



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

Yoan Coudert¹, Arthur Muller¹

¹Ecole Normale Supérieure de Lyon



Yoan Coudert

Ecole Normale Supérieure de Lyon

OPEN  ACCESS



DOI: 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

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

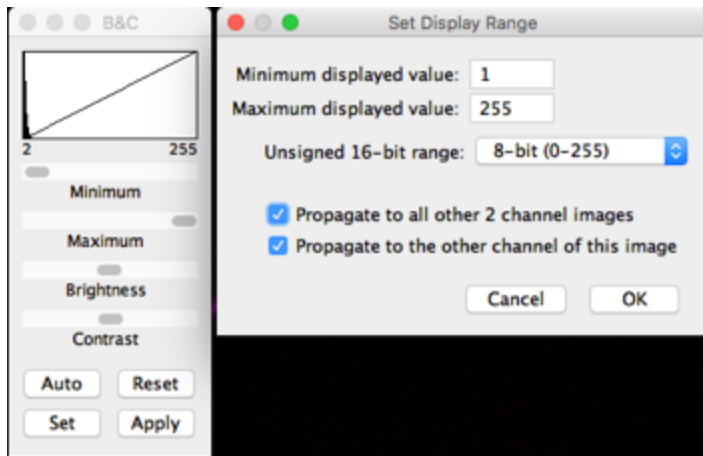
Confocal imaging

- 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

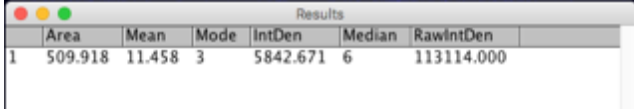
Traitement des images avec Fiji software

- 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

- 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 tableur 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 λ_{ex} 390 nm λ_{em} 480 nm**PI** λ_{ex} 493 nm λ_{em} 636 nm