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

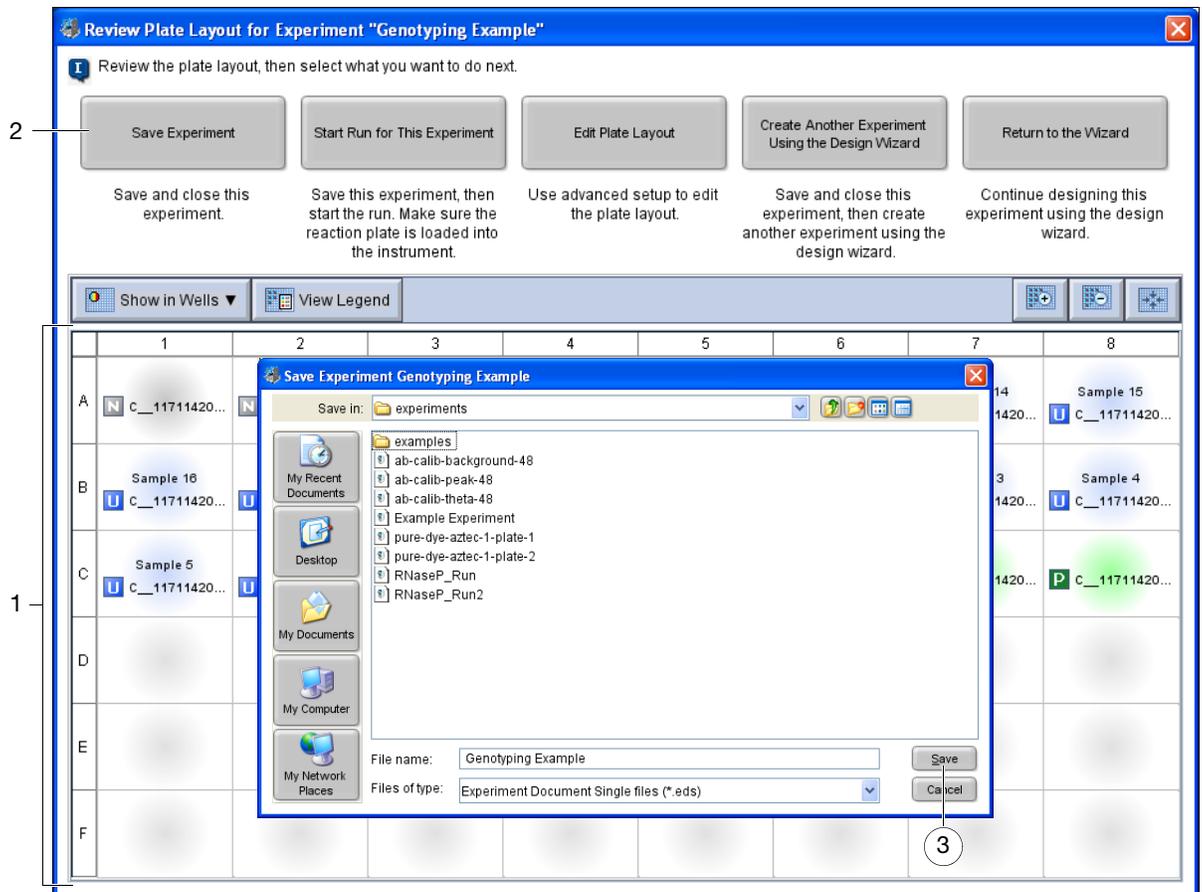
Remarques

Finalisation du workflow de l'assistant de programmation Design Wizard

Dans la fenêtre Review Plate Layout for Experiment (Vérifier le plan de plaque de l'expérience), sélectionner une option pour finaliser la configuration de l'assistant de programmation, vérifier le plan de plaque et démarrer la réaction de PCR.

Finalisation de l'assistant de programmation Design Wizard

1. Vérifier le plan de plaque. Si elle n'est pas correcte, sélectionner **Return to the Wizard** (Revenir à l'assistant) et vérifier les valeurs saisies.
2. Cliquer sur **Save Experiment** (Enregistrer l'expérience).
3. Dans la fenêtre Save Experiment (Enregistrer l'expérience), cliquer sur **Save** (Enregistrer) pour sauvegarder l'expérience sous le nom Genotyping Example.eds.



Remarques _____

Instructions de préparation

Lors de la création d'une expérience, celle-ci est enregistrée à l'emplacement :

<lecteur>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments

où <lecteur> est le répertoire d'installation du logiciel StepOne™.

Remarque : Pour modifier le dossier par défaut, sélectionner **Tools ▶ (Outils) Preferences (Préférences)**, modifier le paramètre du champ Default Data Folder (Répertoire de données par défaut), puis cliquer sur **OK**.

Remarques

3

Préparation des réactions

Sommaire du chapitre :

■ Présentation du chapitre	34
■ Préparation des dilutions d'échantillons	35
■ Préparation du mélange réactionnel	36
■ Préparation de la plaque	38

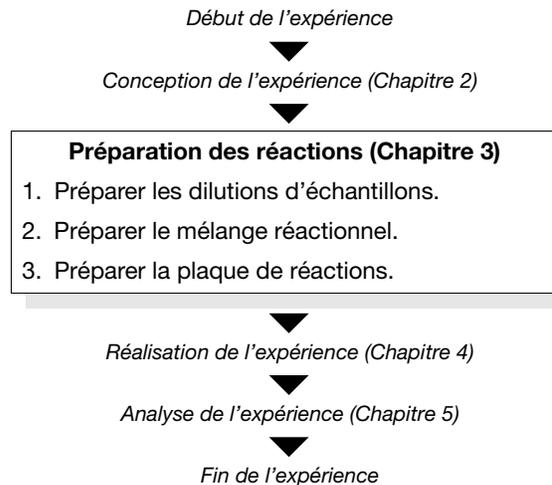
Remarque : Pour plus d'informations sur l'un des sujets abordés dans ce guide, consulter l'aide dans le logiciel du système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ en appuyant sur **F1**, en cliquant sur  dans la barre d'outils ou en sélectionnant **Help (Aide)** ▶ **StepOne Help (Aide de StepOne)**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

Remarques

Présentation du chapitre

Ce chapitre explique comment préparer les réactions de PCR pour la réaction de génotypage donnée en exemple. En outre, il fournit des instructions sur la préparation des réactions de PCR utilisées pour vos propres réactions.

Workflow Préparer les réactions de PCR à l'aide du workflow suivant :



Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur la préparation des essais TaqMan[®] SNP Genotyping Assays, voir les documents :

- *Custom TaqMan[®] SNP Genotyping Assays Protocol* (réf. 4334431)
- *Custom TaqMan[®] Genomic Assays Protocol* (réf. 4367671B)
- *TaqMan[®] SNP Genotyping Assays Protocol* (réf. 4332856C)
- *TaqMan[®] Drug Metabolism Genotyping Assays Protocol* (réf. 4362038A)
- *Performing a Custom TaqMan[®] SNP Genotyping Assay for 96-Well Plates Quick Reference Card* (réf. 4371394A)
- *Performing a TaqMan[®] Drug Metabolism Genotyping Assay for 96-Well Plates Quick Reference Card* (réf. 4367636A)
- *Pre-Developed TaqMan[®] Assay Reagents Allelic Discrimination Protocol* (réf. 4312214C)
- *Allelic Discrimination Pre-Developed TaqMan[®] Assay Reagents Quick Reference Card* (réf. 4312212C)

Remarque : Les procédures de ce chapitre portent essentiellement sur l'utilisation des échantillons d'ADN hydraté. En cas d'utilisation d'ADN déshydraté, voir le protocole de chimie fourni avec le kit PCR pour obtenir plus de renseignements sur la reconstitution et la préparation des échantillons sur la plaque.

Remarques

Préparation des dilutions d'échantillons

Diluer l'échantillon aux concentrations de travail en utilisant les volumes calculés par le logiciel StepOne™ (voir « Vérification de la préparation des réactions » à la page 26).

À propos de l'exemple

Les volumes calculés pour l'exemple de réaction de génotypage sont répertoriés ci-dessous. La concentration finale est de 30,0 ng/μL.

Tube	Nom de l'échantillon	Concentration des échantillons dans la solution mère (ng/μL)	Volume (μL)		
			Solution d'échantillon (μL)	Eau sans DNase (μL)	Total de l'échantillon dilué (μL)
1	Échantillon 1	100,0	0,66	1,54	2,20
2	Échantillon 2	100,0	0,66	1,54	2,20
...
21	Échantillon 21	100,0	0,66	1,54	2,20

Matériels nécessaires

- Eau sans DNase pour diluer l'échantillon
- Microtubes
- Multipipettes et cônes à filtre
- Solution d'échantillon
- Vortex
- Centrifugeuse

Préparation des échantillons

1. Étiqueter un microtube distinct pour chaque échantillon : **Échantillon 1**, **Échantillon 2**, etc. jusqu'à **Échantillon 20**.
2. Ajouter 1,54 μL d'eau sans DNase dans chaque tube vide.
3. Ajouter 0,66 μL de la solution d'échantillon adéquate dans chaque tube.
4. Vortexer chaque échantillon dilué pendant 3 à 5 secondes, puis centrifuger brièvement les tubes.

Instructions de préparation

- Lors de la préparation des échantillons pour une expérience :
- Utiliser de l'eau sans DNase pour diluer les échantillons.
 - Utiliser la même quantité d'ADN par puits dans toutes les expériences.
 - Ne pas chauffer les échantillons d'ADN.

Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur la préparation des essais TaqMan® SNP Genotyping Assays, se reporter au protocole concernant les réactifs utilisés dans les réactions de PCR (voir « Pour plus d'informations » à la page 34).

Remarques _____

Préparation du mélange réactionnel

Préparer le mélange réactionnel pour l'expérience en utilisant les volumes calculés par le logiciel StepOne™. Le logiciel StepOne™ détermine les composants du mélange réactionnel à utiliser en fonction des sélections effectuées dans l'écran Methods and Materials (Méthodes et matériels) (voir « Vérification de la préparation des réactions » à la page 26). Pour les réactions de génotypage, le mélange réactionnel contient tous les composants *sauf* l'échantillon, le tampon ou le contrôle positif.

Matériels nécessaires

- Master mix TaqMan® Universal PCR, No AmpErase® UNG (2X)
- Essai TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay (20X)
- Eau sans DNase
- Microtubes
- Multipipettes
- Cônes à filtre
- Centrifugeuse

Préparation du mélange réactionnel



ATTENTION

DANGER CHIMIQUE. Le master mix **TaqMan® 2X Universal PCR, No AmpErase UNG** peut irriter les yeux et 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.

1. Pour l'essai SNP, ajouter les volumes requis de chaque composant dans un tube de taille appropriée :

Composant	Volume réactionnel			
	Par puits (µL)		24 Rxns. Avec excédent de 10 % (µL)	
	Déshydraté	Hydraté	Déshydraté	Hydraté
Master mix TaqMan® Universal PCR (2X)	12,50	12,50	330	330
Mélange SNP Assay Mix (20X)	1,25	1,25	33	33
H ₂ O, sans DNase	11,25	0	297	0
Volume total du mélange réactionnel	25,00	13,75	660	363

2. Pipeter et refouler délicatement le mélange réactionnel, puis boucher le tube.
3. Centrifuger brièvement le tube.

Remarques _____

Instructions de préparation

Lors de la préparation du mélange réactionnel pour une expérience, veiller à :

- Préparer les réactions séparément pour chaque SNP.
- Inclure un excédent de volume dans les calculs pour compenser les pertes subies pendant le transfert des réactifs.
- Inclure tous les composants requis.
- Préparer les réactifs conformément aux consignes du fabricant.
- Garder le mix primers-sonde à l'abri de la lumière et au congélateur jusqu'au moment de son utilisation. Toute exposition excessive à la lumière peut affecter le fonctionnement des sondes fluorescentes.

Avant l'utilisation :

- Mélanger avec attention le master mix par rotation du flacon.
- Vortexer le mix primers-sonde pour le remettre en suspension, puis centrifuger brièvement le tube.
- Tout échantillon sera décongelé en le plaçant sur la glace, puis vortexé pour le remettre en suspension et brièvement centrifugé.

Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur la préparation du mélange réactionnel, se reporter au protocole concernant les réactifs utilisés dans les réactions de PCR (voir « Pour plus d'informations » à la page 34).

Remarques _____

Préparation de la plaque

Remplir la plaque de réactions avec le mélange réactionnel préparé à la page 36 et les échantillons dilués préparés à la page 35. Les réactions sont ajoutées aux puits d'après le plan de plaque généré dans le logiciel StepOne™ (voir « Configuration des échantillons et des réplicats » à la page 22).

Matériels nécessaires

- Centrifugeuse
- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp Optical 48-Well Adhesive Cover
- Multipipettes et cônes à filtre

Remarque : Le système StepOne™ emploie uniquement les consommables MicroAmp™ Fast.

Préparation de la plaque : ADNg déshydraté

1. Pipeter 1 µL de l'échantillon approprié (3 à 20 ng d'ADN génomique purifié) dans les puits d'une plaque de réactions optique.
Tous les puits appartenant au même essai de génotypage doivent contenir la même quantité d'échantillon ou de contrôle.

2. Déshydrater les échantillons en les laissant s'évaporer à température ambiante dans un endroit obscur sans risque de contamination par les amplicons. (Couvrir la plaque de réactions avec un tissu non-pelucheux pendant l'évaporation.)
3. Transférer 25 µL de mélange réactionnel dans chaque puits.

IMPORTANT ! Veiller à éviter toute contamination croisée entre les puits.

4. Sceller la plaque de réactions avec un film adhésif optique.
5. Vortexer la plaque de réactions pendant 3 à 5 secondes.
6. Centrifuger brièvement la plaque de réactions.
7. Vérifier que le mix réactionnel se trouve au fond de chaque puits de la plaque de réactions. Sinon, recentrifuger la plaque à une vitesse supérieure et plus longtemps.

IMPORTANT ! Éviter toute souillure sur la partie inférieure de la plaque de réactions. En effet, tout liquide ou autre contaminant qui adhère sous la plaque de réactions peut contaminer le bloc et générer un signal de bruit de fond anormalement élevé.

Remarques _____

Préparation de la plaque : ADNg hydraté



Correct	Incorrect
 <p>Le liquide est au fond du puits</p>	 <ul style="list-style-type: none"> • Centrifugée avec une force insuffisante <i>ou</i> • pas assez longtemps

1. Diluer chaque échantillon d'ADN génomique purifié avec de l'eau sans DNase pour produire une quantité finale d'ADN comprise entre 3 et 20 ng par puits de réaction. Le volume d'échantillon d'ADN et d'eau sans DNase doit être de 11,25 μL par réaction.
2. Dans chaque puits de la plaque de réactions, pipeter le volume (indiqué à l'étape 1) d'aliquot de contrôle ou d'échantillon adapté au type de plaque :
 - a. Pour chaque réaction inconnue, ajouter 11,25 μL d'échantillon dans les puits appropriés.
 - b. Pour chaque réaction de contrôle négatif, ajouter 11,25 μL d'eau sans DNase dans les puits appropriés.
 - c. Pour chaque réaction de contrôle positif, ajouter 11,25 μL de contrôle positif dans les puits appropriés.

IMPORTANT ! Vérifier que le génotype de la matrice de contrôle positif ajoutée correspond au génotype attribué au puits.

3. Transférer 13,75 μL de mélange réactionnel dans les puits appropriés.
4. Sceller la plaque de réactions avec un film adhésif optique.
5. Vortexer la plaque de réactions pendant 3 à 5 secondes.
6. Centrifuger brièvement la plaque de réactions.

IMPORTANT ! Éviter toute souillure sur la partie inférieure de la plaque de réactions. En effet, tout liquide ou autre contaminant qui adhère sous la plaque de réactions peut contaminer le bloc et générer un signal de bruit de fond anormalement élevé.



Correct	Incorrect
 <p>Le liquide est au fond du puits</p>	 <ul style="list-style-type: none"> • Centrifugée avec une force insuffisante <i>ou</i> • pas assez longtemps

Remarques _____

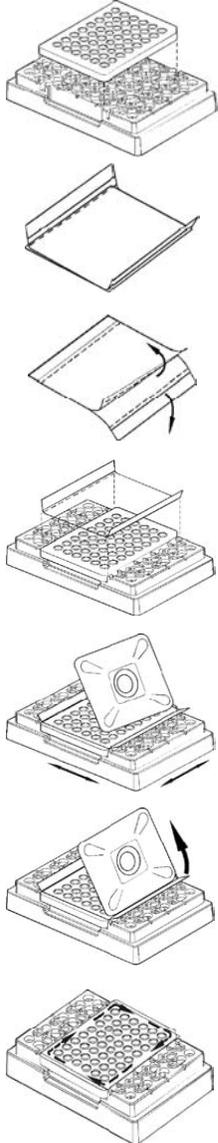
**Instructions de
préparation**

Lors de la préparation de la plaque pour une expérience :

- Contrôler la liste des consommables utilisés.
- Vérifier que les emplacements de la plaque de réactions correspondent au plan affiché dans le logiciel StepOne™.
- Si moins de 40 réactions sont réalisées, utiliser des barrettes de tubes plutôt qu'une plaque de réactions.
- Charger 3 à 20 ng d'ADN génomique purifié par réaction.
- Tous les puits appartenant au même essai de génotypage doivent contenir la même quantité d'échantillon ou de contrôle.
- Plusieurs essais peuvent être exécutés sur une même plaque de réactions, mais ils doivent être analysés séparément.

Remarques _____

- Pour sceller les plaques à l'aide d'un film adhésif optique, procéder comme suit :

Action	Exemple
<p>1. Placer la plaque de réactions optique 48 puits au centre du support anti-projection 96 puits. Vérifier que la plaque se situe au ras de la surface supérieure du support.</p> <p>2. Charger la plaque de réactions optique 48 puits selon les besoins.</p> <p>3. Sortir un seul film adhésif optique de la boîte. Replier les deux languettes latérales vers le haut. Placer le film adhésif optique avec la protection vers le haut.</p> <p>4. D'un mouvement uniforme, retirer la protection blanche sur la surface de scellement centrale et ne pas toucher cette dernière.</p> <p>5. Tenir le film adhésif optique par les languettes latérales et l'apposer sur la plaque de réactions 48 puits (face adhésive vers la plaque). Vérifier que le film recouvre entièrement tous les puits de la plaque.</p> <p>6. Appuyer lentement l'applicateur sur le film adhésif optique en exerçant une pression ferme sur les plans horizontal et vertical pour garantir une bonne adhérence entre le film et la plaque de réactions sur toute sa surface.</p> <p>7. En maintenant le bord du film en place à l'aide de l'applicateur, saisir une extrémité de la languette et tirer d'un coup sec vers le haut. Répéter l'opération pour l'autre languette.</p> <p>8. Répéter l'étape 7. Appuyer l'applicateur horizontalement et verticalement sur le film adhésif optique en exerçant une pression ferme pour assurer une adhérence totale empêchant toute évaporation.</p> <p>9. Pour garantir une étanchéité totale, presser fortement le bord de l'applicateur sur les quatre côtés de la bordure extérieure du film adhésif optique. Inspecter la plaque pour s'assurer que tous les puits sont scellés (vérifier que chaque puits laisse une empreinte sur la surface du film adhésif optique).</p> <p>IMPORTANT ! Si la protection du film est mal enlevée, des zones floues qui n'affectent pas les résultats peuvent apparaître. Elles disparaissent lorsque le film entre en contact avec le couvercle chauffant de l'instrument.</p> <p>Remarque : Les films adhésifs optiques n'adhèrent pas au contact. Il est nécessaire d'exercer une forte pression pour assurer une adhérence totale n'autorisant pas d'évaporation.</p>	

Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur la préparation de la plaque, se reporter au protocole concernant les réactifs utilisés dans les réactions de PCR (voir « Pour plus d'informations » à la page 34).

Remarques

Remarques _____

4

Réalisation de l'expérience

Sommaire du chapitre :

■ Présentation du chapitre	44
■ Préparation de la réaction de PCR	45
■ (Facultatif) Activation des notifications	47
■ Démarrage de la réaction	49
■ Surveillance de la réaction de PCR	53
■ Retrait de la plaque de réactions et transfert des données	63

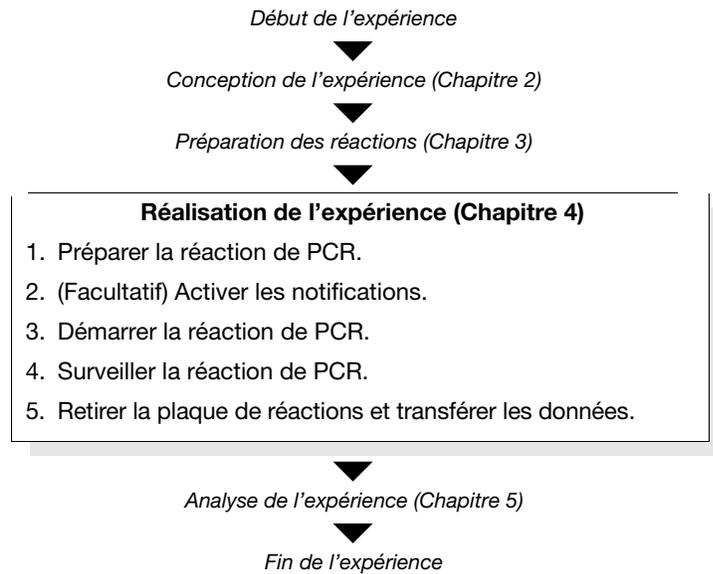
Remarque : Pour plus d'informations sur l'un des sujets abordés dans ce guide, consulter l'aide dans le logiciel du système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ en appuyant sur **F1**, en cliquant sur  dans la barre d'outils ou en sélectionnant **Help (Aide) ▶ StepOne Help (Aide de StepOne)**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

Remarques

Présentation du chapitre

Ce chapitre explique comment réaliser une réaction sur l'instrument Système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™.

Workflow Réaliser l'expérience à l'aide du workflow suivant :



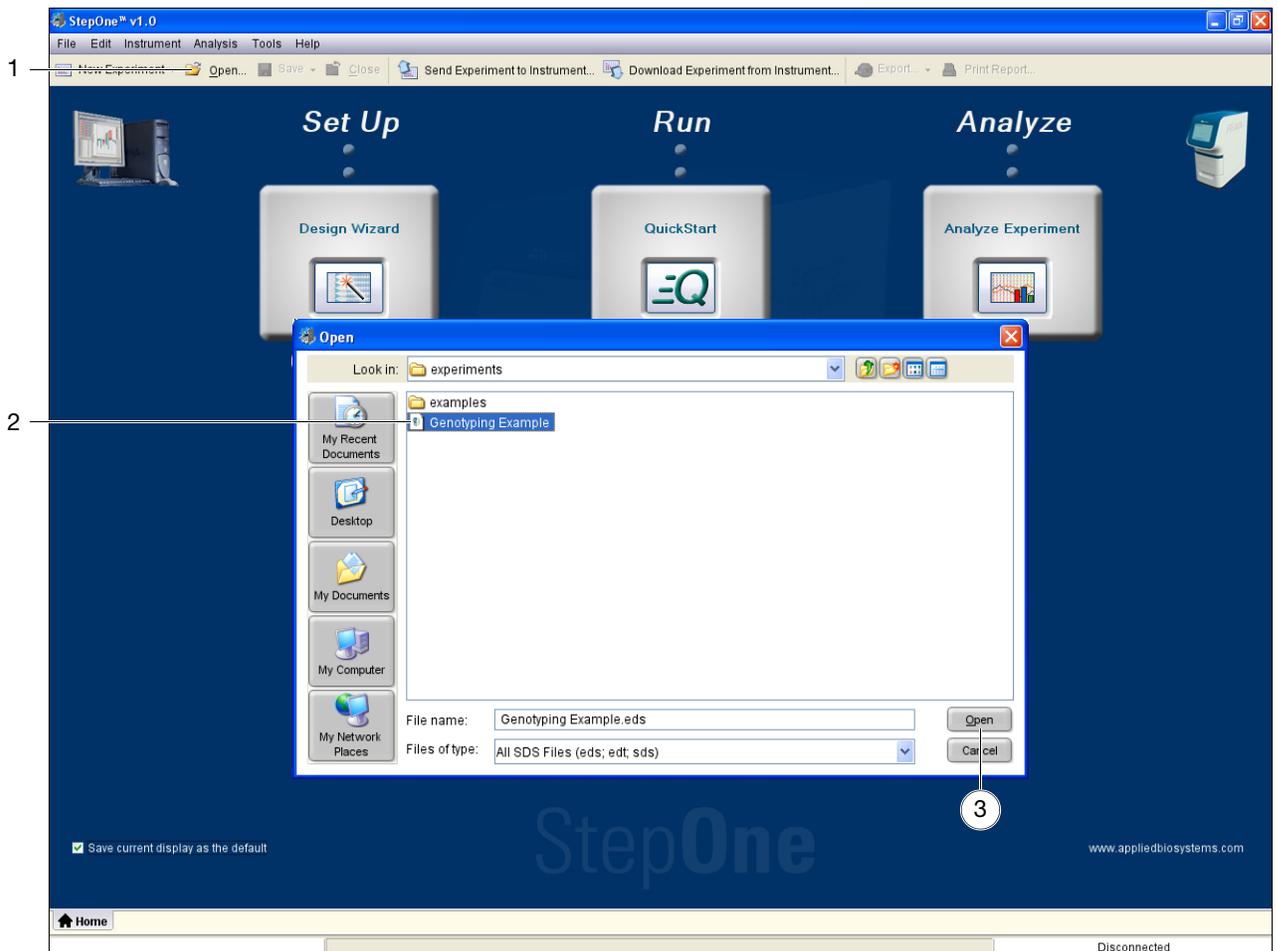
Remarques _____

Préparation de la réaction de PCR

Pour pouvoir réaliser le thermocyclage et la collecte des données, ouvrir le fichier correspondant à cette manipulation et charger la MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate dans le bloc de l'instrument StepOne™.

Ouverture de l'expérience

1. Dans le logiciel StepOne™, cliquer sur **Open** (Ouvrir).
2. Sélectionner **Genotyping Example.eds**.
3. Cliquer sur **Open** (Ouvrir).



Remarques

Chargement de la plaque de réactions



ATTENTION

DANGER DE BLESSURE CORPORELLE. Lorsque l'instrument est en fonctionnement, la température du bloc peut dépasser 100 °C (212 °F). Si l'instrument vient d'être utilisé, ne pas approcher les mains tant que le bloc n'est pas redescendu à température ambiante.



IMPORTANT ! Porter des gants non poudrés pendant la manipulation de la plaque de réactions.

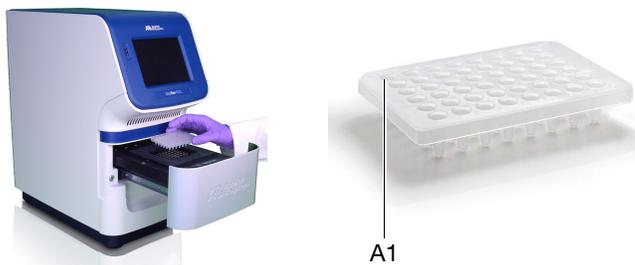
1. Ouvrir le tiroir de l'instrument.



2. Placer les réactions dans le bloc.

L'orientation du support des réactions dépend du type de consommable utilisé :

- S'il s'agit d'une plaque, la placer dans le bloc de sorte que le puits A1 se situe au fond à gauche.
- S'il s'agit de barrettes de tubes, les placer dans le bloc.



3. Refermer délicatement le tiroir de l'instrument.



Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur l'écran Loading the Reaction Plate (Chargement de la plaque de réactions), consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur ? ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

Remarques _____

(Facultatif) Activation des notifications

Activer les paramètres de notification pour que le logiciel StepOne™ envoie un courrier électronique lorsque l'instrument StepOne™ commence et termine la réaction ou en cas d'erreur. Cette fonction facultative n'affecte ni les performances du système StepOne™, ni la durée du thermocyclage.

IMPORTANT ! Les paramètres de notification sont disponibles seulement si l'ordinateur qui commande l'instrument StepOne™ est connecté à un réseau Ethernet.

Remarque : Le système de notification est également accessible sur les ordinateurs qui surveillent à distance un instrument StepOne™. Pour plus d'informations sur la surveillance à distance, voir « Surveillance à distance » à la page 59.

À propos de la création de l'exemple

Dans l'exemple, le logiciel StepOne™ est configuré pour envoyer des notifications à trois utilisateurs (scientifique, superviseur et technicien de monlabo.com) lorsque le système StepOne™ achève la réaction de PCR et en cas d'erreur. L'exemple de serveur SMTP (www.monlabo.com) est configuré pour assurer le cryptage SSL (Secure Sockets Layer) et demander une authentification.

Configuration des paramètres de notification

1. Dans le volet de navigation du logiciel StepOne™, cliquer sur  **Run** (Démarrer).
2. Cliquer sur  **Notification Settings** (Paramètres de notification).
3. Sélectionner **Enable Notifications** (Activer les notifications).
4. Sélectionner les événements qui déclencheront les notifications :
 - a. Sélectionner **Instrument Error** (Erreur de l'instrument).
 - b. Sélectionner **Run Completed** (Réaction terminée).
5. Cliquer dans le champ **Enter e-mail addresses for notifications** (Entrer les adresses électroniques des notifications), puis entrer **scientifique@monlabo.com, superviseur@monlabo.com, technicien@monlabo.com**.
6. Cliquer dans le champ **Outgoing Mail Server (SMTP)** (Serveur de messagerie sortant (SMTP)), puis entrer **smtp.monlabo.com**.
7. Définir les paramètres d'authentification :
 - a. Sélectionner **Yes** (Oui) pour le paramètre Server requires authentication (Authentification obligatoire sur le serveur).
 - b. Cliquer dans le champ **User Name** (Nom d'utilisateur), puis entrer **supervisor**.
 - c. Cliquer dans le champ **Password** (Mot de passe), puis entrer **password**.

Remarques

Instructions de réalisation

Lors de la configuration du système StepOne™ pour les notifications automatiques :

- Le système StepOne™ doit être paramétré pour un usage en réseau. Voir le *Guide d'installation, de mise en réseau et de maintenance du Système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™*.
- Déterminer les événements qui doivent faire l'objet d'une notification :
 - **Instrument Error** (Erreur de l'instrument) – Le système StepOne™ envoie aux destinataires spécifiés un courrier électronique pour chaque erreur rencontrée par l'instrument StepOne™ durant la réaction de PCR.
 - **Run Started** (Réaction commencée) – Le système StepOne™ envoie aux destinataires spécifiés un courrier électronique chaque fois que l'instrument commence une réaction.
 - **Run Completed** (Réaction terminée) – Le système StepOne™ envoie aux destinataires spécifiés un courrier électronique chaque fois que l'instrument termine une réaction.
- Se procurer l'adresse électronique des destinataires des notifications.

IMPORTANT ! Séparer les adresses par des virgules (,).

- Contacter l'administrateur système ou le service informatique pour obtenir :
 - l'adresse réseau d'un serveur SMTP (Simple Mail Transfer Protocol) ;
 - le nom d'utilisateur et le mot de passe du serveur, si nécessaire pour y accéder ;
 - le paramètre SSL du serveur (activé ou désactivé).

Remarques _____

Pour plus d'informations Pour plus d'informations sur l'écran Notification Settings (Paramètres de notification), consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur ? ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

Démarrage de la réaction

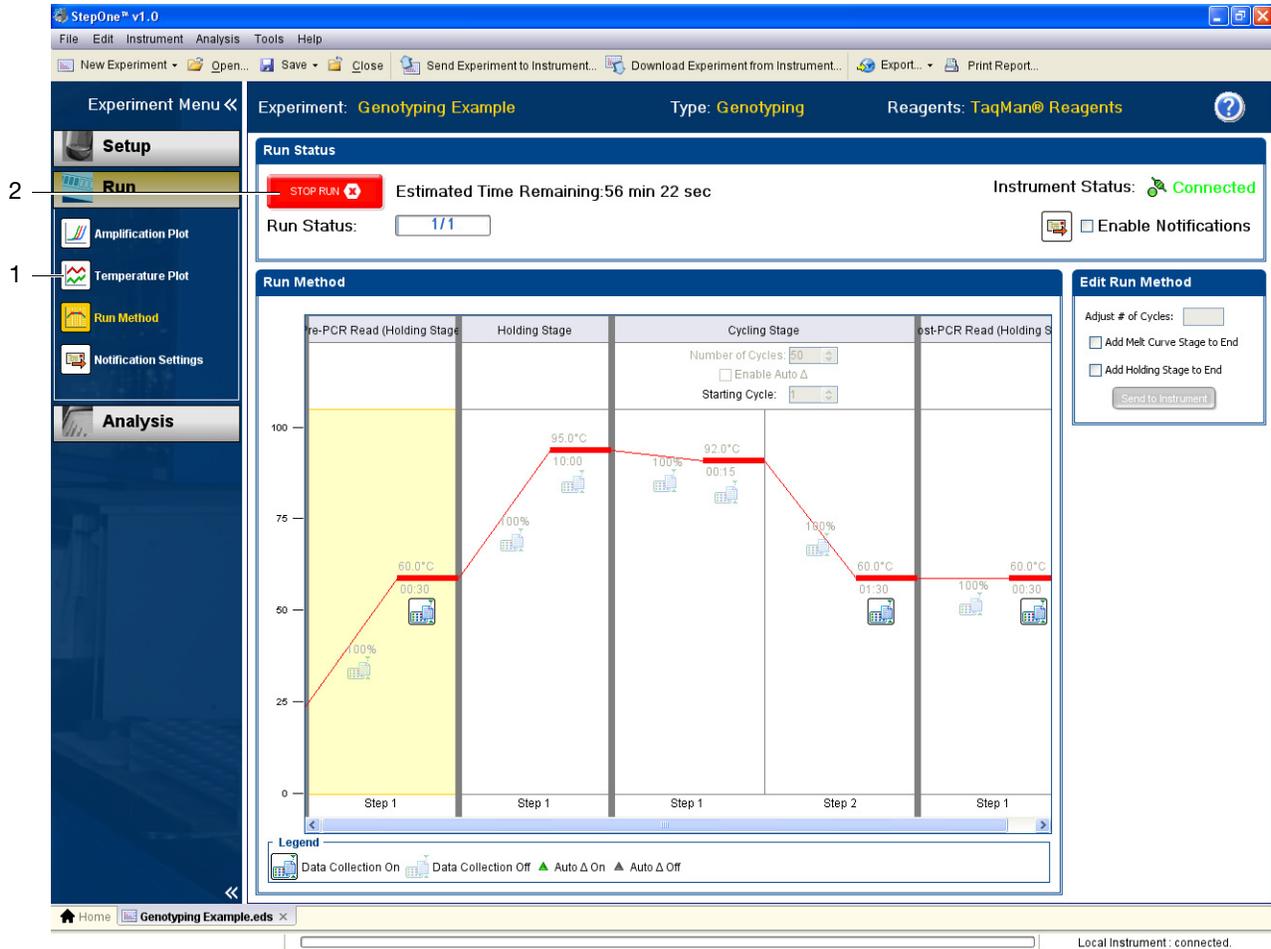
Démarrer la réaction de PCR conformément à la configuration de l'instrument StepOne™. Le mode de démarrage de la réaction dépend de la configuration du système StepOne™ :

Configuration	Description	Voir...
Co-localisée	Le câble jaune du système StepOne™ relie l'ordinateur à l'instrument StepOne™.	« Démarrage co-localisé » ci-dessous
Autonome	<ul style="list-style-type: none"> L'ordinateur et l'instrument StepOne™ ne sont pas connectés ou l'ordinateur et l'instrument StepOne™ sont connectés au même réseau. 	« Démarrage autonome » à la page 50

Démarrage co-localisé Suivre cette procédure si l'ordinateur est directement connecté à l'instrument StepOne™ par le câble du système StepOne™.

1. Dans le logiciel StepOne™, cliquer sur  **Temperature Plot** (Courbe des températures).
2. Cliquer sur **START RUN** ▶ (Démarrer la réaction de PCR).

Remarques _____



Démarrage autonome

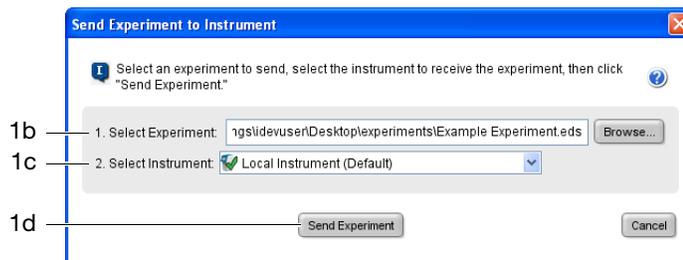
Suivre cette procédure si l'ordinateur et l'instrument StepOne™ ne sont pas directement reliés par le câble jaune du système StepOne™.

1. Si l'ordinateur et l'instrument StepOne™ sont connectés au même réseau, suivre les étapes 1a à 1f. Sinon, passer à l'étape 2.
 - a. Dans le logiciel StepOne™, cliquer sur  **Send Experiment to Instrument** (Envoyer l'expérience à l'instrument).
 - b. Dans la fenêtre Send Experiment to Instrument (Envoyer l'expérience à l'instrument), cliquer sur **Browse** (Parcourir), sélectionner le fichier **Genotyping Example.eds**, puis cliquer sur **Open** (Ouvrir).
 - c. Dans le menu déroulant Select Instrument (Sélectionner un instrument), choisir l'instrument StepOne™.

Si l'instrument StepOne™ n'est pas répertorié, le configurer pour la surveillance à distance comme expliqué dans le *Guide d'installation, de mise en réseau et de maintenance du Système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™*.

Remarques

- d. Cliquer sur **Send Experiment** (Envoyer l'expérience) pour transmettre l'expérience à l'instrument StepOne™ sur le réseau.



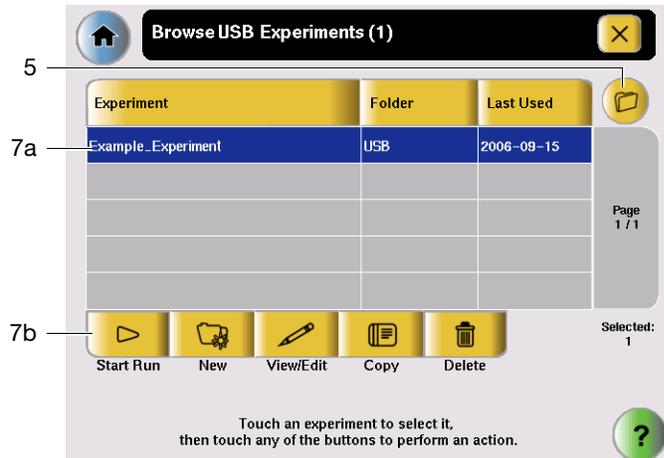
- e. À l'invitation du système, cliquer sur **OK** pour fermer la boîte de confirmation.
- f. Passer à l'étape 3.
2. Si l'instrument StepOne™ n'est pas connecté à l'ordinateur, effectuer les étapes 2a à 2d afin d'utiliser une clé USB pour transférer l'expérience.
- Connecter la clé USB à l'un des ports USB de l'ordinateur.
 - Dans le logiciel StepOne™, sélectionner  **Save** (Enregistrer) ▶ **Save As** (Enregistrer sous).
 - Dans la fenêtre Save (Enregistrer), accéder à la clé USB, puis cliquer sur **Save** (Enregistrer).
 - Retirer la clé USB de l'ordinateur, puis la connecter au port USB de l'instrument StepOne™.



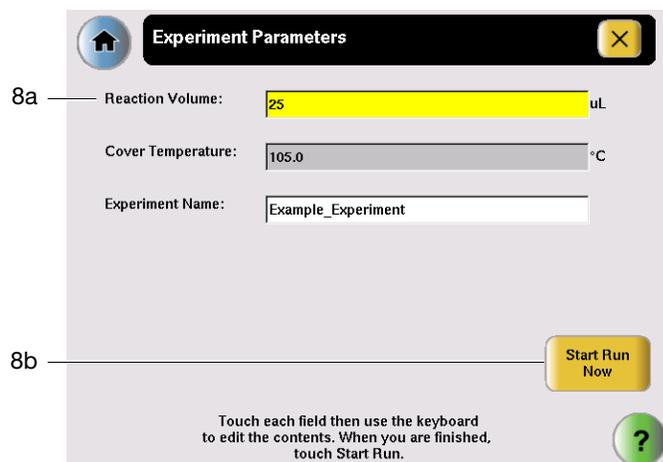
- Toucher l'écran tactile de l'instrument StepOne™, puis toucher .
- Dans l'écran Main Menu (Menu principal), toucher **Browse Experiments** (Rechercher une expérience).
- Dans l'écran Browse Methods (Rechercher une méthode), toucher  (Folders) (Dossiers).
- Dans l'écran Choose an Experiment Category (Choisir une catégorie d'expérience) :
 - Toucher **USB** si l'expérience a été transférée sur une clé USB.
 - Toucher **Default** (Par défaut) pour envoyer l'expérience via une connexion réseau.

Remarques

7. Dans l'écran Browse USB/Default Experiments (Rechercher une expérience dans la clé USB/par défaut) :
 - a. Toucher **Example Experiment** (Exemple) pour sélectionner l'expérience.
 - b. Toucher  **Start Run** (Démarrer la réaction de PCR).



8. Dans l'écran Run Parameters (Paramètres de la réaction) :
 - a. Toucher le champ **Reaction Volume** (Volume réactionnel), utiliser le pavé numérique pour entrer **25 μ L**, puis toucher **Done** (Terminé).
 - b. Toucher **Start Run** (Démarrer la réaction de PCR).



Remarques _____

Surveillance de la réaction de PCR

Surveiller le processus depuis un ordinateur doté du logiciel StepOne™ ou depuis l'écran tactile de l'instrument StepOne™. Le mode de surveillance de la réaction dépend de la configuration du système StepOne™ :

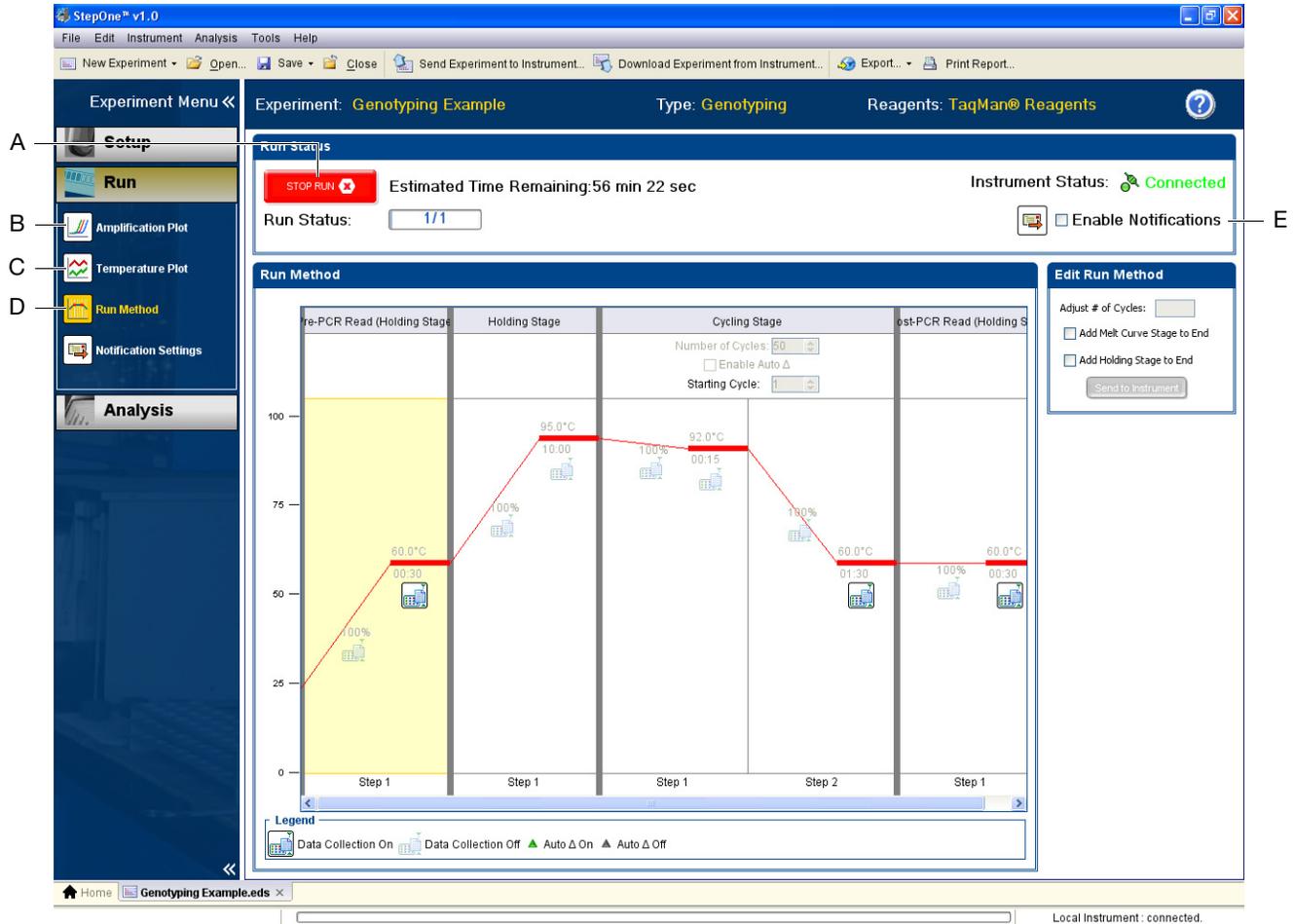
Configuration	Description	Voir...
Co-localisée	Le câble du système StepOne™ relie l'ordinateur à l'instrument StepOne™.	« Surveillance co-localisée » ci-dessous
Autonome (en réseau)	L'ordinateur et l'instrument StepOne™ sont connectés au même réseau.	« Surveillance à distance » à la page 59
Autonome (de base)	L'ordinateur et l'instrument StepOne™ ne sont pas connectés.	« Surveillance autonome » à la page 62

Surveillance co-localisée

Si l'ordinateur est directement connecté à l'instrument StepOne™ par le câble du système StepOne™, il est possible de voir en temps réel la progression de la réaction comme décrit ci-dessous. Pendant la réalisation, visualiser régulièrement les trois courbes disponibles sur le logiciel StepOne™ à la recherche de problèmes potentiels.

Réf.	Pour...	Action
A	Arrêter la réaction	<ol style="list-style-type: none"> Dans le logiciel StepOne™, cliquer sur STOP RUN (Arrêter la réaction). Dans la fenêtre Stop Run (Arrêter la réaction), cliquer sur l'un des éléments suivants : <ul style="list-style-type: none"> Stop Immediately (Arrêter immédiatement) pour interrompre instantanément le processus. Stop after Current Cycle/Hold (Arrêter après le cycle/le maintien en cours) pour interrompre la réaction après le cycle ou le maintien de température en cours. Cancel (Annuler) pour poursuivre la réaction.
B	Afficher en temps réel les données d'amplification	Sélectionner  Amplification Plot (Courbe d'amplification). Pour plus d'informations sur la courbe, voir « À propos de la courbe d'amplification » à la page 54.
C	Afficher en temps réel les données de température de la réaction	Sélectionner  Temperature Plot (Courbe des températures). Pour plus d'informations sur la courbe, voir « À propos de la courbe des températures » à la page 56.
D	Afficher la progression de la réaction dans l'écran Run Method (Profil de thermocyclage)	Sélectionner  Run Method View (Écran Profil de thermocyclage). Pour plus d'informations sur cet écran, voir « À propos de l'écran Run Method (Profil de thermocyclage) » à la page 57.
E	Activer/désactiver les paramètres de notification	Activer ou désactiver l'option Enable Notifications (Activer les notifications).

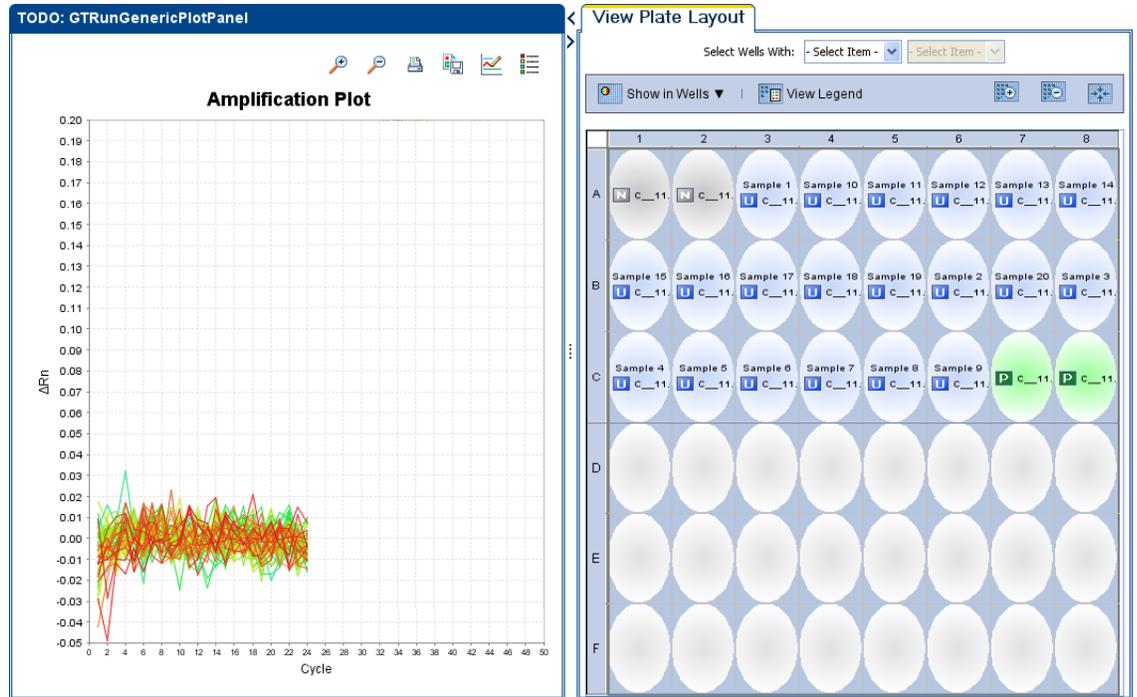
Remarques



À propos de la courbe d'amplification

L'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) permet de visualiser l'amplification des échantillons à mesure que l'instrument StepOne™ collecte les données de fluorescence pendant la réaction. Si une méthode de collecte des données en temps réel a été définie, la courbe d'amplification affiche les données des puits sélectionnés dans l'onglet View Plate Layout (Voir le plan de plaque). La courbe met en évidence la fluorescence normalisée des fluorophores (ΔR_n) et le nombre de cycles. L'illustration ci-dessous montre l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) tel qu'il apparaît pendant l'exemple.

Remarques _____



L'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) est utile pour identifier et examiner les amplifications anormales. Une amplification anormale peut inclure :

- une augmentation de la fluorescence dans les puits de contrôle négatif ;
- une absence d'augmentation de la fluorescence dans les puits de contrôle positif ;
- une absence de fluorescence détectable lors d'un cycle (déterminée d'après des expériences identiques précédentes avec les mêmes réactifs dans des conditions similaires).

En cas d'amplification anormale ou d'absence totale de signal, identifier la cause de l'erreur comme expliqué dans l'aide du logiciel StepOne™ (cliquer sur ? dans la barre d'outils ou sélectionner **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu).

Remarque : Pour afficher les données dans l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification), sélectionner les puits à afficher dans l'onglet View Plate Layout (Voir le plan de plaque).

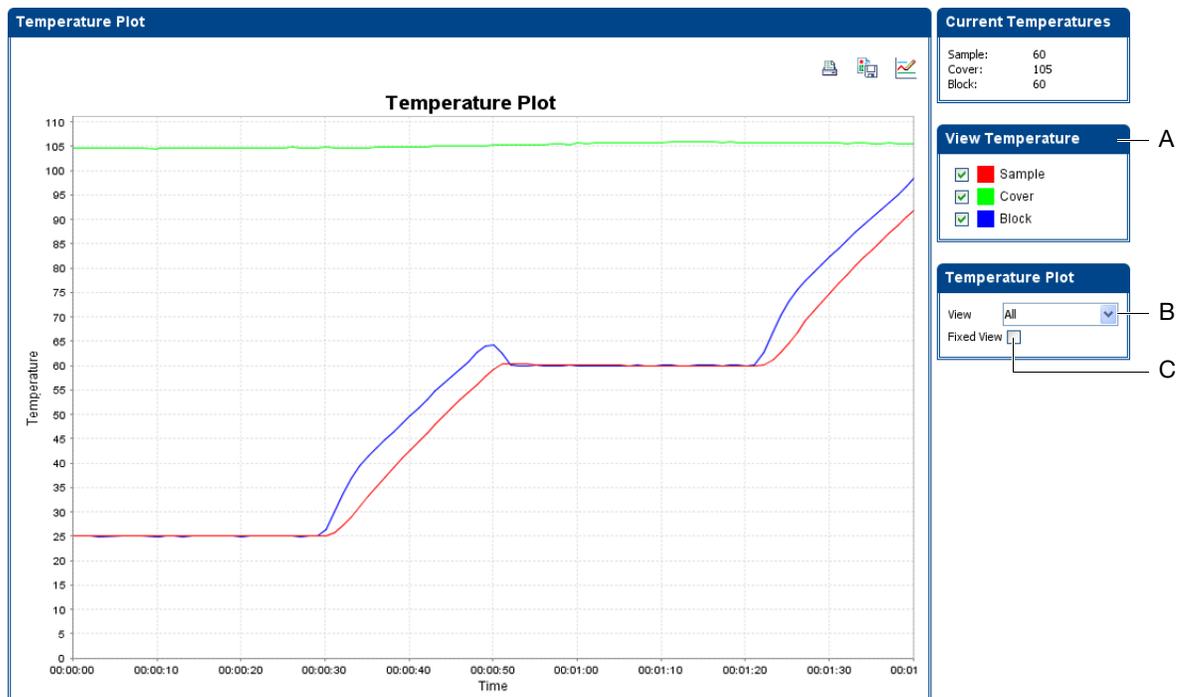
Pour plus d'informations sur l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification), consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur ? ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

Remarques

À propos de la courbe des températures

Pendant une réaction, l'écran Temperature Plot (Courbe des températures) affiche les températures en temps réel du bloc, du couvercle chauffant et des échantillons (températures calculées). L'illustration ci-dessous montre l'écran Temperature Plot (Courbe des températures) tel qu'il apparaît pendant l'exemple.

	Pour...	Action
A	Ajouter/supprimer des courbes de températures	Sélectionner Sample (Échantillon), Heated Cover (Couvercle chauffant) ou Sample Block (Bloc) pour afficher ou masquer les données correspondantes dans la courbe.
B	Modifier l'heure indiquée par la courbe	Sélectionner View (Afficher) ▶ Time Duration (Durée).
C	Figurer l'axe Y de la courbe	Sélectionner Fixed View (Affichage fixe).



L'écran Temperature Plot (Courbe des températures) peut être utile pour identifier les pannes matérielles. Lors de la surveillance de la courbe des températures, observer les courbes des échantillons, du couvercle chauffant et du bloc pour repérer tout phénomène anormal.

- En général, les courbes des échantillons et du bloc doivent plus ou moins se superposer. Un écart important entre ces courbes peut indiquer un problème.
- La courbe du couvercle chauffant doit être une représentation constante de la température spécifiée dans la méthode. Un écart de température peut indiquer un problème.

Remarques _____

En cas de courbe de températures anormale, identifier la cause de l'erreur comme expliqué dans l'aide du logiciel StepOne™ (cliquer sur ? dans la barre d'outils ou sélectionner **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help**) (Aide de StepOne) dans le menu).

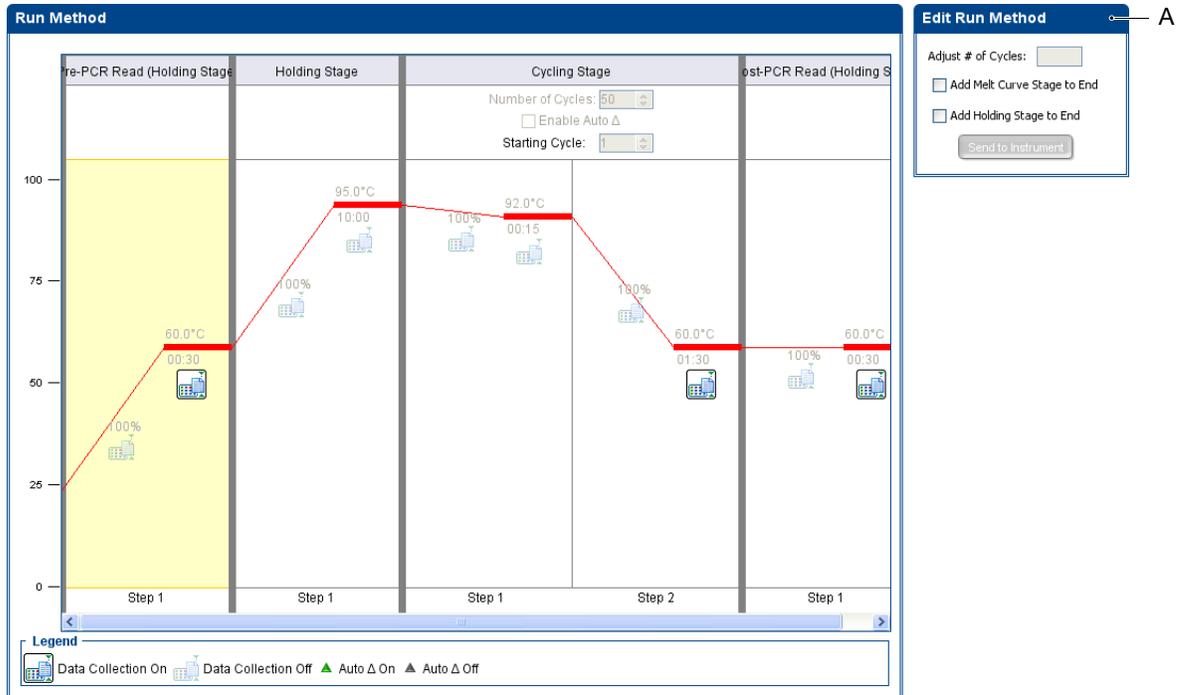
Pour plus d'informations sur l'écran Temperature Plot (Courbe des températures), consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur ? ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

À propos de l'écran Run Method (Profil de thermocyclage)

Lorsque la réaction commence, le système StepOne™ affiche sa progression dans l'écran Run Method (Profil de thermocyclage). Celui-ci indique la progression de la réaction par rapport au profil thermique de la méthode. L'illustration ci-dessous montre l'écran Run Method (Profil de thermocyclage) tel qu'il apparaît dans l'exemple.

	Pour...	Action
A	Modifier le profil de thermocyclage (ajouter des cycles, un maintien de température ou une courbe de fusion)	<ol style="list-style-type: none"> Dans le panneau de navigation, cliquer sur  Run Method (Profil de thermocyclage). Dans l'écran Run Method (Profil de thermocyclage), effectuer l'une des actions suivantes : <ul style="list-style-type: none"> – Entrer le nombre de cycles applicable à la phase de thermocyclage. – Sélectionner Add Melt Curve Stage to End (Ajouter une courbe de fusion à la fin) pour ajouter une phase de courbe de fusion à la fin de la réaction. – Sélectionner Add Holding Stage to End (Ajouter un maintien à la fin) pour ajouter une phase de maintien de la température à la fin de la réaction. Cliquer sur Send to Instrument (Envoyer à l'instrument).

Remarques _____



Remarque : Si une alerte s'affiche, cliquer sur l'erreur pour obtenir plus d'informations et identifier les causes du problème comme expliqué dans l'aide du logiciel StepOne™ (cliquer sur ? dans la barre d'outils ou sélectionner **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu).

Pour plus d'informations sur l'écran Run Method (Profil de thermocyclage), consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur ? ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

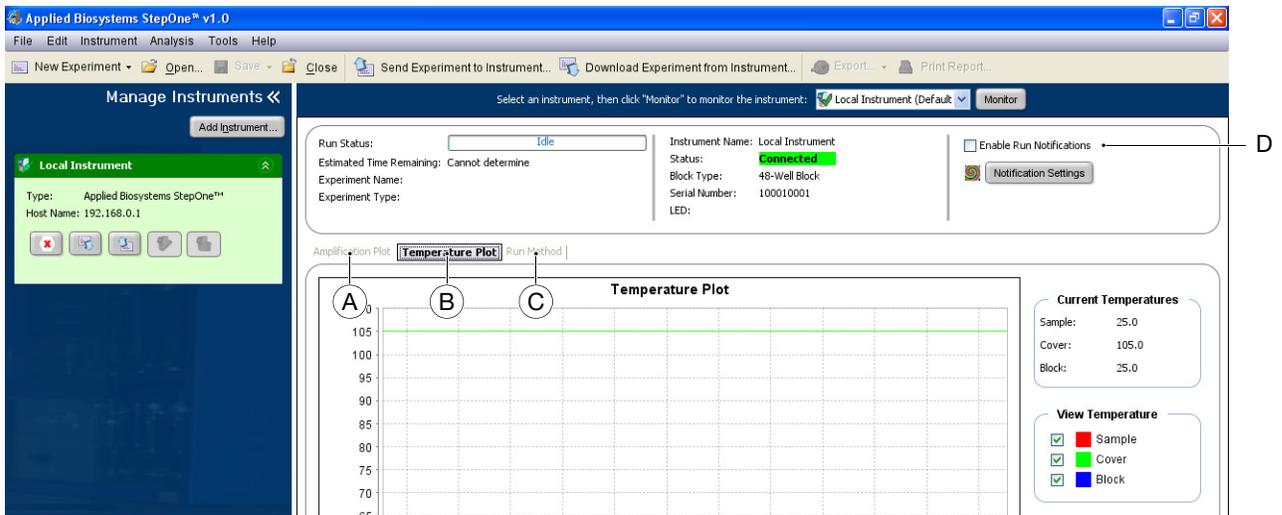
Remarques _____

Surveillance à distance

Si l'instrument StepOne™ est connecté à un réseau, la fonction de surveillance à distance du logiciel StepOne™ permet d'afficher en temps réel la progression de la réaction depuis n'importe quel ordinateur du réseau.

IMPORTANT ! Les ordinateurs en réseau peuvent uniquement surveiller l'instrument StepOne™, mais pas le contrôler.

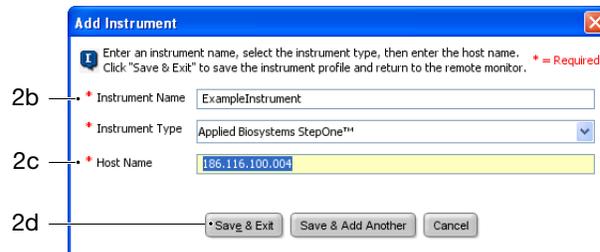
Réf.	Pour...	Action
A	Afficher en temps réel les données d'amplification	Cliquer sur Amplification Plot (Courbe d'amplification). Pour plus d'informations sur la courbe, voir « À propos de la courbe d'amplification » à la page 54.
B	Afficher en temps réel les données de température de la réaction	Cliquer sur Temperature Plot (Courbe des températures). Pour plus d'informations sur la courbe, voir « À propos de la courbe des températures » à la page 56.
C	Afficher la progression de la réaction dans l'écran Run Method (Profil de thermocyclage)	Cliquer sur Run Method View (Écran Profil de thermocyclage). Pour plus d'informations sur cet écran, voir « À propos de l'écran Run Method (Profil de thermocyclage) » à la page 57.
D	Activer/désactiver les paramètres de notification	Activer ou désactiver l'option Enable Notifications (Activer les notifications). Pour plus d'informations sur les paramètres de notification, voir « (Facultatif) Activation des notifications » à la page 47.



Remarques

Pour surveiller l'instrument StepOne™ à distance :

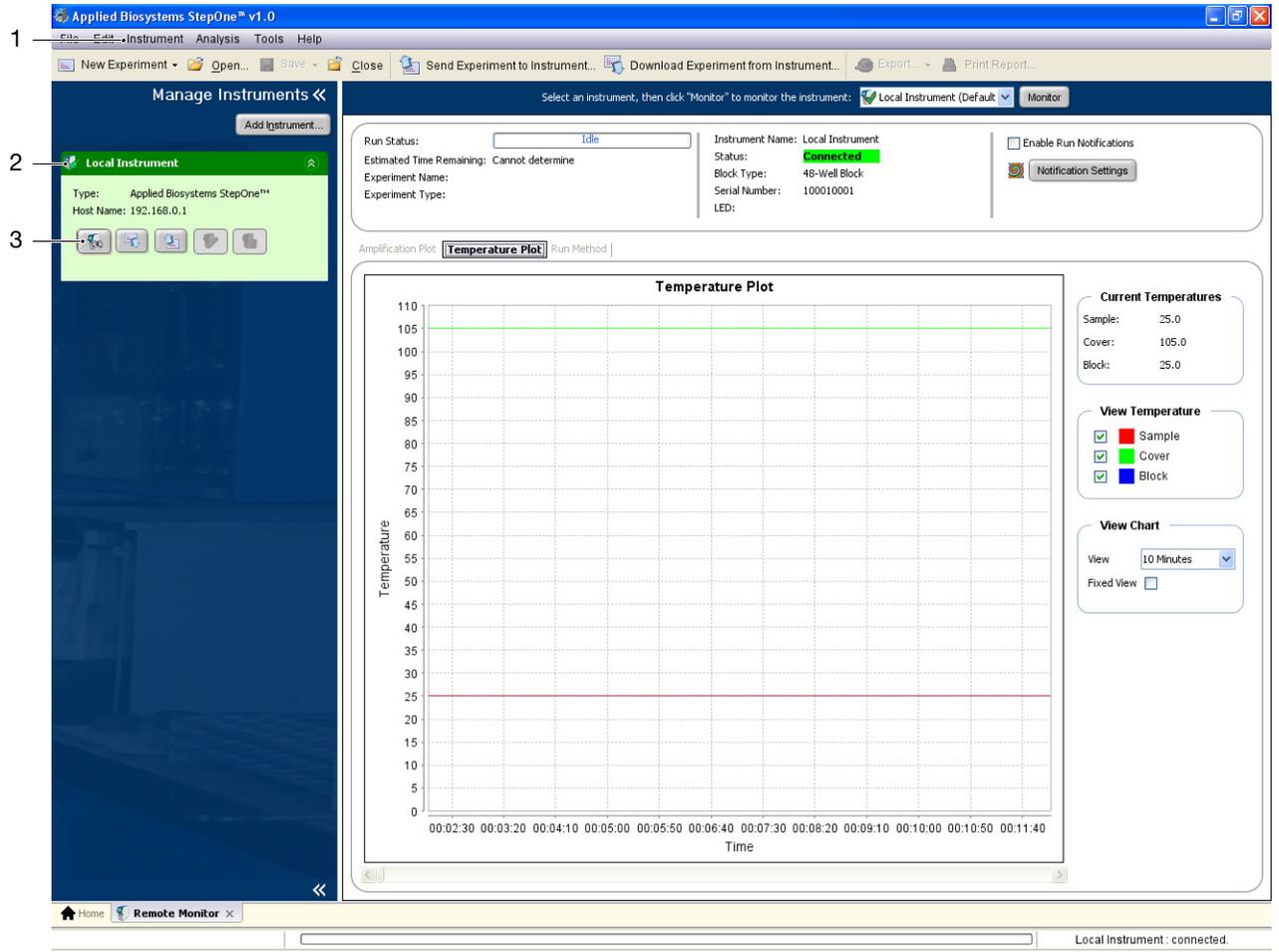
1. Dans le logiciel StepOne™, sélectionner **Instrument ▶ Remote Monitor** (Surveillance à distance).
2. Dans la barre de navigation, sélectionner l'instrument StepOne™.
Si la barre de navigation ne contient pas l'instrument StepOne™ :
 - a. Cliquer sur **Add Instrument** (Ajouter un instrument).
 - b. Cliquer dans le champ **Instrument Name** (Nom de l'instrument), puis entrer le nom de l'instrument.
 - c. Cliquer dans le champ **Host Name** (Nom d'hôte), puis entrer l'adresse IP de l'instrument.
 - d. Cliquer sur **Save & Exit** (Enregistrer et quitter).



Remarque : Pour plus d'informations sur la configuration de l'instrument StepOne™ en vue d'une utilisation en réseau ou de la surveillance à distance, voir le *Guide d'installation, de mise en réseau et de maintenance du Système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™*.

3. Cliquer sur l'icône  (Démarrer la surveillance de cet instrument) associée à l'instrument.

Remarques _____

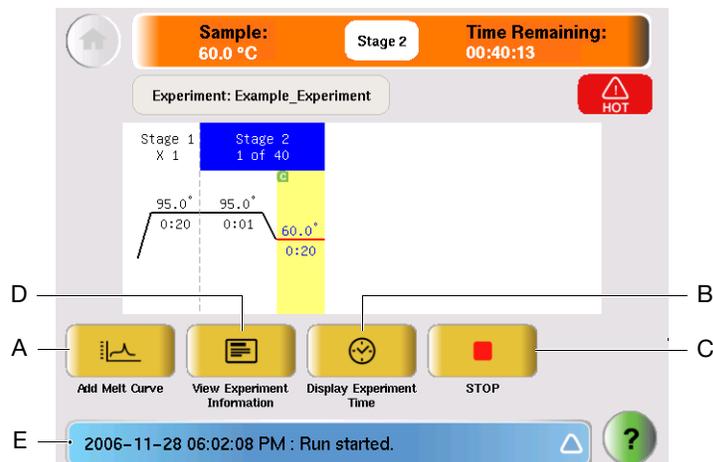


Remarques _____

Surveillance autonome

Si la réaction a été lancée depuis l'instrument StepOne™, il est possible d'afficher sa progression à partir de l'écran tactile. L'écran Run Method (Profil de thermocyclage) affiche la méthode utilisée pour l'expérience et met en évidence les étapes du profil thermique à mesure de leur exécution.

Réf.	Pour...	Action
A	Ajouter une courbe de fusion à la réaction	Toucher  (Add Melt Curve (Ajouter une courbe de fusion)), puis OK .
B	Afficher la durée restante pour la réaction	Toucher  Display Experiment Time (Afficher la durée de l'expérience), puis X pour revenir à l'écran Run Method (Profil de thermocyclage).
C	Arrêter la réaction	Toucher  STOP (Arrêter), puis : <ul style="list-style-type: none"> • Stop (Arrêter) pour interrompre la réaction une fois que l'instrument StepOne™ a terminé le cycle ou le maintien de la température en cours. • Abort (Annuler) pour interrompre immédiatement la réaction ; • X pour continuer la réaction sans apporter de modification.
D	Afficher les informations sur l'expérience	Toucher  View Experiment Information (Afficher les informations sur l'expérience), puis X pour revenir à l'écran Run Method (Profil de thermocyclage).
E	Afficher le journal d'erreurs	Toucher la barre d'état pour afficher le journal d'erreurs.



Remarques _____

Retrait de la plaque de réactions et transfert des données

Lorsque l'instrument StepOne™ affiche l'écran Main Menu (Menu principal), retirer la plaque de réactions de l'instrument StepOne™ et transférer les données de l'expérience vers l'ordinateur pour l'analyse.

Retrait de la plaque de réactions

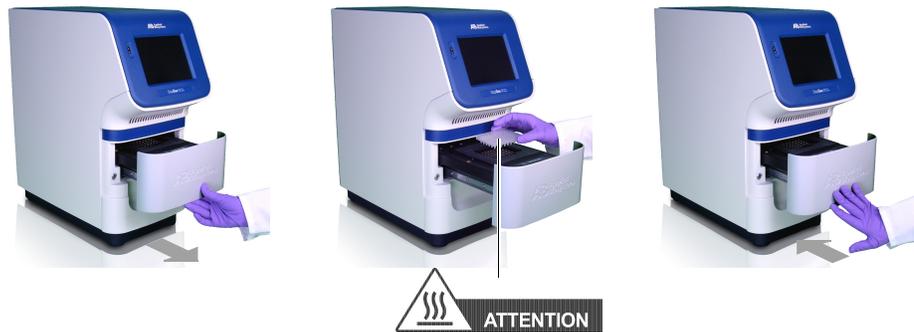


ATTENTION

DANGER DE BLESSURE CORPORELLE. Lorsque l'instrument est en fonctionnement, la température du bloc peut dépasser 100 °C (212 °F). Ne pas toucher le bloc tant qu'il n'est pas revenu à température ambiante.

Remarque : Lorsque l'instrument StepOne™ a terminé une réaction, le système enregistre les détails dans l'historique de la réaction, lequel est conservé dans le système jusqu'à ce que l'instrument termine une autre réaction.

1. Lorsque l'écran Main Menu (Menu principal) apparaît sur l'écran tactile de l'instrument StepOne™, toucher .
2. Ouvrir le tiroir de l'instrument.
3. Retirer la plaque de réactions du bloc.
4. Refermer délicatement le tiroir de l'instrument.



IMPORTANT ! Ne pas mettre l'instrument StepOne™ hors tension après une réaction. Il passe automatiquement en mode veille lorsqu'il n'est pas utilisé.

Pour plus d'informations sur le retrait de la plaque sur l'instrument StepOne™, consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur  ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

Remarques

Sélection d'une méthode de transfert des données

Transférer l'expérience vers l'ordinateur pour analyse selon la configuration du système StepOne™ :

Configuration	Description	Voir...
Co-localisée	Le câble du système StepOne™ relie l'ordinateur à l'instrument StepOne™.	« Transfert de données en configuration co-localisée » ci-dessous
Autonome (en réseau)	L'ordinateur et l'instrument StepOne™ sont connectés au même réseau.	« Surveillance à distance » à la page 59
Autonome (de base)	L'ordinateur et l'instrument StepOne™ ne sont pas connectés.	« Surveillance autonome » à la page 62

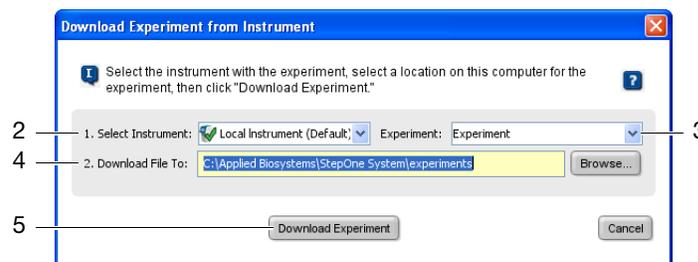
Transfert de données en configuration co-localisée

Si l'ordinateur est directement connecté à l'instrument StepOne™ par le câble du système StepOne™, aucune action n'est requise. Le logiciel StepOne™ transfère automatiquement les données de l'expérience à l'instrument StepOne™ après la réaction.

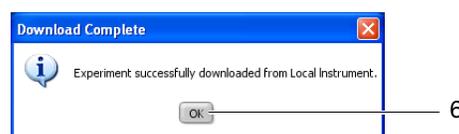
Transfert de données à distance

Si l'ordinateur et l'instrument StepOne™ sont connectés au même réseau Ethernet, télécharger l'expérience depuis l'instrument StepOne™ via le réseau :

1. Dans le logiciel StepOne™, cliquer sur  **Download Experiment from Instrument** (Télécharger une expérience à partir de l'instrument).
2. Dans la fenêtre Download Experiment from Instrument (Télécharger une expérience à partir de l'instrument), sélectionner **Select Instrument** (Sélectionner un instrument) ▶ *<instrument utilisé>*.
3. Sélectionner **Experiment** (Expérience) ▶ **Genotyping_Example**.
4. Dans le champ Download File To (Télécharger le fichier vers), cliquer sur **Browse** (Parcourir), sélectionner le dossier de destination des données de l'expérience, puis cliquer sur **Select** (Sélectionner).
5. Cliquer sur **Download Experiment** (Télécharger l'expérience) pour télécharger l'expérience à partir de l'instrument StepOne™ vers l'ordinateur via le réseau.



6. À l'invitation du système, cliquer sur **OK** pour fermer la boîte de confirmation.



Remarques

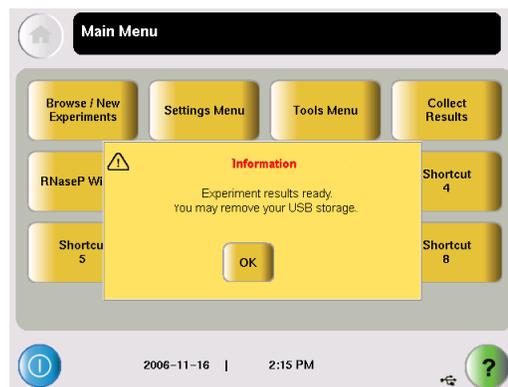
Transfert de données en configuration autonome

Si l'ordinateur n'est pas connecté à l'instrument StepOne™, utiliser la clé USB pour transférer l'expérience vers l'instrument StepOne™ :

1. Si ce n'est pas déjà fait, connecter une clé USB au port USB de l'instrument.



2. Toucher l'écran tactile de l'instrument StepOne™ pour l'activer, puis toucher .
3. Dans Main Menu (Menu principal), toucher **Collect Results** (Collecter les résultats) pour enregistrer les données sur la clé USB.
Si l'instrument StepOne™ ne parvient pas à détecter la clé USB, toucher **OK**, attendre 30 secondes, puis toucher **Collect Results** (Collecter les résultats).
4. Lorsqu'un message signale que les données ont été transférées, toucher **OK**.



5. Retirer la clé USB de l'instrument StepOne™, puis la connecter à l'un des ports USB de l'ordinateur.
6. Sur le bureau de l'ordinateur, utiliser l'Explorateur Windows pour ouvrir la clé USB.
7. Copier le fichier **Genotyping Example.eds** à l'emplacement :
<lecteur>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments
où <lecteur> est le répertoire d'installation du logiciel StepOne™.

Remarques

Remarques _____

5

Analyse de l'expérience

Sommaire du chapitre :

■ Présentation du chapitre	68
■ Ouverture de l'expérience en vue de l'analyse	69
■ Affichage du graphique de discrimination allélique	70
■ Affichage du plan de plaque	74
■ Affichage du tableau des résultats	77
■ Affichage de la synthèse CQ	80
■ Affichage de la courbe des données brutes	82
■ Affichage de la courbe des multicomposantes	84
■ Affichage de la courbe d'amplification	86
■ Affichage des paramètres d'analyse	91
■ Exportation des données	96

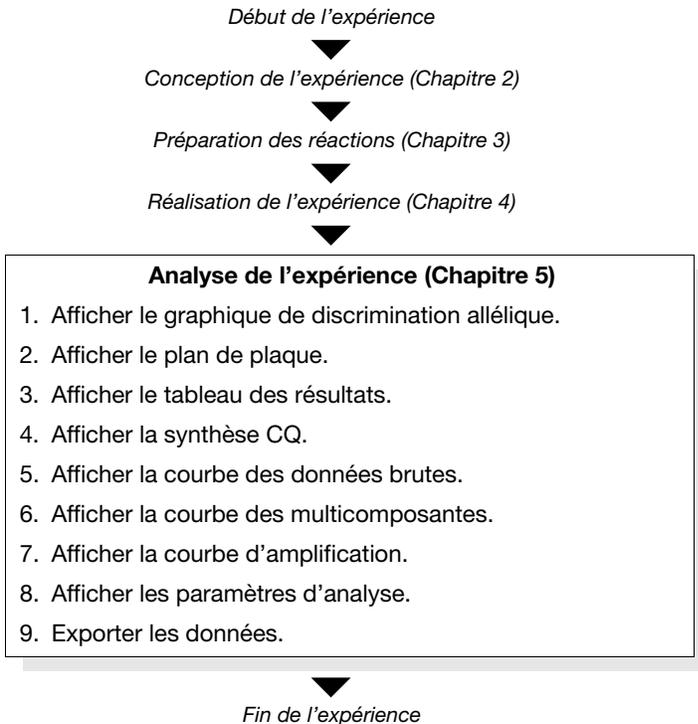
Remarque : Pour plus d'informations sur l'un des sujets abordés dans ce guide, consulter l'aide dans le logiciel du système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ en appuyant sur **F1**, en cliquant sur  dans la barre d'outils ou en sélectionnant **Help (Aide) ▶ StepOne Help (Aide de StepOne)**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

Remarques

Présentation du chapitre

Ce chapitre explique comment afficher, analyser et exporter l'expérience analysée.

Workflow



Évaluation des résultats

La consultation des résultats s'effectue en trois étapes :

1. Réaliser une première vérification du graphique de discrimination allélique (voir page 70), du plan de plaque (voir page 74) et du tableau des résultats (voir page 77) pour évaluer les assignations de génotype effectuées par le logiciel StepOne™.
2. Réaliser une vérification détaillée de la synthèse CQ (voir page 80) pour évaluer les échantillons ayant déclenché des codes d'alerte CQ. Vérifier les données brutes (voir page 82) et les données d'amplification (voir page 86) des échantillons qui présentent une amplification anormale.
3. Si nécessaire, définir les paramètres d'analyse (voir page 91) ou modifier les assignations manuellement (voir page 95).

Après l'évaluation des résultats, il est possible de les exporter comme expliqué au paragraphe « Exportation des données » à la page 96.

Remarques _____

Ouverture de l'expérience en vue de l'analyse

Pour préparer l'analyse, ouvrir l'expérience.

À propos des données de l'exemple

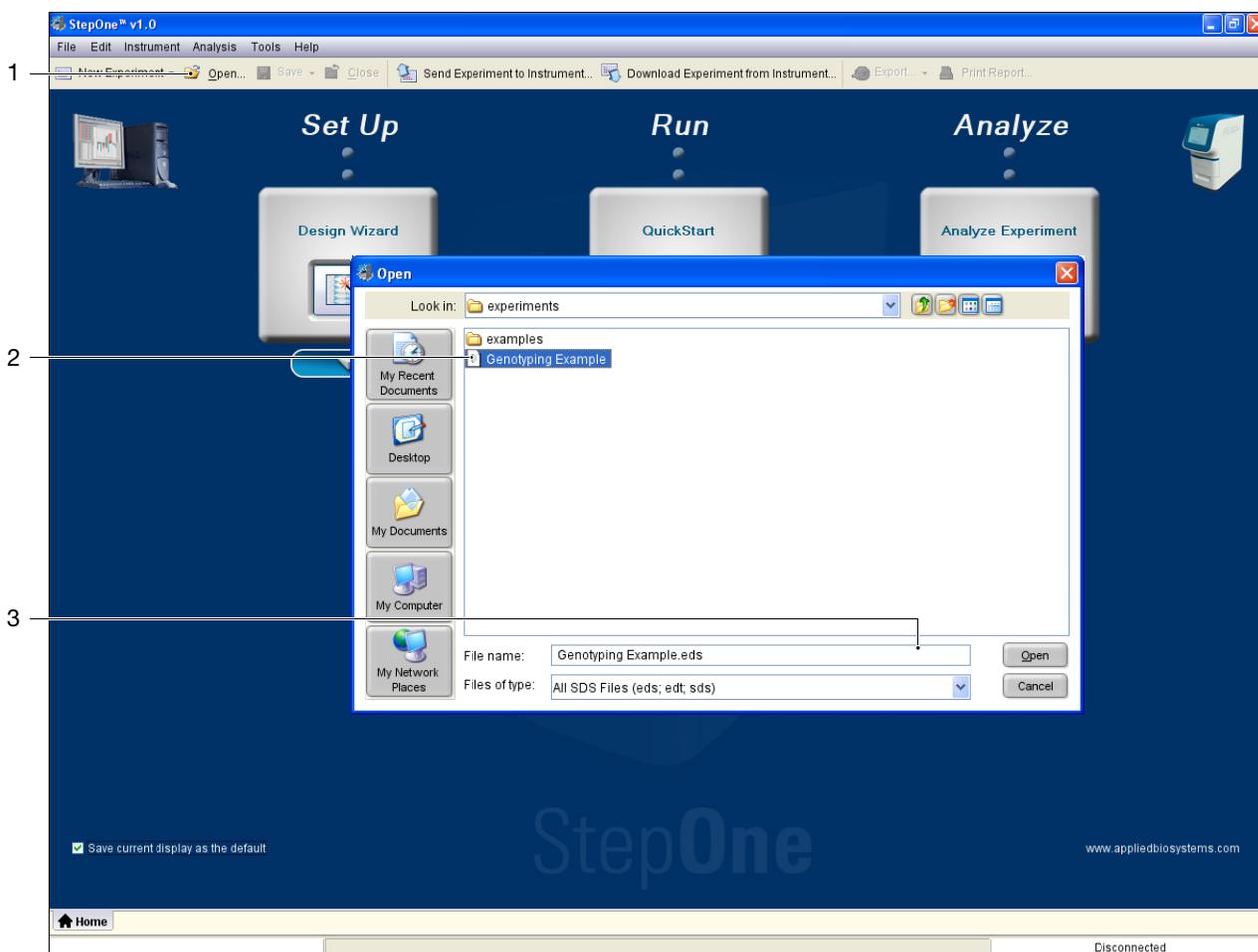
L'exemple se trouve à l'emplacement :

<lecteur>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments\examples

où <lecteur> est le disque dur de l'ordinateur sur lequel le logiciel StepOne™ est installé. Le disque d'installation par défaut est le lecteur C.

Ouverture de l'expérience

1. Dans le logiciel StepOne™, cliquer sur **Open** (Ouvrir).
2. Sélectionner **Genotyping Example.eds**.
3. Cliquer sur **Open** (Ouvrir).



Pour plus d'informations

Pour plus d'informations, consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur ? ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

Remarques

Affichage du graphique de discrimination allélique

Réaliser une première analyse des résultats de l'expérience dans le graphique de discrimination allélique, qui met en évidence la fluorescence du reporter normalisé (R_n) pour les sondes spécifiques des allèles de l'essai SNP. Pour obtenir une description complète de la courbe, voir « Lecture et analyse des plaques » à la page 6.

À propos des données de l'exemple

Dans l'exemple, vérifier que le graphique de discrimination allélique affiche :

- des clusters pour les trois génotypes possibles (allèle 1 homozygote, allèle 2 homozygote et allèle 1/2 hétérozygote) ;
- un cluster pour les contrôles négatifs.

Consultation de la courbe

1. Dans le volet de navigation, sélectionner  **Allelic Discrimination Plot** (Graphique de discrimination allélique).

2. Sélectionner **C__11711420_30** dans le menu SNP Assay (Essai SNP).

- Si la fonction Autocaller (Assignation automatique) est activée, le graphique de discrimination allélique affiche des symboles d'allèles pour chaque échantillon évalué du SNP sélectionné.

Les échantillons sont regroupés sur la courbe comme suit :

Symbole	Regroupés sur...	Les génotypes des échantillons sont...
● (rouge)	L'axe X de la courbe	Homozygotes pour l'allèle 1 de l'essai SNP sélectionné
● (bleu)	L'axe Y de la courbe	Homozygotes pour l'allèle 2 de l'essai SNP sélectionné
● (vert)	À mi-chemin entre les clusters homozygotes	Hétérozygotes pour les deux allèles de l'essai SNP sélectionné (allèle 1 et allèle 2)
■ (noir)	Dans le coin inférieur gauche de la courbe	Un contrôle négatif
× (noir)	N'importe où sur la courbe	Indéterminés

- Si la fonction Autocaller (Assignation automatique) est désactivée, le graphique de discrimination allélique affiche une croix (× – Indéterminé) pour chaque échantillon.

3. Pour chaque cluster de la courbe :

- En cliquant avec la souris, tracer une zone de sélection autour du cluster pour sélectionner les puits associés dans le plan de plaque et le tableau des résultats.
- Vérifier que les puits souhaités sont sélectionnés dans le tableau des résultats. Par exemple, si le cluster situé dans le coin inférieur gauche de la courbe est sélectionné, seuls les contrôles négatifs doivent être sélectionnés. La présence d'une inconnue dans les contrôles négatifs peut indiquer que l'amplification de l'échantillon a échoué.

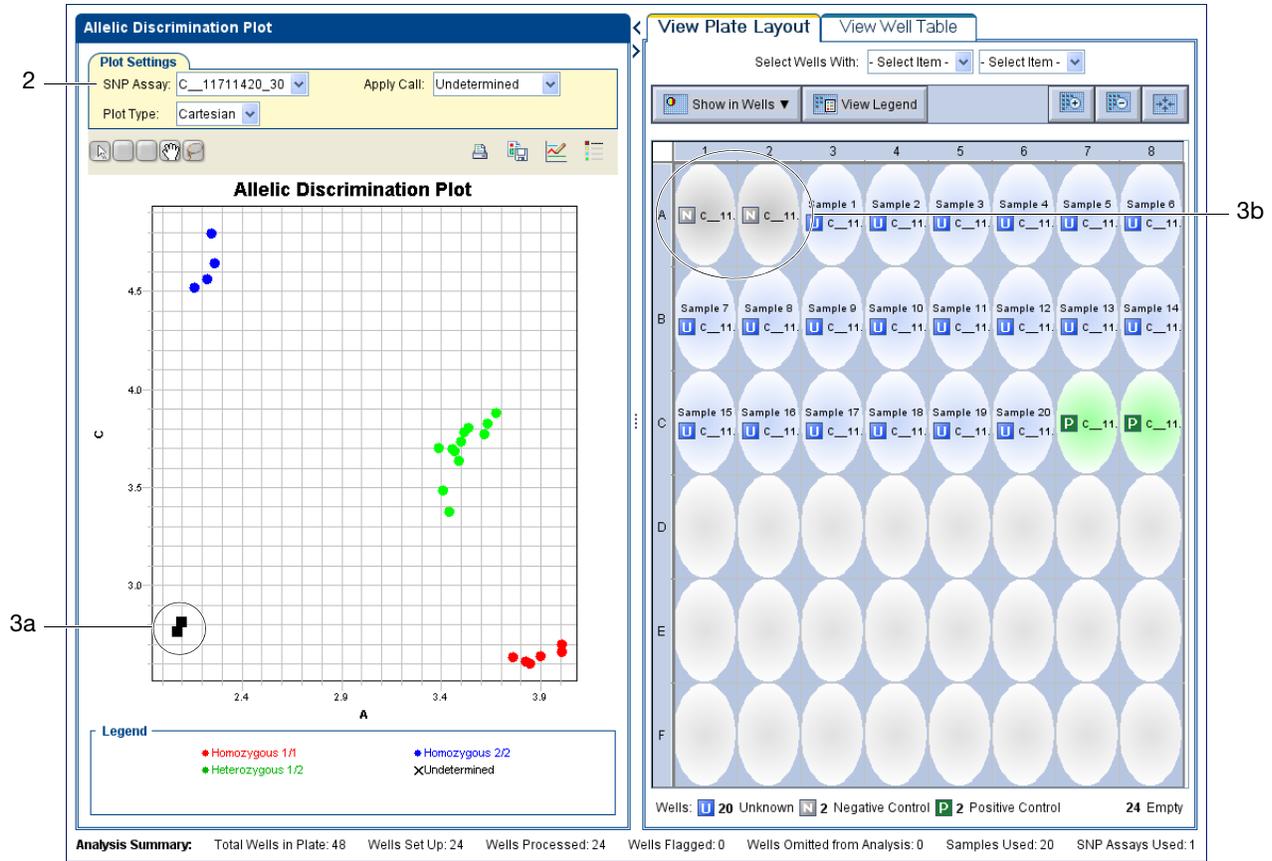
Remarques _____

c. Répéter les étapes 3a et 3b pour tous les autres clusters de la courbe.

Élément	Description
Menu déroulant SNP Assay (Essai SNP)	Détermine les données de l'essai SNP que le logiciel StepOne™ affiche sur la courbe.
Menu déroulant Plot Type (Type de courbe)	Détermine le type de courbe (Cartesian (Cartésienne) ou Polar (Polaire)) que le logiciel StepOne™ utilisera pour afficher les données.
Menu déroulant Apply Call (Appliquer l'assignation)	Lorsqu'un point de données est sélectionné, ce menu permet de lui attribuer une assignation d'allèle au sein du nuage de points.
Barre d'outils	Contient des outils de manipulation du nuage de points : <ul style="list-style-type: none">  – Sélectionne les points de données en cliquant sur chacun d'eux ou en traçant une zone de sélection avec la souris autour d'un groupe de points.  – Sélectionne des points de données en les entourant.  – Repositionne le nuage de points.  – Agrandit la taille du nuage de points.  – Réduit la taille du nuage de points.
Légende	Explication des symboles dans le nuage de points.

La figure ci-dessous montre le graphique de discrimination allélique de l'exemple.

Remarques _____



Instructions d'analyse

Lors de l'analyse d'une expérience :

- Vérifier que tous les contrôles possèdent le génotype adéquat.
- Si des contrôles positifs sont utilisés, vérifier leurs assignations :
 - a. Sur le tableau des résultats, sélectionner les puits contenant un contrôle positif pour faire ressortir les points de données correspondants dans le graphique de discrimination allélique.
 - b. Vérifier que les points des contrôles positifs se superposent sur l'axe de la courbe souhaité. Par exemple, si le contrôle positif Allele 1/Allele 1 (Allèle 1/Allèle 1) est sélectionné, les contrôles doivent se superposer sur l'axe X.
 - c. Répéter les étapes a et b pour les puits contenant les autres contrôles positifs.
- Examiner le cluster des contrôles négatifs pour les échantillons inconnus dont l'amplification a échoué :
 - a. Sélectionner les points de données du cluster dans le coin inférieur gauche du graphique de discrimination allélique pour sélectionner les lignes correspondantes du tableau des résultats.
 - b. Vérifier que les puits sélectionnés dans le tableau des résultats sont des contrôles négatifs et non des échantillons inconnus.

Remarques _____

- Les échantillons superposés avec les contrôles négatifs peuvent :
 - Ne pas contenir d'ADN
 - Contenir des inhibiteurs de PCR
 - Être homozygotes pour une séquence délétée
- Vérifier les résultats des échantillons regroupés de façon plus ou moins éparses avec des contrôles négatifs en les retestant.
- Pour les réplicats, consulter soigneusement les données à la recherche d'amplifications non conformes pour garantir la précision des assignations de génotype. Si des amplifications non conformes sont présentes, vérifier les résultats des échantillons associés en les testant à nouveau.
- Examiner le nombre de clusters dans la courbe. Si le graphique de discrimination allélique contient moins que les trois clusters de génotype représentatifs (hétérozygote, homozygote allèle 1 et homozygote allèle 2), le logiciel StepOne™ ne peut pas génotyper les échantillons tant que la fonction 2-Cluster Calling (Assignation de 2 clusters) n'est pas activée.

Si la courbe contient moins de trois clusters :

- a. Cliquer sur **Analysis Settings** (Paramètres d'analyse).
- b. Cliquer sur **Edit Default SNP Assay Settings** (Modifier les paramètres par défaut des essais SNP).
- c. Sélectionner **2-Cluster Calling Enabled** (Assignation de 2 clusters activée), puis cliquer sur **Save Changes** (Enregistrer les modifications).
- d. Cliquer sur **Apply Analysis Settings** (Appliquer les paramètres d'analyse).
- e. Cliquer sur **Reanalyze** (Réanalyser) pour réanalyser l'expérience en ne désignant que 2 clusters.

Remarque : Les résultats affichés sont synchronisés. Par exemple, en cliquant sur un puits dans le plan de plaque, les données correspondantes dans le tableau des résultats et le graphique de discrimination allélique sont sélectionnées.

Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur le graphique de discrimination allélique, consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur ? ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

Remarques

Affichage du plan de plaque

Consulter les résultats de l'expérience dans le plan de plaque. Le plan de plaque affiche la configuration spécifique de l'essai et les propriétés d'analyse de l'expérience dans un format de puits correspondant au type de plaque de réactions utilisé pour la réaction.

À propos des données de l'exemple

Pour l'exemple, vérifier que le logiciel StepOne™ a désigné :

- 6 échantillons comme homozygote allèle 1 (●)
- 4 échantillons comme homozygote allèle 2 (●)
- 12 échantillons comme hétérozygote (●)
- 2 échantillons comme contrôle négatif (■)

Vérifier qu'aucun puits de la plaque de réactions n'a déclenché de code d'alerte CQ.

Affichage du plan

1. Cliquer sur l'icône < en regard du graphique de discrimination allélique pour afficher intégralement le plan de plaque.
2. Cliquer sur  **Show in Wells** (Afficher dans les puits), puis sélectionner ou désélectionner le paramètre à afficher dans les puits.
3. Répéter l'étape 2 jusqu'à ce que le plan de plaque contienne tous les paramètres souhaités.

Paramètre	Description
Nom de l'échantillon	Nom de l'échantillon appliqué au puits.
Task (Fonction)	Fonction attribuée au puits : <ul style="list-style-type: none"> •  – Unknown (Inconnue) •  – Negative Control (Contrôle négatif) •  – Positive Control (Contrôle positif)
SNP Assay Name (Nom de l'essai SNP)	Nom du SNP évalué dans le puits.
ID d'essai	Numéro d'identification du SNP évalué dans le puits.
Allele 1 / Allele 2 (Allèle 1/2)	Nom de l'allèle associé au SNP évalué dans le puits.
Allele 1 Dyes / Allele 2 Dyes (Fluorophores de l'allèle 1/fluorophores de l'allèle 2)	Nom des fluorophores du reporter et du quencher de l'allèle associé au SNP évalué dans le puits.
SNP Assay Color (Couleur de l'essai SNP)	Couleur du SNP évalué dans le puits.
Sample Color / Task Color (Couleur de l'échantillon/couleur de la fonction)	Couleur de l'échantillon ou de la fonction appliquée au puits.

Remarques _____

Paramètre	Description
Genotype Call (Assignment de génotype)	Assignment d'allèle attribuée à l'échantillon : <ul style="list-style-type: none"> ● Homozygote 1/1 ● Homozygote 2/2 ● Hétérozygote 1/2 ■ Contrôle négatif × Indéterminé
Flag (Code d'alerte)	Nombre de codes d'alerte déclenchés par le puits, indiqué dans le symbole ▲.

L'illustration suivante montre le plan de plaque dans l'exemple de réaction de génotypage.



Remarques

Instructions d'analyse

Lors de l'analyse d'une expérience :

- Le plan de plaque affiche l'icône  dans le coin supérieur gauche des puits omis par l'utilisateur. Il affiche l'icône  dans le coin des puits omis par les paramètres des codes d'alerte CQ.
- Noter l'emplacement des échantillons qui déclenchent les codes d'alerte CQ (). Comprendre les erreurs peut aider à diagnostiquer les éventuels dysfonctionnements.
- Il est possible de sélectionner la plaque de réactions complète, des zones de la plaque de réactions ou des puits spécifiques :
 - Cliquer sur le coin supérieur gauche de la plaque de réactions pour sélectionner les 48 puits.
 - Cliquer avec le bouton gauche de la souris et tracer une zone de sélection en faisant glisser le curseur.
 - Sélectionner **Sample** (Échantillon), **Target** (Cible) ou **Task** (Fonction) dans le menu Select Items (Sélectionner des éléments) de l'onglet View Plate Layout (Voir le plan de plaque). Sélectionner le nom de l'échantillon, de la cible ou de la fonction dans le deuxième menu Select Items (Sélectionner des éléments) pour choisir des puits d'un type spécifique à l'aide de l'outil de sélection.
- Il est possible d'ajuster le plan de plaque :
 - Utiliser les boutons  (Zoom avant),  (Zoom arrière) et  (Tout voir) pour augmenter ou diminuer la taille des puits indiqués.
 - Utiliser les touches fléchées pour développer le plan de plaque sur la totalité de l'écran.

Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur le plan de plaque, consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur  ou en sélectionnant **Help** (Aide) ► **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

Remarques _____

Affichage du tableau des résultats

Consulter les détails des résultats de l'expérience dans le tableau des résultats et repérer les puits accompagnés d'un code d'alerte. Le tableau des résultats affiche la configuration spécifique de l'essai et les propriétés d'analyse de l'expérience dans un tableau.

À propos des données de l'exemple

Dans l'exemple, vérifier qu'aucun puits de la plaque de réactions n'a déclenché de code d'alerte CQ.

Consultation de la courbe

1. Sélectionner l'onglet **View Well Table** (Voir le tableau des résultats).
2. Cliquer sur l'en-tête de colonne **Flag** (Code d'alerte) pour trier les données de sorte que les puits ayant déclenché les codes d'alerte apparaissent en haut du tableau.
3. Vérifier l'intégrité des contrôles :
 - a. Dans le menu Group By (Grouper par), sélectionner **Task** (Fonction) pour organiser les lignes du tableau d'après leur fonction sur la plaque de réactions.
 - b. Vérifier qu'aucun contrôle n'affiche de code d'alerte (⚠).
 - c. Cliquer sur les icônes – pour réduire les contrôles négatifs et positifs.
4. Cliquer sur > en regard de l'onglet View Well Table (Voir le tableau des résultats) pour afficher simultanément le graphique de discrimination allélique et le tableau des résultats.

La figure ci-dessous montre le tableau des résultats de l'exemple de réaction de génotypage.

Colonne	Description
Well (Puits)	Position du puits sur la plaque de réactions.
Omit (Exclure)	Une coche signale que le puits a été retiré de l'analyse.
Flag (Code d'alerte)	Un ⚠ signale que le puits a déclenché le nombre de codes d'alerte inscrit dans le symbole.

Remarques

Colonne	Description
Nom de l'échantillon	Nom de l'échantillon.
SNP Assay Name (Nom de l'essai SNP)	Nom de l'essai SNP évalué dans le puits.
ID d'essai	Numéro d'identification du SNP évalué dans le puits.
Task (Fonction)	Fonction attribuée au puits (inconnue, contrôle négatif ou contrôle positif).
Allele 1 / 2 (Allèle 1/2)	Nom de l'allèle associé au SNP évalué dans le puits.
Allele 1 / 2 Dyes (Fluorophores des allèles 1/2)	Nom des fluorophores du reporter et du quencher de l'allèle associé au SNP évalué dans le puits.
Allele 1 / 2 R _n (Allèle 1/2)	Signal normalisé (R _n) du reporter de l'allèle associé au SNP évalué dans le puits.
Pass Ref (Réf. passive)	Signal du fluorophore de la référence passive pour le puits.
Call (Assignment)	<p>Assignment d'allèle attribuée à l'échantillon, par exemple :</p> <ul style="list-style-type: none"> • ● Homozygote 1/1 – Homozygote pour l'allèle 1 • ● Homozygote 2/2 – Homozygote pour l'allèle 2 • ● Hétérozygote 1/2 – Hétérozygote • ■ Contrôle négatif • × Indéterminé
Quality (%) (Qualité (%))	Valeur de qualité calculée pour l'assignment du génotype.
Method (Méthode)	Méthode utilisée pour attribuer l'assignment à l'échantillon (Auto si elle est attribuée par le logiciel StepOne™ ou Manual (Manuelle) si elle est appliquée par un utilisateur).
Comments (Commentaires)	Commentaires entrés pour le puits d'échantillon associé.
Allele 1 / 2 C _T (Valeur CT de l'allèle 1/2)	Cycle seuil (C _T) de l'échantillon pour l'allèle associé au SNP évalué dans le puits.
<p>Colonnes CQ Flag (Code d'alerte CQ)</p> <p>Le tableau des résultats affiche des colonnes pour les codes d'alerte CQ déclenchés par les données de l'expérience. Si les données de l'expérience ne déclenchent pas de code d'alerte CQ, le logiciel StepOne™ n'affiche pas de colonne de code d'alerte. Un ▲ dans l'une des colonnes suivantes signale que le puits associé a déclenché le code d'alerte.</p>	
BADROX	Le puits a produit un signal de référence passive supérieur à la limite définie dans les paramètres d'analyse.
OFFSCALE	Le puits a produit un niveau de fluorescence supérieur aux valeurs que le système StepOne™ peut mesurer.
NOSIGNAL	Le puits n'a produit aucun niveau de fluorescence détectable.
CLUSTER#	Pour le SNP évalué dans le puits, le nombre de clusters généré à partir des données de l'expérience est supérieur à la limite définie dans les paramètres d'analyse.
PCFAIL	Le contrôle positif n'a pas produit de R _n pour l'allèle associé de valeur supérieure à la limite définie dans les paramètres d'analyse, ce qui montre que l'amplification du contrôle peut avoir échoué.

Remarques _____

Colonne	Description
SMCLUSTER	Le nombre de points de données dans le cluster associé est inférieur à la limite définie dans les paramètres d'analyse.
AMPNC	Le contrôle négatif a produit une valeur R_n supérieure à la limite définie dans les paramètres d'analyse, ce qui indique une amplification possible.
NOAMP	Le puits n'a pas produit de R_n pour un allèle de valeur supérieure à la limite définie dans les paramètres d'analyse, ce qui montre que l'amplification du puits peut avoir échoué.
NOISE	La fluorescence du fond (bruit) produite par le puits est supérieure à celle des autres puits sur la plaque de réactions, et ce d'un facteur supérieur à la limite définie dans les paramètres d'analyse.
SPIKE	La courbe d'amplification du puits contient au moins un point de données non concordant avec les autres points de la courbe.
EXPFAIL	Le logiciel ne peut pas identifier la région exponentielle de la courbe d'amplification pour le puits.
BLFAIL	Le logiciel ne peut pas calculer la ligne de base la plus proche pour les données du puits.
THOLDFAIL	Le logiciel ne peut pas calculer le seuil du puits associé.
CTFAIL	Le logiciel ne peut pas calculer le cycle seuil (C_T) du puits associé.

Instructions d'analyse

Lors de l'analyse d'une expérience :

- Si des contrôles positifs sont utilisés, vérifier leur intégrité :
 - a. Dans le menu Group By (Grouper par), sélectionner **Task** (Fonction) pour organiser les lignes du tableau d'après leur fonction sur la plaque de réactions.
 - b. Vérifier que les contrôles positifs n'affichent pas de code d'alerte (▲) et que la fluorescence du reporter normalisé (R_n) est adaptée au génotype (par exemple, en cas d'évaluation du contrôle positif Allele 1/Allele 1 (Allèle 1/allèle 1), une augmentation importante de la valeur R_n pour la sonde de l'allèle 1 et très faible pour la sonde de l'allèle 2 est attendue).
 - c. Répéter l'étape b pour chaque contrôle positif.
- Consulter les données des échantillons inconnus. Pour chaque ligne qui affiche ▲ dans la colonne Flag (Code d'alerte), noter les données et les codes d'alerte déclenchés par le puits associé.
- Sélectionner les zones du tableau ou les puits d'un type spécifique :
 - En cliquant sur le bouton gauche de la souris et en traçant une zone de sélection dans le tableau.
 - En sélectionnant **Sample** (Échantillon) **Target** (Cible) ou **Task** (Fonction) dans le menu Select Items (Sélectionner des éléments) de l'onglet View Well Table (Voir le tableau des résultats), puis en sélectionnant le nom de l'échantillon, de la cible ou de la fonction dans le deuxième menu Select Items (Sélectionner des éléments) pour choisir des puits d'un type spécifique à l'aide de l'outil de sélection.

Remarques _____

- Regrouper les lignes du plan de plaque en sélectionnant une option dans le menu Group By (Grouper par). Il est possible de développer ou de réduire les listes en cliquant sur l'icône +/- en regard de chaque liste ou en cliquant sur  **Collapse All** (Réduire tout) ou  **Expand All** (Développer tout).
- Exclure un puits de l'analyse en cochant la case **Omit** (Exclure) correspondant au puits. Pour inclure un puits dans l'analyse, décocher la case **Omit** (Exclure).

Remarque : L'expérience doit être réanalysée chaque fois qu'un puits est exclu ou inclus.

Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur le tableau des résultats, consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur  ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

Affichage de la synthèse CQ

Consulter la synthèse des codes d'alerte CQ déclenchés par les données de l'expérience et identifier les causes des phénomènes correspondants. La synthèse CQ affiche la fréquence et l'emplacement de tous les codes d'alerte CQ. Si un code d'alerte n'apparaît pas dans l'expérience, sa fréquence est 0. Sinon, il apparaît à la position du puits indiquée dans la colonne Wells (Puits). Cliquer sur un code d'alerte pour afficher les détails correspondants, notamment la liste de tous les puits accompagnés d'un code d'alerte.

À propos des données de l'exemple

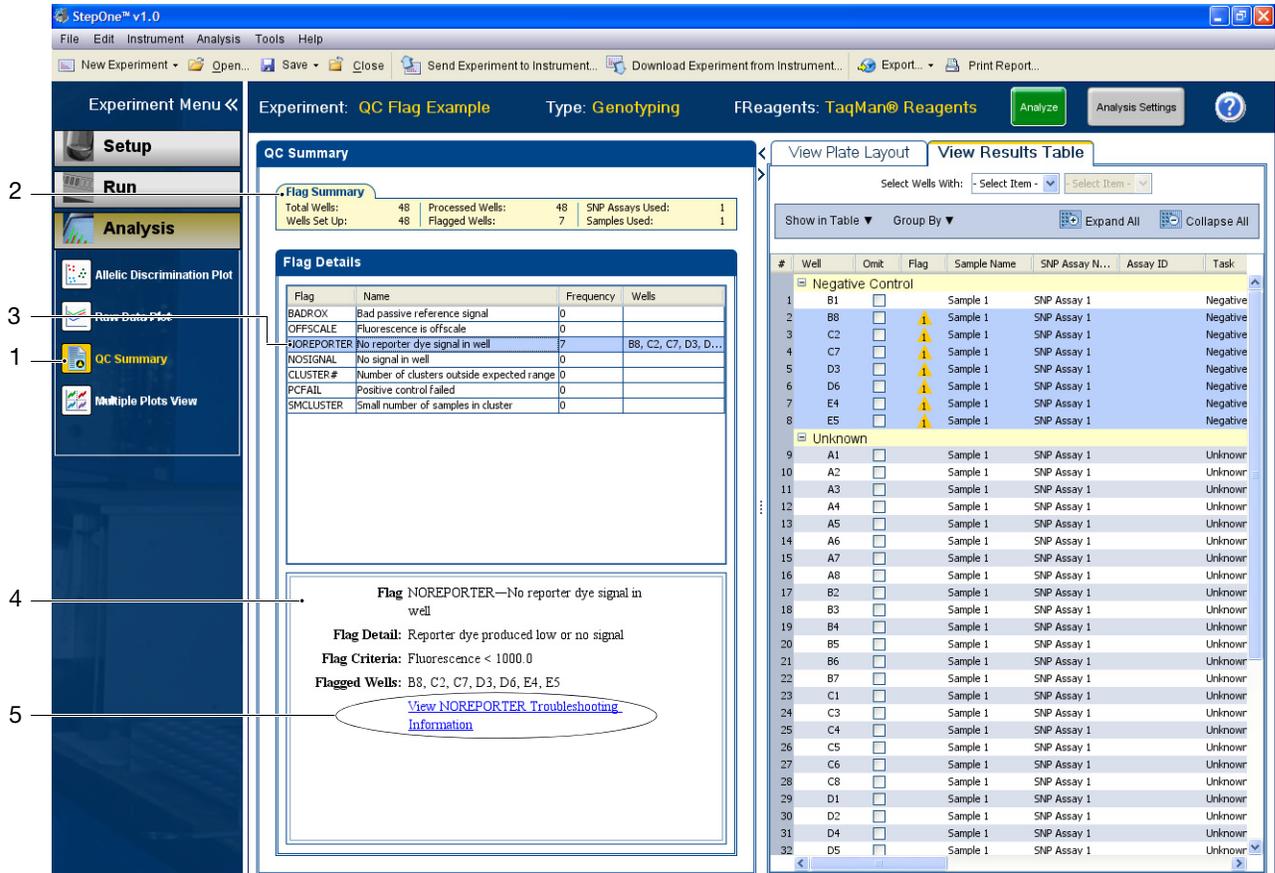
Puisque l'exemple ne déclenche pas de code d'alerte CQ (▲), la figure ci-dessous provient d'une autre expérience contenant des puits ayant déclenché le code d'alerte NOREPORTER.

Consultation de la synthèse

1. Dans le volet de navigation, sélectionner  **QC Summary** (Synthèse CQ).
2. Consulter la zone Flag Summary (Synthèse des codes d'alerte) et noter le nombre de puits ayant déclenché des codes d'alerte.
3. Dans le tableau Flag Details (Détails des codes d'alerte), sélectionner le code d'alerte **NOREPORTER**.
4. Consulter les informations détaillées sur le code d'alerte NOREPORTER.
5. Cliquer sur **View NOREPORTER Troubleshooting Information** (Voir les informations d'identification des causes du code d'alerte NOREPORTER) pour afficher les données d'identification des causes du code d'alerte.

La figure ci-dessous montre la synthèse CQ d'une réaction de génotypage contenant des codes d'alerte.

Remarques



Instructions d'analyse

Lors de l'analyse d'une expérience :

- Dans le tableau Flag Details (Détails des codes d'alerte), sélectionner chaque code d'alerte CQ dont la fréquence est supérieure à 0, consulter la fréquence et l'emplacement des puits ayant déclenché le code d'alerte CQ, puis cliquer sur le lien d'identification des causes du code d'alerte.

Remarque : Lors de la sélection d'un code d'alerte dans Flag Details (Détails des codes d'alerte), le tableau des résultats met en surbrillance les puits ayant déclenché le code d'alerte.

Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur les codes d'alerte CQ, consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur  ou en sélectionnant **Help (Aide) ▶ StepOne Help (Aide de StepOne)** dans le menu.

Remarques

Affichage de la courbe des données brutes

Si nécessaire, consulter la courbe des données brutes pour repérer des irrégularités dans le spectre brut collecté par l'instrument StepOne™.

La courbe des données brutes affiche l'amplitude de la fluorescence brute collectée dans chaque canal (1 à 3) pendant le cycle de la réaction indiqué par le curseur Show Cycle (Afficher le cycle). La courbe affiche le spectre brut des puits sélectionnés dans le plan de plaque ou le tableau des résultats.

À propos des données de l'exemple

Dans l'exemple, consulter l'écran Raw Data Plot (Courbe des données brutes) à la recherche d'une hausse constante du signal (sans creux ni modification brusque) pour le filtre approprié.

Consultation de la courbe

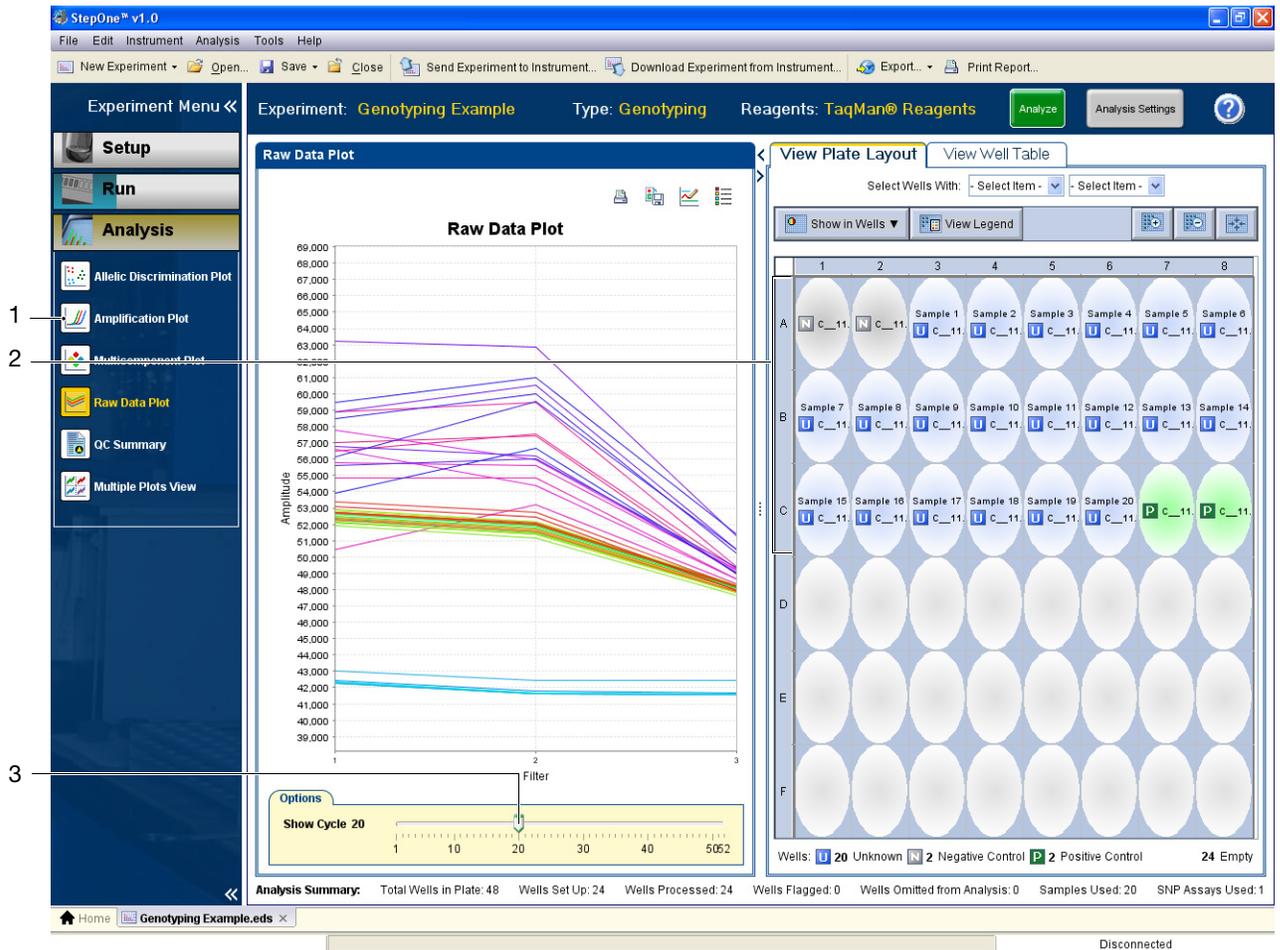
1. Dans le volet de navigation, sélectionner  **Raw Data Plot** (Courbe des données brutes).
2. Dans le tableau des résultats, sélectionner les puits à inspecter.
3. Faire glisser le curseur Show Cycle (Afficher le cycle) pour afficher les modifications temporaires dans chaque filtre du profil des données brutes.

Le système StepOne comporte plusieurs filtres :

Filtre	1	2	3
Fluorophore	<ul style="list-style-type: none"> • Fluorophore FAM™ • Fluorophore SYBR® Green 	<ul style="list-style-type: none"> • Fluorophore JOE™ • Fluorophore VIC® 	<ul style="list-style-type: none"> • Fluorophore ROX™

Remarques _____

La figure ci-dessous montre les données brutes de l'exemple de réaction de génotypage.



Instructions d'analyse

Lors de l'analyse d'une expérience, rechercher les éléments suivants dans chaque filtre :

- Une croissance caractéristique du signal
- Une absence de creux ou de modification brusque

Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur la courbe des données brutes, consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur ? ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

Remarques

Affichage de la courbe des multicomposantes

L'écran Multicomponent Plot (Courbe des multicomposantes) affiche la contribution spectrale complète de chaque fluorophore d'un puits sélectionné sur toute la durée de la réaction de PCR.

À propos des données de l'exemple

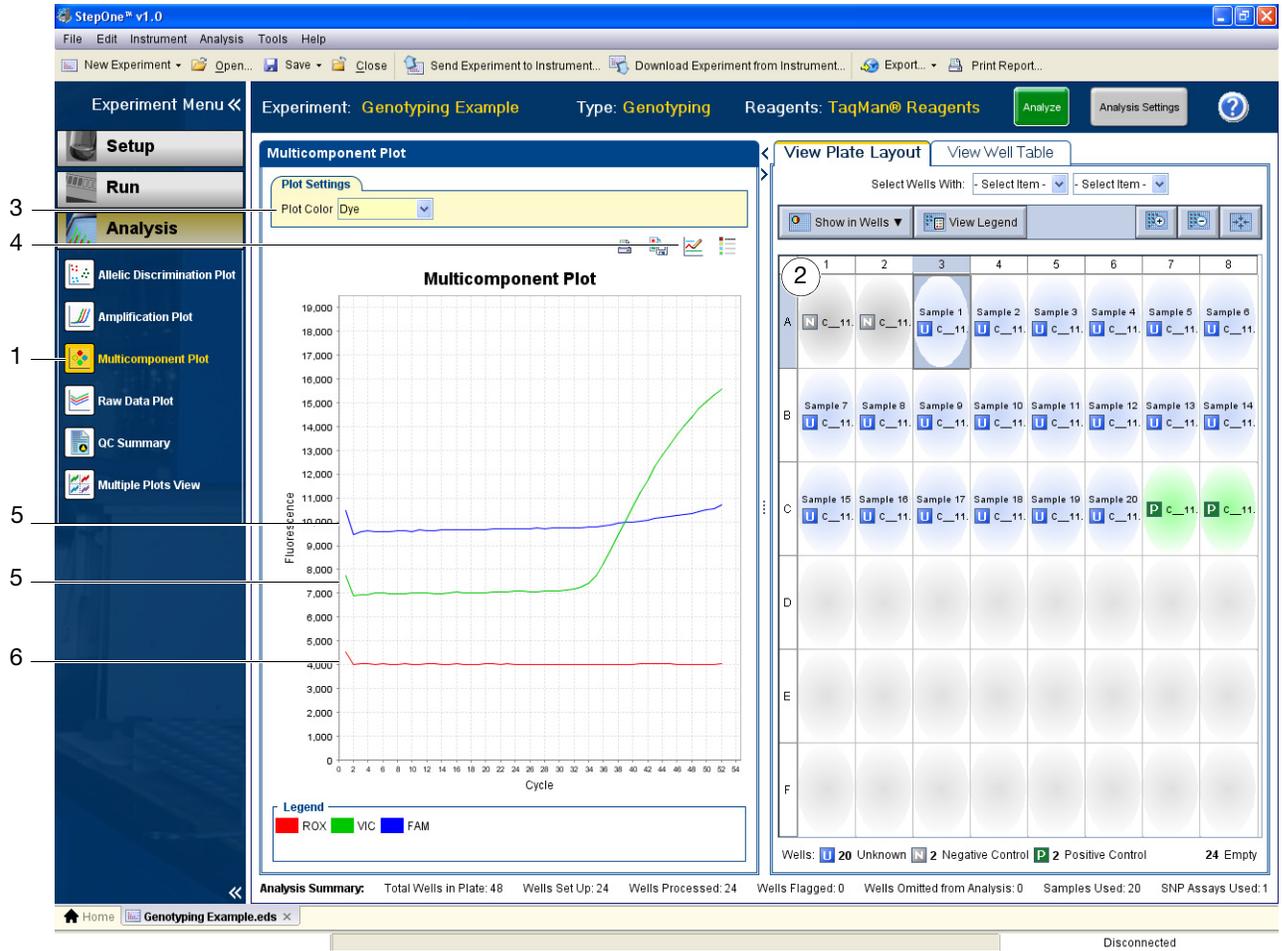
Dans l'exemple, consulter la courbe des multicomposantes à la recherche des éléments suivants :

- Fluorophore ROX™ (référence passive)
- Fluorophore FAM™ (reporter)
- Pics, creux et/ou modifications subites
- Amplification dans les puits de contrôle négatif

Affichage de la courbe des multicomposantes

1. Dans le volet de navigation, sélectionner  **Multicomponent Plot** (Courbe des multicomposantes).
2. Sélectionner un puits du plan de plaque pour afficher les données correspondantes dans l'écran Multicomponent Plot (Courbe des multicomposantes).
3. Dans le menu déroulant Plot Color (Couleur de la courbe), sélectionner **Dye** (Fluorophore).
4. Cliquer sur  **Show/Hide the plot legend** (Afficher/masquer la légende de la courbe).
5. Vérifier le signal des fluorophores FAM™ et VIC®. Dans l'exemple, le signal des fluorophores FAM™ et VIC® augmente pendant la PCR, ce qui témoigne d'une amplification normale.
6. Vérifier le signal du fluorophore ROX®. Dans l'exemple, le signal du fluorophore ROX reste constant pendant la réaction de PCR, ce qui témoigne de données classiques.
7. Sélectionner un puits de contrôle négatif à la fois et vérifier l'amplification. L'exemple ne comporte pas d'amplification dans les puits de contrôle négatif.

Remarques _____



Instructions d'analyse

Lors de l'analyse d'une expérience, rechercher les éléments suivants :

- Référence passive – Le niveau de fluorescence du fluorophore de référence passive doit rester relativement constant pendant la réaction de PCR.
- Reporter – Le niveau de fluorescence du reporter doit présenter une zone plane correspondant à la ligne de base, suivie d'une rapide augmentation de la fluorescence lorsque l'amplification se produit.
- Irrégularités du signal – Le signal de fluorescence ne doit pas présenter de pic, de creux et/ou de modification subite.
- Puits de contrôle négatif – Les puits de contrôle négatif ne doivent pas présenter d'amplification.

Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur la courbe des multicomposantes, consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur ? ou en sélectionnant **Help (Aide) ▶ StepOne Help (Aide de StepOne)** dans le menu.

Remarques

Affichage de la courbe d'amplification

Si des données en temps réel ont été collectées pendant l'expérience, consulter les données d'amplification pour mieux comprendre la cause des codes d'alerte insérés.

L'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) affiche l'amplification de tous les échantillons des puits sélectionnés. Utiliser les courbes d'amplification pour vérifier les résultats de l'expérience :

- **ΔR_n vs Cycle** – ΔR_n représente l'amplitude du signal de fluorescence normalisé généré par la réaction de PCR, ainsi que les données à partir desquelles la valeur C_T est calculée. Cette courbe affiche la valeur ΔR_n en fonction du nombre de cycles. Elle permet d'identifier et d'examiner les amplifications irrégulières, ainsi que de visualiser les valeurs du seuil et de la ligne de base de la réaction.
- **R_n vs Cycle** – R_n représente la fluorescence du reporter normalisé. Cette courbe affiche la valeur R_n en fonction du nombre de cycles. Elle permet d'identifier et d'examiner les amplifications irrégulières.
- **C_T vs Well (CT vs Puits)** – Le cycle seuil (C_T) est le nombre de cycles de PCR pour lequel le niveau de fluorescence atteint le seuil. Cette courbe affiche la valeur C_T par rapport à la position du puits. Elle permet de localiser les amplifications non conformes (aberrations).

Chaque courbe peut s'afficher sous la forme d'un graphique du type suivant : linéaire ou log10.

Remarque : Pour plus d'informations sur les courbes d'amplification, voir le document *Real-Time PCR Systems Chemistry Guide* ou l'aide du logiciel *StepOne™*.

À propos des données de l'exemple

Dans l'exemple, consulter la courbe d'amplification à la recherche des éléments suivants :

- les valeurs correctes de ligne de base et de seuil ;
- Les amplifications non conformes.

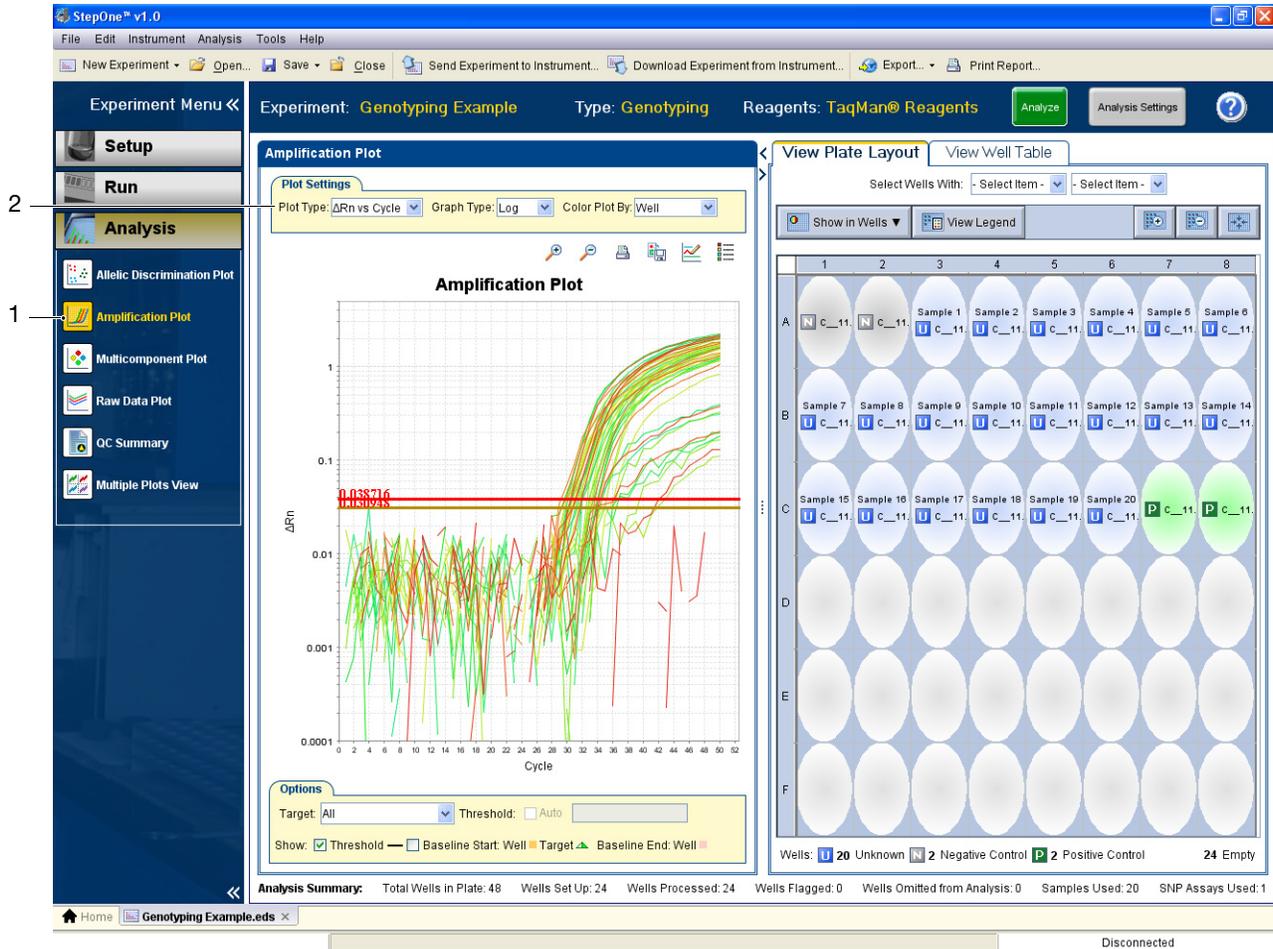
Consultation des résultats

1. Dans le volet de navigation, sélectionner  **Amplification Plot** (Courbe d'amplification).
2. Dans l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) :
 - a. Dans le menu déroulant Plot Type (Type de courbe), sélectionner **ΔR_n vs Cycle**.
 - b. Dans le menu déroulant Color Plot By (Colorer la courbe par), sélectionner **Well (Puits)**.
 - c. Cliquer sur  **Show/Hide the plot legend** (Afficher/masquer la légende de la courbe).

Remarques _____

3. Afficher les valeurs de la ligne de base :
 - a. Dans le menu déroulant Graph Type (Type de graphique), sélectionner **Linear** (Linéaire).
 - b. Cocher la case **Baseline** (Ligne de base) pour afficher les cycles de début et de fin.
 - c. Vérifier que la ligne de base est correctement définie.
4. Afficher les valeurs de seuil :
 - a. Dans le menu déroulant Graph Type (Type de graphique), sélectionner **Log**.
 - b. Dans le menu déroulant Target (Cible), sélectionner **C__11711420_30-A**.
 - c. Cocher la case **Threshold** (Seuil) pour afficher le seuil.
 - d. Vérifier que le seuil est correctement défini. Dans l'exemple, le seuil se situe dans la phase exponentielle.
5. Localiser les amplifications non conformes :
 - a. Dans le menu déroulant Plot Type (Type de courbe), sélectionner **C_T vs Well** (CT vs puits).
 - b. Vérifier que les puits répétés ont la même amplification. L'exemple n'utilise pas de puits répétés.

Remarques _____

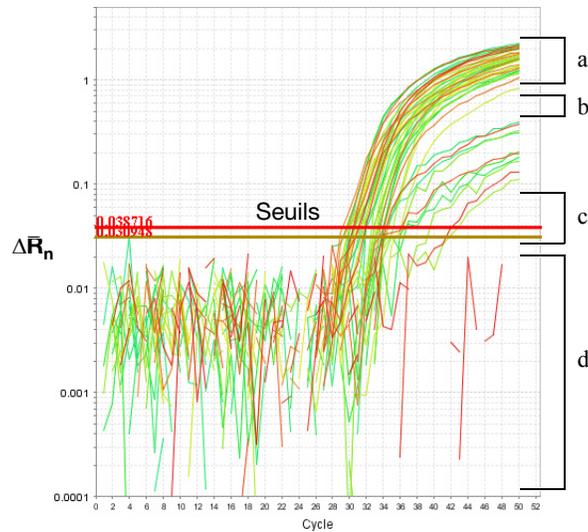


Instructions d'analyse

Lors de l'analyse d'une expérience, rechercher les éléments suivants :

- Les valeurs correctes de ligne de base et de seuil – Le logiciel StepOne™ calcule automatiquement les valeurs de ligne de base et de seuil en supposant que les données présentent une courbe d'amplification *classique*. Une courbe d'amplification classique possède :
 - Une phase de plateau (a)
 - Une phase linéaire (b)
 - Une phase exponentielle (géométrique) (c)
 - Un bruit de fond (d)
 - Une ligne de base (non représentée – les niveaux de base sont calculés pour chaque courbe)

Remarques _____



IMPORTANT ! Une erreur expérimentale (par exemple une contamination ou une imprécision de pipetage) peut produire des courbes d'amplification atypiques susceptibles d'entraîner des calculs de ligne de base et de seuil incorrects dans le logiciel StepOne™. Par conséquent, Applied Biosystems recommande de consulter l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) et de vérifier les valeurs de la ligne de base et du seuil attribuées à chaque puits après l'analyse. Pour plus d'informations, consulter l'aide du logiciel StepOne™.

- Les amplifications non conformes.

Si l'expérience n'est pas conforme aux instructions ci-dessus, procéder comme suit :

- Ajuster manuellement la ligne de base et/ou le seuil (consulter l'aide du logiciel StepOne™).
- ou
- Exclure un puits en cliquant dessus avec le bouton droit dans le plan de plaque et en sélectionnant **Omit** (Exclure).

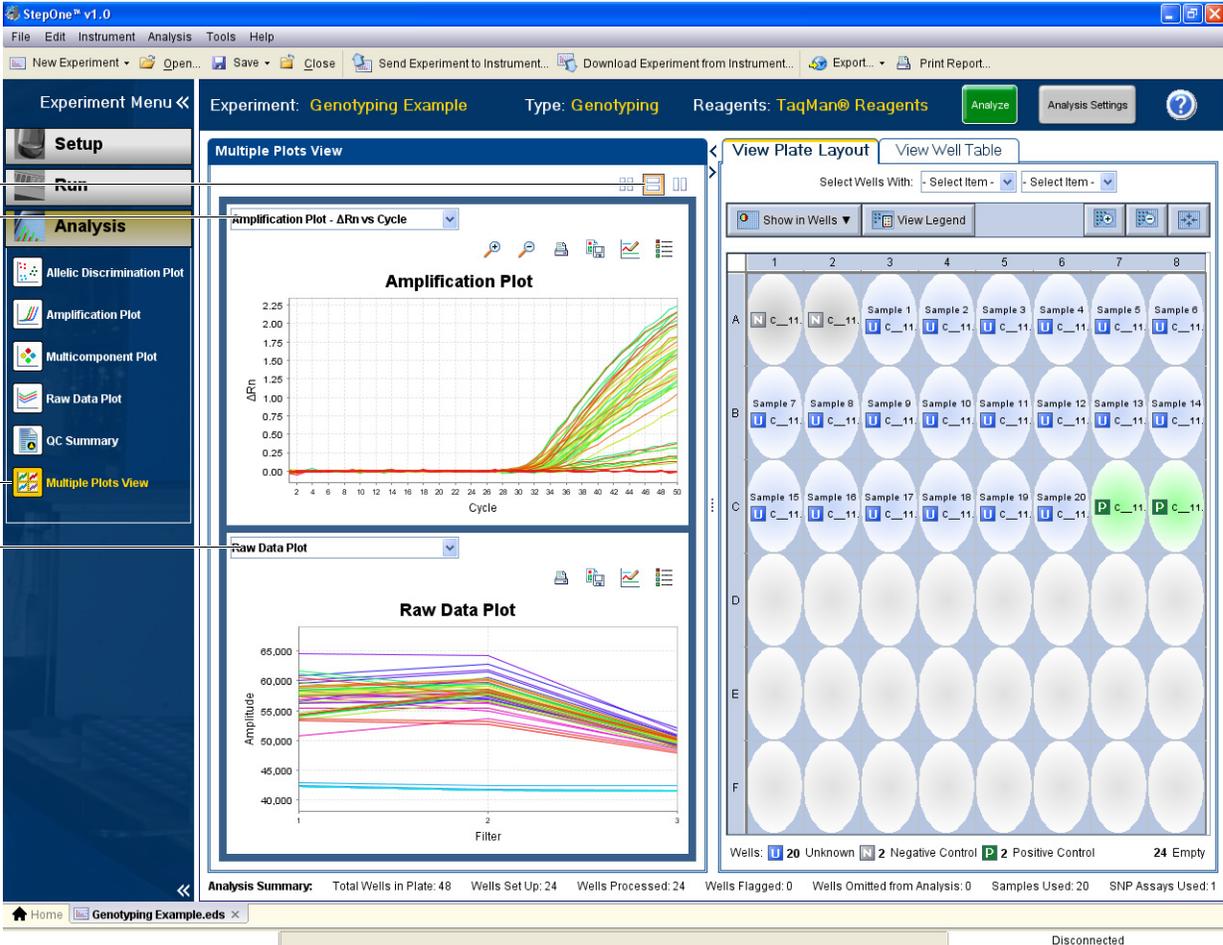
Remarques _____

Affichage simultané de plusieurs courbes

La zone Multiple Plot View (Voir plusieurs courbes) affiche simultanément jusqu'à quatre courbes pour une même analyse. Elle peut contenir une courbe, deux courbes en lignes ou en colonnes ou toutes les courbes dans un cadre 2 × 2.

Pour consulter les résultats de plusieurs courbes :

1. Dans le volet de navigation, sélectionner  **Multiple Plots View** (Voir plusieurs courbes).
2. Cliquer sur  pour afficher deux courbes en parallèle.
3. Dans la courbe du haut, sélectionner **Amplification Plot (ΔR_n vs. Cycle)** (Courbe d'amplification – R_n vs cycle) afin d'afficher les résultats d'amplification pour chaque puits sélectionné dans le plan de plaque.
4. Dans la courbe du bas, sélectionner **Raw Data Plot** (Courbe des données brutes) pour afficher les données brutes de chaque puits sélectionné dans le plan de plaque.



Pour plus
d'informations

Pour plus d'informations sur la courbe d'amplification ou sur l'affichage de plusieurs courbes, consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur  ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

Remarques _____

Affichage des paramètres d'analyse

Si l'assignation des génotypes ou des seuils de codes d'alerte CQ par le logiciel StepOne™ n'est pas satisfaisante, ajuster les paramètres d'analyse et/ou les assignations si nécessaires.

À propos des données de l'exemple

Dans l'exemple, ajuster les paramètres d'analyse selon les besoins pour savoir comment les paramètres des assignations, des valeurs C_T et des codes d'alerte contribuent à l'analyse des données de génotypage.

Modification des paramètres d'analyse

1. Dans l'expérience, cliquer sur **Analysis Settings** (Paramètres d'analyse).
2. Dans le tableau Select a SNP Assay (Sélectionner un essai SNP), sélectionner **C__11711420_30**.
3. Cliquer sur **Edit Default Settings** (Modifier les paramètres par défaut).
4. Si des assignations manuelles ont été effectuées, sélectionner **Keep Manual Calls from Previous Analysis** (Conserver les assignations manuelles de l'analyse précédente) dans la fenêtre Edit Default SNP Assay Settings (Modifier les paramètres par défaut des essais SNP).
5. Dans le champ Quality Value (Valeur de qualité), entrer un pourcentage à appliquer comme intervalle de qualité pour les échantillons désignés automatiquement. Plus la valeur est grande, plus l'assignation de l'allèle est rigoureuse.
6. Cliquer sur **Save Changes** (Enregistrer les modifications) pour sauvegarder les paramètres.
7. Ajuster les paramètres C_T :
 - a. Cliquer sur l'onglet **CT Settings** (Paramètres CT).
 - b. Sélectionner l'allèle **A** dans le tableau Select an Allele (Sélectionner un allèle), puis désactiver **Use Default Settings** (Utiliser les paramètres par défaut).
 - c. Désactiver **Automatic Threshold** (Seuil automatique), puis entrer une nouvelle valeur de seuil.
 - d. Désactiver **Automatic Baseline** (Ligne de base automatique), puis entrer une nouvelle valeur de ligne de base.
 - e. Répéter les étapes 7b à 7d pour l'allèle **C**.

Remarque : Pour plus d'informations sur le réglage des cycles seuil pour les réactions de génotypage, consulter l'*aide du logiciel StepOne™*.

8. Ajuster les paramètres des codes d'alerte :
 - a. Cliquer sur l'onglet **Flag Settings** (Paramètres des codes d'alerte).
 - b. Dans la colonne Use (Utiliser), cocher la case de chaque code d'alerte à activer.

Remarques

- c. Si nécessaire, ajuster la valeur des codes d'alerte activés.
- d. Pour qu'un code d'alerte CQ activé exclue automatiquement les puits testés positifs pour la condition qu'il définit, cocher la case Reject Well (Rejeter un puits) correspondante.

Remarque : Les codes d'alerte CQ permettent de marquer des conditions et d'exclure des puits lorsque certains critères sont satisfaits (par exemple, lorsqu'il manque des données pour un puits). Pour plus d'informations, consulter l'*aide du logiciel StepOne™*.

9. Cliquer sur **Apply Analysis Settings** (Appliquer les paramètres d'analyse).
10. Cliquer sur **Reanalyze** (Réanalyser) pour analyser les données avec les nouveaux paramètres.

La figure ci-dessous montre les paramètres d'analyse définis pour l'exemple de réaction de génotypage.

The screenshot displays the StepOne v1.0 software interface. The main window shows the 'Analysis Settings for Genotyping Example' dialog box. The 'Call Settings' tab is active, showing a table for selecting a SNP assay. The table has columns for 'SNP Assay', 'Analysis Type', and 'Quality Value'. The selected assay is 'C_11711420_30' with a 'Default' analysis type and a 'Quality Value' of 95. An 'Edit Default Call Settings' dialog box is open over the table, showing options to 'Keep Manual Calls from Previous Analysis', 'Autocaller Enabled', and '2-Cluster Calling Enabled'. The 'Quality Value' is set to 95.0. The 'Call Settings for C_11711420_30' panel shows 'Apply Call Settings' with 'Use Default Settings' checked. The 'Well Table' on the right shows a 96-well plate layout with wells 11 and 12 highlighted in green, indicating positive results. The 'Filter' plot at the bottom shows a signal level around -40,000. The 'Analysis Summary' at the bottom indicates 24 wells processed and 20 samples used.

Remarques

Instructions d'analyse

Lors de l'analyse d'une expérience :

- Si l'expérience ne comporte que deux clusters, activer l'algorithme d'assignation de 2 clusters en sélectionnant **2-Cluster Calling Enabled** (Assignation de 2 clusters activée) dans la fenêtre Edit Default SNP Assay Settings (Modifier les paramètres par défaut des essais SNP).
- Les paramètres C_T sont disponibles uniquement pour les expériences qui comportent des données d'amplification. Les expériences composées uniquement de lectures pré et post-PCR n'utilisent pas le système des cycles seuil (C_T) pour l'analyse.
- Les données des échantillons peuvent être désignées :
 - automatiquement, en utilisant la fonction Autocaller (Assignation automatique) (voir page 94) ;
 - manuellement, en utilisant la barre d'outils et le nuage de points (voir page 95).

Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur les paramètres d'analyse, consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur  ou en sélectionnant **Help** (Aide) ► **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

Remarques _____

Attribution automatique des assignations

1. Dans l'expérience, cliquer sur **Analysis Settings** (Paramètres d'analyse).
2. Dans le tableau Select a SNP Assay (Sélectionner un essai SNP), sélectionner l'essai SNP souhaité.
3. Cliquer sur **Edit Default SNP Assay Settings** (Modifier les paramètres par défaut des essais SNP).
4. Si des assignations manuelles ont été effectuées, sélectionner **Keep Manual Calls from Previous Analysis** (Conserver les assignations manuelles de l'analyse précédente).
5. Sélectionner **Autocaller Enabled** (Assignation automatique activée) pour activer l'analyse automatique.
6. Si les données analysées ne doivent comporter que deux clusters, sélectionner **2-Cluster Calling Enabled** (Assignation de 2 clusters activée).
7. Dans le champ Quality Value (Valeur de qualité), entrer un pourcentage à appliquer comme intervalle de qualité pour les échantillons désignés automatiquement. (Plus la valeur est grande, plus l'assignation de l'allèle est rigoureuse.)
8. Cliquer sur **Save Changes** (Enregistrer les modifications) pour sauvegarder les paramètres.
9. (*Facultatif*) Attribuer des codes d'alerte :
 - a. Cliquer sur l'onglet **Flag Settings** (Paramètres des codes d'alerte).
 - b. Attribuer des codes d'alerte selon les besoins.

Remarque : Lors de l'attribution de codes d'alerte, il est possible de marquer des conditions et d'exclure des puits lorsque certains critères sont satisfaits (par exemple, lorsqu'il manque des données pour un puits). Pour plus d'informations, consulter l'*aide du logiciel StepOne™*.

 - c. Cliquer sur **Apply Analysis Settings** (Appliquer les paramètres d'analyse) pour fermer la fenêtre Analysis Settings (Paramètres d'analyse).
10. Cliquer sur **Reanalyze** (Réanalyser) pour analyser les données avec les nouveaux paramètres.

Remarques

Attribution manuelle des assignations

1. Dans l'expérience, cliquer sur **Analysis Settings** (Paramètres d'analyse).
2. Dans le tableau Select a SNP Assay (Sélectionner un essai SNP), sélectionner l'essai SNP souhaité.
3. Définir les paramètres d'analyse du reporter :
 - a. Cliquer sur **Edit Default SNP Assay Settings** (Modifier les paramètres par défaut des essais SNP).
 - b. Désactiver la fonction **Autocaller enabled** (Assignation automatique activée).
 - c. Cliquer sur **Save Changes** (Enregistrer les modifications) pour sauvegarder les paramètres.
4. (*Facultatif*) Attribuer des codes d'alerte :
 - a. Cliquer sur l'onglet **Flag Settings** (Paramètres des codes d'alerte).
 - b. Attribuer des codes d'alerte selon les besoins.

Remarque : Lors de l'attribution de codes d'alerte, il est possible de marquer des conditions et d'exclure des puits lorsque certains critères sont satisfaits (par exemple, lorsqu'il manque des données pour un puits). Pour plus d'informations, consulter l'*aide du logiciel StepOne™*.

- c. Cliquer sur **Apply Analysis Settings** (Appliquer les paramètres d'analyse).
5. Cliquer sur **Reanalyze** (Réanalyser) pour analyser les données avec les nouveaux paramètres.
6. Dans le volet de navigation, sélectionner  **Allelic Discrimination Plot** (Graphique de discrimination allélique).
7. Dans le menu SNP Assay (Essai SNP), sélectionner un reporter. Les croix (× – Indéterminé) qui représentent le reporter sélectionné sont affichées dans le graphique de discrimination allélique.
8. Pour attribuer des assignations :
 - a. Cliquer sur l'outil de sélection .
 - b. Cliquer dans la courbe et faire glisser le curseur pour former une zone de sélection autour du point de données requis.
 - c. Dans le menu Apply Call (Appliquer l'assignation), sélectionner l'assignation souhaitée.
 - d. Répéter les étapes 8b et 8c pour appliquer les assignations aux points de données restants.
9. Si des assignations sont attribuées à plusieurs SNP, sélectionner un autre reporter dans le menu déroulant SNP Assay (Essai SNP) et répéter l'étape 8.

Remarques

Exportation des données

Les données d'expérience peuvent être exportées de plusieurs façons :

- Enregistrement de la courbe sous la forme d'un fichier image
- Impression de la courbe
- Impression du plan de plaque
- Création de diapositives
- Impression d'un rapport
- Exportation des données numériques

Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur l'exportation des données, consulter l'aide du logiciel StepOne™ en cliquant sur  ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

Remarques _____



Autres workflows d'expérience

A

Sommaire de cette annexe :

■ Workflow Advanced Setup (Configuration avancée).....	98
■ Workflow QuickStart (Démarrage rapide)	104
■ Workflow Template (Modèle).	109
■ Workflow Export/Import (Exportation/Importation)	110

Remarque : 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.

Remarques

Workflow Advanced Setup (Configuration avancée)

Les utilisateurs familiers du logiciel StepOne™ peuvent utiliser le workflow Advanced Setup (Configuration avancée) pour créer des réactions de génotypage sans l'assistant de programmation Design Wizard.

À propos du workflow Advanced Setup

Le workflow Advanced Setup (Configuration avancée) approfondit la plupart des opérations effectuées par l'assistant de programmation Design Wizard. Il permet d'ignorer une bonne partie du Chapitre 2, qui explique comment créer une expérience avec l'assistant de programmation Design Wizard.

Création d'une expérience

1. Dans l'écran Home (Accueil) du logiciel StepOne™, cliquer sur  sous la colonne Setup (Configuration).
2. Cliquer sur  **Advanced Setup (Configuration avancée)**.
3. Entrer les propriétés de l'exemple :
 - a. Cliquer dans le champ **Experiment Name** (Nom de l'expérience), puis entrer **Genotyping Example** (Exemple de réaction de génotypage).
 - b. Cliquer dans le champ **Barcode** (Code-barres), puis entrer **Example** (Exemple).
 - c. Cliquer dans le champ **User Name** (Nom d'utilisateur), puis entrer **Example User** (Exemple d'utilisateur).
 - d. Cliquer dans le champ **Comments** (Commentaires), puis entrer **Genotyping Getting Started Guide** (Exemple de réaction de génotypage du guide de mise en route).
 - e. Sélectionner l'application **Genotyping** (Génotypage).
 - f. Sélectionner les réactifs **TaqMan® Reagents** (Réactifs TaqMan).
 - g. Sélectionner la vitesse de variation de la température **Standard (~2 hours to complete a run)** (Standard (env. 2 h pour réaliser la réaction)).
 - h. Sélectionner **Pre-PCR Read** (Lecture pré-PCR) et **Amplification** pour ajouter ces phases au profil de thermocyclage.

Remarques _____

Experiment Properties

Enter an experiment name, select the type of experiment to set up, then select materials and methods for the PCR reactions and instrument run.

How do you want to identify this experiment?

3a Experiment Name: Example Genotyping Experiment

3b Barcode (Optional):

3c User Name (Optional): Example User

3d Comments (Optional): Example Genotyping Experiment

What type of experiment do you want to set up?

3e Quantitation - Standard Curve Quantitation - Relative Standard Curve Quantitation - Comparative Ct ($\Delta\Delta C_T$)

✓ Genotyping Melt Curve Presence/Absence

Detect single nucleotide polymorphism variants of a target nucleic acid sequence in samples.

Which reagents do you want to use to detect the target sequence?

3f ✓ TaqMan® Reagents Other

The PCR reactions contain primers designed to amplify the target sequence and a TaqMan® probe designed to detect amplification of the target sequence.

Which ramp speed do you want to use in the instrument run?

3g ✓ Standard (~ 2 hours to complete a run) Fast (~ 40 minutes to complete a run)

For optimal results with the standard ramp speed, Applied Biosystems recommends using standard reagents for your PCR reactions.

Which stages do you want to include in the instrument run?

3h Collect Data For: Pre-PCR Read Amplification Post-PCR Read

4. Dans le volet de navigation, cliquer sur  **Plate Setup** (Configuration de la plaque).

5. Créer l'essai SNP rs8039 sur le plan de plaque :

- a. Cliquer sur **Create New SNP Assay** (Créer un essai SNP).
- b. Cliquer dans le champ SNP Assay Name (Nom de l'essai SNP), puis entrer **rs8039**.
- c. Cliquer sur **OK**.

New SNP Assay

Enter a SNP assay name, then select a SNP assay color. For each allele, enter an allele name or base(s), then select the reporter, quencher, and allele color. Click "OK" to add the SNP assay to the library. * = Required

SNP Assay Name: rs8039 Color: Assay ID:

Allele 1 Name or Base(s): Allele 1 Color: Reporter: VIC Quencher: NFQ-MGB

Allele 2 Name or Base(s): Allele 2 Color: Reporter: FAM Quencher: NFQ-MGB

Comments:

Reset Fields OK Cancel

Remarques

6. Configurer les inconnues :
 - a. Dans le plan de plaque, sélectionner les lignes **A** et **B**.
 - b. Dans la liste SNP Assays (Essais SNP), cocher la case Assign (Attribuer) de l'essai SNP rs8039 pour appliquer celui-ci aux puits sélectionnés.
 - c. Cliquer dans le menu déroulant Task (Fonction) de l'essai SNP rs8039, puis sélectionner **Unknown** (Inconnue) pour appliquer la fonction aux puits sélectionnés.
7. Dans le plan de plaque, sélectionner les puits **A1** et **A2**.
8. Cliquer dans le menu déroulant Task (Fonction) de l'essai SNP rs8039, puis sélectionner **Negative Control** (Contrôle négatif) pour appliquer la fonction aux puits sélectionnés.
9. Créer les échantillons et les appliquer au plan de plaque :
 - a. Cliquer sur **Add New Sample** (Ajouter un échantillon) autant de fois que nécessaire pour que la liste Sample (Échantillon) contienne 20 échantillons.
 - b. Dans le plan de plaque, sélectionner le puits **A4**.
 - c. Cocher la case Assign (Attribuer) de l'échantillon 1 pour appliquer l'essai à l'échantillon du puits sélectionné.
 - d. Répéter les étapes 9b à 9c pour appliquer les échantillons comme indiqué ci-dessous.

Remarques _____

Instructions: Define the SNP assays and samples for this experiment, then assign them to wells in the plate. For each SNP assay assignment, select a task.

Assign SNP Assay(s) to the Selected Wells.

Create New... Add Saved SNP Assay Edit ▾

Assign	SNP Assay	Allele 1/Allele 2 Reporter	Task
<input type="checkbox"/>	rs8039	VIC/FAM	▾

Assign Sample to the Selected Wells.

Add New Sample Add Saved Sample Save Sample Delete Sample

Assign	Sample	Color
<input type="checkbox"/>	Sample 14	Orange
<input type="checkbox"/>	Sample 15	Light Green
<input type="checkbox"/>	Sample 16	Green
<input type="checkbox"/>	Sample 17	Blue
<input type="checkbox"/>	Sample 18	Light Green
<input type="checkbox"/>	Sample 19	Yellow
<input type="checkbox"/>	Sample 20	Yellow

Select the dye to use as the passive reference.

ROX ▾

View Plate Layout View Results Table

Select Wells With: - Select Item - - Select Item -

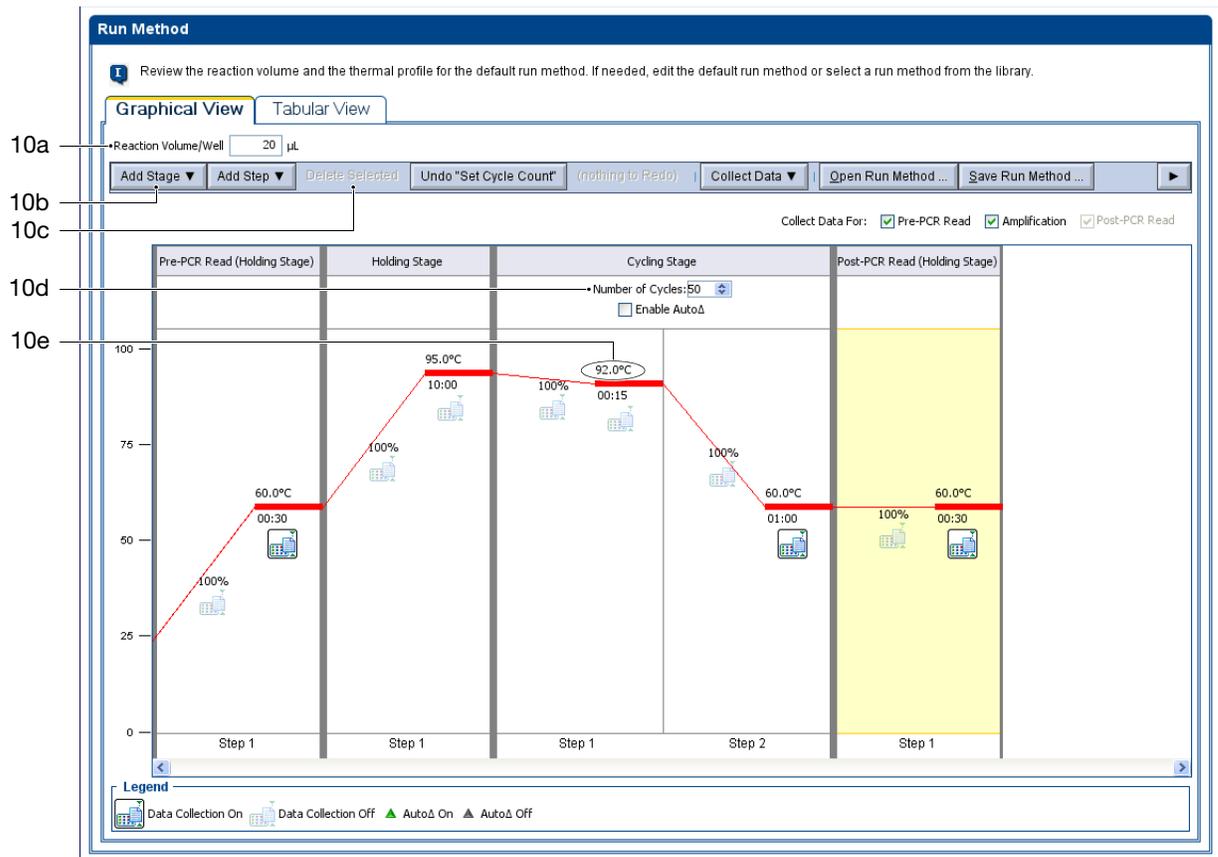
Show in Wells View Legend

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	N rs80...	N rs80...	U rs80...					
B	U rs80...							
C	U rs80...	P rs80...	P rs80...					
D								
E								
F								

Wells: U 24 Unknown N 0 Negative Control P 0 Positive Control 24 Empty

Remarques _____

10. Dans le volet de navigation, cliquer sur  **Run Method** (Profil de thermocyclage), puis configurer le profil de thermocyclage :
 - a. Cliquer dans le champ Reaction Volume/Well (Volume réactionnel par puits), puis entrer **25**.
 - b. Cliquer sur Pre-PCR Read (Holding Stage) (Lecture pré-PCR (Phase de maintien de la température)), sur **Add Stage** (Ajouter une phase), puis sélectionner **Holding** (Maintien de la température).
 - c. Sélectionner la première étape (50 °C/00:02:00) du nouveau maintien de la température, puis cliquer sur **Delete Selected** (Supprimer l'étape sélectionnée) pour effacer l'étape redondante.
 - d. Cliquer dans le champ Number of Cycles (Nombre de cycles) de la colonne Cycling Stage (Phase de thermocyclage), puis entrer **50**.
 - e. Cliquer sur la température dans la première étape de la colonne Cycling Stage (Phase de thermocyclage) (95 °C/00:00:15), puis entrer **92 °C**.



Remarques _____

11. Cliquer sur  **Save** (Enregistrer), puis sur **Save** (Enregistrer) dans la fenêtre Save Experiment (Enregistrer l'expérience) pour sauvegarder l'expérience sous le nom Genotyping Example.eds.
12. Préparer les réactions comme expliqué dans le Chapitre 3, « Préparation des réactions », à la page 33.
13. Réaliser l'expérience comme expliqué dans le Chapitre 4, « Réalisation de l'expérience », à la page 43.
14. Analyser l'expérience comme expliqué dans le Chapitre 5, « Analyse de l'expérience », à la page 67.

Remarques _____

Workflow QuickStart (Démarrage rapide)

Lors de la création d'une réaction de génotypage avec le workflow QuickStart (Démarrage rapide), il est possible de réaliser les réactions sur l'instrument sans entrer les informations de configuration de la plaque de réactions.

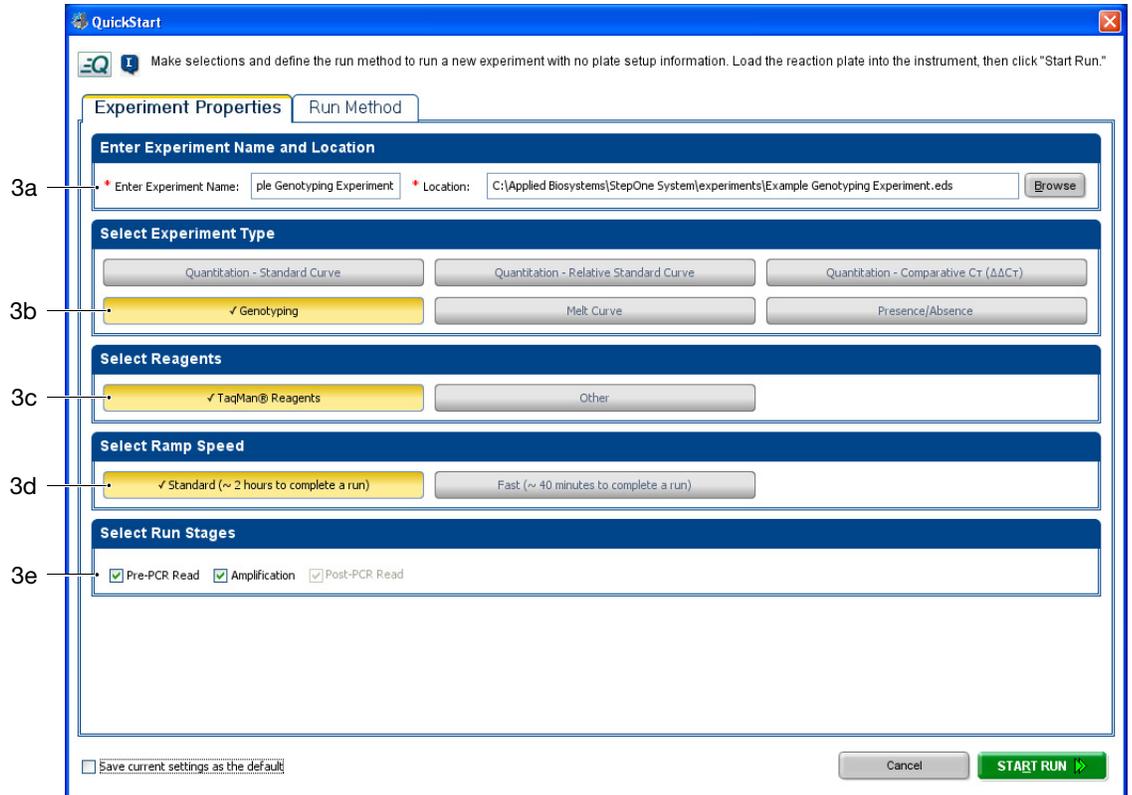
À propos de la configuration du workflow QuickStart

Le logiciel StepOne™ inclut un mode QuickStart (Démarrage rapide) qui permet d'ignorer une bonne partie du Chapitre 2. Lorsqu'il est familier des opérations requises pour configurer une expérience, l'utilisateur peut employer le mode QuickStart (Démarrage rapide) pour effectuer les expériences immédiatement et les modifier ultérieurement.

Création d'une expérience

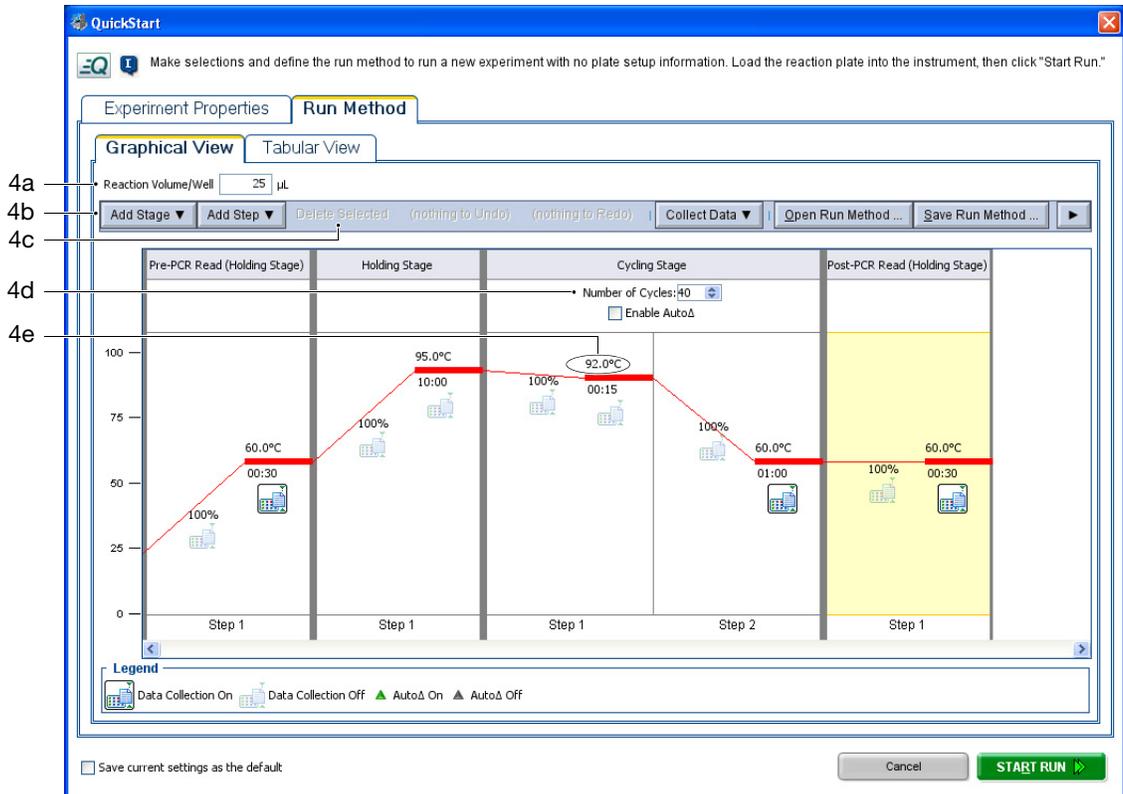
1. Préparer les réactions comme expliqué dans le Chapitre 3, « Préparation des réactions », à la page 33.
2. Dans l'écran Home (Accueil), cliquer sur  **QuickStart** (Démarrage rapide).
3. Entrer les propriétés de l'exemple :
 - a. Cliquer dans le champ **Enter Experiment Name** (Entrer le nom de l'expérience), puis entrer **Genotyping Example** (Exemple de réaction de génotypage).
 - b. Sélectionner l'application **Genotyping** (Génotypage).
 - c. Sélectionner les réactifs **TaqMan® Reagents** (Réactifs TaqMan).
 - d. Sélectionner la vitesse de variation de la température **Standard (~2 hours to complete a run)** (Standard (env. 2 h pour réaliser la réaction)).
 - e. Sélectionner **Pre-PCR Read** (Lecture pré-PCR) et **Amplification** pour ajouter ces phases au profil de thermocyclage.

Remarques _____



4. Cliquer sur l'onglet **Run Method** (Profil de thermocyclage), puis configurer le profil de thermocyclage :
 - a. Cliquer dans le champ Reaction Volume/Well (Volume réactionnel par puits), puis entrer **25**.
 - b. Cliquer sur Pre-PCR Read (Holding Stage) (Lecture pré-PCR (Phase de maintien de la température)), sur **Add Stage** (Ajouter une phase), puis sélectionner **Holding** (Maintien de la température).
 - c. Sélectionner la première étape (50 °C/00:02:00) du nouveau maintien de la température, puis cliquer sur **Delete Selected** (Supprimer l'étape sélectionnée) pour effacer l'étape redondante.
 - d. Cliquer dans le champ Number of Cycles (Nombre de cycles) de la colonne Cycling Stage (Phase de thermocyclage), puis entrer **50**.
 - e. Cliquer sur la température dans la première étape de la colonne Cycling Stage (Phase de thermocyclage) (95 °C/00:00:15), puis entrer **92** °C.

Remarques _____



5. Préparer les réactions comme expliqué dans le Chapitre 3, « Préparation des réactions », à la page 33.
6. Charger les réactions dans le système StepOne™ comme expliqué au paragraphe « Chargement de la plaque de réactions » à la page 46.
7. Dans le logiciel StepOne™, cliquer sur **START RUN** ► (Démarrer la réaction de PCR).
Pendant que le système StepOne™ exécute la réaction, configurer le plan de plaque comme expliqué dans les étapes 8 à 13.
8. Pendant que le système StepOne™ exécute la plaque, cliquer sur  **Plate Layout** (Plan de plaque) dans le volet de navigation.
9. Créer l'essai SNP rs8039 sur le plan de plaque :
 - a. Cliquer sur **Create New SNP Assay** (Créer un essai SNP).
 - b. Cliquer dans le champ SNP Assay Name (Nom de l'essai SNP), puis entrer **rs8039**.
 - c. Cliquer sur **OK**.

Remarques _____

10. Configurer les inconnues :
 - a. Dans le plan de plaque, sélectionner les lignes **A** et **B**.
 - b. Dans la liste SNP Assays (Essais SNP), cocher la case Assign (Attribuer) de l'essai SNP rs8039 pour appliquer celui-ci aux puits sélectionnés.
 - c. Cliquer dans le menu déroulant Task (Fonction) de l'essai SNP rs8039, puis sélectionner **Unknown** (Inconnue) pour appliquer la fonction aux puits sélectionnés.
11. Dans le plan de plaque, sélectionner les puits **A1** et **A2**.
12. Cliquer dans le menu déroulant Task (Fonction) de l'essai SNP rs8039, puis sélectionner **Negative Control** (Contrôle négatif) pour appliquer la fonction aux puits sélectionnés.
13. Créer les échantillons et les appliquer au plan de plaque :
 - a. Cliquer sur **Add New Sample** (Ajouter un échantillon) autant de fois que nécessaire pour que la liste Sample (Échantillon) contienne 20 échantillons.
 - b. Dans le plan de plaque, sélectionner le puits **A4**.
 - c. Cocher la case Assign (Attribuer) de l'échantillon 1 pour appliquer l'essai à l'échantillon du puits sélectionné.
 - d. Répéter les étapes 13a à 13c pour appliquer les échantillons comme indiqué ci-dessous.

Remarques _____

Instructions: Define the SNP assays and samples for this experiment, then assign them to wells in the plate. For each SNP assay assignment, select a task.

Assign SNP Assay(s) to the Selected Wells.

9a Create New... Add Saved SNP Assay Edit ▼

Assign	SNP Assay	Allele 1/Allele 2 Reporter	Task
10b <input type="checkbox"/>	rs8039	VIC/FAM	▼

10c/12

Assign Sample to the Selected Wells.

13a Add New Sample Add Saved Sample Save Sample Delete Sample

Assign	Sample	Color
<input type="checkbox"/>	Sample 14	Orange
<input type="checkbox"/>	Sample 15	Light Green
<input type="checkbox"/>	Sample 16	Green
<input type="checkbox"/>	Sample 17	Blue
<input type="checkbox"/>	Sample 18	Light Blue
<input type="checkbox"/>	Sample 19	Yellow
<input type="checkbox"/>	Sample 20	Light Yellow

13c

Select the dye to use as the passive reference.

ROX ▼

View Plate Layout View Results Table

Select Wells With: - Select Item - - Select Item -

11 Show in Wells View Legend

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	rs80...	rs80...	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6
B	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Sample 11	Sample 12	Sample 13	Sample 14
C	Sample 15	Sample 16	Sample 17	Sample 18	Sample 19	Sample 20	P rs80...	P rs80...
D								
E								
F								

13b

Wells: U 24 Unknown N 0 Negative Control P 0 Positive Control 24 Empty

14. Pendant que le système StepOne™ termine la réaction, analyser l'expérience comme expliqué dans le Chapitre 5, « Analyse de l'expérience », à la page 67.

Remarques _____

Workflow Template (Modèle)

Lors de la création d'un modèle d'expérience, il est possible de configurer de nombreuses expériences avec les mêmes paramètres.

À propos des modèles d'expériences

Le logiciel StepOne™ permet de créer des modèles pour générer des expériences. Ils sont utiles pour gagner du temps avec les expériences pour lesquelles les échantillons sont exécutés sur des plans de plaques identiques dans des conditions similaires.

Création d'une expérience

1. Créer une expérience comme décrit dans le Chapitre 2, « Conception de l'expérience », à la page 13.
2. Cliquer sur **File** (Fichier) ► **Save As Template** (Enregistrer comme modèle), puis cliquer sur **Save** (Enregistrer) dans la fenêtre Save Experiment (Enregistrer l'expérience) pour sauvegarder l'expérience sous le nom Genotyping Example.edt.
3. Cliquer sur  **Close** (Fermer).
4. Créer une expérience en utilisant le modèle :
 - a. Dans l'écran Home (Accueil), cliquer sur , puis sur  **Template** (Modèle).
 - b. Dans la fenêtre Open (Ouvrir), sélectionner le fichier **Example Genotyping.edt**, puis cliquer sur **Open** (Ouvrir).
 - c. Modifier l'expérience en utilisant les outils du workflow Advanced Setup (Configuration avancée).
 - d. Dans la liste déroulante Files of type (Types de fichiers), sélectionner **Experiment Document Template files (*.edt)** (Fichiers modèles de documents d'expériences (*.edt)).
 - e. Cliquer sur  **Save** (Enregistrer), entrer le nom du fichier d'expérience, puis cliquer sur **Save** (Enregistrer) pour sauvegarder l'expérience.
5. Préparer les réactions comme expliqué dans le Chapitre 3, « Préparation des réactions », à la page 33.
6. Réaliser l'expérience comme expliqué dans le Chapitre 4, « Réalisation de l'expérience », à la page 43.
7. Analyser l'expérience comme expliqué dans le Chapitre 5, « Analyse de l'expérience », à la page 67.
8. Répéter les étapes 4 à 7 si nécessaire pour créer d'autres expériences à partir du modèle.

Remarques

Workflow Export/Import (Exportation/Importation)

Lors de la création d'une réaction de géotypage avec le workflow Export/Import (Exportation/Importation), il est possible de configurer une nouvelle expérience à l'aide des données exportées à partir d'autres expériences.

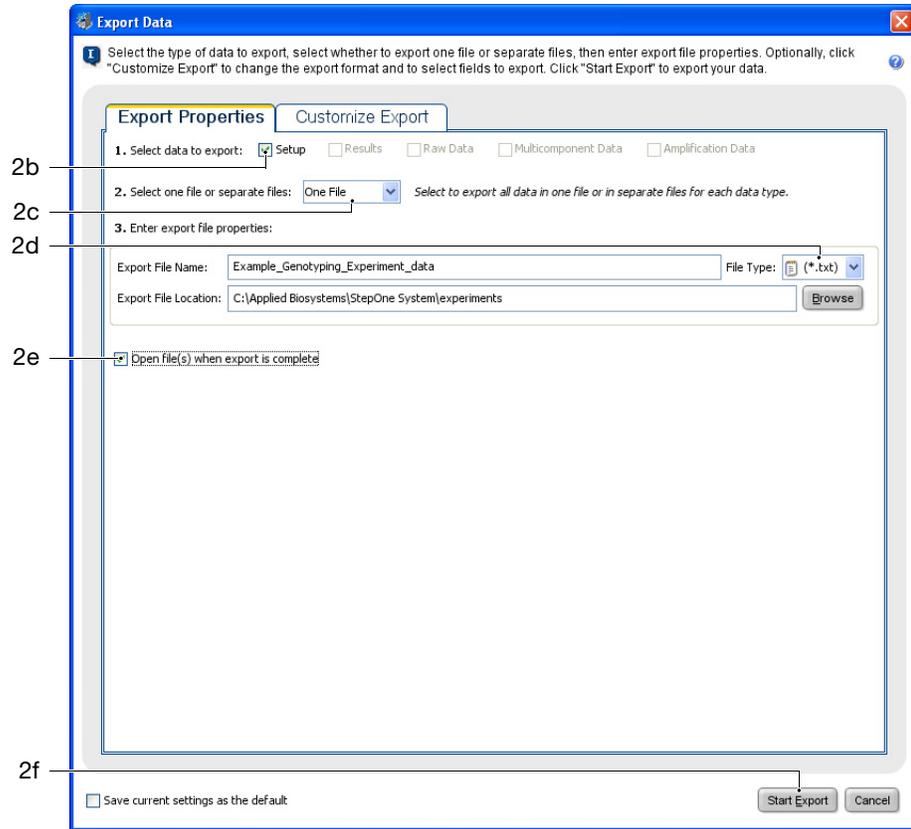
À propos de la configuration du workflow Export/Import

Le logiciel StepOne™ peut importer des expériences à partir de fichiers texte ASCII contenant des informations de configuration au format utilisé par le logiciel StepOne™ pour les plans de plaques. La fonction d'importation peut s'avérer utile pour réaliser plusieurs expériences car elle automatise de nombreuses opérations expliquées dans le chapitre 2.

Création d'une expérience

1. Créer une expérience comme décrit dans le Chapitre 2, « Conception de l'expérience », à la page 13.
2. Pendant que l'expérience est ouverte, exporter les informations de configuration :
 - a. Sélectionner **File** (Fichier) ▶ **Export** (Exporter).
 - b. Dans l'onglet Export Properties (Propriétés de l'exportation), sélectionner **Setup** (Configuration).
 - c. Dans le menu déroulant, sélectionner **One File** (Un fichier).
 - d. Dans le menu déroulant File Type (Type de fichier), sélectionner  **(* .txt)**.
 - e. Sélectionner **Open file(s) when export is complete** (Ouvrir les fichiers lorsque l'exportation est terminée).
 - f. Cliquer sur **Start Export** (Démarrer l'exportation), puis sur **Close Export Tool** (Fermer l'outil d'exportation) à l'invitation du système.

Remarques _____



Remarques

3. Utiliser le fichier exporté comme modèle et créer la configuration de plaque souhaitée :
 - a. À l'aide d'une application de tableur (par exemple Microsoft Excel®), ouvrir le fichier texte exporté.
 - b. Remplacer les paramètres du fichier texte si nécessaire. Une fois l'opération terminée, enregistrer le fichier en tant que fichier texte délimité par des tabulations.

IMPORTANT ! Le fichier texte doit être mis en forme en respectant le format des plans de plaques du logiciel StepOne™. Pour plus d'informations sur le format des plans de plaques, consulter l'aide en cliquant sur  dans la barre d'outils ou en sélectionnant **Help** (Aide) ► **Help Topics** (Rubriques d'aide) dans le menu.

4. Dans le logiciel StepOne™, cliquer sur  sous la colonne Setup (Configuration), puis cliquer sur  **Advanced Setup** (Configuration avancée).
5. Importer les informations de configuration :
 - a. Sélectionner **File** (Fichier) ► **Import** (Importer).
 - b. Cliquer sur **Browse** (Parcourir), sélectionner le fichier **Genotyping_Example_data.txt**, puis cliquer sur **Select** (Sélectionner).
 - c. Cliquer sur **Start Import** (Démarrer l'importation).
6. Préparer les réactions comme expliqué dans le Chapitre 3, « Préparation des réactions », à la page 33.
7. Réaliser l'expérience comme expliqué dans le Chapitre 4, « Réalisation de l'expérience », à la page 43.
8. Analyser l'expérience comme expliqué dans le Chapitre 5, « Analyse de l'expérience », à la page 67.
9. Répéter les étapes 3 à 8 si nécessaire pour créer d'autres expériences à partir du fichier exporté.

Remarques _____

Bibliographie

- Afonina, I., Zivarts, M., Kutuyavin, I., *et al.*, **1997**. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* 25:2657–2660.
- 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.
- Lakowicz, J.R. **1983**. Energy Transfer. In Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York: Plenum Press 303–339.
- Lee, L. G., Connell, C. R., and Block, W. **1993**. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 21:3761–3766.
- Livak, K.J., Marmaro, J., and Todd, J.A. **1995**. Towards fully automated genome-wide polymorphism screening [letter]. *Nat. Genet.* 9:341–342.
- 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.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. **1987**. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335–350.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., *et al.*, **1985**. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354.

Advanced Setup	(Configuration avancée) Fonction du logiciel StepOne™ qui permet de configurer l'expérience selon le modèle expérimental établi.
Agent de blocage d'IPC	Réactif ajouté aux réactions de PCR pour bloquer l'amplification du contrôle positif interne (IPC).
AIF	Acronyme de « assay information file » (fichier d'informations sur l'essai).
Allèles	Pour une cible donnée, toutes les séquences différentes présentes dans une population.
Amorce anti-sens	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.
Amorce sens	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.
Amplicon	Segment d'ADN amplifié pendant la PCR.
Amplification	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.
Amplification non conforme	Pour un ensemble de données, point de données de valeur considérablement inférieure ou supérieure aux autres.
Analyse en point final	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.
Application	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 : <ul style="list-style-type: none">• Quantification absolue par les courbes standard• Quantification relative par les courbes standard• Quantification – Comparaison des valeurs de C_T ($\Delta\Delta C_T$)• Courbe de fusion• Génotypage• Présence/absence

Application	<p>Application effectuée avec le système StepOne™ :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Quantification absolue par les courbes standard • Comparaison des valeurs de C_T ($\Delta\Delta C_T$) • Quantification relative par les courbes standard • Courbe de fusion (non disponible dans l'assistant de programmation Design Wizard) • Génotypage • Présence/absence <p>L'application sélectionnée détermine le contenu des écrans Setup (Configuration), Run (Démarrer) et Analysis (Analyse).</p>
AutoΔ	<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 AutoΔ est activé, les paramètres sont indiqués par une icône dans le profil thermique :</p> <ul style="list-style-type: none"> • AutoΔ activé : ▲ • AutoΔ désactivé : ▲
Bibliothèque d'échantillons	Ensemble des échantillons inclus dans le logiciel StepOne™. La bibliothèque contient le nom et la couleur de chaque échantillon.
Bibliothèque d'essais SNP	Ensemble des essais SNP inclus dans le logiciel StepOne™.
Bibliothèque de cibles	Ensemble des cibles incluses dans le logiciel StepOne™.
Calibrateur	Voir échantillon de référence.
Calibration spatiale	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.
Chimie	Voir réactif.
Cible	Séquence d'acide nucléique à amplifier et à détecter.
Coefficient de régression	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.

Collecte des données	<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"> • Collecte des données activée :  • Collecte des données désactivée : 
Comparaison des valeurs de C_T ($\Delta\Delta C_T$)	<p>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.</p>
Configuration autonome	<p>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.</p>
Configuration co-localisée	<p>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.</p>
Contrôle endogène	<p>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 ».</p>
Contrôle négatif (NC)	<p>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.</p>
Contrôle positif	<p>Dans les réactions de génotypage, fonction attribuée à l'essai SNP dans les puits qui contiennent un échantillon de génotype connu.</p>
Contrôle positif interne (IPC)	<p>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.</p>
Contrôle sans amplification (NAC)	<p>Voir puits de contrôle négatif avec IPC bloqué.</p>
Contrôle sans échantillon (NTC)	<p>Voir contrôle négatif (NC).</p>
Couleur de la cible	<p>Couleur attribuée à une cible pour l'identifier dans le plan de plaque et dans les courbes d'analyse.</p>

Courbe d'amplification	<p>Affichage des données collectées pendant la phase de thermocyclage de l'amplification par PCR. La courbe peut représenter :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Le reporter normalisé corrigé d'après la ligne de base (ΔR_n) en fonction des cycles • Le reporter normalisé (R_n) en fonction des cycles • Le cycle seuil (C_T) en fonction des puits
Courbe de dissociation	Voir courbe de fusion.
Courbe de fusion	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.
Courbe des données brutes	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.
Courbe des multicomposantes	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.
Courbe des températures	Affichage des températures de l'échantillon, du couvercle de l'instrument et du bloc pendant la réaction.
Courbe standard	<p>Dans les expériences de quantification absolue et de quantification relative par les courbes standard :</p> <p>[1] Droite moyenne sur un graphique représentant les valeurs de C_T des échantillons standard en fonction de leur quantité. Voir aussi droite de régression.</p> <p>[2] 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.</p>
C_T	Acronyme de « cycle threshold » (cycle seuil).
C_T automatique	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).
C_T manuel	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_T).
Cycle seuil (C_T)	Nombre de cycles de PCR pour lequel le ΔR_n correspond au seuil dans la courbe d'amplification.
Delta R_n (ΔR_n)	Abréviation utilisée pour « reporter normalisé corrigé d'après la ligne de base ».

Design Wizard	(Assistant de programmation) Fonction du logiciel StepOne™ qui permet de configurer l'expérience avec par défaut les recommandations de configuration.
Diluant	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.
Diluted Sample Concentration (10X for Reaction Mix)	(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).
Droite de régression	<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>
Échantillon	Cible testée.
Échantillon d'ADN (10X)	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.
Échantillon de référence	Dans les expériences de quantification relative par les courbes standard et par la comparaison des valeurs de C_T ($\Delta\Delta C_T$), échantillon utilisé comme base pour les résultats de quantification relative. Également appelé « calibrateur ».
Échantillon ou standard (10X)	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.
Écran tactile	Écran dont les touches tactiles permettent de contrôler l'instrument.
EFF%	Voir efficacité de l'amplification (EFF%).

Efficacité de l'amplification (EFF%)	<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 $-3,3$ 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"> • Intervalle des quantités standard – Pour obtenir des mesures d'efficacité plus précises, utiliser un grand intervalle des quantités standard, de 5 à 6 logs ($\times 10^5$ à 10^6). • Nombre de réplicats standard – Pour obtenir des mesures d'efficacité plus précises, inclure les réplicats afin de diminuer les effets des imprécisions de pipetage. • Inhibiteurs de PCR – Présents dans la réaction, ils peuvent réduire l'efficacité de l'amplification.
Essai	Dans le système StepOne™, réaction de PCR qui contient des amorces pour amplifier une cible et un réactif pour détecter la cible amplifiée.
Essai SNP	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.
Essais en stock	(Inventoried Assays) Essais TaqMan® Genomic Assays précédemment fabriqués, conformes aux spécifications de contrôle qualité et conservés en stock.
Essais fabriqués sur commande	(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.
Étape	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.
Exclure un puits	Action effectuée après l'analyse pour exclure un ou plusieurs puits de toutes les analyses avant de réanalyser les données.
Facteur de dilution	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.
Facteur de dilution sérielle	Voir facteur de dilution.
Fichier d'informations sur l'essai (AIF)	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. Les informations contenues dans le fichier AIF sont délimitées par des tabulations.
Fluorophore	Réactif qui contient le fluorophore. Les fluorophores sont utilisés pour effectuer une calibration spectrale sur le système StepOne™. Voir aussi fluorophore du système.

Fluorophore du système	Fluorophore fabriqué par Applied Biosystems et précalibré sur le système StepOne™. Fluorophores du système : <ul style="list-style-type: none"> • Fluorophore FAM™ • Fluorophore JOE™ • Fluorophore ROX™ • Fluorophore SYBR® Green • Fluorophore VIC®
Fluorophore personnalisé	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. <hr/> <p>IMPORTANT ! Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA™ comme reporter ou quencher avec le système StepOne™.</p> <hr/>
Fonction	Type de réaction effectuée dans le puits pour la cible ou l'essai SNP. Fonctions disponibles dans les expériences système StepOne™ : <ul style="list-style-type: none"> • Inconnue • Contrôle négatif • Standard (expériences de quantification absolue et de quantification relative par les courbes standard) • Contrôle positif (réactions de génotypage) • IPC (expériences de présence/absence) • IPC bloqué (expériences de présence/absence)
Gamme	Voir gamme de dilutions standard.
Gamme de dilutions standard	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.
Gène de ménage	Voir contrôle endogène.
graphique de discrimination allélique	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.
ID d'essai	Valeur attribuée par Applied Biosystems aux essais TaqMan® Gene Expression Assays et TaqMan® SNP Genotyping Assays.

Inconnue	<p>(Unknown) Dans les expériences de quantification, fonction attribuée à la cible dans les puits qui contiennent un échantillon avec des quantités de cible inconnues.</p> <p>Dans les réactions de génotypage, fonction attribuée à l'essai SNP dans les puits qui contiennent un échantillon avec un génotype inconnu.</p> <p>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.</p>
Intersection avec l'axe Y	<p>Coefficient de régression calculé d'après la droite de régression de la courbe standard. L'intersection avec l'axe Y indique le cycle seuil attendu (valeur C_T) pour un échantillon avec une quantité égale à 1 (par exemple, 1 ng/μL).</p>
IPC	<p>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.</p>
IPC bloqué	<p>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.</p>
IPC+	<p>Assignation de présence/absence lorsque le contrôle positif interne (IPC) est amplifié.</p>
Lecture en point final	<p>Voir lecture post-PCR.</p>
Lecture post-PCR	<p>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 ».</p>
Lecture pré-PCR	<p>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.</p>
Ligne de base	<p>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 dans un premier temps les cycles de PCR afin de déterminer la ligne de base.</p>
Ligne de base automatique	<p>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).</p>
Ligne de base manuelle	<p>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.</p>

Matrice génétique	Type d'acide nucléique à ajouter à la réaction de PCR. La matrice génétique recommandée varie en fonction de l'application.
Mélange amorce/sonde	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.
Mélange d'amorces	Composant de la réaction de PCR qui contient les amorces sens et anti-sens visant à amplifier la cible.
Mélange de sonde	Composant de la réaction de PCR qui contient une sonde TaqMan [®] conçue pour détecter l'amplification de la cible.
Mélange réactionnel	Solution qui contient tous les composants nécessaires à la réalisation de la réaction de PCR, hormis la matrice génétique (échantillon, standard ou contrôle).
Méthode de quantification	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.
Mix primers-sonde	Composant de réaction de PCR dans les essais Applied Biosystems TaqMan [®] Gene Expression Assays et TaqMan [®] SNP Genotyping Assays. Il contient des amorces conçues pour amplifier une cible et une sonde TaqMan [®] conçue pour détecter l'amplification de la cible.
NFQ-MGB	De l'anglais « nonfluorescent quencher-minor groove binder » (quencher non fluorescent – ligand du petit sillon). Molécules liées à l'extrémité 3' des sondes TaqMan [®] . 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.
Nom de l'expérience	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 (;).
Numéro rs	Voir refSNP ID.
PCR en temps réel	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.
Pente	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%).
Phase	Composant du profil thermique. Une phase est composée d'au moins une étape.

Phase de courbe de fusion	Phase du profil thermique avec une incrémentation de température pour générer une courbe de fusion.
Phase de maintien de la température	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 incuber une réaction.
Phase de thermocyclage	Phase répétée du profil thermique. Si la phase de thermocyclage est utilisée pour effectuer la PCR, elle est appelée « phase d'amplification ».
Plan de plaque	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.
Point	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.
Profil de thermocyclage	Définition du volume réactionnel et du profil thermique pour l'activité de l'instrument.
Profil thermique	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.
Puits de contrôle négatif avec IPC bloqué	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).
Puits IPC à contrôle négatif	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+.
Quantification absolue par les courbes standard	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.
Quantification relative par les courbes standard	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.
Quantité	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.

Quantité de départ	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.
Quantité normalisée	Quantité de cible divisée par la quantité de contrôle endogène.
Quantité standard	Quantité connue dans la réaction de PCR. Pour 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. Pour 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.
Quencher	Molécule liée à l'extrémité 3' des sondes TaqMan® pour empêcher le reporter d'émettre un signal de fluorescence lorsque la sonde est intacte. Avec les réactifs TaqMan®, la molécule NFQ-MGB peut être utilisée comme quencher. Avec les réactifs SYBR Green, aucun quencher n'est utilisé. <hr/> IMPORTANT ! Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA™ comme reporter ou quencher avec le système StepOne™. <hr/>
QuickStart	(Démarrage rapide) Fonction du logiciel StepOne™ qui permet de démarrer l'expérience sans entrer les informations de configuration de la plaque.
Réactif	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™ : <ul style="list-style-type: none"> • Réactif TaqMan® • Réactif SYBR® Green • Autres réactifs
Réactif SYBR® Green	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.
Réactif TaqMan®	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.
Réaction échantillon/cible	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.
Réaction échantillon/essai SNP	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.

Référence passive	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.
refSNP ID	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 ».
Rejeter un puits	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.
Remote Monitoring	(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.
Réplikat	Ensemble de réactions identiques dans une expérience.
Réplicats	Nombre total de réactions identiques contenant des composants et des volumes identiques.
Reporter	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.
Reporter dérivatif (-R_n')	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.
Reporter normalisé (R_n)	Signal de fluorescence émis par le reporter normalisé par le signal de fluorescence de la référence passive.
Reporter normalisé corrigé d'après la ligne de base (ΔR_n)	Amplitude du signal de fluorescence normalisé généré par le reporter pendant l'amplification par PCR. $\Delta R_n = R_n (\text{valeur seuil}) - R_n (\text{ligne de base}), \text{ où } R_n = \text{reporter normalisé.}$
R_n	Abréviation utilisée pour « reporter normalisé ».
Seuil	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).
Seuil de cycle	Voir cycle seuil (C _T).
SNP	Acronyme de « single nucleotide polymorphism » (polymorphisme de nucléotide unique). Les SNP peuvent comporter une base de différence ou une indel (insertion/délétion).

Standard	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.
Température de fusion (T_m)	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.
T_m	Acronyme de « melting temperature » (température de fusion).
Transcriptase inverse	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.
Valeur R²	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.
Variation de la température	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.
Vitesse de variation de la température	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.

A

à distance
 transfert de données 64

Advanced Setup 115

agent de blocage d'IPC 115

aide en ligne. *Voir* aide

aide, accès viii

AIF. *Voir* *fichier d'informations sur l'essai*.

allèle 115

amorce anti-sens 115

amorce sens 115

amplicon 115

amplification 115
 afficher après une réaction 86–89
 code d'alerte NOAMP 79
 courbe 88
 surveiller pendant une réaction 54

amplification non conforme 115

analyse en point final 4, 115

analyser l'expérience. *Voir* aussi *identification des causes d'erreurs*.
 afficher la courbe des multicomposantes 84
 analyser 68
 instructions 72, 76, 79, 81, 83, 85, 88, 93
 voir la courbe des données brutes 82
 voir la synthèse CQ 80
 voir le tableau des résultats 77
 workflow 68

application 115, 116

Applied Biosystems
 commentaires de la clientèle sur les documents viii
 contact viii
 Information Development, département viii
 support technique viii

assignation automatique d'allèle 94

assignation d'allèle
 automatique 94
 manuelle 95

assignation manuelle d'allèle 95

ATTENTION, description x

AutoΔ 116

autonome
 configuration 117
 démarrer une réaction 50
 surveiller une réaction 62
 transfert de données 65

autres workflows d'expérience. *Voir* *workflows*.

AVERTISSEMENT, description x

B

bibliothèque d'échantillons 116

bibliothèque de cibles 116

C

calibrateur. *Voir* *échantillon de référence*.

calibration spatiale 116

catégorie de surtension xix

charger la plaque de réactions 38

chimie. *Voir* *réactif*.

cible 116

classe d'installation xix

code d'alerte 78, 80
 AMPNC 79
 BADROX 78
 BLFAIL 79
 CLUSTER 78
 CTFAIL 79
 EXPFAIL 79
 NOAMP 79
 NOISE 79
 NOSIGNAL 78
 OFFSCALE 78
 PCFAIL 78
 SMCLUSTER 79
 SPIKE 79
 THOLDFAIL 79

code d'alerte AMPNC 79

code d'alerte BADROX 78, 80

code d'alerte BLFAIL 79

code d'alerte CLUSTER 78

code d'alerte CTFAIL 79

code d'alerte EXPFAIL 79

code d'alerte NOAMP 79

code d'alerte NOISE 79

code d'alerte NOSIGNAL 78

code d'alerte OFFSCALE 78

code d'alerte PCFAIL 78

code d'alerte SMCLUSTER 79

code d'alerte SPIKE 79

code d'alerte THOLDFAIL 79

coefficient de régression 116
Voir aussi *courbe standard*.

collecte des données 117

- co-localisé
 - configuration 117
 - démarrer une réaction 49
 - surveiller une réaction 53
 - transfert de données 64
 - commande de menu, conventions de description v
 - commentaires de la clientèle, à propos des documents
 - Applied Biosystems viii
 - comparaison des valeurs de C_T ($\Delta\Delta C_T$) 117
 - consommables 3, 29, 35, 36, 38
 - Voir aussi *matériels nécessaires*.
 - contrôle
 - négatif 22, 23, 72, 85
 - positif 22, 23, 72
 - contrôle endogène 117
 - Voir aussi *gène de ménage*.
 - contrôle négatif 85, 117
 - appliquer 22, 23
 - code d'alerte AMPNC 79
 - vérifier 72, 77
 - contrôle positif 117
 - appliquer 22, 23
 - code d'alerte PCFAIL 78
 - vérifier 72, 77, 79
 - contrôle positif interne (IPC) 117
 - contrôle sans amplification (NAC). Voir *puits de contrôle négatif avec IPC bloqué*.
 - contrôle sans échantillon (NTC). Voir *contrôle négatif (NC)*.
 - conventions
 - dans ce guide v
 - description des commandes de menus v
 - gras v
 - IMPORTANT ! vi
 - italique v
 - mises en garde à l'attention des utilisateurs vi
 - Remarque vi
 - sécurité x
 - conventions typographiques v
 - couleur de la cible 117
 - courbe d'amplification 118
 - afficher après une réaction 86–90
 - surveiller pendant une réaction 54
 - courbe de dissociation. Voir *courbe de fusion*.
 - courbe de fusion 118
 - courbe des données brutes 82, 118
 - courbe des multicomposantes 84, 118
 - courbe des températures 56, 118
 - courbe standard 118
 - Voir aussi *droite de régression et gamme de dilutions standard*.
 - courbe. Voir *courbe d'amplification*.
 - créer une expérience
 - configurer le profil de thermocyclage 24
 - configurer les essais SNP 19
 - configurer les réactions 26
 - définir les propriétés de l'expérience 16
 - exemple 15
 - finaliser le workflow de l'assistant de programmation
 - Design Wizard 31
 - imprimer 27
 - instructions 17, 18, 21, 23, 25, 28, 30, 32
 - nouvelle 15
 - transférer. Voir *transférer les données*.
 - workflow 14
 - C_T automatique 118
 - C_T manuel 118
 - C_T . Voir *cycle seuil*.
 - cycle seuil (C_T) 118
- ## D
- DANGER, description x
 - dangers. Voir *sécurité*
 - déchets biologiques à risque, manipulation xix
 - déchets radioactifs, manipulation xix
 - delta R_n (ΔR_n) 118
 - démarrer la réaction de PCR
 - autonome 50
 - co-localisé 49
 - département Information Development, contact viii
 - déplacement et levée, sécurité xv
 - Design Wizard (Assistant de programmation) 119
 - écran Experiment Properties (Propriétés de l'expérience) 16
 - écran Reaction Setup (Préparation des réactions) 26
 - écran Run Method (Profil de thermocyclage) 24
 - écran SNP Assays (Essais SNP) 19
 - finaliser 31
 - diluant 119
 - Diluted Sample Concentration (10X for Reaction Mix) (Concentration de l'échantillon dilué (10X pour le mélange réactionnel)) 119
 - documentation, relative vii
 - droite de régression 119
 - Voir aussi *coefficient de régression*.
- ## E
- échantillon 119
 - échantillon d'ADN (10X) 119
 - échantillon de référence 119
 - échantillon ou standard (105) 119
 - échantillons inconnus 22, 74, 122

- écran d'analyse
 courbe d'amplification 86–89
 courbe des données brutes 82–83
 courbe des multicomposantes 84–85
 graphique de discrimination allélique 70–73
 Multiple Plots View (Voir plusieurs courbes) 90
 plan de plaque 74–76
 synthèse CQ 80–81
 tableau des résultats 77–80
- écran Experiment Properties (Propriétés de l'expérience) 16
- écran Reaction Setup (Préparation des réactions) 26
- écran Run Method (Profil de thermocyclage) 24
- écran SNP Assays (Essais SNP) 19
- écran tactile 119
- EFF%. Voir *efficacité de l'amplification (EFF%)*.
- efficacité de l'amplification (EFF%) 120
- élimination des déchets, instructions xix
- ergonomie, sécurité xxi
- essai 120
- essai 5' nucléase 5
- essai plus/moins
 assignation des résultats 90
- essai SNP 4, 120
- essais en stock 120
- essais fabriqués sur commande 120
- essais TaqMan® SNP Genotyping Assays 4
- étape 120
- étiquettes de sécurité, sur les instruments xiv
- exclure des puits 77, 80
- exclure un puits 120
- exemple
 analyser 68
 créer 14, 17, 19, 22, 24, 26, 47
 description 9
 données 69, 70, 74, 77, 80, 82, 84, 86, 91
 emplacement des données 10
 plan de plaque 10
 préparer les réactions 34
 réaliser 44
 workflow 11
- F**
- facteur de dilution 120
- facteur de dilution sérielle. Voir *facteur de dilution*.
- fiche de données de sécurité
 description xvi
 obtention xvii
- fiche de données de sécurité, obtention viii
- fichier d'informations sur l'essai (AIF) 19, 120
- fluorescence
 code d'alerte NOISE 79
 code d'alerte NOSIGNAL 78
 code d'alerte OFFSCALE 78
 code d'alerte SPIKE 79
- fluorescence non spécifique 6
- fluorophore 120
 Voir aussi *fluorophore du système*.
- fluorophore du système 121
- fluorophore personnalisé 121
- fonction 121
- formation, informations sur viii
- G**
- gamme de dilutions standard 121
 Voir aussi *courbe standard*.
- gamme. Voir *gamme de dilutions standard*.
- gène de ménage. Voir *contrôle endogène*.
- gestuelle articulaire répétée, sécurité xxi
- graphique de discrimination allélique 6, 121
 attribuer les assignations manuellement 95
 évaluer les résultats 70–73
- gras, utilisation v
- I**
- icônes de danger. Voir *symboles de sécurité*
- icônes de danger. Voir *symboles de sécurité, sur les instruments*
- ID d'essai 121
- identification des causes d'erreurs
 afficher la courbe d'amplification 86
 afficher la courbe des multicomposantes 84
 afficher les paramètres d'analyse 91
 ajuster la ligne de base 91
 ajuster le seuil 91
 code d'alerte 78
 voir la courbe des données brutes 82
 voir la synthèse CQ 80
- IMPORTANT, description x
- instructions
 analyse 72, 76, 79, 81, 83, 85, 88, 93
 créer 17, 18, 21, 23, 25, 28, 30, 32
 élimination des déchets chimiques xviii
 préparation 35, 37, 40
 réaliser 48
 sécurité chimique xvi
 sécurité des déchets chimiques xviii
- instructions d'analyse 72, 76, 79, 81, 83, 85, 88, 93
- instructions de préparation 35, 37, 40
- instructions de réalisation 48
- intersection avec l'axe Y 122
- IPC 122
- IPC bloqué 122
 Voir aussi *puits de contrôle négatif avec IPC bloqué*.
- IPC+ 122
- italique, utilisation v

L

lecture en point final. Voir *lecture post-PCR*.
 lecture post-PCR 122
 lecture pré-PCR 122
 ligne de base
 à propos de 88, 122
 automatique 122
 ligne de base automatique 122
 ligne de base manuelle 122

M

matériels nécessaires 29, 35, 36, 38
 matrice génétique 123
 matrice, préparation 35
 mélange amorce/sonde 123
 mélange d'amorces 123
 mélange de sonde 123
 mélange réactionnel 123
 configurer 26
 préparer 36
 méthode de quantification 123
 mise en garde à l'attention des utilisateurs, description vi
 mix primers-sonde 36, 123

N

NFQ-MGB 123
 nom de l'expérience 123
 normes
 CEM xxii
 sécurité xxii
 normes CEM xxii
 normes de compatibilité électromagnétique. Voir normes CEM
 normes de sécurité xxii
 numéro rs. Voir *refSNP ID*.

P

paramètres d'analyse 91–93
 paramètres de notification 47–49
 PCR en temps réel 123
 pente 123
 Voir aussi *efficacité de l'amplification (EFF%)*.
 phase 123
 phase de courbe de fusion 124
 phase de maintien de la température 124
 phase de thermocyclage 124
 plan de plaque 124
 plaque de réactions
 charger 46
 compatible
 préparer 38

retirer 63
 plusieurs courbes, affichage 90
 point 124
 polymorphisme de nucléotide unique 4
 préparer l'expérience
 dilution d'échantillon 35
 instructions 35, 37, 40
 mélange réactionnel 36
 plaque de réactions 38
 pour plus d'informations 34
 workflow 34
 préparer la réaction de PCR 34
 prérequis pour l'utilisation de ce guide v
 profil de thermocyclage 124
 configurer 24
 surveiller 57
 profil des déchets, description xix
 profil thermique 124
 puits
 contrôle négatif 74
 contrôle positif 74
 inconnu 74
 plan de plaque 74
 sélection 76
 tableau des résultats 77
 puits de contrôle négatif avec IPC bloqué 124
 puits IPC à contrôle négatif 124
 Voir aussi *IPC+*.

Q

QC Summary (Synthèse CQ) 80
 quantification absolue par les courbes standard 124
 quantification relative par les courbes standard 124
 quantité 124
 quantité de départ 125
 quantité normalisée 125
 quantité standard 125
 quencher 125

R

réactif 125
 réactif TaqMan® 4–6
 réactif SYBR® Green 125
 réactif TaqMan® 125
 réaction échantillon/cible 125
 réaction échantillon/essai SNP 125
 réaliser l'expérience
 activer les paramètres de notification 47–49
 démarrer 49
 préparer 45
 surveiller 53
 transférer les données 63
 workflow 44

référence passive 126
 code d'alerte BADROX 78
 refSNP ID 126
 rejeter un puits 126
 Remote Monitoring (Surveillance à distance) 126
 réplicat 126
 réplicats 126
 reporter 126
 reporter dérivatif (- Rn') 126
 reporter normalisé (Rn) 126
 reporter normalisé corrigé d'après la ligne de base (ΔRn) 126
 résultats
 attribution automatique des assignations 94
 attribution manuelle des assignations 95
 résultats, interprétation 68
 retirer la plaque de réactions 63
 Risque xx
 Rn. Voir *reporter normalisé*. 126

S

sécurité
 avant d'utiliser l'instrument xv
 chimique xvi
 conventions x
 dangers biologiques xx
 déchets chimiques xviii
 déplacement et levée de l'instrument xv
 déplacement/levée xv
 électrique xix
 ergonomie xxi
 gestuelle articulaire répétée xxi
 instructions xvi, xviii, xix
 normes xxii
 station de travail xxi
 utilisation de l'instrument xv
 sécurité chimique xvi
 sécurité de la station de travail xxi
 sécurité des déchets chimiques xviii
 sécurité électrique xix
 sélectionner un puits 76
 seuil 126
 seuil de cycle. Voir *cycle seuil*.
 seuil, ajustement 91
 SNP 126
 sonde TaqMan[®] MGB 4
 standard 127
 Voir aussi *courbe standard* et *gamme de dilutions standard*.
 StepOne 2
 support technique, contact viii

surveiller la réaction de PCR
 à distance 59
 autonome 62
 configuration co-localisée 53
 courbe d'amplification 54
 courbe des températures 56
 écran Run Method (Profil de thermocyclage) 57
 symboles de danger. Voir symboles de sécurité, sur les instruments
 symboles de sécurité, sur les instruments xii
 symboles, sécurité xii
 système StepOne[™]
 à propos de 2
 collecte des données 2
 configuration 117
 consommables
 réactif 4

T

tableau des résultats 77
 température de fusion (T_m) 127
 T_m. Voir aussi *température de fusion*. 127
 transcriptase inverse 127
 transférer les données 50, 64

U

utilisation de ce guide
 avec des connaissances pratiques 8
 comme tutoriel 8
 utilisation de l'instrument, sécurité xv

V

valeur R2 127
 variation de la température 127
 vitesse de variation de la température 18, 127

W

workflow
 Advanced Setup (Configuration avancée) 98
 Design Wizard (Assistant de programmation) 11
 Export/Import (Exportation/Importation) 110
 QuickStart (Démarrage rapide) 104
 Template (Modèle) 109
 workflow Advanced Setup (Configuration avancée) 8, 98, 115
 workflow de l'assistant de programmation Design Wizard 11
 workflow Export/Import (Exportation/Importation) 110
 workflow QuickStart (Démarrage rapide) 104, 125
 workflow Template (Modèle) 109

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.

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