

PEAQ-ITC 操作说明

- 1、先开启仪器和电脑，然后双击桌面上的 control software 图标 ，打开控制软件。
- 2、进入控制软件后，通过左下角提示检查是否联机成功：若显示“Instrument Online”则表示已正常联机，若显示“Instrument Offline”则表示没有联机成功，需检查仪器电源是否打开，数据线是否已连接好。注意仪器的自检提示 ，可能会提示 cell 需要清洗或需要更换耗材等。
- 3、点击左上角的“Run Experiment”，“Method”里会显示已有方法的保存路径，单击后缀为.itcm 的方法，会有该方法的参数显示；双击方法，会进入到该参数的方法里。
- 4、双击进入选择好的方法后，会有“Load”“Run”“Clean”显示，默认是跳到“Run”的界面，先点击“Clean”对仪器进行清洗。

5、----清洁

step 0 是整个清洗的介绍，可以观看视频，看完之后“Next”按照步骤进行清洗；

step 1 是选择清洗方法，**实验前建议 cell 和 syringe 都选择“Rinse”（每结束一次实验选择“wash”）**；

step 2 是将 cell 的清洗工具插到 sample cell 里，需要用力按压一下才能插紧；

step 3 是将 pipette 移到 rest 位置，把 FPA 接头对准 pipette 上的孔插入**（要严格对准，否则 FPA 接头容易损坏）**；

★ **step 4** 是将 pipette 移动到 clean 位置，卡紧卡扣，此时**点击 Next 后清洗开始**，清洗大概 7-12min（Rinse 大概 7min，Wash 大概 12min）后结束**（为避免甲醇残留，清洗结束后请将滴定针空气中干燥 1-2min）**，结束后手动洗池子 3-5 次；

step 5 清洗完后，分离 FPA 接头**（可不分离）**；

step 6 是将 cell 的清洗工具放回原处。

（清洗过程的每一步都可以先看视频后操作，建议新使用仪器的同学看完每一步的视频后再进行操作。）

6、----加样

step 0 是“Load”的一个整体介绍；

step 1 是 cell load，使用上样针缓慢吸取蛋白样品 **300uL** 以上，若有气泡需要轻弹赶走气泡，插入 cell，针尖接触到 cell 底部后抬起 1mm，缓慢注入样品，可以上下抽打或左右搅拌排除气泡**（如果样品粘度比较大则不建议此操作）**，加样时可以加至**稍微**溢出样品池（不要溢出太多，避免污染参比池，影响实验结果），随后用上样针将溢出的样品吸走；

step 2 是将 pipette 移到 rest 位置，把 FPA 接头对准 pipette 上的孔插入，切记要严格对准，否则 FPA 接头容易损坏；

★ **step 3** 是将 **75uL** 左右样品加到小样品管里，放在“Load”位置，**并将 pipette 移动到“Load”位置，点击 Next 后 syringe 开始 load 样品**；

step 4 是 load 完后，**分离 FPA 接头!!!**；

step 5 是将加好样品的 pipette 放到 cell 位置，准备滴定测试。

7、----运行

> 首先输入 syringe 及 cell 里各自的样品浓度, (“Instrument Setting” 可以修改 temperature 等参数, Temperature 通常设置在 25°C, Reference Power 通常设“10ucl/s”, Feedback 通常设“high”, Stir Speed 通常设“750rpm”, Initial Delay 通常设“60s”, Injection Setting 里” # of Injections” 通常设“19 滴”, 每滴通常“2ul”, duration 通常为“4s”, spacing 通常为“120-180s”, 通常按照方法中的默认设置, 不用修改);

> 点击“start”, 弹出提示框里选择文件夹并输入文件名后点击“save”, 样品进入准备测试阶段, 实验进度栏会有 idle--setting temperature—equilibrating—injecting—ready 显示, 进入最后的 ready 阶段表明样品已经测试完。实验开始基线的位置以在设置的 Reference Power 值 ± 1 (最好是 ± 0.3) 范围内为佳。

8、实验完后, 先手动用上样针吸出样品, 然后重复步骤 5 的“Clean”(此时选择“wash”)。实验结束后, 先关软件, 再关仪器。

注意事项:

1、Cell 的盖子不要放在仪器上, 滴定针 load 位置的样品管盖子要放在预留位置, 否则移动滴定针时容易把针碰弯

2、水滴水是检验仪器性能的重要指标, 水滴水至少 5-7 滴; 水滴水的峰以基线平滑, 各个峰的峰面积比较接近, 峰高不超过 0.05 为佳。

3、做完单次滴定后清洗(PEAQ-ITC): 自动清洗前最好手动把 cell 内的溶液吸出, 用 buffer 洗 1-2 次后再用 Cell Wash 命令清洗。(样品池清洗可以用水滴水来检测)

4、做完一天实验或一批实验, 建议 cell 用 soak 浸泡清洗

5、如果系统长期不用, 应该先彻底清洁并将池子中液体抽出, 保持池子干燥。

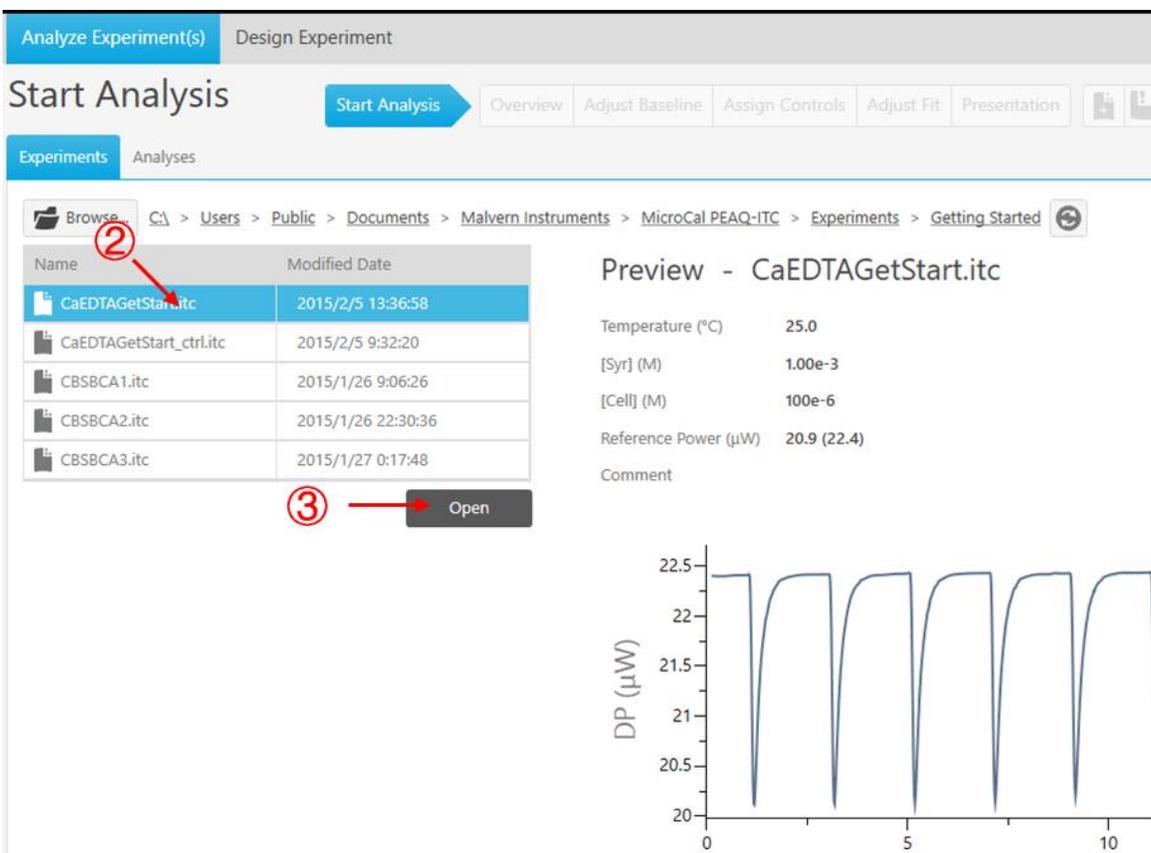
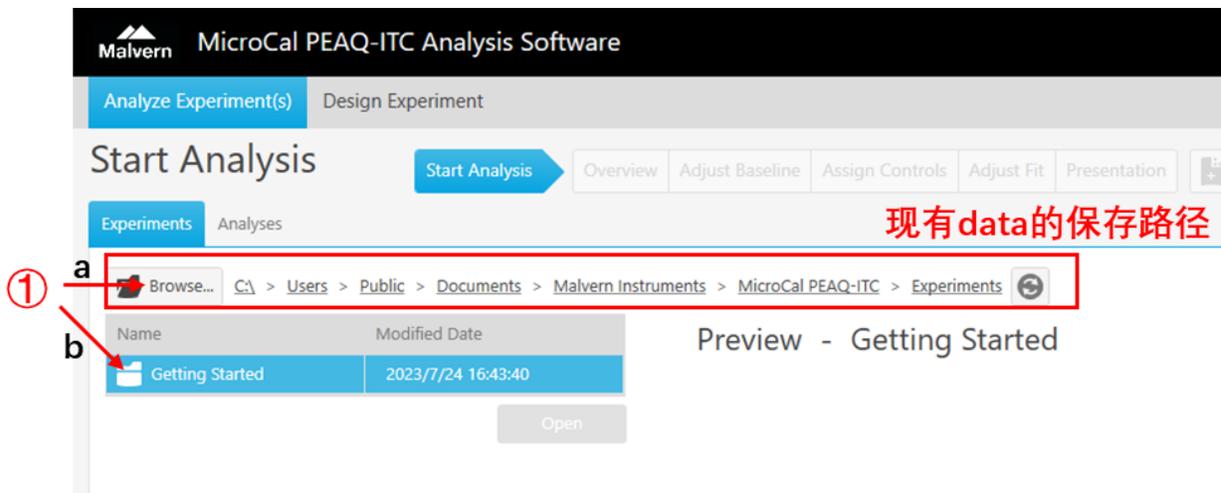
(1) 用去垢剂彻底清洁 soak 样品池和参比池 (cell): 14% Decon™ 90 去离子水溶液, 在 60°C 浸泡 30min-1h。

(2) 彻底清洗滴定针并干燥 (syringe)

6、不用时关闭仪器。

数据分析:

- 1、打开 ITC 分析软件  **New Analysis - MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software** , Experiment 界面 → Browse 打开需要的文件夹 (或者直接双击下方已有的文件夹) → 选择具体的实验, 点击 Open (或者按住“ctrl”, 点击选中多个要分析的 data, 再点“open”可同时打开多个数据) → 进入分析界面



- 2、进入分析界面后, 可以选择要处理的数据 (或者按住“ctrl”, 点击选中多个要处理的数据, 同时处理多个数据) → 选择 presentation → Final Figure 显示最终结果 → Export Data

New Analysis - MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software

Malvern MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software

Analyze Experiment(s) Design Experiment

Overview

Start Analysis Overview Adjust Baseline Assign Controls Adjust Fit Presentation

Experiments

Sort by Bin

- CBSBCA1 Binding **④**
- CaEDTAGetStart Binding
- CaEDTAGetStart_ctrl Control

Fitting Model One Set of Sites

DP (μW)

Time (min)

Display Normalized Heat Raw Heat

ΔH (kJ/mol)

Molar Ratio

⑤

⑥

⑦

⑧

显示实验信息及结果

显示被去除的点

Experiment Information

Filename	CBSBCA1
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	25.1
[Syr] (M)	500e-6
[Cell] (M)	50.0e-6
Ref. Power (μW)	20.9 (21.0)
Comment	
Control Type	Fitted Offset
Control Experiment	N/A
Results	
Bin Comment	Binding
Competitive Model	No
[Syr] (M)	500e-6
[Cell] (M)	50.0e-6
Ligand In Cell	No
N (sites)	$0.931 \pm 1.9e-3$
K_D (M)	$1.34e-6 \pm 33.3e-9$
ΔH (kJ/mol)	-41.8 ± 0.174
ΔG (kJ/mol)	-33.6
$-\Delta\text{S}$ (kJ/mol)	8.20
Offset (kJ/mol)	$-0.546 \pm 9.3e-2$
Reduced Chi-Sqr. (kJ/mol) ²	$1.5e-2$

⑤

⑥

⑦

⑧

⑨

⑩

⑪

⑫

⑬

⑭

⑮

⑯

⑰

⑱

⑲

⑳

㉑

㉒

㉓

㉔

㉕

㉖

㉗

㉘

㉙

㉚

㉛

㉜

㉝

㉞

㉟

㊱

㊲

㊳

㊴

㊵

㊶

㊷

㊸

㊹

㊺

㊻

㊼

㊽

㊾

㊿

Analyze Experiment(s) Design Experiment

Presentation

Start Analysis Overview Adjust Baseline Assign Controls Adjust Fit Presentation

Result Table Final Figure Scatter Plot Injection Table Statistics Plot Signature Plot Raw Plot Integrated Heat Plot

Experiments

Sort by Modified Date

- CaEDTAGetStart Binding

DP (μW)

Time (min)

ΔH (kJ/mol)

Molar Ratio

CaEDTAGetStart
Model: One Set of Sites
[Cell] (M) = 100e-6
[Syr] (M) = 1.00e-3
N (sites) = $0.967 \pm 1.3e-3$
KD (M) = $496e-9 \pm 18.1e-9$
 ΔH (kJ/mol) = $-16.7 \pm 5.7e-2$
Offset (kJ/mol) = $-0.318 \pm 3.4e-2$
 ΔG (kJ/mol) = -36.0

⑦

⑧

⑨

⑩

⑪

⑫

⑬

⑭

⑮

⑯

⑰

⑱

⑲

⑳

㉑

㉒

㉓

㉔

㉕

㉖

㉗

㉘

㉙

㉚

㉛

㉜

㉝

㉞

㉟

㊱

㊲

㊳

㊴

㊵

㊶

㊷

㊸

㊹

㊺

㊻

㊼

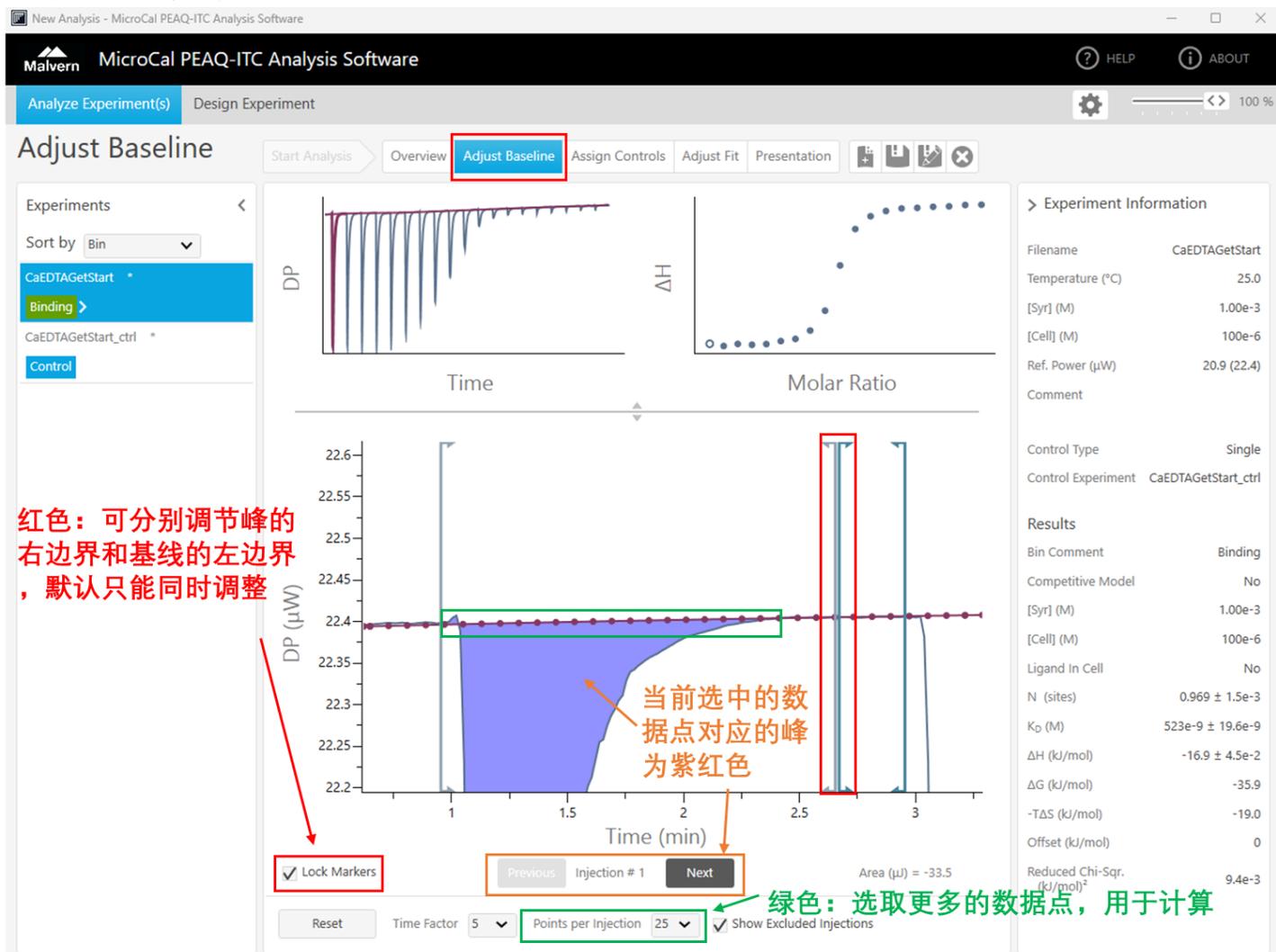
㊽

㊾

㊿

注意:

- 去除或者添加数据点: 选中点后, 右击, 点击 exclude 或者 include
- 基线校正: Analyze Experiment → Adjust Baseline (每次只能打开一个 data, 可以手动调整每个数据点附近的基线)



维护保养:

每次运行后:

- › 每次滴定后用去垢剂清洁样品池 (cell): 14% Decon™ 90 去离子水溶液
- › 用蒸馏水重新充满参比池 (参比池可以 2-3 天更换一次)
- › 每次滴定后彻底清洗滴定针 (syringe)

每周维护:

- › 用去垢剂彻底清洁样品池 (cell): 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 (参比池可以 2-3 天更换一次)
- › 每次滴定后彻底清洗滴定针 (syringe)
- › 每 300 次循环更换活塞头

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): 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子中液体抽出, 保持池子干燥。
 - 1) 用去垢剂彻底清洁样品池和参比池 (cell): 14% Decon™ 90 去离子水溶液, 在 60°C 浸泡 30min-1h。
样品池可以用 0.5M 或者 1M 的 NaOH 浸泡 2h
 - 2) 彻底清洗滴定针并干燥 (syringe)
- › 不用时关闭仪器。