**GENE402**

**Biologie moléculaire et génétique**

**Travaux Pratiques de Biologie Moléculaire**

**Séances 1 à 3**

**Année 2023-2024**

**REGLES D’HYGIENE ET DE SECURITE**

**Avant de manipuler** :

- **Mettre une blouse en coton** (lavable, javellisable et ininflammable).

- **Boutonner la blouse**. Les manches doivent être longues pour protéger les avant-bras reposant sur la paillasse. Ainsi la protection du manipulateur est efficace.

- **Enlever les bijoux** car ils sont sensibles aux produits chimiques.

- **Se laver les mains**.

- Ne pas toucher aux flacons de produits chimiques avant d’avoir été informé des précautions à prendre car les produits peuvent être dangereux.

- **Laver la paillasse** à l’éthanol et essuyer avec un chiffon de papier.

**Pendant les manipulations** :

- **Avoir un plan de travail net** et bien organisé pour que le travail soit plus sûr et plus facile.

- **Eviter le contact des produits** avec la peau, la bouche et les yeux.

- **Refermer les flacons des produits après utilisation** pour éviter les risques de renversements.

- **Marquer avec un feutre les produits et les préparations** afin de les identifier et de ne pas les mélanger.

- **Ne pas porter les mains à la bouche**, ne pas toucher les effets personnels.

- Il est **interdit de boire et de manger en salle de TP**.

**Après les manipulations** :

- Ranger la paillasse.

- Laver le plan de travail avec de l’éthanol. Essuyer au papier absorbant.

- **Se laver les mains**.

**Ces règles de base doivent être respectées et votre rigueur au travail sera prise en compte dans l’évaluation de ces séances de TP.**

**Initiation aux techniques de biologie moléculaire**

Ces trois séances de TP ont pour but de vous faire découvrir et acquérir des techniques utilisées dans un laboratoire de biologie moléculaire. L’évaluation de ces séances se fera de la manière suivante :

- une fiche par binôme rendue à l’issue de chaque séance et présentant les réponses aux questions (Q1, Q2, …) se trouvant dans les encadrés de ce document.

[3 x 15% de l’évaluation des TP

TP1 : Q1 à Q8

TP2 : Q9 à Q12

TP3 : Q13 à Q16]

- un compte-rendu par binôme pour l’ensemble des 3 séances. Vous déposerez ce document sur Moodle au plus tard le vendredi 19 avril 2024 à 16h00, au format PDF. Le nom du fichier devra suivre le modèle suivant : « NOM-1\_NOM-2\_GENE402.pdf ». Tout retard sera pénalisé, par la soustraction d’1 point sur la note obtenue par heure de retard.

[45% de l’évaluation des TP]

- vous serez également évalués au cours de chacune des 3 séances pour votre ponctualité, la qualité de vos expérimentations et pour le respect des consignes d’hygiène et de sécurité.

[10% de l’évaluation des TP]

**Programme des séances**

⮱ 1ère séance

- réalisation d’un clonage (ligation et transformation)

- étalement sur milieu gélosé des réactions de transformation et mise en culture

⮱ 2ème séance

- évaluation de l’efficacité de la réaction de clonage

- screening blanc-bleu

- screening PCR

- mise en culture en milieu liquide de colonies transformées et contenant l’insert

⮱ 3ème séance

- extraction du plasmide

- linéarisation du plasmide extrait

# Séance 1

### Milieu gélosé LB / X-Gal / IPTG / ampicilline

*Remarque : les milieux gélosés ont été préparés en amont de votre séance de TP. L’enseignant vous fournira 2 boîtes de pétri par binôme. Le protocole pour la réalisation de ces milieux gélosés est le suivant :*

Pour 200 mL de milieu, dans une bouteille autoclavable en verre contenant un barreau aimanté :

- peser 4 g de milieu de Luria-Bertani (LB)

- peser 3 g d’agar bactériologique

- ajouter 200 mL d’eau déminéralisée

Autoclaver 20 min à 121°C

Placer dans un bain thermostaté à 50°C et laisser « refroidir »

Lorsque la gélose a refroidi à 50°C, ajouter rapidement :

- 320 µL de solution de X-Gal à 50 mg mL-1

- 1,2 mL de solution d’IPTG à 20 mg mL-1

- 200 µL solution d’ampicilline à 100 mg mL-1

Placer sur l’agitateur magnétique pour mélanger

Couler **immédiatement** dans des boîtes de pétri et laisser refroidir

*Q1 : faire des recherches pour déterminer la composition du milieu de Luria-Bertani.*

*Q2 : calculer les concentrations finales de X-Gal, d’IPTG et d’ampicilline dans le milieu gélosé préparé. Vous les exprimerez en mg L-1 de milieu.*

*Q3 : faire des recherches pour identifier le rôle du X-Gal, de l’IPTG et de l’ampicilline dans le contexte du clonage.*

### Clonage – ligation

*Remarque : répartir les réactions entre les binômes pour que deux binômes réalisent le contrôle négatif, deux autres binômes réalisent le contrôle positif, et que les binômes restants (4 à 6 binômes selon les groupes) travaillent sur l’échantillon d’ADN à cloner*

1. Centrifuger brièvement le micro-tube de pGEM-T Easy Vector et le micro-tube de Control Insert DNA pour collecter la totalité des solutions au fond du tube

2. Vortexer vigoureusement le 2X Rapid Ligation Buffer

3. Préparer la réaction de ligation de la manière suivante, dans un tube de 1,5 mL

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Réactifs** | **Contrôle positif** | **Contrôle négatif** | **ADN amplifié** |
| Buffer 2X | 5 µL | 5 µL | 5 µL |
| pGEM-T Easy Vector | 1 µL | 1 µL | 1 µL |
| Echantillon à cloner | -- | -- | 3 µL |
| Control Insert DNA | 2 µL | -- | -- |
| T4 DNA ligase | 1 µL | 1 µL | 1 µL |
| Eau UP | 1 µL | 3 µL | -- |

4. Homogénéiser le milieu réactionnel par pipettage

5. Incuber environ 1 heure à température ambiante

*Q4 : quel est le rôle de la T4 DNA ligase dans la réaction de ligation ?*

*Q5 : expliquer pourquoi des contrôles positifs et négatifs sont réalisés en parallèle du clonage des échantillons.*

### Clonage - transformation

1. Centrifuger brièvement le tube contenant la réaction de ligation pour collecter la totalité du milieu réactionnel au fond du tube

2. Transférer 2 µL de la réaction de ligation dans un tube de 1,5 mL placé préalablement dans la glace

3. Sortir les cellules compétentes du congélateur à -70°C, les placer IMMEDIATEMENT dans la glace, et les laisser décongeler ABSOLUMENT dans la glace pendant 5 min. Mélanger en retournant le tube plusieurs fois

4. Ajouter 50 µL de cellules compétentes dans le tube de 1,5 mL contenant 2 µL de la réaction de ligation

5. Homogénéiser doucement en agitant le tube

6. Incuber le tube dans la glace pendant 20 min

7. Réaliser un choc thermique en incubant 45-50 sec dans un bain-marie à 42°C exactement

8. Incuber 2 min dans la glace

9. Ajouter 950 µL de milieu SOC préalablement réchauffé à température ambiante

10. Incuber 1h30 à 37°C sous agitation douce (150 rpm)

11. Etaler 2 aliquotes de 200 µL de la réaction de transformation sur 2 boîtes de pétri contenant la gélose LB/ampicilline/IPTG/X-Gal

12. Incuber 16 à 24 h à 37°C

*Q6 : expliquer le rôle des étapes 6-7-8 (choc thermique).*

*Q7 : quelle est la composition du milieu SOC, expliquer son rôle ici.*

*Q8 : compte-tenu de la composition de la gélose sur laquelle sont étalées les réactions de ligation – transformation, quels résultats sont attendus lors de la séance 2 pour les 3 types de réaction (contrôles négatifs et positifs, échantillon d’ADN)*

# Séance 2

### Mise en culture d’une colonie transformée

A l’aide d’un cure-dent, transférer une colonie transformée dans 500 µL de bouillon stérile LB + ampicilline. Incuber pendant 1h30 à 37°C sous agitation douce. A l’issue de l’incubation, transférer ces 500 µL de culture dans 100 mL de bouillon LB + ampicilline. Incuber une nuit à 37°C sous agitation douce.

*Q9 : pourquoi est-ce que le bouillon de culture utilisé contient de l’ampicilline ?*

### Screening PCR

Calculer la composition du milieu réactionnel à réaliser par échantillon sachant qu’il doit être composé des réactifs ci-dessous. Les concentrations des réactifs sont indiquées. Le volume final de la réaction est de 25 µL, et les concentrations finales à obtenir sont indiquées.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Réactif** | **Concentration stock** | **Concentration finale** |
| Eau |  | qsp 25 µL |
| Tampon PCR | 5x | 1x |
| MgCl2 | 25 mM | 1,5 mM |
| Amorce F | 10 µM | 0,5 µM |
| Amorce R | 10 µM | 0,5 µM |
| dNTPs | 10 mM | 1 mM |
| Taq polymérase | 5 U / µL | 0,04 U / µL |

Préparer dans un micro-tube suffisamment de milieu réactionnel pour réaliser 5 réactions de PCR par binôme (2 colonies : 1 bleue, 1 blanche ; 1 réaction témoin négatif sans ADN, et, un peu plus au cas où…). Centrifuger brièvement le micro-tube pour collecter la totalité du milieu réactionnel au fond du tube. Distribuer 3 x 25 µL dans les micro-tubes fournies. A l’aide d’un cure-dent, piquer les colonies à tester et introduire le cure-dent dans le milieu réactionnel, enlever le cure-dent et refermer le tube.

Placer les tubes dans le thermocycleur et appliquer le programme suivant :

Dénaturation initiale 94°C, 5 minutes

30 cycles standards Dénaturation 94°C, 1 minute

Hybridation 55°C, 1 minute

Elongation 72°C, 1 minute

Elongation finale 72°C, 5 minutes

*Q10 : Que signifie l’unité de concentration « X » ? Et l’unité « U » ?*

*Q11 : Quel est le rôle de chacun des réactifs dans la réaction de PCR ?*

*Q12 : Quels sont les résultats attendus pour chacun des 3 types de colonie testée ?*

*Les réactions d’amplification seront analysées par électrophorèse sur gel d’agarose et les résultats vous seront transmis rapidement après la séance 2.*

### Efficacité de la réaction de clonage et screening blanc-bleu

### Calculer l’efficacité de la réaction de clonage selon la procédure présentée.

# Séance 3

### Extraction de plasmide

1. Placer 2 mL de la culture bactérienne dans un micro-tube de 2 mL, et centrifuger 30 secondes à 11000 x g. Prélever le surnageant avec une pipette, en enlevant le plus de liquide possible, et le jeter dans la poubelle de paillasse.
2. Dans le même tube, répéter l’étape 1, jusqu’à avoir centrifugé 10 mL de culture bactérienne.
3. Ajouter 250 μL de tampon A1. Resuspendre les cellules dans ce dernier par aspiration -refoulement à l’aide d’une pipette et à l’aide du vortex. S’assurer qu’aucun amas de cellules ne reste visible.
4. Ajouter 250 μL de tampon A2. Mélanger en retournant le tube 6 à 8 fois. Incuber à température ambiante 5 minutes pour lyser les cellules.
5. Ajouter 350 μL de tampon A3. Mélanger par en retournant le tube 6-8 fois jusqu’à ce que le lysat devienne clair. Centrifuger 5 minutes à vitesse maximale (> 12000 x g).
6. Placer la colonne dans le tube collecteur
7. Ajouter le surnageant dans la colonne (maxi 700 µL). Centrifuger 1 minute à 11000 x g et jeter l’éluat.

*Facultatif : si le surnageant obtenu à l’étape 7 dépasse 700 µL, répéter les étapes 7*

1. Ajouter 500 μL de tampon AW. Centrifuger 1 minute à 11000 x g et jeter l’éluat.
2. Ajouter 600 µL de tampon A4. Centrifuger 1 minute à 11000 x g et jeter l’éluat.
3. Centrifuger 2 minutes à 11000 x g puis jeter le tube collecteur.

*Répéter l’étape 10 si la colonne est toujours humide*

1. Placer la colonne dans un micro-tube neuf et ajouter 50 μL de tampon AE. Incuber 1 minute à température ambiante. Centrifuger 1 minute à 11000 x g.
2. Conserver l’éluat (votre extrait de plasmide)

*Q13 : Quel est le principe de l’extraction de plasmide réalisée ?*

### Digestion du plasmide

Nous travaillerons avec 2 enzymes de restriction différentes : EcoRI et TaqI.

*Q14 : Rechercher la séquence du site de restriction de chacune de ces enzymes.*

Préparer la réaction, dans un volume final de 20 µL, pour qu’elle contienne :

**Enzyme TaqI**

1× de tampon d’enzyme de restriction, 0,25 µg µL-1 de BSA, 1 µL d’extrait de plasmide et 10 U d’enzyme TaqI

**Enzyme EcoRI**

1× de tampon d’enzyme de restriction, 0,25 µg µL-1 de BSA, 1 µL d’extrait de plasmide et 12 U d’enzyme EcoRI.

Incuber la réaction en bain thermostaté, puis inactiver l’enzyme en fonction des informations du tableau ci-dessous.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Enzyme** | **Tampon** | **Incubation** | **Inactivation** |
| EcoRI | Buffer H | 37°C, 1 heure | 65°C, 15 minutes |
| TaqI | Buffer E | 65°C, 1 heure | ------- |

*Q15 : Pour chacune des enzymes, combien de sites de coupure théorique attendez-vous ?*

*Q16 : Préciser le nombre de fragments attendus, et leur taille.*

*Les réactions de digestion seront analysées par électrophorèse sur gel d’agarose et les résultats vous seront transmis rapidement après la séance 3 (plasmide digéré avec chacune des 2 enzymes et non digéré).*