



TheScientist
TOP 10
INNOVATIONS

NanoBiT® 技术被 The Scientist 杂志评为 2015 年度 Top 10 创新技术。

Real-Time | Live cell | Integrated Solution

NanoBiT® 蛋白互补技术

生物发光 ● 活细胞 ● 实时 ● 蛋白相互作用检测

目录

Content

NanoBiT[®] 技术基本介绍 4

- NanoBiT[®] 技术原理4
- NanoBiT[®] 技术优势5
- NanoBiT[®] 技术与 Split 分离杂交技术的比较6

NanoBiT[®] 技术操作流程 7

- NanoBiT[®] 多克隆位点解决方案.....7
- NanoBiT[®] Flexi[®] 技术解决方案8
- GloMax[®] Discover 多功能检测仪9

NanoBiT[®] 技术应用 10

- GPCR 相互作用 11
- RAS 信号通路研究 12
- 病毒研究 13
- 传染病研究 15
- 代谢性疾病研究 17

产品列表及其他技术资源 18

- 产品列表 18
- 技术资源 19



活细胞实时蛋白：蛋白相互作用检测

NanoLuc[®] Binary Technology-NanoBiT[®]

蛋白质：蛋白质相互作用 (PPIs) 对细胞中的几乎所有过程都是必不可少的，因此理解 PPIs 对于理解正常和疾病状态下的细胞生物学就显得至关重要。目前有许多方法来描述蛋白质相互作用，使用细胞提取物或活细胞来表达潜在的目标蛋白。然而这些研究蛋白质间相互作用的传统方法如 Pull-down 或免疫共沉淀，并不能直接提供细胞环境中的数据。

NanoBiT[®] 技术是一种基于 Promega 最新专利萤光素酶 NanoLuc[®] Luciferase 的二亚单元系统，可以定量检测活细胞中蛋白质之间的相互作用。

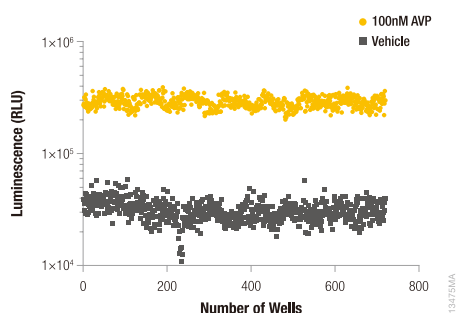
技术应用

- 活细胞蛋白相互作用的动态实时监测。
- 单细胞蛋白相互作用的检测。
- 蛋白相互作用调节因子的筛选 (高达 384 孔板和 1536 孔板通量)。

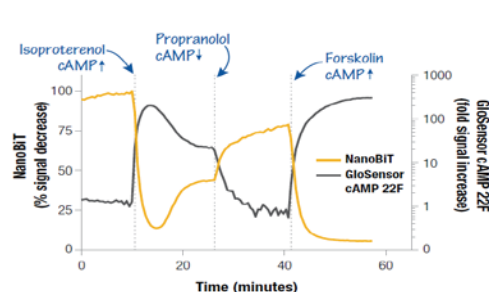
技术优势

- **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；互补作用的可逆，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**
明亮发光的输出，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。

Scale to High Density Formats



Monitor Protein Interactions Reversibly



NanoBiT[®] 蛋白：蛋白相互作用检测技术基本介绍

NanoLuc[®] Binary Technology (NanoBiT[®]) 是一种基于 Promega 最新专利萤光素酶 NanoLuc[®] 萤光素酶的二亚单元系统，用来检测活细胞内蛋白质的相互作用。

关于 NanoLuc[®] 萤光素酶

NanoLuc[®] Luciferase：仅有 19KDa，171 个氨基酸，更适合于融合蛋白表达构建和 NanoBiT[®] 检测，用于细胞水平蛋白相互作用的研究，使 NanoBiT[®] 技术更加优化。见右侧图一。

NanoLuc[®] 蛋白特点：

- 体积更小
- 表达效率更高
- 光信号更强
- 非特异性自发光背景更低

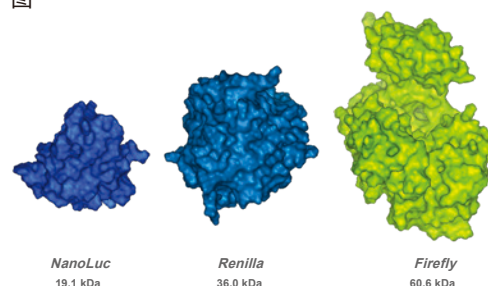
NanoBiT[®] 技术原理

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。见图二。

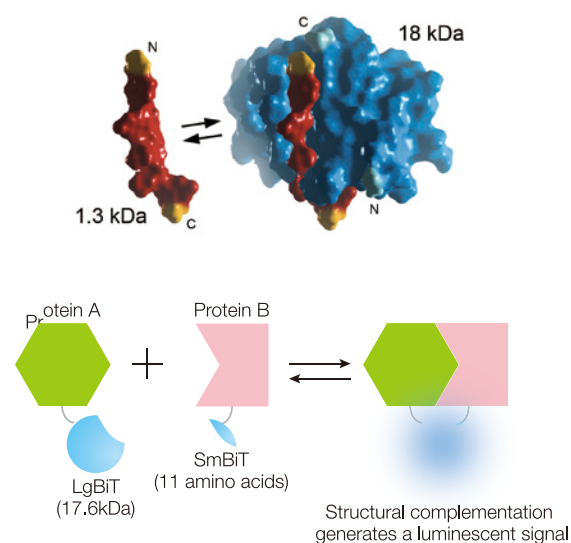
LgBiT 和 SmBiT 两个亚基具有最佳的稳定性和极低限度的自我聚合。

NanoLuc[®] Binary Technology

图一



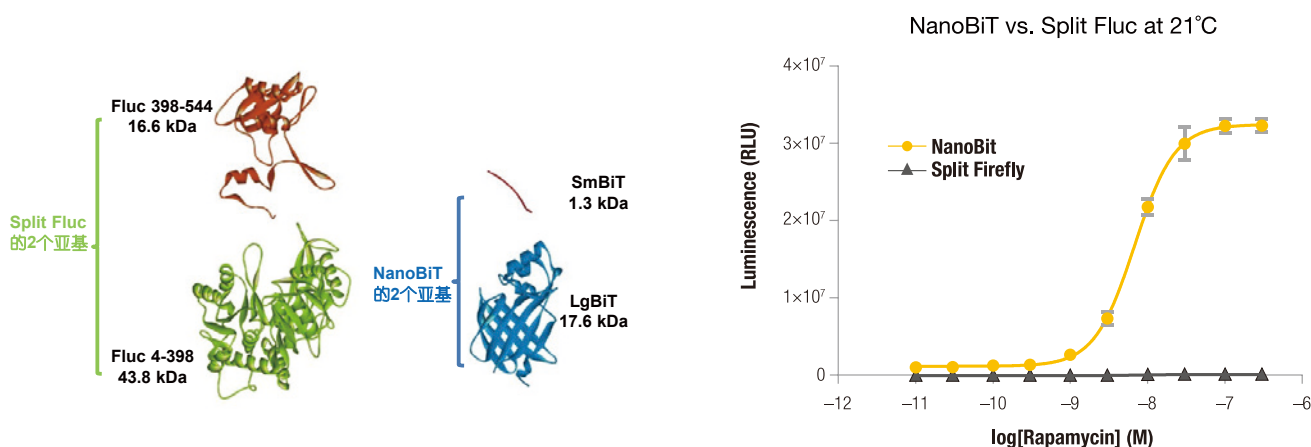
图二



为什么选择 NanoBiT® 技术？

NanoBiT® 与 Split 技术相比的优势

- **商品化解决方案：**NanoBiT® 技术是商品化的经优化的完整解决方案，无需自行对萤光素酶进行裁剪构建。
- **更少的位阻：**NanoBiT® 蛋白更小，更少的位阻现象。LgBiT 是结构稳定的融合伴侣。
- **更强的光信号：**NanoBiT® 室温下比应用萤火虫萤光素酶的 Split Fluc 技术亮 100 倍，37°C 下亮 1000 倍。
- **数据误差更小：**NanoBiT® 技术 CVs 更低。



NanoBiT® 技术与 BiFC 相比的优势

	NanoBiT®	BiFC
标签蛋白来源	NanoLuc® Luciferase	GFP
是否为商品化系统	是 完整解决方案，无需自行裁剪构建标签蛋白。	否 需自行裁剪构建标签蛋白。
光信号类型	发光 无需激发	荧光 需要激发
光信号特点	背景低，信号强，信噪比更佳，可定量检测。	自发背景高，信噪比不佳，信号不易定量。
标签蛋白结合是否可逆	是	否

开始实验，您需要准备好下面的关键实验材料 *

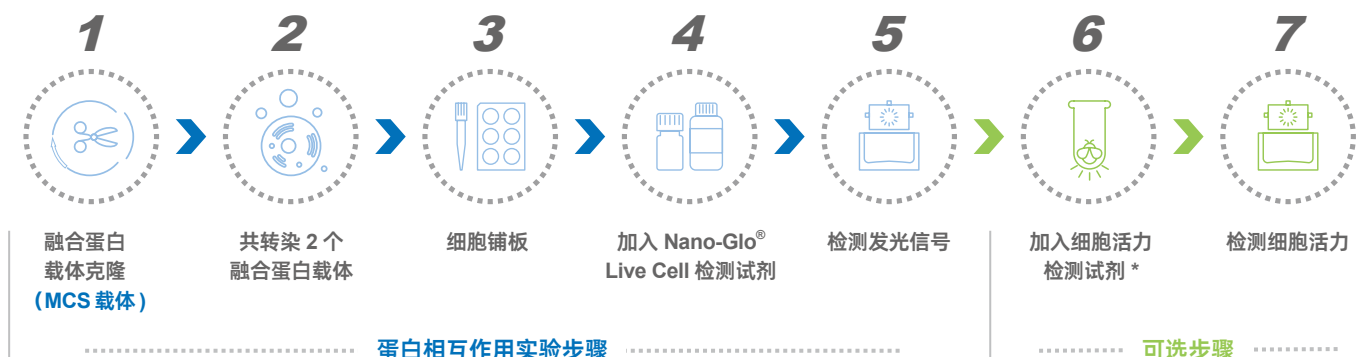
实验试剂与仪器	融合蛋白载体	转染试剂	检测试剂	细胞及培养耗材试剂	检测仪器
					
Promega 解决方案说明	NanoBiT® 融合蛋白表达载体	高效低毒转染试剂	NanoBiT® 蛋白检测试剂	实验者自备	具有发光检测功能的多孔板读板仪及检测板
	Promega 提供商品化的全套 NanoBiT® 融合蛋白载体及实验所需对照载体。 从技术线路上我们可提供经典的多克隆位点载体或专利的高效克隆 Flexi 克隆载体**。 Promega 可提供包含了所有载体和检测试剂的完整试剂盒。见下方。	由于实验是基于活细胞进行检测，因此对细胞的活性状态要求更高，需要高效低毒的转染试剂来完成实验，Promega 提供 FuGENE® 系列转染试剂。	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检测和监测。 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。	您需要自备细胞和培养所需的试剂，根据 Promega 提供的操作说明处理细胞。	GloMax® 系列多孔板读板仪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。
	- NanoBiT® PPI MCS Starter System - NanoBiT® PPI Flexi® Starter System	- 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，在后面的介绍中有相关产品信息。同样不含有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，不是荧光信号，无需激发光。

* 列表中的试剂不是完成实验所需的所有试剂。其他试剂需根据情况用户自行购买。

**Flexi 克隆技术是一种简单而强大的蛋白编码序列的定向克隆方法。方法建立在两种位点稀有的限制性酶 SgfI 和 PmeI 基础上，可以将蛋白编码区在不同的 Flexi® 载体之间转换，不需要重新测序，该方法快速、有效、保真度高。Flexi® 载体带有致死性 barnase 基因，该基因可被插入的目的 DNA 片段所替代，是连接反应成功的阳性筛选标志。与其它的位点特异性重组载体系统不同，Flexi® 载体系统不需要在目的蛋白的氨基或羧基端加上多个氨基酸。此外，该系统不需要入门载体，对于大多数实验而言，都可以找到符合实验设计的载体。

您可以参考下面的简要流程开展实验

如果您选择使用经典**多克隆位点**技术流程



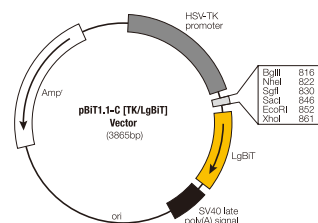
NanoBiT® PPI MCS Starter System 提供融合蛋白克隆的带有多克隆位点的载体，包括阴性和阳性对照载体，及进行活细胞检测的试剂。再配合 Promega 的质粒小提、凝胶回收、T4 连接酶、限制性内切酶、高效低毒转染试剂及高灵敏度的 GloMax® 检测仪即可完成实验。

通过 Promega 提供的带有多克隆位点的 LgBiT 载体和 SmBiT 载体可从 C 端或 N 端构建待测目的蛋白的融合蛋白，转染入细胞后即可用 Nano-Glo® Live Cell Reagent 检测发光。与阴性对照相比有明显光信号的增加，即说明 2 个蛋白间有相互作用。注：具体实验操作请参考 [CTM461](#) 中文说明书。

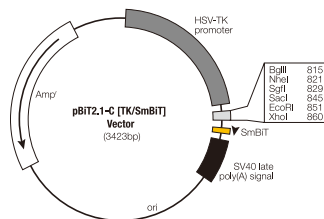
蛋白相互作用试剂盒	组份功能	组分名称
NanoBiT® PPI MCS Starter System Cat.#N2014 1 each	C 端融合蛋白载体	pBiT1.1-C [TK/LgBiT] Vector pBiT2.1-C [TK/SmBiT] Vector
	N 端融合蛋白载体	pBiT1.1-N [TK/LgBiT] Vector pBiT2.1-N [TK/SmBiT] Vector
	阴性对照载体	NanoBiT® Negative Control Vector
	阳性对照 - 已知相互作用蛋白对载体	LgBiT-PRKAR2A Control Vector SmBiT-PRKACA Control Vector
	活细胞检测试剂	Nano-Glo® Live Cell Substrate Nano-Glo® LCS Dilution Buffer

克隆用限制性内切酶	目录号	规格
EcoR I	R6017	15,000u
	R6061	1,000u
Sac I	R6065	5,000u
Sgf I	R7103	250u
	R6181	2,000u
	R6185	10,000u
Xba I	R6161	3,000u
	R6165	10,000u

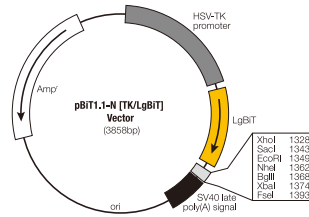
C 端融合 -LgBiT 表达载体



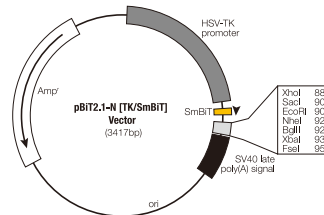
C 端融合 -SmBiT 表达载体



N 端融合 -LgBiT 表达载体

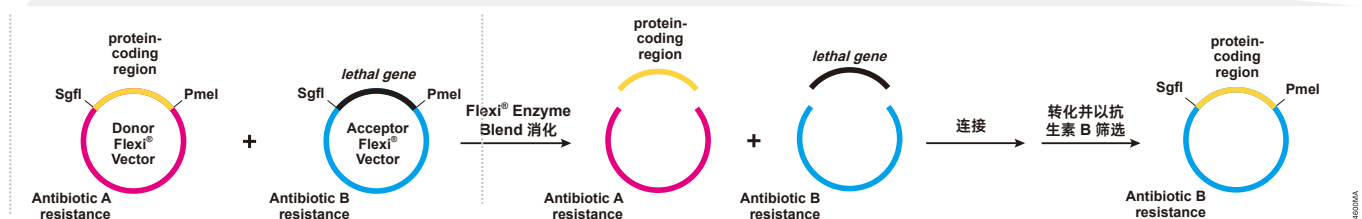
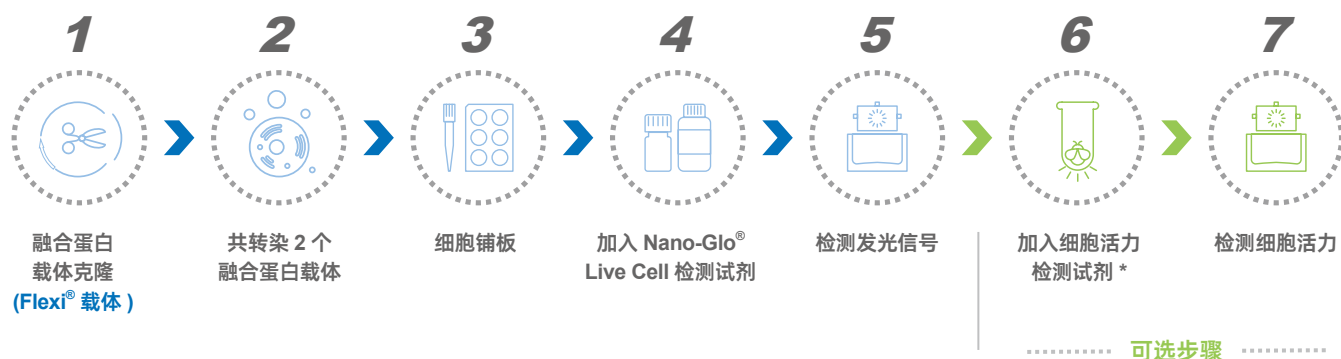


N 端融合 -SmBiT 表达载体



如果您选择使用经典 Flexi[®] 克隆技术流程

Flexi[®] 克隆技术是一种简单而强大的蛋白编码序列的定向克隆方法。方法建立在两种位点稀有的限制性酶 SgfI 和 PmeI 基础上，可以将蛋白编码区在不同的 Flexi[®] 载体之间转换，不需要重新测序，该方法快速、有效、保真度高。Flexi[®] 载体带有致死性 barnase 基因，该基因可被插入的目的 DNA 片段所替代，是连接反应成功的阳性筛选标志。与其它的位点特异性重组载体系统不同，Flexi[®] 载体系统不需要在目的蛋白的氨基或羧基端加上多个氨基酸。此外，该系统不需要入门载体，对于大多数实验而言，都可以找到符合实验设计的载体。



NanoBiT[®] PPI Flexi[®] Starter System 提供 Flexi[®] 融合蛋白克隆的载体包括阴性和阳性对照载体，及进行活细胞检测的试剂。但不包括限制性内切酶。需单独购买 SgfI 和 PmeI。如上所述这种技术能够快速、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。通过 Flexi[®] 技术的载体克隆系统生成 LgBiT 和 SmBiT 的 N- 端或 C- 端融合蛋白，与传统方法相比更为快捷。注：具体实验操作请参考 [CTM461](#) 中文说明书。

蛋白相互作用试剂盒	组份说明	组份名称	限制性内切酶系统	说明
NanoBiT [™] PPI Flexi [®] Starter System Cat.# N2015 1 each	C 端融合蛋白载体	pFC34K LgBiT TK-neo Flexi [®] Vector pFC36K SmBiT TK-neo Flexi [®] Vector	Flexi [®] System, Entry/Transfer Cat.# C8640	配套 Flexi [®] 载体完成克隆所需的所有组份： 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。
	N 端融合蛋白载体	pFN33K LgBiT TK-neo Flexi [®] Vector pFN35K SmBiT TK-neo Flexi [®] Vector		
	阴性对照载体	NanoBiT [™] Negative Control Vector		
	阳性对照 - 已知相互作用蛋白对载体	LgBiT-PRKAR2A Control Vector SmBiT-PRKACA Control Vector		
	活细胞检测试剂	Nano-Glo [®] Live Cell Substrate Nano-Glo [®] LCS Dilution Buffer	Carboxy Flexi [®] System, Transfer Cat.# C9320	C 端融合表达载体间相互转移所需的组份： 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)。
	Flexi 克隆转移载体	pF4A CMV Flexi [®] Vector		

转染试剂

FuGENE® HD Transfection Reagent

FuGENE® HD 转染试剂采用专利的非脂质体配方，提供了一个高效、低毒的转染方法；不含任何人体或其他动物来源的成分，转染前细胞不用去血清培养，转染后不用更换培养基，最大限度的减少对细胞的外源性干扰；操作方便，简单易用，尽可能节省研究者宝贵的实验时间。

技术优势

- 提供超过 40 种细胞类型的数据库，包括原代细胞和干细胞。
- 更具生物相关性，高转染效率，低毒性。
- 操作简单，无需更换培养基，给细胞培养环境带来更小的变化，与血清兼容。

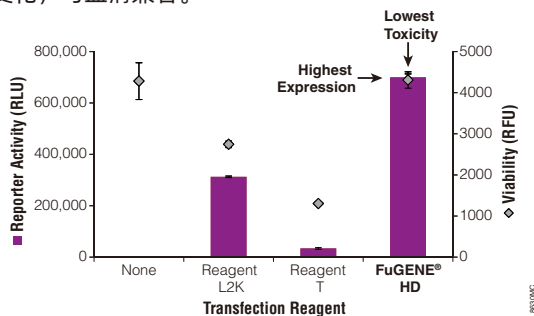
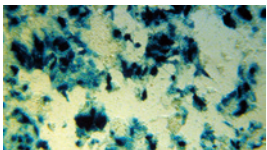
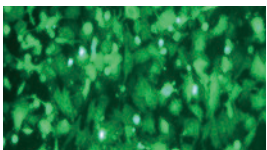


图. 不同转染试剂转染 HEK293 细胞效果比较。
FuGENE® HD 转染试剂组获得更高的蛋白表达，并对细胞的活性影响更小。

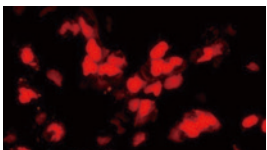
结果展示



干细胞转染
转染在胞外基质中培养的小鼠胚胎干细胞



肿瘤细胞系转染
已验证可转染数十种肿瘤细胞系



细胞成像
高效低毒—增强目的蛋白表达和细胞成像效果

产品	规格	目录号
FuGENE® HD Transfection Reagent	1ml	E2311
	5 × 1ml	E2312
FuGENE® 6 Transfection Reagent	5 × 1ml	E2692
	0.5ml	E2693

检测仪器

GloMax® Discover 多功能检测仪

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程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

GloMax
DISCOVER



产品	包装量	目录号
GloMax® Discover System	1 台	GM3000

NanoBiT[®] 蛋白互补检测 技术应用

1. GPCR 相互作用	11
2. RAS 信号通路研究	12
3. 病毒研究	13
4. 传染病研究	15
5. 代谢性疾病研究	17

在 GPCR 信号通路中的应用

Establishment of a NanoBiT-Based Cytosolic Ca^{2+} Sensor by Optimizing Calmodulin-Binding Motif and Protein Expression Levels

DOI: 10.14348/molcells.2020.0144

研究目的

开发一种基于 Ca^{2+} 负载的钙调蛋白和靶蛋白之间相互作用的指示器，并利用分裂的 NanoLuc® 萤光素酶 (NLuc) 片段生成一种创新的基因编码钙指示剂 GECI 传感器来检测细胞膜 Ca^{2+} 水平 (Ca^{2+} 浓度) 的变化。

研究方法

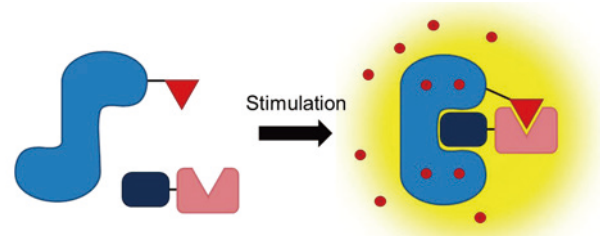
- 构建融合蛋白表达载体：将 SmBiT 和 LgBiT 分别与钙调蛋白 (CM) 和 MYLK2S 的 N 端或 C 端融合；
- 细胞培养及转染：将受体质粒、融合蛋白表达载体转染至 HEK293 或 HEK293T 细胞中；
- 加入 Nano-Glo® 活细胞检测试剂 (furimazine)，检测发光信号。

使用产品

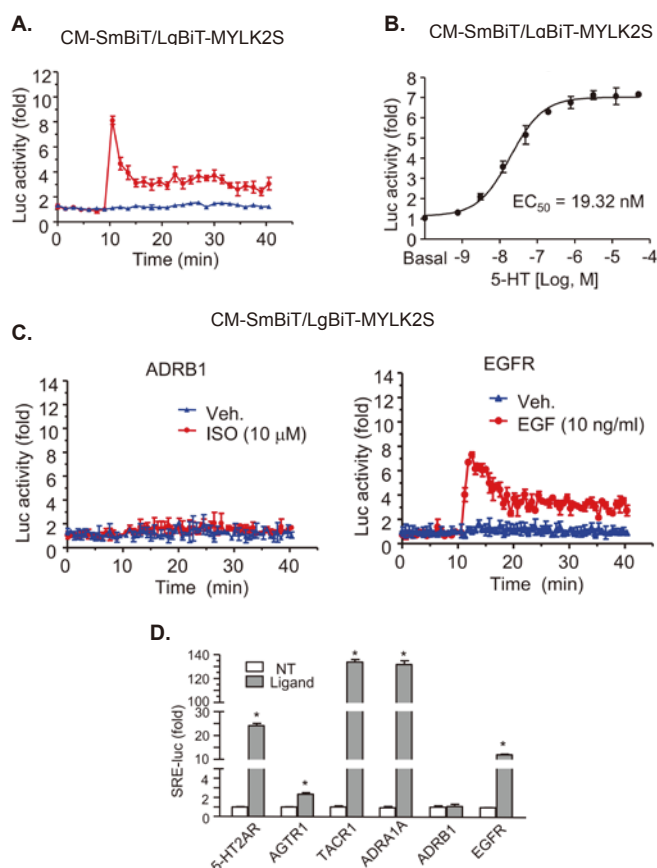
- NanoBiT PPI Starter Kit

研究结果

- 图 A：经过测试，CM-SmBiT 和 LgBiT-MYLK2S 的组合提供了 Ca^{2+} 浓度水平增加的最佳检测（其他组合形式见原文表述）；
- 图 B：在 5-HT 刺激下，CM-SmBiT 和 LgBiT-MYLK2S 组合测得的饱和萤光素酶活性最高，获得的 EC_{50} 最好。
- 图 C：用受体的同源配体处理可增加 Ca^{2+} 浓度的外源受体。表达激活 $\text{G}\alpha_q$ 通路的表皮生长因子受体 (EGFR) 的细胞中萤光素酶活性增加（表示 Ca^{2+} 浓度水平增加），而表达激活 $\text{G}\alpha_s$ 通路的 ADRB1 的细胞中则没有增加（表示 Ca^{2+} 浓度水平没有增加）。
- 图 D： Ca^{2+} 浓度水平增加会触发 SRE 依赖性基因转录。对含有每种受体和 SRE-Luc 的细胞进行报告基因检测，每种受体在同源配体的刺激下，萤光素酶活性出现不同程度的增加，而 ADRB1 测得的微弱的萤光素酶信号也与图 C 结果较一致。



图示说明：浅蓝色，钙调蛋白；深蓝色，靶蛋白；红色圆点， Ca^{2+} ；红色三角形，SmBiT；粉红色，LgBiT。



在 RAS 通路中的应用

Specific inhibition of oncogenic RAS using cell-permeable RAS-binding domains

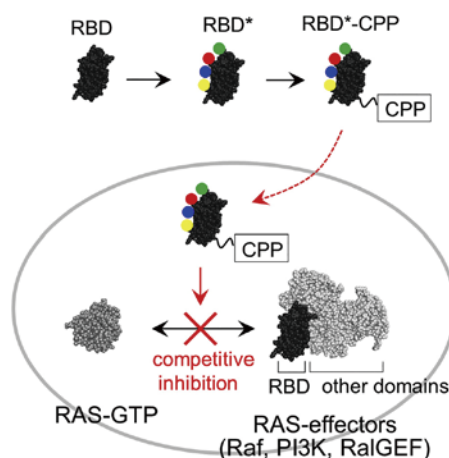
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.04.013>

研究目的

设计一种具有泛素样 RAS 结合结构域 (RBD) 的高亲和力 RAS 抑制剂, 通过细胞渗透性肽结构域实现高效的细胞内递送, 竞争性抑制 RAS 与效应因子的相互作用, 从而对多种 KRAS 突变癌细胞株发挥抗癌活性。

研究方法

- 编码 cRaf (51-131), KRAS, HRAS 或 NRAS 的 DNA, 使用 Flexi 克隆系统插入 NanoBiT® PPI 载体, 通过实验确定在 KRAS 的 N 端添加 LgBiT 和在 cRaf-RBD 的 C 端添加 SmBiT 给出了最佳的发光值;
- 细胞铺板, 转染: 仅 LgBiT-KRAS; 仅 LgBiT-PRKAR2A; LgBiT-RAS + cRaf-RBD-SmBiT 或 LgBiT-PRKAR2A + SmBiT-PRKACA;
- 孵育过夜后, 通过胰蛋白酶消化分离细胞, 重新接种到孔板中, 并放置过夜以粘附;
- 用含有抑制剂的培养基处理 40-80% 的融合细胞 1 小时;
- 加入 Nano-Glo® 活细胞检测试剂 5 分钟, 并通过 Glomax®-Discover 测量发光信号。

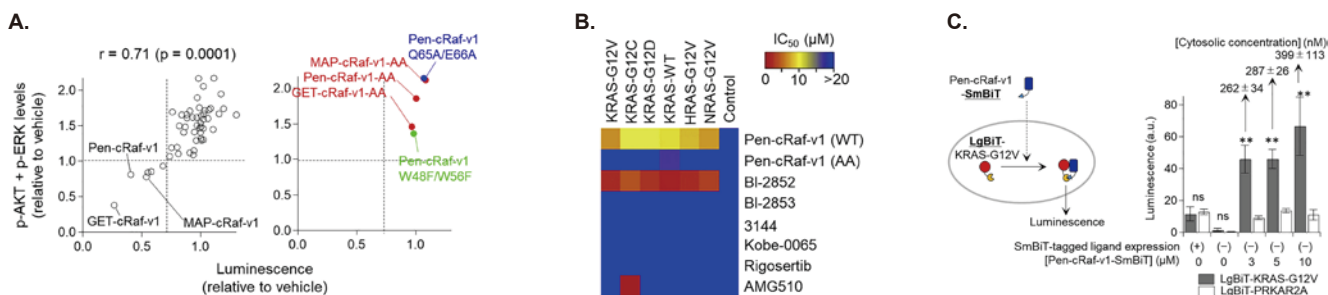


使用产品

- NanoBiT® PPI Flexi® Starter System
- Nano-Glo® Live Cell Assay System

研究结果

- 图 A: 筛选出了 RBD 和 CPP 的最佳组合, 鉴定了六种命中蛋白。前三种命中蛋白 (Pen-cRaf-v1, GET-cRaf-v1 和 MAP-cRaf-v1) 的检测分析发现, CPP-RBDs 和 RAS 之间存在直接的相互作用。
- 图 B: Pen-cRaf-v1 是一种泛 RAS 抑制剂, 可以靶向各种 RAS 突变体和亚型。
- 图 C: Pen-cRaf-v1-SmBiT 处理后, LgBiT-KRAS-G12V 表达细胞的萤光素酶活性恢复, 而 LgBiT-PRKAR2A (对照) 表达细胞的萤光素酶活性没有恢复, 证明 Pen-cRaf-v1-SmBiT 到达细胞质与细胞内表达的 LgBiT-KRAS 融合。



在病毒研究中的应用

SARS-CoV-2 S1 NanoBiT: A nanoluciferase complementation-based biosensor to rapidly probe SARS-CoV-2 receptor recognition

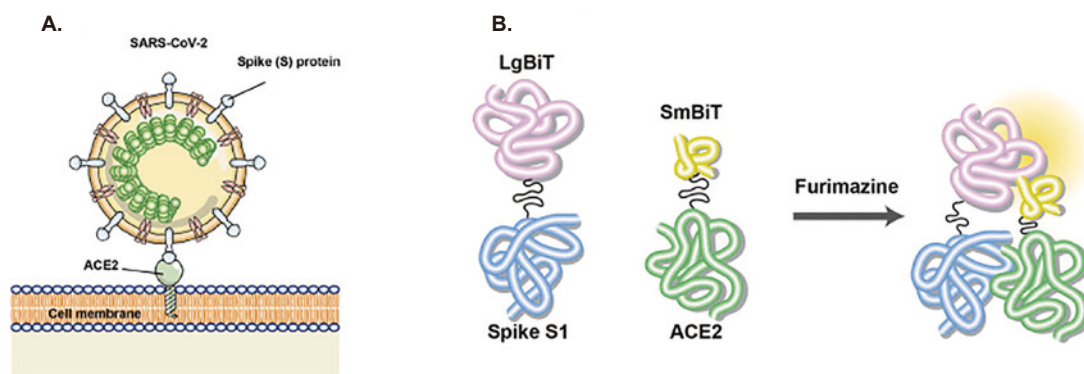
DOI: 10.1016/j.bios.2021.113122

研究目的

开发一种基于生物发光的新颖生物传感器，用于探测病毒进入过程中宿主与病毒之间的关键相互作用，以此来帮助针对 SARS-CoV-2 的快速诊断工具的开发和有效的抗病毒药物的研发。

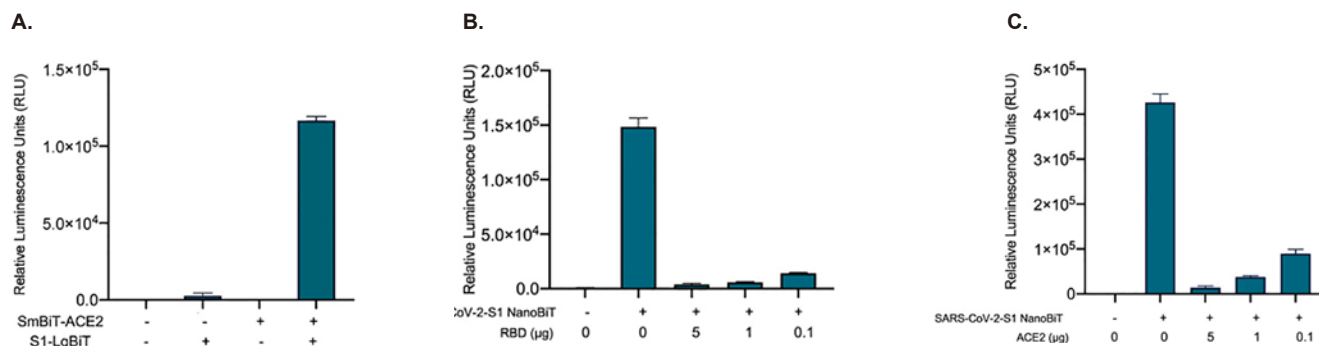
研究方法

- 构建融合蛋白表达载体：由 NanoBiT 系统的两个互补亚基 LgBiT 和 SmBiT，分别与 SARS-CoV-2 S 蛋白的 Spike S1 结构域和 ACE2 外结构域融合构建表达载体：LgBiT-S1 和 SmBiT-ACE2。
- 细胞铺板及转染：将 LgBiT-S1、SmBiT-ACE2 或二者共转染至 HEK293 细胞中。
- 进行荧光素酶检测。



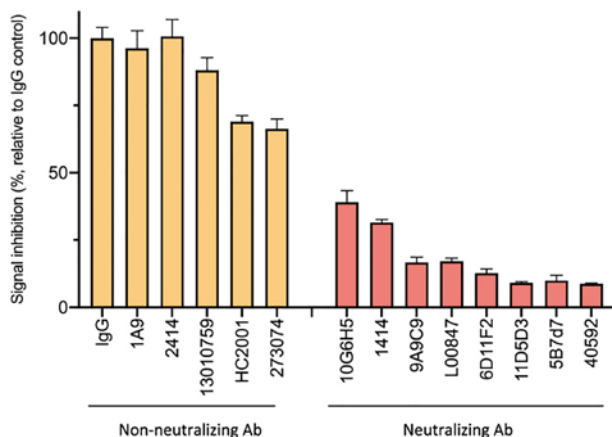
研究结果

- 图 A：通过荧光素酶检测验证了基于 SmBiT-ACE2/S1-LgBiT 的生物传感器的功能，将其称之为 SARS-CoV-2 S1-NanoBiT。
- 图 B-C：重组 RBD 或可溶性 ACE2 可有效地竞争 S1-LgBiT 与 ACE2 的相互作用，导致报告基因信号呈现剂量依赖性损失。



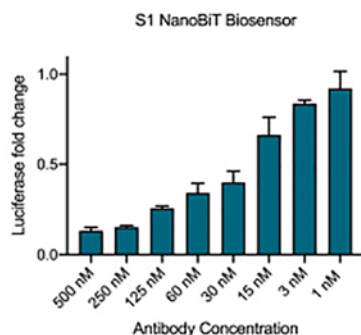
研究结果

- SARS-CoV-2 S1-NanoBiT 生物传感器能够检测血清中的中和抗体水平。

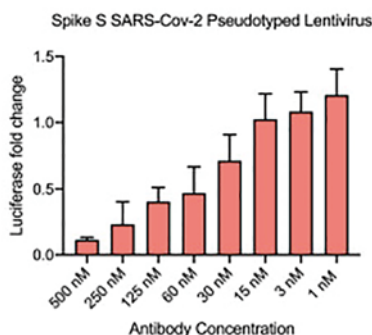


- 对 SARS-CoV-2 S1-NanoBiT 生物传感器和广泛接受的用于 SARS-CoV-2 中和抗体检测的伪态化慢病毒检测法进行了相关比较 (图 A 和 B)。测试了这两种检测方法检测靶向 RBD 的合成纳米抗体水平的能力。两种检测方法都显示出剂量依赖性的信号降低, 两种检测方法的结果相关性很好 (图 C)。这种相关性分析也验证了该生物传感器作为病毒中和检测替代物的应用。

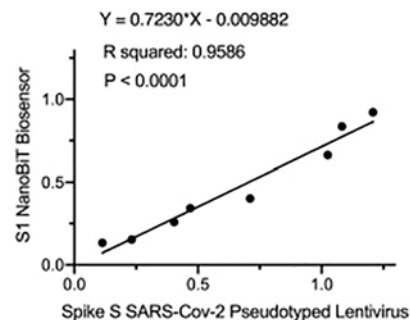
A.



B.



C.



结论

SARS-CoV-2 S1-NanoBiT 生物传感器的诸多优势特性凸显了基于 NanoLuc 互补的报告基因策略在鉴定针对其他宿主 - 病毒相互作用的抗病毒药物方面尚未开发的潜力。

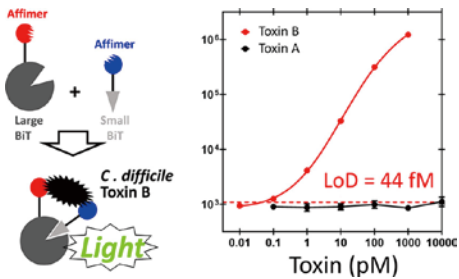
在传染病研究中的应用

Rapid Quantification of *C. difficile* Glutamate Dehydrogenase and Toxin B (TcdB) with a NanoBiT Split-Luciferase Assay.

DOI: 10.1021/acs.analchem.1c05206

研究目的

艰难梭菌感染（CDI）是一种主要的医疗相关性感染，具有高发病率和高死亡率，并且造成较高的经济负担。目前没有任何一种独立的快速检测（POCT）足以识别真正的艰难梭菌感染。本研究的目的是开发出一种快速诊断真正 CDI 急需的超灵敏 POCT。



研究方法

两种结合蛋白 –Affimers 和纳米抗体能够靶向艰难梭菌的两种生物标志物 -- 谷氨酸脱氢酶（GDH）和毒素 B（TxB）。利用 NanoBiT® 技术研究其相互作用，进一步探讨 CDI 机制。

1. 传感器表达和纯化

将含有 Affimers（合成的非免疫球蛋白结合蛋白）的传感器构建体的 pET28a 载体转化至大肠杆菌 BL21*（DE3）细胞，将含有纳米抗体（单结构域抗体）的载体转化至大肠杆菌 T7 细胞。经过表达和纯化后的蛋白，测定浓度，储存在 -80℃。

2. 传感器表征

LgBiT、SmBiT 传感器和谷氨酸脱氢酶 GDH 共同加入到 384 孔板中进行孵育，然后加入 Nano-Glo® 检测试剂，读取发光值。

使用产品

- NanoBiT® PPI Starter Systems

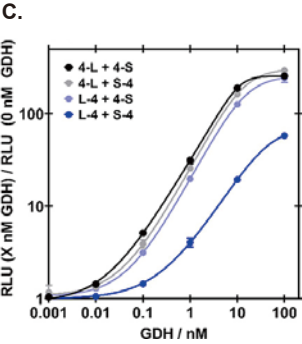
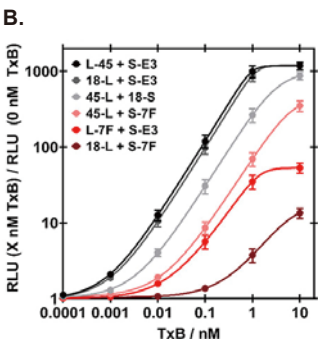
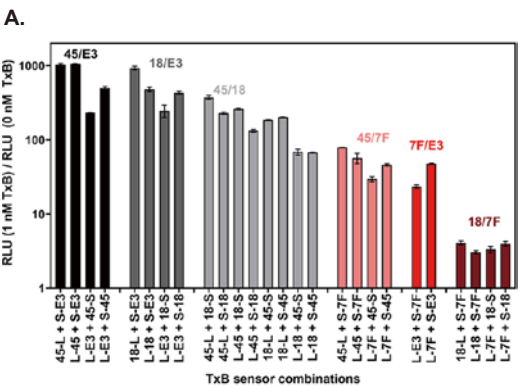
研究结果

1. 筛选和表征了几种结合蛋白（表 1）

2. 建立 NanoBiT® 萤光素酶分离检测平台

- 图 A-B：传感器 L-45 + S-E3 在整个浓度范围内显示出最高的 TxB 驱动信号。
- 图 C：所有 GDH 传感器组合均显示出 GDH 依赖性生物发光。

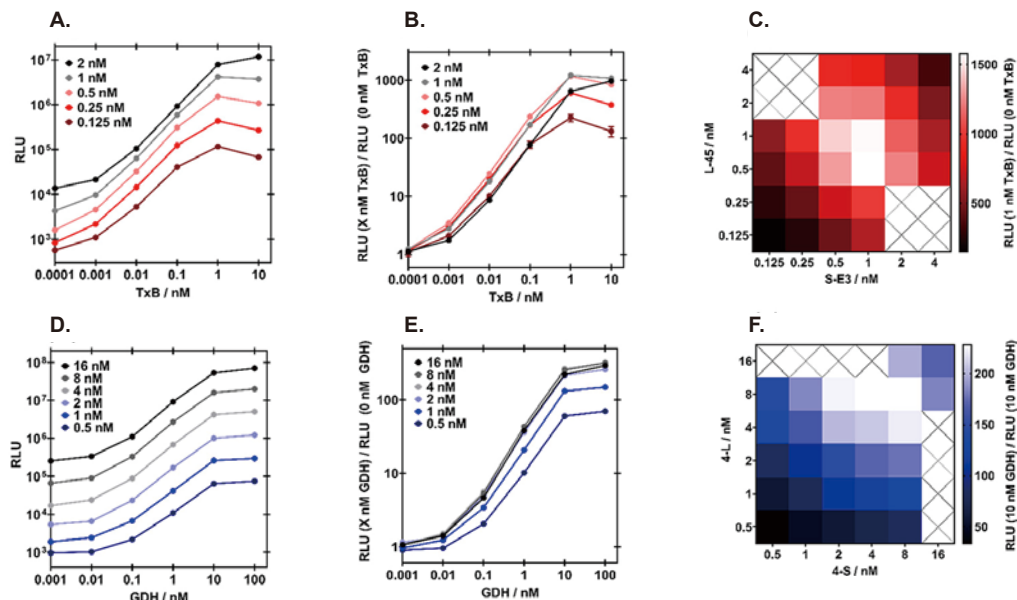
binding protein	target	$k_a \pm SE$ ($M^{-1} s^{-1}$) $\times 10^4$	$k_d \pm SE$ (s^{-1}) $\times 10^{-4}$	$K_d \pm SE$ (nM)
Affimer 4	GDH	4.4 ± 0.8	8.1 ± 0.1	19 ± 3.2
Affimer 18	TxB	14 ± 3	38 ± 11	26 ± 2.6
Affimer 45	TxB	7.7 ± 1.2	9.4 ± 0.3	13 ± 2.4
Nanobody E3	TxB	10 ± 1	2.5 ± 0.2	2.5 ± 0.04
Nanobody 7F	TxB	2.8 ± 0.5	9.0 ± 0.1	33 ± 6.1



研究结果

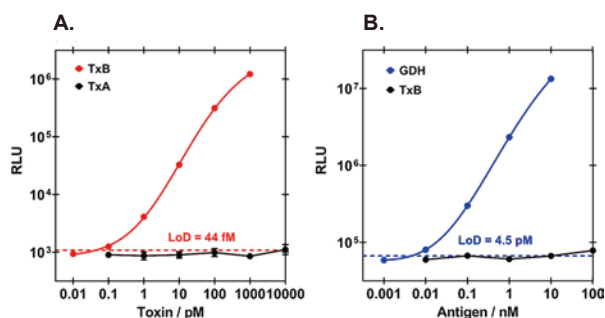
2. 建立 NanoBiT® 荧光素酶分离检测平台

- 图 A-C: 对于 TxB, 0.5 nM S-E3 + 1 nM L-45 被确定为最佳组合, 因为它在低 TxB 浓度下最敏感。
- 图 D-F: 8 nM 4-S + 8 nM 4-L 组合对 GDH 的效果最好。



3. 艰难梭菌生物标志物 TxB 和 GDH 定量

- GDH 和 TxB 检测的最大信号增益分别约为 250 倍和 1300 倍。
- TxB 的 1300 倍信号增益和 44 fM LoD 是迄今为止在 NanoBiT® 免疫测定中观察到的最佳指标。



	intra-assay	interassay
TxB		
sensitivity (LoD)	44 fM	190 fM
quantifiable range	0.1–1000 pM	1–100 pM
% recovery	88–105%	99–101%
% CV	3–25% ^a	11–20%
GDH		
sensitivity (LoD)	4.5 pM	14 pM
quantifiable range	0.01–10 nM	0.1–10 nM
% recovery	100%	101–102%
% CV	1–10%	19–24% ^a

^a% CV precision metrics > 20% only at the limit of quantification.

结论

本文筛选并鉴定了针对艰难梭菌生物标志物 GDH 和 TcdB 的 Affimers (13 kDa 非免疫球蛋白结合蛋白), 它们可用于 CDI 诊断检测。当它们与纳米抗体 (单结构域抗体) 一起作为结合蛋白加入 NanoBiT 分离荧光素酶检测中时, 它们在易于生产和潜在的检测性能方面比抗体更具优势。

在先天性糖基化障碍研究中的应用

An interaction between SLC35A1 and ST3Gal4 is differentially affected by CDG-causing mutations in the *SLC35A1* gene.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.10.019

研究目的

本研究的目的是确定 ST3Gal4（一种哺乳动物的水杨酸转移酶）是否与野生型 SLC35A1（多跨膜转运体）相互作用，以及这种关联是否会在先天性糖基化障碍中发挥作用。

研究方法

Plasmid	Primers	Backbone plasmid
NL-ST3GAL4	FP: TGTGCCAGACTATGCCGGGATGGTCAGCAAGTCCC RP: TCTGGCCAGCTAGCCTCAGAAGGACGTGAGG	pBiT1.1-N[TK/LgBiT]
NS-ST3GAL4	FP: TGTGCCAGACTATGCCGGGATGGTCAGCAAGTCCC RP: TCTGGCCAGCTAGCCTCAGAAGGACGTGAGG	pBiT2.1-N[TK/SmBiT]

- 细胞培养：**野生型 HEK293T 细胞，过表达野生型和突变型的 SLC35A1 缺失的细胞。
- 质粒构建：**将编码人 ST3Gal4 的蛋白融合到 NanoBiT® 的大小亚基，构建表达质粒；编码野生型和突变型 SLC35A1 的蛋白与 NanoBiT® 片段融合的质粒从先前的研究中获得。
- NanoBiT® 检测：**细胞铺板，用 FuGENE® HD 转染试剂进行转染。测量前更换为无血清培养基，加入检测试剂，GloMax® Discover 多功能读板仪记录发光信号。

使用产品

- NanoBiT® PPI System
- Nano-Glo® Live Cell Assay System

研究结果

- SLC35A1 和 ST3Gal4 在活的 HEK293T 细胞中具有关联性。
- T156R 突变体在与 ST3Gal4 共同表达时重组 NanoLuc® 酶的程度与野生型相似。

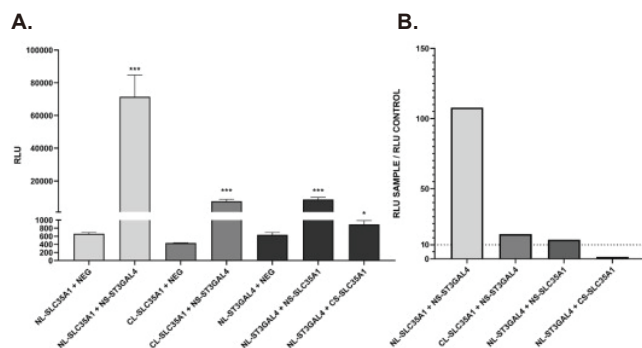


图 1. HEK293T 细胞中野生型 SLC35A1 和 ST3Gal4 之间相互作用的 NanoBiT® 分析结果。

- (A) 所选蛋白质组合和相应的阴性对照的 RLU 值。
(B) 用测试组的平均发光值除以相应对照组的平均发光值所计算的比率。虚线是指信号比对照组增加 10 倍的水平。

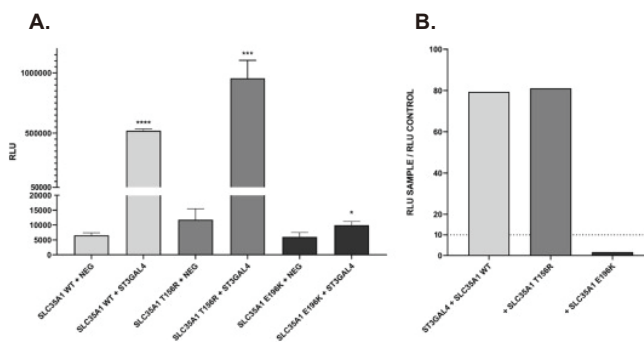


图 2. 野生型 (WT) 和突变型 (T156R 和 E196K) SLC35A1 变体与 ST3Gal4 在 HEK293T 细胞中相互作用的 NanoBiT® 分析结果。

- (A) 所选蛋白质组合和相应的阴性对照的 RLU 值。
(B) 用测试组的平均发光值除以相应对照组的平均发光值所计算的比率。虚线标志着信号比对照组增加 10 倍的水平。

产品列表

NanoBiT® PPI Starter Systems		
(* NanoBiT® 蛋白相互作用检测时的阳性对照 - 已知相互作用蛋白对载体)		
产品	规格	目录号
NanoBiT® PPI MCS Starter System	1 each	N2014
NanoBiT® PPI Flexi® Starter System	1 each	N2015
NanoBiT® PPI Control Pair (FKBP, FRB)*	1 each	N2016
Nano-Glo® 活细胞检测试剂盒		
产品	规格	目录号
Nano-Glo® Live Cell Assay System	100 assays	N2011
	1,000assays	N2012
	10,000assays	N2013
多克隆位点 NanoBiT® 载体相关限制性内切酶		
产品	规格	目录号
EcoR I	5,000u	R6011
	15,000u	R6017
Sac I	1,000u	R6061
	5,000u	R6065
Sgf I	250u	R7103
Xba I	2,000u	R6181
	10,000u	R6185
Xho I	3,000u	R6161
	10,000u	R6165
Flexi® 克隆配套限制性内切酶		
产品	规格	目录号
Flexi® System, Entry/Transfer	5 entry and 20 transfer reactions	C8640
Carboxy Flexi® System, Transfer	50 transfer reactions	C9320
高效低毒转染试剂		
产品	规格	目录号
FuGENE® HD Transfection Reagent	1ml	E2311
	5x 1ml	E2312
FuGENE® 6 Transfection Reagent	1ml	E2691
	5x 1ml	E2692
	0.5ml	E2693
微孔板读板仪		
产品	规格	目录号
GloMax® Discover System	1 台	GM3000

其他相关产品列表

载体克隆产品			
产品	产品特点	规格	目录号
Wizard® <i>Plus</i> SV Minipreps DNA Purification System	- 在 45 分钟内纯化 20 个样品； - 可获得 1-20µg 满足多种应用的高质量质粒 DNA； - 可选择离心或真空模式纯化质粒 DNA。	50 preps	A1330
		250 preps	A1460
		1,000 preps	A1465
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	- 可在 15 分钟内纯化 DNA 片段或 PCR 产物； - DNA 片段回收率高达 95%，反应体系可低至 15µl； - 纯化的 DNA 用自动荧光测序可读取 700 个碱基，准确率 >98%； - 纯化的 DNA 可直接用于自动荧光测序、克隆、标记、限制性酶切及体外转录 / 翻译等。	50 preps	A9281
		250 preps	A9282
		1,000 preps	A9285
T4 DNA 连接酶	- 灵活：可用于 5′、3′ 或平末端 DNA 插入片段； - 提供 10× 反应缓冲液； - 产品经蓝 / 白克隆验证。	500u(高浓度)	M1794
		100u	M1801
		500u	M1804
快速无内毒素质粒提取试剂盒			
产品	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； - 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； - 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

蛋白相互作用研究相关资源

扫描下方二维码观看 NanoLuc® 萤光素酶技术应用讲座视频。



讲座中介绍了 NanoLuc® 萤光素酶的基础应用以及基于其开发的多个技术平台及不同应用方向的示例讲解。如需 NanoLuc® 技术介绍手册，可以联系您所在地经销商获取。

扫描下方二维码下载蛋白：蛋白相互作用解决方案介绍手册。



资料中详细介绍了活细胞蛋白互作研究工具 NanoBiT® 技术和 NanoBRET™ 技术以及细胞裂解物检测 HaloTag® pull down 系统，各自的特点以及应用。

扫描下方二维码下载 Lumit™ 免疫检测技术解决方案。



资料中详细介绍了 Promega 最新的技术平台 -Lumit™ 免疫检测的原理，方法，与 ELISA 相比的优势以及在细胞因子，信号通路磷酸化，糖尿病研究等方面的诸多应用。

Protein: Protein Interactions



关注 Promega 微信公众号



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

更新时间: 2023.8