

Détection de l'activité d'une kinase

Introduction

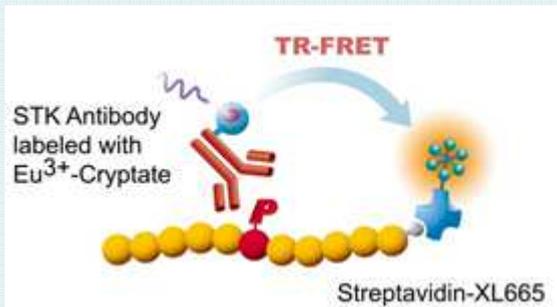
Les kinases interviennent dans la plupart des voies métaboliques cellulaires. Elles catalysent une réaction de phosphorylation de leur substrat en présence d'ATP.



Principe

La détection de l'activité d'une kinase peut être réalisée par la détection de la phosphorylation du substrat, ou par le dosage de l'ATP résiduel de la réaction.

1. Détection de la phosphorylation du substrat : test HTRF® KinEASE (CISBIO INTERNATIONAL)

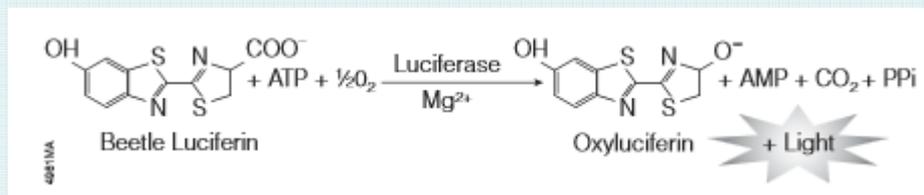


Deux fluorophores partenaires donneur (cryptate d'euprium) / accepteur (XL665) sont fusionnés respectivement à un anticorps spécifique de la phosphorylation et à la streptavidine qui se lie au substrat biotynilé.

Le transfert d'énergie en temps retardé (TR-FRET) entre le couple de fluorophores est proportionnel à l'activité enzymatique.

www.cisbio.com

2. Dosage de l'ATP résiduel : test Kinase-Glo (PROMEGA)



www.promega.com

La réaction enzymatique est arrêtée par ajout d'une luciférine et de sa luciférase qui, en présence de Mg^{2+} et d'ATP, catalyse son substrat en oxyluciférine avec émission d'un photon.

La réaction est quantifiée par mesure du signal luminescent qui est proportionnel à la quantité d'ATP présent dans le milieu réactionnel et donc inversement proportionnel à l'activité enzymatique.