

Travaux dirigés de BCM Bio informatique et PCR

- Objectif :**
- découverte des banques de données et requêtes (NCBI, Swiss prot, nr.....)
 - recherche d'ORF dans une séquence d'ADN
 - recherche d'une carte de plasmide

Vous disposez de la séquence du plasmide contenant l'insert que vous amplifiez par PCR édité dans la base de donnée EMBL Data Library. Sa taille est 4 933 pb, et la séquence est orientée de 5' (nucléotide 1) vers 3' (nucléotide 4933).

1. Recherche des séquences amorces SP6 et T7

1.1. Séquences des amorces

- Aller sur le site : <http://www.usbio.net/Home.aspx>
- Cliquer sur le lien <cloning> puis sur le lien <sequencing primer>
- Rechercher dans la liste, les séquences du primer T7 (20 mer) et du primer SP6 (19 mer) et les copier

Séquence T7: [5'- -3']

Séquence SP6 : [5'-.....3']

1.2. Détermination des Tm des deux amorces

- Utiliser l'outil de calcul de Tm sur le site de SIGMA :
<http://proligo2.proligo.com/Calculacion/calculacion.html>
- Déterminer le Tm des deux amorces et conclure quant à leur utilisation pour la PCR

Tm T7 :°C

Tm SP6 :°C

Conclusion =°C

2. Détermination de la séquence amplifiée par PCR

A l'aide des deux primers correctement positionnés sur le vecteur, vous allez rechercher la séquence amplifiée au cours de la PCR.

2.1. Positionnement de l'amorce T7

- A l'aide de l'outil « **Recherche** » du traitement de texte, rechercher la position de l'amorce et la souligner sur la séquence.

NB : faire la recherche en enlevant les 3G en 3' de l'amorce

Regarder l'orientation de l'amorce T7. Où sont localisées les 3G? Les identifier et les souligner dans la séquence. Quel brin est donc synthétisé à partir de cette amorce?

position de l'amorce T7 : **1er nucléotide :**
20^{ème} nucléotide :

Brin copié :

2.2. Positionnement de l'amorce SP6

- Quel brin sera synthétisé à partir de l'amorce SP6?
- Sur quel brin se fixe-t-elle?

Réponse :

NB enlever le G en 5'

- Quelle séquence doit-on rechercher dans le vecteur afin de positionner l'amorce SP6 ?

Réponse : [5'-.....-3']

- A l'aide de l'outil « **Recherche** » du traitement de texte, rechercher la position de l'amorce et la souligner sur la séquence.

Vous disposez maintenant de la séquence qui sera spécifiquement amplifiée par PCR. Déterminer sa longueur.

Longueur (en nucléotides):

3. Recherche des ORF contenus dans la séquence amplifiée

- Copier la séquence entre les amorces

- Aller sur le site : <http://www.ncbi.nih.gov/>

Il s'agit d'un site permettant d'accéder à de nombreuses banques de données de biotechnologie (bibliographie, séquence génétiques, pathologies humaines, etc....) mais aussi à des outils d'alignements de séquence (BLAST) afin d'identifier des gènes homologues

- Cliquer sur le lien <ORF FINDER>, colonne de droite

- Copier la séquence dans la fenêtre <sequence in FASTA format> et lancer la requête est prise en compte.

- Repérer la plus longue séquence qui change alors de couleur (rosé)

Dans quel cadre ouvert de lecture est - elle positionnée?

Quelle est sa longueur ?

Grâce à l'outil Blastp, on va rechercher la protéine correspondante dans la base <nr>

- Cliquer sur <BLAST> : la requête est prise en compte.

Type de protéine identifiée :

- Pour obtenir la réponse cliquer sur <FORMAT>

Protéine codée par la séquence amplifiée :