

# TRANSFECTION

## Création d'un O.G.M. procaryote

### Comparaison de deux méthodes de transformation d'*E. coli* K12 par un vecteur plasmidique (pGlo)

## 1. PRINCIPE

En génie génétique **la transfection** désigne toutes les opérations permettant de faire pénétrer une molécule d'ADN dans une cellule pour laquelle il est étranger.

La transfection peut utiliser des moyens :

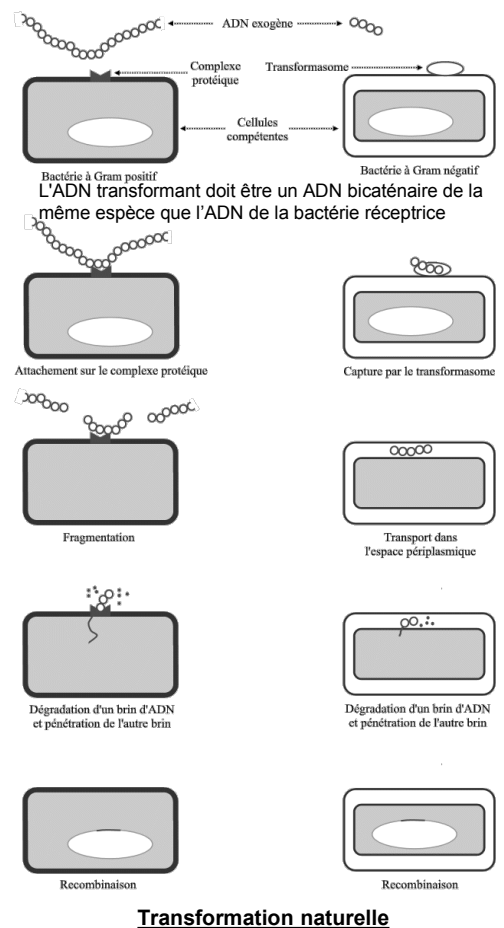
- **naturels** : transformation, transduction, conjugaison
- **artificiels** : électroporation, liposomes, bombardement, molécules chimiques transporteuses, ....

L'ADN étranger peut exprimer ou non des gènes qu'il contient de manière **constitutive** (c'est rarement le cas) ou **régulée** (sous la dépendance de facteurs contrôlés : I.P.T.G. ; arabinose).

Cet ADN est souvent associé à une molécule d'ADN porteuse : le **vecteur de clonage** qui lui confère certaines propriétés :

- stabilité (réplication autonome) ;
- sélectivité : présence d'au moins un marqueur de sélection (ex : résistance à l'ampicilline);
- manipulable au moyen de sites uniques de restriction).

Un organisme génétiquement modifié (définition complète en annexe 1) sera créé dès qu'il aura reçu un ADN codant ou non qui n'a encore jamais existé dans son espèce. Tous les O.G.M. doivent être déclarés aux autorités compétentes (commission de génie génétique) et faire l'objet d'un confinement approprié pour éviter sa dissémination dans l'environnement. Son A.D.N. doit être détruit avant rejet des déchets dans l'environnement.



## 2. EXEMPLE la transformation d'*E. coli* par un vecteur plasmidique par la méthode au chlorure de calcium et choc thermique

L'objectif de ce TP est de transférer dans une souche hôte *Escherichia coli* JM109 ampicilline sensible des gènes portés par un plasmide : pGlo et de sélectionner les hôtes transformés à l'aide d'un antibiotique de sélection l'ampicilline.

### 2.1. Principe de la technique de transformation classique des procaryotes

Avant sa transformation la bactérie est rendue **compétente**; c'est à dire que l'on s'assure que son état physiologique garantira une **efficacité maximum de transformation** (exprimée en nombre d'U.F.C. par  $\mu$ g d'ADN transformant). Pour cela il faudra obtenir des cellules venant de se diviser plusieurs fois au cours de la phase exponentielle : à ce moment les membranes sont étirées au maximum et la paroi cellulaire est plus perméable (une vieille paroi est plus réticulée), d'autre part la cellule est dans un état énergétique lui permettant de résister au mieux aux traitements traumatisants de la transformation.

## Méthode au chlorure de calcium

Les cellules refroidies sont mises en contact d'une solution concentrée de **chlorure de calcium**. Le **calcium chélate les phospholipides** des membranes et participe à la **rigidification** des membranes à **froid**. De plus le calcium **neutralise l'ADN transformant** et lui permet de sédimenter au contact de la membrane avant sa pénétration.

La pénétration de l'ADN transformant se fait au cours du **choc thermique** qui crée des pores dans les membranes qui laissent entrer l'ADN, mais également laissent sortir des nutriments vitaux. La mortalité des cellules est très importante lors du choc thermique.

### **2.2. Principe de sélection des clones recombinants et expression du gène cloné**

La plupart du temps, il existe dans le vecteur de clonage (ici un plasmide) un système appelé **marqueur de sélection** permettant de ne laisser survivre après transformation que les cellules **transfectées**. Le marqueur de sélection apporte un **avantage sélectif** aux bactéries : ici elles vont pouvoir résister à l'ampicilline ( $\beta$ -lactamase) grâce au gène constitutif porté par le plasmide à la condition de laisser le gène s'exprimer avant de mettre les cellules transformées en contact avec le milieu sélectif. C'est pourquoi les cellules transformées seront cultivées un temps proche du temps de génération, sur un milieu nutritif sans antibiotique avant d'être cultivées sur le milieu de sélection.

Le **clonage** est une transfection dont le but est de **multiplier** l'ADN étranger dans un **clone** cellulaire d'un organisme hôte. L'**ADN étranger** est souvent introduit dans une molécule porteuse appelé vecteur de clonage, on l'appelle donc un **insert**. Le vecteur ayant incorporé un insert est un **vecteur de clonage recombiné**.

Si l'insert code pour un gène fonctionnel (ce n'est pas toujours le cas), il peut parfois être exprimé dans l'hôte à condition de posséder les signaux de transcription appropriés. Dans le cas présent le **plasmide pGlo** code pour une **protéine fluorescente la "green fluorescent protein" ou G.F.P.** dont le gène est activé en présence d'**arabinose** (pour pGlo) ou l'**IPTG** pour pET15-EGFP.

## **3. PROCOLE DES MANIPULATIONS**

### **Les grandes étapes de la manipulation à réaliser en binôme**

Préparation des bactéries compétentes : comparaison de deux techniques;  
Transformation par le plasmide pGlo par choc thermique pour les deux techniques;  
Expression du gène de la  $\beta$ -lactamase ;  
Sélection des recombinants sur milieu + ampicilline;  
Visualisation de l'expression de la GFP induite par le lactose ou l'I.P.T.G.

### **3.1. Préparation des cellules compétentes**

Vous allez devoir tester deux protocoles : le protocole en 3.1.1. correspond à l'utilisation du chlorure de calcium et le protocole concurrent proposé par GE Healthcare est donné sous sa forme originale en anglais en annexe 2.

◆\* **Attention ! : Toutes les manipulations de type microbiologique se feront stérilement** ◆\*

#### **3.1.1. Obtention et Dénombrement de la culture en phase exponentielle de croissance**

- Ensemencer un Erlen de 30 mL de milieu de <sup>1</sup>Luria Bertani préincubé à 37°C avec X mL de préculture de 10mL de la souche \_\_\_\_\_ de manière à obtenir une absorbance de 0,1 au plus et suivre la croissance par la mesure de l'absorbance à 600 nm.

*☞ **Montrer la réalisation d'un prélèvement et d'une mesure d'absorbance à un examinateur***

*☞ **Montrer l'ensemencement du milieu neuf à un examinateur***

<sup>1</sup>milieu LB : 10 g NaCl , 5 g extraits de levure, 10 g peptones q.s.p. 1 L H<sub>2</sub>O  
TP Transformation JD/SM/CB - Bio 2 - 2009/2010

- Faire une première lecture au bout de 15 minutes environ, puis prendre les décisions qui s'imposent sachant que : (utiliser du papier semi-log ou un logiciel)
  - G (le temps de génération) est d'environ 30 minutes.
  - la culture doit être trempée dans la glace lorsque l'absorbance atteint 0,4 (pas plus !).
- Laisser la culture au moins 15 minutes dans la glace (ou dans la centrifugeuse déjà réfrigérée).

*☞* **Montrer la réalisation des dilutions en séries**

*☞* **Montrer la réalisation des dépôts**

### 3.1.2. Méthode au chlorure de calcium

☛ **Attention : à partir de ce moment, tous les instruments utilisés doivent être froids.** ☛

- Centrifuger 15 mL de culture à 1600 g pendant 10 minutes dans un tube conique et froid dans la centrifugeuse réfrigérée à 0°C.

**Remarque :** cette souche fragile est conservée par congélation à -20°C ou -80°C dans 15 % de glycérol. A cette étape le reste de culture peut être utilisé pour renouveler le stock. A 0,15 mL de glycérol stérile et froid sont ajoutés 0,85 mL de culture dense. Le tube Eppendorf correctement étiqueté (souche, date) est congelé après 1 à 2 heures passées à 4 °C. Le stock est alors utilisable plusieurs mois; on le récupère en grattant la surface congelée de la suspension glycinée; les copeaux suffisent pour réensemencer un milieu liquide (B.H.I.). Les souches rendues compétentes peuvent être conservées de la même manière.

- Jeter le surnageant devenu inutile dans un Erlen additionné de « 3 en 1 ».
- Remettre le culot en suspension dans 10 mL de chlorure de calcium stérile (CaCl<sub>2</sub>) à 75 mmol.L<sup>-1</sup> et à 4°C au maximum. Attention, à partir de cette étape les cellules sont fragilisées et doivent être manipulées avec précaution (plus de vortex !).
- Centrifuger de la même manière que précédemment et jeter le surnageant.
- Remettre délicatement le fragile culot de cellules dans 0,45 mL de CaCl<sub>2</sub> par rotation manuelle du tube ou par de douces aspirations et refoulements.
- Laisser les cellules au moins 30 minutes (au plus 48 heures) dans la glace fraîche.

### 3.1.3. Méthode proposée par GE Healthcare

Le protocole concurrent est donné sous forme du document original en anglais en **annexe 2**.

## 3.2. Transformation des cellules compétentes et Expression du gène de la β-lactamase

Les membranes rigidifiées par la température basse et stabilisées par le CaCl<sub>2</sub> vont s'ouvrir brièvement lors d'un choc thermique à 42 °C, et laisser passer l'ADN transformant. Les membranes se refermeront dès le choc thermique passé. Ce procédé est très destructeur et peu de bactéries y survivent, d'autre part peu de bactéries auront intégré un fragment d'ADN.

- Préparer 2 tubes à hémolyses stériles les marquer respectivement **T** (Témoin) et **P** (Plasmide) au crayon indélébile. **Les mettre dans la glace**
  - Prévoir une réserve d'environ 5 mL de milieu LB stérile dans un tube stérile.
  - Déposer stérilement 200 µl de la suspension de cellules compétentes dans chacun des tubes à hémolyse glacés. LAISSER LES TUBES DANS LA GLACE.
  - Dans le tube T on n'ajoutera pas de plasmide (témoin cellules).
  - Dans le tube P, ajouter 1 ou 5 ou 10 ng de plasmide pGlo (voir organisation au tableau une quantité à tester par binôme). Rincer le cône par avec la suspension, puis mélanger doucement par rotation.
  - Replacer les tubes T et P dans la glace pendant 30 minutes environ.

### **Précautions pour garder l'ADN plasmidique intact**

- mettre des gants pour ouvrir le tube (protection contre les nucléases)
- le refermer immédiatement après emploi
- conserver constamment ce tube sur la glace surtout lors du passage d'un poste de travail à l'autre
- ne pas chauffer le tube dans la main ; ne pas le mettre près de la flamme
- ne pas le renverser

- **Choc thermique** : bien respecter la technique. C'est à ce moment là que l'ADN plasmidique pénètre dans la cellule. On va faire passer les tubes **T** et **P** de 4°C à 42°C. Opérer comme suit :
  - s'assurer qu'un bain thermostaté à 42°C avec portoir pour tubes à hémolyse est disponible ;
  - après les 30 minutes dans la glace, porter les 2 tubes dans leur bac à glace à côté du bain à 42°C. Se munir d'un chronomètre ;
  - plonger les 2 tubes dans le bain à 42°C pendant 90 secondes EXACTEMENT ;
  - refroidir ensuite les tubes dans la glace 1 à 2 minutes par trempage ;
  - dans chacun des tubes T et P, ajouter stérilement 2 mL de milieu LB.

Incuber les tubes **1 heure** au bain thermostaté agité à 37°C pour exprimer la résistance plasmidique.

### **3.3. Sélection des bactéries transformées**

La sélection est effectuée sur milieu L.B. + ampicilline (à 50 µg.mL<sup>-1</sup> final)

Préparation des boîtes de milieux sélectifs (au minimum une heure avant utilisation):

- Couler 2 boîtes de milieu L.B. par binôme (couche de 4 mm) après avoir ajouté stérilement l'ampicilline (50 µg.mL<sup>-1</sup> final). Étaler 100 µL pour le tube traité par la technique au CaCl<sub>2</sub> et étaler 100 ou 10 µL pour la technique de Amersham (voir consignes au tableau).
- Pour le groupe, deux boîtes de milieu L.B. sans additifs (notées Témoin SA) et deux boîtes avec ampicilline (notées Témoin A) seront coulées et chacun réalisera une strie sur un des 6 secteurs de la boîte avec son tube T.
- Retourner les boîtes une fois bien sèches et les incuber à 37 °C jusqu'au lendemain.

### **3.4. Comptage des colonies et calcul de l'efficacité de transfection**

- Compter le nombre de colonies sur chaque boîte clairement identifiée et inscrire ce nombre au dos. Laisser les boîtes en évidence dans la salle.

## **4. COMPTE RENDU**

### **4.1. Suivi de croissance**

- 4.1.1. Présenter tous les calculs effectués.
- 4.1.2. Consigner dans un tableau les temps de prélèvement et les valeurs d'absorbance.
- 4.1.3. Tracer la courbe de croissance à partir des valeurs expérimentales.
- 4.1.4. Analyser la courbe obtenue.
- 4.1.5. Après l'avoir défini, déterminer par le calcul G et µ.
- 4.1.6. Le prélèvement destiné à l'obtention des cellules compétentes a-t-il été réalisé en phase exponentielle de croissance ?

### **4.2. Transformation des cellules compétentes**

- 4.2.1. Rechercher sur Internet le vecteur pGlo puis le schématiser en plaçant ses éléments constitutifs et expliquer leur rôle.
- 4.2.2. Justifier l'isolement des cellules compétentes (tube **T**) sur milieu LB et LB + ampicilline.
- 4.2.3. Réaliser les schémas de manipulation pour les deux techniques, puis calculer en justifiant votre démarche l'efficacité de transformation pour le cas où l'on compte 560 colonies en moyenne pour 50 ng de plasmide.

- 4.2.4. En supposant que chaque colonie était à l'origine une bactérie transformée par un seul plasmide et sachant que celui-ci fait 4500 paires de base, calculer en vous justifiant le pourcentage d'ADN transformant par rapport à l'ADN total utilisé. MM 1 pb = 660 Dal, N = 6,023 . 10<sup>23</sup>
- 4.2.5. Procéder à la numération des colonies sur chaque boîtes correspondant au tube P (plasmide) même si les colonies sont très nombreuses. Si nécessaire on divise la boîte en 8 secteurs.
- Consigner les résultats sous forme d'un tableau.
  - En déduire le nombre de colonies obtenues pour un volume d'inoculum de 1µL.

---

## **ANNEXE 1 : DÉFINITION DES O.G.M.**

### **DÉFINITION DES ORGANISMES GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉS**

La directive 90-219 \* concernant uniquement les micro-organismes a été transposée en droit français de façon plus étendue à l'ensemble des organismes génétiquement modifiés et non aux seuls micro-organismes génétiquement modifiés (M.G.M.). La loi s'applique donc aux organismes génétiquement modifiés (O.G.M.).

Il faut entendre par "organisme, toute entité biologique non cellulaire, cellulaire ou multicellulaire, capable de se reproduire ou de transférer du matériel génétique ; cette définition englobe les micro-organismes, y compris les virus", précise l'article 1er a) de cette même loi \*. C'est pourquoi, à chaque fois qu'est mentionnée dans un texte l'expression "organismes génétiquement modifiés"(O.G.M.), il faut entendre "y compris les micro-organismes"(M.G.M.).

La loi cependant ne s'applique pas à tous les organismes génétiquement modifiés. L'article 1er b) de la loi définit l'organisme génétiquement modifié comme un "organisme dont le matériel génétique a été modifié autrement que par multiplication ou recombinaisons naturelles".

Le décret 93-774 complète cette définition en spécifiant en son article 1er que sont concernés notamment les O.G.M. obtenus par trois types de techniques :

- 1) Les techniques de recombinaison de l'acide désoxyribonucléique (ADN), visées par la recommandation 82/472/CEE, qui utilisent des systèmes vectoriels.
- 2) Les techniques impliquant l'incorporation directe dans un micro- organisme ou un organisme de matériaux héréditaires préparés à l'extérieur du micro- organisme, ou de l'organisme, y compris la micro-injection et la micro-encapsulation ;
- 3) Les techniques de fusion cellulaire (y compris la fusion de protoplastes) ou d'hybridation dans lesquelles des cellules vivantes présentant de nouvelles combinaisons de matériaux génétiques héréditaires sont constitués par la fusion de deux cellules ou davantage, au moyen de méthodes ne survenant pas naturellement".

Sont en revanche écartés du champ d'application de la loi, les organismes génétiquement modifiés "obtenus par des techniques qui ne sont pas considérées, de par leur caractère naturel, comme entraînant une modification génétique ou par celles qui ont fait l'objet d'une utilisation traditionnelle sans inconvénient avéré pour la santé publique ou l'environnement".

L'article 2 de la loi complété par l'article 2 du même décret 93-774 \* excluent donc :

- les organismes obtenus par plusieurs techniques telles que "1. La fécondation *in vitro* ; 2. La conjugaison, la transduction, l'infection virale, la transformation ou tout autre processus naturel ; 3. L'induction polyploïde à condition qu'elles ne fassent pas appel aux techniques de recombinaison de l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou à des organismes génétiquement modifiés" (article 2-I) ;

- les organismes obtenus par plusieurs techniques telles que "1. La mutagénèse ; 2. La formation et l'utilisation d'hybridomes animaux somatiques ; 3. La fusion cellulaire, y compris la fusion de protoplastes, de cellules provenant de végétaux pouvant être produits par des méthodes de culture ou de multiplication traditionnelles ; 4. L'autoclonage de micro-organismes non pathogènes survenant de façon naturelle et répondant aux critères du groupe I pour les micro-organismes récepteurs ; 5. L'infection de cellules vivantes par les virus, viroïdes ou prions à condition qu'elles ne comportent pas l'utilisation d'O.G.M. en tant qu'organismes récepteurs ou parentaux" (article 2-II).

# **ANNEXE 2 : Document adapté de *GST Gene Fusion System Handbook***

Pages 14 à 16 GE Healthcare ex Amersham Bioscience

## **Preparation of competent cells and transformation**

In these procedures, *E. coli* host cells are made competent and then transformed with either uncut plasmid DNA (eventually recombinant). If electroporation is used to transform the cells, see Appendix 3. Otherwise, proceed as described below. Transform 1 ng of uncut (supercoiled) vector to determine the efficiency of each competent cell preparation. This protocol is based on the procedure of Chung *et al.* (18). All steps in this procedure should be carried out aseptically.

### **Reagents required**

- Use double-distilled H<sub>2</sub>O for preparation of all solutions ;
- Glycerol stock of *E. coli* host strain ;
- **LB medium** and LB medium plates (prepared fresh): Combine 10 g tryptone, 5 g yeast extract, and 10 g NaCl in 900 ml H<sub>2</sub>O. Stir to dissolve, and adjust volume to 1 l. Sterilize by autoclaving. To prepare as a solid medium, add 1.2–1.5% agar ;
- **TSS** (transformation and storage solution) (ice-cold): For 100 ml: combine 1.0 g tryptone, 0.5 g yeast extract, 0.5 g NaCl, 10.0 g polyethylene glycol (Mr 3350), 5.0 ml dimethylsulfoxide (DMSO), and 5.0 ml MgCl<sub>2</sub> (1 M) in 70 ml of sterile distilled H<sub>2</sub>O. Stir until dissolved. Adjust the pH to 6.5 with HCl or NaOH. Adjust to 100 ml with sterile distilled H<sub>2</sub>O. Sterilize by filtering through a 0.2 µm filter. Store at 4 °C. Stable for up to 6 months ;
- **LBG medium** (LB + 20 mM glucose): Dissolve 10 g tryptone, 5 g yeast extract, and 5 g NaCl in 900 ml of distilled H<sub>2</sub>O. Sterilize by autoclaving. After the medium has cooled to 50–60 °C, add 10 ml of sterile 2 M glucose. Adjust to 1 l with sterile distilled H<sub>2</sub>O. To prepare as a solid medium, add 1.2–1.5% agar ;
- **LBAG medium** and plates (LBG + 100 µg/ml ampicillin): See recipe for LBG medium, above. After autoclaving, cool the medium to 50 °C, then aseptically add 1 ml of a 100 mg/ml ampicillin stock solution (final concentration 100 µg/ml). To prepare as a solid medium, add 1.2–1.5 % agar ;
- **Ampicillin** stock solution: Dissolve 400 mg of the sodium salt of ampicillin in 4 ml of H<sub>2</sub>O. Sterilize by filtration and store in small aliquots at -20 °C ;
- Glycerol: 80% in sterile distilled H<sub>2</sub>O.

### **Steps**

#### **Preparation of competent cells**

1. Using sterile technique, streak an *E. coli* host strain (e.g. JM105, BL21, etc.) from a glycerol stock onto an LB medium plate. Incubate overnight at 37 °C.
2. Isolate a single colony and inoculate 50–100 ml of LB broth. Incubate at 37 °C with shaking at 250 rpm. Grow cells to an A600 of 0.4–0.5. **It is critical that the absorbance is not more than 0.5.** This will take approximately 3–6 h. Pre-warming the broth to 37 °C will shorten the growth time.
3. Sediment the 4,5 mL (three times 1,5 mL) cells at approximately 7500 × g for 5 min at 4 °C, then gently resuspend in 1/10 volume (450 µL) of ice-cold TSS and place on ice. Cells must be used for transformations within 2–3 h.

#### **Transformation of competent cells**

1. For each ligation reaction, as well as for the uncut vector control and the negative control (untransformed competent *E. coli* host cells), add 200 µL of freshly prepared competent *E. coli* host cells to separate pre-chilled sterile disposable hemolysis tubes. Store on ice.
2. Add 4 µl of each ligation reaction or 0,2 ng of uncut vector to the competent cells, swirl gently to mix, and place on ice for 45 min. Do not add any DNA to the negative control but instead add 4 µl of sterile distilled H<sub>2</sub>O.
3. Incubate the tubes in a 42 °C water bath for 2 min, then chill briefly on ice.
4. For each sample, immediately transfer 20 µl of the transformed cells to a 17 × 100 mm tube containing 180 µl of LBG medium (pre-warmed to 37 °C) and incubate for 1 h at 37 °C with shaking (250 rpm).
5. Plate 100 µl of the diluted, transformed cells from the ligated samples and 10 µl of the diluted, transformed cells from the uncut vector sample onto separate LBAG plates. Also plate 100 µl of the untransformed, competent *E. coli* host cells. Incubate the plates at 37 °C overnight, then proceed to screening using Procedure 5.
6. To prepare a frozen stock culture, add 100 µl of the diluted, transformed cells containing the plasmid DNA to 1 ml of LBAG medium and incubate for 30 min at 37 °C with shaking at 250 rpm. After incubation, add 200 µl of sterile 80% glycerol and mix with a pipet tip. Store at -70 °C.