

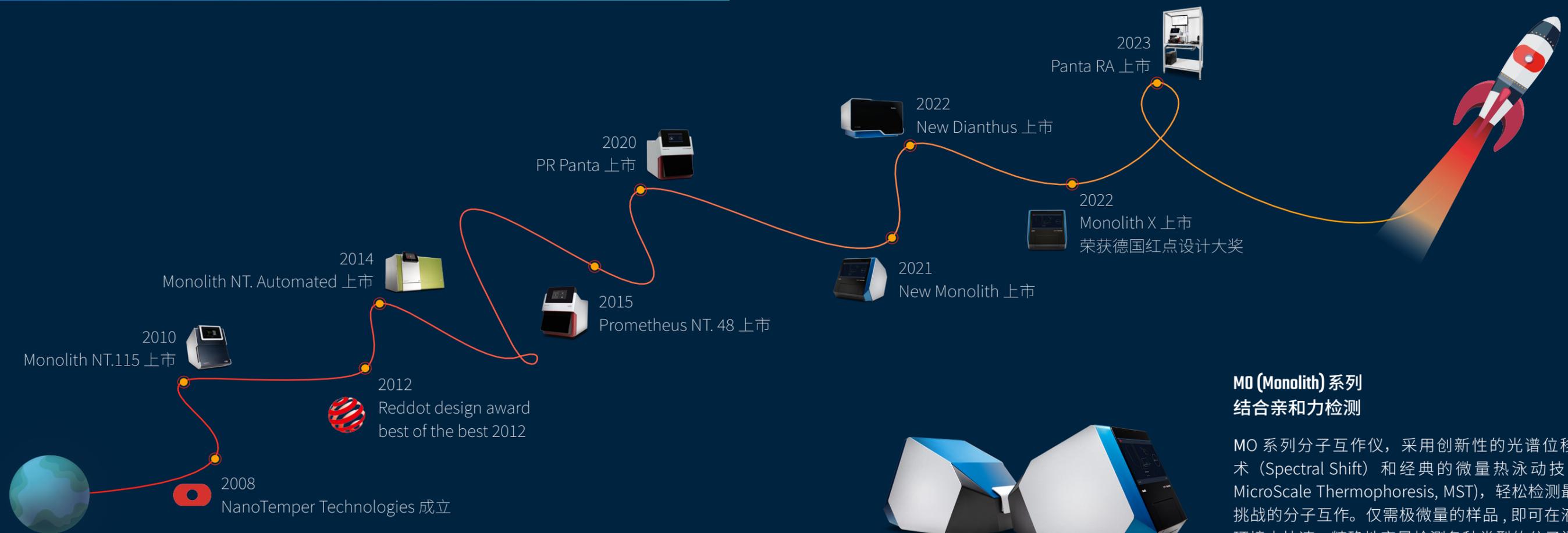
Monolith[®]系列 分子互作分析仪

产品应用手册

Application Manual

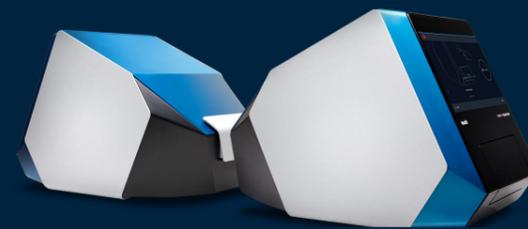


Spectral Shift X
MicroScale Thermophoresis



MO (Monolith) 系列 结合亲和力检测

MO 系列分子互作仪，采用创新性的光谱位移技术 (Spectral Shift) 和经典的微量热泳动技术 (MicroScale Thermophoresis, MST)，轻松检测最具挑战的分子互作。仅需极微量的样品，即可在液体环境中快速、精确地定量检测各种类型的分子间相互作用力，且检测浓度范围广、操作简单。



PR (Prometheus) 系列 蛋白稳定性分析

PR 系列蛋白稳定性分析仪，结合专利 nanoDSF 技术、动态光散射 DLS 技术、静态光散射 SLS 技术以及背反射技术，在单次运行中即可同时且实时地检测多个参数：热变性、粒径、聚集、化学变性。始终如一地提供高质量、高分辨率的可靠数据。它在蛋白质设计、纯化条件优化、制剂配方筛选、去垢剂筛选、缓冲液条件筛选、质量控制等方面加速药物开发进程。



DI (Dianthus) 系列 高通量 hits 筛选

DI 系列分子互作筛选仪，能够帮助客户使用较少的样品高效率完成筛选工作。仪器基于标准 384 孔板进行药物筛选，最快 33 分钟即可完成整个 384 孔板的检测。同时仪器高度集成化，没有任何液路系统，操作简单，无需维护。



NanoTemper Technologies 始创于 2008 年，总部位于德国慕尼黑，历经十余载发展，全球已设立了 13 个分支机构。2016 年，相继在中国北京、上海成立子公司，旨在为中国用户提供更优质便捷的服务。

我们一直致力于为生命科学研究领域提供最优质的解决方案！作为集研发、生产用于生物分析创新型设备及软件的仪器制造商，我们使用开创性的专利技术，从根本上大大缩短研究时间和减少样品消耗，卓越的产品和服务使 NanoTemper 成为世界各地成千上万的制药企业、学术研究及科技公司研究人员的首选合作伙伴。

成立至今，我们一直秉承 NanoTemper 服务客户的先进理念。我们高品质的仪器，专业的技术团队和售后支持服务帮助科研及各行业客户不断实现自我突破和获得成功。在获得一项项奖励后，“客户的成功才是我们成功的来源”，NanoTemper 联合首席执行官 Philipp Baaske 博士说。



功能全面，灵活应对不同类型的亲和力检测项目

实现几乎所有类型分子间的亲和力检测

从IDPs、膜蛋白、大型蛋白复合体到PROTACs、小分子甚至离子，检测各种类型的分子间结合。

液体环境检测，更接近天然条件

在液体环境中直接检测，且适用于几乎所有的缓冲液，保证样品在天然条件下自由发生相互作用，获得更可靠的结果。

不依赖于分子量和粒径变化检测

结合检测不受由配体结合引起的粒径和分子量变化限制。

不仅限于取得 K_d 值数据

研究人员还可计算结合的化学计量比*和热力学参数*，并通过竞争结合实验进行相对亲和力和协同性评估*。

*需进行线下数据处理及分析，无法在MO系列仪器配套软件中完成。

样品消耗量极低

为ITC实验准备大量的、高浓度的互作样品是非常困难的。Monolith系列仅需几微升的样品浓度即可，为您节约宝贵的样品。

不局限于两种分子间的互作分析

竞争结合实验、多种分子结合检测都可以轻松搞定。



高品质的毛细管则保证了高品质的数据，使用毛细管的优势众多：仅需微量样品，在溶液中检测，接近天然环境，无需固定样品，甚至无需进行蛋白纯化。



reddot design award
best of the best 2012

Monolith 可搭载光谱位移和 MST 两种生物物理检测方法，用于结合亲和力的检测。

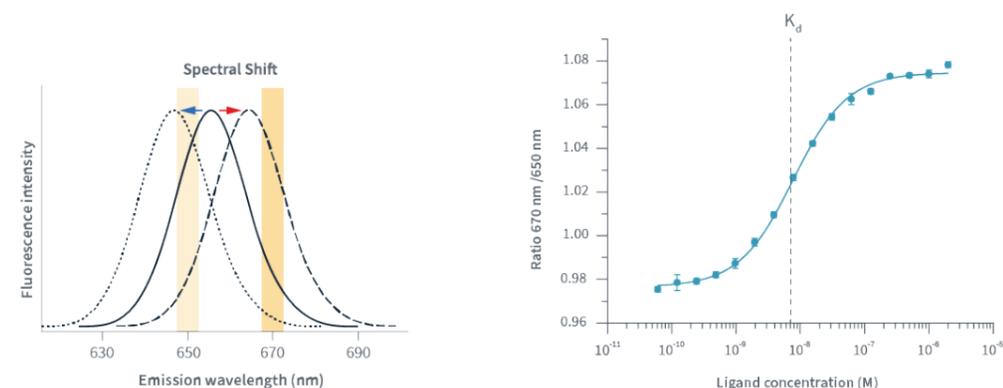
在实验中，我们对其中一个分子进行荧光标记*，然后将其与一系列梯度稀释的结合分子等量混匀，接下来使用毛细管吸取样品并放入仪器开始检测。

*此外，色氨酸内源荧光也可用于免标记 MST 检测

光谱位移技术 (Spectral Shift)

光谱位移技术通过荧光发射光谱的蓝移或红移来检测分子间的结合。Monolith X 在等温条件下精确检测 650nm 和 670nm 双波长的发射光，因而能够精确检测到极细微的光谱位移。

接下来，以配体浓度为横坐标，双波长荧光强度的比值为纵坐标作图，拟合得到平衡解离常数 K_d 。

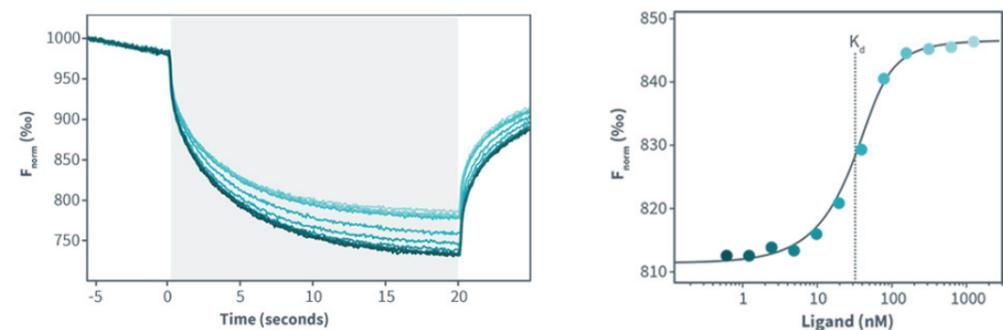


微量热泳动技术 (MicroScale Thermophoresis)

微量热泳动 (MicroScale Thermophoresis, MST) 是一种定量分析生物分子间相互作用的前沿技术。通过精确检测荧光变化，结合灵敏的热泳动现象，MST 提供了一种灵活、强大和快速测量分子间相互作用的方法。

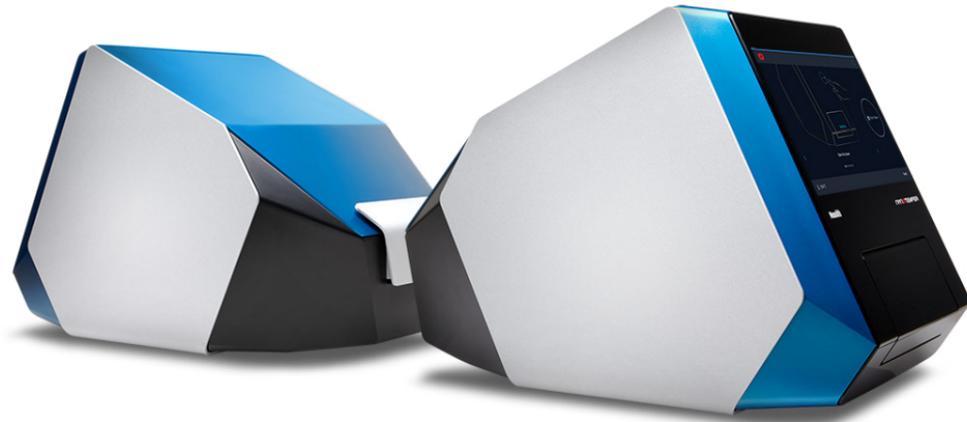
MST 技术是通过激光在溶液中产生精确而短暂的温度变化从而检测配体结合引起的荧光强度变化。

以配体浓度为横坐标，荧光值为纵坐标作图，从而获得平衡解离常数 K_d 。



MO 系列仪器测量一个 K_d 值仅需 10 分钟，专家模式下最快仅需 90 秒，而无需额外冗长的数据分析。通过检测与配体结合后，荧光标记的蛋白或者具有自发荧光的样品的荧光强度在温度梯度中随时间而变化 (左图中灰色部分)，然后将选定时间段内的荧光强度对应配体浓度进行拟合作图，软件自动计算得到该结合的亲和常数 K_d 值 (右图)。

了解相互作用分子之间的结合力强弱，为您深入且全面地揭示生物系统工作的奥秘。



Monolith X 同时搭载了光谱位移和 MST 两项技术，几乎无需耗费时间进行方法开发即可为您提供高质量数据。

Monolith 采用 MST 技术，可实现 pM 级别的高亲和力结合检测、免标记检测或 GFP 标记的蛋白检测。

	Monolith X	Monolith
检测原理	Spectral Shift MST	MST
检测一组 K_d 的时间	10 分钟 (Spectral Shift + MST) 90 秒 (Spectral Shift)	
亲和力检测范围	$10^{-9} - 10^{-3}M$	$10^{-12} - 10^{-3}M$
样品检测范围	$10^1 - 10^7$ Daltons	
最低样品消耗量	10 μ L	
样品数量	1 至 24 个 (单支毛细管 / 毛细管组)	
温控范围	20 - 40 °C +/- 0.5 °C (主动控温)	
荧光通道	RED	pico RED or (pico) RED & LabelFree (UV) or (pico) RED & BLUE
仪器尺寸	36 cm 宽 x 40 cm 高 x 58 cm 深 (样品舱伸出时 71 cm 深)	
仪器重量	27kg	

智能软件自动进行数据分析，使您对实验结果更加自信。

MO. Control 2

对于大多数的软件，当您加载样品之后才会启动。但是 MO 软件别具一格——它不但可以在实验启动之前为您提供每一步骤的详细指导，助您快速设置实验；而且实验结束时，会立即根据所得数据提供实验优化建议，全程为您提供可靠信息。MO. Control 2 软件增加而了缓冲液条件优化功能，提高效率，帮助您快速获得结果（详见以下应用案例）。

Step 1

使用 Binding check 模块检测 Hsp90 与 ADP 在 6 种不同缓冲液中的结合信噪比。每种缓冲液中一组仅加入 Hsp90（未结合），另一组加入 Hsp90 与 ADP 的混合物（结合）并各做一次重复。

Buffer#	Buffer composition	Buffer Check result
1	50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂	S/N ratio too low to conclude binding*
2	Buffer #1, supplemented with 0.05% Tween-20	Binding detected
3	20 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl	S/N ratio too low to conclude binding*
4	Buffer #3, supplemented with 0.05% Tween-20	S/N ratio large enough to conclude binding*
5	Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4	S/N ratio too low to conclude binding
6	Buffer #5, supplemented with 0.05% Tween-20	Response amplitude too slow

表 1. Hsp90 与 ADP 在 6 种缓冲液中的结合信噪比

*Sample aggregation

Step 2

结果显示仅在 2 号缓冲液 (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.05% Tween-20) 中检测到较好的结合信噪比。其他缓冲液中 Hsp90 发生聚集或者信噪比不足。因此选用 2 号缓冲液体系进行亲和力定量检测。

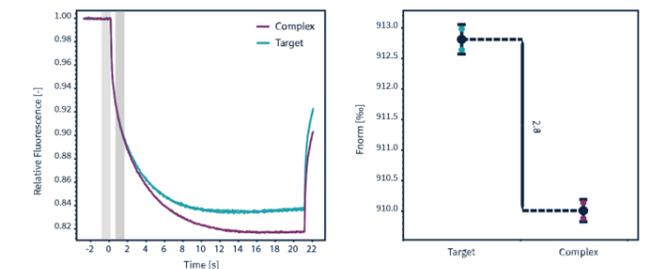


图 1. 2 号缓冲液中信噪比为 13.3 (信噪比至少大于 5, 大于 12 最佳)

Step 3

最终检测到 Hsp90 与 ADP 的 K_d 为 $18 \pm 3 \mu$ M，与文献发表的亲和力数据一致*。

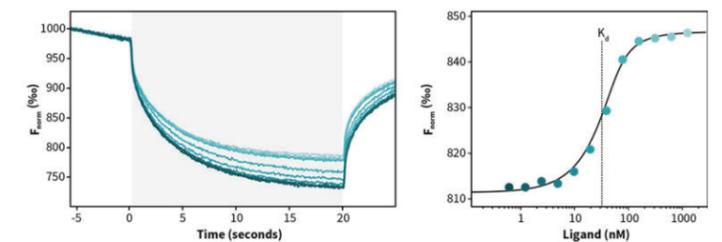


图 2. Hsp90 与 ADP MST 曲线 (左图) 及拟合曲线 (右图)

* Prodromou C., et al. Cell, 1997
doi:10.1016/S0092-8674(00)80314-1

Monolith 系列分子互作仪可以检测几乎所有类型的分子互作，包括蛋白，小分子，多肽，核酸，脂类等，应用范围非常广泛。

蛋白——小分子

自噬—溶酶体靶向降解

基于结构的药物设计

“靶向降解组学”鉴定中药成分靶点

中药小分子抑制剂作用机制

靶向雄激素受体液-液相分离的药物开发

新型泛素化反应的分子机制

蛋白——离子

植物硝态氮新受体

植物免疫抑制与广谱抗病机理

铜元素调节水稻广谱抗病毒的机制

低温特异钙信号的感知和应答机制

蛋白——多肽

植物防止多精受精的分子机制

小肽—受体激酶调控花粉与柱头识别的分子机理

植物重要肽激素作用机理

多肽 PROTAC 降解致癌蛋白

蛋白——蛋白

淬灭抑制蛋白 SOQ1 调节 qH 的作用机制

胃癌基因治疗新靶点 CPEB3 作用机制研究

精子与卵子受精识别的结构基础

抗原表位研究

蛋白——核酸

CRISPR-Cpf1 识别剪切 RNA 的分子机制

核酸适配体检测霉菌毒素

蛋白——脂类

新冠病毒 S 蛋白结合胆固醇

调控蛋白与磷脂酰肌醇二磷酸识别机制

蛋白——复合物

蛋白酶体与去泛素化酶动态调控机制

蛋白——纳米颗粒

靶向乳酸代谢的工程仿生纳米颗粒治疗胶质瘤

多肽修饰的纳米颗粒抑制病毒侵袭

核酸适配体修饰的纳米颗粒探针

蛋白——糖类

流感病毒结构改变介导病毒在人类传播的机制

免纯化 / 无标记检测

老药新用，Wnt/ β -catenin 信号通路活性抑制

血清中多克隆抗体 - 海洛因结合检测

葡萄糖转运蛋白抑制剂

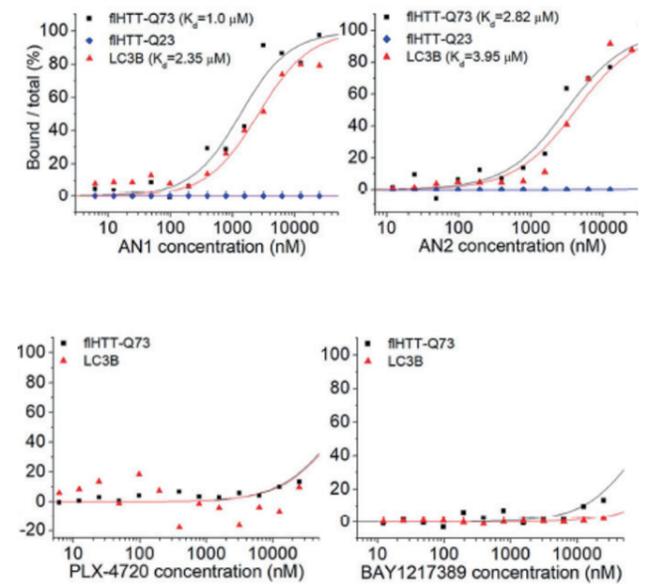
蛋白—小分子 自噬—溶酶体靶向降解

亨廷顿病是一种常染色体显性遗传的神经退行性疾病，病因是突变的 HTT 蛋白错误折叠而形成聚集物。由于引起该病的变异亨廷顿蛋白 (mHTT, Mutant huntingtin protein) 生化活性未知，无法靶向，传统治疗方法并不适用。而特异性降解这些致病蛋白可以从根本上干预或治疗疾病。

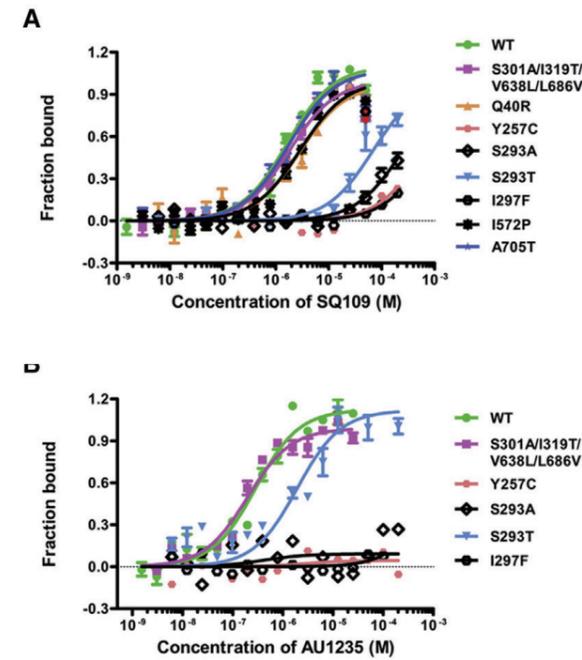
复旦大学生命科学学院鲁伯坝、丁灏课题组和信息科学与工程学院光科学与工程系费义艳课题组合作在 Nature 期刊发表文章，开创自噬小体绑定化合物 (ATTEC) 的概念，弥补 PROTAC 技术中蛋白酶体难以单独消除某些特定蛋白聚合物的问题，发现了特异性降低亨廷顿病致病蛋白的小分子化合物，为亨廷顿病的临床治疗提供全新思路。

研究者成功将 mHTT 和 LC3 “粘连”在一起，然后利用细胞自噬将 mHTT 降解掉。从化合物库筛选得到了两种小分子，随后用 MST 进一步验证了 mHTT、LC3 以及正常亨廷顿蛋白与这些小分子的相互作用。

Z. Li, et al. Allele-selective Lowering of Mutant HTT Protein by HTT-LC3 Linker [J]. Nature. 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1722-1



蛋白—小分子 基于结构的药物设计



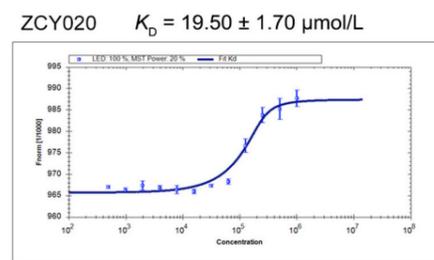
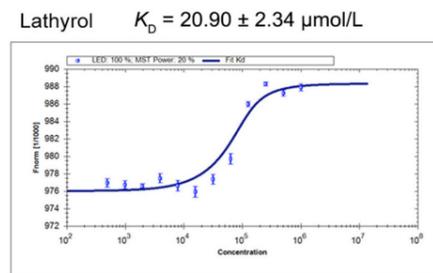
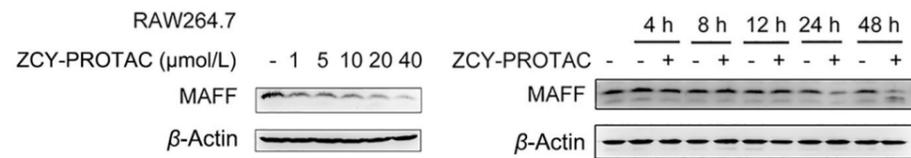
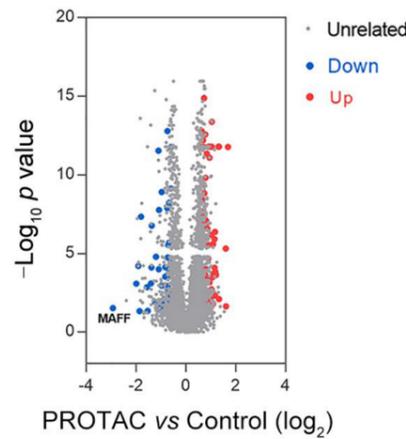
B. Zhang, et al. Crystal Structures of Membrane Transporter MmpL3, an Anti-TB Drug Target [J]. Cell. 2019, doi: 10.1016/j.cell.2019.01.003

MmpL (Mycobacterial membrane protein Large) 是分枝杆菌基因组编码的一组膜蛋白，在细菌耐药性中发挥重要作用，目前已经报道出来的参与分枝杆菌细胞膜生物合成的蛋白有 13 种，其中，MmpL3 调控细胞复制和存活，降低 MmpL3 的表达可以有效阻止细胞分裂并导致细胞迅速死亡。

上海科技大学免疫化学研究所饶子和院士与杨海涛教授团队在 Cell 期刊发表文章，解析了结核分枝杆菌 (*M. smegmatis*) MmpL3 和四种抑制剂复合物的晶体结构。使用 MST 分别检测 MmpL3 及其突变体与四种抑制剂 (SQ109、AU1235、ICA38 和 rimonabant) 的结合常数，确定抑制剂的功能。这种药物结合的结构特点，对于抑制 MmpL3 这一靶点蛋白的抗结核药物设计具有非常重要的指导作用。

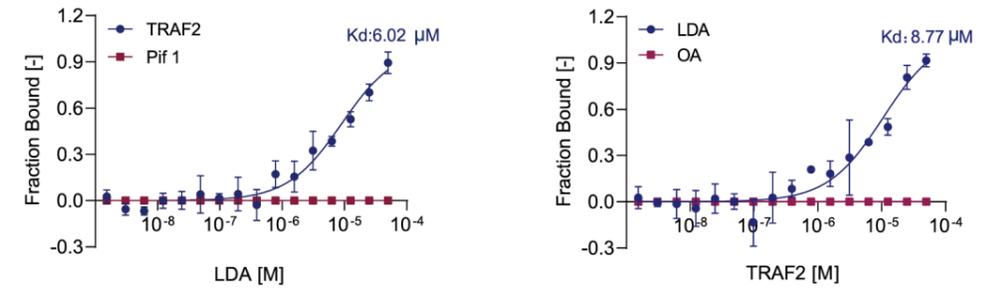
中药活性成分和其作用靶点的鉴定均在中药研发领域具有重要的科学意义和实用价值。尤其是靶点鉴定，它是理解中药机制和下游药物开发的基础和关键。但由于中药“多靶点、多成分”的作用模式，以及与靶点蛋白瞬时、弱亲和力的相互作用，导致中药的靶点鉴定存在巨大挑战，亟需研究的思路创新和技术创新。

沈阳药科大学陈丽霞和李华团队创造性地将 PROTAC 技术引入到了中药研究领域。研究人员在前期研究中从中药千金子中获得了一系列千金二萜类化合物，其中 ZCY-001 化合物具有最强的抗炎活性，并且具有低毒性。将该化合物的核心骨架 Lathyril (即千金子二萜醇) 与沙利度胺 (E3 连接酶 CRBN 配体) 通过 PEG linker 相连，得到了 PROTAC 分子 ZCY-PROTAC。使用该 PROTAC 分子对细胞进行处理后提取蛋白，并使用 TMT 串联质谱标签进行标记定量蛋白组学分析 (图 A)。比较蛋白组学分析发现 MAFF 蛋白在 ZCY-PROTAC 处理后发生了最为显著的降解。Western Blot 结果也显示，MAFF 蛋白的降解水平与 ZCY-PROTAC 的剂量和作用时间是正相关的 (图 B)。研究人员使用 Monolith 直接检测了 Lathyril 及其衍生物 ZCY020 与 MAFF 蛋白的亲合力，证实了 MAFF 蛋白是中药千金子成分的直接作用靶点。



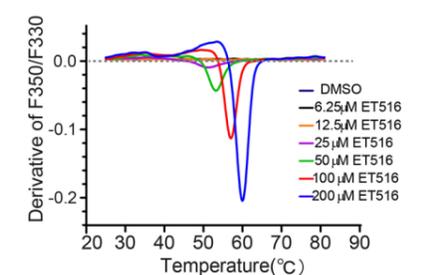
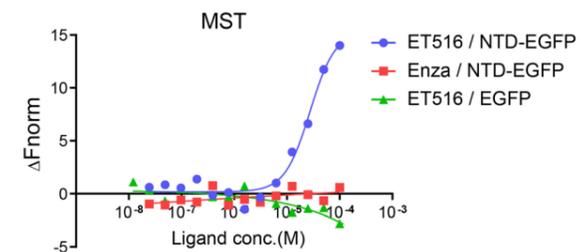
Wu Y, Yang Y, Wang W, et al. PROTAC Technology as a Novel Tool to Identify the Target of Lathyrane Diterpenoids. Acta Pharmaceutica Sinica B. 2022 Jul 16.

Wnt/ β -catenin 信号通路是公认的肿瘤驱动因子，但 β -catenin 缺乏常见的小分子结合深疏水口袋，是个典型的“不可成药”蛋白。上海中医药大学的研究人员发现中药路路通活性分子路路通酸 (LDA) 抑制 Wnt 信号通路和结肠癌，并利用蛋白质谱技术找到了 LDA 的潜在靶标蛋白肿瘤坏死因子受体相关因子 2 (TNF receptor-associated factor 2, TRAF2)。接下来研究人员使用 Monolith 分子互作仪验证了 TRAF2 与 LDA 的直接相互作用。为了进一步探究 LDA 的结合位点，研究人员表达了不同结构域的 GFP 标签蛋白直接在细胞裂解液中检测。结果显示 LDA 与缺少 TRAF-C domain 以及删除 TRAF-C domain 408-431 氨基酸 (Δ 408-431) 的蛋白间并无相互作用，仅与 TRAF-C domain (TRAF2-TC) 作用 (右图)。



Yan R, Zhu H, Huang P, Yang M, Shen M, Pan Y, et al. Liquidambaric acid inhibits Wnt/beta-catenin signaling and colon cancer via targeting TNF receptor-associated factor 2. Cell Reports. 2022;38(5).

上海奕拓生物和上海中国科学院生物与化学交叉研究中心朱继东 / 朱光亚团队合作的研究显示配体活化的 AR 可以形成转录活性的聚合物。AR 的结构化和非结构化区域都有助于 AR 的有效相分离，无序 N 端起主要作用。AR 液-液相分离行为具有转录活性和抗雄激素功效。抗雄激素可以以配体独立的方式促进 AR 抗性突变体的相分离和转录活性。该研究进行了基于相分离的表型筛选，并鉴定了 ET516 分子，ET516 特异性破坏 AR 聚合物，有效抑制 AR 转录活性，并抑制表达 AR 抗性突变体的前列腺癌细胞的增殖和肿瘤生长。通过 NanoTemper 公司的 Monolith 分子互作仪定量验证了 ET516 小分子与蛋白的亲合力，同时还利用 PR 蛋白稳定性分析仪完成了 Thermal Shift Assay，佐证了 ET516 小分子与蛋白间的结合。研究的结果表明液-液相分离是一种新的耐药机制，并表明靶向相分离可能为药物发现提供一种可行的途径。

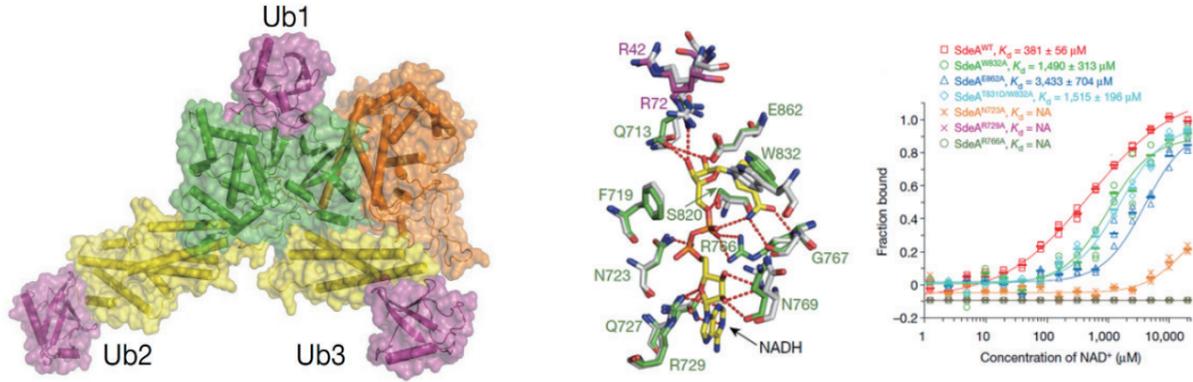


Xie, J., He, H., Kong, W. et al. Targeting androgen receptor phase separation to overcome antiandrogen resistance. Nat Chem Biol 18, 1341-1350 (2022).

蛋白-小分子 新型泛素化反应的分子机制

泛素化是泛素蛋白在特定酶的作用下，对底物蛋白进行特异性修饰的过程，几乎参与调控所有生命活动。嗜肺军团菌的 SdeA 蛋白以一种全新的、完全不同于经典泛素化的方式修饰泛素，并催化其对几种内质网相关蛋白的泛素化过程。

SdeA 蛋白 mART 结构域利用 NAD⁺ 作为辅因子，催化泛素蛋白 R42 的 ADP 核糖基化。北京化工大学冯越教授实验室应用 MST 技术研究了 SdeA 蛋白及其突变体与 NAD⁺ 之间的相互作用。结果发现 R729A 和 R766A 突变体完全丧失了与底物小分子的结合能力。研究 SdeA 蛋白与 NAD⁺ 的结合，为设计针对该家族蛋白的小分子抑制剂，作为治疗军团菌肺炎的潜在抗生素奠定了重要基础。

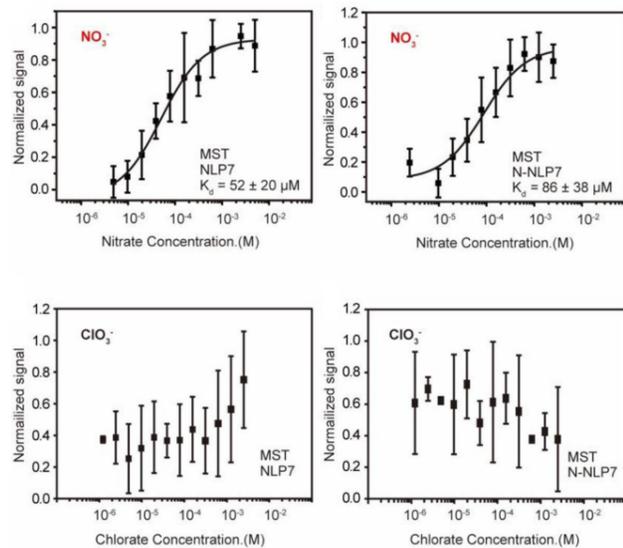


Dong, Y. et al. Structural basis of ubiquitin modification by the Legionella effector SdeA. Nature 557, 674-678, doi:10.1038/s41586-018-0146-7 (2018).
Welsch, M. E. et al. Multivalent Small-Molecule Pan-RAS Inhibitors. Cell 168, 878-889 e829, doi:10.1016/j.cell.2017.02.006 (2017).

蛋白-离子 植物硝态氮新受体

硝态氮不仅是植物必需的矿质营养盐，从 20 世纪九十年代，科学家已经可以在基因水平确定硝态氮是一种信号分子，但并不清楚植物感受它的机制。2022 年，西北农林科技大学的研究人员发现所有拟南芥 NIN 样蛋白 (NLP) 转录因子的突变都破坏了植物的初级硝酸盐反应和发育程序。对 NIN-NLP7 嵌合体和硝酸盐结合的分析表明，NLP7 通过其氨基末端对硝酸盐感知进行去表达。此外，开发的荧光硝酸盐感受器实现了植物中单细胞硝酸盐动力学的可视化，表明 NLP7 为主要的硝酸盐传感器。

为了证明 NLP7 可以直接结合硝酸盐，作者使用 Monolith 来检测 NLP7 和 NO³⁻ 亲和力 (图 A)，为了进一步探究 NO³⁻ 结合位点，研究人员表达了 NLP7 的 N 端，结果显示，N-NLP7 同样可与 NO³⁻ 结合，且亲和力与完整 NLP7 蛋白一致。此外，NLP7 不与 NO³⁻ 类似的 ClO³⁻ 结合。



Kun-Hsiang Liu et al., NIN-like protein 7 transcription factor is a plant nitrate sensor. Science 377, 1419-1425 (2022).

蛋白-离子 植物免疫抑制与广谱抗病机理

植物如何平衡抗病和生长发育平衡，中国科学院分子植物科学卓越创新中心何祖华团队研究揭示了以 ROD1 为免疫抑制中枢，通过降解超氧活性因子 ROS，抑制植物的免疫反应，平衡植物防御和生长之间的冲突。

水稻中，ROD1 编码一种 Ca²⁺ 传感器蛋白，以 Ca²⁺ 依赖的方式结合到磷酸肌醇脂质，靶向至特定膜区域。ROD1 刺激过氧化氢酶 CatB 的活性，促进活性氧 (ROS) 清除，抑制免疫；当有稻瘟菌侵染时，植物通过降解 ROD1 减弱其功能，产生有效的防卫反应。作者使用 Monolith 检测 ROD1 可直接与 Ca²⁺ 结合，并鉴定出活性结果位点。

另一方面，研究发现病原稻瘟菌中具有与 ROD1 结构类似的毒性蛋白 AvrPiz-t，在植物体内盗用 ROD1 的免疫抑制途径，实现侵染的目的，进而与病原菌共同生存。通过 MST 检测到 AvrPiz-t 与 Ca²⁺ 结合，进而盗用 ROD1 途径。



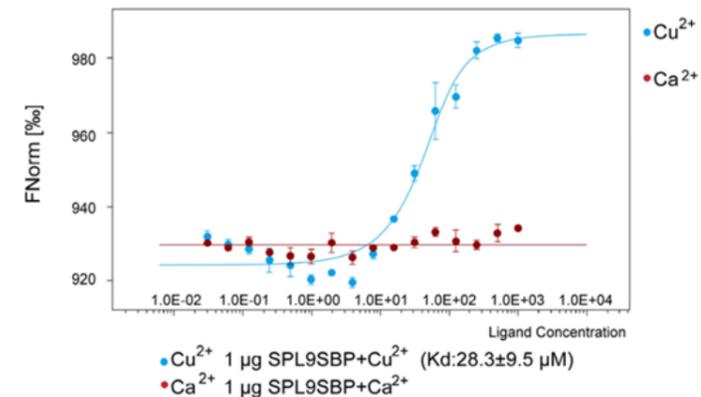
Gao M, He Y, Yin X, et al. Ca²⁺ sensor-mediated ROS scavenging suppresses rice immunity and is exploited by a fungal effector. Cell, 2021.

蛋白-离子 铜元素调节水稻广谱抗病毒的机制

铜是植物生长发育的重要调节剂，然而铜对病毒入侵的反应机制尚不清楚。

2022 年，北京大学的研究人员发现 SPL9 介导的 miR528 转录激活为已建立的 AGO18- miR528 - L- AO 抗病毒防御增加了一个调控层。研究发现，Cu²⁺ 通过抑制 SPL9 的蛋白水平来抑制 miR528 的转录激活，进而提高 ROS 水平，增强 AO 积累量及其酶活，从而加强抗病毒反应，阐明了铜稳态的分子机制、调控网络以及 SPL9-miR528-AO 抗病毒途径。

为了检测 SPL9 和 Cu²⁺ 之间的直接相互作用，作者纯化了 SPL9 DNA 结合区域 (SPL9 SBP)，使用 Monolith 分子互作仪检测其与 Cu²⁺ 的互作。结果显示 SPL9 SBP 直接与 Cu²⁺ 结合，但不与 Ca²⁺ 结合。



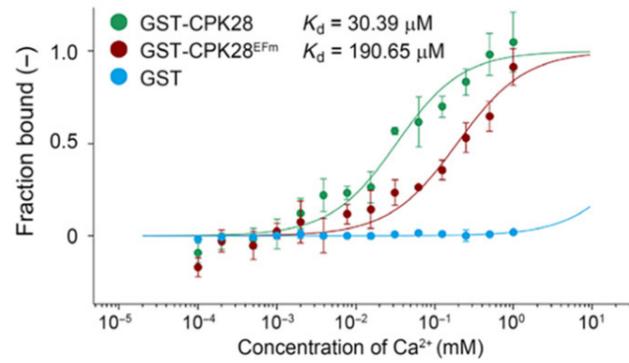
Shengze Yao et al., The key micronutrient copper orchestrates broad-spectrum virus resistance in rice. Sci. Adv. 8, eabm0660 (2022).

蛋白—离子 低温特异钙信号的感知和应答机制

暴露在寒冷环境中会触发胞质 Ca^{2+} 的激增，导致植物的转录重编程。然而， Ca^{2+} 信号是如何被感知和传递到下游的低温信号通路仍然是未知的。

2022年，中国农业大学的研究人员发现，钙依赖性蛋白激酶 28 (CPK28) 启动了一个磷酸化级联，从而作用于低温诱导 Ca^{2+} 信号下游的转录重编程。这项研究阐明了一种先前未知的机制，揭示了植物从质膜到细胞核的快速感知和转导低温信号的关键策略。

研究中，作者通过 Monolith 分子互作仪检测到 CPK28 可直接与 Ca^{2+} 结合，而 CPK28 EF-hand 位点突变蛋白 CPK28EFm 与 Ca^{2+} 亲和力降低了 6 倍，证明了 EF-hand 对结合 Ca^{2+} 非常重要。



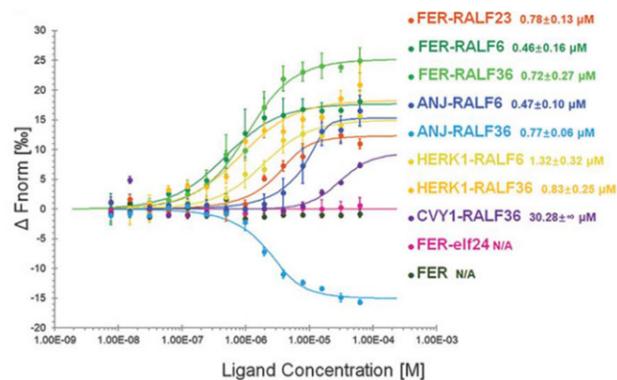
Yanglin Ding et al., CPK28-NLP7 module integrates cold-induced Ca^{2+} signal and transcriptional reprogramming in Arabidopsis. *Sci. Adv.* 8, eabn7901 (2022)

蛋白—多肽 植物防止多精受精的分子机制

植物是如何限制数以百计的花粉管进入同一个胚珠，防止多精受精的呢？当受精失败后又如何进行“受精补偿”呢？

2022年，北京大学研究人员发现于花柱道隔膜处（雌性）表达的 FERONIA、ANJEA 和 HERCULES 受体与花粉管（雄性）特异性分泌的 RALF6、7、16、36 和 37 小肽配体相互作用来建立阻止“多花粉管穿出”的“屏障”，只允许一根花粉管靶向胚珠。花粉管进入胚珠，爆裂释放精子后，RALF 小肽迅速减少，进而解除花柱道隔膜处的“屏障”。从而在受精失败时，可使第二根花粉管穿出花柱道，进行受精补偿。

研究团队使用 Monolith 分子互作仪对 RALF6 和 RALF36 与受体 FER、ANJ 和 HERK1 的亲和力进行测定，快速准确的验证了 RALF6/36 是受体 FER、ANJ 和 HERK1 的配体。

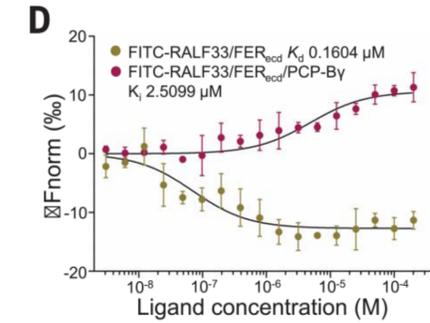


Sheng Zhong et al., RALF peptide signaling controls the polytubey block in Arabidopsis. *Science* 375, 290-296 (2022).

蛋白—多肽 小肽—受体激酶调控花粉与柱头识别的分子机理

开花植物识别本物种花粉，而拒绝其他物种花粉的机制尚不清晰。2021年，华东师范大学的研究人员发现，拟南芥成熟未授粉的柱头内 ANJ-FER 受体激酶复合物与柱头内的 RALF33 多肽结合，引起活性氧产生。而 ANJ/FER 受体激酶复合物与花粉中花粉外壳蛋白 b 肽 (PCP-Bs) 互作，抑制 ROS 产生，使花粉水化。作者通过推测 PCP-Bs 和 RALF33 多肽竞争结合 ANJ-FER 复合物，进而调节柱头中的 ROS 水平。

传统竞争结合方法实验步骤繁琐，且无法得到定量互作信息。作者利用 Monolith 完成了 RALF33, FER/ANJ 和 PCP-B γ 三元复合体系中的竞争结合定量检测：将 RALF33 与 FER_{ecd} 孵育，使其达到结合平衡，然后加入梯度稀释的 PCP-B γ ，检测得到 K_i 值为 2.5099 μ M，即 PCP-B γ 与 RALF33 竞争结合 FER_{ecd}/ANJ_{ecd}，从而抑制 RALF33 诱导的柱头 ROS 的产生，加速了花粉水化。



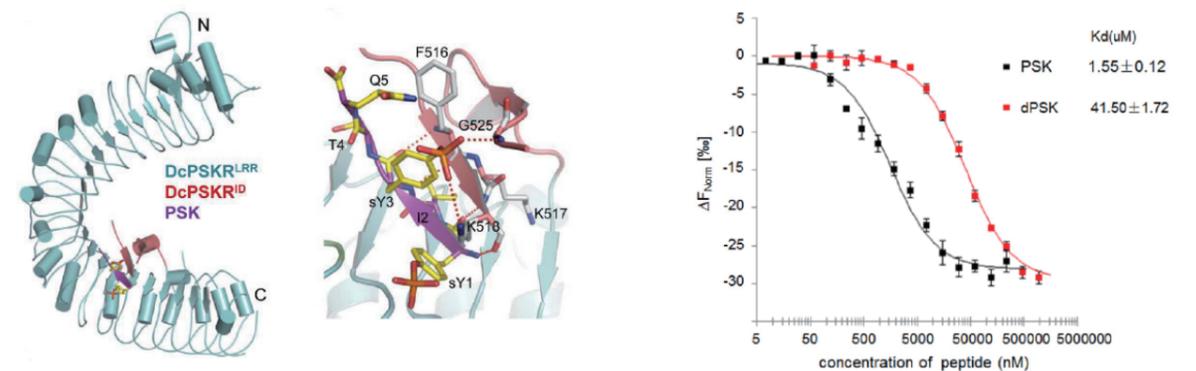
红色曲线：FER_{ecd} 与 FITC-RALF33 的亲和力 K^d 为 0.1604 μ M，
黄色曲线：加入 PCP-B γ ，其对 FER_{ecd}-RALF33 结合的抑制常数 K_i 为 0.5009 μ M

Liu, Chen, et al. "Pollen PCP-B peptides unlock a stigma peptide-receptor kinase gating mechanism for pollination." *Science* 372.6538 (2021)

蛋白—多肽 植物重要肽激素作用机理

植物肽类激素，同植物经典激素一样，对植物的生长发育等生理活动具有重要的调控作用。PSK 是较早被发现和研究的一种含两个酪氨酸磺化修饰的五肽激素，在植物的生长发育、抗逆和先天免疫等方面有广泛调控作用。PSK 发挥活性是通过与细胞膜上的受体激酶 PSKR (PSK receptor, 植物磺肽素受体) 结合来实现的。

清华大学柴继杰教授实验室通过解析 PSKR 胞外区结合 PSK 的复合物结构，阐明了 PSKR 胞外区通过其岛区来识别 PSK 的分子机理。MST 试验表明，PSK 酪氨酸上的磺化修饰对于激素识别至关重要，缺失磺化修饰后两者的亲和力下降了约 40 倍。



Wang, J. et al. Allosteric receptor activation by the plant peptide hormone phytosulfokine. *Nature* 525, 265-268, doi:10.1038/nature14858 (2015).

Ge, Z. et al. Arabidopsis pollen tube integrity and sperm release are regulated by RALF-mediated signaling. *Science*, doi:10.1126/science.aao3642 (2017).

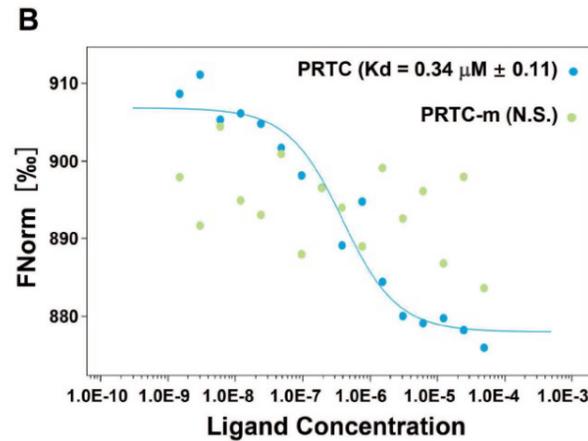
蛋白-多肽 多肽 PROTAC 降解致癌蛋白

肿瘤细胞周期相关和表达升高蛋白 (CREPT) 是一种新的致癌基因。CREPT 的过表达促进胰腺癌细胞集落的形成和增殖, CREPT 的缺失会阻碍这一过程。为了证明 CREPT 蛋白可以作为抑制胰腺癌的新靶点, 清华大学的常智杰教授团队设计了一种以多肽为基础的 PROTAC (命名为 PRTC), PRTC 以蛋白酶体依赖的方式有效地诱导 CREPT 降解。

研究人员使用 Monolith 确定了 PRTC 与 CREPT 蛋白的结合亲和力 ($0.34 \pm 0.11 \mu\text{M}$), 证实了 CREPT 可以作为抑制胰腺癌的新靶点。实验结果表明 PRTC 诱导的 CREPT 降解可抑制肿瘤生长, 这为开发新的抗胰腺癌药物提供了希望。此外, 利用蛋白质二聚化结构的相互作用基序, 可能是一种新的设计方法。

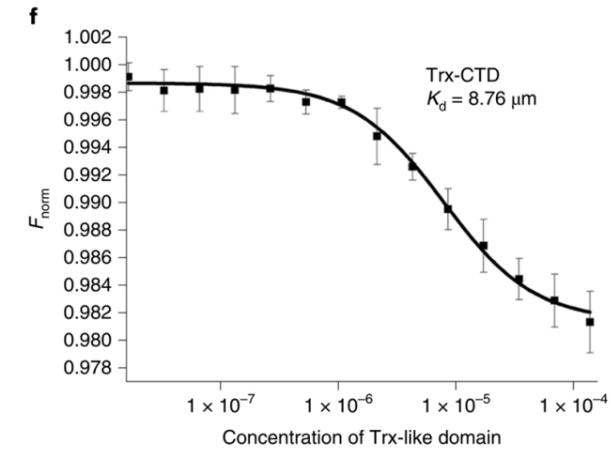
不同的多肽可能具有疏水性、易于聚集、带电荷、呈酸性等不同特性。检测亲和力时, 固定多肽会带来空间位阻, 带电荷的多肽可能和芯片非特异性的

结合, 样品的聚集和 pH 会在滴定时造成热量的变化, 使用传统技术会造成数据的假阳性或假阴性。使用 Monolith 进行多肽的亲合力表征时, 无需固定样品, 直接在溶液中检测。



Ma D, Zou Y, Chu Y, Liu Z, Liu G, Chu J, Li M, Wang J, Sun SY, Chang Z. A cell-permeable peptide-based PROTAC against the oncoprotein CREPT proficiently inhibits pancreatic cancer. *Theranostics*. 2020 Feb 19;10(8):3708-3721.

蛋白-蛋白 淬灭抑制蛋白 SOQ1 调节 qH 的作用机制



为了适应自然环境不断变化的光强, 植物进化出多种光保护机制, 以耗散吸收的多余光能, 称为非光化学淬灭 (NPQ)。在拟南芥中新组成型弛豫较慢的 NPQ 机制, 命名为 qH。质体脂质运载蛋白 (LCNP) 是 qH 产生的必需因子, 位于类囊体膜上的淬灭抑制蛋白 1 (SOQ1) 通过修饰 LCNP 来负调控 qH。

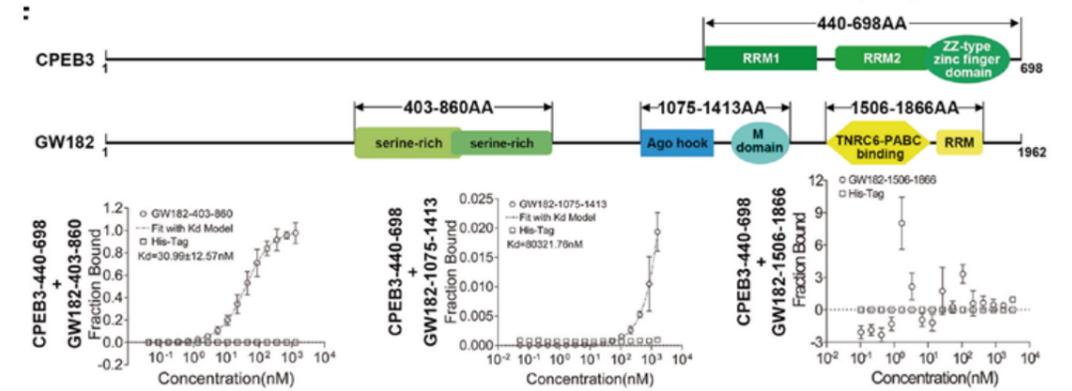
2022 年, 中科院生物物理研究所发表了研究结果, 研究人员解析了 SOQ1 腔侧结构域 (SOQ1-LD) 不同截短体和突变体的四个晶体结构及 SOQ1-LD 低分辨率的电镜结构。在 SOQ1 的 C 端发现一个新的结构域 CTD, CTD 通过与 Trx-like domain 之间的二硫键交换而将电子传递给下游蛋白, 并通过 Monolith 分子互作实验, 检测到 Trx-like domain 与 CTD 之间能够相互作用, 从而在 qH 的抑制中发挥重要作用, 最终提出了淬灭抑制蛋白 SOQ1 调节 qH 的作用机制。

Yu, G., Hao, J., Pan, X. et al. Structure of Arabidopsis SOQ1 luminal region unveils C-terminal domain essential for negative regulation of photoprotective qH. *Nat. Plants* 8, 840-855 (2022).

蛋白-蛋白 胃癌基因治疗新靶点 CPEB3 作用机制研究

胃癌是世界范围内第五大常见恶性肿瘤, 且国内患者总体生存率较低。2022 年, 中山大学附属第一 / 第七医院及广东医科大学研究团队报道了胞浆聚腺苷酸化元件结合蛋白 3 (CPEB3) 通过抑制 ADAR1 介导的 RNA 编辑, 进而抑制胃癌恶性进展的研究; 并揭示了 CPEB3 可作为胃癌治疗的潜在新靶点。

其中, 研究人员通过 Monolith 检测证明了 CPEB3 与 P 小体主要组成蛋白 GW182 可以直接发生相互作用。进一步以 GW182 的不同结构域分别与 CPEB3 (440-698AA) 进行互作检测, 还确认了 GW182 的 serine-rich 结构域 (403-860AA) 是 CPEB3 结合位点。

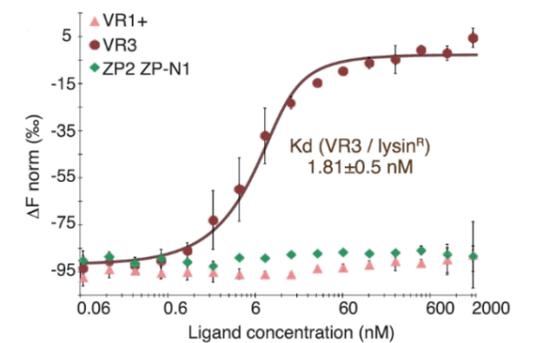
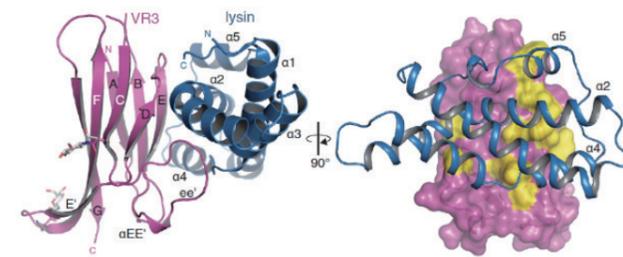


Chen, J., Li, L., Liu, TY. et al. CPEB3 suppresses gastric cancer progression by inhibiting ADAR1-mediated RNA editing via localizing ADAR1 mRNA to P bodies. *Oncogene* 41, 4591-4605 (2022). 372.6538 (2021)

蛋白-蛋白 精子与卵子受精识别的结构基础

早在 100 年前, 就有科学家提出精子与卵子的结合过程是一种锁和钥匙机制。精子与卵子表面配体的结合意味着所有有性生殖生物生命的开始, 但是精子如何识别和刺穿卵子外壳仍然是未知的。

瑞典 Karolinska 研究所的 Luca Jovine 课题组发现鲍鱼卵子表面蛋白 VERL 上的重复序列 VR 与精子蛋白溶素 lysin 发生相互作用。结合 MST 试验和结构分析, 研究人员发现 VR3 与 lysin 通过疏水相互作用发生高亲和力结合 (1.81 nM), 不同物种的 VR3 和 lysin 可以结合; VR2 只与同一物种的 lysin 结合, 亲和力相对较弱 (491 nM)。这项工作首次从原子层面揭示了精子如何与卵子进行识别, 并且绘制出了结合后复合物的三维立体蛋白质结构。



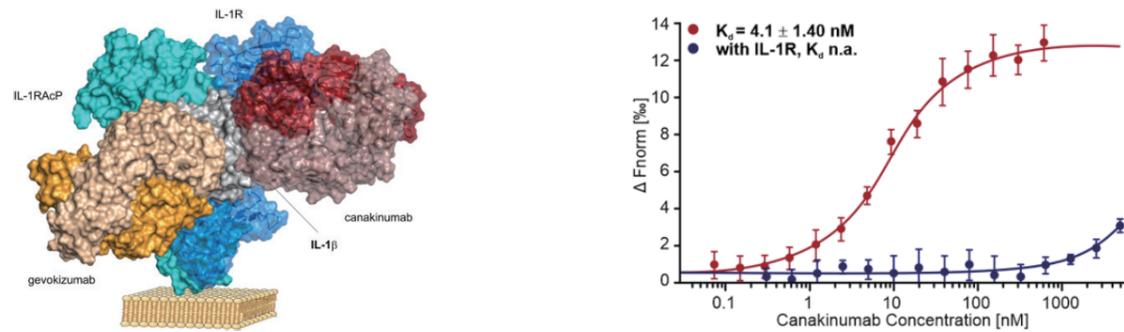
Raj, I. et al. Structural Basis of Egg Coat-Sperm Recognition at Fertilization. *Cell* 169, 1315-1326 e1317, doi:10.1016/j.cell.2017.05.033 (2017).
Wang, T. et al. A receptor heteromer mediates the male perception of female attractants in plants. *Nature* 531, 241-244, doi:10.1038/nature16975 (2016).

蛋白-蛋白 抗原表位研究

Interleukin-1 β (IL-1 β) 在炎症和多种免疫应答中起关键作用，IL-1 β 通过与 IL-1R 和 IL-1RAcP 形成异源三聚体发挥功能。

Canakinumab 和 Gevokizumab 都是靶向 IL-1 β 的人源化单克隆抗体，他们的作用机制不尽相同。勃林格英格翰公司的研究人员通过 MST 试验发现，Canakinumab 与 IL-1 β 的结合受到 IL-1R 的影响；而加入 IL-1R 对 Gevokizumab 和 IL-1 β 的结合影响较小。结合 NMR 和蛋白结构数据，研究人员证明了 Canakinumab 通过竞争性结合，Gevokizumab 通过变构效应，抑制 IL-1 β 活性。

使用 MST 技术，可以在溶液中直接研究第三者分子对抗原抗体结合的影响，从而非常简单直观的进行抗原表位研究。



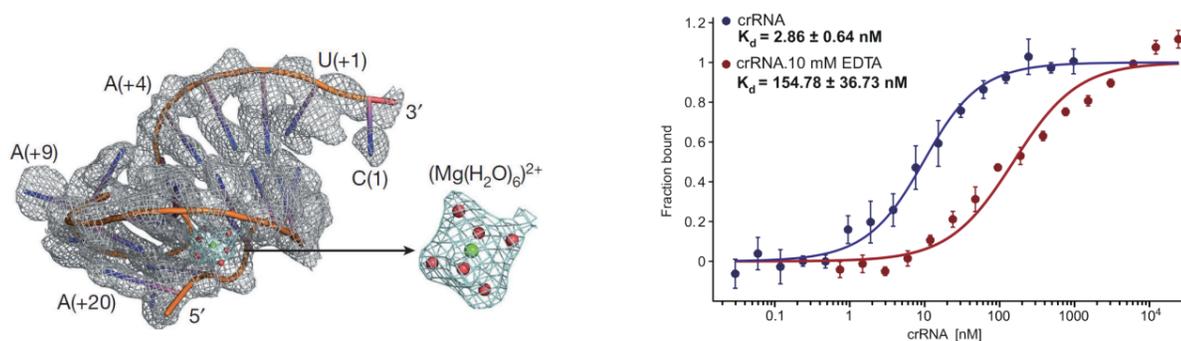
Blech, M. et al. One target-two different binding modes: structural insights into gevokizumab and canakinumab interactions to interleukin-1beta. *Journal of molecular biology* 425, 94-111, doi:10.1016/j.jmb.2012.09.021 (2013).
Chapleau, R. R. et al. Measuring Single-Domain Antibody Interactions with Epitopes in Jet Fuel Using Microscale Thermophoresis. *Analytical Letters* 48, 526-530, doi:10.1080/00032719.2014.947535 (2015).

蛋白-核酸 CRISPR-Cpf1 识别剪切 RNA 的分子机制

CRISPR-Cas 系统是细菌编码的适应性免疫系统，该系统通过 RNA 引导的效应蛋白剪切病毒的 DNA 或者 RNA，从而抵抗病毒感染的感染。

哈尔滨工业大学黄志伟教授实验室解析了 crRNA 和蛋白 Cpf1 复合物的晶体结构，发现一个紧密结合 crRNA 的六水合镁离子对稳定 crRNA 构象，激活 Cpf1 的催化活性非常关键。MST 试验数据表明缺失这个镁离子后，Cpf1 与 crRNA 的亲和力下降了约 70 倍。

此后黄志伟教授还在另一篇论文里研究了 SpyCas9-sgRNA 复合物与 PAM DNA 以及 AcrIIA2 和 AcrIIA4 蛋白的相互作用，从分子水平阐明了 AcrIIA2 和 AcrIIA4 蛋白通过竞争结合的方式抑制 SpyCas9 介导的目的 DNA 剪切。

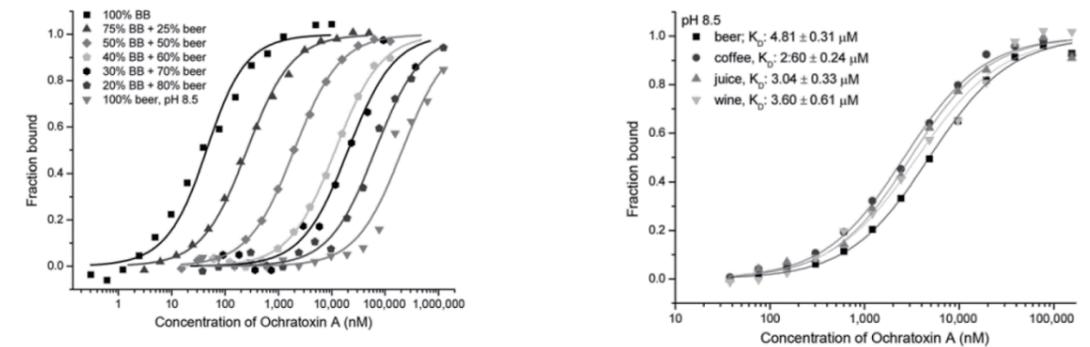


Dong, D. et al. The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA. *Nature* 532, 522-526, doi:10.1038/nature17944 (2016).
Dong et al. Structural basis of CRISPR-SpyCas9 inhibition by an anti-CRISPR protein. *Nature* 546, 436-439, doi:10.1038/nature22377 (2017).

蛋白-核酸 核酸适配体检测霉菌毒素

核酸适配体 (Aptamer) 是一段能特异结合配体分子的核苷酸序列。相比于抗体，核酸适配体具有稳定性高、易于合成等多种优点。

赭曲霉毒素 A 是继黄曲霉毒素后又一个引起世界广泛关注的霉菌毒素，有肾脏毒、肝毒、致畸、致癌、致突变和免疫抑制作用。使用核酸适配体检测食物中的赭曲霉毒素 A 具有非常大的应用前景。德国汉诺威大学的研究人员应用 MST 技术，研究了核酸适配体 1.12.2 与赭曲霉毒素 A 在多种复杂条件下的相互作用。试验结果表明，随着啤酒浓度的提高，二者的亲和力明显下降（从 32 nM 下降到 4808 nM）；研究人员同时在咖啡、果汁和红酒环境中检测了二者的结合。试验结果充分体现了 MST 技术对测试条件没有限制这一优点。

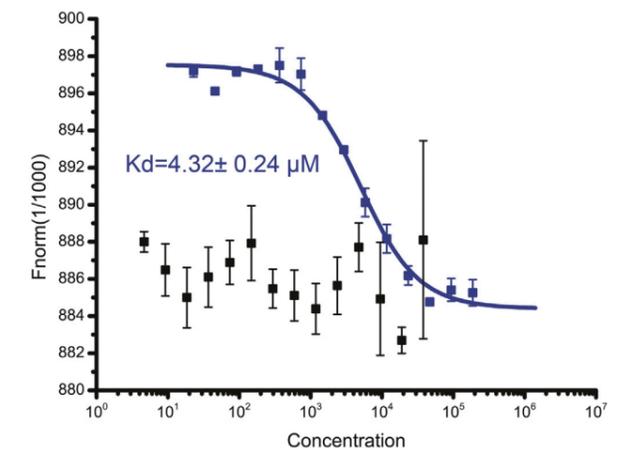
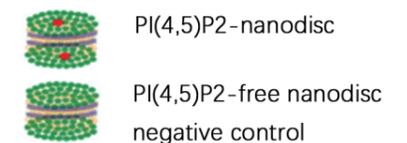


Schax, E. et al. Aptamer-based depletion of small molecular contaminants: A case study using ochratoxin A. *Biotechnology and Bioengineering* 20, 1016-1025, doi:10.1007/s12257-015-0486-1 (2015).
Skouridou, V. et al. Aptatope mapping of the binding site of a progesterone aptamer on the steroid ring structure. *Analytical biochemistry* 531, 8-11, doi:10.1016/j.ab.2017.05.010 (2017).

蛋白-脂类 调控蛋白与磷脂酰肌醇二磷酸识别机制

磷脂酰肌醇 (4,5) 二磷酸，即 PI(4,5)P2 在包括胰岛素分泌在内的胞吐过程中起非常重要的作用。Granuphilin 是具有串联 C2 结构域的蛋白，介导了胰岛素颗粒进入细胞质膜的过程。C2A 结构域通过与 PI(4,5)P2 结合，在这一过程中发挥重要作用。

为了研究 C2A 与 PI(4,5)P2 的结合，来自中国科学院合肥物质科学研究院强磁场科学中心的研究人员首先将 PI(4,5)P2 组装到 nanodisc 中，用以模拟磷脂双分子层环境。MST 试验结果显示，C2A 与含有 PI(4,5)P2 的 nanodisc 发生结合，二者的亲和力为 4.3 μ M，而不与空 nanodisc 相互作用。



Wan, C. et al. Insights into the molecular recognition of the granuphilin C2A domain with PI (4, 5) P2. *Chemistry and physics of lipids* 186, 61-67 (2015).
van den Bogaart, G., Meyenberg, K., Diederichsen, U. & Jahn, R. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate increases Ca²⁺ affinity of synaptotagmin-1 by 40-fold. *The Journal of biological chemistry* 287, 16447-16453, doi:10.1074/jbc.M112.343418 (2012).

血管紧张素转化酶 2(ACE2) 是新冠病毒重要受体。然而, ACE2 在许多组织中的表达水平较低, 这提示新冠病毒的入侵还依赖于辅助受体。2020 年, 军事医学研究院与中国人民解放军第九六〇医院合作发表文章, 揭示了 B 族 I 型清道夫受体 (SR-B1) 是新冠病毒的辅助受体。当人体中高密度脂蛋白 (HDL) 与新冠病毒 S 蛋白结合后, 成为 S 蛋白和细胞表面 SR-B1 的“桥梁”, 促进了病毒对细胞的黏附和入侵。

研究者首先对新冠病毒 S 蛋白的一级序列进行了分析, 发现了六个可能的胆固醇结合基序。通过 Monolith 检测, 证实 S 蛋白的 S1 亚基能够与胆固醇以及与 HDL 结合 (图 1)。随后, 研究人员进一步确认了结合是通过 S1 亚基 C-termina 的 RBD (receptor-binding domain) 结构域完成的 (图 2)。接下来, 研究人员通过三元结合的竞争性实验, 证实了从新冠康复病人体内提取的单克隆抗体 mAb 1D2 可以阻碍 SARS-2-S1 与 HDL 的结合 (图 3)。

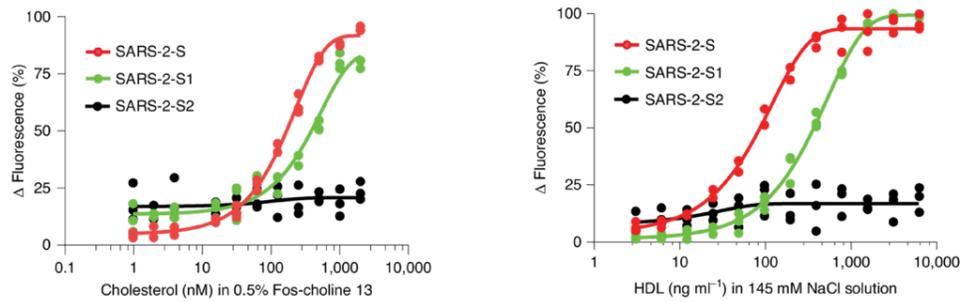


图 1. Monolith 检测证实 SARS-CoV-2 S 蛋白结合胆固醇

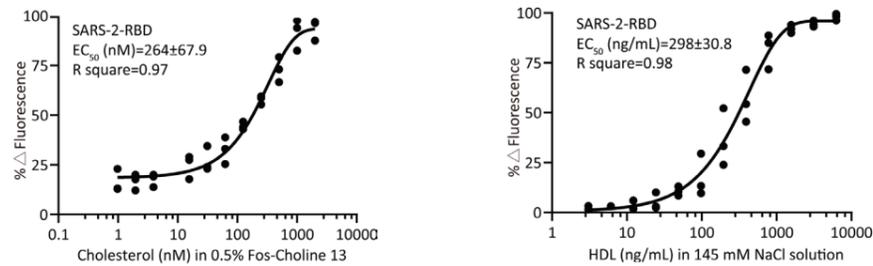


图 2. Monolith 检测证明 S 蛋白 RBD domain 能够与胆固醇以及 HDL 结合

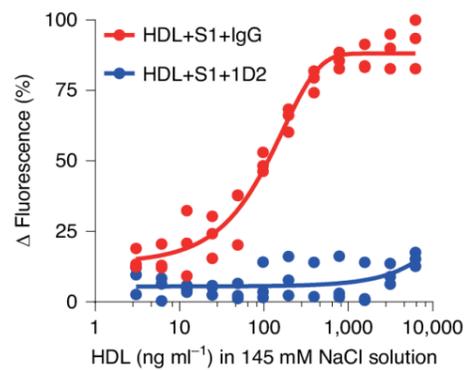
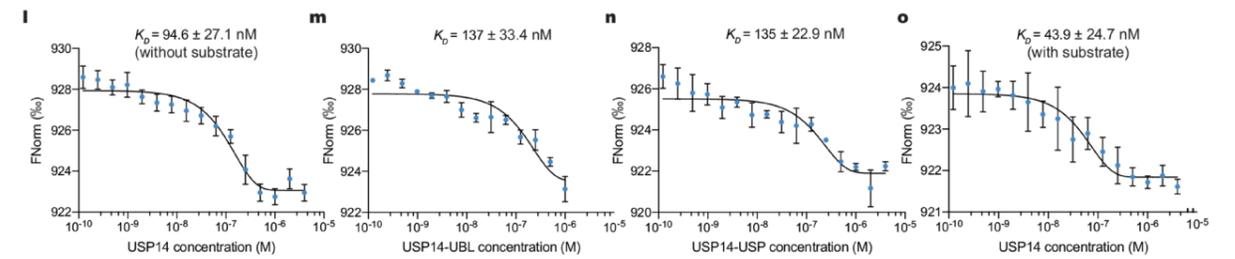


图 3. Monolith 竞争实验证明: mAb 1D2 存在下, S 蛋白与 HDL 无法结合

Wei, C., Wan, L., Yan, Q. et al. HDL-scavenger receptor B type 1 facilitates SARS-CoV-2 entry. Nat Metab 2, 1391–1400 (2020).

在真核细胞中, 蛋白质降解是一项极其重要的生物化学过程, 对细胞周期及分子功能都发挥关键调控作用。泛素-蛋白酶体系是蛋白质降解的一种主要方式。去泛素化酶 USP14 是最主要的蛋白酶体调控分子, 因此它被认为是一个潜力巨大的癌症和神经退行性疾病的靶标。

2022 年, 北京大学研究团队通过时间分辨冷冻电镜技术, 揭示了与去泛素化酶动态调控人源蛋白酶体的机制。在阐述 USP14 被蛋白酶体 26S 激活的机制的过程中, 研究团队利用 Monolith 分子互作仪检测了超大复合物蛋白酶体 26S 与 USP14 的相互作用, 并在溶液体系中轻松检测三元互作, 验证了底物对于 USP14-26S 亲和力的影响。这项突破性的研究阐明了 USP14 和 26S 相互调控活性的原子级结构基础和非平衡热力学机制, 为 USP14 靶向药物分子的开发和临床应用奠定了基础。

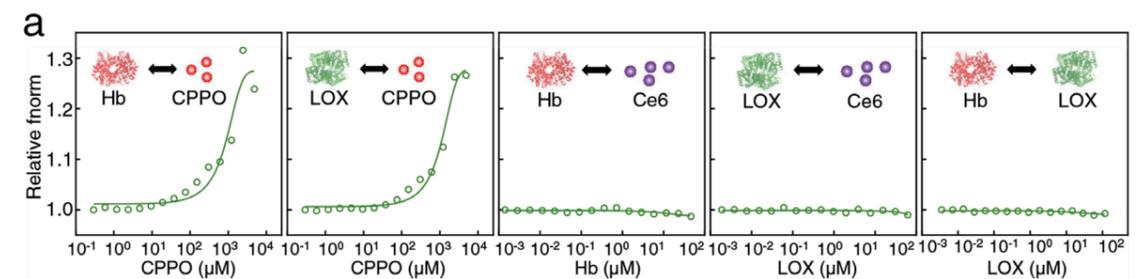


Zhang S, Zou S, Yin D, Zhao L, Finley D, Wu Z, et al. USP14-regulated allostery of the human proteasome by time-resolved cryo-EM. Nature. 2022 2022/05/01;605(7910):567-74.

乳酸代谢异常在肿瘤发生发展中发挥重要作用, 因此乳酸代谢调控拥有巨大的抗癌治疗潜力。

2022 年, 中科院过程所与合作单位针对胶质母细胞瘤 (GBM) 中乳酸水平随肿瘤恶性程度逐步升高, 开发出新型仿生纳米颗粒, 探索 GBM 协同治疗新策略。研究人员利用 GBM 中乳酸水平升高, 选择血红蛋白 (Hb) 和乳酸氧化酶 (LOX) 作为代谢治疗工具, 抑制 GBM 细胞增殖。另一方面, 乳酸代谢产物过氧化氢 (H₂O₂) 可进一步用于针对 GBM 的化学激发光动力学治疗 (PDT), 治疗工具为化学发光剂 CPPO 和光敏剂 Ce6。

研究人员使用 Monolith 检测到 Hb 和 LOX 蛋白均可以直接结合 CPPO。因此, Hb, LOX, CPPO 和 Ce6 可一步自组装并封装进膜材料中, 形成仿生纳米颗粒。进一步实验显示, 该仿生纳米颗粒可穿透血脑屏障, 实现 GBM 的靶向递送。而在 GBM 小鼠模型中, 仿生纳米颗粒表现出显著的抗癌作用, 展示了靶向乳酸代谢的治疗策略在 GBM 中良好的临床应用前景。

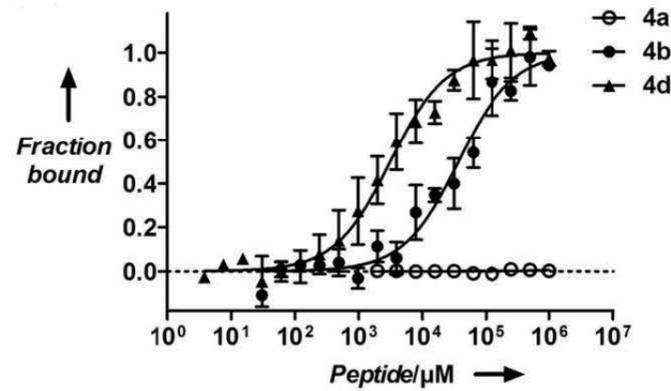


Lu, G., Wang, X., Li, F. et al. Engineered biomimetic nanoparticles achieve targeted delivery and efficient metabolism-based synergistic therapy against glioblastoma. Nat Commun 13, 4214 (2022).

蛋白—纳米颗粒 多肽修饰的纳米颗粒抑制病毒侵染

甲型流感病毒通过血凝素 HA 特异性识别靶细胞表面的唾液酸侵染宿主，因此多年以来，研究人员一直致力于开发偶联有 HA 配体的 scaffolds（如高分子材料、脂质体或纳米金颗粒），竞争结合病毒来阻止其侵染宿主细胞。

研究人员使用 MST 技术在体外验证了病毒颗粒与纳米颗粒间的相互作用并找到了最佳的颗粒大小及多肽修饰密度。其他技术非常难甚至无法检测病毒与纳米颗粒这样的复杂样品，而 MST 技术可以通过亲脂性探针（十八烷基罗丹明 B）标记病毒，非常灵敏的检测到纳米颗粒结合引起的荧光信号变化。



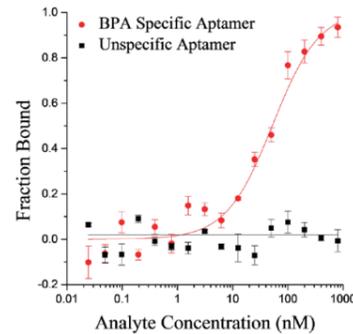
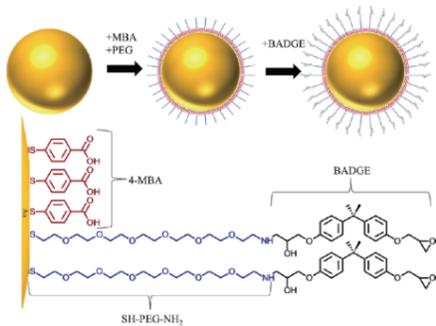
Lauster, D., Glanz, M., Bardua, M., Ludwig, K., Hellmund, M., Hoffmann, U., et al. Multivalent peptide-nanoparticle conjugates for influenza-virus inhibition. Wiley-Blackwell Online Open, 56(21), doi:10.1002/anie.201702005 (2017).

蛋白—纳米颗粒 核酸适配体修饰的纳米颗粒探针

纳米颗粒在医学影像、分子诊断、靶向治疗等方面具有广泛应用。

双酚 A (Bisphenol A, BPA) 广泛用于制造塑料瓶，食品罐内涂层等，同时它又是一种已知的内分泌干扰素，威胁胎儿和儿童的健康。研究人员研发出一种纳米颗粒探针，将双酚 A 固定到金纳米颗粒上，可通过竞争结合的方式定量病患儿童血液中的双酚 A 含量，指导医生的诊断和治疗。应用 MST 技术，研究人员检测了纳米颗粒探针与双酚 A 核酸适配体之间的相互作用，测定到亲和力为 54 nM；这与游离双酚 A 和相同适配体的亲和力 (10 nM) 差异不大。说明固定到金纳米颗粒上没有影响双酚 A 与适配体的结合。

MST 技术不受相互作用分子大小的限制，纳米颗粒，甚至是更大的病毒颗粒与配体的相互作用，都可以应用 MST 技术进行测定。

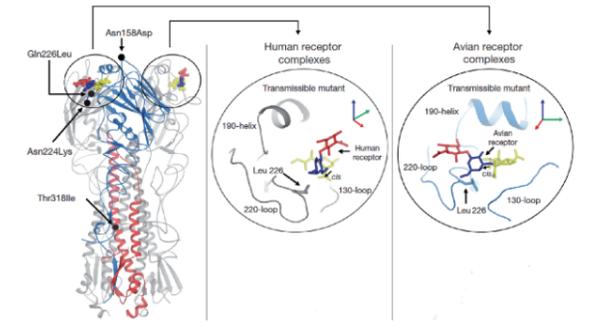
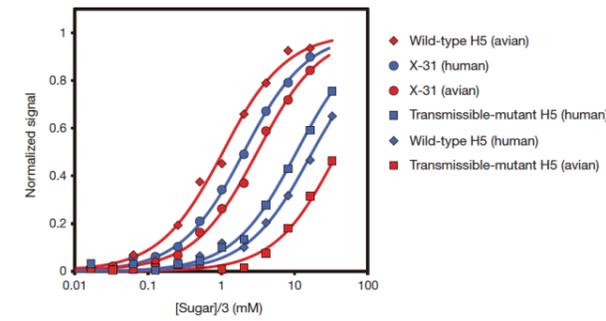


Marks, H. L., Pishko, M. V., Jackson, G. W. & Cote, G. L. Rational design of a bisphenol A aptamer selective surface-enhanced Raman scattering nanoprobe. Analytical chemistry 86, 11614-11619, doi:10.1021/ac502541v (2014).
Pant, K. et al. Surface charge and particle size determine the metabolic fate of dendritic polyglycerols. Nanoscale 9, 8723-8739, doi:10.1039/c7nr01702b (2017).

蛋白—糖类 流感病毒结构改变介导病毒在人类传播的机制

了解流感病毒的物种特异性，是研究人员的长期目标。流感病毒传播很大程度上取决于它们结合宿主细胞表面受体的强弱。病毒表面蛋白血凝素 (haemagglutinin, HA) 介导与宿主细胞互作，是一个关键因子。

英国医学研究委员会国家医学研究所 (NIMR) 的研究人员应用 MST 技术定量研究了一种突变 H5N1 病毒亚型的血凝素 (HA) 和其受体 (细胞表面的糖分子) 的结合特性。结果表明其对于人类受体的亲和力略有增高 ($K_d = 12 \text{ mM VS. } 17 \text{ mM}$)，而对于禽鸟受体的亲和力显著下降 ($K_d = 32 \text{ mM VS. } 11. \text{ mM}$)。使用 MST 技术测定的亲和力与以前使用 NMR 测定的结果非常一致。

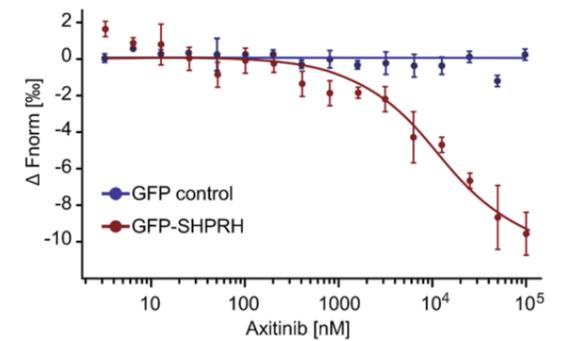
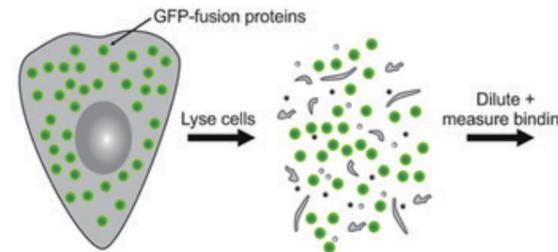


Xiong, X. et al. Receptor binding by a ferret-transmissible H5 avian influenza virus. Nature 497, 392-396, doi:10.1038/nature12144 (2013).
Deng, L. et al. Host adaptation of a bacterial toxin from the human pathogen Salmonella Typhi. Cell 159, 1290-1299, doi:10.1016/j.cell.2014.10.057 (2014).

免纯化 / 无标记检测 老药新用, Wnt/ β -catenin 信号通路活性抑制

很多生物样品亲和力测定在盐溶液中进行；但由于缺少了生物溶液中的很多重要成分，盐溶液中获得的结果不能精确得反应体内情况；且很多实验只有在接近体内环境中才能进行。

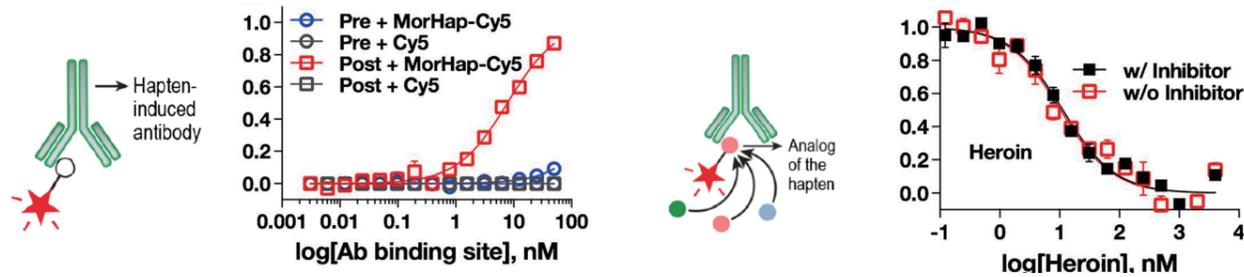
MST 技术对 buffer 没有限制，所以可以在血清和细胞裂解液中测定样品的亲和力。挪威卑尔根大学柯细松教授实验室研究人员融合表达了带 GFP 标签 E3 泛素连接酶 SHPRH，使用 MST 技术在细胞裂解液中对 axitinib (阿西替尼) 结合到融合表达的 GFP-SHPRH 的亲和力进行检测；使用 GFP 做阴性对照；测定 $K_d = 10.4 \mu\text{M}$ 。证明 axitinib 与 SHPRH 存在结合。



Qu, Y. et al. Axitinib blocks Wnt/ β -catenin signaling and directs asymmetric cell division in cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 113, 9339-9344, doi:10.1073/pnas.1604520113 (2016).
Magnez, R. et al. PD-1/PD-L1 binding studies using microscale thermophoresis. Scientific reports 7, 17623, doi:10.1038/s41598-017-17963-1 (2017).

海洛因在血清中半衰期非常短，会产生多种代谢物。研究人员需要在血清中评估多克隆抗体能否有效结合海洛因及其代谢物。而常见的互作定量检测技术均需要使用纯化后的样品，并且样品消耗量大，无法满足检测需求。

MST 技术不受缓冲液限制，可以通过竞争结合实验在血清中直接检测抗体与海洛因及其代谢物相互作用，无需纯化抗体并且样品消耗量低，每组实验仅需 500 ng 抗体。首先在血清中直接检测 Cy5 标记的海洛因半抗原类似物 MorHap 与多克隆抗体的亲和力（图 1 红色曲线），之后将 MorHap 与多克隆抗体混合孵育后，检测复合体与海洛因的相互作用。由于海洛因竞争结合至多克隆抗体，MorHap 会从复合体中解离下来，该过程同样会产生荧光信号的变化（图 2）从而可以间接计算出海洛因与多克隆抗体的亲和力。



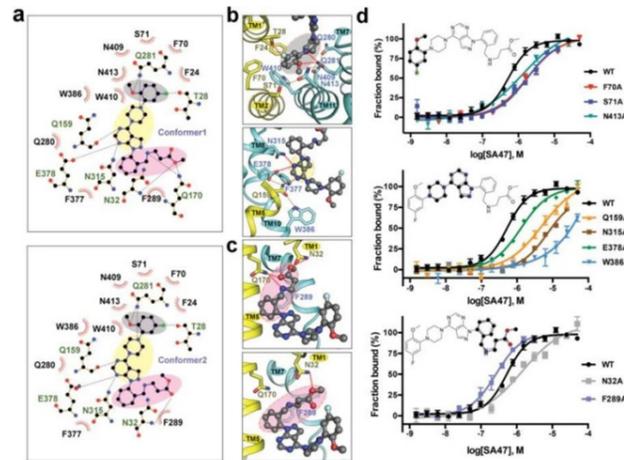
1. 检测 MorHap 与血清中抗体作用

2. 将 MorHap 与血清共孵育，检测与海洛因互作

Torres, et al. A rapid solution-based method for determining the affinity of heroin hapten-induced antibodies to heroin, its metabolites, and other opioids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410, 3885-3903. doi:10.1007/s00216-018-1060-4 (2018).

人类葡萄糖转运体 GLUTs 的表达升高，尤其是 GLUT1 和 GLUT3，与促进癌细胞的过度增殖相关，因此 GLUT 抑制剂具有潜在的抗癌治疗作用。

2022 年，清华大学 Jiang Xin 及普林斯顿大学颜宁课题组共同发表了开发葡萄糖转运蛋白抑制剂的最新研究成果。研究人员报告了一种 GLUT3 的变体 GLUT3exo，可用于筛选和验证外表面抑制剂。随后研究团队鉴定了一种外表面 GLUT3 抑制剂 SA47，并通过 Monolith 分子互作仪检测 SA47 与 GLUT3 及其突变体的相互作用，验证了晶体结构中揭示的抑制剂作用位点。该实验在检测时使用到了 Monolith 的 UV 检测通道，可基于蛋白的内源荧光直接进行亲和力检测。此外 Monolith 分子互作仪检测不依赖于分子量变化，非常适合于小分子互作的检测。该研究为发现用于治疗开发的 GLUTs 表面抑制剂提供了结构生物学基础。



Wang, N., Zhang, S., Yuan, Y. et al. Molecular basis for inhibiting human glucose transporters by exofacial inhibitors. *Nat Commun* 13, 2632 (2022).

Lothar Willmitzer 教授
德国马克斯·普朗克分子植物生理学研究所



在我们部门，我们使用 Nanotemper 公司的 PR 和 MO 仪器来检测蛋白与蛋白、蛋白与代谢物以及蛋白与 DNA 间的相互作用。我们的研究主要集中在植物，酵母和细菌蛋白上。这两种设备蛋白消耗量都非常低，对缓冲体系没有限制并且不需要对蛋白质进行固定化处理，完美契合了我们的实验需求。

Timothy Sharpe 博士
瑞士巴塞尔大学生物物理中心



在过去的一年中我们非常频繁地使用 MO NT.115 研究不同类型的分子间相互作用力，例如蛋白-小分子互作（配体和小分子化学药物），小分子竞争性实验，蛋白-金属离子互作，蛋白-蛋白互作，抗体-抗原互作以及蛋白寡聚物检测。NanoTemper 团队极大地帮助了我们的研究人员和用户，常常提供高实用性的建议。技术支持团队非常专业，对技术了解透彻，有力地支持和帮助了新用户成功开展实验。

Alexey Rak 博士
法国赛诺菲集团结构与生物物理部



在蛋白与小分子，蛋白与蛋白互作的研究中，MST 是值得信赖的实验方式，甚至还可以检测蛋白的聚集浓度。与 ITC、SPR 的结果一致，低样品消耗和耗时短的特点，非常令人赞赏。

Dr. Markus Zeeb 博士
德国勃林格殷格翰集团



MST 技术是一种具有显著的优势生物物理实验技术，样品消耗量低，应用范围广，使用便捷……在一些项目中，我们研究难于操作的蛋白，使用其它方法的困难很多，我们转而使用 MST 进行免标记的实验。最终，得到和其它方法一致的结果。

Antonio Macchiarulo 教授
意大利佩鲁贾大学药学院



MO 仪器简便易用，不需要花很长时间设置实验。样品消耗量少，非固定的实验方式免去了很多样品准备和实验设置上的麻烦。NanoTemper 对客户的服务和技术支持非常好。我们对仪器使用很满意，对于那些寻求快速定量分析结合的实验者，我们推荐 MO 系列仪器。

舒红兵 院士
武汉大学医学研究院



利用微量热泳动技术，我们成功地完成了蛋白-蛋白、蛋白-核酸等一系列相互作用测定。MST 提供了一种非常简单的定量分析结合亲和力的方法。从实验设计到获得高质量的数据只需要很短的时间。MST 技术具有样品消耗量少、无需固定以及不受缓冲液限制等特点，尤其适合测定比较敏感的样品。同时，NanoTemper 公司能够提供优秀的技术支持和客户服务。我们希望将来利用 MST 开发更多的应用方向，并且强烈推荐正在寻找一种简单、快速的定量分析分子互作方法的实验室使用该技术。

雷鸣 研究员
上海交通大学医学院附属九院上海精准医学研究院



本实验室主要研究端粒和端粒酶在维持基因组完整性和染色体稳定性方面的重要性。许多蛋白质和蛋白质复合物涉及到表观遗传学，从而在细胞生命活动调控中发挥重要作用。我们利用微量热泳动技术（MST）来检测蛋白质/蛋白质复合物与 ssDNA/RNA 之间的相互作用。MST 能够很容易地检测蛋白-蛋白或蛋白-核酸之间的相互作用，特别是对于那些用 ITC 或 SPR 很难检测的敏感样品，MST 独具优势。MST 样品消耗量少、测量速度快、应用范围广并且不受缓冲液等条件限制，这使得我们在提高实验效率的同时得到了高重复性的数据。正是因为 MST 这些独特的优点，我们强烈推荐您使用 MST 分析分子间相互作用。

钱韦 研究员
中国科学院微生物研究所



MST 是一个具有高度灵活性和功能强大的研究工具。由于它具有较好的鲁棒性，对溶液成分、待测分子和样品数量要求不高，特别适合对难以检测的分子间相互作用进行研究。对于整合在脂质双分子层里的全长膜蛋白与其它物质相互作用进行分析时，几乎是当前最直接、最适用的方法。

本实验室主攻细菌受体组氨酸激酶的分子识别机制，必须利用蛋白脂质体、Nanodisc 等膜蛋白技术进行分析。基于 MST 技术，我们已经做出了多项细菌感知寄主与环境刺激的重要科学发现，成果发表在包括 Cell Reports, PLoS Pathogens 和 MolPlant-Microbe Interact 在内的期刊上，MST 是开展分子间相互作用研究的强大工具之一。

杜嘉木 教授
南方科技大学生物系



我们实验室主要利用 MST 开展蛋白质和核酸相互作用研究。不同的蛋白质和核酸的互作因种类的不同，会在互作的细节上有比较大的不同，因此经常会出现对于特定的案例，有些方法可以用，有些方法不能用的现象。MST 和现有的大多数测量方法在原理上不同，是一个非常好的补充。我们有几例此前测不出的互作，用 MST 都拿到很不错的数据。因此，我们觉得 MST 和现有的基于其他原理的测量方法可以相互补充，使得研究手段更加丰富和完整。



国内用户 >200

国际用户 >1000



1. Zhang, J. et al. Discovery of natural-product-derived sequanamycins as potent oral anti-tuberculosis agents. *Cell* 186, 1013-1025.e24 (2023).
2. Wang, C. et al. Structural basis for GSDMB pore formation and its targeting by IpaH7.8. *Nature* 616, 590-597 (2023).
3. Sen Santara, S. et al. The NK cell receptor NKp46 recognizes ecto-calreticulin on ER-stressed cells. *Nature* 616, 348-356 (2023).
4. Reardon, J. et al. Trustworthiness matters: Building equitable and ethical science. *Cell* 186, 894-898 (2023).
5. Oudit, G. Y., Wang, K., Viveiros, A., Kellner, M. J. & Penninger, J. M. Angiotensin-converting enzyme 2—at the heart of the COVID-19 pandemic. *Cell* 186, 906-922 (2023).
6. Miao, W. et al. Glucose dissociates DDX21 dimers to regulate mRNA splicing and tissue differentiation. *Cell* 186, 80-97.e26 (2023).
7. Huber, S. T., Terwiel, D., Evers, W. H., Maresca, D. & Jakobi, A. J. Cryo-EM structure of gas vesicles for buoyancy-controlled motility. *Cell* 186, 975-986.e13 (2023).
8. Glover, J. D. et al. The developmental basis of fingerprint pattern formation and variation. *Cell* 186, 940-956.e20 (2023).
9. Gao, Y. et al. Molecular basis of RADAR anti-phage supramolecular assemblies. *Cell* 186, 999-1012.e20 (2023).
10. Flury, V. et al. Recycling of modified H2A-H2B provides short-term memory of chromatin states. *Cell* 186, 1050-1065.e19 (2023).
11. Duncan-Lowey, B. et al. Cryo-EM structure of the RADAR supramolecular anti-phage defense complex. *Cell* 186, 987-998.e15 (2023).
12. Dietz, L. et al. Structural basis for SMAC-mediated antagonism of caspase inhibition by the giant ubiquitin ligase BIRC6. *Science* 379, 1112-1117 (2023).
13. Déjosez, M. et al. Bat pluripotent stem cells reveal unusual entanglement between host and viruses. *Cell* 186, 957-974.e28 (2023).
14. Zhu, X. et al. Non-coding 7S RNA inhibits transcription via mitochondrial RNA polymerase dimerization. *Cell* 185, 2309-2323.e24 (2022).
15. Zhong, S. et al. RALF peptide signaling controls the polytubey block in Arabidopsis. *Science* 375, 290-296 (2022).
16. Zhang, S. et al. USP14-regulated allostery of the human proteasome by time-resolved cryo-EM. *Nature* 605, 567-574 (2022).
17. Wu, X. S. et al. OCA-T1 and OCA-T2 are coactivators of POU2F3 in the tuft cell lineage. *Nature* 607, 169-175 (2022).
18. Reznik, N. et al. Intestinal mucin is a chaperone of multivalent copper. *Cell* 185, 4206-4215.e11 (2022).
19. Reboll, M. R. et al. Meteorin-like promotes heart repair through endothelial KIT receptor tyrosine kinase. *Science* 376, 1343-1347 (2022).
20. Qi, Y. et al. A plant immune protein enables broad antitumor response by rescuing microRNA deficiency. *Cell* 185, 1888-1904.e24 (2022).
21. Mamou, G. et al. Peptidoglycan maturation controls outer membrane protein assembly. *Nature* 606, 953-959 (2022).
22. Liu, K.-H. et al. NIN-like protein 7 transcription factor is a plant nitrate sensor. *Science* 377, 1419-1425 (2022).
23. Haahr, P. et al. Actin maturation requires the ACTMAP/C19orf54 protease. *Science* 377, 1533-1537 (2022).
24. Friml, J. et al. ABP1-TMK auxin perception for global phosphorylation and auxin canalization. *Nature* 609, 575-581 (2022).
25. Yuan, G. et al. Elevated NSD3 histone methylation activity drives squamous cell lung cancer. *Nature* 590, 504-508 (2021).
26. Wang, N. et al. Structural basis of human monocarboxylate transporter 1 inhibition by anti-cancer drug candidates. *Cell* 184, 370-383.e13 (2021).
27. Shen, C. et al. Phase separation drives RNA virus-induced activation of the NLRP6 inflammasome. *Cell* 184, 5759-5774.e20 (2021).
28. Shatalin, K. et al. Inhibitors of bacterial H₂S biogenesis targeting antibiotic resistance and tolerance. *Science* 372, 1169-1175 (2021).
29. Prentice, K. J. et al. A hormone complex of FABP4 and nucleoside kinases regulates islet function. *Nature* 600, 720-726 (2021).
30. Liu, C. et al. Pollen PCP-B peptides unlock a stigma peptide-receptor kinase gating mechanism for pollination. *Science* 372, 171-175 (2021).
31. Li, W. et al. Molecular basis of nucleosomal H3K36 methylation by NSD methyltransferases. *Nature* 590, 498-503 (2021).
32. Ibrahim, A. et al. MeCP2 is a microsatellite binding protein that protects CA repeats from nucleosome invasion. *Science* 372, eabd5581 (2021).
33. Gao, M. et al. Ca²⁺ sensor-mediated ROS scavenging suppresses rice immunity and is exploited by a fungal effector. *Cell* 184, 5391-5404.e17 (2021).
34. Casarotto, P. C. et al. Antidepressant drugs act by directly binding to TRKB neurotrophin receptors. *Cell* 184, 1299-1313.e19 (2021).
35. Bang, Y.-J. et al. Serum amyloid A delivers retinol to intestinal myeloid cells to promote adaptive immunity. *Science* 373, eabf9232 (2021).
36. Zhang, L. et al. Structures of cell wall arabinosyltransferases with the anti-tuberculosis drug ethambutol. *Science* 368, 1211-1219 (2020).
37. Zaccara, S. & Jaffrey, S. R. A Unified Model for the Function of YTHDF Proteins in Regulating m⁶A-Modified mRNA. *Cell* 181, 1582-1595.e18 (2020).
38. Wentink, A. S. et al. Molecular dissection of amyloid disaggregation by human HSP70. *Nature* 587, 483-488 (2020).
39. Saunders, S. H. et al. Extracellular DNA Promotes Efficient Extracellular Electron Transfer by Pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Cell* 182, 919-932.e19 (2020).
40. Kitchen, P. et al. Targeting Aquaporin-4 Subcellular Localization to Treat Central Nervous System Edema. *Cell* 181, 784-799.e19 (2020).
41. Jiang, Y. et al. The NAD⁺-mediated self-inhibition mechanism of pro-neurodegenerative SARM1. *Nature* 588, 658-663 (2020).
42. Griffiths, C. D. et al. IGF1R is an entry receptor for respiratory syncytial virus. *Nature* 583, 615-619 (2020).
43. Bonekamp, N. A. et al. Small-molecule inhibitors of human mitochondrial DNA transcription. *Nature* 588, 712-716 (2020).
44. Zhang, B. et al. Crystal Structures of Membrane Transporter MmpL3, an Anti-TB Drug Target. *Cell* 176, 636-648.e13 (2019).

45. Xiao, Y. et al. Mechanisms of RALF peptide perception by a heterotypic receptor complex. *Nature* 572, 270–274 (2019).
46. Sharif, H. et al. Structural mechanism for NEK7-licensed activation of NLRP3 inflammasome. *Nature* 570, 338–343 (2019).
47. Moura-Alves, P. et al. Host monitoring of quorum sensing during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Science* 366, eaaw1629 (2019).
48. Luther, A. et al. Chimeric peptidomimetic antibiotics against Gram-negative bacteria. *Nature* 576, 452–458 (2019).
49. Li, Z. et al. Allele-selective lowering of mutant HTT protein by HTT-LC3 linker compounds. *Nature* 575, 203–209 (2019).
50. Lee, Y.-R. et al. Reactivation of PTEN tumor suppressor for cancer treatment through inhibition of a MYC-WWP1 inhibitory pathway. *Science* 364, eaau0159 (2019).
51. Kutschera, A. et al. Bacterial medium-chain 3-hydroxy fatty acid metabolites trigger immunity in Arabidopsis plants. *Science* 364, 178–181 (2019).
52. Kim, J. et al. VDAC oligomers form mitochondrial pores to release mtDNA fragments and promote lupus-like disease. *Science* 366, 1531–1536 (2019).
53. Kashiwagi, K. et al. Structural basis for eIF2B inhibition in integrated stress response. *Science* 364, (2019).
54. Huang, H. et al. Histone H3 trimethylation at lysine 36 guides m6A RNA modification co-transcriptionally. *Nature* 567, 414–419 (2019).
55. Hang, S. et al. Bile acid metabolites control TH17 and Treg cell differentiation. *Nature* 576, 143–148 (2019).
56. Gan, N. et al. Regulation of phosphoribosyl ubiquitination by a calmodulin-dependent glutamylase. *Nature* 572, 387–391 (2019).
57. Zhang, Y. et al. Structural Basis for Cholesterol Transport-like Activity of the Hedgehog Receptor Patched. *Cell* 175, 1352–1364.e14 (2018).
58. Mohamed, M. A. A., Stepp, W. L. & Ökten, Z. Reconstitution reveals motor activation for intraflagellar transport. *Nature* 557, 387–391 (2018).
59. Lee, S. et al. Structures of β -klotho reveal a ‘zip code’ -like mechanism for endocrine FGF signalling. *Nature* 553, 501–505 (2018).
60. Lahaye, X. et al. NONO Detects the Nuclear HIV Capsid to Promote cGAS-Mediated Innate Immune Activation. *Cell* 175, 488–501.e22 (2018).
61. Harris, C. J. et al. A DNA methylation reader complex that enhances gene transcription. *Science* 362, 1182–1186 (2018).
62. Dong, Y. et al. Structural basis of ubiquitin modification by the Legionella effector SdeA. *Nature* 557, 674–678 (2018).
63. Deng, M. et al. LILRB4 Signaling in Leukemia Cells Mediates T Cell Suppression and Tumor Infiltration. *Blood* 132, 5236–5236 (2018).
64. Coquel, F. et al. SAMHD1 acts at stalled replication forks to prevent interferon induction. *Nature* 557, 57–61 (2018).
65. Ayala, R. et al. Structure and regulation of the human INO80–nucleosome complex. *Nature* 556, 391–395 (2018).

66. Widenmaier, S. B. et al. NRF1 Is an ER Membrane Sensor that Is Central to Cholesterol Homeostasis. *Cell* 171, 1094–1109.e15 (2017).
67. Welsch, M. E. et al. Multivalent Small-Molecule Pan-RAS Inhibitors. *Cell* 168, 878–889.e29 (2017).
68. Stegmann, M. et al. The receptor kinase FER is a RALF-regulated scaffold controlling plant immune signaling. *Science* 355, 287–289 (2017).
69. Raj, I. et al. Structural Basis of Egg Coat-Sperm Recognition at Fertilization. *Cell* 169, 1315–1326.e17 (2017).
70. Ittner, A. [P4–093]: SITE - SPECIFIC PHOSPHORYLATION OF TAU INHIBITS AMYLOID - β TOXICITY IN ALZHEIMER’ s MICE. *Alzheimer’ s & Dementia* 13, (2017).
71. Ge, Z. et al. Arabidopsis pollen tube integrity and sperm release are regulated by RALF-mediated signaling. *Science* 358, 1596–1600 (2017).
72. Erez, Z. et al. Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions. *Nature* 541, 488–493 (2017).
73. Dong, D. et al. Structural basis of CRISPR–SpyCas9 inhibition by an anti-CRISPR protein. *Nature* 546, 436–439 (2017).
74. Doblaz, V. G. et al. Root diffusion barrier control by a vasculature-derived peptide binding to the SGN3 receptor. *Science* 355, 280–284 (2017).
75. Yamano, T. et al. Crystal Structure of Cpf1 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell* 165, 949–962 (2016).
76. Wild, R. et al. Control of eukaryotic phosphate homeostasis by inositol polyphosphate sensor domains. *Science* 352, 986–990 (2016).
77. Wang, T. et al. A receptor heteromer mediates the male perception of female attractants in plants. *Nature* 531, 241–244 (2016).
78. Walls, A. C. et al. Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer. *Nature* 531, 114–117 (2016).
79. Schardon, K. et al. Precursor processing for plant peptide hormone maturation by subtilisin-like serine proteinases. *Science* 354, 1594–1597 (2016).
80. Athuluri-Divakar, S. K. et al. A Small Molecule RAS-Mimetic Disrupts RAS Association with Effector Proteins to Block Signaling. *Cell* 165, 643–655 (2016).
81. Wang, J. et al. Allosteric receptor activation by the plant peptide hormone phytosulfokine. *Nature* 525, 265–268 (2015).
82. Olmos, Y., Hodgson, L., Mantell, J., Verkade, P. & Carlton, J. G. ESCRT-III controls nuclear envelope reformation. *Nature* 522, 236–239 (2015).
83. Ji, Z., Gao, H. & Yu, H. Kinetochore attachment sensed by competitive Mps1 and microtubule binding to Ndc80C. *Science* 348, 1260–1264 (2015).
84. Hiruma, Y. et al. Competition between MPS1 and microtubules at kinetochores regulates spindle checkpoint signaling. *Science* 348, 1264–1267 (2015).
85. Srinivasan, V., Pierik, A. J. & Lill, R. Crystal Structures of Nucleotide-Free and Glutathione-Bound Mitochondrial ABC Transporter Atm1. *Science* 343, 1137–1140 (2014).
86. Ribeiro, E. de A. et al. The Structure and Regulation of Human Muscle α -Actinin. *Cell* 159, 1447–1460 (2014).
87. Khmelinskii, A. et al. Protein quality control at the inner nuclear membrane. *Nature* 516, 410–413 (2014).



The award for Germany's most innovative SEMs



Reddot Design Award
best of the best 2012

诺坦普科技（北京）有限公司

北京总部

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

上海办公室

地址：上海市黄浦区黄陂北路 227 号中区广场 16 层 1605
邮编：200003
邮箱：support@nanotemper.cn



nanotempertech.com/zh_cn/monolith/
更多 Monolith 产品信息
请关注 NanoTemper 公众号

