

监测 Cbl-b 自身泛素化

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。

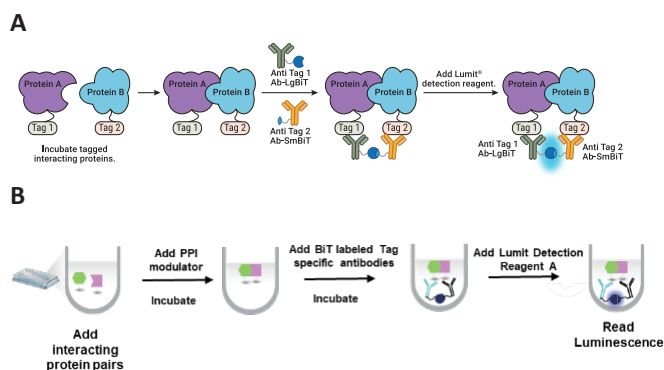


图 1. Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Immunoassay 示意图。 **A.** 当 LgBiT 和 SmBiT 通过蛋白 A 与蛋白 B 的相互作用靠近时，活性萤光素酶在底物存在下产生发光信号。**B.** 简易免洗操作流程概述。

泛素化作为关键细胞过程

泛素化是通过连接泛素分子给蛋白质打上降解标记的关键细胞过程。该三步反应需要三种酶参与：泛素激活酶 (E1)、泛素结合酶 (E2) 和泛素连接酶 (E3)。为标记待降解蛋白，首先 E1 在 ATP 依赖过程中于泛素与其自身半胱氨酸基团间建立硫酯键。随后 E2 同时结合 E1 与活化泛素，催化泛素从 E1 转移至 E2。最终 E3 在靶蛋白赖氨酸与泛素 C 端甘氨酸间形成异肽键。单泛素化蛋白可继续添加泛素分子形成多聚泛素链。最终泛素作为识别信号被 26S 蛋白酶体识别，导致蛋白质降解。

人类拥有 2 种 E1 酶、约 40 种 E2 酶及 600 余种 E3 酶。因此 E3 酶为泛素级联反应提供底物特异性。本研究采用 Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Immunoassay (图 2) 探究 E3 连接酶 Cbl-b。Cbl-b 对维持 T 细胞耐受与活化间的平衡具有关键作用，其功能异常可导致从自身免疫疾病到淋巴瘤等多种疾病状态。我们通过监测自泛素化现象来间接反映靶蛋白的泛素化过程。

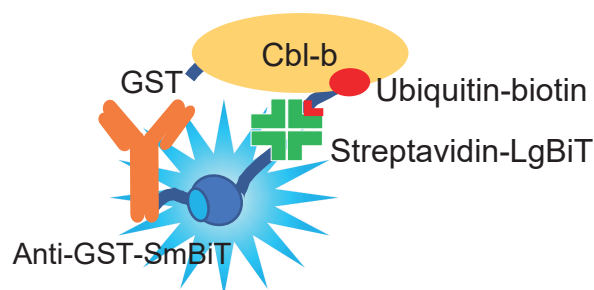


图 2. Lumit[®] Cbl-b autoubiquitination Immunoassay。 在存在泛素化必需组分 E1、E2 和 ATP 的条件下，Lumit[®] Immunoassay 可检测生物素化泛素与 GST-Cbl-b 之间的相互作用。

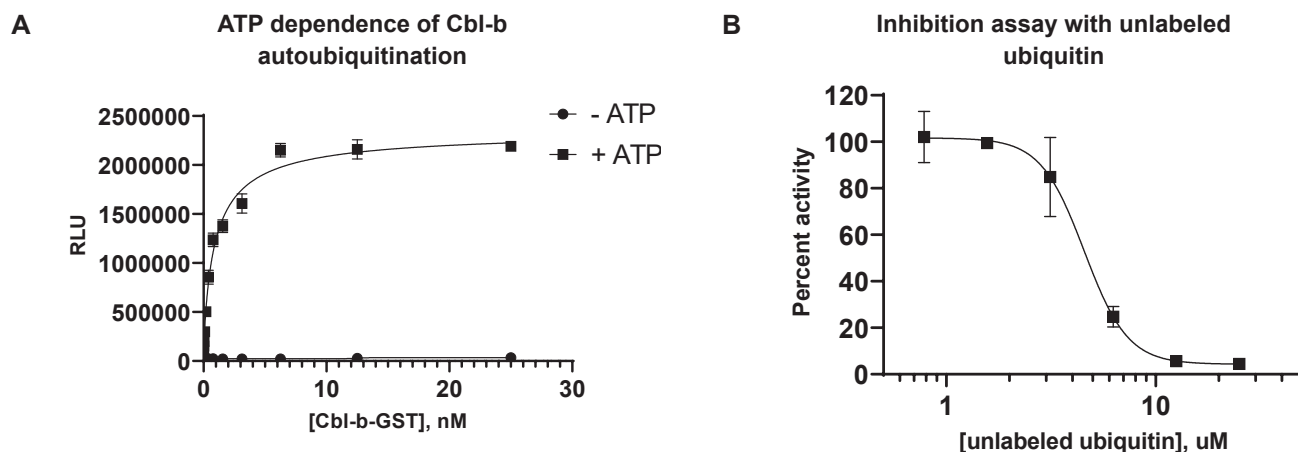


图 3. Cbl-b 自泛素化检测。 (A) 在 ATP 存在条件下, Cbl-b-GST 泛素化呈现浓度依赖性增强, 导致发光信号升高。由于该过程依赖 ATP, 在无 ATP 条件下仅检测到低背景信号。(B) 采用梯度稀释的非标记泛素竞争置换生物素化泛素, 观察到浓度依赖性的发光信号衰减。归一化 RLU 数据处理方式为: 将仅含生物素化泛素的反应孔发光峰值定义为 100%, 随着非标记泛素逐步滴定加入, 计算信号下降百分比。所有浓度均标注为各孔最终浓度值。

Lumit[®] Immunoassay 用于 Cbl-b 泛素化检测操作流程

1. 配制反应混合液: 42nM UBE1、244nM UBCH5b、20μM ATP (对照组仅加缓冲液) 及生物素化泛素。
2. 制备 Cbl-b-GST 梯度稀释液。
3. 向 96 孔板各孔加入 10μl 反应混合液和 10μl Cbl-b-GST 溶液。
4. 37°C 震荡孵育 4 小时
5. 加入 20μl 含 0.10μg/ml 抗 GST-SmBiT 和 0.33μg/ml 链霉亲和素 -LgBiT 的检测混合液 (使用 Lumit[®] Immunoassay Dilution Buffer A 配制)。
6. 震荡孵育 30 分钟。
7. 每孔加入 10μl 按 1:50 比例用 Lumit[®] Immunoassay Dilution Buffer A 配制的 Lumit[®] Detection Substrate A。
8. 震荡孵育 2 分钟。
9. 读取发光信号。

所需材料:

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

订购信息:

Item	Cat. #
Lumit [®] Streptavidin-LgBiT and -SmBiT	W1660
Lumit [®] Anti-GST-LgBiT and -SmBiT	W1620
Lumit [®] Immunoassay Detection Reagent A	VB2010