

Protocole PCR Quantitative LightCycler 480 (1/5)

1. Préparez la gamme étalon

- Faire un pool avec au moins $1\mu\text{L}$ de chaque échantillon

C'est la concentration [1]

$$[0.2] = 10\mu\text{L} + 40\mu\text{L H}_2\text{O}$$

$$[0.1] = 20\mu\text{L} + 20\mu\text{L H}_2\text{O}$$

$$[0.02] = 10\mu\text{L} + 40\mu\text{L H}_2\text{O}$$

$$[0.01] = 20\mu\text{L} + 20\mu\text{L H}_2\text{O}$$

- Faites aussi un point [0] avec H_2O

2. Préparez le mix (Roche Lightcycler 480 SYBR Green I)

- Préparation du mix pour une réaction :

Primer FW($10\mu\text{M}$)	$0,5\mu\text{L}$
Primer RV($10\mu\text{M}$)	$0,5\mu\text{L}$
Sybr GreenI Master(2X)	$5\mu\text{L}$
H_2O	$3\mu\text{L}$

$$V_t = 9\mu\text{L}$$

- Ajoutez $1\mu\text{L}$ ADN
- **Faites tous les échantillons et points de gamme en triplicat**
- Filmez la plaque
- Centrifugez 1min à 3000g

Protocole PCR Quantitative LightCycler 480 (2/5)

3. Lancer une PCR-Q

- Démarrez le programme



- Identifiez-vous User name :

Password :

- Cliquez sur **New expérience from template**

- Cliquez sur **SYBR Green I 384-II** et validez



- Appuyez sur le bouton d'ouverture du tiroir



- Placez la plaque (le puits **A1** doit être en haut à gauche)

- Mettez 10 μ L dans la case Reaction Volume

- Cliquez sur **Start Run**



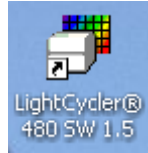
- Cliquez sur le dossier Experiments, nommez, datez le fichier du run puis validez



Protocole PCR Quantitative LightCycler 480^(3/5)

4. Récupérer les données brutes

- Démarrez le programme



- Cliquez sur

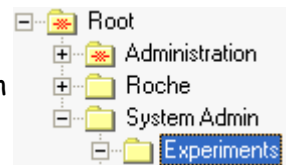


- Cliquez sur le dossier Experiments et sélectionnez le fichier du run

- Cliquez sur



- Enregistrez le fichier

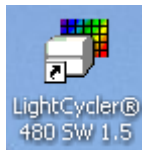


5. Traiter les données

- Démarrez le programme



et



- Identifiez-vous User name : **admin**

Password : LightCycler480

- Cliquez sur



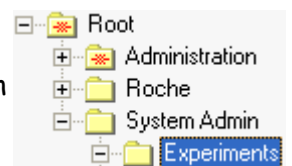
- Cliquez sur le dossier Experiments et sélectionnez le fichier du run

- Cliquez sur



- Sélectionnez le fichier du run (.ixo)

- Cliquez sur



Protocole PCR Quantitative LightCycler 480^(4/5)

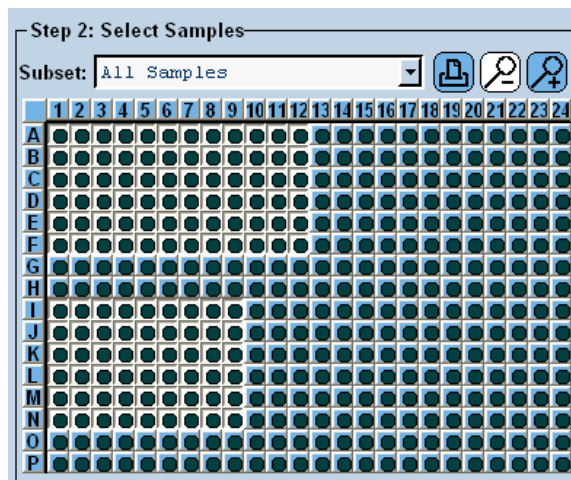
- Cliquez sur  et nommez le subset et sélectionnez sur la plaque sa position puis validez en cliquant sur 

- créez un subset pour chaque couple de primer

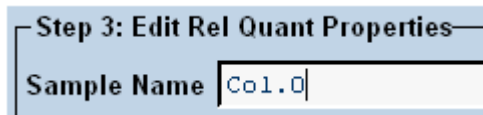
- Cliquez sur 

- Cochez 
 - ☐ Abs Quant
 - ☒ Rel Quant
 - ☐ Tm
 - ☐ Melt Geno

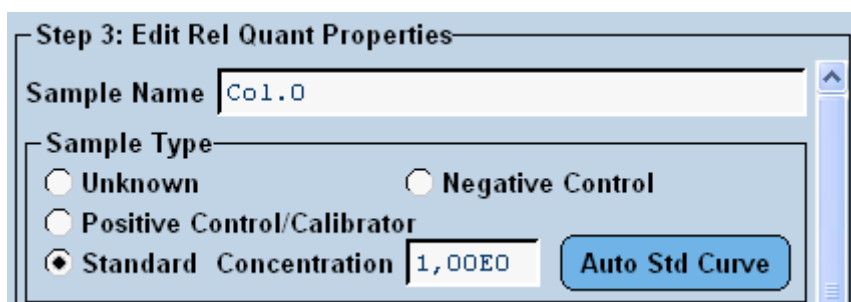
- Sélectionnez les échantillons identiques



- Sélectionnez Sample name dans le menu sous le plan de plaque
- Nommez les échantillons puis tapez sur entrée



- Sélectionnez sur le plan de plaque les points de gamme et assignez-leur la concentration en faisant attention d'utiliser une « , » et tapez sur entrée



Protocole PCR Quantitative LightCycler 480^(5/5)

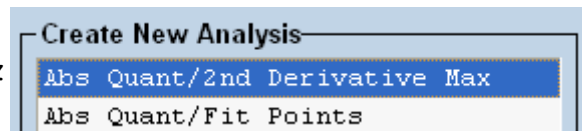
- Sauvegardez en cliquant sur



- Cliquez sur



- Sélectionnez



- Puis sélectionnez le subset puis validez

Create new analysis

Analysis Type * Abs Quant/2nd Derivative Max

Subset * CPK3

Program * amplification

Name * Abs Quant/2nd Derivative Max for CP

- Décochez les valeurs aberrantes et cliquez sur

Calculate

- Notez l'efficacité obtenu par couple de primer

- Pour exporter les Cp obtenus faites clic droit sur le tableau, Export Table

Samples				Results		
Include	Color	Pos	Name	Cp	Concentration	Star
☒		C3	Col1.0	28,01	9,62E-2	1,00
☒		D1	Col1.0	29,95	2,28E-2	2,00
☒		D2	Col1.0	30,02	2,15E-2	2,00
☒		D3	Col1.0	30,42	1,54E-2	2,00
☒		E1	Col1.0	31,17	7,83E-3	1,00
☒		E2	Col1.0	30,85	1,05E-2	1,00
☒		E3	Col1.0		9,67E-3	1,00
☒		F1	Col1.0	34,14	3,38E-4	
☒		F2	Col1.0	32,60	1,89E-3	

- Ouvrir le fichier obtenu avec Excel

- Pour calculer le niveau d'expression vous pouvez utiliser la formule :

$$R = \frac{E(\text{Cpgène intérêt} - \text{Cpgène intérêt pool})}{F(\text{Cpgène ménage} - \text{Cpgène ménage pool})}$$

E: Efficacité primer du gène d'intérêt **Pool** : échantillon calibrateur

F: Efficacité primer du gène ménage