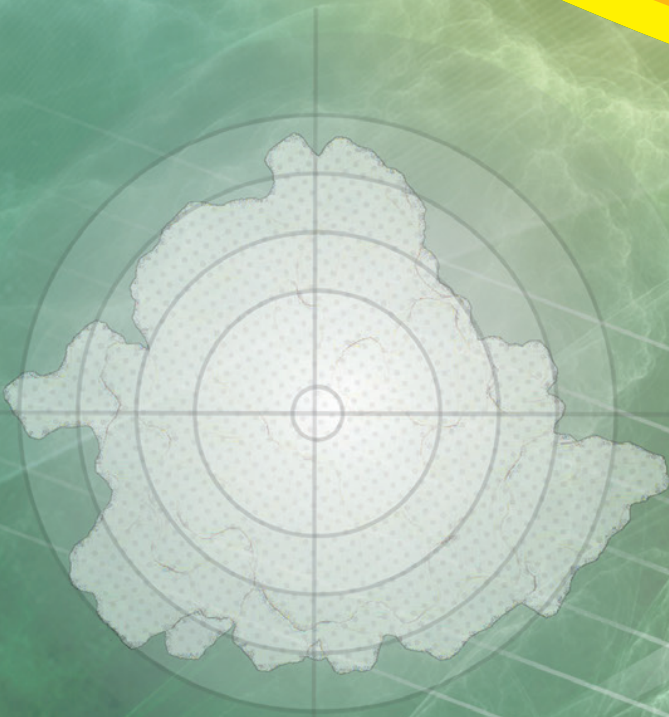


蛋白降解研究解决方案

Targeted Protein Degradation

提供细胞和生化水平检测方案，助力蛋白降解剂研发全流程



目 录

NanoLuc® 萤光素酶	3
TPD 研究检测方案概览	4
靶蛋白降解	5
活细胞实时蛋白降解监测：HiBiT 蛋白标签技术	5
HiBiT 免疫学分析工具	7
通过内参报告基因归一化来控制特异性	8
天然非修饰细胞中终点法检测：Lumit® Immunoassay Cellular Systems	11
化合物膜通透性与靶点结合亲和力	13
活细胞水平监测：NanoBRET® TE 技术	13
生化水平检测：Lumit® Anti-Tag PPI 技术	15
三元复合物形成 / 泛素化 / 蛋白酶体募集	17
活细胞水平监测：NanoBRET® PPI 技术	17
生化水平检测：Lumit® Anti-Tag PPI 技术	19
降解表型研究	21
HaloPROTAC3	21
细胞功能性分析	22
细胞活力、凋亡和毒性检测	22
细胞代谢检测	22
细胞因子检测：Lumit® Cytokine Immunoassay	22
检测仪器	23

NanoLuc[®] 萤光素酶

NanoLuc[®] Luciferase Technology

TheScientist
**TOP
TEN** 2012
INNOVATIONS

NanoLuc[®] luciferase (NanoLuc[®] 萤光素酶, Nluc) 是一个经过基因工程改造的小分子酶 (19.1kDa), 是 Promega 专利技术, 是性能卓越的生物发光报告基因。NanoLuc[®] 萤光素酶在上市当年被 The Scientist 杂志评选为年度十大创新产品。

NanoLuc[®] 萤光素酶使用一种新型底物——Furimazine。Furimazine 是 Promega 的专利底物。它可渗透细胞膜, 同时减少了自发光和实验背景。Furimazine 与 NanoLuc[®] 反应不依赖 ATP, 可产生高强度辉光型发光信号, 比经典的萤光素酶工具酶反应发光信号更亮, 可高达 10^{10} 。

Promega 公司拥有 NanoLuc[®] 萤光素酶 (又称 NanoLuc[®] 荧光素酶) 及底物 Furimazine 相关专利, 且 NanoLuc 为 Promega 公司官方注册商标。

1 分子量小 单体酶, 19kD, 171 个氨基酸

2 结构更简单 没有翻译后修饰或二硫键

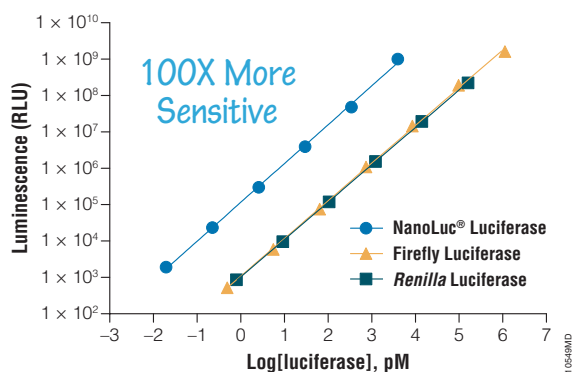
3 分布均匀 蛋白表达后会均匀分布在细胞中

4 光信号稳定 辉光反应, 室温半衰期通常 >2h

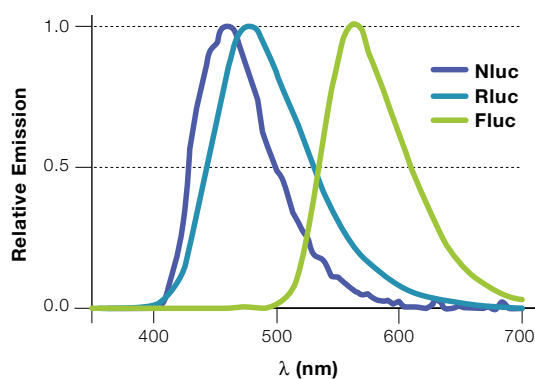
5 pH 耐受性高 pH 值 6-8 范围均有活性

6 BRET 友好 $\lambda_{\max}=460\text{nm}$, 更适于 BRET 实验

7 热稳定性高 $T_m=60^\circ\text{C}$, 室温下放置 8h, 活性仍保留 90%



上图: NanoLuc[®] luciferase 灵敏度要比萤火虫 (Firefly) 和海肾 (Renilla) 萤光素酶高 100 倍。



上图: NanoLuc[®] luciferase 与萤火虫 (Firefly) 和海肾 (Renilla) 萤光素酶的发射光谱比较。

TPD 研究检测方案概览

Overview of TPD Research Solutions

基于 NanoLuc® 的可用于 TPD 研究的优势检测技术

HiBiT 蛋白 标签技术

内源水平蛋白定量与
功能分析

NanoBRET® PPI 技术

活细胞检测蛋白：蛋白
相互作用

NanoBRET® TE 技术

活细胞检测药物：靶标
相互作用

Lumit® 新型免疫 检测技术

完美替代 ELISA，无需
洗涤和固定

Promega 技术可用于以下 TPD 研究关键步骤的检测

靶向蛋白降解

我的靶点是否被降解了？
在靶细胞或天然细胞中，用终点法或
动力学检测定量降解剂活性。

HiBiT, Lumit®

透膜性与亲和力

PROTAC 能否透膜？
靶点亲和力如何？

在活细胞水平和生化体系中评估降
解剂与靶蛋白及效应蛋白的结合。

NanoBRET® TE, Lumit®

三元复合物

PROTAC 能否形成三元复合物？
在活细胞水平和生化体系中评估
降解剂、靶蛋白与 E3 连接酶形成
三元复合物。

NanoBRET®, Lumit®

泛素化

靶点是否发生泛素化？
用细胞和生化方法的动力学工具监测
靶蛋白泛素化。

NanoBRET®, Lumit®

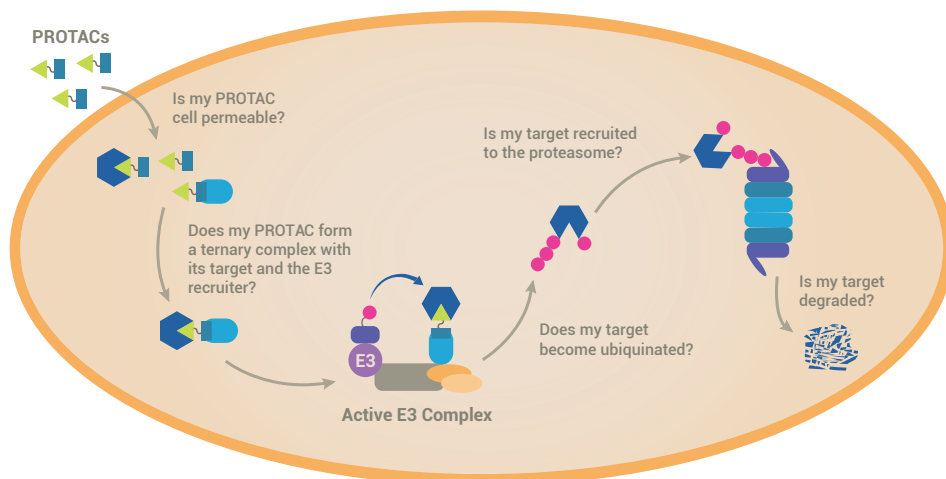
细胞功能性分析

靶蛋白降解对细胞功能有何影响？
通过检测细胞活力、增殖、凋亡及
代谢等关键指标，评估降解对细胞
功能状态的影响。

降解表型

靶蛋白降解的表型结果是什么？
HaloPROTAC 用于研究靶蛋白的
可降解性。

HaloTag®



靶蛋白降解

Target Protein Degradation

HiBiT 蛋白标签技术

——超小标签，实现活细胞中靶蛋白的快速、高灵敏定量检测

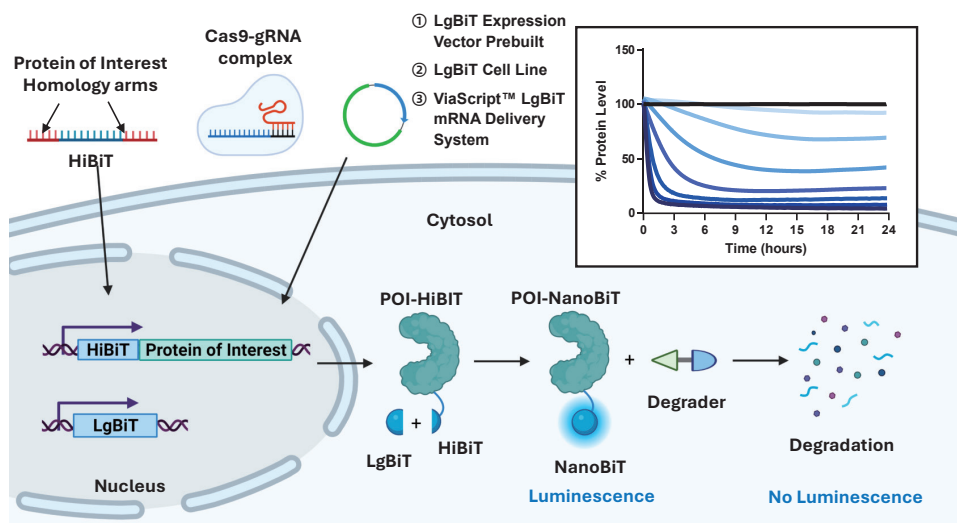
HiBiT 技术提供超高灵敏度的蛋白降解检测能力，适用于高通量筛选。此外，HiBiT 敲入（knock-in）细胞系可无缝支持终点检测和活细胞动力学分析，从而提供稳健的定量指标，用于对降解剂候选分子进行排序与优化。

HiBiT 技术优势

- **标签小**：11 个氨基酸对靶蛋白功能影响非常小
- **一步法均质检测**：无需抗体，无洗涤，仅需“加样 - 检测”
- **高通量筛选**：简单，快速地基于孔板的生物发光检测，可扩展至 96/384 孔板
- **提供多种检测模式**：活细胞实时动态模式（胞内或胞外）；裂解型终点法检测模式
- **便于用 CRISPR/Cas9 插入**：无需克隆可检测内源性蛋白，方案可优化
- **Sub-attomole 级灵敏度**：检测背景低，够检测内源性水平的蛋白，线性范围 >7 logs

HiBiT 技术原理

HiBiT 是一种由 NanoLuc[®] 萤光素酶衍生的 11 个氨基酸（1.3 kDa）构成的肽标签，可以连接到任何目的蛋白（POI），可在 10 分钟或更短时间内使用生物发光试剂进行检测。该方法基于互补配对的 NanoBiT 技术，检测试剂含有一个无活性的萤光素酶大亚基 LgBiT（18 kDa），其能快速与 HiBiT 结合，产生一种高活性的萤光素酶。在萤光素酶底物呋喃嗪（furimazine）存在的情况下产生明亮的发光信号，信号强度与融合蛋白的表达量呈线性正相关。



图：实时监测内源性目的蛋白（POI）的降解。通过 CRISPR/Cas9 技术，可将 HiBiT 编码序列插入目标基因位点中，同时在细胞中共表达 LgBiT 蛋白，配合专用的发光底物，可以进行 2-72 小时的活细胞蛋白水平实时监测（加入蛋白降解剂后发光信号下降）。



下载 HiBiT
技术手册



查看即用型
HiBiT 细胞系列表

HiBiT 检测流程及工具

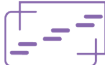
Step1. 用 HiBiT 标签标记目标蛋白

检测方法	特点	工具列表		
方法一： CRISPR/Cas9 介导的内源基因敲入法【推荐】	使 HiBiT 标签与目的蛋白在生理调控下同步表达，最大程度模拟目的蛋白的天然表达模式	① 即用型细胞系：Promega 提供 100+ 针对热门靶标的即用型 HiBiT CRISPR 细胞系。 ② 定制细胞系：联系 Promega 定制满足您研究需求的细胞系。 ③ 自行 DIY：参考 Promega 提供的操作指导 DIY 自行完成 CRISPR 基因敲入。		
方法二： 载体介导的外源基因转染法	• 传统外源性表达； • 实验建立更灵活； • 有过表达伪影风险。	HiBiT 融合表达载体： • HiBiT CMV-neo Flexi® Vectors 载体系列 N2391,N2401, N2411 • pBiT3.1 HiBiT MCS Vectors 载体系列 N2361,N2371, N2381		
		转染试剂：		
		FuGENE® HD E2311 1ml E2312 5 x 1ml	FuGENE® 6 E2691 1ml E2692 5 x 1ml E2693 0.5ml	ViaFect™ E4981 0.75ml E4982 2x 0.75ml E4983 0.2ml

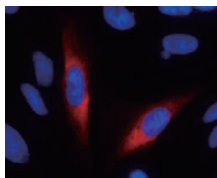
Step 2. 检测 HiBiT 标记的目的蛋白

检测方法	特点	工具列表		
 裂解型检测	• 终点法裂解型检测； • 灵敏准确地检测全部 HiBiT 标记的蛋白。	Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System【明星产品】 N3030 10ml N3040 100ml N3050 10 x 100ml		
 活细胞实时检测	• 非裂解型检测； • 用于定量细胞内的 HiBiT 标签蛋白； • 可进行长达 72 小时实时动力学研究； • 需在细胞内表达 LgBiT 蛋白；	细胞内 LgBiT 蛋白表达工具：		
		LgBiT 表达载体 LgBiT Expression Vector [CMV / Hygro] N2681 20 µg	LgBiT 稳转细胞系 LgBiT Expression Stable Cell Line N2627 2 vial	LgBiT mRNA 递送系统【瞬转、低毒、更快速】 ViaScript™ LgBiT mRNA Delivery System NE1120 10 plates NE1130 10 plates NE1140 5X10 plates
		活细胞实时检测系统 / 底物：		
		0-2 小时检测 Nano-Glo® Live Cell Assay System N2011 10ml N2012 100ml N2013 10X100ml	2-24 小时检测 Nano-Glo® Vivazine™ Substrate N2580 0.1 ml N2581 1ml N2582 10ml	2-72 小时检测 Nano-Glo® Endurazine™ Substrate N2570 0.1 ml N2571 1ml N2572 10ml
		Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System		
 细胞外检测	• 非裂解型检测； • 定量活细胞表面或分泌型表达的 HiBiT 标记蛋白。	N2420 10ml N2421 100ml N2422 10 x 100ml		

HiBiT 免疫学分析工具

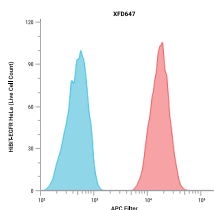
应用	特点	工具列表
 Western Blot 蛋白质印迹	• 发光检测（无需抗体的检测）； • 灵敏度更高，操作更简单，用于快速检测和验证； • 试剂中包含 LgBiT 蛋白，在常规蛋白免疫印迹分析膜上快速测定 HiBiT 标签蛋白的大小。	Nano-Glo® HiBiT Blotting System N2410 100ml
	• 针对 HiBiT 的特异性、高亲和力的小鼠单克隆抗体； • 经典 Western Blot，用于发光检测结果的正交验证； • 也可用于固定细胞中标签蛋白的原位定位与表达分析，如 ICC。	Anti-HiBiT Monoclonal Antibody N7200 100µg N7210 5X100µg
Immunoprecipitation 免疫沉淀 (IP)	• 预偶联抗 HiBiT 单克隆抗体的磁珠； • 实现 HiBiT 标签蛋白的高效捕获与富集； • 灵活洗脱策略、兼容 HiBiT 发光检测系统； • 适用于 IP、Co-IP、IP-MS 和蛋白互作研究。	Anti-HiBiT Magnetic Beads and Elution Peptide N7300 1ml N7301 5ml
Flow Cytometry 流式细胞术	• XFD 荧光基团偶联的抗 HiBiT 单克隆抗体； • 无需二抗，免多步洗涤，操作流程更简单； • 可用于活细胞（膜表面蛋白）或固定细胞（胞内蛋白）； • 支持 CRISPR HiBiT 敲入细胞后的富集与分选（仅针对膜外表面标签的蛋白）。	Anti-HiBiT mAb, XFD Fluorophore Conjugates N7221 50µg (FarRed647, 更亮) N7231 50µg (Green488)

Immunocytochemistry (ICC)



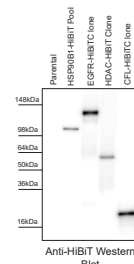
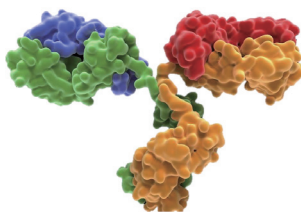
利用抗 HiBiT 单克隆抗体对 CRISPR 编辑细胞池和克隆中 HiBiT 标记蛋白进行免疫荧光检测。

FACS



HiBiT CRISPR 敲入细胞（红色）和亲本对照细胞（蓝色）用抗 HiBiT 单克隆抗体-XFD647 进行染色，随后进行流式细胞术分析。

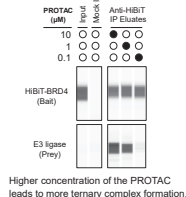
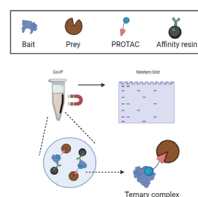
抗 HiBiT 单克隆抗体



Western Blot (WB)

利用抗 HiBiT 单克隆抗体对发光检测结果的正交验证。

Immunoprecipitation (IP)



通过 Anti-HiBiT Magnetic Beads 进行 Co-IP 检测，随着 PROTAC 浓度升高，三元复合物形成更多。

通过内参报告基因归一化来控制特异性

Nano-Glo® HiBiT Dual-Luciferase® Reporter System (HiBiT NanoDLR™)

Nano-Glo® HiBiT Dual-Luciferase® Reporter System (HiBiT NanoDLR™) 可在同一样品中以“add-read-add-read”的方式顺序检测萤火虫萤光素酶 (Fluc) 与 HiBiT 标记蛋白信号，实现双报告基因的同步定量分析。该检测系统可最大程度减少或消除由转染效率、细胞数量、细胞活性、温度或检测时间等因素导致的实验变异性，从而提高数据质量。

核心应用：在检测目标 HiBiT 标记蛋白的受调控降解过程时，区分特异性效应与整体蛋白表达水平的变化（如细胞活力下降或全局蛋白合成抑制）。

检测原理及流程

1 第一步

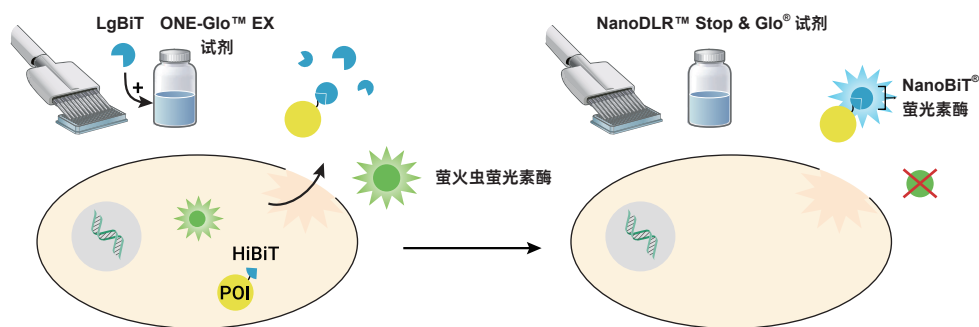
加样 + 读取 Fluc 信号

ONE-Glo™ EX+LgBiT 试剂可裂解细胞，提供测量萤火虫萤光素酶所需的底物，同时提供与 HiBiT 互补所需的 LgBiT 蛋白，从而形成重构的 NanoBiT® 萤光素酶。

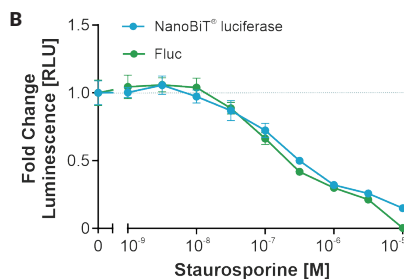
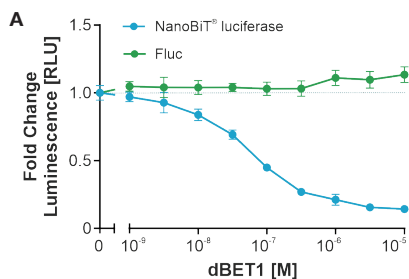
2 第二步

添加 Stop&Glo 读取 HiBiT 信号

加入 NanoDLR™ Stop&Glo® 试剂，以淬灭萤火虫萤光素酶信号，并为 NanoBiT® 萤光素酶提供发光底物，用于定量检测 HiBiT 标记蛋白。



应用数据



用 TK 启动子驱动的 HiBiT-BRD4 和 Fluc 的双顺反子表达构建体瞬时转染 HEK293 细胞。(A) 用靶向 BRD4 的 PROTAC 化合物 dBET1 处理细胞，会导致 HiBiT-BRD4 特异性降解，而 Fluc 对照不会发生降解。(B) 另一方面，用有毒化合物星形孢菌素处理，两种蛋白信号均出现了非特异性下降。

检测工具

产品	规格	目录号
Nano-Glo® HiBiT Dual-Luciferase® Reporter System	10 mL	NE2010
	100 mL	NE2020

应用数据

HiBiT-CRISPR 和 Western Blot 模型结果一致，且内源性标记 HiBiT 不影响靶标蛋白的天然行为

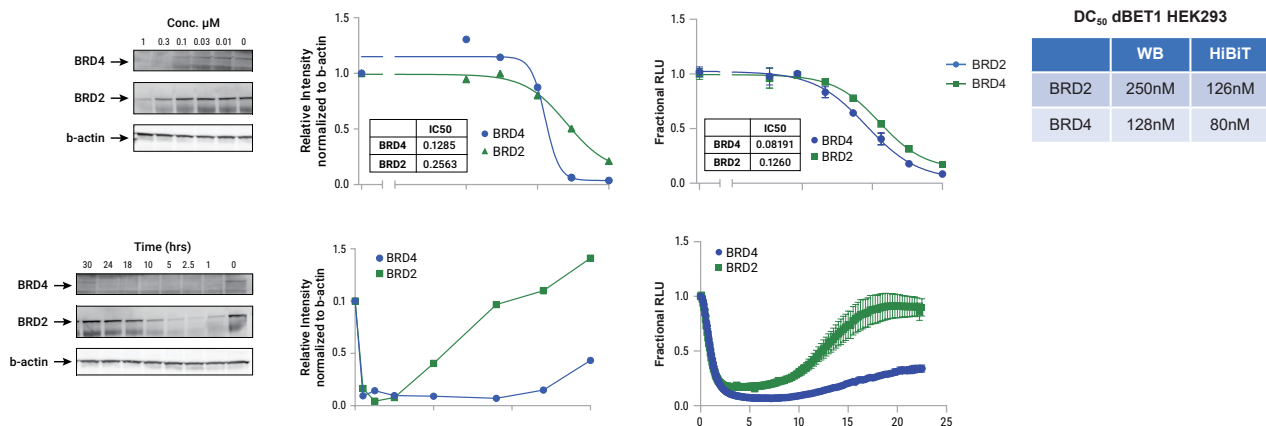


图. 在 HiBiT 标记细胞和野生型细胞中，检测 BRD2 和 BRD4 蛋白由降解剂 dEBET1 导致的靶标降解，野生型细胞中靶蛋白降解水平通过 Western Blot 检测。图显示，HiBiT-CRISPR 和 Western Blot 两个模型的靶蛋白降解的剂量反应和时程响应基本一致。

使用终点法快速检测蛋白降解，是基于 384 孔板高通量筛选降解剂的理想选择

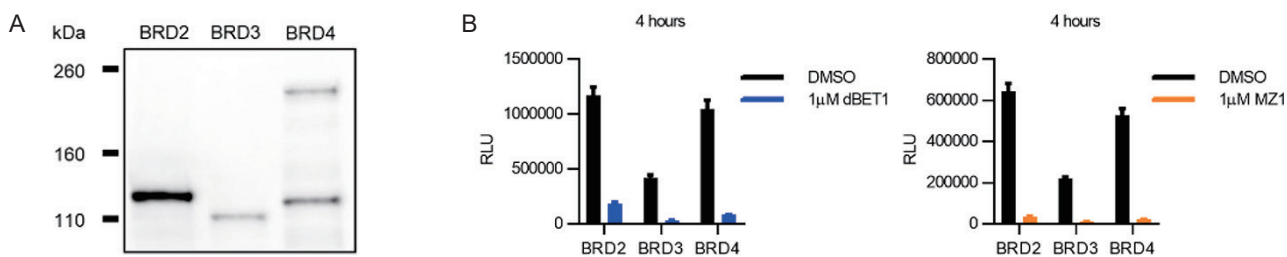


图. 在稳定表达 LgBiT 蛋白的 HEK293 细胞中分别对 BRD2、BRD3 和 BRD4 蛋白进行 HiBiT CRISPR knock-in。图 A. 用 HiBiT Blotting Reagent 验证 HiBiT 是否被连接到了正确的蛋白上，BRD2 和 BRD3 分别得到一条分子量正确的单一条带，BRD4 的两条带分别指示的是 BRD4 大小不同的两种亚型。图 B. 用固定浓度的降解剂 dEBET1 或 MZ1 处理细胞，使用 Nano-Glo[®] HiBiT Lytic Detection System 终点法检测处理 4 个小时后的蛋白降解情况，结果表明这三种 BET 家族成员的蛋白水平均有明显的下降。

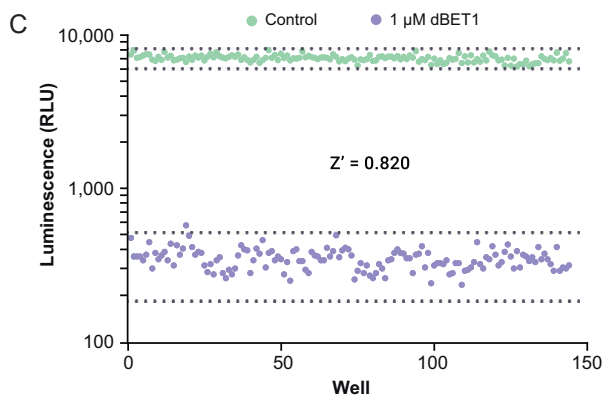
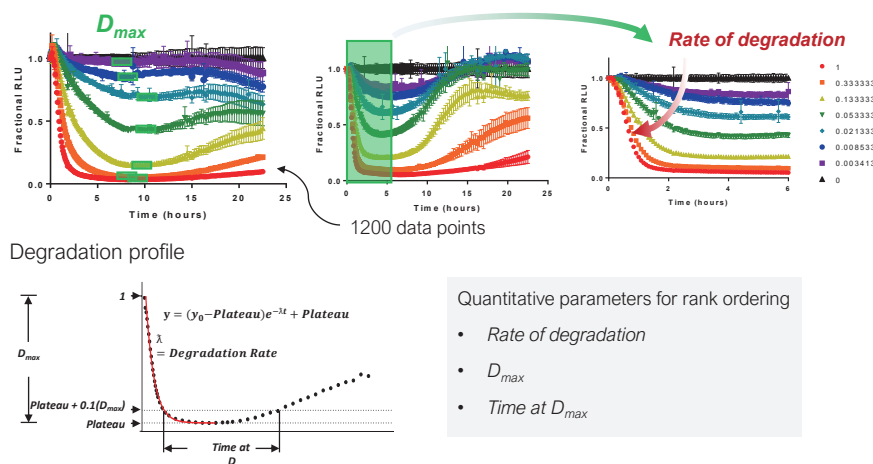


图 C. 在 384 孔板的 CRISPR 衍生的多克隆细胞株中诱导 HiBiT-BRD4 蛋白的降解。Nano-Glo[®] HiBiT Lytic Detection System 凭借其检测方案简单，发光信号半衰期大于 3 个小时，成为高通量应用中批量处理多块板的理想选择。相较于抗体检测方法，HiBiT 灵敏度更高，操作更简单，因而更有利于蛋白降解 HTS 的测定。

应用数据

采用实时活细胞检测可获取更多降解参数，对降解剂的效能进行更准确的评估



上图. 对 HEK293 细胞中 BRD3 蛋白进行内源性 HiBiT 标记, 不同浓度降解剂 MZ1 处理细胞后对靶蛋白水平进行 24 小时实时监测, 从得到的动态结果, 计算蛋白降解的动力学参数, 例如降解速率, 最大降解值 (D_{max}), 最大降解水平持续时间 (Time at D_{max}) 等。由图可知, 不同浓度药物处理达到 D_{max} 的时间不同, 因此对于终点法检测, 如果在所选的检测时间点并不是所有浓度都达到了 D_{max} , 会影响对药物 potency 的判断, 而实时检测可以获得更多的降解参数, 从而对降解剂的效能进行更准确的评估。

联合细胞活力等方法确认发光信号下降（降解）并非由于药物对细胞活性的影响所致

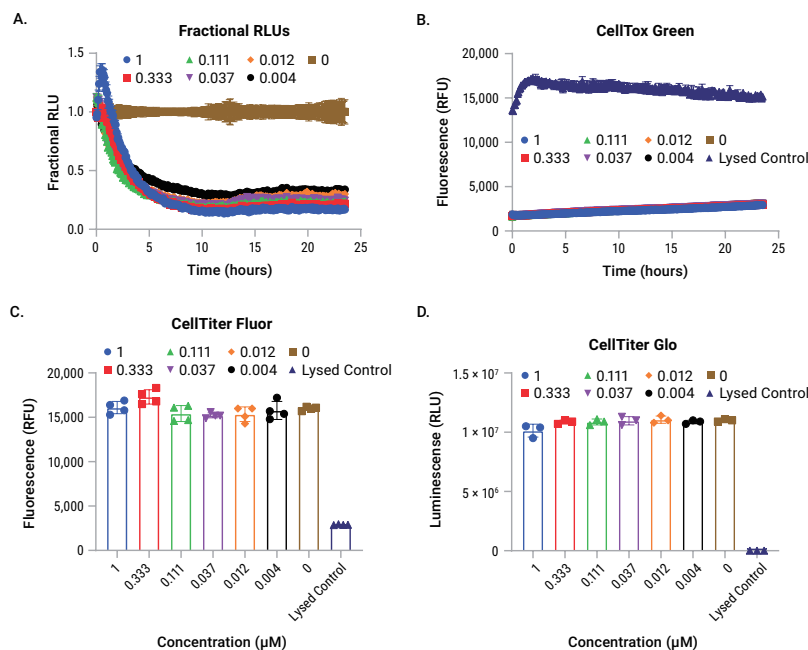


图. 联合细胞活力及细胞毒性检测确认发光信号下降（降解）并非由于药物对细胞活性的影响所致，可用于辅助区分随后可能导致毒性的靶标降解。使用不同的活性检测方法测定不同毒性阶段，进行动力学多重检测：

- 图 A. HiBiT 标签标记的 Ikaros 蛋白在分子胶化合物伊伯多米德处理后的动态降解检测
- 图 B. 降解检测与 CellTox™-Green 细胞毒性检测（膜完整性检测）同步进行
- 图 C. 24 小时动态读数下进行降解检测后，叠加 CellTiter-Fluor™ 活力检测（活性细胞蛋白酶）
- 图 D. 24 小时动态读数下进行降解检测后，叠加 CellTiter-Glo®（CTG）活力检测（细胞 ATP 水平）

靶蛋白降解

Target Protein Degradation

生化水平检测：Lumit[®] Immunoassay Cellular Systems

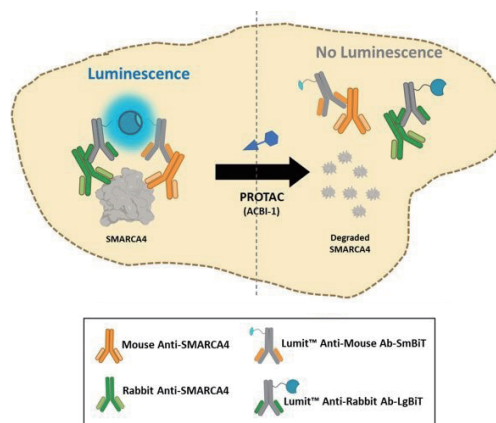
—检测靶蛋白在天然非修饰（非基因工程）细胞中的降解

传统的分析物的检测和定量方法通常耗时且检测步骤多，如 Western blotting 和 ELISA。Lumit[®] 技术是一种简单快速的、基于多孔板、免洗、均质型、生物发光免疫检测方法。它的高特异性和易于高通量筛选（HTS）使其成为科学家进行基础研究和药物发现的有力工具。

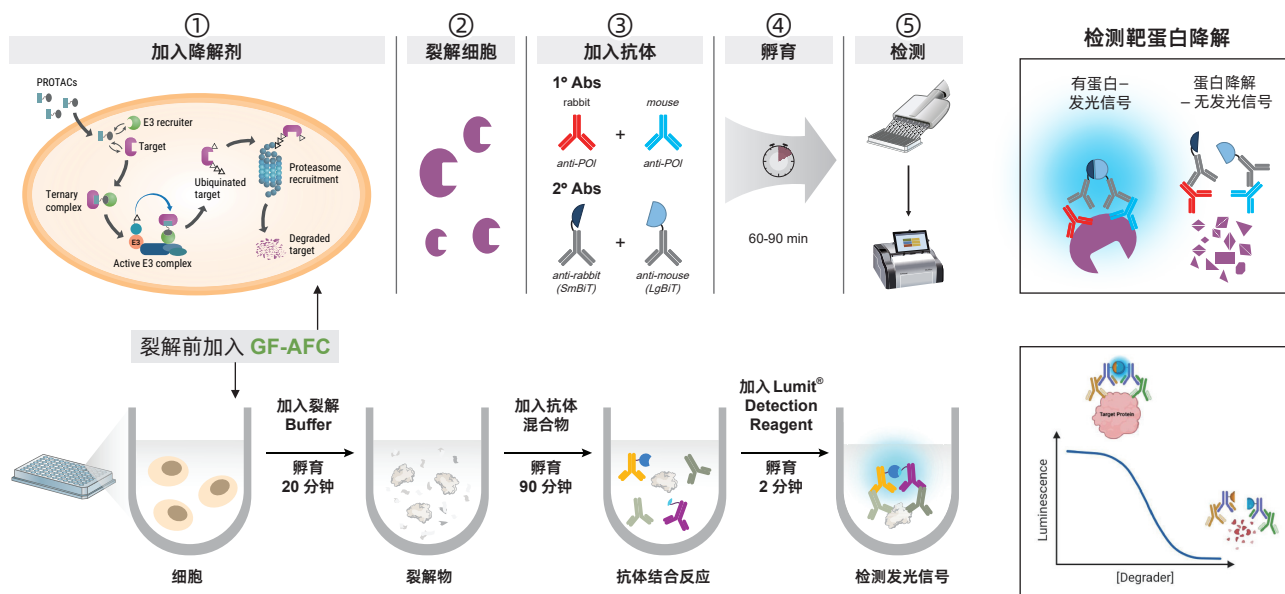
技术原理

Lumit[®] Immunoassay Cellular System (ICS) 可以在表达靶蛋白的任何细胞类型中，在天然水平检测细胞内蛋白的磷酸化或总靶蛋白量。该系统包含 Lumit[®] 二抗，分别针对兔、小鼠或山羊，这些二抗分别与 NanoBiT[®] 亚基 SmBiT 和 LgBiT 相偶联，用户提供两种针对靶蛋白的一抗（或选择包含一抗的完整试剂盒）。裂解细胞后磷酸化的蛋白或总靶蛋白被各自的一抗对识别，然后 Lumit[®] 二抗识别对应种属的一抗，从而使 LgBiT 和 SmBiT 紧密靠近，并形成可产生明亮发光信号的有功能的酶。

右图：以 SMARCA4 的降解为例，加入 PROTAC 后，SMARCA4 蛋白被降解，发光信号下降。

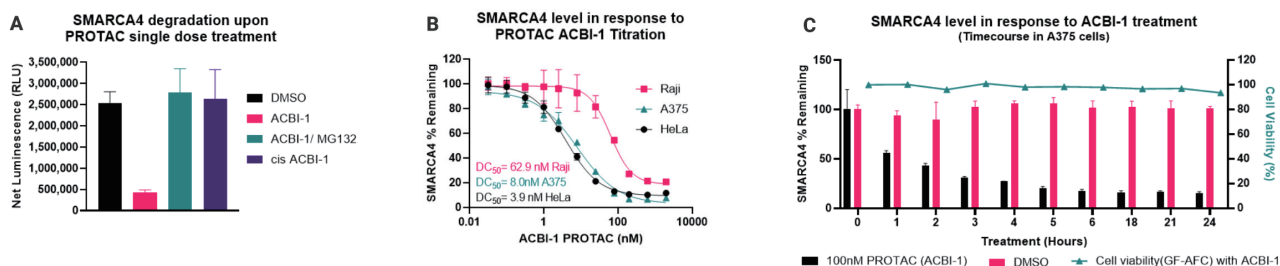


检测流程



应用数据

PROTAC 处理后天然的 SMARCA4 的降解



上图 .PROTAC 处理后天然的 SMARCA4 的降解。每孔接种 50,000 个细胞。用指定化合物处理后，使用 Lumit[®] Immunoassay Cellular System (set 2) 检测 SMARCA4 的水平。图 A. 用 250nM ACBI-1、250nM ACBI-1 + 20μM MG132、250nM Cis-ACBI-1 或 DMSO 处理 5 小时后的 SMARCA4 水平。图 B. ACBI-1 在三种不同细胞系中对 SMARCA4 降解的分析。图 C. ACBI-1 降解 SMARCA4 的时间过程。

检测工具

人类细胞靶点	信号通路	适用 Lumit [®] Immunoassay Cellular System (目录号)	完整试剂盒 (包含一抗)
AKT	PROTAC MS-21	Set 1 (W1201)	有
B-cell lymphoma 6 protein (BCL-6)	BI-3802	Set 1 (W1201)	无
BRD4	PROTACs ARV-771, dBET6	Set 1 (W1201)	有
Burton's Tyrosine Kinase (BTK)	PROTAC MT-802	Set 1 (W1201)	有
ER (Estrogen Receptor)	Fulvestrant	Set 1 (W1201)	无
SMARCA2 (BRM)	PROTAC ACBI-1	具体详情参见操作说明	有
SMARCA4 (BRG1)	PROTAC ACBI-1	Set 2 (W1331)	有
STAT3	PROTAC SD-36	Set 1 (W1201)	有

进入 Promega 官网查看详细操作说明，如需购买完整试剂盒请联系 Promega。

产品	规格	目录号
Lumit [®] Immunoassay Cellular System – Starter Kit	200 assays	W1220
	100 assays	W1201
Lumit [®] Immunoassay Cellular System – Set 1	1000 assays	W1202
	10,000 assays	W1203
Lumit [®] Immunoassay Cellular System – Set 2	100 assays	W1331
	1000 assays	W1332
	10,000 assays	W1333



下载 Lumit[®]
免疫检测系统手册

化合物膜通透性与靶点结合亲和力

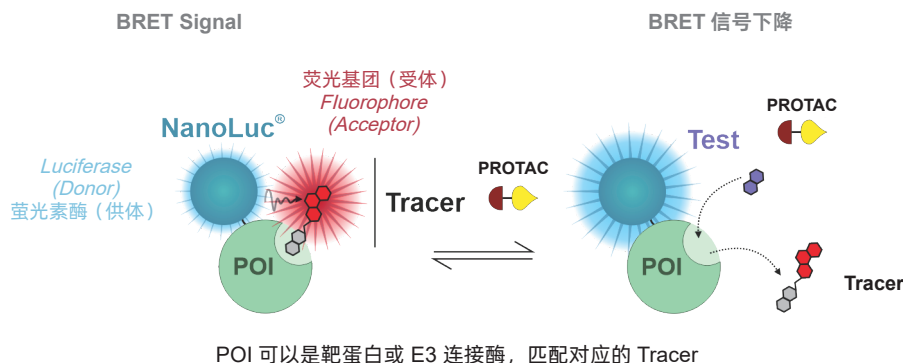
Compound Permeability and Target Affinity

NanoBRET® Target Engagement (TE) 技术

——活细胞水平检测化合物与靶标结合

技术原理

NanoBRET® Target Engagement (TE) 是一种强大的技术，可用于研究活细胞中的相关蛋白：配体结合事件。将目标蛋白 (POI) 与 NanoLuc® 萤光素酶融合后表达作为供体，与靶标可逆结合的配体连接上专用的 NanoBRET® 618 荧光基团形成细胞渗透性荧光示踪分子 (Tracer) 作为受体。Tracer 结合目标蛋白可拉近萤光素酶 (供体) 和荧光基团 (受体) 的距离，进而触发生物发光共振能量转移 (BRET)，如图，加入待测化合物 (降解剂) 后，化合物结合靶标会与 Tracer 产生竞争置换，通过 BRET 信号的降低可以确定化合物的结合。



应用数据

评估降解剂与 E3 连接酶细胞内亲和力、可利用性与渗透性

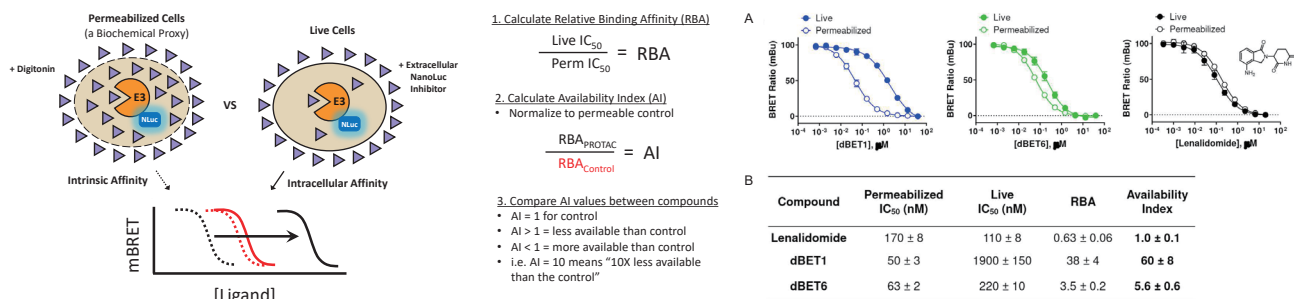


图 A. 采用 NanoBRET® TE CRBN Assay 分别在活细胞模式下测定了 PROTAC 的细胞内亲和力 (intracellular affinity)，在透化细胞模式 (加入洋地黄皂苷破坏细胞膜，去除屏障作用) 下检测 PROTAC 的固有亲和力 (intrinsic affinity)。表 B. 基于图 A 的 NanoBRET® TE IC₅₀ 数据，计算各化合物的可用性指数 (AI)，Lenalidomide 作为高透膜性对照化合物，其 AI 值默认设定为 1；dBET6 的 AI 值为 5.6，dBET1 的 AI 值为 60，表明 dBET6 的细胞内可用性约为 dBET1 的 10 倍。

检测工具

降解剂与 E3 连接酶相互作用检测工具列表

检测类型	E3 连接酶	产品	规格 (96 孔板)	目录号
检测系统	CRBN	NanoBRET® TE Intracellular E3 Ligase Assays, CRBN	100 assays	N2910
			1000 assays	N2911
			10,000 assays	N2912
	VHL	NanoBRET® TE Intracellular E3 Ligase Assays, VHL	100 assays	N2930
			1000 assays	N2931
			10,000 assays	N2932
表达载体	IAP(cIAP1,cIAP2,& XIAP)	NanoBRET® TE Intracellular E3 Ligase Assays, IAP	Please Inquire	
	MDM2	NanoBRET® TE Intracellular E3 Ligase Assay, MDM2	Please Inquire	
	CRBN	NanoLuc®-CRBN fusion vector	20 µg	N2741
	VHL	VHL-NanoLuc® fusion vector	20 µg	N2751
	IAP(cIAP1,cIAP2,& XIAP)	NanoLuc®-cIAP1 Fusion Vector	Please Inquire	
		NanoLuc®-XIAP Fusion Vector	Please Inquire	

降解剂与靶蛋白相互作用工具靶点列表

即用型试剂盒

- **350+ Kinase**
- **Kinase Profiling:** K192 Kinases, CDK
- **Histone Deacetylase (HDAC):** HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6, HDAC10
- **Bromodomains (BRDs):** BRD2, BRD3, BRD4, BRD7, BRD9, BRDT, BRPF1, CECR2, TAF1, TAF1L
- **DNA Damage Response (DDR):** PARG, POLQ (Polymerase Domain), POLQ (Helicase Domain), PRMT5
- **Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP):** PARP 1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 7, 10, 11, 12, 14 & 16
- **G-protein Coupled Receptors (GPCR):** >20 GPCRs from >5 families
- **Heat Shock Protein (HSP):** HSP90AB1
- **Inflammasome:** NLRP3
- **RAF Protomer & Homodimers:** ARAF, BRAF, CRAF
- **RAS:** KRAS2B WT, KRAS2B(G12C), KRAS2B(G12A), KRAS2B(G12D), KRAS2B(G12S), KRAS2B(G12V), KRAS2B(G12R), KRAS2B(G13D), KRAS2B(Q61H), KRAS2B(Q61L), KRAS2B(Q61R), KRAS2B(Y96D), HRAS WT, HRAS(G12C), HRAS(G12V)

用户 DIY 开发专有靶点检测系统

- NanoBRET® Dyes for DIY NanoBRET® TE
- NanoLuc® Cloning Vectors



下载 NanoBRET®
TE 技术手册



查看激酶-NanoLuc®
融合蛋白表达载体

化合物膜通透性与靶点结合亲和力

Compound Permeability and Target Affinity

Lumit[®] Anti-Tag PPI 技术

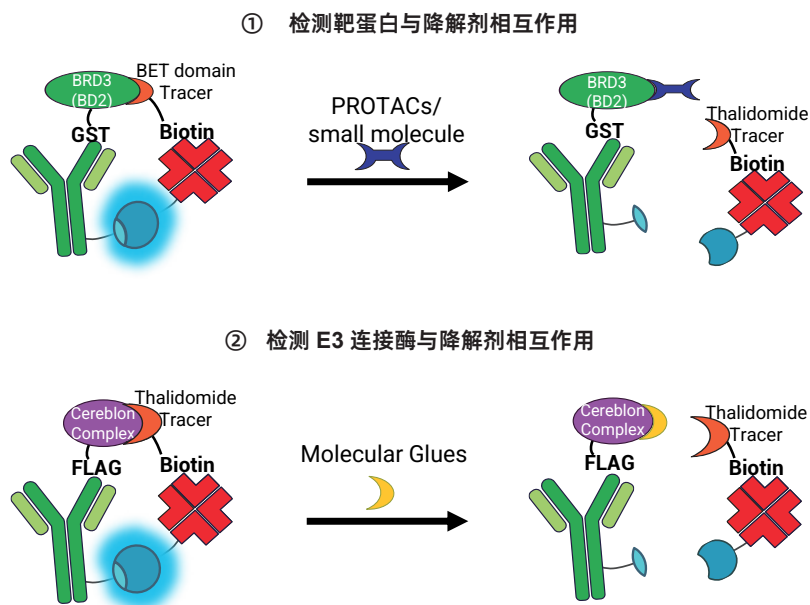
— 无需洗涤固定，生化水平均质法检测蛋白-蛋白 / 小分子相互作用

Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Reagents 是用于检测蛋白质：蛋白质相互作用或蛋白质：小分子相互作用的均质型（无洗涤步骤）免疫检测系统。主要应用包括：寻找这些相互作用的抑制剂或筛选调节相互作用的物质，如 PROTACs 等降解剂。

技术优势

- **真正基于溶液的检测方法：**简化工作流程，仅需“添加 - 读数”，无需固定或洗涤步骤，节省时间，可以在 120 分钟内完成检测。
- **通用型检测平台：**以商品化纯化蛋白质的常用亲和纯化标签作为直接分析物，例如 6His、GST、FLAG[®]，生物素以及人 IgG。
- **宽广的动态范围：**基于生物发光法，检测更灵敏，具有广泛动态范围。
- **适用于高通量应用：**适用于 384 孔板，使用多功能读板仪即可检测，操作流程简单，实验周期短，非常适合抑制剂筛选。

技术原理

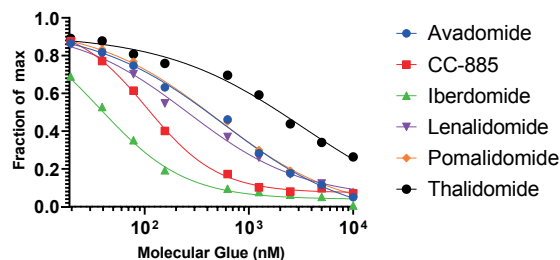


NanoBiT[®] 萤光素酶是一种结构互补性报告基因，非常适合进行相互作用研究。NanoBiT[®] 系统由两个亚基组成：大亚基（LgBiT；18kDa）和小亚基（SmBiT；11 氨基酸肽），它们可以作为重组融合蛋白表达，或通过化学方法偶联到抗体或其他感兴趣的靶标蛋白上。LgBiT 和 SmBiT 两个亚基之间的自亲和力较弱，当 LgBiT 和 SmBiT 被融合伴侣蛋白拉近时，它们会形成一个功能性酶，在 Nano-Glo[®] 底物存在的情况下产生发光信号。

应用数据

检测分子胶的亲和力

Relative Potency of Molecular Glues



Compound	IC50, nM
Avadomide	575
CC-885	105
Iberdomide	38
Lenalidomide	261
Pomalidomide	498
Thalidomide	3281

图. 测定分子胶的相对亲和力, 我们将其滴定至沙利度胺 - 泊马度胺类 (thalidomide) 示踪剂与 CRBN 的复合物体系中。当分子胶置换示踪剂时, 发光信号随之减弱。测得的相对 IC₅₀ 值与裂解细胞中的靶点结合实验结果呈正相关。

检测工具

产品	规格	目录号
Lumit [®] Anti-6His-LgBiT and Anti-6His-SmBiT	20μl each	W1600
Lumit [®] Anti-GST-LgBiT and Anti-GST-SmBiT	20μl each	W1620
Lumit [®] Anti-DYKDDDDK-LgBiT and Anti-DYKDDDDK-SmBiT	20μl each	W1640
Lumit [®] Streptavidin-LgBiT and Streptavidin-SmBiT	20μl each	W1660
Lumit [®] Anti-Human IgG-LgBiT and Anti-Human IgG-SmBiT		Please require
Lumit [®] Anti-6His-LgBiT	200μl	W1601
Lumit [®] Anti-6His-SmBiT	200μl	W1611
Lumit [®] Anti-GST-LgBiT	200μl	W1621
Lumit [®] Anti-GST-SmBiT	200μl	W1631
Lumit [®] Anti-DYKDDDDK-LgBiT	200μl	W1641
Lumit [®] Anti-DYKDDDDK-SmBiT	200μl	W1651
Lumit [®] Streptavidin-LgBiT	200μl	W1661
Lumit [®] Streptavidin-SmBiT	200μl	W1671
Lumit [®] Anti-Human IgG-LgBiT		Please require
Lumit [®] Anti-Human IgG-SmBiT		Please require
搭配购买检测试剂: Lumit [®] Detection Reagent A	500 assays	VB2010
	5000 assays	VB2020
	50,000 assay	VB2030



下载 Lumit[®]
Anti-Tag 手册



下载 Lumit[®]
免疫检测系统手册

三元复合物形成 / 泛素化 / 蛋白酶体募集

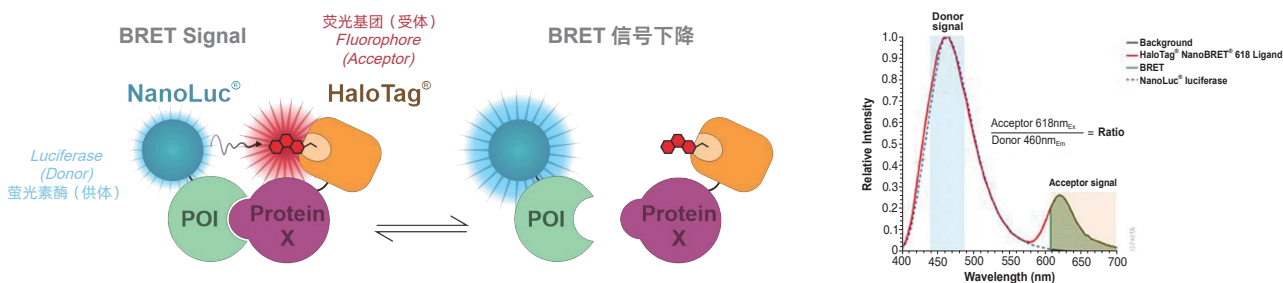
E3 Ternary Complex/Ubiquitination/Proteasomal Recruitment

NanoBRET® PPI 技术

——活细胞水平监测蛋白：蛋白相互作用

技术原理

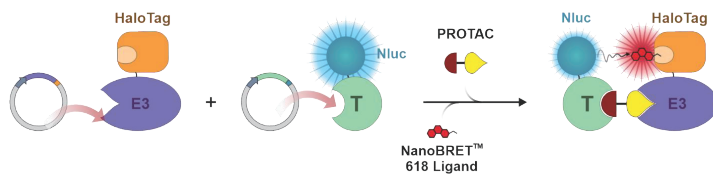
NanoBRET® (Protein Protein Interaction) PPI 技术 是基于 NanoLuc® 萤光素酶和 HaloTag® 蛋白标签技术改良的 BRET 检测，用于进行蛋白质间相互作用检测。如下图，将 A 蛋白与 NanoLuc® 萤光素酶融合，作为光信号的供体；B 蛋白与 HaloTag® 蛋白标签融合，通过专用的 HaloTag® 618 荧光配基，给 B 蛋白带上荧光基团，作为光信号的受体。在细胞中共表达两个融合蛋白，如果蛋白 A 和 B 产生相互作用，即可产生 BRET 信号。检测不同蛋白降解研究步骤中的蛋白相互作用，仅需要替换不同的 A 或 B 蛋白即可。



检测三元复合物的形成：

Ternary complex formation

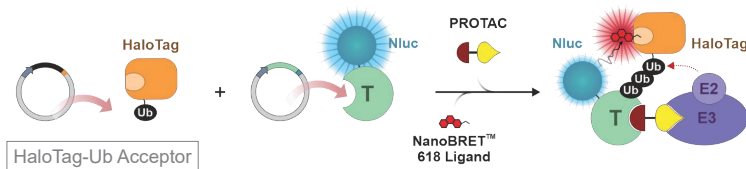
- NanoLuc® -POI A: 目标蛋白
- HaloTag® - POI B: E3 连接酶



检测靶蛋白泛素化：

Target ubiquitination

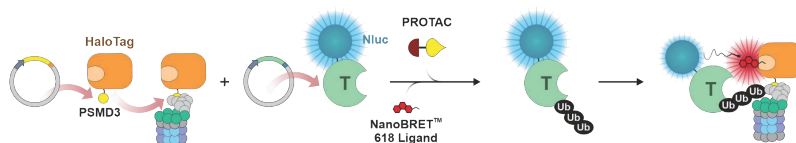
- NanoLuc® -POI A: 目标蛋白
- HaloTag® - POI B: 泛素蛋白



检测蛋白酶体募集：

Proteasomal recruitment

- NanoLuc® -POI A: 目标蛋白
- HaloTag® - POI B: PSMD3 (26S 蛋白酶体调节亚基 3)



应用数据

三元复合物形成的实时监测

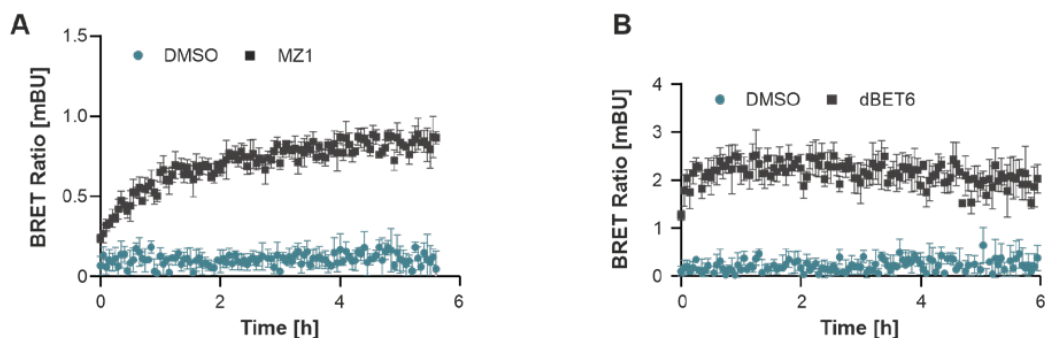


图. 分别使用 PROTACs MZ-1 (1 μ M) 或 dBET6 (0.1 μ M) 进行相关处理后, 测定内源性标记的 HiBiT-BRD4 与异位表达的 HaloTag®-VHL (图 A) 和 HaloTag®-CRBN (图 B) 之间三元复合物的形成情况。使用 NanoBRET® Kinetic Detection System 记录 6 小时内的相关数据。

检测 PROTAC 诱导靶点泛素化的效能

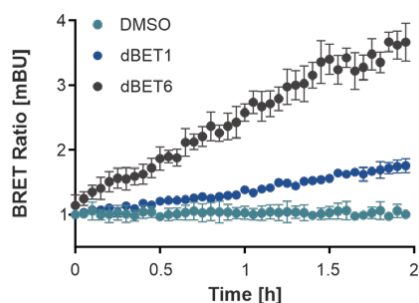


图. PROTAC-dBET1 (1 μ M) 和 dBET6 (0.1 μ M) -处理后异位表达的 HiBiT-BRD4 的泛素化-通过 NanoBRET® 进行检测。相较于 dBET1, dBET6 的泛素化信号增加速度更快, 强度更高, 尽管其浓度比 dBET1 低 10 倍。

多泛素化靶蛋白的蛋白酶体募集研究

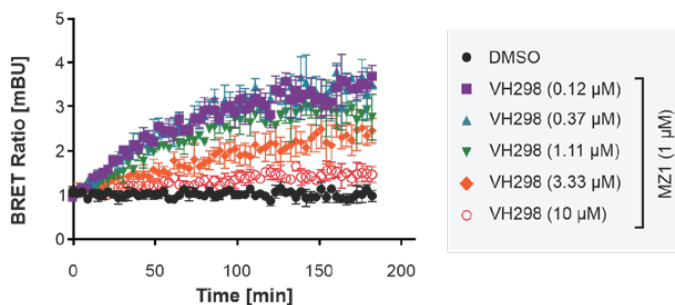


图. 使用 PROTAC MZ-1 (1 μ M) 进行处理后, 26S 蛋白酶体中 HiBiT-BRD4 募集的时间过程分析。与母体化合物 VH298 (即 MZ-1 的 VHL 识别域) 共处理结果证实了本检测的特异性。由于 MZ-1 被竞争性置换, BRET 信号随 VH298 浓度的增加而降低。

检测工具

检测类型	产品	规格 (96 孔板)	目录号
NanoBRET® 三元复合物	NanoBRET® CRBN Ternary Complex Starter Kit	200 assays	ND2720
	NanoBRET® VHL Ternary Complex Starter Kit	200 assays	ND2700
NanoBRET® 泛素化	NanoBRET® Ubiquitination Starter Kit	200 assays	ND2690
NanoBRET® 蛋白酶体募集	NanoBRET® Proteasomal Recruitment Starter Kit	200 assays	ND2730
NanoBRET® HaloTag® 融合蛋白载体	HaloTag®-CRBN Fusion Vector	20 μ g	N2691
	HaloTag®-VHL Fusion Vector	20 μ g	N2731
	HaloTag®-Ubiquitin Fusion Vector	20 μ g	N2721
	HaloTag®-PSMD3 Fusion Vector	20 μ g	N2701

三元复合物形成 / 泛素化 / 蛋白酶体募集

E3 Ternary Complex/Ubiquitination/Proteasomal Recruitment

Lumit[®] Anti-Tag PPI 技术

—无需洗涤固定，生化水平均质法检测蛋白-蛋白 / 小分子相互作用

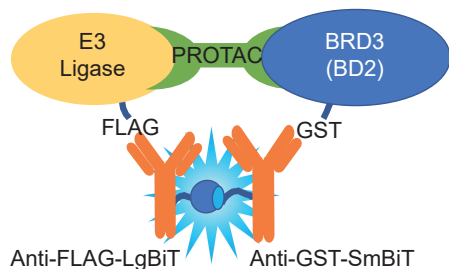
Lumit[®] Anti-Tag Protein Interaction Reagents 是用于检测蛋白质：蛋白质相互作用或蛋白质：小分子相互作用的均质型（无洗涤步骤）免疫检测系统。主要应用包括：寻找这些相互作用的抑制剂或筛选调节相互作用的物质，如 PROTACs 等降解剂。

技术优势

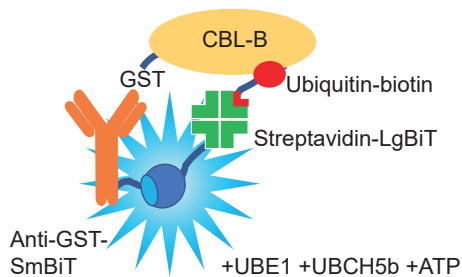
- **真正基于溶液的检测方法：**简化工作流程，仅需“添加 - 读数”，无需固定或洗涤步骤，节省时间，可以在 120 分钟内完成检测。
- **通用型检测平台：**以商品化纯化蛋白质的常用亲和纯化标签作为直接分析物，例如 6xHis、GST、FLAG[®]，生物素以及人 IgG。
- **宽广的动态范围：**基于生物发光法，检测更灵敏，具有广泛动态范围。
- **适用于高通量应用：**适用于 384 孔板，使用多功能读板仪即可检测，操作流程简单，实验周期短，非常适合抑制剂筛选。

技术原理

① 检测 E3 连接酶、靶蛋白以及降解剂形成三元复合物

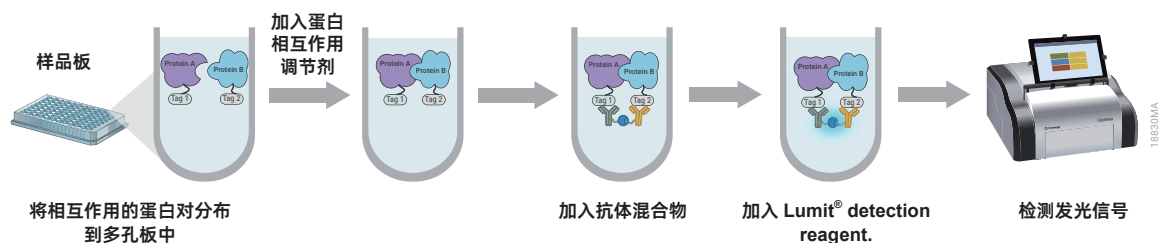


② 检测 E3 连接酶 Cbl-b 的自泛素化



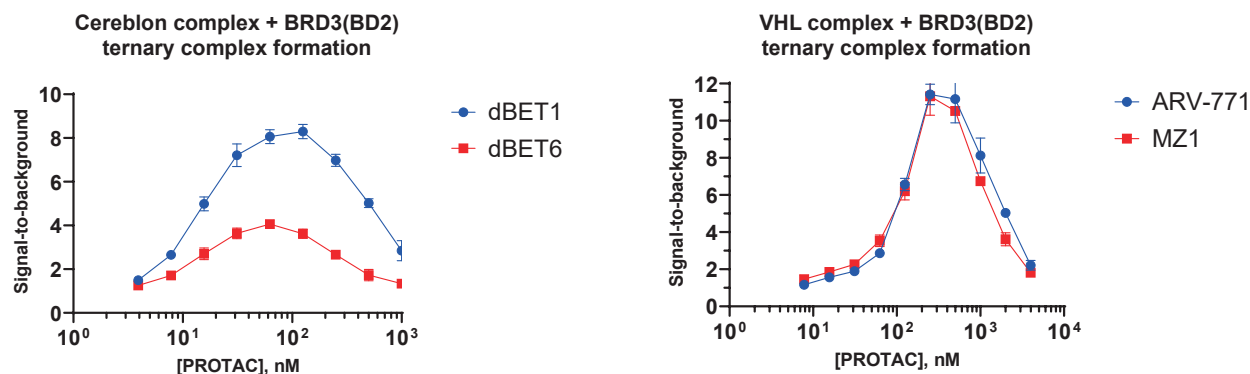
NanoBiT[®] 萤光素酶是一种结构互补性报告基因，非常适合进行相互作用研究。NanoBiT[®] 系统由两个亚基组成：大亚基（LgBiT；18kDa）和小亚基（SmBiT；11 氨基酸肽），它们可以作为重组融合蛋白表达，或通过化学方法偶联到抗体或其他感兴趣的靶标蛋白上。LgBiT 和 SmBiT 两个亚基之间的自发亲和力较弱，当 LgBiT 和 SmBiT 被融合伴侣蛋白拉近时，它们会形成一个功能性酶，在 Nano-Glo[®] 底物存在的情况下产生发光信号。

检测流程



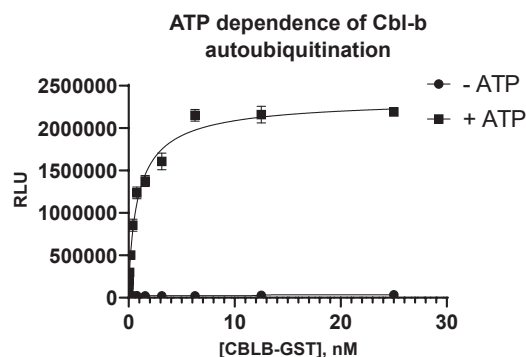
应用数据

监测三元复合物的形成



上图. 以 BRD3 (BD2) 为靶蛋白, 使用抗 FLAG-LgBiT 和抗 GST-SmBiT 的 Lumit[®] Anti-Tag Reagent 监测了 PROTAC 介导的三元复合物 (cereblon 复合物和 VHL 复合物) 形成。

监测 E3 连接酶的自泛素化



左图. 使用 Lumit[®] Anti-Tag Reagent 监测 E1、E2 和 ATP 存在情况下 E3 连接酶 Cbl-b 的自泛素化水平。在 ATP 存在情况下将 Cbl-b 与泛素激活蛋白 (UBE1) 和泛素结合蛋白 (UBCH5b) 共同孵育。并使用 Streptavidin-LgBiT 和抗 GST-SmBiT 监测了泛素化水平。与对照 (无 ATP) 条件相比, 检测窗口约为 70 倍。

检测工具

见 16 页产品列表。



降解表型研究

Degradation Phenotype

HaloPROTAC3

——快速、高效了解 and 表征新靶标降解后表型

技术原理及流程

在开发 PROTAC 前，通常需要确定合适的靶点，将其敲除后，可获得目标表型。HaloPROTAC3 可通过介导 HaloTag®（HT）融合蛋白的 VHL 介导的泛素化途径进行靶向降解，来轻松实现对降解表型的评价。

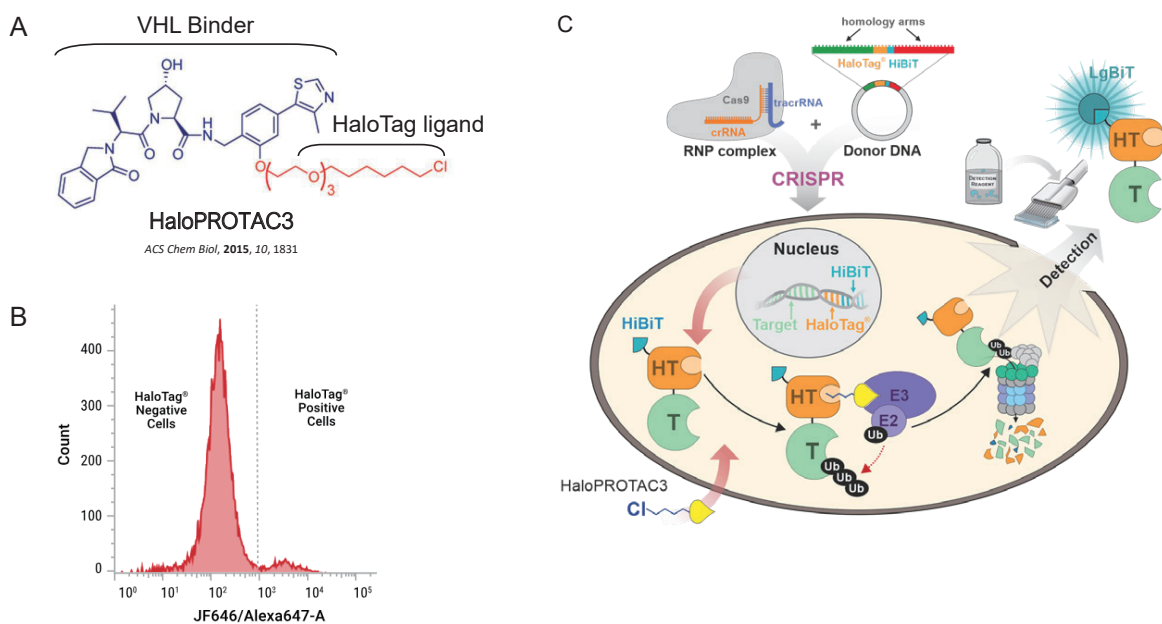


图 A. HaloPROTAC3 一端是 VHL 结合域，另一端与 Halotag 共价结合。图 B. 使用 CRISPR 技术将 HiBiT-HaloTag 标签敲入靶蛋白内源基因中，利用 Halotag 的 JF646 荧光配基，使用荧光激活细胞分选法（FACS），对细胞进行阳性克隆的分选和富集（图 C）。HaloPROTAC3 进入细胞后可以结合 Halotag 融合表达的靶蛋白，使其通过通过 VHL 介导的泛素化途径降解，使用 HiBiT 蛋白标签可检测靶蛋白的降解。

检测工具

产品	规格	目录号
HaloPROTAC3, 2.5 mM	20 µl	GA3110
Ent-HaloPROTAC3, 2.5 mM(Negative Control)	20 µl	GA4110
Janelia Fluor® 646 HaloTag® Ligand	5 µg	GA1120
	3x 5 µg	GA1121

细胞功能性分析

Cellular Functional Analysis

细胞活力、增殖、凋亡和毒性检测工具

检测靶标	产品特点	检测工具	检测信号
ATP 法裂解性检测	简称 CTG，细胞活力检测“金标准”	CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	生物发光
	单一试剂，试剂稳定性强，适合批量样本	CellTiter-Glo® 2.0 Assay	生物发光
	专用于 3D 培养样本	CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay	生物发光
活细胞还原酶	非裂解，72 小时实时监测	RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay	生物发光
活细胞蛋白酶	非裂解、可多重分析	CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	荧光
线粒体脱氢酶	简单可靠的荧光快速读数	CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	荧光
	升级版 MTS	CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	吸收光
Ki-67 蛋白	均质型、免洗、快速检测细胞增殖	Lumit® hKi-67 Immunoassay for Cell Proliferation	生物发光
PS 膜外翻	实时动态监测凋亡与坏死	RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay	生物发光 / 荧光
Caspase-3/7 活性	高灵敏度，适用于高通量检测	Caspase-Glo® 3/7 Assay	生物发光
LDH 释放	高灵敏度，可少量多次取样动态监测	LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay	生物发光
	经典方法，比放射性检测更安全，海量文献支持	CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	吸收光
膜破裂后的 DNA 荧光染色	专利荧光染料结合 DNA 双链，对细胞无毒性作用	CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	荧光
	单一染料	CellTox™ Green Express Cytotoxicity Assay	荧光

细胞代谢检测工具

- 高灵敏度、宽线性范围的生物发光检测法；
- 简单的“加入 - 混合 - 检测”操作模式，支持 384 孔板高通量检测；
- 兼容 2D / 3D 培养样本；
- 同一样品中可检测多种代谢物，并且可联合细胞活力等检测试剂进行多重叠加检测。

我们可以提供以下细胞代谢靶标检测试剂盒：

糖代谢	氨基酸代谢	脂代谢	氧化应激	线粒体功能	辅因子
- 葡萄糖摄取 - 葡萄糖 - 乳酸 - 糖原 - 胰高血糖素 - 胰岛素	- 谷氨酰胺 - 谷氨酸 - 支链氨基酸	- 甘油三酯 - 甘油 - 胆固醇 - 胆固醇酯 - β-羟基丁酸 - 脂肪酸氧化	- 谷胱甘肽 - 谷胱甘肽 / 还原型谷胱甘肽 - ROS	- ATP - 苹果酸 - 丙酮酸	- NAD/NADH - NADP/ NADPH - NAD(P)H

Lumit® 细胞因子检测工具

- 无需 ELISA 和 WB 繁琐操作
- 免洗、仅需“加入 - 读取”
- 最低 70min 即可完成检测
- 支持 96/384 孔板高通量检测

提供基于 Lumit® 免疫检测技术的 15+ 靶标即用型单独试剂盒

- 人 / 鼠 HMGB1 - 人 IFN-γ - 人 IFN-β - 人 VEGF-A - 人 IL-17A - 人 MCP-1	- 人 IL-2 - 人 IL-4 - 人 IL-6 - 人 IL-8 - 人 IL-10 - 人 IL-12	- 人 TGF-β1 - 人 TNF-α - 人 IL-1β - 人 IL-1β - 人 Active IL-18
--	--	---



下载细胞健康解决方案



下载细胞代谢解决方案



下载 Lumit® 细胞因子手册

检测仪器

Instruments

GloMax[®] 微孔板检测仪

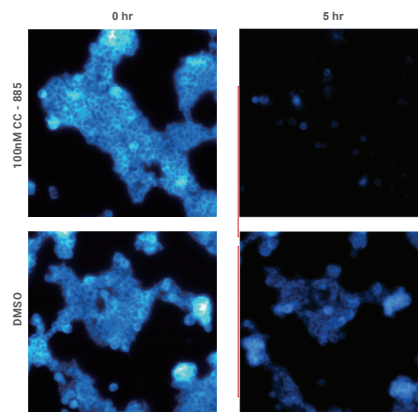
高效、易用的多功能微孔板检测仪，适用于化学发光、荧光、吸收光、BRET 和 FRET 检测。



GloMax[®] Galaxy 细胞成像仪

可视化您的蛋白降解！

支持生物发光、荧光及明场成像的细胞成像仪，搭配 NanoLuc[®] 相关工具，可实时可视化蛋白降解过程。



Targeted Protein Degradation

<https://www.promega.com.cn/applications/small-molecule-drug-discovery/protein-degradation-drug-discovery/>



关注 Promega 生命科学公众号，您可获得



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：2026.07