

活细胞内 CDK 家族激酶选择性分析系统

检测原理

NanoBRET™ Target Engagement (TE) CDK Selectivity Systems 可以在活细胞中检测化合物或抑制剂对多达 16 个 CDK 的亲力和占据率。该系统使用 NanoBRET™ TE 技术，一种生物发光共振能量转移 (BRET) 方法，使用小而明亮的 NanoLuc® 萤光素酶作为能量供体和细胞可渗透的 NanoBRET™ TE tracer 作为能量受体 (图 1A)。相应的细胞周期蛋白 / 调节蛋白与 CDK-NanoLuc® 融合蛋白共表达，添加待测化合物后，化合物与 tracer 竞争靶蛋白的结合而导致 NanoBRET 信号减弱。

NanoBRET™ Target Engagement (TE) CDK Selectivity Systems 可提供 A 或 B 两组即用型 CDK 激酶载体组，极大简化了常规激酶选择性筛选流程。每组包含 8 管 CDK-NanoLuc® 融合表达载体，这些载体与细胞周期蛋白表达载体或载体 DNA 预先混合，以实现最佳转染效果。只需解冻、稀释并转染这些耗材载体混合物即可使用 NanoBRET™ TE Assay K-10 检测所有 CDK 激酶。载体组 A 提供 8 种已经过高度研究的 CDK 激酶融合表达载体，载体组 B 则包含 8 种未充分研究的 CDK 激酶融合表达载体 (图 B)。

特点

- **活细胞检测：**在活细胞中检测化合物或抑制剂对多达 16 个 CDK 的亲力和占据率；
- **转染即用型载体组：**提供 A 和 B 两组 CDK 激酶载体组，简化常规激酶选择性筛选流程。每组包含 8 管 CDK-NanoLuc® 融合载体，这些载体与细胞周期蛋白表达载体或载体 DNA 预先混合，以获得最佳转染效果。使用 NanoBRET™ TE Assay K-10 检测所有 CDK 激酶；
- **一键式检测流程：**只需添加，采用多孔板的检测方法；
- **灵活的格式：**CDK 载体组 A 包含 8 个高度研究的 CDK，载体组 B 包含 8 个未充分研究的 CDK，可单独或一起使用；
- **出色的数据质量：**BRET 比率数据重现性高、误差小。

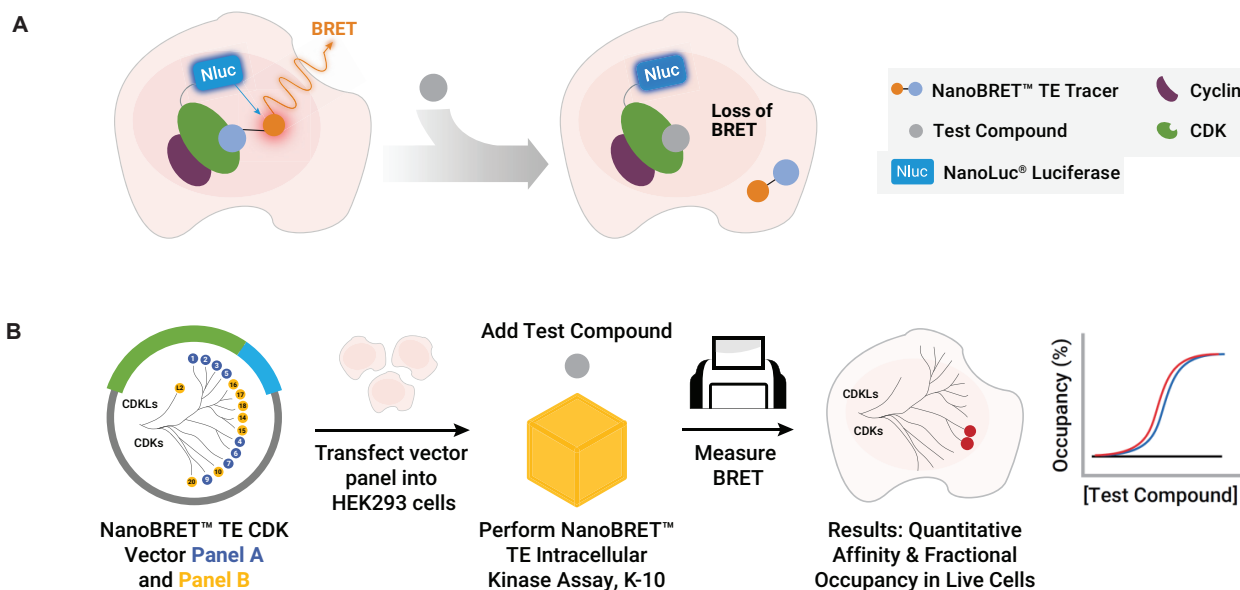


图 1 NanoBRET™ TE CDK Selectivity Systems 操作流程概述。 NanoBRET™ Target Engagement (TE) CDK Selectivity Systems 包含一个 CDK-NanoLuc® 融合表达载体组 (A 或 B) 和 NanoBRET™ TE Assay K-10。首先将载体组转染到多孔板的 HEK293 细胞中。孵育过夜后，将待测化合物添加到检测板中，并进行 NanoBRET™ TE Assay K-10 的检测，对每个 CDK 使用单一优化浓度的 NanoBRET™ Tracer K-10，使用多功能检测仪检测 BRET 信号。

活细胞中定量 16 种 CDK 化合物的亲和力和占有率

A. 化合物细胞内亲和力

	Affinity (K _i ^{app} , nM) for CDK/cyclin complexes using Vector Panel A and B																
CDKs	1	2	3	4	5	6	7	9	10	14	15	16	17	18	20	L2	
Cyclin	B1	E1	E1	D3	R1	D1	--	K	L2	Y	Y	Y	Y	Y	H	--	
Compound																	
AMG 925		310		6		7				600	820	200					
Abemaciclib				7		2		270		440		90	130	380		100	
Palbociclib				10		2											
Ribociclib				29		31											
Trilaciclib				4		4						600	500				

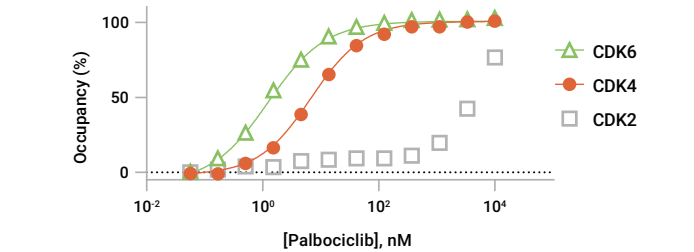


图 A 利用梯度稀释法对载体组 A 和 B 中的 16 个 CDK 与一组抑制剂进行了测试。CDK4/6 抑制剂 Palbociclib（图 A 和上表）和 Ribociclib（表），显示出对 CDK4/6 非常高的选择性。而 Abemaciclib（图 B 和上表）虽然对 CDK4/6 具有选择性，但它也对 CDK9 和 TAIRE 家族具有选择性。其他抑制剂能有效参与 CDK4/6，但也表现出附带参与其他 CDK 家族，包括 TAIRE 家族。表中没有展示 >1 μM 的亲和力，尽管它们是可检测的（如图 A）

B. 化合物细胞内占有率

	CDK Expressed	Partner Protein Expressed	Mean		Standard Deviation	
			Mean	Standard Deviation	Mean	Standard Deviation
Panel A	CDK1	CCNB1	1	0.4	9	5
	CDK2	CCNE1	1	3	30	2
	CDK3	CCNE1	-1	1	34	1
	CDK4	CCND3	95	2	96	0.6
	CDK5	CDK5R1	3	3	19	3
	CDK6	CCND1	96	2	97	0.6
	CDK7	N/A	-2	3	38	4
	CDK9	CCNK	19	5	73	1
	CDK10	CCNL2	-10	8	0.5	13
Panel B	CDK14	CCNY	7	1	48	3
	CDK15	CCNY	2	1	14	4
	CDK16	CCNY	14	9	71	1
	CDK17	CCNY	12	8	67	2
	CDK18	CCNY	3	1	44	3
	CDKL2	N/A	22	10	81	1
	CDK20	CCNH	-8	15	1	7

图 B Palbociclib 和 Abemaciclib 的占有率定量检测。通过检测对照值，BRET 比率可以转换为占有率。占有率分数可以在单一化合物浓度下分析 CDK 中的化合物选择性。Palbociclib 和 Abemaciclib 是 CDK4/6 选择性抑制剂。表中显示了 500nM 的 Palbociclib 和 500nM 的 Abemaciclib 对 CDK 载体组 A 和 B 的占有率数据（平均值和标准偏差是从 3 个独立实验计算得出的）。

产品信息

激酶选择性系统	目录号
NanoBRET™ TE CDK Selectivity System A	NP5050
NanoBRET™ TE CDK Selectivity System B	NP5150
载体组	目录号
NanoBRET™ TE CDK Vector Panel A	NP5000
NanoBRET™ TE CDK Vector Panel B	NP5100
经常一起使用的产品	目录号
NanoBRET™ TE Selectivity DNA Controls	NP1000
Fugene® HD Transfection Reagent	E2311

参考文献

- Vasta, J.D., et al. (2018) Quantitative, wide-spectrum kinase profiling in live cells for assessing the effect of cellular ATP on target engagement. *Cell Chem Biol* **25**, 206.
- Wells, C.I., et al. (2020) Quantifying CDK inhibitor selectivity in live cells. *Nature Commun.* **11**, 2743.

更多详细信息

- NanoBRET™ TE CDK Selectivity 产品请访问 [产品页面](#)
- NanoBRET™ TE 激酶检测请访问: www.Promega.com/NanoBRETkinaseTE