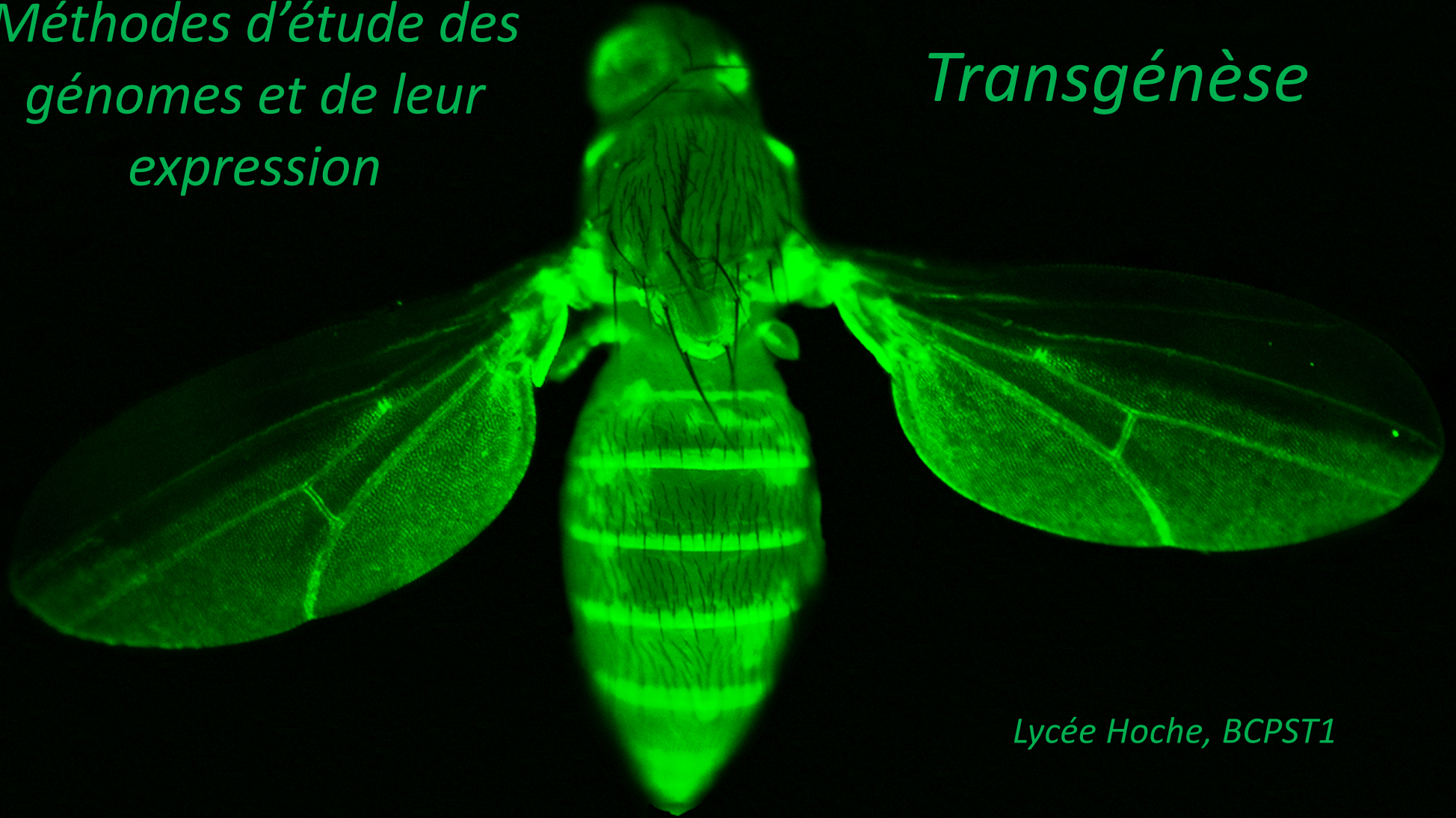


*Méthodes d'étude des  
génomés et de leur  
expression*

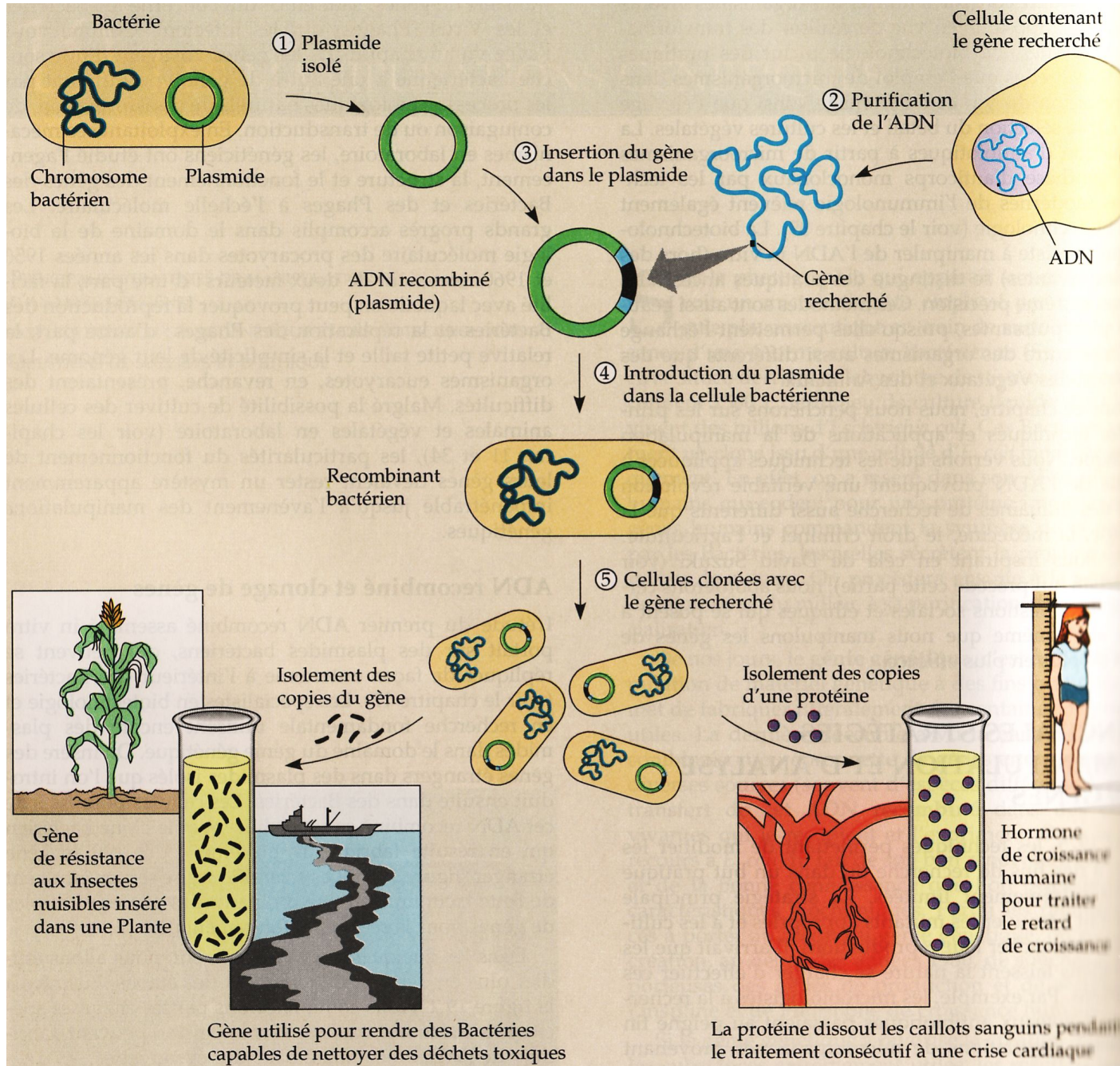
*Transgénèse*



*Lycée Hoche, BCPST1*

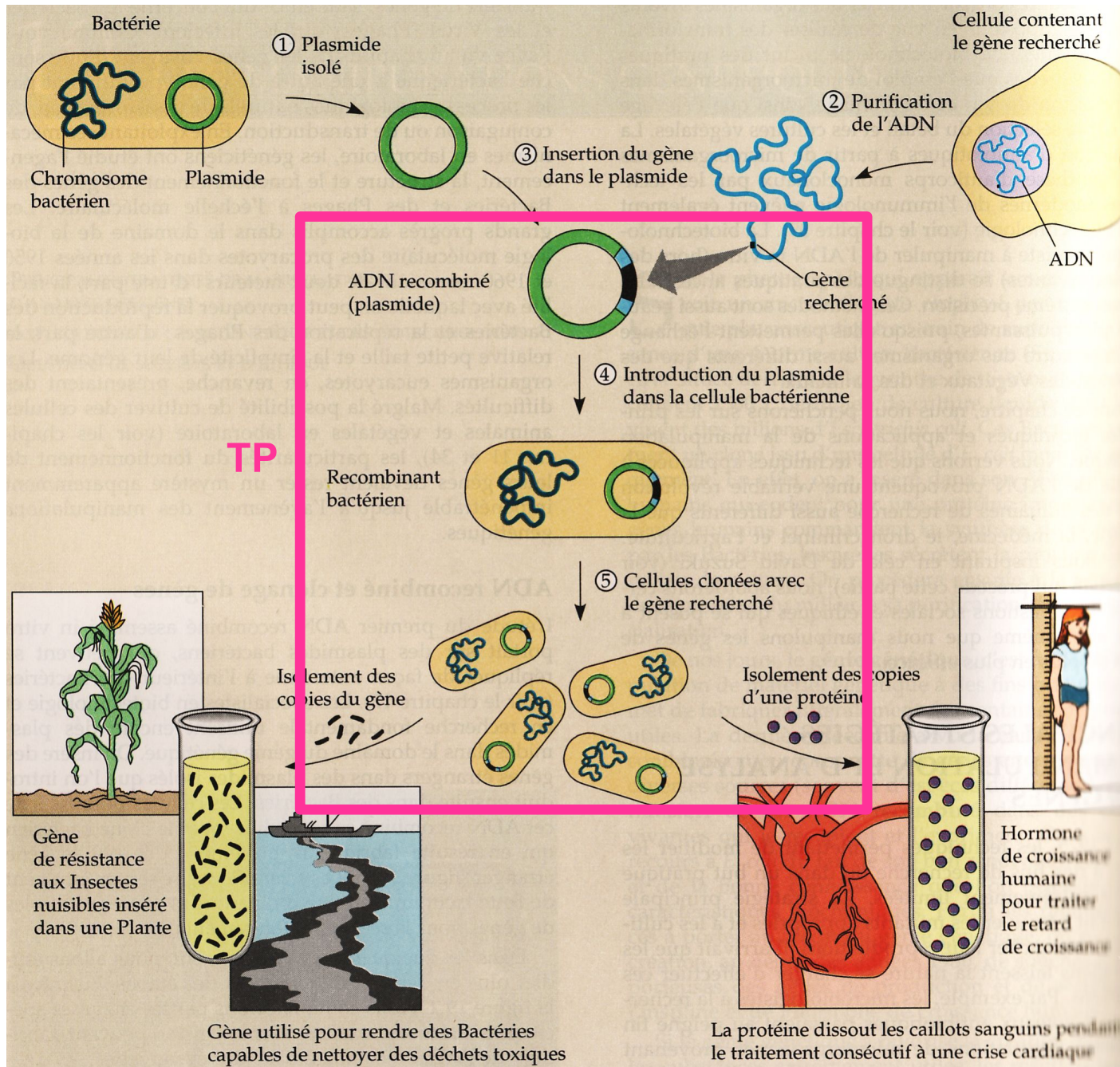


# I. Principe et applications de la transgénèse bactérienne

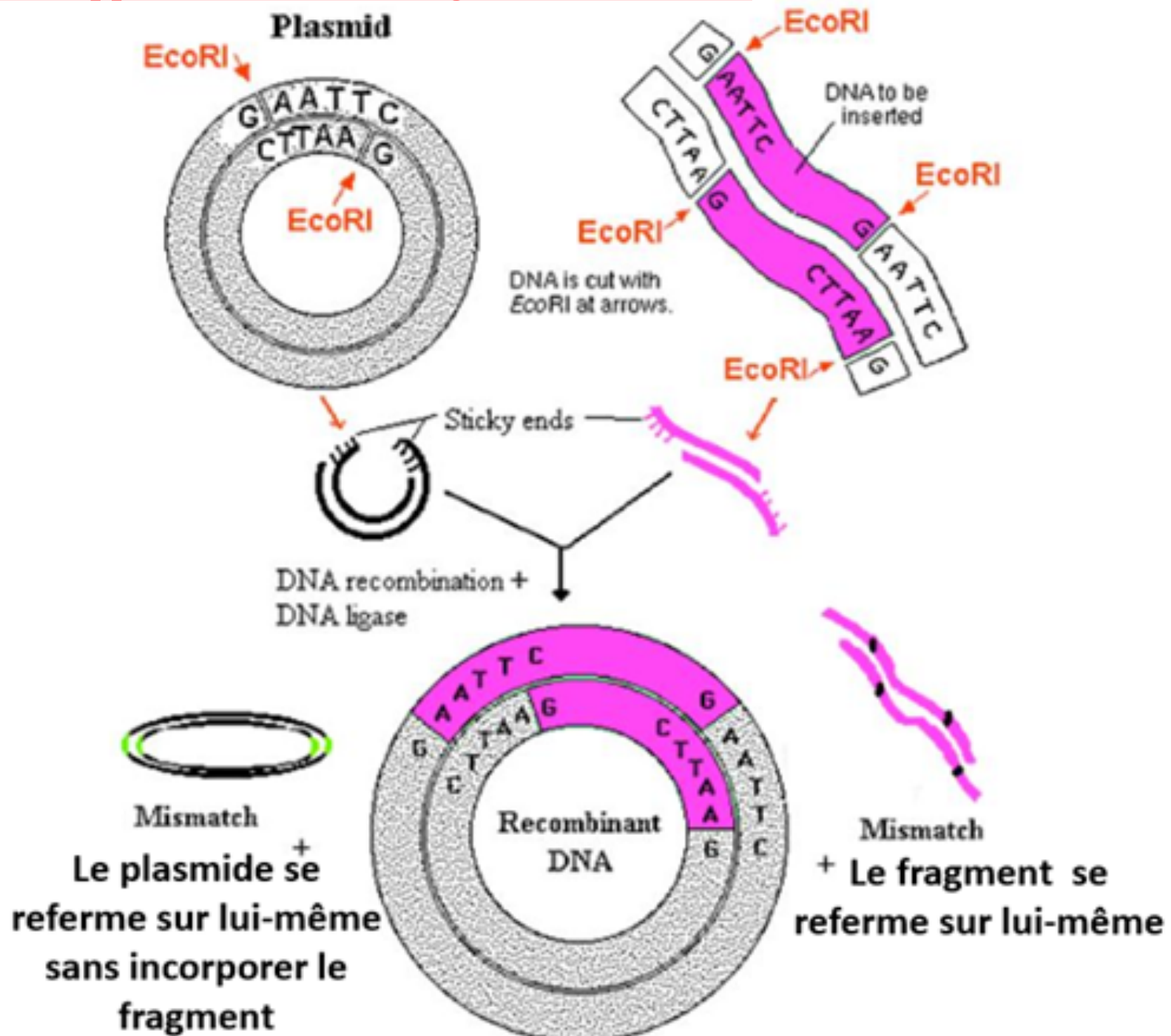




# I. Principe et applications de la transgénèse bactérienne

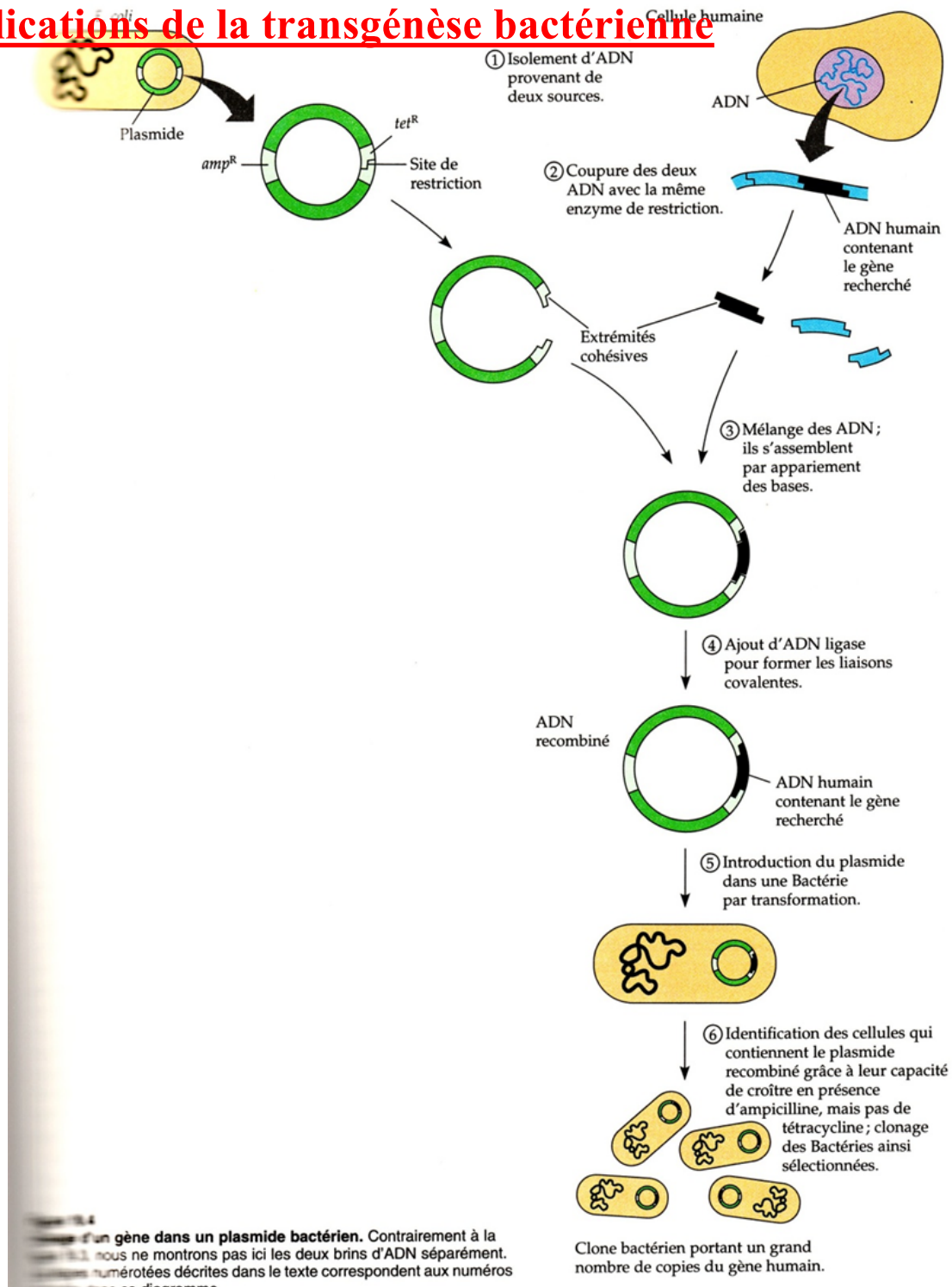


# I. Principe et applications de la transgénèse bactérienne



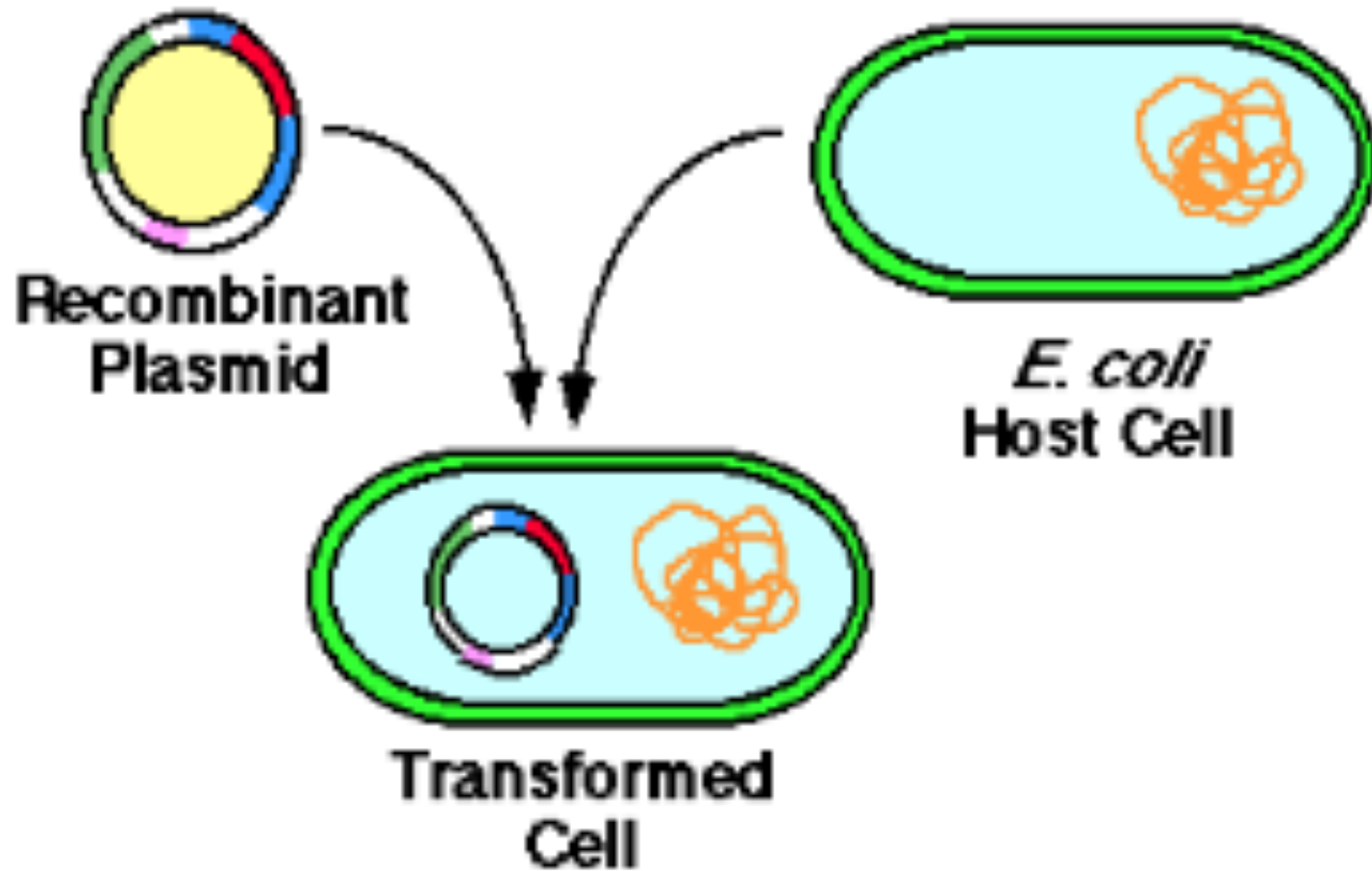


# I. Principe et applications de la transgénèse bactérienne

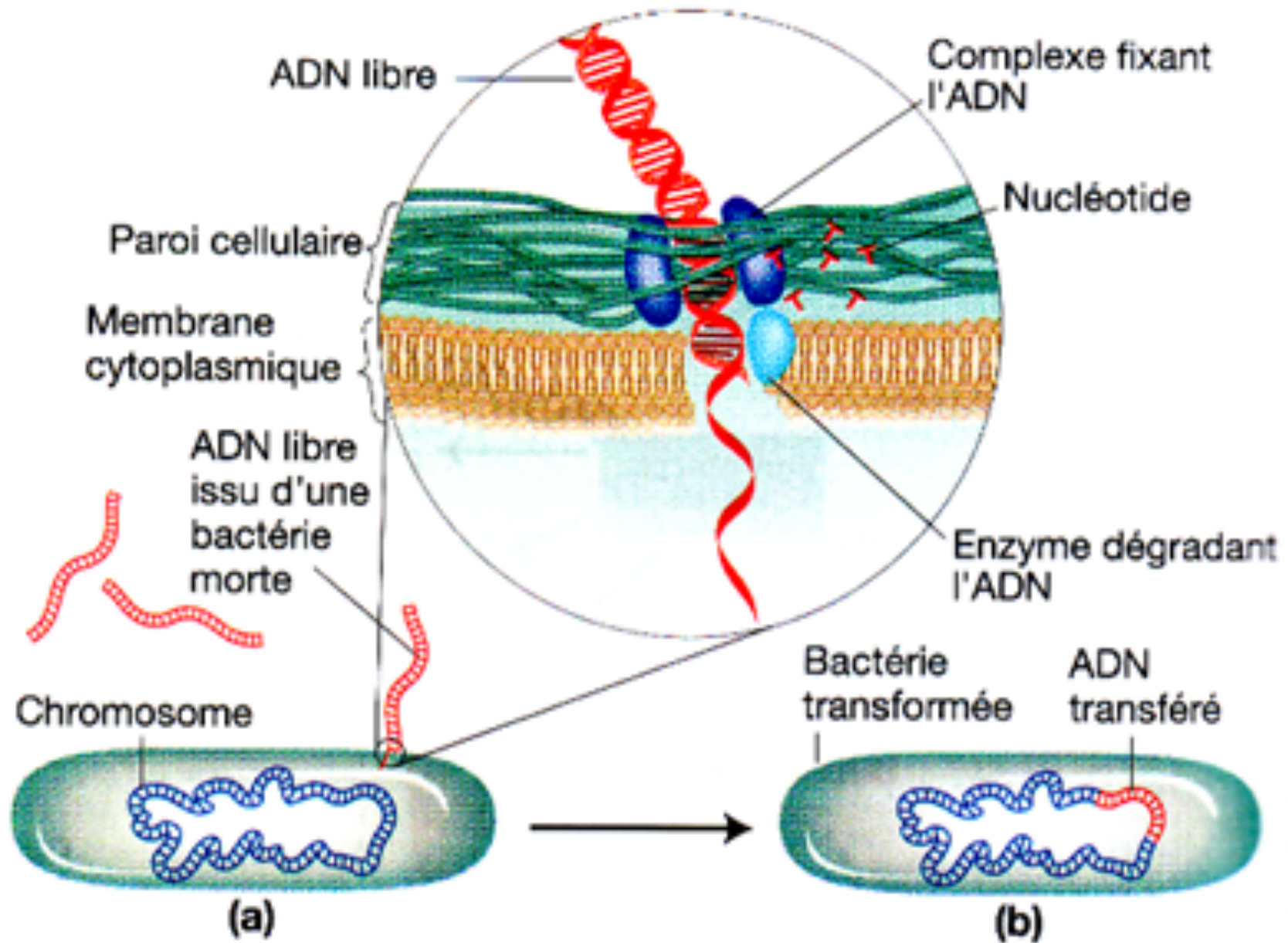


... d'un gène dans un plasmide bactérien. Contrairement à la ... nous ne montrons pas ici les deux brins d'ADN séparément. ... numérotées décrites dans le texte correspondent aux numéros ...

# I. Principe et applications de la transgénèse bactérienne



# I. Principe et applications de la transgénèse bactérienne



## II. Etude du plasmide pGLO

**Objectif** : analyser la séquence du plasmide pGLO

**Démarche** :

1. Ouvrir ou copier la séquence complète du plasmide dans **geniegen2**
2. Déterminer la **taille du plasmide**
3. Réaliser des **alignements de séquences** avec les séquences disponibles :
  - a) Séquence de la GFP (disponible dans geniegen2)
  - b) Séquence du promoteur pBAD-arabinose-promoter (séquence à charger dans geniegen2)
  - c) Séquence du gène BlaP codant une enzyme conférant une résistance à l'ampicilline (séquence à charger dans geniegen2)
4. Construire ainsi la **carte du plasmide pGLO** (positionner les 3 séquences identifiées)
5. Quel est **l'intérêt** de ces différentes séquences pour la **transgénèse**?

<https://www.pedagogie.ac-nice.fr/svt/productions/geniegen2/>







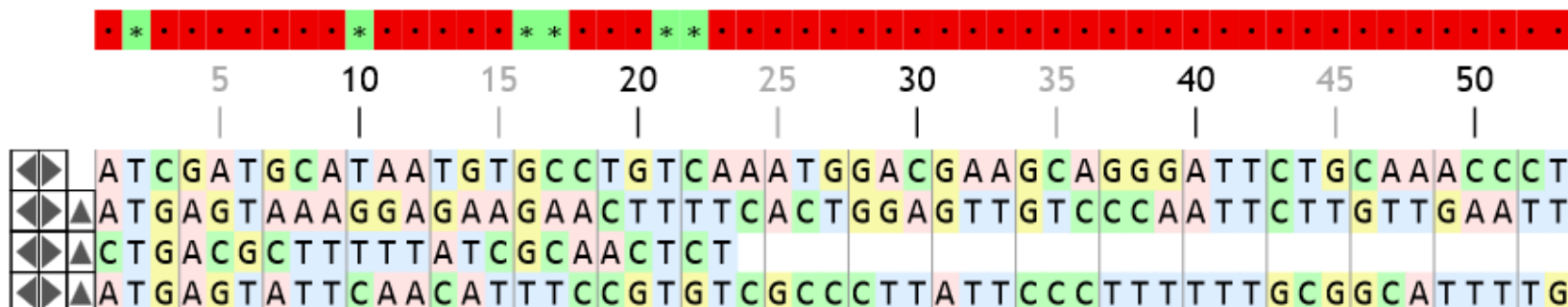


### Séquences chargées

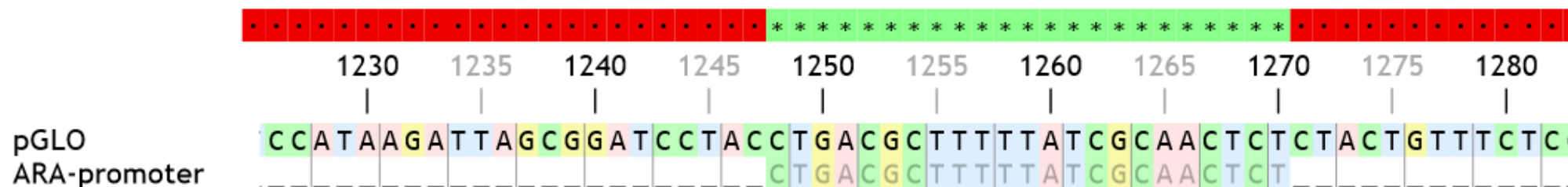
similaires  différentes

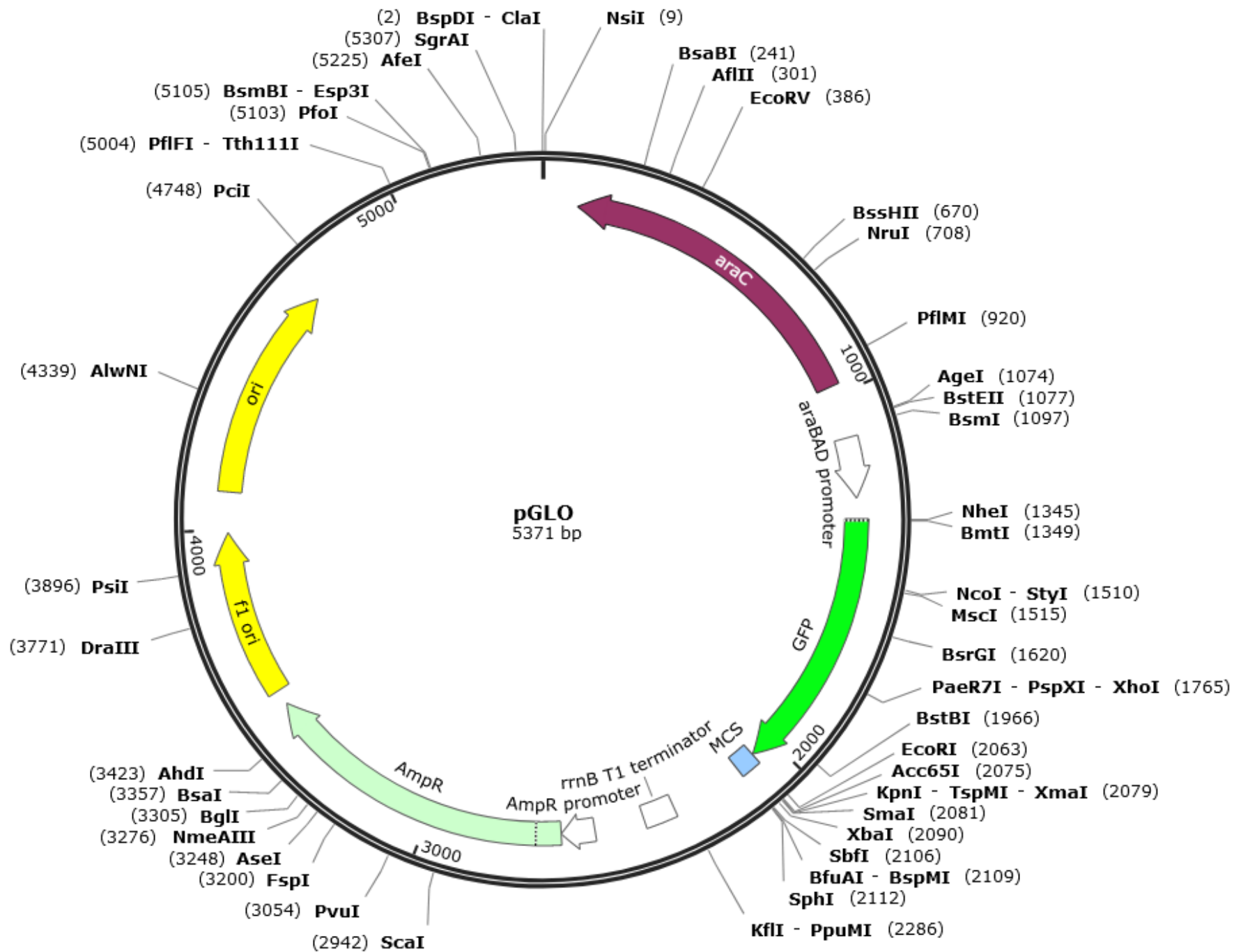


- pGLO
- GFP (A. victoria)
- ARA-promoter
- BLA lactamase

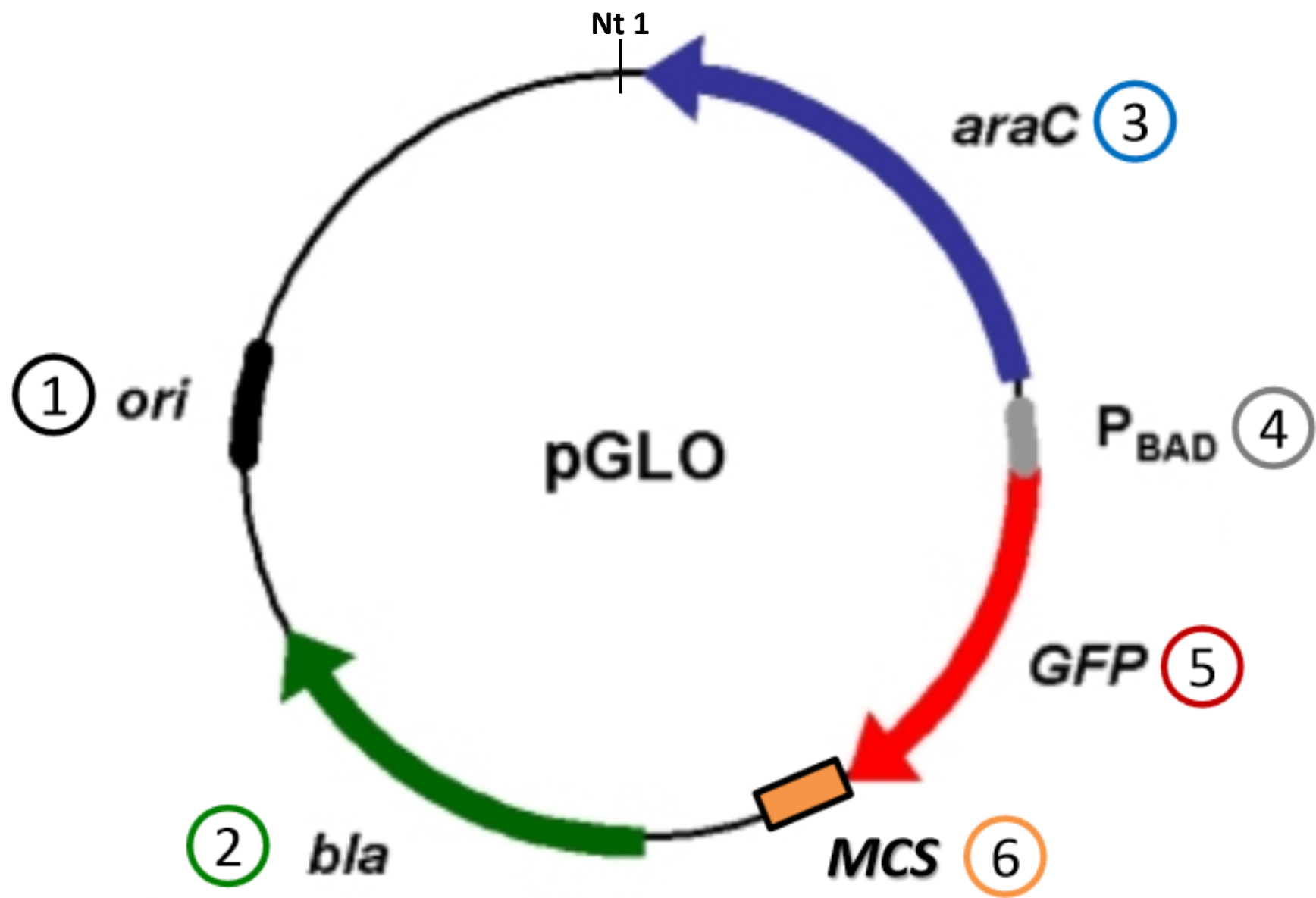


### Séquences alignées



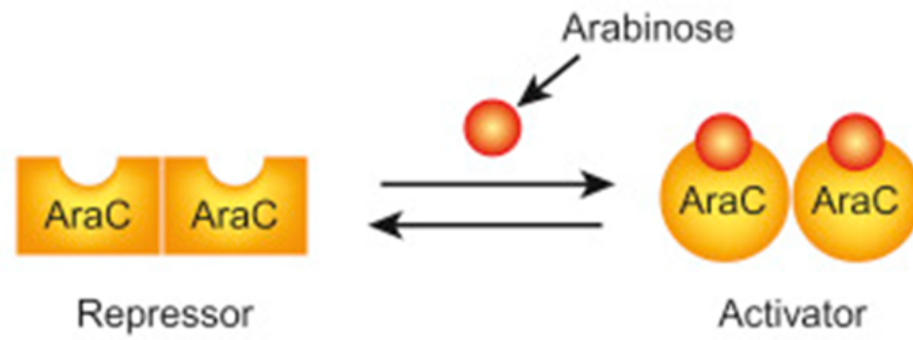




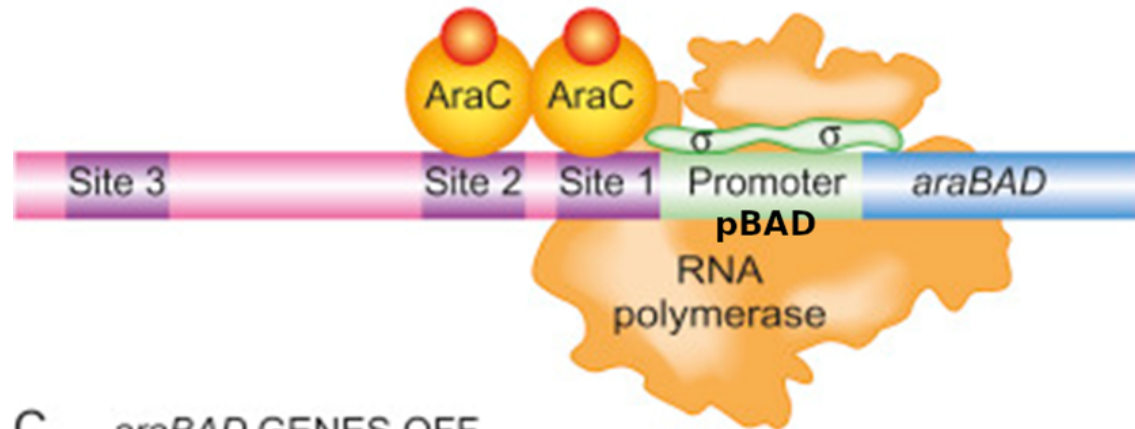


# Modèle de fonctionnement de l'opéron arabinose

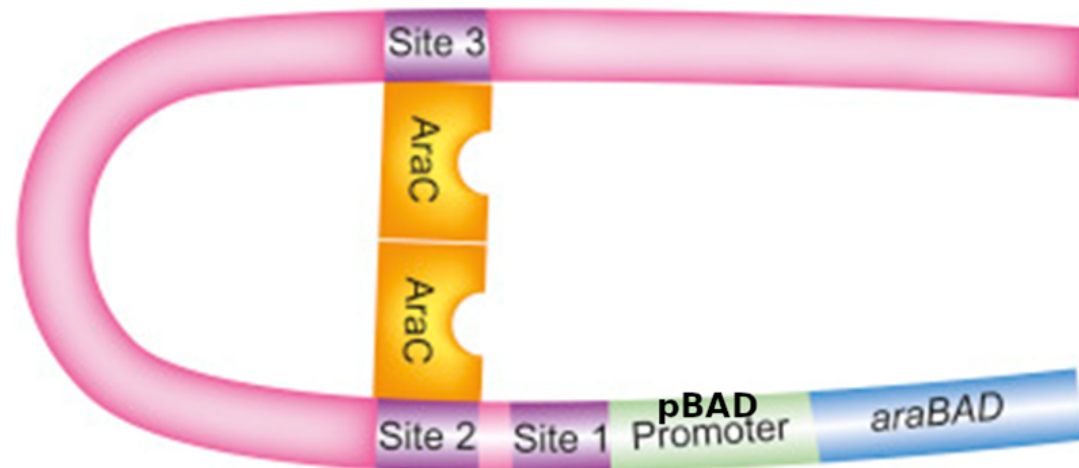
A



B *araBAD* GENES ON



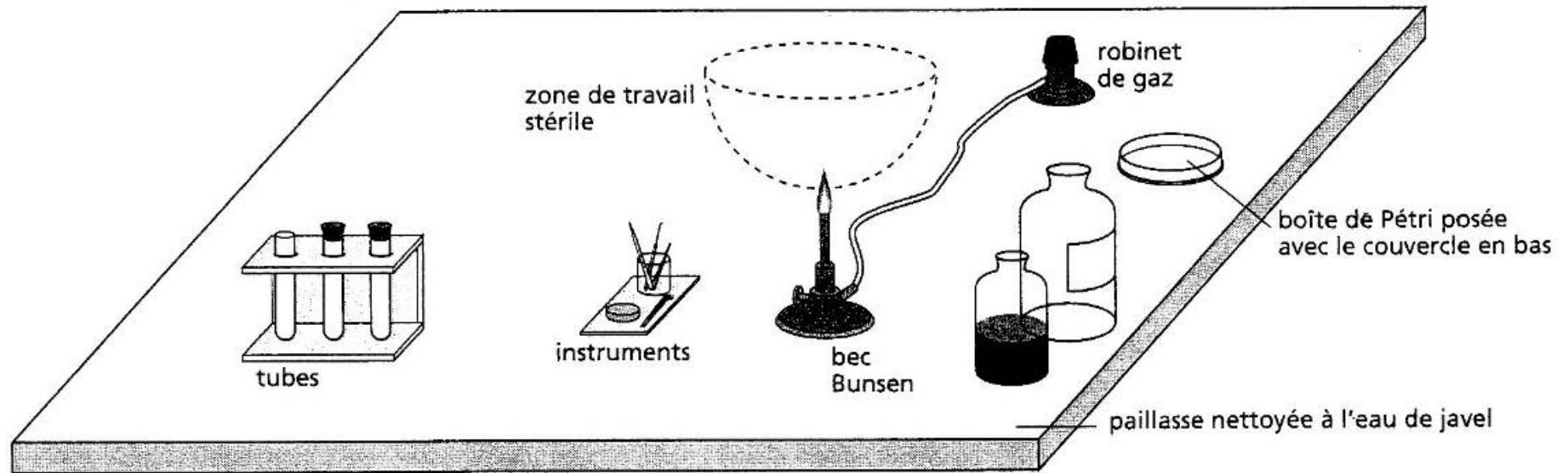
C *araBAD* GENES OFF





- ① **Origine de réplication du plasmide.** Nécessaire pour permettre aux plasmides de se multiplier au sein de la bactérie hôte.
- ② **Gène codant pour la  $\beta$ -lactamase conférant la résistance à l'Ampicilline.** Sélection des bactéries transformées.
- ③ **Opéron Arabinose.** En présence d'Arabinose il active le promoteur Pbad via un mécanisme assez complexe.
- ④ **Promoteur Pbad.** Un élément qui régule la transcription d'un gène situé généralement en aval (3') et donc l'expression de ce gène (ex. protéine).
- ⑤ **Gène codant pour la Green Fluorescent Protein (GFP).** Gène « rapporteur » permettant de visualiser et/ou mesurer l'expression d'un gène d'intérêt où la localisation d'une protéine (fusion à la GFP)
- ⑥ **Multiple Cloning Site.** Courte région de l'ADN où l'on retrouve des (souvent 10 à 20) sites reconnus par des enzymes de restriction. Ces sites sont généralement uniques sur le plasmide et facilitent donc le clonage. Ici, situé juste en aval du gène GFP, il permet éventuellement de fusionner un gène d'intérêt à la GFP.

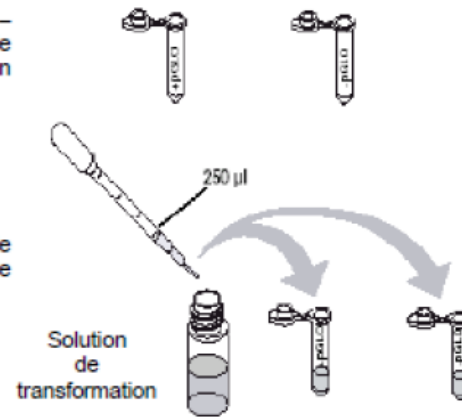
### III. Protocole de transgénèse bactérienne



toutes les manipulations nécessitant  
des conditions aseptiques sont réalisées  
dans le volume stérile dont la flamme  
du bec Bunsen constitue la base



1. Marquez un microtube fermé +pGLO et un autre -pGLO. Marquez les deux tubes avec le nom de votre groupe. Placez les dans le portoir en mousse.



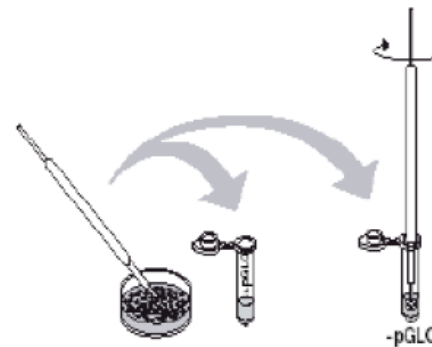
Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  neutralisent les charges négatives des phosphates de l'ADN, et des phospholipides de la membrane cellulaire, permettant ainsi à l'ADN d'entrer dans les cellules.

2. Ouvrez les tubes et, en utilisant une pipette de transfert stérile, transférez 250 µl de solution de transformation ( $\text{CaCl}_2$ ).

3. Placez les tubes sur la glace.

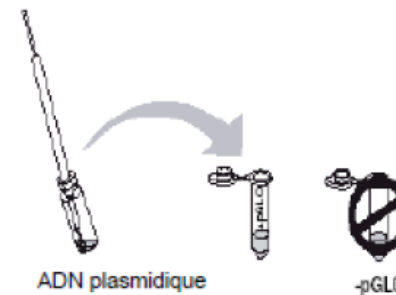


4. Utilisez un ensemenceur stérile pour prélever une seule colonie de bactéries de votre boîte. Prenez le tube +pGLO et immergez l'ensemenceur dans la solution de transformation, au fond du tube. Tournez l'ensemenceur entre votre index et pouce jusqu'à ce que la colonie entière soit dispersée dans la solution de transformation (sans morceaux flottants). Remplacez le tube dans le portoir dans la glace. En utilisant un nouvel ensemenceur stérile, répétez l'opération pour le tube -pGLO.



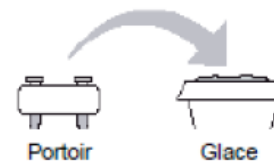
Ensemencement des 2 tubes avec des bactéries

5. Examinez la solution d'ADN plasmidique pGLO avec la lampe UV. Notez vos observations. Immergez un nouvel ensemenceur stérile dans le tube contenant l'ADN plasmidique. Retirez un ensemenceur plein. Il devrait y avoir un film de solution plasmidique dans l'anneau. Ceci revient à observer un film savonneux dans un anneau pour souffler des bulles de savon. Mélangez le contenu de l'anneau dans la suspension de cellules du tube +pGLO. Fermez le tube et remettez le dans le portoir sur la glace. Fermez aussi le tube -pGLO. N'ajoutez pas d'ADN plasmidique dans le tube -pGLO.

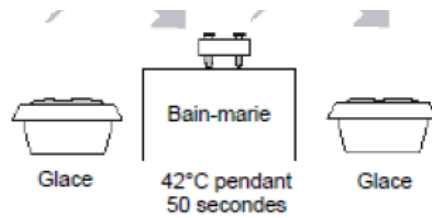


Transfert de l'ADN plasmidique dans la suspension bactérienne : étape délicate !!  
*Bien vérifier la présence d'un film de solution plasmidique dans l'anneau de l'ensemenceur*

6. Incubez les tubes sur la glace pendant 10 minutes. Assurez-vous d'enfoncer les tubes dans le portoir de manière à ce que le bas des tubes dépasse et fasse contact avec la glace.

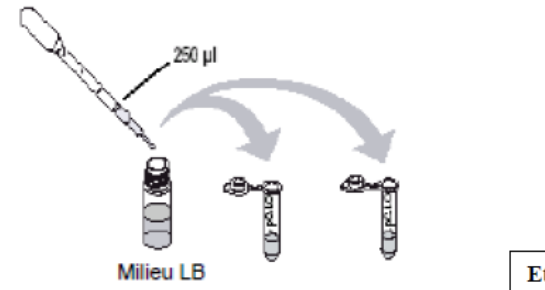


Choc thermique. En utilisant le portoir en mousse comme support, transférez les deux tubes +pGLO et -pGLO dans le bain-marie, réglé à 42°C, pendant exactement 50 secondes. Assurez-vous d'enfoncer les tubes dans le portoir de manière à ce que le bas des tubes dépasse et fasse contact avec l'eau chaude. Quand les 50 secondes sont écoulées, remplacez les deux tubes sur la glace. Pour les meilleurs résultats de transgenèse, le changement de la glace (0°C) à 42°C et ensuite le retour dans la glace doivent être rapides. Incubez les tubes sur la glace pendant 2 minutes.



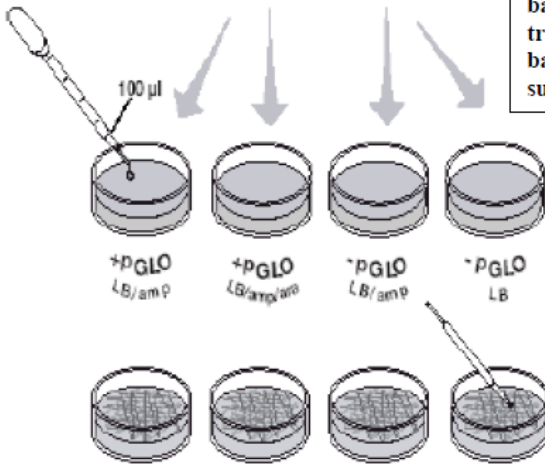
permettant la transformation bactérienne : le changement rapide de température et la durée du choc thermique sont très importants à respecter pour optimiser la transformation

Enlevez le portoir contenant les tubes de la glace et placez-le sur la paillasse. Ouvrez un tube et, en utilisant une nouvelle pipette stérile, ajoutez 250 µl du milieu nutritif LB dans le tube et refermez-le. Répétez avec une nouvelle pipette stérile pour l'autre tube. Incubez les tubes pendant 10 minutes à température ambiante.



Étalement des bactéries transformées et des bactéries contrôles sur les boîtes

Tapotez les tubes fermés avec votre doigt pour mélanger. En utilisant une nouvelle pipette pour chaque tube, pipetez 100 µl des suspensions de transformation et de contrôle sur les boîtes appropriées.

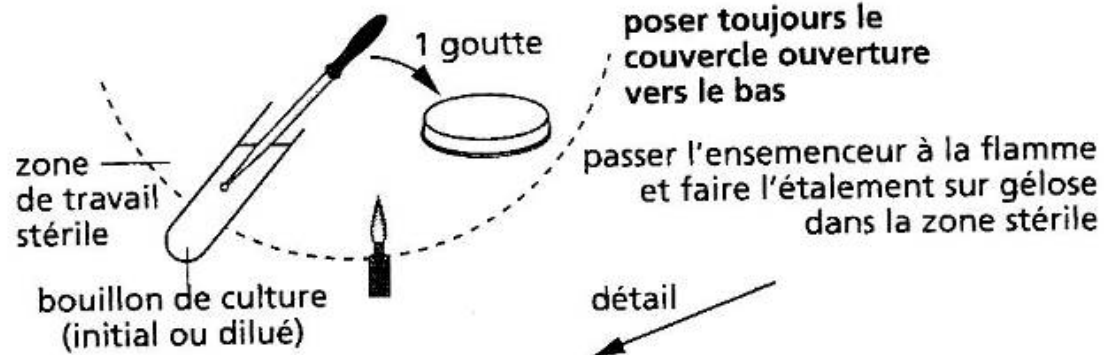


Utilisez un nouvel ensemencur stérile pour chaque boîte. Étalez les suspensions également sur la surface d'agar en balayant rapidement la surface plate d'un nouvel ensemencur stérile dans les deux sens sur la surface de la boîte.

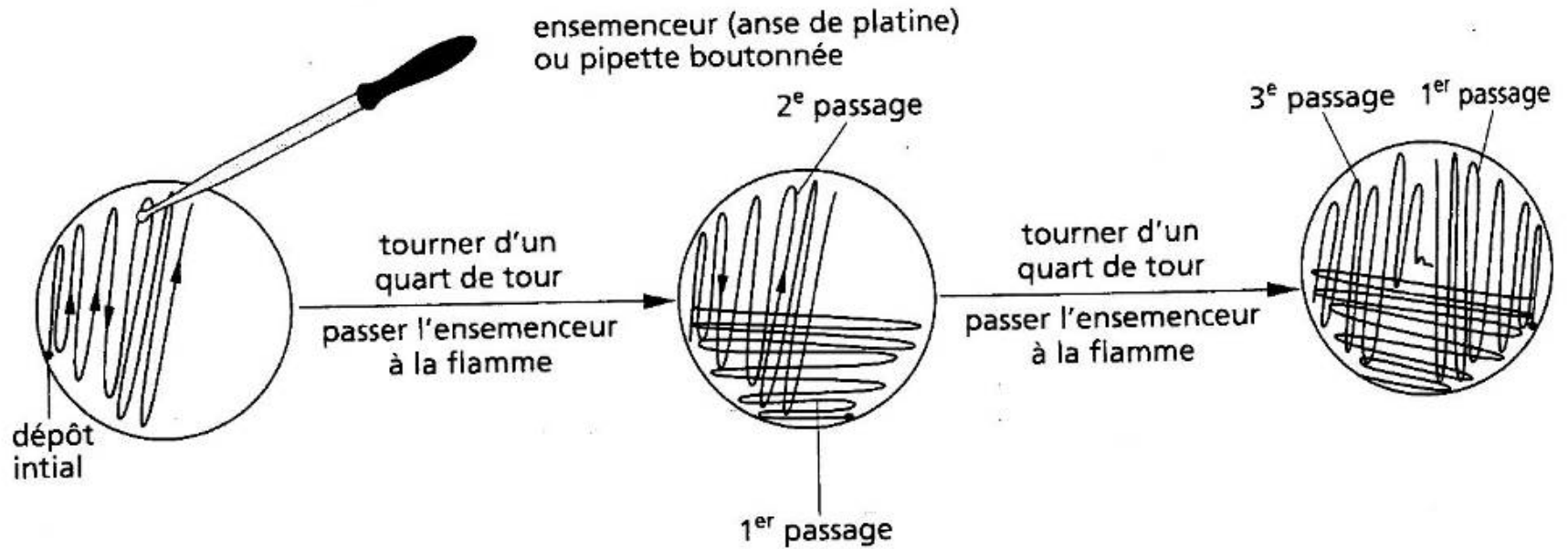
Empilez vos boîtes et rassemblez les. Mettez votre nom de groupe et classe sur le fond de la pile et placez la pile à l'envers dans l'incubateur à 37°C jusqu'au lendemain.



## ensemencement



## isolement





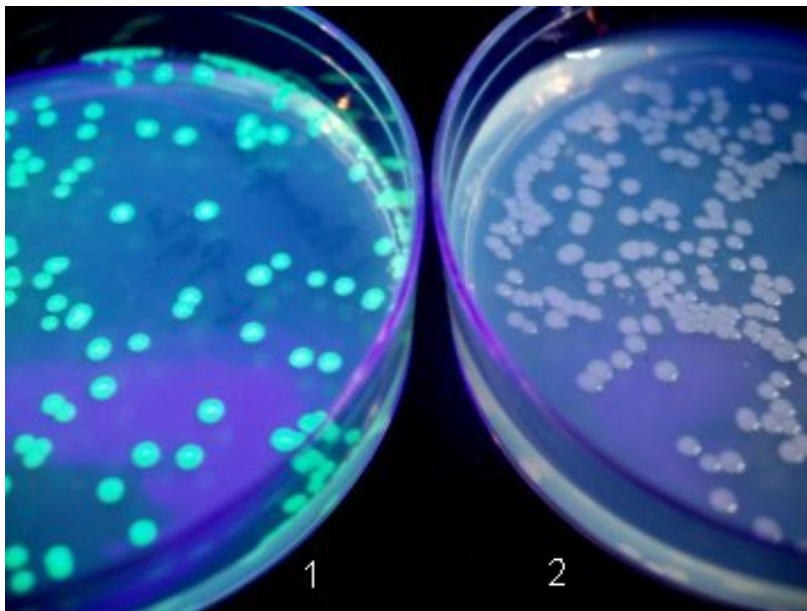
## Résultats attendus

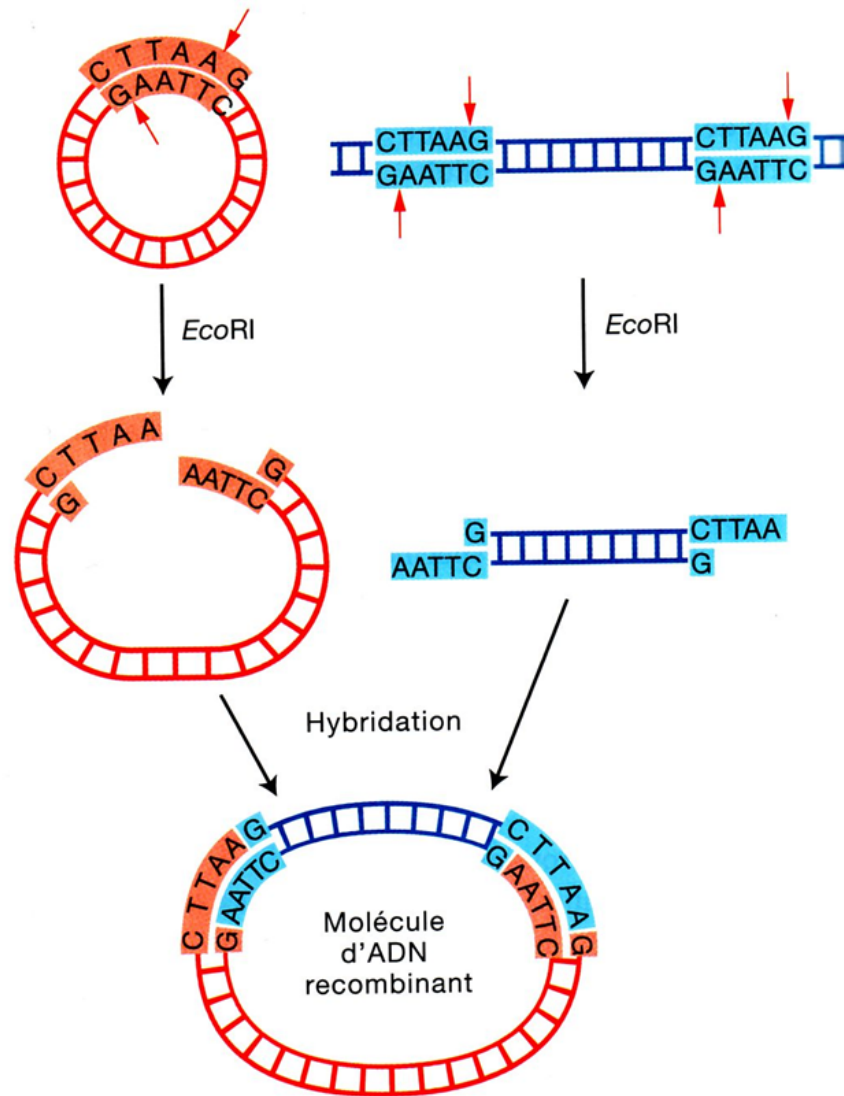
+pGLO sur ampicilline  
+ arabinose

+pGLO sur  
ampicilline

-pGLO sur  
ampicilline

-pGLO





**Figure 11-3 La formation d'une molécule d'ADN recombinant.**

L'enzyme de restriction *EcoRI* coupe une molécule circulaire d'ADN portant une séquence cible, ce qui produit une molécule linéaire avec des extrémités collantes simple-brin. Grâce à la complémentarité, d'autres molécules linéaires possédant des extrémités collantes produites par *EcoRI* peuvent s'hybrider avec l'ADN circulaire linéarisé, formant une molécule d'ADN recombinant.