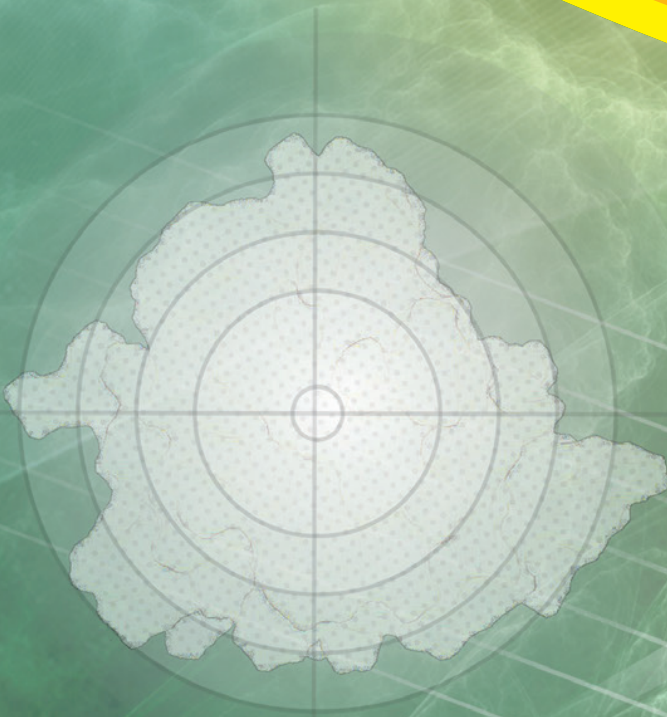


蛋白降解研究解决方案

Targeted Protein Degradation

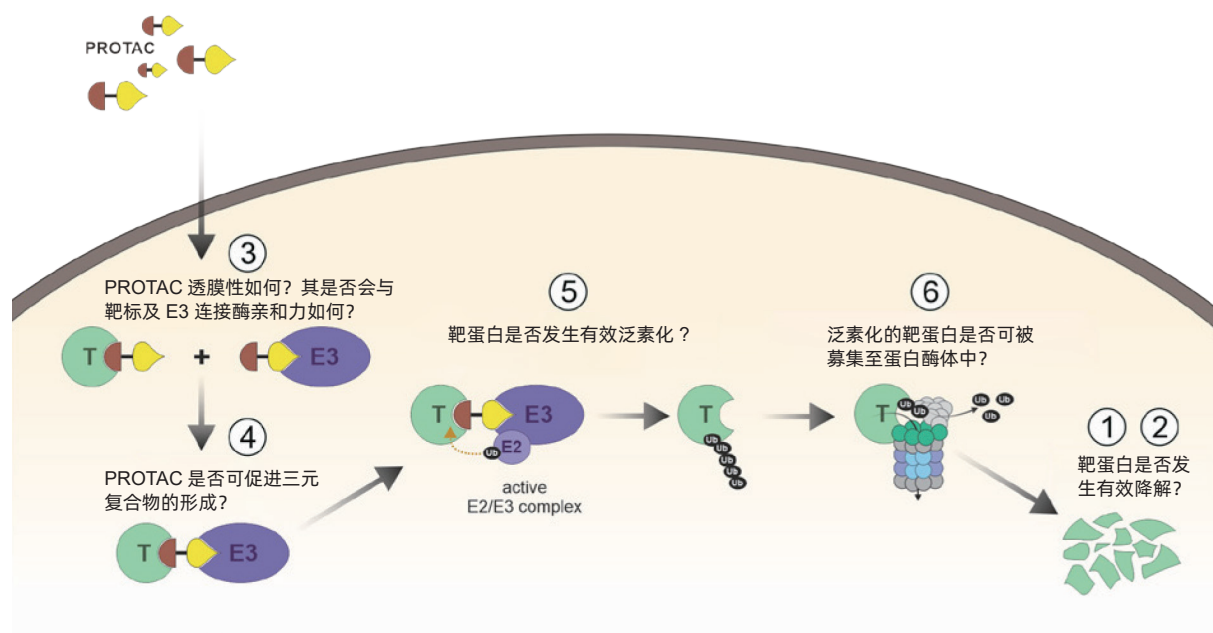
提供细胞和生化水平检测方案，助力蛋白降解剂研发全流程



目 录

1. 靶向蛋白降解（TPD）研究的关键步骤.....	2
2. Promega TPD 研究技术及优势.....	3
3. 靶蛋白降解检测	4
3.1 活细胞实时监测 / 终点法检测：HiBiT 蛋白标签技术	4
3.2 天然非修饰（非基因工程）细胞中终点法快速检测：Lumit® Immunoassay Cellular Systems.....	8
4. 二元复合物形成	10
4.1 活细胞水平监测：NanoBRET® TE 技术	10
4.2 生化水平检测：Lumit® Anti-Tag 蛋白：小分子相互作用技术	12
5. 三元复合物形成 / 靶蛋白泛素化 / 蛋白酶体募集检测	14
5.1 活细胞水平监测：NanoBRET® 蛋白：蛋白相互作用技术.....	14
5.2 生化水平检测：Lumit® Anti-Tag 蛋白：蛋白相互作用技术.....	16
6. 细胞功能性分析	18
6.1 细胞活力、凋亡和毒性检测	18
6.2 细胞代谢检测.....	18
6.3 细胞因子检测：Lumit® Cytokine Immunoassay	18
7. 降解表型研究.....	19
7.1 HaloPROTAC3.....	19

靶向蛋白降解（TPD）研究的关键步骤



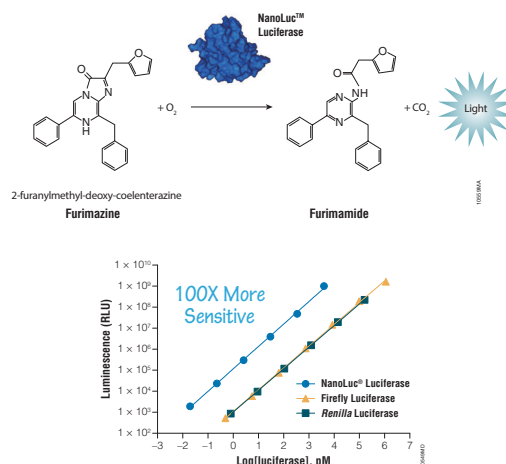
Promega TPD 研究技术及优势

主要检测技术

NanoLuc® 新型专利萤光素酶技术

Promega 提供细胞和生化反应水平检测方案, 助力蛋白降解剂研发全流程, 大多数 TPD 研究所用检测技术都是基于 NanoLuc® 新型专利萤光素酶技术平台开发, 其主要优势和特征为:

- **更亮:** 灵敏度比萤火虫和海肾萤光素酶高 **100 倍**;
- **结构简单:** 没有翻译后修饰或二硫键;
- **分子量更小:** 单体酶, 19 kDa, 171 个氨基酸;
- **分布均匀:** 蛋白表达后会均匀分布在细胞中;
- **光信号稳定:** 辉光反应, 室温半衰期通常 >2h;
- **pH 耐受范围宽:** pH 值 6-8 范围均有活性;
- **热稳定性高:** Tm=60°C, 室温下放置 8h, 活性仍保留 90%;
- **BRET 友好:** λmax=460nm, 更适于 BRET 实验。



基于 NanoLuc® 的可用于 TPD 研究的优势检测技术

HiBiT 蛋白标签技术 内源水平蛋白定量与功能分析

- 2017 年 The Scientist 创新技术大奖 Top10, 11 个氨基酸的超小标签
- 仅需“加样 - 检测”
- 适合 96/384 孔板高通量筛选
- 可活细胞实时动态或裂解型终点法检测

NanoBRET® TE 技术 活细胞检测药物: 靶标相互作用

- 改良的 BRET 技术, 背景更低、信号更强
- 适合 96/384 孔板高通量筛选
- 提供 400+ 靶点的即用型试剂盒 (如 E3 Ligases、Kinase、NLRP3、PARP、RAS、GPCRs 等)

Lumit® 新型免疫检测技术 完美替代 HTRF/AlphaLISA

- 均质型检测, 无需抗体和洗涤
- 简单快速, 0.5-2 小时完成检测
- 仅需“加样 - 检测”
- 适合 96/384 孔板高通量检测

主要检测仪器

GloMax® 微孔板检测仪

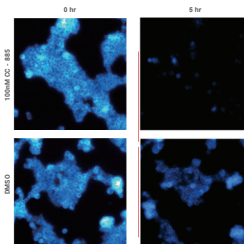
高效, 易用的多功能微孔板检测仪, 用于化学发光、荧光、吸收光、BRET 和 FRET 检测。



GloMax® Galaxy 细胞成像仪

可视化您的蛋白降解!

可实现生物发光、荧光、明场成像的细胞成像仪, 搭配 NanoLuc® 相关工具, 可视化您的蛋白降解。



靶蛋白降解检测

HiBiT 蛋白标签技术

—活细胞水平、10 分钟快速检测、高通量、高灵敏度

HiBiT 技术检测靶向蛋白降解的优势

- **标签小**：11 个氨基酸，对靶蛋白功能影响非常小
- **一步法均质检测**：无需抗体，无洗涤，仅需“加样 - 检测”
- **高通量筛选**：简单，快速地基于孔板的生物发光检测，可扩展至 96/384 孔板
- **提供多种检测模式**：活细胞实时动态模式（胞内或胞外）；裂解型终点法检测模式
- **便于用 CRISPR/Cas9 插入**：无需克隆可检测内源性蛋白，方案可优化
- **Sub-attomole 级灵敏度**：检测背景低，能够检测内源性水平的蛋白，线性范围 >7 logs

技术原理及流程

HiBiT 是一种由 NanoLuc® 萤光素酶衍生的 11 个氨基酸构成的肽标签，可以连接到任何目的蛋白（POI），可在 10 分钟或更短时间内使用生物发光试剂进行检测。该方法基于互补配对的 NanoBiT 技术，检测试剂含有一个无活性的萤光素酶大亚基 LgBiT，其能快速与 HiBiT 结合，产生一种高活性萤光素酶。在萤光素酶底物存在的情况下产生明亮的发光信号。

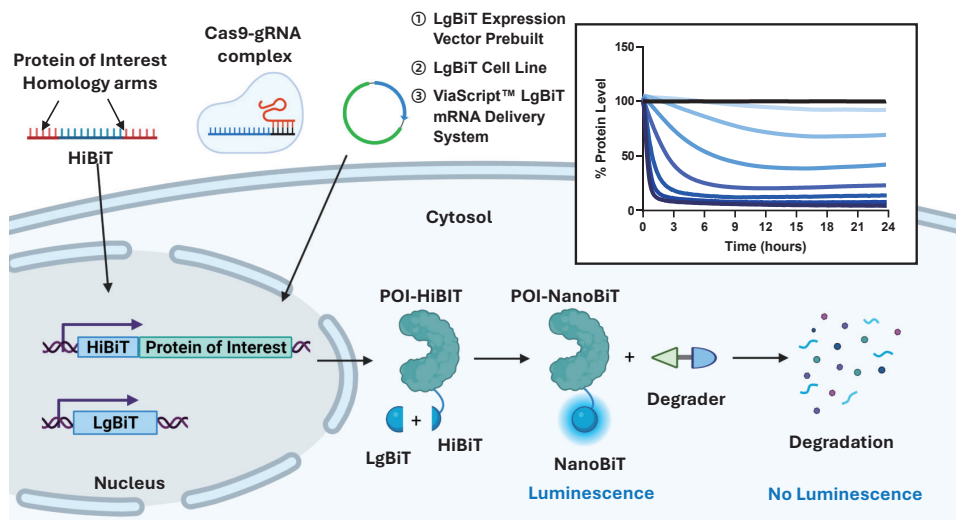


图. 实时监测内源性目的蛋白 (POI) 的降解。通过 CRISPR/Cas9 技术，可将 HiBiT 编码序列插入目标基因位点中，同时在细胞中共表达 LgBiT 蛋白，配合专用的发光底物，可以进行 2-72 小时的活细胞蛋白水平实时监测（加入蛋白降解剂后发光信号下降）。



下载 HiBiT
技术手册



查看即用型
HiBiT 细胞系列表

检测流程及工具

Step1. 用 HiBiT 标签标记您的目标蛋白				
检测方法	特点	工具列表		
方法一：构建载体进行重组表达	传统外源性表达； 实验建立更灵活； 有过表达伪影风险。	HiBiT 融合表达载体： • HiBiT CMV-neo Flexi [®] Vectors 载体系列 N2391, N2401, N2411 • pBiT3.1 HiBiT MCS Vectors 载体系列 N2361, N2371, N2381		
		可选转染试剂： <table><tr><td>FuGENE[®] HD E2311 1ml E2312 5 x 1ml</td><td>FuGENE[®] 6 E2691 1ml E2692 5 x 1ml E2693 0.5ml</td><td>FuGENE[®] 4K E5911 1ml E5912 5 x 1ml</td></tr></table>		FuGENE[®] HD E2311 1ml E2312 5 x 1ml
FuGENE[®] HD E2311 1ml E2312 5 x 1ml	FuGENE[®] 6 E2691 1ml E2692 5 x 1ml E2693 0.5ml	FuGENE[®] 4K E5911 1ml E5912 5 x 1ml		
方法二：用 CRISPR/Cas9 Knock in 技术导入 HiBiT 标签进行内源性表达【推荐】	持续、简单、快速、高通量地检测内源性蛋白降解。	① Promega 提供 100+ 针对热门靶标的即用型 HiBiT CRISPR 细胞系。 ② 联系 Promega 定制满足您研究需求的细胞系。 ③ 参考 Promega 提供的操作指导 DIY 自行完成 CRISPR 基因敲入。		

Step 2. 检测 HiBiT 标记的目的蛋白				
检测方法	特点	工具列表		
 裂解型检测	终点法，灵敏准确地检测全部 HiBiT 标记的蛋白。	Nano-Glo [®] HiBiT Lytic Detection System	N3030 10ml N3040 100ml N3050 10 x 100ml	
 活细胞实时检测	非裂解型，定量细胞内的 HiBiT 标签蛋白，需在细胞内表达 LgBiT 蛋白，可进行长达 72 小时实时动力学研究。	LgBiT 蛋白表达工具：		
		LgBiT 表达载体 LgBiT Expression Vector [CMV / Hygro] N2681 20 µg	稳定表达 LgBiT 的细胞系 LgBiT Expression Stable Cell Line N2627 2 vial	LgBiT mRNA 递送系统 ViaScript [™] LgBiT mRNA Delivery System NE1120 10 plates NE1130 10 plates NE1140 5X10 plates
		活细胞实时检测系统 / 底物：		
		0-2 小时检测 Nano-Glo [®] Live Cell Assay System N2011 10ml N2012 100ml N2013 10X100ml	2-24 小时检测 Nano-Glo [®] Vivazine [™] Substrate N2580 0.1 ml N2581 1ml N2582 10ml	2-72 小时检测 Nano-Glo [®] Endurazine [™] Substrate N2570 0.1 ml N2571 1ml N2572 10ml
 细胞外检测	非裂解型，定量活细胞表面或分泌型表达的 HiBiT 标记蛋白。	Nano-Glo [®] HiBiT Extracellular Detection System	N2420 10ml N2421 100ml N2422 10 x 100ml	
 印迹检测	快速测定 HiBiT 标签融合蛋白大小。	Nano-Glo [®] HiBiT Blotting System	N2410 100ml	
 基于抗体的检测	执行传统的基于抗体的检测，例如通过 WB, IP, ICC, pull-down 的方法检测 HiBiT 标签蛋白。	Anti-HiBiT Monoclonal Antibody	N7200 100ug N7210 5 x 100ug	

应用数据

HiBiT-CRISPR 和 Western Blot 模型结果一致，且内源性标记 HiBiT 不影响靶蛋白的天然行为

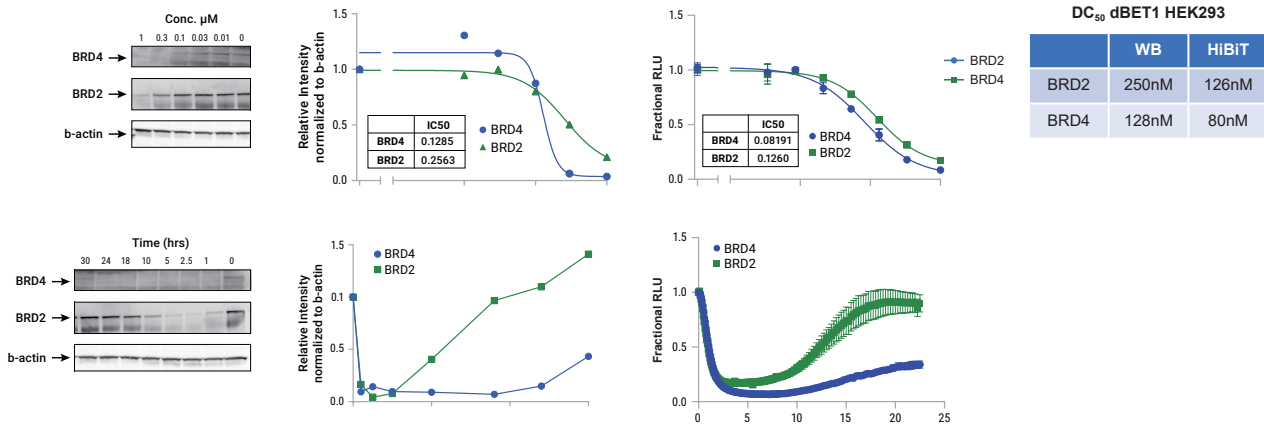


图. 在 HiBiT 标记细胞和野生型细胞中，检测 BRD2 和 BRD4 蛋白由降解剂 dEBET1 导致的靶标降解，野生型细胞中靶蛋白降解水平通过 Western Blot 检测。图显示，HiBiT-CRISPR 和 Western Blot 两个模型的靶蛋白降解的剂量反应和时程响应基本一致。

使用终点法快速检测蛋白降解，是基于 384 孔板高通量筛选降解剂的理想选择

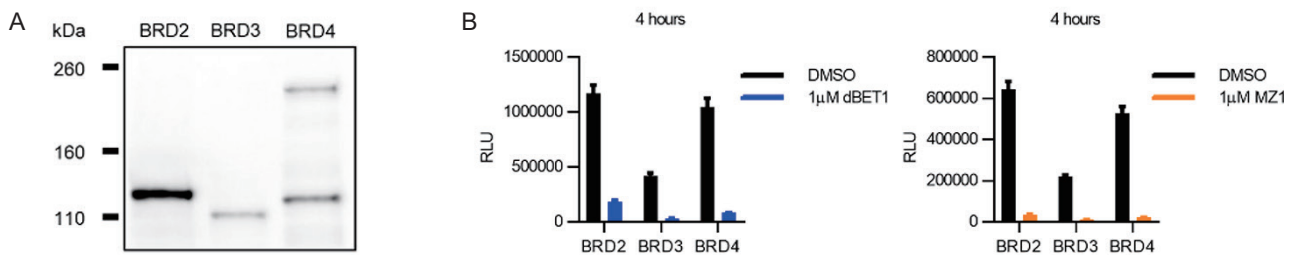


图. 在稳定表达 LgBiT 蛋白的 HEK293 细胞中分别对 BRD2、BRD3 和 BRD4 蛋白进行 HiBiT CRISPR knock-in。图 A. 用 HiBiT Blotting Reagent 验证 HiBiT 是否被连接到了正确的蛋白上，BRD2 和 BRD3 分别得到一条分子量正确的单一条带，BRD4 的两条带分别指示的是 BRD4 大小不同的两种亚型。图 B. 用固定浓度的降解剂 dEBET1 或 MZ1 处理细胞，使用 Nano-Glo[®] HiBiT Lytic Detection System 终点法检测处理 4 个小时后的蛋白降解情况，结果表明这三种 BET 家族成员的蛋白水平均有明显的下降。

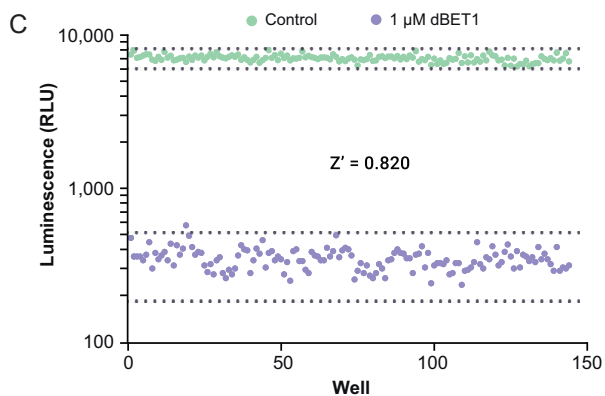
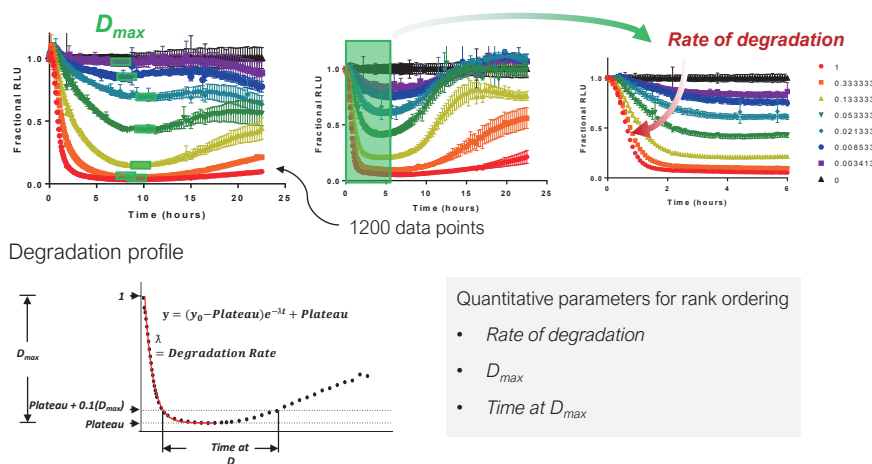


图 C. 在 384 孔板的 CRISPR 衍生的多克隆细胞株中诱导 HiBiT-BRD4 蛋白的降解。Nano-Glo[®] HiBiT Lytic Detection System 凭借其检测方案简单，发光信号半衰期大于 3 个小时，成为高通量应用中批量处理多块板的理想选择。相较于抗体检测方法，HiBiT 灵敏度更高，操作更简单，因而更有利于蛋白降解 HTS 的测定。

应用数据

采用实时活细胞检测可获取更多降解参数，对降解剂的效能进行更准确的评估



上图. 对 HEK293 细胞中 BRD3 蛋白进行内源性 HiBiT 标记, 不同浓度降解剂 MZ1 处理细胞后对靶蛋白水平进行 24 小时实时监测, 从得到的动态结果, 计算蛋白降解的动力学参数, 例如降解速率, 最大降解值 (D_{max}), 最大降解水平持续时间 (Time at D_{max}) 等。由图可知, 不同浓度药物处理达到 D_{max} 的时间不同, 因此对于终点法检测, 如果在所选的检测时间点并不是所有浓度都达到了 D_{max} , 会影响对药物 potency 的判断, 而实时检测可以获得更多的降解参数, 从而对降解剂的效能进行更准确的评估。

联合细胞活力等方法确认发光信号下降（降解）并非由于药物对细胞活性的影响所致

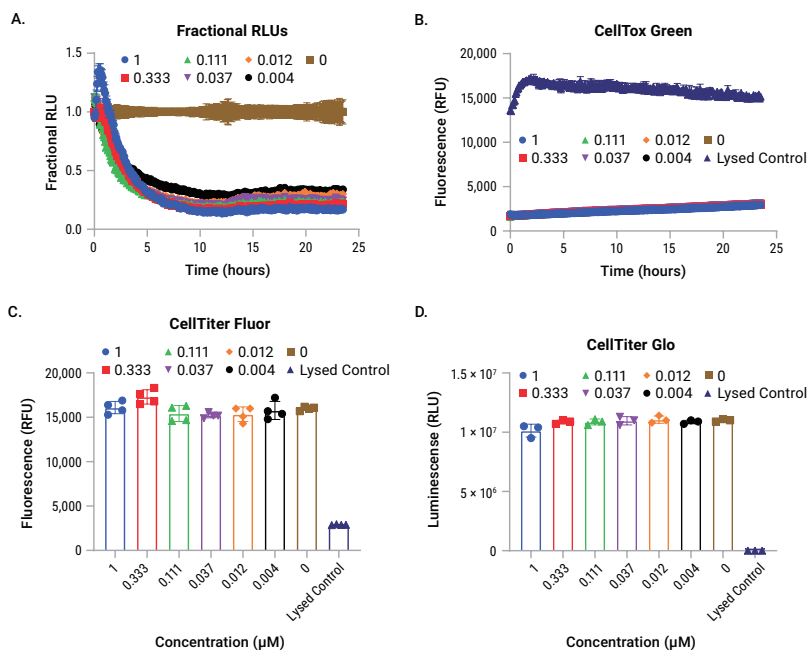


图. 联合细胞活力及细胞毒性检测确认发光信号下降（降解）并非由于药物对细胞活性的影响所致, 可用于辅助区分随后可能导致毒性的靶标降解。使用不同的活性检测方法测定不同毒性阶段, 进行动力学多重检测:

- 图 A. HiBiT 标签标记的 Ikaros 蛋白在分子胶化合物伊伯多米德处理后的动态降解检测
- 图 B. 降解检测与 CellTox™-Green 细胞毒性检测（膜完整性检测）同步进行
- 图 C. 24 小时动态读数下进行降解检测后, 叠加 CellTiter-Fluor™ 活力检测（活性细胞蛋白酶）
- 图 D. 24 小时动态读数下进行降解检测后, 叠加 CellTiter-Glo® (CTG) 活力检测（细胞 ATP 水平）

靶蛋白降解检测

Lumit[®] Immunoassay Cellular Systems

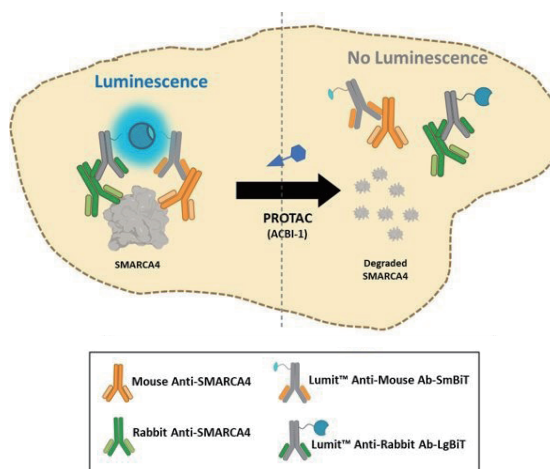
——检测靶蛋白在天然非修饰（非基因工程）细胞中的降解
终点法、无需洗涤和固定，完美替代 ELISA

传统的分析物的检测和定量方法通常耗时且检测步骤多，如 Western blotting 和 ELISA。Lumit[®] 技术是一种简单快速的、基于多孔板、免洗、均质型、生物发光免疫检测方法。它的高特异性和易于高通量筛选（HTS）使其成为科学家进行基础研究和药物发现的有力工具。

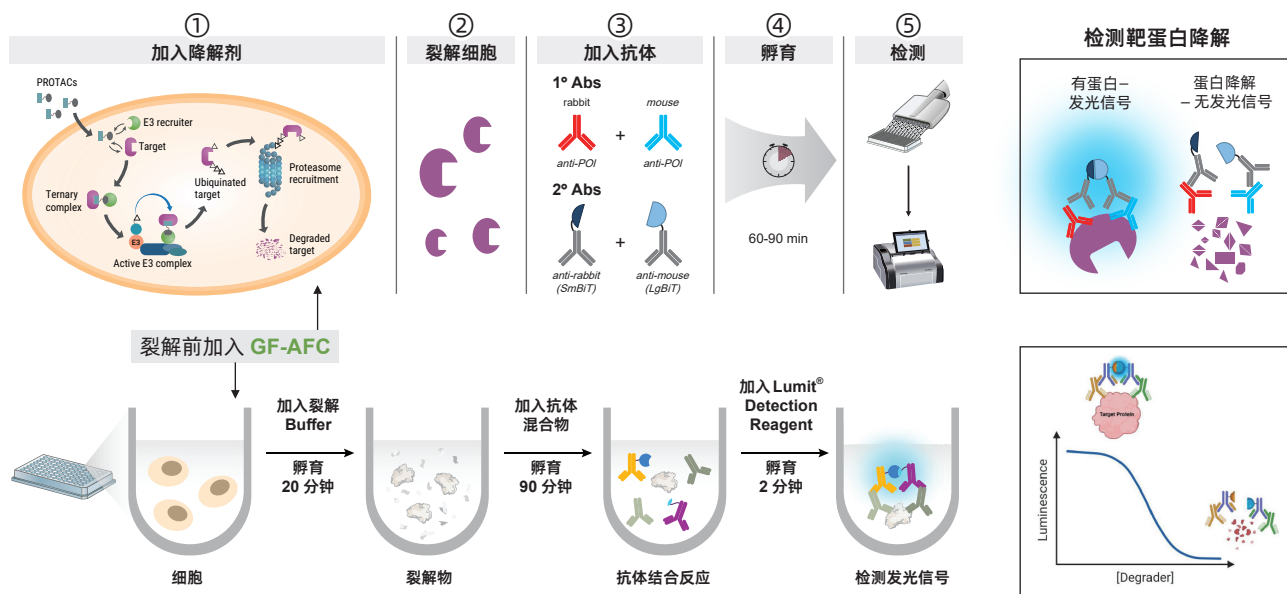
技术原理

Lumit[®] Immunoassay Cellular System (ICS) 可以在表达靶蛋白的任何细胞类型中，在天然水平检测细胞内蛋白的磷酸化或总靶蛋白量。该系统包含 Lumit[®] 二抗，分别针对兔、小鼠或山羊，这些二抗分别与 NanoBiT[®] 亚基 SmBiT 和 LgBiT 相偶联，用户提供两种针对靶蛋白的一抗（或选择包含一抗的完整试剂盒）。裂解细胞后磷酸化的蛋白或总靶蛋白被各自的一抗识别，然后 Lumit[®] 二抗识别对应种属的一抗，从而使 LgBiT 和 SmBiT 紧密靠近，并形成可产生明亮发光信号的有功能的酶。

右图以 SMARCA4 的降解为例，加入 PROTAC 后，SMARCA4 蛋白被降解，发光信号下降。

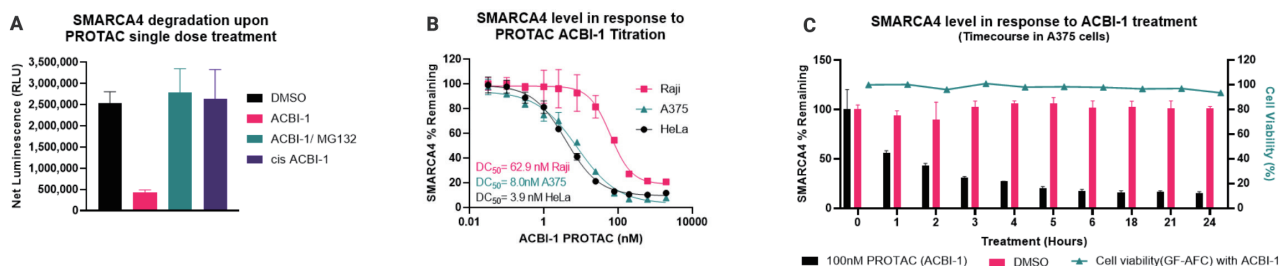


检测流程



应用数据

PROTAC 处理后天然的 SMARCA4 的降解



上图 .PROTAC 处理后天然的 SMARCA4 的降解。每孔接种 50,000 个细胞。用指定化合物处理后，使用 Lumit[®] Immunoassay Cellular System (set 2) 检测 SMARCA4 的水平。图 A. 用 250nM ACBI-1、250nM ACBI-1 + 20μM MG132、250nM Cis-ACBI-1 或 DMSO 处理 5 小时后的 SMARCA4 水平。图 B. ACBI-1 在三种不同细胞系中对 SMARCA4 降解的分析。图 C. ACBI-1 降解 SMARCA4 的时间过程。

检测工具

人类细胞靶点	信号通路	适用 Lumit [®] Immunoassay Cellular System (目录号)	完整试剂盒 (包含一抗)
AKT	PROTAC MS-21	Set 1 (W1201)	有
B-cell lymphoma 6 protein (BCL-6)	BI-3802	Set 1 (W1201)	无
BRD4	PROTACs ARV-771, dBET6	Set 1 (W1201)	有
Burton's Tyrosine Kinase (BTK)	PROTAC MT-802	Set 1 (W1201)	有
ER (Estrogen Receptor)	Fulvestrant	Set 1 (W1201)	无
SMARCA2 (BRM)	PROTAC ACBI-1	具体详情参见操作说明	有
SMARCA4 (BRG1)	PROTAC ACBI-1	Set 2 (W1331)	有
STAT3	PROTAC SD-36	Set 1 (W1201)	有

进入 Promega 官网查看详细操作说明，如需购买完整试剂盒请联系 Promega。

产品	规格	目录号
Lumit [®] Immunoassay Cellular System – Starter Kit	200 assays	W1220
	100 assays	W1201
Lumit [®] Immunoassay Cellular System – Set 1	1000 assays	W1202
	10,000 assays	W1203
Lumit [®] Immunoassay Cellular System – Set 2	100 assays	W1331
	1000 assays	W1332
	10,000 assays	W1333



下载 Lumit[®]
免疫检测系统手册

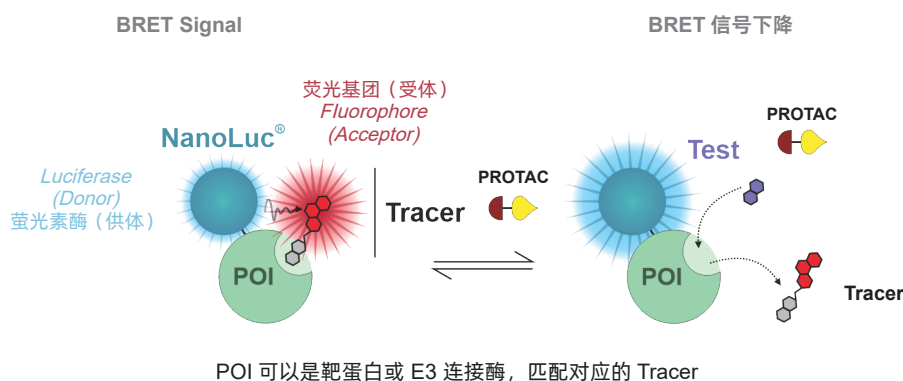
二元复合物形成

NanoBRET® TE 技术

—活细胞水平评估降解剂透膜性及其与靶标及 E3 连接酶亲和力

技术原理

NanoBRET® Target Engagement (TE) 是一种强大的技术，可用于研究活细胞中的相关蛋白：配体结合事件。将目标蛋白 (POI) 与 NanoLuc® 萤光素酶融合后表达作为供体，与靶标可逆结合的配体连接上专用的 NanoBRET® 618 荧光基团形成细胞渗透性荧光示踪分子 (Tracer) 作为受体。Tracer 结合目标蛋白可拉近萤光素酶 (供体) 和荧光基团 (受体) 的距离，进而触发生物发光共振能量转移 (BRET)，如图，加入待测化合物 (降解剂) 后，化合物结合靶标会与 Tracer 产生竞争置换，通过 BRET 信号的降低可以确定化合物的结合。



应用数据

评估降解剂与 E3 连接酶细胞内亲和力、可利用性与渗透性

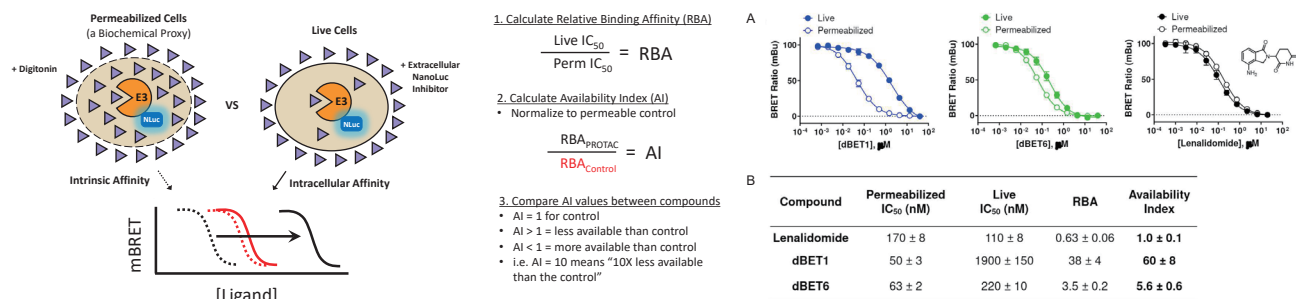


图 A. 采用 NanoBRET® TE CRBN Assay 分别在活细胞模式下测定了 PROTAC 的细胞内亲和力 (intracellular affinity)，在透化细胞模式 (加入洋地黄皂苷破坏细胞膜，去除屏障作用) 下检测 PROTAC 的固有亲和力 (intrinsic affinity)。表 B. 基于图 A 的 NanoBRET® TE IC₅₀ 数据，计算各化合物的可用性指数 (AI)，Lenalidomide 作为高透膜性对照化合物，其 AI 值默认设定为 1；dBET6 的 AI 值为 5.6，dBET1 的 AI 值为 60，表明 dBET6 的细胞内可用性约为 dBET1 的 10 倍。

检测工具

降解剂与 E3 连接酶相互作用检测工具列表

检测类型	E3 连接酶	产品	规格 (96 孔板)	目录号
检测系统	CRBN	NanoBRET® TE Intracellular E3 Ligase Assays, CRBN	100 assays	N2910
			1000 assays	N2911
			10,000 assays	N2912
	VHL	NanoBRET® TE Intracellular E3 Ligase Assays, VHL	100 assays	N2930
			1000 assays	N2931
			10,000 assays	N2932
表达载体	IAP(cIAP1,cIAP2,& XIAP)	NanoBRET® TE Intracellular E3 Ligase Assays, IAP	Please Inquire	
	MDM2	NanoBRET® TE Intracellular E3 Ligase Assay, MDM2	Please Inquire	
	CRBN	NanoLuc®-CRBN fusion vector	20 µg	N2741
	VHL	VHL-NanoLuc® fusion vector	20 µg	N2751
	IAP(cIAP1,cIAP2,& XIAP)	NanoLuc®-cIAP1 Fusion Vector	Please Inquire	
		NanoLuc®-XIAP Fusion Vector	Please Inquire	

降解剂与靶蛋白相互作用工具靶点列表

即用型试剂盒

- **350+ Kinase**
- **Kinase Profiling:** K192 Kinases, CDK
- **Histone Deacetylase (HDAC):** HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6, HDAC10
- **Bromodomains (BRDs):** BRD2, BRD3, BRD4, BRD7, BRD9, BRDT, BRPF1, CECR2, TAF1, TAF1L
- **DNA Damage Response (DDR):** PARG, POLQ (Polymerase Domain), POLQ (Helicase Domain), PRMT5
- **Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP):** PARP 1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 7, 10, 11, 12, 14 & 16
- **G-protein Coupled Receptors (GPCR):** >20 GPCRs from >5 families
- **Heat Shock Protein (HSP):** HSP90AB1
- **Inflammasome:** NLRP3
- **RAF Protomer & Homodimers:** ARAF, BRAF, CRAF
- **RAS:** KRAS2B WT, KRAS2B(G12C), KRAS2B(G12A), KRAS2B(G12D), KRAS2B(G12S), KRAS2B(G12V), KRAS2B(G12R), KRAS2B(G13D), KRAS2B(Q61H), KRAS2B(Q61L), KRAS2B(Q61R), KRAS2B(Y96D), HRAS WT, HRAS(G12C), HRAS(G12V)

用户 DIY 开发专有靶点检测系统

- NanoBRET® Dyes for DIY NanoBRET® TE
- NanoLuc® Cloning Vectors



二元复合物形成

Lumit[®] Anti-Tag PPI 技术

——高灵敏度、生化水平检测蛋白：蛋白 / 蛋白：小分子相互作用
均质，2 小时完成检测，完美替代 HTRF/AlphaLISA

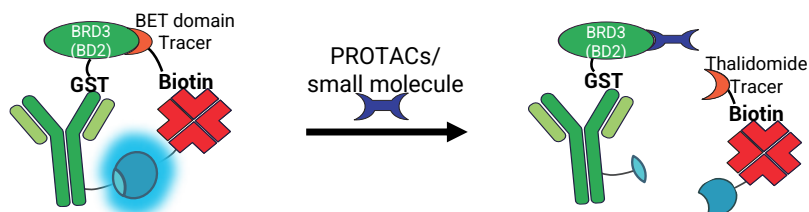
Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Reagents 是用于检测蛋白质：蛋白质相互作用或蛋白质：小分子相互作用的均质型（无洗涤步骤）免疫检测系统。主要应用包括：寻找这些相互作用的抑制剂或筛选调节相互作用的物质，如 PROTACs 等降解剂。

技术优势

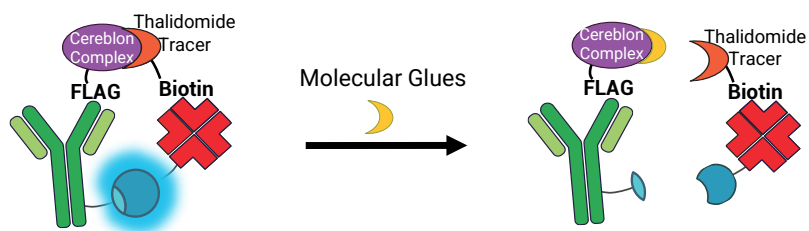
- **真正基于溶液的检测方法：**简化工作流程，仅需“添加 - 读数”，无需固定或洗涤步骤，节省时间，可以在 120 分钟内完成检测。
- **通用型检测平台：**以商品化纯化蛋白质的常用亲和纯化标签作为直接分析物，例如 6His、GST、FLAG[®]，生物素以及人 IgG。
- **宽广的动态范围：**基于生物发光法，检测更灵敏，具有广泛动态范围。
- **适用于高通量应用：**适用于 384 孔板，使用多功能读板仪即可检测，操作流程简单，实验周期短，非常适合抑制剂筛选。

技术原理

① 检测靶蛋白与降解剂相互作用



② 检测 E3 连接酶与降解剂相互作用

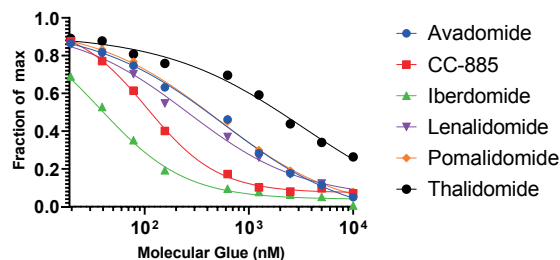


NanoBiT[®] 萤光素酶是一种结构互补性报告基因，非常适合进行相互作用研究。NanoBiT[®] 系统由两个亚基组成：大亚基（LgBiT；18kDa）和小亚基（SmBiT；11 氨基酸肽），它们可以作为重组融合蛋白表达，或通过化学方法偶联到抗体或其他感兴趣的靶标蛋白上。LgBiT 和 SmBiT 两个亚基之间的自发亲和力较弱，当 LgBiT 和 SmBiT 被融合伴侣蛋白拉近时，它们会形成一个功能性酶，在 Nano-Glo[®] 底物存在的情况下产生发光信号。

应用数据

检测分子胶的亲合力

Relative Potency of Molecular Glues



Compound	IC ₅₀ , nM
Avadomide	575
CC-885	105
Iberdomide	38
Lenalidomide	261
Pomalidomide	498
Thalidomide	3281

图. 测定分子胶的相对亲和力, 我们将其滴定至沙利度胺 - 泊马度胺类 (thalidomide) 示踪剂与 CRBN 的复合物体系中。当分子胶置换示踪剂时, 发光信号随之减弱。测得的相对 IC₅₀ 值与裂解细胞中的靶点结合实验结果呈正相关。

检测工具

产品	规格	目录号
Lumit [®] Anti-6His-LgBiT and Anti-6His-SmBiT	20μl each	W1600
Lumit [®] Anti-GST-LgBiT and Anti-GST-SmBiT	20μl each	W1620
Lumit [®] Anti-DYKDDDDK-LgBiT and Anti-DYKDDDDK-SmBiT	20μl each	W1640
Lumit [®] Streptavidin-LgBiT and Streptavidin-SmBiT	20μl each	W1660
Lumit [®] Anti-Human IgG-LgBiT and Anti-Human IgG-SmBiT		Please require
Lumit [®] Anti-6His-LgBiT	200μl	W1601
Lumit [®] Anti-6His-SmBiT	200μl	W1611
Lumit [®] Anti-GST-LgBiT	200μl	W1621
Lumit [®] Anti-GST-SmBiT	200μl	W1631
Lumit [®] Anti-DYKDDDDK-LgBiT	200μl	W1641
Lumit [®] Anti-DYKDDDDK-SmBiT	200μl	W1651
Lumit [®] Streptavidin-LgBiT	200μl	W1661
Lumit [®] Streptavidin-SmBiT	200μl	W1671
Lumit [®] Anti-Human IgG-LgBiT		Please require
Lumit [®] Anti-Human IgG-SmBiT		Please require
搭配购买检测试剂: Lumit [®] Detection Reagent A	500 assays	VB2010
	5000 assays	VB2020
	50,000 assay	VB2030



下载 Lumit[®]
Anti-Tag 手册



下载 Lumit[®]
免疫检测系统手册

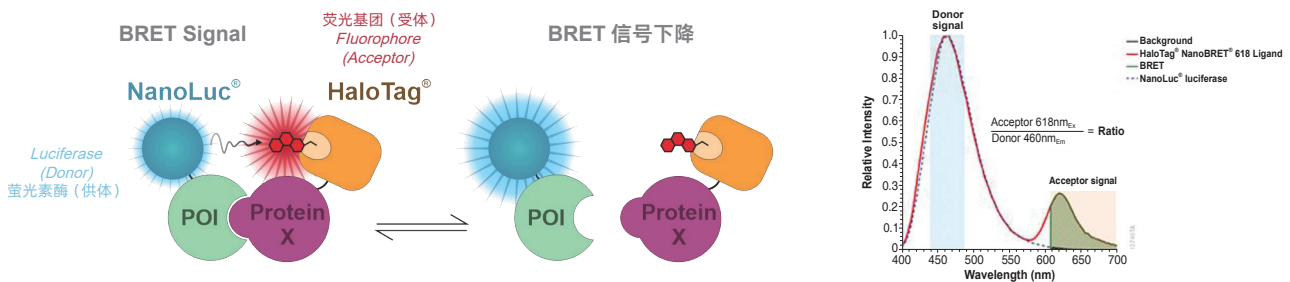
三元复合物形成 / 靶蛋白泛素化 / 蛋白酶体募集检测

NanoBRET[®] PPI 技术

——活细胞水平监测蛋白：蛋白相互作用

技术原理

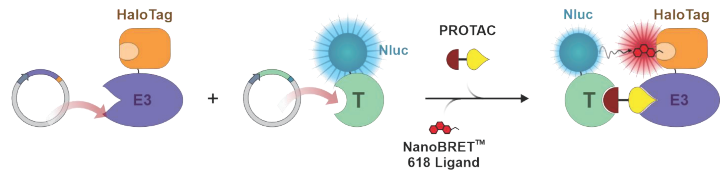
NanoBRET[®] (Protein Protein Interaction) PPI 技术 是基于 NanoLuc[®] 萤光素酶和 HaloTag[®] 蛋白标签技术改良的 BRET 检测，用于进行蛋白质间相互作用检测。如下图，将 A 蛋白与 NanoLuc[®] 萤光素酶融合，作为光信号的供体；B 蛋白与 HaloTag[®] 蛋白标签融合，通过专用的 HaloTag[®] 618 荧光配基，给 B 蛋白带上荧光基团，作为光信号的受体。在细胞中共表达两个融合蛋白，如果蛋白 A 和 B 产生相互作用，即可产生 BRET 信号。检测不同蛋白降解研究步骤中的蛋白相互作用，仅需要替换不同的 A 或 B 蛋白即可。



检测三元复合物的形成：

Ternary complex formation

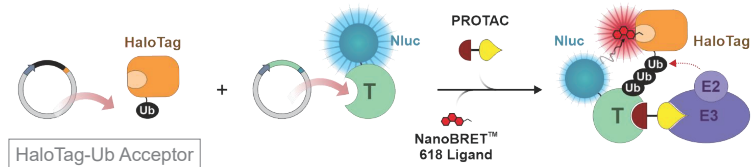
- NanoLuc[®] -POI A: 目标蛋白
- HaloTag[®] - POI B: E3 连接酶



检测靶蛋白泛素化：

Target ubiquitination

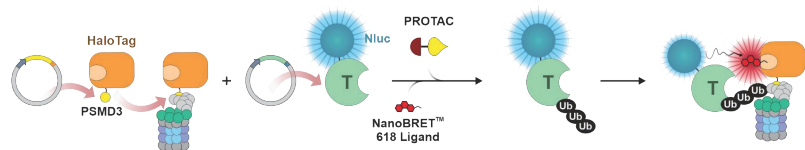
- NanoLuc[®] -POI A: 目标蛋白
- HaloTag[®] - POI B: 泛素蛋白



检测蛋白酶体募集：

Proteasomal recruitment

- NanoLuc[®] -POI A: 目标蛋白
- HaloTag[®] - POI B: PSMD3 (26S 蛋白酶体调节亚基 3)



应用数据

三元复合物形成的实时监测

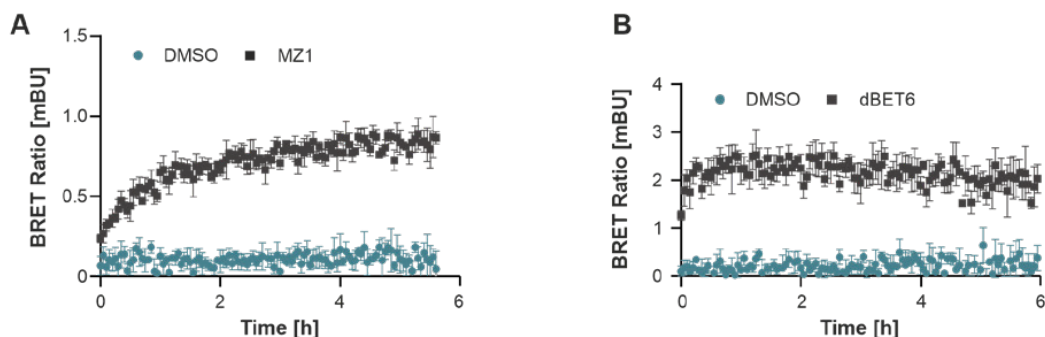


图 1. 分别使用 PROTACs MZ-1 (1 μ M) 或 dBET6 (0.1 μ M) 进行相关处理后, 测定内源性标记的 HiBiT-BRD4 与异位表达的 HaloTag®-VHL (图 A) 和 HaloTag®-CRBN (图 B) 之间三元复合物的形成情况。使用 NanoBRET® Kinetic Detection System 记录 6 小时内的相关数据。

检测 PROTAC 诱导靶点泛素化的效能

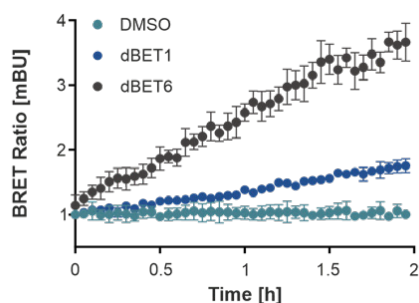


图 2. PROTAC-dBET1 (1 μ M) 和 dBET6 (0.1 μ M) 处理后异位表达的 HiBiT-BRD4 的泛素化—通过 NanoBRET® 进行检测。相较于 dBET1, dBET6 的泛素化信号增加速度更快, 强度更高, 尽管其浓度比 dBET1 低 10 倍。

多泛素化靶蛋白的蛋白酶体募集研究

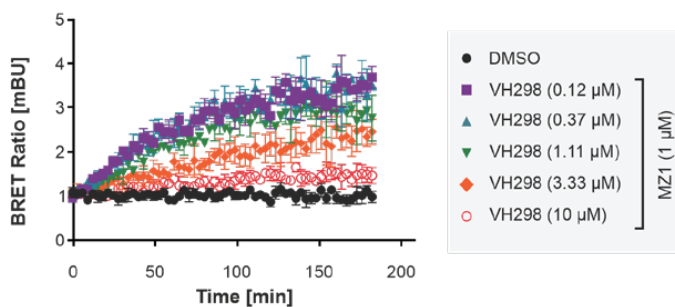


图 3. 使用 PROTAC MZ-1 (1 μ M) 进行处理后, 26S 蛋白酶体中 HiBiT-BRD4 募集的时间过程分析。与母体化合物 VH298 (即 MZ-1 的 VHL 识别域) 共处理结果证实了本检测的特异性。由于 MZ-1 被竞争性置换, BRET 信号随 VH298 浓度的增加而降低。

检测工具

检测类型	产品	规格 (96 孔板)	目录号
NanoBRET® 三元复合物	NanoBRET® CRBN Ternary Complex Starter Kit	200 assays	ND2720
	NanoBRET® VHL Ternary Complex Starter Kit	200 assays	ND2700
NanoBRET® 泛素化	NanoBRET® Ubiquitination Starter Kit	200 assays	ND2690
NanoBRET® 蛋白酶体募集	NanoBRET® Proteasomal Recruitment Starter Kit	200 assays	ND2730
NanoBRET® HaloTag® 融合蛋白载体	HaloTag®-CRBN Fusion Vector	20 μ g	N2691
	HaloTag®-VHL Fusion Vector	20 μ g	N2731
	HaloTag®-Ubiquitin Fusion Vector	20 μ g	N2721
	HaloTag®-PSMD3 Fusion Vector	20 μ g	N2701

三元复合物形成 / 靶蛋白泛素化检测

Lumit[®] Anti-Tag PPI 技术

——高灵敏度、生化水平检测蛋白：蛋白 / 蛋白：小分子相互作用
均质，2 小时完成检测，完美替代 HTRF/AlphaLISA

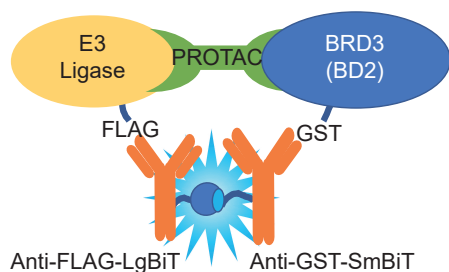
Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Reagents 是用于检测蛋白质：蛋白质相互作用或蛋白质：小分子相互作用的均质型（无洗涤步骤）免疫检测系统。主要应用包括：寻找这些相互作用的抑制剂或筛选调节相互作用的物质，如 PROTACs 等降解剂。

技术优势

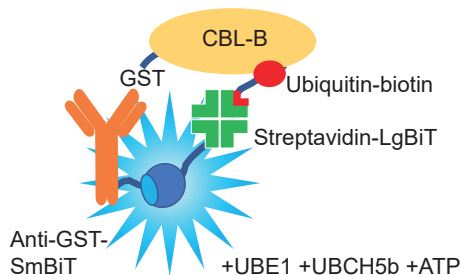
- **真正基于溶液的检测方法：**简化工作流程，仅需“添加 - 读数”，无需固定或洗涤步骤，节省时间，可以在 120 分钟内完成检测。
- **通用型检测平台：**以商品化纯化蛋白质的常用亲和纯化标签作为直接分析物，例如 6xHis、GST、FLAG[®]，生物素以及人 IgG。
- **宽广的动态范围：**基于生物发光法，检测更灵敏，具有广泛动态范围。
- **适用于高通量应用：**适用于 384 孔板，使用多功能读板仪即可检测，操作流程简单，实验周期短，非常适合抑制剂筛选。

技术原理

① 检测 E3 连接酶、靶蛋白以及降解剂
形成三元复合物

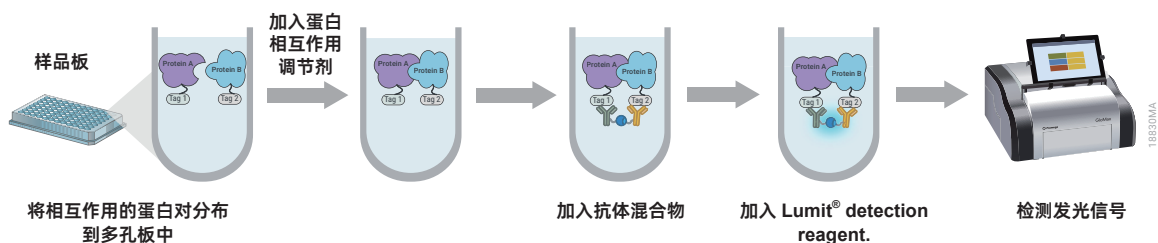


② 检测 E3 连接酶 Cbl-b 的自泛素化



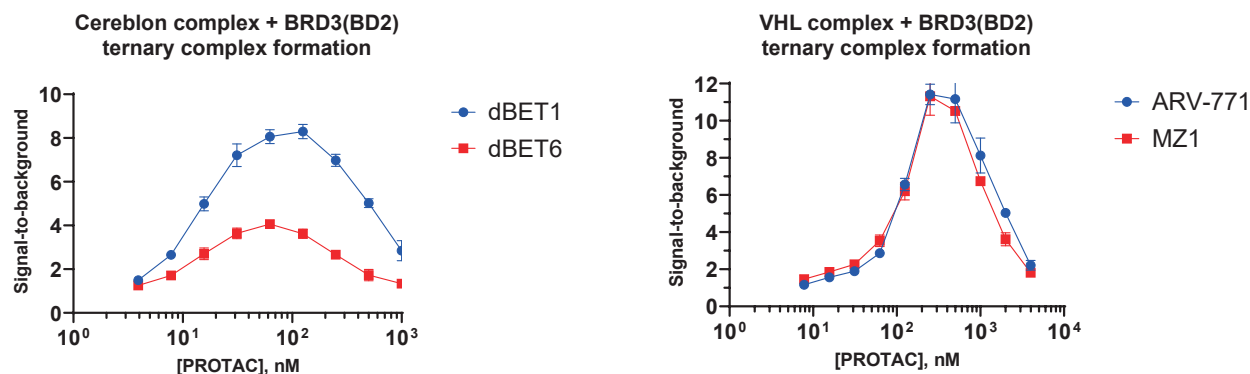
NanoBiT[®] 萤光素酶是一种结构互补性报告基因，非常适合进行相互作用研究。NanoBiT[®] 系统由两个亚基组成：大亚基（LgBiT；18kDa）和小亚基（SmBiT；11 氨基酸肽），它们可以作为重组融合蛋白表达，或通过化学方法偶联到抗体或其他感兴趣的靶标蛋白上。LgBiT 和 SmBiT 两个亚基之间的自发亲和力较弱，当 LgBiT 和 SmBiT 被融合伴侣蛋白拉近时，它们会形成一个功能性酶，在 Nano-Glo[®] 底物存在的情况下产生发光信号。

检测流程



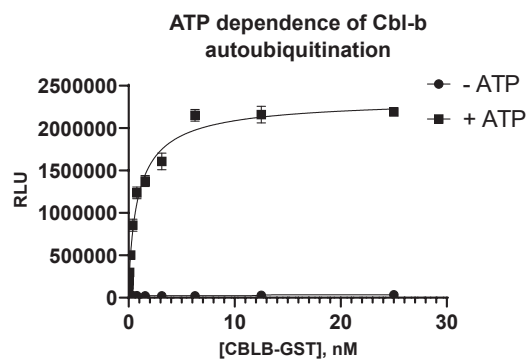
应用数据

监测三元复合物的形成



上图. 以 BRD3 (BD2) 为靶蛋白, 使用抗 FLAG-LgBiT 和抗 GST-SmBiT 的 Lumit[®] Anti-Tag Reagent 监测了 PROTAC 介导的三元复合物 (cereblon 复合物和 VHL 复合物) 形成。

监测 E3 连接酶的自泛素化



左图. 使用 Lumit[®] Anti-Tag Reagent 监测 E1、E2 和 ATP 存在情况下 E3 连接酶 Cbl-b 的自泛素化水平。在 ATP 存在情况下将 Cbl-b 与泛素激活蛋白 (UBE1) 和泛素结合蛋白 (UBCH5b) 共同孵育。并使用 Streptavidin-LgBiT 和抗 GST-SmBiT 监测了泛素化水平。与对照 (无 ATP) 条件相比, 检测窗口约为 70 倍。

检测工具

见 P13 二元复合物形成检测



细胞功能性分析

细胞活力、凋亡和毒性检测工具列表

	方法	检测工具	检测信号
细胞活力检测	ATP 法裂解性检测	CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay 简称 CTG, 细胞活力检测“金标准”,10 分钟快速检测, 最灵敏	生物发光
		CellTiter-Glo® 2.0 Assay 单一试剂, 试剂稳定性强, 适合批量样本	生物发光
		CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay 裂解性更强, 专用于 3D 培养样本	生物发光
	活细胞还原酶	RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay 72 小时实时监测	生物发光
	活细胞蛋白酶	CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	荧光
	线粒体脱氢酶	CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	荧光
		CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay 升级版 MTS	吸收光
增殖	Ki-67	Lumit® hKi-67 Immunoassay for Cell Proliferation	生物发光
细胞凋亡检测	PS 膜外翻	RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay	生物发光 / 荧光
	Caspase-3/7 活性	Caspase-Glo® 3/7 Assay 高灵敏度, 适用于高通量检测	生物发光
细胞毒性检测	LDH（乳酸脱氢酶）释放	LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay 高灵敏度, 可少量多次取样动态监测	生物发光
		CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 经典方法, 比放射性检测更安全, 海量文献支持	吸收光
	膜破裂后的 DNA 荧光染色	CellTox™ Green Cytotoxicity Assay 专利荧光染料结合 DNA 双链, 对细胞无毒性作用	荧光
		CellTox™ Green Express Cytotoxicity Assay	荧光

细胞代谢检测工具

- 高灵敏度、宽线性范围的生物发光检测法;
- 简单的“加入 - 混合 - 检测”操作模式, 支持 384 孔板高通量检测;
- 兼容 2D / 3D 培养样本;
- 同一样品中可检测多种代谢物, 并且可联合细胞活力等检测试剂进行多重叠加检测。

我们可以提供以下细胞代谢靶标检测试剂盒:

糖代谢	氨基酸代谢	脂代谢	氧化应激	线粒体功能	辅因子
葡萄糖摄取	谷氨酰胺	甘油三酯	谷胱甘肽	ATP	NAD/NADH
葡萄糖	谷氨酸	甘油	谷胱甘肽 / 还原型谷胱甘肽	苹果酸	NADP/ NADPH
乳酸	支链氨基酸	胆固醇	ROS	丙酮酸	NAD(P)H
糖原		胆固醇酯			
胰高血糖素		β- 羟基丁酸			
胰岛素					

Lumit[®] 细胞因子检测工具

- 无需 ELISA 和 WB 繁琐操作
- 免洗、仅需“加入 - 读取”
- 最低 70min 即可完成检测
- 支持 96/384 孔板高通量检测
- 提供基于 Lumit[®] 免疫检测技术的 16+ 细胞因子即用型试剂盒:

- | | | |
|-------------|---------|----------------|
| 人 / 鼠 HMGB1 | 人 IL-2 | 人 TGF-β1 1 |
| 人 IFN-γ | 人 IL-4 | 人 TNF-α |
| 人 IFN-β | 人 IL-6 | 人 IL-1β |
| 人 VEGF-A | 人 IL-8 | 人 IL-1β |
| 人 IL-17A | 人 IL-10 | 人 Active IL-18 |
| 人 MCP-1 | 人 IL-12 | |



下载细胞健康
解决方案



下载细胞代谢
解决方案



下载 Lumit[®]
细胞因子手册

Targeted Protein Degradation

<https://www.promega.com.cn/applications/small-molecule-drug-discovery/protein-degradation-drug-discovery/>



关注 Promega 生命科学公众号，您可获得



产品信息



价格查询



中文说明书



讲座视频



技术资料



实验工具



市场活动



经销商信息

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd

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

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