

Cat# MO-L018

MO 系列 RED-tris-NTA 蛋白标记试剂盒
His-Tag 标记 -RED Channel

使用 RED-tris-NTA 二代染料标记带有 His-tag 的蛋白或多肽

组分及储存条件

MO His-Tag 标记试剂盒于室温运输。
 每个试剂盒可用于 500 个单点 MST 检测。

2*125 pmol RED-tris-NTA 2nd Generation dye [-20 °C 保存]
 1*2 mL 5 x PBS-T (for 10 mL 1 x PBS with 0.05 % Tween 20) [-20 °C 保存]
 1* 1200 pmol His6 Control Peptide [-20 °C 保存]

有效期 : 见试剂盒外包装

所需额外材料

- > 台式变速微型离心机
- > 1.5 mL 离心管
- > 0.2 mL PCR 管
- > ddH2O

试剂盒说明

MO-L018 RED-tris-NTA 蛋白标记试剂盒 (His-Tag 标记 -RED Channel) 可用于标记任何带有组氨酸标签的蛋白或多肽，能完成 500 次单点 MST 检测。标记仅需 30 分钟，无需去除过量染料。RED-tris-NTA 二代染料能够特异性结合至少有 6 个组氨酸的 His-tags，亲和力高达几 nM。RED-tris-NTA 二代染料的最大激发光与发射光分别为 650 nm 和 670 nm。

使用前须知

使用前请确认您的仪器型号，本指南适用于 MO NT.115，如果您的仪器型号为 MO NT.115 Pico，请参考第 7 页的 FAQ 8。

His-tags 是用于蛋白亲和纯化的常见蛋白标签。基于 His-tag 的标记方式特异性高，仅需 nM 级别的标签蛋白且无染料去除步骤。同时也可标记细胞裂解液或复杂液体中未纯化的样品。此外，His-tag 标记适用于多种缓冲体系。可能会干扰标记反应的一些缓冲液成分的浓度限制见表 1。推荐使用 pH7-8 的 PBS 或 HEPES 缓冲液进行标记。染料与 His-tag 的亲和力在含有 Tris 的缓冲液及 pH 小于 7 的缓冲液中会显著减低，请避免使用。为了确保足够高的标记效率，建议首先检测染料与您的 His-tagged 蛋白之间的亲和力 (Step A)。试剂盒内同样提供了阳性对照 His6 多肽用于评估表 1 中未列出的缓冲液体系对标记的影响 (详细描述见 FAQ 3)。

表 1: 常见的缓冲液成分及可用最高浓度

成分	可用最高浓度
Histidine	1 mM
Imidazole	1 mM
EDTA, EGTA, other chelating agents	0.05 mM
TCEP*	0.5 mM
DTT	5 mM
β-mercaptoethanol	1 mM
GSH	10 mM
GTP, GDP	1 mM
AMP, ADP, ATP	5 mM
Glycerol	10 %
Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺	preloaded protein only**
Polyhistidine-tagged ligand	none
Tris	not recommended
pH <7	not recommended
SDS	not recommended

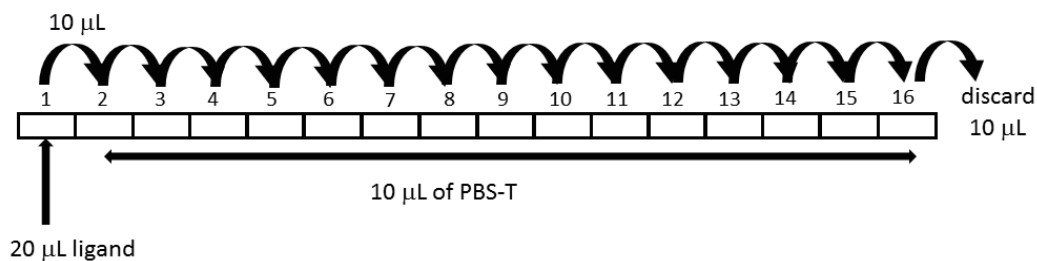
* NanoTemper 建议在使用红色染料时避免加入 TCEP。

** Co²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ 会与 RED-tris-NTA 二代染料竞争性结合，因此请将离子浓度控制在低至 nM 水平。

Step A: 染料与蛋白间亲和力

首先需要检测染料与 His-tagged 蛋白间的亲和力和标记效率。若使用的缓冲体系不是 PBS-T，请将该步骤中的 PBS-T 替换为您所需的缓冲体系：

1. 在 5 x PBS-T 小瓶中加入 8.0 mL ddH₂O 稀释为 1 x PBS-T;
2. 加入 25 μ L PBS-T 将染料稀释为 5 μ M;
3. 取 2 μ L 染料 (5 μ M) 与 198 μ L PBS-T 混匀，得到 200 μ L 染料 (50 nM) ;
4. 准备 30 μ L His-tagged 蛋白 (4 μ M, 用 PBS-T 稀释) ;
5. 向 2-16 号 PCR 管中分别加入 10 μ L PBS-T;
6. 向 1 号 PCR 管中加入 20 μ L His-tagged 蛋白 (4 μ M);
7. 从 1 号管中取 10 μ L ligand(His-tagged 蛋白) 加入 2 号管中，用移液器反复吹打混匀后，取 10 μ L 加入 3 号管中混匀，之后按照同样的方法完成 4-16 号管的稀释。最后从 16 号管中弃去多余的 10 μ L Ligand;



8. 向 1-16 号管中各加入 10 μ L 染料 (50 nM) 并用移液器充分混匀 ;
9. 室温孵育 30 分钟 ;
10. 用毛细管吸取样品后上机检测，仪器设置为 40 % LED/excitation power 及 medium MST power (NT.Control 软件中设置为 40 % MST power);
11. 使用 MO.Control 或 MO.Affinity Analysis 软件，通过 K_d 拟合模式计算 K_d 。

如果染料与蛋白的亲和力强于 10nM ($K_d \leq 10$ nM), 请继续进行 Step B I;
 如果染料与蛋白的亲和力大弱于 10 nM ($K_d > 10$ nM), 请继续进行 Step B II;
 如果染料与蛋白的亲和力太弱 ($K_d > 50$ nM), 建议您调整缓冲体系或改用赖氨酸 (Cat. # MO-L011) 或半胱氨酸 (Cat. # MO L014) 试剂盒标记。

Step B: 蛋白标记

- I) 染料与您的蛋白亲和力强于 10 nM ($K_d \leq 10 \text{ nM}$)。以下步骤描述了以 PBS-T 为缓冲液时，标记的实验过程。如果已经完成 Step A，请从第 3 项开始。体积可按比例放大或缩小。
1. 在 5 x PBS-T 小瓶中加入 8.0 mL ddH₂O 稀释为 1 x PBS-T;
 2. 加入 25 μL PBS-T 将染料稀释为 5 μM ;
 3. 取 2 μL 染料 (5 μM) 与 98 μL PBS-T 混匀，得到 100 μL 染料 (100 nM);
 4. 将蛋白稀释至 200 nM，体积 100 μL ;
 5. 将 90 μL 蛋白 (200 nM) 与 90 μL 染料 (100 nM) 混匀;
 6. 室温孵育 30 分钟;
 7. 将样品于 4 °C 15,000 g 离心 10 分钟，取上清至新的管中。
- II) 染料与蛋白的亲和力大弱于 10 nM ($K_d > 10 \text{ nM}$)。以下步骤描述了以 PBS-T 为缓冲液时，标记的实验过程。如果已经完成 Step A，请从第 3 项开始。体积可按比例放大或缩小。
1. 在 5 x PBS-T 小瓶中加入 8.0 mL ddH₂O 稀释为 1 x PBS-T;
 2. 加入 25 μL PBS-T 将染料稀释为 5 μM ;
 3. 取 2 μL 染料 (5 μM) 与 98 μL PBS-T 混匀，得到 100 μL 染料 (100 nM);
 4. 将蛋白浓度调整为 K_d 的 20 倍，体积 100 μL (例如染料与蛋白间 K_d 为 40 nM，则准备 100 μL 蛋白 (800 nM)。实验终浓度为该浓度的 1/4=200 nM);
 5. 将 90 μL 蛋白与 90 μL 染料 (100 nM) 混匀;
 6. 室温孵育 30 分钟;
 7. 将样品于 4 °C 15,000 g 离心 10 分钟，取上清至新的管中。

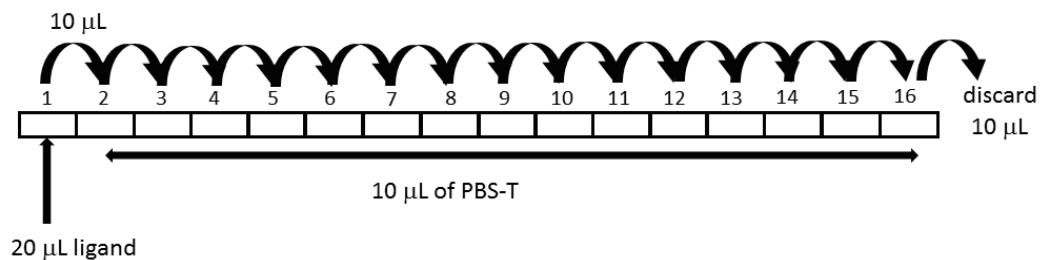
注意事项:

高亲和力的样品检测时蛋白浓度过高会影响 K_d 的计算 (如果蛋白浓度高于相互作用的 K_d ，只能计算 EC₅₀)。如果染料与蛋白的亲和力太弱 ($K_d > 50 \text{ nM}$)，建议您调整缓冲体系，或改用赖氨酸 (Cat. # MO-L011) 或半胱氨酸 (Cat. # MO L014) 试剂盒标记。

Step C: 结合实验

建议在 PCR 管中进行梯度稀释。若使用的缓冲体系不是 PBS-T，请将该步骤中的 PBS-T 替换为您所需的缓冲体系。

1. 准备 25 μL ligand，在稀释时请避免引入缓冲液差异；
2. 向 2-16 号 PCR 管中各加入 10 μL PBS-T；
3. 向 1 号 PCR 管中加入 20 μL ligand；
4. 从 1 号管中取 10 μL ligand 加入 2 号管中，用移液器反复吹打混匀后，取 10 μL 加入 3 号管中混匀，之后按照同样的方法完成 4-16 号管的稀释。最后从 16 号管中弃去多余的 10 μL Ligand；



5. 向 1-16 号管中各加入 10 μL 标记好的蛋白并充分混匀。标记好的蛋白 (Target) 的终浓度为 50 nM (或者高于 50 nM，由 Step B II 决定)。此浓度将用于计算 K_d ；
6. 用毛细管吸取样品后上机检测，建议仪器设置为 40 % LED/excitation power 及 medium MST power (NT.Control 软件中设置为 40 % MST power)。染料终浓度为 25 nM，在 MO NT.115，40 % LED/excitation 下，预期荧光强度大约为 300 counts；

FAQ:

1. 即使在 high MST power 设置下 signal-to-noise ratio (信噪比) 仍旧太低无法进行分析。应该如何提高呢?

溶液中游离的染料会减少 signal-to-noise ratio. 如果标记前的蛋白浓度被高估了, 那么标记后就会存在游离的染料。建议重新检测蛋白的浓度或者提高蛋白与染料的比例, 如 5:1。

2. 我能继续稀释标记好的蛋白吗?

可以继续稀释。MO NT.115 上推荐的染料最低浓度为 10 nM。LED/excitation power 为 100 % 时, 荧光强度大约为 250 counts。由于独特的化学性质, RED-tris-NTA 二代染料拥有良好的抗光漂白能力, 100 % LED/excitation power 造成的光漂白可忽略不计。

高亲和力检测请参考 FAQ 8。

3. 随着 ligand 浓度的升高, 出现了 ligand 结合引起的荧光改变。是不是因为 ligand 干扰了 His 标记?

1. 向对照多肽管内加入 120 μL PBS-T, 得到浓度为 10 μM 的多肽;
2. 将 2 μL 对照多肽 (10 μM) 与 98 μL PBS-T 混匀;
3. 将 2 μL 染料 (5 μM) 与 98 μL of PBS-T 混匀;
4. 将 90 μL 多肽 (200 nM) 与 90 μL 染料 (100 nM) 混匀;
5. 室温孵育 30 分钟;
6. 准备 25 μL ligand;
7. 向 2-16 号 PCR 管中各加入 10 μL PBS-T;
8. 向 1 号 PCR 管中加入 20 μL ligand;
9. 从 1 号管中取 10 μL ligand 加入 2 号管中, 用移液器反复吹打混匀后, 取 10 μL 加入 3 号管中混匀, 之后按照同样的方法完成 4-16 号管的稀释。最后从 16 号管中弃去多余的 10 μL Ligand;
10. 向 1-16 号管内各加入 10 μL 标记好的多肽并充分混匀;
11. 仪器设置为 40 % LED/excitation power 及 medium MST power (NT.Control 软件中设置为 40 % MST power);
12. 如果检测到结合曲线或者 ligand 引起的荧光变化, 表明 ligand 会干扰 His 标记。建议您改用赖氨酸 (Cat. # MO-L011) 或半胱氨酸 (Cat. # MO L014) 试剂盒标记。

4. 我的蛋白需要二价阳离子或者辅因子来维持正确的功能，在标记的时候，可以加到 PBS-T 中吗？

可以加入，具体限制请参照表 1。注意二价阳离子如 Ca^{2+} 加入 PBS 中会引起沉淀，此时您可改用 HEPES 作为标记及实验缓冲液。

5. 如何检测两个都带 His-tags 的蛋白间的相互作用？

RED-tris-NTA 二代染料标记 His-tag 是可逆的。尽管解离速率非常低，但是染料会在 His-tagged 蛋白间转移。因此，我们建议其中的一个分子不带 His-tag。您可以在 His-tag 序列附近插入蛋白酶识别序列（如 TEV），在蛋白纯化过程中利用酶促反应去除。

6. 我的蛋白溶解在与 RED-tris-NTA 二代染料不兼容的缓冲液里，该怎么办呢？

您需要进行缓冲液置换。

7. RED-tris-NTA 二代染料和对照多肽溶解后能保存多久？

最多可以保存 8 周，建议您在溶解后分装成 5-10 μL 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

8. 使用 RED-tris-NTA 二代染料标记的蛋白在检测时可以用比较低的浓度吗？比如使用 MO NT.115 Pico 仪器或者检测高亲和力的相互作用 (K_d 为 μM 或几 nM)。

这取决于染料与 His-tag 蛋白间的亲和力。请按照 Step A 检测染料与 His-tag 蛋白间的亲和力，应当为几 nM ，之后按照同样的条件标记蛋白，此时标记好的蛋白可在该亲和力范围内使用。请注意染料与 His-tag 蛋白的结合时可逆的，因此在低浓度下会逐渐解离。当您在使用 MO NT.115 Pico 检测时，我们推荐蛋白与染料的终浓度分别为 50 nM 和 10 nM ，LED/excitation power 设置为 10%，产生的荧光强度大约为 12,000 counts。

9. 可以用 RED-tris-NTA 二代染料标记细胞裂解液中未纯化的 His-tag 蛋白吗？

如果染料在细胞裂解液中与蛋白仍旧具有高亲和力便可以用，请按照 Step A 检测染料与 His-tag 蛋白间的亲和力。强烈的去垢剂（如 SDS）会影响结合反应，请不要加入到裂解液中。推荐您使用机械力（如匀浆器）和 PBS 缓冲液进行细胞裂解。同时由于细胞裂解液成分比较复杂，请设置好对照组以排除非特异性结合。

安全须知

染料



危险声明

H315	刺激皮肤
H319	严重刺激眼睛
H335	可能会引起呼吸道刺激

防范说明

P264	操作后彻底清洗手部
P280	操作时可穿戴手套/防护服/眼罩/面罩
P302+P352	若不慎洒到皮肤上，请用大量清水冲洗
P305+P351+P338	若不慎入眼，用清水冲洗几分钟。若戴有隐形眼睛，请取下后继续冲洗
P337+P313	如果发生眼部刺激，请进行医务咨询

如需了解详细信息，请联系我们索取安全数据表 (SDS)。

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

The use of this product for research and quality control purposes is covered by a license from QIAGEN Group. No rights to use this product to perform or offer diagnostic, companion diagnostic or other commercial services for money or money's worth are granted by the supply of this product expressly, by implication or by estoppel.

Should you wish to use this product for any other purpose not covered by this license, please contact QIAGEN Corporate Business Development at bd@qiagen.com.

笔记&注释

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；
- 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/

或通过微信公众号直接订购：

- 进入微信公众号
- 点击底部菜单栏【产品信息】>>【耗材订购】即可下单



NanoTemper China

北京总部

地址：北京市朝阳区东三环北路5号北京发展大厦 1609-1611 室 100004
 电话：+86 (10) - 84462100
 邮箱：support@nanotemper.cn

上海分公司

地址：上海市静安区威海路 511 号 1405 室 200041
 邮箱：support@nanotemper.cn