



**Monolith™ RED-NHS 二代蛋白标记试剂盒**  
适用于配置红光检测器的 Monolith™ NT.115 系列和 NT. Automated

**Cat# MO-L011**

# Content

1 关于试剂盒 .....	2
2 标记方案 .....	3
3 缓冲液置换 .....	4
4 蛋白标记及纯化 .....	6
5 浓度和标记效率计算 (DOL) .....	10
6 常见问题 .....	11
7 注释 .....	13
8 安全信息 .....	14
9 购买须知 .....	15

# 1. 关于试剂盒

Monolith™ RED-NHS 二代蛋白标记试剂盒是用于标记和纯化分子质量超过 5 kDa 的蛋白的最优选择。其中，RED 染料所携带的 NHS- 酯可以与一级氨基（赖氨酸残基）发生共价结合，适用于配置红光检测器 (Nano 和 Pico) 的 Monolith™ NT.115 系列和 NT. Automated 系列仪器。试剂盒中提供蛋白标记四步反应所需的各项材料。

试剂盒中材料及其参数	数量	储存条件
 <b>RED-NHS 二代染料 (10 μg)</b> 携带 NHS- 酯，可以与一级氨基（赖氨酸残基）发生共价结合。	4	-20 °C
 <b>标记缓冲液 NHS</b> 缓冲液包括 130 mM NaHCO <sub>3</sub> ，50 mM NaCl，室温条件下 pH 8.2-8.3。	4	4 °C
 <b>A- 柱</b> 试剂盒中提供的 A- 柱用于蛋白样品（分子质量 >5 kDa）的缓冲液置换，蛋白量应控制在 40-100 μL 范围内。	4	4 °C
 <b>B- 柱</b> 试剂盒中提供的 B- 柱用于蛋白样品（分子质量 >5 kDa）的纯化。	4	4 °C
 <b>适配器（适用于 15 mL 离心管）</b>	2	RT



- \* 以恰当方式储存，使用前再将组分置于室温。
- \* 若妥当储存，试剂盒各组分的保质期大约为 12 个月。
- \* 切忌超过建议的离心时间和转速。

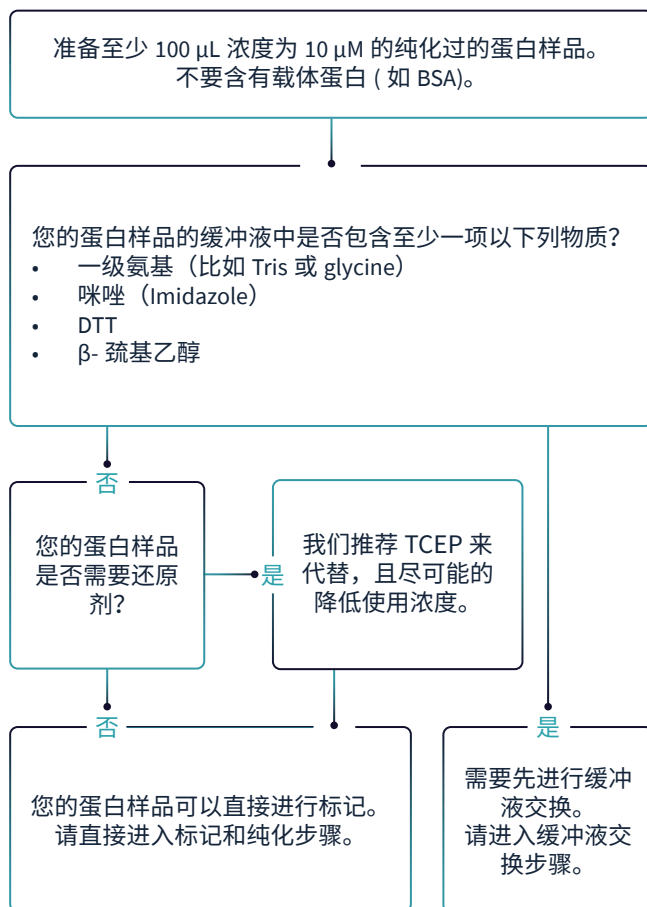


如需帮助，请随时关注NanoTemper微信公众号  
或关注NanoTemper Explorer论坛  
[nanotempertech.com/explore](https://nanotempertech.com/explore)



## 2. 标记方案

在开始标记您的蛋白之前，请确保您的蛋白样品缓冲液与试剂盒兼容。请参考以下的决策进程图来决定您的样品是否需要进行**缓冲液置换**，或是可以直接进行**蛋白标记和纯化**。



### 3. 缓冲液置换

如果蛋白样品溶解在不兼容的缓冲液中，您需要首先进行缓冲液置换。确保您的蛋白样品不含有一级氨基（比如 Tris 和 glycine），咪唑，DTT 或β- 巯基乙醇。除此之外，样品的 pH 需控制在 8.2–8.5 范围内。



如果您的蛋白样品溶解在与标记兼容的缓冲液中，可忽略缓冲液置换步骤直接进行**标记和纯化**。

切勿超过推荐使用的离心时间和速度。

蛋白浓度单位转换公式（mg/mL 至 μM）如下所示：

$$\text{浓度 } (\mu\text{M}) = \frac{1000 \times \text{浓度 } (\text{mg/mL})}{\text{分子量 } (\text{kDa})}$$

#### 所需材料

#### 数量



##### 标记缓冲液 NHS

1

使用前加入 3 mL 双蒸水配制新鲜的缓冲液。室温下缓冲液 pH 应在 8.2–8.3。

缓冲液置换步骤只需使用 1 mL NHS 缓冲液。剩余的 2 mL 将用于标记蛋白。



##### A 柱

1

试剂盒中提供的 A- 柱用于蛋白样品（分子质量 >5 kDa）的缓冲液置换，其中样品量应控制在 40–100 μL 范围内。

10 μM 高纯度蛋白样品

100 μL

1.5 mL 微型离心管

2

变速台式离心机（最低转速 1500 g）

1

## 缓冲液置换操作



轻轻倒置 **A-柱** 三次，使其中液体重新悬浮。



拧下底部盖子，并取下上部瓶盖。



将 **A-柱** 放置于洁净的 1.5 mL 离心管内，1500 *g* 离心 1 min 去除柱中的液体。



弃掉离心管中的液体并重新将 **A-柱** 放置于离心管中。



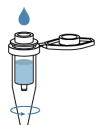
向 **A-柱** 中心加入 300  $\mu\text{L}$  **标记缓冲液 NHS**。操作时请小心将缓冲液直接加入到 **A-柱** 中心的树脂。切勿使缓冲液沾碰柱子内壁或戳破树脂。

1500 *g* 离心 1 min，弃去旋出液。

**重复该步骤 3 次。**



将 **A-柱** 重置于新的洁净的 1.5 mL 离心管中。



取 100  $\mu\text{L}$  预先准备的 10  $\mu\text{M}$  高纯度蛋白样品置于离心柱中心树脂。

1500 *g* 离心 2 min。



此时蛋白样品已经收集到离心管中。

可弃去使用过的 **A-柱**。

## 4. 蛋白标记及纯化

现在，您可以进行蛋白标记和纯化了。



在开始标记前，请确保蛋白样品的浓度在 10  $\mu\text{M}$  左右。如果存在显著差异，请参考“常见问题”获得解决方法。

如果您的蛋白样品过浓，我们建议您使用**标记缓冲液 NHS** 对其进行稀释，以确保能与操作手册兼容。

蛋白浓度单位转换公式（mg/mL 至  $\mu\text{M}$ ）如下所示：

$$\text{浓度 } (\mu\text{M}) = \frac{1000 \times \text{浓度 } (\text{mg/mL})}{\text{分子量 } (\text{kDa})}$$

### 所需材料

### 数量



#### RED-NHS 二代染料

1

使用前加入 25  $\mu\text{L}$  的 DMSO（确保新鲜），用移液枪轻轻吸打数次使其完全溶解。染料终浓度为 600  $\mu\text{M}$ 。



#### 标记缓冲液 NHS

1

如果您进行了缓冲液置换，使用剩余的 2 mL 标记缓冲液进行此步骤；

如果之前没有进行缓冲液置换，加入 3 mL 双蒸水配制新鲜的缓冲液。并确保室温下缓冲液 pH 在 8.2–8.3 之间。



#### B- 柱

1

试剂盒中提供的 B- 柱用于蛋白样品（分子质量 >5 kDa）的纯化。



#### 适配器（适用于 15 mL 离心管）

1

1.5 mL 离心管

3

15 mL 离心管

1

10  $\mu\text{M}$  高纯度蛋白样品

90  $\mu\text{L}$

100% DMSO

30  $\mu\text{L}$

结合反应缓冲液

12 mL

变速台式离心机（最低转速 1500 g）

1



进行 DMSO 及染料的操作时必须佩戴手套。

确保实验时使用新鲜配制的染料。

切勿使用涡旋振荡处理蛋白样品，因为它可能会破坏蛋白样品的完整性。  
请使用移液枪轻轻吸打混匀。

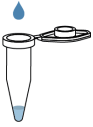


不要超过建议的孵育时间。

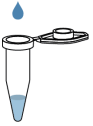
如果标记过程需要使用还原剂，请使用 TCEP 来代替。

标记步骤中 DMSO 的使用终浓度不可超过 5%。

## 蛋白标记操作步骤



取一只新的洁净的 1.5 mL 离心管，加入 7  $\mu$ L 新配制的 **RED-NHS 二代染料**与 7  $\mu$ L **NHS 标记缓冲液**，用移液枪轻轻吸打混合均匀，获得终浓度为 300  $\mu$ M 的染料溶液。



另取一只洁净的 1.5 mL 离心管，加入 90  $\mu$ L 准备好的蛋白样品（浓度 10  $\mu$ M）。取 10  $\mu$ L 的上述 300  $\mu$ M 染料溶液加入到样品中，用移液枪轻轻吸打数次混合均匀，获得 100  $\mu$ L 染料 - 蛋白溶液。此时溶液中染料浓度为蛋白浓度的三倍。

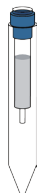


室温下黑暗处避光孵育 30 min。

## 在孵育的同时，平衡 B- 柱（约 20 min）



取下 **B- 柱** 顶部盖子，将其中液体倒出。随后取下下部盖子。将两个盖子放置一旁留用，切勿丢弃。



用提供的**适配器**替换 15 mL 离心管的盖子。将 B- 柱从适配器顶部套入离心管中。



在 B- 柱中加满结合反应缓冲液，以平衡 B- 柱，缓冲液在重力作用下流过树脂。弃去管中收集到的液体。

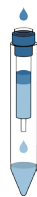
**继续重复该步骤三次。**

四个平衡步骤总共需要使用大约 8-10 mL 结合反应缓冲液。弃去最后一次管中收集到的液体后继续下一步实验。



如果平衡 B- 柱的实验完成后，30 min 的孵育还未结束，**请将柱子的盖子重新盖上以防树脂失水变干。**

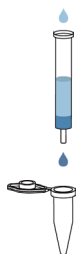
## 纯化已标记的蛋白，去除未反应的染料



在蛋白标记步骤完成后，转移 100  $\mu\text{L}$  染料 - 蛋白标记反应溶液至平衡好的 B- 柱中。请小心将溶液直接加入到 B- 柱中心的树脂。切勿使溶液沾碰柱子内壁。待液体完全进入树脂。



向 B- 柱中加入 550  $\mu\text{L}$  结合反应缓冲液，缓冲液在重力作用下完全穿过树脂。准备一只洁净的 1.5 mL 离心管收集标记好的蛋白样品。



将 B- 柱置于新的 1.5 mL 离心管中，加入 450  $\mu\text{L}$  结合反应缓冲液，收集滤出的含有标记蛋白的液体。请小心将溶液直接加入到 B- 柱中心的树脂，切勿使溶液沾碰柱子内壁。



大多数标记过的蛋白在液氮或者  $-80^{\circ}\text{C}$  条件下可分装储存数周。切勿反复冻融。

## 5. 浓度和标记效率计算 (DOL)

我们建议在进行 MST 检测实验前计算您的蛋白浓度及标记效率 (DOL)。标记效率 (DOL) 可表征染料分子与蛋白样品的结合程度，比如，当 DOL = 1 时表示染料和蛋白的比为 1:1。



- 测量  $A_{280}$  和  $A_{650}$  (280 nm 和 650 nm 处的吸收值)。
- 如果您的蛋白不包括色氨酸或赖氨酸残基，也可以测量  $A_{205}$  来代替  $A_{280}$  和  $A_{650}$ ，205 nm 处的吸收主要是由肽键引起的。
- 由于不同的分光光度计的灵敏度以及您的样品浓度差异，可能会超出检测范围。

分光光度计的典型路径长度  $d$  为 1 cm。

280 nm 处的校正系数为：0.04

205 nm 处的校正系数为：0.19

染料的摩尔吸光度为：195,000  $M^{-1}cm^{-1}$

### 280 nm处的浓度测定

$\epsilon_{Protein}$ ：蛋白样品的消光系数。

$A_{280}$  和  $A_{650}$ ：280 nm 和 650 nm 的吸收值。

用以下公式计算浓度：

$$c(M) = \frac{A_{280} - (A_{650} \times 0.04)}{\epsilon_{Protein} \times d}$$

### 205 nm处的浓度测定

$MW_{Protein}$ ：所测蛋白的分子质量。

$A_{205}$  和  $A_{650}$ ：205 nm 和 650 nm 的吸收值。

用以下公式计算浓度：

$$c(M) = \frac{A_{205} - (A_{650} \times 0.19)}{31 \times MW_{Protein(Da)}}$$

标记效率 (DOL) 的计算可使用以下公式：

$$DOL = \frac{A_{650}}{195,000M^{-1}cm^{-1} \times c(M)}$$



- 纯化后的蛋白质产量一般为 50% ~ 70%。
- 理想的 DOL 在 0.5-1 之间。
- 对于大多数蛋白质来说，需要避免 DOL 超过 1，因为它可能会对蛋白质功能造成负面影响。
- DOL 低于 0.5 的情况也需要避免，因为他可能导致信噪比降低。更多细节请参考“常见问题”。
- 为了得到最好的 MST 实验结果，对于 Nano 探测器，RED-NHS 二代染料标记的蛋白浓度最好不低于 20 nM，对于 Pico 探测器，浓度不低于 5 nM。
- 始终使用最新版本的 MO.Control 软件制定最优的 MST 检测方案。

## 6. 常见问题

### 6.1 我是否能使用标记缓冲液 NHS 之外的其他缓冲液？

试剂盒中所提供的标记缓冲液 NHS 是反应的首选。它是一种碳酸盐缓冲液，室温下 pH 在 8.2–8.3 之间。您也可以选择任意一种不含有一级氨基、咪唑、DTT 或β- 巯基乙醇的缓冲液。使用这些溶液可能会降低标记效率。如果你想实现对氨基端更精细的标记，请使用接近中性 pH 的缓冲液，因为末端氨基的 pKa 值低于赖氨酸的ε-amino 基团。

### 6.2 如果需要进行标记的蛋白样品浓度不是推荐使用的 10 μM，我应当如何进行调整？

下表展示了如果样品浓度不为 10 μM 时对应的染料溶剂的调整策略。但是对于浓度低于 2 μM 的蛋白样品我们不推荐对其进行标记。



用 25 μL DMSO 溶解染料，获得浓度为 600 μM 的溶剂。  
使用下面的公式计算染料和缓冲液所需的体积。

蛋白浓度 (μM)	染料 / 蛋白	染料浓度 (μM)
2–5	5-fold	10–25
6–10	3-fold	18–30
11–20	2-fold	22–40

RED-NHS 二代染料体积的计算可以使用以下公式：

$$Volume_{Dye} (\mu L) = \frac{Concentration_{Protein} (\mu M) \times Dye_{excess}}{600 \mu M} \times 100 \mu L$$

标记缓冲液 NHS 体积的计算可以使用以下公式：

$$Volume_{Buffer} (\mu L) = 10 \mu L - Volume_{Dye} (\mu L)$$



按照上述公式计算 NHS 标记缓冲液和新配制的 RED-NHS 二代染料的体积，将两者混合均匀。

取 10 μL 上述染料溶液 (100–400 μM) 加入到 90 μL 待测的蛋白样品中。用移液枪轻轻吸打数次混合均匀。  
室温下黑暗处避光孵育 30 min 后继续进行蛋白标记和纯化步骤。

### 6.3 我是否可以提高标记反应的体积？

是的，您可以增加到 500  $\mu\text{L}$ ，这是所提供的 B- 柱的最大体积。您可以待样品滤过树脂后加入平衡缓冲液调节体积到 650  $\mu\text{L}$ 。

### 6.4 计算得到的 DOL 显著高于推荐值？是什么原因？

如果您计算所得的 DOL 显著高于推荐值，蛋白很有可能被过度标记了。可以尝试降低染料 / 蛋白的比例。

### 6.5 计算得到的 DOL 显著低于常规值是什么原因？

如果您计算得到的 DOL 显著低于推荐值，蛋白很有可能没有完全被标记。这里列出了一些可能的原因和对应的解决方案。

原因	解释	解决方法
NHS 酯未发生反应。	NHS 酯在 pH 为 8.6 时的半衰期仅为 10 min，pH 为 8 时为 1 h。	准备好的染料溶剂后立即进行标记反应。
缓冲液中含有一级氨基。	溶液中若含有一级氨基（例如 Tris 或者 glycine）会与染料发生反应，削弱标记效率。	在标记前进行缓冲液置换。
蛋白纯度过低。	载体蛋白的存在（如 BSA 或酪蛋白）会影响后续蛋白标记和 MST 检测。	使用适当的蛋白纯度。
标记反应的 pH 不是最优的。	NHS 酯与一级氨基最高效的反应是在生理条件到弱碱性条件下（pH 7.2-9）。	在标记前进行缓冲液置换。
蛋白浓度过低。	蛋白与染料的最优比例是成功标记的必要条件。	浓缩蛋白样品。

## 7. 注释

## 8. 安全信息

### RED-NHS 二代染料



#### 风险声明

H302

吞食有害。

H318

会对眼睛造成严重伤害。

H335

可引起呼吸道刺激。



#### 预防性声明

P261

避免吸入灰尘 / 烟雾 / 气体 / 薄雾 / 蒸汽 / 喷雾。

P280

戴防护手套 / 穿防护服 / 护眼 / 面保护。

P305+P351+P338

若不慎入眼：用清水冲洗几分钟。如果方便，请摘下隐形眼镜，继续冲洗。

P310

马上打电话给医院 / 医生。

P403+P233

存放在通风良好的地方。  
保持容器密封。

P501

按照适用的法律处理废物。

### 柱子 B



#### 风险声明

H317

可引起皮肤过敏反应。



#### 预防性声明

P261

避免吸入灰尘 / 烟雾 / 气体 / 薄雾 / 蒸汽 / 喷雾。

P272

被污染的工作服不允许带离工作场所。

P280

戴防护手套 / 穿防护服 / 护眼 / 面部防护。

P302+P352

若不慎接触皮肤，用大量清水冲洗。

P333+P313

如果出现皮肤刺激或皮疹，请立即就医。

P362+P364

脱下被污染的衣物，清洗后再使用。

有关详情，请参阅有关的安全数据表 (SDS)。SDS 可从 NanoTemper 技术公司获取。

## 9. 购买须知

NanoTemper 授予买方不可转让的产品使用权，供买方进行研究之用。买方不可以商业目的对产品或其组分进行售卖或其他方式转让。

有限质保：NanoTemper 将替换不符合规格的产品。

上述“有限质保”不适用于存在以下任何情形的产品：

- 产品已经超过保质期期限；
- 产品配套提供的各项材料不齐全，发生遗失或丢弃等；
- 存在人为的、间接的损坏或遗失等。

The above limited warranty is sole and exclusive.

如何购买？

中国地区，请前往 NanoTemper 官网在线订购：

[https://nanotempertech.com/zh\\_cn/purchase/](https://nanotempertech.com/zh_cn/purchase/)

# NanoTemper China

## 诺坦普科技(北京)有限公司

北京总部

北京市朝阳区东三环北路 5 号 北京发展大厦 1609-1611 室

电话：+86 (10) - 84462100

传真：+86 (10) - 85120276

邮箱：[support@nanotemper.cn](mailto:support@nanotemper.cn)

上海办公室

上海市静安区威海路 511 号 1405 室 200041

电话：+86 (21) - 62090958

传真：+86 (21) - 52282156

邮箱：[support@nanotemper.cn](mailto:support@nanotemper.cn)

Monolith and NanoTemper are registered trademarks of NanoTemper Technologies GmbH, Munich, Germany.

©2018 NanoTemper Technologies GmbH, Munich, Germany. All rights reserved.