

Travaux pratiques de Génie Génétique

A. Jour 0

1. Préparation des milieux de culture : Milieu LB

a. Composition du milieu LB

Le milieu LB ou Luria-Bertani est un milieu de culture nutritif contenant les éléments essentiels communs pour favoriser la croissance des espèces en culture.

- 10 g de peptone
- 5 g d'extrait de levures
- 10 g de NaCl

b. Milieu liquide LB

Pour un volume de 800 ml,

- Peser 16 g de LB poudre (20 g pour 1 L) et verser dans un bocal contenant un peu d'eau distillée ou déminéralisée
- Remuer légèrement jusqu'à dissolution totale
- Compléter de manière précise avec une éprouvette graduée de l'eau distillé pour atteindre un total de 800 ml.
- Autoclaver à 121° C pendant 15 min.
- Après refroidissement, agiter le flacon pour s'assurer du mélange et le milieu LB est prêt à l'emploi.

c. Milieu solide LB Agar

Pour un volume de 800 ml,

- Peser 16 g de LB poudre (20 g pour 1 L) et verser dans un bocal contenant un peu d'eau distillée ou déminéralisée
- Peser 12 g d'agar poudre (15 g pour 1 L) et ajouter au contenu précédent
- Remuer légèrement jusqu'à dissolution totale
- Compléter de manière précise avec une éprouvette graduée de l'eau distillé pour atteindre un total de 800 ml.
- Autoclaver à 121° C pendant 15 min.
- Après refroidissement, agiter le flacon pour s'assurer du mélange

2. Ajout d'IPTG + Ampicilline + X-Gal dans le milieu solide

Dans le flacon précédent contenant 800 ml de LB Agar, ajouter :

- 800 μ l IPTG à 100 mM
- 800 μ l X-Gal
- 400 μ l d'Ampicilline à 100 mg/ml

Remuer doucement et dispatcher dans des boîtes de Pétri à raison d'une quantité de 25 ml par boîte de Pétri.

Laisser ouvrir jusqu'à refroidissement total et solidification.

3. Ensemencements sur boîte de Pétri

Des échantillons de bactéries (10 échantillons) contenant un type de vecteur connu (soit plasmide recombiné ou soit plasmide non recombiné) ont été ensemencés en deux (02) exemplaires sur les boîtes de Pétri.

- Prélever 5 μ l de chaque échantillon
- Étaler sur toute la surface de la boîte de Pétri à l'aide d'une anse stérile

Après, incuber le tout à l'étuve pendant toute une nuit à 37° C

B. Jour 1

1. Description du protocole

2. Repiquage des colonies

Le repiquage se fera dans le milieu liquide LB préalablement préparé avec ajout de l'ampicilline à une concentration de 50 μ g/ml (donc pour un volume de 800 ml de LB liquide préparé, ajouter 400 μ l d'ampicilline 100 mg/ml).

- Prendre la boîte de Pétri contenant les colonies blanches (colonies de bactéries avec plasmide recombiné)
- Débloquer le bouchon du tube contenant le milieu LB liquide + Amp
- Disposer d'une anse stérile et la passer rapidement à la flamme

- Prélever stérilement une colonie bleue avec l'anse stérile
- Passer rapidement l'ouverture de la boîte de Pétri à la flamme avant de la refermer
- Ouvrir le tube du milieu LB + Amp et y déposer la colonie prélevée
- Passer l'ouverture du tube à la flamme avant de le refermer sans trop serrer le bouchon

Ensuite, incuber les tubes à l'étuve toute une nuit à 37° C.

C. Jour 2

1. Extraction de plasmide

Une extraction plasmidique est réalisée suivant le protocole miniprep. A partir de la pré culture dans 5 ml de LB

- Centrifuger 2 x 1,5 ml de culture (1 min à 13000 rpm)
- Resuspendre le culot dans 200 µl de solution A (vortexer) et Laisser 10 min dans la glace
- Ajouter 400 µl de solution B (vortexer) et Laisser 2 min à température ambiante
- Ajouter 300 µl de solution C, mélanger par inversion et Laisser 5 min à température ambiante
- Centrifuger 5 min à 13000 rpm
- Mettre le surnageant dans un nouveau tube et ajouter 500 µl d'isopropanol froid
- Attendre 30 min à -20° C et Centrifuger 5 min à 13000 rpm
- Laver le culot à l'éthanol 70 % puis Sécher le culot au speed vac
- Redissoudre dans 50 µl d'H₂O

SOLUTIONS

Solution A : 25 mM Tris HCl
10 mM EDTA pH8

Solution B : 0.2 N NaOH
1% SDS

Solution C : 3 M NaAc (pH 4.8 – 5.2)

2. PCR de contrôle

Pour vérifier que les inserts sont bien à la bonne taille et bien intégrés dans le vecteur, une PCR contrôle sera réalisée avec les amorces M13-F et M13-R en diluant simplement les extraits plasmidiques dans le mix PCR

<i>Mix PCR :</i>	Eau	13,8	µl
	dNTPs	2,5	µl
	Buffer	5	µl
	MgCl ₂	1,5	µl
	Amorce M13-F	1	µl
	Amorce M13-R	1	µl
	Taq	0,2	µl
	Volume final	25	µl

<i>Programme PCR :</i>	
3 min	95°C
30 sec	94°C
30 sec	60°C
3 min	72°C
5 min	72°C
X 30 cycles	

3. Digestion avec Enzyme de restriction

Pour chaque enzyme de restriction, le plasmide recombiné comportant son site de restriction a été utilisé dans les mêmes conditions. Les enzymes de restriction disposées sont : BamHI, HindIII, etc.

4. Préparation du gel d'agarose et Migration

Le choix de la concentration du gel en % est un pourcentage massique pour un volume donné.

Méthode de calcul :

Masse à peser (m en gramme), pour un volume (v en ml) : $m = v \times \text{pourcentage} / 100$

Exemple de calcul :

Gel à 1 % pour un volume de 100 ml : $100 \times 1 / 100 = 1$ g à peser

Protocole :

1. Peser 1g d'agarose (gel à 1 %) et mélanger avec 100 ml de tampon TAE à 0,5% (Tris base/Acétate acétique /EDTA 0.5M pH8) dans une bouteille en verre avec couvercle et chauffer dans une microonde pendant 3 mn pour fondre l'agarose et homogénéiser la solution.
2. Ajouter 8 µl de bromure d'éthidium (BET) à 0,5 µg/ml à 60°C de la solution et homogénéiser lentement. Le BET, agent intercalant de l'ADN, permet la visualisation des

bandes sous illumination UV. Il est hautement mutagène et doit être manipulé avec beaucoup de précautions.

3. Couler le mélange sur une plaque d'électrophorèse sur laquelle un peigne est déjà posé avec une épaisseur du gel de 3 à 5 mm.

4. Laisser polymériser le gel et retirer les peignes.

5. Placer la plaque de gel dans la cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE (0,5%) pouvant immerger totalement le gel.

6. Ajouter 3 μ l de tampon de charge (0,040% bromophénol, 7% glycérol, 6 mM EDTA) aux produits PCR, homogénéiser et déposer 15 μ l de ce mélange dans les puits selon l'ordre d'étiquetage des échantillons. Le marqueur de poids moléculaires (4 μ l) est déposé dans le premier puits. Les dépôts se font du côté de la cathode qui est chargée négativement. L'ADN migrera en fonction de la taille vers l'anode qui est chargé positivement.

7. Couvrir la cuve et démarrer la migration électrophorétique à 100 volts pendant 35 à 40 mn.

8. À la fin de la migration, retirer la plaque de gel et déposer le gel sur un trans illuminateur pour la visualisation des bandes sous illumination UV.