Transformation A.tumefasciens
AGL1 par choc thermique

Rédacteur : A.PITARCH
Date : 27.03.2020

### 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, B4888-50g) | Par équipe |  |
| 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 |
| Antibiotique(s) de sélection du plasmide (variable selon le plasmide utilisé) | variable selon le plasmide utilisé | Poudres disponibles dans le communmagasin antibiotiques : Kanamycine, Streptomycine, SpectinomycinePoudre par équipe : chloramphénicol | Aliquot à préparer soit même |
| Aliquots AGL1 thermocompétents |  | Par équipe |  |

## Etape 1 Préparation milieu YEB pour agrobactéries

Préparation a ml de YEB - liquide au minimum
(a= 0,5mL x nombre de plasmide à transformer + 0,5mL + marge)

Préparation b ml de YEB – agar au minimum
(b = 50mL x nombre de plasmide à transformer + 50mL + marge)

a + b = c

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

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Produits pour YEB | Localisation | Quantité pour 1L | Quantité pour c mL= Quantité pour 1L x (c/1000) |
| Beef extract | équipe | 5g | x g |
| yeast extract | Laverie | 1g | x g |
| peptone | Laverie | 5g | x g |
| saccharose | Laverie | 5g | x g |
| MgCl2 | Laverie | 0,5g | x g |
| H20mQ | Laverie | Qsp 1L | Qsp c mL |

Préparer x bouteilles de YEB liquide
 Répartir les a mL de YEB dedans

Préparer x bouteilles de « YEB-agar »
 Répartir les b mL de YEB dedans et rajouter de l’agar pour bactérie à raison de 15mg/mL

Autoclaver 15min à 121°C

## Etape 2 Préparation des antibiotiques (xx/xx/xx)

* Localisation des produits

Antibiotiques sélection agrobactéries

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

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

 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 sélection agrobactéries

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

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

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

 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 3 Transformation agrobactéries AGL1 par choc thermique

* Localisation des produits

Souches  AGL1 thermocompétente : équipe

Antibios :

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

+ Antibiotique(s) de sélection du plasmide (variable selon le plasmide utilisé) 🡪 équipe

Miniprep : équipe

* Avant de commencer

Faire fondre b mL de YEBagar et laisser refroidir
Décongeler la rifampicine (b µl) l’ampicilline (b µl) et l’(les) antibiotique(s) de sélection du plasmide (b µl)
Allumer le bain marie à 37°C
Allumer l’enceinte agitante à 28°C

Décongeler les minipreps à transformer.
Diluer ces dernières pour obtenir un aliquot de 10µL à 50ng/µL

Protocole

Laisser décongeler sur glace d aliquots d’agrobactéries compétentes.
(d= nombre de plasmide à transformer + 1)

Rajouter ≤100ng de plasmide/tubes :

Mixer 50µl d’agrobactéries compétentes avec 2 µl du plasmide à transformer dilué à 50ng/µL
Mixer 50µl d’agrobactéries compétentes avec 2 µl H20mQ (témoin négatif)

Tapoter doucement avec le doigt

Incuber 5min à 37°C

Rajouter 500µl de YEB

Laisser incuber 2 heures à 28°C sous agitation

Pendant ce temps préparation milieu sur YEB agar + ampi 100µg/mL + rifampicine 50µg/mL + antibiotique(s) de sélection plasmides xµg/mL

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

f mL YEB agar + f µL ampiciline [100mg/mL] + f µL rifampicine [50mg/ml] + f µL antibiotique(s) de sélection[xmg/mL]
Couler e boites

Après les 2h d’incubation :
Etaler 50µl sur la première boite
Centrifuger le reste à 5000g 5min, enlever du surnageant pour n’avoir plus que 100µL dans le tube, resuspendre les bactéries et étaler sur la seconde boite

Incuber 48h à 28°C

Résultats transformation :

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

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