

Fitness test

Test : le fitness test est un essai de compétition pour les nutriments entre une souche de type sauvage et une souche mutée pour notre gène de prédilection. Les deux souches sont mises à proportion égale dans le même erlenmeyer, suite à des dilutions successives, nous regardons qui a pris le dessus sur l'autre après 50 générations. Celle qui sera la plus en forme ou en santé prendra le dessus sur l'autre.

Z:\Julie Parenteau\0 Intron deletion project\Fitness\template_fitness2.xls

1. Strier à partir des stocks congelés, les souches* à tester et incuber au moins 2 jours à 30°C. Les souches doivent être les plus fraîches possibles pour cette expérience.
- * Le génotype des souches est très important. Si la souche à tester est de type Mat a, il faut aussi que la souche WT soit de type Mat a, car sinon les deux souches vont conjuguer et nous obtiendrons des souches diploïdes. Pour distinguer les deux souches entre elles, l'une (souche mutée) doit être **ADE2+** et l'autre (souche WT) doit être **ade2-**. Ainsi la souche mutante sera blanche et la souche WT sera rouge sur un milieu contenant peu d'adénine comme les pétris Yc complete.
2. Partir des cultures liquides de la souche WT et des souches à tester dans 10 ml de YEPD (ou Yc sans l'acide aminé de votre choix si les souches contiennent un plasmide) et incuber o/n à 30°C.
3. Prendre la DO₆₆₀ (dilution 1/10) et diluer les cellules à 1×10^6 cellules/ml dans 10 ml et incuber au moins 5h à 30°C. Utiliser le lien hypertexte pour les calculs.
Prévoir une culture de WT pour 3 souches à tester. Par exemple, si on a 8 souches à tester, on doit faire 3 cultures 10 ml de notre souche WT.
4. Prendre la DO₆₆₀ (dilution 1/10); la DO minimum pour les cultures WT doit être de 0.035 (DO diluée), si les cultures ne sont pas assez poussées, laisser à 30°C pour une autre heure.
5. Mélanger 650 000 cellules/ml de la souche WT et mutée ensemble dans 25 ml total de YEPD (ou autre milieu) dans un erlenmeyer de 250ml et incuber 20h à 30°C avec agitation. **Pour connaître la quantité de chaque souche au t₀, faire des dilutions en série en tubes eppendorf ou en plaque pour pouvoir étendre sur Yc complete 100 et 150 cellules et incuber 3 à 4 jours à 30°C.** (10^6 - 10^5 - 10^4 - 10^3 cellules/ml et étendre 100 et 150µl de cette dernière dilution).

6. Prendre la DO_{660} (dilution 1/10), diluer à 650 000 cellules/ml dans 25 ml de YEPD (ou autre milieu) dans un erlenmeyer de 250ml et incuber 24h à 30°C avec agitation.
7. Faire des dilutions successives 1fois/jour comme dans l'étape 6 jusqu'à ce que les cellules aient fait au moins 50 générations.
8. **Pour connaître la quantité de chaque souche au t_{50} , faire des dilutions en série en tubes eppendorf ou en plaque pour pouvoir étendre sur Yc complete 100 et 150 cellules et incuber 3 à 4 jours à 30°C.** (10^7 - 10^6 - 10^5 - 10^4 - 10^3 cellules/ml et étendre 100 et 150 μ l de cette dernière dilution).