

文件编号：Q/WU FLHA19050021R

版本号：V1.0

受控状态：

分发号：

物质科学公共实验平台

质量管理文件

等温滴定微量热仪（MicroCal PEAQ-ITC） 标准操作规程

2020 年 月 日发布

年 月 日实施

物质科学公共实验平台 发布

目录

| | |
|-------------------------|----|
| 1. 目的..... | 1 |
| 2. 范围..... | 1 |
| 3. 职责..... | 1 |
| 4. 性能测试实验室安全管理规范..... | 1 |
| 5. 性能测试实验室仪器设备管理规范..... | 1 |
| 5.1. 等温滴定微量热仪使用制度..... | 1 |
| 5.2. 预约制度及培训考核制度..... | 2 |
| 6. 实验内容..... | 2 |
| 6.1. 基本原理和系统组成..... | 2 |
| 6.2. 样品要求..... | 3 |
| 6.3. 实验测试..... | 3 |
| 6.3.1 实验流程..... | 3 |
| 6.3.2 数据处理及上传..... | 9 |
| 7. 相关/支撑性文件..... | 11 |
| 8. 记录..... | 11 |

1. 目的

建立等温滴定微量热仪标准操作规程, 使其被正确、规范地使用。

2. 范围

本规程适用于所有使用等温滴定微量热仪(MicroCal PEAQ-ITC)的用户。

3. 职责

3.1. 用户: 严格按本规程操作, 发现异常情况及时汇报实验室技术员。

3.2. 实验室技术员: 确保操作人员经过相关培训, 并按本规程进行操作。

4. 性能测试实验室安全管理规范

4.1. 严格遵守性能测试实验室的各项安全注意警示标识。

4.2. 实验室通道及消防紧急通道必须保持畅通, 所有实验人员应了解消防器具与紧急逃生通道位置。

4.3. 严禁戴手套接触门把手。禁止随意丢弃实验废弃物。禁止将锐器、玻璃等丢弃在常规垃圾箱中。

4.4. 实验室应保持整洁, 禁止携带食物饮品等与实验不相关物品进入实验室。严禁在实验室进食与抽烟。严禁动物进入实验室。

4.5. 实验室内存放的药品、试剂、废液应标签、标识完整清晰。

4.6. 实验室内均为大型科研设备, 有专人负责管理, 未经培训人员, 不得擅自上机使用; 经过培训的用户, 需使用预约系统, 使用本人的账号进行登录使用。在仪器使用期间, 使用人承担安全负责责任。

4.7. 非常规实验测试须经设备管理员同意并指导方可进行。个人 U 盘、移动硬盘等易带入病毒的存储设备不得与仪器电脑连接。

4.8. 实验过程中如发现仪器设备及基础设施发生异常状况, 需及时向该实验室技术员反馈。严禁擅自处理、调整仪器主要部件, 凡自行拆卸者一经发现将给予严重处罚。

4.9. 为保持实验室内环境温度及湿度, 保持实验室门窗关闭。实验结束后, 实验人员必须进行清场。最后离开实验室人员需检查水、电、门窗等。

5. 性能测试实验室仪器设备管理规范

5.1. 等温滴定微量热仪使用制度

该仪器遵从学校“科研设施与公共仪器中心”对大型仪器设备实行的管理办法和“集

中投入、统一管理、开放公用、资源共享”的建设原则，面向校内所有教学、科研单位开放使用；根据使用机时适当收取费用；并在保障校内使用的同时，面向社会开放。

等温滴定微量热仪样品测试方案分为四类：

- (1) 培训测试：用户提出培训申请，技术员安排培训。培训内容包括：等温滴定微量热仪各部分功能介绍；样品要求、仪器的标准操作流程、数据处理及测试注意事项等。
- (2) 自主测试：用户在培训考核合格后在预约时间段内，独立完成样品的制备、测试、数据分析及数据上传等；校内用户以自主上机为主；
- (3) 送样测试：用户提供样品的准确信息及测试要求；技术员负责装样、操作仪器进行测试并做基本的数据处理；
- (4) 维护/开发测试：技术员定期维护仪器及其配套附属设备，检测仪器性能；基于用户的特殊测试需求，开发新方法/技术；

该仪器的使用实行预约制度，请用户在西湖大学“大型仪器共享管理系统”（以下简称大仪共享）进行预约，并按照要求登记预约信息。

5.2. 预约制度及培训考核制度

为充分利用仪器效能、服务全校科研工作，性能测试实验室制定了等温滴定微量热仪 7*24 小时预约制度。校内教师、学生均可提出培训申请，由技术员安排时间进行培训，技术员考核培训者达到相应级别的独立操作水平后，给予培训者授权在相应级别所允许的可操作实验范围内独立使用仪器。如果在各级别因为人为操作错误导致仪器故障者，除按要求承担维修费用之外，给予降级重考惩罚、培训费翻倍。实验开始时务必在实验记录本上登记，结束时如实记录仪器状态。

6. 实验内容

6.1. 基本原理和系统组成

等温滴定微量热仪可连续、准确地监测和记录溶液滴定的一个变化过程中热力学和动力学信息以得到分子间相互作用的完整热力学参数，包括亲和力常数（KD），反应的化学计量数（n），熵（ ΔS ）和焓（ ΔH ）等。

MicroCal PEAQ-ITC 基本仪器参数：

1. 温度范围：2℃~80℃；
2. 样品体积：280 μ L；
3. 滴定针内样品体积：40 μ L；

4. 基线噪音: 0.15ncal/s ;
5. 响应时间: 8s ;
6. 反馈模式: Yes (passive, high gain, low gain);

等温滴定微量热仪由仪器主机和电脑控制系统两部分组成。



图 6-1

6.2. 样品要求

溶液样品; 样品池内溶液: 低浓度, 体积 $\geq 280 \mu\text{L}$; 滴定针内溶液: 高浓度, 体积 $\geq 40 \mu\text{L}$ 。

6.3. 实验测试

6.3.1 实验流程

(1) 开启仪器主机背后两个开关, 仪器前方指示灯亮为绿色; 输入大型仪器共享管理系统预约账号密码后登录电脑, 双击桌面上的 MicroCal PEAQ-ITC Control Software 图

标  , 打开控制软件。



图 6-2

(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, 如显示 , 则表示仪器正常; 如提示 , 可能是 Cell 需要清洗或需要更换耗材等。

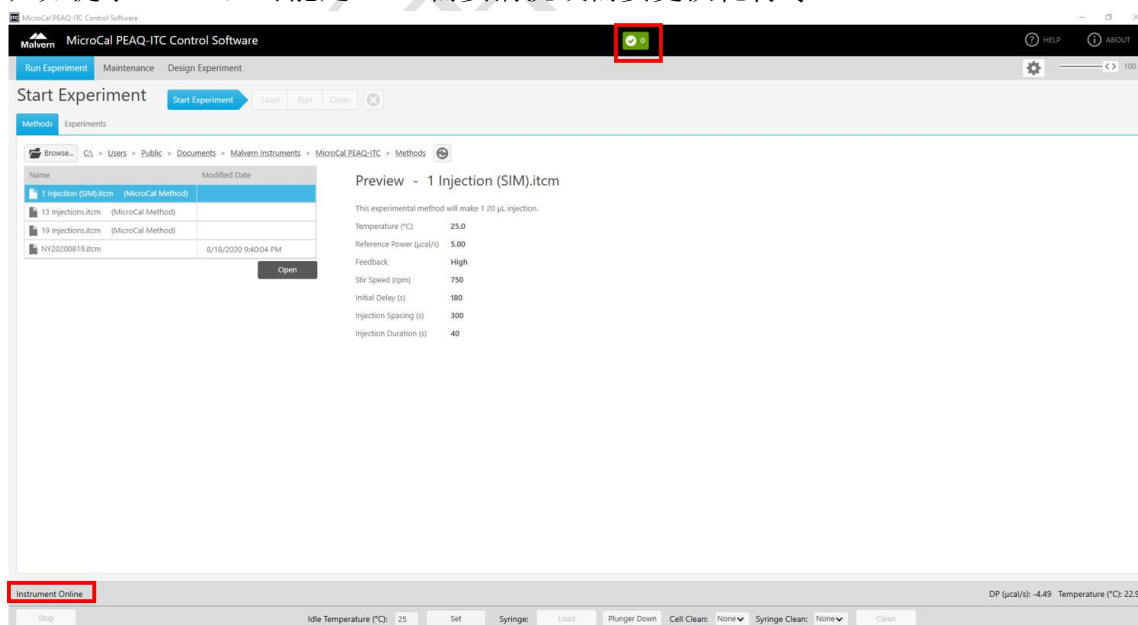


图 6-3

(3) 点击左上角的“Start Experiment”, “Methods”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。

目前已有方法为 1 Injection、13 Injections 和 19 Injections, 其中 19 Injections 方法较为常用。

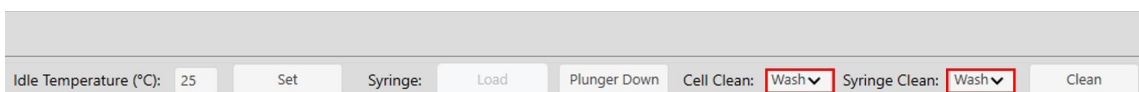
(4) 双击进入所选择的方法后, 会有“Load”“Run”“Clean”显示, 默认是跳到“Run”的界面, 建议先点击“Clean”对仪器进行清洗。如确认已进行过“Clean”, 可跳过此步。

(5) Clean 清洗前务必检查甲醇瓶、Decon 90 瓶(约 10%浓度)、纯水瓶内有足够的液体, 废液瓶有足够的可用容积。

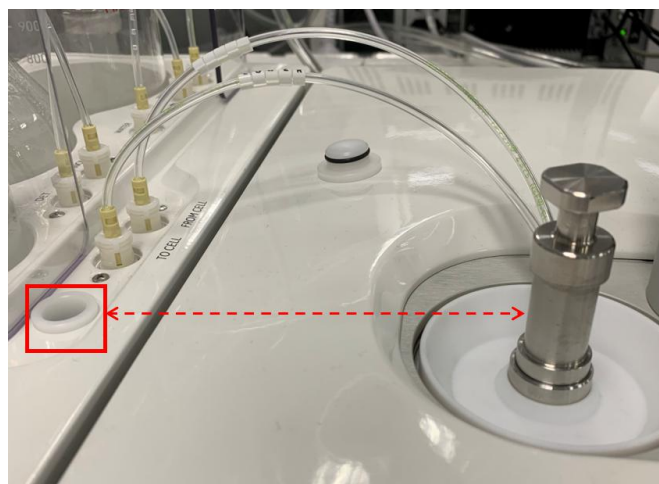


图 6-4

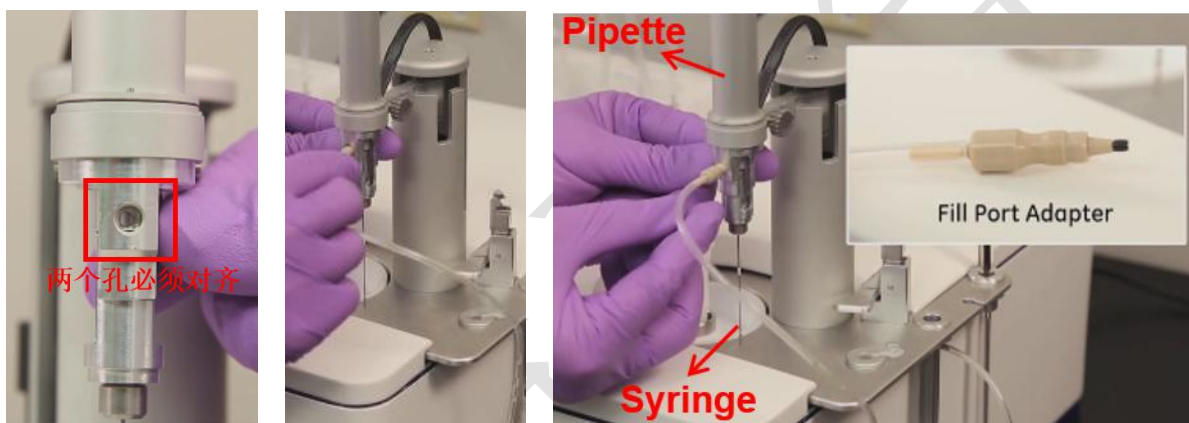
(6) **Clean**——清洁是指对于 Sample Cell 和 Syringe 的清洁。软件中有该操作的视频指导, Step 0 是整个清洗的介绍, 可以根据视频提示进行清洗操作。Step 1~Step 6 为 Step 0 的分步操作; Step 1 是选择清洗方法, 建议 Cell 和 Syringe 都选择“Wash”(如果样品溶液不容易清洗, Cell 的清洗可选择“Soak”); Step 2 是将 Cell 的清洗工具插到 Sample Cell 里, 需要用力按压一下才能插紧; Step 3 是将 Pipette 移到 REST 位置, 把 FPA 接头对准 Pipette 上的孔插入, 切记要严格对准, 否则 FPA 接头容易损坏; Step 4 是将 Pipette 移动到 CLEAN 位置, 卡紧卡扣。Wash 清洗大概 12min 后结束; 如果 Cell 池为 Soak 清洗, 大概需要 1.25 小时(为避免甲醇残留, 请将滴定针在空气中干燥 1~2min); Step 5 清洗完毕后, 分离 FPA 接头; Step 6 是将 Cell 的清洗工具放回原处。



Step 1



Step 2



Step 3



Step 4



Step 5、Step 6

图 6-5

(7) **Load** ——加样，即分别向 Cell 和 Syringe 加入样品。软件中有该操作的视频指导，Step 0 是整个加样过程的介绍；Step 1 是 Cell load, 使用上样针缓慢吸取样品溶液 300uL

以上, 若有气泡需要轻弹赶走气泡, 插入 Cell 中, 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), 加样时可以加至溢出样品池, 随后用上样针将溢出的样品吸走, 参比池采用同样的方法加入相同溶剂, 通常每周更换一次即可; 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 (同前述 (6) Step 3 操作); Step 3 是将 75uL 左右 (至少 40uL) 高浓度样品溶液加到小样品管里, 放在“LOAD”位置 (注: 小样品管务必放平, 否则会造成 Syringe 损坏), 并将 Pipette 移动到“LOAD”位置, 点击 Load 后 Syringe 开始自动加样; Step 4 是加样完成后, 分离 FPA 接头; Step 5 是将加好样品的 Pipette 放到 Cell 位置, 准备开始滴定测试。

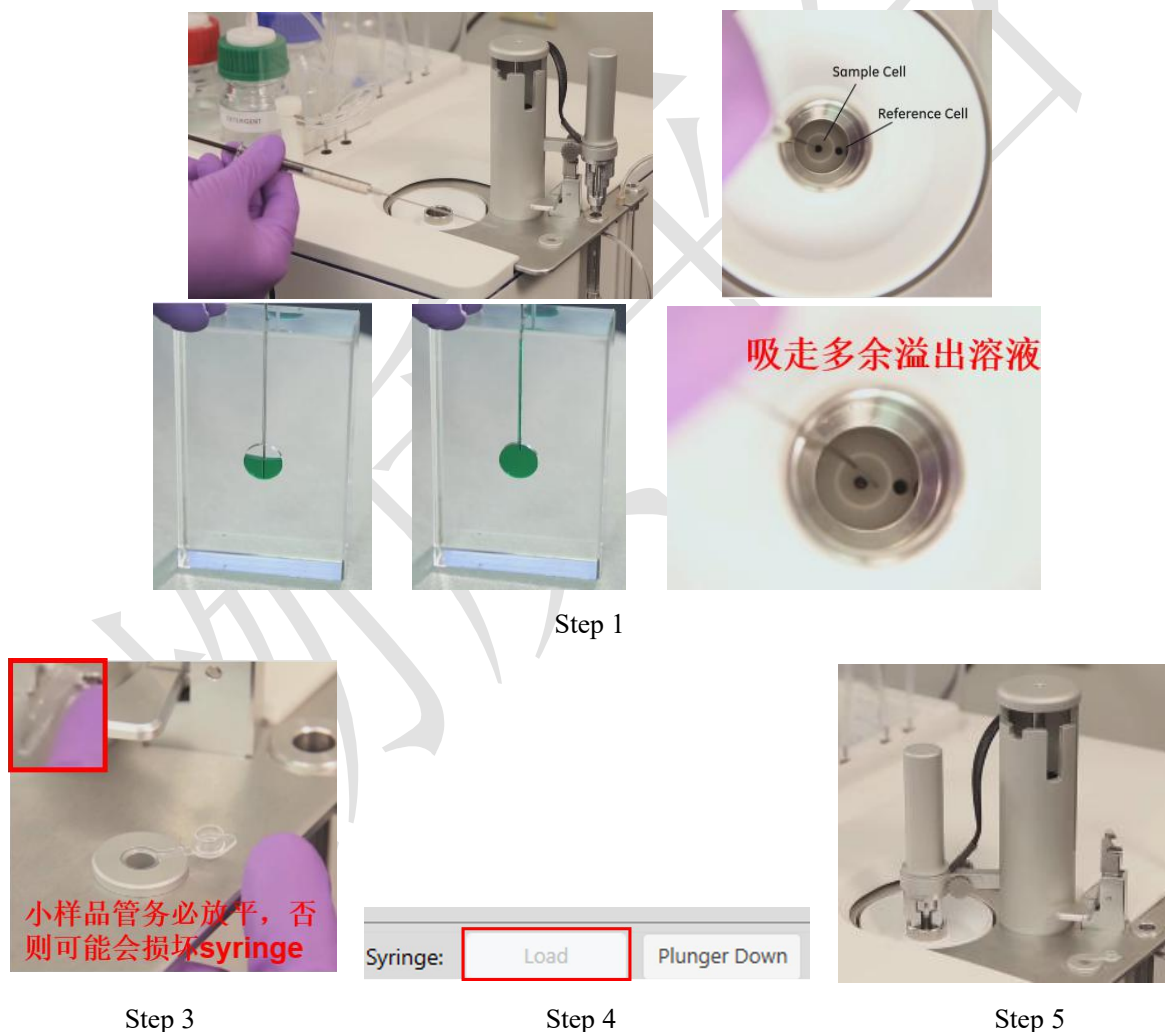


图 6-6

(8) **Run** ——运行。首先输入 Syringe 及 Cell 里各自的样品浓度。“Instrument Settings”中可修改 Temperature 等参数, Temperature 为实验温度; Reference Power(uJ/s)可设置范围为 1~27.9, 如反应为吸热, 一般该值可设为 1~2, 如反应为放热, 一般该值可设

为 10 或更大, 如不知晓, 可设为 5 左右; Feedback 通常设为“High”; Stir Speed(rpm)通常设为“750”; Initial Delay(s) 通常设为“60”; Injection Settings 里”# of Injections”通常设为“19 滴”, 每滴通常“2ul”, Duration 通常为“4s”, Spacing 通常为“120~180s”。修改完之后点击“start”, 弹出提示框里选择存储文件夹 (Local Disk C:/ITC DATA) 并输入文件名 (命名原则为导师姓名首字母—使用人姓名首字母—日期—样品编号), 随后点击“save”, 样品进入准备测试阶段 (Pipette 开始以设定速度旋转)。

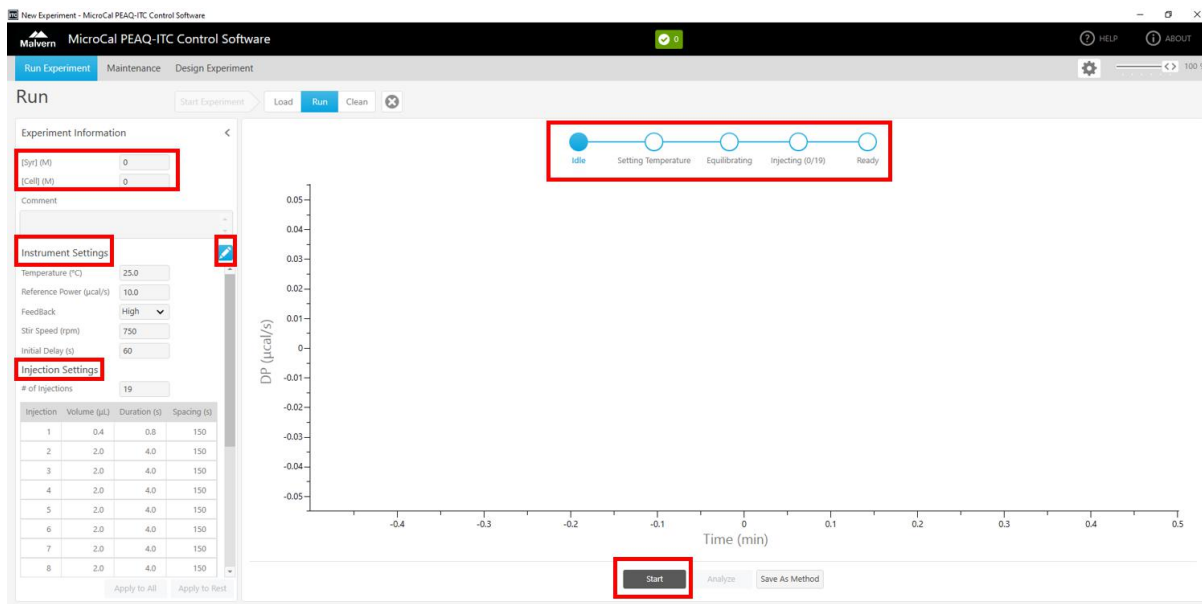


图 6-7

注: 样品测试阶段, 不可在仪器周围 1m 范围内接电话, 否则会影响扰动实验结果曲线。

(9) 实验进度栏会有 Idle—Setting Temperature—Equilibrating—Injecting—Ready 显示。在 Equilibrating 阶段, 平衡基线的位置须在设置的 Reference Power 值 ± 1 范围内, 否则表明 Cell 池中样品溶液没有加好, 其中可能存在气泡等, 建议 Stop 实验重新良好加样后再测试。进入最后的 Ready 阶段表明样品已经测试完。

(10) 实验完成后先手动用上样针吸出 Cell 池中样品, 然后重复步骤 (6) 的“Clean”操作。如两溶液反应生成沉淀等需要进行“Soak”清洗, 保证样品池洗净。

(11) 清洗完成后将 Cell 清洗工具放回原处, 盖上白色盖子。Pipette 卡扣弹起。

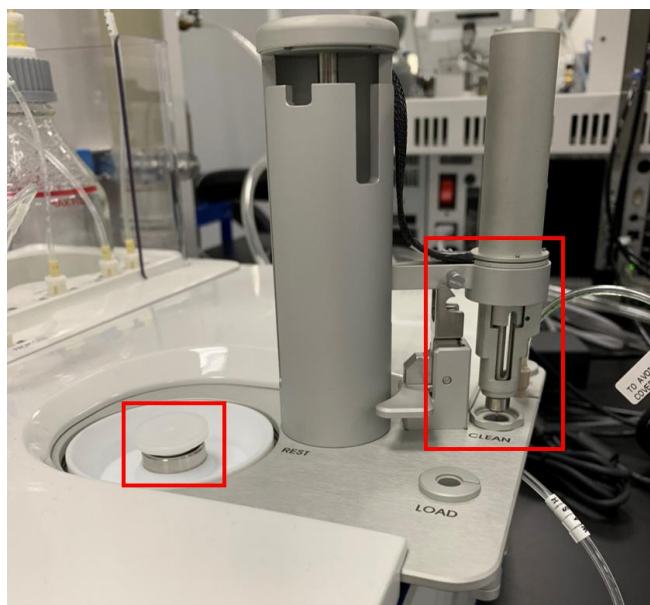


图 6-8

6.3.2 数据处理及上传



- (1) 双击桌面上的 MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software 图标，打开分析软件。
- (2) Browse找到相关文件夹，双击打开待分析数据。选择该测试为Binding（溶液分子相互作用）或Control（相当于背底，检验溶剂对于测试是否有影响时需要）。

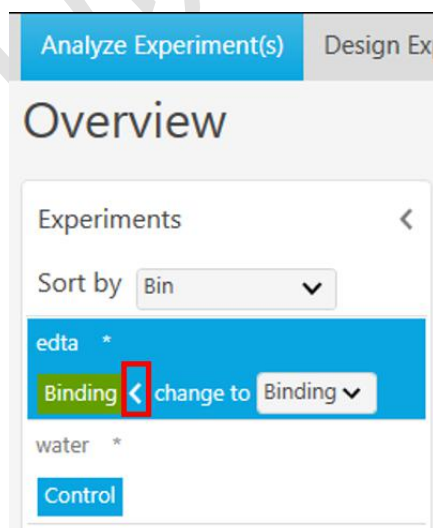


图 6-9

- (3) 对于Binding测试在Overview Fitting Model中选择结合模型，One Set of Sites指位点结合无选择性。在右侧Experiment Information中显示实验信息及Results，可看到N、KD、

ΔH 和 ΔG 等信息。

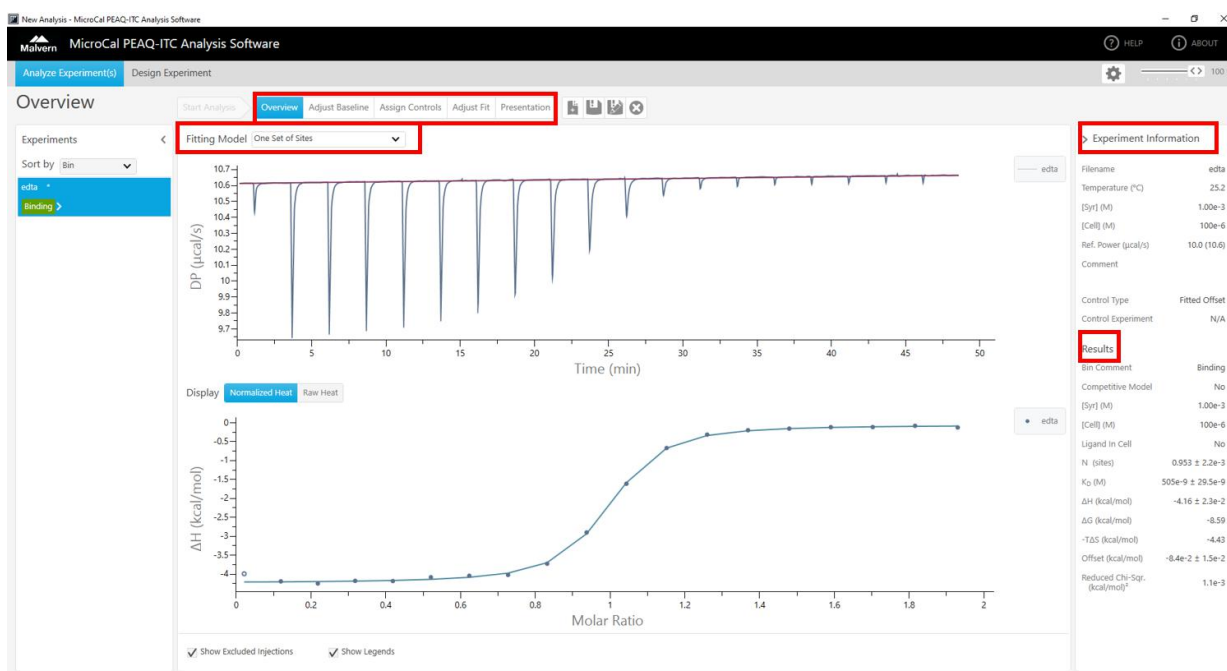


图 6-10

(4) 其他还包括 Adjust Baseline、Assign Controls、Adjust Fit 和 Presentation，其中 Presentation 中包括多项实验信息，Signature Plot 信息也较多被关注。

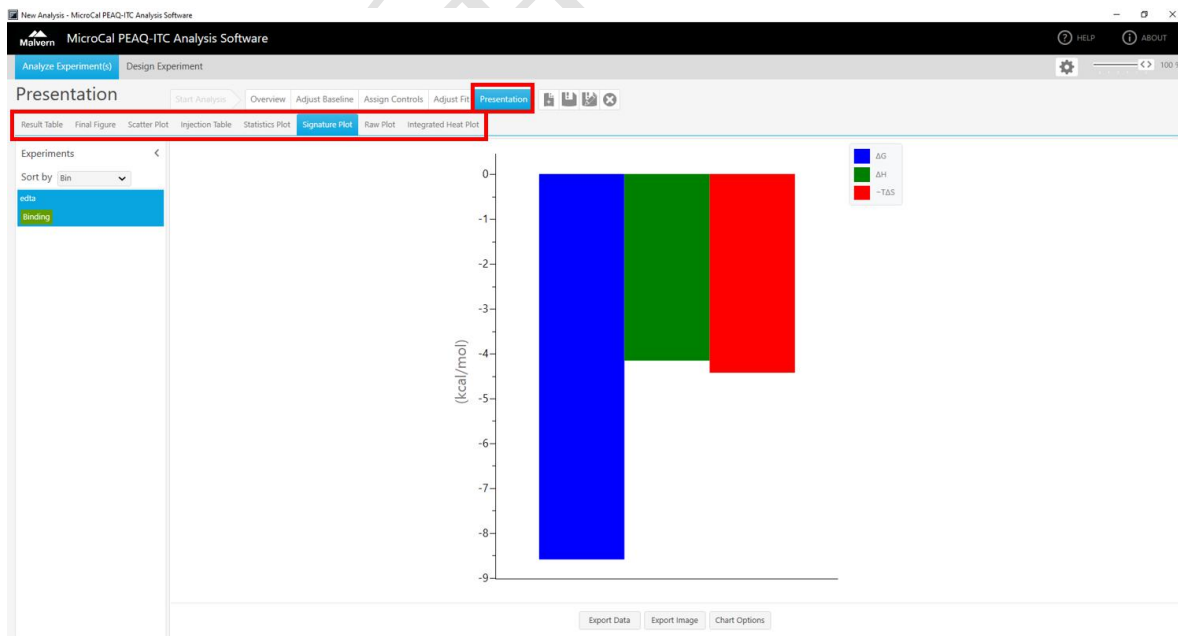


图 6-11

数据分析完成上传数据后，关闭 MicroCal PEAQ-ITC Control Software 和 MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software 软件；关闭仪器两开关；退出电脑登录；实验记录本登记。

7. 相关/支撑性文件

7.1. Q/WU FLHR001 文件编写规范

8. 记录

FLHS028 等温滴定微量热仪使用记录表 V1.0

物质科学公共实验平台

仪器设备使用记录

| 日期 年/月/日 | 使用人 | 课题组 导师 | 样品名称 或代号 | 检测方式(√) | | 实验内容 | 实验起止 时间 | 样品数 | 文件名 导师名首字母-使用人名 首字母-日期-样品编号 | 仪器状态 | | 备注 |
|-------------|-----|-----------|-------------|---------|----|--------------------------|------------|-----|-----------------------------------|--------|-------------|----|
| | | | | 送样 | 自主 | | | | | 正 常 | 报错及问 题描述 | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| 2020.5.6 | 张三 | 王五 | 蛋白、配体 | | √ | 溶剂信息、Cell 和 Syringe 清洗完成 | 9:30-11:00 | 1 | WW-ZS-20200506-001 | √ | | |

**请注意：使用前先检查仪器状况，一切正常方可操作；一旦开始实验，默认为使用前仪器状况正常；使用过程中出现问题须立即联系技术员。