

Anti-HiBiT Monoclonal Antibody

一种抗 HiBiT 单克隆抗体将 HiBiT 标签的用途扩展到其他表位标签之外

正交法验证

FACS 分析

Western blot 检测

免疫沉淀

亚细胞定位

1. 背景介绍

HiBiT 是一种 11 个氨基酸的多肽标签，使用 NanoLuc Binary Technology（或称为 NanoBiT®）可以简单、灵敏地定量标记的蛋白质。其与大亚基 (LgBiT) 互补，可重组成明亮的萤光素酶，促进蛋白质动力学的测定，包括表达水平、降解、易位和翻译后修饰。然而，LgBiT 亚基不能支持传统上用抗体完成的几种理想的检测模式，例如免疫荧光成像或免疫沉淀。

为了将 HiBiT 的功能扩展到包括传统的免疫测定，我们力求开发一种针对 HiBiT 的特异性、高亲和力的小鼠单克隆抗体。我们对抗体进行了免疫印迹、免疫荧光染色、免疫沉淀和 FACS 验证。Anti-HiBiT 抗体也比常用的表位标签抗体结合更紧密，在免疫分析中通常表现出更高的灵敏度或特异性。

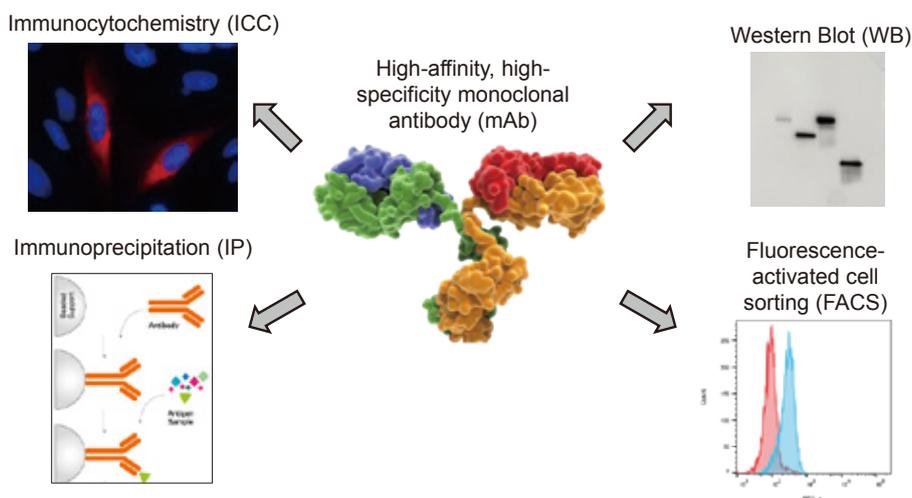
HiBiT 是目前唯一的在检测选择上具有最大灵活性的小肽标签。用户可以很容易地使用定量的、生物发光的、基于细胞的检测方法和执行传统的基于抗体的方法测定蛋白质。HiBiT 标签的高实用性消除了对串联标记方法的需求。

Anti-HiBiT 单抗与其他表位标签抗体相比的优势：

- **免疫荧光：**对内源性表达的 HiBiT 标记蛋白可进行荧光显微成像。
- **FACS：**可用于分离表面表达 HiBiT 的活细胞，或在固定的渗透细胞中定量 HiBiT 标记的蛋白。
- **Western blotting：**以最小的交叉反应检测低至皮克的 HiBiT 标记蛋白。
- **免疫沉淀：**从样品中快速沉淀高比例的 HiBiT 标记蛋白。
- **亲和力高：**Anti-HiBiT mAb 与 HiBiT 的结合比 LgBiT 高 2 个数量级。

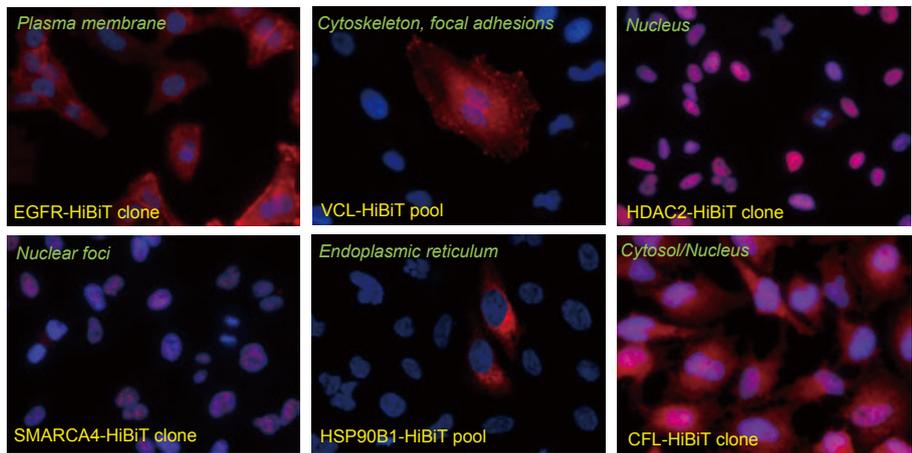
2. 拓展 HiBiT 工具箱

虽然 LgBiT 互补能够简单、灵敏地定量 HiBiT 标记的蛋白，但一种特异性、高亲和力的单克隆抗体将使 HiBiT 也能支持传统表位标签的所有应用。



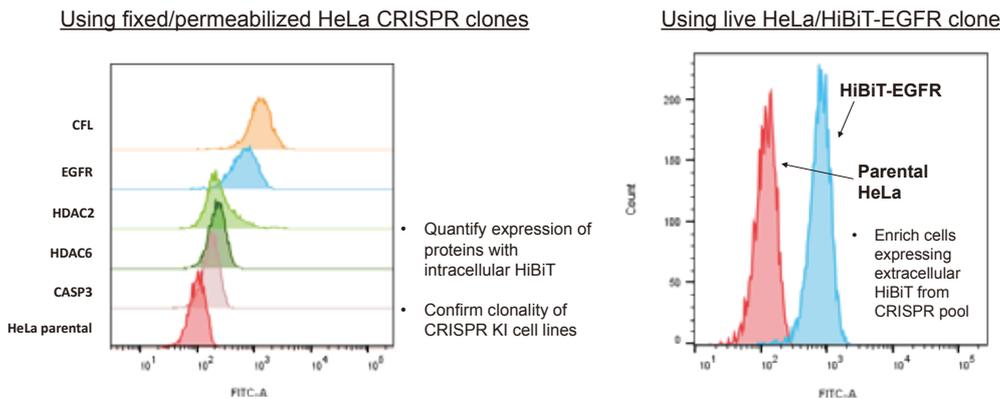
3. 内源性表达 HiBiT 标记蛋白的荧光成像

将 HiBiT 添加到 HeLa 细胞中具有不同亚细胞定位的内源性蛋白位点，并用抗 HiBiT 单抗对细胞进行免疫染色 (红色)。



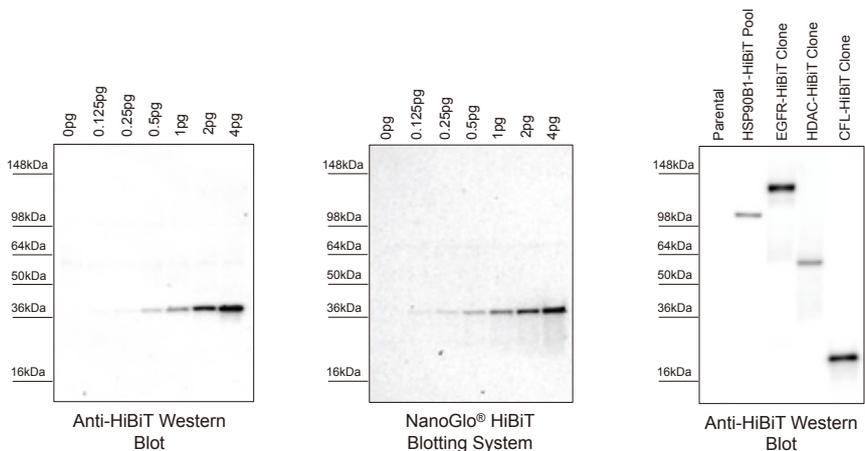
4. 用表达在细胞膜表面的 HiBiT 对活细胞进行 FACS 分选或用表达在细胞内的 HiBiT 对固定细胞进行定量

荧光活化细胞分选可用于在固定细胞、通透化细胞中定量细胞内的 HiBiT 标记蛋白，或用于分离表面表达 HiBiT 标记蛋白的活细胞。



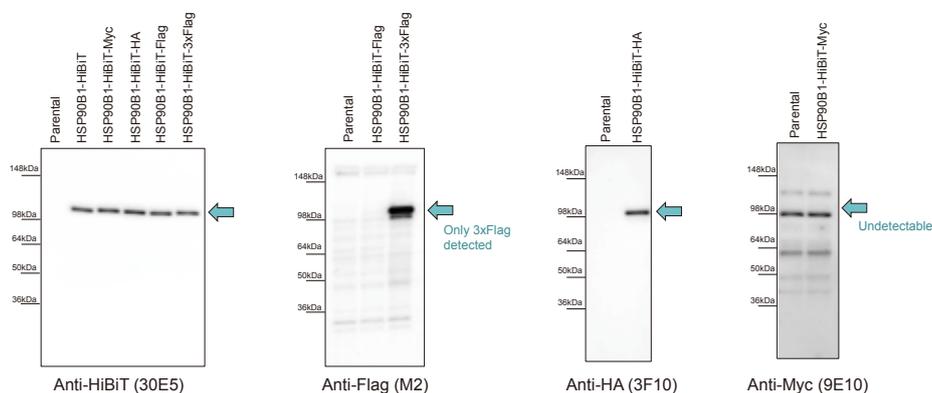
5. 进行免疫印迹检测时，皮克级的灵敏度，且特异性好

- 个位数皮克级的 HaloTag-HiBiT 可以通过 WB 检测到，HeLa 裂解物中的交叉反应带的信号小于 1pg 的 HiBiT 融合蛋白 (图 1)。
- 经 CRISPR 修饰的 HeLa 细胞，其在内源性水平表达的 HiBiT 标记蛋白可以通过 WB 检测到 (图 3)。



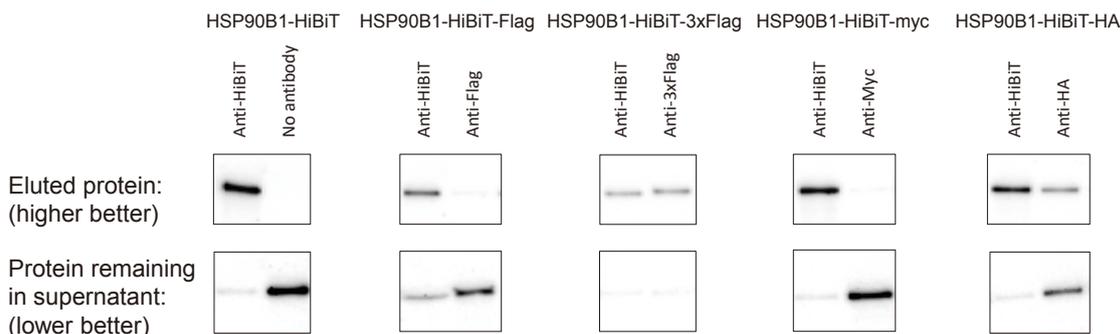
6. 与其他表位标签相比，Anti-HiBiT mAb Western Blotting 具有更高的灵敏度和特异性

使用制造商推荐的方案，通过 Western Blotting 分析表达用 HiBiT 加另一个表位标签串联标记的 HSP90B1 的 CRISPR 池的裂解物。箭头表示预期条带。



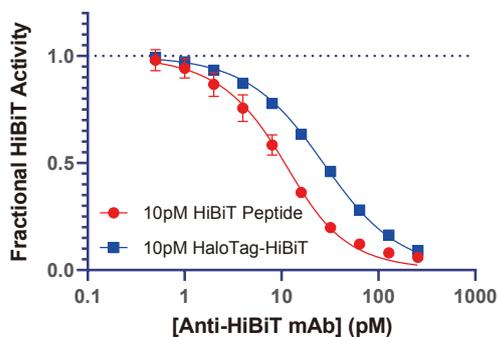
7. 比其他单拷贝表位标签更有效的免疫沉淀

- 使用 CRISPR/Cas9 对 HSP90B1 进行串联标记：HiBiT + HA、Myc、1 或 3 个拷贝的 FLAG 标签。
- 从 CRISPR 池中产生裂解物并分离以制备 IP 样本。
- 标记的 HSP90B1 用 Anti-HiBiT、Anti-Myc、Anti-HA 或 Anti-FLAG 抗体进行免疫沉淀，偶联磁性蛋白 G 树脂。
- HiBiT 的性能与 3xFlag 相似，优于单拷贝标签。



8. Anti-HiBiT 单克隆抗体会以皮摩尔量级与 LgBiT 竞争性结合 HiBiT

梯度浓度的抗体与 10 pM 的 HiBiT 肽或 HaloTag-HiBiT 蛋白共孵育达到平衡。通过加入含有饱和的 LgBiT 和 furimazine 的 HiBiT 检测试剂，并检测发光来测定未结合 HiBiT 的比例。



HiBiT Peptide $K_D = 6\text{pM}$
HaloTag-HiBiT $K_D = 22\text{pM}$

Product	Size	Cat. #
Anti-HiBiT Monoclonal Antibody	1x 100ug	N7200
	5x 100ug	N7210

想了解关于 HiBiT 标签的更多信息, 请访问 <https://www.promega.com//HiBiTtagging>

Related Products	Size	Cat. #
Nano-Glo [®] HiBiT Blotting System	100ml	N2410
	10ml	N3030
Nano-Glo HiBiT [®] Lytic Detection System	100ml	N3040
	10 × 100ml	N3050
	200 assays	N2040
Nano-Glo [®] HiBiT Extracellular Detection System	1,000 assays	N2041
	10,000 assays	N2042

Nano-Glo is a registered trademark of Promega corporation. FLAG is a registered trademark of Sigma-Aldrich Co. LLC

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: 2023.4



欢迎关注 Promega 生命科学



Glo 学院