

使用NanoBiT技术进行的蛋白质相互作用细胞内定位成像

蛋白质相互作用 (PPI) 是两种蛋白质之间的直接物理接触。考虑到大多数细胞过程都有蛋白质参与，很少单独工作，研究成对或更大群体的蛋白质相互作用在多种研究领域都非常重要，例如药物开发和疾病研究等。有多种方法可以在不使用细胞的情况下检测蛋白质相互作用，但这些模型不能准确反映细胞内环境。此外，一些使用细胞的PPI监测方法需要裂解和专用设备才能进行定量检测。

为了克服这些挑战，Promega开发了NanoLuc Binary Technology (NanoBiT)。NanoBiT是一种结构互补报告分子系统，可用于PPI的细胞内检测。它已成功应用于药物筛选、信号传导分析和病毒感染机制分析等一系列研究领域。

该系统由一个大型BiT (LgBiT ; 17.6 kDa) 和一个小BiT (SmBiT ; 11个氨基酸) 亚基组成，它们将与目标蛋白质融合。这些亚基随后在细胞中表达，因此只有靶向PPI才能使这些亚基形成功能酶，从而产生明亮的发光信号 (图1)。

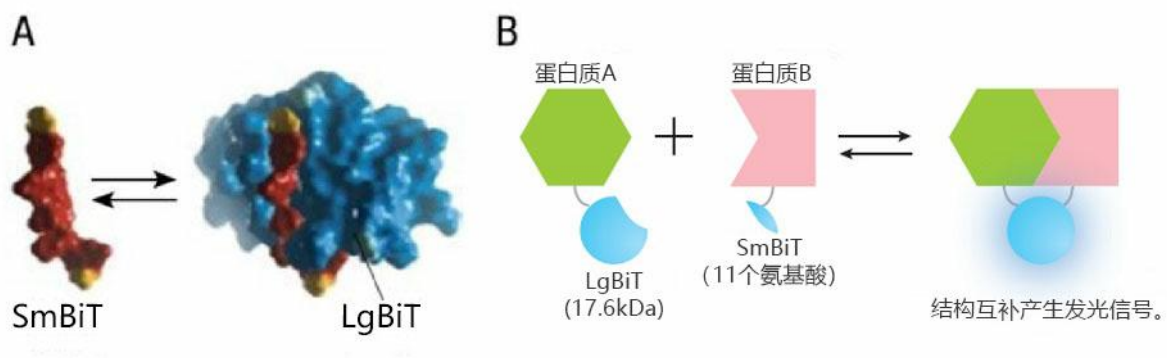


图1.NanoBiT蛋白质相互作用系统概览。

图像承蒙Promega提供。

NanoBiT的细胞内定位成像

为进行细胞溶质和核酸表达，我们将两种载体对转染到HeLa细胞中。第一对为非靶向FKBP-SmBiT控制载体和FRB-LgBiT控制载体。第二对为细胞核靶向NLS¹-FKBP-SmBiT控制载体和FRB-LgBiT控制载体（图2）。已知FKBP和FRB会在雷帕霉素治疗下结合。

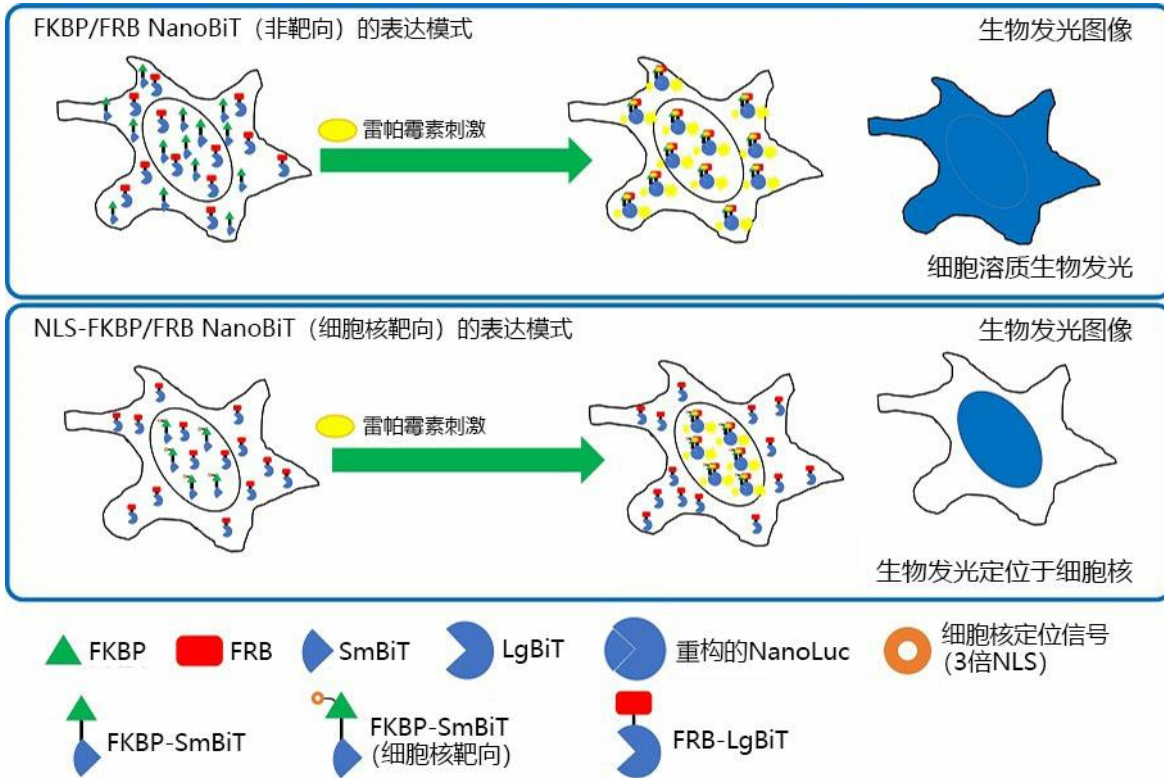


图 2.FKBP/FRB NanoBiT和NLS-FKBP/RRB NanoBiT的细胞内定位。

然后使用IXplore Live for Luminescence显微镜系统对表达NanoBiT的HeLa细胞的生物发光进行了成像²。为了确认细胞核的定位，用Hoechst33342对HeLa细胞进行了复染，并在同一显微镜上用荧光进行了成像（图3）。

我们在接收待扩散到整个细胞液中的非靶向FKBP/FRB NanoBiT的HeLa细胞中观察到了生物发光信号。但由于NLS-FKBP/FRB NanoBiT与Hoechst33342荧光染色重叠，其生物发光被证实局限于细胞核。

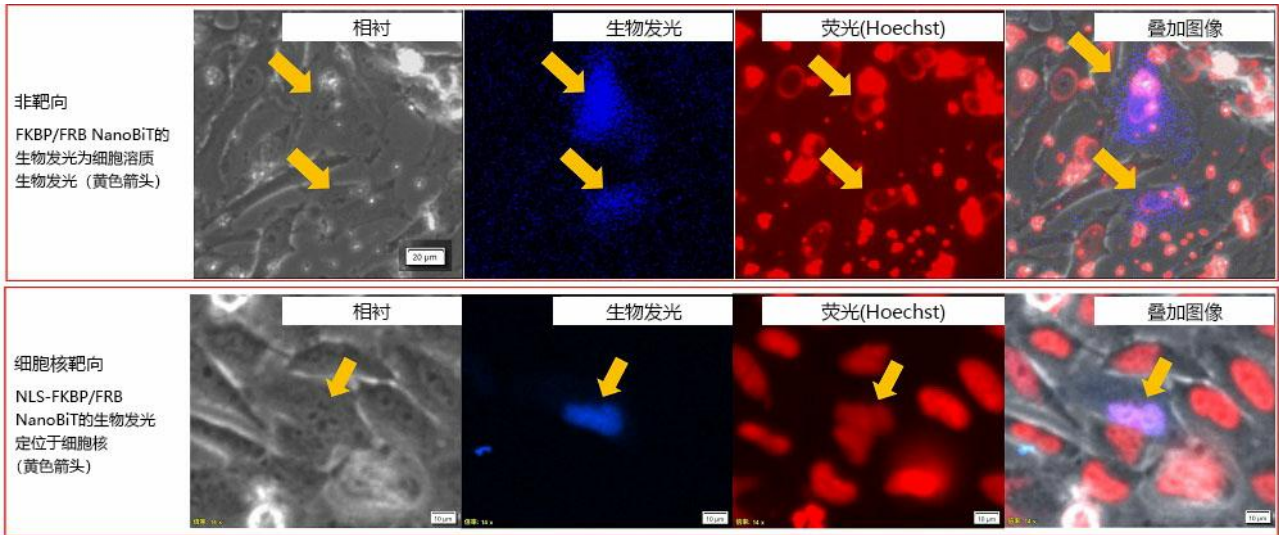


图 3.FKBP/FRB NanoBiT和NLS-FKBP/FRB NanoBiT的细胞内定位。

实验条件：

- 显微镜：IXplore Live for Luminescence显微镜系统²
- 相机：imagEM EM-CCD相机(Hamamatsu Photonics)
- 物镜：LUCPLFLN60XPH
- 成像透镜：0.35X
- EM增益：1200
- 咪喃嗪浓度：1/200稀释
- 雷帕霉素最终浓度：30 nM
- 曝光时间：相衬50 ms/生物发光3 min/荧光100 ms

图4显示了雷帕霉素刺激前后的NLS-FKBP/FRB NanoBiT生物发光变化情况。雷帕霉素刺激后细胞核内的生物发光强度增加。这些结果表明，在雷帕霉素治疗下，FKBP和FRB在细胞核内结合，这种相互作用引起了NanoLuc的生物发光。显微成像使我们能够观察到活细胞内细胞溶质和核酸生物发光强度变化，从而检测到雷帕霉素刺激引起的FKBP和FRB的相互作用。

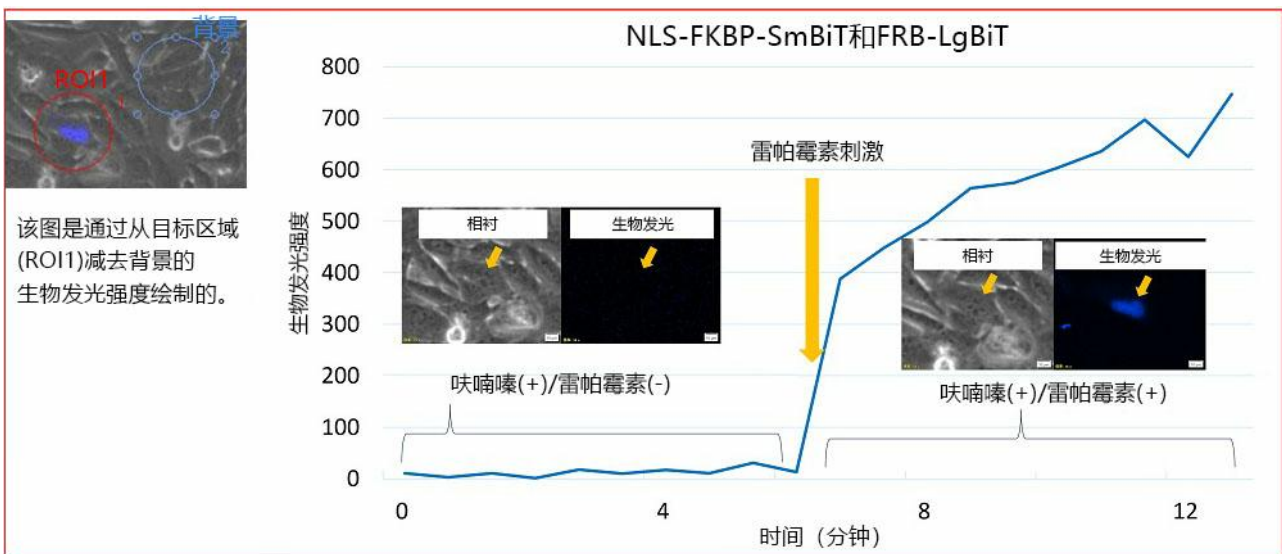


图 4.雷帕霉素刺激引起的NLS-FKBP/FRB生物发光强度变化。

实验条件：

- 载体：NLS-FKBP-SmBiT/FRB-LgBit载体（各50 ng）
- 显微镜：IXplore Live for Luminescence显微镜系统²
- 相机：imagEM EM-CCD相机(Hamamatsu Photonics)
- EM增益：1200
- 物镜：UPLFLN40XPH
- 成像透镜：0.35X
- 曝光时间：相衬50 ms/生物发光30 s/荧光100 ms
- 延时间隔：40 s

使用光度计和发光显微镜检查进行PPI探测

NanoBiT和HiBiT³技术使我们能够使用光度计探测高通量PPI，而这些技术的显微成像使我们能够可视化这些PPI的细胞内定位。

将光度计与专用发光显微镜结合起来用于PPI探测具有若干优点。观察局部发生的PPI或其细胞内定位变化时，我们可以先使用显微成像来确认定位的准确性，然后再使用光度计进行高通量测量。该系统无需额外的荧光成像便可确认细胞内定位。我们可以使用表达NanoBiT或HiBiT的同一构建细胞系来检查细胞内定位和高通量光度计探测。

作者

Taro Hayashi

Evident生物工程、高级光学生物工程、研究与开发研究员

¹细胞核定位信号（我们使用了3倍重复细胞核定位信号）。

²基于IXplore Live显微镜的生物发光成像系统。该系统是根据日本大阪大学长井教授、Tokai Hit., Co, Ltd.及Evident联合开发的成果设计的。这项工作是在日本科学技术振兴机构开发先进测量和分析系统的计划下完成的。

³用于通过使用11个氨基酸肽标签(HiBiT)和大约18 kDa NanoLuc荧光素酶片段(LgBiT)的生物发光探测靶蛋白的HiBiT技术。

相关产品



活细胞成像显微镜系统

IXplore Live

- 利用奥林巴斯实时控制器采集生理相关数据，尽可能减小细胞干扰
- 通过多种环境控制方案确保成像过程中细胞的活力
- 使用TruFocus的时间序列实验中保持精确稳定的聚焦
- 利用奥林巴斯硅油浸物镜还原真实的细胞形状

学习更多内容 ▶ <https://www.olympus-lifescience.com/microscopes/inverted/ixplore-live>

EVIDENT

lifescience.evidentscientific.com.cn

Copyright 2024 EVIDENT, All rights reserved.

Evident Corporation is certified to ISO 9001, and ISO 14001.

All specifications are subject to change without notice. All brands are trademarks or registered trademarks of their respective owners and third party entities. Evident and the Evident logo are trademarks of Evident Corporation or its subsidiaries.

联系我们

lifescience.evidentscientific.com.cn/contact-us