

## NOTICE TECHNIQUE

## Transgénèse bactérienne



Réf. : DT-01

Conception, réalisation, production :  
École de l'ADN - 30015 Nîmes, [www.ecole-adn.fr](http://www.ecole-adn.fr)

Édition :  
APBG - 69356 Lyon, [www.apbg.org](http://www.apbg.org)

Produit Français, fabriqué à Nîmes (Gard) conforme à la réglementation européenne.

Rédaction oct 2013, version 1309-RL

### 1- PRESENTATION

#### 1-1 OBJECTIF

Ce kit permet d'illustrer par la pratique, d'une part le principe de transgénèse et d'autre part les concepts de gène, de génotype et de phénotype. Il offre aussi la possibilité d'ouvrir la discussion sur la production de protéines recombinantes à usage thérapeutique (insuline ou hormone de croissance, par exemple), la technologie OGM, les antibiotiques, etc.

Il s'agit de transformer des bactéries de la souche *Escherichia coli* par le plasmide pUC18 en utilisant la méthode du choc thermique.

Un plasmide est un ADN circulaire bactérien qui existe à l'état naturel et que les bactéries sont capables de se transmettre, notamment par conjugaison. Les plasmides contiennent plusieurs gènes parmi lesquels figurent fréquemment des gènes de résistance. Ils se répliquent de façon autonome au sein de la cellule bactérienne et sont transmis à sa descendance au cours de la division cellulaire.

Certains plasmides sont utilisés dans les laboratoires à des fins de transgénèse bactérienne. Grâce aux enzymes de restriction, il est très facile d'y insérer des séquences d'ADN choisies qui seront ainsi produites, voire même dans certains cas, exprimées par la bactérie hôte. C'est cette technologie du génie génétique qui a permis, entre autre, la production d'insuline ou d'hormone de croissance humaine recombinante. Dans le protocole proposé, les bactéries sont transformées par un plasmide qui n'a pas été recombiné. Il conserve néanmoins sa capacité naturelle à transformer génétiquement une bactérie en lui conférant un génotype dont le phénotype est observable, en l'occurrence une résistance à un antibiotique, l'ampicilline. En effet, les bactéries transformées s'avèrent capables de croître sur un milieu qui contient l'antibiotique alors que les bactéries non transformées n'en sont pas capables.

#### 1-2 Méthodologie

Il s'agit de travaux pratiques comportant une phase expérimentale importante menée directement par l'élève avec des exigences de rigueur, d'habileté et de respect des principes d'hygiène et de sécurité. Une telle phase pratique se replace dans l'ensemble d'un raisonnement scientifique expérimental. Cette méthodologie, alliée à une technique, correspond très bien à l'optique du programme de seconde.

De plus, ce contact avec des aspects correspondant réellement à des processus de biotechnologie concourt à une orientation positive vers des études scientifiques, en particulier dans le domaine des sciences de la vie.

#### 1-3 Place dans les programmes

Ce kit s'accorde avec le nouveau programme de seconde dans le chapitre : « THÈME 1 – LA TERRE DANS L'UNIVERS, LA VIE ET L'ÉVOLUTION DU VIVANT : UNE PLANÈTE HABITÉE » au niveau « La nature du vivant ».

L'élève reconnaît dans un document le principe, les étapes, les résultats et l'intérêt escompté de la pratique d'une transgénèse. De même, dans un texte ou une étude expérimentale, il repère et explique en utilisant ses connaissances, les problèmes soulevés par l'utilisation des OGM. L'élève doit saisir le lien entre la transgénèse qui s'effectue au niveau cellulaire et sa traduction à l'échelle de l'organisme entier.

### 2- PRESENTATION DU KIT

Ce kit permet la réalisation de 50 expériences complètes.

#### 2-1 Constitution du coffret 50 postes

- 13 g de poudre de milieu de culture LB ;
- 64 g de poudre de milieu de culture LA ;
- 3 ml de solution de chlorure de calcium à 0,5 mol / l ;
- 1 tube de billes de verre ;
- 5 ml d'ampicilline à 20 g / l ;
- 700 µl de plasmide pUC18 ;
- 1 isolement d'*E.coli* sur boîte de pétri.

#### 2-2 Caractéristiques

- Les bactéries :  
Souche : *E. coli*, fournie en isolement sur milieu LA (1 boîte de pétri).
- Le plasmide pUC18 :  
Il exprime un gène de résistance à l'ampicilline (classe I des antibiotiques), solution à 10 microgrammes / ml, prête à l'emploi.
- Le chlorure de calcium :  
Solution à 0,5 mol / l, à diluer au 1 / 10ème et à autoclaver.
- L'ampicilline :  
Solution à 20 g / l, prête à l'emploi.
- Les milieux de culture :  
Fournis sous forme de poudre.
- Luria Broth (LB) : préparer une suspension de LB à 25 g / l d'eau distillée et autoclaver. Ce milieu liquide peut se conserver plusieurs semaines au réfrigérateur si les conditions de stérilité sont respectées.
- Luria Agar (LA) : préparer une suspension de LA à 40 g / l d'eau distillée et autoclaver. L'ampicilline doit impérativement être rajoutée, à (0,1 g / l), après l'autoclave et refroidissement du milieu à une température inférieure à 50°C. Le milieu est alors réparti sans attendre dans les boîtes de pétri. Les boîtes peuvent être conservées au réfrigérateur plusieurs semaines, emballées dans du papier cellophane, couvercle vers le bas, à condition de respecter les conditions de stérilité.
- Les billes de verre :  
Fournies dans le kit, à autoclaver avant usage.

#### 2-3 Conseils d'utilisation des réactifs :

- Stockage à température ambiante des milieux de culture en poudre LA et LB ainsi que des billes de verre.
  - Stockage à 2-8°C du chlorure de calcium et des boîtes d'*E.coli* (à repiquer tous les mois minimum).
  - Stockage à -20°C de l'ampicilline et du plasmide.
- Dans tous les cas se référer aux spécifications de stockage mentionnées sur l'étiquette.

### 3- PROTOCOLE

Matériels complémentaires nécessaires au laboratoire (non fournis):

- Microtubes 1,5 ml ;
- Boîtes de pétri diamètre 60 x15 mm ;
- Ensemencés stériles ;
- Liquipettes ou pipettes polypropylène 0,5 ml ;
- Micropipettes (facultatif : voir protocole expérimental alternatif) ;
- Microfuge (facultatif : voir protocole expérimental alternatif) ;
- Bain-marie (facultatif : voir protocole expérimental alternatif).

### Opérations préalables aux travaux pratiques

- Stérilisation du matériel et des réactifs  
Les billes de verre, les pointes de micropipettes, le chlorure de calcium et l'eau distillée doivent être stérilisés avant utilisation. La stérilisation peut être réalisée à l'aide d'un autoclave ou d'une cocotte minute (20 minutes après que la soupape chuchote).

- Préparation des milieux de culture :  
- Le milieu de culture LB s'utilise à la concentration de 25 g par litre d'eau distillée que l'on ajoute à la poudre avant de stériliser. Après stérilisation, le milieu est réparti pour l'expérimentation dans des tubes stériles à raison de 0,5 ml de milieu par tube. Il sera également utilisé pour la culture des bactéries préalable à l'expérimentation (prévoir un récipient stérile d'un volume cinq fois supérieur à celui de la culture désirée).

- Le milieu de culture LA s'utilise à la concentration de 40 g par litre d'eau distillée et doit être également stérilisé. Après stérilisation, lorsque le milieu atteint environ 50°C l'ampicilline peut être rajoutée à la concentration de 1 ml d'ampicilline pour 200 ml de milieu de culture (l'ampicilline ne doit en aucun cas être autoclavée). Les boîtes peuvent ensuite être coulées à raison de 6 à 7 ml de milieu par boîte. Les boîtes sans ampicilline peuvent être coulées immédiatement après stérilisation.

- Préparation des solutions :  
- Le chlorure de calcium doit être dilué au dixième avec de l'eau distillée, puis stérilisé avant d'être réparti dans des tubes stériles à raison de 0,5 ml par tube.  
- Le plasmide est prêt à l'emploi et doit être réparti à raison de 12 microlitres dans des tubes stériles.

- Préparation des bactéries :  
- Piquer une ou plusieurs colonies d'une boîte de pétri à l'aide d'un cure-dent ou d'un enseigneur stérile, puis enseigner (les mettre en culture) dans un flacon stérile contenant du milieu LB, à 37°C, de préférence sous agitation.  
- Au bout de 12 à 24h le milieu devient trouble. Répartir alors les bactéries à raison de 1 ml par tube stérile.

### 4- PREPARATION DE L'EXPERIMENTATION

#### 4-1 Préparation préalable de la séance

- Pour chaque poste, préparer préalablement la veille ou le jour même:
- 2 microtubes contenant 1 millilitre chacun de culture bactérienne (en milieu LB) ;
  - 1 microtube d'eau stérile (12 microlitres) ;
  - 1 microtube contenant 500 microlitres de chlorure de calcium à 5 mmol / l ;
  - 1 microtube contenant 12 microlitres de plasmide pUC18 ;
  - 1 microtube contenant 500 microlitres de milieu LB ;
  - 2 boîtes de pétri contenant le milieu LA sans ampicilline et 3 ou 4 billes de verre stériles ;
  - 2 boîtes de pétri contenant le milieu LA avec ampicilline et 3 ou 4 billes de verre stériles.

#### 4-2 Déroulement de la séance (manipulation par les élèves)

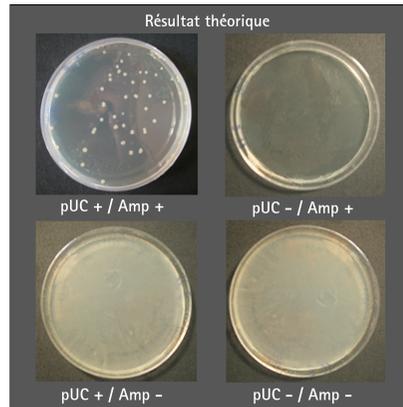
- Marquer un tube contenant la culture bactérienne « pUC + » ; marquer le second tube contenant la culture bactérienne « pUC - » ;

- Centrifuger les deux tubes « pUC + » et « pUC - » à 3 500 tours / minute, 3 à 4 minutes ;
- Eliminer le surnageant ;
- Prendre le culot bactérien dans :
  - tube « pUC + » : 200 microlitres de chlorure de calcium et 10 microlitres de pUC18 ;
  - tube « pUC - » : 200 microlitres de chlorure de calcium et 10 microlitres d'eau stérile ;
- Mélanger par retournements du tube ou par aspirations refoulements à l'aide de la micropipette. La suspension doit être homogène.
- Disposer les 2 tubes dans la glace pendant 10 minutes minimum ;
- Placer les 2 tubes au bain-marie à 42°C pendant précisément 90 secondes ;
- Replacer les 2 tubes dans la glace pendant 10 minutes minimum ;
- Rajouter 200 microlitres de milieu LB à chacun des deux tubes ;
- Ensemencer les boîtes de pétri en déposant :
  - 100 microlitres du tube « pUC + » dans une boîte avec ampicilline ;
  - 100 microlitres du tube « pUC + » dans une boîte sans ampicilline ;
  - 100 microlitres du tube « pUC - » dans une boîte avec ampicilline ;
  - 100 microlitres du tube « pUC - » dans une boîte sans ampicilline.
- Penser à identifier les boîtes.
- Faire rouler les billes sur la gélose en les agitant par glissement sur la paillasse pour bien étaler la suspension bactérienne ;
- Éliminer les billes ;
- Emballer sous papier cellophane les 4 boîtes et les incuber 24 heures à 37°C ou 48 heures à température ambiante, couvercle en bas ;
- Passé ce délai, stocker les boîtes au réfrigérateur jusqu'à ce que les élèves puissent les observer (emballées sous cellophane, les colonies se maintiennent six semaines).

#### 4-3 Résultats attendus

Dans les boîtes contenant l'ampicilline, les bactéries transformées par pUC18 forment quelques colonies éparées, les bactéries non transformées ne forment pas de colonies.

Dans les boîtes ne contenant pas d'ampicilline, les bactéries, qu'elles soient transformées ou non par pUC18, forment généralement des colonies confluentes (tapis de bactéries).



#### 4-4 Protocole expérimental alternatif

Ce protocole permet aux élèves de réaliser l'expérimentation dans d'excellentes conditions sans employer ni centrifugeuse, ni micropipettes, ni bain-marie.

- **Préparation préalable de la séance**

Pour chaque poste, préparer préalablement la veille ou le jour même:

- 1 microtube, marqué « pUC + », contenant 200 microlitres de chlorure de calcium 50 mM et 10 microlitres de pUC18 ;
- 1 microtube, marqué « pUC - », contenant 200 microlitres de chlorure de calcium 50 mM et 10 microlitres d'eau distillée stérile ;
- 1 microtube contenant 500 microlitres de milieu LB ;
- 2 boîtes de pétri contenant le milieu LA sans ampicilline et 3 ou 4 billes de verre stériles ;
- 2 boîtes de pétri contenant le milieu LA avec ampicilline et 3 ou 4 billes de verre stériles ;
- Quelques boîtes de pétri ensemencées d'E. coli (isolements).

- **Déroulement de la séance (manipulation par les élèves)**  
Prélever 3 à 4 colonies d'E.coli avec un ensemencement stérile à partir des isolements, puis les déposer dans les tubes « pUC + » et « pUC - ».

Mélanger par retournements successifs, 2 à 3 minutes, la suspension doit être homogène ;

Disposer les 2 tubes dans la glace pendant 10 minutes minimum ;

Placer les 2 tubes au bain-marie à 42°C pendant précisément 90 secondes (le bain-marie peut être préparé dans un cristalliseur en mélangeant eau chaude et eau froide en contrôlant la température grâce à un thermomètre) ;

Replacer les 2 tubes dans la glace pendant 10 minutes minimum ;

À l'aide de liquipettes ou de pipettes en polyéthylène, ajouter 200 microlitres environ de milieu LB à chacun des deux tubes (6 à 7 gouttes) ;

A l'aide de liquipettes ou de pipettes polyéthylène stériles, ensemencer les boîtes de pétri en déposant :

100 microlitres du tube « pUC + » dans une boîte avec ampicilline ;

100 microlitres du tube « pUC + » dans une boîte sans ampicilline ;

100 microlitres du tube « pUC - » dans une boîte avec ampicilline ;

100 microlitres du tube « pUC - » dans une boîte sans ampicilline.

100 microlitres équivalent à 3 à 4 gouttes de solution.

Faire rouler les billes sur la gélose en les agitant par glissement sur la paillasse pour bien étaler la suspension bactérienne ;

Éliminer les billes ;

Emballer sous papier cellophane les 4 boîtes et les incuber 24 heures à 37°C ou 48 heures à température ambiante, couvercle en bas ;

Passé ce délai, stocker les boîtes au réfrigérateur jusqu'à ce que les élèves puissent les observer (emballées sous cellophane, les colonies se maintiennent six semaines).

#### 5- CONSIGNES DE SECURITE

Ce kit de travaux pratiques a reçu l'agrément 4056 de la Commission du Génie Génétique L'utilisation de ce kit de travaux pratiques doit faire, de la part de l'établissement, l'objet d'une mise en conformité relative à l'usage des organismes génétiquement modifiés. Il est conseillé de respecter toutes les précautions de manipulation spécifiques aux laboratoires de Classe L1.

Les réactifs qui constituent ce kit pédagogique ne présentent aucun caractère dangereux, toxique ou pathogène. La fiche de sécurité MSDS est disponible, sur simple demande auprès de l'École de l'ADN.

Au début de chaque formation, il est néanmoins important de sensibiliser les élèves aux risques encourus lors des manipulations :

Mesures d'hygiène : se laver les mains avant et après l'expérimentation ;  
Se référer aux mesures de sécurité d'utilisation des appareils électriques et matériels ;

Utiliser les précautions d'usage pour toutes manipulations de produits dangereux ou toxiques.

En cas d'ingestion informez le médecin responsable ou contactez le centre antipoison le plus proche.

Précautions spécifiques :

Le port de gants et de la blouse est conseillé.

Les réactifs usagés ne doivent pas être répandus dans l'environnement. Tous les déchets doivent faire l'objet d'une récupération en vue d'une décontamination (javel à 4° de chlore ou autoclave).

Cette consigne est applicable pour tout objet souillé y compris les billes de verre, les pointes, les liquipettes...

La fiche de consigne de sécurité MSDS est disponible en ligne sur le site [www.ecole-adn.fr/MSDS](http://www.ecole-adn.fr/MSDS)

#### Contact commande

APBG - B.P. 8337  
69356 Lyon cedex 08  
tel 04 78 74 47 22  
fax 04 78 01 22 14  
[apbg@wanadoo.fr](mailto:apbg@wanadoo.fr)  
[www.apbg.org](http://www.apbg.org)

#### Informations Renseignements

Ecole de l'ADN  
19, Grand Rue  
BP 81295  
F-30015 Nîmes Cedex 1  
Tel/fax : +33 (0) 466 67 82 29  
E-mail : [patrice@ecole-adn.fr](mailto:patrice@ecole-adn.fr)  
[www.ecole-adn.fr](http://www.ecole-adn.fr)

DNATOOLS est une marque déposée par l'école de l'ADN

Action soutenue par

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

