

Mesure de l'AMPC intracellulaire

Introduction

L' adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique (AMPC) est un des plus importants seconds messagers, intervenant dans les réponses physiologiques de neurotransmetteurs, hormones et médicaments.

L' AMPC est produit à partir d'adénosine triphosphate (ATP) par l'adénylate cyclase membranaire. La régulation de la concentration intracellulaire en AMPC est contrôlée par l'équilibre entre sa synthèse à partir d'ATP et sa dégradation rapide en 5'-AMP par une phosphodiesterase (PDE). Certains récepteurs RCPG peuvent contrôler la production d'AMPC en agissant via l'activation de protéines G spécifiques, capables de stimuler (Gs) ou d'inhiber (Gi) sa production. La mesure de l'AMPC intracellulaire est donc une méthode permettant de mesurer l'effet de composés sur certains RCPG.

Principe

L'essai est basé sur la compétition entre l'AMPC traceur marqué avec l'euporium et l'AMPC de l'échantillon pour la liaison sur à des anticorps anti-cAMP marqués avec le colorant *ULight*TM. En l'absence d'AMPC libre, les anticorps se lient à l'AMPC traceur, l'énergie émise par l'euporium excité à 320 ou 340nm est transférée par FRET aux molécules *ULight*TM qui émettent à 665nm, le signal TR-FRET est maximal. En présence d'AMPC libre, il y a compétition pour la liaison aux anticorps, le signal TR-FRET est donc diminué.



Protocole

Format : 384 puits

Cellules : HEK293 en suspension (possibilité de travailler sur d'autres cellules)

Récepteur : RCPG couplé G α s

- 1) Distribution des cellules dans la plaque
- 2) Stimulation avec les composés d'intérêt
- 3) Ajout des solutions d'AMPC traceur et d'anticorps anti-AMPC-ULight™
- 4) Mesure

Longueur d'onde d'excitation : 320 nm

Longueur d'onde d'émission 1 : 615 nm

Longueur d'onde d'émission 2 : 665 nm

Stimulation du récepteur à la vasopressine et mesure du signal AMPC associé

Format : 384 puits

Cellules : HEK293 surexprimant le récepteur à la vasopressine AVPR2

