

On appelle « transgénèse » le transfert d'un gène à un organisme qui devient génétiquement modifié. Des bactéries d'une souche d'E. Coli sont transformées par le plasmide PUC 18 en utilisant la méthode du choc thermique afin qu'elles deviennent résistantes à un antibiotique, l'Ampicilline.

Un plasmide PUC 18 est un petit chromosome circulaire de la bactérie E. Coli modifié et contenant le gène de résistance.

On cherche à vérifier la réussite d'une transgénèse chez E. Coli.

Matériel :

Pour la préparation du plan stérile :

- réchaud électrique ou bec bunsen et allumettes ; papier absorbant, eau de Javel, savon antiseptique ; feuille de papier filtre stérile
- masque ; gants ; « poubelle » en verre avec fond d'eau de Javel, feutre, chronomètre

Pour la mise en culture :

- bain-marie réglé d'avance à 42 °C, avec support flottant à tubes Eppendorf (bloc polystyrène percé) ; cristalliseur avec glaçons
- support de table pour tube Eppendorf
- 2 tubes centrifugés d'E. coli marqués PUC+ et PUC-
- 2 boîtes de Pétri de gélose + ampicilline notées [amp+] contenant des microbilles stériles
- 2 boîtes de Pétri gélosées sans ampicilline notées [amp-] contenant des microbilles stériles
- micropipette + embouts stériles (ou 4 pipettes Pasteur stériles)
- un microtube de 400 µL de milieu LB (*Luria broth*)
- un microtube de 15 µL de plasmide PUC 18
- un microtube de 500 µL de CaCl₂
- un microtube de 20 µL d'eau stérile

Activités et conditions des activités	Capacités et principaux critères d'évaluation	Barème
1. Justifier l'utilisation des deux milieux gélosés, avec et sans ampicilline, pour sélectionner les bactéries transformées par PUC18 (Répondre pendant les temps d'attente du protocole).	Comprendre la manipulation	2
2. Après lecture du protocole fourni, préparer le plan de travail stérile. Appeler l'examineur pour vérification	Réaliser une manipulation d'après un protocole	2
3. Réaliser la transgénèse en suivant les indications de la fiche protocole-candidat. Appeler l'examineur pour vérification et demander des boîtes en culture depuis 48 h	Respect des étapes Utilisation maîtrisée du matériel Organisation de la paillasse	7
4. Construire un tableau de résultats traduisant vos observations dans les boîtes fournies (préparer le tableau pendant les temps d'attente du protocole).	Présenter des données sous forme d'un tableau	5
5. Interpréter les résultats pour discuter la réussite de la transgénèse, et estimer son efficacité.	Adopter une démarche explicative	3
6. Ranger le poste de travail en fin d'épreuve.	Gérer et organiser le poste de travail, respecter les consignes de sécurité	1

PROTOCOLE DE REALISATION D'UNE TRANSGENESE

1) PREPARATION DU PLAN DE TRAVAIL STERILE

NB : Organiser votre plan de travail pour manipuler proprement.

1. Se laver soigneusement les mains
2. Nettoyer le plan de travail à l'eau de javel
3. Disposer le matériel préalablement stérilisé sur une feuille de papier filtre A3, autour du bec bunsen ou du bec électrique, ce qui matérialise le champ opératoire stérile

2) REALISATION DE LA TRANSGENESE

Deux tubes centrifugés d'une souche d' E.Coli non résistante à l'ampicilline, marqués PUC+ et PUC- vous sont fournis au départ de la manipulation. Le tube PUC+ permettra de mettre en contact les bactéries E. Coli et le plasmide. Les bactéries E. Coli du tube PUC – ne seront pas mis en contact avec le plasmide. On réalise deux tubes de préparations de cultures de bactéries avec (PUC+) ou sans plasmide (PUC-) selon le protocole qui suit (étapes 1 à 6).

Ces deux tubes serviront à ensemer 4 boîtes de Pétri dont deux contiennent l'antibiotique Ampicilline [amp+] et deux sont sans antibiotique [amp-] selon le protocole qui suit (étape 7).

Les étapes de la réalisation	PUC +		PUC -	
1) Eliminer tout le surnageant des tubes centrifugés d'E.Coli en renversant le tube dans la poubelle avec eau de javel (le culot n'est pas toujours visible)	oui		oui	
2) Ajouter le CaCl ₂ avec une micropipette (perméabilisation des membranes)	0,2 mL = 200 µL		0,2 mL = 200 µL	
3) Ajouter le plasmide avec une micropipette	10 µL		0	
4) Ajouter de l'eau stérile avec une micropipette (pour obtenir les mêmes volumes dans tous les tubes)	0		10 µL	
5) Réaliser le choc thermique : - placer les tubes dans la glace 10 minutes, - puis au bain-marie 42°C durant 90 secondes, - puis de nouveau dans la glace 10 minutes.	oui		oui	
6) Ajouter le milieu LB (milieu nutritif) avec une micropipette	0,2 mL = 200 µL		0,2 mL = 200 µL	
7) Ensemencer les 4 boîtes de Pétri avec le contenu des tubes de culture obtenus. Pour cela : - repérer au feutre chaque boîte par PUC+ ou PUC- , - prélever et placer dans une boîte le contenu du tube correspondant comme indiqué ci contre, - Faire rouler les billes en déplaçant la boîte à plat sur la paillasse selon un mouvement circulaire, pour répartir uniformément les bactéries, - Eliminer les billes en renversant la boîte sur le plan stérile, - Placer la boîte à l'envers après l'avoir refermée, - Répéter ces opérations pour les 4 boîtes.	0,1 mL = 100 µL dans une boîte [amp+]	0,1 mL = 100 µL dans une boîte [amp-]	0,1 mL = 100 µL dans une boîte [amp+]	0,1 mL = 100 µL dans une boîte [amp-]

Les boîtes seront placées à l'envers, à l'étuve sous cellophane durant 24 h à 38 °C ou à température ambiante durant 48 h.

Des boîtes de culture après incubation vous seront fournies pour exploitation.