

2/01/2023

425 vinculin

990 pSILVER IRES LAR
1700 µg / ml

729 VE cond

1391 pSILVER anchoring
1475 µg / ml

192 β3

	425 (990)	425 (990)	729 (1391)
ampon lax	5 µL	5 µL	5 µL
ADN 3 µg	3 µL	2 µL	2 µL
lan		41 µL	41 µL

yme de	Nhe I 1 µL	Nhe I 1 µL
iction	EcoRI 1 µL	Pac I 1 µL

on° 425 pour avoir $C = 20 \text{ ng / } \mu\text{L}$
 $637 \text{ ng / mL} = 637 \text{ ng / } \mu\text{L}$

$$\frac{637}{20} = 31,85 \text{ Facteur de dilution}$$

$\frac{1 \mu\text{L}}{31,85} \approx 0,031 \mu\text{L}$ d'ADN à diluer dans

$$1 - 0,031 \mu\text{L} \times 100 \rightarrow 100 - 3,1 = 96,9 \mu\text{L}$$

3,1 µL dans 96,9 µL d'eau distillée

no 729

1,6 µL dans 48,4 µL

$$1305 \text{ ng / mL} = 1305 \text{ ng / } \mu\text{L}$$

$$\frac{1305}{20} = 65,25$$

$\frac{1 \mu\text{L}}{65,25} \approx 0,015 \mu\text{L}$ d'ADN à diluer dans

$$1 - 0,015 \mu\text{L} \times 100 \rightarrow 100 - 1,5 = 98,5$$

1,5 µL dans 98,5 µL d'eau distillée

0,75 dans 49,25

n° 192

$$1370 \mu\text{g} / \text{mL} = 1370 \text{ ng} / \mu\text{L}$$

≈ 1,5 μL dans

0,75 μL dans ~~50,95~~ 49,25 μL d'eau distillée

R: Eva 1 Eva 2 Eva 3

(2003/ μL) 1 μL de n° 192 1 μL de n° 729 1 μL de n° 425

163 mouse GFP 1ve cad 1 GFP-vinculin

P 1 μL (10 mM)

pn (5x) 10 μL

r Fwd 0,2 μL (100 μM)

r Rev 0,2 μL (100 μM)

mouse 0,5 μL

H₂O 38 μL

utions de PCR : - denaturation initiale 98°C 3 min 30

(- denaturation 98°C, 20 sec

- hybridation + élongation 68°C, 30 sec 3 min 30 sec

24 cycles

- élongation 72°C, 6 min

ntrole de la digestion

électrophorèse sur gel d'agarose 1%

110V pendant 3 μL de dépôt

Eva 1 ~ 3160 pb (192)

Eva 2 ~ 2460 pb (729)

va 3 ≠ 3614 pb (425)

i vecteur ~ 8174 pb

insert ~ 3000 pb

Eva 1 Eva 2 Eva 3 V₁ V₂ M



2023.01.02 15:12

Eva 3 non concluant

purification de l'ADN en colonne

Dosage au nanodrop

Gibson Assembly :

insert n° 182 54 ^{ng} / ~~μL~~ ~~μg~~ μL
 insert n° 729 120 ng / μg
 vecteur n° 330 27 ng / μg
 vecteur n° 1394 49 ng / μg

Eva 1: 2 μL de vecteur + 1,3 μL d'insert
 + 1,1 μL d'H₂O + 5 μL de Mix

Gibson Assembly

Eva 2: 1 μL de vecteur + 0,6 μL d'insert
 + 3,4 μL d'H₂O + 5 μL de Mix

Gibson Assembly

↳ 15 min à 50°C

Transformation :

20 μL de bactérie compétente + 2 μL de Gibson Assembly 20 min sur glace

30'' à 42°C - 2 min sur glace

↳ étalement sur agar + Ampicilline

nouvelle Dilution de n° 425 (Eva 3 non concluante) (218 ≈ 425 (n° 218 vinculin))

20 ng / μL

$$\frac{2800}{20} = 140$$

~~plasmide~~ n° 218

2,8 μg / μL

2800 ng / μL

$\frac{100 \mu L}{140} = 0,714 \mu L$ dilué dans

99,3 μL d'eau

~~plasmide~~ n° 425

638 ng / μL

$$\frac{638}{20} = 31,9$$

$\frac{100 \mu L}{31,9} = 3,14 \mu L$ dilué dans
 96,9 μL

n° 218 + n° 425

PCR : avec nouvelle dilution^V : - dénaturation 98°C 20' de n° 218 et n° 425

- hybridation 60°C 30'

- élongation 72°C 3 min 30

x 24 cycle

électrophorèse sur gel
analyse des résultats
Run PCR 10V pendant
sur gel à 1%
lancés (n°218)
- 3000 pb
- 3750 pb
- 5500 pb
- 8000 pb
Ø bande
25 et 218 non concluant



2 = n° 218
4 = n° 426

24 M

mini prep des ~~plasmides~~ plasmide Eva 1 et Eva 2
Sélection de culture bactérienne centrifugée 3 min
sont ajoutés au cuvet : - 150 µL de buffer A1
- 250 µL de buffer A2
- 350 µL de buffer A3

↳ purification du surnageant par minicolumnne après centrifugation

analyse des plasmides (contrôle) du ^{pour} clonage

attendue : Eva 1 - p930 + 132 pb EcoRV attendue - 7 371 pb

- 2373 pb ←

- 847 pb

- contrôle p930 par EcoRV

- 73 pb

↳ - 10 347 pb

- 847 pb

- 73 pb

Eva 2 - p1391 + 723 pb par NheI et PacI - 8174 pb

- 2408 pb

- contrôle 1391 par NheI et PacI - 8174 pb

- 1500 pb

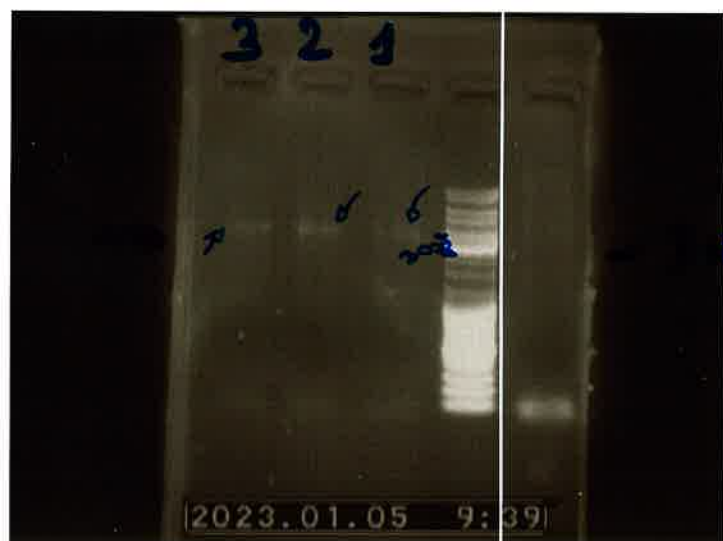
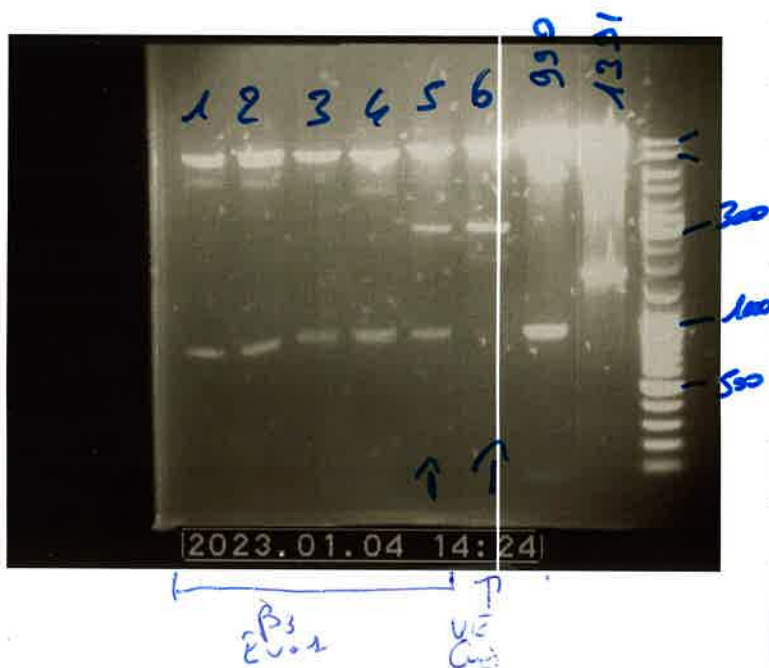
dilution de 425

Concentration nanodrop Eva 1 : 135 ng/μL
Eva 2 : 85 ng/μL

135 ng/μL

electrophorèse sur gel
agarose 1% de Eva 1
1 par EcoRV (1-5)
2 par BclI et NheI (6)
ota Set 6 correspondent
résultats attendues (recombinant)
→ midi prep

2 avec un nouveau plasmide 425
gradient T
de



electrophorèse des amplicons de la
PCR de ⁴²⁵ avec gradient par
la phase d'élongation

3- 63°C ~ 3500 pb

2- 60°C ~ 3500 pb

1- 57°C ~ 3500 pb

La concentration de l'échantillon
après purification sur colonne par 10 μL
d'H₂O : ~45 ng/μL (n°425)

Gibson Assembly de Eva 3: 3 μL de
n° 425, 2 μL de D30 et 5 μL de Mix GA

Sommaire Contents				Page Page
Ev 1	β_3 GFP	Seq CAGS	05550662 AZENTA LIFE SCIENCES	No priming
	Mini-pr	GFP H3	05550665 AZENTA LIFE SCIENCES	Non spécifique.
Ev 2	VEcad mcherry	CAGS	05550668 AZENTA LIFE SCIENCES	1155 pb début \rightarrow 1100 pb
		\rightarrow mcherry H3	05550671 AZENTA LIFE SCIENCES	1237 pb Fin
		\rightarrow matrice origine	MutaO	TCI \approx 1500
PCR	piezo 1B, 2A, 2B avec (HD et phusion)			TCI \approx 1560
<p>Gibson Assembly : <u>piezo 2A, 2B</u> vecteur 1937 digéré par Pst I/EcoRI C:-2A 63,6 ng / μL (4000 pb) (7675 pb) -2B 160 ng / μL (4000 pb) 1 μL vecteur + 2 μL de 2A + 1 μL 2B (A) + 1 μL d H₂O + 5 μL de Mix gibson Assembly (B) 1 v + 1/2 2A + 0,3 2B</p>				
				<u>Ratio 3</u>

Analyse des amplicons
 PCR de piezo
 2B
 et fonctionné
 (HD et P) et
 et P) avec des
 à 4000 pb
 de l'insert)
 bande contaminante
 de 2A HD \rightarrow on utilise
 P pour le gibson



1 2 3 4 5 6
 Tex 2 Polya bases (HD) / Phusion)
 \rightarrow Phusion utilisée pour Piezo 2A

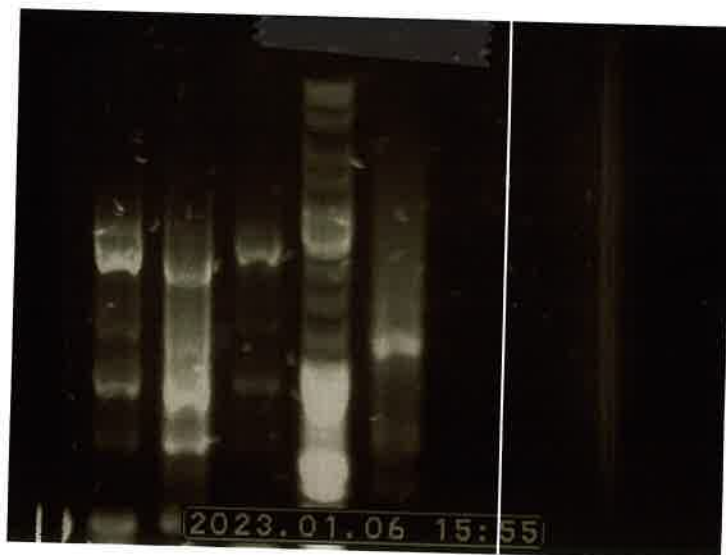
criblage de Eva 3 par PCR (one Tag polymerase)

~~34°C~~ 84°C 5min, x 30 (84°C 20s, 56°C 30s, 68°C 3min) 68°C 5min

Eva 3.1 3.2 3.3
✓ ✓ ✓



GFP 5' ~~DRSNA~~
~~CAG~~ sense / ~~GFP~~ AS



↑

pur. Piezo 1B

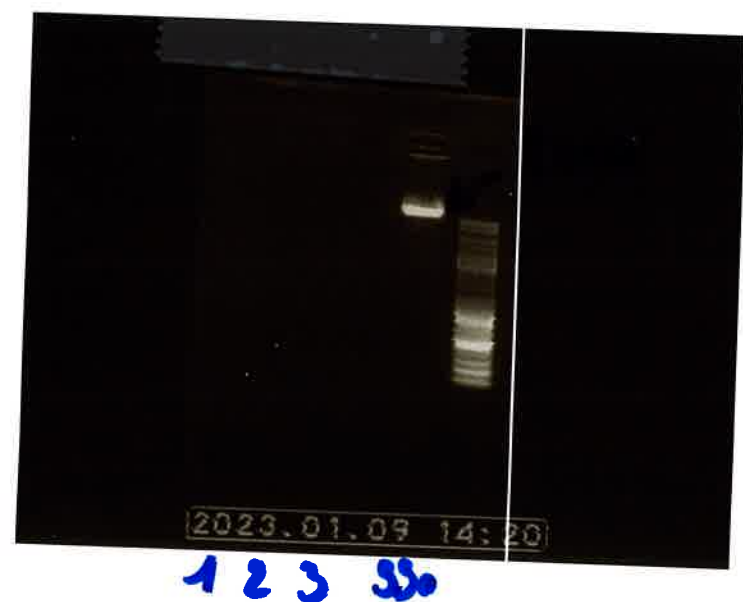
140
4 cycles 50°C
4 cycles 50°C
20 cycles 60°C

concentration Eva 3.1: ~~10~~²⁰ ng / μ L (1^{ère} miniprep)
3.2: ~~20~~³⁷ ng / μ L
3.3: 20 ng / μ L

après miniprep

digestion par EcoRI: Eva 3 ~ 8000 pb + ~ 150 pb
résultat attendu ~ 380: 8174 pb

concentration Eva 3.1 105 ng / μ L (2^{ème} miniprep)
3.2 61 ng / μ L nouvelle miniprep
3.3 140 ng / μ L ↳ pas assez d'ADN
dans la 1^{ère}; résultat de
la PCR ci-dessus non concluant



électrophorèse de la 2^{ème} miniprep
de Eva 3.1 digestion
de la première miniprep

calcul pour séquençage
1 830 ng / μ L

$$C_f \times V_f = C_i \times V_i$$

$$100 \times 5 = 1830 \times V_i$$

$$100 \times 5 = V_i$$

$$V_i = 0,264 \mu\text{L}$$

Sequencing Ev1 CAGs

05550658
AZENTA
LIFE SCIENCES

GFP as

05550661
AZENTA
LIFE SCIENCES

glidi pop.

Ev2 665 pb

05550664
AZENTA
LIFE SCIENCES

1260 pb

05550667
AZENTA
LIFE SCIENCES

760 pb → 1760 pb
1760 pb

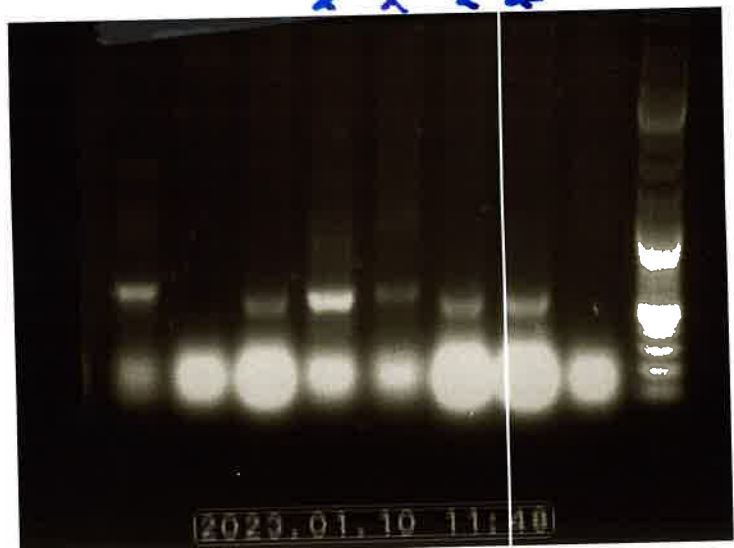
723 665 pb

05550670
AZENTA
LIFE SCIENCES

1260 pb

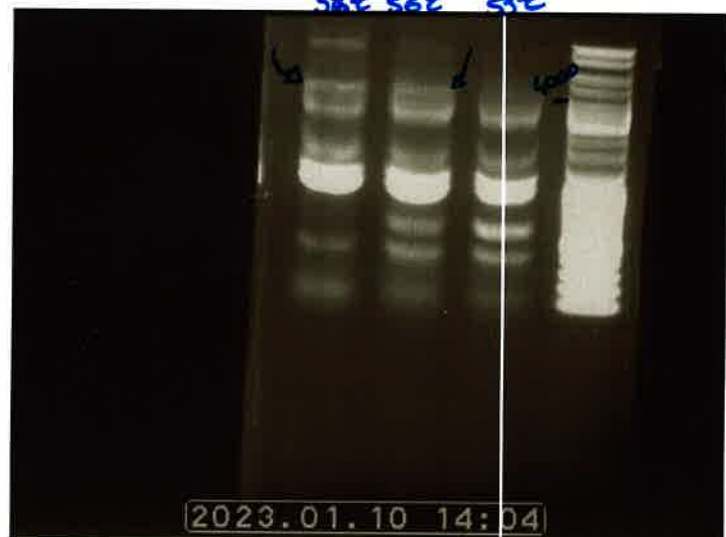
05550657
AZENTA
LIFE SCIENCES

1 2 3
x x x



Criblage par PCR de piece 2
Fragment attendu 300pb
↳ mise en culture

53°C 56°C 59°C



PCR piece 10 temps C/6
+ phusion + gradient
53°C-56°C-59°C
↳ test de contamination

Transformation Eva 1 et Eva 2 (+930)

Eva 1 1830 µg / µL → 1 µL + 100 µL opti-HEM

Eva 2 506 µg / µL → 4 µL + 100 µL opti-HEM

930 1700 µg / µL → 1 µL + 100 µL d'opti-HEM

→ ⊕ dans chaque tube
6 µL lipo ⊕ 100 µL d'opti-HEM
0 µL de solution / puits (2 puits Eva 1, 2 puits Eva 2, 2 puits 930)

camp # 697 C = 1532 µg / mL

$$C \times V = C \times V$$

camp 7F # 2028 C = 4071 µg / mL

$$V = \frac{20 \times 100}{C}$$

camp 7b # 1933 C = 3300 µg / mL

cteur # 1936

$$V = \frac{20 \times 100}{1532} = 1,305 \mu\text{L}$$

densité 100 µL

$$\frac{20 \times 100}{4071} = 0,49 \mu\text{L}$$

densité ~ 100 µL

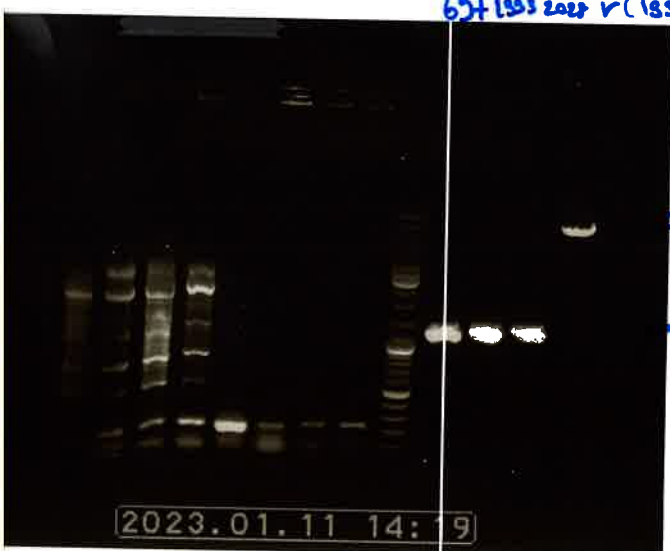
de 697, 2028 et 1933 + digestion de 1936 par
EcoRI (PCR x24 elongation 68°C 1min)

$$\frac{20 \times 100}{3300} = 0,61 \mu\text{L}$$

densité ~ 100 µL

se par PCR ^{sur colonie} d'un nouveau Gibson Assembly de Eva 3

sur boîte de petri après transformation.



electrophorèse des PCR de
697, 2028 et 1933 + digestion de
1936 par PmcI et EcoRI + cuilage
de Eva 3

Gibson Assembly

C (637, 2028, 1933, 1936) $\approx 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$

↳ transformation → étalonnage

↳ screening par PCR (fragment de ~~plasmide~~
pSico (anti-sens) et PGK ~~R~~ F (sens)

mini prep de pizzo 2 : C: pizzo 2.1 43,5 ng/ μL
pizzo 2.2 111,3 ng/ μL
pizzo 2.3 77,6 ng/ μL

↳ contrôle par digestion par EcoRI et BamHI résultats attendus :- 6131 pb
- 5044 pb
- 2128 pb
- 1357 pb
- 1253 pb
- 300 pb

Séquençage

2034 (Eva 1) - CAGs ~~CAGs~~
- GFPas

05550660
AZENTA
LIFE SCIENCES

05550663
AZENTA
LIFE SCIENCES

pizzo 2 - pSico anti-sens

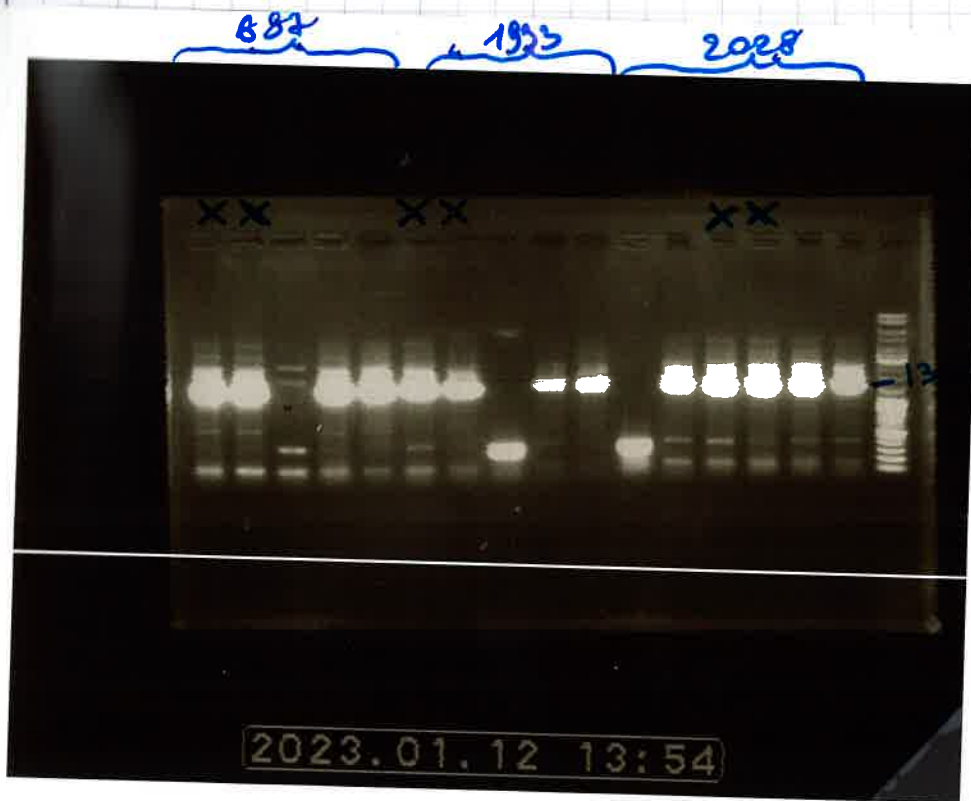
05550666
AZENTA
LIFE SCIENCES

pizzo 2.1 pizzo 2.2 pizzo 2.3



criblage de pizzo 2 par digestion
de EcoRI et BamHI
↳ le profil de digestion ne correspond pas
à celui attendu

↳ le séquençage de pizzo 2.1 car
celui avec la + faible concentration
et celui avec la bande la plus
intense au criblage des colonies
par PCR.



Gap

4H 5' / 1423 RFP
 4H 5' / 882 psico R-GFP sh RNA

digestion 882 et PCR 1423

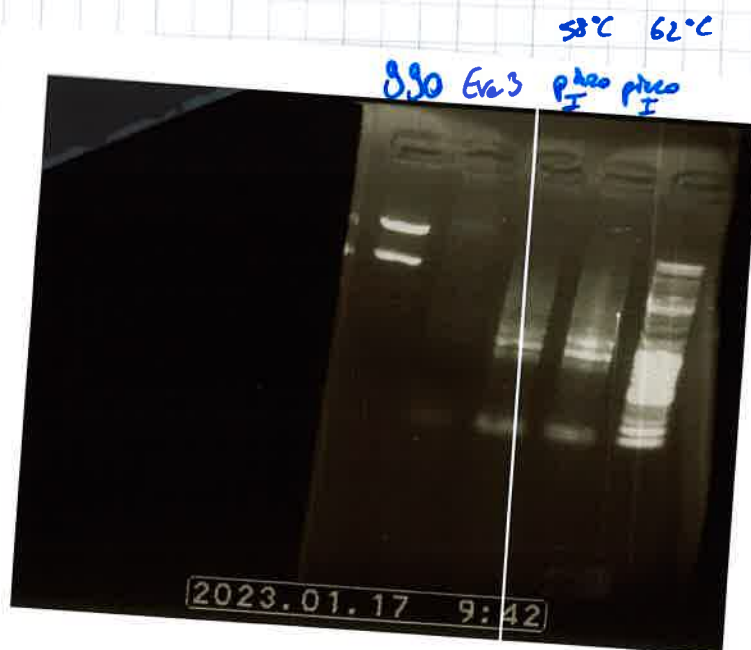


~~digestion de RFP-psico R shRNA~~

PCR de RFP + digestion
 de psico R-GFP shRNA



criblage Era 3
amorce primer AJ
GFP 3



58°C 62°C
890 Era 3 p_{h2o} p_{h2o}

Era 3 x 30 cycle 60°C HD
p_{h2o} x 25 cycle 60°C HD

R CATP5G
JGCATP3
JGCATP4
JGCATP5
JGCATP6
JGCATP7
JGCATP8
JGCATP9
JGCATP10
JGCATP11
JGCATP12
JGCATP13
JGCATP14
JGCATP15
JGCATP16
JGCATP17
JGCATP18
JGCATP19
JGCATP20
JGCATP21
JGCATP22
JGCATP23
JGCATP24
JGCATP25
JGCATP26
JGCATP27
JGCATP28
JGCATP29
JGCATP30
JGCATP31
JGCATP32
JGCATP33
JGCATP34
JGCATP35
JGCATP36
JGCATP37
JGCATP38
JGCATP39
JGCATP40
JGCATP41
JGCATP42
JGCATP43
JGCATP44
JGCATP45
JGCATP46
JGCATP47
JGCATP48
JGCATP49
JGCATP50
JGCATP51
JGCATP52
JGCATP53
JGCATP54
JGCATP55
JGCATP56
JGCATP57
JGCATP58
JGCATP59
JGCATP60
JGCATP61
JGCATP62
JGCATP63
JGCATP64
JGCATP65
JGCATP66
JGCATP67
JGCATP68
JGCATP69
JGCATP70
JGCATP71
JGCATP72
JGCATP73
JGCATP74
JGCATP75
JGCATP76
JGCATP77
JGCATP78
JGCATP79
JGCATP80
JGCATP81
JGCATP82
JGCATP83
JGCATP84
JGCATP85
JGCATP86
JGCATP87
JGCATP88
JGCATP89
JGCATP90
JGCATP91
JGCATP92
JGCATP93
JGCATP94
JGCATP95
JGCATP96
JGCATP97
JGCATP98
JGCATP99
JGCATP100

Sequencing

637

1993

2028

PGK
p_{h2o} as

PGK
p_{h2o} as

PGK
p_{h2o} as

05550669
AZENTA
LIFE SCIENCES

05551088
AZENTA
LIFE SCIENCES

05551091
AZENTA
LIFE SCIENCES

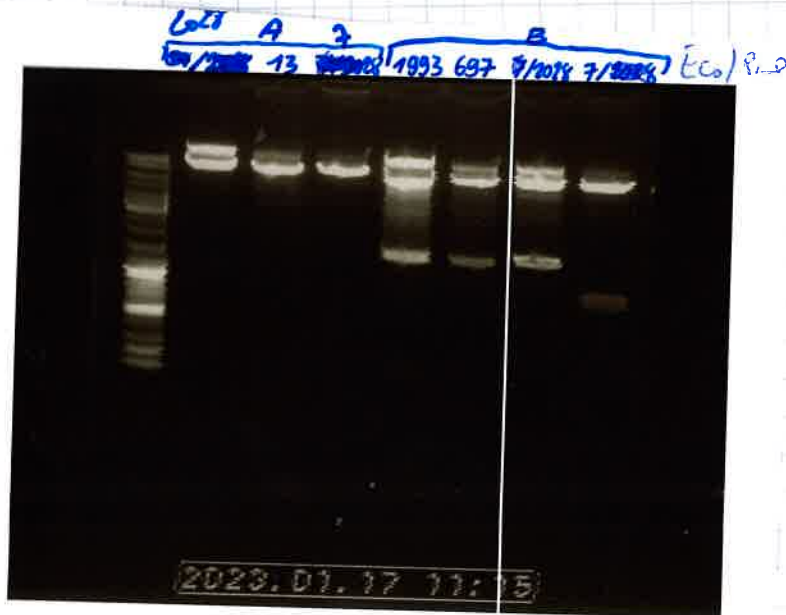
05551094
AZENTA
LIFE SCIENCES

05551097
AZENTA
LIFE SCIENCES

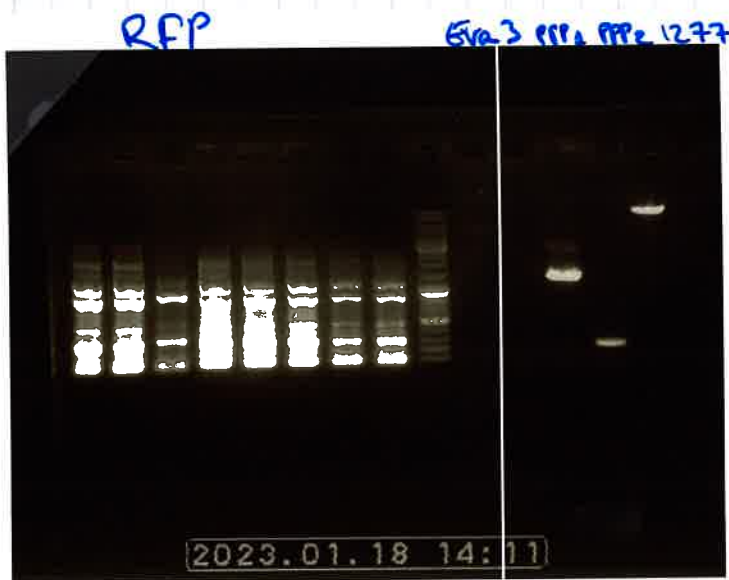
05551100
AZENTA
LIFE SCIENCES

ATG → 890 pb
OK

ATG



digestion controls après
mini prep ratée



Ere3 fusion
G/E 66°C x 35

PCR pfp1 x24 HD

pfp2 x24 HD

digestion 1277 Age I

Lo Gibson Assembly (voir D)

sequençage p3 2034 (mini prep ~30ng/μL et 30ng/μL)

Ⓐ p3 2034 CMV

GFP

Ⓑ p3 2034 CMV

GFP

05551103
AZENTA
LIFE SCIENCES

05551087
AZENTA
LIFE SCIENCES

05551090
AZENTA
LIFE SCIENCES

05551093
AZENTA
LIFE SCIENCES

Screening ppp PCR sur colonies CAG / GFP_{as}
⇒ R10V

Bilan Stage Florent

→ Conclusions :

Eve 1 β_3 non-CFP PRES LAR ⇒ 203
Sequene en cours + CMV / GFP AS
WB ok transfecin HEN ok

Eve 2 VE CAG n'achève ⇒ 2035
WB ok Sep ok transfecin ok

Eve 3 GFP-Vinculin pb d'amplification
Commande nouveau primers

Sylve ppp → Refaire le Gibson.

Gamp des pSico HR X 3 ⇒ 2036
⇒ 2037
A mettre dans la box. ⇒ 2038

Truy RFP dans sh CCR2 → Gibson A refaire

Calnexin / PDIA3 théorique