

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIE

Durée : 8 h 00
Coef. : 8

SESSION 2002

RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS DE GÉNIE BIOLOGIQUE

Calculatrice autorisée

PRODUCTION ET UTILISATION D'UN ANTIBIOTIQUE AU LABORATOIRE

PREMIER JOUR

Durée : 6 heures

Toutes les valeurs expérimentales doivent être communiquées immédiatement aux examinateurs.

PREMIÈRE PARTIE :

CARTOGRAPHIE PARTIELLE DU VECTEUR RECOMBINANT pGEM-*penDE* (50 points)

L'amélioration de la production d'un antibiotique par une souche S peut être obtenue par mutagenèse dirigée dans un gène *penDE* qui est impliqué dans sa synthèse. Ce gène est cloné dans le vecteur pGEM.

La mutation a créé un site de restriction reconnu par l'enzyme de restriction B thermostable. Le site de restriction spécifique de l'enzyme B est unique dans l'insert *penDE* et absent dans le vecteur pGEM.

Trois enzymes de restriction B, H et X sont utilisées pour vérifier la construction du plasmide recombinant.

Trois digestions sont nécessaires :

- digestion d'ADN du phage λ par B pour contrôler l'activité de cette enzyme ;
- digestion par X et H pour déterminer la taille de l'insert ;
- digestion par B et X pour localiser le site de restriction B dans l'insert.

L'une de ces trois manipulations sera réalisée obligatoirement devant un examinateur.

Réactifs

- Enzymes de restriction dans un tampon contenant 50% de glycérol :
 - Enzyme B 10 U/ μ L
 - Enzyme H 10 U/ μ L
 - Enzyme X 10 U/ μ L
- Tampons de digestion 10x adaptés :
 - à B,
 - aux couples B + X et X + H.
- Eau ultrapure
- ADN du phage λ à 250 ng/ μ L
- Plasmide pGEM-*penDE* à 50 ng/ μ L
- Phénol saturé en tampon Tris pH 8. Ne pas agiter le tube et prélever la **phase inférieure. Manipuler avec gants et lunettes de protection.**
- Tampon de charge 6x
- Huile minérale pour biologie moléculaire (limite l'évaporation de l'eau à 60°C)

1.1. CONTRÔLE DE L'ACTIVITÉ DE L'ENZYME DE RESTRICTION B

- Dans un microtube de 500 μL , introduire :

ADN du phage λ	750 à 900 ng
Tampon de digestion X10 (spécifique de l'enzyme B)	$V_1 \mu\text{L}$
Enzyme B	10 unités
Volume final du mélange réactionnel	25 μL
- Centrifuger quelques secondes et déposer à la surface environ 25 μL d'huile minérale.
- Incuber 1 heure 30 minutes à 60°C.
- Prélever la phase inférieure et la transférer dans un autre microtube de 500 μL contenant 30 μL de phénol.
- Homogénéiser le mélange par aspiration-refoulement ou vortex.
- Centrifuger quelques dizaines de secondes et transférer la phase aqueuse supérieure dans un microtube neuf (TUBE n°1).

Les deux transferts seront réalisés devant un examinateur et les volumes lui seront indiqués.

1.2. DÉTERMINATION DE LA TAILLE DE L'INSERT *penDE*

- Dans un microtube de 500 μL , introduire :

Vecteur recombiné	150 à 200 ng
Tampon de digestion X10 (adapté aux enzymes H et X)	$V_2 \mu\text{L}$
Enzyme H	10 unités
Enzyme X	10 unités
Volume final du mélange réactionnel	30 μL
- Centrifuger et incuber 1 heure 30 minutes à 37°C.
- Arrêter la digestion en introduisant 30 μL de phénol. Homogénéiser, centrifuger et transférer la phase aqueuse supérieure dans un microtube neuf.
- Reprendre la phase aqueuse supérieure et la transférer dans un microtube neuf (TUBE n°2).

1.3. LOCALISATION DU SITE DE RESTRICTION DE L'ENZYME B

- Dans un microtube de 500 μL , introduire :

Vecteur recombiné	250 ng
Tampon de digestion X10 (adapté aux enzymes B et X)	$V_3 \mu\text{L}$
Enzyme B	10 unités
Enzyme X	10 unités
Volume final du mélange réactionnel	30 μL
- Centrifuger quelques secondes et déposer à la surface 25 μL d'huile minérale.
- Incuber 50 minutes à 37°C, puis 45 minutes à 1 heure à 60°C.
- Prélever la phase inférieure et la transférer dans un microtube contenant 30 μL de phénol.
- Homogénéiser le mélange par aspiration-refoulement.
- Centrifuger quelques dizaines de secondes et transférer la phase aqueuse supérieure dans un microtube neuf (TUBE n°3).

1.4. ELECTROPHORÈSE

- Mélanger 15 à 20 μL de chaque digestion avec le tampon de charge 6x.
- Incuber la digestion n°1, 10 minutes à 65°C et la refroidir immédiatement dans la glace.
- Déposer 15 μL de chacun des tubes sur un gel d'agarose à 0,7% dans l'ordre 1, 2, 3.

*Les trois dépôts seront réalisés simultanément devant un examinateur.
Une piste par gel est réservée à un marqueur de taille déposé par un examinateur.*

Compte-rendu

- A l'aide de tableaux, décrire les trois mélanges de digestion en indiquant :
 - l'ordre d'introduction des réactifs
 - le volume (justifié) de chaque réactif utilisé
 - la quantité d'ADN digéré
 - le taux final de glycérol (commenter le résultat).
- Dans un autre tableau, donner :
 - le volume de chaque digestion mélangée au tampon de charge
 - le volume de tampon de charge
 - la quantité estimée d'ADN introduit dans chaque puits de dépôt.

DEUXIÈME PARTIE :

VÉRIFICATION DE LA CONCENTRATION EN GLUCOSE ET EN GLUTAMATE DU MILIEU DE CULTURE (30 points)

Le milieu de culture contient 30 à 40 g/L de glucose (source de carbone) et environ 1 g/L de glutamate qui stimule la production d'antibiotique.

2.1. DOSAGE DU GLUCOSE PAR MÉTHODE ENZYMATIQUE (GOD)

Matériel et réactifs

- Milieu de culture "M"
- Etalon 4 g/L

Réalisation des étalons

3 étalons à 1, 2, et 3 g/L sont réalisés à partir d'une solution de glucose à 4 g/L

Dosage

- Dans des microcuvettes introduire :

	Témoin réactif	Etalon	Essai
Etalon		20 µL	
Echantillon à doser			20 µL
Eau distillée	20 µL		
Réactif à la GOD	2 mL	2 mL	2 mL

Linéarité : 4 g/L

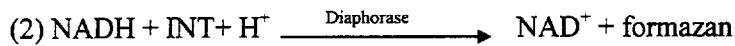
- Mesurer l'absorbance à 510 nm après une incubation de 20 min à la température du laboratoire.

Résultats

- Tracer la droite d'étalonnage.
- Calculer la concentration en glucose du milieu de culture.

2.2. DOSAGE DE L'ACIDE L-GLUTAMIQUE**Principe**

- En présence de glutamate déshydrogénase, l'acide L-glutamique subit une désamination en α -cétooglutarate par l'intermédiaire du NAD^+ .
Le NADH formé transforme en présence de diaphorase, le chlorure d'iodonitrotétrazolium (INT) en un formazan qui est mesuré dans le visible à 492 nm.



- L'équilibre de la réaction (1) est situé du côté du glutamate. En captant le NADH formé par l'INT (2), on déplace l'équilibre de la réaction vers l' α -cétooglutarate.

Mode opératoire

- Introduire dans des cuves :

	Témoin	essai	
Solution de travail	1 mL	1 mL	A DEMANDER AU JURY
Eau bidistillée	2 mL	1,8 mL	
Essai	-	0,2 mL	

- Mélanger. Après 2 min, lire l'absorbance des solutions (A_1) à 492 nm contre l'air ou l'eau.
- Déclencher la réaction par addition de glutamate déshydrogénase :

Glutamate deshydrogénase	0,03 mL	0,03 mL	A DEMANDER AU JURY
--------------------------	---------	---------	---------------------------

- Mélanger, attendre la fin de la réaction environ 15 min, lire l'absorbance des solutions (A_2) comme précédemment.

Remarques :

- **Solution d'essai : 1 à 14 μg de L-glutaminate/cuve** (pour un volume de 0,2 à 2 mL).
- **INT est photosensible** : après avoir ajouté la solution de travail, éviter d'exposer les cuves à la lumière en les entourant de papier aluminium.

Résultats

- Déterminer les différences d'absorbances ($A_2 - A_1$) du témoin et de l'essai. Déduire la différence d'absorbance du témoin (ΔA_T) de celle de l'essai (ΔA_E) : $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$
- Calculer la concentration massique en acide L-glutamique en utilisant le coefficient d'absorption du formazan.
- Données :**
 - Coefficient d'absorbance linéique molaire du formazan à 492 nm : $\epsilon = 19,9 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
 - Masse molaire de l'acide glutamique : 147,13 g/mol
 - Trajet optique : 1,0 cm

TROISIÈME PARTIE :**PRODUCTION ET DOSAGE DE L'ANTIBIOTIQUE AU LABORATOIRE (50 points)**

La souche S a été cultivée en bioréacteur de laboratoire et un prélèvement "P" a été réalisé en fin de phase stationnaire.

3.1. PRÉPARATION DU PRÉLÈVEMENT P

Matériels et réactifs

On dispose du matériel suivant :

- un flacon ou un erlen contenant 100 mL de culture (prélèvement P réalisé en conditions d'asepsie)
- un tube à centrifuger de 50 mL gradué stérile
- un petit flacon stérile
- un bac à glace

Mode opératoire

- Transvaser dans un tube à centrifuger stérile un volume d'environ 40 mL de culture (se servir des graduations du tube et noter le volume effectivement prélevé)

Effectuer cette opération en présence d'un examinateur

- Centrifuger pendant 10 min à 5000 rpm
- Décanter le surnageant dans le petit flacon stérile, conserver alors celui-ci sur la glace. Ce surnageant constitue la solution inconnue I pour le dosage de la solution d'antibiotique. Conserver le culot pour la détermination de la biomasse en 3.2.

Compte-rendu

- Pourquoi faut-il respecter les conditions d'asepsie pour effectuer ces opérations ?

3.2. DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION DE BIOMASSE SÈCHE

Matériels et réactifs

On dispose du matériel suivant :

- une balance permettant des pesées à 0,1 mg près
- un filtre à café déshydraté et placé en dessiccateur
- un entonnoir et un erlenmeyer non stérile de 250 mL
- un carré de papier aluminium
- un flacon de 50 mL d'eau distillée non stérile
- une étuve à 90°C

Mode opératoire :

- Indiquer le numéro de poste sur le filtre (au crayon de papier), puis tarer celui-ci
- Placer l'entonnoir sur l'erlenmeyer et disposer le filtre
- Transférer **quantitativement** sur le filtre la biomasse du culot
- Rincer la biomasse recueillie avec de l'eau distillée

Réaliser ces opérations devant un examinateur

- Disposer alors le filtre sur le papier aluminium et placer le tout à l'étuve à 90°C jusqu'au lendemain

Compte-rendu

- Noter la valeur de la masse du filtre sur la feuille de résultats qui sera restituée le 2ème jour
- Pourquoi les conditions d'asepsie ne sont-elles pas nécessaires pour effectuer ces opérations ?

3.3. DOSAGE MICROBIOLOGIQUE DE L'ANTIBIOTIQUE PRODUIT PAR DIFFUSION EN GÉLOSE

Matériels et réactifs

On dispose du matériel suivant :

- un tube (noté R) de culture de la souche sensible à l'antibiotique produit, en bouillon Mueller-Hinton
- spectrophotomètre, cuves et portoirs
- un flacon contenant exactement 50 mL de gélose Mueller-Hinton maintenu en surfusion à 45°C
- un tube de solution de TTC
- une boîte carrée stérile
- un flacon contenant environ 20 disques non imprégnés stériles
- un tube de solution étalon d'antibiotique "E1" à 40 U/mL
- un tube à essais contenant quelques mL de tampon pH=7 stérile
- matériel nécessaire pour réaliser des dilutions
- 1 étuve à 37°C

3.3.1 Préparation de la boîte de dosage

Mode opératoire

- Déterminer l'absorbance de la culture de la souche R sur une dilution adéquate.

Effectuer toutes les opérations ci-dessus (prélèvement, dilution et mesure) en présence d'un examinateur

- En déduire la concentration cellulaire N de cette culture, sachant qu'une absorbance de 1 à 600 nm correspond à environ $4 \cdot 10^8$ UFC/mL
- Calculer alors la dilution nécessaire pour obtenir une suspension-inoculum permettant d'ensemencer le flacon de gélose Mueller-Hinton pour obtenir une concentration cellulaire finale de 10^6 UFC/mL dans la gélose avec un volume maximal de 5 mL de cette suspension-inoculum

*Faire vérifier ces calculs par un examinateur
(N, puis dilution de la culture et volume d'ensemencement pour le flacon de gélose)*

- Préparer un volume suffisant de cette suspension-inoculum pour ensemencer le flacon de gélose.
- Ajouter 1 mL de solution de TTC dans le flacon de gélose Mueller-Hinton
- Ensemencer alors le flacon de gélose avec le volume (précédemment calculé) de suspension-inoculum, homogénéiser (sans provoquer la formation de bulles) et couler immédiatement dans la boîte carrée
- Lorsque la gélose a solidifié dans la boîte, sécher la surface de celle-ci pendant 15 min à l'étuve à 37°C

Compte-rendu :

- Indiquer, en détaillant les calculs, les étapes de cet ensemencement
- Que doit-on faire du flacon ayant contenu la gélose Mueller-Hinton après avoir coulé la boîte ?

3.3.2. Réalisation du dosage

Mode opératoire

- Préparer une gamme d'étalonnage, à partir de la solution étalon E1 à 40 U/mL, par dilutions géométriques de raison 2 en tampon pH=7 stérile : E2 = 20 U/mL E3 = 10 U/mL
E4 = 5 U/mL E5 = 2,5 U/mL
- Diluer, de même la solution inconnue I à 10^{-1} et à 10^{-2} en tampon pH=7 stérile

BOGEN

- Disposer à la pince les disques selon le schéma fourni sur la feuille de résultats
- *Déposer alors, selon le même schéma, 10 μ L de chaque solution, étalon ou inconnue*
- Laisser prédiffuser les solutions déposées pendant 30 min à la température du laboratoire, boîte à l'endroit
- Retourner la boîte et incuber à 37°C jusqu'au lendemain.

3.4. IDENTIFICATION DE LA SOUCHE PRODUCTRICE

On dispose du matériel suivant :

- 1 culture de la souche S sur gélose Sabouraud
- 1 flacon de bleu coton
- 1 lame porte-objet
- 1 morceau de ruban adhésif

Mode opératoire

- Déposer une goutte de bleu coton sur la lame
- Prélever la culture avec un morceau de ruban adhésif
- Déposer ce prélèvement dans la goutte de colorant
- Observer

Compte-rendu :

- Faire le dessin légendé de l'observation réalisée
- Identifier la souche en indiquant la démarche suivie.

Montrer le champ observé (qui a servi à la réalisation du dessin) ainsi que le compte-rendu correspondant à un examinateur

3^{ème} PARTIE

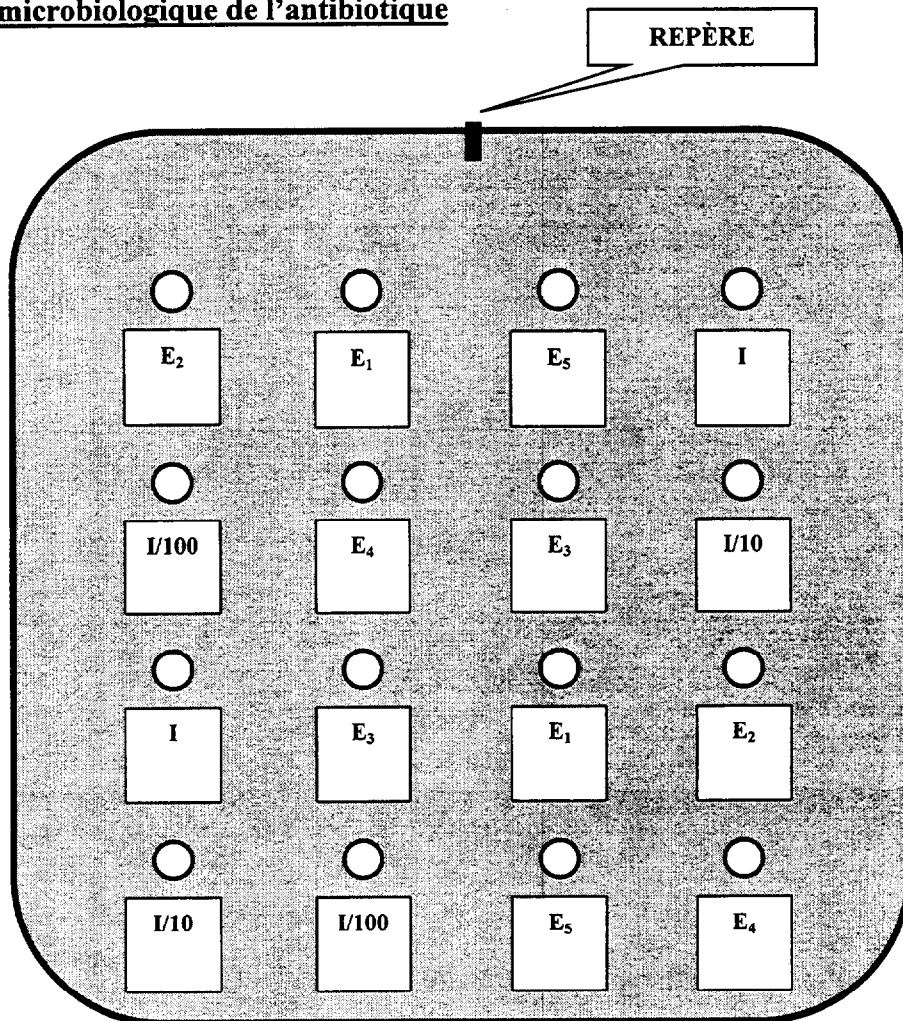
FEUILLE DE RÉSULTATS A JOINDRE AU COMPTE RENDU

Numéro de poste :

3.1. et 3.2. Détermination de la concentration de biomasse sèche

VOLUME DE PRÉLEVEMENT P (mL)	FARE DU FILTRE (g)	PESEL APRES DESSICCATION (g)

3.2. Dosage microbiologique de l'antibiotique



BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

BIOTECHNOLOGIE

Durée : 8 h 00

Coef. : 8

SESSION 2002

RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS DE GÉNIE BIOLOGIQUE

Calculatrice autorisée

PRODUCTION ET UTILISATION D'UN ANTIBIOTIQUE AU LABORATOIRE

DEUXIÈME JOUR

Durée : 2 heures

PRODUCTION ET DOSAGE DE L'ANTIBIOTIQUE AU LABORATOIRE

1. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION DE BIOMASSE SECHE

- Peser le filtre.

Compte-rendu

- Noter la valeur de la masse mesurée dans la feuille de résultats.
- Calculer la concentration de biomasse sèche du prélèvement « P » .

2. DOSAGE MICROBIOLOGIQUE DE L'ANTIBIOTIQUE PRODUIT.

- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition et consigner ces résultats sur la feuille fournie le 1^{er} jour.

Compte rendu

- Lorsque c'est possible, calculer les diamètres moyens des zones d'inhibition pour les solutions étalons, et récapituler ces résultats dans un tableau.
- Tracer la courbe des variations du diamètre moyen en fonction du logarithme décimal de la concentration en antibiotique sur papier millimétré.
- Exploiter graphiquement les résultats des inconnues, en justifiant brièvement le choix de la(des) valeur(s) retenue(s).
- Calculer la concentration en antibiotique dans le prélèvement « P ».

Conclusion

- Calculer la productivité spécifique exprimée en mg d'antibiotique par g de biomasse sèche.
(6 µg de cet antibiotique correspondent à 10 U)

CARTOGRAPHIE PARTIELLE DU VECTEUR pGEM-penDE***Document à compléter et à joindre au compte-rendu***

L'enzyme de restriction B hydrolyse l'ADN de λ en générant 14 fragments dont les tailles sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

- A l'aide de la photographie ou de l'enregistrement de l'image du gel illuminé en U.V., repérer chaque fragment de la piste 1.
- Coller le document de travail à droite du tableau.

Taille en pb	Distance du puits en mm
8454	
7242	
6369	
5686	
4822	
4324	
3675	
2323	
1929	
1371	
1264	
702	
224	Non visible
117	Non visible

- Sans réaliser de graphique et à partir des résultats expérimentaux précédents, évaluer la taille des fragments de restriction séparés et situés sur les pistes 2. et 3.

Piste n°2.		
Piste n°3.		

Document à compléter et à joindre au compte-rendu

Les enzymes X et H ont chacun leur site unique situé dans l'un des deux sites multiples de clonage (MCS).

- Indiquer sur la figure ci-dessous, en justifiant les réponses :
 - la position des sites de restriction X et H
 - la dimension des segments en pb
 - la position du site B et la situation de l'insert
- Cette configuration vous semble-t-elle unique ? Justifier la réponse.
-

Donnée :

Plasmide non recombiné : 3100 pb.

