

监测蛋白激酶与小分子抑制剂之间的相互作用

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。

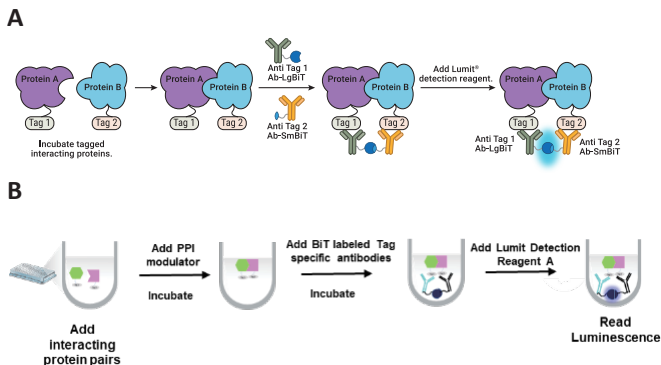


图 1. Anti-Tag Protein Interaction Immunoassay 示意图。A.

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。

小分子激酶抑制剂

蛋白激酶是一种广泛表达的蛋白质，根据它们磷酸化的氨基酸类型分为：丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸激酶。这三种类型的蛋白激酶调节着众多的细胞信号通路。由于它们的功能通常是启动生长、生存和分化，因此持续激活或过表达的激酶会导致诸如癌症等疾病状态。因此，激酶抑制剂成为抗肿瘤药物中受欢迎的一类。如图 2 所示，使用蛋白标签的 Lumit[®] Protein Interaction Immunoassay 提供了一种简单的生物发光方法来筛选激酶抑制剂。

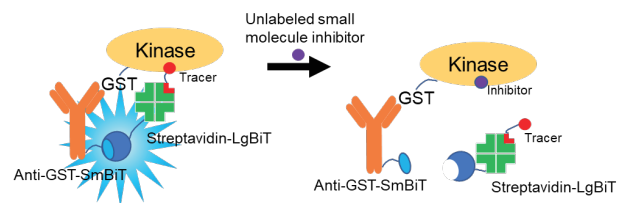
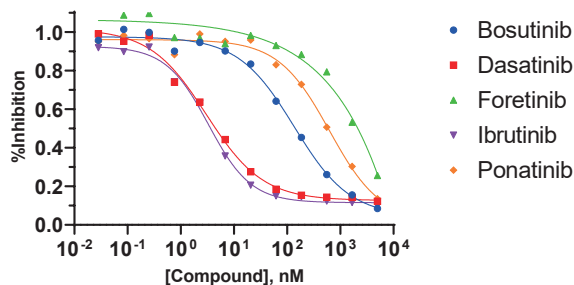


图 2. Lumit[®] 激酶 - 小分子抑制免疫测定。在此测定中，小分子激酶抑制剂与 Ibrutinib-Biotin 示踪剂竞争结合，导致在使用 BiT 标记的抗标签抗体和链霉亲和素检测时，发光信号下降。

A Relative potency of kinase inhibitors against TEC



B Relative potency of kinase inhibitors against SRC

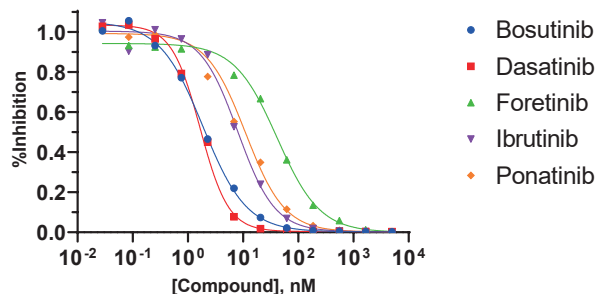


图 3. 比较小分子激酶抑制剂的相对 IC₅₀ 值。未标记的小分子药物与示踪剂 (ibrutinib-Biotin) 竞争结合 (A) TEC-GST 或者 (B) SRC-GST。图中显示了每种小分子抑制剂的相对 IC₅₀ 值。浓度以各孔中的最终浓度表示。

Lumit[®] 激酶 - 小分子相互作用免疫测定法

1. 在激酶缓冲液中，制备含有 25nM ibrutinib-Biotin 和一系列未标记小分子抑制剂稀释液的混合液。
2. 向混合液中添加 10nM 的激酶，然后向各孔中加入 20 μ l 的混合液。
3. 震荡孵育 60 分钟。
4. 加入 20 μ l 的 anti-GST-LgBiT (0.38 μ g/ml) 和 Streptavidin-SmBiT (0.18 μ g/ml) 混合液，该混合液用 1 \times Lumit[®] Immunoassay Dilution Buffer A 进行稀释。
5. 震荡孵育 30 分钟。
6. 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 10 μ l。
7. 震荡孵育 2 分钟。
8. 测量发光信号。

所需材料：

Item	Supplier	Cat. #
Bosutinib	Selleck Chemicals	S1014
Dasatinib	LC Laboratories	D-3307
Foretinib	Selleck Chemicals	S1111
Ibrutinib	Selleck Chemicals	S2680
Ponatinib	Selleck Chemicals	S1490
Ibrutinib-biotin	MedChemExpress	HY-100342

订购信息：

Item	Cat. #
TEC Kinase Enzyme System	VA7306
SRC Kinase Enzyme System	V2921
Lumit [®] Streptavidin-LgBiT and -SmBiT	W1660
Lumit [®] Anti-GST-LgBiT and -SmBiT	W1620
Lumit [®] Immunoassay Detection Reagent A	VB2010