

使用 PROTACs 监测三元复合物形成

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。

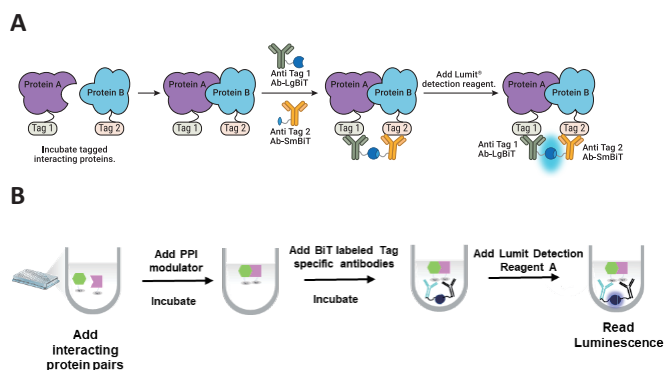


图 1. Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Immunoassay 原理示意图。 A. 当 LgBiT 和 SmBiT 通过蛋白 A 与蛋白 B 的相互作用相互靠近时，在底物存在下形成活性萤光素酶并产生发光信号。 B. 简易免洗操作流程概述

PROTACs

PROTACs (蛋白水解靶向嵌合体) 是一类异源双功能小分子，通过将靶蛋白募集至 E3 泛素连接酶附近引导其降解。一个 PROTAC 分子由通过连接子连接的两个配体组成：一个配体结合 E3 连接酶 (通常为 Cereblon 或 VHL) 以募集细胞泛素系统，另一个配体结合目标靶蛋白。当 PROTAC 同时结合靶蛋白和 E3 连接酶时，E3 连接酶会募集导致靶蛋白泛素化并最终被蛋白酶体降解的酶系。

作为传统抑制剂的替代方案，PROTACs 具有显著的治疗潜力。与小分子药物不同，PROTACs 可在细胞内循环使用从而实现持续降解，且其结合位点不限于靶蛋白活性位点，这为靶向以往“不可成药”蛋白的新位点创造了机会。如图 2 所示，基于蛋白标签的 Lumit[®] 蛋白相互作用免疫检测技术为 PROTACs 筛选提供了一种简易的生物发光检测方法。

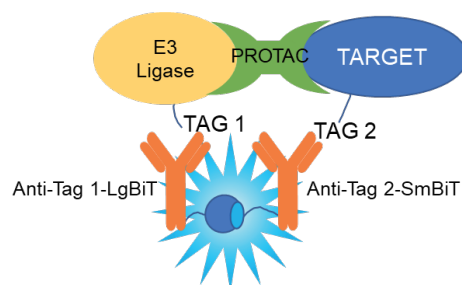


图 2. Lumit[®] PROTAC Immunoassay。 PROTACs 促使 E3 连接酶与靶蛋白相互靠近，该相互作用可通过 BiT 标记的抗标签抗体进行检测。

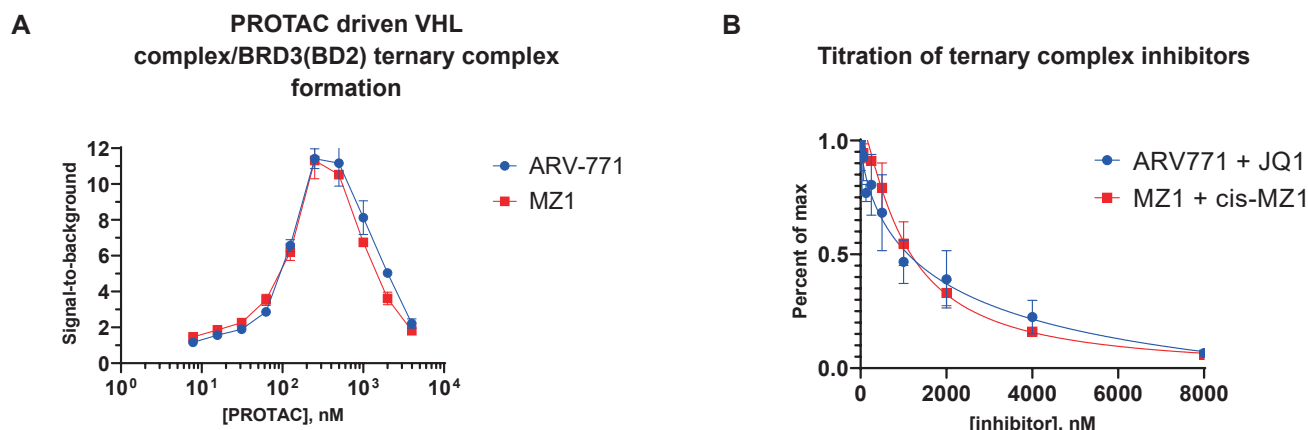


图 3. 不同 PROTACs 介导的三元复合物形成检测。 (A) PROTACs ARV-771 和 MZ1 诱导 VHL 复合物与 BRD3 (BD2) 形成三元复合物。在约 250nM 浓度范围内, 随 PROTAC 浓度升高, 发光信号增强, 表明三元复合物量增加。当发光信号达峰值时, PROTAC 已饱和结合 E3 和 / 或靶蛋白。更高浓度的 PROTAC 会导致发光信号下降 (“钩状效应”), 这是由非活性二元复合物的形成所致。 (B) 在 PROTAC/ 蛋白混合体系中加入梯度浓度的 JQ1 或 cis-MZ1, 与活性三元复合物形成竞争。所有浓度均以各孔终浓度表示。

Lumit[®] PROTAC 介导的 VHL 复合物 /BRD3 (BD2) 免疫检测方案

1. 将 100nM BRD3 (BD2) 与 100nM VHL 复合物分别与: (A) 梯度稀释的 ARV-771 或 MZ1 或 (B) 250nM PROTAC 及梯度浓度的靶蛋白配体 (ARV-771 对应 JQ1, MZ1 对应 cis MZ1) 混合。每孔加入 20 μ l 混合液。
2. 震荡孵育 1 小时。
3. 每孔加入 20 μ l 用 1 $\times$ Lumit[®] Immunoassay Dilution Buffer A 配制的抗 DYKDDDDK-SmBiT (1.5 μ g/ml) 和抗 GST-LgBiT (1.5 μ g/ml) 。
4. 震荡孵育 30 分钟。
5. 每孔加入 10 μ l 按 1:50 比例用 Lumit[®] Immunoassay Dilution Buffer A 稀释的 Lumit[®] Detection Substrate A。
6. 震荡孵育 2 分钟。
7. 检测发光信号。

所需材料:

Item	Supplier	Cat. #
VHL Complex	BPSBioscience	100373
BRD3(BD2)	BPSBioscience	31033
ARV-771	MedChemExpress	1949837-12-0
MZ1	Tocris	6154
JQ1	Tocris	4499
cis-MZ1	Tocris	6155

订购信息:

Item	Cat. #
Lumit [®] Anti-DYKDDDDK-LgBiT and -SmBiT	W1640
Lumit [®] Anti-GST-LgBiT and -SmBiT	W1620
Lumit [®] Immunoassay Detection Reagent A	VB2010