

## Biotechnology Explorer™

# Kit pGLO™ de Transgénèse Bactérienne

Référence

166-0003 EDU

<http://explorer.bio-rad.fr>

**Stocker les composants de ce kit à température ambiante.**

La duplication de toute partie de ce document n'est autorisée que pour l'usage en classe.

**BIO-RAD**

---

Pour le service technique, composez le 01.47.95.69.64

## Comment des méduses peuvent nous aider à "éclairer" la transgénèse ?

Les programmes actuels de lycée abordent la transgénèse à plusieurs reprises :

- en seconde dans la partie "Cellule ADN, unité du vivant", elle permet de soutenir l'idée d'universalité de la molécule d'ADN.
- en première ES et L, dans la partie "De l'information génétique au phénotype, applications", c'est l'occasion de montrer en quoi la génétique a des applications dans des domaines variés en permettant la production de protéines à intérêts agro-alimentaire et médical.
- En terminale S, dans le thème 2 de l'enseignement de spécialité " des débuts de la génétique aux enjeux actuels des biotechnologies", une prise de conscience des enjeux des biotechnologies est recherchée avec l'exemple de la construction d'organismes génétiquement modifiés.

Pour les élèves, la difficulté majeure réside dans le caractère apparemment abstrait des notions abordées si elles ne font pas l'objet d'observations ou de manipulations de leur part.

A l'enseignant qui souhaite permettre à ses élèves une approche concrète de la transgénèse, le programme Biotechnology Explorer de la société Bio-rad apporte une solution, notamment par l'utilisation d'un gène de méduse bioluminescente. Cette bioluminescence est due à la GFP (Green Fluorescent Protein), protéine qui émet une fluorescence d'un vert brillant lorsqu'elle est éclairée par une lumière UV de grande longueur d'onde.

Le gène de la GFP a été originellement isolé chez la méduse, *Aequorea victoria*. Le gène sauvage de la méduse a été modifié par Maxygen Inc., une société de biotechnologie basée à Santa Clara, en Californie. Des mutations spécifiques ont été introduites dans la séquence d'ADN, ce qui a augmenté considérablement la fluorescence de la protéine. Cette forme modifiée du gène de la GFP a été insérée dans le plasmide pGLO de Bio-Rad et est maintenant exclusivement fournie par Bio-Rad pour des applications éducatives.

La GFP est particulièrement lumineuse. Avec le kit de transgénèse de Bio-Rad, les élèves utilisent le pGLO pour transformer les bactéries, et peuvent dès le lendemain observer l'expression du gène en temps réel à l'aide d'une simple lampe UV.

De plus un prolongement de l'expérience de transgénèse est rendu possible par le kit de purification de la GFP.

Suite à la transgénèse, les élèves purifient la GFP à partir de leurs bactéries transformées, ceci en utilisant un simple procédé de chromatographie avec le kit de purification de la GFP de Bio-Rad. Là aussi, le processus entier est visible avec une lampe UV.

Nous cherchons continuellement à améliorer nos programmes et nos produits. Votre contribution est extrêmement précieuse pour nous. Vos commentaires, idées et suggestions seront les bienvenus !

L'équipe Bio-Education  
Bio-Rad division Bio-Recherche  
3, bd Raymond Poincaré  
92430 Marnes-la-Coquette

## Sommaire

<b>Guide de l'enseignant .....</b>	<b>Page</b>
Introduction à la transgénèse .....	3
Le système pGLO.....	3
Liste de contrôle pour l'inventaire du kit.....	4
Déroulement du TP .....	5
Points importants.....	5
Points conceptuels .....	5
Compétences générales pour le TP .....	6
Points expérimentaux.....	9
Vue d'ensemble de la préparation pour l'enseignant.....	10
Liste de contrôle des postes de travail .....	10
Guide de préparation pour l'enseignant .....	12
Mode opératoire détaillé du TP .....	17

## Introduction à la transgénèse

Dans ce TP, vos élèves vont exécuter une transformation bactérienne. La transformation bactérienne se produit quand une cellule intègre un nouveau fragment de matériel génétique (ADN). Si elle est exprimée, cette nouvelle information génétique peut conférer à l'organisme un nouveau caractère identifiable. Son phénotype est modifié.

La transgénèse permet l'insertion d'un ou plusieurs gènes dans un organisme.

La transgénèse est utilisée dans de nombreux domaines de la biotechnologie.

- En agriculture, avec des gènes intervenant dans la résistance contre le gel, les parasites ou la sécheresse.
- Dans le domaine de la protection de l'environnement où des bactéries transformées génétiquement peuvent digérer des nappes de pétrole.
- En médecine, où des maladies causées par des gènes défectueux commencent à être traitées par thérapie génique ; les cellules d'une personne malade étant transformées par la forme saine du gène impliqué.
- Des gènes peuvent être isolés à partir de l'ADN humain, animal ou végétal et placés dans des bactéries.

Par exemple, un gène sain humain codant pour une hormone, l'insuline, peut être intégré au génome bactérien. Dans des conditions adaptées, ces bactéries peuvent produire de l'insuline humaine. Cette insuline peut être ensuite utilisée pour traiter certains patients diabétiques.

## Le système pGLO

Avec le kit de transformation pGLO, les élèves utilisent un procédé simple pour transformer des bactéries avec un gène qui code la GFP (Green Fluorescent Protein). La source de ce gène est la méduse bioluminescente *Aequorea victoria*. La GFP rend la méduse fluorescente et la fait briller dans l'obscurité. Suite au procédé de transgénèse, les bactéries expriment leur gène GFP de la méduse nouvellement acquis et produisent la protéine fluorescente qui les fait briller d'un vert lumineux sous la lumière UV.

Dans cette activité pratique, les élèves vont apprendre à transférer des gènes d'un organisme à un autre avec l'aide d'un plasmide.

En plus d'un grand chromosome, les bactéries contiennent naturellement un ou plusieurs petits fragments circulaires d'ADN appelés plasmides. L'ADN plasmidique contient généralement des gènes codant pour un ou plusieurs caractères qui peuvent être bénéfiques à la survie des bactéries. Dans la nature, les bactéries peuvent échanger des plasmides. Ce mécanisme naturel permet aux bactéries de s'adapter à de nouveaux environnements. De nombreux cas de résistance bactérienne aux antibiotiques sont dus à la transmission de plasmides.

Le plasmide pGLO de Bio-Rad contient le gène codant pour la GFP et un gène conférant la résistance à un antibiotique, l'ampicilline. Le pGLO comprend également un système spécial de régulation de gènes qui peut être utilisé pour contrôler la synthèse de la protéine fluorescente dans les cellules transformées. Le gène codant pour la GFP peut être activé dans les cellules transformées en ajoutant simplement le sucre arabinose au milieu de culture des cellules. La sélection des cellules qui ont été transformées avec l'ADN pGLO est accomplie par culture sur des milieux contenant l'antibiotique. Les cellules transformées vont apparaître blanches sur les milieux ne contenant pas d'arabinose, et vertes fluorescentes quand l'arabinose est inclus dans l'agar nutritif.

La construction originale du pGLO permet, pour la toute première fois, aux enseignants et aux élèves, non seulement de réaliser une transgénèse mais aussi de visualiser facilement les mécanismes de la régulation des gènes ainsi que ceux de la sélection génétique. La fluorescence est facilement observable avec une lampe UV de grande longueur d'onde, peu coûteuse.

Pour que vos élèves tirent le plus grand profit de cette expérience, ils doivent savoir ce qu'est un gène et comprendre la relation entre les gènes et les protéines.

Ce kit de transformation pGLO fournit l'occasion d'une activité pratique supplémentaire qui est la purification de la protéine recombinante fluorescente à partir des bactéries transformées utilisant le kit de chromatographie GFP (ref 166-0005EDU).

## Liste de contrôle (✓) pour l'inventaire du kit

Cette partie liste les composants fournis dans le kit de transgénèse bactérienne. Elle liste aussi les accessoires requis. Chaque kit contient le matériel nécessaire pour équiper 8 postes de travail. Utilisez ceci comme une liste de contrôle pour récapituler vos besoins avant de commencer les expériences. Tous les composants du kit peuvent être stockés à température ambiante jusqu'à utilisation.

### Composants du kit

		(✓)
1. <i>E. Coli</i> HB101 K-12, lyophilisée	une fiole	<input type="checkbox"/>
2. Plasmide (pGLO), lyophilisé, 20 µg	une fiole	<input type="checkbox"/>
3. Ampicilline, lyophilisée, 30 mg	une fiole	<input type="checkbox"/>
4. L(+) arabinose, lyophilisé, 600 mg	une fiole	<input type="checkbox"/>
5. Solution de transformation (50 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 6,1), stérile, 15 ml	une bouteille	<input type="checkbox"/>
6. Milieu nutritif LB, stérile, 10 ml	une bouteille	<input type="checkbox"/>
7. Poudre d'agar LB nutritive, stérile, (pour faire 500 ml)	un sachet	<input type="checkbox"/>
8. Pipettes, stériles, emballées séparément	50	<input type="checkbox"/>
9. Ensemenceurs, stériles, 10 µl, paquets de 10	8 paquets	<input type="checkbox"/>
10. Boîtes de Pétri, 60 mm, paquets stériles de 20	2 paquets	<input type="checkbox"/>
11. Microtubes, 2 ml (10 de chaque : jaune, vert, bleu, orange, lavande, rose)	60	<input type="checkbox"/>
12. Portoir en mousse	8	<input type="checkbox"/>
13. Manuel d'instructions	1	<input type="checkbox"/>

### Accessoires requis – non inclus dans ce kit

1. Lampe UV (de grande longueur d'onde) (ref 166-0500EDU)	1 requise	<input type="checkbox"/>
2. Horloge ou montre pour chronométrer 50 secondes	1 requise	<input type="checkbox"/>
3. Four micro-ondes ou plaque chauffante	1 requis	<input type="checkbox"/>
4. Four incubateur à 37°C (ref 166-0521EDU)	1 optionnel	<input type="checkbox"/>
5. Bain-marie à température contrôlée, 1-6 litres (ref 166-0524EDU)*	1 requis	<input type="checkbox"/>
6. Thermomètre qui indique 42°C	1 requis	<input type="checkbox"/>
7. Flacon d'un L	1 requis	<input type="checkbox"/>
8. Cylindre gradué de 500 ml	1 requis	<input type="checkbox"/>
9. Eau distillée, 500 ml	1 requise	<input type="checkbox"/>
10. Glace pillée et récipients	1-8	<input type="checkbox"/>
11. Eau de javel pour dilution à 10%	100 ml	<input type="checkbox"/>
12. Marqueurs indélébiles	4-8	<input type="checkbox"/>

\* Si un bain marie à température contrôlée n'est pas disponible, prenez un récipient pour l'eau chaude et utilisez de l'eau chaude du robinet pour obtenir une eau à 42°C.

## Déroulement du TP

Chacune des trois sessions de TP est prévue pour être effectuée en périodes consécutives de 50 minutes.

### Suggestion de programmation

**Séance précédant le TP** : Présentation de la transgénèse

**TP de transgénèse** : Transformation des bactéries et étalement sur les boîtes

**Séance suivant le TP** : Observation et étude des résultats

**Séance de TP suivante (éventuellement)** : Isolement par chromatographie de la GFP à l'aide du kit de chromatographie GFP (ref 166-0005EDU)

## Points importants

Cette partie décrit les points conceptuels ou expérimentaux qui peuvent paraître les plus difficiles aux élèves. Ces points sont extrêmement importants pour assurer la réussite de l'expérimentation.

Les enseignants doivent insister sur les points énumérés ci-dessous en effectuant si possible les démonstrations des techniques.

Afin que les élèves mettent les bons produits dans les bons tubes et sur les bonnes boîtes, le marquage des différents récipients devra être effectué avec soin.

La fiche mode opératoire est fournie pour organiser l'activité. Elle fournit des descriptions visuelles de toutes les étapes du TP utilisées dans le procédé de transgénèse.

## Points conceptuels

### Milieux

Les milieux nutritifs liquides et solides, c'est-à-dire le milieu nutritif LB (du nom de Luria et Bertani) et la poudre d'agar nutritif, sont composés d'un extrait de levures et du résultat d'une digestion enzymatique d'abats de viande, lesquels fournissent un mélange de glucides, d'acides aminés, de nucléotides, de sels, et de vitamines qui sont tous des nutriments pour la croissance bactérienne. L'agar, qui est dérivé des algues, fond lorsqu'il est chauffé et forme un gel solide lorsqu'il est refroidi. Il sert à fournir un support solide sur lequel les bactéries sont cultivées.

### Sélection antibiotique

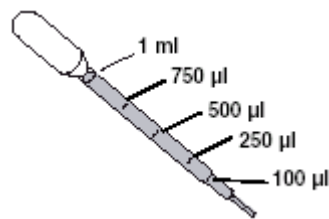
Le plasmide pGLO qui contient le gène GFP contient aussi le gène pour la  $\beta$ -lactamase, qui fournit la résistance à l'antibiotique ampicilline. La protéine  $\beta$ -lactamase est produite et sécrétée par les bactéries qui contiennent le plasmide. La  $\beta$ -lactamase inactive l'ampicilline présente dans l'agar LB nutritif permettant la croissance bactérienne. Seules les bactéries transformées qui contiennent le plasmide et expriment la  $\beta$ -lactamase peuvent survivre sur les boîtes qui contiennent l'ampicilline. Seulement un très faible pourcentage des cellules accepte l'ADN plasmidique et est donc transformé. Les cellules non transformées ne peuvent pas croître sur les boîtes de sélection à l'ampicilline.



ces surfaces qui contaminent. Quand les élèves travaillent avec les ensemenceurs, pipettes, et boîtes d'agar, l'enseignant doit insister sur le fait que l'anneau du bout de l'ensemenceur, l'extrémité de la pipette, et la surface de la boîte d'agar ne doivent pas être touchés ou placés sur des surfaces contaminantes. Même si la contamination n'empêche pas systématiquement l'obtention de résultats expérimentaux, l'élève doit comprendre que le respect scrupuleux des conditions d'aseptie est une contrainte fondamentale dès l'instant qu'on effectue une manipulation de microbiologie.

### Utilisation de la pipette

Avant de commencer les sessions de TP, précisez aux élèves les graduations sur la pipette. Les graduations 100 µl, 250 µl et 1 ml seront utilisées comme unités de mesure tout au long du TP.



### Travailler avec *E. coli*

L'organisme hôte dans ce kit est une souche *E. coli* HB 101 K-12. Le vecteur contenant la protéine recombinante GFP et les organismes transformés créés par leur combinaison ne sont pas des organismes pathogènes comme l'*E. coli* O157 : H7 par exemple. Cependant, la manipulation des entités *E. coli* HB 101 K-12 du kit de transgénèse exige l'utilisation de bonnes pratiques de laboratoire de microbiologie. Ces pratiques comprennent notamment les précautions suivantes :

- Les surfaces de travail sont décontaminées une fois par jour et après chaque éclaboussure de matériel vivant.
- Tout liquide contaminant ou déchets solides sont décontaminés avant d'être jetés.
- Le lavage des mains est indispensable : (1) après avoir manipulé des matériels impliquant des organismes contenant des molécules d'ADN recombinant, et (2) avant de quitter le TP.
- Les élèves doivent manipuler calmement sans parler pour éviter les courants d'air contaminés.
- Des dispositifs de pipetage mécanique sont utilisés ; le pipetage à la bouche est interdit.
- Manger, boire, fumer et utiliser des produits cosmétiques est interdit dans la zone de travail.
- Porter des lunettes de protection et des gants est fortement recommandé.
- Pour éviter les contaminations, le travail pourra être effectué dans le champ stérile entourant un bec bunsen allumé ou une hotte adaptée à la microbiologie.

### Décontamination et rejet des déchets

Si vous ne disposez pas d'un autoclave, toutes les solutions et composants (ensemenceurs et pipettes) qui ont été en contact avec les bactéries peuvent être placés dans une solution d'eau de javel à 10 % pendant au moins 20 minutes pour stérilisation. Une petite cuvette contenant cette solution devrait être placée sur chaque poste de travail. Quelque soit la solution choisie, tous les ensemenceurs et pipettes utilisés doivent être rassemblés pour stérilisation. Stérilisez les boîtes de Pétri en couvrant l'agar avec une solution d'eau de javel à 10 %. Laissez au moins une heure et ensuite jetez le surplus de liquide. Une fois stérilisées, les boîtes d'agar doivent être doublement emballées et traitées comme des détritux normaux. Des lunettes de protection sont recommandées pour l'utilisation de l'eau de javel.



## Lampes à ultraviolet (UV)

Le rayonnement ultraviolet peut causer des dommages aux yeux et à la peau. Les UV de petite longueur d'onde sont plus préjudiciables que la lumière UV de grande longueur d'onde. La lampe UV de Bio-Rad recommandée pour ce module est de grande longueur d'onde. Si possible, utilisez des lunettes de protection.

## Incubation

L'utilisation d'un incubateur à 37°C est recommandée. Cependant, l'expérience de transgénèse peut être conduite sans l'utilisation d'un incubateur. Dans ce cas, le nombre de jours requis pour obtenir des colonies de taille optimale dépend de la température ambiante. Les meilleurs résultats sont obtenus si les premières colonies sont jeunes (24-48 heures) et mesurent 1-1,5 mm de diamètre. **La réfrigération des boîtes cultivées va baisser significativement l'efficacité de la transgénèse.** La température optimale pour la croissance d'*E. coli* est 37°C. Des températures plus basses vont diminuer le taux de croissance. A 28°C, deux jours d'incubation sont requis pour obtenir la taille optimale. A 21°C trois jours d'incubation sont nécessaires. Ajustez les délais de préparation et le programme du TP en fonction de votre température d'incubation.

## Points expérimentaux

### Pratique de techniques

L'enseignant peut juger utile d'entraîner ses élèves au travail en conditions stérile, à l'utilisation des pipettes et des ensemenceurs, à la pratique de la striation et de l'étalement des bactéries sur la surface d'agar. Ceci peut être effectivement nécessaire si les élèves effectuent ce type de manipulation pour la première fois.

### Transfert des colonies bactériennes des boîtes d'agar aux microtubes

Le fait de prélever une colonie unique sur la boîte peut conduire à la tentation de prendre plus de cellules que nécessaire. On peut rappeler aux élèves qu'une seule colonie qui mesure approximativement 1 mm de diamètre contient des millions de cellules bactériennes.

### Transfert d'ADN

Le transfert de l'ADN plasmidique de son tube de stockage à la suspension de transformation est une étape primordiale. Les élèves doivent regarder attentivement l'anneau de l'ensemenceur pour voir s'il porte un film de solution plasmidique. Celui-ci est comparable au film savonneux qui se forme dans un anneau permettant de former des bulles de savon.

### Choc thermique

Le procédé utilisé pour augmenter l'introduction de l'ADN étranger dans les bactéries est appelé **choc thermique**. Il est important que les élèves suivent les instructions relatives à la chronologie. Le changement rapide de température et la durée du choc thermique sont très importants. Pour des résultats optimaux, les tubes contenant les suspensions de cellules doivent être directement pris de la glace, placés dans le bain-marie à 42°C pendant 50 secondes et remis immédiatement dans la glace. En effet, en l'absence de choc thermique, la production d'organismes transformés sera 10 fois moindre et avec un choc thermique de 90 secondes, elle sera diminuée de moitié. Dans tous les cas cependant, l'expérience donnera des résultats.

### Etalement des bactéries transformées et contrôles

Mettre plus de culture transformée dans les boîtes avec le dispositif de pipette de transfert est contre-productif puisque les boîtes ne pourront pas absorber le surplus de liquide et l'étalement sera inégal. Transférer les suspensions de bactéries des microtubes aux boîtes de Pétri exige quelques précautions. Les bactéries s'accumulent au fond, les élèves peuvent donc prendre l'extrémité supérieure d'un tube fermé entre l'index et le pouce d'une main et tapoter le bas du tube avec l'index de l'autre main. Ils peuvent également remuer la suspension avec la pipette avant de l'extraire.

Ils doivent impérativement recouvrir les boîtes de Pétri avec le couvercle immédiatement après avoir étalé les cellules.

### Kit de chromatographie de la GFP (Green Fluorescent Protein)

Si vous envisagez de poursuivre l'expérience de transgénèse bactérienne pGLO avec le kit de purification de la GFP (166-0005EDU), vous devez garder les bactéries pGLO transformées cultivées sur les boîtes LB/amp/ara. La meilleure façon de conserver les boîtes est de les empiler à l'envers (couvercle contre surface) dans un endroit froid, tel que le réfrigérateur. Ceci gardera les cellules en vie mais limitera leur croissance active jusqu'à ce que vous en ayez besoin pour commencer l'expérience suivante. Empiler les boîtes à l'envers permet d'éviter la condensation.

Idéalement, les boîtes devraient être utilisées dans les 2-4 semaines suivantes. Pour une conservation plus longue, assurez-vous que les boîtes sont scellées avec du Parafilm pour prévenir la dessiccation.

## Vue d'ensemble de la préparation pour l'enseignant

Cette partie résume le programme recommandé pour la préparation, sur la partie de l'enseignant. Le guide détaillé de la préparation est fourni aux pages 12-16.

Préparation de l'enseignant	Quand	Durée
Étape 1 Lire le manuel de transgénèse Photocopier la fiche mode opératoire du TP pour chaque élève	Immédiatement	1 heure
Étape 2 Préparer les boîtes d'agar nutritif	3-7 jours avant le TP	1 heure
Étape 3 Préparer les boîtes de bactéries Distribuer les solutions	24-36 heures avant le TP	30 min
Étape 4 Organiser les postes de travail des élèves	Avant le TP	10 min

## Liste de contrôle (✓) des postes de travail

### Postes de travail des élèves

La liste indique le matériel qui doit être présent sur chaque poste de travail.

Les composants fournis dans ce kit sont suffisants pour 8 élèves, ou 8 binômes (soit 16 élèves) ou 8 quadrinômes (soit 32 élèves).

### Poste de travail (commun) de l'enseignant

La liste indique le matériel qui doit être présent à un endroit commun accessible à tous les élèves.

C'est au professeur de décider si les élèves peuvent accéder aux solutions et équipements, ou si le professeur distribue les solutions dans les microtubes fournis.

## TP de transformation

Poste de travail des élèves	Nombre requis	(✓)
Boîte d' <i>E. coli</i> (LB)	1	<input type="checkbox"/>
Boîtes coulées d'agar (1 LB, 2 LB/amp, 1 LB/amp/ara)	4	<input type="checkbox"/>
Solution de transformation	1	<input type="checkbox"/>
Milieu nutritif LB	1	<input type="checkbox"/>
Ensemenceurs	7 (1 paquet de 10)	<input type="checkbox"/>
Pipettes	5	<input type="checkbox"/>
Portoir en mousse	1	<input type="checkbox"/>
Récipient rempli de glace pilée	1	<input type="checkbox"/>
Marqueur	1	<input type="checkbox"/>
Récipient contenant de l'eau de Javel à 10%	1	<input type="checkbox"/>
<b>Poste de travail (commun) de l'enseignant</b>		
ADN plasmidique pGLO réhydraté	1 fiole	<input type="checkbox"/>
Bain-marie à 42°C et un thermomètre	1	<input type="checkbox"/>
Incubateur à 37°C (optionnel, voir compétences générales de TP-Incubation)	1	<input type="checkbox"/>

## Collecte des données et analyses

<b>Poste de travail des élèves</b>	<b>Nombre requis</b>	<b>(✓)</b>
Boîtes incubées de transformation et contrôles :	4	<input type="checkbox"/>
LB/amp/ara	1	<input type="checkbox"/>
LB/amp	2	<input type="checkbox"/>
LB	1	<input type="checkbox"/>
<b>Poste de travail (commun) de l'enseignant</b>		
Lampe UV	1-8	<input type="checkbox"/>

## Guide de préparation pour l'enseignant

Objectifs	Temps requis	Quand
Etape 1 Préparer les boîtes d'agar	1 heure	3-7 jours avant le TP
Etape 2 Réhydrater <i>E.Coli</i>	2 minutes	24-36 heures avant le TP
Strier les boîtes	15 minutes	
Réhydrater l'ADN plasmidique pGLO	2 minutes	
Etape 3 Distribuer les solutions	10 minutes	Avant le TP
Installer les postes de travail	10 minutes	

### Préparation étape 1 : 3 à 7 jours avant le TP de transgénèse

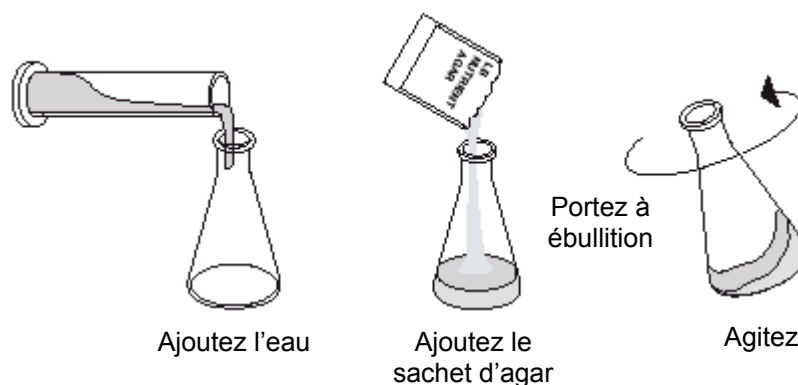
#### 1. Préparer l'agar nutritif (pas besoin d'autoclave)

Les boîtes d'agar seront préparées au moins trois jours avant la séance de TP. Elles doivent être laissées à température ambiante pendant deux jours et ensuite réfrigérées jusqu'à ce qu'elles soient utilisées. Les deux jours permettent à l'agar de sécher suffisamment pour accepter correctement la solution liquide de transformation.

Pour préparer l'agar, versez 500 ml d'eau distillée dans un Erlenmeyer d'au moins 1 L. Ajoutez le contenu entier du sachet d'agar nutritif LB. Agitez l'Erlenmeyer pour dissoudre l'agar, et chauffez jusqu'à ébullition dans un micro-ondes ou sur une plaque chauffante. Répétez le chauffage et l'agitation environ trois fois jusqu'à ce que l'agar soit dissous. Attention à ne pas saisir l'Erlenmeyer chaud directement avec la main afin de ne pas se brûler.

Quand il est dissous, laissez l'agar nutritif LB refroidir de manière à pouvoir saisir l'Erlenmeyer à la main (50°C). Pendant qu'il refroidit, marquez les boîtes et préparez l'arabinose et l'ampicilline comme indiqué ci-après.

N.B. : Le refroidissement de l'agar doit être limité, sinon il se solidifie.

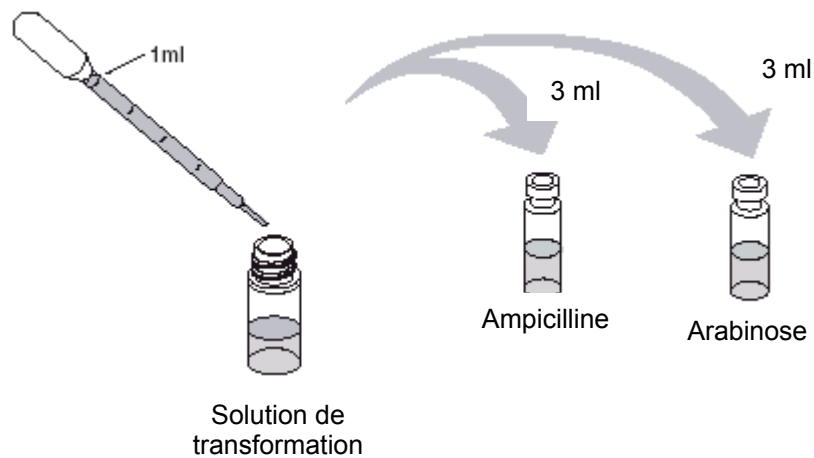


## 2. Préparer l'arabinose et l'ampicilline

**Note** : L'arabinose met au moins 10 minutes pour se dissoudre – soyez patient !

L'arabinose est conservé au sec dans une petite fiole. Avec une nouvelle pipette stérile, ajoutez 3 ml de la solution de transformation directement dans la fiole pour réhydrater le sucre. Mélangez la fiole ; un vortex peut être utilisé. (La solution de transformation est utilisée ici parce que c'est une solution stérile à disposition. L'eau stérile fonctionnerait aussi bien).

L'ampicilline est aussi conservée au sec dans une petite fiole. Avec une nouvelle pipette stérile, ajoutez 3 ml de la solution de transformation directement dans la fiole pour réhydrater l'antibiotique. (La solution de transformation est utilisée ici parce que c'est une solution stérile à disposition. L'eau stérile fonctionnerait aussi bien).



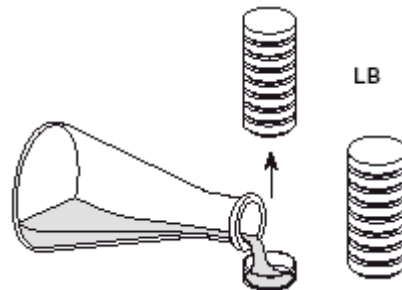
**Note** : une température excessive (> 50°C) détruira l'ampicilline et l'arabinose, mais l'agar nutritif se solidifie à 27 °C, vous devez donc surveiller soigneusement le refroidissement de l'agar et ensuite couler les boîtes de la première à la dernière sans interruption. L'excès de bulles peut être enlevé après que toutes les boîtes soient coulées en chauffant brièvement la surface de chaque boîte avec la flamme d'un bec Bunsen. Après avoir coulé les boîtes, ne les bougez pas jusqu'à ce que l'agar se soit solidifié. Jetez l'excès d'agar dans la poubelle, non pas dans l'évier. Essuyez les gouttes d'agar sur les côtés des boîtes.

## 3. Marquer les boîtes

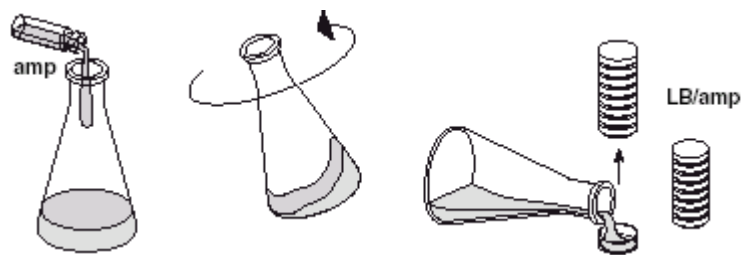
Les 40 boîtes à agar fournies doivent être marquées avec un marqueur indélébile sur le fond près du bord. Indiquez sur 16 boîtes **LB**, sur 16 boîtes **LB/amp** et sur 8 boîtes **LB/amp/ara**.

#### 4. Couler les boîtes avec l'agar nutritif LB (LB, LB/amp, LB/amp/ara)

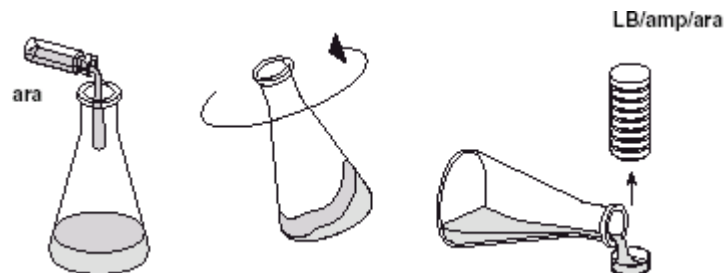
**Première étape :** coulez l'agar nutritif LB dans les 16 boîtes qui sont marquées LB. Faites des piles de 4-8 boîtes vides, enlevez le couvercle d'une boîte avec une main et coulez l'agar nutritif LB avec l'autre. Remplissez la boîte à environ un tiers à un demi (~12 ml) d'agar, remplacez le couvercle et continuez la pile. Coulez les 16 boîtes LB de cette façon. Laissez les boîtes refroidir dans cette configuration empilée.



**Deuxième étape :** ajoutez l'ampicilline hydratée au reste d'agar LB nutritif. Agitez brièvement pour mélanger. Coulez les 16 boîtes qui sont marquées LB/amp en utilisant la technique décrite ci-dessus.



**Troisième étape :** ajoutez l'arabinose hydraté au reste d'agar nutritif LB contenant l'ampicilline. Agitez brièvement pour mélanger et coulez les 8 boîtes marquées LB/amp/ara en utilisant la technique décrite ci-dessus.



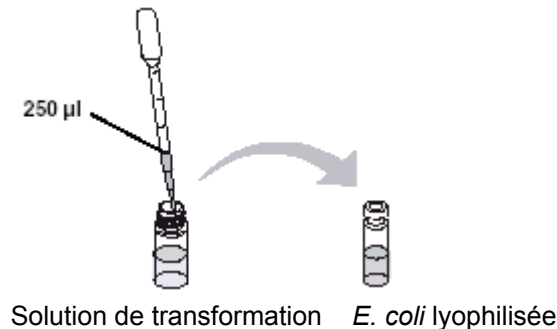
#### 5. Stockage des boîtes

Après un séchage de deux jours à température ambiante, les boîtes peuvent être soit utilisées, soit empilées par vingt en les enfilant dans le sac plastique. La pile est ensuite inversée, le sac fermé, et les boîtes conservées à l'envers dans un réfrigérateur jusqu'à utilisation.

## Préparation étape 2 : 24-36 heures avant le TP de transgénèse

### 1. Réhydrater les bactéries

En utilisant une pipette stérile, réhydratez les *E. coli* HB101 K12 lyophilisées en ajoutant 250 µl de solution de transformation directement dans la fiole. Refermez la fiole et laissez la suspension de cellules à température ambiante pendant 5 minutes. Ensuite secouez pour mélanger avant de strier les boîtes **LB** (la solution de transformation est utilisée ici parce que c'est une solution stérile à disposition. (L'eau stérile fonctionnerait également.) Conservez les bactéries réhydratées dans le réfrigérateur jusqu'à utilisation (dans les 24 heures pour les meilleurs résultats, pas plus de 3 jours).



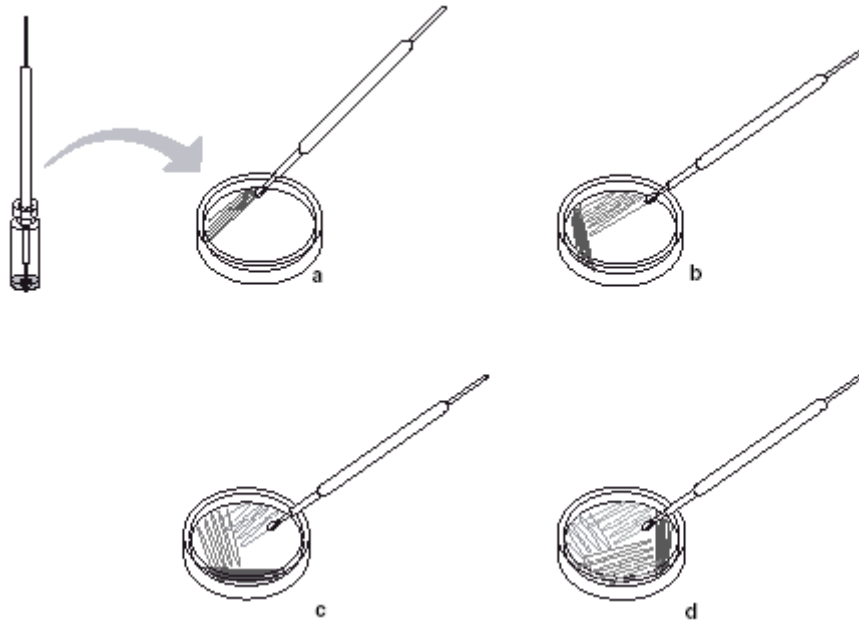
### 2. Strier les boîtes pour produire des colonies d'une seule bactérie sur les boîtes d'agar

Chaque équipe de TP aura besoin de sa propre boîte de bactéries comme source de cellules pour la transgénèse. Ce kit contient assez de matériel pour équiper 8 postes de travail complets. Les boîtes LB doivent être striées pour fournir des colonies issues d'une seule bactérie et incubées à 37°C pendant 24-36 heures avant que l'activité de transgénèse soit planifiée.

En utilisant les *E. coli* réhydratées que vous avez préparées lors de la dernière étape et huit boîtes d'agar **LB** (préparées dans l'étape 1), striez une boîte pour chacun de vos groupes (binômes ou quadrinômes) d'élèves. Le but de la striation est de générer des colonies isolées à partir d'une suspension concentrée de bactéries. Dans des conditions favorables, une cellule se multiplie pour produire des millions de cellules génétiquement identiques. En 24 heures, il y a des millions de bactéries individuelles dans une seule colonie d'1 mm.

- Insérez un enseigneur stérile dans la culture de bactéries réhydratées. Insérez l'enseigneur directement dans la fiole sans incliner la fiole. Enlevez l'enseigneur et striez les boîtes comme illustré sur la page suivante. La striation se déroule successivement sur quatre quadrants. La première strie permet d'étaler un peu les cellules. Allez dans les deux sens avec l'enseigneur à peu près une douzaine de fois comme indiqué sur le schéma.
- Dans les quadrants suivants, les cellules deviennent de plus en plus diluées, augmentant la probabilité de produire des colonies isolées. Pour cela, il ne faut plus replonger l'enseigneur dans la fiole et utiliser au maximum la surface de la boîte. Tournez la boîte d'environ 45 degrés (de manière à ce que le mouvement de striation soit confortable) et commencez le deuxième quadrant. Allez dans le quadrant précédant à peu près deux fois et ensuite dans les deux sens comme montré sur le schéma, ceci une dizaine de fois.
- Tournez la boîte de nouveau et répétez la striation.
- Tournez la boîte pour la dernière fois et faites les dernières stries. Répétez les étapes a-d avec les boîtes **LB** restantes. Utilisez le même enseigneur pour toutes les boîtes. Pour éviter la contamination, couvrez chaque boîte immédiatement après sa striation.

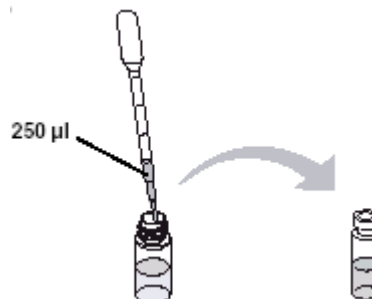




- e. Placez les boîtes à l'envers dans l'incubateur toute la nuit à 37°C ou à température ambiante pendant 2-3 jours si vous ne disposez pas d'incubateur. Les utiliser pour la transgénèse dans les 24-36 heures. **NE PAS REFRIGERER AVANT UTILISATION.**
- f. Les *E. coli* forment des colonies grisâtres qui sont uniformément circulaires avec des bords lisses. Evitez d'utiliser des boîtes avec des colonies contaminantes.

### 3. Préparer le plasmide pGLO

En utilisant une nouvelle pipette stérile, ajoutez 250 µl de solution de transformation dans la fiole d'ADN plasmidique pGLO lyophilisé. Notez que la quantité d'ADN est si petite que la fiole peut sembler vide. Si possible conservez l'ADN hydraté dans un réfrigérateur. (La solution de transformation est utilisée ici parce que c'est une solution stérile disponible sans nucléase. L'eau stérile fonctionnerait aussi bien.)



Solution de transformation ADN plasmidique pGLO lyophilisé

### Préparation étape 3 : avant le TP de transgénèse.

#### 1. Distribuer les solutions.

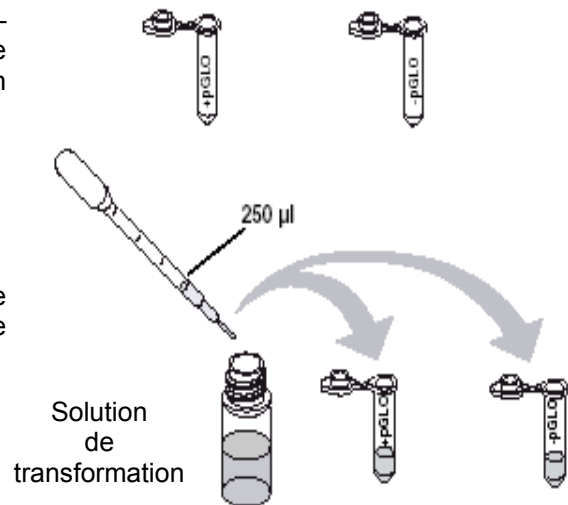
Pour chaque équipe d'élèves, distribuez 1 ml de solution de transformation ( $\text{CaCl}_2$ ) dans les microtubes de 2 ml codés par couleur, fournis dans le kit. Distribuez également 1 ml de milieu nutritif LB dans d'autres tubes. Si le milieu nutritif LB est distribué 1 jour avant le TP, il devra être réfrigéré. Marquez les tubes.

#### 2. Installer les postes de travail pour le TP de transformation

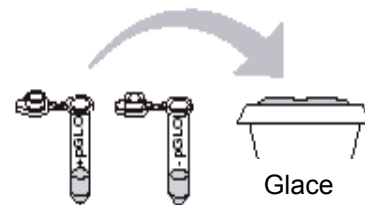
Voir page 10 pour fournir le matériel à chaque poste de travail.

# KIT DE TRANSGENESE – MODE OPERATOIRE DU TP

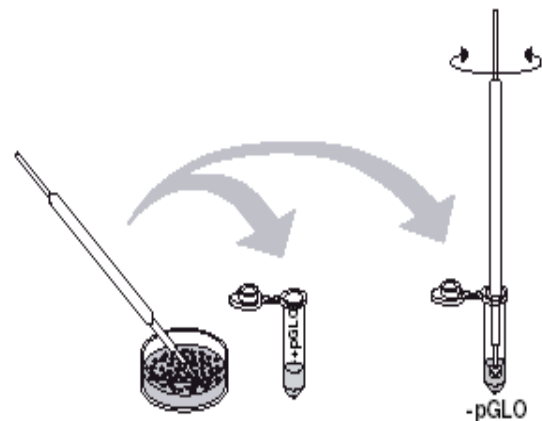
1. Marquez un microtube fermé +pGLO et un autre –pGLO. Marquez les deux tubes avec le nom de votre groupe. Placez les dans le portoir en mousse.



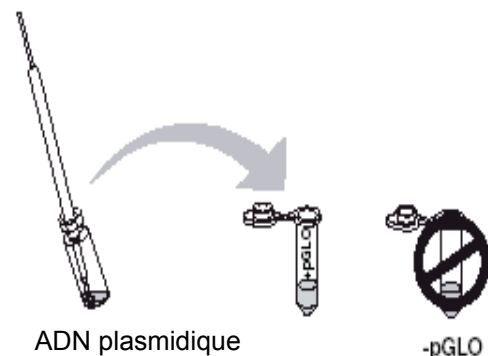
3. Placez les tubes sur la glace.



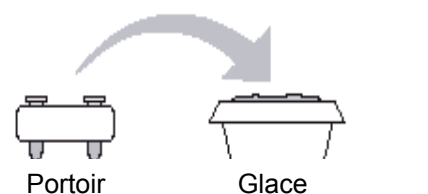
4. Utilisez un enseigneur stérile pour prélever une seule colonie de bactéries de votre boîte. Prenez le tube +pGLO et immergez l'enseigneur dans la solution de transformation, au fond du tube. Tournez l'enseigneur entre votre index et pouce jusqu'à ce que la colonie entière soit dispersée dans la solution de transformation (sans morceaux flottants). Remplacez le tube dans le portoir dans la glace. En utilisant un nouvel enseigneur stérile, répétez l'opération pour le tube –pGLO.



5. Examinez la solution d'ADN plasmidique pGLO avec la lampe UV. Notez vos observations. Immergez un nouvel enseigneur stérile dans le tube contenant l'ADN plasmidique. Retirez un enseigneur plein. Il devrait y avoir un film de solution plasmidique dans l'anneau. Ceci revient à observer un film savonneux dans un anneau pour souffler des bulles de savon. Mélangez le contenu de l'anneau dans la suspension de cellules du tube +pGLO. Fermez le tube et remettez le dans le portoir sur la glace. Fermez aussi le tube –pGLO. N'ajoutez pas d'ADN plasmidique dans le tube –pGLO.



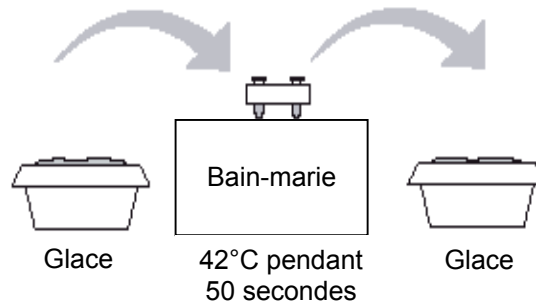
6. Incubez les tubes sur la glace pendant 10 minutes. Assurez-vous d'enfoncer les tubes dans le portoir de manière à ce que le bas des tubes dépasse et fasse contact avec la glace.



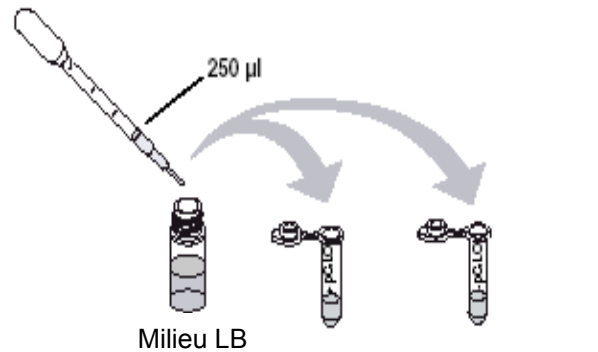
7. Pendant que les tubes sont sur la glace, marquez vos quatre boîtes d'agar sur le fond (pas sur le couvercle) comme suivant : marquez une boîte LB/amp : +pGLO ; marquez la boîte LB/amp/ara : +pGLO ; marquez l'autre boîte LB/amp : -pGLO ; marquez la boîte LB : -pGLO.



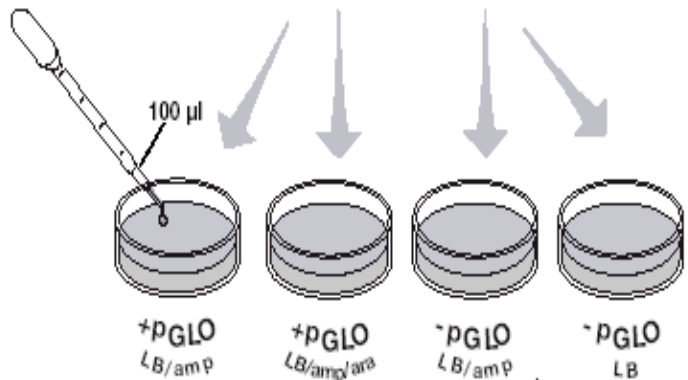
8. Choc thermique. En utilisant le portoir en mousse comme support, transférez les deux tubes +pGLO et -pGLO dans le bain-marie, réglé à 42°C, pendant exactement 50 secondes. Assurez-vous d'enfoncer les tubes dans le portoir de manière à ce que le bas des tubes dépasse et fasse contact avec l'eau chaude. Quand les 50 secondes sont écoulées, replacez les deux tubes sur la glace. Pour les meilleurs résultats de transgénèse, le changement de la glace (0°C) à 42°C et ensuite le retour dans la glace doivent être rapides. Incubez les tubes sur la glace pendant 2 minutes.



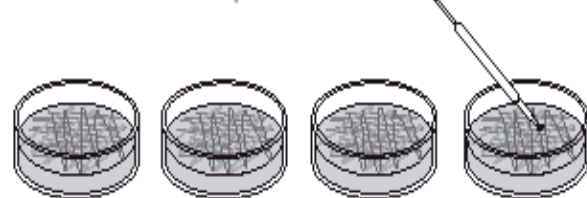
9. Enlevez le portoir contenant les tubes de la glace et placez le sur la pailasse. Ouvrez un tube et, en utilisant une nouvelle pipette stérile, ajoutez 250 µl du milieu nutritif LB dans le tube et refermez le. Répétez avec une nouvelle pipette stérile pour l'autre tube. Incubez les tubes pendant 10 minutes à température ambiante.



10. Tapotez les tubes fermés avec votre doigt pour mélanger. En utilisant une nouvelle pipette pour chaque tube, pipetez 100 µl des suspensions de transformation et de contrôle sur les boîtes appropriées.



11. Utilisez un nouvel ensemencement stérile pour chaque boîte. Etalez les suspensions également sur la surface d'agar en balayant rapidement la surface plate d'un nouvel ensemencement stérile dans les deux sens sur la surface de la boîte.



12. Empilez vos boîtes et rassemblez les. Mettez votre nom de groupe et classe sur le fond de la pile et placez la pile à l'envers dans l'incubateur à 37°C jusqu'au lendemain.

