

Contents

I	Construction des recombinants <i>Acinetobacter</i>	1
I.A	Resuspension des 5µg de gène synthétique	1
I.B	Transformation dans <i>E.coli</i>	1
I.C	Extractions plasmidiques	1
II	Séquençage des ancrs	2
II.A	Sélection des candidats	2
III	Séquençage des clones avec des positions polymorphes	2

I Construction des recombinants *Acinetobacter*

I.A Resuspension des 5µg de gène synthétique

Les gènes synthétiques ont été reçus lyophilisés, à 5 ng mL⁻¹. Ils sont resuspendus dans 25 µL, à la concentration de 200 ng mL⁻¹. Les tubes sont aux positions A2 et A3 dans le soucier au -20°C.

¹ [2016-01-05 Tue]

I.B Transformation dans *E.coli*

On utilise le kit TOPO-TA, Invitrogen² (voir le *quick reference guide*). Deux tubes de cellules d'*E.coli* naturellement compétentes sont sorties du -80°C et placés dans la glace. Ils sont marqués SW et WS, selon le gène alternant. 2 µL d'ADN de la solution de gène synthétique à 200 ng mol⁻¹ (soit 0.2ng d'ADN) sont ajoutés, et laissés dans la glace 30' puis 30'' à 42°C. 250µL de milieu SOC sont ajoutés. La suspension est incubée 1h à 37°C sous agitation.

² [2016-01-05 Tue]

100 nmol de chaque suspension sont étalés sur un milieu LBA+kanamycine. Les milieux sont incubés 24h à 37°C.

Les clones transformants sont isolés sur LBA + kanamycine³. Les milieux sont incubés 24h à 37°C.

³ [2016-01-06 Wed]

Une colonie isolée de chaque plasmide SW et WS est suspendue dans 5mL de LB liquide + kanamycine, incubée 24h à 37°C⁴.

⁴ [2016-01-07 Thu]

1mL est prélevé pour les extractions plasmidiques⁴, les 4 autres sont culottés, re-suspendus dans 1mL et placé en cryotubes⁵.

⁵ Annotation : WS *E.coli* TOPO 08-01 et SW *E.coli* TOPO 08-01

I.C Extractions plasmidiques

Les extractions plasmidiques sont faites avec le kit *NucleoSpin Plasmid*.

II Séquençage des ancres

Dans certaines séquences issues des résultats de Florence, on observe un taux de mutation anormalement élevé au sein de la tract de conversion. Des mutations à des positions de SNP inattendues sont apparues, indépendamment dans chaque séquence. Ça n'est donc pas dû à une mutation dans le plasmide : on n'a pas de mutation systématique. Pour vérifier que ce phénomène soit bien dû à la conversion, on séquence les ancres 100% homologues. L'hypothèse est que le taux de mutation dans la tract de conversion est supérieur à celui dans l'ancre.

Dans le cas où le taux de mutation dans l'ancre ne serait pas significativement supérieur à celui dans la tract de conversion (hypothèse nulle), il faudrait chercher une autre explication à cette augmentation du taux de mutation due à la recombinaison.

II.A Sélection des candidats

On sélectionne donc tous les candidats qui présentent des néo-mutations, d'après l'analyse des données de SNP calling.

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

III Séquençage des clones avec des positions polymorphes

Certains SNP dans les populations séquencées montrent des positions hétérozygotes. Autrement dit, certains individus semblent avoir réparé à cette position de SNP par un W, d'autre par un S. On a donc choisi de repiquer la génération dont les séquences sont issues.

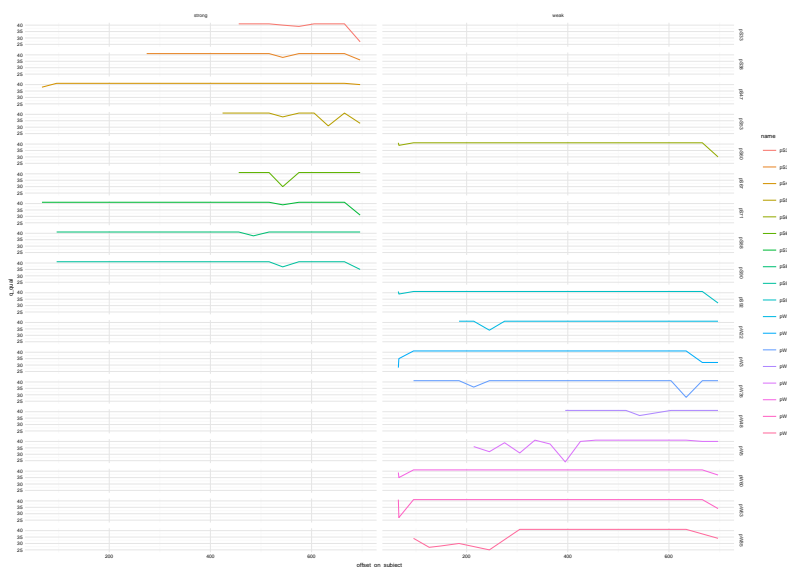


Figure 1: Chaque ligne représente les variations de la qualité du base calling aux positions de SNP attendues, en fonction de la position sur le gène. Les clones représentés sont ceux qui montrent des diminutions de la qualité aux positions attendues. Les clones pW5, pW22, pW85 et pS53, pS67, pS88 ont été choisis pour le séquençage.

3 transformants W et 3 transformants S montrant des positions hétérozygotes sont choisis et repiqués sur milieu LBA + kanamycine. Dans l'hypothèse où ce serait dû à une absence de réparation, 50% des clones de la génération suivante devraient avoir l'allèle W, et 50% l'allèle S.

La séquence du locus d'intérêt est amplifiée par PCR sur colonie. Pour chaque transformant initial, 4 isolats sont amplifiés, pour un total de 24 séquences.