



# Lumit™ Immunoassay Cellular System 应用说明

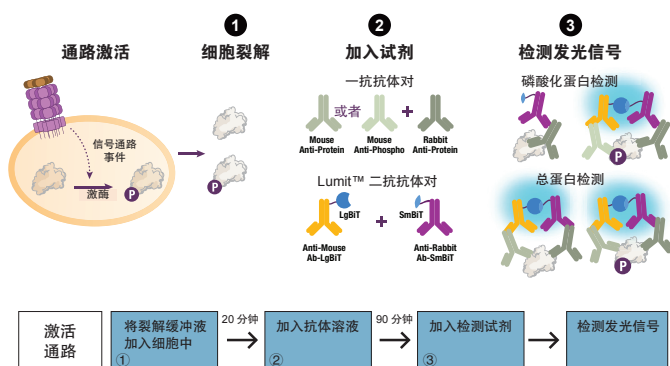
## 细胞通路分析系列

### 总 STAT1 与磷酸化 STAT1 ( Ser 727 )

#### Lumit™ 免疫检测细胞系统：

Lumit™ 免疫检测细胞系统是一种均质的生物发光检测方法，可与适当的一抗抗体对配合用于测定细胞裂解物中靶蛋白的水平 ( 1 )。该系统整合了免疫检测技术和 NanoBiT® 技术 ( 2 )。在 Lumit™ 免疫检测细胞系统中，NanoBiT® 亚基 ( SmBiT 和 LgBiT ) 分别与一对针对不同种属 ( 抗兔、抗小鼠或抗山羊 ) 的二抗相偶联。使用与 Lumit™ 兼容的裂解液在多孔板中裂解接种的细胞，并通过加入含有两个抗靶蛋白的一抗以及 Lumit™ 二抗抗体的混合物，检测靶蛋白。一抗 / Lumit™ 二抗复合物与其对应表位的结合，使得 NanoBiT® 亚基相互靠近而形成可产生发光的有活性的 NanoLuc® 萤光素酶，测得的发光信号与靶蛋白量成正比 ( 图 1 )。

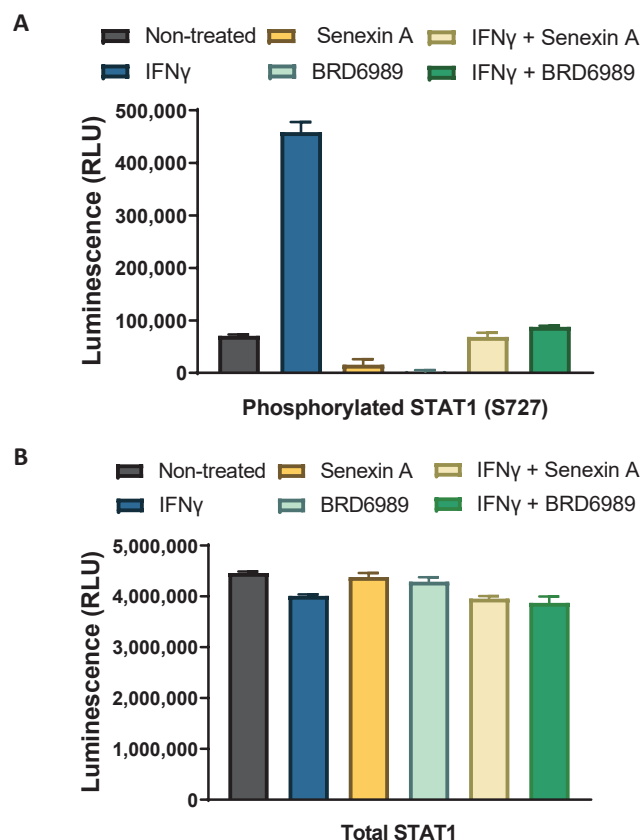
1. Hwang, B. et al. (2020) A homogeneous bioluminescent immunoassay approach to probe cellular signaling pathway regulation. Commun Biol 3, 8. doi:10.1038/s42003-019-0723-9.
2. Dixon, A. S. et al. (2016) NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells. ACS Chem Biol 11, 400-408.



**图 1. Lumit™ 细胞免疫检测图示。** 当一抗抗体对含有磷酸化特异性抗体时，发光信号反映靶蛋白磷酸化水平 ( 上部图示 )。检测总蛋白水平时，除两种一抗均识别靶蛋白上的非磷酸化表位外，其余则应用了相同原理 ( 下部图示 )。产生的发光信号用发光检测仪测定。

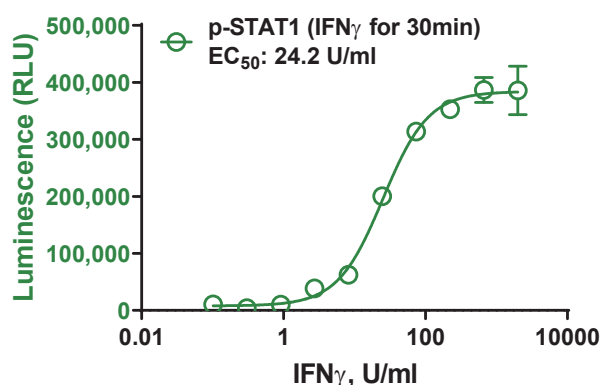
#### 总 STAT1 与磷酸化 STAT1 ( Ser 727 ) 免疫检测：

用 IFN $\gamma$  激活 JAK/STAT1 通路后，STAT1 被磷酸化 ( 图 2 )。细胞膜裂解后，可将 Lumit™ Immunoassay Cellular System - Set 1 中的试剂与表 1 中列出的抗 STAT1 抗体联合使用来检测总 STAT1 与磷酸化 STAT1 ( Ser 727 )。

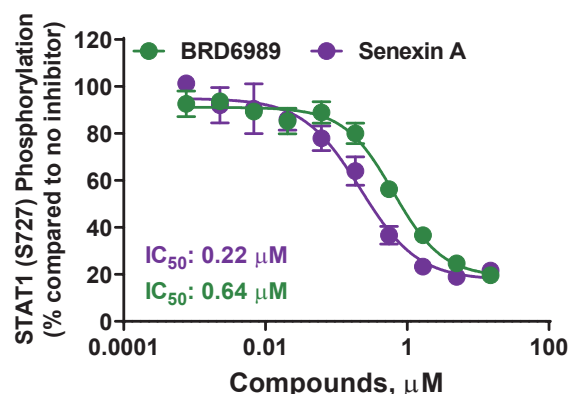


**图 2. 用 Lumit™ Immunoassay Cellular System - Set 1 检测总 STAT1 与磷酸化 STAT1。** 将 50,000 个接种的 HepG2 细胞饥饿过夜。然后，对细胞不予处理，或使用 CDK8 抑制剂进行预处理 ( 10 $\mu$ M, 1 小时 )，之后使用 IFN $\gamma$  ( 1000U/ml ) 处理 30 分钟 ( 或不处理 )。使用表 1 中列出的一抗的实验条件，并按照 Promega 技术手册 TM613 测定总 STAT1 ( 图 B ) 与磷酸化 STAT1 ( 图 A ) 水平。

### A 用 IFN $\gamma$ 激活 STAT1 磷酸化



### B 用 CDK8 抑制剂抑制 STAT1 磷酸化



**图 3. JAK/STAT1 通路的激活与失活。** (A) 将 50,000 个接种的 HepG2 细胞饥饿过夜。之后, 对细胞不予处理, 或使用不同浓度的 IFN $\gamma$  处理 30 分钟, 然后使用 Lumit™ Immunoassay Cellular System - Set 1 检测磷酸化 STAT1, 确定 IFN $\gamma$  EC<sub>50</sub>。 (B) 饥饿处理后, 将 50,000 个接种的 HepG2 细胞用不同浓度的 CDK8 抑制剂预处理 1 小时, 之后用 IFN $\gamma$  处理 (50U/ml, 30 分钟), 然后使用 Lumit™ Immunoassay Cellular System - Set 1 检测磷酸化 STAT1, 确定抑制剂的效价强度 (IC<sub>50</sub>)。

### Lumit™ 免疫检测细胞系统简要操作步骤

1. 向 40 $\mu$ L 细胞中加入 10 $\mu$ L 裂解液。
2. 振荡孵育 20 分钟。
3. 加入 50 $\mu$ L 抗体混合物。
4. 孵育 60~90 分钟。
5. 加入 25 $\mu$ L Lumit™ 检测试剂。
6. 振荡孔板 2 分钟。
7. 读取发光信号。

本操作步骤为快速操作参考步骤。关于细胞和试剂制备以及操作步骤的详细信息, 请参见 Lumit™ Immunoassay Cellular System 技术手册 TM613, 网址: [www.promega.com/protocols](http://www.promega.com/protocols)。

**表 1.**

| 抗体 *        | 靶点     | 供应商                       | 目录号      | 工作储备液 ( $\mu$ g/mL ) |
|-------------|--------|---------------------------|----------|----------------------|
| p-STAT1 (兔) | Ser727 | Abcam                     | ab109461 | 50                   |
| STAT1 (小鼠)  | 全部     | R&D Systems               | MAB14901 | 50                   |
| STAT1 (兔)   | 全部     | Cell Signaling Technology | 14994    | 50                   |

\* 其它供应商提供的抗体亦可。抗体可能需要按照普洛麦格技术手册 TM613 进行优化

### 订购信息:

| 产品                                         | 规格       | Promega 目录号 |
|--------------------------------------------|----------|-------------|
| Lumit™ Immunoassay Cellular System - Set 1 | 100 次    | W1201       |
|                                            | 1,000 次  | W1202       |
|                                            | 10,000 次 | W1203       |