



Lumit™ Immunoassay Cellular System 应用说明

细胞通路分析系列

总 p65 与磷酸化 p65 (Ser 536)

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.

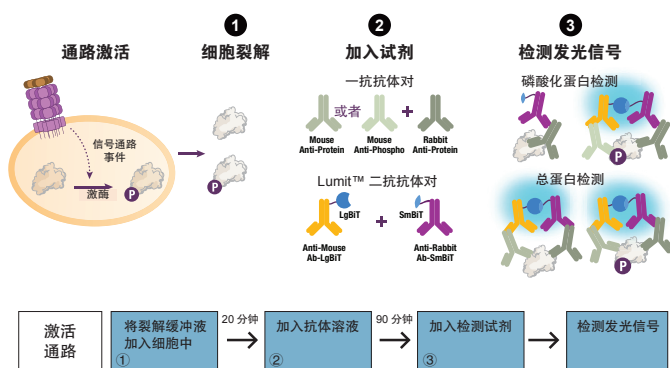


图 1. Lumit™ 细胞免疫检测图示。当一抗抗体对含有磷酸化特异性抗体时，发光信号反映靶蛋白磷酸化水平 (上部图示)。检测总蛋白水平时，除两种一抗均识别靶蛋白上的非磷酸化表位外，其余则应用了相同原理 (下部图示)。产生的发光信号用发光检测仪测定。

总 p65 与磷酸化 p65 (Ser 536) 免疫检测:

用 TNFα 激活 NF-κB 通路后，p65 发生磷酸化 (图 2)。细胞膜裂解后，将 Lumit™ Immunoassay Cellular System-Set 2 中的试剂与表 1 中列出的抗 p65 抗体联合使用检测总 p65 与磷酸化 p65 (Ser 536) 水平。

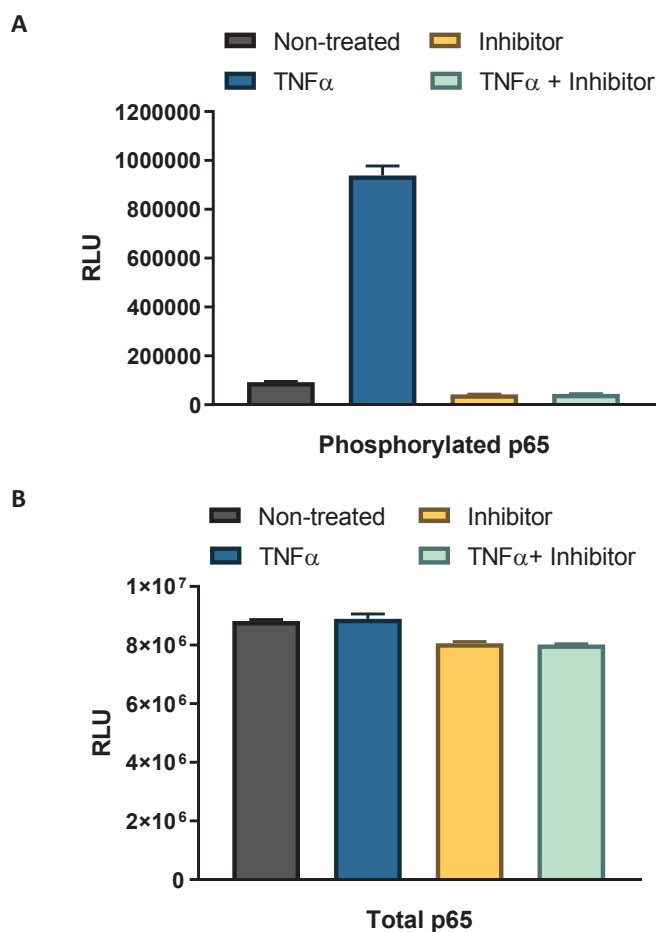
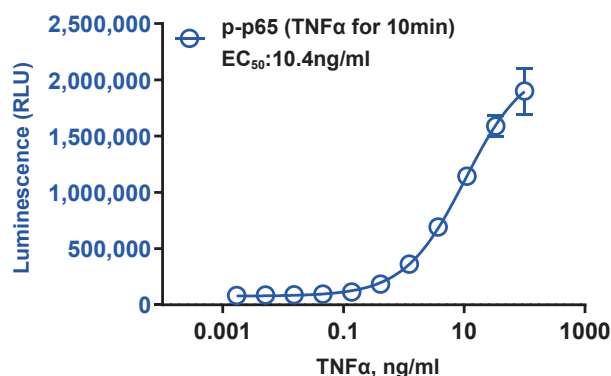


图 2. 用 Lumit™ Immunoassay Cellular System-Set 2 检测总 p65 与磷酸化 p65。对 50,000 个接种的 MCF-7 细胞不予处理，或使用 IKK16 化合物进行预处理 (10μM, 1 小时) 后再使用 TNFα (20ng/ml) 处理 10 分钟 (或不处理)。按照 Promega 技术手册 TM613，并在表 1 列出的一抗的实验条件下测定总 p65 与磷酸化 p65 水平。

A 用 TNFα 激活 p65 磷酸化



B 用 IKK16 抑制 p65 磷酸化

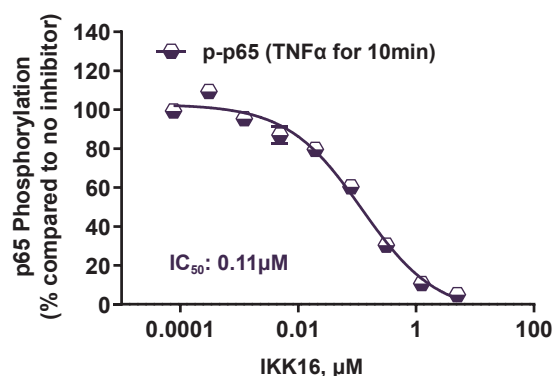


图 3. NF-κB 通路的激活与失活。 (A) 对 50,000 个接种的 MCF-7 细胞不予处理, 或使用不同浓度的 TNFα 处理 10 分钟后, 再使用 Lumit™ Immunoassay Cellular System-Set 2 测定磷酸化 p65 水平, 确定 TNFα 的 EC₅₀。 (B) 将 50,000 个接种的 MCF-7 细胞使用不同浓度的 IKK16 预处理 1 小时, 之后用 TNFα 进行处理 (20ng/ml, 10 分钟), 然后使用 Lumit™ Immunoassay Cellular System-Set 2 测定磷酸化 p65 水平, 确定抑制剂的效价强度 (IC₅₀)。

Lumit™ Immunoassay Cellular System 简要操作步骤

1. 向 40μL 细胞中加入 10μL 裂解液。
2. 振荡孵育 20 分钟。
3. 加入 50μL 抗体混合物。
4. 孵育 60~90 分钟。
5. 加入 25μL 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。如想获取更多有关细胞和试剂制备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。

表 1.

抗体 *	靶点	供应商	目录号	工作储备液 (μg/mL)
p-p65 (小鼠)	Ser536	Cell Signaling Technology	13346	50
p65 (兔)	全部	Cell Signaling Technology	8242	50
p65 (小鼠)	全部	Cell Signaling Technology	6956	50

* 亦可使用其它供应商提供的抗体。抗体可能需要按照普洛麦格技术手册 TM613 要求进行优化处理。

订购信息:

产品	规格	Promega 目录号
Lumit™ Immunoassay Cellular System-Set 2	100 次	W1331
	1000 次	W1332
	10000 次	W1333