

监测蛋白激酶与小分子抑制剂的相互作用

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萤光素酶，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。

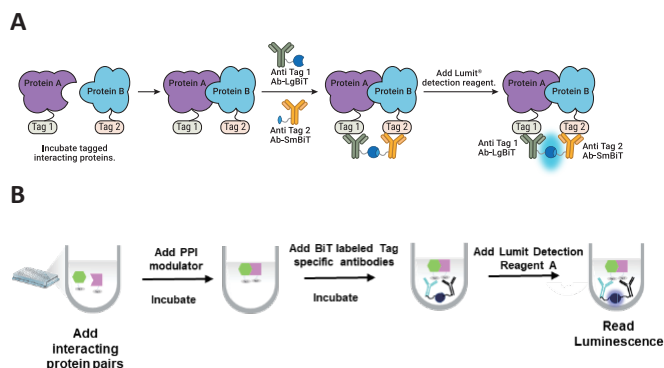


图 1. Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Immunoassay 示意图。 **A.** 当 LgBiT 和 SmBiT 通过蛋白 A 与蛋白 B 的相互作用相互靠近时，在底物存在下形成活性萤光素酶并产生发光信号。**B.** 简易免洗操作流程概述

小分子激酶抑制剂

蛋白激酶是一类广泛表达的蛋白质，根据其磷酸化的氨基酸类型可分为：丝氨酸激酶、苏氨酸激酶或酪氨酸激酶。这三类蛋白激酶均参与调控众多细胞信号通路。由于激酶的功能通常是启动生长、存活和分化通路，组成型激活或过表达的激酶会导致癌症等疾病状态。因此，激酶抑制剂成为一类重要的抗癌药物。如图 2 所示，采用蛋白标记的 Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Immunoassay 技术为激酶抑制剂筛选提供了一种简易的生物发光检测方法。

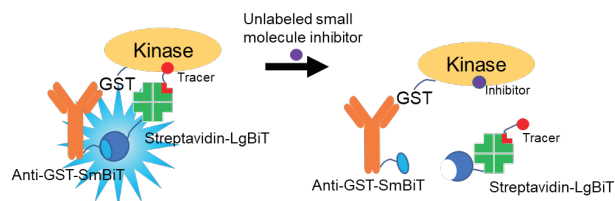


图 2. Lumit[®] kinase-small molecule inhibition immunoassay。

本检测中，小分子激酶抑制剂与 Ibrutinib-生物素示踪剂竞争结合靶蛋白，当使用 BiT 标记的抗标签抗体和链霉亲和素检测时，会导致发光信号下降。

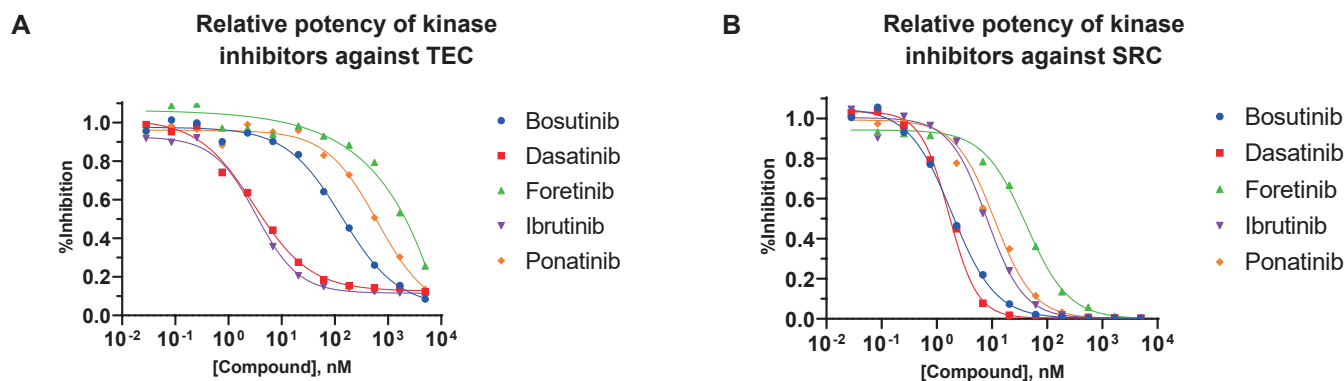


图 3. 小分子激酶抑制剂相对 IC₅₀ 值比较。未标记小分子药物与示踪剂 (ibrutinib-biotin) 竞争结合: (A) TEC-GST 或 (B) SRC-GST。图表展示各小分子抑制剂的相对 IC₅₀ 值。浓度以各孔终浓度表示。

Lumit[®] kinase-small molecule inhibition immunoassay 检测方案:

1. 在激酶缓冲液中配制预混液: 含 25nM ibrutinib-biotin 及梯度稀释的非标记小分子抑制剂。
2. 向上述预混液中加入 10nM 激酶, 每孔加入 20μl 混合液。
3. 震荡孵育 60 分钟。
4. 每孔加入 20μl 含抗 GST-LgBiT (0.38μg/ml) 和链霉亲和素 -SmBiT (0.18μg/ml) 的 1 × Lumit[®] Immunoassay Dilution Buffer A 混合液。
5. 震荡孵育 30 分钟。
6. 每孔加入 10μl 按 1:50 比例用 Lumit[®] Immunoassay Dilution Buffer A 稀释的 Lumit[®] Detection Substrate A。
7. 震荡孵育 2 分钟。
8. 检测发光信号。

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