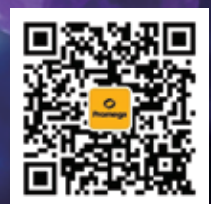
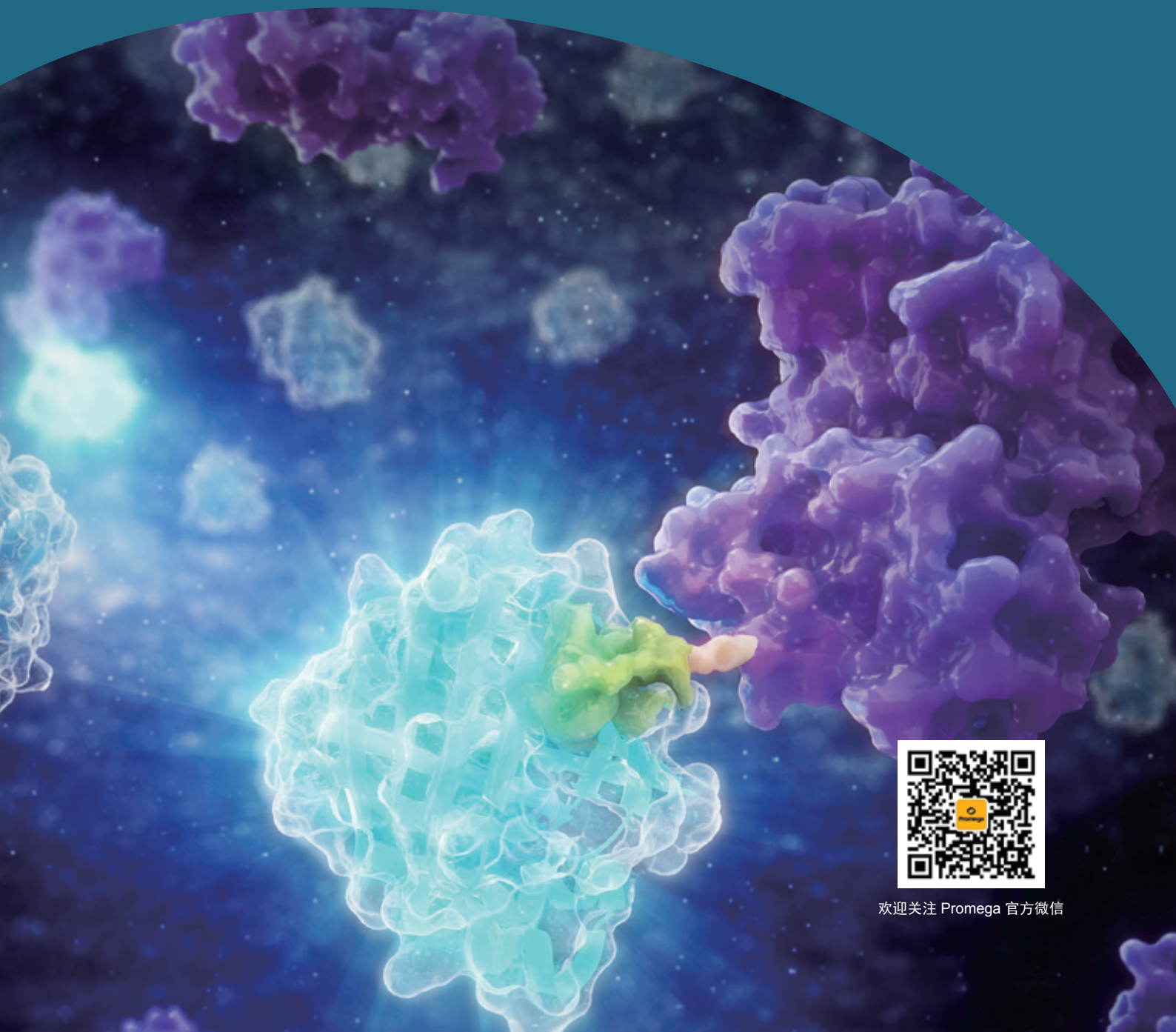
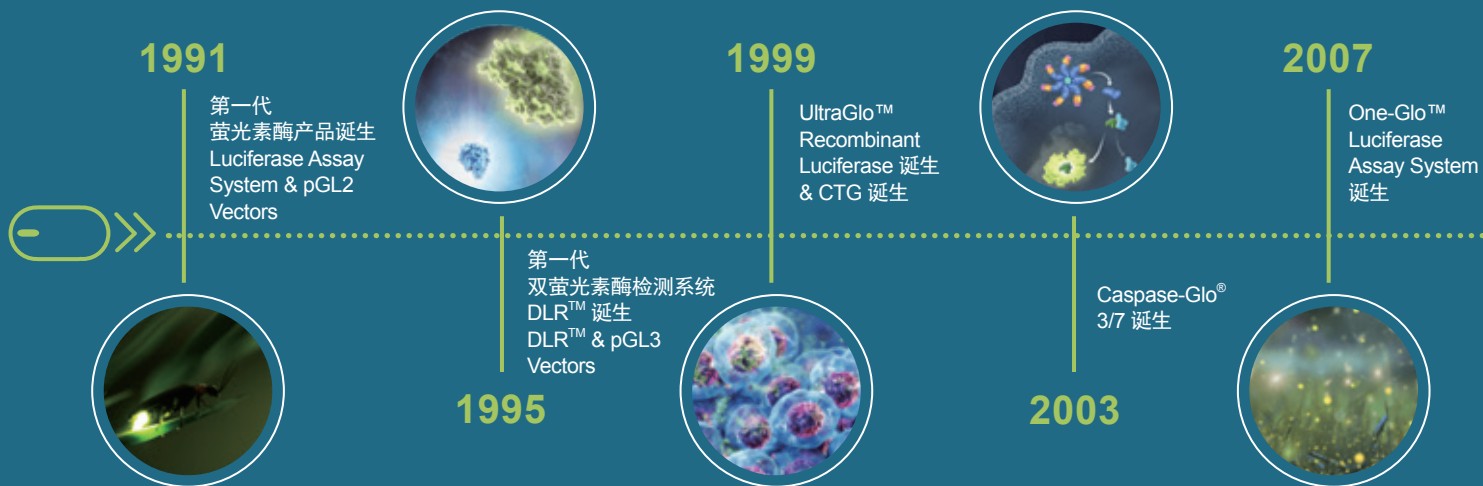


NanoLuc[®] 萤光素酶技术



欢迎关注 Promega 官方微信

Promega 萤光素酶技术发展史



更多里程碑事件与故事请浏览 www.promega.com.cn/global/30-years-of-bioluminescent-technology-innovations



Illuminating your Innovations

30 YEARS AND GLO-ING



关于 NanoLuc 的具体专利和注册商标声明

NanoLuc[®], Nano-Glo[®], Dual-Glo[®], Dual-Luciferase[®], HaloTag[®], NanoBiT[®], Renilla-Glo[®], Stop & Glo[®] 均属于 Promega 公司的注册商标, 由位于美国威斯康星州麦迪逊市的 Promega Corporation 在专利商标局注册。具体专利和注册商标声明信息见本技术手册第 7 页。

目 录

- NanoLuc[®] 应用及相关文献总图 4
- NanoLuc[®] 萤光素酶简介 6
- NanoLuc[®] 萤光素酶载体简介 7
- NanoLuc[®] 报告基因载体 8
- NanoLuc[®] 融合蛋白表达载体 10
- NanoLuc[®] 报告基因检测系统 11
- NanoLuc[®] 萤光素酶技术应用及相关工具 16
- 蛋白: 蛋白相互作用研究— NanoBRET[™] 技术 17
- 药物: 靶点相互作用研究— NanoBRET[™] 技术 19
- 蛋白: 蛋白相互作用检测— NanoBiT[®] 技术 22
- HiBiT 蛋白标签技术 25
- 蛋白降解及 PROTAC 研究 29
- 蛋白降解与 HaloPROTAC 研究 31
- 用 CRISPR 技术导入 HaloTag 和 HiBiT 32
- Lumit[™] Immunoassays 免疫检测技术 34

NanoLuc[®] 报告基因技术

蛋白：配基相互作用 (BRET)
(细胞内 Target Engagement 应用)

Robers, M.B., *et al.* (2015) Target engagement and drug residence time can be observed in living cells with BRET. *Nature Comm.* **6**, 10091.

蛋白：蛋白相互作用 (BRET)

NanoBRET™ 检测

(NanoLuc[®] 萤光素酶 + HaloTag[®] 融合蛋白 + NanoBRET™ 618 荧光配基标记的 HaloTag[®] 蛋白)

NanoLuc[®] 作为供体的 BRET 应用

(NanoLuc[®] 萤光素酶 + 荧光标记的融合蛋白)

(客户可开发的应用检测)

White, C.W., *et al.* (2017) Using nanoBRET and CRISPR/Cas9 to monitor proximity to a genome-edited protein in real-time. *Sci. Reports* **7**, 3187.

NanoLuc[®] 作为供体，基于 BRET 技术的生物传感器

(NanoLuc[®] 萤光素酶 - 传感器 - 荧光标记的融合蛋白)

(客户可开发的应用检测)

Yang, J. *et al.* (2016) Coupling optogenetic stimulation with NanoLuc-based luminescence (BRET) Ca⁺⁺ sensing. *Nature Comm.* **7**, 13268.

基于 BRET 的报告基因成像

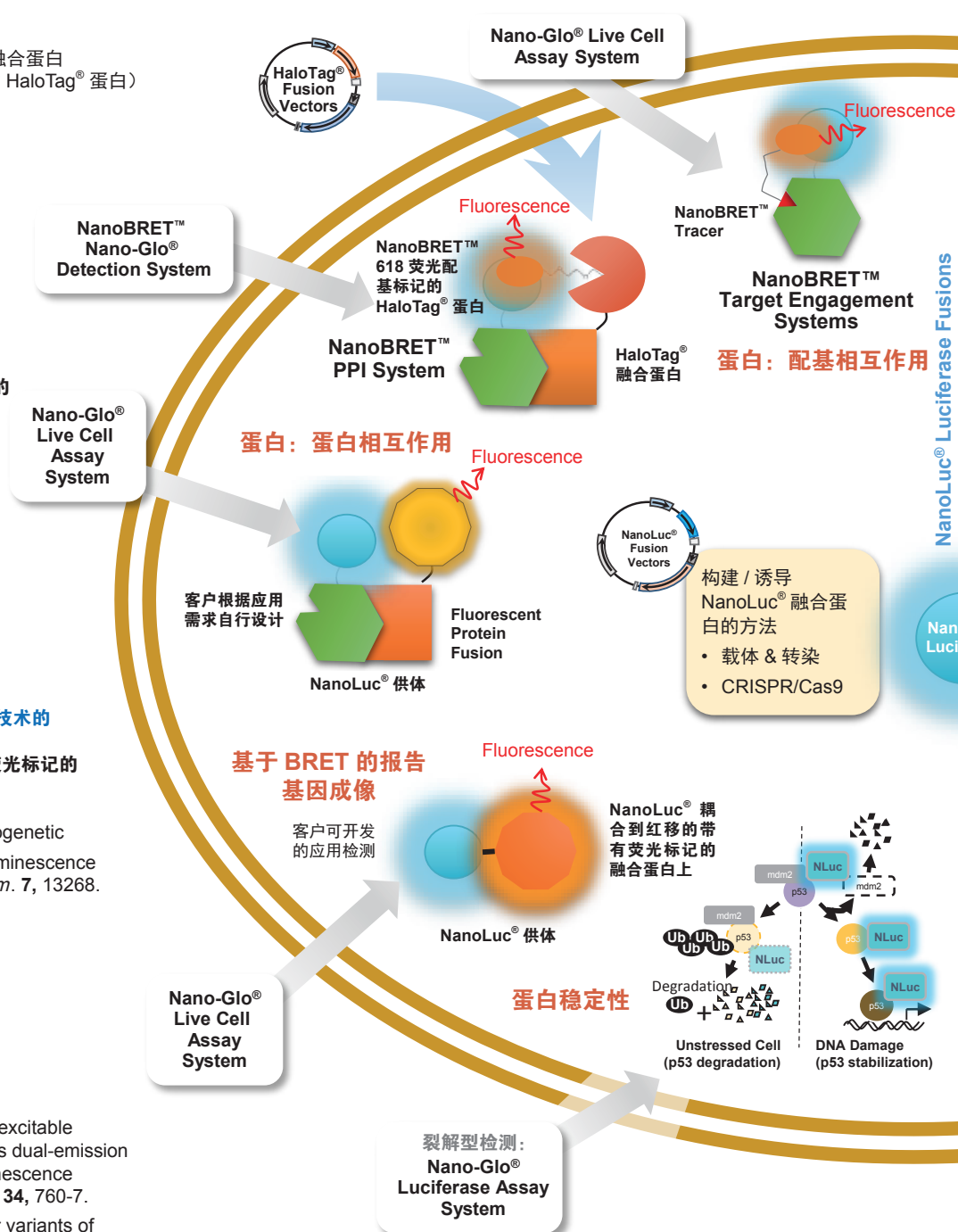
(客户可开发的应用检测)

Chu, J., *et al.* (2016) A bright cyan-excitable orange fluorescent protein facilitates dual-emission microscopy and enhances bioluminescence imaging in vivo. *Nature Biotechnol.* **34**, 760-7.

Suzuki, K., *et al.* (2016) Five colour variants of bright luminescent protein for real-time multicolour bioimaging. *Nature Comm.* **7**, 13718.

蛋白稳定性研究

Narvaez, A.J., *et al.* (2017) Modulating protein-protein interaction of the mitotic Polo-like kinases to target mutant KRAS. *Cell Chem. Biol.* **24**, 1017-28.



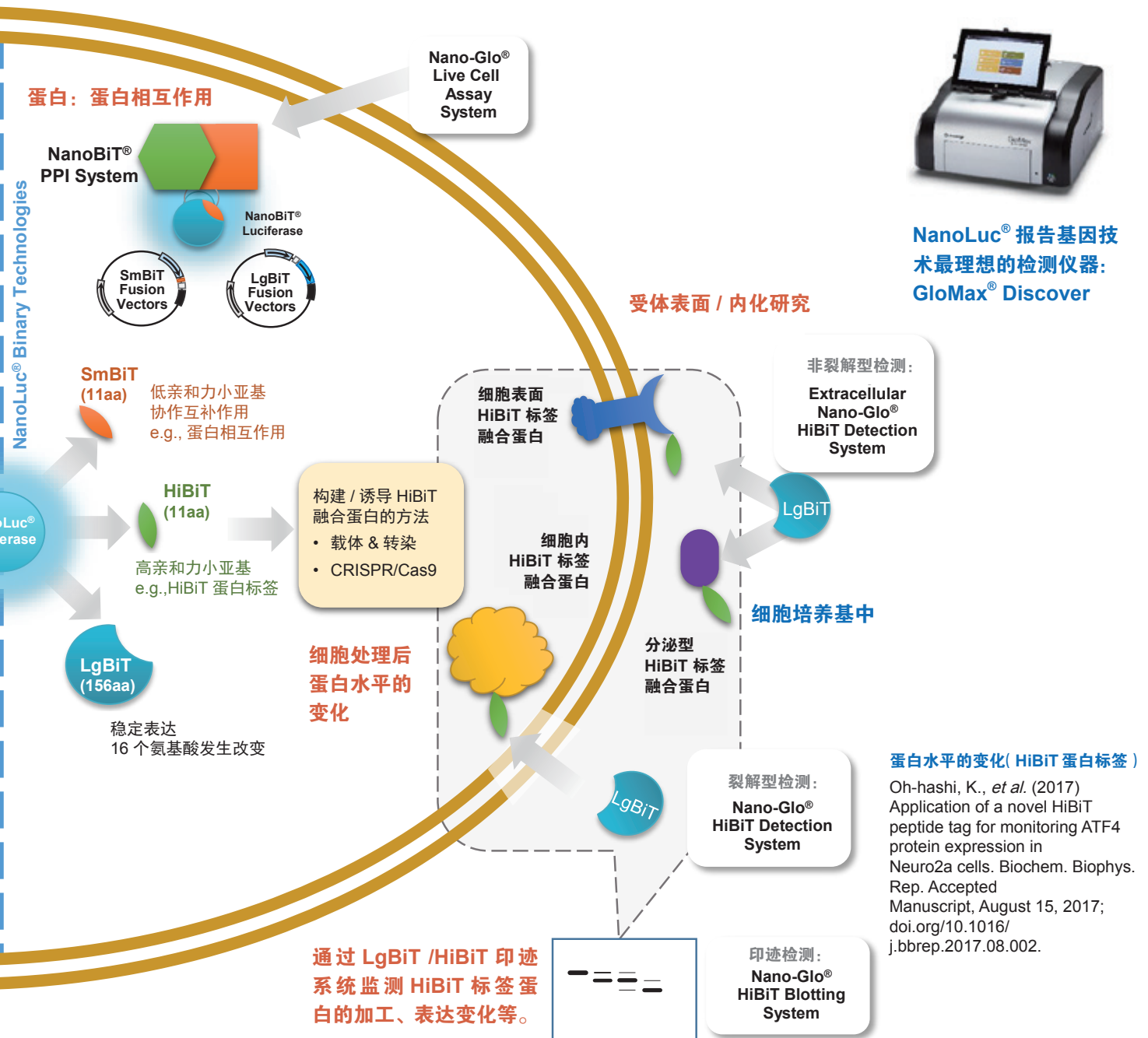
细胞表面配基与受体的相互作用

(NLuc+ 荧光标记的配基)

Stoddart, L.A., *et al.* (2015) Application of BRET to monitor ligand binding to GPCRs. *Nature Meth.* **12**, 661-3.

蛋白：蛋白相互作用 (NanoBiT® 互补结合)

Cannaert, A., *et al.* (2016) Detection and activity profiling of synthetic cannabinoids and metabolites with a newly developed bio-assay. *Anal. Chem.* **88**, 11476-85..



NanoLuc® 萤光素酶的诞生

Hall, M.P., *et al.* (2012) Engineered luciferase reporter from a Deep Sea Shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem. Biol.* **7**, 1848-57.

NanoBiT® 技术的诞生

Dixon, A.S., *et al.* (2016) NanoLuc complementation reporter optimized for accurate measurement of protein interactions in cells. *ACS Chem. Biol.* **11**, 400-8.

NanoLuc[®] 萤光素酶简介

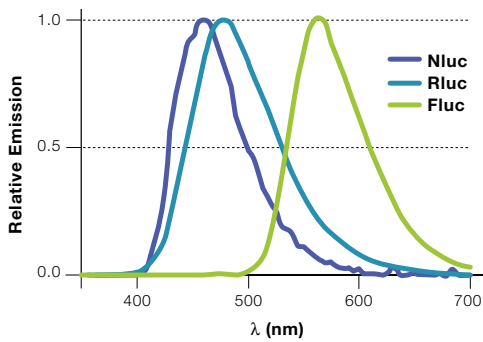
NanoLuc[®] luciferase (NanoLuc[®] 萤光素酶, Nluc) 是一个经过基因工程改造的小分子酶 (19.1kDa), 是性能卓越的生物发光报告基因。NanoLuc[®] 萤光素酶在上市当年被 The Scientist 杂志评选为年度十大创新产品。

它使用一种新型底物——Furimazine, 可产生高强度、辉光型发光信号。生物发光反应不依赖 ATP, 自发光背景低, 光信号更亮, 可高达 10^{10} , 同时抑制背景发光以获得最高检测灵敏度。

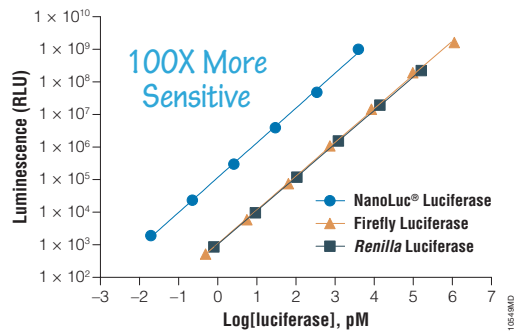


▶ NanoLuc[®] 萤光素酶具有许多使之成为出色报告基因的物理特性

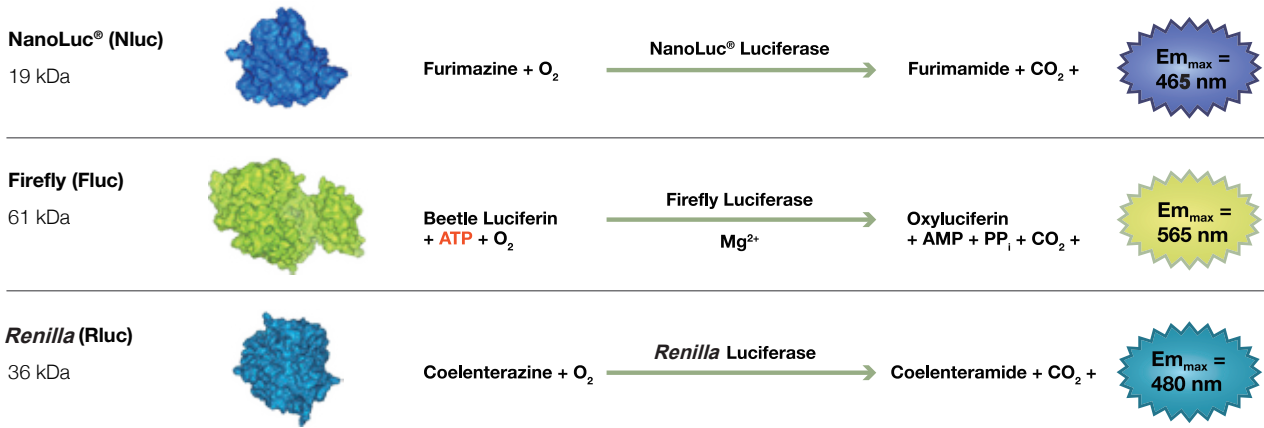
- 分子量非常小, 单体酶 (171 个氨基酸; 513bp)
- 辉光反应: 室温半衰期通常 >2h
- 很宽的 pH 范围内有活性 (pH 值 6-8)
- 没有翻译后修饰或二硫键
- 均匀分布在细胞中
- 发射光谱非常适合于生物发光共振能量转移
- (BRET; λ_{max} =465nm)
- 热稳定性高 (T_m =60°C); 室温下放置 8h, 活性仍保留 90%



上图: NanoLuc[®] luciferase 与萤火虫 (Firefly) 和海肾 (Renilla) 萤光素酶的发射光谱比较。



上图: NanoLuc[®] luciferase 灵敏度要比萤火虫 (Firefly) 和海肾 (Renilla) 萤光素酶高 100 倍。



NanoLuc[®] 萤光素酶载体简介

- NanoLuc[®] 载体根据应用不同主要分为 **报告基因载体**和**融合蛋白表达载体**两大类；
- 根据表达形式的不同可以分为细胞内表达和分泌型表达两类。

1

报告基因载体 (NanoLuc[®] Genetic Reporter Vectors)——pNL 载体

pNL 载体系列以 pGL4 为基础设计，以方便从现有的质粒上进行序列转移。

- 载体骨架设计去掉了许多转录因子结合位点和其他潜在的调控元件以减少非特异性结合的发生。
- 提供多种载体形式，以适应不同应用。

2

融合蛋白表达载体 (NanoLuc[®] Protein Fusion Vectors)——pNLF&pF 载体

NanoLuc[®] 融合蛋白表达载体可方便的构建 N- 或 C- 端融合 Nluc 和您感兴趣蛋白组成的融合蛋白；有两类形式载体可供选择：

- **pNLF 载体系列**：多克隆位点。
- **pF 载体系列**：使用 Flexi[®] Vector Cloning System 产生 N- 端或 C- 端融合蛋白。

» NanoLuc[®] 萤光素酶的载体形式，满足您的不同实验需求

表达形式	报告基因类型	介绍	结构示意图
细胞内表达	NanoLuc [®] 萤光素酶 (缩写 Nluc)	<ul style="list-style-type: none"> • 未经修饰的 NanoLuc[®] 萤光素酶。 • 提供最高亮度信号和最大的检测灵敏度。 	<p>Nluc (513 bp)</p>
	快速应答型 NanoLuc [®] 萤光素酶 (缩写 NlucP)	<ul style="list-style-type: none"> • 带有 PEST 序列，提高 Nluc 蛋白的降解速度，使 NanoLuc[®] 蛋白表达水平变化与转录活性改变密切偶联，应答更加快速。 • 信噪比更好，提供更大的动态范围。 	<p>NlucP (636 bp)</p> <p>促蛋白降解序列</p>
分泌型表达	分泌型 NanoLuc [®] 萤光素酶 (缩写 secNluc)	<ul style="list-style-type: none"> • N- 末端融合分泌信号 (secNluc) 的 NanoLuc[®] 萤光素酶。 • 适用于分泌型报告基因实验。 	<p>secNluc (597 bp)</p> <p>分泌信号肽</p>

专利及注册商标信息及法律声明

NanoLuc 萤光素酶专利号：102459579

NanoLuc 萤光素酶底物 (Furimazine) 专利号：103443121

NanoLuc 商标注册号：9890073

Nano-Glo 商标注册号：9890074

使用 NanoLuc 产品，研究人员需同意接受本有限使用商标许可条款 (LULL) 的约束。具体信息如下：

研究人员只能将本产品用于研究用途，不得用于商业用途。商业用途是指以利益交换为目的的对本产品的任何使用，包括但不限于 (1) 用于进一步的产品加工；(2) 用于提供服务、信息或数据；(3) 转售产品，不论该产品是否转售用于研究。

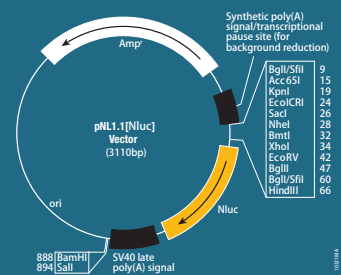
研究人员无权修改或以其他方式创造产品的变体。未经 Promega 事先明确的书面同意，不得使用或转让本产品。

1 NanoLuc[®] 报告基因载体

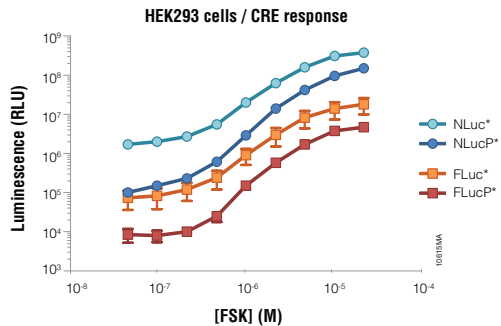
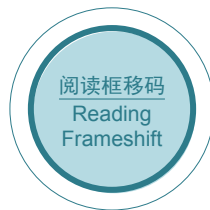
pNL 载体

pNL 载体系列以 pGL4 为基础设计，以方便从现有的质粒上进行序列转移。载体骨架设计还去掉了许多转录因子结合位点和其他潜在的调控元件以减少非特异性结合的发生。

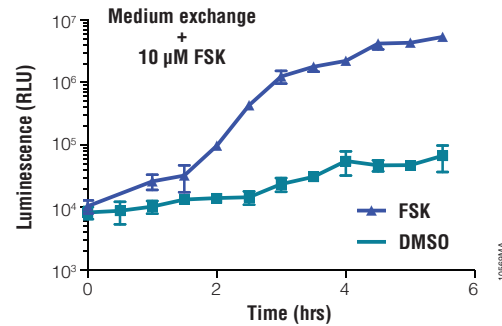
- pNL1: 克隆已知或预测的启动子区域
- pNL2: 克隆已知或预测的启动子区域，并通过潮霉素（Hygromycin）筛选建立一个稳定克隆的细胞系
- pNL3: 克隆不含基本启动子的结合位点或应答原件（如 pNL3.2.NF- κ B-RE 载体）
- 提供非融合和分泌型 Nluc 对照质粒



载体应用



上图: Nluc 信号比 NlucP 更强, NlucP 信号变化更快



上图: 在同一样品中利用分泌型 Nluc 进行药物处理不同时间点的监测

工具载体列表

分类	名称	规格	目录号
无启动子载体	pNL1.1 [Nluc] Vector	20 μ g	N1001
	pNL1.2 [NlucP] Vector	20 μ g	N1011
	pNL1.3 [secNluc] Vector	20 μ g	N1021
含 minP 或组成型启动子	pNL3.1 [Nluc/minP] Vector	20 μ g	N1031
	pNL3.2 [NlucP/minP] Vector	20 μ g	N1041
	pNL3.3 [secNluc/minP] Vector	20 μ g	N1051
	pNL1.1.CMV [Nluc/CMV] Vector	20 μ g	N1091
	pNL3.2.CMV[NlucP/CMV] Vector	20 μ g	N1411
	pNL1.3.CMV [secNluc/CMV] Vector	20 μ g	N1101
	pNL1.1.PGK[Nluc/PGK] Vector	20 μ g	N1441
	pNL1.1.TK[Nluc/TK]Vector	20 μ g	N1501
筛选标记	pNL2.1 [Nluc/Hygro] Vector	20 μ g	N1061
	pNL2.2 [NlucP/Hygro] Vector	20 μ g	N1071
	pNL2.3 [secNluc/Hygro] Vector	20 μ g	N1081
预构建应答元件	pNL3.2. NF- κ B-RE [NlucP/NF- κ B-RE/Hygro]	20 μ g	N1111

Coincidence reporter 载体

药物筛选— —有效减少 False Hit

问题: 在小分子药物筛选阶段, 萤光素酶报告基因方法是药物筛选的常用方法, 但使用萤火虫萤光素酶单报告基因可能会因小分子药物结构与萤光素酶底物结构相似, 而影响萤光素酶活性, 最终影响检测结果, 产生 False Hit 的不良后果, 造成时间和资源的浪费。

解决方案: 采用 Promega 最新的 coincidence reporter 载体配合 NanoDLR™ 检测试剂进行药物筛选研究, 可以有效降低 False Hit 的概率达 70% 以上, 为药物筛选提供了更可靠的解决方案。

1

能从同一 mRNA 转录本中同时表达 Firefly 萤光素酶 (luc2) 和带有一个 PEST 蛋白降解序列的 NanoLuc® 萤光素酶 (NlucP)。通过 P2A 序列产生两个非融合蛋白。

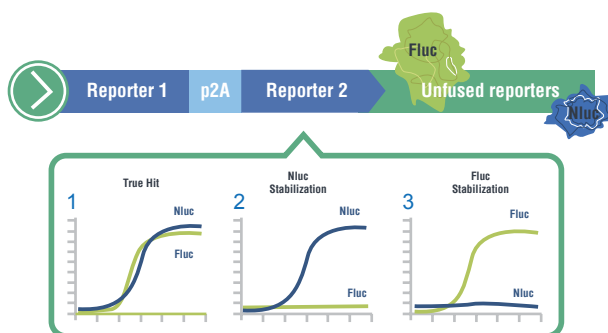
2

与 Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter 检测系统一起使用, 该系统以简单的“加样 - 读数 - 加样 - 读数”模式对同一样品中的 Firefly 和 NanoLuc® 萤光素酶活性进行顺序检测。

» 原理

P2A 序列 (来源于 porcine teschovirus-1) 启动了核糖体跳跃, 同一启动子可调控获得两种非融合萤光素酶的表达, 且两种萤光素酶与化合物相互作用不同。因此, 当用于高通量化合物筛选时, 实现了与其中一种萤光素酶直接作用而导致的假阳性化合物能够与同时引起两种萤光素酶反应的真正有效化合物区别开来, 且两个报告基因可以同时作为筛选药物的报告基因。

当所筛选化合物能够同时引起报告基因改变时, 可认定为 True Hit (右图 1), 其他两种情况可能是由于化合物对萤光素酶活性影响产生的单一报告基因出现假阳性结果 (右图 2,3)。



» 载体列表

启动子	说明	报告基因	载体名称	目录号
—	骨架载体, 包含多克隆位点区域, 可插入感兴趣的启动子序列。	Firefly/NanoLuc®	pNLCol1[luc2-P2A-NlucP/Hygro] Vector	N1461
minP	包含用于在最小启动子 (minP) 上游插入启动子元件的多克隆位点区域。	Firefly/NanoLuc®	pNLCol2[luc2-P2A-NlucP/minP/Hygro] Vector	N1471
CMV	启动 Firefly/NanoLuc® 两个报告基因的高表达; 可作为组成型表达的阳性对照载体。	Firefly/NanoLuc®	pNLCol3[luc2-P2A-NlucP/CMV/Hygro] Vector	N1481
PGK	启动 Firefly/NanoLuc® 两个报告基因的中度表达; 可作为组成型表达的阳性对照载体。	Firefly/NanoLuc®	pNLCol4[luc2-P2A-NlucP/PGK/Hygro] Vector	N1491

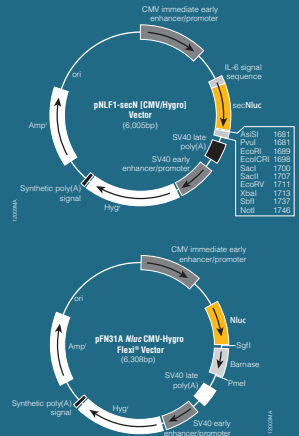
» 参考文献举例

- Smith AM, Costello MS, Kettring AH, et al. Ribosome collisions alter frameshifting at translational reprogramming motifs in bacterial mRNAs. PNAS, 2019.
- Andrienas KK, Ramlall V, Kurland J, et al. DNA-binding landscape of IRF3, IRF5 and IRF7 dimers: implications for dimer-specific gene regulation. Nucleic Acids Res, 2018.

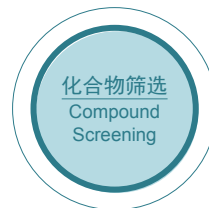
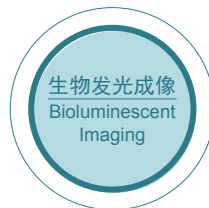
2 NanoLuc® 融合蛋白表达载体

NanoLuc® 融合蛋白表达载体可方便的构建 N- 或 C- 端融合 Nluc 和您感兴趣蛋白组成的融合蛋白；有两类形式载体可供选择：

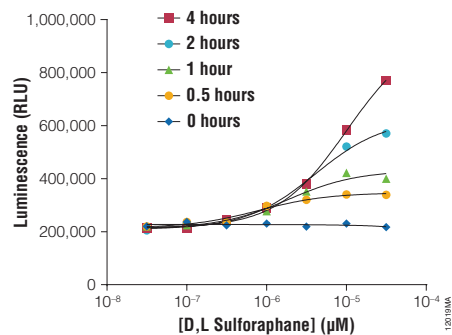
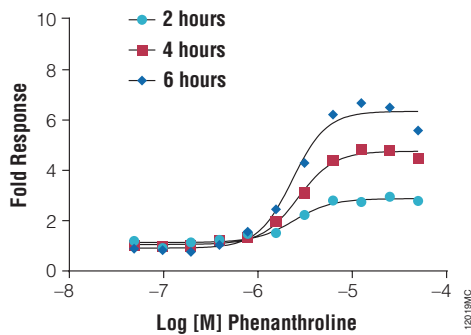
- **pNLF 载体系列：**应用传统的克隆方法（多克隆位点）产生 N- 或 C- 端融合全长 Nluc 的融合蛋白或将分泌型 Nluc 克隆到感兴趣的蛋白 N 端。
- **pF 载体系列：**使用 Flexi® Vector Cloning System 产生 N- 端或 C- 端融合蛋白。Flexi® Vector Cloning System 是一种定向克隆技术，基于两种稀有酶切位点 SgfI 和 PmeI，可以在 Flexi® 载体之间转换蛋白编码序列，快速、高效和高保真。



载体应用



针对 HIF1A 和 NRF2 蛋白的 NanoLuc® Stability Sensors



- HIF1A-NanoLuc 融合载体和 Transfection Carrier DNA 瞬时转染 HCT-116 细胞。
- NRF2-NanoLuc 融合载体和 pKEAP1 DNA 瞬时转染 HCT-116 细胞。

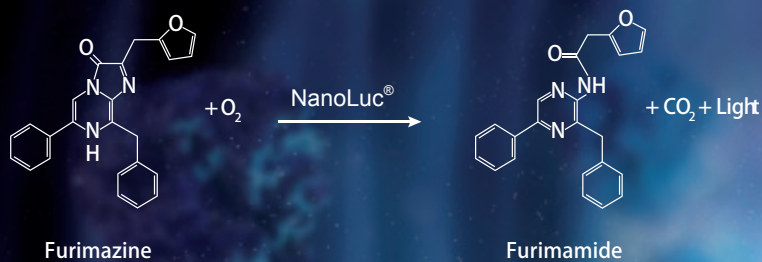
两图实验均按说明进行处理并使用 Nano-Glo® Luciferase Assay 在指定时间点检测 NanoLuc® 的表达。

载体列表

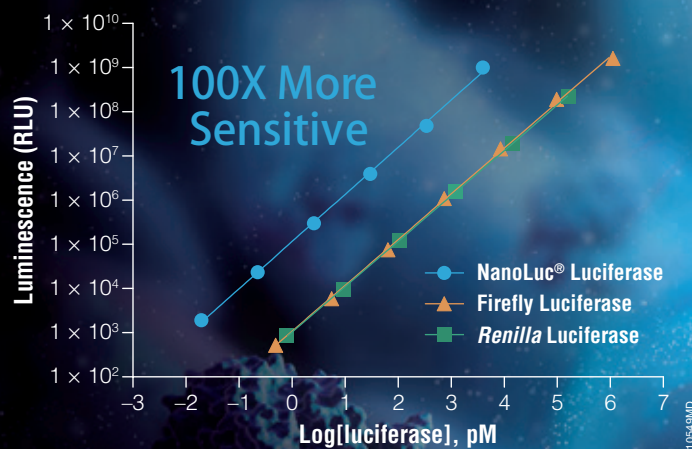
分类	名称	规格	目录号
pF 载体系列	pFN31A Nluc CMV-Hygro Flexi® Vector	20µg	N1311
	pFN31K Nluc CMV-Neo Flexi® Vector	20µg	N1321
	pFC32A Nluc CMV-Hygro Flexi® Vector	20µg	N1331
	pFC32K Nluc CMV-Neo Flexi® Vector	20µg	N1341
pNLF 载体系列	pNLF1-N [CMV/Hygro] Vector	20µg	N1351
	pNLF1-C [CMV/Hygro] Vector	20µg	N1361
	pNLF1-secN [CMV/Hygro] Vector	20µg	N1371
pNLF 载体系列预构建载体	pNLF1-HIF1A [CMV/neo] Vector System	20µg	N1381
	pNLF1-NRF2 [CMV/neo] Vector System	20µg	N1391

注：目录号 N1381 和 N1391 对应的产品分别用于 HIF1A 和 NRF2 的蛋白稳定性分析研究

NanoLuc[®] 报告基因检测系统



这里介绍一下 Furimazine, Furimazine 是 Promega 的新型专利底物。可渗透细胞, 同时还能够减少自发光和实验背景。与 NanoLuc[®] 反应不依赖 ATP, 可产生高强度、辉光型发光信号。生物发光反应光信号更亮, 可高达 10¹⁰。



根据转染方式及应用的不同, NanoLuc[®] 萤光素酶报告基因检测系统分为单报告基因检测系统和双报告基因检测系统 2 种。

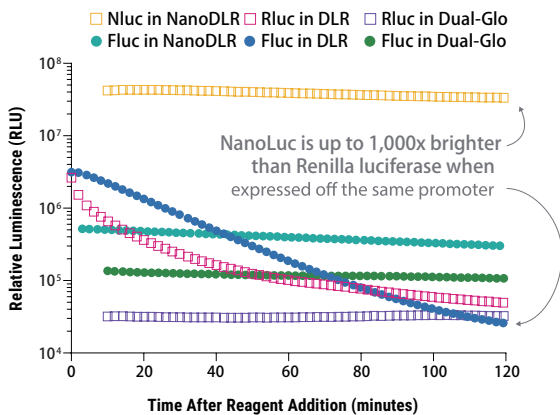
1. Nano-Glo[®] Dual-Luciferase[®] 双报告基因检测系统简介

Nano-Glo[®] Dual-Luciferase[®] Reporter (NanoDLR[™]) Assay System 是 Promega 全新推出的一款双报告基因检测系统。该系统提供均质法检测试剂，能够在同一个样品中先后检测萤火虫萤光素酶 (*Photinus pyralis*) 和 NanoLuc[®] 萤光素酶 (Nluc) 的活性。先以 ONE-Glo[™] EX Luciferase Assay Reagent 检测萤火虫萤光素酶活性，再以 NanoDLR[™] Stop & Glo[®] Reagent 淬灭萤火虫萤光素酶信号，同时 NanoLuc[®] 的底物 furimazine 与 NanoLuc[®] 反应产生光信号。这种“加样 - 检测 - 加样 - 检测”的模式能够产生稳定的辉光信号。详细信息请浏览《双萤光素酶报告基因解决方案》。

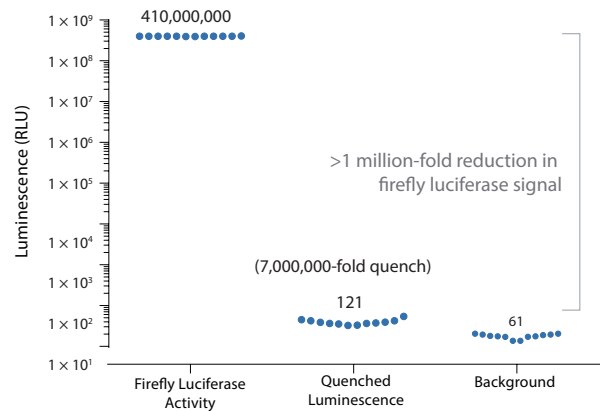
新系统亮点

- 可以任意选择萤火虫或 NanoLuc[®] 作为主报告基因，也可二者都作为主报告基因。
- 采用“加样 - 检测 - 加样 - 检测”的模式，操作流程简单。
- 辉光型检测信号：半衰期更长、灵敏度更高。
- 对于低表达有更高的灵敏度。
- 试剂稳定性更高，储存更方便。
- 可在原有双报告基因系统（萤火虫 / 海肾）上灵活升级。

实验数据



上图：比较了 TK-Rluc (*Renilla*) : TK-Fluc (Firefly) : 载体 DNA 或者是 TK-Nluc (NanoLuc[®]) : TK-Fluc (Firefly) : 载体 DNA 以 1:1:8 的比例转染 HEK293 细胞，通过 NanoDLR[™]，Dual-Glo[®] 或者 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System 测得的发光信号。



上图：在 NanoDLR[™] 检测系统中萤火虫萤光素酶信号的有效淬灭。NanoDLR[™] Stop & Glo[®] Reagent 可以将极高的 Fluc 信号降低至接近本底水平，这将十分有利于信号分离并减少变异性发生，且无需牺牲两个具有明亮发光信号酶的灵敏度。

产品列表

载体组合 (主报告基因 / 内参报告基因)	产品	规格	目录号
NanoLuc [®] /Firefly 或 Firefly/NanoLuc [®]	Nano-Glo [®] Dual-Luciferase [®] Reporter Assay System	10ml	N1610
		100ml	N1620
		10x10ml	N1630
		10x100ml	N1650

2. NanoLuc[®] 专用单报告基因检测系统

NanoLuc[®] 单报告基因检测系统根据检测方式的不同分为终点法检测系统（即裂解细胞后检测）和活细胞实时检测系统 2 种类型。同时根据报告基因表达位置的不同，也可分为细胞内表达检测和分泌型表达检测。

1

终点法检测系统

Nano-Glo[®] Luciferase Assay

试剂含有完整的裂解缓冲液成分，可直接用于检测表达 NanoLuc[®] 萤光素酶的细胞或检测分泌了萤光素酶的培养基。仅需一个加样步骤，即能在 NanoLuc[®] 萤光素酶作用下产生辉光型信号，发光信号在常用培养基中的半衰期大约为 120 分钟。

2

活细胞检测系统

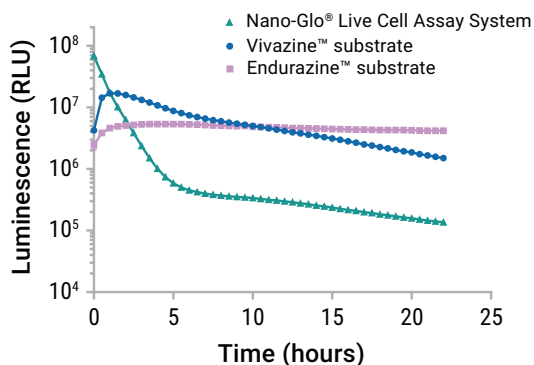
Nano-Glo[®] Live Cell Assay System

用于检测活细胞内 NanoBiT[®] 或 NanoLuc[®] 发光信号；单次加样、非裂解性检测试剂；可用于检测自定义时间点的发光信号或者连续检测发光信号达 2 小时；同时不损害细胞活力。

Nano-Glo[®] Endurazine[™]/Vivazine[™] Live Cell Substrate

可用于检测活细胞内 NanoBiT[®] 或 NanoLuc[®] 发光信号，非裂解型检测。两种底物是通过细胞内的酯酶水解释放出 furimazine，以作为 NanoBiT[®] 或 NanoLuc[®] 萤光素酶反应底物。两种底物的发光信号持续时间长，但随时间的变化情况不同，可根据实验需要选择合适的底物。

细胞内表达检测	VS	分泌型表达检测
裂解细胞		无需裂解细胞
细胞内的 NLuc 释放		NLuc 从细胞中分泌至上清中



左图：Nano-Glo[®] Endurazine[™] 和 Vivazine[™] 底物与 Nano-Glo[®] 活细胞检测系统比较。将 PGK 启动子启动的 NanoLuc[®] 萤光素酶载体瞬时转染到 HEK293 细胞中，使用不同的检测试剂检测长时间的发光信号变化。

检测方式	产品	规格	目录号
终点法检测	Nano-Glo [®] Luciferase Assay	10ml	N1110
		100ml	N1120
		10x10ml	N1130
		10x100ml	N1150
活细胞检测	Nano-Glo [®] Live Cell Assay System	100 assays	N2011
		1,000 assays	N2012
		10,000 assays	N2013
	Nano-Glo [®] Endurazine [™] Live Cell Substrate	0.1ml	N2570
		1ml	N2571
		10ml	N2572
	Nano-Glo [®] Vivazine [™] Live Cell Substrate	0.1ml	N2580
		1ml	N2581
10ml		N2582	
	Nano-Glo [®] Extended Live Cell Substrate Trial Pack	0.2ml	N2590

3. Nano-Glo[®] 胶内检测系统

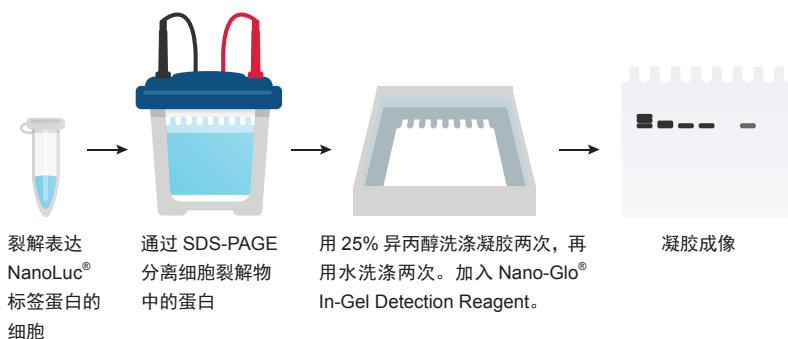
Nano-Glo[®] In-Gel Detection System 是一种无需转膜、封闭或加入抗体，可直接检测聚丙烯酰胺凝胶（包括 SDS 变性胶及非变性胶）中的 NanoLuc[®] 融合蛋白，确定 NanoLuc[®] 融合蛋白分子量以及相对表达水平。当 SDS 被移除后，NanoLuc[®] 萤光素酶会自发重折叠，产生一种明亮的可发光的酶。Furimazine 底物很容易渗透凝胶，产生在多个数量级上与 NanoLuc[®] 标签蛋白量成比例的发光信号值。灵敏度更高，特异性更强。

确定蛋白表达水平
(Verify expression levels)

确定准确的蛋白分子量
(Confirm correct molecular weight)

多重测定多个发光物种
(Multiplex measurements of multiple luminescent species)

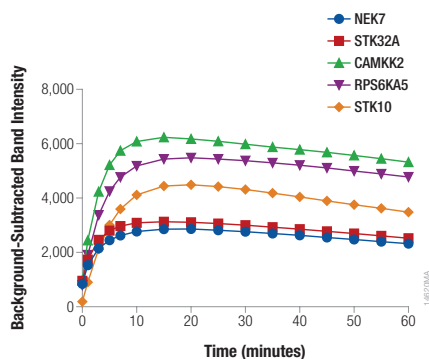
» Nano-Glo[®] In-Gel Detection System 操作流程



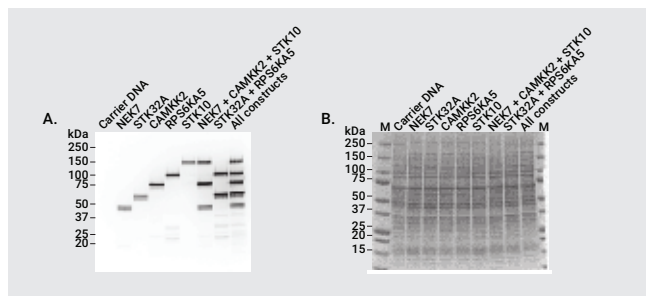
实验 Tips: 对于非变性 SDS-PAGE，凝胶与检测试剂共孵育不到 15 分钟即可显像。对于变性 SDS-PAGE，以 25% 异丙醇洗两遍后再以水清洗两遍以去除 SDS，从而使 NanoLuc[®] 萤光素酶在检测前能够重新折叠。

» 实验举例

HEK293 细胞以五种不同的 NanoLuc[®] 萤光素酶与蛋白激酶的融合蛋白载体单独或组合转染：NEK7, STK32A, CAMKK2, RPS6KA5 和 STK10。CMV 表达载体被稀释到载体 DNA 的 100 倍来降低其表达水平。在过夜孵育后，取 10 μ l 细胞裂解液进行凝胶电泳。



上图：一小时内监测在 SDS-PAGE 凝胶中加入检测试剂后，各种 NanoLuc[®] 融合蛋白的信号动态变化。



上图：瞬时转染 HEK293 细胞的 SDS-PAGE 图。

图 A. Nano-Glo[®] In-Gel Detection System 检测 NanoLuc[®] 融合蛋白。加入试剂后 30 秒曝光图像显示。图 B. 凝胶继续使用考马斯亮蓝染料孵育，然后成像显示细胞裂解物中的总蛋白水平。

» 产品列表

产品	规格	目录号
Nano-Glo [®] In-Gel Detection System	100ml	N3020

4. NanoLuc[®] 抗体

NanoLuc[®] 萤光素酶可用于蛋白稳定性分析、NanoBRET[™] Target Engagement (TE) 和蛋白互作等研究。

Anti-NanoLuc[®] Monoclonal Antibody 是蛋白 A/G 亲和纯化的小鼠单克隆抗体，用于 Western Blot 中检测 NanoLuc[®] 萤光素酶和 NanoLuc[®] 融合蛋白。

» 在使用 NanoLuc[®] 抗体时需注意以下几点：

1. 冷冻产品可能会形成浓度梯度，因此，应在使用前充分混匀。
2. Anti-NanoLuc[®] Monoclonal Antibody 的灵敏度可能不足以检测表达水平非常低的 NanoLuc[®] 萤光素酶或 NanoLuc[®] 萤光素酶融合蛋白，例如，使用 Carrier DNA 稀释基于 CMV 表达的载体进行瞬时表达，或通过像 HSV-TK 等弱启动子进行表达。
3. 在 Western Blot 应用中推荐以 1ug/ml 作为起始浓度，后续可在此基础上进行实验流程的优化。

» 实验示例

右图：使用转染的 HEK293 细胞进行 Western blot 分析。使用编码 NanoLuc[®] 融合蛋白的含 CMV 启动子的表达载体转染 HEK293 细胞。24 小时后，PBS 清洗细胞，并使用加有蛋白酶抑制剂混合物的 Lysis Buffer 将其裂解。检测总蛋白浓度，并使用 Anti-NanoLuc[®] Monoclonal Antibody 进行 Western blot 检测，成像系统进行成像。实际的迁移率接近每个融合蛋白的预期迁移率。背景条带在所有泳道中都很明显，包括 HEK293 细胞裂解液，无 NanoLuc[®] 融合蛋白的表达，但仍然是 NanoLuc[®] 融合条带更为明显。

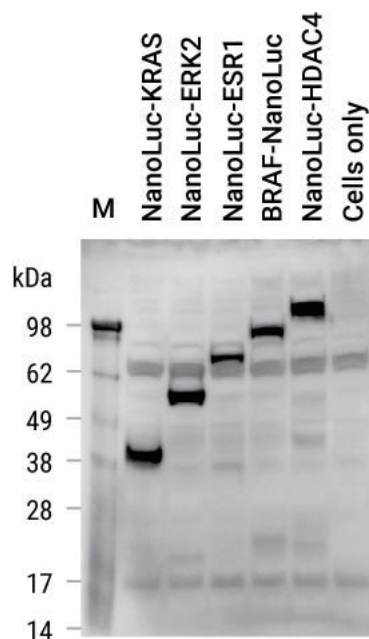
» 实验中用到的产品

Transfection Carrier DNA (Cat.# E4881)

FuGENE[®] HD Transfection Reagent (Cat.# E2311)

Lysis Buffer (Cat.# G9381)

Anti-NanoLuc[®] Monoclonal Antibody (Cat.#N7000)



Detection of NanoLuc[®] fusion proteins expressed in HEK293 cells.

» 产品列表

	产品	规格	目录号
NanoLuc [®] 相关抗体	Anti-NanoLuc [®] Monoclonal Antibody	100µg	N7000
	Anti-LgBiT Monoclonal Antibody	100µg	N7100

NanoLuc[®] 萤光素酶技术应用 及相关工具

技术应用

报告基因分析

- 启动子分析
- 通读翻译
- 阅读框移码
- miRNA 调控

蛋白功能分析

- 蛋白：蛋白相互作用
- 配体：蛋白相互作用
- 蛋白稳定性
- PROTAC 蛋白降解

药物研发

- Target Engagement
- PROTACs
- GPCR
- 细胞因子检测
- 新生儿受体检测

病毒研究

- 病毒的生命周期
- 病毒的致病机理
- 体内体外的传播

生物发光成像

- 细胞成像
- 小动物活体成像

技术工具

载体

- 报告基因载体
- Coincidence Reporter 载体
- 融合蛋白载体

检测试剂

- 单报告基因终点法 / 活细胞检测系统
- 单报告基因腔内检测系统
- 双报告基因终点法检测系统

检测仪

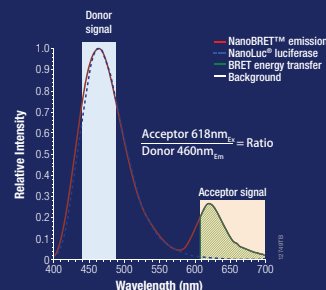
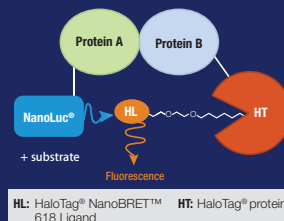
- 多功能多孔板检测仪 -GloMax[®] Discover
- 96 孔板发光检测仪 -GloMax[®] Navigator
- 单管发光检测仪 -GloMax[®] 20/20

蛋白：蛋白相互作用研究

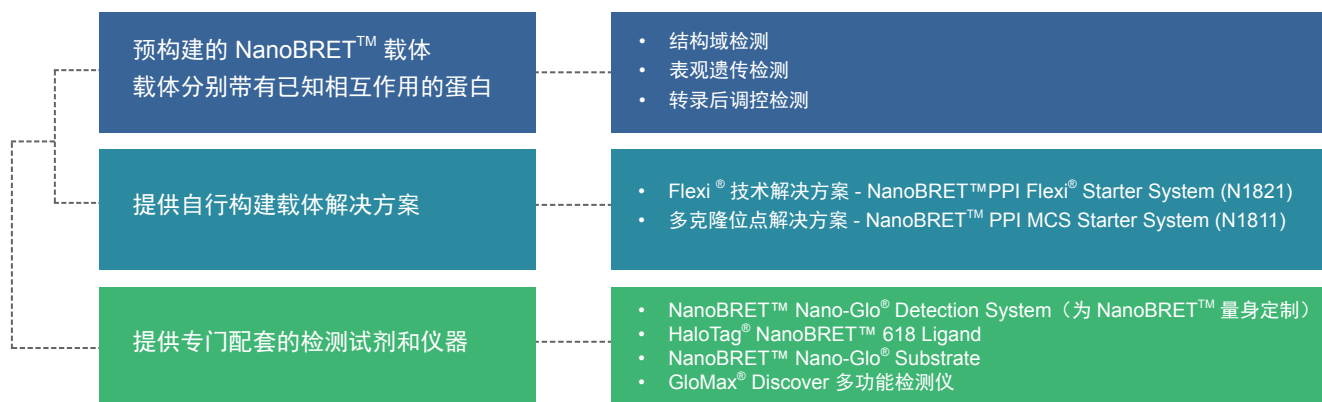
—— NanoBRET™ 技术

NanoBRET™ 技术是大幅度改良的 BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer, 生物发光共振能量转移) 分析平台, 可用于在活细胞内研究蛋白: 蛋白相互作用。

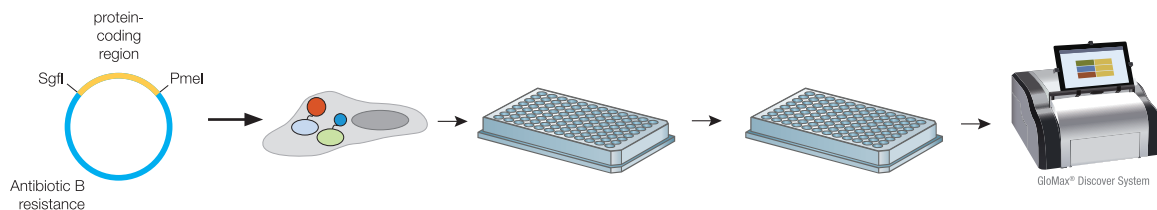
NanoBRET™ 技术使用 NanoLuc® 萤光素酶作为能量供体和 NanoBRET™ 618 荧光配基标记的 HaloTag® 蛋白作为能量受体。来自 NanoLuc® 供体的明亮的蓝移发光信号耦合到远红移的 HaloTag® 受体上, 光谱叠加更佳、信号更强、且与传统 BRET 分析相比背景更低。



针对 NanoBRET™ 技术平台, Promega 提供实验所需的完整解决方案



NanoBRET™ 实验操作流程



蛋白：蛋白相互作用研究

——NanoBRET™ 技术

NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System

该检测系统分两种类型：标准检测系统以及动态检测系统

1

标准检测系统

NanoBRET™ Nano-Glo® Standard Detection System

- NanoBRET™ Nano-Glo Substrate 与 NanoLuc® Luciferase 反应作为能量供体
- 检测 2 小时内单个时间点的信号强度

2

动态检测系统

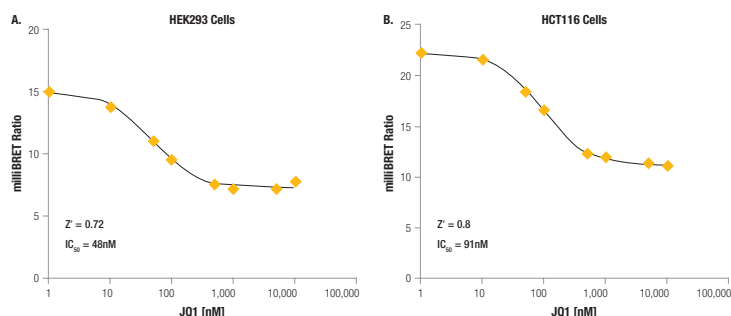
NanoBRET™ Nano-Glo® Kinetic Detection System

- 提供 Vivazine™ substrate 与 NanoLuc® Luciferase 反应作为能量供体
- 为活细胞动力学分析提供持续信号监测

应用举例：检测 JQ1 抑制剂对细胞中 BRD4 蛋白与组蛋白 Histone H3.3 蛋白的相互作用的影响

实验流程简述：

- 使用 Promega 预构建的 BRD4 融合蛋白载体和 Histone H3.3 融合蛋白载体，转染 HEK293 和 HCT116 细胞；
- 以 JQ1 抑制剂处理细胞；
- 孵育后再按顺序加入荧光配基和 NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate 底物反应；
- 最终检测 BRET ratio 信号。



产品列表

NanoBRET™ 检测系统	产品	规格	目录号
NanoBRET™ 标准检测系统	NanoBRET™ Nano-Glo® Standard Detection System	200 assays	N1661
	NanoBRET™ Nano-Glo® Standard Detection System	1,000 assays	N1662
	NanoBRET™ Nano-Glo® Standard Detection System	10,000 assays	N1663
NanoBRET™ 动态检测系统	NanoBRET™ Nano-Glo® Kinetic Detection System	200 assays	N2583
	NanoBRET™ Nano-Glo® Kinetic Detection System	1,000 assays	N2584
	NanoBRET™ Nano-Glo® Kinetic Detection System	10,000 assays	N2585

参考文献举例

1. Miyakawa, Nishi, Matsunaga, *et al.* The tumour suppressor APC promotes HIV-1 assembly via interaction with Gag precursor protein. **Nature Comm**, 2017
2. Juanfei Wang, Jinqi Ren, Bin Wu, *et al.* Activation of Rab8 guanine nucleotide exchange factor Rabin8 by ERK1/2 in response to EGF signaling, **PNAS**, 2015
3. Qiuju Zhu, Fanshu Kong, Hao Xu, *et al.* Tyrosine phosphorylation of GluK2 up-regulates kainate receptor-mediated responses and downstream signaling after brain ischemia, **PNAS**, 2014
4. Rachel Deplus, Benjamin Delatte, Marie K Schwinn, *et al.*, TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS, **The EMBO Journal**, 2013

药物：靶点相互作用研究

——NanoBRET™ 技术

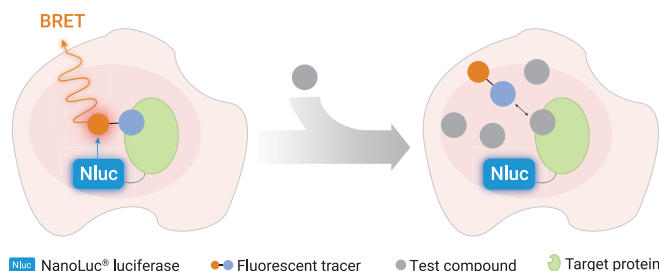
小分子结合并调控靶蛋白活性研究技术的发展对理解生物学机制和治疗疾病至关重要。生物发光能量共振转移（BRET）的应用使得在活细胞内定量检测一个小分子和蛋白之间的相互作用成为可能。某些情况下，这一方法甚至可以实时检测这些相互作用，不仅能研究相互作用的形成，而且能研究相关组分的分离。应用 BRET 研究配体：蛋白相互作用依赖能量从作为 BRET 供体的标记蛋白的萤光素酶转移到作为 BRET 受体的另一荧光标记的配体上。能量的转移受两者接近程度的调控。作为 BRET 供体的 NanoLuc® Luciferase，由于其光信号非常强、蛋白分子小，因而具有独特的优势。NanoBRET™ 可使用多种荧光基团作为 BRET 受体。



» NanoBRET™ Target Engagement (TE) 检测系统原理

系统中 NanoBRET™ tracer 可以透过细胞膜，进入细胞与 NanoLuc®- 靶点融合蛋白相互作用产生 BRET 现象，当待测药物与靶点蛋白存在相互作用时，会与 tracer 竞争结合靶点蛋白，BRET 信号减弱。

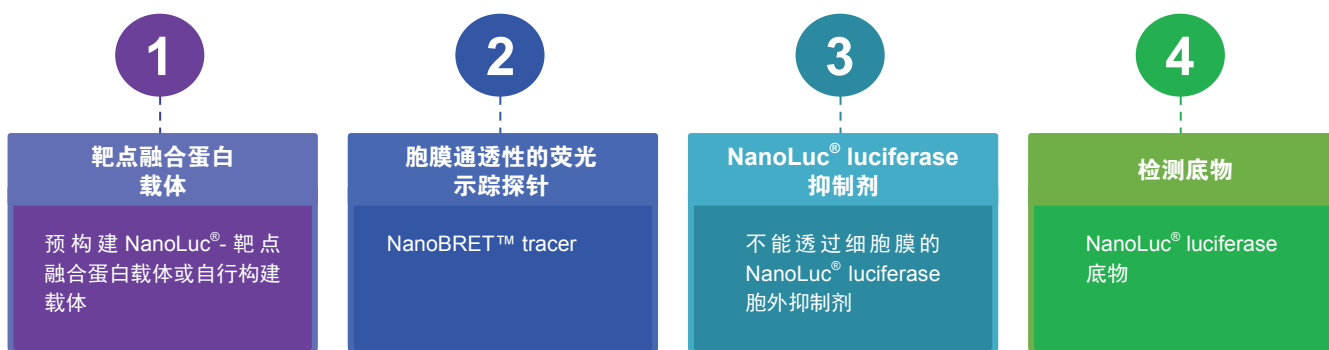
通过 NanoBRET™ TE 检测系统可以检测活细胞水平的药物与靶点的亲和力以及药物膜通透性。



» NanoBRET™ Target Engagement (TE) 检测系统关键组分

NanoBRET™ Target Engagement (TE) Assay 在完整细胞中检测化合物和特定靶点实时的相互作用。

NanoBRET™ TE Assay 中提供四种关键的组分：



Promega 商品化的 NanoBRET™ Target Engagement (TE) 检测系统

检测 Kinase 相关药物

检测 BET BRD 相关药物

检测 HDAC 相关药物

» 检测 Kinase 相关药物

作为人类蛋白质组中最大的一类酶，激酶对从细胞生理调节到信号转导的无数细胞过程都是必不可少的。NanoBRET™ TE kinase assays 是一种特异性检测方法，可以定量检测活细胞中的化合物亲和力和占有率，从而提供与生物学相关的信息。NanoBRET™ Target Engagement Intracellular Kinase Assay 利用 Promega 的专利 NanoBRET™ Target Engagement (TE) 技术检测完整细胞内目标靶蛋白与化合物结合。NanoBRET™ TE Kinase Assays 已成功地应用于多靶标类的研究。

□ NanoBRET™ TE Kinase Assay 亲和力检测简要流程及对应产品工具



□ 自行设计 NanoBRET™ TE 检测系统

Promega 提供激酶，HDAC，BET/BRD，GPCRs 等多种商品化检测平台，同时您可以根据您的实验需求，自行设计建立针对您所研究的专属靶标的检测系统。流程包含 2 个关键步骤：

- 1) 制备示踪剂 Tracer，用于结合你的靶蛋白；
- 2) 制备靶蛋白与 NanoLuc® 萤光素酶融合表达蛋白的载体。如果你感兴趣的目标是一种胞内蛋白，则需要 Nano-Glo® 底物和细胞外 NanoLuc® 抑制剂。这些成分将确保检测的 BRET 信号是细胞内相互作用的结果。开发这些 DIY 分析所需的方法详细说明和订购相关材料，请扫描右侧 2 个二维码。
如果我们提供的预构建解决方案中有您研究的靶标，可以直接选用。



操作流程



订购产品

□ NanoBRET™ Tracer 及其对应的完整 NanoBRET™ TE 细胞内激酶检测系统列表：

产品	规格	目录号
Tracer(示踪剂)		
Cell-Permeable Kinase NanoBRET™ TE Tracer K-3	300ul	N2602
Cell-Permeable Kinase NanoBRET™ TE Tracer K-4	300ul	N2492
Cell-Permeable Kinase NanoBRET™ TE Tracer K-5	550ul	N2482
Cell-Permeable Kinase NanoBRET™ TE Tracer K-8	300ul	N2622
Cell-Permeable Kinase NanoBRET™ TE Tracer K-9	300ul	N2632
Cell-Permeable Kinase NanoBRET™ TE Tracer K-10	300ul	N2642
Cell-Permeable Kinase NanoBRET™ TE Tracer K-11	300ul	N2652
Tracer Dilution Buffer	50ml	N2191
NanoBRET™ TE 细胞内激酶检测系统		
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay K-3	100 assays	N2600
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay K-3	1,000 assays	N2601
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay,K-3 (No control DNA)	10,000 assays	N2810
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay, K-4	100 assays	N2520
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay, K-4	1,000 assays	N2521
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay,K-4 (No control DNA)	10,000 assays	N2540
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay, K-5	100 assays	N2500
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay, K-5	1,000 assays	N2501
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay,K-5 (No control DNA)	10,000 assays	N2530
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay K-8	100 assays	N2620
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay K-8	1,000 assays	N2621
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay,K-8 (No control DNA)	10,000 assays	N2820
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay K-9	100 assays	N2630
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay K-9	1,000 assays	N2631
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay,K-9 (No control DNA)	10,000 assays	N2830
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay K-10	100 assays	N2640
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay K-10	1,000 assays	N2641
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay,K-10 (No control DNA)	10,000 assays	N2840
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay K-11	100 assays	N2650
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay K-11	1,000 assays	N2651
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay,K-11 (No control DNA)	10,000 assays	N2850
底物 / 抑制剂		
Intracellular TE Nano-Glo® Substrate/Inhibitor	1,000 assays	N2160
	10,000 assays	N2161
	100 assays	N2162
Intracellular TE Nano-Glo® Vivazine™/Inhibitor	1,000 assays	N2200
	10,000 assays	N2201
抑制剂		
CC1 pan-Kinase Inhibitor	100ul	N2661
Transfection Carrier DNA		
Transfection Carrier DNA	5x20µg	E4881
	2x100µg	E4882

» 检测 BET BRD 相关药物

产品	规格	目录号
NanoBRET™ TE Intracellular BET BRD Assay	100 assays	N2130
	1,000 assays	N2131
NanoBRET™ TE Intracellular BET BRD Detection Reagents	10,000 assays	N2140
NanoBRET™ TE BET BRD DNA Bundle	1 each	N2150
NanoBRET™ TE Intracellular BET BRD Complete Kit	1000 assays	N2180

» 检测 HDAC 相关药物

产品	规格	目录号
NanoBRET™ TE Intracellular HDAC Assay	100 assays	N2080
	1,000 assays	N2081
NanoBRET™ TE Intracellular HDAC Detection Reagents	10,000 assays	N2090
NanoBRET™ TE HDAC DNA Bundle	1 each	N2120
NanoBRET™ TE Intracellular HDAC Complete Kit	1,000 assays	N2170

蛋白：蛋白相互作用检测——NanoBiT[®] 技术



NanoLuc[®] Binary Technology(NanoBiT[®]) 是一种基于 Promega 最新专利萤光素酶 NanoLuc[®] Luciferase 的二亚单元系统，用来检测活细胞内蛋白质的相互作用。

NanoBiT[®] 技术被 The Scientist 杂志评为 2015 年度 Top 10 创新技术。

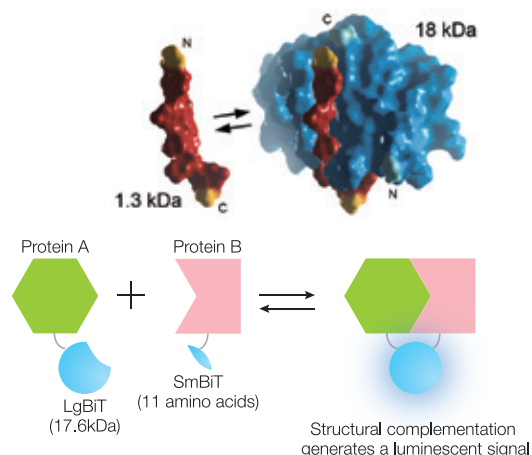
应用

- 活细胞蛋白相互作用的动态实时监测。
- 单个拷贝或单细胞蛋白相互作用的检测。
- 蛋白相互作用调节因子的筛选 (高达 384 孔板和 1536 孔板通量) 。

» NanoBiT[®] 技术原理

NanoBiT[®] 系统是由 Promega 专利型萤光素酶 -NanoLuc[®] Luciferase 人工重组的两个亚基组成，即大亚基 (LgBiT; 17.6 kDa) 和小亚基 (SmBiT; 11 氨基酸肽, 1.3 kDa)，可与 2 个待测目的蛋白分别表达为融合蛋白。

- ◆ LgBiT 和 SmBiT 两个亚基具有最佳的稳定性和极低限度的自我聚合。
- ◆ 目的蛋白之间的相互作用使两个亚基组合从而得到有活性的萤光素酶，进而可与底物反应发光。

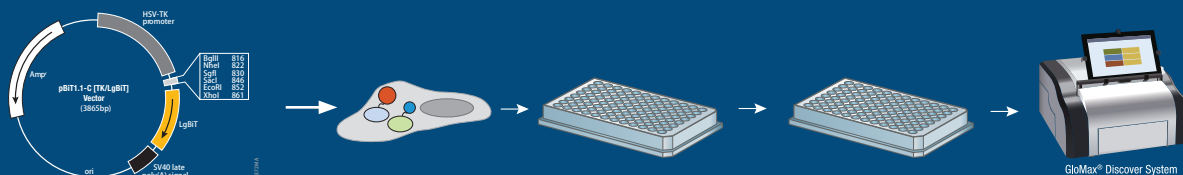


» NanoBiT[®] 技术解决方案

产品	说明	主要组分	目录号	可配套使用的 Promega 其它产品
NanoBiT [®] PPI MCS Starter System	通过 Promega 提供的带有多克隆位点的 LgBiT 载体和 SmBiT 载体可从 C 端或 N 端构建待测目的蛋白的融合蛋白，转染入细胞后即可检测发光。	<ul style="list-style-type: none"> • 多克隆位点融合蛋白表达载体 • 阳性 + 阴性对照载体 • 活细胞检测试剂 	N2014	<ul style="list-style-type: none"> • PureYield[™] 质粒小提试剂盒 • Wizard[®] 凝胶回收试剂盒 • T4 连接酶 • 限制性内切酶 • ViaFect[™] 转染试剂 • GloMax[®] 检测仪
NanoBiT [®] PPI Flexi [®] Starter System	Flexi [®] 载体克隆系统是一种定向克隆技术，基于两个稀有酶切位点的限制性内切酶，能够快速、高效、高保真性地在不同 Flexi [®] 载体间转移蛋白编码区，而无需重新测序。	<ul style="list-style-type: none"> • Flexi[®] 系列融合蛋白表达载体 • 阳性 + 阴性对照载体 • 活细胞检测试剂 • Flexi[®] 克隆转移载体 	N2015	<ul style="list-style-type: none"> • Flexi[®] System, Entry/Transfer • Carboxy Flexi[®] System • GloMax[®] 检测仪
Anti-LgBiT Monoclonal Antibody	可检测 NanoBiT [®] 系统中大亚基 LgBiT 和 LgBiT 融合蛋白 <ul style="list-style-type: none"> • 亲和纯化的小鼠单克隆抗体 • 用于 Western blotting 分析 	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-LgBiT Monoclonal Antibody 	N7100	<ul style="list-style-type: none"> • Nano-Glo[®] 活细胞检测系统

NanoBiT[®] 技术简要操作流程

» NanoBiT[®] 操作流程举例——NanoBiT[®] PPI MCS Starter System



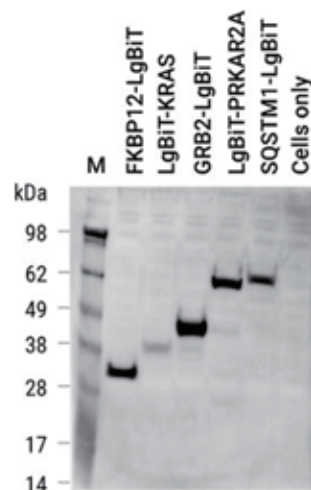
» Western blot 水平检测 LgBiT 融合蛋白 - 应用举例

● 实验设计

使用编码 LgBiT 融合蛋白的含 CMV 启动子的表达载体转染 HEK293 细胞，之后进行 Western blot 分析。

● 实验结果

右图：每个 LgBiT 融合蛋白都达到了预期的迁移率。即使使用 CMV（表达强度较高）驱动表达，且未用转染载体 DNA 进行稀释，LgBiT-KRAS 融合蛋白的表达水平依旧很低，但使用 LgBiT 抗体仍能检测到。



Detection of LgBiT fusion proteins expressed in HEK293 cells.

● 实验所用产品

Anti-LgBiT 单克隆抗体	功能	规格	目录号
Anti-LgBiT Monoclonal Antibody	用于检测 NanoBiT [®] 系统中大亚基 LgBiT 和 LgBiT 融合蛋白	100µg	N7100
Nano-Glo [®] 活细胞检测系统	功能	规格	目录号
Nano-Glo [®] Live Cell Assay System	用于检测活细胞内 NanoBiT [®] 或 NanoLuc [®] 发光信号的单次加样、非裂解性检测试剂；Nano-Glo [®] Live Cell Assay System 可用于检测自定义时间点的发光信号或者连续检测发光信号达 2 小时，同时不损害细胞活力。	100 assays	N2011
		1,000 assays	N2012
		10,000 assays	N2013

蛋白相互作用检测—NanoBiT[®] 技术

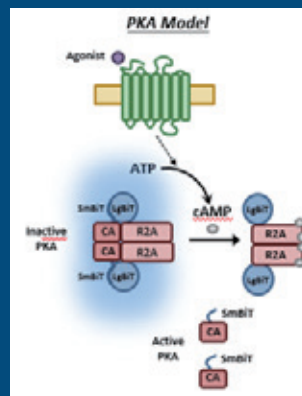
» 监测细胞内的蛋白可逆相互作用——应用举例

● 实验背景

PRKACA (cAMP 依赖性蛋白激酶催化亚基 a) 和 PRKR2A (蛋白激酶 A2A 调控亚基) 蛋白的相互作用受 cAMP 的调控, cAMP 水平增高, PRKACA 和 PRKR2A 蛋白的相互作用会可逆性的分离, cAMP 的水平降低, PRKACA 和 PRKR2A 蛋白的相互作用会可逆性的提高。

● 实验材料

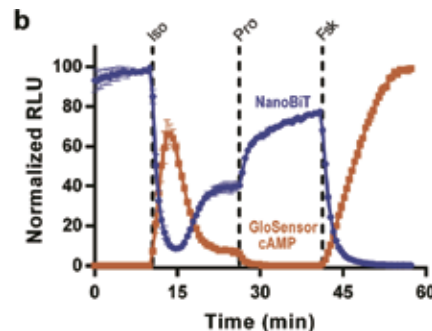
- 细胞: 转染有以 NanoBiT[®] 方法构建的 PRKACA 和 PRKR2A 融合蛋白对的 HEK293 细胞;
- 化合物: Iso 可增加细胞内细胞 cAMP 水平。GPCR 阻断剂 - 心得安 (propranolol, Pro), 降低细胞内 cAMP 水平; 内源性腺苷酸环化酶激活剂 - 毛茛菪 (forskolin, Fsk), 可增加细胞内 cAMP 水平。



● 实验结果

右图 . 监测 HEK293T 细胞中的 SmBiT-PRKACA/LgBiT-PRKR2A 可逆的相互作用。

28°C, 以 10 μM Isoproterenol (Iso), propranolol (Pro), 和 forskolin (Fsk) 依次加入 HEK293T 细胞中, 以 NanoBiT[®] 检测试剂检测药物诱导的 cAMP 水平变化对 SmBiT-PRKACA/LgBiT-PRKR2A 相互作用的可逆性调节。以 GloSensor[™] cAMP 技术监测细胞内 cAMP 浓度的变化。



● 实验所用试剂

产品	说明	目录号
Nano-Glo [®] Live Cell Assay System	用于检测活细胞内 NanoBiT [®] 或 NanoLuc [®] 发光信号的单次加样、非裂解性检测试剂。	N2011
		N2012
		N2013
GloSensor [™] cAMP Assay	一种全新的方法来检测活细胞内 cAMP 的水平	E1290
Luciferin-EF	一种无内毒素的甲虫萤光素, 可用于内毒素会造成影响的活体成像应用中	E6551

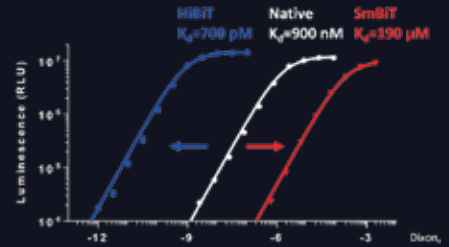
● 参考文献举例

1. Chaudhri, A., et al. PD-L1 Binds to B7-1 Only In Cis on the Same Cell Surface. *Cancer Immunol. Res.* 2018.
2. Koushyar, S., et al. The prohibitin-repressive interaction with E2F1 is rapidly inhibited by androgen signalling in prostate cancer cells. *Oncogenesis*, 2017.
3. Cannaert, A., et al. Detection and activity profiling of synthetic cannabinoids and metabolites with a newly developed bio-assay. *Anal. Chem.* 2016.
4. Andrew S. Dixon, et al. NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells. *ACS Chem. Biol.* 2016

HiBiT 蛋白标签技术

HiBiT 蛋白标签技术简介

- NanoLuc® Binary Technology (NanoBiT®) 将 NanoLuc® 萤光素酶重组表达成两部分肽段，一部分为 LgBiT (17.6 kDa)，另一部分为 1.3kDa 的肽段。在对小肽段研究过程中，与 LgBiT 具有极强亲和作用的肽段，被命名为 HiBiT，作为全新蛋白标签，具有多种功能。
- HiBiT 标签技术于 2017 年被 The Scientist 杂志评选为年度十大创新产品。



HiBiT 蛋白标签技术应用



HiBiT 蛋白标签技术优势



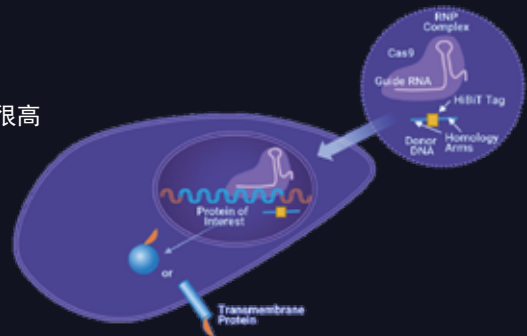
- **01** HiBiT 标签蛋白体积小，只有 11 个氨基酸，对所研究蛋白影响小
- **02** Promega 提供多种类型 HiBiT 标签检测系统
- **03** HiBiT 检测线性范围宽，>7 个数量级，可检测低至 10^{-18} 摩尔 (amole) 的蛋白
- **04** 商品化 HiBiT 载体，可以快速将 HiBiT 标签与感兴趣蛋白构建融合蛋白载体
- **05** 可应用 CRISPR 技术将 HiBiT 标签整合到目标蛋白基因组相应位置，而无需克隆，在蛋白内源表达水平上研究
- **06** 可简化传统 Western blot 实验操作流程，无需抗体

如何用 HiBiT 蛋白标签标记蛋白

» 用 CRISPR/Cas9 导入 HiBiT 内源标签

优势:

- 由于 HiBiT 标签很小，导入 (knock-in) HiBiT 内源性标签蛋白的效率很高
- 操作简单，很容易判定 CRISPR knock-in 的效果
- 无需克隆，节省实验时间
- 详细操作流程请咨询 Promega



流程:



» 选择载体进行重组表达

- 使用 Promega 商品化 HiBiT 蛋白标签载体，可简化融合蛋白载构建流程。
- Promega 提供多克隆位点和基于 Flexi[®] 克隆技术的 2 种 HiBiT 载体。
- 适用于稳定和瞬时的基因表达，并编码卡那霉素和新霉素抗性，适合细菌和哺乳动物细胞中的筛选。

产品	规格	目录号	说明
HiBiT CMV-neo Flexi [®] Vectors 载体系列			
pFC37K HiBiT CMV-neo Flexi [®] Vector	20µg	N2391	将 HiBiT 标签添加到目的基因的 C 端。
pFN38K HiBiT CMV-neo Flexi [®] Vector	20µg	N2401	将 HiBiT 标签添加到目的基因的 N 端。
pFN39K secHiBiT CMV-neo Flexi [®] Vector	20µg	N2411	<ul style="list-style-type: none"> • 将 HiBiT 标签添加到目的基因的 N 端。 • 这种载体在 HiBiT 标签的 N 端编码 IL-6 分泌信号肽，可将带 HiBiT 标签的蛋白直接运输至哺乳动物细胞的质膜，以获得细胞表面或细胞外分泌型蛋白的表达。
pBiT3.1 HiBiT MCS Vectors 载体系列			
pBiT3.1-N [CMV/HiBiT/Blast] Vector	20µg	N2361	将 HiBiT 标签添加到目的基因的 N 端。插入片段的 3' 端应含有终止密码子，以便终止翻译。
pBiT3.1-C [CMV/HiBiT/Blast] Vector	20µg	N2371	将 HiBiT 标签添加到目的基因的 C 端。
pBiT3.1-secN [CMV/HiBiT/Blast] Vector	20µg	N2381	<ul style="list-style-type: none"> • 将 HiBiT 标签添加到成熟的跨膜或分泌蛋白的 N 端。 • 这种载体在 HiBiT 标签的 N 端编码 IL-6 分泌信号肽，可将带 HiBiT 标签的蛋白直接运输至哺乳动物细胞的质膜，实现细胞表面表达或分泌型表达。

如何检测被 HiBiT 标签标记的蛋白

HiBiT 蛋白标签检测技术原理

- HiBiT 与 LgBiT 自发互补结合，形成具有催化活性的 NanoBiT[®] 酶，在底物存在的情况下，可产生明亮的发光信号。
- 在很宽的动态范围内，发光信号强度与 HiBiT 蛋白标签含量成正比。

HiBiT 蛋白标签检测系统分为三种类型：裂解型检测、细胞外检测以及印迹检测



裂解检测

Nano-Glo[®] HiBiT Lytic Detection System



细胞外检测

Nano-Glo[®] HiBiT Extracellular Detection System



印迹检测

Nano-Glo[®] HiBiT Blotting System

快速在几分钟内定量细胞内的蛋白，灵敏度高，动态范围宽，采用“加样 - 混合 - 读数”模式，操作十分方便。

- 线性范围高达 7 个数量级
- 操作简单快速

定量细胞表面和细胞外分泌的蛋白，仅需“加样 - 混合 - 检测”的简单操作，即可在几分钟内完成定量。

- 定量细胞表面或分泌型 HiBiT 标签融合蛋白
- 无需裂解，操作简单
- 线性范围高达 7 个数量级

检测印迹膜上低至飞克级的 HiBiT 标签蛋白。反应利用含有 LgBiT 蛋白的检测试剂，与 HiBiT 标签互补，形成能够催化底物并发光的 NanoBiT[®] 酶。仅需 5 分钟，即可检测。

- 无需抗体，印迹膜上检测
- 灵敏度高，可达飞克级
- 操作简单快速
- 确定蛋白分子量，定量蛋白表达

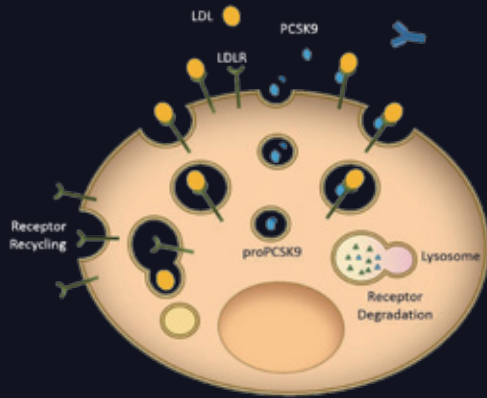
产品列表

	产品	规格	目录号
裂解检测	Nano-Glo [®] HiBiT Lytic Detection System	10ml	N3030
		100ml	N3040
		10 x 100ml	N3050
细胞外检测	Nano-Glo [®] HiBiT Extracellular Detection System	10ml	N2420
		100ml	N2421
		10 x 100ml	N2422
印记检测	Nano-Glo [®] HiBiT Blotting System	100ml	N2410

HiBiT 蛋白标签技术应用举例

HiBiT 技术检测 PCSK9 的加工和分泌

——应用 HiBiT 裂解检测系统、胞外检测系统和 Blotting 检测系统

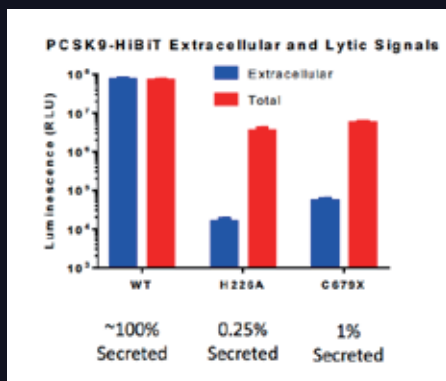


PCSK9 突变会抑制其分泌到胞外

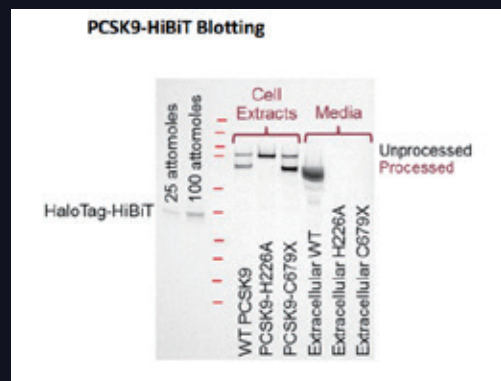
PCSK9 结合低密度脂蛋白胆固醇受体 (LDLR)，PCSK9 与 LDLR 结合阻止 LDLR 的再循环，由 PCSK9 介导 LDLR 降解过程。

PCSK9 是热门的药物靶点之一。

- PCSK9 基因过表达突变导致高脂血症
- PCSK9 基因敲除或胞外低表达导致低脂血症
- H226A 突变影响酶原加工过程，使其滞留在 ER
- C679X 突变导致滞留在 ER，但不抑制蛋白加工



上图：构建 PCSK9-HiBiT 融合蛋白，应用 Nano-Glo[®] HiBiT Extracellular Detection System 检测野生型及突变体 PCSK9 在胞外的含量。应用 Nano-Glo[®] HiBiT Lytic Detection System 检测样品中总的 PCSK9 水平。



Blotting 系统检测 PCSK9 在细胞提取物和培养基中的表达情况；验证发现 H226A 突变影响酶原加工过程，并使其滞留在 ER。C679X 突变导致滞留在 ER，但不抑制蛋白加工。

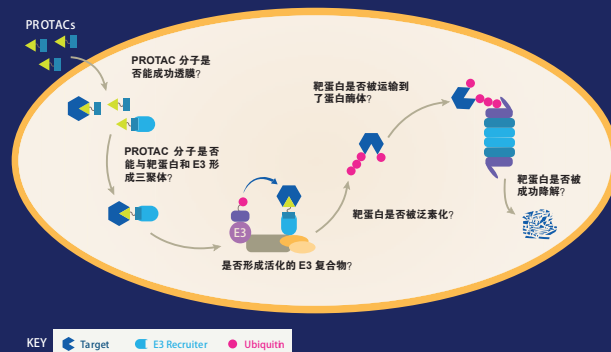
其他参考文献：

1. Wang CY, Patel N, Wholey WY, et al. ABC transporter content diversity in *Streptococcus pneumoniae* impacts competence regulation and bacteriocin production. *PNAS*, 2018.
2. Ranawakage DC, Takada T, Kamachi Y, et al. HiBiT-QIP, HiBiT-based quantitative immunoprecipitation, facilitates the determination of antibody affinity under immunoprecipitation conditions. *Sci Rep*, 2019.
3. Rouault AAJ, Lee AA, Sebag JA. Regions of MRAP2 required for the inhibition of orexin and prokineticin receptor signaling. *Biochim Biophys Acta Mol Cell*, 2017.
4. Oh-Hashi K, Furuta E, Fujimura K, et al. Application of a novel HiBiT peptide tag for monitoring ATF4 protein expression in Neuro2a cells. *Biochem. Biophys. Rep*, 2017.
5. Schwinn MK, Machleidt T, Zimmerman K, et al. CRISPR-Mediated Tagging of Endogenous Proteins with a Luminescent Peptide. *ACS Chemical Biology*, 2017.

蛋白降解及 PROTAC 研究

蛋白降解靶向嵌合体 (Proteolysis targeting chimeras), 简称 PROTACs。目的蛋白通过化学方法与 E3 泛素连接酶组分相连, 诱导选择的蛋白降解, 并通过泛素 - 蛋白酶体系统 (UPS) 启动蛋白降解。PROTACs 是由两个配体和一个短连接臂 (linker) 组成的功能异构分子。其中一个配体与 E3 连接酶结合, 另一个与目标蛋白结合。因为 E3 连接酶是泛素化复合体的一部分, 所以目的蛋白被泛素化, 发生降解。选择性将目的蛋白从细胞中清除, 而不是抑制蛋白活性, 这是一种新的潜在的治疗方式。

了解更多 PROTAC 研究资源, 可参考: www.promega.com/products/small-molecule-drug-discovery/protein-degradation-drug-discovery/



Promega 的 PROTAC 生物活性监测解决方案为您回答上述关键问题

» Promega 基于多项优势技术, 为您提供检测 PROTAC 的完整解决方案: 从透膜性, 三聚体形成, 泛素化, 蛋白酶体结合到最终蛋白降解。

Targeted Protein Degradation	E3 Ternary Complex	Ubiquitination	Target Engagement	Degradation Phenotype
定量目的蛋白水平, 监测降解动态	检测 E3 多重复合物 (三聚体) 的形成	检测目的蛋白泛素化作用	判断复合物的透膜性和结合效率	了解去除目的蛋白后的细胞表型

» NanoBRET™ Starter Kit 即用型试剂盒研究蛋白降解。

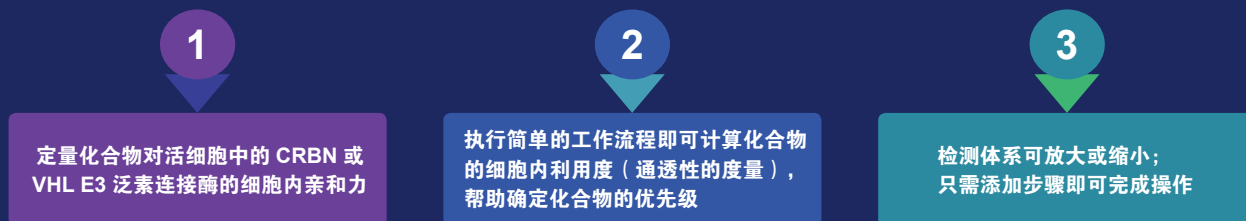
目录号	产品	规格	应用
ND2690	NanoBRET™ Ubiquitination Starter Kit	1 each	检测目的蛋白泛素化作用
ND2700	NanoBRET™ VHL Ternary Complex Starter Kit	1 each	检测三聚体的形成
ND2720	NanoBRET™ CRBN Ternary Complex Starter Kit	1 each	检测三聚体的形成
ND2730	NanoBRET™ Proteasomal Recruitment Starter Kit	1 each	检测目的蛋白到蛋白酶体的运送机制

» 可单独购买的蛋白降解研究系统相关载体。

目录号	产品	规格	应用
N2721	HaloTag®-Ubiquitin Fusion Vector	20µg	检测目的蛋白泛素化作用
N2731	HaloTag®-VHL Fusion Vector	20µg	检测三聚体的形成
N2691	HaloTag®-CRBN Fusion Vector	20µg	检测三聚体的形成
N2701	HaloTag®-PSMD3 Fusion Vector	20µg	检测目的蛋白到蛋白酶体的运送机制
N1691	NanoLuc®-BRD4 FL Fusion Vector	20µg	作为 UPS 检测的阳性对照

蛋白降解及 PROTAC 研究

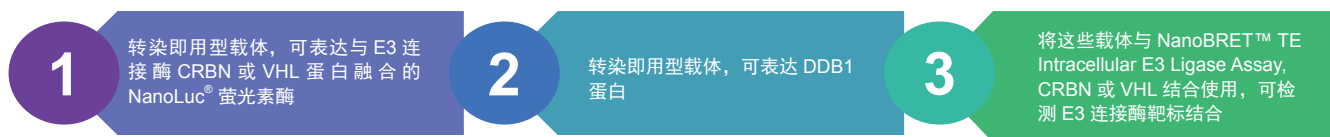
通过小分子（例如 PROTAC 或分子胶）降解蛋白质的过程需要多个步骤。初始步骤涉及小分子降解剂化合物进入细胞，然后与 E3 泛素连接酶和蛋白质靶标结合。NanoBRET™ Target Engagement (TE) Intracellular E3 Ligase Assays 是一种基于 NanoBRET™ 技术的新型检测系统，可用于检测活细胞中的化合物与 E3 泛素连接酶蛋白，Cereblon (CRBN) 或 von Hippel-Lindau 疾病抑制因子 (VHL) 的结合或亲和力，还可用于定量化合物的细胞内利用度 (availability)。



» NanoBRET™ TE Intracellular E3 Ligase Assays

目录号	产品	规格	应用
N2910	NanoBRET™ Intracellular E3 Ligase Assay, CRBN	100 assays	检测或定量活细胞中化合物与 CRBN 的结合
N2911	NanoBRET™ Intracellular E3 Ligase Assay, CRBN	1,000 assays	
N2912	NanoBRET™ Intracellular E3 Ligase Detection Reagents, CRBN	10,000 assays	
N2930	NanoBRET™ Intracellular E3 Ligase Assay, VHL	100 assays	检测或定量活细胞中化合物与 VHL 的结合
N2931	NanoBRET™ Intracellular E3 Ligase Assay, VHL	1,000 assays	
N2932	NanoBRET™ Intracellular E3 Ligase Detection Reagents, VHL	10,000 assays	

在 NanoBRET™ TE Intracellular E3 Ligase Assay 中，NanoLuc® E3 连接酶融合载体被设计为能量供体。另外的能量受体是可透过细胞的 NanoBRET™ 荧光示踪剂，可与 NanoLuc® E3 连接酶融合蛋白结合。示踪剂与 E3 连接酶融合蛋白中的 NanoLuc® 极其接近，从而产生 NanoBRET™ 信号。向与 E3 连接酶结合的细胞中添加化合物会导致 NanoBRET™ 信号的剂量依赖性的降低。此数据使定量降解剂化合物对靶标 E3 连接酶蛋白的细胞内亲和力得以实现。

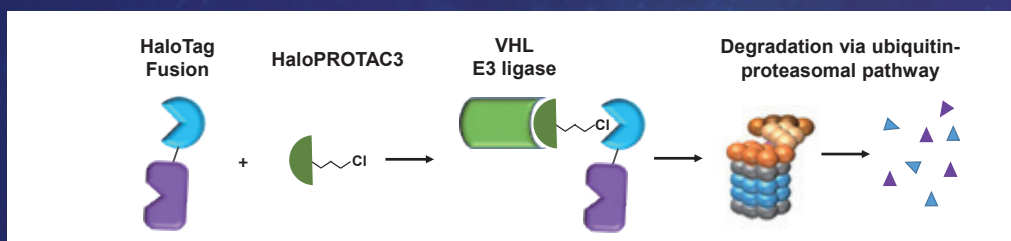
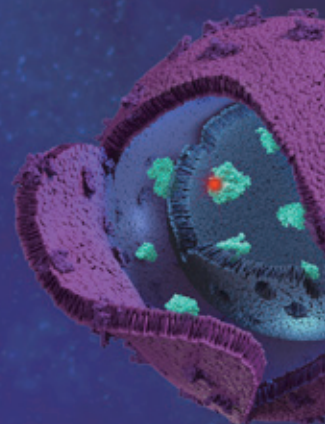


» NanoBRET™ TE E3 Ligase Vectors

目录号	产品	规格	应用
N2741	NanoLuc®-CRBN Fusion Vector	20µg	表达与 E3 连接酶 CRBN 蛋白融合的 NanoLuc® 荧光素酶
N2751	VHL-NanoLuc® Fusion Vector	20µg	表达与 E3 连接酶 VHL 蛋白融合的 NanoLuc® 荧光素酶
N2761	DDB1 Expression Vector	3 x 20µg	表达 DDB1 蛋白

蛋白降解与 HaloPROTAC 研究

与基因敲除或蛋白突变相比，细胞内蛋白质的短暂降解通常会引起一种完全不同的表型。HaloPROTAC-3 是 HaloTag[®] 配基与 PROTAC 的融合小分子，是了解和表征蛋白质降解表型的一种快速高效的方法。HaloPROTAC-3 将内源性 VHL E3 连接酶组分引入 HaloTag[®] 融合蛋白，通过蛋白酶体途径实现泛素化降解。HaloPROTAC 包含一个诱导降解的胺基，通过可变长度的连接物与氯烷基基结合。

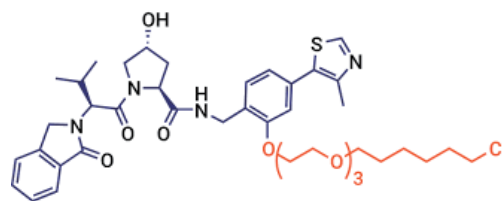


HaloPROTAC 功能原理示意图

应用

- 内源性蛋白的表型分析
- 可帮助确定对 PROTAC 开发很重要的靶标
- 研究活体内 *in vivo* (例如: 小鼠) 蛋白降解
- 在无需开发 PROTAC 的情况下实现蛋白降解
- 降解细胞生长或生存中所必需的蛋白质
- 控制蛋白降解过程中的蛋白水平和时间范围
- 可与 HiBiT 发光检测技术配套使用

- ◆ 无需抗体即可检测蛋白降解
- ◆ 在活细胞中进行降解动力学实验



HaloPROTAC3

HaloPROTAC-3 结构图

优势

- 控制蛋白降解程度 (蛋白水平和时间范围)
- 如果在基因组水平上敲除，可研究那些致命的必需蛋白质的缺失
- 蛋白回收的可能性 / 可逆性
- 模拟 PROTAC 表型
- 无需结合配基即可研究蛋白降解

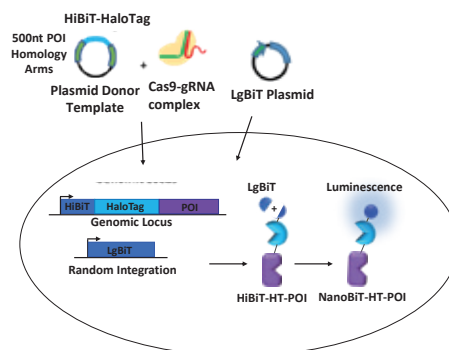
NanoBRET™ TE E3 Ligase Vectors

目录号	产品	规格	应用
GA3110	HaloPROTAC3, 2.5mM	20 µl	了解和表征蛋白质降解表型
GA4110	ent-HaloPROTAC3, 2.5mM	20 µl	用于确定 HaloTag [®] 融合蛋白降解是通过 VHL 结合和 PROTAC 机制介导

用 CRISPR 技术导入 HaloTag 和 HiBiT

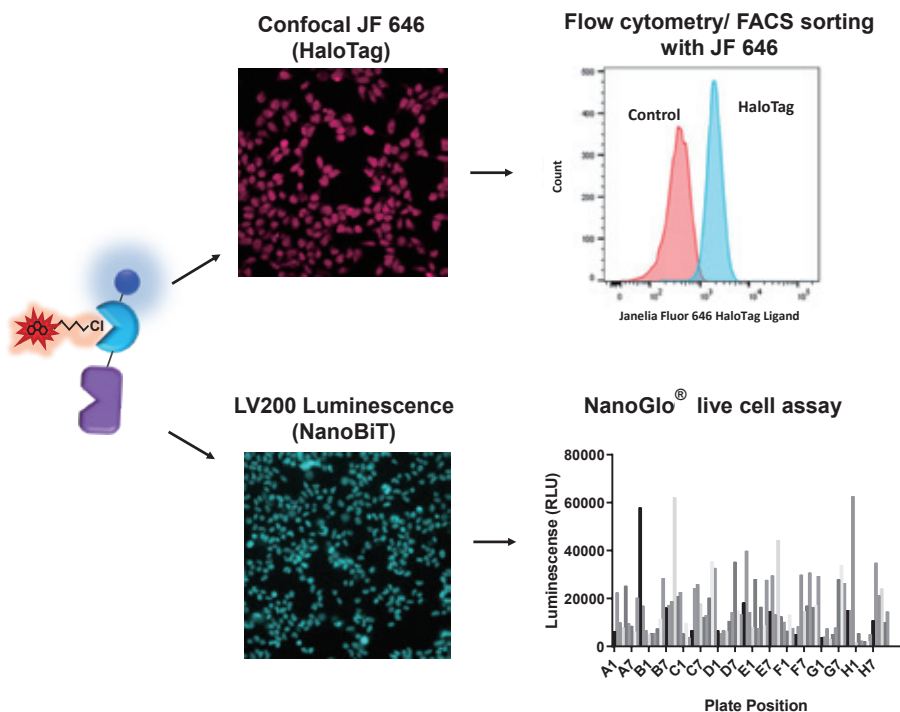
用 CRISPR 技术导入 HaloTag 和 / 或 HiBiT 的流程

- ◆ 利用供体载体（包含针对目标蛋白 (POI) 的 500 个核苷酸同源臂）将 HaloTag[®] (HT) 和 HiBiT 插入基因组位点
- ◆ Cas9/gRNA complex 指导对基因组位点的切割
- ◆ 可利用 LgBiT 质粒创建 LgBiT 稳定细胞株
- ◆ LgBiT 与 HiBiT 互补，生成具有明亮发光信号的功能性的酶 (NanoBiT[®])



筛选及验证内源性标记的目标蛋白

HiBiT-HaloTag-BRD4 HEK293 LgBiT stable cells

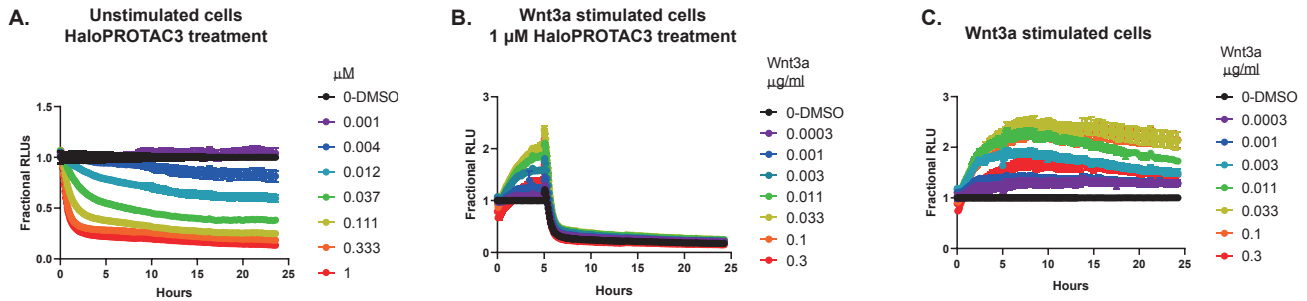


- ◆ Janelia Fluor[®] HaloTag[®] ligands (JF 646) 可用于活细胞成像和流式细胞仪分选以挑选出那些通过 CRISPR 导入 HaloTag[®] 的细胞
- ◆ 将 HaloTag 和 HiBiT/LgBiT 结合可进行细胞成像以及活细胞检测，以便在流式细胞仪分选后鉴定阳性克隆

HaloPROTAC3 技术应用举例

——降解动力学研究

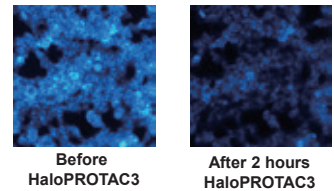
» Wnt3a 刺激前后 β -catenin 的降解动力学



β -catenin-HaloTag-HiBiT HEK293 LgBiT stable cells

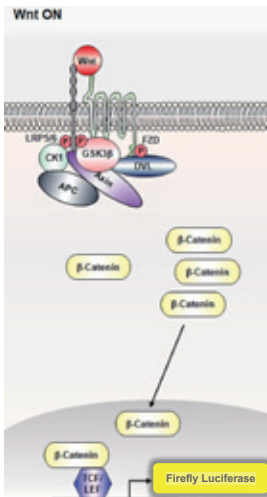
- ◆ 图 A 和 B: 在 Wnt3a 刺激前后, 用 HaloPROTAC3 处理细胞后 HaloTag-HiBiT 内源性标记的 β -catenin 发生有效降解
- ◆ 图 C: Wnt3a 刺激后, 活细胞中的 β -catenin-HT-HiBiT 水平升高
- ◆ 图 D: 在用 HaloPROTAC3 处理后, 使用 LV200 成像系统观察 β -catenin-HT-HiBiT 的丢失

D. NanoBiT imaging Unstimulated cells



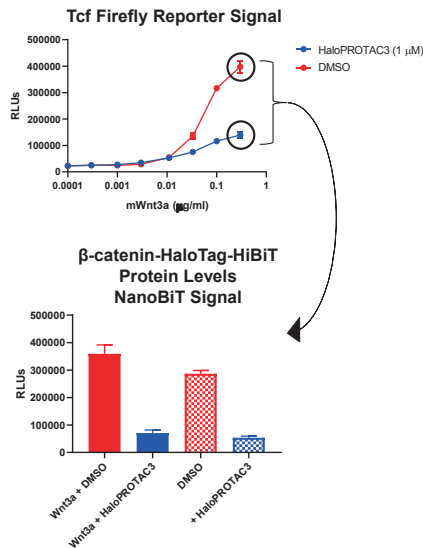
» 在有 β -catenin 降解存在时监测 Wnt3a 信号转导

β -catenin and Wnt3a signaling pathway



Tcf Reporter Assay

β -catenin-HaloTag-HiBiT HEK293 LgBiT stable cells + Tcf Reporter



- ◆ 使用双报告基因系统与 Tcf 萤火虫报告基因检测到, 用 HaloTag-HiBiT 内源性标记的 β -catenin 对 Wnt3a 刺激产生预期响应
- ◆ 在 Wnt3a 存在时观察到 β -catenin 的降解, 及对刺激的响应减弱
- ◆ HaloPROTAC3 是一种用于研究降解表型和功能的优良化合物

» 应用文献

- George M Burslem, Craig M Crews. Proteolysis-Targeting Chimeras as Therapeutics and Tools for Biological Discovery. *Cell*, 2020.
- Soumik BasuRay, Yang Wang, Eriks Smagris, et al. Accumulation of PNPLA3 on lipid droplets is the basis of associated hepatic steatosis. *PNAS*, 2019.

Lumit™ 免疫检测技术

Immunoassays

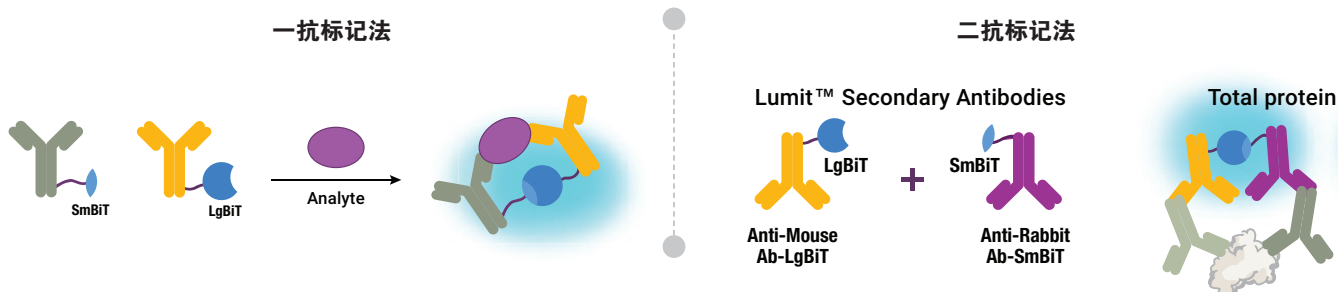
» 什么是免疫检测?

对单个蛋白质进行检测和定量是蛋白质组学研究的基本方面之一。40 年来，诸如 Western blot，定量酶联免疫吸附检测 (ELISA) 一类的基于免疫学的方法已成为蛋白质检测的标准方法。阐释 ELISA 数据时面临的主要挑战是背景信号与检测的可变性，以及洗板过程带来的操作复杂性和误差。这些方法既费时而且产生的结果可变性又高。而 Lumit™ Immunoassays (Lumit™ 免疫检测系统) 可在培养的细胞中直接进行发光检测，检测的动态范围宽，最短可在 30 分钟内即可完成。

» Lumit™ 检测原理

Lumit™ 免疫检测系统是基于 NanoLuc® Binary Technology (NanoBiT®)。在 Lumit™ 免疫检测系统中，抗体分别用 NanoLuc® 萤光素酶的大小亚基 (称为 LgBiT 和 SmBiT) 进行化学标记。在分析物存在的情况下，两种抗体非常接近，从而使 SmBiT 和 LgBiT 形成有活性的酶并产生明亮的发光信号。

抗体标记法可以分为一抗标记法和二抗标记法。随着应用不同，标记方法也所有不同，也可标记抗原蛋白，如新冠病毒抗体检测试剂盒。



» Lumit™ 技术优势

与常规的免疫检测方法 (如 ELISA) 相比，Lumit™ 免疫检测方法具有以下优势：

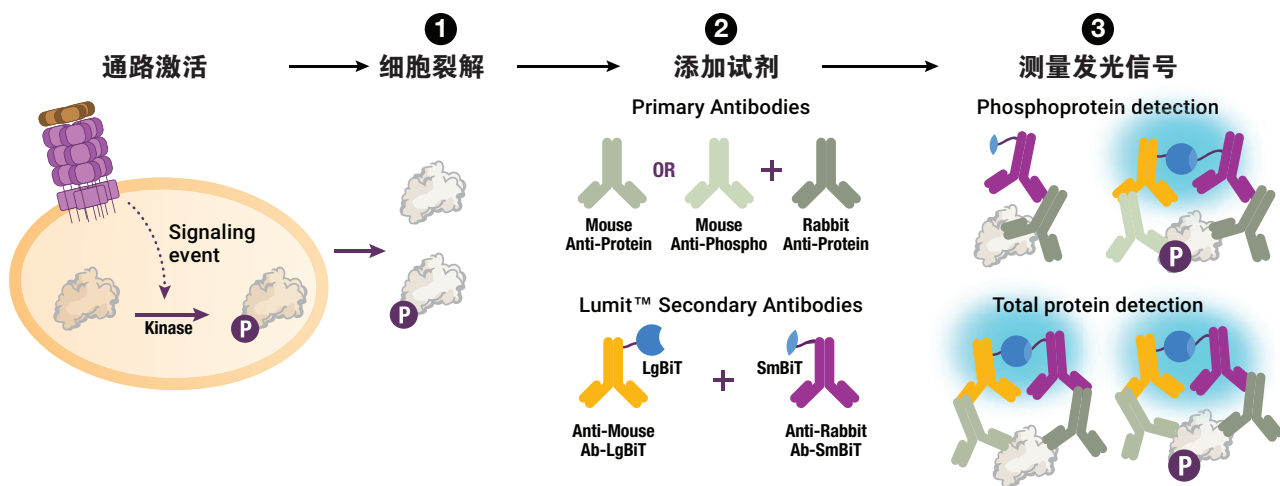
- 简单的“添加 - 混合 - 读数”模式：使用标准的发光检测仪，只需 30-90 分钟即可完成。
- 直接进行分析物测定：可在细胞培养板中或从细胞孔里移出的培养基中检测发光信号。
- 动态范围宽：减少样品稀释的需要。

» 目前的 Lumit™ 产品分类

<p>细胞因子检测</p> <p>多种即用型细胞因子检测试剂盒可选。如：人 IL-1β, IL-2, IL4, IL-6, LI-10, IFN-γ, TNF-α。</p>	<p>能量代谢靶标研究</p> <p>胰岛素 (Insulin) 和胰高血糖素 (Glucagon) 即用型检测。</p>	<p>蛋白质磷酸化 / 通路分析</p> <p>提供信号通路相关靶标检测方案。如 AKT, 4E-BP1, β-catenin, BTK, c-Jun, CREB。</p>	<p>Biologics 相关检测</p> <p>FcRn 即用型检测试剂盒。</p>	<p>病毒相关检测</p> <p>新冠病毒抗体血清学检测试剂盒。</p>	<p>自行建立检测系统</p> <p>Promega 提供抗体标记和检测系统，您可根据自己实验需求建立专属检测系统。</p>
--	--	--	--	---	---

» Lumit™ 操作流程示意图

由于检测靶标不同，检测方法设计不同，其检测反应过程会略有不同，但是基本流程即为加入 - 孵育 - 检测的过程，无需洗涤步骤，以二抗标记法的信号通路相关靶标检测为例。



如需了解更多 Lumit 相关信息请扫描下方二维码。

www.promega.com/products/immunoassay-elisa/lumit-immunoassays



www.promega.com/resources/technologies/nanoluc-luciferase-enzyme/



关注 Promega 微信公众号



价格查询



中文说明书



实验工具



技术资料



市场活动



经销商信息

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司

Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd

地址: 北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909

电话: 010-58256268

网址: www.promega.com

技术支持电话: 400 810 8133(手机拨打)

技术支持邮箱: chinatechserv@promega.com

印刷时间: 2021.2