



Génétique

Transgénèse

Réf :
117 117

Français - p 1

Kit Transgénèse de la levure collège

Version : 8106

1. Description

L'objectif de cette activité expérimentale est de montrer l'unité du vivant et en particulier le caractère universel de l'ADN comme support de l'information génétique. Dans le kit que nous proposons, l'élève réalise une transgénèse et pourra la visualiser à l'aide d'une protéine fluorescente : la GFP (Green Fluorescent Protein). Le gène de la GFP est extrait de la méduse *Aequorea victoria*, ce gène a été intégré à un plasmide bactérien qui est introduit, lors de la transgénèse, dans une levure *Saccharomyces cerevisiae* où il sera exprimé. Lorsque la transformation des levures a réussi, les colonies sont alors visibles sur un milieu minimum (le plasmide est également porteur d'un gène de sélection) et fluorescente sous une lumière UV ou bleue.

1.1 Principe général

La transgénèse est une technique qui permet l'insertion d'un ou plusieurs gènes dans un organisme, cette technique est utilisée dans de nombreux domaines de la biotechnologie comme l'agriculture (résistance contre le gel, sécheresse, parasites...), la protection de l'environnement, ou encore en médecine (thérapie génique).

Au cours de ce TP, les élèves vont effectuer une transformation de levure. Celle-ci consiste en l'introduction d'un nouveau fragment de matériel génétique (ADN) au sein des levures. Si cet ADN est correctement exprimé, alors l'organisme sera pourvu de nouveaux caractères que l'on pourra chercher à identifier.

Cette transgénèse sera réalisée avec un ADN circulaire de petite taille, un plasmide, qui est présent de façon naturelle dans certaines levures et les bactéries. Ce plasmide a été préparé artificiellement en laboratoire et porte le gène de la **GFP** issue de la méduse, ainsi qu'un gène codant pour l'**uracile**. L'organisme hôte est une levure *Saccharomyces cerevisiae* BY4709 qui présente une mutation dans la chaîne de synthèse de l'uracile. Uracile est une base nucléique spécifique de l'ARN, indispensable à la vie de la cellule. Étant inapte à la synthèse de l'uracile, la levure *S. cerevisiae* BY4709 (URA-) puise donc l'uracile directement dans le milieu, sur un milieu minimum dépourvu d'uracile (URA-) elle est incapable de se développer.

L'introduction du plasmide s'effectue sur des levures fraîches. Le taux de transformation (plasmide introduit et exprimé au sein de la levure) étant relativement faible, il est nécessaire de distinguer les levures ayant été transformées des autres. Pour cela, on « cible » spécifiquement les cellules transformées à l'aide d'une culture sur un milieu sélectif URA-. Ainsi, le plasmide apporte 2 caractères nouveaux, la levure devient apte à synthétiser l'uracile et exprime la protéine GFP.

Pour montrer l'intérêt du criblage (screening), l'élève réalise la culture des levures transformées sur 2 milieux :

- Milieu complet YPG (milieu témoin), qui permet à toutes les levures de se développer
- Milieu sélectif URA- où l'on visualise uniquement les colonies de levure transformées contenant la protéine fluorescente.

3 à 4 jours de culture à 37 °C sont nécessaires avant d'observer simultanément les 2 boîtes de culture témoin et URA-. Sous un éclairage en lumière UV (360 nm minimum) la boîte URA- présente quelques colonies qui apparaissent éclatantes d'une couleur jaune-vert alors que la boîte témoin YPG présente un tapis de levures beige pales non fluorescentes.

La protéine GFP synthétisée fluorescence un maximum sous une lumière UV ou bleue.

1.2 Une expérience en 3 étapes

1. 3 à 4 jours avant le TP : Culture d'une souche fraîche de levure par le professeur et coulage des boîtes de gélose YPD et URA- réalisé par le professeur ou les élèves.
2. Le jour du TP (durée : 1h30) : récupération d'une colonie par binôme / élève, transformation et ensemencement de 2 boîtes.
3. 3 jours après le TP : Lecture des boîtes → par les élèves.

1.3 Contenu du kit

Le kit transgénèse collège est composé des éléments suivants :

- 1 boîte de levure BY4709 sur milieu gélosé
- 5 micro-tubes contenant 125µL de solution de transformation
- 1 tube à hémolyse contenant 60µL de plasmide en solution (2µg/10µL)
- 1 tube à hémolyse contenant 60µL de solution d'ADN « carrier »
- 1 tube à hémolyse contenant 5 cure-dents
- 1 lot de 10 inoculateurs stériles de 10µL
- 1 inoculateur stérile (emballage unitaire)
- 1 lot de 5 râteaux à ensemencer
- 1 lot de 15 boîte de pétrie diam 55 stériles
- 1 flacon de 90mL de milieu gélosé YPD stérile (prêt à couler)

Matériel complémentaire (non fourni dans le kit) :

- Pipette stérile ou micropipette
- Papier absorbant
- Lampe UV
- Bain-marie

2. Protocole

2.1 Adapter le poste de travail aux manipulations microbiologiques et de biologie moléculaire

Ce TP a été conçu pour le collège ...

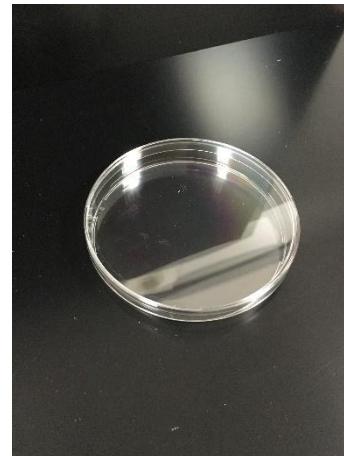
2.2 Avant le TP (3-4 jours avant)

Repiquage de la souche de levure *S. cerevisiae* URA-

Reiquer une colonie sur un milieu frais en suivant la technique d'ensemencement par épuisement (détalée par la suite) afin d'obtenir des colonies fraîches distinctes pour le TP (au moins 5).

Pour ce faire :

Liquéfier le milieu YPD fourni en le mettant au micro-onde bouchon dévissé.



- Pour le **Milieu YPD** repiquage : couler le milieu dans 2 à 3 boîtes de pétri stérile 55 mm fournies (en conditions « propres » → paillasse désinfectée, pas de courant d'air, temps minimum d'ouverture des boites). Laisser le milieu se solidifier à température ambiante durant une vingtaine de minutes.
- Prélever à l'aide d'un cure dent, une colonie existante sur la boîte de pétri contenant les colonies.
- La diluer dans environ 1ml d'eau stérile (non fournie) à l'aide d'une pipette stérile.
- Ensemencer par la technique d'épuisement : Prélever une partie de la solution sur la boîte de pétri préalablement coulée avec le milieu YPD fourni et l'étaler à l'aide d'une anse stérile fournie en sachet individuel comme indiqué sur le schéma suivant :

Technique d'ensemencement par épuisement avec une anse :



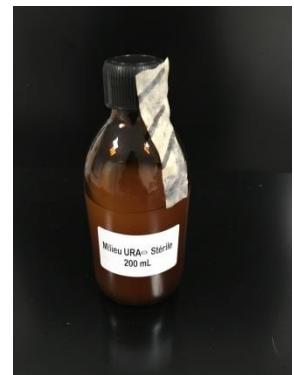
- Laisser reposer 5 min puis retirer le surplus en retournant la boîte de pétri sur une feuille de papier absorbant (non fournie),
Mettre en culture à 37°C durant 3-4 jours afin d'obtenir des colonies suffisamment importantes.

2.3 Avant le TP ou le jour du TP

Préparer les boîtes de pétri pour les ensemencements des levures transformées :

- Liquéfier les milieux YPD et URA- fournis en les mettant au micro-onde (bouchons dévissés); vérifier toutes les 15-20s l'avancement de la liquéfaction, agiter manuellement pour homogénéiser.
- Couler le milieu dans les boîtes de pétri 55mm stériles fournies (15 de chaque milieu).
- Laisser le milieu se solidifier à température ambiante durant une vingtaine de minutes.
- Retourner les boîtes de pétri.

Conservation : les boîtes de pétri peuvent se conserver plusieurs jours au réfrigérateur (couvercle vers le bas pour éviter la condensation). A sortir avant le TP pour rééquilibrage à température ambiante avant ensemencement toujours couvercle en bas.



2.4 Jour du TP

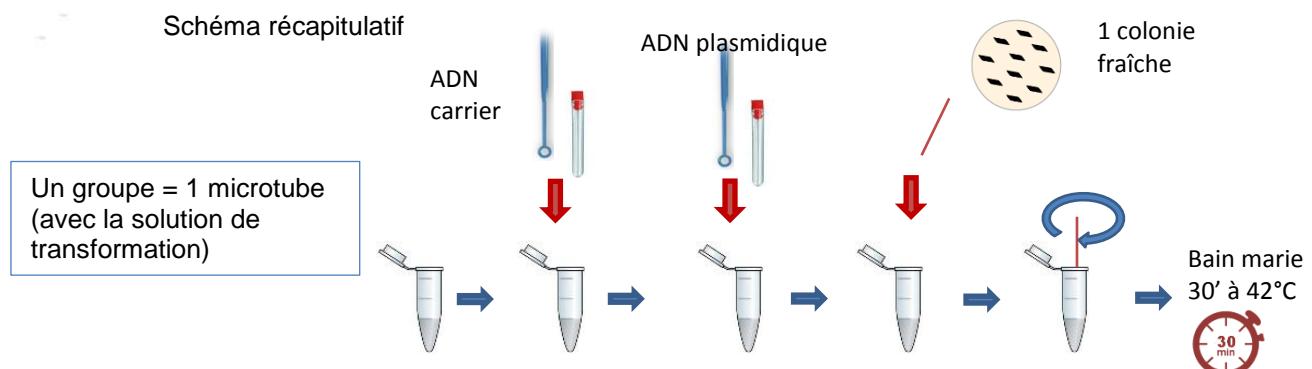
Matériel par poste :

- 1 ptube de solution de transformation
- 2 inoculateurs stériles
- 1 cure dent

Première étape :

A partir du microtube contenant la solution de transformation :

1. Ajouter la solution ADN « Carrier », pour cela :
 1. Plonger la boucle de l'inoculateur dans le tube ADN carrier (solution facilitant la transformation).
 2. Tapoter la boucle sur les bords du microtube pour faire tomber la goutte (10µl env).
2. Ajouter la solution ADN plasmidique pour cela :
 1. Plonger la boucle de l'inoculateur dans le tube ADN plasmidique
 2. Tapoter la boucle sur les bords du microtube pour faire tomber la goutte.
3. Fermer le microtube, regrouper toutes les gouttes en tapant fermement le fond du microtube sur la paillasse (les gouttes doivent être bien rassemblées pour l'étape suivante)
4. Prélever une colonie fraîche de 3-4mm de diamètre à l'aide d'un bâtonnet stérile (fournis dans le tube à bouchon rouge).
5. Transférer cette colonie dans le microtube et homogénéiser avec le cure dents en agitant vivement.
6. Incuber le microtube (fermé) 30 minutes dans un bain-marie thermostaté à 42°C



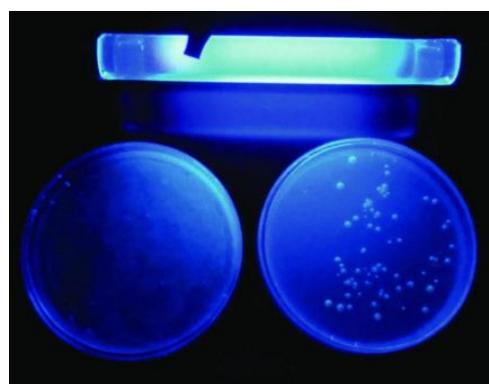
Vous pouvez également réaliser cette étape à 37°C ou à 30°C durant 30min ou 1 nuit à température ambiante ; les transformants seront présents mais en moins grande quantité.

Seconde étape

7. Une fois l'incubation terminée, étaler à l'aide d'un râteau le contenu du microtube sur 2 boîtes de milieu gélosé (une moitié du tube pour chaque boîte):
 1. 1 boîte YPD (témoin)
 2. 1 boîte URA- (milieu sélectif des levures transformées)
8. Transférer la moitié de la solution contenant les levures transformées sur une boîte de pétri contenant le milieu sélectif (URA-) préalablement préparées (Boîtes de pétri de 55mm) et l'autre moitié de la solution sur une boîte de pétri contenant le milieu YPD, qui servira de témoin, à l'aide d'un râteau (fourni -).



9. Incuber les boîtes de pétri à 30°C jusqu'à l'observation des transformants (3-4 jours)
10. Visualiser l'efficacité de la transformation sous une lampe UV permettant l'observation de la fluorescence de la protéine GFP ([Photo ci-dessous](#)).



Lecture des résultats

Lorsqu'une colonie apparaît sur la boîte URA – cela indique que la levure, à l'origine de la colonie à forcement acquis la résistance provenant du plasmide, on dit alors que la levure a été transformée.

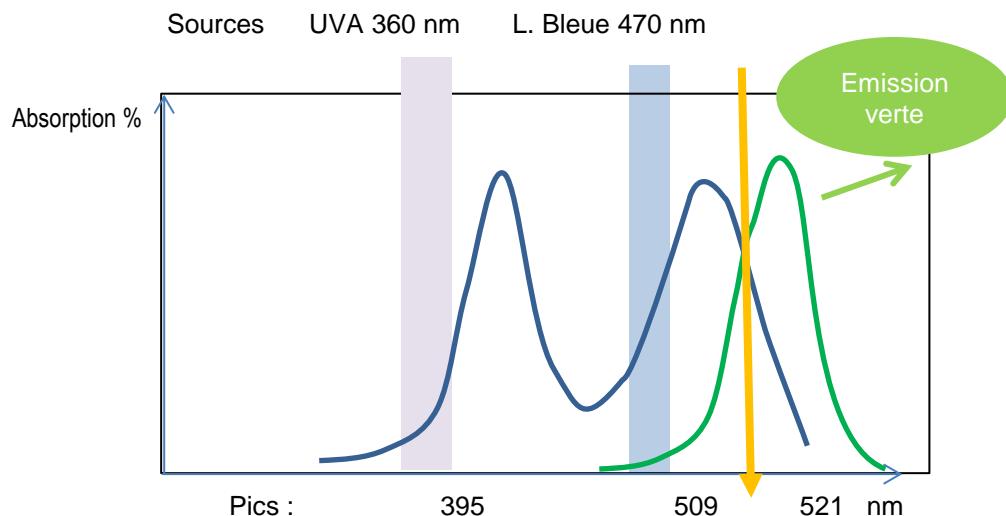
La protéine *daGFP

Le plasmide intégré, code pour une protéine fluorescente appelée daGFP, cette protéine dérivée de la GFP native possède des caractéristiques spectrales légèrement différentes. Elle peut être utilisée classiquement en excitation UV (max 395 nm) et présente aussi un second pic d'excitation à 510 pour une émission à 521 nm à 540 nm (vert).

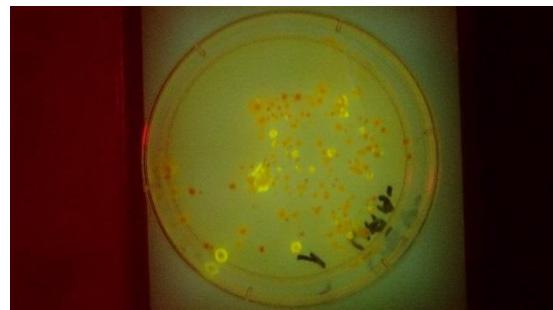
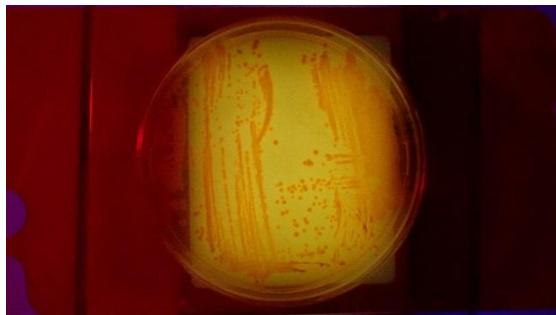
On peut donc utiliser

- Une source UVA (type mini lampe UV à main) dont la longueur d'onde se situe vers 360 – 370 nm les colonies devient d'un blanc éclatant avec des reflets jaunes verts.
- Une source de lumière bleue 470 nm

La visualisation est facilitée en couplant avec un filtre orange, qui coupe les émissions en dessous de 510 nm.



Levures sur boîte YPG → Levures transformées avec GFP



Transilluminateur et filtre orange



Chambre noire pour transilluminateur



2.5 Sécurité et destruction des souches

La transgénèse est une manipulation expérimentale qui a pour objectif de produire un organisme génétiquement modifié. La mise en œuvre d'OGM est soumise à une réglementation stricte de traçabilité et de confinement.

Selon les recommandations du Haut Conseil des Biotechnologies(HCB), les manipulations sur les levures non pathogènes telles que *S. cerevisiae*, associée à une séquence exprimée non pathogène doivent s'effectuer conformément aux conditions de confinement C1⁽¹⁾⁽²⁾. Cette classification n'engendre pas d'aménagement spécifique du laboratoire ni de procédure de destruction particulière⁽³⁾.

Nous vous invitons cependant à prendre connaissance des précautions de manipulation préconisés par HCB et le Ministère de l'Education nationale.

⁽¹⁾ Manuel du HCB pour l'utilisation confinée d'organismes génétiquement modifiés

« 1. Dans des bactéries ou des levures non pathogènes de classe 1

Par exemple *E. coli* (souche K-12 et dérivés non pathogènes), autres bactéries de classe 1 et levures non pathogènes telles que *S. cerevisiae*.

a. La séquence exprimée est dépourvue d'effet pathogène ou délétère, direct ou indirect :

• le classement sera C1 ; »

⁽²⁾ Art. D. 532-3.-Le classement, prévu par l'article L. 532-1, des utilisations confinées d'organismes, en particulier de micro-organismes, génétiquement modifiés en classes de confinement en fonction du groupe de l'organisme défini à l'article D. 532-2 et des caractéristiques de l'opération, obéit aux critères suivants :

« 1° La classe de confinement 1 est constituée des opérations mettant en œuvre des organismes génétiquement modifiés du groupe I et dont le risque pour la santé humaine et pour l'environnement est nul ou négligeable ; »

⁽³⁾. Manuel du HCB pour l'utilisation confinée d'organismes génétiquement modifiés – Annexe III.1

I. Description des différents types de confinement

Confinement C1

a) *Pratiques de travail*

1) Les surfaces de travail sont nettoyées et désinfectées chaque jour et immédiatement après tout incident conduisant au déversement d'organismes contenant des molécules d'ADN recombinant.

2) Tous les déchets biologiques et les fluides sont stérilisés (ou à défaut inactivés par des procédures validées) avant destruction ou rejet. Les matériels contaminés par des microorganismes génétiquement modifiés tels que la verrerie, les cages pour les animaux et les équipements de laboratoire doivent être décontaminés avant le lavage, le réemploi ou la destruction.

3) Le matériel de pipetage mécanique doit être utilisé, le pipetage à la bouche est interdit.

4) Les manipulations doivent être faites de manière à minimiser la création d'aérosols.

5) Manger, boire, conserver des aliments, et toute activité qui n'est pas en lien avec l'expérimentation ne sont pas autorisés dans l'aire de travail.

6) Le port d'une blouse, ou d'un vêtement spécifique de laboratoire est requis. Les vêtements de laboratoire ne sont pas portés en dehors du site.

7) Le personnel doit se laver les mains après avoir été en contact avec des organismes contenant des molécules d'ADN recombinant et quand il quitte le laboratoire.

b) *Équipement de confinement*

Un équipement spécial de confinement n'est pas requis au niveau C1.

c) *Agencement spécial du laboratoire*

Un modèle spécial de laboratoire n'est pas requis au niveau C1.

3. Service après-vente

Pour tous réglages, contacter le **Support Technique** au **0 825 563 563**.

La garantie est de 2 ans, le matériel doit être retourné dans nos ateliers et pour toutes les réparations ou pièces détachées, veuillez contacter :

JEULIN – S.A.V.
468 rue Jacques Monod
CS 21900
27019 EVREUX CEDEX France

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 EFE, 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.



468, rue Jacques-Monod, CS 21900, 27019 Evreux cedex, France

Métropole • Tél : 02 32 29 40 00 - Fax : 02 32 29 43 99 - www.jeulin.fr - support@jeulin.fr

International • Tél : +33 2 32 29 40 23 - Fax : +33 2 32 29 43 24 - www.jeulin.com - export@jeulin.fr

SAS au capital de 1 000 000 € - TVA intracommunautaire FR47 344 652 490 - Siren 344 652 490 RCS Evreux