

May 17, 2020

## Quantification de la callose dans les filaments de *P. patens* par microscopie confocale

DOI

[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bghejt3e](https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bghejt3e)

Yoan Coudert<sup>1</sup>, Arthur Muller<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ecole Normale Supérieure de Lyon



Yoan Coudert

Ecole Normale Supérieure de Lyon

### Create & collaborate more with a free account

Edit and publish protocols, collaborate in communities, share insights through comments, and track progress with run records.

[Create free account](#)

OPEN  ACCESS



DOI: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bghejt3e>

**Protocol Citation:** Yoan Coudert, Arthur Muller 2020. Quantification de la callose dans les filaments de *P. patens* par microscopie confocale. **protocols.io** <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bghejt3e>

**License:** This is an open access protocol distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

**Protocol status:** Working

We use this protocol and it's working

---

**Created:** May 17, 2020

**Last Modified:** May 17, 2020

**Protocol Integer ID:** 37126

**Keywords:** par microscopie confocale, filament, la callose dan

## Troubleshooting

### Before start

Protocole pour microscope Leica TCS SP8

## Culture

- 1 Faire une culture de colonie sur milieu BCD (AT) pendant 15 jours en boîte carrée (10 × 10 cm)

## Aniline blue staining

- 2 Préparer la solution de travail en diluant la solution stock d'aniline bleu 1:3 (v :v) dans du tampon phosphate pH 8,5
- 3 Remplir les puits d'une plaque 48 puits avec 200µL de la solution de travail d'aniline bleu
- 4 Prélever une petite quantité de protonema à la périphérie des colonies et la placer dans les puits de la plaque 48-puits
- 5 Laisser les tissus dans la solution d'aniline bleu 30 minutes à 23°C et à l'obscurité
- 6 Rincer les échantillons à l'eau
- 7 Placer les échantillons sur lame dans une d'iodure de propidium puis déposer une lamelle

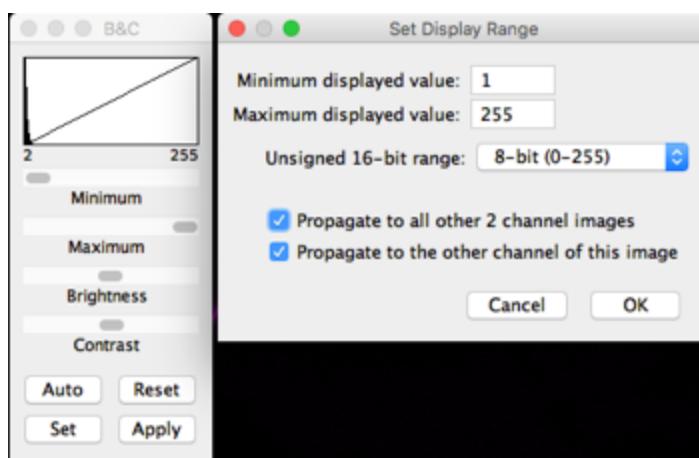
## Confocal imaging

- 8 Vérifier l'échantillon à la binoculaire
- 9 Régler les paramètres du microscope cf *Paramétrage du microscope Leica TCS SP8*
- 10 Localiser l'échantillon sur la lame au grossissement x 5 (air)
- 11 Observer l'ensemble de l'échantillon au grossissement x 25 puis x 40 (eau)

- 12 Définir le nombre de tiles et leurs espacements pour l'acquisition d'images cf *Paramétrage du microscope Leica TCS SP8*
- 13 Faire acquisition de la paroi entre la cellule apicale et la cellule sub-apicale (50 réplicats biologiques)
- 14 A partir des z-stack utiliser la fonction projection maximale pour obtenir l'image finale
- 15 Sauvegarder fréquemment le projet

## Traitement des images avec Fiji software

- 16 Dupliquer les images (raccourci commande + maj + D)
- 17 Changer le contraste pour toutes les images Image>Adjust>Contrast>Set
- 18 Mettre Minimum displayed value : 0 et maximum displayed value : 4095 en 12 bit



- 19 Appliquer les fausses couleurs : Image>Lookup tables>Fire

- 20 Ouvrir le ROI T1 (modèle 360  $\mu\text{m}^2$ ) dans le gestionnaire de ROI : analyze>tools>ROI manager
- 21 Déplacer la ROI dans un coin où il n'y a pas de signal et mesurer la somme de l'intensité des pixels de la ROI = signal bruit de fond :  
analyze>set measurements>cocher integrated density  
analyze>measure (cntrl + m)  
RawIntDens

| Results |         |        |      |          |        |            |
|---------|---------|--------|------|----------|--------|------------|
|         | Area    | Mean   | Mode | IntDen   | Median | RawIntDen  |
| 1       | 509.918 | 11.458 | 3    | 5842.671 | 6      | 113114.000 |

- 22 Positionner la ROI au niveau de la paroi entre la cellule apical et sub-apical et mesurer la somme de l'intensité des pixels de la ROI = signal callose brut
- 23 Signal callose brut – signal bruit de fond = signal callose
- 24 Procéder de la même façon pour tous les échantillons
- 25 Enregistrer les données dans un tableau excel

## Analyses statistiques

- 26 Dans un premier temps pour visualiser les données faire un box plot avec les différentes conditions traités

## Paramétrage du microscope LEICA TCS SP8

### 27 Lasers

|  | Type laser                      | %   |
|--|---------------------------------|-----|
|  | Laser diode UV 405 nm (callose) | 10% |

|  |                           |          |
|--|---------------------------|----------|
|  | Laser visible 488 nm (PI) | 9% à 15% |
|--|---------------------------|----------|

## Détecteurs

| Détecteur | Observation           | Gain | Offset     | Intervalle nm |
|-----------|-----------------------|------|------------|---------------|
| PMT 2     | callose               | 670  | 0,1%       | 440-520 nm    |
| PMT4      | autofluo chloroplaste | 550  | 0,1%       | 600-720 nm    |
| PI        |                       |      | 560-615 nm |               |

## Stack

- Nombre de tiles : 30
- Espacement entre les tiles : 0,70

## Autres

- Grossissement : x 40
- Zoom : 1,5
- Pinhole airy : 1
- Frame average : 8
- Scan speed : 8 000 hz
- Définition de l'image : 1024×1024
- Bit : 12

## Aniline blue

$\lambda_{\text{ex}}$  390 nm

$\lambda_{\text{em}}$  480 nm

## PI

$\lambda_{\text{ex}}$  493 nm

$\lambda_{\text{em}}$  636 nm