

Licence des Sciences de la Vie - LSV2 Correction TD2 Génie Génétique 2014/2015 – partie 2 -

Exercice 1 :

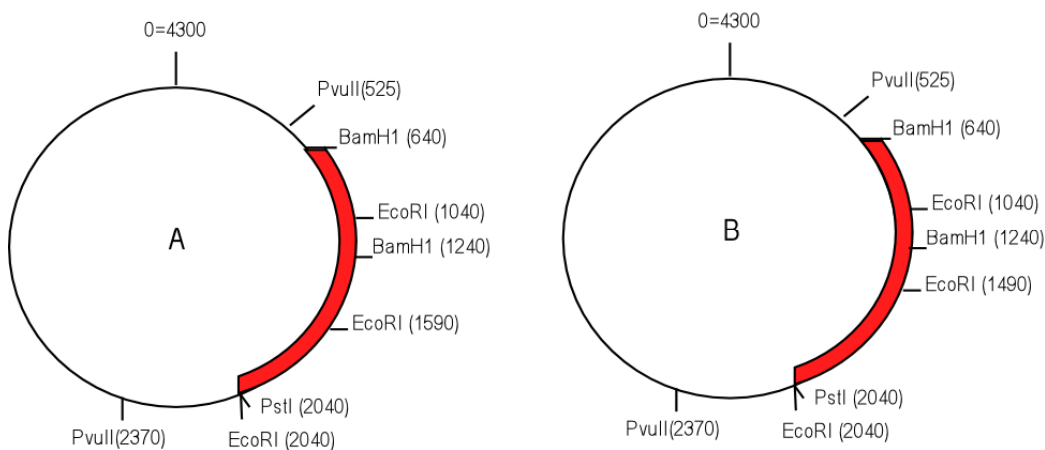
c) carte de restriction

Les digestions du plasmide vide confirment qu'il n'y a qu'un seul site de restriction pour les enzymes se trouvant dans le site de multiclonaage et 2 sites pour PvuII.

Pour le plasmide recombinant :

BamH1 : 2 fragments donc 2 sites, un sur le MCS (site de multiclonaage) et le 2^{ème} dans l'insert ; l'un des fragments est à 600 paires de base du site BamH1 du MCS; donc n'y a qu'une seule possibilité pour le placer.

EcoRI : 3 fragments donc 3 sites ; un sur le MCS, les 2 autres sur l'insert ; un des fragments étant plus grand que le plasmide il contient les 2900pb du plasmide et 400 pb de l'insert ; il y a deux possibilités pour placer l'autre site EcoRI : cas A ou cas B



Pour déterminer quel cas correspond à la carte de restriction du fragment d'intérêt, il faut regarder la double digestion BamHI + EcoRI. Cette digestion donne 5 fragments : 2900, 550, 400, 250 et 200 paires de bases. Seule la possibilité B donne ces résultats. La possibilité A donnerait les fragments de 2900, 400, 450, 350 et 200pb.

La digestion PstI confirme qu'il n'y a qu'un site de restriction dans le vecteur recombinant.

La digestion PvuII confirme également la présence des deux sites, initialement présents dans le vecteur vide.

Le profil de digestion SacI indique l'absence de site SacI dans le vecteur recombinant (pour rappel, le site SacI à une extrémité de l'insert a été perdu lors de la ligation). Les trois bandes visualisées sur gel correspondent à différents états de l'ADN plasmidique non digéré : ADN circulaire relâché (migre le moins loin dans le gel), ADN linéaire (coupure non spécifique de l'enzyme) et ADN superenroulé (migre le plus loin dans le gel).