

Table des matières

I. 2016-01 Janvier	1
1. 2016-01-11 Lundi	1
1.1. (3) PCR cible des gènes synthétiques	1
1.2. (D) aliquoté Taq-ozyme	1
2. 2016-01-12 Mardi	2
2.1. (3) PCR cible des gènes synthétiques	2
2.2. (2) PCR cible de l'ancre	2
2.3. (D) dilué amorces	2
2.4. (D) coulé gel	3
3. 2016-01-13 Mercredi	4
3.1. (2) PCR cible des ancrs	4
3.2. (3) PCR cible des gènes synthétiques	4
4. 2016-01-14 Jeudi	5
4.1. (3) PCR des trois clones récalcitrants	5
4.2. (1) Contrôle des extractions plasmidiques	5
4.3. (D) maintenance	5
5. 2016-01-15 Vendredi	6
5.1. (1) Extractions plasmidiques	6
5.2. (A) Analyses	6
6. 2016-01-18 Lundi	7
6.1. (1) Constructions In-Fusion	7
6.2. (2) PCR pW2 avant séquençage	7
6.3. (2) Envoi ancrs séquençage.	7
6.4. (3) Envoi produits PCR séquençage.	7
6.5. (D) Aliquoté amorces	7
7. 2016-01-19 Mardi	8
7.1. (1) PCR cible GS	8
7.2. (1) Couler boîtes Amp75 XGal IPTG	8
8. 2016-01-20 Mercredi	9
8.1. (1) PCR cible GS	9
8.2. (1) Purification des fragments PCR amplifiés	9
8.3. (1) Ligature dans pGEM-T	9
8.4. (1) Transformation dans <i>E.coli</i> TOP10	9
8.5. (2) et (3) envoi au séquençage	9
8.6. (D) coulé boîtes amp-xgal-iptg	9
9. 2016-01-21 Jeudi	10
9.1. (1) Contrôle des clonages	10
9.2. (1) Relance des clonages	10
9.3. (2) et (3) accusé réception séquençage	10

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 :

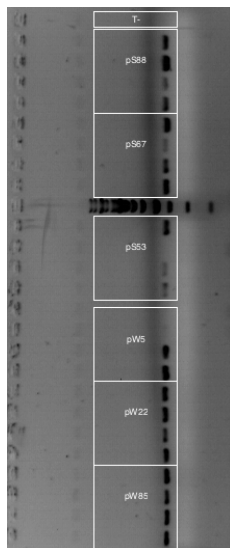


FIGURE 1 – Ladder un peu chargé. Attention au volume. Colonies 3 et 4 de pW5 et 3 de pS53 n'ont pas amplifié. Témoin positif migration sur le gel de [2016-01-12 Tue 16 :05].

- ☐ 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.

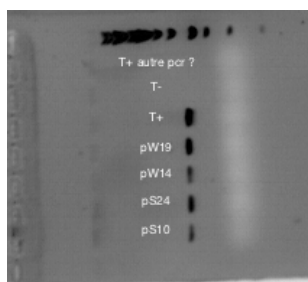


FIGURE 2 – Le contrôle de la PCR cible de l'ancre 100% homologue. Le témoin positif de la PCR d'hier est censé être là également.

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.

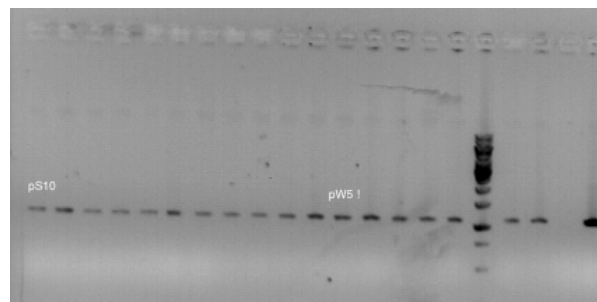


FIGURE 3 – La PCR cible des ancrs semble avoir fonctionné de partout. Dans l'ordre, de pS10 à pS88, puis pW14 à pW93, T- et T+. Le T- est clean, le T+ trop fort. Penser à moins déposer pour le T+.

candidats

pW53 – pW54 – pS533

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.

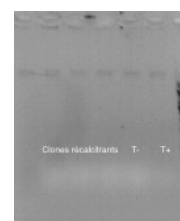


FIGURE 4 – Rien à l'horizon. Ladder tordu, puisque gel qui se tortille dans la cuve... Bien fait pour moi.

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

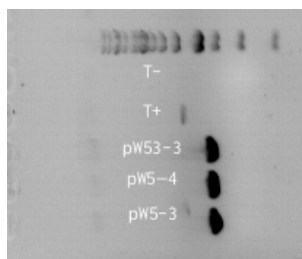


FIGURE 5 – Les trois clones ont bien amplifié. Le T+ a toujours le même soucis, je suis pourtant parti d'un nouvel ADN génomique d'Acineto.

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.

5 2016-01-15 Vendredi

5.1 (1) Extractions plasmidiques

Extractions

Vu les dosages nanodrop des extractions précédentes, je refais l'extraction sur une culture liquide fraîche. Culotté 5mL et suivi le protocole standard. Éluion en deux étapes ($2 \times 15\mu\text{L}$), incubation 3min à °C ambiante. Les tubes sont appelés WS et SW, [2016-01-15 Fri].

Contrôle

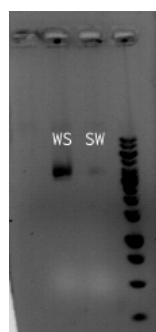


FIGURE 6 – Le plasmide WS semble bon, il ne smirre pas trop. Le plasmide SW est à refaire.

NanoDrop

dosage (ng/ μL)	
WS	25.2
	25.8
SW	6.7
	5.9
	9.1
	5.0
	nul quoi. 0

5.2 (A) Analyses

Avancé sur les alignements polySNP, sur l'extraction des données comme vu avec Laurent hier [2016-01-14 Thu].

6.1 (1) Constructions In-Fusion

On veut mettre au point une méthode de clonage par PCR qui permettrait d'accoler les fragments GS (gène synthétique) avec aphA3 (kanamycine) et l'ancre.

Les kits In-Fusion permettent de concevoir ça in-silico.

Le vecteur utilisé est le plasmide pGEMT-T. Il est ouvert par digestion SpeI. Il faut absence de site de restriction SpeI dans le GS. C'est le cas. Vérifié le <2016-01-18 Mon 08:54>.

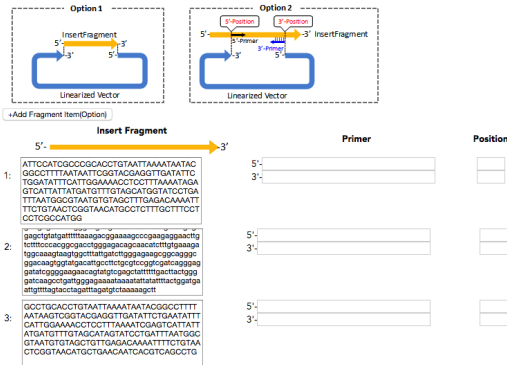


FIGURE 7 – Fragment 1 : le Gene Synthétique. Fragment 2 : le gène aphA-3. Fragment 2 : le gène ancre.

6.2 (2) PCR pW2 avant séquençage

L'isolât pW2 n'a pas été amplifié, confondu les tubes (voir figure 3). On refait la PCR cible ancre sur cet isolat là.

programme PCR

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

volumes

	1-tube	4-tubes
ADN	0.5	2.
Taq	0.5	2.
amorce 1410	2.5	10.
amorce 1411	2.5	10.
MgCl2	1.5	6.
dNTPs	5.0	20.
Tampon 10X Taq	5.0	20.
eau qsp 50µL	32.5	130.

6.3 (2) Envoi ancrs séquençage.

Les produits PCR du [2016-01-13 Wed] sont envoyés à séquençer. But : séquençer les ancrs des clones qui montrent des néomutations.

6.4 (3) Envoi produits PCR séquençage.

Les produits PCR du [2016-01-12 Tue] sont envoyés à séquençer. But : séquençer les gènes synthétiques de certains candidats qui montrent des polymorphismes assez marqués.

6.5 (D) Aliquoté amorces

Aliquoté 3x 100µL des amorces amorces 1073 1392 1411 1410 en diluant au 10⁶.

7.1 (1) PCR cible GS

But : insérer les gènes synthétiques alternants dans pGEM-T, après une PCR A sortant.

Programme PCR :

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

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

Problème : pas le bon couple d'amorce. 1073 est une amorce spécifique *Acineto*. Le couple d'amorce nécessaire est le couple 1392 1393. La PCR est refaite demain <2016-01-20 Wéd 07 :00>.

contrôle

Comme attendu, pas de bandes. En plus la PCR est un peu sale. Penser à changer l'eau.

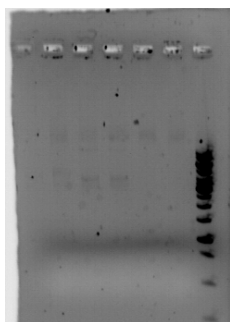


FIGURE 8 –

7.2 (1) Couler boîtes Amp75 XGal IPTG

Ces boîtes servent à sélectionner les transformants qui possèdent le gène synthétique dans le site de clonage. La disruption du gène de la β -gal par l'insertion donne des colonies blanches résistantes à l'ampicilline.

Couler 10 boîtes de LBm aux concentrations :

	\square	V ₀
Xgal	60μg/mL	115 μL
IPTG	40μg/mL	0.5 mL
Amp75	75μg/mL	0.25mL

8.1 (1) PCR cible GS

Le but est d'amplifier les fragments synthétiques, dans l'idée de les insérer après purification dans le plasmide pGEM-T. La PCR donne des A sortants, ligaturés dans les T sortant du plasmide pGEM-T.

Programme PCR :

D'après le cahier de Florence, daté du [2015-05-15 Fri], page 120.

Temps	température	30 cycles
3'	94	
50"	94	x
50"	60	x
45"	72	x
4'	72	

Volumes :

	1-tube	7-tubes
ADN	0.5	3.5
Taq	0.5	3.5
amorce 1392	2.5	17.5
amorce 1393	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

Le T+ utilisé est un plasmide pGEM-T porteur de la construction Weak, synthétisé par Florence.

contrôle

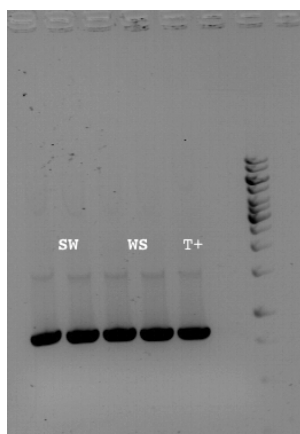


FIGURE 9 – Contrôle de la PCR 1392-1393. Le témoin positif est un pGEM-T de Florence porteur de la construction Weak.

Tout est good. On peut lancer la purification, et éluer dans un bon volume de 25μL.

8.2 (1) Purification des fragments PCR amplifiés

Les fragments PCR sont purifiés par le protocole nucleospin_{pcr purification.pdf}, p. 17.

Les deux produits de PCR SW et WS sont poolés avant d'être mélangé au tampon de charge de l'étape 1. L'éthanol à l'étape 4 est laissé à évaporer pendant 5min à 60°C, colonne ouverte dans le bloc chauffant. L'ADN est élué par un volume de 25μL par de l'eau UP chauffée préalablement à 60°C.

Contrôle

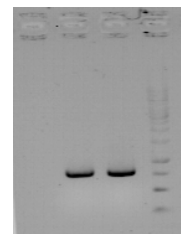


FIGURE 10 – Contrôle de la purification des produits PCR. Les deux purifications semblent avoir fonctionné comme il faut. 2μL sont chargés. 3μL de ladder ne suffisent pas. Il faut homogénéiser le ladder et charger plus.

8.3 (1) Ligature dans pGEM-T

Le plasmide pGEM-T de Promega est un plasmide conçu pour avoir des extrémités franches porteuses de bases T. Il est maintenu ouvert dans son tampon, conservé à -20°C.

Le but est de ligaturer les fragments PCR obtenus et purifiés avec le pGEM-T, puis de transformer des cellules compétentes *E.coli* par choc chaud-froid.

Le protocole utilisé est le protocole promega pGEM-T (pas pGEM-T easy). Lien pour le short-manual : [promega_{pgem-t}short-manual.pdf](#), p. 1. Lien pour le protocole complet : [promega_{pgem-t}.pdf](#), p. 5.

8.4 (1) Transformation dans *E.coli* TOP10

Les produits de ligature sont utilisés pour transformer des *E.coli* TOP10 thermocompétentes à la transformation. Le reste des produits de ligature est placé au 4°C sur la nuit, pour favoriser l'apparition de transformants, en cas de soucis.

Les transformants sont placés dans 300μL de milieu SOC, qui sont en étalés en 3 × 100μL sur les boîtes Amp75 XGal IPTG coulées hier [2016-01-19 Tue].

Les boîtes sont incubées 24H à 37°C.

8.5 (2) et (3) envoi au séquençage

Les tubes à envoyer à séquencer, contenant les produits PCR cibles des gènes synthétiques des clones présentant des polymorphismes et des ancres des clones présentant des néomutations ont été envoyés à séquencer par David aujourd'hui [2016-01-21 Thu].

8.6 (D) coulée boîtes amp-xgal-iptg

Coulée 10 boîtes ampicilline 75, Xgal IPTG, placées en chambre froide.

9 2016-01-21 Jeudi

9.1 (1) Contrôle des clonages

Pas de culture. Aucun clone, ni bleu ni blanc. Thibault pense à un soucis avec les cellules. Il pense aussi à la Taq ozyme, qui pourrait ne pas introduire de A sortant. Mais dans ce cas, on aurait quand même des cellules bleues. Le clonage de Raphaël ne fonctionne pas mieux. Le plus étonnant est qu'il n'y ait pas plus de colonies bleues. Même si le clonage n'avait pas fonctionné, on aurait quand même des cellules bleues.

9.2 (1) Relance des clonages

Les cellules qu'on avait utilisé hier sont périmées depuis septembre 2011. Ce qui est très chiant. On refait donc le clonage avec le restant de produit de ligature, conservé au 4°C depuis hier, en utilisant d'autres cellules, qui périssent en 2017.

On utilise le kit de clonage TOP10. Voir description des protocoles ici : [invitrogen_{one}-shot-top10.pdf](#), p. 8.

Les transformants sont placés dans 300µL de milieu SOC, qui sont en étalés en 3 × 100µL sur les boîtes Amp^r XGal IPTG coulées hier [2016-01-20 *Wed*].

Les boîtes sont incubées 24H à 37°C.

9.3 (2) et (3) accusé réception séquençage

GENOSCREEN : Réception des échantillons envoyés le 20/01/2016

Genoscreen a reçu les échantillons.

10.1 (1) Contrôle des clonages

Ajouté le [2016-01-22 Fri 07 :43]

Beaucoup de colonies blanches et quelques colonies bleues. Le clonage d'hier semble avoir fonctionné. On veut désormais repiquer les colonies blanches, potentiellement transformantes, sur une autre boîte LBm Amp^r Xgal IPTG, 1) pour confirmer leur phénotype, et 2) pour lancer des PCR de confirmations d'insertion du fragment demain [2016-01-23 Sat].