

Bactéries jaunes et qui sentent le citron

Méthodes et Protocoles

Eloïse Epaud, Marjorie Etchevers, Linh Giang Pham

Mai 2022

Culture des bactéries

1. Préparation du milieu de culture : le LB liquide

- Ajouter 25g de poudre de LB (Sigma Aldrich, contenant levures, NaCl,...) dans 1L d'eau pure dans une bouteille à autoclave.
- Mixer jusqu'à avoir un mélange assez homogène (la poudre ne se dissout pas complètement mais ce n'est pas très grave).
- Fermer la bouteille en ne serrant pas complètement le bouchon. Mettre un scotch à autoclave sur le bouchon.
- Mettre à l'autoclave environ 30min à 120°C. Vérifier la couleur du scotch en récupérant la bouteille.
- Attendre que le LB soit à température ambiante environ avant de l'utiliser. Si besoin de le garder, bien serrer le bouchon une fois refroidi.

2. Préparation des plaques de LB agar

- Préparer 1L de LB liquide selon le protocole ci-dessus.
- Ajouter 15g d'agar pour culture de cellules à 1L de LB.
- Mixer. Le mélange ne devient jamais très homogène.
- Fermer la bouteille en ne serrant pas complètement le bouchon. Mettre un scotch à autoclave sur le bouchon.
- Mettre à l'autoclave environ 30min à 120°C. Vérifier la couleur du scotch en récupérant la bouteille.
- Attendre que le LB refroidisse un peu.
- Si besoin, rajouter l'antibiotique désiré selon la concentration que l'on veut :

	Solution stock		Concentration dans du LB
Antibiotique	Concentration	Température	Pour plasmides « relâchés »
Ampicilline	50mg/ml dans H2O	-20°C	20µg/ml

Chloramphénicol	34mg/ml dans ethanol	-20°C	25µg/ml
Kanamycine	10mg/ml dans H2O	-20°C	10µg/ml

*Tableau provenant de : Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J.F. Sambrook and D.W. Russell, 2001

- Verser le LB agar dans les boîtes de Petri (environ 25g par boîte).
- Conserver les boîtes au réfrigérateur à l'envers pour éviter la condensation.

Transformation des bactéries

1. Digestion/Ligation

Pour nos plasmides, nous avons utilisé le kit d'assemblage des BioBricks de NEB (<https://international.neb.com/products/e0546-biobrick-assembly-kit#Product%20Information>) et les protocoles fournis avec le kit que l'on peut retrouver aux liens suivants :

- Digestion : <https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/digestion-protocol-e0546>
- Ligation : <https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/ligation-protocol-e0546>

Nous avons fait plusieurs essais de digestion. Le plasmide AraC correspond au plasmide contenant le promoteur inductible à Arabinos, Yellow le plasmide produisant le pigment jaune, Limonene celui permettant la production de limonène par la bactérie. Les concentrations des plasmides ont été obtenues par spectrophotomètre Nanodrop à 260nm.

Protocoles de digestion :

1^{ère} digestion :

Plasmid	AraC (45,2 ng/µL)	Jaune (168,3ng/µL)	Limonene (147,6ng/µL)
V plasmid (µL) for ~ 500ng plasmid	11,5	3	3,5
EcoRI-HF (µL)	1	1	1
SpeI (µL)	1	////	////
XbaI (µL)	////	1	1

NEBuffer 2;1 (10X) (µL)	5	5	5
H2O (µL)	31,5	40	39,5

Après la digestion on purifie les plasmides digérés par PCR en utilisant le kit de QIAGEN (<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/dna-clean-up/qiaquick-pcr-purification-kit/>) avec le protocole fourni retrouvable à cette adresse. Pour AraC nous avons aussi effectué des purifications sur gel par électrophorèse.

Après notre digestion et purification, on refait un Nanodrop pour obtenir nos concentrations de plasmides digérés.

Pour la 1^{ère} digestion, la purification par colonne a échoué, nous n'avions plus d'ADN à la fin. Le buffer PE du kit n'avait pas été correctement préparé. Pour la purification sur gel, la quantité d'ADN récupérée est trop importante par rapport à ce que l'on doit avoir. Il doit donc rester du plasmide non digéré. On doit donc refaire une digestion.

2^{ème} digestion :

Plasmid	AraC (45,2 ng/µL)	Jaune (168,3ng/µL)	Limonene (147,6ng/µL)
Plasmid (µL) for ~ 1000ng plasmid	25	6	7
EcoRI-HF (µL)	1	1	1
SpeI (µL)	1	////	////
XbaI (µL)	////	1	1
NEBuffer 2;1 (10X) (µL)	3	2	1
H2O (µL)	////	10	////

*On double les concentrations en plasmides pour être sûrs d'obtenir une grande concentration d'ADN pour après faire la ligation dans des volumes intéressants.

On refait les purifications comme précédemment et on quantifie par Nanodrop. On a alors :

Yellow : 23.9ng/µL

Limonene : 23.8ng/µL

On s'est ensuite aperçu que l'on n'avait pas incubé assez longtemps la digestion. Nos plasmides ne sont pas bien coupés.

3^{ème} digestion :

Plasmid	AraC (66ng/μL)	Limonene (147,6ng/μL)
V plasmid (μL) for ~ 1000ng plasmid	15	7
EcoRI-HF (μL)	1	1
SpeI (μL)	1	////
XbaI (μL)	////	1
NEBuffer 2;1 (10X) (μL)	2	1
H2O (μL)	1	////

On n'a pas refait le jaune tout de suite car après séquençage de l'autre groupe qui utilisait le même plasmide que nous, on s'est aperçu que nous n'avions pas le plasmide exact que nous avions commandé.

On purifie par gel pour AraC et par colonne pour Limonene. On quantifie par Nanodrop.

Limonene : 24ng/μL

AraC : 12 ng/μL

Digestion du plasmide Yellow qui prend en compte les vrais sites de restriction disponibles :

Plasmid	Jaune (147,6ng/μL)
V plasmid (μL) for ~ 1000ng plasmid	7
EcoRI-HF (μL)	1
NheI (μL)	1
NEBuffer 2;1 (10X) (μL)	2
H2O (μL)	1

Après purification :

Yellow : 10ng/μL

On a fait une version du promoteur AraC compatible avec le plasmide Yellow par PCR, il est noté AraC_J tandis que l'AraC digéré pour le plasmide Limonene est noté AraC_L.

1^{ère} Ligation :

	eau	araC_J // araC_L 18,4 // 12 ng/μL		Jaune 10 ng/μL		Limonene 24 ng/μL		Tampon ligation	T4 DNA ligase
	Vol (μL)	Vol (μL)	m (ng)	Vol (μL)	m (ng)	Vol (μL)	m (ng)	Vol (μL)	Vol (μL)
A1	7	-	-	2	20	-	-	1	-
A2	7	-	-	-	-	2	48	1	-
B1	6	-	-	2	20	-	-	1	1
B2	6	-	-	-	-	2	48	1	1
C1	2,5	1	18,4	5,5	55	-	-	1	1
C2	0,5	3	36	-	-	4,5	108	1	1

2. Transformation

Pour faire nos transformations, nous avons utilisé le protocole suivant fourni par notre encadrant. Nous avons utilisé des bactéries compétentes achetées dans le commerce (<https://international.neb.com/products/c2987-neb-5-alpha-competent-e-coli-high-efficiency#Product%20Information>) :

- Thaw a tube of Competent *E. coli* cells on ice until the last ice crystals disappear. Mix gently and carefully pipette 50 μl of cells into a transformation tube on ice.
- Add 3 μl ligation product to the cell mixture. Carefully flick the tube 4-5 times to mix cells and DNA. **Do not vortex.**
- Place the mixture on ice for 30 minutes. Do not mix.
- Heat shock at exactly 42°C for exactly 30 seconds. Do not mix.
- Place on ice for 5 minutes. Do not mix.
- Pipette 950 μl of room temperature SOC into the mixture. (PUT SOC AT ROOM TEMP as soon as you get it from the green rack or heat it up at 37°C since you'll get it frozen)
- Place at 37°C for 60 minutes. Shake vigorously (250 rpm) or rotate.
- Warm selection plates to 37°C.
- Mix the cells thoroughly by flicking the tube and inverting
- Spread 200 μl onto a selection plate.
- Incubate.

On compte le nombre de colonies sur nos différentes plaques et on récupère quelques colonies de C1 pour effectuer des miniprep puis séquencer les plasmides récupérés pour vérifier si on obtient bien les plasmides que l'on voulait.

Autres méthodes de ce PSE

1. Miniprep

Pour récupérer les plasmides lorsqu'ils sont contenus dans des bactéries (on a récupéré comme cela notre plasmide Yellow au début du PSE et au cours du PSE pour séquencer et voir ce que l'on a comme plasmide), on utilise le kit Miniprep de QIAGEN : (<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/plasmid-dna/qiaprep-spin-miniprep-kit/>).

Le protocole utilisé est celui de QIAGEN que l'on peut retrouver à l'adresse ci-dessus.

2. Stockage des bactéries dans le glycérol

Nous avons du stocker nos bactéries dans du glycérol pour les conserver le plus longtemps possible au congélateur. Pour cela, nous avons réalisé des solutions de glycérol à 50% stérilisées par filtre.

On a ajouté 1ml de solution de bactéries concentrée à 1ml de cette solution de glycérol dans des tubes. Les bactéries sont alors dans une solution à 25% de glycérol.

On les stocke à -80°C.

3. Purification sur colonne

Le kit utilisé est celui de QIAGEN (<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/dna-clean-up/qiaquick-pcr-purification-kit/>). Le protocole peut être récupéré à l'adresse ci-dessus.

4. Purification sur gel

Pour les petites séquences d'ADN à purifier (comme celle de notre promoteur AraC), la purification sur colonne n'est pas très efficace. Il vaut mieux réaliser une purification sur gel.

Pour cela, nous avons réalisé un gel à électrophorèse selon le protocole suivant (donné par Yann Verdier pour les TP de Biologie de 1A):

- Ajouter 0,4g d'Agarose à 40ml de tampon TAE 1x.
- Chauffer au micro-ondes pendant 40s jusqu'à fusion complète de l'agarose.
- Laisser refroidir sur la paillasse.
- Ajouter 4 μ L de GelRed. Homogénéiser la solution. Couler la solution sur les supports. Placer le peigne. Laisser polymériser.
- Une fois le gel polymérisé, retirer les embouts et le peigne. Placer le gel dans la cuve à électrophorèse.
- Remplir la cuve de TAE 1x jusqu'à recouvrir le gel, chasser les éventuelles bulles d'air.
- Déposer les échantillons dans les différents puits ainsi qu'un marqueur de taille Ladder200.
- Fermer la cuve. Appliquer une tension de 80V pour un courant d'environ 40mA.