

KIT DE TP TRANSFORMATION GENETIQUE : PROTEINE FLORESCENTE VERTE

Réf. 912 002

Objectifs de l'expérience

Grâce à cette expérience, les étudiants découvriront le processus biologique de transformation bactérienne en utilisant la bactérie *E.Coli* et de l'ADN plasmidique. A la fin de l'expérience, les étudiants auront pu observer et analyser les caractères acquis (comme la résistance à l'ampicilline ou encore la fluorescence) comme cela a été montré avec les cellules bactériennes transformées.

Table des matières

• Composants de l'expérience	Page 2
• Equipements nécessaires	Page 3
• Informations générales	Page 4
• Procédures de l'expérience	
○ Vue d'ensemble de l'expérience	Page 9
○ La sécurité du travail en laboratoire	Page 11
○ Transformation de la bactérie <i>E.Coli</i> avec la protéine fluorescente verte	Page 12
○ Résultats de l'expérience et Analyse	Page 14
○ Questions d'études	Page 15
• Guide de l'instructeur	
○ Informations pour l'instructeur	Page 16
○ Préparations préalables	Page 17
○ Résultats de l'expérience et Analyse	Page 21
○ Réponses – Questions d'études	Page 22
• Annexes	
○ A – Guide d'aide EDVOTEK®	Page 24

Composants de l'expérience

Composants	Conservation	Validation (✓)
A – BactoBeads™ <i>E.coli</i> GFP Host	4°C (avec un déshydratant)	<input type="checkbox"/>
B – ADN plasmidique pFluoroGreen™	Congélateur	<input type="checkbox"/>
C – Ampicilline	Congélateur	<input type="checkbox"/>
D – IPTG	Congélateur	<input type="checkbox"/>
E – CaCl ₂	Température ambiante	<input type="checkbox"/>
Additif stimulant le développement	Congélateur	<input type="checkbox"/>

Cette expérience est conçue pour 10 groupes de travail.

Tous les composants de l'expérience sont destinés à des recherches éducatives seulement. Ils ne conviennent pas à un usage diagnostique ou à titre médicamenteux et ne peuvent être administrés ou consommés par des humains ou des animaux.

REACTIFS ET FOURNITURES

Conservez les composants ci-dessous à température ambiante.

Composants	Validation (✓)
Milieu de culture en gélose stérile en bouteille ReadyPour™ (« ReadyPour Agar »)	<input type="checkbox"/>
Milieu de culture de bouillon de récupération stérile en bouteille (« Recovery Broth »)	<input type="checkbox"/>
Petites boîtes de Pétri (plaques)	<input type="checkbox"/>
Grandes boîtes de Pétri (plaques)	<input type="checkbox"/>
Micropipettes de transfert en plastique avec des microsondes	<input type="checkbox"/>
Pipette emballée (stérile)	<input type="checkbox"/>
Cure-dents (stériles)	<input type="checkbox"/>
Anses d'inoculation (stériles)	<input type="checkbox"/>
Tubes de micro centrifugeuse	<input type="checkbox"/>

ATTENTION !

Les expériences de transformation impliquent l'utilisation d'antibiotiques dans la sélection de la bactérie transformée. Les étudiants allergiques aux antibiotiques tels que la pénicilline, l'ampicilline, la kanamycine ou la tétracycline ne peuvent pas participer à cette expérience.

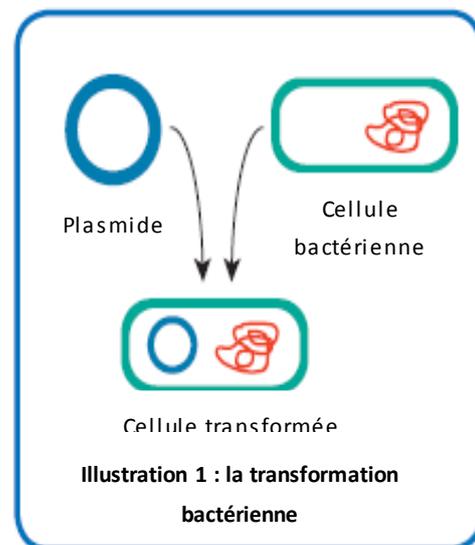
Equipements nécessaires

- Une micropipette automatique (5-50 μ L) et plusieurs embouts
- Deux bains-marie (chauffés à 37°C et à 42°C)
- Un thermomètre
- Un incubateur (chauffé à 37°C)
- Des poires à pipeter ou des pipettes avec ampoule
- De la glace
- Des feutres marqueurs
- Un bec Bunsen, une plaque chauffante ou un four à micro-ondes
- Des gants de protection contre la chaleur
- Une lampe UV avec une grande longueur d'onde (de préférence #969 EDVOTEK®)

Informations générales

L'ADN peut être transféré entre les bactéries

Par sa nature, l'ADN est transféré d'une bactérie à une autre en utilisant deux méthodes principales : la transformation et la conjugaison. Lors de la transformation, une bactérie extrait une séquence d'ADN exogène du milieu ambiant dans lequel elle se trouve (cf. Illustration 1). En revanche, la conjugaison, elle, dépend du contact direct entre les deux cellules bactériennes. Un morceau d'ADN est copié dans une cellule (la cellule donnatrice) et est ensuite transféré dans l'autre cellule (la cellule réceptrice). Dans les deux cas, les bactéries ont acquis une nouvelle information génétique qui est à la fois stable et héréditaire.



Frederick Griffith est le premier scientifique à avoir découvert cette transformation en 1928 lorsqu'il observa des cultures vivantes dans une souche normalement non-pathogène du pneumocoque (aussi appelé « *Streptococcus pneumoniae* ») capables de tuer des souris seulement après avoir été mélangées avec une souche pathogène tuée par la chaleur. Du fait que la souche non-pathogène ait été transformée en une souche pathogène, il a nommé ce transfert de virus « transformation ». En 1944, le médecin Oswald Avery et ses collègues ont purifié de l'ADN, de l'ARN (de l'acide ribonucléique) et des protéines d'une souche virulente du pneumocoque pour déterminer lequel d'entre eux était responsable de la transformation. Chaque composant a été mélangé avec une souche non-pathogène de la bactérie. Seules les cellules réceptives exposées à l'ADN sont devenues pathogènes. Ces expériences de transformation n'ont pas seulement révélé comment leur virulence a été transférée mais elles ont aussi permis l'identification de l'ADN comme matériel génétique.

Ce mode exact de transformation peut différer entre différentes espèces de bactéries. Par exemple, l'*Haemophilus Influenzae* utilise les vésicules de la membrane pour saisir un ADN double-brin de l'environnement. En revanche, le pneumocoque a de plus fortes compétences lui permettant de saisir des molécules d'ADN à brin unique. Dans les laboratoires, les scientifiques peuvent amener les cellules (même celles qui ne sont pas assez compétentes) à extraire de l'ADN et à se transformer. Pour réussir cela, de l'ADN est ajouté dans les cellules en présence de produits chimiques précis (comme le calcium, le rubidium ou le chlorure de magnésium) et la suspension est soumise à des chocs thermiques (avec de grands et rapides changements de température). Nous estimons qu'une combinaison d'ions chimiques et qu'un changement rapide de la température modifie la perméabilité de la paroi et de la membrane cellulaire, ce qui permet aux molécules d'ADN d'entrer dans la cellule. Aujourd'hui, plusieurs biologistes moléculaires utilisent la transformation d'*Escherichia coli* dans leurs expériences, même s'il est normalement impossible de le transformer par sa nature.

ABBREVIATIONS

GFP = Green
Fluorescent Protein
(Protéine
Fluorescente Verte)

pGFP = Plasmide
pour l'expression de
la protéine
fluorescente verte

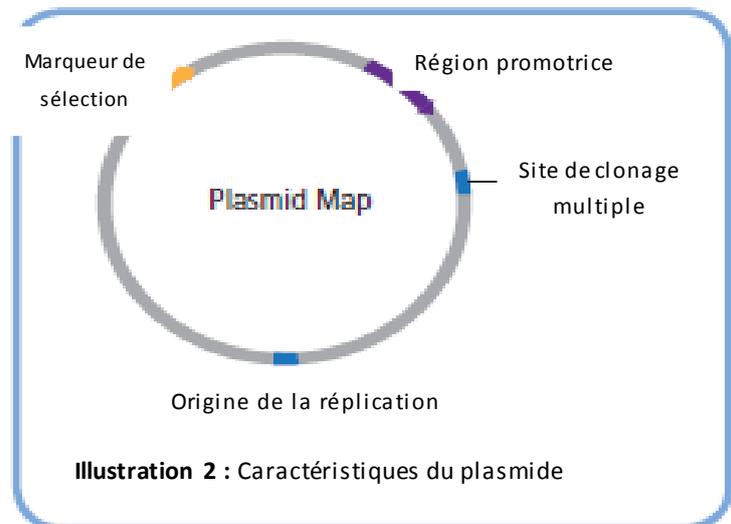
gfp = Gène de la
protéine
fluorescente verte

LE GENIE GENETIQUE ET LA TECHNOLOGIE DE L'ADN RECOMBINANT

Plusieurs bactéries possèdent des gènes supplémentaires non-essentiels dans de petits fragments d'ADN double-brin circulaires en plus de leur ADN chromosomique. Ces fragments d'ADN sont appelés les plasmides et ils permettent aux bactéries d'échanger des gènes bénéfiques. Par exemple, le gène porteur du β -lactamase, une enzyme qui fournit une résistance aux antibiotiques, peut être transporté entre les bactéries grâce aux plasmides. Ces cellules sécrètent le β -lactamase dans le milieu ambiant où se détériore l'antibiotique ampicilline, ce qui empêche le développement de la cellule en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire. Par conséquent, les bactéries possédant le gène peuvent se développer en présence d'ampicilline. De plus, les petites colonies satellites de cellules non-transformées peuvent aussi se développer autour de colonies transformées puisqu'elles sont indirectement protégées par l'activité du β -lactamase.

La technologie de l'ADN recombinant a permis aux scientifiques de relier des gènes de différentes sources à des plasmides bactériens (cf. Illustration 2). Ces plasmides spécialisés, appelés aussi vecteurs, contiennent ces différentes caractéristiques :

- L'origine de la réplication : une séquence unique d'ADN de laquelle les bactéries peuvent initier la copie du plasmide.
- Site de clonage multiple : une séquence courte d'ADN qui contient plusieurs sites de restriction d'enzyme unique et qui permet aux scientifiques de contrôler l'introduction de gènes spécifiques dans le plasmide.
- La région promotrice du gène : une séquence d'ADN qui est généralement localisée juste avant la séquence codante du gène, où peut débiter la transcription.
- Le marqueur de sélection : un gène qui code la résistance à des antibiotiques spécifiques (comme l'ampicilline, la kanamycine ou la tétracycline). Lorsqu'il est utilisé dans un milieu sélectif, seules les cellules contenant le marqueur peuvent se développer dans les colonies, ce sont celles qui ont été transformées avec succès.



L'EFFICACITE DE LA TRANSFORMATION

En pratique, la transformation est très rarement efficace, seule une cellule sur 10 000 est incorporée avec succès dans l'ADN plasmidique. Toutefois, même si beaucoup de cellules sont utilisées dans les expériences de transformation (à peu près 1×10^9 cellules), seul un petit nombre de cellules peuvent être transformées pour atteindre un résultat positif. Si les bactéries sont transformées avec le plasmide contenant le marqueur de sélection et sont déposées sur des milieux de gélose sélectifs et non-sélectifs, nous pourrions observer des résultats très différents. Les boîtes de gélose non-sélectives vont permettre aux bactéries transformées et non-transformées de se développer, formant donc un tapis bactérien. En revanche, les boîtes de gélose sélectives permettent seulement le développement des cellules transformées porteuses du marqueur, aboutissant donc à la récupération des colonies isolées.

Illustration 3 : Calcul de l'Efficacité de la Transformation Bactérienne

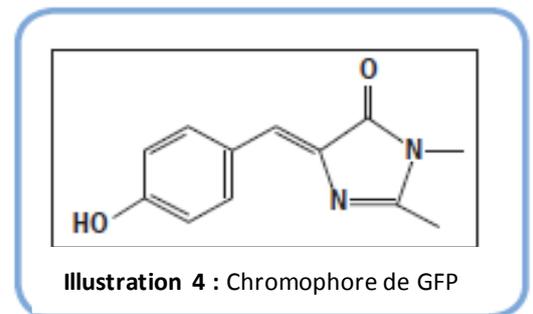
$$\frac{\text{Nombre de transformants}}{\mu\text{g d'ADN}} \times \frac{\text{Volume final de récupération (mL)}}{\text{Volume d'isolement (mL)}} = \text{Nombre de transformants par } \mu\text{g}$$

$$\frac{100 \text{ transformants}}{0.01 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{ mL}}{0.1 \text{ mL}} = 100\,000 (1 \times 10^5) \text{ transformants par } \mu\text{g}$$

Du fait que chaque colonie prend son origine dans une unique cellule transformée, nous pouvons calculer l'efficacité de la transformation ou bien le nombre de cellules transformées par microgramme (μg) d'ADN plasmidique (comme expliqué dans l'illustration 3). Par exemple, si 10 nanogrammes ($0.01 \mu\text{g}$) de plasmide sont utilisés pour transformer un millilitre (mL) de cellules et en isolant 0.1 mL de ce mélange ($100 \mu\text{L}$) pour permettre le développement de 100 colonies, il y aurait donc 1 000 bactéries dans un seul millilitre de mélange. Diviser 1 000 transformants par $0.01 \mu\text{g}$ d'ADN revient donc à dire que l'efficacité de la transformation serait de 1×10^5 de cellules transformées par μg d'ADN plasmidique. L'efficacité de la transformation varie généralement entre 1×10^5 à 1×10^8 de cellules transformées par μg de plasmide.

LA PROTEINE FLUORESCENTE VERTE

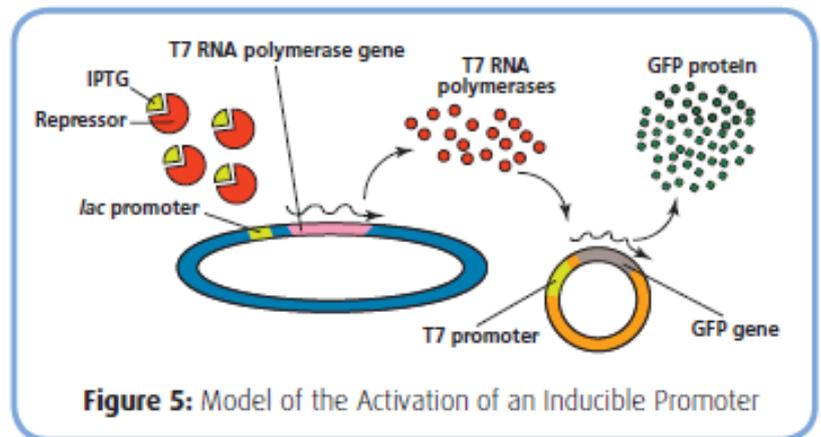
Le plasmide que nous utiliserons pour transformer notre bactérie *E.coli* a été conçu pour contenir la séquence d'ADN de la protéine fluorescente verte (GFP). Cette petite protéine (approximativement 27 kilodaltons) possède la capacité d'absorber la lumière bleue et d'émettre de la lumière verte en retour. Cette activité, connue sous le nom de fluorescence, ne requiert aucun substrat, aucun produit génétique ou cofacteur additionnel pour produire de la lumière visible. La protéine fluorescente verte a été isolée de la méduse *Aequora Victoria* pour la première fois dans les années 1970. Une fois que les scientifiques ont pu identifier sa séquence ADN, ils étaient donc capables d'utiliser le génie génétique pour introduire les protéines fluorescentes dans d'autres organismes comme *E.coli* mais aussi le nématode *Caenorhabditis elegans*. Les scientifiques ont aussi identifié des substitutions d'acides aminés dans la protéine fluorescente verte qui modifient le comportement de son chromophore, une structure spéciale intégrée dans la protéine qui est responsable de sa production de lumière (cf. Illustration 4). Différents changements peuvent donc entraîner un degré différent d'absorption et d'émission de la lumière, permettant aux scientifiques de développer un arc-en-ciel de protéines fluorescentes. Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Tsien ont été récompensés du Prix Nobel de Chimie en 2008 pour leur découverte et leur développement de la protéine fluorescente verte et d'autres protéines fluorescentes.



La protéine fluorescente verte (GFP) et ses autres protéines fluorescentes liées sont devenues des outils incontournables dans le domaine de la biologie cellulaire et moléculaire. En utilisant des stratégies de clonage d'ADN, les protéines peuvent être étiquetées comme des protéines fluorescentes et ensuite exprimées dans des cellules. Ces marqueurs simplifient donc la purification car une protéine étiquetée « protéine fluorescente verte » peut être visible en utilisant la lumière UV. L'utilisation la plus utile des protéines fluorescente verte est celle d'être un outil de visualisation pendant des recherches de microscopie fluorescente. En marquant les autres protéines comme la GFP, les chercheurs peuvent déterminer où les protéines se trouvent généralement dans la cellule. Par ailleurs, en utilisant la protéine fluorescente verte comme gène rapporteur, les scientifiques peuvent observer des processus biologiques comme ils se produisent dans les cellules vivantes. Par exemple, dans le modèle d'organisme du poisson-zèbre (*Danio rerio*), les scientifiques utilisent la protéine fluorescente verte pour marquer la protéine fluorescente des vaisseaux sanguins afin qu'ils puissent suivre les modèles et les réseaux de croissance de ces vaisseaux sanguins. Les scientifiques peuvent aussi marquer des séquences d'ADN de régulation avec la protéine fluorescente verte pour qu'ils puissent observer où et quand le gène est exprimé. De ce fait, la protéine fluorescente verte peut révéler quel rôle joue ces séquences de régulation dans une cellule. En résumé, la protéine fluorescente verte et la microscopie fluorescente ont permis une meilleure compréhension de plusieurs processus biologiques en aidant les scientifiques à observer ces processus en temps réel.

CONTROLLER L'EXPRESSION DU GENE

Les scientifiques peuvent réguler l'expression des protéines recombinantes en utilisant un commutateur génétique que l'on appelle « promoteur inductible » (cf. Illustration 5). Ces séquences permettent un contrôle précis car l'expression du gène ne s'activera seulement en la présence d'une petite molécule comme l'arabinose, la tétracycline ou l'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside).



Dans cette expérience, nous utiliserons un promoteur inductible pour réguler l'expression de la protéine fluorescente verte. Les bactéries hôtes ont été génétiquement modifiées pour contenir le gène d'une ADN polymérase particulière (T7), qui est contrôlé par l'opéron lactose. Lors de conditions normales, les bactéries créent une protéine que l'on nomme « répresseur lac », qui se lie à l'opéron lactose et qui bloque l'expression de la polymérase T7. Sans la polymérase T7, la protéine fluorescente verte ne peut être exprimée et les cellules ne peuvent pas fluorescer. Toutefois, lorsque l'IPTG est ajouté, le répresseur lac ne s'active pas et la polymérase T7 peut s'exprimer. Cette polymérase reconnaît spécifiquement l'opéron lactose sur le plasmide contenant la protéine fluorescente verte et transcrit de larges quantités d'ARNm (l'acide ribonucléique messager). Enfin, l'ARNm est traduit pour produire une protéine fluorescente verte, permettant aux cellules de fluorescer.

VUE D'ENSEMBLE DE L'EXPERIENCE

Dans cette expérience, la bactérie *E.coli* chimiquement compétente sera transformée avec pFluoroGreen™, un plasmide contenant des gènes pour la résistance à l'ampicilline et à la protéine fluorescente verte. Les transformants seront choisis pour la présence de plasmide en utilisant des milieux de culture d'ampicilline et l'efficacité de la transformation sera calculée. De plus, certaines cellules seront exposées à l'IPTG tandis que d'autres n'y seront pas. Du fait que la protéine fluorescente verte ne s'exprime seulement en la présence d'une petite molécule d'IPTG, cette expérience démontrera les différentes expressions du gène. A la fin de l'activité, les étudiants auront pu observer et analyser les caractères acquis (la résistance à l'ampicilline et la fluorescence) comme montré par les cellules bactériennes transformées. Les étudiants pourront aussi acquérir une compréhension des concepts abstraits de la transformation et de l'expression génétique.

Vue d'ensemble de l'expérience

LES OBJECTIFS DE L'EXPERIENCE :

Les étudiants exploreront le processus biologique de la transformation bactérienne en utilisant *E.coli* et de l'ADN plasmidique. A la fin de l'activité, les étudiants auront pu observer et analyser les caractères acquis (la résistance à l'ampicilline et la fluorescence) comme montré par les cellules bactériennes transformées.

LES CARNETS DE LABORATOIRE :

Les scientifiques documentent et expliquent tout ce qu'il se passe lors d'une expérience, comme les conditions expérimentales mais aussi les pensées et différentes observations lors du déroulé de celle-ci, et, bien entendu, les informations scientifiques récoltées. Aujourd'hui vous documenterez cette expérience dans un carnet de laboratoire ou sur une feuille vierge.

Avant de commencer l'expérience :

- Lisez attentivement l'introduction et le protocole. Utilisez ces informations pour formuler une hypothèse sur cette expérience.
- Estimez quels seront les résultats de votre expérience.

Pendant l'expérience :

- Notez vos observations.

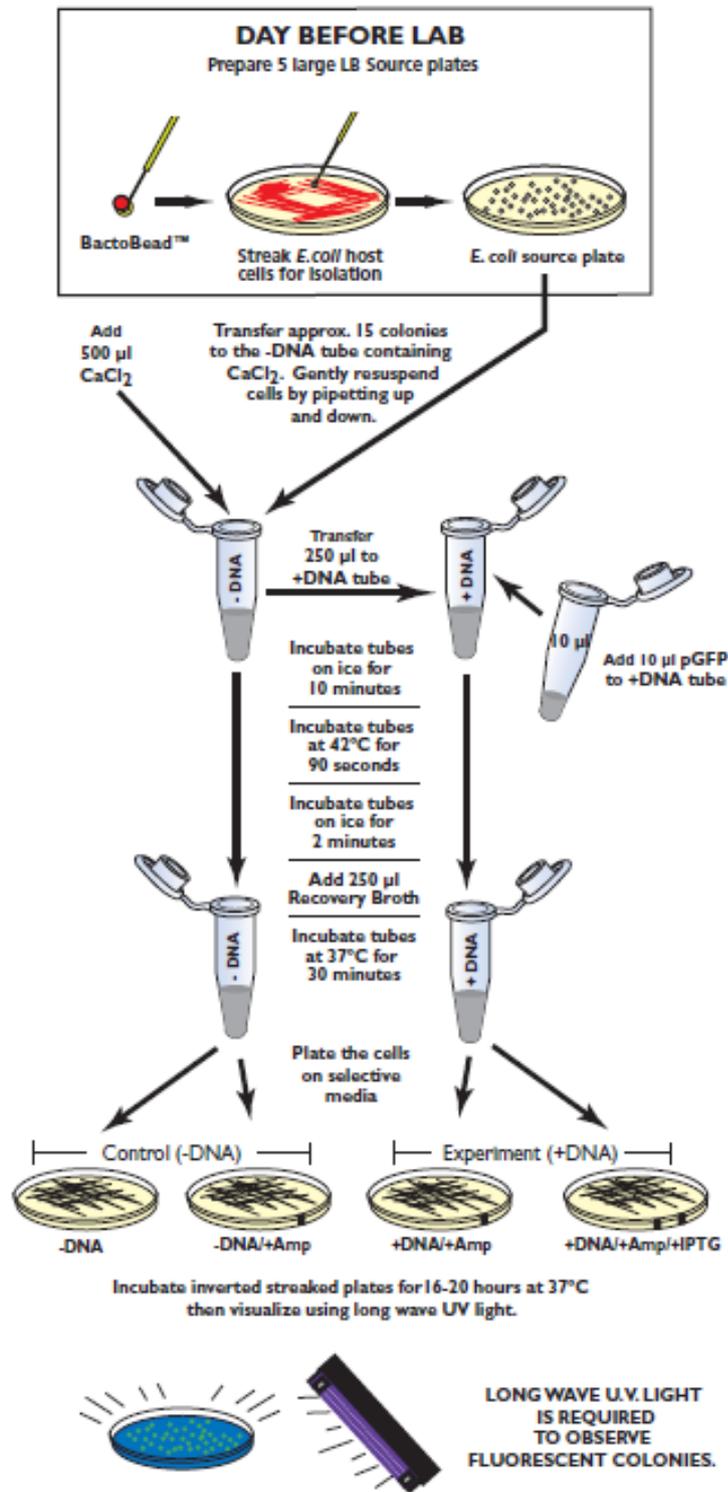
Après l'expérience :

- Interprétez les résultats : est-ce que vos données collectées appuient ou contredisent votre hypothèse ?
- Si vous deviez recommencer cette expérience, que changeriez-vous ? Corrigez votre hypothèse pour expliquer ce changement.

Répondez à ces questions dans votre carnet de laboratoire avant de débiter l'expérience :

1. Selon toi, sur quelles plaques de cellule se trouveront les bactéries comme celle d'*E.coli* présente sur la plaque source ? Justifie ta réponse.
2. Selon toi, sur quelles plaques de cellule se trouveront les cellules bactériennes génétiquement modifiées ? Justifie ta réponse.
3. A quoi servent les plaques de contrôle ? Explique la différence entre les différents contrôles et explique pourquoi chacun de ces contrôles est essentiel ?
4. Quel est l'intérêt de comparer les plaques « -ADN/+Amp » et « +ADN/+Amp » ?

Vue d'ensemble de l'expérience



La sécurité du travail en laboratoire

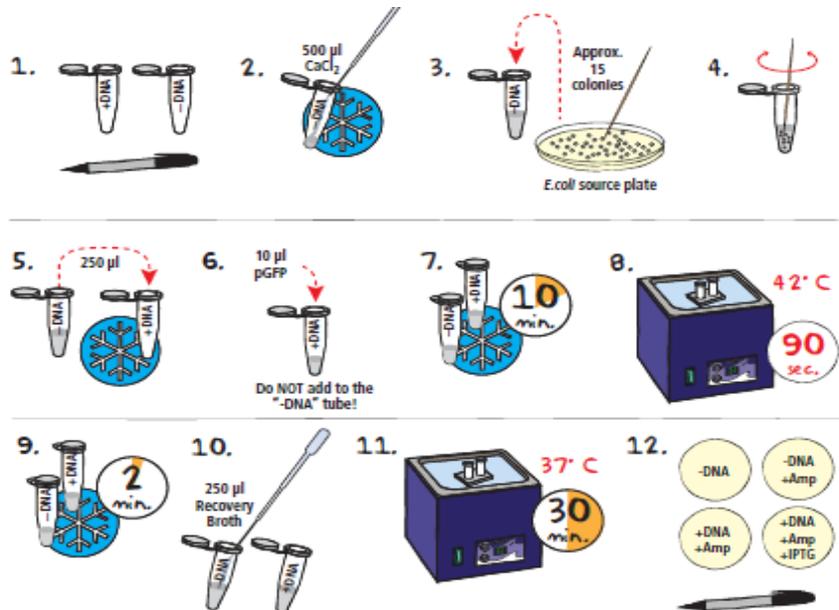
IMPORTANT !

Les expériences de transformation impliquent l'utilisation d'antibiotiques dans la sélection des bactéries transformées. Les étudiants allergiques aux antibiotiques tels que la pénicilline, l'ampicilline, la kanamycine ou la tétracycline ne peuvent pas participer à cette expérience.



1. Portez des gants et des lunettes de sécurité lorsque vous travaillez dans le laboratoire.
2. Soyez extrêmement prudents lorsque vous travaillerez dans le laboratoire. Vous chaufferez et ferez fondre de la gélose, ce qui peut être très dangereux lors d'une mauvaise manipulation.
3. Ne jamais pipeter les réactifs avec la bouche, utilisez les poires à pipeter ou les pipettes avec ampoule !
4. Les bactéries *E.coli* utilisées dans cette expérience sont non-pathogènes. Néanmoins, il est conseillé de suivre les protocoles de sécurité suivants en manipulant et en jetant ces bactéries.
 - a. Nettoyez la table de laboratoire avec une solution à l'eau de javel (10%) ou un produit désinfectant.
 - b. Tous les matériaux, y compris les boîtes de Pétri, les pipettes, les pipettes de transfert, les anses et les tubes qui entreront en contact avec les bactéries doivent être désinfectés avant de les mettre à la poubelle. Désinfectez le matériel après utilisation aussi tôt que possible d'une des deux manières suivantes :
 - i. Autoclavage à 121°C pendant 20 minutes.
Attachez les boîtes de Pétri ensemble et fermez les bouchons des tubes avant de les jeter. Rassemblez tout le matériel contaminé dans un sac jetable autoclavable. Fermez le sac et placez-le sur le plateau métallique pour éviter tout risque de fuite du liquide du milieu ambiant ou de la gélose dans la chambre stérilisée.
 - ii. Laissez tremper dans une solution à l'eau de javel (10%).
Immergez les boîtes de Pétri, les tubes ouverts et le matériel contaminé restant dans une cuve contenant une solution à l'eau de javel (10%). Faites tremper le matériel pendant une nuit complète et jetez-le. Portez des gants et des lunettes de protection lorsque vous manipulez de la javel.
5. Lavez-vous bien les mains avec de l'eau et du savon après avoir réalisé l'expérience.
6. Si vous avez un quelconque doute, demandez à votre instructeur.

Transformation de la bactérie *E. coli* avec la protéine fluorescente verte



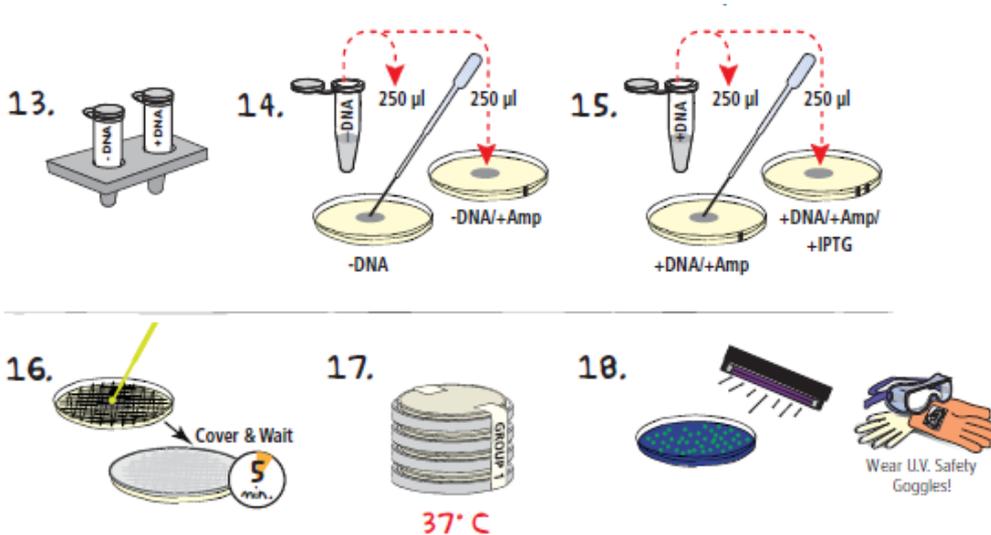
RAPPEL

Pour de meilleurs résultats, assurez-vous que les cellules soient complètement remises en suspension.

Assurez-vous aussi de faire des petites étiquettes !

1. **Étiquetez** un tube pour micro-centrifugeuse avec l'inscription « +ADN » et un deuxième avec l'inscription « -ADN ».
2. **Transférez** 500µL de solution glacée CaCl₂ dans le tube « -ADN » en utilisant une pipette stérile d'1mL.
3. En utilisant un cure-dent, **transférez** approximativement 15 colonies bien isolées (chaque colonie mesure environ 1 à 1.5mm) de la plaque de cellules bactériennes *E. coli* dans le tube « -ADN ».
4. **Tournez** le cure-dent avec vos doigts afin de libérer les cellules. **Remettez en suspension** les cellules bactériennes dans la solution CaCl₂ en tourbillonnant fortement jusqu'à ce qu'aucun amas de cellule ne soit visible et que la suspension cellulaire soit trouble.
5. **Transférez** 250µL de la suspension cellulaire dans le tube « +ADN » et placez les tubes dans la glace.
6. **Ajoutez** 10µL d'ADN pFluoroGreen™ (pGFP) au tube « +ADN ». **N'ajoutez surtout pas** cette solution au tube « -ADN ».
7. **Incubez** les tubes dans la glace pendant 10 minutes.
8. **Placez** les tubes transformés dans un bain-marie à 42°C pendant 90 secondes.
9. **Retournez** immédiatement les tubes dans la glace et **laissez incuber** pendant 2 minutes.
10. **Transférez** 250µL du bouillon de récupération dans chaque tube en utilisant une pipette stérile d'1mL. Mélangez délicatement en tapotant le tube.
11. **Incubez** les cellules dans un bain-marie à 37°C pendant 30 minutes.
12. Pendant que les cellules récupèrent, **étiquetez** la base des plaques de gélose comme indiqué ci-dessous :
 - a. « -ADN » (plaque sans rayure)
 - b. « -ADN/+Amp » (plaque avec 1 rayure)
 - c. « +ADN/+Amp » (plaque avec 1 rayure)
 - d. « +ADN/+Amp/+IPTG » (plaque avec 2 rayures)

Suite de la transformation de la bactérie *E. coli* avec la protéine fluorescente verte



13. Après le temps de récupération, **enlevez** les tubes du bain-marie et placez-les sur la table du laboratoire.
14. En utilisant une pipete stérile d'1mL, **transférez** 250µL de cellules récupérées du tube nommé « -ADN » au milieu des plaques « -ADN » et « -ADN/+Amp ».
15. En utilisant une nouvelle pipete stérile d'1mL, **transférez** 250µL de cellules récupérées du tube nommé « +ADN » au milieu des plaques « +ADN/+Amp » et « +ADN/+Amp/+IPTG ».
16. **Étalez** les cellules sur l'ensemble de la plaque en utilisant une anse d'inoculation. Utilisez une anse stérile pour étaler les échantillons « -ADN ». Changez à nouveau d'anse avant d'étaler les échantillons « +ADN ». Assurez-vous que les cellules soient bien étalées sur la surface entière des plaques. **Recouvrez** les plaques et **attendez** 5 minutes que la suspension des cellules soit absorbée par la gélose.
17. **Empilez** les plaques les unes sur les autres et **attachez-les ensemble**. **Étiquetez** les plaques avec vos initiales ou votre numéro de groupe. **Placez** les plaques dans la position inverse (la gélose doit se trouver en haut) dans un four à incubation bactérienne à 37°C pendant une nuit complète (16-18 heures). Si vous n'avez pas d'incubateur, les colonies se formeront à température ambiante entre 24 et 48 heures.
18. **Visualisez** la transformation et les plaques de contrôle en utilisant la lumière UV. Pour chaque plaque, **notez** les choses suivantes :
 - a. Le nombre de colonies présentes sur la plaque.
 - b. La couleur des bactéries sous la lumière UV.

RESUME DE L'EXPERIENCE

Les bactéries *E. coli* de la plaque source sont à nouveau mises en suspension dans la solution glacée CaCl₂. L'ADN plasmidique est ajouté à la moitié des cellules avant le choc thermique du bain-marie à 42°C. Le choc thermique facilite l'entrée de l'ADN dans les cellules bactériennes. Le bouillon de récupération est ajouté à la suspension cellulaire et les bactéries peuvent récupérer pendant 30 secondes à 37°C. Ce temps de récupération aide les bactéries à réparer leurs parois cellulaires et d'exprimer leur gène de résistance aux antibiotiques. Enfin, les bactéries transformées *E. coli* sont étalées sur les plaques de gélose et peuvent se développer toute la nuit à 37°C.

NOTE POUR L'ETAPE 17 :

Les cellules peuvent prendre plus de temps à absorber. N'inversez pas les plaques si les cellules n'ont pas bien été absorbées.

Résultats de l'expérience et Analyse

RECOLTE DES DONNEES

1. Observez les résultats que vous avez obtenus dans plaques de contrôle et de transformation.
 - a. Plaques de contrôle : (-) ADN
 - ADN
 - ADN/+Amp
 - b. Plaques de transformation : (+) ADN
 - +ADN/+Amp
 - +ADN/+Amp/+IPTG

2. Dessinez et décrivez ce que vous avez observé. Pour chacune des plaques, notez les informations suivantes :
 - a. Combien de développements bactériens avez-vous pu observer ? Déterminez un nombre total.
 - b. Quelle est la couleur des bactéries ?
 - c. Pourquoi certains membres de votre classe ont une efficacité de transformation différente ?
 - d. Si vous n'avez pas obtenu de résultat, quels ont pu être les facteurs de cet échec ?

DETERMINATION DE L'EFFICACITE DE TRANSFORMATION

L'efficacité de transformation est une détermination quantitative du nombre de cellules transformées par 1µg d'ADN plasmidique. Il est, par essence, un indicateur de réussite de l'expérience de transformation.

Vous allez donc calculer l'efficacité de la transformation en utilisant les données collectées de votre expérience.

1. Comptez le nombre de colonies sur la plaque étiquetée « +ADN/+Amp/+IPTG ». Un procédé pratique pour compter le bon nombre de colonies serait de les marquer avec un marqueur sur la partie extérieure de la boîte.
2. Déterminez l'efficacité de la transformation en utilisant la formule suivante :

$$\frac{\text{Nombre de transformants}}{\mu\text{g d'ADN}} \times \frac{\text{Volume final de récupération (mL)}}{\text{Volume d'isolement (mL)}} = \text{Nombre de transformants par } \mu\text{g}$$

EXEMPLE :

Si vous avez observé 40 colonies :

$$\frac{40 \text{ transformants}}{0.05 \mu\text{g}} \times \frac{0.5 \text{ mL}}{0.25 \text{ mL}} = 1600 (1.6 \times 10^3) \text{ transformations par } \mu\text{g}$$

Questions d'étude

1. L'ADN exogène n'atteint pas les cellules *E.coli* incompetentes. Quel traitement pourriez-vous donner aux cellules afin de devenir compétentes ?
2. Pourquoi le bouillon de récupération utilisé dans l'expérience contient de l'ampicilline ?
3. Sur quelles preuves basez-vous la réussite de votre transformation ?
4. Quelles peuvent être les raisons d'un échec de transformation ?
5. D'où vient la source de fluorescence ? Pourquoi certaines cellules fluorescent et d'autres non ?

Guide de l'instructeur

Les expériences de transformation impliquent l'utilisation d'antibiotiques dans la sélection de la bactérie transformée. Les étudiants allergiques aux antibiotiques tels que la pénicilline, l'ampicilline, la kanamycine ou la tétracycline ne peuvent pas participer à cette expérience.

PREPARATION PREALABLE

Que faire ?	Temps requis	Quand?	Page
Préparer les plaques de gélose	1 heure	2 à 7 jours avant l'expérience	17
Préparer les boîtes de Pétri d'E.coli	20 minutes pour remplir les boîtes de Pétri, 16 à 18 heures pour les incubes	1 jour avant le début de l'expérience	19
Distribuer l'ADN plasmidique, la solution CaCl ₂ et le bouillon de récupération	30 minutes	De 30 minutes à maximum 24 heures avant le début de l'expérience	20

LE JOUR DE L'EXPERIENCE

Que faire ?	Temps requis	Quand?	Page
Equilibrer les bains-marie à 37°C et à 42°C et l'incubateur à 37°C	10 minutes	Une à deux heures avant l'expérience	20
Réaliser l'expérience en laboratoire	50 minutes	Pendant le cours	12
Incuber les cellules à 37°C	16 à 18 heures	La nuit après le TP	13

LES RESULTATS ET LE NETTOYAGE

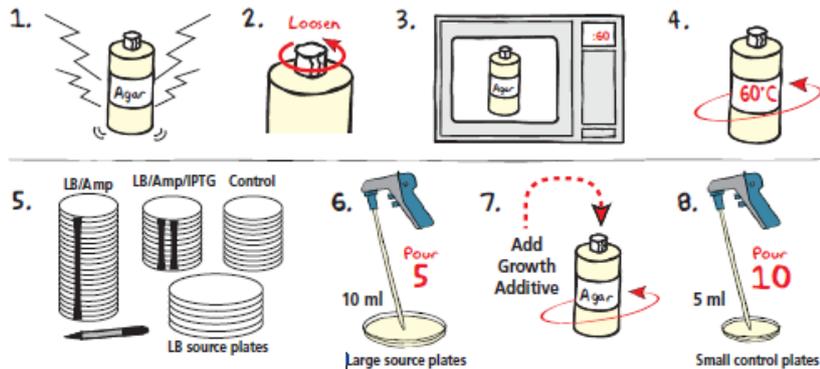
Que faire ?	Temps requis	Quand?	Page
Les étudiants observent les résultats de leur expérience et calculent leur efficacité de transformation	50 minutes	Pendant le cours suivant	14
Jeter le matériel contaminé	45 minutes ou plus	Après l'analyse des résultats des étudiants	11

Préparations préalables

PREPARATION DES BOÎTES DE PETRI DE GELOSE

Une bouteille de préparation pour milieu de culture de gélose ReadyPour™ peut remplir 5 grandes boîtes de Pétri, 10 petites boîtes de Pétri, 20 plaques de milieu de culture LB/Amp et 10 plaques de milieu de culture LB/Amp/IPTG.

1. **Cassez** la préparation solide ReadyPour™ en petits morceaux en pressant et en agitant fortement la bouteille en plastique.
2. **Desserrez mais n'enlevez pas le bouchon** de la bouteille. Cela permettra la ventilation de la chaleur lors du chauffage.

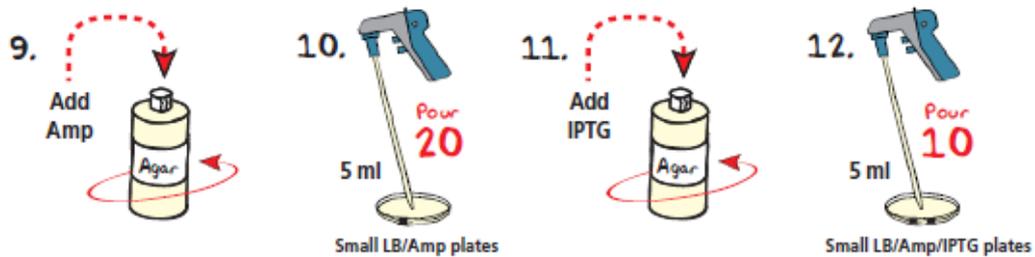


- Attention** : Si vous n'arrivez pas à desserrer le bouchon avant le chauffage, cela pourra provoquer l'explosion ou la dégradation de la bouteille.
3. **Chauffez** la gélose ReadyPour™ au four à micro-ondes pendant 60 secondes à la puissance maximale pour ramollir la gélose. **Enlevez** avec précaution la bouteille du four et mélangez en **remuant** la bouteille. Continuez à **chauffer** la solution pendant des intervalles de 30 secondes jusqu'à ce que la gélose soit complètement dissoute (la solution de couleur ambre doit être transparente et homogène).
 4. **Refroidissez** la gélose ReadyPour™ à 60°C en l'agitant délicatement pour provoquer une plus grande dissipation de la chaleur.
 5. Pendant que le milieu de culture est entrain de refroidir, **étiquetez** les petites boîtes de pétri (60x15mm) avec un marqueur indélébile.
 - a. **Ouvrez** le premier manche et **empilez** soigneusement les 20 boîtes.
 - b. **Marquez** les 20 boîtes **d'une ligne** en plaçant la marque au fond de la pile et faites glisser le verticalement jusqu'à la boîte du haut.
 - c. **Ouvrez** le deuxième manche et **empilez** soigneusement les boîtes.
 - d. **Marquez** les 10 boîtes avec **deux lignes**. Celles-ci seront les plaques de milieu de culture LB/Amp/IPTG. **N'étiquetez pas** les 10 plaques restantes, celles-ci seront les plaques de contrôle. (Vous avez normalement 5 autres grandes boîtes de pétri pour les plaques de source LB).
 6. **Versez** 10mL de la solution refroidie ReadyPour™ dans chacune des 5 grandes boîtes de Pétri (les plaques de source) en utilisant une pipette de 10mL et une poire à pipeter.
 7. **Ajoutez** la préparation entière de Growth Additive à la gélose refroidie. **Rebouchez** la bouteille et **agitez-la** pour mélanger les réactifs. **Ajoutez les réactifs que lorsque la gélose est refroidie** ! Les réactifs comme l'ampicilline et l'IPTG se dégradent à de fortes températures.
 8. En utilisant une nouvelle pipette de 10mL, **versez** 5mL de la gélose dans les 10 boîtes de Pétri vides.

NOTE POUR L'ETAPE 3

Agissez avec précaution et assurez-vous que la gélose ne puisse fuiter. Soyez attentifs et arrêtez le chauffage si la solution bouillonne.

Préparations préalables



- Ajoutez** la quantité entière d'ampicilline dans la bouteille avec la solution ReadyPour™. **Fermez** la bouteille et **agitez-la** pour mélanger les réactifs.
- Utilisez une nouvelle pipette de 10mL et **versez** 5mL de milieu ambiant LB/Amp dans les 20 petites boîtes de Pétri avec une seule rayure.
- Ajoutez** la quantité entière du liquide IPTG dans la bouteille avec la solution ReadyPour™. Du fait que son volume soit petit, nous vous recommandons d'utiliser une pipette de transfert ou une micropipette pour ajouter le contenant à la bouteille. **Fermez** la bouteille et **agitez-la** pour mélanger les réactifs.
- En utilisant une nouvelle pipette de 10mL, **versez** 5mL du milieu ambiant LB/Amp/IPTG dans les 10 petites boîtes de Pétri avec deux rayures.
- Recouvrez** et **attendez** au moins 20 minutes que les boîtes se solidifient. Pour de meilleurs résultats, laissez les boîtes à température ambiante toute la nuit.
- Conservez** les boîtes à température ambiante au maximum pendant deux jours. Les boîtes peuvent être interverties et placées dans un sac plastique refermable pour s'assurer qu'ils ne sèchent pas.

Note : si les boîtes sont préparées plus de deux jours avant l'expérience, elles peuvent être conservées dans un sac plastique au réfrigérateur (4°C). Enlevez les boîtes du réfrigérateur et réchauffez les dans l'incubateur à 37°C pendant 30 minutes avant l'utilisation.

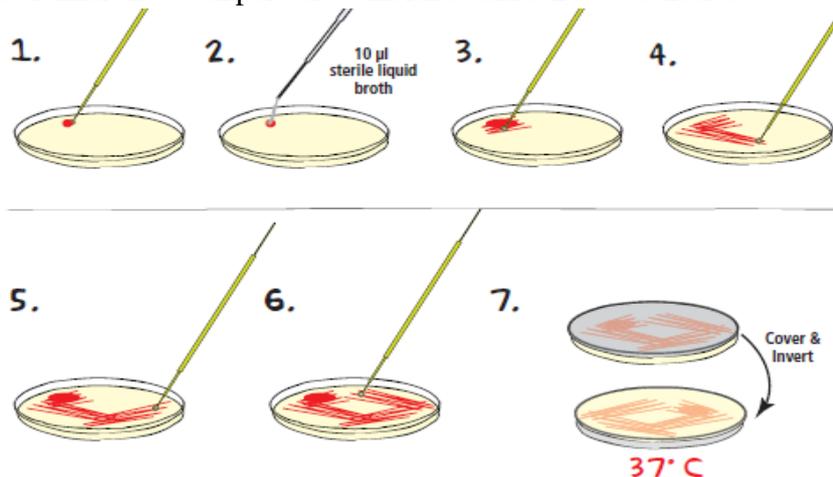
PREPARATION DES PLAQUES DE GELOSE

- Utilisez une pipette stérile de 10mL et une poire à pipeter pour transférer la quantité demandée de gélose dans chaque boîte de Pétri. Pipetez délicatement afin d'éviter de former des bulles.
- Penchez la boîte de Pétri en avant et en arrière afin de recouvrir sa surface totale.
- Si la gélose contient des bulles, vous pouvez les retirer en passant une flamme au-dessus de la surface.
- Recouvrez les boîtes de Pétri afin que la gélose puisse se solidifier.

Préparations préalables

PREPARATION DES PLAQUES SOURCES D'*E.coli*

Pour obtenir de meilleurs résultats, les plaques sources d'*E.coli* peuvent être préparées 16 à 20 heures avant le début de l'expérience. Préparer ces plaques 24 heures avant peut compromettre la réussite de l'expérience. Si vous ne possédez pas d'incubateur, les colonies se formeront à température ambiante entre 24 et 48 heures.



1. **Prenez** une goutte de la bactérie BactoBead™ de son flacon en utilisant une anse d'inoculation. En appliquant une technique aseptique, **transférez** la goutte de bactérie sur le côté de la grande boîte de Pétri (les plaques sources de milieu ambiant LB) et remplacez le couvercle. Fermez le flacon immédiatement après l'utilisation pour limiter l'exposition de la préparation à l'air.
2. **Dissolvez** immédiatement la goutte en y ajoutant 10%L de milieu ambiant stérile ou l'eau stérile.
3. **Tirez l'anse en avant et en arrière** dans la préparation dissoute de la bactérie pour créer une première traînée au-dessus de la plaque. Faites attention à ne pas arracher l'anse.
4. **Tirez l'anse** de la première traînée jusqu'à une partie propre de la plaque plusieurs fois pour créer une deuxième traînée.
5. **Faites pivoter la plaque. Créez une nouvelle traînée** avec l'anse à partir de la deuxième traînée dans une partie propre.
6. **Pivotez la plaque** une nouvelle fois. **Créez encore une fois une nouvelle traînée** à partir de la troisième traînée dans une autre partie propre de la plaque. Cela permettra aux colonies de se développer.
7. **Recouvrez la plaque** et **incubez-la** à 37°C entre 16 et 20 heures. Si vous ne possédez pas d'incubateur, les colonies se formeront à température ambiante entre 24 et 48 heures.
8. **Répétez** les étapes précédentes pour chaque plaque source.

Note : si la croissance des milieux des plaques est importante (par exemple un tapis de colonies de cellules), demandez à vos étudiants de transférer une anse remplie de cellules dans la solution CaCl₂.

Préparations préalables

LE JOUR DE L'EXPERIENCE

1. Equilibrez la température des bains-marie à 37°C et 42°C et l'incubateur à 37°C.
2. Distribuez 1mL de solution CaCl₂ dans les 10 tubes de micro centrifugeuse correspondant à chaque groupe et déposez-les dans la glace.
3. Distribuez 1.5mL de bouillon de récupération (« Recovery Broth ») dans les tubes de chaque groupe d'étudiants et conservez-les à température ambiante.

Alternative : la bouteille de bouillon de récupération peut être placée dans une station de manipulation liquide permettant aux étudiants d'aller récupérer la quantité de solution demandée.

PREPARATION DE L'ADN PLASMIDIQUE pFluoroGreen™

Des parties aliquotes d'ADN plasmidique peuvent être préparées un jour avant le début de l'expérience et conservées à 4°C.

4. Placez le tube d'ADN plasmidique pFluoroGreen™ dans la glace pour décongeler.
5. Etiquetez 10 tubes de micro centrifugeuse avec l'inscription « pGFP ».
6. Avant de distribuer, tapotez le tube de pFluoroGreen™ jusqu'à ce que l'échantillon se trouve en bas du tube.
7. En utilisant une micro pipette automatique, distribuez 12µL d'ADN plasmidique dans chaque tube de micro centrifugeuse étiquetés « pGFP ».

Note : les étudiants utiliseront 10µL dans l'expérience de transformation.

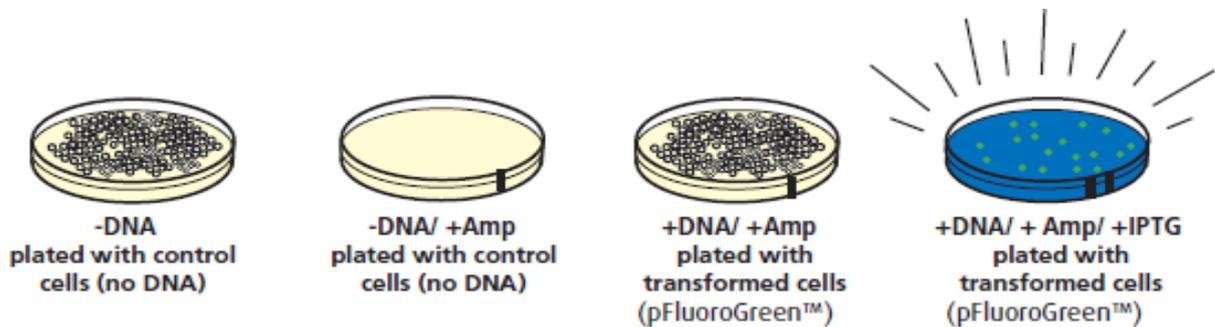
8. Fermez les tubes et placez-les dans la glace.

Chaque groupe doit avoir : une des 5 plaques sources d'*E.coli*, un tube de solution CaCl₂ (1mL), un tube d'ADN plasmidique pFluoroGreen™, un tube de bouillon de récupération « Recovery Broth » (1.5mL), deux plaques avec 1 rayure, une plaque avec 2 rayures, quatre pipetes stériles (1mL), deux anses d'inoculation stériles et des cure-dents.

Equipement de la salle demandé :

- Deux bains-marie
- Un incubateur

Résultats de l'expérience et Analyse



« -ADN »

Résultat : il n'y a pas de cellule fluorescente visible. Impression d'une couche étendue de cellules.

Preuve : les cellules bactériennes hôtes peuvent vivre en l'absence d'ampicilline.

« -ADN/+Amp »

Résultat : il n'y a pas de développement.

Preuve : les cellules sont sensibles à l'ampicilline. Sans pFluoroGreen™, elles ne sont plus résistantes à l'ampicilline.

« +ADN/+Amp »

Résultat : il y a des colonies blanches. Impression d'une couche étendue de cellules.

Preuve : les cellules deviennent résistantes à l'ampicilline lorsqu'elles sont transformées avec pFluoroGreen™.

La protéine fluorescente verte n'est pas produite en l'absence d'IPTG.

« +ADN/+Amp/+IPTG »

Résultat : des colonies individuelles sont fluorescentes lorsqu'elles sont exposées à la lumière bleue.

Preuve : les cellules deviennent résistantes à l'ampicilline lorsqu'elles sont transformées avec pFluoroGreen™. La production de la protéine fluorescente verte est activée en la présence d'IPTG

LES QUESTIONS PREALABLES

- 1. Selon toi, sur quelles plaques de cellule se trouveront les bactéries comme celle d'*E.coli* présente sur la plaque source ? Justifie ta réponse.**

Les bactéries présentes sur la plaque « -ADN » sont identiques à celles présente sur la plaque source *E.coli* car elles n'ont pas de plasmide et car elles se trouvent dans un milieu non-sélectif.

- 2. Selon toi, sur quelles plaques de cellule se trouveront les cellules bactériennes génétiquement modifiées ? Justifie ta réponse.**

Les bactéries se développant sur les plaques « +ADN/+Amp » et « +ADN/+Amp/+IPTG » auraient les cellules génétiquement modifiées puisque ces cellules ont pris le plasmide qui exprime le gène de résistance à l'ampicilline pour leur permettre de survivre dans un milieu sélectif.

- 3. A quoi servent les plaques de contrôle ? Explique la différence entre les différents contrôles et explique pourquoi chacun de ces contrôles est essentiel ?**

Les plaques de contrôle aident à interpréter les résultats de l'expérience. Ici, nous avons deux plaques de contrôle. La plaque étiquetée « -ADN/+Amp » montre que les cellules bactériennes hôtes d'*E.coli* ne se développent que dans un milieu sélectif en présence de plasmide. La plaque étiquetée « -ADN » montre que les cellules sans plasmide peuvent se développer dans la gélose sans l'ampicilline.

- 4. Quel est l'intérêt de comparer les plaques -ADN/+Amp et +ADN/+Amp ?**

Les cellules qui ne sont pas traitées avec le plasmide ne pourront pas se développer sur la plaque « -ADN/+Amp » puisqu'elles n'expriment pas le gène de résistance à l'ampicilline. Toutefois, les cellules traitées avec le plasmide peuvent se développer sur la plaque « +ADN/+Amp » puisqu'elles expriment le gène de résistance à l'ampicilline.

Les réponses aux questions d'études se trouvent à l'intérieur du kit.

Annexes
A – Guide d'aide EDVOTEK®

Annexe A – Le guide d’aide EDVOTEK®

Problème ?	Cause?	Réponse
Il y a peu de cellules développées sur la plaque source	Le temps d'incubation est trop court	Continuez à incuber les plaques sources à 37°C entre 16 et 20 heures.
	L'antibiotique ajouté à la plaque source	Lorsque vous préparez les plaques, assurez-vous d'ajouter les antibiotiques et les additifs à la bonne étape.
	Il y a eu une mauvaise température d'incubation	Utilisez un thermomètre pour vérifier la température de l'incubateur. Ajustez-la à 37°C si nécessaire.
Il y a des colonies satellites sur la plaque de transformation	Il y a une mauvaise concentration des antibiotiques sur la plaque	Assurez-vous que la quantité de concentration d'antibiotiques ajoutée aux plaques soit bonne. Assurez-vous que la solution Ready-poor soit refroidie à 60°C avant d'y ajouter les antibiotiques.
	L'antibiotique s'est décomposé	Assurez-vous que la solution Ready-poor soit refroidie à 60°C avant d'y ajouter les antibiotiques.
	Les plaques ont incubé pendant trop longtemps	Incubez les plaques toute une nuit à 37°C (entre 16 et 20 heures).
Les colonies semblent tâchées sur la plaque de transformation	Les plaques contenant des transformations ont été inversées trop rapidement	Laissez les cellules en suspension pour absorber totalement le milieu avant d'inverser les plaques
	Les plaques sont trop humides	Après avoir préparé les plaques, laissez-les sécher toute une nuit à température ambiante. Alternative : réchauffez les plaques à 37°C pendant 30 minutes avant d'y ajouter les cellules.
Il n'y a pas de colonie sur la plaque de transformation	L'ADN plasmidique n'a pas été ajouté au mélange de transformation	Assurez-vous que l'ADN plasmidique soit ajouté dans le tube de transformation. Assurez-vous que les pipettes ont été utilisées proprement. Si vous utilisez des micropipettes, assurez-vous que les étudiants sachent s'en servir.
	De mauvaises cellules hôtes ont été utilisées pour la transformation	Vérifiez que la bonne souche bactérienne soit utilisée pour la transformation.
	Les cellules n'ont pas subi de choc thermique	Assurez-vous que la température soit à 42°C et que les étapes du choc thermique aient lieu au maximum pendant 90 secondes.
	Mauvais antibiotiques	Assurez-vous que les bons antibiotiques soient utilisés.
	Les cellules n'ont pas été remises en suspension dans la solution CaCl ₂	Mettez à nouveau en suspension les cellules dans la solution CaCl ₂ sans laisser d'amas de cellule (agitez ou mélangez bien pour suspendre à nouveau les cellules. La suspension doit être trouble.
Il y a une faible efficacité de transformation	Pas assez de cellules ont été utilisées pour la transformation	Prenez plus de colonies de la plaque source (15 colonies / 1-2mm de largeur par 500µL de solution CaCl ₂)
	Les plaques sources ont incubé pendant plus de 20 heures	Il est important que les cellules source ne se développent pas plus de 20 heures. Vous pouvez refroidir les plaques au réfrigérateur après 20 heures de développement si nécessaire. N'utilisez pas les plaques source qui ont incubé plus de 24 heures, qu'elles soient réfrigérées ou non.
	Les plaques de Pétri sont trop vieilles	Préparez la plaque de transformation et utilisez-la rapidement.
	Les cellules n'ont pas été remises en suspension dans la solution CaCl ₂	Mettez à nouveau en suspension les cellules dans la solution CaCl ₂ sans laisser d'amas de cellule (agitez ou mélangez bien pour suspendre à nouveau les cellules. La suspension doit être trouble.
	La solution de CaCl ₂ n'est pas assez froide	Pré-refroidissez la solution CaCl ₂ avant d'y ajouter les cellules.
	La solution de cellules n'est pas assez froide	Augmentez le temps d'incubation de la suspension des cellules dans la glace entre 10 et 15 minutes (pas plus de 30 minutes au total). Cela permettra d'accroître l'efficacité de la transformation.
	Il y a eu trop ou pas assez d'ADN plasmidique ajouté dans la suspension de cellules	Assurez-vous que la quantité exacte de plasmide soit ajoutée dans le tube de transformation. Si vous utilisez des micropipettes, assurez-vous que les étudiants sachent s'en servir.
	Les cellules n'ont pas subi de choc thermique	Assurez-vous que la température soit à 42°C et que les étapes du choc thermique aient lieu au maximum pendant 90 secondes.
	Les antibiotiques étaient dégradés avant la préparation des plaques	Assurez-vous que la solution Ready-poor soit refroidie à 60°C avant d'y ajouter les antibiotiques.
	Il y a eu une mauvaise concentration des antibiotiques dans les plaques	Assurez-vous que la quantité de concentration d'antibiotiques ajoutée aux plaques soit bonne.

Nous contacter:

Ce matériel est garanti 2 ans. Pour toutes questions, veuillez contacter :

sav@sciencethic.com

www.sciencethic.com