

Évolution du vivant

Variabilité génétique et mutation

Réf :
117 086
117 087
117 088

Français – p 1

Version : 7110

**Kit mutagénèse levure
*S.cerivisiae ADE2***

1 Composition du kit

Chaque kit comporte au moins une boîte souche de *S.cerevisiae* ADE2 pour repiquage et le milieu de culture YPG pour 90 boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre (boîtes de Pétri non fournies).

Trois formats de kits mutagénèse sont proposés. Ils diffèrent uniquement par le conditionnement du milieu de culture des levures.

- **Réf. 117 086** : Le milieu de culture est déjà coulé dans les boîtes de Pétri. Stockage à 4 °C couvercle vers le bas.
- **Réf. 117 087** : Le milieu de culture est prêt à être coulé dans les boîtes de Pétri (non fournies). Stockage à température ambiante.
- **Réf. 117 088** : Le milieu de culture est à préparer (format déshydraté) puis à couler dans les boîtes de Pétri (non fournies). Stockage du milieu à température ambiante.

La boîte souche se conserve plusieurs jours dans un local frais.
Un kit est prévu pour 18 binômes.

Matériel complémentaire à prévoir :

- Boîtes de Pétri
- Incubateur
- Tube stérile
- Pipette pasteur stérile 1ml
- Inoculateur stérile
- Étaleur stérile
- Ensemenceur stérile
- Pince stérile
- Bec électrique (pour zone de stérilité)
- Vortex
- Enceinte UV
- Microscope
- Feutre permanent
- Lame de numération KOVA®-slide

2 Principe

On soumet une population de levures à un niveau progressif de rayonnement ultraviolet. Cette expérimentation va permettre de mettre en évidence l'effet mutagène des UV sur les organismes vivants (ici le changement de couleur des colonies) et/ou des effets létaux avec une diminution remarquable du nombre de colonies viables.

La levure *S.cerevisiae* ADE2 est une levure qui a subi une mutation sur sa chaîne de biosynthèse de l'adénine, qui la rend auxotrophe à l'**adénine**, c'est-à-dire qu'elle est incapable de synthétiser ce composé. En absence d'une quantité suffisante d'adénine dans le milieu (c'est le cas avec le milieu YPG), la levure accumule un produit intermédiaire de teinte rose : l'aminooimidazole ribotide (AIR).

*Pourquoi la levure *S.cerevisiae* ADE 2 ?*

Avec cette souche, on peut visualiser aisément la conséquence de certaines mutations et l'action des UV sur l'ADN. Si les colonies redeviennent blanches,

on en déduit que la mutation concerne la chaîne de biosynthèse de l'adénine et a rétabli un phénotype « sauvage ».

3 Préparation des milieux

- **Réf. 117 087** : Le milieu en bouteille est à réchauffer dans un micro-onde 4 à 5 minutes (750 W) ou au bain-marie. Dévisser légèrement le bouchon avant le réchauffage. Au micro-onde, remuer régulièrement et vérifier toutes les 45 secondes, la liquéfaction progressive du milieu.
- **Réf. 117 088** : Le milieu de culture est déshydraté, un flacon permet de reconstituer 500 mL de milieu. Verser le mélange en poudre dans un flacon de 500 mL, ajouter le volume d'eau correspondant, agiter jusqu'à complète dissolution. Autoclaver 20 minutes à 120 °C. Attention au risque de brûlures à la sortie des flacons de l'autoclave, utiliser le matériel de protection adéquat (gant anti-chaleur).

Une fois les boîtes de Pétri coulées, laisser refroidir jusqu'à la prise complète de la gélose, puis stocker à 4 °C couvercle en bas.

4 Mise en place

4.1 Préparation enseignant

- Coulage du milieu dans les boîtes de Pétri (selon le kit)
- Repiquage des levures souches

Avant d'ouvrir la boîte de Pétri contenant les levures souches, veillez à nettoyer le poste de travail à la javel, les mains à l'alcool et portez une blouse. Tout le matériel au contact des levures et des boîtes de Pétri doit être stérile.

Un bec électrique de microbiologie permettant de créer une zone de stérilité est à envisager pour éviter toutes contaminations. Il est préférable de travailler dans cette zone de stérilité pour toutes les manipulations ci-dessous.

Préparation de la suspension de levure

- Ouvrir la boîte de *S.cerevisiae* et récupérer 2 colonies de levure à l'aide d'un inoculateur stérile.
- Mettre en suspension ces colonies dans un tube stérile avec 2 mL d'eau stérile. (1 colonie de 1 mm environ pour suspension dans 1 mL d'eau stérile).
- Agiter cette solution au vortex, elle doit être légèrement trouble.
- Répéter cette opération pour chaque binôme.

Autre alternative : On peut également réaliser des suspensions de concentrations connues de levure à 10^3 cellules/mL. Ceci est plus rigoureux mais également plus exigeant en termes de temps et de matériel (voir protocole en fin de notice)

4.2 Manipulation élève

• Préparation des boîtes de gélose YPG

Chaque binôme dispose de 5 boîtes de Pétri, identifier sur le fond à l'aide d'un marqueur comme suit :

t 0 s / t 15 s / t 30 s / t 60 s / t 120 s

- A partir de la solution préparée précédemment, déposer dans chaque boîte 2 gouttes de solution de levure (à l'aide d'une pipette pasteur stérile) au centre de la boîte.
- Utiliser l'étaleur stérile de façon circulaire afin de répartir les levures sur toute la surface de la boîte, jusqu'à ce que celles-ci apparaissent sèches (les levures doivent bien imprégner l'agar, pour assurer une répartition homogène). Refermer.

• Exposition des boîtes aux UV

4 des boîtes vont subir une exposition aux UV, la 5^{ème} boîte t 0 servira de témoin.

- Les couvercles sont ôtés le temps de l'exposition (car le rayonnement UV ne traverse pas le polycarbonate).
- La lampe doit être réglée sur $\lambda = 254$ nm (UV-C). Certains groupes peuvent réaliser l'expérience à une longueur différente ($\lambda = 365$ nm) afin de comparer la dangerosité des rayonnements UV-A.
- Stocker les boîtes de Pétri dans un incubateur à 28 °C. Les résultats seront visibles dès le 5^{ème} jour.
- En l'absence d'incubateur, laisser les boîtes de Pétri à température ambiante durant 2 jours de plus.

• Elimination des boîtes :

- Ne pas jeter les boîtes à la poubelle, il faut détruire les cultures par stérilisation auparavant,
- Après l'observation, placer les boîtes dans de l'eau de javel diluée pendant 48h.

Vous pouvez également utiliser un autoclave (120 °C pendant 20 minutes).

4.3 Complément d'utilisation de la lame de numération KOVA® slide 10

a) Utilisation

Lames à usage unique pour la cytologie.

b) Caractéristiques

- Chaque lame comporte 10 cupules individuelles à grille quadrillée.
- Le volume de liquide retenu sur la grille est de 1 μ L (1 mm³).
- Dimensions externes de la grille : 3 x 3 mm.
- La grille comporte 9 cases, chacune d'entre elles étant subdivisée en 9 petits carrés (voir ci-dessous).

c) Mode opératoire

- Utilisation avec des levures : prélever un échantillon de levures en agitation (suspension à 5 %) et le diluer au 1/50^{ème} (0,1 mL dans 4,9 mL d'eau). 1 g de levure fraîche correspond à environ 10⁹ cellules.
- A l'aide d'une micropipette, introduire 6 μ L environ de milieu contenant les cellules à compter dans la cupule (ou une grosse goutte avec une pipette Pasteur) et observer au microscope (x100). Ne compter que les cellules situées à l'intérieur des carrés ; les cellules à cheval sur les traits de la grille ne sont pas prises en compte.
- En fonction de la densité cellulaire, le nombre total N de cellules dans 1 μ L s'obtiendra soit :
 - en comptant sur toute une grille. N = nombre de cellules observées.
 - en comptant le nombre n1 de cellules situées dans 9 petits carrés (1 case). N = n1 x 10*

- en comptant le nombre n_2 de cellules situées dans 1 petit carré. $N = n_2 \times 100^*$

*** Remarques**

On admet que les différents traits de la grille représentent 11 % de la surface. Comme on ne compte que les cellules situées à l'intérieur des carrés, il convient de multiplier le résultat par 1,1.

Ainsi :

- lorsque l'on compte le nombre n_1 de cellules dans 9 petits carrés (une case) : $N = n_1 \times 9 \times 1,1 = n_1 \times 10$.
- lorsque l'on compte le nombre n_2 de cellules à l'intérieur d'un petit carré : $N = n_2 \times 81 \times 1,1 = n_2 \times 90$.

Dans ce dernier cas, on peut soit arrondir en multipliant n_2 par 100, soit, pour être plus précis et par mesure de commodité, calculer $n_2 \times 100$ et soustraire 10 % en arrondissant au besoin.

5 Service après-vente

Pour toutes questions, contacter le **Support Technique** au **0 825 563 563***.

* 0,15 € TTC/min. à partir un téléphone fixe

Assistance technique en direct

Une équipe d'experts
à votre disposition
du lundi au vendredi
de 8h30 à 17h30

- Vous recherchez une information technique ?
- Vous souhaitez un conseil d'utilisation ?
- Vous avez besoin d'un diagnostic urgent ?

Nous prenons en charge
immédiatement votre appel
pour vous apporter une réponse
adaptée à votre domaine
d'expérimentation :
Sciences de la Vie et de la Terre,
Physique, Chimie, Technologie.

Service gratuit*

0 825 563 563 choix n°3**

* Hors coût d'appel. 0,15 € TTC/min à partir d'un poste fixe.
** Numéro valable uniquement pour la France métropolitaine et la Corse. Pour les DOM-TOM et les EEE, composez le +33 2 32 29 40 50.

Aide en ligne
FAQ.jeulin.fr

Direct connection for technical support

A team of experts
at your disposal
from Monday to Friday
(opening hours)

- You're looking for technical information ?
- You wish advice for use ?
- You need an urgent diagnosis ?

We take in charge your request
immediately to provide you
with the right answers regarding
your activity field : Biology, Physics,
Chemistry, Technology.

Free service*

+33 2 32 29 40 50**

* Call cost not included.
** Only for call from foreign countries.

