

On appelle « transgénèse » le transfert d'un gène à un organisme qui devient génétiquement modifié. Des bactéries d'une souche d'E. Coli sont transformées par le plasmide PUC 18 en utilisant la méthode du choc thermique afin qu'elles deviennent résistantes à un antibiotique, l'Ampicilline.

Un plasmide PUC 18 est un petit chromosome circulaire de la bactérie E. Coli modifié et contenant le gène de résistance.

On cherche à vérifier la réussite d'une transgénèse chez E. Coli.

Matériel :

Pour la préparation du plan stérile :

- réchaud électrique ou bec bunsen et allumettes ; papier absorbant, eau de Javel, savon antiseptique ; feuille de papier filtre stérile
- masque ; gants ; « poubelle » en verre avec fond d'eau de Javel, feutre, chronomètre

Pour la mise en culture :

- bain-marie réglé d'avance à 42 °C, avec support flottant à tubes Eppendorf (bloc polystyrène percé) ; cristalliseur avec glaçons
- support de table pour tube Eppendorf
- 2 tubes centrifugés d'E. coli marqués PUC+ et PUC-
- 2 boîtes de Pétri gélosées notées [amp-] contenant des microbilles stériles
- 2 boîtes de Pétri de gélose + ampicilline notées [amp+] contenant des microbilles stériles
- micropipette + embouts stériles (ou 4 pipettes Pasteur stériles)
- un microtube de 400 µL de milieu LB (*Luria broth*)
- un microtube de 15 µL de plasmide PUC 18
- un microtube de 500 µL de CaCl₂
- un microtube de 20 µL d'eau stérile

| Activités et conditions des activités | Capacités et principaux critères d'évaluation | Barème |
|--|---|----------|
| 1. Justifier l'utilité des conditions stériles pour réaliser une transgénèse chez des bactéries. (<u>Répondre pendant les temps d'attente du protocole</u>) | Comprendre la manipulation | 2 |
| 2. Après lecture du protocole fourni, préparer le plan de travail stérile. Appeler l'examineur pour vérification | Réaliser une manipulation d'après un protocole | 2 |
| 3. Réaliser la transgénèse en suivant les indications de la fiche protocole-candidat. Appeler l'examineur pour vérification et demander des boîtes en culture depuis 48 h à la fin de la manipulation | Respect des étapes Utilisation maîtrisée du matériel Organisation de la paillasse | 7 |
| 4. Construire un tableau de résultats traduisant vos observations dans les boîtes fournies (<u>préparer le tableau pendant les temps d'attente du protocole</u>). | Présenter des données sous forme d'un tableau | 5 |
| 5. Interpréter les résultats pour discuter la réussite de la transgénèse, et estimer son efficacité. | Adopter une démarche explicative | 3 |
| 6. Ranger le poste de travail en fin d'épreuve. | Gérer et organiser le poste de travail, respecter les consignes de sécurité | 1 |

PROTOCOLE DE REALISATION D'UNE TRANSGENESE**1) PREPARATION DU POSTE DE TRAVAIL STERILE****NB : Organiser** votre plan de travail pour manipuler proprement.

1. Se laver soigneusement les mains
2. Nettoyer le plan de travail à l'eau de javel
3. Disposer le matériel préalablement stérilisé sur une feuille de papier filtre A3 , autour du bec bunsen ou du bec électrique, ce qui matérialise le champ opératoire stérile

2) REALISATION DE LA TRANSGENESE

Deux tubes centrifugés d'une souche d' E.Coli non résistante à l'ampicilline, marqués PUC+ et PUC- vous sont fournis au départ de la manipulation.

On réalise deux tubes de préparations de cultures de bactéries avec (PUC+) ou sans plasmide (PUC-) selon le protocole qui suit (étapes 1 à 6).

Ces deux tubes serviront à ensemencer 4 boîtes de Pétri dont deux contiennent l'antibiotique Ampicilline [amp+] et deux sont sans antibiotique [amp-] selon le protocole qui suit (étape7).

| Les étapes de la réalisation | PUC + | | PUC - | |
|---|---|---|---|---|
| 1) Eliminer le surnageant des tubes centrifugés d'E.Coli en renversant le tube | oui | | oui | |
| 2) Ajouter le CaCl ₂ avec une micropipette | 0,2 mL = 200 µL | | 0,2 mL = 200 µL | |
| 3) Ajouter le plasmide avec une micropipette | 10 µL | | 0 | |
| 4) Ajouter de l'eau stérile avec une micropipette | 0 | | 10 µL | |
| 5) Réaliser le choc thermique : - placer les tubes dans la glace 10 minutes, - puis au bain-marie 42°C durant 90 secondes, - puis de nouveau dans la glace 10 minutes. | oui | | oui | |
| 6) Ajouter le milieu LB (<i>Luria broth</i>) avec une micropipette | 0,2 mL = 200 µL | | 0,2 mL = 200 µL | |
| 7) Ensemencer les 4 boîtes de Pétri avec le contenu des tubes de culture obtenus. Pour cela : - repérer au feutre chaque boîte par PUC+ ou PUC- , - prélever et placer dans une boîte le contenu du tube correspondant ci contre, - Faire rouler les billes en déplaçant la boîte à plat sur la paillasse selon un mouvement circulaire, pour répartir uniformément les bactéries, - Eliminer les billes en renversant la boîte sur le plan stérile, - Placer la boîte à l'envers après l'avoir refermée, - Répéter ces opérations pour les 4 boîtes. | 0,1 mL = 100 µL dans une boîte [amp+] | 0,1 mL = 100 µL dans une boîte [amp-] | 0,1 mL = 100 µL dans une boîte [amp+] | 0,1 mL = 100 µL dans une boîte [amp-] |

Les boîtes seront placées à l'envers, à l'étuve sous cellophane durant 24 h à 38 °C ou à température ambiante durant 48 h.

Des boîtes de culture après incubation vous seront fournies pour exploitation.