

APPLICATION NOTE

利用 NanoBRET 技术检测 p53-MDM2 蛋白相互作用

Joyce Itatani | Applications Scientist | Molecular Devices

Cathy Olsen, PhD | Sr. Applications Scientist | Molecular Devices

简介

BRET (生物发光共振能量转移) 是一种测量蛋白 - 蛋白或蛋白 - 配体相互作用的技术, 涉及生物发光供体和荧光受体的相互作用。当供体和受体彼此相距小于 10 nm 时, 供体激发受体, 然后受体发射荧光。通过用供体标记一种目的蛋白, 用受体标记该目的蛋白的结合配体, 可以使用酶标仪来检测供体和受体发射的光, 从而测量蛋白质相互作用。

Promega 的 NanoBRET™ 技术通过使用更亮的发光供体 (NanoLuc 荧光素酶)、优化的能量受体 (HaloTag®-NCT) 以及供体和受体波长之间更宽的分离, 改进了早期的 BRET, 包括 BRET1 和 BRET2 (见图一) 不足。这些改进提供了更强的信号, 更好的灵敏度和更低的背景, 使得在活细胞内检测蛋白质相互作用成为可能。

检测 NanoBRET 信号并分析结果数据需要灵敏的仪器和功能强大的分析软件。标配 SoftMax®Pro 软件的 SpectraMax®iD5 多功能酶标仪可让研究人员使用优化的滤光片组系统获得 NanoBRET 数据结果, 并对结果进行包括曲线拟合在内的分析。在这里, 我们描述了在 SpectraMax iD5 酶标

仪上使用 NanoBRET™ PPI 质控对来验证酶标仪功能, 该质控对由相互作用的蛋白质配偶体 p53 和 MDM2 组成。使用 p53 途径激活剂 nutlin-3 以浓度依赖性方式破坏 p53 与 MDM2 的相互作用, 并使用 SoftMax Pro 软件分析和绘制结果。

优势

- NanoLuc 带来更强的光学信号、更宽的光谱, 较其它 BRET 技术具有更高灵敏度
- 正常生理的活细胞下能够更灵敏的检测蛋白相互作用
- 使用 SoftMax Pro 软件自动计算 NanoBRET 比率并拟合生成曲线

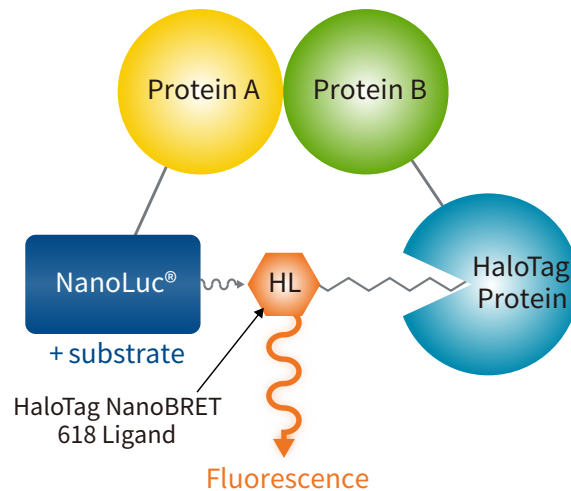


图1 NanoBRET 图示。当 NanoLuc- 蛋白 A 融合体 (能量供体) 与荧光标记的 HaloTag- 蛋白 B 融合体 (能量受体) 相互作用时, 供体和受体会距离更近, 能量发生转移

材料

- NanoBRET PPI 质控对 (p53, MDM2; Promega cat. #N1641)
- NanoBRET Nano-Glo[®] 检测体系 (Promega cat. #N1661)
- ViaFect[™] 转染试剂 (Promega cat. #E4981)
- Nutlin-3 (Millipore-Sigma cat. #6287)
- Opti-MEM[™] 36/5000 减少量的血清培养基, 无酚红 (ThermoFisher cat. #11058021)
- 293 (HEK-293) 细胞 (ATCC cat. #CRL-1573)
- Eagle's 最低限度基础培养基 (EMEM, Corning cat. #10-010-CV)
- BenchMark[™] 胎牛血清 (Gemini Bio-Products cat. #100-106)
- 青霉素-链霉素 (10,000 U/mL, ThermoFisher cat. #15140122)
- 6 孔透明微孔板 (VWR cat. #1006-892)
- 96 孔白色平底聚苯乙烯微孔板 (Corning cat. #3917)
- SpectraMax iD5 多功能酶标仪 (Molecular Devices cat. #iD5-STD), 包括以下配置:
 - 供体滤光片: 447 nm BW 60 nm (Molecular Devices cat. #6590-0088)
 - 受体滤光片: 610 nm LP (Molecular Devices cat. #6590-0117)

方法

将 HEK-293 细胞以 400,000 个细胞/mL 悬浮于细胞培养基 (EMEM + 10% 胎牛血清 + 1% 青霉素/链霉素) 中, 并接种到 6 孔板上, 每孔 2 mL, 或每孔 800,000 个细胞。使细胞在 37°C, 5% CO₂ 下与孔接触 4-6 小时。然后用 100 μL Opti-MEM 减少量的血清培养基, 无酚红, 含 2 μg p53-HaloTag 融合载体 DNA 和 0.2 μg NanoLuc-MDM2 融合载体 DNA, 和 3: 1 ViaFect 转染试剂: DNA 比例, 来转染细胞。细胞在 37°C, 5% CO₂ 下孵育过夜 20-24 小时。

Parameter	Setting
Read mode	LUM (luminescence)
Read type	Endpoint
Wavelengths	α Specify wavelengths β Use filter [make sure filters are installed] Lm1: 447 nm Lm2: 610 nm
Plate type	96-well Costar
PMT and optics	Integration time: 1000 ms Read height: 0.67 mm*

*Read height should be optimized for the microplate used.

表 1 SpectraMax iD5 酶标仪上的 NanoBRET 检测设置

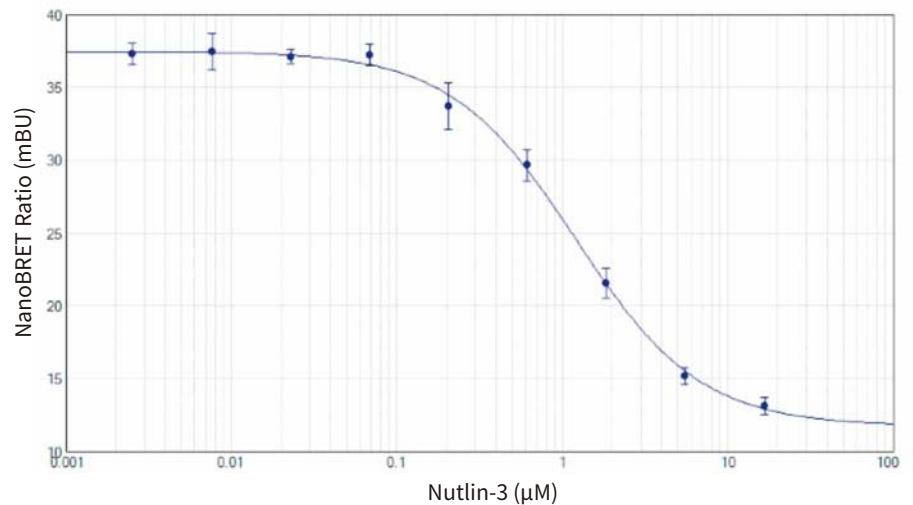


图 2 nutlin-3 对 p53-MDM2 相互作用的破坏

SoftMax Pro 软件中生成的 4 参数曲线拟合的 IC₅₀ 为 1.2 μM (n = 4)。

通过以 1,000 rpm 旋转 5 分钟收获 HEK-293 细胞, 弃去培养基。在 Opti-MEM + 4% FBS 中将细胞密度调节至 2.2×10^5 个细胞/mL, 并分装在两个 15 mL 锥形管。一管用 0.1 μM HaloTag 618 配体处理, 另一管无配体处理。将细胞以每孔 2×10^4 个细胞接种到 96 孔白色微孔板中, 并立即用 1: 3 连续稀释的 nutlin-3 (每个浓度 $n = 4$ 个重复) 或 0.5% DMSO 处理。将细胞在 37°C, 5% CO_2 下孵育过夜。

在 Opti-MEM + 4% FBS 中制备 5x NanoBRET Nano-Glo 底物溶液, 并向每个孔中加入 25 μL 。使用表 1 中所示的设置在 SpectraMax iD5 酶标仪上测量供体发射光 (447 nm) 和受体发射光 (610 nm)。通过将受体信号除以供体信号在 SoftMax Pro 软件中计算 NanoBRET 比率, 并将比率乘以 1000 以获得整数 milliBRET 单位 (mBU)。通过减去不含配体的样品的平均 mBU 来对 mBU 值进行背景校正。分析了 nutlin-3 处理的细胞的结果, 并使用 SoftMax Pro 软件 (版本 7.0.3 和更高版本) 中的 4 参数曲线拟合图表。在每种浓度的 nutlin-3 下计算 Z' 因子以评估测定性能。

结果

使用 SoftMax Pro 软件中的 4 参数曲线拟合, 绘制 NanoBRET 比率 (mBU) 对 nutlin-3 浓度的曲线 (图 2)。计算出的 nutlin-3 的 IC_{50} 值为 1.2 μM , 与 Promega 对 NanoBRET PPI 质控对所示的结果一致。

在用于产生图 2 所示曲线的所有浓度的 nutlin-3 下获得至少 0.7 μM 的 Z' 因子。对于 0.07 μM 和更低的浓度, Z' 因子等于 0.9 μM 。这些值证明了这种 NanoBRET 分析的稳定性和低变异性。

总结

SpectraMax iD5 酶标仪配备了用于检测 NanoBRET 供体和受体信号的极佳滤光片, 被证明了可以使用 NanoBRET PPI 对质控对 (p53, MDM2) 进行测定。Nutlin-3 用于以浓度依赖性方式破坏 p53-MDM2 相互作用, 产生 1.2 μM 的预期 IC_{50} 值。对于所有测试样品浓度, 计算以评估测定性能和重复性变异性的 Z' 因子在 0.7 和 1 之间, 证实了 SpectraMax iD5 酶标仪的灵敏度和 NanoBRET 实验的稳定性质。SoftMax Pro 软件可计算 NanoBRET 比率并自动绘制数据, 简化分析。

参考内容

1. Machleidt T, Woodrooffe CC, Schwinn MK, Mendez J, Robers MB, Zimmerman K, Otto P, Daniels DL, Kirkland TA, and Wood KV. NanoBRET—A Novel BRET Platform for the Analysis of Protein-Protein Interactions. ACS Chem. Biol. 2015, 10, 1797-1804.
2. Technical Manual: NanoBRET Protein: Protein Interaction System. Promega Corporation.



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

