

1-Sortie de clones de l'ORFeome.

Nous avons trois ORFeome humain.

- la version 5.1 du CCSB (<http://horfdb.dfci.harvard.edu/hv5/index.php?page=orfsearch>). Les ORF sont dans des pDON223 (Spectinomycine résistant) et n'ont pas de codon stop. Chaque ORF est présente sous forme de pool de clones et non comme clone unique. Ils n'ont pas été séquencés. Les clones sont re-isolés par la plateforme et partiellement séquencés.

- la version 8.1 du CCSB (<http://horfdb.dfci.harvard.edu/index.php?page=orfsearch>) Les ORF sont dans des pDON223 (Spectinomycine résistant) et n'ont pas de codon stop. Ce sont des clones uniques et séquencés.

Il faut préférer la version 8.1 si possible car l'ORFeome a été entièrement séquencé (ce qui n'est pas le cas de la version 5.1). Environ 20% des clones de l'ORFeome 5.1 contiennent des erreurs (délétions/mutations). Il y a beaucoup moins d'erreur dans la version 8.1.

- ORFeome de life technologie (http://orf.lifetechnologies.com/cgi-bin/ORF_Browser). Les ORF de cet ORFeome possèdent des codons stop et ont été séquencé. Ils sont dans le pDON211 (kanamycin résistant).

Nous avons un ORFeome souris

- ORFeome de Biovalley. Les ORF sont dans des pDON223 (Spectinomycine résistant). Certains clones possèdent un codon stop d'autres non.

Nous avons un ORFeome levure

- ORFeome de GE Healthcare Dharmacon(<http://dharmacon.gelifesciences.com/non-mammalian-cdna-and-orf/yeast-orf-collection/?productId=D886A3C9-EFDF-4EE4-B35D-E45C749C34BA>) . Les ORF sont dans des BG1805 (Ampicilline résistant).

Prestation : Les clones sortis des ORFeomes sont reséquencés aux extrémités et vérifiés par digestion. Suivant leur taille, les clones ne sont pas re-séquencés entièrement. La séquence théorique de l'ORF, la séquence expérimentale obtenue, l'alignement des deux ainsi que la séquence de l'ORF intégrée dans le pDON sont fournis avec les clones. Les clones sont livrés sous forme de miniprep et une partie reste archivée dans nos congélateurs. Il est fondamental de bien vérifier l'isoforme présent dans l'ORFeome.

2-Réaction de clonage BP

Les clones issus de BP sont séquencés entièrement. Les séquences expérimentales et l'alignement avec la séquence théorique sont fournis avec les clones. . Les clones sont livrés sous forme de miniprep.

3-Réactions de clonage LR

Les clones issus de réactions LR sont uniquement vérifiés par digestion. La séquence des vecteurs de destination est accessible sur le web

(http://www.igmm.cnrs.fr/spip.php?article326&equipe=COMMUN_psmgc&chemin_rub=89)

Prestation : Les clones sont testés par digestion et la photographie du gel est envoyée à l'utilisateur. Si les pDON sont fournis pour l'utilisateur, nous demandons que la séquence de l'ORF soit certifiée. La séquence de l'ORF intégré dans le pDest est fournie. Les clones sont livrés sous forme de miniprep.