

中文说明书

NanoBRET™ Protein: Protein Interaction System

适用产品目录号：N1661, N1662, N1663, N2583, N2584 和 N2585



NanoBRET™ Protein:Protein Interaction 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. 一般注意事项	7
3.A. 仪器	7
3.B. NanoBRET™ 检测方法设置和优化的策略及工作流程	8
4. 检测开始前	9
4.A. 构建 NanoBRET™ 表达载体	9
4.B. 仪器设置	10
4.C. NanoBRET™ PPI Control Pair (p53, MDM2)	11
4.D. NanoBRET™ 阳性对照	12
5. NanoBRET™ 操作步骤	13
5.A. 使用 HaloTag® 和 NanoLuc® 融合蛋白对 HEK293 细胞进行瞬时转染	14
5.B. 将转染后的 HEK293 细胞重新铺板至多孔板中并添加 HaloTag® NanoBRET™ 618 配基	18
5.C. 测试化合物或抑制剂终点检测的可选操作流程	19
5.D. 添加 NanoBRET™ Nano-Glo® 底物并进行 NanoBRET™ 终点测量	20
5.E. 使用 NanoBRET™ Nano-Glo® Kinetic Detection System 进行活细胞的动态检测	20
5.F. NanoBRET™ 计算	21
6. 代表性数据	22
7. 疑难解答	25
8. 缓冲液和溶液的组成	27
9. 参考文献	27
10. 附录	28
10.A. 检测验证的建议	28
10.B. 供体饱和和分析 (DSA) 操作流程	28
10.C. 与 CellTiter-Glo® 2.0 Assay 结合使用的多重检测	31
11. 相关产品	32
12. 内容变更总结	33

1. 产品描述

了解蛋白功能的关键在于了解蛋白质在细胞内存在的动态相互作用。但是，监测活细胞中的蛋白：蛋白相互作用（PPI）以及这些相互作用的变化情况极具挑战性，而能够实现这一目的的技术却少之又少。在此我们将介绍 NanoBRET™ Protein:Protein Interaction (PPI) System^(a-d)，一种生物发光共振能量转移（Bioluminescence Resonance Energy Transfer, BRET）技术的新形式和方法（1, 2）。与 BRET 类似，NanoBRET™ 系统是一种基于蛋白接近度的检测技术，通过测量从生物发光蛋白供体至荧光蛋白受体的能量转移来检测蛋白间的相互作用。如图 1, A 所示，NanoBRET™ 检测技术使用 NanoLuc® 融合蛋白作为能量供体，并使用荧光标记的 HaloTag® 融合蛋白作为能量受体（3, 4）。优化后的蓝移的 NanoLuc® 供体与红移的 HaloTag® 受体配对后可最大程度地减少检测过程中的光谱重叠，因此在计算 NanoBRET™ 比值时使信号：背景比得到改善（图 1, B）。本说明书为在活细胞中进行终点法和动态 NanoBRET™ 检测均提供了操作说明。

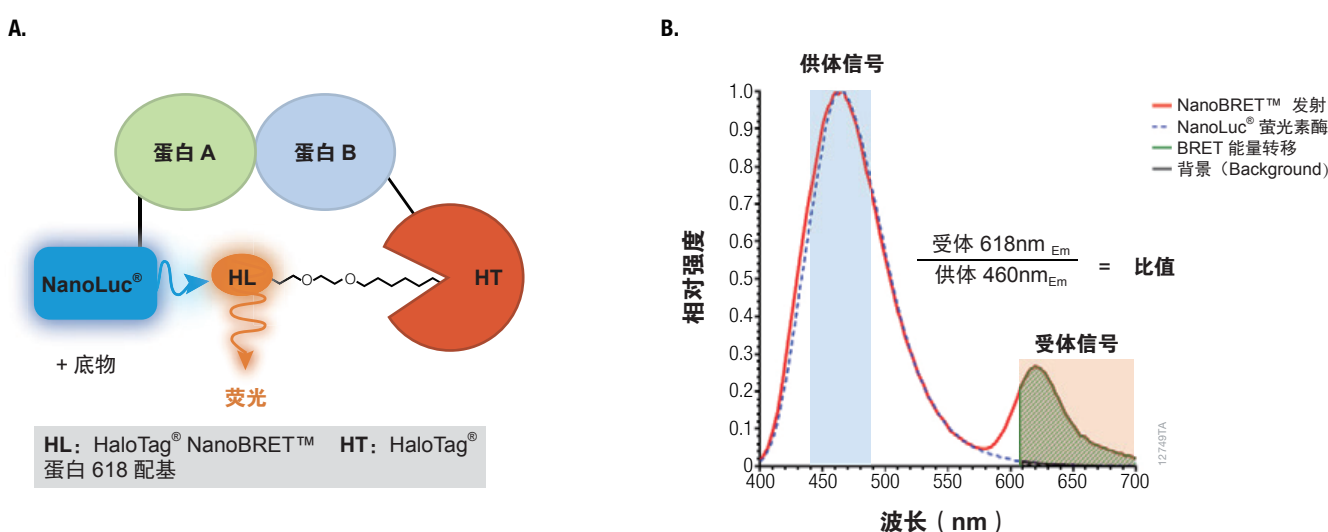


图 1. NanoBRET™ 检测技术。 **A.** 描述了蛋白质 A 和蛋白质 B 相互作用后，从 NanoLuc®- 融合蛋白 A（能量供体）到荧光标记的 HaloTag®- 融合蛋白 B（能量受体）的能量转移过程。 **B.** NanoLuc® 发射（460nm）和荧光 HaloTag® NanoBRET™ 配基发射（618nm）的光谱分离情况，以及 NanoBRET™ 比值的计算。



图 2. NanoBRET™ PPI 检测流程包括四个步骤。第一步，将 NanoLuc® 和 HaloTag® 融合蛋白载体均转染至合适的细胞系中。第二步，将细胞重新铺板至 96 孔板或 384 孔板中，并设置实验样品，包括荧光 NanoBRET™ HaloTag®618 配基（用于实验样品）和对照样品（无荧光配基）。如果需要化合物进行测试，则应在该步骤添加化合物。第三步，添加 NanoBRET™ NanoLuc® 底物，并使用配备合适滤光片的可测量双滤光片发光的仪器来测量供体和受体信号。第四步，计算校正后的 NanoBRET™ 比值，即用实验样品（含配基）的 NanoBRET™ 比值减去对照样品的 NanoBRET™ 比值。

NanoBRET™ PPI 检测法还可用于监测蛋白相互作用的变化，包括诱导或抑制所引起的变化（如图 3 所示）。因此，NanoBRET™ 检测法可用于筛选特定 PPI 的变化，从而使该方法成为在活细胞中进行小分子筛选的有效工具（5）。与其他比率检测法相似，NanoBRET™ 比值不受细胞数量的影响，变异性很低且再现性较好（可被图 3 所示的 Z 因子计算所证明）。我们已经成功开发出与药物筛选相关的，适用于多种表观遗传靶点、转录因子、激酶、受体和重要信号蛋白的 NanoBRET™ 检测方法。如需了解更多信息以及是否可购买，请访问：www.promega.com/NanoBRET

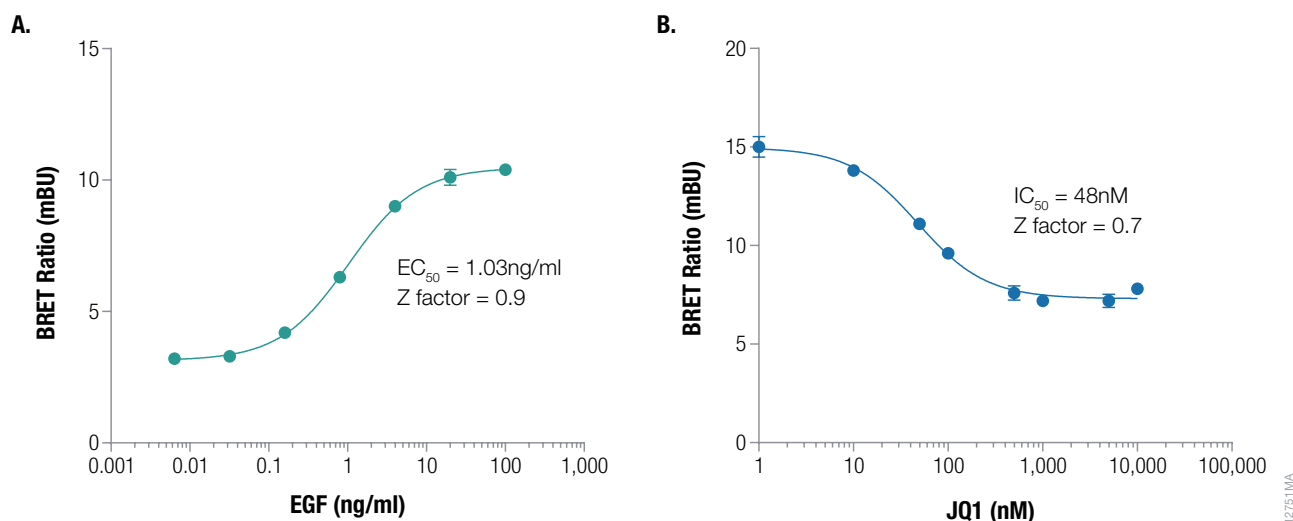


图 3. BRET 比值显示蛋白相互作用被诱导和抑制的示例。A. EGF 诱导了 EGFR/GRB2 之间的相互作用。B. JQ1 抑制了 BRD4/ 组蛋白 H3.3 之间的相互作用。

2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System	200 assays	N1661

当采用活细胞终点检测形式时，本系统足以在 96 孔板中进行约 200 次检测。本系统也可用于 384 孔板，总共可进行约 500 次检测。包括：

- 1 × 50µl NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate
- 1 × 20µl HaloTag® NanoBRET™ 618 Ligand

产品	规格	目录号
NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System	1,000 assays	N1662

当采用活细胞终点检测形式时，本系统足以在 96 孔板中进行约 1000 次检测。本系统也可用于 384 孔板，总共可进行约 2500 次检测。包括：

- 5 × 50µl NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate
- 5 × 20µl HaloTag® NanoBRET™ 618 Ligand

产品	规格	目录号
NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System	10,000 assays	N1663

当采用活细胞终点检测形式时，本系统足以在 96 孔板中进行约 10000 次检测。本系统也可用于 384 孔板，总共可进行约 25000 次检测。包括：

- 2 × 1.25ml NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate
- 1 × 1ml HaloTag® NanoBRET™ 618 Ligand

产品	规格	目录号
NanoBRET™ Nano-Glo® Kinetic Detection System	200 assays	N2583

当采用活细胞动态检测形式时，本系统足以在 96 孔板中进行约 200 次检测。本系统也可用于 384 孔板，总共可进行约 500 次检测。包括：

- 2 × 100µl Nano-Glo® Vivazine™ Substrate
- 1 × 20µl HaloTag® NanoBRET™ 618 Ligand

产品	规格	目录号
NanoBRET™ Nano-Glo® Kinetic Detection System	1,000 assays	N2584

当采用活细胞动态检测形式时，本系统足以在 96 孔板中进行约 1000 次检测。本系统也可用于 384 孔板，总共可进行约 2500 次检测。包括：

- 1 × 1ml Nano-Glo® Vivazine™ Substrate
- 5 × 20µl HaloTag® NanoBRET™ 618 Ligand

产品	规格	目录号
NanoBRET™ Nano-Glo® Kinetic Detection System	10,000 assays	N2585

当采用活细胞动态检测形式时，本系统足以在 96 孔板中进行约 10000 次检测。本系统也可用于 384 孔板，总共可进行约 25000 次检测。包括

- 10 × 1ml Nano-Glo® Vivazine™ Substrate
- 1 × 1ml HaloTag® NanoBRET™ 618 Ligand

储存条件：在 -30℃ 至 -10℃ 条件下避光储存。HaloTag® NanoBRET™ 618 配基最多可反复冻融 5 次。

对照载体

产品	规格	目录号
NanoBRET™ Positive Control	1 each	N1581

包括：

- 20µg NanoBRET™ Positive Control Vector
- 20µg Transfection Carrier DNA

产品	规格	目录号
NanoBRET™ PPI Control Pair (p53, MDM2):	1 each	N1641

包括：

- 20µg p53-HaloTag® Fusion Vector
- 20µg NanoLuc®-MDM2 Fusion Vector

注意：NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System 中提供的底物和配基足够进行试剂盒所标明的检测次数。由于我们建议实验中应始终包括一组不含 HaloTag® NanoBRET™ 618 配基的样品作为阴性对照，因此您可能会有剩余的配基。每种检测试剂也可单独购买。

可单独购买

产品	规格	目录号
NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate	50µl	N1571
	5 × 50µl	N1572
	2 × 1.25ml	N1573
Nano-Glo® Vivazine™ Live Cell Substrate	100µl	N2580
	1ml	N2581
	10 × 1ml	N2582
HaloTag® NanoBRET™ 618 Ligand	20µl	G9801

产品	规格	目录号
NanoBRET™ PPI Flexi® Starter System	1 each	N1821

包括:

- NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System, 200 assays
- NanoBRET™ PPI Control Pair (p53, MDM2)
- pFN31K Nluc CMV-neo Flexi® Vector
- pFC32K Nluc CMV-neo Flexi® Vector
- pFN21A HaloTag® CMV Flexi® Vector
- pFC14K HaloTag® CMV Flexi® Vector

产品	规格	目录号
NanoBRET™ PPI MCS Starter System	1 each	N1811

包括:

- NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System, 200 assays
- NanoBRET™ PPI Control Pair (p53, MDM2)
- pNLF1-N (CMV/Hygro) Vector
- pNLF1-C (CMV/Hygro) Vector
- pHTN HaloTag® CMV-neo Vector
- pHTC HaloTag® CMV-neo Vector

转染试剂

产品	规格	目录号
FuGENE® HD Transfection Reagent	1ml	E2311
	5 × 1ml	E2312

3. 一般注意事项

在本节中，我们会介绍 NanoBRET™ PPI 检测的关键因素，包括对仪器的要求以及检测方法开发和优化的策略概述。

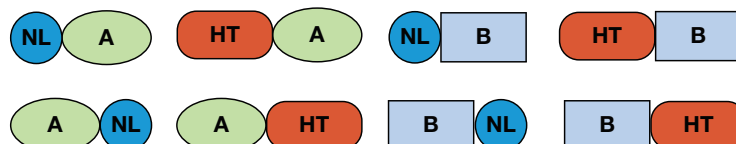
3.A. 仪器

如需进行 NanoBRET™ PPI 检测，请使用配备有适当滤光片的能够依次测量双滤光片发光的仪器。理想的滤光片设置应包括一个 460nm 带通 (BP) 滤光片，用以测量供体信号 (发射波长 450nm/BP 80nm)，以及一个起始波长约为 600-610nm 的长波通 (LP) 滤光片，用以测量受体信号 (发射波长 610nm/LP)。注意：超出上述范围的滤光片会错过关键的测量并导致数据质量低下。

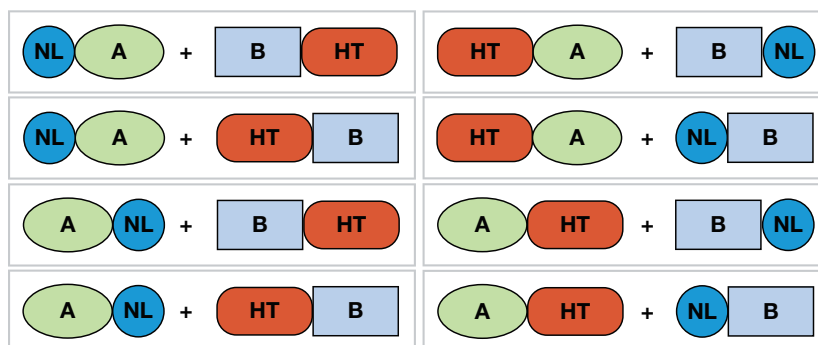
3.B.NanoBRET™ 检测方法设置和优化的策略及工作流程

图 4 列出了在对特定蛋白的标记位置无已知限制的情况下，建立和优化 NanoBRET™ 检测方法所必需的步骤。如果可接受的供体 / 受体组合形式不止一种，那么这些验证实验可帮助我们选择更稳健的配置。如果在测量过程中发生相互作用的一种蛋白伴侣的水平发生变化（即可能引起蛋白降解的相互作用），我们建议将此受到调节的蛋白固定为供体融合蛋白。

1. 将 NanoLuc® (NL) 供体标签和 HaloTag® (HT) 受体标签附加至蛋白 A 和蛋白 B 上，以构建克隆（最多 8 个可能的克隆）。



2. 测试不同组合形式以找到最佳的能量传递组合（最多 8 种可能的组合形式）。



3. 对最佳组合的转染条件进行优化，以获得最佳的供体与受体 DNA 比值，进而最大程度减少未结合的供体并使动态范围最大化。
4. 使用抑制剂或激活剂进行验证，以测试优化后转染条件下的特异性反应。或者，通过饱和分析法测试特异性。

图 4. 建立和优化 NanoBRET™ 检测方法。将 NanoLuc® 供体或 HaloTag® 受体标签加到靶蛋白的氨基（N）或羧基（C）末端，得到八个可能的克隆（步骤 1）和八种可能的供体 / 受体组合形式（步骤 2）。但是，可能会存在如下情况：已知标签位置会影响蛋白功能或者在某一特定末端会优先选择某个标签，因而减少了制备和测试的克隆数量。找到最佳的供体 / 受体组合后，根据供体和受体的相对水平优化转染条件（步骤 3）。最后，可通过使用已知的调节剂或通过饱和和分析法验证此检测方法（步骤 4）。

4. 检测开始前

4.A. 构建 NanoBRET™ 表达载体

有两组载体可用于创建目的蛋白 (Proteins of Interest, POI) 与 NanoBRET™ 的融合体。这些载体与 Flexi® Vector System (该载体系统可加快所有目标载体的快速克隆) 或使用多克隆位点 (Multiple Cloning Sites, MCS) 的常规载体兼容。

与 Flexi® Vector System 兼容的载体

如需获取 Flexi® Vector System 的详细信息, 请参阅 Flexi® Vector System 技术手册 # TM254, 网址: www.promega.com/protocols

简而言之, Flexi® 载体包含一个致死基因, 必须使用目的基因将其替换才能使细胞存活并形成集落。经过优化的操作流程和试剂极大降低了克隆的总体工作量, 尤其是当针对特定的 PPI 对构建八个不同载体时。

可使用克隆 PCR 产物的标准流程将目的基因导入各个 HaloTag® 载体、NanoLuc® 载体或两者之中。为了减少克隆的工作量, 可先将每个 POI 从 PCR 产物克隆至 HaloTag® 入门载体 pFN21A HaloTag® CMV Flexi® 载体 (目录号 G2821) 的氨基 (N) 末端, 然后经过测序确认序列后将其转移至其他载体中, 而无需对每个重组载体的插入序列进行测序。对于序列转移的操作流程, 请参阅 Flexi® Vector Systems 技术手册 # TM254 的第 4 节。

注意: 对于将标签添加在羧基 (C) 末端的载体, 则应使用第 4.B 节操作流程的改良版本, 其中在步骤 2 进行载体消化时使用的是 CarboxyFlexi® Enzyme Blend (SgfI & EcoICRI), 而不是技术手册 # TM254 中所述的 Flexi® Enzyme Blend (SgfI 和 PmeI)。

一种更为简便的克隆方法是将目标开放读码框 (ORF) 从现有的与 Flexi® 兼容的载体中转移至 HaloTag® 和 NanoLuc® 融合载体中。使用我们的 “Find My Gene™” 资源 (www.promega.com/findmygene/search.aspx) 从约 10000 个重组载体的列表进行搜索, 以确定您所需的目的基因是否存在。将这些 ORF 克隆至 pFN21A HaloTag® CMV Flexi® 载体, 从而将 HaloTag® 蛋白添加至融合蛋白的 N 末端。参照技术手册 # TM254 第 5.A 和 5.B 节中的操作流程, 将 ORF 转移至其余的 HaloTag® (C 端) 和 NanoLuc® (N 端和 C 端) 融合载体中。

MCS 载体

参照标准克隆程序, 将目的基因引入各个 MCS 载体中 (和单个载体操作流程一致)。

4.B. 仪器设置

为进行 NanoBRET™ 检测，需要有一台能够依次测量双波长窗口的发光检测仪。这可通过滤光片来实现；我们建议使用带通（Band Pass, BP）滤光片测量供体信号，使用长波通（Long Pass, LP）滤光片测量受体信号，以最大程度地提高灵敏度。

1. NanoBRET™ 生物发光供体的发射波长为 460nm。为测量此供体信号，我们建议使用带通（BP）滤光片，其覆盖范围接近 460nm，带通范围为 8–80nm。例如，450nm/BP80 可捕获范围在 410nm 至 490nm 之间的信号。

注意：对于供体信号测量，最佳选择应为 BP 滤光片，以选择性捕获信号峰并避免检测到任何受体峰渗透（bleed-through）。但是，也可使用覆盖 460nm 区域的短波通（SP）滤光片。这可能会造成供体信号值的人为性升高，而且还可测量到渗透至受体峰的信号，因而可能会压缩计算出的比率，从而减小检测窗口（assay window）。

2. NanoBRET™ 受体发射波长为 618nm。为测量受体信号，我们建议使用起始波长为 600-610nm 的长波通滤光片。

可进行双发光信号测量的仪器应配备可供选择的滤光片，或者可单独购买并添加滤光片。对于使用镜子的仪器，请选择发光镜（luminescence mirror）。一般来说，0.2-1 秒的整合时间就足够了。请确保对 PMT 的增益进行了优化，以在不造成仪器信号饱和的情况下可捕获到最高供体信号。

请咨询仪器制造商，以确定是否安装了合适的滤光片，或者将滤光片添加至发光检测仪需要进行哪些步骤。例如，安装滤光片时可能需要特殊支架或立方体，而且形状和厚度对不同仪器也可能存在差异。我们对下述仪器和配置较为熟悉：

1. GloMax® Discover 系统（目录号 GM3000）带有预装的滤光片，用于供体 450nm/8nm BP 和受体 600nm LP。从操作流程菜单中选择预装的 BRET：NanoBRET™ 618 操作流程。
2. BMG Labtech CLARIOstar® 带有预装的滤光片，用于供体 450nm/80nm BP 和受体 610nm LP
3. Thermo Varioskan® 带有 Edmunds Optics 公司生产的滤光片，使用供体 450nm CWL，直径 25mm，80nm FWHM，干涉滤光片和受体，直径 1 英寸，RG-610 长波通滤光片

PerkinElmer 的 EnVision® Multilabel Reader 是另一款可用于测量双发光信号的仪器，其推荐设置如下：

- 镜子：发光信号 - Slot4
- 发射滤光片：Chroma，目录号 AT600LP- EmSlot4
- 第二个发射滤光片：Chroma，目录号 AT460/50m - EmSlot1
- 测量高度（mm）：6.5
- 测量时间（秒）：1

4.C. NanoBRET™ PPI Control Pair (p53, MDM2)

为确保仪器的配置正确，我们建议使用 NanoBRET™ PPI Control Pair (p53, MDM2; 目录号 N1641) 进行测试。NanoBRET™ PPI Control Pair 由相互作用的蛋白伴侣 p53 和 MDM2 组成，此蛋白对可单独购买或包含在 NanoBRET™ PPI Flexi® Starter System(目录号 N1821)和 NanoBRET™ PPI MCS Starter System(目录号 N1811)中。当进行其他 NanoBRET™ 检测时，也可使用此参比对照对作为对照。市售化合物 Nutlin-3 (6; Tocris 目录号 3984) 可特异性破坏 p53/MDM2 的相互作用。图 5 为使用此系统在 GloMax® Discover System (目录号 GM3000) 上得到的代表性数据。在所有情况下，均可观察到 Nutlin-3 引起的预期生物学反应。就此系统以及其他 NanoBRET™ PPI 检测而言，NanoBRET™ 的绝对比值取决于多个因素，包括蛋白伴侣的接近程度、相互作用的亲和力、相对占有率和仪器设置。因此不应针对不同系统或仪器之间的绝对值进行比较。

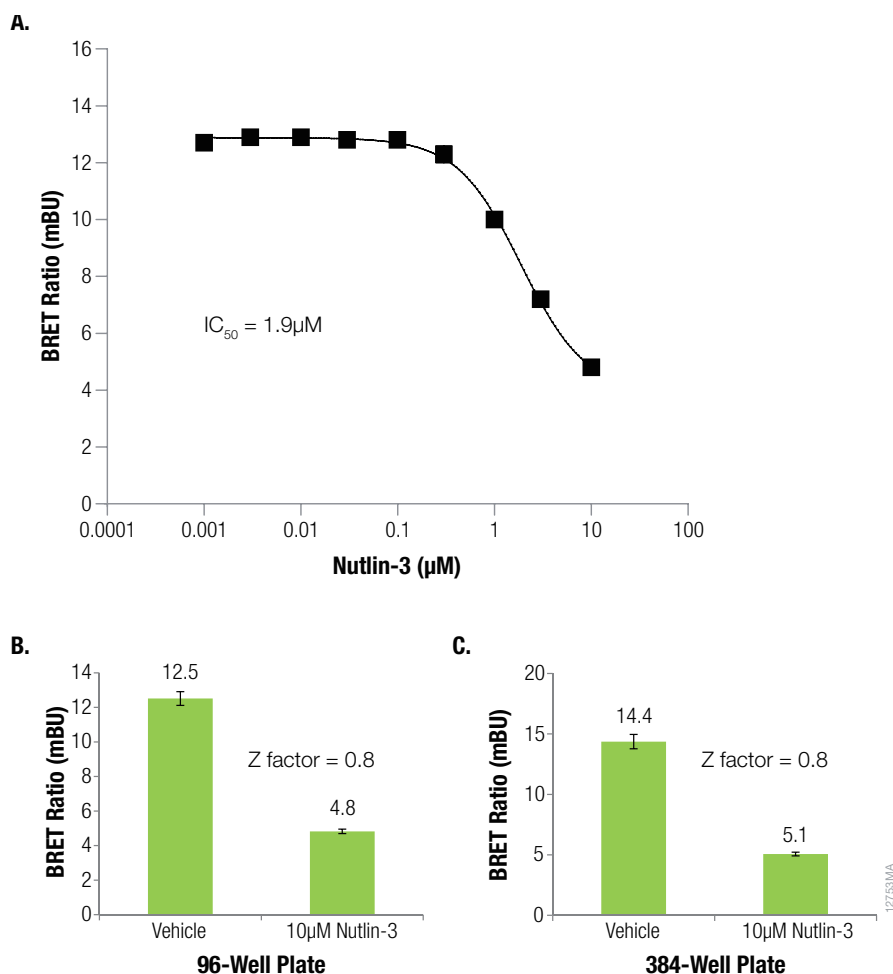


图 5. p53/MDM2 NanoBRET™ PPI Control Pair 的代表性数据。 A 为特异性抑制剂 Nutlin-3 引起的剂量反应曲线 (Dose-Response Curve, DRC)。B 和 C 显示了在 96 孔板模式 (B) 和 384 孔板模式 (C) 下的单剂量测量值和 Z 因子的计算。数据生成通过配备了 450nm/8nm BP 和 600nm LP 滤光片的 GloMax® Discover System 完成。

4.D. NanoBRET™ 阳性对照

测试仪器设置是否正确的另一种可行方法为使用 NanoBRET™ 阳性对照（目录号 N1581；可单独购买）。该载体是一个人工系统，它将 NanoLuc® 和 HaloTag® 蛋白连接在一起，以确保可发生能量转移。由于 NanoLuc® 萤光素酶明亮度极高，并且能量转移至 HaloTag® 的过程非常有效，因此必须使用 Transfection Carrier DNA 稀释载体质粒以降低其表达水平。请注意，实际条件下的蛋白对能量转移效率不可能达到同一水平，因此不应将其与这种人工对照进行比较。代表性数据如图 6 所示。

注意：如果将 NanoBRET™ 阳性对照载体与实际的 PPI 伴侣置于同一块孔板中使用，我们建议在 PPI 伴侣和 NanoBRET™ 阳性对照载体之间留一行未加样的空孔，因为来自对照质粒的光信号可能会在相邻孔中产生交叉干扰。

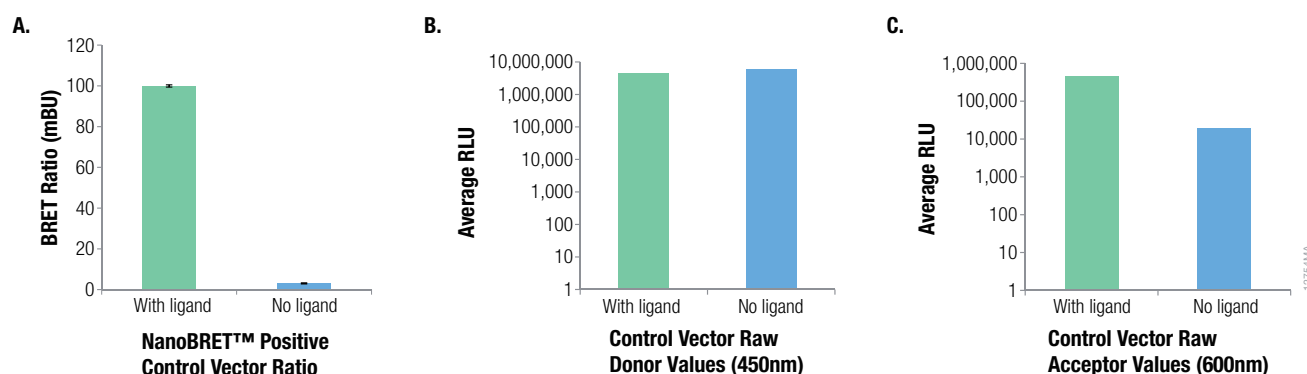


图 6. 使用 NanoBRET™ 阳性对照载体得到的 NanoBRET™ 比值以及供体和受体的原始测量值。 **A.** 在实验样品和无配基对照中计算出的 NanoBRET™ 比值。无配基对照代表的是渗透至受体通道的供体信号所产生的 NanoBRET™ 比值，因此实验样品应减去此值以获得校正的 NanoBRET™ 比值。 **B.** 以相对光单位（RLU）表示的原始供体值，可衡量仪器的灵敏度。对于最常用的仪器，有或无配基的两组样品值一般在 1000000 至 10000000 RLU 之间。 **C.** 原始受体值代表的是从供体到受体的能量转移，因而在含有配基的实验样品中应更高，而在无配基的对照样品中该值代表的是渗透的信号。数据生成通过配备了 450nm/8nm BP 和 600nm LP 滤光片的 GloMax® Discover System 完成。

5. NanoBRET™ 操作步骤

用户需提供的材料

- HEK293 或类似的哺乳动物培养细胞
- 白色 96 孔板 (Costar 目录号 3917) 或 384 孔板 (Corning, 目录号 3570)
- 组织培养仪器和试剂 (请参见第 8 节缓冲液和溶液组成)
- DPBS (Gibco, 目录号 14190)
- 0.05% 胰蛋白酶 / EDTA (Gibco, 目录号 25300)
- FuGENE® HD 转染试剂 (目录号 E2311)
- HaloTag® 载体, 组织培养级 DNA
- NanoLuc® 载体, 组织培养级 DNA
- DMEM (Gibco, 目录号 11995)
- 胎牛血清 (Seradigm, 目录号 89510-194) 目录
- Opti-MEM® I 低血清培养基, 无酚红 (Life Technologies, 目录号 11058-021)
- DMSO (Sigma, 目录号 2650)
- 无核酸酶的水 (目录号 P1191)
- 可选: p53/MDM2 抑制剂 Nutlin-3 (Tocris, 目录号 3984)

5.A. 使用 HaloTag® 和 NanoLuc® 融合蛋白载体对 HEK293 细胞进行瞬时转染

注意：请参照合适的转染流程，因为不同对照或检测方法优化的不同阶段所需的 DNA 量不同。以下是五种不同的转染方案：

- 使用 NanoBRET™ PPI Control Pair 检查仪器性能
- 使用 NanoBRET™ 阳性对照检查仪器性能
- 检测方法优化：对初始蛋白对的所有组合形式进行测试
- 检测方法优化：稀释 NanoLuc® 供体 DNA
- 标签位置和 DNA 浓度条件优化后的 NanoBRET™ 检测方法

转染步骤结束后，操作流程中的所有其余步骤均保持不变（无论采用了何种转染方案）。

NanoBRET™ PPI Control Pair 的转染条件

1. 检测前应于合适条件下培养 HEK293 细胞。
2. 吸出细胞培养瓶中的培养基，然后使用胰蛋白酶进行消化，使细胞从细胞培养瓶底部分离。
3. 用细胞培养基中和胰蛋白酶，对细胞进行计数以估算细胞密度，并用细胞培养基重悬以使最终密度为 4×10^5 个细胞 /ml。
4. 将 2ml 细胞（800000 个细胞）接种至六孔板的一个孔中。
5. 使细胞贴壁并于 37°C，5% CO₂ 条件下孵育 4-6 小时。
6. 制备转染混合物，其中包含 2μg p53-HaloTag® 融合载体 DNA + 0.2μg NanoLuc®-MDM2 融合载体 DNA（用水稀释所得）。
7. 向转染混合物中添加 100μl 无酚红的 Opti-MEM® I 低血清培养基，并混匀。
8. 加入 6μl FuGENE® HD 转染试剂，并在室温条件下孵育 10 分钟。
9. 将转染混合物添加至含有贴壁细胞的孔中，并于 37°C，5% CO₂ 条件下表达蛋白约 20 小时。
10. 如果在不使用化合物的情况下进行终点测量或进行动态测量，请继续进行第 5.B 节所述内容；如果在使用化合物的情况下进行终点测量，请继续进行第 5.C 节所述内容。

NanoBRET™ PPI 阳性对照的转染条件

1. 检测前应于合适条件下培养 HEK293 细胞。
2. 吸出细胞培养瓶中的培养基，然后使用胰蛋白酶进行消化，使细胞从细胞培养瓶底部分离。
3. 使用细胞培养基中和胰蛋白酶，对细胞进行计数以估算细胞密度，并用细胞培养基重悬以使最终密度为 4×10^5 个细胞 /ml。
4. 将 2ml 细胞（800000 个细胞）接种至六孔板的一个孔中。
5. 使细胞贴壁并于 37°C，5% CO₂ 条件下孵育 4-6 小时。
6. 制备转染混合物，其中包含 2μg Transfection Carrier DNA + 0.002μg NanoBRET™ 阳性对照载体（用水稀释）。
7. 向转染混合物中添加 100μl 无酚红的 Opti-MEM® I 低血清培养基，并混匀。
8. 加入 6μl FuGENE® HD 转染试剂，并在室温条件下孵育 10 分钟。
9. 将转染混合物添加至含有贴壁细胞的孔中，并于 37°C，5% CO₂ 条件下表达蛋白约 20 小时。
10. 如果在不使用化合物的情况下进行终点测量或进行动态测量，请继续进行第 5.B 节所述内容；如果在使用化合物的情况下进行终点测量，请继续进行第 5.C 节所述内容。

检测方法优化的转染条件：测试初始蛋白对的所有组合形式

1. 检测前应于合适条件下培养 HEK293 细胞。
2. 吸出细胞培养瓶中的培养基，然后使用胰蛋白酶进行消化，使细胞从细胞培养瓶底部分离。
3. 用细胞培养基中和胰蛋白酶，对细胞进行计数以估算细胞密度，并用细胞培养基重悬以使最终密度为 4×10^5 个细胞 /ml。
4. 将 2ml 细胞（800000 个细胞）接种至六孔板的一个孔中。
5. 使细胞贴壁并于 37°C，5% CO₂ 条件下孵育 4-6 小时。
6. 对于每种测试组合，制备转染混合物或由 2μg HaloTag® 质粒 + 0.2μg Nano Luc® 质粒组成的混合物（用水稀释）。
7. 向转染混合物中添加 100μl 无酚红的 Opti-MEM® I 低血清培养基，并混匀。
8. 加入 6μl FuGENE® HD 转染试剂，并置于室温条件下孵育 10 分钟。
9. 将转染混合物添加至含有贴壁细胞的孔中，并于 37°C，5% CO₂ 条件下表达蛋白约 20 小时。
10. 如果在不使用化合物的情况下进行终点测量，请继续进行第 5.B 节所述内容；如果在使用化合物的情况下进行终点测量，请继续进行第 5.C 节所述内容；

注意：对于 NanoBRET™ 检测方法的优化，我们建议采用终点检测。

5.A. 使用 HaloTag® 和 NanoLuc® 融合蛋白对 HEK293 细胞进行的瞬时转染 (续)

检测方法优化的转染条件: NanoLuc® 供体 DNA 稀释

1. 检测前应于合适条件下培养 HEK293 细胞。
2. 吸出细胞培养瓶中的培养基, 然后使用胰蛋白酶进行消化, 使细胞从细胞培养瓶底部分离。
3. 使用细胞培养基中和胰蛋白酶, 对细胞进行计数以估算细胞密度, 并用细胞培养基重悬以使最终密度为 4×10^5 个细胞 /ml。
4. 将 2ml 细胞 (800000 个细胞) 接种至六孔板的一个孔中。
5. 使细胞贴壁并于 37°C, 5% CO₂ 条件下孵育 4-6 小时。
6. 如下图所示, 针对初筛后每一选定的组合形式 (一般为 2-4 种组合) 并使用不同量的 HaloTag® 和 NanoLuc® DNA (代表 NanoLuc® DNA 相对于 HaloTag® DNA 的十倍稀释液, 以减少作为表达蛋白的游离供体的量) 制备转染混合物。组装反应体系时, 将 NanoLuc® DNA 质粒以 10 倍稀释度在水中进行连续稀释。对于每种转染混合物, DNA 总量均约为 2 µg。

所需比值	用量
1:1 (NanoLuc® 与 HaloTag®)	1µg HaloTag® 质粒 + 1µg NanoLuc® 质粒
1:10 (NanoLuc® 与 HaloTag®)	2µg HaloTag® 质粒 + 0.2µg NanoLuc® 质粒
1:100 (NanoLuc® 与 HaloTag®)	2µg HaloTag® 质粒 + 0.02µg NanoLuc® 质粒
1:1000 (NanoLuc® 与 HaloTag®)	2µg HaloTag® 质粒 + 0.002µg NanoLuc® 质粒

7. 向转染混合物中添加 100µl 无酚红的 Opti-MEM® I 低血清培养基, 并混匀。
8. 加入 6µl FuGENE® HD 转染试剂, 并在室温条件下孵育 10 分钟。
9. 将转染混合物添加至含有贴壁细胞的孔中, 并于 37°C, 5% CO₂ 条件下表达蛋白约 20 小时。
10. 如果在不使用化合物的情况下进行终点测量, 请继续进行第 5.B 节所述内容; 如果在使用化合物的情况下进行终点测量, 请继续进行第 5.C 节所述内容;

注意: 对于 NanoBRET™ 检测方法的优化, 我们建议采用终点检测。

标签位置和 DNA 浓度优化后的 NanoBRET™ PPI 检测的转染条件

进行检测时应参照优化后和验证后的操作流程。有关检测方法验证建议，请参见第 10 节。

1. 检测前应于合适条件下培养 HEK293 细胞。
2. 吸出细胞培养瓶中的培养基，然后使用胰蛋白酶进行消化，使细胞从细胞培养瓶底部分离。
3. 使用细胞培养基中和胰蛋白酶，对细胞进行计数以估算细胞密度，并用细胞培养基重悬以使最终密度为 4×10^5 个细胞 /ml。
4. 将 2ml 细胞（800000 个细胞）接种至六孔板的每个孔中（需足够进行计划好的检测次数）。经过转染和细胞分裂后，六孔板的三个孔中产生的细胞足够用于检测一块 96 孔板。
5. 使细胞贴壁并于 37°C，5% CO₂ 条件下孵育 4-6 小时。
6. 制备由优化后的供体和受体质粒载体对和其相对应 DNA 浓度组成的转染混合物。例如，如果按 1: 100 的比例稀释所得结果最佳，则应制备 2μg HaloTag® 质粒 + 0.02μg NanoLuc® 质粒（用水进行稀释）。
7. 向转染混合物中添加 100μl 无酚红的 Opti-MEM® I 低血清培养基，并混匀。
8. 加入 6μl FuGENE® HD 转染试剂，并在室温条件下孵育 10 分钟。
9. 将转染混合物添加至含有贴壁细胞的孔中，并于 37°C，5% CO₂ 条件下表达蛋白约 20 小时。
10. 如果在不使用化合物的情况下进行终点测量或进行动态测量，请继续进行第 5.B 节所述内容；如果在使用化合物的情况下进行终点测量，请继续进行第 5.C 节所述内容；

5.B. 将转染后的 HEK293 细胞重新铺板至多孔板中并添加 HaloTag® NanoBRET™ 618 配基

1. 去除六孔板每孔细胞中的培养基，并使用 1ml DPBS 进行洗涤。弃上清。
2. 加入 0.5ml 0.05% 的胰蛋白酶 -EDTA，并置于室温条件下孵育直至细胞从孔底部浮起。
3. 加入 2ml 细胞培养基以中和胰蛋白酶，混合以收集和重悬细胞，然后将细胞悬液转移至 15ml 锥形管中。
4. 将细胞在 125 x g 离心 5 分钟。弃掉细胞培养基，并重悬于等体积的检测培养基（Opti-MEM® I 低血清培养基，无酚红 + 4% FBS）中。
5. 对细胞进行计数以估算细胞密度，并使用检测培养基将其密度调整为 2×10^5 个细胞 / ml。铺满整个 96 孔板，至少需要 10ml 上述浓度的细胞。对于 384 孔板，需要大约 16ml 上述密度的细胞。

注意：如果需要对化合物或抑制剂进行测试，请使用第 5.C 节中的可选操作流程（可针对需测试的化合物调整细胞密度和体积）。

6. 将细胞分成两部分，并按如下所述添加 HaloTag® NanoBRET™ 618 配基或溶剂 DMSO：

实验样品（+ 配基）：向每毫升细胞中加入 1μl 的 0.1mM HaloTag® NanoBRET™ 618 配基（终浓度为 100nM）。

无受体对照（- 配基）：向每毫升细胞中加入 1μl DMSO（终浓度为 0.1% DMSO）。

7. 对于未经化合物处理的 NanoBRET™ 检测，应按下述说明铺板一定体积的细胞：

96 孔模式：将步骤 6 中制备所得的细胞按每孔 100μl 加入到至少 3-4 个孔中。

用于终点检测的 384 孔模式：将步骤 6 中制备所得的细胞按每孔 40μl 加入到至少 3-4 个孔中。

用于动态检测的 384 孔模式：将步骤 6 中制备所得的细胞按每孔 36μl 加入到至少 3-4 个孔中。

8. 将孔板置于 37°C，5% CO₂ 条件下孵育至少 4-6 小时至过夜（18-24 小时）。
9. 如果需进行终点测量，请继续进行第 5.D 节所述内容；如果需进行动态测量，请继续进行第 5.E 节所述内容。

5.C. 测试化合物或抑制剂终点检测的可选操作流程

1. 去除六孔板每孔细胞中的培养基，并使用 1ml DPBS 进行洗涤。弃上清。
2. 加入 0.5ml 0.05% 的胰蛋白酶-EDTA，并置于室温条件下孵育直至细胞从孔的底部浮起。
3. 加入 2ml 细胞培养基以中和胰蛋白酶，混合以收集和重悬细胞，然后将细胞悬液转移至 15ml 锥形管中。
4. 将细胞在 125 x g 离心 5 分钟。弃掉细胞培养基，并重悬于等体积的检测培养基（Opti-MEM® I 低血清培养基，无酚红 + 4% FBS）。
5. 对细胞进行计数以估算细胞密度，并使用检测培养基将其密度调整为 2.2×10^5 个细胞 / ml。铺满整个 96 孔板，至少需要 10ml 上述浓度的细胞。对于 384 孔板，需要大约 16ml 上述浓度的细胞。
6. 将细胞分成两部分，并按下述内容添加 HaloTag® NanoBRET™ 618 配基或溶剂 DMSO：
实验样品（+ 配基）：向每毫升细胞中加入 1μl 的 0.1mM HaloTag® NanoBRET™ 618 配体（终浓度为 100nM）。
无受体对照（- 配基）：向每毫升细胞中加入 1μl DMSO（终浓度为 0.1% DMSO）。
7. 按下述说明铺板一定体积的细胞：
96 孔模式：将步骤 6 中制备所得的细胞按每孔 90μl 加入到至少 3-4 个孔中。
384 孔模式：将步骤 6 中制备所得的细胞按每孔 36μl 加入到至少 3-4 个孔中。
8. 加入比在检测培养基中终浓度高十倍的化合物（例如，如果终浓度为 10μM，添加的浓度应为 100μM）：
96 孔模式：将 10μl 10X 化合物或溶剂加入至接种的细胞中。
384 孔模式：将 4μl 10X 化合物或溶剂加入至接种的细胞中。
9. 将孔板在 37°C，5% 的 CO₂ 中孵育至少 4-6 小时至过夜（18-24 小时）。为获得最佳的化合物效果，我们建议过夜孵育。
10. 请继续进行第 5.D. 节。

有关剂量反应曲线（DRC）的说明：如果需要测试一系列浓度的化合物或抑制剂，请在稀释剂中进行连续稀释，稀释剂所含溶剂的量应与最高浓度相同。例如，如果最高 10X 浓度含 1% DMSO，那么后续稀释过程应在含 1% DMSO 的检测培养基中进行，以使所有样品中的 DMSO 的最终浓度均为 0.1%。对于溶剂或零点对照（zero control），请添加不含化合物的含 DMSO 培养基。NanoBRET™ 检测方法已经过测试可于终浓度为 0.5% DMSO 的条件下进行，且对结果无任何影响。检测方法或可耐受更高浓度的 DMSO。

5.D. 添加 NanoBRET™ Nano-Glo® 底物并进行 NanoBRET™ 终点测量

1. 在 Opti-MEM® I 低血清培养基（无酚红）中制备 NanoBRET™ Nano-Glo® Substrate 的 5X 溶液。此浓度为储备试剂稀释 100 倍后的浓度。对于一块 96 孔板，应至少准备 2.5ml 培养基 + 25μl 储备试剂。对于一块 384 孔板，应至少准备 3.9ml 培养基 + 39μl 储备试剂。对于两种多孔板模式，考虑到死体积这一因素，我们建议准备至少 10% 的额外溶液，尤其是在进行自动分液的情况下。

注意：如果储存条件为室温，请于 2 小时内使用此 5X 溶液，如果储存条件为 4℃，请于 4 小时内使用此 5X 溶液。

2. 将底物添加至细胞中，摇板使之混合 30 秒。（对于 384 孔模式，我们建议使用电磁搅拌器）：

96 孔模式：添加 25μl 底物。

384 孔模式：添加 10μl 底物。

3. 添加底物后的 10 分钟内，使用与 NanoBRET™ PPI 检测方法兼容的发光检测仪测量供体发射信号（460nm）和受体发射信号（618nm）（请参见第 4.B 节）。

注意：通过联合使用 CellTiter-Glo® 2.0 Assay（目录号 G9241），您可用同一孔板检测细胞活力并确定化合物对细胞活力的影响（即毒性）。进行 NanoBRET™ 测量后，保留孔板并参照第 10.C 节中所述的流程进行操作。

5.E. 使用 NanoBRET™ Nano-Glo® Kinetic Detection System 进行活细胞的动态检测

1. 根据下面所述制备底物：

96 孔模式：使用 Opti-MEM® I 低血清培养基（无酚红，含 4% FBS）制备 1X Nano-Glo® Vivazine™ Substrate 溶液（储备试剂的 1: 100 稀释液）。

384 孔模式：使用 Opti-MEM® I 低血清培养基（无酚红，含 4% FBS）制备 2X Nano-Glo® Vivazine™ Substrate 溶液（储备试剂的 1: 50 稀释液）。

2. 添加 Vivazine™ 溶液至每一孔中。

96 孔模式：吸出培养基并加入 90μl 1X Vivazine™ 溶液。

384 孔模式：将 36μl 2X Vivazine™ 溶液加入至 36μl 细胞中。

3. 将孔板置于 37℃，5% CO₂ 条件下孵育 30-60 分钟，以平衡底物发光信号。

4. **可选：**使用 Opti-MEM® I 低血清培养基（无酚红）制备 10X 浓度的测试化合物。

96 孔模式：向每个孔中添加 10μl，使终浓度为 1-10μM。

384 孔模式：向每个孔中添加 8μl，使终浓度为 1-10μM。

5. **可选：**将等量的 DMSO 添加至 Opti-MEM® I 低血清培养基中（无酚红），制备 10X DMSO（用作阴性对照）。

96 孔模式：添加 10μl 至每个阴性对照孔中。

384 孔模式：添加 8μl 至每个阴性对照孔中。

6. 在添加测试化合物后，使用与 NanoBRET™ PPI 分析兼容的发光检测仪，每隔 3 至 5 分钟立即收集在供体发射波长（460nm）和受体发射波长（618nm）处的动态测量值，直至进行 6 小时（请参见第 4.B 节）。

注意：通过联合使用 CellTiter-Glo® 2.0 Assay（目录号 G9241），您可用同一孔板检测细胞活力并确定化合物对细胞活力的影响（即毒性）。进行 NanoBRET™ 测量后，保留孔板并参照第 10.C 节中所述的流程进行操作。

5.F. NanoBRET™ 计算

1. 用每个样品的受体发射值（例如 618nm）除以供体发射值（例如 460nm），即得到原始 NanoBRET™ 比值。

$$\frac{618\text{nm}_{\text{Em}}}{460\text{nm}_{\text{Em}}} = \text{原始 NanoBRET}^{\text{TM}} \text{ 比例} = \text{BU}$$

2. 将每个原始 BRET 值乘以 1000，即将原始 NanoBRET™ 单位（一般为十进制值）转换为 milliBRET 单位（mBU；整数）。

$$\frac{618\text{nm}_{\text{Em}}}{460\text{nm}_{\text{Em}}} = \text{BU} \times 1000 = \text{mBU}$$

3. 确定每组样品的平均 NanoBRET™ 比值：样品包括含有 HaloTag® NanoBRET™ 618 配基的实验样品和无受体对照样品。还应考虑供体造成的本底或渗透，因此实验样品平均值应减去无受体对照的平均值，以得到校正后的 NanoBRET™ 比值。

实验样品平均 mBU – 无配体对照平均 mBU = 校正后的平均 mBU

4. **可选：**建立 Z' 和 Z 因子计算方法用以评估检测方法一致性（7）。Z' 因子通过比较实验样品和基线对照（例如无配基对照）的平均值和标准偏差值以估算检测方法的一致性。

$$Z' \text{ 因子} = 1 - \left[\frac{(3X \text{ STDV 实验} + 3X \text{ STDV 无配基对照})}{(\text{mBU 实验均值} - \text{mBU 无配基对照均值})} \right]$$

在存在调节剂（如抑制剂）的情况下，Z 因子（不同于 Z' 因子）同时考虑检测方法的变异性以及处理后的样品与溶剂对照之间的差异（Δ）。进行计算时，应使用校正后的 mBU 和 STDV。一般来说，Z' 或 Z 值在 0.5–1 之间时可认为检测方法的变异性较小，稳健可靠。在下述示例中，处理后样品代表的是抑制剂。但是，如果检测的是增强剂，请将公式中数值的顺序进行调整以确保所得结果为正值。

$$Z' \text{ 因子} = 1 - \left[\frac{(3X \text{ STDV 未处理} + 3X \text{ STDV 经处理})}{(\text{mBU 未处理均值} - \text{mBU 经处理均值})} \right]$$

6. 代表性数据

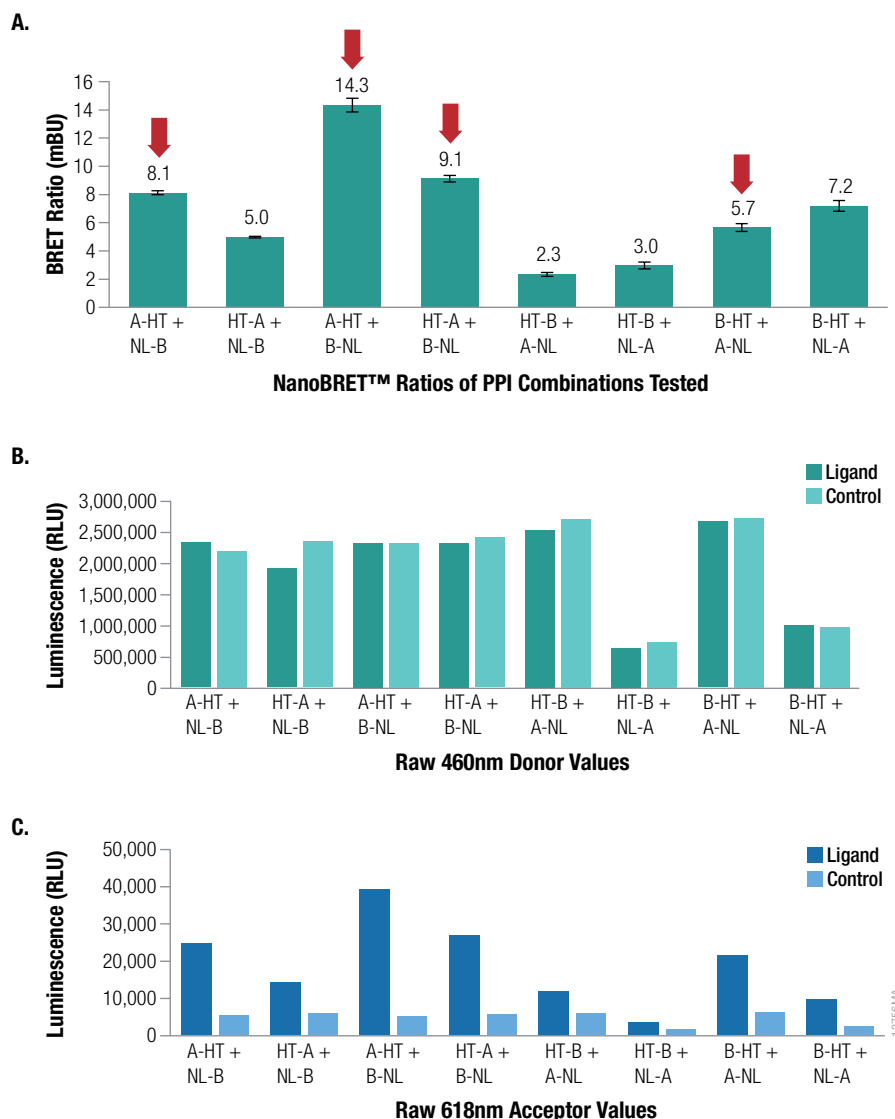


图 7. 当两种蛋白（A 或 B）的 N 或 C 末端均被 NanoLuc®（NL）供体或 HaloTag®（HT）受体标记时，所测试的所有可能 PPI 组合形式的代表性结果。进行初始筛选时，所有样品均按 NL 与 HT DNA 比例 1：10 进行转染。基于计算所得的比值、原始供体值（B）和受体值（C），选择了 NanoBRET™ 比值图（A）上箭头标记的组合形式进行后续优化。尽管图 7，A 中的最后一种组合形式（标记为 B-HT + NL-A）所得比值较大，但因为其供体值（图 7，B）较低（在 DNA 稀释倍数较大时会更低），所以未选择此组合形式。如有可能，请始终选择原始供体值远高于仪器检测极限的组合形式。

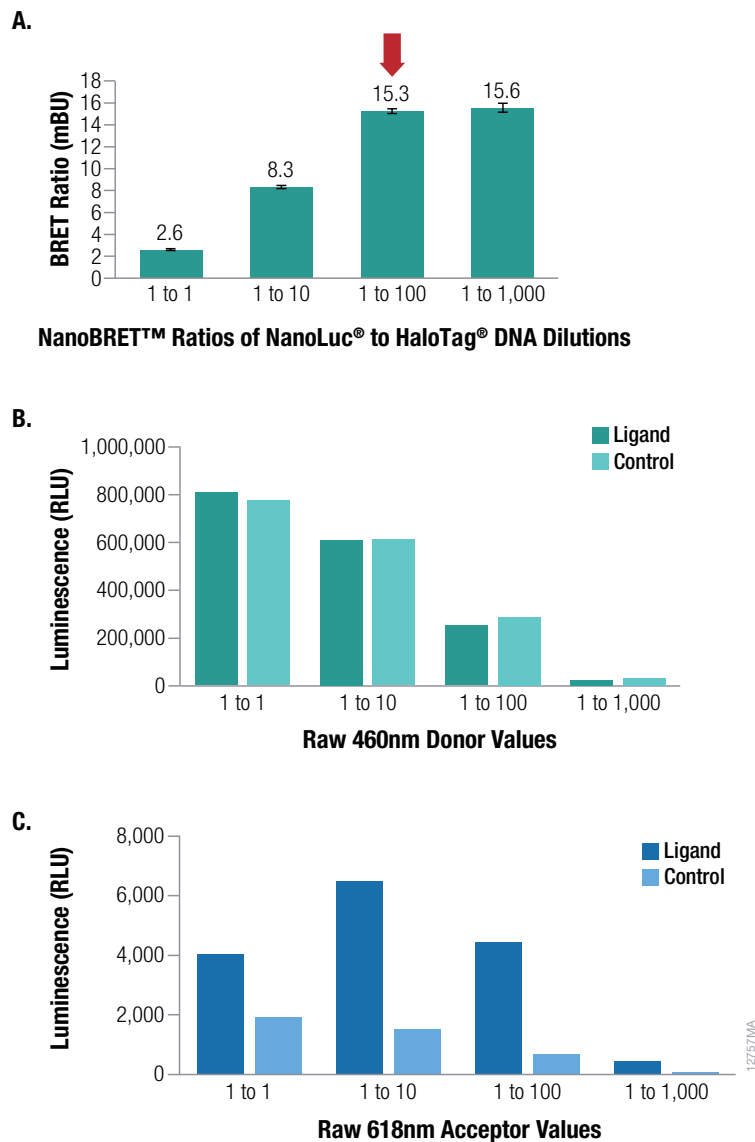


图 8. 选择图 7 初始筛选中的最佳组合形式之一（HT-A + B-NL）用于 NL DNA 的连续稀释，以确定产生最佳动态范围的最佳量。使用等量的 NL 和 HT DNA（1：1）及 1：10、1：100 和 1：1000 的稀释液（NL 相对于 HT DNA）。

在 NanoBRET™ 比值图上用箭头标记的 1：100 稀释倍数被选择为最佳 NL 与 HT DNA 比值。请注意，从 1：1000 这一稀释倍数也会得到相似的比值，但其原始供体值极低，因此存在检测方法接近仪器检测极限的风险（这可能会增加变异性）。

6. 代表性数据 (续)

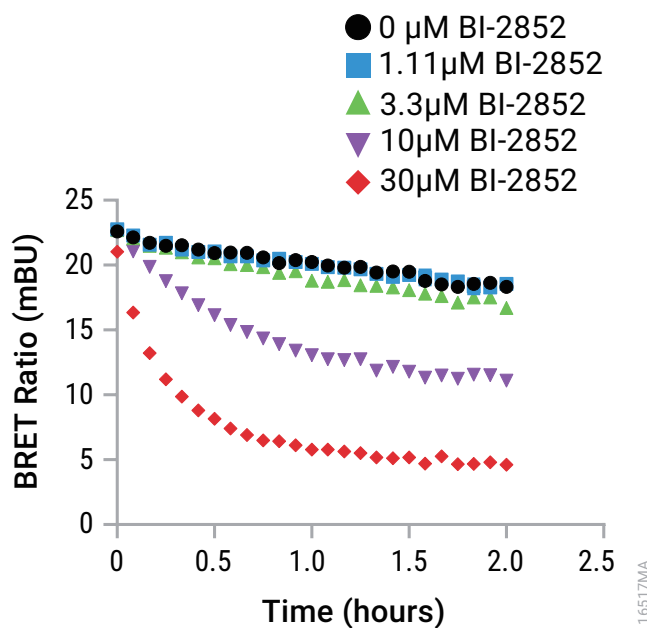


图 9. 在活细胞中动态测量 NanoLuc®-KRAS 2B G12D 与 BRAF RBD-HaloTag® 融合蛋白之间的相互作用。将 NanoLuc®-KRAS 2B G12D 和 BRAF RBD-HaloTag® 载体转染至 HEK293 细胞中。用不同浓度的 BI-2852 处理细胞, 并使用 GloMax® Discover 系统每隔 5 分钟测量一次 NanoBRET™ 信号, 持续 2 小时。在活细胞中的动态数据显示, 当用浓度递增的 BI-2852 进行处理时, KRAS 2B G12D 与 BRAF RBD 之间的相互作用会如预期一样减弱。

7. 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
即使使用了对照载体或对照对，也无法得到 NanoBRET™ 比值。	仪器设置不当。 • 确保发光检测仪配备了合适的滤光片：460nm/8–80nm BP 用于检测供体信号；600 – 610nm LP 用于检测受体信号。 • 确保将 PMT 上的增益设置为检测供体信号且仪器信号未饱和。
	缺乏蛋白伴侣表达。通过测量发光信号或读取 460nm 处的光信号以检查 NanoLuc® 融合蛋白的表达情况。通过使用荧光 HaloTag® 配基标记蛋白质，并用 SDS-PAGE 进行分离，然后使用荧光扫描仪扫描条带（请参见 HaloTag® Mammalian Pull-Down and Labeling System 技术手册 # TM342），以检查荧光 HaloTag® 融合蛋白的表达情况。
	蛋白伴侣的配对欠佳。测试所有可能的组合形式以确定最佳配对。
	计算有误。用受体值除以供体值（618nm/460nm）。或者，乘以 1000 以转换为 mBU。为消除本底的影响，实验样品的比值应减去无配基阴性对照的比值。
	细胞健康状态不佳或化合物毒性。通过进行 CellTiter-Glo® 2.0 Assay（请参见第 10.C 节），确保检测期间细胞仍保持良好的活力。
Z' 和 Z 因子值不佳。	生物学异常或缺乏合适的刺激因素。一些 PPI 可能依赖于特定生物事件或刺激因素以激活特异性通路。确保已添加合适的通路激活剂。如有可能，通过其他方法检查合适的表型反应。
	检测方法变异性过大。优化检测方法的所有参数使 Z' 落在 0.5–1 范围内。如果已优化检测方法参数，可考虑采用自动分液以降低变异性。
比值和原始值与所示示例不一致。	存在弱调节剂。弱抑制剂会造成处理样品和未处理样品之间产生较小的变化量，导致 Z 因子值欠佳（并非由检测方法稳健性所致）。
	使用不同仪器和检测设置得到的绝对原始值和比值可能会有所不同。确认已观察到预期的生物学反应，例如 Nutlin-3 对 p53 和 MDM2 对照蛋白对相互作用的影响。
	不同 PPI 系统的绝对原始值和比值会有所不同。NanoBRET™ 的绝对值取决于蛋白伴侣的接近程度、相互作用的亲和力、与其他相互作用蛋白的相对占有率以及仪器设置。如有可能，应使用已知的调节剂（例如抑制剂）或通过供体饱和分析法（DSA，第 10.B 节）来检查特异性。尽管遵循了正确的开发流程，但在极少数情况下，特异性较差还是会导致检测窗口低和变异性较大的次优检测方法。

问题	原因和参考建议
无法获得合适的蛋白质表达	转染条件不佳。 • 优化转染条件以及供体与受体 DNA 的相对比值。 • 如果使用的是不同的细胞系或转染试剂，则应优化转染条件。 • 仅使用转染级 DNA。
	克隆构建出错。通过测序技术确认克隆的起始位点、连接肽和末端序列是否正确。
	传代过多导致细胞健康状况不佳。细胞传代次数请勿超过 40 次。
使用已知化合物抑制剂未检测到信号降低这一现象。	化合物稀释倍数过大或检测活细胞中的抑制作用时处理时间不够。增加抑制剂的浓度、处理过夜或两者并用，以达到最大效果。
	使用的是全长蛋白，而不是蛋白结构域或区域。如果化合物是针对单独的蛋白结构域或区域在体外开发的，那么化合物可能不会破坏全长蛋白质的相互作用。测试单独的蛋白区域或结构域与全长蛋白。
	如需进行动态检测，请确保先在终点检测模式下测试并优化标签定位和蛋白质表达水平。
	化合物可影响蛋白之间的酶活力，但不破坏其 PPI。
HaloTag® NanoBRET™ 618 配基变色	HaloTag® NanoBRET™ 618 配基通常为粉红色至红色，但是在某些情况下，其颜色可能会更浅或呈无色。这是由于不同分子接近程度而导致的。闭合形式的配基为无色。当将其添加至培养基中时，配基转化为可用的开放形式。为确认化学完整性，请使用 1ml Opti-MEM® I 低血清培养基（无酚红）稀释 1µl HaloTag® NanoBRET™ 618 配基，并通过在 593±4nm 处激发荧光团和在 621±4nm 处读取发射信号以检查荧光信号。如果使用的是 GloMax® Discover System，请使用绿色通道（Ex: 525nm, Em: 580–640 nm）。
使用 NanoBRET™ Nano-Glo® Kinetic Assay 时出现意料之外的发光信号	动态测量开始时发光信号增加，这是因为 Nano-Glo® Vivazine™ 底物未经过适当平衡。在添加化合物和进行检测之前，必须将 Nano-Glo® Vivazine™ 底物置于检测板上稳定平衡 30-60 分钟。有关使用 Nano-Glo® Vivazine™ 底物的更多信息，请参见 Nano-Glo® Endurazine™ 和 Vivazine™ Live Cell Substrates 技术手册 # TM550。
	NanoBRET™ Nano-Glo® Kinetic Detection System 是为与 Nano-Glo® Vivazine™ 底物一起使用而设计的。我们不建议使用其他 NanoLuc® 底物进行 NanoBRET™ 蛋白：蛋白相互作用的动态检测。

8. 缓冲液和溶液的组成

细胞培养基

90% DMEM (Gibco, 目录号 11995)

10% 胎牛血清 (HyClone, 目录号 SH30070.03)

检测培养基

96% Opti-MEM® I 低血清培养基, 无酚红
(Life Technologies, 目录号 11058)

4% 胎牛血清 (HyClone, 目录号 SH30070.03)

9. 参考文献

1. PflK.D. and Eidne, K.A. (2006) Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat Methods* 3, 165–74.
2. Mercier, J.F. et al. (2002) Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem.* 277, 44925–31.
3. Hall, M.P. et al. (2012) Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem. Biol.* 7, 1848–57.
4. Deplus, R. et al. (2013) TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS. *EMBO J.* 32, 645–55.
5. Demont, E.H. et al. (2014) 1,3-dimethyl benzimidazolones are potent, selective inhibitors of the BRPF1 bromodomain. *ACS Med. Chem. Lett.* 5, 1190–5.
6. Vassilev, L.T. et al. (2004) In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844–8.
7. Zhang J.H., Chung, T.D. and Oldenburg, K.R. (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* 4, 67–73.
8. Bacart, J. et al. (2008) The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnol. J.* 3, 311–24.

10. 附录

10.A. 检测验证的建议

如果超过一对以上的组合形式可供检测用且可获得已知调节剂（抑制剂或增强剂），则应测试所有可能的组合形式，以确认何种组合形式对预期的生物学反应最佳。

10.B. 供体饱和分析（Donor Saturation Assay, DSA）操作流程

为了在不存在已知抑制剂的情况下验证 NanoBRET™ 检测方法，可通过使用在初始筛选中确定的供体 / 受体组合进行供体饱和分析（DSA；8）进而确定检测方法的特异性。（有关 DSA 原理的介绍，请参见图 10。）

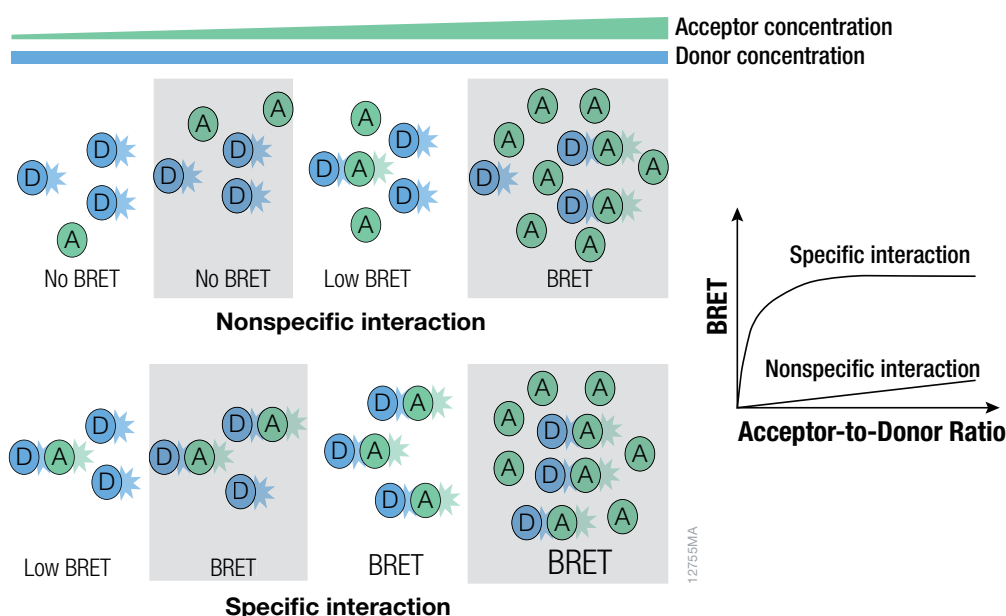


图 10. DSA 原理。

在供体的数量保持恒定而受体的数量逐渐增加的情况下，非特异性 BRET 可能会由于蛋白极其接近而产生，并且信号会随着受体数量的增加而呈线性升高。但是，特异性的 BRET 信号会以双曲线方式升高，然后达到平台期（代表所有供体被受体分子完全饱和）。

执行此 DSA 方案时，用恒定量的 NanoLuc® 供体 DNA 和可变量的 HaloTag® 受体 DNA 转染细胞，以实现受体与供体之比的增加。可选择性转染阴性对照样品，如用未融合或无关的 DNA 作为模拟供体或受体（已知其在相同的细胞空间，例如核，细胞质或膜）。如果蛋白对的相互作用真实存在，那么 DSA 曲线将会呈现饱和现象，而阴性对照将产生线性或平坦曲线（如图 11 所示）。

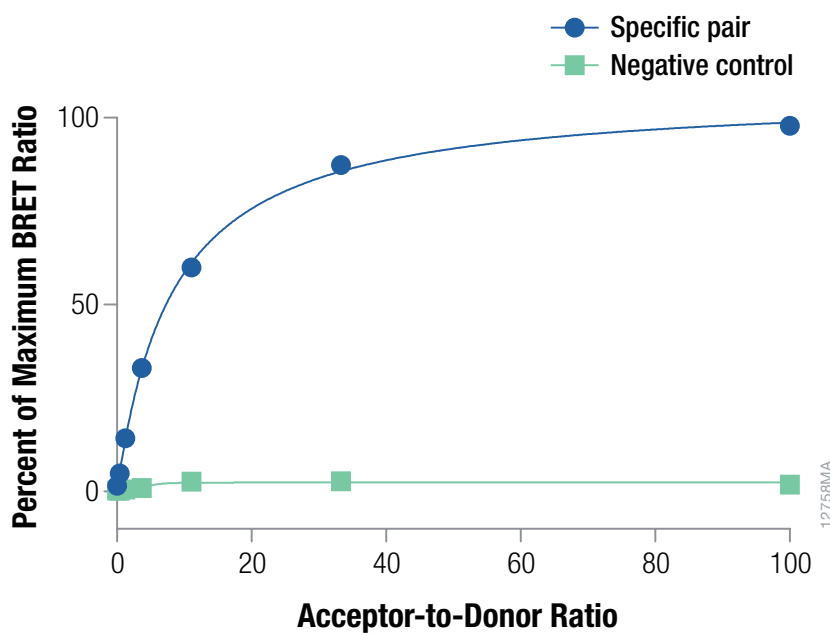


图 11. 特异性 BRET 对与阴性对照的 DSA 曲线。

以下示例流程采用的是前期选择的 NanoLuc[®] 供体: HaloTag[®] 受体比例 (1: 100)。进行一系列转染, 保持供体恒定, 同时逐渐稀释 carrier DNA 中的受体以得到一系列不同的受体和供体比值。对于其他 NanoLuc[®] 供体: HaloTag[®] 受体比值, 可进行适当调整。

1. 将细胞培养基中的 1ml 细胞 (4×10^5 / ml) 接种到 12 孔板的 9 个孔中。
2. 使细胞贴壁并于 37°C, 5% CO₂ 条件下孵育 4-6 小时。
3. 准备转染时, 用水将 NanoLuc[®] 供体稀释至 0.01 µg/µl。
4. 使用 0.5ml 的 Opti-MEM[®] I 低血清培养基 (无酚红) + 10 µl 稀释的 NanoLuc[®] 供体, 制备 NanoLuc[®] 供体 DNA 混合母液。
5. 将 HaloTag[®] 受体和 Transfection Carrier DNA 稀释至 1 µg/µl。

10.B. 供体饱和分析 (Donor Saturation Assay, DSA) 流程 (续)

6. 对于表 1 列出的稀释方案的第 2-8 样品点, 将受体连续稀释到 carrier DNA 中 (按 3 倍进行稀释。例如, 4 μ l 先前的稀释液 + 8 μ l carrier DNA)。请注意, 样品点 1 仅使用了 HaloTag[®] 受体 DNA (无 carrier DNA), 而样品点 9 仅使用了 carrier DNA。

样品点	NanoLuc [®] 供体的量 (ng)	HaloTag [®] 受体的量 (ng)	受体 - 供体比值
1	10	1000	100
2	10	333	33.3
3	10	111	11.1
4	10	37	3.7
5	10	12.3	1.2
6	10	4.1	0.41
7	10	1.4	0.14
8	10	0.46	0.046
9	10	0	

7. 为制备转染混合物 (共九种), 请混合下述组分:

- 1 μ l 合适的 HaloTag[®] 受体稀释液或 Transfection Carrier DNA
- 50 μ l NanoLuc[®] 供体 DNA 混合母液
- 4 μ l FuGENE[®] HD 转染试剂

8. 于室温条件下孵育转染混合物 10 分钟, 然后将所有混合物添加到 12 孔板的合适孔中。

9. 于 37 $^{\circ}$ C 下条件孵育约 20 小时, 然后按第 5.B 节所述进行操作。

10. 相对于受体与供体的比值来绘制 NanoBRET[™] 比值, 确定曲线形状。如果呈双曲线, 表示检测方法的特异性很好; 如果呈直线, 则表示 NanoBRET[™] 检测方法的特异性较差。

10.C. 与 CellTiter-Glo® 2.0 Assay 结合使用的多重检测

在某些情况下，您可能需要测定细胞活力或化合物毒性或同时测定两者，而且还需进行 NanoBRET™ 检测。与另一种检测方法结合使用的多重检测可使您从单孔中获得更多数据。可以使用即用型 CellTiter-Glo® 2.0 Assay 评估细胞健康状况。此检测方法为定量检测存在的 ATP 量（可表明是否存在代谢活跃的细胞）的发光检测方法。图 11 为示例数据。

1. 将 CellTiter-Glo® 2.0 试剂平衡至室温。
2. 进行 NanoBRET™ 测量后，向每块孔板的孔内添加 125µl CellTiter-Glo® 2.0 试剂，并置于微孔板振荡器以 500-700rpm 的转速混合 5 分钟。
3. 将孔板在室温孵育 30 分钟，以裂解细胞并淬灭 NanoLuc® 信号。
4. 孵育 30 分钟后，使用发光检测仪测量总发光信号。如果使用的是 GloMax® Discover System，请选择 CellTiter-Glo® 检测流程。
5. 如果要确定化合物毒性，请比较含溶剂样品与含化合物样品的发光信号（RLU）。请注意，即使观察到某些毒性，NanoBRET™ 比值也仅源自 NanoBRET™ 检测实验中的活细胞。除非可观察到全部细胞死亡现象，否则抑制剂引起的 NanoBRET™ 信号降低现象最可能是由于相互作用被破坏而不是细胞死亡造成的。

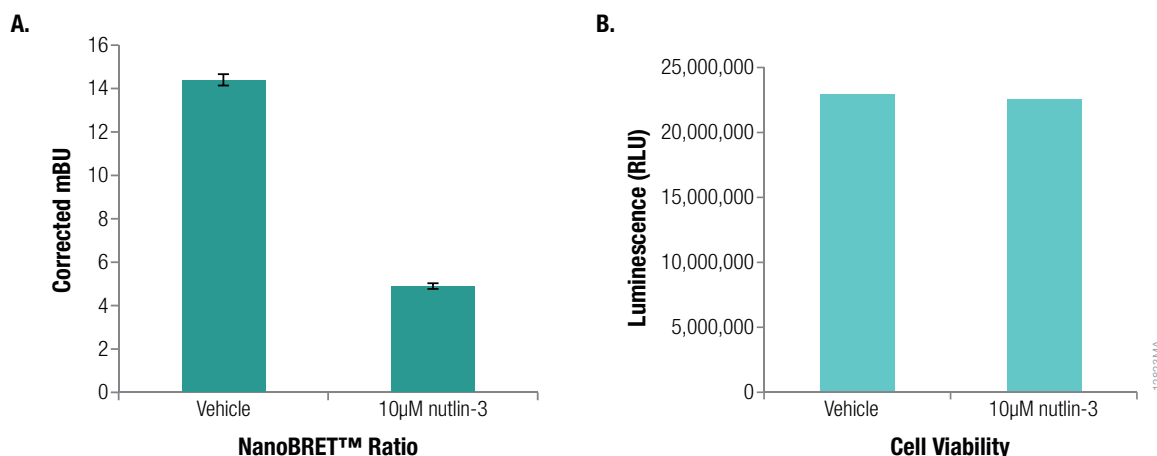


图 12. 将 NanoBRET™ PPI Assay 与 CellTiter-Glo® 2.0 Assay 结合使用的多重检测示例数据。 **A.** 在添加和不添加调节剂 nutlin-3 的条件下，使用 NanoBRET™ 检测方法检测了 NanoBRET™ PPI Control Pair（p53-HaloTag® 融合载体和 NanoLuc®-MDM2 融合载体）。 **B.** 在进行 NanoBRET™ 测量后，使用 CellTiter-Glo® 2.0 试剂检测了同一组样品的细胞活力。

11. 相关产品

NanoLuc® Vectors

产品	规格	目录号
pFN31A Nluc CMV-Hygro Flexi® Vector	20µg	N1311
pFN31K Nluc CMV-neo Flexi® Vector	20µg	N1321
pFC32A Nluc CMV-Hygro Flexi® Vector	20µg	N1331
pFC32K Nluc CMV-neo Flexi® Vector	20µg	N1341
pNLF1-N [CMV/Hygro] Vector	20µg	N1351
pNLF1-C [CMV/Hygro] Vector	20µg	N1361
pNLF1-secN [CMV/Hygro] Vector	20µg	N1371

HaloTag® Fusion Vectors

产品	规格	目录号
pFN21A HaloTag® CMV Flexi® Vector	20µg	G2821
pFC14K HaloTag® CMV Flexi® Vector	20µg	G9661

Multimode Detection Instrument

产品	规格	目录号
GloMax® Discover System	1 each	GM3000

Transfection Reagent

产品	规格	目录号
FuGENE® HD Transfection Reagent	1ml	E2311
	5 × 1ml	E2312

12. 内容变更总结

此中文版说明书是以 3/20 版英文技术手册为基础编译的，而 3/20 版英文技术手册与旧版相比对以下内容进行了变更：

1. 更新了操作流程、代表性数据和疑难解答等内容，增加了 NanoBRET™ Nano-Glo® Kinetic Detection System 的使用说明。
2. 更改了第 5.A 节操作流程中所用转染试剂的体积。

^(a)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 Nano-Glo®-branded reagents intended for energy transfer (such as bioluminescence resonance energy transfer) to acceptors other than a genetically encoded autofluorescent protein, researcher must:

- (a) use NanoBRET™-branded energy acceptors (e.g., BRET-optimized HaloTag® ligands) for all determinations of energy transfer activity by this product; or
- (b) contact Promega to obtain a license for use of the product for energy transfer assays to 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 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. No. 8,809,529, European Pat. No. 2635582, and other patents and patents pending.

^(c)U.S. Pat. No. 7,867,726, Japanese Pat. No. 4748685 and other patents and patents pending.

^(d)Licensed under EP1295121 and EP1088233.

© 2015–2020 Promega Corporation. All Rights Reserved.

CellTiter-Glo, Flexi, GloMax, HaloTag, Nano-Glo and NanoLuc are registered trademarks of Promega Corporation. Find My Gene and NanoBRET are trademarks of Promega Corporation.

CLARIOstar is a registered trademark of BMG LABTECH. FuGENE is a registered trademark of Fugent, L.L.C., USA. Opti-MEM is a registered trademark of Life Technologies, Inc. Varioskan is a registered 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.