

Dosage de l'IP1 intracellulaire

Introduction

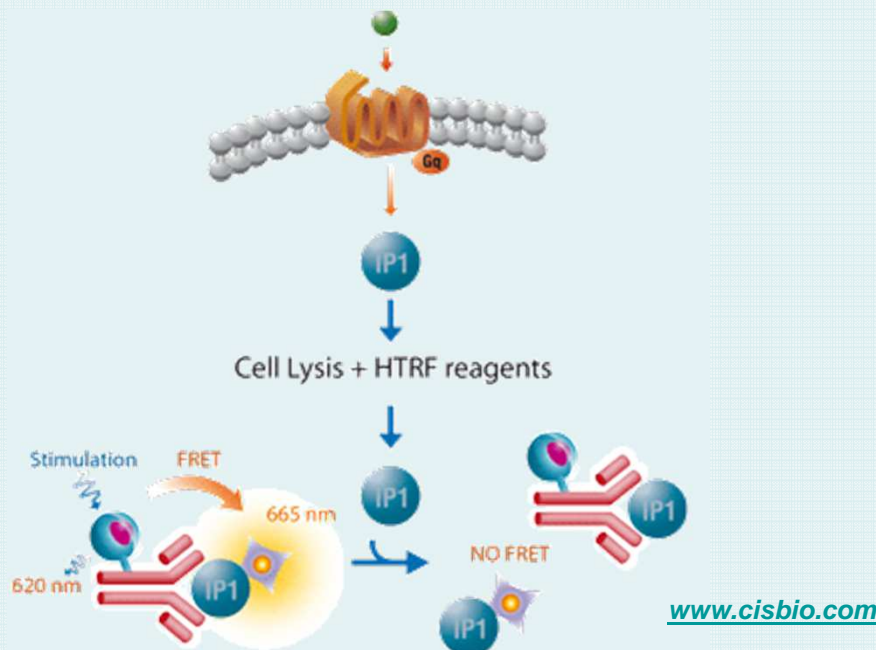
La détection des seconds messagers intracellulaires comme l'IP1, produit suite à l'activation des récepteurs couplés aux protéines Gq, peut être réalisée par la technologie HTRF®.

La technologie HTRF® (<http://www.cisbio.com/>) repose sur le principe de base du FRET. Les propriétés des fluorophores utilisés apportent de nombreux avantages.

Principe

Il s'agit d'un test de compétition pour la liaison à un anticorps anti-IP1 lié au fluorophore donneur, entre d'une part l'IP1 intracellulaire et d'autre part l'IP1 apporté par le kit fusionné au fluorophore accepteur.

Du LiCl est ajouté dans le tampon de réaction pour permettre l'accumulation de l'IP1 produit dans les cellules.

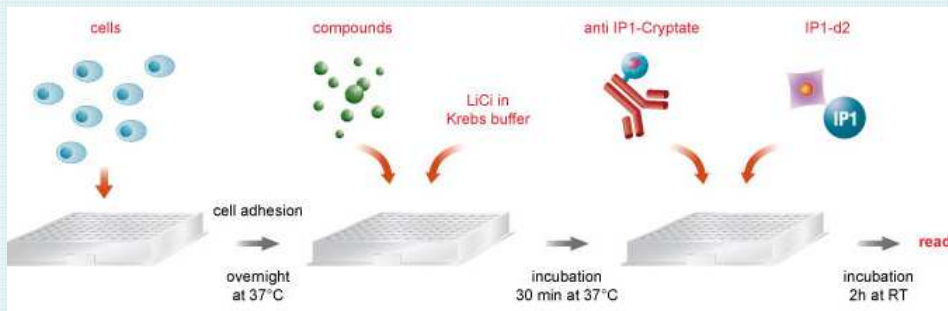


Protocole

Format : 384 puits

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

- 1) Distribution des cellules dans la plaque
- 2) Stimulation
- 3) Incubation à 37°C (temps variable en fonction du type cellulaire et du récepteur)
- 4) Ajout des réactif HTRF
- 5) Incubation 1h à TA
- 6) Lecture



Longueur d'onde d'excitation : 337 nm

Longueur d'onde d'émission 1 : 665 nm (émission du fluorophore donneur)

Longueur d'onde d'émission 2 : 615 nm (émission du fluorophore accepteur)

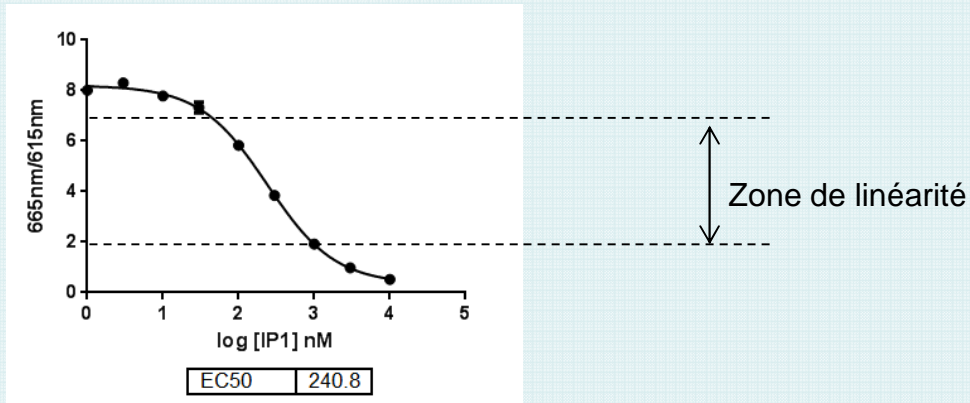
www.cisbio.com

Dosage de l'IP1 intracellulaire suite à la stimulation du récepteur de l'ocytocine

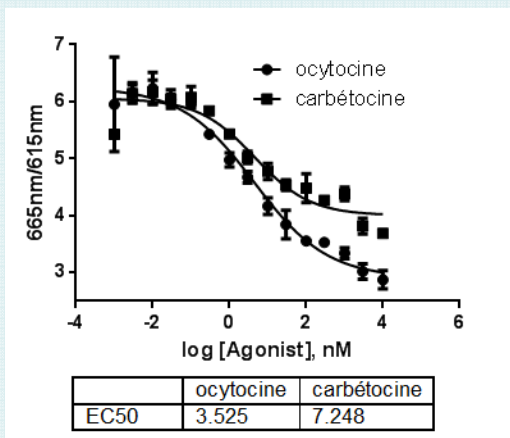
Cellules HEK293 surexprimant le récepteur de l'ocytocine

Analyse : S = Signal 665 nm / Signal 615 nm

1) Courbe standard



2) Mesure de l'effet agoniste de l'ocytocine et de la carbétocine



3) Mesure de l'effet antagoniste du composé L-869,899 en présence de 30 nM d'agoniste

