

免洗、快速、高通量的生物发光法蛋白相互作用检测

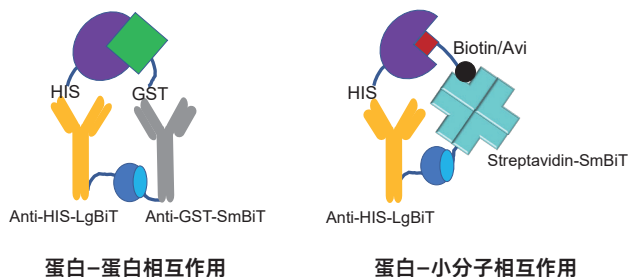
Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Reagents

蛋白相互作用（包括蛋白-蛋白相互作用（PPI）和蛋白-小分子相互作用）对于许多细胞过程均至关重要，例如运输、信号传导、细胞凋亡和增殖。蛋白相互作用是信号级联反应的主要驱动因素，蛋白相互作用失调可导致自身免疫性疾病和癌症等疾病。因此，调节蛋白相互作用是药物研发的主要着重点。

Promega 开发的 Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Reagents，是用于测定蛋白质：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。

应用：

- 监测 KRAS 突变体和 RBD-cRAF 之间的相互作用
- 监测酪氨酸激酶的小分子抑制剂
- 监测 PROTAC 介导的二元和三元复合物形成
- E3 连接酶 Cbl-b 的自泛素化



特点及优势

• 检测标签蛋白质相互作用

标签包括 6His、GST、FLAG、人 IgG 和生物素。体外检测蛋白质-蛋白质和蛋白质-小分子相互作用。

• 真正基于溶液的检测方法

简化工作流程，无需固定或洗涤步骤，节省时间和减少潜在错误。

• 快速且简单

添加 - 读数格式（没有洗涤步骤），可以在 **2** 小时内完成检测。

• 宽广的动态范围

Lumit[®] 抗标签试剂依赖于生物发光的力量，允许灵敏地检测具有广泛动态范围的蛋白质相互作用。

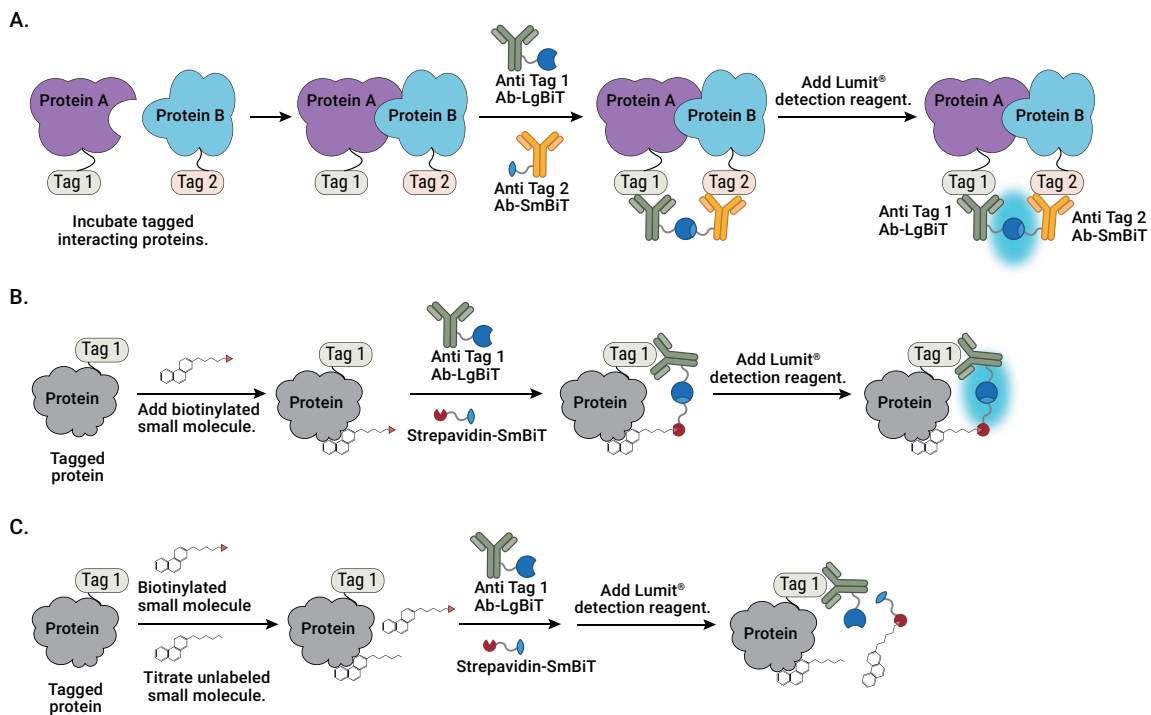
• 适用于高通量应用

兼容 384 孔板高通量筛选。

Lumit[®] Protein Interaction Immunoassay

原理:

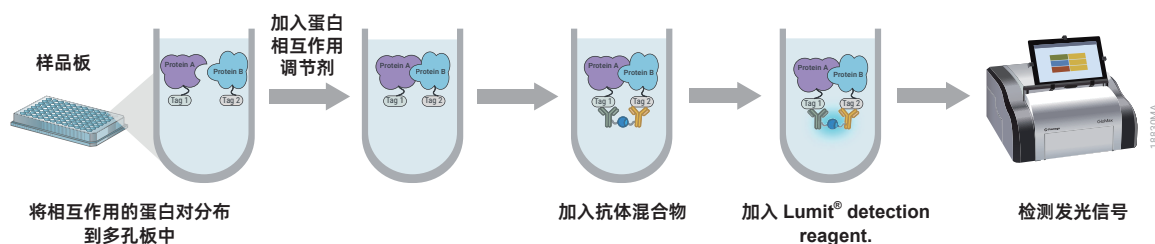
用于蛋白质相互作用研究的 Lumit[®] 抗标签试剂，通过结合免疫检测和 NanoLuc[®] 二亚单元系统 (NanoBiT) 发挥作用。NanoBiT[®] 荧光素酶是一种结构互补性报告基因，非常适合进行相互作用研究。NanoBiT[®] 系统由两个亚基组成：大亚基 (LgBiT; 18kDa) 和小亚基 (SmBiT; 11 氨基酸肽)，它们可以作为重组融合蛋白表达，或通过化学方法偶联到抗体或其他感兴趣的靶标蛋白上。LgBiT 和 SmBiT 两个亚基经过优化，具有最佳的稳定性和极低限度的自我聚合，这是由于它们之间较弱的亲和力 ($K_d \approx 190\mu M$)。当 LgBiT 和 SmBiT 相互靠近时，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。



上图 . A. Lumit[®] protein interaction immunoassay 示意图。B. Lumit[®] small molecule interaction immunoassay 示意图。C. 在 Lumit[®] small molecule interaction immunoassay 中，滴定未标记的小分子化合物。

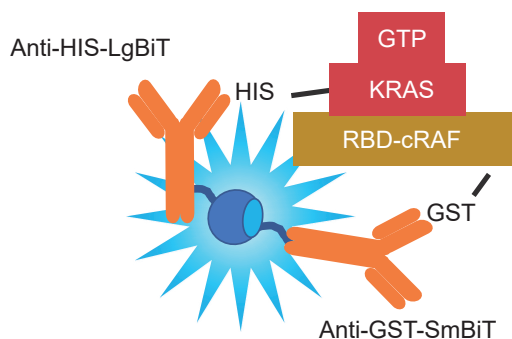
简要工作流程:

在多孔板中，将感兴趣的带标签蛋白质置于可促进相互作用的条件下进行孵育。接着，添加抗标签试剂（或者 NanoBiT 标记的链霉亲和素），使其与相应的标签结合。加入 Lumit 检测试剂，检测发光信号。



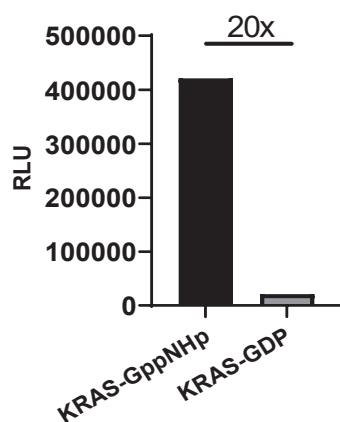
应用数据展示

Lumit[®] KRAS-RAF Assay 监测 GTP 结合的 KRAS 与 cRAF 的相互作用

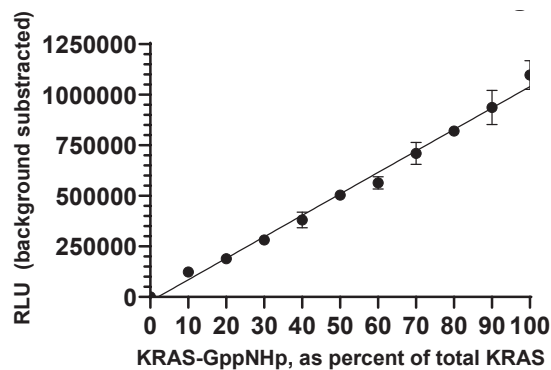


对于 Lumit[®] KRAS/c-RAF 相互作用检测，我们使用了 HIS 标记的 KRAS (G12C) 和 GST 标记的 RBD-cRAF 以及 LgBiT 标记的抗 HIS 和 SmBiT 标记的抗 GST 抗体。

KRAS/RBD-cRAF binding



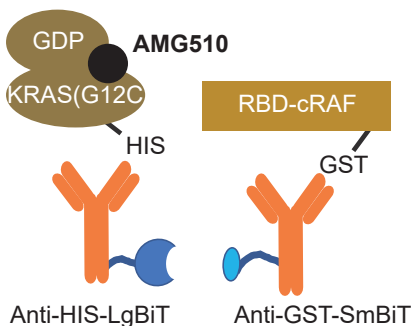
KRAS/RBD-cRAF binding



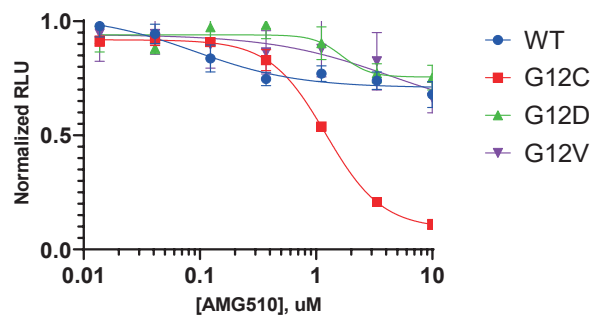
- Lumit[®] KRAS-cRAF 检测方法的检测窗口较宽（约 20 倍，左图）且分辨率极佳（右图），可用于监测 KRAS/c-RAF 结合的细微变化，检测方法准确性和重现性良好。

应用数据展示

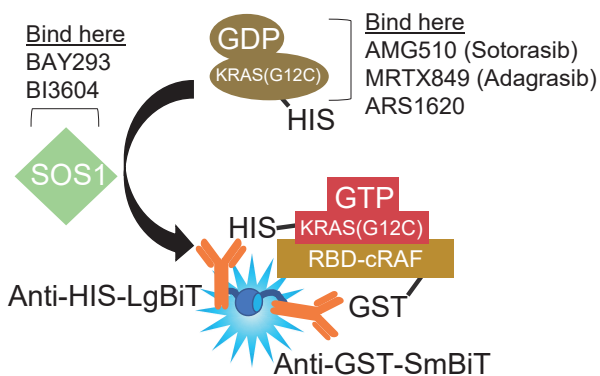
Lumit[®] KRAS-RAF Assay 可用于研究小分子抑制剂



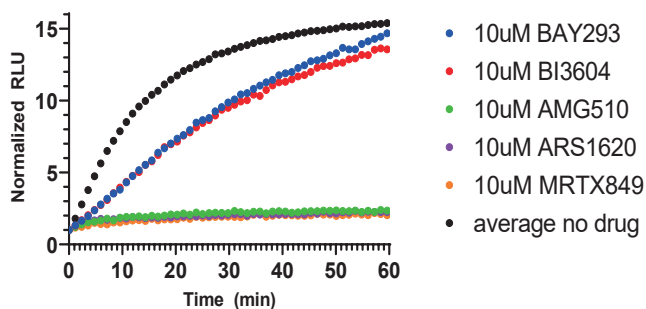
KRAS(G12C)/RBD-cRAF interaction with AMG510



- Lumit[®] KRAS-cRAF Assay 可用于研究小分子抑制剂对系列 KRAS 突变体的特异性。

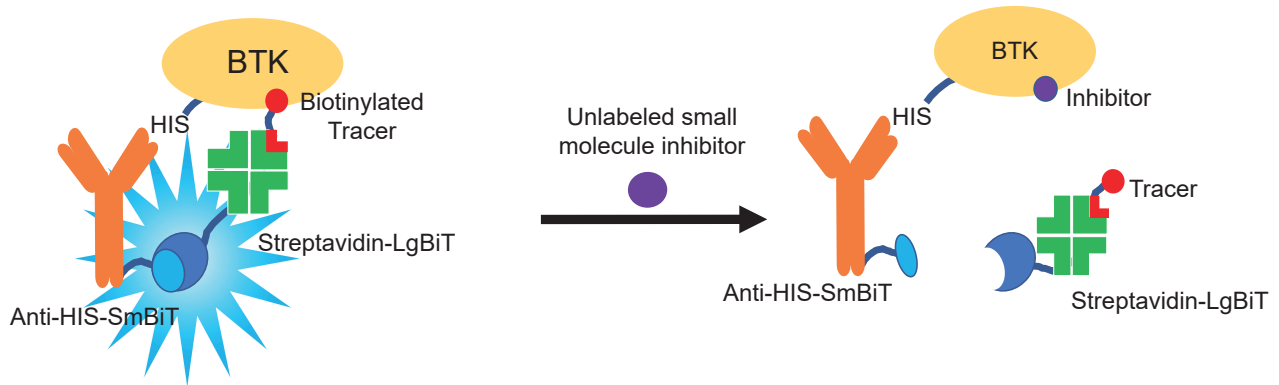


Kinetics of KRAS(G12C)/RBD-cRAF interaction

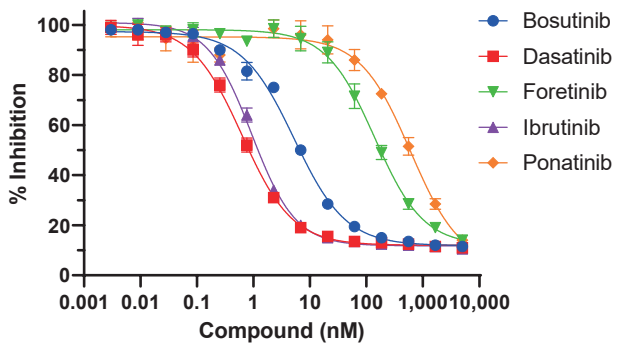


- KRAS 活化循环可于体外重建，且可监测小分子抑制剂存在的情况下 KRAS/cRAF 结合动力学，从而反映 SOS1 介导的 GDP/GTP 转换。

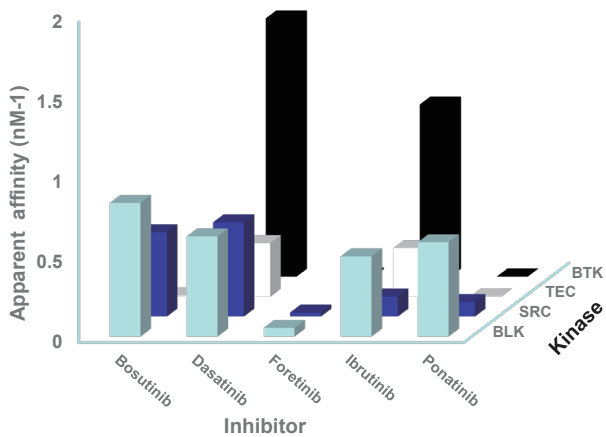
Lumit[®] Protein Interaction Immunoassay 用于监测与小分子的相互作用



BTK with small molecule inhibitors



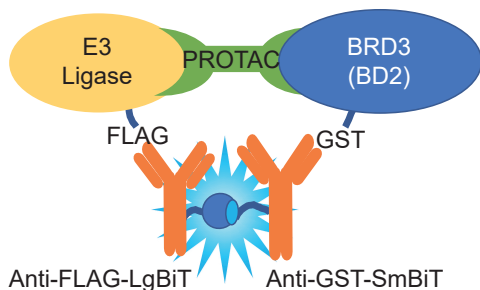
- 可实现小分子抑制剂的灵敏、快速筛选。



- 适用于高通量模式，可用于比较不同抑制剂和靶标的表观亲和力。

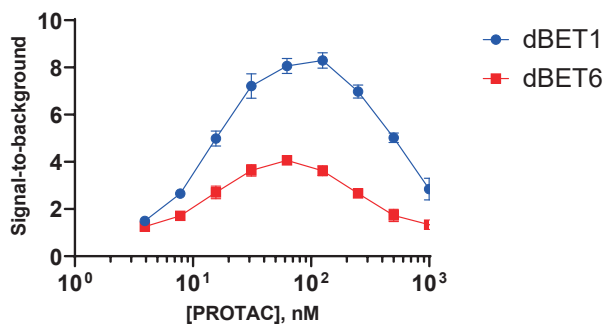
应用数据展示

PROTAC 应用：监测三元复合物形成

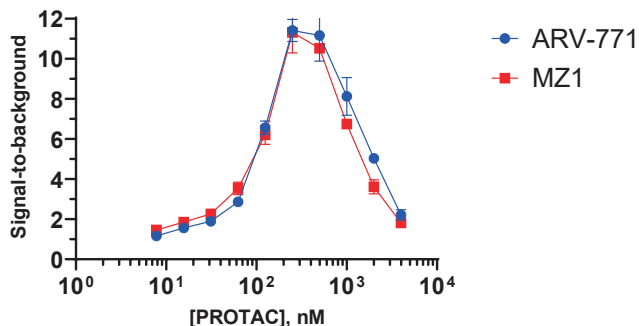


以 BRD3 (BD2) 为靶蛋白，我们使用抗 FLAG-LgBiT 和抗 GST-SmBiT 的 Lumit[®] 试剂监测了 PROTAC 介导的三元复合物（cereblon 复合物和 VHL 复合物）形成。

Cereblon complex + BRD3(BD2)
ternary complex formation

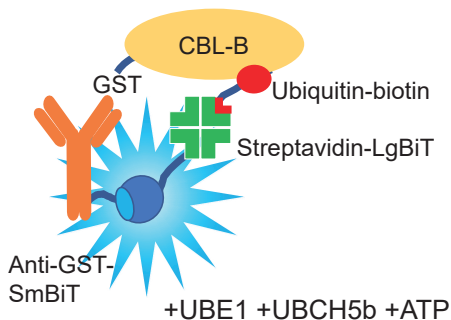


VHL complex + BRD3(BD2)
ternary complex formation



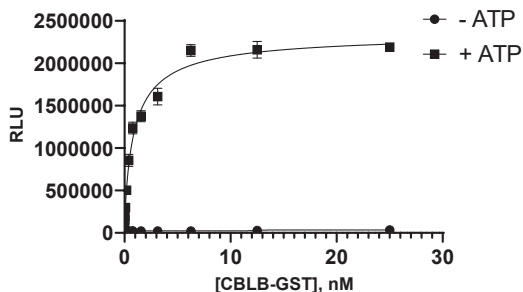
- 可监测不同 E3、靶蛋白和 PROTAC 形成的三元复合物。

PROTAC 应用：监测 E3 连接酶的自泛素化



为监测 E3 连接酶 Cbl-b 的自泛素化，我们于 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。并使用链霉素亲和素-LgBiT 和抗 GST-SmBiT 监测了泛素化水平。

ATP dependence of
Cbl-b autoubiquitination



- Lumit[®] 可用监测 E1、E2 和 ATP 存在情况下 E3 连接酶 Cbl-b 的自泛素化水平，且与对照（无 ATP）条件相比，检测窗口约为 70 倍。

Lumit[®] 比 HTRF 展现出更宽动态范围

Lumit[®] Anti-Tag 微量体积反应体系 (20μl) 与标准体积反应体系 (50μl) 及 HTRF 检测体系 (20μl) 对比, 结果表明:

1. Lumit[®] Anti-Tag 微量体积 (20μl) 与标准体积 (50μl) 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 (图 4)。
2. 相较于 HTRF 体系 (40 倍蛋白稀释范围, 20μl 体系), 微量体积 Lumit[®] Anti-Tag 反应体系展现出更宽动态范围 (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。

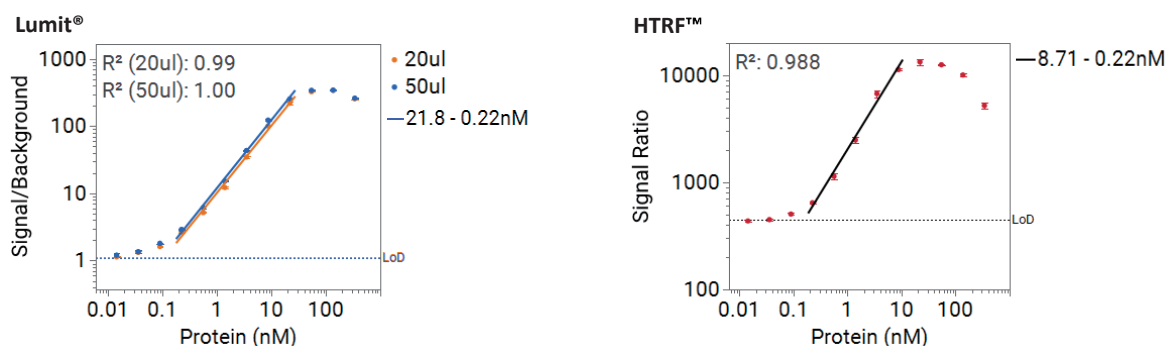


图 4. 使用 Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Reagents 与 HTRF 检测法测量蛋白梯度稀释系列。制备了 340.1-0.01nM 的双标签蛋白 (His/FLAG[®] 标签) 梯度稀释系列, 分别用两种试剂盒进行检测。**左图:** 50μl 与 20μl Lumit[®] Anti-Tag 反应。按照 Lumit[®] Anti-Tag 技术手册, 在 96 孔半区板中用 Lumit[®] Anti-6His SmBiT 和 Anti-DYKDDDDK LgBiT 配制 50μl (标准) 反应体系, 在 96 孔低体积板中配制 20μl 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 ± 标准差 (n=3)。检测限 (LoD) = 平均背景 RLU+ (3×标准差), 以水平线标示 (LoD/ 平均背景 RLU)。拟合线对应 50μl 或 20μl 反应体系的线性范围 (21.8-0.22nM)。**右图:** HTRF 反应。如方案所述 1, 在 96 孔低体积板中用抗 6His Tb Cryptate Gold 单抗和抗 FLAG[®] d2 单抗配制 20μl (标准) 反应体系。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。信号比 = (665nm 信号 / 620nm 信号) × 10⁴。数据表示为平均信号比 ± 标准差 (n=3)。LoD= 平均背景信号比 + (3×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。

检测方法	格式	动态范围
Lumit [®] Anti-Tag Protein Interaction Reagents, 标准体积 (50μl)	96-well ½ area	21.8 – 0.22nM
Lumit [®] Anti-Tag Protein Interaction Reagents, 微量体积 (20μl)	96-well low volume	21.8 – 0.22nM
HTRF Assay (20μl)	96-well low volume	8.71 – 0.22nM

Lumit[®] 和 HTRF 技术对比

指标	HTRF	Lumit
仪器要求	高, 需专用 TR-FRET 功能的酶标仪	低, 仅需具有发光检测功能的酶标仪
试剂价格	高	中
检测时间	大于 4 小时, 可能需要过夜孵育	0.5-2 小时
动态范围	宽	更宽
是否均质法	均质法	均质法
操作步骤	加样 - 检测	加样 - 检测
样品消耗	20μl	20μl
适用 96/384 孔板高通量	适用	适用

产品订购

产品名称	规格	目录号
Lumit [®] Anti-6His	LgBiT and SmBiT 20 µl	W1600
	LgBiT 200 µl	W1601
	SmBiT 200 µl	W1611
Lumit [®] Anti-GST	LgBiT and SmBiT 20 µl	W1620
	LgBiT 200 µl	W1621
	SmBiT 200 µl	W1631
Lumit [®] Anti-DYKDDDDK*	LgBiT and SmBiT 20 µl	W1640
	LgBiT 200 µl	W1641
	SmBiT 200 µl	W1651
Lumit [®] Streptavidin	LgBiT and SmBiT 20 µl	W1660
	LgBiT 200 µl	W1661
	SmBiT 200 µl	W1671
Lumit [®] Anti-Human IgG-LgBiT and -SmBiT	Please Enquire	
Lumit [®] Detection Reagent A	500 assays	VB2010
	5,000 assays	VB2020

*Anti-DYKDDDDK 识别常用于标记蛋白质的 FLAG[®] 标签。

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 网站: www.promega.com
 微网站: wechat.promega.com.cn 技术支持电话: 400 810 8133
 技术支持邮箱: chinatechserv@promega.com
 更新时间: 2025.09



Promega 生命科学



联系授权经销商