

微量体积 Lumit[®] 抗标签蛋白相互作用反应与 HTRF[™] 检测对比

本方案由 Promega 应用科学家开发，仅供研究使用。用户需自行确定该方案是否适用于其具体应用。如需更多信息，请参阅技术手册 TM723，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

采用均质（免洗）检测形式，使用 Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Reagents 测量蛋白质 - 蛋白质或蛋白质 - 小分子相互作用，具有卓越的线性范围、高灵敏度和操作灵活性。

试剂盒： Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Reagents
(目录号 W1600、W1620、W1640 和 W1660)

分析方法： 发光检测

样品类型： 带标签的相互作用蛋白质或小分子

所需材料：

- Lumit[®] Anti-Tag SmBiT 和 LgBiT（如用于 6His 和 FLAG[®] 标签，目录号 W1611 和 W1641）
- Lumit[®] Immunoassay Detection Reagent A（目录号 VB2010）
- Tris 缓冲盐溶液（TBS）
- 白色 96 孔低体积板（如 Revvity 目录号 66PL96005）
- 平板振荡器
- 平板密封膜
- 用于检测 Lumit[®] assays 的发光检测仪（如 GloMax[®] Discover System）

操作步骤：

实验开始前请查阅技术手册（TM723），获取针对特定目标蛋白相互作用检测的 Lumit[®] 免疫检测优化方案。

Lumit[®] Anti-Tag Assay 的典型应用场景包括：在抑制剂处理条件下监测蛋白质 - 蛋白质 / 小分子相互作用。低容量反应体系各孔组分分配比如下：

Reagent	Volume (20µl reaction)
8X Protein A-Tag 1	2µl
8X Protein B-Tag 2	2µl
4X inhibitor dilution series	4µl
2X anti-Tag antibody master mix	8µl
Lumit [®] detection reagent	4µl

1. 配制蛋白相互作用缓冲液。通用注意事项与添加剂兼容性请参阅技术手册（TM723）第3章节。
2. 将 Protein A-Tag 1 用蛋白相互作用缓冲液稀释至优化浓度的 8 倍，制成 8X 蛋白溶液。对 Protein B-Tag 2 重复相同操作。
3. 用蛋白相互作用缓冲液配制 4 倍工作浓度的抑制剂梯度稀释液，需设置仅含缓冲液的阴性对照孔。
4. 将 10X Lumit[®] Immunoassay Dilution Buffer A 用 Tris 缓冲盐溶液（TBS）稀释至 1X，制备 1X Lumit[®] dilution buffer，置于冰上保存。
5. 用 1X Lumit[®] dilution buffer 配制 2X 抗标签抗体混合液，包含优化确定的 2 倍浓度抗 Tag-SmBiT 和抗 Tag-LgBiT，置于冰上保存。
6. 向白色 96 孔低体积板各孔加入 2 μ l 8X Protein A-Tag 1 和 2 μ l 8X Protein B-Tag 2。
7. 向检测板加入 4 μ l 4X 抑制剂稀释液。
8. 孵育形成蛋白复合物，具体孵育条件因蛋白组合而异。
9. 向检测板加入 8 μ l 2X 抗标签抗体混合液。
10. 室温孵育 30 分钟。
11. 将 Lumit[®] Detection Substrate A 用 1X Lumit[®] dilution buffer 进行 50 倍稀释，制备 Lumit[®] detection reagent，倒置混匀。
12. 每孔加入 4 μ l Lumit[®] detection reagent。
13. 室温下轻柔振荡孵育 3-5 分钟。
14. 使用微孔板读数发光检测仪测量发光信号。

结果:

将 Lumit[®] Anti-Tag 微量体积反应体系 (20 μ l) 与标准体积反应体系 (50 μ l) 及 HTRF[™] 检测体系 (20 μ l) 进行对比。采用 Lumit[®] Anti-6His SmBiT 和 Lumit[®] Anti-DYKDDDDK LgBiT (识别 FLAG[®]) 在 50 μ l 标准体积和 20 μ l 微量体积反应中对双标签蛋白 (His/FLAG[®] 标签) 的稀释系列进行了检测 (图 1 左)。该蛋白稀释系列也通过 HTRF[™] (mAb Anti-6His Tb Cryptate Gold 与 mAb Anti-FLAG[®] d2) 进行了检测 (图 1 右)。Lumit[®] 反应在 GloMax[®] Discover System 上检测, HTRF[™] 反应在具备时间分辨荧光能量转移 (TR-FRET) 滤光功能的 Tecan Spark[®] Cyto 酶标仪上完成检测。

微量体积与标准体积的 Lumit[®] 反应体系表现出相似的信号背景比, 并具有等效的检测灵敏度与线性范围。相较于 HTRF[™] 体系 (40 倍蛋白稀释范围), 微量体积 Lumit[®] 反应体系展现出更宽的动态范围 (100 倍蛋白稀释范围; 表 1), 在保持同等灵敏度的前提下可实现更广浓度范围的蛋白检测。

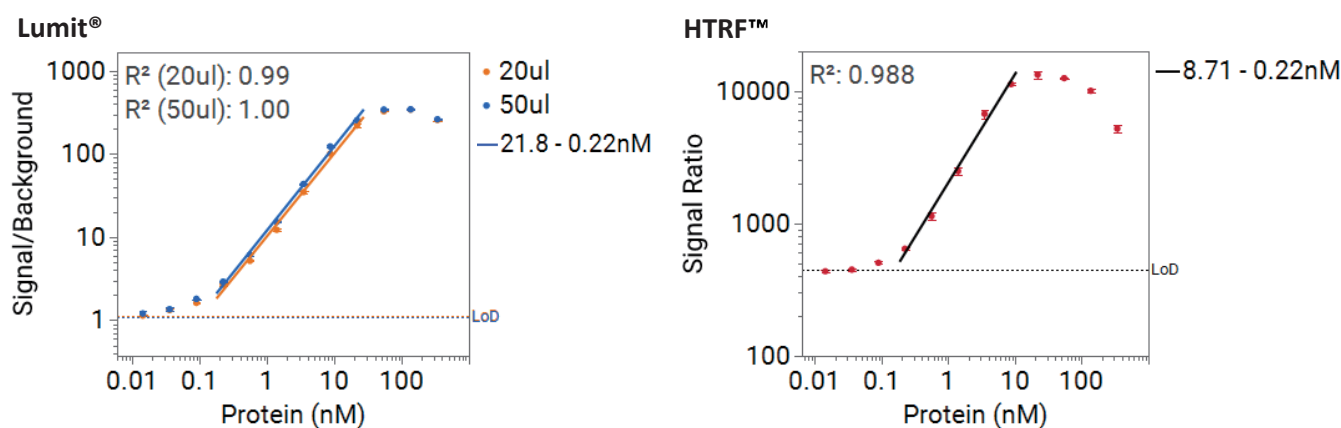


图 1. 使用 Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Reagents 与 HTRF[™] 检测法测量蛋白梯度稀释系列。制备了 340.1-0.01nM 的双标签蛋白 (His/FLAG[®] 标签) 梯度稀释系列, 分别用两种试剂盒进行检测。**左图: 50 μ l 与 20 μ l Lumit[®] Anti-Tag 反应。**按照技术手册, 在 96 孔半区板中用 Lumit[®] Anti-6His SmBiT 和 Anti-DYKDDDDK LgBiT 配制 50 μ l (标准) 反应体系, 在 96 孔低体积板中配制 20 μ l 反应体系 (方法同上, 省略抑制剂步骤)。发光信号在 GloMax[®] Discover System 上检测。数据表示为平均信背比 $\pm$ 标准差 ($n=3$)。检测限 (LoD) = 平均背景 RLU + ($3 \times$ 标准差), 以水平线标示 (LoD/ 平均背景 RLU)。拟合线对应 50 μ l 或 20 μ l 反应体系的线性范围 (21.8-0.22nM)。**右图: HTRF[™] 反应。**如方案所述, 在 96 孔低体积板中用抗 6His Tb Cryptate Gold 单抗和抗 FLAG[®] d2 单抗配制 20 μ l (标准) 反应体系。信号在具备 TR-FRET[†] 滤光功能的 Tecan Spark[®] Cyto 酶标仪上检测。信号比 = (665nm 信号 / 620nm 信号) $\times 10^4$ 。数据表示为平均信号比 $\pm$ 标准差 ($n=3$)。LoD = 平均背景信号比 + ($3 \times$ 标准差), 以水平线标示。拟合线对应线性范围 (8.71-0.22nM)。

表 1. 检测双标签蛋白 (His/FLAG® 标签) 梯度稀释液时 Lumit® 与 HTRF™ 检测体系形式及动态范围的对比。

Assay	Plate Size	Dynamic Range (nM)
Lumit® Anti-Tag Protein Interaction Reagents, standard volume (50µl)	96-well ½ area	21.8 – 0.22nM
Lumit® Anti-Tag Protein Interaction Reagents, reduced volume (20µl)	96-well low volume	21.8 – 0.22nM
HTRF™ Assay	96-well low volume	8.71 – 0.22nM

参考文献

Application Note: HTRF® assays with the Spark® multimode reader's enhanced fluorescence optics. Tecan publication 400901 v2.0, 2018-10.

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司

地址: 北京市东城区北三环东路 36 号
环球贸易中心 B 座 907-909
电话: 010-58256268
传真: 010-58256160

网址: www.promega.com
技术支持电话: 400 810 8133
技术支持邮箱: chinatechserv@promega.com
更新时间: 2025.07



关注 Promega
生命科学