

Coloration de levures avec le colorant FUN-I

But : Cette coloration permet de différencier les cellules vivantes des cellules mortes par une différence de couleur due à la métabolisation ou à la non-métabolisation du colorant.

Matériel :

- solution GH
- colorant FUN-I
- calcofluor

Solution GH : **100 ml**

2% D(+)Glucose	10 ml	from 20%
10 mM Na-HEPES pH 7.2	1 ml	from 1 M
H ₂ O 0.2 µM filtrée	89 ml	

Remarques :

Faire une solution stock 200 µM de FUN-I dans du solution GH à partir d'une solution stock FUN-I de 10 mM dans du DMSO.

FUN-I solution stock 10 mM in DMSO:

$$100 \mu\text{l} \times 200 \mu\text{M} \leftrightarrow 2 \mu\text{l} \times 10 \text{ mM}$$

Prendre ensuite cette solution de 200 µM pour faire les concentrations finales pour l'optimisation de la coloration.

FUN-I solution stock 200 µM in GH solution:

$$2 \mu\text{l} \text{ de } 10 \text{ mM} + 98 \mu\text{l} \text{ de solution GH.}$$

FUN-I 5 µM : 25 µl de 200 µl dans 1 ml final de GH sln.

FUN-I 10 µM : 50 µl de 200 µl dans 1 ml final de GH sln.

FUN-I 15 µM : 75 µl de 200 µl dans 1 ml final de GH sln.

FUN-I 20 µM : 100 µl de 200 µl dans 1 ml final de GH sln.

Calcofluor 25 µM : 5 µl d'une solution 5 mM dans 1 ml final.

Coloration de levures avec le colorant FUN-I

Méthode :

1. Faire pousser des cellules en phase logarithmique tardive dans un milieu approprié ($OD_{600} \sim 0.8$ et 1.0 , 10^6 - 10^7 cellules)
2. Ajouter $50 \mu\text{l}$ de culture dans 1 ml de solution GH. Spin 5 min à $10\,000g$.
3. Enlever le surnageant et resuspendre le culot dans 1 ml de solution GH.
4. Combiner 10^6 - 10^7 cellules/ml avec les colorants aux concentrations finales suivantes:
 - FUN-I 5 à $20 \mu\text{M}$ (dans la solution GH)
 - Calcofluor $25 \mu\text{M}$ (dans la solution GH)
5. Mixer et incuber à 26 ou $30 \text{ }^\circ\text{C}$ dans le noir pour 30 min .
6. Mettre $5 \mu\text{l}$ sur une lame et observer.