

超高感度等温滴定型マイクロカロリメータ
iTC₂₀₀
測定用簡易マニュアル

DKSHジャパン株式会社

目次

はじめに	1
・ ご使用の前に	
・ 設置環境	
・ DKSHジャパン株式会社からのサポート	
1. iTC200 基本原理.....	4
1. 装置ダイアグラム	
2. 解析データ	
2. システムの起動	6
1. iTC200 のシステム立ち上げ	
2. iTC200 のジャケット温度の設定	
3. システムの終了	
3. 機器オペレーション（水-水インジェクション）	10
1. パラメータの設定	
2. サンプルセルへの蒸留水の注入	
3. リファレンスセルへの蒸留水の注入	
4. ピペット（滴定シリンジ）への蒸留水のローディング	
5. オプションの設定	
6. 測定スタート	
7. リアルタイム・データ・ディスプレイ	
8. 測定中の滴定パラメータの変更	
4. クリーニング	23
1. サンプルセルの及び滴定シリンジの定期クリーニング	
2. その他の洗浄ボタン	
3. サンプルセルの強力なクリーニング	
5. メンテナンス	27
1. ピペットの取り外し	
2. シリンジの交換	
3. プランジャーチップの交換	
6. キャリブレーション	36
1. Y-Axis キャリブレーション	
7. 測定パラメータデザイン用ソフトウェア	39
8. サンプル調製	40
9. カロリメトリーに関する図書.....	43

はじめに

ご使用前に

機器を操作するユーザーの皆様はこのガイドラインをお読み頂き、一通りのオペレーションを習得してから実験に望んでいただけますようお願い致します。

機器本来のパフォーマンスを十分に発揮させるだけでなく、誤った操作、理解の基に実験を進めることにより、機器への取り返しの付かないダメージを与えることにもなりかねません。本システムはピコボルトオーダーの電力を取り扱うため、非常に高性能、高感度な実験装置であることを十分ご理解の上ご使用いただけますようお願い申し上げます。

設置環境

PCコントローラ付きの iTC₂₀₀ を設置するには少なくとも通常の実験台（幅 70cm 程度）が必要となります。設置場所は風、室温変動、直射日光、振動、強い電場や磁場（NMR や電子レンジ、大型モータ、冷蔵設備など）が無い場所とします。さらに電源（110～240VAC）は適切に接地され、電圧変動、同期はずみ、ディップやスパイクが乗っていないことなどが必要です。

ほとんどの実験室条件下ではこの装置に内蔵の電源フィルタで十分ですが、場合によっては外部のノイズが装置の性能発揮を妨げることがあります。そのような場合には電源安定化装置を併用することが必要になります。電源に起因するトラブルはさまざまな形であらわれ、全てのケースに有効な電源安定化装置はありません。電源安定化装置を購入する場合はその前に実際に使用する場所で予備テストを試みることをお勧めします。電源由来のトラブルらしいとお考えの場合には当社の技術者に相談していただければ適切なアドバイスを差し上げられるかもわかりません。繰り返しになりますがエアコンのオン/オフにともなう室温変動、室内の風、あるいは装置への直射日光、空間電磁波などは微妙に影響しますから十分気をつけてください。

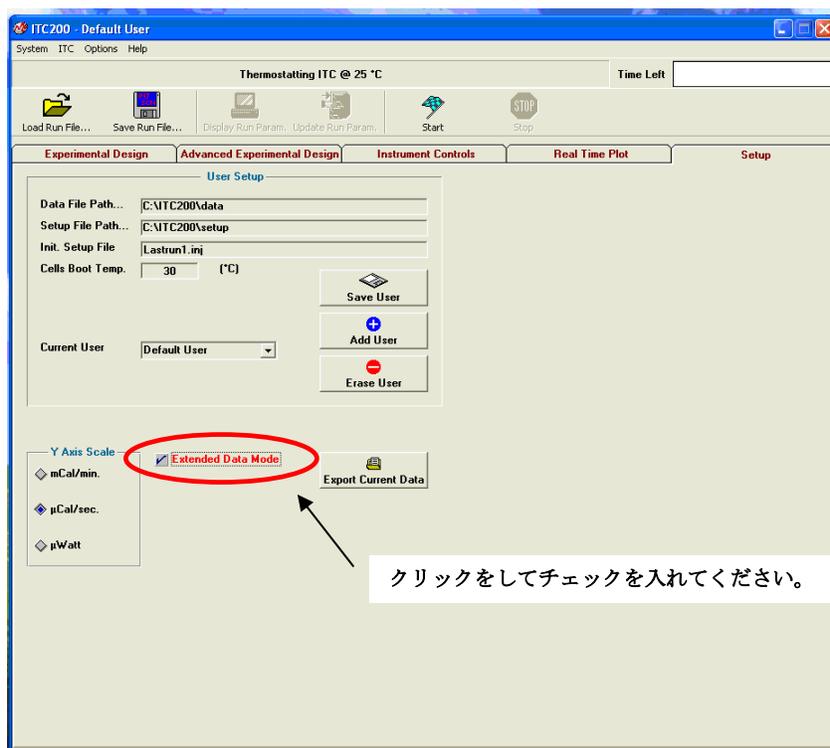
DKSH ジャパン株式会社へのお問い合わせ方法

DKSH ジャパン株式会社へお問い合わせの際には、なるべく最近の問題のデータファイル (*.itc 生データファイル) をメールでお送りいただくと問題解決が早くなります。たとえば測定データに不明な点がある時には生データファイル (*.itc)、またデータ解析に関する質問の場合には、生データファイル (*.itc) と Origin ドキュメント (*.opj) をお送り下さい。

VP-ITC とその操作に関する問題には大きく分けて 2 種類あります。最も極端な例はシステムが全く作動しないという場合です。この場合は直ちに当社の技術者に連絡してください。お客様はハードやソフトを修理しようと試みないでください。

第 2 のケースは、装置は動いているが仕様どおりに動作しないという場合です。たとえばベースラインのドリフトが大きい、再現性のないピークの出現（水/水）、短期ノイズレベルの上昇などです。これらは多くの場合お客様が対応可能です。当社に問い合わせる前に次の診断操作を行ってください。

- 1) 両セルを徹底的に洗浄してください。シリンジもよく洗浄します。（詳細は、4.クリーニングの項を参照）
- 2) セルとシリンジに蒸留水を充填します。
- 3) 以下のように iTC200 with Origin の Setup ウィンドウを開き Extended Data Mode にチェックを入れます。（このモードにチェック入れることでデータファイルに iTC₂₀₀ が作成する全ての情報が入ります。）
- 4) 水 - 水インジェクションの測定（3. 水-水インジェクションの項を参照）をします。



この水-水インジェクションの結果が悪い場合には DKSH ジャパン株式会社の技術サービス部に連絡してください。メールで連絡を頂く場合には、Extended data モードで水/水測定を行った時のデータを添付してください。

DKSHジャパン株式会社 科学機器部 技術課への連絡先

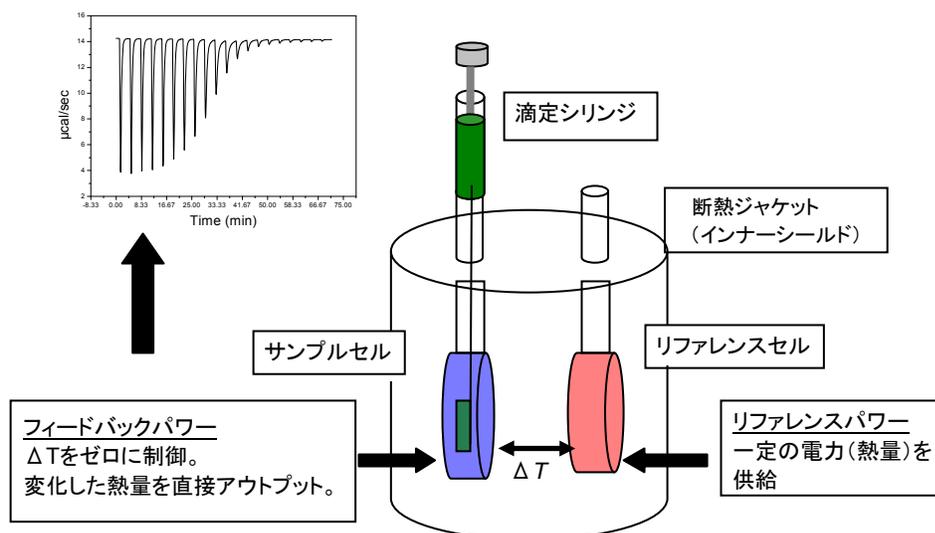
電話番号 : 03-3767-4508

ファックス : 03-3767-4569

1. iTC₂₀₀ 基本原理

1. 装置の概要

iTC₂₀₀ は、温度一定下の条件においてリガンド溶液を高分子溶液に混合させ、その時に生じる反応熱を直接的に測定する装置です。溶液の混合はピペット（滴定シリンジ）を用い、コイン型のセルへ滴定することによって行われます。以下がシステムの構造の概略です。



iTC₂₀₀ は Hastelloy 製の 2 つのコイン型のセル（リファレンスセル及びサンプルセル）が半導体熱伝導センサを挟んで断熱ジャケット内に併設されています。また、セルの外側にはそれぞれ補償ヒータが装着されています。これら全体は 2 重の断熱シールド（上図ではインナーシールドのみを記載）に覆われ、シールド外部との熱交換を極力抑えるよう設計および制御されています。サンプルセル、リファレンスセルには導入管（キャピラリー管）を通じてサンプル試料等が挿入される構造をしています。

熱の発生や吸収が起きていない時はこの 2 つのセル間の温度差はゼロになっています。しかし、リガンドが滴定されると、サンプルセル内で発熱あるいは吸熱反応が生じ、2 つのセル間に温度差が生じます。この温度差を半導体熱伝導センサが検知し、2 つのセルの温度差が常にゼロになるよう制御がかかります。すなわち、この平衡維持のために変化する補償電力量（フィードバックパワー）をプロットすることによって、反応熱量を測定することが可能となります。

例えば、高分子を含むセルに一定量のリガンドを滴定します。セル中で発熱反応が生じる場合には DP 電力に負の変化が生じます。吸熱反応の場合は逆になります。DP は時間当たりの熱量変化の単位をもっていますからピークを時間積分すれば生じた熱量を決定できます。滴定を続け、

セル容量

セル有効容積：200 ul（厳密には機器により異なる）
必要調整試料量は 300 ul 以上

シリンジ容量

滴定シリンジの容量：40 ul
必要調整試料量：60 ul 以上

Hastelloy C-276

耐薬品性、熱伝導製に優れた Cr-Mo-W-Fe 系合金。特にアルカリ側に耐性があり、酸耐性に関しては、pH=2 ~ 3 程度まで。詳細は CORROSION RESISTANCE OF HASTELLOY® ALLOYS の Booklet 参照。

※セルの腐食や損傷に関しては保障期間内であっても、その対象外となっております。溶液の選択につきましては十分ご配慮の上、実験を行っていただきますようお願い申し上げます。

特殊な溶媒を使用される場合、腐食耐性試験を行うことができます。当社へご連絡いただければ、Hastelloy 小片をお送りします。

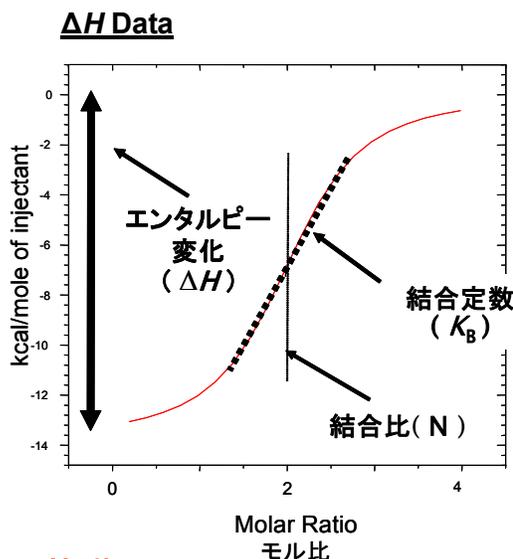
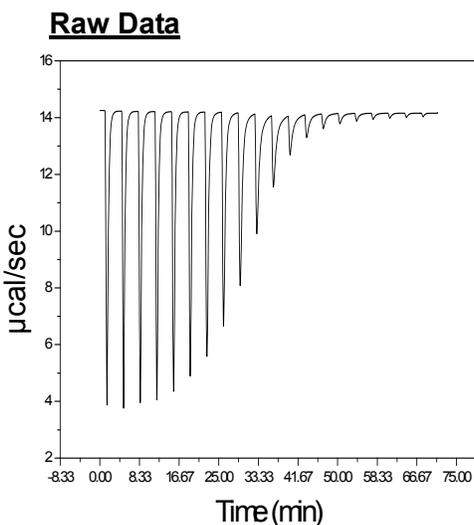
セル中の高分子がリガンドで飽和されると、希釈にともなう熱の出入りのみが観測されます。

この装置ではこの一連の測定動作はソフトウェアの制御下のもとに行われます。ユーザーは実験パラメータ（温度、注入回数、注入量）を入力するだけであとは自動的に測定が行われます。測定が終わったら Origin ソフトによって ITC データを解析します。フィッティングモデルを用い、反応ストイキオメトリ(N)、結合定数 (K_A)、エンタルピー(ΔH)及びエントロピー(ΔS)が求められます。

試料調製濃度

K_A により異なります。詳細は7) サンプル測定 の項を参照ください。

2. 解析データ



吸発熱の方向

ピークは、下向が発熱反応。上向が吸熱反応を示す。

マイクロカロリメリーの熱力学的基礎

$$\Delta G = -RT \ln K_A = \Delta H - T\Delta S$$

- ◆ $\Delta G < 0 \Rightarrow$ 自発的な反応 (熱力学的に有利な反応)
- ◆ K_A より ΔG が得られる
- ◆ ΔH と ΔS の大小が ΔG の符号を決定している (熱力学の第2法則)
- ◆ マイクロカロリメリーは ΔH を直接決定できる

ΔG : 自由エネルギー変化
 ΔH : エンタルピー変化
 ΔS : エントロピー変化
 K_A : 結合定数
 R : 気体定数
 T : 絶対温度
 $*K_A = 1 / K_D$

ITC測定より得られる情報

- ・ 結合定数 (K_A)
- ・ 結合熱力学量 ($\Delta H, \Delta S, \Delta G$)
- ・ 結合サイト数 (N)

特長

- ・ 固定化、化学修飾不要
- ・ 分子量、分子種の制限なし (低分子、イオンでも問題ない)
- ・ 精密な反応メカニズムの解析 (反応駆動力の同定)
- ・ 有機溶媒系でも使用可能
- ・ 結合サイトの個別解析が可能

2. システムの起動

1. iTC₂₀₀ システムの立上げ

- 1) セルユニット背面の電源を入れます。(電源安定化装置または UPS がシステムに備わっている場合は、コントローラ起動の前にその電源を ON してください)
- 2) コントローラ (PC、モニター) の電源を入れ、Windows を立ち上げます。
- 3) デスクトップ上の **iTC₂₀₀ with Origin** のアイコンをクリックし、測定制御用ソフトウェアを立ち上げます。



iTC200 with Origin



iTC₂₀₀ システム

電源について

ビコポルトオーダーの電力を取り扱うシステムであり、単一の電源から電力が供給されないとグラウンドレベル、ヴォルテージの補正レベルを上回ってしまう。グラウンドレベルの補正を超えた場合、場合によっては基盤が焼き付く等の事故を起こす可能性がありますのでご注意ください。

電磁波

この他、携帯電話の電磁波によっても測定ベースライン上へスパイクノイズ等の影響を及ぼす場合があります。システム付近での通話は避けて下さい。高周波、高磁場が発生する機器の付近は設置環境としてふさわしくないのでご注意ください。

室温変動

室温の変動は 1 時間当たり 2°C 以内に収まることが望ましい。エアコンの風が直接的に当たる場所、窓やドアの付近等は避けることが好ましい。

ソフトウェア画面

ソフトウェアを立ち上げると 1) iTC200 Main Window と 2) Real Time Plot の2つのウィンドウ画面が現れます。

1) iTC₂₀₀ Main Window

実験デザイン、測定パラメータの入力、メンテナンスのため機器制御を行うための Window 画面。

以下の 5 つのタブに分かれています。詳細については後の項で説明します。

Experimental Design:

N、K_D、およびΔHの予想値を入力すると、ソフトウェアがセルとシリンジの必要濃度を計算し、それらに基づいて **Advanced Experimental Design** タブに実験パラメータを自動的に設定します。

ソフトウェアを立ち上げると、このタブが選択されています。

Advanced Experimental Design

測定パラメータの入力。

Instrument Controls

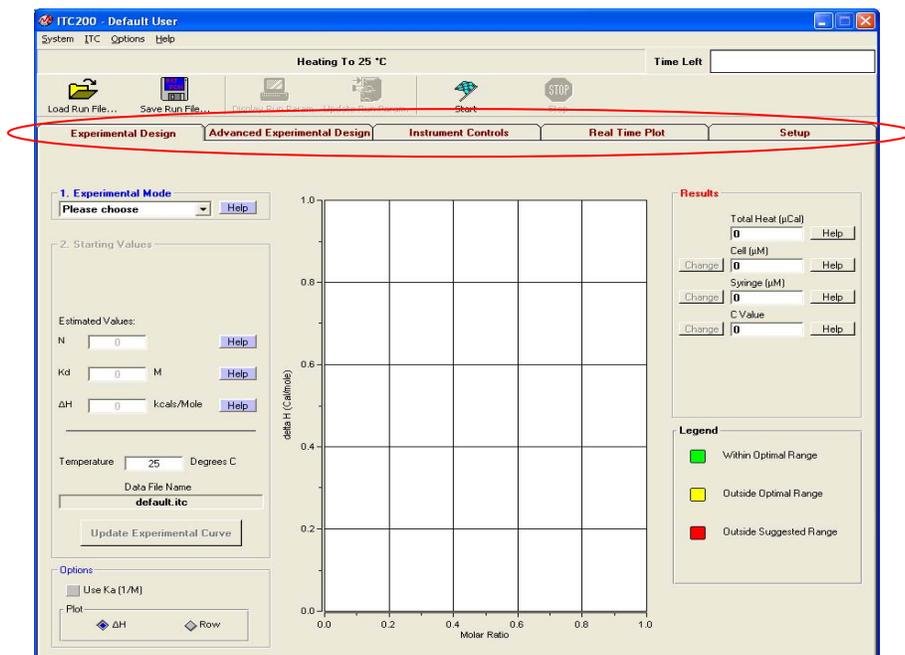
シリンジへの溶液の充填、洗浄、メンテナンス操作。

Real Time Plot

現在測定中のデータを表示。

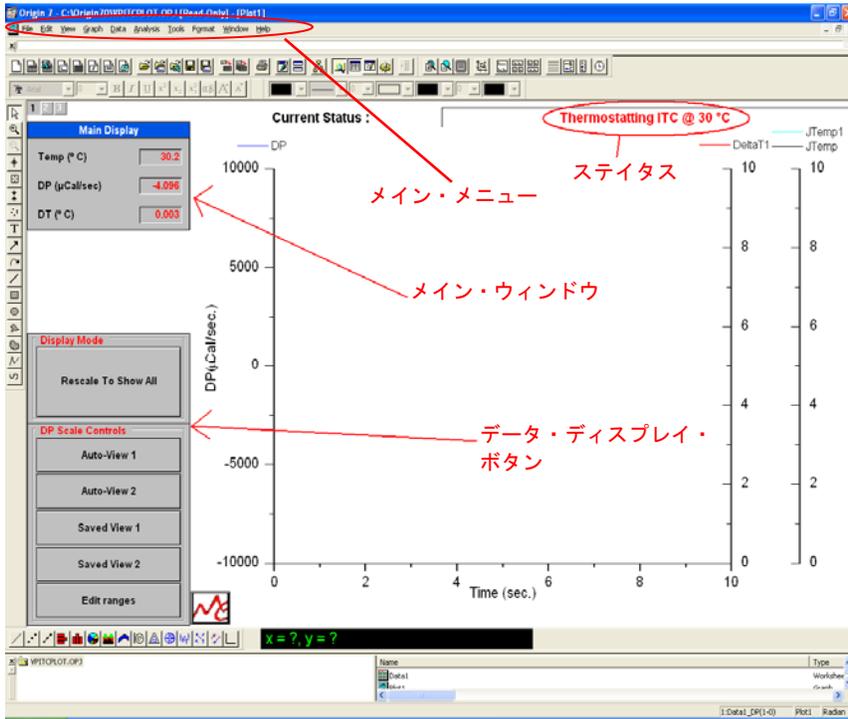
Setup

データを保存するフォルダを選択。



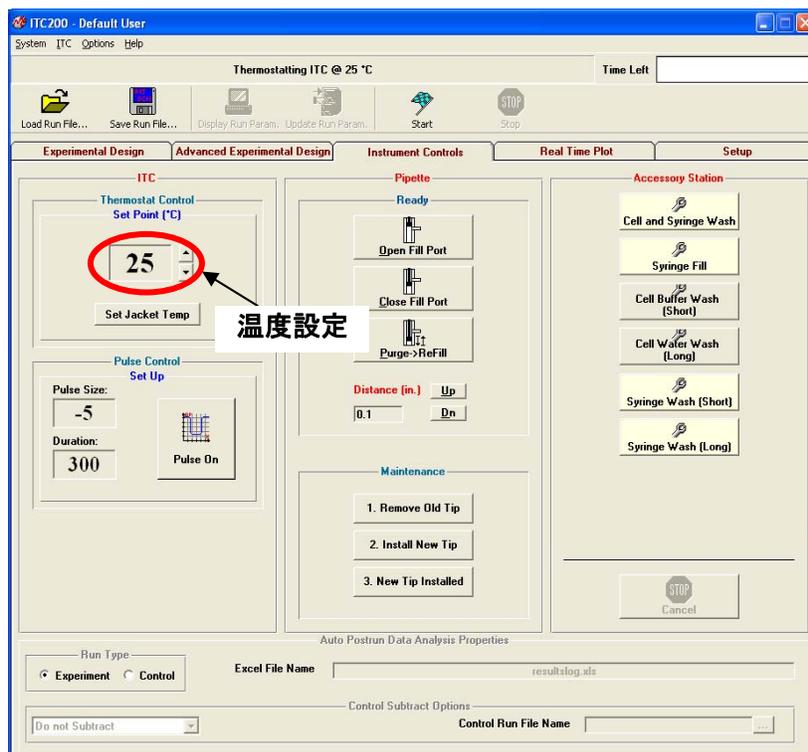
2) Origin7.0 –Real Time Plot

測定中の生データをプロットするための Window 画面。



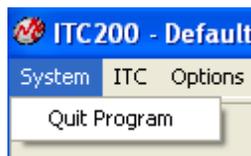
2. iTC200 のジャケット温度を設定

iTC200 Main Window の **Instrument Controls** のタブをクリックし、待機中のジャケットの制御温度を測定温度に設定します。あらかじめ環境温度を安定させ、測定目的温度にあらかじめ設定しておくことが時間短縮のポイントです。(Default の Boot 温度は 30°C に設定されています。)



3. システムの終了

- 1) iTC200 Main Window の **System** - **Quit Program** または画面右上の **x** をクリック。



- 2) iTC200 背面の電源を OFF。
- 3) PC をシャットダウン。
- 4) 電源安定化装置もしくは UPS が備え付けられていれば、これらの電源も最後に OFF。

システムのOFF

システムの電源は絶えず ON のままで問題ありません。ON の状態であるほうがむしろ機器は安定します。あらかじめ 2 週間以上使用しないことがわかっているような場合には電源を OFF にすることをお勧めします。たとえ iTC200 の電源が ON になっていても、iTC200with Origin を立ち上げないと全く温度制御はされませんので、ご注意ください。PC を絶えず ON にしているとハードウェアの消耗が早くなりますが、自動シャットダウンの設定はしないでください。

3. 機器オペレーション（水-水インジェクション）

測定セル、滴定シリンジ両者に蒸留水を充填して行う滴定実験を水-水インジェクションと呼んでいます。蒸留水に蒸留水を滴定した時に発生する微小な機械的な熱量を検出します。

この測定は最も基本となる測定で、装置のコンディションを確認するためにはこの測定を行います。

また、機器に不具合が生じた場合等もこの測定を行い機器の状態をチェックします。重要な測定の一つになりますのでこの測定は必ずマスター下さい。また、機器に不具合が生じた時にお客様からご連絡があった場合、弊社の技術者からこの測定をご依頼することがあります。

実験手順

1. パラメータの設定

パラメータの設定方法には2つあり、**Experimental Design** を使い N 、 K_d 、および ΔH の予想値を入力し、ソフトにパラメータを自動で設定する方法と、**Advanced Experimental Design** に手入力する方法があります。

- 1) iTC200 Main Window の **Advanced Experimental Design** を選択します。

The screenshot shows the ITC200 software interface with the 'Advanced Experimental Design' tab selected. The 'Experimental Parameters' section includes fields for Total # Injections (20), Cell Temperature (30), Reference Power (5), Initial Delay (60), Syringe Concentration (0), Cell Concentration (0), and Stirring Speed (1000). The 'Injection Parameters' section includes Volume (2), Duration (4), Spacing (120), and Filter Period (5). A table below shows the injection schedule for 20 injections, all with a volume of 2.0, duration of 4.0, spacing of 120, and filter period of 5. The 'Edit Mode' is set to 'Unique'.

	Volume	Duration	Spacing	Filter
1	2.0	4.0	120	5
2	2.0	4.0	120	5
3	2.0	4.0	120	5
4	2.0	4.0	120	5
5	2.0	4.0	120	5
6	2.0	4.0	120	5
7	2.0	4.0	120	5
8	2.0	4.0	120	5
9	2.0	4.0	120	5
10	2.0	4.0	120	5
11	2.0	4.0	120	5
12	2.0	4.0	120	5
13	2.0	4.0	120	5
14	2.0	4.0	120	5
15	2.0	4.0	120	5
16	2.0	4.0	120	5
17	2.0	4.0	120	5
18	2.0	4.0	120	5
19	2.0	4.0	120	5
20	2.0	4.0	120	5

Experimental Parameters

Total#injections	: 滴定の回数。
CellTemperature	: 実験の設定温度。2°C~80°Cまで。
Reference Power	: 測定中に常にリファレンスセルにかかる電力(ベースラインになります)
Initial Delay	: 実験データ取り込み開始から最初の滴定までの時間
Syringe concentration	: シリンジ中の溶液濃度。(単位:mM)
Cell Concentration	: セル中の溶液濃度。(単位:mM)
Stirring Speed	: シリンジの攪拌速度。通常 1000rpm
Data File Name	: アルファベットと数字の組み合わせで入力を行い、先頭文字は必ずアルファベットしてください。ハイフン、コンマ、スペース、ピリオド、アンダーバーの入力はできません。
Feedback Mode/Gain	: DP(補償エネルギー)の応答速度の設定。通常は最も応答の速い High モードで測定します。反応速度の遅い系や構造の経時変化を測定する場合は、Low もしくは None モードを使用します。

Injection Parameters

Volume	: 滴定 1 回の容量 (単位 : μ l) 通常 0.2~4 μ l。
Duration	: 滴定の持続時間。 Volume の 2 倍数に自動的に設定されます。
Spacing	: 滴定の間隔時間。一般的な実験の場合 60~120 sec 程度。
Filter Period	: データの取り込み時間間隔。通常 5sec。

水-水インジェクションのパラメータ設定

Total # Injections	: 19
Cell Temperature	: 30
Reference Power(ucal/sec)	: 5
Initial Delay(sec)	: 60
Stirring Speed(rpm)	: 1000
Injection Parameter	
Volume(uL)	: 2
Duration(sec)	: 4
Spacing(sec)	: 120
Filter Period(sec)	: 5

Spacingの時間設定

実際の測定では、ピークがベースラインに戻る前に次の滴定がはじまると正確な熱量を測定することができません。ピークが設定時間内にベースラインに戻らないようであれば、この設定パラメータを変更してください。まだ完了していないインジェクションのパラメータの設定は自由に変えることができます。

Edit mode

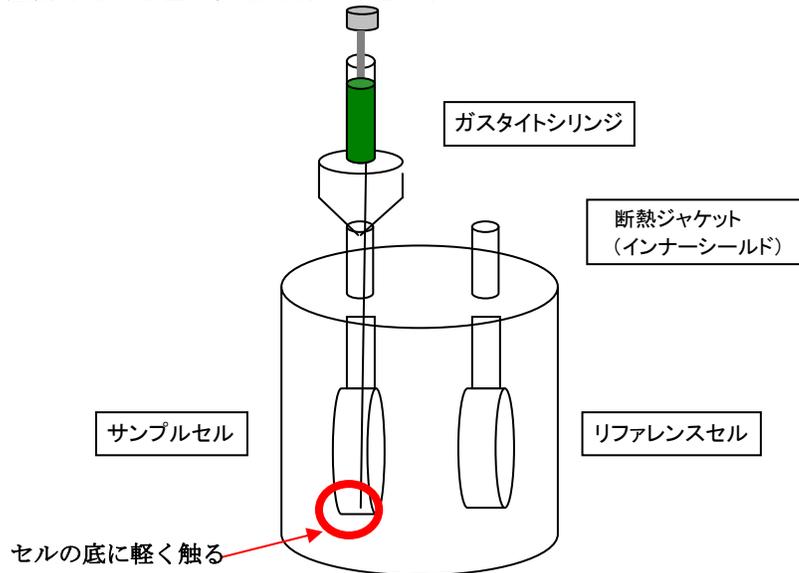
All Same	: Injection Parameters の設定をすべての滴定に適用されます。
Unique	: Injection Parameters の設定を、選択した滴定回だけに適用されます。
Apply To Rest	: Injection Parameters の設定を、選択した滴定回以降の全ての滴定に適用されます。

データの保存先

Setup タブの **Data File Path** で指定したフォルダへ保存されます。
変更したい場合は、指定欄を直接ダブルクリックし、フォルダを指定します。

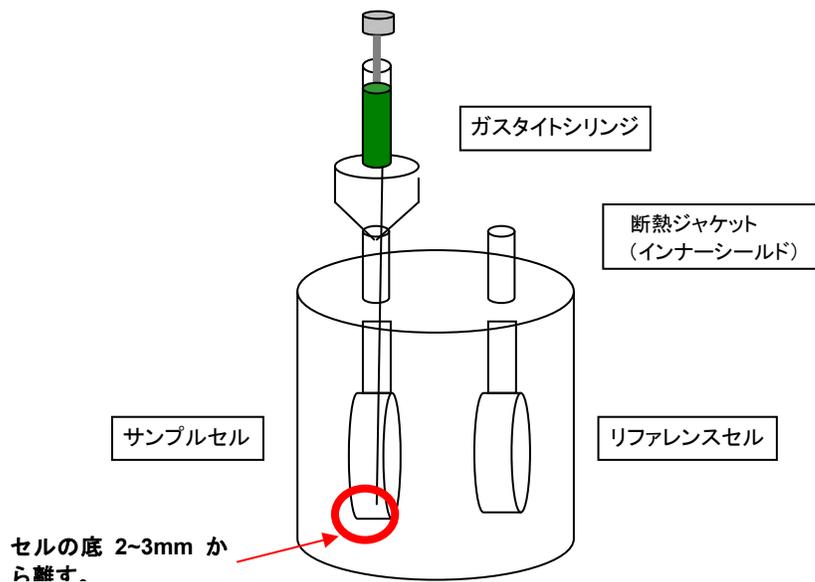
2. サンプルセルへの蒸留水の注入

- 1) ガスタイトシリンジのニードル部分を測定セルの底部へゆっくりと挿入していき、一旦測定セルの底にタッチさせます。このとき**強い衝撃を与えないこと**。セル底部にシリンジ先端をタッチさせるもしくは触る程度であれば全く問題はありません。

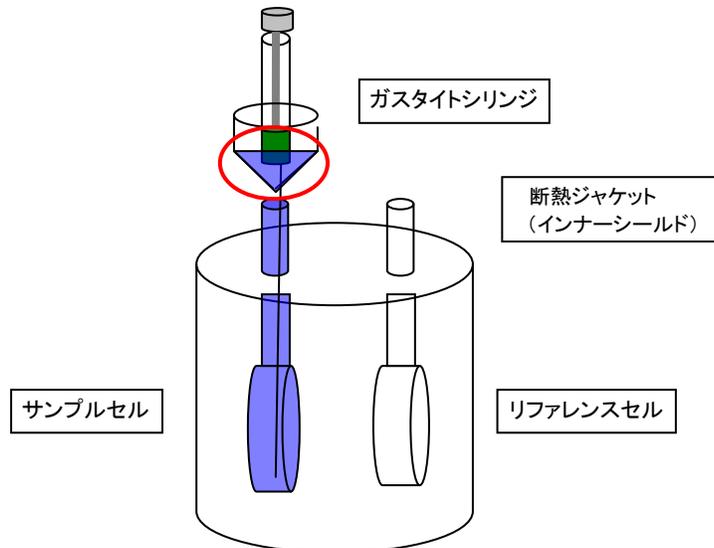


測定セルへの衝撃は厳禁！！
 測定セルは機器の心臓部であり、これを交換修理する場合には非常に高額な修理費用が発生します。不慮の事故やセル部の破損に関する修理に関しましてはたとえ保障期間内であっても保証の対象外となっております。あしからずご了承いただけますようお願い申し上げます。
 セルへの物理的なダメージは、即データクオリティーの低下につながります。

- 2) タッチさせた後、ガスタイトシリンジのニードル先端をセル底から約2~3mm程度上げ、浮かせた状態にします。

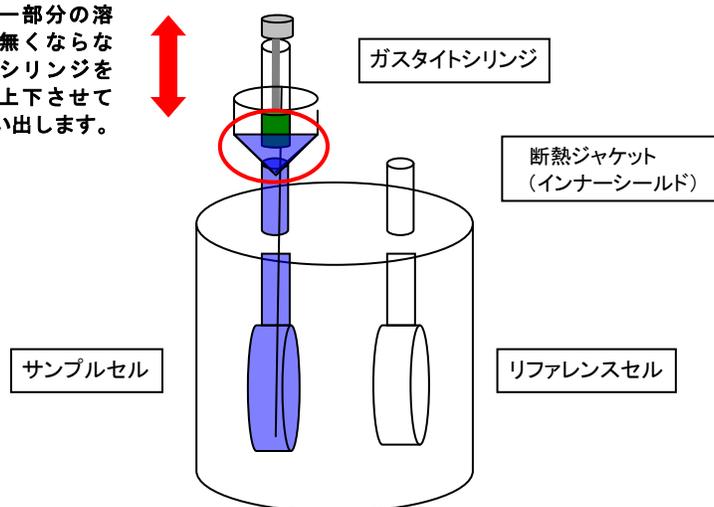


ゆっくりとガスタイトシリンジのプランジャーを下げていき、セル導入管の上部にあるリザーバー部分に水が見えてくるまで水を充填します。リザーバー部分に水が見えた時点で一旦水の注入を止めてください。



- 3) ガスタイトシリンジのニードル先端をセル底部 2~3mm 程度浮かした状態で、シリンジプランジャーを下方に 1~2 回速い速度で動かし (ポンピング) 脈流を発生させることでセル内に入った気泡を追い出します。

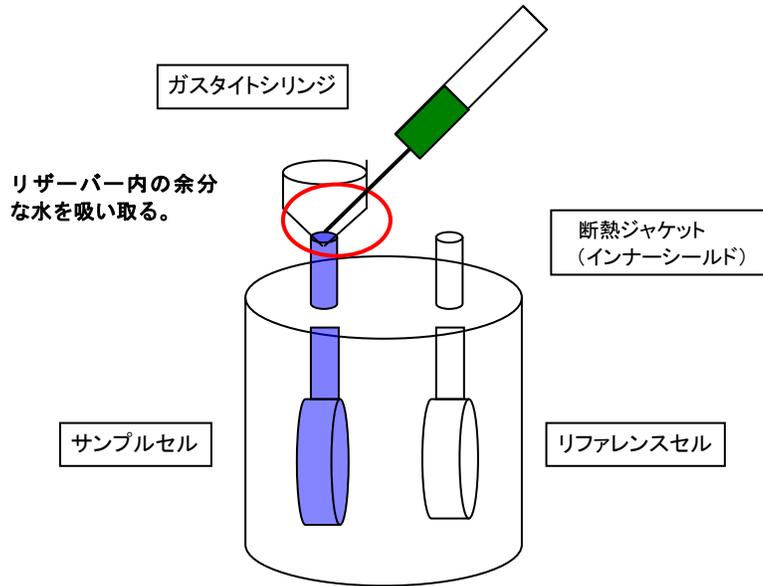
リザーバー部分の溶液が全て無くならない程度にシリンジを小刻みに上下させて気泡を追い出します。



ポンピング時の注意
 ポンピング時には、絶えずサンプルセルリザーバー内に溶液がある状態で行ってください。セル導入管の上端より液を吸い取ってしまうと、サンプルセルにまで再度気泡を入れてしまう可能性があります。

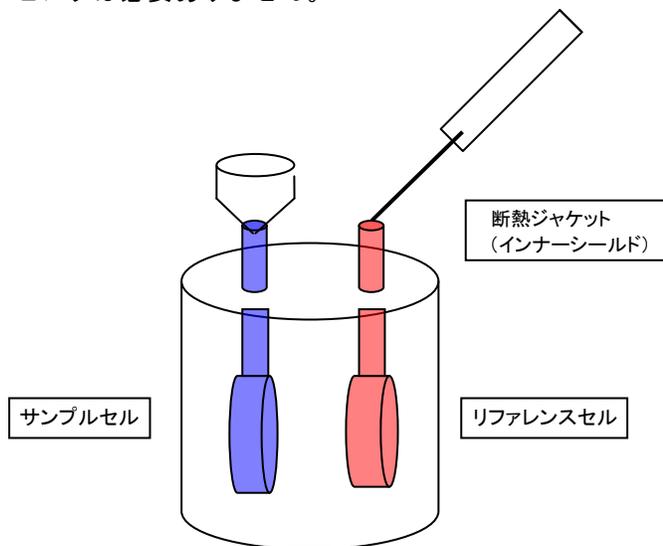
- 3) の作業を 5 回程度繰り返し、セル内に気泡が無い状態にします。

- 4) ガスタイトシリンジをゆっくりと抜き取り、ガスタイトシリンジのニードル先端をセル導入管上端の肩部分にタッチさせ、リザーバー内の余分な水を取り除きます。



3. リファレンスセルへの蒸留水の注入

サンプルセルと同様にガスタイトシリンジによりリファレンスセルに脱気した蒸留水を充填し、セル導入管上端にガスタイトシリンジにて余分な液を抜き取ります。リファレンスセルはサンプルセルのようなポンピングは必要ありません。



リファレンスセルの蒸留水の交換
リファレンスセルの蒸留水は、温度基準となるだけです。毎回交換しなくても問題ありません。

しかし長期間使用されずにいた後は、交換して測定して下さい。交換頻度の目安は約2~3週間です。

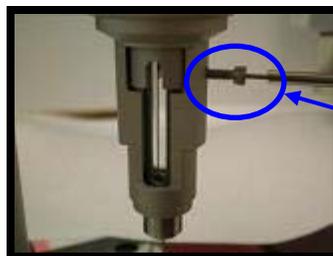
4. ピペット(滴定シリンジ)への蒸留水のローディング

- 1) ピペット(滴定シリンジ)に蒸留水を充填するには、約 100 μL の蒸留水の入った専用チューブをチューブ・ホルダに取り付けます。必ずホルダの底までチューブを押し込んで、溝にフタを合わせます。



チューブがきちんとチューブホルダに入っていないとシリンジが引っかかって曲ってしまう可能性がありますのでご注意ください。
一度曲ってしまったシリンジは使用できませんのでご注意ください。

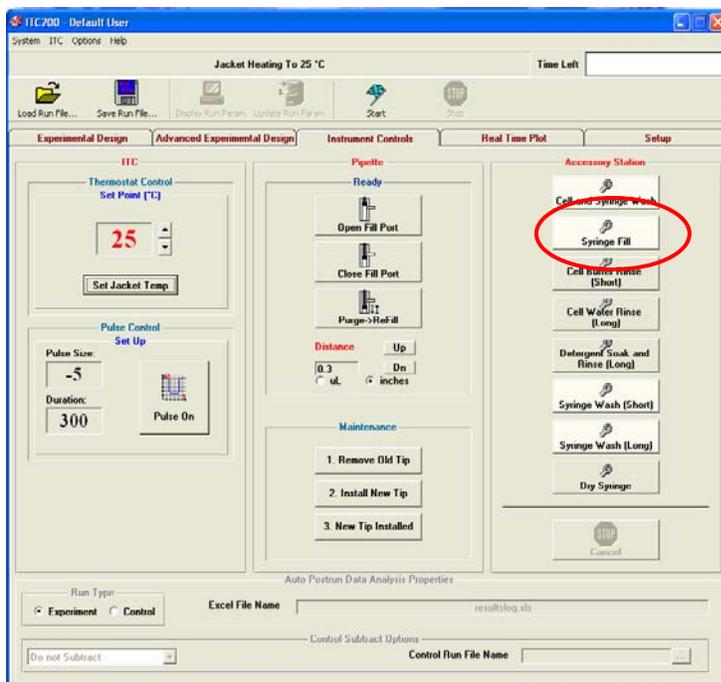
- 2) ピペット(滴定シリンジ)のフィルポートに洗浄モジュールの C1 に繋がっているフィルポートアダプタを接続します。



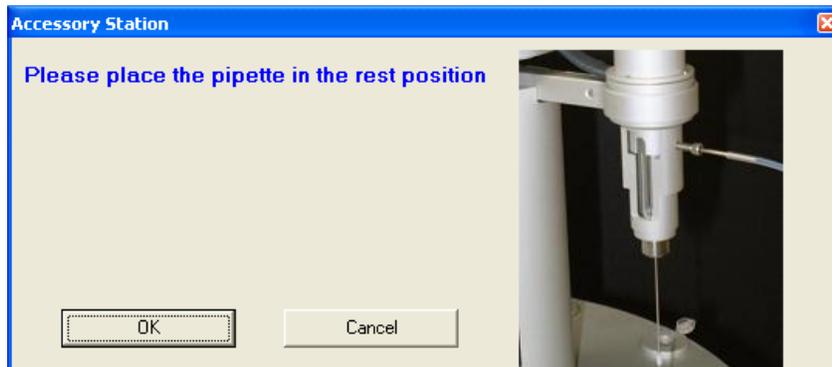
フィルポートアダプタ

フィルポートアダプタを傾いた状態で差し込むと、リガンド溶液を上手く吸引できなかったり、乾燥後にメタノールがシリンジ内に残ってしまったりする可能性がありますのでご注意ください。

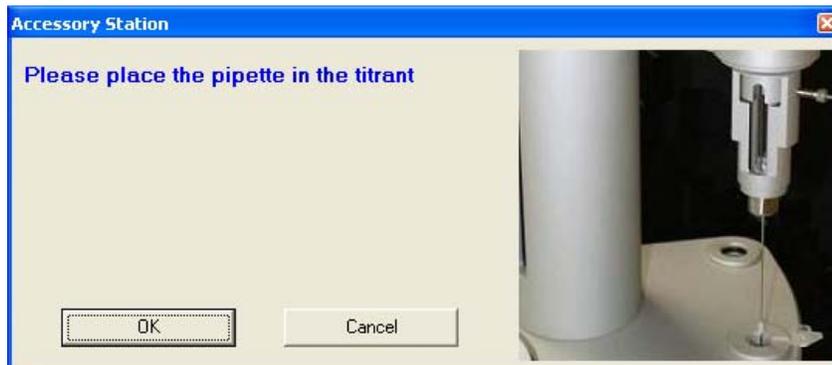
- 3) **Instrument Controls** タブで **Syringe Fill** をクリックします。



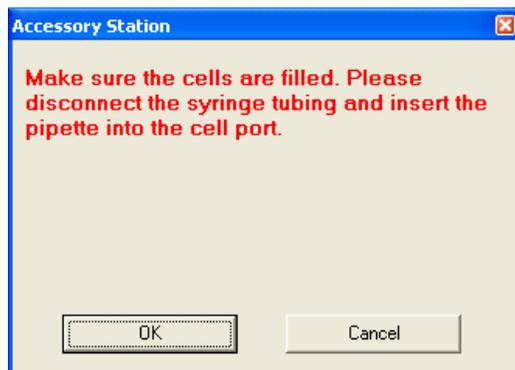
- 5) PC 画面に以下の表示が出ます。ピペット(滴定シリンジ)をレストポジションに置き、OK を押します。(プランジャーがピペット(滴定シリンジ)の底部に移動して、充填の準備に備えます。)



- 6) PC 画面に以下の表示が出ます。ピペット(滴定シリンジ)を 1)で取り付けしたチューブに移動させ、OK を押します。(プランジャーが上部まで移動しピペット(滴定シリンジ)に水を充填します。プランジャーがポートの開位置に達したら、ポンプが蒸留水を吸い上げます。次にポートが閉位置に移動し、ポンプで余分な蒸留水が取り除かれます。)



PC 画面に以下の表示が出ますので、OK をクリックします。
 フィルポートに接続してあるフィルポートアダプタ取り外し、セルが
 充填されていることの確認し、サンプル・セルへピペットを移動さ
 せます。



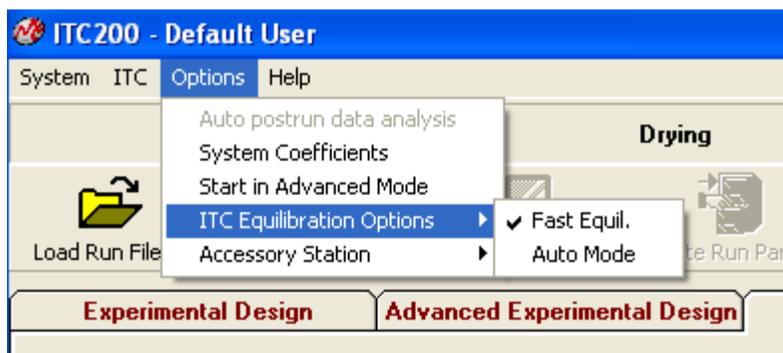
5. オプションの設定

測定開始（滴定開始）までの平衡化条件のオプション設定を行います。

メインメニューの **Options > ITC Equilibration Options**

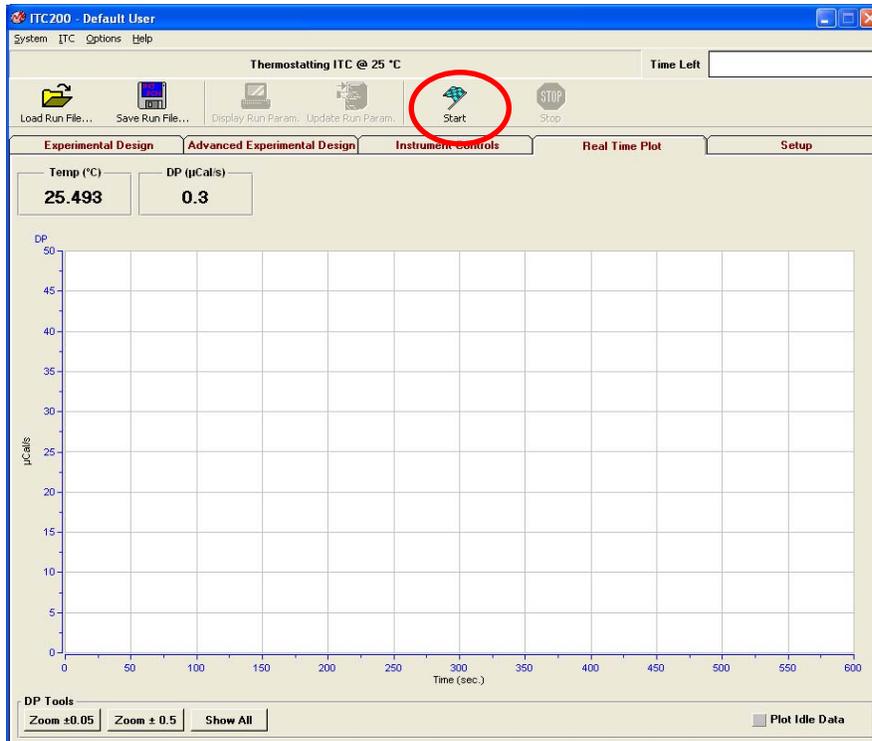
- Fast Equil.** : 攪拌しないで熱平衡化を行うフェーズをスキップさせます。
Auto Mode : 熱平衡化の判断をソフトウェアにより自動で行う場合のオプション。

通常は **Fast Equil.**にのみチェックを入れます。



6. 滴定スタート

- 1) パラメータ設定後、セルにピペットを挿入して **Start** ボタンをクリックします。



- 2) 測定温度で安定した後、攪拌が始まり DP の制御が始まります。DP が安定したら、DP の下の数字が赤より緑に変わります。DP をダブルクリックすると滴定が開始されます。

→Injection 開始



ベースライン安定の目安

正確な熱量を求めるためにはできるかぎりベースラインをX軸に対して水平になるよう安定化を待つべきです。ソフトウェアによるベースラインの安定化の判断はかなりスロープがある状態でもグリーンに変わります。できれば測定者により視覚的判断をしていただくことをお勧めします。攪拌時の熱平衡化判断がありますが、

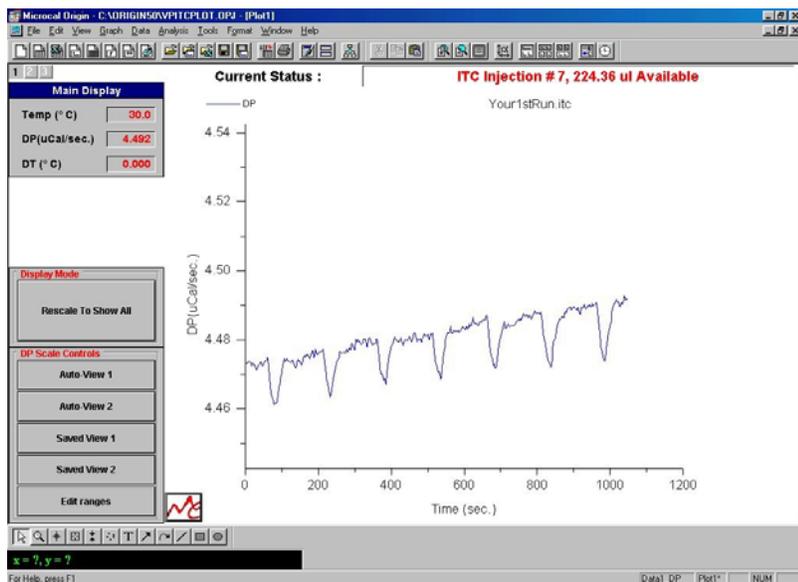
X 軸スケール : 1200sec.

Y 軸スケール : 0.3 µcal/sec.

のスケールで DP シグナルを確認し、ベースラインがX軸にたいしてほぼ水平になれば OK です。

- 3) 実験が終了すると攪拌が停止します。データはリアルタイムに自動保存されます。

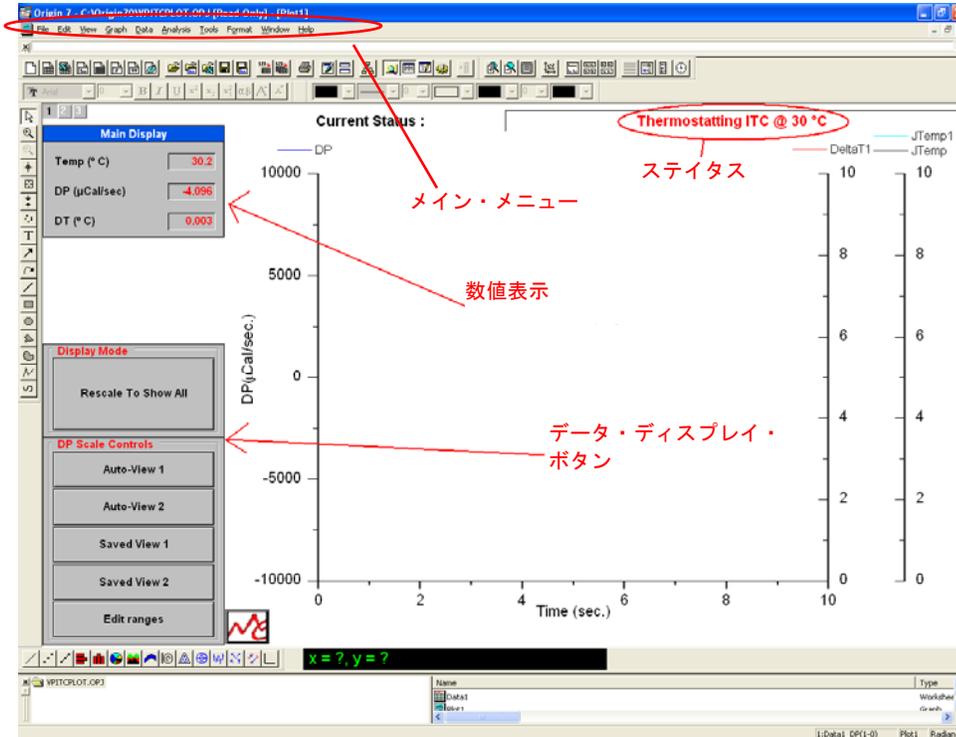
水-水インジェクションデータ



水-水インジェクションの再現性
 水がインジェクションされるときに発生する微小な摩擦熱や極わずかな温度のミスマッチ等の機械的な熱が検出されます。水-水のインジェクションによって、ピークの再現性を評価します。再現性が悪い場合はシリンジの汚れなどが考えられます。水-水インジェクションの再現性が悪い場合はシリンジの洗浄、プランジャーチップの交換、インジェクターのリードスクリュー清掃等を行うことによって改善するケースがほとんどです。

7. リアルタイム・データ・ディスプレイ

下記の画面により、滴定実験中の熱量変化がリアルタイムにプロットされます。



ステイタス

画面右上に以下のステイタスが表示されます。

Thermostating

Thermostat/Calib.ウィンドウで設定した温度で平衡化制御を行っている状態。

Heating/Cooling Jacket/Cells to ~ °C

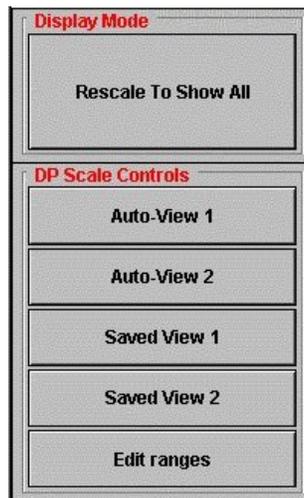
セル及びジャケット温度を実験の設定温度まで加熱、あるいは冷却している状態。

Final Baseline Equilibration

PreStirring Equilibration で DP シグナルの安定化した後、シリンジの攪拌を行いながら、DP を再度、安定化させている状態。

データ・ディスプレイ・ボタン

データ・ディスプレイの表示スケールの変更に用います。



Rescale To Show All

自動的に全てのデータが表示されるように再表示されます。

Auto-View 1, Auto-View 2

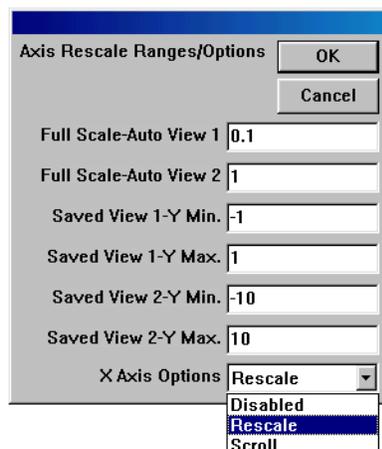
DP の最新のデータプロットがディスプレイの中心となるように再表示されます。Y 軸の表示スケールは、**Edit Ranges** をクリックし、それぞれ **Full Scale Auto View-1** , **Full Scale Auto View-2** で設定します。

Saved View 1, Saved View 2

Edit Ranges の **Saved View 1-Y Min**, **Saved View 1-Y Max** または **Saved View 2-Y Min**, **Saved View 2-Y Max** で設定された Y 軸の表示スケールで表示されます。

Edit Ranges

Auto-View、Saved View のスケール設定を行うことができます。また、**X Axis Options** により、DP プロットに関する X 軸の表示スケールの表示法を選択できます。



X Axis Options

Disabled : X 軸スケールを変更しない。DP プロットは表示範囲外でプロットされます。

Rescale : 表示スケールを 25%ずつ拡大していきます。

Scroll : 表示スケールは変更せず、25%ずつプロットをスクロールさせていきます。

グラフ軸スケールの変更は、ディスプレイ上の軸の上をダイレクトにダブルクリックし、ポップアップするスケール変更画面で、スケール変更することができます。

8. 測定中の滴定パラメータの変更方法

測定中に Injection parameter を変更したい場合、テーブルで変更したいインジェクションナンバーを選択し、上段の入力用カラム中のパラメータを変更します。

②値を変更する

①変更したいインジェクションを選択

	Volume	Duration	Spacing	Filter
1	2.0	4.0	120	5
2	2.0	4.0	120	5
3	2.0	4.0	120	5
4	2.0	4.0	120	5
5	2.0	4.0	120	5

Update Run parameter をクリックして変更を確定させます。



4. クリーニング

装置のパフォーマンスを維持させるためには定期的なセル、ピペットのクリーニングが必要不可欠です。測定毎に必ずセルやピペットを洗浄されることを推奨いたします。

1. サンプルセル及びピペット(滴定シリンジ)のクリーニング

以下の1)~8)の方法は、測定が終わり、次の測定に取り掛かる前に行う洗浄方法です。この方法は一例ですので、各サンプルにあった洗浄方法を行うことをおすすめします。

次回の測定に使用するバッファの組成が違う場合や、以下の方法で汚れが取りきれない場合には、27 ページに記載の他の洗浄ボタンやその横の囲みに記載してある推奨の手順等を参考にして下さい。

- 1) **Thermostat Controls** の **Instrument Controls** のタブで温度を 30℃ 以下に設定します。
- 2) 実験後、測定したバッファで良くポンピングしながら 2 回~3 回サンプルセルを洗浄してください。(ガスタイトシリンジ使用)
- 3) 下図の溶媒バイアルに、左側から順に蒸留水、メタノール、バッファ(もしくは蒸留水)を充填しておきます。



Dcn90

デコン 90 は強力なアルカリ剤のため、使用時に皮膚等に付けないように注意してください。

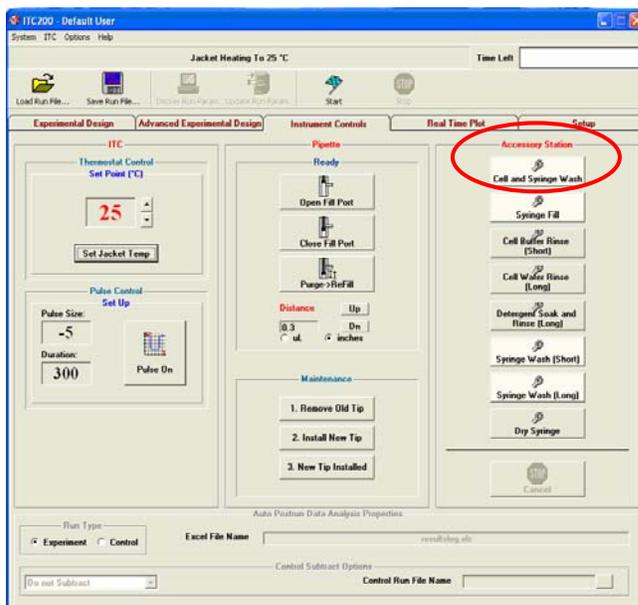
また iTC200 のセル洗浄については、最 10% を越える濃度での使用はセルを腐食するおそれがあるため、避けてください。

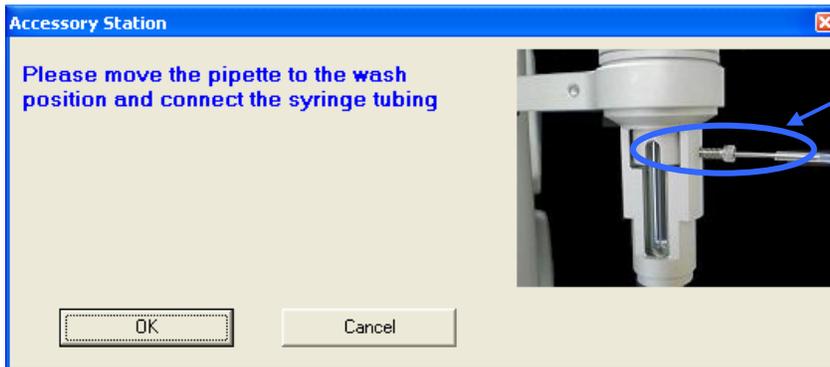
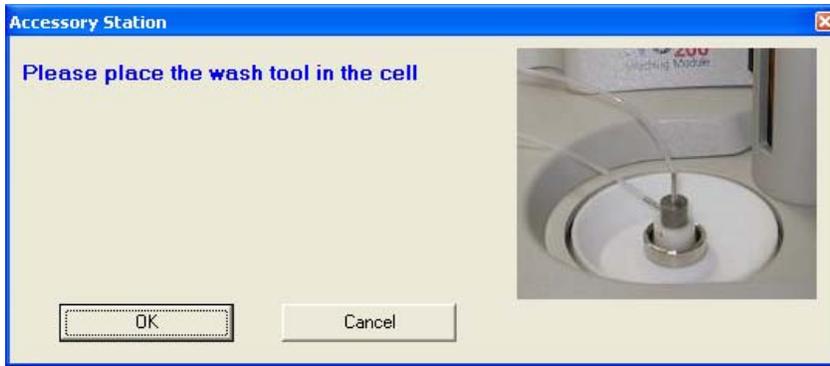
また故障の原因になりますのでデコン溶液を、洗浄モジュールに流さないで下さい。

- 4) セルにセルクリーニングデバイス、ピペットに洗浄モジュールの C1 に繋がっているチューブ先端のネジを差し込みます。同時に PC 画面にも操作の手順が表示されます。



- 5) **Instrument Controls** のタブの **Cell and Syringe Wash** ボタンをクリックします。

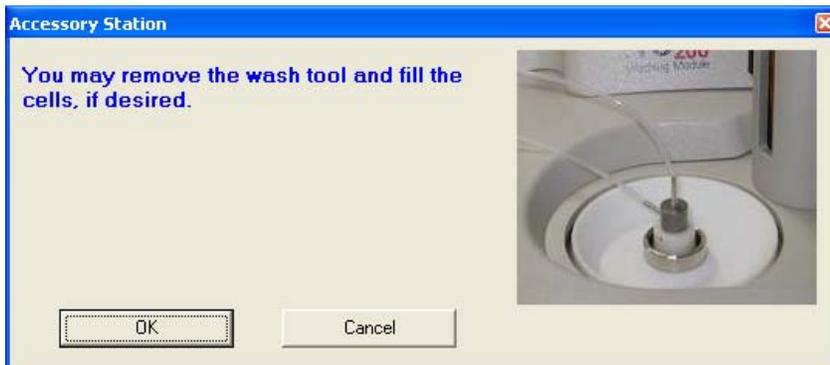




フィルポートアダプタ

フィルポートアダプタを傾いた状態で差し込むと、リガンド溶液を上手く吸引できなかったり、乾燥後にメタノールがシリンジ内に残ってしまったりする可能性がありますのでご注意ください。

- 6) まず自動でセルの洗浄を行います。(Buffer ボトルに入っている溶液を 3mL 流します。セルの洗浄が終了しましたら、PC に以下の表示が出ます。) 続けてピペットの洗浄を行う場合には OK をクリックします。



- 7) セルのクリーニングデバイスを取り外し、セルに蒸留水を充填してキャップを閉めてください。
- 8) 自動でピペットの洗浄を行います。(シリンジの洗浄はまず 1.5mL の蒸留水で洗った後に 1.5mL のメタノールで洗い、完全に乾燥させます。)

シリンジの乾燥が終わった後、目視でもシリンジが完全に乾燥していることを確認して下さい。万が一完全に乾燥していなければ、Instrument Controls タブの Dry Syringe ボタンを押して再度乾燥を続けて下さい。

2. 他の洗浄ボタン

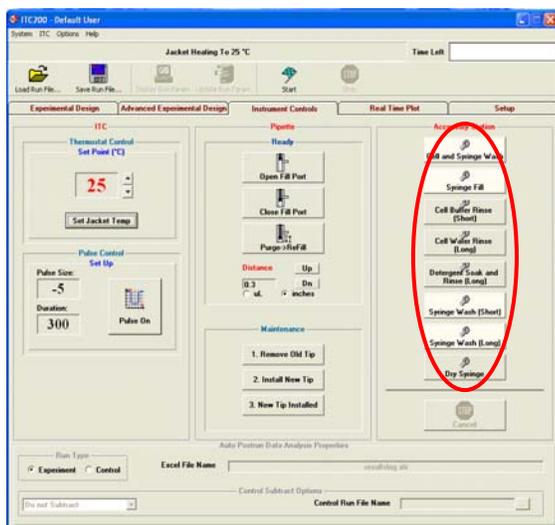
Instrument Controls のタブの **Accessory Station** にある **Cell and Syringe Wash** 以外のボタンについて説明します。

Cell Buffer Rinse(short) : 次に測定しようとするリガンド溶液が前回の溶液と同一で、セルのみ洗浄したい場合に使用します。(バッファボトルに入っている溶媒を 3.5mL セルに流します。)

Cell Water Rinse(Long) : DCN90 5%でセルを洗浄した後に使用します。(蒸留水を 12.5mL セルに流します。)

Syringe Wash(short) : 蒸留水を 1.5mL シリンジに流し、次にメタノールを 1.5mL シリンジに流します。その後、シリンジを乾燥させます。

Syringe Wash(Long) : 蒸留水を 2.5mL シリンジに流し、次にメタノールを 2.5mL シリンジに流します。その後、シリンジを乾燥させます。



3. サンプルセルの強力なクリーニング

汚れがひどい場合など、より強力なクリーニングが必要な場合、以下の要領でセルをクリーニングします。

- 1) ジャケット温度が常温(30℃以下)であることを確認し、セルに **10% dcn90** 溶液を充填し、蓋をします。
- 2) VPViewer2000 の **Thermostat/Calib**. ウィンドウでセル温度を 70℃ に設定します。
- 3) 70℃で 1 時間保持します。
- 4) セルの温度を室温まで下げ、**dcn90** 溶液をガスタイトシリンジで取り除いた後、定期クリーニングと同様に蒸留水でセルのリスを行う。

24 ページ記載の **I. サンプルセル及びピペットのクリーニング** だけでは洗浄が不十分な場合もあるので、必要に応じて洗浄ボタンを使用してください。

推奨 : 一日の測定が全て終了した時や 1.の方法では完全にセルの汚れが取れにくい場合には、以下の方法でセルとシリンジを洗浄することをおすすめします。

セルの洗浄

- ① ガスタイトシリンジに **Buffer** を取り、ポンピングしながらセルを洗浄 (3 回繰り返す)
- ② ガスタイトシリンジに **5% dcn** を取り、ポンピングしながらセルを洗浄 (3 回繰り返す)
- ③ ガスタイトシリンジの **蒸留水** を取り、ポンピングしながらセルを洗浄 (3 回以上)
- ④ **Cell Water Rinse(Long)** ボタンを押し、ソフトウェアの指示に従い自動でセルを洗浄

シリンジの洗浄

Syringe Wash ボタンを押し、ソフトウェアの指示に従い、自動でシリンジを洗浄して下さい。

洗浄時の注意事項

非常にアグレッシブな洗浄方法ですので、以下の 4 点は、必ず厳守お願い致します。セルの腐食、ダメージに関しては、保証の対象外になっております。十分ご注意くださいようお願い申し上げます。

- ①クリーニング中は SHIPPING キャップの栓を締めたまま測定してください。万一に備え、セル中の溶液の蒸発を抑え、セルを乾燥させないためです。
- ②1 時間以上は絶対に行わないでください。
- ③dcn90 の濃度は 10% 以下にしてください。
- ④ジャケット温度は 70℃ 以上に上げないで下さい。

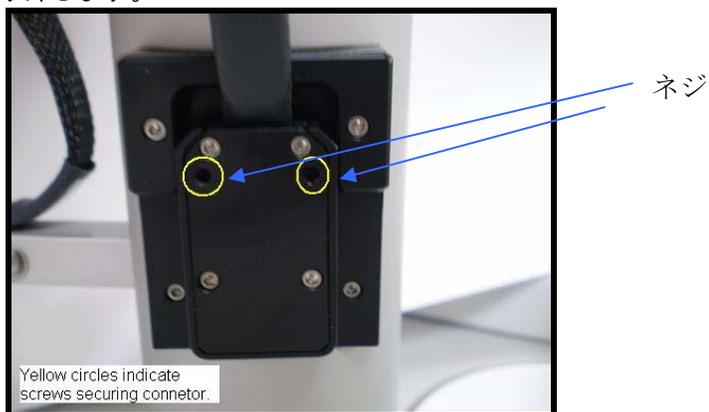
5. メンテナンス

機器のパフォーマンス、データのクオリティーを保つためにも機器のメンテナンスは欠かせない作業の一つです。

1. ピペットの取り外し



- 1) 0.050 インチの六角ドライバーを使ってタワーの側面にある 2 本のネジを取り外します。タワーの側面にあるネジを緩めて、ピペットを取り外します。

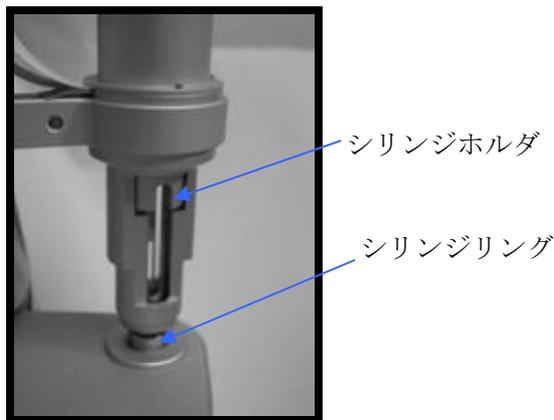


- 2) コネクタを引っ張り、黒のプラスチック製コネクタを取り外します。
- 3) ピペットを取り付けるには、タワーのソケットにピペットのコネクタを取り付けてネジを締めます。ケーブルを溝に差し込んで 2 本のネジを締めます。

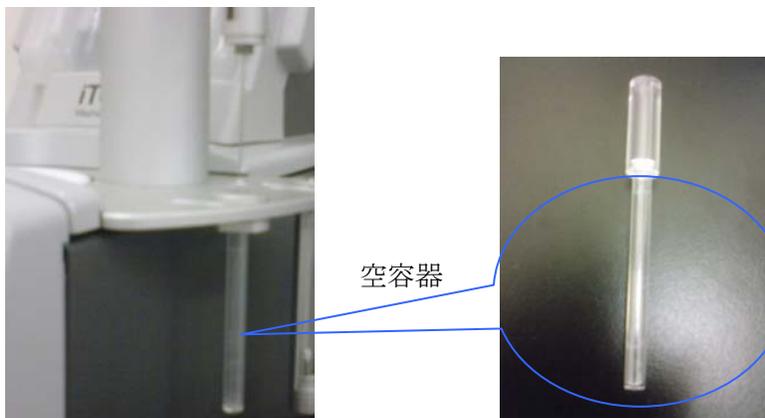
2. 滴定シリンジの取り外し

シリンジにヒビが入ったまま測定されますと、測定の失敗につながりますので新しいシリンジに交換することをお奨めします。また、32ページのプランジャーチップの交換前にもシリンジを取り外す必要があります。

- 1) シリンジを洗浄して乾燥させます。(シリンジは WASH 位置にあります。)
- 2) シリンジ・ホルダを左回りに数回回転させます。
(シリンジを固定しているシリンジリングが外れます。)



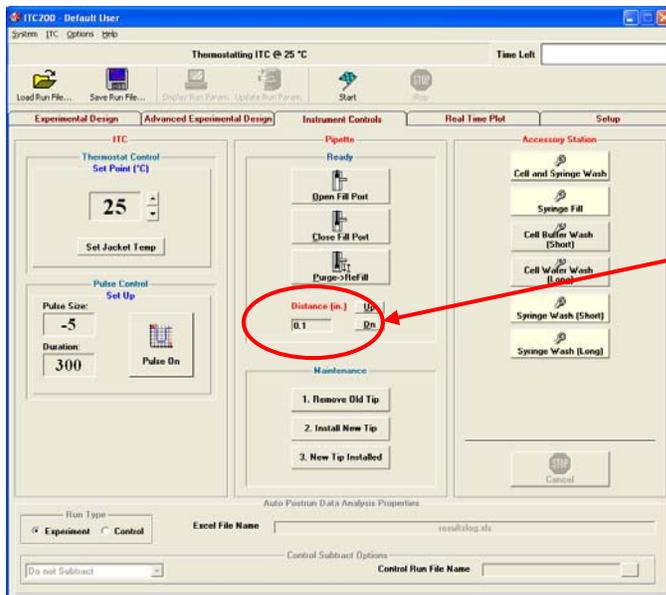
- 3) シリンジが入っていた空容器の蓋を取った状態で LOAD 位置に挿入します。(以下の 6) の操作を行う際にシリンジのニードル部分が曲がることを防ぎます。



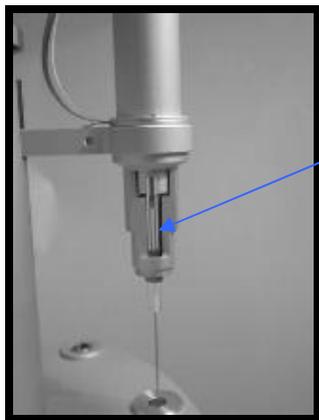
ニードル部分が曲がってしまったシリンジは使用できませんのでご注意ください。曲がったシリンジを使い続けると、測定中にデータ上で大きなノイズになったり、セルを傷つけてしまったりする恐れがあります。

シリンジの空容器は付属品の木箱内にございますのでご確認ください。

- 4) シリンジリングを取ったシリンジを LOAD 位置まで動かします。
- 5) 手動ピペット・コントロールを使用して、Distance(in.)の下にある数字に"0.3"と入力し Dn を押すと、ピペットが 0.3 インチ下に下がります。(シリンジはプランジャーと共に下がります。)



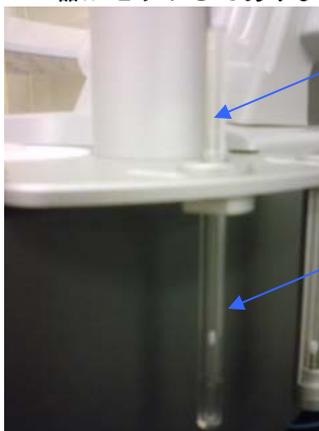
0.3 と入力



シリンジ

6) シリンジをまっすぐ引き下ろします。シリンジをひきおろす際に、ソフト・グリップ・ピンセットを使用することで、シリンジに傷を付けることを防ぎます。

7) 3)の操作で行ったように、LOAD 位置にシリンジの受け皿として空容器がセットしてありますので、シリンジを中に入れます。



シリンジ

空容器

- 8) 容器ごと上に押し上げてシリンジを取り出します。

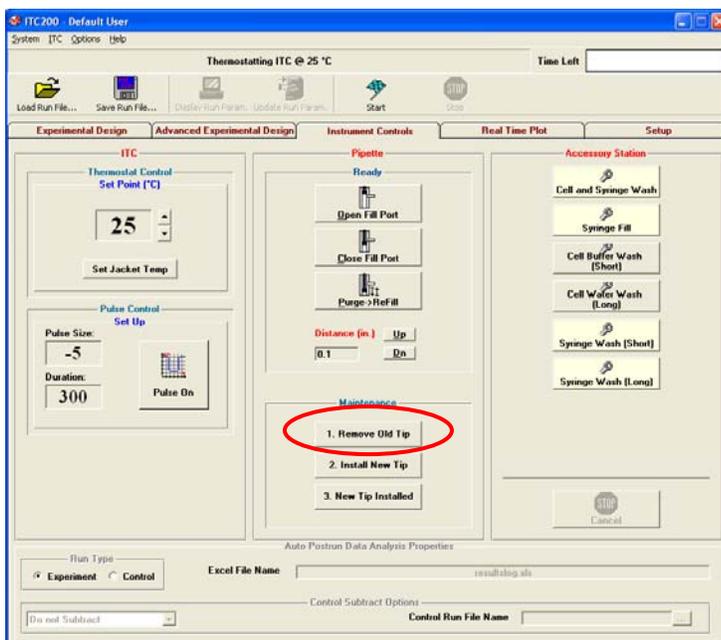


一度曲がってしまったシリンジは使用
できませんのでご注意ください。

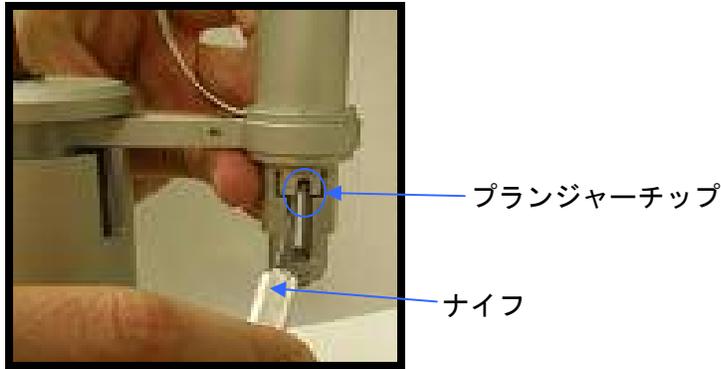
3. プランジャーチップの交換

測定するに従いプランジャーチップが磨耗してくるため、定期的にプランジャーチップを交換することを推奨いたします。

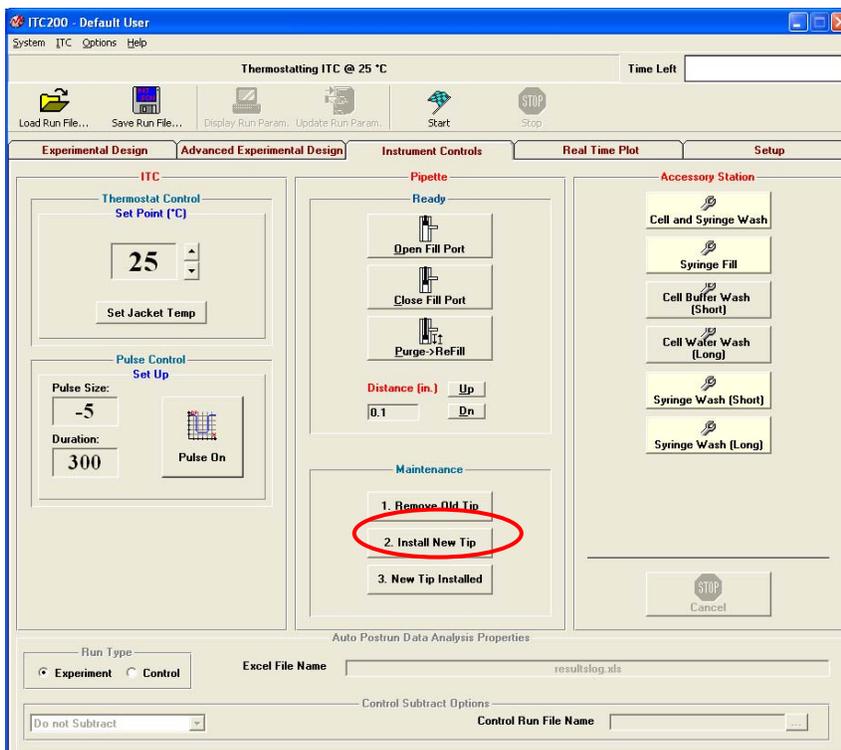
- 1) iTC₂₀₀ ソフトウェアの **Instrument Controls** タブにある **Mentences** にある **Remove Old Tip** ボタンをクリックします。(プランジャーチップが自動的にオープンポジションに移動します。)



- 2) ナイフの刃でプランジャーチップの先端側面を斜めに切り、ピンセットでプランジャーチップを引き抜きます。



- 3) **Install New Tip** ボタンをクリックします (プランジャーチップが自動的にチップ取り付け位置に移動します。)

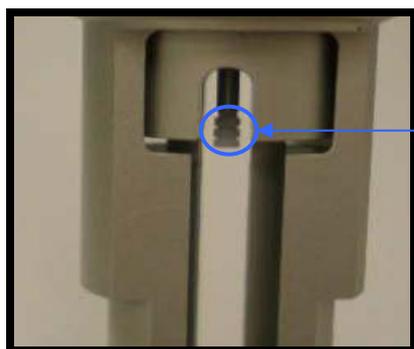


- 4) チッププッシャーに新しいプランジャーチップ（穴のある側を上）を置き、所定の位置にしっかり押し込みます。



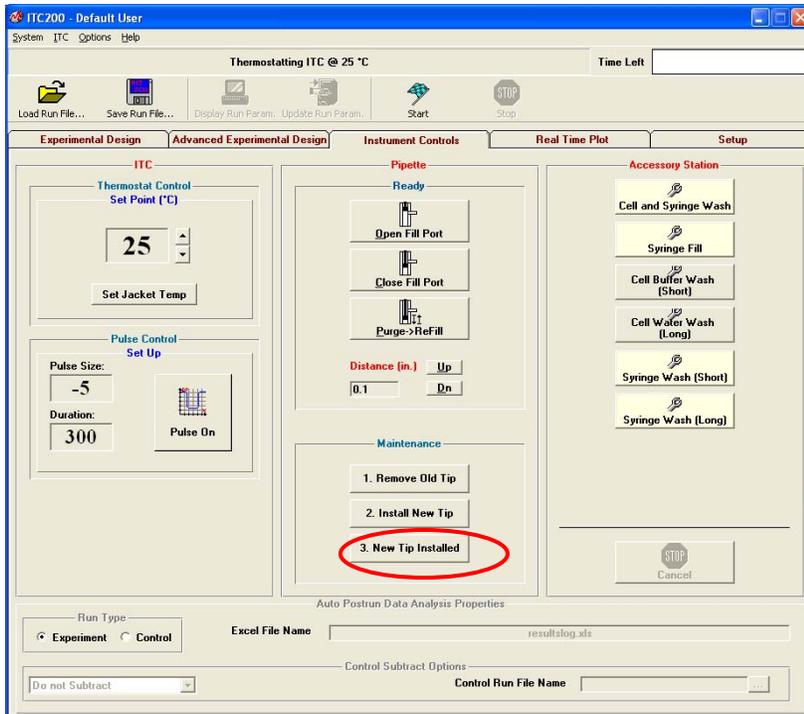
チッププッシャー

- 5) チッププッシャーを回転させ、新しいプランジャーチップが所定の位置にはまったことを確認します。チッププッシャーを取り外します。



プランジャーチップ

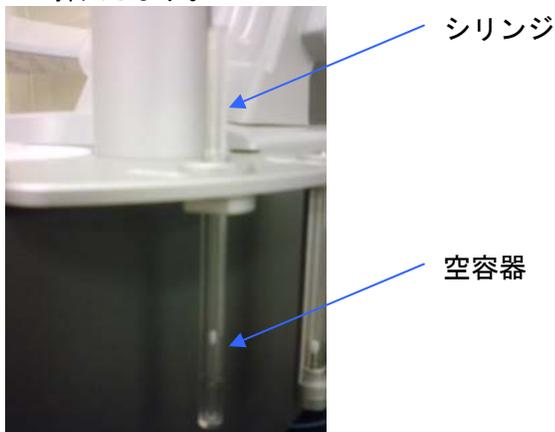
- 6) **New Tip Installed** ボタンをクリックします（プランジャーチップが自動的にシリンジ取り付け位置に移動します。）



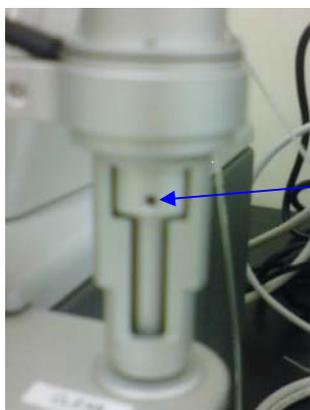
4. シリンジの取り付け

シリンジの破損や、プランジャーチップを交換の後は以下の操作を行い新しいシリンジを取り付けて下さい。

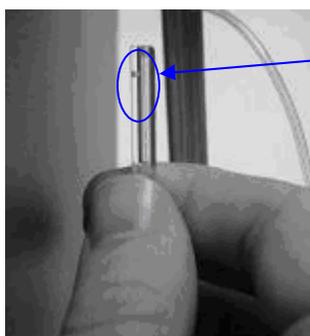
- 1) シリンジが入っている容器のキャップを取った状態で、LOAD 位置に挿入します。



- 2) シリンジの充填穴とピペットの充填穴が合わさる方向を確認し、シリンジを真っ直ぐ押し上げます。



ピペットの
充填穴

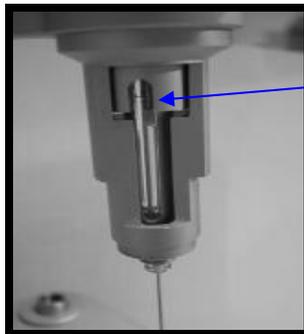
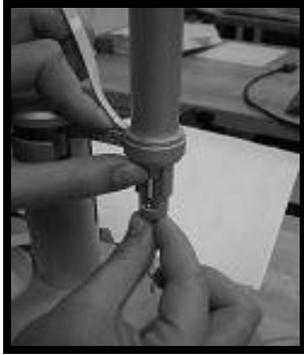


シリンジの
充填穴

2)シリンジを引っかかるまで押し込みます。

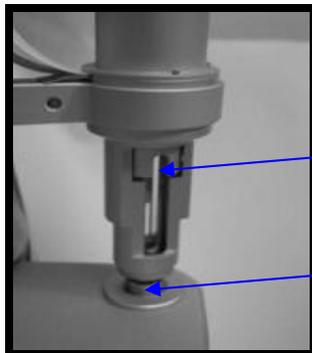


3)シリンジを手で持って固定した上で、シリンジ・ホルダーをゆっくり回転させると、シリンジの充填穴とホルダーとシリンジ充填穴が揃う場所があり、その時シリンジは上にスライドします。



シリンジホルダー

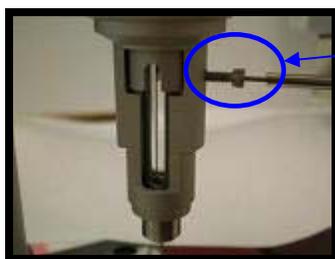
- 3) ピペットを wash の位置に移動し、シリンジが多少上下するくらいにゆるくシリンジリングを締めます。



シリンジホルダー

シリンジリング

- 4) シリンジを回転させてシリンジ充填穴とピペットの充填穴を合わせて、充填穴にフィルポートアダプタを取り付けます。



フィルポートアダプタ

フィルポートアダプタを傾いた状態で差し込むと、リガンド溶液を上手く吸引できなったり、洗浄後に溶液がシリンジ内に残ってしまったりする可能性がありますので、ご注意ください。

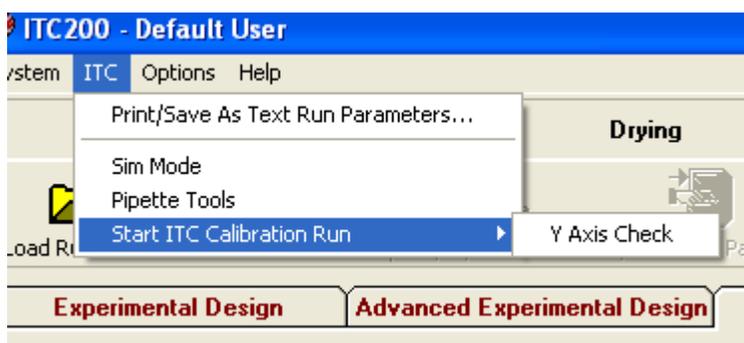
- 5) シリンジリングを完全に締めてシリンジを固定します。

6. キャリブレーション

1. Y-Axisキャリブレーション

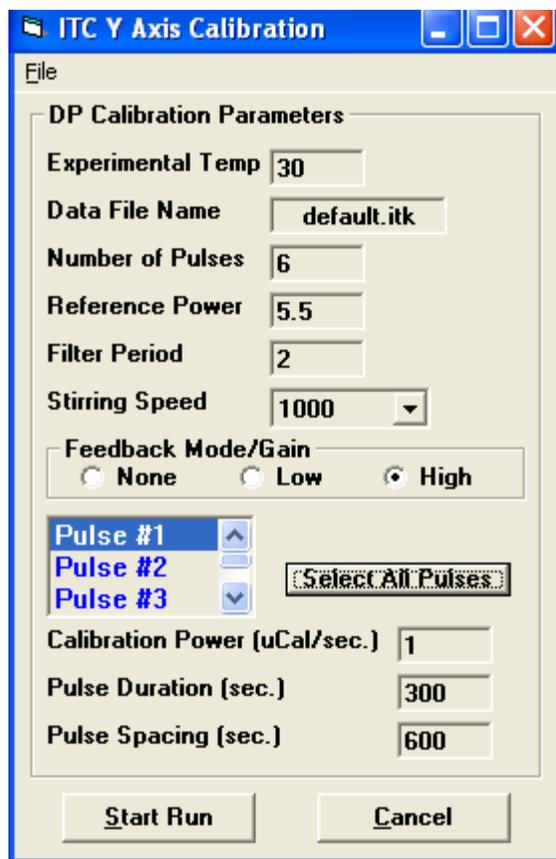
Y-axis キャリブレーションは、セルの外部からセルに一定の既知のヒートパルスを与え、正確な熱量（DP : Deferential Power）を測定しているかどうかを確認します。約3ヶ月に1度行うことを推奨いたします。

- 1) システムを立ち上げます。
- 2) サンプルセル、シリンジに、蒸留水を充填し、ピペットをセルにセットします。
- 3) メニューバーより、
ITC>Start ITC Calibration Run>Yaxis を選択します。



キャリブレーション時の滴定

Y-Axis キャリブレーションでは実際の滴定は行われません。ITC Controlsのタブ上で有効になるのは、**ITC Equilibration Options**のみです。4)の**ITC Y Axis Calibration**のウィンドウでパラメータを設定します。

**パラメータ設定**

Default の 6 つのパルスパワーの設定は下記の通りです。

Pulse #1

Calibration Power: 1
Pulse Duration: 300
Pulse Spacing: 600

Pulse #2

Calibration Power: 2
Pulse Duration: 300
Pulse Spacing: 600

Pulse #3

Calibration Power: 3
Pulse Duration: 300
Pulse Spacing: 600

Pulse #4

Calibration Power: -1
Pulse Duration: 300
Pulse Spacing: 600

Pulse #5

Calibration Power: -2
Pulse Duration: 300
Pulse Spacing: 600

Pulse #6

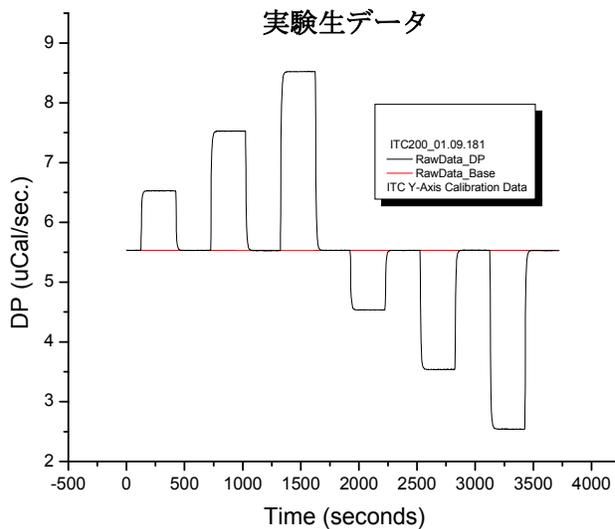
Calibration Power: -3
Pulse Duration: 300
Pulse Spacing: 600

- 4) ITC Y Axis Calibration ウィンドウより、Data File Name 以外は下記のパラメータになっているかを確認してください。

- 5) **Start Run** をクリックしスタートします。
- 6) ベースラインが安定したら、DP が赤より緑に変わり、DP をダブルクリックします。
→**Final Baseline Equilibration 開始**
- 7) キャリブレーションが開始されます。
- 8) キャリブレーション終了後の結果例を下図に示します。
パルス・エネルギーをかけた値、得られた結果、入力値と結果の誤差がスクリプト・ウィンドウに自動的に計算されて表示されます。
スクリプト・ウィンドウは、1 度閉じると再度開くことができませんので、測定が終了するまで閉ないでください。測定終了後、ファイル名と同じ名前を付けて.txt として保存してください。
- 9) 計算された#3 と#6 のパルス・パワー、パルス・エネルギーの誤差が±1%以内であることを確認してください。

ベースライン安定の目安

正確な熱量を求めるためにはできるかぎりベースラインをX軸に対して水平になるよう安定化を待つべきです。ソフトウェアによるベースラインの安定化の判断はかなりスロープがある状態でグリーンに変わります。できれば測定者により視覚的判断をしていただくことをお勧めします。無攪拌時、攪拌時の2回の安定化判断がありますが、そのどちらも
X軸スケール: 1200sec.
Y軸スケール: 0.15µcal/sec.
 のスケールで DP シグナルを確認し、ベースラインがX軸にたいしてほぼ水平になればOKです。



Script Window

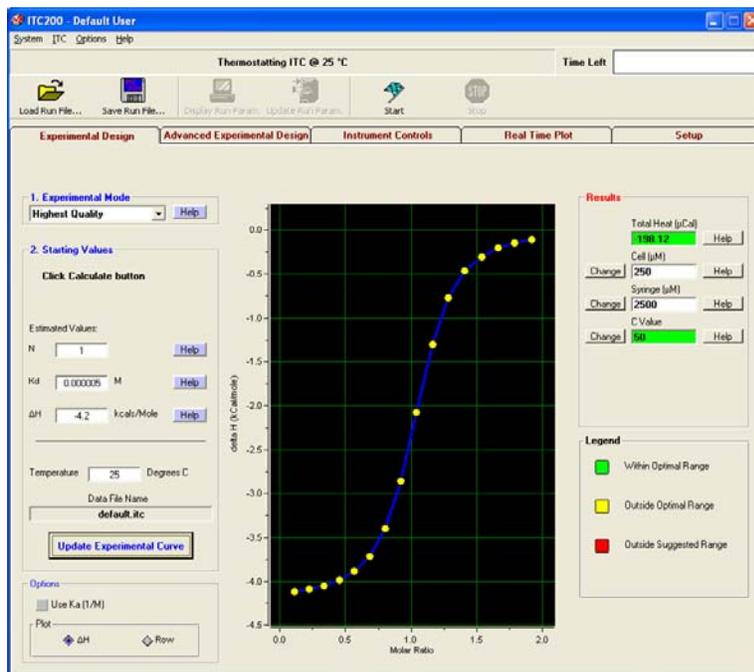
```

*****Pulse # 1*****
Pulse power = 1 uCal/sec.
Pulse Duration = 300.11 sec.
Pulse Energy = 300.11 uCal.
*****
Resulting DP Deflection = .9981 uCal/sec.
Resulting DP Area = 298.6204 uCal.
Percent Error in Power = .19%
Percent Error in Energy = .4964%
*****Pulse # 2*****
Pulse power = 2 uCal/sec.
Pulse Duration = 300.11 sec.
Pulse Energy = 600.22 uCal.
*****
Resulting DP Deflection = 2.0016 uCal/sec.
Resulting DP Area = 600.5151 uCal.
Percent Error in Power = -.08%
Percent Error in Energy = -.0492%
*****Pulse # 3*****
Pulse power = 5 uCal/sec.
Pulse Duration = 300.06 sec.
Pulse Energy = 1500.3 uCal.
*****
Resulting DP Deflection = 5.0033 uCal/sec.
Resulting DP Area = 1501.2371 uCal.
Percent Error in Power = -.066%
Percent Error in Energy = -.0625%
*****Pulse # 4*****
Pulse power = -1 uCal/sec.
Pulse Duration = 300.06 sec.
Pulse Energy = -300.06 uCal.
*****
Resulting DP Deflection = -1.0036 uCal/sec.
Resulting DP Area = -300.3984 uCal.
Percent Error in Power = -.36%
Percent Error in Energy = -.1128%
*****Pulse # 5*****
Pulse power = -2 uCal/sec.
Pulse Duration = 300.06 sec.
Pulse Energy = -600.12 uCal.
*****
Resulting DP Deflection = -2.0023 uCal/sec.
Resulting DP Area = -600.3219 uCal.
Percent Error in Power = -.115%
Percent Error in Energy = -.0336%
*****Pulse # 6*****
Pulse power = -5 uCal/sec.
Pulse Duration = 300.05 sec.
Pulse Energy = -1500.25 uCal.
*****
Resulting DP Deflection = -5.0031 uCal/sec.
Resulting DP Area = -1500.99 uCal.
Percent Error in Power = -.062%
Percent Error in Energy = -.0493%
    
```

7. 測定パラメータデザイン用ソフトウェア

この章では、**Experimental Design** タブを使い N 、 K_d 、および ΔH の予想値を入力し、パラメータを自動で設定する方法を説明します。(C 値については 40 ページの解説を参照下さい。)

- 1) **Experimental Design** タブを選択します。
- 2) **1.Experimental Mode** を選択します。
High Quality : C 値が 50 になるように設定 (高品質なデータを得る為に必要なサンプル量を設定)
Minimum Protein : C 値が 10 になるように設定 (滴定を成功させる為にサンプル必要最低量を使用)
High Speed Mode : 長い時間をかけて 1 回だけ注入するモード
- 3) **2.Stating Value** で N , K_d , dH 、測定温度それぞれの予想値を入力後、エンターキーを押します。
- 4) **Update Experimental Curve** ボタンを押すと概要グラフが表示され、また結果に基づいて **Advanced Experimental Design** タブに測定パラメータが表示されます。
- 5) **Results** にセル、シリンジの予想値に基づく必要濃度が表示されます。
- 6) **Results** にセル、シリンジの予想値に基づく必要濃度は **Change** ボタンで変更することが可能です。
C 値の背景色が計算により、**Legend** に表示されているいずれかの色に変わります。
緑 : 最良なデータが得られる最適値(C 値が 5~500)
黄 : 有効範囲内であるが、最良なデータが得られない可能性がある(C 値が 1~5 及び 500~1000)
赤 : 使用可能なデータが得られることはない(C 値が 1 以下か 1000 以上)



8. サンプル調製ガイド

1 必要サンプル量

iTC200の1回の測定に必要な最小のサンプル量は、

滴定シリンジ側 : 60 ul
セル側 : 300 ul

2 必要濃度

濃度設定は結合の強さによって変わり、大よその目安は、

滴定シリンジ側 : $K_D \times 50 \sim 100$
セル側 : $K_D \times 5 \sim 10$

となります。詳細な検討については以下を参照下さい。

2.1 高分子濃度（セル側のサンプル濃度）

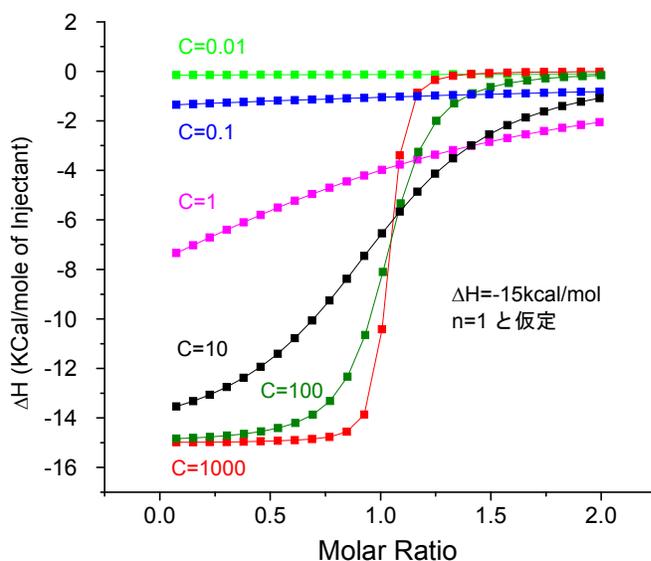
結合定数を決定するためにはシグモイド型のサーモグラムを得る必要がありますが、このサーモグラム形状はセル側の高分子濃度により決まります。

高分子濃度[M](mol/L)は、C値(※)が $1 \leq C \leq 1000$ の範囲に入るように調製します。
($5 \leq C \leq 250$ の間にはいると、理想的なシグモイド型のサーモグラムになります。)

※C値とは

$C = [M] \times K_A \times n$ で表される値で、C値によりITCサーモグラムの形状は図のように変化します。

[M] (mol/L) はセル側高分子濃度、 K_A (L/mol)は結合定数、nは高分子とリガンドの結合比です。C値を計算する場合、まったく未知の相互作用であっても、 K_A およびnの推測値が必要となります。



1:1の結合で高分子濃度が10uMの場合
 $K_A = 10^7 \text{ M}^{-1}$ ($K_D = 0.1 \text{ uM}$)の時、
 $C = 10^7 \times 10 \times 10^{-6} = 100$
(理想的なシグモイドカーブ)

$K_A = 10^4 \text{ M}^{-1}$ ($K_D = 100 \text{ uM}$)の時、
 $C = 10^4 \times 10 \times 10^{-6} = 0.1$
(熱変化が見られない)

C=1以下になるような場合は、高分子濃度を上げてC値を大きくするか、濃度を上げるのが難しい場合は後述のLowC ITC法で測定することになります。

2.2 リガンド濃度 (滴定シリンジ側のサンプル濃度)

リガンド濃度[X]は通常の測定の場合 $[M] \times n \times 10 \sim 50$ の範囲で高めの濃度の溶液をご用意ください。 $n = 1$ の場合、[X]は[M]の10倍以上の濃度が必要ということになります。これは滴定終了時に高分子:リガンド=1:2以上となるように滴定することで、結合を飽和させるためです。

後述のLowC ITC法の場合、滴定終了時に高分子:リガンド=1:10程度以上となるように滴定するため、[X]は、[M]の50~100倍の濃度をご用意下さい。

2.3 結合が非常に強い場合 ($K_A = 10^8 \text{ M}^{-1}$ 程度以上の場合)

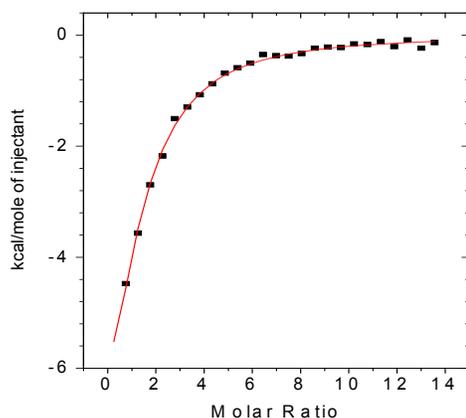
結合が非常に強い場合、C値を適正な範囲に入れるためには高分子濃度を薄くする必要がありますが、あまりに薄い場合には滴定当たりの熱変化が検出限界以下となり、C値が適正でも熱変化を見ることができなくなります。このため、結合が強い場合でも熱変化を見るために最低5uM以上の高分子濃度をご用意下さい。この場合、得られるパラメータが ΔH とnのみで、正確な K_A が得られない場合があります。 $K_A = 10^8 \text{ M}^{-1}$ 以上の結合定数を決定する場合はDisplacement ITC法を用いることで決定が可能です。

2.4 結合が非常に弱い場合 ($K_A = 10^4 \text{ M}^{-1}$ 程度以下の場合) (LowC ITC法)

結合が非常に弱い場合、C値を適正な範囲に入れるためには高分子濃度を濃くする必要がありますが、濃度を上げるのが困難な場合、通常と異なり、以下の目安による濃度設定で測定します。

滴定シリンジ側 [X] : $K_D \times 10 \sim 50$
 セル側 [M] : $K_D \times 1/5 \sim 1/100$ (10uM程度以上)

この場合、C値は1以下となりますが、滴定シリンジ側濃度をセル側に対して50~100倍の高濃度に設定しますので、下図のようなサーモグラムが得られます。この場合、 ΔH と K_A を決定することが可能です。nは決定できませんので、値を仮定して解析します。



1:1の結合で予想 $K_A = 10^4 \text{ M}^{-1}$ ($K_D = 100 \text{ uM}$) の場合

高分子濃度を 10uM とすると通常の濃度設定では $C = 0.1$ (熱変化が見られない) となるため、リガンド濃度を、1mM 以上の高濃度に設定して滴定することで、熱の変化が観測可能になる。

3 バッファーとサンプル溶液調製時の注意点

3.1 バッファー組成

バッファー組成は、pH、塩濃度、添加物濃度などの組成がセル側溶液、シリンジ側溶液およびバッファーについて完全に同一組成である必要があります。pHについては溶液間の差異が0.05以下であることが目安です。組成の不一致があるとバックグラウンド熱が大きくなり、場合によっては測定したい結合の熱を大きく上回り、結合熱量の決定が困難となる場合があります。

使用バッファーは一般的にはプロトネーションエンタルピーの補正が無視できるあるいは必要のないリン酸バッファー、酢酸バッファー、カコジル酸バッファーが理想的です。TrisバッファーなどGoodバッファー系は厳密に結合エンタルピーを得るためには補正が必要となりますが、一般に K_A や n には無関係と考えられています。なお塩濃度の目安は50~100mMです。

3.2 DMSO の使用

タンパク質 - 低分子相互作用測定などでDMSOを含むバッファーを使用する場合、サンプル間でDMSO濃度のミスマッチがあると大きなバックグラウンド熱を発生させる可能性があります。そのため調製の際には濃度差が大きくなるようご注意ください。また使用濃度は5%以下を目安にご使用下さい。DMSO以外の有機溶媒やグリセロールをご使用の場合も同様に濃度のミスマッチにご注意下さい。

3.3 透析

全てのサンプルのバッファー組成や濃度条件が同じになるよう、高分子とリガンドを同時に透析することをお勧めします。透析できない低分子のリガンドの場合には、高分子側の透析外液でリガンドを溶解・希釈して下さい。合成ペプチドや合成オリゴヌクレオチドなど合成サンプルを用いる場合、合成残留物による影響(ノイズやイレギュラーなピークあるいは大きなバックグラウンド熱の発生)が見られることがありますので、ご注意ください。

3.4 ろ過

ゴミや不溶成分などの不均一な微粒子がサンプル溶液に混入するとベースラインのノイズとなりデータが乱れることがありますので、凝集やゴミがあれば濃度決定の前に0.8 μ m程度のフィルターでろ過して下さい。

3.5 還元剤

還元剤の添加はベースラインに大きな変動(ドリフト)を与える場合があります。もし使用する場合1~2mMのTCEP(トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン)であれば、変動は比較的抑えられます。DTT(ジチオスレイトール)や β メルカプトエタノールは、大きなベースラインのドリフトが見られる場合があります。(影響のない場合もあります。)

3.6 凝集試験

凝集を伴う反応から得られたデータから正確な結合の熱力学量を得ることはできません。凝集の恐れがあればITCの実験を行う前に、調製した試料の一部を使って反応による凝集の有無をご確認ください。

9. カロリメトリーに関する参考図書

Biocalorimetry	John E. Ladbury and Babuer Z. Chowdhry	WILEY
Biocalorimetry 2	John E. Ladbury and Michel L. Doyle	WILEY
熱測定・熱分析ハンドブック	日本熱測定学会 編	丸善株式会社
生体機能関連化学実験法	日本化学会生体機能関連化学部会 編	化学同人
バイオ高性能機器・新技術利用マニュアル	編集 小原収・谷口寿章・市川哲生・猪飼 篤	共立出版
分析・計測法	猪飼 篤 編	丸善株式会社
生命科学のための機器分析実験ハンドブック	西村善文編	羊土社
分子間相互作用解析ハンドブック	磯辺俊明・中山敬一・伊藤隆司編	羊土社
ポストシーケンスタンパク質実験法3	構造・機能解析の基礎 大島泰郎・鈴木紘一・藤井義明・松村喬編	共立出版

超高感度等温滴定型マイクロカロリメータ

iTC₂₀₀

データ解析用簡易チュートリアル

DKSH ジャパン株式会社

1. 解析の流れ
 - 1.1 Origin の立ち上げ
 - 1.2 測定データの読み込み
 - 1.3 画面上に 2 つのデータを表示
 - 1.4 濃度でノーマライズ
 - 1.5 コントロールの差し引き
 - 1.6 バッドデータを取り除く
 - 1.7 データフィッティング
 - 1.8 データを保存

2. その他の必要な操作
 - 2.1 ベースラインの調整
 - 2.2 コントロールの差し引き
 - 2.3 ワークシートデータの表示と Excel への書き出し

1. 基本的な解析の流れ

1.1 Origin の立ち上げ

データ解析ソフトウェア Origin を立ち上げます。

MicroCal, LLC ITC のアイコンをダブルクリックします。

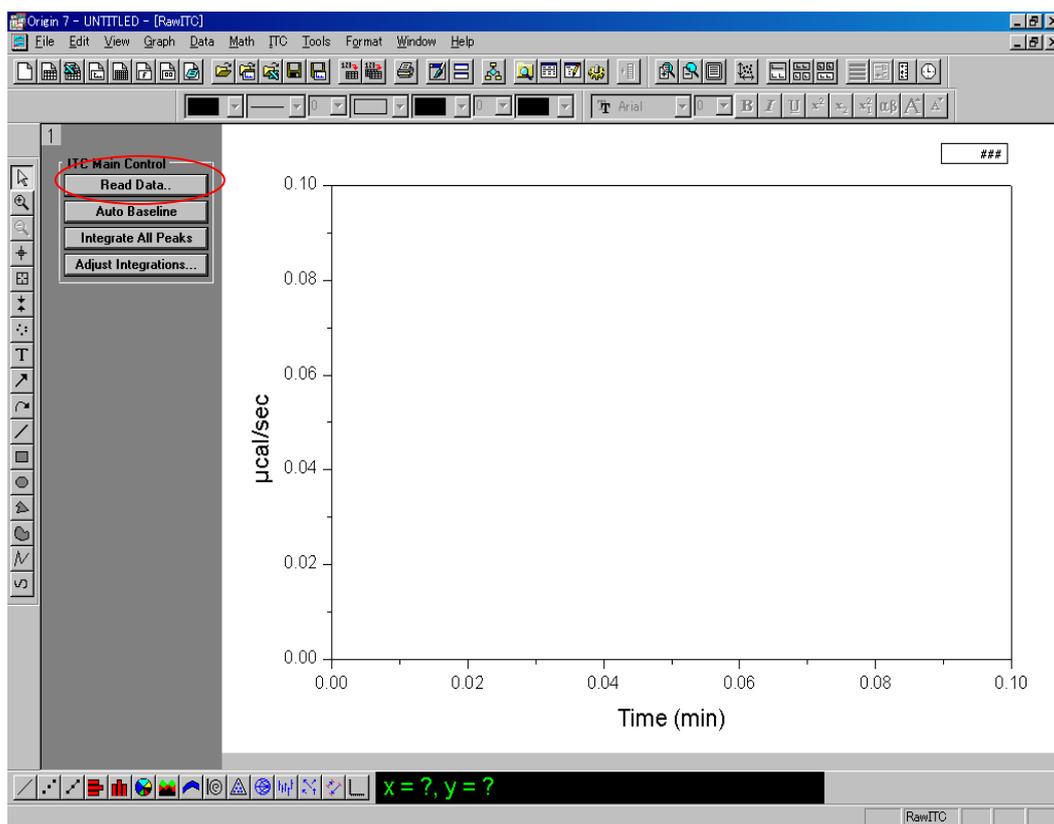


1.2 測定データの読み込み

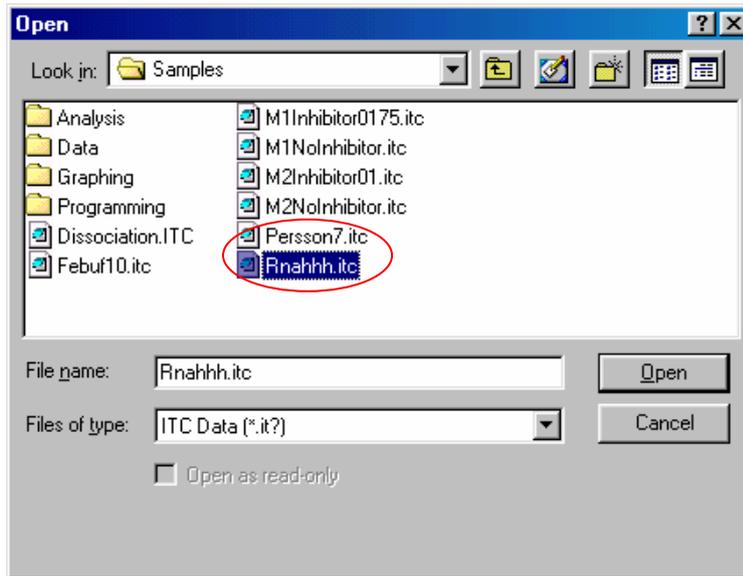
Origin を立ち上げると以下のようなウインドウが表示されます。

データを読み込むには、画面の左側にある **Read Data** をクリックします。

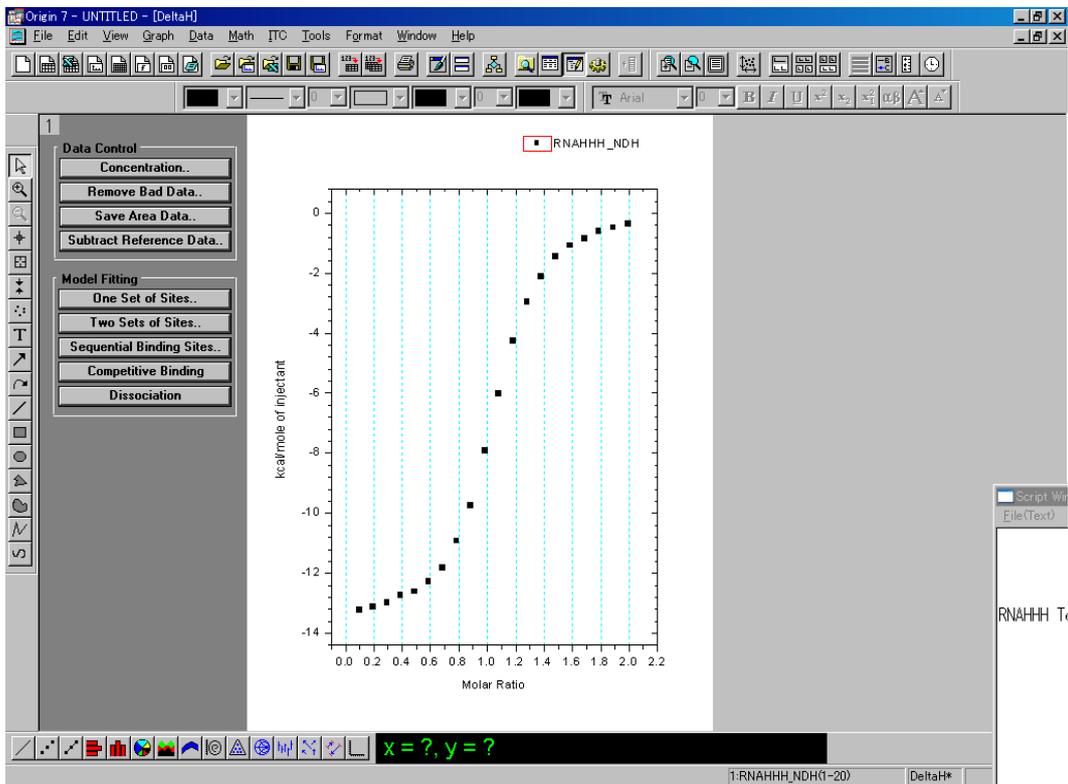
以下のウインドウが表示されます。



読み込み可能なデータは.itc という拡張子が付いたデータのみになります。



解析するデータ（ここでは Rnahhh.itc）を選択し、**Open** をクリックします。
 ここでは例として RNaseA-2'CMP の測定の解析を行います。
 データが読み込むと、以下のようにデータが表示されます。

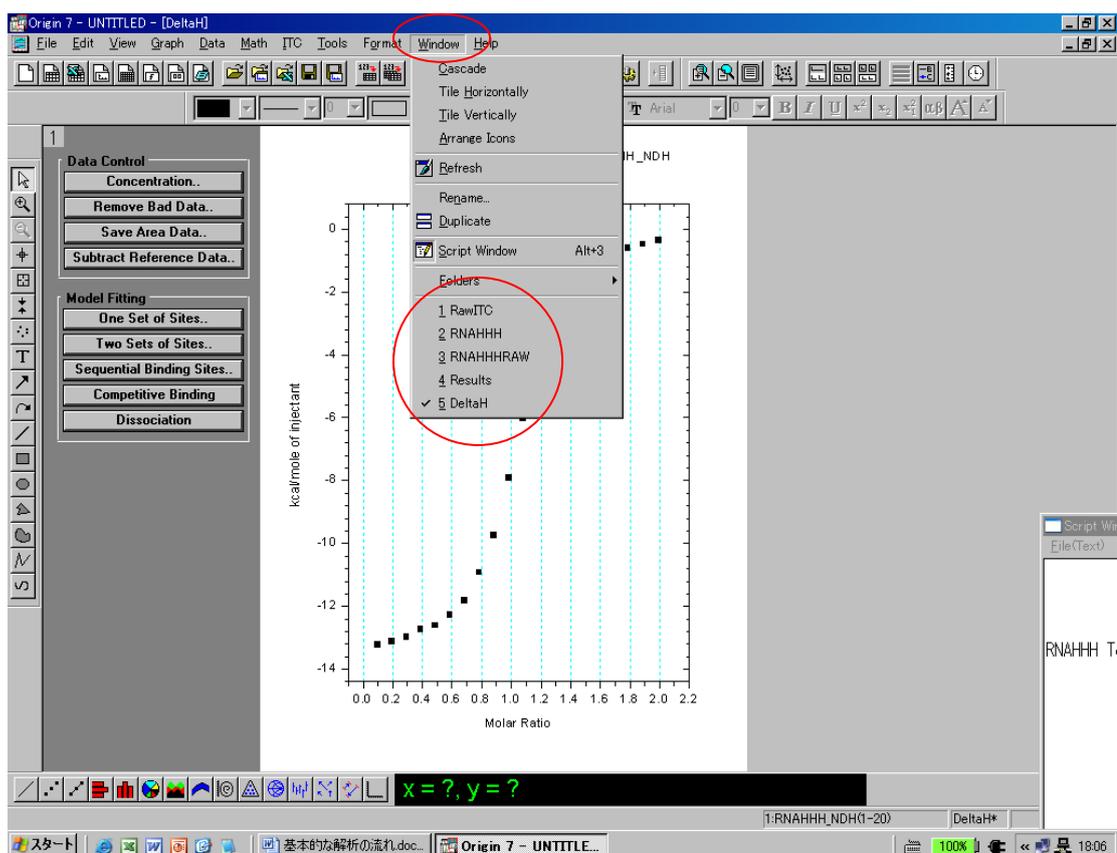


DeltaH ウィンドウが前に表示されますが、同時に滴定データ(RAWITC ウィンドウ)とそれぞれの数値データのウィンドウも立ち上がっています。

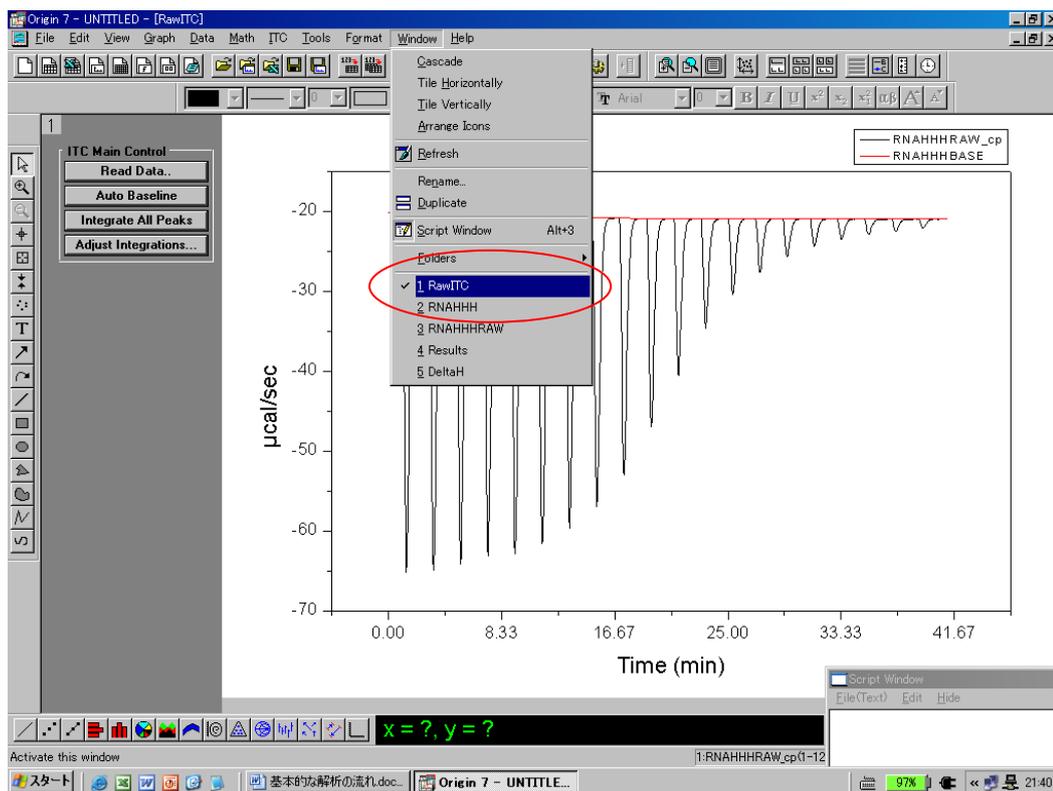
立ち上がっているウィンドウは、メインメニューの **Window** のサブメニューに表示され、それぞれ

1.RawITC (滴定データ) 2.RNAHHH (解析の数値データ) 3.RNAHHHRAW (滴定データの数値) 4.Results 5.DeltaH (解析データ) となっています。

図ではチェックマークが入っている 5.DeltaH ウィンドウがアクティブになっています。

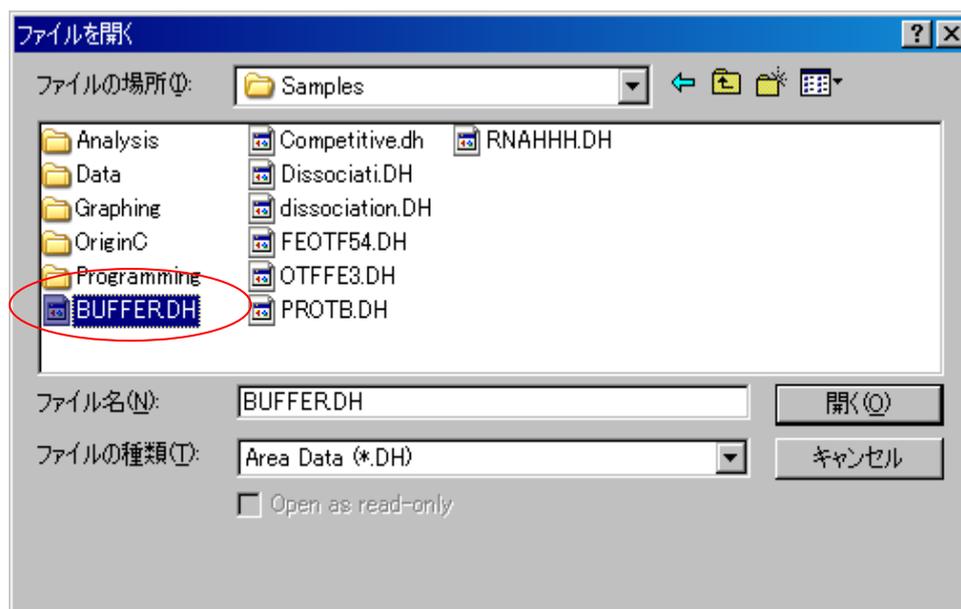


1.RawITC を選択すると、以下のように滴定生データがアクティブに表示されます。



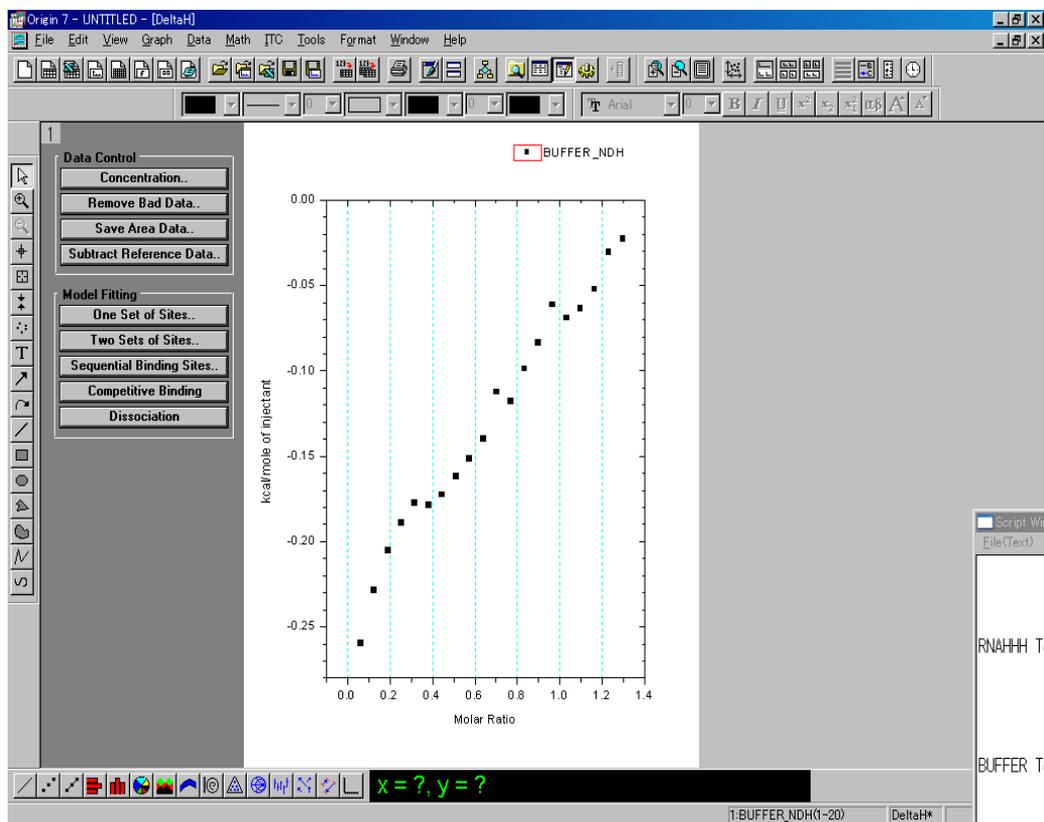
次にサンプルデータからコントロールデータを差し引きするためのコントロールデータも読み込みます。

1.RawITC をアクティブにして、画面の左側にある **Read Data** をクリックします。以下の画面が表示されます。



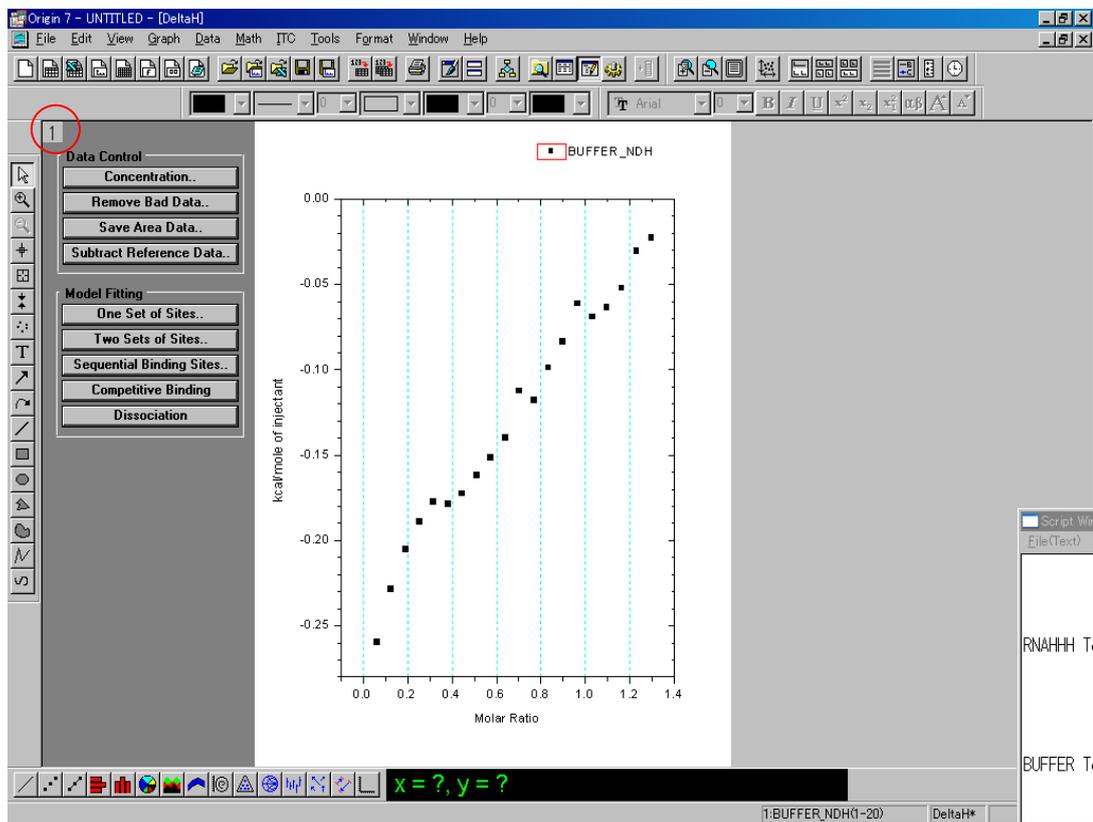
通常は本測定データと同様、.itc の拡張子のついたデータを選択します。

コントロール測定用のデータ（ここでは Buffer.dh）を選択し、**Open** ボタンを押しますと Buffer の DeltaH のデータが表示されます。（本測定の DeltaH のデータは一時的に隠れます。）

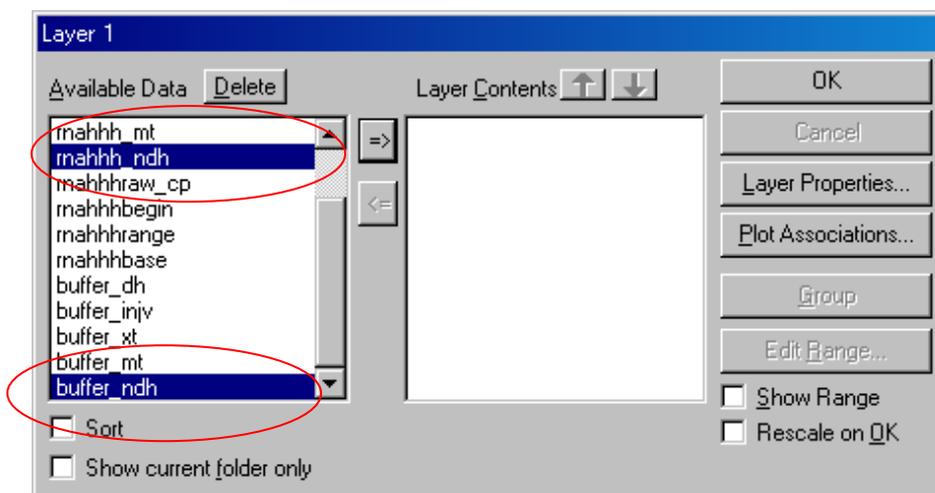


1.3 画面上に2つのデータを表示

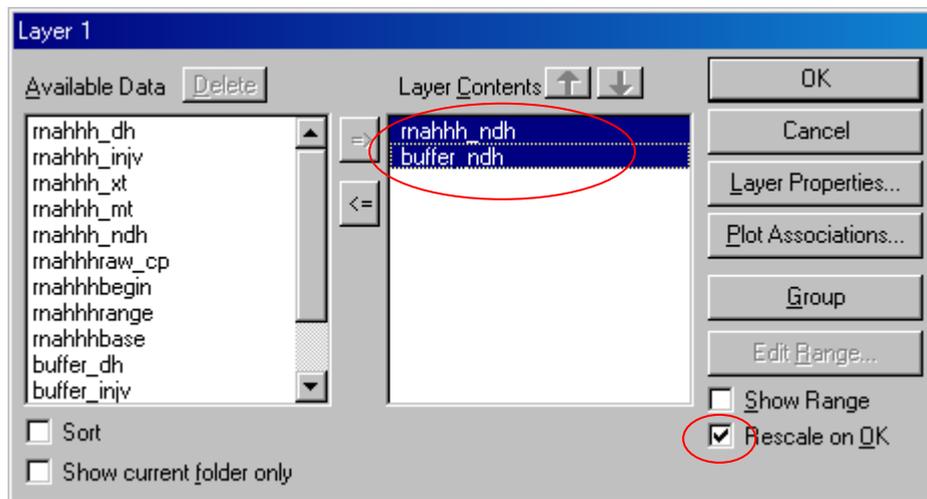
本測定とコントロール測定の2つのデータを表示するためには、下図の左上の端にある1をクリックします。以下のウィンドウが表示されます。



左側にある Available Data の中から、両測定 of DeltaH のデータ (ファイル名_ndh) を選択し、=>を押します。

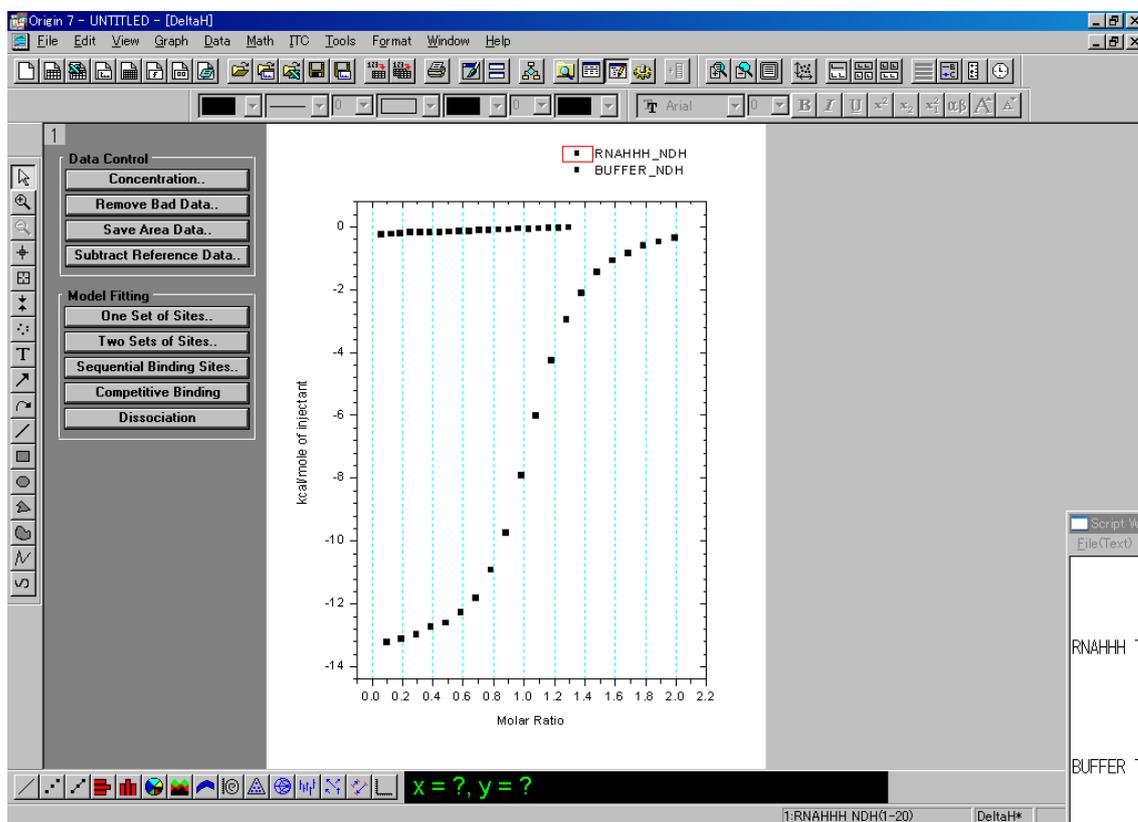


以下のように選択したデータが右側の Layer Contents に移っていることを確認します。



両データが表示されるスケールに変更するために、rescale on OK にチェックを入れ OK ボタンを押します。

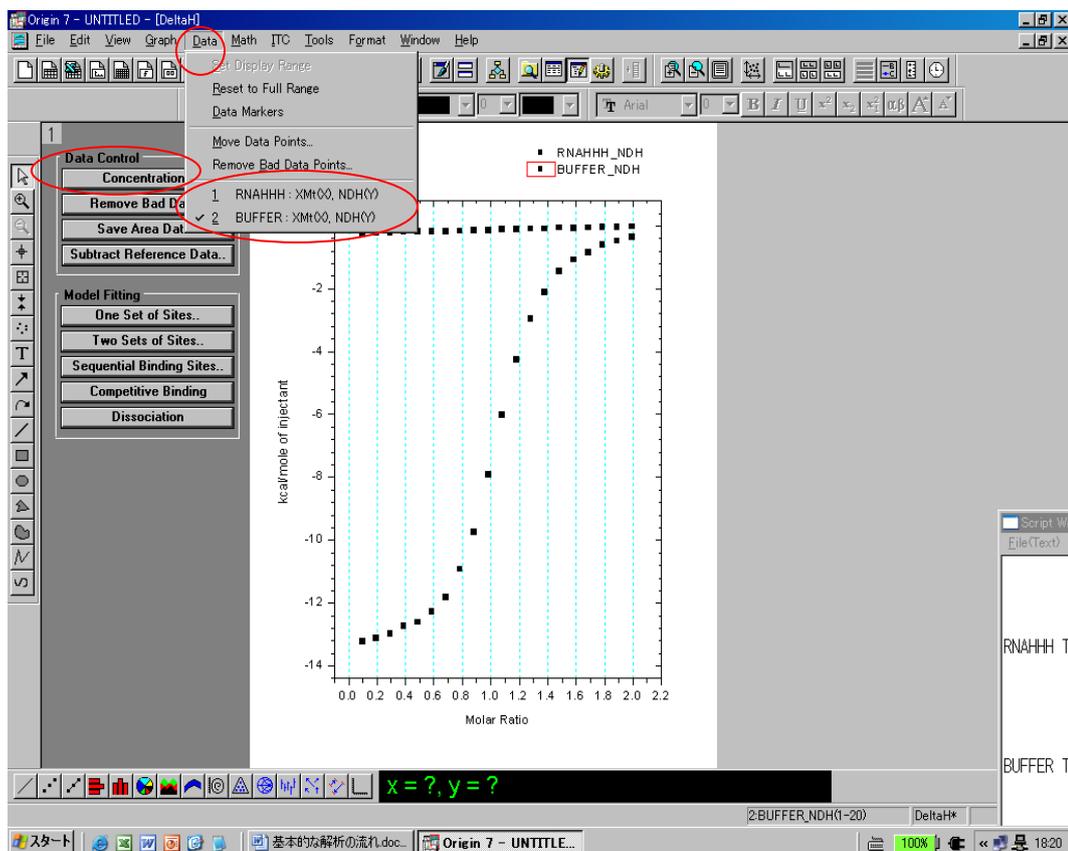
以下のように、サンプルとコントロール 2 つのデータが表示されます。



1.4 濃度でノーマライズ

それぞれのデータの濃度をノーマライズします。

まずノーマライズするデータを選択します。以下のように、メニューにある **Data** をクリックすると、1 RNAHHH、2 BUFFER というファイル名が表示されます。どちらかを選択するとチェックマークが付きます。チェックマークが付いている方が現在アクティブになっているデータです。



左側にある **Concentration** ボタンをクリックすると、以下のウィンドウが表示されます。横軸をモル比、縦軸をリガンド 1 モル当たりのエンタルピー変化量に変換するために、シリンジとセルのサンプル濃度を入力して、**OK** ボタンを押します。(Inject Vol.(μL)は一回ごとの滴定容量, Cell Vol.(mL)は装置固有のセルの容量が自動的に入力されていますので、入力必要はありません。)

For Data demo

OK

Cancel

C in Syringe(mM) 5

C in Cell(mM) 0.4

Cell Vol. (ml) 0.2054

サンプル、コントロールそれぞれの濃度を入力し、**OK** ボタンを押します。
 この時コントロールデータは、セルは Buffer のみなので、濃度はゼロですが、表示を
 そろえるために、本測定のサンプル濃度と同じ濃度を入力します。

1.5 コントロールの差し引き

サンプルデータからコントロールデータを差し引きます。
 まず、Data Control の **Subtract Reference Data** をクリックします。
 以下のウインドウが表示されます。Data:にサンプルのデータを、Reference:にコント
 ロールのデータを選択し、**OK** ボタンを押します。

Subtract Reference Data

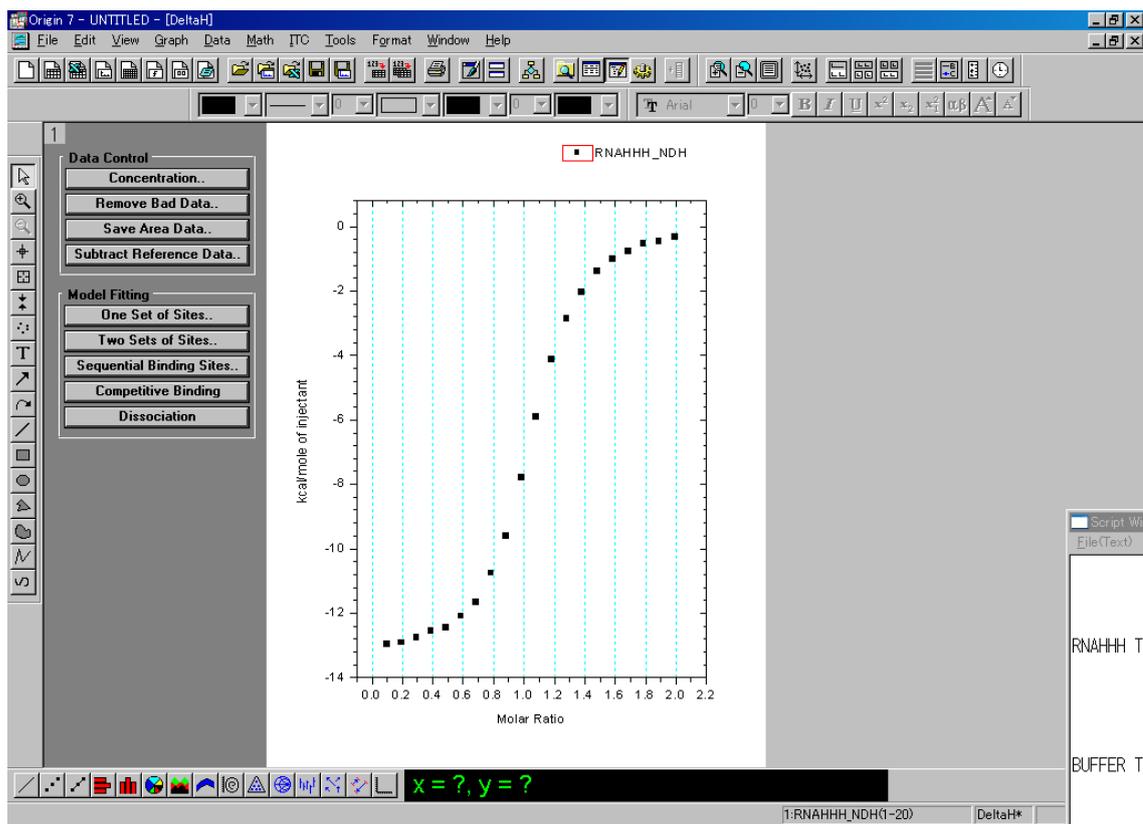
(Data-Reference)

Data: Rnahhh NDH

Reference: Buffer_NDH

Ok Cancel

下図のように、差し引かれたコントロールのデータが画面から消えます。



1.6 バッドデータを取り除く

バッドデータポイントを消すことができます。

まず Data Control の **Remove Bad Data** をクリックします。

マウスの矢印が十字架に変わりますので、十字架を消したいポイントに合わせてダブルクリックをします。

The screenshot shows the Origin 7 software interface. The 'Data Control' panel on the left has the 'Remove Bad Data...' button highlighted with a red oval. The main plot area displays a graph of 'kcal/mole of injectant' (Y-axis, ranging from -14 to 0) versus 'Molar Ratio' (X-axis, ranging from 0.0 to 2.2). The data points are represented by black squares, and a red square indicates the selected point for removal. The status bar at the bottom shows the coordinates of the selected point: 'RNAHHH_NDH[1]: X = 0.0968094367, Y = -13232.1192'. The status bar also includes the instruction 'Click the point you want to remove, then hit ENTER' and the label '1:RNAHHH_NDH[1]'.

1.7 データフィッティング

モデルフィッティングを行います。Origin にはあらかじめ 5 つの相互作用におけるモデルが用意されています。

One Set of Sites : 結合サイトが 1 種類だけの場合のモデル。結合サイトが複数あっても全て同じ結合様式の結合サイトである場合は、このモデルを使用します。

Two Set of Sites : 結合サイトが 2 種類で、互いに独立したサイトである場合のモデル。
Sequential Binding Sites : 結合サイトが 2 種類以上であり、互いに協同作用がある場合の解析

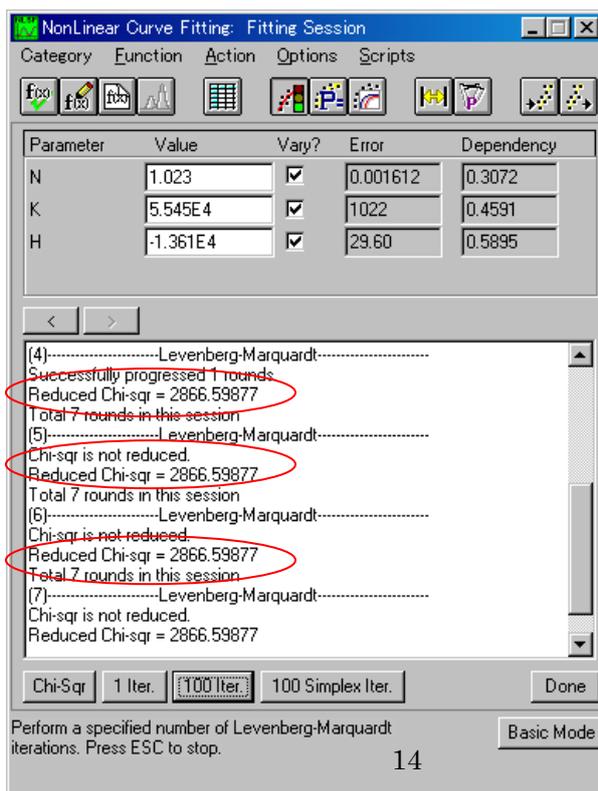
Competitive Binding : Displacement/TC 法で測定したデータを解析

Dissociation : 会合体解離モデルの解析

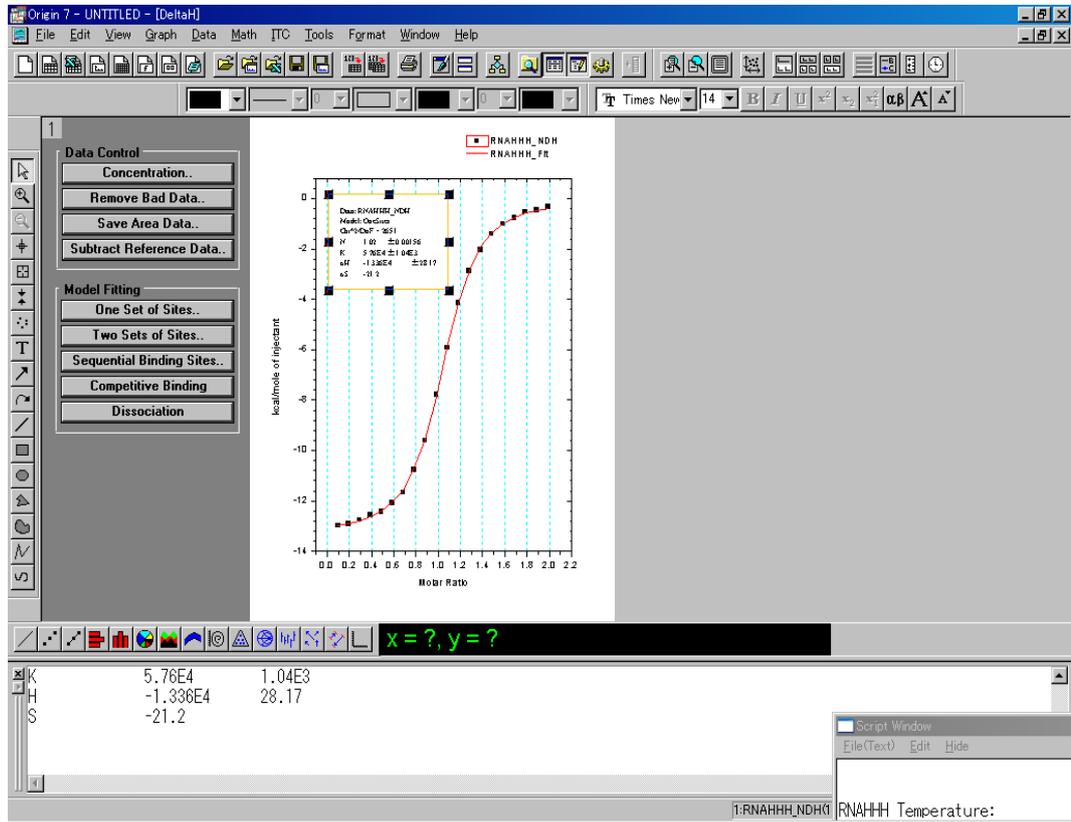
この反応の場合は 1:1 の相互作用ですので、1:1 の結合モデルである **One Set of Sites** をクリックしますとフィッティングセッションのウィンドウが立ち上がります。

以下のウィンドウが立ち上がります。

100Iter. を押すと自動的にフィッティングの計算が行われ、 χ^2 (カイ 2 乗) 値が表示されます。**100Iter** のボタンをクリックすると、 χ^2 値が小さくなっていき、最終的にはクリックしても値が変わらなくなっていきます。(Chi-sqr is not reduced. と表示されます。) 値が変わらなくなったら、**Done** ボタンをクリックしますと、フィッティングカーブと決定されたパラメータが表示されます。

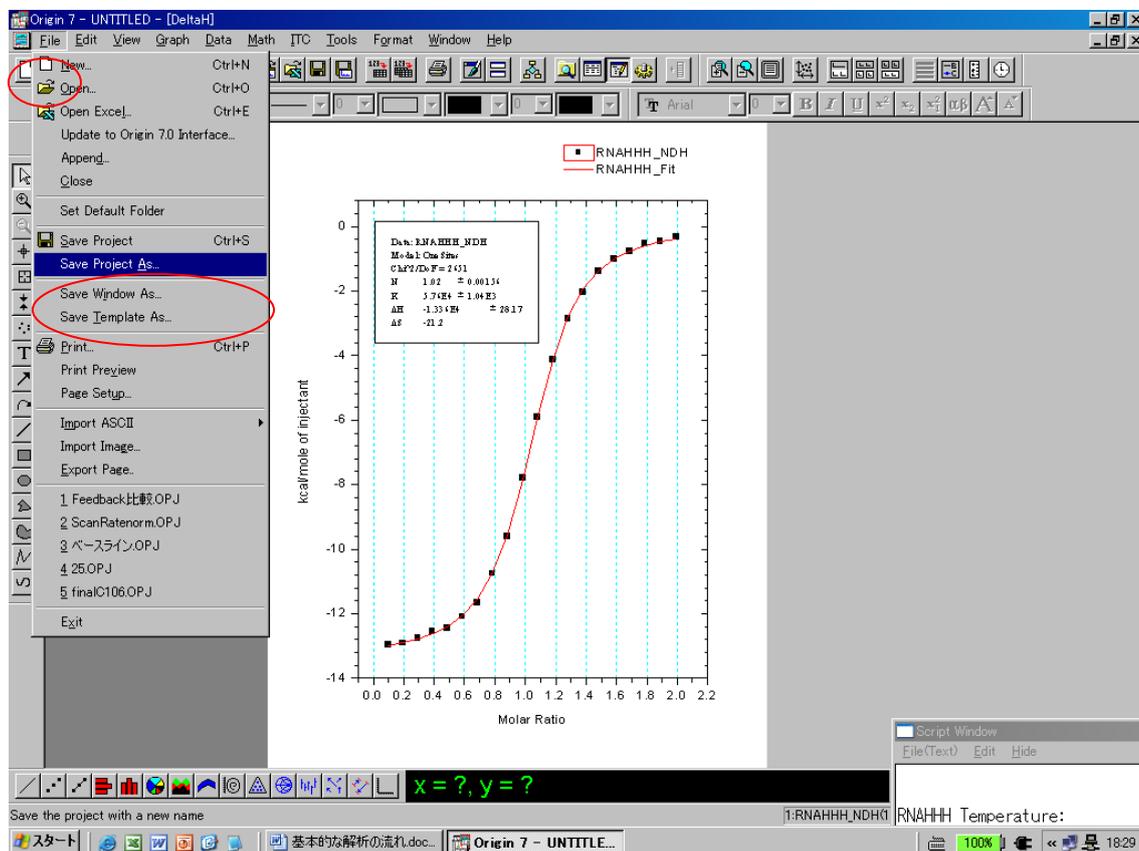


データにフィッティングカーブ（赤線）が出て、パラメータが表示されます。



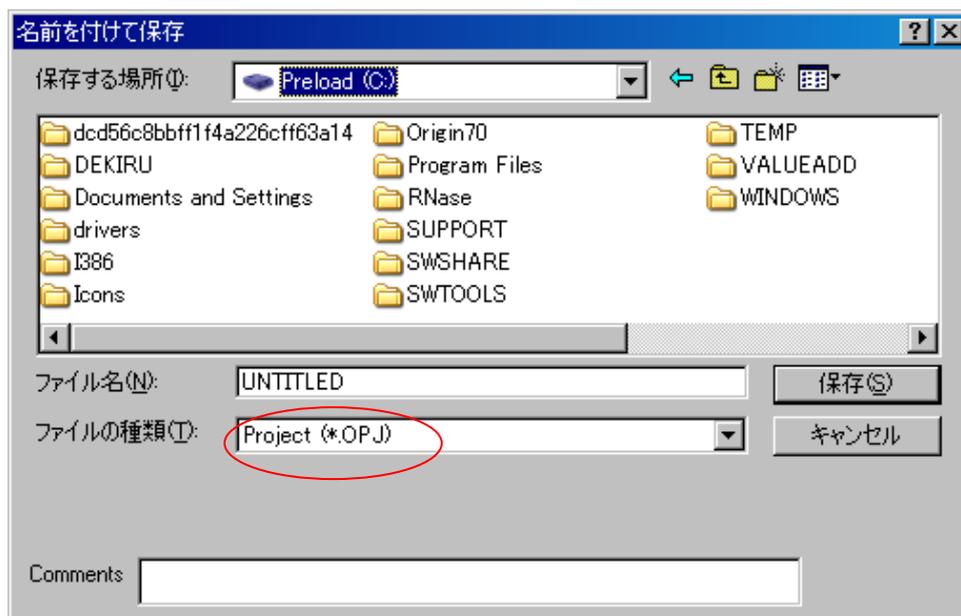
1.8 データを保存

データを保存する場合には、メニューの **File** にある **Save Project As** をクリックします。



以下のようなウィンドウが表示されます。

Save ボタンを押すと.opj のファイルとして保存します。

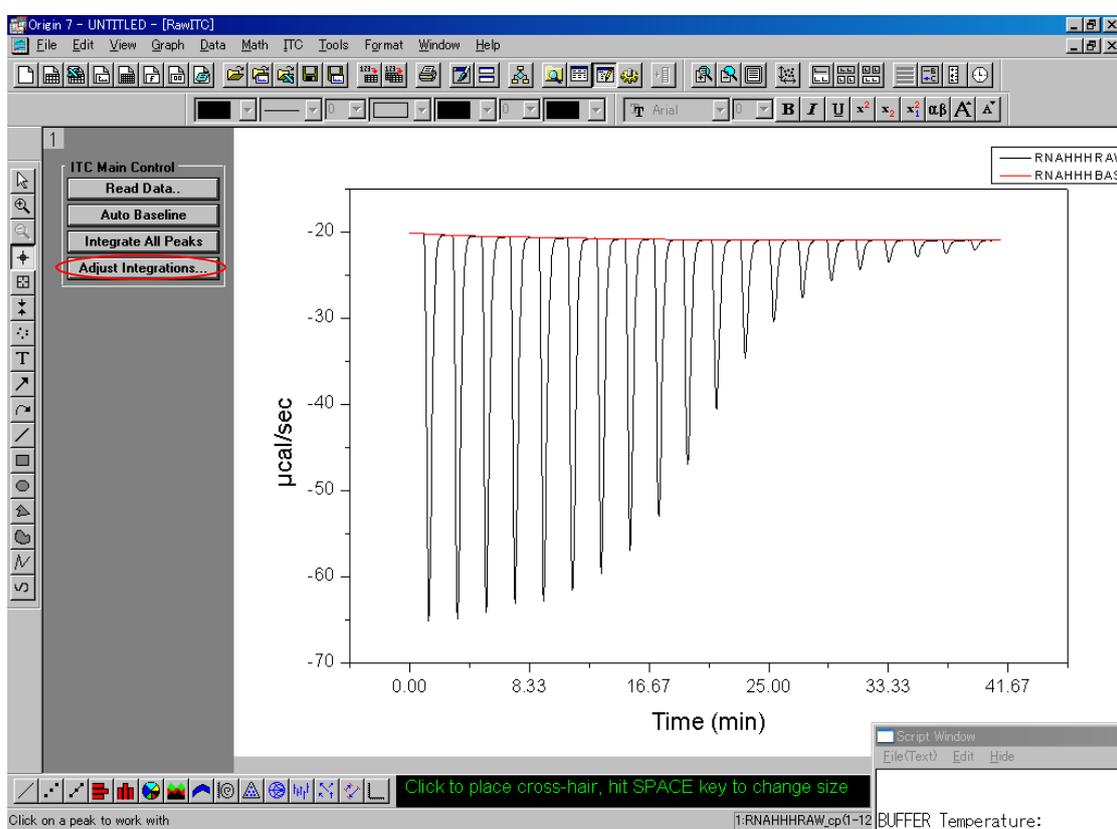


2. その他の操作

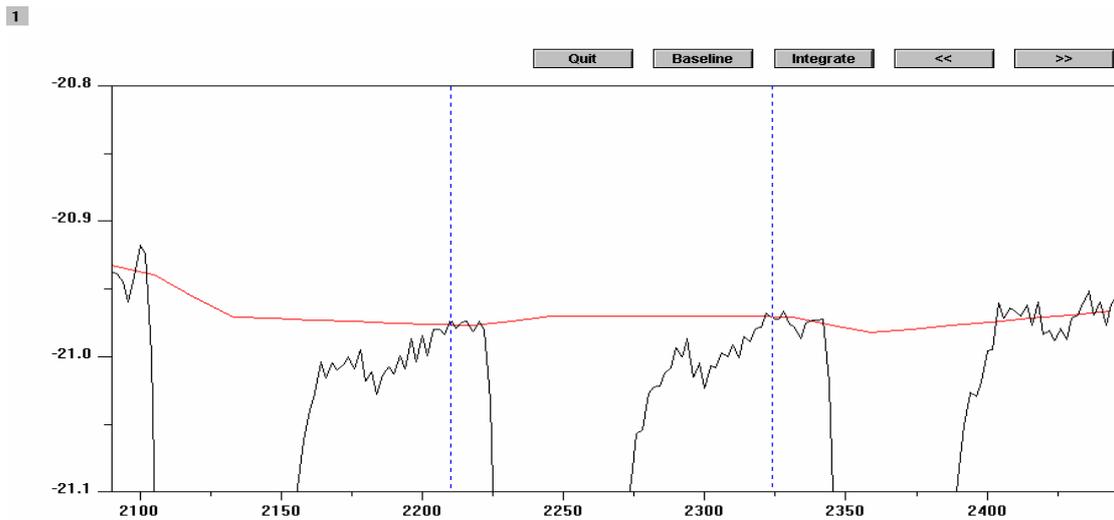
2.1 ベースライン、積分範囲の再計算

通常、生データの積分範囲は自動的にベースラインが生成されて計算されます。もし、ベースラインを補正して積分範囲を指定して、再計算したい場合には以下の操作を行います。

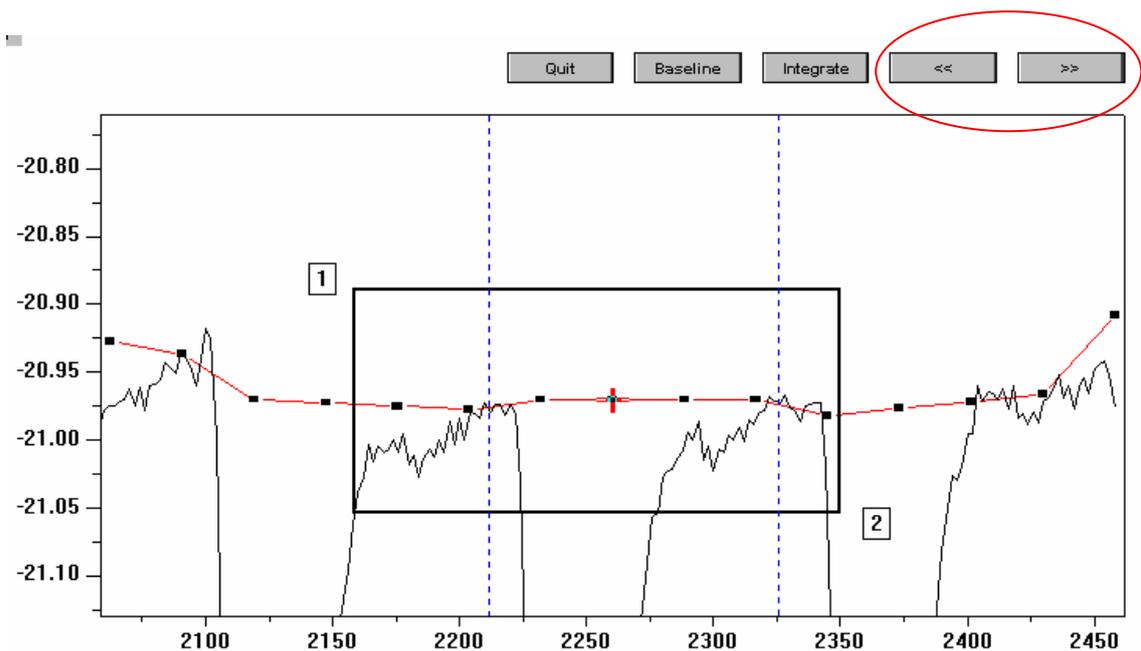
生データウインドウを表示して、ITC Controls から **Adjust Integration...** ボタンをクリックします。



マウスのカーソルが矢印から十字架に変わります。十字架をベースラインの調節したいピーク付近にあわせてクリックします。以下のように選択したピークがベースラインの境界線がはっきり見えるように拡大されます。選択されたピークが中央にきます。



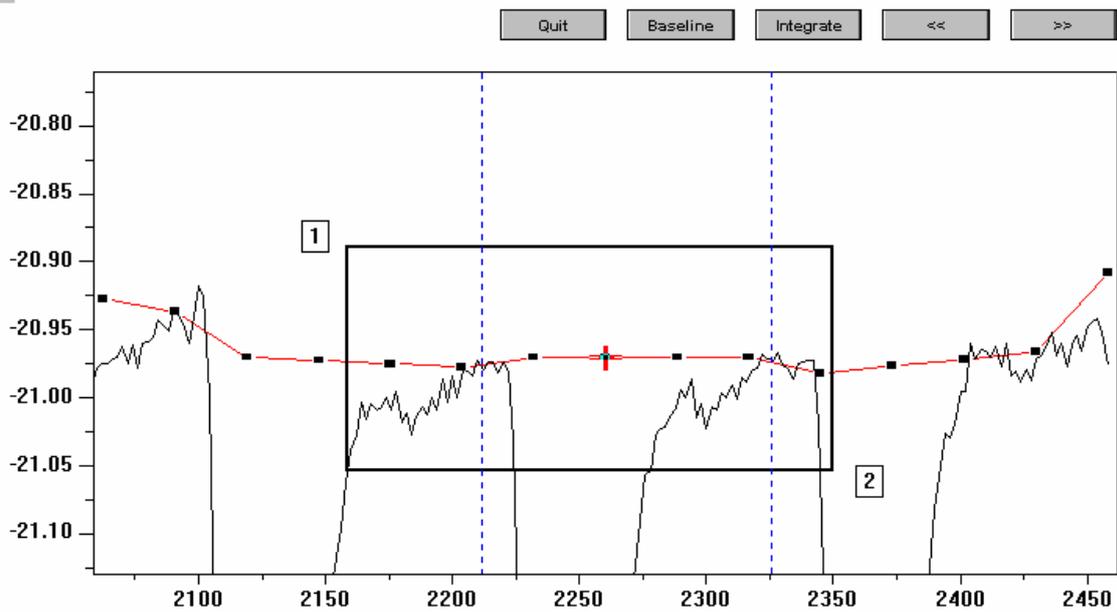
以上のウィンドウで **BaseLine** を押すと、ベースライン上に黒いポイントが表示されます。



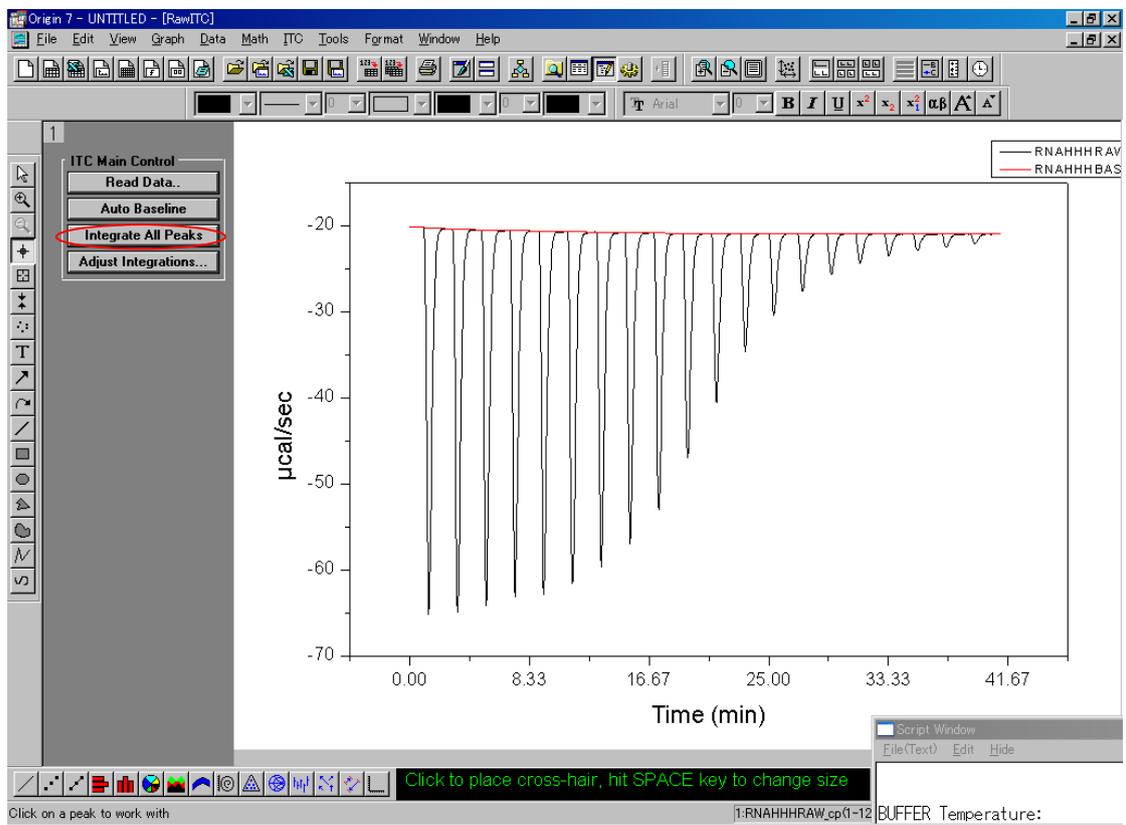
黒いポイントにマウスの十字架を合わせて、ドラックさせてベースラインを移動します。調節した場所が新しいベースラインの位置になり、調節したベースラインで決定された積分範囲の計算が行われます。

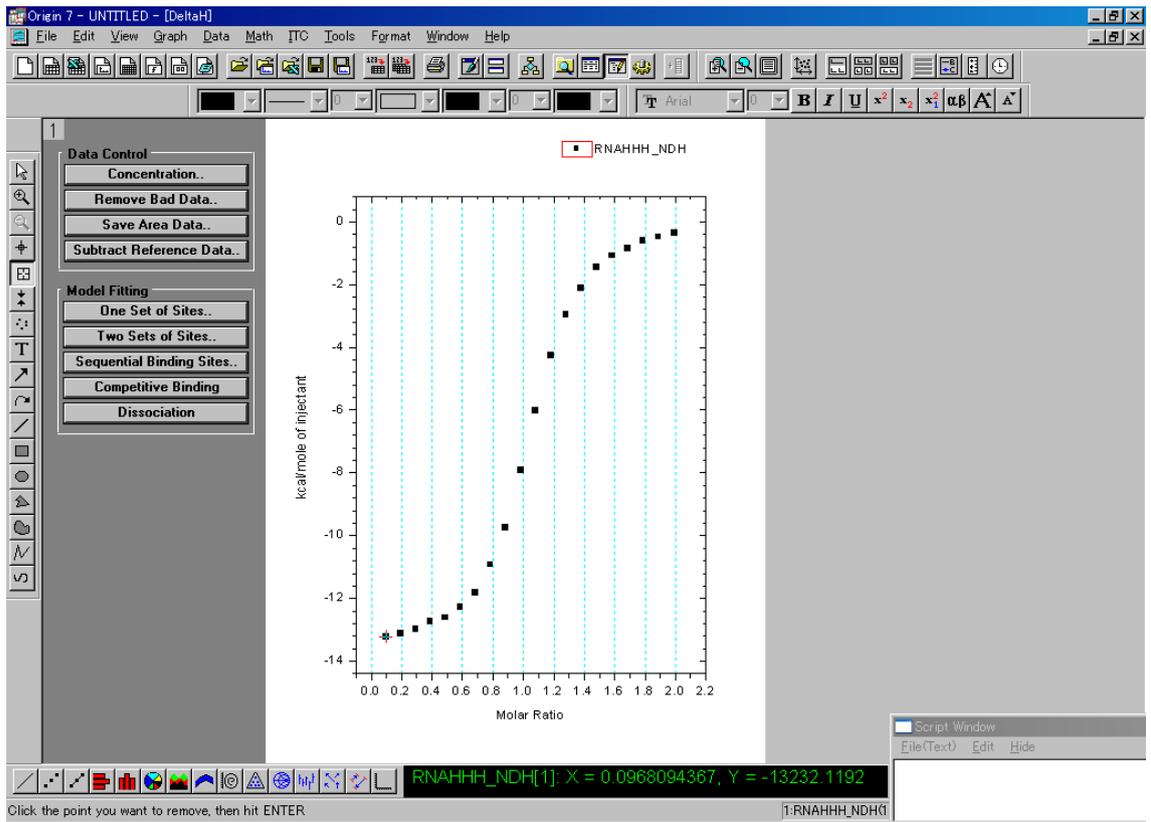
次のピークに移る時は画面の右上にある右矢印を、前のピークに戻る時は左矢印を押します。

積分範囲の調整が全て終わったら、以下のウィンドウの **Quit** ボタンを押すと、



以下のように測定生データ全体が表示されます。さらに、**Integrate All Peaks** をクリックすると新しく調節されたベースラインで解析された ΔH データが表示されます。

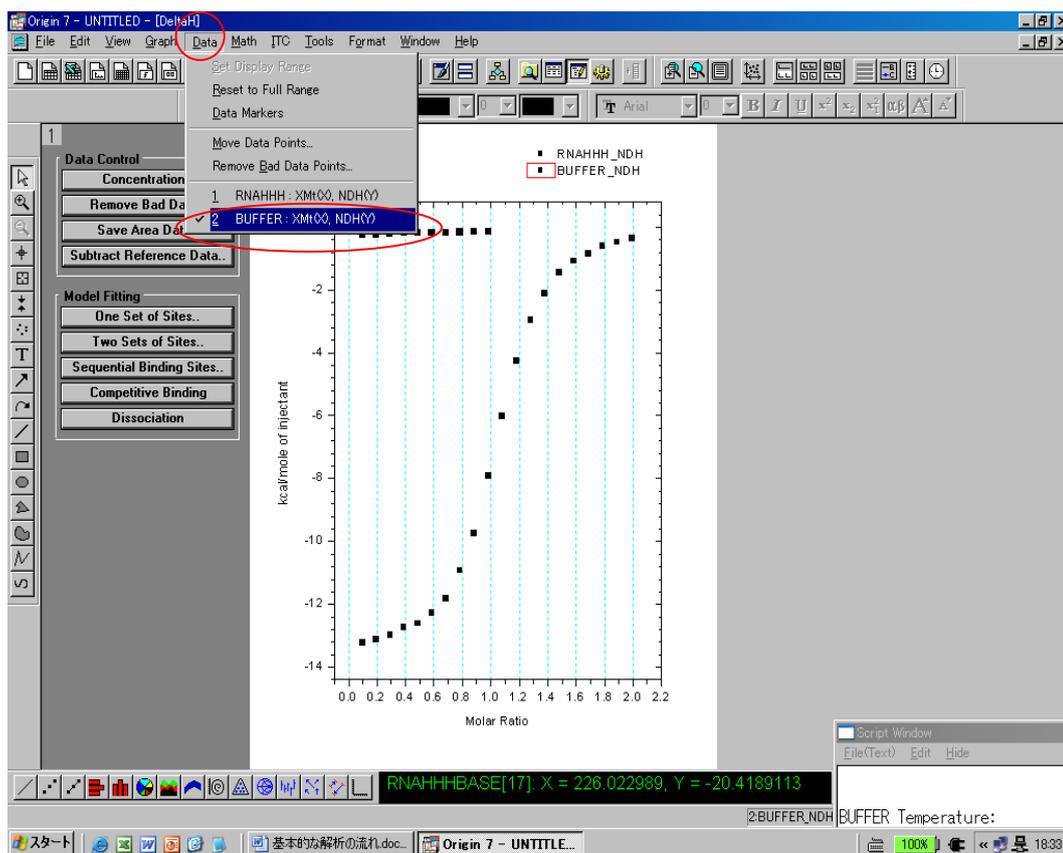




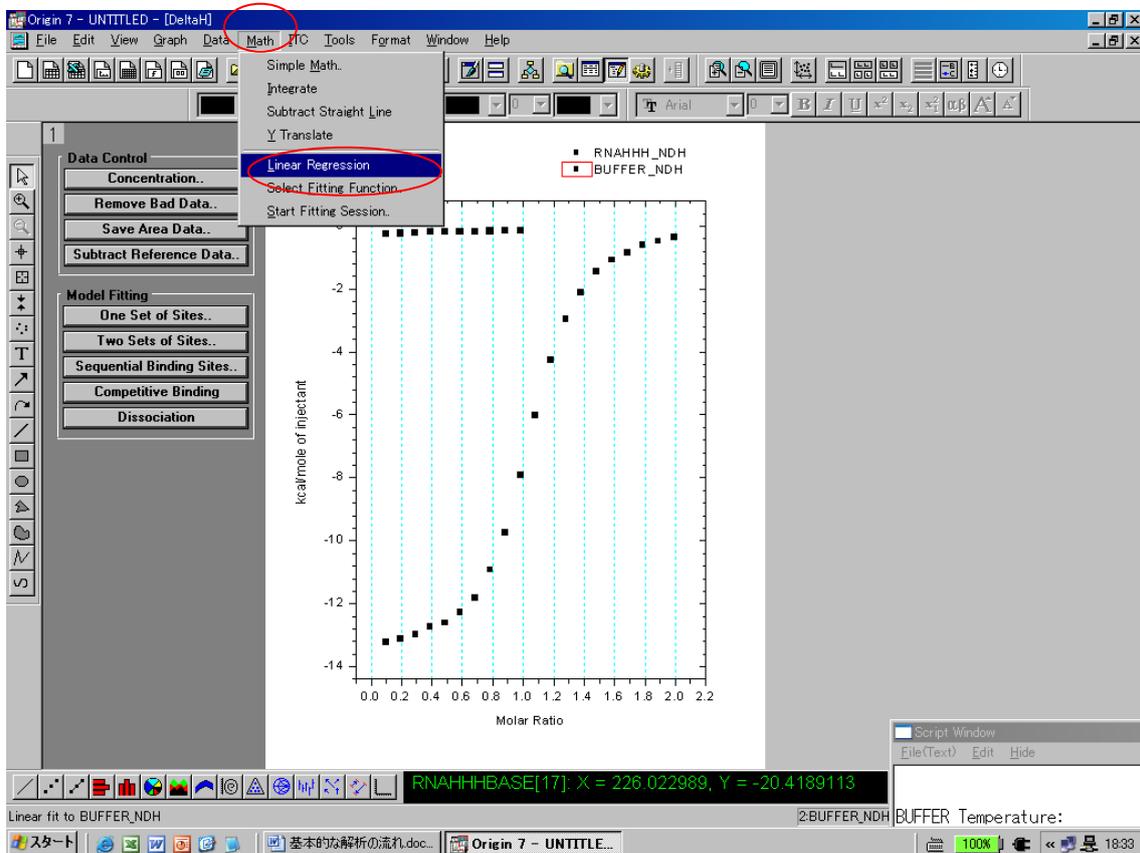
2.2 コントロールの差し引き

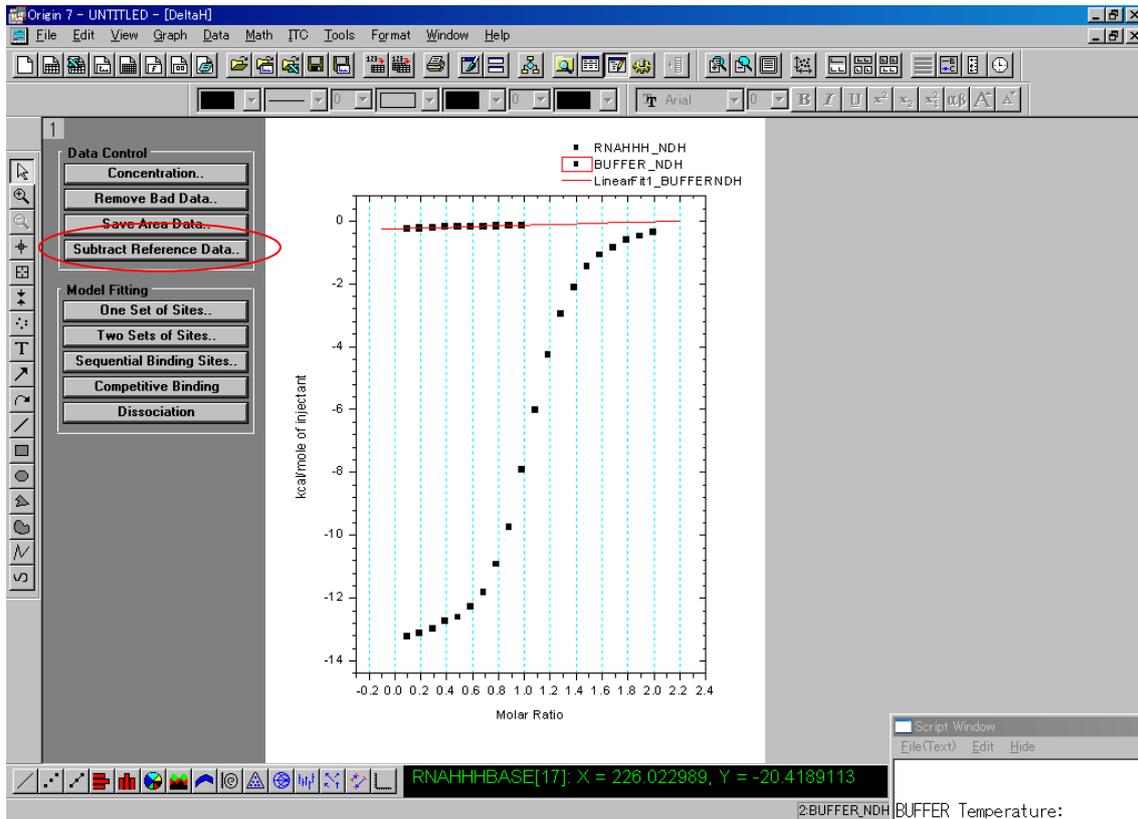
コントロール測定はサンプルと同じだけの回数を測定することが望ましいですが、毎滴定で同じだけの熱量が出ていることがわかれば、数回だけ滴定したデータに回帰直線を引き、直線をコントロールの熱とみなすことができます。

まずコントロールデータをアクティブにするために、メニューの **Data** の下方にある **BUFFER** を選択します。

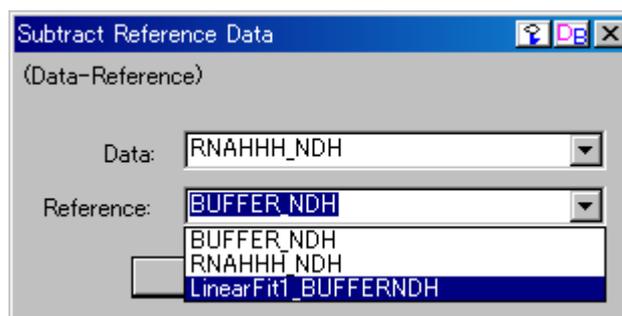


メニューの **Math** にある **Linear Regression** をクリックすると、コントロールデータに対して赤線が引かれます。





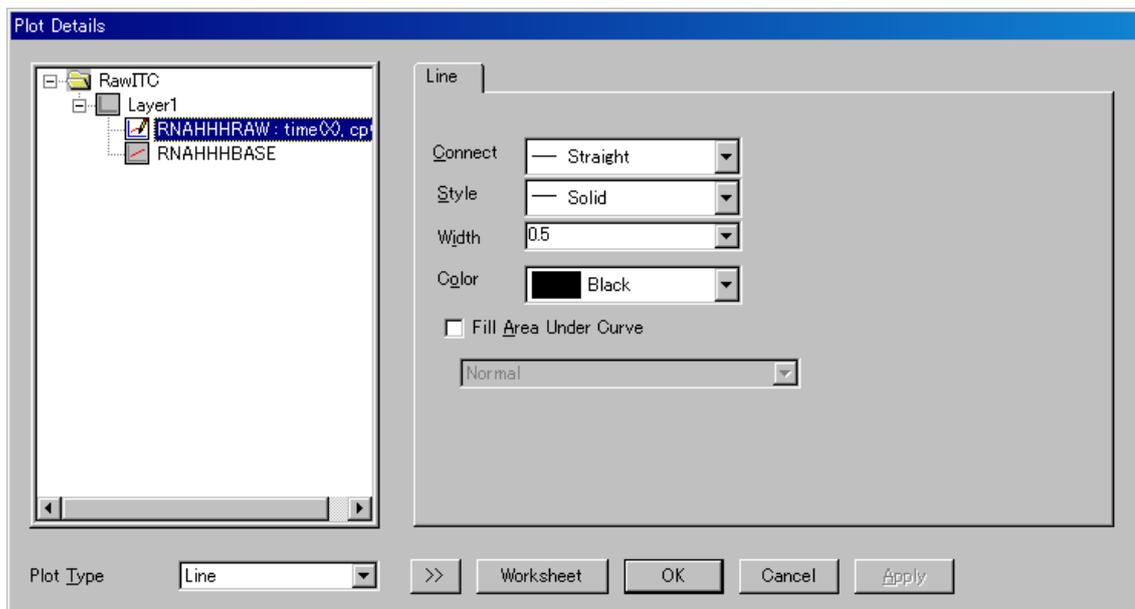
次に Data Control の **Subtract Reference Data** をクリックし、サンプルからコントロールを差し引きする時に、Reference の項目で LinearFit1_BUFFERNDH を選択し生成した直線データを差し引きします。



後は通常通りのモデルフィッティングを行います。

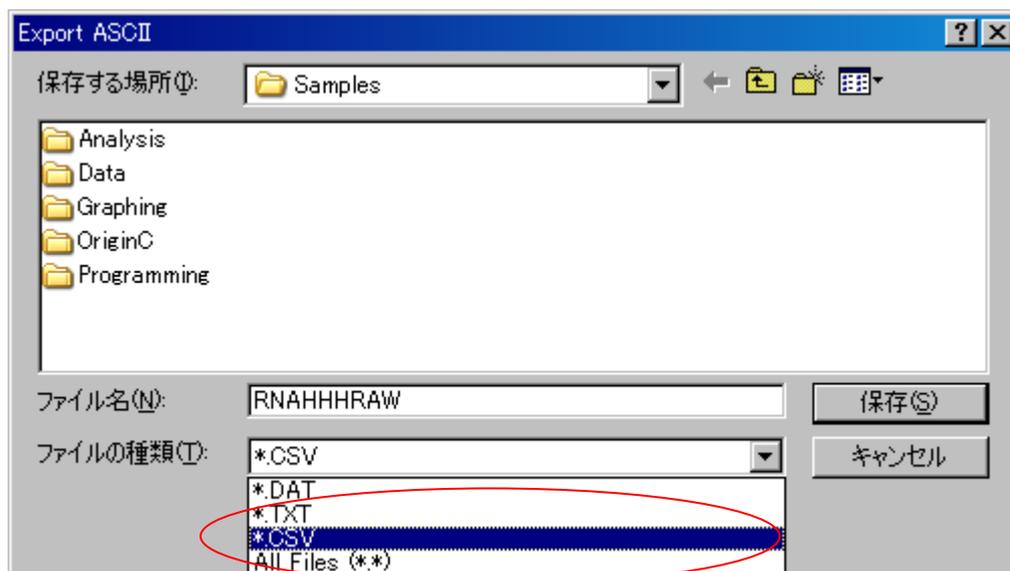
2.3 ワークシートデータの表示と Excel への書き出し

プロットされているデータのライン上をダブルクリックすると、プロットの詳細設定のダイアログボックスが表示されます。



Worksheet ボタンをクリックすると、選択したデータのワークシートが表示されますので、メニューから **File>Export ASCII** をクリックします。

保存先や保存名、保存フォーマットを指定するダイアログボックスが表示されるので、Excel で使用可能なフォーマットで保存します。



Save を押すと、保存オプションを選択するとダイアログボックスが立ち上がりますので、必要であればオプションにチェックを入れて **OK** を押します。



Include Column Names . . . カラム名を保存する。

Include Column Labels . . . カラムのラベルを保存する。

Expert Selection . . . ワークシートの一部の範囲のみを保存する。

2.4 Final Figure の作成

Menu より ITC > Final Figure を選択すると、自動的に下記のような上段に生データ、下段に DH データとなるグラフが作成されません。この時、生データは自動的にベースラインが差し引きされフラットになります。

