

## NOTICE TECHNIQUE

### Le Génie Génétique : Produire des protéines recombinantes



Réf. : DT-02

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-LR

## 1- PRESENTATION

### 1-1 Objectif

Ce kit permet d'illustrer la fonction moléculaire des gènes et l'expression phénotypique des variations alléliques. La modification du génotype de la bactérie par un transgène GFP induit un phénotype particulier, observable à l'oeil nu. Mais surtout, il éclaire de manière simple, rapide et convaincante la technique de transgénèse telle qu'elle est employée pour la production de protéines recombinantes.

Des bactéries de la souche *Escherichia coli* sont génétiquement modifiées grâce à un vecteur plasmidique porteur du gène de la GFP (Green Fluorescent Protein), initialement isolé à partir de la méduse *Aequorea victoria*.

Une fois transformées les bactéries sont sélectionnées sur un milieu contenant de la kanamycine. Induite par IPTG, l'expression du gène de la GFP se traduit par une fluorescence verte produite par les colonies bactériennes.

### 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 et des objectifs de spécialité SVT de terminale S.

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

L'étude pratiquée à l'aide de ce kit s'accorde avec le programme de seconde, première, et TS spécialité « Les enjeux actuels des biotechnologies » :

« La transgénèse et la construction d'organismes génétiquement modifiés (OGM) »

L'élève reconnaît dans un document le principe, les étapes, les résultats et l'intérêt de la pratique d'une transgénèse pour la production de protéines recombinantes. La production de ces protéines par les méthodes de génie génétique est un procédé usuel dans la plupart des secteurs de la biotechnologie. Faisant appel à des méthodes maîtrisées, ce procédé permet l'obtention de protéines spécifiques, notamment d'intérêt thérapeutique, avec un très haut rendement. C'est cette technologie du génie génétique qui a permis, entre autres, la production d'insuline ou d'hormone de croissance humaine recombinantes.

## 2- PRESENTATION DU KIT

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

- 13 g de poudre de milieu de culture LB ;
- 64 g de poudre de milieu de culture LA ;
- 7 ml de solution de chlorure de calcium à 1 mol / l ;
- 1 tube de billes de verre ;
- 5 ml de kanamycine à 5 g / l ;
- 6,5 ml IPTG 10 mmol/l ;

- 0,6 ml de plasmide pGFP ;
- 1 isolement d'*E.coli* BL21 DE3 sur boîte de petri.

### 2-2 Caractéristiques

- Les bactéries :  
Souche : *E. coli* BL21 DE3, fournie en isolement sur milieu LA (1 boîte de petri) ;
- Le plasmide pGFP :  
Il exprime un gène de résistance à la kanamycine (classe I des antibiotiques) ;
- Le chlorure de calcium à 1 mol / l, à diluer au 1 / 10<sup>ème</sup> et à autoclaver ;
- Kanamycine : Solution à 5 g / l, prête à l'emploi ;
- IPTG : Solution à 10 mmol/l :prête à l'emploi ;
- Les milieux de culture (fournis prêts à l'emploi sous forme solide).
- 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. La kanamycine doit impérativement être rajoutée après l'autoclave. Le milieu est réparti dans les boîtes de petri avant qu'il ne refroidisse. 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 doivent être autoclavées avant usage.

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

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

## 3- PROTOCOLE

### 3-1 Matériels complémentaires nécessaires au laboratoire (non fournis):

- Microtubes 1,5 ml ;
- Microtubes 0,5ml ( facultatif )
- Boîtes de petri diamètre 60\*15 mm ;
- Ensemencateurs stériles ;
- Liqueur ou pipettes polypropylène 0,5 ml ;
- Micro-pipettes ;
- Microfuge ;
- Bain-marie .

### 3-2 Opérations préalables aux travaux pratiques

- Stérilisation du matériel et des réactifs

Les billes de verre, les pointes de micropipettes, les microtubes, 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 dans des tubes stériles à raison de 1 ml de milieu par tube.  
- 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, 1 ml de kanamycine à 5 g/l et 2 ml d'IPTG à 10mmol/l doivent être rajoutés à la même préparation pour 200 ml de milieu de culture (la kanamycine et l'IPTG ne doivent en aucun cas être autoclavés). Les boîtes peuvent alors être remplies à raison de 6 à 7ml de milieu par boîte.  
L'IPTG est un inducteur de la régulation du gène de la GFP. L'IPTG agit par inhibition de répression.

Bilan vous avez deux types de boîtes :

- Boîtes Kanamycine +/ IPTG + ;
- Boîtes Kanamycine - .

- 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 1 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 :  
**Attention, pour un rendement de transformation optimal nous recommandons de bien respecter les différentes phases de repiquage et de précultures présentées ci-dessous.**

- Effectuer un repiquage de l'isolement d'*E.coli* BL21 DE3 reçu dans le kit, sur une boîte de petri contenant une gélose LA sans kanamycine ni IPTG.
- Le lendemain, piquer une ou plusieurs colonies de votre isolement à l'aide d'un cure dents ou d'un ensemencateur stériles puis ensemencher (les mettre en culture) dans un flacon stérile contenant 5 ml de milieu LB à 37°C, de préférence sous agitation toute une nuit (le milieu doit être trouble);
- Le surlendemain prélever 1 ml de la solution de bactéries de la veille et l'ajouter à 100 ml de milieu LB, incubé sous agitation 3 heures à 37°C ;
- Aliquoter les bactéries à raison de 1,5 ml de bactéries par tubes de 1,5ml ;

## 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 1,5 millilitres de culture bactérienne (en milieu LB) ;
  - 1 microtube d'eau stérile (12 microlitres) ;
  - 1 microtube contenant 1 millilitre de chlorure de calcium 100 mmol / l ;
  - 1 microtube contenant 12 microlitres de plasmide pGFP ;
  - 2 boîtes de pétri contenant le milieu LA sans kanamycine et 4 ou 5 billes de verre stériles ;

- 2 boîtes de pétri contenant le milieu LA avec kanamycine + IPTG et 4 ou 5 billes de verre stériles.

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

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

- Centrifuger les deux tubes « pGFP + » et « pGFP - » à 3500 tours / minute, 5 minutes ;
- Éliminer le surnageant en l'aspirant à l'aide d'une micropipette tout en conservant le culot bactérien ;
- Ajouter 400 microlitres de CaCl<sub>2</sub> 100 mmol/l, par tube, mélanger au vortex, ou par aspirations / refoulements à l'aide d'une micropipette, jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène ;
- Centrifuger les deux tubes « pGFP + » et « pGFP - » à 3500 tours / minute, 5 minutes ;
- Éliminer le surnageant ;

Reprendre le culot bactérien dans :

- tube « pGFP + » : 80 microlitres de chlorure de calcium et 10 microlitres de pGFP, mélanger jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène ;
- tube « pGFP - » : 80 microlitres de chlorure de calcium et 10 microlitres d'eau stérile, mélanger jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène ;

Disposer les 2 tubes dans la glace pendant 30 minutes précisément ;

Placer les 2 tubes au bain-marie à 42°C pendant précisément 90 secondes (la transition entre les deux températures doit être la plus rapide possible).

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

Ensemencer les boîtes de pétri en déposant :

40 microlitres du tube « pGFP + » dans une boîte avec kanamycine + IPTG ;

40 microlitres du tube « pGFP + » dans une boîte sans kanamycine ;

40 microlitres du tube « pGFP - » dans une boîte avec kanamycine + IPTG ;

40 microlitres du tube « pGFP - » dans une boîte sans kanamycine.

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 ;

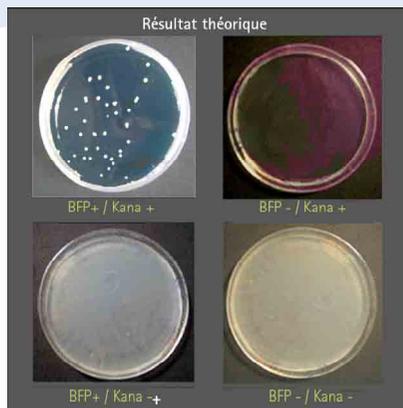
Emballer sous papier cellophane les 4 boîtes et les incuber 24 heures à 37°C ou 48 heures à température ambiante, couvercle en bas ;

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).

#### Résultats attendus

Dans les boîtes contenant la kanamycine, les bactéries transformées par pGFP forment quelques colonies éparées dont la coloration verte est observable sous lumière ultraviolette (elle est aussi visible à l'œil nu après plusieurs jours), les bactéries non-transformées ne forment pas de colonies.

Dans les boîtes ne contenant pas la kanamycine les bactéries transformées peuvent présenter quelques colonies vertes, en revanche les bactéries non-transformées forment généralement des colonies confluentes (tapis de bactéries) sans colonies vertes.



#### 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. Ce kit a fait l'objet d'un agrément auprès de la commission de génie génétique sous le n°4056.

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.

Les bactéries transformées et le plasmide 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



UNION EUROPÉENNE