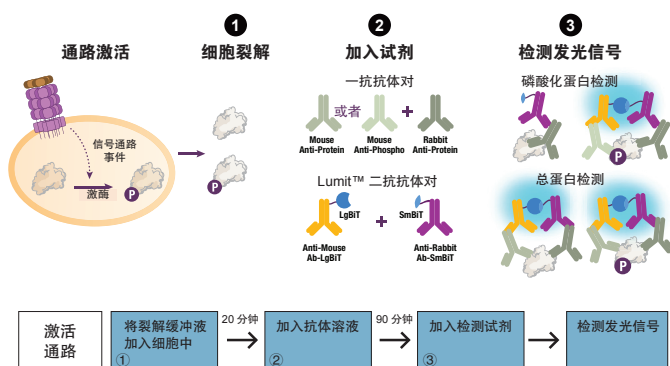


### 总 $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin ) 与磷酸化 $\beta$ -连环蛋白 ( Thr 41/Ser 45 )

#### 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 )。

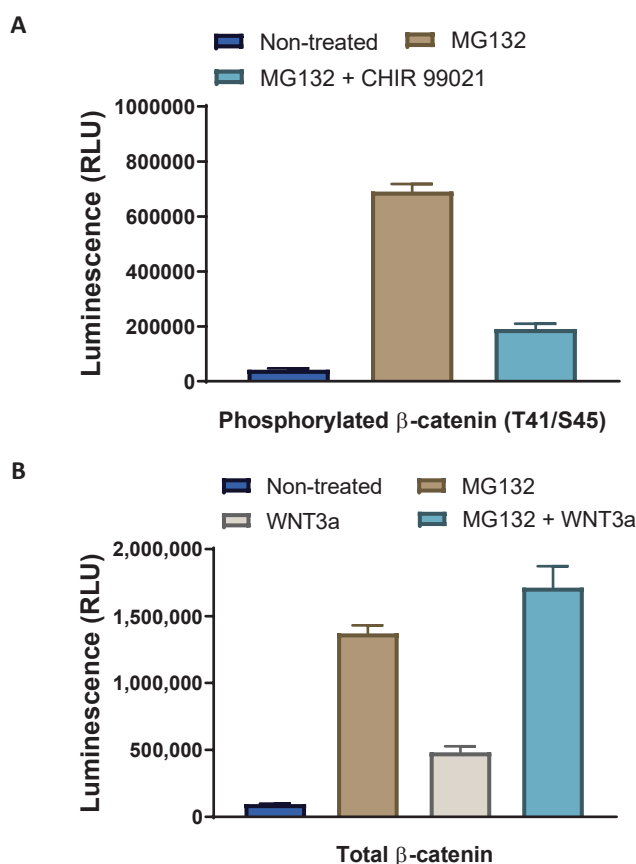
1. Hwang, B. et al. (2020) A homogeneous bioluminescent immunoassay approach to probe cellular signaling pathway regulation. Commun Biol 3, 8. doi:10.1038/s42003-019-0723-9.
2. Dixon, A. S. et al. (2016) NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells.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

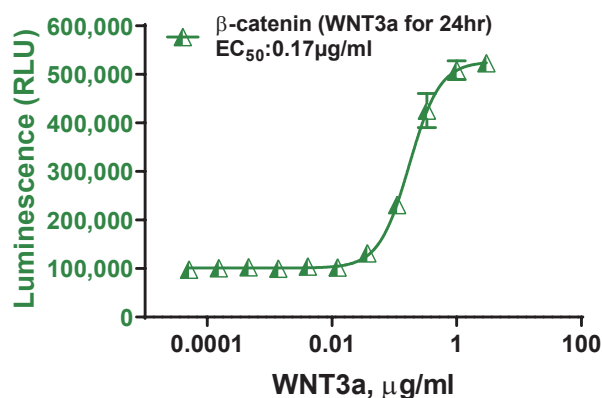
#### 总 $\beta$ -连环蛋白与磷酸化 $\beta$ -连环蛋白 ( Thr 41/Ser 45 ) 免疫检测:

在没有 Wnt 配体的情况下,  $\beta$ -连环蛋白发生磷酸化, 并进入蛋白酶体降解, 而使用 Wnt 配体激活 WNT 信号转导后,  $\beta$ -连环蛋白稳定下来 ( 图 2 ) 并转移至细胞核。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  $\beta$ -连环蛋白抗体联合使用检测总  $\beta$ -连环蛋白与磷酸化  $\beta$ -连环蛋白 ( Thr 41/Ser 45 )。

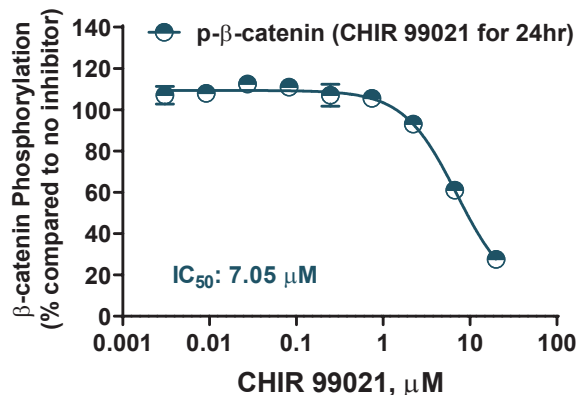


**图 2. 用 Lumit™ Immunoassay Cellular System-Set 2 检测总  $\beta$ -连环蛋白与磷酸化  $\beta$ -连环蛋白。**对 50,000 个接种的 HEK293 细胞不予处理, 或使用不同化合物对其进行处理 ( 0.5 $\mu$ g/ml WNT3a, 20 $\mu$ M CHIR99021 和 / 或 20 $\mu$ M MG132, 处理 24 小时 )。按照 Promega 技术手册 TM613, 并在表 1 列出的一抗的实验条件下测定总  $\beta$ -连环蛋白与磷酸化  $\beta$ -连环蛋白水平。

### A 使用 WNT3a 激活 $\beta$ - 连环蛋白累积



### B 使用 GSK3- $\beta$ 抑制剂抑制 $\beta$ - 连环蛋白磷酸化



**图 3. Wnt/ $\beta$ - 连环蛋白通路的激活与失活。** (A) 对 50,000 个接种的 HEK293 细胞不予处理, 或使用不同浓度的 WNT3a 对其处理 24 小时, 然后使用 Lumit™ Immunoassay Cellular System-Set 2 测定总  $\beta$ - 连环蛋白, 确定 WNT3a 的 EC<sub>50</sub>。 (B) 在 20  $\mu$ M MG132 存在的情况下, 将 50,000 个接种的 HEK293 细胞使用不同浓度的 GSK3- $\beta$  抑制剂 CHIR99021 处理 24 小时, 然后使用 Lumit™ Immunoassay Cellular System-Set 2 测定磷酸化  $\beta$ - 连环蛋白, 确定抑制剂效价强度 (IC<sub>50</sub>)。

## Lumit™ Immunoassay Cellular System 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。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](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- $\beta$ - 连环蛋白 ( 兔 ) | Thr 41/Ser 45 | Thermo Fisher Scientific | 702969   | 50                   |
| $\beta$ - 连环蛋白 ( 小鼠 )   | 全部            | R&D Systems              | MAB13292 | 50                   |
| $\beta$ - 连环蛋白 ( 兔 )    | 全部            | Abcam                    | ab196204 | 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       |