

## MATERIELS ET METHODES

Le projet se base sur les travaux de l'équipe iGem 2012 Rotten Meat dont les informations sont disponibles sur le lien suivant : <https://2012.igem.org/Team:Groningen>.

Les protocoles utilisés sont en partie tirés du polycopié de TP biologie de première année. Les références pour les protocoles sont présentées à chaque étape. Les liens pour les produits qui ont dû être commandés sont présentés. Les autres produits étaient fournis par l'encadrement.

### CULTURE CELLULAIRE

#### Préparation de boîtes de pétri

<u>Matériel</u> Flacon de 1L Autoclave Hotte Boîtes de Pétri Parafilm Réfrigérateur à 4°C	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Dans un flacon de 1L d'eau distillée, ajouter 40 g de poudre LB Agar.</li><li>2. Passer à l'autoclave (demander à un encadrant).</li><li>3. Laisser refroidir jusqu'à 50°C.</li><li>4. Sous hotte, ajouter l'antibiotique chloramphénicol pour une concentration finale de 25 µg/mL.</li><li>5. Sous hotte, verser dans des boîtes de Pétri. Recouvrir et laisser solidifier 30 à 60 min.</li><li>6. Sceller les boîtes à l'aide de parafilm. Conserver à 4°C.</li></ol>
<u>Références</u> : <a href="https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sigma/l3147">https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sigma/l3147</a> <a href="https://www.addgene.org/protocols/pouring-lb-agar-plates/#:~:text=Luria%20broth%20(LB)%20is%20a,nutrition%20from%20the%20LB%20within.">https://www.addgene.org/protocols/pouring-lb-agar-plates/#:~:text=Luria%20broth%20(LB)%20is%20a,nutrition%20from%20the%20LB%20within.</a>	

#### Suspension à partir d'une culture en milieu solide ou liquide

<u>Matériel</u> Tube Falcon de 50 ml Anse d'inoculation Etuve à 37°C avec agitateur	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Préparer 500 ml de milieu LB.</li><li>2. Passer à l'autoclave (demander à un encadrant).</li><li>3. Sous hotte, ajouter l'antibiotique chloramphénicol pour une concentration finale de 25 µg/mL.</li><li>4. Prélever une colonie sur la boîte de Pétri ou gratter délicatement le dessus d'une culture liquide, avec une anse d'inoculation.</li><li>5. Dans un tube Falcon, ajouter 5 à 10 ml du milieu LB avec l'antibiotique. Disséminer la colonie dans ce tube.</li><li>6. Incuber les cellules pendant la nuit, à 37°C, sur un agitateur à 220 rpm.</li><li>7. Vérifier le lendemain que le tube est trouble, à cause de la croissance des bactéries.</li></ol>
<u>Référence</u> : <a href="https://www.addgene.org/protocols/inoculate-bacterial-culture/">https://www.addgene.org/protocols/inoculate-bacterial-culture/</a>	

#### Stock de glycérol pour un stockage à long terme de cellules

<u>Matériel</u> Tube à vis de 2 ml Congélateur à -80°C	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Dans un tube à vis de 2 ml, ajouter 1 ml de cellules en suspension à 1 ml de glycérol à 50%. Mélanger doucement en agitant 5-6 fois.</li><li>2. Congeler le tube à -80°C.</li></ol>
<u>Référence</u> : <a href="https://www.addgene.org/protocols/create-glycerol-stock/">https://www.addgene.org/protocols/create-glycerol-stock/</a>	

### CLONAGE

Le plasmide d'intérêt doit contenir :

- le promoteur sboA ou araC
- le gène de couleur amilCP ou spisPink
- un gène de résistance au chloramphénicol

Ce plasmide est construit via un assemblage standard par enzyme de restriction (kit BioBrick Assembly). Les caractéristiques des différentes briques utilisées sont d'abord décrites ci-dessous. Le protocole de clonage est détaillé ensuite.

**Référence :** <https://international.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-assembly-and-cloning/biobrick-assembly>

## Caractéristiques des briques utilisées

### Plasmide vecteur

Les plasmides vecteurs pSB1C3 utilisés contiennent un gène de couleur et un gène résistance au chloramphénicol.

Caractéristique	V107 p28 (pSB1C3) Cm pCons – amilCP	V109 p28 (pSB1C3) Cm pCons – spisPINK
<b>Origine de réplication</b>	pUC19-derived pMB1 qui permet 100 à 300 copies par cellule.	
<b>Taille du plasmide</b>	2796 pb	2827 pb
<b>Gène de sélection</b>	Confère une résistance au chloramphénicol	
<b>Clonage</b>	Polylinker avec des sites d'enzymes de restriction	
<b>Sites de restriction utilisés</b>	En amont : EcoRI En aval : NdeI ou NheI	
<b>Gène d'intérêt</b>	Gène de couleur amilCP codant pour une chromoprotéine bleue/violette	Gène de couleur codant pour une chromoprotéine rose
	Couleur observable à l'œil nu après 24h d'incubation en milieu de culture LB ou agar	
<b>Expression</b>	Expression de la chromoprotéine contrôlée par un promoteur constitutif.	
<b>Références</b>	<a href="http://parts.igem.org/wiki/index.php?title=Part:BBa_K1033930">http://parts.igem.org/wiki/index.php?title=Part:BBa_K1033930</a>	<a href="http://parts.igem.org/wiki/index.php?title=Part:BBa_K1033932">http://parts.igem.org/wiki/index.php?title=Part:BBa_K1033932</a>

Référence sur le plasmide pSB1C3 :

<https://parts.igem.org/Part:pSB1C3#:~:text=pSB1C3%20is%20a%20high%20copy,reading%20out%20into%20the%20vector>

### Sites de restriction

Les sites de restriction utilisés pour le clonage se trouvent de part et d'autres du gène de couleur. En amont, le site considéré est celui de l'enzyme EcoRI-HF, et en aval, celui de l'enzyme NdeI ou celui de l'enzyme NheI-HF.

Pour EcoRI	Pour NdeI	Pour NheI-HF
5'... G <sup>▼</sup> AATTC... 3'	5'... CA <sup>▼</sup> TATG... 3'	5'... G <sup>▼</sup> CTAGC... 3'
3'... CTTAA <sup>▲</sup> G... 5'	3'... GTATA <sup>▲</sup> C... 5'	3'... CGATC <sup>▲</sup> G... 5'

Références :

<https://international.neb.com/products/r3101-ecori-hf#Product%20Information>

<https://international.neb.com/products/r0111-ndei#Product%20Information>

<https://international.neb.com/products/r3131-nhei-hf#Product%20Information>

### Amorce

Les promoteurs commandés n'ont pas les sites de restriction EcoRI-NdeI ou EcoRI-NheI. Ces promoteurs sont donc amplifiés par PCR avec des amorces amont et aval portant ces sites.

### Design d'amorces

Les amorces sont conçues via le logiciel *Geneious* en respectant au mieux le cahier de charge suivant :

- L'amorce contient une vingtaine de bases complémentaire à la séquence cible
- La température de fusion (T<sub>m</sub>) est comprise entre 50 et 62°C
- L'amorce n'inclut pas de site de restriction déjà existants
- La longueur optimale des amorces est comprise entre 16 et 25 bases
- La séquence n'a pas plus de 3 bases identiques à la suite
- La teneur en GC de l'amorce est entre 35 et 60%

- Un G ou un C est situé à l'extrémité 3' de l'amorce
- Le nombre de G ou de C en 3' ne dépasse pas 2 G ou C
- 'Hairpin\_Tm= None' et 'Self\_Dimer\_Tm = None'

Référence : <https://eurofinsgenomics.eu/en/custom-dna-sequencing/gatc-services/lightrun-tube/>

### Amorces pour l'amplification par PCR des promoteurs

	AraC	sboA
<b>Amorce EcoRI</b>	5' – AGG ATG ATT TCT GGA ATT CG – 3' T <sub>m</sub> = 53.1°C	5' – ATG AAT TCG CGG CCG CTT CTA G – 3' T <sub>m</sub> = 61.8°C
<b>Amorce NdeI</b>	5' – GGC ATA TGA ATG GAG AAA CAG TAG AGA G – 3' T <sub>m</sub> = 61.4°C	5' – ATC ATA TGT ATT TAT TTC TCC TCT TTT CTA GTG AC – 3' T <sub>m</sub> = 52.6°C
<b>Amorce NheI</b>	5' – CCG CTA GCA ATG GAG AAA CAG TAG AGA G – 3' T <sub>m</sub> = 64.9°C	5' – ATG CTA GCT TTC TCC TCT TTT CTA GTG AC – 3' T <sub>m</sub> = 52.6°C

En gras, les sites de restriction d'intérêt. Les températures de fusion présentées ici sont celles données par le logiciel *Geneious*.

### Amorces utilisées pour le séquençage

Amorce amont	Amorce aval
5' – TGC CAC CTG ACG TCT AAG AA – 3' T <sub>m</sub> = 55.9°C	5' – ATT ACC GCC TTT GAG TGA GC – 3' T <sub>m</sub> = 55.3°C

### Stock d'amorces à 100 µM

<u>Matériel</u> Tube avec bouchon à vis de 2 ml contenant l'amorce solide	1. Calculer le volume d'eau bidistillée nécessaire en µl, en multipliant le rendement en oligo (en nmol, inscrit sur l'étiquette du tube) par 10. 2. Ajouter ce volume dans le tube à vis contenant l'amorce. Mélanger.
<u>Eau bidistillée</u>	
Référence : <a href="https://eu.idtdna.com/pages/education/ecoded/article/tips-for-resuspending-and-diluting-your-oligonucleotides">https://eu.idtdna.com/pages/education/ecoded/article/tips-for-resuspending-and-diluting-your-oligonucleotides</a>	

### Promoteurs

Les promoteurs suivants sont clonés en amont du gène de couleur.

Promoteur	AraC	sboA
<b>Intérêt</b>	Inductible par addition de L-arabinose, ce qui permet d'avoir une échelle de couleur de l'expression bactérienne en fonction de la concentration en inducteur	Suractivé en présence de viandes avariées, ce qui permet d'avoir un indicateur coloré de l'état avarié d'une viande.
<b>Taille</b>	151 pb	259 bp
<b>Séquence</b>	5' – GGCGTAACAAAAGTGTCTATAATCA CGGCAGAAAAGTCCACATTGATTAT TTGCACGGCGTCACACTTTGCTATG CCATAGCATT TTTTATCCATAAGATTA GCGGATCCTACCTGACGCTTTTATC GCAACTCTCTACTGTTTCTCCATT – 3'	5' – CTGCTTCTATCTTACCATCATTGCTCAT CAGATTTGAAGATAAACCTCATAAAA AGCATTTTCTTATATAGAAGAGAAAAT CATATCACTAATTACCTTTAGGAAATG TTACATTTTCCGAAATCTATCATTTC TTTTACATTTTTTTCAAATATATGTA TTGAATTAGTAATTTGATAGTTTAAAG ATAAAAGTACAACATAGATCTGCTAG AAAAACAAAAAAGGGAGGATTCAAT TATGAAAAAAGCTGTC – 3'
<b>Référence</b>	<a href="http://parts.igem.org/Part:BBa_R0080">http://parts.igem.org/Part:BBa_R0080</a>	<a href="http://parts.igem.org/Part:BBa_K818100">http://parts.igem.org/Part:BBa_K818100</a>

## Caractéristiques de la souche bactérienne

Les plasmides arrivent sous forme de solide. Ils sont transformés dans des cellules bactériennes E. Coli C2987H pour future utilisation. Les bactéries utilisées pour la transformation sont des bactéries E. Coli NEB® 5-alpha. Ces dernières ont été rendues compétentes.

## Rendre des cellules compétentes

<b>Matériel</b> Pipette P500, cônes adaptés Tube Falcon avec 50 ml de LB Spectromètre Centrifugeuse à 4000 rpm, 4°C Bain de glace Poire à pipeter Pipette 15 ml Pipette 5 ml Tubes Eppendorf de 1.5 ml pré-congelés	<ol style="list-style-type: none"><li>1. La veille, inoculer 5 ml de culture et laisser incuber la nuit, à 37°C, sous agitation (voir <i>Suspension à partir d'une culture liquide</i>).</li><li>2. Prélever 250 µl de culture de nuit et diluer dans un tube Falcon contenant 50 ml de LB. Le reste de la culture peut être utilisé pour obtenir plus de cellules compétentes. Il suffit d'adapter les proportions.</li><li>3. Incuber les cellules à 37 °C, jusqu'à atteindre un OD600 de 0.6-0.7 (environ 3h). Laisser le tube ouvert pour une bonne aération.</li><li>4. Centrifuger les cellules à 4°C, 4000 rpm, pendant 15 min. Veillez à maintenir les cellules à 4°C pour les étapes suivantes.</li><li>5. Vider le tube. Suspendre le culot dans 15 ml de solution froide de CaCl<sub>2</sub> à 100 mM. Laisser reposer sur glace pendant 4h.</li><li>6. Centrifuger les cellules à 4°C, 4000 rpm, pendant 15 min.</li><li>7. Vider le tube. Suspendre le culot dans 4 ml de solution froide de CaCl<sub>2</sub> à 100 mM, contenant du glycérol à 15%.</li><li>8. Répartir les cellules dans des tubes Eppendorf de 1.5 ml pré-congelés. Utiliser immédiatement 20 µl de cellules pour une transformation ou stocker à -80 °C. Les tubes ne peuvent être utilisés qu'une seule fois. Ne pas recongeler après avoir décongelé.</li></ol>
Cellules NEB 5-alpha Solution froide de CaCl <sub>2</sub> à 100 mM Solution froide de CaCl <sub>2</sub> à 100 mM, avec du glycérol à 15% 15%	

## Préparation du plasmide

Pour le clonage, les plasmides doivent être extraits de bactéries. Pour y insérer le promoteur d'intérêt, ils sont linéarisés avec des enzymes de restriction.

## Extraction du plasmide

<b>Matériel (Kit QIAprep® Spin Miniprep)</b> Centrifugeuse à 4193 rpm Pipette P100, P500, P1000, cônes adaptés Tube Eppendorf de 1.5 ml Microcentrifugeuse à 13000 rpm Colonne QIAquick Tube de collecte de 2 ml	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Centrifuger 5 ml de culture bactérienne de nuit, à 4193 rpm pendant 5 min.</li><li>2. Suspendre les cellules dans 250 µl de tampon P1. Transférer dans un tube Eppendorf de 1.5 ml.</li><li>3. Ajouter 250 µl de tampon P2. Mélanger en inversant le tube 4-6 fois pour obtenir une solution claire.</li><li>4. Ajoutez 350 µl de tampon N3. Mélangez immédiatement en inversant le tube 4-6 fois.</li><li>5. Centrifuger à 13000 rpm, pendant 10 min.</li><li>6. Placer une colonne QIAquick dans un tube de collecte. Déposer le surnageant de l'étape 5 sur la colonne QIAquick. Centrifuger pendant 30 à 60 s à la même vitesse. Jeter l'éluat.</li><li>7. Rincer la colonne en ajoutant 750 µl de tampon PE. Centrifuger pendant 30 à 60 s à la même vitesse. Jeter le tampon élué.</li><li>9. Centrifuger pendant 1 min à la même vitesse.</li><li>10. Placer la colonne sur un tube Eppendorf propre. Pour éluer l'ADN, ajoutez 30 µl de tampon EB. Laisser reposer 1 min. Centrifuger 1 min à la même vitesse.</li></ol>
Culture bactérienne de nuit Tampons P1 (avec RNase A, à 4°C) Tampon P2 Tampon N3 Tampon PE (avec éthanol à 96-100%) Tampon EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5)	
<b>Référence :</b> <a href="https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/plasmid-dna/qiaprep-spin-miniprep-kit/">https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/plasmid-dna/qiaprep-spin-miniprep-kit/</a>	

## Quantification au Nanodrop

<u>Matériel</u> Spectrophotomètre Nanodrop Pipette P2, cônes adaptés Papier absorbant <hr/> Tampon EB Échantillon d'ADN	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Pipeter 1 <math>\mu</math>L de tampon EB sur le socle de mesure. Abaisser le bras supérieur sur le socle et lancer une mesure d'absorbances à 260 et 280 nm, à l'aide du logiciel sur PC.</li><li>2. Répéter avec 1 <math>\mu</math>L d'échantillon.</li><li>3. Noter la concentration.</li><li>4. Relever le bras et nettoyer le bras et le socle avec un papier absorbant.</li></ol>
Référence : polycopié de TP Biologie de première année.	

## Coupage par restriction du vecteur

<u>Matériel</u> Bain de glace Tube Eppendorf de 1.5 ml Pipettes P2, P20, P100, cônes adaptés Étuve à 37°C Bain à 80°C <hr/> Eau bidistillée Plasmide Tampon rCutSmart Enzyme EcoRI-HF Enzyme NdeI ou NheI	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Sortir les tampons et enzymes à -20°C et laisser sur glace.</li><li>2. A partir de la quantification par Nanodrop, déterminer le volume associé à 1000 ng de plasmide.</li><li>3. Dans un tube Eppendorf de 1.5 ml, introduire dans cet ordre :<ul style="list-style-type: none"><li>- qsp 20-50 <math>\mu</math>l d'eau bidistillée</li><li>- 1000 ng de plasmide</li><li>- 5 <math>\mu</math>l de tampon rCutSmart</li><li>- 1 <math>\mu</math>l d'enzyme EcoRI</li><li>- 1 <math>\mu</math>l d'enzyme NdeI ou NheI</li></ul></li><li>4. Incuber à 37°C pendant 1h.</li><li>5. Inactiver les enzymes à 80°C pendant 20 min.</li></ol>
Référence : <a href="https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/digestion-protocol-e0546">https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/digestion-protocol-e0546</a>	

## Vérification de la restriction par électrophorèse en gel d'agarose

<u>Matériel</u> Gants en latex Cuve à électrophorèse horizontale Eprouvette de 100 ml Erlenmeyer de 100 ml Balance Micro-onde Pipette P20, cônes adaptés Générateur Table de lecture UV <hr/> Agarose en poudre TAE 1x (pH 8) GelRed 10 000x Tampon de charge 6x (0.25% Bleu de bromophénol, 0.25% Xylène cyanol, 15% Ficoll) Marqueur de taille (Ladder 200)	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Avec des gants, mettre en place le système de coulage des gels (support et embouts noirs).</li><li>2. Dans un erlenmeyer, ajouter 0.4 g d'agarose et 40 ml de TAE 1x. Chauffer au micro-onde pendant 40 s. Vérifier que l'agarose est dissout.</li><li>3. Laisser refroidir sur la paillasse jusqu'à environ 60°C.</li><li>4. Ajouter 4 <math>\mu</math>l de GelRed. Homogénéiser en agitant doucement l'erlenmeyer.</li><li>5. Couler le gel dans les supports. Placer le peigne. Laisse polymériser.</li><li>6. Placer le gel dans la cuve à électrophorèse, avec les puits du côté anode.</li><li>7. Remplir la cuve de TAE 1x, jusqu'à recouvrir le gel.</li><li>8. Déposer dans 3 puits, chacun des échantillons suivants :<ul style="list-style-type: none"><li>- 1 <math>\mu</math>l de plasmide non digéré, 4 <math>\mu</math>l d'eau et 1 <math>\mu</math>l de tampon de charge</li><li>- 1.5 <math>\mu</math>l du plasmide linéarisé, 3.5 <math>\mu</math>l d'eau et 1 <math>\mu</math>l de tampon de charge</li><li>- 5 <math>\mu</math>l de marqueur de taille</li></ul></li><li>9. Fermer la cuve et appliquer une tension de 80V.</li><li>10. Si le bleu de bromophénol a migré jusqu'au dernier 1/3 du gel, couper la tension.</li><li>11. Retirer le gel avec précaution. Le placer sur la table UV.</li><li>12. Si la digestion du plasmide semble complète, transférer le tube de restriction à 68°C pendant 10 min, pour inactiver l'enzyme. Laisser refroidir pendant 5 min, sur la paillasse.</li></ol>
Référence : polycopié de TP Biologie de première année.	

## Purification sur gel

<p><u>Matériel (QIAquick Gel Extraction)</u> Scalpel propre Tubes Eppendorf de 1.5 ml Bain à 50°C Pipette P20, P1000, cônes associés Colonne QIAquick Tube de collecte de 2 ml Microcentrifugeuse à 13 000 rpm Spectrophotomètre Nanodrop</p> <hr/> <p>Gel d'agarose avec fragment d'ADN Tampon QG Acétate de sodium (3M, pH 5) Tampon PE (avec éthanol à 96-100%) Tampon EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5)</p>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Exciser grossièrement le fragment d'ADN du gel d'agarose, avec un scalpel propre. Retirer l'agarose supplémentaire autour de l'ADN, afin d'obtenir une fine tranche de gel.</li><li>2. Peser la tranche de gel dans un tube Eppendorf de 1.5 ml. Ajoutez 3 volumes de tampon QG au gel (i.e. 100 µl de tampon pour 100 mg de gel).</li><li>3. Incuber à 50°C jusqu'à ce que la tranche de gel soit complètement dissoute (~10 min).</li><li>4. Vérifier que le mélange est de couleur jaune, indicateur d'un pH ≤ 7.5. Si ce n'est pas le cas, ajouter 10 µl d'acétate de sodium 3 M, pH 5, et mélanger.</li><li>5. Placer une colonne QIAquick dans un tube de collecte de 2 ml. Ajouter l'échantillon sur la colonne. Centrifuger à 13 000 rpm, pendant 1 minute.</li><li>8. Jeter l'éluat et replacer la colonne dans le même tube de collecte. Ajouter 0.5 ml de tampon QG à la colonne. Centrifuger pendant 1 min.</li><li>9. Laver avec 0.75 ml de tampon PE dans la colonne. Laisser reposer pendant 2 min. Centrifuger pendant 1 minute. Jeter l'éluat et centrifuger pendant 1 min.</li><li>10. Placer la colonne dans un tube Eppendorf propre de 1.5 ml.</li><li>11. Éluer l'ADN en ajoutant 30 µl de tampon EB sur la colonne. Centrifuger pendant 1 min. Laissez reposer pendant 1 min. Centrifuger pendant 1 min.</li><li>12. Récupérer l'éluat et le quantifier au Nanodrop.</li></ol>
<p>Référence : <a href="https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/dna-clean-up/qiaquick-gel-extraction-kit/">https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/dna-clean-up/qiaquick-gel-extraction-kit/</a></p>	

## Déphosphorylation du vecteur

Cette étape est optionnelle mais préférable.

<p><u>Matériel</u> Bain de glace Tube Eppendorf de 1.5 ml Microcentrifugeuse à 13 000 rpm Pipettes P2, P20, cônes associés Étuve à 37°</p> <hr/> <p>Phosphatase alcaline à 1 U/µl (Artic phosphatase) Tampon Phosphatase alcaline 10x (500 mM Bis Tris-Propane 1 mM MgCl<sub>2</sub> 0.1 mM ZnCl<sub>2</sub> pH 6.0 à 25°C) Eau millipore stérile Plasmide linéarisé</p>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Placer le Tampon Phosphatase alcaline 10x et l'enzyme Phosphatase alcaline, sur un bain de glace.</li><li>2. Prélever 20 µl de plasmide linéarisé et transférer dans un tube Eppendorf de 1.5 ml.</li><li>3. Ajouter 1.5 µl d'eau, 2.5 µl de tampon et 1 µl d'enzyme.</li><li>4. Centrifuger à 13 000 rpm, pendant 1 min.</li><li>5. Incuber à 37°C, pendant 30 min.</li></ol>
<p>Référence : polycopié de TP Biologie de première année.</p>	

## Préparation de l'insert

## Amplification de l'insert par PCR

<p><u>Matériel</u> Microtubes de PCR de 0.5 ml Pipettes P2, P20, cônes adaptés Microcentrifugeuse à 13 000 rpm Thermocycleur</p> <hr/> <p>Promoteur à amplifier Eau sans nucléase Amorce amont à 300 nM Amorce aval à 300 nM repliQa HiFi ToughMix (2X)</p>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Dans un tube de 0.5ml ajouter : 4 <math>\mu</math>l de promoteur, 3.5 <math>\mu</math>l d'eau sans nucléase, 2.5 <math>\mu</math>l d'amorce amont, 2.5 <math>\mu</math>l d'amorce aval, 12.5 <math>\mu</math>l du mélange repliQa HiFi ToughMix (2X).</li><li>2. Centrifuger le tube quelques secondes.</li><li>3. Déposer le tube dans l'appareil à PCR.</li><li>4. Programmer l'appareil selon la méthode suivante. 5 s à 98°C 35-40 cycles consécutifs composés ainsi : Dénaturation de l'ADN pendant 10 s à 98°C Hybridation pendant 10 s à 55°C Polymérisation pendant 10 s à 68°C 10 min à 12°C.</li><li>5. Analyser par électrophorèse sur gel, en comparant le résultat de l'amplification et un témoin non amplifié.</li></ol>
<p>Référence : <a href="https://www.quantabio.com/product/repliqa-hifi-toughmix/">https://www.quantabio.com/product/repliqa-hifi-toughmix/</a></p>	

Pour le promoteur AraC, l'amplification par PCR selon le protocole précédent n'a pas fonctionné. Le protocole suivant a été utilisé.

<p><u>Matériel</u> Microtubes de PCR de 0.5 ml Pipettes P2, P20, cônes adaptés Microcentrifugeuse à 13 000 rpm Thermocycleur Bain à 72°C</p> <hr/> <p>Eau bidistillée Promoteur à 10 ng/<math>\mu</math>l dNTP (mélange de dATP, dTTP, dCTP, dGTP, à 10mM de chaque nucléotide) Tampon Taq 10x (50mM Tris-HCl pH8,5 250mM KCl, 25mM MgCl<sub>2</sub>) Amorce amont à 25 <math>\mu</math>M Amorce aval à 25 <math>\mu</math>M Taq polymérase 2.5 U/<math>\mu</math>l Tampon de charge 5x</p>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Dans le tube de 0.5ml contenant déjà 1<math>\mu</math>l de promoteur, ajouter dans cet ordre:<ul style="list-style-type: none"><li>- 40<math>\mu</math>l d'eau bidistillée</li><li>- 5<math>\mu</math>l de tampon Taq 10X</li><li>- 1 <math>\mu</math>l du mélange de dNTPs</li><li>- 1 <math>\mu</math>l de l'amorce amont</li><li>- 1 <math>\mu</math>l de l'amorce aval</li><li>- 1 <math>\mu</math>l de Taq polymérase</li></ul></li><li>2. Centrifuger le tube quelques secondes.</li><li>3. Déposer le tube dans l'appareil à PCR qui sera programmé pour effectuer 25 cycles consécutifs composés ainsi : 30sec, 98°C — 15sec, 52°C — 30sec, 72°C.</li><li>4. A l'issue des 25 cycles: 10 min, 12°C.</li><li>5. Analyser sur gel, en comparant le résultat de l'amplification et un témoin non amplifié.</li></ol>
<p>Référence : photocopié de TP Biologie de première année.</p>	

## Purification de l'insert après amplification

<u>Matériel</u> Colonne QIAquick Vortex Pipettes P100, P1000 et cônes associés Centrifugeuse Colonne QIAquick Tube de collecte de 2 ml Tube Eppendorf de 1.5 ml Spectrophotomètre Nanodrop	1. Ajouter 5 volumes de tampon PB à la réaction de PCR. Vortexer. 2. Placer une colonne QIAquick dans un tube de collecte de 2 ml. Déposer le mélange sur la colonne. Centrifuger pendant 30-60 s, à 13000 rpm. 3. Jeter l'éluat. Replacer la colonne sur le même tube. 4. Rincer en ajoutant 750 $\mu$ l de tampon PE sur la colonne et centrifuger pendant 1 min, à la même vitesse. Jeter le tampon PE élué. 5. Centrifuger pendant 2 min, à la même vitesse. 6. Placer la colonne sur un tube propre. Pour éluer l'ADN, ajouter 30 $\mu$ l de tampon EB sur la colonne. Laisser poser pendant 1 min. Centrifuger pendant 1 min à la même vitesse. 7. Récupérer l'éluat et le replacer sur la colonne. Laisser 1 min puis centrifuger pendant 1 min, à la même vitesse. 8. Récupérer l'éluat et le quantifier au nanodrop.
Produit de PCR Tampon PB Tampon PE (avec éthanol à 96-100%) Tampon EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5)	
Référence : <a href="https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/dna-clean-up/qiaquick-pcr-purification-kit/">https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/dna-clean-up/qiaquick-pcr-purification-kit/</a>	

### Coupage par restriction de l'insert

Le protocole appliqué pour la restriction du plasmide est utilisé ici.

### Purification de l'insert après restriction

Le protocole est le même que celui de la purification de l'insert après amplification par PCR.

### Ligation du vecteur et de l'insert

<u>Matériel</u> Microtube de 0.5 ml Pipette P2, P20, cônes associés  Plasmide linéarisé Insert purifié Tampon T4 DNA Ligase 10X (500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7.5 à 25°C) T4 DNA Ligase (1U/ $\mu$ l) Eau bidistillée	1. Dans un tube de 0.5 ml, ajouter 2 $\mu$ l de plasmide, 2 $\mu$ l d'insert, 2 $\mu$ l de tampon de ligation, 1 $\mu$ l de ligase, 11 $\mu$ l d'eau bidistillée. 2. Incuber à température ambiante pendant 10 minutes. 3. Inactiver l'enzyme à 80°C pendant 20 minutes.
Référence : <a href="https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/ligation-protocol-e0546">https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/ligation-protocol-e0546</a>	

### Transformation des bactéries par le mélange de ligation

<u>Matériel</u> Bain de glace Bain à 42°C Pipette P2, P20, P100, cônes associés Étuve à 37°C avec agitateur Boîte de Pétri avec du milieu LB agar  Tube de 20 $\mu$ l de cellules compétentes E.Coli NEB 5-alpha	1. Décongeler un tube de 20 $\mu$ l de cellules compétentes E.Coli NEB 5-alpha sur de la glace pendant 10 min. 2. Dès que le dernier morceau de glace dans le tube a disparu, ajouter 1-5 $\mu$ l contenant 1 pg à 100 ng d'ADN plasmidique au mélange de cellules. Inverser le tube 4-5 fois pour mélanger les cellules et l'ADN. Ne pas utiliser le vortex. 3. Placer le mélange sur la glace pendant 30 minutes. Ne pas mélanger. 4. Placer le mélange à 42°C pendant exactement 30s. Ne pas mélanger. 5. Placer sur la glace pendant 5 minutes. Ne pas mélanger. 6. Ajouter 950 $\mu$ l de milieu LB à température ambiante. Placer à 37°C pendant 30 min. Agiter vigoureusement.
---	--



ADN plasmidique Milieu LB à température ambiante	7. Réchauffer les boîtes de Pétri à 37°C. 8. Répartir 50 à 100 $\mu$ l du mélange sur chaque boîte de Pétri. Laisser à température ambiante.
Référence : <a href="https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/transformation-protocol-for-bl21-de3-competent-cells-c2527">https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/transformation-protocol-for-bl21-de3-competent-cells-c2527</a>	

### Amplification par PCR de l'ADN plasmidique des clones transformants

Appliquer le protocole d'amplification par PCR sur 3 clones transformants colorés. Prendre l'amorce amont utilisée pour le séquençage, et l'amorce aval pour l'amplification du promoteur (correspondant au site de restriction utilisé, soit NdeI, soit NheI). Analyser par électrophorèse sur gel.

### Séquençage pour vérification du contenu des plasmides

<u>Matériel</u> Tubes Eppendorf de 1.5 ml  ADN plasmidique ou produit PCR purifié Amorce de séquençage amont à 5 $\mu$ M Amorce de séquençage aval à 5 $\mu$ M	1. Dans 2 tubes Eppendorf, ajouter 5 $\mu$ l d'amorce (soit l'amorce amont, soit l'amorce aval) et 5 $\mu$ l d'ADN purifié à la concentration suivante : ADN plasmidique 50-100 ng/ $\mu$ l Produit PCR purifié : 1 ng/ $\mu$ l pour 150-300 bp, 5 ng/ $\mu$ l pour 300-1000 pb, 10 ng/ $\mu$ l pour 1000-3000 pb Le volume total ne doit pas être inférieur à 10 $\mu$ l. 2. Déposer l'échantillon à l'adresse suivante : École Normale Supérieure de Paris – ENS 48 rue d'Ulm 75005 Paris Bâtiment IBENS, niveau 1 Point de collection GATC, près de la réception 3. Une fois les résultats du séquençage reçus, analyser les résultats sur Geneious.
Référence : <a href="https://eurofinngenomics.eu/en/custom-dna-sequencing/gatc-services/lightrun-tube/">https://eurofinngenomics.eu/en/custom-dna-sequencing/gatc-services/lightrun-tube/</a>	

### INDUCTION

**Volatiles** (<https://2012.igem.org/Team:Groningen/volatiles>).

Ci-dessous des composés organiques volatiles considérées. Elles ont été identifiées dans la viande avariée (70% porc, 30% bœuf émincé) via GC-MS par l'équipe iGem 2012 Rotten Meat

Molécules	Référence pour commande
Acide tridécanoïque	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/substance/tridecanoicacid21434638539_">https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/substance/tridecanoicacid21434638539_</a>
Acide benzoïque	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/substance/benzoicacid1221265850">https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/substance/benzoicacid1221265850</a>
1-hexadecanol	<a href="https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/substance/1hexadecanol2424436653824">https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/substance/1hexadecanol2424436653824</a>