

Clonage

Matériel et Solution :

Éthanol salé (volume total de 50 mL) :

- 1g d'acétate de potassium
- compléter avec de l'éthanol 100% à 50 mL

Méthode :

Digestion du plasmide et du fragment à intégrer

1. Préparer le mélange pour faire la réaction de digestion (dans l'ordre suivant) :
 - a. 2 µg d'ADN (plasmide ou fragment qui sera inséré par la suite)
 - b. 10 µL de tampon adéquat
 - c. eau achetée (= 100µL – volume d'ADN – volume d'enzyme – volume de BSA)
 - i. l'eau nano a tendance à inhiber les réactions enzymatiques
 - d. 1 µL de BSA, si requis pour l'enzyme de digestion choisie
 - e. 20 Unités d'enzymes
 - f. Total de la réaction : 100µL
2. NE JAMAIS VORTEXER CE MÉLANGE – faire un quick spin à la fin.
3. Placer le mélange dans un bain à la température de digestion adéquate (souvent 37°C) pendant un minimum 30 minutes (il est possible de la faire durer la réaction beaucoup plus longtemps).
 - a. Toutefois, pour s'assurer d'une digestion complète avant de faire les extractions phénol-chloroforme, il est possible de prélever 1 µL de la réaction et de regarder sur gel d'agarose le produit obtenu (les tubes sont maintenus à température de digestion en attendant le résultat du gel).
 - b. Il est important que la digestion soit complète, surtout pour éviter d'avoir de faux positifs lors de la transformation bactérienne.
4. Une fois la digestion réalisée, il est important de vérifier les produits obtenus en prélevant 1 µL du mélange et le déposer sur gel d'agarose. Pendant que la migration s'effectue, il faut procéder aux étapes suivantes.

5. Extraction phénol/chloroforme : mettre 1 volume de phénol/chloroforme (donc, si le mélange de digestion était de 100 μ L, il faut ajouter 50 μ L de phénol et 50 μ L de chloroforme). Vortexer 30 secondes et centrifuger 3 minutes à 13 000 rpm.
6. Récupérer le surnageant dans un nouvel Eppendorf et faire une extraction chloroforme (1 volume) – donc, pour une digestion de 100 μ L, il faut ajouter 100 μ L de chloroforme. Vortexer 30 secondes et centrifuger 3 minutes à 13 000 rpm.
7. Récupérer le surnageant dans un nouvel Eppendorf et ajouter 2 volumes d'éthanol salé. Mélanger le tube par inversion 3 fois.
8. Placer le tube à -80°C pendant 30 minutes (précipitation).
9. Centrifuger 10 minutes à 13 000 rpm.
10. Enlever le surnageant (faire attention pour que le culot soit bien conservé dans le tube).
11. Ajouter 1 mL d'éthanol 70% (cette solution doit être faite moins de 2 semaines avant l'utilisation) pour enlever les sels. Mélanger le tube par inversion 3 fois.
12. Centrifuger 3 minutes à 13 000 rpm.
13. Enlever le surnageant (faire attention pour que le culot soit bien conservé dans le tube).
14. Sécher le culot (speed vac par exemple ou en laissant les tubes ouverts).
15. Resuspendre le culot dans 25 μ L d'eau achetée si une seconde digestion doit être faite ou dans 25 μ L d'eau stérile si une purification sur gel d'agarose s'en suit.

Donc, la prochaine étape est une purification du fragment obtenu, que ce soit par gel d'agarose et freezezen squizzen, en utilisant un kit particulier ou en faisant une colonne de Sephadex.

La ligation

16. Une fois que les plasmides et les fragments à intégrer sont digérés de manière appropriée et purifiés, il faut procéder à la ligation.
17. Il y a 3 réactions à faire pour chaque vecteur et insert à liguer;
 - a. le plasmide digéré + l'insert digéré avec ligase
 - b. le plasmide digéré + eau achetée avec ligase
 - c. le plasmide digéré + eau achetée sans ligase

18. Il faut donc calculer la quantité de plasmide par rapport à l'insert selon leurs tailles respectives comme suit :

a. Lorsque possible, 100 ng de plasmide doivent être utilisés.

$$X \text{ quantité d'insert}(\text{ng}) = \frac{100 \text{ ng de plasmide} * \text{taille de l'insert}(\text{pb})}{\text{taille du plasmide} (\text{pb})}$$

19. Les réactions suivantes doivent ensuite être préparées :

Composantes	Plasmide+insert+ligase	Plasmide+eau+ligase	Plasmide+eau Øligase
plasmide	100 ng	100 ng	100 ng
insert	X ng	-	-
Tampon kinase 10X	1 µL	1µL	1 µL
ATP 10mM	1 µL	1µL	1 µL
Eau achetée	9µL – plasmide-insert	9µL – plasmide	10µL – plasmide
T4 DNA ligase 1/10	1 µL	1µL	-
Total	10 µL	10 µL	10 µL

a. L'ATP doit être dilué dans l'eau achetée à une concentration de 10 mM

b. La T4 DNA ligase est diluée dans le T4 DNA ligase buffer 1/10

20. Ne pas vortexer, faire un quick spin et incuber dans un bain réglé à 16°C pour la nuit et le laisser sur l'espace de travail (donc le lendemain, la température du bain sera de 18-19°C).

a. De meilleurs résultats de ligation sont obtenus en laissant la réaction se faire toute une nuit. Il est toutefois possible de la réaliser en 2 heures.

21. Une fois la ligation terminée, prélever 2 µL et les déposer sur gel afin de voir le produit obtenu.

22. Une fois que le produit est bon, il faut effectuer une transformation de chaque réaction de ligation dans des bactéries compétentes.

23. Résultats possibles :

- a. Si des transformants ne poussent que pour la réaction de ligation du plasmide et de l'insert, il y a de fortes chances que le plasmide qui sera obtenu par mini-prep soit bon.
- b. S'il y a des transformants pour les réactions de ligation du plasmide avec l'insert et du plasmide avec l'eau et ligase, il est peut-être intéressant de faire un colony lift.

24. Il faut ensuite obtenir le plasmide par mini-prep et vérifier qu'il soit bon par digestion enzymatique.

25. Une fois que le plasmide est vérifié et qu'il est bon, la transformation peut se faire dans les souches de levure adéquates.