**Protocole transformation ATMT Z.tritici**

Rédacteur : A.PITARCH  
Date : 08.04.2020

## 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

Transfert cellophane sur MMzt + Antifongique de sélection + Ab

Etalement sur IM + AS + Ab + cellophane  
gamme de 100-800µL

Culture liquide   
LB + Ab

Etalement sur   
LB + Ab

Souche agrobactérie comportant le vecteur  
Stock -80°C

Incubation 2 jours 28°C

Incubation ON 28°C agitation

Préparation suspension agrobactéries  
DO=0,4  
dans IM+AS+Ab

Préparation suspension de spores à 1x107 sp/mL   
dans IM+AS+Ab

Incubation 7 jours à 18°C

Incubation 7 jours à 18°C

Etalement sur YPD

Repiquage sur YPD

Souche *Zymoseptoria tritici*   
à transformer  
Stock -80°C

Incubation 2 jours à 18°C

Mélange volume à volume

Incubation entre 10 jours et 1 mois à 18°C

MMzt + Ab   
+  
(antifongique présent dans la souche si remplacement)

Lecture résultats pour chaque transformant :  
antifongique de sélection S/R ?  
+ croissance ok sur MMzt+Ab ? ou antifongique présent dans la souche S/R ?  
  
Poursuivre uniquement avec les transformants validés :   
antifongique de sélection R   
+  
croissance ok sur MMzt+Ab ou antifongique présent dans la souche S

Transformant HygroR/GenetS

Incubation 7 - 10jours à 18°C

MMzt + Ab   
+   
antifongique de sélection

Repiquage de chaque transformant en double sur

Extraction ADNg et   
Validation moléculaire du transformant

Stock -80°C

Etalement sur YPD  
Incubation 5 jours 18°C

Monosporage 2 sur YDP  
Incubation 7 jours 18°C

Monosporage 1 sur YDP  
Incubation 7 jours 18°C

Après 10 jours à 1 mois 🡪 lecture des boites :

Agrobactérie seule   
🡪 pas de transformants

Mélange Zt + agrobactérie  
🡪 transformants : colonies roses pâles

Souche Zt seule   
🡪 pas de transformants ou bruit de fond

## Planning

Semaine avant : vérifier la dispo du matériels (voir tableau page suivante)

Réserver la hôte en L2

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **J-14** | **J-7** | **J-5** | **J-1** | **J0** | **J+2** |
|  |  |  |  |  |  |  |
| 9h | Prep réactifs +  coulage boites YPD + Inoc Zt | Prep MMzt + Prep sol mère IM + autoclavage cellophane 2x |  | Prep IM et IMagar | ATMT L2 | Coulage  boite MMzt+Af+Ab |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |  |  |
| 12h |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
| 14h | Repiquage Zt Inoc agro |  | Coulage boite IMagar Culture liq Agro | Transfert cello |
|  |  |
|  |  |
|  | Mettre les agros à 4°C |
| 18h |

10 jours à 1mois plus tard :

* lecture et repiquage sur milieu, incubation 7-10jours
* 2 monosporages successifs (2x7jours incubation)
* Etalement pour stock (5jours d’incubation)

## A prévoir avant la manip

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Quoi ?** | **Localisation  (commun ou pour équipe)** | **Action à faire** |
| 1,5L YPD agar par transfo | Commun laverie mais à commander en avance par équipe | Commander à la laverie |
| 20mL LB par transfo 25mL LB agar par transfo | Commun laverie/L2 | Commander à la laverie si plus assez en L2 |
| Poudre pour MMzt : Glucose  NaNO3  KH2PO4  MgSO4, 7 H20 KCl  Ca Cl2, 2 H20 agar | Commun laverie | Vérifier la dispo |
| 0,5mL FeSO4 12mM – 3mg/mL 1000X par transfo ou poudre FeSO4. 7H2O (246,5 g/mol) | Poudre en commun à la laverie  Aliquot par équipe | Vérifier la dispo Refaire si plus assez |
| 0,5mL microelements 1000X (sans Fe) par transfo ou poudre  ZnSO4 7HOH  H3B03 MnCl2 4HOH CoCl2 6HOH CuSO4 5HOH Na2MoO4 2HOH Citrate Na3 | Poudre en commun à la laverie  Aliquot par équipe | Vérifier la dispo Refaire si plus assez |
| Poudre Thiamine Poudre Biotine ou 0,5mL aliquot vitamines 1000X 0,1mg/mL chaque par transfo | Poudre par équipe Aliquot par équipe | Vérifier la dispo Refaire si plus assez |
| Poudre pour IM solution mère : K2HPO4 (174,2g/mol)  KH2PO4 (136,09 g/mol)  NaCl (58,44 g/mol)  MgSO4.7H2O (246,5 g/mol)  CaCl2 (pur 110,88g/mol)  FeSO4. 7H2O (246,5 g/mol)  (NH4)2 SO4 (132.14g/mol)  Glucose (180.16g/mol)  Glycérol | Commun laverie | Vérifier la dispo |
| Poudre pour IM et IM agar : MES agar | Commun laverie | Vérifier la dispo |
| 10 disques cellophane par transfo | Par équipe | Vérifier la dispo  Découper x cellophanes et les faire autoclaver 2x la semaine avant |
| Par transfo (à choisir selon le plasmide et l’agro) : 1mL Kanamycine 50mg/mL  1mL Ampicilline 100mg/mL  1mL Streptomycine 100mg/mL  1mL Spectinomycine 50mg/mL  1mL Chloramphénicol 12,5mg/mL  500µL Rifampicine 50mg/mL  1,5mL Cefotaxime 50mg/mL  1,5mL ou 150µL Hygromycine 50mg/mL  1,5mL ou 150µL Geneticine 50mg/mL  0,5mL ou 50µL mL Sulf 10mg/mL  1mL ou 100µL Basta 100mg/mL | Poudres disponibles dans le commun magasin antibiotiques :  Ampicilline, Kanamycine, Streptomycine, Spectinomycine, Rifampicine, Cefotaxime, Hygromycine, Généticine, Nourséo  Poudres par équipe :  Chloramphénicol, Basta, Sulf  Aliquots à préparer par les équipes | Vérifier la dispo En refaire si besoin |
| 0,5mL Acétosyringone 40mg/mL 1000X par transfo | Poudre par équipe Aliquot par équipe | Vérifier la dispo  Refaire aliquot |
| DMSO | Commun magasin BM - antibio |  |
| Calque numérotation boite | Fichier sur intranet | Imprimer et découper au moins 4 disques. |
| Souche Zt à transformer | Par équipe |  |
| Souches agro pour transfo | Par équipe |  |
| Témoin Zt antifongique de sélection R (+ antifongique présent dans la souche à transformer S si remplacement) | Par équipe |  |
| Témoin Zt antifongique de sélection S (+ antifongique présent dans la souche à transformer R si remplacement) | Par équipe |  |

## Protocole ATMT

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Souche Zymo** | **Souche Agro** | **Résistance** |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

**J-14**

# Préparation FeSO4 12mM – 3mg/mL 1000X

60mg FeSO4. 7H2O (246,5 g/mol)+20mL H20mQ  
Aliquoter en 1mL  
Stocker au -20°C

# Préparation microelements 1000X (sans Fe)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **1000x** |  | final |
| H2O | 80.0 ml |  |
| ZnSO4 7HOH | 2.20 g | 22 mg/L |
| H3B03 | 1.10 g | 11 mg/L |
| MnCl2 4HOH | 0.50 g | 5 mg/L |
| CoCl2 6HOH | 0.17 g | 1.7 mg/L |
| CuSO4 5HOH | 0.16 g | 1.6 mg/L |
| Na2MoO4 2HOH | 0.15 g | 1.5 mg/L |
| Citrate Na3 | 1.00 g | 10 mg/L |
| ajouter les composes dans l'eau | |  |
| dans l'ordre de la liste | |  |
| equilibrer a pH 6 avec KOH | |  |
| ajuster à **100 mL** avec de l’eau. | |  |
| couleur finale bleu clair | |  |

1. **Préparation acétosyringone 40mg/mL 200mM 1000X**

400mg Acétosyringone (3′,5′-Dimethoxy-4′-hydroxyacetophenone 97%, Sigma, D134406)  
+10mL DMSO  
Aliquoter en 1mL  
Stocker au -20°C

# Préparation Vitamines 1000X

|  |  |
| --- | --- |
| Thiamin hydrochloride, Sigma, T4625 | 0,01g |
| Biotin, Sigma, B4639 | 0.01g |
| H20mQ | 100mL |
| **Filter sterilize** | |
|  |  |
| Aliquot en 1mL conservation 4°C obscurité |  |

1. **Préparation antibiotiques et antifongiques**

Antibiotiques

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

Ab sélection agrobactérie : x  
Ab sélection plasmide : x  
Ab pour milieu MMzt post ATMT : cefotaxime + Ab1+ Ab2   
(2 antibiotiques, qui serviront à tuer les agrobactéries. Les antibiotiques doivent être différents de ceux portés par le plasmide et l’agrobactérie)  
*Exemples :   
Si la souche agrobactérienne est résistante à la rifampicine et à l’ampicilinne et que le plasmide est résistant à la kana choisir strepto+spectino.   
Si la souche agrobactérienne est résistante à la rifampicine et que le plasmide est résistant à la spectino choisir strepto+ampi.*

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Produits** | **Ampicillin sodium** | **Kanamycine** | **Streptomycine** | **Spectinomycine** | **Chloramphénicol** | **Rifampicine** | **Cefotaxime** |
| Marque- Référence | Duchefa - A0104 | Sigma - K4000 | Sigma - S6501 | Fluka - PHR1441 | ? | Sigma – R3501 | Duchefa -C01111 |
| Localisation | magasin antibiotiques | magasin antibiotiques | magasin antibiotiques | magasin antibiotiques | équipe | magasin antibiotiques | magasin antibiotiques |
| Concentration aliquot à préparer | 1000X | 1000X | 1000X | 1000X | 1000X | 1000X | 200X |
| 100mg/mL | 50mg/mL | 100mg/mL | 50mg/mL | 12,5mg/mL | 50mg/mL | 50mg/mL |
| Dose de sélection | 100µg/mL | 50µg/mL | 100µg/mL | 50µg/mL | 12,5µg/mL | 50µg/mL | 250µg/mL |
| Volume à prévoir / transfo | 1mL | 1mL | 1mL | 1mL | 1mL | 500µL | 1,5mL |

Antifongiques

A choisir selon le plasmide utilisé et la souche de Zt

Antifongique de sélection (sélection transformants) : x (prévoir au moins un volume pour 300mL de milieu soit x mL )  
Antifongique porté par la souche à transformer si remplacement : x (prévoir au moins un volume pour 25mL de milieu soit x mL)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Produits** | **Hygromycine** | **Geneticine** | **Sulfonylurée  (Chlorimuron-ethyl)** | **Basta (Glufosinate sodium)** |
| Marque- Référence | Sigma - H0654 | Gibco - Lifetechnologies - 10131027 | Sigma - 32874 | Stock perso hors marché |
| Localisation | magasin antibiotiques | magasin antibiotiques | Equipe | Equipe |
| Concentration aliquot à préparer | 250X | 200X | 1000X | 500X |
| 50mg/mL | 50mg/mL | 10mg/mL dans DMSO | 100mg/mL |
| Dose de sélection | 200µg/ml | 250µg/ml | 10µg/ml | 200µg/ml |

Voir protocoles de préparation disponibles sur l’intranet

1. **Préparation YPD**

Couler des petites boites d’YPD (au moins une dizaine/transfo)

1. **Sortie de collection souche *Zymoseptoria tritici***

Nom tube : x  
Localisation : x

Inoculer 3 boite YPD Ø45mm avec la souche Zt à transformer du -80°C

Incuber 7 jours à 18°C

**J-7**

# Repiquage souche *Zymoseptoria tritici*

Repiquer les souches inoculées à J-14 sur 3 boite YPD Ø45mm chacune

Incuber 7 jours à 18°C

# Inoculation Agrobactéries

Pour chaque agrobactérie préparer 1boite de LBagar + Ab sélection agrobactérie xµg/mL + Ab sélection plasmide xµg/mL:

25 mL LBagar + x µL Ab sélection agrobactérie [xmg/ml] + x µL Ab sélection plasmide [xmg/mL]

Strier une boite par souches d’agrobactéries

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Nom souche agro | Résistance agrobactérie | Résistance plasmide |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

Incuber 2jours à 28°C puis frigo

# **Préparation cellophanes**

Calcul du nombre de cellophane nécessaire :  
4cello/transfo + 1cello/agro + 1cello/zymo + 1 témoin cello - + marge = x cellophanes

Découper x cellophanes (cellophane membrane backing, Biorad, 1650963, Pkg of 50, 35 x 45 cm)  
Autoclaver 2 x   
Stocker à 4°C jusqu’à utilisation

# Préparation MMzt

Calcul MMzt nécessaire :

Pour la transfo

4boites/transfo + 1boite/agro + 1boite/zymo + 1 témoin cello - + 1 témoin - = x boites

* x boites x 25mL = a mL MMZt

Pour le repiquage

2boites/transfo = x boites

* x boites x 25mL = b mL MMZt

a mL + b mL + marge = c mL de MMzt

**Composition du milieu MMzt (hors vitamines)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  | 1 litre | Volume / c mL |
|  | **MM-Zt** |  | g / Litre |  |
|  | Glucose | Glucose | 20 |  |
|  | Sodium nitrate | NaNO3 | 2 |  |
|  | Monopotassium phosphate | KH2PO4 | 1 |  |
|  | Magnesium sulphate | MgSO4, 7 H20 | 0,5 |  |
|  | Potassium chloride | KCl | 0,5 |  |
|  | Calcium chloride | Ca Cl2, 2 H20 | 0,1 |  |
|  | Microelements (sans Fe) | Micro 1000X | 1 ml |  |
|  | FeSO4 12mM-3mg/mL | 1000X | 1 ml |  |
|  | Final pH ( at 25°C) | **pH** | **6** |  |
|  | Agar | agar | 15 |  |
|  | **Autoclaving, keep at 4°C** | | |  |

# Préparation solution mère IM

**K2HPO4 (174,2g/mol) 1M (100X)**

17,42g dans 100mL H20mQ

**KH2PO4 (136,09 g/mol) 1M (100X)**

13,6g dans 100mL H20mQ

**NaCl (58,44 g/mol) 250mM (100X)**

1,46g dans 100mL H20mQ

**MgSO4.7H2O (246,5 g/mol) 0,2M (100X)**

4,93g dans 100mL H20mQ

**CaCl2 (pur 110,88g/mol) 0,7M (1000X)**

7,7g dans 100mL H20mQ

**FeSO4. 7H2O (246,5 g/mol) 10mM (1000X)**

0,278g dans 100mL H20mQ

**(NH4)2 SO4 (132.14g/mol) 0,4M (100X)**

5,2g dans 100mL H20mQ

**Glucose (180.16g/mol) 1M (100X)**

18g dans 100mL H20mQ

**Glycérol 50%**  
50mL glycerol pur  
50mL H20mQ

Stérilisation par filtration et conservation à 4°C

**J-1**

# **Préparation IM et IMagar**

* Calcul des quantités nécessaires IM et IMagar

IM agar : 4boites/transfo + 1boite/agro + 1boite/zymo + 1 témoin cello - + 1 témoin - = x boites  
 x boites x 25mL + marge = d mL IMagar

IM : 50mL IM / transfo = e mL IM

dmL IMagar + e mL IM = fmL IM/IMagar

* Préparation des milieux

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **IM/IM agar** | **A diluer** | **molarité finale** | **Volumes/1L** | **Volume/fmL** |
| K2HPO4 1M | 100X | 10mM | 10mL |  |
| KH2PO4 1M | 100X | 10mM | 10mL |  |
| NaCl 0,25M | 100X | 2,5mM | 10mL |  |
| MgSO4,7H2O 0,2M | 100X | 2mM | 10mL |  |
| CaCl2 pur 0,7M | 1000X | 0,7mM | 1mL |  |
| FeSO4,7H20 10mM | 1000X | 10µM | 1mL |  |
| (NH4)2SO4 0,4M | 100X | 4mM | 10mL |  |
| glucose 1M | 100X | 10mM | 10mL |  |
| MES | - | 40mM | 7,8g |  |
| glycérol 50% | 100X | 0,50% | 10mL |  |
| H20 mQ stérile |  |  | **qsp 1L** |  |
| **Ajustement pH 5.6** | | | |  |
| **Répartir les** dmL IMagar + e mL IM **En x bouteilles de xml « IM » : Autoclave puis stockage 4°C**  **En x bouteilles de 250mL « IM agar » : Rajouter 3,25g d’agar par bouteille (13g/L), autoclavage et mettre à 55°C jusqu’au coulage** | | | | |
| Réaliser le mélange suivant : 250mL IMagar + + x µL Ab de sélection plasmide x mg/mL + 250µl AS 1000X  et couler x boites (faire autant de mélange que necessaire) | | | | |
| Conservation à 4°C pour le lendemain | | | | |

1. **Culture liquide agrobactéries**

Pour chaque agrobactérie préparer dans un erlen 50mL 10mL LB + Ab sélection agrobactérie xµg/mL + Ab sélection plasmide xµg/mL:

x mL LB + x µL Ab sélection agrobactérie [xmg/ml] + x µL Ab sélection plasmide [xmg/mL]

Rajouter une petite loop d’agrobactérie de chaque construits

Incubation ON, 28°C sous agitation

**J-0**

# **ATMT**

* Préparation des agrobactéries à Do= 0,4

Préparer 50mL de milieu d’induction :   
50ml IM autoclavé + 50µL acétosyringone 1000X + x µL Ab de sélection plasmide x mg/mL

Sortir les agros de 28°C (environ 16h de culture), transférer dans falcon 50mL  
Centrifuger 5min à 4000 rpm  
Resuspendre dans 2 mL de milieu d’induction

Diluer un aliquot au 1/10 dans le milieu d’induction (vf 1mL) et mesurer la DO

Préparer 5mL d’une solution d’agrobactérie à DO=0,4 dans l’IM.  
Relire la DO pour contrôle

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Souche d’agro** | **DO d1/10** | **DO susp mère** | **Vol susp mère à mettre (mL)** | **Vol IM+AB+AS (mL)** | **DO finale lue** |
|  |  | (DO d1/10) x 10 | (5mL x DO0,4) /DO susp mère | 5mL-vol susp mère | 0,4 ? |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |

* Préparer les souches de Zt à une concentration de 1 x 107 spores/mL

Préparer 50mL de milieu d’induction (si plus de dispo pour les agrobactéries):   
50ml IM autoclavé + 50µL acétosyringone 1000X + x µL Ab de sélection plasmide x mg/mL

Racler deux boites de pétri Ø45mm avec 5mL de milieu IM+AS+Ab sélection plasmide  
Diluer en série 1mL dans 9mL d’ H20mQ stérile jusqu’à obtenir une solution correcte pour effectuer le comptage  
Compter le nombre de spores sur 10 carrés, faire 2 comptages indépendants.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  | **Comptage 1** | **Comptage 2** | **Moyenne** | **Concentration de la dilution dénombrée** | **Concentration solution mère** |
| **Souche Zt** | Comptage par | Dilution comptée | Y1 =  nombre de spores sur 10 carrés | Y2 =  nombre de spores sur 10 carrés | Y= (Y1+Y2)/2 (spores) | Cd1/x =  Y x 10 x 103 (sp/mL) | Cd1/x  x facteur dilution |
|  |  |  |  |  |  |  |  |

*(ex : si d1/100 = 105spores* 🡪 *solution mère = 1.05 x 108 spores/mL)*

Faire une dilution à partir d’un aliquot de la suspension mère pour obtenir 5mL à *1 x 107 spores/mL*  (mini 1,5mL/transfo)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Souche | [sp/mL] solution mère | V sol mère à prélever (mL) = (5mL x 1.107sp/mL) /[sp/mL]solmère | V IM (mL) = 5mL – V sol mère prélevée (mL) |
|  |  | xmL | xmL |

Garder un peu de spores pour repiquer la souche Zt à transformer pour contrôle

* Nommer les boites d’IMagar et placer les disques de cellophane dessus.

Nom souche Zt à transformer + Nom souche agro 100µL

Nom souche Zt à transformer + Nom souche agro 200µL

Nom souche Zt à transformer + Nom souche agro 500µL

Nom souche Zt à transformer + Nom souche agro reste

Nom souche Zt à transformer

Nom souche agro

Cello –

IM –

* Lorsque DO600nm agrobactérie DO=0.4 et suspension de spores souche *Z. tritici* à transformer = [1.107sp/mL] réalisation des mix suivants :

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Souche Zymo** | **Souche Agro** | **IM+AB+AS** | **Boites à inoculer** |
| 800µL nom souche zt à transformer | 800µL nom souche agro | / | Nom souche Zt à transformer + Nom souche agro 100µL  Nom souche Zt à transformer + Nom souche agro 200µL  Nom souche Zt à transformer + Nom souche agro 500µL  Nom souche Zt à transformer + Nom souche agro reste |
| / | 250µL nom souche agro | 250µL | Nom souche agro |
| 250µL nom souche Zt à transformer | / | 250µL | Nom souche Zt à transformer |

* Etaler 100,200µl, 500µL et le reste (800µl) sur les boites Zt+agros
* Etaler 500µl pour les témoins
* Incuber 48h à 18°C
* Repiquage/ étalement des contrôles

Repiquer sur YPD la souche Zt à transformer

Sortir du -80°C et repiquer sur YPD les souches de Zt témoin :

Une souche résistante à l’antifongique de sélection (+ sensible à l’antifongique présent dans la souche à transformer si remplacement)

Nom – localisation

Une souche sensible à l’antifongique de sélection (+ résistant à l’antifongique présent dans la souche à transformer si remplacement)  
Nom – localisation

Incuber à 18°C, 1semaine puis repiquer chaque semaine jusqu’à la validation des transformants !

**J+2**

# Préparation MMzt + Antifongique de sélection + Ab

* Préparation du milieu

Autant de boite à couler que de boite d’IM

Faire fondre milieu MMzt et une fois à 55°C rajouter :

- les vitamines 1000X

- 2 antibiotiques, qui serviront à tuer les agrobactéries. Les antibiotiques doivent être différents de ceux portés par le plasmide et l’agrobactérie.

*Exemples :   
Si la souche agrobactérienne est résistante à la rifampicine et à l’ampicilinne et que le plasmide est résistant à la kana choisir strepto+spectino.   
Si la souche agrobactérienne est résistante à la rifampicine et que le plasmide est résistant à la spectino choisir strepto+ampi.*

- l’antifongique de sélection (pour ne sélectionner que les transformants)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Constituants** | **[] finale** | **1L** | **x mL** |
| MMzt fondu et mis à 55°C |  | 1L | X mL |
| Vit Thiamine/Biotine 1000X | 1X | 1ml | x µl |
| Antibiotique 1 xmg/mL | xµg/mL | x mL | x µl |
| Antibiotique 2 xmg/mL | xµg/mL | x mL | x µl |
| Cefotaxime 50mg/mL | 250µg/mL | 5mL | x µl |
| Antifongique de sélection Ci xmg/mL | xµg/mL | xmL | x µl |

Couler en boite Ø90mm

# Transferts des membranes

Transférer de manière stérile les membranes de l’IMagar+ Ab sur le milieu MMzt + Antifongique de sélection + Ab

Incubation 18°C pendant 10jours à 1mois

**Entre J+12 et J+30**

# Lecture des résultats sur MMzt + Antifongique de sélection + Ab Remplir les 4 1ères colonnes

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Boite | Nb TRF total sur MMzt | TRF repiquée n° | Morpho sur  MMzt + Antifongique de sélection + Ab | Résultat post sélection :  Antifongique de sélection S/R | Résultat post sélection :  Antifongique porté par la souche à transformer S/R ou croissance |
| Nom souche Zt à transformer + Nom souche agro 100µL |  |  |  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
| Nom souche Zt à transformer + Nom souche agro 200µL |  |  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
| Nom souche Zt à transformer + Nom souche agro 500µL |  |  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
| Nom souche Zt à transformer + Nom souche agro reste |  |  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
| Nom souche agro 500µL |  |  |  |  |  |
| Nom souche Zt à transformer 500µL |  |  |  |  |  |
| Cello- |  |  |  |  |  |
| IM- |  |  |  |  |  |

# **Préparation du milieu pour repiquage des transformants**

MMzt + Ab + Antifongique de sélection

et MMzt + Ab (+ Antifongique porté par la souche à transformer si remplacement)

1 boite de chaque par transfo  
 🡪 1 boite x x transformation x 25mL + marge = x mL de chaque milieu à préparer

Faire fondre milieu MMzt et une fois à 55°C rajouter :

- les vitamines 1000X

- 2 antibiotiques, qui serviront à tuer les agrobactéries. Les antibiotiques doivent être différents de ceux portés par le plasmide et l’agrobactérie.

*Exemples :   
Si la souche agrobactérienne est résistante à la rifampicine et à l’ampicilinne et que le plasmide est résistant à la kana choisir strepto+spectino.   
Si la souche agrobactérienne est résistante à la rifampicine et que le plasmide est résistant à la spectino choisir strepto+ampi.*

- l’antifongique de sélection (pour ne sélectionner que les transformants) pour la première boite  
- l’antifongique porté par la souche à transformer si remplacement, sinon pas d’antifongique pour la seconde boite

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Constituants** | **[] finale** | **1L** | **x mL** |
| MMzt fondu et refroidi à 55°C |  | 1L | X mL |
| Vit Thiamine/Biotine 1000X | 1X | 1ml | x µl |
| Antibiotique 1 xmg/mL | xµg/mL | x mL | x µl |
| Antibiotique 2 xmg/mL | xµg/mL | x mL | x µl |
| Cefotaxime 50mg/mL | 250µg/mL | 5mL | x µl |
| Antifongique de sélection Ci xmg/mL | xµg/mL | xmL | x µl |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Constituants** | **[] finale** | **1L** | **x mL** |
| MMzt fondu et refroidi à 55°C |  | 1L | xmL |
| Vit Thiamine/Biotine 1000X | 1X | 1ml | x µl |
| Antibiotique 1 xmg/mL | xµg/mL | x mL | x µl |
| Antibiotique 2 xmg/mL | xµg/mL | x mL | x µl |
| Cefotaxime 50mg/mL | 250µg/mL | 5mL | x µl |
| Antifongique porté par la souche à transformer si remplacement Ci xmg/mL | xµg/mL | xmL | x µl |

Couler en boites Ø90mm, conserver à 4°C jusqu’à utilisation.

# Repiquage des transformants potentiels

NB : les contrôles doivent être sur incubé boite YPD depuis 5-10jours à 18°C.  
  
Chaque colonie visible au-dessus est numérotée et repiquée avec un cure-dent stérile sur ces 2 milieux, sans oublier les témoins Zt :

Nom souche Zt témoin : souche résistante à l’antifongique de sélection (+ sensible à l’antifongique présent dans la souche à transformer si remplacement)

Nom souche Zt témoin : souche sensible à l’antifongique de sélection (+ résistant à l’antifongique présent dans la souche à transformer si remplacement)

Incubation 18°C 7jours-10jours

**Une semaine à 10 jours plus tard**

# Lecture résultats

Lire les boites :  
MMzt + Ab + Antifongique de sélection  
MMzt + Ab (+ Antifongique porté par la souche à transformer si remplacement).

Noter les résultats dans le tableau précédent.

Si les transformants sont bien :

antifongique de sélection R  
+ croissance ok sur MMzt+Ab ou antifongique présent dans la souche S  si remplacement

Procéder au monosporage à partir de la boite « MMzt + Ab + Antifongique de sélection »

# Préparation YPD

Couler du YPD en petite boite (minimum 3 boites/transformants)

# Monosporage 1

Repiquer les transformants validés, sur une petite boite YPD (une strie+zig/zag en changeant de cône)

Incubation 5-7 jours à 18°C

**Une semaine plus tard**

# Monosporage 2

Repiquer les colonies précédentes, sur une petite boite YPD (une strie+zig/zag en changeant de cône)

Incubation 5-7 jours à 18°C

**Une semaine plus tard**

# Etalement pour stockage et pour extraction pour validation moléculaire des transformants

Pour chaque monospore :

étaler une colonie sur YPD petite boite (pour validation et stockage)

Incuber à 18°C 5 jours

**Cinq jours plus tard**

# Stockage (+ récupération du matériel pour extraction/validation moléculaire)

Gratter avec une spatule la boite et mettre dans un cryotube. Stocker au -80°C (stock sec)

En garder un peu sur la boite pour procéder en parallèle à la validation moléculaire des transformants.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Transformants repiqué n°** | **N° tube stockage -80°C** | **Nom sur tube stockage -80°C** |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

Localisation stockage -80°C : x