



Lumit™ 免疫检测细胞系统应用说明

细胞通路分析系列

磷酸化 4E-BP1 (Ser 65)

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.

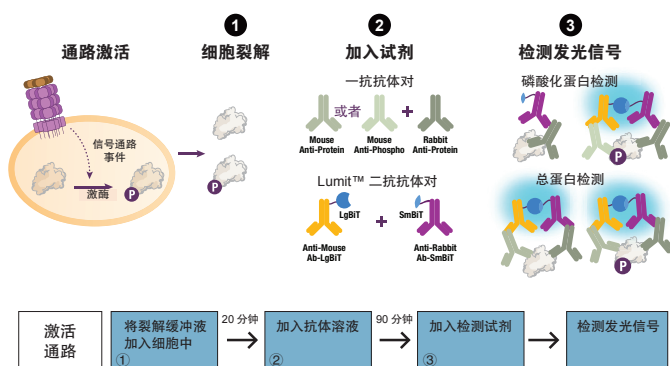


图 1. Lumit™ 细胞免疫检测图示。当一抗抗体对含有磷酸化特异性抗体时，发光信号反映靶蛋白磷酸化水平（上部图示）。检测总蛋白水平时，除两种一抗均识别靶蛋白上的非磷酸化表位外，其余则应用了相同原理（下部图示）。产生的发光信号用发光检测仪测定。

磷酸化 4E-BP1 (Ser 65) 免疫检测：

用 Insulin (胰岛素) 激活 mTOR 通路后，4E-BP1 被磷酸化 (图 2)。细胞膜裂解后，可使用 Lumit™ Immunoassay Cellular System – Set 2 中的试剂与表 1 中列出的抗 4E-BP1 抗体，检测磷酸化 4E-BP1 (Ser 65)。

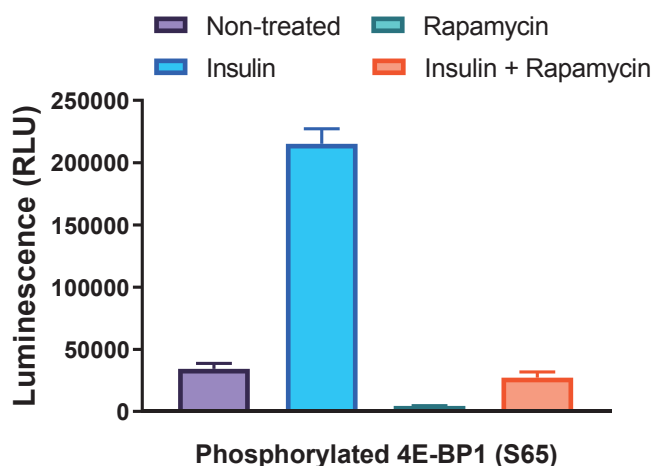
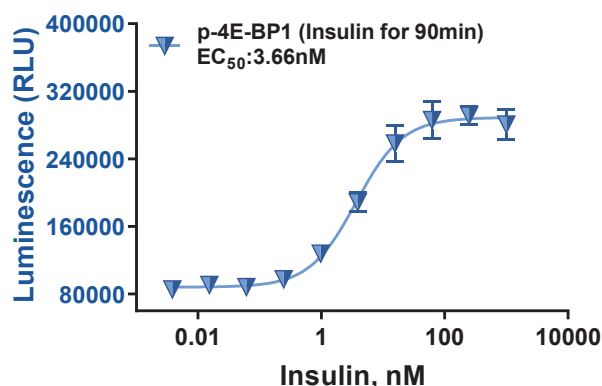


图 2. 用 Lumit™ Immunoassay Cellular System – Set 2 检测磷酸化 4E-BP1。将 50,000 个接种的 MCF-7 细胞饥饿过夜。细胞不予处理，或使用 Rapamycin (雷帕霉素) 化合物进行预处理 (10nM, 1 小时)，之后使用胰岛素 (0.1μM) 处理 90 分钟 (或不处理)。使用表 1 中列出的一抗的实验条件，并按照 Promega 技术手册 TM613 测定磷酸化 4E-BP1 水平。

A 用胰岛素激活 4E-BP1 磷酸化



B 用雷帕霉素抑制 4E-BP1 磷酸化

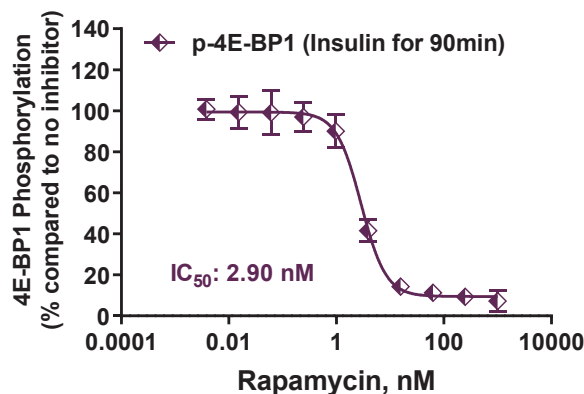


图 3. mTOR 通路的激活与失活。 (A) 将 50,000 个接种的 MCF-7 细胞饥饿过夜。细胞不予处理, 或使用不同浓度胰岛素处理 90 分钟, 然后使用 Lumit™ Immunoassay Cellular System – Set 2 检测磷酸化 4E-BP1, 确定胰岛素 EC₅₀。 (B) 饥饿处理后, 将 50,000 个接种的 MCF-7 细胞用不同浓度雷帕霉素预处理 1 小时, 之后用胰岛素处理 (0.1 μM, 90 分钟), 然后使用 Lumit™ Immunoassay Cellular System – Set 2 检测磷酸化 4E-BP1, 确定抑制剂的效价强度 (IC₅₀)。

Lumit™ 免疫测定细胞系统简要操作步骤

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

本操作步骤为快速参考步骤。关于细胞和试剂制备的更多详情, 以及详细操作步骤, 参见 Lumit™ 免疫测定细胞系统技术手册 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-4E-BP1 (小鼠)	Ser65	Thermo Fisher Scientific	MA5-31843	50
4E-BP1 (兔)	全部	Cell Signaling Technology	9644	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 2	100 次检测	W1331
	1,000 次检测	W1332
	10,000 次检测	W1333