

ITC 样品准备须知

注意：为了消除背景稀释放热，获得准确的热力学数据，实验前需要透析或超滤样品 → 准确定量样品 → 确保缓冲液、pH、DMSO 匹配 → 实验前进行 Control 实验

1、样品浓度及体积：

› 首次实验（不知道 K_d 值范围）：建议

样品池浓度为 $20\mu\text{M}$ ，体积为 **$300\mu\text{L}$** （样品池样品最低浓度约 $10\mu\text{M}$ ）

配体浓度 $200\mu\text{M}$ ，体积 **$75\mu\text{L}$** 左右

› 根据 K_D 值及 C-value 选择样品浓度

$$\text{C-value} = [\text{样品池样品浓度}] \times N / K_D$$

（C = 10-100 very good；C = 5-500 good；C = 1-5 and 500-1000 OK；不建议 C < 1 and > 1000）

› 建议的浓度选择

K_D μM	[Protein] μM	[Compound]
< 0.5	10	100
0.5-2	30	300
2-10	50	500
10-100	30	$40 * K_D$
>100	30	$20 * K_D$

2、浓度调整：

› 曲线很难达到饱和（C-value 太低，提高样品池浓度）

› 曲线爆炸式地达到饱和（C-value 太高，降低样品池浓度）

› 放热太小（提高浓度）

3、缓冲液匹配：

› 使用透析、脱盐柱或者超滤方法将蛋白样品统一到一致的缓冲液中。

› 对于样品中的甘油、表面活性剂等添加剂需要额外增加透析时间或超滤次数。

- › 透析过程保持蛋白活性。
- › **保留透析或超滤尾液，用于：**
 - 溶解小分子样品
 - 稀释样品
 - 用于做 Control 实验
- › 透析或超滤后的样品需要重新浓缩并**准确定量**。
- › 改变缓冲液成分，以提高蛋白的稳定性和溶解性。例如 pH，盐离子浓度或其他添加剂。

4、缓冲液选择：

- › ITC 几乎可以兼容所有缓冲液类型。例如：HEPES, PBS, glycine, acetate。
- › 选择最能保持分子活性、水溶性和稳定性的缓冲液。
- › 避免 DTT
- › 如果必须使用还原性试剂，可选择：TCEP 或者 β -巯基乙醇 (BME)。

5、DMSO 匹配：

- › 小分子：由 100%DMSO 溶解的小分子母液，使用蛋白的透析尾液稀释至目标 DMSO 含量，比如 5%。
- › 蛋白：向透析过的蛋白添加 DMSO，达到与小分子**相同的 DMSO 含量**。
(例：50 μ l 的 5 mM 的溶于 100% DMSO 的小分子+950 μ L 的透析尾液，得到含有 **5%** DMSO 的 250 μ M 小分子；50 μ l 纯 DMSO+ 950 μ L 的 25 μ M 透析过的蛋白，得到含有 **5%** DMSO 的 23.75 μ M 的蛋白)

6、pH 匹配

- › 当使用较高浓度的样品时，比如 mM 以上，生物分子本身的缓存能力将造成样品间 pH 差异。
- › 为保证 pH 匹配，实验前使用酸或者碱将样品间的 pH 调一致 (<0.1pH)。或者提高缓冲液浓度，增强 pH 缓冲能力。

7、Control 实验—小分子滴定透析尾液：**必须在正式实验之前进行 Control 实验，以检测匹配。**

- › 使用与正式实验完全相同的参数。
- › Control 放热峰须恒定、高度较小、与正式试验最后几滴的稀释放热接近。