

Protocole

Transformation d'Ecoli K12 par le plasmide pGLO™



1. Etapes préliminaires

Examiner la solution d'ADN plasmidique pGLO avec la lampe UV. Noter vos observations

- 1.1 Introduire avec une pipette stérile de 250µL de solution de transformation (CaCl₂) dans un microtube annoté « +pGLO » et dans un microtube annoté « -pGLO ».



Réaliser les 3 étapes suivantes de la manipulation dans un bain de glace

- 1.2 Avec une anse stérile, introduire et disperser une colonie de E Coli K12, dans chacun des microtubes (aucun morceau flottant ne doit être visible).
- 1.3 Transférer une anse de solution plasmidique dans le microtube annoté « +pGLO »
- 1.4 Incuber 10 minutes dans le bain de glace
- 1.5 Marquer le boîtes de Pétri (sur le tour)
 - LB/-pGLO
 - LB/amp/+pGLO
 - LB/amp/-pGLO
 - LB/amp/ara/+pGLO



2. Réalisation de la transformation

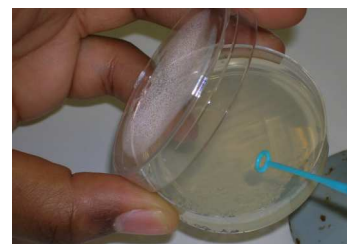
- 2.1 En utilisant un portoir en mousse comme support, transférer rapidement les deux microtubes dans un bain marie à 42°C pendant exactement 50 secondes (le bas du tube doit être en contact avec l'eau chaude).
- 2.2 Déposer le portoir ensuite rapidement dans la glace et laisser incuber 2 minutes.
- 2.3 En dehors de la glace, introduire avec une pipette stérile 250µL de milieu LB dans

chacun des microtubes : « +pGLO » et « -pGLO » et homogénéiser.

3. Inoculations

En utilisant, à chaque fois, une nouvelle pipette et un nouvel ensemencement :

- 3.1. Introduire au centre de la boîte LB/amp/+pGLO (contenant le milieu LB + ampicilline) 100µL de suspension transformée « +pGLO » et étaler avec une ose stérile par 4 balayages serrés en tournant entre chaque balayage la boîte de Pétri d' 1/4 de tour.
- 3.2. Introduire au centre de la boîte LB/amp/ara/+pGLO (contenant le milieu LB + ampicilline+ arabinose) 100µL de suspension transformée « +pGLO » et étaler avec une ose stérile par 4 balayages serrés en tournant entre chaque balayage la boîte de Pétri d' 1/4 de tour
- 3.3. Introduire au centre de la boîte LB/amp/-pGLO (contenant le milieu LB + ampicilline) 100µL de suspension transformée « -pGLO » et étaler avec une ose stérile par 4 balayages serrés en tournant entre chaque balayage la boîte de Pétri d' 1/4 de tour
- 3.4. Introduire au centre de la boîte LB/-pGLO (contenant le milieu LB) 100µL de suspension transformée « -pGLO » et étaler avec une ose stérile par 4 balayages serrés en tournant entre chaque balayage la boîte de Pétri d' 1/4 de tour



- 3.5. Incuber à 37°C pendant 24 heures

Lire le résultat sous lampe UV