

### 监测 Cbl-b 自泛素化

#### 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。

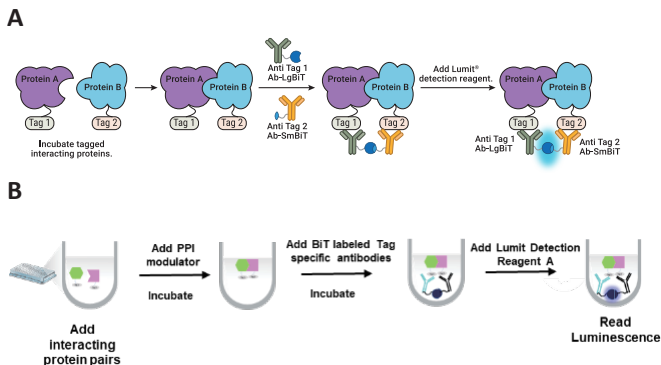


图 1. Anti-Tag Protein Interaction Immunoassay 示意图。A.

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。

#### 泛素化：细胞中的关键过程

泛素化是一个重要的细胞过程，蛋白质通过泛素的附着而被降解。这三步过程需要三种酶：泛素激活蛋白 (E1)、泛素偶联蛋白 (E2) 以及泛素蛋白连接酶 (E3)。为了标记蛋白质进行降解，首先，E1 通过 ATP 依赖的过程中，在自身半胱氨酸基团与泛素之间形成一个硫酯键。接下来，E2 结合 E1、活化的泛素，并催化泛素从 E1 向 E2 的转移。最后，E3 在靶蛋白的赖氨酸与泛素的 C 末端甘氨酸之间形成异肽键。接下来，在单泛素化的蛋白质上继续添加额外的泛素分子，形成多泛素链。最终，泛素作为识别信号，介导 26S 蛋白体对蛋白质进行降解。

人类有两类 E1 酶，大约 40 种 E2 酶，以及超过 600 种 E3 酶。因此，E3 为泛素级联提供了对底物的特异性。在此，我们使用 Lumit<sup>®</sup> Anti-Tag Protein Interaction Immunoassay 研究了一种 E3 连接酶，即 Cbl-b (图 2)。Cbl-b 的功能对于维持 T 细胞耐受性和 T 细胞激活之间的平衡至关重要。功能障碍会导致从自身免疫疾病到淋巴瘤的各种疾病状态。我们通过监测自泛素化来间接监测目标蛋白质的泛素化。

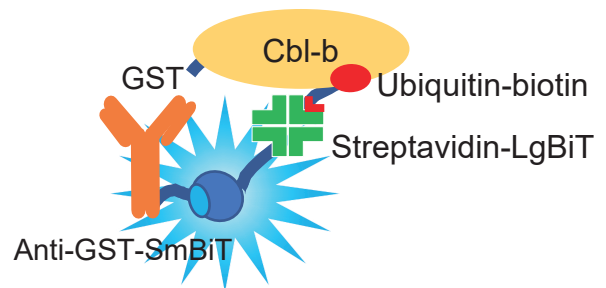
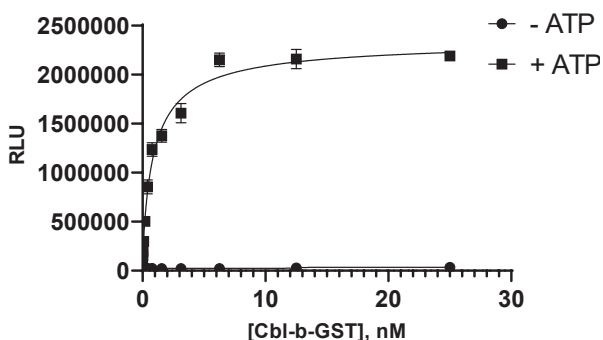
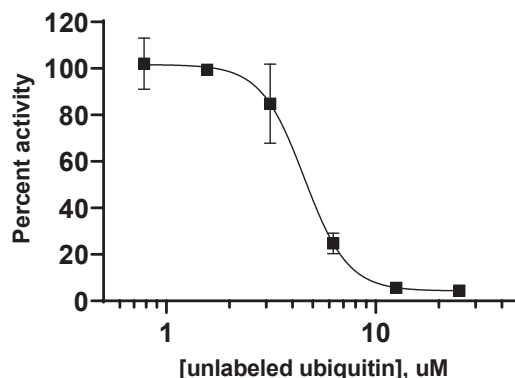


图 2. Lumit<sup>®</sup> Cbl-b 自泛素化免疫测定、免疫检测还是免疫实验，说法最好统一一下。在必要的泛素化组分 E1、E2 和 ATP 存在下，Lumit<sup>®</sup> Immunoassay 能够测定生物素化泛素与 GST-Cbl-b 之间的相互作用。

### A ATP dependence of Cbl-b autoubiquitination



### B Inhibition assay with unlabeled ubiquitin



**图 3. 检测 Cbl-b 的自泛素化。** (A) 在 ATP 存在下, Cbl-b-GST 泛素化随浓度的依赖性增加会导致发光信号的增强。由于这一过程依赖于 ATP, 在没有 ATP 的情况下, 仅有低水平的背景信号。(B) 一系列未标记的泛素被用来与生物素化泛素竞争结合, 导致发光信号以浓度依赖的方式减少。通过将仅含有生物素化泛素的反应中获得的生物发光信号最大值设为 100%, 并计算随着未标记泛素滴定到反应中信号的百分比下降, 从而生成归一化的 RLU 数据。浓度表示为每个孔中的终浓度。

## Lumit<sup>®</sup> Immunoassay 用于检测 Cbl-b 的泛素化

1. 准备反应混合物, 包含 42nM UBE1, 244nM UBCH5b, 20 $\mu$ M ATP (或仅缓冲液作为对照), 以及生物素化泛素。
2. 准备 Cbl-b-GST 的稀释系列物。
3. 向 96 孔板中每孔加入 10 $\mu$ l 反应混合物和 10 $\mu$ l Cbl-b-GST。
4. 在 37 $^{\circ}$ C 下震荡孵育 4 小时。
5. 加入 20 $\mu$ l 反应混合物, 其中包含 0.10 $\mu$ g/ml anti-GST-SmBiT 和 0.33 $\mu$ g/ml Streptavidin-LgBiT, 这 2 种成分用 Lumit<sup>®</sup> Immunoassay Dilution Buffer A 进行稀释。
6. 震荡孵育 30 分钟。
7. 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, 之后每孔加入 10 $\mu$ l。
8. 震荡孵育 2 分钟。
9. 测量发光信号。

### 所需材料:

Item	Supplier	Cat. #
CBL-B TR-FRET Assay Kit	BPSBioscience	79575

### 订购信息:

Item	Cat. #
Lumit <sup>®</sup> Streptavidin-LgBiT and -SmBiT	W1660
Lumit <sup>®</sup> Anti-GST-LgBiT and -SmBiT	W1620
Lumit <sup>®</sup> Immunoassay Detection Reagent A	VB2010