

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIE

Durée de l'épreuve : 8 heures
Coefficient : 8

*RÉALISATION PRATIQUE
D'OPÉRATIONS DE GÉNIE
BIOLOGIQUE*

PREMIER JOUR

Durée : 6 h 45

Le sujet comporte 6 pages numérotées de 1/6 à 6/6

L'usage d'une calculatrice est autorisé.
Une feuille de papier millimétré est fournie aux candidats.

REALISATION PRATIQUE D'OPERATIONS DE GENIE BIOLOGIQUE

TRANSFERTS ET EXPRESSION DES PLASMIDES

PREMIER JOUR :

Durée : 6 heures 45

Les plasmides sont des ADN circulaires double brin extrachromosomiques naturellement transférés par **conjugaison** entre une souche donatrice et une souche réceptrice. Ils confèrent des propriétés nouvelles aux bactéries réceptrices.

Au laboratoire de recherche, le transfert de plasmides s'effectue classiquement par **transformation** de bactéries compétentes. Ce processus permet de réaliser le transfert de gènes codant pour des protéines d'intérêt dans des cellules capables de les surproduire. Ces gènes auront été intégrés dans la cassette de clonage du vecteur plasmidique.

Dans ce qui suit, seront réalisés :

- une vérification des paramètres de croissance de la souche productrice *E.coli*,
- la vérification, dans un surnageant issu d'une minipréparation rapide, de la présence d'un plasmide recombinant contenant l'insert souhaité,
- le dosage des protéines obtenues par expression de la séquence insérée, ceci afin d'évaluer la réalité de la surexpression recherchée,
- des cultures cellulaires qui permettront d'étudier les effets de cette protéine d'intérêt *in vivo*.

PREMIÈRE PARTIE : 40 points (premier et deuxième jour).

Vérification des paramètres de croissance de la souche productrice *E.coli*

On se propose d'étudier les paramètres de croissance de la souche productrice *E.coli*.

1.1. Réactifs et matériels :

- Souche d'*E.coli* en phase exponentielle de croissance en bouillon ordinaire à raison de 5 mL par tube
- Un Erlenmeyer contenant 50 mL de bouillon ordinaire stérile « **BO** »
- Un flacon de 10 mL de bouillon ordinaire stérile « **BO** »
- Microcuves pour spectrophotomètre
- Pipettes graduées stériles 1, 2 et 5 mL
- Pipettes de transfert
- Dispositifs de récupération des déchets
- Tubes à hémolyse stériles
- Billes de verre stériles ou râteau
- Géloses ordinaires en boîtes : 7
- Bac à glace

BOGEN

- Eau physiologique stérile « EP » : 30 mL

1.2. Manipulation :

S'organiser pour inoculer la souche et faire immédiatement une lecture d'absorbance (temps 0).

- Inoculer 50 mL de bouillon ordinaire avec un volume de la souche correspondant à 5 % du volume du milieu
- Mesurer l'absorbance de la culture à 650 nm (limite de linéarité précisée par le centre)
- Toutes les 15 minutes, réaliser un prélèvement de 2 mL environ et en mesurer l'absorbance ; conserver les prélèvements dans la glace.

Montrer la réalisation d'un prélèvement et d'une mesure d'absorbance à un examinateur.

- Choisir deux temps t_1 et t_2 durant la phase exponentielle à partir desquels seront déterminées les concentrations bactériennes par numération en surface.
- À partir des absorbances mesurées à t_1 et t_2 , calculer les dilutions nécessaires pour obtenir de l'ordre de 10^2 colonies par boîte (3 boîtes de géloses ordinaires disponibles par temps et une boîte par dilution).

Montrer la réalisation d'une dilution à un examinateur.

Donnée : $3,5 \cdot 10^7$ bactéries.mL⁻¹ correspondent à une absorbance de 0,1.

- En fin de manipulation, effectuer un contrôle de pureté de la culture par isolement.

1.3. Compte rendu

- 1.3.1. Présenter les calculs effectués en 1.2.
- 1.3.2. Tracer la courbe de croissance sur papier millimétré à partir des valeurs expérimentales.
- 1.3.3. Commenter la courbe obtenue.
- 1.3.4. Déterminer graphiquement G et calculer Qx. (μ)

DEUXIÈME PARTIE : 35 points (premier et deuxième jour).

Vérification d'une construction plasmidique

Un fragment d'ADN de 1100 pb codant pour la protéine d'intérêt est intégré dans la cassette de clonage du plasmide P (3250 pb). La construction plasmidique est amplifiée par transformation de bactéries compétentes. Les bactéries ayant intégré le plasmide sont mises en culture sur milieu sélectif.

Une des colonies est repiquée en milieu liquide. Une minipréparation de plasmide est réalisée par la technique rapide de lyse bouillante. La solution plasmidique obtenue est analysée par digestion enzymatique pour vérifier la présence de l'insert.

2.1. Réactifs :

- solution plasmidique « S » : 30 μ L
- endonucléase de restriction Hinc II à 10 U. μ L⁻¹ « E » : 3 μ L
- tampon d'hydrolyse concentré 10 fois, « TH » : 5 μ L
- eau distillée, « ED » : 50 μ L
- solution de tampon de charge « TC » : 12 μ L
concentration fournie par le centre.

2.2. Manipulation :

2.2.1. Digestion.

- Dans un microtube, préparer 20 μL d'hydrolysate en introduisant successivement :
 - V_1 μL d'eau distillée
 - V_2 μL de tampon x 10
 - 10 μL de solution plasmidique
 - 10 U d'enzyme
- Incuber à 37°C pendant 1 heure.

2.2.2. Contrôle négatif.

Déposer parallèlement à la digestion la même quantité de solution plasmidique non digérée préparée comme suit dans un microtube :

- V_3 μL d'eau distillée
- 10 μL de solution plasmidique

2.2.3. Electrophorèse.

- Ajouter un volume adéquat de tampon de charge « **TC** » au produit de digestion et à la solution plasmidique non digérée. Conserver les mélanges dans la glace jusqu'au moment du dépôt.
- Charger le gel avec un volume V de chaque mélange (indiqué en début d'épreuve).
- Les dépôts du marqueur de taille, la migration et la révélation du gel seront réalisés par un examinateur.

2.3. Compte rendu

Indiquer les volumes mis en œuvre et expliquer les calculs réalisés pour la réalisation des différentes étapes de la manipulation.

TROISIÈME PARTIE : 45 points

Dosage des protéines exprimées par les cellules transformées

Le fragment d'ADN du clone positif est ensuite introduit dans un vecteur d'expression. Les cellules transformées sont cultivées sur un milieu permettant d'optimiser l'expression du gène d'intérêt (production optimale estimée à 10 g.L^{-1}). Après culture, le surnageant protéique est dosé par la méthode de Bradford.

3.1. Réactifs et matériels

- solution étalon de BSA à 0,5 g.L^{-1} , « **BSA à 0,5 g.L^{-1}** » 5 mL
- solution protéique à doser, « **P** » 5 mL
- « **Réactif de Bradford** » en distributeur réglé sur 3 mL
- 2 fioles jaugées
- tubes à hémolyse et cuves de spectrophomètre

3.2. Manipulation

3.2.1. Préparation de la gamme et des essais :

- À partir de la solution étalon fournie, préparer 5 solutions étalon filles contenant au maximum 50 µg de protéines pour 0,1 mL.
- Réaliser deux dilutions différentes de la solution **P** à doser.

Une dilution de la solution P sera réalisée en présence d'un examinateur.

3.2.2. Réaction colorimétrique :

- 0,1 mL de solution protéique
- 3 mL de réactif de Bradford
- Agiter, attendre 10 min.
- Lire l'absorbance à 595 nm contre le témoin réactif.
(La coloration est stable pendant 1 heure).

3.3. Compte rendu

- 3.3.1. Expliquer les dilutions effectuées sur la solution **P** à doser.
- 3.3.2. Présenter la préparation de la gamme et les résultats sous forme d'un tableau.
- 3.3.3. Tracer la courbe d'étalonnage à l'aide de l'outil informatique, calculer la concentration en protéines de la solution à doser (cv = 5 %)

QUATRIÈME PARTIE : 40 points

Préliminaire à l'étude des effets de cette protéine d'intérêt sur la cellule animale.

En vue de tester les effets de cette protéine sur des cellules animales, on se propose d'entretenir des cultures cellulaires (cellules animales adhérentes cultivant en monocouche dans du milieu DMEM additionné de 10 % v/v de sérum de veau fœtal), en réalisant les étapes suivantes :

- vérification des flacons de cultures cellulaires à repiquer,
- repiquage des cellules,
- numération de la suspension cellulaire.

4.1. Réactifs et matériel :

En salle de culture :

- 2 flacons de la culture cellulaire « **Xa** » et « **Xb** » 25 mL
- tampon PBS sans calcium, stérile « **PBS** », 6 mL
- solution de trypsine stérile « **Trypsine** », 2,5 mL
- milieu DMEM stérile additionné de glutamine, de 10 % v/v de SVF et d'antibiotiques « **DMEM⁺** », 10 mL
- flacon de culture stérile (25 mL)
- matériel spécifique aux cultures cellulaires

En salle de T.P :

- hématimètre et lamelles planes,
- solution de bleu de Funk à 0,4 % « **BF** » 1 mL
- 2 tubes à hémolyse, 2 tubes Eppendorf

4.2. Manipulation :

Les parties 4.2.1 et 4.2.2 sont réalisées sous hotte à flux laminaire en salle de culture cellulaire en présence d'un examinateur.

Tous les examens microscopiques réalisés doivent être présentés à un examinateur.

4.2.1. Vérification des cultures cellulaires à repiquer.

- Réaliser un examen macroscopique des cultures cellulaires à disposition.
- Réaliser un examen microscopique des cultures cellulaires au microscope inversé.
- Choisir un flacon de culture cellulaire (« Xa » ou « Xb ») afin d'effectuer le repiquage.

4.2.2. Repiquage des cellules.

À partir du flacon de culture choisi :

- Éliminer le milieu de culture.
- Laver le tapis cellulaire avec 5 mL de « PBS ».
- Introduire 2 mL de solution de trypsine et laisser agir à température ambiante en surveillant attentivement l'action de la trypsine.
- Introduire 5 mL de milieu DMEM⁺ et homogénéiser soigneusement : on obtient la suspension cellulaire C.
- Transférer 1,5 mL de suspension C dans un nouveau flacon stérile. Compléter à 5 mL avec le milieu DMEM⁺.
- Placer le flacon à l'étuve à 37°C en atmosphère air + 5 % CO₂.

4.2.3. Numération des cellules viables de la suspension cellulaire C.

- Prélever 0,2 mL de la suspension C.
- Ajouter 0,05 mL de bleu de Funk.
- À l'aide de l'hématimètre, compter immédiatement les cellules viables.

Montrer un champ de l'hématimètre à un examinateur.

4.3. Compte rendu

- 4.3.1. Indiquer les résultats des examens macroscopique et microscopique des cultures cellulaires.
- 4.3.2. Indiquer le critère de choix du flacon de culture cellulaire utilisé pour prélever les cellules à repiquer.
- 4.3.3. Présenter le résultat de la numération : nombre de cellules viables par mL de suspension cellulaire et pourcentage de viabilité.
- 4.3.4. Calculer le nombre de cellules viables introduites dans le nouveau flacon de culture.

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

BIOTECHNOLOGIE

Durée de l'épreuve : 8 heures

Coefficient : 8

*RÉALISATION PRATIQUE
D'OPÉRATIONS DE GÉNIE
BIOLOGIQUE*

DEUXIÈME JOUR

Durée : 1h 15

Le sujet comporte 3 pages numérotées de 1/3 à 3/3

L'usage d'une calculatrice est autorisé.

RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS DE GÉNIE BIOLOGIQUE

TRANSFERTS ET EXPRESSION DES PLASMIDES

DEUXIÈME JOUR :

Durée : 1 heure 15

PREMIÈRE PARTIE : 40 points (premier et deuxième jour).

Vérification des paramètres de croissance de la souche productrice *E.coli*

- 1.1. Présenter les résultats obtenus pour le contrôle de pureté et les commenter.
- 1.2. Interpréter les résultats des numérations obtenues à t_1 et t_2 .
- 1.2. À l'aide des résultats des numérations, déterminer Q_x et comparer au résultat obtenu le premier jour.

DEUXIÈME PARTIE : 35 points (premier et deuxième jour).

Vérification d'une construction plasmidique.

- 2.1. Joindre au compte rendu l'électrophorégramme fourni.
- 2.2. Repérer les différentes bandes correspondant au marqueur à l'aide du document joint.
- 2.3. Interpréter le résultat obtenu pour la construction non digérée.
- 2.4. Évaluer la taille du ou des fragments séparés par la digestion enzymatique.
- 2.5. Conclure.
- 2.6. Calculer la quantité d'ADN présente dans chaque bande de la digestion en sachant que la concentration initiale de la solution plasmidique était de $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ et que $10 \mu\text{L}$ ont été soumis à la digestion.

BOGEN

DOCUMENT

0,5 µg du ladder 1 kb visualisé sur gel d'agarose à 0,8 % en présence de BET

