



P L A T E A U D E B I O P H Y S I Q U E



DSF

OBJECTIF

La DSF (fluorimétrie différentielle à balayage) permet :

- ◆ d'identifier les conditions de stabilité d'une macromolécule (tampons, sels, solvants, etc...)
- ◆ de mettre en évidence la formation de complexes (protéines, acides nucléiques, petites molécules, ...).

DESCRIPTIF PRESTATION

Du fait du peu de matériel protéique utilisé et du débit relativement élevé de la méthode, la DSF est un outil précieux et parfaitement adapté pour les applications telles que l'identification de conditions optimales pour la purification et le stockage d'une macromolécule ou encore la mise en évidence de complexes formés.

Les protéines sont incubées avec une sonde dont la fluorescence augmente lors d'interactions avec les régions hydrophobes des protéines. Le dépliement de la protéine, et l'exposition des parties hydrophobes, donnent alors naissance à un motif caractéristique de la fluorescence en fonction de la température qui permet de déterminer le T_m de la cible.

La prestation se déroule en deux temps :

Etude de faisabilité :

Cette phase permet de déterminer les concentrations

optimales de l'échantillon à analyser et de la sonde fluorescente.

Criblage des conditions de stabilité :

Cette phase permet d'optimiser le conditionnement d'une protéine en testant différentes conditions physicochimiques (concentration de la protéine, nature et concentration des tampons et des sels, additifs, présence de ligands).

ou

Identification de complexes :

Cette phase permet la mise en évidence de la formation d'un complexe sur la base d'une variation du T_m de la protéine en présence du partenaire.

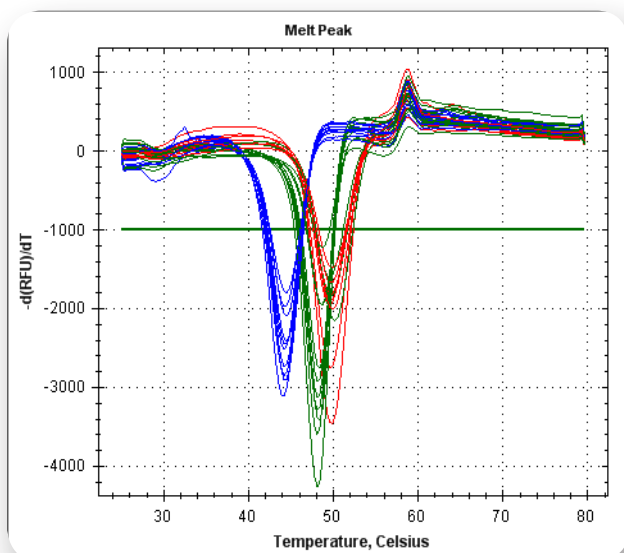
Une mise à disposition de l'équipement est également possible après validation d'une formation des utilisateurs.

ECHANTILLONS

Le client devra fournir la protéine purifiée (à 95% d'homogénéité), de préférence issue d'une colonne de filtration sur gel et caractérisée par diffusion dynamique de lumière (DLS) confirmant l'état non agrégé de la protéine.

La quantité de protéine nécessaire est variable et dépendra de la protéine elle-même (masse moléculaire, concentration, ...), de l'ordre de quelques mg.

Chaque mesure repose sur un volume de 20 µl à une concentration de l'ordre de quelques dizaines de µM (selon la taille de la protéine).



PERSPECTIVES

A l'issue de cette prestation, des mesures de DLS peuvent être réalisées pour vérifier l'effet du nouveau conditionnement ou du ligand sur les propriétés hydrodynamiques de la protéine (absence d'agrégation et monodispersité).

Le meilleur conditionnement identifié pourra par la suite être utilisé pour des études de criblage de ligands (DSF, spectroscopie RMN et cristallographie aux rayons X) ou de biologie structurale.

Pour tout complexe mis en évidence, l'interaction protéine/ligand pourra être validée/caractérisée par d'autres méthodes biophysiques (spectroscopie RMN, cristallographie aux rayons X, ITC ou SEC-MALS).

RESULTATS

Les résultats seront remis sous forme d'un rapport préparé par le responsable de la prestation (ou toute autre personne habilitée par celui-ci). Ce rapport fournira une synthèse des mesures faites, et sera présenté sous forme d'un tableau donnant pour chaque condition/ligand testée le T_m mesuré et l'écart par rapport à la référence.

Les données brutes seront conservées par la plateforme le temps de la prestation mais le stockage et la confidentialité n'étant pas garantis, le client peut s'il le souhaite les récupérer et/ou les effacer dans le cadre d'une mise à disposition.

A l'issue de la prestation, si tout l'échantillon n'a pas été utilisé, il pourra soit être rendu au client soit être utilisé pour une autre prestation.

Dans le cas d'une mise à disposition de l'équipement, aucun résultat ne sera remis au client, seule une aide sous forme de conseil pourra être dispensée lors des premières utilisations.

CONTROLES QUALITE

Variabilité du T_m entre duplicats ± 0,3 °C
Contrôle semestriel du T_m d'une protéine de référence dans le respect de notre démarche qualité certifiée ISO 9001:2016, NFX 50-900.



Contacts

IPBS UMR 5089
205, route de Narbonne
31077 Toulouse cedex

Manageur projet

Dr Virginie NAHOUM
Tél. 05 61 17 54 48
pict@ipbs.fr

Responsable Prestation

Dr Samuel TRANIER
Tél. 05 61 17 54 38
samuel.tranier@ipbs.fr