

中文说明书

Lumit[®] Immunoassay Cellular Systems

适用产品目录号：

W1220, W1201, W1202, W1203, W1231,
W1232, W1233, W1331, W1332 和 W1333



Lumit[®] Immunoassay Cellular Systems

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	7
3. 一般注意事项	12
4. Lumit [®] Immunoassay Cellular System 的准备工作	14
4.A. 为 Lumit [®] Immunoassay Cellular System 准备细胞	15
4.B. 为 Lumit [®] Immunoassay Cellular System 准备试剂	16
5. Lumit [®] Immunoassay Cellular System 操作步骤.....	18
6. 建立针对新靶标的 Lumit [®] Immunoassay 指南	18
6.A. 一抗的选择	18
6.B. 选择裂解溶液	18
6.C. 棋盘格实验中最佳一抗对的选择.....	20
7. 用于高通量筛选的 Lumit [®] ICS 微型化指南	24
7.A. 缩减试剂，以便在 384 孔或 1536 孔格式中使用	24
7.B. 稀释 Lumit [®] C 底物以提高稳定性	25
8. 参考文献.....	27
9. 相关产品.....	27
10. 变更总结.....	28

1. 产品描述

Lumit[®] Immunoassay Cellular System^(b,c) 是一种均质型生物发光检测方法，当其与合适的一抗对结合使用时，可用于测定细胞裂解物中靶蛋白的水平。该系统将免疫检测和 NanoLuc[®] Binary Technology (NanoBiT[®]) 相结合。NanoBiT[®] 是一种结构互补性报告基因系统，非常适合研究蛋白：蛋白相互作用 (PPI)。NanoBiT[®] System 由两个亚基组成：Large BiT (LgBiT; 18kDa) 和 Small BiT (SmBiT; 11 个氨基酸肽)，其可表达为重组融合蛋白或化学偶联至目的蛋白上。因亲和力弱 (K_D : 190 μ M)，LgBiT 和 SmBiT 亚基经过优化后拥有良好的稳定性和最小的自发缔合。当两种蛋白质（一种由 LgBiT 标记，另一种由 SmBiT 标记）相互作用时，这两个亚基会相互靠近并形成一种有功能的酶，该酶在底物 (furimazine) 存在时可产生发光信号 (1)。

在 Lumit[®] Immunoassay Cellular System (Lumit[®] ICS) 中，NanoBiT[®] 的两个亚基与针对两个不同物种（抗兔，抗小鼠；抗山羊抗体可单独购买）的一对二抗偶联。使用与 NanoBiT[®] 兼容的裂解液 (Digitonin【洋地黄皂苷】或 Lumit[®] Lysis Buffer II, 10X) 在多孔板上裂解接种的细胞，并通过添加包含两种抗靶蛋白的一抗以及偶联了 SmBiT 和 LgBiT 的二抗（例如，Lumit[®] Anti-Mouse Ab-LgBiT 和 Lumit[®] Anti-Rabbit Ab-SmBiT）的抗体混合物检测靶蛋白。一抗 / Lumit[®] 二抗复合物与其相应表位的结合可使两个 NanoBiT[®] 亚基相互靠近，从而形成可产生发光的有活性的 NanoLuc[®] 萤光素酶，发光信号与靶蛋白量成正比（图 1）。当一抗对中包含磷酸特异性抗体时，发光信号反映的是靶蛋白的磷酸化水平（图 1A）。另一方面，当检测总蛋白水平时应用的原理与上面所述一致，不同之处在于两种一抗识别的均是靶蛋白上的非磷酸化表位（图 1A）。如图 2 所示，使用发光检测仪测定产生的发光信号。

Lumit[®] Immunoassay Cellular System 是基于溶液的系统，与标准免疫检测技术（如 ELISA 或 Western blot）不同之处在于其检测过程不包括洗涤、液体转移或固定等步骤。因此，细胞裂解、抗体结合以及发光信号的产生均于同一孔中进行（图 1B）。该检测采用均质的“添加和读取”模式，只需不到 2 个小时即可完成。这种方法的一个主要优点是它不要求使用细胞工程实验技术。因此，可以在表达靶蛋白的任何细胞类型中，在天然水平检测细胞内蛋白的磷酸化或总蛋白量 (2)。

此外，如果有合适的一抗（来源于小鼠、兔或山羊），Lumit[®] 系列的二抗能够灵活用于检测任何目标蛋白。该检测方法可在单个孔板内完成，无需移除培养基或转移裂解液至新的孔板。其均质检测模式无需洗涤步骤，相较于传统的 Western 印迹法、ELISA 或荧光检测法，实验流程更加快捷。此检测方法仅需少量细胞样本，并且对于磷酸化蛋白的检测无需进行免疫沉淀步骤。检测仅需一台发光检测仪，即可在 96 孔、384 孔乃至 1536 孔板上进行。有文献报道该方法的 Z' 因子大于 0.7 (3)。

针对许多常见细胞靶标的额外实验方案也已提供，您可查阅相关应用说明获取更多信息：

<http://www.promega.com/products/immunoassay-elisa/lumit-immunoassays/lumit-immunoassay-cellular-systems/>

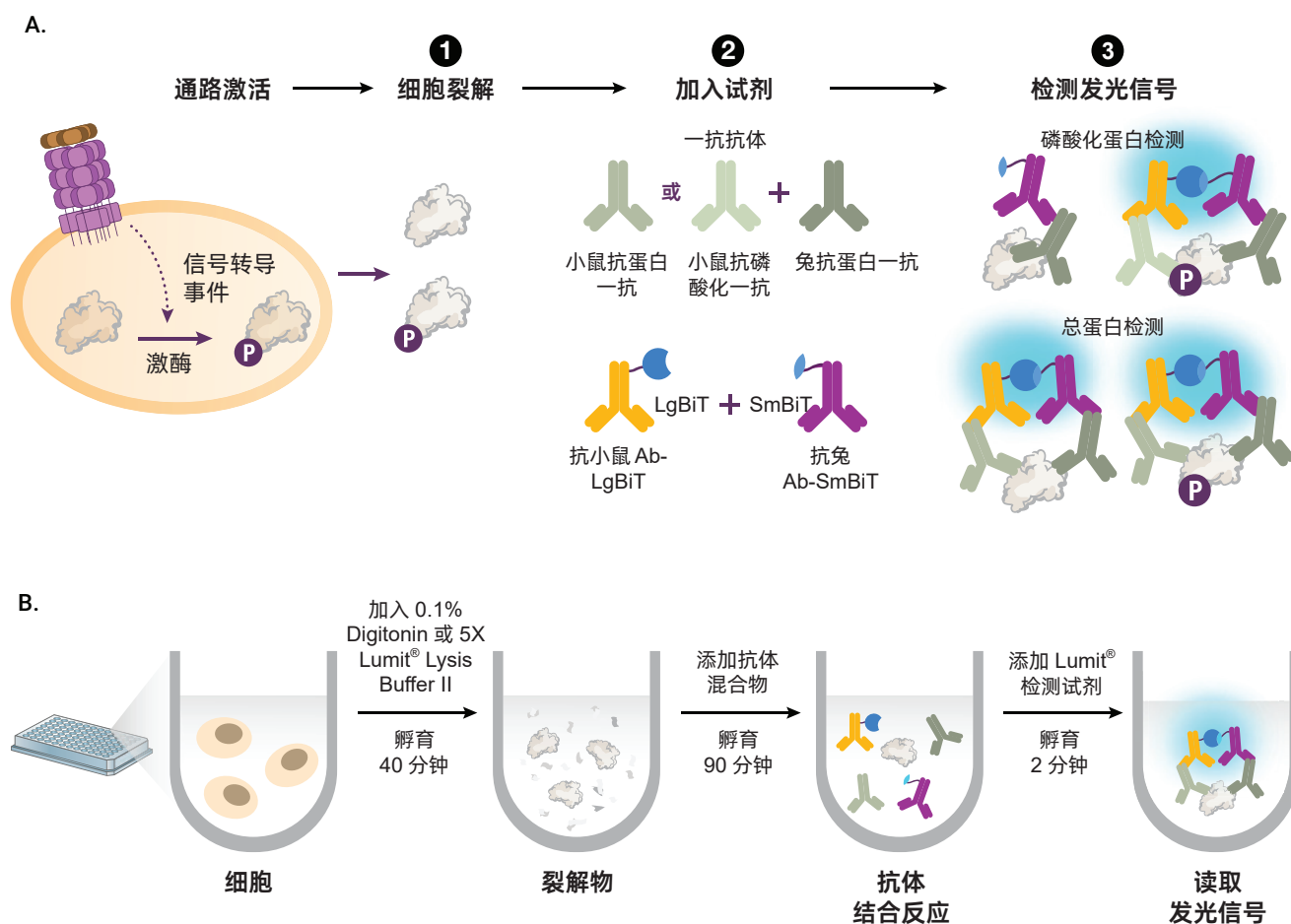


图 1. Lumit® Immunoassay Cellular System 原理。 **A.** 每对一抗均对刺激后裂解细胞中的磷酸化靶蛋白或总靶蛋白进行识别。然后 Lumit® 二抗识别其同源一抗，从而使两个 NanoBiT® 亚基彼此靠近，形成可产生明亮发光信号的功能性酶。**B.** Lumit® Immunoassay 是一种终点法均质型检测；细胞裂解、抗体与靶标的结合以及发光信号的产生均在溶液中进行，无需进行移液或洗涤步骤。

1. 产品描述 (续)

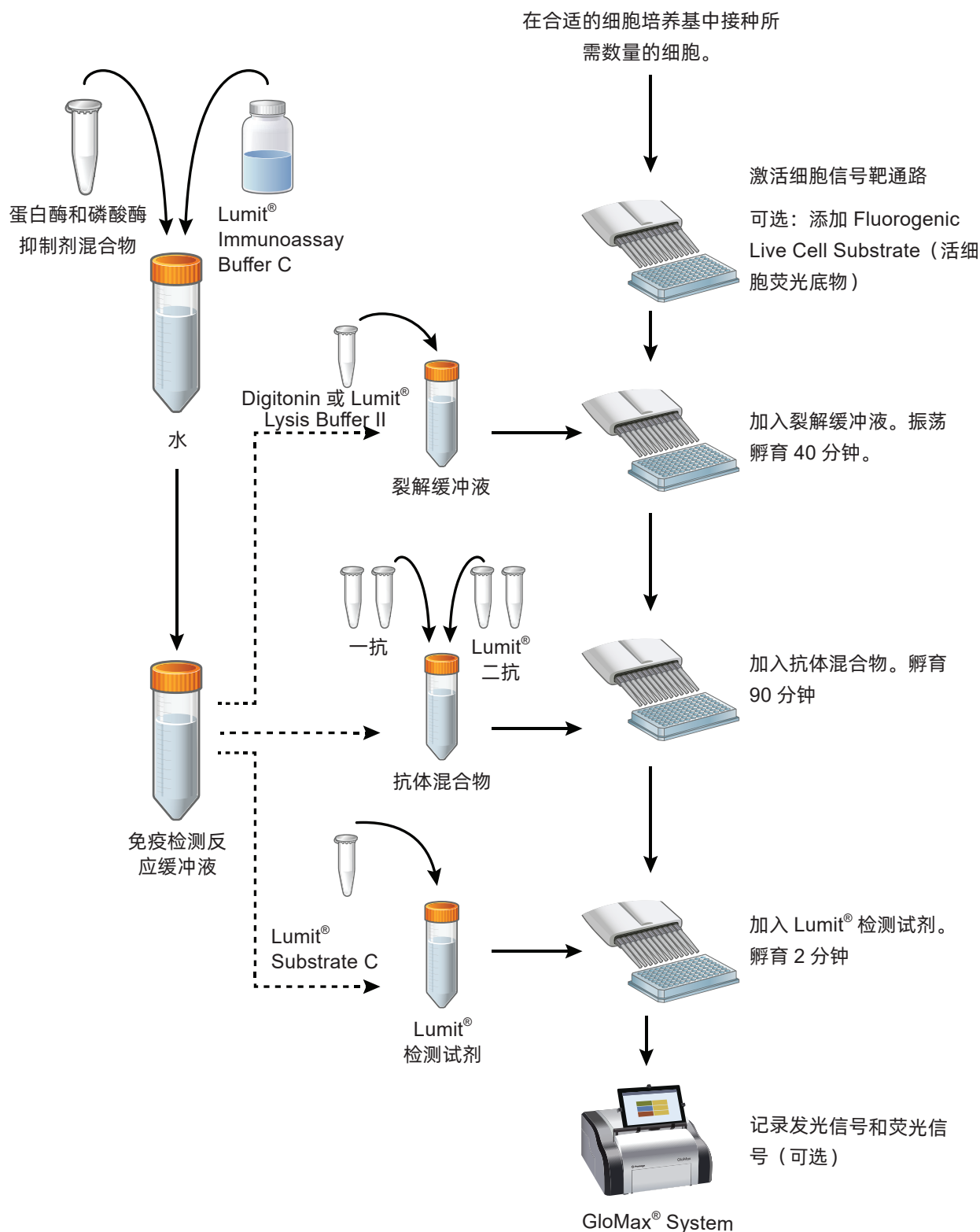


图 2. Lumit® Immunoassay Cellular System 操作流程。裂解缓冲液是指用 Digitonin 或 Lumit® Lysis Buffer II 制备的裂解试剂。

信号通路激活可引起多种细胞应答，包括酶活性调节、基因表达和蛋白质易位或降解。可逆性的蛋白磷酸化是一种将上游激活事件信号转导至下游细胞应答的常见机制。The Lumit[®] Immunoassay Cellular System 适用于任何信号通路标志蛋白或磷酸蛋白，只要可获得针对这些蛋白的相应物种的一抗（2）。图 3 是使用 NF- κ B 通路调控的两种标志物进行检测的示例。

注意：

- a. 目前可提供以下 Lumit[®] 二抗：抗兔、抗小鼠和抗山羊二抗。因此，Lumit[®] Immunoassay Cellular System 可与小鼠 / 兔、小鼠 / 山羊或兔 / 山羊的靶标特异性一抗对结合使用。
-  b. 来自相同物种（例如，小鼠 / 小鼠）的一抗抗体对与 Lumit[®] Immunoassay Cellular System 不兼容。
- c. Lumit[®] Immunoassay Cellular System 的性能可能会受到一抗与目标蛋白亲和力的影响，以及所使用的细胞裂解液和 Lumit[®] 二抗试剂盒的影响。例如，在测试兔 / 鼠抗体对时，我们建议使用 Lumit[®] Immunoassay Cellular System-Starter Kit（目录号：W1220），因为它包含了 SmBiT 和 LgBiT 偶联的两种二抗组合，以及两种裂解试剂。这个试剂盒有助于您确定最适合您的目标蛋白的裂解液和 Lumit[®] 二抗组合。
- d. 由于某些去垢剂会干扰 NanoBiT[®] 互补作用（例如 RIPA），因此它们与 Lumit[®] Immunoassay Cellular System 不兼容。基于这一原因，我们推荐使用 Digitonin 或者试剂盒中提供的 Lumit[®] Lysis Buffer II, 10X。

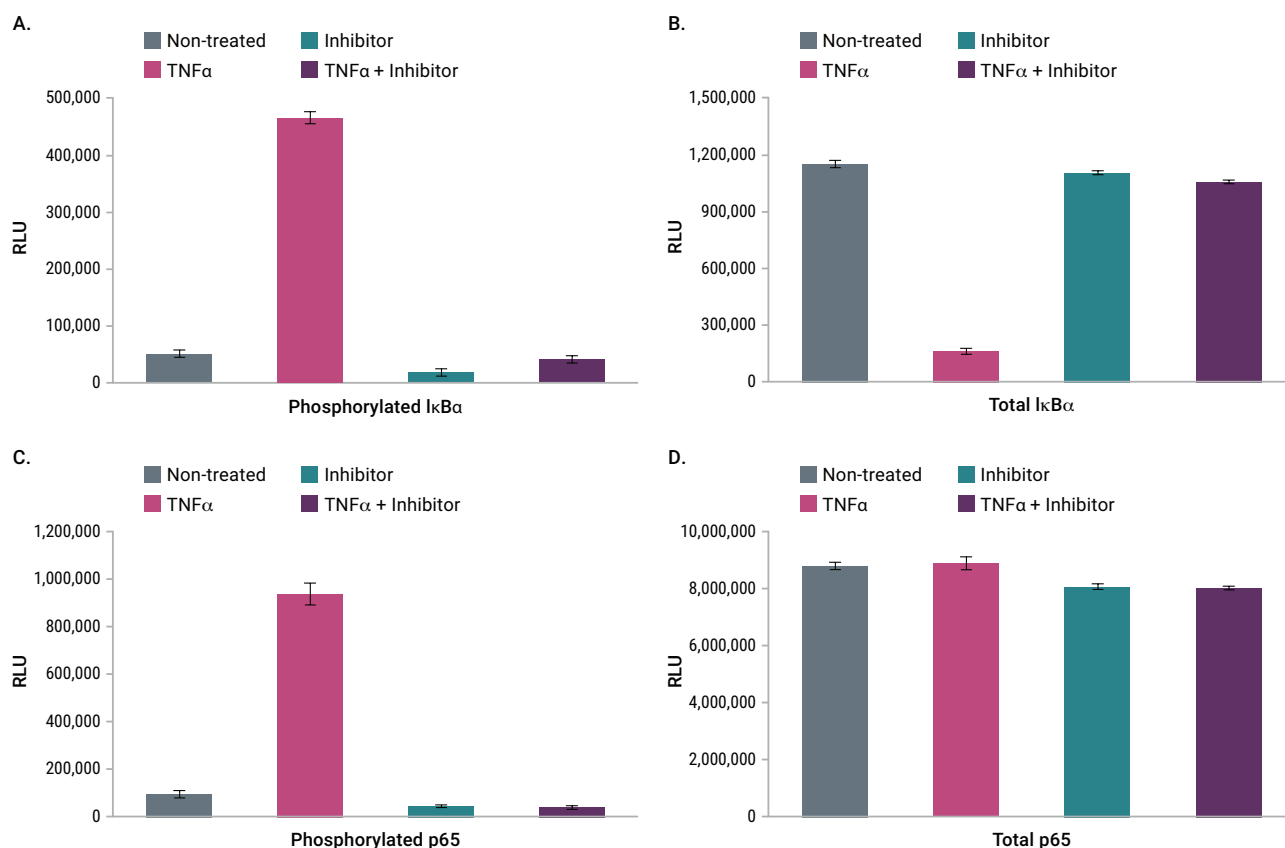


图 3. 用 Lumit[®] Immunoassay Cellular System 检测 NF-κB 信号通路中的总靶蛋白和磷酸化靶蛋白。使用 IKK 复合物特异性抑制剂 IKK16 (10μM, 1 小时) 对接种的 MCF-7 细胞 (50,000) 进行预处理, 然后使用 TNFα (20ng/ml) 处理 30 分钟 (IκBα) 或 10 分钟 (p65)。**A.** 使用 MG132 (20μM, 1 小时) 对细胞进行预处理, 然后用 Lumit[®] Immunoassay 以及 150ng / ml 的下列抗体检测磷酸化 IκBα (S32): 小鼠抗 IκBα (Cell Signaling Technology, 目录号: 4814) 和兔抗磷酸化 IκBα (Cell Signaling Technology, 目录号: 2859)。**B.** 使用 150ng / ml 的下列抗体测量总 IκBα 水平: 小鼠抗 IκBα (Cell Signaling Technology, 目录号: 4814) 和兔抗 IκBα (Cell Signaling Technology, 目录号: 4812)。**C.** 使用 150ng / ml 的下列抗体测量磷酸化 p65 (S536) 水平: 小鼠抗磷酸化 p65 (Cell Signaling Technology, 目录号: 13346), 兔抗 p65 (Cell Signaling Technology, 目录号: 8242)。**D.** 使用 Lumit[®] Immunoassay 和 150ng / ml 的下列抗体测量总 p65 水平: 兔抗 p65 (Cell Signaling Technology, 目录号: 8242), 小鼠抗 p65 (Cell Signaling Technology, 目录号: 6956)。

2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
Lumit [®] Immunoassay Cellular System - Starter Kit	200 assays	W1220

如果每次检测分别使用 50µl、50µl 和 25µl 的细胞裂解物、抗体混合物和检测试剂并在 96 孔板中进行，则此系统足够进行 200 次检测（包括使用 Anti-Mouse Ab-LgBiT / Anti-Rabbit Ab-SmBiT 组合进行 100 次检测和使用 Anti-Mouse Ab-SmBiT / Anti-Rabbit Ab-LgBiT 组合进行 100 次检测）。在 384 孔板中按照 12.5µl: 12.5µl: 6.25µl 的比例进行测定时，该系统可进行 800 次检测。表 1 列出的是针对各种孔板模式的体积比。包括：

- 2×50µl Digitonin, 2%
- 2×500µl Lumit[®] Lysis Buffer II, 10X
- 2×1.5ml Lumit[®] Immunoassay Buffer C, 10X
- 2×200µl Lumit[®] Substrate C
- 30µl Lumit[®] Anti-Mouse Ab-LgBiT
- 30µl Lumit[®] Anti-Rabbit Ab-SmBiT
- 30µl Lumit[®] Anti-Mouse Ab-SmBiT
- 30µl Lumit[®] Anti-Rabbit Ab-LgBiT
- 1ml Antibody Dilution Buffer
- 10µl Fluorogenic Live Cell Substrate (GF-AFC Substrate), 100mM

产品	规格	目录号
Lumit [®] Immunoassay Cellular System - Set 1	100 assays	W1201

如果每次检测分别使用 50µl、50µl 和 25µl 的细胞裂解物、抗体混合物和检测试剂并在 96 孔板中进行，那么此系统足够进行 100 次检测。在 384 孔板中按照 12.5µl: 12.5µl: 6.25µl 的比例进行测定时，该系统可进行 400 次检测。表 1 列出的是针对各种孔板模式的体积比。包括：

- 50µl Digitonin, 2%
- 500µl Lumit[®] Lysis Buffer II, 10X
- 1.5ml Lumit[®] Immunoassay Buffer C, 10X
- 200µl Lumit[®] Substrate C
- 30µl Lumit[®] Anti-Mouse Ab-LgBiT
- 30µl Lumit[®] Anti-Rabbit Ab-SmBiT
- 1µl Antibody Dilution Buffer
- 10µl Fluorogenic Live Cell Substrate (GF-AFC Substrate), 100mM

产品	规格	目录号
Lumit [®] Immunoassay Cellular System - Set 1	1,000 assays	W1202

如果每次检测分别使用 50µl、50µl 和 25µl 的细胞裂解物、抗体混合物和检测试剂并在 96 孔板中进行，那么此系统足够进行 1000 次检测。在 384 孔板中按照 12.5µl: 12.5µl: 6.25µl 的比例进行测定时，该系统可进行 4000 次检测。表 1 列出的是针对各种孔板模式的体积比。包括：

- 500µl Digitonin, 2%
- 5ml Lumit[®] Lysis Buffer II, 10X
- 15ml Lumit[®] Immunoassay Buffer C, 10X
- 2×1ml Lumit[®] Substrate C
- 300µl Lumit[®] Anti-Mouse Ab-LgBiT
- 300µl Lumit[®] Anti-Rabbit Ab-SmBiT
- 1ml Antibody Dilution Buffer
- 2×10µl Fluorogenic Live Cell Substrate (GF-AFC Substrate), 100mM

产品	规格	目录号
Lumit [®] Immunoassay Cellular System - Set 1	10,000 assays	W1203

如果每次检测分别使用 50µl、50µl 和 25µl 的细胞裂解物、抗体混合物和检测试剂并在 96 孔板中进行，那么此系统足够进行 10000 次检测。在 384 孔板中按照 12.5µl: 12.5µl: 6.25µl 的比例进行测定时，该系统可进行 40000 次检测。表 1 列出的是针对各种孔板模式的体积比。**注意：**W1203 相当于 10 × W1202。包括：

- 10×500µl Digitonin, 2%
- 10×5ml Lumit[®] Lysis Buffer II, 10X
- 10×15ml Lumit[®] Immunoassay Buffer C, 10X
- 20×1ml Lumit[®] Substrate C
- 10×300µl Lumit[®] Anti-Mouse Ab-LgBiT
- 10×300µl Lumit[®] Anti-Rabbit Ab-SmBiT
- 10×1ml Antibody Dilution Buffer
- 20×10µl Fluorogenic Live Cell Substrate (GF-AFC Substrate), 100mM

产品	规格	目录号
Lumit [®] Immunoassay Cellular System - Set 2	100 assays	W1331

如果每次检测分别使用 50µl、50µl 和 25µl 的细胞裂解物、抗体混合物和检测试剂并在 96 孔板中进行，那么此系统足够进行 100 次检测。在 384 孔板中按照 12.5µl: 12.5µl: 6.25µl 的比例进行测定时，该系统可进行 400 次检测。表 1 列出的是针对各种孔板模式的体积比。**注意：**W1331 为 W1231、W1041 和 W1051 的组合。包括：

- 50µl Digitonin, 2%
- 500µl Lumit[®] Lysis Buffer II, 10X
- 1.5ml Lumit[®] Immunoassay Buffer C, 10X
- 200µl Lumit[®] Substrate C
- 30µl Lumit[®] Anti-Mouse Ab-SmBiT
- 30µl Lumit[®] Anti-Rabbit Ab-LgBiT
- 1ml Antibody Dilution Buffer
- 10µl Fluorogenic Live Cell Substrate (GF-AFC Substrate), 100mM

产品	规格	目录号
Lumit [®] Immunoassay Cellular System - Set 2	1,000 assays	W1332

如果每次检测分别使用 50μl、50μl 和 25μl 的细胞裂解物、抗体混合物和检测试剂并在 96 孔板中进行，那么此系统足够进行 1000 次检测。在 384 孔板中按照 12.5μl: 12.5μl: 6.25μl 比例进行测定时，该系统可进行 4000 次检测。表 1 列出的是针对各种孔板模式的体积比。**注意：**W1332 为 W1232、W1042 和 W1052 的组合。包括：

- 500μl Digitonin, 2%
- 5ml Lumit[®] Lysis Buffer II, 10X
- 15ml Lumit[®] Immunoassay Buffer C, 10X
- 2×1ml Lumit[®] Substrate C
- 300μl Lumit[®] Anti-Mouse Ab-SmBiT
- 300μl Lumit[®] Anti-Rabbit Ab-LgBiT
- 1ml Antibody Dilution Buffer
- 2×10μl Fluorogenic Live Cell Substrate (GF-AFC Substrate), 100mM

产品	规格	目录号
Lumit [®] Immunoassay Cellular System - Set 2	10,000 assays	W1333

如果每次检测分别使用 50μl、50μl 和 25μl 的细胞裂解物、抗体混合物和检测试剂并在 96 孔板中进行，那么此系统足够进行 10000 次检测。在 384 孔板中按照 12.5μl: 12.5μl: 6.25μl 比例进行测定时，该系统可进行 40000 次检测。表 1 列出的是针对各种孔板模式的体积比。**注意：**W1333 为 10×W1232、10×W1042 和 10×W1052 的组合。包括：

- 10×500μl Digitonin, 2%
- 10×5ml Lumit[®] Lysis Buffer II, 10X
- 10×15ml Lumit[®] Immunoassay Buffer C, 10X
- 20×1ml Lumit[®] Substrate C
- 10×300μl Lumit[®] Anti-Mouse Ab-LgBiT
- 10×300μl Lumit[®] Anti-Rabbit Ab-SmBiT
- 10×1ml Antibody Dilution Buffer
- 20×10μl Fluorogenic Live Cell Substrate (GF-AFC Substrate), 100mM

产品	规格	目录号
Lumit [®] Immunoassay Lysis and Detection Kit	100 assays	W1231

如果每次检测分别使用 50μl、50μl 和 25μl 的细胞裂解物、抗体混合物和检测试剂并在 96 孔板中进行的检测，那么此系统足够进行 100 次检测。在 384 孔板中按照 12.5μl: 12.5μl: 6.25μl 比例进行测定时，该系统可进行 400 次检测。表 1 列出的是针对各种孔板模式的体积比。包括：

- 50μl Digitonin, 2%
- 500μl Lumit[®] Lysis Buffer II, 10X
- 1.5ml Lumit[®] Immunoassay Buffer C, 10X
- 200μl Lumit[®] Substrate C
- 1ml Antibody Dilution Buffer
- 10μl Fluorogenic Live Cell Substrate (GF-AFC Substrate), 100mM

产品	规格	目录号
Lumit [®] Immunoassay Lysis and Detection Kit	1,000 assays	W1232

如果每次检测分别使用 500μl、50μl 和 25μl 的细胞裂解物、抗体混合物和检测试剂并在 96 孔板中进行，那么此系统足够进行 1000 次检测。在 384 孔板中按照 12.5μl: 12.5μl: 6.25μl 比例进行测定时，该系统可进行 4000 次检测。表 1 列出的是针对各种孔板模式的体积比。包括：

- 500μl Digitonin, 2%
- 5ml Lumit[®] Lysis Buffer II, 10X
- 15ml Lumit[®] Immunoassay Buffer C, 10X
- 2×1ml Lumit[®] Substrate C
- 1ml Antibody Dilution Buffer
- 2×10μl Fluorogenic Live Cell Substrate (GF-AFC Substrate), 100mM

产品	规格	目录号
Lumit [®] Immunoassay Lysis and Detection Kit	10,000 assays	W1233

如果每次检测分别使用 50μl、50μl 和 25μl 的细胞裂解物、抗体混合物和检测试剂在 96 孔板中进行，那么此系统足够进行 10000 次检测。在 384 孔板中按照 12.5μl: 12.5μl: 6.25μl 比例进行测定时，该系统可进行 40000 次检测。表 1 列出的是针对各种孔板模式的体积比。**注意：**W1233 相当于 10×W1232。包括：

- 10×500μl Digitonin, 2%
- 10×5ml Lumit[®] Lysis Buffer II, 10X
- 10×15ml Lumit[®] Immunoassay Buffer C, 10X
- 20×1ml Lumit[®] Substrate C
- 10×1ml Antibody Dilution Buffer
- 20×10μl Fluorogenic Live Cell Substrate (GF-AFC Substrate), 100mM

储存条件：收到产品后，请将所有组分在 -30°C 至 -10°C 储存。使用前，将除抗体外的其他试剂在室温下完全融化（抗体应于 -30°C 至 -10°C 下保存直至使用）。使用前，应将所有试剂充分混合均匀。使用后，应立即将所有试剂再次保存在 -30°C 至 -10°C。Lumit[®] 底物 C（Lumit[®] Substrate C）和 GF-AFC 底物必须在避光黑暗条件下储存。

注意：

- 在确定最佳检测浓度后，使用抗体稀释缓冲液（Antibody Dilution Buffer）对一抗进行稀释以制备工作液（请参见第 6 节）。
- GF-AFC 底物是用于细胞数归一化的细胞活力底物。这是一种非裂解性的、添加单一试剂的荧光检测组分，可用于测定某一细胞群体中活细胞的相对数量。该底物是基于对活细胞内保守型和组成型蛋白酶活性的测量，因此可作为细胞活力的生物标志物。底物进入完整的细胞后，在活细胞蛋白酶的作用下被切割并产生与活细胞数量成正比的荧光信号。活细胞蛋白酶在细胞裂解后失去活性。裂解后，在 Lumit Immunoassay 完成时对发光信号和累积的荧光信号同时进行测量（图 4）。荧光信号亦可在裂解前进行读取，以检查细胞活力。
- 对于不同孔板的体积配比，参见第 4 节 4.A 部分的表 1。

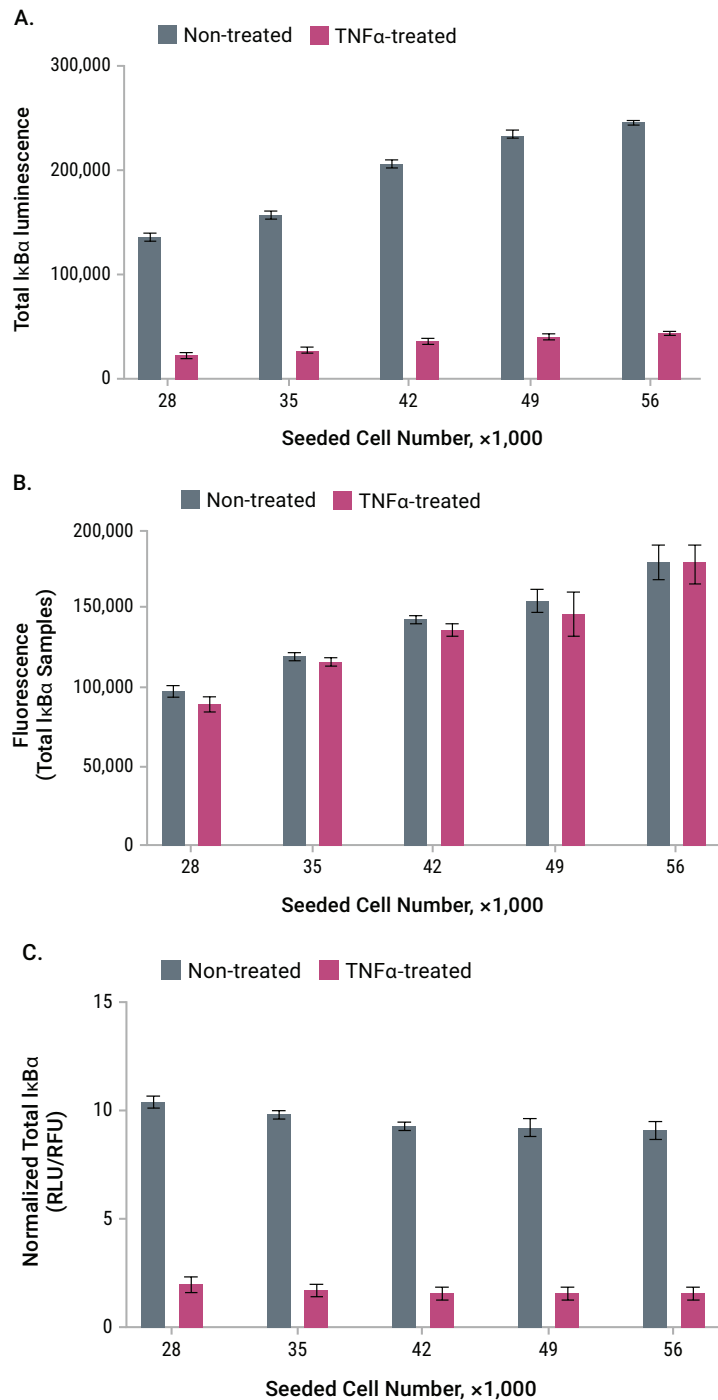


图 4. 发光数据相对每孔细胞数量的归一化。使用 50ng/ml TNFα 对不同数量的细胞处理 30 分钟。裂解前 30 分钟，将 GF-AFC 底物添加至所有细胞中。使用 Lumit[®] Immunoassay 和 150ng/ml 的下列抗体检测总的 IκBα 水平：小鼠抗 IκBα（Cell Signaling Technology，目录号：4814）和兔抗 IκBα（Cell Signaling Technology，目录号：4812）。实验结束时读取发光信号（**A**）和荧光信号（**B**）。**C.** 将发光信号 RLU 相对于荧光信号 RFU 值进行归一化。使用 GloMax[®] Discover（目录号：GM3000）记录发光和荧光信号。

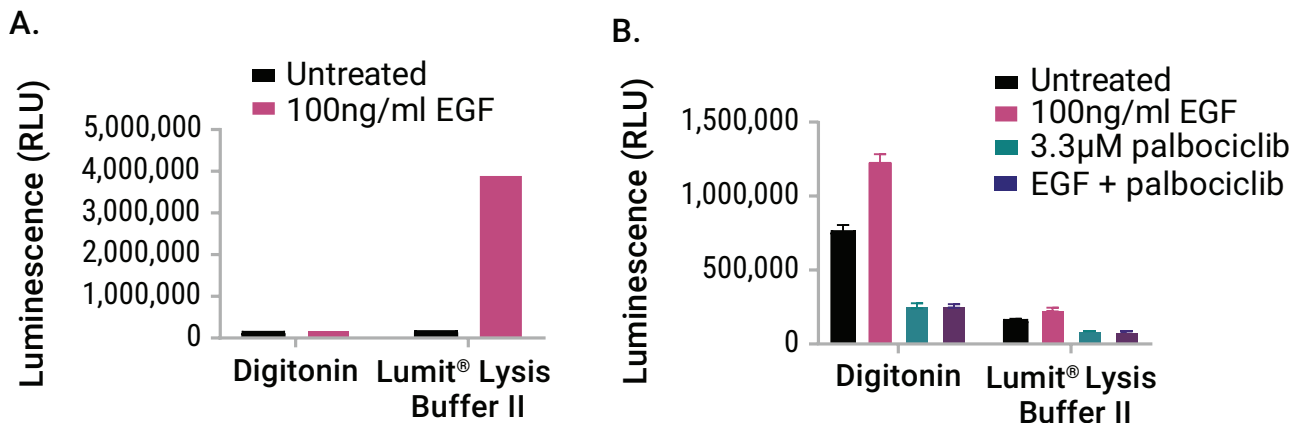
3. 一般注意事项

裂解缓冲液：常用的裂解细胞的去污剂会对 NanoBiT[®] 互补产生负面影响。Digitonin 和 Lumit[®] Lysis Buffer II, 10X 已经过广泛测试，证明与 Lumit[®] Immunoassay Cellular System 可兼容。本手册中优化后的裂解处理方式可有效地将细胞内的靶标暴露于 Lumit[®] 检测试剂中，而不会影响 NanoBiT[®] 互补。我们已经通过实验证明了测试两种裂解液的重要性，以便构建一个可行的检测体系。因为部分目标蛋白只能通过 Lumit[®] Lysis Buffer II, 10X 裂解液得以有效检测，而另一些目标蛋白则仅能通过 Digitonin 实现检测（图 5）。我们比较了采用不同细胞裂解方案（如无去污剂的超声波处理法和其他裂解液处理法）下蛋白质的表达水平及其磷酸化程度。结果显示，采用无去污剂的超声波处理法和基于 Digitonin 或 Lumit[®] Lysis Buffer II, 10X 的细胞裂解法所得到的结果类似。选择后者是因为它与高通量实验平台具有良好的兼容性。

抗体：Lumit[®] Immunoassay Cellular System 是一种通用试剂盒，需要用户提供可与之兼容的一抗。为覆盖更多靶标，我们提供多种版本的 Lumit[®] 二抗，这些二抗在含有裂解和检测组分的试剂盒中提供或者作为独立产品提供。如需确定适合靶标的最佳一抗对，您可以：1) 在仅测试兔 / 小鼠抗体对的情况下使用 Lumit[®] Immunoassay Cellular System - Starter Kit（目录号：W1220）；或者，2) 使用 Lumit[®] Immunoassay Lysis and Detection Kit（目录号：W1231）以及标记有 LgBiT 或 SmBiT 的独立的 Lumit[®] 抗小鼠、抗兔或抗山羊的任意组合形式。

生物学条件与对照：在针对新靶点进行测试时，我们建议优化细胞数量，以及与目标蛋白生物特性相关的任何处理条件和对照设置。我们不推荐在这些实验中使用无细胞对照。由于细胞碎片可能会淬灭一小部分发光信号，因此，无细胞的 Lumit[®] 对照孔可能具有比含细胞的 Lumit[®] 对照孔具有更高的背景值。

孔板和仪器：我们建议使用适合发光测量的标准白色多孔板（例如，Corning，目录号：3570、3693 和 3917）。发光信号可通过多种微孔板读数仪记录，尽管相对发光单位取决于仪器。检测孔的几何形状和较小的注液量可能会影响混合效率。因此，各个孔中检测的均一性差时可能会导致反应噪音增加、信号减弱或两者同时出现。



18848MA

图 5. 展示了为新靶点开发 Lumit® Immunoassay 时，测试两种裂解液的重要性。图 A：当使用 Lumit® Lysis Buffer II, 10X 裂解液时，可以检测到磷酸化的表皮生长因子受体（EGFR），而在使用 Digitonin 裂解时则无法检测到。将 25,000 个 A431 细胞铺板过夜后，先用 100ng/ml 的 EGF (GIBCO™ Cat.# PHG0311L) 刺激 5 分钟，然后加入裂解液。结果显示，在使用 Lumit® Lysis Buffer II 裂解的细胞中，可以检测到明显的 EGFR 磷酸化水平，而在使用 Digitonin 裂解的细胞中则未能检测到。**图 B：**在用 Digitonin 裂解的细胞中观察到了视网膜母细胞瘤蛋白（RB）的磷酸化现象，而在使用 Lumit® Lysis Buffer II 裂解的细胞中则未能检测到。50,000 个 MCF7 细胞经过隔夜血清饥饿处理后，分别用 palbociclib (Tocris Cat.# 4786) 和 / 或 EGF 处理 24 小时。

4. Lumit® Immunoassay Cellular System 的准备工作

用户需提供的材料

- 一对靶蛋白的一抗。可以使用来自兔 / 小鼠、小鼠 / 山羊或兔 / 山羊的抗体对
- 白色多孔板（注意：请勿使用黑色或透明板）。亦可使用底部透明的白色孔板。但是，在读取发光信号时，应使用 3M 白纸遮盖孔板底部。
- 多通道移液器或自动移液站
- 可读取多孔板的发光检测仪（如 GloMax® Discover，目录号：GM3000）
- 微孔板振荡器
- 蛋白酶抑制剂混合物或蛋白酶 / 磷酸酶抑制剂混合物（例如，Halt® 蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物，100X，Thermo Scientific，目录号：78440）

4. Lumit[®] Immunoassay Cellular System 的准备工作（续）

以下是 Lumit[®] Immunoassay Cellular System 的快速操作参考步骤（2:2:1 体系）。如需获得更多有关细胞和试剂制备的细节及详细步骤，请参阅第 4.A 节、4.B 节和 5 节。

此操作流程适用于 96 孔板，其中细胞裂解物：抗体混合物：检测试剂的比例为 50μl:50μl:25μl。若要在 384 孔板或 1536 孔板等高通量环境下使用此检测方法，请查阅第 7 节。

对于每 40μl 细胞：

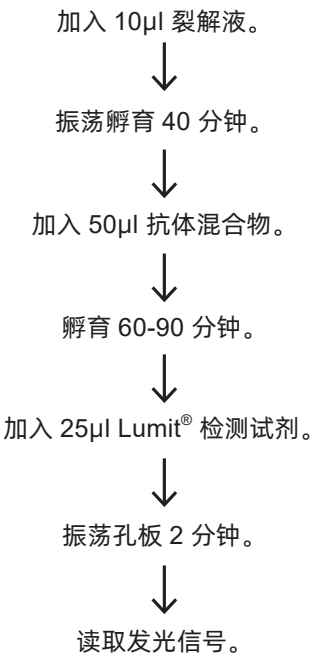


表 1. 不同孔板模式的检测组分体积

孔板类型	细胞裂解物 (μl) ¹	抗体混合物 (μl)	底物 (μl)
96 孔板	50	50	25
96 孔板（体积减半）	25	25	12.5
384 孔板	12.5	12.5	6.25

¹ 细胞裂解物体积包括细胞培养基、处理液和裂解液。

4.A. 为 Lumit[®] Immunoassay Cellular System 准备细胞

贴壁细胞

1. 将贴壁细胞在适当的生长培养基中进行培养。当融合度为 70–90% 时，将细胞分离。
2. 计数细胞，并在含完全生长培养基的 96 孔板中按每孔 50000 个细胞进行接种。对于 384 孔板，按每孔 10000 个细胞进行接种。

注意：为获得最佳信号，应通过实验确定细胞数量，因为信号受细胞类型和信号通路影响。一般来说，最佳信号变化可在 96 孔板中每孔 10000-80000 个细胞的范围内获得。

3. 将孔板置于恰当的细胞培养条件下孵育过夜。

注意：如有必要，当细胞稳定贴壁于孔板后，可在无血清培养基中培养细胞。根据靶信号通路确定血清饥饿处理的时间。

4. 用 35μl 新鲜细胞培养基替换孔板中的培养基。
5. 为刺激和 / 或抑制靶通路，用 5μl 含有适当剂量的激活剂和 / 或抑制剂的细胞培养基处理细胞。对于对照孔，则加入 5μl 含溶剂（例如 DMSO）的细胞培养基。

注意：

- a. 在保证加入裂解液前的最终体积为 40μl（96 孔板）和 10μl（384 孔板）的前提下，可调整步骤 4 和 5 中的体积以适应不同的处理方式。
 - b. 为测量细胞活力并相对于活细胞数量进行数据归一化，需在处理过程中（步骤 4 或 5）向细胞培养基中加入活细胞荧光底物（GF-AFC 底物），并使其在 40μl 体积内的最终浓度为 50μM。在裂解前 0.5–3 小时，将 GF-AFC 底物与细胞一起孵育，信号可保持稳定长达 3 小时。
6. 立即进行 Lumit[®] Immunoassay Cellular System 操作步骤（第 5 节）。

悬浮细胞

1. 将悬浮细胞在适当的生长培养基中进行培养。
2. 计数细胞，并按每孔 100000 个细胞将其接种于每孔含 35μl 新鲜培养基的 96 孔板中。对于 384 孔板，按每孔 20000 个细胞进行接种。

注意：为获得最佳信号，应通过实验确定细胞数量，因为信号受细胞系和细胞信号通路影响。一般来说，最佳信号变化可在 96 孔板中每孔 100000-200000 个细胞的范围内获得。

3. 为刺激和 / 或抑制该通路，使用 5 μ l 含有适当剂量的激活剂和 / 或抑制剂的细胞培养基处理细胞。对于对照孔，则加入 5 μ l 含溶剂（例如 DMSO）的细胞培养基。

注意：

- a. 在保证加入裂解液前的最终体积为 40 μ l（96 孔板）和 10 μ l（384 孔板）的前提下，可调整步骤 2 和 3 中的体积以适应不同的处理方式。
 - b. 为测量细胞活力并相对于活细胞数量进行数据归一化，需在处理过程中（步骤 2 或 3）向细胞培养基中加入活细胞荧光底物（GF-AFC 底物），并使其在 40 μ l 体积内的最终浓度为 50 μ M。在裂解前 0.5–3 小时，将 GF-AFC 底物与细胞一起孵育，信号可保持稳定长达 3 小时。
4. 立即进行 Lumit[®] Immunoassay Cellular System 操作步骤（第 5 节）。

4.B. 为 Lumit[®] Immunoassay Cellular System 准备试剂

计算实验所需的免疫检测反应缓冲液（Immunoassay Reaction Buffer）和裂解液（Lysis Solution）体积。此检测中细胞裂解物、抗体混合物与检测试剂的体积比应为 2：2：1。

注意：按以下说明准备的试剂足够做 10 次检测。

1. **免疫检测反应缓冲液（Immunoassay Reaction Buffer）：**将 150 μ l Lumit[®] Immunoassay Buffer C、适量的蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物以及水（最多 1.35ml）进行混合，制备 1.5ml 免疫检测反应缓冲液。
2. **裂解液：**按照下方描述准备其中一种裂解液：
 - a. 向免疫检测反应缓冲液中加入 5 μ l 洋地黄皂苷（Digitonin, 2%）和 4X 蛋白酶 / 磷酸酶抑制剂，制备 100 μ l 裂解液（Digitonin, 0.1%）。
 - b. 将 50 μ l Lumit[®] Lysis Buffer II, 10X 加入到 50 μ l 含有 10X 蛋白酶 / 磷酸酶抑制剂的水中制备 100 μ l 5X Lumit[®] Lysis Buffer II。
3. **抗体混合物（在第 5 节的裂解步骤中进行制备）：**对于每 10 次检测，将表 2 中所列的 4 种抗体（每种取 3 μ l）与 488 μ l 免疫检测反应缓冲液混合，制备 500 μ l 抗体混合物。

注意：在大多数情况下，每个孔中每种一抗 15ng（添加抗体后的最终浓度为 150ng/ml）为最佳条件。但是，我们建议根据经验确定最佳一抗浓度（请参见第 6 节）。根据最佳浓度，可在抗体稀释缓冲液（Antibody Dilution Buffer）中制备抗体工作储备液，并于 -30°C 至 -10°C 储存。例如，对于每个检测孔 15ng 抗体的最佳条件，可制备 50 μ g/ml 的抗体储备液并进行存储以用于后续测定。如表 2 所述，3 μ l 的抗体储备液可用于制备供 10 次检测的抗体混合物。

表 2. 抗体混合物制备示例（每 10 次检测所需体积，单位为 μl ）。

组分	体积 (μl)
一抗	抗磷酸表位抗体
	3
Lumit [®] 二抗	抗蛋白抗体
	3
	Lumit [®] 抗小鼠抗体 -LgBiT
	Lumit [®] 抗兔抗体 -SmBiT
	3
免疫检测反应缓冲液 (Immunoassay Reaction Buffer)	488

4. **Lumit[®] 检测试剂** (Lumit[®] Detection Reagent; 在第 5 节的抗体结合步骤中进行制备)：于室温下平衡 Lumit[®] 底物 C (Lumit[®] Substrate C)。对于 10 次检测，应在即将使用前将 20 μl Lumit[®] 底物 C 和 230 μl 免疫检测反应缓冲液 (1: 12.5 稀释) 混合，以制备 250 μl 新鲜的 Lumit[®] 检测试剂。

5. Lumit[®] Immunoassay Cellular System 操作步骤

Lumit[®] Immunoassay Cellular System 需要向处理后的细胞中进行三次溶液添加（图 1 和 2）。下述操作步骤不需要在处理后将细胞中去除培养基。

注意：

- 如果您的实验需要在较高体积条件下对细胞进行处理，那么在处理后请先移除细胞培养基。接下来，将细胞重悬于 50 μl 含有 1X 蛋白酶和磷酸酶抑制剂和 0.02% Digitonin 或 1X Lumit[®] Lysis Buffer II 的溶液中，随后继续进行步骤 2 的操作。
- 在进行 Lumit[®] 免疫检测之前，请根据第 4 节所述准备细胞和试剂。但是，抗体混合物和 Lumit[®] 检测试剂应在即将使用前再制备。
- 我们建议使用一组不含一抗的细胞样品作为对照，以评估试剂的本底水平。将样品信号值减去试剂本底值，计算得出净信号值。
- 许多类型的细胞已成功通过以下方案进行裂解。您可以根据您的特定细胞类型，通过以下任一方式优化裂解步骤：延长孵育时间（步骤 2），或者使用较小体积但浓度更高的裂解液（步骤 1）。务必确保在加入抗体混合物（步骤 4）后，Digitonin 的终浓度最高不超过 0.015%，同时 Lumit[®] Lysis Buffer II 的终浓度最高为 0.8X。

操作步骤

- 向含有 40 μl 细胞的每个孔中加入 10 μl 裂解液。

注意：如果使用洋地黄皂苷，此时的浓度为 0.02%，如果使用 Lumit[®] Lysis Buffer II，此时的浓度是 1X。使用上述任何一种裂解液均可产生均一的裂解物，并使细胞内的靶标表位暴露从而可通过 Lumit[®] 试剂进行检测。

- 以约 800rpm 的速度剧烈振荡孔板 40 分钟。
- 按第 4.B 节所述制备抗体混合物。
- 向裂解的细胞中加入 50 μl 抗体混合物。

5. 以约 400rpm 的速度轻轻振荡孔板 2 分钟。

6. 将孔板在 23°C 下孵育 90 分钟。

注意：较短的孵育时间可能就足够了，但是最佳孵育时间应根据经验确定。

7. 按照第 4.B 节所述制备 Lumit[®] 检测试剂。

8. 向检测孔中加入 25μl Lumit[®] 检测试剂。

9. 以约 400rpm 的速度轻轻振荡孔板 2 分钟。

10. 用发光检测仪测量发光信号。

注意：仪器设置取决于制造商。每孔 0.25-1 秒的整合时间可作为参考。

11. **可选：**如果使用了 GF-AFC 底物，则使用荧光计（380–400nm Ex / 505nm Em）测量得到的荧光信号，并将发光 RLU 相对于荧光 RFU 值进行归一化处理。

6. 建立针对新靶标的 Lumit[®] Immunoassay 指南

Lumit[®] Immunoassay Cellular System 已成功用于检测未修饰的细胞中几种信号蛋白的磷酸化水平和总水平（2）。对于每个经过验证的靶标，我们提供一份应用说明（application note），其中包括代表性数据、所用一抗的具体信息以及推荐的浓度。可在 Lumit[®] Immunoassay Cellular System 网页上获取相应的 application notes: www.promega.com/immunoassay-elisa/lumit-immunoassays/lumit-immunoassay-cellular-systems

对于经过验证的靶标，我们建议您遵循上述操作步骤 application notes 中所述的抗体条件。如需开发针对新靶标的 Lumit[®] 免疫检测方法，以下各节就如何选择一抗和进行优化做了相关介绍。

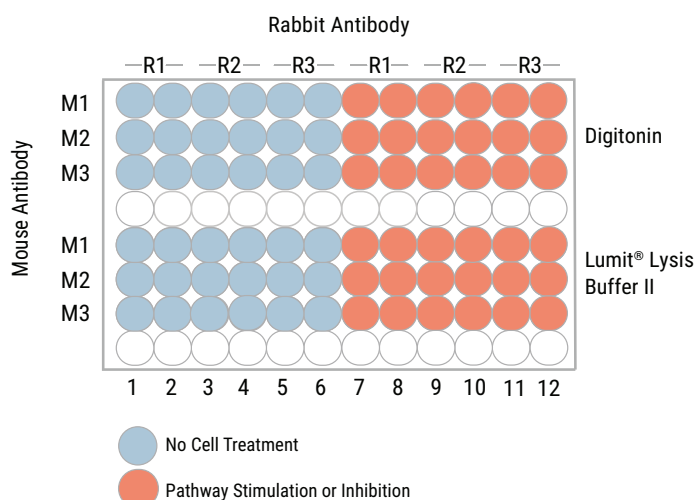
6.A. 一抗的选择

Lumit[®] 免疫检测方法的灵敏度和特异性取决于所用一抗的质量。选择性能最佳的抗体对于充分发挥 Lumit[®] Immunoassay Cellular System 的优势来说尤为重要。可选择两至三个兔 / 小鼠、小鼠 / 山羊或兔 / 山羊抗体对，并将相应的 Lumit[®] 二抗以及 Lumit[®] Immunoassay Lysis and Detection Kit 结合使用作为切入点。当仅测试兔 / 小鼠抗体对时，我们建议使用 Lumit[®] Immunoassay Cellular System - Starter Kit（目录号：W1220），因为它包含偶联了 SmBiT 和 LgBiT 的两种二抗组合。虽然 Starter Kit 能够帮助您确定最适合目标蛋白的 Lumit[®] 二抗组合，但是也需要额外的试剂（Lumit[®] Cellular-set1 或 set2）完成后续的优化过程。

6.B. 选择一种裂解液

一些目标蛋白仅能在使用 Digitonin 裂解时被检测到，而另一些则仅能在使用 Lumit[®] Lysis Buffer II 裂解时才能被检测。为了确定您的目标蛋白最适的裂解液，我们建议在最初的棋盘格实验中（如第 6.C 节所述）同时包含 Digitonin 和 Lumit[®] Lysis Buffer II，并搭配一抗一同进行测试。我们建议以复孔形式执行该棋盘格实验，检测板的一侧使用 Digitonin 裂解细胞，另一侧则使用 Lumit[®] Lysis Buffer II 裂解细胞（图 6, A 所示）。

A.



B.

	R1	R2	R3	R1	R2	R3		R1	R2	R3	
M1	83,536	83,278	80,072	83,211	83,790	80,839	Digitonin	M1	1.01	1.01	1.05
M2	83,130	82,340	80,478	82,963	84,497	82,878		M2	1.00	1.03	0.98
M3	82,827	83,048	80,418	84,214	83,001	82,452		M3	1.00	1.01	0.99
M1	56,780	55,240	54,950	620,500	56,297	54,791	Lumit® Lysis Buffer II	M1	10.90	0.98	1.01
M2	55,550	56,720	56,720	54,029	54,996	220,300		M2	1.00	1.01	3.88
M3	56,720	56,730	58,400	55,320	54,586	54,575		M3	0.98	1.05	1.05
	Untreated			Cell Treatment							

C.

	R1	R2	R3	R1	R2	R3		R1	R2	R3	
M1	80,457	81,859	84,079	84,676	80,765	81,954	Digitonin	M1	0.98	1.01	0.99
M2	80,014	81,102	81,155	82,279	950,640	80,147		M2	0.96	11.28	0.96
M3	81,347	83,190	84,275	80,035	82,280	324,500		M3	0.98	1.01	3.99
M1	56,982	55,614	56,510	56,780	55,240	54,950	Lumit® Lysis Buffer II	M1	1.03	1.01	0.97
M2	54,546	54,364	62,980	55,550	56,720	55,550		M2	1.02	1.04	0.88
M3	58,460	56,356	56,839	55,550	56,730	58,400		M3	0.95	1.04	1.04
	Untreated			Cell Treatment							

D.

	R1	R2	R3	R1	R2	R3		R1	R2	R3	
M1	81,396	84,937	80,694	1,120,350	83,643	84,173	Digitonin	M1	13.86	0.95	1.05
M2	81,213	80,493	80,088	81,116	82,251	80,926		M2	0.99	1.00	0.97
M3	81,642	81,808	83,645	83,005	82,380	80,335		M3	1.01	0.97	1.04
M1	54,346	54,609	56,944	56,780	55,240	54,950	Lumit® Lysis Buffer II	M1	1.05	1.01	0.98
M2	55,652	56,613	62,980	55,550	920,700	58,400		M2	0.99	16.93	0.93
M3	58,460	54,429	55,226	55,550	56,730	58,400		M3	0.95	1.01	1.03
	Untreated			Cell Treatment							

图 6. 单抗体浓度棋盘格实验。 图 A. 孔板平面图展示了如何在单个 96 孔板上以复孔的形式设置一个棋盘格实验，来探究三对兔源抗体（标记为 R1、R2 和 R3）和三对鼠源抗体（标记为 M1、M2 和 M3）的组合效果。实验设置了两种不同的处理条件，即分别使用 Lumit® Lysis Buffer II, 10X 和 Digitonin 裂解细胞。图 B、C 和 D. 实验数据展示了使用这两种裂解液筛选抗体时可能出现的结果。每种情况都显示了平均原始数据（左侧）以及处理组与未处理组信号比值（右侧）。在选择合适的抗体时，考虑原始发光强度和信号背景比值都是非常重要的。图 B 中，只有使用 Lumit® Lysis Buffer II 时，才能成功检测到目标蛋白；并且，在这种情况下，抗体对 M1/R1 是最佳选择。图 C 中，唯有采用 Digitonin 裂解时，得到了有效的实验结果；并且，抗体对 M2/R2 是最佳选择。图 D 中，无论是抗体对 M1/R1 和 Digitonin，还是抗体对 M2/R2 和 Lumit® Lysis Buffer II，都是进一步优化的良好选择，例如在抗体稀释梯度棋盘格实验中。

6.C. 棋盘格实验中最佳一抗对的选择

在选择抗体对时，我们建议在单一浓度下（例如 15ng / 孔）对细胞中靶蛋白的各种抗体对进行棋盘格实验。实验还需包括处理后用以产生高端和低端信号的细胞。通过这种方法，选择可以产生最大发光信号和最大信号背景比（signal-to-background ratio）的抗体对。在第二个棋盘格实验中，对所选抗体对中的每种抗体进行滴定以确定最佳浓度。通过对改变靶蛋白水平的添加物产生真实的生物学响应来验证抗体的选择性。

注意：细胞可不处理，也可用会改变靶蛋白水平的激活剂或抑制剂对其进行处理。有时，对可调节细胞中靶蛋白水平的处理方法尚不了解；因此，无法获取棋盘格实验中的上限和下限信号。在这种情况下，我们建议使用纯化的重组靶蛋白（如果有）。

单一抗体浓度的棋盘格选择实验

在图 6 所示的例子中，使用了针对靶蛋白的三种兔抗体和三种小鼠抗体，建立了一个九对的棋盘格。在加入抗体后（15ng/孔），每种抗体的最终浓度均为 150ng/ml。此处介绍的是一种经改良的 Lumit[®] 免疫检测操作流程（其中包括了棋盘格方案）。

1. 按照第 4.B 节所述，制备 8ml 免疫检测反应缓冲液和 400μl 裂解液 Digitonin 或 Lumit[®] Lysis Buffer II。
2. 根据图 6A 中的棋盘格方案并按第 4A 节所述，在 96 孔板上每孔准备 40μl 细胞。

注意：如果使用的为重组靶蛋白而非细胞，则在免疫检测反应缓冲液中以 1nM 的浓度制备 1.6ml 蛋白。然后将 40μl 免疫检测反应缓冲液添加至标有“无细胞处理组”（No Cell Treatment）的孔中，并将 40μl 靶蛋白溶液添加至标有“信号通路激活或抑制”（Pathway Stimulation or Inhibition）的孔中。

3. 将每种裂解液取 10μl 加入到对应孔中。
4. 以约 800rpm 的速度剧烈振荡孔板 40 分钟。
5. 用适量体积的 Immunoassay Reaction Buffer 对 400ng 抗体进行稀释，制备 400μl 的各种一抗。
6. 向 1552μl Immunoassay Reaction Buffer 中加入 24μl Lumit[®] Anti-Mouse Antibody-LgBiT 和 24μl Lumit[®] Anti-Rabbit Antibody-SmBiT，制备 1.6ml Lumit[®] 二抗混合物。
7. 向所有 Lumit[®] 对照孔中加入 30ul Immunoassay Reaction Buffer。
8. 如图 6A 所示，将 15μl 的每种兔一抗添加至相应的孔中。
9. 如图 6A 所示，将 15μl 的每种小鼠一抗添加至相应的孔中。
10. 向所有孔中加入 20μl Lumit[®] 二抗混合物。
11. 以约 400rpm 的速度轻轻振荡孔板 2 分钟。
12. 将孔板置于 23°C 孵育 90 分钟。

13. 按照第 4.B 节所述, 制备 2ml Lumit[®] 检测试剂。

14. 向所有孔中加入 25 μ l Lumit[®] 检测试剂。

15. 以约 400rpm 的速度轻轻振荡孔板 2 分钟。

16. 用发光检测仪测量发光信号。

注意: 仪器设置取决于制造商。每孔 0.25-1 秒的整合时间可作为参考。

17. 如图 6B 所示, 通过绝对发光读数以及信号背景比 (signal-to-background ratio), 来选择一个抗体组合用于后续测定。

如图 6B, C, D 所示, 最佳抗体对应可实现最佳的发光信号和信号背景比之间的平衡。

注意: 如果在该实验中未选择出抗体对, 请使用其他可用的一抗重复棋盘格选择实验, 增加每孔的抗体量或采用 Lumit[®] 抗体的其他组合 (例如, Lumit[®] Anti-Mouse Antibody-SmBiT 和 Lumit[®] Anti-Rabbit Antibody-LgBiT)。在有些情况下, 后一种组合的效果可能会更好。

6.C. 棋盘格实验中选择最佳一抗对的选择 (续)

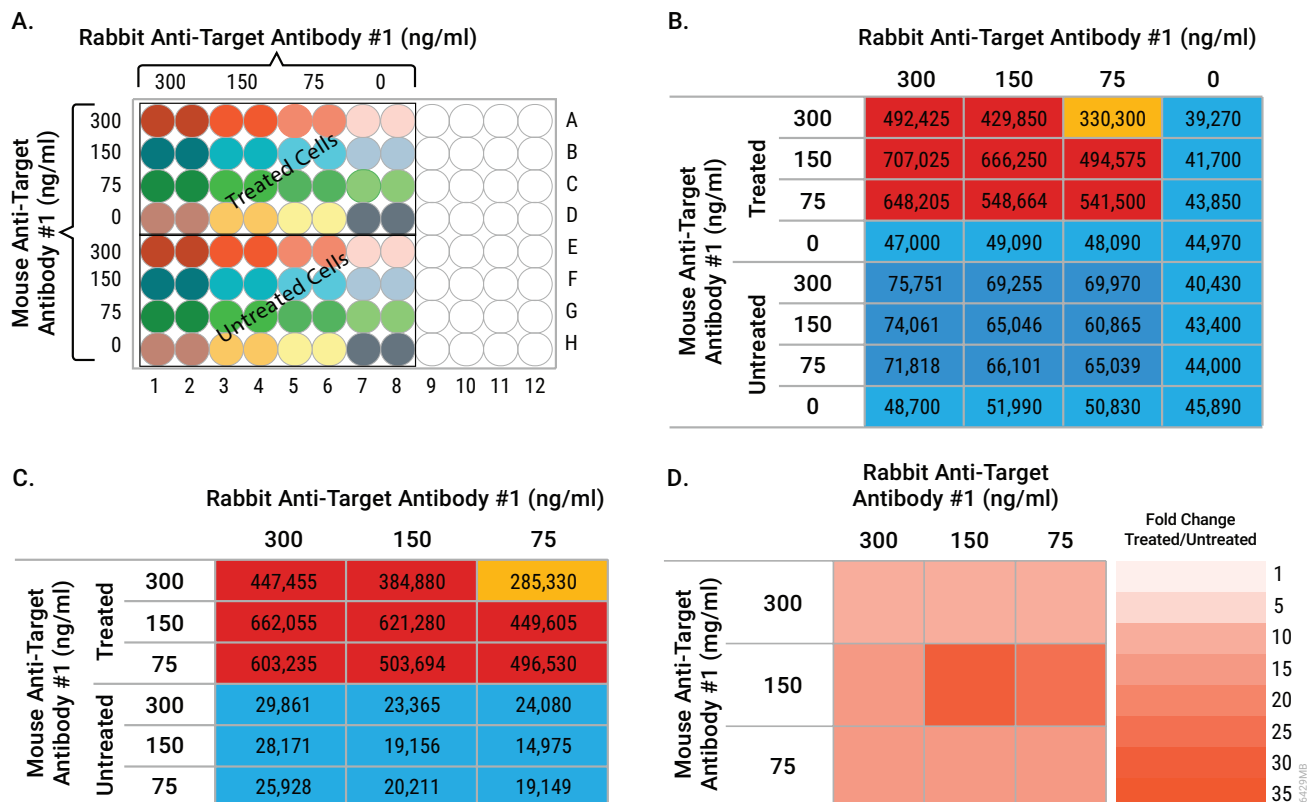


图 7. 抗体滴定棋盘格选择实验。 **A.** 棋盘格实验设计是通过单一浓度棋盘格实验选择一种兔和一种小鼠抗体（图 6B 的 M1/R1 抗体对），对其进行了三个浓度梯度的稀释。**B.** 使用兔抗体和小鼠抗体的三个浓度稀释液组合检测靶蛋白所得的平均发光值示例。**C.** 扣除“无一抗”对照后的净发光值。**D.** 用于后续实验的最佳抗体浓度通过倍数变化【处理组 / 未处理组 (Treated/Non-Treated)】来确定，倍数变化从 C 图计算得出并在热图中表示出来。

抗体滴定棋盘格选择实验

在图 7 所示的例子中，对兔一抗 # 1 和小鼠一抗 # 1 进行滴定以确定各自的最佳浓度。在加入抗体后，每种抗体的最终浓度为 75、150 和 300ng/ml（每孔 7.5、15 和 30ng）。此处介绍的是一种经改良的 Lumit[®] 免疫检测操作流程（其中包括了棋盘格方案）。

- 按照第 4 节所述，制备 7ml 免疫检测反应缓冲液和 700μl 裂解液。
- 根据图 7A 中的棋盘格方案并按第 4 节所述，在 96 孔板上每孔准备 40μl 细胞。

注意: 如果使用的是重组靶蛋白而非细胞，则向标有“未处理组” (Untreated) 的孔中添加 40μl 免疫检测反应缓冲液，并向标有“处理组” (Treated) 的孔中添加 40μl 1nM 靶蛋白溶液。

3. 将适量的免疫检测反应缓冲液与 150、300 或 600ng 的抗体混合，制备体积为 300 μ l 的各浓度一抗稀释液，其在反应体系里的终浓度分别为 75、150 或 300ng/ml。
4. 向 1358 μ l 免疫检测缓冲液中加入 21 μ l Lumit[®] Anti-Mouse Antibody-LgBiT 和 21 μ l Lumit[®] Anti-Rabbit Antibody-SmBiT，制备 1400 μ l Lumit[®] 抗体混合物。
5. 向所有孔中加入 10 μ l 裂解液。
6. 以约 800rpm 的速度剧烈振荡孔板 40 分钟。
7. 如图 7A 所示，将 15 μ l 的每种兔一抗稀释液添加至相应孔中。
8. 如图 7A 所示，将 15 μ l 的每种小鼠一抗稀释液添加至相应孔中。
9. 如图 7A 所示，向“0ng 抗体”对照孔（D 行和 H 行，第 7 和 8 列）中加入 15 μ l 免疫检测反应缓冲液。
10. 向所有孔中加入 20 μ l Lumit[®] 抗体混合物。
11. 以约 400rpm 的速度轻轻振荡孔板 2 分钟。
12. 将板置于 23°C 孵育 90 分钟。
13. 按照第 3.B 节所述，制备 1.8ml Lumit[®] 检测试剂。
14. 向所有孔中加入 25 μ l Lumit[®] 检测试剂。
15. 以约 400rpm 的速度轻轻振荡孔板 2 分钟。
16. 用发光检测仪测量发光信号。

注意：仪器设置取决于制造商。每孔 0.25-1 秒的整合时间可作为参考。

17. 从相应的实验组样品中扣除“无一抗”对照孔（孔 D7、D8、H7 和 H8；图 7A）的本底值。如图 7C 和 7D 所示，通过归一化的发光信号以及信号背景比，来选择一个抗体浓度组合以用于后续测定。

注意：在该实验中，最佳抗体浓度应可实现最佳的发光信号和信号背景比之间的平衡。

18. 使用抗体稀释缓冲液（Antibody Dilution Buffer）制备选定浓度的一抗工作储备液，并将其置于 -30°C 至 -10°C 储存。例如，如果最佳浓度为 150ng/ml，则可制备 50 μ g/ml 的浓缩一抗工作储备液并储存起来以用于后续测定。

7. 用于高通量筛选的 Lumit[®] ICS 微型化指南

7.A. 缩减试剂，以便在 384 孔或 1536 孔格式中使用

针对将 Lumit[®] 免疫检测应用于高通量筛选的微型化需求，这里提供了两种推荐的试剂缩放方案：比率缩放法和用户自定义体积法。比率缩放法保持推荐的 2:2:1（细胞裂解液：抗体：底物）体积比不变。采用比率缩放时，不需要过多优化，但用户在每个孔的体积选择上灵活性较低。要使用比率缩放法完成微型化，只需按一定的倍数减少每个步骤的体积，同时保持 2:2:1 的体积比例不变。

用户自定义体积法允许用户拥有更大的灵活性，但需要更多的优化工作。在该方案中，用户自行定义每个步骤所需的体积，但必须保证试剂浓度在试剂盒组分规定的范围内。采用用户自定义体积法完成微型化时，请按照此处概述的方案进行，并确保每个试剂都在列出的限定范围内。请使用以下推荐的试剂体积或浓度。

1. 裂解细胞。细胞裂解的建议是基于某些洗涤剂对 NanoBiT[®] 互补效应的负面影响。过高浓度的洗涤剂可能会降低光信号输出，而浓度过低则可能导致裂解程度不足，无法有效检测目标蛋白。

用户可以选择：

- a. Digitonin: 0.01–0.025%，或
 - b. Lumit[®] Lysis Buffer II: 0.8–1.0X
2. 加入抗体：
 - a. 每孔添加 0.1ul Lumit[®] 二抗。
 - b. 对一抗进行滴定，起始点建议为 50ug/ml 的储备溶液每孔 0.1ul。
 3. 加入底物：
 - a. 为了防止沉淀，加入的 Lumit[®] 底物 C 溶液应 ≤7%。
 - b. 为了获得最佳信号结果，每孔应加入的底物需 ≥1%。

7.B. 稀释 Lumit® Substrate C 以增强稳定性

Lumit® Substrate C 在 1X 免疫检测反应缓冲液中的稳定性较差。按照标准操作流程并在加入孔板前立即准备底物稀释液时, 通常没有问题。然而, 在某些情况下, 如果底物需要在加入孔板前超过 10 分钟进行稀释 (例如, 在高通量筛选实验中), 就需要提高底物的稳定性。为此, 可以通过在乙醇、甘油和水中稀释底物来实现。请参考以下准则和表 3 来准备 Lumit® Substrate C 的稀释液。

- 确保 Lumit® Substrate C 在溶液中的浓度不超过 7%。如果浓度过高, 底物可能会析出。
- 孔板中 Lumit® Substrate C 的最小含量应 $\geq 1\%$ 。
- 始终保持水在溶液中的含量为 50%。如果 Lumit® Substrate C 浓度偏离 7%, 那么应使用乙醇和甘油补足这部分体积。
- 制备稀释底物的一种简便方法是首先配制一份 85% 乙醇和 15% 甘油的溶液。如果需要 100ul 的稀释液, 可加入 50ul 水、7ul 底物和 43ul 由乙醇和甘油组成的溶液 (参考表 3)。

表 3. 在室温稀释底物以增强稳定性

试剂	溶液中的百分比
Lumit® Substrate C	7
85% Ethanol/15% Glycerol	43
Water	50

7.B. 稀释 Lumit® Substrate C 以增强稳定性 (续)

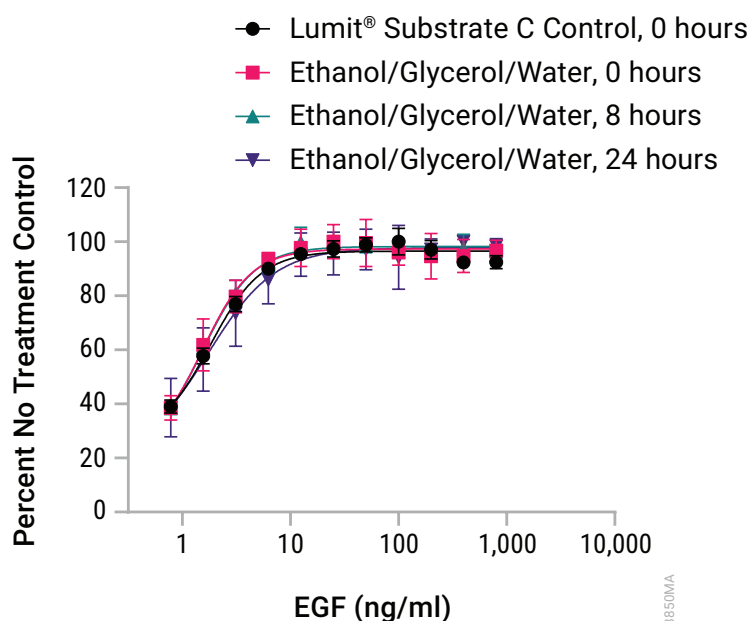


图 8. 使用 p-ERK (Thr202) 检测时底物稳定性的展示。数据显示，在向孔板中加入底物前，Lumit® Substrate C 在乙醇 / 甘油 / 水溶液中分别提前 8 小时和 24 小时进行稀释后的稳定性表现。同时还包含了一个 0 小时对照组（Lumit® Substrate C 在 1X 免疫检测反应缓冲液中进行稀释），以证明在乙醇 / 甘油 / 水中稀释底物不会对检测性能造成影响。实验前一天将 50,000 个 MCF7 细胞接种于孔板中并静置过夜。分别用 100ng/ml 的 EGF 或培养基对照处理细胞，先振荡 5 分钟，再加入 Lumit® Lysis Buffer II 进行细胞裂解。随后按照本应用说明中所述程序检测磷酸化 ERK（Thr202）：

www.promega.com/products/immunoassay-elisa/lumitimmunoassays/lumit-immunoassay-cellular-systems/

孔板振荡 2 分钟，之后使抗体孵育 1.5 小时。接着加入底物，并再次振荡 2 分钟后读取信号。根据所标注的小时数，底物在加入孔板前已在室温下预先准备并孵育一定时间。

8. 参考文献

1. Dixon, A. S. *et al.* (2016) NanoLuc complementation reporter optimized for accurate measurement of protein interactions in cells. *ACS Chem. Biol.* **11**, 400–8.
2. Hwang, B. *et al.* (2020) A homogeneous bioluminescent immunoassay approach to probe cellular signaling pathway regulation. *Commun. Biol.* **3**, 8
3. Zegzouti, H. *et al.* (2020) A versatile bioluminescent immunoassay approach to probe cellular signaling pathway regulation. Poster presented at the 2020 Annual Conference of the Society for Laboratory Automation and Screening (SLAS), available online at www.promega.com/resources/

9. 相关产品

Lumit[®] 二抗 ^(a)

产品	规格	目录号
Lumit [®] Anti-Mouse Ab-LgBiT	30μl	W1021
Lumit [®] Anti-Mouse Ab-LgBiT	300μl	W1022
Lumit [®] Anti-Mouse Ab-SmBiT	30μl	W1051
Lumit [®] Anti-Mouse Ab-SmBiT	300μl	W1052
Lumit [®] Anti-Rabbit Ab-LgBiT	30μl	W1041
Lumit [®] Anti-Rabbit Ab-LgBiT	300μl	W1042
Lumit [®] Anti-Rabbit Ab-SmBiT	30μl	W1031
Lumit [®] Anti-Rabbit Ab-SmBiT	300μl	W1032
Lumit [®] Anti-Goat Ab-LgBiT	30μl	W1061
Lumit [®] Anti-Goat Ab-LgBiT	300μl	W1062
Lumit [®] Anti-Goat Ab-SmBiT	30μl	W1071
Lumit [®] Anti-Goat Ab-SmBiT	300μl	W1072

9. 相关产品（续）

激酶检测

产品	规格	目录号
ADP-Glo [®] Kinase Assay	400 assays	V6930
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

仪器设备

产品	规格	目录号
GloMax [®] Discover System	1 each	GM3000

10. 变更总结

本次修订（3/24 版）对技术手册做了如下更新：

1. 在第 2 节以及流程图和实验步骤章节中新增了 Lumit[®] Lysis Buffer II, 10X 这一新的试剂盒组份介绍。
2. 更新了 Lumit[®] 商标的相关表述。
3. 更新了有限使用标签许可条款（a）和专利声明（b）的内容。
4. 增加了表格 3，并对图 7 进行了修改。另外还新增了图 4、5、6 和 8。
5. 新增了第 7 节，并对剩余章节重新编号排列。

^(a)Lumit[®] Conjugated Reagents 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; and (2) resale of the product, whether or not such product is resold for use in research. Notwithstanding the foregoing, researcher may use this product in provision of services, information or data to third parties in exchange for consideration, provided that researcher does not transfer the product. Researchers shall have no right to modify or otherwise create variations of the product. No other use of this product is authorized without the prior express written consent of Promega.

In addition, researcher must either:

- (i) use Lumit[®]-branded luminescent assay reagents (LARs) for all determinations of luminescence activity of this product and its derivatives; or
- (ii) contact Promega to obtain a license for use of the product and its derivatives with LARs 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 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)U.S. Pat. Nos. 9,797,889, 9,797,890, 10,107,800, 11,493,504 and other patents and patents pending.

^(c)U.S. Pat. No. 8,809,529, European Pat. No. 2635582 and other patents and patents pending.

©2020–2024 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Lumit, NanoLuc, NanoBiT, NanoBRET and GloMax are registered trademarks of Promega Corporation. ADP-Glo is a trademark of Promega Corporation.

Halt is a trademark of Thermo Fisher Scientific.

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.