

TRANSFORMATION DES LEVURES EN MICROPLAQUE 96 PUIITS

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 surtout à des petits plasmides circulaires réplicatifs.

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

MATERIEL

- Microplaque 96-multi well plate (U bottom) stériles et centrifugeuses

SOLUTIONS

- Solution A :

Acétate de Lithium pH 7,5	0,2 M	for 50 ml	10 ml of 1 M
Polyéthylèneglycol 3350 (p/vol)	40%		20 g
DTT	100 mM		5 ml of 1 M

- ADN entraîneur à 10 mg/ml (ADN de sperme de hareng soniqué et dénaturé)

PROTOCOLE

- Distribuer 100 µl de milieu YPglu dans une microplaque 96-multi well plate (U bottom).
- Ajouter 10 µl dans chaque puits d'une culture en phase stationnaire de la souche de levure à transformer.
- Incuber à 30°C SANS agitation (afin d'éviter les contaminations) pendant la nuit sous atmosphère humide.
- Centrifuger la culture à 4°C pendant 5 min à 3000 t/min.
- Jeter le surnageant par inversion rapide de la microplaque.
- Resuspendre le culot en vortexant la microplaque (les quelques gouttes du reste des surnageants sont suffisantes pour resuspendre les cellules).
- Ajouter 100 µl dans chaque puits de la solution A contenant 5 µl d'ADN entraîneur et 1 µl (1 µg/µl) de plasmide réplicatif à transformer.
- Mélanger soigneusement par aspiration/refoulement.
- Incuber à 45°C pendant 30 min.
- Faire des gouttes de 10 µl sur milieu sélectif (utiliser des grandes boîtes). Généralement on obtient de 1 à 20 transformants par goutte.

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