



**Ce document a été numérisé par le CRDP de Bordeaux pour la Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel.**

**Campagne 2010**

Ce fichier numérique ne peut être reproduit, représenté, adapté ou traduit sans autorisation.

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR  
BIOTECHNOLOGIES**

*ÉPREUVE E5 :  
Travaux pratiques de biotechnologies*

Durée de l'épreuve : 8 heures  
Coefficient : 4

**SOUS-ÉPREUVE U.51**  
*TRAVAUX PRATIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET  
DE GÉNIE GÉNÉTIQUE*  
*Durée de la sous-épreuve : 2 H 00*  
*Coefficient : 1*

**PREMIER JOUR**

Durée : 1 heure 30 minutes

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

**L'utilisation de la calculatrice est autorisée. Un document en annexe.**

## Etude de la réplication d'un plasmide recombiné dans deux souches d'*E. coli*. Estimation de la quantité de plasmide dans chaque souche.

Pour produire l'enzyme d'intérêt « LYC », un laboratoire utilise deux souches recombinées d'*E. coli* (souches *E. coli NM* et *E. coli K12 JM109*) contenant le plasmide pourvu du gène d'intérêt codant pour l'enzyme à produire. Pour l'une des souches, le rendement de production d'enzyme est plus élevé. Un technicien cherche à savoir si l'augmentation de ce paramètre est en lien avec une meilleure réplication du plasmide dans la bactérie.

À partir d'extraits plasmidiques issus de cultures bactériennes, il s'agit d'estimer la quantité de plasmide de chaque souche. Pour cela, il est nécessaire de réaliser une électrophorèse précédée d'une digestion enzymatique. L'exploitation des résultats se fera le deuxième jour.

### 1. Digestion enzymatique des plasmides :

#### 1.1. Matériel et réactifs

- 1 Bain thermostaté
- Pipettes automatiques réglables de 10  $\mu\text{L}$ , de 20  $\mu\text{L}$  et de 200  $\mu\text{L}$
- 4 microtubes de 1,5 mL
- 2 Solutions de plasmides obtenues par minipréparation (mode opératoire similaire pour chaque souche)
  - o Minipréparation à partir de la souche *NM*, notée « NM »
  - o Minipréparation à partir de la souche *JM109*, notée « JM109 »
- 10  $\mu\text{L}$  de tampon d'hydrolyse X10 en microtube noté « Tp »
- 500  $\mu\text{L}$  d'eau de qualité biologie moléculaire en microtube noté « H<sub>2</sub>O »
- 4  $\mu\text{L}$  d'enzyme de restriction *Hinc II* à 10 U. $\mu\text{L}^{-1}$  en microtube noté « HincII »

#### 1.2. Mode opératoire

Dans deux microtubes notés « NMD » et « JM109d », préparer les digestions des deux solutions de plasmides sous un volume de 20 $\mu\text{L}$  en introduisant :

- ☞ X  $\mu\text{L}$  d'eau qualité BM
- ☞ Y  $\mu\text{L}$  de tampon d'hydrolyse 10X ( pour obtenir une concentration finale 1X)
- ☞ 5  $\mu\text{L}$  de solution de plasmide
- ☞ Z  $\mu\text{L}$  correspondant à 10 U d'enzyme *Hinc II*

Incuber pendant 1 heure au bain thermostaté à 37°C.

Réserver le reste des minipréparations pour la confection des témoins : « NMT » et « JM109t ».

### 1.3. Compte rendu

Rendre sur feuille les calculs de volumes : X, Y, Z.

## 2. Electrophorèse en gel d'agarose

### 2.1. Matériel et réactifs :

- 20 mL de tampon TBE 1X
- Solution de Bromure d'Ethidium (BET) à  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$
- 25  $\mu\text{L}$  de tampon de charge x6 en microtube noté « TC »
- Marqueur de poids moléculaire « 1kB DNA Ladder » à  $500 \text{ ng}/\mu\text{L}$
- X mL de gel d'agarose à 0.8% en TBE 1X en surfusion (X sera précisé par le centre d'examen)
- Système électrophorétique + notice

### 2.2. Mode opératoire

#### 2.2.1. Préparation du gel

- ☞ Introduire sous la hotte un volume  $V_{\text{BET}}$  de BET dans le gel pour obtenir une concentration dans le gel de  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .
- ☞ Couler le gel sur son support
- ☞ Terminer la préparation du système électrophorétique en vue de réaliser les dépôts.

#### 2.2.2. Préparation et dépôt des échantillons sur gel

Des dépôts de 20  $\mu\text{L}$  seront à réaliser dans l'ordre suivant :

NMd	NMt	JM109d	JM109t	Marqueur de taille
-----	-----	--------	--------	--------------------

- ☞ Préparer les solutions de dépôt en ajoutant le volume  $V_{\text{TC}}$  adéquat de tampon de charge 6X.
- ☞ Préparer le marqueur de taille de manière à obtenir un électrophorégramme conforme à celui de la fiche technique fournie en **annexe U51-1**.

#### 2.2.3. Compte rendu

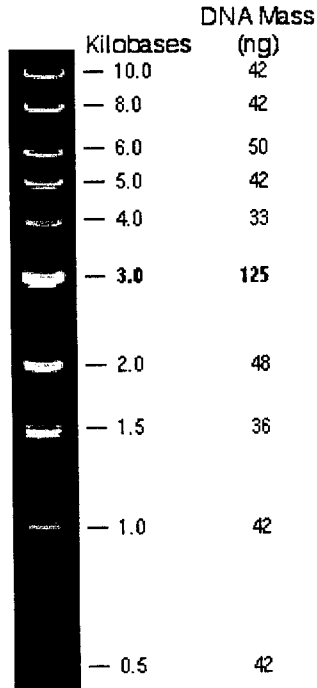
Rendre sur feuille les calculs de volumes  $V_{\text{BET}}$  et  $V_{\text{TC}}$ .

## Annexe U51 1 : Fiche technique du marqueur de taille

### 1 kb DNA Ladder

**Description:**

A number of proprietary plasmids are digested to completion with appropriate restriction enzymes to yield 10 bands suitable for use as molecular weight standards for agarose gel electrophoresis. The digested DNA includes fragments ranging from 0.5-10.0 kilobases (kb). The 3.0 kb fragment has increased intensity to serve as a reference band. The approximate mass of DNA in each of the bands is provided (assuming a 0.5 µg load) for approximating the mass of DNA in comparably intense samples of similar size.



0.5 µg of 1 kb DNA Ladder visualized by ethidium bromide staining on a 0.8% TAE agarose gel.

**Effective Size Range:** 500 bp to 10 kb