

## Protocole de TP

Visualiser la transformation de bactéries

### ► Matériel nécessaire :

- Kit pGLO de Transgénèse Bactérienne (Bio-Rad) : le gène de la GFP est inséré dans un plasmide conférant la résistance à l'ampicilline, et sous la dépendance d'un promoteur inductible en présence d'arabinose
- boîtes de Petri avec agar nutritif (LB seul, LB + ampicilline, LB + ampicilline + arabinose)
- étalement d'*E. coli* HB101 K12 sur boîte d'agar nutritif
- ADN plasmidique pGLO réhydraté dans la solution de transformation ( $\text{CaCl}_2$ )
- pipettes ou micropipette + embouts stériles
- ensemenceurs stériles
- bac avec glace
- portoir en mousse pour microtubes
- bec bunsen électrique
- bain-marie à 42° C
- lampe UV
- incubateur à 37° C
- chronomètre

### ► Protocole :

1. Délimiter un champ stérile en allumant le bec bunsen.
2. Avec un ensemenceur, prélever une colonie sur la boîte d'étalement et la disperser dans un microtube contenant 250  $\mu\text{l}$  de solution de transformation.

Préparer un second microtube de la même façon. Annoter les tubes : **+pGLO** et **-pGLO**.

3. Avec un ensemenceur prélever une goutte de la solution d'ADN et la mélanger dans le tube +pGLO.
4. Laisser reposer les tubes +pGLO et -pGLO pendant 10 minutes sur la glace.
5. Pendant ce temps-là, annoter 4 boîtes :
  - boîte LB annotée -pGLO ;
  - boîte LB/amp annotée -pGLO ;
  - boîte LB/amp annotée +pGLO ;
  - boîte LB/amp/ara annotée +pGLO.
6. Transférer le portoir en mousse contenant les 2 tubes de bactéries dans le bain-marie à 42° C. Après 50 secondes précises de choc thermique, replacer les tubes dans la glace pendant 2 minutes.
7. Ajouter 250 µl de milieu de culture LB à chaque tube. Incuber 10 minutes à température ambiante.
8. Tapoter les tubes pour homogénéiser la suspension bactérienne, puis prélever 100 µl et les déposer sur la boîte de culture correspondante (+ ou - pGLO).
9. Avec un ensemenceur stérile par boîte, étaler les bactéries à la surface de la gélose en balayant rapidement et faisant tourner la boîte.
10. Placer les boîtes à l'envers dans l'incubateur pendant 24 heures.
11. En utilisant les moyens de protection adaptés, observer les colonies sous UV.