

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 是一种均质生物发光检测方法，用于测量蛋白质-蛋白质或蛋白质-小分子相互作用。该技术结合了免疫检测与 NanoLuc 二元技术 (NanoBiT[®])。在 Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Immunoassay 中，NanoBiT[®] 亚基 (SmBiT 和 LgBiT) 与两种针对常见蛋白标签的抗体 (或链霉亲和素) 偶联。当抗标签 -LgBiT 和抗标签 -SmBiT 被添加到带有相应标签的相互作用蛋白对时，LgBiT 和 SmBiT 会相互靠近形成活性荧光素酶，在底物存在下产生发光信号 (图 1A)。Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Immunoassay 采用简单免洗操作模式 (图 1B)，所需样品体积小，并可支持高通量检测。

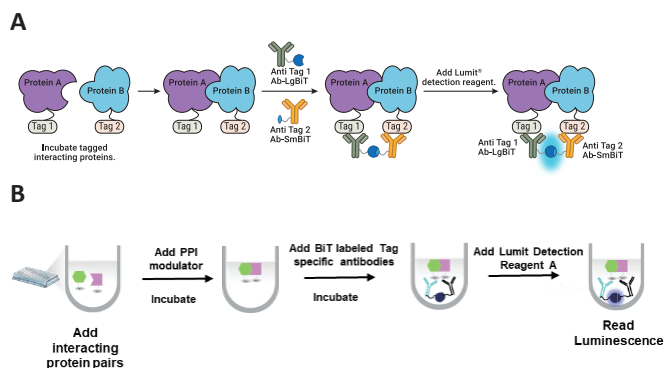


图 1. Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Immunoassay 示意图。 **A.** 当 LgBiT 和 SmBiT 通过蛋白 A 与蛋白 B 的相互作用相互靠近时，在底物存在下形成活性 NanoLuc 荧光素酶并产生发光信号。 **B.** 简易免洗操作流程概述。

KRAS 作为关键治疗靶点

KRAS 是 RAS 超家族成员，调控细胞生长、分化和增殖。KRAS 通过与 GDP 和 GTP 的相互作用分别切换非活性和活性状态。这些转换受鸟苷酸交换因子 (GEFs) 和 GTP 酶激活蛋白 (GAPs) 调控，GEFs 促进 GTP 结合，GAPs 水解 GTP 并重启循环。

KRAS 是人类癌症中最常发生突变的致癌基因之一。最常见的突变发生在 12、13 和 61 密码子，这些突变被认为会干扰 GAP 介导的水解作用，导致活化 KRAS 的积累。

本文描述利用蛋白标签的 Lumit[®] 蛋白相互作用免疫检测来监测 KRAS 与效应蛋白 c-RAF 的相互作用 (图 2)。

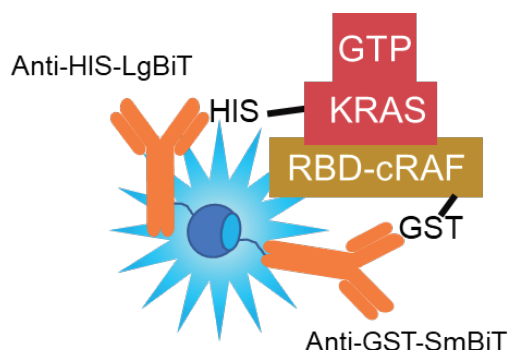


图 2. KRAS/c-RAF Lumit[®] 免疫检测示意图。



Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Reagents

应用说明

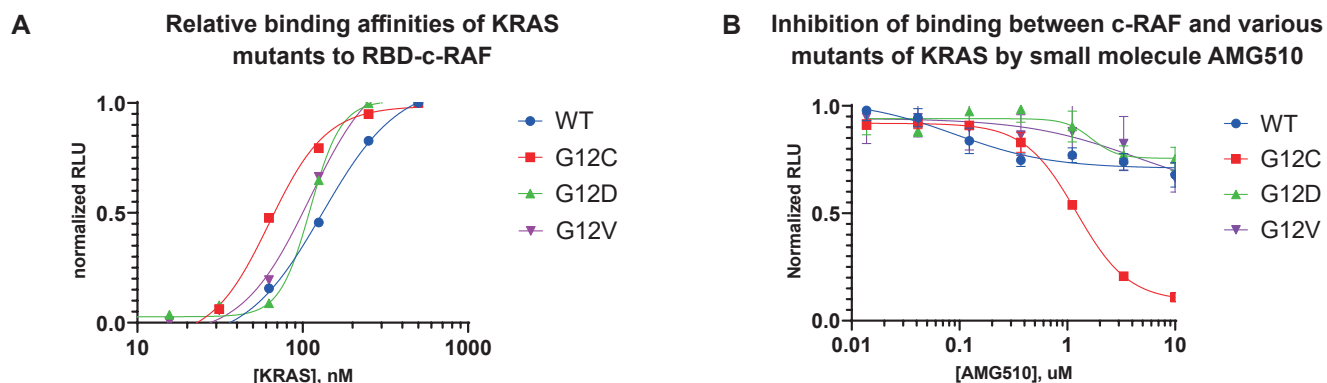


图 3. 评估 KRAS 突变体对 RBD-c-RAF 亲和力的差异及 AMG510 的抑制效应。(A) 使用 BiT 标记抗体检测时, RBD-c-RAF-GST 与浓度递增的 KRAS-6HIS (野生型或突变体 (相互作用导致发光信号增强))。(B) AMG510 特异性抑制 KRAS (G12C) /RBD-c-RAF 相互作用, 而对野生型及其他 KRAS 突变体 (如 G12D/G12V) 影响甚微。标注浓度为各孔终浓度。

Lumit[®] KRAS-c-RAF Binding Immunoassay

1. 配制 KRAS 交换缓冲液 (1xTBS/5mM EDTA/0.5mM $MgCl_2$ /1mM DTT), 加入 GTP 至终浓度 10 μ M。
2. 在 KRAS 交换缓冲液中制备 KRAS 及 KRAS 突变体的梯度稀释液。每孔加入 10 μ l。
3. 震荡孵育 10 分钟, 使活化的 KRAS-GTP 形成。
4. 加入 $MgCl_2$ 至 10mM 以螯合 EDTA 并稳定 GTP 结合的 KRAS。
5. 加入 10 μ l 用 1x TBS/1mM DTT 稀释的 200nM RBD-c-RAF, 震荡孵育 30 分钟。
6. 加入 20 μ l 用 1x Lumit[®] Immunoassay Dilution Buffer A 稀释至 1.5 μ g/ml 的抗 6HIS-LgBiT 和抗 GST-SmBiT。
7. 震荡孵育 30 分钟。
8. 每孔加入 10 μ l 按 1:50 比例用 Lumit[®] Immunoassay Dilution Buffer A 稀释的 Lumit[®] Detection Substrate A。
9. 震荡孵育 2 分钟。
10. 检测发光信号。
11. 抑制实验中, 将 200nM KRAS (G12C) 突变体与不同浓度的小分子抑制剂 AMG510 在缓冲液 (使用 1x TBS/1mM DTT 制备) 中预先孵育, 使抑制剂与靶点充分结合, 后续完全遵循标准 Lumit[®] 免疫检测步骤。(详细操作指导请查阅说明书 TM723)

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
c-RAF, GST tagged	BPSBioscience	100519
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