

Première partie

2016-01 Janvier

1 2016-01-11 Lundi

1.1 (3) PCR cible des gènes synthétiques

Ajouté le [2016-01-11 Mon 09:50]

La PCR du [2016-01-07 Thu], cible des gènes synthétiques des clones transformants hétérozygotes, n'a pas fonctionné, vraisemblablement dû à un problème dans le mix PCR (pas d'amplification dans le t+). On refait donc la même PCR sur moins de clones transformants, dans l'idée de se faire la main, avant de faire des PCR plus conséquentes, avec de plus grands volumes.

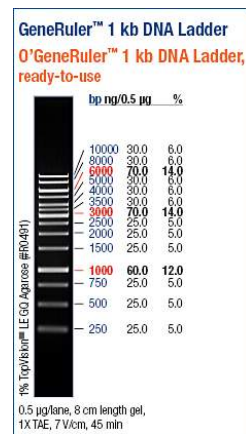
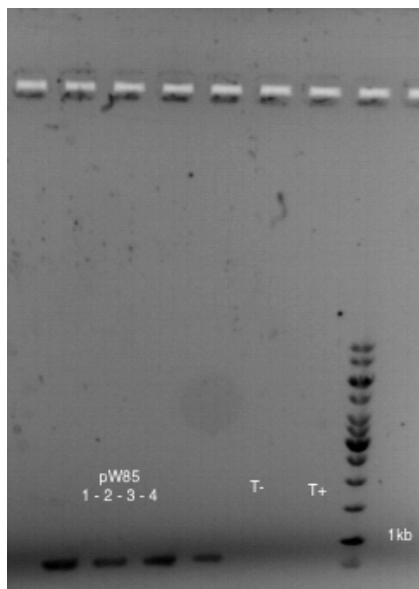
Programme PCR :

Temps	température	30 cycles
3'	94	
50"	94	x
50"	58	x
4'	72	x

Volumes :

	1-tube	7-tubes
ADN	0.5	3.5
Taq	0.5	3.5
amorce 1392	2.5	17.5
amorce 1073	2.5	17.5
MgCl ₂	1.5	10.5
dNTPs	5.0	35.
Tampon 10X Taq	5.0	35.
eau qsp 50μL	32.5	227.5

Contrôle



Ahah, la migration a duré trop longtemps à priori... Le bleu était sorti, petite réunion avec Franck non-prévue...

On voit quand même des bandes dans les quatre puits, mais pas dans le témoin positif, avec ADN génomique d'*Acinetobacter*. Les bandes sont à la position attendue dans le gel (taille : 750bp.)

— voir à changer le témoin positif.

1.2 (D) aliquoté Taq-ozyme

Ajouté le [2016-01-11 Mon 11:47]

Aliquoté 10μL de Taq-ozyme en eppendorf, placé dans le tiroir commun du -20°C.

2 2016-01-12 Mardi

2.1 (3) PCR cible des gènes synthétiques

Ajouté le [2016-01-12 Tue 08 :19]

La PCR d'hier ayant fonctionné, le but est de refaire la même PCR sur l'ensemble des clones montrant des polymorphismes que j'ai isolé, avant de pouvoir les envoyer à séquencer.

- Penser à changer de témoin positif (peut-être utiliser un plasmide porteur de l'une des constructions par exemple.)

Programme PCR :

Temps	température	30 cycles
3'	94	
50"	94	x
50"	58	x
50"	72	x
4'	72	

Volumes :

	1-tube	27-tubes
ADN	0.5	13.5
Taq	0.5	13.5
amorce 1392	2.5	67.5
amorce 1073	2.5	67.5
MgCl ₂	1.5	40.5
dNTPs	5.0	135.
Tampon 10X Taq	5.0	135.
eau qsp 50μL	32.5	877.5

Contrôle :

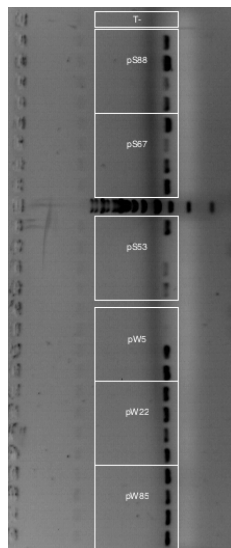


FIGURE 1 – Ladder un peu chargé. Attention au volume. Colonies 3 et 4 de pW5 et 3 de pS53 n'ont pas amplifié. Témoin positif migration sur le gel de [2016-01-12 Tue 16 :05].

- ☐ refaire la PCR pour les deux clones pW5 et le clone de pS53 qui n'a pas fonctionné.
- ☐ faire migrer le témoin positif.

2.2 (2) PCR cible de l'ancrage

Ajouté le [2016-01-12 Tue 14 :15]

Chez les différents clones montrant des néomutations, on veut séquencer l'ancrage, pour vérifier que le taux de mutation dans la tract de conversion est bien supérieur au taux de mutation dans une zone parfaitement homologue. L'hypothèse, floue pour l'instant, est que le système de réparation des mésappariements est "saturé", et qu'il introduit des erreurs. (Ces mutations semblent biaisées vers GC d'après les données dont on dispose pour l'instant.)

Le but est ici de réaliser une PCR simple sur quelques candidats, avant de passer aux grands volumes, envoyés à séquencer. Les conditions de PCR sont tirées du cahier de Florence, page 146, daté du [2015-06-25 Thu].

Candidats sélectionnés

strong	weak
pS10	pW14
pS24	pW19

Programme PCR

Temps	température	30 cycles
3'	94	
50"	94	x
50"	55	x
60"	72	x
4'	72	

Volumes :

	1-tube	7-tubes
ADN	0.5	3.5
Taq	0.5	3.5
amorce 1410	2.5	17.5
amorce 1411	2.5	17.5
MgCl ₂	1.5	10.5
dNTPs	5.0	35.
Tampon 10X Taq	5.0	35.
eau qsp 50μL	32.5	227.5

Contrôle :

Voir figure 2.

- ☐ Refaire migrer le témoin positif.

2.3 (D) dilué amorces

Ajouté le [2016-01-12 Tue 10 :02]

Dilué au 10^e (10 / 90μL eau aguetant) les amorces 1073, 1392, 1410 et 1411.

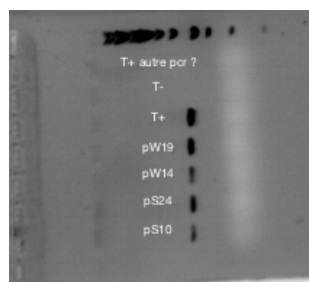


FIGURE 2 – Le contrôle de la PCR cible de l'ancre 100% homologue. Le témoin positif de la PCR d'hier est censé être là également.

2.4 (D) coulé gel

Ajouté le [2016-01-12 Tue 16:01]

Coulé deux grands gels 300mL agarose 1% 26 puits.

3.1 (2) PCR cible des ancrs

Ajouté le [2016-01-13 Wed 09 :36]

La PCR d'hier ayant fonctionné, le but est de faire la même PCR dans les mêmes conditions pour séquencer toutes les ancrs des clones montrant des néomutations.

candidats sélectionnés

strong	weak
pS10	pW14
pS24	pW19
pS30	pW2
pS39	pW23
pS5	pW35
pS54	pW6
pS74	pW81
pS82	pW87
pS88	pW93

— erreur : trompé de clone, prélevé pW5 au lieu de pW2... gros malin.

programme PCR

Temps	température	30 cycles
3'	94	
50"	94	x
50"	55	x
60"	72	x
4'	72	

volumes

	1-tube	19-tubes
ADN	0.5	9.5
Taq	0.5	9.5
amorce 1410	2.5	47.5
amorce 1411	2.5	47.5
MgCl ₂	1.5	28.5
dNTPs	5.0	95.
Tampon 10X Taq	5.0	95.
eau qsp 50µL	32.5	617.5

contrôle

Voir figure 3.

Tout a fonctionné a priori. Les produits de PCR sont conservés au -20°C dans le portoir orange à couvercle. Je refais la PCR pour l'isolat pW2.

3.2 (3) PCR cible des gènes synthétiques

Il n'y a pas de bandes dans trois cas d'amplification, l'hypothèse la plus parcimonieuse étant que la PCR n'a pas fonctionné... Je la refais donc pour ces trois isolats là. lala.

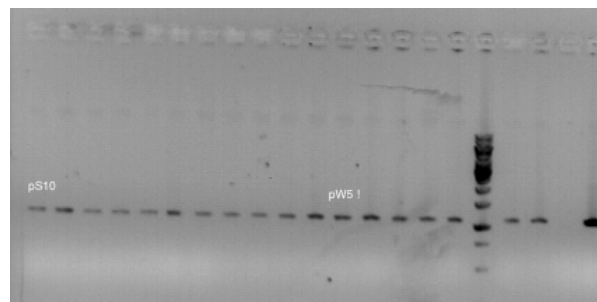


FIGURE 3 – La PCR cible des ancrs semble avoir fonctionné de partout. Dans l'ordre, de pS10 à pS88, puis pW14 à pW93, T- et T+. Le T- est clean, le T+ trop fort. Penser à moins déposer pour le T+.

candidats

pW53 – pW54 – pS53

programme PCR

Temps	température	30 cycles
3'	94	
50"	94	x
50"	58	x
50"	72	x
4'	72	

volumes

	1-tube	6-tubes
ADN	0.5	3.
Taq	0.5	3.
amorce 1410	2.5	15.
amorce 1411	2.5	15.
MgCl ₂	1.5	9.
dNTPs	5.0	30.
Tampon 10X Taq	5.0	30.
eau qsp 50µL	32.5	195.

contrôle

Voir figure 4. Absence d'amplification. Repartir des boîtes, resuspendre les colonies, et refaire la PCR.

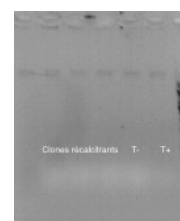


FIGURE 4 – Rien à l'horizon. Ladder tordu, puisque gel qui se tortille dans la cuve... Bien fait pour moi.

4 2016-01-14 Jeudi

4.1 (3) PCR des trois clones récalcitrants

La PCR d'hier semble montrer qu'il n'y a pas d'ADN dans le tube. Le témoin positif, qui fonctionne bien avec le couple d'amorce 1410-1411 ne fonctionne pas avec les amorces 1073-1392, pour une raison que je ne m'explique encore pas.

Je veux donc repartir d'une nouvelle suspension, et refaire (encore une fois) la PCR sur ces trois colonies. Le but est d'avoir un plan d'expérience équilibré, avec quatre colonies isolées par candidat choisi.

suspension des clones

Les trois colonies sélectionnées, pW₅₃ - pW₅₄ - pS₅₃, sont resuspendues dans 20μL d'eau pure.

programme PCR

Temps	température	30 cycles
3'	94	
50"	94	x
50"	58	x
50"	72	x
4'	72	

volumes

	1-tube	6-tubes
ADN	0.5	3.
Taq	0.5	3.
amorce 1410	2.5	15.
amorce 1411	2.5	15.
MgCl ₂	1.5	9.
dNTPs	5.0	30.
Tampon 10X Taq	5.0	30.
eau qsp 50μL	32.5	195.

contrôle

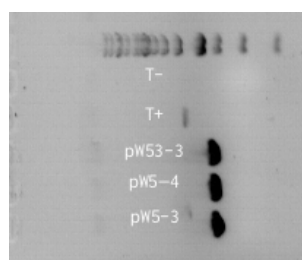


FIGURE 5 – Les trois clones ont bien amplifié. Le T+ a toujours le même soucis, je suis pourtant parti d'un nouvel ADN génomique d'Acineto.

Résultat :

plasmide	dosage
WS	8.5ng/μL
SW	7.2ng/μL

Il n'y a pratiquement rien.

relance des cultures

J'ai sorti les cryotubes du -80°C, resuspendu les cultures dans 5mL de LB+Kan₅₀, incubation 24H à 37°C. Le but est de refaire les extractions demain [2016-01-15 Fri] avec plus de milieu, en culottant les 5mL de culture, et en éluant dans un plus petit volume.

4.3 (D) maintenance

- nettoyé paillasse
- aliquoté 10 × 1.5mL d'eau UP en eppendorf.

4.2 (1) Contrôle des extractions plasmidiques

Les extractions des plasmides porteurs des gènes synthétiques du [2016-01-08 Fri] sont contrôlées au nano-drop.