

Les différentes étapes d'un crible ULTImate Y2H™

> Design de l'appât

Avant de lancer votre projet, l'un de nos experts Y2H regarde attentivement votre protéine, et en fonction de notre expérience et grâce à l'outil BSOL, il/elle vous conseille sur l'appât à cribler le plus optimal

> Clonage de l'appât (4 à 6 semaines*)

- > Design et commande des oligonucléotides pour l'amplification par PCR
- > Vérification par séquençage des bornes 5p et 3p de l'insert fourni
- > Amplification de l'appât par PCR et clonage dans le vecteur appât standard
- > Séquençage intégral de l'appât nouvellement cloné

> Optimisation des conditions de criblage (2 semaines*)

Avant de réaliser le crible ULTImate Y2H, l'appât est criblé contre la banque à petite échelle afin de sélectionner les meilleures conditions de criblage :

- > Transformation de l'appât dans la levure
- > Réalisation du crible à petite échelle
 - Test de toxicité de l'appât
 - Test d'autoactivation et choix du milieu le plus approprié
 - Estimation du nombre de clones positifs attendus

Il est important de noter qu'environ 15% des appâts ne sont pas criblables dans le vecteur appât standard (système LexA) suite à des problèmes d'auto-activation et de toxicité. L'utilisation d'un autre vecteur appât (système inductible) permettra de baisser le taux d'échec à 5%, mais le temps de livraison des résultats sera augmenté en conséquence.

> Crible ULTImate Y2H™ (2 à 3 mois*)

- > 'Croisement cellule à cellule' à grande échelle
- > Séquençage 5p et 3p de la totalité des clones positifs (« proies »)
- > Identification automatique des proies
- > Contrôle qualité final par vérification de l'identité de l'appât et de la proie sur des clones choisis aléatoirement

> Livraison des résultats

Les résultats sont envoyés sur un CD-ROM contenant les fichiers suivants :

- > Un fichier pdf « Results Summary » contenant les identifications des proies, le domaine d'interaction et le Score de confiance,
- > Un tableau Excel® (données brutes)
- > Un fichier pdf « Domsight® » contenant la comparaison graphique du domaine minimal d'interaction avec les domaines fonctionnels présents dans les proies.

* **Les délais précisés pour chaque étape sont donnés à titre indicatif.**

Excel® est une marque déposée de Microsoft Corp.