

PSE Biologie – Promoteurs dépendants de la température

Méthodes et protocoles

1) Préparation de milieux de culture :

Pour la mise en culture des bactéries *E. Coli*.

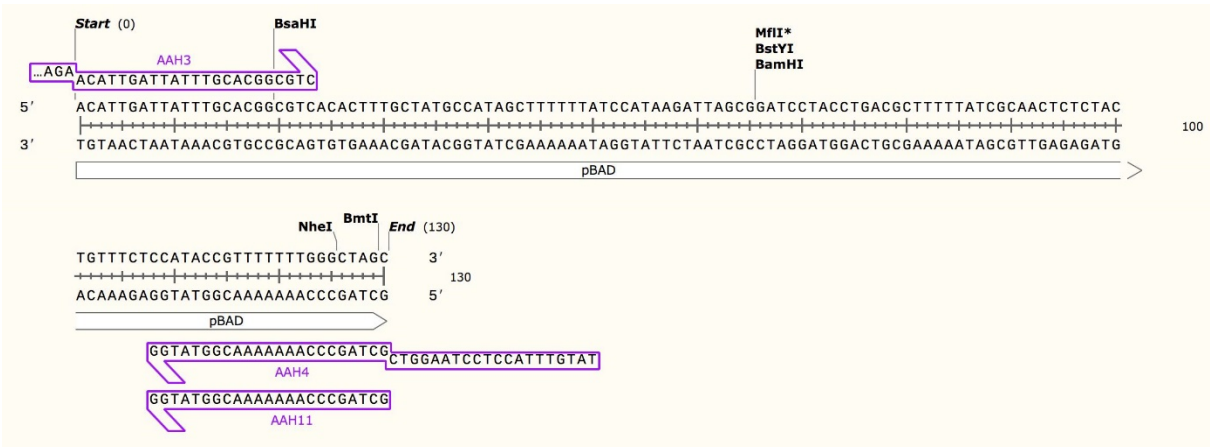
- Milieu de culture Agar/Boîte de Pétri (pour 20 boîtes)
Mesurer 500 mL d'eau distillée avec une éprouvette
Peser 12,5 g de LB Broth
Peser 7,5 g d'Agar
Verser l'eau dans une grande bouteille de 500 mL
Ajouter les poudres
Bien remuer
Mettre à l'autoclave (environ 1 h)
(Si le milieu de culture est gélifié, le faire fondre au microonde)
Ajouter l'antibiotique (chlorophénicol dans notre cas)
Verser environ 25 mL dans chaque boîte
Quand c'est pris, mettre les couvercles
Stocker les boîtes dans le frigo, à l'envers (couvercle vers le bas)
- Milieu de culture phase liquide (pour 1 L)
Mesurer 1 L d'eau distillée avec une éprouvette
Peser 25 g de LB Broth
Verser l'eau dans une grande bouteille de 1 L
Ajouter le LB Broth
Bien remuer
Mettre à l'autoclave (environ 1 h)
Ajouter l'antibiotique avant usage si besoin

2) Commande des amorces

Les amorces permettent la réalisation de PCR pour la construction de nos 5 plasmides.

Name	Description	Sequence 5' to 3'	Target	Purpose
AAH1	AmilCP (V107) forward linearization primer	GACCTTAGGAGGTAACATATGAGTGTG	Plasmid AmilCP (V107)	Linearization of V107
AAH2	AmilCP (V107) reverse linearization primer	TCTAGAAGCGGCCGGAATTC	Plasmid AmilCP (V107)	Linearization of V107
AAH3	pBAD forward cloning primer with V107 20 bp overhang	AATTCGGCGCCGCTCTAGAACATTGATTATTGACGGCGTC	Plasmid with pBAD	Cloning of pBAD into V107
AAH4	pBAD reverse cloning primer with V107 20 bp overhang	TATGTTACCTCTAAGGTCGCTAGCCCAAAAAACGGTATGG	Plasmid with pBAD	Cloning of pBAD into V107
AAH5	pTet ON forward cloning primer with V107 20 bp overhang	AATTCGGCGCCGCTCTAGATCCCTATCAGTGATAGAGATTGAC	Plasmid with pTet ON	Cloning of pTet ON into V107
AAH6	pTet ON reverse cloning primer with V107 20 bp overhang	TATGTTACCTCTAAGGTCGCTCAGTATCTCTACTG	Plasmid with pTet ON	Cloning of pTet ON into V107
AAH7	dsrA forward annealing oligo	GGCGAATATTTTCTGTGACGGAAAAAATTGCGGATAAGGTGATGAA		
AAH8	dsrA reverse annealing oligo	TTTCATCACCTTATCCGCAATTTTTTCGCTGACAAGAAAAATTCGCC		
AAH9	dsrA forward cloning primer with V107 20 bp overhang	AATTCGGCGCCGCTCTAGAGGGGAATATTTCTGTGACGG	Annealed dsrA	Cloning of dsrA into V107
AAH10	dsrA reverse cloning primer with V107 20 bp overhang	TATGTTACCTCTAAGGCTTTCATCACCTTATCCGCAATT	Annealed dsrA	Cloning of dsrA into V107
AAH11	pBAD reverse cloning primer	GCTAGCCCAAAAAACGGTATGG	Plasmid with pBAD	Cloning of pBAD into V107 together with dsrA that has pBAD overlap
AAH12	dsrA forward cloning primer with pBAD 20 bp overhang	TACCGTTTTTTGGGCTAGCGGGAATATTTCTGTGACGG	Annealed dsrA	Cloning of dsrA into V107 together with pBAD
AAH13	pTet ON reverse cloning primer	GTGCTCAGTATCTCTACTG	Plasmid with pTet ON	Cloning of pTet ON into V107 together with dsrA that has pTet ON overlap
AAH14	dsrA forward cloning primer with pTet ON 20 bp overhang	GTGATAGAGATACTGACGACGGGAATATTTCTGTGACGG	Annealed dsrA	Cloning of dsrA into V107 together with pTet ON

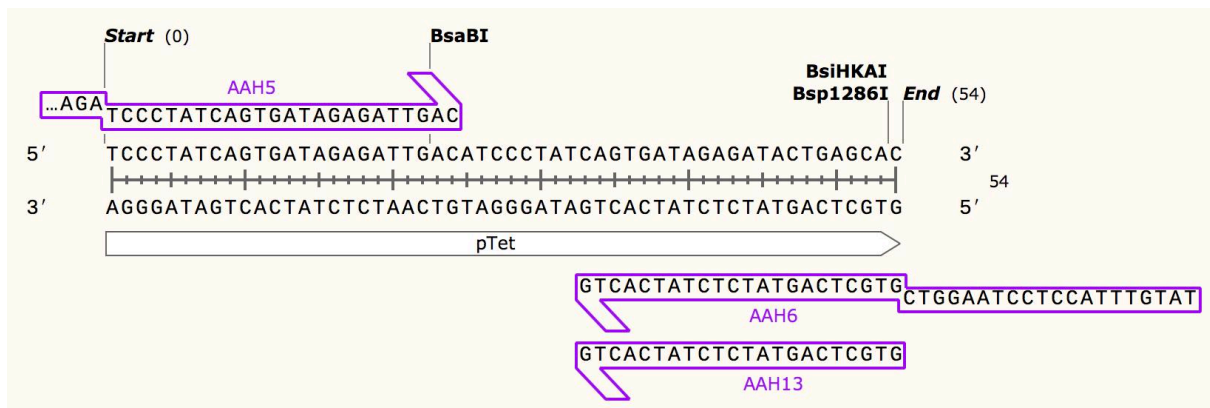
Tableau récapitulatif des amorces et fragments commandés



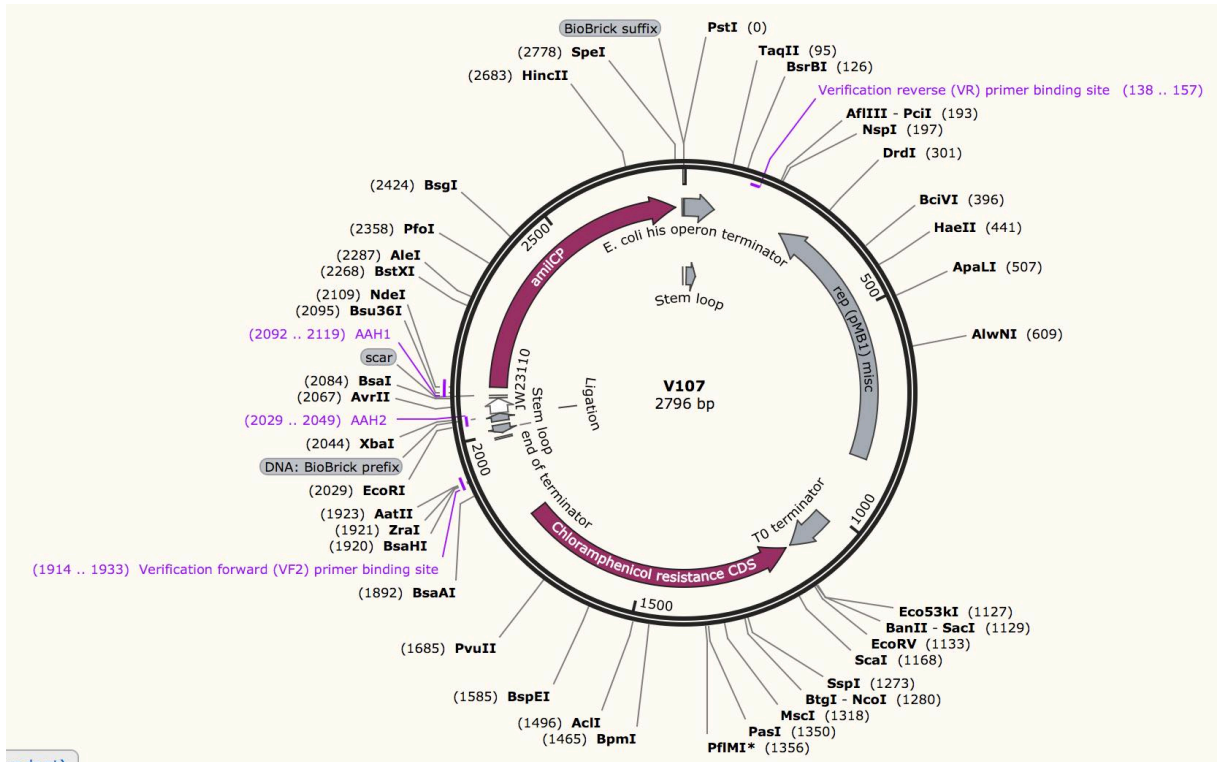
Amorces pBAD



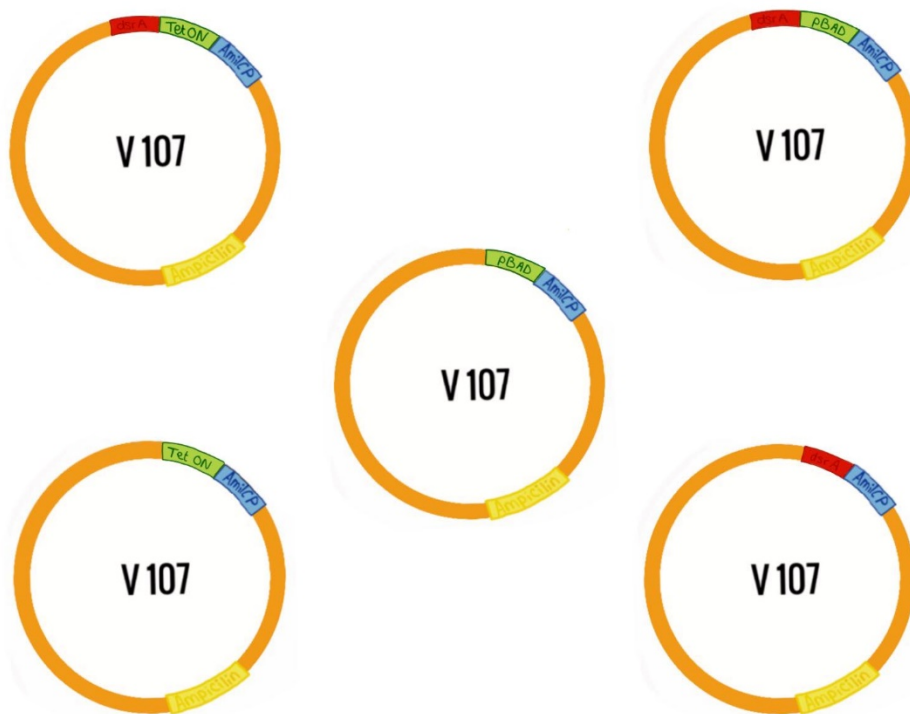
Amorces dsrA



Amorce pTET



Carte du plasmide V107



Les 5 plasmides à construire

3) Extraction des plasmides

Utilisation du kit QIAPrep Spin Miniprep. Kit 50 pour extraire les plasmides contenant les promoteurs pTet et pBAD.

Protocole en ligne :

<https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=331740ca-077f-4ddd-9e5a-2083f98eebd5&lang=en>

4) Dilution des amorces

Pour avoir une concentration de 30 μM à partir d'une concentration de 100 μM

Dans un tube Eppendorf de 1,5 mL, mettre 3 μL de primer + 7 μL d'eau
Pipeter pour homogénéiser

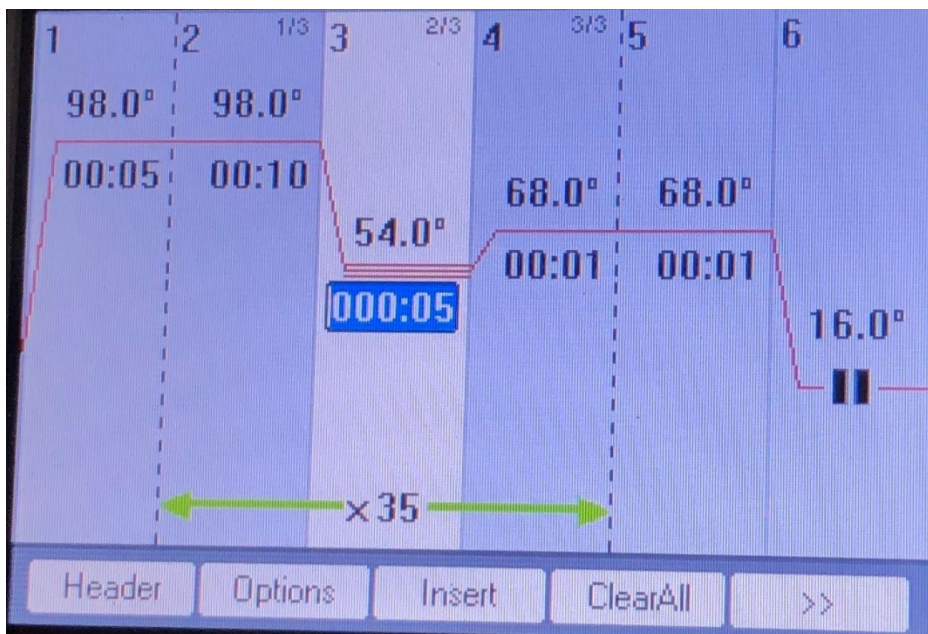
5) Amplification du plasmide V107 par PCR

Pour construire nos 5 plasmides, nous avons réalisé des PCR sur le plasmide V107 (contenant le gène AmilCP utile à la visualisation de nos résultats). Nous avons choisi les amorces à ajouter en fonction de la construction voulue.

Dans des tubes PCR placés dans la glace, ajouter :

- 25 μL de Repliqa Polymerase 2x
- 0,5 μL de l'amorce amont
- 0,5 μL de l'amorce aval
- 1 μL du plasmide V107
- 23 μL d'eau ddH₂O

Programme PCR :



6) Gel électrophorèse puis extraction

Purification du produit PCR

Dans un erlenmeyer de 100 mL :

Mettre 50 mL de TAE 1x

1 tablette de TopVision Agarose Tablets

Mettre au micro-onde environ 1 min 30 s, jusqu'à ce que la tablette soit dissoute.

Ajouter 5 μ L de Safe DNA Gel Stain

Remuer en agitant circulairement l'erlen

Attendre un peu que ça refroidisse

Couler le gel (ne pas oublier de mettre la barre pour les puits)

Dans chaque échantillon, on ajoute du dye 6x (1 μ L pour 5 μ L d'échantillon)

Attendre environ 15 min que le gel soit pris

Le démouler et le placer avec les puits du côté - (l'ADN est chargé négativement, il migre du - vers le +)

Recouvrir de TAE 1x

Mettre les échantillons + le ladder dans les puits

Faire migrer 1 h à 100 V

On observe le gel sous lampe UV

Découper les carrés contenant l'ADN au cutter

Peser les cubes (masse m)

Dans un tube Eppendorf de 1,5 mL, insérer le cube + 3 fois en volume de tampon de solubilisation

Incuber 10 min à 50°C en vortexant de temps en temps pour faire fondre les cubes de gel

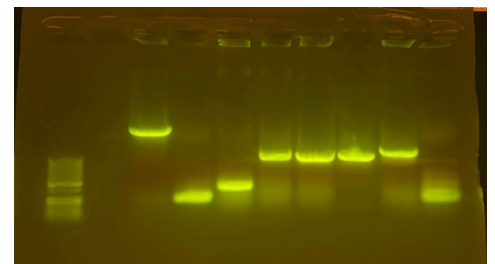
Ajouter 1 fois le volume de gel d'isopropanol

Suivre le protocole suivant pour purifier l'ADN extrait :

<https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=e0fab087-ea52-4c16-b79f-c224bf760c39&lang=en>



Pipetage des échantillons dans les puits



Observation du gel sous lampe UV

7) Recombinaison homologue

Pour associer les différents fragments construits. Utilisation de GenBuilder™ Cloning Kit.

Protocole :

https://www.genscript.com/product/documents/down?doc_name=L00701_QuickGuide.pdf&file=scm_files/productFile_notes/2022/06/09/1ae0165c-7ccb-46eb-807b-050f1101d8ba.pdf

8) Insertion des plasmides dans les bactéries

- Protocole pour des bactéries E. Coli C2987:

[High Efficiency Transformation Protocol \(C2987H/C2987I\) | NEB](#)

- Protocole d'électroporation pour un autre type de cellules E. Coli :

Dans un tube de 1,5 mL, ajouter :

45 µL d'eau (autoclaved water)

6 µL de cellules E. Coli

3 µL de l'échantillon (produit de la recombinaison homologue)

Mettre le contenu du tube entre les 2 plaques de la capsule d'électroporation

Insérer la capsule dans la machine

Préparer une pipette de 1 mL de SOC

Quand ça sort de la machine, ajouter le SOC

Pipeter pour homogénéiser

Mettre dans un tube Eppendorf de 1,5 mL

Incuber 1 h à 37°C sous agitation

9) Mise en culture des bactéries contenant les plasmides

Sous hotte, déposer 100 µL de bactéries obtenues en 8) sur le milieu agar (boîte de Pétri)

Etaler pendant 3 minutes environ

Centrifuger le reste des tubes pour concentrer. On obtient un culot.

Jeter le surplus de « jus »

Suspendre le culot en pipetant

Réaliser comme précédemment des boîtes avec les bactéries concentrées

Placer les boîtes à l'étuve à 30°C pendant 2 à 3 jours

10) Sélection de colonies

On sélectionne des colonies dans les boîtes obtenues afin de développer un seul type de plasmide. En effet, certaines bactéries peuvent ne pas contenir le plasmide construit par exemple.

Régler la pipette à 3,5 µL

Avec le cône, toucher à peine la colonie (tenir la pipette comme un stylo)

Déposer la colonie prélevée dans un tube PCR contenant 5 µL d'eau

Homogénéiser en pipetant doucement

Déposer 3,5 µL du mélange colonie + H₂O dans un autre tube PCR contenant 10 µL de milieu de culture liquide

Réaliser cette procédure plusieurs fois pour chaque construction.

11) Vérification au microscope

On vérifie au microscope si la colonie est bien E. Coli.

Prélever la colonie avec un cône

La déposer sur la lame de microscope

Ajouter une goutte d'eau (environ 2 μ L)

Poser une lamelle

Si vous souhaitez plus de détails ou d'informations pour reproduire nos expériences, n'hésitez pas à nous contacter pour que nous vous fournissions notre cahier de laboratoire.