



Licence des Sciences de la Vie - LSV2 TD2 Génie Génétique - 2014/2015

Mini-Questions :

- 1 - Le gène de l'insuline humaine contient des introns. Comment peut-on faire exprimer le gène de l'insuline par une bactérie sachant que les bactéries ne possèdent pas le système d'excision des introns ?
- 2- Citer 3 éléments importants d'un vecteur de clonage.
- 3- Comment distingue t'on des bactéries transformées de bactéries non transformées ?
- 4- Comment discrimine t'on des bactéries transformées avec un vecteur recombinant de celles transformées avec un vecteur vide ?

Exercice n° 1 :

On veut cloner un fragment d'ADNc de 1,4 Kb ayant des extrémités XhoI et PstI. Le vecteur choisi est le plasmide pK (**figure 1**) ne contenant pas de site XhoI, le fragment est donc inséré par ligation entre les sites SacI et PstI du plasmide. On considèrera que les distances entre les 4 sites notés du polylinker sont négligeables et que leur localisation est à 640 paires de bases de l'origine notée 0=2900.

site XhoI : (C/TCGAG)

site PstI : (CTGCA/G)

site SacI : (GAGCT/C)

Quelles expériences devez-vous réaliser afin d'intégrer ce fragment dans le plasmide?

Un échantillon de la ligation est transformé dans des bactéries sensibles à l'ampicilline puis les bactéries sont étalées sur milieu + ampicilline + IPTG (inducteur du gène β -Gal) + X-Gal (substrat incolore de la β -galactosidase qui est converti par l'enzyme en un produit bleu). On obtient 1000 colonies blanches et 2 colonies bleues.

Commentez ce résultat.

Cinq clones blancs appelés pK rec sont mis en milieu liquide + ampicilline. Après une nuit de croissance à 37°C, les bactéries sont lysées, leur ADN purifié et digéré par différentes enzymes de restriction. En parallèle, l'ADN du plasmide vide (pK) est digéré par les mêmes enzymes de restriction. Les fragments obtenus sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose et le résultat de la migration est présenté dans la **figure 2**. Tous les clones blancs donnent le même résultat.

Donnez la carte de restriction du plasmide pK rec.

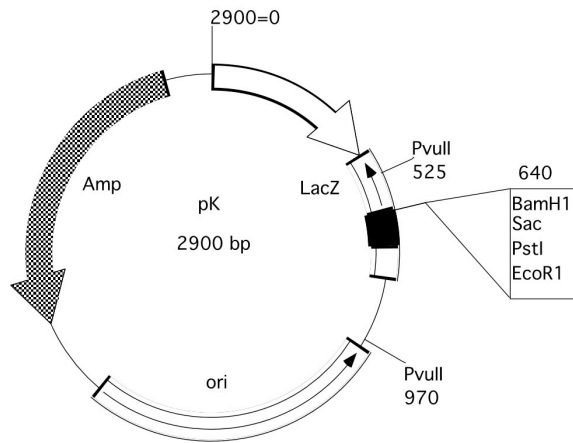


Figure 1

Figure 2

