



# **Biotechnology Explorer<sup>®</sup>**

## **Kit de purification de la Green Fluorescent Protein (GFP)**

**Référence 166-0005-EDU**

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



Pour le service technique, composez le 01.47.95.69.64

### **Un guide d'enseignement complet**

Développés sur cinq années, les kits et les programmes de cours Biotechnology Explorer ont été écrits pour des enseignants, par des enseignants et ils ont été intensivement testés sur le terrain dans un large éventail de salles de cours, du lycée à la faculté. Les kits Biotechnology Explorer qui sont faciles à utiliser, sont un moyen parfait d'introduire l'exaltation de la biotechnologie dans la salle de cours. Chaque kit contient un mode opératoire innovant étape par étape qui fait des kits le choix parfait pour des enseignants aussi bien expérimentés que débutants.

Le Guide de l'enseignant est divisé en trois parties qui aident à assurer un fonctionnement en douceur des TP. Une partie contient des informations sur le contexte, des sujets d'exposés et des suggestions d'exposés qui permettront à tout enseignant, qu'il soit expérimenté ou nouveau venu en terme de biotechnologie, de préparer et concevoir des exposés et des cours pouvant précéder les véritables travaux pratiques. Cette préparation préalable assurera virtuellement que les travaux pratiques fonctionneront en douceur et que les élèves comprendront les concepts inclus dans chaque TP. Il y a une partie détaillée qui porte sur la préparation du TP, complétée par des techniques simples qui contiennent des schémas détaillant la préparation à l'avance des TP. Ceci rend l'installation de chaque TP virtuellement infaillible. En outre, cette partie contient des calendriers qui vous aideront à planifier votre emploi du temps en conséquence. Chaque TP peut être réalisé sur une période de 50 minutes, ce qui devrait convenir à la plupart des emplois du temps.

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

Nous nous efforçons d'améliorer continuellement nos programmes de cours et nos produits. Votre contribution est très importante pour nous. L'incorporation de vos idées, commentaires, critiques et suggestions permettront de faire évoluer les produits Explorer en des aides éducatives encore meilleures.

Vous pouvez trouver le catalogue et le programme des cours sur internet. Consultez notre page d'accueil à <http://explorer.bio-rad.fr> ou appelez-nous au 01 47 95 69 65.

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>
Liste de contrôle de la composition du kit	Composants du kit et accessoires nécessaires .....2
Contenu de cours suggéré	Planification de votre semaine .....4
Liste de contrôle des postes de travail	Installation des TP pour les élèves et l'enseignant .....5
Déroulement de la mise en œuvre	Préparation préalable et cours des élèves .....6
Points importants du cours	Guide détaillé pour les enseignants .....9
Mode opératoire	Mode opératoire schématisé des TP .....16

### **Est-il plus facile de trouver une aiguille dans une botte de foin lorsqu'elle brille?**

Cette activité de travaux pratiques est conçue pour suivre le Kit 1 de Biotechnology Explorer, “Transgenèse bactérienne—le système pGLO” (Référence 166-0003-EDU). Les élèves commencent cette activité avec les bactéries qu'ils ont génétiquement transformées en utilisant le plasmide pGLO. Les bactéries transformées qui produisent la Green Fluorescent Protein (GFP) génétiquement fabriquée sont prélevées à partir de boîtes d'agar et on les laisse se multiplier dans des milieux nutritifs liquides. Les cellules bactériennes sont ensuite rompues (lysées) pour libérer la Green Fluorescent Protein. La GFP est ensuite purifiée à partir des débris bactériens contaminants en utilisant les colonnes de chromatographie à usage unique fournies dans ce kit. Les propriétés fluorescentes uniques de la GFP permettent d'observer tout le processus à l'aide d'une lampe UV de grande longueur d'onde (*c'est-à-dire* une lampe de géologie de poche).

L'un des outils de base de la biotechnologie moderne est l'épissage de l'ADN, la coupure de l'ADN et sa ligature à d'autres molécules d'ADN. Le concept de base de l'épissage de l'ADN est de prélever un fragment d'ADN fonctionnel — disons un gène — dans un organisme et de le combiner à l'ADN d'un autre organisme pour fabriquer la protéine codée par le gène. Le résultat souhaité de l'épissage du gène est pour l'organisme receveur de réaliser les instructions génétiques fournies par son gène nouvellement acquis. Par exemple, certaines plantes peuvent recevoir des gènes de résistance à des parasites ou à des maladies, et dans quelques cas de nos jours, des gènes fonctionnels peuvent être donnés à des personnes qui ont des gènes non fonctionnels ou mutés, comme dans une maladie génétique telle que la mucoviscidose.

Des gènes peuvent être coupés dans de l'ADN humain, animal ou végétal et placés à l'intérieur de bactéries. Par exemple, un gène humain sain pour l'hormone insuline peut être mis dans des bactéries. Dans des conditions correctes, ces bactéries peuvent fabriquer de l'insuline humaine authentique. Lorsqu'on les laisse se multiplier dans des cuves gigantesques (fermenteurs), ces bactéries peuvent être utilisées pour produire en masse la protéine de l'insuline humaine. Cette insuline génétiquement fabriquée est purifiée à l'aide de la chromatographie de la protéine et elle est utilisée pour traiter des patients souffrant de la maladie génétique, le diabète, dont les gènes de l'insuline ne fonctionnent pas normalement.

Un problème courant de la purification de protéines “de conception” génétiquement fabriquées à partir de bactéries transformées est la contamination par des protéines bactériennes endogènes. La chromatographie est une méthode puissante utilisée dans l'industrie de la biotechnologie pour séparer et purifier des protéines d'intérêt à partir de protéines bactériennes. Les protéines purifiées de cette manière peuvent être ensuite utilisées, par exemple, en tant que médicaments pour traiter des maladies humaines ou en tant que produits ménagers comme des enzymes naturelles pour fabriquer de meilleurs détergents de blanchisserie.

Le clonage et l'expression du gène de la GFP (Kit 1 pGLO de transgenèse), suivi de la purification de sa protéine dans le kit 2, est totalement analogue aux processus utilisés en industrie biotechnologique pour produire et purifier des protéines d'une valeur commerciale. La source réelle du gène de la GFP est la méduse bioluminescente *Aequoria victoria*. Dans cet exercice, vous pouvez suggérer à vos élèves un scénario hypothétique dans lequel la GFP a quelque valeur commerciale spécifique et son gène provient d'une source naturelle différente, végétale ou animale. Dans un cas ou dans l'autre, le principe est exactement le même, le gène code pour la GFP.

*“L'ADN biologiquement modifié, poids pour poids, a été le matériau le plus précieux dans le monde. Une seule bactérie microscopique, trop petite pour être vue par l'œil humain, mais contenant le gène pour une enzyme de crise cardiaque, la streptokinase, ou pour “ice-minus” qui a protégé les récoltes contre le gel, pourrait valoir 5 milliards de dollars pour le bon acheteur.”*

**- Michael Crichton - Jurassic Park**

## Guide des enseignants

### Liste de contrôle (✓) de la composition du kit

Cette partie liste les composants fournis dans le kit de Purification de la GFP. Elle liste aussi les accessoires nécessaires. Chaque kit contient le matériel nécessaire pour équiper huit postes de travail. Utilisez ceci comme une liste de contrôle pour récapituler vos besoins avant de commencer les expériences.

Composants fournis avec le kit	Nombre/Kit	(✓)
Ampicilline – lyophilisée	1 flacon	<input type="checkbox"/>
Arabinose – lyophilisé	1 flacon	<input type="checkbox"/>
Comprimé de bouillon LB (pour faire 50 millilitres)	1 comprimé	<input type="checkbox"/>
Anses d'inoculation — paquets de 10 anses	2 paquets	<input type="checkbox"/>
Pipettes — stériles, emballées individuellement	40	<input type="checkbox"/>
Microtubes — 2,0 millilitres, transparents	30	<input type="checkbox"/>
Tubes de culture — 15 millilitres, stériles (paquet de 25)	1 paquet	<input type="checkbox"/>
Tubes de recueil — 5 millilitres, polystyrène	25	<input type="checkbox"/>
Tampon TE (10 mM de Tris, 1 mM d'EDTA, pH 8,0 ; stérile)	1 bouteille	<input type="checkbox"/>
Lysozyme — lyophilisé	1 flacon	<input type="checkbox"/>
Tampon de liaison (4 M de NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> /TE, pH 8,0)	1 bouteille	<input type="checkbox"/>
Tampon d'équilibre de colonne (2 M de NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> /TE, pH 8,0)	1 bouteille	<input type="checkbox"/>
Tampon de lavage de colonne (1,3 M de NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> /TE, pH 8,0)	1 bouteille	<input type="checkbox"/>
Colonnes de chromatographie HIC	8	<input type="checkbox"/>
Bouchons de colonne	1 sachet	<input type="checkbox"/>
Support de microtubes en mousse	8	<input type="checkbox"/>

<b>Accessoires non compris dans le kit</b>	<b>Nombre/Classe</b>	<b>(✓)</b>
Boîtes de transformation (Kit 1 – LB/amp et LB/amp/ara)	2	<input type="checkbox"/>
Lampe UV – Grande longueur d'onde * Bio-Rad Référence 166-0500-EDU	1-4	<input type="checkbox"/>
Four à micro-ondes	1	<input type="checkbox"/>
Ballon de 1 litre	1	<input type="checkbox"/>
Fiole de 250 millilitres	1	<input type="checkbox"/>
Eprouvette graduée de 100 millilitres et 250 millilitres	1	<input type="checkbox"/>
Eau distillée (bidon de 4,5 litres en magasin)		
Thermomètre	1	<input type="checkbox"/>
Centrifugeuse	1	<input type="checkbox"/>
Bécher d'eau pour rincer les pipettes	1	<input type="checkbox"/>
Eau de Javel	10 millilitres	
Marqueurs	1	<input type="checkbox"/>
Réfrigérateur avec congélateur	1	<input type="checkbox"/>

#### **Facultatif**

Plate-forme ou incubateur à agitation/agitation basculante 1

L'utilisation d'un agitateur ou d'un agitateur basculant accélérera la croissance bactérienne dans les cultures liquides mais elle n'est pas obligatoire.

#### **\*Lampe UV**

Les rayonnements ultraviolets peuvent provoquer des lésions des yeux et de la peau. La lumière UV à onde courte provoque plus de lésions que celle à onde longue. La lampe UV de Bio-Rad recommandée pour ce module est à onde longue. Si possible, utilisez des lunettes de sécurité à l'épreuve des UV.

## Contenu de cours suggéré

Il y a cinq parties dans le cours du kit de purification de la GFP, y compris quatre sessions actives de travaux pratiques pour les élèves. Tous les cours sont conçus pour être réalisés sur des périodes consécutives de 50 minutes.

<b>Cours 1</b>	Introduction à la purification. Exposé et discussion.
<b>Cours 2</b>	Prélèvement de colonies et inoculation de cultures cellulaires
<b>Cours 3</b>	Phase 1 de la purification — Concentration bactérienne et lyse
<b>Cours 3</b>	Phase 2 de la purification — Elimination des débris bactériens
<b>Cours 3</b>	Phase 3 de la purification — Chromatographie des protéines

## Généralités sur la préparation préalable par les enseignants

Cette partie présente l'emploi du temps recommandé pour la préparation préalable à réaliser par l'enseignant. Le guide détaillé de la préparation préalable commence à la page 6.

<u>Activité de préparation</u>	<u>Quand</u>	<u>Temps requis</u>
Lecture du manuel	Immédiatement	1 heure
Préparation des milieux de culture liquides	Avant le cours 2	15 minutes
Installations des postes de travail	Le jour de chaque cours	5 minutes/jour

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

### Postes de travail des élèves

Les matériaux et les consommables qui doivent être présents à chaque poste de travail d'élèves avant de commencer chaque activité de TP sont listés ci-dessous. Les composants fournis dans ce kit sont suffisants pour équiper 8 postes de travail complets des élèves.

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

Les matériaux, les consommables et les instruments qui doivent être présents à un emplacement commun qui est accessible à tous les élèves au cours de chaque activité de TP sont également listés ci-dessous. C'est à l'enseignant de décider si les élèves doivent avoir accès aux solutions de tampons/instruments communs ou si l'enseignant doit distribuer les solutions et faire fonctionner les instruments.

<b>Cours 2</b>		<b>Cours 3 Phase 2</b>	
<b>Postes de travail des élèves</b>	<b>Nombre/groupe</b>	<b>Postes de travail des élèves</b>	<b>Nombre/groupe</b>
Boîtes de transformation du Kit 1 (LB/amp/ara et LB/amp)	2	Microtube	1
Anses d'inoculation	2	Pipette	1
Tubes de culture contenant 2 ml de milieu de culture	2	Portoir de microtubes	1
Marqueur	1	Marqueur	1
Support de tubes à essai	1-4	Bécher d'eau pour rincer les pipettes	1
		Colonne de chromatographie HIC	1
		Bouchon de colonne	1
<b>Poste de travail de l'enseignant</b>		<b>Poste de travail de l'enseignant</b>	
Incubateur ou plate-forme à agitation (facultatif)	1	Tampon de liaison	1 flacon
Lumière UV	1-4	Tampon d'équilibre	1 flacon
		Centrifugeuse	1
		Lumière UV	1-4
<b>Cours 3 Phase 1</b>		<b>Cours 3 Phase 3</b>	
<b>Postes de travail des élèves</b>		<b>Postes de travail des élèves</b>	
Microtube	1	Tubes de recueil	3
Pipette	1	Pipette	1
Portoir de microtubes	1	Portoir de microtubes	1
Marqueur	1	Marqueur	1
Bécher d'eau pour rincer les pipettes	1	Bécher d'eau pour rincer les pipettes	1
<b>Poste de travail de l'enseignant</b>		Colonne de chromatographie HIC	1
Solution TE	1 flacon	Bouchon de colonne	1
Lysozyme (réhydraté)	1 flacon	<b>Poste de travail de l'enseignant</b>	
Centrifugeuse	1	Tampon de lavage	1 flacon
Lumière UV	1-4	Tampon d'équilibre	1 flacon
		Tampon TE	1 flacon
		Lumière UV	1-4



## Préparation préalable des TP par l'enseignant

Cette partie décrit la préparation à réaliser au préalable par l'enseignant pour les sessions actives de TP dans les cours 2 et 3.

**Cours 2** Inoculation — Développement d'une culture cellulaire

**Cours 3-1** Phase 1 de la purification — Concentration bactérienne et lyse

**Cours 3-2** Phase 2 de la purification — Elimination des débris bactériens

**Cours 3-3** Phase 3 de la purification — Chromatographie des protéines

Pour que les élèves commencent le cours 2, ils auront besoin des deux boîtes de transformation (LB/amp/ara et LB/amp) du Kit 1. Pour éviter une contamination, les cellules bactériennes provenant de ces boîtes doivent être utilisées dans les 3 jours qui suivent l'activité de transformation. Au terme de l'activité de transformation, stockez les boîtes de transformation dans un réfrigérateur pour garder les cellules fraîches.

### Cours 2 - Inoculation — Développement d'une culture cellulaire Préparation préalable

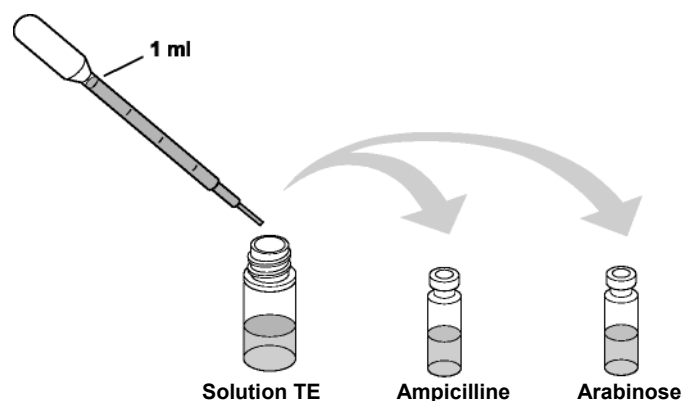
<b>Objectifs</b>	Préparation des milieux de culture liquides (6–8 ci-dessous) Installations des postes de travail des élèves et de l'enseignant (Page 5) Installation de la table basculante ou de l'incubateur à agitation ou du four incubateur
<b>Temps requis</b>	30 minutes

**Remarque : Utilisez une technique stérile lors de la préparation des matériaux suivants.**

#### Préparation des solutions d'ampicilline et d'arabinose

L'ampicilline et l'arabinose sont expédiés sous forme sèche dans de petits flacons. Après réhydratation, les deux sont ajoutés dans des milieux de croissance liquides. L'ampicilline est un antibiotique qui inhibe la croissance des contaminants bactériens pouvant être introduits à partir de l'environnement. L'arabinose est un sucre qui provoque la surexpression de la protéine fluorescente en vert dans des cellules clonées.

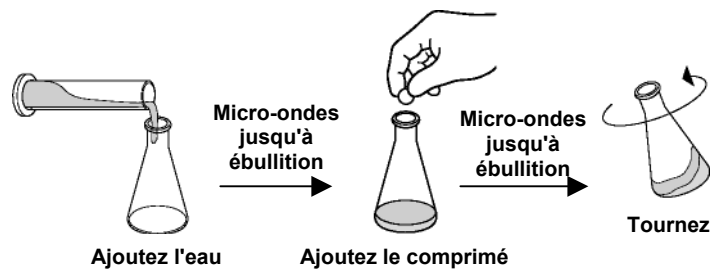
A l'aide d'une pipette stérile, ajoutez 3 millilitres de solution TE directement dans le flacon contenant l'ampicilline. A l'aide d'une autre pipette stérile, ajoutez 3 millilitres de solution TE pour réhydrater l'arabinose. Mélangez les flacons et faites-les tourner doucement ou passez-les au vortex pour aider la réhydratation.



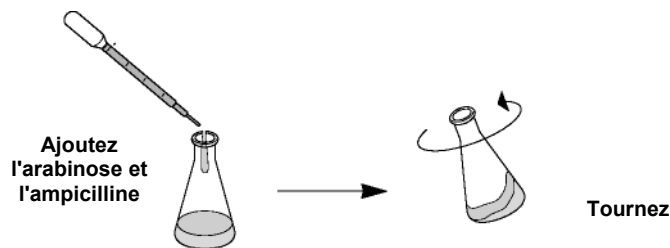
**Remarque : Réhydratez l'ampicilline et l'arabinose le jour où vous préparez le milieu de croissance liquide. L'arabinose requiert 10 minutes pour se dissoudre — soyez patient.**

### Préparation des milieux nutritifs liquides

Dans le cours 2, chaque poste de travail des élèves aura besoin de deux tubes de culture contenant 2 millilitres de milieu nutritif liquide. Ceux-ci seront utilisés pour développer des cultures bactériennes. Pour préparer les milieux liquides, ajoutez 55 millilitres d'eau distillée dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 ml et chauffez jusqu'à ébullition dans un micro-ondes. Ensuite, ajoutez le comprimé unique de LB dans la fiole. Laissez le comprimé tremper dans de l'eau très chaude pendant 20 minutes ; ceci aidera la dissolution. Chauffez de nouveau la fiole jusqu'à ébullition dans le micro-ondes. Faites tourner la fiole pour dissoudre le comprimé. Répétez le chauffage et faites tourner plusieurs fois jusqu'à dissolution complète du comprimé, mais prenez soin de laisser la fiole refroidir un peu avant de la faire tourner de sorte que le milieu très chaud ne vous éclabousse pas les mains.



Lorsque le comprimé est complètement dissous, laissez le milieu LB refroidir de sorte qu'il soit possible de toucher l'extérieur de la fiole ou au-dessous de 50 °C. Lorsque le milieu refroidit, prenez les solutions d'ampicilline et d'arabinose qui ont été préparées dans l'étape 1. Lorsque le milieu a refroidi, utilisez une nouvelle pipette et transférez 0,5 millilitre d'arabinose et 0,5 ml d'ampicilline dans la fiole. Tournez la fiole pour mélanger les composants. Vous pouvez jeter les solutions résiduelles d'arabinose et d'ampicilline.



### Distribution des milieux de culture liquides

En utilisant une nouvelle pipette comme ci-dessus, distribuez 2 millilitres de milieu liquide dans 16 tubes de culture. (Ceci peut être accompli en transférant deux fois 1 ml avec une pipette stérile.) Stockez les tubes de culture dans un réfrigérateur jusqu'au jour de leur utilisation. Neuf tubes de culture supplémentaires sont fournis. Vous pouvez souhaiter remplir ces tubes de milieu et les utiliser pour des démonstrations ou pour des cultures liquides de remplacement pour les groupes d'élèves qui n'ont pas réussi leur culture.

Pour le cours 2, chaque poste de travail d'élèves aura besoin de deux tubes de culture de 15 millilitres, chacun contenant 2 millilitres de milieu de culture liquide. Dans ce cours, les élèves inoculent leurs cultures de 2 millilitres avec les bactéries transformées provenant du Kit 1.

**Remarque :** Une agitation vigoureuse des cultures cellulaires liquides fournit plus d'oxygène aux cellules en division, leur permettant de se multiplier plus rapidement. Un incubateur à agitation aide ce processus. Si vous ne disposez pas d'un tel dispositif, les cultures cellulaires peuvent être agitées manuellement pendant 30 secondes et incubées à 32 °C pendant 24 heures. Faites simplement agiter les tubes de culture bouchés par les élèves pendant 30 secondes, comme ils le feraient avec une bombe de peinture. Plus l'agitation manuelle est vigoureuse, plus la croissance est importante, laquelle résulte en une plus grande production de GFP. Après agitation, posez les tubes à plat dans le four incubateur pendant 1 ou 2 jours. Lorsque les tubes sont orientés horizontalement, plus de surface spécifique du milieu de culture est exposée à l'air dans le tube, permettant à plus d'oxygène de diffuser dans les cellules. Agitez périodiquement au cours du 2<sup>ème</sup> jour d'incubation.

Si vous disposez d'une table basculante, d'un bain-marie à agitation ou d'un agitateur orbital, ajustez le dispositif pour qu'il fonctionne entre 40 et 200 tr/min. De nouveau, plus l'agitation est vigoureuse, mieux c'est. Une agitation à 32 °C fournira suffisamment de croissance bactérienne en moins de 24 heures. Les cellules se développeront également suffisamment à température ambiante (sous agitation basculante). Les cultures stationnaires ne sont pas recommandées pour un développement à température ambiante. Dans un cas ou dans l'autre, en observant la période d'incubation appropriée, des cultures cellulaires inoculées avec des colonies transformées blanches et vertes doivent apparaître en vert brillant sous lumière ultraviolette.

### **Cours 3 - Phase 1 de la purification**

#### **Concentration bactérienne et lyse**

##### **Préparation préalable**

<b>Objectif</b>	Installez les postes de travail Réhydratez le lysozyme Réglez la centrifugeuse
<b>Temps requis</b>	10 minutes

Réhydratez le flacon de lysozyme lyophilisé avec 1 millilitre de solution TE en utilisant une nouvelle pipette. Mélangez doucement pour aider la remise en suspension. Conservez le flacon de lysozyme sur de la glace ou dans un réfrigérateur jusqu'à utilisation.

### **Cours 3 - Phase 2 de la purification**

#### **Élimination des débris bactériens**

<b>Objectif</b>	Installez les postes de travail (la seule préparation requise) Réglez la centrifugeuse
<b>Temps requis</b>	10 minutes

### **Cours 3 - Phase 3 de la purification**

#### **Chromatographie des protéines**

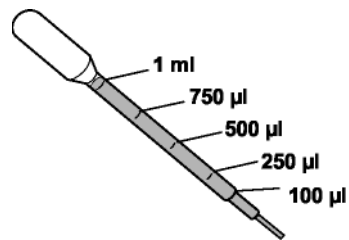
<b>Objectif</b>	Installez les postes de travail (la seule préparation requise)
<b>Temps requis</b>	10 minutes

## Points du cours à souligner

Cette partie décrit les étapes du mode opératoire de l'expérience qui peuvent être techniquement difficiles ou qui sont extrêmement importantes pour le résultat global et la compréhension des expériences. Les enseignants doivent attirer l'attention de leurs élèves sur ces points et, lorsque c'est possible, leur montrer la technique avant qu'ils ne commencent.

### Utilisation de la pipette

Avant de commencer les sessions de travaux pratiques, faites remarquer aux élèves les graduations présentes sur la pipette. Les marques de 250  $\mu\text{l}$  et de 1 ml seront utilisées comme des unités dans les cours 2 à 5.



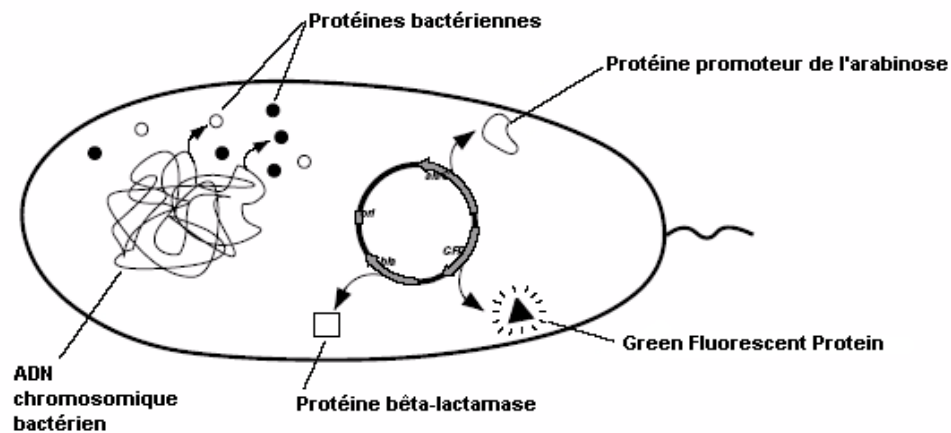
## Cours 1 - Révision de la transformation génétique

### Milieux de culture

Les milieux d'agar liquides et solides sont appelés bouillon LB (d'après Luria-Bertani) et ils sont constitués d'un extrait de levure et d'un produit de digestion enzymatique de sous-produits de viandes qui fournit 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 un dérivé d'algue, fond lorsqu'elle est chauffée et elle refroidit pour former un gel solide (très analogue à de la gelée) et elle fonctionne pour fournir un support solide sur lequel cultiver des bactéries.

### Sélection des antibiotiques

Le plasmide pGLO qui contient le gène GFP contient également le gène de la bêta-lactamase, une protéine qui fournit aux bactéries la résistance à un antibiotique, l'ampicilline. La protéine bêta-lactamase est produite et sécrétée par des bactéries qui contiennent le plasmide. La bêta-lactamase sécrétée inactive l'ampicilline, ne permettant qu'aux cellules transformées de croître en sa présence. Seules les bactéries transformées qui contiennent le plasmide pGLO et produisent de la bêta-lactamase, peuvent survivre en présence d'ampicilline. (Voir le schéma ci-dessous.)



Plasmide génétiquement modifié utilisé pour insérer de nouveaux gènes dans des bactéries.

"GFP" Gène qui code pour la Green Fluorescent Protein



"bla" Gène qui code pour la bêta-lactamase, une protéine qui donne aux bactéries la résistance à l'antibiotique ampicilline



"araC" Gène qui code pour AraC, une protéine qui régule la production de la Green Fluorescent Protein



### Régulation génique

L'un des points éducatifs principaux du kit pGLO de transgénèse était le concept de la régulation génique. Dans ce kit, les bactéries qui ont été transformées avec le plasmide pGLO ont été cultivées sur des boîtes d'agar LB/amp et LB/amp/ara. L'expression du gène GFP est sous le contrôle régulateur du promoteur de l'arabinose. Ainsi, lorsque les bactéries ont été cultivées sur de l'agar LB contenant de l'arabinose (LB/amp/ara), la GFP a été exprimée et les colonies sont apparues en vert brillant. Au contraire, lorsque les bactéries ont été cultivées sur de l'agar LB qui ne contenait pas d'arabinose (LB/amp), le gène a été éteint et les colonies sont apparues en blanc.

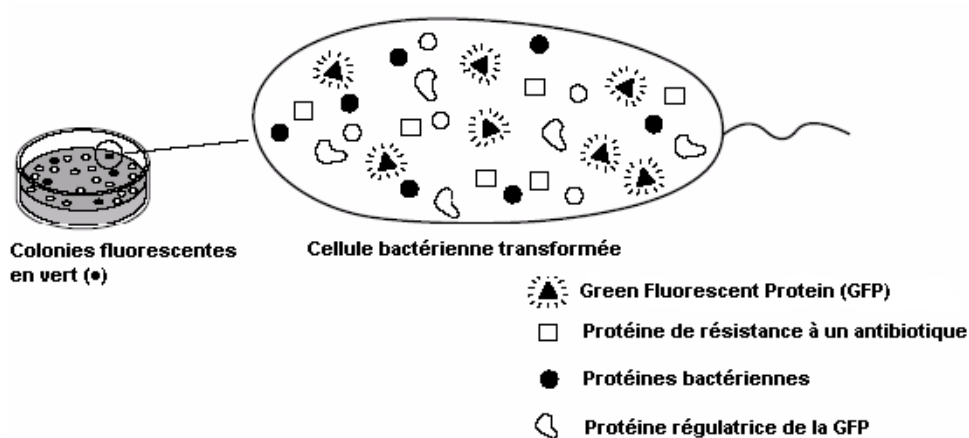
Le concept de la régulation génique peut être encore étendu dans ce kit. Si une colonie blanche (qui contient le gène GFP mais n'exprime pas la GFP en l'absence d'arabinose) estensemencée dans des milieux liquides LB/amp/ara, l'arabinose présent dans le milieu sera repris par les bactéries, ce qui ensuite active le gène GFP. Ainsi les élèves ensemenceront une colonie blanche qui a le gène GFP dormant dans des milieux contenant de l'arabinose. L'arabinose active le gène dormant, produisant une culture liquide fluorescente en vert. En outre, l'élève ensemencera une colonie fluorescente en vert dans une culture liquide LB/amp/ara. Dans ce cas, le gène restera activé et la culture liquide fluorescera également en vert brillant.

## Cours 2 - Inoculation—Développement d'une culture cellulaire

### Isolement de colonies bactériennes simples

Dans cette activité, les élèves prélèveront une colonie blanche de leurs boîtes LB/amp et une colonie verte de leurs boîtes LB/amp/ara pour une propagation dans des cultures liquides parallèles.

Le clonage décrit l'isolement et la propagation d'un gène unique. Parce qu'une colonie bactérienne unique provient d'une bactérie unique, toutes les bactéries individuelles dans la colonie sont génétiquement identiques et elles sont appelées des clones. Lorsque les élèves prélèvent des colonies (ou clones) de bactéries vertes et blanches de leurs boîtes d'agar, des colonies isolées simples sont choisies pour être transférées dans le milieu de culture. Les colonies isolées simples qui sont séparées des autres colonies sur l'agar par au moins 1 ou 2 millimètres ne sont généralement pas contaminées par d'autres bactéries. Le schéma ci-dessous illustre les gènes exprimés dans des colonies vertes fluorescentes.



L'enseignant peut souhaiter faire une démonstration de comment prélever une colonie simple bien isolée à partir de l'agar en utilisant une anse d'inoculation. De nouveau, il est très important d'observer une technique stérile correcte lors du prélèvement des colonies et de la dissociation subséquente des colonies dans les tubes de culture. Rappelez aux élèves de garder leurs boîtes couvertes et leurs tubes bouchés, autant que possible.

### Cultures liquides pendant une nuit

Le gène GFP nécessite une température d'incubation de 32 °C (ou inférieure) pour obtenir un repliement optimal des protéines et une fluorescence. Si vous ne disposez pas d'un incubateur à 32 °C, les bactéries peuvent être cultivées sous agitation à température ambiante, mais ceci peut demander un période de culture de 48 heures, plutôt que de 24 heures.

Dans ce cours, les cultures bactériennes liquides produiront une croissance et une production suffisante de protéine simplement en incubant pendant une nuit à 32 °C. Toutefois, une agitation vigoureuse de la culture liquide délivre plus d'oxygène aux cellules en division, leur permettant de croître plus rapidement et de produire plus de GFP. Pour cette raison, nous recommandons fortement d'utiliser un incubateur à agitation. Si vous ne disposez pas d'un incubateur à agitation, les cultures cellulaires peuvent être agitées manuellement pendant 30 secondes puis incubées 1 ou 2 jours à 32 °C. Agitez simplement vigoureusement les tubes de culture bouchés pendant 30 secondes — comme une bombe de peinture. Puis placez les tubes à plat dans le four incubateur pendant 1 ou 2 jours. Le placement des tubes horizontalement dans le four maximise la surface

spécifique des cultures et l'échange d'oxygène. Le retrait des tubes et leur agitation périodique au cours de l'incubation amplifiera encore la croissance cellulaire.

Plus l'agitation est constante et vigoureuse, plus la croissance sera importante ainsi que la production de GFP. Dans tous les cas, après l'incubation, la culture liquide devra fluorescer en vert brillant lors d'une exposition à une lumière UV.

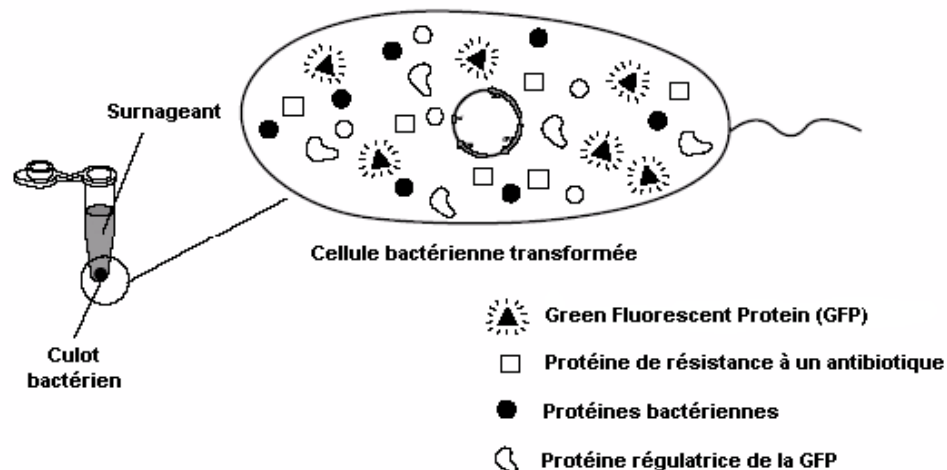
Conditions de culture	Jours requis
32 °C — agitation	1 jour
32 °C — sans agitation	1 ou 2 jours
Température ambiante — agitation	2 jours
Température ambiante — sans agitation	Non recommandé

### Cours 3 - Phase 1 de la purification Concentration bactérienne et lyse

#### Centrifugation

La centrifugation est une technique utilisée pour séparer des molécules d'après leur taille par rotation à vitesse élevée (un peu analogue au cycle de rotations dans une machine à laver où les vêtements sont compactés contre les parois du laveur). Dans cette session de TP, les cellules bactériennes plus lourdes se sépareront du milieu de croissance liquide par une étape unique de centrifugation. La centrifugation entraîne la formation d'un "**culot**" de bactéries qui se retrouve au fond du tube et d'un "**surnageant**" liquide qui se trouve au-dessus du culot. Le recueil et la concentration des bactéries est une première étape dans l'isolement de la GFP à partir des bactéries qui ont été cultivées dans le milieu liquide dans le Cours 2.

A l'aide d'une pipette jetable, les élèves transfèrent les 2 millilitres de culture du tube de culture dans un microtube de 2 millilitres — en une giclée douce. Ensuite ils centrifugeront le culot bactérien vers le fond du tube et déverseront (jetteront) le surnageant liquide présent au-dessus du culot. Le culot fluorescera en vert brillant lors d'une exposition à une lumière UV parce que la protéine verte est exprimée au sein des bactéries. A ce point, cette brève discussion sur un "culot" et un "surnageant" peut être utile.



#### Remise en suspension du culot bactérien

Dans cette étape du mode opératoire, il est essentiel que la totalité du culot bactérien soit remis en suspension dans du tampon TE. Les élèves doivent ajouter 250 µl de tampon TE au culot de bactéries et ensuite ils doivent remettre en suspension les culots en aspirant et en rejetant soigneusement mais rapidement avec la pipette les cellules avec le volume de 250 µl de tampon.

(Si vous disposez de vortex, un passage doux au vortex aidera également à la remise en suspension.) Le volume dans le tube peut être examiné visuellement pour la présence d'agrégats de bactéries non remises en suspension. Si vous observez des agrégats, les élèves doivent continuer à aspirer et rejeter avec la pipette pour remettre complètement les bactéries en suspension.

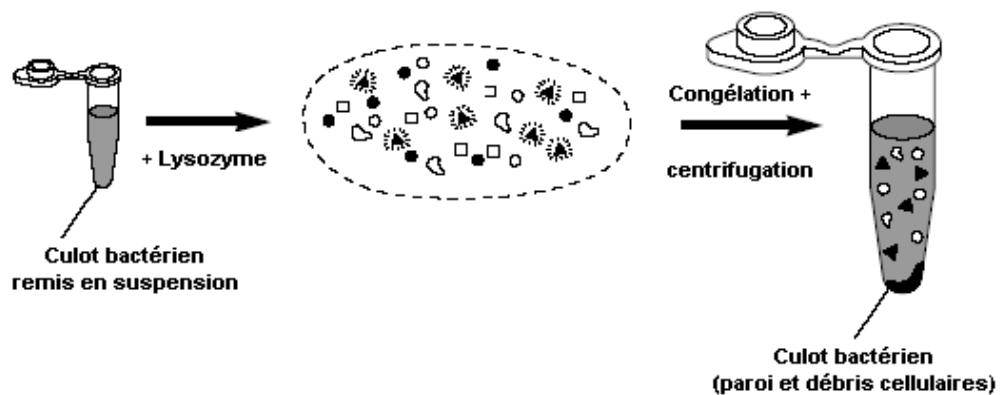
### Lysozyme

Le lysozyme est une enzyme qui fonctionne pour dégrader (ou lyser) la paroi des cellules bactériennes, par clivage des résidus polysaccharidiques (sucres) dans les parois cellulaires. L'étape de congélation-décongélation qui suit dans ce cours aide à la rupture complète de la paroi et de la membrane interne. La rupture complète ou "lyse" libère les composants solubles, y compris la GFP. Le lysozyme se trouve naturellement dans les larmes humaines, agissant comme un agent bactéricide pour aider à prévenir des infections bactériennes des yeux. Le lysozyme tire son nom de son aptitude naturelle à "lyser" les bactéries.

## Cours 3 – Phase 2 de la purification

### Élimination des débris bactériens

Cette étape de centrifugation finale sert à séparer les grosses particules des bactéries lysées (telles que la membrane et les parois cellulaires) des protéines beaucoup plus petites, y compris la GFP. Les débris bactériens plus gros sont transformés en culot au fond du microtube, alors que les protéines plus petites restent dans le surnageant. A ce stade, le surnageant fluorescera en vert brillant lors d'une exposition à une lumière UV. Ensuite, les élèves prélèveront très soigneusement le surnageant du culot et le placeront dans un nouveau microtube de 2,0 millilitres en utilisant une pipette propre de 1 millilitre. Ceci doit être réalisé immédiatement pour empêcher les débris du culot de filtrer et de contaminer le surnageant et de potentiellement boucher la colonne de chromatographie dans la technique de purification du cours 3 phase 3.



## Cours 3 – Phase 3 de la purification

### Chromatographie des protéines

La chromatographie est une technique puissante pour séparer les protéines dans un mélange complexe. Les bactéries contiennent des milliers de protéines endogènes desquelles la GFP doit être séparée. En chromatographie, un cylindre ou colonne est rempli de manière dense avec un "lit" de billes microscopiques. Ces billes forment une matrice que les protéines doivent traverser avant d'être recueillies. La matrice que les élèves emploieront dans ce cas présente une "affinité" pour la molécule d'intérêt (GFP), mais pas pour les autres protéines bactériennes présentes dans le mélange. La GFP "colle" à la colonne, lui permettant d'être séparée des contaminants bactériens.



Les substances hydrophobes ("qui détestent l'eau") ne se mélangent pas bien avec l'eau. Lorsqu'elles sont mises dans de l'eau salée, elles tendent à coller ensemble. Certains acides aminés qui constituent les protéines sont très hydrophobes. Dans de l'eau salée, ces parties d'une protéine tendent à coller étroitement à d'autres substances hydrophobes. Une concentration élevée de sel provoque une véritable modification de la structure tridimensionnelle de la protéine de telle manière que les régions hydrophobes de la protéine sont plus exposées à la surface de la protéine et les régions hydrophiles ("qui aiment l'eau") sont plus protégées.

Une colonne de chromatographie qui est remplie de billes hydrophobes est appelée une matrice d'interaction hydrophobe. Lorsque l'échantillon est chargé sur la matrice dans de l'eau salée, les protéines hydrophobes présentes dans l'échantillon colleront aux billes de la colonne. Plus elles sont hydrophobes, mieux elles colleront. Lorsque le sel est retiré, la structure tridimensionnelle de la protéine se modifie de nouveau de telle manière que les régions hydrophobes de la protéine se déplacent maintenant vers l'intérieur de la protéine et les régions hydrophiles ("qui aiment l'eau") se déplacent vers l'extérieur. Le résultat est que les protéines hydrophobes ne collent plus aux billes et s'écoulent vers le bas de la colonne, séparées des autres protéines.

### **Chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC)**

Dans les cours 4 et 5, la GFP soluble présente dans le surnageant est purifiée à l'aide d'une chromatographie d'interaction hydrophobe (HIC). La GFP présente plusieurs extensions d'acides aminés hydrophobes, ce qui fait que la protéine totale est très hydrophobe. Lorsque le surnageant, riche en GFP, traverse une colonne de HIC dans un tampon fortement salé (tampon de liaison), les régions hydrophobes de la GFP collent aux billes de la HIC. D'autres protéines qui sont moins hydrophobes (ou plus hydrophiles) traversent directement la colonne. Cette technique simple permet la purification de la GFP à partir d'un mélange complexe de protéines bactériennes.

### **Chargement du surnageant de GFP sur la colonne de chromatographie**

Lorsque les élèves chargent le surnageant de GFP sur leurs colonnes, il est très important qu'ils ne perturbent pas la surface supérieure du lit de la colonne lorsqu'ils réalisent la technique de chromatographie. La matrice de la colonne présente une surface supérieure relativement plate. Un lit de colonne légèrement inégal n'affecte pas tellement la technique. Toutefois, les étapes suivantes de chargement, de lavage et d'éluion doivent minimiser la perturbation de la colonne de manière à ce que les billes ne se remettent pas en suspension dans le tampon. Lorsque vous chargez le surnageant de GFP sur la colonne, vous devez insérer l'embout de la pipette dans la colonne et le faire reposer contre la paroi de la colonne. Le surnageant doit être expulsé lentement de la pipette, le long de la paroi de la colonne. Lorsque le surnageant a pénétré complètement dans la colonne, un anneau vert de fluorescence doit être visible en haut du lit lorsque vous regardez avec une lumière UV.

Il y a quatre tampons différents qui sont utilisés dans la technique de HIC. Chaque tampon doit être pipeté lentement le long de la paroi de la colonne pour minimiser la perturbation des résines de la colonne.

### **Tampon d'équilibre**

Un tampon à teneur moyenne en sel (2 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) qui est utilisé pour "équilibrer" ou "amorcer" la colonne de chromatographie pour la liaison de la GFP.

### **Tampon de liaison**

Un volume égal de tampon de liaison à teneur élevée en sel (4 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) est ajouté au lysat bactérien. Le résultat final est que le surnageant contenant la GFP a la même concentration en sel que la colonne équilibrée. Lorsqu'elles sont dans une solution à teneur élevée en sel, les régions hydrophobes des protéines sont plus exposées et plus aptes à interagir avec et se lier aux régions hydrophobes de la colonne.

### **Tampon de lavage**

Un tampon de lavage à teneur moyenne en sel (1,3 M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) est utilisé pour laver les protéines faiblement associées de la colonne ; les protéines qui sont fortement hydrophobes restent liées à la colonne. Lorsque le tampon de lavage est appliqué à la colonne, vous devez de nouveau prendre soin de minimiser la perturbation de la résine de la colonne. Un pipetage lent et régulier le long de la paroi de la colonne est le plus efficace. A ce point, un "anneau" de GFP doit commencer à pénétrer la surface supérieure de la matrice (~ 1 à 2 mm dans le lit).

### Tampon d'élution

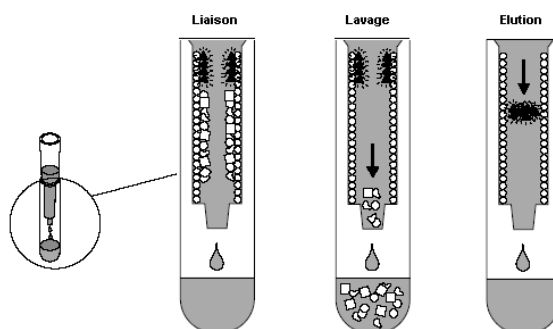
Un tampon à teneur basse en sel (solution TE ; 10 mM de Tris/EDTA) est utilisé pour laver la GFP de la colonne. Dans les tampons à teneur basse en sel (qui ont une concentration plus élevée de molécules d'eau), la conformation de la GFP se modifie de telle manière que les résidus hydrophiles de la GFP sont plus exposés à la surface, faisant que la GFP a une affinité plus élevée pour le tampon que la colonne, permettant ainsi à la GFP d'être séparée de la colonne par lavage. 0,75 millilitre de tampon TE (élution) est appliqué doucement à la colonne, comme il a été décrit ci-dessus. La solution TE rompra les interactions hydrophobes entre la GFP et le lit de la colonne, faisant que la GFP se détache et "s'élue" de la colonne. La GFP doit descendre dans la colonne sous la forme d'un anneau fluorescent vert brillant. Ceci s'observe facilement en utilisant une lumière UV. Si le lit de la colonne a été perturbé dans l'une quelconque des étapes précédentes, la GFP ne s'éluera pas sous la forme d'un anneau distinct, mais elle s'éluera sous une forme plus tordue et irrégulière. Toutefois, l'élution doit encore se produire à cette étape. Si elle est réussie, le tube de recueil 3 doit fluorescer en vert brillant.

### Stockage des tubes

Tous les tubes de recueil et leurs constituants peuvent être recouverts d'un parafilm ou bouchés et stockés pendant approximativement 1 à 2 semaines dans le réfrigérateur.

### Conseils importants pour réussir une chromatographie

1. Placez doucement la colonne dans les tubes de recueil. Si vous enfoncez fermement la colonne dans les tubes de recueil, cela créera un joint étanche à l'air et l'échantillon ne circulera pas. Vous pouvez créer un "support en papier" en pliant un petit morceau de papier, à peu près de la taille d'une allumette, et le coincer entre la colonne et le tube de recueil. Ce support empêchera la formation d'un joint étanche à l'air et assurera la circulation de la colonne.
2. Le débit de la colonne peut être augmenté dans l'étape d'élution en replaçant fermement le bouchon du haut sur la colonne. Ceci crée une pression d'air qui pousse sur le lit de la colonne, faisant que l'échantillon circule plus vite.
3. Les colonnes sont conçues pour s'égoutter lentement. La technique complète de chromatographie doit prendre 20 à 30 minutes. Il est important de ne pas retirer la colonne plus que nécessaire de tube de recueil à tube de recueil, car le mouvement peut provoquer une perturbation importante du lit de la colonne.

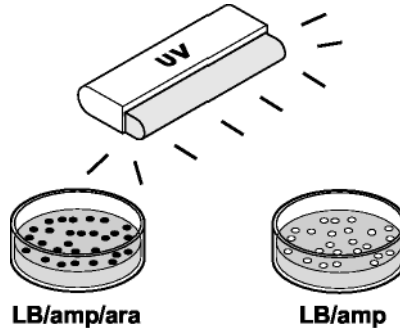


## Purification de la GFP — Mode opératoire

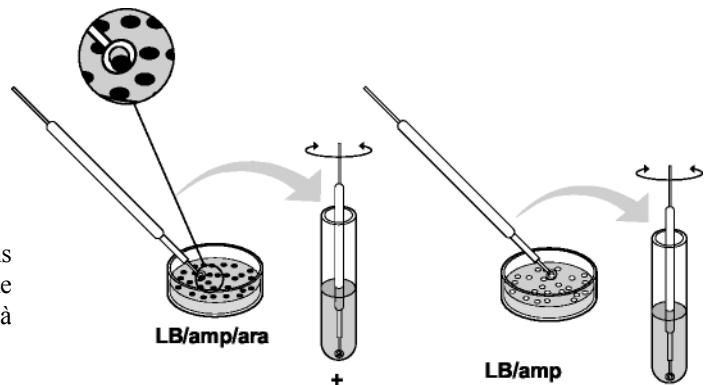
### Cour 2 - Inoculation

#### Développement de cultures cellulaires

1. Retirez les boîtes de transformation de l'incubateur et examinez avec une lumière UV. Identifiez plusieurs colonies vertes qui ne touchent pas d'autres colonies sur la plaque LB/amp/ara. Identifiez plusieurs colonies blanches sur la plaque LB/amp.



2. Prenez deux tubes de culture contenant le milieu de culture LB/amp/ara. Marquez un "+" et un "-". A l'aide d'une anse stérile, posez délicatement l'anse sur une colonie verte et immergez-la dans le tube "+". Avec une nouvelle anse stérile, recommencez avec une colonie blanche et immergez-la dans le tube "-" (il est très important de ne prélever qu'une seule colonie). Faites tourner l'anse entre l'index et le pouce pour disperser la colonie entière.



3. Bouchez les tubes et placez-les dans l'incubateur à agitation ou sur la plate-forme à agitation et cultivez pendant une nuit à 32 °C ou 2 jours à température ambiante.

ou

Bouchez les tubes et agitez vigoureusement à la main. Placez-les horizontalement pendant 24 à 48 heures. Retirez-les et agitez-les périodiquement à la main

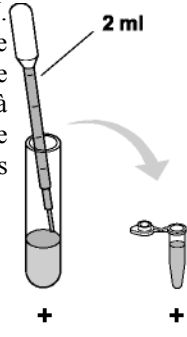
Incubez à 32°C pendant une nuit ou 2 jours à température ambiante



Incubate at 32 °C overnight or 2 days at room temperature

**Cours 3 – Phase 1 de la purification**  
**Concentration bactérienne**

1. Marquez un microtube "+" avec votre nom et la période du cours. Retirez vos cultures liquides de l'agitateur et observez avec la lumière UV. Notez toute différence de couleur entre les deux cultures. A l'aide d'une pipette, transférez 2 ml de culture liquide "+" dans le microtube pendant 5 minutes dans la centrifugeuse à vitesse maximale. La pipette utilisée dans cette étape peut être rincée de d'eau et utilisée pour toutes les étapes suivantes de cette période de travaux pratiques.

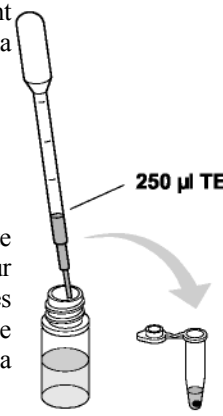


2. Déversez le surnageant et observez le culot UV.



us lumière

3. A l'aide d'une pipette rincée, ajoutez 250 µl dans le tube. Remettez le culot complètement en aspirant et rejetant rapidement avec la plusieurs fois.



de solution TE  
 en suspension  
 pipette

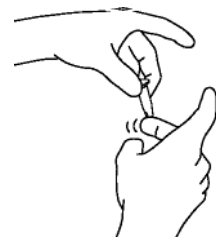
4. A l'aide d'une pipette rincée, ajoutez 1 goutte au culot bactérien remis en suspension pour digestion enzymatique de la paroi des bactériennes. Mélangez doucement le tapotant le tube. Observez le tube sous la

de lysozyme  
 démarrer la  
 cellules  
 contenu en  
 lumière UV.

5. Placez le microtube dans le congélateur pendant 10 min. La congélation produit une rupture complète des bactéries.



1 goutte de lysozyme



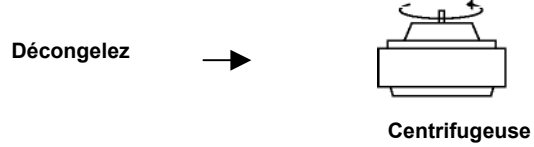
pendant 10 min. La  
 bactéries.

→ Congélateur

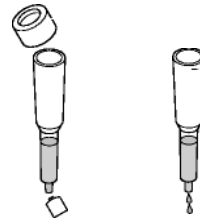
### Cours 3 – Phase 2 de la purification

#### Lyse bactérienne

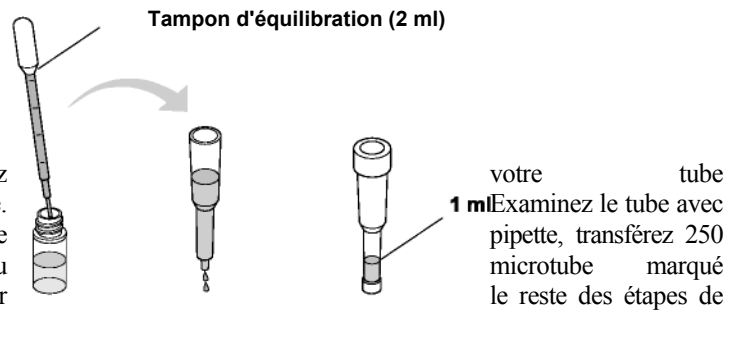
1. Retirez le microtube du congélateur et décongelez à la chaleur de la main. Placez le tube dans la centrifugeuse et transformez en culot les débris bactériens insolubles en centrifugeant pendant 10 minutes à vitesse maximale.



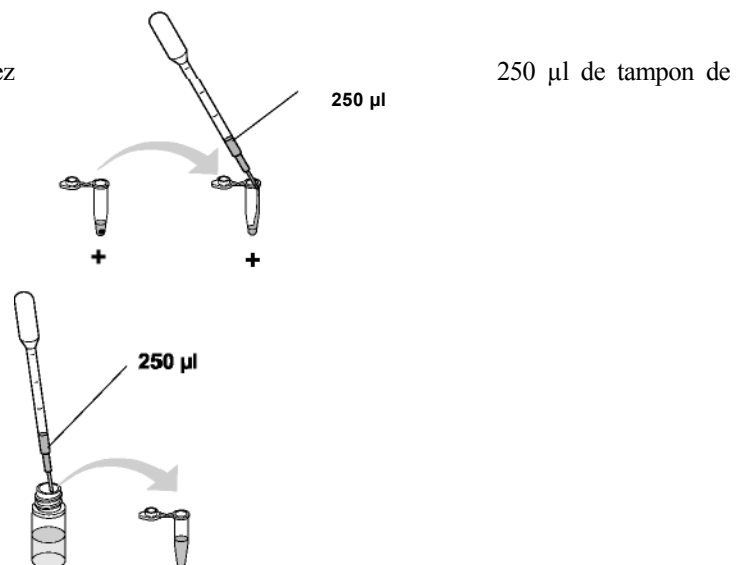
2. Pendant la centrifugation de votre tube, préparez la colonne de chromatographie. Retirez le bouchon et brisez le bas de la colonne pré-remplie de HIC. Laissez la totalité du tampon liquide s'écouler de la colonne (~ 3 à 5 minutes).



3. Préparez la colonne en ajoutant 2 ml de tampon d'équilibration en haut de la colonne. Ceci est réalisé en ajoutant deux fois 1 ml avec une pipette rincée. Laissez le tampon s'écouler jusqu'à la marque de 1 ml de la colonne. Bouchez le haut et le bas et stockez la colonne à température ambiante jusqu'à la période suivante de TP.

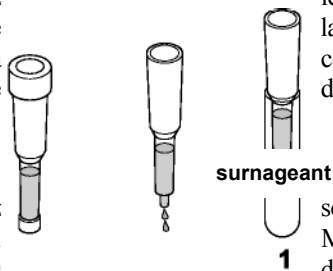


5. A l'aide d'une pipette bien rincée, transférez 250 µl de tampon de liaison dans le surnageant "+".



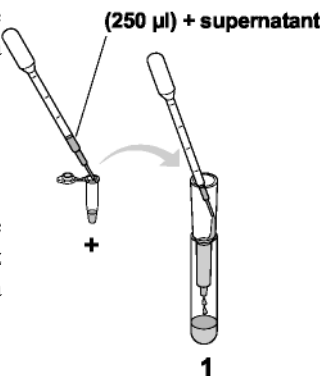
### Cours 3 – Phase 3 de la purification Chromatographie des protéines

1. Marquez 3 tubes de recueil de 1 à 3 et placez ou dans un portoir fourni dans votre du haut et du bas de la colonne et placez la Lorsque la fin du tampon a atteint la surface l'étape suivante ci-dessous.



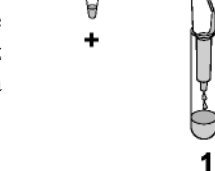
les tubes dans le portoir en mousse laboratoire. Retirez les bouchons colonne dans le tube de recueil 1. de la matrice de HIC, passez à

2. A l'aide d'une nouvelle pipette, chargez  $250\ \mu\text{l}$  du surnageant "+" en haut de la colonne. contre la paroi de la colonne, juste au-dessus matrice et laissez le surnageant s'écouler le Examinez la colonne en utilisant une lumière Lorsque l'écoulement s'arrête, transférez la



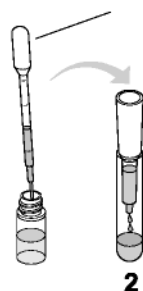
soigneusement et doucement  $250\ \mu\text{l}$  Maintenez l'embout de la pipette de la surface supérieure de la long de la paroi de la colonne. UV. Notez vos observations. colonne dans le tube de recueil 2.

3. A l'aide de la pipette rincée, ajoutez  $250\ \mu\text{l}$  de volume circuler dans la colonne. Examinez UV. Notez vos observations. Lorsque la transférez-la dans le tube 3.



tampon de lavage et laissez tout le la colonne en utilisant la lumière colonne arrête de s'écouler,

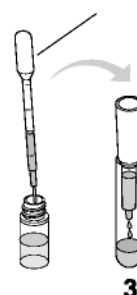
4. A l'aide de la pipette rincée, ajoutez  $750\ \mu\text{l}$  le volume circuler dans la colonne. utilisant la lumière UV. Notez vos



Tampon de lavage (250  $\mu\text{l}$ )

de tampon TE et laissez tout Examinez la colonne en observations.

5. Examinez les trois tubes de recueil et notez entre les tubes. Couvrez les tubes de parafilm ou de film adhésif et placez-les dans le réfrigérateur jusqu'à la période



toute différence de couleur

Tampon TE (750  $\mu\text{l}$ ) suivante de TP.

