

技术短文

NanoBRET 技术特点及如何利用 SpectraMax i3x 多功能微孔板读板机进行相应检测

简介

研究蛋白质之间的相互作用 (PPI) 对于探索细胞功能及信号转导通路来说至关重要，目前有许多种方法来研究蛋白质之间的相互作用。其中包括免疫共沉淀技术，以及基于荧光基础理论的荧光共振能量转移技术 (FRET)，由于基于荧光的方法依赖于激光或高能氙闪灯作为光源来对样品的进行激发，因此往往容易产生光漂白和背景荧光等问题，从而大大限制了基于荧光方法的实用性。一种可以替代的方法，生物荧光共振能量转移 (BRET)，是利用荧光素酶催化的化学反应来产生光学信号，由于这种方法无需外置光源激发作用，BRET 可以有效避免由于外来光源激发带来的种种弊端。

来自于 Promega 的 Nano BRET 技术，其利用了 Nano[®]Luc 荧光素酶作为 BRET 检测供体分子，标记有 HaloTag[®] 荧光基团的蛋白发射 618 nm 荧光波长作为受体分子。发生红移现象的受体分子减少了供体和受主荧光信光谱的光谱重叠作用，较替他类型的 BRET 方法具有更好信噪比，如 Renilla 荧光素酶为供体，YFP 或 GFP 作为受体的 BRET1 和 BRET2。

本篇技术性短文介绍了如何利用 SpectraMax i3x 多功能微孔板读板机进行 NanoBRET 检测，分别介绍了如何利用仪器内置的检测模式进行 NanoBRET 检测以及如何利用具有更高灵敏度的 NanoBRET 卡盒进行相应检测，如果利用更灵敏的检测卡盒可将定量检测下限提高四倍以上。

验证方法

利用 Promega 提供的一种用 NanoBRET 质控蛋白检测体系的实验方案来优化仪器设置并探索其不同条件下的检测下限，将梯度浓度稀释的具有 NanoBRET 活性的蛋白标准品固定在白色 96 孔板上用于相应的检测，这些测量值用于生成线性回归计算和定量其检测下限 (LOQ) 值，可以测量仪器性能。

此验证方案使用 SpectraMax i3x 微孔板读板机内置化学发光检测模式或专用 NanoBRET 检测卡盒分别进行检测获得结果。

材料

- 白色 96 孔板
- 1XPBS 缓冲液 (包括 0.1BSA)

- NanoBRET 质控蛋白-5 瓶的含量分别如下
 - NanoBRET 质控蛋白 1:0%
 - NanoBRET 质控蛋白 2:0.1%
 - NanoBRET 质控蛋白 3:1%
 - NanoBRET 质控蛋白 4:10%
 - NanoBRET 质控蛋白 5:100%
- NanoBRET Nano-Glo 底物 (NanoBRET 检测体系)
- SpectraMax i3x 多功能微孔板读板机
- NanoBRET 检测卡盒

检测方法

- 将 50 μ l 质控蛋白分别以 3 个复孔方式加入 96 孔板中
- 准备 20 μ M 的 1XPBS/0.1% BSA 的 NanoBRET 的 Nano-Glo 底物溶液 (5 nM 储存液以 250 倍的方式进行稀释)
- 加入 50 μ l 底物溶液使之每个孔的终浓度为 10 μ M
- 在底物加入的十分钟内进行相应检测，使用具有 NanoBRET 检测功能的仪器来分别检测供体发射光强度 (450 nm) 和受体分子发射光强度 (610 nm)



数据分析

- 产生的 NanoBRET 信号比率，即受体分子信号/供体分子信号
- 确定 NanoBRET 检测每组数据的平均比率值和相对标准偏差
- 所有其他数据组平均比率值减去 0% 组数据的平均比率值，获得校正过的 NanoBRET 值，代表了真正的能力转移信号值
- 绘制校正获得 NanoBRET 比率值曲线并选择线性回归方式进行拟合，计算曲线斜率，曲线应该强制 X,Y = 0 (因为没有检测到受体分子信号强度的话 NanoBRET 现象就不会产生)
- 计算定量下限 (LOQ)，哪个代表了 BRET 配对相对于总供体 (部分占用率) 的最小百分比，可以从统计学上与单独供体区分开， $LOQ = (10 * SD_{0\% \text{ 样品}}) / \text{斜率}$ 。

结果

SpectraMax i3x 多功能微孔板断布机进行 NanoBRET 的检测专用模块情况下，LOQ 为 0.58%，使用内置的发光检测模块情况下可达到 LOQ 为 2.6%，专用检测模块可以提升微弱限号检测灵敏度和动态学范围，仪器内置化学发光检测模块更适用于信号比较强的实验。

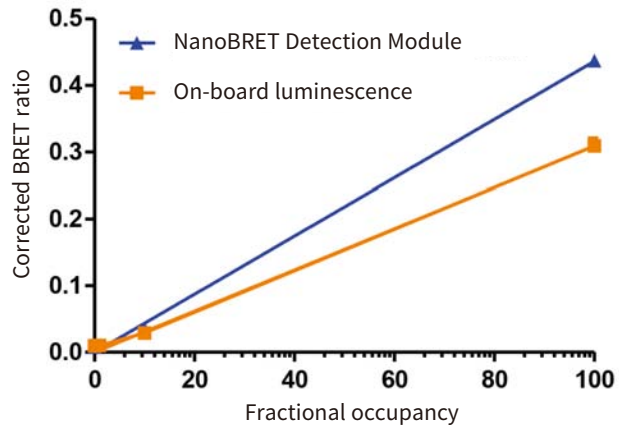


图 1 SpectraMax i3x 微孔板读板机进行 NanoBRET 检测情况下，分别使用内置发光检测模块或者专用 NanoBRET 检测卡盒模块获得数据。曲线绘制强制其 X,Y = 0，专用外置检测模块下和内置检测模块 (内置四光栅系统) 下分别计算的 LOQ 为 0.58% 和 2.6%

Compatible with this Molecular Devices system



SpectraMax i3x 多功能微孔板读板机及专用的外置 NanoBRET 检测模块



更多精彩内容
尽在官方微信

美谷分子仪器 (上海) 有限公司

全国咨询服务热线: 400-820-3586
上海 电话: 86-21-3372 1088
北京 电话: 86-10-6410 8669
成都 电话: 86-28-6558 8820
台北 电话: 886-2-2656 7585
香港

www.MolecularDevices.com.cn Email: info.china@moldev.com
传真: 86-21-3372 1066
传真: 86-10-6410 8601
传真: 86-28-6558 8831
传真: 886-2-2894 8267
传真: 852-2289 5385

地址: 上海市长宁区福泉北路 518 号 1 座 501 室 200335
地址: 北京市朝阳区广渠东路 3 号中水电国际大厦 612 & 613 室 100124
地址: 成都市锦江区东御街 18 号百扬大厦 2208 室 610016
地址: 台北市内湖区堤顶大道二段 89 号 3 楼
地址: 香港中环皇后大道中 15 号置地广场 公爵大厦 21 楼

