



Jihane MENNANA – 06 21 33 71 75

claudine.delomenie@univ-lyon1.fr

Emy PONSARDIN – 06 10 93 37 33

emy.ponsardin@univ-lyon1.fr

Fabiola BASTIAN – 07 78 26 54 15

fabiola.bastian@univ-lyon1.fr



SOMMAIRE

| | |
|--|---|
| SOMMAIRE | 1 |
| 1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION | 1 |
| 1.1 Objet et domaine d'application | 1 |
| 1.2 Définitions | 1 |
| 2. INFORMATIONS PRÉALABLES..... | 2 |
| 2.1 Principales particularités du logiciel | 2 |
| 2.2 Formations sur le logiciel | 2 |
| 3. DESCRIPTION | 2 |
| 3.1 Pilotage des instruments | 2 |
| 3.2 Création d'un fichier d'expérience (fichier .edt)..... | 2 |
| 3.2.1 Renseigner l'onglet « Run Method »..... | 3 |
| 3.2.2 Renseigner l'onglet « Plate Setup » | 4 |
| 3.3 Lancement du Run | 6 |
| 3.3.1 A partir d'un fichier .edt sur clé USB | 6 |
| 3.3.2 A partir de l'ordinateur Thermofisher..... | 6 |
| 3.3.3 Sauvegarder le fichier de résultats (.eds)..... | 7 |
| 3.4 Analyser les données | 7 |
| 3.4.1 Contrôle qualité (onglet Quality Check)..... | 7 |
| 3.4.2 Courbe standard (onglet Standard Curve) | 9 |

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

1.1 Objet et domaine d'application

1.2 Définitions

GOI = gène d'intérêt (gene of interest)

REF = gène de référence

QC = contrôle qualité

NRT = contrôle négatif de RT (no RT)

NTC = contrôle négatif de PCR (no template control)

Standard = point de gamme standard

Unknown = échantillon à quantifier

RQ = ratio quantitatif (relative quantity)

NRQ = ratio quantitatif normalisé

CI = intervalle de confiance

SEM = erreur type ou erreur standard de la moyenne

SD = écart-type ou déviation standard de la moyenne

2. INFORMATIONS PRÉALABLES

2.1 Principales particularités du logiciel

Le logiciel Design & Analysis permet le design du run et l'analyse des données de qPCR générés à partir des appareils QuantStudio. Ce logiciel est présent à la fois sur les appareils QuantStudio à partir de leurs écrans tactiles, et à partir d'un ordinateur. Pour être installé sur un ordinateur, l'exécutable du logiciel est disponible sur le site ThermoFisher à l'adresse suivante :

<https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/global/forms/life-science/quantstudio-3-5-software.html>

Téléchargez la **version v2.6** du logiciel compatible à la fois avec le QS5 et le QS7 pro.

2.2 Formations sur le logiciel

Consulter les liens vers des vidéos de formation sur le logiciel Design & Analysis (en anglais) :

- Edition du plan de plaque : <https://www.youtube.com/watch?v=IKWJvyXfVSo>
- Edition de la méthode de run : <https://www.youtube.com/watch?v=udy7iskkZwE>
- Analyse de données : <https://www.youtube.com/watch?v=2klPm2vy2cs>

3. Description

3.1 Pilotage des instruments

Le pilotage des instruments peut se faire directement à partir de l'écran tactile des appareils.

Connexion aux appareils :

Plusieurs comptes utilisateurs peuvent être installés sur les appareils.

Pour le QuantStudio 7 pro -> se connecter au compte utilisateur avec le mdp 0000

Pour le QuantStudio 5 -> pas de compte

Accès ordinateur :

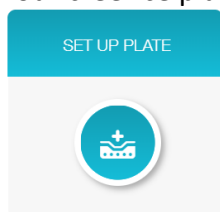
Se connecter au compte **Administrator** pour avoir accès au dossier partagé

Mdp du compte : **Administrator**

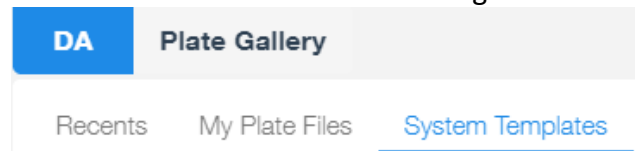
3.2 Création d'un fichier d'expérience (fichier .edt)

Pour lancer un run, il faut créer un plan d'expérience (custom plate file). Ce plan d'expérience est enregistré dans un fichier au format .edt.

Pour créer ce plan d'expérience, cliquer sur l'icône « Set Up Plate »



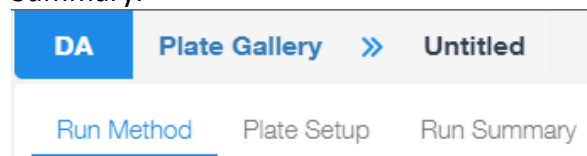
Vous vous retrouvez alors dans l'onglet « Plate Gallery » contenant 3 onglets :




Pour pouvez aller chercher un fichier d'expérience précédemment créé dans l'onglet « Recent » ou « My Plate Files » ou bien créer un nouveau plan d'expérience à partir d'un modèle de Thermo dans l'onglet « System Template ». En sélectionnant des filtres à gauche, vous pourrez rapidement trouver un Template adapté à votre application, qu'il suffira de modifier.

Une fois un Template sélectionné, un nouvel onglet nommé « Untitled » apparaît. Cet onglet sera renommé quand vous nommerez votre fichier .edt en l'enregistrant.


Cet onglet contient des informations à renseigner sous trois onglets : run method, Plate Setup et Run Summary.




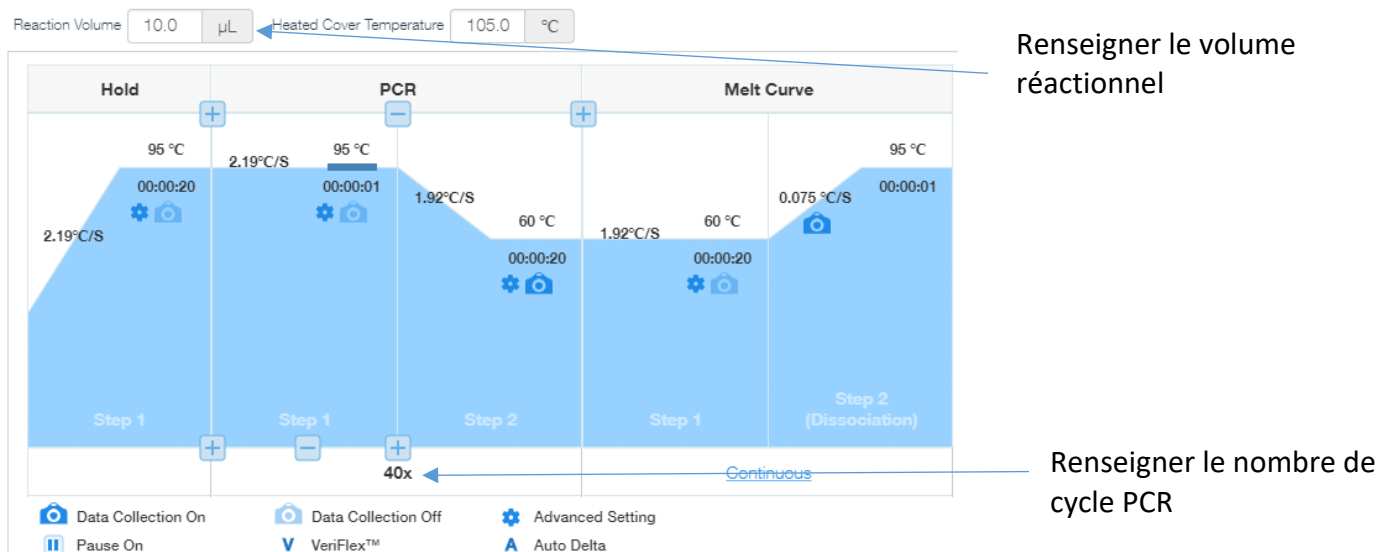
Il est primordial pour lancer un run de compléter l'onglet « Run Method » qui renseigne le programme PCR à exécuter. L'onglet Plate Setup peut être complété avant ou après le run.

Pour sauvegarder un fichier .edt que vous avez créé dans « My Plate Files », enregistrez d'abord ce fichier sur votre ordinateur en cliquant sur  en haut à droite de la fenêtre, puis « Save As» puis cliquer sur « Add to my plates ».

3.2.1 Renseigner l'onglet « Run Method »

Dans cet onglet, renseignez votre programme PCR en vérifiant bien que le petit logo  signifiant « Data collection On » est présent à la fin de vos cycles pour faire une capture d'image de la fluorescence à chaque cycle PCR.

Pour utiliser la fonctionnalité Veriflex qui n'est disponible que sur les blocs 96 et donc sur le QuantStudio 5, cliquer sur le logo  Advanced Setting et cocher la case « Enable VeriFlex »



Modifiez directement les temps et températures en cliquant dessus.

Ajouter ou supprimez des étapes en appuyant sur le **+** ou sur le **-**

3.2.2 Renseigner l'onglet « Plate Setup »

Pour importer un plan créé précédemment, cliquer sur les 3 points **☰** en haut à droite du plan de plaque, puis cliquer sur **Import Plate Setup** et aller chercher un plan de plaque créé précédemment et sauvegardé au format **.csv** ou **.txt**.

3.2.2.1 Créer un nouveau plan de plaque manuellement

Pour renseigner un plan de plaque manuellement, il est possible de le faire en cliquant sur un puit, et en renseignant le nom de l'échantillon et la cible. L'échantillon renseigné apparaît alors dans le tableau **« Sample »** et le nom de la cible apparaît dans le tableau **« Target »**

- Tableau **« Sample »** : permet de rentrer tous les échantillons de votre plaque, ainsi que le type d'échantillon : Unknown, NTC, Standard, ect... Il est également possible de renseigner un groupe biologique pour chaque échantillon ainsi qu'une quantité (utile pour la gamme).
- Tableau **« Target »** : permet de renseigner toutes les cibles de votre plaque. Pensez à renseigner le type de fluorochrome utilisé dans la colonne **« Reporter »**

Pour renseigner les échantillons et les cibles plus rapidement, sélectionnez plusieurs puits et sélectionner la cible ou l'échantillon dans les tableau **Sample** et **Target**. Il est aussi possible comme dans excel, d'implémenter une série d'échantillons dont les nombres se suivent. Pour cela, faire glisser avec la souris le point bleu en bas à droite du cadre bleu autour du ou des puit(s) sélectionné(s).

| | | | | | |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Ech 1 | Ech 2 | Ech 3 | Enter sample | Enter sample | Enter sample |
| 16S | 16S | 16S | 16S | 16S | 16S |
| Enter sample | Enter sample | Enter sample | Enter sample | Enter sample | Enter sample |
| 16S | 16S | 16S | 16S | 16S | 16S |

Pour enregistrer ce plan de plaque au format .csv ou .txt, cliquer sur les 3 points ******* en haut à droite du plan de plaque, puis cliquer sur **Export Plate Setup**. Il pourra être de nouveau utilisé sur un prochain run.

3.2.2.2 La référence passive

La référence passive en qPCR est un dye qui est ajouté à la réaction et qui peut être utilisé pour normaliser le signal fluorescent et ainsi réduire la variabilité entre les répliques techniques.

Le fluorochrome ROX est souvent utilisé comme référence passive pour faire cette normalisation car sa fluorescence n'est pas influencée par la réaction de PCR.

Si vous n'utilisez pas le ROX comme référence passive, pensez à indiquer NONE dans la fenêtre « Passive reference » au-dessus du plan de plaque.

3.2.2.3 Renseigner les points de la gamme

Sélectionnez les puits où se trouvent les points de votre gamme sur le plan de plaque.










Cliquer sur les 3 points ******* en haut à droite du plan de plaque, puis cliquer sur **Standard Curve Setup**

La page Standard Curve Wizard s'ouvre :

The screenshot shows the 'Standard Curve Wizard' interface with the following fields and annotations:

- Sample name prefix**: A text input field with a red arrow pointing to it and the annotation: "Renseigner un préfixe pour tous les points de votre gamme". Below the field is the note: "* Sample name prefix is appended with quantity".
- Select targets for standard curve**: A dropdown menu showing "16S" with a red arrow pointing to it and the annotation: "Sélectionner le gène cible".
- Number of Wells**: A calculation area with three input fields: "5" (labeled "#points"), "3" (labeled "#replicates"), and "15" (labeled "wells required"). A red arrow points to the "15" field with the annotation: "Renseigner le nombre de points de la gamme et le nombre de réplicas".
- Starting quantity**: A text input field containing "1" with a red arrow pointing to it and the annotation: "Renseigner la concentration du point le plus haut de votre gamme".
- Serial factor**: A dropdown menu showing "1:5" with a red arrow pointing to it and the annotation: "Renseigner le facteur de dilution entre chaque point de gamme".
- Select wells**: Two radio buttons: "Automatically" (selected) and "Manually".
- Arrange standards in**: Two radio buttons: "Rows" (selected) and "Columns". A red arrow points to this section with the annotation: "Indiquer comment les points de votre gamme sont rangés, en ligne ou en colonne".

Il est également possible de le faire manuellement en renseignant les concentrations manuellement de chacun des points de votre gamme dans la colonne « Quantity » dans la fenêtre « Samples » :

| Samples (132) | | Biogroup (0) | | | |
|--------------------------|------------|---|----------|-----------|--------|
| | Name↕ | Color | Type▼ 1 | Quantity↕ | Biogro |
| <input type="checkbox"/> | Sample 108 |  | Unknown | | |
| <input type="checkbox"/> | Sample 109 |  | Unknown | | |
| <input type="checkbox"/> | STD1 |  | Standard | 100 | |
| <input type="checkbox"/> | STD2 |  | Standard | 50 | |
| <input type="checkbox"/> | STD3 |  | Standard | 25 | |
| <input type="checkbox"/> | STD4 |  | Standard | 12.5 | |
| <input type="checkbox"/> | STD5 |  | Standard | 6.25 | |
| <input type="checkbox"/> | STD6 |  | Standard | 3.125 | |
| <input type="checkbox"/> | STD7 |  | Standard | 1.563 | |

En renseignant les points de gammes, le logiciel calculera automatiquement l'efficacité (E) de la PCR.

3.3 Lancement du Run

3.3.1 A partir d'un fichier .edt sur clé USB

Pour lancer un run sur les Quantstudio, il est possible de préparer son fichier de plan d'expérience au préalable, puis de le mettre sur une clé USB, connecter la clé USB à l'appareil et lancer le run à partir de ce fichier.

→ Pour cela : cliquer sur **Load plate file** -> **USB** -> ouvrez votre fichier .edt et lancer votre run

Il est possible au moment de lancer le run de changer le nom de votre fichier. Le nom du run aura le nom de votre fichier .edt et la date et l'heure de lancement du run.

3.3.2 A partir de l'ordinateur Thermofisher

Il est également possible de préparer votre fichier de plan d'expérience depuis l'ordinateur qui pilote les appareils.

→ Pour cela : allumer l'ordinateur et se connecter au compte Administrator -> ouvrir le logiciel Design & Analysis -> cliquer sur **Set Up Plate** -> renseigner la méthode, puis :

OPTION 1 (valable uniquement avec le QS7) : Dans l'onglet Run Summary, sélectionner le QuantStudio 7 pro et cliquer sur **Send to Run Queue**. Le fichier est alors envoyé à l'appareil (l'appareil doit avoir été allumé au préalable).

Sur l'appareil, cliquer sur **Load plate file** -> **File d'attente exp.** -> ouvrez votre fichier .edt et lancer votre run

OPTION 2 : Enregistrez votre fichier .edt dans le dossier data qui se trouve sur le bureau (à ranger dans un dossier à votre nom dans le dossier de votre unité). Ce dossier Data est partagé au QS5 et au QS7 via le réseau.

Sur l'appareil cliquer sur **Load plate file** -> **Lecteur réseau** -> ouvrez votre fichier .edt et lancer votre run.

Si le lecteur réseau n'est plus connecté, reconnecter l'appareil au lecteur réseau en renseignant les informations suivantes :

Emplacement du lecteur : 134.214.204.162/Data

Nom de domaine : *[laisser vide]*

Nom d'utilisateur : Administrator

Mot de passe : Administrator

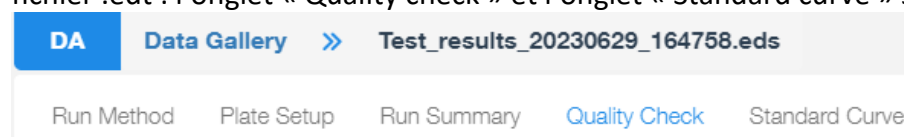
3.3.3 Sauvegarder le fichier de résultats (.eds)

Au moment de lancer votre run, il vous sera demandé de choisir où enregistrer votre fichier de résultats .eds. Ce fichier est automatiquement sauvegardé sur l'appareil, mais il faut choisir un autre endroit pour sauvegarder votre fichier de résultat : soit sur une clé USB, soit sur le dossier partagé via le réseau **Data** (à ranger dans un dossier à votre nom). La capacité de stockage des appareils étant limité, le DTAMB devra procéder à un nettoyage de la mémoire régulièrement, veillez donc à toujours bien sauvegarder vos fichiers de résultats.

3.4 Analyser les données

Pour analyser vos données, ouvrez le fichier de résultats. eds.

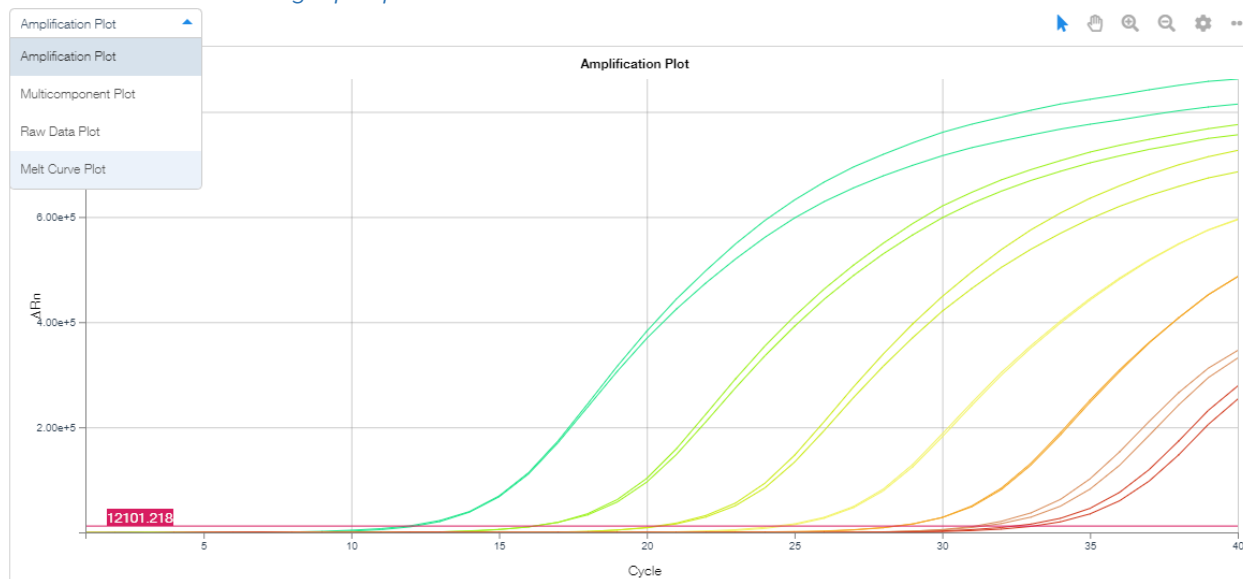
En ouvrant votre fichier .eds dans le logiciel, de nouveaux onglets apparaissent par rapport à votre fichier .edt : l'onglet « Quality check » et l'onglet « Standard curve » si applicable



3.4.1 Contrôle qualité (onglet Quality Check)


Les résultats se présentent sous la forme de 3 fenêtres comprenant : une fenêtre pour la visualisation de graphiques, une fenêtre pour visualiser le plan de plaque et une fenêtre affichant un tableau de résultats.

3.4.1.1 Visualisation graphique des résultats



Dans le menu déroulant en haut à gauche, vous pouvez sélectionner le type de graphique que vous souhaitez visualiser :


- Amplification Plot pour visualiser les courbes d'amplification
- Multicomponent Plot pour visualiser la fluorescence tout au long du programme PCR
- Raw Data Plot pour visualiser les données brutes
- Melt Curve Plot pour visualiser les courbes de fusion

En cliquant sur le logo  en haut à droite du graphique il est possible de changer les paramètres d'affichage sur le graphique :

- Pour les courbes d'amplification :

Dans l'onglet général, vous pouvez choisir la valeur de l'ordonnée : **Rn** ou **ΔRn**. Rn est la fluorescence du colorant rapporteur divisée par la fluorescence d'un colorant de référence passif, c'est-à-dire que Rn est le signal rapporteur normalisé par rapport au signal de fluorescence du colorant ROX si celui-ci a été sélectionné comme référence passive. ΔRn correspond à Rn moins la ligne de base.

La valeur de **Cq** correspond à l'intersection entre la courbe d'amplification et la ligne de seuil. Il est alors possible de bouger cette barre seuil. Pour la visualiser, cochez la case « **threshold** ». Pour bouger cette barre seuil, il vous est conseillé de visualiser les courbes en mode logarithme, puis de la placer au-dessus du bruit de fond dans la phase linéaire de la courbe d'amplification. Pour déplacer cette ligne de base, il suffit de cliquer sur la ligne (en rose) et de la faire glisser avec la souris.

ATTENTION : après avoir bougé la barre seuil, pensez à cliquer sur le bouton  pour que les valeurs de Cq soient recalculées avec ces nouveaux paramètres.

En effet, il est également possible dans cet onglet général de modifier la couleur, l'épaisseur des courbes ou encore le nom de votre graphique.

- Pour les courbes de fusion :

De la même manière, il est possible de modifier les paramètres d'affichage des courbes.

En passant la souris sur les courbes, le puit correspondant dans le plan de plaque ainsi que la ligne du tableau correspondant apparaît en surbrillance.

3.4.1.2 Tableaux de résultats

Deux tableaux peuvent être affichés : le tableau « Well Table » et le tableau « Replicate group ».

- Well table :

| Well# | Omit# | Sample* 1 | Target# | Task# | Dyes# | Cq# | Cq Conf# | Amp Score# | Amp Status# | Annotated# | Baseline Start# | Baseline End# | Tm1# |
|-------|--------------------------|-----------|---------|----------|-------|--------|----------|------------|-------------|------------|-----------------|---------------|--------|
| A24 | <input type="checkbox"/> | 10 | 16S | Standard | SYBR | 32.532 | 0.999 | 2.653 | Amp | | 3 | 26 | 84.272 |
| B24 | <input type="checkbox"/> | 10 | 16S | Standard | SYBR | 33.147 | 0.968 | 2.597 | Amp | | 3 | 25 | 84.364 |
| A23 | <input type="checkbox"/> | 100 | 16S | Standard | SYBR | 31.465 | 0.98 | 2.663 | Amp | | 3 | 25 | 84.089 |
| B23 | <input type="checkbox"/> | 100 | 16S | Standard | SYBR | 31.144 | 0.966 | 2.662 | Amp | | 3 | 24 | 83.813 |
| A22 | <input type="checkbox"/> | 1000 | 16S | Standard | SYBR | 28.506 | 0.987 | 2.676 | Amp | | 3 | 19 | 83.813 |
| B22 | <input type="checkbox"/> | 1000 | 16S | Standard | SYBR | 28.57 | 0.976 | 2.677 | Amp | | 3 | 24 | 83.63 |
| A21 | <input type="checkbox"/> | 10000 | 16S | Standard | SYBR | 24.714 | 0.933 | 2.672 | Amp | | 3 | 18 | 83.63 |
| B21 | <input type="checkbox"/> | 10000 | 16S | Standard | SYBR | 24.47 | 0.893 | 2.674 | Amp | | 3 | 19 | 83.538 |

Ce tableau vous donne pour chaque puit la valeur de Cq et de Tm calculé (si applicable) ainsi qu'un score d'amplification. Le tableau renseigne également un certain nombre d'informations relatives à chaque puits. Pour retirer ou afficher des colonnes, cliquer sur **View** ▼ en haut à droite du tableau.

Il est possible de télécharger ce tableau de résultats au format .csv en cliquant sur **...** puis sur « export ».

- Replicate group :

Le tableau replicate group donne la valeur de Cq moyenne calculé pour un groupe de réplicas, ainsi que l'écart-type. De la même façon que pour le tableau Well table, il est possible d'ajouter ou retirer des colonnes et enregistrer le tableau au format .csv.

3.4.2 Courbe standard (onglet Standard Curve)


Si applicable, cet onglet permet de visualiser votre gamme de standards.

Le logiciel calcul également automatiquement la quantité de matériel pour chaque échantillon à partir de votre gamme standard. Ces valeurs se trouvent dans les tableaux « Well Table » et « Replicate group » qui contiennent les mêmes informations que dans l'onglet Quality Check mais avec les valeurs de quantité en plus.

Sous le graphique sont renseignés plusieurs valeurs qui sont calculés automatiquement par le logiciel comme l'**Efficacité E** de votre réaction, le **R²** de la droite, ou encore la **pente** de la droite.

Pour visualiser sur la droite les points correspondants à votre gamme, sélectionnez les points de votre gamme sur le plan de plaque.

Pour retirer un point 'outlier' de la gamme : sélectionner ce point sur le plan de plaque, puis cliquer sur **...** puis sur « Omit » pour retirer ce point de l'analyse.

Pour que ces nouveaux paramètres soient pris en compte, pensez à bien cliquer sur le bouton  pour que l'Efficacité soit recalculé automatiquement.