

中文说明书

NanoBRET™ TE K192 Kinase Selectivity System

适用产品目录号：
NP4100、NP4101、NP4050 和 NP4060



NanoBRET™ TE K192 Kinase Selectivity System

所有技术文献的英文原版均可在 www.promega.com/protocols 获得。请访问该网址以确定您使用的说明书是否为最新版本。
如果您在使用该试剂盒时有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。
电子邮箱: chinatechserv@promega.com

1. 产品描述.....	2
2. 产品组分和储存条件.....	4
3. 开始实验前.....	5
3.A. NanoBRET™ Target Engagement K192 Kinase Vector Panel	5
3.B. NanoBRET™ TE Selectivity DNA Controls	5
3.C. NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Detection Reagent, K-10	5
3.D. 细胞背景	6
3.E. 仪器要求和设置.....	6
4. NanoBRET™ TE K192 Kinase Selectivity Assay 一般操作方案.....	7
4.A. 所需条件	9
4.B. 建议条件	9
4.C. 制备转染即用型 K192 工作 DNA 孔板.....	10
4.D. 制备转染用对照载体.....	11
4.E. 转染工作流程（第 1 天）	12
4.F. 转染对照实验（第 2 天）	13
4.G. NanoBRET™ Target Engagement K192 Assay 操作方案（第 2 天）	14
4.H. 进行数据质量分析，计算部分占有率.....	16
4.I. 192 种激酶的部分占有率检测所用孔板的布局示例和操作方案	18
5. 附录.....	23
5.A. 对照化合物测定窗口和选择性数据示例	23
5.B. 管理试板蒸发和重新密封.....	24
5.C. 缓冲液和溶液组成	25
5.D. 常见问题	25
5.E. 疑难解答	26
5.F. 数据处理和部分占有率计算示例.....	28
5.G. NanoBRET™ Tracers 的消光系数	28
5.H. 参考文献	29
5.I. 相关产品	29

1. 产品描述

NanoBRET™ Target Engagement K192 Kinase Selectivity Systems^(a-k) 使研究人员能够通过一个包含 192 个人类激酶的多样化集合，在活细胞中对激酶抑制剂的选择性进行评估。本选择性系统的基础是 NanoBRET™ 靶标结合 (TE) 技术。NanoBRET™ TE 技术是利用一种被称为 NanoLuc 的小但极亮的萤光素酶进行检测的生物发光共振能量转移方法 (BRET) (请参见图 1)。NanoBRET™ TE 技术定量检测完整活细胞内化合物对选定靶蛋白的结合亲和力和占有率 (1)。NanoBRET™ TE 技术已成功应用于激酶等许多种靶标类型 (2-4)。为实施简化的活细胞激酶分析方法，使用单一广谱 NanoBRET™ Tracer (K-10) 对每个激酶 -NanoLuc® 融合蛋白的 TE 进行量化分析。

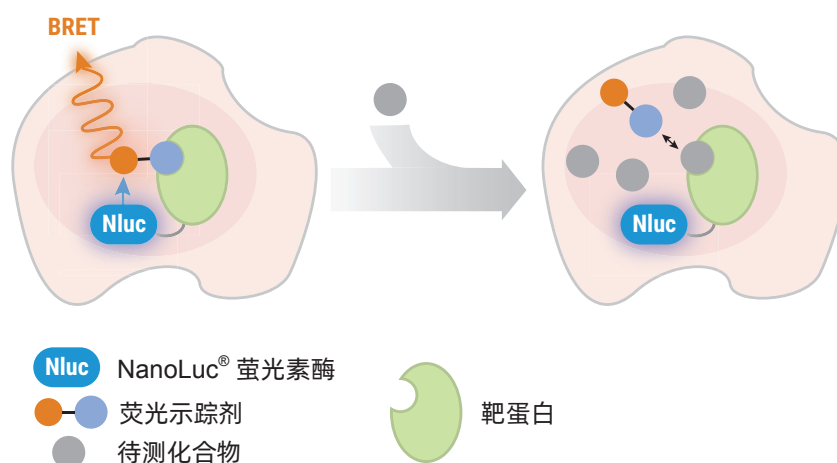


图 1. NanoBRET™ TE 检测技术。关注的靶蛋白在哺乳动物细胞中作为靶蛋白 -NanoLuc® 融合构建体表达。使用具有细胞渗透性的荧光示踪剂，并于竞争性模式下测量化合物结合。BRET 检测原理为 NanoLuc® 萤光素酶与可透过细胞的荧光示踪剂（与靶蛋白 -NanoLuc® 融合蛋白结合）之间发生的发光能量转移。具有细胞渗透性并与示踪剂竞争与靶蛋白结合的待测化合物将导致 NanoBRET™ 信号丢失。关于 NanoBRET™ TE 技术的基本生物物理原理的更多信息，可见 *NanoBRET™ Target Engagement Intracellular Kinase Assay, Adherent Format* 的说明书 #TM598。

NanoBRET™ TE K192 Kinase Selectivity System 提供了一种基于微孔板的新工作流程，使用常用的实验室设备通过一次实验即可测定活细胞内化合物对 192 种激酶的占有率。该系统由 NanoBRET™ TE K192 Kinase Vector Panel^(a) 和 NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay K-10 组成^(b-d)（请参见图 2）。

- NanoBRET™ TE K192 Kinase Vector Panel 含有 192 种独特的激酶 -NanoLuc® 萤光素酶融合载体，这些载体在 96 孔板中排列布局，可随时用于转染。实验第 1 天，使用者将 K192 试板载体转染至 HEK293 细胞中。试板内载体表达的每种激酶是全长的。
- NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay K-10 含有第二天单次实验中 192 种激酶 NanoBRET™ TE 检测所需的试剂。NanoBRET™ Tracer K-10 已经过优化，可实现最大的激酶组覆盖，仅通过单试剂设计即可用于广谱分析。另外，NanoBRET™ Target Engagement K192 Kinase Vector Panel 内的每种激酶使用四种 NanoBRET™ Tracer K-10 浓度的其中之一。示踪剂浓度已经过优化以便可给出每种激酶的定量占有率数据，进一步简化检测方法。与示踪剂竞争与目标激酶结合的待测化合物将导致 BRET 信号丢失。使用对照组校准 BRET 竞争，以便计算待测化合物的部分占有率。

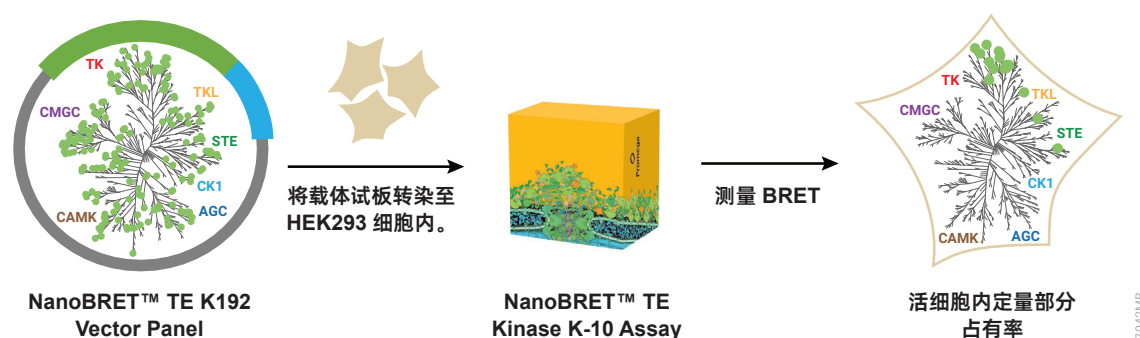


图 2. NanoBRET™ TE K192 Kinase Selectivity System 概览。使用该系统可以在活细胞中测定化合物对代表激酶组的整试板 192 个全长激酶的选择性。

从细胞生理调节到信号转导，激酶在无数细胞过程中都是必不可少的。因此，激酶活性失调是各种病理的共同驱动因素，激酶是药物开发的关键治疗靶点。过去，已经使用一系列体外生化实验来评估化合物在整个激酶组中的结合选择性。尽管生物化学方法在纯化环境中非常适用于确定药物的结合特性，但可能无法预测活细胞环境中的药物选择性。原因可能包括激酶活化状态多变，使用截短蛋白而不是全长靶点，细胞内存在可能影响靶点行为的结合伴侣蛋白，以及高且不可预测的细胞内 ATP 浓度产生的竞争效应⁽³⁾。使用大量不同种类的全长激酶 NanoBRET™ TE 检测产品进行测定，证实了与生化结合检测结果相比，FDA 批准的药物克唑替尼和达沙替尼在活细胞环境中的选择性显著提高⁽³⁾。本研究突出了 NanoBRET™ TE K192 Kinase Selectivity System 等方法在细胞环境内测定药物选择性的重要性。

2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
NanoBRET™ TE K192 Kinase Selectivity System	1 each	NP4050

不得用于医学诊断。试剂盒中包含 192 种激酶 -NanoLuc® 融合表达载体，每一种 DNA 都足够进行 50 次分析。包括：

- 1 each NanoBRET™ TE K192 Kinase Vector Panel
- 1 each NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Detection Reagent, K-10 (10,000 assays)

产品	规格	目录号
NanoBRET™ TE K192 Kinase Selectivity System with Controls	1 each	NP4060

不得用于医学诊断。试剂盒中包含 192 种激酶 -NanoLuc® 融合表达载体，每一种 DNA 都足够进行 50 次分析。包括：

- 1 each NanoBRET™ TE K192 Kinase Vector Panel
- 1 each NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Detection Reagent, K-10 (10,000 assays)
- 1 each NanoBRET™ TE Selectivity DNA Controls

产品	规格	目录号
NanoBRET™ TE K192 Kinase Vector Panel	1 each	NP4100

不得用于医学诊断，包括：

- 2 each NanoBRET™ TE K192 Vector Plate A
- 2 each NanoBRET™ TE K192 Vector Plate B
- 1 each Adhesive Foil Plate Seals

产品	规格	目录号
NanoBRET™ TE K192 Kinase Vector Panel, Small	1 each	NP4101

不得用于医学诊断。包括：

- 1 each NanoBRET™ TE K192 Vector Plate A
- 1 each NanoBRET™ TE K192 Vector Plate B
- 1 each Adhesive Foil Plate Seals

储存条件: NanoBRET™ TE K192 Kinase Vector Panel Plates 和 NanoBRET™ TE Selectivity DNA Controls 置于 -30°C 至 -10°C 温度下保存。NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Detection Reagent, K-10 置于低于 -65°C 温度条件下保存。或者，将 NanoBRET™ Tracer K-10 置于低于 -65°C 的条件下保存，所有其他组分则置于 -30°C 至 -10°C 的条件下保存。我们建议对 NanoBRET™ Tracer K-10 进行等分分装，且冻融循环不超过 5 次。NanoBRET™ Tracer K-10、NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate 和 Extracellular NanoLuc® Inhibitor 均避光保存。Adhesive Foil Plate Seals（自粘铝箔封板膜）置于室温下保存。

3. 开始实验前

3.A. NanoBRET™ Target Engagement K192 Kinase Vector Panel

该试板共包括 192 种激酶 -NanoLuc® 融合载体，用两个 96 孔板排列组装。每种独特的激酶 -NanoLuc® 融合载体在 96 孔板中有专属的位置放置。每个孔板采用热密封，维护每个孔的密封性，防止蒸发。

该产品提供的 192 种激酶 -NanoLuc® 融合载体采用易于使用的消耗品形式。将激酶 -NanoLuc® 融合载体与特定的运载体 DNA 预混合，使用者省去了为实现最优转染和表达而制备运载体 DNA 和激酶 -NanoLuc® 融合载体混合物的步骤。如第 4.C 节所述，转染前仅需要稀释该 10X 制剂即可。

将两个 NanoBRET™ TE K192 Kinase Vector Panel 96 孔板标记为 NanoBRET™ TE K192 Vector Plate A 和 NanoBRET™ TE K192 Vector Plate B。目录号 NP4101 中，每种孔板各 1 个，共 2 个孔板，每种激酶有足够数量的激酶 -NanoLuc® 载体，每种载体至少能进行 25 次分析（检测孔板中每个孔进行一次分析）。目录号 NP4100 中，每种孔板各 2 个，共 4 个孔板，每种激酶有足够数量的激酶 -NanoLuc® 载体，每种载体至少能进行 50 次分析。如果您正在使用目录号 NP4100 并计划对每个激酶执行不超过 25 次分析，您可以一次只处理一套 A 板和 B 板。

预排列好的转染即用型激酶 -NanoLuc® 融合 DNA 按照用于检测的 NanoBRET™ Tracer K-10 Reagent 浓度顺序，在 96 孔板中按竖列组织排列。用于分析的每种激酶的孔板布局图和相关的示踪剂 K-10 浓度，见 K192 孔板布局图文件，想要获取该文件，请访问 www.promega.com/K192-Downloads

3.B. NanoBRET™ TE Selectivity DNA Controls

进行检测时，我们建议加入特定的对照载体，这种载体可在 NanoBRET™ TE Selectivity DNA Controls 中找到。对照组套装包括：1) NanoLuc® 对照载体；2) 转染对照载体；以及 3) Transfection Carrier DNA（运载体 DNA）。NanoBRET™ TE Selectivity DNA Controls 可从 Promega 购买（目录号 NP1000），NanoBRET™ TE K192 Kinase Selectivity System with Controls 产品（目录号：NP4060）中也包含 NanoBRET™ TE Selectivity DNA Controls。关于对照品的制备，见第 4.D 节。

注意：NanoLuc® 对照载体为 pNL1.1.CMV[Nluc/CMV] 载体（目录号：N1091）。转染对照载体为 NanoLuc® -HIPK2 融合载体（目录号：NV3221）。Transfection Carrier DNA 目录号为 E4881。以上均可单独购买。

3.C. NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Detection Reagent, K-10

除了 K192 载体试板和对照 DNA 外，本检测方法还需要使用其他一些试剂，包括：

- NanoBRET™ Tracer K-10
- NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate
- Extracellular NanoLuc® Inhibitor
- Tracer Dilution Buffer

NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Detection Reagent, K-10（目录号：N2840）提供这些试剂，NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Detection Reagent, K-10 是 NanoBRET™ TE K192 Kinase Selectivity System（目录号：NP4050）和 NanoBRET™ TE K192 Kinase Selectivity System with Controls（目录号：NP4060）的组分。

3.D. 细胞背景

NanoBRET™ TE K192 Kinase Selectivity System 是一套由 192 种细胞内激酶检测组成的集合，最初是在共同的细胞背景下优化的，即 HEK293 细胞。因此，本检测试板已明确证实，可用于 HEK293 细胞（ATCC，目录号：CRL-1573）或 TransfectNow™ HEK293 细胞（目录号：NC1001、NC1002）。NanoBRET™ TE K192 Kinase Selectivity Systems 尚未被证实可用于其他细胞类型。

3.E 仪器要求和设置

为进行 NanoBRET™ TE 检测，需要一个能够测量双波长窗口的发光检测仪。这可以通过使用滤光片来实现。我们建议使用带通滤波器（BP）检测供体信号和长通滤波器（LP）检测受体信号，以最大程度地提高灵敏度。

- NanoBRET™ 生物发光供体的发射波长为 460nm。测量此供体信号时，我们建议使用带通（BP）滤波器（覆盖范围接近 460nm，带通范围为 8–80nm）。例如可捕获 410–490nm 范围的 450nm/BP80 滤波器。

注意：供体信号的测量，应首选 BP 滤波器，以选择性捕获信号峰和避免测量任何受体渗透峰。当然，也可使用覆盖 460nm 这一范围的短通（SP）滤波器。这可能会造成供体信号值的人为性升高，而且还会测量到受体渗透峰，这可能会压缩比率计算，从而缩短测定窗口。

- NanoBRET™ 受体峰发射波长约为 590–610nm。测量受体信号时，我们建议使用长通滤波器（从 600–610nm 处开始）。

可进行双重发光信号测量的仪器要么是已配备可供选择的滤波器，或者滤波器可单独购买和添加。对于涉及使用光学镜子的仪器，请选择发光镜。一般来说，0.2–1 秒的整合时间足够。确保对仪器增益进行了优化，以在不造成仪器信号饱和的情况下捕获最高供体信号。

请咨询仪器制造商，以确定滤波器是否正确安装或者将滤波器添加至发光检测仪涉及的信息。例如，安装滤波器时可能需要特殊支架或立方形物件，而且不同仪器的形状和厚度也可能存在差异。我们对下述仪器和配置的使用有丰富的经验：

- GloMax® Discover System（目录号：GM3000）带有预装滤波器，用于供体 450nm/8nm BP 和受体 600nm LP。从“Protocol”菜单中选择预装的 BRET: NanoBRET™ 618 Protocol。
- BMG Labtech CLARIOstar® 带有预装滤波器，用于供体 450nm/80nm BP 和受体 610nm LP。
- Thermo Varioskan® 带有 Edmunds Optics 公司生产的滤波器，使用供体 450nm CWL，直径 25mm，80nm FWHM，干涉滤波器，和受体直径 1 英寸，RG-610 长通滤波器。

PerkinElmer 公司的 EnVision® Multilabel Reader 也可用于测量双重发光信号。如果将 EnVision® 用于 NanoBRET™ 检测，Perkin Elmer 公司可提供下述光学元件：

- EnVision Optimized Label-NanoBRET（PE 目录号：2100-8530）。包括：双色镜，585nm（目录号：2100-4380）；滤波器，460/80nm（目录号：2100-5950）；以及滤波器 647/75nm（目录号：2100-5970）。

4. General NanoBRET™ TE K192 Kinase Selectivity Assay 操作方案

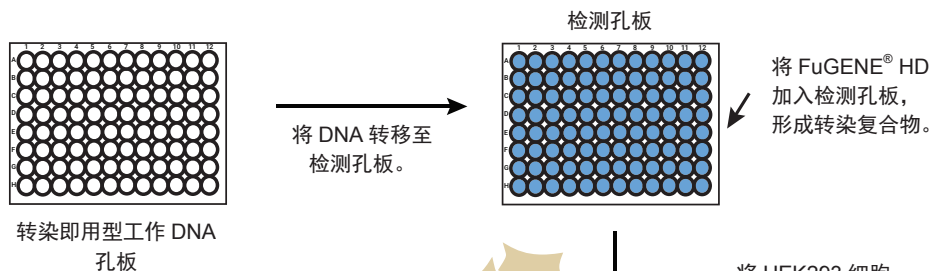
需要单独获取的其他检测材料，见用户需提供的材料清单。第 4.A 节讨论了实施检测需要的处理条件和对照组。第 4.B 至 4.D 节分别详细描述了工作 K192 试板 DNA 和对照 DNA 的制备过程。第 4.E-H 节详细描述了转染步骤和 BRET 检测方法的实施过程，以及数据处理和质量控制的指导原则。第 4.I 节提供了一个示例板布局和快速操作示例，可用于确定该试板中 192 种激酶的技术单重复的部分占有率。第 5.C 节列出了所需缓冲液和溶液的组分。关于操作方案的示意图，见图 3。

注意：本中文说明书中描述的操作方案已经过优化仅用于 96 孔板；目前不支持用于 384 孔板。

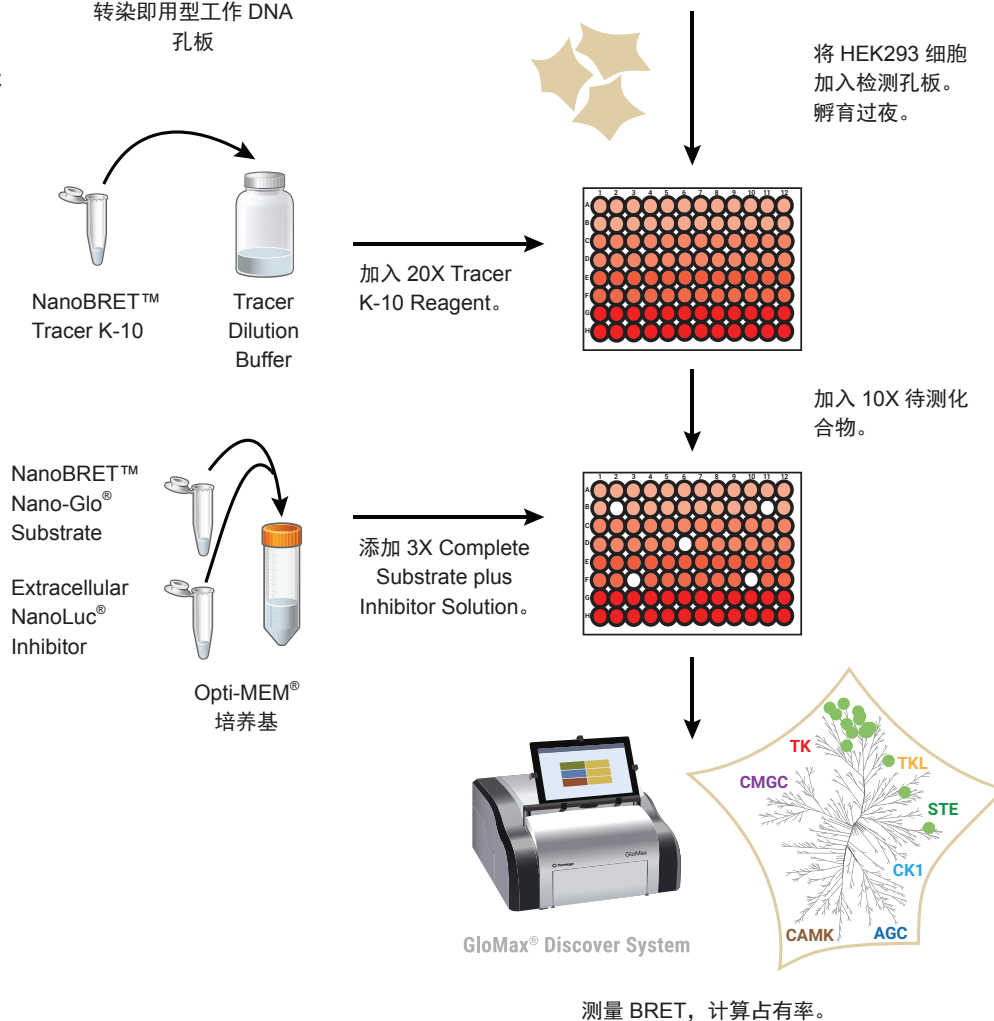
用户需提供的材料

- HEK293 细胞（例如，即用型 TransfectNow™ HEK293 细胞，目录号：NC1001、NC1002；或用户自行制备，ATCC，目录号：CRL-1573）
- Dulbecco 改良后 Eagle 培养基（DMEM；Thermo Fisher Scientific，目录号：11995-065）
- 胎牛血清（HyClone，目录号：SH30070.03，或 Seradigm，目录号：1500-050）
- Opti-MEM™ I 低血清培养基，无酚红（Life Technologies，目录号：11058-021）
- 组织培养处理过的白色 96 孔板（首选 Corning®，目录号：3917；替代使用 Greiner 目录号 655083）
- 用于示踪剂操作的聚丙烯塑料器皿（注意：本检测方法不建议使用聚苯乙烯塑料器皿。）
- 0.05% 胰蛋白酶 / EDTA（Thermo Fisher，目录号：25300）
- FuGENE HD 转染试剂（目录号：E2311；注意：本检测方法使用的转染操作方案是使用 FuGENE® HD 优化，可能与其他转染试剂不兼容。）
- DMSO（Sigma，目录号：D2650）
- NanoBRET™ TE Selectivity DNA Controls（目录号：NP1000）注意：如果正在使用 NanoBRET™ TE K192 Kinase Selectivity System with Controls（目录号：NP4060），该产品包含 NanoBRET™ TE Selectivity DNA Controls。
- TE 缓冲液，1X，分子生物学级（目录号：V6231）
- 可以测量 NanoBRET™ 波长的检测仪器（例如 GloMax® Discover System，目录号：GM3000；详情可见第 3.E 节）
- 可选：CC1 泛激酶抑制剂（对照配体；目录号：N2661）

第 1 天



第 2 天



17994MB

图 3. NanoBRET™ TE K192 Kinase Selectivity System 操作方案示意图。第 1 天, 将 NanoBRET™ TE K192 Vector Panel 中转染即用型激酶载体在检测板中转染至 HEK293 细胞内。第 2 天, 使用 NanoBRET™ TE Intracellular Kinase K-10 Assay 进行下述 BRET 分析: 使用单一示踪剂 (NanoBRET™ Tracer K-10) 与试板中的每种激酶形成 BRET 复合物, 通过确定的示踪剂浓度为每个激酶提供定量数据。用单剂量待测化合物竞争 BRET 信号, 可以让你确定在试板内的每个激酶处的化合物的部分占有率。

4.A. 所需条件

要用 NanoBRET™ Target Engagement K192 Kinase Selectivity System 计算待测药物在特定剂量下的部分占有率，需要使用以下对照组或条件：

BRET_{Min} 对照组：每次实验必须加入该对照组，以定义零 BRET 或“100% 部分占有率”。该对照组最有效的方案是在细胞内表达 NanoLuc® 对照载体，测量 BRET 数值。无需加入 K-10 示踪剂。具体地，NanoBRET™ TE Selectivity DNA Controls（目录号：NP1000）包含我们建议用作 NanoLuc® 对照组的载体，标记为 pNL1.1.CMV [Nluc/CMV] 载体。

可以在每个检测孔板的多个孔中放置表达 NanoLuc® 对照载体的 BRET_{Min} 对照组，或者至少需要在其中一个检测孔板的数个孔中放置 BRET_{Min} 对照组。我们建议每次实验至少在两个孔中加入 NanoLuc® 对照载体。关于孔板中 NanoLuc® 对照品的布局示例，请参见第 4.I 节。转染用 NanoLuc® 对照载体的制备见第 4.D 节。

BRET_{Max} 对照组：K192 试板中每种激酶都需要设置该对照组。具体地，使用 BRET_{Max} 对照组定义每种激酶的最大 BRET 或“0% 部分占有率”，该对照组使用的是 K-10 示踪剂 + DMSO 溶剂（或其他对应的待测化合物溶剂）。该对照组的使用详见第 4.H 节，照此进行数据质量控制，计算待测化合物的部分占有率。

样品：该条件是每种激酶使用示踪剂 + 待测化合物。

4.B. 建议条件

建议使用以下对照组或条件：

供体本底对照组：本对照组仅含检测培养基，用作试剂本底对照组。该对照组与检测试剂结合，以测定供体通道的仪器本底发光信号，用来计算每种激酶的供体信背比（S/B）。我们建议每次实验在相对独立的孔中进行该对照组的技术重复（两次重复），以最大程度地减少附近孔 NanoLuc® 信号的孔间渗透。在转染对照孔板和 NanoBRET 检测孔板均应使用该对照组。

转染对照组：该对照组用于确认实验前全激酶试板转染是否成功，如果转染过程中出现错误，也可以节省时间和成本。NanoBRET™ TE Selectivity DNA Controls（目录号：NP1000）包含我们建议用作转染对照组的载体，标记为 NanoLuc®-HIPK2 融合载体。

我们建议另外准备一个孔板，该孔板含有转染对照组和供体本底对照组，按照全激酶 DNA 试板相同的方法处理该孔板。至少转染两个孔作为转染对照，相互隔离的孔中至少有两个孔加入供体本底对照组，以最大程度地减少转染对照孔中 NanoLuc® 信号发生孔间渗透，否则可能影响信背比的计算。转染对照孔板无需加入 K-10 示踪剂。

注意：制备要使用的转染对照载体，具体参见第 4.D 节。转染对照实验的示例板图，见第 4.E 节图 4。

4.B. 建议条件（接上页）

表 1. 对照条件汇总表

对照组名称	内容物	目的
BRET _{Min} 对照组	用 NanoLuc [®] 对照载体转染的细胞。无需加入示踪剂和待测化合物。	计算最小 BRET 或 100% 部分占有率以及测定窗口。
BRET _{Max} 对照组	转染了单独的每个激酶的细胞 + K-10 示踪剂 + 化合物溶剂	计算最大 BRET 或 0% 部分占有率以及测定窗口。
供体本底对照	仅含检测培养基。	测定仪器本底发光信号，并计算供体信背比。
转染对照	用 NanoLuc [®] HIPK2 融合载体转染的细胞。	确定转染成功。 采用另外的孔板进行测定。

4.C. 制备转染即用型 K192 工作 DNA 孔板

将 NanoBRET™ TE K192 Vector Plate A 和 NanoBRET™ TE K192 Vector Plate B 中所含的 DNA 溶液稀释至转染所需的浓度。孔板中 DNA 溶液为激酶 -NanoLuc[®] 融合载体与 Transfection Carrier DNA（目录号：E4882）或适合的调节蛋白表达载体的混合物（例如，CDK 的细胞周期蛋白表达载体）。这些 DNA 混合物以 10X 原液提供。制备经稀释的转染即用型工作 DNA 孔板后，可储存以备以后实验使用，而且可重复使用多次。我们建议使用以下步骤生成转染即用型工作 DNA 原液。

1. 融化 NanoBRET™ TE K192 Vector Plate A 和 NanoBRET™ TE K192 Vector Plate B，在 200×g 下离心 2-3 分钟，去除顶部密封产生的冷凝水。
2. 小心去除密封，防止飞溅和交叉污染。
3. 在试板 A 和 B 的所有孔中加入 250μl 无菌、无核酸酶的 TE 缓冲液。此时，形成了转染即用型工作 DNA 孔板。

注意：

- a. 每次更换分配 TE 缓冲液使用的吸液头，避免交叉污染。
- b. 如果立即使用工作 DNA 孔板进行细胞转染，则参见第 4.D 节。如果您此时不打算进行细胞转染，则按照第 5.B 节所述，使用产品附带的 K192 Adhesive Foil Plate Seals 或自己准备的热封将孔板 A 或 B 紧密地封存。在密封孔板上放置一块干净的 96 孔检测孔板盖，置于 -20℃ 条件下存放。（盖子有助于保持密封膜紧贴，减少蒸发。）
- c. NanoBRET™ TE K192 Kinase Vector Panel 提供了四块 K192 Adhesive Foil Plate Seals。如果需要使用其他密封膜，可从 Corning[®] 购买（目录号：PCR-AS-600, Axygen Aluminum Sealing Film）。

4. 每次使用后，应使用新的孔板封膜重新密封工作 DNA 孔板，并置于 -20℃ 条件下存放。每次必须使用新的封膜，以减少 DNA 溶液交叉污染的机会。干净的 96 孔板盖可重复使用。

注意：对于工作 DNA 溶液，为实现最佳性能，我们建议限制冻融次数为五次或以下。关于孔板管理和再密封条件的全面讨论，请参见第 5.B 节。

4.D. 制备转染用对照载体

NanoLuc[®] 对照载体和转染对照载体等对照载体，以 1mg/ml 纯化形式提供。这些 DNA 溶液必须与 Transfection Carrier DNA 混匀后在使用前稀释至工作浓度（请参见第 4.B 节）。

制备 NanoLuc[®] 对照载体

1. 将 1 份 pNL1.1.CMV [Nluc/CMV] 载体（目录号：N1091；1mg/ml）与 9 份 Transfection Carrier DNA（1mg/ml）混合，制备成 50X DNA 混合物，浓度为 1mg/ml。
2. 以 1:50 加入无核酸酶 TE 缓冲液，稀释 50X DNA 混合物，制备转染即用型工作溶液，浓度为 20μg/ml。

注意：在每次使用之间，第 1 步制备的 50X 浓缩 DNA 混合物和第 2 步制备的转染即用型工作 DNA 溶液储存在 -20℃ 条件下。为实现最佳性能，我们建议限制转染即用型工作 DNA 溶液的冻融次数为五次或更少。

制备转染对照载体

3. 将 1 份 NanoLuc[®]-HIPK2 融合载体（目录号：NV3221；1mg/ml）与 9 份 Transfection Carrier DNA（目录号：E4882；1mg/ml）混合，制备成 50X DNA 混合物，DNA 浓度为 1mg/ml。
4. 以 1:50 加入无核酸酶 TE 缓冲液，稀释 50X 浓缩 DNA 混合物，制备转染即用型工作溶液，DNA 浓度为 20μg/ml。

注意：在每次使用之间，第 3 步制备的 50X 浓缩 DNA 混合物和第 4 步制备的转染即用型工作 DNA 溶液储存在 -20℃ 条件下。为实现最佳性能，我们建议限制转染即用型工作 DNA 溶液的冻融循环次数为五次或更少。

4.E. 转染工作流程（第 1 天）

以下描述的转染工作流程可以直接在白色 96 孔检测孔板的孔中制备转染复合物。为了适当安排转染步骤的时间，我们建议最初由一名科学家制备转染复合物，而另一名科学家同时制备 HEK293 细胞。一旦熟悉了工作流程，一位科学家就可以在形成转染复合物时进行细胞制备。

转染前一天进行 HEK293 细胞传代，使转染当日细胞达到 75-95% 融合度。

或者，您可以使用 TransfectNow™ HEK293 细胞（目录号：NC1001、NC1002），这样可以简化工作流程，无需按常规培养、扩增和收获 HEK293 细胞。如要使用 TransfectNow™ HEK293 细胞，如《TransfectNow™ HEK293 细胞说明书》#TM690 所述，仅需融化细胞并在检测培养基中重悬即可。你可以跳过下文的 科学家 #1，直接进入科学家 #2 第 4 步的操作步骤。

4.E. 转染工作流程（接上页）

科学家 #1：制备 HEK293 细胞

1. 细胞用胰酶消化，用细胞培养基使胰蛋白酶失活。
2. 在 200×g 下细胞离心 3-5 分钟，使细胞沉淀聚集，然后抽吸弃去上清液。
3. 在检测培养基（99% Opti-MEM™+1% FBS）中重悬细胞，密度为 2.5×10^5 个细胞 /ml。

科学家 #2：制备转染复合物

4. 使用第 4.C 节和第 4.D 节制备的 K192、NanoLuc® 对照载体和转染对照载体的转染即用型工作 DNA 原液，如下所述：
注意：如果转染即用型 DNA 原液为冷冻状态，我们建议在 37°C 条件下快速融化 DNA。置于定轨振荡器上轻柔混匀，然后短暂离心孔板，确保溶液位于容器底部。每个检测孔会需要 10μl 转染即用型工作 DNA 溶液。
5. 通过确定每种激酶所需的数据点数来估算需要的转染复合物体积，包括需要的技术重复次数以及第 4.A 节和第 4.B 节中要求和条件的条件。例如，测定单次技术重复（singlicate）下一化合物的单一剂量，需要在一个孔中加入 BRET_{Max} 对照品，一个孔中加入待测化合物样品，每种激酶共使用 2 个孔。该试验还需要在至少两个孔中加入 BRET_{Min} 对照组（NanoLuc® 对照载体），并在另外的孔板上用两孔建立推荐的转染对照组。关于该类实验的孔板布局图示例，请参见第 4.I 节。要谨记 NanoBRET 孔板和转染对照孔板都要至少包括 2 个供体本底对照孔。
6. 取每种转染即用型工作 DNA 溶液 10μl，转移至要求的检测孔中。

注意：为了最有效地形成复合物，将 DNA 溶液添加至每个检测孔的角落（而不是中间位置）。

可选：如要进行转染对照实验（第 4.F 节），我们建议要对转染对照组和供体本底对照组进行最少两次的技术重复。应在检测孔板隔离出一些孔来设置对照组，防止发生信号渗透，否则会影响信背比的计算。转染对照组的孔板布局示例见图 4。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空
B	空	转染对照	空	空	供体本底对照	空	空	空	空	空	空	空
C	空	转染对照	空	空	供体本底对照	空	空	空	空	空	空	空
D	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空
E	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空
F	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空
G	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空
H	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空

图 4. 转染对照实验孔板布局示例

7. 制备 20 μ l/ml FuGENE[®] HD 溶液，方法是：在无菌锥形管中加入室温 Opti-MEM[™] 培养基，将 FuGENE[®] HD 稀释至 20 μ l/ml 终浓度。直接用移液管将 FuGENE[®] HD 试剂移入培养液中，注意不要使试剂直接接触塑料锥形管的表面。
注意：对于每个分析孔，均制备 30 μ l FuGENE[®] HD 稀释溶液。例如，如果要在单一剂量下以单次技术重复的方式测试一种化合物，需要为 192 种激酶的每种激酶准备 2 个孔，BRET_{Min} 对照品准备 2 个孔，FuGENE[®] HD 溶液共需要 11.58ml。如果还准备转染对照组（两次技术重复），FuGENE[®] HD 溶液共需要 11.64ml。我们建议制备 12ml FuGENE[®] HD 溶液，确保足够使用。
8. 在每个含 10 μ l 转染即用型 DNA 的检测孔中加入 30 μ l 20 μ l/ml FuGENE[®] HD 稀释溶液。
注意：将 FuGENE[®] HD 溶液添加到检测孔中之前添加 DNA 溶液的一侧，以实现最有效的复合物形成。避免移液头尖端与 DNA 溶液直接接触，以防止交叉污染。
9. 置于定轨振荡器，在 500-600rpm 下混合 15 秒。
10. 在室温下孵育 30 分钟，形成复合物。
11. 在上述每个含有转染复合物的孔中加入 60 μ l 细胞悬浮液（以检测培养基制备，密度为 2.5×10^5 个细胞 /ml，按第 3 步所述制备）。
12. 在 5% CO₂ 培养箱中，在 37 $^{\circ}$ C 温度下孵育过夜。至少转染 16 个小时；理想时间为 20-24 个小时。

4.F. 转染对照实验（第 2 天）

1. 从培养箱中取出转染对照孔板，平衡至室温 15 分钟。
2. 制备 3X Complete Substrate plus Inhibitor Solution。该溶液由无血清无酚红的 Opti-MEM[™] 培养液按 1:166 稀释 NanoBRET[™] Nano-Glo[®] Substrate 并同时按 1:500 稀释 Extracellular NanoLuc[®] Inhibitor 而制成的。上下轻微颠倒锥形管 5-10 次，混匀。例如，对于图 4 中描述的转染对照实验，将 0.5 μ l 的 Extracellular NanoLuc[®] Inhibitor 和 1.5 μ l 的 NanoBRET[™] Nano-Glo[®] Substrate 添加到 250 μ l Opti-MEM[™] 培养基中即可制成所需的 3X Complete Substrate plus Inhibitor Solution。
注意：应在完成制备 1.5 个小时内使用 3X Complete Substrate plus Inhibitor Solution。
3. 在含转染对照品或供体本底对照品的孔中，每孔加入 50 μ l 3X Complete Substrate plus Inhibitor Solution。置于室温下孵育 2-3 分钟。
注意：如果未如图 4 中所述提前配制好供体本底对照品，则在孔板中含转染对照品的孔对侧，每孔加入 100 μ l 检测培养基和 50 μ l 3X Complete Substrate plus Inhibitor Solution。
4. 使用兼容 BRET 的发光检测仪测量转染对照和供体本底对照的供体发射光（例如 450nm）。

5. 运用下述方程式，计算供体通道的信背比（S/B）：

$$S/B \text{ 比} = X/Y$$

式中，X= 转染对照孔的供体信号均值，Y= 本底对照孔的供体信号均值。

注意：信背比应 >1000，以支持继续进行更大规模的检测分析。S/B 比的理想范围为 10000-100000。

4.G. NanoBRET™ Target Engagement K192 Assay 操作方案（第 2 天）

NanoBRET™ Target Engagement K192 Kinase Selectivity System 使用单一示踪剂 NanoBRET™ Tracer K-10。每种激酶使用的 K-10 示踪剂的浓度已经过优化，分成了 4 个组别（25nM、100nM、250nM 和 1μM）。每种激酶使用的示踪剂浓度组别，可从 K192 孔板布局图文件中获得，文件获取网址 www.promega.com/K192-Downloads

稀释 NanoBRET™ Tracer K-10 Reagent，加入细胞中

1. 基于孔板布局，计算每个示踪剂浓度组别需要的数据点数，包括按第 4.D 节所述执行的对照组。例如，以单次技术重复测试 1 种化合物，需要每种激酶两个孔进行分析。该实验的计算示例见表 2。
2. 使用 DMSO 制备 100X NanoBRET™ Tracer K-10 溶液。1 份 100X 溶液中加入 4 份 Tracer Dilution Buffer 进行稀释，制备 Complete 20X NanoBRET™ Tracer K-10 Reagent。

注意：要制备 Complete 20X NanoBRET™ Tracer Reagent，我们建议首先在锥形管中加入示踪剂浓缩原液和 DMSO，然后加入 Tracer Dilution Buffer。混匀，将 Complete 20X NanoBRET™ Tracer Reagent 转至聚丙烯（非聚苯乙烯）加样槽中进行分配。制备 Complete 20X NanoBRET™ Tracer K-10 Reagents 的计算示例，见表 2。

表 2. 所需 Complete 20X NanoBRET™ Tracer Reagents 体积的计算示例。每个浓度组别对应的实验中，一种化合物将以单次技术重复的方式进行测试。

示踪剂组别	激酶计数	每种激酶的数据点	数据点总数	400μM K-10 原液稀释	400μM K-10 原液 (μl)	DMSO (μl)	Tracer Dilution Buffer (μl)	总体积 (μl)
25nM	16	2	32	1:160	0.2	31.8	128	160
100nM	40	2	80	1:40	2	78	320	400
250nM	24	2	48	1:16	3	45	192	240
1μM	112	2	224	1:4	56	168	896	1,120

注意：表 2 中的计算仅为举例。我们建议为每种 Complete 20X NanoBRET Tracer 至少额外制备 500μl，以弥补分液过程中发生的损失，或者如果需要的示踪剂原液体积太小（例如，25nM 组别），无法精确移液，则调整制备方案。

3. 根据孔板布局，在每孔已转染细胞中加入 5 μ l Complete 20X NanoBRET™ Tracer Reagent（直接加入液体中）。

注意：无需在 BRET_{Min} 对照（NanoLuc® 对照品）孔中加入示踪剂。

4. 置于定轨振荡器，在 900rpm 下混合 15 秒。

注意：不同定轨振荡器的混合速度不同，应通过目视检查优化每个装置，确保示踪剂完全分散。

在培养基中制备 10X 待测化合物或 10X BRET_{Max} 对照品

5. 将 1000X 待测化合物加入 Opti-MEM™ 培养基中，稀释至 10X。例如，在单次技术重复测试中，每种 10X 待测化合物至少制备 1920 μ l，还应准备多余量用于弥补移液过程的损失。

6. 对于 BRET_{Max} 对照品，用 99 份 Opti-MEM™ 培养基稀释 1 份 DMSO（或其他待测化合物溶剂）。例如，在单次技术重复测试 1 种化合物时，该溶液至少制备 1920 μ l，还应准备多余量用于弥补移液过程的损失。

7. 根据要求的孔板布局，每孔中加入 10 μ l 10X 待测化合物或 10 μ l 化合物溶剂溶液（BRET_{Max} 对照品）。

注意：无需向 BRET_{Min} 对照孔中加入待测化合物或待测化合物溶剂溶液。

8. 置于定轨振荡器，在 900rpm 下混合 15 秒。

9. 使用 5% CO₂ 培养箱，在 37℃ 温度下孵育孔板 2 个小时。

BRET 检测

10. 孵育 2 个小时后，将样品所在的平板放在室温下大约 15 分钟，以使其自然冷却。

11. BRET 检测前，制备 3X Complete Substrate plus Inhibitor Solution，该溶液是由无血清无酚红的 Opti-MEM™ 培养液按 1:166 稀释 NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate 并同时按 1:500 稀释 Extracellular NanoLuc® Inhibitor 而制成的，随用随配置。上下轻微颠倒锥形管 5-10 次，混匀。例如，在单次技术重复测试 1 种化合物时，如果使用必须条件（第 4.A 节），则共需 386 个孔，如果还加入推荐的供体本底对照品（两次技术重复）（第 4.B 节），则共需 388 个孔。为方便操作，制备至少 20ml 3X Complete Substrate plus Inhibitor Solution，方法是：将 40 μ l Extracellular NanoLuc® Inhibitor 和 120 μ l NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate 加入 20ml Opti-MEM™ 培养基中并混匀。

注意：应在完成制备 1.5 个小时内使用 3X Complete Substrate plus Inhibitor Solution。

12. 每孔加入 50 μ l 3X Complete Substrate plus Inhibitor Solution，在室温下孵育 2-3 分钟。

13. 使用 GloMax® Discover System 或其他与 NanoBRET™ Assay 兼容的发光检测仪测量供体发射波长（例如 450nm）和受体发射波长（例如 610nm）。

4.H. 进行数据质量分析，计算部分占有率

供体信号与供体信背比（供体 S/B）

检查整个 192 个激酶集合的供体发射信号（例如，450nm），并确定累积表达是否充足。

1. 计算整个 192 个激酶集合的平均供体信号。计算供体本底对照孔的供体信号均值。
2. 通过将整个 192 个激酶集合的平均供体信号除以供体本底对照孔的平均供体信号，计算整个 192 个激酶集合的供体信噪比 (S/B) 均值。

注意：全部 192 种激酶集合的供体 S/B 理想值为 10000-100000。如果全部 192 种激酶集合的供体 S/B<1000，考虑重复进行实验。

检查每个单独激酶的供体发射信号（例如，450nm），并如步骤 3 和 4 所述确定每个孔中的表达是否足够。

3. 计算每种激酶的供体信号均值，或者所有含某一单独激酶的孔内的供体信号均值。
4. 计算每种激酶的供体 S/B，方法是每种激酶的供体信号均值除以供体本底对照孔的供体信号均值。

注意：大多数激酶的供体 S/B 理想值为 10000-100000。考虑排除供体 S/B 小于 1000 的激酶。有一些激酶的常规表达水平较低，因此更多情况下显示的供体信背比小于 1,000。包括 MET、MAP3K19、HIPK3 等激酶，而在一定程度上还包括 CDKL3、CDKL5、HIPK2、MAST4、NEK2、PLK2、PLK4、TLK2 和 TXK。对于这些激酶，供体 S/B 值小于 100 是更合适的排除标准。

BRET 信号与测定窗口

6. 计算所有孔的原始 BRET 数值，方法是受体发射信号（例如 610nm）除以供体发射信号（例如 450nm）。
7. 分别计算 BRET_{Max} 对照组（示踪剂 + 溶剂）、BRET_{Min} 对照组（NanoLuc[®] 对照品）和样品（示踪剂 + 化合物）的 BRET 均值。对于 BRET_{Min} 对照组的均值，逐板计算，或者计算整个实验的数值，具体取决于选择的孔板模式。

8. 计算每种激酶检测的测定窗口，方法是每种激酶的 $BRET_{Max}$ 对照组 $BRET$ 均值除以 $BRET_{Min}$ 对照组的 $BRET$ 均值。

注意：当 Promega 科学家使用 GloMax® Discover System 实施时，192 种激酶中大多数激酶的测定窗口一般大于 2。关于每种激酶的测定窗口数据示例，请参见第 5.A 节。

在正常执行的情况下，有些激酶的测定窗口有时可能在 1.7-2 范围内。根据我们的经验，当 10 种以上激酶的测定窗口 <2 时，则实验不正常，提示整个实验过程中数据质量可能不可靠。这些范围可以用作每个实验质量控制的起点，但可能需要根据使用您的设备和实验设置获得的正常值进行修订，这可能会因使用的 HEK293 细胞或微孔板检测仪而异。

部分占有率

运用下述公式，计算待测药物对每种激酶的部分占有率：

$$\text{占有率 (\%)} = \left[1 - \frac{(\text{样品} - BRET_{Min})}{(BRET_{Max} - BRET_{Min})} \right] \times 100$$

式中：

样品 = 一个单独激酶的所有样品孔（示踪剂 + 化合物）的平均 $BRET$ 值。

$BRET_{Max}$ = 一个单独激酶的所有 $BRET_{Max}$ 对照孔（示踪剂 + 溶剂）中的 $BRET$ 均值。

$BRET_{Min}$ = NanoLuc® 对照孔的 $BRET$ 均值（逐板计算或整个实验计算）。

4.1. 192 种激酶的部分占有率检测所用孔板的布局示例和操作方案

在第 4 节中描述的选择性分析实验可以通过多种方式进行设置。本节详细介绍了可用于评估试剂盒提供的所有 192 个激酶在单次技术重复下的单个测试化合物的部分占有率的一种具体板布局模式。采用第 4.E 节中描述的转染操作方案，可以使用 6×96 孔板完成整个实验（ $BRET$ 检测使用 5 个孔板，转染对照品使用 1 个孔板）。

转染和对照组的孔板布局

工作 DNA 孔板中每列激酶根据图 5 孔板布局图进行转染（两个平行孔）。孔板第 1 列和第 12 列仅含检测培养基，最大程度地减少潜在边缘效应。 $BRET_{Max}$ 对照品和样品被安排在相邻列。 $BRET_{Min}$ 对照品和供体本底对照品被安排在第 5 个孔板中相互隔离的孔中。最后，实验中还包括了一个转染对照板。

4.I. 192 种激酶的部分占有率检测所用孔板的布局示例和操作方案（续）

示踪剂浓度

为提高移液效率，使用相似示踪剂浓度的激酶在平板上被分组在一起。用于分析的 NanoBRET™ Tracer K-10 浓度在孔板中的分布，见图 6。

第 1 天：转染

按第 4.C 节的描述，制备 192 种激酶试板所需的工作 DNA 孔板。按第 4.D 节所述，制备对照载体。根据图 5 的孔板布局图，使用第 4.E 节描述的转染操作方案，转染 HEK293 细胞。请务必记住加入第 4.A-B 节中描述的全部对照品，包括转染对照孔板。

1. 对于每个分析孔，取 10μl 转染即用型工作 DNA 溶液，转移至该孔的底部角落。
2. 在 Opti-MEM™ 培养基中制备 20μl/ml FuGENE® HD 溶液。每个分析孔加入 30μl FuGENE® HD 溶液，转移至孔内 DNA 溶液的同一侧。为最大程度减少交叉污染，避免直接触碰 DNA 溶液。
3. 混匀孔板并孵育 30 分钟，使转染复合物形成。
4. 同时，在检测培养基（99% Opti-MEM+1% FBS）中制备 HEK293 细胞悬浮液，密度为 2.5×10^5 个细胞/ml。或者，如果使用 TransfectNow™ HEK293 细胞，按照其说明书 #TM690 的指导融化和重悬细胞。
5. 30 分钟的孵育结束后，将 60μl 细胞悬浮液转移至每个孔中。
6. 在 5% CO₂ 培养箱中，在 37°C 温度下孵育过夜。

板 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	检测培养基	LRRK2	LRRK2	AURKA	AURKA	AXL	AXL	CLK1	CLK1	BRSK1	BRSK1	检测培养基
B	检测培养基	MAPK6	MAPK6	AURKC	AURKC	FGFR3	FGFR3	SBK3	SBK3	MAP3K10	MAP3K10	检测培养基
C	检测培养基	IRAK3	IRAK3	AURKB	AURKB	FLT3	FLT3	NEK9	NEK9	MAP3K9	MAP3K9	检测培养基
D	检测培养基	TEK	TEK	NUAK1	NUAK1	IGF1R	IGF1R	NEK3	NEK3	MYLK3	MYLK3	检测培养基
E	检测培养基	TNK1	TNK1	LATS2	LATS2	INSR	INSR	NIM1K	NIM1K	PHKG1	PHKG1	检测培养基
F	检测培养基	GAK	GAK	RPS6KA3	RPS6KA3	LIMK2	LIMK2	STK36	STK36	STK33	STK33	检测培养基
G	检测培养基	MAPK4	MAPK4	SNF1LK2	SNF1LK2	TEC	TEC	ULK2	ULK2	STK4	STK4	检测培养基
H	检测培养基	AAK1	AAK1	MYLK2	MYLK2	TIE1	TIE1	ULK3	ULK3	TLK1	TLK1	检测培养基

板 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	检测培养基	FGFR1	FGFR1	BRAF(V600E)	BRAF(V600E)	BMP2K	BMP2K	MARK4	MARK4	CLK4	CLK4	检测培养基
B	检测培养基	FGFR2	FGFR2	IRAK4	IRAK4	NEK5	NEK5	PRKAA1	PRKAA1	MAPK8	MAPK8	检测培养基
C	检测培养基	MUSK	MUSK	ITK	ITK	STK16	STK16	PRKAA2	PRKAA2	MAPK9	MAPK9	检测培养基
D	检测培养基	NTRK1	NTRK1	JAK2 (V617F)	JAK2 (V617F)	TBK1	TBK1	RPS6KA1	RPS6KA1	IKBKE	IKBKE	检测培养基
E	检测培养基	RET	RET	MAP3K11	MAP3K11	ULK1	ULK1	RPS6KA2	RPS6KA2	LATS1	LATS1	检测培养基
F	检测培养基	NTRK2	NTRK2	PTK2	PTK2	MAP4K2	MAP4K2	RPS6KA4	RPS6KA4	PRKX	PRKX	检测培养基
G	检测培养基	TNK2(Iso1)	TNK2(Iso1)	PTK6	PTK6	WEE1	WEE1	RPS6KA6	RPS6KA6	CSNK2A2	CSNK2A2	检测培养基
H	检测培养基	LTK	LTK	PTK2B	PTK2B	MYLK4	MYLK4	SIK1	SIK1	HIPK4	HIPK4	检测培养基

板 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	检测培养基	STK10	STK10	LIMK1	LIMK1	ABL2	ABL2	CLK2	CLK2	CDK1	CDK1	检测培养基
B	检测培养基	FGFR4	FGFR4	EPHA1	EPHA1	BMX	BMX	DYRK1A	DYRK1A	CDK2	CDK2	检测培养基
C	检测培养基	MAP4K1	MAP4K1	EPHA4	EPHA4	BTK	BTK	DYRK1B	DYRK1B	CDK3	CDK3	检测培养基
D	检测培养基	MERTK	MERTK	EPHA6	EPHA6	FER	FER	ERN1	ERN1	CDK4	CDK4	检测培养基
E	检测培养基	MET	MET	EPHA7	EPHA7	FES	FES	ERN2	ERN2	CDK5	CDK5	检测培养基
F	检测培养基	RON	RON	EPHB1	EPHB1	JAK3	JAK3	HIPK2	HIPK2	CDK6	CDK6	检测培养基
G	检测培养基	TYRO3	TYRO3	EPHB4	EPHB4	SRMS	SRMS	HIPK3	HIPK3	CDK7	CDK7	检测培养基
H	检测培养基	LCK	LCK	FYN	FYN	TXK	TXK	ICK	ICK	CDK9	CDK9	检测培养基

板 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	检测培养基	CDK10	CDK10	CDKL1	CDKL1	NEK11	NEK11	DAPK2	DAPK2	BRSK2	BRSK2	检测培养基
B	检测培养基	CDK14	CDK14	CSNK2A1	CSNK2A1	NEK1	NEK1	MAP3K2	MAP3K2	MARK2	MARK2	检测培养基
C	检测培养基	CDK15	CDK15	CDKL3	CDKL3	NEK2	NEK2	PLK2	PLK2	MELK	MELK	检测培养基
D	检测培养基	CDK16	CDK16	CDKL5	CDKL5	NEK4	NEK4	PLK3	PLK3	CSNK1A1L	CSNK1A1L	检测培养基
E	检测培养基	CDK17	CDK17	JNK3	JNK3	PAK4	PAK4	PAK4	PAK4	CSNK1D	CSNK1D	检测培养基
F	检测培养基	CDK18	CDK18	MAPK11	MAPK11	MAP4K3	MAP4K3	STK35	STK35	CSNK1G2	CSNK1G2	检测培养基
G	检测培养基	CDKL2	CDKL2	MAPK14	MAPK14	STK11	STK11	STK17B	STK17B	SIK3 FL	SIK3 FL	检测培养基
H	检测培养基	CDK20	CDK20	NLK	NLK	SLK	SLK	TLK2	TLK2	SNRK	SNRK	检测培养基

板 5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	检测培养基	CAMK1	CAMK1	RIOK2	RIOK2	PAK6	PAK6	RIPK1	RIPK1	检测培养基	检测培养基	检测培养基
B	检测培养基	CAMK2A	CAMK2A	MAP4K5	MAP4K5	AKT2	AKT2	RIPK2	RIPK2	检测培养基	供体本底对照	检测培养基
C	检测培养基	CAMK2D	CAMK2D	MAST3	MAST3	PKMYT1	PKMYT1	TNNI3K	TNNI3K	检测培养基	供体本底对照	检测培养基
D	检测培养基	CHEK2	CHEK2	MAST4	MAST4	PRKACA	PRKACA	MLTK	MLTK	检测培养基	检测培养基	检测培养基
E	检测培养基	DCLK3	DCLK3	STK32B	STK32B	PRKACB	PRKACB	MAP3K12	MAP3K12	检测培养基	检测培养基	检测培养基
F	检测培养基	MKNK2	MKNK2	STK3	STK3	PRKCE	PRKCE	MAP3K19	MAP3K19	检测培养基	BRET _{Min} 对照	检测培养基
G	检测培养基	PHKG2	PHKG2	STK38	STK38	SGK1	SGK1	MAP3K21	MAP3K21	检测培养基	BRET _{Min} 对照	检测培养基
H	检测培养基	MAP3K3	MAP3K3	STK38L	STK38L	WEE2	WEE2	MAP3K4	MAP3K4	检测培养基	检测培养基	检测培养基

转染对照板

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空
B	空	转染对照	空	空	供体本底对照	空	空	空	空	空	空	空
C	空	转染对照	空	空	供体本底对照	空	空	空	空	空	空	空
D	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空
E	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空
F	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空
G	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空
H	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空

BRET _{Max} 对照 (示踪剂 + 溶剂)	BRET _{Min} 对照 (NanoLuc [®] 对照品)	“样品” (示踪剂 + 化合物)	供体本底对照	转染对照	检测培养基
--------------------------------------	--	---------------------	--------	------	-------

图 5. 激酶位置与药物处理条件。K192 载体转染所用的孔板布局图示例，以及单次技术重复下 192 种激酶的部分占有率检测对照组条件。

板 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	无示踪剂	LRRK2	LRRK2	AURKA	AURKA	AXL	AXL	CLK1	CLK1	BRSK1	BRSK1	无示踪剂
B	无示踪剂	MAPK6	MAPK6	AURKC	AURKC	FGFR3	FGFR3	SBK3	SBK3	MAP3K10	MAP3K10	无示踪剂
C	无示踪剂	IRAK3	IRAK3	AURKB	AURKB	FLT3	FLT3	NEK9	NEK9	MAP3K9	MAP3K9	无示踪剂
D	无示踪剂	TEK	TEK	NUAK1	NUAK1	IGF1R	IGF1R	NEK3	NEK3	MYLK3	MYLK3	无示踪剂
E	无示踪剂	TNK1	TNK1	LATS2	LATS2	INSR	INSR	NIM1K	NIM1K	PHKG1	PHKG1	无示踪剂
F	无示踪剂	GAK	GAK	RPS6KA3	RPS6KA3	LIMK2	LIMK2	STK36	STK36	STK33	STK33	无示踪剂
G	无示踪剂	MAPK4	MAPK4	SNF1LK2	SNF1LK2	TEC	TEC	ULK2	ULK2	STK4	STK4	无示踪剂
H	无示踪剂	AAK1	AAK1	MYLK2	MYLK2	TIE1	TIE1	ULK3	ULK3	TLK1	TLK1	无示踪剂

板 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	无示踪剂	FGFR1	FGFR1	BRAF(V600E)	BRAF(V600E)	BMP2K	BMP2K	MARK4	MARK4	CLK4	CLK4	无示踪剂
B	无示踪剂	FGFR2	FGFR2	IRAK4	IRAK4	NEK5	NEK5	PRKAA1	PRKAA1	MAPK8	MAPK8	无示踪剂
C	无示踪剂	MUSK	MUSK	ITK	ITK	STK16	STK16	PRKAA2	PRKAA2	MAPK9	MAPK9	无示踪剂
D	无示踪剂	NTRK1	NTRK1	JAK2 (V617F)	JAK2 (V617F)	TBK1	TBK1	RPS6KA1	RPS6KA1	IKBKE	IKBKE	无示踪剂
E	无示踪剂	RET	RET	MAP3K11	MAP3K11	ULK1	ULK1	RPS6KA2	RPS6KA2	LATS1	LATS1	无示踪剂
F	无示踪剂	NTRK2	NTRK2	PTK2	PTK2	MAP4K2	MAP4K2	RPS6KA4	RPS6KA4	PRKX	PRKX	无示踪剂
G	无示踪剂	TNK2(Iso1)	TNK2(Iso1)	PTK6	PTK6	WEE1	WEE1	RPS6KA6	RPS6KA6	CSNK2A2	CSNK2A2	无示踪剂
H	无示踪剂	LTK	LTK	PTK2B	PTK2B	MYLK4	MYLK4	SIK1	SIK1	HIPK4	HIPK4	无示踪剂

板 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	无示踪剂	STK10	STK10	LIMK1	LIMK1	ABL2	ABL2	CLK2	CLK2	CDK1	CDK1	无示踪剂
B	无示踪剂	FGFR4	FGFR4	EPHA1	EPHA1	BMX	BMX	DYRK1A	DYRK1A	CDK2	CDK2	无示踪剂
C	无示踪剂	MAP4K1	MAP4K1	EPHA4	EPHA4	BTK	BTK	DYRK1B	DYRK1B	CDK3	CDK3	无示踪剂
D	无示踪剂	MERTK	MERTK	EPHA6	EPHA6	FER	FER	ERN1	ERN1	CDK4	CDK4	无示踪剂
E	无示踪剂	MET	MET	EPHA7	EPHA7	FES	FES	ERN2	ERN2	CDK5	CDK5	无示踪剂
F	无示踪剂	RON	RON	EPHB1	EPHB1	JAK3	JAK3	HIPK2	HIPK2	CDK6	CDK6	无示踪剂
G	无示踪剂	TYRO3	TYRO3	EPHB4	EPHB4	SRMS	SRMS	HIPK3	HIPK3	CDK7	CDK7	无示踪剂
H	无示踪剂	LCK	LCK	FYN	FYN	TXK	TXK	ICK	ICK	CDK9	CDK9	无示踪剂

板 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	无示踪剂	CDK10	CDK10	CDKL1	CDKL1	NEK11	NEK11	DAPK2	DAPK2	BRSK2	BRSK2	无示踪剂
B	无示踪剂	CDK14	CDK14	CSNK2A1	CSNK2A1	NEK1	NEK1	MAP3K2	MAP3K2	MARK2	MARK2	无示踪剂
C	无示踪剂	CDK15	CDK15	CDKL3	CDKL3	NEK2	NEK2	PLK2	PLK2	MELK	MELK	无示踪剂
D	无示踪剂	CDK16	CDK16	CDKL5	CDKL5	NEK4	NEK4	PLK3	PLK3	CSNK1A1L	CSNK1A1L	无示踪剂
E	无示踪剂	CDK17	CDK17	JNK3	JNK3	PAK4	PAK4	PLK4	PLK4	CSNK1D	CSNK1D	无示踪剂
F	无示踪剂	CDK18	CDK18	MAPK11	MAPK11	MAP4K3	MAP4K3	STK35	STK35	CSNK1G2	CSNK1G2	无示踪剂
G	无示踪剂	CDKL2	CDKL2	MAPK14	MAPK14	STK11	STK11	STK17B	STK17B	SIK3 FL	SIK3 FL	无示踪剂
H	无示踪剂	CDK20	CDK20	NLK	NLK	SLK	SLK	TLK2	TLK2	SNRK	SNRK	无示踪剂

板 5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	无示踪剂	CAMK1	CAMK1	RIOK2	RIOK2	PAK6	PAK6	RIPK1	RIPK1	无示踪剂	无示踪剂	无示踪剂
B	无示踪剂	CAMK2A	CAMK2A	MAP4K5	MAP4K5	AKT2	AKT2	RIPK2	RIPK2	无示踪剂	供体本底对照	无示踪剂
C	无示踪剂	CAMK2D	CAMK2D	MAST3	MAST3	PKMYT1	PKMYT1	TNNI3K	TNNI3K	无示踪剂	供体本底对照	无示踪剂
D	无示踪剂	CHEK2	CHEK2	MAST4	MAST4	PRKACA	PRKACA	MLTK	MLTK	无示踪剂	无示踪剂	无示踪剂
E	无示踪剂	DCLK3	DCLK3	STK32B	STK32B	PRKACB	PRKACB	MAP3K12	MAP3K12	无示踪剂	无示踪剂	无示踪剂
F	无示踪剂	MKNK2	MKNK2	STK3	STK3	PRKCE	PRKCE	MAP3K19	MAP3K19	无示踪剂	BRET _{Min} 对照	无示踪剂
G	无示踪剂	PHKG2	PHKG2	STK38	STK38	SGK1	SGK1	MAP3K21	MAP3K21	无示踪剂	BRET _{Min} 对照	无示踪剂
H	无示踪剂	MAP3K3	MAP3K3	STK38L	STK38L	WEE2	WEE2	MAP3K4	MAP3K4	无示踪剂	无示踪剂	无示踪剂

转染对照板

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空
B	空	转染对照	空	空	供体本底对照	空	空	空	空	空	空	空
C	空	转染对照	空	空	供体本底对照	空	空	空	空	空	空	空
D	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空
E	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空
F	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空
G	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空
H	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空	空

每个浓度的示踪剂	25nM	250nM	100nM	1000nM	无示踪剂
----------	------	-------	-------	--------	------

图 6. 单次技术重复下用于 192 激酶部分占有率分析的示踪剂 K-10 浓度位置分布。转染对照孔板或 BRET_{Min} 和供体本底对照孔中均不需要添加示踪剂。

第 2 天：转染对照、BRET 测定和数据分析

7. 通过读取转染对照孔板的供体信号并根据第 4.H 节计算转染对照孔板的供体 S/B 均值来检测转染成功。如果供体 S/B 均值 ≥ 1000 ，则继续进行剩余实验部分。如果供体 S/B 均值 < 1000 ，考虑重复转染。
8. 按照第 4.G 节的描述制备 Complete 20X NanoBRET™ Tracer K-10 Reagent，按照图 6 所示的孔板布局图在细胞中加入 5 μ l 试剂。置于定轨振荡器，在 900rpm 下混合 15 秒。

注意：BRET_{Min} 或供体本底对照孔中无需加入示踪剂。

9. 按照第 4.G 节的描述制备 10X 待测化合物和 10X 溶剂溶液，按照图 5 所示的孔板布局图在细胞中加入 10 μ l 试剂。置于定轨振荡器，在 900rpm 下混合 15 秒。

注意：BRET_{Min} 或供体本底对照孔中无需加入待测化合物或待测化合物溶剂溶液。

10. 在 5% CO₂ 培养箱中，在 37°C 温度下，孔板孵育 2 个小时。孵育后，将孔板重新在室温平衡 15 分钟。
11. 如第 4.G 节所述，制备 3X Complete Substrate plus Inhibitor Solution，每孔中加入 50 μ l。置于室温下孵育 2-3 分钟。
12. 如第 4.G 节第 13 步所述，测量供体发射信号（例如 450nm）和受体发射信号（如 610nm）。
13. 按照第 4.H 节的描述对表达和测定窗口进行数据质量分析，并确保实验符合建议的接受标准。
14. 如第 4.H 节所述，计算待测化合物在每种激酶上的部分占有率。

5. 附录

5.A. 对照化合物测定窗口和选择性数据示例

NanoBRET™ TE K192 Kinase Selectivity System 提供了细胞内待测化合物对一组具有代表性的蛋白激酶的选择性的独特信息。但由于产生 BRET 的距离和几何构成差异，试板内每种激酶检测可能表现出不同的测定窗口。在本试板 192 次检测中，测定窗口的范围为二至二十五倍，测定窗口中位值为四倍。在许多实验中，我们观察到每种激酶检测的测定窗口一致，一般测定窗口的变异系数（CV）约为 8%。对于某些激酶（尤其是具有较大测定窗口的激酶），不同实验之间的测定窗口可能有很大的差异，但这种差异一般不会影响待测化合物部分占有率的测定。测定窗口示例见 K192 检测性能文件，文件获取网址为 www.promega.com/K192-Downloads

由于细胞内存在无数种不同的因素（例如，细胞内 ATP、蛋白复合物、可变激酶活化状态），与无细胞激酶检测的选择性行为相比，活细胞内待测化合物的选择性行为可能有很大的不同。为确保适当进行 NanoBRET™ TE K192 Kinase Selectivity System，我们建议加入对照化合物。我们已多次测试两种具有独特选择性行为的对照化合物。这两种对照化合物分别是 CC1 泛激酶抑制剂（一种可与选择性试板中每种激酶结合的混杂激酶配体）和克唑替尼（细胞内显示出对一小部分激酶的选择性更高）。每种对照化合物的占有率数据和特定剂量见 K192 检测性能文件：www.promega.com/K192-Downloads

我们建议首先测试这两种对照化合物，并与 K192 检测性能文件中的数据进行比较，以获得总体一致性，建立对实验真实性的置信度：www.promega.com/K192-Downloads。之后，有时可以使用其中一种或两种对照化合物来校准新用户，或在每次分析中作为预期检测行为的常规内部控制。

5.B. 管理试板蒸发和重新密封

NanoBRET™ TE K192 Kinase Selectivity System 以浓缩 DNA 组合的形式提供，与适当的运载体 DNA 预混，以促进转染。NanoBRET™ TE K192 Kinase Vector Plates 经过热封处理，以尽量减少储存和运输过程中的蒸发损失。然而，像这样的塑料储存板是透气的。因此，即使在储存期间，它们也可能随着时间的推移表现出一定程度的液体损失，这可能会从一个孔到另一个孔有所不同。我们发现，按照第 4.C 节的说明，将 TE 缓冲液加入浓缩 DNA 孔板中，可以恢复 DNA 的可转染性。

稀释 DNA 原液，制备工作 DNA 孔板后，这些孔板可以重新密封并保持转染能力至少 6 个月，至少能进行 5 次冻融循环。如果可能，我们建议使用热封重新密封工作 DNA 孔板。我们建议使用 Porvair miniSeal II（Porvair Part# 500090）配合 Porvair Sciences Thermal Sealing Film（Porvair Part# 229571），并在 190℃ 热密封 1.9 秒。对于其他热封膜，可能需要优化密封条件。如果无法使用热封膜重新密封，我们建议至少使用 NanoBRET™ TE K192 Vector Panel 附带的 Adhesive Foil Plate Seals 重新密封孔板。其他密封膜可从 Corning® 购买（即 Axygen Aluminum Sealing Film, Corning®, 目录号：PCR-AS-600）。用指尖用力按压确保每个孔周围密封完整。每次使用新的 Adhesive Foil Plate Seals，以尽量减少 DNA 交叉污染。此外，我们建议使用 Adhesive Foil Plate Seals 手动密封孔板后加盖塑料板盖，实现长期密封的最佳效果。塑料板盖可重复利用。这样将减少长时间储存发生的蒸发损失，并延长工作 DNA 孔板的使用寿命。

在解冻用于后续转染的即用型工作 DNA 孔板时，须进行工作 DNA 孔板离心，以去除顶部密封上形成的冷凝水。然后小心地打开密封，以防止飞溅和 DNA 交叉污染。

5.C. 缓冲液和溶液组成

细胞培养基

90%	DMEM
10%	胎牛血清

检测培养基

99%	Opti-MEM™ I 低血清培养基, 无酚红
1%	胎牛血清

5.D. 常见问题

1. NanoBRET™ Target Engagement K192 Kinase Selectivity System 是否能用于其他细胞类型?

回答: 虽然技术上 NanoBRET™ TE K192 Kinase Selectivity Assays 可以用于 HEK293 细胞以外的细胞类型, 但需要在替代细胞系中重新验证全部激酶检测, 确保每种激酶使用的示踪剂浓度仍是可定量的。而且不能保证在替代细胞背景中每种激酶表现适当。鉴于以上原因, 在另一细胞系中进行检测不可行。

2. 我是否需要注意 NanoBRET™ TE K192 Vector Plates 产生的液体蒸发?

回答: 为了最大限度地减少 NanoBRET™ TE K192 Vector Plates 中 DNA 原液蒸发, 孔板已采用热封, 并加盖塑料盖, 储存在真空密封袋中。然而, 由于塑料固有的透气性, 可能会有轻微蒸发。根据我们的经验, 只要将原始孔板中的 DNA 原液按第 4.C 节用 250μl 分子生物学级 TE 缓冲液稀释, DNA 原液就能正常进行转染。

3. 我可以批量 (in bulk) 制备转染复合物吗?

回答: 可以, 请参见《STAR 方法》第 (6) 条中使用批量转染复合物的应用示例。

5.E. 疑难解答

如果您遇到的问题在此没有列出，请联系普洛麦格（北京）生物技术有限公司或当地经销商。联系信息见：www.promega.com 电子邮箱：chinatechserv@promega.com

问题	原因和参考建议
低表达水平（450nm 处供体信背比均值 <1000）	转染时的细胞状态。确保细胞在转染前一天完成传代，细胞融合度适当（70%-90%）。 DNA 工作溶液制备不精确。确保 DNA 已适当稀释到工作浓度，并妥善储存以减少蒸发。想要了解具体细节，参见第 4 节和第 5 节。 转染复合物制备不精确。在执行完整的 192 激酶分析实验之前，依靠转染对照样品来确保每个实验得到适当的转染水平。当发生异常转染时，这样可以节省试剂。
测定窗口有噪音（BRET S/B），变异系数（CV）>20%。	低表达水平。确保每个激酶的供体（450nm 通道）RLU 大于供体本底对照品 1000 倍以上（关于具体细节，请参见第 4.A 节和第 4.F 节）。 示踪剂分配不一致。确保液体处理机向每个孔精确递送示踪剂。
待测化合物的部分占有率（百分比 %）为负	BRET_{Max} 对照组（100% BRET，或 0% 部分占有率对照组）示踪剂分配不精确。确保液体处理机精确分配 NanoBRET™ Tracer。 待测化合物的自发荧光或光散射特性。光学效应会增加 BRET 值。这通常通过使用不相关的 BRET 对照检测来确定。如果化合物对不相关的 BRET 检测产生相同的效应，这很可能是一种虚假的光学效应。潜在的对照检测见第 5.I 节《相关产品》，包括 HDAC、BET BRD、E3 连接酶 CRBN 和 VHL 的 BRET 检测，或者其他不应与待测化合物结合的靶蛋白的 BRET 检测。

问题	原因和参考建议
待测化合物的部分占有率百分比为负（续）	虽然罕见，但可以观察到对激酶活化状态有全局 / 非特异性的影响。非特异性激酶抑制剂可能间接影响关注的靶蛋白，改变激酶的活化状态。在某些情况下，改变激酶活化状态可能会增加 NanoBRET™ Tracer 的表观亲和力，从而导致 BRET 的非特异性增加。在洋地黄皂苷处理的细胞中进行特定 Nano BRET™ 激酶检测，可以确定 BRET 的增加是否是由于早期研究中描述的非特异性途径的影响导致的（3,5）。
待测化合物的部分占有率（百分比）异常低	待测化合物分配不精确。确保液体处理机精确地分配化合物。
	化合物溶解度差。确保化合物可溶为 10X 溶液。
	无细胞和活细胞靶标结合检测不一致。如果将 NanoBRET™ 与靶标占有率无细胞评估进行比较，应考虑渗透性或 [ATP] 的影响，这可能会干扰靶标的结合。这些变量的综合作用可能改变活细胞与脱细胞系统的占有率结果。可能需要在洋地黄皂苷处理的细胞中进行后续实验，以分析早期研究中描述的 [ATP] 或渗透性的影响（3,5）。
待测化合物的部分占有率（百分比）异常高	待测化合物分配不精确。确保液体处理机精确地分配化合物。
	无细胞和活细胞靶标结合检测不一致。如果将 NanoBRET™ 与靶标占有率无细胞评估进行比较，应考虑靶标活化状态的影响。如果化合物优先与活性或非活性激酶状态结合，则可能对细胞内结合产生不可预测的影响。

5.F. 数据处理和部分占有率计算示例

图 7 中我们给出了使用单剂量待测化合物（帕博西尼）进行 CDK6 检测的原始数据示例，以及用于计算部分占有率的数据处理结果。

5.G. NanoBRET™ Tracers 的消光系数

NanoBRET™ Tracer K-10 使用 NanoBRET™ 590 荧光基团。通过 590nm 波长处的消光系数（83000 M⁻¹ cm⁻¹）确定 Tracer K-10 的浓度。如需获取详细信息，请参见参考文献中表 10.1（7）。

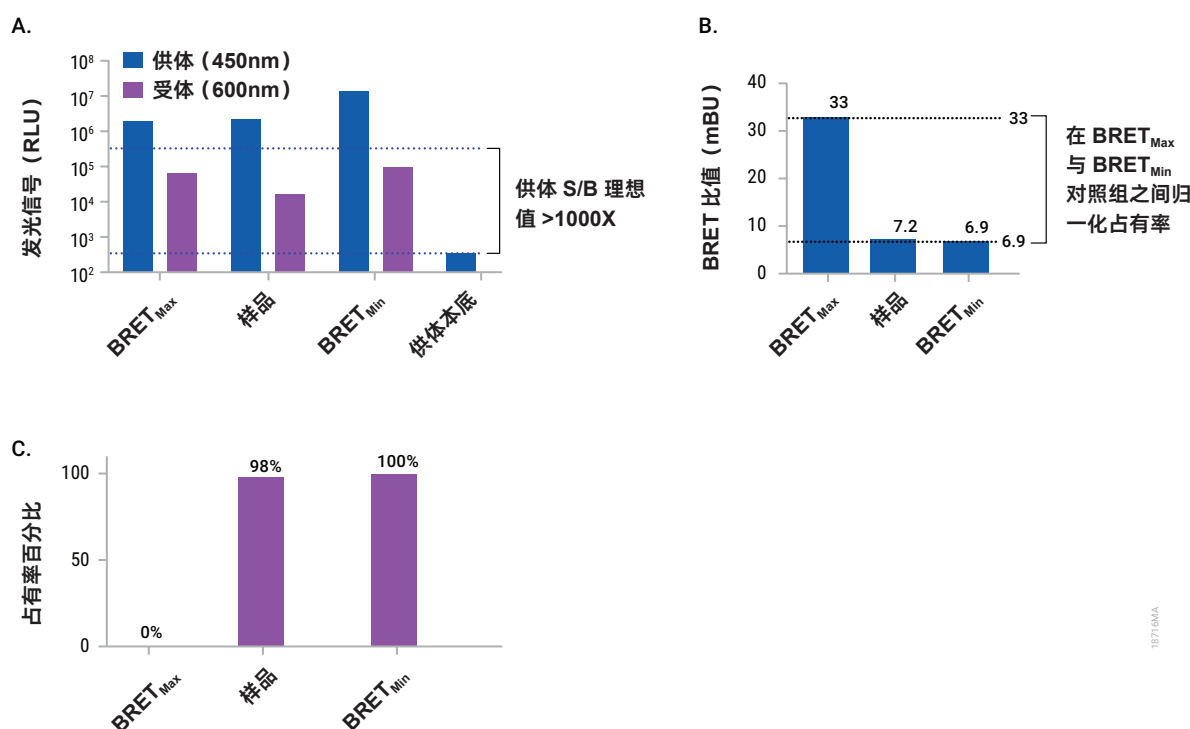


图 7. CDK6 检测的原始数据及数据处理示例。 96 孔检测孔板中表达 NanoLuc®-CDK6 和细胞周期蛋白 D1 的 HEK293 细胞，与 1μM NanoBRET™ Tracer K-10 结合，而且用样品（500nM 帕博西尼）或 DMSO 溶剂（BRET_{Max} 对照品）处理。本实验使用 NanoLuc® 对照载体作为 BRET_{Min} 对照品，使用供体本底对照品评估表达质量。孵育 2 个小时后，加入完整 NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate 和 Extracellular NanoLuc® Inhibitor，然后置于含 450/80BP 和 610/LP 滤波器的发光检测仪上测量 BRET。图 A. 绘制了 BRET_{Max} 和 BRET_{Min} 对照品以及帕博西尼处理样品的原始供体（450nm）和受体（600nm）信号示例图。样品和对照品显示的供体信号比供体本底对照品高 1000X 以上。图 B. 计算 BRET_{Min} 和 BRET_{Max} 对照品以及帕博西尼处理样品的 BRET 比率为 mBRET 值。图 C. 如本操作步骤所述，使用图 B 中 BRET_{Max}、BRET_{Min} 和样品的 BRET 值计算占有率百分比。

5.H. 参考文献

1. Machleidt, T. et al. (2015) NanoBRET-A novel BRET platform for the analysis of protein-protein interactions. ACS Chem. Bio. 10, 1797–804.
2. Robers, M.B. et al. (2015) Target engagement and drug residence time can be observed in living cells with BRET. Nat. Commun. 6, 10091.
3. Vasta, J.D. et al. (2018) Quantitative, wide-spectrum kinase profiling in live cells for assessing the effect of cellular ATP on target engagement. Cell Chem. Biol. 25, 206–14.
4. Wells, C.I. et al. (2020) Quantifying CDK inhibitor selectivity in live cells. Nat. Commun. 11, 2743.
5. Robers, M.B. et al. (2020) Quantifying target occupancy of small molecules within living cells. Annu. Rev. Biochem. 89, 557–82.
6. Robers, M.B. et al. (2021) Single tracer-based protocol for broad-spectrum kinase profiling in live cells with NanoBRET. STAR Protocols 2, 100822. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100822>
7. In: Anthropological Genetics: Theory, Methods and Applications, Michael H. Crawford, ed. (2006) University of Cambridge Press.

5.I. 相关产品

NanoBRET™ TE Intracellular CDK Selectivity Assay

产品	规格	目录号
NanoBRET™ TE CDK Vector Panel A	1 each	NP5000
NanoBRET™ TE CDK Vector Panel B	1 each	NP5100
NanoBRET™ CDK Selectivity System A	1 each	NP5050
NanoBRET™ CDK Selectivity System B	1 each	NP5150
NanoBRET™ TE Selectivity DNA Controls	1 each	NP1000

NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assays

产品	规格	目录号
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay, K-3	100 assays	N2600
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay, K-4	100 assays	N2520
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay, K-5	100 assays	N2500
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay, K-8	100 assays	N2620
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay, K-9	100 assays	N2630
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay, K-10	100 assays	N2640
NanoBRET™ TE Intracellular Kinase Assay, K-11	100 assays	N2650

还可购买其他规格的检测系统。如需获取完整的可用激酶 TE 表达载体及其 NanoBRET™ Tracer 兼容性列表，请访问：
www.promega.com/kinasevectors

5.1. 相关产品（续）

NanoBRET™ TE Nano-Glo® Substrate/Inhibitors

产品	规格	目录号
Intracellular TE Nano-Glo® Substrate/Inhibitor	100 assays	N2162
	1,000 assays	N2160
	10,000 assays	N2161
Intracellular TE Nano-Glo® Vivazine™ Inhibitor	1,000 assays	N2200
	10,000 assays	N2201

其他 NanoBRET™ Target Engagement Assays

产品	规格	目录号
NanoBRET™ Target Engagement Intracellular HDAC Assays	100 assays	N2080
NanoBRET™ TE Intracellular HDAC Complete Kit	1,000 assays	N2170
NanoBRET™ Target Engagement Intracellular BET BRD Assays	100 assays	N2131
NanoBRET™ TE Intracellular BET BRD Complete Kit	1,000 assays	N2180
NanoBRET™ TE Intracellular E3 Ligase Assay, CRBN	100 assays	N2910
NanoBRET™ TE Intracellular E3 Ligase Assay, VHL	100 assays	N2930

还可购买其他规格的检测系统。

转染试剂和附件

产品	规格	目录号
FuGENE® HD Transfection Reagent	1ml	E2311
	5 × 1ml	E2312
Transfection Carrier DNA	5 × 20µg	E4881
	2 × 100µg	E4882
TransfectNow™ HEK293 Cells	1 × 0.5ml	NC1001
	2 × 1ml	NC1002

检测仪器

产品	规格	目录号
GloMax® Discover System	1 each	GM3000

仅供研究使用。不得用于诊断用途。

^(a) NanoBRET™ TE Selectivity Vector Panel Limited Use Label License

BY USE OF THIS PRODUCT, USER AGREES TO BE BOUND BY THE TERMS OF THIS LIMITED USE LABEL LICENSE. If user is not willing to accept the terms of this label license, and the product is unused, Promega will accept return of the unused product and provide user with a full refund.

User may use this product for research use only; however, no amplification or isolation of the vector components of this product and no transfer or commercial use of this product is allowed. Commercial use means any and all uses of this product by a party in exchange for consideration, including, but not limited to: (1) use in further product manufacture; and (2) resale of the product, whether or not such product is resold for use in research. User shall have no right to manufacture or have a third party manufacture the vector components within this product for any purpose. User shall have no right to modify or otherwise create variations of the nucleotide sequence of the luciferase gene. Notwithstanding the foregoing, user may use this product in provision of services to third parties in exchange for consideration; however, user may not transfer the product to third parties. No other use of this product is authorized without the prior express written consent of Promega.

In addition, user must:

- (1a) use Nano-Glo®-branded luminescent assay reagents (LARs) for all determinations of luminescence activity of this product; or
- (1b) contact Promega to obtain a license for use of the product with LARs not manufactured by Promega.

For uses of this product for energy transfer (such as bioluminescence resonance energy transfer), user must:

- (2a) use NanoBRET™-branded energy acceptors (e.g., NanoBRET™ tracers, NanoBRET™ dyes, BRET-optimized HaloTag® ligands) for all determinations of energy transfer activity; and
- (2b) use NanoBRET™-branded LARs (e.g., NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate) or Intracellular TE Nano-Glo® Substrate/Inhibitor or Intracellular TE Nano-Glo® Vivazine/Inhibitor for all determinations of luminescent activity; or
- (2c) contact Promega to obtain a license for use of the product for energy transfer assays using energy acceptors not manufactured by Promega. No license is needed if the energy transfer acceptor is a genetically encoded autofluorescent protein.

With respect to any uses outside this label license, including any diagnostic, therapeutic, prophylactic or commercial uses, please contact Promega for supply and licensing information. PROMEGA MAKES NO REPRESENTATIONS OR WARRANTIES OF ANY KIND, EITHER EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING FOR

MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, WITH REGARD TO THE PRODUCT. The terms of this label license shall be governed under the laws of the State of Wisconsin, USA.

^(b) NanoLuc® ORF TE Vector Limited Use Label License

BY USE OF THIS PRODUCT, RESEARCHER AGREES TO BE BOUND BY THE TERMS OF THIS LIMITED USE LABEL LICENSE. If researcher is not willing to accept the terms of this label license, and the product is unused, Promega will accept return of the unused product and provide researcher with a full refund.

Researcher may use this product for research use only; no transfer or commercial use of this product is allowed. Commercial use means any and all uses of this product by a party in exchange for consideration, including, but not limited to (1) use in further product manufacture; (2) use in provision of services, information or data; and (3) resale of the product, whether or not such product is resold for use in research. Researcher shall have no right to modify or otherwise create variations of the nucleotide sequence of the luciferase gene. No other use of this product is authorized without the prior express written consent of Promega.

In addition, researcher must:

- (1a) use Nano-Glo®-branded luminescent assay reagents (LARs) for all determinations of luminescence activity of this product; or
- (1b) contact Promega to obtain a license for use of the product with LARs not manufactured by Promega.

For uses of this product (NanoLuc® ORF Vector) for energy transfer (such as bioluminescence resonance energy transfer), researcher must:

- (2a) use NanoBRET™-branded luminescent assay reagents (LARs; e.g. NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate), Intracellular TE Nano-Glo® Substrate/Inhibitor, or Intracellular TE Nano-Glo® Vivazine™/Inhibitor for all determinations of luminescent activity; and
- (2b) use NanoBRET™-branded energy acceptors (e.g., NanoBRET™ tracers, NanoBRET™ dyes, BRET-optimized HaloTag® ligands) for all determinations of energy transfer activity; or
- (2c) contact Promega to obtain a license for use of the product for energy transfer assays using energy acceptors not manufactured by Promega. No license is needed if the energy transfer acceptor is a genetically encoded autofluorescent protein.

With respect to any uses outside this label license, including any diagnostic, therapeutic, prophylactic or commercial uses, please contact Promega for supply and licensing information. PROMEGA MAKES NO REPRESENTATIONS OR WARRANTIES OF ANY KIND, EITHER EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING FOR MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, WITH REGARD TO THE PRODUCT. The terms of this label license shall be governed under the laws of the State of Wisconsin, USA.