活细胞内实时检测蛋白相互作用

NanoBRET™ : Innovative BRET Technology

新型生物发光共振能量转移

NanoBRET™技术

- 一站式
- 活细胞
- BRET

NanoBRET™ 完整解决方案 - 背景介绍

蛋白：蛋白相互作用检测与生物发光共振能量转移 (BRET，bioluminescence resonance energy transfer) 技术：

蛋白相互作用调控绝大部分的生物进程——从信号通路转导中短暂的相互作用到大的多种蛋白复合体组装，是现在研究的热点。目前蛋白相互作用检测方法分为两类，一类是蛋白水平检测，如 Co-IP，pull down 等。检测结果欠缺在细胞水平的验证而缺乏说服力，因此还需要进行细胞学检测来进行验证。而生物发光共振能量转移 (BRET) 方法与荧光共振能量转移 (FRET) 则是极为少数可以在活细胞水平进行蛋白相互作用检测的方法。BRET 与蛋白水平检测结果可相互印证。

FRET 原理：

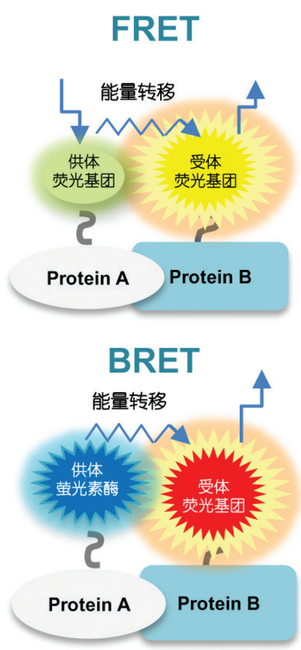
当两个蛋白分子相互作用，一个蛋白标记的供体荧光基团的荧光发射光光谱与另一个蛋白标记的受体荧光基团的激发光谱相重叠，供体荧光分子的激发能诱发受体分子发出荧光，随着距离延长，FRET 效应显著减弱。

BRET 原理：

当两个蛋白分子相互作用，一个蛋白融合表达的供体萤光素酶蛋白 (传统使用 Renilla 海肾萤光素酶) 酶学反应产生的发光信号光谱与另一个蛋白标记的受体荧光基团的激发光谱相重叠，诱发受体分子发出荧光。

BRET 方法的优点：

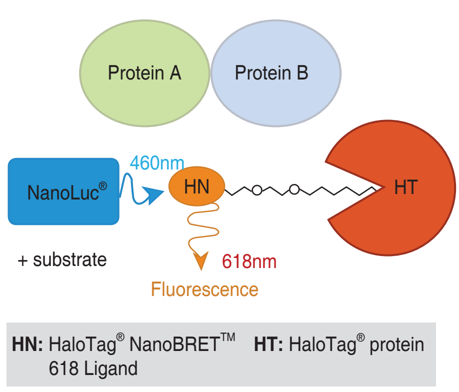
- 无需激发光，背景更低。
- 无需漂白，细胞损坏更少。
- 避免了自发荧光干扰。
- 数据窗口更宽。



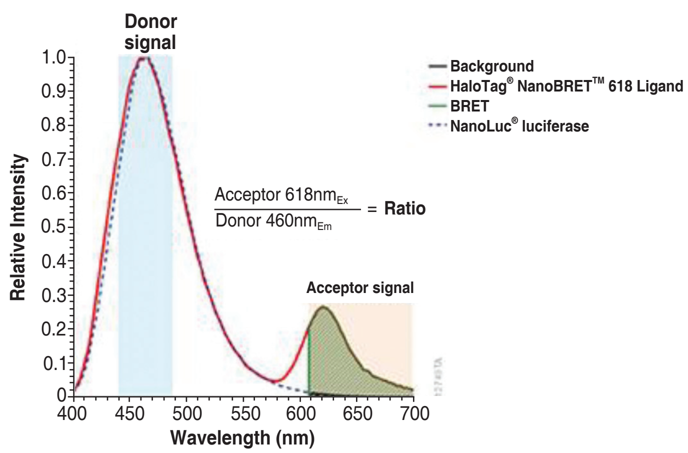
NanoBRET™ 技术：

NanoBRET™ 分析是大幅度改良的 BRET 分析平台，使用 NanoLuc® luciferase 作为能量供体和 HaloTag® 蛋白标记的 NanoBRET™ 618 荧光基团作为受体。来自 NanoLuc® 供体的明亮的蓝移发光信号耦合到远红移的 HaloTag® 受体上后，光谱叠加更佳、信号更强、且与传统 BRET 分析相比背景更低。

A.



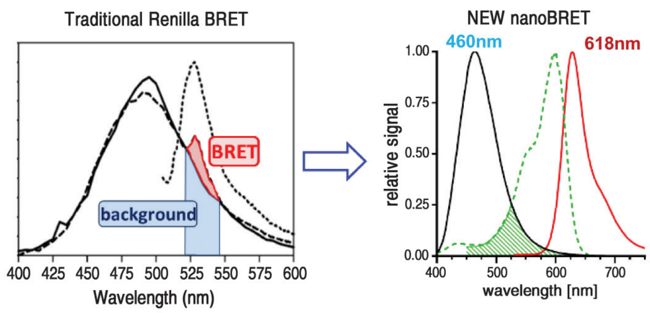
B.

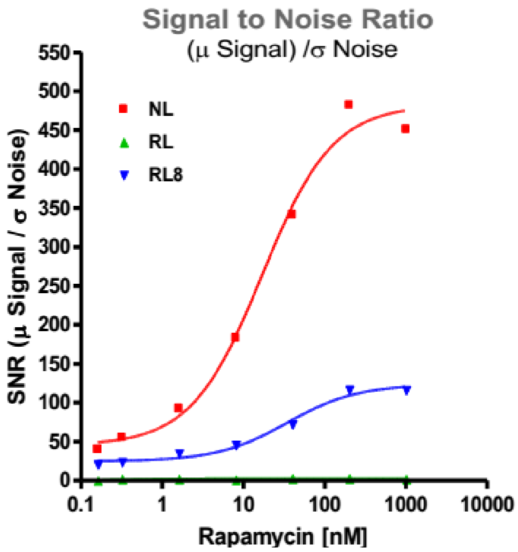


NanoBRET™ 完整解决方案 - 技术优势，操作流程及产品

NanoBRET™ 方法与传统 BRET 法相比的优势

- 作为供体的专利型 NanoLuc® 萤光素酶蛋白光信号更强，与受体荧光基团的波长配对更理想。
- 克隆更简单：使用先进的 Flexi® 载体技术进行克隆，更简单省时。
- 线性范围更宽
- 提供商品化预构建载体，可节省自行构建载体的时间，应用更方便。



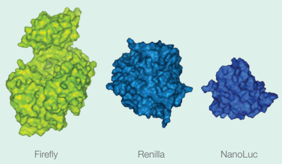


技术优势小标签

NanoLuc® Luciferase：仅有 19KDa，171 个氨基酸，更适合于融合蛋白表达构建和 BRET 检测，用于细胞水平蛋白相互作用的研究，使 BRET 技术更加优化。

NanoLuc® 蛋白特点：

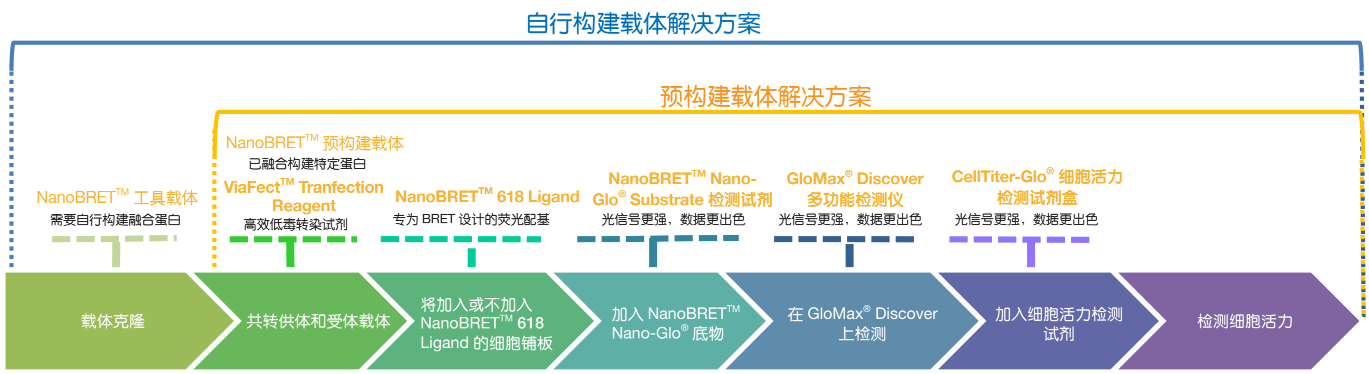
- 体积更小
- 表达效率高
- 光信号更强
- 非特异性自发光背景更低

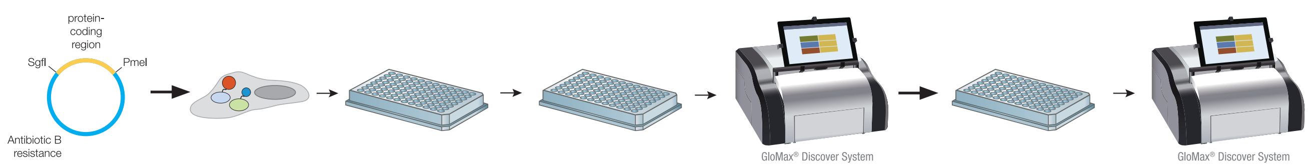


HaloTaq® 蛋白标签技术：能在体内和体外标记和固定蛋白的一种技术平台，以独特设计的报告蛋白与其特异配基之间形成高效的共价键为基础，这种共价结合可以发生在活细胞内、溶液内，或在固相支持物上。可以通过更换不同配基而实现蛋白标记，细胞成像，蛋白纯化等多种方面的应用。

NanoBRET™ 系统中应用的 HaloTag® NanoBRET™ 618 Ligand 是专为 BRET 技术开发的 HaloTag® 标签荧光配基，与 NanoLuc 的波长配对更佳，检测数据更出众。

- 技术流程 - 完整解决方案





NanoBRET™ 完整解决方案 - 预构建载体解决方案

• 预构建载体解决方案

NanoBRET™ 预构建载体是已融合构建已知相互作用的蛋白基因的载体对，无需您自行再构建载体，可直接用于进行转染构建细胞模型，配合检测试剂即可进行药物作用机理及其他相关的机制研究。省时省力，结果更有保证。

Bromodomain Assays

Protein Partner A	Protein Partner B
ATAD2 BD	Histone H3.3
ATAD2 BD	Histone H4
ATAD2A	Histone H3.3
ATAD2A	Histone H4
BAZ2A	Histone H3.3
BAZ2A	Histone H4
BAZ2A BD	Histone H3.3
BAZ2A BD	Histone H4
BRD2	Histone H3.3
BRD2	Histone H4
BRD3	Histone H3.3
BRD3	Histone H4
BRD4	Histone H3.3
BRD4	Histone H4
BRD4 BD1	Histone H3.3
BRD4 BD1	Histone H4
BRD7	Histone H3.3
BRD7	Histone H4
BRD9	Histone H3.3
BRD9	Histone H4
BRDT	Histone H3.3
BRDT	Histone H4
BRPF1	Histone H3.3
BRPF1	Histone H4
BRPF1 BD	Histone H3.3
BRPF1 BD	Histone H4
BRPF2	Histone H3.3
BRPF2	Histone H4
BRPF3	Histone H3.3
BRPF3	Histone H4
CBP	Histone H3.3
CBP	Histone H4
CBP BD	Histone H3.3
CBP BD	Histone H4
CECR2	Histone H3.3
CECR2	Histone H4
GCN5	Histone H3.3
GCN5	Histone H4
MLL1	Histone H3.3
MLL1	Histone H4
P300	Histone H3.3
P300	Histone H4
PCAF	Histone H3.3
PCAF	Histone H4
SMARCA2	Histone H3.3
SMARCA2	Histone H4

Other Epigenetic Assays

Protein Partner A	Protein Partner B
EZH2	Histone H3.1
EZH2	Histone H3.3
EZH2	SUZ12
EZH2	EED1
EED1	Histone H3.1
EED1	Histone H3.3
HDAC1	HDAC2
SETD1A	Histone H3.3
L3MBTL3	Histone H4
L3MBTL3 3MBT Domain	Histone H4
MLL1	Menin
TET3	Histone H2A
TET3	Histone H2B
TET3	Histone H3.3
TET3	Histone H4
LSH	Histone H2A
LSH	Histone H2B
LSH	Histone H3.3
LSH	Histone H4
OGT	Histone H2A
OGT	Histone H2B
CBX1	Histone H3.1
CBX3	Histone H3.1
CBX5	Histone H3.1

Transcriptional Protein Assays

Protein Partner A	Protein Partner B
P300	HIF1alpha
P53	MDM2
N-terminal p53	MDM2
P53	PARP1
MED12	MED26
MED13	MED26
MYC	MAX

Signaling Proteins and Kinase Assays

Protein Partner A	Protein Partner B
FKBP	FRB
GRB2	EGFR
MEK	ERK
SKP1	SKP2
SKP2	CKS1B
SKP2	p27
ERK	ELK
KRas (G12C)	cRaf

Membrane Protein Assays

Protein Partner A	Protein Partner B
MRAP	MC2R
MRAP	MRAP (Dimerization)
EGFR	EGFR (Dimerization)

RNA Binding Protein Assays

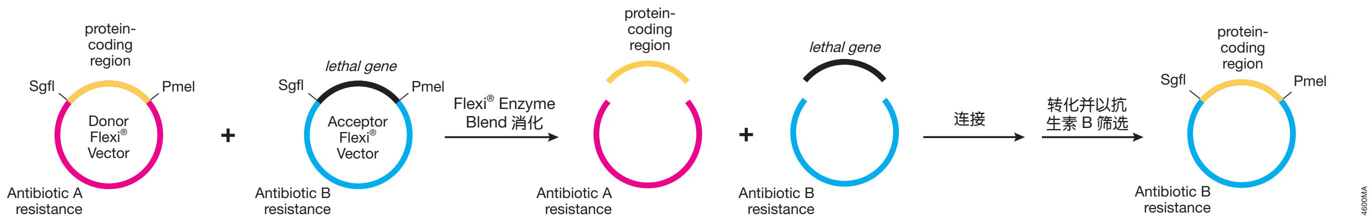
Protein Partner A	Protein Partner B
hnRNPA	hnRNPF
hnRNPA	hnRNPM
hnRNPA	hnRNPU
hnRNPA	hnRNPH
hnRNPF	hnRNPH
hnRNPF	hnRNPM
hnRNPF	hnRNPU
hnRNPH	hnRNPM
hnRNPH	hnRNPU
hnRNPM	hnRNPU
hnRNPF	Nono
hnRNPU	DDX5

NanoBRET™ 完整解决方案 - 自行构建载体及检测试剂

• 自行构建载体解决方案

1. Flexi 技术解决方案 - NanoBRET™ PPI Flexi® Starter System

通过 Flexi® 载体克隆系统生成 Nluc 或 HaloTag® 的 N- 端融合蛋白 — Flexi® 载体克隆系统生成一种定向克隆技术，基于两个稀有酶切位点的限制性内切酶，SgfI 和 PmeI，这种技术能够快速，高效，高保真性地在不同 Flexi® 载体间转移蛋白编码区，而无需重新测序。NanoBRET™ PPI Flexi® Starter System 提供了以 Flexi® 载体系统为基础进行蛋白相互检测的解决方案，包括载体，检测试剂及阳性对照，配合 Flexi® System, Entry/Transfer 或 Carboxy Flexi® System, Transfer 即可完成实验。



产品及目录号	组分	组分目录号	说明
NanoBRET™ PPI Flexi® Starter System (Cat.#N1821)	pFN31K *Nluc* CMV-neo Flexi® Vector	N1321	NanoLuc® 融合蛋白工具载体 (供体), 能够生成 Nluc 的 N- 端融合蛋白 或 C- 端融合蛋白
	pFC32K *Nluc* CMV-neo Flexi® Vector	N1341	
	pFN21A HaloTag® CMV Flexi® Vector	G2821	HaloTag® 融合蛋白载体 (受体), 能够生成 HaloTag® 的 N- 端融合蛋白的 C- 端融合蛋白
	pFC14K HaloTag® CMV Flexi® Vector	G9661	
	NanoBRET™ PPI Control Pair (p53, MDM2)	N1641	已构建了 p53 和 MDM2 融合蛋白的载体对，作为阳性对照
	NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System	N1661	包括受体 HaloTag® 蛋白荧光配基和供体 NanoLuc® 萤光素酶反应底物，先后加入后即可检测 BRET 信号

注：以上所有组分均可单独购买

克隆配套产品:

产品功能	产品	目录号	规格	说明
是配套 Flexi® 载体完成克隆所需的所有组份	Flexi® System, Entry/Transfer	C8640	5 entry and 20 transfer reactions	包括凝胶回收，T4 连接酶，Flexi® Enzyme Blend (SgfI & PmeI) 限制性内切酶及缓冲液等
C 端融合表达载体间相互转移所需的组份	Carboxy Flexi® System, Transfer	C9320	50 transfer reactions	包括 T4 连接酶，Flexi® Enzyme Blend (SgfI & PmeI) 限制性内切酶及缓冲液等 Carboxy Flexi® Enzyme Blend (SgfI & EcoICRI)

2. 多克隆位点解决方案 - NanoBRET™ PPI MCS Starter System

带有多克隆位点的 NanoLuc® 融合蛋白克隆载体和 HaloTag® 融合蛋白载体，检测试剂和阳性对照的试剂盒

产品及目录号	组分	组分目录号	说明
NanoBRET™ PPI MCS Starter System (Cat.#N1811)	pNLF1-N [CMV/Hygro] Vector	N1351	NanoLuc® 融合蛋白工具载体 (供体)，带有 NanoLuc® 基因的克隆载体，能够生成 Nluc 的 N- 端或 C- 端融合蛋白 (AmpR)
	pNLF1-C [CMV/Hygro] Vector	N1361	
	pHTN HaloTag® CMV-neo Vector	G7721	HaloTag® 融合蛋白载体 (受体)，带有 HaloTag® 标签的克隆载体，能够生成 HaloTag® 的 N- 端或 C- 端融合蛋白 (KanR)
	pHTC HaloTag® CMV-neo Vector	G7711	
	NanoBRET™ PPI Control Pair(p53, MDM2)	N1641	已构建了 p53 和 MDM2 融合蛋白的载体对，作为阳性对照
	NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System	N1661	包括受体 HaloTag® 蛋白荧光配基和供体 NanoLuc® 萤光素酶反应底物，先后加入后即可检测 BRET 信号

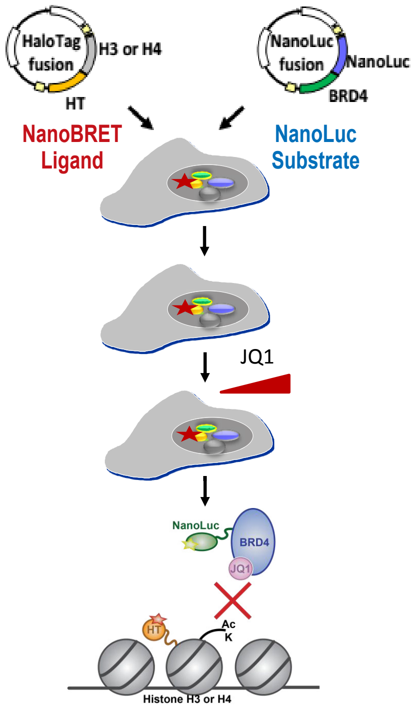
注：以上所有组分均可单独购买

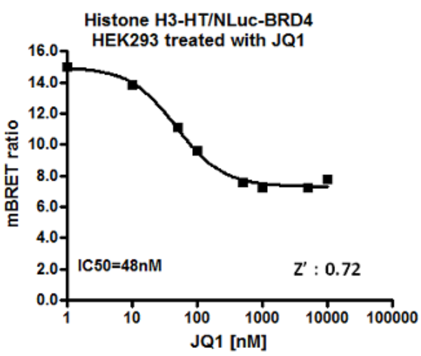
NanoBRET™ 完整解决方案 - 应用举例

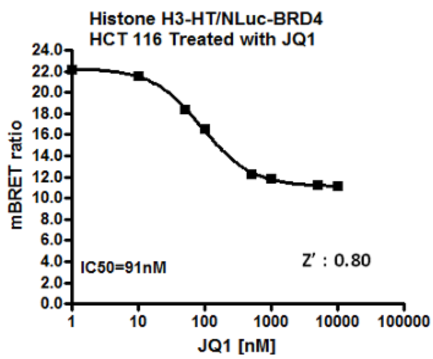
应用举例：检测 JQ1 抑制剂对细胞中 BRD4 蛋白与组蛋白 Histone H.3 蛋白的相互作用的影响

检测 BET bromodomain 抑制剂 -JQ1 对 BRD4 和 Histone H.3 蛋白相互作用的影响：

- 使用 Promega 预构建的 BRD4 融合蛋白载体和 Histone H.3 融合蛋白载体，转染 HEK293 和 HCT116 细胞。
- 以 JQ1 处理细胞。
- 孵育后再按顺序加入荧光配基和 NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate 底物反应。
- 最终检测 BRET ratio 信号。







其他相关文献：

- Demont, E., Bamborough, P., Chung, C., Craggs, P., Fallon, D., Gordon, L., Grandi, P., Hobbs, C., Hussain, J., Jones, E., Le Gall, A., Michon, A., Mitchell, D., Prinjha, R., Roberts, A., Sheppard, R., & Watson, R. (2014). 1,3-Dimethyl Benzimidazolones Are Potent, Selective Inhibitors of the BRPF1 Bromodomain。

  ACS Medicinal Chemistry Letters DOI: 10.1021/ml5002932

- Demont, E.H. et al. (2014) 1, 3-Dimethyl Benzimidazolones Are Potent, Selective Inhibitors of the BRPF1 Bromodomain.

  ACS Medicinal Chemistry Letters. September 10 (Epub), DOI: 10.1021/ml5002932

Promega 技术资源：

- **技术资料**：可联系 Promega 公司或经销商所需资料。具体联系方式见封底。
- **现场技术讲座**：可联系 Promega 公司预约讲座。具体联系方式见封底。
- **网络技术讲座**：请登陆 http://cn.promega.com/resources/webinars 观看。
- **技术博客**：请登录 http://www.promegaconnections.com/ 浏览最新技术文章。

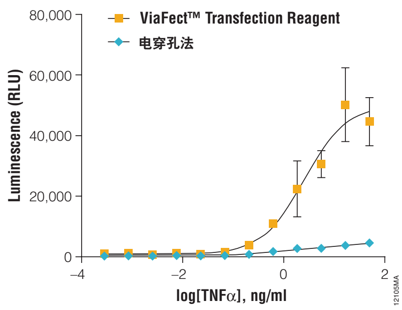
NanoBRET^{TM} 完整解决方案 - 转染试剂及检测仪器

4. 高效低毒转染 -ViaFect 转染试剂

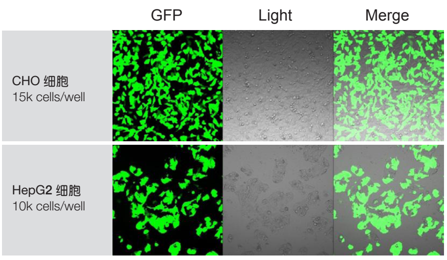
产品功能	产品	规格	目录号	说明
将载体转入细胞	ViaFect^{TM} Transfection Reagent	0.2 ml	E4983	• 创新型配方转染试剂； • 性价比更高； • 超低细胞毒性； • 对于难转染的多种细胞效果更佳； • 操作简单，无需更换培养基；
		0.75 ml	E4981	
		2 x 0.75 ml	E4982	

右图．以 ViaFect^{TM} 转染试剂建立造血细胞的细胞因子信号通路模型。以 ViaFect^{TM} 转染试剂或电穿孔将 pGL4.32[*luc2P*/NF- κ B-RE/Hygro] Vector (一种带有 NF- κ B 应答元件的萤光素酶报告基因载体) 瞬时转染入 TF-1 cells。然后以 TNF α 刺激细胞 6 小时，再以 Bio-Glo^{TM} Luciferase Assay System 检测萤光素酶表达。

在难转染的悬浮细胞中建立细胞检测模型



转染效果举例



* 注：反向转染指先在培养板孔中加入 DNA：转染试剂混合物，再加入细胞进行转染的方式。

5. 细胞活力检测试剂 ---- 一步法快速细胞活力检测

产品功能	产品	规格 (96 孔板)	目录号	说明
检测转染细胞的活力，确认因细胞活力造成的 NanoBRET 信号的变化	CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	100 assays	G7570	基于活细胞 ATP 含量检测的快速细胞活力检测法。在国内外被广泛应用和公认的高灵敏度发光检测法，细胞活力检测的金标准
		1000 assays	G7571	
		1000 assays	G7572	
		10000 assays	G7573	

6. GloMax® Discover 多功能检测仪

检测仪器	货号	包装量
GloMax® Discover System	GM3000	1 台

高效，易用的多功能检测仪，用于化学发光，荧光，吸收光，BRET 和 FRET。

- 使用简单
  选择预置的 Promega 程序或编辑您自己需要的程序。数据可输出至网络，云，LIMS 或其他服务器。容易实现化学发光，荧光，UV- 可见吸收光，BRET 和 FRET 检测。
- 可实现自动化
  可与您的自动化工作流整合实现高通量检测，或者整合进您的 LIMS 数据管理系统。
- 超高灵敏度
  动态范围宽，灵敏度高，孔间交叉干扰小，使得您的数据更加可信。
- 手动干扰最小化
  自动转换滤片，轻松实现多重检测。
- 节省人力
  预置的程序可节省优化程序的时间。
- 直观的软件界面
  触摸屏可实现编辑程序，整合自动化平台，输出数据。

• 其他关联产品推荐

无内毒素质粒提取——PureYield™ 去内毒素质粒纯化系统！

- 系统包含独特的内毒素清除洗脱液，用于去除纯化质粒 DNA 中的蛋白质、RNA 和内毒素的污染。
- 使用新型硅基质膜，无需异丙醇沉淀或长时间的离心步骤，使操作更简单，纯化产量更高。

名称	产品特点	规格	目录号
PureYield™ Plasmid Miniprep System	• 仅需 10 分钟就能从 600μl 到 3ml 细菌培养物中纯化出高达 15μg 的质粒 DNA； • 无需异丙醇沉淀或长时间的离心步骤； • 可使用离心或真空法操作。	100 次	A1223
		250 次	A1222
PureYield™ Plasmid Midiprep System	• 使用真空装置可在 30 分钟内从 50ml 细菌培养液中快速抽提 100-200μg 质粒 DNA； • 高速离心法操作可从 250ml *E. coli* 培养液中纯化出最高达 400μg 高拷贝数质粒； • 无需异丙醇沉淀或长时间的离心步骤。	25 次	A2492
		100 次	A2495
		300 次	A2496
PureYield™ Plasmid Maxiprep System	• 通过真空装置操作可从 250ml 高拷贝数细菌培养液中快速抽提 1mg 质粒 DNA； • 无需异丙醇沉淀或长时间的离心步骤。	10 次	A2392
		25 次	A2393

普洛麦格（北京）生物技术有限公司　北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909
电话：010-58256268　传真：010-58256160　网址：www.promega.com
免费电话：800 810 8133 (固定电话)

欢迎关注 Promega 官方微信