

Mesure de la liaison récepteur-ligand par FRET

Introduction

La technologie de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) est liée à la distance séparant 2 fluorophores, elle permet de mesurer des distances de quelques dizaines d'angström, et est donc une technique de choix pour étudier les interactions moléculaires.

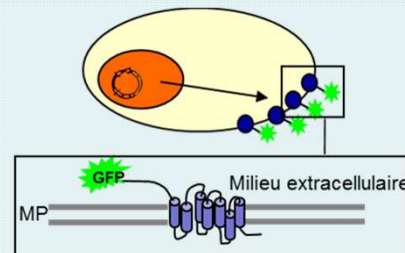
Ici, elle permet de mesurer la liaison entre un récepteur membranaire fusionné à un fluorophore et un ligand fusionnée à un autre fluorophore.

La liaison est mesurée sur cellules entières vivantes. Le test est réalisé en conditions homogènes et ne nécessite donc aucun lavage.

Principe

Les cellules surexpriment le récepteur fusionné à un fluorophore donneur, la GFP (Green Fluorescence Protein).

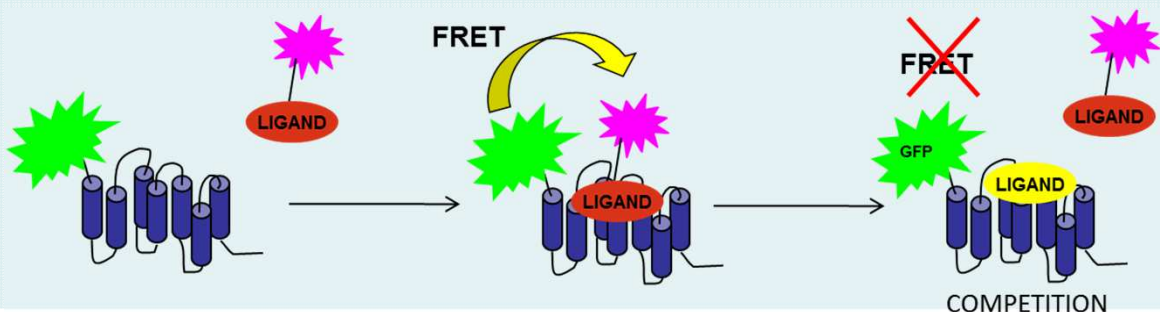
Une sélection de constructions plasmidiques et de cellules sont accessibles à PCBiS



Le ligand est fusionné à un fluorophore accepteur compatible, dont le spectre d'excitation recouvre au moins partiellement le spectre d'émission du fluorophore donneur.

Le FRET est un transfert d'énergie non radiatif entre le fluorophore donneur à l'état excité et le fluorophore accepteur, lorsqu'ils sont suffisamment proches. Il en résulte une diminution de la lumière émise par le fluorophore donneur, et une augmentation de la lumière émise par le fluorophore accepteur.

La détection de l'interaction entre le récepteur et le ligand rendus fluorescents, qui se traduit par une diminution de la fluorescence du fluorophore donneur, est réalisée par un lecteur de microplaques ou un spectrofluorimètre. Par compétition, il est possible de détecter la liaison d'une molécule non marquée sur le récepteur.



Protocole

Format : 96 puits ou cuves de 1 mL

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

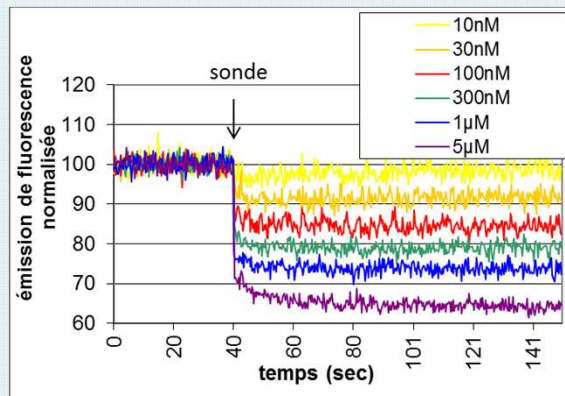
- 1) Distribution des cellules
- 2) Lecture de la ligne de base
- 3) Ajout du ligand fluorescent et du composé non marqué à tester en même temps ou séquentiellement
- 4) Incubation
- 5) Lecture

Liaison d'une sonde fluorescente fusionnée à la lissamine sur le récepteur de l'apéline

Format : cuve de 1 mL

Cellules : HEK293 en suspension surexprimant le récepteur de l'apéline fusionné à la GFP

Suivi de la fluorescence de la GFP suite à l'ajout de différentes concentrations de la sonde fluorescente



Evaluation de l'affinité de la sonde pour le récepteur à partir de l'efficacité de FRET

