**Protocole transformation ATMT L.maculans**

Rédacteur : A.PITARCH  
Date : 15.06.2020

## But du projet

Décrire içi le but et les objectifs du projet ainsi que la stratégie de transfo (KO, intégration ectopique, remplacement d’allèle)

## Plan général de la manip

Souche agrobactérie comportant le vecteur  
Stock -80°C

🡪 Filament blanc « brillant » = colonies mycéliennes

Après 10 jours à 1 mois 🡪 lecture des boites à la loupe :

Incubation entre 10 jours et 1 mois à 25°C

Transfert cellophane sur MT + Antifongique de sélection + Cefo

Mélange volume à volume

Etalement 200µL/boite sur 30 boites MT + AS + cellophane

Incubation 2,5 jours à 25°C

Induction des agrobactéries  
dans MI+AS  
Incubation 6h à 25°C

Mise en germination  
Incubation 24h à 28°C

Préparation suspension de spores à 9x107 sp/mL dans Fries

Incubation 24h 28°C agitation

Culture liquide   
LB + Ab

Souche *L.maculans*Stock mycothèque 4°C

Etalement sur V8

Incubation 7 jours à 25°C

Incubation 2 semaines à 25°C  
sous lumière blanche

Mise en sporulation sur V8

Préculture liquide   
LB + Ab

Incubation 2 jours 28°C

## Planning

Deux planning possible : choisir celui qui convient le mieux des deux.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Avant J-22** | **Lundi J-22** | **Lundi J-15** | **Entre   J-15 et J-4** | **Vendredi  J-4** | **Lundi**  **J-1** | **Mardi**  **J0** | **Vendredi  J+3** |
| 9h | Commande  V8 Fries LB  Solution Sels minéraux Résa PSM Vérification des poudres et réactifs |  | Mise en sporulation souche Lm | Préparation  Antibiotiques Antifongiques Cellophanes MES25X Glycérol 10%  Milieu MI et MT |  | Culture agro Préparation Acétosyringone 1000X boites MT+acéto et MT+Ab | ATMT :  induction agro vérif germination cello sur boite étalement | Transfert cellophane |
|  |  |  |
|  |  |  |
| 12h |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
| 14h | Prep boites V8  Sortie mycothèque  souche Lm |  | Préculture agro | Spores à germer |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
| 18h |  |  |  |

10 jours à 4 semaines plus tard : lecture des boites

Procéder par la suite à la purification des transformants (voir protocole dédié).

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Avant J-22** | **Jeudi J-22** | **Jeudi  J-15** | **Entre J-15 et J-3** | **Mardi J-3** | **Jeudi  J-1** | **Vendredi J0** | **Lundi  J+3** |
| 9h | Commande  V8 Fries LB  Solution Sels minéraux Résa PSM Vérification des poudres et réactifs |  | Mise en sporulation souche Lm | Préparation  Antibiotiques Antifongiques Cellophanes MES25X Glycérol 10%  Milieu MI et MT | Préculture agro | Culture agro Préparation Acétosyringone 1000X boites MT+acéto et MT+Ab | ATMT :  induction agro vérif germination cello sur boite étalement | Transfert cellophane |
|  |  |
|  |  |
| 12h |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
| 14h | Prep boites V8  Sortie mycothèque  souche Lm |  |  | Spores à germer |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
| 18h |  |  |  |  |

10 jours à 4 semaines plus tard : lecture des boites

Procéder par la suite à la purification des transformants (voir protocole dédié).

## Protocole ATMT

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Souche *L.maculans*** | **Souche Agro** | **Résistance** |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

# Avant J-22

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Quoi ?** | **Localisation  (commun ou par équipe)** | **Action à faire** |
| 50mL Fries par transfo | Commun laverie mais à commander en avance par équipe | Commander à la laverie |
| 500mL V8 par transfo | Commun laverie mais à commander en avance par équipe | Commander à la laverie |
| 30mL LB par transfo | Commun laverie/L2, fait d’office | Commander à la laverie si plus assez en L2 |
| Par transfo (à choisir selon le plasmide, l’agro et la souche *L.maculans*) : 0,5mL Kanamycine 50mg/mL  1mL Ampicilline 100mg/mL  0,5mL Streptomycine 100mg/mL  0,5mL Spectinomycine 50mg/mL  0,5mL Chloramphénicol 12,5mg/mL  0,5mL Rifampicine 50mg/mL  5mL Cefotaxime 50mg/mL (plateau) ou 1mL Cefotaxime 250mg/mL (EPLM)  1mL Hygromycine 50mg/mL  1mL Généticicine 50mg/mL  1mL Nourséo 50mg/mL | Poudres disponibles dans le commun magasin antibiotiques :  Ampicilline, Kanamycine, Streptomycine, Spectinomycine, Rifampicine, Cefotaxime, Hygromycine, Généticine, Nourséo voir ref plus loin ou sur intranet  Poudres par équipe :  Chloramphénicol, Duchefa, C0113.0025  labo BM derrière paillasse EPLM, deuxième réfrigérateur à droite après la porte  Localisation des aliquots à préparer par les équipes : tous les aliquots sont stockés à -20°C L2 pièce robot, 2ème congel, tiroir 2 en partant du haut. Sauf hygromycine : L2 champi, congel sous paillasse juste à droite du micro-onde (aliquots pour l’unité), Boite « Hygromycine »  Et chloramphénicol : congel EPLM labo microbio, tiroir n°1 | Vérifier la dispo des aliquots et des poudres.  Si plus de poudre et plus d’aliquots demander à Laetitia (commun) ou l’équipe de recommander.  Si poudre dispo mais pas aliquot en refaire à l’étape J-15 et J-4/3 |
| 39mg Acétosyringone par transfo | Poudre par équipe : 3′,5′-Dimethoxy-4′-hydroxyacetophenone 97%, Sigma, D134406. Labo BM, placard sous paillasse Bénédicte. | Vérifier la dispo de la poudre |
| 1mL DMSO par transfo | Equipe : Dimethylsulfoxyde, Sigma, D4540. Labo BM, placard sous paillasse Bénédicte. | Vérifier la dispo de la solution |
| 20mL solution Sel minéraux (MM Salt 100X) par transfo | Solution disponible à la laverie | Vérifier la dispo Recommander si plus assez |
| poudres MES (environ 20g par transfo) | Poudre de l’équipe MES MONOHYDRATE BIOXTRA, >= 99.0%, Sigma, ref 69892-500G  labo BM, sous paillasse Bénédicte | Vérifier la dispo de la poudre |
| solution pure glycérol 100% (10mL par transfo) | laverie | Vérifier la dispo de la solution |
| Poudres supplémentaires pour MI et MT : Glucose Agar | Glucose : Poudre en commun à la laverie  Agar : Poudre de l’équipe (plus pur) bacto agar, BD, ref214010, labo BM sous paillasse Bénédicte | Vérifier la dispo |
| cellophane (35 disques par transfo) | Par équipe : L2 champi, dans tiroir petit meuble sous paillasse centrale  Feuille cellophane 240 x 240 mm x 50 CLEARLINE ref053088 | Vérifier la dispo de plaque de cellophane ou de disque déjà découpé. Si pas de disque mais des plaques dispo la découpe sera faite entre J-15 et J-4/3 |
| Souche *L.maculans* à transformer | Par équipe préciser localisation dans mycothèque |  |
| Souches agro pour transfo | Par équipe préciser localisation dans -80°C |  |
| Réserver le psm |  |  |

# J-22

# Préparation boites V8

* Localisation des produits

V8 : laverie ou chambre froide 4°C

* Avant de commencer

Faire fondre environ 500mL de milieu V8 et laisser refroidir à 55°C.

* Protocole

Couler 1 boite Ø45mm et 4 boites Ø90mm par transfo.  
  
Mettre de côté les boites Ø45mm pour le point 2) si fait immédiatement.   
Conserver les autres boites à 4°C.

# Sortie mycothèque souche *L.maculans*

* Localisation des produits

Souche *L.maculans* en tube incliné malt-agar: préciser nom souche sur tube/capuchon, préciser localisation exacte dans mycothèque.  
Boites V8 Ø45mm : faite à l’instant ou stockées à 4°C.

* Avant de commencer

Lancer les UV sous le psm 30minutes.  
Récupérer une boite à la laverie.  
Allumer et nettoyer le psm.  
Ouvrir le gaz et allumer le bec.  
Prévoir un flacon d’EtOH 70°C (en dehors de la hotte).  
Installer les boites de V8 et les souches sous le psm.

* Protocole

Pour chaque souche

* Tremper le scalpel à manche long dans l’EtOH, stériliser à la flamme et laisser refroidir.  
   !! Attention à bien stériliser sur toute la longueur !!
* Nommer la boite.
* Flamber à la flamme l’ouverture du tube incliné.
* Prélever un bout de gélose dans le tube.
* Déposer ce fragment de gélose sur une boite Ø45mm de V8, face mycélium contre la gélose.
* Reflamber l’ouverture du tube avant de refermer.
* Retremper le scalpel dans EtOH.
* Etc pour les différentes souches à transformer.

A la fin

* Reparafilmer les tubes inclinés.
* Parafilmer les boites V8 et les stocker dans boite laverie.
* Nettoyer psm, l’éteindre et lancer les UV 30minutes.
* Remettre les tubes inclinés dans la mycothèque à 4°C.
* Mettre les boites à incuber 1 semaine à 25°C dans la chambre 26, sur les étagères sans éclairage.

# J-15

# Mise en sporulation souche *L.maculans*

* Localisation des produits

Boites V8 Ø 90mm : conservées à 4°C frigo ou chambre froide  
Souches inoculées sur V8 : chambre 26

* Avant de commencer

Lancer 30min d’UV sous le psm.  
Allumer et nettoyer le PSM.  
Ouvrir le gaz et allumer le bec.  
Prévoir un flacon d’EtOH70°C (stockage en dehors de la hotte).  
Installer les boites Ø90mm de V8 (4 par souches) et les souches à faire sporuler sous le psm.

* Protocole

Pour chaque souche

* Tremper le scalpel dans l’EtOH, stériliser à la flamme et laisser refroidir.
* Nommer les 4 boites Ø90mm de V8.
* Découper 4 triangles de gélose/mycélium dans la boite Ø45mm de V8.
* Déposer chacun de ces triangles sur 1 boite Ø90mm de V8, le mycélium contre la gélose, frotter l’ensemble de la surface avec puis découper la gélose en petit bout et la répartir dans la boite.
* Scalpel dans EtOH.
* Etc pour les différentes souches.

A la fin

* Reparafilmer les anciennes boites de V8 et les mettre dans une boite de la laverie.
* Eteindre le bec et fermer le gaz
* Nettoyer le PSM.
* Lancer 30min d’UV.
* Conserver les anciennes boites 1 semaine au cas où.
* Mettre les boites à incuber 2 semaines à 25°C dans la chambre 26, sur les étagères à gauche, sous les éclairages (lumière blanche, lumière UV), sans parafilm !

# Entre J-15 et J-4/3 (selon planning 1 ou 2

# Préparation antibiotiques et antifongiques

Antibiotiques

A choisir selon le plasmide utilisé et la souche d’agrobactérie

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Produits** | **Chloramphénicol** | **Ampicillin sodium** | **Kanamycine** | **Streptomycine** | **Spectinomycine** | **Rifampicine** | **Cefotaxime** |
| Marque - Référence | chloramphénicol, Duchefa, C0113.0025? | Duchefa - A0104 | Sigma - K4000 | Sigma - S6501 | Fluka - PHR1441 | Sigma – R3501 | Duchefa -C01111 |
| Localisation | Equipe 2ème frigo EPLM BM | magasin antibiotiques | magasin antibiotiques | magasin antibiotiques | magasin antibiotiques | magasin antibiotiques | magasin antibiotiques |
| Concentration aliquot à préparer | 1000X | 500X | 1000X | 1000X | 1000X | 1000X | 200X |
| 12,5mg/mL | 100mg/mL | 50mg/mL | 100mg/mL | 50mg/mL | 50mg/mL | 50mg/mL |
| Dose de sélection | 12,5µg/mL | 200µg/mL | 50µg/mL | 100µg/mL | 50µg/mL | 50µg/mL | 250µg/mL |
| Volume à prévoir / transfo | 500µL | 1mL | 500µL | 500µL | 500µL | 500µL | 5mL |
| Lieu stockage aliquots EPLM | -20°C, congel EPLM labo microbio, tiroir n°1 | -20°C, L2 pièce robot, 2ème congel, tiroir 2 en partant du haut | | | | | |

Ab sélection agrobactérie : indiquer les Ab servant à sélectionner l’agrobactérie  
Ab sélection plasmide : indiquer les Ab servant à sélectionner le plasmide  
Ab pour milieu post ATMT : cefotaxime

* Voir protocoles de préparation disponibles sur l’intranet

Antifongiques

A choisir selon le plasmide utilisé et la souche de *L.maculans*

Antifongique de sélection (sélection transformants) : indiquer les antifongiques servant à sélectionner les transformants

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Produits** | **Hygromycine** | **Geneticine** | **Nourséothricine** |
| Marque - Référence | Sigma - H0654 | Gibco - Lifetechnologies - 10131027 | clonNAT (Nourseothricin) - Werner BioAgents GmbH - 5002000 |
| Localisation | magasin antibiotiques | magasin antibiotiques | magasin antibiotiques |
| Concentration aliquot à préparer | 1000X | 1000X | 1000X |
| 50mg/mL | 50mg/mL | 50mg/mL |
| Dose de sélection | 50µg/ml | 50µg/ml | 50µg/mL |
| Volume à prévoir / transfo | 1mL | 1mL | 1mL |
| Lieu stockage aliquots EPLM | -20°C, L2 champi, congel sous paillasse juste à droite du micro-onde (aliquots pour l’unité), boite « Hygromycine » | -20°C L2 pièce robot, 2ème congel, tiroir 2 en partant du haut | |

* Voir protocoles de préparation disponibles sur l’intranet

# Préparation cellophanes

* Localisation des produits

Plaque cellophane : par équipe   
Feuille cellophane 240 x 240 mm x 50, CLEARLINE, ref 053088.          
L2 champignon, étagère sous paillasse centrale

Découpeur cellophane : bureau 162, étagère derrière Mylène.

* Protocole

Calcul du nombre de cellophane nécessaire :  
35cello/transfo = x cellophanes

Découper x cellophanes  
Autoclaver 2 x   
Stocker à 4°C jusqu’à utilisation

# Préparation MES 25X

Le MES20X doit être fait frais avant chaque manip.  
Prévoir de le faire le matin d’un jour d’autoclave, juste avant la préparation du milieu MI et MT.

* Localisation des produits

MES : équipe   
MES MONOHYDRATE BIOXTRA, >= 99.0%, Sigma, ref 69892-500G   
labo BM, sous paillasse Bénédicte

* Protocole

1ATMT = 100mL 🡪 x ATMT = 100mL x x = x mL

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Vf 100mL** | x mL | |  |
| MES | 19.52g | x g | |  |
| H2O | Qsp 100mL | Qsp x mL | |  |
| Ajuster le pH à 5,3 avec NaOH |  |  |

# Préparation Glycérol 10%

Le glycérol 10% doit être fait frais avant chaque manip.  
Prévoir de le faire le matin d’un jour d’autoclave, juste avant la préparation du milieu MI et MT.

* Localisation des produits

Le glycérol est disponible à la laverie.

* Protocole

1ATMT = 100mL 🡪 x ATMT = 100mL x x = x mL

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  | **Vf 100mL** | x mL |
| Glycérol pur |  | 10mL | x mL |
| H2O |  | qsp 100mL | Qsp x mL |

# Préparation milieux MI et MT

* Localisation des produits

Sels minéraux (ou MMsalt100X) disponible à la laverie  
Glycérol 10% : par équipe, RT, pas de mise en commun dans l’équipe EPLM

MES25X  : par équipe, RT, pas de mise en commun dans l’équipe EPLM  
agar : équipe (agar très pur !), Bacto agar, BD, référence 214010, labo BM sous paillasse Bénédicte

* Protocole

**Milieu liquide d'induction (MI)**

Calcul volume nécessaire : 200mL MI/ transfo = x L

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | | **1L** | **x L** |  |  |
| Sel minéraux/MM Salt 100X | | | | 10mL | x mL |  |  |
| Glycérol 10% (0,5% final) | | | | 50mL | x mL |  |  |
| Glucose 10mM (final) | | | | 1,8g | x mL |  |  |
| MES 25X | | | | 40mL | x mL |  |  |
| H20 | | | | Qsp 1L | Qsp x L |  |  |
|  |  |  |

Ajuster le pH à 5,3  
Aliquoter (60mL dans les flacons de 100mL)  
Autoclaver

**Milieu de transformation (MT)**

Calcul volume nécessaire : 1,5L MT/ transfo = x L

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **1L** | **x L** |  |  |
| Sel minéraux/MM Salt 100X | 10mL | x mL |  |  |
| Glycérol 10% (0,5% final) | 50mL | x mL |  |  |
| Glucose 5mM (final) | 0,9g | x mL |  |  |
| MES 25X | 40mL | x mL |  |  |
| H20 | Qsp 1L | Qsp x L |  |  |

Ajuster le pH à 5,3  
Aliquoter en 500mL  
Ajouter 7,5g d'agar par bouteille de 500mL

Autoclaver  
Stockage à 4°C.  
  
 NB : les milieux MI et MT en bouteilles peuvent être conservés plusieurs semaines à 4°C !

# J-4 ou -3 selon planning choisi (vendredi ou mardi)

# Préculture agrobactéries

* Localisation des produits

LB : L2 bactério ou laverie

Souches agrobactérie : par équipe, congel -80°C n°x, étagère n° x, rack n° x, x ème colonne, boite « x », tube n° x nommé « x »

Antibiotiques sélection plasmides : aliquots par équipe,   
nom ab, Ci xmg/mL xX, localisation (voir tableau en amont)  
nom ab, Ci xmg/mL xX,   
  
Antibiotiques sélection agrobactéries ; aliquots par équipe,  
nom ab, Ci xmg/mL xX, localisation (voir tableau en amont)  
nom ab, Ci xmg/mL xX, localisation (voir tableau en amont)

* Avant de commencer

Allumer l’enceinte à 28°C.  
Allumer le psm et nettoyer la surface.  
Décongeler les antibiotiques pour la sélection du plasmide et de l’agrobactérie (minimum 20µL/transfo).

* Protocole

Préparer 1 erlen par transfo avec 10mL LB + Ab sélection plasmide xµg/mL + Ab sélection agrobactérie xµg/mL :

Mélanger 10mL LB + xµL Ab sélection plasmide [xmg/ml] + xµL Ab sélection agrobactérie [xmg/mL]

Ensemencer directement avec la souche -80°C.

Incuber 48h à 28°C sous agitation.

# J-1

# Culture agrobactéries

* Localisation des produits

LB : L2 bactério ou laverie

Antibiotiques sélection plasmides : aliquots par équipe,   
nom ab, Ci xmg/mL xX, localisation (voir tableau en amont)  
nom ab, Ci xmg/mL xX, localisation (voir tableau en amont)  
  
Antibiotiques sélection agrobactéries ; aliquots par équipe,  
nom ab, Ci xmg/mL xX, localisation (voir tableau en amont)  
nom ab, Ci xmg/mL xX, localisation (voir tableau en amont)

* Avant de commencer

Allumer l’enceinte à 28°C.   
Allumer le psm et nettoyer la surface.  
Décongeler les antibiotiques pour la sélection du plasmide et de l’agrobactérie (minimum 20µL/transfo).

* Protocole

Préparer 1 erlen par transfo avec 10mL LB + Ab sélection plasmide xµg/mL + Ab sélection agrobactérie xµg/mL :

Mélanger 10mL LB + xµL Ab sélection plasmide [xmg/ml] + xµL Ab sélection agrobactérie [xmg/mL]

Ensemencer avec 2mL de préculture.

Incuber 24h à 28°C sous agitation.

# Germination des spores

* Localisation des produits

Fries : L2 champignon, placard sous paillasse centrale derrière psm EPLM, chambre froide 4°c ou laverie.

Souches misent à sporuler sur V8 : chambre 26   
H20mQ, cône 5mL avec ou sans filtre, tubes hémolyse, cure dent, falcons 15mL: placard L2 champignon sinon salle de psm microbio RDC.  
Spatule, scalpel, cellule de Malassez EPLM : L2 champignon, placard vert sous paillasse derrière PSM EPLM.

* Avant de commencer
* Vérifier à l’oeil l’état des souches misent à sporuler : les pycnidies ont dû se développer et produire des spores (exsudats rosés au-dessus des pycnides)
* Lancer 30min d’UV sous le psm.
* Allumer et nettoyer le PSM
* Ouvrir le gaz et allumer le bec
* Prévoir un flacon d’EtOH70°C (stockage en dehors de la hotte)
* Installer les souches sous le psm
* Protocole

Récolte de spores

Vers 14h

Pour chaque souche

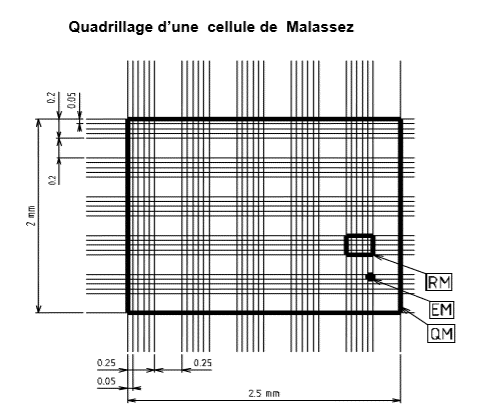
* Tremper spatule dans l’EtOH, stériliser à la flamme et laisser refroidir.
* Installer 4 Falcon 15mL, chacun surmonté d’un cône 5mL avec filtre, coincé avec un cure dent.
* Ajouter 5 mL de milieu Fries par grande boite de Petri
* Gratter la surface de la culture à la spatule, pour libérer les spores dans l’eau. Essorer les bouts de gélose avec la spatule.
* Récupérer le liquide avec une pipette + cône 5 mL et déposer dans le cône 5mL avec filtre.
* Laisser la filtration se faire

*La suspension ne contient en théorie que des conidies, aucun fragment de mycélium ou de pycnide. La suspension est rosée, et d’autant plus intensément que la suspension est concentrée.*

* Spatule dans EtOH, jeter le cône et le cure dent.
* Pooler les 4 suspensions dans un falcon 50mL
* Etc pour les différentes souches

Comptage suspension spores

Pour chaque souche

* Réaliser une dilution de la suspension mère au 1/100ème :
  + Préparer deux tubes Ep 1.5mL, les nommer d1/10 et d1/100 et mettre 900µl d’H20 dans chacun
  + Vortexer la suspension mère
  + Prélever 100µL de la suspension mère et les diluer dans les 900µL du tube d1/10
  + Vortexer la d1/10
  + Prélever 100µL de la d1/10 et les diluer dans les 900µL du tube d1/100
* Comptage en cellule de Mallassez
  + Préparer la cellule de Mallassez
  + Vortexer la d1/100
  + Déposer sur chacune des deux grilles de la cellule 10µL de la suspension
  + Laisser sédimenter 1/2min
  + Compter 5 rectangles « RM » par cellule (10 rectangles au total)
  + Indiquer dans le tableau ci-dessous le nombre de spores comptées par rectangles et calculer la concentration solution mère.  
    Un fichier de calcul automatique est disponible sur intranet.
  + Nettoyer la cellule de mallassez à l’EtOH70°C et la laisser sécher avant de la ranger

Typiquement, et sauf problème spécifique de sporulation de la souche, on récupère environ 4 mL d’une suspension titrant entre 5.107 et 5.108 spore/mL à partir d’une boite de Petri diam 9 cm.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Nb de spores comptées | | |
| Rectangle N° | Suspension souche nom souche | Suspension souche nom souche | Suspension souche nom souche |
| 1 |  |  |  |
| 2 |  |  |  |
| 3 |  |  |  |
| 4 |  |  |  |
| 5 |  |  |  |
| 6 |  |  |  |
| 7 |  |  |  |
| 8 |  |  |  |
| 9 |  |  |  |
| 10 |  |  |  |
| Moyenne spores comptées/rectangle |  |  |  |
| Ci (sp/mL)  =moyenne\*100\*1000\*100 |  |  |  |

Réalisation d’une suspension de spores à 9.107sp/mL pour l’ATMT

* + Calculer le volume de suspension à prélever (Vi) et le volume de fries à mettre (V Fries) pour réaliser la suspension de 20mL à 9.107sp/mL.  
    Un fichier de calcul automatique est disponible sur intranet.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | Suspension souche  nom souche | Suspension souche  nom souche | Suspension souche  nom souche |
|  | Ci calculé (sp/mL) |  |  |  |
| Vi (mL) volume de suspension à prélever | =  (20mL x 9x107sp/mL) / Ci sp/ml  soit 1,8 x109/ Ci |  |  |  |
| V Fries (ml)  volume de fries à mettre | = 20 – Vi (mL) |  |  |  |

* + Remplir un erlen 100mL avec le volume de Fries indiqué (V Fries)
  + Vortexer la solution mère
  + Prélever le volume de solution mère indiqué (Vi) et l’insérer dans l’erlen.
  + Mettre les spores à germer 24h à 28°C sous agitation

Réalisation de suspensions de spores à 1.107sp/mL

Avec l’excédent de suspension de spores, réaliser plusieurs suspensions de spores de 2mL à 1.107sp/mL pour les futurs tests patho.

* + Calculer le volume de suspension à prélever (Vi) et le volume d’eau à mettre (V eau)  
    fichier de calcul automatique sur intranet si beaucoup de suspensions

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | Suspension souche  nom souche | Suspension souche  nom souche | Suspension souche  nom souche |
|  | Ci calculé (sp/mL) |  |  |  |
| Vi (mL) volume de suspension à prélever | =  (2mL x 1x107sp/mL) / Ci sp/ml  soit 2x107/ Ci |  |  |  |
| V eau (ml)  volume d’eau à mettre | = 2 – Vi (mL) |  |  |  |

* + Remplir des tubes à hémolyse avec le volume d’eau (V eau) indiqué
  + Vortexer la solution mère
  + Prélever le volume de solution mère indiqué (Vi) et compléter les tubes à hémolyses.
  + Etiqueter et stocker au -20°C
* Eteindre le bec et fermer le gaz
* Nettoyer le PSM
* Lancer 30min d’UV

# Préparation acétosyringone 39mg/mL 1000X

* Localisation des produits

Poudre acétosyringone : par équipe.  
3′,5′-Dimethoxy-4′-hydroxyacetophenone 97%, Sigma, D134406.  
Labo BM étagère sous paillasse Bénédicte

DMSO : dispo dans le commun, mais EPLM utilise son propre stock.  
Dimethylsulfoxyde, Sigma, D4540.  
Labo BM étagère sous paillasse Bénédicte

* Protocole

Prévoir 1mL par transfo. A préparer frais à chaque fois  
  
 39mg Acétosyringone   
+ 1mL DMSO (sous la sorbonne)

Vortexer et aliquoter en 1mL

# Préparation boites MT+acéto et MT+Ab

* Localisation des produits

Milieu MT : par équipe,   
stock à 4°C dans la chambre froide RDC, étagère EPLM.

Acétosyringone : aliquot par équipe,   
Ci 39mg/mL, 1000X

Cefotaxime : aliquot par équipe,   
aliquot plateau Ci 50mg/mL 200X, localisation (voir tableau en amont)  
aliquot EPLM Ci 250mg/mL 1000X, localisation (voir tableau en amont)

Antifongique de sélection : aliquot par équipe,   
nom antifongique, Ci 50mg/mL 1000X. localisation (voir tableau en amont)

* Avant de commencer

Faire fondre 1,5L de MT/ transfo et laisser refroidir à 55°C

Décongeler par transfo :

Cefotaxime : 750µL à 250mg/mL ou 4mL à 50mg/mL

Antifongique de sélection : 750µL à 50mg/mL

Acétosyringone : 750µL 1000X 39mg/mL

* Protocole

Par transfo

Mélanger 750mL MT + 750µL Acétosyringone 1000X

Couler 30-32 boites

Stocker à 4°C

Mélanger 750mL MT + 750µL Antifongique de sélection50mg/mL + 750µl Cefo250mg/ml (ou 3,75mL Cefo 50mg/mL)

Couler le même nombre de boite que de boites de MT+acétosyringone

Stocker à 4°C les boites et le restant d’acétosyringone.

# J0

# ATMT : Induction des agrobactéries

* Localisation des produits

Acétosyringone : aliquot par équipe, Ci 39mg/mL, 1000X, 4°C

Milieu MI : par équipe,   
stock à 4°C dans la chambre froide RDC, étagère EPLM.

* Avant de commencer

Allumer psm en L2 bactérie et nettoyer la surface.

Décongeler par transfo  :

Acétosyringone 20µL à 39mg/mL 1000X

* Protocole

Dans un erlen de 100mL   
18ml de MI + 20µL acétosyringone 39mg/mL + 2ml de culture liquide agro nom souche agro

Incubation 6h à 28°C sous agitation (9h à 15h)

# ATMT : Vérification niveau germination spores

* Localisation des produits

Cellule de Malassez EPLM : L2 champignon, placard vert sous paillasse derrière PSM EPLM.

* Avant de commencer

Lancer les uv sous le psm L2 champi  
Allumer le psm et le nettoyer

* Protocole

Prélever stérilement sous le PSM L2 champi quelques µL de la suspension de spores de *L.maculans*. Les déposer en cellule de Mallassez pour observation : les spores doivent être renflées avec un tube germinatif naissant (15-16h). Possibilité d’arrêter la germination en mettant à 4°C.

# ATMT : dépôt cellophane sur boite, mélange *L.maculans* et agrobactérie et étalement

En attendant que la germination se fasse déposer stérilement sous le psm un cellophane par boite de MT+acéto préparé la veille.

* Localisation des produits

Cellophanes autoclavés : mis par ses propres moyens à 4°C en chambre froide après autoclavage par Bruno.

2 pinces, rateau  : L2 champignon, placard vert sous paillasse derrière PSM EPLM. Stock rateau pièce stock RDC.

Boites MT+ acéto : 4°C

* Avant de commencer

PSM déjà allumé et nettoyé à l’étape précédente.

* Ouvrir le gaz et allumer le bec
* Prévoir un flacon d’EtOH70°C (stockage en dehors de la hotte)
* Installer les boites de MT+acéto et les cellophanes sous le psm.
* Protocole
* Tremper les deux pinces dans l’EtOH, stériliser à la flamme et laisser refroidir.
* Récupérer avec les deux pinces un cellophane dans la boite en verre contenant le lot de cellophane. Attention à en attraper bien qu’un seul (visible à l’épaisseur ou sur les bords).
* Déposer délicatement le cellophane sur la boite en évitant de toucher les bordures de la boite de pétri, de faire des bulles et des plis et de trop toucher le cellophane avec les pinces.
* Restériliser de temps en temps les pinces.
* Eteindre le bec et fermer le gaz

Une fois que les spores sont correctes :

* Mélanger volume à volume les spores et les agrobactéries : 4mL spores + 4mL agrobactéries

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Nom mélange** | **Souche Lepto** | **Souche Agro** |
| Nom souche lm  Nom souche agro | Nom souche Lm | Nom souche agro |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

* Etaler 200µl du mélange par boite (30/transfos) (5boites avec un râteau puis changer)  
  Placer les boites dans une boite en acier, sans parafilm.
* Incubation 2 jours et demi à 25°C dans étuve en L2 champignon à 25°C ou en chambre 26.
* Nettoyer le PSM
* Lancer 30min d’UV

# J+3

# Transfert cellophane

* Localisation des produits

Boites MT+acéto : étuve 25°C L2 champignon ou chambre 26.  
Boites MT+ ab : stockée à 4°C  
pinces : L2 champignon, placard vert sous paillasse derrière PSM EPLM. Stock rateau pièce stock RDC.

* Avant de commencer

Lancer les uv sous le psm L2 champi  
Allumer le psm et le nettoyer.  
Installer les boites MT+ acéto et MT+ Ab sous le psm.  
Ouvrir le gaz et allumer le bec  
Prévoir un flacon d’EtOH70°C (stockage en dehors de la hotte)

* Protocole

Tremper les deux pinces dans l’EtOH, stériliser à la flamme et laisser refroidir.

Transférer de manière stérile les cellophanes sur milieu MT+ Ab. Attention à garder les cellophanes bien droit lors du transfert pour ne pas perdre du liquide restant sur le cellophane.

Par précaution restériliser les pinces entre deux cellophanes.

Parafilmer toutes les boites, les stocker dans boites en acier.

Nettoyer le PSM

Lancer 30min d’UV

Incuber entre 10jours et 4 semaines à 25°C en chambre 26.

# J+10 à J+28

# Lecture résultats

Surveiller régulièrement l’apparition des colonies mycéliennes sur les boites de MT+Ab. Celles-çi apparaissent généralement entre 10 jours si tout marche bien jusqu’à 3 voire 4 semaines pour une souche à la croissance est lente.

Les colonies s’observent à la loupe bino en L2 (dans la pièce aveugle). En jouant avec la réflexion de la lumière (miroir du plateau) elles apparaissent comme « brillantes », comparé au bruit de fond (mycélium mort) qui va apparaître terne car « vide ».

1. **Purifications des transformants**

Lorsque assez de colonies mycélienne sont visibles procéder à la purification des transformants.  
Les étapes varient selon le but de la manip (intégration ectopique, transformants crisper-cas9).  
Voir les protocoles dédiés.

# Annexe : composition des milieux préparés par la laverie

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Milieu minimum II (MMII)** |  |  |  |  |  |  |
|  | 1L | 2L | 4L |  |  |  |
| MM Salt 100X | 10mL | 20mL | 40mL |  |  |  |
| Glucose | 20g | 40g | 80g |  |  |  |
| NaNO3 | 2g | 4g | 8g | Oxidizing Agent   |  | | --- | | comburant | |  |  |
| Aliquoter en 500mL |  |  |  |  |  |  |
| Ajouter 7,5g d'agar/bouteille |  |  |  |  |  |  |
| Autoclaver |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |
| **V8** |  |  |  |  |  |  |
|  | 1L | 2L | 4L |  |  |  |
| V8 juice | 200mL | 400mL | 800mL |  |  |  |
| CaCO3 | 2g | 4g | 8g |  |  |  |
| Aliquoter en 500mL |  |  |  |  |  |  |
| Ajouter 7,5g d'agar/bouteille |  |  |  |  |  |  |
| Autoclaver |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |
| **Fries** |  |  |  |  |  |  |
|  | 1L | 2L | 3L | 4L |  |  |
| Nitrate d'ammonium( NH4NO3) | 1g | 2g | 3g | 4g | Oxidizing Agent   |  | | --- | | comburant | |  |
| Acide tartrique (C4H12N2O6) | 5g | 10g | 15g | 20g |  |  |
| Phosphate de potassium( KH2PO4) | 1g | 2g | 3g | 4g |  |  |
| Sulfate de magnésium (MgSO4, 7H2O) | 500mg | 1g | 1,5g | 2g |  |  |
| Chloride de calcium (CaCl2) | 130mg | 260mg | 390mg | 520mg |  |  |
| Chlorure de sodium (NaCl) | 100mg | 200mg | 300mg | 400mg |  |  |
| Saccharose (C12H22O11) | 30g | 60g | 90g | 120g |  |  |
| Extrait de levure | 5g | 10g | 15g | 20g |  |  |
| Aliquoter en 150mL |  |  |  |  |  |  |
| Autoclaver |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |
| **Sel minéraux / MM Salt 100X** |  |  |  |  |  |  |
| KH2PO4 | 10g |  |  |  |  |  |
| MgSO4, 7H2O | 5g | ou 2,4g si MgSO4 anhydre | | |  |  |
| KCl | 5g |  |  |  |  |  |
| FeSO4, 7H2O | 0,1g |  |  |  |  |  |
| H2O | qsp 100mL |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |