

# PCR en temps réel - Light Cycller 480

## Guide de l'utilisateur

Département de biochimie

Université de Montréal



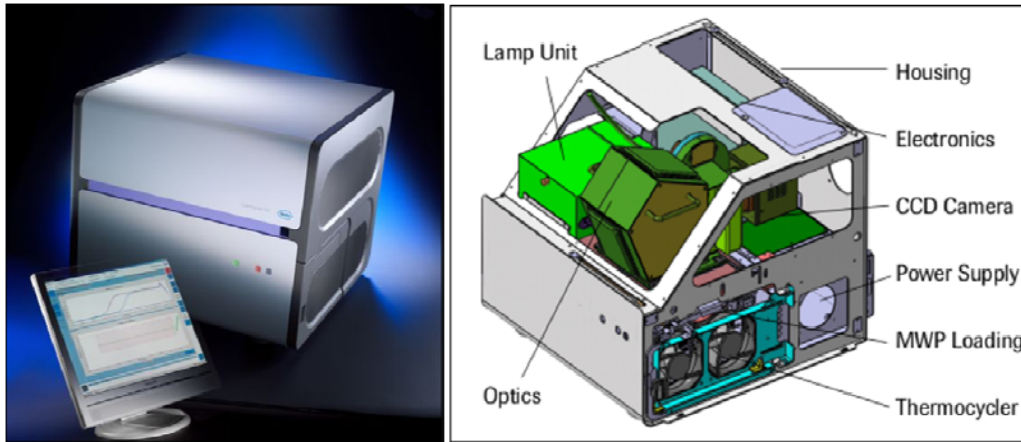
### Table des matières

1. **Présentation** de l'instrument et **Introduction** sur la base du PCR en temps réel
  - a. **Composantes** du Light Cycller 480 et **principes de base**
  - b. **Stratégies** et applications utilisées pour le PCR en temps réel
2. **Mise en marche** de l'instrument et de l'ordinateur
3. Utilisation du **logiciel** de l'instrument
  - a. Informations sur la **base de données**
  - b. Création du **compte utilisateur**
  - c. Entrée des **paramètres** expérimentaux (un aperçu)
  - d. **Analyse** par quantification absolue (un aperçu)
  - e. Création d'un **rapport d'expérience** complet
  - f. **Exportation / Importation** de fichiers
4. Exemple d'expérience en **SYBR Green** (Source : Roche)
5. **Consignes générales** d'utilisation du Light Cycller 480
6. Matériels supplémentaires :
  - a. **Feuilles de travail** SYBR Green et Sonde d'hydrolyse (UPL)
  - b. **Plan** de plaque 96 puits.

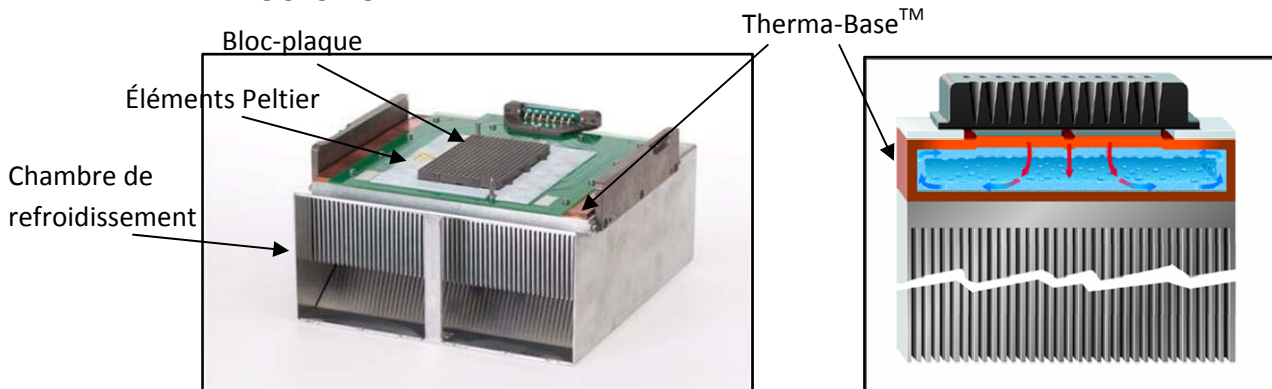
## Présentation de l'instrument

### 1. Composantes du Light Cycler 480 et principes de base

- Le Light Cycler 480 est constitué d'un thermocycleur (Appareil de PCR conventionnel) couplé à un système optique (pour l'excitation et la détection de fluorophores).
- Cet instrument permet de faire le suivi d'une réaction PCR en temps réel grâce à l'utilisation des fluorophores.

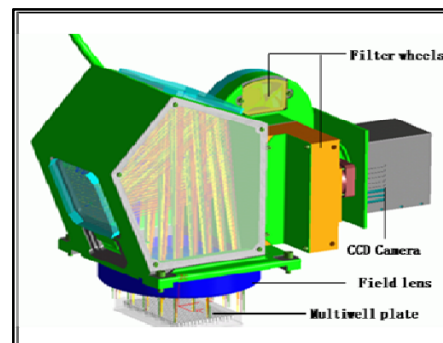
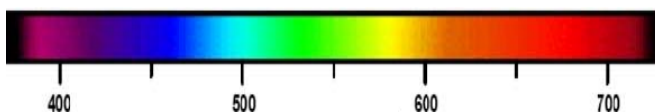


### THERMOCYCLEUR



### SYSTÈME OPTIQUE

- Lampe au Xénon
- Caméra CCD
- 5 filtres d'excitation : 450, 483, 523, 558, 615 nm
- 6 filtres de détection : 500, 533, 568, 610, 640, 670 nm

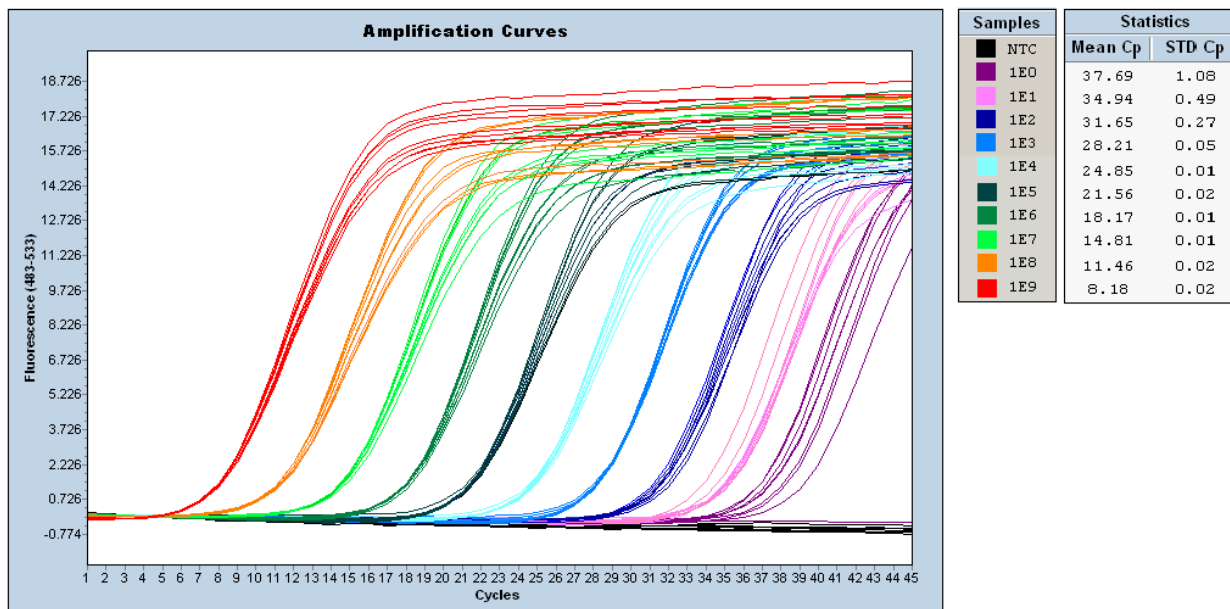


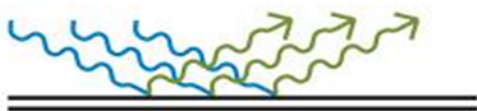
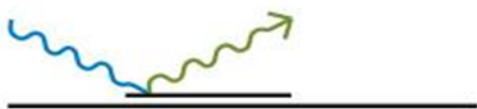
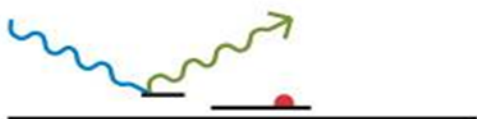
## Principe de base du PCR en temps réel

- La réaction en chaîne par polymérase en temps réel est une technologie ayant de nombreuses applications, basée sur une réaction enzymologique, la [PCR](#) et sur la mesure en continue de son produit.
- À chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN total ou d'[amplicon](#) est mesurée grâce à un [marqueur fluorescent](#). L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible, ce qui était très difficile à obtenir sans biais en [PCR en point final](#). *Du point de vue enzymatique, il n'y a aucune différence théorique entre ces deux types de PCR.* Grâce à l'extraordinaire puissance de la technique d'amplification de l'ADN par PCR, il est possible aujourd'hui d'établir un profil génétique à partir de quantités infimes d'ADN.
- La différence fondamentale de la PCR en [temps réel](#) avec la PCR en point final est que l'intégralité de la cinétique mesurable (au-dessus du bruit de fond) est quantifiée. Les données de fluorescence peuvent donc être exprimées en logarithme afin d'identifier facilement la phase exponentielle et mesurable, qui prend alors une apparence linéaire. Cette partie, alors appelée « segment quantifiable », permet de calculer la quantité d'ADN initial.

Source : Wikipédia

## Exemple de résultats obtenus en PCR en temps réel

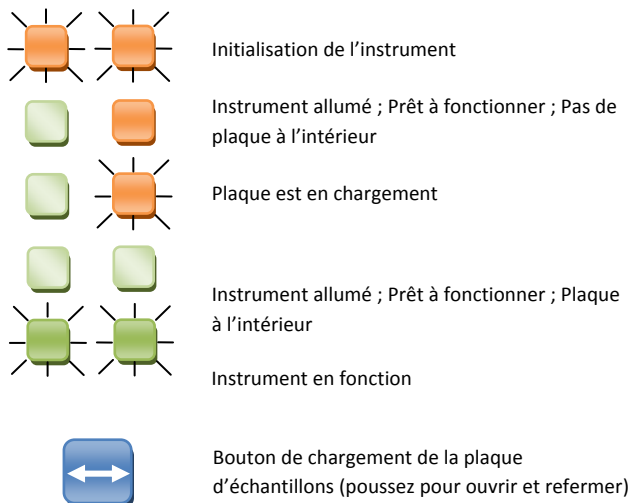



**b) Stratégies et applications utilisées pour le PCR en temps réel****SYBR Green I****SimpleProbe Probes****HybProbe Probes****Hydrolysis Probes**


Assay Format	Excitation (nm)	Detection (nm)	Dyes	Application
SYBR Green I	483	530	SYBR Green I	Qualitative Detection Quantification
HybProbe Probes	483	533/ 610 533/ 640 533/ 670	Fluo - LightCycler® RED 610 Fluo - LightCycler® RED 640 Fluo - Cy5	Quantification SNP Analysis
Hydrolysis Probes	450 483 523 558 558 615	500 533 568 610 640 670	LightCycler® CYAN 500 FAM VIC/HEX LightCycler® RED 610 LightCycler® RED 640 Cy5	Quantification
Universal ProbeLibrary Probes	483	533	FAM	Quantification
SimpleProbe Probes	483	533	Fluorescein	SNP Analysis

## 2. Mise en marche de l'instrument et de l'ordinateur

- Allumez l'instrument en premier (bouton POWER situé en arrière à droite),
  - Code de lumière de l'instrument :



- Allumez l'ordinateur et l'écran,
- CTRL+ALT+DEL pour ouvrir une session
  - **User name** : operator
  - **Password** : LC480 (respectez la casse)
- Votre session est maintenant ouverte
- Assurez-vous que la base de données de votre laboratoire de recherche est activée en visualisant le logo  dans la barre des tâches,
  - Si non, activez le raccourci correspondant dans le dossier Exor4 Base de données.


- Double cliquez sur l'icône du logiciel du Light Cycler 480 

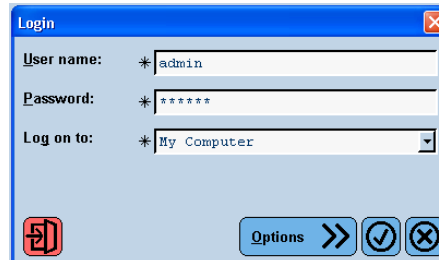
## 3. Utilisation du logiciel de l'instrument


### 1. Informations sur la base de données

- Une base de données a été créée pour chacun des laboratoires de recherche du département utilisant le Light Cycler 480.
- Elle porte le nom de XDMS\_T(*nom de famille du professeur*) ex : XDMS\_TDesGrosseillers
- Chaque utilisateur aura un compte dans la base de données de son laboratoire respectif.











## 2. Création du compte utilisateur

- Lors de la formation, un compte vous sera créé afin de sectoriser et sécuriser vos résultats. Seuls vous et les membres de votre laboratoire pourront avoir accès à ces données.
- **Double cliquer** sur l'icône du logiciel Light Cycl<sup>er</sup> 480 sur le bureau, 
- Dans la boîte de dialogue *Login*, inscrivez votre **nom d'utilisateur**, votre **mot de passe** et sélectionnez la base de donnée correspondante.
  - Lors d'une première ouverture pour la création d'un compte :
    - Nom d'utilisateur : admin
    - Mot de passe : Voir Philippe; car différent pour chaque base de donnée
    - Log on to : XDMS\_T(*nom de famille du professeur*)



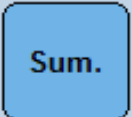



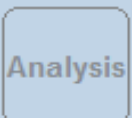

- Cliquez sur 
- Interface du logiciel :

### Interface des actions globales :

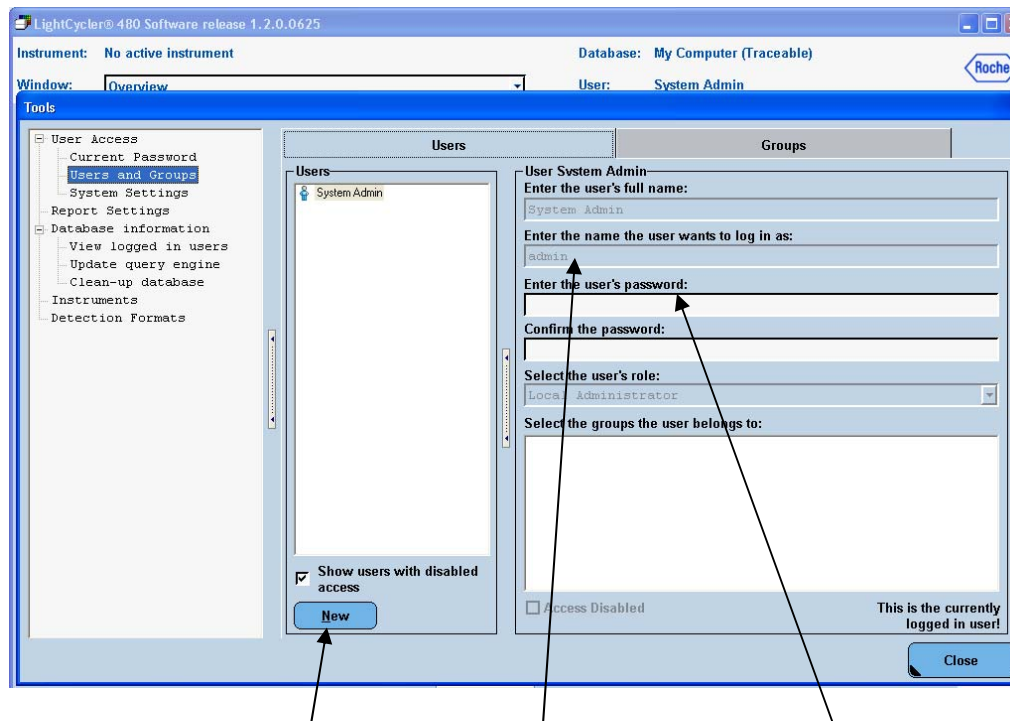
- |   |   |
|---|---|
|  | → <b>Sortie</b>   |
|  | → <b>Déconnexion</b> de l'utilisateur   |
|  | → Affiche écran <b>Overview</b>   |
|  | → Ouvre <b>Navigator</b>  |
|  | → <b>Enregistre</b> l'expérience en cours   |
|  | → <b>Exporte</b> l'expérience en cours  |
|  | → <b>Ferme</b> l'expérience en cours  |
|  | → <b>Imprime</b> objet sélectionné  |
|  | → <b>Tools:</b> Gérer les utilisateurs, état de la base de donnée, instrument, rapport de configuration et formats de détection |
|  | → <b>Aide:</b> contient le Manuel de l'utilisateur  |

### Interface des modules :

La barre des modules est affichée sur le côté gauche de l'écran et contient 6 boutons principaux. Voici une brève description des actions engendrées par ces boutons :

- |   |   |
|---|---|
|  | Cliquer sur ce bouton ouvre le module <b>Summary</b> de l'expérience. Ce module contient les informations au sujet de l'expérience (tel que le nom, la date, et l'utilisateur ainsi que les combinaisons de filtres), affiche le log des changements, et vous permet de programmer une expérience sous forme de macro.  |
|  | Cliquer sur cette icône ouvre le module <b>Run</b> , qui inclue les détails du protocole expérimental, le schéma expérimental et des notes entrées par l'utilisateur.   |
|  | Cliquer sur cette icône ouvre le module <b>Subset Editor</b> , qui vous permet de grouper des échantillons en sous-groupes pour l'analyse et le rapport d'expérience.   |
|  | Cliquer sur cette icône ouvre le module <b>Sample Editor</b> , qui est utilisé pour définir les informations relatives à chaque échantillon utilisé dans l'expérience.  |
|  | Cliquer sur cet icône ouvre le module <b>Analysis</b> . Si aucune analyse n'est ouverte, cette action vous mènera à la fenêtre <b>Analyses Overview</b> . Vous pourrez créer une nouvelle analyse ou en ouvrir une autre déjà existante. Chaque nouvelle analyse créée pour une expérience est ajoutée à la liste des analyses et peut être sélectionnée. Si une analyse est déjà ouverte, la fenêtre correspondante sera appelée dans la fenêtre principale. |
|  | Cliquer sur cet icône ouvre le module <b>Report</b> qui vous permet de définir le contenu du rapport, l'afficher et l'imprimer. <i>Vous devez d'abord avoir sauvé votre expérience pour que cet icône soit activé.</i>  |

- Ensuite, allez dans la section Tools

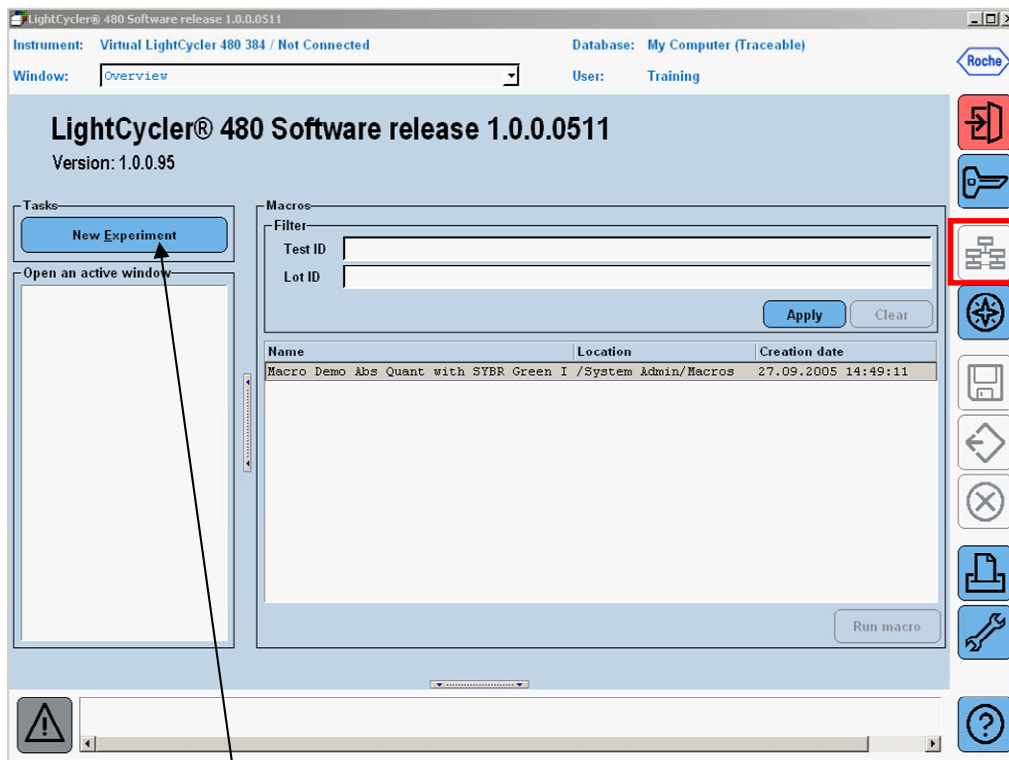


- Sélectionnez **New** et entrez un **nom d'utilisateur** et un **mot de passe**.
- Prenez en **note** votre **User name** ainsi que votre **Password**.


**N.B.** Vous devez vous assurer d'être dans le compte **admin** de votre base de données pour pouvoir créer de nouveau profil d'utilisateur.

### c) Entrer des paramètres expérimentaux (un aperçu)

- Fenêtre **Overview**




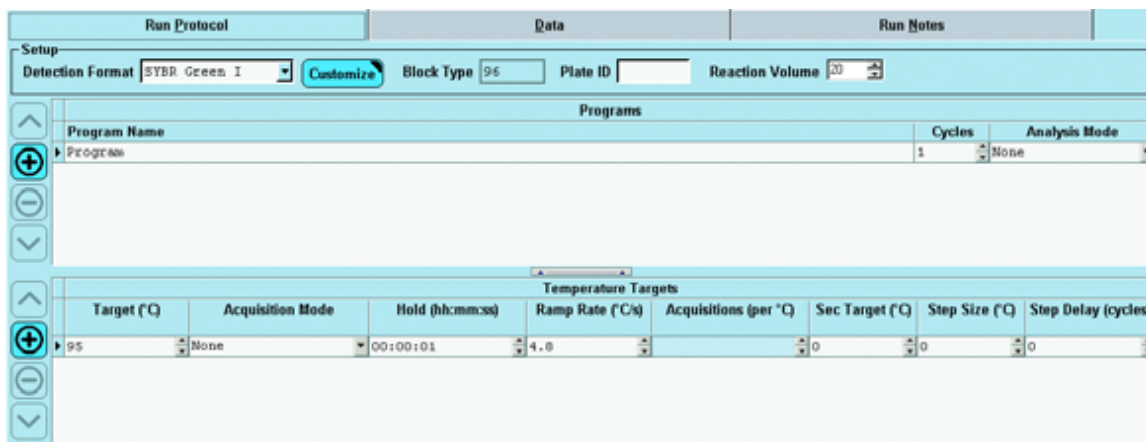
- ✓ Pour programmer une nouvelle expérience :

- Sélectionnez **New Experiment**
- Sélectionnez l'icône pour une nouvelle expérience avec le Light Cycler 480 et cliquez 
- Dans la section Setup de l'onglet *Programs*, spécifiez les paramètres pour chacune des catégories suivantes :



- Detection Format
  - Block Type (déjà assigné, ce sera toujours 96 puits)
  - Plate ID, (optionnel)
  - Reaction Volume
- Choisissez un format de détection (ex : SYBR Green I) et modifiez les paramètres pour les formats de détection disponibles en utilisant l'option Customize, si nécessaire.
  - Sélectionnez un volume réactionnel final en  $\mu\text{L}$ . L'échelle de volume recommandée pour une plaque 96 puits varie de 10 à 100  $\mu\text{L}$  (conseillé : 20  $\mu\text{L}$ )

6. Dans la section *Programs and Temperature Targets*, cliquez  pour ajouter des étapes dans le protocole du thermocycleur (autant que nécessaire pour le protocole) (le premier programme est toujours inscrit par défaut. Pour chaque rangée de programme, spécifiez le nom de l'étape (ex : dénaturation, amplification, melting,...), le nombre de cycle, le mode d'analyse, etc. (Voir exemple SYBR Green section 4)






The screenshot shows the 'Run Protocol' setup window. At the top, there are tabs for 'Run Protocol', 'Data', and 'Run Notes'. Below the tabs, there are fields for 'Detection Format' (SYBR Green I), 'Block Type' (96), 'Plate ID', and 'Reaction Volume' (20). The main section is divided into two parts: 'Programs' and 'Temperature Targets'.

**Programs Table:**

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Program	1	None

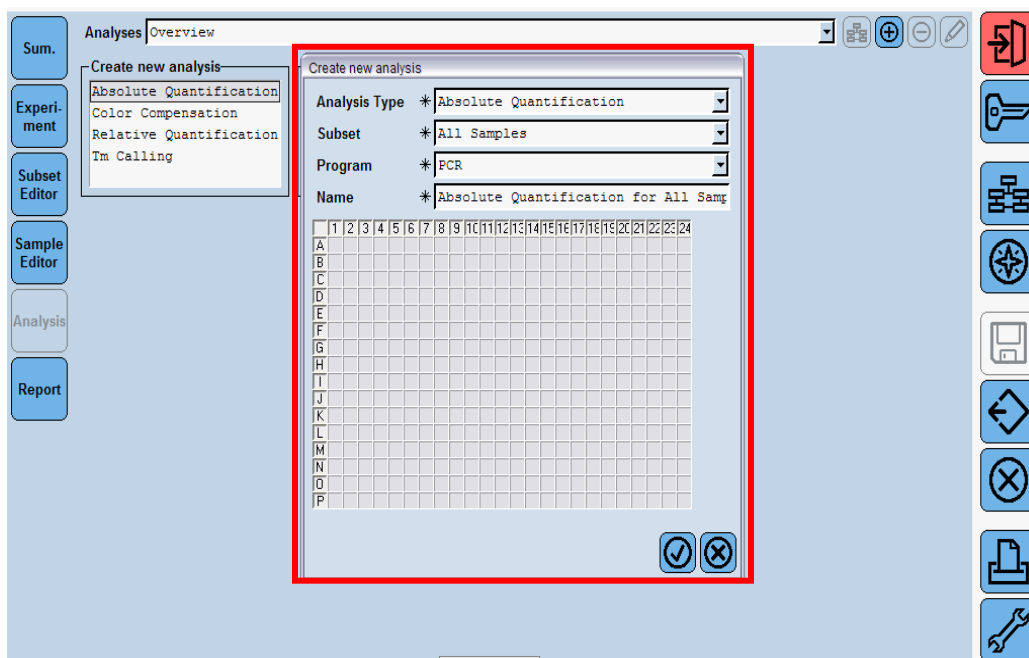
**Temperature Targets Table:**

Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec. Target (°C)	Step Size (°C)	Stop Delay (cycles)
95	None	00:00:01	4.0	0	0	0	0

7. Alternativement, il est possible **d'appliquer un template** expérimental préalablement enregistré :
- Cliquez **Apply Template** pour afficher la boîte de dialogue *Apply Template*
  - Sélectionnez un **Template** de la liste et cliquez 
  - Pour **enregistrer un Template**, cliquez sur Save Template As après avoir entré tous les paramètres désirés.
8. Dans la barre Module, cliquez **Sample Editor** pour **définir les informations** de chaque échantillon. Il est possible d'effectuer cette étape pendant que l'expérience est en cours ou à la fin de celle-ci. Pour une description plus détaillée, voir le guide de l'opérateur dans la section Aide 
9. Dans la barre Module, cliquez **Subset Editor** pour **définir les sous-groupes** facilitant la tâche lors de l'analyse et de la compréhension du rapport de résultats. Il est également possible d'effectuer cette étape pendant que l'expérience est en cours ou à la fin de celle-ci. Pour une description plus détaillée, voir le guide de l'opérateur dans la section Aide 
10. Préparez la **plaque** et chargez-la dans l'instrument à l'aide du bouton situé sur le devant de l'instrument. Vérifiez l'alignement du coin diagonal de la plaque avec celui présent dans le tiroir. Pressez à nouveau sur le bouton pour fermer le tiroir afin de permettre à l'appareil de positionner convenablement la plaque dans le bloc du thermocycleur.
11. Cliquez sur **Start Run**. Le bouton Start Run est seulement disponible si la plaque a été chargée dans l'instrument. La boîte de dialogue **Save Experiment** s'affiche. Entrez un nom significatif pour l'expérience et enregistrez-la dans le dossier correspondant.
- \* Si vous désirez **sauter une étape** pendant la RUN, utilisez le bouton END PROGRAM.
  - \* Si vous désirez rajouter des cycles d'amplification à votre programme en cours de run, cliquez sur +10 cycles.

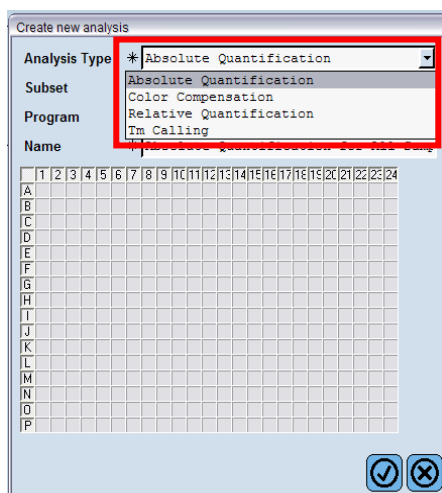
## d) Analyse : Quantification absolue

1. Lorsque l'expérience est terminée, sélectionnez le module
2. La fenêtre "Create new analysis" apparaît.



3. Sélectionnez:

- i. Analysis Type



ii. Subset

Create new analysis

Analysis Type \* Absolute Quantification

Subset \* All Samples

Program All Samples  
96er Format

Name

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A																								
B																								
C																								
D																								
E																								
F																								
G																								
H																								
I																								
J																								
K																								
L																								
M																								
N																								
O																								
P																								

✓ ✕

iii. Program

Create new analysis

Analysis Type \* Absolute Quantification

Subset \* All Samples

Program \* PCR

Name

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A																								
B																								
C																								
D																								
E																								
F																								
G																								
H																								
I																								
J																								
K																								
L																								
M																								
N																								
O																								
P																								

✓ ✕

iv. Renommez cette analyse.

Create new analysis

Analysis Type \* Absolute Quantification

Subset \* All Samples

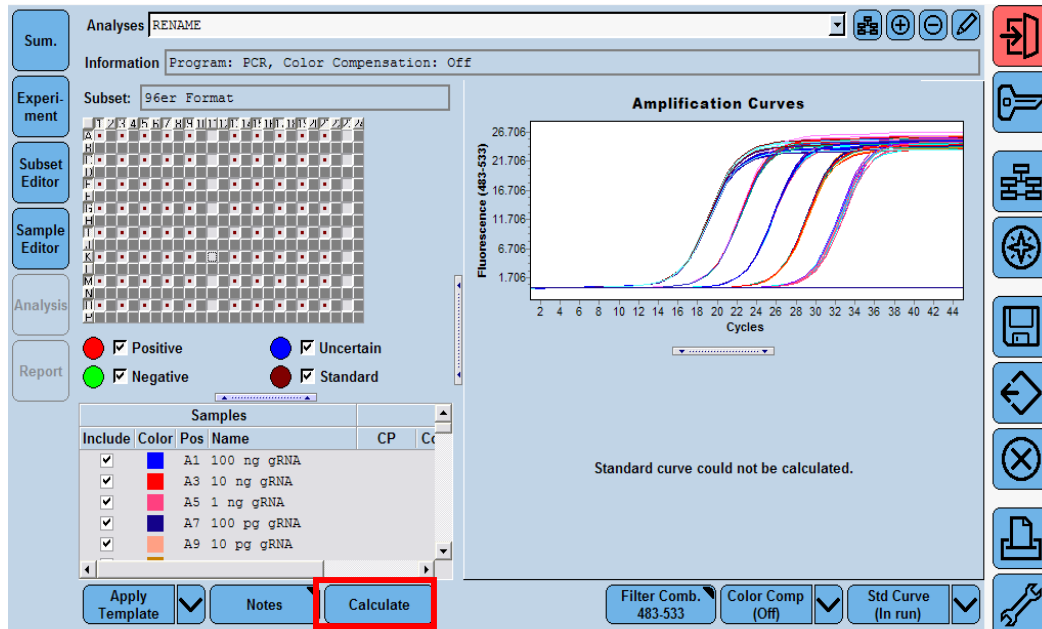
Program \* PCR

Name \* RENAME

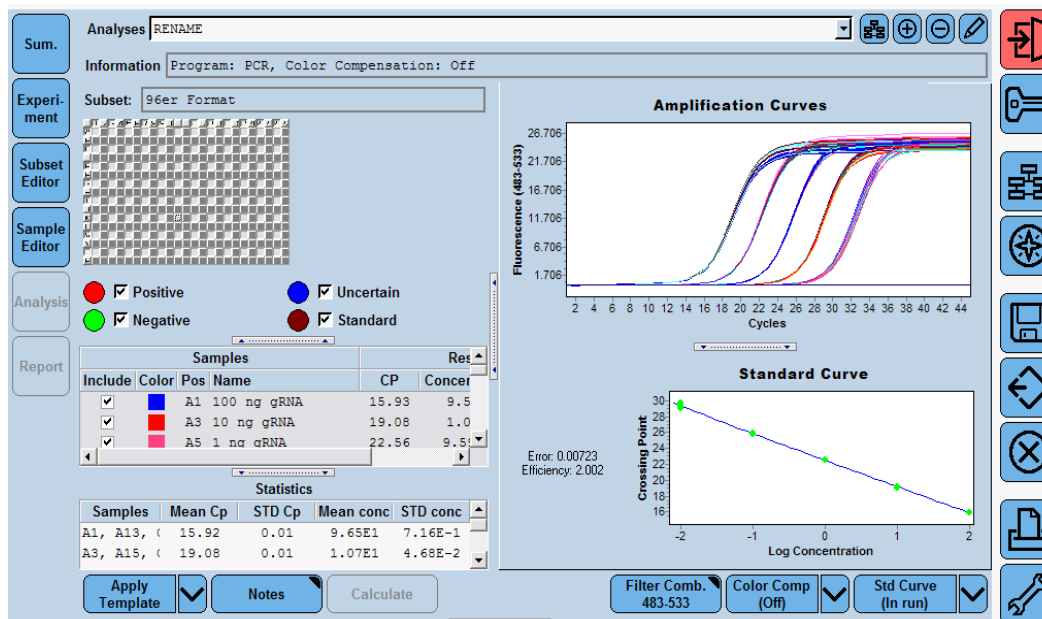
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A																								
B																								
C																								
D																								
E																								
F																								
G																								
H																								
I																								
J																								
K																								
L																								
M																								
N																								
O																								
P																								

✓ ✕

## 4. Une fenêtre d'analyse s'ouvrira :

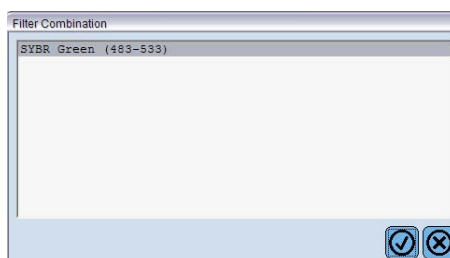
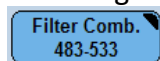


5. Pour évaluez le Crossing point (Cp) identique au Ct, cliquez sur Calculate
6. Si vous avez entré des points pour une courbe standard dans la section Sample Editor, une courbe standard sera automatiquement affichée et les concentrations des inconnus instantanément calculées. De plus, si vous avez spécifié vos réplicats au logiciel, les statistiques seront automatiquement calculées incluant le Cp moyen, la déviation standard du Cp, la moyenne des concentrations ainsi que la déviation standard de ces concentrations.

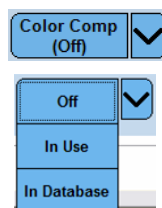


7. En utilisant les boutons du menu en bas à droite, il est possible de :

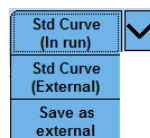
- i. Accéder aux données générées par une combinaison alternative de filtres de couleurs.



- ii. Appliquer un fichier de compensation de couleur lors d'étude en multiplex (infos avancées). *La compensation de couleur est dependante de la température, plus la température monte plus la compensation de couleur baisse.*

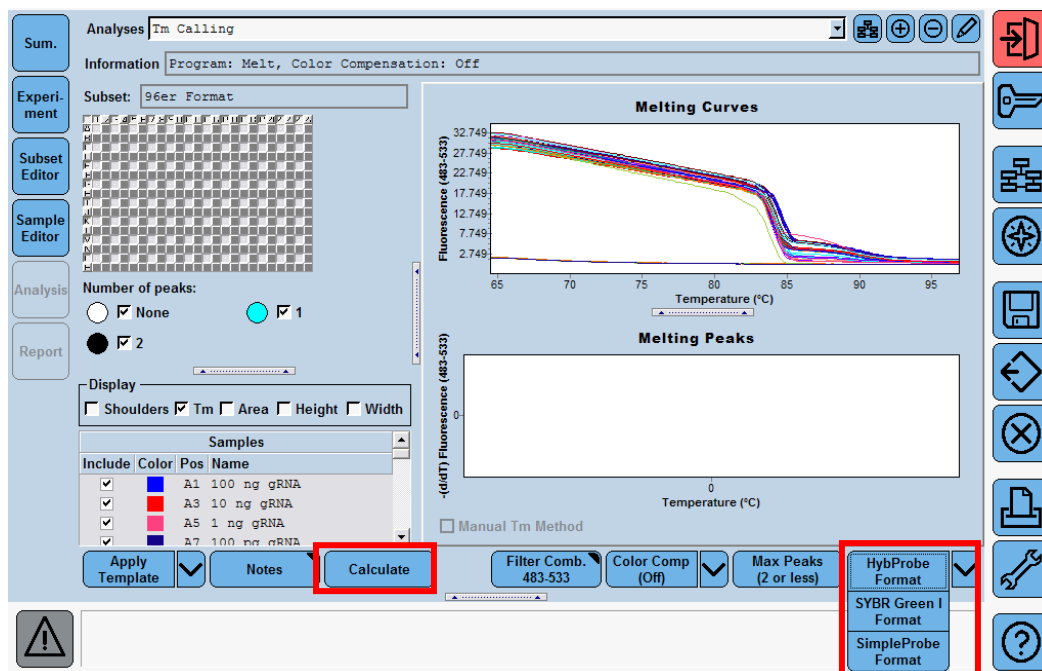


- iii. Appliquer une courbe Standard en provenance de la RUN actuelle ou archivée.

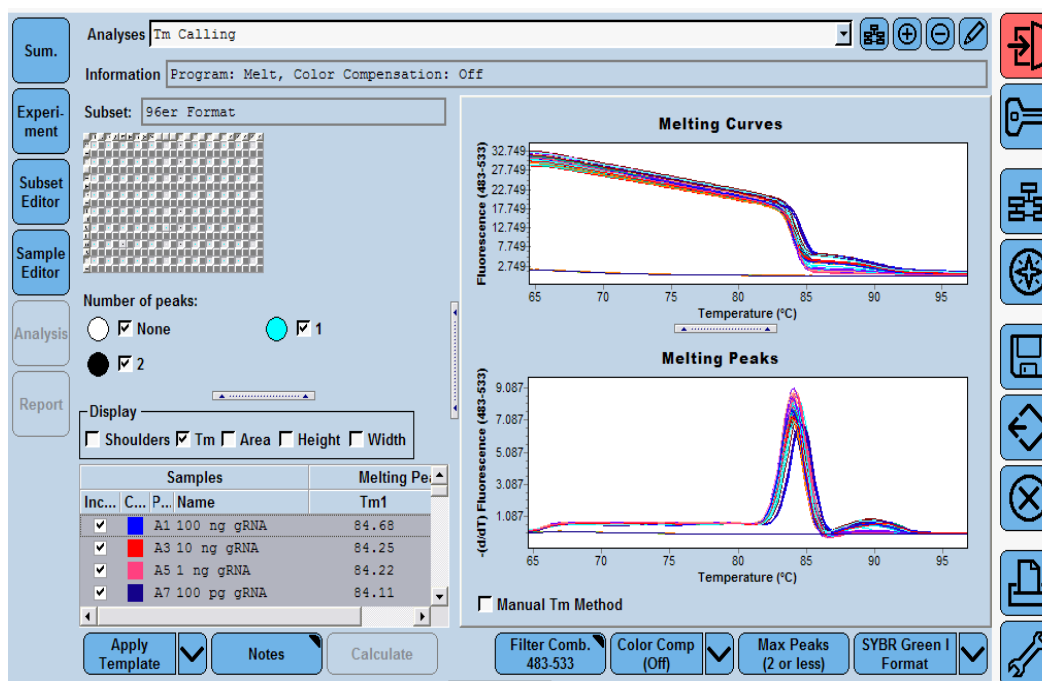


## d) Analyse : Courbe de melting (Tm) alias - Tm calling

1. Pour générer et vérifier les courbes de melting, créez une nouvelle fenêtre d'analyse en sélectionnant le type d'analyse *Tm Calling*. Lorsque la fenêtre d'analyse apparaît, sélectionnez le format de détection approprié et cliquez sur **Calculate** pour calculer le Tm de chaque courbe individuellement.

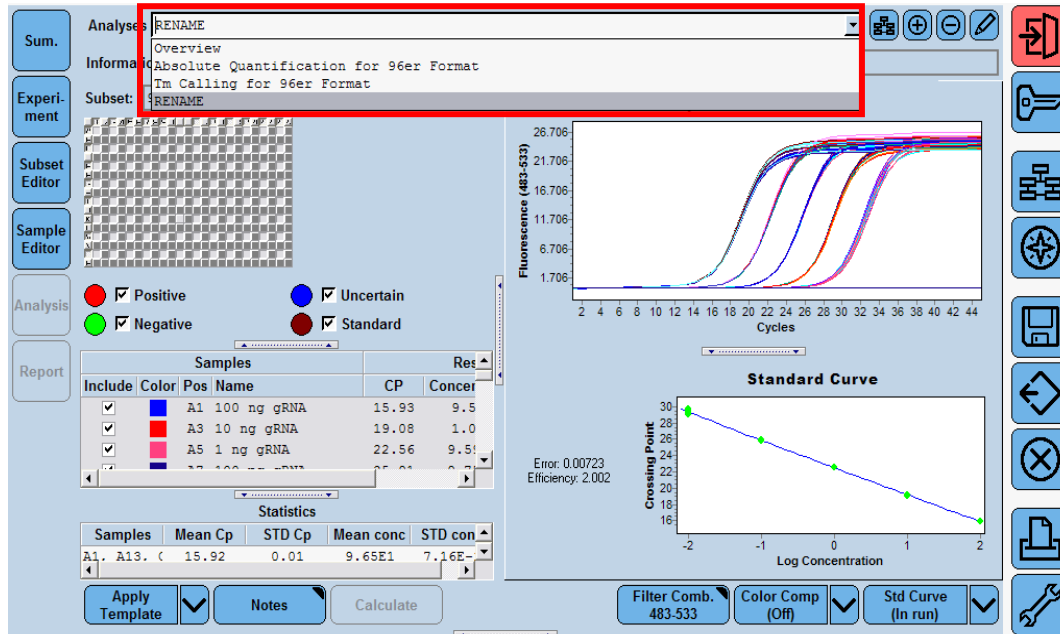


2. Les courbes de melting et la valeur du Tm values seront affichées.



## d) Analyse : Naviguer à travers les différentes analyses:

1. Pour naviguer d'une analyse à l'autre, utiliser le menu déroulant.



## Boutons



- pour accéder à l'**Overview** des fenêtres d'analyse pour cette expérience.



- pour **ajouter** une nouvelle fenêtre d'analyse, donc une nouvelle analyse.




- pour **enlever** une fenêtre d'analyse.

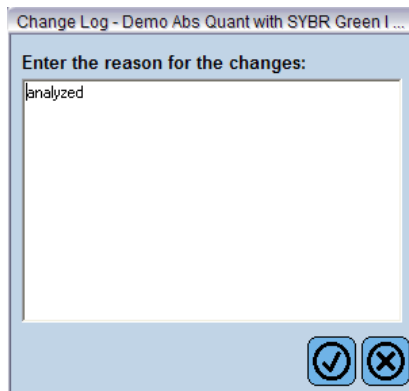



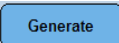
- pour **renommer** une fenêtre d'analyse.

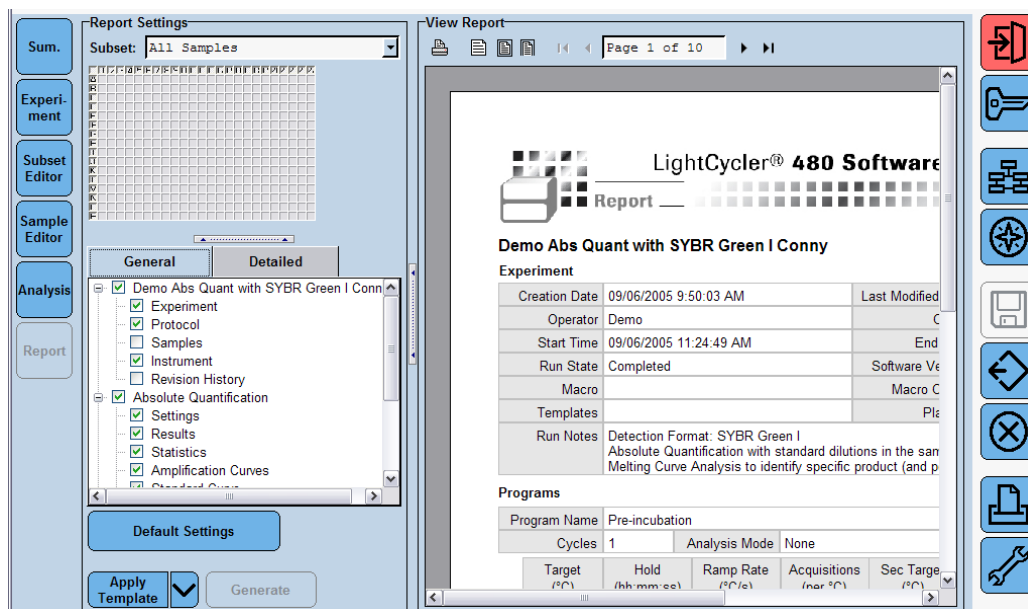
\*Si vous êtes intéressés à utiliser le module de **quantification relative**, consultez le guide sur la quantification relative (Voir Philippe Lampron).

### e) Générer un rapport d'expérience complet

1. Pour générer un rapport d'expérience, les données de l'expérience doivent être enregistrées en utilisant l'icône  du menu d'action globale. Comme il s'agit d'une altération/modification au fichier de données vous devez spécifier une raison pour les changements. À noter qu'il est possible d'appuyer une fois sur la barre d'espace et cela peut suffire comme raison des changements. Ceci peut être fort utile pour les utilisateurs pressés!



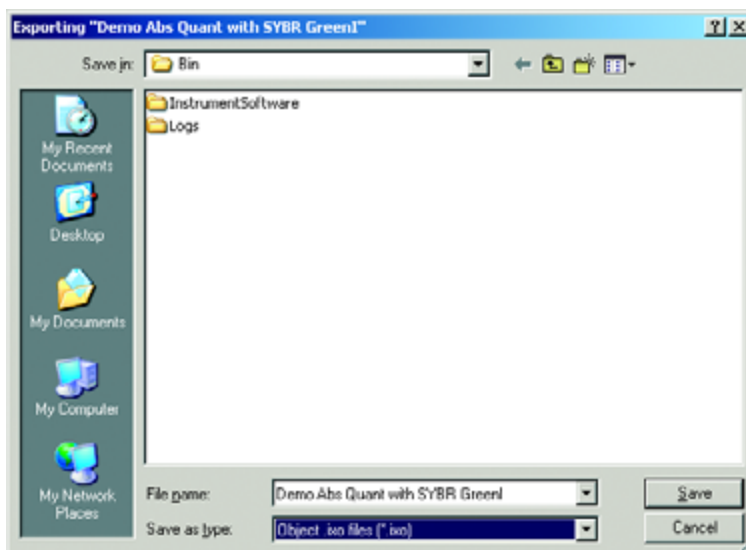
2. Après avoir enregistré l'expérience, le bouton  dans le menu Modules est activé.
3. Il est donc possible de sélectionner les différentes informations à inclure dans le rapport en cochant les cases appropriées.
4. Une fois les sélections faites, cliquez sur  pour créer le rapport.



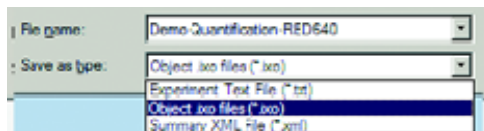
## f) Exportation / Importation de fichiers

Les données d'expérience du logiciel de base du LightCycler® 480 peuvent être exportées du module *Navigator* ou lorsque l'expérience est ouverte dans la fenêtre principale du logiciel. Utilisez une des options suivantes pour exporter un objet provenant du logiciel LightCycler® 480 :

- Sélectionnez-le dans le *Navigator* **ou**
- Ouvrez-le dans la fenêtre principale
- Lorsque vous êtes dans le *Navigator*, cliquez le bouton :
- Lorsque vous êtes dans la fenêtre principale, cliquez le bouton :
- La fenêtre de dialogue suivante apparaît :
  - Parcourir pour trouver le dossier de destination du fichier à exporter.




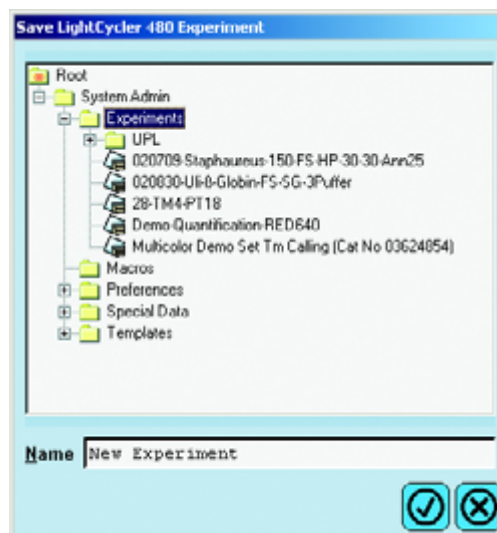
- Dans le menu déroulant *Save as type*, sélectionnez le format désiré (\*.ixc, \*.txt, or \*.xml):



- Entrez un nom de fichier et cliquez *Save*.

## Importation de fichiers

- À partir du Navigator, sélectionnez *Import* et sélectionnez le type de fichier que vous désirez importer.
  - Pour le LightCycler 480, le format sera toujours le **.ixo**
- Trouvez et sélectionnez le fichier désiré et cliquez sur *Open*. Le fichier sera alors importé dans la fenêtre principale.
  - *Pour sélectionner plusieurs fichiers à la fois, maintenez la touche CTRL enfoncée en cliquant sur chaque fichier.*
- Pour enregistrer les fichiers importés, cliquez sur le bouton Save, Parcourez le navigateur pour trouver le bon dossier et enregistrez l'objet sous un nom significatif en cliquant sur 

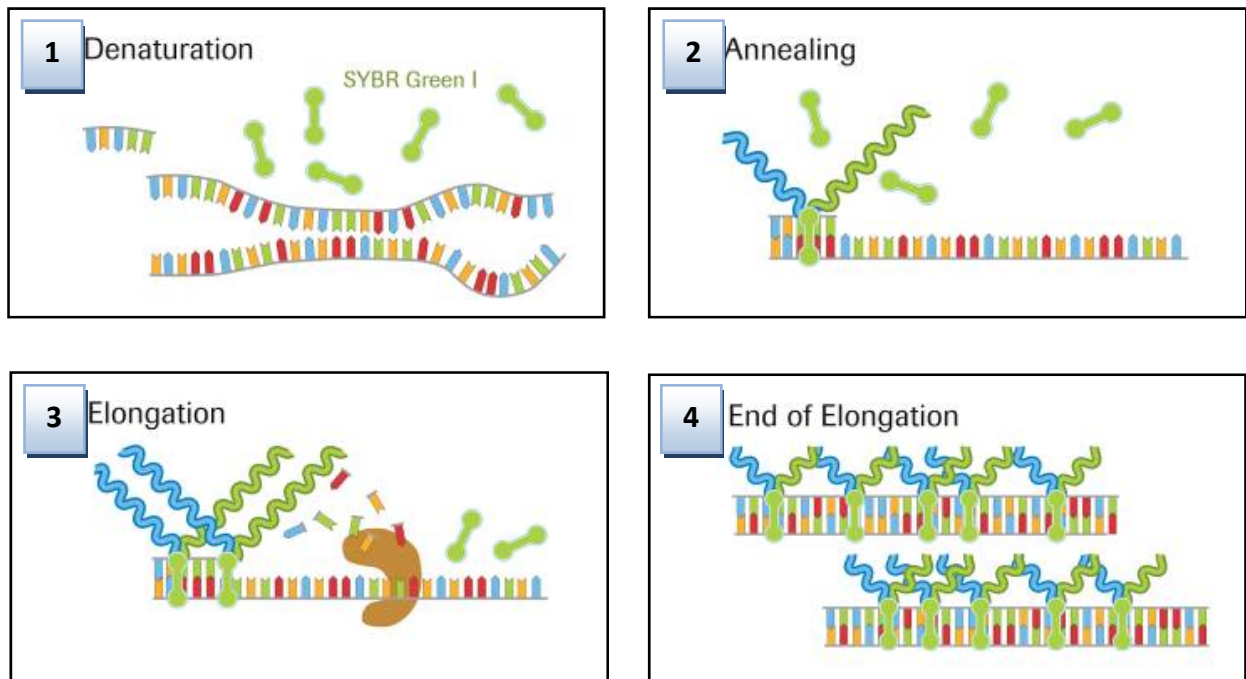


#### 4. Exemple d'expérience en SYBR Green (Source : Roche)

- **Monitoring PCR with the SYBR Green I Dye**

Generation of PCR products can be detected by measurement of the SYBR Green I fluorescence signal. SYBR Green I intercalates into the dsDNA helix. In solution, the unbound dye exhibits very little fluorescence; however, fluorescence (measured at 530 nm) is greatly enhanced (100-fold) upon binding to DNA due to conformational changes. Therefore, during PCR, the increase in SYBR Green I fluorescence is directly proportional to the amount of dsDNA generated. Since SYBR Green I dye is very stable it is the reagent of choice when measuring total DNA quantity.

The following are the basic steps of DNA detection by SYBR Green I during real-time PCR on the LightCycler® 480 System:



## 1. Programming

- Login to LightCycler® 480 Software
- Create a **New Experiment**
- The module **Experiment** is automatically opened. It consists of 3 folders:
  - **Run Protocol** for programming the experiment
  - **Data** for online data display
  - **Run Notes** optional

### Program - Setup

- Detection Format: **SYBR Green I**
- **Customize :** **Integration Mode : Dynamic**
- **Reaction Volume:** **20 µl**

### Program - Programs and Temperature Targets

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Pre-incubation	1	None
Amplification	40	Quantification
Melting Curve	1	Melting Curves
Cooling	1	None

Pre-incubation				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)
95	None	00:05:00	4.4	

Amplification				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)
95	None	00:00:10	4.4	
55	None	00:00:15	2.2	
72	Single	00:00:08 (ex) Base #/25	4.4	
Melting Curve				
95	None	00 00:05		
65	None	00:01:00		
95	Continuous			10

Cooling				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)
40	None	00:01:00	1.5	

## 2. Subset Editor

Define a new subset that includes all wells that contain samples for the quantification assay. The MWP worksheet below is an example.

LightCycler 480 SYBR Green Master kit

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													A
B													B
C													C
D													D
E													E
F													F
G													G
H													H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

	A 1 e 3
	B 2 e 3

	S6 1 e 6
	S5 1 e 5
	S4 1 e 4
	S2 1 e 3
	S1 1 e 2
	NTC

### 3. Sample Editor

The Sample Editor includes four folders (General, Abs Quant, Color Comp and Tm Calling) to edit general sample information and to define analysis specific sample information.

Sample information can be edited in these folders or by using the **Property Editor**.

- General: edit Sample Names and define Replicates
- Abs Quant: define Sample Types for Quantification and edit the respective Concentration for standard samples

#### Property Editor: For the definition of replicates

- Subset: User defined name
- Analysis Module: **General**
- Detection formats: SYBR Green I
- Sample Properties: Select individual subset groups and define them as **Replicates** of first well in row A (do not activate the original),

e.g. For Unknown A samples define as replicate of A1

**Apply:** Use this button before proceeding to next definition.

**Property Editor**

**Samples**

Subset: Quant Control Kit

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Analysis**

Module: General

**Detection formats**

Filter combination: SYBR Green I

**Sample properties**

☐ Sample name

☒ Replicate: A1

☐ Sample ID

☐ Notes

OK Apply Cancel

### Property Editor: for definition of Standards and Concentrations

- Subset: User defined name
- Analysis Module: **Absolute Quantification**
- Detection formats: SYBR Green I
- Sample Properties: Activate the respective samples in the grid, define their **Sample Type** as **Standard** and edit the respective **Concentration**.
- Apply: Use this button and go on with defining the next standard dilution.

**Property Editor**

**Samples**

Subset: Quant Control Kit

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Analysis**

Module: Absolute Quantification

**Detection formats**

Filter combination

SYBR Green I

**Sample properties**

☐ Target name

☒ Sample type: Standard

☒ Concentration: 100

OK Apply Cancel

#### 4. Pipetting

- Prepare PCR mixes and pipet into the MWP using template in part 3.

Component	1 Reaction	µl for <u>10</u> Reactions
Water, PCR grade (vial 2, colorless cap)	9,8 µl	98 µl
PCR primer mix (100 nM)	0,2 µl	2 µl
Master Mix, 2 x conc. (vial 1, green cap)	10 µl	100 µl
<b>TOTAL VOLUME OF MIX</b>	<b>18 µl</b>	<b>18 µl</b>
Template Volume	2 µl	2 µl
<b>TOTAL REACTION VOLUME</b>	<b>20 µl</b>	<b>20 µl</b>

- Cover the MWP with a sealing foil; use an adhesive seal applicator for correct sticking.
- Centrifuge the MWP at 1500 g for 2 minutes.

#### 5. Start Run

#### 6. Analysis

- **Absolute Quantification**

- **Analysis Type:** Absolute Quantification
- **Subset:** Subset from Part 3.
- **Program:** PCR

- When Analyses Window appears, select  . Standard curve will be plotted.

## 5. Consignes générales d'utilisation du Light Cycler 480

- ✓ Chaque personne désirant utiliser l'appareil de PCR en temps réel (Light Cycler 480) doit préalablement avoir suivi la **formation** donnée par Philippe Lampron avant de ce prémunir de ce droit;
  - Pour info sur la formation :
    - Contactez Philippe Lampron, local B-312 poste 5560  
Courriel : [p.lampron@umontreal.ca](mailto:p.lampron@umontreal.ca)
- ✓ L'utilisateur doit avoir préalablement **réservé** l'appareil pour pouvoir s'en servir;
  - **Marche à suivre pour la réservation :**
    - Allez sur le site web suivant :  
<http://airen.bcm.umontreal.ca/reservations>
      - Login : realtime
      - Password : pcr2008
      - 2<sup>e</sup> Login : nom de votre labo (ex : desgroseillers)
      - 2<sup>e</sup> Password : voir Philippe Lampron
      - Sélectionner une plage horaire
      - Entrez, votre nom, l'appareil à réserver, votre # de poste pour vous joindre ainsi que la durée de la réservation. Sélectionnez realtimepcrgroup dans l'onglet Participants et enregistrez.
      - La réservation s'effectue selon le premier arrivé/premier servi
- ✓ Le port des **gants** est obligatoire pour la préparation et la manipulation de la plaque d'échantillons;

✓ **Conseil d'utilisation** des plaques 96 puits :

- Si vous n'utilisez pas toute la plaque pour une expérience, vous pouvez **réutiliser une même plaque** jusqu'à 3X. Vous n'avez qu'à découper le *scellant* (dans le **sens horizontal** seulement) pour couvrir les puits utilisés. Utiliser l'applicateur pour bien étanchéifier le scellant.

**\*\* Dans ce cas, faites attention aux contaminants\*\***

- ✓ Chaque utilisateur est responsable de **récupérer la plaque** d'échantillons après chaque RUN de l'instrument;
  - Ne pas laisser de plaque dans l'instrument lorsqu'il n'est pas en cours d'utilisation;
- ✓ Chaque utilisateur est responsable de la **gestion** de ses données,
  - Lorsque la **base de donnée est pleine** (fichier dépassant 1 Go), procédez à une copie de sécurité de la base de données afin d'éviter la perte de ces dernières;
    - Il est possible de **graver** un DVD ou d'utiliser une clé USB pour effectuer cette sauvegarde;
  - L'utilisateur doit s'assurer d'effectuer l'enregistrement de ses données d'expériences **dans son compte** d'utilisateur pour s'assurer de la sécurité de celles-ci.

**MERCI DE RESPECTER SES CONSIGNES!**

## **6. Matériels supplémentaires :**

A) WorkSheets pour SYBR Green et Sondes  
d'hydrolyse

B) Plan de plaque 96 puits

PAGES SUIVANTES

# LightCycler® 480 Worksheet – 96 well block

- SYBR Green I Master -

File Name: \_\_\_\_\_

Date: \_\_\_\_\_

User: \_\_\_\_\_

Detection Format Profile: \_\_\_\_\_

Volume: \_\_\_\_\_

Program				
Program Names	Cycles		Analysis Mode	
Pre-incubation	1		None	
Amplification			Quantification	
Melting Curve	1		Melting Curves	
Cooling	1		None	
Temperature Targets				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)
Pre-incubation				
95	None	00:05:00 *	4.4	-
Amplification				
	None		4.4	-
	None		2.2	-
	Single		4.4	-
Melting Curve				
	None			-
	None			-
	Continuous		-	5-10
Cooling				
40	None	00:00:10	1.5	

\* If high polymerase activity is required, the pre-incubation program can be extended to 10 minutes.

Component	1 Reaction	µl for ____ Reactions
Water, PCR grade (vial 2, colorless cap)	µl	
PCR primer mix	µl	
Master Mix, 2 x conc. (vial 1, green cap)	µl	
TOTAL VOLUME OF MIX	µl	
Template Volume	µl	
TOTAL REACTION VOLUME	µl	

# LightCycler® 480 Worksheet – 96 well block

## - Probes Master with Hydrolysis Probes-

File Name: \_\_\_\_\_

Date: \_\_\_\_\_

User: \_\_\_\_\_

Detection Format Profile: \_\_\_\_\_

Volume: \_\_\_\_\_

Excitation Channels used: ☐ 450 ☐ 483 ☐ 523 ☐ 558 ☐ 615Emission Channels used: ☐ 500 ☐ 533 ☐ 568 ☐ 610 ☐ 640 ☐ 670

Program				
Program Names	Cycles		Analysis Mode	
Pre-incubation	1		None	
Amplification			Quantification	
Cooling	1		None	
Temperature Targets				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)
Pre-incubation				
95	None	00:05:00 *	4.4	-
Amplification				
	None		4.4	-
	None		2.2	-
	Single		4.4	-
Cooling				
40	None	00:00:10	1.5	

\* If high polymerase activity is required, the pre-incubation program can be extended to 10 minutes.

Component	1 Reaction	µl for ____ Reactions
Water, PCR grade (vial 2, colorless cap)	µl	
PCR primer mix	µl	
Master Mix, 2 x conc. (vial 1, red cap)	µl	
TOTAL VOLUME OF MIX	µl	
Template Volume	µl	
TOTAL REACTION VOLUME	µl	

## **Pour toutes informations supplémentaires et questions :**

1. Consultez le **guide de l'opérateur de Roche** dans la rubrique **Aide** du logiciel 

**OU**

2. N'hésitez pas à me contacter :

Philippe Lampron  
Coordonnateur de Laboratoire  
Département de biochimie  
Pav. Roger Gaudry, Local B-312  
(514) 343-6111 poste 5560  
courriel : [p.lampron@umontreal.ca](mailto:p.lampron@umontreal.ca)

## **BON SUCCÈS DANS VOS EXPÉRIENCES!**