



MicroCal ITC systems

MicroCal™ PEAQ ITC

2015年3月推出新产品PEAQ



培训内容

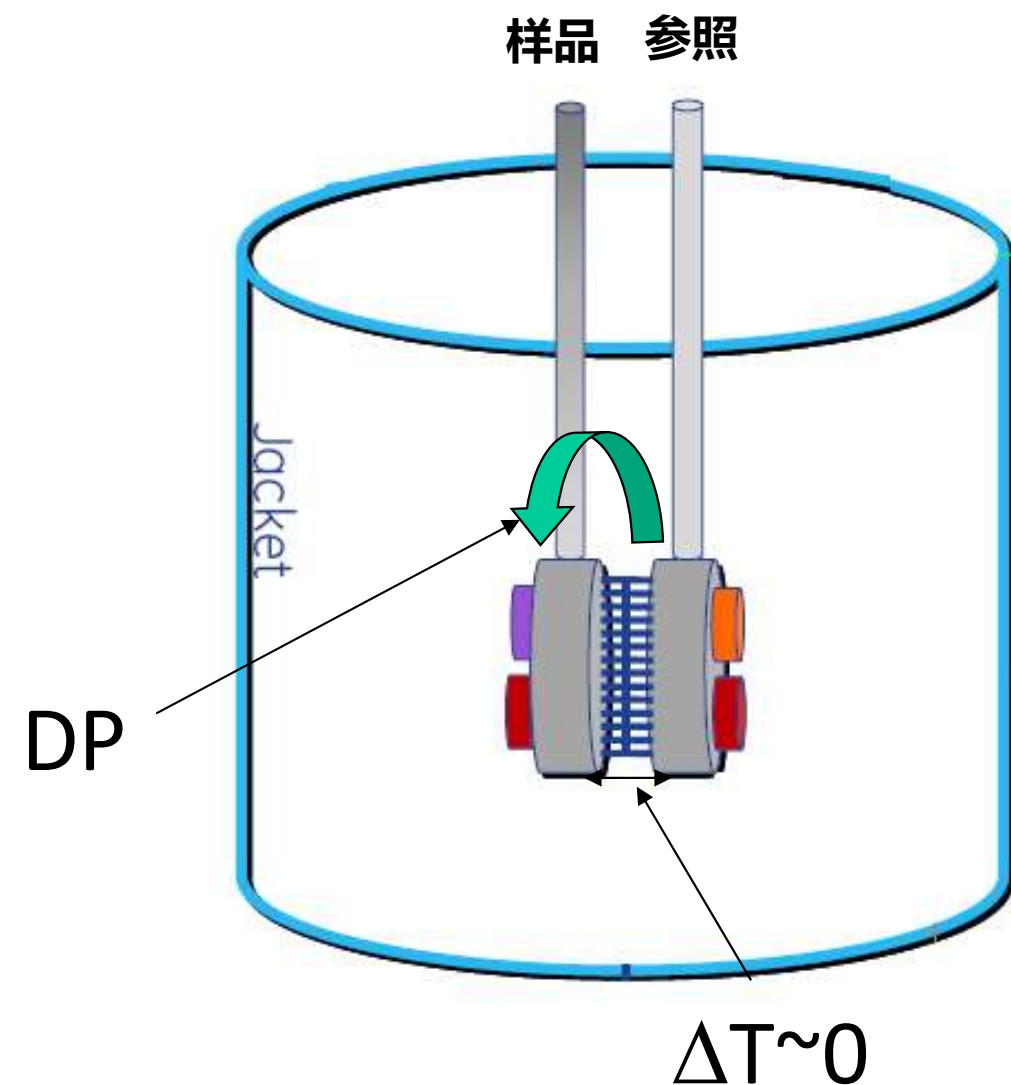
- 等温滴定量热法简介
- ITC的基本实验流程
- DEMO实验和数据分析
- 维护保养



Microcal ITC systems

1. 等温滴定量热仪 (ITC) 的介绍

工作原理

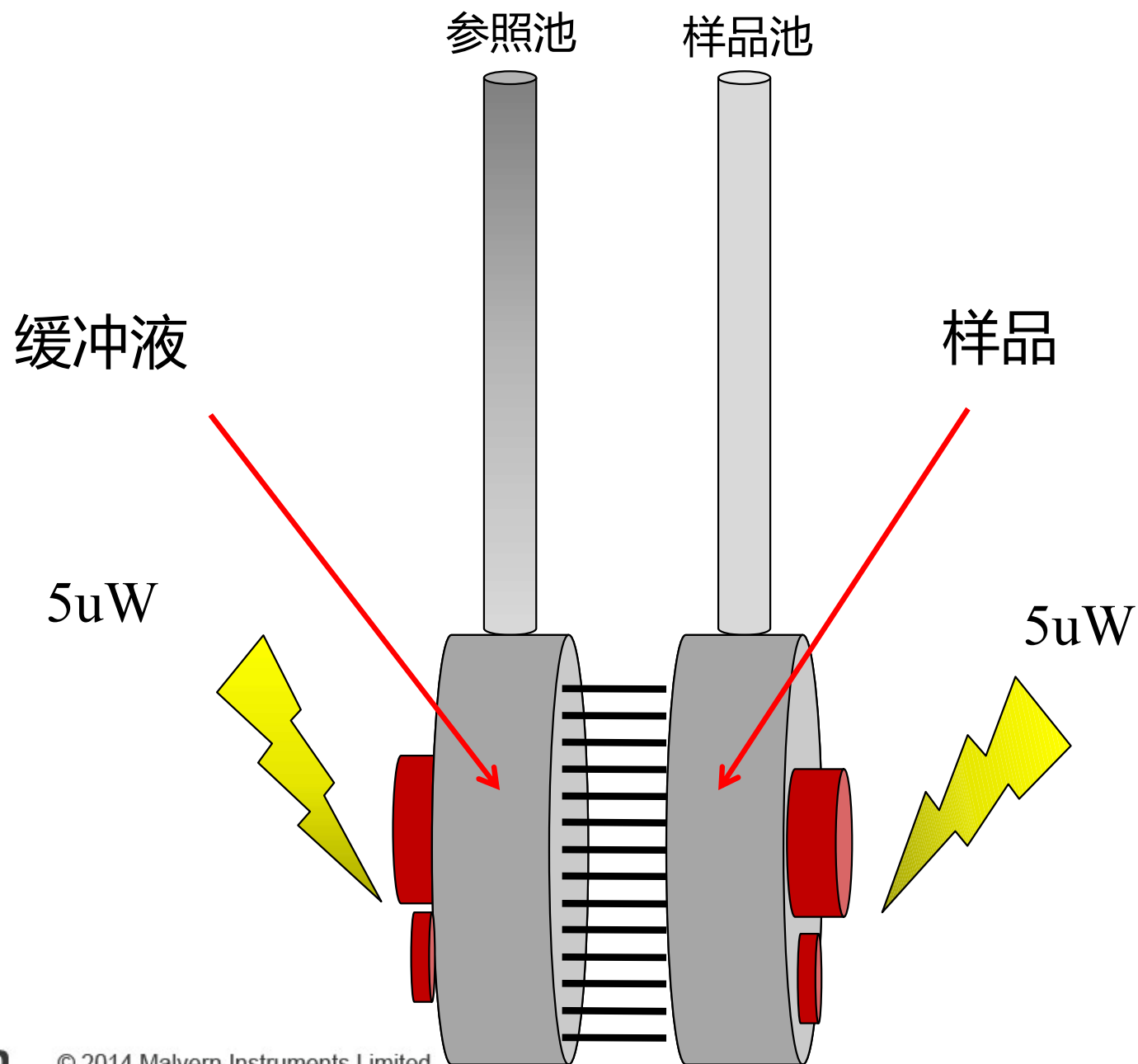


DP是为维持零温度差异所测得的参照池和样品池间的功率差异

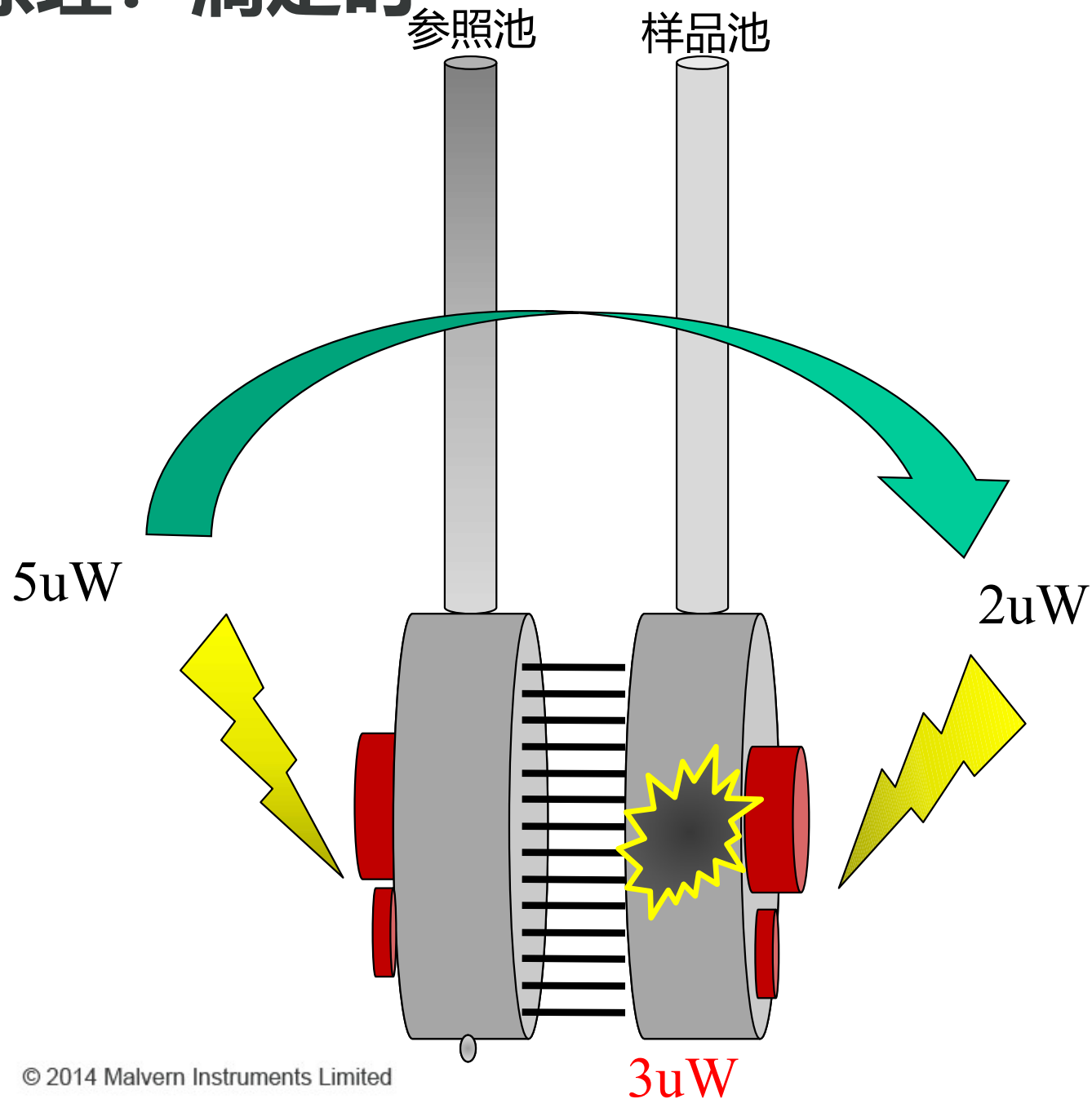
- 参照校准加热器
- 样品校准加热器
- 样品池主加热器

DP = Differential power
 ΔT = Temperature difference

工作原理：滴定前

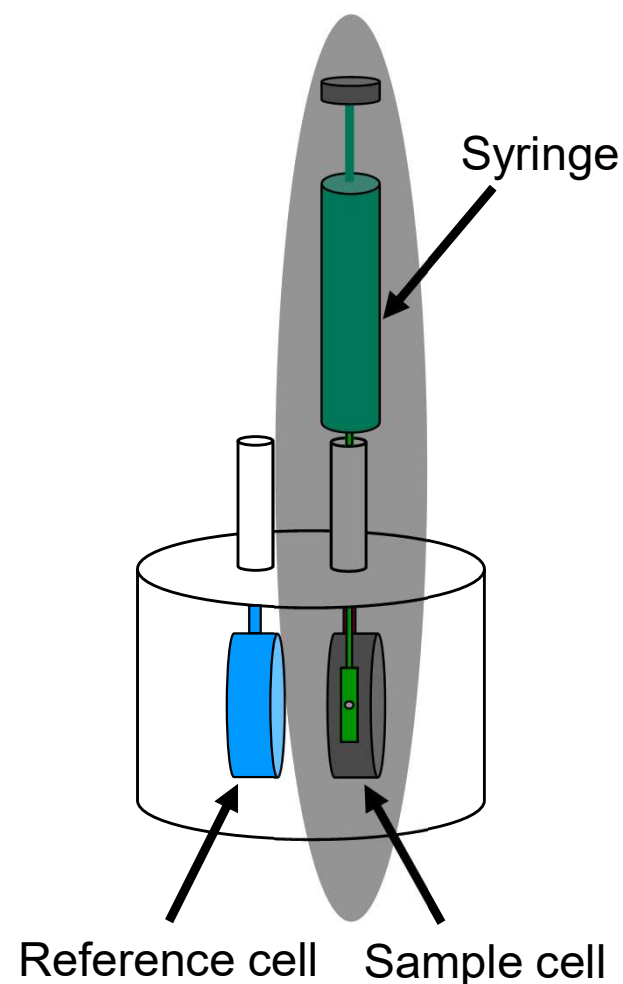


工作原理：滴定时

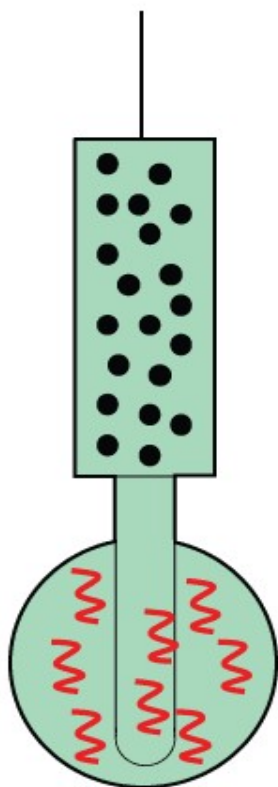


进行ITC实验

- › “配体”放在滴定针中
- › “大分子”放在样品池
- › 测量反应热
- › 单次ITC实验所能得到的参数：
 - 亲和力 (K_D)
 - 反应热 (ΔH)
 - 结合位点的数目 (N)

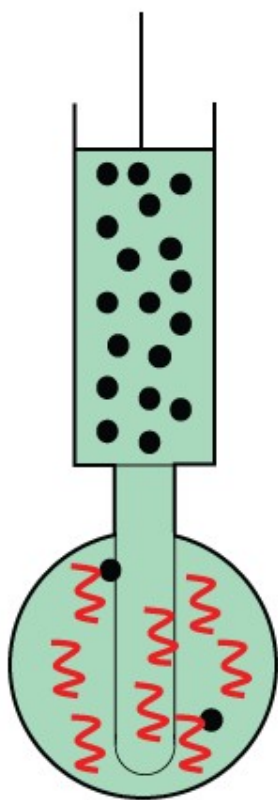


ITC – Before titration

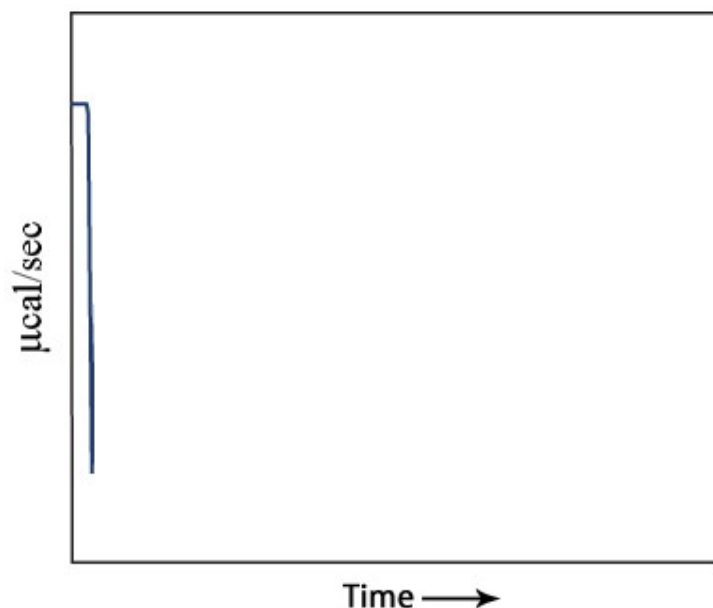


- Compound – in syringe
- ~ Protein target in ITC cell

Titration begins: First injection

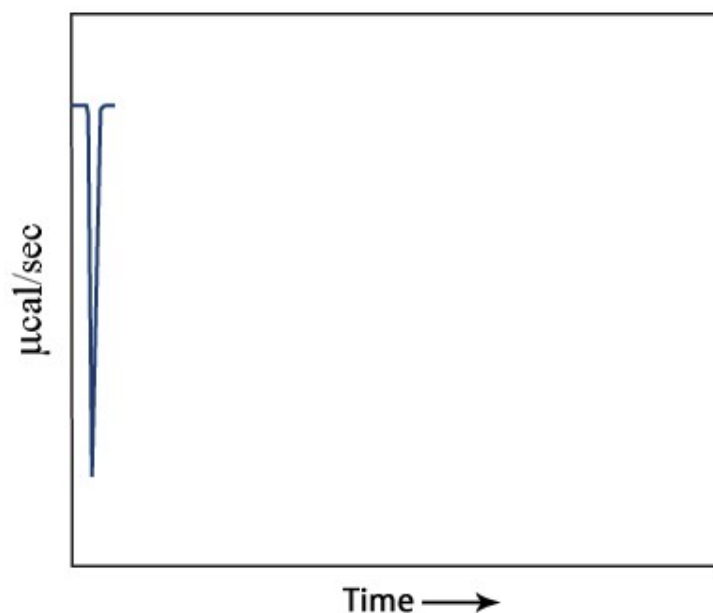
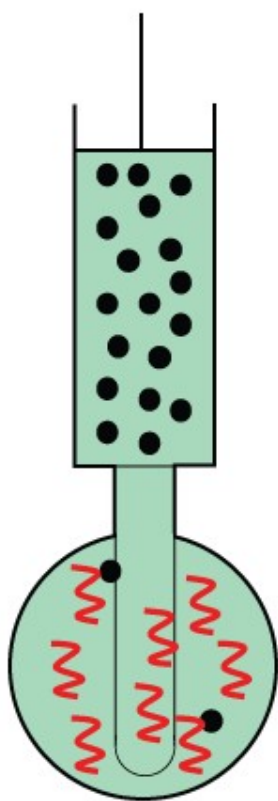


- Compound in syringe
- ~ Protein target in cell
- ~ Protein target-ligand complex



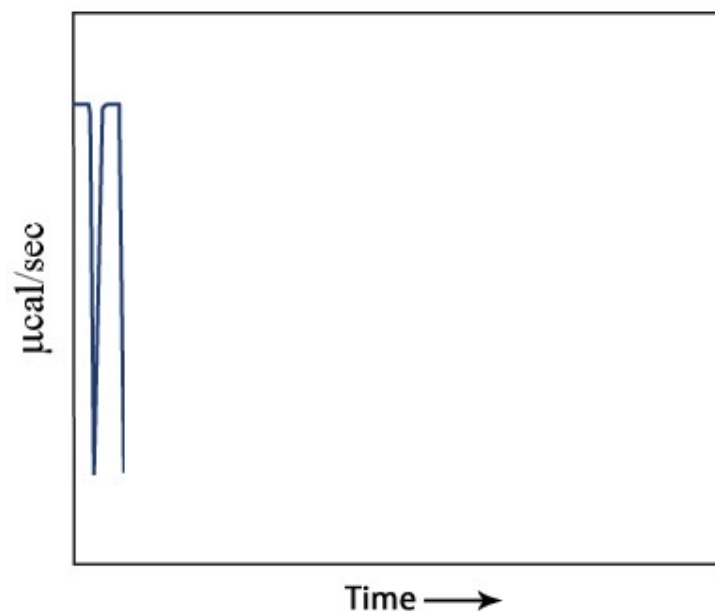
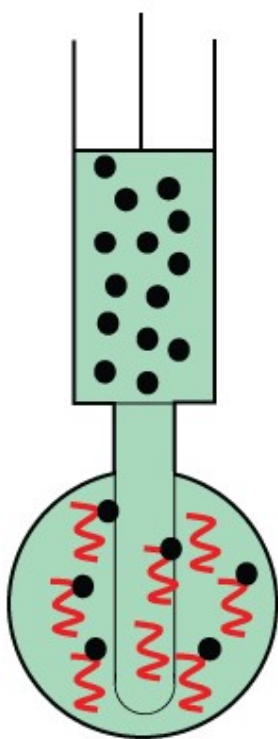
As the first injection is made, the injected compound begins to bind to the target protein.

First injection ready: Return to baseline



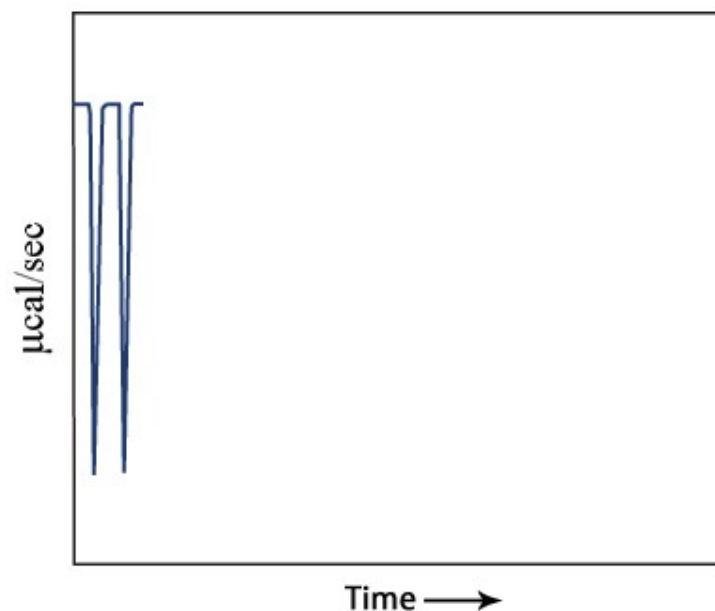
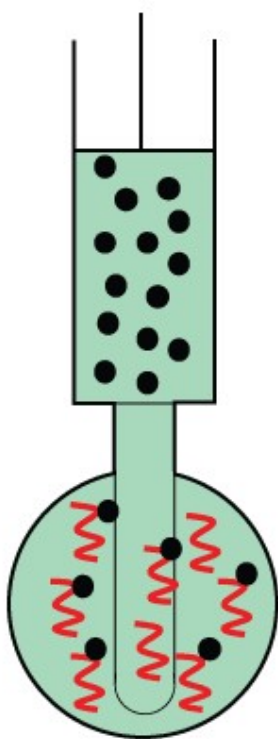
The signal returns to baseline before the next injection.

Second injection



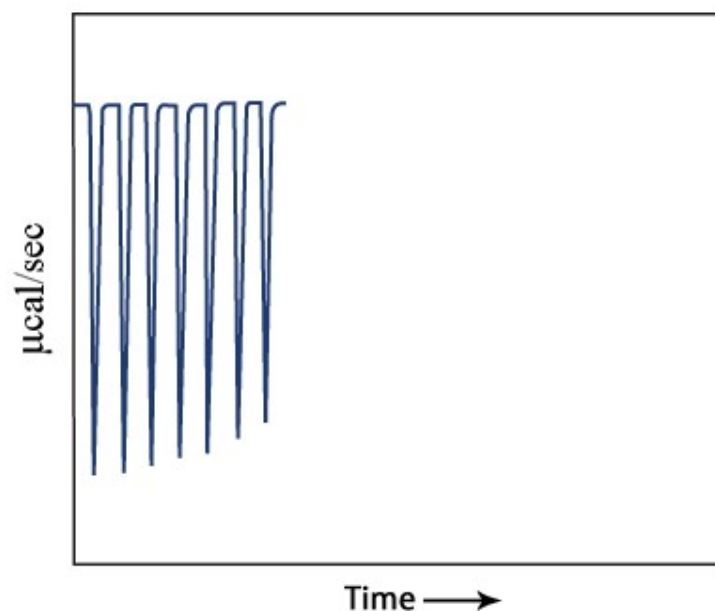
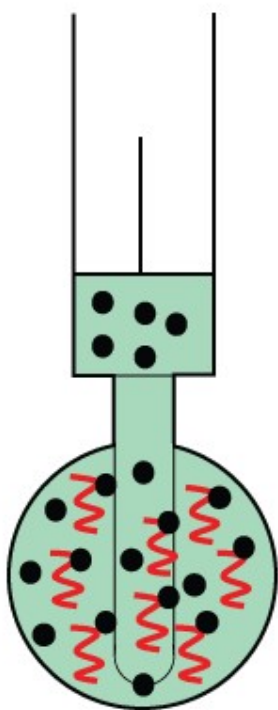
As a second injection is made, again the injected compound binds to the target.

Second injection ready: Return to baseline



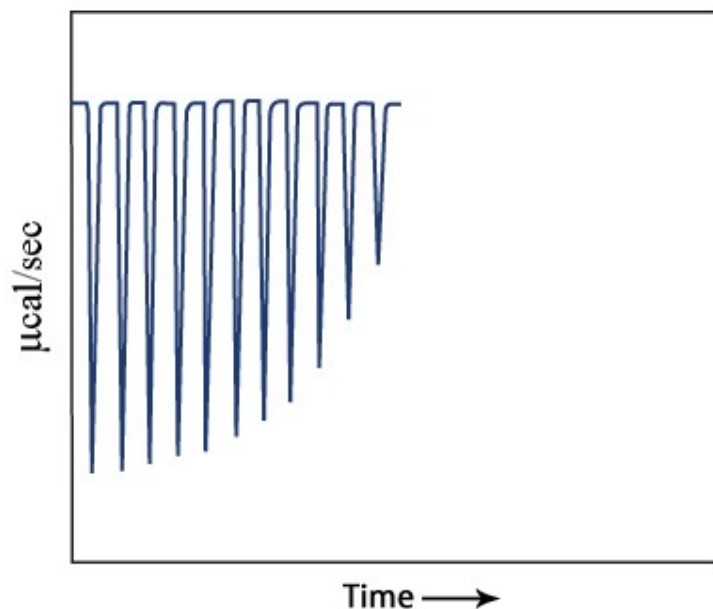
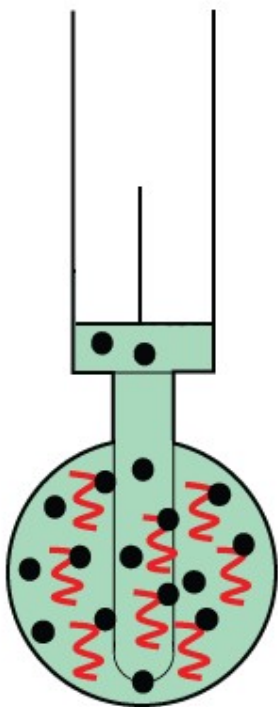
Signal again
returns to
baseline before
next injection.

Injectons continue...



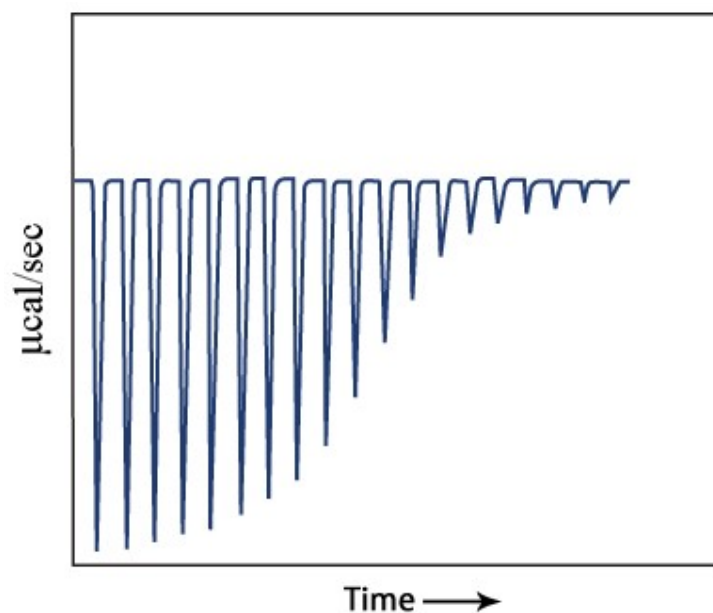
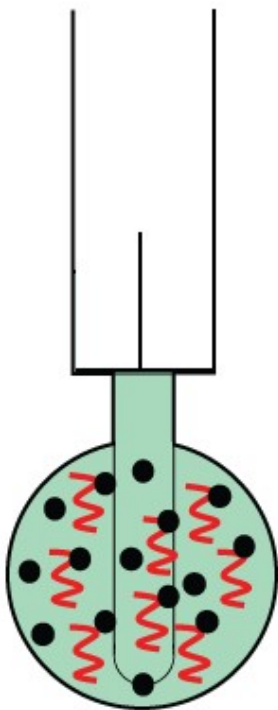
As the injections continue, the target becomes saturated with compound, so less binding occurs and the heat change starts to decrease.

Injectons continue...



As the injections continue, the target becomes saturated with compound, so less binding occurs and the heat change starts to decrease.

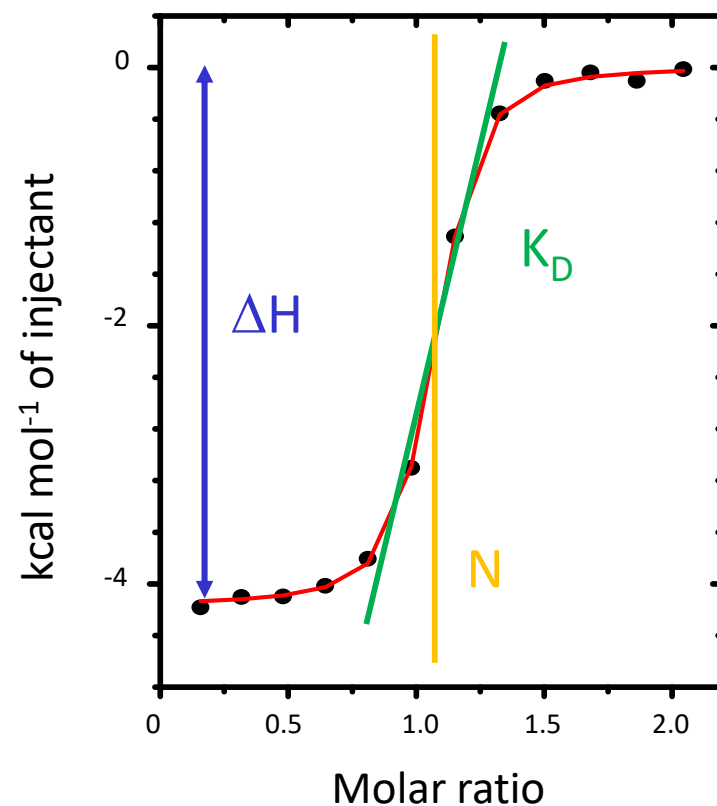
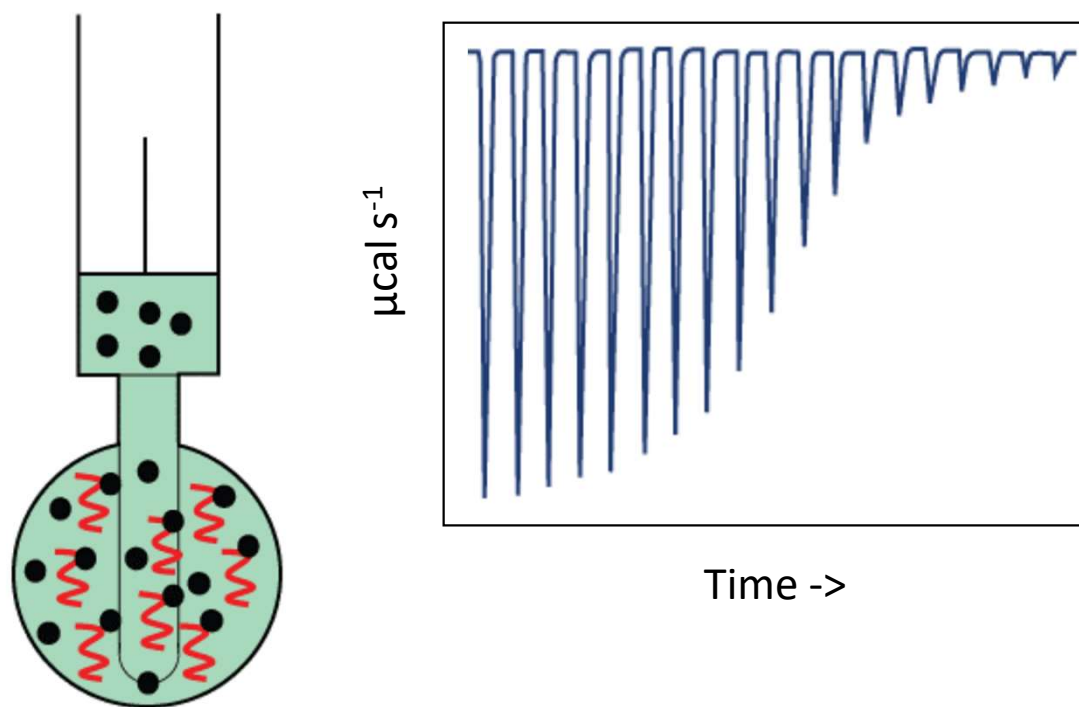
End of titration



When the target is saturated with compound, no more binding occurs.

ITC实验的基本原理

基于热量检测的通用技术



- 原始数据积分;
- 将热量进行积分并运用合适的结合模型得到; 亲和力(K_D), 化学计量比 (N) 和反应焓变(ΔH);
- 通过热力学公式, 计算得到反应熵变(ΔS)。

K_D : Affinity
 N : Stoichiometry
 ΔH : Enthalpy
 ΔS : Entropy

用等温滴定量热法能...

- › 二次筛选/hit 验证中快速得到 K_D 值
- › 测量靶点活性
- › 确认药物与靶点的结合
- › 用热力学指导先导化合物的优化
- › 研究作用机制
- › 确认 IC_{50} 和 EC_{50} 值
- › 测定酶动力学

MicroCal PEAQ-ITC and
PEAQ-ITC Automated



MicroCal iTC₂₀₀

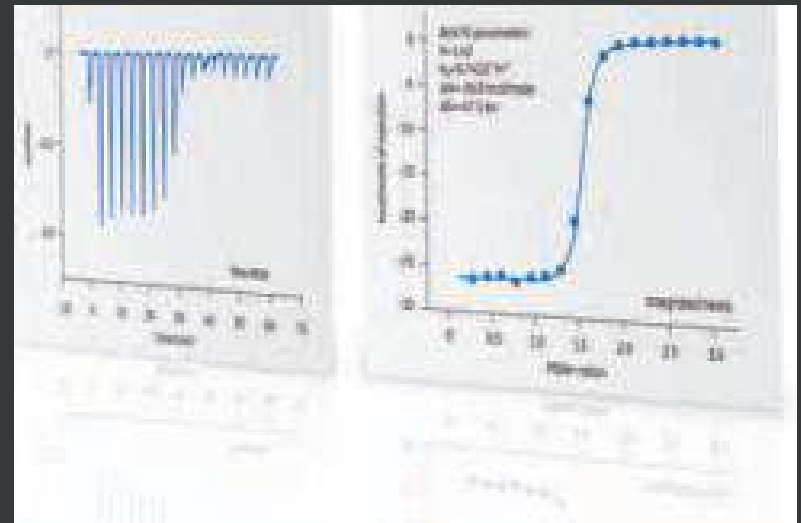


MicroCal VP ITC

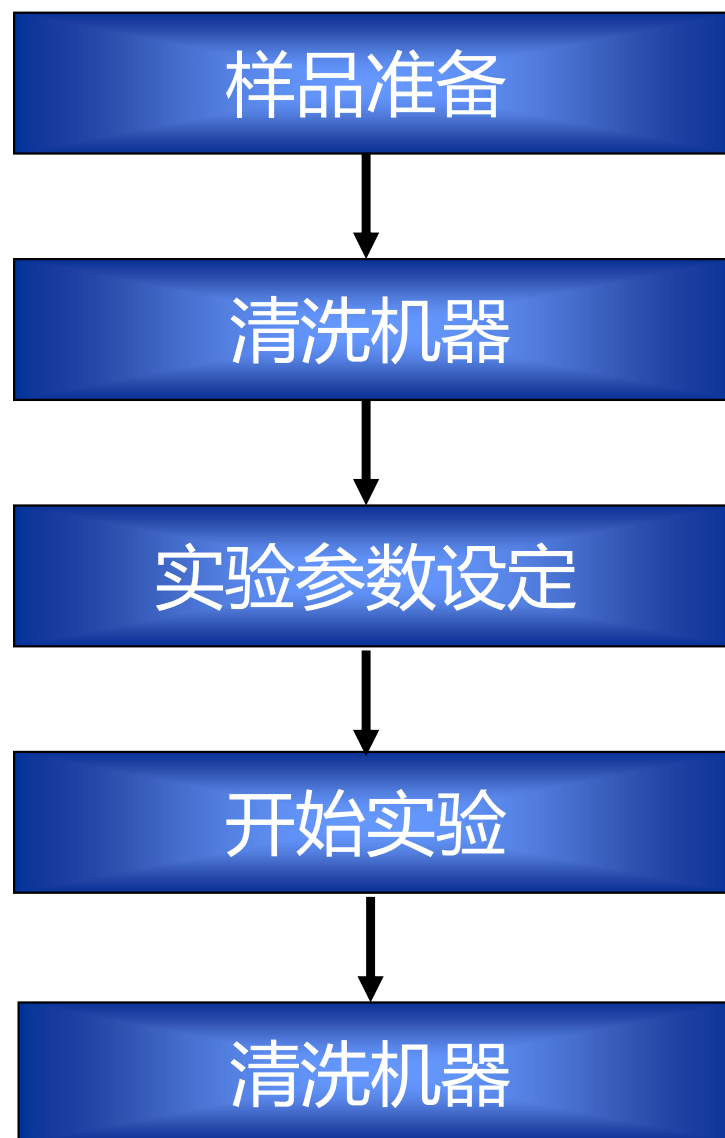


Microcal ITC systems

2. PEAQ ITC的实验基本流程



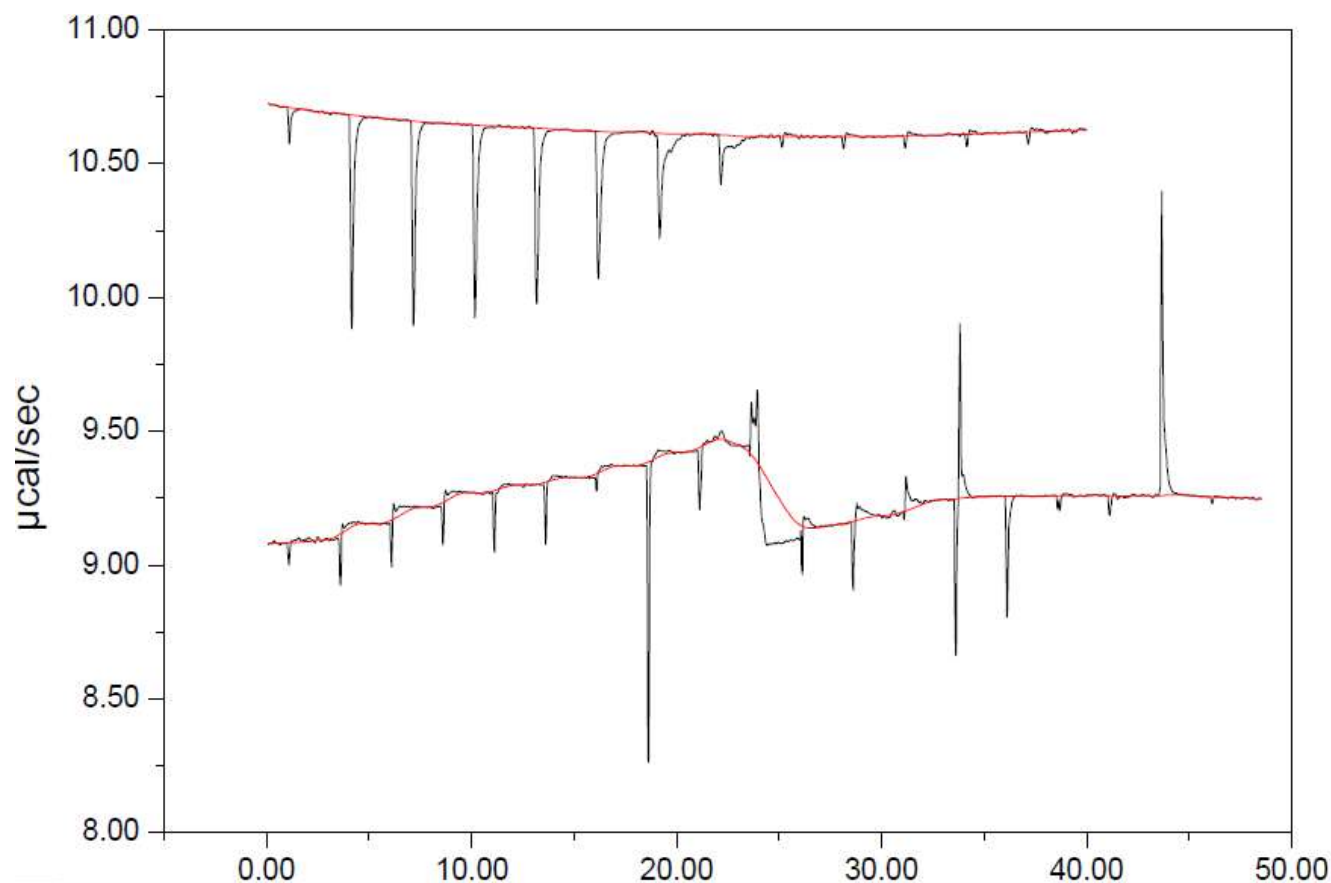
PEAQ-ITC的基本实验流程



样品准备

- 保证滴定物与被滴定物间的缓冲液保持完全一致
 - pH, 盐浓度, DMSO浓度
 - 同一缓冲液中透析或者置换大分子和配体
 - 若配体太小无法透析, 用蛋白透析液配置 (eg. 小分子或者多肽)
- 准确测量浓度
 - 用A280准确测量蛋白浓度
 - 尽量准确地称取配体。若配体带发光基团, 使用UV测定浓度
- 适用于广泛的缓冲体系
 - 几乎所有的缓冲液, 如HEPES, PBS, glycine, acetate等均可使用
 - 如需使用还原剂, 最好使用:
 - TCEP (Tris (2-carboxyethylphosphine) hydrochloride)
 - β -巯基乙醇 (β - mercaptoethanol, BME)

清洗样品池和进样针



用20% Contrad 70TM
(14% Decon 90TM)
清洗

典型实验参数设定

- 体积: 约40 μl
 - 初始0.5 μl , 随后18*2 μl
- 持续时间: 4 s
- 间隔: 典型150 s
- 滤过时长: 5 s, 用于平均数据的数据采集时间跨度
- 参考功率: 5 to 10 $\mu\text{cals/sec}$
- 搅拌速度: 750 rpm
- 反馈: 高



Microcal ITC systems

3. DEMO实验和数据分析

目标

- › 演示如何在MicroCal™ ITC PEAK上设置和运行一个滴定实验
- › 1mM CaCl_2 滴定 0.1 mM EDTA (10 mM MES buffer, pH 5.6), 测定相互作用的 K_D , ΔH 和 ΔS 。
- › 简单处理和分析实验数据。



Microcal ITC systems

4. 维护保养

仪器维护 如何做？

› 2个层次的日常维护

常规的用户维护

预防性维护操作 (Malvern Microcal工程师完成)

› 需要的材料

20% Contrad™ 70 或者14% Decon™ 90

EDTA test 试剂盒

自带零件和工具

仪器常规用户维护 每次运行后

› 每次滴定后用去垢剂清洁样品池 (cell)

20% Contrad™ 70 或 14% Decon™ 90 去离子水溶液。

› 用蒸馏水重新充满参比池

› 每次滴定后彻底清洗滴定针 (syringe)

仪器常规用户维护 每周维护

› 用去垢剂彻底清洁样品池（cell）

20% Contrad™ 70 或 14% Decon™ 90 去离子水溶液。

在60°C浸泡30min。

› 用蒸馏水重新充满参比池或与样品池一同清洗

› 每次滴定后彻底清洗滴定针（syringe）

› 每300次循环更换活塞头

仪器常规用户维护 每月维护

› 仔细检测滴定针的玻璃是否破裂

如有任何损坏迹象立即更换进样针

› 用去垢剂彻底清洁样品池和参比池 (cell)

20% Contrad™ 70 或 14% Decon™ 90 去离子水溶液。

在60°C浸泡30min-1h。

› 每次滴定后彻底清洗滴定针 (syringe)

› 每300次循环更换活塞头

长期不用如何处理MicroCal™ ITC 系统

› 如果系统长期不用，应该先彻底清洁并将池中液体抽出，保持池子干燥。

1. 用去垢剂彻底清洁样品池和参比池（cell）

20% Contrad™ 70 或 14% Decon™ 90 去离子水溶液。

在60°C浸泡30min-1h。

2. 彻底清洗滴定针并干燥（syringe）

› 不用时关闭仪器。

Questions?

Thank you!

我该何时呼叫维修工程师?
随时联系您当地的维修工程师
客服：4008206902