



Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Reagents 应用说明

使用小分子抑制剂调控 KRAS-c-RAF 相互作用

Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Immunoassay:

Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Immunoassay 是一种均质型的生物发光方法，用于测定蛋白质-蛋白质或蛋白质-小分子间的相互作用。它结合了免疫检测和 NanoLuc[®] 二亚单元技术 (NanoBiT[®])。在 Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Immunoassay 中，NanoBiT[®] 亚基 (SmBiT 和 LgBiT) 被偶联至针对常用蛋白标签的两种抗体 (或链霉亲和素)。当 anti-Tag-LgBiT 和 anti-Tag-SmBiT 加入到带有相应标签的相互作用蛋白对中时，LgBiT 和 SmBiT 相互靠近，从而形成一个活性的萤光素酶，在存在底物的情况下产生发光 (图 1A)。Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Immunoassay 具有简单、无需洗涤的格式 (图 1B)，仅需少量样本体积，并且能以高通量格式运行。

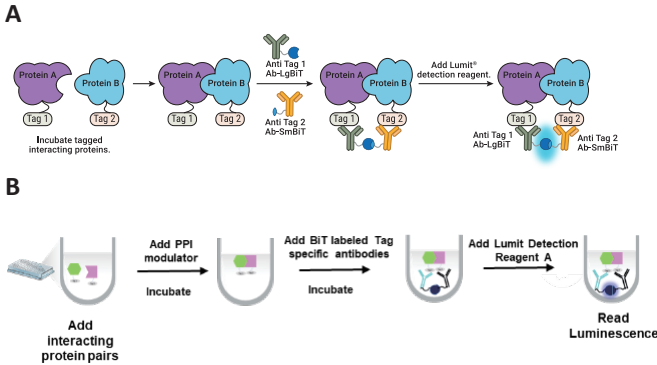


图 1. Anti-Tag Protein Interaction Immunoassay 示意图。A. 当 Protein A 和 Protein B 的相互作用使得 LgBiT 和 SmBiT 彼此靠近时，一个有活性的萤光素酶会在底物存在的条件下产生发光信号。**B.** 简单无需洗涤的流程概览。

KRAS 作为关键的治疗靶点

KRAS 是 RAS 超家族的一员，调控细胞的生长、分化和增殖。通过与 GDP 和 GTP 的相互作用，KRAS 在非活性和活性状态之间切换。这些转换受到鸟嘌呤核苷酸交换因子 (GEFs) 的调控，它们促进 GTP 的结合，以及鸟嘌呤激活蛋白 (GAPs) 的作用，后者水解 GTP 并重新开始循环。

KRAS 是人类癌症中最常出现突变的致癌基因之一。突变最常发生在第 12、13 和 61 位密码子上，这些突变干扰了 GAP 介导的水解，导致激活态 KRAS 的积累。

在这里，我们描述了使用蛋白标签的 Lumit[®] Protein Interaction Immunoassay 来监测 KRAS 与效应蛋白 c-RAF 的相互作用 (图 2)。

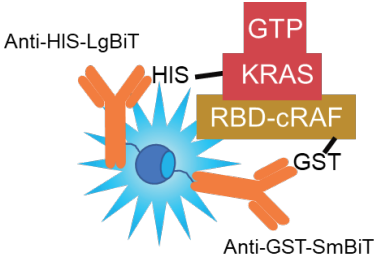


图 2. KRAS/c-RAF Lumit[®] Immunoassay 示意图。

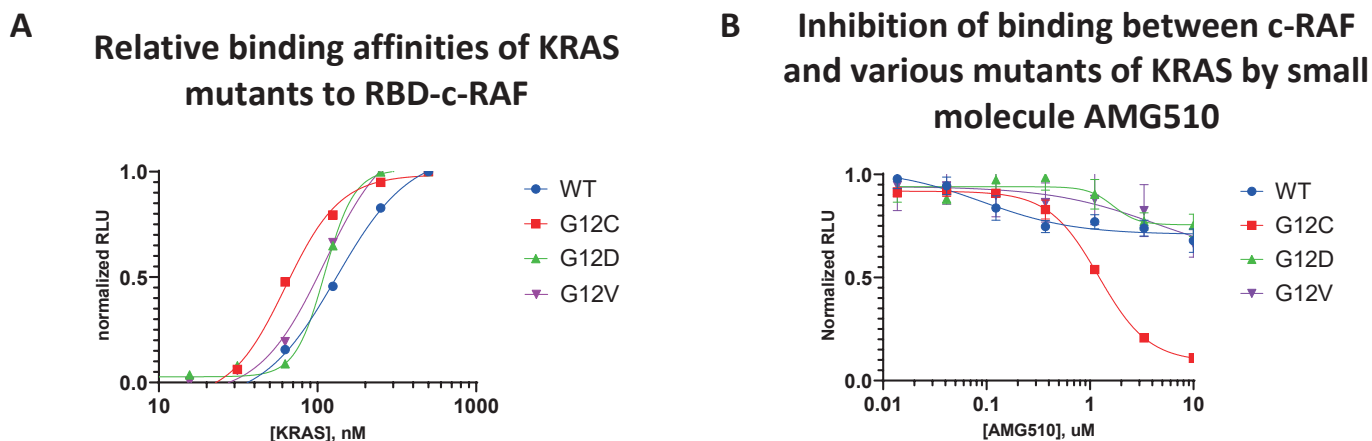


图 3. 评估不同 KRAS 突变对 RBD-c-RAF 亲和力及 AMG510 抑制效果的差异。 (A) 使用 BiT 标记抗体检测时，随着 KRAS-6HIS (野生型或突变型) 浓度逐渐增加，其与 RBD-c-RAF-GST 的相互作用产生的发光信号也逐渐增加；(B) AMG510 特异性抑制 KRAS(G12C)/RBD-c-RAF 的相互作用，而对野生型和其他 KRAS 突变体影响较小。浓度表示为每孔的终浓度。

Lumit[®] KRAS-c-RAF Binding Immunoassay

1. 制备 KRAS 交换缓冲液 (1×TBS/5mM EDTA/0.5mM MgCl₂/1mM DTT)，并向其中添加 GTP 至终浓度为 10μM。
2. 使用 KRAS 交换缓冲液对 KRAS 和 KRAS 突变体进行倍比稀释。每孔加入 10μl。
3. 震荡孵育 10 分钟，以形成激活态的 KRAS-GTP。
4. 加入 MgCl₂ 至 10mM，以螯合 EDTA 并稳定 GTP 结合的 KRAS。
5. 加入 10μl 的 200nM RBD-c-RAF，该 RBD-c-RAF 用 1× TBS/1mM DTT 稀释，震荡孵育 30 分钟。
6. 分别加入 20μl 的 anti-6HIS-LgBiT 和 anti-GST-SmBiT，这两种抗体均使用 1× Lumit[®] Immunoassay Dilution Buffer 稀释至 1.5μg/ml。
7. 震荡孵育 30 分钟。
8. 使用 Lumit[®] Immunoassay Dilution Buffer A 按 1:50 的比例对 Lumit[®] Detection Substrate A 进行稀释，之后每孔加入 10ul。
9. 震荡孵育 2 分钟。
10. 测量发光信号。
11. 对于抑制测定，200nM 的 KRAS 预先与 AMG510 在 1× TBS/1mM DTT 中孵育，其余步骤按照上述实验流程进行。

所需材料:

Item	Supplier	Cat. #
KRAS, WT, HIS tagged	BPSBioscience	11308
KRAS(G12C), HIS tagged	BPSBioscience	100413
KRAS(G12D), HIS tagged	BPSBioscience	100623
KRAS(G12V), HIS tagged	BPSBioscience	100480
RBD-c-RAF, GST tagged	BPSBioscience	9145
AMG-510	Selleck Chemicals	S8830

订购信息:

Item	Cat. #
Lumit [®] Anti-6HIS-LgBiT and -SmBiT	W1600
Lumit [®] Anti-GST-LgBiT and -SmBiT	W1620
Lumit [®] Immunoassay Detection Reagent A	VB2010