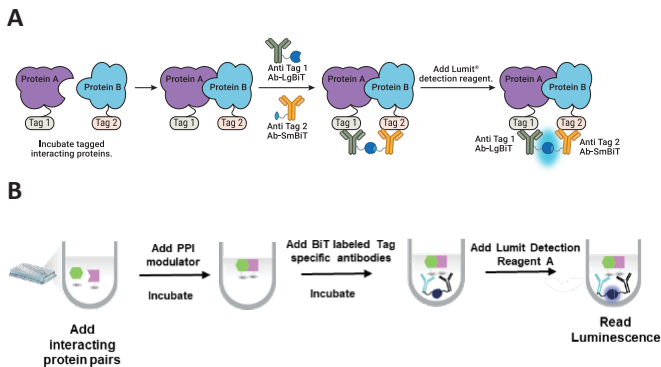


### 使用 PROTACs 监测三元复合物形成

#### Lumit<sup>®</sup> Anti-Tag Protein Interaction Immunoassay:

Lumit<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 二亚单元技术 (NanoBiT<sup>®</sup>)。在 Lumit<sup>®</sup> Anti-Tag Protein Interaction Immunoassay 中，NanoBiT<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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。

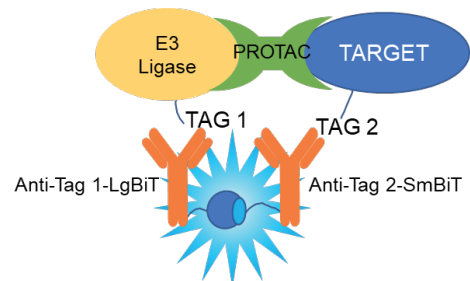


**图 1. Anti-Tag Protein Interaction Immunoassay 示意图。** **A.** 当 Protein A 和 Protein B 的相互作用使得 LgBiT 和 SmBiT 彼此靠近时，一个有活性的萤光素酶会在底物存在的条件下产生发光信号。 **B.** 简单无需洗涤的流程概览。

#### PROTACs

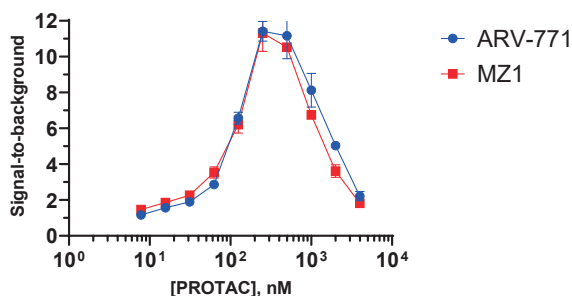
PROTACs (PROteolysis TARgeting Chimeras, 即蛋白水解靶向嵌合体) 是异质双功能小分子，它们能将靶标蛋白带到 E3 泛素连接酶附近进行降解。PROTAC 由两个配体通过 linker 连接而成。其中一个配体结合 E3 连接酶 (通常为 Cereblon 或 VHL)，以激活细胞内的泛素系统; 另一个配体则结合靶标蛋白。当 PROTAC 与靶标和 E3 结合时，E3 连接酶招募酶类，导致靶标蛋白的泛素化并最终通过蛋白酶体降解。

PROTACs 作为传统抑制剂的替代方案，具有显著的治疗潜力。与小分子药物不同，PROTACs 在细胞内可循环利用，这使得降解得以持续，而且 PROTAC 的结合位点不限于靶标蛋白的活性位点，这为以往认为是“不可成药”的蛋白开辟了新的靶向机会。如图 2 所示，使用蛋白标签的 Lumit<sup>®</sup> Protein Interaction Immunoassays 提供了一种简单生物发光的方法来筛选 PROTACs。

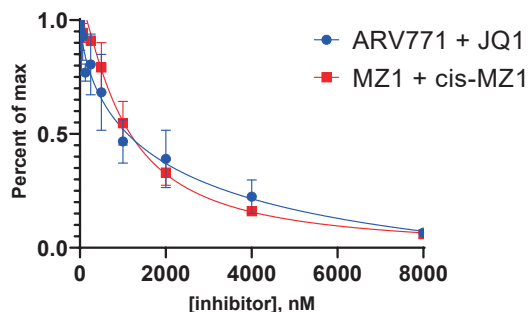


**图 2. Lumit<sup>®</sup> PROTAC Immunoassay。** PROTACs 将 E3 连接酶和靶标蛋白带入接近位置，这可以通过使用 BiT 标记的抗标签抗体进行检测。

### A PROTAC driven VHL complex/BRD3(BD2) ternary complex formation



### B Titration of ternary complex inhibitors



**图 3. 使用不同 PROTACs 检测三元复合物的形成。** (A) PROTACs ARV-771 和 MZ1 诱导 VHL 复合体于 BRD3 (BD2) 形成三元复合体。直到大约 250nM, 随着 PROTAC 浓度的增加, 发光信号上升, 表明三元复合体的量在增加。在发光信号峰值处, PROTAC 已经饱和了 E3 和 / 或靶标蛋白。更高浓度的 PROTAC 会导致发光信号的下降或“钩状效应”, 这是由于形成了非产物的二元复合物。(B) 分别增加 JQ1 或 cis-MZ1 的浓度加入到 PROTAC/ 蛋白混合物中, 与产生的三元复合物竞争。浓度为每孔中的终浓度。

## Lumit<sup>®</sup> PROTAC 介导的 VHL 复合体 /BRD3(BD2) Immunoassay

1. 将 100nM BRD3(BD2) 和 100nM VHL 复合体与 (A) 梯度稀释的 ARV-771 或 MZ1 或 (B) 250nM PROTAC 和梯度稀释的靶标蛋白结合物 (对于 ARV-771: JQ1, 对于 MZ1: cis MZ1) 混合。向各孔中加入 20 $\mu$ l 混合物。
2. 振荡孵育 1 小时。
3. 用 1x Lumit<sup>®</sup> Immunoassay Dilution Buffer A 对 anti-DYKDDDDK-SmBiT 和 anti-GST-LgBiT (1.5 $\mu$ g/ml) 稀释, 每加入 20 $\mu$ l 的抗体混合液。
4. 振荡孵育 30 分钟。
5. 用 Lumit<sup>®</sup> Immunoassay Dilution Buffer A 按 1:50 的比例对 Lumit<sup>®</sup> Detection Substrate A 进行稀释后, 每孔加入 10 $\mu$ l。
6. 振荡孵育 2 分钟。
7. 测量发光信号。

### 所需材料:

Item	Supplier	Cat. #
VHL Complex	BPSBioscience	100373
BRD3(BD2)	BPSBioscience	31033
ARV-771	MedChemExpress	1949837-12-0
MZ1	Tocris	6154
JQ1	Tocris	4499
cis-MZ1	Tocris	6155

### 订购信息:

Item	Cat. #
Lumit <sup>®</sup> Anti-DYKDDDDK-LgBiT and -SmBiT	W1640
Lumit <sup>®</sup> Anti-GST-LgBiT and -SmBiT	W1620
Lumit <sup>®</sup> Immunoassay Detection Reagent A	VB2010