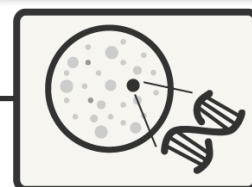


PLATEAU PICT-ICEO

Ingénierie d'enzymes et évolution dirigée



OBJECTIF

La prestation d'ingénierie d'enzymes et d'évolution dirigée offre au client la possibilité de :

- ◆ Mettre au point une stratégie de génération de diversité génique pour une protéine d'intérêt, diversité localisée (mutagenèse dirigée ou ingénierie semi-rationnelle) ou aléatoire,
- ◆ Construire le(les) mutants (individuels ou banques) de ce gène d'intérêt,
- ◆ Si banque, l'organiser au format microplaque.

DESCRIPTIF PRESTATION

Nous proposons dans cette prestation de mettre en œuvre la technique de mutagenèse la plus appropriée pour optimiser le catalyseur étudié :

- Par mutagenèse dirigée, il sera possible de modifier ponctuellement des résidus ciblés.
 - La mutagenèse aléatoire permet d'introduire au hasard un nombre contrôlé de mutations afin d'obtenir au sein de la banque créée, des mutants susceptibles d'être sensiblement améliorés par rapport à la protéine sauvage. Ces techniques
- itératives font le plus souvent succéder à une première étape de création de diversité / criblage, une ou plusieurs étapes de recombinaisons des mutations sélectionnées, afin d'améliorer encore les propriétés étudiées.
- L'ingénierie semi-rationnelle enfin, met en œuvre des aspects d'évolution dirigée associés à une approche rationnelle, afin d'explorer une diversité contrôlée d'acides aminés dans des zones ciblées de la protéine, susceptibles de jouer un rôle dans la propriété à modifier.

Selon les modalités discutées avec le client, la prestation d'évolution dirigée comprendra un certain nombre des étapes décrites ci-après :

1. Choix et design de diversité : selon les besoins du projet, et les connaissances préalables sur la(les) protéine(s) cible(s)
2. Construction de banques de mutants selon la méthode choisie
3. Repiquage des banques de clones et organisation en microplaques 96 ou 384 puits.
4. Séquençage afin de valider les mutations introduites (mutagenèse dirigée) ou d'évaluer un taux de mutations (mutagenèse aléatoire).

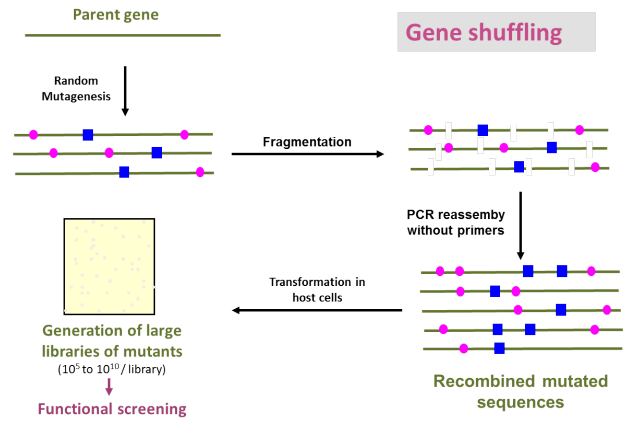
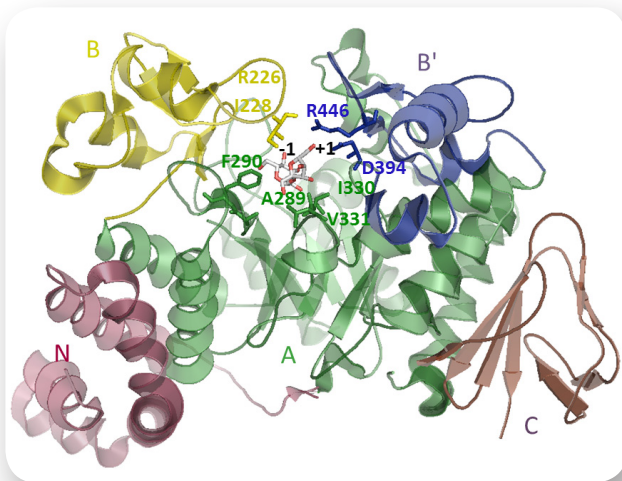
ECHANTILLONS

Le client devra fournir le gène à muter, cloné dans le vecteur de son choix, ainsi que le plasmide dans lequel devra être cloné la librairie de mutants. Si nécessaire, un gène synthétique pourra être commandé.

Le cas échéant la souche à transformer sera également fournie (glycérol ou étalée sur milieu gélosé).

Le client précisera la concentration des échantillons (ADN, µg/ml ; glycérol, cfu/ml) ainsi que les conditions optimales de température pour leur stockage (ADN, glycérol, boîte de Pétri).

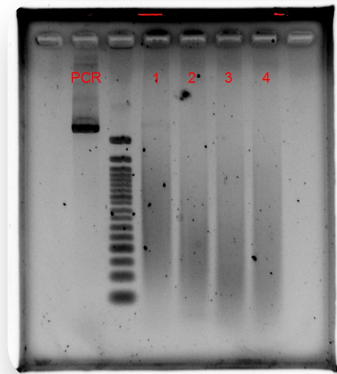
La carte du plasmide hôte sera également fournie.



Stemmer, 1994, PNAS, 91:10747-10751
Zhang et al., 1997, PNAS, 94:4504-4509

RESULTATS

A l'issue de la prestation, la banque de clones organisés en format microplaque sera remise au client, ainsi qu'un rapport sur la prestation, incluant les informations sur la construction de la banque et ses caractéristiques (% mutations, séquençage le cas échéant,...)



CONTROLES QUALITE

Dans tous les cas, la génération de diversité sera validée par séquençage ADN afin de vérifier soit l'introduction correcte des mutations choisies, soit le taux de mutations effectif de la banque.

PERSPECTIVES

Le client pourra, s'il le souhaite, démarrer une prestation de criblage sur la banque de mutants créés, en s'appuyant sur les ressources du plateau de criblage PICT-ICEO.



Contacts

PICT-ICEO
TBI – INSA Toulouse
135 Avenue de Rangueil
31077 Toulouse cedex 04

Manageur projet
Sophie BOZONNET
Tél. +33 5 61 55 94 88
iceo@insa-toulouse.fr

Responsable Prestation
Sandra PIZZUT-SERIN
Tél. +33 5 61 55 94 53
sandra.serin@insa-toulouse.fr