

Transformation bactérienne chimique

Jour 1

1. Sortir les bactéries compétentes B834(De3) du congélateur à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ et les faire dégeler sur de la glace. Faire de même avec les plasmides stockés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
2. Pour chaque transformation, transférer $50\text{ }\mu\text{l}$ de bactéries compétentes dans un tube eppendorf de $1,5\text{ ml}$.
3. Ajouter $2\text{ }\mu\text{l}$ de plasmide à une concentration de $15\text{ ng}/\mu\text{l}$. La quantité finale de plasmide doit se situer entre 10 ng et 100 ng . Dans le cas présent, la masse finale de plasmide est de 30 ng .
4. Incuber le mélange de plasmide et de bactéries compétentes pendant 30 minutes sur la glace.
5. Les étapes suivantes se passent près d'une flamme au bec Bunsen afin de ne pas contaminer l'agar avec des bactéries de l'air. Verser l'agar fondu au micro-ondes dans les tubes falcon. Ajouter l'antibiotique après que la température soit descendue suffisamment. Je verse ensuite l'agar liquide dans les boîtes autour de la flamme et je les laisse ouvertes afin qu'elles sèchent.
6. Après les 30 minutes d'incubation sur glace, chauffer les bactéries pendant 5 minutes à $42\text{ }^{\circ}\text{C}$.
7. Remettre les tubes sur glace pendant 2 minutes.
8. Ajouter 1 ml de milieu LB dans le tube eppendorf de $1,5\text{ ml}$ et transférer le tout dans des tubes de culture de 12 ml à incuber pendant 30-60 min à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ à 220 rpm . Cette période de temps permet aux bactéries d'exprimer la résistance à l'antibiotique codée sur le plasmide.
9. Etaler $50\text{ }\mu\text{l}$ sur les boîtes d'agar contenant l'antibiotique. Seules les bactéries ayant incorporé l'antibiotique formeront des colonies pendant la nuit.
10. Incuber du jour au lendemain à 37°C dans le thermostat.

Jour 2

1. Vérifier la présence de colonies dans les boîtes sur lesquelles des bactéries transformées ont été étalées. Vérifier que le contrôle négatif, la boîte sur laquelle des bactéries non transformées ont été étalées, ne contienne pas de colonies.