

Extraction d'ADN plasmidique bactérien

L'objectif de la séance est de purifier de l'ADN plasmidique qui a été introduit dans une souche d'E. coli DH5 α et de vérifier la présence d'un gène inséré dans le plasmide.

Les plasmides sont utilisés en génie génétique comme vecteurs de gènes. Des fragments d'ADN sont incorporés dans les plasmides. Ce vecteur fonctionne comme véhicule propageant le gène dans la cellule hôte, généralement une bactérie mais d'autres cellules peuvent aussi être utilisées après transfection ou transformation. Au départ, le plasmide est introduit dans une bactérie. Du fait de la résistance à l'ampicilline que contient ce plasmide, E. coli cultivé en présence d'E. coli va se multiplier tout en conservant le plasmide. C'est une étape d'amplification.

Les bactéries contenant le plasmide seront traitées de sorte que nous allons récupérer et purifier le vecteur plasmidique. Dans une prochaine séance, nous transformerons des cellules eucaryotes qui exprimeront le gène inséré dans le plasmide.

Le plasmide utilisé ici est le plasmide pCDNA3 II contient le gène de résistance à l'ampicilline ce qui justifie la culture des bactéries en présence d'ampicilline pour maintenir la présence du plasmide A l'intérieur de ce plasmide a été inséré un gène codant pour une sous unité d'un récepteur au GABA (sous unité GABA B1) tandis que l'autre plasmide contient l'autre sous unité du même récepteur (sous unité GABA B2). Chacun de ces gènes codant pour une sous unité d'un récepteur est associé à un gène codant pour une protéine fluorescente. Ces 2 gènes insérés dans le vecteur sont de taille connues, nous allons tenter de vérifier leur présence dans la plasmide par digestion enzymatique et par révélation des produits de digestion par électrophorèse.

Préparation d'ADN plasmidique : miniprep d'ADN plasmidique

1. Protocole: voir polycopié MO BIO Ultraclean Mini Plasmid Prep Kit

- A partir du protocole, présenter les différentes étapes de l'extraction de l'ADN plasmidique.
- A partir du kit, expliquer comment s'opère la récupération de l'ADN plasmidique sans contamination par l'ADN génomique.
- A partir de la solution finale, réaliser une dilution au 1/50^{ième} dans de l'eau stérile (sous un volume final de 200 μ L) et tracer le spectre UV de la solution entre 210 et 330 nm.
- Déterminer les absorbances à 260 nm et 280 nm
- Déterminer le rapport A_{260} / A_{280}
- Conclure quant à la pureté de l'ADN obtenu.
- Calculer la quantité totale et la concentration d'ADN obtenues sachant que 1 unité d'absorbance à 260 nm correspond à une concentration d'ADN de 50 μ g/mL.

2. Digestion et électrophorèse du plasmide

2.1. Protocole

Le plasmide est incubé en présence de 2 enzymes et les fragments obtenus dans chaque mélange réactionnel sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose immergé (technique des minigels) La révélation des bandes génomiques se fait grâce au bromure d'éthydiu incorporé préalablement au gel d'agarose, le gel s'observera en transillumination U.V. puis photographié à l'aide d'un dispositif spécial (système photographique Polaroid).

Par binôme :

- 7 microtubes sont marqués de 1 à 7 et placés dans la glace pilée Introduire dans ces tubes les divers réactifs dans l'ordre indiqué dans le tableau ci-dessous.

Pour éviter toute contamination, changer de cône chaque fois qu'une nouvelle endonucléase est utilisée . Suivre les précautions a usage indiquées dans le document annexe.

Tubes n°	Eau distillée (µL)	Tampon (µL)	ADN(µL)	Enzyme de restriction (µL)
1	12	2 E	6µL d'ADN <i>E. coli</i>	0
2	12	2 E	6µL plasmide 1	0
3	10	2 E	6µL plasmide 1	1 Hind III + 1 Xho
4	12	2 E	6µL d'ADN <i>E.coli</i>	0
5	12	2 E	6µL plasmide 2	0
6	10	2 E	6µL plasmide 2	2 Hind III
7	12	2 E	4µL ADN λ	2 Hind III

Remarques : - l'ADN du phage λ est au départ à une concentration de $0,25\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ Après digestion par Hind III, il sert de marqueurs de taille Taille des fragments λ/Hind III = 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027 et 564 pb

- les enzymes de restriction sont préparés à partir des solutions stocks du commerce à 2-4 unités par µL et diluées dans leurs tampons respectifs 10X.

- Agiter doucement les tubes et centrifuger à 12000 tr/min pendant quelques secondes.
- Incuber à 37°C pendant 45 minutes.
- Ajouter dans chaque tube 4µL de la solution de charge 6X (glycérol 30% avec bleu de bromophénol). Mélanger vigoureusement et incuber les tubes 5 min à 65°C.
- Centrifuger quelques secondes à 12000 tr/min pour collecter les liquides et éliminer les bulles.
- Déposer 8-10µL du contenu de chaque tube dans les puits correspondants du minigel d'agarose à 1%
- Laisser migrer entre 45min et 1 heure (suivre la migration du bleu de bromophénol) a une tension voisine de 5V/cm de gel (voisine de 100V).
- Après migration, rincer dans le tampon de migration (tampon Tris Borate EDTA :TBE)
- Observer en transillumination et faire une photographie du gel
- L'ADN ainsi préparé peut se conserver plusieurs semaines au congélateur

Rappels : 1) Sécurité : le bromure d'ethydidium (BET) est un colorant fluorescent qui s'intercale entre les paires de base des acides nucléiques ou sa fluorescence est exaltée. Il est révélée placé sous illumination par U.V. courts (vers 300 nm). Le port de lunettes de protection est obligatoire. De plus, le BET est hautement mutagène, tout produit contenant du BET doit être manipulé avec d'extrême précautions et dans tous les cas, manipulé avec des gants.

2) Préparation du gel d'agarose : Le BET est déjà introduit dans le gel à une concentration finale de 1µg/mL de gel. 15 mL de gel sont maintenus en surfusion, couler le gel de sorte qu'il ne déborde pas de son support (utiliser du film adhésif pour éviter tout débordement). Placer le peigne de sorte qu'il ne touche pas les bords du support. Laisser solidifier, retirer le peigne.

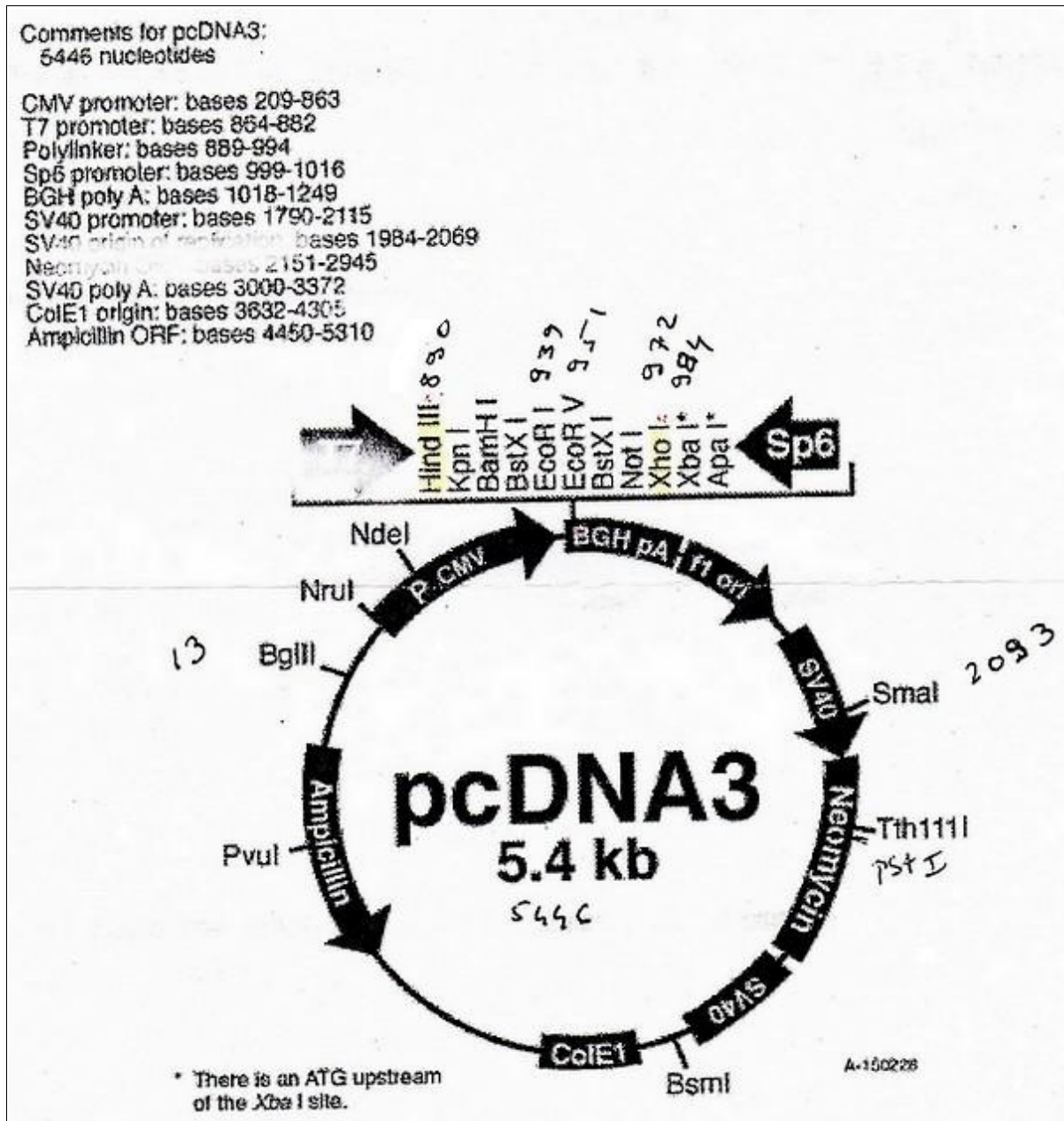
3) L'électrophorèse se fait ici dans des minicuves « prêtes » à l'emploi. La migration se fait en tampon TBE. Le gel est immergé par le tampon et les dépôts se font donc sous le liquide . L'utilisation de la solution de charge permet d'alourdir l'ADN de sorte qu'il reste emprisonné dans le gel

3. Compte rendu

- Principe de l'étude, de l'électrophorèse particularités expérimentales, présentations de l'ADN étudié
- Faire figurer les résultats expérimentaux, photographie et photocopie des gels, légendes, interprétation
- Compter le nombre de fragments obtenus pour chacune des expériences avec les 4 tests et les 4 gels obtenus.
- En utilisant comme standard la taille des fragments λ / Hind III visibles sur le gel, tracer sur

papier semi-logarithmique le graphe $d = f(\log \text{ taille pb})$.

- En déduire alors la taille des fragments du plasmide / Hind III + Xho
- En déduire la taille du plasmide.
- Vérifier que la taille de l'insert correspond à la taille attendue.



Detailed Protocol

We highly recommend you read this information if this is your first time using the UltraClean 6 Minute Mini Plasmid Prep Kit.

Please wear gloves at all times

Equipment required:

Microcentrifuge (10,000 x g), vortex, 80 well microcentrifuge tube rack (optional)

3 Pipettors: It makes things easier to have three pipettors: a P200 set to 50µl, a P200 set to 100µl, and a P1000 set to 325µl.

1. Grow cells (plasmid culture) to a typical density of $A_{600} = 2.0$ or higher.
2. Each plasmid prep will require a set of 2 tubes and 1 spin filter unit (a plastic spin basket with a white silica membrane sitting inside a 2 ml microcentrifuge tube).
3. Label the caps of each set with an ethanol resistant marker. It is convenient to place these sets in a microcentrifuge tube rack in this order: tube, spin filter, tube
4. Open the first tube in each set, and add up to 2ml of culture. If you are using high nutrient broth (terrific broth, TB DRY™, 2 x YT, super broth, etc.), use no more than 2 ml of culture per prep. For LB or low nutrient cultures, you can use 2ml or you can combine cells from up to 5ml of culture. Do this by spinning 2ml of cells, discarding the supernatant, adding more culture to the same tube and spinning again. Repeat until 5ml worth of cells have been processed. Note: the yields of many low copy plasmids (containing large insert), can be drastically increased by growing in high nutrient broth such as TB DRY. (MoBio catalog number 12105-1)
5. Orient the microcentrifuge tubes the same way each time you spin them in all the following procedures so that the tube hinge is facing straight out away from the center of the rotor.
6. Centrifuge for 1 minute at 10,000 x g. (usually 15,000 rpm).

What's happening: The bacterial cells are being forced to the bottom of the tube.

7. Decant the supernatant by inverting the tube and pouring into a waste container. You will need to do another spin to be sure to remove all traces of liquid from the sides of the tube as described in the next 3 steps.
8. Orient tubes with the hinges in the same position (hinges pointing straight out from center of rotor).
9. Centrifuge 5 seconds at 10,000 x g.
10. Remove **all** visible liquid with a narrow pipet tip. **Removing all liquid at this step is critical. Using a small bore pipet tip helps remove all traces of liquid media.**

What's happening: The cells have been pelleted and are now separated from the culture growth medium.

11. **Add 50µL Solution 1** to each cell pellet tube and close the tubes.
12. Resuspend the bacterial pellet by bump vortexing with the vortex set at the highest speed. Bump vortexing means: hold the tube tip on the vortex head for 10 seconds, take it off for 1 second then hold it on the vortex again. Repeat this process for 1 minute. After 1 minute, hold the tube in a horizontal position up to a light and look at it. The liquid will spread from one end of the tube to the other. If you see any clumps of cells, keep bump vortexing until they are gone. It takes a minimum of 1 minute with the vortex at its highest speed to resuspend cells in the 50µl volume. Do two tubes at a time when processing multiple preps for best efficiency. An alternative procedure is to scrape the tube tips back and forth over the holes of an 80 well microcentrifuge tube rack. This procedure is actually the subject of a paper in Biotechniques. Voo, K. S.; Jacobsen, B. M. *Biotechniques* 24:240-243, February 1998.

What's happening: The bacterial cells are re-suspended in a small volume of buffer that keeps them from breaking open (lysing). It is important to make this suspension of cells homogeneous because cells trapped in clumps will be resistant to lysis reagents. Solution 1 contains RNase A; however, it cannot digest RNA until the cells are lysed in the next step.

13. Check Solution 2. If precipitated, heat to 55° - 65°C for 5 minutes to dissolve. **Be sure to cool to room temperature and mix before use.**

What's happening: Solution 2 contains a detergent SDS that can precipitate if cooled. This precipitate is easy to re-suspend by heating. For this reason, always store this kit at room temperature (20-25°C).

14. **Add 100µL Solution 2 to the cell suspension.**

What's happening: Alkaline cell lysis. Solution 2 is very alkaline (pH 12) and contains the detergent SDS. Addition of Solution 2 causes the bacterial cells to lyse because the proteins in the cell membrane become denatured similar to when you cook an egg. All DNA becomes denatured to its single stranded form at this point. The bacterial chromosomal DNA is long and is attached to broken pieces of the cell membrane. Plasmid DNA is linked so it forms two attached circles. Like two links of a chain. All RNA is digested during this very short step because RNase A is active even in very alkaline conditions.

15. Close all tubes.

16. Gently invert the tubes once to mix. Inverting more than once will reduce the quality of your plasmid prep. It causes chromosomal DNA contamination by breaking pieces of the bacteria's chromosomal DNA which will then co purify with the plasmid DNA. Do not vortex at this step.

17. **Add 325µL Solution 3.**

What's happening: Neutralization. Solution 3 contains potassium acetate and salt. The potassium acetate forms a precipitate when it interacts with SDS. At the same time denatured proteins co-precipitate with the SDS. Solution 3 neutralizes the alkaline pH to a more neutral pH 7. All DNA tries re-nature. Plasmid can easily re-form to its double stranded form. Bacterial chromosomal DNA finds it difficult to re-nature because it has no reference point and homologous pieces of DNA may be blocked from finding each other by the cell debris present.

18. Close the tubes and gently invert once to mix. Inverting more than once causes chromosomal DNA contamination. **Do not vortex at this step.**

19. Centrifuge for 1 minute (10,000 x g minimum).

What's happening: Dense cell debris is pelleted to the bottom of the tube. Chromosomal DNA is also pelleted along with the cell debris.

20. Remove the tubes from the centrifuge. There should be a clear non viscous supernatant on top of a large white pellet stuck to the sides of the tube. If the pellet is not firm but instead it is loose or gloppy this is a clear indication you did not remove all the culture media when you originally pelleted the cells. You will need to start over in this case and be more careful to remove all the culture media.

21. Open the cap of as many spin filters as you have plasmid preps.

22. Transfer all of the clear liquid supernatant to a spin filter (avoid the white precipitate). Decanting is the best method here. Just turn the tube so that you pour away from the hinge. The white pellet will stay stuck to the side of the tube. Close the lids of the spin filters.

23. Centrifuge 30 seconds. The liquid will flow through the white spin filter membrane leaving the plasmid DNA bound to the filter membrane.

What's happening: The plasmid DNA now binds to the white silica membrane in the spin filter. Plasmid DNA binds due to the high salt conditions. Unwanted impurities such as digested RNA, and any other cell components that did not pellet are passed through the spin filter and end up in the flow through in the collection tube. This flow through is discarded.

24. (Precaution: Do not let the liquid in the spin filter collection tube come in contact with bleach). Lift out the plastic filter basket from the collection tube, discard the liquid from the collection tube, and then replace the filter basket into the tube.

25. **Add 300µL Solution 4** to the spin filter. Close the lid.

26. Centrifuge 30 seconds at 10,000 x g. Discard flow through liquid from the collection tube, and centrifuge again for 5 seconds.

What's happening: Solution 4 washes the DNA that is bound to the spin filter. Solution 4 is about 50% ethanol. The ethanol keeps the plasmid DNA bound to the filter as impurities are washed away.

27. Being careful not to splash liquid on the filter basket, place spin filter basket in a new 2.0ml collection tube (provided).

28. **Add 50µL of Solution 5** or sterile water directly in the middle of the white spin filter membrane.

What's happening: Solution 5 is 10mM Tris. As it passes through the spin filter, the plasmid DNA is

released (eluted) off the filter and it passes into the collection tube. The plasmid DNA is released because it will not stay bound to the spin filter when there is no salt present.

29. Centrifuge 30 seconds at 10,000 x g.

30. Remove filter basket and close tube lid. Plasmid DNA in the collection tube is now ready to use for any application.

Thank you for choosing the MoBio UltraClean™ 6 Minute Mini Plasmid Prep Kit.

To concentrate DNA, if desired, see Hints on next page.