

NanoBRET™-TECHNOLOGIE

Messung von Protein-Protein-
Interaktionen in lebenden Zellen

NanoBRET™-Technologie

NanoBRET™ stellt eine robuste und screeningfähige Methode für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen (PPI) in lebenden Zellen dar. Die Methode eignet sich für dynamische Messungen von Proteininteraktionen und wird sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der angewandten Forschung eingesetzt. Ein Anwendungsbereich von NanoBRET™ ist hierbei der Aufbau von Biosensorzelllinien für die Aktivitätsmessung von Signalwegen.

Prinzip

NanoBRET™ beruht auf dem physikalischen Prozess des Biolumineszenz-Resonanzenergietransfers (BRET). Bei diesem Prozess wird strahlungsfrei Energie einer Donor-Luciferase auf ein Akzeptor-Fluorophor übertragen, das in Folge der Anregung längerwelliges Licht emittiert. Herzstück der NanoBRET™-Technologie stellt die Kombination aus der äußerst lichtintensiven NanoLuc®-Luciferase mit dem spektral-angepassten NanoBRET™ Liganden 618 dar (siehe Abbildungen 1+2). Diese Kombination erlaubt den Aufbau von robusten Proteininteraktionsassays mit einem exzellenten Signal/Hintergrundverhältnis.

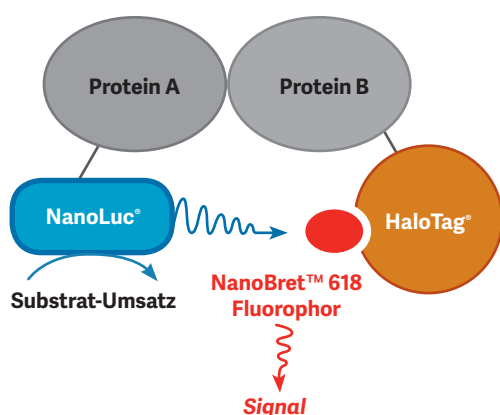


Abb. 1: Für den Nachweis der Protein-Protein-Interaktion werden die Proteinpartner (A, B) als Fusionsproteine mit NanoLuc® bzw. HaloTag® exprimiert. Befinden sich die Interaktionspartner in räumlicher Nähe (< 10 nm) zueinander, wird das NanoBRET™ 618 Fluorophor durch die NanoLuc®-Luciferase angeregt.

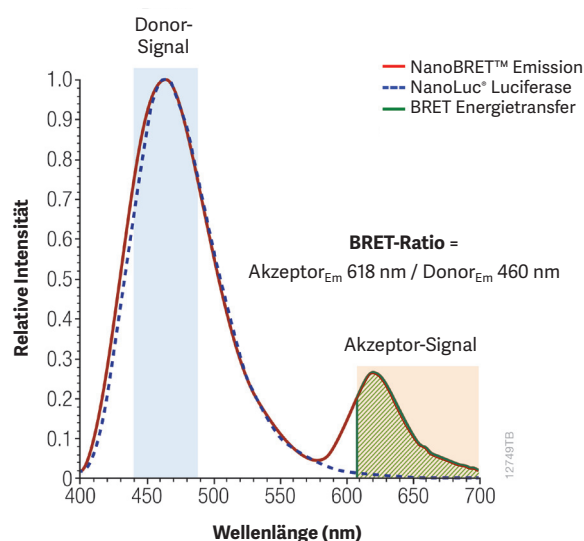


Abb. 2: Die Donor-Emission (NanoLuc®) und die Akzeptor-Emission (HaloTag® NanoBRET™-Ligand 618) sind spektral weit voneinander getrennt (175 nm). Die Lichtemission wird im Donor- und Akzeptorkanal mit einem 460 nm Bandpassfilter bzw. 610 nm Langpassfilter gemessen. Die BRET-Ratio wird durch die Quotientenbildung aus Akzeptorsignal und Donorsignal ermittelt.

Eigenschaften

Lebendzell-Assay: Messung von Protein-Protein-Interaktionen im biologischen Kontext.

Robust: Geringe Assay-Variabilität und hohe Reproduzierbarkeit (hoher Z'-Faktor).

Physiologische Expressionslevel: Lichtintensive NanoLuc® ermöglicht den Aufbau von NanoBRET™-Assays mit schwachen Promotern für geringe Expressionslevel.

Hochdurchsatz-geeignet: 96- oder 384-weil Platten.

Ratiometrischer Assay: Keine weitere Normalisierung gegen Zellzahl/Proteingehalt notwendig.

Sensitivität/Linearer Messbereich: Deutlich verbessert gegenüber konventionellen BRET-Methoden durch weite spektrale Trennung der Donor- und Akzeptor-Emission.

Intrinsische Negativkontrolle: Keine separate "Donor-Only" Transfektion notwendig.

Anwendung von NanoBRET™

Die NanoBRET™-Technologie ermöglicht in lebenden Zellen die Messung der Protein-Protein-Assoziation und -Dissoziation. Deshalb ist sie besonders geeignet für Induktions- bzw. Inhibitions-Experimente.

Anwendungsbereiche

- Small Molecule/ Off-Target Screening
- Peptide Library Screening
- Validierung von *in vitro* Daten
- Kinetik-Messungen
- Dosis-Wirkungs-Messungen
- Biosensor-Zelllinien

Liganden-induzierte Proteininteraktion am Beispiel von β -Arrestin 2 und Vasopressin-Rezeptor 2

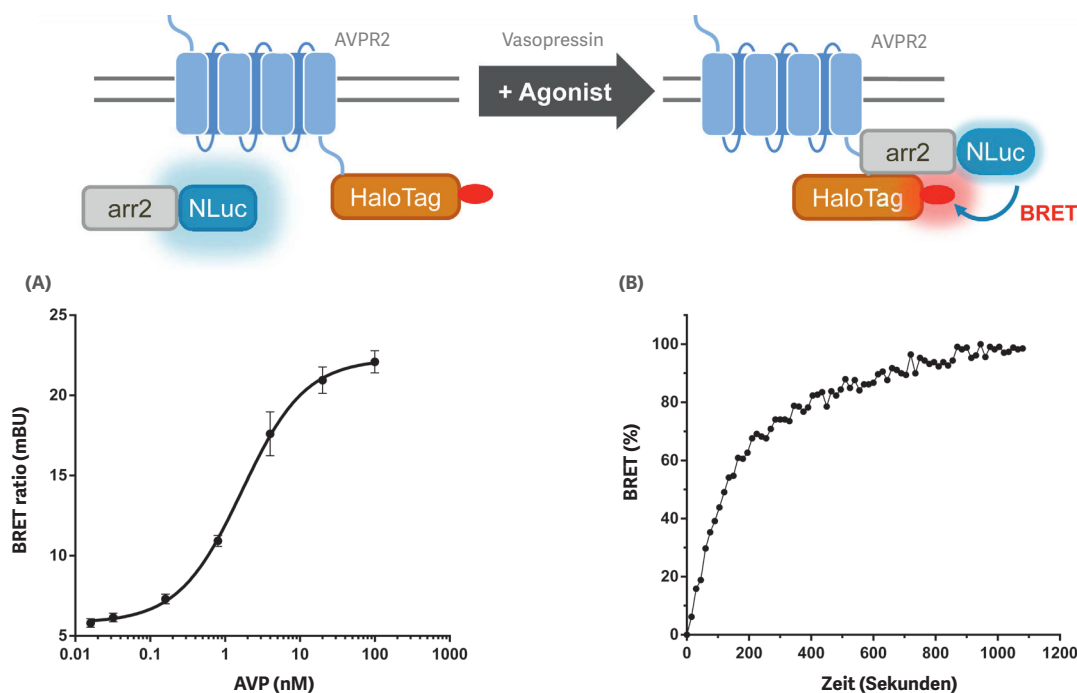


Abb. 3: (A) Dosisabhängige und (B) zeitabhängige Rekrutierung von β -Arrestin 2 (arr2) an den Vasopressin-Rezeptor 2 (AVPR2) nach Zugabe des Peptidhormons Vasopressin (AVP).

Inhibitionsexperiment am Beispiel der p53:MDM2-Interaktion

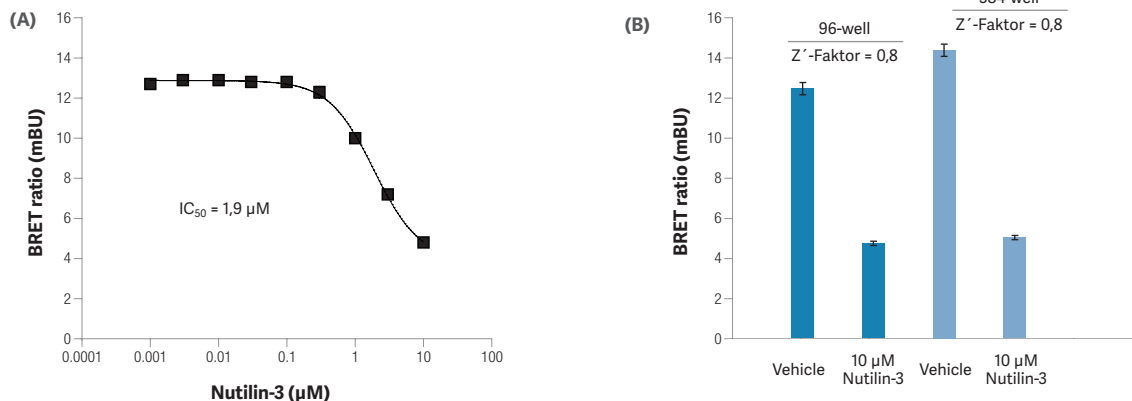


Abb. 4: (A) Dosisabhängige Inhibition der p53:MDM2-Interaktion durch Nutilin-3. (B) Effekt einer Einzeldosis Nutilin-3 auf die p53:MDM2-Interaktion in 96-well bzw. 384-well mit entsprechenden Z' -Faktoren.

"Ready-to-use" NanoBRET™ Proteininteraktions-Assays

Mit den gebrauchsfertigen und optimierten NanoBRET™ Proteininteraktions-Assays können Sie direkt durchstarten. Die in den Proteininteraktions-Assays enthaltenen Vektorkonstrukte wurden experimentell validiert und sind für eine Reihe interessanter Targets erhältlich.

- **Epigenetische Protein-Assays**, z.B. für die Analyse der Bromodomäne:Histon-Interaktion
- **Signalprotein-Assays**, z.B. Kras/Braf
- **Kinase-Assays**, z.B. ERK/ELK
- **Transkriptionsfaktor-Assays**, z.B. cMyc/Max
- **Membranprotein-Assays**, z.B. EGFR/GRB2
- **RNA-Bindungsprotein-Assays**, z.B. hnRNPA/hnRNPF

Assays im Internet

Eine komplette Liste der "Ready-to-use" und optimierten NanoBRET™-Assays ist erhältlich unter: www.promega.com/nanobret

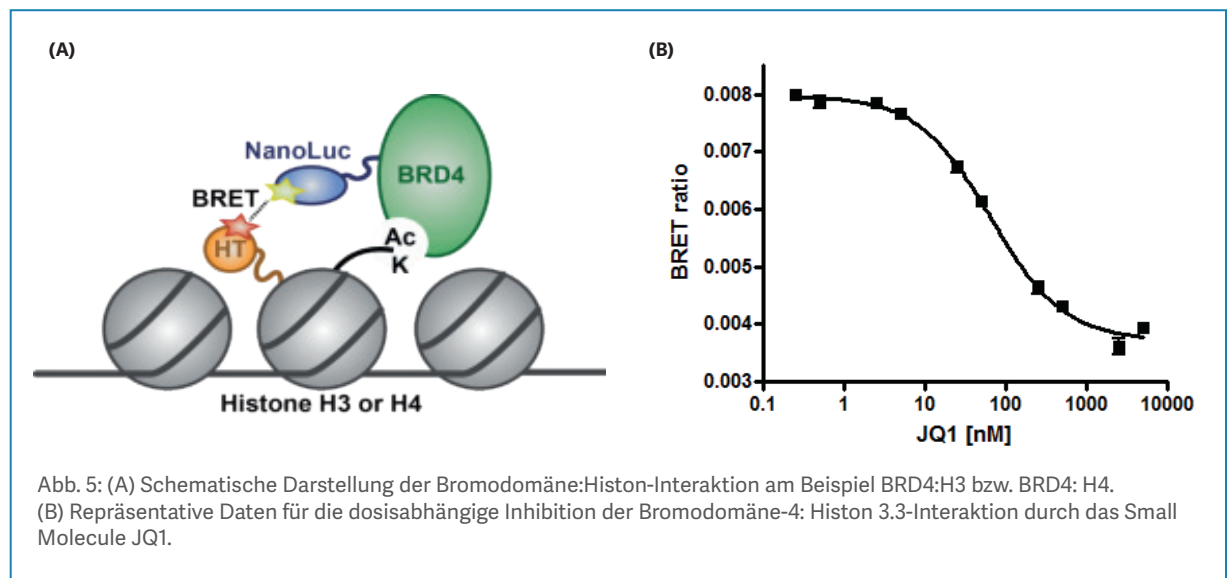


Abb. 5: (A) Schematische Darstellung der Bromodomäne:Histon-Interaktion am Beispiel BRD4:H3 bzw. BRD4: H4. (B) Repräsentative Daten für die dosisabhängige Inhibition der Bromodomäne-4: Histon 3.3-Interaktion durch das Small Molecule JQ1.

"Ready-to-use" NanoBRET™-Assays	Größe	Kat.Nr.
NanoBRET™ BRD4/Histone H3.3 Interaction Assay	je 1x*	N1830
NanoBRET™ BRD4/Histone H4 Interaction Assay	je 1x*	N1890
NanoBRET™ BRD9/Histone H3.3 Interaction Assay	je 1x*	N1840
NanoBRET™ BRD9/Histone H4 Interaction Assay	je 1x*	N1900
NanoBRET™ CBP/Histone H3.3 Interaction Assay	je 1x*	N1850
NanoBRET™ BRPF1/Histone H3.3 Interaction Assay	je 1x*	N1860
NanoBRET™ BRPF1/Histone H4 Interaction Assay	je 1x*	N1910
NanoBRET™ cMyc/MAX Interaction Assay	je 1x*	N1870
NanoBRET™ KRas/BRAF Interaction Assay	je 1x*	N1880
NanoBRET™ PPI Control Pair (p53,MDM2)	je 1x*	N1641

* Alle "Ready-to-use" NanoBRET™-Assays enthalten neben den optimierten Vektorkonstrukten, das Kontrollpaar p53/MDM2 und Reagenzien für 200 Assays (96-well). Eine vollständige Liste der "Ready-to-use" NanoBRET™-Assays abrufen unter: www.promega.com/nanobret

NanoBRET™ Starter Systeme

Zur Herstellung und Untersuchung eigener Proteinpaare verwenden Sie die NanoBRET™ Starter Systeme. Die Systeme enthalten alle notwendigen Vektoren für die Herstellung N- bzw. C-terminaler Fusionskonstrukte mit NanoLuc® und HaloTag®. Zusätzlich umfassen die Starter-Systeme Detektionsreagenzien für 200 Assays (96-well) bzw. 500 Assays (384-well) und ein NanoBRET™-Kontrollpaar (p53-HaloTag® und NanoLuc®-MDM2).

NanoBRET™ PPI Flexi® Starter System

Das Flexi® Starter System enthält Vektoren für die gerichtete Klonierung auf Basis der Restriktionsenzyme Sgf1 und Pme1. Dieses System ist optimal für die schnelle Generierung von N- bzw. C-terminalen NanoLuc®- und HaloTag®-Fusionskonstrukten.

Voraussetzung für die Verwendung des Flexi®-Systems ist, dass weder Sgf1 noch Pme1 in dem zu klonierenden Insert schneiden. Im ersten Schritt wird das Insert über Sgf1/Pme1 in den pFN21A HaloTag® Vektor kloniert. Ausgehend von diesem Vektorkonstrukt werden über einfache Transferreaktionen die verbleibenden N- und C-terminalen NanoLuc®- und HaloTag®-Fusionen erstellt.

Bei der Verwendung des Flexi® Starter Systems ist die Klonierung des offenen Leserasters unter der richtigen Positionierung des jeweiligen Start- und Stop-Codons garantiert.

NanoBRET™ PPI MCS Starter System

Die Erstellung der N- und C-terminalen Fusionskonstrukte mit Hilfe des Multiple Cloning Site (MCS) Starter Systems erfordert die Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme. Bei dieser traditionellen Klonierung achtet der Anwender selbst darauf, dass der offene Leseraster erhalten bleibt und die entsprechenden Start- und Stop-Codons richtig positioniert sind.

Sparen Sie Zeit und finden Sie Ihre
Flexi-kompatiblen "Ready-to-use"
ORF-Klone in Find My Gene™!
www.promega.com/findmygene

NanoBRET™ Starter Kits	Größe	Kat.Nr.
NanoBRET™ PPI Flexi® Starter System N1321: pFN31K Nluc CMV-neo Flexi® Vector N1341: pFC32K Nluc CMV-neo Flexi® Vector G2821: pFN21A HaloTag® CMV Flexi® Vector G9661: pFC14K HaloTag® CMV Flexi® Vector N1641: NanoBRET™ PPI Control Pair (p53, MDM2) N1661: NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System (200 Assays)	je 1x*	N1821
NanoBRET™ PPI MCS Starter System N1351: pNLF1-N [CMV/Hygro] Vector N1361: pNLF1-C [CMV/Hygro] Vector G7721: pHTN HaloTag® CMV-neo Vector G7711: pHTC HaloTag® CMV-neo Vector N1641: NanoBRET™ PPI Control Pair (p53, MDM2) N1661: NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System (200 Assays)	je 1x*	N1811

Für weitere Informationen kontaktieren Sie uns bitte unter promega_info@promega.com

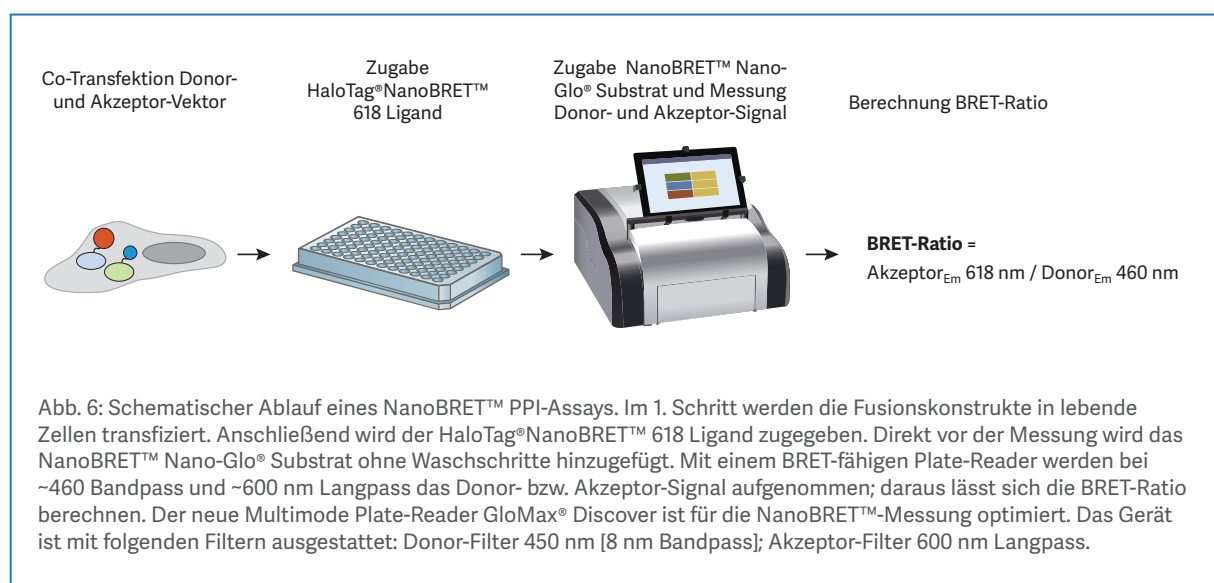
NanoBRET™ Nano-Glo® Detektionsreagenzien

Das NanoBRET™ Detektionssystem beinhaltet das Substrat für die NanoLuc®-Luciferase (NanoBRET™ Nano-Glo® Substrat) und den fluoreszenten HaloTag®NanoBRET™ 618 Liganden, der nach Zugabe ins Medium kovalent an HaloTag® bindet. Das Detektionssystem ist in drei unterschiedlichen Größen erhältlich.

Bestellinformation: NanoBRET™ Nano-Glo® Detektionsreagenzien

Produkt	Größe	Kat.Nr.
NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System	200 Assays / 96-well-Platten 500 Assays / 384-well-Platten	N1661
NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System	1.000 Assays / 96-well-Platten 2.500 Assays / 384-well-Platten	N1662
NanoBRET™ Nano-Glo® Detection System	10.000 Assays / 96-well-Platten 25.000 Assays / 384-well-Platten	N1663

NanoBRET™ Assay Workflow



Primärliteratur NanoBRET™

Machleidt, T. et al. (2015) NanoBRET- A Novel BRET Platform for the Analysis of Protein:Protein Interactions. ACS Chem Biol. 2015 Jun 9.

Demont, E.H. et al. (2014) 1,3-Dimethyl Benzimidazolones Are Potent, Selective Inhibitors of the BRPF1 Bromodomain. ACS Med Chem Lett. 5(11):1190-5

Wang, J. et al. (2015) Activation of Rab8 guanine nucleotide exchange factor Rabin8 by ERK1/2 in response to EGF signaling. Proc Natl Acad Sci. 112 (1), 148–53.

Clark, P.G. et al. (2015) LP99: Discovery and Synthesis of the First Selective BRD7/9 Bromodomain Inhibitor. Angew Chem Int Ed Engl. 54(21):6217-21.

Für weitere Informationen kontaktieren Sie uns bitte unter promega_info@promega.com

Detektion von NanoBRET™

Für die Detektion von NanoBRET™ wird ein BRET-fähiger Plate-Reader benötigt, der sequentiell gefilterte Lumineszenz über zwei Emissionsfilter misst. Im Allgemeinen empfehlen wir für die Messung im Donorkanal einen Bandpassfilter im Bereich von ~ 450–460 nm und für die Messung im Akzeptorkanal einen Langpassfilter im Bereich von ~ 600–610 nm.

Der neue Multimode Plate-Reader GloMax® Discover ist für die Messung von NanoBRET™ optimiert. Das Gerät ist für die Messung im Donorkanal mit einem 450 nm [8 nm Bandpass] und für die Messung im Akzeptorkanal mit einem 600 nm Langpassfilter ausgestattet.



GloMax DISCOVER

High-Performance Multimode Plate-Reader für Lumineszenz, Fluoreszenz, Absorption, BRET und FRET. Einfach in der Handhabung

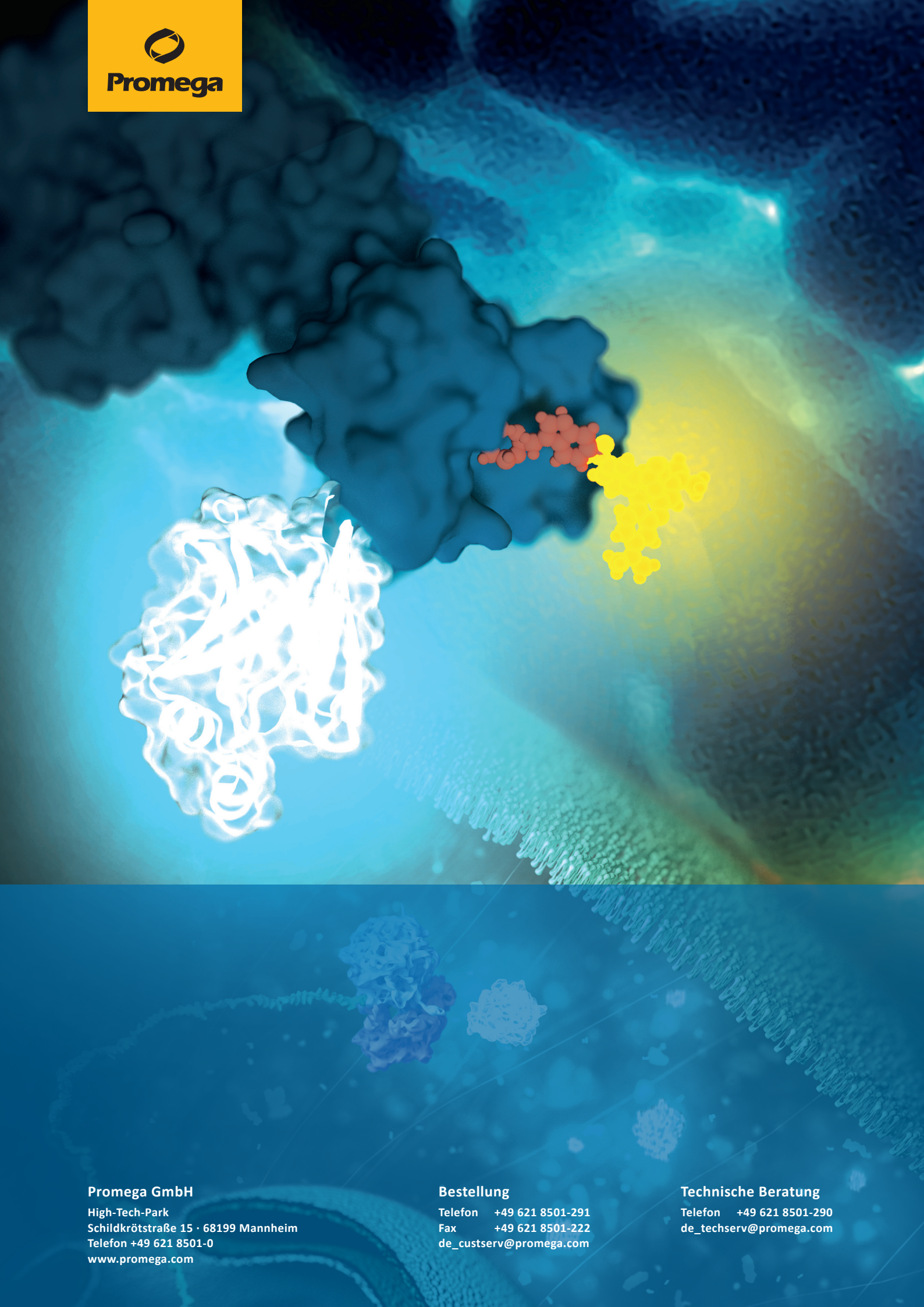
Das GloMax® Discover ermöglicht die Detektion von Lumineszenz, Fluoreszenz, UV/Visible, Absorption, BRET, FRET sowie die Messung gefilterter Lumineszenz. Dieser High-Performance-Reader liest die gängigen Plattenformate 6-, 96- und 384-well mit sehr hoher Empfindlichkeit und über einen breiten linearen Messbereich.

Das System ist über einen integrierten Tablet-PC sehr einfach zu bedienen und kann in einen automatisierten Workflow eingebunden werden.

Vielseitige Anwendungen:

- Reportergen-Assays
- Zellviabilitäts-, Zytotoxizitäts- und Apoptose-Assays
- Kinetik-Messungen
- Multiplexing
- Assays zum Nachweis von oxidativem Stress und Zellmetabolismus
- ELISA
- BRET/FRET-Analysen

Lassen Sie sich individuell beraten und reservieren Sie sich jetzt schon eine Demo unter:
www.promega.de/discover



Promega GmbH

High-Tech-Park
Schildkrötstraße 15 · 68199 Mannheim
Telefon +49 621 8501-0
www.promega.com

Bestellung

Telefon +49 621 8501-291
Fax +49 621 8501-222
de_custserv@promega.com

Technische Beratung

Telefon +49 621 8501-290
de_techserv@promega.com