

Vérification des caractéristiques de 2 souches à utiliser pour des expériences de conjugaison

1. Description des souches D et R

La souche donatrice (D, Hfr) est : E. coli DSMZ1562 (= U. Winkler, K12 W1034. [W1034 GY767 Hfr Sm^s]. Used in conjugation experiments). Prototrophe pour les métabolites essentiels et les coenzymes, sensible à la streptomycine.

La souche réceptrice (R, F⁻) est E. coli DSMZ 1563. (U. Winkler, W 1022. Derivative of strain AB1157. F⁻ lambda^s SmA^r leu arg pro his ara xyl mtl lac gal. Used in conjugation experiments). Résistance chromosomique à la streptomycine, auxotrophe pour leu, arg, pro, his, ne métabolisant pas ara, xyl, lac et mtl.

Les 2 souches sont fournies isolées sur boîte de milieu Trypticase soja.

2. Vérification des caractéristiques culturelles de D et R

2.1 Milieux et réactifs

- Base liquide M63gluB1 = KH₂PO₄ 13,6 g/L ; (NH₄)₂SO₄ 2 g/L ; FeSO₄ 7H₂O 0,5 mg/L ; NaCl 0,5 g/L ; agar 15g/L ; ajusté à pH 7,0 puis autoclavé puis on rajoute stérilement 2mL MgSO₄ 7 H₂O 100 g/L + 2 mL CaCl₂ 10 g/L + 1 mL de thiamine à 20 g/L + 30 mL glucose 300 g/L par litre.
- Maa1 : arginine 15 g/L + histidine 10 g/L + proline 10 g/L + leucine 10 g/L stérile. Il s'agit de réaliser une supplémentation en arg+his+pro+leu.
- valileu : valine 20 g/L + isoleucine 10 g/L stérile. Comme la voie de biosynthèse de la leucine présente une partie commune avec celle de la valine et de l'isoleucine avec co-répression, on choisit d'ajouter aussi valine et isoleucine lors d'un test avec supplémentation en leucine.
- Sm :Streptomycine 4 g/L

2.2 Sensibilité à la streptomycine et besoins en acides aminés, préparation des milieux et inoculations

Préparer 5 boîtes de Pétri stériles vides annotées minglu, minglu+Sm, minglu+Maa1, minglu+Maa1+valileu, minglu+Maa1+valileu+Sm.

Boîte	Maa1 (*)	Valileu (*)	Streptomycine 4 g/L (*)	M63gluB1 agar
minglu	-	-	-	15 mL surfusion (**)
minglu+Sm	-	-	150 µL	15 mL surfusion (**)
minglu+Maa1	50 µL	-	-	15 mL surfusion (**)
minglu+Maa1+valileu	50 µL	50 µL	-	15 mL surfusion (**)
minglu+Maa1+valileu+Sm	50 µL	50 µL	150 µL	15 mL surfusion (**)

(*) : Répartir en gouttes au fond de la boîte de Pétri.

(**) : couler, bien homogénéiser en douceur pour éviter tout débordement (3 rotations, 3 anti rotations, 3 gauche droite, 3 haut bas), attendre la gélification puis sécher la surface.

Préparer une suspension stérile (en NaCl 9g/L) de souche D et R de trouble MacFarland 1. Diluer au 1/10 en NaCl 9g/L. Inoculer chaque boîte avec les souches D et R en strie de 10 µL.

Incuber à 37°C.

2.3 Capacité à utiliser le lactose

Isoler chacune des souches sur milieu de Drigalski.

2.4 Compte-rendu, conclusions

Commenter la composition de la base base liquide M63gluB1. Analyser les résultats des cultures.