

	Mode opératoire	Réf : MO-INF FLO Version 1 date : 20/09/12 page 1/2
	Transformation d' <i>Arabidopsis thaliana</i> par infiltration florale en présence de silwet L77	

1. Objet et domaine d'application

Protocole de transformation d'*Arabidopsis thaliana* par infiltration florale.

2. Documents de référence

technical advance - [Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*](#) *Plant J.* (1998) **16**(6):735-743

3. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

BPMP

4. Hygiène et sécurité

Prendre des précautions pour la pesée des antibiotiques (hotte de pesée p 108, mettre des gants)

Rifampicine (Xn / GHS07, H317, H334)
Gentamicine (Xn/GHS08, H317, H334, R45)
streptomycine (Xn/ GHS07 , GHS08, H302, H361, R63, R22)
néomycine (Xn, GHS08, H317, H334, R42, R43)
kanamycine (GHS08, H360, R61)
hygromycine (T+/ GHS05, GHS06, GHS08,H300, H310, H330, H318, H334, R26/27/28-R41/42/43)
tetracycline ((Xi/ GHS07, H315, H319, H335)

5. Principe de la méthode

Infiltration florale d'Agrobactéries

6. Matériels nécessaires

Plats à gratins, Sacs à autoclave, pots à centrifugation Nalgènes autoclavables 250 ml centrifugeuse

7. Réactifs (chimiques et biologiques)

* 2 boîtes de pétri LB (LB 10g/L bacto peptone, 5g/L yeast extract, 5g/L NaCl + 15g/L agar)+ antibiotiques requis (rajouter les antibio juste avant de couler les boîtes)

* 1 erlen de 1 litre contenant 250 ml de LB liquide

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	C TOURNAIRE	Doan Luu	Alain Gojon
Fonction :	Resp Atelier transgénèse	Chercheur	DU
Visa :			

	Mode opératoire	Réf : MO-INF FLO Version 1 date : 20/09/12 page 2/2
	Transformation d'<i>Arabidopsis thaliana</i> par infiltration florale en présence de silwet L77	

* sucrose 5% (volume calculé en fonction de la DO obtenue)

* Plats à gratins, Sacs à autoclave

* doses d'antibiotiques utilisées

rifampicine 50 µg/ml (à dissoudre dans du DMSO, ne pas filtrer)

gentamicine 25 µg/ml

streptomycine 100 µg/ml

néomycine 200 µg/ml

kanamycine 50µg/ml)

hygromycine 30 µg/ml

tetracycline 20 µg/ml (à dissoudre dans de l'éthanol 70%)

Attention : dans le cas d'une transformation avec pGreen et la souche d'agrobactérie GV3101, ne mettre que **3 à 5 µg/ml** de tetracycline
faire des stocks à -20°C concentrés 1000x, dilués dans l'eau et stérilisés sur filtre 0.2µm.

8. Contraintes de la méthode

Bien coordonner la préparation des Agrobactéries avec le stade de floraison.

9. Contenu du mode opératoire

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	C TOURNARE	<i>Doan Luu</i>	<i>Alain Gojon</i>
Fonction :	Resp Atelier transgénèse	<i>Chercheur</i>	<i>DU</i>
Visa :			

	Mode opératoire	Réf : MO-INF FLO Version 1 date : 20/09/12 page 3/2
	Transformation d' <i>Arabidopsis thaliana</i> par infiltration florale en présence de silwet L77	

Préparation des plantes

(3 semaines avant la transformation)

Semis

Les graines sont semées dans des barquettes 13x21x6cm remplies de terreau et éventuellement recouvertes d'une grille plastique maintenue avec deux élastiques (afin de maintenir la motte lors du trempage, facultatif). Avant le semis, les barquettes sont sub-irriguées avec une solution d'engrais diluée (1/2 micro tube 1.5 ml d'algospeed pour 5 litres d'eau). La densité de plantation souhaitable est de 50 à 100 plantes par barquette (50 graines pèsent environ 1 mg). Pour un semis homogène mélanger les graines avec du sable fin. Semer avec un morceau de papier plié. Les semis sont traités par une pulvérisation de prévicur 2.5 ‰ (traitement fongicide de prélevée). Les semis sont recouverts de plaques en plastique transparent pendant 4 jours.

Arrosage

Les plantes sont arrosées toutes les semaines par sub-irrigation 30' avec avec une solution d'engrais diluée (1/2 micro tube 1.5 ml d'algospeed pour 5 litres d'eau).

* *Le stade favorable est lorsque les plantes portent 3-4 siliques et de nombreux boutons floraux non ouverts*

Quelques jours avant la manip...

Sortir la souche d'agrobactérie du congélateur à -80°C ou d'une boîte et étaler les bactéries à l'ose de platine (colonies singulières) sur des boîtes LB contenant les antibiotiques requis par cette souche. Incuber à l'étuve à 30°C pendant 48h.

J₀-2

A partir de colonies isolées, inoculer une pré-culture de 50 ml de LB (dans un erlen de 250 ml) . Incuber à 30°C sur l'agitateur pendant 24 h.

J₀-1

Inoculer un erlen de 2 litres contenant 250 ml de LB et les antibiotiques requis (en général seul l'antibiotique correspondant au plasmide binaire est ajouté) avec 1 ml de la pré-culture. Incuber à 30°C sur l'agitateur pendant environ 20h.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	C TOURNAIRE	Doan Luu	Alain Gojon
Fonction :	Resp Atelier transgénèse	Chercheur	DU
Visa :			

	Mode opératoire	Réf : MO-INF FLO Version 1 date : 20/09/12 page 4/2
	Transformation d' <i>Arabidopsis thaliana</i> par infiltration florale en présence de silwet L77	

J₀

Préparation de la suspension d'Agrobactéries

1. Prendre la DO à 600 nm de la culture d'Agrobactéries. Si la DO est supérieure à 1, diluer et recommencer la mesure.
2. Transférer les agrobactéries en pots Nalgène autoclavables de 250 ml et centrifuger à 5000 rpm à température ambiante dans le rotor JA14. Vider le surnageant de chaque pot dans une bouteille Schott, (bouteille qui sera autoclavée avec les autres effluents après transformation).
3. Préparer la solution de trempage (sucrose 5%) : calculer le volume nécessaire pour resuspendre les agrobactéries de façon à obtenir une DO finale de 0.8.
4. Transporter à la serre les culots bactériens dans les pots Nalgène fermés avec tout le matériel nécessaire à la transformation, la solution de trempage et la bouteille contenant pré-culture et culture prête à autoclaver.

A la serre

1. Protéger les paillasse avec des sacs à autoclaver, disposer les plats pyrex
2. Resuspendre les culots bactériens dans le bain de sucrose. (DO = 0.8)
3. Ajouter 0.02% de détergent Silwet L77 dans les agrobactéries et mélanger.
4. Verser les agrobactéries dans les plats pyrex.
5. Tremper les fleurs et les hampes en inversant la barquette et en remuant de temps en temps, pendant 2 fois 1 min.
6. Placer les barquettes de plantes trempées sur un plateau dans un sac à autoclave dont on a coupé le fond et refermer.
7. Placer l'ensemble dans la serre pendant 24 h.
8. Nettoyage : tout ce qui contient des agrobactéries est autoclavé à 130°C 45 min.

(V. protocole élimination des effluents issus des transformations)

J₀+1

Ouvrir le sac à autoclave.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	C TOURNAIRE	Doan Luu	Alain Gojon
Fonction :	Resp Atelier transgénèse	Chercheur	DU
Visa :			

	Mode opératoire	Réf : MO-INF FLO Version 1 date : 20/09/12 page 5/2
	Transformation d' <i>Arabidopsis thaliana</i> par infiltration florale en présence de silwet L77	

Arrosage

Les barquettes sont contingentées afin d'éviter les contamination par d'autres graines. Les plantes sont arrosées toutes les semaines par sub-irrigation 30' avec une solution d'engrais diluée (1/2 micro tube 1.5 ml d'algo-speed pour 5 litres d'eau).

Après quelques semaines...

Lorsqu'une partie des siliques sont sèches les graines sont récoltées, tamisées, et conservées dans un sachet. Une deuxième récolte est effectuée quelques semaines plus tard pour les siliques restantes.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	C TOURNAIRE	<i>Doan Luu</i>	<i>Alain Gojon</i>
Fonction :	Resp Atelier transgénèse	<i>Chercheur</i>	<i>DU</i>
Visa :			

	Mode opératoire	Réf : MO-INF FLO Version 1 date : 20/09/12 page 6/2
	Transformation d'<i>Arabidopsis thaliana</i> par infiltration florale en présence de silwet L77	