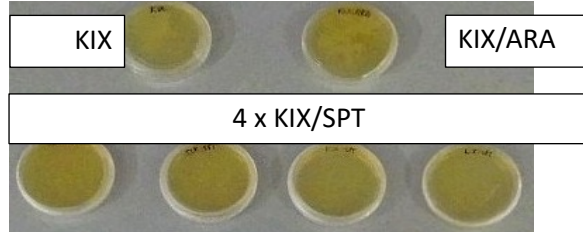


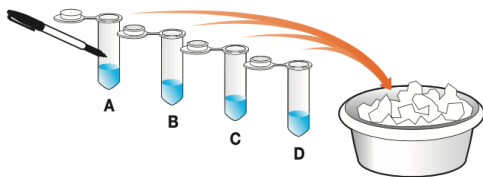
# Protocole de modification génétique par CRISPR/Cas9

## Cultures et Nutriments:

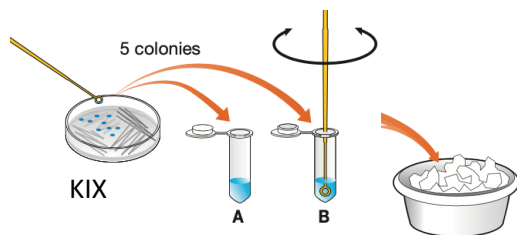


## 1. Modifier génétiquement avec CRISPR/Cas9

1.1 Pipeter 250  $\mu$ L de solution transformante glacée (TS) dans chacun des 4 tubes identifiés A, B, C et D. Placer les 4 tubes dans la glace.

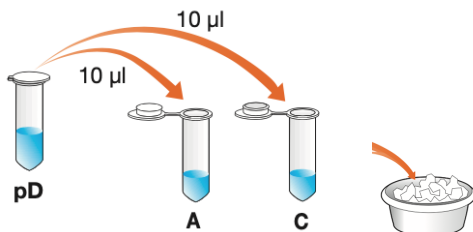


1.2 Avec une hanse, prélever 5 colonies d'*E. coli* dans la boîte de pétri KIX-starter. Introduire l'hanse dans le tube A afin de disperser toutes les bactéries dans la solution transformante. Aucune bactérie ne doit rester sur l'hanse. Répéter les étapes dans le tube B avec une nouvelle hanse stérile. Placer les deux tubes dans la glace.



1.3 A l'aide d'une hanse, prélever 5 colonies d'*E. coli* de la boîte de pétri **KIX/Ara**-starter. Introduire l'hanse dans le tube C afin de disperser toutes les bactéries dans la solution transformante. Aucune bactérie ne doit rester sur l'hanse. Répéter les étapes dans le tube D avec une nouvelle hanse stérile. Placer les deux tubes dans la glace.

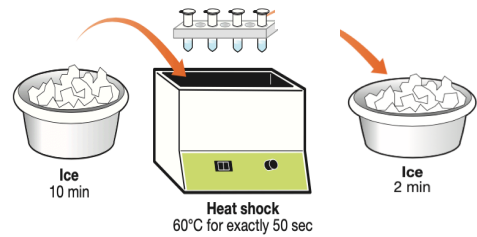
1.4 Pipeter 10  $\mu$ L de *pLZDonor Plasmid (pD)* et les verser dans chacun des tubes A et C, mélanger de bas en haut avec la pipette. Placer les 2 tubes immédiatement dans la glace.



1.5 Recommencer exactement la même manipulation en introduisant 10  $\mu$ L *pLZDonor Guide Plasmid (pDG)* dans les tubes B et D. Les placer immédiatement dans la glace.

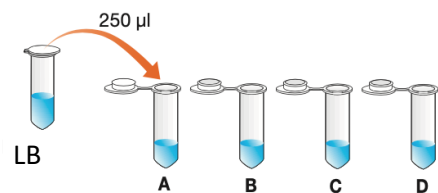
1.6 Laisser les tubes A, B, C et D pendant 10 minutes dans la glace.

1.7 Pour réaliser un choc thermique, déplacer les tubes de la glace au bain-mari à 60  $^{\circ}$ C pendant 50 secondes.

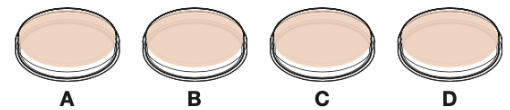


dans la glace pendant 2 minutes.

1.9 Pipeter 250  $\mu$ L d'un milieu nutritif LB et les répartir dans chacun des 4 tubes A, B, C et D. Laisser les 4 tubes pendant 20 minutes à température ambiante.



1.10 En dessous de la gélose, noter sur les bords le nom des géloses A, B, C et D et voter numero de groupe.



1.11 Remettre en suspension les bactéries dans le tube A et mélanger par rotation

1.12 Pipeter 50  $\mu$ L du tube A sur la gélose A et étaler le liquide uniformément avec une spatule Drigalski. Faites pivoter la gélose plusieurs fois au cours du processus.

1.13 Répéter les étapes 10 et 11 avec les tubes B, C et D et les géloses B, C et D.

1.14 Mettre à l'étuve les géloses en les mettant à l'envers pendant 24h à 37  $^{\circ}$ C.

## Evaluation de l'expérience

1. Regarder les géloses pour des changements éventuels de couleur.

2. Expliquer les couleurs bleu et blanche des colonies sur les différentes géloses.