

# Applied Biosystems StepOne™

## Système de PCR en temps réel

Expériences de quantification relative par la méthode des courbes standard et de comparaison des valeurs de  $C_T$





# Applied Biosystems StepOne™

## Système de PCR en temps réel

Expériences de quantification relative par la méthode des courbes standards et de la comparaison de  $C_T$

Prise en main

1

Conception de l'expérience de quantification relative par la méthode des courbes standards

2

Préparation des réactions pour la quantification relative par la méthode des courbes standards

3

Réalisation des réactions de quantification relative par la méthode des courbes standards

4

Analyse de l'expérience de quantification relative par la méthode des courbes standards

5

Conception de l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison de  $C_T$

6

Préparation des réactions de quantification relative par la méthode de comparaison de  $C_T$

7

Réalisation de l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison de  $C_T$

8

Analyse de l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison de  $C_T$

9

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

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

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

**NOTICE TO PURCHASER: Label License**

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

**TRADEMARKS:**

Applera, Applied Biosystems, AB (Design), MicroAmp, Primer Express, and VIC are registered trademarks, and FAM, JOE, ROX, 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.

Macintosh is a registered trademark of Apple Computer, Inc.

Microsoft and Windows are registered trademarks of Microsoft Corporation.

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

Référence 4377744 Rév. B  
06/2010

# Table des matières

	<b>Préface</b> .....	<b>vii</b>
	Utilisation de ce guide .....	vii
	Informations supplémentaires .....	viii
	Comment obtenir une assistance .....	x
	Conventions de sécurité utilisées dans ce document .....	xi
	Symboles sur les instruments .....	xiii
	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
<b>Chapitre 1</b>	<b>Prise en main</b> .....	<b>1</b>
	À propos du système StepOne™ .....	2
	À propos des expériences de quantification relative par les courbes standard et par la comparaison des valeurs de $C_T$ .....	4
	Utilisation de ce guide .....	9
	À propos de l'exemple .....	10
	Workflow de l'exemple .....	12
<b>Chapitre 2</b>	<b>Conception de l'expérience de quantification relative par les courbes standard</b> .....	<b>15</b>
	Présentation du chapitre .....	16
	Création d'une expérience .....	17
	Définition des paramètres de l'écran Experiment Properties (Propriétés de l'expérience) .....	20
	Définition des méthodes et des matériels nécessaires .....	22
	Configuration des cibles .....	24
	Configuration des standards .....	28
	Configuration des échantillons .....	30
	Configuration des paramètres de quantification relative .....	32
	Configuration du profil de thermocyclage .....	33

Vérification de la configuration des réactions .....	34
Commande des matériels nécessaires pour l'expérience .....	42
Finalisation du workflow de l'assistant de programmation Design Wizard .....	45

### Chapitre 3 **Préparation des réactions de quantification relative par les courbes standard** ..... 49

Présentation du chapitre .....	50
Préparation de la matrice .....	51
Préparation des dilutions d'échantillons .....	53
Préparation des gammes de dilutions standard .....	55
Préparation du mélange réactionnel .....	58
Préparation de la plaque de réactions .....	61

### Chapitre 4 **Réalisation de l'expérience de quantification relative par les courbes standard** ..... 65

Présentation du chapitre .....	66
Préparation de la réaction de PCR .....	67
(Facultatif) Activation des notifications .....	69
Démarrage de la réaction .....	71
Surveillance de la réaction de PCR .....	75
Retrait de la plaque de réactions et transfert des données .....	84

### Chapitre 5 **Analyse de l'expérience de quantification relative par les courbes standard** ..... 87

Présentation du chapitre .....	88
<b>Section 5.1 : Vérification des résultats</b> .....	<b>89</b>
Analyse de l'expérience .....	90
Affichage de la courbe standard .....	95
Affichage de la courbe d'amplification .....	98
Affichage du profil d'expression génétique et du tableau des résultats .....	103
Exportation des données .....	105
<b>Section 5.2 : Identification des causes d'erreurs (si nécessaire)</b> .....	<b>107</b>
Affichage des paramètres d'analyse .....	108
Affichage de la synthèse CQ .....	110
Exclusion de puits dans une analyse .....	112
Affichage de la courbe des multicomposantes .....	114
Affichage de la courbe des données brutes .....	116

<b>Chapitre 6</b>	<b>Conception de l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de <math>C_T</math>...</b>	<b>119</b>
	Présentation du chapitre .....	120
	Création d'une expérience .....	121
	Définition des paramètres de l'écran Experiment Properties (Propriétés de l'expérience) .....	124
	Définition des méthodes et des matériels nécessaires .....	126
	Configuration des cibles .....	129
	Configuration des échantillons .....	131
	Configuration des paramètres de quantification relative .....	133
	Configuration du profil de thermocyclage .....	135
	Vérification de la configuration des réactions .....	137
	Commande des matériels nécessaires pour l'expérience .....	142
	Finalisation du workflow de l'assistant de programmation Design Wizard .....	146
<b>Chapitre 7</b>	<b>Préparation des réactions de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de <math>C_T</math>...</b>	<b>149</b>
	Présentation du chapitre .....	150
	Préparation de la matrice .....	151
	Préparation des dilutions d'échantillons .....	152
	Préparation du mélange réactionnel .....	154
	Préparation de la plaque de réactions .....	157
<b>Chapitre 8</b>	<b>Réalisation de l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de <math>C_T</math>...</b>	<b>161</b>
	Présentation du chapitre .....	162
	Préparation de la réaction de PCR .....	163
	Réalisation de l'expérience .....	165
<b>Chapitre 9</b>	<b>Analyse de l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de <math>C_T</math>...</b>	<b>167</b>
	Présentation du chapitre .....	168
	<b>Section 9.1 : Vérification des résultats</b> .....	<b>169</b>
	Analyse de l'expérience .....	170
	Affichage du profil d'expression génétique et du tableau des résultats .....	175
	Affichage de la courbe d'amplification .....	177
	Exportation des données .....	182

<b>Section 9.2 : Identification des causes d'erreurs (si nécessaire)</b> .....	<b>183</b>
Affichage des paramètres d'analyse .....	184
Affichage de la synthèse CQ .....	186
Exclusion de puits dans une analyse .....	188
Affichage de la courbe des multicomposantes .....	190
Affichage de la courbe des données brutes .....	193

<b>Annexe A</b>	<b>Autres workflows d'expérience</b> .....	<b>195</b>
	Workflow Advanced Setup (Configuration avancée) .....	196
	Workflow QuickStart (Démarrage rapide) .....	197
	Workflow Template (Modèle) .....	198
	Workflow Export/Import (Exportation/Importation) .....	199
	<b>Bibliographie.</b> .....	<b>201</b>
	<b>Glossaire</b> .....	<b>203</b>
	<b>Index</b> .....	<b>217</b>

## Utilisation de ce guide

- Objectif de ce guide** Ce guide explique comment réaliser des expériences de quantification relative par les courbes standard et par la comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) sur le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ (système StepOne™). Il possède deux utilisations :
- Tutoriel, grâce aux données de l'exemple fourni avec le logiciel du système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ (logiciel 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 expériences de quantification relative par les courbes standard et/ou par la comparaison des valeurs de  $C_T$  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/ARN 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 de réactifs ou à la manipulation d'un produit chimique en toute sécurité.

---

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

---

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

---

---

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

---

## Alertes à la sécurité

La documentation destinée aux utilisateurs comporte également des alertes à la sécurité. Pour plus d'informations, voir « [Alertes à la sécurité](#) » à la [page xi](#).

## Informations supplémentaires

### Documentation relative

Le système StepOne est fourni avec les documents suivants :

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

Les documents suivants sont disponibles auprès de Applied Biosystems :

Document	Réf.
<i>Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note</i>	127AP05
<i>Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol</i>	4375575
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation Performance Verification Protocol</i>	4376791
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation Qualification-Operation Qualification Protocol</i>	4376790
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Planned Maintenance Protocol</i>	4376788
<i>Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4334429
<i>Primer Express® Software Version 3.0 Getting Started Guide</i>	4362460
<i>TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4333458
<i>User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression</i>	4303859

---

**Remarque :** Pour plus de renseignements sur la documentation, voir « [Comment obtenir une assistance](#) » à la [page x](#).

---

### 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](mailto:techpubs@appliedbiosystems.com)

---

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

---

## Comment obtenir une assistance

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

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

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

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

---

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

---

## 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 de réactifs ou à la manipulation d'un produit chimique en toute sécurité.

---

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

---

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

---

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

---

À l'exception d'IMPORTANT, chaque alerte à la sécurité présente dans un document Applied Biosystems est accompagnée d'un panneau triangulaire contenant un symbole de danger. Ces symboles sont identiques à ceux figurant sur les instruments Applied Biosystems (voir « [Symboles de sécurité](#) » à la [page xiii](#)).

## Exemples

---

**IMPORTANT !** Il convient de créer un tableur distinct pour la saisie des échantillons de 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

Le tableau suivant décrit les symboles électriques susceptibles d'apparaître sur les instruments Applied Biosystems.

Symbole	Description	Symbole	Description
	Position <b>Marche</b> 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 <b>Arrêt</b> 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 <b>Veille</b> . 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 <b>Marche/Arrêt</b> 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

Le tableau suivant décrit les *symboles* de sécurité susceptibles d'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 inclus dans le texte des documents associés aux produits, 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
	<b>Ne pas éliminer ce produit avec les déchets usuels non soumis au tri sélectif.</b> 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. <b>Utilisateurs de l'Union européenne :</b> Appeler le bureau local du Service clientèle Applied Biosystems pour connaître les procédures d'enlèvement et de recyclage des équipements. Consulter le site <a href="http://www.appliedbiosystems.com">http://www.appliedbiosystems.com</a> pour obtenir la liste des bureaux du Service clientèle dans l'Union européenne.

## 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
<b>CAUTION</b> Hazardous chemicals. Read the Material Safety Data Sheets (MSDSs) before handling.	<b>ATTENTION</b> Produits chimiques dangereux. Lire les fiches de données de sécurité des matériels avant la manipulation des produits.
<b>CAUTION</b> Hazardous waste. Refer to MSDS(s) and local regulations for handling and disposal.	<b>ATTENTION</b> Déchets dangereux. Lire les fiches de données de sécurité des matériels et les réglementations locales en matière de manipulation et d'élimination des déchets.
<b>CAUTION</b> Hot surface.	<b>ATTENTION</b> Surface brûlante.
<b>DANGER</b> High voltage.	<b>DANGER</b> Haute tension.
<b>WARNING</b> 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.	<b>AVERTISSEMENT</b> 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.
<b>CAUTION</b> Moving parts.	<b>ATTENTION</b> Parties mobiles.
<b>DANGER</b> Class 3B (III) visible and/or invisible LED radiation present when open and interlocks defeated. Avoid exposure to beam.	<b>DANGER</b> 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 autonomes



**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 xvii.

### 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 xvii](#).)
- 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](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 SQUELETTE-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 squelette-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 ».

EN 60825-1, « Sécurité des appareils à laser – Partie 1 : classification des matériels, prescriptions et guide de l'utilisateur ».

#### 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 quantification relative par la méthode des courbes standards ou de comparaison de $C_T$	4
■ Utilisation de ce guide	9
■ À propos de l'exemple	10
■ Workflow de l'exemple.	12

**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.

## À propos du système StepOne™

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

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

### À propos de la collecte de données

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

Type d'application		Point de collecte de données
Analyses en temps réel	Quantification absolue par les courbes standard	L'instrument collecte les données après chaque étape d'extension de la PCR.
	Quantification relative par les courbes standard	
	Comparaison des valeurs de $C_T$ ( $\Delta\Delta C_T$ )	
Analyses en point final	Génotypage	L'instrument collecte les données avant et après la PCR. Pour les réactions de génotypage, le logiciel StepOne™ peut également collecter les données pendant la PCR (en temps réel), ce qui peut s'avérer 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.

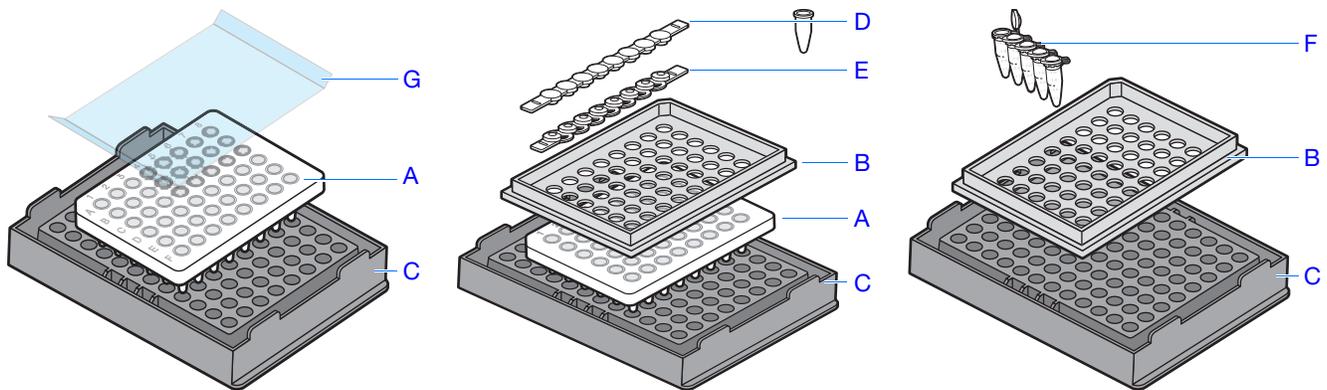
Après une réaction de PCR, le logiciel StepOne utilise les données de calibration (spatiale, spectrale et du bruit de fond) pour déterminer l'emplacement et l'intensité des signaux fluorescents à chaque lecture, le fluorophore associé à chaque signal fluorescent et l'amplitude du signal.

Remarques \_\_\_\_\_

## Consommables compatibles

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

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



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

## Remarques

**Pour plus d'informations**

Pour plus d'informations sur :

- Le système StepOne, voir le document *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software Help*.

---

**Remarque :** Pour accéder à l'aide du logiciel StepOne, sélectionner **Help** (Aide) ► **StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

---

- Les expériences de quantification absolue par les courbes standard, voir le *Guide de mise en route pour les expériences de quantification absolue par les courbes standard sur le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™*.
- Les réactions de génotypage, voir le *Guide de mise en route pour les réactions de génotypage sur le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™*.
- Les expériences de présence/absence, voir le document *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments*.

## À propos des expériences de quantification relative par la méthode des courbes standards ou de comparaison de $C_T$

**Expériences de PCR en temps réel**

Les expériences de quantification relative par les courbes standard et par la comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) sont des expériences de PCR en temps réel. Dans les expériences de PCR en temps réel :

- L'instrument mesure la progression de la PCR (Kwok and Higuchi, 1989).
- Les données sont collectées tout au long de la réaction de PCR.
- Les réactions sont caractérisées par le moment où l'amplification d'une cible est détectée pour la première fois pendant le thermocyclage (Saiki *et al.*, 1985).

---

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

---

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

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

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

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

## Remarques

## Composants

Les composants suivants sont requis lors de la préparation des réactions de PCR pour les expériences de quantification relative par les courbes standard :

- **Échantillon** – Échantillon dans lequel la quantité de cible est inconnue.
- **Échantillon de référence** – Échantillon utilisé comme base de comparaison des résultats. Par exemple, dans une étude relative aux effets des médicaments sur l'expression génétique, un contrôle non traité peut constituer un bon échantillon de référence.
- **Standard** – Échantillon de quantité connue.
- **Gamme de dilutions standard** – Gamme de dilutions du standard (par exemple 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) utilisé pour établir une courbe standard. Pour tous les échantillons, la quantité de cible est déterminée en interpolant la courbe standard, puis en divisant par la quantité de cible de l'échantillon de référence. L'échantillon de référence étant l'échantillon 1X, toutes les autres quantités sont exprimées sous la forme d'une variation d'expression d'un facteur  $n$  comparé à celui-ci. En outre, l'unité de la courbe standard n'est pas prise en compte car la quantité de l'échantillon est divisée par la quantité de l'échantillon de référence. Par conséquent, il suffit juste de connaître la dilution relative des standards. Tout ADNc, ARN ou ADN contenant la cible appropriée peut être utilisé comme standard.
- **Contrôle endogène** – Gène présent à un niveau d'expression similaire dans tous les échantillons. Le contrôle endogène est utilisé pour normaliser les éventuelles variations, liées à une imprécision de pipetage, de la quantité d'ADNc ajoutée à chaque réaction.
- **Réplicats** – Réactions identiques contenant des composants et des volumes identiques.
- **Contrôles négatifs** – Échantillons qui contiennent de l'eau ou du tampon à la place d'un échantillon connu ou inconnu. Les contrôles négatifs ne doivent pas être amplifiés.

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

Les expériences de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) déterminent les variations d'expression d'une cible dans un échantillon comparé à un échantillon de référence. Des formules arithmétiques sont utilisées pour obtenir les résultats.

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

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

## Composants

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

- **Échantillon** – Échantillon dans lequel la quantité de cible est inconnue.

### Remarques

- **Échantillon de référence** – Échantillon utilisé comme base de comparaison des résultats. Par exemple, dans une étude relative aux effets des médicaments sur l'expression génétique, un contrôle non traité peut constituer un bon échantillon de référence.
- **Contrôle endogène** – Gène présent à un niveau d'expression similaire dans tous les échantillons. Le contrôle endogène est utilisé pour normaliser les éventuelles variations, liées à une imprécision de pipetage, de la quantité d'ADNc ajoutée à chaque réaction.
- **Réplicats** – Réactions identiques contenant des composants et des volumes identiques.
- **Contrôles négatifs** – Échantillons qui contiennent de l'eau ou du tampon à la place d'un échantillon connu ou inconnu. Les contrôles négatifs ne doivent pas être amplifiés.

### Expériences de quantification relative par les courbes standard et de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de $C_T$

Les éléments suivants sont à prendre en compte au moment de choisir entre expérience de quantification relative par les courbes standard et expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  :

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

Remarques \_\_\_\_\_

**Options de PCR** Lors de la réalisation de la PCR en temps réel, choisir entre :

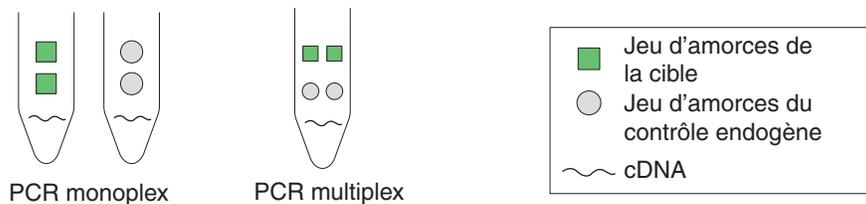
- PCR simplex et multiplex (ci-dessous)
- et
- RT-PCR 1 étape et 2 étapes (Page 7)

### PCR simplex vs PCR multiplex

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

- simplex, où un ensemble amorce/sonde est présent dans le puits ou le tube de réaction. Une seule cible ou un seul contrôle endogène peut être amplifié par réaction.
- ou
- multiplex, où au moins deux ensembles d'amorce/sonde sont présents dans le puits ou le tube de réaction. Chaque ensemble amplifie spécifiquement une cible ou un contrôle endogène.

**IMPORTANT !** Les réactifs SYBR<sup>®</sup> Green ne sont pas validés pour les réactions multiplex.



### RT-PCR 1 étape vs RT-PCR 2 étapes

Il est possible d'effectuer une rétro-transcription (RT) et une PCR dans une seule réaction (1 étape) ou dans des réactions distinctes (2 étapes). Les réactifs utilisés varient selon que la RT-PCR comporte 1 ou 2 étapes :

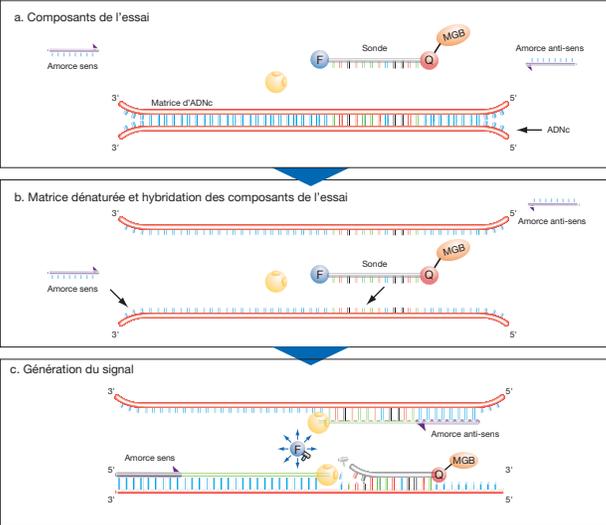
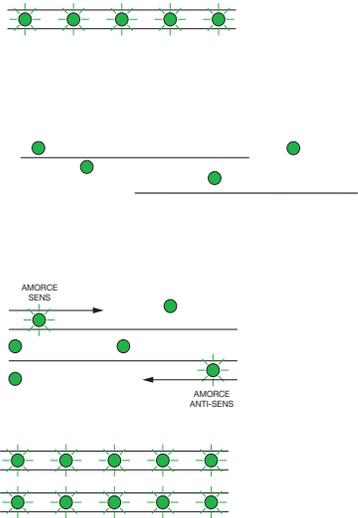
- Avec la RT-PCR 1 étape, la RT et la PCR sont réalisées dans le même tampon, ce qui permet de ne préparer qu'un seul tube pour la RT et la réaction de PCR. Toutefois, il n'est pas possible d'utiliser un master mix Fast PCR ou l'enzyme de prévention des contaminations AmpErase<sup>®</sup> UNG (uracil-N-glycosylase), avec la RT-PCR 1 étape.
- La RT-PCR 2 étapes est effectuée dans deux réactions distinctes : d'abord, l'ARN total est rétro-transcrit en ADNc, puis l'ADNc est amplifié par la PCR. Cette méthode permet de détecter plusieurs transcrits à partir du même échantillon d'ADNc ou de stocker des aliquots d'ADNc pour une utilisation ultérieure. L'enzyme AmpErase<sup>®</sup> UNG permet d'empêcher les contaminations.

**Remarque :** Pour plus d'informations sur l'enzyme AmpErase<sup>®</sup> UNG, voir le *Guide des réactifs du système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™*.

### Remarques

## Réactifs Réactifs TaqMan® et SYBR® Green

Applied Biosystems propose d'utiliser les réactifs TaqMan® et SYBR® Green sur le système StepOne. Les deux types de réactifs sont brièvement décrits dans le tableau ci-dessous.

Type de réactif	Processus
<p><b>Réactifs ou kits TaqMan®</b></p> <p><b>Description</b></p> <p>Les réactifs TaqMan utilisent une sonde marquée par un fluorophore pour faciliter la détection d'un produit de PCR spécifique accumulé pendant les cycles de PCR.</p> <p><b>Avantages</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Augmentent la spécificité avec une sonde. L'hybridation spécifique entre la sonde et la cible génère le signal de fluorescence.</li> <li>• Permettent l'utilisation de la PCR multiplex.</li> <li>• Des essais optimisés sont disponibles.</li> <li>• Permettent d'effectuer un essai 5'nucléase pendant la PCR.</li> <li>• Compatibles avec la RT-PCR 1 ou 2 étapes.</li> </ul>	<p><b>PCR et détection de l'ADNc</b></p>  <p><b>LÉGENDE</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>RP Amorce aléatoire</li> <li>F Fluorophore FAM™</li> <li>Q Quencher</li> <li>MGB Ligand du petit sillon</li> <li>AmpiTaq Gold® DNA Polymerase</li> <li>Sonde</li> <li>Amorce</li> <li>Matrice génétique</li> <li>Extension d'amorce</li> </ul>
<p><b>Réactifs SYBR® Green</b></p> <p><b>Description</b></p> <p>Les réactifs SYBR Green utilisent le fluorophore SYBR® Green I, un fluorophore de liaison à l'ADN double brin, pour détecter les produits de PCR accumulés pendant les cycles de PCR.</p> <p><b>Avantages</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Économiques (aucune sonde requise).</li> <li>• Permettent, grâce à l'analyse de la courbe de fusion, de mesurer le <math>T_m</math> de tous les produits de PCR.</li> <li>• Compatibles avec la RT-PCR 1 ou 2 étapes.</li> </ul> <p><b>Inconvénients</b></p> <p>Se lie de manière non spécifique à toutes les séquences d'ADN double brin. Pour éviter les signaux faux positifs, vérifier qu'aucun produit non spécifique ne se forme en analysant la courbe de fusion ou le dépôt sur le gel.</p>	 <p><b>Étape 1 : Préparation des réactions</b> Le fluorophore SYBR® Green 1 émet une fluorescence lorsqu'il est lié à l'ADN double brin.</p> <p><b>Étape 2 : Dénaturation</b> Lorsque l'ADN est dénaturé, le fluorophore SYBR® Green 1 est libéré et la fluorescence est fortement réduite.</p> <p><b>Étape 3 : Polymérisation</b> Lors de l'extension, les amorces s'hybrident et le produit de PCR est généré.</p> <p><b>Étape 4 : Polymérisation terminée</b> Le fluorophore SYBR® Green 1 se lie au produit de PCR double brin, entraînant une augmentation de la fluorescence détectée par l'instrument.</p>

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

Remarques \_\_\_\_\_

### Autres réactifs

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

- Le logiciel StepOne calcule automatiquement les volumes réactionnels pour les réactifs TaqMan et SYBR Green, mais pas pour les autres réactifs.
- L'expérience doit être créée à l'aide du workflow Advanced Setup (Configuration avancée), plutôt qu'avec l'assistant de programmation Design Wizard. (Voir « [Workflow Advanced Setup \(Configuration avancée\)](#) » à la page 196.)

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur les expériences de PCR en temps réel, les options de PCR et les réactifs, voir le *Guide des réactifs du système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™*.

## Utilisation de ce guide

Ce guide sert à la fois de tutoriel et d'aide-mémoire pour réaliser des expériences.

### Utilisation de ce guide comme tutoriel

Les données de l'exemple fourni avec le logiciel StepOne permettent de réaliser une expérience de quantification relative par les courbes standard ou par la comparaison des valeurs de  $C_T$  sur le système StepOne. Voir les procédures décrites dans les chapitres appropriés :

Chapitre		Procédure
Quantification relative par les courbes standard	Comparaison des valeurs de $C_T$	
2	6	Créer l'expérience à l'aide de l'assistant de programmation Design Wizard du logiciel StepOne.
3	7	Préparer l'expérience en utilisant les réactifs et volumes calculés par l'assistant de programmation Design Wizard au chapitre 2 (Expérience de quantification relative par les courbes standard) ou au chapitre 6 (Expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de $C_T$ ).
4	8	Démarrer la réaction de PCR sur un instrument StepOne (en configuration autonome ou co-localisée).
5	9	Analyser les 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 9 sont terminés, ce guide permet d'utiliser l'assistant de programmation Design Wizard pour créer des expériences de quantification relative par les courbes standard ou par la comparaison des valeurs de  $C_T$ . Les procédures des chapitres 2 à 9 contiennent des instructions détaillées sur la manière de créer des expériences spécifiques.

### Remarques

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.	<a href="#">Chapitre 2</a> ou <a href="#">Chapitre 6</a>
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.	<a href="#">Page 196</a>
QuickStart (Démarrage rapide)	L'utilisateur démarre une nouvelle expérience sans les informations de configuration de la plaque.	<a href="#">Page 197</a>
Template (Modèle)	L'utilisateur configure une nouvelle expérience en utilisant les informations de configuration d'un modèle.	<a href="#">Page 198</a>
Export/Import (Exportation/Importation)	L'utilisateur importe des modèles existants d'expériences à partir de fichiers texte ASCII contenant des informations de configuration.	<a href="#">Page 199</a>

## À propos de l'exemple

Pour illustrer la réalisation d'une expérience de quantification relative par les courbes standard ou par la comparaison des valeurs de  $C_T$ , ce guide décrit les étapes de création, préparation, démarrage et 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 de l'exemple de quantification relative par les courbes standard

L'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple a pour objectif de comparer l'expression du facteur transcriptionnel c-myc (une oncoprotéine qui active la transcription des gènes liés à la croissance) dans les tissus de foie et de rein.

Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple :

- Les échantillons sont constitués d'ADNc préparé à partir d'ARN total isolé dans des tissus de foie et de rein.
- La cible est l'oncoprotéine c-myc humaine.
- Le contrôle endogène est le glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase humain (GAPDH).
- L'échantillon de référence est l'ARN isolé à partir de tissu rénal.
- Une courbe standard est configurée pour c-myc (cible). Le standard utilisé pour la gamme de dilutions est un échantillon d'ADNc de quantité connue préparé à partir d'ARN isolé dans des tissus de poumon.
- Une courbe standard est configurée pour le GAPDH (contrôle endogène). Le standard utilisé pour la gamme de dilutions est un échantillon d'ADNc de quantité connue préparé à partir d'ARN isolé dans des tissus de poumon.

Remarques \_\_\_\_\_

- L'expérience est conçue pour la PCR simplex, avec laquelle les essais de la cible (c-myc) et du contrôle endogène (GAPDH) sont effectués dans des puits distincts.
- Les réactions sont configurées pour la RT-PCR 2 étapes. Le High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit est utilisé pour la rétro-transcription. Le master mix TaqMan® Fast Universal PCR est utilisé pour la PCR.
- Les ensembles amorce/sonde sont sélectionnés dans la gamme des produits Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays :
  - Pour l'essai cible (c-myc), l'ID de l'essai est Hs00153408\_m1 (RefSeq NM\_002467.3).
  - Pour l'essai du contrôle endogène (GAPDH), l'ID de l'essai est Hs99999905\_m1 (RefSeq NM\_002046.2).

### Plan de la plaque de réactions

L'illustration ci-dessous montre le plan de plaque de réactions utilisé pour l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	N c-myc	N c-myc	N c-myc	N GAPDH	N GAPDH	N GAPDH	Liver U c-myc	Liver U c-myc
B	Liver U c-myc	Liver U GAPDH	Liver U GAPDH	Liver U GAPDH	Kidney U c-myc	Kidney U c-myc	Kidney U c-myc	Kidney U GAPDH
C	Kidney U GAPDH	Kidney U GAPDH	S c-myc 200	S c-myc 200	S c-myc 200	S c-myc 20	S c-myc 20	S c-myc 20
D	S c-myc 2	S c-myc 2	S c-myc 2	S c-myc 0.2	S c-myc 0.2	S c-myc 0.2	S c-myc 0.02	S c-myc 0.02
E	S c-myc 0.02	S GAPDH 200	S GAPDH 200	S GAPDH 200	S GAPDH 20	S GAPDH 20	S GAPDH 20	S GAPDH 2
F	S GAPDH 2	S GAPDH 2	S GAPDH 0.2	S GAPDH 0.2	S GAPDH 0.2	S GAPDH 0.02	S GAPDH 0.02	S GAPDH 0.02

### Description de l'exemple de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de $C_T$

L'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple a pour objectif de comparer l'expression de TP53 (un facteur transcriptionnel qui régule d'autres gènes) dans les tissus de foie, de rein et de cerveau.

Dans l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple :

- Les échantillons sont constitués d'ADNc préparé à partir d'ARN total isolé dans des tissus de foie, de rein et de cerveau.
- La cible est TP53.
- L'échantillon de référence est constitué de tissu cérébral.
- Le contrôle endogène est le GAPDH humain.
- L'expérience est conçue pour la PCR simplex, avec laquelle les essais de la cible (c-myc) et du contrôle endogène (GAPDH) sont effectués dans des puits distincts.

### Remarques

- Les réactions sont configurées pour la RT-PCR 2 étapes. Le High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit est utilisé pour la rétro-transcription. Le master mix TaqMan® Fast Universal PCR est utilisé pour la PCR.
- Les ensembles amorce/sonde sont sélectionnés dans la gamme des produits Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays :
  - Pour l'essai cible (TP53), l'ID de l'essai est Hs00153340\_m1 (RefSeq NM\_000546.2).
  - Pour l'essai du contrôle endogène, le Human GAPD (GAPDH) Endogenous Control Kit (réf. 4333764T) est utilisé.

### Plan de la plaque de réactions

L'illustration ci-dessous montre le plan de plaque de réactions utilisé pour l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	TP53	TP53	TP53	GAPDH	GAPDH	GAPDH	Liver TP53	Liver TP53
B	Liver TP53	Liver GAPDH	Liver GAPDH	Liver GAPDH	Kidney TP53	Kidney TP53	Kidney TP53	Kidney GAPDH
C	Kidney GAPDH	Kidney GAPDH	Brain TP53	Brain TP53	Brain TP53	Brain GAPDH	Brain GAPDH	Brain GAPDH
D								
E								
F								

### À propos des données de l'exemple

Le fichier de données de l'exemple est installé avec le logiciel StepOne. Il 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 dur utilisé par défaut pour l'installation du logiciel est le lecteur C.

## Workflow de l'exemple

L'illustration de la Page 13 montre le workflow des exemples d'expériences de quantification relative par les courbes standard et par la comparaison des valeurs de  $C_T$ .

Remarques \_\_\_\_\_

**Expérience de quantification relative  
par les courbes standard**  
*Début de l'expérience*

**Conception de l'expérience (Chapitre 2)**

1. Créer une expérience.
2. Définir les propriétés de l'expérience.
3. Définir les méthodes et les matériels nécessaires.
4. Configurer les cibles.
5. Configurer les standards.
6. Configurer les échantillons.
7. Configurer la quantification relative.
8. Configurer le profil de thermocyclage.
9. Vérifier la préparation des réactions.
10. Commander les matériels nécessaires pour l'expérience.
11. Finaliser le workflow de l'assistant de programmation Design Wizard.

**Préparation des réactions (Chapitre 3)**

1. Préparer la matrice.
2. Préparer les dilutions d'échantillons.
3. Préparer les gammes de dilutions standard.
4. Préparer le mélange réactionnel pour chaque cible.
5. Préparer la plaque de réactions.

**Réalisation de l'expérience (Chapitre 4)**

1. Préparer la réaction de PCR.
2. Activer les paramètres de notification.
3. Démarrer la réaction de PCR.
4. Surveiller la réaction de PCR.
5. Retirer la plaque sur l'instrument et transférer les données.

**Expérience de quantification relative par la méthode  
de comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ )**  
*Début de l'expérience*

**Conception de l'expérience (Chapitre 6)**

1. Créer une expérience.
2. Définir les propriétés de l'expérience.
3. Définir les méthodes et les matériels nécessaires.
4. Configurer les cibles.
5. Configurer les échantillons.
6. Configurer la quantification relative.
7. Configurer le profil de thermocyclage.
8. Vérifier la préparation des réactions.
9. Commander les matériels nécessaires pour l'expérience.
10. Finaliser le workflow de l'assistant de programmation Design Wizard.

**Préparation des réactions (Chapitre 7)**

1. Préparer la matrice.
2. Préparer les dilutions d'échantillons.
3. Préparer le mélange réactionnel pour chaque cible.
4. Préparer la plaque de réactions.

**Réalisation de l'expérience (Chapitre 8)**

1. Préparer la réaction de PCR.
2. Activer les paramètres de notification.
3. Démarrer la réaction de PCR.
4. Surveiller la réaction de PCR.
5. Retirer la plaque sur l'instrument et transférer les données.

Remarques \_\_\_\_\_

**Analyse de l'expérience (Chapitre 5)****Section 1, Analyse des résultats :**

1. Analyser.
2. Afficher l'écran Standard Curve (Courbe standard).
3. Afficher l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification).
4. Afficher l'écran Gene Expression Plot (Profil d'expression génétique) et l'onglet Well Table (Tableau des résultats).
5. Exporter les données.

**Section 2, Identification des causes d'erreurs (si nécessaire) :**

1. Afficher la fenêtre Analysis Settings (Paramètres d'analyse) et ajuster le seuil et la ligne de base.
2. Afficher l'écran QC Summary (Synthèse CQ).
3. Exclure des puits.
4. Afficher l'écran Multicomponent Plot (Courbe des multicomposantes).
5. Afficher l'écran Raw Data Plot (Courbe des données brutes).

▼  
*Fin de l'expérience*

**Analyse de l'expérience (Chapitre 9)****Section 1, Analyse des résultats :**

1. Analyser.
2. Afficher l'écran Gene Expression Plot (Profil d'expression génétique) et l'onglet Well Table (Tableau des résultats).
3. Afficher l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification).
4. Exporter les données.

**Section 2, Identification des causes d'erreurs (si nécessaire) :**

1. Afficher la fenêtre Analysis Settings (Paramètres d'analyse) et ajuster le seuil et la ligne de base.
2. Afficher l'écran QC Summary (Synthèse CQ).
3. Exclure des puits.
4. Afficher l'écran Multicomponent Plot (Courbe des multicomposantes).
5. Afficher l'écran Raw Data Plot (Courbe des données brutes).

▼  
*Fin de l'expérience*

Remarques \_\_\_\_\_

## 2

# Conception de l'expérience de quantification relative par la méthode des courbes standards

## Sommaire du chapitre :

■ Présentation du chapitre . . . . .	16
■ Création d'une expérience . . . . .	17
■ Définition des paramètres de l'écran Experiment Properties (Propriétés de l'expérience) . . . . .	20
■ Définition des méthodes et des matériels nécessaires . . . . .	22
■ Configuration des cibles . . . . .	24
■ Configuration des standards . . . . .	28
■ Configuration des échantillons . . . . .	30
■ Configuration des paramètres de quantification relative . . . . .	32
■ Configuration du profil de thermocyclage . . . . .	33
■ Vérification de la configuration des réactions . . . . .	34
■ Commande des matériels nécessaires pour l'expérience . . . . .	42
■ Finalisation du workflow de l'assistant de programmation Design Wizard. . . . .	45

**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

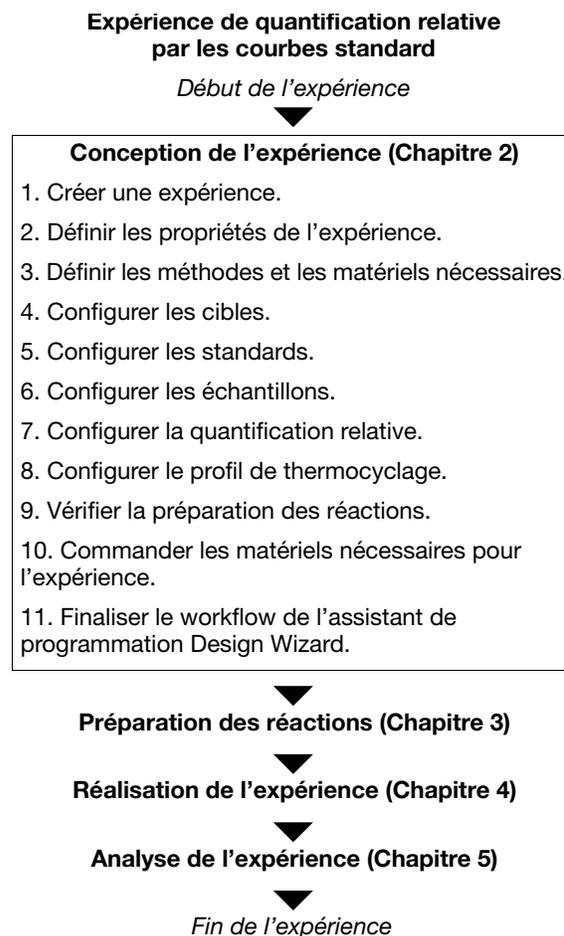
## Présentation du chapitre

Ce chapitre explique comment utiliser l'assistant de programmation Design Wizard du logiciel StepOne™ pour configurer l'exemple de quantification relative par les courbes standard. L'assistant de programmation Design Wizard présente les meilleures pratiques recommandées par Applied Biosystems lors de la saisie des paramètres de conception pour l'exemple.

### Workflow de l'exemple

Le workflow de conception de l'exemple fourni avec ce guide de mise en route est indiqué ci-dessous.

**Remarque :** Créer l'exemple en utilisant l'assistant de programmation Design Wizard du logiciel StepOne. Lors de la conception d'une expérience, il est possible de sélectionner d'autres workflows (voir « [Utilisation de ce guide avec des connaissances pratiques](#) » à la page 9).



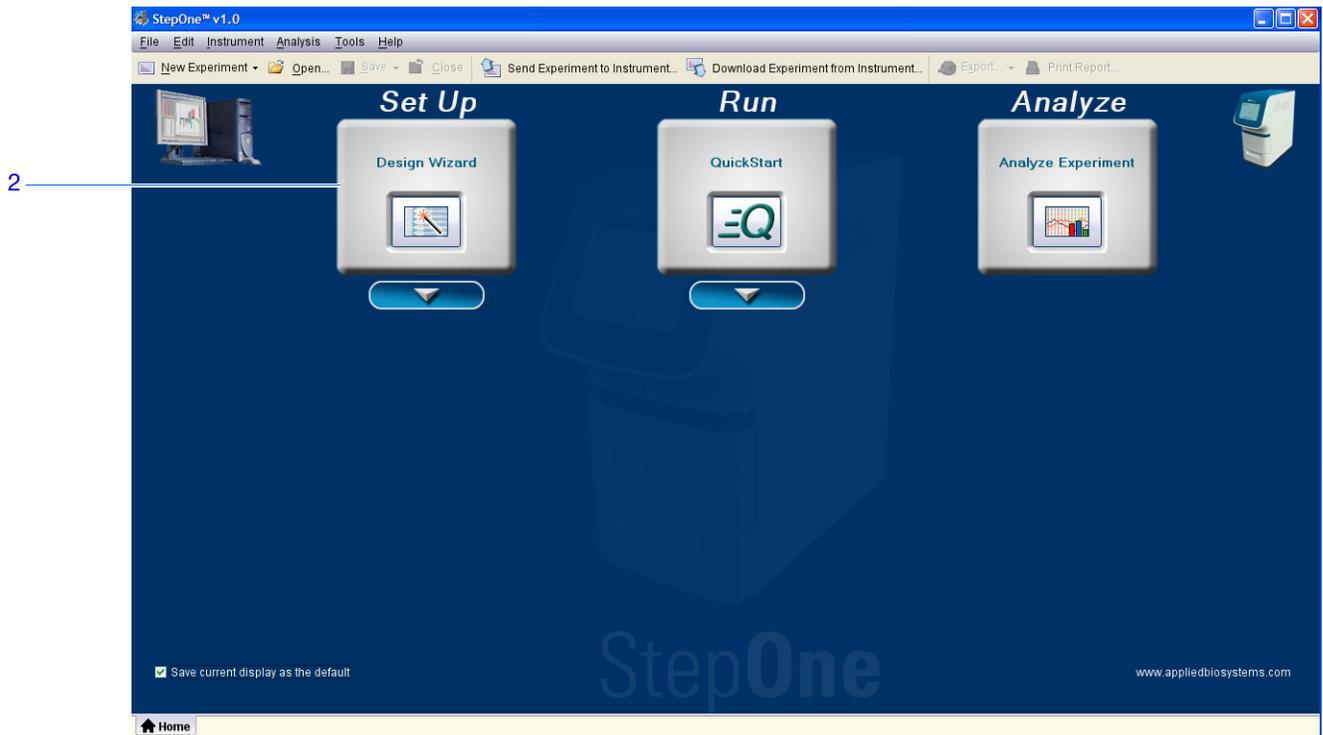
Remarques \_\_\_\_\_

## Création d'une expérience

Créer une expérience à l'aide de l'assistant de programmation Design Wizard du logiciel StepOne.

### Création d'une expérience

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



3. Pour plus d'informations sur la navigation dans l'assistant de programmation Design Wizard, voir ci-dessous la section « **Éléments du logiciel** ».

### Éléments du logiciel

Les éléments du logiciel StepOne présents dans l'assistant de programmation Design Wizard sont illustrés ci-dessous.

1. Barre de menus – Affiche les menus disponibles dans le logiciel :
  - File (Fichier)
  - Edit (Édition)
  - Instrument
  - Analysis (Analyse)
  - Tools (Outils)
  - Help (Aide)

### Remarques

2. Barre d'outils – Affiche les outils disponibles dans le logiciel :
  - New Experiment (Nouvelle expérience)
  - Open (Ouvrir)
  - Close (Fermer)
  - Send Experiment to Instrument (Envoyer une expérience à l'instrument)
  - Download Experiment from Instrument (Télécharger une expérience à partir de l'instrument)
3. En-tête de l'expérience – Affiche le type et le nom de l'expérience, ainsi que les réactifs requis pour l'expérience ouverte.
4. Panneau de navigation – Fournit des liens vers tous les écrans de l'assistant de programmation Design Wizard :
  - Experiment Properties (Propriétés de l'expérience)
  - Methods & Materials (Méthodes et matériels)
  - Targets (Cibles)
  - Relative Quantitation Settings (Paramètres de quantification relative)
  - Standards
  - Samples (Échantillons)
  - Run Method (Profil de thermocyclage)
  - Reaction Setup (Préparation des réactions)
  - Materials List (Liste des matériels)

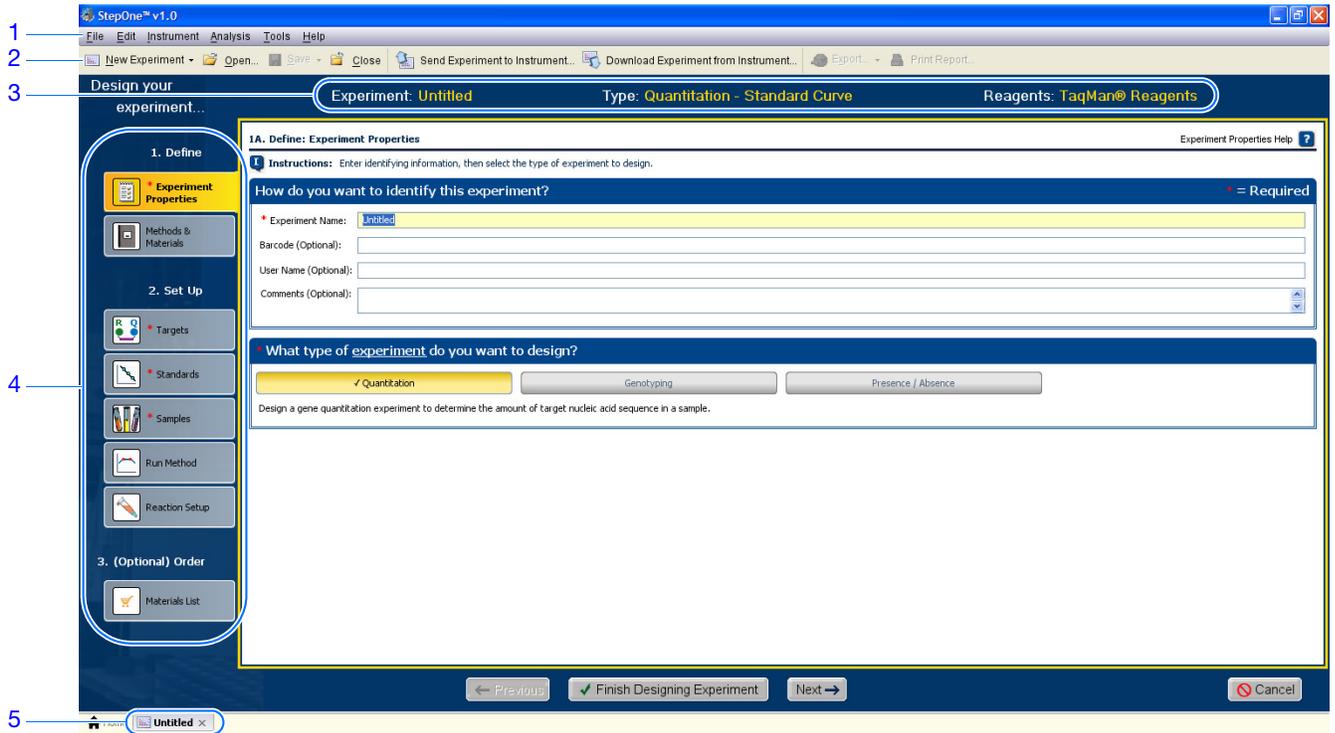
---

**Remarque :** L'assistant de programmation Design Wizard affiche en premier l'application Quantitation – Standard Curve (Quantification – Courbe standard). L'aspect des écrans disponibles dans l'assistant de programmation Design Wizard peut changer si une autre application est sélectionnée. Par exemple, l'écran Relative Quantitation Settings (Paramètres de quantification relative) n'est affiché que si l'application Relative Standard Curve (Courbe standard relative) ou Comparative  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) (Comparaison des valeurs de  $C_T$ ) est sélectionnée.

---

Remarques \_\_\_\_\_

5. Onglets Experiment (Expérience) – Affichent un onglet pour chaque expérience ouverte.



Remarques

## Définition des paramètres de l'écran Experiment Properties (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.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple :

- L'expérience est identifiée comme un exemple.
- Une MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate est utilisée.
- L'application choisie est la quantification.

### Définition des paramètres de l'écran Experiment Properties (Propriétés de l'expérience)

1. Cliquer dans le champ **Experiment Name** (Nom de l'expérience), puis entrer **Relative Standard Curve Example** (Exemple de quantification relative par les courbes standard).

---

**Remarque :** L'en-tête de l'expérience est remplacé par le nom saisi.

---

2. Cliquer dans le champ **Barcode** (Code-barres), puis entrer le code-barres inscrit sur la plaque de réactions de PCR.
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 **Relative Standard Curve Getting Started Guide Example** (Exemple de quantification relative par les courbes standard du guide de mise en route).
5. Sélectionner l'application **Quantitation** (Quantification).
6. Cliquer sur **Next >** (Suivant).

Remarques \_\_\_\_\_

### Instructions de préparation

Lors de la création d'une expérience de quantification relative par les courbes standard :

- Entrer un nom descriptif et facile à retenir pour l'expérience. Le nom de l'expérience est utilisé comme nom de fichier d'expérience par défaut. Le champ Experiment Name (Nom de l'expérience) peut contenir au maximum 100 caractères.

**Remarque :** Le champ Experiment Name (Nom de l'expérience) n'accepte pas 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 (;).

- Utiliser des MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plates, des MicroAmp™ Fast 8-Tube Strips ou des MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Caps. Les consommables Fast sont compatibles avec les réactifs Fast et standard.
- *(Facultatif)* Entrer la référence du code-barres inscrit sur la plaque de réactions de PCR. Le champ Barcode (Code-barres) peut contenir au maximum 100 caractères.
- *(Facultatif)* Entrer le nom d'utilisateur du créateur de l'expérience. Le champ User Name (Nom d'utilisateur) peut contenir au maximum 100 caractères.
- *(Facultatif)* Entrer des commentaires décrivant l'expérience. Le champ Comments (Commentaires) peut contenir au maximum 1 000 caractères.
- Sélectionner l'application **Quantitation** (Quantification).

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur :

- Les paramètres de l'écran Experiment Properties (Propriétés de l'expérience), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur F1.
- Les consommables, voir « [Consommables compatibles](#) » à la page 3.
- Les expériences de quantification, voir le *Guide des réactifs du système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™*.

### Remarques

## Définition des méthodes et des matériels nécessaires

Dans l'écran Methods & Materials (Méthodes et matériels), sélectionner la méthode de quantification, les réactifs, la vitesse de variation de la température et le type de PCR à utiliser pour l'expérience.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple :

- La méthode de quantification relative par les courbes standard est employée.
- Les réactifs TaqMan<sup>®</sup> sont utilisés.
- La vitesse de variation de la température Fast (Rapide) est utilisée pendant la réaction de PCR.
- La matrice utilisée est l'ADNc (préparé à partir d'ARN isolé dans des tissus de foie et de rein). Avant d'utiliser la matrice ADNc, effectuer une rétro-transcription pour convertir l'ARN en ADNc (voir « Préparation de la matrice » à la page 51).

### Paramètres de l'écran Methods & Materials (Méthodes et matériels)

1. Sélectionner la méthode de quantification **Relative Standard Curve** (Courbe standard relative).
2. Sélectionner les réactifs **TaqMan<sup>®</sup> Reagents** (Réactifs TaqMan).
3. Sélectionner la vitesse de variation de la température **Fast (~40 minutes to complete a run)** (Rapide (env. 40 min pour réaliser la réaction)).
4. Sélectionner le type de matrice **cDNA (complementary DNA)** (ADNc (ADN complémentaire)).
5. Cliquer sur **Next >** (Suivant).

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

**Instructions:** Select the quantitation method, reagents, ramp speed, and type of template for the real-time PCR reactions.

**Which quantitation method are you using?**

Standard Curve   Relative Standard Curve  Comparative Ct ( $\Delta\Delta C_T$ )

With the relative standard curve method, you use standards, a reference sample, and an endogenous control to determine the relative quantity of target sequence in a sample.

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

TaqMan<sup>®</sup> Reagents  SYBR<sup>®</sup> Green Reagents

These real-time PCR reactions contain two primers and a TaqMan<sup>®</sup> probe. The primers are designed to amplify the target sequence. The TaqMan probe is designed to hybridize to the target sequence and generate fluorescence signal when the target sequence is amplified.

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

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

For optimal results using the Fast ramp speed, Applied Biosystems recommends using Fast reagents for your real-time PCR reactions.

**What type of template do you want to use in the real-time PCR reactions?**

cDNA (complementary DNA)  RNA  gDNA (genomic DNA)

You are adding cDNA to the real-time PCR reactions. You have already performed reverse transcription to convert the RNA to cDNA.

### Remarques

## Instructions de préparation

Lors de la création d'une expérience de quantification relative par les courbes standard :

- Sélectionner la méthode de quantification **Relative Standard Curve** (Courbe standard relative). Les expériences de quantification relative par les courbes standard déterminent les variations d'expression d'une cible dans un échantillon comparé à un échantillon de référence. Une courbe standard créée à partir d'une gamme de dilutions de quantité connue est utilisée pour obtenir les résultats. Lors de la configuration du plan de plaque, la quantification relative par les courbes standard nécessite des cibles, des standards, des échantillons, un échantillon de référence et un contrôle endogène.
- Sélectionner les réactifs à utiliser :
  - Sélectionner **TaqMan® Reagents** afin d'utiliser les réactifs TaqMan pour détecter l'amplification et évaluer la quantité de cible des échantillons. Les réactifs TaqMan sont composés de deux amorces et d'une sonde TaqMan®. Les amorces sont conçues pour amplifier la cible. La sonde TaqMan est conçue pour s'hybrider avec la cible et générer un signal de fluorescence lorsque la cible est amplifiée.

---

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

---

- Sélectionner **SYBR® Green Reagents** afin d'utiliser les réactifs SYBR Green pour détecter l'amplification et évaluer la quantité de cible des échantillons. Les réactifs SYBR Green sont composés de deux amorces et du fluorophore SYBR Green. Les amorces sont conçues pour amplifier la cible. Le fluorophore SYBR Green génère un signal de fluorescence lorsqu'il est lié à l'ADN double brin. Le fluorophore SYBR Green est souvent inclus dans le master mix SYBR Green ajouté à la réaction. Si le fluorophore SYBR Green est utilisé :  
Cocher la case **Include Melt Curve** (Inclure la courbe de fusion) pour effectuer l'analyse de la courbe de fusion sur la cible amplifiée.  
Sélectionner la vitesse de variation de la température **Standard**.

---

**Remarque :** Dans le système StepOne, il est possible d'utiliser d'autres réactifs basés sur le principe de la fluorescence. Toutefois, cela nécessite de créer l'expérience en utilisant le workflow Advanced Setup (Configuration avancée) plutôt que l'assistant de programmation Design Wizard. Voir « [Workflow Advanced Setup \(Configuration avancée\)](#) » à la page 196.

---

- Sélectionner la vitesse de variation de la température adaptée à l'activité de l'instrument :
  - Sélectionner **Fast (~40 Minutes to Complete a Run)** [(Rapide (env. 40 min pour réaliser la réaction))] si des réactifs Fast sont utilisés pour les réactions de PCR.
  - Sélectionner **Standard (~2 Hours to Complete a Run)** [(Standard (env. 2 h pour réaliser la réaction))] si des réactifs standard sont utilisés pour les réactions de PCR (notamment les réactifs SYBR Green et TaqMan standard).

## Remarques

---

- Sélectionner le type de PCR approprié :
  - Sélectionner **cDNA (complementary DNA)** (ADNc (ADN complémentaire)) si la RT-PCR 2 étapes est choisie et si la rétro-transcription permettant de convertir l'ARN en ADNc a déjà été réalisée. L'ADN complémentaire est ajouté aux réactions de PCR.
  - Sélectionner **RNA** si la RT-PCR 1 étape est choisie. L'ARN total ou l'ARNm est ajouté aux réactions de PCR.
  - Sélectionner **gDNA (genomic DNA)** (ADNg (ADN génomique)) si l'ADNg a déjà été extrait des tissus ou de l'échantillon. L'ADN génomique purifié est ajouté aux réactions de PCR.

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur :

- Les paramètres de l'écran Methods & Materials (Méthodes et matériels), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.
- L'utilisation de la méthode de quantification par comparaison des valeurs de  $C_T$ , voir les chapitres 6 à 9 de ce guide.
- La quantification absolue par les courbes standard, voir le *Guide de mise en route pour les expériences de quantification absolue par les courbes standard sur le système de PCR en temps réel StepOne™*.
- Les réactifs TaqMan et SYBR Green, voir le *Guide des réactifs du système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™*.
- La PCR, notamment la PCR simplex vs la PCR multiplex et la RT-PCR 1 étape vs la RT-PCR 2 étapes, voir le *Guide des réactifs du système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™*.

## Configuration des cibles

Dans l'écran Targets (Cibles), entrer le nombre de cibles à quantifier lors de la réaction de PCR, puis configurer le plan de plaque pour chacune.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple :

- Deux cibles sont quantifiées dans la plaque de réactions.
- La case Set Up Standards (Configurer les standards) est cochée pour que le logiciel affiche automatiquement l'écran Standards lorsque les paramètres de l'écran Targets (Cibles) sont définis. Dans l'écran Standards, il est possible de configurer une courbe standard pour chaque cible (voir « [Configuration des standards](#) » à la page 28).
- L'essai Target 1 (Cible 1) correspond au gène cible étudié. Dans l'exemple, il s'agit de c-myc humaine (une oncoprotéine qui active la transcription des gènes liés à la croissance).
- L'essai Target 2 (Cible 2) correspond au contrôle endogène. Dans l'exemple, il s'agit du glycéraldéhyde-3-phosphate humain (GAPDH). Le GAPDH sert de contrôle endogène car ses niveaux d'expression tendent à être relativement stables.

Remarques \_\_\_\_\_

## Paramètres de l'écran Targets (Cibles)

1. Cliquer dans le champ **How many targets do you want to quantify in the reaction plate?** (Combien de cibles à quantifier dans la plaque de réactions ?), puis entrer **2**.

---

**Remarque :** Le tableau des cibles se met à jour en fonction du nombre choisi.

---

2. Cocher la case **Set Up Standards** (Configurer les standards) pour configurer les standards des deux cibles.

---

**Remarque :** La case Set Up Standards (Configurer les standards) est cochée par défaut.

---

3. Configurer l'essai Target 1 (Cible 1) :

- a. Cliquer dans le champ **Enter Target Name** (Entrer le nom de la cible), puis entrer **c-myc**.
- b. Dans le menu déroulant Reporter, sélectionner **FAM** (par défaut).
- c. Dans le menu déroulant Quencher, sélectionner **NFQ-MGB** (par défaut).
- d. Ne pas modifier le paramètre par défaut dans le champ Color (Couleur).

4. Configurer l'essai Target 2 (Cible 2) :

- a. Cliquer dans le champ **Enter Target Name** (Entrer le nom de la cible), puis entrer **GAPDH**.
- b. Dans le menu déroulant Reporter, sélectionner **FAM** (par défaut).
- c. Dans le menu déroulant Quencher, sélectionner **NFQ-MGB** (par défaut).
- d. Ne pas modifier le paramètre par défaut dans le champ Color (Couleur).

5. Cliquer sur **Next >** (Suivant).

---

**Remarque :** Pour toutes les cibles, laisser vierge le champ facultatif Enter Gene Name (Entrer le nom du gène). Il est possible de rechercher l'ID du gène/essai lors de la commande des matériels de l'expérience (voir « [Commande des matériels nécessaires pour l'expérience](#) » à la page 42).

---

## Remarques

---

### Instructions de préparation

Lors de la création d'une expérience de quantification relative par les courbes standard :

- Cocher la case **Set Up Standards** (Configurer les standards). Applied Biosystems recommande de configurer une courbe standard pour chaque cible présente dans la réaction.
- Attribuer à chaque cible un nom et une couleur univoques. Le champ Target Name (Nom de la cible) peut contenir au maximum 100 caractères.
- Sélectionner un contrôle endogène pour chaque échantillon. Le contrôle endogène est une cible présente dans tous les échantillons de l'étude. Il doit être exprimé de manière équivalente dans tous les types d'échantillons, indépendamment du traitement ou de l'origine des tissus (les contrôles endogènes sont par exemple  $\beta$ -actin, GAPDH et ARN ribosomal 18S (ARNr 18S)). Le contrôle endogène est utilisé pour normaliser les résultats de la PCR. Il corrige les masses d'échantillons variables, l'efficacité de l'extraction d'acide nucléique, l'efficacité de la rétro-transcription et les erreurs de calibration des pipettes. Remarque :
  - Chaque type d'échantillon (par exemple chaque tissu d'une étude comparant plusieurs tissus) nécessite un contrôle endogène.
  - Si les échantillons sont répartis sur plusieurs plaques, chacune doit avoir un contrôle endogène. En outre, les plaques doivent comporter un contrôle endogène pour chaque type d'échantillon de la plaque.
- Sélectionner le reporter utilisé dans l'essai cible :
  - Sélectionner **FAM** si le fluorophore FAM<sup>TM</sup> est placé à l'extrémité 5' de la sonde TaqMan utilisée pour détecter la cible.
  - Sélectionner **JOE** si le fluorophore JOE<sup>TM</sup> est placé à l'extrémité 5' de la sonde TaqMan utilisée pour détecter la cible.
  - Sélectionner **VIC** si le fluorophore VIC<sup>®</sup> est placé à l'extrémité 5' de la sonde TaqMan utilisée pour détecter la cible.
  - Sélectionner **SYBR** si le fluorophore SYBR<sup>®</sup> Green est utilisé pour détecter l'ADN double brin.

Remarques \_\_\_\_\_

- Sélectionner le quencher utilisé dans l'essai cible :
  - Sélectionner **NFQ-MGB** si un quencher non fluorescent – ligand du petit sillon est placé à l'extrémité 3' de la sonde TaqMan utilisée pour détecter la cible.
  - Sélectionner **None** (Aucun) si le fluorophore SYBR Green est utilisé.

---

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

---

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur :

- Les paramètres de l'écran Targets (Cibles), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.
- La sélection d'un contrôle endogène, voir la note d'application *Using TaqMan® Endogenous Control Assays to Select an Endogenous Control for Experimental Studies*.

Remarques \_\_\_\_\_

## Configuration des standards

Dans l'écran Standards, entrer le nombre de points et de réplicats présents sur toutes les courbes standard de la plaque de réactions. Pour chaque courbe standard, entrer la quantité de départ et sélectionner le facteur de dilution.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple :

- Une courbe standard est configurée pour la cible (c-myc). Le standard utilisé pour la gamme de dilutions est un échantillon d'ADNc de quantité connue préparé à partir d'ARN isolé dans des tissus de poumon.
- Une courbe standard est configurée pour le contrôle endogène (GAPDH). Le standard utilisé pour la gamme de dilutions est un échantillon d'ADNc de quantité connue préparé à partir d'ARN isolé dans des tissus de poumon.
- Pour chaque courbe standard :
  - Cinq points sont utilisés sur la courbe standard.
  - Trois réplicats sont utilisés pour chaque point. Les réplicats sont des réactions identiques contenant des composants et des volumes réactionnels identiques.
  - La quantité de départ est de 200 ng, avec un facteur de dilution de 1:10.

### Paramètres de l'écran Standards

1. Cliquer dans le champ **How many points do you need for each standard curve?** (Combien de points pour chaque courbe standard ?), puis entrer **5**.
2. Cliquer dans le champ **How many replicates do you need for each point?** (Combien de réplicats pour chaque point ?), puis entrer **3**.
3. Définir l'intervalle de quantités standard de l'essai c-myc :
  - a. Cliquer dans le champ **Enter Starting Quantity** (Entrer la quantité de départ), puis entrer **200**.
  - b. Dans le menu déroulant Select Serial Factor (Sélectionner le facteur de dilution), sélectionner **1:10**.
4. Définir l'intervalle de quantités standard de l'essai GAPDH :
  - a. Cliquer dans le champ **Enter Starting Quantity** (Entrer la quantité de départ), puis entrer **200**.
  - b. Dans le menu déroulant Select Serial Factor (Sélectionner le facteur de dilution), sélectionner **1:10**.
5. Consulter le panneau Standard Curve Preview (Aperçu de la courbe standard) pour chaque essai. Les courbes standard comportent les points suivants : 200, 20, 2, 0,2 et 0,02.
6. Cliquer sur **Next >** (Suivant).

Remarques \_\_\_\_\_

Si nécessaire, déplacer la barre de défilement pour voir GAPDH, puis effectuer les étapes 4a et 4b.

**Instructions de préparation**

Lors de la création d'une expérience de quantification relative par les courbes standard :

- Configurer une courbe standard pour chaque cible de la plaque de réactions. Les cibles sont préalablement définies dans l'écran Targets (Cibles) (« Configuration des cibles » à la page 24).
- Entrer le nombre de points pour chaque courbe standard de la plaque de réactions. Applied Biosystems recommande au moins cinq points de dilution pour chaque courbe standard.
- Entrer le nombre de réactions identiques (réplicats) pour chaque point de la courbe standard. Applied Biosystems recommande trois réplicats pour chaque point.
- Parce que l'intervalle des quantités standard affecte les calculs d'efficacité de l'amplification, bien vérifier l'intervalle des quantités standard de l'essai :
  - Pour obtenir des mesures plus précises de l'efficacité de l'amplification, utiliser un grand intervalle des quantités standard, de 5 à 6 logs. Dans cette configuration, utiliser un produit de PCR ou un échantillon très concentré, par exemple un clone d'ADNc (plasmide).
  - Si la quantité de matrice ADNc est limitée et/ou si la cible est transcrite à un faible nombre de copies ou si elle est comprise dans un intervalle donné, un intervalle réduit des quantités standard peut s'avérer nécessaire.
- Le facteur de dilution est utilisé pour calculer les quantités à chaque point de la courbe standard. Si la quantité de départ est la plus élevée, sélectionner un facteur de dilution tel que 1:2, 1:3, etc. Si la quantité de départ est la plus faible, sélectionner un facteur de concentration tel que 2X, 3X, etc.

Remarques

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur :

- Les paramètres de l'écran Standards, accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.
- L'efficacité de l'amplification, voir le document *Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note*.

## Configuration des échantillons

Dans l'écran Samples (Échantillons), entrer le nombre d'échantillons, de réplicats et de contrôles négatifs à inclure dans la plaque de réactions, entrer le nom des échantillons, puis sélectionner les réactions échantillon/cible à configurer.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple :

- Deux échantillons sont utilisés : ADNc préparé à partir d'ARN total isolé dans des tissus de foie et de rein. Les échantillons contiennent des quantités inconnues des gènes c-myc (cible) et GAPDH (contrôle endogène).
- Trois réplicats sont utilisés. Les réplicats sont des réactions identiques contenant des composants et des volumes réactionnels identiques.
- Trois contrôles négatifs sont utilisés. Les réactions de contrôle négatif contiennent de l'eau à la place de l'échantillon et ne doivent pas être amplifiées.

### Paramètres de l'écran Samples (Échantillons)

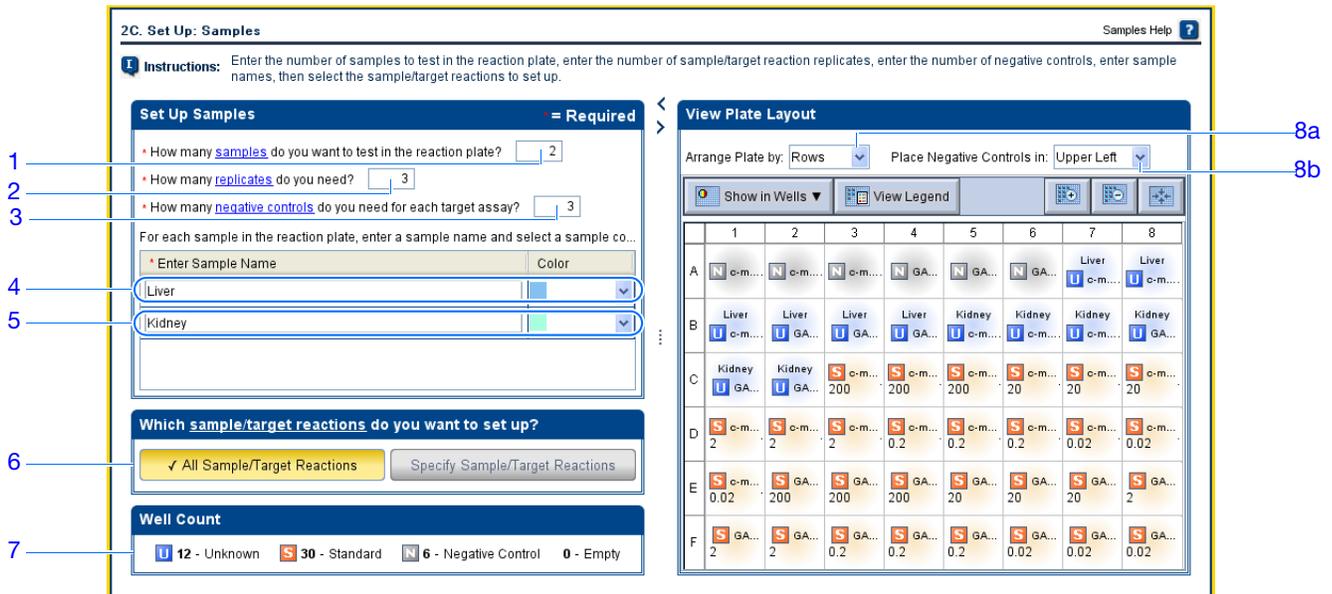
1. Cliquer dans le champ **How many samples do you want to test in the reaction plate?** (Combien d'échantillons à tester dans la plaque de réactions ?), puis entrer **2**.

**Remarque :** Le tableau des échantillons se met à jour en fonction du nombre choisi.

2. Cliquer dans le champ **How many replicates do you need?** (Combien de réplicats ?), puis entrer **3**.
3. Cliquer dans le champ **How many negative controls do you need for each target assay?** (Combien de contrôles négatifs pour chaque essai cible ?), puis entrer **3**.
4. Configuration de l'échantillon 1 :
  - a. Cliquer dans le champ **Enter Sample Name** (Entrer le nom de l'échantillon), puis entrer **Liver** (Foie).
  - b. Ne pas modifier le paramètre par défaut dans le champ Color (Couleur).
5. Configuration de l'échantillon 2 :
  - a. Cliquer dans le champ **Enter Sample Name** (Entrer le nom de l'échantillon), puis entrer **Kidney** (Rein).
  - b. Ne pas modifier le paramètre par défaut dans le champ Color (Couleur).

Remarques \_\_\_\_\_

6. Sélectionner **All Sample/Target Reactions** (Toutes les réactions échantillon/cible) pour tester toutes les cibles sur chaque échantillon.
7. Dans le panneau Well Count (Décompte des puits), vérifier la présence de :
  - 12 puits inconnus **U**
  - 30 puits de standard **S**
  - 6 puits de contrôle négatif **N**
  - 0 puits vide
8. Dans l'onglet View Plate Layout (Voir le plan de plaque) :
  - a. Dans le menu déroulant Arrange Plate by (Organiser la plaque par), sélectionner **Rows** (Lignes) (par défaut).
  - b. Dans le menu déroulant Place Negative Controls in (Placer les contrôles négatifs dans), sélectionner **Upper Left** (Coin supérieur gauche) (par défaut).
9. Cliquer sur **Next >** (Suivant).



### Instructions de préparation

Lors de la création d'une expérience de quantification relative par les courbes standard :

- Attribuer à chaque échantillon un nom et une couleur univoques. Le champ Sample Name (Nom de l'échantillon) peut contenir au maximum 100 caractères.
- Entrer le nombre de réactions identiques (réplicats) à configurer. Applied Biosystems recommande trois réplicats pour chaque réaction d'échantillon.
- Entrer le nombre de réactions de contrôle négatif à configurer. Applied Biosystems recommande trois réactions de contrôle négatif pour chaque essai cible.
- Sélectionner les associations de réactions échantillon/cible souhaitées :
  - Sélectionner **All Sample/Target Reactions** (Toutes les réactions échantillon/cible) pour tester toutes les cibles sur chaque échantillon.

### Remarques

- Sélectionner **Specify Sample/Target Reactions** (Spécifier les réactions échantillon/cible) pour préciser les cibles à tester dans chaque échantillon.

**Remarque :** Dans l'assistant de programmation Design Wizard, chaque réaction de PCR ne peut contenir qu'un échantillon et une cible.

**Pour plus d'informations** Pour plus d'informations sur les paramètres de l'écran Samples (Échantillons), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.

## Configuration des paramètres de quantification relative

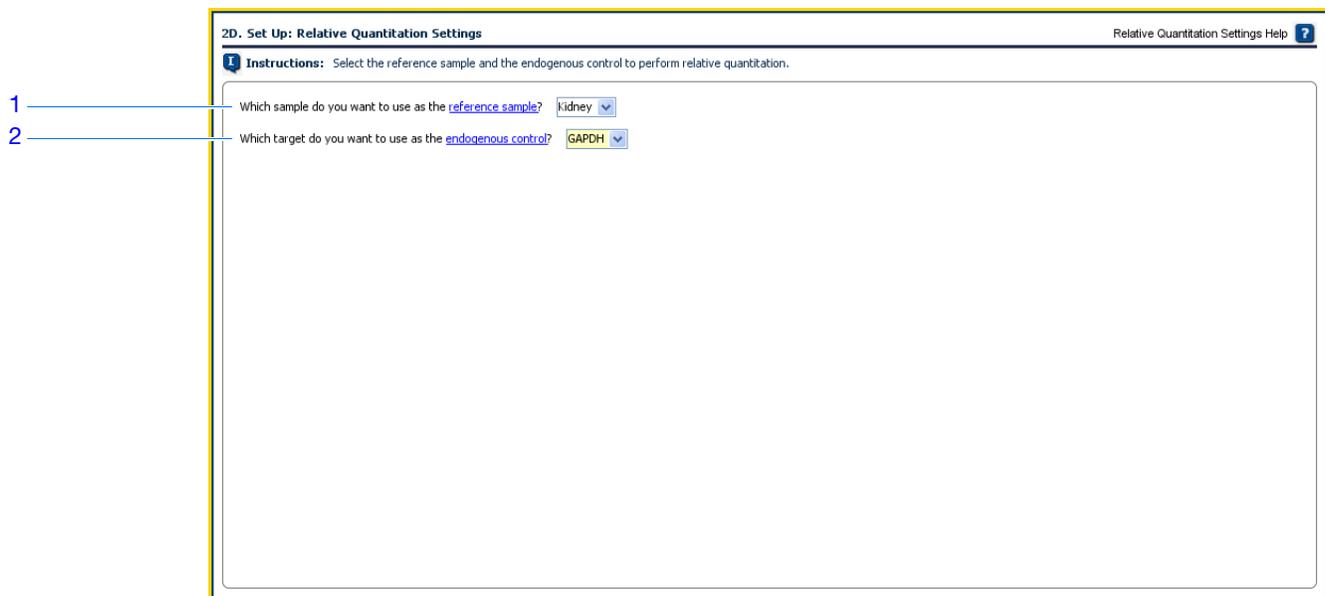
Dans l'écran Relative Quantitation Settings (Paramètres de quantification relative), sélectionner l'échantillon de référence et le contrôle endogène pour la quantification relative.

**À propos de l'exemple** Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple :

- L'échantillon de référence est constitué de tissu rénal.
- GAPDH est utilisé comme contrôle endogène.

**Paramètres de l'écran Relative Quantitation Settings (Paramètres de quantification relative)**

1. Dans le menu déroulant Which sample do you want to use as the reference sample? (Quel échantillon utiliser comme référence ?), sélectionner **Kidney (Rein)**.
2. Dans le menu déroulant Which target do you want to use as the endogenous control? (Quelle cible utiliser comme contrôle endogène ?), sélectionner **GAPDH**.
3. Cliquer sur **Next >** (Suivant).



Remarques \_\_\_\_\_

- Instructions de préparation** Lors de la création d'une expérience de quantification relative par les courbes standard :
- Sélectionner un échantillon de référence issu des échantillons précédemment créés (« Configuration des échantillons » à la page 30). Les résultats d'amplification des échantillons sont comparés à ceux de l'échantillon de référence pour déterminer l'expression relative.
  - Sélectionner un contrôle endogène dans la liste de cibles précédemment créée (« Configuration des cibles » à la page 24). Les résultats d'amplification du contrôle endogène sont utilisés pour normaliser ceux de la cible en corrigeant les différences de quantité d'acide nucléique ajouté à chaque réaction.
- Pour plus d'informations** Pour plus d'informations sur :
- Le contenu de l'écran Relative Quantitation Settings (Paramètres de quantification relative), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.
  - Les échantillons de référence (également appelés calibrateurs) et les contrôles endogènes, voir le document *User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression*.

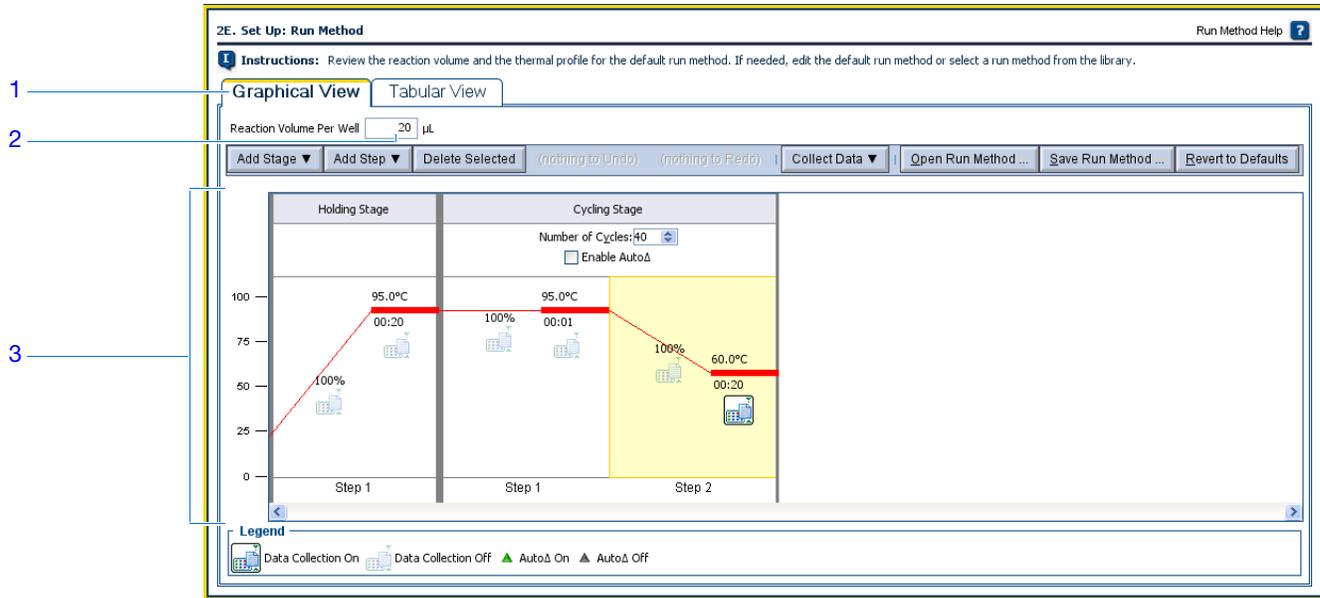
## Configuration du profil de thermocyclage

Dans l'écran Run Method (Profil de thermocyclage), vérifier le volume réactionnel et le profil thermique du profil de thermocyclage par défaut. Si nécessaire, modifier le profil de thermocyclage par défaut ou la remplacer par un profil de la bibliothèque Run Method (Profil de thermocyclage).

- À propos de l'exemple** Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple, le profil de thermocyclage par défaut est utilisée sans modification.
- Consultation de l'écran Run Method (Profil de thermocyclage)**
1. Cliquer sur l'onglet **Graphical View** (Vue graphique) (par défaut) ou **Tabular View** (Vue en tableau).
  2. Vérifier que le champ Reaction Volume Per Well (Volume réactionnel par puits) indique **20 µL**.
  3. Vérifier que le profil thermique affiche les phases de maintien de la température et de thermocyclage indiquées ci-dessous.
  4. Cliquer sur **Next >** (Suivant).

### Remarques

---



### Instructions de préparation

Lors de la création d'une expérience de quantification relative par les courbes standard :

- Entrer un nombre compris entre 10 et 30 pour le volume réactionnel par puits. Le système StepOne accepte les volumes réactionnels compris entre 10 et 30 µL.
- Consulter le profil thermique :
  - Vérifier que le profil thermique est adapté aux réactifs utilisés.
  - Si la RT-PCR 1 étape est effectuée, inclure une étape de rétro-transcription. Si l'expérience nécessite un autre profil thermique, modifier le profil en cours ou remplacer la réaction de PCR par défaut par un profil de la bibliothèque Run Method (Profil de thermocyclage) intégrée au logiciel StepOne.

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur la bibliothèque Run Method (Profil de thermocyclage) ou sur les paramètres de l'écran Run Method, accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.

## Vérification de la configuration des réactions

Dans l'écran Reaction Setup (Préparation des réactions), sélectionner le type d'essai (si des réactifs TaqMan sont utilisés), puis vérifier les volumes calculés pour la préparation des réactions de PCR, des gammes de dilutions standard et des dilutions d'échantillons. Si nécessaire, modifier le volume réactionnel, le volume excédentaire, ainsi que la concentration des composants, du standard et/ou de l'échantillon dilué.

**IMPORTANT !** Effectuer ces étapes pour chaque cible présente dans la réaction.

Remarques \_\_\_\_\_

**À propos de l'exemple :** Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple :

- Des essais Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays sont utilisés.
- Le volume réactionnel par puits est de 20 µL.
- Le volume excédentaire est de 10 %.
- Les composants de la réaction sont :
  - Master mix TaqMan® Fast Universal PCR (2X)
  - Mix primers-sonde c-myc (20X)
  - Mix primers-sonde GAPDH (20X)
  - Échantillon ou standard
  - Eau
- La concentration du standard dans la solution mère est de 200 ng/µL.
- La concentration de l'échantillon dilué est de 5,0 ng/µL.
- La concentration des échantillons dans la solution mère est de 100 ng/µL.

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

**Paramètres de l'onglet Reaction Mix Calculations (Calcul du mélange réactionnel) pour l'essai c-myc**

1. Sélectionner l'onglet **Reaction Mix Calculations** (Calcul du mélange réactionnel) (par défaut).
2. Dans le panneau Select Target (Sélectionner la cible), sélectionner **c-myc**.
3. Dans le menu déroulant Assay Type (Type d'essai), sélectionner **Inventoried/Made to Order** (En stock/fabriqué sur commande).
4. Vérifier que le champ **Reaction Volume Per Well** (Volume réactionnel par puits) indique **20 µL**.
5. Vérifier que le champ **Excess Reaction Volume** (Volume excédentaire) indique **10 %**.
6. Dans le panneau Reactions for c-myc (Réactions pour c-myc) :
  - a. Vérifier que le champ Master Mix Concentration (Concentration du master mix) indique **2,0X**.
  - b. Vérifier que le champ Assay Mix Concentration (Concentration du mix primers-sonde) indique **20,0X**.
  - c. Vérifier les composants et les volumes calculés pour les réactions de PCR :

Composant	Volume (µL) pour 1 réaction
Master mix (2,0X)	10,0
Mix primers-sonde (20,0X)	1,0
Échantillon (10X) ou standard	2,0 <sup>‡</sup>
H <sub>2</sub> O	7,0
Volume total	20,0

<sup>‡</sup> Le volume d'échantillon ou de standard est limité à 10 % du volume réactionnel total.

Remarques \_\_\_\_\_

7. Dans le panneau Standard Dilution Series for c-myc (Gamme de dilutions standard pour c-myc) :
  - a. Cliquer dans le champ **Standard Concentration in Stock** (Concentration du standard dans la solution mère), puis entrer **200**.
  - b. Dans le menu déroulant du champ des unités, sélectionner **ng per  $\mu$ L** (ng/ml) (par défaut).
  - c. Vérifier les volumes calculés pour la préparation de la gamme de dilutions standard :

Point de dilution	Source	Volume de la source ( $\mu$ L)	Volume du diluant ( $\mu$ L)	Volume total ( $\mu$ L)	Concentration du standard (ng/ $\mu$ L)
1 [200]	Solution mère	5,0	5,0	10,0	100,0
2 [20]	Dilution 1	1,0	9,0	10,0	10,0
3 [2]	Dilution 2	1,0	9,0	10,0	1,0
4 [0,2]	Dilution 3	1,0	9,0	10,0	0,1
5 [0,02]	Dilution 4	1,0	9,0	10,0	0,01

**2F. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations** Reaction Setup Help ?

**Instructions:** For each target assay in the reaction plate, select the assay type (if using TaqMan reagents), then review the calculated volumes for preparing the standard dilution series, samples, and 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.

**Reaction Mix Calculations** | Sample Dilution Calculations

Select Target: **c-myc**, **GAPDH**

Assay Type: **Inventoried/Made to Order** | Reaction Volume Per Well: **20**  $\mu$ L | Excess Reaction Volume: **10** % | **Print Reaction Setup**

**Total Volume** 20.0

**Standard Dilution Series for c-myc**

Standard Concentration in Stock: **200** **ng** per  $\mu$ L

Dilution Point	Source	Source Volume ( $\mu$ L)	Diluent Volume ( $\mu$ L)	Total Volume ( $\mu$ L)	Standard Concentration...
1 [200]	Stock	5.0	5.0	10.0	100.0
2 [20]	Dilution 1	1.0	9.0	10.0	10.0
3 [2]	Dilution 2	1.0	9.0	10.0	1.0
4 [0.2]	Dilution 3	1.0	9.0	10.0	0.1
5 [0.02]	Dilution 4	1.0	9.0	10.0	0.0

### Paramètres de l'onglet Reaction Mix Calculations (Calcul du mélange réactionnel) pour l'essai GAPDH

1. Sélectionner l'onglet **Reaction Mix Calculations** (Calcul du mélange réactionnel) (par défaut).
2. Dans le panneau Select Target (Sélectionner la cible), sélectionner **GAPDH**.

Remarques \_\_\_\_\_

3. Dans le menu déroulant Assay Type (Type d'essai), sélectionner **Inventoried/Made to Order** (En stock/fabriqué sur commande).
4. Vérifier que le champ **Reaction Volume Per Well** (Volume réactionnel par puits) indique **20 µL**.
5. Vérifier que le champ **Excess Reaction Volume** (Volume excédentaire) indique **10 %**.
6. Dans le panneau Reactions for GAPDH (Réactions pour GAPDH) :
  - a. Vérifier que le champ Master Mix Concentration (Concentration du master mix) indique **2,0X**.
  - b. Vérifier que le champ Assay Mix Concentration (Concentration du mix primers-sonde) indique **20,0X**.
  - c. Vérifier les composants et les volumes calculés pour les réactions de PCR :

Composant	Volume (µL) pour 1 réaction
Master mix (2,0X)	10,0
Mix primers-sonde (20,0X)	1,0
Échantillon (10X) ou standard	2,0 <sup>‡</sup>
H <sub>2</sub> O	7,0
Volume total	20,0

<sup>‡</sup> Le volume d'échantillon ou de standard est limité à 10 % du volume réactionnel total.

Remarques

7. Dans le panneau Standard Dilution Series for GAPDH (Gamme de dilutions standard pour GAPDH) :
- Cliquer dans le champ **Standard Concentration in Stock** (Concentration du standard dans la solution mère), puis entrer **200**.
  - Dans le menu déroulant du champ des unités, sélectionner **ng per  $\mu$ L** (ng/ml) (par défaut).
  - Vérifier les volumes calculés pour la préparation de la gamme de dilutions standard :

Point de dilution	Source	Volume de la source ( $\mu$ L)	Volume du diluant ( $\mu$ L)	Volume total ( $\mu$ L)	Concentration du standard (ng/ $\mu$ L)
1 [200]	Solution mère	5,0	5,0	10,0	100,0
2 [20]	Dilution 1	1,0	9,0	10,0	10,0
3 [2]	Dilution 2	1,0	9,0	10,0	1,0
4 [0,2]	Dilution 3	1,0	9,0	10,0	0,1
5 [0,02]	Dilution 4	1,0	9,0	10,0	0,01

2F. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations

Instructions: For each target assay in the reaction plate, select the assay type (if using TaqMan reagents), then review the calculated volumes for preparing the standard dilution series, samples, and 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.

Reaction Mix Calculations | Sample Dilution Calculations

Select Target: c-myc, GAPDH

Assay Type: Inventoried/Made to Order | Reaction Volume Per Well: 20  $\mu$ L | Excess Reaction Volume: 10 %

Total Volume: 20.0

Standard Dilution Series for GAPDH

Standard Concentration in Stock: 200 ng per  $\mu$ L

Dilution Point	Source	Source Volume ( $\mu$ L)	Diluent Volume ( $\mu$ L)	Total Volume ( $\mu$ L)	Standard Concentration...
1 [200]	Stock	5.0	5.0	10.0	100.0
2 [20]	Dilution 1	1.0	9.0	10.0	10.0
3 [2]	Dilution 2	1.0	9.0	10.0	1.0
4 [0.2]	Dilution 3	1.0	9.0	10.0	0.1
5 [0.02]	Dilution 4	1.0	9.0	10.0	0.0

#### Paramètres de l'onglet Sample Dilution Calculations (Calcul de dilution de l'échantillon)

- Sélectionner l'onglet **Sample Dilution Calculations (Calcul de dilution de l'échantillon)**.
- Cliquer dans le champ **Diluted Sample Concentration (10X for Reaction Mix)** (Concentration de l'échantillon dilué (10X pour le mélange réactionnel)), puis entrer **5,0**.

Remarques \_\_\_\_\_

- Dans le menu déroulant des unités, sélectionner **ng/μL** (par défaut).
- Vérifier les volumes calculés pour les dilutions d'échantillons :

Nom de l'échantillon	Concentration de la solution mère (ng/μL)	Volume d'échantillon (μL)	Volume du diluant (μL)	Volume total de l'échantillon dilué (μL)
Foie	100,0	1,0	19,0	20,0
Rein	100,0	1,0	19,0	20,0

### Impression des instructions de configuration des réactions

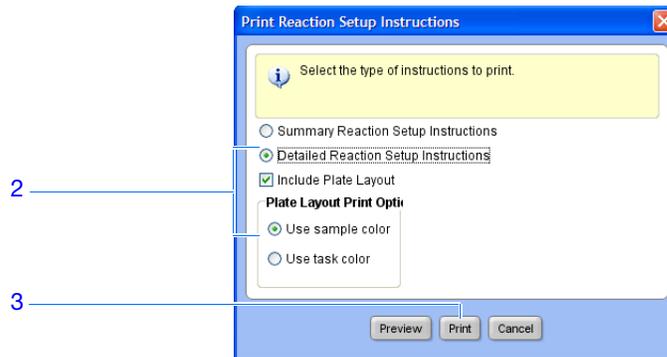
Imprimer les instructions détaillées de préparation des réactions, puis enregistrer les instructions pour le [Chapitre 3, « Préparation des réactions de quantification relative par les courbes standard »](#).

- Cliquer sur **Print Reaction Setup** (Imprimer la préparation des réactions).

- Dans la fenêtre, sélectionner :
  - Detailed Reaction Setup Instructions (Instructions détaillées de préparation des réactions)**
  - Include Plate Layout (Inclure le plan de plaque)**
  - Use Sample Color (Utiliser la couleur d'échantillon)**

Remarques \_\_\_\_\_

3. Cliquer sur **Print** (Imprimer).



4. Dans la fenêtre Print (Imprimer), sélectionner l'imprimante et les options d'impression, puis cliquer sur **OK**.

5. Cliquer sur **Next >** (Suivant).

### Instructions de préparation

Lors de la création d'une expérience de quantification relative par les courbes standard :

- Si des réactifs TaqMan sont utilisés, sélectionner le type d'essai employé :
  - Sélectionner **Inventoried/Made to Order** (En stock/fabriqué sur commande) si des essais Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays (en stock ou fabriqués sur commande) ou Applied Biosystems Custom TaqMan® Gene Expression Assays sont utilisés.
  - Sélectionner **Custom** (Personnalisé) si les essais sont créés avec le logiciel Primer Express®.
- Entrer un nombre compris entre 10 et 30 pour le volume réactionnel par puits. Le système StepOne accepte les volumes réactionnels compris entre 10 et 30 µL.
- Inclure le volume excédentaire pour compenser les pertes dues au pipetage. Applied Biosystems recommande un volume excédentaire d'au moins 10 %.
- Vérifier la concentration du mélange réactionnel pour chaque cible. Si nécessaire :
  - Pour les réactifs TaqMan, modifier la concentration du master mix et du mix primers-sonde.
  - Pour les réactifs SYBR Green, modifier la concentration du master mix, de l'amorce sens et de l'amorce anti-sens.
  - Pour la RT-PCR 1 étape, modifier la concentration de la transcriptase inverse.
- Vérifier les composants du mélange réactionnel pour chaque cible :
  - Si des réactions de PCR Fast sont réalisées, veiller à utiliser un master mix Fast dans les réactions de PCR.
  - Si des réactions de PCR standard sont réalisées, veiller à utiliser un master mix standard dans les réactions de PCR.
  - Pour la RT-PCR 1 étape, veiller à inclure la transcriptase inverse dans les réactions de PCR et à utiliser un tampon spécifique.

Remarques \_\_\_\_\_

- Vérifier le calcul de la gamme de dilutions standard pour chaque cible. Si nécessaire, modifier la concentration du standard dans la solution mère (y compris les unités).

---

**Remarque :** Pour les unités du champ Standard Concentration in Stock (Concentration du standard dans la solution mère), il est possible de sélectionner **ng** ou **µg** dans le menu déroulant ou de saisir une autre unité (par exemple, **copies**, **IU**, (International Units) (Unités internationales), **nmol**, **pg**, etc.). Le tableau est mis à jour en fonction de l'unité sélectionnée.

---

- Vérifier le calcul de dilution de chaque échantillon. Si nécessaire, modifier la concentration de l'échantillon dilué (y compris les unités) et de la solution mère.

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur :

- Les paramètres de l'écran Reaction Setup (Préparation des réactions), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.
- Les essais Applied Biosystems, voir les documents :
  - *TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays Protocol*
  - *Custom TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays Protocol*.

---

### Remarques

---

## Commande des matériels nécessaires pour l'expérience

Dans l'écran Materials List (Liste des matériels), vérifier la liste des matériels recommandés pour préparer la plaque de réactions de PCR.

Il est possible de se procurer les matériels recommandés dans la boutique Applied Biosystems. Créer un panier, ajouter les articles à la liste d'achat, puis ouvrir une session pour envoyer la commande. Une connexion Internet sans restriction est nécessaire pour accéder à la boutique Applied Biosystems.

---

**Remarque :** Le logiciel StepOne préconise de commander les matériels en fonction de l'application créée. Il s'appuie par principe sur la procédure suivante : création de l'expérience, commande des matériels, puis préparation ([Chapitre 3](#)) et utilisation ([Chapitre 4](#)) de la plaque de réactions à réception des matériels.

---

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple, les matériels recommandés sont :

- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Cover
- Master mix TaqMan® Fast Universal PCR (2X), No AmpErase® UNG
- Mix primers-sonde c-myc : Hs00153408\_m1 (RefSeq NM\_002467.3)
- Mix primers-sonde GAPDH : Hs99999905\_m1 (RefSeq NM\_002046.2)

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

1. Localiser l'essai cible dans la boutique Applied Biosystems :
  - a. Vérifier que l'ordinateur est connecté à Internet.
  - b. Cliquer dans le champ **Enter Gene Name** (Entrer le nom du gène), entrer **c-myc**, puis cliquer sur **Find Assay** (Rechercher l'essai).
  - c. Dans la fenêtre Find Assay Results (Résultats de la recherche d'essais), sélectionner la ligne **Hs00153408\_m1**.
  - d. Cliquer dans le champ **Entrer Gene Name** (Entrer le nom du gène), entrer **GAPDH**, puis cliquer sur **Find Assay** (Rechercher l'essai).
  - e. Dans la fenêtre Find Assay Results (Résultats de la recherche d'essais), sélectionner la ligne **Hs99999905\_m1**.
  - f. Cliquer sur **Apply Assay Selection** (Utiliser l'essai sélectionné).
2. Définir les paramètres du panneau Experiment Materials List (Liste des matériels de l'expérience) :
  - a. Dans le menu déroulant Display (Afficher), sélectionner **All Items** (Tous les articles) (par défaut), puis consulter les matériels recommandés. Si nécessaire, déplacer la barre de défilement vers la droite pour voir tous les articles.

Remarques \_\_\_\_\_

b. Cocher la case en regard des articles suivants :

- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Cover
- Master mix TaqMan® Fast Universal PCR (2X), No AmpErase® UNG
- Mix primers-sonde c-myc : Hs00153408\_m1 (RefSeq NM\_002467.3)
- Mix primers-sonde GAPDH : Hs99999905\_m1 (RefSeq NM\_002046.2)

**Remarque :** Pour plus d'informations sur un article, cliquer sur le lien du numéro de référence conduisant à la boutique Applied Biosystems. Sur la page d'accueil, entrer le numéro de référence dans le champ Search (Rechercher), puis cliquer sur  **Go** (Atteindre).

c. Cliquer sur **Add Selected Items to Shopping List** (Ajouter les articles sélectionnés à la liste d'achats).

3. Vérifier que la section Experiment Shopping List (Liste d'achats pour l'expérience) contient les matériels nécessaires dans les quantités adéquates, puis cliquer sur **Order Materials in List** (Commander les matériels de la liste).

**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**

Enter Gene Name:   Enter a gene name, then click "Find Assay" to search the Applied Biosystems Store for a gene expression assay.

**Experiment Materials List**

Display:

<input type="checkbox"/> Check All	Item	Part Number	Description
<input checked="" type="checkbox"/>	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate	<a href="#">4375816</a>	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. An optically clear adhesive film used to seal the samples into the

**Experiment Shopping List (3 items)**

Shopping Basket Name:

<input type="checkbox"/> Check All	Item	Part Number	Quantity
<input type="checkbox"/>	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction ...	<a href="#">4375816</a>	<input type="text" value="1"/>
<input type="checkbox"/>	MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film	<a href="#">4375928</a>	<input type="text" value="1"/>

4. Dans la fenêtre Order Materials – Log In (Commander des matériels – Ouvrir une session), entrer le nom d'utilisateur et le mot de passe pour accéder à la boutique Applied Biosystems, puis cliquer sur **Login and Submit** (Ouvrir une session et envoyer).

**Remarque :** Si aucun compte n'a été créé dans la boutique Applied Biosystems, cliquer sur **Register Now** (S'inscrire maintenant) pour en ouvrir un.

Remarques

5. Une fois la commande passée, cliquer sur **Finish Designing Experiment** (Finaliser la création de l'expérience).

### Instructions de préparation

Lors de la création d'une expérience de quantification relative par les courbes standard :

- Vérifier que l'ordinateur dispose d'une connexion Internet sans restriction.
- Applied Biosystems recommande d'employer le logiciel Adobe® Acrobat® Reader et les navigateurs Web suivants sur son site Internet :

Système d'exploitation	Netscape® Navigator	Microsoft® Internet Explorer	Adobe® Acrobat® Reader
Windows® 98/NT/2000	v6.x ou ultérieure	v6.x ou ultérieure	v4.0 ou ultérieure
Macintosh® OS 9 ou ultérieur	v6.x ou ultérieure	v5.2 ou ultérieure	v4.0 ou ultérieure

**Remarque :** Pour assurer un fonctionnement optimal, vérifier que les cookies et Java Script sont activés pour le site Web.

- Sélectionner tous les matériels nécessaires à l'expérience et les ajouter à la liste d'achats.

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur les paramètres de l'écran Materials List (Liste des matériels), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.

Remarques \_\_\_\_\_

## Finalisation du workflow de l'assistant de programmation Design Wizard

Pour finaliser le workflow de l'assistant de programmation Design Wizard, vérifier le plan de plaque, puis sélectionner une option de fermeture.

### À propos de l'exemple

Le logiciel StepOne sélectionne automatiquement les emplacements des puits dans la plaque de réactions. Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple :

- Les puits sont disposés comme indiqué ci-dessous.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	N c-myc	N c-myc	N c-myc	N GAPDH	N GAPDH	N GAPDH	U Liver c-myc	U Liver c-myc
B	U Liver c-myc	U Liver GAPDH	U Liver GAPDH	U Liver GAPDH	U Kidney c-myc	U Kidney c-myc	U Kidney c-myc	U Kidney GAPDH
C	U Kidney GAPDH	U Kidney GAPDH	S c-myc 200	S c-myc 200	S c-myc 200	S c-myc 20	S c-myc 20	S c-myc 20
D	S c-myc 2	S c-myc 2	S c-myc 2	S c-myc 0,2	S c-myc 0,2	S c-myc 0,2	S c-myc 0,02	S c-myc 0,02
E	S c-myc 0,02	S GAPDH 200	S GAPDH 200	S GAPDH 200	S GAPDH 20	S GAPDH 20	S GAPDH 20	S GAPDH 2
F	S GAPDH 2	S GAPDH 2	S GAPDH 0,2	S GAPDH 0,2	S GAPDH 0,2	S GAPDH 0,02	S GAPDH 0,02	S GAPDH 0,02

- L'expérience est enregistrée en l'état puis fermée.

**Remarque :** Pour l'exemple, ne pas démarrer la réaction de PCR à ce stade.

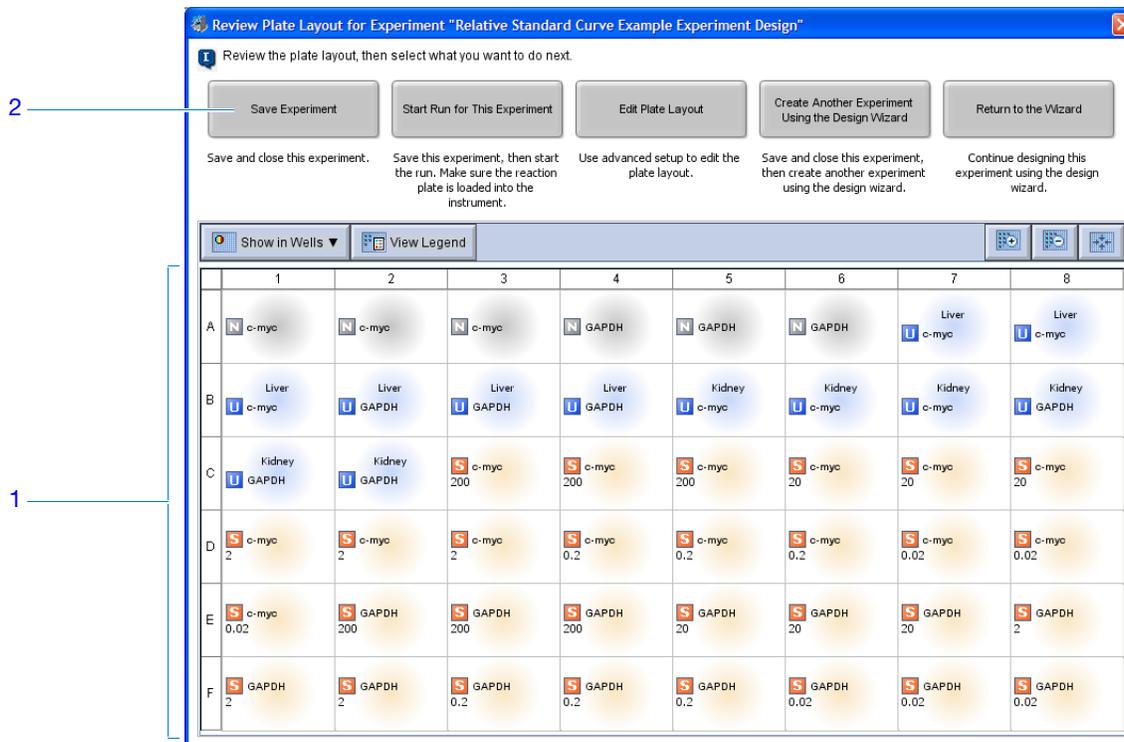
### Finalisation de l'assistant de programmation Design Wizard

1. Dans la fenêtre Review Plate for Experiment (Vérifier la plaque de l'expérience), contrôler le plan de plaque. Vérifier que sont présents :
  - 12 puits inconnus **U**
  - 30 puits de standard **S**
  - 6 puits de contrôle négatif **N**
  - 0 puits vide

**Remarque :** Si le plan de plaque est incorrect, cliquer sur **Return to the Wizard** (Revenir à l'assistant) et vérifier les valeurs saisies.

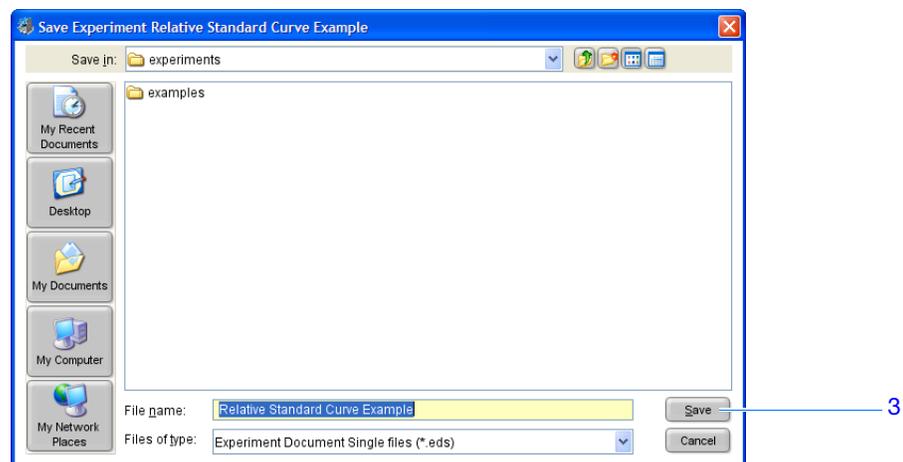
2. Cliquer sur **Save Experiment** (Enregistrer l'expérience).

### Remarques



3. Dans la fenêtre Save Experiment (Enregistrer l'expérience), cliquer sur **Save** (Enregistrer) pour accepter le nom de fichier et l'emplacement par défaut. L'exemple est enregistré puis fermé et l'écran d'accueil réapparaît.

**Remarque :** Par défaut, l'exemple est enregistré dans le dossier Applied Biosystems\StepOne System\experiments.



## Remarques

## Instructions de préparation

Lors de la création d'une expérience de quantification relative par les courbes standard :

- Dans la fenêtre Review Plate for Experiment (Vérifier la plaque de l'expérience), sélectionner l'option de fermeture appropriée :
  - Cliquer sur **Save Experiment** (Enregistrer l'expérience) pour enregistrer et fermer l'expérience sans apporter d'autres modifications ni démarrer la réaction de PCR.
  - Cliquer sur **Start Run for This Experiment** (Démarrer la réaction de PCR de cette expérience) pour enregistrer l'expérience et démarrer la réaction de PCR. Vérifier que la plaque de réactions est chargée dans l'instrument.
  - Cliquer sur **Edit Plate Layout** (Modifier le plan de plaque) pour utiliser le workflow Advanced Setup (Configuration avancée) afin de modifier le plan de plaque.
  - Cliquer sur **Create Another Experiment Using the Design Wizard** (Créer une autre expérience avec l'assistant de programmation) pour enregistrer et fermer l'expérience, puis créer une autre expérience à l'aide de l'assistant de programmation Design Wizard.
  - Cliquer sur **Return to the Wizard** (Revenir à l'assistant) pour retourner à l'expérience et y apporter des modifications à l'aide de l'assistant de programmation Design Wizard.
- Par défaut, les expériences sont enregistrées dans le dossier Applied Biosystems\StepOne System\experiments. Pour modifier :
  - L'emplacement de sauvegarde d'une expérience, utiliser la fenêtre Save Experiment (Enregistrer l'expérience).
  - L'emplacement de sauvegarde par défaut, sélectionner **Tools (Outils) ▶ Preferences** (Préférences), puis sélectionner l'onglet **General** (Général) (par défaut). Dans le champ Default Data Folder (Répertoire de données par défaut), choisir l'emplacement souhaité.

## Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur l'utilisation du workflow Advanced Setup (Configuration avancée), voir « [Workflow Advanced Setup \(Configuration avancée\)](#) » à la page 196.

## Remarques

Remarques \_\_\_\_\_

---

## 3

# Préparation des réactions pour la quantification relative par la méthode des courbes standards

Sommaire du chapitre :

■ Présentation du chapitre .....	50
■ Préparation de la matrice .....	51
■ Préparation des dilutions d'échantillons .....	53
■ Préparation des gammes de dilutions standard .....	55
■ Préparation du mélange réactionnel .....	58
■ Préparation de la plaque de réactions .....	61

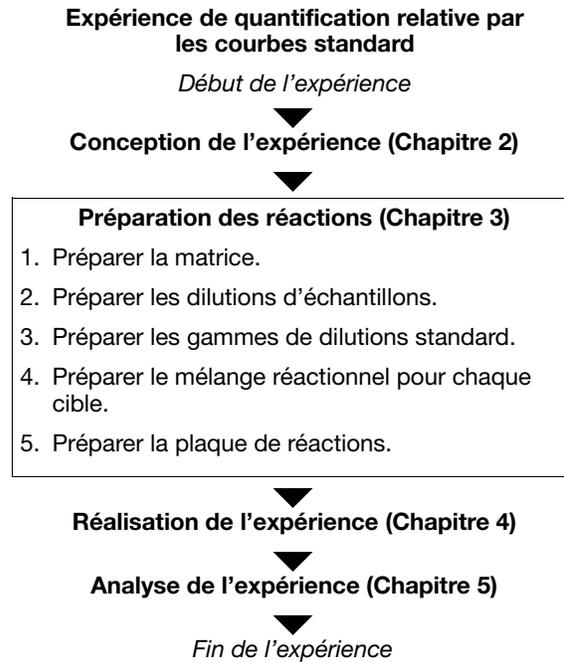
**Remarque :** Pour plus d'informations sur l'un des sujets abordés dans ce guide, consulter l'aide dans le logiciel du système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ en appuyant sur **F1**, en cliquant sur  dans la barre d'outils ou en sélectionnant **Help** (Aide) ▶ **StepOne Help** (Aide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

## Remarques

## Présentation du chapitre

Ce chapitre explique comment préparer les réactions de PCR pour l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple. En outre, il fournit des instructions sur la préparation des réactions de PCR utilisées dans les expériences de quantification relative par les courbes standard personnalisées.

**Workflow de l'exemple** Le workflow de préparation des réactions de PCR pour l'exemple fourni avec ce guide de mise en route est indiqué ci-dessous.



Remarques \_\_\_\_\_

## Préparation de la matrice

Préparer la matrice pour les réactions de PCR (des échantillons et des standards) en utilisant le High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

**IMPORTANT !** Applied Biosystems recommande d'utiliser le High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit pour réaliser une rétro-transcription de l'ADNc à partir de l'ARN total. Les essais TaqMan® Gene Expression Assays ont été conçus à l'aide du High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Les autres protocoles n'ont pas été testés pour une utilisation avec les essais TaqMan Gene Expression Assays.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple, l'échantillon utilisé pour les réactions de PCR est un ADNc synthétisé à partir d'ARN total à l'aide du High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

### Matériels nécessaires

- Pour les échantillons, 'ARN total isolé dans des tissus de foie et de rein.
- Pour les standards, 'ARN total isolé dans des tissus de poumon.

**Remarque :** Veiller à préparer un ADNc pour les échantillons et pour les standards.

- Un des Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits :

Kit	Référence
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (200 réactions)	4368814
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (1 000 réactions)	4368813
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (200 réactions)	4374966
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (1 000 réactions)	4374967

**Remarque :** Le High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit était précédemment désigné par l'appellation « High-Capacity cDNA Archive Kit ».

### Remarques

### Préparation de la matrice

Utiliser le High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit pour synthétiser l'ADNc simple brin à partir d'échantillons d'ARN total. Voir les procédures décrites dans le document *Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol* pour :

1. Préparer le master mix RT.



**ATTENTION**

**DANGER CHIMIQUE. 10** Le tampon  $\times$  RT risque de provoquer l'irritation des yeux, de la peau et de l'appareil respiratoire. Lire la fiche de données de sécurité applicable et suivre les consignes de manipulation. Porter des protections oculaires, des gants et des vêtements appropriés.

2. Préparer les ADNc.
3. Réaliser la rétro-transcription sur un thermocycleur.

### Instructions de préparation

Lors de la préparation d'une expérience de quantification relative par les courbes standard :

- Applied Biosystems recommande d'extraire d'abord l'ADN ou l'ARN de tissus ou d'un échantillon.
- Applied Biosystems préconise l'emploi des acides nucléiques suivants :
  - **Complementary cDNA (cDNA)** (ADNc complémentaire (ADNc)) – ADNc synthétisé à partir d'échantillons d'ARN total à l'aide d'un High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.
  - **RNA** – ARN total purifié ou ARNm extrait de tissus ou d'un échantillon.
  - **Genomic DNA (gDNA)** (ADN génomique (ADNg)) – ADNg purifié déjà extrait de tissus ou d'un échantillon.

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur :

- La préparation des ADNc, voir le document *Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol* (réf. 4375575). Ce protocole n'est pas fourni avec les High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits. Il est téléchargeable sur le site Web de Applied Biosystems consacré à la documentation :

**<http://docs.appliedbiosystems.com/search.taf>**

- La préparation des ARN ou de l'ADNg, voir le protocole des réactifs de purification sélectionnés. Pour savoir quel réactif de purification Applied Biosystems utiliser, voir le site Web de Applied Biosystems :

**<http://www.appliedbiosystems.com/>**

Remarques \_\_\_\_\_

## Préparation des dilutions d'échantillons

Préparer les dilutions d'échantillons avant d'ajouter ces derniers au mélange réactionnel final. Diluer les échantillons en utilisant les volumes calculés par le logiciel StepOne™ (voir « Paramètres de l'onglet Sample Dilution Calculations (Calcul de dilution de l'échantillon) » à la page 38).

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple :

- Il est nécessaire de diluer les échantillons car leur volume est limité à 10 % du volume réactionnel total dans le logiciel StepOne. Le volume réactionnel total étant de 20 µL/réaction, le volume d'échantillon est de 2 µL/réaction.
- La concentration de la solution mère est de 100 ng/µL. Après dilution de l'échantillon conformément au tableau Sample Dilution Calculations (Calcul de dilution de l'échantillon), sa concentration sera de 5,0 ng/µL. Le facteur de concentration sera porté à 10X après ajout de 2 µL au mélange réactionnel final (volume : 20 µL). En définitive, le facteur de concentration dans la réaction finale sera de 1X.
- Volumes calculés dans le logiciel :

Nom de l'échantillon	Concentration de la solution mère (ng/µL)	Volume d'échantillon (µL)	Volume du diluant (µL)	Volume total de l'échantillon dilué (µL)
Foie	100,0	1,0	19,0	20,0
Rein	100,0	1,0	19,0	20,0

### Matériels nécessaires

- Eau pour diluer l'échantillon
- Microtubes
- Multipipettes
- Cônes à filtre
- Solution d'échantillon
- Vortex
- Centrifugeuse

### Préparation des dilutions d'échantillons

1. Étiqueter un microtube distinct pour chaque échantillon dilué :
  - **Foie**
  - **Rein**

### Remarques

2. Ajouter le volume d'eau requis dans chaque tube vide :

Tube	Nom de l'échantillon	Volume du diluant (µL)
1	Foie	19,0
2	Rein	19,0

3. Ajouter le volume de solution d'échantillon requis dans chaque tube :

Tube	Nom de l'échantillon	Volume d'échantillon (µL)
1	Foie	1,0
2	Rein	1,0

4. Vortexer chaque échantillon dilué pendant 3 à 5 secondes, puis centrifuger brièvement les tubes.

5. Placer les échantillons dilués sur la glace jusqu'à ce que la plaque de réactions soit prête.

### Instructions de préparation

Lors de la préparation d'une expérience de quantification relative par les courbes standard :

- Il est parfois nécessaire de diluer les échantillons car leur volume est limité à 10 % du volume réactionnel total dans le logiciel StepOne. Préparer les dilutions d'échantillons avant d'ajouter ces derniers au mélange réactionnel final.
- Pour que les essais TaqMan® Gene Expression Assays et Custom TaqMan® Gene Expression Assays produisent des performances optimales, utiliser 10 à 100 ng d'ADNc pour chaque 20 µL de réaction. Pour les réactifs Fast, Applied Biosystems recommande l'emploi de 10 ng.
- Utiliser du tampon TE ou de l'eau pour diluer l'échantillon.

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur les essais Applied Biosystems, voir les documents :

- *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
- *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*.

Remarques \_\_\_\_\_

## Préparation des gammes de dilutions standard

Préparer les gammes de dilutions standard en utilisant les volumes calculés par le logiciel StepOne (voir « Paramètres de l'onglet Reaction Mix Calculations (Calcul du mélange réactionnel) pour l'essai c-myc » à la page 35 et « Paramètres de l'onglet Reaction Mix Calculations (Calcul du mélange réactionnel) pour l'essai GAPDH » à la page 36) :

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple :

- La concentration du standard dans la solution mère est de 200 ng/μL.
- Volumes calculés dans le logiciel pour les essais c-myc et GAPDH :

Point de dilution	Source	Volume de la source (μL)	Volume du diluant (μL)	Volume total (μL)	Concentration du standard (ng/μL)
1 [200]	Solution mère	5,0	5,0	10,0	100,0
2 [20]	Dilution 1	1,0	9,0	10,0	10,0
3 [2]	Dilution 2	1,0	9,0	10,0	1,0
4 [0,2]	Dilution 3	1,0	9,0	10,0	0,1
5 [0,02]	Dilution 4	1,0	9,0	10,0	0,01

### Matériels nécessaires

- Eau pour diluer les standards
- Microtubes
- Multipipettes
- Cônes à filtre
- Solution de standard
- Vortex
- Centrifugeuse

### Préparation des gammes de dilutions standard pour l'essai c-myc

1. Étiqueter un microtube distinct pour chaque standard :
  - c-myc Std. 1
  - c-myc Std. 2
  - c-myc Std. 3
  - c-myc Std. 4
  - c-myc Std. 5

Remarques \_\_\_\_\_

2. Ajouter le volume d'eau requis dans chaque tube vide :

Tube	Nom du standard	Volume de diluant à ajouter (µL)
1	c-myc Std. 1	5,0
2	c-myc Std. 2	9,0
3	c-myc Std. 3	9,0
4	c-myc Std. 4	9,0
5	c-myc Std. 5	9,0

3. Préparer la dilution 1 dans le tube c-myc Std. 1 :

- a. Vortexer la solution mère pendant 3 à 5 secondes, puis centrifuger brièvement le tube.
- b. À l'aide d'un nouveau cône à filtre, ajouter 5,0 µL de solution mère au tube c-myc Std. 1.
- c. Vortexer le standard 1 pendant 3 à 5 secondes, puis centrifuger brièvement le tube.

4. Préparer la dilution 2 dans le tube c-myc Std. 2 :

- a. À l'aide d'un nouveau cône à filtre, ajouter 1,0 µL de dilution 1 au tube c-myc Std. 2.
- b. Vortexer le standard 2 pendant 3 à 5 secondes, puis centrifuger brièvement le tube.

5. Préparer la dilution 3 dans le tube c-myc Std. 3 :

- a. À l'aide d'un nouveau cône à filtre, ajouter 1,0 µL de dilution 2 au tube c-myc Std. 3.
- b. Vortexer le standard 3 pendant 3 à 5 secondes, puis centrifuger brièvement le tube.

6. Préparer la dilution 4 dans le tube c-myc Std. 4 :

- a. À l'aide d'un nouveau cône à filtre, ajouter 1,0 µL de dilution 3 au tube c-myc Std. 4.
- b. Vortexer le standard 4 pendant 3 à 5 secondes, puis centrifuger brièvement le tube.

7. Préparer la dilution 5 dans le tube c-myc Std. 5 :

- a. À l'aide d'un nouveau cône à filtre, ajouter 1,0 µL de dilution 4 au tube c-myc Std. 5.
- b. Vortexer le standard 5 pendant 3 à 5 secondes, puis centrifuger brièvement le tube.

Remarques \_\_\_\_\_

8. Placer les standards sur la glace jusqu'à ce que la plaque de réactions soit prête.

**Préparation des gammes de dilutions standard pour l'essai GAPDH**

1. Étiqueter un microtube distinct pour chaque standard :

- **GAPDH Std. 1**
- **GAPDH Std. 2**
- **GAPDH Std. 3**
- **GAPDH Std. 4**
- **GAPDH Std. 5**

2. Ajouter le volume d'eau requis dans chaque tube vide :

<b>Tube</b>	<b>Nom du standard</b>	<b>Volume de diluant à ajouter (µL)</b>
1	GAPDH Std. 1	5,0
2	GAPDH Std. 2	9,0
3	GAPDH Std. 3	9,0
4	GAPDH Std. 4	9,0
5	GAPDH Std. 5	9,0

3. Préparer la dilution 1 dans le tube GAPDH Std. 1 :

- a. Vortexer la solution mère pendant 3 à 5 secondes, puis centrifuger brièvement le tube.
- b. À l'aide d'un nouveau cône à filtre, ajouter 5,0 µL de solution mère au tube GAPDH Std. 1.
- c. Vortexer le standard 1 pendant 3 à 5 secondes, puis centrifuger brièvement le tube.

4. Préparer la dilution 2 dans le tube GAPDH Std. 2 :

- a. À l'aide d'un nouveau cône à filtre, ajouter 1,0 µL de dilution 1 au tube GAPDH Std. 2.
- b. Vortexer le standard 2 pendant 3 à 5 secondes, puis centrifuger brièvement le tube.

5. Préparer la dilution 3 dans le tube GAPDH Std. 3 :

- a. À l'aide d'un nouveau cône à filtre, ajouter 1,0 µL de dilution 2 au tube GAPDH Std. 3.
- b. Vortexer le standard 3 pendant 3 à 5 secondes, puis centrifuger brièvement le tube.

Remarques \_\_\_\_\_

6. Préparer la dilution 4 dans le tube GAPDH Std. 4 :
  - a. À l'aide d'un nouveau cône à filtre, ajouter 1,0 µL de dilution 3 au tube GAPDH Std. 4.
  - b. Vortexer le standard 4 pendant 3 à 5 secondes, puis centrifuger brièvement le tube.
7. Préparer la dilution 5 dans le tube GAPDH Std. 5 :
  - a. À l'aide d'un nouveau cône à filtre, ajouter 1,0 µL de dilution 4 au tube GAPDH Std. 5.
  - b. Vortexer le standard 5 pendant 3 à 5 secondes, puis centrifuger brièvement le tube.
8. Placer les standards sur la glace jusqu'à ce que la plaque de réactions soit prête.

### Instructions de préparation

Lors de la préparation d'une expérience de quantification relative par les courbes standard :

- Les standards ont une importance capitale pour obtenir une analyse précise des résultats de l'expérience.
- Toute erreur ou imprécision durant la préparation des dilutions affecte directement la qualité des résultats.
- La qualité des multipipettes et des cônes à filtre, ainsi que le soin apporté à la mesure et au mélange des dilutions, influencent la précision.
- Utiliser du tampon TE ou de l'eau pour diluer les standards.

## Préparation du mélange réactionnel

Préparer le mélange réactionnel en utilisant les composants et volumes calculés par le logiciel StepOne (voir « Paramètres de l'onglet Reaction Mix Calculations (Calcul du mélange réactionnel) pour l'essai c-myc » à la page 35 et « Paramètres de l'onglet Reaction Mix Calculations (Calcul du mélange réactionnel) pour l'essai GAPDH » à la page 36).

---

**Remarque :** Le logiciel calcule tous les composants des réactions de PCR. Toutefois, pour préparer le mélange réactionnel à l'aide des indications de cette section, ajouter uniquement le master mix, le mix primers-sonde et l'eau. Ajouter l'échantillon ou le standard pendant la préparation de la plaque (voir « Préparation de la plaque de réactions » à la page 61).

---

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple :

- Composants du mélange réactionnel :
  - Master mix TaqMan® Fast Universal PCR (2X)
  - Mix primers-sonde c-myc (20X)
  - Mix primers-sonde GAPDH (20X)

Remarques \_\_\_\_\_

– Eau

- Volumes calculés dans le logiciel pour les deux cibles :

Composant	Volume (µL) pour 1 réaction
Master mix (2,0X)	10,0
Mix primers-sonde (20,0X)	1,0
H <sub>2</sub> O	7,0
Volume total	18,0

Remarque : L'échantillon ou le standard n'est pas ajouté à ce stade.

### Matériels nécessaires

- Microtubes
- Multipipettes
- Cônes à filtre
- Composants du mélange réactionnel (voir ci-dessus)
- Centrifugeuse

### Préparation du mélange réactionnel

**IMPORTANT !** Préparer le mélange réactionnel séparément pour chaque essai cible.

1. Étiqueter un tube de taille adéquate pour chaque mélange réactionnel :
  - **Mélange réactionnel c-myc**
  - **Mélange réactionnel GAPDH**
2. Pour l'essai c-myc, ajouter les volumes requis de chaque composant dans le tube contenant le mélange réactionnel c-myc :

Composant	Volume (µL) pour 1 réaction	Volume (µL) pour 24 réactions (plus 10 % minimum)
Master mix TaqMan® Fast Universal PCR (2X)	10,0	264,0
Mix primers-sonde c-myc (20X)	1,0	26,4
Eau	7,0	184,8
<b>Volume total du mélange réactionnel</b>	18,0	475,2

### Remarques

3. Pour l'essai GAPDH, ajouter les volumes requis de chaque composant dans le tube contenant le mélange réactionnel GAPDH :

Composant	Volume ( $\mu\text{L}$ ) pour 1 réaction	Volume ( $\mu\text{L}$ ) pour 24 réactions (plus 10 % minimum)
Master mix TaqMan® Fast Universal PCR (2X)	10,0	264,0
Mix primers-sonde GAPDH (20X)	1,0	26,4
Eau	7,0	184,8
<b>Volume total du mélange réactionnel</b>	<b>18,0</b>	<b>475,2</b>

4. Mélanger le mélange réactionnel dans chaque tube en le pipétant et le refoulant délicatement plusieurs fois, puis boucher les tubes.
5. Centrifuger brièvement les tubes pour chasser les bulles d'air.
6. Placer les mélanges réactionnels sur la glace jusqu'à ce que la plaque de réactions soit prête.

### Instructions de préparation

Lors de la préparation d'une expérience de quantification relative par les courbes standard :

- Si l'expérience inclut plusieurs gènes cible, préparer distinctement le mélange réactionnel pour chacun d'eux.
- Inclure un excédent de volume dans les calculs pour compenser les pertes subies pendant le transfert des réactifs. Applied Biosystems recommande un excédent de volume d'au moins 10 %.
- 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 :

- *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
- *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*

Remarques \_\_\_\_\_

## Préparation de la plaque de réactions

Préparer les réactions pour chaque réplikat, puis les transférer dans la plaque de réactions. Utiliser le plan de plaque affiché dans le logiciel StepOne.

### À propos de l'exemple :

Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple :

- Une MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate est utilisée.
- Le volume réactionnel est de 20 µL/puits.
- Contenu de la plaque de réactions :
  - 12 puits inconnus **U**
  - 30 puits de standard **S**
  - 6 puits de contrôle négatif **N**
  - 0 puits vide
- Le plan de plaque automatiquement généré par le logiciel StepOne est utilisé :

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	N c-myc	N c-myc	N c-myc	N GAPDH	N GAPDH	N GAPDH	Liver U c-myc	Liver U c-myc
B	Liver U c-myc	Liver U GAPDH	Liver U GAPDH	Liver U GAPDH	Kidney U c-myc	Kidney U c-myc	Kidney U c-myc	Kidney U GAPDH
C	Kidney U GAPDH	Kidney U GAPDH	S c-myc 200	S c-myc 200	S c-myc 200	S c-myc 20	S c-myc 20	S c-myc 20
D	S c-myc 2	S c-myc 2	S c-myc 2	S c-myc 0.2	S c-myc 0.2	S c-myc 0.2	S c-myc 0.02	S c-myc 0.02
E	S c-myc 0.02	S GAPDH 200	S GAPDH 200	S GAPDH 200	S GAPDH 20	S GAPDH 20	S GAPDH 20	S GAPDH 2
F	S GAPDH 2	S GAPDH 2	S GAPDH 0.2	S GAPDH 0.2	S GAPDH 0.2	S GAPDH 0.02	S GAPDH 0.02	S GAPDH 0.02

### Matériels nécessaires

- Microtubes
- Multipipettes
- Cônes à filtre
- Mélange réactionnel c-myc (voir [page 59](#))
- Mélange réactionnel GAPDH (voir [page 59](#))
- Eau
- Standards c-myc (voir [page 55](#))
- Standards GAPDH (voir [page 57](#))
- Échantillons (voir [page 53](#))
- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Cover

### Remarques

- Centrifugeuse

## Préparation de la plaque

1. Pour chaque cible, préparer les réactions de contrôle négatif :

- a. Dans un tube de taille adéquate, ajouter les volumes de mélange réactionnel et d'eau indiqués ci-dessous.

Tube	Mélange réactionnel	Volume du mélange réactionnel (µL)	Volume d'eau (µL)
1	Mélange réactionnel c-myc	59,4	6,6
2	Mélange réactionnel GAPDH	59,4	6,6

- b. Mélanger la réaction en la pipétant et la refoulant délicatement plusieurs fois, puis boucher le tube.
- c. Centrifuger brièvement le tube pour chasser les bulles d'air.
- d. Ajouter 20 µL de la réaction de contrôle négatif dans les puits appropriés de la plaque de réactions.

2. Pour chaque réplicat, préparer les réactions standard :

- a. Dans des tubes de taille adéquate, ajouter les volumes de mélange réactionnel et de standard indiqués ci-dessous.

Tube	Réaction standard	Mélange réactionnel	Volume du mélange réactionnel (µL)	Standard	Volume de standard (µL)
1	c-myc Std 1	Mélange réactionnel c-myc	59,4	c-myc Std 1	6,6
2	c-myc Std 2	Mélange réactionnel c-myc	59,4	c-myc Std 2	6,6
3	c-myc Std 3	Mélange réactionnel c-myc	59,4	c-myc Std 3	6,6
4	c-myc Std 4	Mélange réactionnel c-myc	59,4	c-myc Std 4	6,6
5	c-myc Std 5	Mélange réactionnel c-myc	59,4	c-myc Std 5	6,6
6	GAPDH Std 1	Mélange réactionnel GAPDH	59,4	GAPDH Std 1	6,6

Remarques \_\_\_\_\_

Tube	Réaction standard	Mélange réactionnel	Volume du mélange réactionnel (µL)	Standard	Volume de standard (µL)
7	GAPDH Std 2	Mélange réactionnel GAPDH	59,4	GAPDH Std 2	6,6
8	GAPDH Std 3	Mélange réactionnel GAPDH	59,4	GAPDH Std 3	6,6
9	GAPDH Std 4	Mélange réactionnel GAPDH	59,4	GAPDH Std 4	6,6
10	GAPDH Std 5	Mélange réactionnel GAPDH	59,4	GAPDH Std 5	6,6

- b. Mélanger les réactions en les pipétant et les refoulant délicatement plusieurs fois, puis boucher les tubes.
- c. Centrifuger brièvement les tubes pour chasser les bulles d'air.
- d. Ajouter 20 µL de la réaction standard dans les puits appropriés de la plaque de réactions.

3. Pour chaque réplicat, préparer les réactions des échantillons inconnus :

- a. Dans des tubes de taille adéquate, ajouter les volumes de mélange réactionnel et d'échantillon indiqués ci-dessous.

Tube	Réaction inconnue	Mélange réactionnel	Volume du mélange réactionnel (µL)	Échantillon	Volume d'échantillon (µL)
1	Foie c-myc	Mélange réactionnel c-myc	59,4	Foie	6,6
2	Rein c-myc	Mélange réactionnel c-myc	59,4	Rein	6,6
3	Foie GAPDH	Mélange réactionnel GAPDH	59,4	Foie	6,6
4	Rein GAPDH	Mélange réactionnel GAPDH	59,4	Rein	6,6

- b. Mélanger les réactions en les pipétant et les refoulant délicatement plusieurs fois, puis boucher les tubes.
- c. Centrifuger brièvement les tubes pour chasser les bulles d'air.

Remarques \_\_\_\_\_

- d. Ajouter 20  $\mu\text{L}$  de la réaction d'échantillon inconnu dans les puits appropriés de la plaque de réactions.
4. Sceller la plaque de réactions avec un film adhésif optique.
5. Centrifuger brièvement la plaque de réactions pour chasser les bulles d'air.
6. Jusqu'au moment de démarrer la réaction de PCR, placer la plaque de réactions sur la glace dans l'obscurité.

**Instructions de préparation**

Lors de la préparation d'une expérience de quantification relative par les courbes standard :

- Contrôler la liste des consommables utilisés.
- Vérifier que l'agencement des réactions de PCR correspond au plan de plaque affiché dans le logiciel StepOne. Deux choix sont possibles :
  - Accepter le plan de plaque généré automatiquement par le logiciel.
  - ou*
  - Utiliser le workflow Advanced Setup (Configuration avancée) pour modifier le plan de plaque dans le logiciel.

**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 :
  - *TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays Protocol*
  - *Custom TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays Protocol*
- Les consommables, voir « [Consommables compatibles](#) » à la page 3.
- L'utilisation du workflow Advanced Setup (Configuration avancée) pour modifier le plan de plaque, voir « [Workflow Advanced Setup \(Configuration avancée\)](#) » à la page 196.

Remarques \_\_\_\_\_

## 4

# Réalisation des réactions de quantification relative par la méthode des courbes standards

Sommaire du chapitre :

■ Présentation du chapitre .....	66
■ Préparation de la réaction de PCR .....	67
■ (Facultatif) Activation des notifications .....	69
■ Démarrage de la réaction de PCR .....	71
■ Suivi de la réaction de PCR .....	75
■ Retrait de la plaque de réactions et transfert des données .....	84

**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.

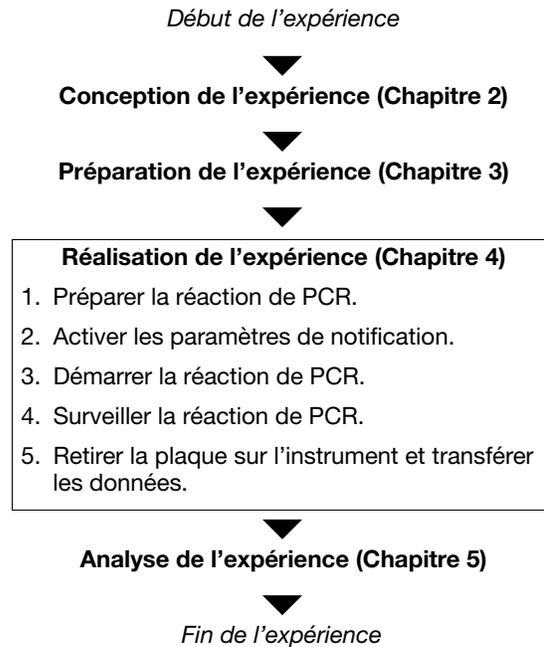
## Remarques

## Présentation du chapitre

Ce chapitre explique comment réaliser une réaction sur le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™.

### Workflow de l'exemple

Le workflow de l'exemple fourni avec ce guide de mise en route est indiqué ci-dessous.



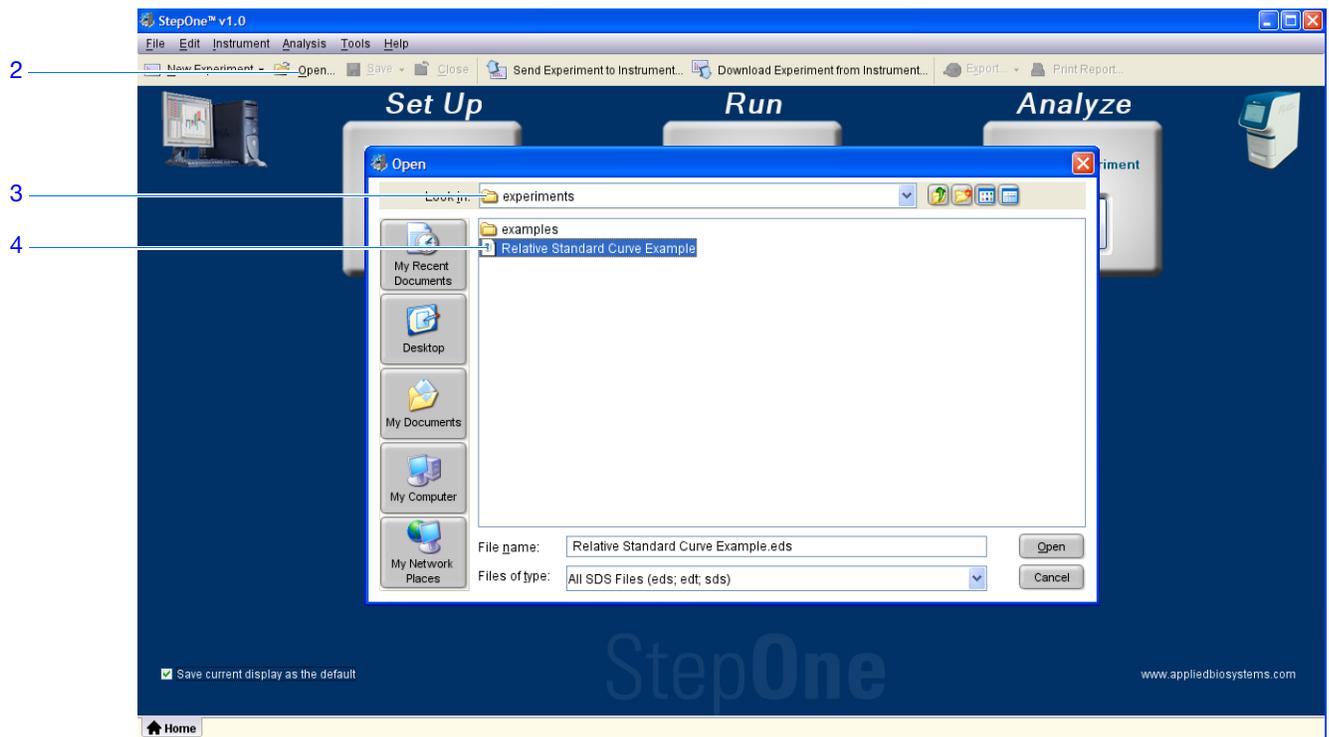
Remarques \_\_\_\_\_

## 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'exemple

1. Si le logiciel StepOne™ n'est pas déjà en cours d'exécution, double-cliquer sur le raccourci du logiciel StepOne (  ) ou sélectionner **Start ▶ (Démarrer) All Programs ▶ (Tous les programmes) Applied Biosystems ▶ StepOne ▶ StepOne v1.0**.
2. Dans l'écran Home (Accueil), cliquer sur **Open** (Ouvrir).
3. Dans la fenêtre Open (Ouvrir), accéder au dossier **experiments** (par défaut).
4. Double-cliquer sur **Relative Standard Curve Example** (Exemple de quantification relative par les courbes standard) pour ouvrir le fichier d'exemple créé au [Chapitre 2](#).



### 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.

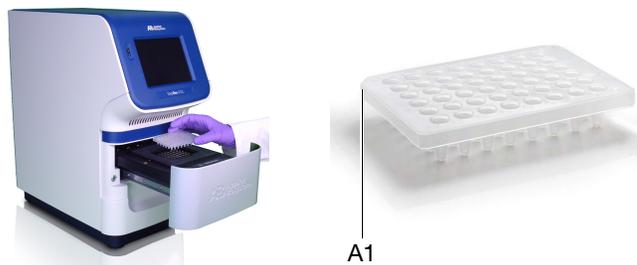
1. Ouvrir le tiroir de l'instrument.



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.



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 commande l'instrument StepOne *et* s'il 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 80.

### À propos 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. Dans le champ Enter e-mail addresses for notifications (Entrer les adresses électroniques des notifications), entrer : **scientifique@monlabo.com, superviseur@monlabo.com, technicien@monlabo.com**.
6. Dans le champ Outgoing Mail Server (SMTP) (Serveur de messagerie sortant (SMTP)), 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. Dans le champ User Name (Nom d'utilisateur), entrer **supervisor**.
  - c. Dans le champ Password (Mot de passe), 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 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) sur le réseau LAN ;
  - 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

---

## Démarrage de la réaction de PCR

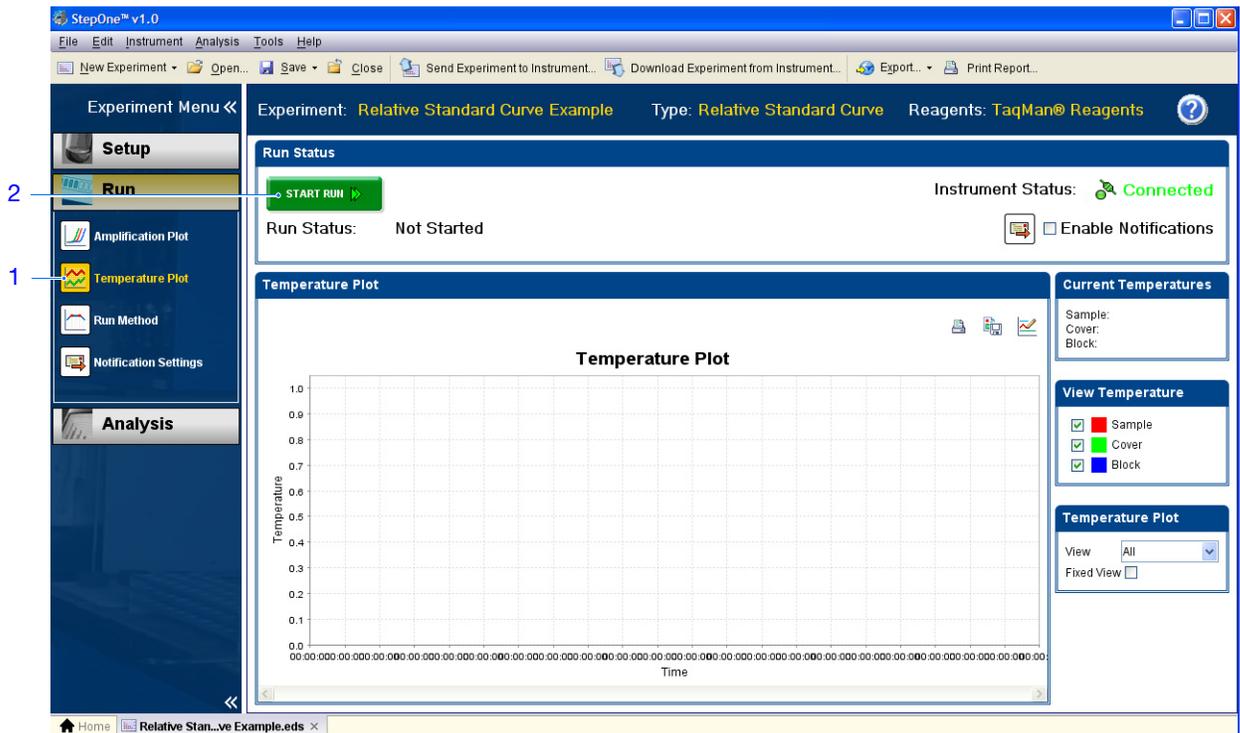
Démarrer la réaction de PCR conformément à la configuration de l'instrument StepOne. Le mode de démarrage de la réaction dépend de la configuration du système StepOne :

Configuration	Description	Voir...
Co-localisée	Le câble jaune du système StepOne relie l'ordinateur à l'instrument StepOne	« Démarrage en configuration autonome » ci-dessous
Autonome	<ul style="list-style-type: none"> <li>L'ordinateur et l'instrument StepOne ne sont pas connectés ou</li> <li>L'ordinateur et l'instrument StepOne sont connectés au même réseau.</li> </ul>	« Démarrage en configuration autonome » à la page 72

### Démarrage en configuration autonome

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 en configuration 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.

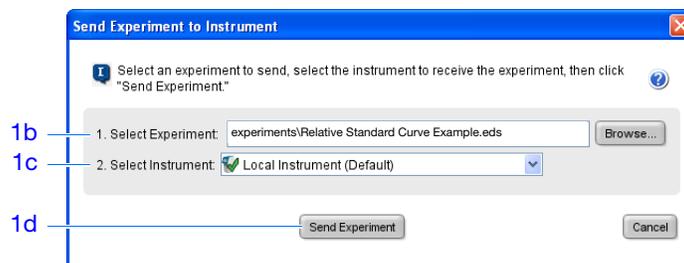
- a. Dans le logiciel StepOne, cliquer sur  **Send Experiment to Instrument** (Envoyer l'expérience à l'instrument).

- b. Dans la fenêtre Send Experiment to Instrument (Envoyer l'expérience à l'instrument), cliquer sur **Browse** (Parcourir), sélectionner le fichier **Relative Standard Curve 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 Applied Biosystems StepOne™*.

- 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 6.

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.

- a. Connecter la clé USB à l'un des ports USB de l'ordinateur.

- b. Dans le logiciel StepOne, sélectionner  **Save** (Enregistrer) ► **Save As** (Enregistrer sous).

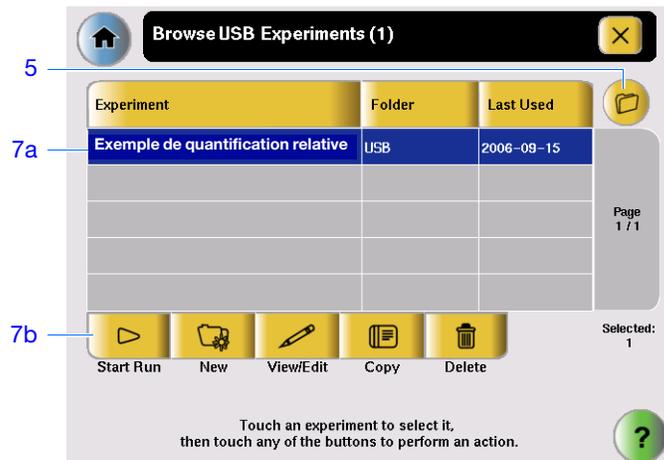
- c. Dans la fenêtre Save (Enregistrer), accéder à la clé USB, puis cliquer sur **Save** (Enregistrer).

- d. Retirer la clé USB de l'ordinateur, puis la connecter au port USB de l'instrument StepOne.

## Remarques

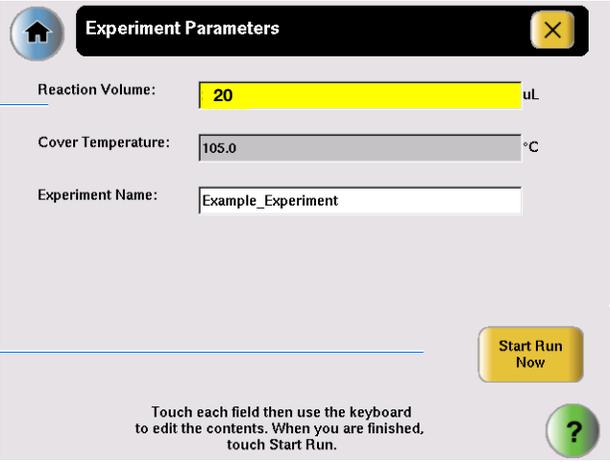


3. Toucher l'écran tactile de l'instrument StepOne, puis toucher .
4. Dans l'écran Main Menu (Menu principal), toucher **Browse Experiments** (Rechercher une expérience).
5. Dans l'écran Browse Methods (Rechercher une méthode), toucher  (Folders) (Dossiers).
6. Dans l'écran Choose an Experiment Category (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.
7. Dans l'écran Browse USB/Default Experiments (Rechercher une expérience dans la clé USB/par défaut) :
  - a. Toucher **Relative Standard Curve Example** (Exemple de quantification relative par les courbes standard) pour sélectionner l'expérience.
  - b. Toucher  **Start Run** (Démarrer la réaction de PCR).



Remarques

8. Dans l'écran Run Parameters (Paramètres de la réaction) :
- Toucher le champ **Reaction Volume** (Volume réactionnel), utiliser le pavé numérique pour entrer **20**  $\mu\text{L}$ , puis toucher **Done** (Terminé).
  - Toucher **Start Run** (Démarrer la réaction de PCR).



8a

8b

Touch each field then use the keyboard to edit the contents. When you are finished, touch Start Run.

Remarques

## Suivi 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 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 80
Autonome (de base)	L'ordinateur et l'instrument StepOne ne sont pas connectés.	« Surveillance en configuration autonome » à la page 83

### Surveillance en configuration 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.

N°	Pour...	Action
A	Arrêter la réaction	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dans le logiciel StepOne, cliquer sur <b>STOP RUN</b> (Arrêter la réaction).</li> <li>2. Dans la fenêtre Stop Run (Arrêter la réaction), cliquer sur l'un des éléments suivants : <ul style="list-style-type: none"> <li>– <b>Stop Immediately</b> (Arrêter immédiatement) pour interrompre instantanément le processus.</li> <li>– <b>Stop after Current Cycle/Hold</b> (Arrêter après le cycle/le maintien en cours) pour interrompre la réaction après le cycle ou le maintien de température en cours.</li> <li>– <b>Cancel</b> (Annuler) pour poursuivre la réaction.</li> </ul> </li> </ol>
B	Afficher en temps réel les données d'amplification	Sélectionner  <b>Amplification Plot</b> (Courbe d'amplification). Voir « À propos de l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) » à la page 77.
C	Afficher en temps réel les données de température de la réaction	Sélectionner  <b>Temperature Plot</b> (Courbe des températures). Voir « À propos de l'écran Temperature Plot (Courbe des températures) » à la page 78.
D	Afficher la progression de la réaction dans l'écran Run Method (Profil de thermocyclage)	Sélectionner  <b>Run Method</b> (Profil de thermocyclage). Voir « À propos de l'écran Run Method (Profil de thermocyclage) » à la page 79.

### Remarques

N°	Pour...	Action
E	Activer/désactiver les paramètres de notification	Activer ou désactiver l'option <b>Enable Notifications</b> (Activer les notifications).

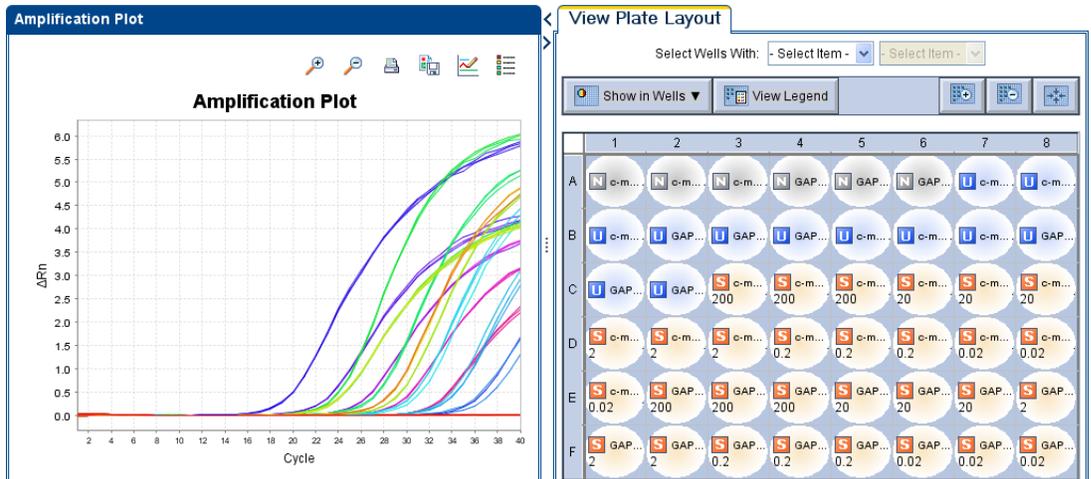
The screenshot displays the StepOne v1.0 software interface. The top menu bar includes File, Edit, Instrument, Analysis, Tools, and Help. The main window title is "Experiment: Relative Standard Curve Example Type: Relative Standard Curve Reagents: TaqMan® Reagents". The interface is divided into several sections:

- Experiment Menu (Left):** Contains buttons for Setup (A), Run (B), Amplification Plot, Temperature Plot (C), Run Method (D), Notification Settings, and Analysis.
- Run Status (Top Center):** Shows a "STOP RUN" button, "Estimated Time Remaining: 56 min 22 sec", and "Instrument Status: Connected". Below this, it displays "Run Status: 1/1" and an "Enable Notifications" checkbox (E).
- Temperature Plot (Center):** A graph with "Temperature" on the y-axis (0.0 to 1.0) and "Time" on the x-axis (00:00:00.000000 to 00:00:00.000000).
- Current Temperatures (Right):** A panel showing "Sample:", "Cover:", and "Block:".
- View Temperature (Right):** A panel with checkboxes for "Sample" (red), "Cover" (green), and "Block" (blue).
- Temperature Plot (Right):** A panel with a "View" dropdown set to "All" and a "Fixed View" checkbox.

Remarques \_\_\_\_\_

### À propos de l'écran Amplification Plot (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, l'écran Amplification Plot (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 ( $\Delta R_n$ ) et le nombre de cycles. L'illustration ci-dessous montre l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) tel qu'il apparaît pendant l'exemple.



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 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).

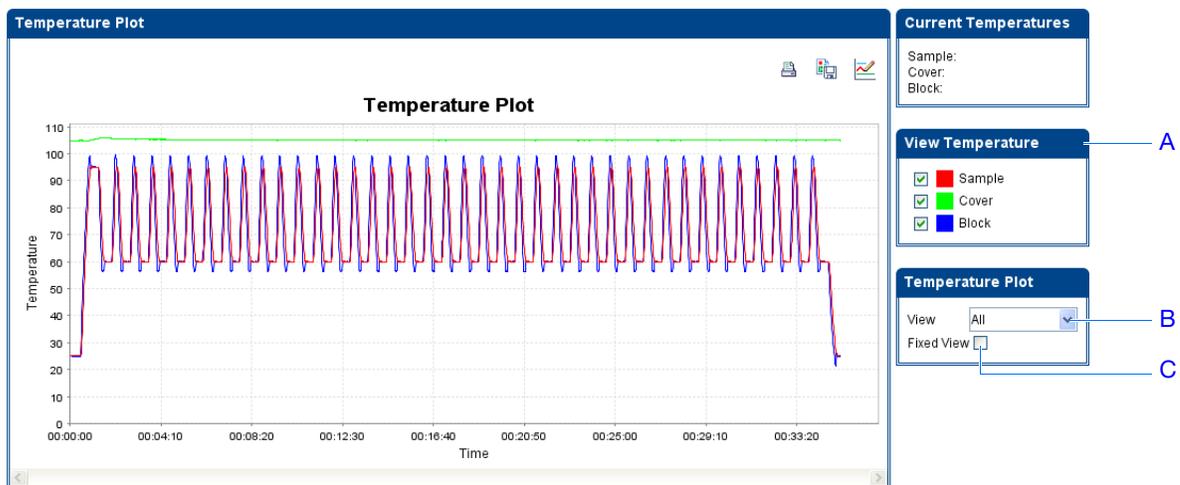
**Remarque :** Pour afficher les données dans l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification), sélectionner les puits à afficher dans l'onglet View Plate Layout (Voir le plan de plaque).

### Remarques

### À propos de l'écran Temperature Plot (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 (calculés). 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 <b>Sample</b> (Échantillon), <b>Heated Cover</b> (Couvercle chauffant) ou <b>Sample Block</b> (Bloc) pour afficher ou masquer les données correspondantes dans la courbe.
B	Modifier l'heure indiquée par la courbe	Sélectionner <b>View</b> (Afficher) ▶ Time Duration (Durée).
C	Figer l'axe Y de la courbe	Sélectionner <b>Fixed View</b> (Affichage fixe).



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

- En général, les courbes de l'échantillon 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.

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).

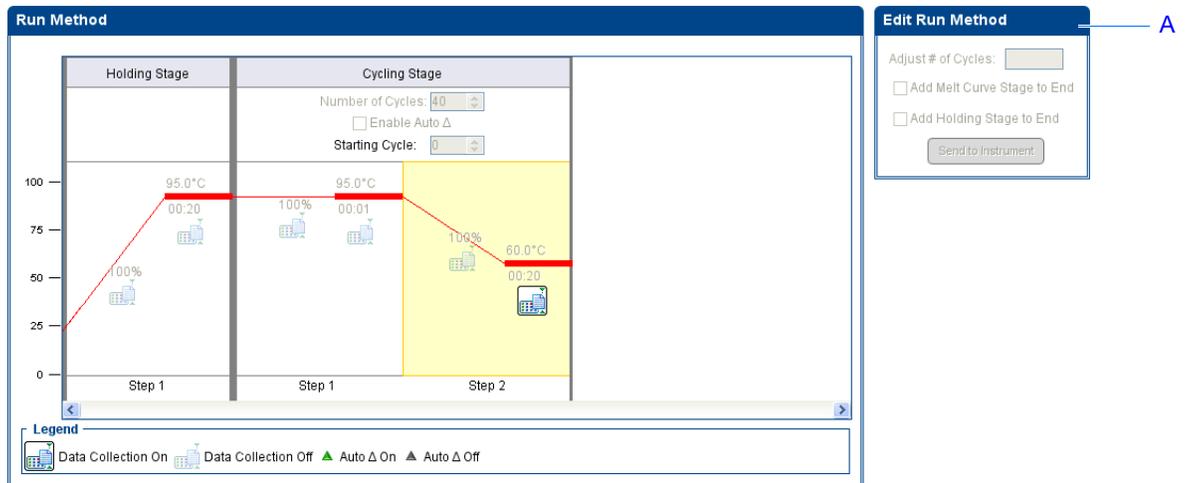
**Remarque :** La température de l'échantillon affichée dans le groupe Current Temperatures (Températures actuelles) est une estimation.

#### Remarques

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



**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).

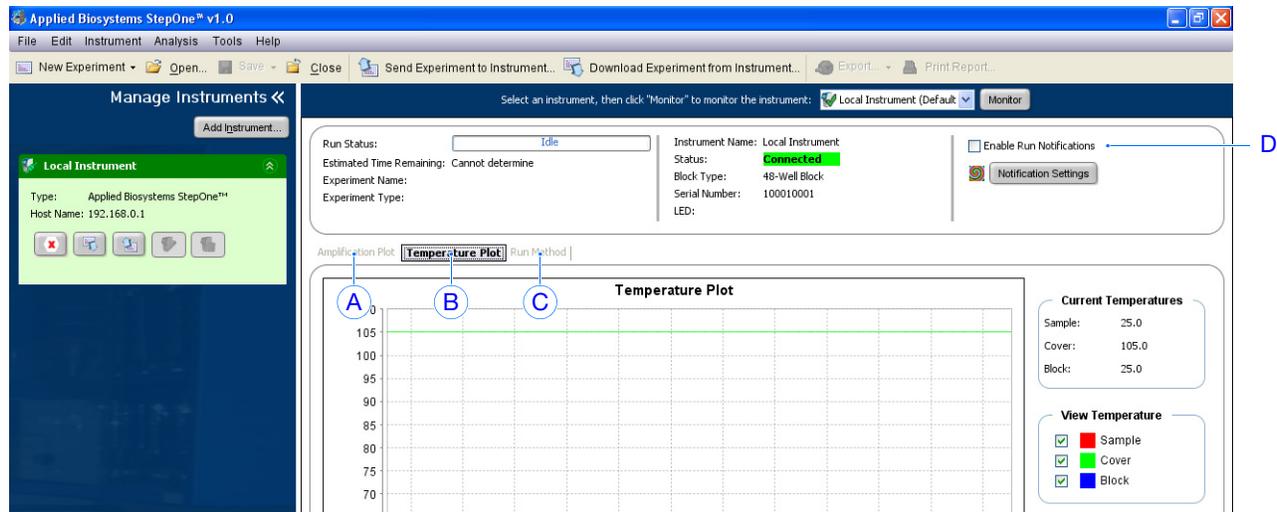
### Remarques

## 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.

N°	Pour...	Action
A	Afficher en temps réel les données d'amplification	Cliquer sur <b>Amplification Plot</b> (Courbe d'amplification). Voir « À propos de l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) » à la page 77.
B	Afficher en temps réel les données de température de la réaction	Cliquer sur <b>Temperature Plot</b> (Courbe des températures). Voir « À propos de l'écran Temperature Plot (Courbe des températures) » à la page 78.
C	Afficher la progression de la réaction dans l'écran Run Method (Profil de thermocyclage)	Cliquer sur <b>Run Method</b> (Profil de thermocyclage). Voir « À propos de l'écran Run Method (Profil de thermocyclage) » à la page 79.
D	Activer/désactiver les paramètres de notification	Activer ou désactiver l'option <b>Enable Notifications</b> (Activer les notifications). Voir « (Facultatif) Activation des notifications » à la page 69.

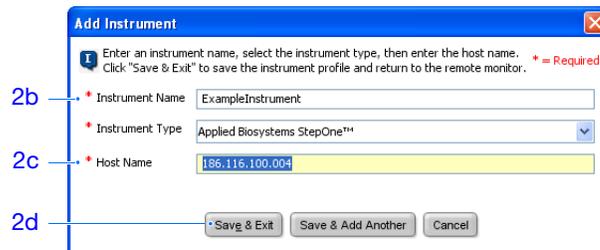


Pour surveiller l'instrument StepOne à distance :

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 :

## Remarques

- 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 de l'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

The screenshot displays the Applied Biosystems StepOne v1.0 software interface. On the left, the 'Manage Instruments' panel shows a 'Local Instrument' with the following details:

- Type: Applied Biosystems StepOne™
- Host Name: 192.168.0.1

Three blue arrows point to the 'Local Instrument' header, the instrument details box, and the control icons (refresh, stop, start, print) respectively.

The main area shows the 'Run Status' as 'Idle' and the instrument as 'Connected'. A 'Temperature Plot' graph is displayed, showing temperature over time. The y-axis is labeled 'Temperature' and ranges from 0 to 110. The x-axis is labeled 'Time' and ranges from 00:02:30 to 00:11:40. The plot shows a red line for 'Sample' at approximately 25.0°C and a green line for 'Cover' at approximately 105.0°C. A blue line for 'Block' is also present at 25.0°C.

On the right side of the plot, there are control panels for 'Current Temperatures', 'View Temperature', and 'View Chart'.

Component	Temperature (°C)
Sample	25.0
Cover	105.0
Block	25.0

The 'View Temperature' panel shows checkboxes for 'Sample', 'Cover', and 'Block', all of which are checked. The 'View Chart' panel shows a 'View' dropdown set to '10 Minutes' and a 'Fixed View' checkbox that is unchecked.

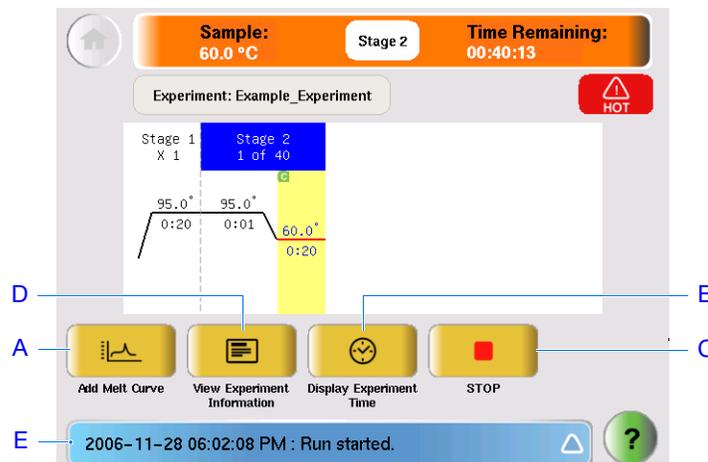
The bottom status bar indicates 'Local Instrument : connected.'

## Remarques

**Surveillance en configuration 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.

N°	Pour...	Action
A	Ajouter une phase de dissociation à la réaction	Toucher  (Add Dissociation Curve (Ajouter une courbe de dissociation)), puis <b>OK</b> .
B	Afficher la durée restante pour la réaction	Toucher <b>Display Method Time</b> (Afficher la durée de la méthode), puis <b>X</b> pour revenir à l'écran Run Method (Profil de thermocyclage).
C	Arrêter la réaction	Toucher <b>Stop</b> (Arrêter), puis : <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Stop</b> (Arrêter) pour interrompre la réaction une fois que l'instrument StepOne a terminé le cycle ou le maintien de température en cours ;</li> <li>• <b>Abort</b> (Annuler) pour interrompre immédiatement la réaction ;</li> <li>• <b>X</b> pour continuer la réaction sans apporter de modification.</li> </ul>
D	Afficher les informations sur l'expérience	Toucher <b>View Method Information</b> (Afficher les informations sur la méthode) puis <b>X</b> 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 Run History (Historique de la réaction), retirer la plaque de réactions 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 Run Report (Rapport de la PCR) 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.

### 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.	« Transfert de données à distance » à la page 85
Autonome (de base)	L'ordinateur et l'instrument StepOne ne sont pas connectés.	« Transfert de données en configuration autonome » à la page 86

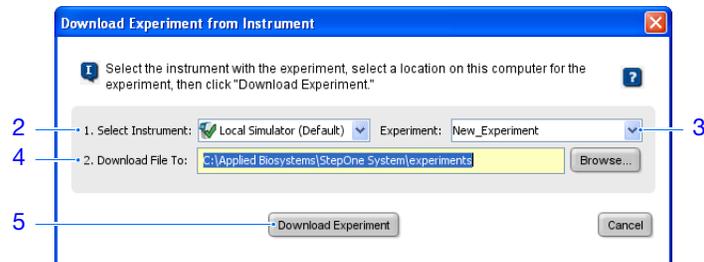
**Transfert de données en configuration co-localisée**

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 vers l'instrument StepOne après la réaction.

**Transfert de données à distance**

Si l'ordinateur et l'instrument StepOne sont connectés au même réseau Ethernet, envoyer l'expérience sur 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) ▶ **Relative Standard Curve Example** (Exemple de quantification relative par les courbes standard).
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

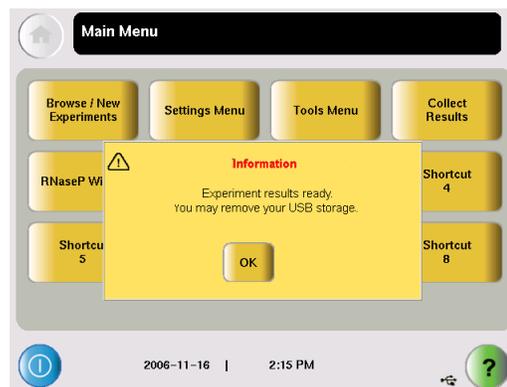
### Transfert de données en configuration autonome

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

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 à nouveau **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 Relative Standard Curve Example.eds à l'emplacement :  
<lecteur>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments  
où <lecteur> est le disque dur de l'ordinateur sur lequel le logiciel StepOne est installé. Le disque dur utilisé par défaut pour l'installation du logiciel est le lecteur C.

#### Remarques

## 5

# Analyse de l'expérience de quantification relative par la méthode des courbes standards

Sommaire du chapitre :

- Présentation du chapitre ..... 88
- Section 5.1 Analyse des résultats ..... 89
- Section 5.2 Identification des causes d'erreurs (si nécessaire) ..... 107

**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

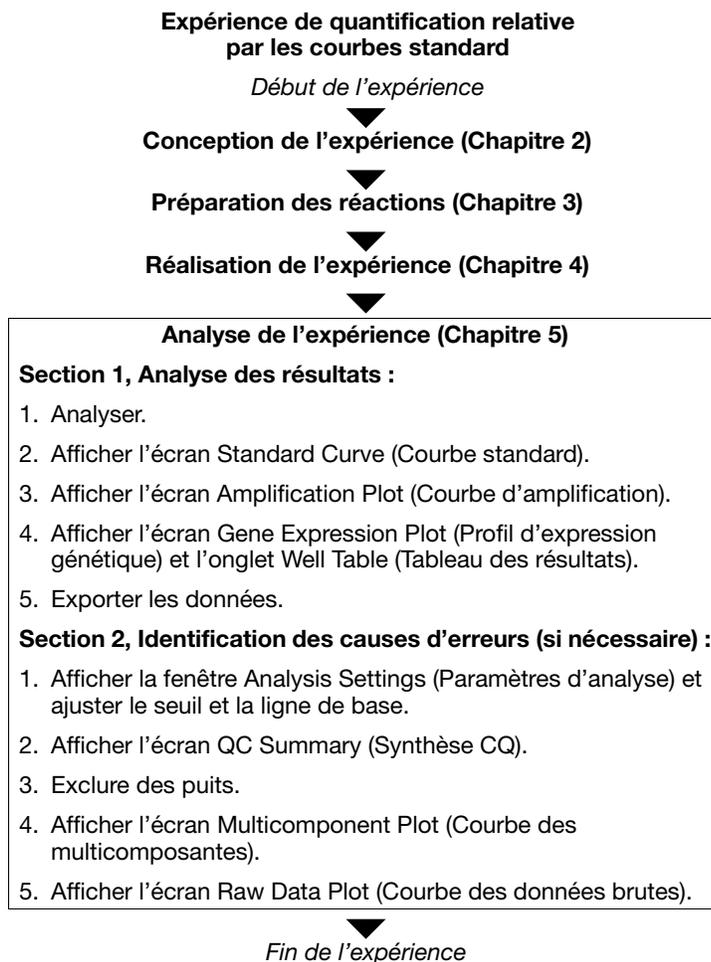
## Présentation du chapitre

Le logiciel StepOne™ analyse les données à l'aide de la méthode de quantification relative par les courbes standard. La section 1 de ce chapitre explique comment vérifier les données analysées avec plusieurs écrans d'analyse et comment les exporter. En cas de résultats ambigus, la section 2 explique comment identifier les causes possibles des imprécisions.

**Remarque :** L'exemple de quantification relative par les courbes standard inclut quatre puits accompagnés d'un code d'alerte. Les codes d'alerte reflètent les problèmes courants susceptibles de survenir lors de la réalisation des expériences. Les procédures d'affichage des codes d'alerte et d'exclusion de puits sont fournies dans ce guide.

### Workflow de l'exemple

Le workflow d'analyse de l'exemple fourni avec ce guide de mise en route est indiqué ci-dessous.



Remarques \_\_\_\_\_

## Section 5.1 Analyse des résultats

---

Sommaire de la section :

■ Analyse de l'expérience .....	90
■ Affichage de la courbe standard .....	95
■ Affichage des courbe d'amplification.....	98
■ Affichage du profil d'expression génétique et du tableau des résultats .....	103
■ Export des données .....	105

Remarques \_\_\_\_\_

## Analyse de l'expérience

Le logiciel StepOne analyse l'expérience et affiche les résultats dans les écrans d'analyse (par exemple les écrans Amplification Plot (Courbe d'amplification), QC Summary (Synthèse CQ), etc.).

### À propos de l'exemple

Pour l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple, utiliser le fichier de données installé avec le logiciel StepOne. Il a été créé à l'aide des paramètres de conception fournis au [Chapitre 2](#), puis exécuté et analysé sur un instrument StepOne™.

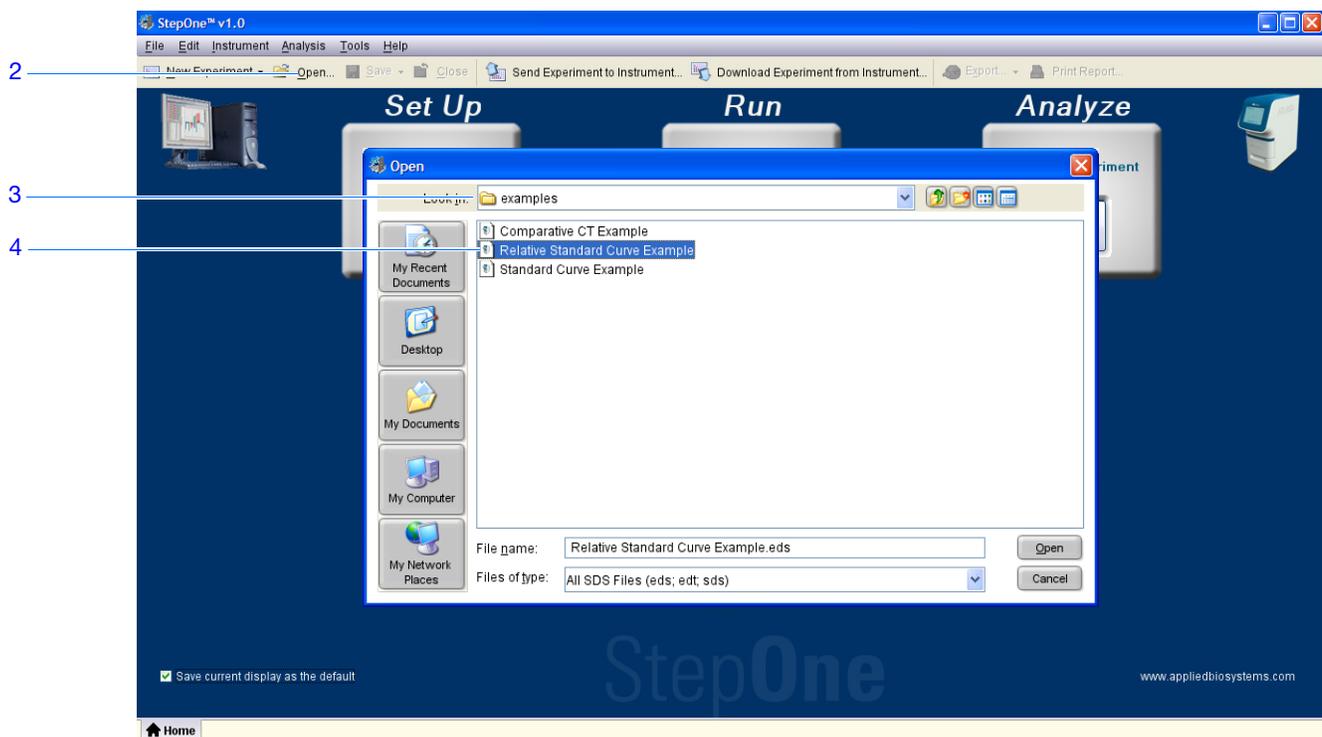
Le fichier de données de l'exemple est disponible sur l'ordinateur à l'emplacement suivant :

<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 dur utilisé par défaut pour l'installation du logiciel est le lecteur C.

### Analyse de l'exemple

1. S'il n'est pas déjà en cours d'exécution, double-cliquer sur le raccourci du logiciel StepOne (  ) ou sélectionner **Start** ▶ (Démarrer) **All Programs** ▶ (Tous les programmes) **Applied Biosystems** ▶ **StepOne** ▶ **StepOne v1.0**.
2. Dans l'écran Home (Accueil), cliquer sur **Open** (Ouvrir).
3. Dans la fenêtre Open (Ouvrir), accéder au dossier **examples**.
4. Double-cliquer sur **Relative Standard Curve Example** (Exemple de quantification relative par les courbes standard) pour ouvrir le fichier de données de l'exemple.



Remarques \_\_\_\_\_

5. Cliquer sur **Analyze** (Analyser). Le logiciel analyse les données en utilisant les paramètres d'analyse par défaut.



6. Voir « **Éléments du logiciel** » ci-dessous et « **Conseils de navigation** » à la page 93 pour plus d'informations sur la navigation dans les écrans d'analyse.

**Instructions** Lors de l'analyse d'une expérience de quantification relative par les courbes standard :

- Immédiatement après une réaction, le logiciel StepOne analyse automatiquement les données en utilisant les paramètres d'analyse par défaut, puis il affiche l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) sur l'ordinateur.
- Pour réanalyser les données, sélectionner tous les puits du plan de plaque, puis cliquer sur **Analyze** (Analyser).

**Éléments du logiciel** Les éléments du logiciel StepOne présents dans les écrans d'analyse sont illustrés ci-dessous.

1. Barre de menus – Affiche les menus disponibles dans le logiciel :
  - File (Fichier)
  - Edit (Édition)
  - Instrument
  - Analysis (Analyse)
  - Tools (Outils)
  - Help (Aide)
2. Barre d'outils – Affiche les outils disponibles dans le logiciel :
  - New Experiment (Nouvelle expérience)
  - Open (Ouvrir)
  - Save (Enregistrer)
  - Close (Fermer)
  - Send Experiment to Instrument (Envoyer une expérience à l'instrument)
  - Download Experiment from Instrument (Télécharger une expérience à partir de l'instrument)
  - Export (Exporter)
  - Print Report (Imprimer un rapport)
3. En-tête de l'expérience – Affiche le type et le nom de l'expérience, ainsi que les réactifs requis pour l'expérience ouverte.

Remarques \_\_\_\_\_

4. Panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience) – Fournit des liens vers les écrans suivants du logiciel :
  - Écrans de configuration
  - Écrans de lancement
  - Écrans d'analyse :
    - Amplification Plot (Courbe d'amplification)
    - Standard Curve (Courbe standard)
    - Gene Expression (Expression génétique)
    - Multicomponent Plot (Courbe des multicomposantes)
    - Raw Data Plot (Courbe des données brutes)
    - QC Summary (Synthèse CQ)
    - Multiple Plots View (Voir plusieurs courbes)
5. Panneau Plot (Courbe) – Affiche l'écran d'analyse sélectionné pour l'expérience ouverte.
6. Onglets View (Voir) – Montrent le plan de plaque ou le tableau des résultats de l'expérience ouverte.
7. Onglets Experiment (Expérience) – Affichent un onglet pour chaque expérience ouverte.

The screenshot displays the StepOne v1.0 software interface. The top menu bar includes File, Edit, Instrument, Analysis, Tools, and Help. Below the menu bar, there are buttons for New Experiment, Open, Save, Close, Send Experiment to Instrument, Download Experiment from Instrument, Export, and Print Report. The main interface is divided into several sections:

- Experiment Menu (3):** A vertical sidebar on the left containing buttons for Setup, Run, Analysis, Amplification Plot, Standard Curve, Gene Expression, Multicomponent Plot, Raw Data Plot, QC Summary, and Multiple Plots View.
- Amplification Plot (5):** A central graph showing the amplification curve with ΔRn on the y-axis and Cycle on the x-axis. Below the graph are options for Target, Threshold, and Baseline.
- View Plate Layout (6):** A grid of wells showing results for various samples. The grid includes columns for wells 1-8 and rows for samples A-F. Each well contains a color-coded icon and numerical data (Ct values).
- Analysis Summary (7):** A status bar at the bottom showing Total Wells in Plate: 48, Wells Set Up: 48, Wells Processed: 48, Wells Flagged: 4, Wells Omitted from Analysis: 0, Samples Used: 2, and Targets Used: 2.

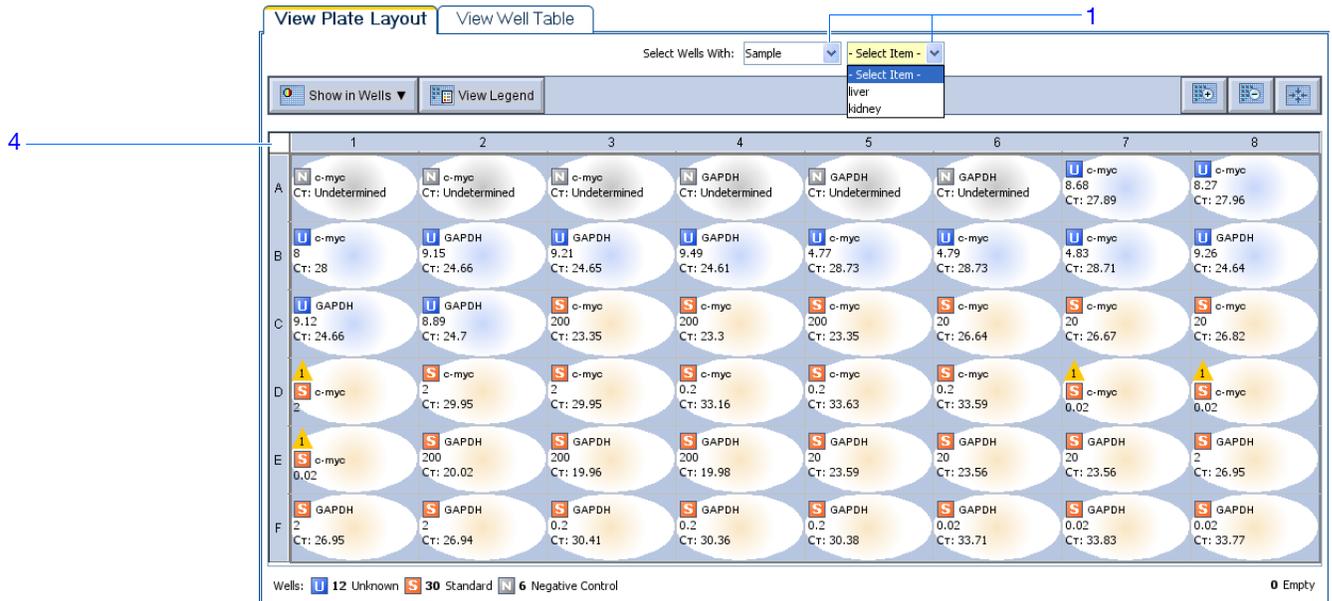
## Remarques

**Conseils de navigation**

**Sélection d'un puits**

Pour afficher certains puits dans les écrans d'analyse, les sélectionner dans l'onglet View Plate Layout (Voir le plan de plaque) comme suit :

1. Pour sélectionner un puits d'un type particulier, utiliser les menus déroulants **Select Wells With** (Sélectionner les puits avec). Sélectionner **Sample** (Échantillon), **Target** (Cible) ou **Task** (Fonction), puis le nom de l'échantillon, de la cible ou de la fonction.
2. Pour sélectionner un seul puits, cliquer dessus dans le plan de plaque.
3. Pour sélectionner plusieurs puits, cliquer sur un premier puits et former un rectangle de sélection contenant les autres puits tout en maintenant le bouton de la souris enfoncé, appuyer sur **Ctrl** et cliquer sur chaque puits ou appuyer sur **Maj** et cliquer sur des puits adjacents dans le plan de plaque.
4. Pour sélectionner les 48 puits, cliquer sur le coin supérieur gauche du plan de plaque.



Remarques

### Affichage de plusieurs courbes

Utiliser l'écran Multiple Plots (Plusieurs courbes) pour afficher jusqu'à quatre courbes en même temps. Pour naviguer dans l'écran Multiple Plots (Plusieurs courbes) :

1. Dans le panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience), sélectionner **Analysis (Analyse)** ►  **Multiple Plots View** (Afficher plusieurs courbes).
2. Pour afficher quatre courbes, cliquer sur  **Show plots in a 2 × 2 matrix** (Afficher les courbes dans un cadre 2X2).
3. Pour afficher deux courbes superposées, cliquer sur  **Show plots in two rows** (Afficher les courbes sur deux lignes).
4. Pour afficher deux courbes juxtaposées, cliquer sur  **Show plots in two columns** (Afficher les courbes sur deux colonnes).
5. Pour afficher une courbe particulière, la sélectionner dans le menu déroulant au-dessus de chaque affichage.



Remarques \_\_\_\_\_

## Affichage de la courbe standard

L'écran Standard Curve (Courbe standard) affiche la courbe standard des échantillons désignés comme étant des standards. Le logiciel StepOne calcule la quantité d'une cible inconnue à partir de la courbe standard.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple, consulter l'écran Standard Curve (Courbe standard) pour repérer les valeurs suivantes :

- Pente/efficacité de l'amplification
- Valeur  $R^2$  (coefficient de corrélation)
- Valeurs  $C_T$

### Affichage de la courbe standard

1. Dans le panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience), sélectionner **Analysis (Analyse)** ►  **Standard Curve (Courbe standard)**.

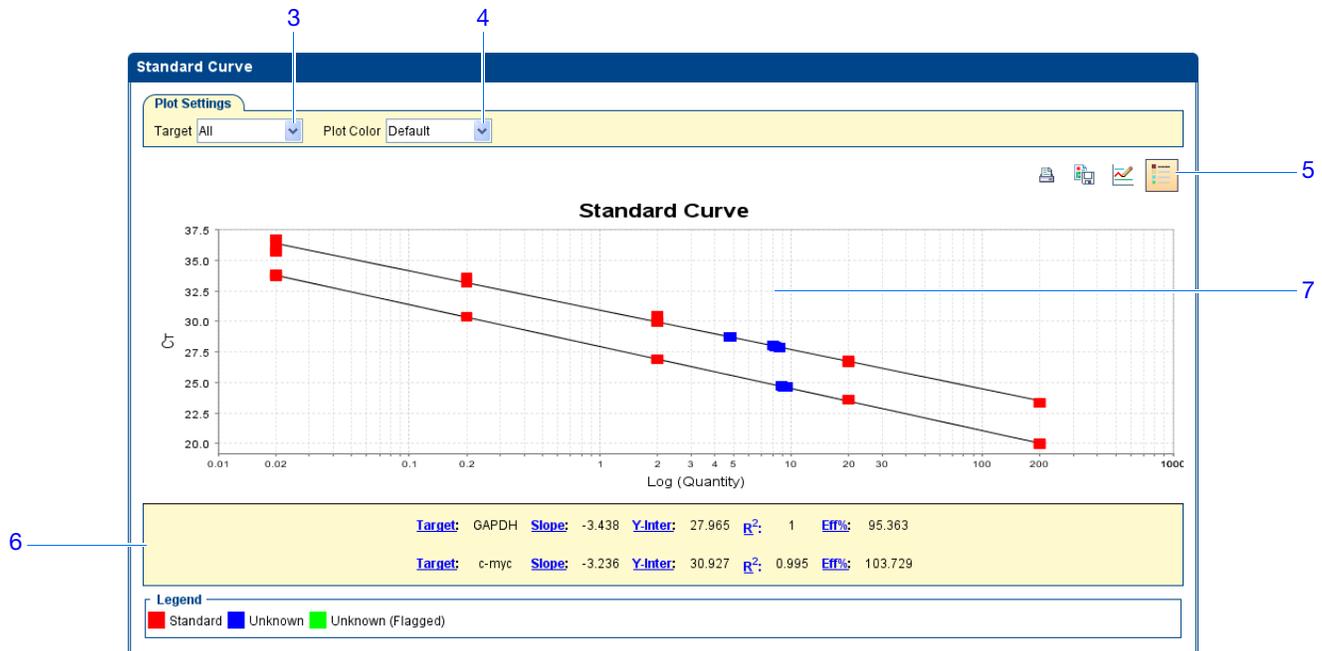
**Remarque :** Si l'écran Standard Curve (Courbe standard) ne contient pas de données, cliquer sur **Analyze (Analyser)**.

2. Dans l'onglet View Plate Layout (Voir le plan de plaque), cliquer sur le coin supérieur gauche du plan de plaque pour afficher les 48 puits dans l'écran Standard Curve (Courbe standard).
3. Dans le menu déroulant Target (Cible), sélectionner **All (Tout)**.
4. Dans le menu déroulant Plot Color (Couleur de la courbe), sélectionner **Default (Par défaut)**.
5. Cliquer sur  **Show/Hide the plot legend (Afficher/masquer la légende de la courbe)**.
6. Afficher les valeurs figurant sous la courbe standard. Dans l'exemple, les valeurs de chaque cible sont comprises dans les intervalles acceptables :

Cible	Pente	Valeur $R^2$	Efficacité de l'amplification (Eff%)
GAPDH	-3,438	1	95,363
c-myc	-3,236	0,995	103,729

7. Vérifier que tous les échantillons se situent sur la courbe standard. Dans l'exemple, tous les échantillons (points bleus) se situent sur la courbe standard (points rouges).

### Remarques



**8. Vérifier les valeurs  $C_T$  :**

- Cliquer sur l'onglet **View Well Table** (Voir le tableau des résultats).
- Dans le menu déroulant Group By (Grouper par), sélectionner **Replicate** (Réplicat).
- Examiner les valeurs dans la colonne  $C_T$ . Dans l'exemple, les valeurs  $C_T$  sont comprises dans l'intervalle attendu ( $>8$  et  $<35$ ).

**Remarque :** Les valeurs  $C_T$  pour les puits D7, D8 et E1 sont  $>35$  en raison d'une faible quantité de cible. Les puits ne doivent pas nécessairement être exclus de l'analyse.

Remarques \_\_\_\_\_

8a points to the 'View Well Table' tab. 8b points to the 'Show in Table' dropdown. 8c points to the 'Expand All' and 'Collapse All' buttons.

#	Well	Omit	Flag	Sample Na...	Target Name	Task	Dyes	C <sub>T</sub>	C <sub>T</sub> Mean	C <sub>T</sub> SD	R <sub>n</sub>	ΔR <sub>n</sub>	Quantity
	GAPDH - 19.961893												
1	E3	<input type="checkbox"/>			GAPDH	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	19.961893	19.98554	0.028	6.637	5.869	2
	GAPDH - 19.979004												
2	E4	<input type="checkbox"/>			GAPDH	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	19.979004	19.98554	0.028	6.524	5.775	2
	GAPDH - 20.015724												
3	E2	<input type="checkbox"/>			GAPDH	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	20.015724	19.98554	0.028	6.603	5.82	2
	GAPDH - 23.557253												
4	E7	<input type="checkbox"/>			GAPDH	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	23.557253	23.567474	0.017	4.829	4.191	
	GAPDH - 23.557608												
5	E6	<input type="checkbox"/>			GAPDH	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	23.557608	23.567474	0.017	4.942	4.291	
	GAPDH - 23.587563												
6	E5	<input type="checkbox"/>			GAPDH	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	23.587563	23.567474	0.017	4.772	4.17	
	GAPDH - 26.939299												
7	F2	<input type="checkbox"/>			GAPDH	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.939299	26.945066	0.005	4.364	3.747	
	GAPDH - 26.947723												
8	F1	<input type="checkbox"/>			GAPDH	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.947723	26.945066	0.005	4.38	3.727	
	GAPDH - 26.948175												
9	E8	<input type="checkbox"/>			GAPDH	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.948175	26.945066	0.005	4.321	3.688	
	GAPDH - 30.363256												
10	F4	<input type="checkbox"/>			GAPDH	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	30.363256	30.385414	0.023	3.753	3.143	
	GAPDH - 30.383087												
11	F5	<input type="checkbox"/>			GAPDH	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	30.383087	30.385414	0.023	3.762	3.148	

**Instructions d'analyse**

Lors de l'analyse d'une expérience de quantification relative par les courbes standard, rechercher les éléments suivants :

- **Valeurs de pente/efficacité de l'amplification** – 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 :
  - 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 répliqués standard – Pour obtenir des mesures d'efficacité plus précises, inclure les répliqués afin de diminuer les effets des imprécisions de pipetage.
  - Inhibiteurs de PCR – Présents dans la réaction, ils peuvent réduire l'efficacité de l'amplification.
- **Valeurs  $R^2$  (coefficient de corrélation)** – La valeur  $R^2$  indique la proximité entre la droite de régression 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. Une valeur  $R^2 >$  ou égale à 0,99 est souhaitable.
- **Valeurs  $C_T$**  – Le cycle seuil ( $C_T$ ) est le nombre de cycles de PCR pour lequel le niveau de fluorescence atteint le seuil. Une valeur  $C_T >8$  et  $<35$  est souhaitable. Une valeur  $C_T <8$  montre que la réaction contient trop de cible. Une valeur  $C_T >35$  montre que la réaction ne contient pas assez de cible. Pour les valeurs  $C_T >35$ , l'écart-type peut être plus important.

Remarques

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

- Exclure des puits (voir « [Exclusion de puits dans une analyse](#) » à la page 112).
- Ou*
- Réaliser à nouveau l'expérience.

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur :

- L'écran Standard Curve (Courbe standard), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.
- L'efficacité de l'amplification, voir le document *Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note*.

## Affichage des courbe d'amplification

L'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) affiche l'amplification de tous les échantillons présents dans le puits sélectionné. Trois courbes sont disponibles :

- **$\Delta Rn$  vs Cycle** –  $\Delta Rn$  représente l'amplitude du signal de fluorescence normalisé généré par la réaction PCR, ainsi que les données à partir desquelles la valeur  $C_T$  est calculée. Cette courbe affiche la valeur  $\Delta Rn$  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.
- **$Rn$  vs Cycle** –  $Rn$  représente la fluorescence du reporter normalisé. Cette courbe affiche la valeur  $Rn$  en fonction du nombre de cycles. Elle permet d'identifier et d'examiner les amplifications irrégulières.
- **$C_T$  vs Well ( $C_T$  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.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple, consulter chaque cible dans l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) pour :

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

### Affichage de la courbe d'amplification

1. Dans le panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience), sélectionner **Analysis (Analyse)**  **Amplification Plot** (Courbe d'amplification).

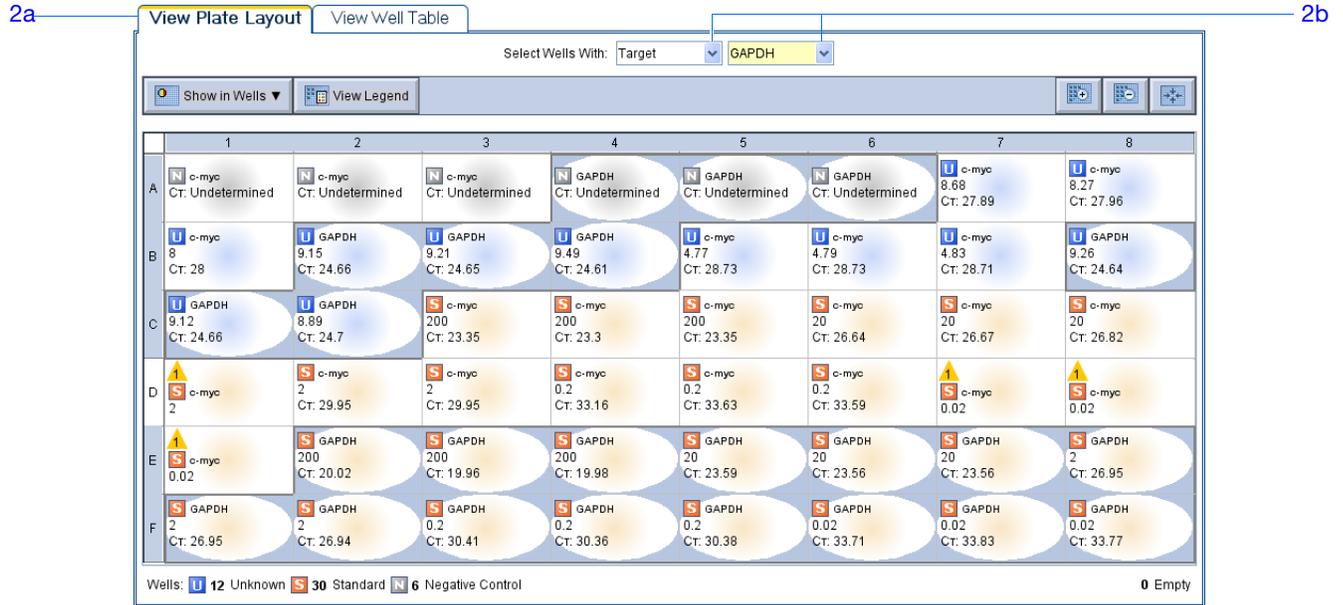
---

**Remarque :** Si l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) ne contient pas de données, cliquer sur **Analyze** (Analyser).

---

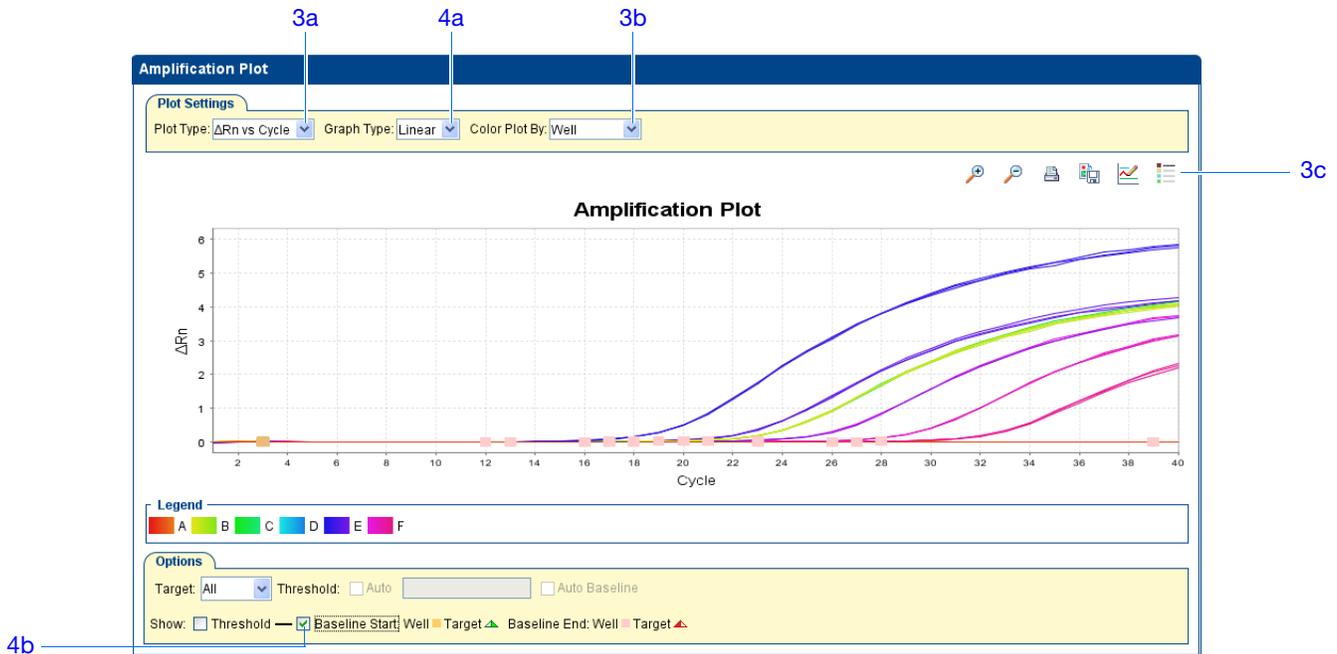
Remarques \_\_\_\_\_

2. Afficher les puits GAPDH dans l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) :
  - a. Cliquer sur l'onglet **View Plate Layout** (Voir le plan de plaque).
  - b. Dans les menus déroulants Select Wells With (Sélectionner les puits avec), sélectionner **Target** (Cible), puis **GAPDH**.



3. Dans l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) :
  - a. Dans le menu déroulant Plot Type (Type de courbe), sélectionner  **$\Delta Rn$  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).
4. 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. Dans l'exemple, la ligne de base est définie avant le début de l'amplification.

Remarques \_\_\_\_\_



## 5. Afficher les valeurs de seuil :

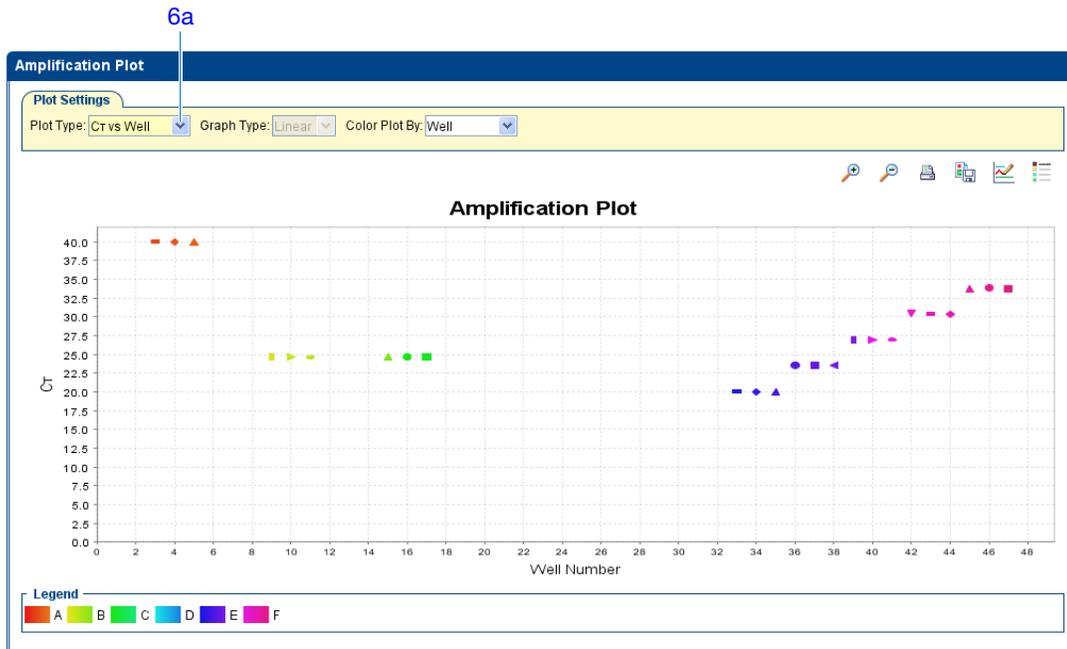
- Dans le menu déroulant Graph Type (Type de graphique), sélectionner **Log**.
- Dans le menu déroulant Target (Cible), sélectionner **GAPDH**.
- Cocher la case **Threshold** (Seuil) pour afficher le seuil.
- Vérifier que le seuil est correctement défini. Dans l'exemple, le seuil se situe dans la phase exponentielle.



Remarques \_\_\_\_\_

6. Localiser les amplifications non conformes :

- a. Dans le menu déroulant Plot Type (Type de courbe), sélectionner  $C_T$  vs Well ( $C_T$  vs Puits).
- b. Rechercher les puits situés en dehors de la courbe d'amplification. L'exemple ne comporte aucune amplification non conforme dans les puits GAPDH.



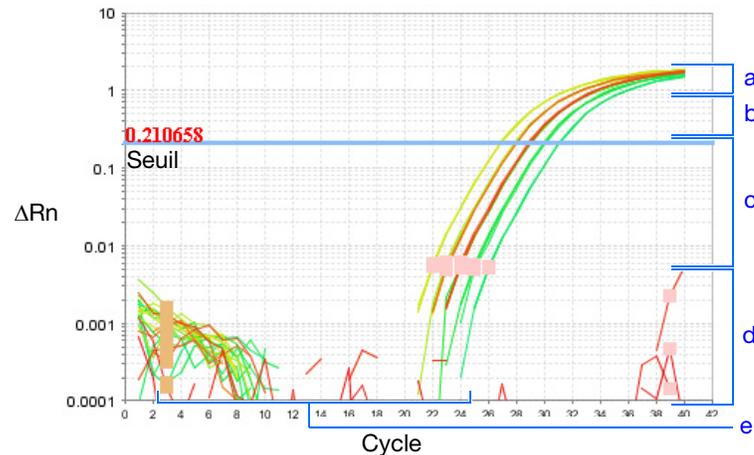
7. Répéter les étapes 2 à 6 pour les puits c-myc. L'exemple comporte une amplification non conforme pour c-myc (puits D1). La section sur l'identification des causes d'erreurs (« Exclusion de puits dans une analyse » à la page 112) explique comment exclure ce puits.

**Instructions d'analyse**

Lors de l'analyse d'une expérience de quantification relative par les courbes standard, 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 :
  - a. Une phase de plateau
  - b. Une phase linéaire
  - c. Une phase exponentielle (géométrique)
  - d. Un bruit de fond
  - e. Une ligne de base

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.

- 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 (voir « [Affichage des paramètres d'analyse](#) » à la page 108).

*Ou*

- Exclure des puits (voir « [Exclusion de puits dans une analyse](#) » à la page 112).

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.

Remarques \_\_\_\_\_

## Affichage du profil d'expression génétique et du tableau des résultats

L'écran Gene Expression Plot (Profil d'expression génétique) affiche le résultat des calculs de quantification relative dans le profil d'expression génétique. Deux courbes sont disponibles :

- **RQ vs Target** (RQ vs Cible) – Regroupe les valeurs de quantification relative (RQ) par cible. Un profil de chaque échantillon est réalisé pour toutes les cibles.
- **RQ vs Sample** (RQ vs Échantillon) – Regroupe les valeurs de quantification relative (RQ) par échantillon. Un profil de chaque cible est réalisé pour tous les échantillons.

Chaque profil peut s'afficher sous la forme d'un graphique du type suivant : linéaire, log10, Ln, log2.

L'onglet View Well Table (Voir le tableau des résultats) affiche les données de chaque puits de la plaque de réactions, notamment :

- Le nom de l'échantillon, le nom de la cible, la fonction et les fluorophores
- Les valeurs du cycle seuil calculé ( $C_T$ ), de la fluorescence normalisée ( $R_n$ ) et de la quantité
- Codes d'alerte

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple, vérifier :

- Chaque cible de l'écran Gene Expression Plot (Profil d'expression génétique) pour relever le niveau d'expression (ou taux de variation) de l'échantillon cible par rapport à l'échantillon de référence.
- Le tableau des résultats pour évaluer la précision des réplicats.

### Affichage du profil d'expression génétique et du tableau des résultats

1. Dans le panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience), sélectionner **Analysis (Analyse)** ►  **Gene Expression** (Expression génétique).

---

**Remarque :** Si l'écran Gene Expression Plot (Profil d'expression génétique) ne contient pas de données, cliquer sur **Analyze** (Analyser).

---

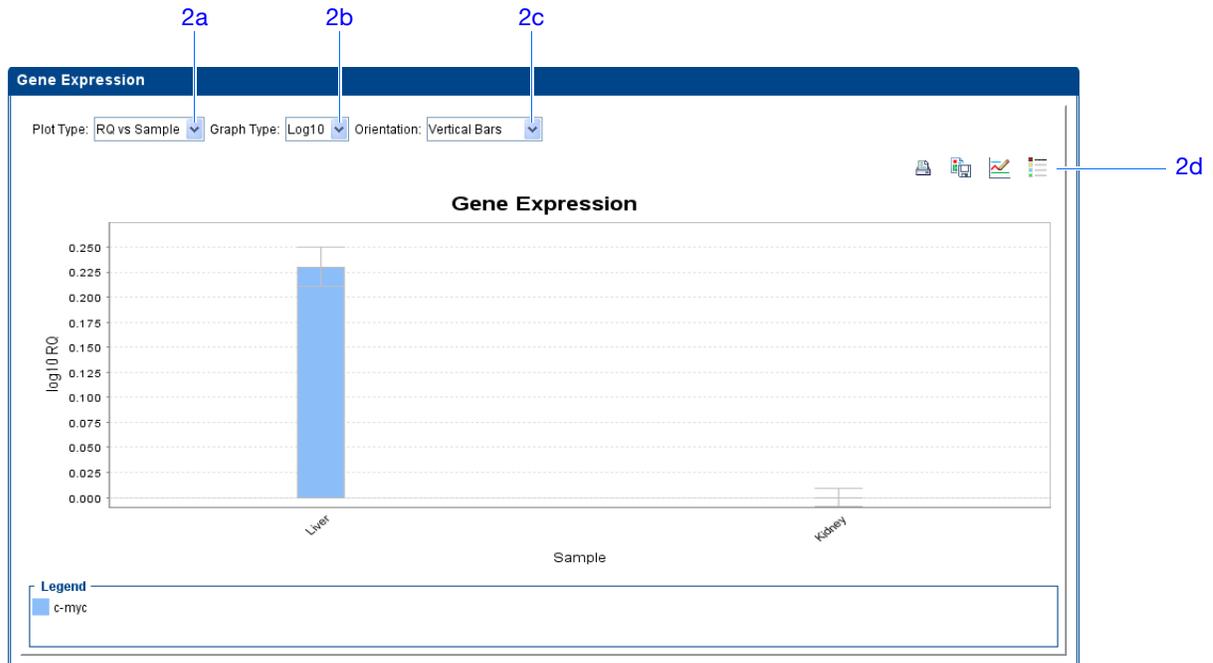
2. Dans l'écran Gene Expression Plot (Profil d'expression génétique) :
  - a. Dans le menu déroulant Plot Type (Type de courbe), sélectionner **RQ vs Sample** (RQ vs Échantillon).
  - b. Dans le menu déroulant Graph Type (Type de graphique), sélectionner **Log10**.
  - c. Dans le menu déroulant Orientation, sélectionner **Vertical Bars** (Barres verticales).

### Remarques

---

- d. Cliquer sur  **Show/Hide the plot legend** (Afficher/masquer la légende de la courbe).

Dans l'exemple, le niveau d'expression de c-myc dans le foie est affiché par rapport à son niveau d'expression dans l'échantillon de référence (rein). Comme l'échantillon de référence est comparé à lui-même, le niveau d'expression est 1. Lorsque le résultat est affiché dans le graphique de type Log10, le niveau d'expression de l'échantillon de référence y est représenté par un 0 ( $\log_{10}$  de 1 = 0).



### 3. Afficher le tableau des résultats :

- Dans le panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience), sélectionner **Analysis (Analyse)**  **Amplification Plot** (Courbe d'amplification), puis cliquer sur l'onglet **View Well Table** (Voir le tableau des résultats).
- Dans le menu déroulant Group By (Grouper par), sélectionner **Replicate** (Réplicat).
- Examiner la colonne  $C_T$  SD (E-T CT) pour évaluer la précision des réplicats. L'exemple comporte une amplification non conforme (puits D1). La section sur l'identification des causes d'erreurs (« [Exclusion de puits dans une analyse](#) » à la page 112) explique comment exclure ce puits.

Remarques \_\_\_\_\_

#	Well	Omit	Flag	Sample Na...	Target Name	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Rn	ΔRn	Quantity
36	c-myc - 29.954172	<input type="checkbox"/>			c-myc	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.954172	30.127504	0.3	5.342	4.298	
37	D2	<input type="checkbox"/>			c-myc	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.954172	30.127504	0.3	5.342	4.298	
38	c-myc - 29.9543	<input type="checkbox"/>			c-myc	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.9543	30.127504	0.3	5.579	4.443	
39	D3	<input type="checkbox"/>			c-myc	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.9543	30.127504	0.3	5.579	4.443	
39	c-myc - 30.474043	<input type="checkbox"/>	▲		c-myc	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	30.474043	30.127504	0.3	5.266	4.182	
40	D4	<input type="checkbox"/>			c-myc	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	30.474043	30.127504	0.3	5.266	4.182	
40	c-myc - 33.16362	<input type="checkbox"/>	▲		c-myc	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	33.16362	33.459904	0.257	4.177	3.124	
41	D4	<input type="checkbox"/>			c-myc	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	33.16362	33.459904	0.257	4.177	3.124	
41	c-myc - 33.586723	<input type="checkbox"/>			c-myc	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	33.586723	33.459904	0.257	3.944	2.807	
42	D6	<input type="checkbox"/>			c-myc	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	33.586723	33.459904	0.257	3.944	2.807	
42	c-myc - 33.629368	<input type="checkbox"/>			c-myc	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	33.629368	33.459904	0.257	4.012	2.935	
43	D5	<input type="checkbox"/>			c-myc	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	33.629368	33.459904	0.257	4.012	2.935	
43	c-myc - 35.704887	<input type="checkbox"/>	▲		c-myc	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	35.704887	36.135754	0.532	2.729	1.645	
44	D7	<input type="checkbox"/>			c-myc	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	35.704887	36.135754	0.532	2.729	1.645	
44	c-myc - 35.97167	<input type="checkbox"/>	▲		c-myc	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	35.97167	36.135754	0.532	2.807	1.673	
45	E1	<input type="checkbox"/>			c-myc	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	35.97167	36.135754	0.532	2.807	1.673	
45	c-myc - 36.7307	<input type="checkbox"/>	▲		c-myc	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	36.7307	36.135754	0.532	2.435	1.315	
46	D8	<input type="checkbox"/>			c-myc	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	36.7307	36.135754	0.532	2.435	1.315	
46	c-myc - Undetermined	<input type="checkbox"/>											
46	A1	<input type="checkbox"/>			c-myc	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermi...			1.101	0.009	
47	A2	<input type="checkbox"/>			c-myc	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermi...			1.098	0.013	
48	A3	<input type="checkbox"/>			c-myc	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermi...			1.146	0.017	

**Remarque :** Pour afficher/masquer des colonnes dans le tableau des résultats, sélectionner/désélectionner le nom de la colonne dans le menu déroulant Show in Table (Afficher dans le tableau).

### Instructions d'analyse

Lors de l'analyse d'une expérience de quantification relative par les courbes standard, rechercher les éléments suivants :

- Les différences d'expression génétique (sous la forme d'un taux de variation) par rapport à l'échantillon de référence.
- Les écarts-types dans les réplicats (valeurs  $C_T$  SD). Si nécessaire, exclure les amplifications non conformes (voir « Exclusion de puits dans une analyse » à la page 112).

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur l'écran Gene Expression Plot (Profil d'expression génétique), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur ou en appuyant sur **F1**.

## Export 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 sur la réalisation de ces opérations, accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur ou en appuyant sur **F1**.

### Remarques

Remarques \_\_\_\_\_

---

## Section 5.2 Identification des causes d'erreurs (si nécessaire)

---

Sommaire de la section :

■ Affichage des paramètres d'analyse .....	108
■ Affichage du Contrôle Qualité .....	110
■ Exclusion de puits dans une analyse .....	112
■ Affichage du multicomposant .....	114
■ Affichage des données brutes .....	116

Remarques \_\_\_\_\_

## Affichage des paramètres d'analyse

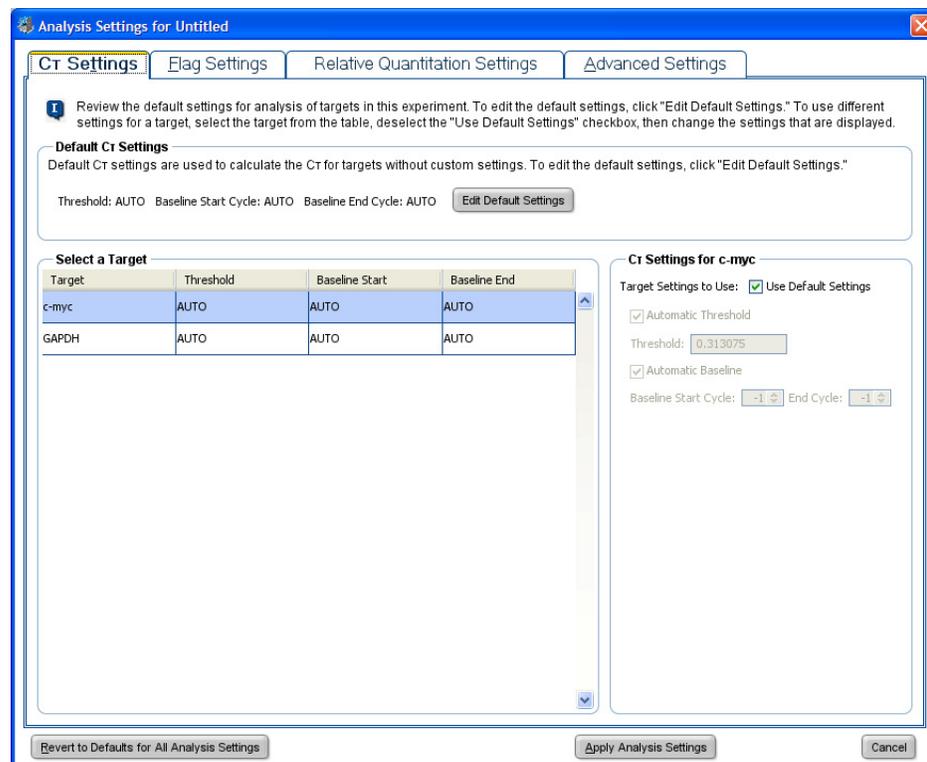
La fenêtre Analysis Settings (Paramètres d'analyse) affiche les paramètres d'analyse pour le cycle seuil ( $C_T$ ), les codes d'alerte, la quantification relative et les options avancées. Si les paramètres d'analyse par défaut du logiciel StepOne ne sont pas adaptés à l'expérience, il est possible de les modifier dans la fenêtre Analysis Settings (Paramètres d'analyse), puis de réanalyser l'expérience.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple, les paramètres d'analyse par défaut sont utilisés sans modification.

### Affichage des paramètres d'analyse

1. Dans le panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience), sélectionner **Analysis** (Analyse).
2. Cliquer sur **Analysis Settings** (Paramètres d'analyse) pour ouvrir la fenêtre Analysis Settings (Paramètres d'analyse).
3. Dans l'exemple, les paramètres d'analyse par défaut sont utilisés pour chaque onglet :
  - $C_T$  Settings (Paramètres  $C_T$ )
  - Flag Settings (Paramètres des codes d'alerte)
  - Relative Quantitation Settings (Paramètres de quantification relative)
  - Advanced Settings (Paramètres avancés)



Remarques \_\_\_\_\_

## Instructions d'analyse

À moins que les paramètres optimaux de l'expérience soient déjà déterminés, utiliser les paramètres d'analyse par défaut du logiciel StepOne. Si les paramètres par défaut ne sont pas adaptés à l'expérience, il est possible de modifier les réglages suivants :

- **C<sub>T</sub> Settings** (Paramètres C<sub>T</sub>) – Utiliser cet onglet pour définir manuellement le seuil et la ligne de base. Lors du réglage manuel des valeurs de seuil et de ligne de base, Applied Biosystems recommande d'effectuer les opérations suivantes :

Paramètre	Recommandation
Seuil	Entrer la valeur du seuil pour qu'il soit situé : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Au-dessus du bruit de fond.</li> <li>• Sous les zones de plateau et linéaires de la courbe d'amplification.</li> <li>• Dans la phase exponentielle de la courbe d'amplification.</li> </ul>
Ligne de base	Sélectionner les valeurs Start Cycle (Cycle de début) et End Cycle (Cycle de fin) pour que la ligne de base s'arrête avant le début de l'amplification.

- **Flag Settings** (Paramètres des codes d'alerte) – Utiliser cet onglet pour :
  - Ajuster la sensibilité afin de marquer plus ou moins de puits.
  - Modifier les codes d'alerte appliqués par le logiciel StepOne.
- **Relative Quantitation Settings** (Paramètres de quantification relative) – Utiliser cet onglet pour :
  - Modifier l'échantillon de référence et/ou le contrôle endogène.
  - Sélectionner l'algorithme à utiliser pour déterminer les valeurs RQ minimales et maximales (niveau de confiance ou écarts-types).
- **Advanced Settings** (Paramètres avancés) – Utiliser cet onglet pour modifier les paramètres de la ligne de base puits par puits.

## Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur les paramètres d'analyse, accéder à l'aide du logiciel StepOne en appuyant sur **F1** lorsque la fenêtre Analysis Settings (Paramètres d'analyse) est ouverte.

## Remarques

## Affichage du Contrôle Qualité

L'écran QC Summary (Synthèse CQ) affiche la liste des codes d'alerte du logiciel StepOne, ainsi que la fréquence et l'emplacement des codes d'alerte de l'expérience ouverte.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple, consulter l'écran QC Summary (Synthèse CQ) pour repérer les codes d'alerte associés aux données de l'expérience :

- Les puits D7, D8 et E1 ont produit des données ayant déclenché l'insertion du code d'alerte HIGHSD.
- Le puits D1 a produit des données ayant déclenché l'insertion du code d'alerte OUTLIERRG.

### Affichage de la synthèse CQ

1. Dans le panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience), sélectionner **Analysis (Analyse)** ►  **QC Summary (Synthèse CQ)**.

---

**Remarque :** Si l'écran QC Summary (Synthèse CQ) ne contient pas de données, cliquer sur **Analyze (Analyser)**.

---

2. Vérifier la synthèse des codes d'alerte. L'exemple comporte 4 puits accompagnés d'un code d'alerte.
3. Rechercher les codes d'alerte insérés dans l'expérience en examinant les colonnes Frequency (Fréquence) et Wells (Puits) du tableau Flag Details (Détail des codes d'alerte). Dans l'exemple :
  - Le code d'alerte HIGHSD apparaît 3 fois, dans les puits D7, D8 et E1.
  - Le code d'alerte OUTLIERRG apparaît 1 fois, dans le puits D1.

---

**Remarque :** Un 0 affiché dans la colonne Frequency (Fréquence) signifie qu'aucun code d'alerte de ce type n'apparaît dans l'expérience.

---

4. Pour chaque code d'alerte qui apparaît dans l'expérience, cliquer sur la ligne correspondante pour afficher des informations détaillées le concernant. Dans l'exemple :
  - a. Le code d'alerte HIGHSD (puits D7, D8 et E1) signale un écart-type élevé dans le répliat. Ce phénomène est attendu pour les valeurs  $C_T > 35$  en raison d'une faible quantité de cible. Les puits ne doivent pas nécessairement être exclus de l'analyse.
  - b. Le code d'alerte OUTLIERRG (puits D1) indique une amplification non conforme dans le répliat. Passer au paragraphe « [Exclusion de puits dans une analyse](#) » à la page 112 pour supprimer le puits D1.

### Remarques

---

**QC Summary**

**Flag Summary**

Total Wells:	48	Processed Wells:	48	Targets Used:	2
Wells Set Up:	48	Flagged Wells:	4	Samples Used:	2

**Flag Details**

Flag	Name	Frequency	Wells
AMPNC	Amplification in negative control	0	
BADROX	Bad passive reference signal	0	
OFFSCALE	Fluorescence is offscale	0	
HIGHSD	High standard deviation in replicate group	3	D7, D8, E1
NOAMP	No amplification	0	
NOISE	Noise higher than others in plate	0	
SPIKE	Noise spikes	0	
NOSIGNAL	No signal in well	0	
OUTLIERRG	Outlier in replicate group	1	D1
EXPFAIL	Exponential algorithm failed	0	

**Flag** OUTLIERRG—Outlier in replicate group  
**Flag Detail:** The Ct deviates significantly from Ct values in the associated replicate group.  
**Flagged Wells:** D1  
[View OUTLIERRG Troubleshooting Information](#)

**Codes d'alerte possibles**

Dans les expériences de quantification relative par les courbes standard, les codes d'alerte énumérés ci-dessous peuvent être associés aux données de l'expérience.

Si un code d'alerte n'apparaît pas dans l'expérience, sa fréquence est 0. Une fréquence >0 signifie que le code d'alerte apparaît quelque part dans l'expérience. La position du puits est indiquée dans la colonne Wells (Puits).

Code d'alerte	Description
AMPNC	Amplification du contrôle négatif
BADROX	Mauvais signal de la référence passive
BLFAIL	Échec de l'algorithme des lignes de base
CTFAIL	Échec de l'algorithme C <sub>T</sub>
EXPFAIL	Échec de l'algorithme exponentiel
HIGHSD	Écart-type élevé dans un réplicat
NOAMP	Pas d'amplification
NOISE	Bruit supérieur aux autres dans la plaque
NOSIGNAL	Aucun signal dans le puits
OFFSCALE	La fluorescence est hors échelle
OUTLIERRG	Amplification non conforme dans un réplicat
SPIKE	Pics de bruit
THOLDFAIL	Échec de l'algorithme du seuil

Remarques

### Instructions d'analyse

Lors de l'analyse d'une expérience de quantification relative par les courbes standard :

- Dans le tableau Flag Details (Détail des codes d'alerte), cliquer sur chaque code d'alerte dont la fréquence est >0 pour afficher les informations détaillées le concernant. Si nécessaire, cliquer sur le lien d'identification des causes d'erreurs pour afficher les informations sur l'origine des codes d'alerte et les moyens d'y remédier.
- Il est possible de modifier les paramètres des codes d'alerte :
  - Ajuster la sensibilité afin de marquer plus ou moins de puits.
  - Modifier les codes d'alerte appliqués par le logiciel StepOne.

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur l'écran QC Summary (Synthèse CQ) ou sur les paramètres des codes d'alerte, accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.

## Exclusion de puits dans une analyse

Une erreur expérimentale peut avoir provoqué l'amplification insuffisante ou nulle de certains puits. Ces puits produisent généralement des valeurs  $C_T$  qui diffèrent considérablement de la moyenne des puits répétés correspondants. Si elles sont comprises dans les calculs, ces amplifications non conformes peuvent générer des mesures erronées. Pour obtenir des résultats précis, exclure les amplifications non conformes de l'analyse.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple, utiliser l'onglet Well Table (Tableau des résultats) pour exclure le puits D1 de l'analyse. Le puits D1 est marqué du code d'alerte OUTLIERRG (voir « [Affichage du Contrôle Qualité](#) » à la page 110).

### Exclusion de puits

1. Dans le panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience), sélectionner **Analysis (Analyse)**  **Amplification Plot** (Courbe d'amplification).

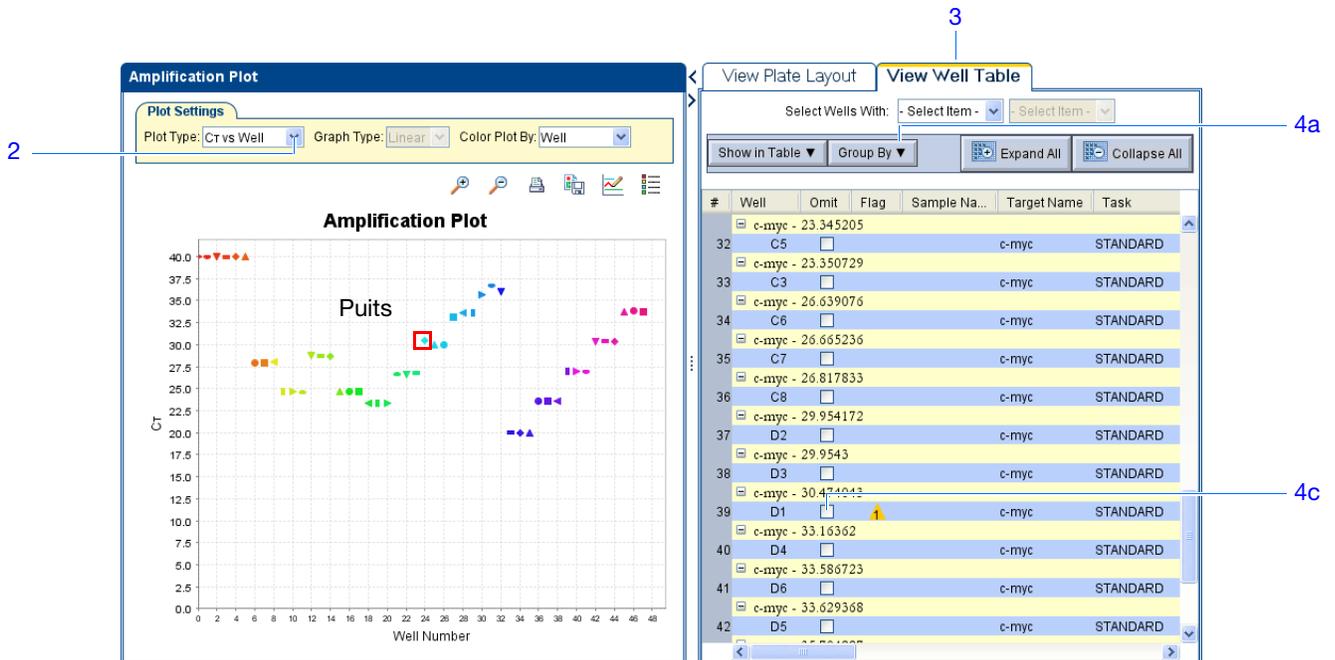
---

**Remarque :** Si l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) ne contient pas de données, cliquer sur **Analyze** (Analyser).

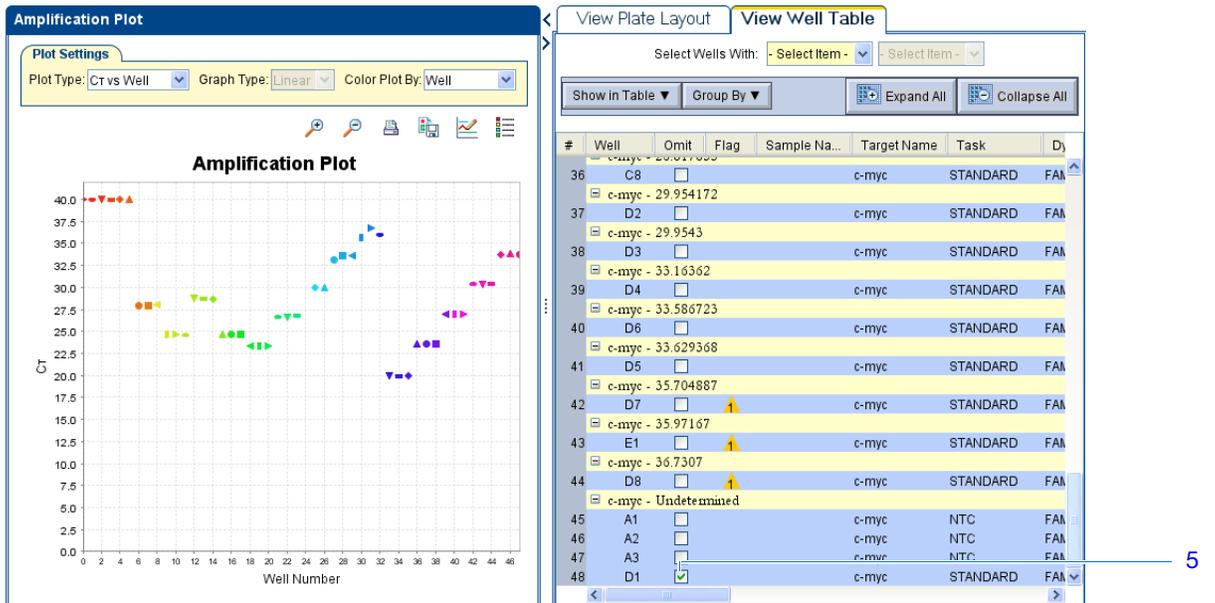
---

2. Dans le menu déroulant Plot Type (Type de courbe) de l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification), sélectionner  **$C_T$  vs Well** ( $C_T$  vs Puits).
3. Sélectionner l'onglet **View Well Table** (Voir le tableau des résultats).
4. Dans l'onglet View Well Table (Voir le tableau des résultats) :
  - a. Dans le menu déroulant Group By (Grouper par), sélectionner **Replicate** (Réplicat).
  - b. Rechercher les amplifications non conformes parmi les réplicats (vérifier qu'elles sont accompagnées d'un code d'alerte). Dans l'exemple, le puits D1 est une amplification non conforme.
  - c. Cocher la case **Omit** (Exclure) en regard du puits D1.

Remarques \_\_\_\_\_



5. Cliquer sur **Analyze** (Analyser) pour réanalyser les données de l'expérience une fois que le puits D1 a été exclu de l'analyse.



**Instructions d'analyse**

Lors de l'analyse d'une expérience de quantification relative par les courbes standard, examiner attentivement les répliqués à la recherche d'amplifications non conformes. Si nécessaire, supprimer manuellement les amplifications non conformes à l'aide du tableau des résultats. Voir la procédure « Exclusion de puits » ci-dessus pour supprimer les amplifications non conformes dans l'expérience.

Remarques

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur l'exclusion de puits dans l'analyse, ouvrir l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**. Dans l'aide, rechercher les sujets relatifs à l'exclusion des puits :

1. Cliquer sur l'onglet **Search** (Rechercher).
2. Entrer **omit well** (exclure un puits).
3. Cliquer sur **List Topics** (Trouver les sujets).
4. Double-cliquer sur les sujets à consulter.

## Affichage du multicomposant

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 de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en exemple, consulter l'écran Multicomponent Plot (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 panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience), sélectionner **Analysis (Analyse)** ►  **Multicomponent Plot** (Courbe des multicomposantes).

---

**Remarque :** Si l'écran Multicomponent Plot (Courbe des multicomposantes) ne contient pas de données, cliquer sur **Analyze** (Analyser).

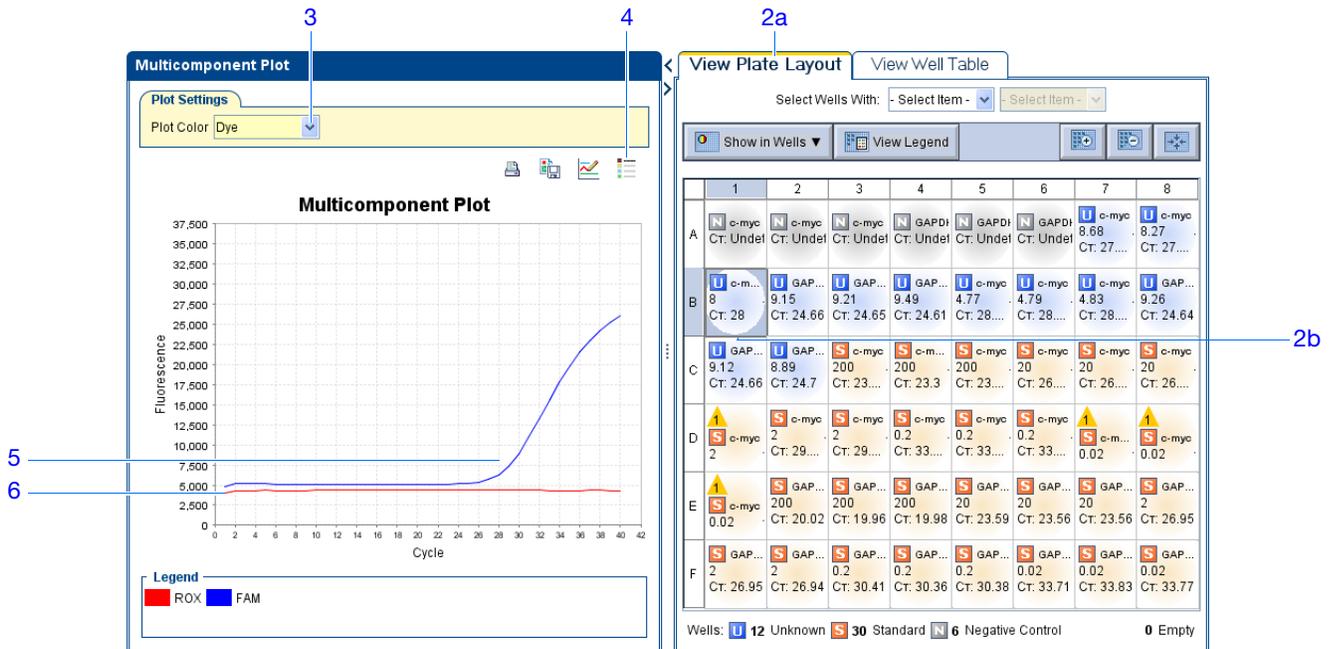
---

2. Afficher un puits à la fois dans l'écran Multicomponent Plot (Courbe des multicomposantes) :
  - a. Cliquer sur l'onglet **View Plate Layout** (Voir le plan de plaque).
  - b. Sélectionner un puits du plan de plaque. Il s'affiche 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).

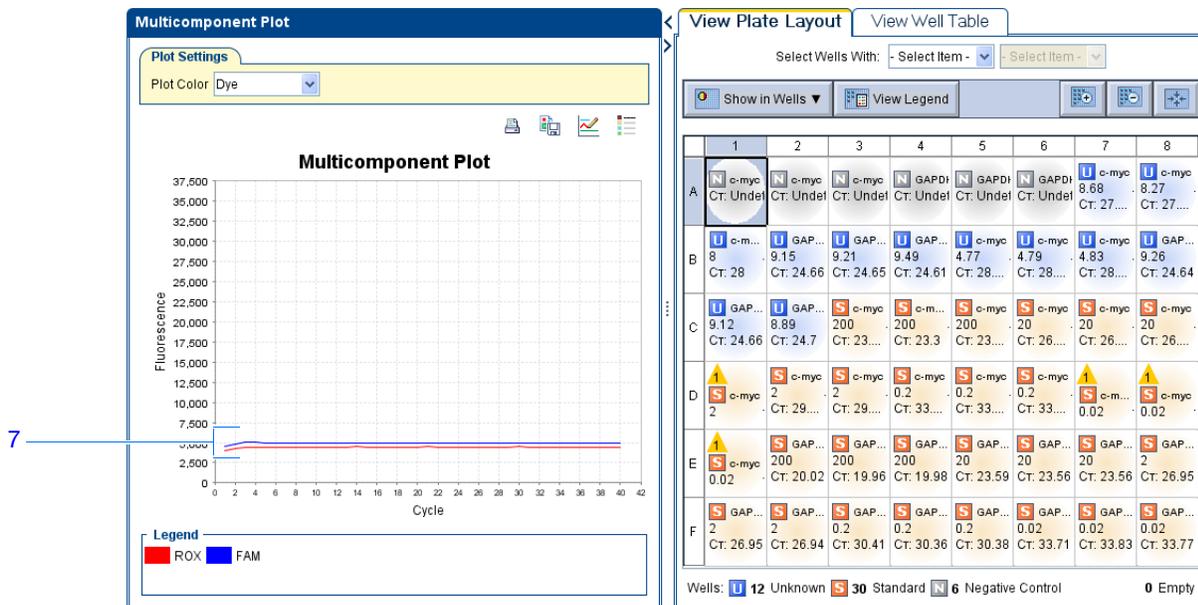
### Remarques

---

- Vérifier le signal du fluorophore FAM. Dans l'exemple, le signal du fluorophore FAM augmente pendant la réaction de PCR, ce qui témoigne d'une amplification normale.
- 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.



- 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 de quantification relative par les courbes standard, 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 l'écran Multicomponent Plot (Courbe des multicomposantes), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.

## Affichage des données brutes

L'écran Raw Data Plot (Courbe des données brutes) affiche le signal de fluorescence brut (non normalisé) pour chaque filtre optique des puits sélectionnés pendant tous les cycles de PCR en temps réel.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par les courbes standard donnée en 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.

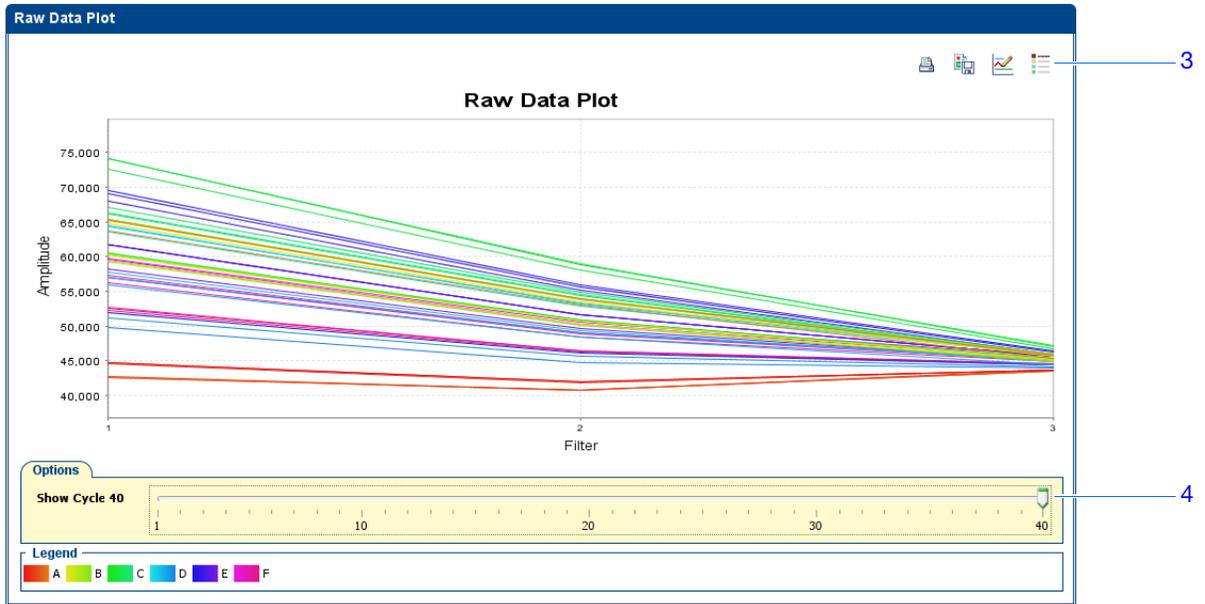
### Affichage de la courbe des données brutes

1. Dans le panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience), sélectionner **Analysis (Analyse)**  **Raw Data Plot** (Courbe des données brutes).

**Remarque :** Si l'écran Raw Data Plot (Courbe des données brutes) ne contient pas de données, cliquer sur **Analyze** (Analyser).

2. Dans l'onglet View Plate Layout (Voir le plan de plaque), afficher les 48 puits dans l'écran Raw Data Plot (Courbe des données brutes) en cliquant sur le coin supérieur gauche du plan de plaque.
3. Cliquer sur  **Show/Hide the plot legend** (Afficher/masquer la légende de la courbe).
4. Cliquer sur le curseur Show Cycle (Afficher le cycle) et le faire glisser du cycle 1 vers le cycle 40. Dans l'exemple, le signal présente une hausse constante à partir du filtre 1, qui est celui du fluorophore FAM<sup>TM</sup>.

### Remarques



Le système StepOne™ comporte plusieurs filtres :

Filtre	Fluorophore
1	Fluorophore FAM™
	Fluorophore SYBR® Green
2	Fluorophore JOE™
	Fluorophore VIC®
3	Fluorophore ROX™

### Instructions d'analyse

Lors de l'analyse d'une expérience de quantification relative par les courbes standard, 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 l'écran Raw Data Plot (Courbe des données brutes), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.

### Remarques

Remarques \_\_\_\_\_

---

## 6

# Conception de l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison de $C_T$

Sommaire du chapitre :

■ Présentation du chapitre . . . . .	120
■ Création d'une expérience . . . . .	121
■ Définition des paramètres de l'écran Experiment Properties (Propriétés de l'expérience) . . . . .	124
■ Définition des méthodes et des matériels nécessaires . . . . .	126
■ Configuration des cibles . . . . .	129
■ Configuration des échantillons . . . . .	131
■ Configuration des paramètres de quantification relative . . . . .	133
■ Configuration du profil de thermocyclage . . . . .	135
■ Vérification de la configuration des réactions . . . . .	137
■ Commande des matériels nécessaires pour l'expérience . . . . .	142
■ Finalisation du workflow de l'assistant de programmation Design Wizard. . . . .	146

**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 du logiciel StepOne™ pour configurer l'exemple de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ). L'assistant de programmation Design Wizard présente les meilleures pratiques recommandées par Applied Biosystems lors de la saisie des paramètres de conception pour l'exemple.

### Workflow de l'exemple

Le workflow de conception de l'exemple fourni avec ce guide de mise en route est indiqué ci-dessous.

**Remarque :** Créer l'exemple en utilisant l'assistant de programmation Design Wizard du logiciel StepOne. Lors de la conception d'une expérience, il est possible de sélectionner d'autres workflows (voir « [Utilisation de ce guide avec des connaissances pratiques](#) » à la page 9).

#### Expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de $C_T$ ( $\Delta\Delta C_T$ )

Début de l'expérience

#### Conception de l'expérience (Chapitre 6)

1. Créer une expérience.
2. Définir les propriétés de l'expérience.
3. Définir les méthodes et les matériels nécessaires.
4. Configurer les cibles.
5. Configurer les échantillons.
6. Configurer la quantification relative.
7. Configurer le profil de thermocyclage.
8. Vérifier la préparation des réactions.
9. Commander les matériels nécessaires pour l'expérience.
10. Finaliser le workflow de l'assistant de programmation Design Wizard.

#### Préparation des réactions (Chapitre 7)

#### Réalisation de l'expérience (Chapitre 8)

#### Analyse de l'expérience (Chapitre 9)

Fin de l'expérience

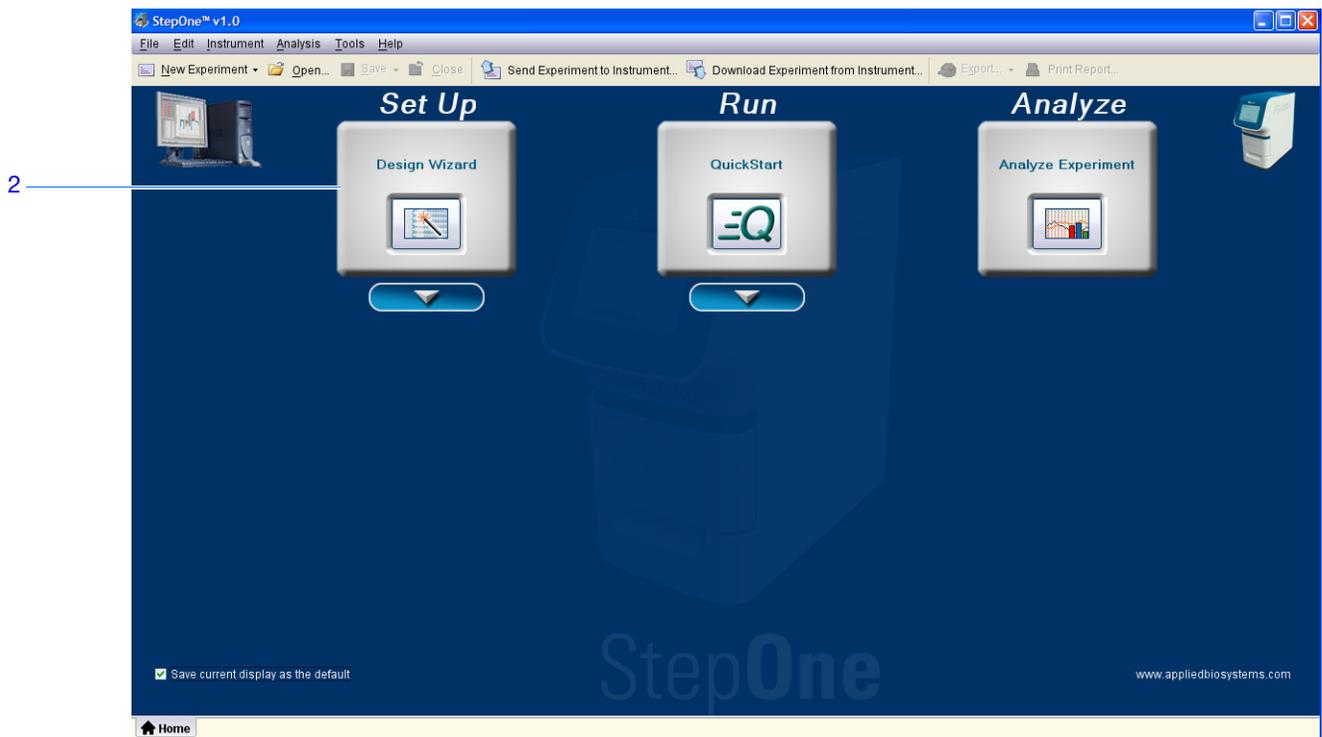
### Remarques

## Création d'une expérience

Créer une expérience à l'aide de l'assistant de programmation Design Wizard du logiciel StepOne.

### Création d'une expérience

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



3. Pour plus d'informations sur la navigation dans l'assistant de programmation Design Wizard, voir ci-dessous la section « **Éléments du logiciel** ».

### Éléments du logiciel

Les éléments du logiciel StepOne présents dans l'assistant de programmation Design Wizard sont illustrés ci-dessous.

1. Barre de menus – Affiche les menus disponibles dans le logiciel :
  - File (Fichier)
  - Edit (Édition)
  - Instrument
  - Analysis (Analyse)
  - Tools (Outils)
  - Help (Aide)

### Remarques

2. Barre d'outils – Affiche les outils disponibles dans le logiciel :
  - New Experiment (Nouvelle expérience)
  - Open (Ouvrir)
  - Close (Fermer)
  - Send Experiment to Instrument (Envoyer une expérience à l'instrument)
  - Download Experiment from Instrument (Télécharger une expérience à partir de l'instrument)
3. En-tête de l'expérience – Affiche le type et le nom de l'expérience, ainsi que les réactifs requis pour l'expérience ouverte.
4. Panneau de navigation – Fournit des liens vers tous les écrans de l'assistant de programmation Design Wizard :
  - Experiment Properties (Propriétés de l'expérience)
  - Methods & Materials (Méthodes et matériels)
  - Targets (Cibles)
  - Relative Quantitation Settings (Paramètres de quantification relative)
  - Samples (Échantillons)
  - Run Method (Profil de thermocyclage)
  - Reaction Setup (Préparation des réactions)
  - Materials List (Liste des matériels)

---

**Remarque :** L'assistant de programmation Design Wizard affiche en premier l'application Quantitation – Standard Curve (Quantification – Courbe standard). L'aspect des écrans disponibles dans l'assistant de programmation Design Wizard peut changer si une autre application est sélectionnée. Par exemple, l'écran Relative Quantitation Settings (Paramètres de quantification relative) n'est affiché que si l'application Relative Standard Curve (Courbe standard relative) ou Comparative  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) (Comparaison des valeurs de  $C_T$ ) est sélectionnée.

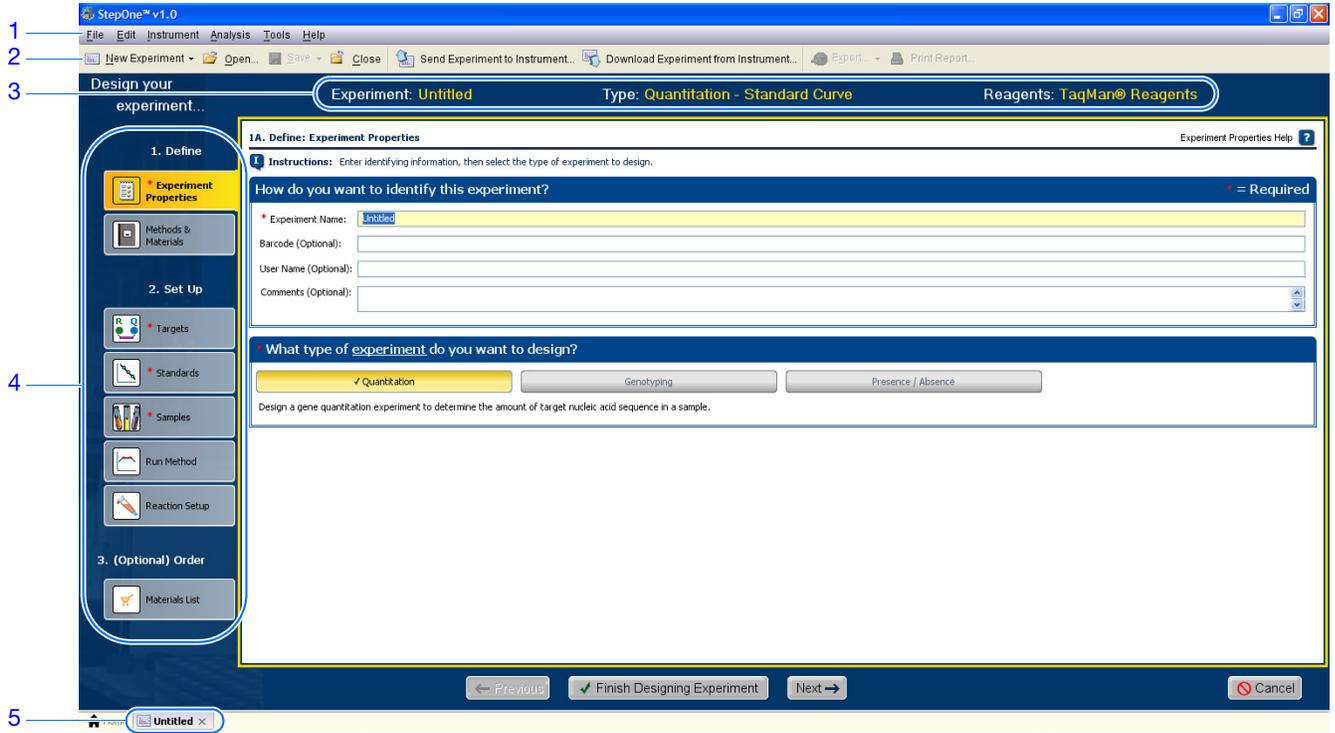
---

5. Onglets Experiment (Expérience) – Affichent un onglet pour chaque expérience ouverte.

---

## Remarques

---



Remarques

## Définition des paramètres de l'écran *Experiment Properties* (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.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) donnée en exemple :

- L'expérience est identifiée comme un exemple.
- Une MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate est utilisée.
- L'application choisie est la quantification.

### Définition des paramètres de l'écran *Experiment Properties* (Propriétés de l'expérience)

1. Cliquer dans le champ **Experiment Name** (Nom de l'expérience), puis entrer **Comparative CT Example** (Exemple de comparaison des valeurs de  $C_T$ ).

**Remarque :** L'en-tête de l'expérience est remplacé par le nom saisi.

2. Cliquer dans le champ **Barcode** (Code-barres), puis entrer le code-barres inscrit sur la plaque de réactions de PCR.
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 **Comparative CT Getting Started Guide Example** (Exemple de comparaison des valeurs de  $C_T$  du guide de mise en route).
5. Sélectionner l'application **Quantitation** (Quantification).
6. Cliquer sur **Next >** (Suivant).

### Remarques

## Instructions de préparation

Lors de la conception d'une expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  :

- Entrer un nom descriptif et facile à retenir pour l'expérience. Le nom de l'expérience est utilisé comme nom de fichier d'expérience par défaut. Le champ Experiment Name (Nom de l'expérience) peut contenir au maximum 100 caractères.

---

**Remarque :** Le champ Experiment Name (Nom de l'expérience) n'accepte pas 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 (;).

---

- Utiliser des MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plates, des MicroAmp™ Fast 8-Tube Strips ou des MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Caps. Les consommables Fast sont compatibles avec les réactifs Fast et standard.
- *(Facultatif)* Entrer la référence du code-barres inscrit sur la plaque de réactions de PCR. Le champ Barcode (Code-barres) peut contenir au maximum 100 caractères.
- *(Facultatif)* Entrer le nom d'utilisateur du créateur de l'expérience. Le champ User Name (Nom d'utilisateur) peut contenir au maximum 100 caractères.
- *(Facultatif)* Entrer des commentaires décrivant l'expérience. Le champ Comments (Commentaires) peut contenir au maximum 1 000 caractères.
- Sélectionner l'application **Quantitation** (Quantification).

## Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur :

- Les paramètres de l'écran Experiment Properties (Propriétés de l'expérience), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.
- Les consommables, voir « [Consommables compatibles](#) » à la page 3.
- Les expériences de quantification, voir le *Guide des réactifs du système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™*.

## Remarques

---

## Définition des méthodes et des matériels nécessaires

Dans l'écran Methods & Materials (Méthodes et matériels), sélectionner la méthode de quantification, les réactifs, la vitesse de variation de la température et le type de PCR à utiliser pour l'expérience.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple :

- La méthode de quantification est la comparaison des valeurs de  $C_T$ .
- Les réactifs TaqMan® sont utilisés.
- La vitesse de variation de la température Fast (Rapide) est utilisée pendant la réaction de PCR.
- Le type d'échantillon utilisé est l'ADNc (préparé à partir d'ARN total isolé dans des tissus de foie, de rein et de cerveau). Avant d'utiliser la matrice ADNc, effectuer une rétro-transcription pour convertir l'ARN en ADNc (voir « Préparation de la matrice » à la page 151).

### Paramètres de l'écran Methods & Materials (Méthodes et matériels)

1. Sélectionner la méthode de quantification **Comparative  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ )** (Comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ))
2. Sélectionner les réactifs **TaqMan® Reagents** (Réactifs TaqMan).
3. Sélectionner la vitesse de variation de la température **Fast (~40 minutes to complete a run)** (-Rapide (env. 40 min pour réaliser la réaction)).
4. Sélectionner le type de matrice **cDNA (complementary DNA)** (ADNc (ADN complémentaire)).
5. Cliquer sur **Next >** (Suivant).

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

**Instructions:** Select the quantitation method, reagents, ramp speed, and type of template for the real-time PCR reactions.

**Which quantitation method are you using?**

Standard Curve    Relative Standard Curve     Comparative Ct ( $\Delta\Delta C_T$ )

With the comparative Ct ( $\Delta\Delta C_T$ ) method, you use a reference sample and an endogenous control to determine the relative quantity of target sequence in a sample.

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

TaqMan® Reagents    SYBR® Green Reagents

These real-time PCR reactions contain two primers and a TaqMan® probe. The primers are designed to amplify the target sequence. The TaqMan probe is designed to hybridize to the target sequence and generate fluorescence signal when the target sequence is amplified.

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

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

For optimal results using the Fast ramp speed, Applied Biosystems recommends using Fast reagents for your real-time PCR reactions.

**What type of template do you want to use in the real-time PCR reactions?**

cDNA (complementary DNA)    RNA    gDNA (genomic DNA)

You are adding cDNA to the real-time PCR reactions. You have already performed reverse transcription to convert the RNA to cDNA.

### Remarques

## Instructions de préparation

Lors de la conception d'une expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  :

- Sélectionner la méthode de quantification **Comparative  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ )** (Comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ )). Les expériences de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) déterminent les variations d'expression d'une cible dans un échantillon comparé à un échantillon de référence. Des formules arithmétiques sont utilisées pour obtenir les résultats. Lors de la configuration du plan de plaque, la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  nécessite des cibles, des échantillons, un échantillon de référence et un contrôle endogène.

---

**Remarque :** Avant d'utiliser la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$ , Applied Biosystems recommande de déterminer si l'efficacité de la PCR est à peu près équivalente pour le gène cible et le gène de référence endogène. Les essais Applied Biosystems TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays et Custom TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays ont une efficacité d'amplification équivalente à 100 % ( $\pm 10$  %).

- Sélectionner les réactifs à utiliser :
  - Sélectionner **TaqMan<sup>®</sup> Reagents** afin d'utiliser les réactifs TaqMan pour détecter l'amplification et évaluer la quantité de cible des échantillons. Les réactifs TaqMan sont composés de deux amorces et d'une sonde TaqMan<sup>®</sup>. Les amorces sont conçues pour amplifier la cible. La sonde TaqMan est conçue pour s'hybrider avec la cible et générer un signal de fluorescence lorsque la cible est amplifiée.

---

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

- Sélectionner **SYBR<sup>®</sup> Green Reagents** afin d'utiliser les réactifs SYBR Green pour détecter l'amplification et évaluer la quantité de cible des échantillons. Les réactifs SYBR Green sont composés de deux amorces et du fluorophore SYBR Green. Les amorces sont conçues pour amplifier la cible. Le fluorophore SYBR Green génère un signal de fluorescence lorsqu'il est lié à l'ADN double brin. Le fluorophore SYBR Green est souvent inclus dans le master mix SYBR Green ajouté à la réaction. Si le fluorophore SYBR Green est utilisé :

Cocher la case **Include Melt Curve** (Inclure la courbe de fusion) pour effectuer l'analyse de la courbe de fusion sur la cible amplifiée.

Sélectionner la vitesse de variation de la température **Standard** .

---

**Remarque :** Dans le système StepOne, il est possible d'utiliser d'autres réactifs basés sur le principe de la fluorescence. Toutefois, cela nécessite de créer l'expérience en utilisant le workflow Advanced Setup (Configuration avancée) plutôt que l'assistant de programmation Design Wizard. Voir « [Workflow Advanced Setup \(Configuration avancée\)](#) » à la page 196.

## Remarques

- Sélectionner la vitesse de variation de la température adaptée à l'activité de l'instrument :
  - Sélectionner **Fast (~40 Minutes to Complete a Run)** [(Rapide (env. 40 min pour réaliser la réaction))] si des réactifs Fast sont utilisés pour les réactions de PCR.
  - Sélectionner **Standard (~2 Hours to Complete a Run)** [(Standard (env. 2 h pour réaliser la réaction))] si des réactifs standard sont utilisés pour les réactions de PCR (notamment les réactifs SYBR Green et TaqMan standard).
- Sélectionner le type de PCR approprié :
  - Sélectionner **cDNA (complementary DNA)** (ADNc (ADN complémentaire)) si la RT-PCR 2 étapes est choisie et si la rétro-transcription permettant de convertir l'ARN en ADNc a déjà été réalisée. L'ADN complémentaire est ajouté aux réactions de PCR.
  - Sélectionner **RNA** si la RT-PCR 1 étape est choisie. L'ARN total ou l'ARNm est ajouté aux réactions de PCR.
  - Sélectionner **gDNA (genomic DNA)** (ADNg (ADN génomique)) si l'ADNg a déjà été extrait des tissus ou de l'échantillon. L'ADN génomique purifié est ajouté aux réactions de PCR.

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur :

- Les paramètres de l'écran Methods & Materials (Méthodes et matériels), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.
- Le calcul d'efficacité de la PCR, accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**. Dans l'aide, procéder à une recherche comme suit :
  - a. Cliquer sur l'onglet **Search** (Rechercher).
  - b. Entrer **PCR efficiency** (Efficacité de la PCR).
  - c. Cliquer sur **List Topics** (Trouver les sujets).
  - d. Double-cliquer sur **Determine PCR Efficiency** (Déterminer l'efficacité de la PCR).
- La quantification relative par les courbes standard, voir les chapitres 2 à 5 de ce guide.
- La quantification absolue par les courbes standard, voir le *Guide de mise en route pour les expériences de quantification absolue par les courbes standard sur le système de PCR en temps réel StepOne™*.
- Les réactifs TaqMan et SYBR Green, voir le *Guide des réactifs du système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™*.
- La PCR, notamment la PCR simplex vs la PCR multiplex et la RT-PCR 1 étape vs la RT-PCR 2 étapes, voir le *Guide des réactifs du système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™*.

### Remarques

---

## Configuration des cibles

Dans l'écran Targets (Cibles), entrer le nombre de cibles à quantifier lors de la réaction de PCR, puis configurer le plan de plaque pour chacune.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple :

- Deux cibles sont quantifiées dans la plaque de réactions.
- L'essai Target 1 (Cible 1) correspond au gène cible étudié. Dans l'exemple, il s'agit de TP53 (un facteur de transcription qui régule d'autres gènes).
- L'essai Target 2 (Cible 2) correspond au contrôle endogène. Dans l'exemple, il s'agit du glycéraldéhyde-3-phosphate humain (GAPDH). Le GAPDH sert de contrôle endogène car ses niveaux d'expression tendent à être relativement stables.

### Paramètres de l'écran Targets (Cibles)

1. Cliquer dans le champ **How many targets do you want to quantify in the reaction plate?** (Combien de cibles à quantifier dans la plaque de réactions ?), puis entrer **2**.

---

**Remarque :** Le tableau des cibles se met à jour en fonction du nombre choisi.

---

2. Configurer l'essai Target 1 (Cible 2) :
  - a. Cliquer dans le champ **Enter Target Name** (Entrer le nom de la cible), puis entrer **TP53**.
  - b. Dans le menu déroulant Reporter, sélectionner **FAM** (par défaut).
  - c. Dans le menu déroulant Quencher, sélectionner **NFQ-MGB** (par défaut).
  - d. Ne pas modifier le paramètre par défaut dans le champ Color (Couleur).
3. Configurer l'essai Target 2 (Cible 2) :
  - a. Cliquer dans le champ **Enter Target Name** (Entrer le nom de la cible), puis entrer **GAPDH**.
  - b. Dans le menu déroulant Reporter, sélectionner **FAM** (par défaut).
  - c. Dans le menu déroulant Quencher, sélectionner **NFQ-MGB** (par défaut).
  - d. Ne pas modifier le paramètre par défaut dans le champ Color (Couleur).
4. Cliquer sur **Next >** (Suivant).

---

**Remarque :** Pour toutes les cibles, laisser vierge le champ facultatif Enter Gene Name (Entrer le nom du gène). Il est possible de rechercher l'ID du gène/essai lors de la commande des matériels de l'expérience (voir « [Commande des matériels nécessaires pour l'expérience](#) » à la page 142).

---

### Remarques

---

2A. Set Up: Targets Targets Help ?

**Instructions:** Enter the number of targets to quantify in the reaction plate, then set up the assay for each target.

**Set Up Targets** = Required

\* How many **targets** do you want to quantify in the reaction plate?

For each target **assay** in the reaction plate, enter a target name, select the **reporter** and **quencher** to use to detect the target, and select a **target color**. Optionally, enter a gene name, find Applied Biosystems gene expression assays, then select an assay to fill in the **Assay ID**.

* Enter Target Name	Reporter	Quencher	Color	(Optional) Enter Gene Name and Click "Find"	Assay ID
TP53	FAM	NFO-MGB	Blue	<input type="text"/> Find	
GAPDH	FAM	NFO-MGB	Green	<input type="text"/> Find	

### Instructions de création

Lors de la conception d'une expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  :

- Attribuer à chaque cible un nom et une couleur univoques. Le champ Target Name (Nom de la cible) peut contenir au maximum 100 caractères.
- Sélectionner un contrôle endogène pour chaque échantillon. Le contrôle endogène est une cible présente dans tous les échantillons de l'étude. Il doit être exprimé de manière équivalente dans tous les types d'échantillons, indépendamment du traitement ou de l'origine des tissus (les contrôles endogènes sont par exemple  $\beta$ -actin, GAPDH et ARN ribosomal 18S (ARNr 18S)). Le contrôle endogène est utilisé pour normaliser les résultats de la PCR. Il corrige les masses d'échantillons variables, l'efficacité de l'extraction d'acide nucléique, l'efficacité de la rétro-transcription et les erreurs de calibration des pipettes. Remarque :
  - Chaque type d'échantillon (par exemple chaque tissu d'une étude comparant plusieurs tissus) nécessite un contrôle endogène.
  - Si les échantillons sont répartis sur plusieurs plaques, chacune doit avoir un contrôle endogène. En outre, les plaques doivent comporter un contrôle endogène pour chaque type d'échantillon de la plaque.
- Sélectionner le reporter utilisé dans l'essai cible :
  - Sélectionner **FAM** si le fluorophore FAM<sup>TM</sup> est placé à l'extrémité 5' de la sonde TaqMan utilisée pour détecter la cible.
  - Sélectionner **JOE** si le fluorophore JOE<sup>TM</sup> est placé à l'extrémité 5' de la sonde TaqMan utilisée pour détecter la cible.
  - Sélectionner **VIC** si le fluorophore VIC<sup>®</sup> est placé à l'extrémité 5' de la sonde TaqMan utilisée pour détecter la cible.
  - Sélectionner **SYBR** si le fluorophore SYBR<sup>®</sup> Green est utilisé pour détecter l'ADN double brin.

### Remarques

- Sélectionner le quencher utilisé dans l'essai cible :
  - Sélectionner **NFQ-MGB** si un quencher non fluorescent – ligand du petit sillon est placé à l'extrémité 3' de la sonde TaqMan utilisée pour détecter la cible.
  - Sélectionner **None** (Aucun) si le fluorophore SYBR Green est utilisé.

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

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur :

- Les paramètres de l'écran Targets (Cibles), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.
- La sélection d'un contrôle endogène, voir la note d'application *Using TaqMan® Endogenous Control Assays to Select an Endogenous Control for Experimental Studies*.

## Configuration des échantillons

Dans l'écran Samples (Échantillons), entrer le nombre d'échantillons, de réplicats et de contrôles négatifs à inclure dans la plaque de réactions, entrer le nom des échantillons, puis sélectionner les réactions échantillon/cible à configurer.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple :

- Trois échantillons sont utilisés : l'ADNc est préparé à partir d'ARN total isolé dans des tissus de foie, de rein et de cerveau. Les échantillons contiennent des quantités inconnues de TP53 (cible) et GAPDH (contrôle endogène).
- Trois réplicats sont utilisés. Les réplicats sont des réactions identiques contenant des composants et des volumes réactionnels identiques.
- Six contrôles négatifs sont utilisés. Les réactions de contrôle négatif contiennent de l'eau à la place de l'échantillon et ne doivent pas être amplifiées. Le logiciel inclut automatiquement trois contrôles négatifs pour chaque cible.

### Paramètres de l'écran Samples (Échantillons)

1. Cliquer dans le champ **How many samples do you want to test in the reaction plate?** (Combien d'échantillons à tester dans la plaque de réactions ?), puis entrer **3**.

**Remarque :** Le tableau des échantillons se met à jour en fonction du nombre choisi.

2. Cliquer dans le champ **How many replicates do you need?** (Combien de réplicats ?), puis entrer **3**.
3. Configuration de l'échantillon 1 :
  - a. Cliquer dans le champ **Enter Sample Name** (Entrer le nom de l'échantillon), puis entrer **Liver** (Foie).
  - b. Ne pas modifier le paramètre par défaut dans le champ Color (Couleur).

### Remarques

4. Configuration de l'échantillon 2 :
    - a. Cliquer dans le champ **Enter Sample Name** (Entrer le nom de l'échantillon), puis entrer **Kidney** (Rein).
    - b. Ne pas modifier le paramètre par défaut dans le champ Color (Couleur).
  5. Configuration de l'échantillon 3 :
    - a. Cliquer dans le champ **Enter Sample Name** (Entrer le nom de l'échantillon), puis entrer **Brain** (Cerveau).
    - b. Ne pas modifier le paramètre par défaut dans le champ Color (Couleur).
  6. Sélectionner **All Sample/Target Reactions** (Toutes les réactions échantillon/cible) pour tester toutes les cibles sur chaque échantillon.
  7. Dans le panneau Well Count (Décompte des puits), vérifier la présence de :
    - 18 puits inconnus **U**
    - 24 puits vide
- Remarque :** Le logiciel inclut automatiquement trois contrôles négatifs pour chaque cible. Les puits de contrôle négatif **N** sont affichés dans le plan de plaque (puits A1 à A6).
8. Dans le menu déroulant Arrange Plate by (Organiser la plaque par) de l'onglet View Plate Layout (Voir le plan de plaque), sélectionner **Rows** (Lignes) (par défaut).
  9. Cliquer sur **Next >** (Suivant).

## Remarques

### Instructions de préparation

Lors de la conception d'une expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  :

- Attribuer à chaque échantillon un nom et une couleur univoques. Le champ Sample Name (Nom de l'échantillon) peut contenir au maximum 100 caractères.
- Entrer le nombre de réactions identiques (réplicats) à configurer. Applied Biosystems recommande trois réplicats pour chaque réaction d'échantillon.
- Le logiciel inclut automatiquement trois contrôles négatifs pour chaque cible.
- Sélectionner les associations de réactions échantillon/cible souhaitées :
  - Sélectionner **All Sample/Target Reactions** (Toutes les réactions échantillon/cible) pour tester toutes les cibles sur chaque échantillon.
  - Sélectionner **Specify Sample/Target Reactions** (Spécifier les réactions échantillon/cible) pour préciser les cibles à tester dans chaque échantillon.

---

**Remarque :** Dans l'assistant de programmation Design Wizard, chaque réaction de PCR ne peut contenir qu'un échantillon et une cible.

---

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur les paramètres de l'écran Samples (Échantillons), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.

## Configuration des paramètres de quantification relative

Dans l'écran Relative Quantitation Settings (Paramètres de quantification relative), sélectionner l'échantillon de référence et le contrôle endogène pour la quantification relative.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple :

- L'échantillon de référence est constitué de tissu cérébral.
- GAPDH est utilisé comme contrôle endogène.

### Paramètres de l'écran Relative Quantitation Settings (Paramètres de quantification relative)

1. Dans le menu déroulant Which sample do you want to use as the reference sample? (Quel échantillon utiliser comme référence ?), sélectionner **Brain** (Cerveau).
2. Dans le menu déroulant Which target do you want to use as the endogenous control? (Quelle cible utiliser comme contrôle endogène ?), sélectionner **GAPDH**.
3. Cliquer sur **Next >** (Suivant).

### Remarques

---

### Instructions de préparation

Lors de la conception d'une expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  :

- Sélectionner un échantillon de référence issu des échantillons précédemment créés (« [Configuration des échantillons](#) » à la page 131). Les résultats d'amplification des échantillons sont comparés à ceux de l'échantillon de référence pour déterminer l'expression relative.
- Sélectionner un contrôle endogène dans la liste de cibles précédemment créée (« [Configuration des cibles](#) » à la page 129). Les résultats d'amplification du contrôle endogène sont utilisés pour normaliser ceux de la cible en corrigeant les différences de quantité d'acide nucléique ajouté à chaque réaction.

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur :

- Le contenu de l'écran Relative Quantitation Settings (Paramètres de quantification relative), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.
- Les échantillons de référence (également appelés calibrateurs) et les contrôles endogènes, voir le document *User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression*.

### Remarques

## Configuration du profil de thermocyclage

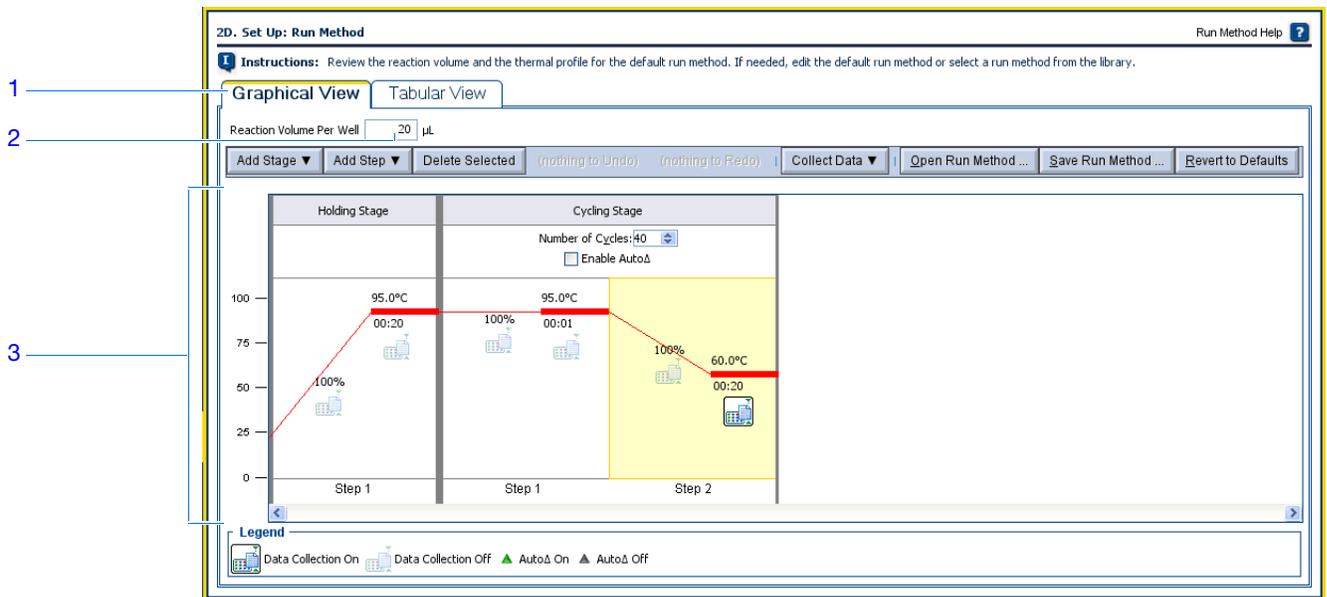
Dans l'écran Run Method (Profil de thermocyclage), vérifier le volume réactionnel et le profil thermique du profil de thermocyclage par défaut. Si nécessaire, modifier le profil de thermocyclage par défaut ou la remplacer par un profil de la bibliothèque Run Method (Profil de thermocyclage).

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple, le profil de thermocyclage par défaut est utilisé sans modification.

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

1. Cliquer sur l'onglet **Graphical View** (Vue graphique) (par défaut) ou **Tabular View** (Vue en tableau).
2. Vérifier que le champ Reaction Volume Per Well (Volume réactionnel par puits) indique **20  $\mu\text{L}$** .
3. Vérifier que le profil thermique affiche les phases de maintien de la température et de thermocyclage indiquées ci-dessous.
4. Cliquer sur **Next >** (Suivant).



### Instructions de création

Lors de la conception d'une expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  :

- Entrer un nombre compris entre 10 et 30 pour le volume réactionnel par puits. Le système StepOne accepte les volumes réactionnels compris entre 10 et 30  $\mu\text{L}$ .

### Remarques

- Consulter le profil thermique :
  - Vérifier que le profil thermique est adapté aux réactifs utilisés.
  - Si la RT-PCR 1 étape est effectuée, inclure une étape de rétro-transcription.Si l'expérience nécessite un autre profil thermique, modifier le profil en cours ou remplacer la réaction de PCR par défaut par un profil de la bibliothèque Run Method (Profil de thermocyclage) intégrée au logiciel StepOne.

**Pour plus d'informations**

Pour plus d'informations sur la bibliothèque Run Method (Profil de thermocyclage) ou sur les paramètres de l'écran Run Method, accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.

Remarques \_\_\_\_\_

## Vérification de la configuration des réactions

Dans l'écran Reaction Setup (Préparation des réactions), sélectionner le type d'essai (si des réactifs TaqMan sont utilisés), puis vérifier les volumes calculés pour la préparation des réactions de PCR et des dilutions d'échantillons. Si nécessaire, modifier le volume réactionnel, le volume excédentaire, ainsi que la concentration des composants et/ou de l'échantillon dilué.

---

**IMPORTANT !** Effectuer ces étapes pour chaque cible présente dans la réaction.

---

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple :

- Des essais Applied Biosystems TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays sont utilisés.
- Le volume réactionnel par puits est de 20  $\mu\text{L}$ .
- Le volume excédentaire est de 10 %.
- Les composants de la réaction sont :
  - Master mix TaqMan<sup>®</sup> Fast Universal PCR (2 $\times$ )
  - Mix primers-sonde TP53 (20 $\times$ )
  - Mix primers-sonde GAPDH (20 $\times$ )
  - Échantillon
  - Eau
- La concentration de l'échantillon dilué est de 5,0 ng/ $\mu\text{L}$ .
- La concentration des échantillons dans la solution mère est de 100 ng/ $\mu\text{L}$ .

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

Paramètres de l'onglet Reaction Mix Calculations (Calcul du mélange réactionnel) pour l'essai TP53

1. Sélectionner l'onglet **Reaction Mix Calculations** (Calcul du mélange réactionnel) (par défaut).
2. Dans le panneau Select Target (Sélectionner la cible), sélectionner **TP53**.
3. Dans le menu déroulant Assay Type (Type d'essai), sélectionner **Inventoried/Made to Order** (En stock/fabriqué sur commande).
4. Vérifier que le champ **Reaction Volume Per Well** (Volume réactionnel par puits) indique **20  $\mu\text{L}$** .
5. Vérifier que le champ **Excess Reaction Volume** (Volume excédentaire) indique **10 %**.
6. Dans le panneau Reactions for c-myc (Réactions pour c-myc) :
  - a. Vérifier que le champ Master Mix Concentration (Concentration du master mix) indique **2,0 $\times$** .
  - b. Vérifier que le champ Assay Mix Concentration (Concentration du mix primers-sonde) indique **20,0 $\times$** .

Remarques \_\_\_\_\_

c. Vérifier les composants et les volumes calculés pour les réactions de PCR :

Composant	Volume ( $\mu\text{L}$ ) pour 1 réaction
Master mix (2,0X)	10,0
Mix primers-sonde (20,0X)	1,0
Échantillon (10X)	2,0 <sup>‡</sup>
H <sub>2</sub> O	7,0
Volume total	20,0

<sup>‡</sup> Le volume d'échantillon est limité à 10 % du volume réactionnel total.

2E. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations

Instructions: For each target assay in the reaction plate, select the assay type (if using TaqMan reagents), then review the calculated volumes for preparing the samples and 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.

Reaction Mix Calculations | Sample | Dilution Calculations

Select Target: TP53, GAPDH

Assay Type: Inventoried/Made to Order | Reaction Volume Per Well: 20.0  $\mu\text{L}$  | Excess Reaction Volume: 10 % | Print Reaction Setup

Reactions for TP53

Master Mix Concentration: 2.0 x | Assay Mix Concentration: 20.0 x

Component	Volume ( $\mu\text{L}$ ) for 1 Reaction
Master Mix (2.0x)	10.0
Assay Mix (20.0x)	1.0
Sample (10x)	2.0
H <sub>2</sub> O	7.0
Total Volume	20.0

#### Paramètres de l'onglet Reaction Mix Calculations (Calcul du mélange réactionnel) pour l'essai GAPDH

1. Sélectionner l'onglet **Reaction Mix Calculations** (Calcul du mélange réactionnel) (par défaut).
2. Dans le panneau Select Target (Sélectionner la cible), sélectionner **GAPDH**.
3. Dans le menu déroulant Assay Type (Type d'essai), sélectionner **Inventoried/Made to Order** (En stock/fabriqué sur commande).
4. Vérifier que le champ **Reaction Volume Per Well** (Volume réactionnel par puits) indique **20  $\mu\text{L}$** .
5. Vérifier que le champ **Excess Reaction Volume** (Volume excédentaire) indique **10 %**.

Remarques

6. Dans le panneau Reactions for GAPDH (Réactions pour GAPDH) :
  - a. Vérifier que le champ Master Mix Concentration (Concentration du master mix) indique **2,0X**.
  - b. Vérifier que le champ Assay Mix Concentration (Concentration du mix primers-sonde) indique **20,0X**.
  - c. Vérifier les composants et les volumes calculés pour les réactions de PCR :

Composant	Volume (µL) pour 1 réaction
Master mix (2,0X)	10,0
Mix primers-sonde (20,0X)	1,0
Échantillon (10X)	2,0‡
H <sub>2</sub> O	7,0
Volume total	20,0

‡ Le volume d'échantillon est limité à 10 % du volume réactionnel total.

### Paramètres de l'onglet Sample Dilution Calculations (Calcul de dilution de l'échantillon)

1. Sélectionner l'onglet **Sample Dilution Calculations (Calcul de dilution de l'échantillon)**.

Remarques \_\_\_\_\_

2. Cliquer dans le champ **Diluted Sample Concentration (10× for Reaction Mix)** (Concentration de l'échantillon dilué (10X pour le mélange réactionnel)), puis entrer **5,0**.
3. Dans le menu déroulant des unités, sélectionner **ng/μL** (par défaut).
4. Vérifier les volumes calculés pour les dilutions d'échantillons :

Nom de l'échantillon	Concentration de la solution mère (ng/μL)	Volume d'échantillon (μL)	Volume du diluant (μL)	Volume total de l'échantillon dilué (μL)
Foie	100,0	1,0	19,0	20,0
Rein	100,0	1,0	19,0	20,0
Cerveau	100,0	1,0	19,0	20,0

**2E. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations** Reaction Setup Help ?

**Instructions:** For each target assay in the reaction plate, select the assay type (if using TaqMan reagents), then review the calculated volumes for preparing the samples and 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.

Reaction Mix Calculations | **Sample Dilution Calculations**

Diluted Sample Concentration (10× for Reaction Mix): 5.0 ng/μL Print Reaction Setup

Sample Name	Stock Concentration (ng/μL)	Sample Volume (μL)	Diluent Volume (μL)	Total Volume of Diluted Sample ...
Liver	100.0	1.0	19.0	20.0
Kidney	100.0	1.0	19.0	20.0
Brain	100.0	1.0	19.0	20.0

### Impression des instructions de configuration des réactions

Imprimer les instructions détaillées de préparation des réactions, puis enregistrer les instructions pour le [Chapitre 7, « Préparation des réactions de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  \$C\_T\$  »](#).

1. Cliquer sur **Print Reaction Setup** (Imprimer la préparation des réactions).

**2E. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations** Reaction Setup Help ?

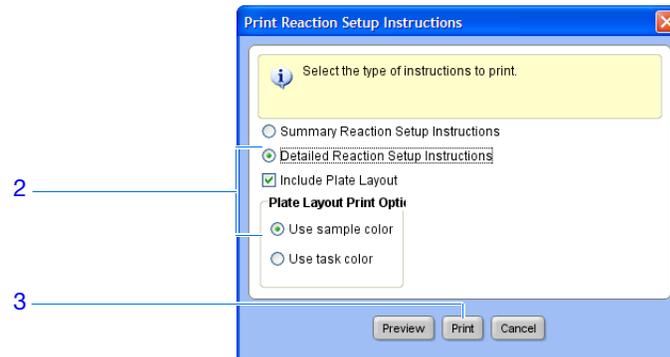
**Instructions:** For each target assay in the reaction plate, select the assay type (if using TaqMan reagents), then review the calculated volumes for preparing the samples and PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.

Reaction Mix Calculations | **Sample Dilution Calculations**

Diluted Sample Concentration (10× for Reaction Mix): 5.0 ng/μL Print Reaction Setup

Remarques \_\_\_\_\_

2. Dans la fenêtre, sélectionner :
  - **Detailed Reaction Setup Instructions (Instructions détaillées de préparation des réactions)**
  - **Include Plate Layout (Inclure le plan de plaque)**
  - **Use Sample Color (Utiliser la couleur d'échantillon)**
3. Cliquer sur **Print** (Imprimer).



4. Dans la fenêtre Print (Imprimer), sélectionner l'imprimante et les options d'impression, puis cliquer sur **OK**.
5. Cliquer sur **Next >** (Suivant).

### Instructions de préparation

Lors de la conception d'une expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  :

- Si des réactifs TaqMan sont utilisés, sélectionner le type d'essai employé :
  - Sélectionner **Inventoried/Made to Order** (En stock/fabriqué sur commande) si des essais Applied Biosystems TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays (en stock ou fabriqués sur commande) ou Applied Biosystems Custom TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays sont utilisés.
  - Sélectionner **Custom** (Personnalisé) si les essais sont créés avec le logiciel Primer Express<sup>®</sup>.
- Entrer un nombre compris entre 10 et 30 pour le volume réactionnel par puits. Le système StepOne accepte les volumes réactionnels compris entre 10 et 30  $\mu$ L.
- Inclure le volume excédentaire pour compenser les pertes dues au pipetage. Applied Biosystems recommande un volume excédentaire d'au moins 10 %.
- Vérifier la concentration du mélange réactionnel pour chaque cible. Si nécessaire :
  - Pour les réactifs TaqMan, modifier la concentration du master mix et du mix primers-sonde.
  - Pour les réactifs SYBR Green, modifier la concentration du master mix, de l'amorce sens et de l'amorce anti-sens.
  - Pour la RT-PCR 1 étape, modifier la concentration de la transcriptase inverse.

### Remarques

- Vérifier les composants du mélange réactionnel pour chaque cible :
  - Si des réactions de PCR Fast sont réalisées, veiller à utiliser un master mix Fast dans les réactions de PCR.
  - Si des réactions de PCR standard sont réalisées, veiller à utiliser un master mix standard dans les réactions de PCR.
  - Pour la RT-PCR 1 étape, veiller à inclure la transcriptase inverse dans les réactions de PCR et à utiliser un tampon spécifique.
- Vérifier le calcul de dilution de chaque échantillon. Si nécessaire, modifier la concentration de l'échantillon dilué (y compris les unités) et de la solution mère.

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur :

- Les paramètres de l'écran Reaction Setup (Préparation des réactions), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.
- Les essais Applied Biosystems, voir les documents :
  - *TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays Protocol*
  - *Custom TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays Protocol*.

## Commande des matériels nécessaires pour l'expérience

Dans l'écran Materials List (Liste des matériels), vérifier la liste des matériels recommandés pour préparer la plaque de réactions de PCR.

Il est possible de se procurer les matériels recommandés dans la boutique Applied Biosystems. Créer un panier, ajouter les articles à la liste d'achat, puis ouvrir une session pour envoyer la commande. Une connexion Internet sans restriction est nécessaire pour accéder à la boutique Applied Biosystems.

---

**Remarque :** Le logiciel StepOne préconise de commander les matériels en fonction de l'application créée. Il s'appuie par principe sur la procédure suivante : création de l'expérience, commande des matériels, puis préparation ([Chapitre 7](#)) et utilisation ([Chapitre 8](#)) de la plaque de réactions à réception des matériels.

---

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple, les matériels recommandés sont :

- MicroAmp<sup>™</sup> Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp<sup>™</sup> Optical 48-Well Adhesive Cover
- Master mix TaqMan<sup>®</sup> Fast Universal PCR (2X), No AmpErase<sup>®</sup> UNG
- Mix primers-sonde TP53 : Hs00153340\_m1 (RefSeq NM\_000546.2)
- Mix primers-sonde GAPDH : Human GAPD (GAPDH) Endogenous Control Kit (réf. 4333764T)

### Remarques

---

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

1. Localiser l'essai cible dans la boutique Applied Biosystems :
    - a. Vérifier que l'ordinateur est connecté à Internet.
    - b. Cliquer dans le champ **Entrer Gene Name** (Entrer le nom du gène), entrer **TP53**, puis cliquer sur **Find Assay** (Rechercher l'essai).
    - c. Dans la fenêtre Find Assay Results (Résultats de la recherche d'essais), sélectionner la ligne **Hs00153340\_m1**.
    - d. Cliquer dans le champ **Entrer Gene Name** (Entrer le nom du gène), entrer **GAPDH**, puis cliquer sur **Find Assay** (Rechercher l'essai).
    - e. Dans la fenêtre Find Assay Results (Résultats de la recherche d'essais), sélectionner la ligne **4333764T**.
    - f. Cliquer sur **Apply Assay Selection** (Utiliser l'essai sélectionné).
  2. Définir les paramètres du panneau Experiment Materials List (Liste des matériels de l'expérience) :
    - a. Dans le menu déroulant Display (Afficher), sélectionner **All Items** (Tous les articles) (par défaut), puis consulter les matériels recommandés. Si nécessaire, déplacer la barre de défilement vers la droite pour voir tous les articles.
    - b. Cocher la case en regard des articles suivants :
      - MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
      - MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Cover
      - Master mix TaqMan® Fast Universal PCR (2X), No AmpErase® UNG
      - Mix primers-sonde TP53 : Hs00153340\_m1 (RefSeq NM\_000546.2)
      - Mix primers-sonde GAPDH : Human GAPD (GAPDH) Endogenous Control Kit (réf. 4333764T)

---

**Remarque :** Pour plus d'informations sur un article, cliquer sur le lien du numéro de référence conduisant à la boutique Applied Biosystems. Sur la page d'accueil, entrer le numéro de référence dans le champ Search (Rechercher), puis cliquer sur  **Go** (Atteindre).

---
  - c. Cliquer sur **Add Selected Items to Shopping List** (Ajouter les articles sélectionnés à la liste d'achats).
3. Vérifier que la section Experiment Shopping List (Liste d'achats pour l'expérience) contient les matériels nécessaires dans les quantités adéquates, puis cliquer sur **Order Materials in List** (Commander les matériels de la liste).

Remarques

**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**

Enter Gene Name:   Enter a gene name, then click "Find Assay" to search the Applied Biosystems Store for a gene expression assay.

**Experiment Materials List**

Display:

<input type="checkbox"/> Check All	Item	Part Number	Description
<input checked="" type="checkbox"/>	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate	<a href="#">4375816</a>	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. An optically clear adhesive film used to seal the samples into the

**Experiment Shopping List (3 items)**

**Shopping Basket Name**

<input type="checkbox"/> Check All	Item	Part Number	Quantity
<input type="checkbox"/>	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction ...	<a href="#">4375816</a>	<input type="text" value="1"/>
<input type="checkbox"/>	MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film	<a href="#">4375928</a>	<input type="text" value="1"/>

4. Dans la fenêtre Order Materials – Log In (Commander des matériels – Ouvrir une session), entrer le nom d'utilisateur et le mot de passe pour accéder à la boutique Applied Biosystems, puis cliquer sur **Login and Submit** (Ouvrir une session et envoyer).

**Remarque :** Si aucun compte n'a été créé dans la boutique Applied Biosystems, cliquer sur **Register Now** (S'inscrire maintenant) pour en ouvrir un.

**Order Materials - Log In**

Log into the Applied Biosystems Store to place the selected items in your shopping basket. If you do not have a user name and password, click "Register Now" to create a new account.

**Store Log In** OR **Register**

To log into the Applied Biosystems Store, enter your user name and password then click "Log In and Submit".

User Name:

Password:

If you do not have an Applied Biosystems account, click the link below to create a new account.

[Register Now](#)

Remember my user name and password for future orders

5. Une fois la commande passée, cliquer sur **Finish Designing Experiment** (Finaliser la création de l'expérience).

## Remarques

### Instructions de préparation

Lors de la conception d'une expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  :

- Vérifier que l'ordinateur dispose d'une connexion Internet sans restriction.
- Applied Biosystems recommande d'employer le logiciel Adobe® Acrobat® Reader et les navigateurs Web suivants sur son site Internet :

Système d'exploitation	Netscape® Navigator	Microsoft® Internet Explorer	Adobe® Acrobat® Reader
Windows® 98/NT/2000	v6.x ou ultérieure	v6.x ou ultérieure	v4.0 ou ultérieure
Macintosh® OS 9 ou ultérieur	v6.x ou ultérieure	v5.2 ou ultérieure	v4.0 ou ultérieure

---

**Remarque :** Pour assurer un fonctionnement optimal, vérifier que les cookies et Java Script sont activés pour le site Web.

---

- Sélectionner tous les matériels nécessaires à l'expérience et les ajouter à la liste d'achats.

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur les paramètres de l'écran Materials List (Liste des matériels), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.

Remarques \_\_\_\_\_

## Finalisation du workflow de l'assistant de programmation Design Wizard

Pour finaliser le workflow de l'assistant de programmation Design Wizard, vérifier le plan de plaque, puis sélectionner une option de fermeture.

### À propos de l'exemple

Le logiciel StepOne sélectionne automatiquement les emplacements des puits dans la plaque de réactions. Dans l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple :

- Les puits sont disposés comme indiqué ci-dessous.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	N TP53	N TP53	N TP53	N GAPDH	N GAPDH	N GAPDH	Liver TP53	Liver TP53
B	Liver TP53	Liver GAPDH	Liver GAPDH	Liver GAPDH	Kidney TP53	Kidney TP53	Kidney TP53	Kidney GAPDH
C	Kidney GAPDH	Kidney GAPDH	Brain TP53	Brain TP53	Brain TP53	Brain GAPDH	Brain GAPDH	Brain GAPDH
D								
E								
F								

- L'expérience est enregistrée en l'état puis fermée.

**Remarque :** Pour l'exemple, ne pas démarrer la réaction de PCR à ce stade.

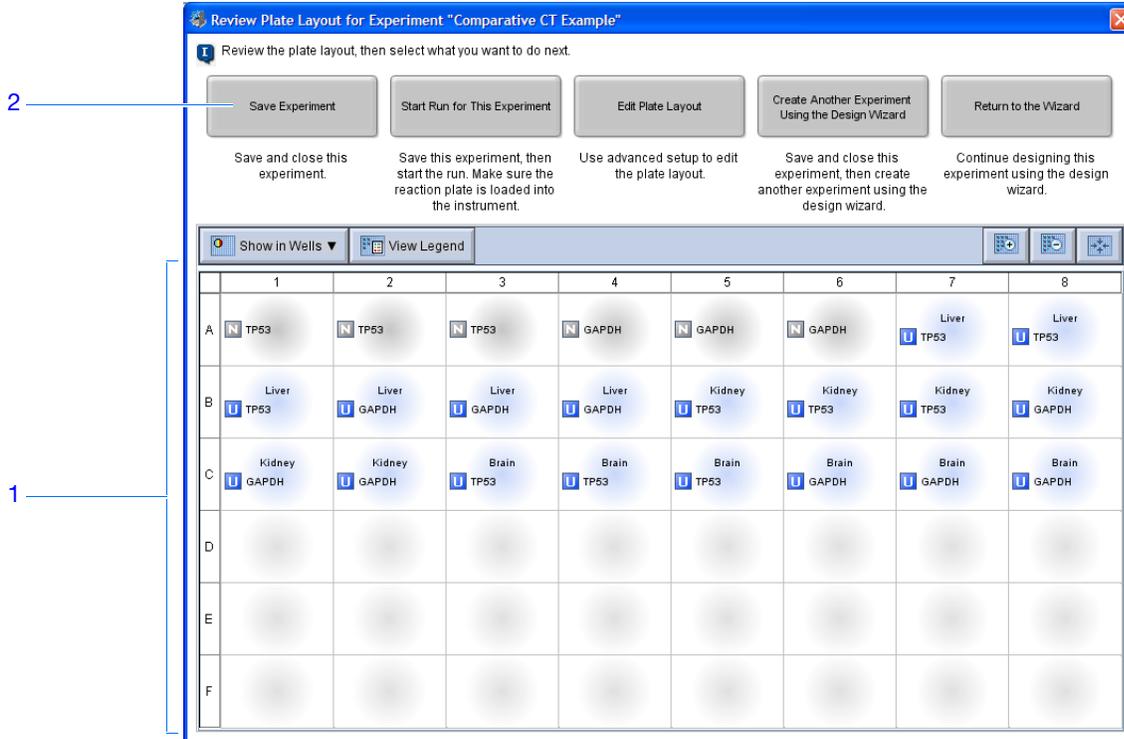
### Finalisation de l'assistant de programmation Design Wizard

1. Dans la fenêtre Review Plate for Experiment (Vérifier la plaque de l'expérience), contrôler le plan de plaque. Vérifier que sont présents :
  - 18 puits inconnus **U**
  - 6 puits de contrôle négatif **N**
  - 24 puits vide

**Remarque :** Si le plan de plaque est incorrect, cliquer sur **Return to the Wizard** (Revenir à l'assistant) et vérifier les valeurs saisies.

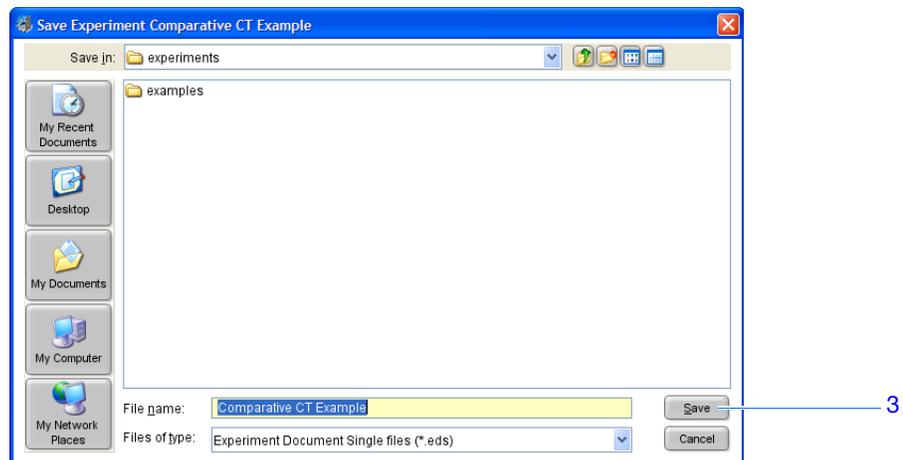
2. Cliquer sur **Save Experiment** (Enregistrer l'expérience).

### Remarques



3. Dans la fenêtre Save Experiment (Enregistrer l'expérience), cliquer sur **Save** (Enregistrer) pour accepter le nom de fichier et l'emplacement par défaut. L'exemple est enregistré puis fermé et l'écran d'accueil réapparaît.

**Remarque :** Par défaut, l'exemple est enregistré dans le dossier Applied Biosystems\StepOne System\experiments.



## Remarques

### Instructions de création

Lors de la conception d'une expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  :

- Dans la fenêtre Review Plate for Experiment (Vérifier la plaque de l'expérience), sélectionner l'option de fermeture appropriée :
  - Cliquer sur **Save Experiment** (Enregistrer l'expérience) pour enregistrer et fermer l'expérience sans apporter d'autres modifications ni démarrer la réaction de PCR.
  - Cliquer sur **Start Run for This Experiment** (Démarrer la réaction de PCR de cette expérience) pour enregistrer l'expérience et démarrer la réaction de PCR. Vérifier que la plaque de réactions est chargée dans l'instrument.
  - Cliquer sur **Edit Plate Layout** (Modifier le plan de plaque) pour utiliser le workflow Advanced Setup (Configuration avancée) afin de modifier le plan de plaque.
  - Cliquer sur **Create Another Experiment Using the Design Wizard** (Créer une autre expérience avec l'assistant de programmation) pour enregistrer et fermer l'expérience, puis créer une autre expérience à l'aide de l'assistant de programmation Design Wizard.
  - Cliquer sur **Return to the Wizard** (Revenir à l'assistant) pour retourner à l'expérience et y apporter des modifications à l'aide de l'assistant de programmation Design Wizard.
- Par défaut, les expériences sont enregistrées dans le dossier Applied Biosystems\StepOne System\experiments. Pour modifier :
  - L'emplacement de sauvegarde d'une expérience, utiliser la fenêtre Save Experiment (Enregistrer l'expérience).
  - L'emplacement de sauvegarde par défaut, sélectionner **Tools (Outils) ▶ Preferences (Préférences)**, puis sélectionner l'onglet **General (Général)** (par défaut). Dans le champ Default Data Folder (Répertoire de données par défaut), choisir l'emplacement souhaité.

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur l'utilisation du workflow Advanced Setup (Configuration avancée), voir « [Workflow Advanced Setup \(Configuration avancée\)](#) » à la page 196.

### Remarques

---



# Préparation des réactions de quantification relative par la méthode de comparaison de $C_T$

Sommaire du chapitre :

■ Présentation du chapitre .....	150
■ Préparation de la matrice .....	151
■ Préparation des dilutions d'échantillons .....	152
■ Préparation du mélange réactionnel .....	154
■ Préparation de la plaque de réactions .....	157

**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.

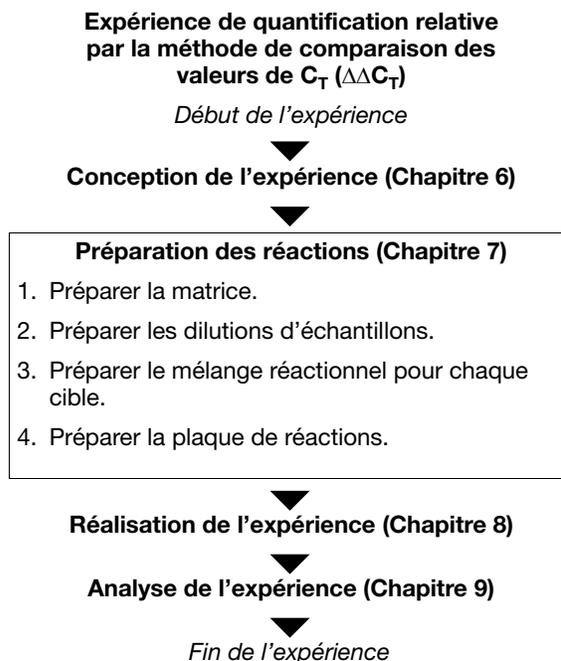
## Remarques

## Présentation du chapitre

Ce chapitre explique comment préparer les réactions de PCR pour l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) donnée en exemple. En outre, il fournit des instructions sur la préparation des réactions de PCR utilisées dans les expériences de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  personnalisées.

### Workflow de l'exemple

Le workflow de préparation des réactions de PCR pour l'exemple fourni avec ce guide de mise en route est indiqué ci-dessous.



Remarques \_\_\_\_\_

## Préparation de la matrice

Préparer la matrice pour les réactions de PCR en utilisant le High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

**IMPORTANT !** Applied Biosystems recommande d'utiliser le High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit pour réaliser une rétro-transcription de l'ADNc à partir de l'ARN total. Les essais TaqMan® Gene Expression Assays ont été conçus à l'aide du High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Les autres protocoles n'ont pas été testés pour une utilisation avec les essais TaqMan Gene Expression Assays.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple, l'échantillon utilisé pour les réactions de PCR est un ADNc synthétisé à partir d'ARN total à l'aide du High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

### Matériels nécessaires

- ARN total isolé dans des tissus de foie, de rein et de cerveau
- Un des Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits :

Kit	Référence
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (200 réactions)	4368814
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (1 000 réactions)	4368813
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (200 réactions)	4374966
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (1 000 réactions)	4374967

**Remarque :** Le High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit était précédemment désigné par l'appellation « High-Capacity cDNA Archive Kit ».

### Préparation de la matrice

Utiliser le High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit pour synthétiser l'ADNc simple brin à partir d'échantillons d'ARN total. Voir les procédures décrites dans le document *Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol* pour :

1. Préparer le master mix RT.



**ATTENTION**

**DANGER CHIMIQUE. 10Le tampon RT** × risque de provoquer l'irritation des yeux, de la peau et de l'appareil respiratoire. Lire la fiche de données de sécurité applicable et suivre les consignes de manipulation. Porter des protections oculaires, des gants et des vêtements appropriés.

### Remarques

2. Préparer les ADNc.
3. Réaliser la rétro-transcription sur un thermocycleur.

### Instructions de préparation

Lors de la préparation d'une expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) :

- Applied Biosystems recommande d'extraire d'abord l'ADN ou l'ARN de tissus ou d'un échantillon.
- Applied Biosystems préconise l'emploi des acides nucléiques suivants :
  - **Complementary cDNA (cDNA)** (ADNc complémentaire (ADNc)) – ADNc synthétisé à partir d'échantillons d'ARN total à l'aide d'un High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.
  - **RNA** – ARN total purifié ou ARNm extrait de tissus ou d'un échantillon.
  - **Genomic DNA (gDNA)** (ADN génomique (ADNg)) – ADNg purifié déjà extrait de tissus ou d'un échantillon.

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur :

- La préparation des ADNc, voir le document *Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol* (réf. 4375575). Ce protocole n'est pas fourni avec les High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits. Il est téléchargeable sur le site Web de Applied Biosystems consacré à la documentation :

**<http://docs.appliedbiosystems.com/search.taf>**

- La préparation des ARN ou de l'ADNg, voir le protocole des réactifs de purification sélectionnés. Pour savoir quel réactif de purification Applied Biosystems utiliser, voir le site Web de Applied Biosystems :

**<http://www.appliedbiosystems.com/>**

## Préparation des dilutions d'échantillons

Préparer les dilutions d'échantillons avant d'ajouter ces derniers au mélange réactionnel final. Diluer les échantillons en utilisant les volumes calculés par le logiciel StepOne™ (« Paramètres de l'onglet Sample Dilution Calculations (Calcul de dilution de l'échantillon) » à la page 139).

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple :

- Il est nécessaire de diluer les échantillons car leur volume est limité à 10 % du volume réactionnel total dans le logiciel StepOne. Le volume réactionnel total étant de 20  $\mu\text{L}$ /réaction, le volume d'échantillon est de 2  $\mu\text{L}$ /réaction.
- La concentration de la solution mère est de 100 ng/ $\mu\text{L}$ . Après dilution de l'échantillon conformément au tableau Sample Dilution Calculations (Calcul de dilution de l'échantillon), sa concentration sera de 5,0 ng/ $\mu\text{L}$ . Le facteur de concentration sera porté à 10X après ajout de 2  $\mu\text{L}$  au mélange réactionnel final (volume : 20  $\mu\text{L}$ ). En définitive, le facteur de concentration dans la réaction finale sera de 1X.

### Remarques

---

- Volumes calculés dans le logiciel :

Nom de l'échantillon	Concentration de la solution mère (ng/ $\mu$ L)	Volume d'échantillon ( $\mu$ L)	Volume du diluant ( $\mu$ L)	Volume total de l'échantillon dilué ( $\mu$ L)
Foie	100,0	1,0	19,0	20,0
Rein	100,0	1,0	19,0	20,0
Cerveau	100,0	1,0	19,0	20,0

### Matériels nécessaires

- Eau pour diluer l'échantillon
- Microtubes
- Multipipettes
- Cônes à filtre
- Solution d'échantillon
- Vortex
- Centrifugeuse

### Préparation des dilutions d'échantillons

1. Étiqueter un microtube distinct pour chaque échantillon dilué :

- **Foie**
- **Rein**
- **Cerveau**

2. Ajouter le volume d'eau requis dans chaque tube vide :

Tube	Nom de l'échantillon	Volume du diluant ( $\mu$ L)
1	Foie	19,0
2	Rein	19,0
3	Cerveau	19,0

3. Ajouter le volume de solution d'échantillon requis dans chaque tube :

Tube	Nom de l'échantillon	Volume d'échantillon ( $\mu$ L)
1	Foie	1,0
2	Rein	1,0
3	Cerveau	1,0

4. Vortexer chaque échantillon dilué pendant 3 à 5 secondes, puis centrifuger brièvement les tubes.
5. Placer les échantillons dilués sur la glace jusqu'à ce que la plaque de réactions soit prête.

Remarques \_\_\_\_\_

- Instructions de préparation** Lors de la préparation d'une expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  :
- Il est parfois nécessaire de diluer les échantillons car leur volume est limité à 10 % du volume réactionnel total dans le logiciel StepOne. Préparer les dilutions d'échantillons avant d'ajouter ces derniers au mélange réactionnel final.
  - Pour que les essais TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays et Custom TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays produisent des performances optimales, utiliser 10 à 100 ng d'ADNc pour chaque 20  $\mu$ L de réaction. Pour les réactifs Fast, Applied Biosystems recommande l'emploi de 10 ng.
  - Utiliser du tampon TE ou de l'eau pour diluer l'échantillon.
- Pour plus d'informations** Pour plus d'informations sur les essais Applied Biosystems, voir les documents :
- *TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays Protocol*
  - *Custom TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays Protocol*.

## Préparation du mélange réactionnel

Préparer le mélange réactionnel en utilisant les composants et volumes calculés par le logiciel StepOne (voir « Paramètres de l'onglet Reaction Mix Calculations (Calcul du mélange réactionnel) pour l'essai TP53 » à la page 137 et « Paramètres de l'onglet Reaction Mix Calculations (Calcul du mélange réactionnel) pour l'essai GAPDH » à la page 138).

---

**Remarque :** Le logiciel calcule tous les composants des réactions de PCR. Toutefois, pour préparer le mélange réactionnel à l'aide des indications de cette section, ajouter uniquement le master mix, le mix primers-sonde et l'eau. Ajouter l'échantillon pendant la préparation de la plaque (voir « Préparation de la plaque de réactions » à la page 157).

---

- À propos de l'exemple** Dans l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple :
- Composants du mélange réactionnel :
    - Master mix TaqMan<sup>®</sup> Fast Universal PCR (2 $\times$ )
    - Mix primers-sonde TP53 (20 $\times$ )
    - Mix primers-sonde GAPDH (20 $\times$ )
    - Eau

---

### Remarques

- Volumes calculés dans le logiciel pour les deux cibles :

Composant	Volume (µL) pour 1 réaction
Master mix (2,0X)	10,0
Mix primers-sonde (20,0X)	1,0
H <sub>2</sub> O	7,0
Volume total	18,0

Remarque : L'échantillon n'est pas ajouté à ce stade.

### Matériels nécessaires

- Microtubes
- Multipipettes
- Cônes à filtre
- Composants du mélange réactionnel (voir ci-dessus)
- Centrifugeuse

### Préparation du mélange réactionnel

**IMPORTANT !** Préparer le mélange réactionnel séparément pour chaque essai cible.

1. Étiqueter un tube de taille adéquate pour chaque mélange réactionnel :
  - **Mélange réactionnel TP53**
  - **Mélange réactionnel GAPDH**
2. Pour l'essai TP53, ajouter les volumes requis de chaque composant dans le tube contenant le mélange réactionnel TP53 :

Composant	Volume (µL) pour 1 réaction	Volume (µL) pour 12 réactions (plus 10 % minimum)
Master mix TaqMan® Fast Universal PCR (2X)	10,0	132,0
Mix primers-sonde TP53 (20X)	1,0	13,2
Eau	7,0	92,4
<b>Volume total du mélange réactionnel</b>	18,0	237,6

### Remarques

3. Pour l'essai GAPDH, ajouter les volumes requis de chaque composant dans le tube contenant le mélange réactionnel GAPDH :

Composant	Volume ( $\mu\text{L}$ ) pour 1 réaction	Volume ( $\mu\text{L}$ ) pour 12 réactions (plus 10 % minimum)
Master mix TaqMan® Fast Universal PCR (2X)	10,0	132,0
Mix primers-sonde GAPDH (20X)	1,0	13,2
Eau	7,0	92,4
<b>Volume total du mélange réactionnel</b>	<b>18,0</b>	<b>237,6</b>

4. Mélanger le mélange réactionnel dans chaque tube en le pipétant et le refoulant délicatement plusieurs fois, puis boucher les tubes.
5. Centrifuger brièvement les tubes pour chasser les bulles d'air.
6. Placer les mélanges réactionnels sur la glace jusqu'à ce que la plaque de réactions soit prête.

### Instructions de préparation

Lors de la préparation d'une expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  :

- Si l'expérience inclut plusieurs gènes cible, préparer distinctement le mélange réactionnel pour chacun d'eux.
- Inclure un excédent de volume dans les calculs pour compenser les pertes subies pendant le transfert des réactifs. Applied Biosystems recommande un excédent de volume d'au moins 10 %.
- 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 :

- *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
- *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*

### Remarques

---

## Préparation de la plaque de réactions

Préparer les réactions pour chaque réplicat, puis les transférer dans la plaque de réactions. Utiliser le plan de plaque affiché dans le logiciel StepOne.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple :

- Une MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate est utilisée.
- Le volume réactionnel est de 20  $\mu$ L/puits.
- Contenu de la plaque de réactions :
  - 18 puits inconnus **U**
  - 6 puits de contrôle négatif **N**
  - 24 puits vides
- Le plan de plaque automatiquement généré par le logiciel StepOne est utilisé :

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	<b>N</b> TP53	<b>N</b> TP53	<b>N</b> TP53	<b>N</b> GAPDH	<b>N</b> GAPDH	<b>N</b> GAPDH	<b>U</b> Liver TP53	<b>U</b> Liver TP53
B	<b>U</b> Liver TP53	<b>U</b> Liver GAPDH	<b>U</b> Liver GAPDH	<b>U</b> Liver GAPDH	<b>U</b> Kidney TP53	<b>U</b> Kidney TP53	<b>U</b> Kidney TP53	<b>U</b> Kidney GAPDH
C	<b>U</b> Kidney GAPDH	<b>U</b> Kidney GAPDH	<b>U</b> Brain TP53	<b>U</b> Brain TP53	<b>U</b> Brain TP53	<b>U</b> Brain GAPDH	<b>U</b> Brain GAPDH	<b>U</b> Brain GAPDH
D								
E								
F								

### Matériels nécessaires

- Microtubes
- Multipipettes
- Cônes à filtre
- Mélange réactionnel TP53 (voir [page 155](#))
- Mélange réactionnel GAPDH (voir [page 155](#))
- Eau
- Échantillons (voir [page 153](#))
- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Cover
- Centrifugeuse

### Préparation de la plaque

1. Pour chaque cible, préparer les réactions de contrôle négatif :

Remarques \_\_\_\_\_

- a. Dans un tube de taille adéquate, ajouter les volumes de mélange réactionnel et d'eau indiqués ci-dessous.

Tube	Mélange réactionnel	Volume du mélange réactionnel ( $\mu\text{L}$ )	Volume d'eau ( $\mu\text{L}$ )
1	Mélange réactionnel TP53	59,4	6,6
2	Mélange réactionnel GAPDH	59,4	6,6

- b. Mélanger la réaction en la pipétant et la refoulant délicatement plusieurs fois, puis boucher le tube.
- c. Centrifuger brièvement le tube pour chasser les bulles d'air.
- d. Ajouter 20  $\mu\text{L}$  de la réaction de contrôle négatif dans les puits appropriés de la plaque de réactions.

2. Pour chaque réplicat, préparer les réactions des échantillons inconnus :

- a. Dans des tubes de taille adéquate, ajouter les volumes de mélange réactionnel et d'échantillon indiqués ci-dessous.

Tube	Réaction inconnue	Mélange réactionnel	Volume du mélange réactionnel ( $\mu\text{L}$ )	Échantillon	Volume d'échantillon ( $\mu\text{L}$ )
1	Foie TP53	Mélange réactionnel TP53	59,4	Foie	6,6
2	Rein TP53	Mélange réactionnel TP53	59,4	Rein	6,6
3	Cerveau TP53	Mélange réactionnel TP53	59,4	Cerveau	6,6
4	Foie GAPDH	Mélange réactionnel GAPDH	59,4	Foie	6,6
5	Rein GAPDH	Mélange réactionnel GAPDH	59,4	Rein	6,6
6	Cerveau GAPDH	Mélange réactionnel GAPDH	59,4	Cerveau	6,6

- b. Mélanger les réactions en les pipétant et les refoulant délicatement plusieurs fois, puis boucher les tubes.

Remarques \_\_\_\_\_

- c. Centrifuger brièvement les tubes pour chasser les bulles d'air.
  - d. Ajouter 20  $\mu$ L de la réaction d'échantillon inconnu dans les puits appropriés de la plaque de réactions.
3. Sceller la plaque de réactions avec un film adhésif optique.
  4. Centrifuger brièvement la plaque de réactions pour chasser les bulles d'air.
  5. Jusqu'au moment de démarrer la réaction de PCR, placer la plaque de réactions sur la glace dans l'obscurité.

### Instructions de préparation

Lors de la préparation d'une expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  :

- Contrôler la liste des consommables utilisés.
- Vérifier que l'agencement des réactions de PCR correspond au plan de plaque affiché dans le logiciel StepOne. Deux choix sont possibles :
  - Accepter le plan de plaque généré automatiquement par le logiciel.

*ou*

  - Utiliser le workflow Advanced Setup (Configuration avancée) pour modifier le plan de plaque dans le logiciel.

### 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 :
  - *TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays Protocol*
  - *Custom TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays Protocol*
- Les consommables, voir [page 3](#).
- L'utilisation du workflow Advanced Setup (Configuration avancée) pour modifier le plan de plaque, voir « [Workflow Advanced Setup \(Configuration avancée\)](#) » à la [page 196](#).

### Remarques

---

Remarques \_\_\_\_\_

---



# Réalisation de l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison de $C_T$

Sommaire du chapitre :

■ Présentation du chapitre .....	162
■ Préparation de la réaction de PCR .....	163
■ Réalisation de l'expérience.....	165

**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.

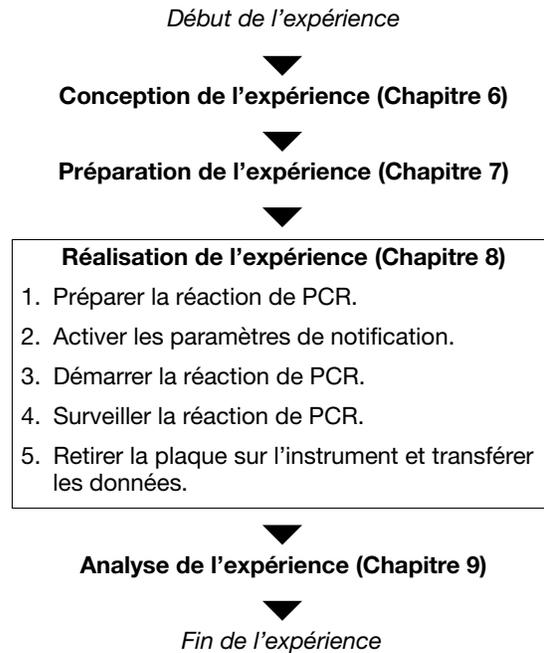
Remarques

## Présentation du chapitre

Ce chapitre explique comment réaliser une réaction sur le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™.

### Workflow de l'exemple

Le workflow de l'exemple fourni avec ce guide de mise en route est indiqué ci-dessous.



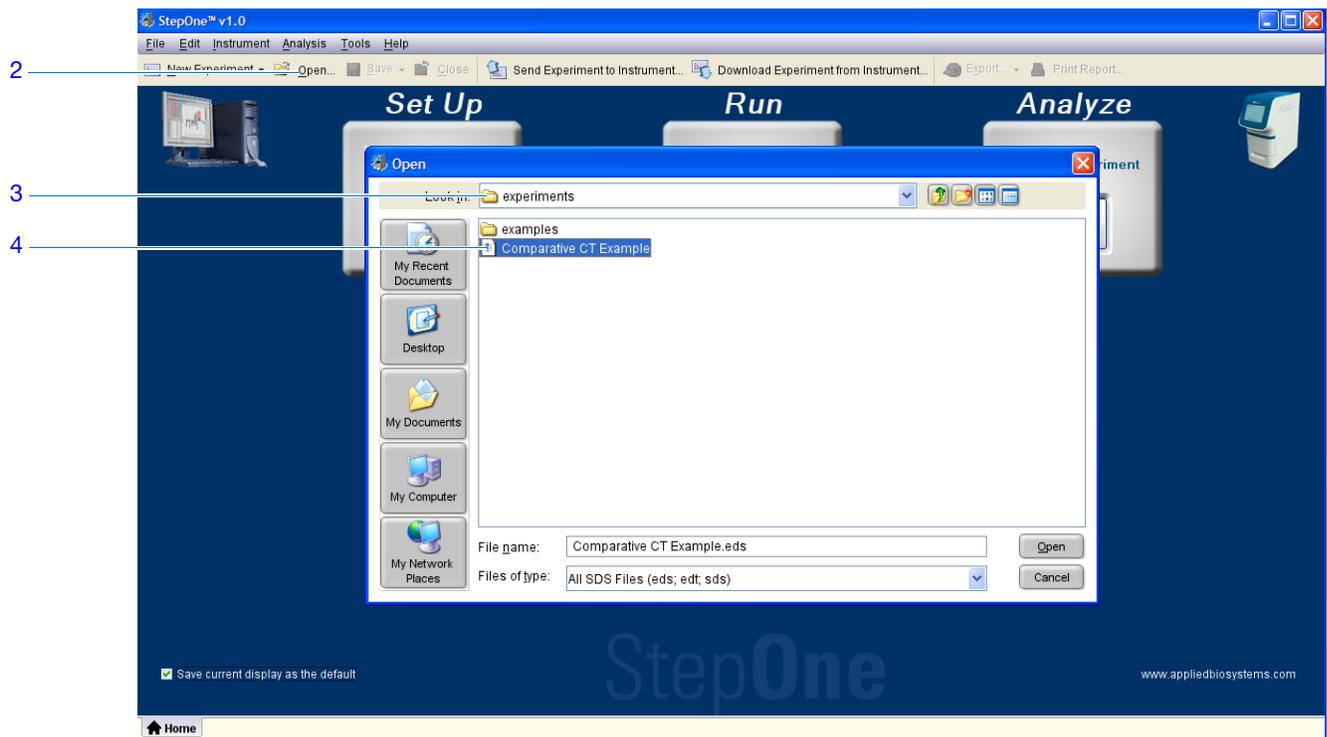
Remarques \_\_\_\_\_

## 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'exemple

1. Si le logiciel StepOne™ n'est pas déjà en cours d'exécution, double-cliquer sur le raccourci du logiciel StepOne (  ) ou sélectionner **Start ▶ (Démarrer) All Programs ▶ (Tous les programmes) Applied Biosystems ▶ StepOne ▶ StepOne v1.0.**
2. Dans l'écran Home (Accueil), cliquer sur **Open** (Ouvrir).
3. Dans la fenêtre Open (Ouvrir), accéder au dossier **experiments** (par défaut).
4. Double-cliquer sur **Comparative CT Example** (Exemple de comparaison des valeurs de  $C_T$ ) pour ouvrir le fichier d'exemple créé au [Chapitre 6](#).



### 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.

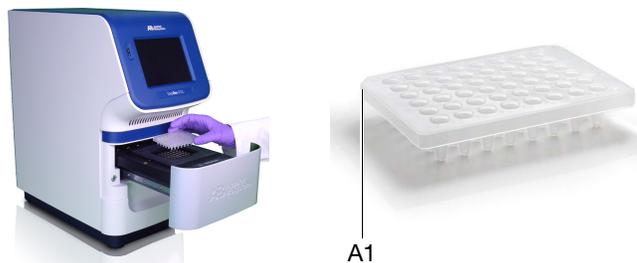
1. Ouvrir le tiroir de l'instrument.



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.



Remarques \_\_\_\_\_

## Réalisation de l'expérience

Appliquer les procédures suivantes du chapitre 4 :

- « (Facultatif) Activation des notifications » à la page 69
- « Démarrage de la réaction de PCR » à la page 71
- « Suivi de la réaction de PCR » à la page 75
- « Retrait de la plaque de réactions et transfert des données » à la page 84

Veiller à sélectionner le fichier **Comparative CT Example.eds** et non le fichier **Relative Standard Curve Example.eds**.

Remarques \_\_\_\_\_

Remarques \_\_\_\_\_

---

## 9

# Analyse de l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison de $C_T$

Sommaire du chapitre :

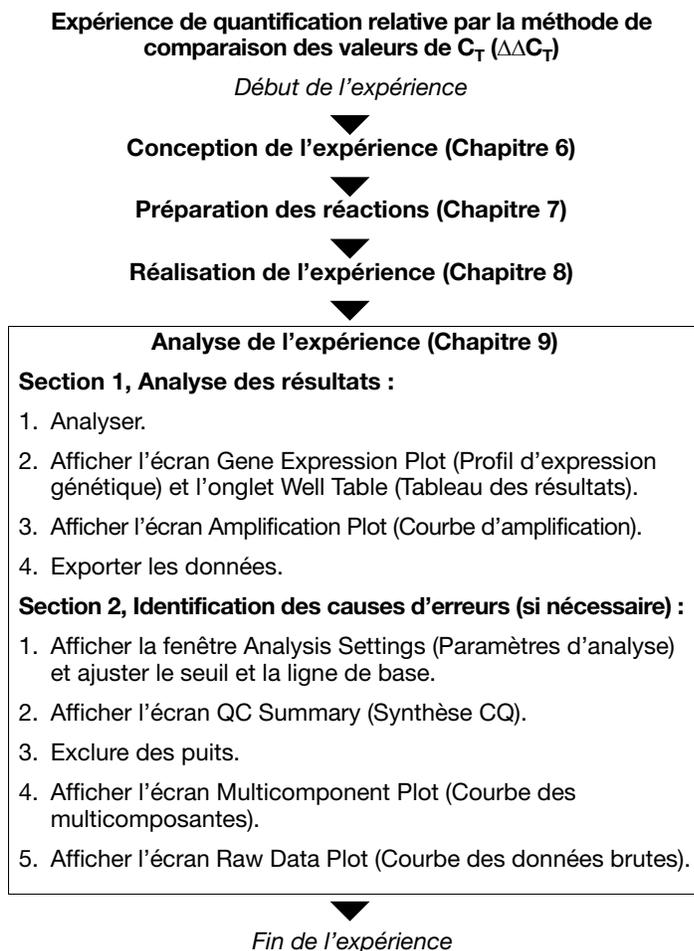
- Présentation du chapitre ..... 168
- Section 9.1 Analyse des résultats ..... 169
- Section 9.2 Identification des causes d'erreurs (si nécessaire) ..... 183

**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.

## Présentation du chapitre

Le logiciel StepOne™ analyse les données à l'aide de la méthode de quantification par « comparaison des valeurs de  $C_T$  » ( $\Delta\Delta C_T$ ). La section 1 de ce chapitre explique comment vérifier les données analysées avec plusieurs écrans d'analyse et comment les exporter. En cas de résultats ambigus, la section 2 explique comment identifier les causes possibles des imprécisions.

**Workflow de l'exemple** Le workflow d'analyse de l'exemple fourni avec ce guide de mise en route est indiqué ci-dessous.



Remarques \_\_\_\_\_

## Section 9.1 Analyse des résultats

---

Sommaire de la section :

■ Analyse de l'expérience . . . . .	170
■ Affichage du profil d'expression génétique et du tableau des résultats . . . . .	175
■ Affichage des courbe d'amplification . . . . .	177
■ Export des données . . . . .	182

Remarques \_\_\_\_\_

## Analyse de l'expérience

Le logiciel StepOne analyse l'expérience et affiche les résultats dans les écrans d'analyse (par exemple les écrans Amplification Plot (Courbe d'amplification), QC Summary (Synthèse CQ), etc.).

### À propos de l'exemple

Pour l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple, utiliser le fichier de données installé avec le logiciel StepOne. Il a été créé à l'aide des paramètres de conception fournis au [Chapitre 6](#), puis exécuté et analysé sur un instrument StepOne™.

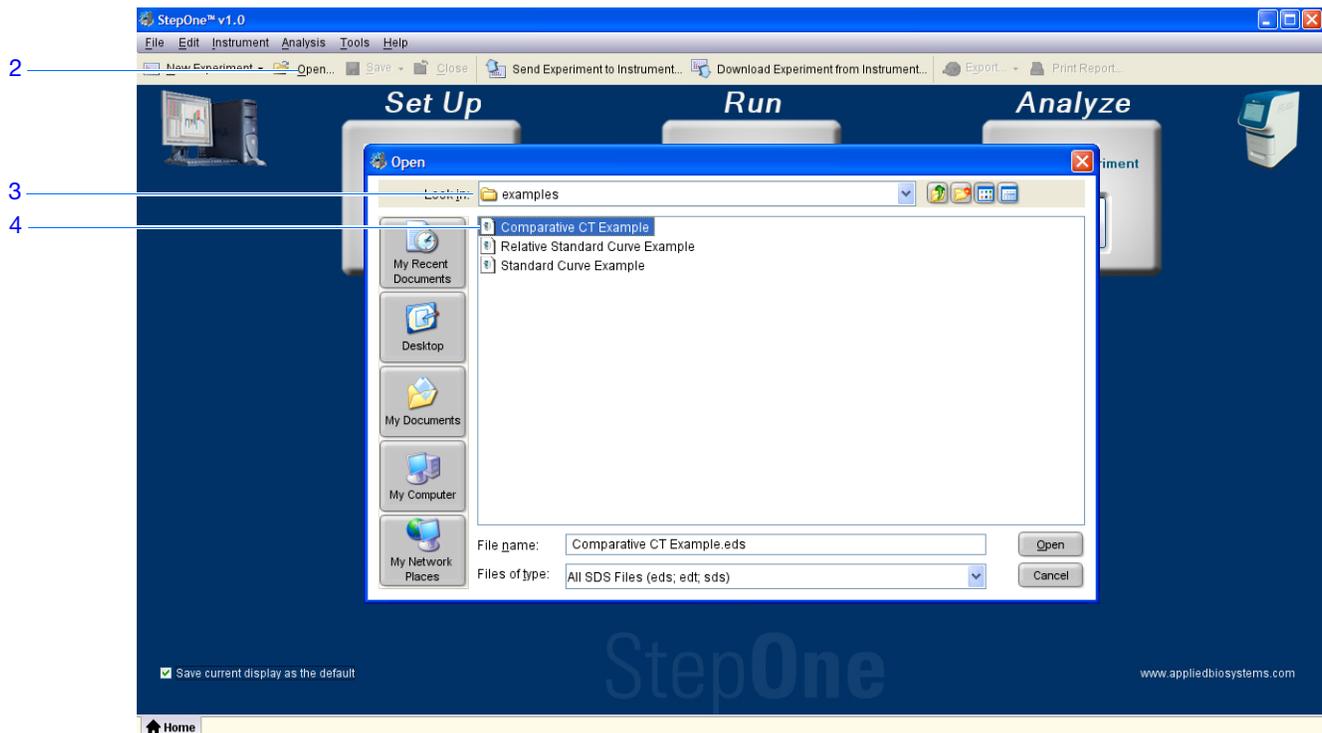
Le fichier de données de l'exemple est disponible sur l'ordinateur à l'emplacement suivant :

<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 dur utilisé par défaut pour l'installation du logiciel est le lecteur C.

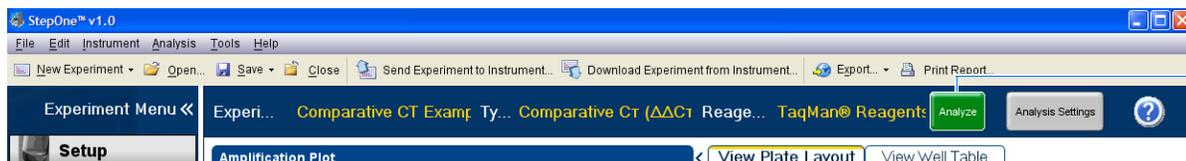
### Analyse de l'exemple

1. Si le logiciel StepOne n'est pas déjà en cours d'exécution, double-cliquer sur le raccourci du logiciel StepOne (  ) ou sélectionner **Start ▶ (Démarrer) All Programs ▶ (Tous les programmes) Applied Biosystems ▶ StepOne ▶ StepOne v1.0.**
2. Dans l'écran Home (Accueil), cliquer sur **Open (Ouvrir).**
3. Dans la fenêtre Open (Ouvrir), accéder au dossier **examples.**
4. Double-cliquer sur **Comparative CT Example (Exemple de comparaison des valeurs de CT)** pour ouvrir le fichier de données de l'exemple.



Remarques \_\_\_\_\_

5. Cliquer sur **Analyze** (Analyser). Le logiciel analyse les données en utilisant les paramètres d'analyse par défaut.



6. Voir « [Éléments du logiciel](#) » ci-dessous et « [Conseils de navigation](#) » à la page 173 pour plus d'informations sur la navigation dans les écrans d'analyse.

**Instructions** Lors de l'analyse d'une expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  :

- Immédiatement après une réaction, le logiciel StepOne analyse automatiquement les données en utilisant les paramètres d'analyse par défaut, puis il affiche l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) sur l'ordinateur.
- Pour réanalyser les données, sélectionner tous les puits du plan de plaque, puis cliquer sur **Analyze** (Analyser).

## Éléments du logiciel

Les éléments du logiciel StepOne présents dans les écrans d'analyse sont illustrés ci-dessous.

1. Barre de menus – Affiche les menus disponibles dans le logiciel :
  - File (Fichier)
  - Edit (Édition)
  - Instrument
  - Analysis (Analyse)
  - Tools (Outils)
  - Help (Aide)
2. Barre d'outils – Affiche les outils disponibles dans le logiciel :
  - New Experiment (Nouvelle expérience)
  - Open (Ouvrir)
  - Save (Enregistrer)
  - Close (Fermer)
  - Send Experiment to Instrument (Envoyer une expérience à l'instrument)
  - Download Experiment from Instrument (Télécharger une expérience à partir de l'instrument)
  - Export (Exporter)
  - Print Report (Imprimer un rapport)
3. En-tête de l'expérience – Affiche le type et le nom de l'expérience, ainsi que les réactifs requis pour l'expérience ouverte.

Remarques \_\_\_\_\_

4. Panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience) – Fournit des liens vers les écrans suivants du logiciel :
  - Écrans de configuration
  - Écrans de lancement
  - Écrans d'analyse :
    - Amplification Plot (Courbe d'amplification)
    - Gene Expression (Expression génétique)
    - Multicomponent Plot (Courbe des multicomposantes)
    - Raw Data Plot (Courbe des données brutes)
    - QC Summary (Synthèse CQ)
    - Multiple Plots View (Voir plusieurs courbes)
5. Panneau Plot (Courbe) – Affiche l'écran d'analyse sélectionné pour l'expérience ouverte.
6. Onglets View (Voir) – Montrent le plan de plaque ou le tableau des résultats de l'expérience ouverte.
7. Onglets Experiment (Expérience) – Affichent un onglet pour chaque expérience ouverte.

The screenshot displays the StepOne v1.0 software interface. The top menu bar includes File, Edit, Instrument, Analysis, Tools, and Help. Below the menu bar is a toolbar with options like New Experiment, Open, Save, Close, Send Experiment to Instrument, Download Experiment from Instrument, Export, and Print Report. The main interface is divided into several sections:

- Experiment Menu (1):** A vertical sidebar on the left containing buttons for Setup, Run, Analysis, Amplification Plot, Gene Expression, Multicomponent Plot, Raw Data Plot, QC Summary, and Multiple Plots View.
- Amplification Plot (4):** A central window showing a graph of  $\Delta Rn$  vs Cycle. The graph displays several sigmoidal curves. Below the graph are Plot Settings (Plot Type:  $\Delta Rn$  vs Cycle, Graph Type: Linear, Color Plot By: Well) and Options (Target: All, Threshold: Auto, Auto Baseline, Show: Threshold, Baseline Start: Well, Target, Baseline End: Well).
- View Plate Layout (6):** A window on the right showing a grid of wells (A-F, 1-8). Each well contains a sample name and its  $C_T$  value. For example, well A1 contains TP53 with  $C_T$  30.00. The bottom of the grid shows a summary: Wells: 18 Unknown, 6 Negative Control, 24 Empty.
- Analysis Summary (5):** A status bar at the bottom of the software window showing: Total Wells in Plate: 4, Wells Set Up: 24, Wells Processed: 24, Wells Flagged: 0, Wells Omitted from Analysis: 0, Samples Used: 3, Targets Used: 2.
- Onglets View (7):** A tabbed interface at the bottom showing the active experiment: Comparative CT Example.ede.

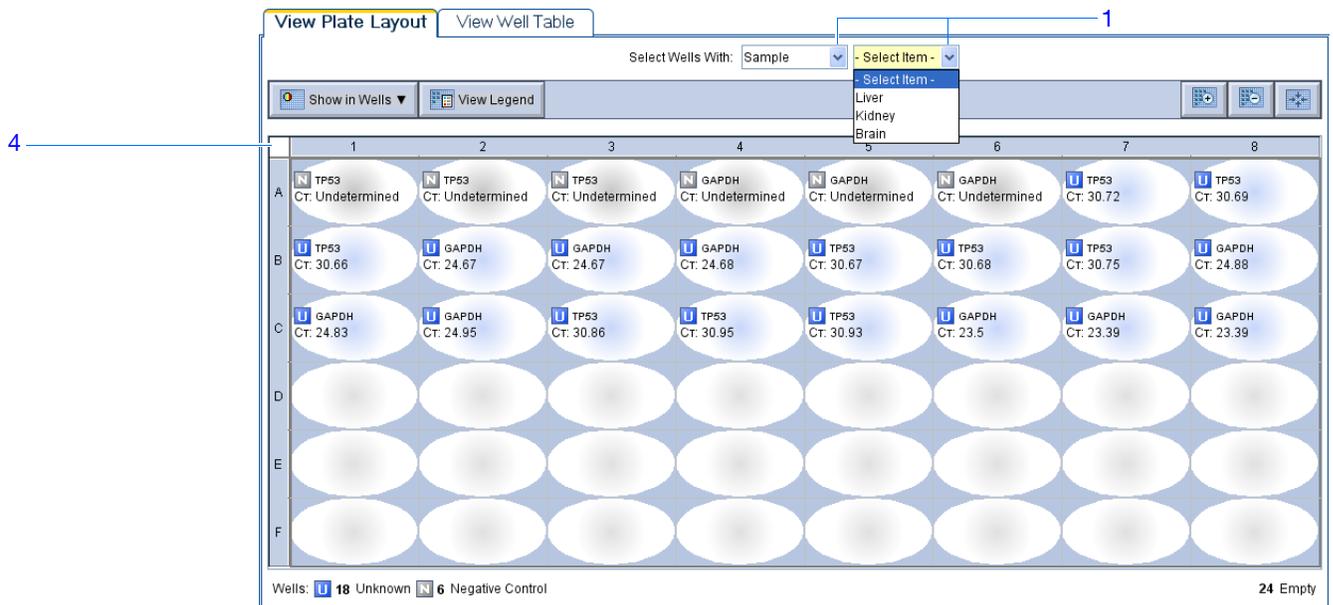
## Remarques

**Conseils de navigation**

**Sélection d'un puits**

Pour afficher certains puits dans les écrans d'analyse, les sélectionner dans l'onglet View Plate Layout (Voir le plan de plaque) comme suit :

1. Pour sélectionner un puits d'un type particulier, utiliser les menus déroulants Select Wells With (Sélectionner les puits avec). Sélectionner **Sample** (Échantillon), **Target** (Cible) ou **Task** (Fonction), puis le nom de l'échantillon, de la cible ou de la fonction.
2. Pour sélectionner un seul puits, cliquer dessus dans le plan de plaque.
3. Pour sélectionner plusieurs puits, cliquer sur un premier puits et former un rectangle de sélection contenant les autres puits tout en maintenant le bouton de la souris enfoncé, appuyer sur **Ctrl** et cliquer sur chaque puits ou appuyer sur **Maj** et cliquer sur des puits adjacents dans le plan de plaque.
4. Pour sélectionner les 48 puits, cliquer sur le coin supérieur gauche du plan de plaque.

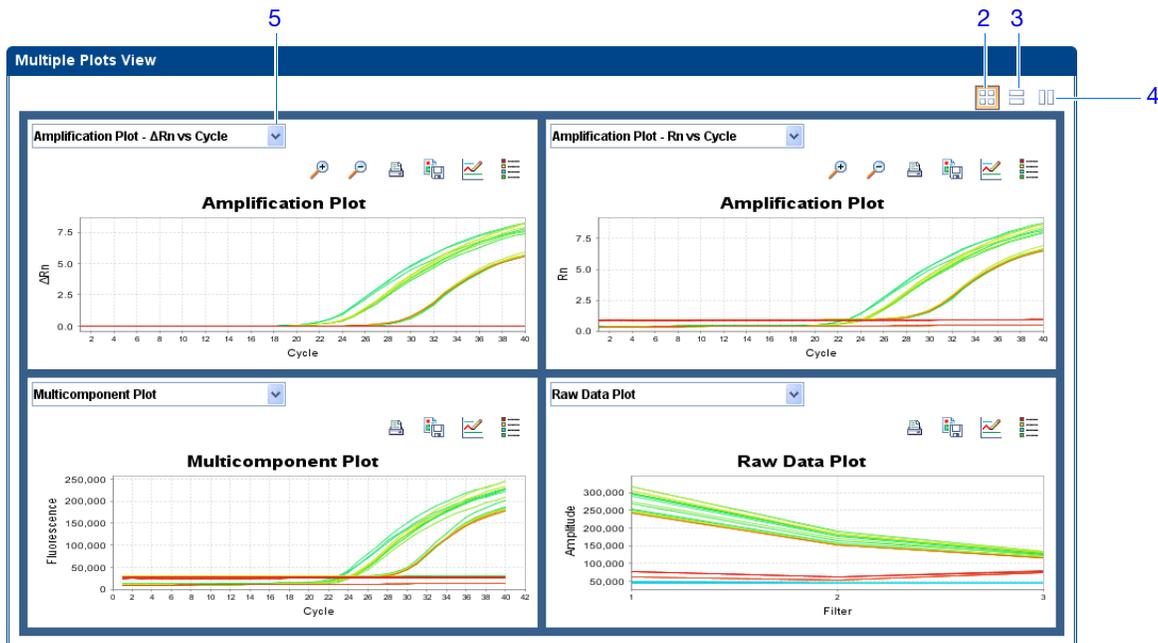


**Remarques**

### Affichage de plusieurs courbes

Utiliser l'écran Multiple Plots (Plusieurs courbes) pour afficher jusqu'à quatre courbes en même temps. Pour naviguer dans l'écran Multiple Plots (Plusieurs courbes) :

1. Dans le panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience), sélectionner **Analysis (Analyse)** ▶  **Multiple Plots View** (Voir plusieurs courbes).
2. Pour afficher quatre courbes, cliquer sur  **Show plots in a 2 × 2 matrix** (Afficher les courbes dans un cadre 2X2).
3. Pour afficher deux courbes superposées, cliquer sur  **Show plots in two rows** (Afficher les courbes sur deux lignes).
4. Pour afficher deux courbes juxtaposées, cliquer sur  **Show plots in two columns** (Afficher les courbes sur deux colonnes).
5. Pour afficher une courbe particulière, la sélectionner dans le menu déroulant au-dessus de chaque affichage.



### Remarques

## Affichage du profil d'expression génétique et du tableau des résultats

L'écran Gene Expression Plot (Profil d'expression génétique) affiche le résultat des calculs de quantification relative dans le profil d'expression génétique. Deux courbes sont disponibles :

- **RQ vs Target** (RQ vs Cible) – Regroupe les valeurs de quantification relative (RQ) par cible. Un profil de chaque échantillon est réalisé pour toutes les cibles.
- **RQ vs Sample** (RQ vs Échantillon) – Regroupe les valeurs de quantification relative (RQ) par échantillon. Un profil de chaque cible est réalisé pour tous les échantillons.

Chaque profil peut s'afficher sous la forme d'un graphique du type suivant : linéaire, log10, Ln, log2.

L'onglet View Well Table (Voir le tableau des résultats) affiche les données de chaque puits de la plaque de réactions, notamment :

- Le nom de l'échantillon, le nom de la cible, la fonction et les fluorophores
- Les valeurs du cycle seuil calculé ( $C_T$ ), de la fluorescence normalisée ( $R_n$ ) et de la quantité
- Codes d'alerte

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple, vérifier :

- Chaque cible de l'écran Gene Expression Plot (Profil d'expression génétique) pour relever le niveau d'expression (ou taux de variation) de l'échantillon cible par rapport à l'échantillon de référence.
- Le tableau des résultats pour évaluer la précision des réplicats.

### Affichage de la courbe de l'expression génétique et du tableau des résultats

1. Dans le panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience), sélectionner **Analysis (Analyse)** ►  **Gene Expression** (Expression génétique).

---

**Remarque :** Si l'écran Gene Expression Plot (Profil d'expression génétique) ne contient pas de données, cliquer sur **Analyze** (Analyser).

---

2. Dans l'écran Gene Expression Plot (Profil d'expression génétique) :
  - a. Dans le menu déroulant Plot Type (Type de courbe), sélectionner **RQ vs Sample** (RQ vs Échantillon).
  - b. Dans le menu déroulant Graph Type (Type de graphique), sélectionner **Log10**.
  - c. Dans le menu déroulant Orientation, sélectionner **Vertical Bars** (Barres verticales).
  - d. Cliquer sur  **Show/Hide the plot legend** (Afficher/masquer la légende de la courbe).

### Remarques

---

Dans l'exemple, le niveau d'expression de TP53 dans le foie et le rein est affiché par rapport à son niveau d'expression dans l'échantillon de référence (le cerveau). Comme l'échantillon de référence est comparé à lui-même, le niveau d'expression est 1. Lorsque le résultat est affiché dans le graphique de type Log10, le niveau d'expression de l'échantillon de référence y est représenté par un 0 ( $\log_{10}$  de 1 = 0).



### 3. Afficher le tableau des résultats :

- Dans le panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience), sélectionner **Analysis (Analyse)** ►  **Amplification Plot** (Courbe d'amplification), puis cliquer sur l'onglet **View Well Table** (Voir le tableau des résultats).
- Dans le menu déroulant Group By (Grouper par), sélectionner **Replicate** (Réplicat).
- Examiner la colonne  $C_T$  SD (E-T CT) pour évaluer la précision des réplicats. L'exemple ne comporte aucune amplification non conforme.

#### Remarques

The screenshot shows a software window titled 'View Well Table'. At the top, there are two tabs: 'View Plate Layout' and 'View Well Table', with 'View Well Table' selected. Below the tabs, there are two dropdown menus for 'Select Wells With:'. Below that, there are buttons for 'Show in Table' and 'Group By', and 'Expand All' and 'Collapse All' buttons. The main area is a table with the following columns: #, Well, Omit, Flag, Sample..., Target N..., Task, Dyes, Ct, Ct Mean, Ct SD, Rn, ΔRn, and ΔCt. The table contains 12 rows of data, grouped by sample type (Brain, TP53, GAPDH, Kidney). Callout 3a points to the 'View Well Table' tab, 3b points to the 'Show in Table' button, and 3c points to the 'Expand All' button.

**Remarque :** Pour afficher/masquer des colonnes dans le tableau des résultats, sélectionner/désélectionner le nom de la colonne dans le menu déroulant Show in Table (Afficher dans le tableau).

### Instructions d'analyse

Lors de l'analyse d'une expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$ , rechercher :

- Les différences d'expression génétique (sous la forme d'un taux de variation) par rapport à l'échantillon de référence.
- Les écarts-types dans les réplicats (valeurs  $C_T$  SD). Si nécessaire, exclure les amplifications non conformes (voir « Exclusion de puits dans une analyse » à la page 188).

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur l'écran Gene Expression Plot (Profil d'expression génétique), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur ou en appuyant sur **F1**.

## Affichage des courbe d'amplification

L'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) affiche l'amplification de tous les échantillons présents dans le puits sélectionné. Trois courbes sont disponibles :

- **ΔRn vs Cycle** – ΔRn 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 ΔRn 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.

### Remarques

- **Rn vs Cycle** – Rn représente la fluorescence du reporter normalisé. Cette courbe affiche la valeur Rn en fonction du nombre de cycles. Elle permet d'identifier et d'examiner les amplifications irrégulières.
- **$C_T$  vs Well ( $C_T$  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.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple, consulter chaque cible dans l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) pour localiser :

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

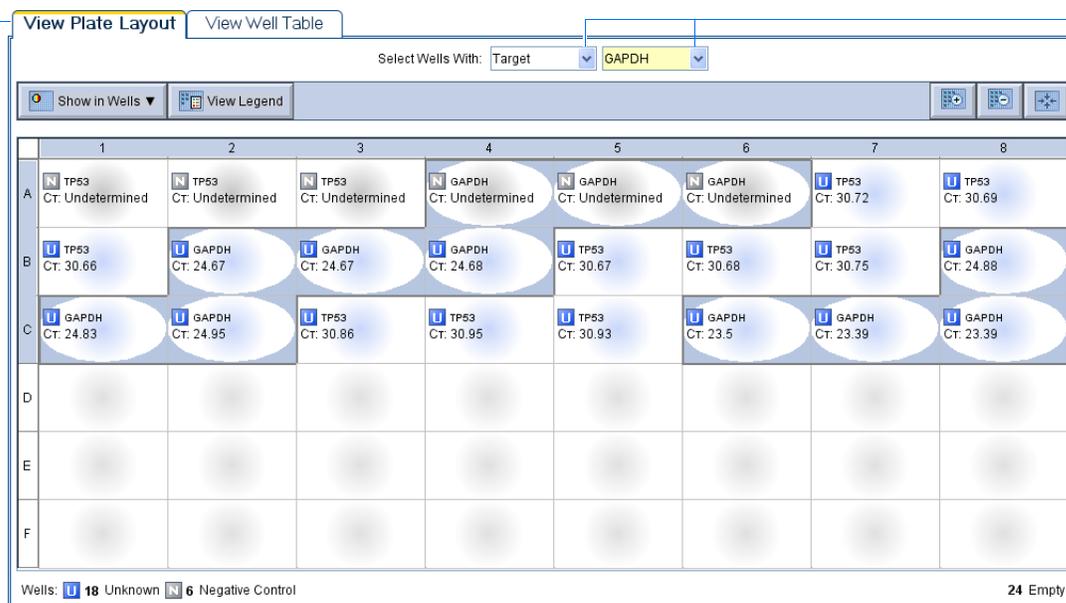
### Affichage de la courbe d'amplification

1. Dans le panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience), sélectionner **Analysis** (Analyse)  **Amplification Plot** (Courbe d'amplification).

**Remarque :** Si l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) ne contient pas de données, cliquer sur **Analyze** (Analyser).

2. Afficher les puits GAPDH dans l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) :
  - a. Cliquer sur l'onglet **View Plate Layout** (Voir le plan de plaque).
  - b. Dans les menus déroulants Select Wells With (Sélectionner les puits avec), sélectionner **Target** (Cible), puis **GAPDH**.

2a



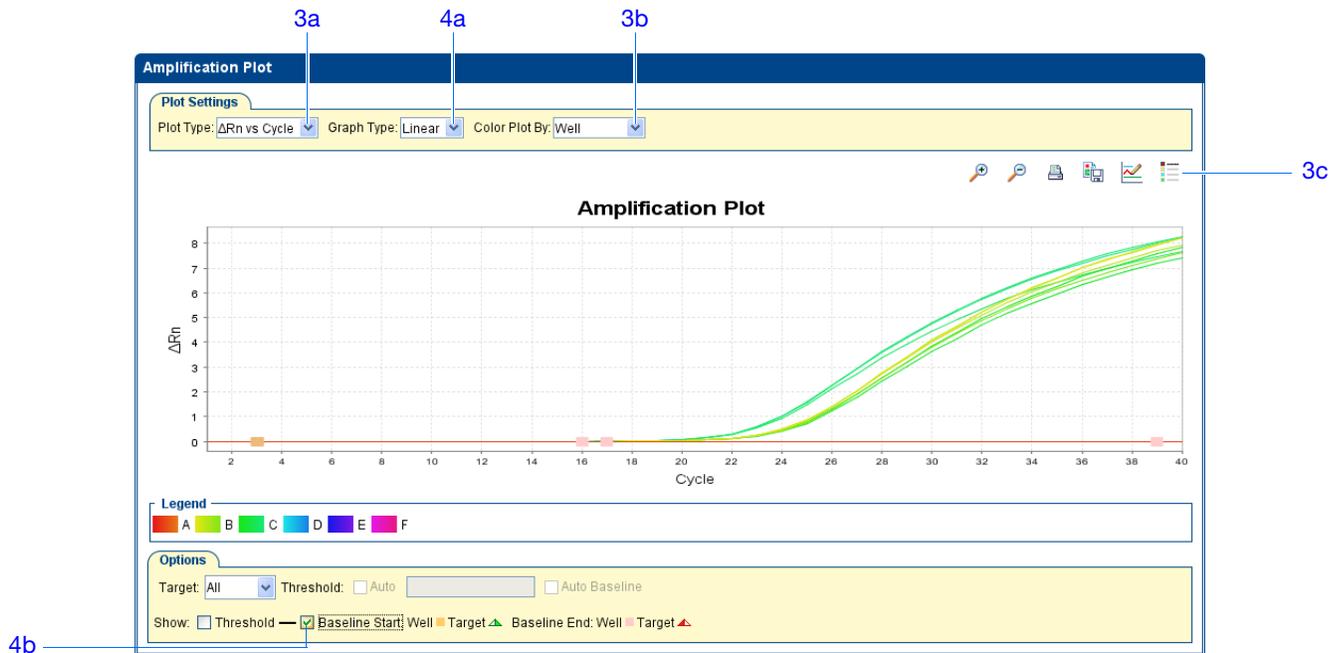
The screenshot shows the 'View Plate Layout' interface. At the top, there are tabs for 'View Plate Layout' and 'View Well Table'. Below the tabs, there is a 'Select Wells With:' dropdown menu set to 'Target' and another dropdown menu set to 'GAPDH'. There are also buttons for 'Show in Wells' and 'View Legend'. The main area is a 96-well plate grid with columns 1-8 and rows A-F. Each well contains a target name and a Ct value. Wells with 'U' (Unknown) are highlighted in blue, and wells with 'N' (Negative Control) are highlighted in grey. The status bar at the bottom indicates 'Wells: 18 Unknown, 6 Negative Control' and '24 Empty'.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	N TP53 Ct: Undetermined	N TP53 Ct: Undetermined	N TP53 Ct: Undetermined	N GAPDH Ct: Undetermined	N GAPDH Ct: Undetermined	N GAPDH Ct: Undetermined	U TP53 Ct: 30.72	U TP53 Ct: 30.69
B	U TP53 Ct: 30.66	U GAPDH Ct: 24.67	U GAPDH Ct: 24.67	U GAPDH Ct: 24.68	U TP53 Ct: 30.67	U TP53 Ct: 30.68	U TP53 Ct: 30.75	U GAPDH Ct: 24.88
C	U GAPDH Ct: 24.83	U GAPDH Ct: 24.95	U TP53 Ct: 30.86	U TP53 Ct: 30.95	U TP53 Ct: 30.93	U GAPDH Ct: 23.5	U GAPDH Ct: 23.39	U GAPDH Ct: 23.39
D								
E								
F								

2b

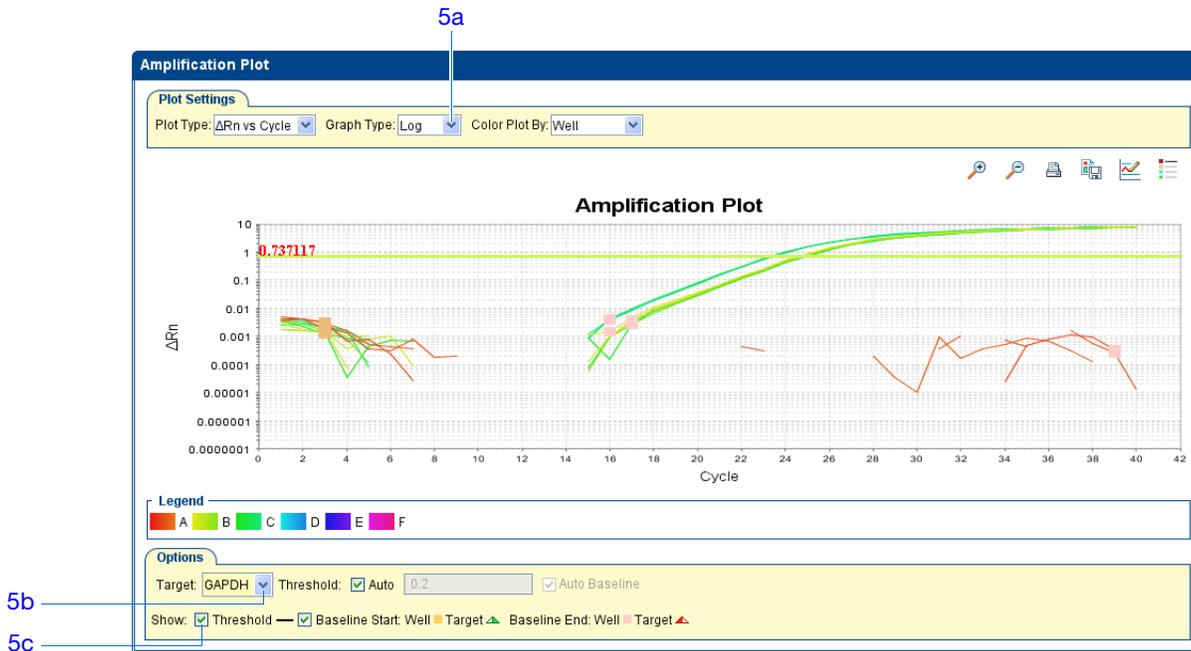
### Remarques

3. Dans l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) :
  - a. Dans le menu déroulant Plot Type (Type de courbe), sélectionner  **$\Delta Rn$  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).
  
4. 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. Dans l'exemple, la ligne de base est définie avant le début de l'amplification.



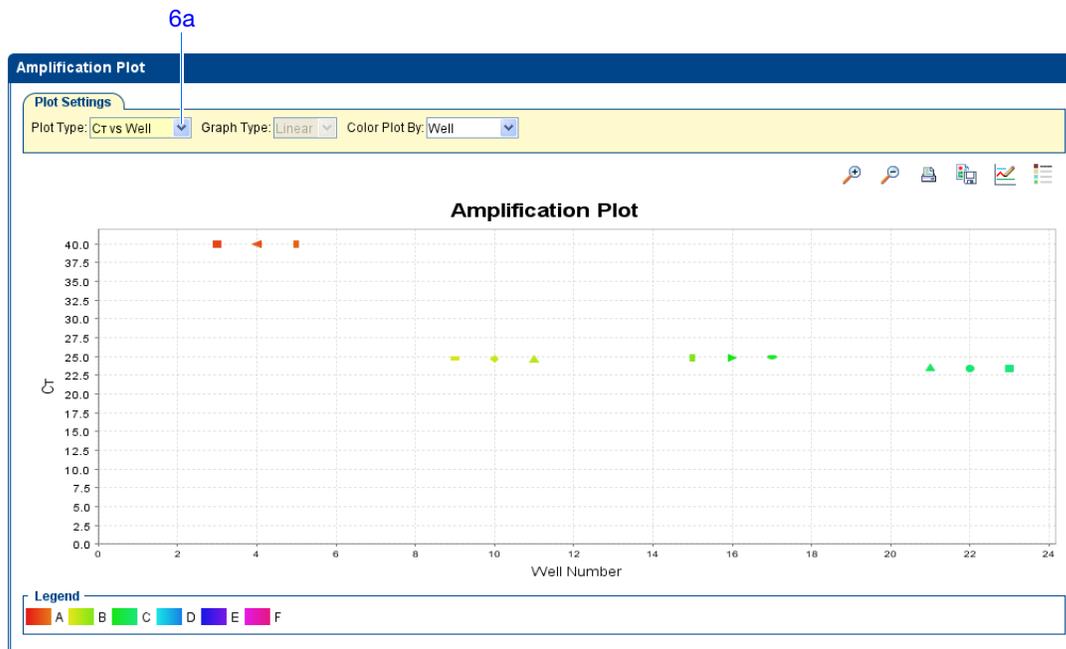
5. Afficher les valeurs de seuil :
  - a. Dans le menu déroulant Graph Type (Type de graphique), sélectionner **Log**.
  - b. Dans le menu déroulant Target (Cible), sélectionner **GAPDH**.
  - c. Cocher la case **Threshold** (Seuil) pour afficher le seuil.
  - d. Vérifier que le seuil est correctement défini. Dans l'exemple, le seuil se situe dans la phase exponentielle.

Remarques



## 6. Localiser les amplifications non conformes :

- Dans le menu déroulant Plot Type (Type de courbe), sélectionner  $C_T$  vs Well ( $C_T$  vs Puits).
- Rechercher les puits situés en dehors de la courbe d'amplification. L'exemple ne comporte aucune amplification non conforme dans les puits GAPDH.



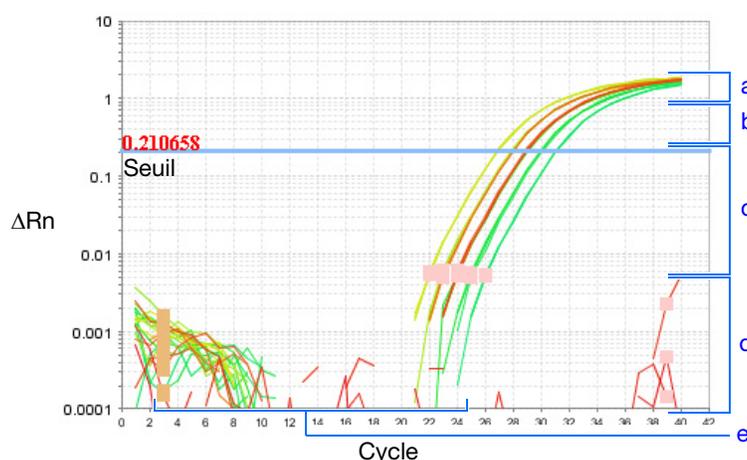
## 7. Répéter les étapes 2 à 6 pour les puits TP53. L'exemple ne comporte aucune amplification non conforme dans les puits TP53.

Remarques

### Instructions d'analyse

Lors de l'analyse d'une expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$ , rechercher :

- 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 :
  - a. Une phase de plateau
  - b. Une phase linéaire
  - c. Une phase exponentielle (géométrique)
  - d. Un bruit de fond
  - e. Une ligne de base



**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.

- 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 (voir « [Affichage des paramètres d'analyse](#) » à la page 184).

Ou

- Exclure des puits (voir « [Exclusion de puits dans une analyse](#) » à la page 188).

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur ou en appuyant sur **F1**.

### Remarques

## Export 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 sur la réalisation de ces opérations, accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.

Remarques \_\_\_\_\_

## Section 9.2 Identification des causes d'erreurs (si nécessaire)

---

Sommaire de la section :

■ Affichage des paramètres d'analyse .....	184
■ Affichage du Contrôle Qualité .....	186
■ Exclusion de puits dans une analyse .....	188
■ Affichage du multicomposant .....	190
■ Affichage des données brutes .....	193

Remarques \_\_\_\_\_

## Affichage des paramètres d'analyse

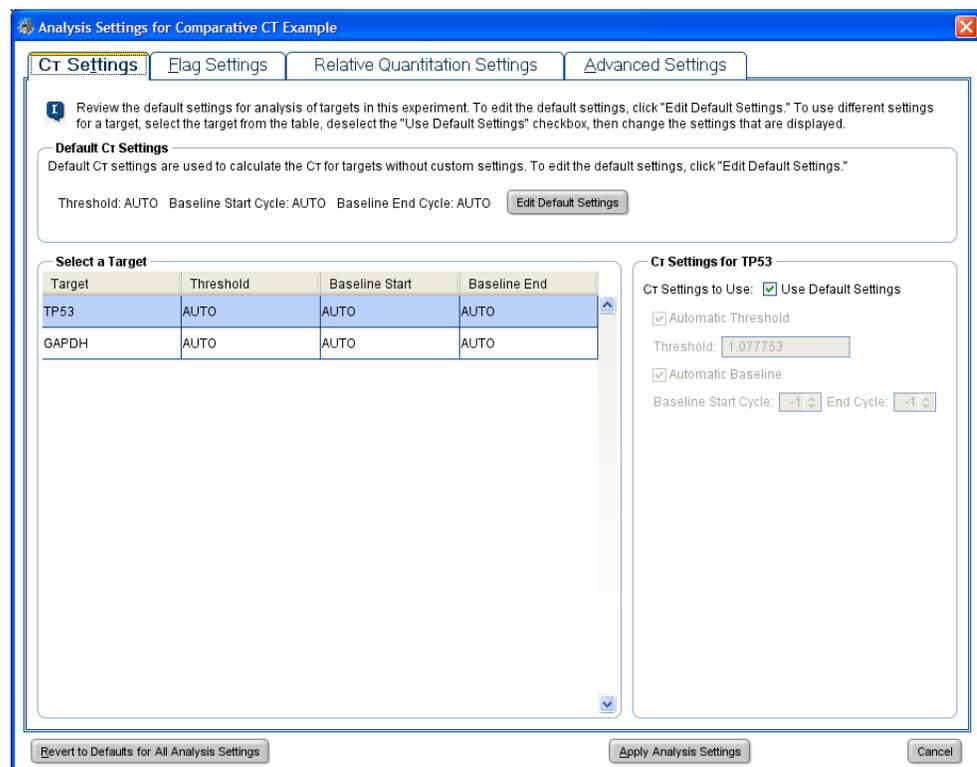
La fenêtre Analysis Settings (Paramètres d'analyse) affiche les paramètres d'analyse pour le cycle seuil ( $C_T$ ), les codes d'alerte, la quantification relative et les options avancées. Si les paramètres d'analyse par défaut du logiciel StepOne ne sont pas adaptés à l'expérience, il est possible de les modifier dans la fenêtre Analysis Settings (Paramètres d'analyse), puis de réanalyser l'expérience.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple, les paramètres d'analyse par défaut sont utilisés sans modification.

### Affichage des paramètres d'analyse

1. Dans le panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience), sélectionner **Analysis** (Analyse).
2. Cliquer sur **Analysis Settings** (Paramètres d'analyse) pour ouvrir la fenêtre Analysis Settings (Paramètres d'analyse).
3. Dans l'exemple, les paramètres d'analyse par défaut sont utilisés pour chaque onglet :
  - $C_T$  Settings (Paramètres  $C_T$ )
  - Flag Settings (Paramètres des codes d'alerte)
  - Relative Quantitation Settings (Paramètres de quantification relative)
  - Advanced Settings (Paramètres avancés)



### Remarques

## Instructions d'analyse

À moins que les paramètres optimaux de l'expérience soient déjà déterminés, utiliser les paramètres d'analyse par défaut du logiciel StepOne. Si les paramètres par défaut ne sont pas adaptés à l'expérience, il est possible de modifier les réglages suivants :

- **$C_T$  Settings** (Paramètres  $C_T$ ) – Utiliser cet onglet pour définir manuellement le seuil et la ligne de base. Lors du réglage manuel des valeurs de seuil et de ligne de base, Applied Biosystems recommande d'effectuer les opérations suivantes :

Paramètre	Recommandation
Seuil	Entrer la valeur du seuil pour qu'il soit situé : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Au-dessus du bruit de fond.</li> <li>• Sous les zones de plateau et linéaires de la courbe d'amplification.</li> <li>• Dans la phase exponentielle de la courbe d'amplification.</li> </ul>
Ligne de base	Sélectionner les valeurs Start Cycle (Cycle de début) et End Cycle (Cycle de fin) pour que la ligne de base s'arrête avant le début de l'amplification.

- **Flag Settings** (Paramètres des codes d'alerte) – Utiliser cet onglet pour :
  - Ajuster la sensibilité afin de marquer plus ou moins de puits.
  - Modifier les codes d'alerte appliqués par le logiciel StepOne.
- **Relative Quantitation Settings** (Paramètres de quantification relative) – Utiliser cet onglet pour :
  - Modifier l'échantillon de référence et/ou le contrôle endogène.
  - Sélectionner l'algorithme à utiliser pour déterminer les valeurs RQ minimales et maximales (niveau de confiance ou écarts-types).
- **Advanced Settings** (Paramètres avancés) – Utiliser cet onglet pour modifier les paramètres de la ligne de base puits par puits.

## Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur les paramètres d'analyse, accéder à l'aide du logiciel StepOne en appuyant sur **F1** lorsque la fenêtre Analysis Settings (Paramètres d'analyse) est ouverte.

## Remarques

## Affichage du Contrôle Qualité

L'écran QC Summary (Synthèse CQ) affiche la liste des codes d'alerte du logiciel StepOne, ainsi que la fréquence et l'emplacement des codes d'alerte de l'expérience ouverte.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple, consulter l'écran QC Summary (Synthèse CQ) pour repérer les codes d'alerte associés aux données de l'expérience. Dans l'exemple, aucun code d'alerte n'a été inséré.

### Affichage de la synthèse CQ

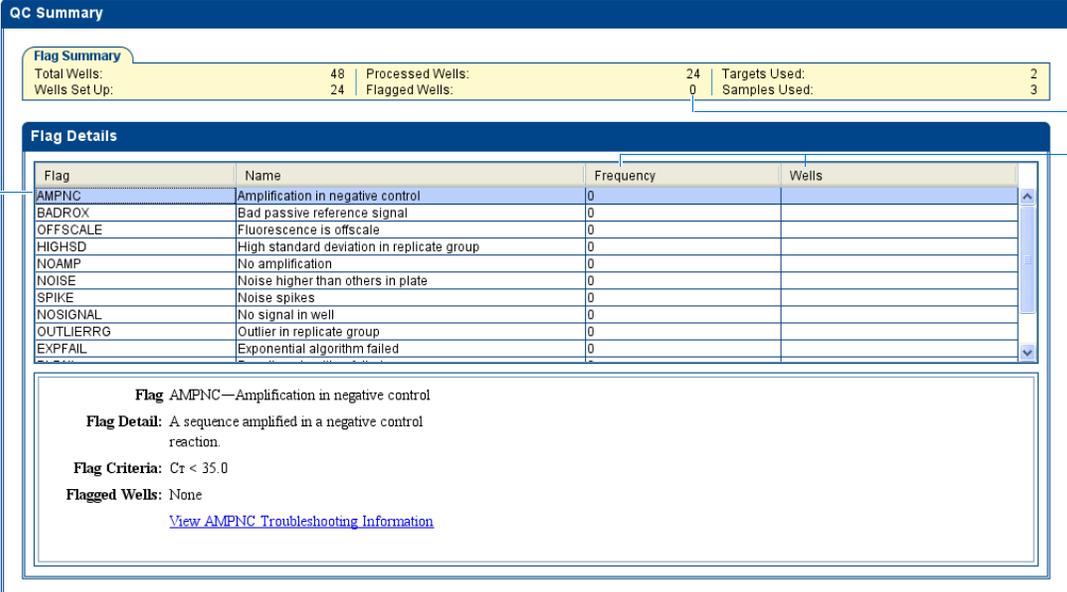
1. Dans le panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience), sélectionner **Analysis (Analyse)** ►  **QC Summary (Synthèse CQ)**.

**Remarque :** Si l'écran QC Summary (Synthèse CQ) ne contient pas de données, cliquer sur **Analyze (Analyser)**.

2. Vérifier la synthèse des codes d'alerte. L'exemple ne comporte aucun puits accompagné d'un code d'alerte.
3. Rechercher les codes d'alerte insérés dans l'expérience en examinant les colonnes Frequency (Fréquence) et Wells (Puits) du tableau Flag Details (Détail des codes d'alerte). Dans l'exemple, la colonne Frequency (Fréquence) affiche 0 pour tous les codes d'alerte.

**Remarque :** Un 0 affiché dans la colonne Frequency (Fréquence) signifie qu'aucun code d'alerte de ce type n'apparaît dans l'expérience.

4. (Facultatif) Cliquer sur la ligne d'un code d'alerte pour afficher les informations détaillées le concernant.



**QC Summary**

**Flag Summary**

Total Wells:	48	Processed Wells:	24	Targets Used:	2
Wells Set Up:	24	Flagged Wells:	0	Samples Used:	3

**Flag Details**

Flag	Name	Frequency	Wells
AMPNC	Amplification in negative control	0	
BADPROX	Bad passive reference signal	0	
OFFSCALE	Fluorescence is offscale	0	
HIGHSD	High standard deviation in replicate group	0	
NOAMP	No amplification	0	
NOISE	Noise higher than others in plate	0	
SPIKE	Noise spikes	0	
NOSIGNAL	No signal in well	0	
OUTLIERRG	Outlier in replicate group	0	
EXPFAIL	Exponential algorithm failed	0	

**Flag AMPNC—Amplification in negative control**

**Flag Detail:** A sequence amplified in a negative control reaction.

**Flag Criteria:**  $C_T < 35.0$

**Flagged Wells:** None

[View AMPNC Troubleshooting Information](#)

### Remarques

### Codes d'alerte possibles

Dans les expériences de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$ , les codes d'alerte énumérés ci-dessous peuvent être associés aux données de l'expérience.

Si un code d'alerte n'apparaît pas dans l'expérience, sa fréquence est 0. Une fréquence  $>0$  signifie que le code d'alerte apparaît quelque part dans l'expérience. La position du puits est indiquée dans la colonne Wells (Puits).

Code d'alerte	Description
AMPNC	Amplification du contrôle négatif
BADROX	Mauvais signal de la référence passive
BLFAIL	Échec de l'algorithme des lignes de base
CTFAIL	Échec de l'algorithme $C_T$
EXPFAIL	Échec de l'algorithme exponentiel
HIGHSD	Écart-type élevé dans un réplicat
NOAMP	Pas d'amplification
NOISE	Bruit supérieur aux autres dans la plaque
NOSIGNAL	Aucun signal dans le puits
OFFSCALE	La fluorescence est hors échelle
OUTLIERRG	Amplification non conforme dans un réplicat
SPIKE	Pics de bruit
THOLDFAIL	Échec de l'algorithme du seuil

### Instructions d'analyse

Lors de l'analyse d'une expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  :

- Dans le tableau Flag Details (Détail des codes d'alerte), cliquer sur chaque code d'alerte dont la fréquence est  $>0$  pour afficher les informations détaillées le concernant. Si nécessaire, cliquer sur le lien d'identification des causes d'erreurs pour afficher les informations sur l'origine des codes d'alerte et les moyens d'y remédier.
- Il est possible de modifier les paramètres des codes d'alerte :
  - Ajuster la sensibilité afin de marquer plus ou moins de puits.
  - Modifier les codes d'alerte appliqués par le logiciel StepOne.

### Pour plus d'informations

Pour plus d'informations sur l'écran QC Summary (Synthèse CQ) ou sur les paramètres des codes d'alerte, accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.

### Remarques

## Exclusion de puits dans une analyse

Une erreur expérimentale peut avoir provoqué l'amplification insuffisante ou nulle de certains puits. Ces puits produisent généralement des valeurs  $C_T$  qui diffèrent considérablement de la moyenne des puits répétés correspondants. Si elles sont comprises dans les calculs, ces amplifications non conformes peuvent générer des mesures erronées. Pour obtenir des résultats précis, exclure les amplifications non conformes de l'analyse.

### À propos de l'exemple

L'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple ne comporte aucune amplification non conforme, ce qui ne nécessite l'exclusion d'aucun puits dans l'analyse.

### Exclusion de puits

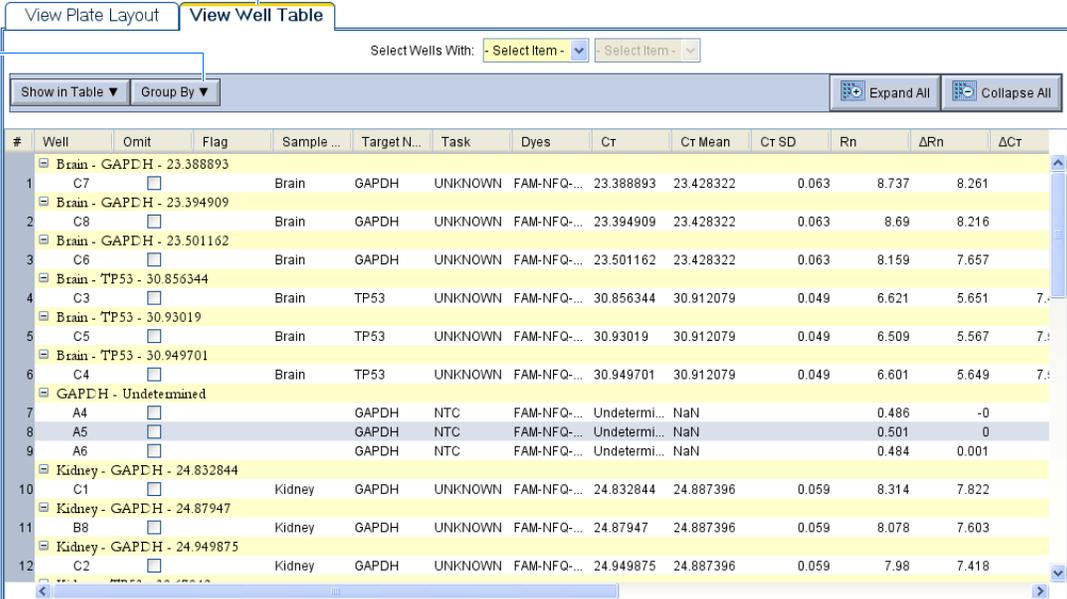
1. Dans le panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience), sélectionner **Analysis (Analyse)** ►  **Amplification Plot** (Courbe d'amplification).

**Remarque :** Si l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) ne contient pas de données, cliquer sur **Analyze** (Analyser).

2. Dans le menu déroulant Plot Type (Type de courbe) de l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification), sélectionner  **$C_T$  vs Well** ( $C_T$  vs Puits).
3. Sélectionner l'onglet **View Well Table** (Voir le tableau des résultats).
4. Dans l'onglet View Well Table (Voir le tableau des résultats) :
  - a. Dans le menu déroulant Group By (Grouper par), sélectionner **Replicate** (Réplicat).
  - b. Rechercher les amplifications non conformes parmi les réplicats (vérifier qu'elles sont accompagnées d'un code d'alerte). L'exemple ne comporte aucune amplification non conforme.

3

4a



#	Well	Omit	Flag	Sample ...	Target N...	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Rn	ΔRn	ΔCt
1	Brain - GAPDH - 23.388893 C7	<input type="checkbox"/>		Brain	GAPDH	UNKNOWN	FAM-NFQ-...	23.388893	23.428322	0.063	8.737	8.261	
2	Brain - GAPDH - 23.394909 C8	<input type="checkbox"/>		Brain	GAPDH	UNKNOWN	FAM-NFQ-...	23.394909	23.428322	0.063	8.69	8.216	
3	Brain - GAPDH - 23.501162 C6	<input type="checkbox"/>		Brain	GAPDH	UNKNOWN	FAM-NFQ-...	23.501162	23.428322	0.063	8.159	7.657	
4	Brain - TP53 - 30.856344 C3	<input type="checkbox"/>		Brain	TP53	UNKNOWN	FAM-NFQ-...	30.856344	30.912079	0.049	6.621	5.651	7.0
5	Brain - TP53 - 30.93019 C5	<input type="checkbox"/>		Brain	TP53	UNKNOWN	FAM-NFQ-...	30.93019	30.912079	0.049	6.509	5.567	7.0
6	Brain - TP53 - 30.949701 C4	<input type="checkbox"/>		Brain	TP53	UNKNOWN	FAM-NFQ-...	30.949701	30.912079	0.049	6.601	5.649	7.0
GAPDH - Undetermined													
7	A4	<input type="checkbox"/>			GAPDH	NTC	FAM-NFQ-...	Undetermi...	NaN		0.486	-0	
8	A5	<input type="checkbox"/>			GAPDH	NTC	FAM-NFQ-...	Undetermi...	NaN		0.501	0	
9	A6	<input type="checkbox"/>			GAPDH	NTC	FAM-NFQ-...	Undetermi...	NaN		0.484	0.001	
Kidney - GAPDH - 24.832844													
10	C1	<input type="checkbox"/>		Kidney	GAPDH	UNKNOWN	FAM-NFQ-...	24.832844	24.887396	0.059	8.314	7.822	
11	Kidney - GAPDH - 24.87947 B8	<input type="checkbox"/>		Kidney	GAPDH	UNKNOWN	FAM-NFQ-...	24.87947	24.887396	0.059	8.078	7.603	
12	Kidney - GAPDH - 24.949875 C2	<input type="checkbox"/>		Kidney	GAPDH	UNKNOWN	FAM-NFQ-...	24.949875	24.887396	0.059	7.98	7.418	

### Remarques

**Instructions d'analyse** Lors de l'analyse d'une expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$ , examiner attentivement les réplicats à la recherche d'amplifications non conformes. Si nécessaire, supprimer manuellement les amplifications non conformes à l'aide du tableau des résultats :

1. Dans le panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience), sélectionner **Analysis (Analyse)** ►  **Amplification Plot** (Courbe d'amplification).

---

**Remarque :** Si l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) ne contient pas de données, cliquer sur **Analyze** (Analyser).

---

2. Dans le menu déroulant Plot Type (Type de courbe) de l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification), sélectionner  **$C_T$  vs Well** ( $C_T$  vs Puits).
3. Sélectionner l'onglet **View Well Table** (Voir le tableau des résultats).
4. Dans l'onglet View Well Table (Voir le tableau des résultats) :
  - a. Dans le menu déroulant Group By (Grouper par), sélectionner **Replicate** (Réplicat).
  - b. Rechercher les amplifications non conformes parmi les réplicats (vérifier qu'elles sont accompagnées d'un code d'alerte).
  - c. Cocher la case **Omit** (Exclure) en regard de chaque puits non conforme.
5. Cliquer sur **Analyze** (Analyser) pour réanalyser les données de l'expérience une fois que les puits non conformes ont été exclus de l'analyse.

**Pour plus d'informations** Pour plus d'informations sur l'exclusion de puits dans l'analyse, ouvrir l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**. Dans l'aide, rechercher les sujets relatifs à l'exclusion des puits :

1. Cliquer sur l'onglet **Search** (Rechercher).
2. Entrer **omit well** (exclure un puits).
3. Cliquer sur **List Topics** (Trouver les sujets).
4. Double-cliquer sur les sujets à consulter.

#### Remarques

---

## Affichage du multicomposant

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 de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en exemple, consulter l'écran Multicomponent Plot (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 panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience), sélectionner **Analysis (Analyse)** ▶  **Multicomponent Plot** (Courbe des multicomposantes).

---

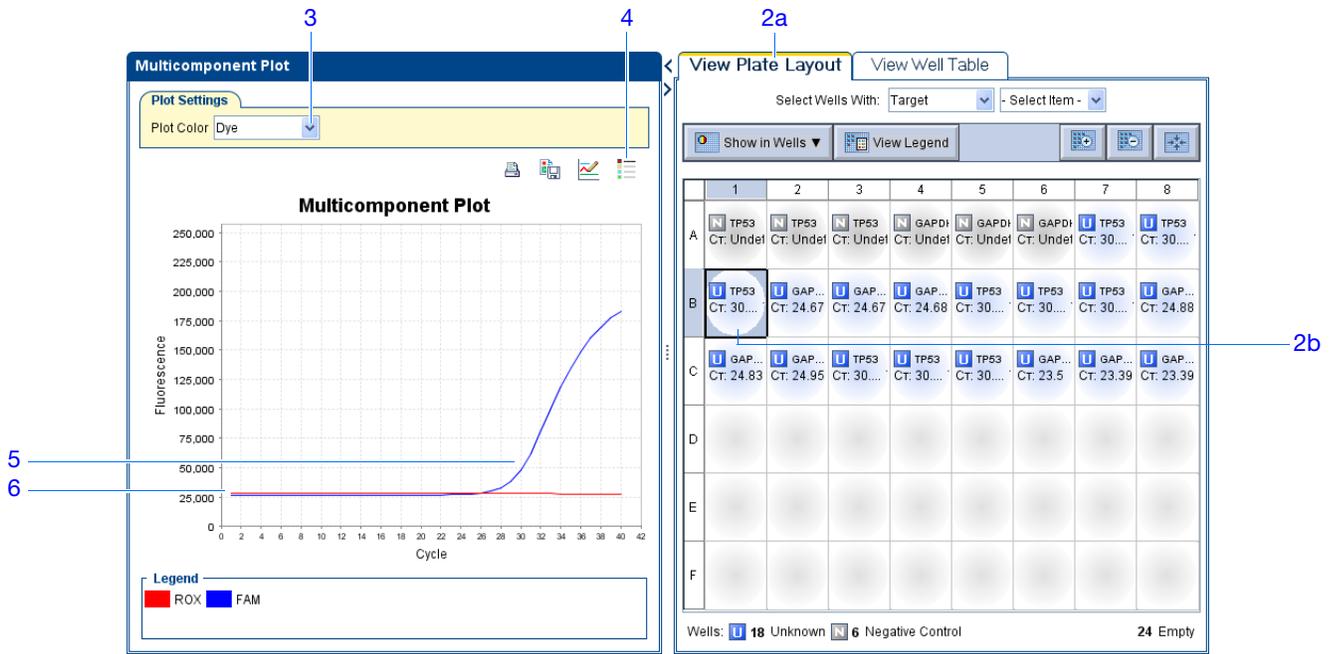
**Remarque :** Si l'écran Multicomponent Plot (Courbe des multicomposantes) ne contient pas de données, cliquer sur **Analyze** (Analyser).

---

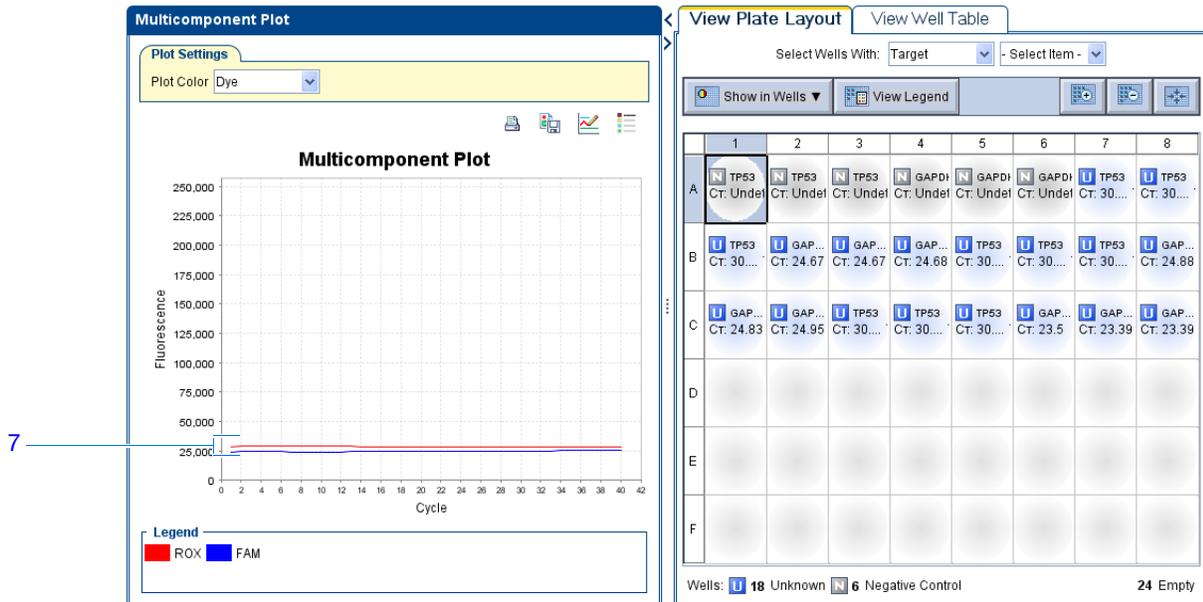
2. Afficher un puits à la fois dans l'écran Multicomponent Plot (Courbe des multicomposantes) :
  - a. Cliquer sur l'onglet **View Plate Layout** (Voir le plan de plaque).
  - b. Sélectionner un puits du plan de plaque. Il s'affiche dans l'écran Multicomponent Plot (Courbe des multicomposantes).
3. Dans 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 du fluorophore FAM. Dans l'exemple, le signal du fluorophore FAM augmente pendant la réaction de 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.

### Remarques

---



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 de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$ , rechercher :

- 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 l'écran Multicomponent Plot (Courbe des multicomposantes), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.

Remarques \_\_\_\_\_

## Affichage des données brutes

L'écran Raw Data Plot (Courbe des données brutes) affiche le signal de fluorescence brut (non normalisé) pour chaque filtre optique des puits sélectionnés pendant tous les cycles de PCR en temps réel.

### À propos de l'exemple

Dans l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  donnée en 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.

### Affichage de la courbe des données brutes

1. Dans le panneau Experiment Menu (Menu de l'expérience), sélectionner **Analysis (Analyse)** ►  **Raw Data Plot** (Courbe des données brutes).

**Remarque :** Si l'écran Raw Data Plot (Courbe des données brutes) ne contient pas de données, cliquer sur **Analyze** (Analyser).

2. Dans l'onglet View Plate Layout (Voir le plan de plaque), afficher les 48 puits dans l'écran Raw Data Plot (Courbe des données brutes) en cliquant sur le coin supérieur gauche du plan de plaque.
3. Cliquer sur  **Show/Hide the plot legend** (Afficher/masquer la légende de la courbe).
4. Cliquer sur le curseur Show Cycle (Afficher le cycle) et le faire glisser du cycle 1 vers le cycle 40. Dans l'exemple, le signal présente une hausse constante à partir du filtre 1, qui est celui du fluorophore FAM™.



### Remarques

Le système StepOne™ comporte plusieurs filtres :

Filtre	Fluorophore
1	Fluorophore FAM™
	Fluorophore SYBR® Green
2	Fluorophore JOE™
	Fluorophore VIC®
3	Fluorophore ROX™

**Instructions  
d'analyse**

Lors de l'analyse d'une expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$ , 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 l'écran Raw Data Plot (Courbe des données brutes), accéder à l'aide du logiciel StepOne en cliquant sur  ou en appuyant sur **F1**.

Remarques \_\_\_\_\_



## Autres workflows d'expérience

A

Sommaire de cette annexe :

- Workflow Advanced Setup (Configuration avancée) ..... 196
- Workflow QuickStart (Démarrage rapide) ..... 197
- Workflow Template (Modèle) ..... 198
- Workflow Export/Import (Exportation/Importation) ..... 199

---

**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)

Lors de la création d'une expérience de quantification relative par les courbes standard ou de comparaison des valeurs de  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) avec le workflow Advanced Setup (Configuration avancée) dans le logiciel StepOne™, il est possible de la configurer selon ses besoins personnels.

### 1. Configurer une nouvelle expérience :

- a. Double-cliquer sur le raccourci du logiciel StepOne (  ) ou sélectionner **Start ▶ (Démarrer) All Programs ▶ (Tous les programmes) Applied Biosystems ▶ StepOne ▶ StepOne v1.0.**
- b. Dans la colonne Set Up (Configurer), cliquer sur  **Advanced Setup** (Configuration avancée).
- c. Dans le panneau de navigation, cliquer sur  **Experiment Properties** (Propriétés de l'expérience) (par défaut), puis redéfinir les propriétés de l'exemple.
- d. Dans le panneau de navigation, cliquer sur  **Plate Setup** (Configuration de la plaque), puis attribuer les cibles, les standards (expériences de quantification relative par les courbes standard uniquement) et les échantillons.
- e. Dans le panneau de navigation, cliquer sur  **Run Method** (Profil de thermocyclage), entrer le volume réactionnel, puis modifier le profil thermique si nécessaire.
- f. Dans le panneau de navigation, cliquer sur  **Reaction Setup** (Préparation des réactions), vérifier les volumes calculés pour les réactions de PCR, les gammes de dilutions standard (expériences de quantification relative par les courbes standard uniquement) et les dilutions d'échantillons. Modifier les valeurs si nécessaire.
- g. (Facultatif) Dans le panneau de navigation, cliquer sur  **Materials List** (Liste des matériels), puis sélectionner et acheter les matériels nécessaires à l'expérience.

### 2. Préparer les réactions de PCR :

- a. Préparer la matrice.
- b. Préparer les dilutions d'échantillons.
- c. Préparer les gammes de dilutions standard (expériences de quantification relative par les courbes standard uniquement).
- d. Préparer le mélange réactionnel.
- e. Préparer la plaque de réactions.

### 3. Réaliser l'expérience :

- a. Charger l'instrument.
- b. Démarrer la réaction de PCR.
- c. Retirer la plaque sur l'instrument.

### 4. Analyser les données.

Remarques \_\_\_\_\_

## Workflow QuickStart (Démarrage rapide)

Lors de la création d'une expérience de quantification relative par les courbes standard ou de comparaison des valeurs de  $C_T$  avec le workflow QuickStart (Démarrage rapide), il est possible de réaliser les réactions sur l'instrument sans les informations de configuration de la plaque.

1. Préparer les réactions de PCR :
  - a. Préparer la matrice.
  - b. Préparer les dilutions d'échantillons.
  - c. Préparer les gammes de dilutions standard (expériences de quantification relative par les courbes standard uniquement).
  - d. Préparer le mélange réactionnel.
  - e. Préparer la plaque de réactions.
2. Lancer le démarrage rapide de l'expérience :
  - a. Double-cliquer sur le raccourci du logiciel StepOne () ou sélectionner **Start ▶ (Démarrer) All Programs ▶ (Tous les programmes) Applied Biosystems ▶ StepOne ▶ StepOne v1.0.**
  - b. Dans la colonne Run (Démarrer), cliquer sur  **QuickStart** (Démarrage rapide).
  - c. Sélectionner l'onglet **Experiment Properties** (Propriétés de l'expérience), puis entrer les propriétés de l'expérience.
  - d. Sélectionner l'onglet **Run Method** (Profil de thermocyclage), entrer le volume réactionnel, puis modifier le profil thermique si nécessaire.
3. Réaliser l'expérience :
  - a. Charger l'instrument.
  - b. Démarrer la réaction de PCR.
  - c. Retirer la plaque sur l'instrument.
4. Configurer la plaque.
5. Analyser les données.

### Remarques

---

## Workflow Template (Modèle)

Lors de la création d'un modèle d'expérience de quantification relative par les courbes standard ou de comparaison des valeurs de  $C_T$ , il est possible de configurer de nombreuses expériences avec les mêmes paramètres.

### 1. Créer un modèle :

- a. Double-cliquer sur le raccourci du logiciel StepOne (  ) ou sélectionner **Start** ▶ (Démarrer) **All Programs** ▶ (Tous les programmes) **Applied Biosystems** ▶ **StepOne** ▶ **StepOne v1.0**.
- b. Ouvrir une expérience ou en créer une nouvelle comme décrit au [chapitre 2](#) ou au [chapitre 6](#).
- c. Sélectionner **File** (Fichier) ▶ **Save As Template** (Enregistrer comme modèle).
- d. Dans la fenêtre Save As Template (Enregistrer comme modèle), entrer un nom de fichier, puis cliquer sur **Save** (Enregistrer) pour sauvegarder le modèle.
- e. Cliquer sur  **Close** (Fermer).

### 2. Créer une expérience en utilisant le modèle :

- a. Si l'écran d'accueil n'est pas déjà affiché, cliquer sur **Home** (Accueil).
- b. Dans la colonne Set Up (Configurer), cliquer sur  **Template** (Modèle).
- c. Dans la fenêtre Open (Ouvrir), sélectionner le modèle créé à l'[étape 1](#).
- d. Modifier l'expérience à l'aide des outils du workflow Advanced Setup (Configuration avancée).
- e. Cliquer sur  **Save** (Enregistrer), entrer un nom de fichier, puis cliquer sur **Save** (Enregistrer) pour sauvegarder l'expérience.

### 3. Préparer les réactions de PCR :

- a. Préparer la matrice.
- b. Préparer les dilutions d'échantillons.
- c. Préparer les gammes de dilutions standard (expériences de quantification relative par les courbes standard uniquement).
- d. Préparer le mélange réactionnel.
- e. Préparer la plaque de réactions.

### 4. Réaliser l'expérience :

- a. Charger l'instrument.
- b. Démarrer la réaction de PCR.
- c. Retirer la plaque sur l'instrument.

### 5. Analyser les données.

Remarques \_\_\_\_\_

## Workflow Export/Import (Exportation/Importation)

Lors de la création d'une expérience de quantification relative par les courbes standard ou de comparaison des valeurs de  $C_T$  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.

1. Double-cliquer sur le raccourci du logiciel StepOne () ou sélectionner **Start** ▶ (Démarrer) **All Programs** ▶ (Tous les programmes) **Applied Biosystems** ▶ **StepOne** ▶ **StepOne v1.0**.
2. Ouvrir une expérience ou en créer une nouvelle comme décrit au [chapitre 2](#) ou au [chapitre 6](#).
3. Pendant que l'expérience est ouverte, exporter les informations de configuration :
  - a. Sélectionner **File** (Fichier) ▶ **Export** (Exporter).
  - b. Dans l'onglet Export Properties (Exporter les propriétés), sélectionner **Setup** (Configurer).
  - 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

---

4. 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) ▶ StepOne Help** (Aide de StepOne) dans le menu.

---

5. Si l'écran d'accueil n'est pas déjà affiché, cliquer sur **Home** (Accueil).
6. Dans la colonne Set Up (Configurer), cliquer sur  **Advanced Setup** (Configuration avancée).
7. Importer les informations de configuration :
  - a. Sélectionner **File** (Fichier) ▶ **Import** (Importer).
  - b. Cliquer sur **Browse** (Parcourir), sélectionner le fichier \*.txt créé à l'étape 4, puis cliquer sur **Select** (Sélectionner).
  - c. Cliquer sur **Start Import** (Démarrer l'importation).
8. Préparer les réactions de PCR :
  - a. Préparer la matrice.
  - b. Préparer les dilutions d'échantillons.
  - c. Préparer les gammes de dilutions standard (expériences de quantification relative par les courbes standard uniquement).
  - d. Préparer le mélange réactionnel.
  - e. Préparer la plaque de réactions.
9. Réaliser l'expérience :
  - a. Charger l'instrument.
  - b. Démarrer la réaction de PCR.
  - c. Retirer la plaque sur l'instrument.
10. Analyser les données.

Remarques \_\_\_\_\_

# Bibliographie

Kwok, S. and Higuchi, R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237–238.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., *et al.* 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354.



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

<b>Application</b>	<p>Le système StepOne™ peut réaliser plusieurs applications :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Quantification absolue par les courbes standard</li> <li>• Comparaison des valeurs de <math>C_T</math> (<math>\Delta\Delta C_T</math>)</li> <li>• Quantification relative par les courbes standard</li> <li>• Courbe de fusion (non disponible dans l'assistant de programmation Design Wizard)</li> <li>• Génotypage</li> <li>• Présence/absence</li> </ul> <p>L'application sélectionnée détermine le contenu des écrans Setup (Configuration), Run (Démarrer) et Analysis (Analyse).</p>
<b>Auto<math>\Delta</math></b>	<p>Réglage qui sert à augmenter ou à diminuer la température et/ou la durée de chaque cycle postérieur dans une phase de thermocyclage. Lorsque le réglage Auto<math>\Delta</math> est activé, les paramètres sont indiqués par une icône dans le profil thermique :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Auto<math>\Delta</math> activé : ▲</li> <li>• Auto<math>\Delta</math> désactivé : ▲</li> </ul>
<b>Bibliothèque d'échantillons</b>	<p>Ensemble des échantillons enregistrés dans le logiciel StepOne™. La bibliothèque contient le nom et la couleur de chaque échantillon.</p>
<b>Bibliothèque d'essais SNP</b>	<p>Ensemble des essais SNP enregistrés dans le logiciel StepOne™.</p>
<b>Bibliothèque de cibles</b>	<p>Ensemble des cibles enregistrées dans le logiciel StepOne™.</p>
<b>Calibrateur</b>	<p>Voir échantillon de référence.</p>
<b>Calibration spatiale</b>	<p>Type de calibration du système StepOne™ dans lequel le système analyse les positions des puits sur le bloc. Les données de calibration spatiale sont utilisées pour que le logiciel puisse associer les augmentations de fluorescence pendant une réaction de PCR à des puits spécifiques de la plaque de réactions.</p>
<b>Chimie</b>	<p>Voir réactif.</p>
<b>Cible</b>	<p>Séquence d'acide nucléique à amplifier et à détecter.</p>
<b>Coefficient de régression</b>	<p>Valeur calculée à partir de la droite de régression dans les courbes standard, notamment la valeur <math>R^2</math>, 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.</p>
<b>Collecte des données</b>	<p>Pendant la réaction de PCR, processus au cours duquel un des composants recueille les données de fluorescence dans chaque puits de la plaque de réactions. L'instrument transforme le signal en données électroniques, lesquelles sont enregistrées dans le fichier de l'expérience. Un point de collecte des données est indiqué par une icône dans le profil thermique :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Collecte des données activée : </li> <li>• Collecte des données désactivée : </li> </ul>

<b>Comparaison des valeurs de <math>C_T</math> (<math>\Delta\Delta C_T</math>)</b>	Une des méthodes utilisées pour les expériences de quantification. Avec la comparaison des valeurs de $C_T$ ( $\Delta\Delta C_T$ ), les résultats par rapport à un échantillon de référence et à un contrôle endogène sont utilisés pour déterminer les quantités relatives d'une cible dans les échantillons.
<b>Configuration autonome</b>	Disposition du système dans laquelle l'instrument StepOne™ <i>n'est pas</i> connecté à un ordinateur par le câble jaune du système StepOne™. À la place, une clé USB (🗑️) est utilisée pour transférer les données entre les composants du système StepOne™. Dans cette disposition, l'instrument StepOne™ est contrôlé par l'écran tactile de l'instrument.
<b>Configuration co-localisée</b>	Disposition du système dans laquelle l'instrument StepOne™ est directement connecté à un ordinateur co-localisé par le câble jaune du système StepOne™. Dans cette disposition, l'instrument StepOne™ est contrôlé par l'intermédiaire du logiciel StepOne™ installé sur l'ordinateur co-localisé.
<b>Contrôle endogène</b>	Cible qui doit exister à des niveaux identiques dans tous les échantillons testés. Ce contrôle est utilisé dans les expériences de quantification relative par les courbes standard et par la comparaison des valeurs de $C_T$ ( $\Delta\Delta C_T$ ) pour normaliser les signaux de fluorescence de la cible quantifiée. Également appelé « gène de ménage ».
<b>Contrôle négatif (NC)</b>	Dans les expériences du système StepOne™, fonction attribuée aux cibles ou aux essais SNP dans les puits qui contiennent de l'eau ou du tampon à la place de l'échantillon. Aucune amplification de la cible ne doit se produire dans les puits de contrôle négatif.
<b>Contrôle positif</b>	Dans les réactions de génotypage, fonction attribuée à l'essai SNP dans les puits qui contiennent un échantillon de génotype connu.
<b>Contrôle positif interne (IPC)</b>	Dans les expériences de présence/absence, échantillon d'ADN synthétique court ajouté aux réactions de PCR. L'IPC peut être utilisé pour distinguer les vrais résultats négatifs et les réactions affectées par les inhibiteurs de PCR, une configuration d'essai incorrecte ou une défaillance du réactif ou de l'instrument.
<b>Contrôle sans amplification (NAC)</b>	Voir puits de contrôle négatif avec IPC bloqué.
<b>Contrôle sans échantillon (NTC)</b>	Voir contrôle négatif (NC).
<b>Couleur de la cible</b>	Couleur attribuée à une cible pour l'identifier dans le plan de plaque et dans les courbes d'analyse.
<b>Courbe d'amplification</b>	Affichage des données collectées pendant la phase de thermocyclage de l'amplification par PCR. La courbe peut représenter : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Le reporter normalisé corrigé d'après la ligne de base (<math>\Delta R_n</math>) en fonction des cycles</li> <li>• Le reporter normalisé (<math>R_n</math>) en fonction des cycles</li> <li>• Le cycle seuil (<math>C_T</math>) en fonction des puits</li> </ul>
<b>Courbe de dissociation</b>	Voir courbe de fusion.

<b>Courbe de fusion</b>	Affichage des données collectées pendant la phase de courbe de fusion. Les pics de la courbe de fusion peuvent indiquer la température de fusion ( $T_m$ ) de la cible ou identifier une amplification par PCR non spécifique. Il est possible d'afficher la courbe de fusion comme un marqueur normalisé ( $R_n$ ) par rapport à la température ou comme un marqueur dérivatif ( $-R_n'$ ) toujours par rapport à la température.
<b>Courbe des données brutes</b>	Affichage de l'amplitude de fluorescence des puits sélectionnés pour tous les filtres. Montre l'amplitude de fluorescence de tous les points de collecte des données pendant la réaction.
<b>Courbe des multicomposantes</b>	Affichage des données collectées pendant la phase de thermocyclage de la PCR en temps réel. La courbe des multicomposantes montre la fluorescence pour tous les cycles de la réaction.
<b>Courbe des températures</b>	Affichage des températures de l'échantillon, du couvercle de l'instrument et du bloc pendant la réaction.
<b>Courbe standard</b>	Dans les expériences de quantification absolue et de quantification relative par les courbes standard : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Droite moyenne sur un graphique représentant les valeurs de <math>C_T</math> des échantillons standard en fonction de leur quantité. Voir aussi droite de régression.</li> <li>• Ensemble des standards contenant un intervalle de quantités connues. Les données des réactions de la courbe standard sont utilisées pour générer la courbe standard. La courbe standard est définie par le nombre de points dans la gamme, le nombre de réplicats standard, la quantité de départ et le facteur de dilution. Voir aussi gamme de dilutions standard.</li> </ul>
<b><math>C_T</math></b>	Acronyme de « cycle threshold » (cycle seuil).
<b><math>C_T</math> automatique</b>	Paramètre d'analyse selon lequel le logiciel calcule automatiquement le seuil et la ligne de base dans la courbe d'amplification. Le logiciel utilise le seuil et la ligne de base pour calculer le cycle seuil ( $C_T$ ).
<b><math>C_T</math> manuel</b>	Paramètre d'analyse selon lequel l'utilisateur entre la valeur de seuil et sélectionne le mode de calcul de la ligne de base (automatique ou manuelle). Le logiciel utilise la valeur de seuil saisie et la ligne de base pour calculer le cycle seuil ( $C_T$ ).
<b>Cycle seuil (<math>C_T</math>)</b>	Nombre de cycles de PCR pour lequel le $\Delta R_n$ correspond au seuil dans la courbe d'amplification.
<b>Delta <math>R_n</math> (<math>\Delta R_n</math>)</b>	Abréviation utilisée pour « reporter normalisé corrigé d'après la ligne de base ».
<b>Design Wizard</b>	(Assistant de programmation) Fonction du logiciel StepOne™ qui permet de configurer l'expérience avec par défaut les recommandations de configuration.
<b>Diluant</b>	Réactif utilisé pour diluer un échantillon ou un standard avant de l'ajouter à la réaction de PCR. Le diluant peut être constitué d'eau ou de tampon.

<b>Diluted Sample Concentration (10X for Reaction Mix)</b>	(Concentration de l'échantillon dilué (10X pour le mélange réactionnel)) Champ du logiciel affiché dans l'onglet Sample Dilution Calculations (Calcul de dilution de l'échantillon) de l'écran Reaction Setup (Préparation des réactions). Dans ce champ, entrer la concentration de l'échantillon à ajouter au mélange réactionnel pour tous les échantillons de l'expérience. « 10X for Reaction Mix » (10X pour le mélange réactionnel) signifie que, pour le logiciel, l'échantillon ou le composant standard du mélange réactionnel est à une concentration de 10X. Par exemple, si la concentration de l'échantillon dilué est de 50 ng/μL (10X), la concentration de l'échantillon final dans la réaction est de 5 ng/μL (1X).
<b>Droite de régression</b>	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 : $C_T = m [\log (Qté)] + b$ où m est la pente, b est l'intersection avec l'axe Y et Qté est la quantité standard. Voir aussi coefficient de régression.
<b>Échantillon</b>	Cible testée.
<b>Échantillon d'ADN (10X)</b>	Composant de la réaction affiché sur l'écran Reaction Setup (Préparation des réactions). Le logiciel considère que l'échantillon d'ADN ajouté au mélange réactionnel est à une concentration de 10X. Par exemple, si le volume réactionnel est de 20 μL, le volume d'échantillon calculé pour une réaction est de 2 μL.
<b>Échantillon de référence</b>	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 ».
<b>Échantillon ou standard (10X)</b>	Composant de réaction affiché dans l'onglet Reaction Mix Calculations (Calcul du mélange réactionnel) de l'écran Reaction Setup (Préparation des réactions). Le logiciel considère que l'échantillon ou le standard ajouté au mélange réactionnel est à une concentration de 10X. Par exemple, si le volume réactionnel est de 20 μL, le volume d'échantillon ou de standard calculé pour une réaction est de 2 μL.
<b>Écran tactile</b>	Écran dont les touches tactiles permettent de contrôler l'instrument.
<b>EFF%</b>	Voir efficacité de l'amplification (EFF%).
<b>Efficacité de l'amplification (EFF%)</b>	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 : <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Intervalle des quantités standard</b> – Pour obtenir des mesures d'efficacité plus précises, utiliser un grand intervalle des quantités standard, de 5 à 6 logs (<math>\times 10^5</math> à <math>10^6</math>).</li> <li>• <b>Nombre de répliquats standard</b> – Pour obtenir des mesures d'efficacité plus précises, inclure les répliquats afin de diminuer les effets des imprécisions de pipetage.</li> <li>• <b>Inhibiteurs de PCR</b> – Présents dans la réaction, ils peuvent réduire l'efficacité de l'amplification.</li> </ul>

<b>Essai</b>	Dans le système StepOne™, réaction de PCR qui contient des amorces pour amplifier une cible et un réactif pour détecter la cible amplifiée.
<b>Essai SNP</b>	Utilisée dans les réactions de génotypage, cette réaction de PCR contient deux amorces pour amplifier le produit de la PCR et deux sondes pour détecter les différents allèles du SNP.
<b>Essais en stock</b>	(Inventoried Assays) Essais TaqMan® Genomic Assays précédemment fabriqués, conformes aux spécifications de contrôle qualité et conservés en stock.
<b>Essais fabriqués sur commande</b>	(Custom Assays) Essais TaqMan® Genomic Assays fabriqués au moment de la commande. Seuls les essais qui répondent aux spécifications de contrôle qualité pour la fabrication sont fournis.
<b>Étape</b>	Composant du profil thermique. Une étape est définie par la température, la durée, la variation de la température et l'état de la collecte des données. Dans les phases de thermocyclage, une étape est également définie par l'état AutoΔ.
<b>Exclure un puits</b>	Action effectuée après l'analyse pour exclure un ou plusieurs puits de toutes les analyses avant de réanalyser les données.
<b>Facteur de dilution</b>	Valeur numérique qui définit la séquence des quantités dans la courbe standard. Le facteur de dilution et la quantité de départ sont utilisés afin de calculer la quantité standard pour chaque point de la courbe standard. Par exemple, si la courbe standard est définie avec un facteur de dilution de 1:10 ou 10, la différence entre deux points adjacents dans la courbe possède un facteur de 10.
<b>Facteur de dilution sérielle</b>	Voir facteur de dilution.
<b>Fichier d'informations sur l'essai (AIF)</b>	Fichier de données inclus sur un CD-Rom expédié avec chaque commande d'essai. Le nom du fichier inclut le numéro du code-barres inscrit sur la plaque. Les informations contenues dans le fichier AIF sont délimitées par des tabulations.
<b>Fluorophore du système</b>	Fluorophore fabriqué par Applied Biosystems et précalibré sur le système StepOne™. Fluorophores du système : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fluorophore FAM™</li> <li>• Fluorophore JOE™</li> <li>• Fluorophore ROX™</li> <li>• Fluorophore SYBR® Green</li> <li>• Fluorophore VIC®</li> </ul>

---

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

---

<b>Fluorophore personnalisé</b>	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/> <b>IMPORTANT !</b> Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA™ comme reporter ou quencher avec le système StepOne™. <hr/>
<b>Fluorophore pur</b>	Réactif qui contient le fluorophore. Les fluorophores purs sont utilisés pour effectuer une calibration spectrale des fluorophores purs sur le système StepOne™. Voir aussi fluorophore du système.
<b>Fonction</b>	Type de réaction effectuée dans le puits pour la cible ou l'essai SNP. Fonctions disponibles dans les expériences du système StepOne™ : <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inconnue</li> <li>• Contrôle négatif</li> <li>• Standard (expériences de quantification absolue et de quantification relative par les courbes standard)</li> <li>• Contrôle positif (réactions de génotypage)</li> <li>• IPC (expériences de présence/absence)</li> <li>• IPC bloqué (expériences de présence/absence)</li> </ul>
<b>Gamme</b>	Voir gamme de dilutions standard.
<b>Gamme de dilutions standard</b>	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.
<b>Gène de ménage</b>	Voir contrôle endogène.
<b>Graphique de discrimination allélique</b>	Affichage des données collectées pendant la lecture post-PCR. Le graphique de discrimination allélique met en rapport le signal du reporter normalisé de la sonde spécifique de l'allèle 1 et celui du reporter normalisé de la sonde spécifique de l'allèle 2.
<b>ID d'essai</b>	Valeur attribuée par Applied Biosystems aux essais TaqMan® Gene Expression Assays et TaqMan® SNP Genotyping Assays.
<b>Inconnue</b>	(Unknown) Dans les expériences de quantification, fonction attribuée à la cible dans les puits qui contiennent un échantillon avec des quantités de cible inconnues.  Dans les réactions de génotypage, fonction attribuée à l'essai SNP dans les puits qui contiennent un échantillon avec un génotype inconnu.  Dans les expériences de présence/absence, fonction attribuée à la cible dans les puits qui contiennent un échantillon pour lequel la présence de la cible n'est pas connue.

<b>Intersection avec l'axe Y</b>	Coefficient de régression calculé d'après la droite de régression de la courbe standard. L'intersection avec l'axe Y indique le cycle seuil attendu (valeur $C_{T\downarrow}$ ) pour un échantillon avec une quantité égale à 1 (par exemple, 1 ng/ $\mu$ L).
<b>IPC</b>	Acronyme de « internal positive control » (contrôle positif interne). Dans les expériences de présence/absence, fonction attribuée à la cible IPC dans les puits qui contiennent un échantillon d'IPC.
<b>IPC bloqué</b>	Dans les expériences de présence/absence, fonction attribuée à la cible IPC dans les puits qui contiennent un agent de blocage de l'IPC à la place de l'échantillon. Voir aussi puits de contrôle négatif avec IPC bloqué.
<b>IPC+</b>	Assignation de présence/absence lorsque le contrôle positif interne (IPC) est amplifié.
<b>Lecture en point final</b>	Voir lecture post-PCR.
<b>Lecture post-PCR</b>	Utilisée dans les réactions de génotypage et les expériences de présence/absence, collecte des données de fluorescence qui se produit après l'amplification. Dans les réactions de génotypage, les données de fluorescence collectées pendant la lecture post-PCR sont affichées sur le graphique de discrimination allélique et utilisées pour produire des assignations d'allèles. Dans les expériences de présence/absence, les données de fluorescence collectées pendant la lecture post-PCR sont affichées sur la courbe de présence/absence et utilisées pour produire des assignations de détections. Également appelée « lecture en point final ».
<b>Lecture pré-PCR</b>	Utilisée dans les réactions de génotypage et les expériences de présence/absence, collecte des données de fluorescence qui se produit avant l'amplification. Les données de fluorescence collectées pendant la lecture pré-PCR sont utilisées pour normaliser les données de fluorescence en lecture post-PCR.
<b>Ligne de base</b>	Dans la courbe d'amplification, une ligne correspond aux niveaux de fluorescence de base dans 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.
<b>Ligne de base automatique</b>	Paramètre d'analyse selon lequel le logiciel calcule les valeurs de début et de fin de la ligne de base de la courbe d'amplification. Le logiciel utilise la ligne de base et le seuil pour calculer le cycle seuil ( $C_T$ ).
<b>Ligne de base manuelle</b>	Paramètre d'analyse selon lequel l'utilisateur entre les valeurs de début et de fin de la ligne de base de la courbe d'amplification. Le logiciel utilise la ligne de base et le seuil pour calculer les valeurs $C_T$ .
<b>Matrice génétique</b>	Type d'acide nucléique à ajouter à la réaction de PCR. La matrice génétique recommandée varie en fonction de l'application.
<b>Mélange amorce/sonde</b>	Composant de la réaction de PCR constitué des amorces visant à amplifier la cible et de la sonde TaqMan <sup>®</sup> conçue pour détecter l'amplification de la cible.
<b>Mélange d'amorces</b>	Composant de la réaction de PCR qui contient les amorces sens et anti-sens visant à amplifier la cible.

<b>Mélange de sonde</b>	Composant de la réaction de PCR qui contient une sonde TaqMan <sup>®</sup> conçue pour détecter l'amplification de la cible.
<b>Mélange réactionnel</b>	Solution qui contient tous les composants nécessaires à la réalisation de la réaction de PCR, hormis la matrice génétique (échantillon, standard ou contrôle).
<b>Méthode de quantification</b>	Lors des expériences de quantification, méthode utilisée pour déterminer la quantité de cible des échantillons. Trois types de méthodes sont disponibles pour les expériences de quantification : quantification absolue par les courbes standard, comparaison des valeurs de $C_T$ ( $\Delta\Delta C_T$ ) et quantification relative par les courbes standard.
<b>Mix primers-sonde</b>	Composant de réaction de PCR dans les essais Applied Biosystems TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression Assays et TaqMan <sup>®</sup> SNP Genotyping Assays. Il contient des amorces conçues pour amplifier une cible et une sonde TaqMan <sup>®</sup> conçue pour détecter l'amplification de la cible.
<b>NFQ-MGB</b>	De l'anglais « nonfluorescent quencher-minor groove binder » (quencher non fluorescent – ligand du petit sillon). Molécules liées à l'extrémité 3' des sondes TaqMan <sup>®</sup> . Lorsque la sonde est intacte, le quencher non fluorescent (NFQ) empêche le reporter d'émettre un signal de fluorescence. Puisque le NFQ n'émet pas de fluorescence, il produit des signaux de bruit de fond plus faibles qui donnent une quantification plus précise. Le ligand du petit sillon (MGB) augmente la température de fusion ( $T_m$ ) sans accroître la longueur de la sonde. Il permet également de concevoir des sondes plus courtes.
<b>Nom de l'expérience</b>	Nom saisi pendant la configuration de l'expérience, utilisé pour identifier cette dernière. Le nom d'une expérience ne peut ni dépasser 100 caractères, ni comporter les caractères suivants : barre oblique (/), barre oblique inverse (\), signe supérieur à (>), signe inférieur à (<), astérisque (*), point d'interrogation (?), guillemets ("), ligne verticale ( ), deux-points (:), et point-virgule (;).
<b>Numéros</b>	Voir refSNP ID.
<b>PCR en temps réel</b>	Processus de collecte des données de fluorescence pendant l'amplification par PCR. Les données de PCR en temps réel sont utilisées pour calculer le résultat des expériences de quantification ou pour vérifier le résultat des réactions de génotypage ou des expériences de présence/absence.
<b>Pente</b>	Coefficient de régression calculé d'après la droite de régression de la courbe standard. La pente indique l'efficacité de l'amplification par PCR pour l'essai. Une pente de – 3,3 indique une efficacité d'amplification de 100 %. Voir aussi efficacité de l'amplification (EFF%).
<b>Phase</b>	Composant du profil thermique. Une phase est composée d'au moins une étape.
<b>Phase de courbe de fusion</b>	Phase du profil thermique avec une incrémentation de température pour générer une courbe de fusion.
<b>Phase de maintien de la température</b>	Phase du profil thermique qui inclut au moins une étape. Par exemple, il est possible d'ajouter une phase de maintien de la température au profil thermique pour activer/désactiver les enzymes ou incubé une réaction.
<b>Phase de thermocyclage</b>	Phase répétée du profil thermique. Si la phase de thermocyclage est utilisée pour effectuer la PCR, elle est appelée « phase d'amplification ».

<b>Plan de plaque</b>	Représentation de la grille de 48 puits (6 × 8) et du contenu de la plaque de réactions. Le logiciel peut utiliser le plan de plaque comme outil de sélection pour attribuer des contenus de puits, afficher des attributions de puits et montrer les résultats. Le plan de plaque est affiché dans les écrans Design Wizard (Assistant de programmation), Advanced Setup (Configuration avancée), Run (Démarrer) et Analysis (Analyse). Le plan de plaque peut être imprimé, inclus dans un rapport, exporté ou enregistré sous la forme d'une diapositive en vue de préparer une présentation.
<b>Point</b>	Point standard d'une courbe standard. La quantité standard de chaque point de la courbe standard est calculée en fonction de la quantité de départ et du facteur de dilution.
<b>Profil de thermocyclage</b>	Définition du volume réactionnel et du profil thermique pour l'activité de l'instrument.
<b>Profil thermique</b>	Partie du profil de thermocyclage qui précise la température, la durée, la variation de la température et les points de collecte des données pour toutes les étapes et phases de l'activité de l'instrument.
<b>Puits de contrôle négatif avec IPC bloqué</b>	Dans les expériences de présence/absence, puits qui contient un agent de blocage de l'IPC à la place de l'échantillon dans la réaction de PCR. Aucune amplification ne doit se produire dans les puits de contrôle négatif avec IPC bloqué car la réaction ne contient aucun échantillon et l'amplification de l'IPC est bloquée. Également appelé « contrôle sans amplification » (NAC).
<b>Puits IPC à contrôle négatif</b>	Dans les expériences de présence/absence, puits qui contient un échantillon d'IPC et un tampon ou de l'eau à la place de l'échantillon dans la réaction de PCR. Seul l'échantillon d'IPC doit être amplifié dans les puits IPC à contrôle négatif car la réaction ne contient aucun échantillon. Voir aussi IPC <sup>+</sup> .
<b>Quantification absolue par les courbes standard</b>	Une des méthodes utilisées pour les expériences de quantification. Avec la quantification absolue par les courbes standard, les résultats par rapport aux standards sont utilisés pour déterminer les quantités absolues d'une cible dans les échantillons.
<b>Quantification relative par les courbes standard</b>	Une des méthodes utilisées pour les expériences de quantification. Avec la quantification relative par les courbes standard, les résultats par rapport aux standards, à un échantillon de référence et à un contrôle endogène sont utilisés pour déterminer les quantités relatives d'une cible dans les échantillons.
<b>Quantité</b>	Dans les expériences de quantification, quantité de cible dans les échantillons. La quantité absolue peut faire référence au nombre de copies, à la masse, à la molarité ou à la charge virale. La quantité relative fait référence au facteur de variation entre la quantité de cible normalisée dans l'échantillon et dans l'échantillon de référence.
<b>Quantité de départ</b>	Lors de la définition d'une courbe standard ou d'une gamme de dilutions standard, correspond à la quantité la plus élevée ou la plus faible.
<b>Quantité normalisée</b>	Quantité de cible divisée par la quantité de contrôle endogène.

<b>Quantité standard</b>	<p>Quantité connue dans la réaction de PCR.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dans les expériences de quantification absolue par les courbes standard, quantité de cible connue. Les quantités standard sont définies en plusieurs unités : la masse, le nombre de copies, la charge virale ou d'autres unités de mesure de la quantité de cible.</li> <li>• Dans les expériences de quantification relative par les courbes standard, quantité connue dans le standard. Par exemple, la quantité standard peut faire référence à la quantité d'ADNc ou à la quantité de solution mère. Les unités ne sont pas pertinentes pour les expériences de quantification relative par les courbes standard car elles s'annulent dans les calculs.</li> </ul>
<b>Quencher</b>	<p>Molécule liée à l'extrémité 3' des sondes TaqMan<sup>®</sup> pour empêcher le reporter d'émettre un signal de fluorescence lorsque la sonde est intacte. Avec les réactifs TaqMan<sup>®</sup>, la molécule NFQ-MGB peut être utilisée comme quencher. Avec les réactifs SYBR Green, aucun quencher n'est utilisé.</p> <hr/> <p><b>IMPORTANT !</b> Applied Biosystems déconseille d'utiliser le fluorophore TAMRA<sup>™</sup> comme reporter ou quencher avec le système StepOne<sup>™</sup>.</p> <hr/>
<b>QuickStart</b>	<p>(Démarrage rapide) Fonction du système StepOne<sup>™</sup> qui permet de démarrer l'expérience sans entrer les informations de configuration de la plaque.</p>
<b>Réactif</b>	<p>Composant de la réaction de PCR utilisé pour amplifier la cible et détecter l'amplification. Plusieurs types de réactifs sont utilisés sur le système StepOne<sup>™</sup> :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Réactif TaqMan<sup>®</sup></li> <li>• Réactif SYBR<sup>®</sup> Green</li> <li>• Les autres réactifs</li> </ul>
<b>Réactif SYBR<sup>®</sup> Green</b>	<p>Composant de la réaction de PCR constitué de deux amorces visant à amplifier la cible et du fluorophore SYBR<sup>®</sup> Green conçu pour détecter l'ADN double brin.</p>
<b>Réactif TaqMan<sup>®</sup></b>	<p>Composant de la réaction de PCR constitué des amorces visant à amplifier la cible et de la sonde TaqMan<sup>®</sup> conçue pour détecter l'amplification de la cible.</p>
<b>Réaction échantillon/cible</b>	<p>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.</p>
<b>Réaction échantillon/essai SNP</b>	<p>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.</p>
<b>Référence passive</b>	<p>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.</p>

<b>refSNP ID</b>	Numéro qui identifie le SNP de référence (refSNP). Généré par la base de données des polymorphismes de nucléotides simples (dbSNP) de la variation de séquence nucléotidique. Peut être utilisé pour rechercher un essai Applied Biosystems SNP Genotyping Assay dans la boutique Applied Biosystems. Également appelé « numéro rs ».
<b>Rejeter un puits</b>	Action effectuée par le logiciel pendant l'analyse pour retirer un ou plusieurs puits de l'analyse en cours si une alerte spécifique est appliquée au puits.
<b>Remote Monitoring</b>	(Surveillance à distance) Fonction du logiciel qui permet d'afficher l'état d'un instrument mis en réseau, d'envoyer des expériences à l'instrument et de télécharger des expériences effectuées sur l'ordinateur.
<b>Réplikat</b>	Ensemble de réactions identiques dans une expérience.
<b>Réplicats</b>	Nombre total de réactions identiques contenant des composants et des volumes identiques.
<b>Reporter</b>	Fluorophore utilisé pour détecter l'amplification. Si des réactifs TaqMan <sup>®</sup> sont utilisés, le reporter est lié à l'extrémité 5'. Si des réactifs SYBR <sup>®</sup> Green sont utilisés, le reporter est le fluorophore SYBR <sup>®</sup> Green.
<b>Reporter dérivatif (-Rn')</b>	Rapporté sur l'axe Y de la courbe de fusion. Le signal du reporter dérivatif est la dérivée première négative de la fluorescence normalisée du reporter.
<b>Reporter normalisé (Rn)</b>	Signal de fluorescence émis par le reporter normalisé par le signal de fluorescence de la référence passive.
<b>Reporter normalisé corrigé d'après la ligne de base (<math>\Delta Rn</math>)</b>	Amplitude du signal de fluorescence normalisé généré par le reporter pendant l'amplification par PCR. $\Delta Rn = Rn$ (valeur seuil) – $Rn$ (ligne de base), où $Rn$ = reporter normalisé.
<b>Rn</b>	Abréviation utilisée pour « reporter normalisé ».
<b>Seuil</b>	Niveau de fluorescence situé au-dessus de la ligne de base et dans la zone d'amplification exponentielle de la courbe d'amplification. Le seuil peut être déterminé automatiquement (voir valeur $C_T$ automatique) ou défini manuellement (voir valeur $C_T$ manuelle).
<b>Seuil de cycle</b>	Voir cycle seuil ( $C_T$ ).
<b>SNP</b>	Acronyme de « single nucleotide polymorphism » (polymorphisme de nucléotide unique). Les SNP peuvent comporter une base de différence ou une indel (insertion/délétion).
<b>Standard</b>	Échantillon qui contient des quantités standard connues. Les réactions standard sont utilisées dans les expériences de quantification pour générer des courbes standard. Voir aussi courbe standard et gamme de dilutions standard.
<b>Température de fusion (<math>T_m</math>)</b>	Point de la courbe de fusion pour lequel la valeur du reporter dérivatif est maximale, signalant que l'ADN double brin amplifié se dissocie en ADN simple brin.
<b>Tm</b>	Acronyme de « melting temperature » (température de fusion).

<b>Transcriptase inverse</b>	Composant de la réaction de PCR qui convertit l'ARN en ADNc. La transcriptase inverse est ajoutée à la réaction de PCR pour effectuer la RT-PCR 1 phase.
<b>Valeur R<sup>2</sup></b>	Coefficient de régression calculé d'après la droite de régression de la courbe standard. La valeur R <sup>2</sup> indique la proximité entre la droite de régression de la courbe standard et les points de données C <sub>T</sub> des réactions standard. Par exemple, la valeur 1,00 indique une corrélation parfaite entre la droite de régression et les points de données.
<b>Variation de la température</b>	Vitesse de variation de la température pendant la réaction de PCR. Excepté pour la phase de courbe de fusion, la variation de la température est définie en pourcentage. Pour la phase de courbe de fusion, la variation de la température est définie en incréments de température. Dans la vue graphique du profil thermique, la variation de la température est indiquée par une diagonale.
<b>Vitesse de variation de la température</b>	Vitesse à laquelle la variation de la température se produit pendant la réaction de PCR. Deux vitesses de variation de la température sont disponibles : Fast (Rapide) et Standard.



## A

- aide en ligne. *Voir* aide
- aide, accès [ix](#)
- amplification non conforme. Voir « exclure des puits ».
- analyser l'expérience
  - afficher l'écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) [98](#), [177](#)
  - afficher l'écran Gene Expression Plot (Profil d'expression génétique) [103](#), [175](#)
  - afficher l'écran Multicomponent Plot (Courbe des multicomposantes) [114](#), [190](#)
  - afficher l'écran Multiple Plots (Plusieurs courbes) [94](#), [174](#)
  - afficher l'écran QC Summary (Synthèse CQ) [110](#), [186](#)
  - afficher l'écran Raw Data Plot (Courbe des données brutes) [116](#), [193](#)
  - afficher l'écran Standard Curve (Courbe standard) [95](#)
  - afficher le tableau des résultats [103](#), [175](#)
  - afficher les paramètres d'analyse [108](#), [184](#)
  - analyser [90](#), [170](#)
  - exclure des puits [112](#), [188](#)
  - exporter les données [105](#), [182](#)
  - instructions [91](#), [97](#), [101](#), [105](#), [109](#), [112](#), [113](#), [116](#), [117](#), [171](#), [177](#), [181](#), [185](#), [187](#), [189](#), [192](#), [194](#)
  - pour plus d'informations [98](#), [102](#), [105](#), [109](#), [112](#), [114](#), [116](#), [117](#), [177](#), [181](#), [185](#), [187](#), [189](#), [192](#), [194](#)
  - workflow [88](#), [168](#)
- Applied Biosystems
  - commentaires de la clientèle sur les documents [ix](#)
  - contact [x](#)
  - support technique [x](#)
- ATTENTION, description [xi](#)
- autres réactifs basés sur le principe de la fluorescence [9](#)
- autres workflows d'expérience. Voir workflows.
- AVERTISSEMENT, description [xi](#)

## B

- bibliothèque [34](#), [136](#)
- bibliothèque Run Method (Profil de thermocyclage) [34](#), [136](#)

## C

- catégorie de surtension [xix](#)
- charger la plaque de réactions [68](#), [164](#)

- cibles
  - configurer [24](#), [129](#)
  - instructions de préparation [26](#), [130](#)
- classe d'installation [xix](#)
- code d'alerte
  - dans les expériences de quantification relative par les courbes standard [111](#)
  - dans une expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  [187](#)
  - paramètres d'analyse [109](#), [185](#)
- code d'alerte AMPNC [111](#), [187](#)
- code d'alerte BADROX [111](#), [187](#)
- code d'alerte BLFAIL [111](#), [187](#)
- code d'alerte CTFAIL [111](#), [187](#)
- code d'alerte EXPFAIL [111](#), [187](#)
- code d'alerte HIGHSD [111](#), [187](#)
- code d'alerte NOAMP [111](#), [187](#)
- code d'alerte NOISE [111](#), [187](#)
- code d'alerte NOSIGNAL [111](#), [187](#)
- code d'alerte OFFSCALE [111](#), [187](#)
- code d'alerte OUTLIERRG [111](#), [187](#)
- code d'alerte SPIKE [111](#), [187](#)
- code d'alerte THOLDFAIL [111](#), [187](#)
- commander les matériels nécessaires [42](#), [142](#)
- commentaires de la clientèle, sur les documents Applied Biosystems [ix](#)
- configuration autonome
  - démarrage [72](#)
  - surveillance [83](#)
  - surveillance à distance [80](#)
  - transfert de données [86](#)
  - transfert de données à distance [85](#)
- configuration co-localisée
  - démarrage [71](#)
  - surveillance [75](#)
  - transfert de données [85](#)
- conseils de navigation
  - sélectionner un puits [93](#), [173](#)
  - voir plusieurs courbes [94](#), [174](#)
- consommables [21](#), [125](#)
  - compatibles [3](#)
  - Voir aussi matériels nécessaires [3](#)
- contrôle endogène
  - composant de l'expérience [5](#), [6](#)
  - écran Relative Quantitation Settings (Paramètres de quantification relative) [32](#), [133](#)
  - sélection [26](#), [130](#)

contrôle négatif, composant de l'expérience 5, 6  
 conventions utilisées dans ce guide vii  
 courbe d'amplification, classique 101, 181  
 créer une expérience 17, 121  
   commander les matériels nécessaires 42, 142  
   configurer le profil de thermocyclage 33, 135  
   configurer les cibles 24, 129  
   configurer les échantillons 30, 131  
   configurer les standards 28  
   définir les méthodes et les matériels nécessaires 22, 126  
   définir les propriétés de l'expérience 20, 124  
   éléments du logiciel 121  
   finaliser le workflow de l'assistant de programmation Design Wizard 45, 146  
   instructions 21, 23, 26, 29, 31, 33, 34, 40, 44, 47, 125, 127, 130, 133, 134, 135, 141, 145, 148  
   nouvelle 17, 121  
   pour plus d'informations 21, 24, 27, 30, 32, 33, 34, 41, 44, 47, 125, 128, 131, 133, 134, 136, 142, 145, 148  
   vérifier la préparation des réactions 34, 137  
 workflow 16, 120

## D

DANGER, description xi  
 dangers. *Voir* sécurité  
 déchets biologiques à risque, manipulation xix  
 déchets radioactifs, manipulation xix  
 démarrer la réaction de PCR  
   configuration autonome 72  
   configuration co-localisée 71  
 déplacement et levée, sécurité xv  
 Design Wizard (Assistant de programmation)  
   écran Experiment Properties (Propriétés de l'expérience) 20, 124  
   écran Materials List (Liste des matériels) 42, 142  
   écran Methods & Materials (Méthodes et matériels) 22, 126  
   écran Reaction Setup (Préparation des réactions) 34, 137  
   écran Run Method (Profil de thermocyclage) 33, 135  
   écran Samples (Échantillons) 30, 131  
   écran Standards 28  
   écran Targets (Cibles) 24, 129  
   éléments du logiciel 121  
   finaliser 45, 146  
 dilution d'échantillon  
   préparer 53, 152  
   volume calculé 39, 53, 140, 153  
 documentation, relative viii  
 données  
   à propos de la collecte de données 2  
   exemple 9, 12, 90, 170  
   exporter 105, 182  
   transférer 84

## E

échantillon  
   composant de l'expérience 5  
   configurer 30, 131  
   dilution 53, 152  
   instructions de préparation 31, 133  
   préparer la matrice 51, 151  
   réaction d'échantillon (inconnu) 63, 158  
 échantillon de référence  
   composant de l'expérience 5, 6  
   écran Relative Quantitation Settings (Paramètres de quantification relative) 32, 133  
 écran Amplification Plot (Courbe d'amplification)  
   afficher après une réaction 98, 177  
   surveiller pendant une réaction 77  
 écran d'analyse  
   conseils de navigation 93, 173  
   écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) 98, 177  
   écran Gene Expression Plot (Profil d'expression génétique) 103, 175  
   écran Multicomponent Plot (Courbe des multicomposantes) 114, 190  
   écran Multiple Plots (Plusieurs courbes) 94, 174  
   écran QC Summary (Synthèse CQ) 110, 186  
   écran Raw Data Plot (Courbe des données brutes) 116, 193  
   écran Standard Curve (Courbe standard) 95  
   éléments du logiciel 91, 171  
   tableau des résultats 103, 175  
 écran Experiment Properties (Propriétés de l'expérience) 20, 124  
 écran Gene Expression Plot (Profil d'expression génétique) 103, 175  
 écran Materials List (Liste des matériels) 42, 142  
 écran Methods & Materials (Méthodes et matériels) 22, 126  
 écran Multicomponent Plot (Courbe des multicomposantes) 114, 190  
 écran Multiple Plots (Plusieurs courbes) 94, 174  
 écran QC Summary (Synthèse CQ) 110, 186  
 écran Raw Data Plot (Courbe des données brutes) 116, 193  
 écran Reaction Setup (Préparation des réactions) 34, 137  
 écran Run Method (Profil de thermocyclage) 33, 135  
   surveiller pendant une réaction 79  
 écran Samples (Échantillons) 30, 131  
 écran Standards 28  
 écran Targets (Cibles) 24, 129  
 écran Temperature Plot (Courbe des températures) 78  
 efficacité de l'amplification 29, 30, 97, 98  
 éléments du logiciel  
   Design Wizard (Assistant de programmation) 121  
   écran d'analyse 91, 171  
 élimination des déchets, instructions xix

ergonomie, sécurité [xxi](#)  
 essai en stock [40, 141](#)  
 essai fabriqué sur commande [40, 141](#)  
 essai personnalisé [40, 141](#)  
 étiquettes de sécurité, sur les instruments [xiv](#)  
 exclure des puits [112, 188](#)  
 exemple de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$   
   analyser [168](#)  
   créer [120](#)  
   description [11](#)  
   données [12](#)  
   nom [124](#)  
   préparer [150](#)  
   réaliser [162](#)  
   workflow [13](#)  
 exemple de quantification relative par les courbes standard  
   analyser [88](#)  
   créer [16](#)  
   description [10](#)  
   données [12](#)  
   nom [20](#)  
   préparer [50](#)  
   réaliser [66](#)  
   workflow [13](#)  
 expérience DDCT. Voir expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$   
 expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$   
   à propos de [5](#)  
 expérience de quantification relative par les courbes standard  
   à propos de [4](#)  
   comparée à l'expérience de quantification relative par la méthode de comparaison des valeurs de  $C_T$  [6](#)  
 exporter les données [105, 182](#)

## F

fiche de données de sécurité  
   description [xvii](#)  
   obtention [xvii](#)  
 fiche de données de sécurité, obtention [x](#)  
 formation, informations sur [x](#)

## G

gamme de dilutions standard  
   composant de l'expérience [5](#)  
   préparer [55](#)  
   volume calculé [36, 38](#)  
 gestuelle articulaire répétée, sécurité [xxi](#)

## H

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits [51, 151](#)

## I

icônes de danger. Voir symboles de sécurité  
 icônes de danger. Voir symboles de sécurité, sur les instruments  
 identification des causes d'erreurs  
   afficher l'écran Multicomponent Plot (Courbe des multicomposantes) [114, 190](#)  
   afficher l'écran QC Summary (Synthèse CQ) [110, 186](#)  
   afficher l'écran Raw Data Plot (Courbe des données brutes) [116, 193](#)  
   afficher les paramètres d'analyse [108, 184](#)  
   ajuster la ligne de base [109, 185](#)  
   ajuster le seuil [109, 185](#)  
   code d'alerte [111, 187](#)  
   exclure des puits [112, 188](#)  
 imprimer les instructions de préparation des réactions [39, 140](#)  
 instructions  
   analyse [91, 97, 101, 105, 109, 112, 113, 116, 117, 171, 177, 181, 185, 187, 189, 192, 194](#)  
   créer [21, 23, 26, 29, 31, 33, 34, 40, 44, 47, 125, 127, 130, 133, 134, 135, 141, 145, 148](#)  
   élimination des déchets chimiques [xviii](#)  
   préparation [54, 58, 60, 64, 152, 154, 156, 159](#)  
   réaliser [70](#)  
   sécurité chimique [xvi](#)  
   sécurité des déchets chimiques [xviii](#)

## L

ligne de base  
   ajuster manuellement [109, 185](#)  
   valeurs correctes [101, 181](#)

## M

matériels nécessaires [51, 53, 55, 59, 61, 151, 153, 155, 157](#)  
 matrice. Voir échantillons.  
 mélange réactionnel  
   volume [59, 155](#)  
   volume calculé [35, 37, 138, 139](#)  
 mises en garde à l'attention des utilisateurs, description [viii](#)

## N

normes  
   CEM [xxii](#)  
   sécurité [xxii](#)  
 normes CEM [xxii](#)

normes de compatibilité électromagnétique. *Voir* normes CEM

normes de sécurité xxii

## P

paramètres d'analyse

afficher 108, 184

avancés 109, 185

code d'alerte 109, 185

$C_T$  109, 185

ligne de base 109, 185

quantification relative 109, 185

seuil 109, 185

paramètres de notification 69

PCR multiplex 7, 24, 128

PCR simplex 7, 24, 128

plaque de réactions

charger 68, 164

disposition 45, 146

préparer 61, 157

retirer 84

préparer l'expérience

dilution d'échantillon 53, 152

gamme de dilutions standard 55

instructions 54, 58, 60, 64, 152, 154, 156, 159

matrice 51, 151

mélange réactionnel

préparer 58, 154

plaque de réactions 61, 157

pour plus d'informations 52, 54, 60, 64, 152, 154, 156, 159

workflow 50, 150

préparer la réaction de PCR 67, 163

prérequis pour l'utilisation de ce guide vii

profil des déchets, description xix

puits

contrôle négatif 31, 45, 61, 132, 146, 157

exclure 112, 188

inconnu 31, 45, 61, 132, 146, 157

sélection 93, 173

standard 31, 45, 61, 132, 146, 157

## Q

quantification 32, 133

## R

réactif

autres réactifs basés sur le principe de la fluorescence 9

SYBR Green 8

TaqMan 8

réactif SYBR Green 8, 23, 24, 26, 40, 117, 127, 128, 130, 141, 194

réactif TaqMan 8, 23, 24, 26, 40, 117, 127, 128, 130, 141, 194

réaliser l'expérience

activer les paramètres de notification 69

alerte 79

démarrer 71

instructions 70

pour plus d'informations 69, 79, 81

préparer 67, 163

surveiller 75

transférer les données 84

workflow 66

réplicat, composant de l'expérience 5, 6

résultats, interprétation 89, 169

retirer la plaque de réactions 84

Risque xx

RT-PCR 1 étape 24, 34, 40

RT-PCR 1 étapes 7, 128, 136, 141, 142

RT-PCR 2 étapes 7, 11, 12, 24, 128

## S

sécurité

avant d'utiliser l'instrument xv

chimique xvi

conventions xi

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 93, 173

seuil

ajuster manuellement 109, 185

valeurs correctes 101, 181

standard

case Set Up Standards (Configurer les standards) 24, 26

composant de l'expérience 5

configurer 28

dilution 55

instructions de préparation 29

réaction standard 62

support technique, contact x

surveiller la réaction de PCR

configuration autonome 83

configuration autonome (distante) 80

configuration co-localisée 75

- écran Amplification Plot (Courbe d'amplification) 77
- écran Run Method (Profil de thermocyclage) 79
- écran Temperature Plot (Courbe des températures) 78
- symboles de danger. *Voir* symboles de sécurité, sur les instruments
- symboles de sécurité, sur les instruments xiii
- symboles, sécurité xiii
- système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne. *Voir* système StepOne.
- système StepOne
  - collecte des données 2
  - configuration 71, 75, 85
  - consommables 3
  - filtre 117, 194
  - réactif 8

## T

- tableau des résultats 103, 175
- transférer les données 84

## U

- utilisation de ce guide
  - avec des connaissances pratiques 9
  - comme tutoriel 9
- utilisation de l'instrument, sécurité xv

## V

- vitesse de variation de la température 22, 23, 126, 128

## W

- workflow Advanced Setup (Configuration avancée) 9, 10, 23, 47, 64, 127, 148, 159, 196
- workflow Export/Import (Exportation/Importation) 10, 199
- workflow QuickStart (Démarrage rapide) 10, 197
- workflow Template (Modèle) 10, 198
- workflows
  - Advanced Setup (Configuration avancée) 196
  - exemple 13
  - Export/Import (Exportation/Importation) 10, 199
  - QuickStart (Démarrage rapide) 10, 197
  - Template (Modèle) 10, 198





**Worldwide Sales and Support**

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

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

**Headquarters**

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

06/2010