Préparation E.coli   
Top 10 et DH5 α   
thermocompétentes

Rédacteur : L. DUPONT & A.PITARCH  
Date : 25.03.2020

J+2 Préparation des aliquots thermocompétents

J+1 Pré-culture liquide

J0 Etalement sur boite

J+2 Culture liquide

J+2 Stockage -80°C

# Matériels, réactifs et équipements nécessaires

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Produits** | **Référence** | **Disponibilité - Localisation ?** |  |
| LB et LBagar | / | Disponibles dans le commun (laverie) |  |
| Poudre pour CaCl2 0,1M : CaCl2 pur | / | Poudre disponible dans le commun (laverie) | Aliquot à préparer soit même |
| Glycérol 80% | / | Glycérol 100% disponible dans le commun (laverie) | A préparer soit même |
| Azote | / | Disponible dans le commun (sous sol) |  |
| Souche *E.coli* TOP10/ DH5α | / | Par équipe |  |

# Plan manip

J - X Préparation CaCl2 0,1M et glycérol 80%

J+2 Préparation des aliquots thermocompétents

J+1 Pré-culture liquide

J0 Etalement souche *E.coli* sur boite

J+2 Culture liquide

J+2 Stockage -80°C

## Etape 1 Préparation tampon CaCl2 0,1M et glycérol 80% (xx/xx/xx)

**CaCl2 0,1M**

Calcul des quantités à mettre

CaCl2 pur disponible en laverie  
  
Poids moléculaire = 110,99 g/mol  
Molarité voulue = 0,1M = 0,1mol/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 0,1 mol/L x 0,02 (L) = 0,22g

Peser 0,22g de CaCl2 pur  
Rajouter de l’H20mQ qsp 20mL  
Homogénéiser

Autoclaver 15min à 121°C   
Conservation bouteille à +4°C

**Glycérol 80%**

80mL Glycérol 100% + 20mL H2OmQ  
  
Autoclaver 15min à 121°C   
Conservation bouteille à +4°C

## Etape 2 Etalement souche *E.coli* sur boite (xx/xx/xx)

* Localisation des produits

Souches Top10/ DH5α 🡪 Equipe

* Avant de commencer

Faire fondre 25mL de LB-agar et laisser refroidir à 55°C  
Allumer l’enceinte à 37°C  
Décongeler sur glace l’aliquot de Top 10

* Protocole

Préparation 1 boite de LB agar

Couler 25 mL LB agar en 1 boite et laisser prendre.

Étalement en strie de la souche Top 10.  
  
Incubation 24h à 37°C

## Etape 3 Pré-culture *E.coli* (xx/xx/xx)

* Avant de commencer

Allumer l’enceinte agitante à 37°C.  
Vérifier la batterie du lecteur DO pour le lendemain.  
Mettre des Eppendorfs et cônes au -20°C

* Protocole

Préparation milieu de culture LB :   
Deux erlens de 5mLde LB (on double par précaution)  
Mettre une colonie isolée dans chaque milieu.   
  
Incuber la pré-culture O.N à 37°C, 220rpm

## Etape 4 Culture *E.coli* et préparation des aliquots thermocompétents (xx/xx/xx)

* Localisation des produits

CaCl2 0,1M 🡪 équipe  
Glycérol 80% 🡪 équipe  
Azote 🡪 Sous-sol

* Avant de commencer

Préparer des boites pour le stockage et les mettre au -80°C  
Allumer l’enceinte agitante à 37°C.

* Protocole

Préparation milieu de culture LB : 2 erlens de 100mL de LB  
Mettre de côté 1mL de milieu pour faire le blanc de la DO.  
Transférer 1mL de la pré culture dans chaque erlen  
  
Incuber à 37°C 220rpm, jusqu’à DO600 = 0,5 (environ 2h). Suivre la DO

|  |  |
| --- | --- |
| Temps d’incubation ( en heure) | DO à 600nm |
|  |  |
|  |  |
|  |  |

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

Mettre les bactéries dans la glace pendant 10 minutes

Centrifuger 10minutes à 4000rpm à 4°C dans tubes falcons 50mL (4 tubes)

Pendant ce temps prendre de l’azote

Resuspendre très doucement chaque culot dans 500µL de CaCl2 0.1M froid (ou le premier dans 2mL et transvaser de tubes en tubes jusqu’au dernier).

Ajouter 125µL de glycérol 80% pour 500µL de suspension bactérienne (500µL pour 2mL de suspension)

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

Stocker à -80°C   
  
Pour 200mL de culture on obtient environ 40 aliquots de bactéries.