

PROTOCOLE DE CONGELATION A L'AZOTE LIQUIDE

1) La veille du jour J, préparer la boîte Nalgène

Mettre 250 ml d'isopropanol dans la boîte et la mettre à 4°C (chambre froide)

1) The day before D day, prepare the Nalgene box

Put 250 ml of isopropanol in the box and put the box in the cold room or cold box at 4 C.

2) Le jour J : préparation des cellules à congeler : une culture A pour chaque souche

(quantité pour 9 tubes de congélation d'une souche).

- Préparer des cellules *en bon état physiologique* (2 stries sur une boîte de TAP)
- Le jour J, resuspendre à forte concentration (beau vert, environ 10^7 / ml) les cellules dans 10 ml de TAP (préculture A).
- Laisser agiter 30 min ou plus pour que les cellules soient bien dissociées.
- Estimer la concentration cellulaire par comptage à la cellule Mallassez
- Diluer pour obtenir 10 ml de cultures à 6.10^6 cel / ml dans du TAP = culture A.
- Laisser en agitation ces cultures le temps de préparation de la solution B.

2) On D day : Prepare the cells that you want to freeze : one Culture A per strain

(The quantity for 9 frozen tubes for each strain is given)

- Prepare the cells in a good physiological state 2 streaks per TAP plate. The streaks can be 4 days old, fat and happy cells.
- On D day, resuspend to a high concentration (nice green, about 10^7 per ml) in 10 ml of TAP (this is preculture A)
- Shake 30 min or more so that cells are not aggregated or clumpy and well-dissociated.
- Count cells and calculate the concentration
- Dilute to obtain 10 ml of culture at 6×10^6 per ml in TAP = this is culture A
- Leave Culture A shaking while you are preparing Solution B

3) Préparation de la solution de méthanol : Solution B :

(quantité pour 18 tubes de congélation correspondant au nombre de place dans une boîte Nalgène)

- Préparer 15 ml de TAP avec 10% de méthanol
- Filtrer avec un embout Millipore 4 μ
- Distribuer 750 μ l de solution B dans 18 cryotubes stériles de 2 ml

3) Preparation of the solution of methanol : Solution B

(quantity is for 18 frozen tubes, which corresponds to the number of spaces in the Nalgene box)

- Prepare 15 ml of TAP with 10% methanol
- Sterile filter using 4 micron filter
- Distribute 750 μ l solution B in 18 sterile 2 ml cryotubes

4) Mélange des cultures A et de la solution B sous la hotte en très faible lumière

- Indiquer sur les cryotubes la référence de la souche et la date
- Reprendre la boîte Nalgène refroidie et vérifier qu'aucune projection d'isopropanol n'a touché le portoir intérieur

Mélange A + B : transférer 750 µl de la culture A dans un tube en maintenant le tube caché au creux de la main, renverser le tube 2 fois (gentil shaker)

4) Mix of cultures A with solution B in a sterile hood under dim light

- Label the cryotube with strain name, date, etc.
- Take Nalgene box from cold and make sure that isopropanol has not touched in the interior compartment.

Mix A and B : transfer 750 ul of culture A in a tube from step 3 while holding it in the curved palm of your hand, invert the tube 2 times gently.

5) Première congélation à – 80°C durant 1h 30

Aller placer la boîte Nalgène dans un congélateur à – 80°C, attendre 1h 30

5) First freezing to –80 C for 1h 30 min

Put the box in a –80 C freezer, wait 1 h 30 min

6) Deuxième congélation à – 170°C dans l’azote (Sandrine)

6) Second freezing at liquid nitrogen temperature. This has to be done quickly. That is, don’t allow samples from Step 5 to thaw.

The best way to do this is to take the square box that you are using for liquid nitrogen storage and put it in a styrofoam tub with liquid nitrogen. Remove the tubes from the Nalgene box and put the tubes into the long term storage plastic box in the styrofoam container. Make sure that the size of the tubes is compatible with quick removal from one box and placement into the other.

Immediately put the box into the liquid nitrogen tank.

6) Décongélation de contrôle et coloration au bleu Evans

Un à deux jours (ou plus !) après le jour de congélation, décongeler un tube suivant le protocole présenté ci-après afin de vérifier la survie et la stérilité.

7) Thawing and Evans Blue staining

After one or two days (or more !) after the day of freezing, thaw the tubes following the instructions on the next page after checking the survival and sterility.

PROTOCOLE DE DECONGELATION

1) Récupérer un cryotube : Sandrine

2) Réchauffement au bain-marie

Dans la pièce BM 232 qui possède à la fois la centri de paillasse, le bain-marie et la hotte à flux laminaire nécessaires.

- Régler un bain-marie à 35°C
- Placer les tubes dans un portoir en polystyrène. Placer le tout dans le bain marie durant **5 min. en mettant un chiffon noir dessus.**
- Sortir les tubes, les essuyer en plaçant le portoir sur un sopalin.

3) Elimination du TAP/méthanol

- Transférer sous la hotte non éclairée les solutions dans des tubes Eppendorff de 2 ml avec une pipette Pasteur stérile.
- Centrifuger **10 min à vitesse lente** les tubes Eppendorff dans une centri de paillasse réglée à 0,2 ref (ou 1,5 rpm)
- Eliminer le surnageant (attention, le culot est peu collant). Ajouter 1,5 ml de TAP et agiter doucement.
- Transférer avec une pipette Pasteur les 1,5 ml dans un petit tube stérile en verre.

4) Coloration au bleu Evans

- Mélanger les 200 µl de cellules décongeler et 200 µl de la solution de bleu Evans (0,1 %) dans des petits tubes en verre non stériles.
- Observer les cellules (sans traitement à l'alcool iodé) dans un hématimètre Mallassez au microscope en contraste de phase. S'exercer à reconnaître les cellules en bon état physiologique : elles peuvent nager, elles ne se colorent pas et restent bien vertes et lumineuses, alors que les cellules abîmées sont colorées en bleu et sont plus ternes avec des formes moins régulières.
- Compter le pourcentage des cellules vertes lumineuses.
- Observation éventuelle le lendemain de la reprise des divisions. On peut aussi faire des gouttes sur une boîte de TAP ou suivre le verdissement du tube. C'est loupé si aucun culot vert n'apparaît sous 15 jours

5) Récupération d'une souche

- Laisser 24h le tube sans agitation
- Plusieurs solutions sont possibles : faire des gouttes sur une boîte de TAP ou diluer dans 10 ml de TAP ; on peut aussi cloner, mais dans ce cas il est souhaitable de contrôler le clone qui sera prélevé pour son phénotype ou bien de reconstituer la souche avec 8 clones pour éviter une dérive sur des caractères non testés indésirables.

Tests de décongélation de Jacqueline

souches	% survie
WT 69 -	16%
CC 621 -	70%
WT.S3 -	5,8%
WT.S1 +	≤ 1%
WT S1 + (gamètes)	21%
WT S3 – (gamètes)	14%
WT 11 (8) +	4,9%
WT A1 -	13,2%
t21.32 – (cyt-)	9%*
F54.7 – (atpase-)	24%
F34.3 + (PSII-)	20%
F15.5 + (PSI-)	45,7%
Fud47.1 + (PSII-)	34,4%
Fud47.2 + (PSII-)	38,9%
139.10 + (cyt-)	57,7%

Tests de décongélation de Sandrine

SOUCHES	% SURVIE
WTS11+	31.5%
WTS14-	29%
WTS11+ (2ième passage)	27.5%
WTS14- (2ième passage)	28%
WT59+	19%
WT69-	19%
WT11+	40%
WT12-	63%
WT11.8+	20%
Fud7.12+ (PSII)	39%
Fud7.2+ (PSII)	38.5%
Arg2.9+	54%
Arg2.31-	51%
Arg2.93-	53%
Arg2.94+	33%