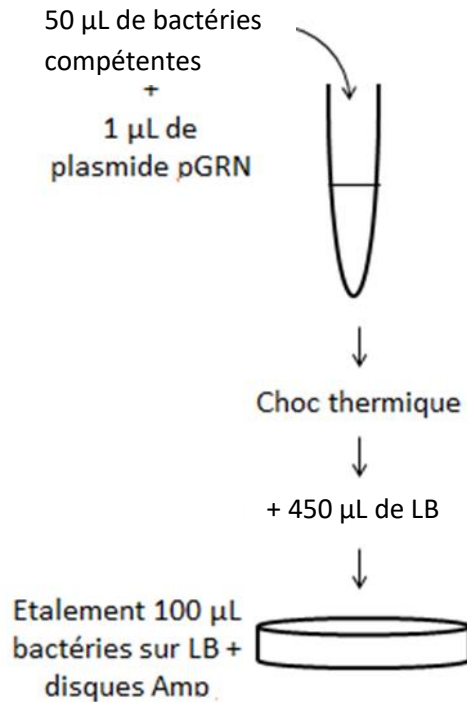


**BIOBUILDER : What a colorful world**

**Transformation d'une souche de E.coli K12 compétente par les plasmides pGRN et pPRL**

Schéma :



Organisation :

16 élèves = 8 binômes

| POSTES   | Eau distillée stérile | Plasmide utilisé       | Volume de bactéries compétentes | Volume de LB | Milieu utilisé      |
|----------|-----------------------|------------------------|---------------------------------|--------------|---------------------|
| 1 et 2   | /                     | 1 µL pGRN              | 50 µL                           | 450 µL       | LB sans ampicilline |
| 3 et 4   | /                     | 1 µL pPRL              | 50 µL                           | 450 µL       | LB sans ampicilline |
| 5 et 6   | /                     | 1 µL pGRN              | 50 µL                           | 450 µL       | LB sans ampicilline |
| 7 et 8   | /                     | 1 µL pPRL              | 50 µL                           | 450 µL       | LB sans ampicilline |
| 9 et 10  | /                     | 1 µL pGRN              | 50 µL                           | 450 µL       | LB avec ampicilline |
| 11 et 12 | /                     | 1 µL pPRL              | 50 µL                           | 450 µL       | LB avec ampicilline |
| 13 et 14 | 1 µL                  | /                      | 50 µL                           | 450 µL       | LB avec ampicilline |
| 15 et 16 | /                     | 1 µL Plasmide contrôle | 50 µL                           | 450 µL       | LB avec ampicilline |

## Protocole :

### 1. Préparer :

- un bain-marie à 42°C.
- un gros bécher avec de la glace.
- un tube Ependorf **annoté** (pGRN ou pPRL, ou témoin + et -) et le mettre dans la glace.
- un tube contenant du LB (0,5 mL par transformation) et le mettre dans la glace.
- un tube à hémolyse vide contenant un cône jaune, un tube à hémolyse vide contenant un cône bleu et les mettre dans la glace

### 2. Sortir les bactéries compétentes du congélateur et les laisser décongeler dans la glace pendant 5 minutes maximum.

*Attention, les bactéries compétentes doivent rester au maximum dans la glace.*

### 3. Mélanger les cellules compétentes en tapotant doucement le tube.

### 4. Prélever rapidement 50 µL de bactéries compétentes avec une pipette automatique adaptée et les introduire dans le tube Ependorf placé dans la glace.

### 5. Ajouter dans le tube Ependorf 1 µL de plasmide (ou d'eau stérile pour les postes 13 et 14) en plongeant le cône dans les bactéries compétentes. Tapoter le tube plusieurs fois et remettre immédiatement dans la glace.

### 6. Laisser dans la glace 10 min.

### 7. Réaliser le choc thermique en mettant les bactéries à 42°C dans le bain-marie pendant 50 secondes. ***Ne pas remuer.***

### 8. Remettre le tube dans la glace pendant 2 min.

### 9. Ajouter 450 µL de milieu LB froid dans chaque tube.

### 10. Incuber à 37°C sous agitation pendant au moins 1h.

### 11. En conditions d'asepsie étaler avec des billes 100 µL

- a. sur une boîte de Pétri annotée contenant du milieu LB solide (sans ampicilline) et ajouter 3 disques d'ampicilline sur la boîte pour les postes 1 à 8
- b. sur une boîte de Pétri annotée contenant du milieu LB solide contenant déjà de l'ampicilline pour les postes 9 à 16

### 12. Incuber la nuit à 37°C.