

**TRAVAUX PRATIQUES DE BACTERIOLOGIE**  
**ET DE BIOLOGIE MOLECULAIRE**  
**2015-2016**

<b>Protocoles</b>	<b>pages</b>
Souches et plasmides	1
Conjugaison interrompue	2
Digestions enzymatiques	5
Transfert sur membrane	6
Hybridation	7

**Souches bactériennes**

Hfr3000 Lac<sup>+</sup> :      Arg<sup>+</sup> His<sup>+</sup> Leu<sup>+</sup> Pro<sup>+</sup> Thr<sup>+</sup> Str<sup>S</sup>  
Souche donneuse de la conjugaison interrompue.

AB1157 :      Lac<sup>-</sup> Arg<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> Pro<sup>-</sup> Thr<sup>-</sup> Str<sup>R</sup> (F<sup>-</sup>)  
Souche réceptrice utilisée pendant la conjugaison interrompue,  
permettant de positionner les marqueurs.

**Plasmides**

pGal :      Plasmide portant le gène de la  $\beta$ -galactosidase.

pGal ::Tn5      Plasmide pGal contenant une insertion du transposon Tn5

pKANA :      Plasmide portant le gène de résistance à la kanamycine et  
utilisé comme source de sonde pour le Southern blot.

## CONJUGAISON INTERROMPUE

### JOUR 1:

#### Préparation des boîtes

Chaque binôme testera un marqueur différent :

Binôme	Marqueur testé	Souche F <sup>-</sup>
1	Lactose	AB1157
2	Thrénine	AB1157
3	Proline	AB1157
4	Leucine	AB1157
5	Histidine + contrôles	AB1157
6	Arginine + contrôles	AB1157
Eventuellement:7	Proline	AB1157

Pour la cartographie des marqueurs d'auxotrophie, les souches Hfr3000 et AB1157 seront conjuguées. Les conjuguants seront sélectionnés sur milieu minimum supplémenté.

Pour l'analyse du marqueur Lactose, les souches Hfr3000 et AB1157 seront conjuguées, et les conjuguants seront sélectionnés sur gélose de type McConkey.

#### Seront fournis :

- Pour le binôme 1 : 500 ml de gélose McConkey.
- Pour les autres binômes : 250 ml de gélose + 250 ml de milieu minimum contenant uniquement des sels minéraux.
- Les géloses doivent être conservées à 60°C jusqu'à l'introduction simultanée de tous les additifs nécessaires (acides aminés, antibiotiques, sucre ou vitamine).
- Les additifs sont donnés en solutions-stocks dont les concentrations figurent dans le tableau ci-dessous. Y figurent également les concentrations finales des composés dans les milieux gélosés.

PRODUIT	CONCENTRATION DU STOCK	CONCENTRATION DANS LA GELOSE
Glucose	50 %	0.2 %
Thiamine	2 %	0.004 %
Acides aminés	1 %	0.004 %
Streptomycine	50 mg/ml	100 µg/ml

### Protocole :

- 1- Etablir la composition de chacun des milieux sélectifs et calculer les volumes de chacun des additifs à ajouter.
- 2- Introduire tous ces additifs dans un tube conique de 50 ml.
- 3- Calculer le nombre de boîtes nécessaires : voir p. 5 le nombre minimum requis, et ajouter 3 à 4 boîtes (ex : le binôme 1 doit préparer 11-12 boîtes)
- 4- Marquer le numéro de binôme au dos des boîtes de Petri.
- 5- Ajouter les additifs au milieu gélosé et mélanger délicatement pour éviter de faire de la mousse dans les flacons.
- 6- Verser environ 25 ml de milieu dans chaque boîte. Attendre environ 30 min que les géloses solidifient.
- 7- Faire sécher les boîtes à 37°C pendant la nuit.

### **Mise en culture des souches Hfr et F-**

- 8- Le soir, ensemer les colonies de Hfr3000 (dans 5 ml de LB); Inoculer 1 colonie de la souche AB1157 dans 5 ml de LB + Streptomycine 100 µg/ml. Mettre en bain-marie à agitation à 37°C pendant la nuit.

## **JOUR 2**

### Conjugaison

- 9- Chaque binôme ensemence 0.2 ml de la culture de Hfr3000 dans 10 ml de LB.  
Tous les binômes ensemencent 0.2 ml de AB1157 dans 10 ml de LB  
**Attention!!** Ne pas mettre d'antibiotiques dans ces cultures afin de ne pas tuer les bactéries parentales pendant la conjugaison.  
Incuber à 37°C dans un bain-marie à agitation.
- 10- Au bout de 1 h 30, mesurer la DO à 600 nm des cultures. Sachant que le temps de doublement de ces souches est d'environ 30 min, estimer le temps de culture restant pour aboutir à des DO de 0.2 pour la souche Hfr3000, et des DO de 0.4 pour AB1157. Si une des cultures pousse plus rapidement qu'une autre, placer la première des cultures ayant atteint la bonne DO dans la glace en attendant que la seconde soit prête.
- 11- Préparer 2 ou 3 étaleurs à partir de pipettes Pasteur.
- 12- Préparer 4 tubes (tubes à hémolyse à bouchon rouge) marqués du numéro de binôme et du temps de conjugaison : 0, 2, 20 ou 90 min.
- 13- Dans le cas où des dilutions sont à faire sur les conjuguants (voir tableau ci-dessous), calculer le nombre de tubes Eppendorf nécessaires. En n'oubliant pas de marquer les tubes, introduire 0.9 ml de sérum physiologique dans les tubes utilisés (stérilement!).
- 14- Récupérer les boîtes de gélose et marquer au dos les temps de conjugaison et la dilution étalée.
- 15- Mélanger, dans les tubes "20 min" et "90 min", 0.1 ml de la donatrice avec 0.9 ml de la réceptrice. Incuber sans agitation à 37°C pendant les temps indiqués.
- 16- Procéder au même mélange pour le tube "2 min". Après incubation, vortexer le tube immédiatement pendant 1 min. Mettre le tube dans la glace

et procéder immédiatement aux dilutions éventuelles en sérum physiologique.

Si les conjuguants doivent être étalés sans dilution, introduire la suspension dans un tube Eppendorf et centrifuger 1 min. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot bactérien dans 1 ml de sérum physiologique en conservant les tubes autant que possible au froid.

- 17- Etaler 100 µl des dilutions indiquées, 1 boîte par dilution.
- 18- Suivre ensuite le même protocole pour le temps 0 min, mais en conservant autant que possible le tube dans la glace et en opérant très rapidement.
- 19- Suivre ensuite le même protocole pour le tube "20 min", puis pour le tube "90 min".

MARQUEUR	TEMPS DE CONJUGAISON			
	0 min	2 min	20 min	90 min
Arginine	ND	ND	ND	ND
	1/10	1/10	1/10	1/10
Thréonine	1/10	1/10	1/10	1/10
	1/100	1/100	1/100	1/100
		1/1000	1/1000	1/1000
Leucine	1/10	1/10	1/10	1/10
	1/100	1/100	1/100	1/100
		1/1000	1/1000	1/1000
Proline	ND	ND		
	1/10	1/10	1/10	1/10
			1/100	1/100
				1/1000
Lactose	ND	ND		
	1/10	1/10	1/10	1/10
			1/100	1/100
				1/1000
Histidine	ND	ND	ND	ND
	1/10	1/10	1/10	1/10

#### JOUR 4 :Lecture des résultats

## DIGESTIONS ENZYMATIQUES

### • pGal::Tn5

Les tampons de digestion optimum pour chaque enzyme sont :

R1 : Cla I et SacI

R2 : Ava I

R3 : BamHI

R4 : Pvu II

Les tampons de digestion des enzymes (donnés ici en concentration x1) sont les suivants :

R1 : Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM

R2 : Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 50 mM

R3 : Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM

R4 : Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 50 mM, KCl 50 mM

Les solutions stock disponibles sont aux concentrations suivantes :

Tris : 1M

MgCl<sub>2</sub> : 2M

NaCl : 5M

KCl : 2M

### • pGal

Chaque binôme se charge des digestions suivantes :

Binôme 1 :	Pvu II	Pvu II + Ava I		
Binôme 2 :	Cla I	Cla I + Ava I		
Binôme 3 :	BamHI	BamHI + Cla I		
Binôme 4 :	Ava I	Ava I + BamHI		
Binôme 5 :	Sac I	Pvu II + Cla I		
Binôme 6 :	BamHI + Pvu II	Sac I	+	Pvu II
Binôme 7 :	Sac I + Cla I	BamHI	+	Sac I
Binôme 8 :	Ava I + Sac I	PvuII		

Pour les groupes n'ayant que 7 binômes, le binôme 3 prendra en plus la digestion Ava I + Sac I.

**Extraction du fragment PCR : voir protocole fabricant.**

**MINIPREP D'ADN PLASMIDIQUE : voir protocole fabricant.**

## **SOUTHERN BLOT TRANSFERT SUR MEMBRANE**

- 1- Après électrophorèse, le gel est photographié sous UV. Les bandes sont marquées avec une aiguille de seringue trempée dans de l'encre de Chine et le gel est mesuré. Le numéro de binôme sera inscrit au crayon à papier.
- 2- Les binômes des mêmes paillasse placent leurs gels dans la même boîte plastique.
- 3- PENDANT LES TEMPS D'INCUBATION, découper :
  - 10 feuilles de Whatman 3M au format du gel
  - 1 feuille de Hybond N au format du gel (ATTENTION !!! Mettre des gants)
  - du papier absorbant au format du gel en quantité suffisante pour en obtenir une épaisseur de 1.5 cm environ.
  - 1 feuille de ParaFilm à une taille supérieure d'au moins 1 cm à celle du gel
4. Les gels sont recouverts d'acide chlorhydrique 0.25 M Laisser en contact pendant 15 min en remuant doucement une fois toutes les 3-4 min.
- 5- La solution est éliminée et les gels sont rapidement rincés avec de l'eau.
- 6- Introduire environ 100 ml de tampon de dénaturation dans chaque boîte. Laisser en contact pendant au moins 15 min en remuant doucement une fois toutes les 3-4 min.
- 8- Placer sur la paillasse la feuille de Parafilm. Y déposer 7 feuilles Whatman et les imbiber de 15 à 20 ml de tampon de dénaturation.
- 9- Déposer le gel sur la pile de papier Whatman.
- 10- Déposer sur le gel la feuille de Hybond N. Avec une pipette utilisée comme un rouleau à pâtisserie, éliminer les bulles d'air.
- 11- Déposer 2 feuilles Whatman sur le Hybond.
- 12- Déposer le papier absorbant sur le Whatman.
- 13- Déposer une plaque de verre sur la pile de papiers, surmontée d'un poids d'environ 150g.
- 14- Laisser le transfert opérer pendant environ 1h30. Eliminer les papiers Whatman, et marquer au crayon à papier l'emplacement des puits, ainsi que le numéro de binôme. Enlever le Hybond du gel, et le laisser sécher sur un papier Whatman propre.

## **SOUTHERN BLOT MARQUAGE DE LA SONDE ET HYBRIDATION**

Le marquage de la sonde est basé sur l'utilisation de dUTP modifié, le 11-dUTP-DIG. DIG est la digoxygénine, un stéroïde produit de façon naturelle par une plante, la digitale. La DIG a pour intérêt de s'incorporer dans l'ADN sans altérer l'efficacité de la technique de random priming et d'être détectable de façon sensible par un anticorps. Cet anticorps est de plus lié de façon covalente à la peroxydase, enzyme révélée aisément par une réaction colorée.

### **Préhybridation de la membrane**

- La membrane est placée dans un film plastique scellé sur trois des côtés.
- 5 ml de milieu de préhybridation sont placés dans la poche
- La poche plastique est scellée sur le quatrième côté, en évitant de laisser des bulles.
- Incubation à 65°C pendant 1 heure, en agitation.

### **Marquage de la sonde**

- Placer 100-500 ng de sonde dans un tube Eppendorf et compléter à 20 µl final avec de l'eau stérile.
- Percer un trou dans le tube
- Faire bouillir pendant 5 min, puis placer le tube dans la glace
- Ajouter :
  - 2 µl d'hexanucléotides
  - 2 µl de dNTP
  - 1 µl de Klenow
- Incuber 30 min à 37°C
- Faire bouillir 5 min et placer la sonde dans la glace

### **Hybridation**

- Dans un tube contenant 5 ml de solution d'hybridation, introduire la sonde marquée et mélanger délicatement.
- Eliminer le milieu de préhybridation de la poche plastique
- Introduire la solution d'hybridation dans la poche plastique
- Sceller la poche en éliminant les bulles
- Incuber à 65°C pendant la nuit en agitation

### **Rinçage du filtre**

*Mettre deux blots par boîte*

- Faire 2 lavages de 5 min à température ambiante dans 100 ml de 2xSSC + 0.1%SDS
- Faire 2 lavages de 15 min à 65°C dans 100 ml de 0.1xSSC + 0.1%SDS

### **Révélation immunologique**

- Equilibrer la membrane avec 50 ml de tampon 1 pendant 1 min
- Incuber 30 min dans 50 ml de tampon 2 (blocage de la membrane)
- Laver 1 min dans 50 ml de tampon 1
- Incuber pendant 30 min dans 20 ml de tampon 3 (fixation de l'anticorps)
- Faire 2 lavages de 15 min dans 50 ml de tampon 1
- Equilibrer les membranes pendant 2 min dans 20 ml de tampon 3
- Incuber **dans le noir et sans agitation** la membrane dans 10 ml de solution de coloration.
- Quand la coloration est suffisante, stopper la réaction en lavant les membranes dans 50 ml de tampon 4.
- Conserver la membrane à sec dans un film plastique scellé