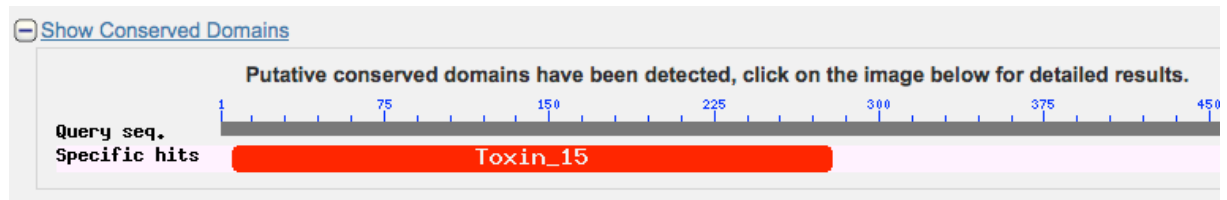


## Etape 1 : Identification de la protéine par comparaison à la base de données

### Résultats du « protein blast » :

- Identification d'un domaine fonctionnel conservé « Toxin 15 » dans la région N terminale de la protéine. Le motif a une longueur d'environ 275 acides aminés (sur les 560 de la protéine étudiée) :



En survolant la zone avec le curseur, on est redirigé vers la page du NCBI dédiée aux « Domaines conservés », on peut alors obtenir une fenêtre d'informations :

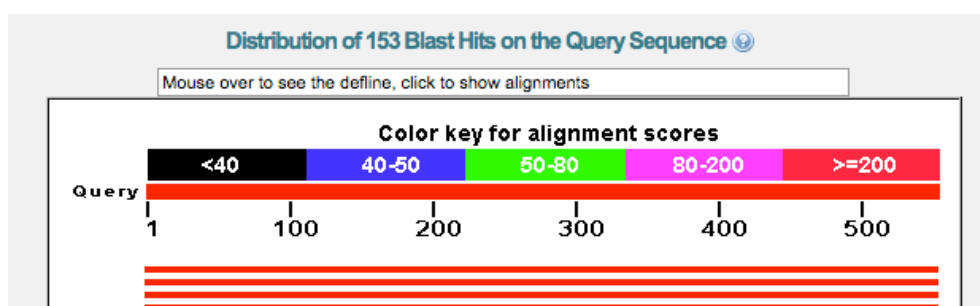
**Toxin\_15**

**Cdd:pfam07906**

[Specific hit] Cdd:pfam07906, ShET2 enterotoxin, N-terminal region. The members of this family are sequences that are similar to the N-terminal half of the ShET2 enterotoxin produced by *Shigella flexneri* and *Escherichia coli*. This protein was found to confer toxigenicity in the Ussing chamber, and the N-terminal region was found to be important for the protein's enterotoxic effect. It is thought to be a hydrophobic protein that forms inclusion bodies within the bacterial cell, and may be secreted by the Mxi system. Most members of this family are annotated as putative enterotoxins, but one member is a regulator of acetyl CoA synthetase, and another two members are annotated as ankyrin-like regulatory proteins and contain Ank repeats (pfam00023).

En résumé, on y apprend que le motif « Toxin 15 » est retrouvé chez *E.coli* et *Shigella flexneri*. Il s'agit d'un polypeptide hydrophobe à effet entérotoxique.

- En retournant sur la page de résultats de Blast, on constate que les séquences alignées les plus significatives figurent en haut de classement, soit sous forme de graphique, soit sont directement recensées sous forme de liste :



Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/>	ShET2 enterotoxin [Escherichia coli 53638] >ref ZP_11502061.1  putative shET2 enterotoxin	1127	1127	100%	0.0	99%	YP_001919259.1
<input type="checkbox"/>	OspD3 [Shigella boydii Sb227] >ref ZP_14853925.1  putative enterotoxin [Shigella boydii 444	1125	1125	100%	0.0	99%	YP_406300.1
<input type="checkbox"/>	Enterotoxin [Shigella flexneri CDC 796-83] >gb AAP78983.1  OspD3 [Shigella flexneri] >gb E	1125	1125	100%	0.0	99%	ZP_11653627.1

On constate que la protéine analysée semble correspondre à une entérotoxine ShET2 d'E.coli avec un score de 1127. En cliquant sur le lien, on peut alors visualiser l'alignement :

#### ShET2 enterotoxin [Escherichia coli 53638]

Sequence ID: [ref|YP\\_001919259.1](#) Length: 565 Number of Matches: 1

► [See 12 more title\(s\)](#)

Range 1: 2 to 560 [GenPept](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
1127 bits(2914)	0.0	Compositional matrix adjust.	554/559(99%)	554/559(99%)	5/559(0%)
Query 1	PSVNLIPSRKICLQNMINKDNVSVETIQSLLHSHKQLPYFSDKRSFLLNLCQVTDHSGRL				60
Sbjct 2	PSVNLIPSRKICLQNMINKDNVSVETIQSLLHSHKQLPYFSDKRSFLLNLCQVTDHSGRL				61
Query 61	IVCRHLASYWIAQFNKSSGHVDYHHFAPFDEIKNYVSVEEEKAINVPAIIYFVENGWSWG				120
Sbjct 62	IVCRHLASYWIAQFNKSSGHVDYHHFAPFDEIKNYVSVEEEKAINVPAIIYFVENGWSWG				121
Query 121	DIIFYIFNEMIFHSEKSR-EISTSNHNMALGLKIKETKNGGDFVIQLYDPNHTATHLRA				179
Sbjct 122	DIIFYIFNEMIFHSEKSR-EISTSNHNMALGLKIKETKNGGDFVIQLYDPNHTATHLRA				181
Query 180	EFNKFNLAKIKKLTVDNFLDEKHQKCYGLISDGMSIFVDRHTPTSMSSIIIRWPNLLHPK				239
Sbjct 182	EFNKFNLAKIKKLTVDNFLDEKHQKCYGLISDGMSIFVDRHTPTSMSSIIIRWPNLLHPK				241
Query 240	VIIYHAMRMGLTELIQKVTTRVQVLSDDLSDNTLELLLAAKNDGSLGALLALQNGHSDTILA				299
Sbjct 242	VIIYHAMRMGLTELIQKVTTRVQVLSDDLSDNTLELLLAAKNDGSLGALLALQNGHSDTILA				301
Query 300	YGELLETSGLNLDKTVELLTAEGMGGRI SGLSQALQNGHAETIKTYGRLLKKRAINIEYN				359
Sbjct 302	YGELLETSGLNLDKTVELLTAEGMGGRI SGLSQALQNGHAETIKTYGRLLKKRAINIEYN				361
Query 360	KLKNLLTAYYYDEVHRQIPGLMFALQNGHADAIRAYGELILSPPLLNSEDI VNLASRRY				419
Sbjct 362	KLKNLLTAYYYDEVHRQIPGLMFALQNGHADAIRAYGELILSPPLLNSEDI VNLASRRY				421
Query 420	DNVPGLLALNNGQADAILAYGDILNEAKLNLDKKAELLEAKDSNGLSGLFVALHNGCVE				479
Sbjct 422	DNVPGLLALNNGQADAILAYGDILNEAKLNLDKKAELLEAKDSNGLSGLFVALHNGCVE				481
Query 480	TIIAYGKILHTADLTPHQASKLLAAEGPNGVSGLI IAFQNRNFE-----YMGIIKNENITP				535
Sbjct 482	TIIAYGKILHTADLTPHQASKLLAAEGPNGVSGLI IAFQNRNFE YMGIIKNENITP				541
Query 536	EEIAEHLDDKNGSDFLEIM	554			
Sbjct 542	EEIAEHLDDKNGSDFLEIM	560			

La séquence de notre protéine (Query) présente 554 acides aminés identiques par rapport aux 560 de l'entérotoxine ShET2 de la base de donnée (subject). Il y a donc 554 match, on constate également un gap de 5 acides aminés (-----). 554 match + 5 gap = 559 : il n'y a donc aucun mismatch.

## Etape 2 : Traduction de la séquence protéique en séquence nucléotidique

### Résultats du « tBlastN » :

Après traduction à partir de la séquence protéique, tBlastN retourne en tête de liste, une correspondance avec une séquence nucléotidique : le plasmide p53638-226 de *E.coli*.

#### Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

<div>Alignments Download GenBank Graphics</div>							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Escherichia coli 53638 plasmid p53638_226, complete sequence</a>	1126	1785	100%	0.0	99%	<a href="#">CP001064.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">E.coli senA gene (isolate EI-34)</a>	1126	1126	100%	0.0	99%	<a href="#">Z54194.1</a>

En cliquant sur le lien du numéro d'accèsion, Blast redirige vers la fiche Genbank du plasmide :

Extrait de la fiche :

En début de fiche (ligne LOCUS) on constate que le plasmide représente 225.683 paires de bases.

[Display Settings:](#) ☐ GenBank

[Send:](#) ☐

## Escherichia coli 53638 plasmid p53638\_226, complete sequence

GenBank: CP001064.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

LOCUS CP001064 225683 bp DNA circular BCT 16-MAY-2008  
DEFINITION Escherichia coli 53638 plasmid p53638\_226, complete sequence.  
ACCESSION CP001064  
VERSION CP001064.1 GI:188501074  
DBLINK BioProject: [PRJNA15639](#)  
KEYWORDS .  
SOURCE Escherichia coli 53638  
ORGANISM [Escherichia coli 53638](#)  
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;  
Enterobacteriaceae; Escherichia.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 225683)  
AUTHORS Rasko,D.A., Rosovitz,M.J., Brinkley,C., Myers,G.S.A., Seshadri,R.,  
Cer,R.Z., Jiang,L., Sebastian,Y. and Ravel,J.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (01-MAY-2008) The Institute for Genomic Research, 9712  
Medical Center Dr., Rockville, MD 20850, USA  
COMMENT The chromosome for this organism was deposited in GenBank Accession  
Numbers AAKB02000001-AAKB02000002.  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..225683  
/organism="Escherichia coli 53638"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/strain="53638"  
/serotype="O144"  
/db\_xref="taxon:344610"  
/plasmid="p53638\_226"  
gene 302..577

[Change region shown](#)

[Customize view](#)

### Analyze this sequence

[Run BLAST](#)

[Pick Primers](#)

[Highlight Sequence Features](#)

[Find in this Sequence](#)

### Related information

[Related Sequences](#)

[Assembly](#)

[BioProject](#)

[Full text in PMC](#)

[Gene](#)

[Genome](#)

[Identical RefSeq](#)

[Protein](#)

[PubMed \(Weighted\)](#)

[Taxonomy](#)

... fin de la fiche :

```
224821 ctttttgaga agctgattat atcgccggg ttactggcg aggattgccc tggttaactg
224881 cagaaggaat gcgctttgac atgatgggtt ttctgcgcg gctggattgc ggtaagaacg
224941 gtgaaaccac tgtaatgata ggcaattcag gtaataaaaa agccggagct ccctttccgg
225001 cacgtctcat tgccgtatca cttcctcccg aaaaagcatt aatcagtaaa acccgactgc
225061 tcagcgagaa tcgtcgaaaa ggacgagtag ttacggcga aacgctggaa gcagcgggcc
225121 atgtgctatt gctaacaatca ttaccggaag atgaatatc agcagagcaa gtggctgatt
225181 gttaccgtct gcgatggcaa attgaactgg cttttaagcg gctcaaaagt ttgctgcacc
225241 tggatgcttt gcgtgcaaag gaacctgaac tcgcgaaagc gtggatattt gctaattctac
225301 tcgccgcatt tttaattgac gacataatcc agccatcgct ggatttcccc ccagaagtg
225361 ccgatccga aaagaagaac taactcgttg tggagaataa caaaaatggt catctggagc
225421 ttacaggtgg ccattcgtgg gacagtatcc ctgacagcct acaaacgca attgaagaac
225481 gcgaggcatc gtottaacga ggcaccgagg cgtcgcatc ttcatatggt tcaaccctta
225541 agttagcgtc tatgggaata tctccccggc agccttcagg ataaaatatt atcagatgac
225601 tgcttagaaa aagaacaaat ggtggtgtcc gctattgcca gtacacctca agcttcttac
225661 catatttgaa ataaagctca ata
```

//

You are here: [NCBI](#) > [DNA & RNA](#) > [Nucleotide Database](#)

### GETTING STARTED

[NCBI Education](#)

[NCBI Help Manual](#)

[NCBI Handbook](#)

[Training & Tutorials](#)

### RESOURCES

[Chemicals & Bioassays](#)

[Data & Software](#)

[DNA & RNA](#)

[Domains & Structures](#)

### POPULAR

[PubMed](#)

[Nucleotide](#)

[BLAST](#)

[PubMed Central](#)

### FEATURED

[Genetic 1](#)

[PubMed](#)

[GenBank](#)

[Referenc](#)



Remarque : en parcourant la fiche dans la longueur (bon courage, elle est longue !), on constate qu'il y a bien un ORF correspondant au gène codant l'entérotoxine ShET2. Celui-ci est localisé entre les paires de base 154687 à 156384 :

```

gene      complement(154687..156384)
CDS       /locus_tag="Ec53638_A0209"
          complement(154687..156384)
          /locus_tag="Ec53638_A0209"
          /note="identified by match to protein family HMM PF07906"
          /codon_start=1
          /transl_table=11
          /product="ShET2 enterotoxin"
          /protein_id="ACD54249.1"
          /db_xref="GI:188501114"
          /translation="MPSVNLIPSRKICLQNMINKDNVSVETIQSLHLSKQLPYFSDKR
          SFLNLNLCQVTDHSGRLIVCRHLASYWIAQFNKSSGHVDYHHFAFPDEIKNYVSSEE
          EKAINVPAIIYFVENGSGWDIIIFYIPNEMIPHSEKSRALSTSNHNMALGLKIKETK
          NGGDFVIQLYDPNHTATHLRAEFNKFNLAKIKKLTVDNLFDEKHQKCYGLISDGMISF
          VDRHTPTSMSSIIRWPNLLHPKVIYHAMRMGLTELIQKVTRVVQLSDLSNTLELLL
          AAKNDGLSGLLALQNGHSDTILAYGELLETSGLNLDKTVELLTAEGMGGRISGLSQ
          ALQNGHAETIKTYGRLLKKRAINIEYNKLNLLTAYYYDEVHRQIPGLMFALQNGHAD
          AIRAYGELILSPPLNSEDIVNLLASRRYDNVPGLLALNNGQADAILAYGDILNEAK
          LNLDKAELLEAKDSNGLSGLFVALHNGCVETIIAYGKILHTADLTPHQSKLLAAEG
          PNGVSGLIIFQNRNFEAIKTYMGIKKNENITPEEIAEHLDDKNGSDFLEIMKNIS "
gene      156460..156648

```

Pour manipuler plus simplement la séquence de ce long plasmide de 225 kbp, on retourne en début de fiche pour convertir la fiche en format FASTA :

NCBI Resources ☒ How To ☒

Nucleotide

[Display Settings:](#) ☒ GenBank

### Escherichia coli 53638 plasmid p53638

GenBank: CP001064.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS CP001064 225683 bp DNA

Après conversion, on obtient une séquence simplifiée plus facilement gérable par copier – coller :

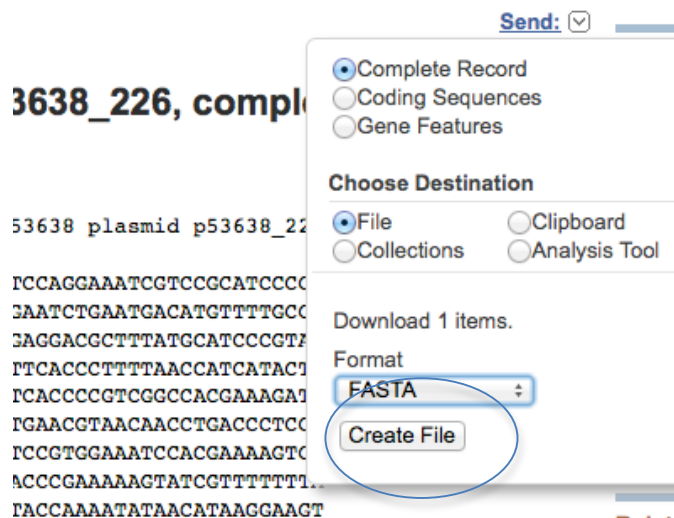
Extrait en format FASTA :

```

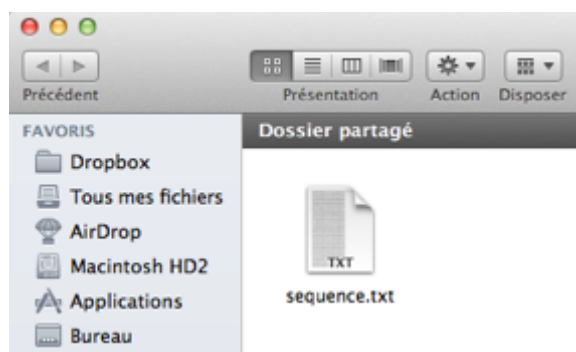
>gi|188501074|gb|CP001064.1| Escherichia coli 53638 plasmid p53638_226,
sequence
GCGCGAATTTTTGTTCTTCAGTAAACATGTTTCATCTTCTGAGAGTCCAGGAAATCGTCCGCATCCCCA
TTACCGTCTTATATCACTGGCGCTGACATGTGCTCATTGATGAAGTGAATCTGAATGACATGTTTTGCCA
TATCAACGCCAACCGGTGTATATTTTCAATTTGTGGAGTCTCCAGTCTGAGGACGCTTTATGCATCCCGTAT
TGGGCACTATGATGCCGGAAGCTGCGAGGCTCCACACCTGCCAGTTTCACCCCTTTAACCATCATACTA
CTCCGTGTTTAATTTGTGTGGGATGCGTTTACATTATTAACAGTGTACACCCGTCGGCCACGAAAGATA
AACAGGTGACCAGAAAAGGGATCTTCATCCAGCACATGCTATATCTTGAACGTAACAACCTGACCCTCCG
CACCCGCATCAAGCGGCTGGCACGTAAAAACAATCTGCTTCTCGCGTTCCGTGGAAATCCACGAAAAGTCA
TCGGCTCCTTCATTGAAAAACACATATTCTACTGATTGGAAGCGCCACCCGAAAAAGTATCGTTTTTTTA

```

Pour récupérer la séquence, procéder soit par copier- coller du contenu dans un document texte (avec le bloc notes ou le wordpad dans les accessoires du système d'exploitation), soit utiliser plus simplement le générateur de fichier de NCBI qui est en entête de fiche (outil « send » en haut à droite) :



En cliquant sur « Create file », le fichier texte au format FASTA sera immédiatement uploadé sur votre ordinateur sous le nom « sequence ». Ce fichier pourra alors être utilisé ultérieurement pour interroger d'autres outils !!



### Etape 3 : Recherche des amorces pour l'amplification du plasmide

Dans le logiciel **Primer3** accessible en ligne, coller la séquence du plasmide et rechercher les amorces les plus intéressantes en cliquant sur « Pick primers » :

Le logiciel retourne alors les 2 amorces sens / antisens à utiliser pour l'amplification par PCR :

## Primer3 Output

```
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO
LEFT PRIMER    start len   tm    gc%   any   3' seg
                114856 20   60.00 40.00 5.00  3.00 AATCCGTTTTGGGAAATCC
RIGHT PRIMER    115072 20   60.00 55.00 5.00  1.00 CCAGTGTCTCTCCAGTGGTT
SEQUENCE SIZE: 225683
INCLUDED REGION SIZE: 225683

PRODUCT SIZE: 217, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 2.00
```

Remarque : pour personnaliser le design des amorces, il est possible d'utiliser les fonctions avancées de Primer 3. Sur la page du logiciel, il est possible de paramétrer certains paramètres supplémentaires (GC%, Tm, longueur souhaitée pour les amorces...) afin de pouvoir améliorer la spécificité des amorces :

### General Primer Picking Conditions

[Primer Size](#) Min:  Opt:  Max:   
[Primer Tm](#) Min:  Opt:  Max:  [Max Tm Dif](#)  
[Product Tm](#) Min:  Opt:  Max:   
[Primer GC%](#) Min:  Opt:  Max:   
[Max Self Complementarity:](#)  [Max 3' Self Complementarity:](#)

A ce stade, les amorces étant définies, il « suffit » de les commander afin de réaliser l'amplification du plasmide.

## Etape 4 : Recherche des sites de restriction

Le plasmide portant le gène codant notre protéine vient d'être amplifié. On réalise maintenant la digestion du plasmide à l'aide d'enzyme de restriction afin d'isoler une séquence contenant le gène d'intérêt.

Ecran du logiciel Ncbutter :

NEW ENGLAND  
**BioLabs**  
[NEB homepage]

## NEBcutter V2.0

[Program Guide](#) [Help](#) [Comm](#)

This tool will take a DNA sequence and find the large, non-overlapping open reading frames using the E.coli genetic code and the sites for all Type II and commercially available Type III restriction enzymes that cut the sequence just once. By default, only enzymes available from NEB are used, but other sets may be chosen. Just enter your sequence and "submit". Further options will appear with the output. **The maximum size of the input file is 1 MByte, and the maximum sequence length is 300 KBases.**  
[What's new in V2.0](#) [Citing NEBcutter](#)

Local sequence file:  [Parcourir...](#)  
GenBank number:  [\[Browse GenBank\]](#)  
or paste in your DNA sequence: (plain or FASTA format)

Standard sequences:  
# Plasmid vectors :  
# Viral + phage :  
  
[More options](#)  
[Set colors](#)

The sequence is: ☐ Linear ☒ Circular  
Enzymes to use:  
☒ NEB enzymes  
☐ All commercially available specificities  
☐ All specificities  
☐ All + defined oligonucleotide sequences  
☐ Only defined oligonucleotide sequences  
[\[define oligos\]](#)

Minimum ORF length to display:  a.a.

Name of sequence:  (optional)

### Remarques :

- Au lieu de copier – coller la séquence du plasmide, on utilise le fichier « sequence.txt » créé précédemment en le chargeant dans « Local sequence file ».
- Le réglage « sequence » est sur « circular » car le plasmide est circulaire.
- Le réglage « Minimum ORF length to display » est réglé sur 550 AA par exemple, car on sait que la protéine que l'on étudie et pour laquelle on recherche le gène, mesure 554 acides aminés.
- On utilise les enzymes de toutes spécificités.

Pendant le traitement des données...



NEBcutter



Cutting your DNA...

### Résultats obtenus :



Circular Sequence: sequence

Help

Comments

Display: - NEB single cutter restriction enzymes  
- Main non-overlapping, min. 550 aa ORFs

GC=48%, AT=52%

Cleavage code	Enzyme name code
✂   blunt end cut	Available from NEB
✂   5' extension	Has other supplier
✂   3' extension	Not commercially available
✂   cuts 1 strand	*: cleavage affected by CpG meth.
	o: cleavage affected by other meth.
	(enz.name): ambiguous site

ORFs:			
a:	1763 aa	k:	602 aa
b:	1653 aa	l:	575 aa
c:	959 aa	m:	574 aa
d:	925 aa	n:	569 aa
e:	877 aa	o:	565 aa
f:	830 aa	p:	565 aa
g:	753 aa		
h:	750 aa		
i:	669 aa		
j:	666 aa		



Main options
New DNA
Custom digest
View sequence
ORF summary
Save project
Print

Availability
All commercial
All

Display
2 cutters
3 cutters
Linear

List
0 cutters
1 cutters
All sites
Save all sites

Les différents ORF repérés sont listés dans un tableau et sont légendés sous forme de flèches grises à l'intérieur de la carte du plasmide.

Le repérage de l'ORF correspond à notre protéine n'est pas très aisé sur cette carte circulaire, on affichera donc une représentation linéaire (menu Display > Linear) :



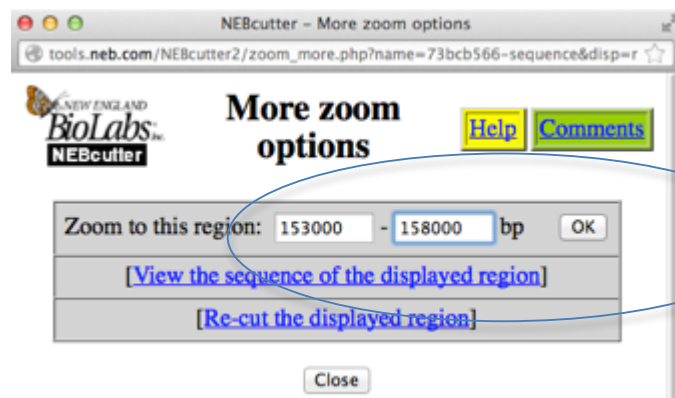
Availability
All commercial
All

Display
2 cutters
3 cutters
Circular

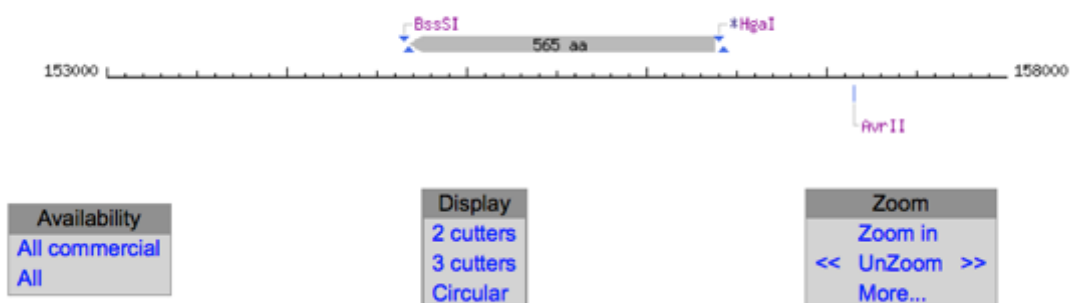
Zoom
Zoom in
More...

Le plasmide apparaît sous forme linéarisée avec chaque ORF désigné par le nombre d'AA du produit d'expression, et entouré par un couple d'enzyme de restriction permettant de couper l'ORF.

Le repérage n'étant toujours pas très aisé, on peut utiliser la fonction « Zoom, More... » permettant d'afficher seulement une zone du plasmide. Puisque nous avons précédemment repéré dans la fiche Genbank que l'ORF était localisé entre les pb 154687 et 156384, on réglera par exemple le zoom entre les paires de bases 153000 et 158000 :



Une fois le zoom effectué, on obtient une séquence plus facile à lire dans laquelle on repère l'ORF :



Availability
All commercial
All

Display
2 cutters
3 cutters
Circular

Zoom
Zoom in
<< UnZoom >>
More...



On constate que l'ORF peut être coupé à l'aide des enzymes de restriction BssSI et HgaI. Pour avoir d'autres options, on peut survoler l'ORF avec le pointeur et cliquer dessus :



On constate que 21 enzymes de restriction peuvent être utilisées : en pratique Nebcutter avait sélectionné en première intention les 2 enzymes les plus adaptées (BssSI et HgaI) car réalisant la coupure le plus prêt possible de la séquence nucléotidique d'intérêt.

Remarque : à côté de chaque enzyme de restriction on trouve le nombre total de point de coupure que chaque enzyme est susceptible de réaliser sur la séquence proposée. En pratique, plus ce nombre est élevé, plus le nombre de fragments obtenus après digestion sera élevé.

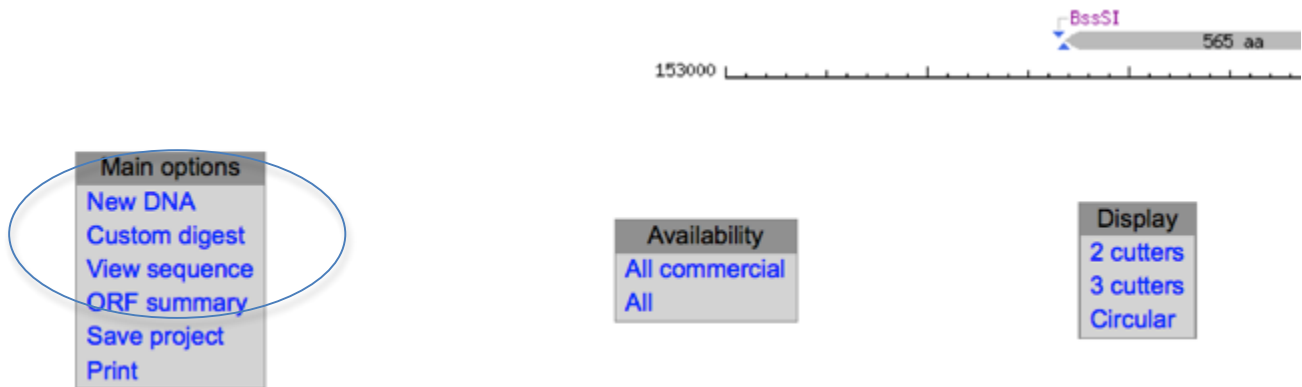
On retourne sur la page précédente à l'aide du lien « Back to main display » en haut de page à gauche. En cliquant sur le nom de deux enzymes de restriction, on obtient la position des points de restriction sur le plasmide :



On constate que BssSI coupe au nucléotide 154674 et HgaI au nucléotide 156424.  
→ le fragment digéré contenant notre gène d'intérêt a donc une longueur de  $156424 - 154674$  soit **1750 bp**.

## Etape 5 : Prévision des conditions électrophorétiques

Dans le menu inférieur « Main options », on réalise une digestion personnalisée du plasmide avec « Custom digest » :



Dans la liste de choix d'enzymes de restriction proposée, cocher les deux enzymes BssSI et HgaI :

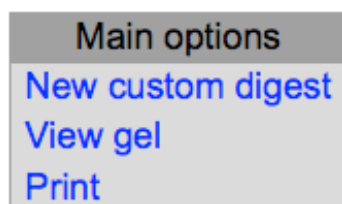
<input type="checkbox"/>	BssHII	G <sup>^</sup> CGCG <sub>^</sub> C	25	100	100	100	100
<input type="checkbox"/>	BssKI	<sup>^</sup> CCNGG <sub>^</sub>	1292	50	100	100	100
<input checked="" type="checkbox"/>	BssSI	C <sup>^</sup> ACGA <sub>^</sub> G	21	50	100	100	50
<input type="checkbox"/>	BstAPI	GCAN <sub>^</sub> NNN <sup>^</sup> NTGC	82	50	100	25	100
<input type="checkbox"/>	BstBI	TT <sup>^</sup> CG <sub>^</sub> AA	47	75	100	10	100

<input type="checkbox"/>	HaeIII	GG <sub>^</sub> CC	764	50	100	25	100
<input checked="" type="checkbox"/>	HgaI	GACGC(N) <sub>5</sub> <sup>^</sup> (N) <sub>5</sub> <sub>^</sub>	298	100	100	25	100
<input type="checkbox"/>	HhaI	G <sub>^</sub> CG <sup>^</sup> C	778	25	100	100	100
<input type="checkbox"/>	HinPII	G <sup>^</sup> CG <sub>^</sub> C	778	100	100	100	100

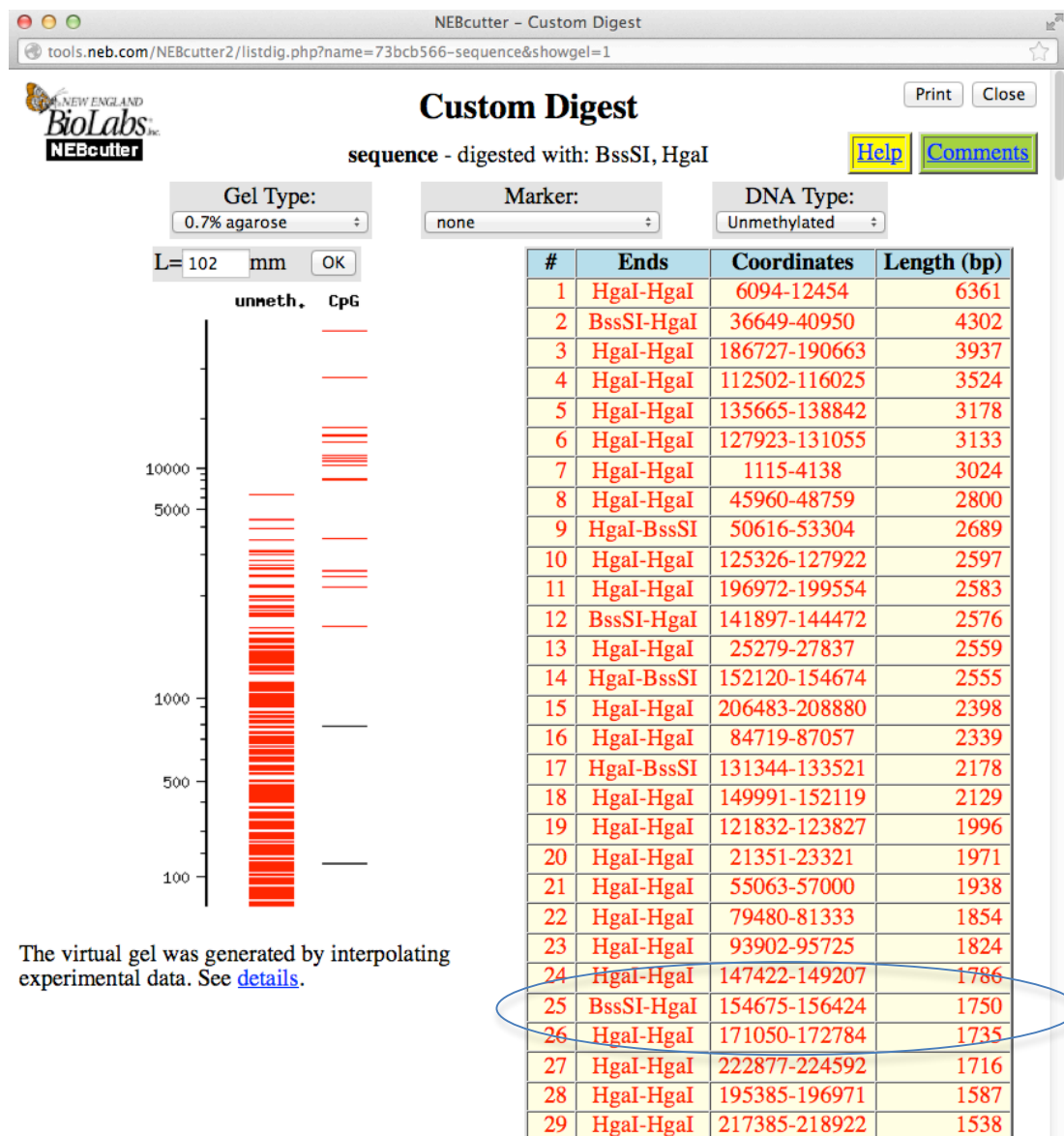
...puis en bas d'écran, cliquer sur « Digest » :



Après digestion, cliquer sur « View gel » dans le menu inférieur « Main options » :



Le logiciel propose alors une fenêtre de simulation de profil électrophorétique comportant toutes les bandes prévisibles après digestion :



La bande correspondant à notre gène d'intérêt est repérée par rapport à sa longueur connue de 1750 pb : elle porte le numéro 25. Il est possible en survolant le visuel de la piste d'électrophorèse de repérer la bande correspondante.

On constate dans ce cas que suite à l'action des 2 enzymes de restriction retenues, un nombre très important de fragments est obtenu : notre fragment d'intérêt serait impossible à différencier d'autres fragments proches.

On devra donc réenvisager le protocole en choisissant d'autres enzymes de restriction adaptées mais produisant moins de fragments et simuler les meilleures conditions électrophorétiques afin de séparer le fragment d'intérêt.

Exemple à re-simuler : en conservant BssSI, mais en remplaçant HgaI par XmnI, le fragment d'intérêt obtenu aurait une longueur de 1897 pb. Le nombre de points de coupure de XmnI étant inférieur à celui de HgaI, moins de fragments seront produits. En simulant de bonnes conditions électrophorétiques (gel type Clearose, 38 Volts/cm, gel de 87 mm, 100 min par exemple), la bande devient plus facile à isoler :

Gel Type:

Clearose BG

No EtBr 20°C

no

L= 87

mm

t= 90

min

E= 38

V/cm

OK

