

德国 Nano Temper ---分子间相互作用测量仪 MST

最新的分子间相互作用分析技术平台

快速、无需固定、低样品量、天然溶液、高灵敏度

技术优势：

- ☆ **快速**：在 10 分钟之类测量解离常数
- ☆ **高灵敏范围**：从离子和片段结合到复合物间作用
- ☆ **天然的环境条件**：直接在血清和裂解液中测量
- ☆ **样品使用量低**：nM 的浓度下只需<4ul 样品量
- ☆ **溶液测量**：不需要固定到固相表面
- ☆ **动力学范围**：亚-nM 和 mM 的解离常数
- ☆ **极低消耗费、无维护费、简单易操作**

工作原理：

微量热泳 (MST) 是一种分析生物分子的技术。微尺度热泳是粒子在微观的温度梯度中的定向运动。生物分子结构/构象的变化引起的水化层的变化导致的沿温度梯度运动的相对变化可以用来确定亲和力。甚至像蛋白质磷酸化或小分子结合到靶标上都可以被监测。MST 也允许直接在溶液中测量分子间相互作用，而不需要一个固定的表面 (无需固定)。MST 是由总部设在慕尼黑的德国高科技公司 NanoTemper 技术有限公司发展出来的。

微尺度热泳 (MST) 是一种新的方法，可以定量分析溶液中微升的分子间的相互作用。MST 是基于热泳效应，即沿温度梯度定向的分子运动。一个空间的温度差 ΔT 导致分子浓度在温度升高的地区的变化，用 Soret 系数 S_T 定义为：

$$c_{\text{热}}/c_{\text{冷}} = \text{EXP}(-S_T\Delta T)。$$

热泳取决于分子和溶剂之间的界面。在恒定的缓冲条件下，热泳反映出分子大小，电荷和溶剂化熵。一个荧光标记分子 A 的热泳由于大小、电荷和溶剂化熵的差异通常显著不同于分子和靶标形成的复合物 AT。这种分子的热泳的区

别可以用来量化在一定缓冲条件下，梯度滴定实验的结合常数。

MST 技术介绍

测量荧光标记分子的热泳运动是通过监测荧光毛细管内分布 F 。微观的温度梯度产生的红外激光，这是集中到毛细管强烈被水吸收。水溶液在激光光斑的温度升高 $\Delta T = 5 \text{ K}$ 之前的红外激光是在同质化的荧光分布 F 是毛细管内观察到的冷切换。当红外激光开关，两方面的影响，其时间尺度分离，有利于新的荧光分布 $F_{\text{热}}$ 。热弛豫时间快和诱导荧光染料，由于当地环境的依赖反应温度跳跃约束力的依赖下降。在较慢的扩散时间尺度（10 秒），分子运动从局部加热区域外的低温地区。当地的分子浓度降低，直到达到一个稳态分布在激烈的地区。

虽然质量扩散 D 的决定消耗的动力学， S_T 确定的稳态浓度比例下温度上升 $C_{\text{hot}}/C_{\text{cold}} = \exp(-S_T \Delta T) \approx 1 - S_T \Delta T$ 。归一化荧光 $F_{\text{norm}} = F_{\text{热}}/F_{\text{冷}}$ 主要是这个浓度比，除了温度跳跃 $\partial F/\partial T$ 。的线性近似，我们发现： $F_{\text{norm}} = 1 + (\partial F/\partial T S_T)$ 的温差。由于荧光强度的线性和热泳枯竭， $F_{\text{norm}}(A)$ 未结合的分子归荧光和约束复杂的 $F_{\text{norm}}(AT)$ 线性叠加。表示 x 的绑定到目标分子的一小部分，在目标 T 滴定的荧光信号不断变化的计算公式如下： $F_{\text{norm}} = (1-x) F_{\text{norm}}(A) + x F_{\text{norm}}(AT)$ 。

定量绑定参数获得通过的约束力基板的连续稀释。通过绘制 F 规范对系列稀释的不同浓度的对数，获得一个 S 形的结合曲线。这种结合曲线，可以直接安装质量作用定律的非线性解与解离常数 K_d ，作为结果。微量热泳（MST）是一种分析生物分子的技术。微尺度热泳是粒子在微观的温度梯度中的定向运动。生物分子结构/构象的变化引起的水化层的变化导致的

实验流程：

很简单的实验方法，避免了昂贵的样品消耗和繁琐的制备过程。

结合毛细管使用，大大降低其他的标准的分子相互作用的技术所需的实验成本，并且可以测量天然状态环境中的生物分子间的相互作用。

荧光分子的浓度的保持不变而结合分子的浓度梯度增加。一个 4 μl 的样品量被填充在 MST 毛细血管，然后使用制造一个局部温度梯度。由于标记分子在玻璃毛细管中的运动导致的区域荧光强度变化就会被观测到。既可用标签/荧光蛋白来发光 (NT.115 系统)，也可以用色氨酸自发荧光来检测 (NT.LabelFree 系统)。

荧光分子或颗粒最初是自由均匀分布的。在红外激光照射下，分子收到热泳动的作用力，而移出加热区域，最后分子在热泳动作用力和质量扩散作用力下达到平衡，形成稳定态。在关闭激光后，分子扩散重建均匀分布状态。下图显示了该过程。

主要特点：

NanoTemper 独特的 MST 技术，可应用于：

- ☆ 直接在生物溶液环境中测量任何（生物）分子间亲和力(KD, 解离常数)
- ☆ 研究血清、细胞裂解液或其它生物溶液对生物分子的作用，并且能够分离出真正的结合过
- ☆ 直接在细胞膜上研究膜结合蛋白
- ☆ 研究溶液中酶活性、复合物形成、定向组装过程的多组分反应或者生化成分
- ☆ 使用荧光标记竞争物以无标记的方式获得更大的筛选项目（“竞争性 MST”）
- ☆ 一个靶标上不同结合位点的区分
- ☆ 研究酶动力学(vmax, kcat)
- ☆ 研究化学计量学并确定生物分子结合位点的数目
- ☆ 研究结合能量学 ΔG (自由能), ΔH (焓) and ΔS (熵)
- ☆ 直接测量或是在竞争性实验中研究抑制物亲和力 K_i
- ☆ 这个方向是 MST 最常用的应用，一个结合物浓度固定，另一个梯度变化...不同于直接相互作用，这写实验中的荧光信号是被竞争物挤下来的分子发出的，用于研究竞争性结合物的结合能力...该研究使用与确定靶分子上的配体结合位点...该研究用于测定反应中的热力学参数，包括焓和熵...