

GloMax[®] Galaxy 细胞成像仪上的 NanoBRET[®] 检测——成像与定量指导

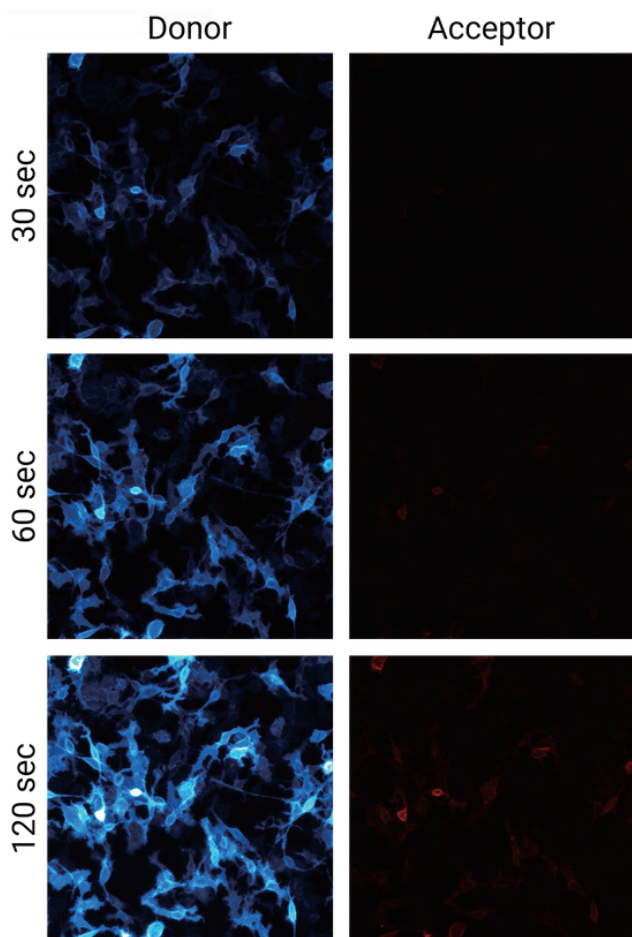


图 1. 无受体情况下的曝光测试示例。图像使用 GloMax[®] Galaxy 细胞成像仪在不同曝光时间下采集。在此例中，供体通道的理想曝光时间为 60 秒，而受体通道的理想曝光时间为 120 秒。底部一行显示了在没有受体的情况下，供体信号渗入受体通道的情况。

引言

生物发光共振能量转移（BRET）检测通过测量当萤光素酶供体在约 10 纳米范围内激发荧光受体时所发射的光，来检测分子间的邻近关系。BRET 检测避免了仅使用荧光方法（例如 FRET）常见的自发荧光、光漂白和光毒性问题。NanoBRET[®] 检测进一步优化了这一方法，通过将高亮度、低背景的 NanoLuc[®] 萤光素酶供体与具有优化光谱重叠的受体荧光团配对，从而实现对活细胞中蛋白质 - 蛋白质以及蛋白质 - 小分子相互作用的灵敏、实时检测。

获取供体和受体信号的图像需要对曝光时间进行优化，并在后期处理软件中对两个通道的图像灰度进行精细调节。这适用于使用 NanoBRET[®] 检测进行靶标结合分析以及蛋白质 - 蛋白质相互作用研究。本指南总结了在 GloMax[®] Galaxy 细胞成像仪上成像 NanoBRET[®] 信号的最佳实践，以及如何将发光数据转换为定量 BRET 比值，以监测蛋白质结合或靶标结合情况。

优化曝光时间与动态范围

- 首先在不使用受体的情况下进行优化，以确定受体通道的基线背景信号。
- 选择一个较短的初始曝光时间（例如 30 秒），并在逐渐增加的曝光时间下（例如 30/60/90 秒）对供体和受体进行成像。
 - 逐步调整曝光时间，直至找到供体通道中信号充足但未饱和的曝光时间。
 - 为受体通道找到合适的曝光时间，使得在该曝光时间下受体通道信号应略高于背景（即在没有受体的情况下，供体信号刚刚开始渗入受体通道）。这样可以确保在存在受体时信号将高于背景（如图 1 中 120 秒曝光所示）。
- **重要提示：**供体与受体的理想曝光时间可能并不相同。

如果各通道的曝光时间在所有实验条件下保持恒定，供体与受体之间采用不同的曝光时间将产生相同的倍数响应，但动态范围会得到改善（图 2）。为了证明这一点，NanoBRET® 靶标结合（TE）HTR2C 检测在不同曝光时间下对两个通道进行了成像。受体标记示踪剂与 HiBiT-HTR2C 的结合驱动能量转移至受体，并在加入检测试剂后产生 BRET 信号（左图）；未标记氯氮平通过竞争性置换示踪剂降低 BRET 信号（右图）。

当在 GloMax® Galaxy 上对该检测进行成像时，供体与受体均采用 120 秒曝光时间，在氯氮平处理后 BRET 比值从约 45 mBU 下降至约 22 mBU，变化倍数为两倍。将供体曝光时间缩短至 60 秒，在氯氮平介导的示踪剂置换后仍显示出两倍的信号损失（从约 90 mBU 下降至约 45 mBU；图 2B），同时动态范围翻倍。因此，调整曝光时间提供了一种简单的方法来提升动态范围，而无需改变相对响应。

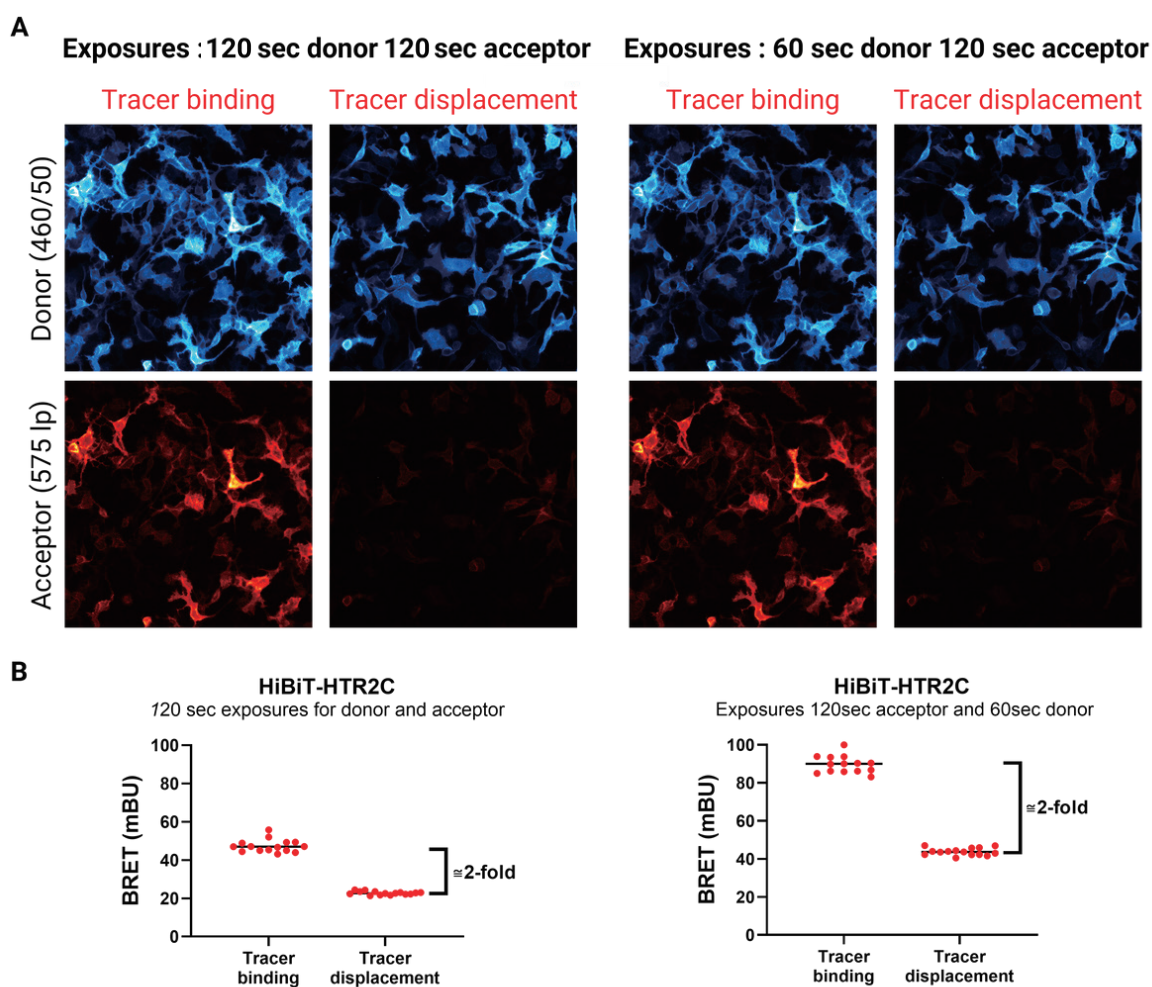


图 2. 比较不同曝光时间下的 NanoBRET® 倍数响应。 A.) 在 GloMax® Galaxy 细胞成像仪上，供体和受体图像分别采用相同曝光时间（120 秒，左图）或不同曝光时间（供体 60 秒 / 受体 120 秒，右图）采集。细胞分别经过单独示踪剂处理（示踪剂结合）或示踪剂联合过量未修饰氯氮平处理（示踪剂置换）。各处理条件下的曝光参数保持一致。B.) 在 GloMax® Galaxy 上采集的 BRET 比值数据。图表通过以下方法生成：针对每个处理条件，测量 15 个独立细胞的供体和受体图像的平均灰度值。mBRET 比值通过以下公式计算： $\text{mBRET 比值} = (\text{受体} / \text{供体}) \times 1000$ 。倍数变化通过将示踪剂结合组的平均 mBRET 比值除以示踪剂置换组的平均 mBRET 比值计算得出。

优化图像灰度（亮度与对比度）

在受体通道中获取足够的信号（灰度值）有助于生成更稳健、噪声更低的比率图像。此外，可通过后处理软件（如 Fiji）调整亮度与对比度以优化图像视觉效果，但需确保这些调整在整个实验中保持一致。

这些视觉比例尺的变化不会影响比率数值，因为比率数值是基于原始图像所捕获的灰度值计算得出的。灰度值代表图像上的像素强度水平，反映了检测到的信号量。图 3 展示了供体与受体通道采用不同灰度标尺不会对最终的比率图像或数值产生影响。

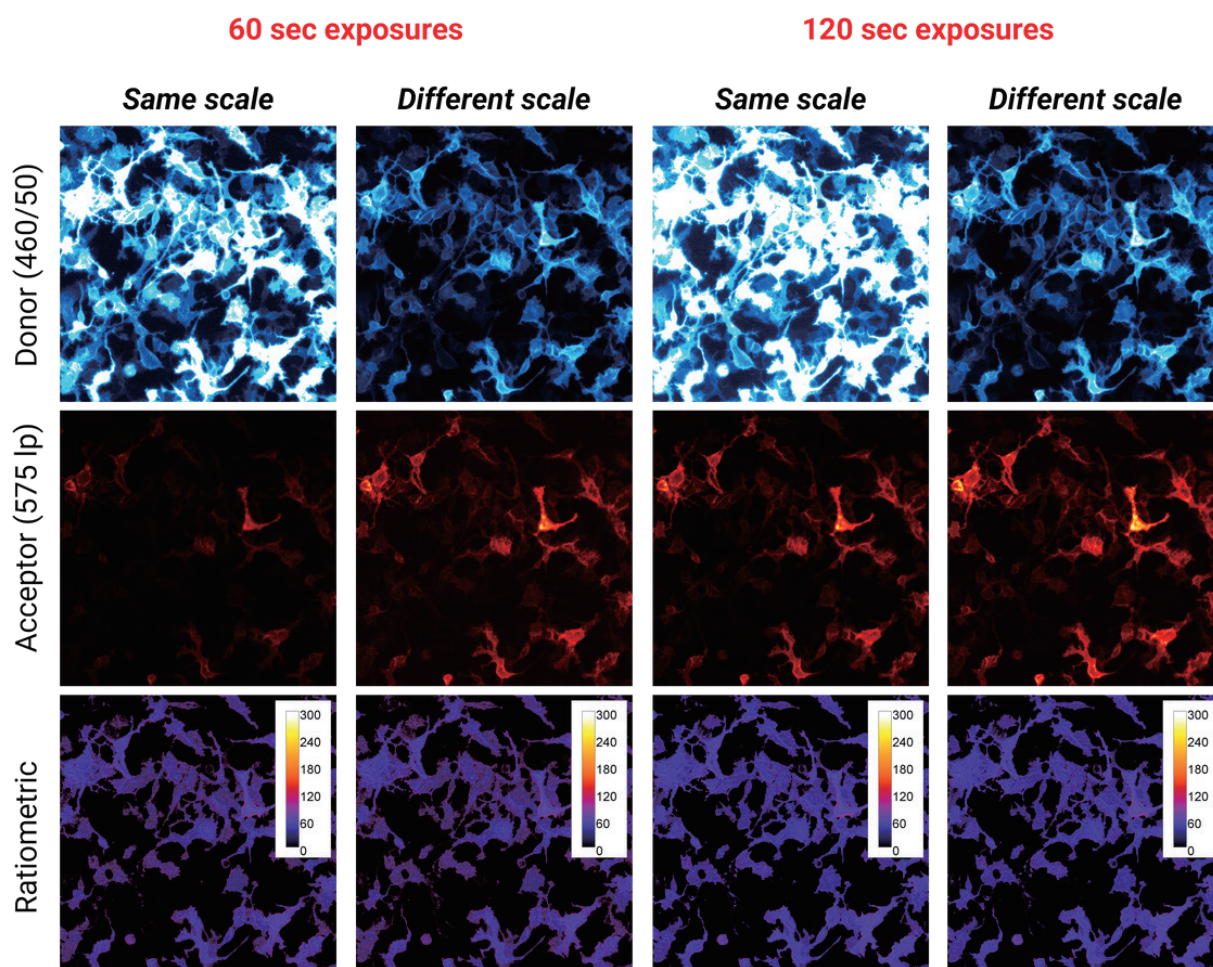


图 3. 修改亮度或对比度比例尺的说明。无论是 60 秒还是 120 秒曝光的比率图像，都不会受到后期处理中所做的比例尺调整（亮度或对比度）的影响。有关如何调整图像并生成比率图像的更多信息，请参阅我们的《[GloMax® Galaxy Fiji 使用指南](#)》。

优化示例：在 HTR2A 和 HTR2C 上成像 NanoBRET® 靶标结合检测

1. GloMax® Galaxy 成像的细胞铺板与转染

- 将密度为 1×10^5 个细胞 /mL 的 HeLa 细胞（培养于含 2% 血清的 Opti-MEM 培养基中）以 200 μ L/ 孔的体积铺板于 8 孔 ibidi 处理培养皿中。
- 使用标准 DNA 转染方案，以 100 倍稀释的 HiBiT-5HT2A 或 HiBiT-5HT2C 质粒转染细胞，并在 37°C、5% CO₂ 条件下孵育过夜。

2. 曝光时间优化（未添加示踪剂）

- 在成像前，立即向含有 200 μ L 生长培养基的孔中加入 200 μ L 的 2 \times 检测试剂（N157 NanoBRET® 底物按 1:125 稀释，N401 LgBiT 按 1:100 稀释）。
- 用 460/50 nm 带通滤光片采集供体发光信号，600 nm 长通滤光片采集受体发光信号。
- 按照前述方法进行曝光时间优化，以确定受体基线背景信号和供体的最佳曝光时间。

3. 化合物添加

- 将示踪剂预先配制成 HTR2C 的 200 \times EC₇₀ 浓度和 HTR2A 的 200 \times EC₈₀ 浓度（溶于 DMSO 中），然后 10 倍稀释于 0.3 \times 示踪剂稀释缓冲液（N2191）中，制备成 20 \times 示踪剂溶液。EC₇₀ 和 EC₈₀ 值已通过基于平板的预实验确定。
- 每孔添加 10 μ L 的 20 \times 示踪剂溶液；每种受体留一孔不处理作为阴性对照。
- 将未修饰的氯氮平配制成 10% DMSO 中的 20 \times 溶液（600 μ M）。向相应孔中添加 10 μ L 的 20 \times 氯氮平溶液（最终浓度为 30 μ M）或 10 μ L 的 10% DMSO 溶液。
- 在 37°C、5% CO₂ 条件下孵育处理 60 分钟。

4. 在 GloMax® Galaxy 上进行成像

- 在成像前立即向每孔添加 200 μ L 的 2 \times 检测试剂（N157 底物按 1:125 稀释，N401 LgBiT 按 1:100 稀释）。
- 使用步骤 2 中确定的曝光时间对细胞进行成像：供体曝光 60 秒，受体曝光 120 秒。

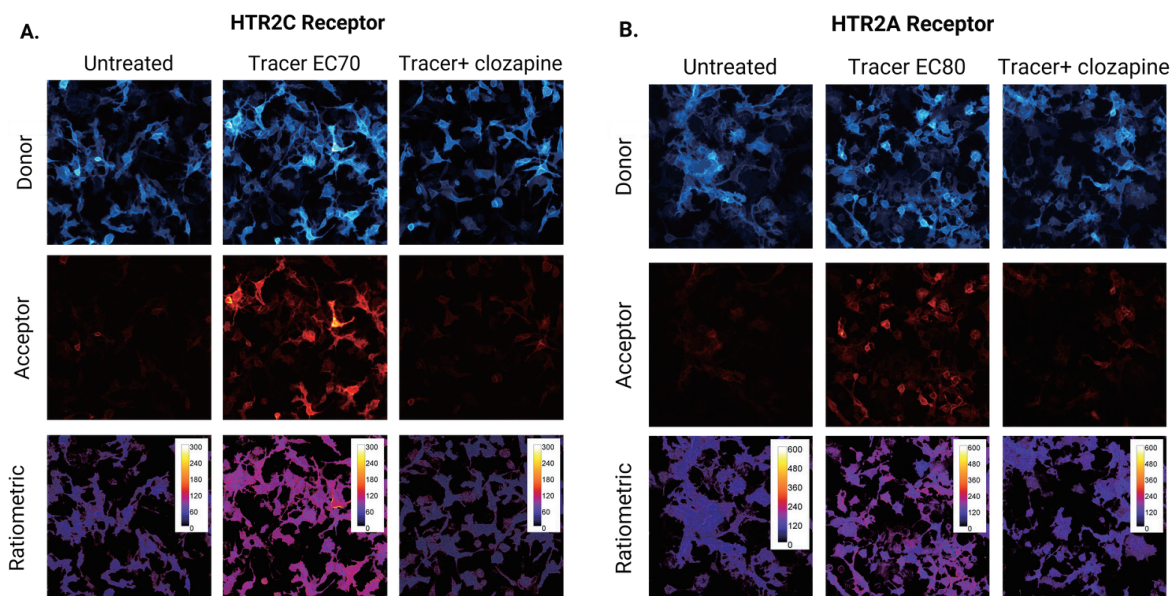


图 4. G 蛋白偶联受体 (GPCR) 靶标结合检测 A.) 在 GloMax® Galaxy 上拍摄的 HTR2C 受体靶标结合 (TE) 图像。B.) 在 GloMax® Galaxy 上拍摄的 HTR2A 受体靶标结合 (TE) 图像供体通道曝光 60 秒，受体通道曝光 120 秒。供体与受体未采用相同比例尺（亮度与对比度），但在整个实验过程中保持恒定。比率图像通过将供体与受体图像同时乘以细胞“掩膜”，并将处理后的受体图像除以供体图像生成。

总结与扩展资源

本指南阐述了使用 GloMax[®] Galaxy 细胞成像仪优化 NanoBRET[®] 检测的关键注意事项与建议。通过精细调节供体与受体的曝光时间及比例尺，研究人员可获得理想的动态范围，适用于 NanoBRET[®] 蛋白质 - 蛋白质相互作用及靶标结合研究。

想了解更多关于 GloMax[®] Galaxy 生物发光成像的信息？

请查阅我们的完整版《[GloMax[®] Galaxy Fiji 使用指南](#)》和《[GloMax[®] Galaxy 活细胞检测指南](#)》，深入了解生物发光成像技术。

Promega 生物发光成像产品

仪器设备

产品	规格	目录号
GloMax [®] Galaxy Bioluminescence Imager System	1 each	GM4005
GloMax [®] Galaxy Bioluminescence Imager Accessories	1 each	GM4000

GloMax[®] Galaxy Bioluminescence Imager System 仅供科研使用（RUO）。

检测试剂

产品	规格	目录号
NanoBRET [®] Nano-Glo [®] Standard Detection System	200 assays	N1661
	1000 assays	N1662
	10000 assays	N1663
NanoBRET [®] Nano-Glo [®] Kinetic Detection System	200 assays	N2583
	1000 assays	N2584
	10000 assays	N2585
NanoBRET [®] PPI Flexi [®] Starter System	1 each	N1821
NanoBRET [®] PPI MCS Starter System	1 each	N1811
NanoBRET [®] TE Intracellular Kinase Assay K-3	100 assays	N2600
	1000 assays	N2601
NanoBRET [®] TE Intracellular Kinase Assay, K-3 (No control DNA)	10000 assays	N2810
NanoBRET [®] TE Intracellular Kinase Assay, K-4	100 assays	N2520
	1000 assays	N2521
NanoBRET [®] TE Intracellular Kinase Assay, K-4 (No control DNA)	10000 assays	N2540
NanoBRET [®] TE Intracellular Kinase Assay, K-5	100 assays	N2500
	1000 assays	N2501
NanoBRET [®] TE Intracellular Kinase Assay, K-5 (No control DNA)	10000 assays	N2530

检测试剂

产品	规格	目录号
NanoBRET® TE Intracellular Kinase Assay K-8	100 assays	N2620
	1000 assays	N2621
NanoBRET® TE Intracellular Kinase Assay,K-8 (No control DNA)	10000 assays	N2820
NanoBRET® TE Intracellular Kinase Assay K-9	100 assays	N2630
	1000 assays	N2631
NanoBRET® TE Intracellular Kinase Assay,K-9 (No control DNA)	10000 assays	N2830
NanoBRET® TE Intracellular Kinase Assay K-10	100 assays	N2640
	1000 assays	N2641
NanoBRET® TE Intracellular Kinase Assay,K-10 (No control DNA)	10000 assays	N2840
NanoBRET® TE Intracellular Kinase Assay K-11	100 assays	N2650
	1000 assays	N2651
NanoBRET® TE Intracellular Kinase Assay,K-11 (No control DNA)	10000 assays	N2850
NanoBRET® TE Intracellular E3 Ligase Assay, CRBN	100 assays	N2910
NanoBRET® TE Intracellular E3 Ligase Assay, CRBN	1,000 assays	N2911
NanoBRET® TE Intracellular E3 Ligase Detection Reagents, CRBN	10,000 assays	N2912
NanoBRET® TE Intracellular E3 Ligase Assay, VHL	100 assays	N2930
NanoBRET® TE Intracellular E3 Ligase Assay, VHL	1,000 assays	N2931
NanoBRET® TE Intracellular E3 Ligase Detection Reagents, VHL	10,000 assays	N2932

相关数据库资源

Addgene 平台 Promega 质粒资源库
已验证适用于 NanoBRET® Target Engagement Assay 的目标蛋白列表

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司

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
传真：010-58256160

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：2025.09

