

50376
1992
192-2

50376
1992
192-2 ✓

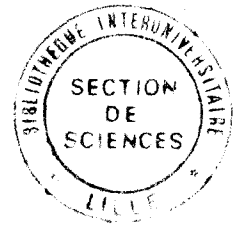
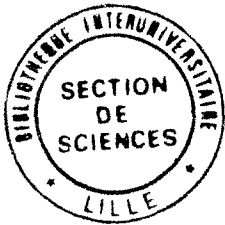
Numéro d'ordre 939

Université de Lille I

1992

THESE

Isolement d'une communauté microbienne dégradant l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique à partir d'un sol de Dijon. Caractérisations cinétique et génétique des souches impliquées



ANNEXES (FICHES TECHNIQUES)

Tatiana VALLAEYS

TABLE DES MATIERES

Fiche 1 :	Milieux de culture	1
Fiche 2 :	Conservation des souches	6
Fiche 3 :	Etude de l'ADN en gel d'agarose	7
Fiche 4 :	Dialyse	14
Fiche 5 :	Purification de l'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i> sur gradient de chlorure de cesium	16
Fiche 6 :	Purification de l'ADN plasmidique sur gradient de chlorure de cesium	21
Fiche 7 :	Extraction de plasmides sur gradient de saccharose	24
Fiche 8 :	Mise en évidence rapide de plasmides par electrophorese en gel d'agrose	28
Fiche 9 :	Mise en évidence rapide de plasmides bactériens	31
Fiche 10 :	Mini-préparations d'ADN plasmidique	33
Fiche 11 :	Extraction de l'ADN bactérien	36
Fiche 12 :	Ligation	39
Fiche 13 :	Transformation de cellules d' <i>E. coli</i> par de l'ADN plasmidique	
Fiche 14 :	Conjugaison	45
Fiche 15 :	Préparation de membranes pour hybridations de colonies sur membranes	48
Fiche 16 :	Transfert de gel sur membrane sous vide	50
Fiche 17 :	Marquage radioactifs par "nick - translation" hybridation en sacs	52
Fiche 18 :	Hybridations en four rotatif à l'aide de sondes non radioactives (Kit boehringer)	57

FICHE TECHNIQUE 1

MILIEUX DE CULTURE

I- SOLUTIONS STOCK

1 - Solutions d'oligo-éléments

Solution A

Fe SO ₄ , 7(H ₂ O)	0,028 g l ⁻¹
H ₃ BO ₃	2 µg l ⁻¹
Mn SO ₄	1,8 µg l ⁻¹
Zn SO ₄	0,2 µg l ⁻¹
CuSO ₄	0,08 µg l ⁻¹
NaMoO ₄	Traces

Solution B

Zn SO ₄ , 7(H ₂ O)	0,4g l ⁻¹
Mg Cl ₂ , 4(H ₂ O)	20 mg l ⁻¹
Acide borique	10 mg l ⁻¹
Co Cl ₂ , 6(H ₂ O)	50 mg l ⁻¹
Cu SO ₄	200 mg l ⁻¹
Ni Cl ₂ , 6(H ₂ O)	10 mg l ⁻¹
FeSO ₄ , 7(H ₂ O)	500 mg l ⁻¹
EDTA	250 mg l ⁻¹

2 - Tampon phosphate

Solution A

K ₂ HPO ₄	150 g l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	50 g l ⁻¹

Solution B

KH ₂ PO ₄	0,16M
Na H PO ₄ 12 (H ₂ O)	0,33M

3 - Solution d'azote

(NH ₄) ₂ SO ₄	200 g l ⁻¹
---	-----------------------

4 - Solution de magnésium

MgSO ₄ , 7(H ₂ O)	1M
---	----

5 - Solution de substrats carbonés (solutions séparées des produits suivants)

Stériliser par filtration les solutions suivantes :

Acétate de Na	30mM
Malate de Na	30mM
Succinate de Na	100mM
Phénol	100mM
2,4-dichlorophénol	30mM
Benzoate de Na	100mM
2,4-D	100mM
2,4,5-T	100mM
MCPA	30mM
Acide m-fluorobenzoïque	30mM

6 - Solution d'extrait de levure

Solution à 5 g l⁻¹

7 - Solution d'antibiotiques

Stériliser par filtration les solutions suivantes :

		Sol. mère mg/ml	C.finale µg/ml
Ampicilline	Amp	100	50
Carbeniciline	Cb	40	200
Kanamycine	Km	20	20 ou 100
Tétracycline	Tc	10	5 ou 20
Streptomycine	Sm	100	250 (ou 1000)
Spectinomycine	Sp	20	100
Ac. nalidixique	Nal	10	50
(ajuster pH)			
Rifampicine	Rif	20	30
Chloramphénicol	Cm	20	50

Dissoudre la rifampicine dans du méthanol, le chloramphénicol et la tetracyline dans l'alcool à 50 %, les autres antibiotiques dans de l'eau. Ajouter de la soude pour dissoudre l'ampicilline.

Remarque :

Les concentrations sont données à titre indicatif et dépendent de la souche bactérienne utilisée. Elles sont en général plus fortes pour des souches de pseudomonas que des souches d'E. coli.

8- Extrait de sol concentré

5 kg de sol argilo-limoneux provenant de la région de Dijon sont autoclavés 2 heures à 110°C en présence de 7 litres d'eau. La solution obtenue, une fois décantée est filtrée successivement à travers :

- 1- un préfiltre composé d'une couche de 1 cm de célite 545 Prolabo maintenue entre deux feuilles de papier Chardin
- 2- un préfiltre MILLIPORE (AP 2004700)
- 3- un filtre MILLIPORE (diamètre des pores 1,2 µm)

Le carbone organique est dosé à l'aide d'un analyseur de carbone DOHRMANN DC 80. L'extrait de sol est conservé au congélateur à -20°C, en flacons de 1 litre. Cette solution est utilisée de façon à apporter 50 mg l⁻¹ de carbone organique au milieu extrait de sol.

II- MILIEUX

Les milieux sont préparés à partir des solutions stock.

Tous les milieux sont autoclavés à 120°C 20 minutes. Les antibiotiques éventuels sont ajoutés après autoclavage et refroidissement des milieux gélosés dans un bain-marie maintenu à 60°C. Les milieux sont ensuite répartis en boîtes, en tubes (milieux solides) ou en erlen (milieux liquides).

1. Milieu à l'extrait de sol

Extrait de sol concentré : quantité nécessaire à l'apport de 50 mg l⁻¹ de carbone organique

Solution A d'oligo-éléments 1 ml l⁻¹

NH₄NO₃ : quantité nécessaire pour ajuster le rapport C/N du milieu à 5, en tenant compte de la concentration en azote de l'extrait de sol concentré qui est de l'ordre de 7,5 mg l⁻¹.

2. Milieu liquide minimal

Tampon phosphate A	1 ml
Solution d'azote	500 µl
Solution de magnésium	84 µl
Solution B de sels minéraux	50 µl
Solution d'extrait de levure	100 µl
Solution de substrats carbonés	3mM
H ₂ O	q.s.p. 100 ml

3. Milieu solide minimal

Même composition que précédemment avec :

agar purifié (agar bactériologique type E BioKar ou Bitek Agar Difco, Laboratories Détroit, Michigan, USA).	1,6 g
--	-------

4. Milieu 2,4-D pour fermenteur

Pour 4 l

Tampon phosphate A	80 ml
NH ₄ NO ₃	200 mg
2,4-D	800 mg
Solution de sels minéraux A	4 ml
q.s.p. H ₂ O	4 l

5. Milieu 2,4-D solide, préparation de Loos (1976) modifiée

Pour 1 l

Eosine B	40 mg
Bleu de Méthylène	6,5 mg
2,4-D (3mM)	663 mg
Extrait de levure	250 mg
Solution B de sels minéraux	500 µl
Solution de Mg SO ₄	840 µl
Agar minimum	20 g
q.s.p. H ₂ O	1 l
Ajouter NH ₄ (SO ₄) ₂ jusqu'à obtenir un pH égal à 7	

6. Milieu complet liquide (LB)

Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
q.s.p. H ₂ O	1 l

7. Milieu complet solide (LB)

Même composition que précédemment avec :

Agar bactériologique type E Biokar	18 g
q.s.p. H ₂ O	1 l

8. Milieu complet Nutrient Agar (NA)

Nutrient agar (Difco laboratories Detroit Michigan USA)	: 18 g
q.s.p. H ₂ O	1 l

9. Milieu X-gal - IPTG pour la mise en évidence du métabolisme du lactose.

- Milieu LB agar : (stérile, température stabilisée à 60°C dans un bain-marie)	500 ml
- Solution de 5-Bromo, 4-chloro, 3-indolyl β-D-galactopyranoside (X-gal) à 25 mg par 1,25 ml de diméthylformamide	812 µl
- Solution d'isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) à 240 mg par 10 ml d'H ₂ O	212 µl
- Ajouter l'antibiotique approprié.	

10. Milieu Mac Conkey pour la mise en évidence du métabolisme du lactose.

- Dissoudre 50 g de gélose Mac Conkey (Difco laboratories Detroit Michigan USA) par litre d'eau, autoclaver à 120°C 15 minutes.

11. Milieu DORSET pour la conservation des souches *d'E. coli*.

Remarque :

Permet la longue conservation (un an) des souches d'E. coli.

1. Laver à l'éthanol un mortier et un pilon en verre ainsi que 6 oeufs de poule.
2. Jeter l'éthanol, égoutter.
3. Flamber le mortier et le pilon.
4. Sous une hotte à flux laminaire, casser les oeufs précautionneusement dans le mortier pour éviter toute contamination.
5. Ajouter 60 ml de milieu LB liquide concentré 2 fois.
6. Battre les oeufs, les incorporer au milieu à l'aide du pilon.
7. Presser le mélange à travers une mousseline stérile dans une fiole en verre stérile.
8. Répartir en tubes à vis stériles de 20 ml à raison de 4 à 5 ml par tube.
9. Pasteuriser les tubes en les soumettant à la chaleur (75 à 80°C) pendant 45 minutes 2 jours consécutifs. Conserver quelques temps et vérifier la stérilité des tubes avant d'inoculer.

FICHE TECHNIQUE 2

CONSERVATION DES SOUCHES

1. En tube gélosé incliné

Répartir le milieu gélosé adéquat à raison de 5 ml par tube dans des tubes à vis muni de joints. Autoclaver 20 minutes à 120°C. Laisser refroidir les tubes en position inclinée de façon à obtenir une surface gélosée en pente dans le tube, ensemercer les tubes avec une colonie isolée de la souche à conserver.

2. A -80° C dans le glycérol

Remettre en suspension dans 2 ml de milieu LB stérile concentré 2 fois (fiche technique 1) le contenu en cellules d'un tube incliné. Prélever 0,5 ml dans un cryotube Nalgène. Ajouter 0,6 ml de glycérol stérile (25 % dans l'eau). Congeler à -80°C.

FICHE TECHNIQUE 3

ETUDE DE L'ADN EN GEL D'AGAROSE

MATERIEL

Microcentrifugeuse
Bacs à électrophorèse pour maxi et minigels.
Générateur de courant.
Tubes de dialyse.
Tubes pour microcentrifugeuse.
Pointes pour micropipette.
Micropipettes 20 et 200 μ l.
Support de polystyrène flottant avec trous pour tubes de microfugeuse.
Bain-marie ou incubateur à 37°C.
Bain-marie à 65°C.
Carboglace.
Appareil photo polaroid + films.

SOLUTIONS

Solutions tampons

1. Tampon d'électrophorèse : TBE x 10 :

Tris-base, pH 8	108	g.l ⁻¹
Acide borique	55	g.l ⁻¹
EDTA acide	8,7	g.l ⁻¹

2. TE, pH 8 :

Tris-HCl	10 mM
Na ₂ EDTA	1 mM

3. TES, pH 8 :

Tris-HCl,	50 mM
Na ₂ EDTA	5 mM
NaCl	50 mM

4. Tampon de dépôt :

Glycérol	50 %
TES	50 %
Bleu de bromophénol	0,07 %

Tampons pour la digestion par les endonucléases de restriction.

1. Tampons spécifiques

Utiliser les tampons fournis par le fabricant ou des tampons préparés comme ci-dessous.

		pour 10 ml de tampon concentré 10 fois					
		<i>EcoR</i> I	<i>Bam</i> H I <i>Hind</i> III	<i>Bgl</i> II	<i>Xho</i> II <i>Sal</i> I	<i>Xho</i> I	<i>Sma</i> I <i>Pst</i> I
Tris-HCl	1 M	8,5 ml	1,0 ml	1,0 ml	0,6 ml	0,6 ml	2 ml
NaCl	5 M	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	3,0 ml	-	-
MgCl ₂	1 M	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,6 ml	0,6 ml	1 ml
KCl	1 M	-	-	-	-	2,0 ml	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 M	-	-	-	-	-	0,5 ml
β-mercaptoéthanol	-	-	-	60 µl	42 µl	42 µl	-
	14 M			(100 mM)			
BSA		10 mg	10 mg	10 mg	10 mg	10 mg	10 mg
Eau		-	7,5 ml	7,5 ml	5,8 ml	6,8 ml	6,4 ml
pH final		7,5	7,5	7,5	7,9	8,8	7,5

2. Tampon universel : TU x 10, pH 7,9

Tri-acétate	0,33 M
Acétate de K	0,66 M
Acétate de Mg	0,1 mM
DTT	50 mM
BSA	100 µg. ml ⁻¹

Tampon de dilution pour enzymes de restriction :

Pour dilutions extemporanées :

Tampon d'enzyme	1 ml
Eau	9 ml
β -mercaptoéthanol	4 μ l

Remarques :

Pour conserver l'enzyme diluée à -80 °C, utiliser le tampon préconisé par le fabricant. Les enzymes sont moins stables dilués.

Ne jamais ajouter un volume d'enzyme supérieur au 1/10 du volume final de la réaction d'hydrolyse car le glycérol peut inhiber l'activité de l'enzyme.

Solutions d'ADN, enzymes et tampon sont conservés à -20 °C. Les enzymes sont retirées du congélateur au dernier moment, placées dans la glace et remises au congélateur.

Autres réactifs

1. BEt (Bromure d'éthidium) 2 mg ml⁻¹ dans l'eau. Ajouter 0,50 ml par litre pour colorer les gels.

2. NaCl 3 M ou acétate de Na 3M.

3. Phénol saturé en tampon TE (mélange volume à volume)

4. Ethanol absolu froid - 20 °C.

5. Chloroforme - alcool isoamylique 24/1.

6. Ethanol à 70 % froid - 20 °C.

7. ADN de référence :

ADN du phage λ cl 857 S7 à 300 μ g ml⁻¹. Hydrolyser 3 μ l et ajouter à chaque migration électrophorétique effectuée

ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE

Préparation des gels d'agarose

Pour un gel ordinaire à 0,7 % d'agarose :

TBE x 10	10 ml
Agarose	0,7 g

Fondre l'agarose au four à micro-ondes ou sur un agitateur chauffant avec barreau magnétique.

Laisser refroidir l'agarose jusqu'à 60° C environ, pendant ce temps nettoyer et préparer l'appareil pour couler le gel et disposer le peigne, en laissant l'espace d'une lame de microscope entre le fond et les dents.

Couler le gel.

Laisser solidifier 1 heure.

Remarques :

On peut rajouter du BET à raison de 1 µg ml⁻¹ à la solution d'agarose. Cela évite la coloration ultérieure. Il est inutile d'ajouter du BET au tampon de migration. Travailler avec des gants. Ne pas ajouter le BET dans le gel lorsqu'il s'agit d'électroéluer un fragment d'ADN.

Dans les expériences de routine on peut utiliser un mini-gel : on coule 25 ml de gel directement dans le mini-appareil. Si on y ajoute le BET : 10 µl de BET à 2 mg ml⁻¹.

Electrophorèse

Enlever le peigne et placer le gel sur l'appareil. Immerger avec le tampon TBE.

Déposer les échantillons dans les puits. Les échantillons sont alourdis par addition du tampon de dépôt (glycérol 50 %, TES 50 %, bleu de bromophénol 0,07 %) à raison de 1/4 à 1/5 du volume final.

Faire migrer entre 2 à 7 V cm⁻¹ selon le temps de migration désiré (6 ou 16 heures). 60 V pour les minigels, pendant environ 2 heures. Ne pas oublier le marqueur de poids moléculaire connu.

Coloration du gel

Si le BET n'est pas déjà dans le gel, celui-ci est coloré par immersion dans une solution aqueuse de BET à 1 µg.l⁻¹ pendant 30 minutes avec agitation douce, puis photographié en lumière UV avec filtre rouge. Se munir de gants et de lunettes.

HYDROLYSE PAR LES ENDONUCLEASES DE RESTRICTION

Diagramme de restriction

1. Hydrolyser de 0,1 à 1 µg d'ADN à analyser (selon le nombre de fragments attendus) (on visualise correctement une bande d'environ 300 ng d'ADN) dans un volume final de 20 µl avec 1 à 2 U d'enzyme par µg d'ADN).

2. Ajouter dans l'ordre :

Tampon de restriction x 10	2 μ l
ADN	2 μ l
Enzyme de restriction	1 μ l
Eau distillée q.s.p.	20 μ l

3. Incuber à 37°C 1 heure (ou plus).

4. Arrêter la réaction par chauffage 5 à 15 minutes (selon l'enzyme) à 65°C.

5. Ajouter 5 μ l de tampon de dépôt.

6. Procéder à l'électrophorèse.

Méthode préparative

Hydrolyser la quantité d'ADN désirée et vérifier la restriction par électrophorèse d'une aliquote sur mini-gel par exemple.

Remarque : Pour l'ADN chromosomique on hydrolyse entre 1 à 5 μ g et les quantités d'enzyme nécessaires sont souvent très supérieures à celles utilisées dans le cas de l'ADN plasmidique.

La composition optimale du tampon de restriction varie beaucoup d'un fabricant à l'autre, il est prudent de consulter les notices.

Pour réaliser une double hydrolyse vérifier que les tampons sont compatibles. S'ils sont identiques, ajouter les enzymes simultanément ou successivement à 1 heure d'intervalle. S'ils sont très différents, hydrolyser d'abord avec l'enzyme exigeant pour son activité la concentration en sel la plus faible.

ELECTROELUTION

Cette méthode permet de purifier un fragment de restriction à partir d'un gel d'agarose.

L'ADN plasmidique est hydrolysé de façon à avoir quelques μ g du fragment désiré.

Après électrophorèse et coloration à l'abri de la lumière, la bande d'agarose contenant ce fragment est découpée, placée dans un sac de dialyse contenant un minimum de TBE propre, fermé avec des pinces et soumise à une nouvelle électrophorèse dans le noir jusqu'à élution totale de l'ADN hors de l'agarose, 2 h à 120 volts. Le contenu du sac de dialyse est récupéré dans un tube Eppendorf.

Procéder à une extraction avec le phénol-chloroforme et deux extractions à l'éther avant de précipiter l'ADN.

DEPROTEINISATION

7. Ajouter à la solution d'ADN 1 volume de mélange phénol-saturé TE, passer au vortex à faible vitesse, laisser 5 minutes dans la glace.

8. Centrifuger 5 minutes dans la microcentrifugeuse.

9. Prélever la phase aqueuse (phase supérieure) qui contient l'ADN et procéder à une nouvelle extraction phénol-chloroforme.

10. Ajouter 1 volume de chloroforme, éliminer le chloroforme (phase supérieure), répéter l'opération et évaporer l'excès de chloroforme sous vide, dans une centrifugeuse style Speed vac.

11. Précipiter ensuite l'ADN à l'éthanol absolu froid (-20°C) comme suit.

PRECIPITATION A L'ETHANOL

12. Ajuster la concentration saline de la solution d'ADN à 0,3 M en Na avec du NaCl 3M ou de l'acétate de Na 3M, bien mélanger.

13. Ajouter l'éthanol, bien mélanger et mettre au froid.

On peut utiliser :

- 2 volumes d'éthanol et conserver 2 heures à 1 nuit à -20°C.
- 3 volumes d'éthanol et laisser 30 minutes à -80°C.
- 3 volumes d'éthanol et laisser 5 à 15 minutes dans un - mélange carboglace-alcool

14. Centrifuger à la microcentrifugeuse 15 minutes.

15. Noter l'emplacement du culot, prélever la phase alcoolique à la pipette Pasteur et sécher quelques minutes sous vide.

16. Remettre en suspension le culot dans du TE pH 7,5. Pour les fragments d'ADN soumis à une ligation ultérieure, remettre en suspension dans du TE dilué au 1/10^{ème}.

DETERMINATION DE LA TAILLE DES FRAGMENTS DE RESTRICTION

La taille des fragments est estimée par rapport à la migration de standards. Utiliser comme référence le bactériophage λ hydrolysé par les endonucléases de restriction *Hind* III, *Eco*RI et *Hind* III + *Eco*RI, *Bgl* II.

	<i>Hind</i> III	<i>Pst</i> I	<i>Hind</i> III + <i>Eco</i> RI	<i>Bgl</i> II
Taille des	23,7	11,493	21,8	22,8
fragments	9,46	5,080	5,24	13,6
en kb	6,75	4,749	5,05	9,8
	4,26	4,505	4,21	2,3
	2,26	2,840	3,41	0,46
	1,98	2,562	1,98	
	0,58	2,454	1,90	
		2,139	1,57	
		1,986	1,32	
		1,7	0,93	
		1,159	0,84	
		1,093	0,58	
		0,8		
		0,511		
		0,467		
		0,339		

Tracer la courbe du log de la taille des fragments de λ en fonction de leur distance de migration et déterminer sur cette courbe la taille des fragments inconnus.

Pour les fragments de taille inférieure à 0,5 kb utiliser des gels d'agarose entre 1 à 1,8 % ou mieux des gels de polyacrylamide et comme standard la forme répliquative du phage ϕ X 174 hydrolysée par *Hae* III ou *Hinc* II.

Pour les ADN circulaires :

- dans le cas de petits plasmides la taille est difficile à déterminer à cause de la présence des complexes de relaxation et de multimères.

- dans le cas de gros plasmides utiliser comme standard le prophage P1 60×10^6 daltons et RP4 36×10^6 daltons. Au dessus de 100×10^6 daltons la détermination de la taille par gel d'agarose est très imprécise.

FICHE TECHNIQUE 4

DIALYSE

MATERIEL ET SOLUTIONS

Tubes de dialyse conservés dans l'éthanol à 50 %

Tampon de dialyse :	TES 1/5	
Na ₂ EDTA, pH 8		1 mM
Tris HCl, pH 8		10 mM
Na Cl		10 mM

Tampon TE, pH 8		
Tris HCl		10 mM
Na ₂ EDTA		1 mM

Solution A :		
Bicarbonate de sodium		3 %
Na ₂ EDTA		1 mM

Toutes les solutions sont stériles.

Remarques :

Il est préférable, lors de purifications de gros plasmides sur des gradients de chlorure de césium, de dialyser les échantillons recueillis plutôt que de les soumettre à une précipitation à l'éthanol. Cette dernière méthode, plus rapide, est utilisée pour les petits plasmides.

Travailler avec des gants pour éviter toute contamination par des nucléases.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

JOUR 1

1. Couper les tubes de dialyse à la taille appropriée (fragments de 10 à 20 cm).
2. Faire bouillir pendant 10 minutes dans un grand volume de solution A.
3. Rincer les tubes dans l'eau distillée.
4. Faire bouillir 10 min dans l'eau distillée.
5. Laisser refroidir et conserver à 5°C dans un mélange eau-éthanol à 50 %

JOUR 2

6. Sortir les tubes de dialyse de l'alcool, les égoutter, mettre dans de l'eau désionisée avec l'agitateur et les pinces. Faire bouillir au micro-onde pendant 5 minutes, laisser refroidir.

7. Placer une pince à l'une des extrémités du tube, introduire la solution d'ADN à dialyser. A l'aide de la 2^{ème} pince, chasser l'air autant que possible (laisser un petit volume d'air). Mettre dans du TES dilué au 1/5 environ 4 heures. Vider le tampon et placer 4 heures dans du TE. Renouveler 2 fois l'opération.

FICHE TECHNIQUE 5

PURIFICATION DE L'ADN PLASMIDIQUE D'*E. COLI* SUR GRADIENT DE CHLORURE DE CESIUM

*Remarque : Cette méthode est essentiellement réservée à la préparation des plasmides d'*E. coli*.*

PRINCIPE

De nombreuses techniques de purification de l'ADN plasmidique consistent à obtenir un lysat "clarifié", c'est-à-dire débarrassé de la majeure partie de l'ADN chromosomique. Le lysat peut être obtenu après action de divers détergents comme le triton X-100 ou le Brij-désoxycholate qui sera utilisé dans cette expérience. L'ADN plasmidique sera ensuite purifié par centrifugation sur un gradient de chlorure de césium en présence de bromure d'éthidium (BEt). Ce colorant a moins d'affinité pour l'ADN linéaire ou l'ADN circulaire possédant une coupure simple brin, que pour l'ADN super-enroulé. L'ADN plasmidique a donc une densité apparente plus élevée que celle de l'ADN chromosomique.

REFERENCE

Humphreys, G.O., Willshaw G.A. and Anderson, E.S., (1975). A simple method for the preparation of large quantities of pure plasmid DNA. *Biochem. Biophys. Acta*, 383 : 457-463.

MATERIEL

Tout le matériel utilisé et les solutions sont stériles
Tubes Quick Seal (16 x 76) "Ultra Clear" pour rotor 50Ti
Aiguilles (22G x 1¼ - 20G x 1½)
Seringues (10 ml)
Tubes Falcon 2063
Tubes Sterilin 25 ml
Gants
Poires ou propipettes
Cuves de quartz
Ultracentrifugeuse avec rotor vertical 50 Ti

SOLUTIONS

Les solutions de lysozyme, de Brij 58 et de désoxycholate sont préparées la veille ou le jour même.

Solution de lyse :	Brij ® 58(Aldrich-Chemie)	0,8 g
	Na désoxy-cholate	0,32 g
	Tris HCl 2M pH 8	2 ml
	0,25 M Na ₂ EDTA pH 8	20 ml
	q.s.p. H ₂ O	80 ml

à préparer extemporainement à l'aide de la solution B.

Tampon TE : Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8

Solution A : Saccharose 0,25 M, Tris - HCl 50 mM, pH 8

Solution B : Tris HCl 2M, EDTA 0,25 M, pH 8

Solution de lysozyme : 5 mg ml⁻¹ en tampon TE.

Phénol chloroforme tamponé :

Sous la hotte liquéfier 100 g de phénol au bain-marie (60°C). Dissoudre dans 100 ml de chloroforme. Ajouter 0,1 g de 8 - hydroxyquinoléine.

Préparer 100 ml d'une solution, Tris-HCl 0,1 M, EDTA 10 mM pH 8, et l'introduire dans le mélange phénol/chloroforme, bien mélanger, placer au réfrigérateur jusqu'à séparation complète des 2 phases. Utiliser la phase inférieure colorée.

Solution : acétate 3 M, pH 6

Solution de Bromure d'éthidium : 10 mg.ml⁻¹ à diluer dans du TE

Chlorure de césium

Huile de paraffine

Solution 20 x SSC : NaCl 3 M, Tri sodium citrate 0,3 M

Isopropanol saturé avec du 20 x SSC (70 % isopropanol 30 % 20 x SSC)

Ethanol à 70 % : froid (-20°C)

Ethanol absolu : froid (- 20°C)

Mélange carboglace-alcool ou congélateur

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

JOUR 1 (LE SOIR)

Culture des bactéries

Ensemencer 200 ml de milieu LB avec 0,1 ml de préculture (ajouter les antibiotiques nécessaires au maintien du plasmide).

Incuber les cultures toute la nuit à 37°C avec agitation vigoureuse.

JOUR 2

Lysat clarifié

Toutes les opérations doivent être effectuées au froid (boîte à glace) et avec du matériel stérilisé de façon à éviter toute contamination par des nucléases.

Toutes les agitations sont ménagées (ne jamais utiliser le Vortex), sauf pour la remise en suspension des bactéries.

1. Préparer la solution de lysozyme 5 mg ml⁻¹.
2. Centrifuger la culture à 5000 rpm pendant 10 minutes.
3. Jeter le surnageant - remettre en suspension dans 6 ml de solution A.
4. Ajouter 1 ml de lysozyme.
5. Ajouter 2 ml d'EDTA 0,25 M, pH 8. Laisser 5 minutes à température ambiante.
6. Ajouter 8 ml de solution de lyse. Laisser sur table d'agitation à température ambiante pendant 30 minutes
7. Centrifuger la préparation à 20 000 rpm pendant 45 minutes. Verser le surnageant dans un tube à centrifuger propre en polyallomère (résistant au phénol).
8. Sous hotte, ajouter un volume équivalent du mélange de phénol/chloroforme. Centrifuger à 15 000 rpm pendant 10 minutes.
9. Recueillir la phase supérieure à l'aide d'un cône dont on aura coupé l'extrémité (de façon à éviter les remous et la contamination du surnageant par les protéines situées à l'interface).
10. Ajouter 2,25 ml d'une solution d'acétate de sodium 3 M, pH 6 et remuer, puis 12 ml d'isopropanol - 20° C. Centrifuger 15 000 rpm 25 minutes.
11. Jeter le surnageant, laver les culots avec 10 ml d'éthanol froid (-20°C) et centrifuger 5 minutes à 15 000 rpm en veillant à replacer les tubes dans la centrifugeuse avec la même orientation de façon à ne pas détacher les culots.

12. Remettre en suspension dans le volume adéquat de tampon TE, laisser dissoudre, ajouter le chlorure de césium de façon à obtenir une solution à 1 g ml⁻¹ puis le bromure d'éthidium, ajuster le volume du culot à 7,7 ml : les volumes à utiliser sont fonction du type de rotor. A titre d'exemple :

Rotor 50 Ti Beckman : 6 ml TE, 7,5 g chlorure de césium, 0,3 ml de BEt à 10 mg ml⁻¹

Rotor TFF 7038 Kontron : 3 ml TE, 4,6 g chlorure de césium, 0,24 ml de BEt à 10 mg ml⁻¹

Compléter avec du TE pour équilibrer les tubes.

13. Compléter les tubes avec de l'huile de paraffine - équilibrer - sceller.

14. Centrifuger à 45 000 rpm pendant au moins 16 h.

JOUR 3

Collecte de l'ADN plasmidique et extraction du BEt

Cette étape se fait sous rayonnement ultra-violet. Mettre le masque de protection.

15. Arrêter la centrifugeuse (sans frein). Deux bandes rouges sont visibles en éclairage UV. La bande inférieure correspondant à l'ADN plasmidique circulaire superhélicoïdal. La bande supérieure contient de l'ADN plasmidique circulaire relaxé et linéaire ainsi que des fragments d'ADN bactérien résiduels.

La bande inférieure est prélevée à l'aide d'une aiguille et d'une seringue de 1 ml, dans un tube de 4 ml après avoir percé la partie supérieure du tube Quick Seal pour éviter une dépression dans le tube.

16. Ajouter 1 volume de propanol-2 saturé avec du 20 x SSC (phase supérieure) dans le tube. Boucher le tube avec du parafilm et retourner doucement.

Laisser décanter quelques minutes. Le colorant passe dans la phase alcoolique supérieure. Prélever cette phase alcoolique avec une pipette Pasteur et la jeter. Répéter l'extraction avec un volume de propanol-2 saturé jusqu'à ce que la phase aqueuse soit devenue incolore.

17. Pour précipiter l'ADN, transvaser la phase aqueuse dans un tube Corex de 15 ou 30 ml, ajouter 2 volumes d'alcool à 70 % froid (-20°C), on voit deux phases. Bien mélanger, on doit voir l'ADN précipiter. Mettre à -20°C.

Remarque : On peut dialyser la phase aqueuse pendant 24 heures pour éliminer le CsCl dans du TES au lieu de précipiter l'ADN directement à l'alcool. Cette méthode est beaucoup moins rapide.

JOUR 4

18. Centrifuger les tubes contenant l'ADN précipité, 30 minutes à 10 000 rpm.

19. Noter l'emplacement des culots et prélever la phase liquide avec une pipette Pasteur, drainer le reste du liquide si nécessaire.

20. Sécher quelques minutes sous un courant d'azote.

21. Remettre en suspension le culot dans 0,5 ml de tampon TE et transvaser dans 2 tubes pour microcentrifugeuse de 1,5 ml.

A ce stade il est préférable de refaire une précipitation à l'alcool. Ajuster la concentration en NaCl 0,3M, mélanger. Ajouter 3 volumes d'éthanol absolu, mélanger, l'ADN doit précipiter. Placer dans un mélange carboglace-éthanol 5 minutes (ou - 80°C 1/2 heure ou 4 heures à - 20°C). Centrifuger 10 minutes en chambre froide. Décanter la phase aqueuse, sécher les culots et les remettre en suspension chacun dans 250 µl de tampon TE. Rassembler les deux tubes.

Détermination de la quantité et de la pureté de l'ADN

22. Dosage spectrophotométrique

Faire une dilution 1/40 (dans 1 ml de TE) et lire la DO à 260 et 280 nm.

On doit obtenir 200 à 500 µg d'ADN par ml en sachant que $DO_{260} = 1$ correspond à 50 µg d'ADN ml⁻¹. Le rapport 260/280 doit être supérieur à 1,6.

23. Migration sur gel d'agarose.

Faire migrer 1 à 3 µl de la solution d'ADN sur un mini-gel pour vérifier l'absence de contamination en ARN et en protéines.

FICHE TECHNIQUE 6

PURIFICATION D'ADN PLASMIDIQUE SUR GRADIENT DE CHLORURE DE CESIUM

Remarque : Cette variante est destinée à l'extraction de gros plasmides. Les souches testées d'Alcaligenes, Pseudomonas et Rhizobium donnent généralement de bons résultats. (peut se faire sur 1 journée = 12 heures de manipulation pour 4 souches).

PRINCIPE

La méthode proposée est une synthèse des méthodes de Guerry *et al.*, 1973 ; Humphreys *et al.*, 1975 ; Currier et Nester, 1976. Elle reprend, en particulier, l'étape de précipitation des composés membranaires au chlorure de sodium proposée par Guerry *et al.*, 1973.

Contrairement au Brij ® 58 utilisé lors de la lyse dans la fiche précédente, l'utilisation de NaCl 5 N en présence d'un détergent (ici le SDS) provoque la précipitation d'une grande partie de l'ADN chromosomique en même temps que celle des protéines.

L'ADN plasmidique semble se détacher de la membrane en présence de fortes concentrations en sels et reste en solution. Il est ultérieurement précipité à l'aide du polyéthylène glycol 8000 qui possède la propriété d'agglutiner les macromolécules.

REFERENCE

Currier, T.C. and Nester, E.W., 1976. Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. *Anal. Biochem.* 76: 431-441.

Guerry, P., Leblanc, D.G. and Falkow, S., 1973. General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 116 (2) : 1064-1066.

Hansen J.B. and Olsen R.M., 1978 : Isolation of large bacterial plasmids and characterisation of the P2 incompatibility group, plasmids pMG1 and pMG5. *J. Bact.*, 135 : 227-238.

Humphreys, G.O., Willshaw, G.A. and Anderson, E.S., 1975. A simple method for the preparation of large quantities of pure plasmid DNA. *Biochem. Biophys. Acta*, 383 : 457-463.

MATERIEL

Ultra centrifugeuse. Rotor vertical.

SOLUTION

Solution A saccharose 0,25 M, Tris HCl 0,05 M, pH 8

Solution de lysozyme : 5 mg ml de Tris - HCl 0,25 M, pH 8

Solution d'EDTA 0,25 M, pH 8

Tampon TE Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8

Solution de SDS 20 % à diluer le jour même dans du TE

Solution de NaOH 3 M

Solution Tris 2 M, pH 8

Solution de NaCl 5 M

Tampon Na₂ HPO₄/Na H₂ PO₄, pH 7

Pour 200 ml de tampon, mélanger 61 ml de Na₂ HPO₄ 0,2 M (31,2 g l⁻¹) à 39 ml de Na H₂ PO₄ 0,2 M (71,6 g l⁻¹). Rajouter 100 ml d'H₂O.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

JOUR 1 (LE SOIR)

Ensemencer 100 ml de milieu LB contenant l'antibiotique nécessaire au maintien du plasmide.

JOUR 2

Préparer la solution de lysozyme et de SDS. Placer la solution de NaCl 5M dans la glace.

1. Centrifuger 100 ml de culture à 7000 RPM pendant 10 minutes.
2. Remettre en suspension les culots dans 6 ml de solution A. Transvaser dans un tube à centrifuger de 50 ml.
3. Ajouter 1 ml de solution de lysozyme, agiter avec précaution et laisser 5 minutes à température ambiante.
4. Ajouter 2,5 ml d'EDTA 0,25 M (pH 8) mélanger, laisser 5 minutes à température ambiante.
5. Ajouter 2,5 ml de solution de SDS, remuer jusqu'à obtenir une lyse complète des cellules (la viscosité de la solution est alors importante), placer sur glace. Dans certains

cas, il est nécessaire de placer les tubes quelques secondes au bain-marie pour obtenir la lyse.

Dénaturation Alcaline et renaturation

6. Ajouter 0,75 ml de NaOH 3M, mélanger avec précaution. Laisser 3 minutes sur glace.

7. Ajouter 6 ml de Tris 2M pH 8, mélanger.

Précipitation des protéines

8. Ajouter 3 ml de solution de SDS. Celui-ci se lie aux protéines.

9. Ajouter 6 ml de NaCl 5M froid, mélanger et laisser sur glace pendant au moins 4 heures.

10. Centrifuger à 20 000 RPM pendant 30 minutes et décanter le surnageant dans un tube propre.

Précipitation de l'ADN

11. Ajouter 9 ml de solution de polyéthylène glycol, agiter doucement laisser la nuit dans la glace (4 heures suffisent).

jour 3

12. Centrifuger à 7000 RPM pendant 5 minutes, draîner tout le surnageant à l'aide d'une pipette Pasteur effilée.

13. Remettre en suspension dans un volume adéquat de TE. Bien dissoudre.

14. Ajouter le chlorure de césium puis le BEt (Voir Fiche Technique 5 pour les détails et la collecte).

FICHE TECHNIQUE 7

EXTRACTION DE PLASMIDES SUR GRADIENT DE SACCHAROSE

Remarque : Cette méthode est appropriée à l'extraction de gros plasmides (50 kb et plus). Elle permet dans certains cas d'isoler des plasmides "rebelles" au gradient de CsCl. Elle a donné des résultats positifs pour plusieurs souches d'Alcaligenes, et de Pseudomonas. Très rapide, elle donne cependant de moins bons rendements que les gradients de CsCl.

PRINCIPE

Après lyse alcaline au SDS, la suspension bactérienne est soumise à une agitation vigoureuse, en présence d'antimousse destinée, d'une part à casser le chromosome et d'autre part, à détacher le(s) plasmide(s) du complexe membranaire. La séparation des 2 types d'ADN est alors réalisée sur gradient de saccharose en utilisant les différences de vitesse de sédimentation.

REFERENCE

Wheatcroft, R. and Williams, P.A., 1981. "Rapid methods for the study of both stable and unstable plasmids in *Pseudomonas*. J. Gen. Microbiol., 124 : 433-437.

MATERIEL

- Ultra centrifugeuse
- Congélateur
- Tubes à centrifuger 14 x 89 mm (Polyallomer Beckmann) Instrument INC
- Rotor à godets mobiles
- Pompe péristaltique
- Tube souple muni d'une aiguille
- Tubes Eppendorf
- Eau distillée stérile
- Congélateur
- Facilités pour l'électrophorèse

SOLUTIONS

Solution A :

Tris	50 mM
EDTA de Na	50 mM
Anti-mousse (Dow Corning Antifoam RD emulsion BDH)	5 % (volume à volume)
Xylène Cyanol	10 mg.l ⁻¹

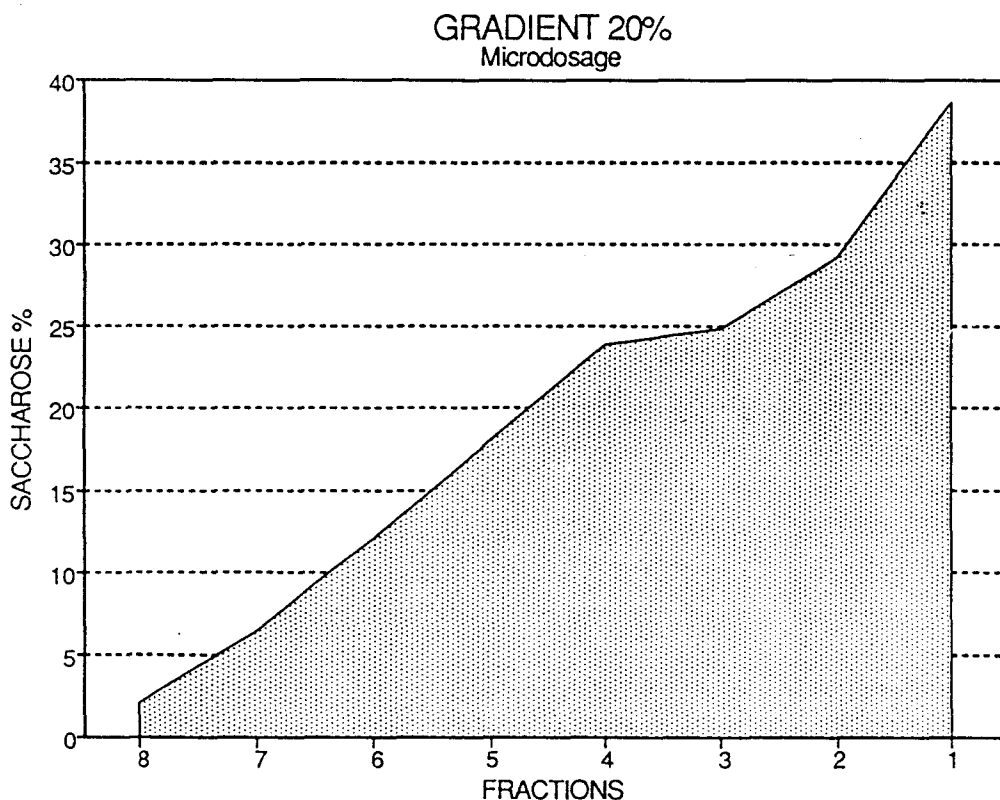
Solution B :

Dissoudre 1 % (poids volume) de SDS dans une solution de NaOH 1M à 65°C puis refroidir.

Tubes de gradient de saccharose :

Pipeter 8 ml d'une solution de saccharose 20 % dans des tubes pour ultracentrifugation. Congeler, décongeler (c'est à ce stade que le gradient de saccharose se forme dans le tube), et congeler à nouveau pour conserver le gradient ainsi formé.

La concentration en saccharose dans le tube se répartit alors de la façon suivante :



PROTOCOLE EXPERIMENTAL

JOUR 1

Préparer les tubes de gradient de saccharose.

Inoculer 100 ml d'une solution de LB en prélevant une colonie isolée de chaque souche.

Incuber à 30°C d'une nuit à 48 heures selon la vitesse de croissance des souches.

JOUR 2

Lyse bactérienne

Sortir les tubes de gradient de saccharose du congélateur.

1. Centrifuger les cultures (12 000 RPM, 30 minutes). Eliminer le surnageant. Assécher les culots à l'aide de pipettes Pasteur effilées.

2. Remettre en suspension les culots dans 1,6 ml de solution A préalablement agitée avant usage (le réactif coloré, le xylène cyanol, est un indicateur rédox, la solution contient également de l'anti-mousse ce qui évite la formation de bulles en présence de SDS lors de l'étape suivante). Transférer dans des tubes à hémolyse.

Remarque : A ce stade, il est possible de laisser la suspension au réfrigérateur.

3. Ajouter goutte à goutte 400 µl de solution B (provoque instantanément la lyse bactérienne).

Remarque : A ce stade, la suspension doit devenir visqueuse et sa couleur doit passer du bleu au bleu vert. Des tubes restant bleus indiqueraient une concentration en cellules insuffisante. Des tubes trop "verts" seraient à diluer avec de la solution A.

4. Passer au vortex les tubes jusqu'à ce que la viscosité diminue (jusqu'à 5 minutes, le lysat doit monter progressivement le long du tube.

5. Charger le lysat sur le tube de gradient de saccharose avec précaution.

6. Equilibrer très précisément les tubes deux à deux et centrifuger à 34 000 rpm pendant 1h30 à 15°C dans un rotor à godets mobiles.

7. Préparer un gel 0,7 % d'agarose en TBE à 2 rangées de puits pour tester les fractions collectées.

Collecte du plasmide

8. Introduire avec précaution l'aiguille verticalement par le haut dans le gradient en veillant à ne pas provoquer de remous et ce, jusqu'à 1 cm du fond. Collecter des fractions d'environ 400 μ l.

L'arrivée du marqueur bleu dans les tubes indique la présence d'ADN chromosomique. Arrêter alors la collecte, rincer l'aiguille et le tube de collecte avec de l'eau distillée stérile entre chaque échantillon.

Vérification des fractions

9. Déposer une aliquote de chaque fraction sur un gel à 0,7 % d'agarose en TBE (il est inutile d'utiliser le tampon de dépôt usuel car le saccharose "alourdit" déjà les fractions).

10. Faire migrer une nuit à 35 V.

FICHE TECHNIQUE 8

MISE EN EVIDENCE RAPIDE DE PLASMIDES PAR ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSEF

Remarque :

La méthode décrite par Kado et Liu (1981) permet de mettre en évidence en quelques heures des plasmides de masse moléculaire de 3 à 350 Mda, dans de nombreuses espèces bactériennes.

PRINCIPE

Les cellules bactériennes sont lysées par du SDS dans une solution fortement alcaline. Le chauffage de cette solution permet d'obtenir une lyse complète des cellules, l'élimination de l'ARN ainsi que de l'ADN linéaire qui correspond essentiellement à l'ADN chromosomique. L'ADN plasmidique est principalement sous forme super-enroulée et est peu sensible à la dénaturation dans ces conditions de température et de pH.

Le mélange de lyse est ensuite déprotéiné par une solution de phénol/chloroforme non tamponnée. Cette étape permet également une neutralisation partielle de la solution.

Après centrifugation, la phase aqueuse est déposée sur un gel d'agarose vertical dans lequel les plasmides migrent et se séparent selon leur masse moléculaire.

REFERENCE

Kado, C.I. and Liu, S.T. (1981). Rapid Procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol. 145 : 1365-1373.

SOLUTIONS

Tris-acétate pH 7,9 : Tris 40 mM
 Na₂- EDTA .2 mM
 Ajuster le pH 7,9 avec de l'acide acétique

Solution de lyse : SDS 3 %
 Tris 50 mM
 Amener le pH à 12,6 avec NaOH 2 M

Phénol/chloroforme : mélange volume à volume, non saturé, non tamponné.

TBE : (voir fiche technique 3)

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1 - PREPARATION DU GEL D'AGAROSE

- . Nettoyer à l'alcool la face interne des plaques de verre.
- . Mettre en place les espaceurs, maintenir l'ensemble avec des pinces.
- . Faire fondre 100 ml d'agarose à 1 % et 200 ml d'agarose à 0,7 % (en tampon TBE_{x1}).
- . Scellage des plaques : avec une pipette Pasteur, couler 0,5 cm d'agarose 1 % au fond, laisser prendre, et faire la même chose sur les côtés. On assure ainsi l'étanchéité et la rigidité du gel.
- . Coulage du gel : laisser refroidir l'agarose à 0,7 % jusqu'à 55°C. Couler rapidement le gel en inclinant les plaques. Eviter de faire des bulles. Mettre en place le peigne : rentrer d'abord une dent sur le côté puis incliner le peigne doucement pour faire entrer les autres dents sans former de bulles.

2 - INSTALLATION DU GEL

- . Enlever l'agarose débordant en haut du gel avec un scalpel.
- . Enlever l'espaceur inférieur.
- . Mettre l'un sur l'autre deux gros élastiques plats sur la plaque extérieure à la place de la baguette pour éviter que le gel glisse.
- . Incliner les plaques à 45°, peigne vers le bas, pour faire glisser le gel avec le peigne. Quand le peigne est entièrement dégagé de la petite plaque, l'enlever en le faisant basculer d'avant en arrière. Attention à ne pas arracher les dents du gel.
- . Redresser les plaques, le gel se remet en place.
- . Remplir la cuve inférieure de l'appareil à l'électrophorèse avec le tampon TEB_{x1}.
- . Oter les pinces de côté du gel.
- . Installer le gel, le bas sur les cales, la petite plaque (ou plaque échancrée) contre la cuve supérieure.

- . Maintenir le gel avec les pinces.
- . Eliminer les bulles d'air en bas du gel en inclinant tout le support.
- . Couler de l'agarose à 0,7 % entre le bac supérieur et la plaque interne pour assurer l'étanchéité.

3 - PREPARATION DES ECHANTILLONS

- . Centrifuger 1,5 ml d'une culture en phase stationnaire, en tube Eppendorf (6000 RPM, 10 minutes).
- . Eliminer le surnageant.
- . Lyse : resuspendre le culot bactérien dans 100 µl de tampon Tris-acétate pH 7,9.
- . Ajouter 400 µl de solution de lyse. Mélanger doucement en renversant une ou deux fois le tube. Ne pas vortexer.
- . Placer pendant 30 minutes dans un bain-marie à 50°C. NE PAS AGITER.
- . Mettre à 4°C pendant quelques minutes.
- . Déprotéination : ajouter 500 µl de phénol/chloroforme.
- . Agiter DOUCEMENT pendant quelques minutes, jusqu'à ce que la phase supérieure soit quasiment homogène.
- . Centrifuger 10 minutes (15 000 rpm).
- . A ce stade on peut conserver la préparation à 4°C.
- . Dépôt : sur un parafilm, préparer des gouttes de 20 µl de tampon de dépôt.
- . Prélever 80 à 100 µl d'échantillon (phase supérieure), avec une pipette automatique munie d'un cône jaune dont on aura préalablement coupé l'extrémité (pour ne pas casser l'ADN).
- . Mélanger échantillon et tampon en pipetant 1 ou 2 fois sur le parafilm.
- . Déposer.
- . Couler délicatement de l'agarose à 0,7 % au dessus des dépôts pour ne pas les mélanger avec le tampon d'électrophorèse.
- . Remplir le réservoir supérieur de l'appareil avec le tampon TBE_{x1}.

4 - ELECTROPHORESE

- . Migrer 1 heure à 5 mA (ampérage limitant), puis 1 heure à 10mA, et 4 heures à 40 mA (le bleu de bromophénol doit être sorti du gel).
- . Colorer le gel 30 minutes dans une solution de bromure d'éthidium à 0,4 µl.ml⁻¹.
- . Photographier en UV.

FICHE TECHNIQUE 9

MISE EN EVIDENCE RAPIDE DE PLASMIDES BACTERIENS

PRINCIPE

La méthode décrite permet une mise en évidence rapide de petits plasmides chez *E. coli* essentiellement. Elle s'appuie sur une dénaturation à la chaleur des composants membranaires de la cellule auxquels reste généralement attaché l'ADN chromosomique.

REFERENCE

Holmes D.S. and Quigley M., 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114 : 193-197.

MATERIEL ET SOLUTIONS

Solution A

Saccharose 8 %

Triton X-100 0,5 % dans Na₂EDTA 50 mM, Tris Hcl 25 mM, pH 8

Solution de lysozyme

Lysozyme

10 mg.ml⁻¹

Tris HCl, pH 8

10 mM

Ethanol absolu froid (-20°C)

Isopropanol

Tampon TE

Tris HCl, pH 8

10 mM

Na₂EDTA

1 mM

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

JOUR 1

Ensemencer 5 ml de milieu LB contenant l'antibiotique approprié au maintien du plasmide

JOUR 2

Préparer la solution de lysozyme

1. Centrifuger 1,2 ml de culture bactérienne dans un tube Eppendorf.
2. Remettre en suspension le culot dans 200 μ l de solution A, passer brièvement au vortex.
3. Fermer les tubes, mettre des clips pour les maintenir clos, ou utiliser des tubes à vis.
4. Faire bouillir 1 min.
5. Centrifuger à 15 000 rpm pendant 10 min.
6. Evacuer le culot à l'aide d'un cure-dent plat.
7. Ajouter 200 μ l d'isopropanol, mettre 30 minutes à -80°C ou 5 min dans la carboglace.
8. Centrifuger à 12 000 rpm pendant 5 min, jeter le surnageant.
9. Introduire 0,5 ml d'éthanol à 95 %, centrifuger 1 min à 12 000 rpm (veiller à orienter les tubes de la même façon que lors de l'étape précédente pour ne pas décrocher les culots).
10. Assécher le culot à l'aide d'une pipette Pasteur effilée, redissoudre dans 50 μ l de TE, en utiliser 5 μ l pour les digestions.

FICHE TECHNIQUE 10

MINI-PREPARATIONS D'ADN PLASMIDIQUE

Remarque : Des méthodes rapides d'isolement de l'ADN plasmidique ont été développées ces dernières années. Elles permettent d'obtenir, à partir d'une culture bactérienne de faible volume, de l'ADN de quantité et de pureté suffisante pour effectuer divers traitements : hydrolyse par différentes endonucléases de restriction, analyse par électrophorèse en gel d'agarose, hybridation de type Southern, transformation, séquençage, clonage....

PRINCIPE

La méthode décrite est une modification de la méthode de Birnboim & Doly (1979). Cette méthode de lyse alcaline est rapide, permet de traiter de nombreux échantillons à la fois, est applicable à la plupart des souches d'*E. coli* et donne de bons rendements (2-3 µg d'ADN de pBR322 à partir de 1,5 ml d'une culture agée d'une nuit).

REFERENCES

Sambrook J., Fritsch E.F., & Maniatis T., 1989. *In Molecular Cloning a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor ed., p. 363.

Birnboim, H.C., & Doly, J., 1979. A rapide alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513-1523.

SOLUTIONS

Solution I

Glucose	20 % 50 mM
Tris - HCl	25 mM
Na ₂ EDTA	1 mM pH8
Lysozyme	10 mg.ml ⁻¹

La solution, conservée à -20°C, est décongelée au moment de l'emploi.

Solution II

NaOH	0,2 M
SDS	1 %

A préparer extemporanément en mélangeant, par exemple volume à volume une solution de soude 0,4 M et une solution de SDS 2 %. La solution de NaOH peut être conservée à -20°C et décongelée au moment de l'emploi.

Solution III (Acétate de Na 3 M, pH 4,8)

Solution d'acétate de Na 5 M,	60 ml
Acide acétique glaciale	11,5 ml
q.s.p. H ₂ O	100 ml

Mélange Phénol/chloroforme : Mélange volume à volume de :

Phénol saturé avec Tris - HCl 100 mM pH 8 et équilibré avec du TE pH 8.
Chloroforme/alcool isoamylique (24/1 v/v).

TE, pH 8

Tris - HCl	10 mM
Na ₂ EDTA, pH 8	1 mM

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1. Inoculer 2 ml de milieu LB (contenant l'antibiotique approprié) avec les bactéries. Incuber la nuit à 37°C avec agitation.
2. Pipeter 1,5 ml de culture dans un tube Eppendorf (1,7 ml) et centrifuger 1 minute à 6000 rpm dans une centrifugeuse.
3. Retirer le surnageant.
4. Remettre en suspension le culot en agitant au Vortex dans 100 µl de solution 1 froide (maintenue dans la glace). Laisser 5 minutes à température ambiante.
5. Ajouter 200 µl de solution II. Agiter au Vortex. Laisser dans la glace 5 minutes.
6. Ajouter 150 µl de solution III froide (glace). Agiter au Vortex brièvement. Laisser 5 minutes dans la glace.
7. Centrifuger 15 minutes à 12 000 rpm.
8. Retirer le culot avec un cure-dent plat.
9. Ajouter 500 µl d'un mélange phénol-chloroforme. Agiter au Vortex. Centrifuger 2 minutes. Transférer la phase aqueuse (supérieure) dans un nouveau tube sans prendre l'interface (ne retirer que 400 µl).
10. Ajouter 2 volumes d'éthanol absolu (froid). Agiter. Laisser 5 minutes à température ambiante.
11. Centrifuger 15 minutes à 15 000 rpm. Prélever le surnageant.

12. Rincer le tube avec 1 ml d'éthanol 70 % (froid) sans décrocher le culot. Prélever le surnageant.

13. Sécher le culot.

14. Remettre en suspension dans 50 μ l de TE stérile (incuber éventuellement à 65°C pendant quelques minutes). L'ADN est prêt à être utilisé. Conserver à -20°C.

FICHE TECHNIQUE 11

EXTRACTION DE L'ADN BACTERIEN

REFERENCE

Marmur, S., 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, 3 : 208-215.

MATERIEL ET SOLUTIONS

Solution de phénol saturé/chloroforme/alcool isoamylique : faire fondre au bain-marie sous une hotte, du phénol dans une éprouvette jusqu'à 1 volume de 100 ml, ajouter 96 ml de chloroforme, puis 4 ml d'alcool isoamylique. Rajouter 200 ml d'une solution de Tris 100 mM pH 7,5. Mélanger et laisser décanter au réfrigérateur. Utiliser la phase inférieure.

- Ethanol absolu froid (conservé à -20°C).
- Na acétate 3 M.
- Chloroforme/alcool isoamylique 24/1 volume à volume.
- Solution de SDS 25 % poids/volume.
- Solution de sodium perchlorate 5 M dans l'eau à préparer le jour même.
- Solution d'EDTA 0,1 M NaCl 0,15 M pH 8.
- Tampon TE : Tris HCl 10 mM EDTA 1 mM pH 8.
- RNase A 10 mg.ml⁻¹ en tampon TE chauffée 10 minutes à 80°C, conservée, congelée en aliquotes.
- Pronase 1 mg.ml⁻¹ en tampon TE. Incuber 2 heures au bain-marie à 37°C, conserver aliquotée au congélateur.
- Incubateur à 37°C, 60°C.
- Bac à glace.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

jour 1

Ensemencer 4 l de milieu LB avec la souche dont on veut préparer l'ADN.

jour 2

Préparer la solution de perchlorate. Incubateur 37°C, 60°C, bac à glace.

Lyse cellulaire

1. Centrifuger les cultures 10 minutes à 8000 RPM.
2. Laver deux fois les culots en les resuspendant dans 20 ml de solution d'EDTA/NaCl, centrifuger.
3. Remettre en suspension les culots bactériens dans 25 ml d'EDTA/NaCl, transvaser dans des tubes en polyallomères de 250 ml (résistants au chloroforme), ajouter 10 mg de lysozyme, incubé à 37°C 30 minutes.
4. Préchauffer la solution de SDS à 60°C, ajouter goutte à goutte 2 ml de cette solution à la suspension bactérienne. Si la lyse n'est pas instantanée, incubé 10 minutes la suspension à 60°C puis placer sur glace.
5. Ajouter 7 ml de sodium perchlorate, mélanger.

Précipitation des protéines

6. Ajouter 35 ml d'une solution de phénol saturé/chloroforme alcool isoamylique. Mélanger jusqu'à obtenir un mélange laiteux. Laisser décanter sur glace pendant 30 minutes. Centrifuger 10 minutes à 12 000 RPM.
7. A l'aide de cônes de 5 ml dont on aura préalablement coupé l'extrémité prélever la phase aqueuse supérieure en veillant à ne pas aspirer les protéines situées à l'interface.
8. Pour retirer toute trace de phénol (qui pourrait inhiber les enzymes de restriction utilisées pour d'éventuelles digestions) ajouter un volume de chloroforme/alcool isoamylique équivalent au volume de la phase aqueuse prélevée. Agiter. Laisser décanter sur glace 10 minutes, centrifuger 10 minutes à 12 000 RPM.

Précipitation de l'ADN

9. Prélever la phase aqueuse directement dans un tube "STERILIN". Mesurer approximativement le volume et le verser lentement dans un tube contenant 2 volumes d'éthanol absolu froid (-20°C). En traversant la phase alcoolique, l'ADN contenu dans la solution aqueuse va précipiter. Enrouler l'ADN autour d'une pipette Pasteur à extrémité légèrement recourbée en forme de crochet. L'ADN va se coller au verre. Laisser l'éthanol s'évaporer jusqu'à ce que l'ADN forme une masse blanchâtre redissoudre dans le volume approprié de tampon TE (environ 500 µl dans un tube Eppendorf).
10. Ajouter 1/10e de volume de RNase A, incubé à 37°C une heure.
11. Ajouter 1/10e de volume de protéase, incubé à 37°C 30 minutes.

12. Ajuster la concentration en sels à 0,3 mM avec une solution de Na acétate 3 M puis 2 volumes d'éthanol. Mélanger. Précipiter l'ADN en plaçant les tubes à -20°C pour la nuit.

jour 3

13. Mesurer la pureté de l'ADN obtenu en fonction des résultats. Si nécessaire, refaire une extraction au chloroforme/alcool isoamylique suivie d'une précipitation à l'éthanol. Redissoudre dans un volume minimal de tampon TE.

14. Utiliser 1 à 2 µg d'ADN pour une restriction.

15. L'ADN a été dissous dans du tampon TE dilué au dixième.

16. Si possible diluer au 1/20 l'ADN en solution dans le tampon TE dilué au 1/10.

17. Mesurer l'absorption (A) de cette solution aux longueurs d'ondes suivantes : 230, 260, 280 et 320 nm. Utiliser le TE au dixième pour faire le "Zéro" à chaque longueur d'onde.

18. Contrôle de la pureté. Calculer les rapports :

$$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$$

$$\frac{A_{260} - A_{230}}{A_{230} - A_{320}}$$

La valeur du premier rapport doit être comprise entre 1,8 et 2,0.
Une valeur inférieure indique une contamination par des protéines.
La valeur du second rapport doit être comprise entre 2,0 et 2,3.
Une valeur supérieure traduit la présence d'ARN ou de nucléotides libres.

19. Détermination de la concentration de l'ADN en solution. Il est admis qu'une absorption d'une unité à 260 nm correspond à une concentration d'ADN bicaténaire égale à 50 µg/ml. Calculer : $(A_{260} - A_{320}) \times$ inverse de la dilution $\times 50$, pour obtenir la concentration (en µg/ml de l'ADN en solution).

FICHE TECHNIQUE 12

LIGATION

PRINCIPE

Pour cloner un fragment d'ADN, on utilise un vecteur comportant traditionnellement au moins deux marqueurs de sélection qui peuvent être des gènes de résistance à des antibiotiques ou le gène *lac Z* du métabolisme du lactose. Un site de clonage multiple c'est-à-dire une portion d'ADN comportant des sites reconnus par de nombreuses enzymes de restriction est généralement présent aux milieu de l'un de ces marqueurs. L'introduction d'un gène étranger, ou insert, à ce niveau, empêche l'expression de ce marqueur dans la souche receveuse lors de l'étape ultérieure de transformation.

La ligation consiste à relier à l'aide de l'ADN ligase des bactériophages T₄ d'*E. Coli* deux molécules d'ADN présentant des extrémités compatibles. Les protocoles de ligation dépendent de la structure des extrémités laissées libres après la digestion par les enzymes de restriction (bouts cohésifs complémentaires ou bouts francs).

La déphosphorylation du vecteur empêche sa recirculation, ainsi que sa dimérisation et évite ainsi lors de l'étape de transformation ultérieure des souches receveuses, la sélection de "faux-positifs".

REFERENCE

Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T., 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd edition. Cold spring harbor laboratories. Cold spring harbor, N.Y.

Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C., & Richardson, C.C., 1968. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. J. Biol. Chem. 243:4543.

MATERIEL ET SOLUTIONS

Facilités pour l'électrophorèse

Enzymes de restriction

Phosphatase alcaline - Tampon commercial de déphosphorylation

Solution d'acide nitrilotriacétique 100 mM

Tampon TE

Tampon de ligation + T₄ DNA ligase (Boehringer - Mannheim, France)

Pour la ligation d'ADN présentant des bouts francs, le tampon de ligation suivant est mieux adapté :

- préparer une solution de polyéthylène glycol 8000 (PEG) à 40 %. Aliquoter. Conserver à - 20°C, décongeler au moment de l'emploi..

- Préparer le tampon de ligation B, concentré 10 fois

- ATP	5 mM
- Na Cl	150 mM
- Mg Cl ₂	50 mM
- Dithiothréitol	10 mM
- Tris HCl pH 7,6	100 mM

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

jour 1

Préparation du vecteur

1 - Digérer 2 µg d'ADN du vecteur avec l'enzyme de restriction approprié. S'assurer que la digestion est complète en déposant une aliquote du mélange de digestion sur un minigel et en le faisant migrer le temps nécessaire.

Remarque :

L'insert doit être un fragment d'ADN obtenu à l'aide du même enzyme (dans le cas d'enzymes de restriction générant des bouts cohésifs) ou d'un enzyme libérant des extrémités compatibles avec les extrémités du vecteur digéré. Il doit être dissous dans du tampon TE dilué au 1/10ème.

Déphosphorylation du vecteur

2 - Dans un tube Eppendorf, introduire dans l'ordre.

- solution d'ADN	
- H ₂ O distillée q.s.p.	35 µl
- tampon de déphosphorylation	4 µl
- phosphatase alcaline	1 µl

3 - Incuber à 37°C pendant 30 minutes.

4 - Ajouter 4 µl d'acide nitrilotriacétique (celui-ci se lie aux ions Zn²⁺ présents dans le mélange. En l'absence de ceux-ci, la sensibilité de la phosphatase alcaline à la chaleur est accrue).

5 - Incuber 10 minutes à 70°C.

6 - Précipiter l'ADN en ajoutant 90 µl d'éthanol absolu froid (- 20°C).

7 - Centrifuger 30 minutes à 15 000 rpm.

8 - Remettre en suspension les culots dans 10 µl de TE dilué au 1/10^{ème}.

9 - Mélanger l'ADN du vecteur à l'ADN de l'insert dans un rapport de concentration de 3/1 à 5/1.

10 - Ajouter le tampon de ligation à raison de 1/10^{ème} du volume du mélange de pré-ligation.

- Pour les bouts cohésifs, le tampon commercial peut-être utilisé.

- Pour les bouts francs, utiliser le tampon B. Ajuster la concentration en PEG 8000 du mélange de pré-ligation à 15 % à partir d'une aliquote de la solution stock.

11 - Prélever 2 µl du mélange de préligation, conserver à 4°C.

12 - Ajouter la T₄ DNA ligase

- Pour les extrémités cohésives, 2 unités de Weiss (Weiss *et al.*, 1968) par ml suffisent. Incuber une nuit à 4°C.

- Dans le cas de bouts francs, utiliser jusqu'à 50 unités de T4 DNA ligase par ml de mélange de pré-ligation, incuber une nuit à 20°C.

JOUR 2

Charger sur un minigel les 2 µl du mélange de préligation ainsi que 2 µl du mélange de ligation et vérifier que les bandes correspondant aux fragments introduits initialement ont disparues ou que leur intensité a sensiblement diminuée. L'apparition de bande(s) plus lourdes est un indice de ligation réussie.

FICHE TECHNIQUE 13

TRANSFORMATION DE CELLULES D'E. COLI PAR DE L'ADN PLASMIDIQUE

PRINCIPE

On fragilise la membrane cellulaire à l'aide de cations divalents (Ca^{++} , Mg^{++}). Celle-ci laisse alors plus facilement entrer l'ADN plasmidique.

REFERENCES

M. Dagert et S.D. Ehrlich (1979). Préparation des cellules compétentes. *Gene*, 6, 23-28.

C.T. Chung, S.L. Niemela et R.H. Miller (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli* : transformation and storage of bacterial cells in the same solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 2172-2175.

Remarque : Ce protocole a été étendu à la transformation de souches de Pseudomonas.

MATERIEL ET SOLUTIONS

- Solution MgCl_2 100 mM froide
- Solution CaCl_2 100 mM froide
- Pots à centrifuger et cones stériles, froids
- Milieu LB (voir fiche technique 1)
- Boîtes de milieu gélosé contenant les antibiotiques appropriés

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Préparation de cellules compétentes

1. Ensemencer 100 ml de milieu LB avec 0,5 ml d'une préculture agée d'une nuit.
2. Incuber à 37°C avec agitation pendant 2 heures (DO = 0,5).
3. Refroidir la culture dans la glace pendant 10 minutes.
4. Centrifuger la culture 10 minutes à 6000 rpm et remettre en suspension les bactéries dans 50 ml de MgCl₂ 100 mM froid (dans la glace).
5. Centrifuger la suspension bactérienne 10 minutes à 6000 RPM et remettre en suspension dans 50 ml de CaCl₂ 100 mM froid (dans la glace).
6. Laisser 30 minutes dans la glace.
7. Centrifuger et remettre en suspension le culot dans 5 ml de CaCl₂ 100 mM froid. Conserver dans la glace jusqu'à utilisation (au maximum 1 heure).

Remarques :

Outre le CaCl₂ 100 mM, tous les récipients, pipettes, cones Eppendorf, pots de centrifugation doivent être froids.

Les cellules compétentes ainsi préparées peuvent être conservées congelées à -80°C dans le glycérol (voir fiche technique 2). Le nombre de cellules compétents à la décongélation (tube décongelé dans la glace) est de moitié environ.

Transformation

8. L'ADN (de 1 à 100 ng) est dilué dans 10 µl de TE.
9. A 100 µl de cellules compétentes fraîches (ou 300 µl de cellules compétentes décongelées) ajouter 10 µl de la dilution d'ADN (plasmide ou mélange de ligation) dans un tube Eppendorf.
10. Laisser 1 heure dans la glace.
11. Incuber 2 minutes à 42°C (choc thermique).
12. Laisser 20 minutes sur glace.
13. Inoculer 1 ml de milieu LB avec le mélange de transformation. Les suspensions de cellules compétentes peuvent être congelées à -80°C à ce stade. Aliquoter en fraction de 500 µl. Ajouter 600 µl.

14. Incuber à 37°C afin de permettre l'expression de la résistance à l'antibiotique portée par le plasmide. Le temps d'incubation dépend de l'antibiotique :

Ampicilline/Carbénicilline	expression quasi-immédiate	30 minutes
Tétracycline		60 minutes
Kanamycine		1 heure
Streptomycine		3 heures
Spectinomycine		1 heure
Rifampicine		2 heures

15. Etaler 10 µl, 50 µl, 100 µl sur des boîtes de milieu sélectif.

16. Incuber à 37°C.

Remarque : La quantité d'ADN utilisée pour la transformation dépend de la compétence de la souche réceptrice et de la taille de la molécule à transformer.

FICHE TECHNIQUE 14

CONJUGAISON

Remarque : Travailler en condition stérile. Tout le matériel réutilisé (pincettes, étales) est flambé à l'alcool.

PRINCIPE

Transfert plasmidique sur milieu solide (filtres de nitrocellulose)

REFERENCES

Chaudry, G.R., & Huang, G.H., 1988. Isolation and characterization of a new plasmid from a *Flavobacterium* sp. which carries the genes for degradation of 2,4 dichlorophenoxy-acetate.

Simon, R., Priefer, U. & Puhler, A., 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering : transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Biotechnology*. 1 : 784-791.

MATERIEL

Cônes stériles

Tubes à hémolyse et capuchons stériles

Étales

Fioles contenant du milieu LB (voir fiche technique 1)

Antibiotiques

Filtres stériles (MILLIPORE, diamètre des pores 0,22 µm)

Boîtes de Pétri contenant les milieux gélosés appropriés

Fioles stériles de 50 ml ou tubes "Sterilin"

Milieu tamponné ou eau physiologique

Glace

Cure-dents stériles

Réplicateur 48 dents (SIGMA)

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

JOUR 0 : (ou Jour 1, le matin, suivant la vitesse de croissance de la souche)

1. Ensemencer la souche receveuse dans 100 ml de milieu approprié à partir d'une colonie isolée.

2. Incuber sur table d'agitation à la température adéquate (37°C pour des souches d'*E. coli*, 30°C pour les non-entéro bactéries).

JOUR 1 (matin) :

3. Ensemencer la souche donneuse dans un milieu liquide contenant l'antibiotique approprié au maintien du plasmide. Ensemencer éventuellement une souche portant un plasmide "helper" dans un milieu approprié au maintien de ce plasmide.

Mettre en agitation à la température adéquate.

JOUR 1 (soir) : pour 10 conjugaisons

4. Centrifuger 500 µl de chaque culture dans un tube eppendorf de façon à éliminer les antibiotiques. Remettre en suspension dans 500 µl de milieu LB.

5. Rassembler dans un même tube la bactérie donneuse la bactérie receveuse et éventuellement la souche porteuse du plasmide "helper".

6. Agiter les suspensions bactériennes en secouant légèrement le tube.

7. Placer stérilement 12 pastilles (filtres MILLIPORE, diamètre des pores 0,22 µm) sur 12 boîtes de milieu LB à l'aide d'une pince flambée à l'alcool.

8. Déposer 100 µl à partir du mélange sur les pastilles.

9. Réaliser les deux témoins de mutation spontanée :

Mettre 100 µl seuls de la culture de la souche donneuse sur une pastille,

Mettre 100 µl seuls de la culture de la souche donneuse sur une autre pastille (éventuellement 100 µl de la culture de la bactérie portant le plasmide "helper" sur une 13^{ème} pastille).

10. Incuber à 28°C pendant une nuit (dans le cas d'une conjugaison impliquant une non-entéro bactérie).

JOUR 2 :

11. Transférer les pastilles dans des tubes "Sterilin" de 50 ml stériles à l'aide d'une pince préalablement flambée à l'alcool.

12. Rincer avec 2 ml de milieu tamponné stérile ou de l'eau physiologique de façon à resuspendre les bactéries présentes sur la membrane.

13. Réaliser les dilutions 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³..., 10⁻⁸, à partir de la suspension bactérienne obtenue (dilution 0) avec du milieu tamponné.

14. Pour les dilutions 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , étaler 100 μ l sur les différents milieux contenant les antibiotiques appropriés, permettant de dénombrer les bactéries donneuses et les bactéries receveuses, ainsi que sur un milieu complet afin de vérifier l'absence de contaminants.

15. Pour les dilutions 0, 10^{-1} , 10^{-2} , étaler 100 μ l sur les boîtes permettant de sélectionner les transconjugants et de visualiser les mutants spontanés éventuels.

JOUR 3

16. Flamber le réplicateur à l'alcool et l'appliquer sur la gelose de manière à obtenir une empreinte,

17. Repiquer les transconjugants à l'aide de cure-dents stériles aux emplacements ainsi délimités (le milieu gelosé doit être le même que celui utilisé précédemment, ce qui permet de vérifier que les transconjugants ne sont pas des mutants spontanés) incubé à la température adéquate

JOUR 4

18. Repiquer les colonies sur différents milieux "tests" à l'aide du réplicateur pour effectuer les vérifications éventuelles.

19. Congeler les souches sélectionnées à -80°C .

FICHE TECHNIQUE 15

PREPARATION DE MEMBRANES POUR HYBRIDATIONS DE COLONIES SUR MEMBRANES

Remarque : Travailler avec des gants.

MATERIEL

Membranes pour hybridation (HYBOND™-N, Amersham)
Boîtes de Pétri + LB agar (ou autre milieu complet) + Antibiotique approprié
Papier Whatman 3 MM
Film étirable
Papier aluminium
Bacs ou cuvettes.

SOLUTIONS

Solution de dénaturation :

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 N

Solution de neutralisation :

NaCl	1,5 M
Tris-HCl, pH = 7,2	0,5 M
Na ₂ EDTA	1 M

Solution 20 x SSC, pH 7 :

NaCl	3M
Tri-Sodium citrate	0,3 M

Eau distillée stérile

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1. Repiquer (au cure-dent ou à l'aide d'un réplicateur) les colonies sur une membrane de nylon quadrillée (plus solide que la nitrocellulose). Bien repérer l'emplacement des colonies et adopter une numérotation logique. Placer les membranes sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB agar et l'antibiotique nécessaire au maintien du plasmide. Incuber 6 heures à 37°C. Procéder éventuellement au marquage de la sonde (voir fiche technique 18).

2. Déposer les membranes dans une cuvette contenant une feuille de papier Whatman saturée en solution de dénaturation (les membranes placées sur le papier Whatman ne doivent pas être complètement recouvertes de solution). Laisser 7 mn.

3. Egoutter les membranes. Les placer dans une cuvette contenant une feuille de papier Whatman saturée en solution de neutralisation. Laisser 3 mn.

4. Renouveler l'opération précédente. (3)

5. Placer les membranes dans une cuvette contenant une solution de 2 x SSC. Agiter légèrement les membranes à l'aide d'une pince dans cette solution de façon à éliminer l'éventuel excès de cellules.

6. Egoutter et laisser sécher les membranes 10 mn sur une feuille de papier Whatman propre.

7. Fixer 3 mn aux U.V.

8. Emballer dans une feuille de film étirable. la membrane ainsi fixée peut être conservée plusieurs semaines au frais et à l'obscurité. La placer alors entre deux feuilles de papier Whatman. Entourer de papier aluminium et conserver au réfrigérateur.

FICHE TECHNIQUE 16

TRANSFERT DE GEL SUR MEMBRANE SOUS VIDE

MATERIEL

Système de transfert sous vide vacugène 2016.
Pompe à vide.

SOLUTIONS

Solution de dépurination

HCl	0,25 M
-----	--------

Solution de dénaturation :

NaOH	0,5 M
NaCl	1,5 M

Solution de neutralisation

Tris HCl, pH 7,5	0,5 M
NaCl	3 M

Solution 10 x SSC

NaCl	3M
tri sodium citrate	0,3M

Eau stérile pour dilution.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Mise en place du gel

1. Découper la membrane un peu plus grande que le masque (5 mm de chaque côté).

2. Mouiller la membrane dans l'eau distillée.

3. Placer ensuite la membrane dans une solution 10 x SSC pendant au moins 5 minutes.

4. Installer l'appareil de transfert bien horizontal. Mettre la plaque de transfert côté lisse vers le haut. Poser la membrane sur la plaque et appliquer le masque sur la membrane. Positionner le gel. Le gel doit dépasser du masque d'au moins 2 à 3 mm pour éviter les fuites. Visser la partie supérieure de l'appareil.

5. Mettre la pompe en marche et régler le vide.

6. Recouvrir successivement le gel avec les solutions suivantes :

Solution de dépurination	20 minutes.
Solution de dénaturation	20 minutes.
Solution de neutralisation	45 minutes.
Solution 10 x SSC	60 minutes.

Entre chaque traitement, récupérer la solution restante à l'aide d'une pipette Pasteur et la jeter.

7. Marquer les puits.

8. Enlever le gel.

9. Laver la membrane dans une solution 2 x SSC pendant 5 minutes.

10. Faire sécher les membranes entre 2 feuilles de papier Whatman 3 MM.

11. Fixer aux U.V. 3 minutes.

FICHE TECHNIQUE 17

MARQUAGES RADIOACTIFS PAR "NICK - TRANSLATION" HYBRIDATION EN SACS

REFERENCE

Anon - 1987 "Nucleic Acid Labelling" Amersham International PLC. Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J., 1982. Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold spring harbour laboratory, 32 p.

MATERIEL

Salle homologuée pour l'utilisation des produits marqués
Ecrans, ciseaux, pinces pour manipuler les produits marqués
Gants
Deux incubateurs 15°C et 65°C.
Bacs, boîtes en plastique à couvercle hermétique
Bac à glace
Sacs à hybridation (réf 827 8BA Gibco BRL)
Soude sac
"Nick colonnes" (PHARMACIA)
Film étirable
Matériel pour autoradiographie
Chambre noire
Films "X Ray kodak"
Congélateur - 80°C

SOLUTIONS

Nucléotides marqués

Solution 20 x SSC, NaCl 3 M, Tri-Sodium citrate 0,3 M

Solution 10 % SDS (Sodium dodécyl sulfate) à 10 % dans l'eau.

Solution de Denhardt

2 % Polyvinylpyrrolidone

2 % Ficoll

2 % Sérum albumine Bovine

Filtrer et conserver à - 20°C.

Tampon d'hybridation pour 50 ml (200 cm ² de membrane)	
Solution de 20 x SSC	15 ml
Solution de Denhardt	2,5 ml
Solution 10 % SDS	2,5 ml
H ₂ O	30 ml
Solution d'ADN de sperme de hareng à 10 mg/ml dénaturé (10 minute à 100°C)	100 µl

Tampon TEDS	
Tris - HCl pH8	50 mM
EDTA	10 mM
SDS	0,1 %

Solutions de révélation et de fixation
L X 24 Kodak
Solution à 3 % d'acide acétique
F X 40 Kodak

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

JOUR 1

Marquage de la sonde au ³²P

Remarque 1 :

Cette méthode est mieux adaptée pour le marquage des petites sondes (quelques kb) que les méthodes non radioactives. Elle apporte également des résultats plus concluants que les méthodes de marquage non radioactives lorsque l'homologie entre l'ADN à tester et la sonde est faible.

Remarque 2 :

Nécessite un équipement spécifique et le strict respect des consignes de sécurité concernant les produits radioactifs : toutes étapes sont réalisées derrière un écran arrêtant les radiations.

Remarque 3 :

Les tubes et sacs contenant les produits marqués sont manipulés à l'aide de pinces, EVITER TOUT CONTACT DIRECT AVEC LES SOURCES RADIOACTIVES.

1. Dans un tube Eppendorf placé sur la glace, ajouter successivement :
 - 1 µg de DNA à marquer
 - qsp 12,5 µl avec de l'eau
 - 5 µl de tampon contenant des nucléotides (kit)
 - 2,5 µl de ³²P CTP (25 µCi)
 - Enzyme 5 µl (kit)
2. Centrifuger quelques secondes pour rassembler les composés au fond du tube.
3. Incuber à 15°C pendant 2 heures.

Préhybridations

4. Découper les sacs à hybridation à la taille des membranes. Introduire les membranes dans les sacs en présence de 25 ml de tampon d'hybridation préchauffé à 65°C. Souder en évitant les bulles. Incuber à 65°C pendant 2 heures. Laisser le reste du tampon d'hybridation à 65°C.

Séparation du DNA marqué des nucléotides non incorporés sur colonne

Il est nécessaire de préparer deux "poubelles" destinées à recueillir les déchets radioactifs.

5. Pour les fortes radioactivités, le volume d'une colonne est d'environ 3 ml. Un sac étanche qui sera conservé dans une boîte en plexiglass épais jusqu'à la disparition des radiations.

6. Pour les faibles doses une poubelle en container anti-radiations .

7. Placer la colonne sur une potence, jeter le liquide qu'elle contient, rincer avec 3 ml de TEDS, laisser le tampon s'écouler, placer un tube Eppendorf sous la colonne.

8. Charger sur la colonne les 25 µl du mélange de marquage, jeter le cône dans la poubelle à produits marqués.

9. Laver le tube ayant contenu le mélange de marquage avec 25 µl de TEDS que l'on chargera sur la colonne, placer le tube vide et le cône dans la poubelle à produits marqués.

10. Déposer 400 µl de TEDS sur la colonne, recueillir le liquide et jeter le tube Eppendorf dans la poubelle à produits marqués.

11. Placer un tube Eppendorf propre sous la colonne pour collecter l'ADN marqué, ajouter 400 µl de TEDS. Mesurer la radioactivité qu'il contient à l'aide d'un compteur Geiger. Pour le ^{32}P , 1000 coups par seconde indiquent un marquage correct.

12. Dénaturer la sonde marquée en la faisant bouillir 10 minutes - refroidir dans la glace.

Hybridations

13. Jeter le tampon d'hybridation contenu dans les sacs à hybridation.

14. Introduire les 25 ml de tampon restant ainsi que la sonde dénaturée, souder à l'extrémité du sac, évacuer les bulles éventuelles vers le haut du sac et souder de nouveau à proximité de la membrane. Placer le sac dans une cuvette à couvercle hermétique et placer celle-ci à 65°C pour la nuit.

JOUR 2

Lavages après hybridation

15. Préchauffer à 65°C les solutions

2 x SSC

2 x SSC, 0,1 % SDS

1 x SSC ou 0,1 x SSC si un lavage stringent est nécessaire (dans le cas où l'on ne veut détecter que les très fortes homologues).

16. Couper une extrémité du sac recueillir la solution d'hybridation contenant la sonde marquée dans un tube. Placer celui-ci dans un container en plexiglass épais et congeler, la solution ainsi conservée pourra être réutilisée pendant plusieurs semaines (en fonction de l'intensité du marquage initial).

17. Placer la membrane dans une cuvette à couvercle hermétique contenant 500 ml de 2 x SSC préchauffé à 65°C. Laisser 15 minutes à 65°C. La première solution de lavage devra être recueillie dans un récipient et stockée pendant le temps nécessaire à sa décontamination.

18. Renouveler l'opération.

19. Laver pendant 30 minutes à 65°C avec du 2 x SSC ; 0,1 % SDS.

20. Laver 10 minutes dans du 1 x SSC à 65°C (où 0,1 x SSC si un lavage stringent est requis).

21. Egoutter la membrane sur du papier Whatman, entourer de film étirable (jeter la feuille de papier Whatman dans la poubelle pour faible radioactivité).

22. Passer le compteur Geiger sur la membrane pour avoir une idée de l'intensité des radiations émises.

Autoradiographie

23. En chambre noire, placer un film dans la cassette pour autoradiographie, placer la membrane dans la cassette, face supportant l'ADN vers le film préalablement orienté (pratiquer une incision sur l'un des bords pour faciliter l'interprétation ultérieure).

24. Laisser à - 80°C pendant le temps nécessaire, un développement du film peut être réalisé au bout de 24 à 48 heures. Un autre film peut être replacé au contact de la membrane en fonction du résultat conservé à - 80°C pendant le temps nécessaire.

Développement

JOUR 3

25. Placer le film

- 3 minutes dans une solution "L X 24 Kodak"

- 30 secondes dans une solution à 3 % d'acide acétique

- 3 minutes dans un bain "F X 40 Kodak"

- 5 minutes dans l'eau.

Remarques :

L'utilisation d'écrans réflecteurs peut augmenter la réponse obtenue sur le film lors de l'exposition de celui-ci en présence membranes marquée au ^{32}P ; les particules de haute énergie pouvant traverser directement le film. Si celles-ci produisent de la lumière au contact de l'écran celle-ci sera captée par le film et la sensibilité pourra être ainsi accrue.

FICHE TECHNIQUE 18

HYBRIDATIONS EN FOUR ROTATIF A L'AIDE DE SONDES NON RADIOACTIVES (KIT BOEHRINGER)

MATERIEL

Four à hybridations rotatif GFL 7601
"DNA labelling and detection kit non radioactive Boehringer-Mannheim
Bac à glace
Cônes stériles

SOLUTIONS

Solution EDTA, pH 8	0,2 M
Solution de Na-N-laurylsarcosine	20 % (poids/volume)
Solution de SDS	20 % (poids/volume)
Solution 20 x SSC, pH 7	
NaCl	3 M
Tri-sodium citrate	0,3 M
Eau distillée stérile	

Solution d'hybridation

100 ml sont nécessaires pour 250 cm² de membrane

Solution x 20 SSC	25 ml
Agent bloquant 0,5 % (poids/volume)	0,5 g
Na-N-lauroylsarcosine 20 %	0,5 ml
Solution de SDS 20 %	0,1 ml
Eau distillée stérile	75 ml

Préparer la solution une heure à l'avance en la laissant à 50-70°C (l'agent bloquant se dissout uniquement à de telles températures).

Solution 2 x SSC ; 0,1 % SDS

300 ml sont nécessaires pour 250 cm² de membrane

Solution 20 x SSC	30 ml	
Solution de SDS 20 %		1,5 ml
q.s.p. H ₂ O		300 ml

Solution 1 x SSC ; 0,1 % SDS

300 ml sont nécessaires pour 250 cm² de membrane.

Solution 20 x SSC		15 ml
Solution de SDS 20 %		1,5 ml
q.s.p. H ₂ O		300 ml

Tampon n° 1 concentré 10 x

Tris-HCl, pH 7,5		1M
NaCl		1,5 M

Diluer au 1/10ème au moment de l'emploi

Tampon n° 2

Agent bloquant		0.5 %
Tampon n° 1 concentré 10 x		25 ml
q.s.p. H ₂ O		250 ml

Chauffer 1 heure à 70°C au bain-marie pour dissoudre l'agent bloquant.

Tampon n° 3

Tris-HCl, pH 9,5		100 mM
NaCl		100 mM
MgCl ₂		50 mM

Tampon n° 4

Tris-HCl		10 mM
Na ₂ EDTA, pH 8		1mM

Réactif coloré (ne pas préparer à l'avance)

Solution NBT (tube n° 9 du kit)		112,5 µl
Solution X-phosphate (tube n° 10 du kit)		87,5 µl
Tampon n° 3		25 ml

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

JOUR 1

Marquage non radioactif de la sonde

10 ng à 3 µg d'ADN linéaire sont utilisés pour un marquage.

La sonde marquée peut être réutilisée pour plusieurs hybridations pendant une durée d'environ 1 an (conservation à -20°C).

Remarque : Il peut être nécessaire de purifier l'ADN linéaire par une précipitation à l'éthanol.

1. Allumer l'incubateur 37°C.

2. Dénaturer l'ADN à marquer en le laissant bouillir 10 mn au bain marie. Placer immédiatement l'ADN dans la glace. Prévoir au minimum 200 ng d'ADN à marquer pour 250 cm² de membrane (1000 ng est une bonne concentration).

Remarque : L'efficacité du marquage diminue avec la concentration en ADN.

3. Dans un tube Eppendorf maintenu sur glace ajouter dans l'ordre :

- 1 à 15 µl de la solution d'ADN dénaturé
- 2 µl de solution d'hexanucléotide (tube n° 5 du kit)
- 2 µl de solution de dNTP (tube n° 6 du kit)
- Eau stérile distillée q.s.p. 19 µl
- 1 µl d'enzyme "KLENOW" (tube n° 7 du kit)

4. Incuber pendant 4 à 20 h à 37°C

5. Arrêter la réaction en ajoutant 2 µl de solution de Na₂EDTA 0,2 M, pH 8.

6. Préparer la solution d'hybridation. (Stockage possible au congélateur).
Allumer le four à hybridation, régler la température à 68° C.

7. Séparer l'ADN marqué des oligonucléotides marqués non incorporés sur une "Nick Column Pharmacia".

Préparer la colonne en la maintenant sur une potence. Retirer les deux bouchons et la rincer avec 3 ml d'eau. Laisser tout le liquide s'écouler. Aux 20 µl d'ADN marqués, ajouter 80 µl d'eau. Charger sur la colonne les 100 µl de solution d'ADN. Laisser écouler. Ajouter 350 µl d'eau. Laisser s'écouler et jeter ce qui sort. Placer un tube Eppendorf propre sous la colonne.

Ajouter 450 µl d'eau. Collecter la solution issue de la colonne. (Celle-ci contient l'ADN marqué dans environ 400 µl).

Préhybridation des membranes en tube

8. Placer les membranes dans le tube à hybridation en veillant à ce que les surfaces ne se recouvrent pas. Introduire 50 ml de solution d'hybridation par 250 cm² de membrane. Laisser la solution d'hybridation à 68°C (bain-marie).

9. Placer le tube à hybridation dans le four à hybridation. Vérifier qu'un tube soit présent à l'opposé du tube à hybridation par rapport à l'axe de rotation de façon à équilibrer les poids. Incuber à 68°C deux heures au moins.

Hybridations

10. Dénaturer l'ADN marqué en le laissant bouillir 10 mn au bain marie. Placer sur glace.

11. Jeter la solution de préhybridation. Pour 250 cm² de membrane, mélanger les 400 µl de l'ADN marqué avec 10 ml de solution d'hybridation. Introduire l'ensemble dans le tube à hybridation.

12. Incuber à 68°C pendant au moins 6 heures (la nuit).

Remarque : De plus hautes concentrations en ADN marqué dans la solution d'hybridation peuvent permettre de réduire le temps d'incubation à 2 heures.

JOUR 2

13. Préparer le tampon n° 2.

14. Préchauffer la solution 0,1 x SSC ; 0,1 % SDS à 68°C.

Lavage après hybridation

15. Récupérer la solution d'hybridation dans les tubes (la congeler). Laisser la porte du four à hybridation ouverte de façon à abaisser la température. Arrêter la réaction en plaçant dans les tubes à hybridation (contenant toujours les membranes) la solution 2 x SSC ; 0,1 % SDS (125 ml de solution pour 250 cm² de membrane). Laisser tourner l'appareil pendant 5 minutes à température ambiante.

16. Répéter l'étape n° 15.

17. Refermer la porte du four à hybridation (la température doit remonter à 68°C). Vider les tubes de leur solution. Introduire 125 ml de la solution 0,1 x SSC ; 0,1 % SDS préchauffée (68°C) par 250 cm² de membrane. Replacer les tubes dans le four à hybridation et laisser tourner 15 minutes à 68°C.

18. Répéter l'étape n° 17.

Remarque : les filtres peuvent être immédiatement utilisés pour la détection ou être conservés après séchage pour une détection ultérieure.

Détection immunologique

19. Laver brièvement à température ambiante les membranes dans le tampon n° 1 (1 minute).

20. Dans le tube, ajouter environ 250 ml de tampon n° 2 pour 250 cm² de membrane pendant 30 minutes.

21. Laver brièvement les membranes dans le tampon n° 1 (1 minute).

22. Préparer la solution d'anticorps : pour 250 cm² de membrane, diluer 10 µl de solution d'anticorps (tube n° 8 du kit) dans 50 ml de tampon n° 1. La stabilité de la solution d'anticorps diluée ne dépasse pas 12 heures à + 4°C.

23. Incuber les filtres pendant 30 minutes à température ambiante dans la solution d'anticorps.

24. Enlever l'excès d'anticorps en lavant 2 fois les membranes dans 250 ml de tampon n° 1 pendant 15 minutes à chaque fois.

25. Préparer le tampon n° 3 et en vérifier le pH.

26. Equilibrer les membranes pendant 2 minutes dans 50 ml de tampon n° 3 (pour 250 cm²).

27. Incuber les filtres en présence de 25 ml de réactif coloré à l'obscurité. La précipitation du réactif débute après quelques minutes d'incubation et est généralement complète au bout de 24 heures. Ne pas remuer les membranes lors de cette étape.

28. Lorsque les bandes ou tâches colorées sont visibles arrêter la réaction en lavant les membranes pendant 5 minutes avec 125 ml de tampon n° 4.

