

## Mesure de la liaison récepteur-ligand par HTRF

### Introduction

Tout comme le FRET, La technologie HTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorescence) permet de mesurer la liaison entre un récepteur membranaire fusionné à un fluorophore et un ligand fusionné à un autre fluorophore.

Elle représente une bonne alternative aux tests FRET ou aux tests radioactifs. Elle permet, entre autres, de s'affranchir de l'auto-fluorescence transitoire des réactifs et consommables qui participent au bruit de fond, en réalisant une mesure décalée dans le temps de 50 à 150 microsecondes par rapport à l'excitation du fluorophore donneur (<http://www.cisbio.com/>).

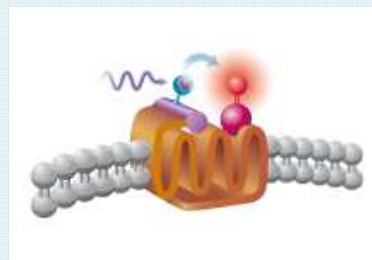
La liaison est mesurée sur cellules entières vivantes. Le test est réalisé en conditions homogènes et ne nécessite donc aucun lavage.

### Principe

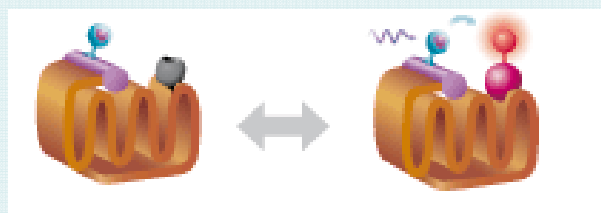
Les cellules surexpriment le récepteur fusionné à une étiquette de type SNAP-Tag, CLIP-Tag ou Halo-Tag. Ces étiquettes interagissent de manière covalente avec le dérivé terbium ou europium, utilisés comme fluorophores donneurs.

Les constructions plasmidiques ou les cellules déjà transfectées sont accessibles chez Cisbio International.

La détection de la liaison d'un ligand fusionné à un fluorophore accepteur compatible est réalisée par un lecteur de microplaques .



Par compétition, il est possible de détecter la liaison d'une molécule non marquée sur le récepteur.

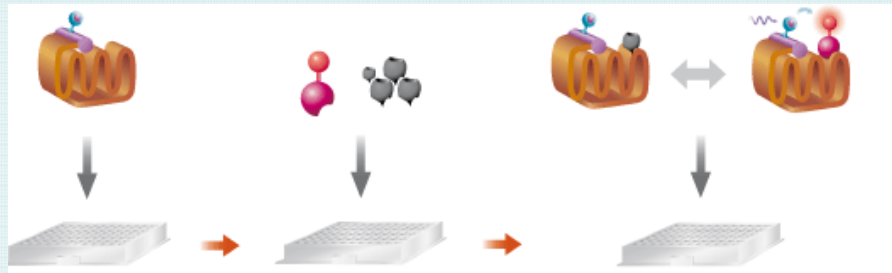


## Protocole

Format : 384 puits

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

- 1) Marquage des cellules, possibilité de faire un stock marqué congelé
- 2) Distribution des cellules dans la plaque
- 3) Ajout du ligand fluorescent et du composé à tester
- 4) Incubation
- 5) 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](http://www.cisbio.com)

## Mesure de la liaison de ligands du récepteur V1A

Cellules : HEK293 surexprimant de récepteur V1A-SNAPTag provenant de chez Cisbio (référence C1PU1V1A)

Ligand fluorescent provenant de chez Cisbio (référence L0003RED), 1 nM

Analyse :  $S = \text{Signal } 665 \text{ nm} / \text{Signal } 615 \text{ nm} \times 10$

