

中文说明书

NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay

适用产品目录号：
N8010、N8012 和 N8013



NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay

所有技术文献的英文原版均可在 www.promega.com/protocols 获得。请访问该网址以确定您使用的说明书是否为最新版本。
如果您在使用该试剂盒时有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。
电子邮箱：chinatechserv@promega.com

1. 产品描述.....	2
2. 产品组分和储存条件.....	6
3. 开始检测前.....	7
3.A. 关于 RAS 融合载体.....	7
3.B. LgBiT-RAS 和 SmBiT(q)-RAS 融合载体的扩增和制备.....	7
3.C. 仪器要求和设置.....	7
4. NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay 检测方案.....	8
4.A. 用户需提供的材料.....	9
4.B. 使用 NanoBiT® Fusion Vector 瞬时转染 HEK293 细胞（第 1 天）.....	10
4.C. 使用 NanoBRET™ Tracer RAS 制备细胞（第 2 天）.....	11
4.D. 加入待测化合物.....	13
4.E. NanoBRET™ Assay 检测方案.....	14
4.F. 计算 BRET 比值.....	15
5. KRAS (G12C) 对照品检测的代表性 BRET 数据.....	16
6. 不同 RAS 变体的化合物选择性分析.....	18
7. 疑难解答.....	20
8. 附录.....	25
8.A. 有关 NanoBRET™ Technology 和 NanoBiT® Luciferase Fusion Protein 的其他信息.....	25
8.B. 实现充分的检测板混合.....	25
8.C. NanoBRET™ Tracer RAS 的消光系数.....	25
8.D. 缓冲液和溶液组成.....	26
8.E. 参考文献.....	26
8.F. 相关产品.....	27

1. 产品描述

NanoBRET™ Target Engagement (TE) Assays 可测量完整细胞内化合物与选定靶蛋白的结合情况，并已成功应用于多个靶蛋白类别的研究 (1)。在本文中，我们对 NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay^(a-g) 进行了描述，该检测系统可测量化合物与两种主要 RAS 家族 GTP 酶 (KRAS 和 HRAS) 的结合情况。

RAS 蛋白是小 GTP 酶，可作为生物分子开关调节细胞内的多种活动，包括细胞增殖和存活。RAS 蛋白在人类癌症中经常发生突变，因此成为药物开发的重要靶点。NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay 能够测量在影响靶标结合效力的细胞内因素存在条件下的化合物与选定 RAS 靶蛋白的结合情况。具体而言，该检测系统可定量待测化合物对活细胞内全长多聚体 RAS 蛋白的表观细胞内亲和力，并可用于研究许多 RAS 变体，如 KRAS、HRAS 和相关突变体。

NanoBRET™ TE Assays 可利用生物发光共振能量转移 (BRET) 定量检测与靶蛋白的结合，BRET 是发光供体和荧光受体之间的能量转移，仅当供体和受体非常靠近时才会发生。最初的 NanoBRET™ 靶标结合检测系统使用与靶蛋白融合的完整 NanoLuc® 萤光素酶作为能量供体，而 NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay 使用 NanoLuc® Binary Technology (NanoBiT®)，该检测技术是一种由大萤光素酶亚基 (LgBiT) 和小互补肽 (SmBiT(q)) 组成的结构互补系统。这种互补方法的独特之处在于，可以评估 RAS 蛋白在多聚体复合物中的靶标结合。具体而言，LgBiT 和全长 RAS 的融合蛋白与 SmBiT(q) 和全长 RAS 的融合蛋白在细胞中共表达。当 RAS 蛋白相互作用并形成多聚体时，LgBiT 和 SmBiT(q) 亚基结合形成活性萤光素酶，并在存在萤光素酶底物的情况下产生明亮的发光信号，作为 BRET 能量供体 (图 1)。能量受体是一种细胞渗透性荧光 NanoBRET™ 示踪剂，能与 RAS 特异性结合。当示踪剂与复合物内的 RAS 原聚体结合时，就会形成 BRET 报告基因复合物。当示踪剂和待测化合物竞争与 RAS 结合时，以 BRET 信号的损失作为未标记待测化合物的靶蛋白占据的测量结果。

NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay 中所用的 NanoBiT® 系统的独特之处在于使用 SmBiT (q) 肽，使得 NanoBiT® 萤光素酶对 Extracellular NanoLuc® Inhibitor 敏感。该抑制剂可淬灭受损细胞和细胞碎片产生的信号，确保 NanoBRET™ 信号源自活细胞。

NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay 可用于研究多种 RAS 变体，包括野生型 KRAS 和 HRAS 以及多种临床相关的 KRAS 和 HRAS 突变体。可与本检测系统配合使用的融合载体列表参见表 1，载体和检测试剂的完整列表参见第 8.F 节“相关产品”。本检测系统可以检测开关 I/II 口袋抑制剂和开关 II 口袋抑制剂的结合情况。KRAS (Y96D) 突变体的融合载体可用于评估待测化合物对开关 II 口袋抑制剂常见耐药突变的敏感性。

此外，对于所有 RAS 变体使用单一浓度的 NanoBRET™ Tracer RAS，提供了一种简单的工作流程，以描述待测化合物对特定目标 RAS 变体的选择性。

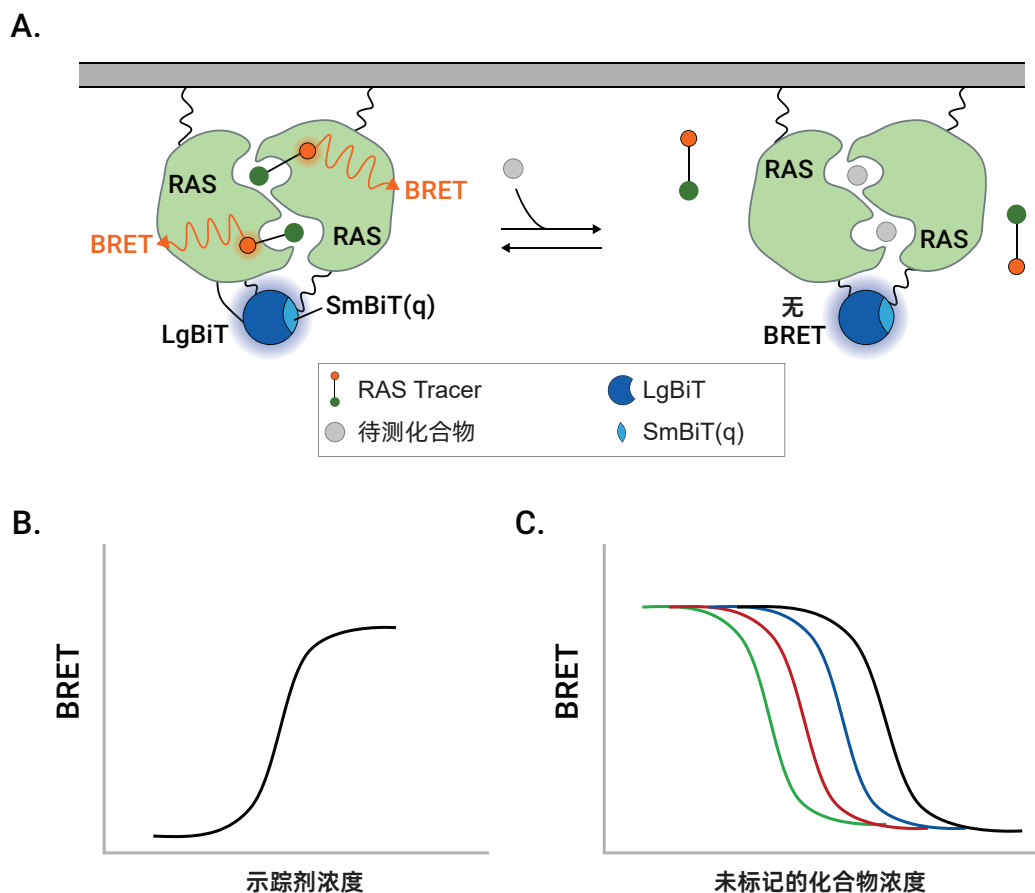


图 1.NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay 概述。图 A.LgBiT 和 SmBiT(q) 与全长 RAS 的融合蛋白在活细胞中共表达。这些融合蛋白的多聚化导致 SmBiT(q) 和 LgBiT 亚基的互补，以产生功能性 NanoBiT® 萤光素酶，在存在萤光素酶底物的情况下，该萤光素酶作为 BRET 的发光供体。细胞渗透性 NanoBRET™ Tracer RAS 与 RAS 多聚体可逆性地结合，并作为发光受体。LgBiT 和 SmBiT(q) 融合蛋白以及荧光示踪剂共同组成了用于 RAS 多聚体的靶标结合的 BRET 报告基因复合物。加入的细胞渗透性 RAS 配体会取代示踪剂，并导致 BRET 信号丢失呈剂量依赖性关系。**图 B.** 通过生成 NanoBRET™ 示踪剂的剂量反应曲线，确定每种 RAS 变体的示踪剂亲和力。所得曲线用于选择本检测方案的示踪剂浓度，该浓度处于亚饱和状态，且接近示踪剂的剂量反应曲线的 EC_{50} 值。**图 C.** 为了分析靶标结合和确定待测化合物的亲和力，在该固定示踪剂浓度存在下用不同浓度的待测化合物对细胞进行处理。随着与 RAS 结合的化合物浓度的增加，BRET 信号减弱。每种 RAS 检测（表 1）的代表性示踪剂的剂量反应曲线和化合物抑制曲线参见各自的应用手册（application note）（3）。

1. 产品描述 (续)

本说明书介绍了 NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay 所使用的非结合表面 (NBS) 模式。该检测模式在 NBS 检测板中使用新鲜收获细胞或悬浮细胞, 以获得示踪剂的最佳效果。NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay 的工作流程总结参见图 2。

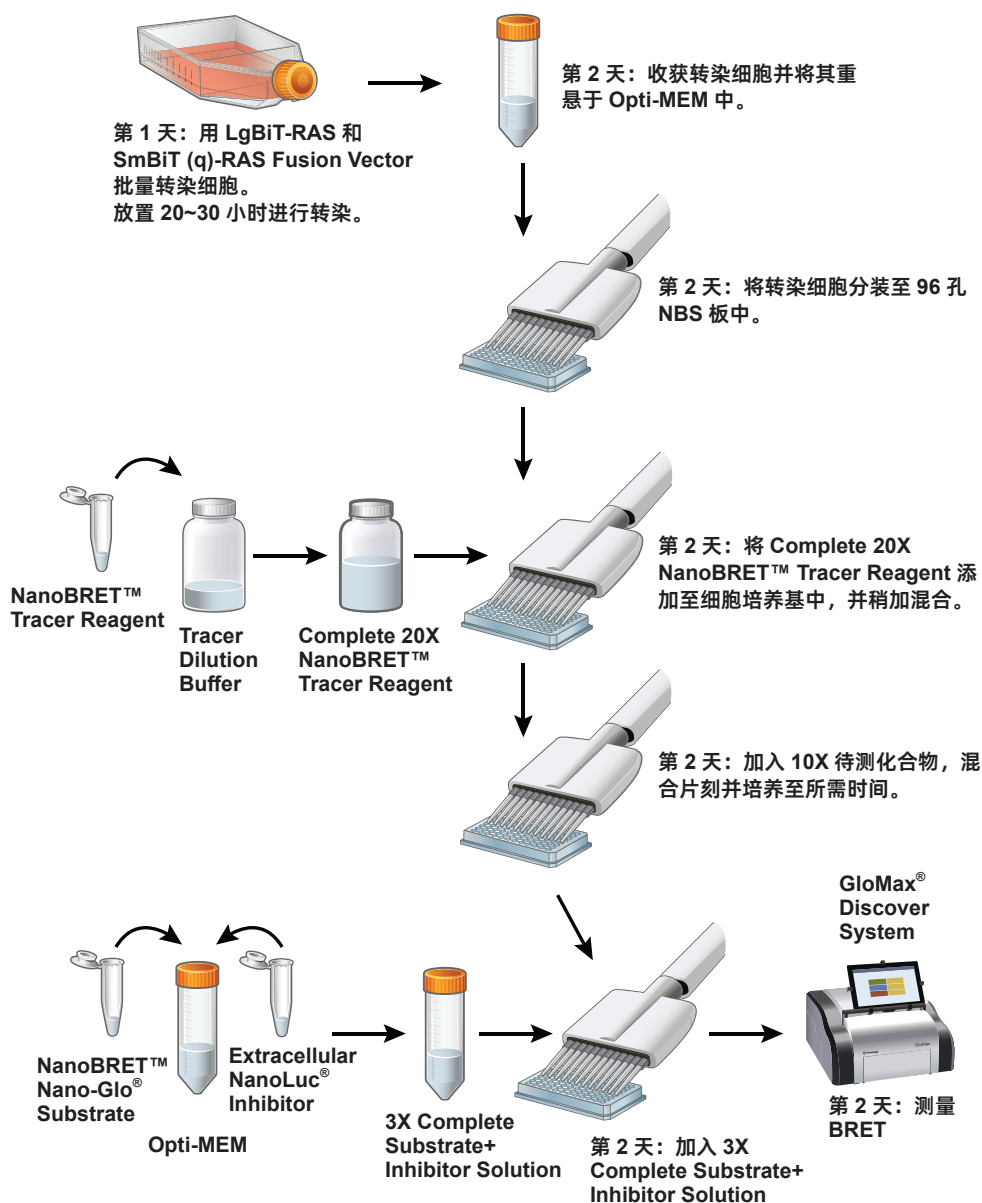


图 2. NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay 概述。 本检测必须在非结合表面 (NBS) 微孔板上进行, 检测模式如图所示。

表 1.KRAS 融合载体和相关检测靶标。

RAS 变体	融合载体	目录号
KRAS WT	LgBiT-KRAS WT Fusion Vector	NV4561
	SmBiT(q)-KRAS WT Fusion Vector	NV4571
KRAS(G12C)	LgBiT-KRAS(G12C) Fusion Vector	NV4581
	SmBiT(q)-KRAS(G12C) Fusion Vector	NV4591
KRAS(G12D)	LgBiT-KRAS(G12D) Fusion Vector	NV4601
	SmBiT(q)-KRAS(G12D) Fusion Vector	NV4611
KRAS(G12V)	LgBiT-KRAS(G12V) Fusion Vector	NV4621
	SmBiT(q)-KRAS(G12V) Fusion Vector	NV4631
KRAS(G12A)	LgBiT-KRAS(G12A) Fusion Vector	NV4641
	SmBiT(q)-KRAS(G12A) Fusion Vector	NV4651
KRAS(G12S)	LgBiT-KRAS(G12S) Fusion Vector	NV4661
	SmBiT(q)-KRAS(G12S) Fusion Vector	NV4671
KRAS(G12R)	LgBiT-KRAS(G12R) Fusion Vector	NV4681
	SmBiT(q)-KRAS(G12R) Fusion Vector	NV4691
KRAS(G13D)	LgBiT-KRAS(G13D) Fusion Vector	NV4701
	SmBiT(q)-KRAS(G13D) Fusion Vector	NV4711
KRAS(Q61H)	LgBiT-KRAS(Q61H) Fusion Vector	NV4721
	SmBiT(q)-KRAS(Q61H) Fusion Vector	NV4731
KRAS(Q61L)	LgBiT-KRAS(Q61L) Fusion Vector	NV4741
	SmBiT(q)-KRAS(Q61L) Fusion Vector	NV4751
KRAS(Q61R)	LgBiT-KRAS(Q61R) Fusion Vector	NV4761
	SmBiT(q)-KRAS(Q61R) Fusion Vector	NV4771
KRAS(Y96D)	LgBiT-KRAS(Y96D) Fusion Vector	NV4781
	SmBiT(q)-KRAS(Y96D) Fusion Vector	NV4791
HRAS WT	LgBiT-HRAS WT Fusion Vector	NV4801
	SmBiT(q)-HRAS WT Fusion Vector	NV4811
HRAS(G12C)	LgBiT-HRAS(G12C) Fusion Vector	NV4821
	SmBiT(q)-HRAS(G12C) Fusion Vector	NV4831
HRAS(G12V)	LgBiT-HRAS(G12V) Fusion Vector	NV4841
	SmBiT(q)-HRAS(G12V) Fusion Vector	NV4851

2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay	100 assays	N8010

使用 96 孔板时，试剂可进行 100 次检测。包括：

- 5µg LgBiT-KRAS(G12C) Fusion Vector
- 5µg SmBiT(q)-KRAS(G12C) Fusion Vector
- 50µl NanoBRET™ Tracer RAS
- 5ml Tracer Dilution Buffer
- 50µl NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate
- 17µl Extracellular NanoLuc® Inhibitor
- 20µg Transfection Carrier DNA

产品	规格	目录号
NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay	1000 assays	N8012

使用 96 孔板时，试剂可进行 1000 次检测。包括：

- 5µg LgBiT-KRAS(G12C) Fusion Vector
- 5µg SmBiT(q)-KRAS(G12C) Fusion Vector
- 500µl NanoBRET™ Tracer RAS
- 5ml Tracer Dilution Buffer
- 330µl NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate
- 110µl Extracellular NanoLuc® Inhibitor
- 100µg Transfection Carrier DNA

产品	规格	目录号
NanoBRET™ TE Intracellular RAS Detection Reagents	10000 assays	N8013

使用 96 孔板时，试剂可进行 10000 次检测。包括：

- 10×500µl NanoBRET™ Tracer RAS
- 50ml Tracer Dilution Buffer
- 3.3ml NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate
- 1.1ml Extracellular NanoLuc® Inhibitor

储存条件：将所有 NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay 组分置于低于 -65°C 的条件下储存。或者，将 NanoBRET™ Tracer RAS 置于低于 -65°C 的条件下储存；所有其他组分则置于 -30°C ~ -10°C 的条件下储存。避免对载体进行反复冻融循环。首次使用后，将 NanoBRET™ Tracer RAS 分装为等分试样，避免冻融循环超过五次。NanoBRET™ Tracer RAS、NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate 和 Extracellular NanoLuc® Inhibitor 均应避光储存。

! 注：NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay 需要用两种融合载体转染细胞：一种是编码 LgBiT 融合蛋白的载体，另一种是编码 SmBiT(q) 融合蛋白的载体。对于目标 RAS 变体，您可能需要同时购买 LgBiT 和 SmBiT(q) 融合载体。有关 RAS 融合载体的列表，请参见表 1 或第 8.F 节“相关产品”。

3. 开始检测前

3.A 关于 RAS 融合载体

可用于本说明书的多种 RAS 变体（融合载体）的列表参见表 1。每种 RAS 变体均使用 LgBiT-RAS 和 SmBiT(q)-RAS 融合载体以及 Transfection Carrier DNA 来制备转染复合物。

在 100 次和 1000 次两种规格的试剂盒（目录号：N8010、N8012）中包含的对照载体可以用于 KRAS(G12C) 靶标的检测。具体而言，这些载体是 LgBiT-KRAS(G12C) Fusion Vector、SmBiT(q)-KRAS(G12C) Fusion Vector 和 Transfection Carrier DNA。图 3 和图 4 包含使用这些对照品的数据。与 NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay 配合使用的其他 RAS 变体的数据参见各自的应用手册（3）。

3.B LgBiT-RAS 和 SmBiT(q)-RAS 融合载体的扩增和制备

每小瓶中提供的 RAS 融合载体量可用于特定次数的实验。强烈建议您在大肠埃希菌中扩增每种载体，并纯化大量低内毒素载体用于转染。按照标准方案进行质粒转化至大肠埃希菌的载体扩增和细胞培养级载体制备。

LgBiT-RAS 和 SmBiT(q)-RAS Fusion Vector 包含一个卡那霉素表达盒，用于在细菌增殖期间进行选择。建议在扩增后对编码区进行测序，以确保 LgBiT- 和 SmBiT(q)-RAS 融合编码序列的保真度。有关载体序列信息，请访问 NanoBRET™ TE RAS Assay 产品网页。

有关载体扩增的问题，请联系 Promega 技术服务部：chinatechserv@promega.com

3.C 仪器要求和设置

如需进行 NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay，需要一个能够连续测量双波长窗口的发光检测仪。使用滤波器即可实现该要求。建议使用带通滤波器（BP）测量供体信号，使用长通滤波器（LP）测量受体信号，以最大程度地提高灵敏度。

NanoBRET™ 发光供体 NanoBiT® 萤光素酶的发射波长为 460nm。建议使用 BP 滤波器（覆盖范围接近 460nm，带通范围为 8~80nm）测量此供体信号。例如，450nm/80nm 的 BP 滤波器可捕获 410~490nm 范围内的发射信号。

注：建议使用 BP 滤波器测量供体信号，以选择性地捕获信号峰，避免测量受体峰串色。可以使用覆盖 460nm 波长区域的短通滤波器，但可能导致供体信号值过大（人为原因）和检测窗口缩小。

NanoBRET™ Tracer RAS 的发射峰值在 590~610nm 范围内。建议使用长通滤波器（从 600~610nm 处开始）测量该受体信号。

能够进行双波长测量的仪器均配备有滤波器，或者也可以单独购买和添加滤波器。对于涉及使用光学镜子的仪器，请选择发光镜。一般来说，0.2~1 秒的积分时间就足够了。确保对光电倍增管的增益进行了优化，以在不达到仪器信号饱和的情况下捕获最高的供体信号。

3.C 仪器要求和设置 (续)

请咨询仪器制造商，以确定是否已安装适当的滤波器，或者是否需要采取步骤添加适当的滤波器。例如，安装滤波器时可能需要特殊支架或立方形物件，而且滤波器的形状和厚度也可能因仪器而异。我们在以下仪器和配置方面拥有丰富的经验：

- GloMax[®] Discover System (目录号：GM3000)，配备预装供体信号滤波器（450nm/8nm BP 滤波器）和受体信号滤波器（600nm LP 滤波器）。从“检测方案”菜单中选择预装的 BRET: NanoBRET[™] 618 检测方案。
- BMG Labtech CLARIOstar[®] Multimode Microplate Reader，配备预装供体信号滤波器（450nm/80nm BP 滤波器）和受体信号滤波器（610nm LP 滤波器）。
- Thermo Fisher Varioskan[®] Multimode Microplate Reader，配备 Edmunds Optics 的以下滤波器：供体滤波器（CWL: 450nm，直径：25mm，FWHM: 80nm）、干涉滤波器、受体滤波器（直径：1 英寸，RG-610 长通滤波器）。

另一种可用于测量双发光信号的仪器是 PerkinElmer Envision[®] Multilabel Reader，其推荐设置如下：

- 镜子：发光镜 - 插槽 4
- 发射滤波器：Chroma (目录号：AT600LP) - 发射插槽 4
- 发射滤波器 2：Chroma (目录号：AT460/50m) - 发射插槽 1
- 测量高度：6.5mm
- 测量时间：1 秒

4. NanoBRET[™] TE Intracellular RAS Assay 检测方案

NanoBRET[™] TE Intracellular RAS Assay 的检测结果可通过以下几种方式表示：原始 BRET 比值、减去本底值的 BRET 比值和 / 或归一化 BRET。有关更多信息，请参见第 4.F 节。在组装检测板时，请确保检测板上包含必要的对照品，以进行所需的计算并协助排除故障。建议每种对照类型至少制备三个孔。

未转染细胞对照：含未转染细胞，因此不表达 RAS 融合载体。该对照组代表本底供体信号，可用于评估转染成功与否，详见第 7 节。

无示踪剂对照：含转染细胞，但不含示踪剂或待测化合物。无示踪剂对照组的 BRET 信号用于计算减去本底的 BRET 比值。

BRET_{Min} 对照：含示踪剂和过量浓度的已知 RAS 配体（如 20μM BI-2852）的转染细胞。在计算归一化 BRET 时，该对照组的平均 BRET 比值代表 BRET_{Min}。该对照品还可作为 RAS 靶标结合的阳性对照（阳性 TE 对照）。

BRET_{Max} 对照：含示踪剂的转染细胞，仅添加待测化合物的溶剂，但不含待测化合物。在计算归一化 BRET 时，该对照组的平均 BRET 比值代表 BRET_{Max}。

4.A 用户需提供的材料

- HEK293 或其他培养的哺乳动物细胞（参见下文注释 a.）
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; 例如 Thermo Fisher Scientific 目录号: 11995-065)
- 胎牛血清（例如 HyClone 目录号: SH30070.03 或 Seradigm 目录号: 1500-050）
- Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium（不含酚红）（例如 Life Technologies 目录号: 11058-021）
- 0.05% Trypsin/EDTA（例如 Thermo Fisher Scientific 目录号: 25300）
- FuGENE® HD Transfection Reagent（目录号: E2311）
- DMSO（例如 99.7%; Sigma 目录号: D2650）
- TE Buffer, 1X, Molecular Biology Grade（目录号: V6231）（如果需要稀释 DNA）
- LgBiT-RAS Fusion Vector（参见下文注释 b.）
- SmBiT(q)-RAS Fusion Vector（参见下文注释 b.）
- BI-2852（阳性对照 RAS 配体, MedChemExpress 目录号: HY-126247）
- 96 孔白色平底聚苯乙烯 NBS 微孔板（Corning® 目录号: 3600）（参见下文注释 c.）
- 细胞培养仪器和试剂
- 无菌聚丙烯锥形管
- 聚丙烯塑料器具，例如用于稀释和分配试剂的槽。由于示踪剂的吸附作用，请勿使用传统的聚苯乙烯塑料器具进行此项检测。
- 可以测量 NanoBRET™ 波长的检测仪器（例如 GloMax® Discover System, 目录号: GM3000）；参见第 3.B 节
- 能够混合粘性试剂的微孔板混合器（详见第 8.B 节）

注：

- a. 本检测方案针对 HEK293 细胞进行了优化。当使用其他类型的细胞时，请使用适合该类型细胞的细胞培养条件。您可能需要对转染条件进行优化并确定 NanoBRET™ Tracer RAS 的适当浓度（2）。
- b. 进行 NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay 需要使用 LgBiT 和 SmBiT(q) 融合载体检测目标 RAS 变体。如果使用的系统不含 RAS 变体的融合载体，则需要单独购买相应的 LgBiT 和 SmBiT(q)RAS 融合载体。有关可用 LgBiT 和 SmBiT(q) 融合载体的列表，请参见第 8.F 节“相关产品”。
- c. 确保使用 Corning® 96 孔白色平底聚苯乙烯 NBS 微孔板（Corning® 目录号: 3600）。使用传统的聚苯乙烯或经细胞培养处理的微孔板，或使用其他生产商生产的“非结合”微孔板进行检测时，本检测系统的效果并不理想。

4.B 使用 NanoBiT® Fusion Vector 瞬时转染 HEK293 细胞（第 1 天）

1. 使用适当的细胞培养条件培养 HEK293 细胞（或所需类型的细胞）。

注：

- a. 本检测方案中提供的转染条件针对 HEK293 细胞进行了优化。如果使用其他类型的细胞，可能需要优化转染条件。
- b. 细胞处理对检测结果的重现性至关重要。为获得最佳转染结果，应使用 70~90% 融合且刚进行传代（理想情况下在 1~2 天内传代）的 HEK293 细胞。
- c. 建议每个 96 孔检测板至少制备 2×10^6 个细胞。
- d. **可选：**在第 4.B 节中制备并预留一批未转染的细胞。这些细胞将作为第 4.C~4.E 节中的非转染细胞对照。

2. 从各细胞培养瓶中抽吸出细胞培养基，使用胰蛋白酶处理细胞，使细胞从培养瓶表面脱落下来。

注：为获得最佳结果，请使用能产生单细胞悬液的胰蛋白酶消化条件。

- 3. 加入含血清的预热细胞培养基（含 10% 胎牛血清的 90%DMEM）中和胰蛋白酶，在 $200 \times g$ 转速下离心细胞 5 分钟，使细胞沉淀。
- 4. 抽吸去掉细胞培养基，将细胞重悬于预热的检测培养基（含 1% 胎牛血清的 Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium（不含酚红））中。
- 5. 使用预热的检测培养基将细胞密度调节至 2×10^5 个细胞 /ml。
- 6. 如需转染 HEK293 细胞，请按以下步骤制备脂质 :DNA 复合物：
 - a. 在无菌锥形管中，使用 Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium（不含酚红）制备 10 μ g/ml 的 DNA 溶液，混匀。

组分	体积 ¹	最终浓度
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium（不含酚红）	1ml	—
Transfection Carrier DNA	8 μ l	8.0 μ g/ml
LgBiT-RAS Fusion Vector2	1 μ l	1.0 μ g/ml
SmBiT(q)-RAS Fusion Vector2	1 μ l	1.0 μ g/ml

¹ 这些体积适合制备约 1ml DNA 和转染 20ml 的 HEK293 细胞。如需制备不同体积的 DNA，可按比例增加或减少各组分的体积。如有必要，为避免移液体积小于 1 μ l，可在制备脂质 :DNA 复合物前，使用 1X TE 缓冲液对 DNA 进行连续稀释。

² 随检测试剂盒提供的每种对照融合载体的量有限。强烈建议您在大肠埃希菌中扩增每种载体，并纯化大量低内毒素载体用于转染。请参见第 3.A 节。

（下页续第 6 步。）

- b. 对于制备的每种 DNA 混合物，取 1ml DNA 混合物，向其中加入 30μl FuGENE® HD Transfection Reagent，即可形成脂质 :DNA 复合物。确保 FuGENE® HD Transfection Reagent 不直接接触试管的塑料侧面；直接移液至试管中的液体中，混匀。

注：如果在 1.5ml 微量离心管中制备转染复合物，则需颠倒离心管 5~10 次，混匀。如果在较大的锥形管（例如 15ml 或 50ml 锥形管）中制备转染复合物，则以最低速度振荡（vortexing）或轻轻涡旋试管进行混匀。请勿将较大锥形管中的少量转染复合物进行颠倒混匀，否则会降低复合物的形成效率，导致较低的发光信号。

- c. 在室温条件下孵育 20~30 分钟，以形成脂质 :DNA 复合物。

7. 在无菌锥形管中，取 1 份脂质 :DNA 复合物（例如 1ml）与 20 份步骤 6 中制备的 HEK293 细胞（例如 20ml）混匀。轻轻颠倒试管 5 次，混匀。

注：对于较大或较小的批量转染，可相应增加或减少组分体积。应确保细胞与脂质 :DNA 复合物的比例保持在 20:1。

8. 将细胞 + 脂质 :DNA 复合物分装至无菌细胞培养瓶中，在 37°C 和 5%CO₂ 培养箱中培养 20~30 小时。

注：在此步骤中，建议细胞密度约为 55000~80000 个细胞/cm²。例如，对于 T75 培养瓶，应使用约 4~6×10⁶ 个细胞。

4.C 使用 NanoBRET™ Tracer RAS 制备细胞（第 2 天）

1. 从转染 HEK293 细胞的细胞培养瓶中抽吸出培养基，使用胰蛋白酶处理细胞，使细胞从培养瓶表面脱落下来。

可选：为制备未转染细胞对照品，从第 4.B 节中预留的未转染细胞培养瓶中吸取培养基。然后使用胰蛋白酶处理细胞，使细胞从培养瓶表面脱落下来。

注：为获得最佳结果，请使用能产生单细胞悬液的胰蛋白酶消化条件。

2. 向各培养瓶中加入含血清的预热细胞培养基（含 10% 胎牛血清的 90%DMEM）中和胰蛋白酶。将细胞悬液转移至离心管中，以 200×g 转速离心 5 分钟，使细胞沉淀。
3. 抽吸去掉培养基，使用预热的含 1% 胎牛血清的 Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium（不含酚红）重悬细胞。
4. 使用预热的含 1% 胎牛血清的 Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium（不含酚红）将细胞密度调节至 2×10⁵ 个细胞/ml。
5. 取 85μl 转染细胞悬液，分装至 96 孔白色平底聚苯乙烯 NBS 微孔板（Corning® 目录号：3600）的孔中（参见步骤 6 中的“可选”部分）。

4.C 使用 NanoBRET™ Tracer RAS 制备细胞（第 2 天；续）

6. 可选：

- 取 85μl 未转染细胞悬液，分装至未转染细胞对照孔中。在分装过程中定期混合细胞，以防止细胞沉淀。
- 为制备无示踪剂对照品，取 90μl 转染细胞悬液，分装至 96 孔检测板的无示踪剂对照孔中。
- 对于 BRET_{Min} 对照品，取 85μl 转染细胞悬液，分装至 96 孔检测板的 BRET_{Min} 对照孔中。
- 对于 BRET_{Max} 对照品，取 85μl 转染细胞悬液，分装至 96 孔检测板的 BRET_{Max} 对照孔中。

注：仅使用 Corning® 96 孔白色平底聚苯乙烯 NBS 微孔板（Corning® 目录号：3600）。使用传统的聚苯乙烯或经细胞培养处理的微孔板，或使用其他生产商生产的“非结合”微孔板进行检测时，本检测系统的效果并不理想。

7. 使用聚丙烯管制备 Complete 20X NanoBRET™ Tracer RAS 试剂。

注：本检测方案中使用的示踪剂浓度（2μM）针对 HEK293 细胞进行了优化。使用其他细胞类型时，可能需要确定适当的示踪剂浓度。其他 RAS 变体的示踪剂浓度参见各自的应用手册（3）。

- 解冻 NanoBRET™ Tracer RAS 和 Tracer Dilution Buffer。

注：首次使用时，建议将 NanoBRET™ Tracer RAS 分装成等分试样；避免冻融循环超过五次。将 NanoBRET™ Tracer RAS 在低于 -65°C 下避光储存。Tracer Dilution Buffer 解冻后可在室温下储存。

- 使用 100% DMSO 制备 100X NanoBRET™ Tracer RAS 溶液，即将等体积的 100% DMSO 和 NanoBRET™ Tracer RAS 混合，混匀；参见下文示例。

组分	体积 /96 孔板
NanoBRET™ Tracer RAS	50μl
100% DMSO	50μl
最终体积	100μl

- 取 1 份步骤 7.b 中制备的 100X NanoBRET™ Tracer RAS，缓慢加入 4 份 Tracer Dilution Buffer，混匀，制备成 Complete 20X NanoBRET™ Tracer RAS 试剂；参见下文示例和注释。

组分	体积 /96 孔板
100X NanoBRET™ Tracer RAS	100μl
Tracer Dilution Buffer	400μl
最终体积	500μl

注：由于 Tracer Dilution Buffer 具有粘性，因此应缓慢移取。目视检查溶液，确保 Complete 20X NanoBRET™ Tracer RAS 试剂完全分散，且混合后试管内容物均匀。如有必要，重复混合步骤。

8. 将 5 μ l Complete 20X NanoBRET™ Tracer RAS 试剂分装至每个检测孔中。请勿向无示踪剂对照孔中加入示踪剂。
注：由于 Tracer Dilution Buffer 具有粘性，因此请缓慢移取 Complete 20X NanoBRET™ Tracer RAS。
9. 将检测板置于定轨振荡器上，并于 900rpm 转速下混合 15 秒。目视检查微孔，确保 Complete 20X NanoBRET™ Tracer RAS 分散，且微孔内容物均匀。如有必要，可重复混合步骤，直至微孔内容物均匀。
注：达到均匀性所需的平板混合条件可能会因振荡器而异。有关更多详细信息，请参见第 8.B 节。

4.D 加入待测化合物

1. 使用 100% DMSO 或适当的待测化合物溶剂制备 1000X 最终浓度的待测化合物。
对于 BRET_{Min} 对照品或阳性 TE 对照品，使用 100% DMSO 制备浓度为 20mM 的 BI-2852。
2. 使用 Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium（不含酚红）将 1000X 待测化合物稀释至最终浓度 10X。
对于 BRET_{Min} 对照品或阳性 TE 对照品，使用 Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium（不含酚红）将 20mM BI-2852 稀释至最终浓度 200 μ M。
使用 Opti-MEM™ I 低血清培养基（不含酚红）稀释待测化合物溶剂 100 倍，作为 10X BRET_{Max} 对照。
3. 如下所述，向每个含有样品和未转染细胞对照品的孔中加入 10 μ l 10X 待测化合物或培养基：
 - a. 取 10 μ l 的 200 μ M BI-2852，加至 BRET_{Min} 对照孔和阳性 TE 对照孔中。
 - b. 取 10 μ l Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium（不含酚红），加至无示踪剂对照孔中。
 - c. 取 10 μ l 的 10X BRET_{Max} 对照品，加至 BRET_{Max} 对照孔中。
4. 在完成步骤 3 的添加后，将检测板置于定轨振荡器上，并于 900rpm 转速下混合内容物 15 秒。将检测板置于 37°C 和 5%CO₂ 条件下培养 2 小时。
注：根据待测化合物的细胞渗透性和结合特性，可能需要优化培养时间。不可逆抑制剂的抑制作用呈时间依赖性关系，效力随时间推移而增加。最快可在 30 分钟内进行 BRET 测量。
5. 冷却检测板至室温（约 15 分钟），然后继续进行第 4.E 节中的 NanoBRET™ Assay 检测方案。

4.E NanoBRET™ Assay 检测方案

1. 解冻 Extracellular NanoLuc® Inhibitor 和 NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate。
注：首次使用后，Extracellular NanoLuc® Inhibitor 和 NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate 可在 -30℃ ~ -10℃条件下避光储存。
2. 在即将测量 BRET 之前，按下述方法在锥形管中用 Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium（不含酚红）制备 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution：

组分	体积 /96 孔板
100X NanoBRET™ Tracer RAS	100μl
Tracer Dilution Buffer	400μl
最终体积	500μl

注：于制备后 1.5 小时内使用 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution。丢弃未使用的溶液。

3. 轻轻颠倒试管 5~10 次混匀。
4. 向检测板的每个孔（包括对照孔）中加入 50μl 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution。置于室温下孵育 2~3 分钟。
注：在加入 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution 后的 10 分钟内进行步骤 5，以测量 BRET 信号。加入后 2 小时内均可以测量 BRET，但发光信号会有所损失，具体损失情况因检测靶标而异（参见第 7 节）。
5. 按照仪器的使用说明，使用 GloMax® Discover System 或其他 NanoBRET™ 检测兼容的发光检测仪，采用 450nm BP 滤波器测量供体发射信号，采用 600LP 滤波器测量受体发射信号。不同仪器的最佳积分时间可能不同，但通常 0.2~1 秒的积分时间就足够了。有关更多信息，请参见第 3.C 节。

4.F 计算 BRET 比值

检测结果可通过计算原始 BRET 比值、减去本底值的 BRET 比值和 / 或归一化 BRET 信号来表示，如下所述：

如需计算原始 NanoBRET™ 比值，将各样品或对照品的受体发射信号除以供体发射信号。

将各 BRET 比值乘以 1000，即将原始 BRET 单位转换为 milliBRET 单位（mBU）。

$$\text{BRET 比值} = \frac{\text{受体信号}_{\text{样品}}}{\text{受体信号}_{\text{样品}}} \times 1000$$

如需计算减去本底值的 BRET 比值，可用各样品的原始 BRET 比值减去无示踪剂对照品的平均原始 BRET 比值。将各 BRET 比值乘以 1000，即将 BRET 单位转换为 milliBRET 单位（mBU）。

$$\text{减去本底的 BRET 比值} = \left[\frac{\text{受体信号}_{\text{样品}}}{\text{供体信号}_{\text{样品}}} - \frac{\text{受体信号}_{\text{无示踪剂对照}}}{\text{供体信号}_{\text{无示踪剂对照}}} \right] \times 1000$$

为便于比较可能具有不同检测窗口的 RAS 变体之间的选择性，可考虑将每个样品的 BRET 信号归一化为两个对照品的 BRET 信号，即一个对照品定义最大 BRET 值，另一个对照品定义最小 BRET 值，如下所述。归一化 BRET 值表示样品的 BRET 比值占最大 BRET 比值的百分比。

$$\text{归一化 BRET (\%)} = \left[\frac{(\text{BRET}_{\text{样品}} - \text{BRET}_{\text{Min}})}{(\text{BRET}_{\text{Max}} - \text{BRET}_{\text{Min}})} \times 100 \right]$$

式中：

BRET 样品是样品的 BRET 比值；

BRET_{Min} 是含有示踪剂和过量浓度的已知 RAS 配体（如 20μM BI-2852）的对照品的平均 BRET 比值。或者，可以使用无示踪剂对照品的平均 BRET 比值，该对照品不含示踪剂或待测化合物。

BRET_{Max} 是含示踪剂和待测化合物溶媒但不含待测化合物的对照品的平均 BRET 比值。

5. KRAS(G12C) 对照品检测的代表性 BRET 数据

KRAS(G12C) 对照品检测的代表性数据参见图 3。NanoBRET™ Tracer RAS 在高达 2 μ M 的溶解度限度内是非饱和的，因此示踪剂浓度对待测化合物表观效价的影响可忽略不计（比较图 B 中的 IC₅₀ 值）。根据图 3 中的数据，建议 NanoBRET™ Tracer RAS 的最终浓度为 2 μ M。

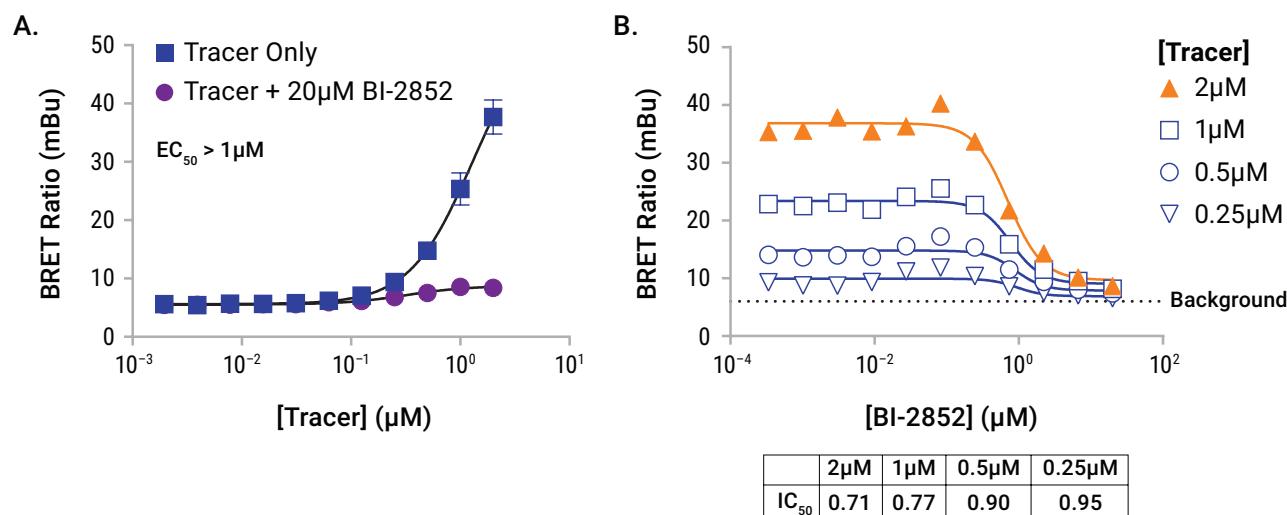
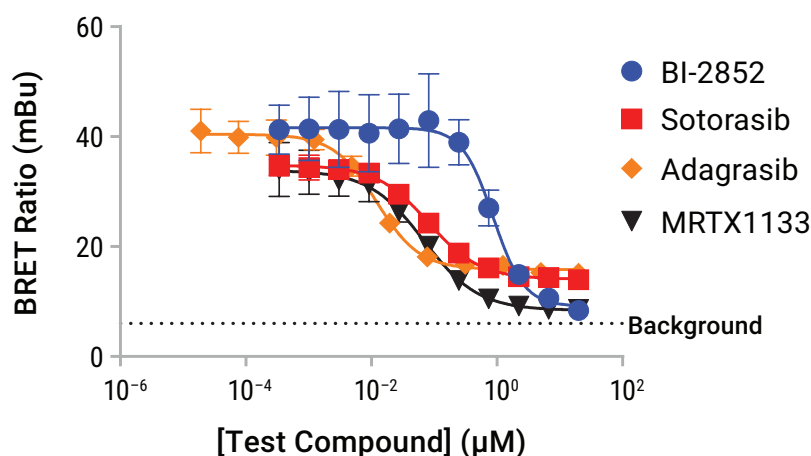


图 3. NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay 的检测验证数据。 存在和不存在饱和浓度的已知 RAS 配体时的示踪剂剂量响应曲线的示例参见图 A。示踪剂浓度对待测化合物的表观效价的影响参见图 B。将表达 SmBiT(q)-KRAS(G12C) 和 LgBiT-KRAS(G12C) 融合蛋白的 HEK293 细胞重悬于检测培养基中，并将其接种至 96 孔非结合表面微孔板中。加入不同浓度的 NanoBRET™ Tracer RAS。在存在或不存在饱和剂量的 SI/II 口袋配体 BI-2852（图 A）或连续稀释的 BI-2852（图 B）的情况下培养细胞 2 小时，然后加入 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution，随后使用 GloMax® Discover System 进行 BRET 测量。示踪剂的推荐浓度在图 B 中以橙色表示。

代表性化合物选择性特征分析数据参见图 4。观察到 SI/II 口袋配体 BI-2852 与 SII 口袋配体 Sotorasib、Adagrasib 和 MRTX1133 都与示踪剂存在竞争。其他代表性数据以及其他 RAS 变体的代表性数据参见参考文献 3。



	BI-2852	Sotorasib	Adagrasib	MRTX1133
IC ₅₀	0.87	0.080	0.012	0.068

18481MA

图 4. KRAS(G12C) 对照品检测的代表性化合物选择性特征分析数据。将表达 SmBiT(q)-KRAS(G12C) 和 LgBiT-KRAS(G12C) Fusion Vector 的 HEK293 细胞重悬于检测培养基中，并将其接种至 96 孔非结合表面微孔板中。加入 NanoBRET™ Tracer RAS 至最终浓度 2 μM。将细胞与连续稀释的待测化合物培养 2 小时，然后加入 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution，随后使用 GloMax® Discover System 进行 BRET 测量。

6. 不同 RAS 变体的化合物选择性分析

您可能不仅希望了解待测化合物对特定 RAS 变体的效价，还希望了解待测化合物与其他 RAS 变体的潜在相互作用。NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay 可以采用相同的工作流程和一致的示踪剂浓度（2 μM）对多种 RAS 变体的待测化合物选择性进行评估。所有可用 RAS 融合载体中各种已知 KRAS 抑制剂的选择性特征示例参见图 5，RAS 变体中每种配体的效价值参见表 2。其他代表性数据以及其他 RAS 变体的数据参见参考文献 3。

6. 不同 RAS 变体的化合物选择性分析 (续)

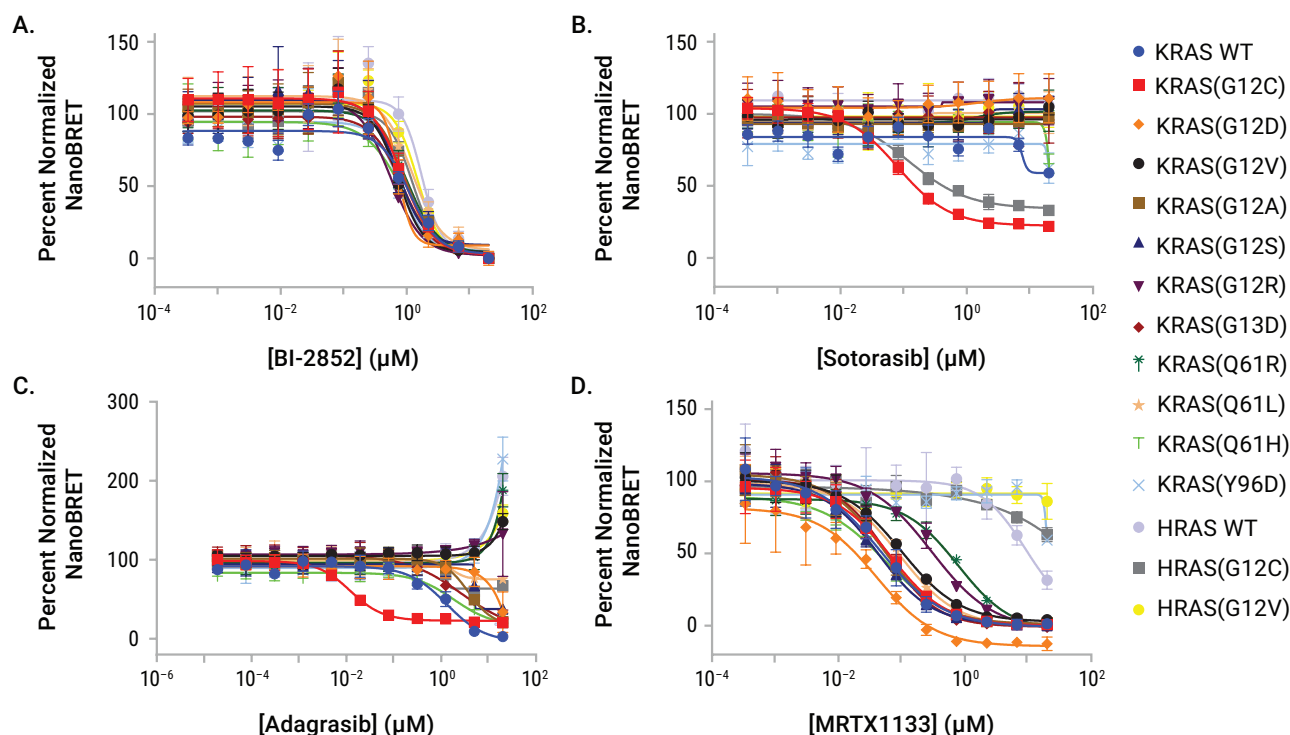


图 5. RAS 配体的选择性特征示例。将表达 SmBiT(q)-RAS 和 LgBiT-RAS 融合蛋白的 HEK293 细胞重悬于检测培养基中，并将其接种至 96 孔非结合表面微孔板中。加入 NanoBRET™ Tracer RAS 至最终浓度 $2\mu\text{M}$ 。将细胞与待测化合物的连续稀释液培养 2 小时，然后加入 3X Complete Substrate+Inhibitor，使用 GloMax® Discover System 进行 BRET 测量。如第 4.F 节所述，使用 DMSO 溶媒处理细胞的平均 BRET 比值 (BRET_{Max}) 和 $20\mu\text{M}$ BI-2852 处理细胞的平均 BRET 比值 (BRET_{Min}) 计算归一化 BRET。图 A. S.II 口袋配体 BI-2852 对所有 RAS 变体的 BRET 信号都有竞争作用，且效价相似。因此，BI-2852 可作为 RAS 变体靶标结合的理想阳性对照。图 B. S.II 口袋配体 Sotorasib 对 G12C 热点 RAS 突变体表现出较强的选择性。图 C. S.II 口袋配体 Adagrasib 对 KRAS(G12C) 具有选择性，但对其他 KRAS 变体的相互作用较弱。请注意，Adagrasib 在极高浓度下显示 BRET 增加，这可能与细胞毒性有关（更多信息，参见第 7 节“疑难解答”）。图 D. S.II 口袋配体 MRTX1133 对 KRAS(G12D) 具有强效相互作用，但对多种 KRAS 变体也具有相互作用。

表 2. 效价值列表。RAS 变体中各配体的效价值参见下表（另见图 5）。

RAS 检测	BI-2852 IC ₅₀ (μM)	Sotorasib IC ₅₀ (μM)	Adagrasib IC ₅₀ (μM)	MRTX1133 IC ₅₀ (μM)
KRAS WT	1.1	> 10	1.3	0.047
KRAS (G12C)	0.87	0.080	0.012	0.068
KRAS (G12D)	0.73	> 10	> 10	0.040
KRAS (G12V)	0.74	> 10	> 10	0.100
KRAS (G12A)	0.94	> 10	3.8	0.051
KRAS (G12S)	0.73	> 10	> 10	0.043
KRAS (G12D)	0.55	> 10	> 10	0.300
KRAS (G13D)	0.86	> 10	2.7	0.059
KRAS (Q61R)	1	> 10	> 10	0.78
KRAS (Q61L)	1.2	> 10	> 10	0.093
KRAS (Q61H)	0.84	> 10	1.8	0.056
KRAS (Y96D)	0.8	> 10	> 10	> 10
HRAS WT	1.7	> 10	> 10	> 10
HRAS (G12C)	1.2	0.012	> 10	> 10
HRAS (G12V)	1.5	> 10	> 10	> 10

7. 疑难解答

对于本文中未涉及的问题，请联系当地 Promega 分公司或经销商。联系方式见：
www.promega.com 电子邮箱：techserv@promega.com

问题	原因和参考建议
未添加待测化合物时 NanoBRET™ 信号值较弱或接近仪器本底	示踪剂吸附至塑料器具表面。在制备或使用含 NanoBRET™ Tracer RAS 的试剂时，应使用聚丙烯材料，避免使用传统的聚苯乙烯材料器具，以尽量减少吸附。
	所用微孔板类型有误。强烈建议使用 96 孔白色平底聚苯乙烯 NBS 微孔板（Corning® 目录号：3600）。使用传统的聚苯乙烯或经细胞培养处理的微孔板，或使用其他生产商生产的“非结合”微孔板进行检测时，本检测系统的效果并不理想。
	制备后 1.5 小时内未使用 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution。应为每次实验制备新鲜的 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution，并在 1.5 小时内使用溶液。丢弃任何未使用的溶液。
	加入 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution 后，未立即测量 NanoBRET™ 信号。为获得最佳结果，应在加入溶液后 10 分钟内测量 BRET 信号。虽然 BRET 信号可在加入溶液后 2 小时内测量，但会存在一些信号损失。
	仪器设置不合理。仪器应使用适用于供体波长（450nm BP）和受体波长（600nm LP）的滤波器，以准确测量 NanoBRET™ 信号。有关更多信息，请参见第 3.B 节。
	由于 HEK293 细胞的低转染效率较低，LgBiT-RAS 和 SmBiT(q)-RAS 融合蛋白的表达水平较差。如果怀疑转染效果不佳导致表达较低，则测量表达融合蛋白的细胞的供体信号，并将其与非转染细胞中的本底供体信号进行比较。如果供体通道中的信背比小于 1000，则制备一批新的 HEK293 细胞，并按照第 4.B 节所述小心重复转染。如果重复转染后信背比仍然较低，则考虑增加 LgBiT-RAS 和 SmBiT(q)-RAS 融合载体与 Transfection Carrier DNA 的比例，同时保持脂质 :DNA 复合物中的 DNA 总量不变（参见第 4.B 节）。

问题	原因和参考建议
未添加待测化合物时 NanoBRET™ 信号值较弱或接近仪器本底（续）	由于转染效率较低，LgBiT-RAS 和 SmBiT(q)-RAS 融合蛋白在 HEK293 以外的细胞类型中的表达水平较差。如果怀疑转染效果不佳导致表达较低，则测量表达融合蛋白的细胞的供体信号，并将其与不含表达融合蛋白的细胞的本底供体信号进行比较。如果供体通道中的信背比小于 1000，则应考虑针对细胞类型优化转染试剂和转染条件。最佳转染试剂和转染条件会因细胞类型的不同而有很大差异。 在除 HEK293 细胞以外的其他细胞类型中，由于 CMV 启动子驱动表达效率低下，LgBiT-RAS 和 SmBiT(q)-RAS 融合蛋白的表达水平较差。CMV 启动子在大多数细胞系中都是强启动子，但并非在所有细胞系都是如此。确保 CMV 启动子在相关细胞类型中能提供足够的表达水平。
添加示踪剂时，供体或受体发光信号发生变化	此现象较为常见，但一般不会对检测造成影响。图 6 列出了代表性数据，具体为滴定 NanoBRET™ Tracer RAS 时，供体（450nm）和受体（600nm）通道的原始发光数据。LgBiT-RAS 和 SmBiT(q)-RAS 融合蛋白与荧光示踪剂之间发生的 BRET 可能会导致受体信号的增加与供体信号的减少呈剂量依赖性关系。比率 BRET 分析法可减少 NanoBiT® 萤光素酶原始发光信号波动的影响。
NanoBRET™ 信号的高变异性	细胞处理对检测结果的重现性至关重要。为降低变异性，应确保第 4.B 节中转染的 HEK293 细胞刚进行传代（1~2 天内），且达到 70~90% 的融合率。使用 HEK293 细胞的单细胞悬液进行第 4.B 节中的转染和第 4.C~4.E 节的 RAS 靶标结合检测。 在第 4.C 节中，制备 Complete 20X NanoBRET™ Tracer RAS 试剂时，移液不准确。Tracer Dilution Buffer 具有粘性，难以准确移取。确保缓慢移取 Tracer Dilution Buffer 和 Complete 20X NanoBRET™ RAS Tracer RAS Reagent，以确保分装适当体积。

7. 疑难解答 (续)

问题	原因和参考建议
NanoBRET™ 信号的高变异性 (续)	溶液未充分混匀, 尤其是在第 4.C 节中制备或添加 Complete 20X NanoBRET™ Tracer RAS 试剂时未充分混匀。Tracer Dilution Buffer 具有粘性, 因此难以实现完全混匀。加入 Complete 20X NanoBRET™ Tracer RAS 试剂后, 目视检查检测孔, 以确保孔内内容物均匀。如有需要, 可再进行混合。
	由于 LgBiT-RAS 和 SmBiT(q)-RAS 融合蛋白的表达不佳, 供体发光信号较低。由于供体通道和受体通道的信背比降低, 可能导致 BRET 数据产生噪声。
添加待测化合物后 NanoBRET™ 信号增强	待测化合物具有细胞毒性。导致细胞裂解的细胞毒性化合物通常表现出 BRET 信号的人为增加 (图 7)。这是由于 Extracellular NanoLuc® Inhibitor 对发光信号的猝灭作用所致, 可能导致 BRET 比值的净增加。在导致 BRET 比值升高的浓度下, 对待测化合物的细胞毒性效应进行评估。
	SI/II- 口袋配体 BI-2852 可能会在某些浓度范围内显示 BRET 比值轻微增加, 然后导致 BRET 信号的减弱。确切机制尚不清楚, 但这可能是由于 RAS 二聚体结合时的协同效应所致。具有相似结合机制的其他相关化合物可能表现出相似的 BRET 信号增加。
	待测化合物为有色或荧光化合物。由于 BRET 信号受到干扰, 使用 NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay 难以对这种性质的化合物进行表征。
与存在 BI-2852 时的 BRET 信号相比, 待测化合物显示出饱和但不完全的 BRET 信号降低。	待测化合物仅对一种状态的 RAS 蛋白具有选择性。NanoBRET™ Tracer RAS 可与活性和非活性状态的 RAS 蛋白结合。如果待测化合物仅与 RAS 蛋白的活性或非活性状态结合, 则与 SI/II 口袋配体 (如 BI-2852) 相比, 该化合物可能会与示踪剂发生不完全竞争, 并部分减少 BRET 信号。这在某些开关 II 口袋结合剂 (如 Sotorasib 和 Adagrasib) 中很常见, 且在 KRAS(G12C) Assay 的待测化合物剂量反应曲线中清晰可见 (详情参见图 4 和参考文献 4)。

图 6 和图 7 包含支持第 7 节“疑难解答”的数据（详见上文）。NanoBRET™ Intracellular TE RAS Assay 正常进行检测期间供体和受体信号的潜在活动参见图 6。细胞毒性化合物对检测活动的潜在影响参见图 7。

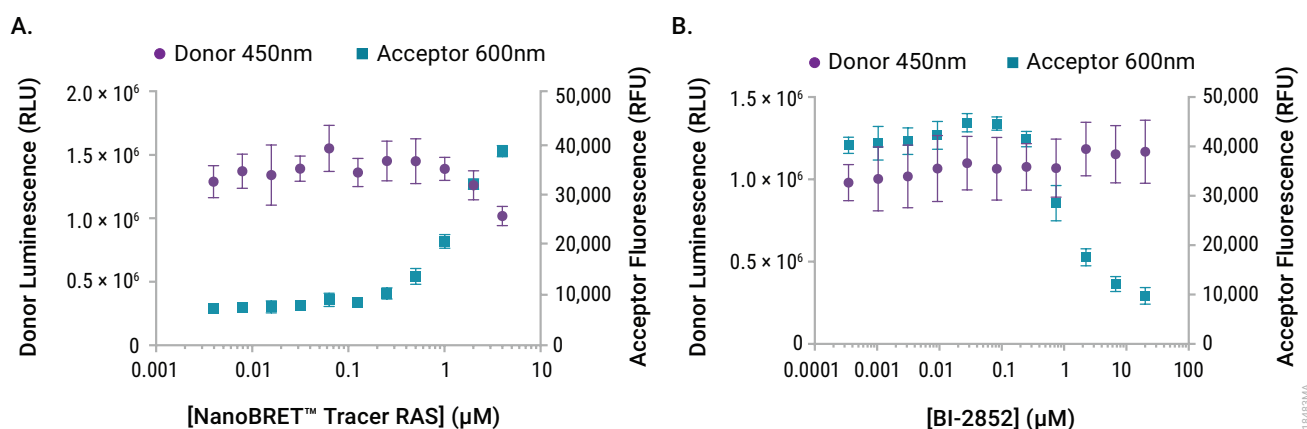


图 6. 示踪剂和待测化合物浓度对 NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay 中原始供体或受体发射信号的潜在影响。 HEK293 细胞的 NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay。将表达 LgBiT-KRAS(G12C) 和 SmBiT(q)-KRAS(G12C) 融合蛋白的 HEK293 细胞重悬于检测培养基中，并将其接种至 96 孔非结合表面微孔板中。图 A. 将细胞与不同浓度 (0.002~2μM) 的 NanoBRET™ Tracer RAS 培养 2 小时，加入 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution，随后使用 GloMax® Discover System 进行 BRET 测量。图 B. 在存在 2μM NanoBRET™ Tracer RAS 和 BI-2852 连续稀释液 (0.0003~20μM) 的条件下培养细胞 2 小时，加入 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution，随后使用 GloMax® Discover System 进行 BRET 测量。

7. 疑难解答 (续)

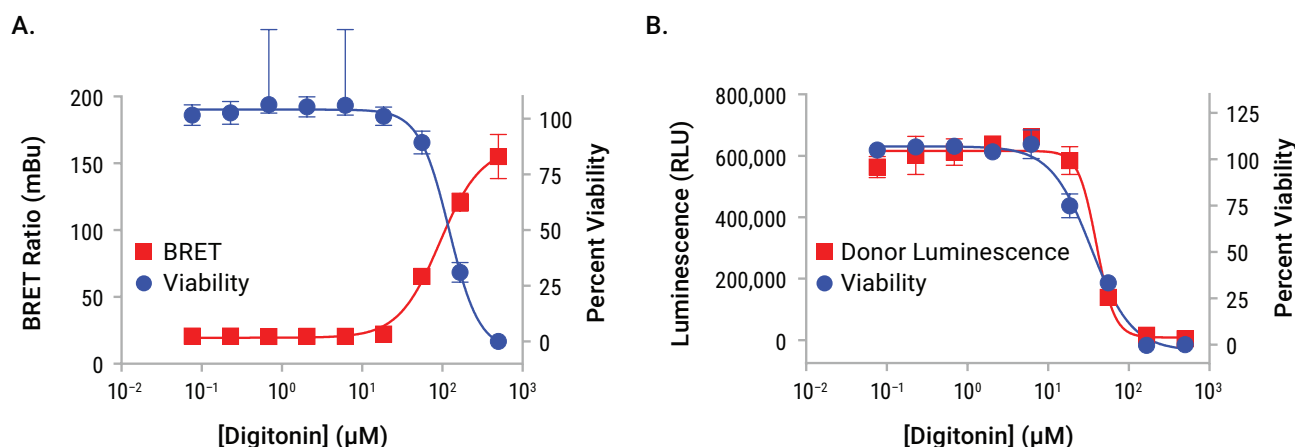


图 7. 细胞毒性化合物对 BRET 信号和供体发光信号的影响。将表达 LgBiT-KRAS(G12C) 和 SmBiT(q)-KRAS(G12C) 融合蛋白的 HEK293 细胞重悬于检测培养基中, 并将其接种至 96 孔非结合表面微孔板中。对洋地黄皂苷 (一种能破坏膜完整性的急性细胞毒性化合物) 处理进行了测试。在进行 BRET 和供体发光信号测量时, 加入 NanoBRET™ Tracer RAS 至最终浓度 2μM, 并加入洋地黄皂苷作为三倍连续稀释液 (0.076~500μM)。将细胞培养 2 小时后, 加入 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution, 随后使用 GloMax® Discover System 进行测量。在进行细胞活力测定时, 使用相同的洋地黄皂苷连续稀释液处理未转染 HEK293 细胞 2 小时, 然后在 GloMax® Discover System 上使用 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay 测量细胞活力。**图 A.** 洋地黄皂苷在降低细胞活力的相同浓度范围内, 可导致 BRET 信号明显增加。**图 B.** 由于 Extracellular NanoLuc® Inhibitor 淬灭 NanoBiT™ 萤光素酶, 洋地黄皂苷处理导致的细胞裂解会使供体发光信号减少。

8. 附录

8.A 有关 NanoBRET™ Technology 和 NanoBiT® Luciferase Fusion Protein 的其他信息

NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay 的供体发光信号由 LgBiT 亚基和 SmBiT(q) 肽结构互补形成的功能性萤光素酶产生。这些亚基的相互作用产生功能性 NanoBiT® 萤光素酶，其发光特性与完整 NanoLuc® Luciferase 的发光特性相似。NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay 使用蓝移 NanoBiT® 萤光素酶作为 BRET 供体，使用红移荧光示踪剂作为 BRET 受体，以尽量减少光谱重叠，从而获得更高的信背比。

当 SmBiT(q) 肽用于互补 LgBiT 亚基时，所产生的 NanoBiT® 萤光素酶对 Extracellular NanoLuc® Inhibitor 的抑制作用敏感，可缓解来自细胞外碎片的任何 NanoBRET™ 信号，并确保对细胞内靶标结合进行准确评估。虽然 SmBiT(q) 肽对 Extracellular NanoLuc® Inhibitor 具有敏感性，并能够进行真正的活细胞 RAS 检测，但 SmBiT(q) 不像传统的 SmBiT 肽一样适用于测量蛋白：蛋白相互作用，因此不应将其作为 SmBiT 肽的一般替代品。

8.B 实现充分的检测板混合

由于 Tracer Dilution Buffer 具有粘性，在制备和添加 Complete 20X NanoBRET™ Tracer RAS 试剂时，必须特别注意检测板的混合，以确保 NanoBRET™ Tracer RAS 充分分散。如需保证足够的漩涡混合强度，则混合器的运行轨道直径应小于每孔内径。虽然大多数市售定轨振荡器可分散 96 孔板的示踪剂，但还需对振荡力度进行优化（一般通过目视检查）。尽管本检测系统尚未针对 384 孔板进行优化，但如果您希望使用 384 孔板进行检测，建议使用能在 384 孔板的孔中进行涡旋混合的混合设备。我们在水平振荡器使用方面具备相关经验，例如 Union Scientific 公司的 VibraTranslator™ 系列产品。请咨询混合设备制造商，以确定所用孔板混合器是否适用于涉及粘性试剂的 384 孔应用场景。

8.C NanoBRET™ Tracer RAS 的消光系数

NanoBRET™ Tracer RAS 使用 NanoBRET™ 590 荧光团。在 590nm 波长处使用 83000M-1cm-1 的消光系数测定 NanoBRET™ Tracer RAS 的浓度（5）。

8.D 缓冲液和溶液组成

检测培养基

99% Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium (不含酚红)

1% 胎牛血清

细胞培养基

90% DMEM

10% 胎牛血清

8.E 参考文献

1. Robers, M.B. *et al.* (2015) Target engagement and drug residence time can be observed in living cells with BRET. *Nat. Commun.* **6**, 10091.
2. Robers, M.B. *et al.* (2019) Quantitative, real-time measurements of intracellular target engagement using energy transfer. *Methods Mol. Biol.* **1888**, 45–71.
3. Application Notes for the NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay. Access online at the NanoBRET™ TE Intracellular RAS Assay product page: www.promega.com/products/cell-signaling/ras-raf-pathway-assays/ras-nanobret-target-engagement-assays/
4. Vasta, J.D. *et al.* (2022) KRAS is vulnerable to reversible switch-II pocket engagement in cells. *Nat. Chem. Biol.* **18**, 596–604.
5. Anthropological Genetics: Theory, Methods and Applications, Michael H. Crawford, *ed.* (2006) University of Cambridge Press, Table 10.1.

8F. 相关产品**NanoBRET™ Fusion Vector**

产品	规格	目录号
LgBiT-KRAS WT Fusion Vector	20µg	NV4561
SmBiT(q)-KRAS WT Fusion Vector	20µg	NV4571
LgBiT-KRAS(G12C) Fusion Vector	20µg	NV4581
SmBiT(q)-KRAS(G12C) Fusion Vector	20µg	NV4591
LgBiT-KRAS(G12D) Fusion Vector	20µg	NV4601
SmBiT(q)-KRAS(G12D) Fusion Vector	20µg	NV4611
LgBiT-KRAS(G12V) Fusion Vector	20µg	NV4621
SmBiT(q)-KRAS(G12V) Fusion Vector	20µg	NV4631
LgBiT-KRAS(G12A) Fusion Vector	20µg	NV4641
SmBiT(q)-KRAS(G12A) Fusion Vector	20µg	NV4651
LgBiT-KRAS(G12S) Fusion Vector	20µg	NV4661
SmBiT(q)-KRAS(G12S) Fusion Vector	20µg	NV4671
LgBiT-KRAS(G12R) Fusion Vector	20µg	NV4681
SmBiT(q)-KRAS(G12R) Fusion Vector	20µg	NV4691
LgBiT-KRAS(G13D) Fusion Vector	20µg	NV4701
SmBiT(q)-KRAS(G13D) Fusion Vector	20µg	NV4711
LgBiT-KRAS(Q61H) Fusion Vector	20µg	NV4721
SmBiT(q)-KRAS(Q61H) Fusion Vector	20µg	NV4731
LgBiT-KRAS(Q61L) Fusion Vector	20µg	NV4741
SmBiT(q)-KRAS(Q61L) Fusion Vector	20µg	NV4751
LgBiT-KRAS(Q61R) Fusion Vector	20µg	NV4761
SmBiT(q)-KRAS(Q61R) Fusion Vector	20µg	NV4771
LgBiT-KRAS(Y96D) Fusion Vector	20µg	NV4781
SmBiT(q)-KRAS(Y96D) Fusion Vector	20µg	NV4791
LgBiT-HRAS WT Fusion Vector	20µg	NV4801
SmBiT(q)-HRAS WT Fusion Vector	20µg	NV4811
LgBiT-HRAS(G12C) Fusion Vector	20µg	NV4821
SmBiT(q)-HRAS(G12C) Fusion Vector	20µg	NV4831
LgBiT-HRAS(G12V) Fusion Vector	20µg	NV4841
SmBiT(q)-HRAS(G12V) Fusion Vector	20µg	NV4851

8F. 相关产品（续）

Intracellular TE Nano-Glo® Substrate/Inhibitor

产品	规格	目录号
Intracellular TE Nano-Glo® Substrate/Inhibitor	100 assays	N2162
	1000 assays	N2160
	10000 assays	N2161
Intracellular TE Nano-Glo® Vivazine™/Inhibitor	1000 assays	N2200
	10000 assays	N2201

NanoBRET™ Target Engagement Assay Reagent

产品	规格	目录号
Tracer Dilution Buffer	50ml	N2191
Transfection Carrier DNA	5×20µg	E4881
	2×100µg	E4882

转染试剂

产品	规格	目录号
FuGENE® HD Transfection Reagent	1ml	E2311
	5×1ml	E2312

发光检测仪

产品	规格	目录号
GloMax® Discover System	1 each	GM3000

仅供研究使用。不得用于诊断程序。

^(a)NanoBiT[®] ORF TE Vector Limited Use Label License

BY USE OF THIS PRODUCT, RESEARCHER AGREES TO BE BOUND BY THE TERMS OF THIS LIMITED USE LABEL LICENSE. If researcher is not willing to accept the terms of this label license, and the product is unused, Promega will accept return of the unused product and provide researcher with a full refund.

Researcher may use this product for research use only; no transfer or commercial use of this product is allowed. Commercial use means any and all uses of this product by a party in exchange for consideration, including, but not limited to (1) use in further product manufacture; (2) use in provision of services, information or data; and (3) resale of the product, whether or not such product is resold for use in research.

Researchers shall have no right to modify or otherwise create variations of the nucleotide sequences of the subunits of NanoBiT[®] Technology. No other use of this product or its derivatives is authorized without the prior express written consent of Promega.

In addition, researcher must:

(1a) use Nano-Glo[®]-branded luminescent assay reagents (LARs) for all determinations of luminescence activity of this product; or (1b) contact Promega to obtain a license for use of the product with LARs not manufactured by Promega.

For uses of this product for energy transfer (such as bioluminescence resonance energy transfer), researcher must:

(2a) use NanoBRET[™]-branded luminescent assay reagents (LARs; e.g., NanoBRET[™] Nano-Glo[®] Substrate), Intracellular TE Nano-Glo[®] Substrate/Inhibitor, or Intracellular TE Nano-Glo[®] Vivazine[™]/Inhibitor for all determinations of luminescent activity; and

(2b) use NanoBRET[™]-branded energy acceptors (e.g., NanoBRET[™] tracers, NanoBRET[™] dyes, BRET-optimized HaloTag[®] ligands) for all determinations of energy transfer activity; or

(2c) contact Promega to obtain a license for use of the product for energy transfer assays using energy acceptors not manufactured by Promega. No license is needed if the energy transfer acceptor is a genetically encoded autofluorescent protein.

With respect to any uses outside this label license, including any diagnostic, therapeutic, prophylactic or commercial uses, please contact Promega for supply and licensing information. PROMEGA MAKES NO REPRESENTATIONS OR WARRANTIES OF ANY KIND, EITHER EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING FOR MERCHANT-ABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, WITH REGARD TO THE PRODUCT. The terms of this label license shall be governed under the laws of the State of Wisconsin, USA.

^(b) NanoBRET™ TE Tracers V2 Limited Use Label License

BY USE OF THIS PRODUCT, RESEARCHER AGREES TO BE BOUND BY THE TERMS OF THIS LIMITED USE LABEL LICENSE. If researcher is not willing to accept the terms of this label license, and the product is unused, Promega will accept return of the unused product and provide researcher with a full refund.

Researcher may use this product for research use only; no commercial use is allowed. Commercial use means any and all uses of this product by a party in exchange for consideration, including, but not limited to (1) use in further product manufacture; (2) use in provision of services, information or data; and (3) resale of the product, whether or not such product is resold for use in research. Researcher shall have no right to modify or otherwise create variations of the product. No other use or transfer of this product is authorized without the prior express written consent of Promega.

For uses of this product for energy transfer (such as bioluminescence resonance energy transfer), researcher must:

(a) use NanoLuc®-branded luciferase or derivatives, or subunits of the NanoBiT® technology for all energy transfer determinations conducted with this product; and

(b) use NanoBRET™-branded luminescent assay reagents (LARs; e.g., NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate), Intracellular TE Nano-Glo® Substrate/Inhibitor, or Intracellular TE Nano-Glo® Vivazine™/Inhibitor for all determinations of luminescent activity; or

(c) contact Promega to obtain a license for use of the product with LARs not listed above or manufactured by Promega.

In addition, researcher must:

Contact Promega to obtain a license for use of the product in assays not involving bioluminescence resonance energy transfer (BRET).

With respect to any uses outside this label license, including any diagnostic, therapeutic, prophylactic or commercial uses, please contact Promega for supply and licensing information. PROMEGA MAKES NO REPRESENTATIONS OR WARRANTIES OF ANY KIND, EITHER EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING FOR MERCHANT-ABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, WITH REGARD TO THE PRODUCT. The terms of this label license shall be governed under the laws of the State of Wisconsin, USA.

^(c) NanoBRET™ TE LAR Limited Use Label License

BY USE OF THIS PRODUCT, RESEARCHER AGREES TO BE BOUND BY THE TERMS OF THIS LIMITED USE LABEL LICENSE. If researcher is not willing to accept the terms of this label license, and the product is unused, Promega will accept return of the unused product and provide researcher with a full refund.

Researcher may use this product for research use only; no commercial use is allowed. Commercial use means any and all uses of this product by a party in exchange for consideration, including, but not limited to (1) use in further product manufacture; (2) use in provision of services, information or data; and (3) resale of the product, whether or not such product is resold for use in research. Researcher shall have no right to modify or otherwise create variations of the product. No other use or transfer of this product is authorized without the prior express written consent of Promega.

For uses of this product intended for energy transfer (such as bioluminescence resonance energy transfer) to acceptors other than genetically encoded autofluorescent protein, researcher must:

(a) use NanoBRET™-branded energy acceptors (e.g., NanoBRET™ tracers, NanoBRET™ dyes, BRET-optimized HaloTag® ligands) for all determinations of energy transfer activity; or

(b) contact Promega to obtain a license for use of the product for energy transfer assays using energy acceptors not manufactured by Promega.

With respect to any uses outside this label license, including any diagnostic, therapeutic, prophylactic or commercial uses, please contact Promega for supply and licensing information. PROMEGA MAKES NO REPRESENTATIONS OR WARRANTIES OF ANY KIND, EITHER EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING FOR MERCHANT-ABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, WITH REGARD TO THE PRODUCT. The terms of this label license shall be governed under the laws of the State of Wisconsin, USA.

^(d)U.S. Pat. Nos. 9,797,889, 9,797,890, 10,107,800 and 11,493,504, European Pat. Nos. 2970412 and 3783011, Japanese Pat. No. 6654557, and other patents pending.

^(e)U.S. Pat. No. 8,809,529, European Pat. No. 2635582, Japanese Pat. No. 5889910 and other patents and patents pending.

^(f)U.S. Pat. Nos. 10,067,149 and 10,024,862, Japanese Pat. Nos. 6751294 and 7092691 and other patents and patents pending.

^(g)Patent Pending.

© 2023 Promega Corporation. All Rights Reserved.

GloMax, NanoBiT, Nano-Glo and NanoLuc are registered trademarks of Promega Corporation. NanoBRET and Vivazine are trademarks of Promega Corporation.

CLARIOstar is a registered trademark of BMG Labtech. Corning is a registered trademark of Corning, Inc. Envision is a registered trademark of PerkinElmer, Inc. FuGENE is a registered trademark of Fugent, L.L.C., USA. Opti-MEM is a trademark and Varioskan is a registered trademark of Thermo Fisher Scientific.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.