Afin de cloner un segment d’ADN circulaire double brin dans le plasmide pUC 18, on réalise les opérations suivantes :

1. Traitement de l’ADN à cloner avec l’enzyme de restriction EcoRI
2. Traitement du plasmide pUC 18 avec le même enzyme
3. Traitement de l’ADN à cloner et du plasmide traités par EcoRI en présence de ligase T4 et d’ATP

On répète la même expérience avec les enzymes de restriction suivantes : BamHI, XbalI et HindIII

Les plasmides recombinants sont incubés en présence d’une souche d’E.coli Amps. Lac Z- ( B-galactosidase inactive). Les bactéries sont ensuite cultivées sur une gélose contenant de l’ampicilline, de l’IPTG (inducteur de l’opéron lactose) et du X-gal (5-bromo-4-chlor-3-indolvI-B-D-thiogalactoside substrat incolore devenant bleu après hydrolyse par la B-galactosidase).

Tous les types de colonies cultivant sur le milieu Amp-IPTG-X-gal sont isolés et leur ADN plasmidique extrait sous forme superenroulée. L’électrophorèse sur gel d’agarose permet de déterminer la taille de chaque plasmide.



Les résultats de ces expériences sont consignés dans le tableau suivant :

1. Quel est le rôle de l’ampicilline au cours de ces expériences ?
2. A quoi correspond une colonie bleue ? une colonie blanche ?
3. Quel est l’intérêt de réalisé une expérience sans utiliser d’enzyme de restriction ?
4. Déterminer la taille de l’ADN inséré dans chaque cas ?
5. Quelle est la taille du fragment d’ADN concerné ?
6. Comment interpréter le résultat obtenu avec l’enzyme de restriction Xbal ?

