

Méthodes et protocoles

1. Bactéries :

a) Milieu de culture :

On mélange 5 g de Luria Broth (LB), 250 mL d'eau et 3,75 g d'agar dans un flacon. Le mélange est autoclavé pendant environ une heure pour éviter tout type de contamination. S'il s'agit des milieux de contrôle, le mélange est prêt à ce moment. S'il s'agit des milieux de sélection des bactéries, on ajoute 250 mg d'une solution 1000 fois diluée d'antibiotique.

Sous hotte, le contenu est versé dans des boîtes de Pétri en plastique. Après refroidir et solidifier, les milieux sont fermés et laissés au réfrigérateur jusqu'au moment de leur utilisation.

b) Transformation des bactéries :

Pour ce travail, on a utilisé des plasmides contenant le fragment d'ADN qu'on était intéressé à étudier. Pour faire la transformation, on a utilisé des bactéries compétentes DH5 α , activées par choc thermique. Une bactérie transformée doit présenter une résistance à l'ampicilline, c'est pourquoi on l'utilise comme antibiotique dans cette expérience. Le protocole est le suivant :

1. Nous avons laissé les plasmides, les bactéries et la solution 1000 fois diluée d'ampicilline fondre lentement dans la glace. Nous y avons aussi laissé les tubes de 2 ml où le mélange de bactérie et de plasmide est fait.
2. Après que les bactéries et les plasmides sont fondus, nous ajoutons 15 μ L de cellules compétentes et 3 μ L de plasmides, dans cette ordre, dans chaque tube.
3. Nous laissons le mélange pendant 10 minutes dans la glace.
4. Pour le choc thermique, nous avons laissé les tubes pendant 45 secondes dans un bain à 42°C.
5. Encore une fois les tubes sont mis dans la glace, cette fois pour 2 minutes.
6. Nous ajoutons 500 μ L de solution LB (concentration 20 g/L) dans chaque tube.
7. Nous laissons les tubes incubés à 37°C pendant 1 heure.
8. La dernière étape consiste à appliquer une fine couche de cette solution sur les milieux de culture déjà solidifiés. Les boîtes de Pétri sont donc fermées et incubées à 37°C pendant 24 heures.

c) Multiplication des bactéries :

Afin d'avoir la plus grande quantité possible d'ADN lors de l'extraction, il est important de multiplier une seule colonie. Le procédé est le suivant :

1. Ajout de 2 mL de solution LB dans un flacon en plastique avec couvercle.
2. Ajout de 2 μ L de solution 1000 fois diluée d'ampicilline.
3. On prend une colonie du milieu de culture avec une pointe de pipette et on la jette dans ce tube.
4. Une fois le tube fermé, il est incubé à 37°C sous une douce agitation pendant 24 heures.

d)Extraction de l'ADN :

Un kit d'extraction d'ADN Invitrogen by Thermo Fisher Scientific a été utilisé. Le protocole d'extraction type "miniprep" proposé par le kit a été adopté. Le procédé est le suivant :

1. Ajout de 2 mL de buffer d'équilibre à la colonne. Attendre le drainage par écoulement gravitationnel.
2. 2 mL de la solution de multiplication sont centrifugés à 4000g pendant 10 minutes. Les cellules sédimentées sont reconnues au fond du tube et le milieu est enlevé par pipetation.
3. Ajout de 0,4 mL de buffer de resuspension avec RNase dans le tube avec les cellules. Agitation jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.
4. Ajout de 0,4 mL de Lysis buffer dans le tube. On le mélange en tournant le tube jusqu'à un mélange homogène. Le tube reste en repos à température ambiante pendant 5 minutes.
5. Ajout de 0,4 mL de buffer de précipitation. Mélange immédiat en tournant le tube jusqu'à un mélange homogène. Centrifugation à 12000g pendant 10 minutes.
6. Ajout du surnageant dans la colonne déjà équilibrée. L'écoulement se fait par gravité.
7. Ajout de 2,5 mL de buffer de lavage à la colonne. L'écoulement se fait encore une fois par gravité. Le lavage se fait deux fois. Le buffer est jeté après avoir écoulé.
8. Un microtube est placé en dessous de la colonne. Ajout de 0,9 mL de buffer d'élution. L'écoulement se fait par gravité. Le tube contient l'ADN.
9. Ajout de 0,63 mL d'isopropanol, mélanger. Centrifugation à 12000g pendant 30 minutes à 4°C. Jeter le surnageant.
10. Ajout de 1 mL d'éthanol 70%. Centrifugation à 12000g pendant 5 minutes à 4°C. Jeter le surnageant.
11. Laisser le tube sécher dans l'air pendant 10 minutes. Resuspendre l'ADN dans de l'eau milliQ.

La concentration d'ADN obtenue a été mesurée par l'équipement nanodrop.

2. Teste de détection LAMP :

Pour le test de détection, on a utilisé le kit WarmStart Colorimetric LAMP 2x Master Mix Typical LAMP by BioLabs. Le produit consiste en un liquide rose qui changera de couleur dans le cas de détection d'ADN. Pour cette expérience, on a besoin de ce kit LAMP, de l'ADN obtenu après l'étape 1.d), des amorces du fragment d'ADN et de l'eau milliQ.

La première étape était de préparer le mélange des amorces correspondant au fragment d'ADN qu'on était intéressé à étudier. On a travaillé avec deux différentes possibilités d'amorces afin de détecter celui avec la meilleure performance. Les amorces nécessaires ont été déterminé¹ par le logiciel Primer Explorer (disponible sur <https://primerexplorer.jp/e/>) et ils étaient commandés chez Integrated DNA Technologies. On a donc préparé un mélange dans les concentrations indiquées sur le protocole du kit LAMP, comme illustré dans le tableau ci-dessous :

PRIMER	10X CONCENTRATION (STOCK)	1X CONCENTRATION (FINAL)
FIP	16 μ M	1.6 μ M
BIP	16 μ M	1.6 μ M
F3	2 μ M	0.2 μ M
B3	2 μ M	0.2 μ M
LOOP F	4 μ M	0.4 μ M
LOOP B	4 μ M	0.4 μ M

Finalement, on a obtenu deux mélanges, correspondants à deux ensembles d'amorces différents. On va les appeler amorces 1 et amorces 2.

Afin de déterminer le seuil de détection du test, on a travaillé avec des différentes concentrations d'ADN, en le diluant 10 fois à chaque tube, jusqu'à obtenir 9 différentes concentrations : la concentration originale et huit dilutions, chacune plus diluée d'un facteur de dix.

Pour chaque tube du test de détection, on ajoute 25 μ L de kit LAMP, 2 μ L de la solution d'ADN, 13 μ L du mélange d'amorces (soit les amorces 1, soit les amorces 2) et 10 μ L d'eau.

Il est important de prévoir des tubes contrôles pour cette expérience, pour s'assurer que la détection s'agit du fragment d'ADN qu'on étudie. On a travaillé avec trois contrôles : un tube avec ADN, mais sans amorces, un tube sans ADN, mais avec les amorces 1 et un autre tube sans ADN, mais avec les amorces 2. Dans les trois cas, une quantité d'eau équivalente à celle du composant manquant a été ajoutée, de manière à avoir le même volume pour tous les échantillons.

Finalement, les tubes sont immergés dans un bain à 65°C pendant 30 minutes. Après ce temps, les tubes sont enlevés et le résultat est immédiatement aperçu par le changement de couleur : rose indique que l'ADN n'était pas détecté, jaune indique la détection. Si la couleur est orange, il est indiqué de laisser les tubes dans le bain pour 10 minutes de plus. Un exemple de résultat est illustré ci-dessous :



¹ Le protocole pour déterminer les amorces est disponible sur https://primerexplorer.jp/e/v4_manual/pdf/PrimerExplorerV4_Manual_1.pdf