

TRANSFORMATION DES LEVURES AVEC ACETATE DE LITHIUM

PRINCIPE

La méthode de transformation des levures par l'acétate de lithium consiste à "décaper" leur membrane puis à leur faire subir un choc thermique. Cette méthode s'applique à des petits plasmides circulaires réplicatifs et à des fragments linéaires intégratifs.

Référence : Ce protocole est inspiré de celui de Gietz *et al.* (1995)

MATERIEL

- Tubes Falcon 50 ml stériles et centrifugeuses pour tubes Falcon
- Bain marie à 30°C et à 42°C
- Râteau ou billes de verre : les billes sont mises à tremper dans une cuvette contenant de l'eau, puis elles sont rincées à l'eau déminéralisée et mises à sécher. Une fois sèches, elles sont disposées dans des tubes en verre. Ceci est fait avec des gants afin de ne pas les toucher directement avec les doigts. Elles sont stérilisées à 120°C pendant 30 min.

SOLUTIONS

Solutions mères :

- Solution TE 10 X :

Tris-HCl (pH 7,5)	100 mM	pour 500 ml	50 ml de 1 M
EDTA	10 mM		10 ml de 0,5 M

----> autoclaver

- Solution LiAc 10 X :

Acétate de Lithium pH 7,5	1 M
---------------------------	-----

----> autoclaver

- Solution PEG 3350 (filtrer la solution mère, diluer extemporanément) :

Polyéthylène glycol 3350 (p/vol)	50%
----------------------------------	-----

Solutions finales à préparer stérilement à partir des solutions mères :

- Solution TE/LiAc :

Solution TE 10 X	10 ml
Solution LiAc 10 X	10 ml
H ₂ O	qsp 100 ml

- Solution TE/LiAc/PEG :

Solution TE 10 X	0,1 ml	
Solution LiAc 10 X	0,1 ml	
Solution PEG 3350 (p/vol) 50%	0,8 ml	(40% final)

- ADN entraîneur à 5 mg/ml (ADN de sperme de hareng soniqué et dénaturé)

PROTOCOLE : PREPARATION DES CELLULES COMPETENTES

- Ensemencer la souche de levure à transformer dans 10 ml de milieu YPglu et incubé à 30°C avec agitation pendant la nuit.
- Diluer au 1/50 la culture de la nuit dans 50 ml de milieu YPglu.
- Cultiver à 30°C sous agitation jusqu'à une densité cellulaire de 1 à 3×10^7 cellules/ml. Il faut 10 ml d'une culture à 10^7 cellules/ml pour une transformation.
- Compter les cellules sous le microscope avec une lame de Mallassez.
 - diluer la culture au 1/10 dans un tube Eppendorf (50 μ l de cellules + 450 μ l d'eau distillée)
 - transférer environ 30 μ l de cette dilution entre lame et lamelle,
 - compter les cellules de 20 petits carrés sous le microscope et faire une moyenne pour un,
 - calculer la concentration de cellule sachant que
nombre de cellules d'un carré $\times 10^5 =$ concentration de cellules/ml (ne pas oublier le facteur de dilution)
- Centrifuger la culture à 4°C pendant 5 min à 5 000 t/min dans des tubes Falcon.
- Effectuer 1 lavage en resuspendant délicatement le culot à la pipette dans 20 ml de solution TE/LiAc stérile.
- Centrifuger à 4°C pendant 5 min à 5 000 t/min.
- Resuspendre le culot afin d'avoir 2×10^9 cellules/ml dans la solution TE/LiAc (soit 50 μ l pour 10 ml de culture à 10^7 cellules/ml) (prendre en compte le volume du culot).
- Incuber à 30°C pendant 15 min sans agiter.

PROTOCOLE : TRANSFORMATION

- Placer sur un portoir autant de tubes Eppendorf que de transformations à réaliser. Inclure un témoin positif (plasmide répliquatif de levure portant le même marqueur de sélection que celui des transformations à effectuer) et un témoin négatif sans ADN.
- Mettre 300 μ l de TE/LiAc/PEG (préparé extemporanément).
- Ajouter 50 μ g d'ADN de sperme de hareng préalablement soniqué (10 μ l) et dénaturé 3 min à 95°C.
- Ajouter la solution d'ADN à transformer (de 1 à 10 μ l). Mélanger soigneusement au Vortex.
- Transférer 50 μ l de cellules compétentes par tube (10^8 cellules/ transformation) et mélanger soigneusement par aspiration/refoulement.
- Incuber à 30°C pendant 30 min sans agiter.
- Effectuer un choc thermique en plaçant les tubes 20 min à 42°C.
- Étaler directement les cellules au râtelier ou avec des billes de verre sur milieu sélectif ou sur milieu YPglu (pour le marqueur KANMX). Etaler 2 boîtes par transformation afin d'éviter de mettre trop de cellules par boîte.
- Dans le cas des marqueurs d'auxotrophie, incubé les boîtes de milieu sélectif à 30°C pendant 48 à 72 h. Pour le marqueur KANMX, répliquer les boîtes de milieu

YPglu sur milieu YPglu-G418 après une nuit à 30°C (les transformants apparaissent au bout de 48 h à 30°C). On obtient en moyenne 10^5 transformants/ μg d'ADN.

Si vous utilisez la souche S288C (ou dérivative), vérifier que vos transformants ne sont pas glycérol sensible car la transformation favorise l'apparition de ce type de colonies.