UMONS
Université de Mons

Travaux Pratiques de Biologie Moléculaire

-

Bachelier en Sciences Biologiques – Bloc 2

Professeur : L. Tafforeau

Assistante : E. Hennebert

Année 2015-2016

1.INTRODUCTION GENERALE

Au cours de ces travaux pratiques, vous allez appliquer certaines des **techniques de biologie moléculaire** vues au cours théorique afin de mettre en évidence une interaction physique éventuelle entre deux protéines d'intérêt.

Chaque groupe recevra 2 tubes contenant chacun un ADNc codant pour une protéine d'intérêt. Ces ADNc seront amplifiés par **PCR** (Polymerase Chain Reaction) à l'aide d'amorces (primers) spécifiques. Le succès de l'amplification ainsi que la taille du fragment amplifié seront vérifiés par **électrophorèse sur gel d'agarose** par comparaison à une échelle de poids moléculaire. Chaque produit PCR sera ensuite clivé à l'aide d'**enzymes de restriction** et inséré dans un **plasmide** clivé à l'aide des mêmes enzymes. Avant **ligation** du produit PCR dans le plasmide, les **profils de restriction** obtenus à l'aide des enzymes pour le produit PCR et le plasmide seront analysés sur gel d'agarose.

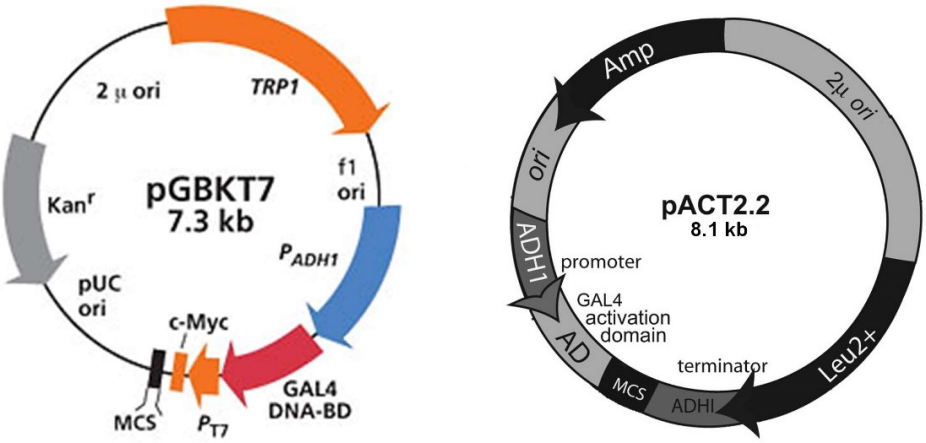


Fig. 1. Plasmides dans lesquels seront insérés les deux ADNc d'intérêt. MCS : site multiple de clonage.

Les plasmides contenant leurs inserts respectifs seront ensuite introduits dans des bactéries, on parle de **transformation**. Les bactéries qui seront utilisées, une souche d'*Escherichia coli,* ont été rendues **chimico-compétentes**, c'est-à-dire que leurs parois ont été fragilisées par traitement chimique afin de permettre l'entrée d'ADN. Les bactéries transformées seront étalées sur boîtes de milieu nutritif contenant un antibiotique qui permettra de **sélectionner les bactéries** ayant incorporé le plasmide. Celui-ci comporte en effet un gène de résistance à un antibiotique (Kan^r pour kanamycine ou Amp^r pour ampicilline, sur la Fig. 1). Les bactéries ayant incorporé le plasmide seront capables de survivre en présence de l'antibiotique et se multiplieront, amenant à la formation de colonies (clones bactériens). Chaque colonie sera composée de bactéries contenant toutes le même plasmide. Le processus impliquant l'insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur afin de l'amplifier à l'identique dans un organisme hôte est appelé **clonage**.

Plusieurs colonies seront sélectionnées aléatoirement sur les boîtes et repiquées dans un milieu nutritif liquide contenant un antibiotique permettant la sélection des bactéries (ampicilline ou kanamycine) durant une nuit (on parle de culture liquide). Cette étape permettra l'amplification des

clones bactériens et donc du plasmide qu'ils contiennent. Une fois amplifiés, les ADN plasmidiques seront isolés des bactéries par une technique appelée minipréparation. Une lyse alcaline va permettre la solubilisation des phospholipides et des protéines composant la membrane des bactéries, ainsi que la dénaturation des protéines, de l'ADN génomique et de l'ADN plasmidique. Après neutralisation, l'ADN du plasmide qui est petit se renature facilement, ce qui n'est pas le cas de l'ADN génomique de la bactérie, dont on peut le séparer par précipitation différentielle et centrifugation. Une PCR sera réalisée sur les ADN plasmidiques afin de vérifier que les fragments ayant été insérés dans les vecteurs possèdent une taille correspondant à la taille des ADNc d'intérêt. Les ADN plasmidiques contenant les fragments de bonne taille seront ensuite séquencés.

Ces vecteurs seront transformés en levures. Pour ce faire, les membranes des levures seront perméabilisées à l'aide d'acétate de lithium, une solution saline alcaline. Les levures qui seront utilisées appartiennent à une souche de *Saccharomyces cerevisiae* dont les gènes LEU2, TRP1 et HIS3 sont délétés ($Leu2^-$, $Trp1^-$, $His3^-$). Ces 3 gènes codent pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la leucine, du tryptophane et de l'histidine, respectivement. Ces levures sont donc incapables de fabriquer la leucine, le tryptophane et l'histidine et, dès lors, de survivre dans un milieu dépourvu de ces acides aminés. Les levures ayant incorporé les plasmides seront sélectionnées sur base de leur survie sur milieu nutritif ne contenant pas de leucine et de tryptophane. Les séquences des gènes TRP1 et LEU2 sont en effet portées par les plasmides (Fig.1). Les levures ayant incorporé les plasmides exprimeront donc les enzymes codées par ces gènes et seront dès lors capables de produire ces acides aminés. Par ailleurs, les levures qui seront utilisées possèdent une construction génétique constituée d'une région promotrice appelée UAS_{Gal} (Upstream Activating Sequence du promoteur Gal) et du gène HIS3 (Fig. 2). Le gène HIS3 dans ces levures est donc sous le contrôle du facteur de transcription Gal4, qui se lie à la région UAS_{Gal}. Gal4 est constitué d'un domaine de liaison à l'ADN (Gal4DNA-BD) et d'un domaine d'activation de la transcription (Gal4-AD). La reconstitution du facteur de transcription Gal4 par rapprochement des deux domaines permet le recrutement de l'ARN polymérase II et la transcription du gène HIS3 (Fig. 2). Les levures qui seront utilisées ne possèdent pas le facteur Gal4. En fait, les plasmides dans lesquels ont été insérés les ADNc d'intérêt à étudier pour ces travaux pratiques contiennent soit la séquence codant pour Gal4DNA-BD soit la séquence codant pour Gal4-AD (pGBKT7 et pACT2 respectivement, voir Fig. 1). Dans la levure, les protéines codées par les ADNc d'intérêt seront donc traduites en fusion à l'un ou l'autre domaine. Les vecteurs d'expression (= plasmides contenant le gène d'intérêt en fusion avec la séquence codant pour un domaine de Gal4) seront transformés 2 par 2 dans les levures, on parle de **double hybride en levure**. Si après transformation les levures sont capables de survivre dans un milieu dépourvu d'histidine, cela veut dire que les protéines codées par les 2 vecteurs d'expression interagissent physiquement l'une avec l'autre, permettant donc de reconstituer le facteur de transcription Gal4 et donc de recruter l'ARN polymérase au promoteur en amont du gène HIS3.

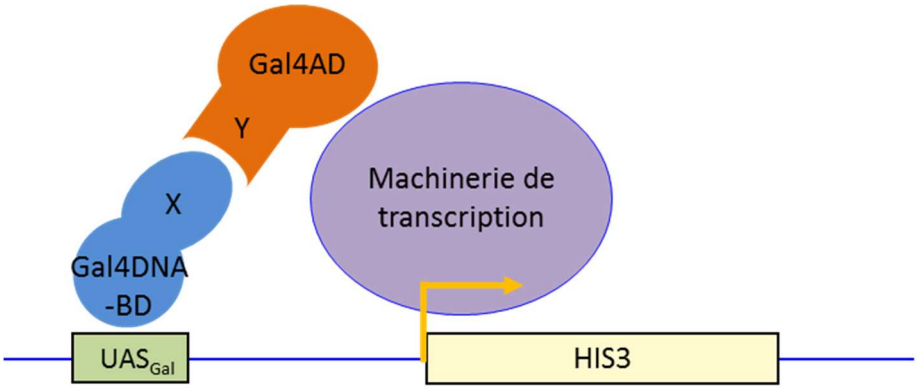


Fig. 2. Schéma expliquant le principe du double hybride en levure.

Dans le cadre de ces travaux pratiques, vous travaillerez avec les ADNc codant pour les protéines humaines PES1, WDR12, p53 et NPM1. PES1, WDR12 et NPM1 sont des protéines nucléolaires impliquées dans la biogenèse des ribosomes. PES1 et WDR12 s'associent à une autre protéine, BOP1 pour former un complexe requis dans la formation de l'ARN ribosomique de la grande sous-unité. NPM1, elle, interagit directement avec le suppresseur de tumeur p53 et régule sa transcription. p53 est un facteur de transcription qui, en cas de stress (exemple, lésion au niveau de l'ADN, problème lors de la réplication) induit l'arrêt du cycle cellulaire et les machineries de réparation de l'ADN. Si l'ADN ne peut pas être réparé, alors p53 induit finalement la mort cellulaire, que l'on appelle l'apoptose. Lors des expériences de double hybride en levure, vous pourrez vérifier que les protéines PES1 et WDR12 interagissent physiquement l'une avec l'autre, de même que le couple NPM1 et p53.

2. LIGNES DE CONDUITE DANS LE LABORATOIRE

- Avant de vous présenter au laboratoire, vous devez avoir lu et compris la description des manipulations que vous réaliserez le jour-même.

- Il est recommandé de relire attentivement la théorie vue au cours concernant les techniques mises en évidence en gras dans l'introduction générale.

- Le port du tablier (à amener) est obligatoire pour toutes les manipulations. Le port de gants (fournis par l'assistant) est obligatoire pour toutes les manipulations exceptées pour celles se réalisant autour d'une flamme.

- Les cheveux longs devront être attachés.

- Le TP s'effectue par travail d'équipe au sein d'un groupe. Le ou les étudiant(s) du groupe ne participant pas activement aux manipulations peuvent être pénalisés de 50% des points totaux attribués au groupe.

- Il est strictement interdit de boire et/ou de manger en salle de laboratoire. Les étudiants peuvent par contre, après en avoir formulé la demande, se rendre dans le hall.

- En fin de chaque séance de TP, il vous est demandé de nettoyer correctement vos paillasses et la verrerie utilisée. En cas de non-respect répété de cette demande, des points de pénalité peuvent être attribués aux différents membres du groupe.

3. MANIPULATIONS

Afin de permettre une organisation optimale des travaux pratiques, vous vous répartirez en 8 groupes de 3 et 1 groupe de 2.

Afin de vous aider dans la réalisation des expériences, des canevas vous seront distribués. Remplissez-les au fur et à mesure de l'ajout d'un composant dans un tube.

Les cônes et solutions ayant été en contact avec des bactéries ou levures devront être jetés dans des sacs ou récipients prévus à cet effet.

3.1. TP1

3.1.1 Introduction

La première partie de cette séance de TP vous permettra de vous familiariser à (ou de revoir) l'utilisation des micropipettes. Vous serez en effet amenés à prélever de très petits volumes lors des différentes expériences et une erreur de prélèvement pourrait entrainer d'importantes conséquences. Différentes micropipettes sont destinées à des volumes différents :

- P1000 : volumes de 100 à 1000 µl (cônes bleus)
- P200 : volumes de 20 à 200 µl (cônes jaunes ou blancs),
- P100 : volumes de 10 à 100 µl (cônes jaunes ou blancs)
- P20 : volumes de 2 à 20 µl (cônes jaunes ou blancs)
- P10 : volumes de 0,5 à 10 µl (petits cônes blancs).

Rappel sur le fonctionnement d'une micropipette : la vis micrométrique est d'abord ajustée sur le volume à prélever, indiqué sur le corps de la micropipette. Un cône en plastique de taille adéquate est ensuite adapté sur la micropipette correspondante. Le piston d'une micropipette est constitué de deux crans d'arrêt, le premier que vous sentez en appuyant légèrement sur le piston permet d'aspirer le volume demandé, le deuxième (en appuyant à fond sur le piston) permet d'éjecter la solution contenue dans le cône (attention à ne pas éjecter trop vite).
Il est important de toujours pré-mouiller les cônes avant de les utiliser. Pour ce faire, il suffit d'aspirer et d'éjecter le liquide à utiliser trois fois avant de prélever le liquide à dispenser (pratiquement, 3 aller-retours vers le premier cran d'arrêt sont suffisants). Le pré-mouillage augmente l'humidité dans le cône, réduisant ainsi les biais dus à l'évaporation.
Attention, les micropipettes sont des instruments fragiles et il faut absolument éviter de les laisser tomber ou de les manipuler trop brusquement.

Dans la deuxième partie de la séance de TP, chaque groupe amplifiera par PCR deux ADNc codant chacun pour une protéine d'intérêt (tel que spécifié dans le tableau du point 3.1.3). La séquence des amorces à utiliser a été établie sur base de la séquence de l'ADNc à amplifier. Une séquence correspondant à un site de restriction enzymatique a été ajoutée à l'extrémité 5' des amorces. Ces sites permettront l'insertion des produits amplifiés dans les vecteurs (voir TP2). Le produit de la PCR sera déposé sur gel afin d'estimer la taille de l'ADNc amplifié ainsi que sa concentration.

3.1.2 Matériel

Pour chaque groupe :

- Micropipettes
- Cônes stériles
- Eau non stérile pour l'apprentissage de l'utilisation des micropipettes
- Glace dans une boîte de frigolite
- Microtubes 1,5 ml
- Tubes PCR
- ADN Polymérase Taq (DreamTaq ; 5U/µl) (se trouve au congélateur)
- Tampon PCR
- dNTPs 10 mM
- Amorces (a, a', b, b' ou c, c', d, d') 25 µM
- Eau stérile
- ADNc (PES1 et WDR12, ou p53 et NPM1) (10 ng/µl)

En commun :

- Balance analytique
- Nacelles de pesée
- Microcentrifugeuse de paillasse
- Agarose
- Tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) 1X
- Gel red
- Erlenmeyer
- Four à Micro-ondes
- Marqueurs de poids moléculaire
- Matériel d'électrophorèse

3.1.3 Manipulation

A. Utilisation des micropipettes

Vous testerez l'utilisation d'une P1000, d'une P200 (ou P100) et d'une P20 (ou P10). Choisissez la bonne micropipette pour prélever la quantité d'eau adéquate. Vous prélèverez les quantités suivantes : 900 µl, 400 µl, 100 µl, 10 µl, 2 µl. Afin de vérifier si vous avez bien prélevé les bons volumes,

vous utiliserez la balance analytique afin de peser le volume prélevé (éjectez l'eau dans une nacelle tarée au préalable et prenez note du poids de chaque prélèvement). Pour rappel, 1 ml d'eau pèse 1g.

Vous vérifierez également l'importance du pré-mouillage des cônes. Pour ce faire, prélevez 10 x 2 µl d'eau que vous éjecterez dans une nacelle tarée (la nacelle contiendra donc 20 µl d'eau). Faites cela une fois en gardant le même cône pour les 10 prélèvements et une fois en changeant de cône à chaque prélèvement. Notez les différences de poids.

Tous les étudiants d'un même groupe devront tester l'utilisation des différentes micropipettes mais l'utilisation de la balance analytique sera limitée à un seul représentant par groupe afin de ne pas perdre trop de temps.

B. Amplification des ADNc par PCR

Référez-vous au tableau suivant afin de connaître le gène et les amorces avec lesquels vous allez travailler :

	ADNc	Amorce sens	Amorce anti-sens
Groupe 1	p53	a	a'
	NPM1	b	b'
Groupe 2	PES1	c	c'
	WDR12	d	d'
Groupe 3	p53	a	a'
	NPM1	b	b'
Groupe 4	PES1	c	c'
	WDR12	d	d'
Groupe 5	p53	a	a'
	NPM1	b	b'
Groupe 6	PES1	c	c'
	WDR12	d	d'
Groupe 7	p53	a	a'
	NPM1	b	b'
Groupe 8	PES1	c	c'
	WDR12	d	d'

Groupe 9	p53	a	a’
	NPM1	b	b’

- Vortexez le tampon, les dNTPs et les amorces, centrifugez-les brièvement à l’aide de la microcentrifugeuse et conservez les tubes sur glace.
- L’ADN polymérase est conservée à -20°C dans un tampon contenant du glycérol (elle est donc sous forme liquide même à cette température). **Elle doit être retirée du congélateur à la dernière minute et être placée sur glace à la sortie du congélateur. Elle doit être replacée au congélateur directement après utilisation**.
- Pour toutes les expériences, **il est impératif de changer de cône à chaque fois afin d’éviter les contaminations ! N’oubliez pas le pré-mouillage.**
- Préparez 2 tubes de 1,5 ml sur glace, annotez-les comme indiqué dans le canevas et ajoutez dans l’ordre, par tube, les quantités reprises dans le canevas pour le mix :

  - 89,65 µl H20 stérile
  - 11 µl Tampon PCR concentré 10X
  - 2,2 µl dNTP Mix 10 mM
  - 2,2 µl Amorce sens 25 µM
  - 2,2 µl Amorce anti-sens 25 µM
  - 0,55 µl ADN polymérase (DreamTaq)

  Volume final = 107,8 µl

  Vortexez les tubes.

  Rq : [1]Vous travaillez avec deux mix différents car vous utilisez 2 ADNc différents avec leurs amorces respectives. **Soyez attentifs !**
  [2]Les quantités pour les mix sont calculées pour 2,2 tubes (1 pour la réaction positive, 1 pour le contrôle négatif, et 20% supplémentaire pour limiter les effets dus aux erreurs de pipetage).
- Préparez 4 tubes PCR sur glace. Annotez-les comme suit : le numéro de votre groupe, suivi du nom de l’ADNc et de + (pour la réaction positive) ou de – (pour le contrôle négatif). (Exemple : 2PES1- = Groupe 2, PES1, contrôle négatif).
- Ajoutez dans les tubes 49 µl du mix correspondant et 1 µl de l’ADNc correspondant ou d’eau stérile.
- Sur glace, mélangez le contenu des tubes à l’aide d’une micropipette réglée sur 100 µl.
- Les tubes seront placés dans le thermocycleur par l’assistante. Le cycle utilisé est le suivant :

Dénaturation initiale	95°C	2 min	
Dénaturation	95°C	30 sec	←
Hybridation	X°C	30 sec	35 cycles
Elongation	72°C	1 min	
Elongation finale	72°C	10 min	

Rq : La température d'hybridation dépend des amorces utilisées (plus elles sont riches en GC, plus la T° sera élevée). X = 55°C pour les amorces a et a', = 49°C pour les amorces b et b', = 53°C pour les amorces c et c', et = 52°C pour les amorces d et d'.

C. Vérification de la taille du fragment amplifié

Préparation du gel d'agarose 1% :

- Un seul gel sera préparé pour tous les groupes. Les groupes 1 à 3 prépareront le gel. (Les autres groupes le feront les fois suivantes). **Le gel sera préparé sous hotte**.
- Pesez 2 g d'agarose et mettez-le dans un erlenmeyer de 500 ml.
- Ajoutez 200 ml de TAE 1X et mélangez.
- Chauffez au four à micro-ondes jusqu'à apparition de bulles. Ne pas laisser déborder ! Sortir l'erlenmeyer à l'aide d'un gant isolant, mélanger, et chauffer à nouveau jusqu'à dissolution complète de l'agarose.
- Laissez refroidir (vous devez être capables de toucher l'erlenmeyer sans vous brûler tout en le gardant le plus chaud possible).
- **Appelez l'assistante**. Elle ajoutera 10 µl de GelRed dans l'agarose fondu. **Attention le GelRed est un agent intercalant des acides nucléiques et est potentiellement mutagène !**
- Mélangez et coulez le gel d'agarose dans un plateau fermé à l'aide de rubans adhésifs et muni de 3 peignes.
- Laissez solidifier le gel au moins 20 min.
- Enfilez des gants en nitrile, puis enlevez délicatement les peignes et le ruban adhésif.
- Déposez le gel avec son plateau dans la cuve d'électrophorèse contenant le tampon TAE 1X. Il faut que le tampon recouvre le gel d'au moins 1 mm et que les puits soient remplis de tampon.

Préparation et dépôt des échantillons sur gel, et migration :

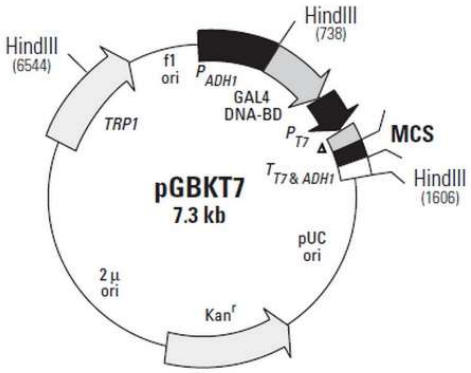
- Les produits PCR peuvent être déposés directement sur gel. En effet, le tampon utilisé pour la PCR contient une solution dense colorée permettant de faire couler l'échantillon dans le fond du puits ainsi que de visualiser sa migration dans le gel.
- Pour chaque groupe, déposez 5 µl de marqueur de poids moléculaire (PM) dans un puits, puis 5 µl de chacun de vos produits PCR dans les puits suivants. **Ne réalisez pas cette étape sans appeler l'assistante**.
- Congelez le reste des produits PCR. Ils seront utilisés lors du TP2.
- L'électrophorèse s'effectuera à 100 V pendant environ 30 min. L'ADN, chargé négativement par ses groupements phosphates, migre vers l'électrode positive.
- Le gel sera récupéré par l'assistante et pris en photo.

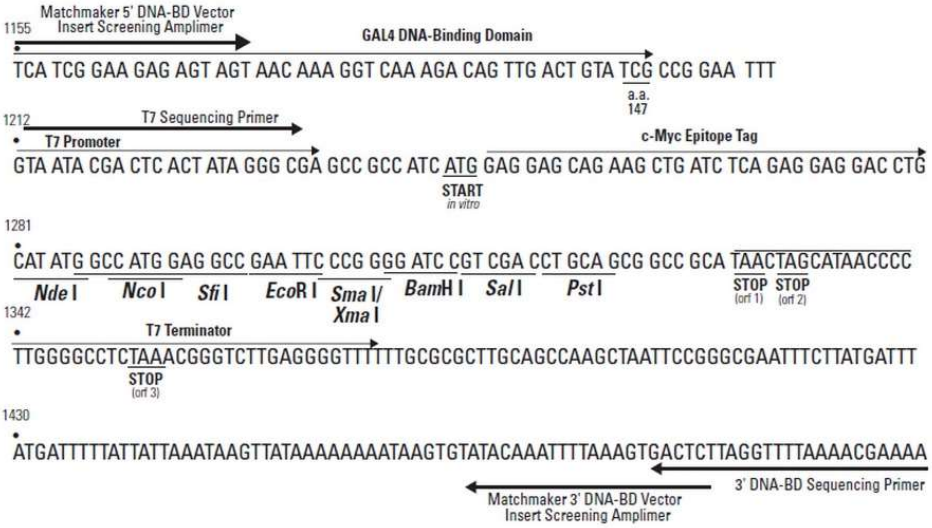
3.2. TP2

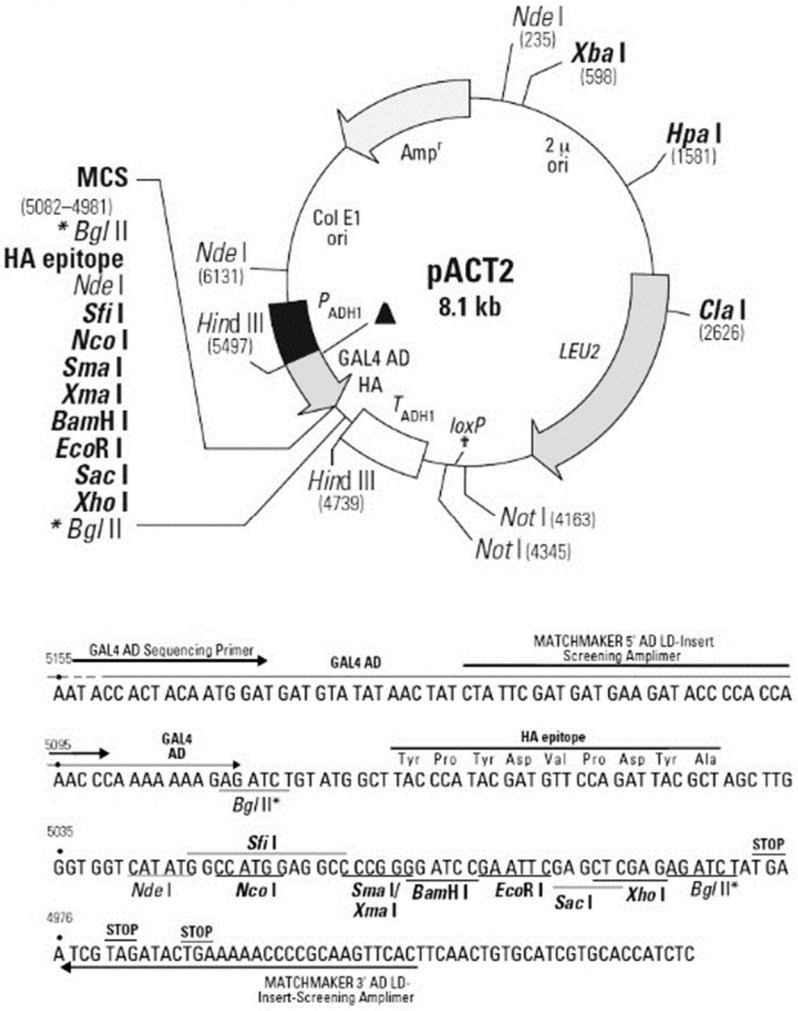
3.2.1 Introduction

Dans un premier temps, la photo du gel issu du TP1 vous sera remise. Vous aurez un peu de temps afin d'analyser les résultats.

Ensuite, les produits PCR obtenus au TP1 seront insérés dans des vecteurs d'expression. Pour cela, les produits PCR et les vecteurs seront clivés à l'aide d'enzymes de restriction. Pour rappel, des sites de restriction ont été ajoutés au niveau des amorces utilisées lors de la PCR (voir introduction du TP1). Les produits PCR sont donc munis de ces sites de restriction. Les vecteurs d'expression utilisés ainsi qu'une partie de leur séquence sont présentés ci-dessous :







Les produits PCR seront purifiés sur membrane de silice avant leur digestion enzymatique. En effet, il est important d'éliminer les sels, la polymérase et les dNTPs de la PCR car les enzymes de restriction fonctionnent à des concentrations en sels qui leur sont propres. Chaque produit PCR sera déposé sur une membrane qui lie l'ADN et laisse passer les autres molécules. Après lavage, l'ADN est élué (décroché) de la membrane.

L'efficacité de la digestion par les enzymes de restriction des produits PCR et des vecteurs d'expression sera analysée par migration des produits de digestion sur gel d'agarose. A l'issue de la digestion enzymatique, les produits PCR posséderont des bouts collants complémentaires de ceux des vecteurs d'expression dans lesquels ils seront insérés. La jonction entre la molécule d'ADNc et la molécule de vecteur sera catalysée par une ligase.

3.2.2 Matériel

Pour chaque groupe :

- Micropipettes

- Cônes stériles
- Glace dans une boîte de frigolite
- Microtubes 1,5 ml
- Colonnes de purification
- Tampon de liaison
- Tampon de lavage
- Tampon d'élution
- Plasmides pGBKT7 et pACT2 AD
- Enzymes de restriction (EcoRI et BamH1 ou EcoRI et XhoI) (se trouvent au congélateur)
- Tampon pour les enzymes de restriction
- Eau stérile
- Ligase (se trouve au congélateur)
- Tampon de ligation

En commun :

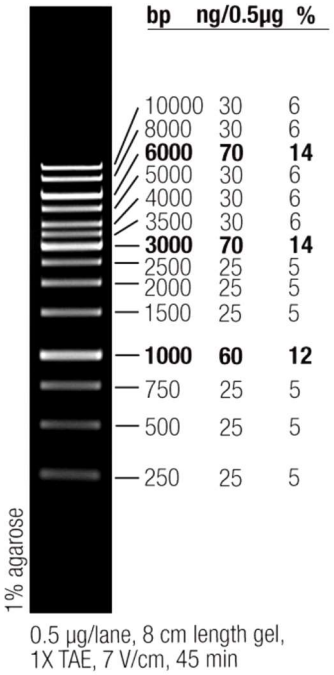
- Balance
- Nacelles de pesée
- Microcentrifugeuse de paillasse
- Agarose
- Tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) 1X
- Gel red
- Erlenmeyer
- Four à Micro-ondes
- Marqueurs de poids moléculaire
- Matériel d'électrophorèse
- Bain marie
- Centrifugeuse

3.2.3. Manipulation

A. Analyse de la photo du gel du TP1

- Indiquez la taille des fragments amplifiés par comparaison aux marqueurs de poids moléculaire.
- Estimez la quantité d'ADN présente dans la bande par comparaison avec l'intensité des bandes de l'échelle de marqueurs de poids moléculaire (…… ng/5 µl déposés sur gel = …… ng/µl). Cette technique de quantification est valable uniquement si vous comparez des bandes de taille similaire. Faites donc attention à comparer votre bande avec une bande de marqueur de poids moléculaire de taille assez proche.

  Echelle de marqueurs de poids moléculaire utilisée :



B. Purification des produits PCR

- Par groupe, vous aurez 2 produits PCR à purifier (les deux réactions positives réalisées au TP1).
- Transférez la totalité de chacun des produits PCR dans 2 microtubes de 1,5 ml annotés avec le numéro de votre groupe, suivi du nom du gène d'intérêt (p53, NPM1, PES1 ou WDR12).
- Ajoutez un volume égal de tampon de liaison (soit 45 µl) à chaque tube et vortexez.
- Prenez 2 microtubes munis d'une colonne et annotez les capuchons comme précédemment.
- Appliquez la totalité des échantillons sur les colonnes et centrifugez à 13000 rpm pendant 1 min.
- Eliminez à l'évier le liquide qui est passé à travers les colonnes et replacez chaque colonne sur son tube.
- Ajoutez 700 µl de tampon de lavage sur les colonnes et centrifugez à 13000 rpm pendant 1 min.
- Eliminez le liquide et replacez les colonnes sur les mêmes tubes.
- Centrifugez à nouveau 1 min à 13000 rpm afin d'éliminer toute trace de tampon de lavage.
- Placez les colonnes sur de nouveaux microtubes de 1,5 ml annotés comme précédemment.
- Ajoutez 50 µl de tampon d'élution au centre de la membrane et centrifugez 1 min à 13000 rpm. **Réalisez cette étape rapidement, ne laissez pas l'ADN pendant plus de 1 min sur la membrane.**
- Les microtubes contiennent maintenant les produits PCR purifiés.
- Jetez les colonnes et fermez les tubes.

C. Digestion des produits PCR et des vecteurs par des enzymes de restriction

Vous digérerez 1 µg de vecteur et 600 ng de produit PCR.

Reprenez la quantité de produit PCR que vous avez estimée sur gel (……ng/µl). Calculez la quantité de produit PCR que vous avez déposée sur colonne lors de la purification. Estimez que vous avez récupéré 80% du produit lors de sa purification (……ng dans 50 µl, soit ……ng/µl).

- Par groupe, vous aurez 2 produits PCR et 2 vecteurs à digérer.
- Préparez 4 microtubes de 1,5 ml sur glace. Annotez-les 2 premiers tubes comme suit : le numéro de votre groupe, suivi du nom du gène d'intérêt (p53, NPM1, PES1 ou WDR12) et les 2 autres tubes comme suit : le numéro de votre groupe, suivi du nom du vecteur (pGBKT7 ou pACT2)
- Ajoutez, dans l'ordre, l'eau, le tampon, l'ADN et les enzymes comme indiqué dans le canevas. Vous devrez calculer vous-même le nombre de µl d'ADN et d'eau que vous devrez ajouter. Le vecteur pACT2.2 est fourni à une concentration de 95 ng/µl et le vecteur pGBKT7 est fourni à une concentration de 405 ng/ µl. **Montrez vos calculs à l'assistante avant de mélanger les composants.**
- Les enzymes de restriction sont conservées à -20°C dans un tampon contenant du glycérol (elles sont donc sous forme liquide même à cette température). **Elles doivent être retirées du congélateur à la dernière minute et être placées sur glace à la sortie du congélateur. Elles doivent être replacées au congélateur directement après utilisation**.
- Mélangez le contenu des tubes à l'aide d'une micropipette réglée sur 20 µl.
- Placez les tubes dans un bain marie à 37°C pendant 20 min.
- Chauffez ensuite 5 min à 80°C afin d'inactiver les enzymes de restriction.
- Placez ensuite vos tubes **à température ambiante**. Ne les placez surtout pas sur la glace. En effet, les ADN, ayant été dénaturés lors de l'étape à 80°C, resteraient sous forme simple brin.

D. Vérification de l'efficacité de la digestion

- Un seul gel d'agarose 1% sera préparé pour tous les groupes. Les groupes 4 à 6 prépareront le gel comme au point 3.1.3.C.
- Les produits de digestion peuvent être déposés directement sur gel. En effet, le tampon utilisé contient une solution dense colorée permettant de faire couler l'échantillon dans le fond du puits ainsi que de visualiser sa migration dans le gel.
- Pour chaque groupe, déposez 5 µl de marqueur de poids moléculaire (PM) dans un puits, puis 100 ng (= …… µl) de vos produits de digestion dans les puits suivants (1 produit de restriction par puits !). **Ne réalisez pas cette étape sans appeler l'assistante**.
- Placez le reste des produits PCR et des vecteurs digérés sur glace. Ils seront utilisés pour la ligation.
- L'électrophorèse s'effectuera à 100 V pendant environ 30 min.
- Le gel sera récupéré par l'assistante et pris en photo.
- Analysez votre partie de gel. Quelles sont les poids moléculaires des bandes que vous observez ? La digestion a-t-elle été efficace à 100% ?

E. Ligation

- Les produits PCR digérés seront insérés dans les vecteurs présentant des bouts collants complémentaires dans un rapport insert : vecteur de 3 :1 (3 fois plus de molécules d'insert que de molécules de vecteur).
- Préparez 2 microtubes de 1,5 ml sur glace. Annotez-les comme suit : le numéro de votre groupe, suivi du nom du gène d'intérêt (p53, NPM1, PES1 ou WDR12), puis du nom du vecteur (pGBKT7 ou pACT2) (**voir le canevas**).
- Ajoutez, dans l'ordre, l'eau, le tampon, le vecteur digéré, le produit PCR digéré et la ligase comme indiqué dans le canevas. Vous devrez calculer vous-même le nombre de µl de produit PCR, de vecteur et d'eau que vous devrez ajouter.

  Pour ce faire, utilisez la formule suivante :

  $$\frac{\text{Taille de l'insert (Kb)}}{\text{Taille du vecteur (Kb)}} \times \text{quantité de vecteur (ng)} = \text{quantité d'insert requise (ng) pour un rapport insert : vecteur de 1 : 1}$$

  Pour connaître la taille de l'insert, référez-vous au point 3.2.3.A. La taille du vecteur est indiquée dans la partie introductive des TP. La quantité de vecteur à utiliser est de 100 ng.

  Attention, la valeur obtenue est celle pour un rapport insert : vecteur de 1 : 1. N'oubliez pas de faire le calcul pour obtenir un rapport insert : vecteur de 3 : 1.

- La ligase est conservée à -20°C dans un tampon contenant du glycérol (elle est donc sous forme liquide même à cette température). **Elle doit être retirée du congélateur à la dernière minute et doit être placée sur glace à la sortie du congélateur. Elle doit être replacée au congélateur directement après utilisation**.
- Mélangez le contenu des tubes à l'aide d'une micropipette réglée sur 20 µl.
- Placez les tubes dans un thermomixer à 22°C pendant 1 h.
- Chauffez ensuite 5 min à 70°C dans le thermomixer afin d'inactiver la ligase.
- Placez ensuite vos tubes **à température ambiante**. Ne les placez surtout pas sur la glace. En effet, les ADN, ayant été dénaturés lors de l'étape à 80°C, resteraient sous forme simple brin.
- Les tubes seront récupérés par l'assistante et stockés au congélateur.

3.3. TP3

3.3.1 Introduction

Dans un premier temps, vous préparerez des boîtes de milieu nutritif contenant un antibiotique (ampicilline ou kanamycine).

Ensuite, les produits de ligation issus du TP2 seront transformés dans des souches de bactéries *Escherichia coli* chimico-compétentes. Les bactéries transformées seront étalées sur les boîtes de milieu nutritif avec antibiotique afin de sélectionner les bactéries ayant incorporé les plasmides.

3.3.2 Matériel

Pour chaque groupe :

- Micropipettes
- Cônes stériles
- Microtubes 1,5 ml
- Bec Bunsen
- Ethanol 70% dans pissette
- Ampicilline stock (50 mg/ml) ou Kanamycine stock (50 mg/ml)
- *E. coli* chimico-compétentes (au congélateur -80°C) (2 tubes contenant 200 µl de bactéries par groupe)
- Produits de ligation issu du TP2 (2 produits par groupe) sur glace
- LB liquide
- Billes de verre stériles
- Bécher contenant de l'eau de javel pour l'élimination des solutions ayant été en contact avec les bactéries
- Bécher muni d'un sachet ziplock pour l'élimination des cônes et microtubes ayant été en contact avec les bactéries

En commun :

- Balance
- Nacelles de pesée
- Tryptone
- NaCl
- Yeast extract
- Agar
- Eau milliQ (tourie)
- Verrerie
- Boîtes de Pétri
- Barreaux magnétiques
- Plaques agitatrices
- Autoclave
- Bain marie
- Portoirs pour microtubes pour le bain marie
- Thermomixer

3.3.3. Manipulation

A. Préparation des boîtes de Pétri

- Plusieurs groupes travailleront ensemble pour cette étape : groupes 1+2, 3+4, 5+6, et 7+8+9. Les groupes 1 à 4 prépareront les boîtes avec ampicilline, les groupes 5 à 9 prépareront les

boîtes avec kanamycine. Vous préparerez donc 4 bouteilles de milieu LB (Luria-Bertani) en tout.

- Pesez les quantités suivantes et placez-les dans un bécher de 500 ml:
    - 2,5 g de Tryptone
    - 1,25 g de Yeast Extract
    - 2,5 g de NaCl
- Ajoutez de l'eau milliQ (attention, en dessous du trait de 250 ml sur le bécher, la graduation de ce dernier étant très imprécise).
- Mélangez à l'aide d'un barreau magnétique.
- Une fois la solution homogène, transférez dans une éprouvette graduée et portez à 250 ml avec l'eau milliQ.
- Transférez les 250 ml dans une bouteille de 500 ml et ajoutez 3,75 g d'agar dans la solution.
- Dévissez légèrement le bouchon de la bouteille et autoclavez durant environ 40 min.
- Laissez refroidir le milieu en passant la bouteille sous l'eau froide et en mélangeant. Il ne faut pas que la température descende en dessous de 55°C, température en dessous de laquelle le milieu solidifie. Placez les bouteilles au bain marie à 56°C. **Vous coulerez les boîtes durant un temps d'incubation de la manipulation suivante**.

Les étapes suivantes doivent se faire **stérilement**:

- Nettoyez la table avec de l'éthanol 70%.
- Allumez un bec bunsen. **Faites toutes les manipulations suivantes dans un périmètre de 30 cm autour de la flamme**. **Pour toute manipulation avec la flamme, n'oubliez pas de retirer vos gants.**
- Ouvrez la bouteille contenant 250 ml de LB, retournez le bouchon sur la table, et passez rapidement le goulot à la flamme.
- Prélevez 500 µl de solution d'ampicilline stock (50 mg/ml) **OU** de kanamycine stock (50 mg/ml) avec une micropipette et ajoutez-les au milieu. Faites attention de ne pas toucher la paroi interne de la bouteille avec la micropipette : seul le bout du cône stérile doit toucher la paroi pour laisser s'écouler la solution d'antibiotique lors de son éjection.
- Repassez rapidement le goulot et le capuchon de la bouteille à la flamme et refermez-la. Melangez doucement pour bien répartir l'antibiotique. **Attention de ne pas agiter trop fort pour ne pas former de bulles !** Annotez la bouteille LB-ampi ou LB-kana selon l'antibiotique que vous avez utilisé.
- 250 ml de milieu seront utilisés pour couler 10 boîtes (environ 25 ml/ boîte).
- Prélevez 10 boîtes de Pétri en les maintenant fermées, annotez le dessous LB-ampi ou LB-kana selon l'antibiotique utilisé, et répartissez-les autour de la flamme.
- Ouvrez une boîte à la fois et coulez-y le milieu après avoir passé le goulot de la bouteille rapidement à la flamme. Ne refermez pas complétement la boîte de Pétri, déposez le couvercle en laissant un petit espace. Cette étape doit se réaliser assez rapidement afin de ne pas laisser le milieu se solidifier dans la bouteille.
- Rincez la bouteille immédiatement après avoir terminé de couler les boîtes.
- Laissez durcir le milieu. Laissez la flamme allumée tant que les boîtes sont entre-ouvertes.

B. Transformation bactérienne par choc thermique

- Décongelez 2 tubes de bactéries *E. coli* DH5α compétentes sur glace.
- Annotez les capuchons des tubes comme suit : le numéro de votre groupe, suivi du nom du produit de ligation. Aidez-vous du canevas.

Les étapes suivantes doivent se faire **stérilement comme décrit au point 3.3.3.A :**

- Nettoyez la table avec de l'éthanol 70%, allumez un bec bunsen et travaillez près de la flamme.
- Dans chaque microtube contenant 200 µl de bactéries, ajoutez 5 µl de produit de ligation issu du TP2. Mélangez délicatement avec le cône mais sans pipetter !
- Incubez sur glace pendant 20 à 30 min. **Pendant ce temps, préparez vos boîtes de Pétri**.
- Transférez ensuite les microtubes dans un bain marie à 42°C pendant 2 min et replacez les tubes directement sur glace pour 2 min. Ce choc thermique permet la pénétration de l'ADN dans les bactéries.
- Ajoutez de manière stérile 800 µl de LB liquide stérile dans chaque tube et mélangez délicatement par inversion après avoir fermé les tubes.
- Placez les tubes dans un thermomixer et incubez durant 45 min à 37°C sous agitation à 600 rpm.
- Centrifugez 5 min à 5000 rpm (**attention à l'équilibrage dans la centrifugeuse ; placez toujours les charnières vers l'extérieur**) et retirez les tubes délicatement de la centrifugeuse.
- Jetez le surnageant **dans un bécher prévu à cet effet** et resuspendez le culot dans 100 µl de LB liquide.
- Par groupe, prenez 2 boîtes de milieu LB-ampi et 2 boîtes de milieu LB-Kana.
- Sur une boîte de chaque sorte de milieu, étalez 100 µl de LB liquide à l'aide de billes de verre. Appelez l'assistante pour réaliser cette étape. Ces boîtes serviront à vérifier que vous avez bien travaillé de manière stérile. Annotez ces 2 boîtes comme suit : le numéro de votre groupe, suivi de -
- Etalez la totalité des bactéries transformées sur les deux autres boîtes. Attention : les produits de ligation dans le vecteur pGBKT7 seront étalés sur boîte LB-kana alors que les produits de ligation dans le vecteur pACT2 seront étalés sur boîte LB-ampi. Annotez le dessous de chaque boîte comme suit : le numéro de votre groupe, suivi du nom du produit de ligation.
- Les boîtes seront placées par l'assistante pour la nuit dans un incubateur à 37°C et seront ensuite conservées au frigo. Remarque : les boites de pétri sont toujours conservées à l'envers (que ce soit dans l'incubateur ou dans le frigo) afin d'éviter des risques de condensation et dessèchement du milieu nutritif.

3.4. TP4

3.4.1 Introduction

Les colonies visibles sur les boîtes de Pétri préparées lors du TP3 correspondent aux bactéries ayant incorporé correctement le vecteur. Il se pourrait cependant que certaines bactéries aient incorporé des vecteurs ne possédant pas d'insert, l'étape de ligation n'étant jamais efficace à 100%. De telles bactéries seraient également capables de pousser sur milieu avec antibiotique. La veille de cette

séance de TP, nous avons prélevé des colonies de chaque boîte et les avons placées en culture liquide. Vous allez maintenant vérifier que ces colonies contiennent bien le plasmide avec l'insert.

Chaque groupe recevra 4 cultures liquides correspondant aux colonies de bactéries transformées avec chacun des deux produits de ligation du TP2 (2 colonies de bactéries transformées avec le produit de ligation n°1, et 2 colonies de bactéries transformées avec le produit de ligation n°2). Vous isolerez les ADN plasmidiques de ces cultures par la technique de minipréparation. Vous réaliserez ensuite une PCR sur les plasmides à l'aide d'amorces se liant aux séquences du vecteur encadrant l'insert afin de vérifier vous-même que le vecteur contient effectivement un insert de taille correspondant au gène d'intérêt.

3.4.2 Matériel

Pour chaque groupe :

- Micropipettes
- Cônes stériles
- Microtubes 1,5 ml
- Ethanol 70% dans pissette
- Solution de resuspension, S1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA, RNAseA 100µg/ml, pH 8)
- Solution de lyse, S2 (200 mM NaOH, 1% SDS)
- Solution de neutralisation, S3 (2,55M acétate de potassium, pH 4,8)
- Isopropanol
- Ethanol 70% (au congélateur)
- Eau stérile
- Glace dans boîte de frigolite
- Tubes PCR
- ADN Polymérase Taq (DreamTaq) (se trouve au congélateur)
- Tampon PCR
- dNTPs
- Amorces (e et e' pour le vecteur pGBKT7 ; f et f' pour le vecteur pACT2) 25 µM
- Bécher contenant de l'eau de javel pour l'élimination des solutions ayant été en contact avec les bactéries
- Bécher muni d'un sachet ziplock pour l'élimination des cônes et microtubes ayant été en contact avec les bactéries

En commun :

- Centrifugeuse

3.4.3 Manipulation

Référez-vous au tableau suivant afin de connaître les amorces à utiliser pour la PCR :

	Produit de ligation	Amorces
Groupes 1, 3, 5, 7 et 9	Bactéries transformées avec p53pGBKT7	e et e'
	Bactéries transformées avec NPM1pACT2	f et f'
Groupes 2, 4, 6 et 8	Bactéries transformées avec PES1pGBKT7	e et e'
	Bactéries transformées avec WDR12pACT2	f et f'

A. Minipréparations d'ADN plasmidique

Au cours de la manipulation, vous devrez transférer à plusieurs reprises la solution contenant les plasmides dans de nouveaux tubes. Annotez bien chaque nouveau tube ; n'intervertissez pas de tubes au cours de la manipulation.

- Préparez 4 microtubes de 1,5 ml que vous annoterez avec le numéro de votre groupe suivi du nom de l'ADNc, suivi de A ou B (pour distinguer les deux colonies). (Exemple : 2PES1B = Groupe 2, bactéries transformées avec PES1pGBKT7, 2ème colonie).
- Prélevez 1,5 ml de chaque culture liquide que vous transférerez dans un microtube de 1,5 ml.
- Centrifugez les tubes 1 min à 13000 rpm.
- Jetez les surnageants **dans un bécher prévu à cet effet**.
- Reprenez les culots dans 300 µl de solution de resuspension S1.
- Ajoutez 300 µl de solution de lyse S2 afin de lyser les cellules.
- Fermez les tubes et mélangez en inversant 5x.
- Incubez 5 min à température ambiante.
- Ajoutez 300 µl de solution de neutralisation S3 afin de précipiter les membranes et les débris cellulaires.
- Fermez les tubes et mélangez en inversant 10x. Un précipité floconneux blanc apparaît.
- Centrifugez 20 min à 13000 rpm.
- Récupérez les surnageants délicatement, sans prélever de débris présents dans le fond des tubes et transférez-les dans de nouveaux tubes. Les culots peuvent être jetés.
- Ajoutez 600 µl d'isopropanol afin de faire précipiter l'ADN.
- Fermez les tubes et mélangez en inversant 10x.
- Centrifugez 20 min à 13000 rpm.
- Eliminez les surnageants et ajoutez 500 µl d'éthanol 70% froid à chaque culot.
- Centrifugez 5 min à 13000 rpm.
- Eliminez les surnageants : utilisez d'abord une micropipette réglée sur 500 µl et ensuite une micropipette réglée sur 10 µl afin de tout retirer, **sans toucher le culot**. Placez toujours l'extrémité du cône à l'opposé de la charnière du tube, où se trouve le culot.
- Laissez les tubes ouverts sous la hotte et laissez sécher à température ambiante durant 5 min (ne passez pas les mains ou du matériel au-dessus des tubes ouverts afin de ne pas contaminer vos échantillons).
- Reprenez les culots dans 50 µl d'eau stérile et vortexez.

B. Vérification du clonage par PCR

- Vortexez le tampon, les dNTPs et les amorces, centrifugez-les brièvement à l'aide de la microcentrifugeuse et conservez les tubes sur glace.
- Après avoir utilisé les ADN plasmidiques, **placez-les au congélateur**, ils seront utilisés pour les TP5 et 6.
- L'ADN polymérase est conservée à -20°C dans un tampon contenant du glycérol (elle est donc sous forme liquide même à cette température). **Elle doit être retirée du congélateur à la dernière minute et doit être placée sur glace à la sortie du congélateur. Elle doit être replacée au congélateur directement après utilisation**.
- Préparez les mix PCR dans des microtubes de 1,5 ml sur glace. Calculez les quantités de réactifs dont vous avez besoin pour préparer des mix pour 3,2 tubes (2 pour les réactions positives, 1 pour le contrôle négatif, et 20% supplémentaire pour limiter les effets dus aux erreurs de pipetage), **pour un volume de réaction final de 25 µl par tube**. Référez-vous au TP1. **Montrez vos calculs à l'assistante avant de commencer à mélanger les composants**.

  - …… µl H20 stérile
  - …… µl Tampon PCR concentré 10X
  - …… µl dNTP Mix 20 mM
  - …… µl Amorce sens 25 µM
  - …… µl Amorce anti-sens 25 µM
  - …… µl ADN polymérase (DreamTaq)

  Volume final = …… µl

  Vortexez les tubes.

- Préparez 6 tubes PCR sur glace. Annotez-les comme indiqué dans le canevas.
- Ajoutez dans les tubes 24,5 µl du mix correspondant et 0,5 µl de l'ADN plasmidique correspondant ou d'eau stérile (4 tubes préparés au point A).
- Sur glace, mélangez le contenu des tubes à l'aide d'une micropipette réglée sur 25 µl.
- Les tubes seront placés dans le thermocycleur par l'assistante. Le cycle utilisé est le suivant :

Dénaturation initiale	95°C	2 min	
Dénaturation	95°C	30 sec	35 cycles
Hybridation	X°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Elongation finale	72°C	10 min	

X = 51°C pour les amorces e et e', et = 46°C pour les amorces f et f'.

- Les produits PCR seront récupérés par l'assistante et conservés au congélateur.

3.5. TP5

3.5.1 Introduction

Les produits PCR du TP4 seront déposés sur gel afin de vérifier que les fragments insérés dans les vecteurs possèdent une taille correspondant à la taille des ADNc d'intérêt. Les ADN plasmidiques contenant les fragments de bonne taille seront ensuite préparés pour le séquençage. Pour celui-ci, vous utiliserez des amorces construites sur base de la séquence du vecteur encadrant la zone où a été insérée l'ADNc d'intérêt.

Lors de cette séance, vous préparerez également les boîtes de milieu nutritif pour les levures qui seront utilisées lors du TP6.

3.5.2 Matériel

Pour chaque groupe :

- Micropipettes
- Cônes stériles
- Microtubes 1,5 ml
- Produits PCR issus du TP4
- ADN plasmidiques issus du TP4
- Eau stérile
- Amorces (e et e' pour le vecteur pGBKT7 ; f et f' pour le vecteur pACT2) 25 µM
- Tubes PCR

En commun :

- Agarose
- Tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) 1X
- Gel red
- Erlenmeyer
- Four à Micro-ondes
- Marqueurs de poids moléculaire
- Matériel d'électrophorèse
- Spectrophotomètre
- Balance
- Nacelles de pesée
- Bacto Yeast Nitrogen Base
- Sulfate d'ammonium
- Dextrose
- Mélange stérile de 9 acides aminés (arginine, aspartate, isoleucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tyrosine, valine) concentré 10x

- Histidine stérile concentrée 100x
- Adénine stérile concentrée 100x
- Uracile stérile concentrée 100x
- Agar
- Eau milliQ (tourie)
- Verrerie
- Autoclave
- Boîtes de Pétri

3.5.3 Manipulation

A. Préparation du gel d'agarose, dépôt des échantillons et migration

- Un seul gel d'agarose 1% sera préparé pour tous les groupes. Les groupes 7 à 9 prépareront le gel comme au point 3.1.3.C.
- Pour chaque groupe, déposez 5 µl de marqueur de poids moléculaire (PM) dans un puits, puis 5 µl de chacun des produits PCR dans les puits suivants.
- Placez le reste des produits PCR sur glace.
- L'électrophorèse s'effectuera à 100 V pendant environ 30 min. **Pendant ce temps, préparez les échantillons pour le séquençage, comme décrit au point B.**
- Le gel sera récupéré par l'assistante et pris en photo.

Analysez votre partie de gel. Quelles sont les poids moléculaires des bandes que vous observez ? Le clonage a-t-il réussi ?

B. Préparation des échantillons pour le séquençage

Par groupe, vous choisirez un ADN plasmidique pour lequel vous avez eu de bons résultats en PCR.

Référez-vous au tableau suivant afin de connaître la sonde avec laquelle vous séquencerez votre échantillon :

	Sonde
Groupe 1	p53pGBKT7 ; Sonde sens : e
Groupe 2	PES1pGBKT7 ; Sonde sens : e
Groupe 3	p53pGBKT7 ; Sonde anti- sens : e'
Groupe 4	PES1pGBKT7 ; Sonde anti-sens : e'
Groupe 5	NPM1pACT2 ; Sonde sens : f
Groupe 6	WDR12pACT2 ; Sonde sens : f

Groupe 7	NPM1pACT2 ; Sonde anti-sens : f’
Groupe 8	WDR12pACT2 ; Sonde anti-sens : f’
Groupe 9	p53pGBKT7 ; Sonde sens : e

- Décongelez l’ADN plasmidique à séquencer.
- Préparez 2 microtubes de 1,5 ml annotés « Blanc » et « Echantillon ».
- Dans le tube annoté « Blanc », placez 80 µl d’eau stérile
- Dans le tube annoté « Echantillon », mélangez 76 µl d’eau stérile avec 4 µl d’ADN plasmidique (soit une dilution 20x). Vortexez. **Placez le reste d’ADN plasmidique au congélateur**.
- A l’aide du spectrophotomètre, dosez la concentration de votre échantillon contre le blanc. **L’assistante vous expliquera l’utilisation du spectrophotomètre**. Notez la concentration de votre ADN plasmidique (……ng/µl). **N’oubliez pas de tenir compte de la dilution 20x** !
- Dans un nouveau microtube de 1,5 ml, diluez l’amorce à 10 µM dans l’eau stérile.
- Dans un tube PCR annoté avec le numéro de votre groupe, mélangez 600 ng d’ADN plasmidique (= …… µl ; **max 6 µl**) et 1 µl d’amorce 10 µM. Portez à un volume final de 7 µl avec l’eau stérile.
- Remettez votre tube à l’assistante. Les tubes seront envoyés à la firme Starseq pour le séquençage.

C. Préparation des boîtes de milieu nutritif pour les levures

- Plusieurs groupes travailleront ensemble pour cette étape : groupes 1+2, 3+4, 5+6, et 7+8+9. Les groupes 1 à 4 prépareront les boîtes sans tryptophane et sans leucine (milieu SD Trp-Leu-), les groupes 5 à 9 prépareront les boîtes sans tryptophane, sans leucine et sans histidine (milieu SD Trp-Leu-His-). Vous préparerez donc 4 bouteilles de milieu en tout.
- Pesez les quantités suivantes et placez-les dans un bécher de 200 ml:
    - 0,2 g de bacto Yeast Nitrogen Base
    - 0,6 g de sulfate d’ammonium
    - 2,5 g de dextrose
- Ajoutez de l’eau milliQ jusqu’environ 90 ml.
- Mélangez à l’aide d’un barreau magnétique.
- Une fois la solution homogène, transférez dans une éprouvette graduée et portez à 110 ml avec l’eau milliQ.
- Transférez les 110 ml dans une bouteille de 250 ml et ajoutez 3 g d’agar dans la solution.
- Dévissez légèrement le bouchon de la bouteille et autoclavez durant environ 40 min.
- Laissez refroidir le milieu en passant la bouteille sous l’eau froide et en mélangeant. Ne refroidissez pas trop afin d’éviter la solidification du milieu dans la bouteille.
- Lorsqu’il est possible de toucher la bouteille sans se brûler (environ 60°C), ajoutez **de manière stérile** (près d’une flamme, comme expliqué au TP3) :
    - 12,5 ml de mélange stérile d’acides aminés concentré 10x
    - 1,25 ml d’uracile stérile concentrée 100 x

    - 1,25 ml d'adénine stérile concentrée 100x
- Les groupes 1+2 et 3+4 ajouteront en +, de manière stérile 1,25 ml d'histidine stérile concentrée 100x à leur bouteille. Annotez ces bouteilles « SD Trp-Leu- ».
- Les groupes 5+6 et 7+8+9 ne doivent rien ajouter de plus. Annotez ces bouteilles « SD Trp-Leu-His- ».
- 125 ml de milieu seront utilisés pour couler 5 boîtes (environ 25 ml/ boîte).
- Coulez le milieu dans des boîtes de Pétri comme expliqué au point 3.3.3. N'oubliez pas de noter le nom du milieu sur le dessous des boîtes (à faire avant de couler le milieu !).

3.6. TP6

3.6.1 Introduction

Les ADN plasmidiques isolés par minipréparation lors du TP4 seront transformés 2 par 2 (un produit de ligation dans le vecteur pGBKT7, et un produit de ligation dans le vecteur pACT2) dans des souches de levures *S. cerevisiae* incapables de synthétiser la leucine, le tryptophane et l'histidine dont elles ont normalement besoin pour croître. Dans un premier temps, vous étalerez les levures transformées sur un milieu nutritif dépourvu en leucine et tryptophane afin de sélectionner les levures ayant incorporé les 2 plasmides, ceux-ci codant chacun pour une enzyme de la voie de biosynthèse de ces acides aminés. Les levures seront incubées plusieurs jours sur le milieu afin de permettre l'expression des protéines codées par le vecteur.

Les colonies ayant poussé seront ensuite repiquées sur un milieu nutritif dépourvu en leucine, en tryptophane et en histidine afin de déterminer si les protéines codées par les ADNc insérés dans les 2 vecteurs interagissent physiquement. En effet, une interaction entre les protéines permet, comme expliqué dans l'introduction générale, le rapprochement des deux domaines du facteur de transcription Gal4 et, dès lors, l'activation de la machine de transcription permettant la transcription du gène HIS3 codant pour une enzyme de la voie de biosynthèse de l'histidine. Cette étape sera réalisée par l'assistante.

3.6.2 Matériel

Pour chaque groupe :

- Micropipettes
- Cônes stériles
- Microtubes 1,5 ml
- Tubes à centrifuger de 15 ml
- Becs Bunzen
- *S. cerevisiae* culture liquide
- Eau stérile
- Solution 100 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5
- Solution 1M d'acétate de Lithium (LiAc)

- Solution de polyéthylène glycol (PEG) 50%
- ADN de sperme de saumon
- ADN plasmidiques (seront distribués par l'assistante)
- Boîtes de milieu SD Trp-Leu- préparées lors du TP5
- Billes de verre stériles
- Bécher contenant de l'eau de javel pour l'élimination des solutions ayant été en contact avec les levures
- Bécher muni d'un sachet ziplock pour l'élimination des cônes et microtubes ayant été en contact avec les levures

En commun :

- Centrifugeuse
- Bain marie
- Thermomixer

3.6.3. Manipulation

Référez-vous au tableau suivant afin de connaître avec quels produits de ligation (ADN plasmidiques) les levures seront transformées :

	ADN plasmidiques
Groupe 1	p53pGBKT7 avec NPM1pACT2
Groupe 2	PES1pGBKT7 avec WDR12pACT2
Groupe 3	p53pGBKT7 avec NPM1pACT2
Groupe 4	PES1pGBKT7 avec WDR12pACT2
Groupe 5	p53pGBKT7 avec NPM1pACT2
Groupe 6	PES1pGBKT7 avec WDR12pACT2
Groupe 7	p53pGBKT7 avec NPM1pACT2
Groupe 8	PES1pGBKT7 avec WDR12pACT2
Groupe 9	p53pGBKT7 avec NPM1pACT2

- Préparez les solutions suivantes :
    - 5 ml (dans un tube de 15 ml) de LiAc/TE : 0,1M LiAC, 10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,5
    - 1 ml (dans un microtube de 1,5 ml) de LiAc/TE/PEG : 0,1M LiAC, 10 mM Tris, 1mM EDTA, 40% PEG, pH 7,5. **Attention, le PEG étant très visqueux, il faut le pipeter très lentement afin d'obtenir le bon volume.**

- Par groupe, vous recevrez 2 microtubes de 1,5 ml contenant plusieurs colonies de *S. cerevisiae* dissoutes dans de l'eau stérile. Annotez-les avec le numéro de votre groupe.
- Centrifugez les tubes à 13000 rpm durant 1 min.
- **Les étapes suivantes doivent se faire stérilement comme décrit au point 3.3.3.A**
- Retirez le surnageant (à jeter dans un bécher prévu à cet effet), et reprenez les culots dans 1 ml d'eau stérile.
- Centrifugez les tubes à 13000 rpm durant 1 min.
- Retirez le surnageant (à jeter dans un bécher prévu à cet effet), et reprenez les culots dans 1 ml de LiAc/TE.
- Centrifugez à 13000 rpm durant 1 min.
- Retirez le surnageant (à jeter dans un bécher prévu à cet effet), et reprenez les culots dans 100 µl de LiAc/TE.
- Faites bouillir 25 µl d'ADN de sperme de saumon pendant 5 min à 95°C dans le thermomixer et placez le tube sur glace.
- Ajoutez 10 µl d'ADN de sperme de saumon dans chaque tube contenant les levures.
- Au tube « + », ajoutez 1 µg (= XX µl) de chacun des 2 ADN plasmidiques. Au tube « - », ajoutez la même quantité d'eau stérile. Vous réaliserez donc une transformation avec les 2 vecteurs contenant l'ADN d'intérêt et une transformation sans ADN, qui servira de contrôle négatif.
- Mélangez doucement en pipetant.
- Incubez 10 min à température ambiante.
- Ajoutez ensuite 260 µl de LiAc/TE/PEG et mélangez doucement en pipetant.
- Transférez les microtubes dans un bain marie à 30°C pendant 30 min.
- Transférez-les ensuite dans un bain marie à 42°C pendant 5 min.
- Centrifugez les tubes à 8000 rpm durant 1 min.
- Retirez le surnageant (à jeter dans un bécher prévu à cet effet) et reprenez les culots dans 150 µl d'eau stérile.
- Etalez la totalité des levures transformées sur 2 boîtes de milieu SD Trp-Leu- à l'aide de billes de verre. Annotez le dessous des boîtes de la même façon que les microtubes.
- Les boîtes seront placées par l'assistante dans un incubateur à 30°C durant 3-4 jours et les colonies ayant poussé seront ensuite repiquées sur un milieu SD Trp-Leu-His-.

3.6. TP7

3.7.1 Introduction

Lors de cette séance vous analyserez les résultats du double hybride en levure. Pour rappel, les colonies ayant poussé sur le milieu SD Trp-Leu- (et ayant donc incorporé les deux vecteurs) ont été repiquées sur un milieu SD Trp-Leu-His-. Si les levures sont capables de survivre dans un tel milieu, cela veut dire que les protéines codées par les 2 vecteurs d'expression interagissent physiquement l'une avec l'autre.

Enfin, vous analyserez les résultats du séquençage de l'ADN plasmidique choisi au TP5. A l'aide du programme gratuit BioEdit, vous visualiserez la séquence ainsi que le chromatogramme correspondant. Vous effectuerez une recherche Blast dans les bases de données afin de vérifier que votre séquence correspond bien à l'ADNc d'intérêt qui vous a été distribué au TP1.

3.7.2 Manipulation

A. Analyse des résultats du double hybride en levure

Les résultats de tous les groupes seront discutés ensemble oralement

B. Analyse des résultats du séquençage

Téléchargez le programme gratuit BioEdit (http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html)

Par groupe, vous allez recevoir la séquence issue de votre séquençage ainsi que la séquence obtenue par un autre groupe pour le même ADN mais avec l'autre amorce.

Référez-vous au tableau suivant pour connaître l'ADN auquel correspondent les séquences que vous allez recevoir, ainsi que la séquence des amorces qui ont été utilisées lors du TP1 :

	ADN	Amorces utilisées pour la PCR du TP1
Groupes 1,3, 9	p53	a : acgcgaattcatggaggagccgcagtcagatcc et a' : acgcggatcctcagtctgagtcaggcccttctg
Groupes 2 et 4	PES1	c : acgcgaattcatgggaggccttgagaagaagaag et c' : acgcggatcctcactccggccttgccttcttgg
Groupes 5 et 7	NPM1	b : acgcgaattcgaatggaagattcgatggacatgg et b' acgcctcgagctaaagagacttcctccactgcc
Groupes 6 et 8	WDR12	d : acgcgaattcgaatggctcagctccaaacacgc et d' acgcctcgagctatgccccaacatgggaagtgg

Dans BioEdit :

- Ouvrez (File → open) la séquence obtenue avec l'amorce sens (= X_F ; X étant le numéro de votre groupe).
- Vous allez ainsi pouvoir visualiser votre séquence ainsi que le chromatogramme correspondant.
- Importez la séquence obtenue avec l'amorce anti-sens (= X_R) : File → Import → Sequence alignment file : choisissez la séquence.
- Dans la colonne de gauche, sélectionnez la deuxième séquence, et convertissez-là en son reverse complément : Sequence → Nucleic acid → Reverse complement.
- Alignez ensuite la séquence obtenue avec l'amorce sens et la séquence obtenue avec la séquence anti-sens : dans la colonne de gauche, sélectionnez les deux séquences. Sequence → Pairwise alignment → Align two sequences (allow ends to slide).
- Quel est le pourcentage d'identité entre les deux séquences ?
- Obtenez la séquence consensus entre les deux séquences : Alignment → Create consensus sequence.
- Comparez les deux séquences de départ entre-elles. S'il y a des erreurs, regardez les chromatogrammes afin d'identifier quelle est la bonne base. La procédure vous sera expliquée par l'assistante.

- Corrigez les erreurs dans la séquence consensus (mettez-vous en mode Edit et placez-vous avant la lettre à remplacer).
- Copiez la séquence consensus dans un fichier word.
- Dans cette séquence, recherchez l'amorce sens et anti-sens que vous avez utilisées pour réaliser la PCR lors du TP1 (surlignez-les en couleur).
- A l'aide des cartes des vecteurs (voir TP2) et connaissant les enzymes de restriction que vous avez utilisées, repérez la séquence de l'ADN d'intérêt.
- Surlignez cette séquence. Quelle est sa taille ?
- Allez sur le site http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
- Dans nucleotide blast, collez la séquence de l'ADN d'intérêt dans l'encart prévu à cet effet.
- Gardez les paramètres par défaut et cliquez sur « BLAST ». Le programme compare votre séquence aux séquences existant dans les bases de données.
- Notez le premier résultat de la liste. Cela correspond-il à votre ADN d'intérêt ? Y a-t-il des erreurs dans votre séquence ?

4. Ecriture du rapport : consignes

- Un rapport par groupe.

- Vous trouverez ci-dessous les différentes parties à aborder dans votre rapport. Pour chaque partie, faites une **petite introduction** (**but de la manipulation**), indiquez vos résultats (collez les photos de gel, etc) et discutez-les. Le canevas ci-dessous reprend également des questions/points à aborder pour chaque partie.

- 1 - Utilisation des micropipettes
  Dans un tableau, présentez les micropipettes utilisées, les volumes prélevés et les poids correspondants.
  Selon les résultats que vous avez obtenus lors de la pesée de 10 x 2 µl avec et sans pré-mouillage, discutez de l'importance de celui-ci pour le pipetage de petits volumes.
- 2 - Amplification des ADNc par PCR
  Indiquez le nom des ADNc avec lesquels vous avez travaillé.
  Calculez la concentration en dNTP et amorces ainsi que le nombres d'unité d'enzymes utilisées pour une réaction PCR.
  A quoi sert le contrôle négatif (sans ADN) que vous avez réalisé lors de la PCR ?
  Collez la photo de votre partie de gel dans votre rapport (il faut que l'on puisse y voir également les marqueurs de poids moléculaire).
  Quelle est la taille du fragment amplifié ?
  Quelle est la concentration du produit PCR estimée sur base de la concentration des marqueurs de poids moléculaire ?
- 3 - Digestion des produits PCR et des vecteurs par des enzymes de restriction
  Quelle est la concentration du produit PCR purifié (en tenant compte du volume final d'élution et en estimant qu'il reste 80 % du produit PCR après passage sur la colonne) ?
  Combien de µl de produit PCR (correspondant à 600 ng) avez-vous prélevés pour réaliser la digestion ?

Combien de µl de vecteur (correspondant à 1 µg) avez-vous prélevés pour réaliser la digestion ?
Quelles sont les enzymes de restriction que vous avez utilisées ? Quels sont leurs sites de restriction ? Ecrivez la séquence et indiquez-y l'endroit de coupure.
Quel est le nombre de µl de produit de digestion enzymatique que vous avez chargés sur le gel (pour charger 100 ng) ?
Collez la photo de votre partie de gel dans votre rapport (il faut que l'on puisse y voir également les marqueurs de poids moléculaire).
Quels sont les tailles des bandes que vous avez observées sur votre gel ?
La digestion a-t-elle été efficace à 100% ?

- 4 - Ligation des produits PCR dans les vecteurs
  Indiquez quel produit PCR vous avez inséré dans quel vecteur.
  Quelles quantités de produit PCR (en µl et en ng) avez-vous utilisées pour avoir un rapport insert : vecteur de 3 :1 ?
- 5 - Transformation bactérienne avec les produits de ligation
  Pour des raisons organisationnelles, vous n'avez pas réalisé de contrôles pour l'étape de transformation. Selon-vous, quels seraient les contrôles à réaliser ?
  Pourquoi les bactéries transformées ont-elles été étalées sur boîtes de Pétri contenant un antibiotique ? Pourquoi ne pas les mettre directement en culture liquide ?
  Pourquoi avez-vous utilisé deux antibiotiques différents pour vos deux produits de ligation ?
  Expliquez ce qu'il se passerait si vous travailliez avec des boîtes sans antibiotiques.
- 6 – Minipréparations d'ADN plasmidique
  Indiquez avec quel produit de ligation ont été transformées les bactéries avec lesquelles vous avez travaillé.
  Quel est le but des minipréparations ?
  Calculez les quantités de Tris, EDTA et RNAse A à peser pour préparer 100 ml de solution de resuspension.
  Quel est le but de la PCR que vous avez réalisée sur les ADN plasmidiques ?
  Quelles amorces avez-vous utilisées pour cette PCR ? Quelle séquence reconnaissent-elles ?
  Collez la photo de votre partie de gel dans votre rapport (il faut que l'on puisse y voir également les marqueurs de poids moléculaire).
  Quels sont les tailles des bandes que vous observez ? Quels sont les tubes pour lesquels vous êtes confiants dans les résultats ?
  Observez-vous une différence de poids moléculaire par rapport au produit amplifié lors du 1er TP ? Devriez-vous observer une différence ? Expliquez.
- 7 – Double hybride en levure
  Indiquez quels produits de ligation vous avez transformés dans les levures.
  Pour des raisons organisationnelles, vous n'avez pas réalisé tous les contrôles possibles pour l'étape de transformation. Selon-vous, quels seraient les contrôles à réaliser ?
  Pourquoi avez-vous utilisé deux milieux nutritifs différents ? Pourquoi ne pas utiliser directement le deuxième milieu nutritif ?
  Discutez les résultats que vous avez obtenus en fonction du rôle des protéines dans la cellule.
- 8 – Séquençage
  Indiquez le nom de l'ADN plasmidique que vous avez séquencé.

Quelle était sa concentration ? Combien de µl avez-vous utilisé pour la réaction de séquençage ?

Quel est le pourcentage d'identité entre les deux séquences qui vous ont été fournies (sens et anti-sens) ?

Copiez la séquence consensus obtenue dans votre rapport. Mettez-y en évidence : les amorces, les sites de restriction, la séquence d'ADN d'intérêt.

Quelle est la taille de la séquence d'intérêt ? Correspond-elle à la taille du produit PCR obtenu lors du premier TP ?

Quel est le premier résultat obtenu lors de la recherche Blast dans les bases de données ? Y a-t-il des erreurs dans votre séquence ?

- Le rapport devra être rendu le **13 mai 2016** au plus tard, en le chargeant sur la plate-forme moodle.

- Les points du TP comptent pour 20% de la note finale du cours de Biologie moléculaire. Cette note inclut la cote du rapport mais également votre participation lors des séances de TP.