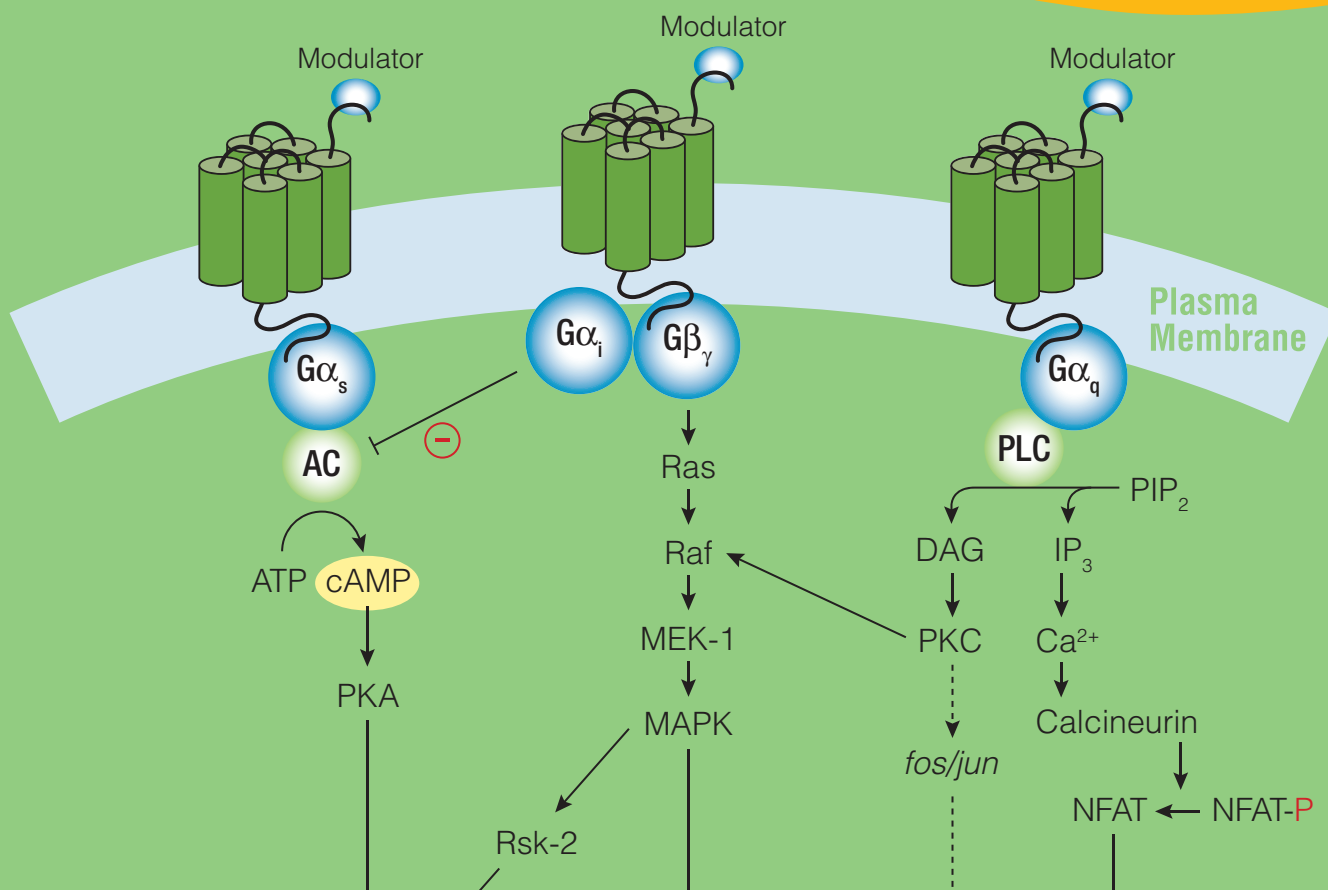


GPCR 信号通路研究用工具

配基与受体结合 | 受体内化研究 | 第二信使 (cAMP) 检测

信号通路元件应答 | 蛋白磷酸化检测 | GPCR 相互作用研究



目录

1. 基本介绍 3

- GPCR 家族介绍 3
- GPCR 信号通路研究的关键问题 3
- GPCR 信号通路研究工具一览 4

2. GPCR 信号通路研究解决方案 6

- 配基与受体结合检测 6
 - NanoBRET™ TE 检测技术
- GPCR 相互作用研究 8
 - NanoBiT® 蛋白相互作用检测
 - NanoBRET™ 蛋白相互作用检测
- GPCR 内化研究 10
 - HiBiT 蛋白标签系统
- 转录反应 12
 - 萤光素酶报告基因检测
- 蛋白磷酸化检测 14
 - Lumit® 免疫检测细胞系统
- 第二信使 cAMP 检测 16
 - cAMP-Glo™ assays
 - GloSensor™ cAMP assays

3. 文献解析 17

- 实验目的
- 实验方法
- 使用产品
- 实验结果

GPCR

G 蛋白偶联受体

细胞信号通路（Cell Signaling Pathway）是细胞内部一系列高度协调和有序分子间相互作用过程，这些过程将细胞外部的化学或物理信号转换为细胞内的生物化学反应，并最终影响细胞的功能状态、代谢活动、增殖、分化、迁移以及凋亡等。当细胞膜上的受体蛋白接收到特定的信号分子（如激素、生长因子、细胞因子等）时，信号会通过一连串蛋白质磷酸化、脱磷酸化、酶促激活、基因转录调控等方式，在细胞内传递并放大。这一系列复杂的生化事件通常涉及 G 蛋白偶联受体、酪氨酸激酶受体、离子通道受体等多种类型的受体，以及第二信使（如 cAMP、Ca²⁺）、蛋白激酶、转录因子等众多参与者。

关于 GPCR 家族

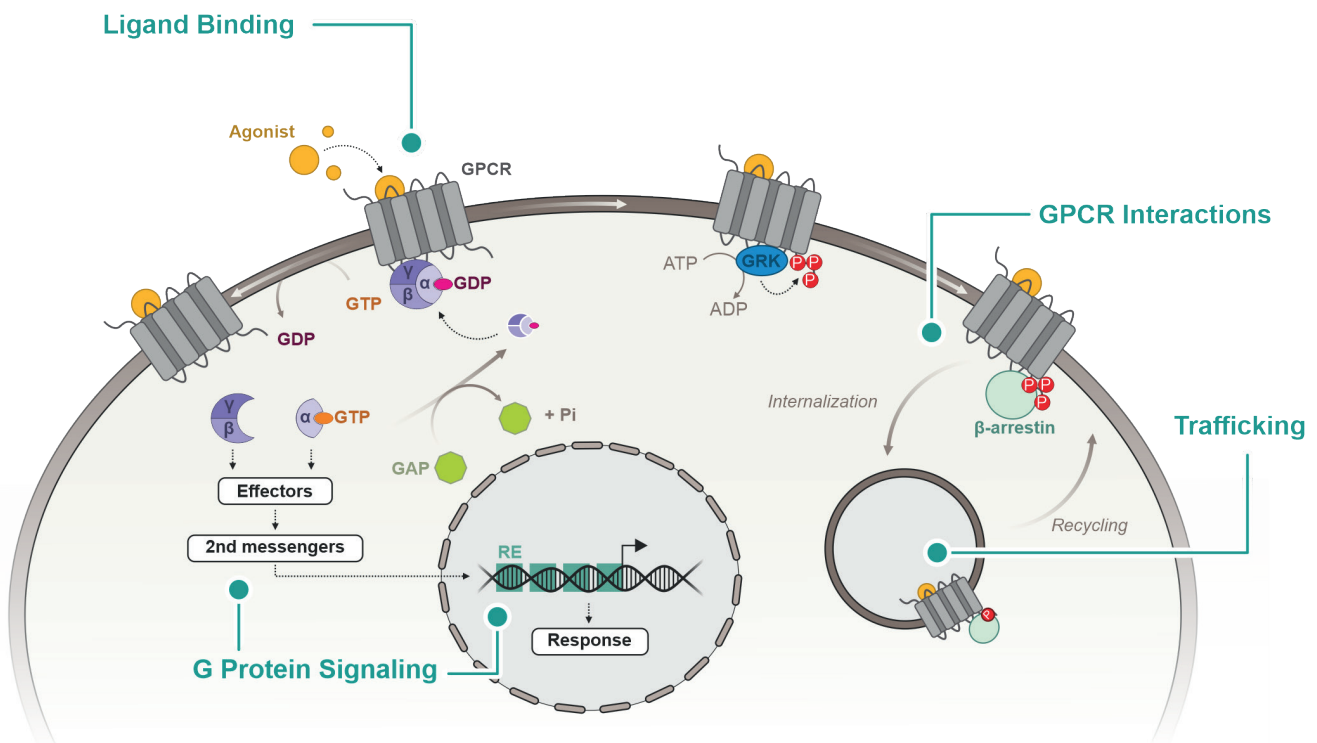
GPCR（G 蛋白偶联受体）是真核生物中最大的一类膜蛋白家族，包括约 800 个家族成员。GPCR 包含 7 次跨膜结构域，在几乎所有的器官系统中都起着至关重要的作用。GPCR 可被多种配体激活，与配体结合后，GPCR 的构象会发生变化，从而导致特定效应蛋白的募集和激活，并触发下游信号通路的调节。目前，FDA 批准上市的临床药物中，约三分之一的药物作用于 GPCRs 发挥治疗作用，GPCRs 被认为是新药研发领域中最重要，也是最有应用前景的药物靶点之一。

GPCR 信号通路研究的关键问题

GPCRs 如何识别和招募下游 G 蛋白

GPCRs 如何被 GPCR 激酶（GRKs）识别和调控

GPCRs 如何识别和招募下游 arrestin 蛋白



GPCR 信号通路研究工具

萤光素酶报告基因具有高灵敏度、非放射性、易于操作等特点，在众多生物学领域尤其是信号转导研究中具有广泛的应用价值。Promega 公司在萤光素酶报告基因技术领域占据着领导地位，基于萤光素酶技术开发的多个平台工具更是促进了信号通路的研究。

配基结合

(NanoBRET™ TE Assay)

Killoran, M.P., *et al.* An Integrated Approach toward NanoBRET Tracers for Analysis of GPCR Ligand Engagement. *Molecules* **2021**, 26, 2857. <https://doi.org/10.3390/molecules26102857>

第二信使 cAMP 检测

(cAMP-Glo™ Assay & GloSensor™ cAMP Assay)

Mikheil, D., Larsen, M.A., Hsiao, K. *et al.* A bioluminescent and homogeneous assay for monitoring GPCR-mediated cAMP modulation and PDE activity. *Sci Rep* **2024**, 14, 4440. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55038-0>

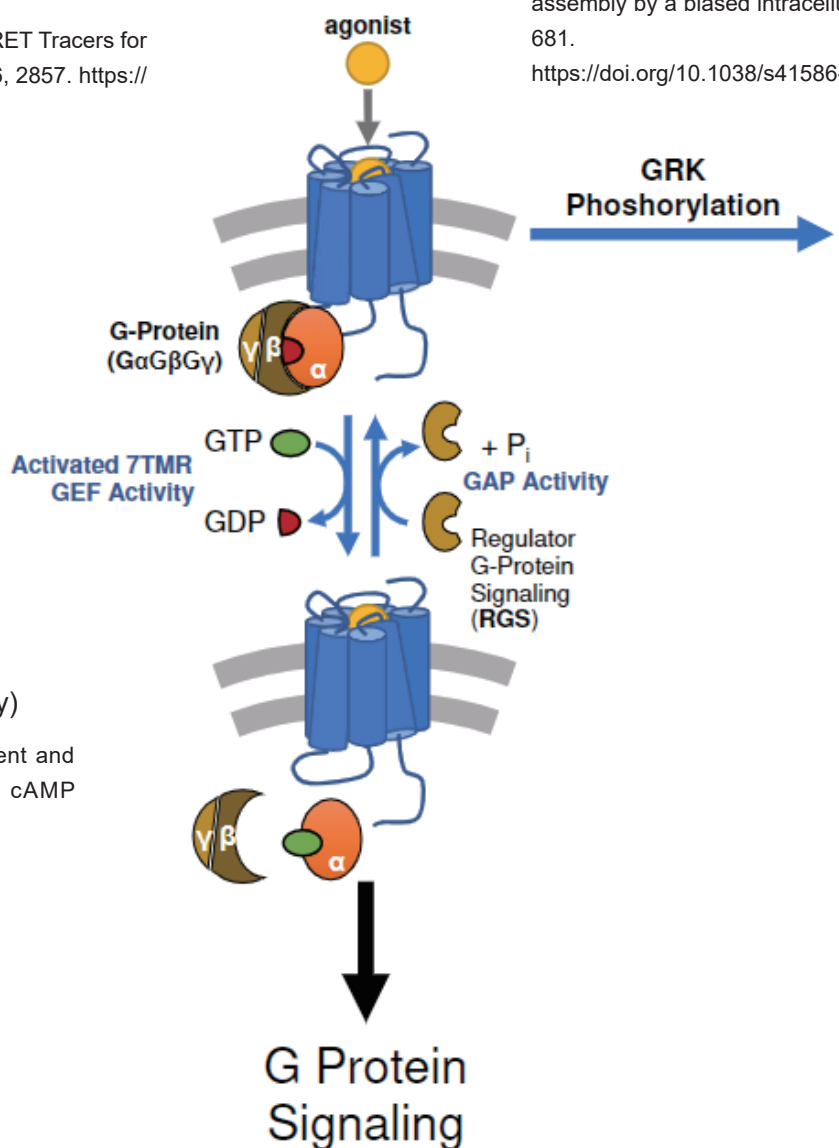
转录反应

(萤光素酶报告基因载体及检测试剂)

Zeghal, M., Laroche, G., Freitas, J.D. *et al.* Profiling of basal and ligand-dependent GPCR activities by means of a polyvalent cell-based high-throughput platform. *Nat Commun* **2023**, 14, 3684. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39132-x>

GPCR 与 GPCR 激酶 (G) (NanoBiT® PPI System /

Duan, J., Liu, H., Zhao, F. *et al.* assembly by a biased intracellular 681. <https://doi.org/10.1038/s41586>



GPCR 与 arrestin 蛋白的相互作用

(NanoBiT[®] PPI System / NanoBRET[™] PPI System)

Littmann, T., *et al.* Split luciferase-based assay for simultaneous analyses of the ligand concentration- and time-dependent recruitment of β -arrestin2. *Anal. Biochem* **2019**, 573, 8–16.

DOI: 10.1016/j.ab.2019.02.023

Schulz, R., *et al.* Chimeric GPCRs mimic distinct signaling pathways and modulate microglia responses. *Nat Commun* **2022**, 13, 4728.

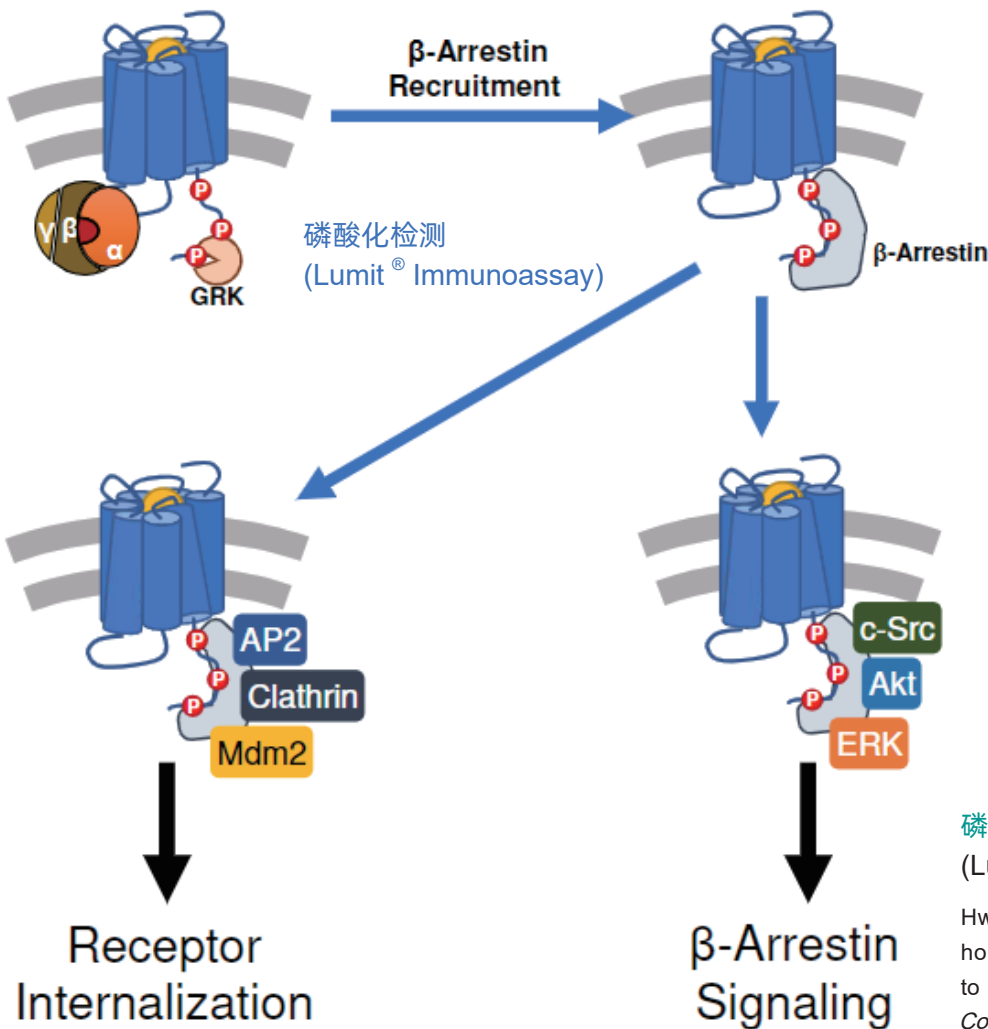
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-32390-1>

GRK) 的相互作用

(NanoBRET[™] PPI System)

et al. GPCR activation and GRK2
molecular agonist. *Nature* **2023**, 620, 676–

023-06395-9



磷酸化检测

(Lumit[®] Immunoassay)

Hwang, B.(., Engel, L., Goueli, S.A. *et al.* A homogeneous bioluminescent immunoassay to probe cellular signaling pathway regulation. *Commun Biol* **2020**, 3, 8.

<https://doi.org/10.1038/s42003-019-0723-9>

GPCR 内化

(HiBiT 蛋白标签系统)

Boursier ME, Levin S, Zimmerman K, *et al.* The luminescent HiBiT peptide enables selective quantitation of G protein-coupled receptor ligand engagement and internalization in living cells. *J Biol Chem* **2020**, 295(15):5124-5135.

doi: 10.1074/jbc.RA119.011952.

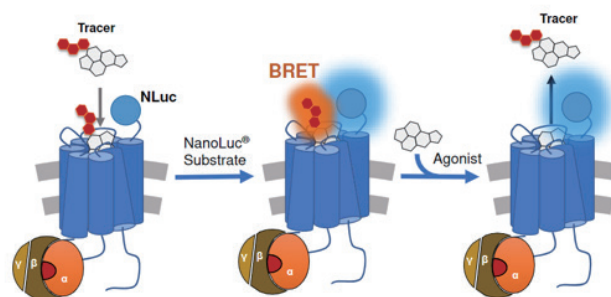
配基与受体结合

Ligand Binding

GPCR 与配基结合后，其构象会发生变化，从而导致特定效应蛋白的募集和激活，并触发下游信号通路的调节。在此过程中，Promega 提供的以 NanoLuc[®] 萤光素酶为基础的 NanoBRET[™] 技术，以其高灵敏度的特点使得研究 GPCR 与其配基在活细胞模型中的相互作用变得更为便捷。

NanoBRET[™] Target Engagement (TE) 技术

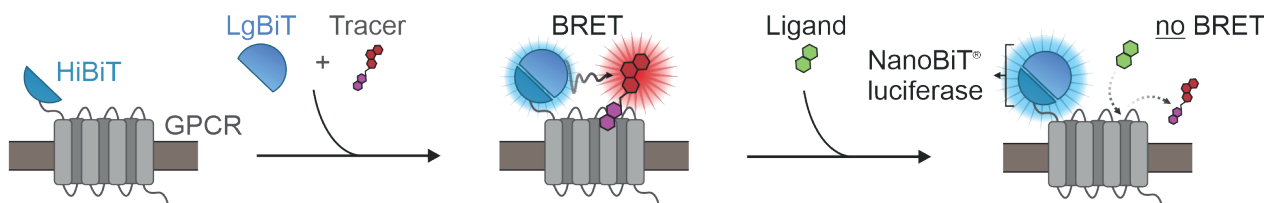
目标蛋白与 NanoLuc[®] 萤光素酶融合表达。当加入一种可渗透细胞的荧光示踪剂 NanoBRET[®] Tracer 时，该示踪剂会可逆性地结合到目标蛋白上。当荧光示踪剂结合到活细胞中的 NanoLuc[®] 融合蛋白时，示踪剂与 NanoLuc[®] 萤光素酶距离非常近，从而产生 BRET 信号。当加入待测化合物时，待测化合物会与示踪剂竞争性地结合到目标蛋白上，导致 NanoBRET[®] 信号的丧失。



技术应用

- 开发荧光示踪剂
- 开发或筛选候选药物，例如：激动剂、拮抗剂

通过 NanoBRET[™] TE 检测系统可以检测活细胞水平的 GPCR 与配基（如激动剂、拮抗剂等小分子化合物）的亲合力以及膜通透性。在此基础上还可以引入 HiBiT 蛋白标签技术，使用 HiBiT 蛋白标签标记特定的 GPCR 胞外结构域，通过添加不可透膜的互补 LgBiT 亚基，使其重组形成有活性的萤光素酶，以此检测荧光标记的 Tracer 从萤光素酶-GPCR 融合蛋白的竞争性置换。BRET 信号的减少表明待测药物的结合。



HiBiT 相关产品

产品	目录号	应用说明
pBiT3.1-N [CMV/HiBiT/Blast] Vector	N2361	将 HiBiT 标签添加到目的基因的 N 端
pBiT3.1-secN [CMV/HiBiT/Blast] Vector	N2381	将 HiBiT 标签添加到成熟的跨膜或分泌蛋白的 N 端
pFN38K HiBiT CMV-neo Flexi [®] Vector	N2401	将 HiBiT 标签添加到目的基因的 N 端
pFN39K secHiBiT CMV-neo Flexi [®] Vector	N2411	将 HiBiT 标签添加到成熟的跨膜或分泌蛋白的 N 端
Nano-Glo [®] HiBiT Extracellular Detection System	N2420/N2421/N2422	细胞外检测（非裂解型）

注：Promega 提供广泛的 HiBiT-GPCR 融合载体选择，以及适用于不同 GPCR 类别的即用型检测试剂，如对上述产品感兴趣，请咨询 Promega。

NanoBRET™ TE Assay 工作流程及对应的产品工具

1

构建靶标融合蛋白表达载体

- Promega 提供多种预构建的 NanoLuc®-靶标融合蛋白载体
- 您也可自行构建载体
- Transfection Carrier DNA



扫我下载产品
介绍手册

2

转染细胞

- FuGENE® 4K Transfection Reagent
- FuGENE® HD Transfection Reagent
- FuGENE® 6 Transfection Reagent



扫我下载产品
介绍手册

3

加入可透过活细胞膜的荧光示踪剂

- NanoBRET™ TE tracer
K3/K4/K5/K8/K9/K10/K11/K12 共 8 种



扫我下载产品
介绍手册

4

加入待测化合物（用户自备）

5

加入 NanoLuc® luciferase 抑制剂及检测底物

- 不透细胞膜的 NanoLuc® luciferase 胞外抑制剂 + NanoLuc® luciferase 底物
- Intracellular TE Nano-Glo® Substrate/Inhibitor



扫我下载产品
介绍手册

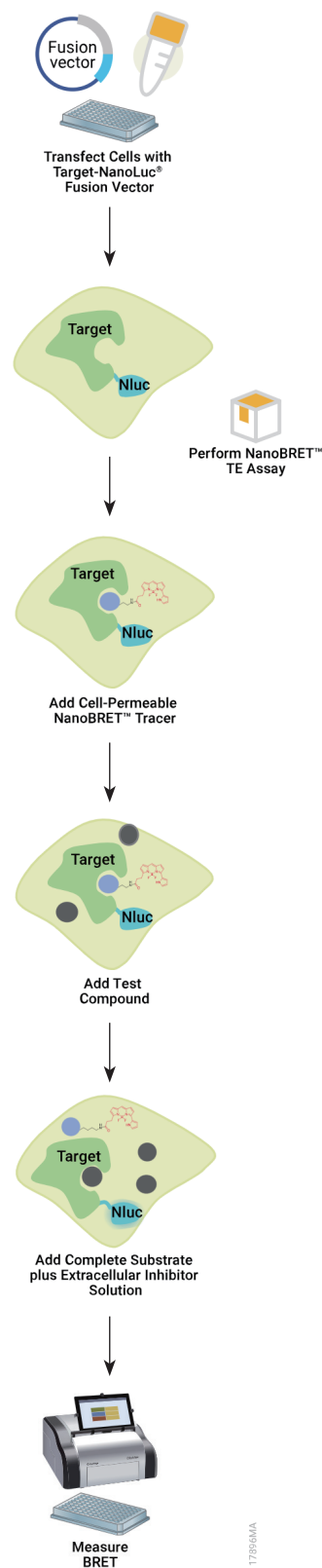
6

多功能微孔板读板仪检测发光信号

- GloMax® Discover System



扫我下载产品
介绍手册



17896AMA

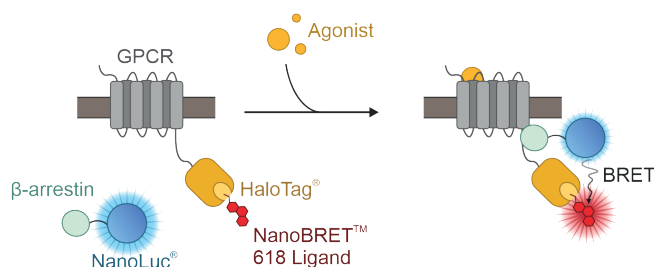
GPCR 蛋白相互作用

GPCR Interactions

激活的 GPCR 与细胞内蛋白（如 G 蛋白、GPCR 激酶（GRK）和 β -arrestin 蛋白）的相互作用是 G 蛋白信号传导中的关键步骤，同时这些关键研究领域也成为了药物研发的重点。灵敏的生物发光检测方法支持在活细胞中检测这些相互作用，以评估高通量兼容模式下的实时动力学。在新型 NanoLuc[®] 萤光素酶报告基因的基础上，Promega 开发的 NanoBiT[®] 和 NanoBRET[™] 技术均可用于活细胞内蛋白相互作用的研究。

NanoBRET[™] 技术

NanoBRET[™] 技术是一种改良的生物发光共振能量转移技术（BRET），使用最新型的专利报告基因 NanoLuc[®] 萤光素酶作为 BRET 的能量供体，HaloTag[®] 标签蛋白连接的 NanoBRET[™] 618 荧光配基作为能量受体，用来检测活细胞中蛋白间的相互作用。



产品	目录号	应用说明
NanoBRET [™] PPI Starter System Flexi [®] 或 MCS	N1821 或 N1811	包含进行蛋白互作实验设计和优化的所有试剂
NanoBRET [™] Nano-Glo [®] Detection System	N1661 / N1662 / N1663	不含载体，检测 2 小时内单个时间点的信号强度

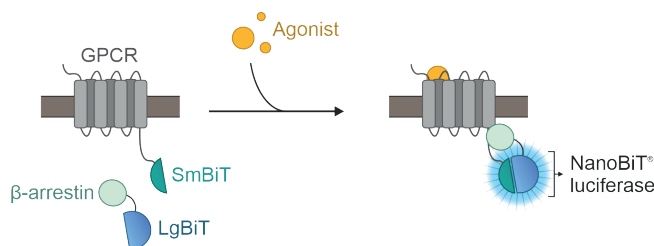


扫我下载 NanoBRET[™] 蛋白互作技术手册

NanoBiT[®] 技术

NanoBiT[®] 系统是由 Promega 专利型萤光素酶 -NanoLuc[®] Luciferase 人工重组的两个亚基组成，即大 BiT (LgBiT: 18 kDa) 和小 BiT (SmBiT: 11 氨基酸肽)，可与 2 个待测目的蛋白分别表达为融合蛋白。当两种蛋白发生相互作用时，两个亚基会相互结合形成具有活性的酶并在底物存在的条件下产生明亮的发光信号。

LgBiT 和 SmBiT 两个亚基具有最佳的稳定性和极低限度的自我聚合。



NanoBiT[®] 技术优势

● 精确地动态监测蛋白相互作用

标签蛋白之间的自发亲和力低，LgBiT:SmBiT 的自发结合最小化；互补作用可逆，可精确分析蛋白质的相互作用和解离。

● 灵敏度更高

明亮的信号和更低的背景提高了灵敏度、信噪比和动态检测范围。

● 更准确的蛋白相互作用生物模型

小标签蛋白和接近生理条件的低水平蛋白表达将人工影响降到最低；在活细胞水平进行实时动态分析。

● 操作更简单

明亮的发光输出，无需使用特殊的滤光片或进样器。

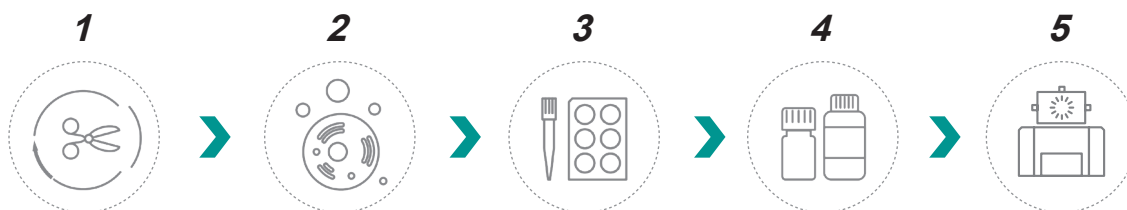
● 可调整放大实验通量

操作可以从手动到 HTS，最高至 1536 孔板的检测通量；检测试剂的稳定性高，适用于手动加样操作。



扫我下载 NanoBiT[®] 蛋白互作技术手册

以 NanoBiT® 技术为例介绍活细胞蛋白相互作用操作流程及对应产品工具



实验试剂与仪器	融合蛋白载体克隆	共转染 2 个融合蛋白载体	细胞铺板	加入 Nano-Glo® Live Cell 检测试剂	检测发光信号
	NanoBiT® 融合蛋白表达载体	高效低毒转染试剂	实验者自备	NanoBiT® 蛋白检测试剂	具有发光检测功能的多孔板读板仪及检测板
Promega 解决方案说明	Promega 提供商品化的全套 NanoBiT® 融合蛋白载体及实验所需对照载体。 从技术线路上我们可提供经典的多克隆位点 MCS 载体或专利的高效克隆 Flexi 克隆载体。 Promega 可提供包含所有载体和检测试剂的完整试剂盒。	由于实验是基于活细胞进行检测，因此对细胞的活性状态要求更高，需要高效低毒的转染试剂来完成实验，Promega 提供 FuGENE® 系列转染试剂。	您需要自备细胞和培养所需的试剂，根据 Promega 提供的操作说明进行处理细胞。	Nano-Glo® Live Cell Assay System 是专为 NanoBiT® 和 NanoLuc® 相关的活细胞检测而设计，可完美实现蛋白相互作用的活细胞水平终点法检测和实时动态监测。 Promega 可提供包含了所有载体和检测试剂的完整试剂盒，同时也提供可单独购买的检测试剂。	GloMax® 系列多孔板读板仪是包括多功能读板仪和单功能发光检测仪。高效，易用的多功能微孔板读板仪，可用于化学发光，荧光，吸收光，BRET 和 FRET。通量可以高达 384 孔板，具备加热和震荡功能。可以灵活满足您多方面的实验需求。
产品	- NanoBiT® PPI MCS Starter System - NanoBiT® PPI Flexi® Starter System	- FuGENE® 4K Transfection Reagent - FuGENE® HD Transfection Reagent - FuGENE® 6 Transfection Reagent		Nano-Glo® Live Cell Assay System	- GloMax® Discover System - GloMax® Navigator System - GloMax® Explorer System
注意事项	试剂盒中不包含载体酶切所需的限制性内切酶，以及纯化和扩增质粒所需试剂。			NanoBiT® PPI MCS/Flexi® Starter System 中已含有检测试剂，Nano-Glo® Live Cell Assay System 为可单独购买的检测试剂。	检测所需的检测板需用户自备。NanoBiT® 的光信号是发光信号，无需激发光。

GPCR 内化

GPCR Internalization

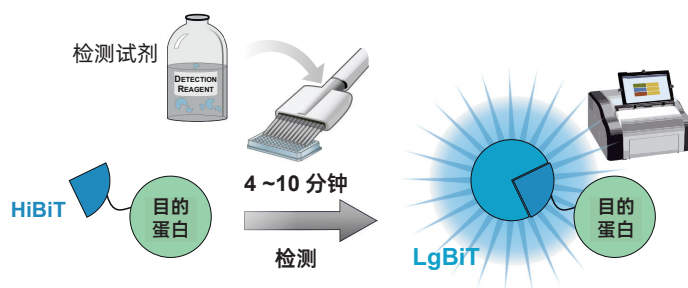
配基激活 GPCRs 后，其内化是调节受体信号传导的重要步骤。利用 HiBiT 蛋白标签系统能够开发出操作简单、可定量测定受体内化的检测方法，可节省时间并消除基于抗体方法的变异性。使用经优化的检测试剂，可快速平衡表面受体，快速采集变化的生物学数据，最大限度降低孔间变异性。

HiBiT 标记的 GPCR 内化具有以下优势：

- 进行活细胞实时动力学分析
- 无需固定、洗涤；无需抗体
- 在同一细胞中测定总受体的量
- 适用于内源性标记受体，检测内源生物学

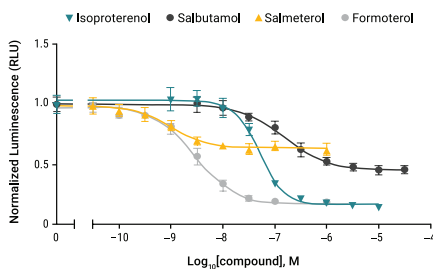
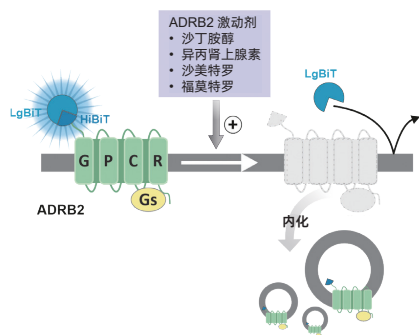
原理

HiBiT 是一个由 11 个氨基酸构成的肽标签，可以连接到任何目的蛋白 (POI)，可在 10 分钟或更短时间内使用生物发光试剂进行检测。检测试剂含有一个无活性的萤光素酶亚基 LgBiT，其能快速与 HiBiT 结合，产生一种高活性萤光素酶。



应用示例：在几分钟内检测配体的效价和 GPCR 受体内化的程度

不同激动剂刺激 β_2 肾上腺素能受体 (β_2 adrenergic receptor, ADRB2) 导致其内化。当作为外源标记的 HiBiT 融合蛋白进行表达时，这个过程可以很容易地使用 Nano-Glo[®] HiBiT Extracellular Detection System 进行定量，因为 LgBiT 蛋白具有细胞非渗透性，只会结合到表面受体上。



激动剂	EC ₅₀	表面受体剩余百分比
异丙肾上腺素	50.9nM	16%
沙丁胺醇	161nM	45%
沙美特罗	1.04nM	63%
福莫特罗	2.92nM	16%

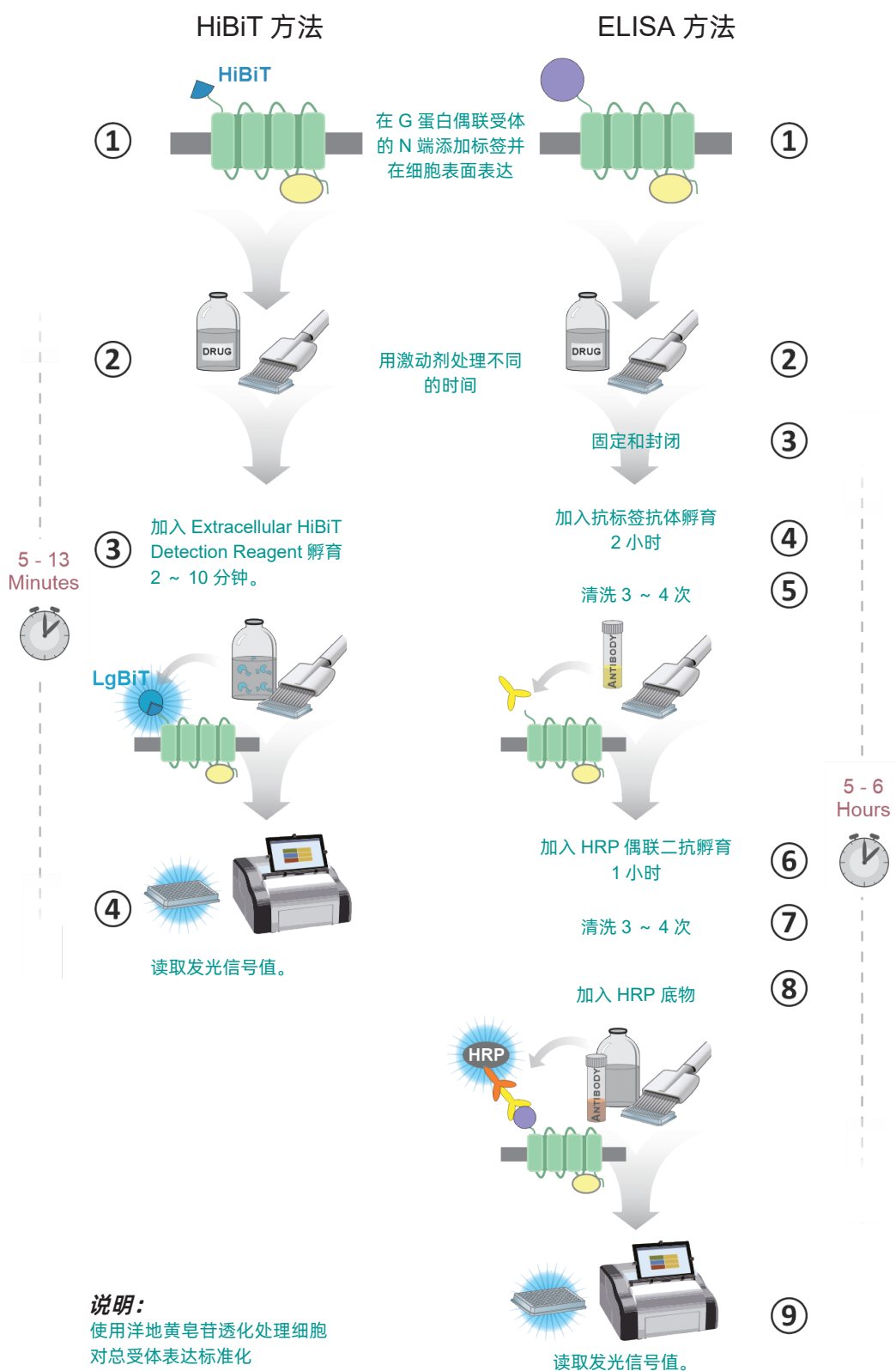
相关产品

产品说明	产品	规格	目录号
细胞外检测	Nano-Glo [®] HiBiT Extracellular Detection System	10ml	N2420
		100ml	N2421
		10 x 100ml	N2422



扫我下载 HiBiT 标签介绍手册

与工作负荷较高的 ELISA 方法相比，HiBiT 蛋白标签系统提供了一种更快、更灵敏和更稳定的方法来监测进出细胞表面的受体。

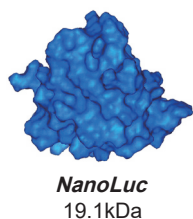


转录反应

Transcriptional Responses

GPCR 信号级联反应导致特定转录因子的激活，从而引起基因表达的变化。带有应答元件的萤光素酶报告载体允许使用简单、灵敏的加样 - 混合 - 读数法检测特定的 GPCR 激活转录因子的活性。

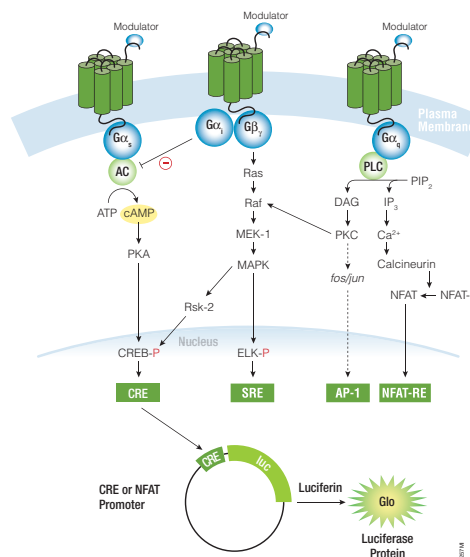
目前除了广为人知的萤火虫萤光素酶报告基因，海肾萤光素酶报告基因以外，Promega 还最新推出了革新性的 NanoLuc® 报告基因，具有蛋白更小，表达更高，光信号更强等特点。



NanoLuc
19.1kDa

• NanoLuc® 萤光素酶-NanoLuc® Luciferase

Promega 最新推出的专利报告基因，经过基因工程改造的小分子酶（19.1kDa），配合革新型专利底物——Furimazine，可产生高强度、辉光型发光。其生物发光反应不依赖 ATP，自发光背景低，光信号更强，同时抑制背景发光以获得最高检测灵敏度。既可用作主报告基因，也可用作内参报告基因。



萤光素酶报告基因种类及性能比较

报告基因	NanoLuc®	Firefly	Renilla
来源	细角刺虾萤光素酶突变体	鞘翅目萤火虫	腔肠动物海肾
分子量	19kD	61kD	36kD
蛋白表达	细胞内或分泌型	细胞内	细胞内
颜色	蓝色	黄绿色	蓝色
灵敏度	+++++	++++	++++
线性范围	10 ¹⁰	10 ⁸	10 ⁸
主要应用	调控元件功能分析及信号通路分析 融合蛋白表达 BRET	细胞信号通路分析 调控元件功能型研究等	与 Firefly 共同使用做为内参报告基因

相关产品

产品说明	产品	规格	目录号
双报告基因检测	Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay System	10ml	N1610
	Dual-Luciferase Reporter Assay System	10ml	E1910
	Dual-Glo® Luciferase Assay System	10ml	E2920
单报告基因检测	Nano-Glo® Luciferase Assay System	10ml	N1110
	Nano-Glo® Live Cell Assay System	100 assays	N2011
	Firefly 萤光素酶检测试剂： One-Glo™/Bright-Glo®/Steady-Glo®/ Luciferase Assay System	可前往 Promega 微网站查询 对应产品信息	



注：左侧列表中的产品均有其他规格提供，请扫描下方二维码下载双报告基因解决方案，查看包括载体和检测试剂在内的完整产品列表。

萤光素酶报告基因实验流程及对应产品工具

报告基因技术是基于报告基因载体构建，转染，表达，最终以检测系统来检测数据的一套研究方案，适用于多种应用方向。
大体流程包括：

1

构建表达载体

- pGL4 系列萤光素酶载体
- pNL 系列萤光素酶载体



扫我下载产品
介绍手册

2

转染细胞

- FuGENE® 4K Transfection Reagent
- FuGENE® HD Transfection Reagent
- FuGENE® 6 Transfection Reagent



扫我下载产品
介绍手册

3

加入检测试剂

- 双报告基因检测
- 单报告基因检测



扫我下载产品
介绍手册

4

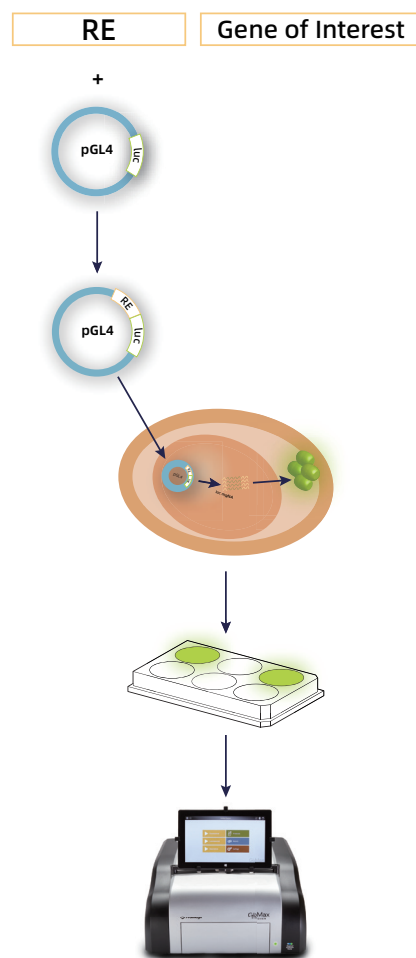
多功能读板仪检测发光信号

- GloMax® Discover System



扫我下载产品
介绍手册

1. 确定要克隆的 RE(应答元件), 选择合适的载体
2. 将 RE 克隆入载体



实验 Tips:

1. 选择合适的报告基因载体：
 - 选择报告基因：Firefly、Renilla、NanoLuc® 萤光素酶；
 - 选择载体：骨架载体，需自行构建不同元件的报告基因载体；预构建载体，商品化的已经预构建了所需调控元件的载体
2. 根据实验目的选择合适的转染方法：
 - 转染方法：瞬时转染或稳定转染
 - 商品化的稳转细胞：已稳定转染所需目的基因或报告基因的细胞系
3. 根据实验需求选择合适的检测方案（单报告基因检测或双报告基因检测）

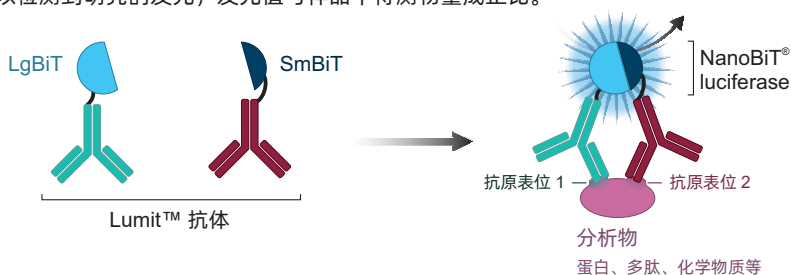
蛋白磷酸化

Protein phosphorylation

GPCRs 在被配体激活后，主要通过下游的 G 蛋白或 arrestin 通路行使特定的生理功能。然而，GPCRs 在招募 arrestin 蛋白之前，必须被 GPCR 激酶（GPCR Kinases, GRKs）识别和调控。多项研究证实，Lumit[®] Immunoassay Cellular Systems 可用于细胞中的激酶信号通路分析。特别是因磷酸化介导的信号转导。

Lumit[®] Immunoassay

Lumit[®] 的基本原理是 NanoLuc[®] 二亚单元系统 (NanoBiT[®])。在 Lumit[®] 免疫分析中，两种抗体分别用 NanoLuc[®] 萤光素酶的小亚基和大亚基（即 SmBiT 和 LgBiT）进行化学标记。直接或间接与分析物结合产生标记抗体的空间接近性，使 SmBiT 和 LgBiT 能够重组形成 NanoBiT[®] 萤光素酶。在其底物 furimazine 的存在下，可以检测到明亮的发光，发光值与样品中待测物量成正比。

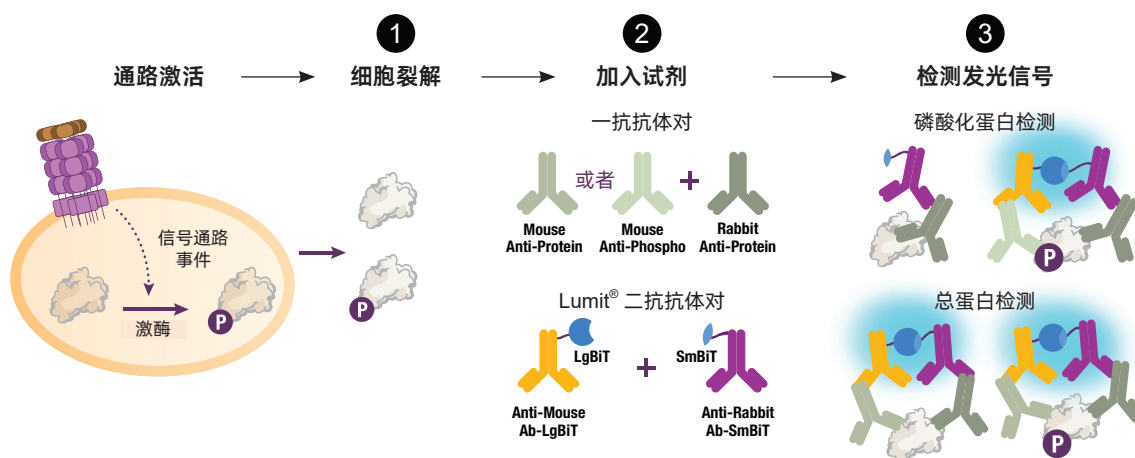


特点及优势

- 简单的均质型操作流程
 - ✓ 无需洗涤
 - ✓ 无需封闭
- 检测分析物在：
 - ✓ Buffer
 - ✓ 细胞培养基上清
 - ✓ 细胞裂解物
- 在常规的可读板发光检测仪上检测信号

Lumit[®] Immunoassay Cellular Systems

使用间接的 Lumit[™] 检测模式，将两种一抗与预先标记 LgBiT 或 SmBiT 亚基的两种匹配二抗进行混合以检测靶标蛋白质。一抗 / 二抗复合物与各自相应表位的结合使 NanoBiT[®] 大小亚基紧密相邻，形成了有活性的萤光素酶，该酶产生的光信号与靶标蛋白质的量成正比。



预验证靶标

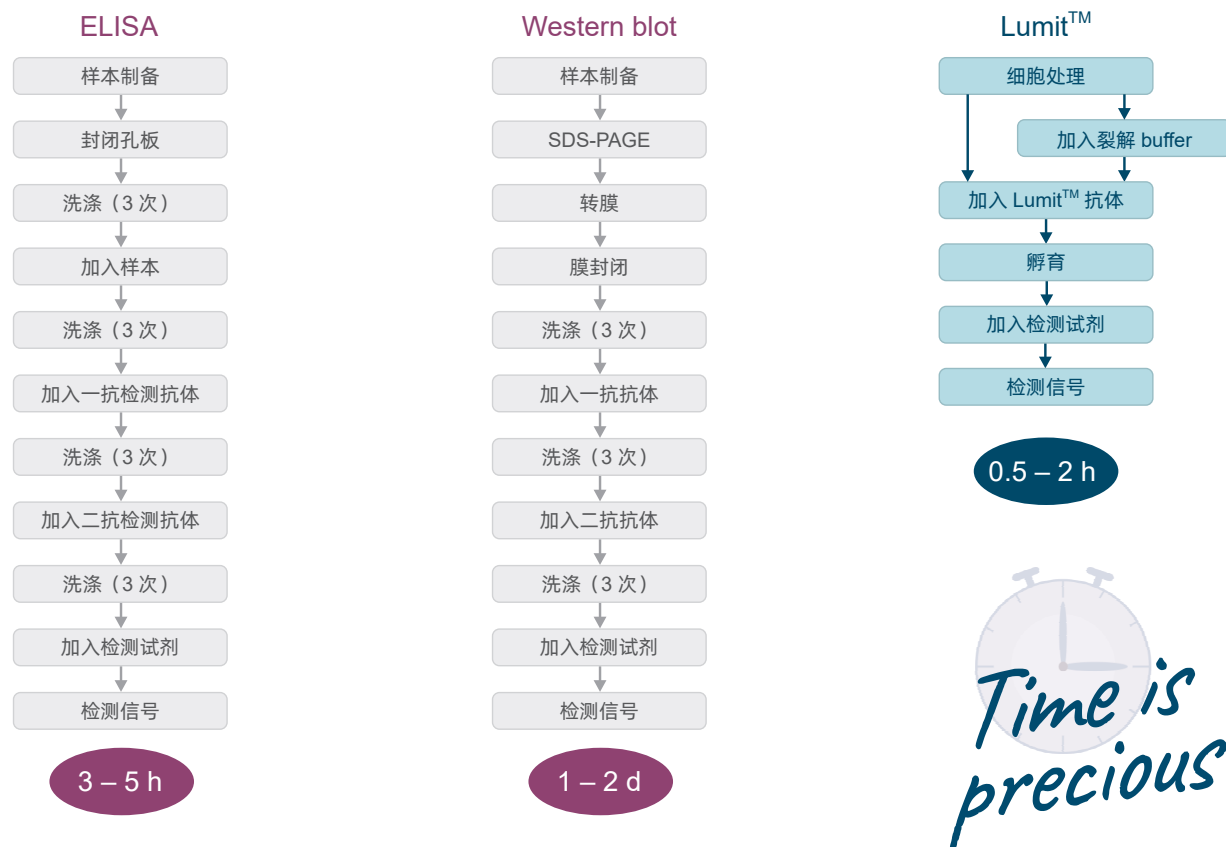
Promega 提供 20 多种预验证目标蛋白的应用说明列表，以节省检测时间和人力。应用说明包含靶标特异性操作步骤、代表性数据以及使用的市售一抗抗体信息。请访问 Promega 官方网站浏览最新的应用说明 www.promega.com/LumitCellularSystems 或扫描右侧二维码查看中文版应用说明。



扫我下载预验证
靶标列表

Lumit[®] vs. 常规的免疫检测

Lumit[®] 免疫检测是快速的、基于孔板的加样 - 读数检测。无需洗涤步骤使得 Lumit[®] 成为了传统的免疫分析方法 (如 ELISA 和 Western Blot) 的极好的替代方法。



相关产品

产品	规格	目录号
Lumit [™] Immunoassay Cellular System - Starter Kit	200 assays	W1220
Lumit [™] Immunoassay Cellular System - Set 1	100 / 1,000 / 10,000assays	W1201 / W1202 / W1203
Lumit [™] Immunoassay Cellular System - Set 2	100 / 1,000 / 10,000 assays	W1331 / W1332 / W1333
Lumit [™] Immunoassay Lysis and Detection Kit	100 / 1,000 / 10,000 assays	W1231 / W1232 / W1233
Lumit [™] Anti-Mouse Ab-LgBiT	30 / 300 µl	W1021 / W1022
Lumit [™] Anti-Mouse Ab-SmBiT	30 / 300 µl	W1051 / W1052
Lumit [™] Anti-Rabbit Ab-LgBiT	30 / 300 µl	W1041 / W1042
Lumit [™] Anti-Rabbit Ab-SmBiT	30 / 300 µl	W1031 / W1032
Lumit [™] Anti-Goat Ab-LgBiT	30 / 300 µl	W1061 / W1062
Lumit [™] Anti-Goat Ab-SmBiT	30 / 300 µl	W1071 / W1072

注: Promega 目前可提供定制化的完整检测试剂盒 (Complete Assays, 含一抗的抗体对), 包括用于几个重要信号通路节点的抗体试剂盒——pERK、pAKT、pSTAT3、plkBα 和 pBTK 等。如您想了解更多, 请扫描右侧二维码联系您所在地经销商。



扫我下载 Lumit[®] 技术介绍手册



扫我查看经销商联系方式

cAMP 检测

cAMP Assays

环腺苷酸 (cAMP) 是参与 GPCR 信号转导的一种重要的二级信使，通过 $G\alpha_s$ 和 $G\alpha_i$ 蛋白产生作用。利用灵敏、易用的 cAMP-Glo™ 和 GloSensor™ cAMP Assay，监测 cAMP 的产生，以响应待测化合物对 GPCRs 的影响。

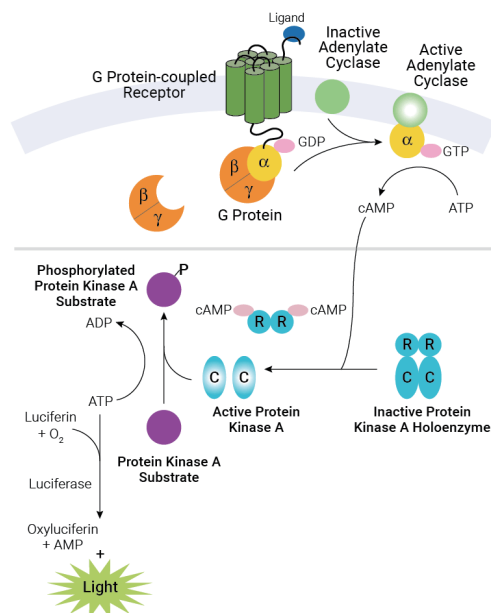
cAMP-Glo™ Assay

cAMP-Glo™ Max Assay 是一种均质的、利用生物发光原理检测细胞内 cAMP 水平的高通量方法。用于监测细胞内的 cAMP 水平在以下应答反应中的改变：激动剂、拮抗剂、及受试化合物对 GPCR 的效应。

- 高灵敏度 (30 fmol ± 5 SEM cAMP/ 孔) 和可重复性 ($Z' > 0.8$)
- 与贴壁细胞、悬浮细胞、冷冻细胞和组织提取物兼容
- 生物发光检测，与基于荧光的检测相比不易受化合物干扰
- 延长了发光信号的半衰期 (>4 小时)，可对多个孔板进行批量处理

相关产品

产品	规格	目录号
cAMP-Glo™ Max Assay	2 plates	V1681
	20 plates	V1682
	10x20 Plates	V1683



上图：细胞内 cAMP 生成和 cAMP-Glo™ Max 分析法。

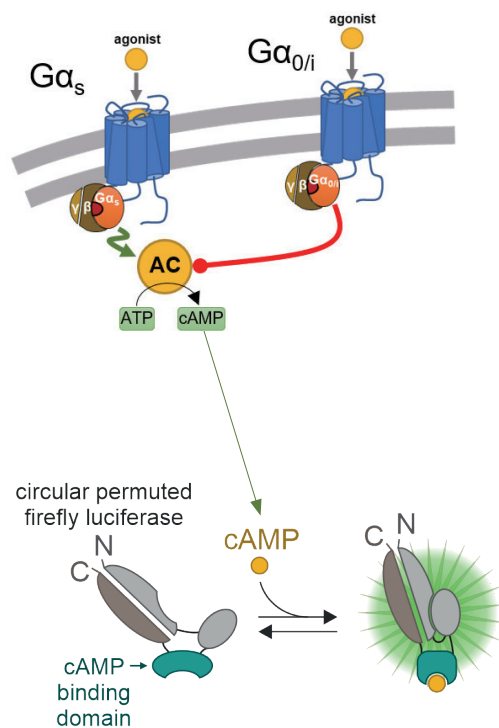
GloSensor™ cAMP Assay

该检测方法基于 GloSensor™ 技术，将萤火虫萤光素酶经过遗传改造，插入了一个结合 cAMP 的蛋白组分。当结合上 cAMP 后，萤光素酶构象发生改变，导致光输出的增加。这种活细胞检测在利用 cAMP 进行信号转导动力学和调控等研究方面表现出众。将目的受体和该生物传感器在选定的细胞系中进行瞬时表达时，研究者可使用 GloSensor™ cAMP 检测试剂盒进行检测。

- 实时检测活细胞中的 cAMP；
- 动态范围宽，可显示高达 500 倍的光输出变化；
- 灵敏度极高，可在没有 forskolin 等化合物人为刺激的情况下检测 G_i 偶联受体的激活或反向激动剂活性。

相关产品

产品	规格	目录号
pGloSensor™ - 22F cAMP Plasmid	20µg	E2301
pGloSensor™ - 20F cAMP Plasmid	20µg	E1171
GloSensor™ cAMP Reagent	25mg	E1290
	250mg	E1291



一种用于监测 GPCR 介导的 cAMP 调控和 PDE 活性的生物发光均质检测方法

A bioluminescent and homogeneous assay for monitoring GPCR-mediated cAMP modulation and PDE activity

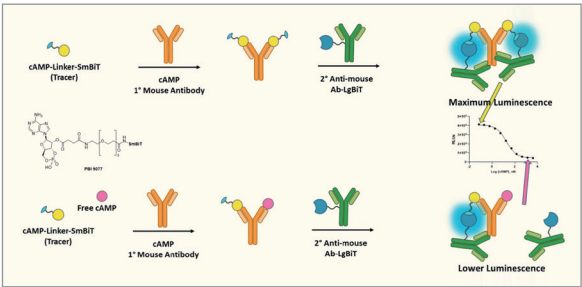
<https://doi.org/10.1038/s41598-024-55038-0>

研究目的

cAMP 是第一个被发现的第二信使，参与了涉及细胞代谢、细胞增殖和分化、凋亡以及基因表达等多种细胞过程。cAMP 信号传导的失调与心血管疾病、神经退行性和行为障碍、癌症、糖尿病、肥胖、白内障等各种病理条件有关。cAMP 靶向治疗一直备受关注，以期用于上述及其他疾病的治疗。本研究的目的是开发检测和动态监测 cAMP 水平的方法，为未来 cAMP 信号通路治疗药物筛选提供新工具。

研究方法

在本文中，作者利用 NanoLuc® 二亚单元（NanoBiT）系统，结合特异性的 cAMP 抗体和 cAMP 示踪剂（偶联 SmBiT），在生化酶促反应以及细胞实验中检测 cAMP。此外，Lumit® Immunoassay 是均质型检测且特异性强，具有较大的检测窗口和宽广的动态范围，适用于高通量筛选（HTS），并且可以在任何简单的发光光度计上，以不同的筛选规格运行。这一检测方法将有助于简化针对 cAMP 信号通路靶向治疗的筛选工作。



相关产品

产品	目录号	应用说明
GloSensor™ cAMP assay	E1290	一种全新的方法来检测活细胞中的 cAMP 水平
cAMP Glo™ assay	V1501	利用生物发光原理检测细胞内 cAMP 水平的高通量方法
cAMP	V6421	cAMP 依赖性的蛋白激酶激活剂
cGMP	V6411	cGMP 依赖性的蛋白激酶激活剂
Lumit® Anti-Mouse Ab-LgBiT	W1022	Lumit® 检测系统中的二抗抗体
Immunoassay Buffer C	VB115B	Lumit® 检测系统中的缓冲液
Nano-Glo® Luciferase Assay Substrate	N113C	检测底物
GloMax® Discover System	GM3000	可进行滤光片式化学发光、荧光、紫外 - 可见光吸光度、生物发光共振能量转移 (BRET) 和荧光共振能量转移 (FRET) 检测

研究结果

文章中的数据展示了 cAMP Lumit® immunoassay system 在生化酶促反应和细胞实验中的稳健性和能力，这使其成为针对 cAMP 信号通路治疗药物筛选的完美选择。

嵌合 GPCR 模拟不同的信号通路并调节微胶质细胞反应

Chimeric GPCRs mimic distinct signaling pathways and modulate microglia responses

<https://doi.org/10.1038/s41467-022-32390-1>

研究目的

GPCRs 调控着从免疫反应到神经信号传递等各种过程。然而，许多 GPCRs 的配体仍然未知，存在非靶向效应或生物利用度差。此外，当同一 GPCR 在组织内的不同细胞上表达时，分离细胞类型特异性反应具有挑战性。本研究的目的就是克服上述在 GPCRs 研究中遇到的限制，推动对 GPCR 功能和调控机制的更深入理解，以及可能促进新药发现。

研究方法

在本文中，作者通过分析视网膜转录组数据，确定与神经元突触可塑性相关的基因，并筛选出潜在的药物靶点。
选择 β 2-adrenergic receptor (β 2AR) 作为模型，构建 DREADD- β 2AR，探讨其是否能够引发与 β 2AR 相同的信号途径。
验证 DREADD- β 2AR 在微小胶质细胞中的表达，并研究其在细胞迁移和炎症反应中的作用。
设计 DREADD-GPR65 和 DREADD-GPR109A，分别验证它们在 GPCR 信号途径中的功能。

相关产品

产品	目录号	应用说明
NanoBiT [®] PPI MCS Starter system	N2014	活细胞蛋白相互作用检测
Beetle Luciferin, Potassium Salt	E1602	适用于自行配制检测试剂进行体外或体内萤光素酶活性检测
pGloSensor [™] - 22F cAMP Plasmid	E2301	一种全新的方法来检测活细胞内 cAMP 的水平
GloSensor [™] cAMP Reagent	E1290	
Nano-Glo [®] Live Cell Assay System	N2011	检测活细胞内 NanoBiT [®] 或 NanoLuc [®] 萤光素酶的生物发光
Dual-Glo [®] Luciferase Assay System	E2920	双报告基因检测
pGL4.33[luc2P/SRE/Hygro] Vector	E1340	带有信号通路应答元件的萤光素酶报告基因载体
pGL4.29 [luc2P/CRE/Hygro] Vector	E8471	

研究结果

- 使用 DREADD 技术设计了针对不同微小胶质细胞特异性 GPCR 的突变体，并成功验证其功能。
- 发现 DREADD 技术可用于研究微小胶质细胞中的炎症反应和免疫调节。
- 研究发现 GPR65 和 GPR109A 这两种 GPCR 对酸性环境敏感，可能影响微小胶质细胞的功能。
- 使用 DREADD 技术可以有效地控制微小胶质细胞中特定 GPCR 的活性，为深入研究微小胶质细胞的生理学和病理学提供了新的工具。

孤儿受体 GPR61 的反向激动剂通过 G 蛋白竞争性变构机制发挥作用

An inverse agonist of orphan receptor GPR61 acts by a G protein-competitive allosteric mechanism

<https://doi.org/10.1038/s41467-023-41646-3>

研究目的

GPR61 是一个与生物胺受体相关的孤儿 G 蛋白偶联受体 (GPCR)。由于它与食欲相关的表型有关，因此作为一个潜在的药物靶标，对于治疗代谢和体重紊乱（如肥胖症和恶病质等疾病）具有重要的研究意义。然而目前由于缺乏结构信息或已知的生物配体或工具化合物，对 GPR61 结构和功能的研究受到了阻碍。本研究的目的是寻找工具化合物，深入了解其与 GPR61 的结合位点和作用机制，以支持未来的药物发现工作。

研究方法

在本文中，作者使用冷冻电镜 (cryo-EM) 技术，研究 GPR61 在未结合配体时的活性状态和其与 G 蛋白偶联的结构；通过对 GPR61 基因敲除小鼠模型的观察，研究 GPR61 对食欲亢进和肥胖表型的作用机制；在开发针对 GPR61 的小分子治疗药物的过程中，寻找新的工具化合物，通过体外药理学分析实验研究化合物在离体条件下对生物系统的作用和效果。

相关产品

产品	目录号	应用说明
Fugene® 6 Transfection Reagent	E2691	高效低毒转染试剂
Transfection carrier DNA	E4881	使用质粒 DNA 稀释表达载体或报告基因载体进行转染
Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System	N2421	可定量细胞表面和细胞外分泌的 HiBiT 标签蛋白的表达，无需裂解细胞
Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System	N3040	几分钟内快速定量细胞内的 HiBiT 标签蛋白

研究结果

文章中构建了一个工具箱，用于未来对 GPR61 及其他受体的研究，包括：

- AlphaFold2：这是一种 AI 驱动蛋白质结构预测工具，它在结构生物学中应用广泛，并可能有助于设计实验策略，以确定其他 GPCRs 的结构。
- 化合物 1：研究中发现的工具化合物具有强大的效果和良好的非靶向性，使其成为未来 GPR61 体内功能研究的有力工具。
- 变构口袋：研究中意外发现了一个变构口袋 (allosteric pocket)，可能成为药物设计的新靶点，对未来的药物发现工作具有重要意义。

GPCR 信号通路研究用工具

www.promega.com.cn/applications/small-molecule-drug-discovery/gpcr-research-drug-discovery/



关注 Promega 生命科学公众号，您可获得



产品信息



价格查询



中文说明书



讲座视频



技术资料



实验工具



市场活动



经销商信息

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司
Promega (Beijing) Biotech Co., Ltd

地址：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

网址：www.promega.com

技术支持电话：400 810 8133

技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

印刷时间：2024.05