Préparation Agrobactéries AGL1 thermocompétentes

Rédacteur : A. PITARCH et L. DUPONT
Date : 17.03.2020

Matériels, réactifs et équipements nécessaires

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Produits** | **Référence** | **Disponibilité - Localisation ?** |  |
| Poudres pour milieu YEB (hors beef extract) :yeast extract peptone saccharose MgCl2agar bactérie | / | Poudres disponibles dans le commun (laverie) |  |
| Poudres pour milieu YEB :Beef extract | Beef extract powder for microbiology – Sigma Fluka – ref B4888-50g | Par équipe |  |
| Poudre pour Cacl2 20mM :CaCl2 pur | / | Poudre disponible dans le commun (laverie) | Aliquot à préparer soit même |
| Ampicilline | Ampicillin sodium (Duchefa - A0104) | Poudre disponible dans le communmagasin antibiotiques | Aliquot à préparer soit même |
| Rifampicine | Rifampicin (Sigma- R3501) | Poudre disponible dans le communmagasin antibiotiques | Aliquot à préparer soit même |
| Souche AGL1 |  | Par équipe |  |

# Plan manip

J - X Préparation milieu YEB, CaCl2 20mM et antibiotiques

J+3 Préparation des aliquots thermocompétents

J+2 Pré-culture liquide

J0 Etalement agro sur boite

J+3 Culture liquide

J+3 Stockage -80°C

## Etape 1 Préparation milieu YEB pour agrobactéries (xx/xx/xx)

Préparation 400 ml de YEB - liquide

Préparation 100ml de YEB – agar

Dans une bécher peser les produits du tableau ci-dessous puis compléter avec le volume d’eau.
Agiter jusqu’à dissolution complète

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Produits pour YEB | Localisation | Quantité/1L | Quantité / 500mL |
| Beef extract | Equipe | 5g | 2,5g |
| yeast extract | Laverie | 1g | 0,5g |
| peptone | Laverie | 5g | 2,5g |
| saccharose | Laverie | 5g | 2,5g |
| MgCl2 | Laverie | 0,5g | 2,5g |
| H20mQ | Laverie | Qsp 1L | Qsp 500mL |

Préparer 2 bouteilles de 200mL de YEB liquide

Préparer 1 bouteille de 100mL « YEB-agar »
 (100ml YEB + 1,5g agar pour bactérie)

Autoclaver 15minutes à 121°C

## Etape 2 Préparation tampon CaCl2 0,2M 10X (xx/xx/xx)

Rq : la masse de CaCl2 pour obtenir 20mL à 20mM est trop faible. On va préparer une solution de CaCl2 à 200mM, concentrée au 10X. On diluera ensuite une partie de cette solution dans de l’H20mQ pour obtenir une solution à 20mM.

Calcul des quantités à mettre

CaCl2 pur disponible en laverie

Poids moléculaire = 110,99 g/mol
Molarité voulue = 200mM = 200mmol/L = 0,2mol/L
Volume souhaité = 20mL

Masse à peser (g) = Poids moléculaire (g/mol) x molarité (mol/L) x volume (L)

Masse à peser (g) = 110,99 g/mol x 0,2 mol/L x 0,02 (L) = 0,44g

Peser 0,44g de CaCl2 pur
Rajouter de l’H20mQ QSP 20mL
Homogénéiser

Autoclaver 15min à 121°C

Conservation bouteille à +4°C

## Etape 3 Préparation des antibiotiques (xx/xx/xx)

* Localisation des produits

Ampicillin sodium (Duchefa - A0104)🡪 magasin BM antibiotique
Rifampicin (Sigma- R3501)🡪 magasin BM antibiotique

* Protocole

Préparation ampicilline 1000X 100mg/mL : 250µL au minimum

Préparation rifampicine 1000X 50mg/mL : 250µL au minimum

* Voir protocoles disponibles sur l’intranet

## Etape 4 Etalement souche AGL1 sur boite (xx/xx/xx)

* Localisation des produits

Souches  agro AGL1 🡪 équipe

Rifampicine à 50mg/mL concentré 1000X 🡪 équipe
Ampicilline à 100mg/mL concentré 1000X 🡪 équipe

* Avant de commencer

Faire fondre 25mL de YEB-agar et laisser refroidir à 55°C
Décongeler la rifampicine (25µl) et l’ampicilline (25µl)
Allumer l’enceinte agitante à 28°C
Décongeler sur glace l’aliquot d’AGL1

* Protocole

Préparation 1 boite de YEB agar + ampi 100µg/mL + rifampicine 50µg/mL

25 mL YEB agar + 25 µL ampiciline [100mg/mL] + 25 µL rifampicine [50mg/ml]

Couler et laisser prendre.

Étalement en strie de la souche AGL1, bien étaler car les colonies sont grosses.

Incubation 48h à 28°C

## Etape 5 Pré-culture AGL1 (xx/xx/xx)

* Localisation des produits

Rifampicine à 50mg/mL concentré 1000X 🡪 équipe
Ampicilline à 100mg/mL concentré 1000X 🡪 équipe

* Avant de commencer

Décongeler la rifampicine (10µl) et l’ampicilline (10µl)
Allumer l’enceinte agitante à 28°C.
Vérifier la batterie du lecteur DO pour le lendemain

* Protocole

Préparation milieu de culture YEB + ampi 100µg/mL + rifampicine 50µg/mL

10 mL YEB agar + 10 µL ampiciline [100mg/mL] + 10 µL rifampicine [50mg/ml]
Diviser en deux erlens de 5mL (on double par précaution)

Mettre une colonie isolée dans chaque milieu.

Incuber la pré-culture 24h à 28°C, 220rpm

*Croissance lente, il faut bien laisser 24h pour avoir une bonne densité.*

## Etape 6 Culture AGL1 et préparation des aliquots thermocompétents (xx/xx/xx)

* Localisation des produits

Rifampicine à 50mg/mL concentré 1000X 🡪 équipe
Ampicilline à 100mg/mL concentré 1000X 🡪 équipe

CaCl2 0,2M 10X 🡪 4°C équipe
Azote 🡪 Sous-sol

* Avant de commencer

Préparer des boites et les mettre au -80°C
Décongeler la rifampicine (200µl) et l’ampicilline (200µl)
Allumer l’enceinte agitante à 28°C.

* Protocole

Préparation milieu de culture YEB + ampi 100µg/mL + rifampicine 50µg/mL

200 mL YEB agar + 200 µL ampiciline [100mg/mL] + 200 µL rifampicine [50mg/ml]
Puis diviser en 4 erlens de 50mL

Mettre de côté 1mL de milieu pour faire le blanc de la DO.

Transférer 1mL de la pré culture dans chaque erlen

Incuber à 28°C 220rpm, jusqu’à DO600 = 0,5 (entre 5h30 et 6h30).

Suivre la DO

|  |  |
| --- | --- |
| Temps d’incubation | DO à 600nm |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |

En attendant préparer CaCl2 à 20mM : 900µL H20mQ + 100µL CaCl2 0,2M puis le mettre à 4°C

Lorsque DO600 = 0,5 mettre les cultures dans la glace et faire refroidir la centri à 4°C

Centrifuger 15min à 5000rpm à 4°C

Pendant ce temps prendre de l’azote

Supprimer le surnageant et resuspendre chaque culot dans 1mL de CaCl2 20mM froid.

Aliquoter dans tubes Eppendorf en 50µL et flash freez dans l’azote liquide.

Stocker à -80°C

*Pour 200mL de culture on obtient environ 80 aliquots de bactéries.*