

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

BIOTECHNOLOGIE

Durée de l'épreuve : 8 heures

Coefficient : 8

*ÉTUDE DE PROJET ET RÉALISATION
PRATIQUE D'OPÉRATIONS DE GÉNIE
BIOLOGIQUE*

PREMIER JOUR

Durée: 5h30

Le sujet comporte 7 pages numérotées de 1/7 à 7/7.

L'usage d'une calculatrice est autorisé.

Une feuille de papier millimétré semi-logarithmique est fournie aux candidats.

CLONAGE D'UN VECTEUR CODANT POUR UNE β -GALACTOSIDASE MODIFIÉE

PREMIER JOUR

Durée: 5h30

La souche bactérienne *Escherichia coli* JM 109 doit servir de cellule hôte pour cloner le vecteur navette p β Gal portant comme marqueur de sélection la résistance à l'ampicilline et possédant un gène muté codant une β -Galactosidase modifiée dont l'activité sera étudiée.

Avant de transformer les bactéries *Escherichia coli* JM 109 avec le vecteur p β Gal, on cherche :

- à déterminer la CMI de l'ampicilline pour JM 109, de manière à adapter la concentration d'ampicilline à introduire dans les boîtes de milieu de sélection (première partie) ;
- à préciser l'action de cet antibiotique sur cette souche bactérienne à l'aide d'une étude cinétique (première partie) ;
- à valider un protocole de miniprep d'ADN plasmidique afin de produire efficacement le vecteur (deuxième partie).

Avant d'introduire le vecteur navette dans des cellules eucaryotes déficientes en lactase pour tester l'expression du gène β Gal, on procède :

- à un repiquage de la lignée concernée (troisième partie).

PREMIÈRE PARTIE : (50 points)

1.1. Détermination de la CMI de l'ampicilline vis-à-vis d'*Escherichia coli* JM 109 (18 points)

1.1.1. Matériel

- Solution d'ampicilline à 1 mg/mL notée « Amp »
- 2 flacons de milieu Mueller Hinton liquide (15 mL/flacon) notés « MH-CMI »
- Un tube d'eau distillée stérile noté « eau distillée stérile »
- 15 tubes à hémolyse stériles
- Culture de 18 h d'*Escherichia coli* JM 109 (cultivée en milieu Mueller Hinton liquide) notée « E coli JM 109 »
- Pipettes automatiques P 1 000 ou P 100 (ou pipettes Paille)

1.1.2. Mode opératoire

- Préparer l'inoculum : diluer au 1/10 une culture de 18 h d'*Escherichia coli* JM 109 en eau distillée et en tube à hémolyse puis introduire 150 μ L de cette dilution dans 15 mL de bouillon « MH-CMI ».

- Diluer l'antibiotique suivant le tableau donné ci-dessous.
- ~ **Présenter à un examinateur la réalisation d'une dilution.**
- Introduire l'inoculum dans les tubes sous un volume de 1 mL.

Tubes	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Solution de d'ampicilline à 1 mg/mL (mL)		1	1									
Mueller Hinton stérile (mL)	1		1	↘ 1	↘ 1	↘ 1	↘ 1	↘ 1	↘ 1	↘ 1	↘ 1	↘ 1
Volume redistribué (mL)				1	1	1	1	1	1	1	1	1
Inoculum en Mueller Hinton (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Concentration finale de l'ampicilline (µg/mL)												
Lecture après 24 h d'incubation												

- Mettre à l'étuve pendant 24 heures.

1.1.3. Compte-rendu

- Indiquer le protocole de réalisation de la dilution au 1/10 de la pré-culture.
- Calculer la concentration en ampicilline des tubes 1 à 11.

1.2. Effet de l'ampicilline sur la croissance d'*Escherichia coli* JM 109 (32 points)

1.2.1. Matériel

- Souche JM 109 de 18 h en MH liquide (50 mL de pré-culture) en bain agité à 37° C notée "E coli JM 109"
- 1 erlen contenant 50 mL de MH + ampicilline ([ampicilline] = 100 µg/mL) noté "MH-ampicilline 100 µg/mL"
- 1 flacon contenant 50 mL de MH stérile noté "MH-croissance"
- 1 tube contenant 5 mL de MH stérile noté "MH-blanc"
- Cuves pour spectrophotomètre + spectrophotomètre
- Bain thermostaté agité à 37° C
- Pipettes automatiques P 1 000 et P 100 avec cônes stériles
- Bac de javel
- Parafilms prédécoupés

1.2.2. Mode opératoire

- Ensemencer l'erlenmeyer à l'aide de la pré-culture de manière à obtenir une absorbance de 0,2 à 600 nm au temps t = 0 minute.
- ~ **Effectuer le prélèvement et la mesure d'absorbance à t = 0 minute en présence d'un examinateur.**
- Suivre l'évolution de la croissance en réalisant des mesures d'absorbance, toutes les 15 minutes pendant 1h30, puis toutes les 30 minutes pendant 2h.

1.2.3. Compte rendu

- Justifier le volume de la préculture introduit dans l'erlenmeyer.
- Tracer la courbe de croissance sur papier millimétré.
- Déterminer les paramètres de croissance en phase exponentielle :
 - Vitesse spécifique de croissance Qx.
 - Temps de génération G.
- Décrire et analyser la courbe obtenue.
- En déduire l'effet de l'ampicilline sur cette souche.

DEUXIÈME PARTIE :
(40 points)

Validation d'un protocole de minipréparation de plasmide

Dans cette partie, le but est de déterminer l'ordre préférentiel de certaines étapes dans une minipréparation. On dispose de 5 mL d'une culture de bactéries transformées par le vecteur p β Gal. À partir de cette culture, une minipréparation sera réalisée selon un protocole modifié. Les résultats obtenus seront comparés à ceux du protocole habituel. Ces derniers figurent en annexe 1.

2.1. Matériel

- Microtubes stériles de 1,5 mL
- Pipettes P 20, P 100, P 1 000 et cônes
- Bac avec glace pilée
- Bain thermostaté à 37° C
- Vortex
- Minifuge
- Centrifugeuse réfrigérée à 4° C
- Congélateur à -20° C
- Hotte chimique avec cônes filtrés de P 1 000
- Cuves UV en quartz

2.2. Réactifs

- 5 mL de culture bactérienne transformée par p β Gal
- 350 μ L de solution A (Tris/HCl 25 mM, Glucose 50 mM, EDTA 10 mM, lysozyme 4mg/mL, pH 8,0)
- 650 μ L de solution B (NaOH 0,2 M, SDS 1 %)
- 500 μ L de solution C (Acétate de potassium 5M, pH 5,0)
- 1 mL de solution D (ribonucléase pancréatique à 50 μ g/mL eau)
- Phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1; v/v) saturé en TE pH 8,0 (flacon sous hotte chimique)
- Chloroforme/alcool isoamylique (24:1; v/v) (flacon sous hotte chimique)
- Ethanol absolu (congélateur)
- Ethanol à 70 % (congélateur)

2.3. Mode opératoire

2.3.1. Protocole de minipréparation modifié

- Mettre dans un microtube 1,5 mL de la culture transformée.
- Centrifuger 3 minutes à 5 000 rpm à température ambiante.
- Éliminer le surnageant en laissant le culot aussi sec que possible.
- ☞ **Montrer le culot à un examinateur.**
- Agiter au vortex 10 secondes.
- Ajouter 100 μ L de solution A et mélanger par aspirations-refoulements.
- Incuber 5 minutes dans la glace.
- Ajouter 200 μ L de solution B et mélanger par retournement.
- Incuber 5 minutes dans la glace.
- Ajouter 150 μ L de solution C et agiter au vortex 10 secondes.
- Incuber 5 minutes dans la glace.
- Centrifuger 5 minutes à 10 000 rpm à température ambiante.
- Récupérer la totalité du surnageant dans un nouveau microtube; soit V μ L le volume de ce surnageant.

- * Ajouter 1 volume V de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1; v/v) sous hotte chimique en mettant des gants et en utilisant des cônes pourvus de filtre. Agiter au vortex jusqu'à l'obtention d'une émulsion.
- * Centrifuger le tube 2 minutes à 10 000 rpm.
 ⚡ **Récupérer la phase aqueuse dans un nouveau tube devant un examinateur.**
 L'ancien tube sera soigneusement fermé et jeté dans un container sous la hotte chimique.
- * Ajouter 1 volume V de chloroforme/alcool isoamylique (24:1; v/v) sous hotte chimique en mettant des gants et en utilisant des cônes pourvus de filtre. Agiter au vortex jusqu'à l'obtention d'une émulsion.
- * Centrifuger le tube 2 minutes à 10 000 rpm. Récupérer la phase aqueuse dans un nouveau tube. L'ancien tube sera soigneusement fermé et jeté dans un container sous la hotte chimique.
- Ajouter 2 volumes V d'éthanol absolu glacé, mélanger par inversions et placer le tube 10 minutes à -20° C. Centrifuger 15 minutes à 12 000 rpm à 4° C (ergot du microtube à l'extérieur du rotor). ⚡ **Montrer le culot à un examinateur.**
- Enlever le surnageant et tapoter le tube sur un papier filtre pour éliminer l'excès de liquide.
- Ajouter 500 μ L d'éthanol à 70 %. Centrifuger 5 minutes à 12 000 rpm à 4° C en prenant soin d'inverser la position du tube par rapport à la centrifugation précédente (ergot du microtube à l'intérieur du rotor). ⚡ **Montrer le culot à un examinateur.**
- Éliminer le surnageant et à l'aide d'une mèche de papier filtre, essuyer les gouttes résiduelles sur les bords du microtube. Recouvrir le tube d'un morceau de parafilm étiré et percé de quelques trous avec une aiguille. Sécher 5 minutes.
- Ajouter 300 μ L de solution D, tapoter le fond du microtube et incubé 15 minutes dans un bain thermostaté à 37° C.

2.3.2. Analyse spectrophotométrique

- Effectuer une dilution en mettant 100 μ L d'ADN plasmidique dans 900 μ L d'eau.
- Lire l'absorbance à 260 nm et à 280 nm.
- Effectuer un spectre UV de 230 à 320 nm.

2.4. Résultats et compte-rendu

- a) Indiquer la valeur du volume V.
- b) Déterminer la quantité Q d'ADN plasmidique total extrait en justifiant le calcul.
- c) Calculer le rapport A_{260nm}/A_{280nm} et conclure sur le degré de pureté d'ADN plasmidique extrait.
- d) Légender le spectre obtenu et le joindre à la copie.
- e) Analyser ce spectre et discuter à nouveau de la pureté de l'ADN plasmidique obtenu.
- f) Dans le protocole habituel les quatre étapes repérées par * sont effectuées en fin de manipulation, après l'ajout de la solution D. Les résultats d'absorbance et le spectre figurent en annexe 1. Analyser et comparer ces résultats fournis à ceux que vous avez obtenus.
- g) Préciser le rôle des quatre étapes repérées par *.
- h) Conclure sur l'ordre préférentiel des étapes de minipréparation d'ADN plasmidique.

TROISIÈME PARTIE :
(20 points)

Repiquage de la lignée eucaryote déficiente en lactase

3.1. Réactifs et matériel

En salle de culture :

- 1 flacon de la culture cellulaire (25 cm²)
- tampon PBS sans calcium, stérile noté « **PBS** » 3 mL
- solution de trypsine stérile notée « **Trypsine** » 2 mL
- milieu MEM stérile additionné de glutamine et de 10 % de SVF 10 mL
- flacon de culture stérile (25 cm²)

En salle de T.P. :

- hématimètre
- solution de bleu trypan à 0,4 % 0,1 mL
- 2 tubes à hémolyse
- pipettes automatiques et cônes correspondants

3.2. Manipulation

3.2.1. Repiquage des cellules

☞ Cette manipulation est réalisée sous hotte à flux laminaire en salle de culture cellulaire en présence d'un examinateur. Un ordre de passage sera établi.

- Éliminer le milieu de culture.
- Laver le tapis cellulaire avec 2 mL de « PBS ».
- Introduire 1,5 mL de solution de trypsine et laisser agir à température ambiante en surveillant attentivement l'action de la trypsine.
- Introduire 5 mL de milieu MEM et homogénéiser soigneusement (suspension S).
- Prélever 2 mL de la suspension S dans un tube à hémolyse en vue d'une numération.
- Transférer ensuite 1,5 mL de la suspension S dans un nouveau flacon stérile. Compléter à 5 mL avec le milieu MEM.
- Placer le flacon à l'étuve à 37° C en atmosphère air + 5 % CO₂.

3.2.2. Numération des cellules viables de la suspension cellulaire

- Transférer 0,2 mL de la suspension dans un nouveau tube.
- Ajouter 0,05 mL de bleu trypan.
- À l'aide de l'hématimètre, compter les cellules viables.

☞ Montrer un champ de l'hématimètre à un examinateur après avoir consigné les résultats bruts dans le compte-rendu.

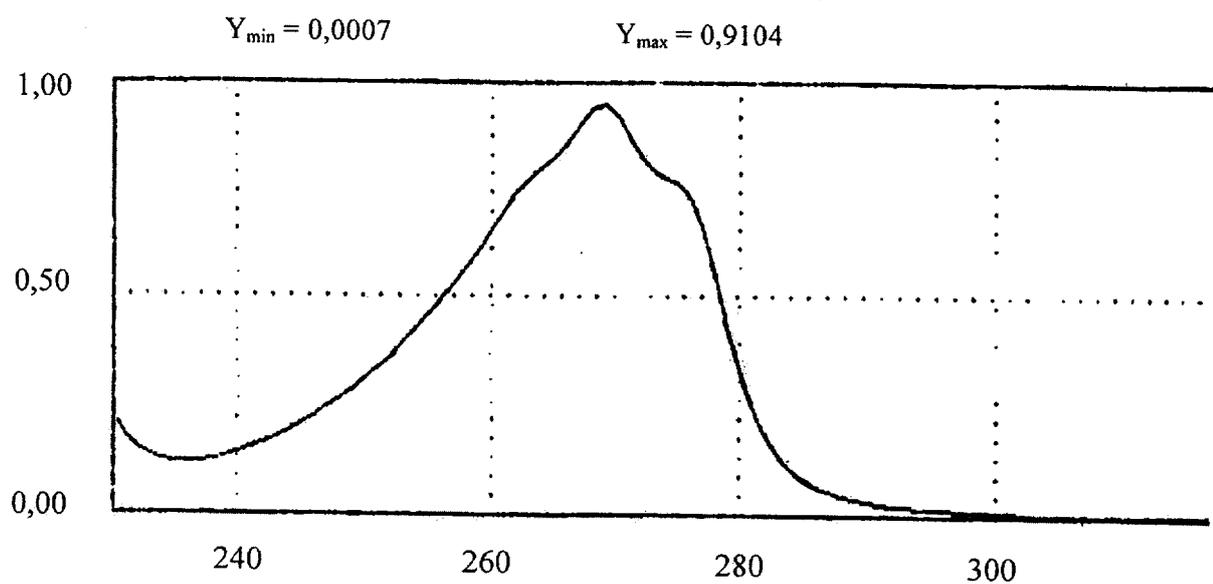
3.3. Compte-rendu

- a) Calculer la concentration en cellules viables de la suspension cellulaire S.
- b) Déterminer le pourcentage de viabilité.
- c) Déterminer la concentration en cellules viables du nouveau flacon de culture mis à l'étuve.
- d) En vue d'une cryoconservation, préciser comment procéder à partir de 20 mL de suspension S pour obtenir en ampoule une suspension de concentration de l'ordre de 10⁷ cellules/mL.

ANNEXE 1

Longueur d'onde	Absorbance
260 nm	0,6286
280 nm	0,3186

Balayage spectral



BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

BIOTECHNOLOGIE

Durée de l'épreuve : 8 heures

Coefficient : 8

*ÉTUDE DE PROJET ET RÉALISATION
PRATIQUE D'OPÉRATIONS DE GÉNIE
BIOLOGIQUE*

DEUXIÈME JOUR

Durée: 2h30

Le sujet comporte 4 pages numérotées de 1/4 à 4/4.

L'usage d'une calculatrice est autorisé.

Une feuille de papier millimétré semi-logarithmique est fournie aux candidats.

CLONAGE D'UN VECTEUR CODANT POUR UNE β -GALACTOSIDASE MODIFIÉE

DEUXIÈME JOUR

Durée: 2h30

PREMIÈRE PARTIE

Détermination de la CMI de l'ampicilline (18 points)

1. Détermination de la CMI de l'ampicilline vis-à-vis d'*Escherichia coli* JM 109

1.1. Lecture des résultats

Procéder à la lecture de la gamme de dilution en justifiant la légende de lecture des tubes.
Compléter le tableau consigné en annexe 2.

1.2. Compte-rendu :

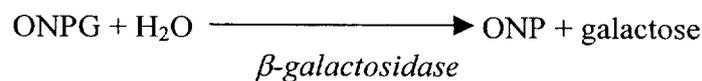
- a) Déterminer la CMI de l'ampicilline pour cette souche bactérienne.
- b) En vue de l'utilisation de l'ampicilline en biologie moléculaire :
 - Le choix de cet antibiotique est-il judicieux pour sélectionner les souches d'*Escherichia coli* transformées à l'aide du plasmide p β gal ?
 - Quelle doit être la concentration de l'antibiotique à introduire dans le milieu de sélection pour assurer l'efficacité de sélection des souches résistantes ?

DEUXIÈME PARTIE

Détermination de l'activité β -Galactosidase clonée (32 points)

On souhaite étudier quelques propriétés de cette β -galactosidase mutée. Après extraction et purification à partir d'une culture des bactéries JM 109, on obtient un extrait enzymatique E, sur lequel on se propose de travailler. On cherche à étudier quelques propriétés de cette enzyme, notamment sa résistance à la chaleur.

Pour étudier cette enzyme, le substrat utilisé est l'ONPG (ortho-nitrophényl β -D-galactoside) qui donne par hydrolyse enzymatique l'ONP (orthonitrophénol) de couleur jaune et qui présente un maximum d'absorption à 420 nm.



2.1. Réactifs et matériel

- 2 mL d'extrait enzymatique E
- 35 mL ONPG 1 mM en tampon Tris-HCl pH 7,6
- 15 mL de réactif d'arrêt Na_2CO_3 2M / EDTA 8mM
- 6 microtubes
- 10 tubes
- Macrocuves
- Pipettes P 5 000, P 1 000 et P 200 + cônes
- Parafilm
- 1 chronomètre
- Bac à glace

2.2. Mesure de l'activité de la β -galactosidase à 30° C et pH 7,6

∞ À réaliser en présence d'un examinateur.

2.2.1. Mode opératoire (prévoir deux essais)

- Préincuber les réactifs à 30° C quelques minutes puis déterminer l'activité enzymatique à 30° C et à pH 7,6 selon le protocole suivant :

- ONPG	2,9 mL
- Extrait E	0,1 mL

 - Arrêt de la réaction après 5 min par ajout de 1 mL de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{EDTA}$
- Lire l'absorbance à 420 nm contre un témoin adapté.

2.2.2. Compte-rendu

Donnée : Le coefficient d'absorption molaire de l'ONP dans ces conditions est de $4\,500\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

- Indiquer la composition du tube témoin.
- Calculer la concentration d'activité catalytique de l'extrait E de β -galactosidase en U/mL d'extrait E.
- Le dosage des protéines sur cet extrait donne une concentration massique de $0,259\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Calculer l'activité spécifique de l'extrait E en U/mg de protéines et en nkat/mg.

2.3. Dénaturation thermique à 56° C.

2.3.1. Dénaturation de l'enzyme à 56° C.

- Introduire 0,25 mL d'extrait E dans 6 microtubes.
- Placer ces tubes dans le bain thermostaté à 56° C et les sortir à exactement 2, 4, 6, 8, 10 et 12 minutes.
- Les placer immédiatement dans la glace pour arrêter la dénaturation thermique.
- Les laisser dans la glace 10 minutes environ.

2.3.2. Mesure de l'activité résiduelle à température ambiante.

- Préincuber les réactifs à la température du laboratoire pendant quelques minutes.
- Mesurer l'activité résiduelle des 6 tubes précédents à température ambiante selon le protocole suivant :

- ONPG	2,9 mL
- Extrait E dénaturé pendant t minutes à 56° C	0,1 mL

 - Arrêt de la réaction après 5 min par ajout de 1 mL de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{EDTA}$
- Lire pour chaque tube l'absorbance à 420 nm contre un témoin adapté.

2.3.3 Compte-rendu :

- Présenter l'organisation de la réalisation des essais sous forme de tableau.
- Tracer la courbe $\text{Ln } A_{420\text{nm}} = f(\text{temps d'exposition à } 56^\circ\text{ C})$ par traitement informatique.
- Déterminer la constante cinétique de dénaturation k_D .
- Déterminer le temps de demi-vie à 56° C de la β -galactosidase mutée.
- La β -galactosidase utilisée habituellement possède un temps de demi-vie à 56° C de 1,5 minute. Comparer avec le résultat obtenu.
- Conclure sur l'intérêt de cette mutation.

ANNEXE 2

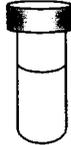
À compléter et à rendre avec la copie

Rappel :

La solution d'ampicilline a été utilisée au départ à 1 mg/mL.

Tube	T	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentration finale ($\mu\text{g/mL}$)												
Lecture après 24 h d'incubation												

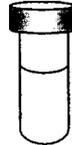
Tube - :



Légende (à compléter) :

.....

Tube + :



Légende (à compléter) :

.....