

## 1. ITC 样品准备说明:

**样品** (假定考察对象为大分子与小分子相互作用) :

- (1) 大分子样品每次滴定需 **300 微升(实际上样量 : 200 微升)** ;
- (2) 小分子每次滴定需 **80 微升 (实际上样量 : 70 微升)** ;
- (3) 样品浓度需根据实验数据进行摸索, 一般第一次可以取大分子 **0.1mM**, 小分子浓度大约为大分子浓度 **10 倍**左右。

**缓冲液 :**

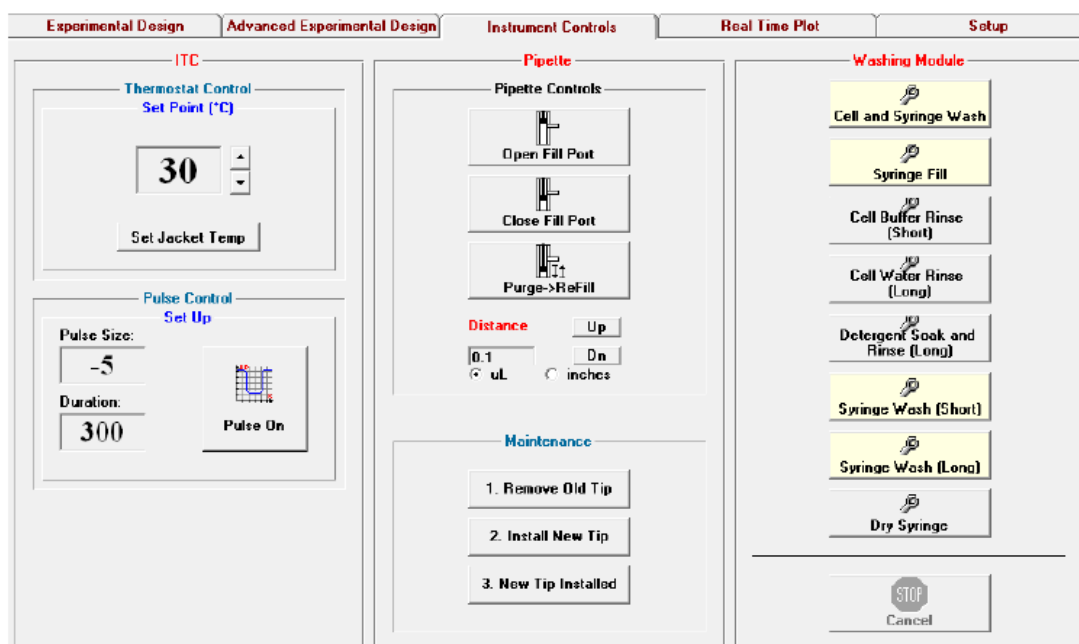
- (1) 主要用于清洗反应池、大分子进样针, 或者用于摸索实验条件时配制不同浓度的样品 ;
- (2) 如做全天 (大概可做 5 次滴定实验) 需至少 **400 毫升**缓冲液 ;

**注意事项 :**

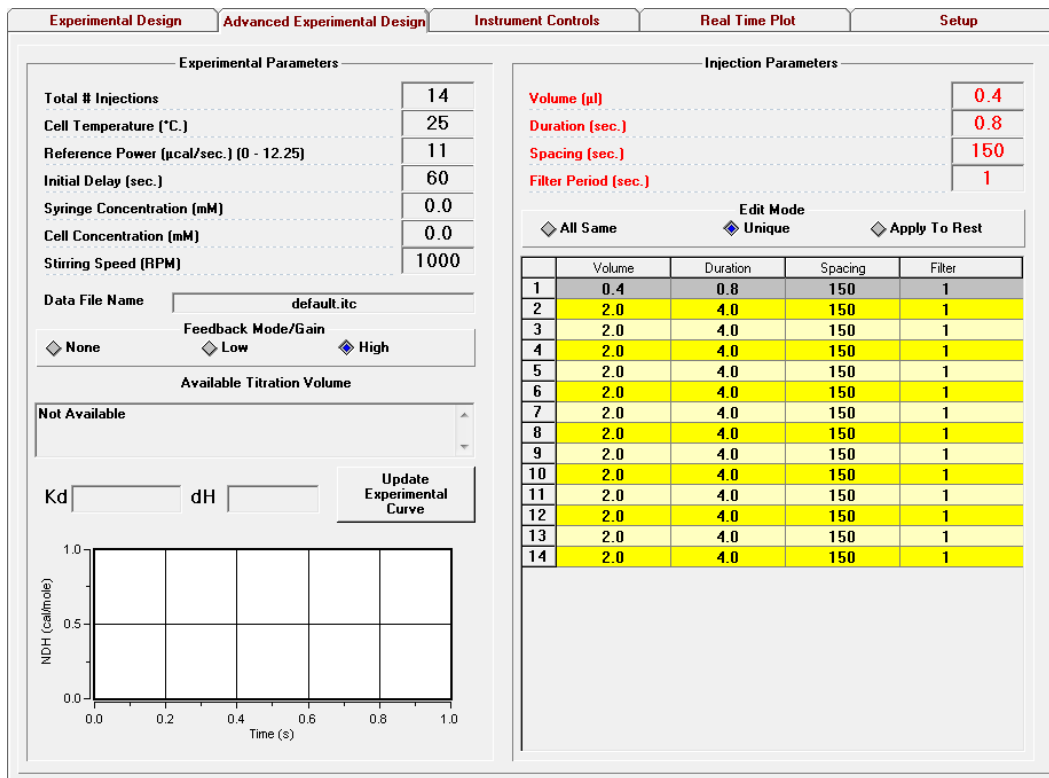
- (1) 保证大分子和小分子所用的缓冲液的成分、浓度一致 ;
- (2) 特别强调 : 如果稀释溶剂中含有机溶剂成分, 那么必须**严格保证**大分子和小分子的有机溶剂浓度一致, 否则滴定过程中有机溶剂稀释放热带来的误差会很大, 实验数据可能无效 ;
- (3) 大颗粒 (如包埋物、细胞等) 和易沉淀、易析出结晶样品 (如碳纳米颗粒、含金属离子体系等) 不能用于本仪器 ;

## 2. 实验流程:

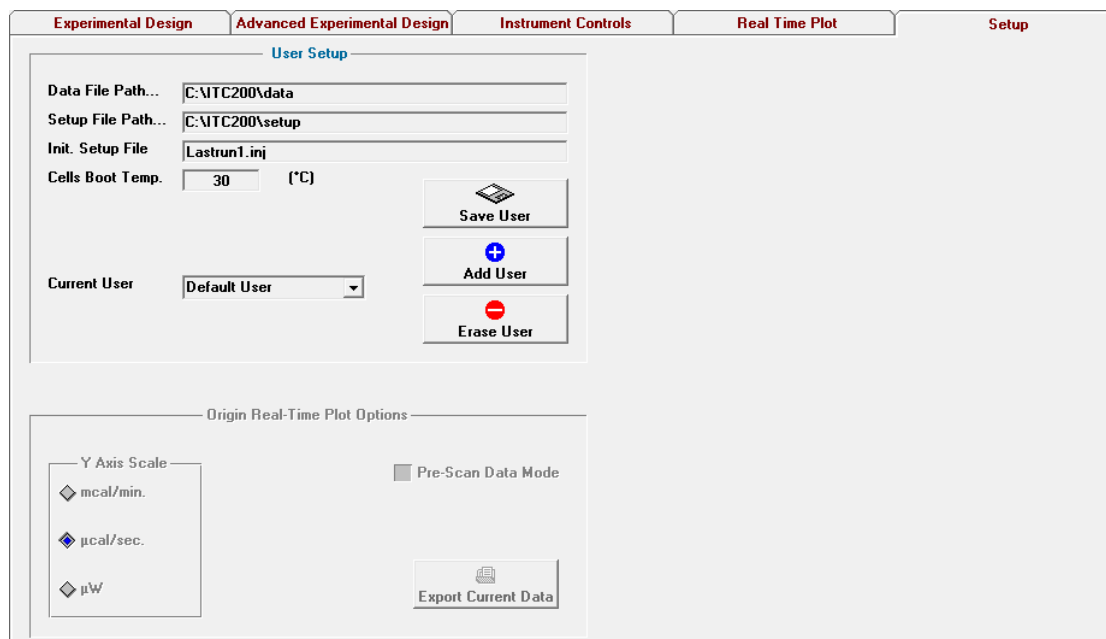
- (1) 实验开始之前, 清洗样品池和滴定针, 运行Cell Water Rinse 和Cell Buffer Rinse各两次, 用蒸馏水和缓冲液冲洗样品池。运行Syringes Wash, 用蒸馏水和甲醇冲洗滴定注射器。



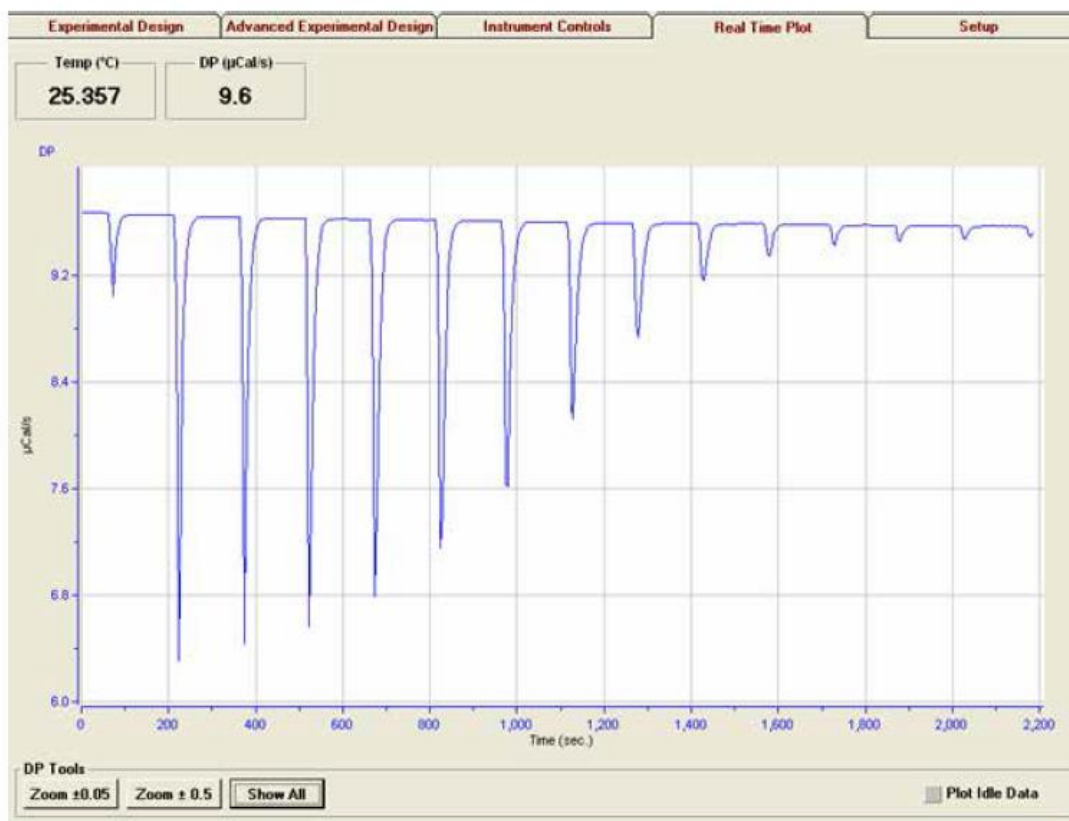
- (2) 滴定注射器中加入40uL的配体（参照Syringe Fill执行操作）或小分子蛋白溶液，样品池中加入200uL的大分子蛋白溶液，同时参照池中加入200uL的蒸馏水。对于假定1:1结合反应，通常滴定注射器中配体的摩尔浓度比样品池中大分子蛋白的浓度高10-20倍，以确保滴定反应结束时反应达到饱和或接近饱和。
- (3) 在实验参数（Experimental Parameters）界面，设定总滴定数、样品池反应温度、参比池测量的功率范围、搅拌速度、滴定注射器和样品池中蛋白样品的摩尔浓度以及实验数据文件命名。在滴定参数（injection Parameters）界面，设定每次滴定的体积，时间，两次滴定的间隔时间等。



(4) 在 set up 界面, 设定实验数据和实验方法的存储路径, 以及目前的使用者。

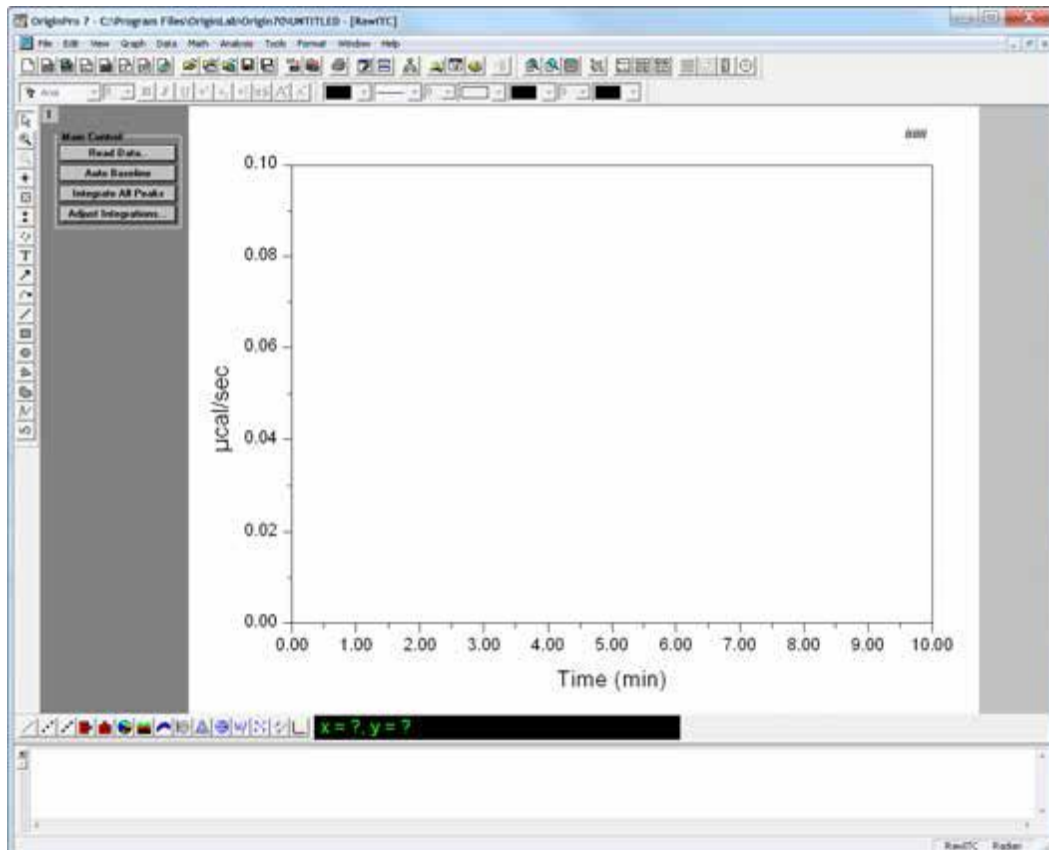


(5) 将滴定注射器放入样品池当中, 实验前注意拨下 Filling Port Adaptor. 点击 Start, 实验开始进行。在 Real Time Plot 界面显示实验实时图像。

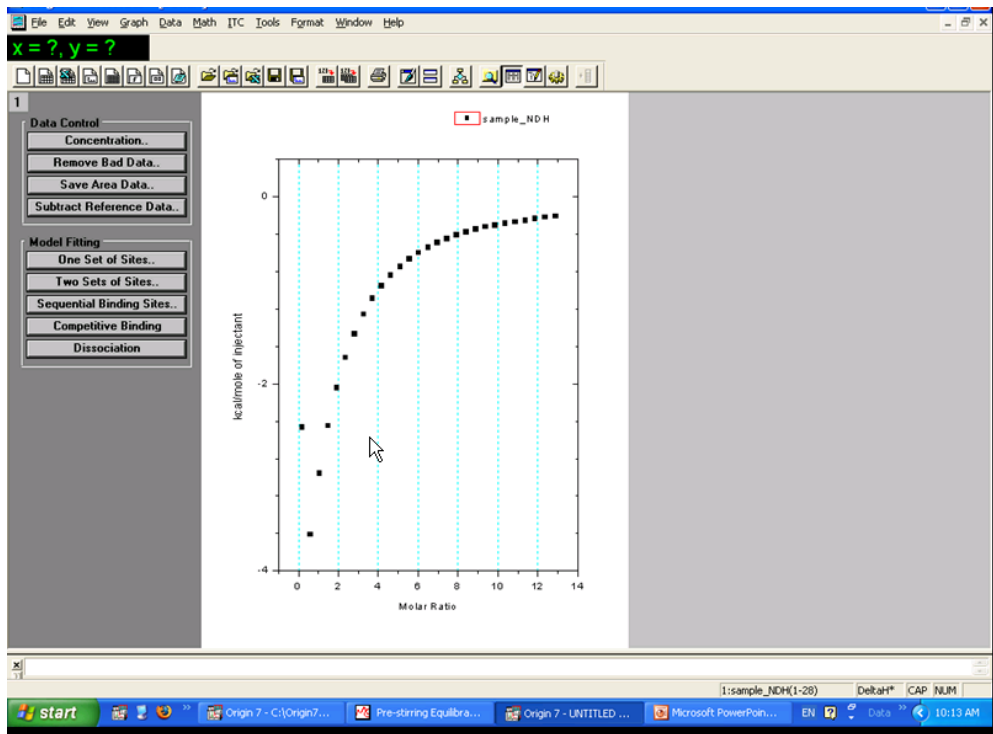


### 3. 数据分析流程:

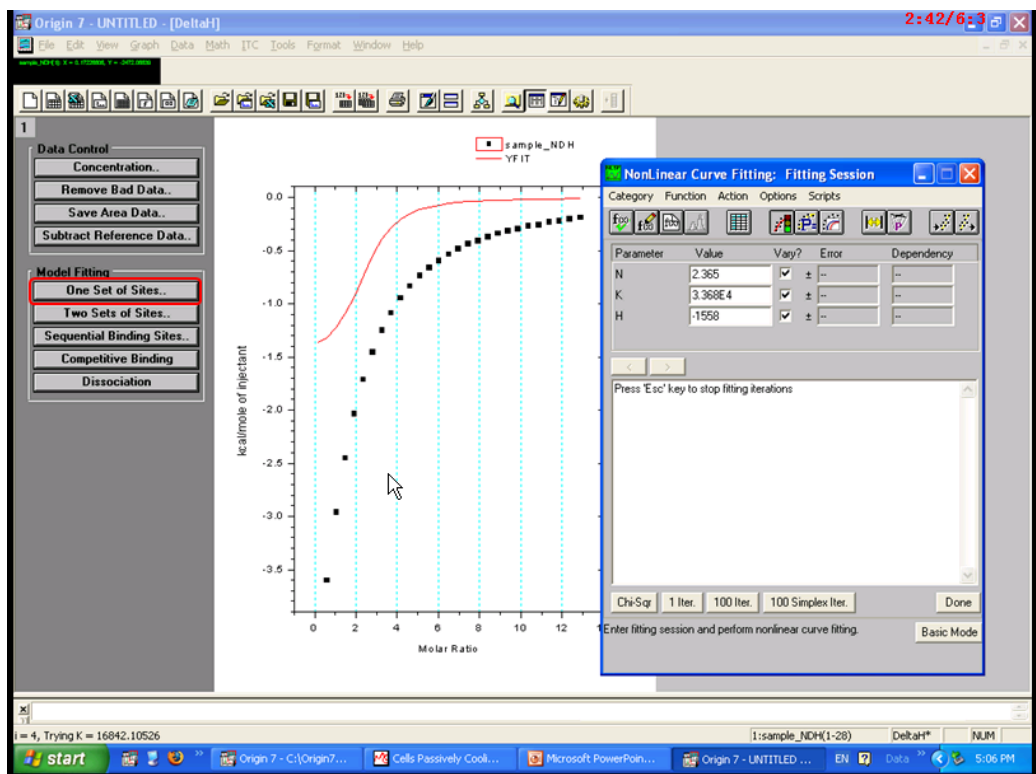
- (1) 双击打开 Microcal LLC ITC 数据分析软件, 点击 Read Data, 打开所要分析的文件。

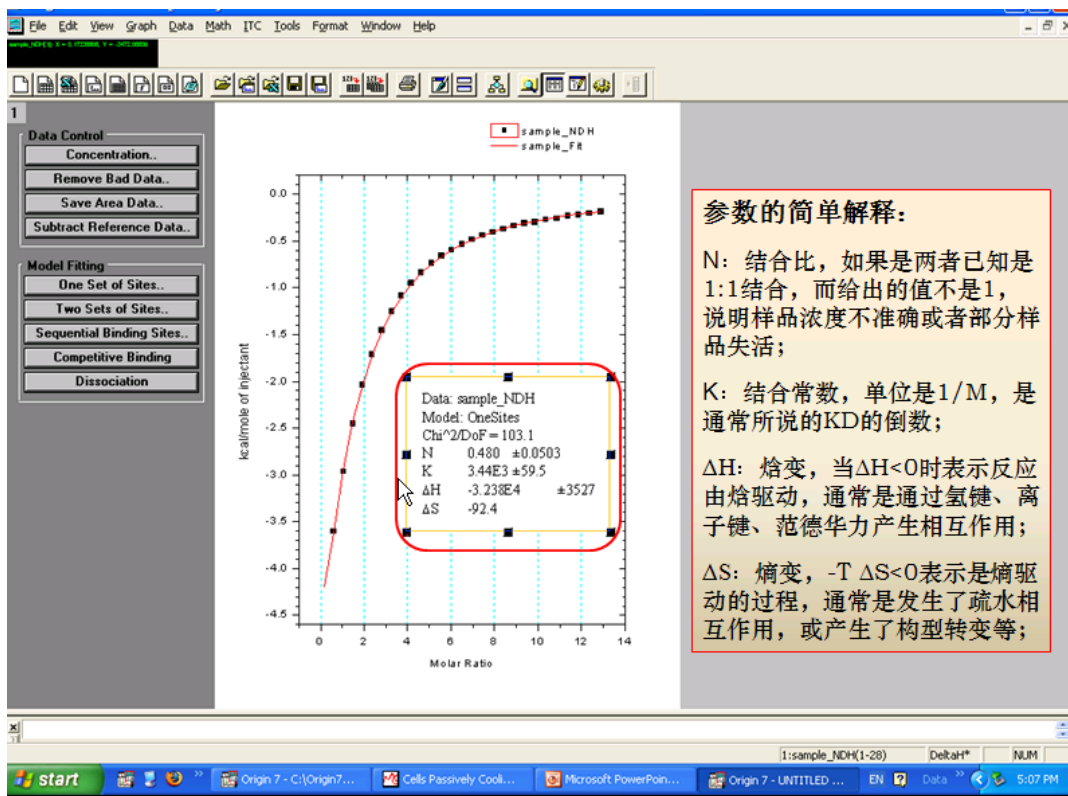
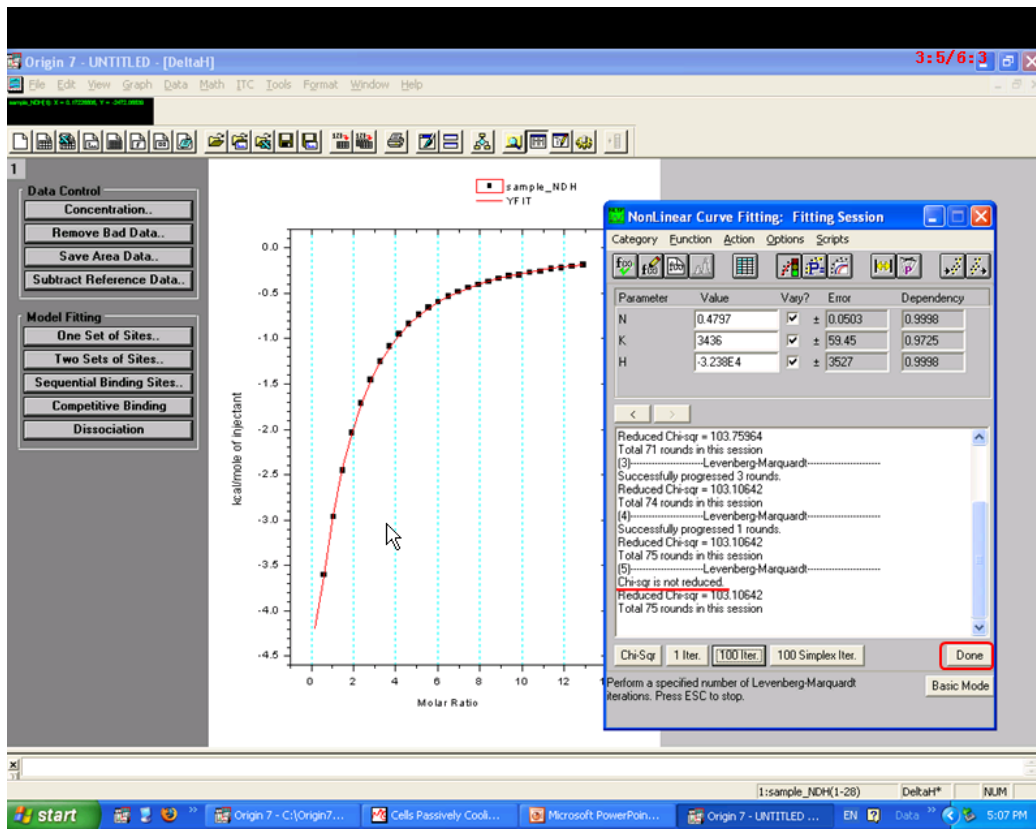


(2) 输入样品池和滴定注射器中样品的摩尔浓度，去除 Bad Data，  
减去对照样品的数据。注意对照组和实验组的样品池和滴定注射器的溶液浓度必须一致。



(3)若选择单点拟合模式 One Set of Sites, 依次点击 Chi-Sqr, 1 lter, 100 lter, 直至显示 Chi-Sqr is not reduced. 然后点击 done. 得出最后实验分析结果。





(4) 结果参数的分析:

N: 结合比, 如果两者已知是 1:1 结合, 而给出值不是 1, 说明样品浓度不准确或者部分样品失活。

K: 结合常数, 单位是 1/M, 是通常所说的 KD 的倒数。

$\Delta H$ : 焓变, 当  $\Delta H < 0$  时, 表示反应由焓驱动, 通常是通过氢键、离子键、范德华力产生相互作用。

$\Delta S$ : 熵变,  $-T \Delta S < 0$  时, 表示是熵驱动的过程, 通常是发生了疏水相互作用, 或产生了构型转变等。

(5) 实验结束后, 清洗样品池和滴定针, 运行 Cell Water Rinse 和 Cell Buffer Rinse 各两次, 用蒸馏水和缓冲液冲洗样品池。运行 Syringes Wash, 用蒸馏水和甲醇冲洗滴定注射器。关闭仪器和电脑电源。