

Nano ITC Quick manual

-原理と操作-

- Nano ITC SV (標準タイプ)
- Nano ITC LV (低容量タイプ)



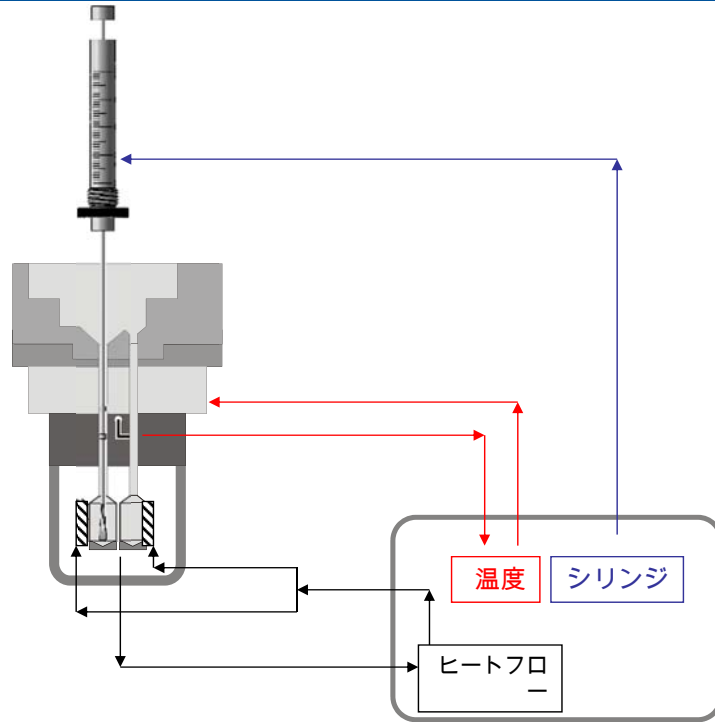
Nano ITCはサンプル容量で選択



アプリケーションによって装置を選択
します

* セルの変更はできません

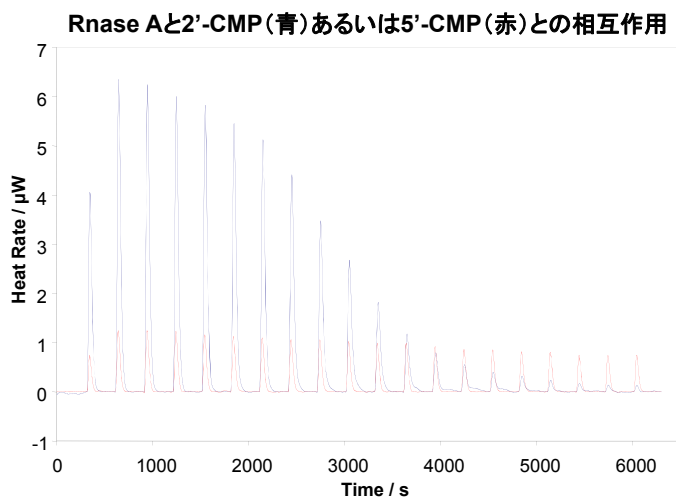
Nano ITC概略図



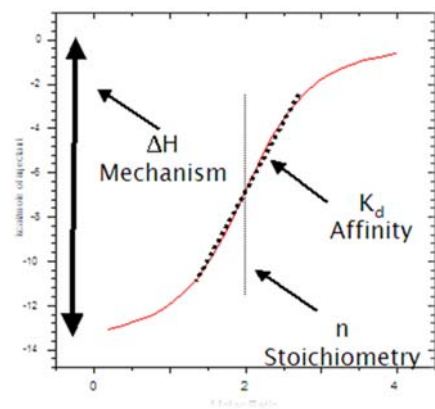
ソフトウェア-ファームウェア操作



等温滴定カロリーメトリー(ITC)



Typical ITC Data



2種類の溶液を混ぜ合わせた時に生じる熱流量変化を測定し、そこから熱量値を算出



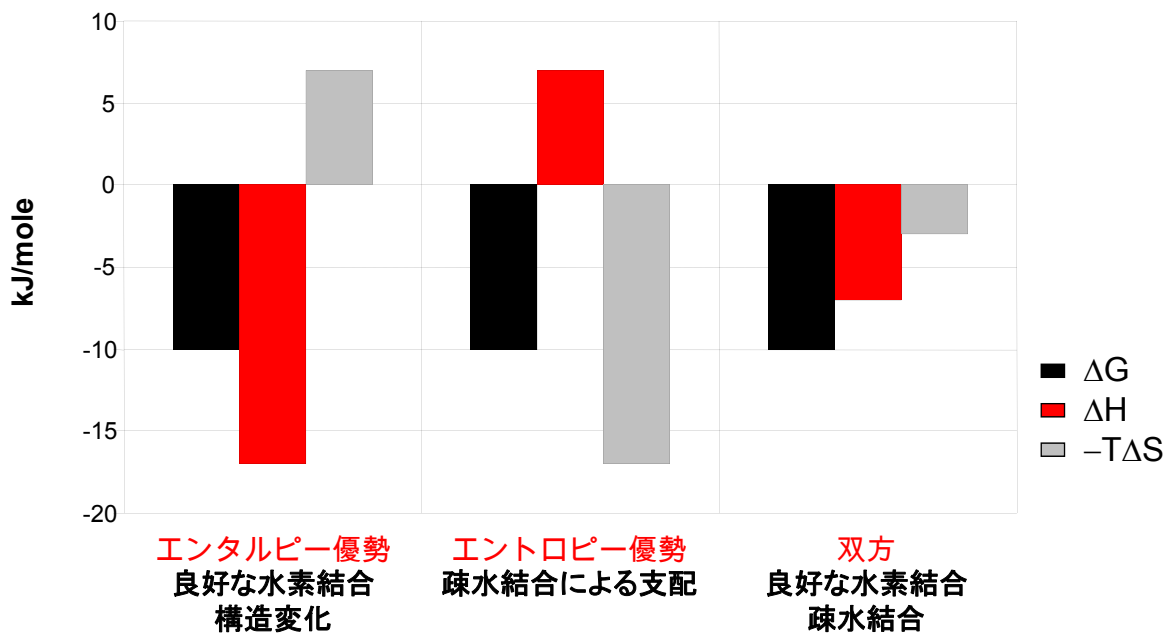
スキャッチャード・プロットにより平衡定数など算出



ITC による熱力学的プロファイル

$$\Delta G = -RT \ln K_a$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$



実際の測定
(サンプル調製 & 測定・解析)



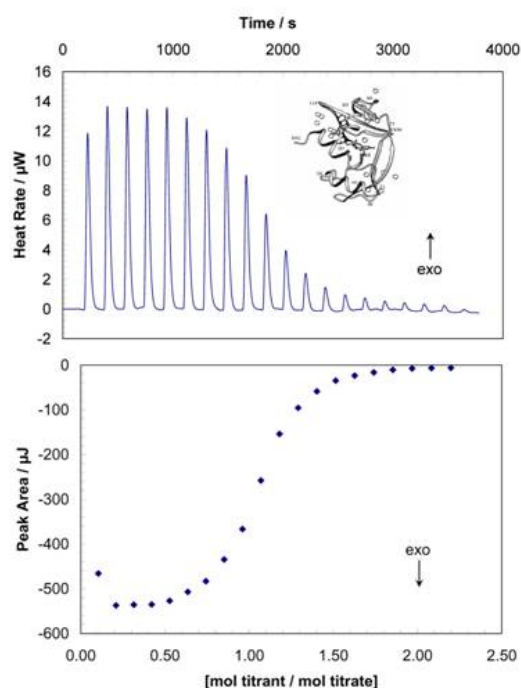
Nano ITC仕様

| 特徴 | Nano ITC SV | Nano ITC LV |
|---------------------------------------|--|--|
| 最少検出熱 (μJ) | 0.1 ¹ | 0.05 ¹ |
| 最大検出熱 (μJ) | 5,000 ² | 3,000 ³ |
| ベースライン安定性 ($\mu\text{W}/\text{hr}$) | ± 0.02 | ± 0.02 |
| ベースライン・ノイズ (Avg SD μW) | $\pm 0.0025^4$ | $\pm 0.0014^4$ |
| 温度安定性 | $\pm 0.0002^\circ\text{C}$ at 25°C | $\pm 0.0002^\circ\text{C}$ at 25°C |
| 操作温度範囲 | 2 to 80°C | 2 to 80°C |
| サンプルセル容量 | 1.0 mL | 190 μL |
| サンプル容量範囲 | 1.2~1.5mL | 300~700 μL |
| 応答時間 (sec) | 13 | 11 |
| 滴定シリンジ容量 (μL) | 100, 250 | 50 |
| 最少滴定量 (μL) | 100 μL : 0.11 250 μL : 0.29 | 50 μL : 0.06 |
| スターラ回転数 (rpm) | 150~400 | 150~400 |
| セル形状 | 固定、円柱状 | 固定、円柱状 |
| セル材質 | 金またはハステロイ | 金 |
| 測定方式 | 断熱型入力補償 | 断熱型入力補償 |



滴定実験

- 一般的に、“レセプター”タンパク質 (titrate) にリガンド (titrant)を滴下
- ストイキオメリー(化学量論比 n ; リガンド分子数/レセプター分子)は変曲線の中点から決定
- 結合定数(‘ K_a ’ or ‘ K_b ’) や結合エンタルピー(ΔH)はフィッティング・カーブから決定。



サンプル調製

- 全ての反応には熱の発生を伴います。目的の反応の熱のみを測定する必要があります
- サンプル粒子の希釈は熱を発生させます(‘heat of dilution’)
- 緩衝液の希釈熱を最小にするために、
 - 1)サンプルを透析
 - 2)リガンドの希釈は1)で使用した透析バッファーを用いる
 - 3) ‘blank’ 測定 (バッファーにTitrateを滴下)を行い、実測定データを補正する
- 可能であれば還元剤や有機溶媒の使用を避ける
- 最適な温度やバッファーを選択する
- 温度: ΔH は温度や測定系に依存し、 ΔC_p で変化します。結合測定できる適切な温度を探する必要があります
- 異なるバッファーは異なるイオン化エンタルピーを持っています。これは結合エンタルピーに影響します



サンプル調製条件

一般的な調整条件として、下記の条件でサンプルを用意します。

- セル側に入れる試薬のサンプル濃度：数10から数100 μ M程度に調整したもの
- シリンジ側のサンプル濃度：セル側サンプルの10倍程度に調整したもの（結合比による）
- 用意するサンプル容量

| | Nano ITC SV | Nano ITC LV |
|-------|----------------|---------------------|
| セル側 | 1.5mL*程度 | 400 μ L*程度 |
| シリンジ側 | 0.3mL*程度 x 2回分 | 80 μ L*程度 x 2回分 |

*Dead volumeを含みます

- 希釈熱測定用レファレンス：溶媒を使用 数mL程度
- 良く用いられる溶媒：酢酸バッファー、リン酸バッファー、カコジル酸バッファーなど
- 添加物などを入れる際は、注意

*ITCによる測定はCファクター値に依存します。下記の等式で $10 < C < 1000$ 程度になるように標的サンプル濃度を調整してください。

$$C = K_a \times [M]$$

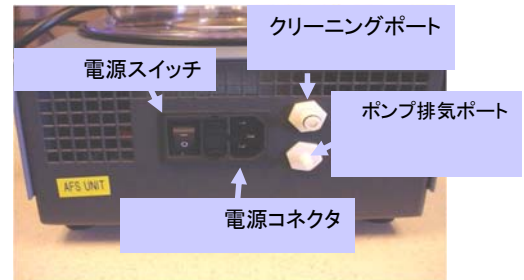
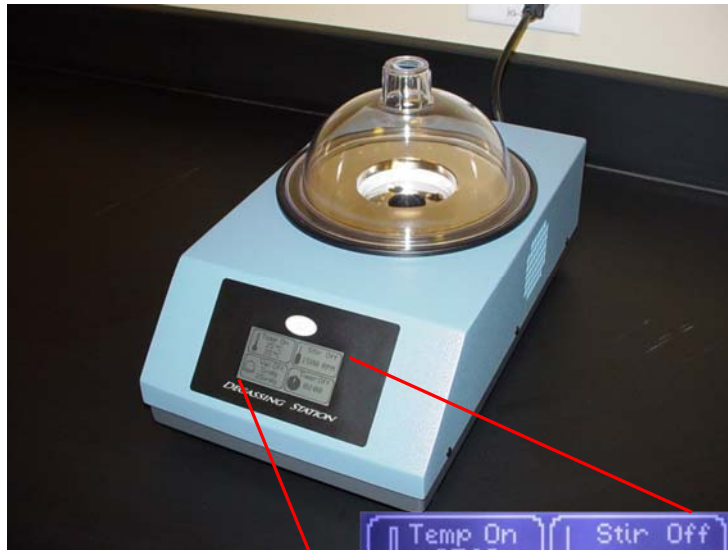
Ka: 結合定数、[M]: 標的濃度

*通常、一サンプル当たり、二測定行います(実際のサンプル測定x1、Blank希釈熱測定x1)。一測定にかかる時間は通常、約0.5時間から2時間(機種による)です



サンプルの測定前処理

- サンプル前調製のための脱気装置
- サンプルセルの簡便な洗浄にも使用



サンプルおよびリファレンスセルへの注入



セルへの溶液注入



ビュレットを外す

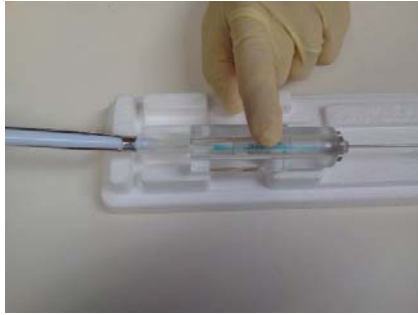


サンプルセル
アクセスチューブ

リファレンスセル
アクセスチューブ



滴定シリンジの装填



シリンジに注入 ↓



小さな泡は問題なし

SV (標準型) (1 mL) – 100 ~ 250 μL

LV (低容量型) (190 μL) – 50 μL



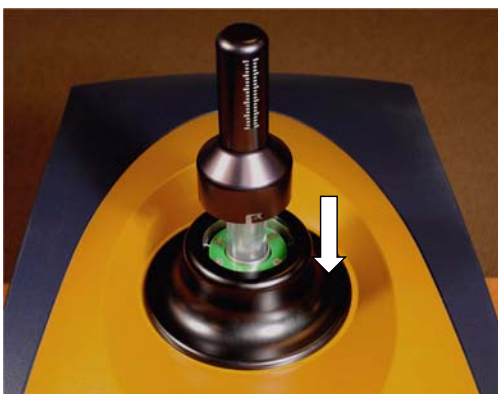
↓



ビュレットにシリンジを装填



Nano ITC の滴定準備



- カロリメータ開口部にニードルから入れ、ビュレットを滴定シリンジのニードルに沿って挿入
- ビュレットをやさしく下向きに押し、時計回りに少し回すとビュレットがロックされます



データ収集ソフト“ITCRun”

The screenshot shows the ITCRun software interface with several key areas highlighted by numbered callouts:

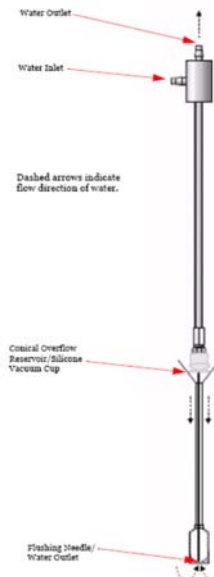
- 1:** "Start/Stop" ボタン (Start/Stop button) in the top toolbar.
- 2:** "Setup" タブ (Setup tab) in the top navigation bar.
- 3:** Experiment Setup section, including titration mode selection (Incremental Titration, Continuous Titration, Electrical Pulses).
- 4:** Injection Table (Injectionテーブル) showing a list of injections with columns for Injection number, Injection Interval (s), and Volume (μL).
- 5:** Equilibration section, including Start Delay (s) and Auto Equilibrate options (Small, Medium, Large).
- 6:** Instrument Control section, including Spring Rate (RPM) and Temperature Set Point (°C).
- 7:** A green "Start experiment" button in the top toolbar.

1. "Starring Rate"を設定
2. Syringe Size"を選択(LV では50、SVでは100あるいは250を選択
3. "Experimental Setup"で測定モードを選択(通常 Incremental Titrationを選択)
4. "Injection"テーブルの"Setup"ボタンをクリックしてSetup Injectionウインドウが開き、Injection Interval(滴定間隔)、Injection volume(滴定量)、およびNumber of Injection(滴定回数)を入力
5. "Auto Equilibrate"を選択
6. "Starring rate"横にある青色のスタートボタンを押し、スターラーの回転を開始
7. Buttonアイコンの中にある緑色の"Start experiment"ボタンを押しして測定を開始



Nano ITC Cleaning

- ほかのサンプルを測定する前にクリーニングツールを入れて簡単・迅速に洗淨できます
- 脱気ステーションを使用することでサンプルセルのフラッシュイングができます



シリンジの洗浄



流水で洗浄

窒素ガスで乾燥



データ解析 “NanoAnalyze”



■ ITCフィッティングモデル

- Independent
- Minimized Independent
- Multiple sites
- Competitive replacement
- Cooperative
- Blank (linear)
- Blank (constant)
- Dimer dissociation

■ 統計処理 (K_a , ΔH , n)

- ユーザ選択による適合反復
- 信頼区間計算
- 適合反復結果のグラフ表示
- 結果の統計処理 (K_a , ΔH , n)

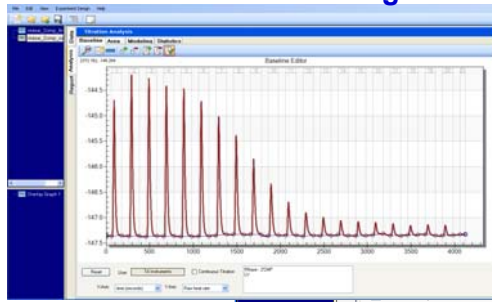
■ 柔軟なグラフ重ね合わせ機能

- 複数のグラフをディスプレイ表示
- ユーザ選択による様々な出力フォーマット

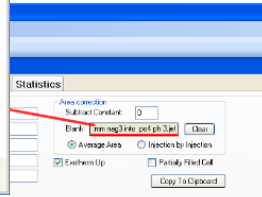


NanoAnalyze による解析の流れ

Baseline & Integration



Input Titration condition & Blank correction



Model Fitting

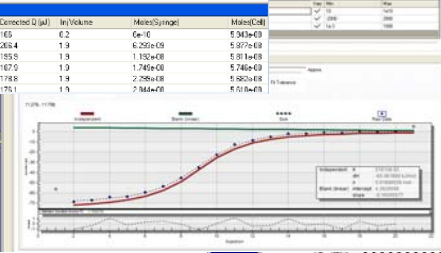
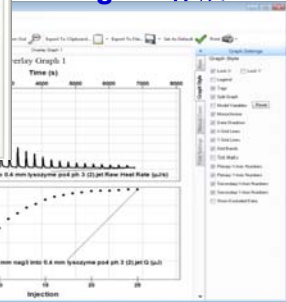


Figure 作成



専用に設計された解析ソフトを使うことで、簡単にデータを解析できます。