

微量热泳动仪(MST)样品制备流程及注意事项

一、 准备内容

1、 染料

蓝色粉末状，用 30 μL DMSO 完全溶解。标记蛋白时只需要 6 μL ，剩余放置于 -20°C 冰箱中待用（Note: 必须使用新鲜的 DMSO，否则影响标记效率）。

2、 A 柱：去掉氨基类或其它影响互作的物质。无论是旧还是新，都需要 $6000\times\text{g}$ 离心 1 min 去掉存在于 A 柱中的液体，再加 300 μl 标记缓冲液， $6000\times\text{g}$ 离心 1 min，弃流出液，如此重复三次,表明 A 柱已处理好。

二、 样品制备应注意事项

- 1、 蛋白制备过程的所涉及的缓冲液均应用纯水配制；
- 2、 蛋白纯度应有足够的纯，最好是电泳纯，只有一条带；
- 3、 蛋白浓度单位用 10 μM 。
- 4、 在提取蛋白的过程中，若采用的是含有氨基类（如 Tris、咪唑类）、DTT、EDTA、甘油等物质的缓冲液，需要经过离子交换柱的处理才能进行一步的实验。

三、 样品标记流程

(一)、对于需要除去氨基类物质蛋白样品的处理---离子交换

- 1、取 100 μL 、10 μM 的蛋白，加入处理好的 A 柱中， $6000\times\text{g}$ 离心 1 min，收集流出液；
（此步骤只针对使用 TRIS 缓冲液的蛋白）
- 2、大概 100 μL 流出液，先加 100 μL 标记缓冲液，混匀，再加 6 μL 染料，再混匀，避光条件下常温孵育 30 min；
- 3、孵育期间处理 B 柱：每次加 2-3 mL 溶解蛋白的缓冲液（如 PBS 缓冲液），共 3 次，当最后一次缓冲液液面进入柱子内后，即可加第二步中的染料与蛋白混合液，加在柱子中间，当染料进入柱内后，加 300 μL 蛋白缓冲液，当缓冲液完全进入柱内后，再加 600 μL 蛋白缓冲液，流出的前两滴不要接，从第三滴开始用 1.5 mL 离心管收集，直到全部液体进入液面后，结束收集，约 400-500 μL ，标记完成，此时用锡箔纸包裹避光。
- 4、B 柱使用完毕，可用任意缓冲液或者纯水洗 3 次，并保持柱内充满溶液。次日还需

要使用时，就放置在 4℃冰箱中；若长期不用，则柱子用 20%乙醇保存于 4℃冰箱中。

(A 柱也是如此处理)。

5、样品的梯度稀释：

通常情况下需要 12-16 个样进行测量：拿出 12 或 16 个 0.5 mL 低吸附的离心管，先加 10 μ L PBS 缓冲液到第 2-16 管中，再分别加与标记蛋白互作的蛋白或小分子 10 μ L 于第一和第二个离心管管中。第二个离心管管中的混合液用枪混匀，在第二管中吸取 10 μ L 于第三管中，用枪混匀，换枪头，在第三管中也吸取 10 μ L 于第四管中，依次类推，直至最后一管，混匀后吸取 10 μ L 扔掉。(注意：此步需要每个离心管都更换干净的枪头)

6、将标记好的蛋白样品先进行毛细管扫描，标记的荧光强度的范围为 400-1200，若强度太高还需要稀释至该范围。

7、拿出 12 或 16 根毛细管，右手指只能拿毛细管的两端，中间不能碰，左手抓住离心管（不能抓管底的样品），将毛细管插入管底，利用虹吸现象将样品吸入毛细管，再将毛细管轻轻横放在样品架上，样品架由外到里的编号是 1 号至 16 号，代表样品浓度高低的顺序，测定时先测量样品浓度低的 16 号毛细管。

8、所有样品放在样品架上后，再用两条磁板轻轻压在毛细管上，按一下仪器上的“上”箭头，打开门，将样品架放进去，再近发“下”箭头，进行待测状态。

(二)、对于没有氨基类物质的样品缓冲液则直接从上述第 2 步开始做即可。

微量热泳动仪(MST)的使用流程：

- 1、测量前建立自己的文件夹，在文件夹内再建一个子文件夹，填写本次反应的名称。
- 2、选择通道：一般选 red，若为 GFP 蛋白，应选择 blue 通道。
- 3、根据稀释的数量选择使用的毛细管数量。
- 4、选择 LED power 强度和反应条件。
- 5、填写稀释的小分子或蛋白的浓度和单位；
- 6、开始测量。