

中文说明书

NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assays

适用产品目录号：
N8014、N8015、N8016 和 N8017



NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assays

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	6
3. 开始检测前	7
3.A. NanoBRET™ Fusion Vector 的扩增和制备	8
3.B. 仪器要求和设置.....	9
4. NanoBRET™ TE Intracellular RAF Protomer and RAF Homodimer Assay 检测方案.....	10
4.A. 用户需提供的材料.....	10
4.B. 使用 NanoBiT® Fusion Vector 瞬时转染 HEK293 细胞	11
4.C. 使用 NanoBRET™ Tracer 制备细胞（第 2 天）	12
4.D. 加入待测化合物	14
4.E. NanoBRET™ 检测方案	14
4.F. 计算 BRET 比值	15
5. 单个 RAF 原聚体的代表性数据.....	16
6. RAF 同源二聚体的代表性数据.....	19
7. 不同 RAF 二聚体变体的化合物选择性分析	21
8. 疑难解答.....	22
9. 附录.....	26
9.A. 有关 NanoBRET™ Technology 和 NanoBiT® Fusion Protein 的其他信息	26
9.B. 实现充分的检测板混合	27
9.C. NanoBRET™ Tracer 的消光系数	27
9.D. 缓冲液和溶液组成.....	27
9.E. 参考文献	28
9.F. 相关产品.....	28

2. 产品描述

NanoBRET™ Target Engagement (TE) Assays 可测量完整细胞内化合物与选定靶蛋白的结合情况，并已成功应用于多个靶蛋白类别的研究 (1)。在此，我们介绍一种利用 NanoBRET™ TE 技术的方法，用于测定在组成性激活突变体 KRAS(G12C) 存在下形成的 RAF 激酶 (包括 ARAF、BRAF 和 CRAF) 胞内二聚体形式上的化合物结合 (图 1)。RAF 激酶在通过 MAPK 通路传递信号方面发挥着重要作用，MAPK 通路是癌症中突变最严重的通路之一。RAF 二聚体是各种癌症，尤其是由突变型 RAS 蛋白驱动的癌症的重要药物靶点。具体而言，NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assays^(a-g) 可测量化合物与 RAF 异源二聚体内的三种单个 RAF 原聚体 (ARAF、BRAF 或 CRAF) 的相互作用以及 BRAF 和 CRAF 同源二聚体的靶蛋白相互作用。

NanoBRET™ TE 检测系统可利用生物发光共振能量转移 (BRET) 定量检测与靶蛋白的结合，BRET 是发光供体和荧光受体之间的能量转移，仅当供体和受体靠近时才会发生。最初的 NanoBRET™ 靶蛋白结合检测系统使用与靶蛋白融合的完整 NanoLuc® 萤光素酶作为能量供体，而 NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assays 使用 NanoLuc® Binary Technology (NanoBiT®)，该检测技术是一个由大萤光素酶亚基 LgBiT 和小互补肽 SmBiT (q) 组成的结构互补系统。这种互补方法的独特之处在于，可以评估 RAF 蛋白在多聚体复合物中的靶标结合。具体而言，LgBiT 和全长 RAF 的融合蛋白与 SmBiT (q) 和全长 RAF 的融合蛋白在细胞中共表达。上述蛋白与组成型活性突变型 KRAS (G12C) 共表达。当 RAF 蛋白在存在 KRAS (G12C) 的情况下相互作用并形成多聚体时，LgBiT 和 SmBiT (q) 亚基结合形成活性萤光素酶，并在存在萤光素酶底物的情况下产生明亮的发光信号，作为 BRET 能量供体 (图 1)。能量受体是一种细胞渗透性荧光 NanoBRET™ 示踪剂，可与复合物中的一个或两个 RAF 原聚体特异性结合。当示踪剂与复合物中的 RAF 原聚体结合并使荧光团靠近萤光素酶时，形成 BRET 报告基因复合物。当示踪剂和待测化合物竞争与 RAF 原聚体结合时，以 BRET 信号的损失作为未标记待测化合物的靶蛋白占据和亲和力的测量结果。

NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assays 中所用的 NanoBiT® 系统的独特之处在于使用 SmBiT (q) 肽，使得活性萤光素酶对 Extracellular NanoLuc® Inhibitor 敏感。该抑制剂可淬灭受损细胞和细胞碎片产生的信号，确保 NanoBRET™ 信号源自活细胞。

将适当的 RAF 融合载体与优化的 NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assay (A 或 BC) 配对，就能对两种不同的 RAF 同源二聚体 (BRAF 和 CRAF) 或 RAF 异源二聚体复合物中三种不同的 RAF 单体 (ARAF、BRAF 和 CRAF) 的靶蛋白结合进行评估 (图 2)。为评估 RAF 同源二聚体，用表达相同 RAF 蛋白的 LgBiT 和 SmBiT (q) 融合载体转染细胞 (图 2.A 和图 2.B)。为选择性地评估异源二聚体复合物中的特定 RAF 单体，可将其中的目的主要单体 (ARAF、BRAF 或 CRAF) 与第二种突变 RAF 蛋白 [BRAF (A481F) 或 CRAF (A373F)] 进行配对 (图 2.C~2.E)。这些丙氨酸 - 苯丙氨酸突变是假激酶突变，可阻止示踪剂与第二个 RAF 原聚体结合，但保持形成 RAF 异源二聚体复合物的能力 (2)。除可测量待测化合物与特定 RAF 二聚体的靶标结合之外，这 5 种检测方法还能在简单的工作流程中评估待测化合物在多种 RAF 二聚体构型中的选择性。在本说明书的其余部分，上述 5 种检测方法将统称为 NanoBRET™ TE RAF Dimer Assays。

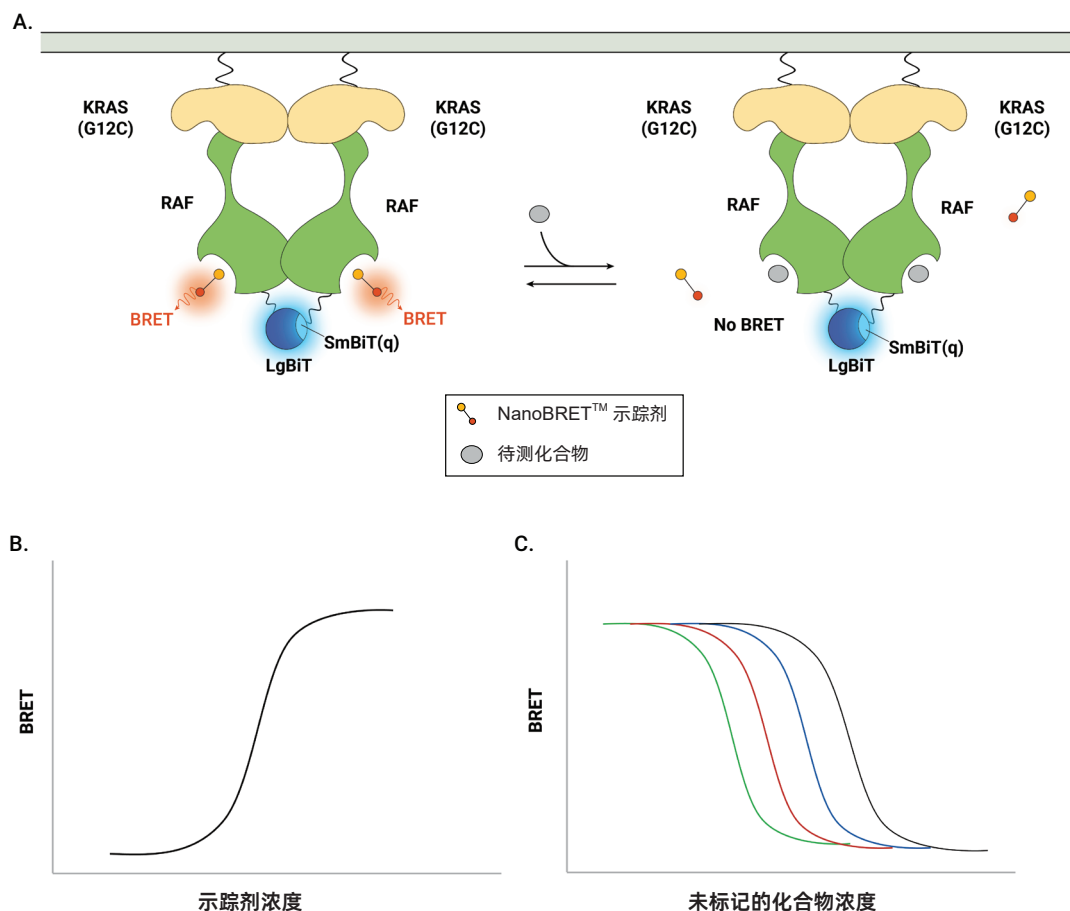


图 1. NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assays 概述。图 A. 检测示意图概述。在用 RAF-LgBiT 和 RAF-SmBiT (q) 融合载体转染的细胞中，RAF 二聚体的形成由 KRAS (G12C) 蛋白的共表达驱动，从而使 SmBiT (q) 和 LgBiT 蛋白亚基靠近，并产生条件性 BRET 供体信号。使用与 RAF 核苷酸口袋结合的 NanoBRET™ 示踪剂在目标 RAF 二聚体处生成 BRET 报告基因复合物。图 B. 通过生成 NanoBRET™ 示踪剂的剂量反应曲线来确定示踪剂对各 RAF 的亲和力；图中展示了这种剂量反应曲线的示意图。所得曲线用于选择本检测方案的示踪剂浓度，该浓度处于亚饱和状态，且接近示踪剂的剂量反应曲线的 EC50 值。图 C. 为了分析靶蛋白占据和确定待测化合物的亲和力，在该固定示踪剂浓度存在下用不同浓度的待测化合物对细胞进行处理。随着与 RAF 结合的化合物浓度增加，BRET 信号降低。

2. 产品描述（续）

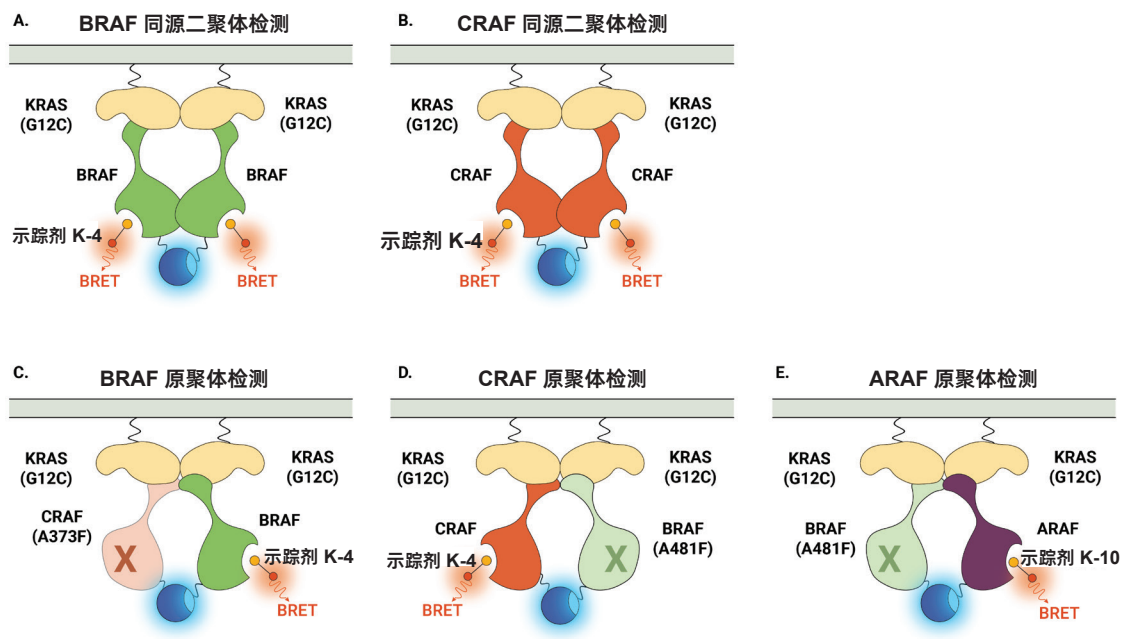
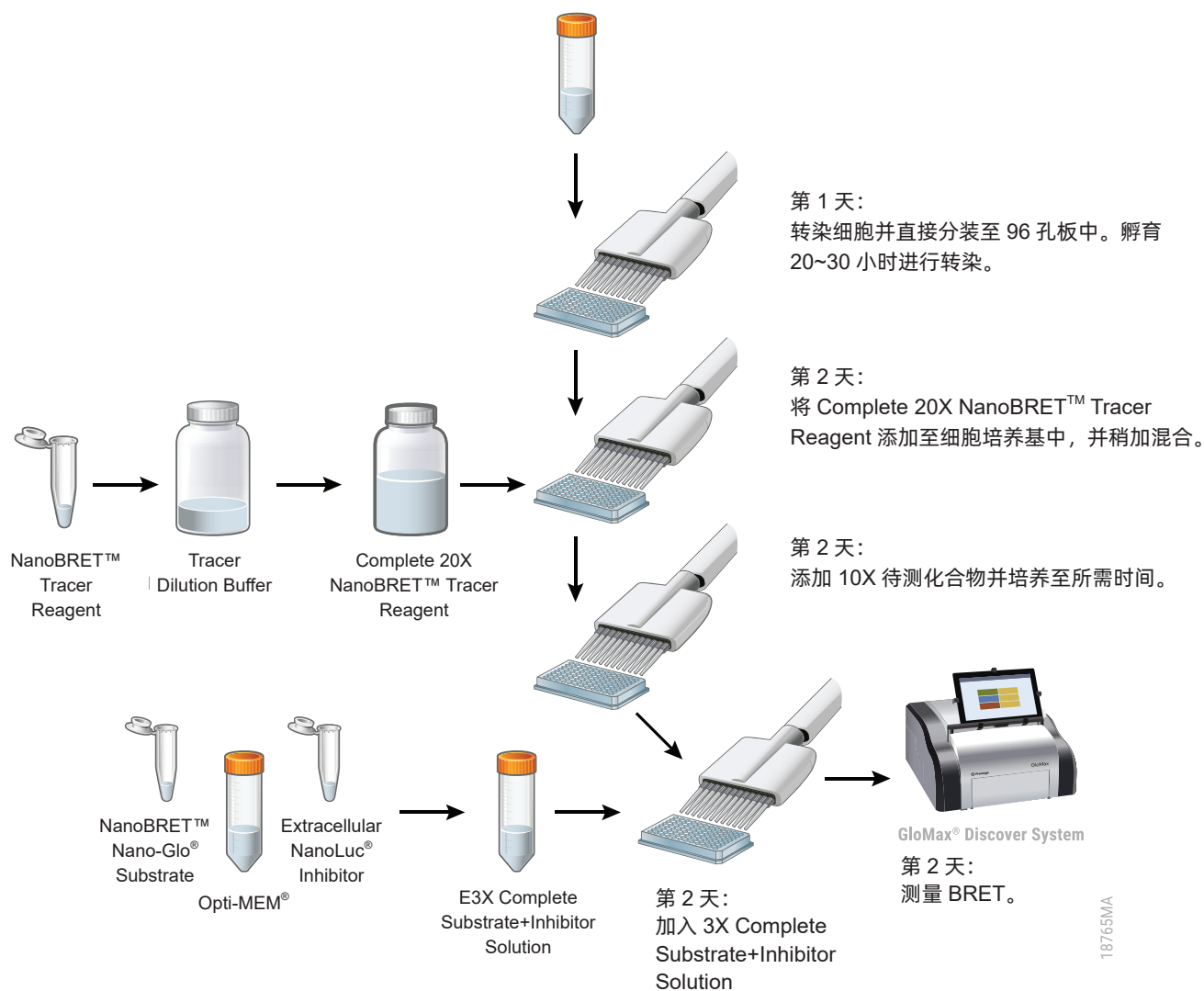


图 2. 使用 NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assays 的可检测靶蛋白。图 A 和图 B。两种 RAF 同源二聚体构型（BRAF 和 CRAF）的示意图。图 C~ 图 E。为评估异源二聚体复合物中的特定 RAF 原聚体，将目的主要 RAF 原聚体与第二种突变 RAF 蛋白 [BRAF (A481F) 或 CRAF (A373F)] 进行配对。这些丙氨酸 - 苯丙氨酸突变是假激酶突变，可阻止示踪剂与 RAF 原聚体结合，但保持形成 RAF 异源二聚体复合物的能力（2）。该方法能检测异源二聚体中的三种 RAF 原聚体构型（ARAF、BRAF 和 CRAF）。

本说明书介绍了 NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assays 所使用的贴壁模式。贴壁模式可与经细胞培养处理的孔板兼容，可用于测量贴壁细胞中的靶标结合（TE），并与其他使用贴壁细胞的基于细胞表型的检测方法更具可比性。在本贴壁模式中，在第 1 天将细胞接种到检测板中，并在第 2 天加入示踪剂和待测化合物。NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assay 的工作流程总结参见图 3。



18765WA

图 3.NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assay 工作流程概述。

2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assay, BC	100 assays	N8014

使用 96 孔板时，试剂可进行 100 次检测。包括：

- 20µg BRAF-SmBiT (q) Fusion Vector
- 20µg CRAF (A373F)-LgBiT Fusion Vector
- 20µg KRAS (G12C) Expression Vector
- 30µl NanoBRET™ Tracer K-4
- 5ml Tracer Dilution Buffer
- 50µl NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate
- 17µl Extracellular NanoLuc® Inhibitor

产品	规格	目录号
NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assay, BC	1000 assays	N8015

使用 96 孔板时，试剂可进行 1000 次检测。包括：

- 20µg BRAF-SmBiT (q) Fusion Vector
- 20µg CRAF (A373F)-LgBiT Fusion DNA
- 60µg KRAS (G12C) Expression Vector
- 300µl NanoBRET™ Tracer K-4
- 5ml Tracer Dilution Buffer
- 330µl NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate
- 110µl Extracellular NanoLuc® Inhibitor

产品	规格	目录号
NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assay, A	100 assays	N8016

使用 96 孔板时，试剂可进行 100 次检测。包括：

- 20µg SmBiT (q)-ARAF Fusion Vector
- 20µg BRAF (A481F)-LgBiT Fusion Vector
- 20µg KRAS (G12C) Expression Vector
- 30µl NanoBRET™ Tracer K-10
- 5ml Tracer Dilution Buffer
- 50µl NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate
- 17µl Extracellular NanoLuc® Inhibitor

产品	规格	目录号
NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assay, A	1000 assays	N8017

使用 96 孔板时，试剂可进行 1000 次检测。包括：

- 20µg SmBiT (q)-ARAF Fusion Vector
- 20µg BRAF (A481F)-LgBiT Fusion Vector
- 60µg KRAS (G12C) Expression Vector
- 300µl NanoBRET™ Tracer K-10
- 5ml Tracer Dilution Buffer
- 330µl NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate
- 110µl Extracellular NanoLuc® Inhibitor

储存条件：将所有 NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assay 组分置于低于 -65℃ 的条件下储存。或者，将 NanoBRET™ Tracer 置于低于 -65℃ 的条件下储存；所有其他组分则置于 -30℃ ~ -10℃ 的条件下储存。避免对载体进行反复冻融循环。建议在首次使用后将 NanoBRET™ Tracer 分装成等分试样，并避免冻融循环超过五次。NanoBRET™ Tracer、NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate 和 Extracellular NanoLuc® Inhibitor 均应避光储存。

3. 开始检测前

NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assays 需要用两种融合载体转染细胞，一种是编码 LgBiT 融合蛋白的载体，另一种是编码 SmBiT (q) 融合蛋白的载体。编码 LgBiT 和 SmBiT (q) 与目标 RAF 变体融合的所有载体均可单独获取，并列于表 1 中。

此外，NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assays 也需要与 KRAS (G12C) Expression Vector（目录号：NV4941）共转染。该载体在目录号 N8014、N8015、N8016 和 N8017 中作为对照品提供，也可作为 NV4941 单独提供。参见表 1。

表 1. NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assays 所需的载体

载体	规格	目录号
SmBiT (q)-ARAF Fusion Vector	20µg	NV4861
BRAF-SmBiT (q) Fusion Vector	20µg	NV4871
BRAF-LgBiT Fusion Vector	20µg	NV4881
CRAF-SmBiT (q) Fusion Vector	20µg	NV4891
CRAF-LgBiT Fusion Vector	20µg	NV4901
BRAF (A481F)-LgBiT Fusion Vector	20µg	NV4911
BRAF (A481F)-SmBiT (q) Fusion Vector	20µg	NV4921
CRAF (A373F)-LgBiT Fusion Vector	20µg	NV4931
KRAS (G12C) Expression Vector	20µg	NV4941

3. 开始检测前（续）

如果需研究特定 RAF 二聚体的靶标结合, 推荐使用图 2、表 2 或第 5 节中所示的组合。

表 2. 推荐的靶标结合检测试剂盒和融合载体组合。

靶标结合检测	SmBiT (q) Fusion Vector	LgBiT Fusion Vector	NanoBRET™ TE RAF Dimer Assay	备注
BRAF 同源二聚体	BRAF-SmBiT (q) Fusion Vector	BRAF-LgBiT Fusion Vector	BC	检测试剂盒中包含 K-4 Tracer。
CRAF 同源二聚体	CRAF-SmBiT (q) Fusion Vector	CRAF-LgBiT Fusion Vector	BC	检测试剂盒中包含 K-4 Tracer。
ARAF 原聚体	SmBiT (q)-ARAF Fusion Vector	BRAF (A481F)-LgBiT Fusion Vector	A	目录号 N8016 和 N8017 中包含 K-10 Tracer。
BRAF 原聚体	BRAF-SmBiT (q) Fusion Vector	CRAF (A373F)-LgBiT Fusion Vector	BC	目录号 N8014 和 N8015 中包含 K-4 Tracer。
CRAF 原聚体	BRAF (A481F)-SmBiT (q) Fusion Vector	CRAF-LgBiT Fusion Vector	BC	检测试剂盒中包含 K-4 Tracer。

3.A. NanoBRET™ Fusion Vector 的扩增和制备

系统随附各载体量可用于特定次数的实验。强烈建议您在大肠埃希菌中扩增每种载体, 并纯化大量低内毒素载体用于转染。按照标准方案进行质粒转化至大肠埃希菌的载体扩增和细胞培养级载体制备。

RAF-LgBiT Fusion Vector、RAF-SmBiT (q) Fusion Vector 和 KRAS (G12C) Expression Vector 包含一个卡那霉素表达盒, 用于在细菌增殖期间进行选择。建议在扩增后对编码区进行测序, 以确保蛋白质编码区的保真度。有关载体序列信息, 请访问 RAF 融合载体产品页面。

有关 RAF 载体扩增的信息, 请访问 RAF 融合载体产品页面: [promega.com](https://www.promega.com) 或联系 Promega 技术服务部: chinatechserv@promega.com

3.B. 仪器要求和设置

如需进行 NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assay，需要一个能够连续测量双波长窗口的发光检测仪。使用滤波器即可实现该要求。建议使用带通滤波器（BP）测量供体信号，使用长通滤波器（LP）测量受体信号，以最大程度地提高灵敏度。

NanoBRET™ 发光供体 NanoBiT® 萤光素酶的发射波长为 460nm。建议使用 BP 滤波器（覆盖范围接近 460nm，带通范围为 8~80nm）测量此供体信号。例如，450nm/80nm 的 BP 滤波器可捕获 410~490nm 范围内的发射信号。

注：建议使用 BP 滤波器测量供体信号，以选择性地捕获信号峰，避免测量受体峰串色。可以使用覆盖 460nm 波长区域的短通（SP）滤波器，但可能导致供体信号值过大（人为原因）和检测窗口缩小。

NanoBRET™ Tracer K-4 和 NanoBRET™ Tracer K-10 的发射峰值在 610~630nm 范围内。建议使用长通滤波器（从 600~610nm 处开始）测量该受体信号。

能够进行双波长测量的仪器均配备有滤波器，或者也可以单独购买和添加滤波器。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 秒的积分时间就足够了。确保对光电倍增管的增益进行了优化，以在不达到仪器信号饱和的情况下捕获最高的供体信号。

请咨询仪器制造商，以确定是否已安装适当的滤波器，或者是否需要采取步骤添加适当的滤波器。例如，安装滤波器时可能需要特殊支架或立方形物件，而且滤波器的形状和厚度也可能因仪器而异。我们在以下仪器和配置方面拥有丰富的经验：

- GloMax® Discover System（目录号：GM3000），配备预装供体信号滤波器（450nm/8nm BP 滤波器）和受体信号滤波器（600nm LP 滤波器）。从“检测方案”菜单中选择预装的 BRET: NanoBRET™ 618 检测方案。
- BMG Labtech CLARIOstar® Multimode Microplate Reader，配备预装供体信号滤波器（450nm/80nm BP 滤波器）和受体信号滤波器（610nm LP 滤波器）。
- Thermo Fisher Varioskan® Multimode Microplate Reader，配备 Edmunds Optics 的以下滤波器：供体滤波器（CWL: 450nm，直径：25mm，FWHM: 80nm）、干涉滤波器和受体滤波器（直径：1 英寸，RG-610 长通滤波器）。

另一种可用于测量双发光信号的仪器是 PerkinElmer Envision® Multilabel Reader，其推荐设置如下：

- 镜子：发光镜 - 插槽 4
- 发射滤波器：Chroma（目录号：AT600LP）- 发射插槽 4
- 发射滤波器 2：Chroma（目录号：AT460/50m）- 发射插槽 1
- 测量高度（mm）：6.5
- 测量时间（秒）：1

4. NanoBRET™ TE Intracellular RAF Protomer and RAF Homodimer Assay 检测方案

NanoBRET™ TE Intracellular RAF Protomer and RAF Homodimer Assays 的检测结果可通过以下几种方式表示：原始 BRET 比值、减去本底值的 BRET 比值和 / 或归一化 BRET。有关更多信息，请参见第 4.F 节。在组装检测板时，请确保检测板上包含必要的对照品，以进行所需的计算并协助排除故障。建议每种对照类型至少制备三个孔。

未转染细胞对照：含未转染细胞，因此不表达 RAF 融合蛋白。该对照组代表本底供体信号，可用于评估转染成功与否，详见第 8 节。

无示踪剂对照：含转染细胞，但不含示踪剂或待测化合物。无示踪剂对照组的 BRET 信号用于计算减去本底的 BRET 比值。

BRET_{Min} 对照：含示踪剂和过量浓度的已知 RAF 配体（如 20μM TAK-632）的转染细胞。在计算归一化 BRET 时，该对照组的平均 BRET 比值代表 BRET_{Min}。该对照品还可作为 RAF 靶标结合的阳性对照（阳性 TE 对照）。

BRET_{Max} 对照：含示踪剂的转染细胞并且仅添加待测化合物的溶剂。在计算归一化 BRET 时，该对照组的平均 BRET 比值代表 BRET_{Max}。

4.A. 用户需提供的材料

（缓冲液和溶液的组成请参见第 9.D. 节）

- HEK293 或其他培养的哺乳动物细胞（参见下文注释 a.）
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; 例如 Thermo Fisher Scientific 目录号：11995-065)
- 胎牛血清（例如 HyClone 目录号：SH30070.03 或 Seradigm 目录号：1500-050）
- Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium（不含酚红）（例如 Life Technologies 目录号：11058-021）
- 0.05% Trypsin/EDTA（例如 Thermo Fisher Scientific 目录号：25300）
- FuGENE® HD Transfection Reagent（目录号：E2311）
- DMSO（例如 99.7%；Sigma 目录号：2650）
- TE Buffer, 1X, Molecular Biology Grade（目录号：V6231）（如果需要稀释 DNA）
- 96 孔经组织培养处理的全白平底聚苯乙烯微孔板（例如 Corning® 目录号：3917 或 Greiner 目录号：655083）
- 细胞培养仪器和试剂
- 无菌聚丙烯锥形管
- 聚丙烯塑料器具，例如用于稀释和分配试剂的槽。由于示踪剂的吸附作用，请勿使用传统的聚苯乙烯塑料器具进行此项检测。
- 可以测量 NanoBRET™ 波长的检测仪器（例如 GloMax® Discover System，目录号：GM3000）；参见第 3.B 节
- RAF-LgBiT Fusion Vector 和 RAF-SmBiT (q) Fusion Vector（见下文注释 b）
- KRAS (G12C) Expression Vector（见下文注释 b）
- TAK-632（阳性对照 RAF 配体，Selleckchem 目录号：S7291）
- 能够混合粘性试剂的微孔板混合器；参见第 9.B 节

注：

- a. 本检测方案针对 HEK293 细胞进行了优化。当使用其他类型的细胞时，请使用适合该类型细胞的细胞培养条件。您可能需要对转染条件进行优化并确定 NanoBRET™ Tracer K-4 或 K-10 的适当浓度。
- b. 进行 NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assay 需要使用 LgBiT 和 SmBiT (q) Fusion Vector 检测目标 RAF 变体。您需要单独购买相应的 LgBiT 和 SmBiT (q) RAF Fusion Vector；有关可用的 LgBiT 和 SmBiT (q) Fusion Vector 列表，请参见表 1、表 2 和第 9.F 节。

4.B. 使用 NanoBiT® Fusion Vector 瞬时转染 HEK293 细胞

- 1. 使用适当的细胞培养条件培养 HEK293 细胞（或其他类型的细胞）。

注：

- a. 细胞处理对检测结果的重现性至关重要。为获得最佳转染结果，应使用 70~90% 融合且刚进行传代（理想情况下在 1~2 天内）的 HEK293 细胞。
 - b. 建议每个检测板至少制备 2×10^6 个细胞。
- 2. 从细胞培养瓶中抽吸出细胞培养基，使用胰蛋白酶处理细胞，使细胞从培养瓶表面脱落下来。
注：为获得最佳结果，请使用能产生单细胞悬液的胰蛋白酶消化条件。
 - 3. 加入含血清的预热细胞培养基（含 10% 胎牛血清的 90%DMEM）中和胰蛋白酶。将细胞在 200×g 转速下离心 5 分钟，使细胞沉淀。
 - 4. 抽吸去掉细胞培养基，将细胞重悬于预热的检测培养基（含 1% 胎牛血清的 Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium（不含酚红））中。
 - 5. 在无菌锥形管中使用预热的检测培养基，将细胞密度调节至 2×10^5 个细胞 /ml。
 - 6. 使用 FuGENE® HD Transfection Reagent 转染 HEK293 细胞，按以下步骤制备脂质 :DNA 复合物：
 - a. 在无菌锥形管中，使用 Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium（不含酚红）制备 10µg/ml 的 DNA 溶液，混匀。²

组分	体积 1	最终浓度 2
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium（不含酚红）	1ml	-
KRAS (G12C) Expression Vector ³	9.5µl	9.5µg/ml
RAF-LgBiT Fusion Vector ³	0.25µl	0.25µg/ml
RAF-SmBiT (q) Fusion Vector ³	0.25µl	0.25µg/ml

¹ 这些体积适合制备约 1ml 转染复合物和转染 20ml 的 HEK293 细胞。如需制备不同的体积，可按比例增加或减少各组分的体积。如有必要，为避免移液体积小于 1µl，可在制备脂质 :DNA 复合物前，使用 1X TE 缓冲液对载体进行连续稀释。
(下页续第 6 步。)

4.B. 使用 NanoBiT® Fusion Vector 瞬时转染 HEK293 细胞 (续)

该载体比例经过优化,既能产生足够的供体信号,同时又能限制 SmBiT (q) 和 LgBiT 融合蛋白的假性相互作用所产生的非特异性供体信号。不建议调整该比例,除非需要为不同的细胞系优化转染条件。

³提供的每种载体量有限。强烈建议您在大肠埃希菌中扩增每种载体,并纯化大量低内毒素载体用于转染。请参见第 3.A 节。

- b. 每 1ml 载体混合物中加入 30μl FuGENE® HD Transfection Reagent, 形成脂质 :DNA 复合物。确保 FuGENE® HD Transfection Reagent 不直接接触塑料试管的侧面;直接移液至试管中的液体中,轻轻混匀。

注:如果在 1.5ml 微量离心管中制备转染复合物,则需颠倒离心管 5~10 次,混匀。如果在较大的锥形管(例如 15ml 或 50ml 锥形管)中制备转染复合物,则以最低速度振荡(vortexing)或轻轻涡旋试管进行混匀。请勿将较大锥形管中的少量转染复合物进行颠倒混匀,否则会降低复合物的形成效率,导致较低的发光信号。

- c. 在室温条件下孵育 20~30 分钟,以形成脂质 :DNA 复合物

7. 在无菌锥形管中,取 1 份脂质 :DNA 复合物(例如 1ml)与 20 份步骤 5 中制备的 HEK293 细胞(例如 20ml)混匀。轻轻颠倒试管 5 次,混匀。

注:对于较大或较小的批量转染,可相应增加或减少组分体积。应确保细胞与脂质 :DNA 复合物的比例保持在 20:1。

8. 将 100μl 细胞和脂质 :DNA 复合物分装至 96 孔固体全白平底聚苯乙烯经组织培养处理的微孔板(Corning® 目录号: 3917 或 Greiner 目录号: 655083)的每个孔中,然后在 37°C 和 5%CO₂ 条件下培养 20~30 小时。

可选:将 105μl 细胞和脂质 :DNA 复合物分装至 96 孔检测板的三个孔中,作为无示踪剂对照样品,以测定本底信号值,从而计算归一化 BRET 比值。请参见第 4.F 节。

注:在此步骤中,建议细胞密度约为 55000~80000 个细胞 /cm₂。例如,96 孔检测板的细胞密度约为 20000 个细胞 /孔。

4.C. 使用 NanoBRET™ Tracer 制备细胞 (第 2 天)

1. 使用聚丙烯管制备 Complete 20X NanoBRET™ Tracer, 步骤如下:

- a. 解冻 NanoBRET™ Tracer 和 Tracer Dilution Buffer。

注:首次使用时,建议将 NanoBRET™ Tracer 分装成等分试样;避免冻融循环超过五次。将 NanoBRET™ Tracer 在 -65°C 下避光储存。Tracer Dilution Buffer 解冻后可在室温下储存。

- b. 根据下表,使用纯 DMSO 制备推荐用于目标 RAF 原聚体或同源二聚体检测的 100X NanoBRET™ Tracer 溶液,混匀。

注:每种 NanoBRET™ Tracer 均以纯 DMSO 的 400μM 储备液的形式提供。用适当体积的纯 DMSO 稀释 400μM 溶液,制备 100X 溶液。

	推荐的 NanoBRET™ 示踪剂	推荐的 100X 示踪剂浓度
RAF 同源二聚体检测		
BRAF 同源二聚体	K-4	50μM
CRAF 同源二聚体	K-4	100μM
RAF 原聚体检测		
BRAF 原聚体	K-4	50μM
CRAF 原聚体	K-4	100μM
ARAF 原聚体	K-10	13μM

注：上述 100X 示踪剂浓度是作为起始条件提供的。更高浓度的示踪剂可能会增加检测窗口，但是会降低灵敏度。有关优化示踪剂浓度的更多信息，请参见第 5 节和第 6 节。

- c. 取 1 份步骤 1.b 中制备的 100X NanoBRET™ Tracer，缓慢加入 4 份 Tracer Dilution Buffer，混匀，制备成 Complete 20X NanoBRET™ Tracer。
- 注：**由于 Tracer Dilution Buffer 具有粘性，因此请缓慢移取 Tracer Dilution Buffer。目视检查溶液，确保 Complete 20X NanoBRET™ Tracer 完全分散，且试管内容物均匀。

组分	体积 /96 孔板
100X NanoBRET™ Tracer	100μl
Tracer Dilution Buffer	400μl
最终体积	500μl

2. 取 5μl Complete 20X NanoBRET™ Tracer，分装至第 4.B 节中制备的 96 孔检测板的每个孔中。请勿向无示踪剂对照孔中加入示踪剂。
- 注：**由于 Tracer Dilution Buffer 具有粘性，因此请缓慢移取 Complete 20X NanoBRET™ Tracer。
3. 将检测板置于定轨振荡器上，并于 900rpm 转速下混合 15 秒。目视检查微孔，确保 Complete 20X NanoBRET™ Tracer 完全分散，且微孔内容物均匀。如有必要，可重复混合步骤，直至微孔内容物均匀。
- 注：**达到均匀性所需的平板混合条件可能会因定轨振荡器而异。有关更多详细信息，请参见第 9.B 节。

4.D. 加入待测化合物

1. 使用 100% DMSO 或适当的待测化合物溶剂制备 1000X 最终浓度的待测化合物。
2. 使用 Opti-MEM™ I 低血清培养基（不含酚红）将 1000X 待测化合物稀释 100 倍，至最终浓度 10X。
可选：
 - a. 使用 Opti-MEM™ I 低血清培养基（不含酚红）制备 200μM（10X）TAK-632 溶液，作为 BRET_{Min} 或阳性 TE 对照。
 - b. 使用 Opti-MEM™ I 低血清培养基（不含酚红）稀释待测化合物溶剂 100 倍，作为 10X BRET_{Max} 对照。
3. 向含细胞和 NanoBRET™ Tracer 的每个孔中加入 10μl 10X 待测化合物。将检测板置于定轨振荡器上，并于 900rpm 转速下混合 15 秒。
可选：
 - a. 取 10μl 的 200μM TAK-632，加至 BRET_{Min} 对照孔和阳性 TE 对照孔中。
 - b. 取 10μl 的 10X BRET_{Max} 对照品，加至 BRET_{Max} 对照孔中。
4. 将检测板置于 37°C 和 5%CO₂ 条件下培养 2 小时。
注：根据待测化合物的细胞渗透性和结合特性，可能需要优化培养时间。最快可在 30 分钟内进行 BRET 测量。

4.E. NanoBRET™ 检测方案

1. 从培养箱中取出检测板，冷却至室温约 15 分钟。
2. 解冻 Extracellular NanoLuc® Inhibitor 和 NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate。
注：首次使用后，Extracellular NanoLuc® Inhibitor 和 NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate 可在 -30°C ~ -10°C 条件下避光储存。
3. 在即将测量 BRET 之前，按下述方法在锥形管中用 Opti-MEM™ I 低血清培养基（不含酚红）制备 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution：

组分	体积 /96 孔板
Opti-MEM™ I 低血清培养基（不含酚红）	4960μl
NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate	30μl
Extracellular NanoLuc® Inhibitor	10μl
最终体积	5000μl

注：于制备后 1.5 小时内使用 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution。丢弃任何未使用的溶液。

4. 轻轻颠倒试管 5~10 次混匀。

5. 在 96 孔检测板的每个孔中加入 50μl 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution。置于室温下孵育 2~3 分钟。
注：在加入 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution 后的 10 分钟内进行步骤 6，以测量 BRET 信号。加入后 2 小时内均可以测量 BRET，但发光信号会有所损失，损失量取决于具体靶蛋白。
6. 按照制造商的使用说明，使用 GloMax[®] Discover System 或其他 NanoBRET[™] 检测兼容的发光检测仪，采用 450nm BP 滤波器测量供体发射信号，采用 600LP 滤波器测量受体发射信号。不同仪器的最佳积分时间可能不同，但通常 0.2~1 秒的积分时间就足够了。有关更多信息，请参见第 3.B 节。

4.F. 计算 BRET 比值

检测结果可通过计算原始 BRET 比值、减去本底值的 BRET 比值和 / 或归一化 BRET 信号来表示，如下所述：
如需计算原始 BRET 比值，将各样品或对照品的受体发射信号除以供体发射信号。将各 BRET 比值乘以 1000，即将原始 BRET 单位转换为 milliBRET 单位 (mBU)。

$$\text{BRET 比值} = \frac{\text{受体信号}_{\text{样品}}}{\text{供体信号}_{\text{样品}}} \times 1000$$

如需计算减去本底值的 BRET 比值，可用各样品的原始 BRET 比值减去无示踪剂对照品的平均原始 BRET 比值。将各 BRET 比值乘以 1000，即将 BRET 单位转换为 milliBRET 单位 (mBU)。

$$\text{减去本底值的 BRET 比值} = \left[\frac{\text{受体信号}_{\text{样品}}}{\text{供体信号}_{\text{样品}}} - \frac{\text{受体信号}_{\text{无示踪剂对照品}}}{\text{供体信号}_{\text{无示踪剂对照品}}} \right] \times 1000$$

为了便于在具有不同检测窗口的不同 RAF 之间进行选择比较，可考虑使用两个对照品的 BRET 信号对每个样品的 BRET 信号做归一化处理，即一个对照品定义最大 BRET 值，另一个对照品定义最小 BRET 值，如下所述。归一化 BRET 值表示样品的 BRET 比值占最大 BRET 比值的百分比。

$$\text{归一化 BRET (\%)} = \left[\frac{(\text{BRET}_{\text{样品}} - \text{BRET}_{\text{Min}})}{(\text{BRET}_{\text{Max}} - \text{BRET}_{\text{Min}})} \right] \times 100$$

式中：

BRET_{样品} 是样品的 BRET 比值。

BRET_{Min} 是含有示踪剂和过量浓度的已知 RAF 配体（如 20μM TAK-632）的对照品的平均 BRET 比值。或者，可以使用无示踪剂对照品的平均 BRET 比值，该对照品不含示踪剂或待测化合物。

BRET_{Max} 是含示踪剂和待测化合物溶媒但不含待测化合物的对照品的平均 BRET 比值。

5. 单个 RAF 原聚体的代表性数据

证明 NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assays 可用于评估 RAF 原聚体的靶标结合的代表性数据请参见下文。在每种情况下，通过共表达未标记的组成型活性突变型 KRAS (G12C) 诱导特定的 RAF 异源二聚体。待检测的 RAF 原聚体与第二种 RAF 原聚体配对，后者已发生突变，以防止与示踪剂结合，便于测量目标 BRAF (图 4)、CRAF (图 5) 或 ARAF (图 6) 原聚体的特异性靶标结合。这些数据证明了示踪剂的亲和力和示踪剂浓度对待测化合物效价的影响，以及用于测定待测化合物亲和力的推荐示踪剂浓度。

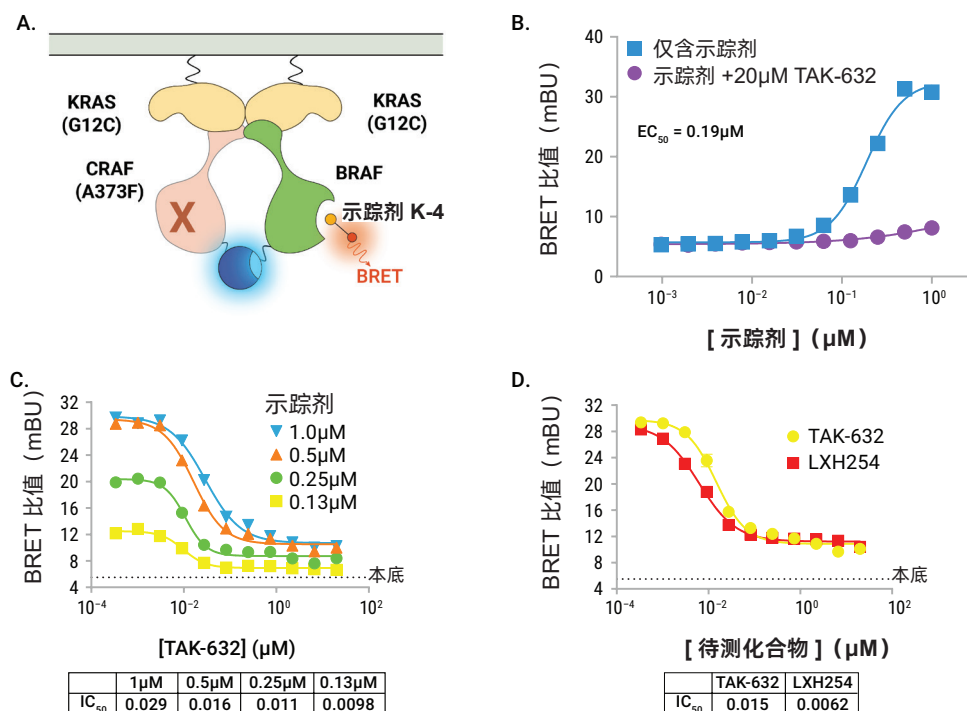
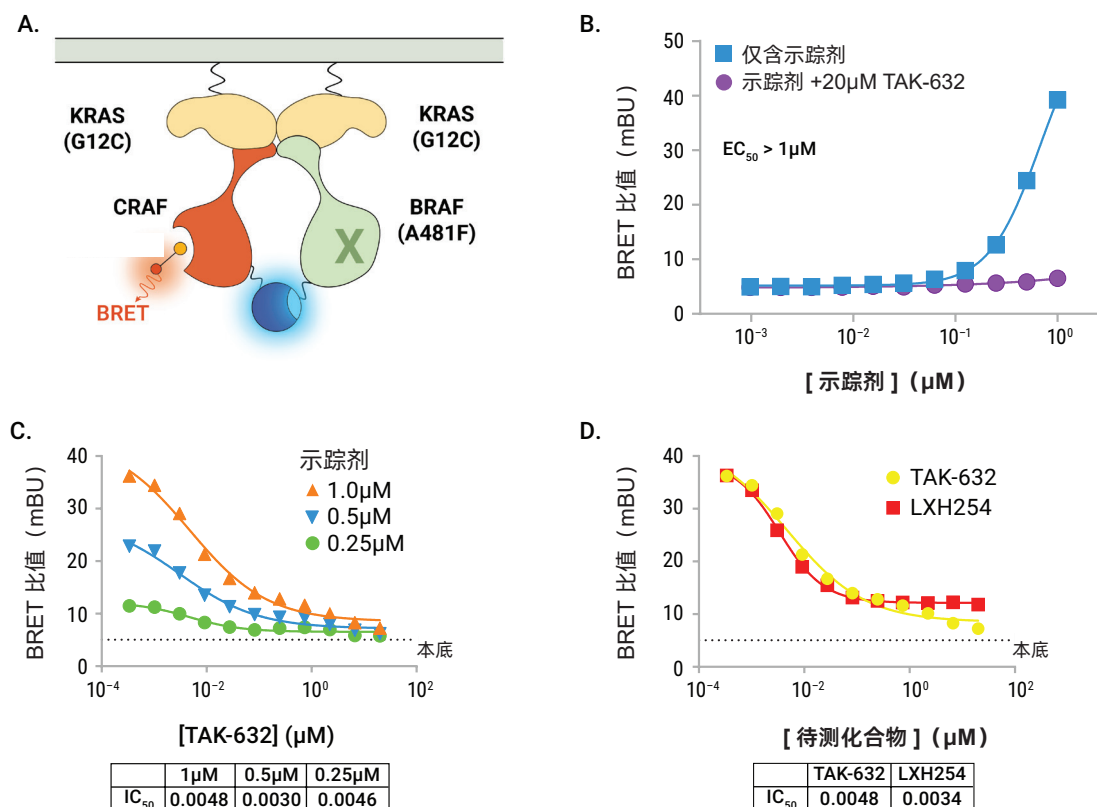


图 4. 使用 NanoBRET™ TE RAF Dimer Assay (BC) 检测 HEK293 细胞中 BRAF 原聚体的靶标结合的代表性数据。

图 A. NanoBRET™ TE BRAF 原聚体检测示意图。用 BRAF-SmBiT (q) Fusion Vector、CRAF (A373F)-LgBiT Fusion Vector 和 KRAS (G12C) Expression Vector 以 0.25:0.25:9.5 的比例瞬时转染贴壁 HEK293 细胞。将表达 BRAF-SmBiT (q)、CRAF (A373F)-LgBiT 和 KRAS (G12C) 蛋白的细胞与不同浓度的 NanoBRET™ Tracer K-4 结合。在存在或不存在饱和用量的 TAK-632 (图 B) 或连续稀释的 TAK-632 (图 C) 的情况下培养细胞 2 小时，然后加入 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution，随后使用配备 450/80BP 和 610/LP 滤波器的 GloMax® Discover System 进行 BRET 测量。BRAF 原聚体检测的 NanoBRET™ Tracer K-4 推荐浓度在图 C 中以橙色表示。推荐示踪剂浓度下的化合物特征分析实验的示例请参见图 D。



186837A

图 5. 使用 NanoBRET™ TE RAF Dimer Assay (BC) 检测 HEK293 细胞中 CRAF 原聚体的靶标结合的代表性数据。
图 A. NanoBRET™ TE CRAF 原聚体检测示意图。用 CRAF-LgBiT Fusion Vector、BRAF (A481F)-SmBiT (q) Fusion Vector 和 KRAS (G12C) Expression Vector 以 0.25:0.25:9.5 的比例瞬时转染贴壁 HEK293 细胞。将表达 CRAF-LgBiT、BRAF (A481F)-SmBiT (q) 和 KRAS (G12C) 蛋白的细胞与不同浓度的 NanoBRET™ Tracer K-4 结合。在存在或不存在饱和用量的 TAK-632 (**图 B**) 或连续稀释的 TAK-632 (**图 C**) 的情况下培养细胞 2 小时，然后加入 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution，随后使用配备 450/80BP 和 610/LP 滤波器的 GloMax® Discover System 进行 BRET 测量。CRAF 原聚体检测的 NanoBRET™ Tracer K-4 推荐浓度在**图 C** 中以橙色表示。推荐示踪剂浓度下的化合物特征分析实验的示例请参见**图 D**。

5. 单个 RAF 原聚体的代表性数据 (续)

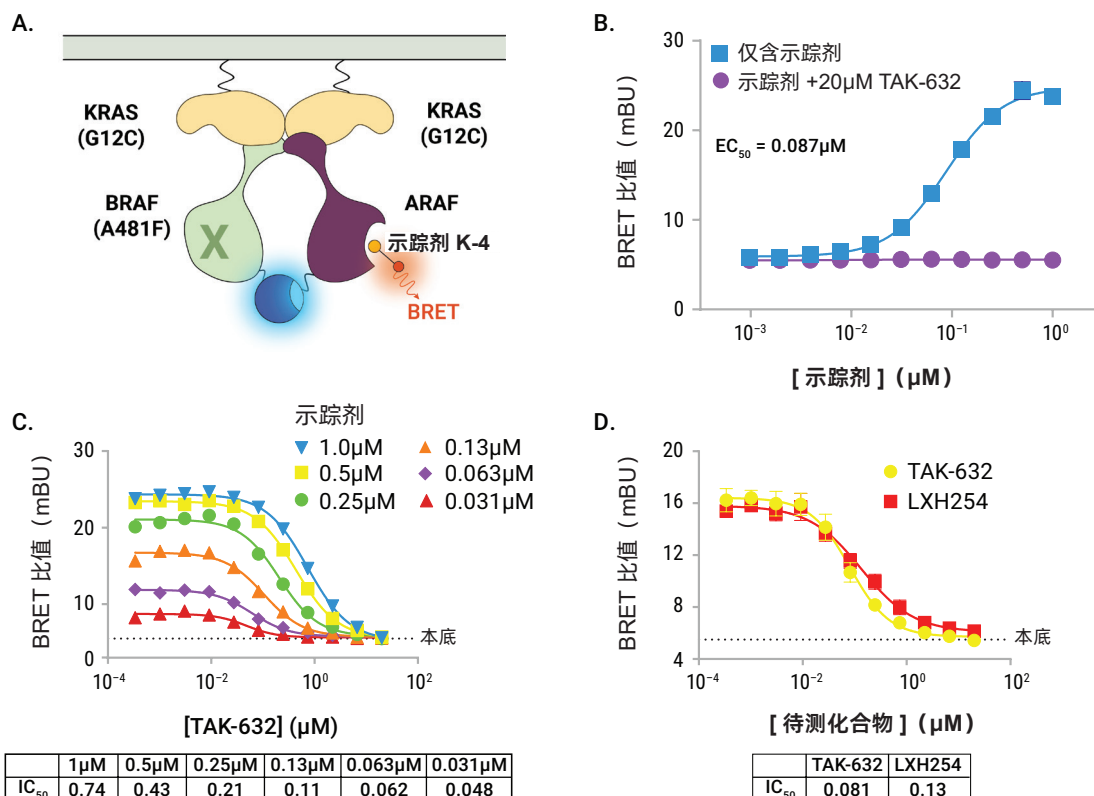


图 6. 使用 NanoBRET™ TE RAF Dimer Assay (A) 检测 HEK293 细胞中 ARAF 原聚体的靶标结合的代表性数据。图 A. NanoBRET™ TE Intracellular ARAF Protomer Assay 示意图。用 SmBiT (q)-ARAF Fusion Vector、BRAF (A481F)-LgBiT Fusion Vector 和 KRAS (G12C) Expression Vector 以 0.25:0.25:9.5 的比例瞬时转染贴壁 HEK293 细胞。将表达 SmBiT (q)-ARAF、BRAF (A481F)-LgBiT 和 KRAS (G12C) 蛋白的细胞与不同浓度的 NanoBRET™ Tracer K-10 结合。在存在或不存在饱和用量的 TAK-632 (图 B) 或连续稀释的 TAK-632 (图 C) 的情况下培养细胞 2 小时，然后加入 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution，随后使用配备 450/80BP 和 610/LP 滤波器的 GloMax® Discover System 进行 BRET 测量。ARAF 原聚体检测的 NanoBRET™ Tracer K-10 推荐浓度在图 C 中以橙色表示。推荐示踪剂浓度下的化合物特征分析实验的示例请参见图 D。

6. RAF 同源二聚体的代表性数据

证明 NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assay 可用于评估 RAF 同源二聚体的靶标结合的代表性数据请参见图 7 和图 8。

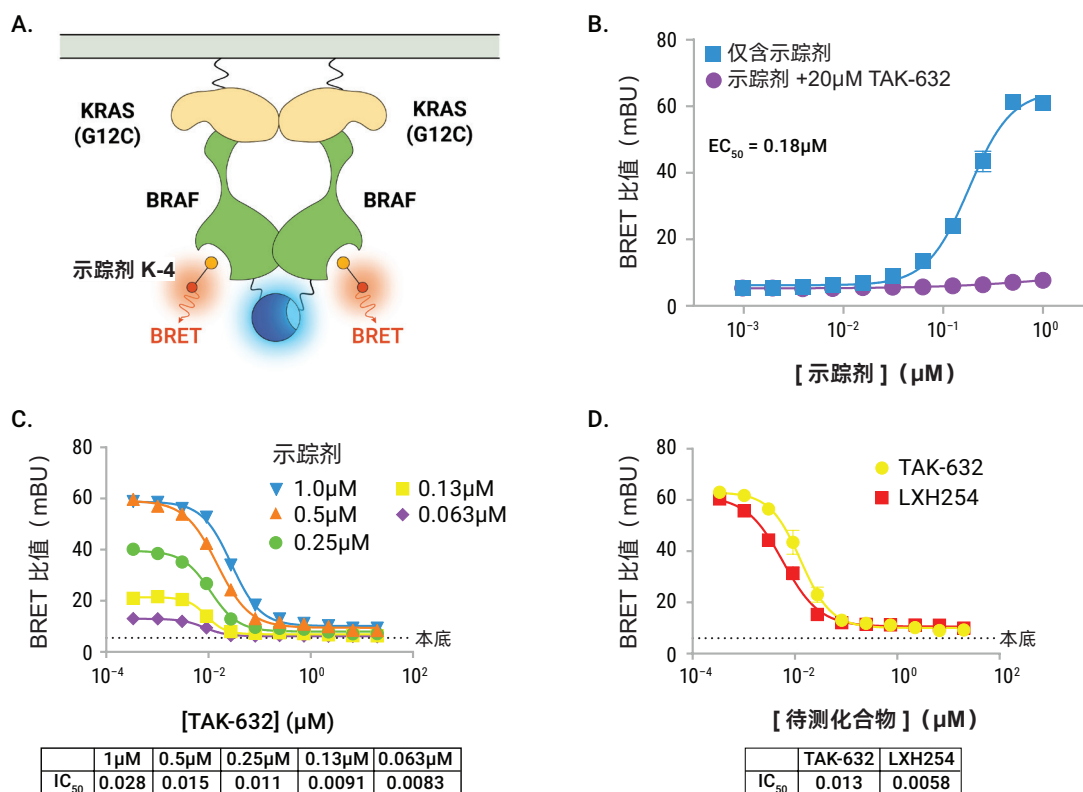


图 7. 使用 NanoBRET™ TE RAF Dimer Assay (BC) 检测 HEK293 细胞中 BRAF 同源二聚体的靶标结合的代表性数据。图 A. NanoBRET™ TE BRAF 同源二聚体检测示意图。用 BRAF-SmBiT (q) Fusion Vector、BRAF-LgBiT Fusion Vector 和 KRAS (G12C) Expression Vector 以 0.25:0.25:9.5 的比例瞬时转染贴壁 HEK293 细胞。将表达 BRAF-SmBiT (q)、BRAF-LgBiT 和 KRAS (G12C) 蛋白的细胞与不同浓度的 NanoBRET™ Tracer K-4 结合。在存在或不存在饱和用量的 TAK-632 (图 B) 或连续稀释的 TAK-632 (图 C) 的情况下培养细胞 2 小时，然后加入 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution，随后使用配备 450/80BP 和 610/LP 滤波器的发光检测仪进行 BRET 测量。BRAF 同源二聚体检测的 NanoBRET™ Tracer K-4 推荐浓度在图 C 中以橙色表示。推荐示踪剂浓度下的化合物特征分析实验的示例请参见图 D。

6. RAF 同源二聚体的代表性数据 (续)

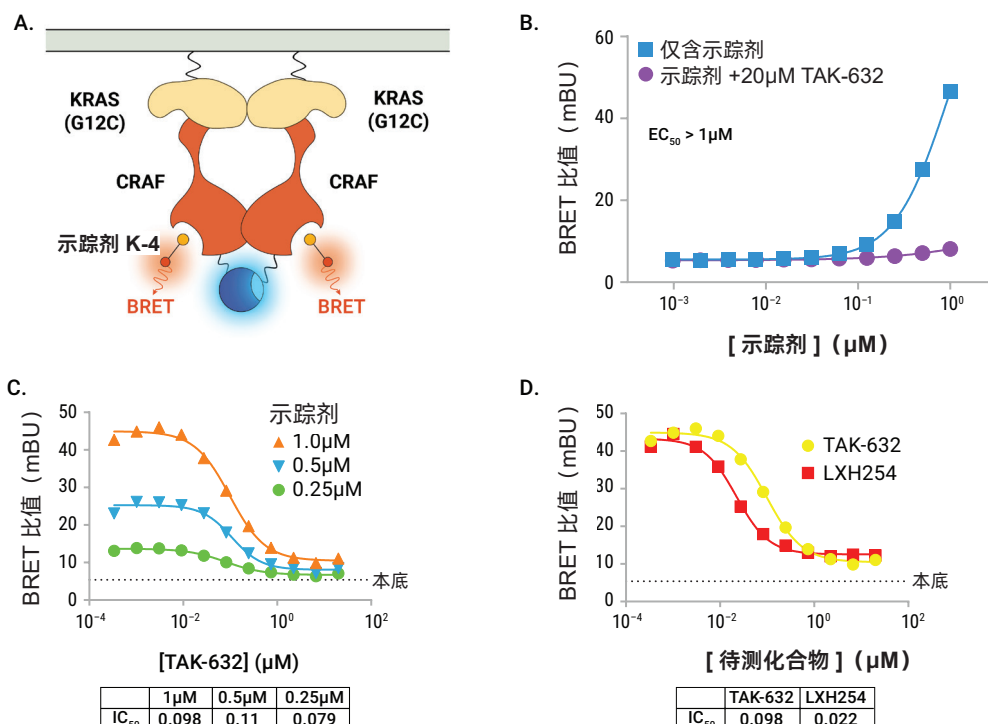


图 8. 使用 NanoBRET™ TE RAF Dimer Assay (BC) 检测 HEK293 细胞中 CRAF 同源二聚体的靶标结合的代表性数据。图 A. NanoBRET™ TE CRAF 同源二聚体检测示意图。用 CRAF-SmBiT (q) Fusion Vector、CRAF-LgBiT Fusion Vector 和 KRAS (G12C) Expression Vector 以 0.25:0.25:9.5 的比例瞬时转染贴壁 HEK293 细胞。将表达 CRAF-SmBiT (q)、CRAF-LgBiT 和 KRAS (G12C) 蛋白的细胞与不同浓度的 NanoBRET™ Tracer K-4 结合。在存在或不存在饱和用量的 TAK-632 (图 B) 或连续稀释的 TAK-632 (图 C) 的情况下培养细胞 2 小时, 然后加入 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution, 随后使用配备 450/80BP 和 610/LP 滤波器的 GloMax® Discover System 进行 BRET 测量。CRAF 同源二聚体检测的 NanoBRET™ Tracer K-4 推荐浓度在图 C 中以橙色表示。推荐示踪剂浓度下的化合物特征分析实验的示例请参见图 D。

7. 不同 RAF 二聚体变体的化合物选择性分析

您可能希望了解待测化合物对特定 RAF 原聚体或 RAF 同源二聚体的亲和力，以及该化合物在其他 RAF 构型的潜在结合情况。NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assays 可以使用相似的工作流程和最多两种不同的 NanoBRET™ 示踪剂来评估多种 RAF 构型的待测化合物选择性。已知 RAF 抑制剂在一组各种 NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assays 上的选择性特征示例请参见图 9。各 RAF 原聚体或 RAF 同源二聚体的代表性数据参见第 5 节和第 6 节。

RAF 二聚体抑制剂 TAK-632 和 LXH254 均能抑制所有 RAF 同源二聚体或异源二聚体的 BRET 信号，效价在纳摩尔范围内。两种化合物均偏好于结合 BRAF，其 RAF 原聚体配偶体不影响这种选择性；同样偏好于结合与 BRAF 配偶时的 CRAF 原聚体。两种化合物均显示与同源二聚体中的 CRAF 以及与 BRAF 配偶的 ARAF 原聚体的结合力相对较弱。

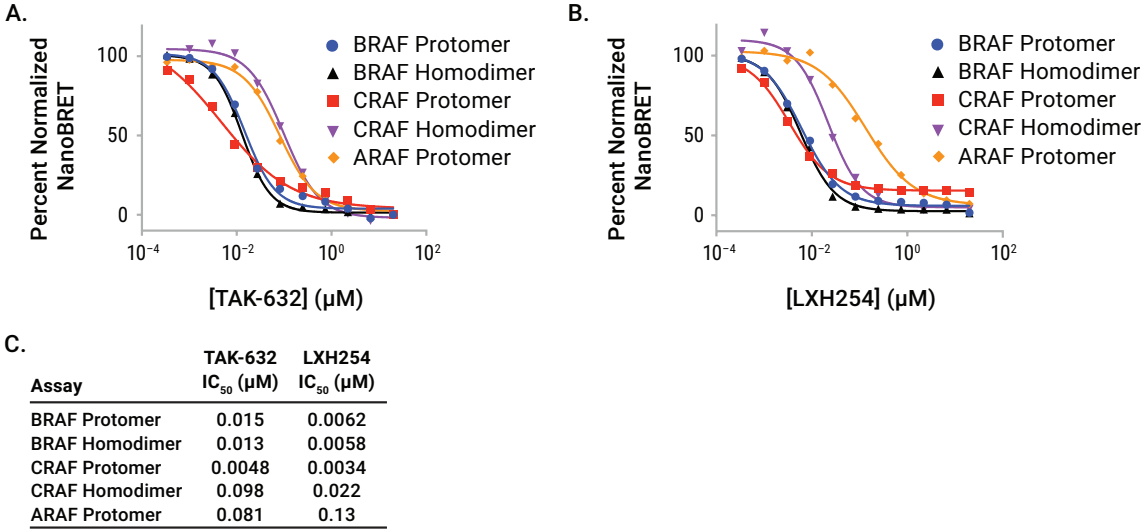


图 9. RAF 配体的选择性特征的示例。用推荐浓度的 NanoBRET™ Tracer K-4 或 K-10 处理表达不同构型 RAF 原聚体或 RAF 同源二聚体的贴壁 HEK293 细胞（参见图 4~ 图 8）。将细胞与连续稀释的 TAK-632（图 A）或 LXH254（图 B）培养 2 小时，然后加入 3X Complete Substrate+Inhibitor，随后使用 GloMax® Discover System 进行 BRET 测量。如第 4.F 节所述，BRET 值在 DMSO 溶媒处理样品的 BRET 值（BRET_{Max}）和与 20μM TAK-632 竞争后的 BRET 值（BRET_{Min}）之间进行归一化。效价值参见图 C。

8. 疑难解答

对于本文中未涉及的问题，请联系当地 Promega 分公司或经销商。
联系方式见：www.promega.com 电子邮箱：chinatechserv@promega.com

问题	原因和参考建议
未添加待测化合物时 NanoBRET™ 信号值较弱或接近仪器本底	示踪剂吸附至塑料器具表面。在制备或使用含 NanoBRET™ Tracer 的试剂时，应使用聚丙烯材料，避免使用传统的聚苯乙烯材料器具，以尽量减少吸附。
	所用微孔板类型有误。推荐使用 96 孔固体全白平底聚苯乙烯经 TC 处理的微孔板（Corning® 目录号：3917 或 Greiner 目录号：655083）。本检测系统可能无法与传统的聚苯乙烯微孔板配合使用。
	制备后 1.5 个小时内未使用 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution。应为每次实验制备新鲜的 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution，并在 1.5 小时内使用溶液；丢弃任何未使用的溶液。
	加入 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution 后，未立即测量 NanoBRET™ 信号。为获得最佳结果，应在加入溶液后 10 分钟内测量 BRET 信号。虽然 BRET 信号可在加入溶液后 2 小时内测量，但会存在一些信号损失。
	仪器设置错误。仪器应使用适用于供体波长（450nm BP）和受体波长（600nm LP）的滤波器，以准确测量 NanoBRET™ 信号。有关更多信息，请参见第 3.B 节。
	由于 HEK293 细胞转染效率低下，RAF-LgBiT 和 RAF-SmBiT(q) 融合蛋白的表达水平不理想。如果怀疑低表达是由于转染效果差造成的，请测量表达融合蛋白的细胞中供体信号，并将其与未转染细胞中的背景供体信号进行比较。如果供体通道中的信背比小于 1000，则制备一批新的 HEK293 细胞，并按照第 4.B 节所述小心重复转染。如果重复转染后信背比仍然较低，则考虑增加 RAF-LgBiT 和 RAF-SmBiT (q) 融合载体与 KRAS (G12C) Expression Vector 的比值，同时保持脂质 :DNA 复合物中的 DNA 总量不变（参见第 4.B 节）。

问题	原因和参考建议
未添加待测化合物时 NanoBRET™ 信号值较弱或接近仪器本底（续）	由于转染效率较低，RAF-LgBiT 和 RAF-SmBiT (q) 融合蛋白在 HEK293 以外的细胞类型中的表达水平较差。如果怀疑转染效果不佳导致表达较低，则测量表达融合蛋白的细胞的供体信号，并将其与未转染细胞中的背景供体信号进行比较。如果供体通道中的信背比小于 1000，则应考虑针对细胞类型优化转染试剂和转染条件。最佳转染试剂和转染条件会因细胞类型的不同而有很大差异。 在除 HEK293 细胞以外的其他细胞类型中，由于 CMV 启动子驱动表达效率低下，RAF-LgBiT 和 RAF-SmBiT(q) 融合蛋白的表达水平较差。CMV 启动子在大多数细胞系中都是强启动子，但并非在所有细胞系都是如此。检查以确保 CMV 启动子在相关细胞类型中能提供足够的表达水平。
添加示踪剂时，供体或受体信号发生变化	此现象较为常见，但一般不会对检测造成影响。图 10 列出了代表数据，具体为滴定 NanoBRET™ 示踪剂时，供体（450nm）和受体（600nm）通道的原始发光信号。RAF-LgBiT 和 RAF-SmBiT (q) 融合蛋白与荧光示踪剂之间发生的 BRET 可能会导致受体信号的增加与供体信号的减少呈剂量依赖性关系。比率 BRET 分析法可减少活性荧光素酶原始发光信号波动的影响。
NanoBRET™ 信号的高变异性	细胞处理对检测结果的重现性至关重要。为降低变异性，应确保第 4.B 节中转染的 HEK293 细胞刚进行传代（1~2 天内），且达到 70~90% 的融合率。在第 4.B 节中，使用 HEK293 细胞的单细胞悬液进行转染。 在第 4.C 节中，制备 Complete 20X NanoBRET™ 示踪剂时，移液不准确。Tracer Dilution Buffer 具有粘性，难以准确移取。确保缓慢移取 Tracer Dilution Buffer 和 Complete 20X NanoBRET™ 示踪剂，以确保分装适当体积。

8. 疑难解答(续)

问题	原因和参考建议
NanoBRET™ 信号的高变异性 (续)	溶液未充分混匀, 尤其是在第 4.C 节中制备和添加 Complete 20X NanoBRET™ Tracer 时未充分混匀。Tracer Dilution Buffer 具有粘性, 因此难以实现完全混匀。向细胞中加入 Complete 20X NanoBRET™ Tracer 后, 目视检查检测孔, 以确保孔内容物均匀。如有必要, 可再进行混合。
	由于 RAF-LgBiT 和 RAF-SmBiT (q) 融合蛋白的表达不佳, 供体发光信号较低。由于供体通道和受体通道的信背比降低, 可能导致 BRET 数据产生噪声。
	待测化合物具有细胞毒性。导致细胞裂解的细胞毒性化合物通常表现出 BRET 信号的人为增加 (图 11)。这是由于 Extracellular NanoLuc® Inhibitor 对发光信号的猝灭作用所致, 可能导致 BRET 比值的净增加。在导致 BRET 比值升高的浓度下, 对待测化合物的细胞毒性效应进行评估。
添加待测化合物后 NanoBRET™ 信号增强	待测化合物是有色或荧光化合物。由于 BRET 信号受到干扰, 使用 NanoBRET™ TE Intracellular RAF Protomer and RAF Homodimer Assays 难以对这种性质的化合物进行表征。
本底信号较高	3X Complete Substrate+Inhibitor Solution 不含 Extracellular NanoLuc® Inhibitor。Extracellular NanoLuc® Inhibitor 可减轻处理过程中受损细胞释放的 NanoBiT® 萤光素酶产生的信号。在不存在该抑制剂的情况下测量的 BRET 信号包括细胞内和细胞外 NanoBiT® 萤光素酶的发光信号, 导致本底信号较高。

说明在正常进行检测期间对原始供体或受体信号可能产生的影响的示例数据参见图 10。说明细胞毒性化合物对 BRET 可能产生的影响的示例数据参见图 11。

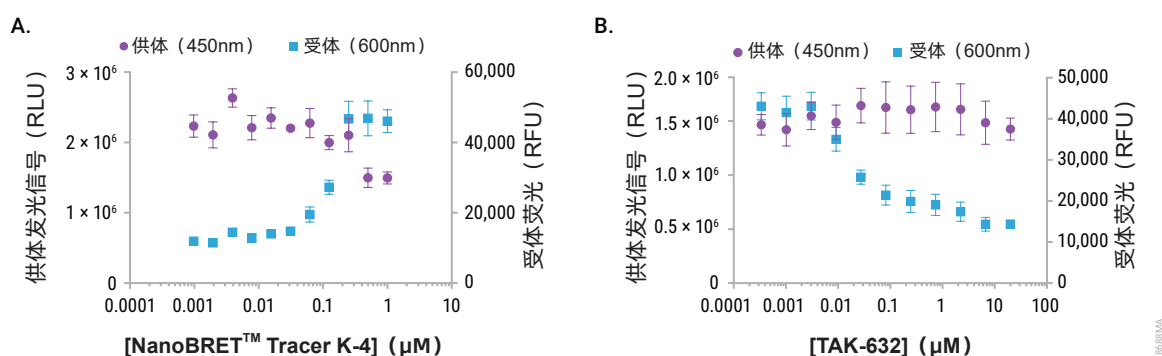


图 10. 示踪剂和待测化合物浓度对 NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assay 中原始供体或受体发射信号的潜在影响。将表达 BRAF-SmBiT (q)、CRAF (A373F)-LgBiT 和 KRAS (G12C) 的 HEK293 细胞重悬于检测培养基中，并接种至 96 孔板中。**图 A.** 将细胞与不同浓度 (0.0001~1μM) 的 NanoBRET™ Tracer K-4 培养 2 小时，加入 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution，随后使用 GloMax® Discover System 进行 BRET 测量。**图 B.** 在存在 0.5μM NanoBRET™ Tracer K-4 和 TAK-632 连续稀释液 (0.0003~20μM) 的条件下培养细胞 2 小时，加入 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution，随后使用 GloMax® Discover System 进行 BRET 测量。

8. 疑难解答(续)

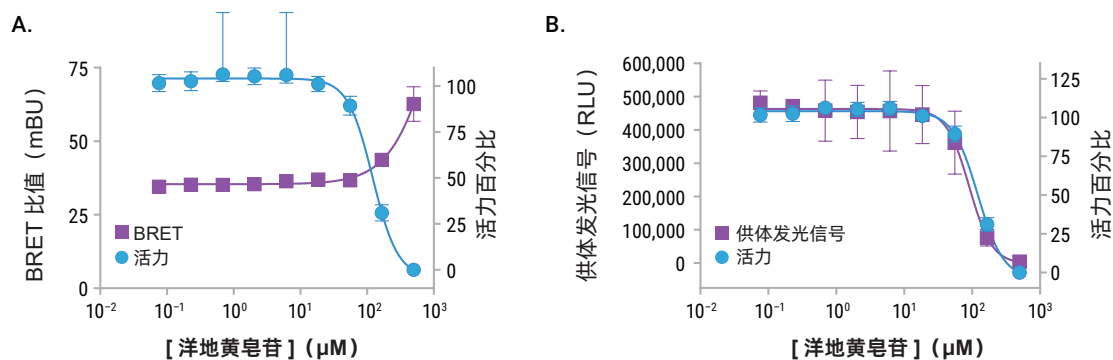


图 11. 细胞毒性化合物对 NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assay 中 BRET 信号和供体发光信号的影响。用洋地黄皂苷（一种能破坏膜完整性的急性细胞毒性化合物）处理表达 BRAF-SmBiT (q)、CRAF (A373F)-LgBiT 和 KRAS (G12C) 的贴壁 HEK293 细胞。在进行 BRET 和供体发光信号测量时，加入 NanoBRET™ Tracer K-4 至最终浓度 0.5μM，并加入洋地黄皂苷三倍连续稀释液（0.076~500μM）。将细胞培养 2 小时，加入 3X Complete Substrate+Inhibitor Solution，随后使用 GloMax® Discover System 进行 BRET 测量。在进行细胞活力测定时，使用相同的洋地黄皂苷连续稀释液处理未转染 HEK293 细胞 2 小时，然后使用 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay 和 GloMax® Discover System 测量细胞活力。图 A. 洋地黄皂苷在降低细胞活力的相同浓度范围内，可导致 BRET 信号明显增加。图 B. 由于 Extracellular NanoLuc® Inhibitor 淬灭活性荧光素酶，洋地黄皂苷处理导致的细胞裂解会使供体发光信号减少。

9. 附录

9.A. 有关 NanoBRET™ Technology 和 NanoBiT® Fusion Protein 的其他信息

NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assays 的供体发光信号由 LgBiT 亚基和 SmBiT (q) 肽互补形成的功能性荧光素酶产生。这些亚基的相互作用产生功能性活性荧光素酶，其发光特性与完整 NanoLuc® 荧光素酶的发光特性相似。NanoBRET™ TE Intracellular RAF Dimer Assays 使用蓝移活性荧光素酶作为 BRET 供体，使用红移荧光示踪剂作为 BRET 受体，以尽量减少光谱重叠，从而获得更高的信背比。

当 SmBiT (q) 肽用于互补 LgBiT 亚基时，所产生的活性荧光素酶对 Extracellular NanoLuc® Inhibitor 的抑制敏感，可缓解来自细胞外碎片的任何 NanoBRET™ 信号，并确保对细胞内靶标结合进行准确评估。虽然 SmBiT (q) 肽对 Extracellular NanoLuc® Inhibitor 具有敏感性，并能够进行真正的活细胞 RAF 检测，但 SmBiT (q) 尚未像传统的 SmBiT 肽一样广泛用于测量蛋白：蛋白相互作用的检测中，因此不建议将其作为 SmBiT 肽的一般替代品。

9.B. 实现充分的检测板混合

由于 Tracer Dilution Buffer 具有粘性，在制备 Complete 20X NanoBRET™ Tracer Reagent 和将 Complete 20X NanoBRET™ Tracer Reagent 加入检测板时，必须特别注意检测板的混合，以确保 NanoBRET™ Tracer 充分分散。如需保证足够的漩涡混合强度，则混合器的运行轨道直径应小于每孔内径。虽然大多数市售定轨振荡器可分散 96 孔板的示踪剂，但还需对振荡力度进行优化（一般通过目视检查）。如果您想尝试以 384 孔检测模式进行检测，建议使用能在 384 孔板的孔中进行涡旋混合的特定混合设备。我们在水平振荡器使用方面具备相关经验，例如 Union Scientific 公司的 VibraTranslator™ 系列产品。请咨询混合仪器制造商，以确定所用孔板混合器是否适用于涉及粘性试剂的 384 孔应用场景。

9.C. NanoBRET™ Tracer 的消光系数

NanoBRET™ Tracer K-4 和 NanoBRET™ Tracer K-10 使用 NanoBRET™ 590 荧光团。在 590nm 波长处使用 83000M-1cm-1 的消光系数测定 NanoBRET™ Tracers K-4 和 K-10 的浓度。有关更多信息，请参见参考文献 4。

9.D. 缓冲液和溶液组成

检测培养基

- 99% Opti-MEM™ I 低血清培养基（不含酚红）
- 1% 胎牛血清

细胞培养基

- 90% DMEM
- 10% 胎牛血清

9.E. 参考文献

1. Robers, M.B. *et al.* (2015) Target engagement and drug residence time can be observed in living cells with BRET. *Nat. Commun.* **6**, 10091.
2. Hu, J. *et al.* (2011) Mutation that blocks ATP binding creates a pseudokinase stabilizing the scaffolding function of kinase suppressor of RAS, CRAF and BRAF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 6067–72.
3. Robers, M.B. *et al.* (2019) Quantitative, real-time measurements of intracellular target engagement using energy transfer. In: *Systems Chemical Biology. Methods in Molecular Biology*, Ziegler, S., Waldmann, H. eds. Humana Press, New York, NY. **1888**, 45–71.
4. In: *Anthropological Genetics: Theory, Methods and Applications* (2006). Crawford, M.H. ed. University of Cambridge Press. Chapter **10**, Table 10.1.

9.F. 相关产品

NanoBRET™ TE RAF Fusion and Expression Vectors

产品	规格	目录号
ARAF-SmBiT (q) Fusion Vector	20µg	NV4861
BRAF-SmBiT (q) Fusion Vector	20µg	NV4871
BRAF-LgBiT Fusion Vector	20µg	NV4881
CRAF-SmBiT (q) Fusion Vector	20µg	NV4891
CRAF-LgBiT Fusion Vector	20µg	NV4901
BRAF (A481F)-LgBiT Fusion Vector	20µg	NV4911
BRAF (A481F)-SmBiT (q) Fusion Vector	20µg	NV4921
CRAF (A373F)-LgBiT Fusion Vector	20µg	NV4931
KRAS (G12C) Expression Vector	20µg	NV4941

NanoBRET™ Tracers

产品	规格	目录号
NanoBRET™ Tracer K-4, 400µM	300µl	N2492
NanoBRET™ Tracer K-10, 400µM	300µl	N2642

NanoBRET™ Target Engagement Assay Reagent

产品	规格	目录号
Tracer Dilution Buffer	50ml	N2191

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

有其他规格可供选择。

Intracellular TE Nano-Glo® Substrate/Inhibitors

产品	规格	目录号
Intracellular TE Nano-Glo® Substrate/Inhibitor	100 assays	N2162
Intracellular TE Nano-Glo® Vivazine™/Inhibitor	1000 assays	N2200

有其他规格可供选择。

Transfection Reagent

产品	规格	目录号
FuGENE® HD Transfection Reagent	1ml	E2311

有其他规格可供选择。

Detection Instrument

产品	规格	目录号
GloMax® Discover System	1 each	GM3000

仅供研究使用。不得用于诊断程序。

^(a) NanoBRET™ TE LAR 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 commercial use 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 product. No other use or transfer of this product is authorized without the prior express written consent of Promega.

For uses of this product intended for energy transfer (such as bioluminescence resonance energy transfer) to acceptors other than genetically encoded autofluorescent protein, researcher must:

- (a) use NanoBRET™-branded energy acceptors (e.g., NanoBRET™ tracers, NanoBRET™ dyes, BRET-optimized HaloTag® ligands) for all determinations of energy transfer activity;
- (b) contact Promega to obtain a license for use of the product for energy transfer assays using energy acceptors not manufactured by Promega.

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 MERCHANT-ABILITY 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) NanoBRET™ TE Tracers V2 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 commercial use 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 product. No other use or transfer of this product is authorized without the prior express written consent of Promega.

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

- (a) use NanoLuc®-branded luciferase or derivatives, or subunits of the NanoBiT® technology for all energy transfer determinations conducted with this product; and
- (b) 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; or
- (c) contact Promega to obtain a license for use of the product with LARs not listed above or manufactured by Promega.

In addition, researcher must:

Contact Promega to obtain a license for use of the product in assays not involving bioluminescence resonance energy transfer (BRET).

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 MERCHANT-ABILITY 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.

^(c) NanoBiT[®] 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.

^(d) U.S. Pat. Nos. 9,797,889, 9,797,890 and 10,648,971, Japanese Pat. Nos. 6654557 and 7280842 and other patents and patents pending.

^(e) U.S. Pat. No. 8,809,529 and other patents and patents pending.

^(f) U.S. Pat. Nos. 10,067,149 and 10,024,862 and other patents and patents pending.

^(g) Patent Pending.

©2023 Promega Corporation. All Rights Reserved.

GloMax, NanoBiT, Nano-Glo and NanoLuc are registered trademarks of Promega Corporation. NanoBRET and Vivazine are trademarks of Promega Corporation.

CLARIOstar is a registered trademark of BMG Labtech. Corning is a registered trademark of Corning, Inc. Envision is a registered trademark of PerkinElmer, Inc. FuGENE is a registered trademark of Fugent, L.L.C., USA. Opti-MEM is a trademark and Varioskan is a registered trademark of Thermo Fisher Scientific. VibraTranslator is a registered trademark of Union Scientific Corp.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information. All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.