Transformation E.coli
TOP10 par choc thermique

Rédacteur : A.PITARCH
Date : 31.03.2020

### Matériels, réactifs et équipements nécessaires

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Produits** | **Référence** | **Disponibilité - Localisation ?** |  |
| LB et LB agar | / | Disponibles dans le commun (laverie) |  |
| Antibiotique(s) de sélection du plasmide (variable selon le plasmide utilisé) | variable selon le plasmide utilisé | Poudres disponibles dans le communmagasin antibiotiques : Ampicilline, Kanamycine, Streptomycine, SpectinomycinePoudre par équipe : chloramphénicol | Aliquot à préparer soit même |
| H20mQ stérile |  | Disponibles dans le commun (chambre froid et L2) |  |
| Miniprep / Produit de ligation / Mix clonage |  | Par équipe |  |
| Aliquots TOP10 thermocompétents |  | Par équipe |  |

## Etape 1 Préparation des antibiotiques

* Localisation des produits

Antibiotiques de sélection du plasmide (variable selon le plasmide utilisé)

 Ampicillin sodium (Duchefa - A0104)🡪 magasin antibiotiques
et/ou Kanamycine (Sigma- K4000) 🡪 magasin antibiotiques
et/ou Streptomycine (Sigma- S6501) 🡪 magasin antibiotiques
et/ou Spectinomycine (Fluka- PHR1441) 🡪 magasin antibiotiques
et/ou Chloramphénicol 🡪 équipe

* Protocole

Antibiotiques de sélection du plasmide (variable selon le plasmide utilisé)

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

et/ou Préparation kanamycine 1000X 50mg/mL : b µL au minimum

et/ou Préparation spectinomycine 1000X 50mg/mL : b µL au minimum

et/ou Préparation streptomycine 1000X 100mg/mL : b µL au minimum

et/ou Préparation chloramphénicol 1000X 12,5mg/mL : b µL au minimum

(b = 50µL x nombre de plasmide à transformer + 50µL + marge)

Voir protocoles disponibles sur l’intranet

## Etape 2 Transformation E.coli TOP10 par choc thermique

* Localisation des produits

Souches  TOP10 thermocompétente : équipe

Antibios :

Antibiotique(s) de sélection du plasmide (variable selon le plasmide utilisé) à xmg/mL concentré 1000X 🡪 équipe

Miniprep : équipe

* Avant de commencer

Faire fondre b mL de LBagar et laisser refroidir
Décongeler l’(les) antibiotique(s) de sélection du plasmide (b µl)
Allumer le bain marie à 42°C
Allumer l’enceinte agitante à 37°C

Décongeler les minipreps / le produit de ligation / le mix de clonage à transformer.

Protocole

Laisser décongeler sur glace d aliquots de TOP10 thermocompétents.
(d= nombre de plasmide à transformer + 1 x nombre d’antibiotique de sélection différent porté par les plasmides)

Si le produit à transformer est un plasmide :

Mixer 50µl de TOP10 compétentes avec 50ng à 200ng du plasmide à transformer (= g µL)
Mixer 50µl de TOP10 compétentes avec g µl H20mQ (témoin négatif)

Si le produit à transformer est un produit de ligation / un mix de clonage :

Mixer 50µl de TOP10 compétentes avec h µL du produit de ligation / mix de clonage
Mixer 50µl de TOP10 compétentes avec h µl H20mQ (témoin négatif)

h = volume recommandé dans protocole de ligation / de clonage

Tapoter doucement avec le doigt

Laisser reposer 30 minutes dans la glace

Incuber 30sec à 42°C

Rajouter 500µl de LB (RT)

Laisser incuber 1 heures à 37°C sous agitation

Pendant ce temps préparation milieu sur LB agar + antibiotique(s) de sélection plasmides xµg/mL

2 boites / plasmide à transformer + 2boites pour témoin négatif = e boites
e boites x 25mL LBagar 🡪 f mL LB agar

f mL LB agar + f µL antibiotique(s) de sélection[xmg/mL]

Couler e boites

Après solidification, laisser les boites à 37°C

Après les 1h d’incubation :

Si le produit à transformer est un plasmide :

Etaler 50µl sur la première boite
Etaler 200µl sur la deuxième boite

Si le produit à transformer est un produit de ligation / un mix de clonage :

Etaler 200µl sur la première boite
Etaler le reste sur la deuxième boite

Incuber 24h à 37°C

Résultats transformation :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Plasmides à transformer | Nombre de colonies pour 50µL étalé | Nombre de colonies pour 200µL étalé |
|  |  |  |
| Témoin - |  |  |

ou

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Produit ligation / mix clonage à transformer | Nombre de colonies pour 200µL étalé | Nombre de colonies pour restant étalé |
|  |  |  |
| Témoin - |  |  |

Procéder à la validation des clones obtenus par PCR sur colonies.