

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 (CaCl₂)
- 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 µl de solution de transformation.

CHAPITRE 3 - LA COMPLEXIFICATION DES GÉNOMES

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.