

- **Milieu YPglu (milieu riche de base) :**

Bacto peptone Difco	10 g	
Bacto yeast extract Difco	10 g	
Glucose	20 g	
H ₂ O	qsp 1 litre	----> autoclaver

- **Milieu YPglu-G418 (sélection Geneticin) :**

Après autoclavage, quand la température du milieu est <60°C, on ajoute à 1 litre de milieu YPglu 2 ml d'une solution de G418 à 100 mg/ml.

Pour la sélection après transformation, il faut étaler les cellules sur milieu YPglu puis après une nuit à 30°C, répliquer ces boîtes sur milieu YPglu-G418 (50 µl/boîte).

- **Milieu YPglu-Nat (sélection nourseothricin) :**

Après autoclavage, quand la température du milieu est <60°C, on ajoute à 1 litre de milieu YPglu 150 µl d'une solution de Nat à 200 mg/ml (7,5 µl/boîte).

- **Milieu contenant de la doxycycline :**

Après autoclavage, quand la température du milieu est <60°C, on ajoute à 1 litre de milieu YPglu 10 ml d'une solution de doxycycline à 10 mg/10 ml.

- **Milieu YPgly (sélection des cellules respirant) :**

Bacto peptone Difco	10 g	
Bacto yeast extract Difco	10 g	
Glycérol	20 ml	
H ₂ O	qsp 1 litre	----> autoclaver

- **Milieu W0 (milieu sélectif pour des cellules prototrophes) :**

Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids	6,7 g	
Glucose	20 g	
H ₂ O	qsp 1 litre	----> autoclaver

Supplément au milieu minimum pour les cellules non prototrophes : ajouter 250 µl par boîte de 25 ml de solution stock 100 X (seuls sont indiqués ici les acides aminés et les bases correspondant aux mutations d'auxotrophie les plus fréquentes) :

adenine	2 mg/ ml dans 50 mM HCl
uracile	2 mg/ ml dans 0,5% (p/vol) NaHCO ₃
L-arginine	1 mg/ ml dans H ₂ O
L-histidine	1 mg/ ml dans H ₂ O
L-isoleucine	6 mg/ ml dans H ₂ O
L-leucine	6 mg/ ml dans H ₂ O
L-lysine-HCl	1 mg/ ml dans H ₂ O
L-méthionine	1 mg/ ml dans H ₂ O
L-phenylalanine	2 mg/ ml dans H ₂ O
L-tryptophane	2 mg/ ml dans H ₂ O
L-tyrosine	1 mg/ ml dans 50 mM HCl
L-valine	2 mg/ ml dans H ₂ O

- **Milieu de stockage pour les levures :**

Bacto peptone Difco	10 g	
Bacto yeast extract Difco	10 g	
Glucose	20 g	
Glycérol	250 ml	
H ₂ O	qsp 1 litre	----> autoclaver

Pour le stockage de souches de levure, on ajoute à une culture en phase stationnaire du milieu de stockage (vol/vol : 0,5 ml/0,5 ml). Les stocks se font dans des tubes cryogènes de 2 ml et sont congelés immédiatement à -80°C. Lorsque l'on désire déstocker une souche de levure, il suffit de mettre le tube dans de la carboglace (sans aucune décongélation), gratter le haut du stock à l'aide d'une anse ou d'un cure-dent et l'étaler sur une boîte de milieu riche.

- **Milieu SC ou synthétique complet (sélection d'auxotrophie) :**

Les milieux synthétiques complets sont des milieux où l'on contrôle la source d'acides aminés et de bases (uracile et adénine). Ceci permet de sélectionner la prototrophie pour un acide aminé ou une base.

Exemple : si on transforme une souche portant la mutation *ura3-Δ52* (phénotype [URA]) avec le marqueur *URA3*, on sélectionnera la transformation sur un milieu SC fait avec un mélange d'acides aminés et de bases contenant tous les éléments indiqués sauf l'uracile (SC-UR). Ce milieu sera sélectif pour les cellules [URA]⁺.

Le milieu synthétique complet permet une croissance rapide car on fournit à la cellule tous les acides aminés et les bases sauf ceux correspondant à la prototrophie désirée. Quand on veut sélectionner de nombreuses prototrophies, lors d'un croisement par exemple (il faudrait omettre de nombreux acides aminés), il est parfois plus facile d'utiliser un milieu WO auquel on n'ajoute que les acides aminés ou les bases indispensables.

Exemple : on veut croiser les deux souches haploïdes suivantes :

souche 1 : MATa, *ura3-Δ851*, *leu2-Δ1*, *his3-Δ200*, *lys2-Δ202*

souche 2 : MATalpha, *ura3-Δ851*, *trp1-Δ63*

On sélectionnera le diploïde sur un milieu ne permettant pas la croissance des haploïdes. Par exemple, un milieu SC fait avec un mélange d'acides aminés et de bases contenant tous les éléments indiqués sauf la leucine, l'histidine, la lysine et le tryptophane (SC-L-H-K-W). Ce milieu sera sélectif pour les cellules [LEU]⁺ [HIS]⁺ [LYS]⁺ [TRP]⁺. Ou, plus simplement, on pourra sélectionner le diploïde sur un milieu WO supplémenté avec de l'uracile.

Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids Difco	6,7 g	
Glucose	20 g	
mélange d'acides aminés et de bases	2 g	
H ₂ O	qsp 1 litre	----> autoclaver

Pour le mélange d'acides aminés et de bases, peser les produits suivant les quantités indiquées et mélanger le tout.

Adénine (AD)	1 g	Isoleucine (I)	2 g
Uracile (UR)	2 g	Leucine (L)	4 g
Alanine (A)	2 g	Lysine (K)	2 g
Arginine (R)	2 g	Méthionine (M)	2 g
Aspartate (D)	2 g	Phénylalanine (F)	2 g
Asparagine (N)	2 g	Proline (P)	2 g
Cystéine (C)	2 g	Sérine (S)	2 g
Glutamate (E)	2 g	Thréonine (T)	2 g
Glutamine (Q)	2 g	Tryptophane (W)	2 g
Glycine (G)	2 g	Tyrosine (Y)	2 g
Histidine (H)	2 g	Valine (V)	2 g

- **Milieu 5'-FoA (perte du marqueur URA) :**

Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids Difco	6,7 g	
Glucose	20 g	
mix-URA	2 g	
Uracile	50 mg	
H ₂ O	qsp 1 litre	----> autoclaver

Après autoclavage, quand la température du milieu est à environ 65°C, on ajoute du 5'-FoA en poudre à 1 g/l. Laisser le milieu sous agitation le temps que le 5'-FoA se dissolve.

- **Milieu alphaAA (sélection des cellules LYS2 et LYS5) :**

Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids w/o ammonium sulfate Difco	1,67 g
Glucose	20 g
L-Lysine	30 mg
H ₂ O	qsp 950 ml
	----> autoclaver

Après autoclavage, quand la température du milieu est à environ 65°C, on ajoute une solution d'alpha-aminoacétate pH 6 (2 g pour 50 ml d'H₂O) ajusté avec KOH 10 N

- **Milieu GNA (milieu riche) :**

Bacto Nutrient broth Difco	30 g	
Bacto yeast extract Difco	10 g	
Glucose	50 g	
H ₂ O	qsp 1 litre	----> autoclaver

Après autoclavage, quand la température du milieu est à environ 65°C, on ajoute du 5'-FoA en poudre à 1 g/l. Laisser le milieu sous agitation le temps que le 5'-FoA se dissolve.

● **Milieu SPO (milieu pauvre pour sporulation) :**

Bacto yeast extract Difco	2,5 g	
Glucose	1 g	
KOAc	10 g	
H ₂ O	qsp 1 litre	----> autoclaver

Afin d'améliorer le taux de sporulation, il est possible d'ajouter avant autoclavage le mélange d'acides aminés MIXSPO à une concentration finale de 666 mg/l :

Adénine (AD)	10 g
Uracile (UR)	7,5 g
Leucine (L)	7,5 g
Tryptophane (W)	7,5 g
Histidine (H)	7,5 g
Lysine (K)	7,5 g
Méthionine (M)	7,5 g
Arginine (R)	7,5 g

● **Milieu LEAD (plomb) :**

Bacto Nutrient broth Difco	1,5 g	
Bacto yeast extract Difco	2,5 g	
Ammonium Sulfate	100 mg	
drop out -Met	1 g	
H ₂ O	390 ml	----> autoclaver

Après autoclavage, quand la température du milieu est à environ 55°C, on ajoute 100 ml de Glucose 20%

Quand la température du milieu est ≤ 50°C (sinon le nitrate de plomb précipite), on ajoute 1 ml de lead nitrate à 0,5 mg/ml

● Milieu GO avec sulfate et sans thiamine :

Préparer les solutions stock suivantes :

- Sels 10 X :

MgSO ₄ 7 H ₂ O (MM 246,48)	5 g	
(NH ₄) ₂ SO ₄ (MM 132,14)	20 g	
KH ₂ PO ₄ (MM 136,09)	10 g	
NaCl (MM 58,45)	1 g	
CaCl ₂ (MM 110,99)	1 g	
H ₂ O	qsp 1 litre	----> autoclaver

- Eléments trace 1000 X :

H ₃ BO ₃ (MM 61,83)	500 mg	
CuSO ₄ 5 H ₂ O (MM 249,68)	60 mg	
KI (MM 166,01)	100 mg	
MnSO ₄ H ₂ O (MM 169,00)	400 mg	
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O (MM 241,95)	200 mg	
ZnSO ₄ 7 H ₂ O (MM 287,54)	400 mg	
H ₂ O	qsp 1 litre	----> autoclaver

- Solution chlorure ferrique 1000 X :

FeCl ₃ (MM 162,21)	20 mg	
H ₂ O	qsp 100 ml	----> filtrer

Cette solution est stérilisée par filtration sur membrane Millipore 0,2 µm.

- Vitamine et cofacteur 200 X :

Pentothénate de calcium (MM 476,53)	40 mg
Hydrochlorure de pyridoxine (vitamine B6) (MM 205,64)	40 mg
Acide nicotinique (niacine) (MM 123,11)	10 mg
H ₂ O	qsp 99 ml

Ajouter à cette solution 1 ml de la solution stock suivante :

Biotine (MM 244,31)	8 mg
NaHCO ₃ 50mM	qsp 20 ml

La solution finale est stérilisée par filtration sur membrane Millipore 0,2 µm.

- Solution inositol 200 X :

Inositol (MM 180,16)	400 mg	
H ₂ O	qsp 100 ml	----> filtrer

Cette solution est stérilisée par filtration sur membrane Millipore 0,2 µm.

Préparer le milieu final : Milieu GO avec sulfate et sans thiamine :

Solution sels 10 X	100 ml	
Glucose	20 g	
Mélange d'acides aminés (SC-URA)	2 g	
H ₂ O	qsp 950 ml	----> autoclaver

Avant d'ajouter les solutions suivantes, la température du milieu ne doit pas dépasser 60°C :

Solution vitamine et cofacteur 200 X	5 ml
Solution inositol 200 X	5 ml
Solution éléments trace 1000 X	1 ml
Solution chlorure ferrique 1000 X	1 ml
H ₂ O distillée stérile	qsp 1 litre

On peut ajouter à ce milieu de la thiamine à une concentration finale de 10⁻⁶ M (1 ml de la solution stock pour 1 litre de milieu) ou à une concentration finale de 10⁻⁸ M (10 µl de la solution stock pour 1 litre de milieu).

- Solution stock de thiamine 1000 X :

Hydrochlorure de thiamine (vitamine B1) (MM 337,28)	7 mg
H ₂ O	qsp 20 ml

