

ITC实验设计与方法



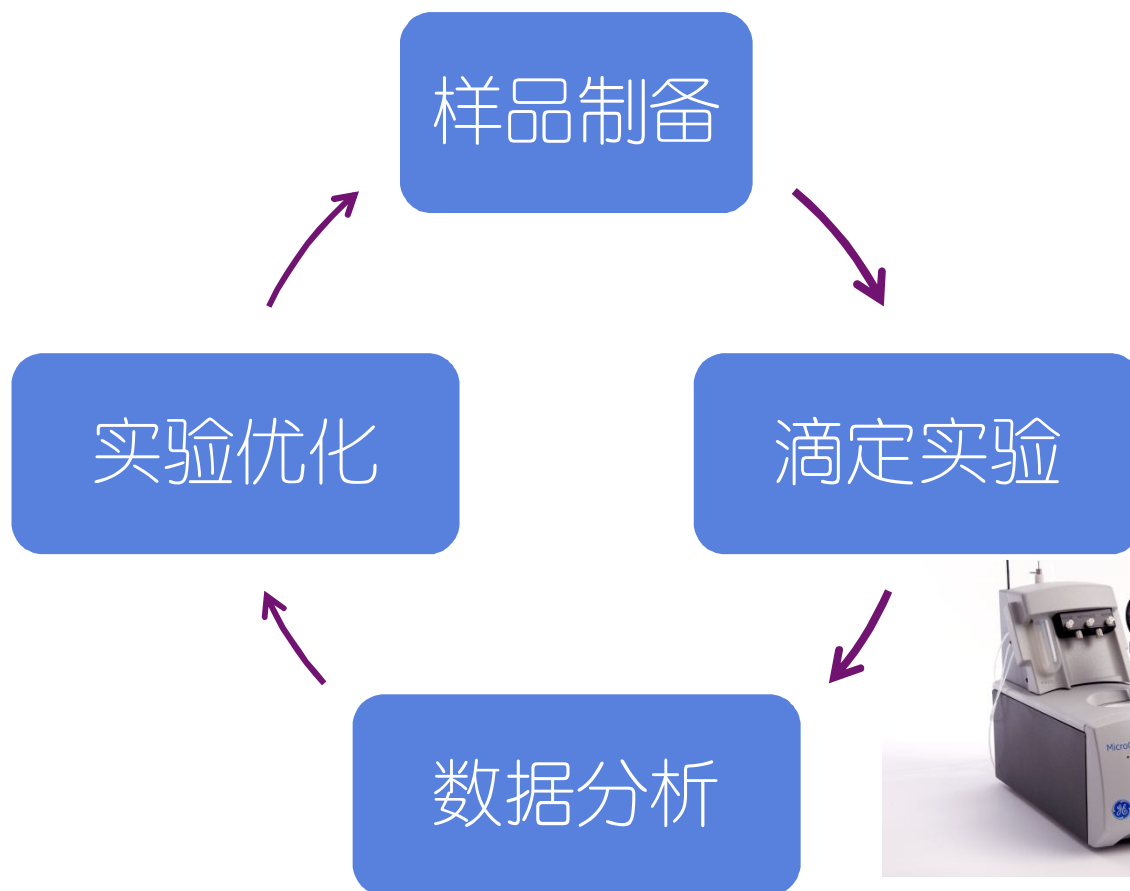
imagination at work

课程内容

1. KD, C-value与反应物浓度的选择
2. 样品制备与缓冲液匹配 (buffer matching)
3. 样品池的清洗
4. 实验环境的要求
5. 实验参数的选择和优化



ITC实验的流程



KD, C-value与反应物浓度的选择



imagination at work

亲和力, K_A 或 K_D

$$K_A = 1/K_D \text{ and } K_D = 1/K_A, \text{ so...}$$

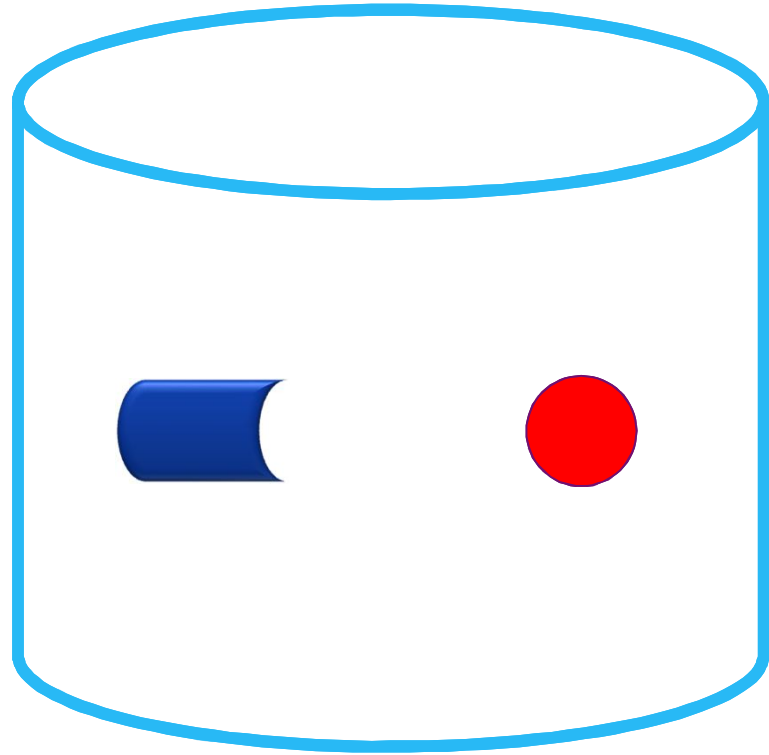


K_A (M ⁻¹)	K_D (M)	What they say...	
100000 (1E5)	0.00001 (1E-5)	10 micromolar	-
1000000 (1E6)	0.000001 (1E-6)	1 micromolar	-
10000000 (1E7)	0.0000001 (1E-7)	0.1 micromolar	100 nanomolar
100000000 (1E8)	0.00000001 (1E-8)	-	10 nanomolar
1000000000 (1E9)	0.000000001 (1E-9)	-	1 nanomolar

亲和力增加, 相应的结合强度和选择性也增加

强结合

nM级的结合：
在非常稀释的情况下
也能发生结合。

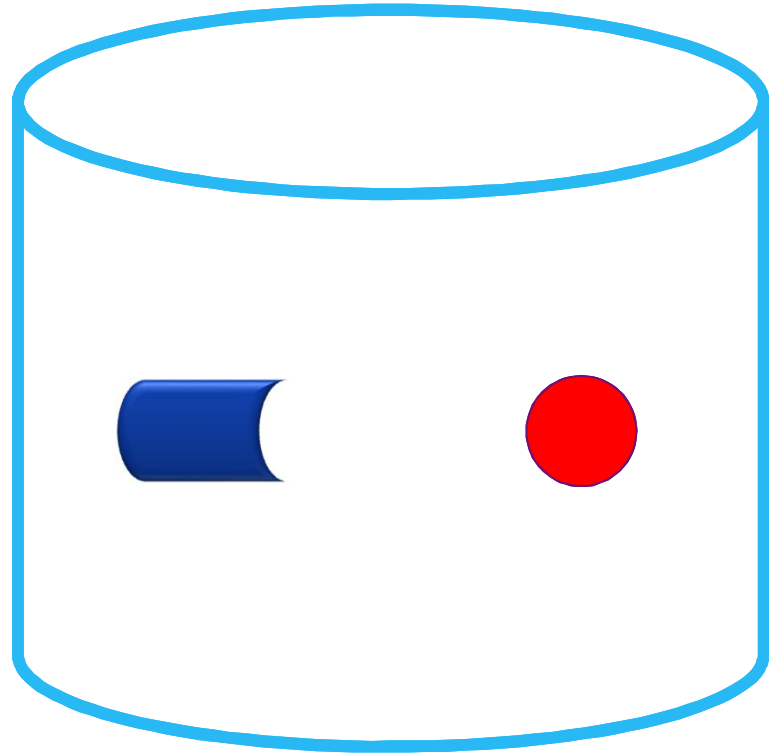


imagination at work

弱结合

mM级的结合:

在非常稀释的情况下
无法发生结合。

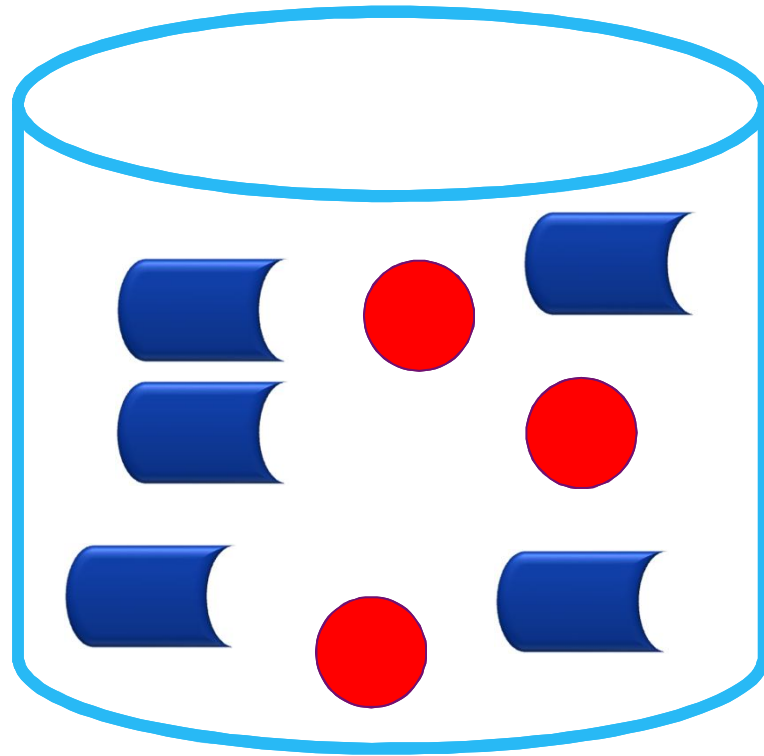


imagination at work

弱结合

mM级的结合:

通过提高反应物浓度
促进结合的发生。



imagination at work

KD意味着：

- 高 K_D = 弱结合，需要更高的配体浓度来饱和结合位点。
- 低 K_D = 强结合，只要较低的配体浓度就能饱和结合位点。

* KD对选择合适的反应物浓度至关重要

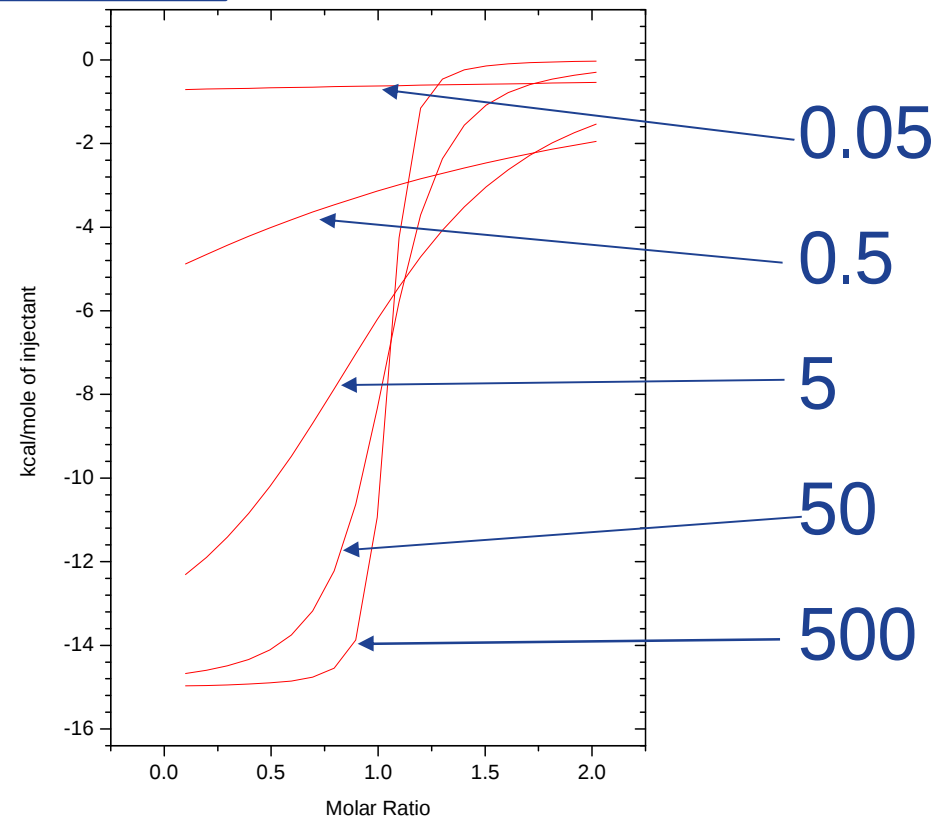
C-value



imagination at work

C-value

$$\text{C-value} = [\text{样品池样品浓度}] \times n/K_D$$



imagination at work

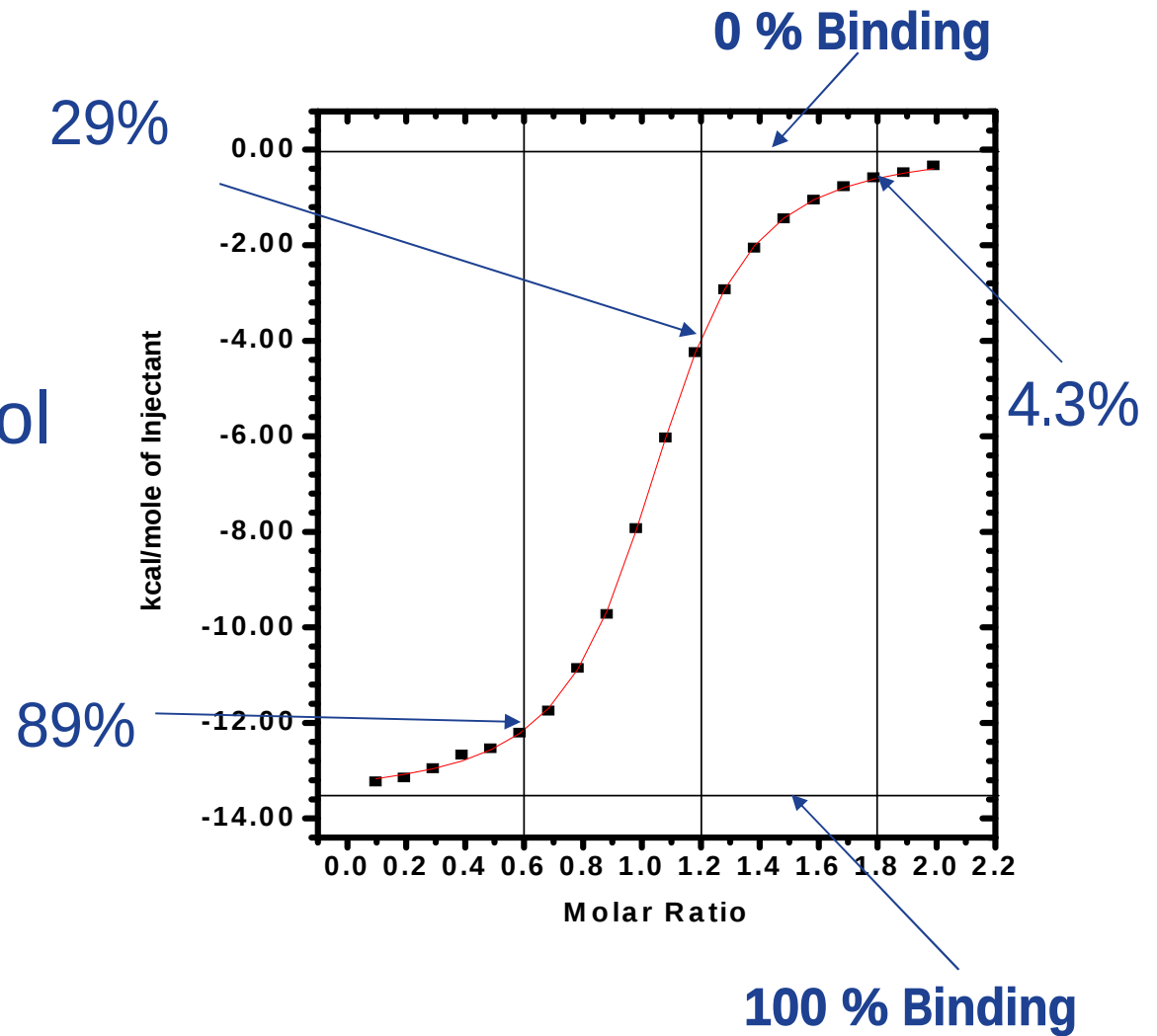
合适的C-value带来理想的S型曲线

$N=1$

$K_D = 18 \mu\text{M}$

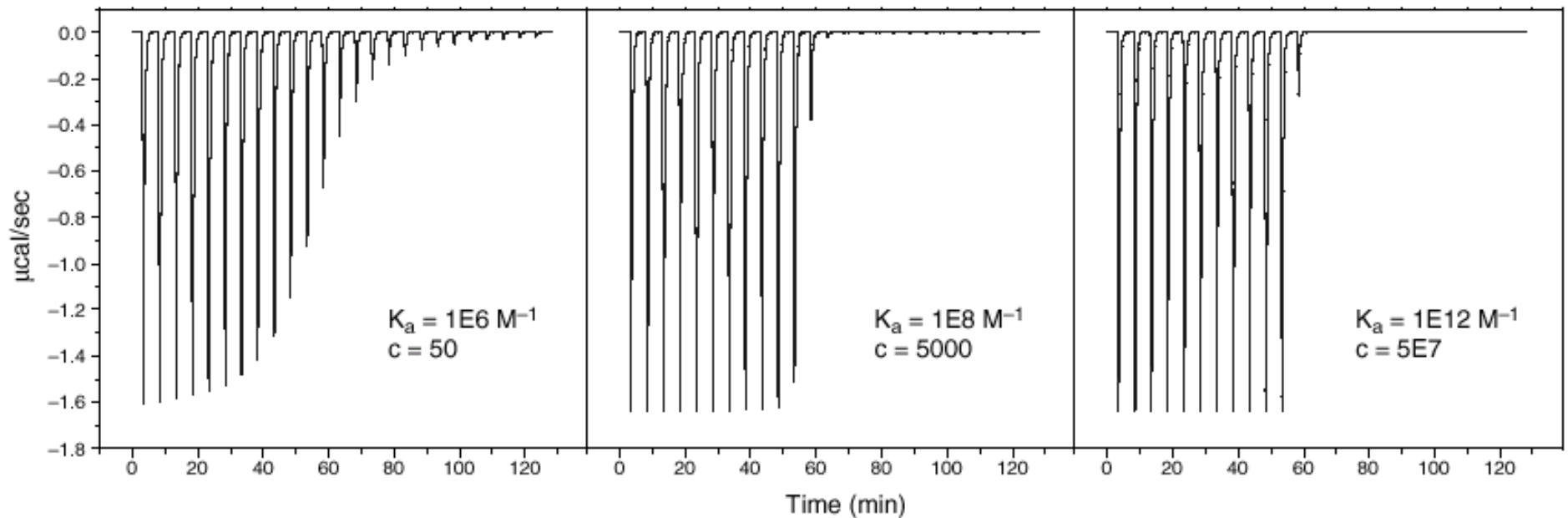
$\Delta H = 13.56 \text{ kcal.mol}^{-1}$

$C \sim 30$



imagination at work

如果C-value太高



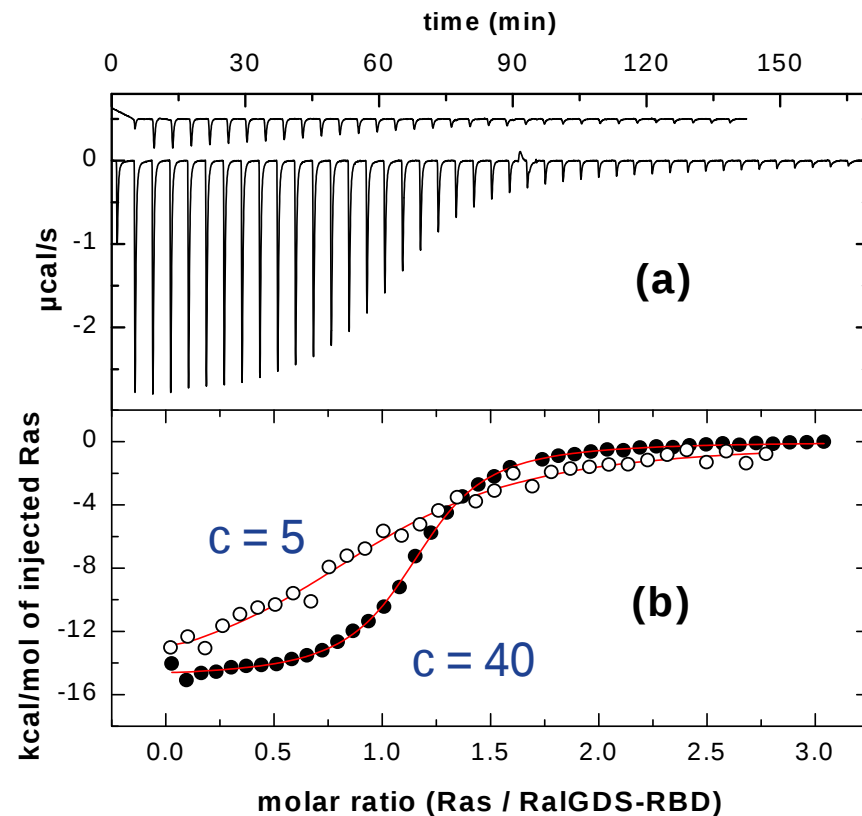
C-value超过1000, 由于没有足够的数据点描述结合的饱和过程, 因此有数据拟合获得的K值不准确



imagination at work

如果C-value太低

- 如果C-Value太低, 焓变 ΔH 和化学计量比 n 将不准确。
- 小分子实验通常不得不采用低C-value。
- 可以通过提高样品池样品浓度来对实验进行改进。



$$K_D = 1.2 \mu\text{M}$$

选择一个合适的C-value

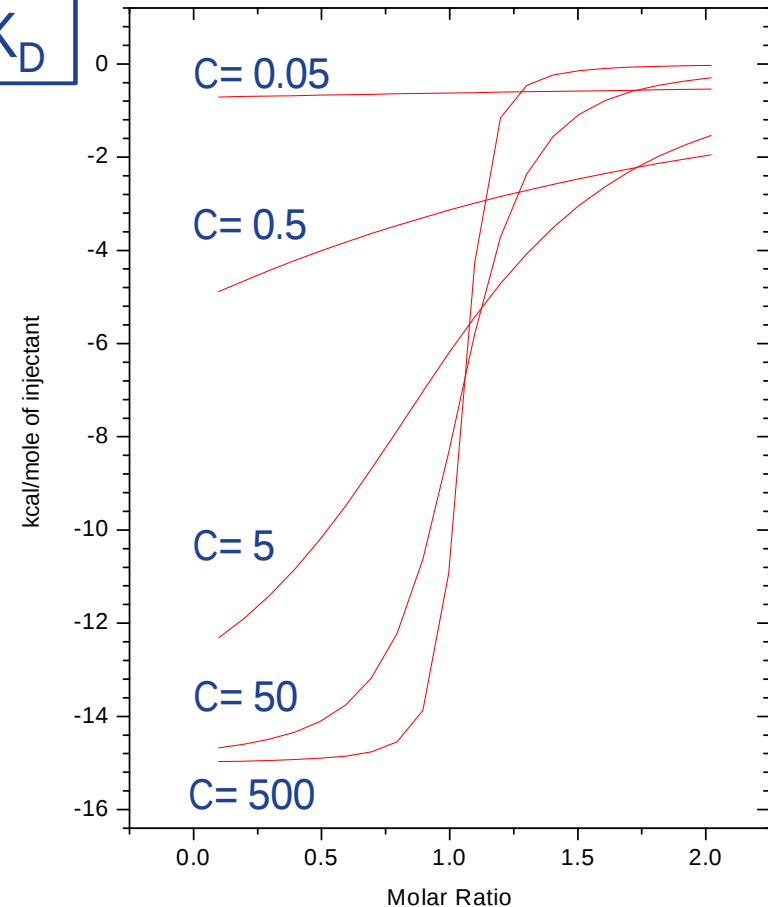
$$C\text{-value} = [\text{样品池样品浓度}] \times n/K_D$$

C = 10-100 very good

C = 5-500 good

C = 1-5 and 500-1000 OK

C < 1 and > 1000 bad

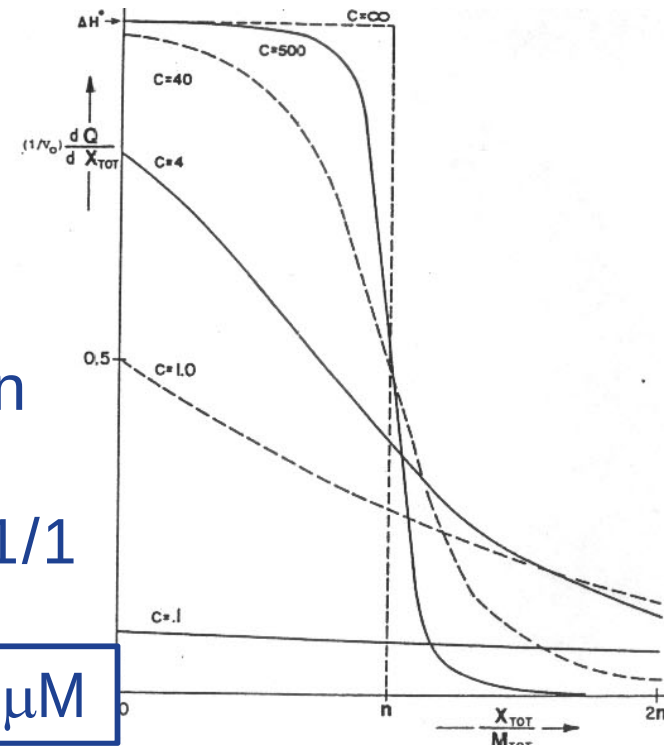


imagination at work

如何使用C-value和KD

- 假设 K_D 为 $1\mu\text{M}$
- $n = 1$
- 选择 C-value 等于 40
- [样品池样品浓度] = $c\text{-value} \times K_D / n$
- [样品池样品浓度] = $40 \times 0.000001 / 1$

$$[\text{样品池样品浓度}] = 4 \times 10^{-5} \text{ M} = 40\mu\text{M}$$



Simulated binding isotherms for various c values.

配体浓度

$$[\text{滴定配体浓度}] = 10^{-20} \times [\text{样品池样品浓度}]$$

建议的浓度选择

K_D μM	[Protein] μM	[Compound] μM	[Protein] / K_D
<0.5	10	100	>20
0.5-2	30	300	15-60
2-10	50	500	5-25
10-100	30	$40 \cdot K_D$	0.3-3
>100	30	$20 \cdot K_D$	<0.3

} Fixed stoichiometry



imagination at work

第一次实验？你不知道KD范围？

选择：

- 样品池浓度=20 μM
- 配体浓度=200 μM

最低的样品池样品浓度

Average heat required per injection $\sim 1 \mu\text{cal}$

Need ~ 10 injections

Average ΔH of binding is $\sim -5 \text{ kcal/mol}$

Therefore minimum sample concentration, $[\text{Prot}]$, required in a $200 \mu\text{l}$ cell is

- Total heat, Q , = $1 \mu\text{cal/injection} * 10 \text{ injections}$
 $= 10 \times 10^{-6} \text{ cal}$
- $Q = (\text{cell volume}) (\Delta H) [\text{Prot}]$
- $[\text{Prot}] = (10 \times 10^{-6} \text{ cal}) * (2.0 \times 10^{-4} \text{ L}) * (5,000 \text{ cal/moles})]$

Min [Cell] $\sim 10 \mu\text{M}$



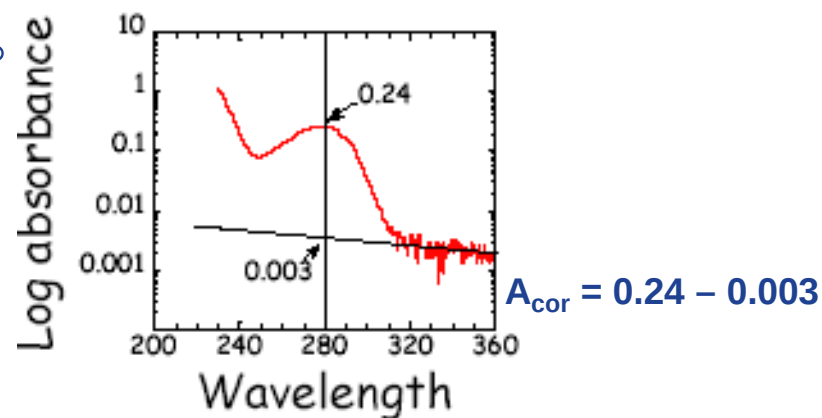
imagination at work

关于浓度的问题与对策

- 曲线很难达到饱和 (C-value太低, 提高浓度)
- 曲线爆炸式地达到饱和 (C-value太高, 降低浓度)
- 放热太小 (提高浓度)

准确地浓度定量-与滴定实验一样重要

- 选择最准确的蛋白或生物分子定量方法
- 如果选择A280方法，需要注意很多化合物在280nm有吸收，比如DTT。
- A280方法必须使用“干净的”石英比色皿
- 注意浑浊物对A280的影响。



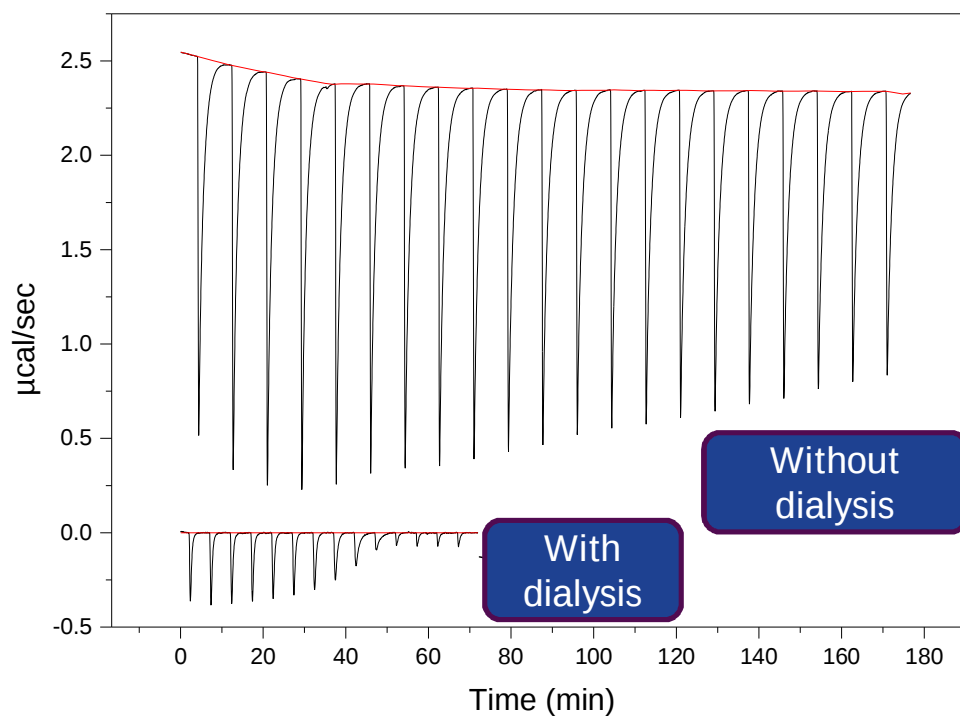
样品制备与缓冲液匹配 (buffer matching)



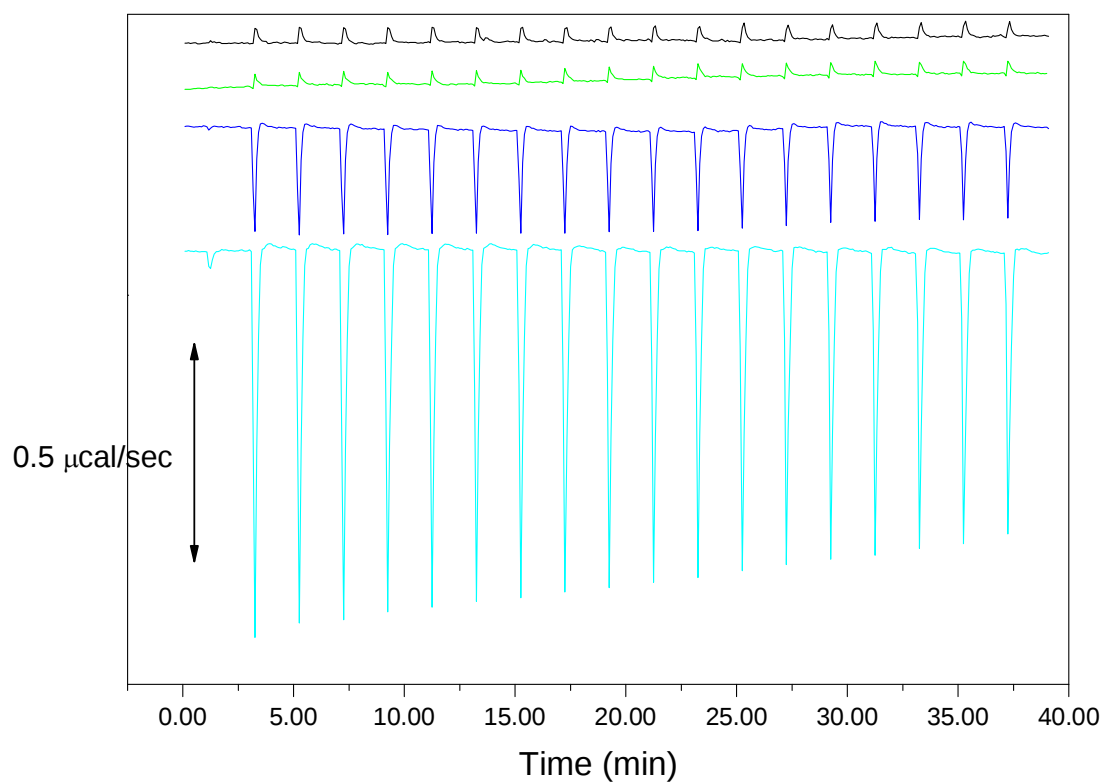
imagination at work

上下样品间的缓冲液必须匹配

- 右图显示样品透析前后的滴定结果。
- 未透析样品巨大的放热峰由上下样品中 NaCl 的浓度差异造成。
- 对于商业化样品同样需要关注缓冲液匹配问题。



DMSO (二甲基亚砜) 匹配一小分子实验



Buffer into buffer

5% DMSO into 5% DMSO

5% DMSO into 4.5% DMSO

5% DMSO into 4 % DMSO

pH匹配

- 当使用较高浓度的样品时，比如mM以上，生物分子本身的缓存能力将造成样品间的pH差异。
- 为保证pH匹配，实验前使用酸或者碱将样品间的pH调一致（ $<0.1\text{pH}$ ）。或者提高缓冲成浓度，增强pH缓冲能力。



样品制备要求

1. 使用透析、脱盐柱或者超滤方法将蛋白样品统一到一致的缓冲液中。
2. 对于样品中的甘油、表面活性剂等添加剂需要额外增加透析时间或超滤次数。
3. 透析过程保持蛋白活性！
4. 保留透析或超滤尾液，用于：
 - 溶解小分子样品
 - 稀释样品
 - 用于做**Control**实验
5. 透析或超滤后的样品需要重新浓缩并准确定量。
6. 改变缓冲液成分，以提高蛋白的稳定性和溶解性。例如pH，盐离子浓度或其他添加剂。



样品制备要求-DMSO

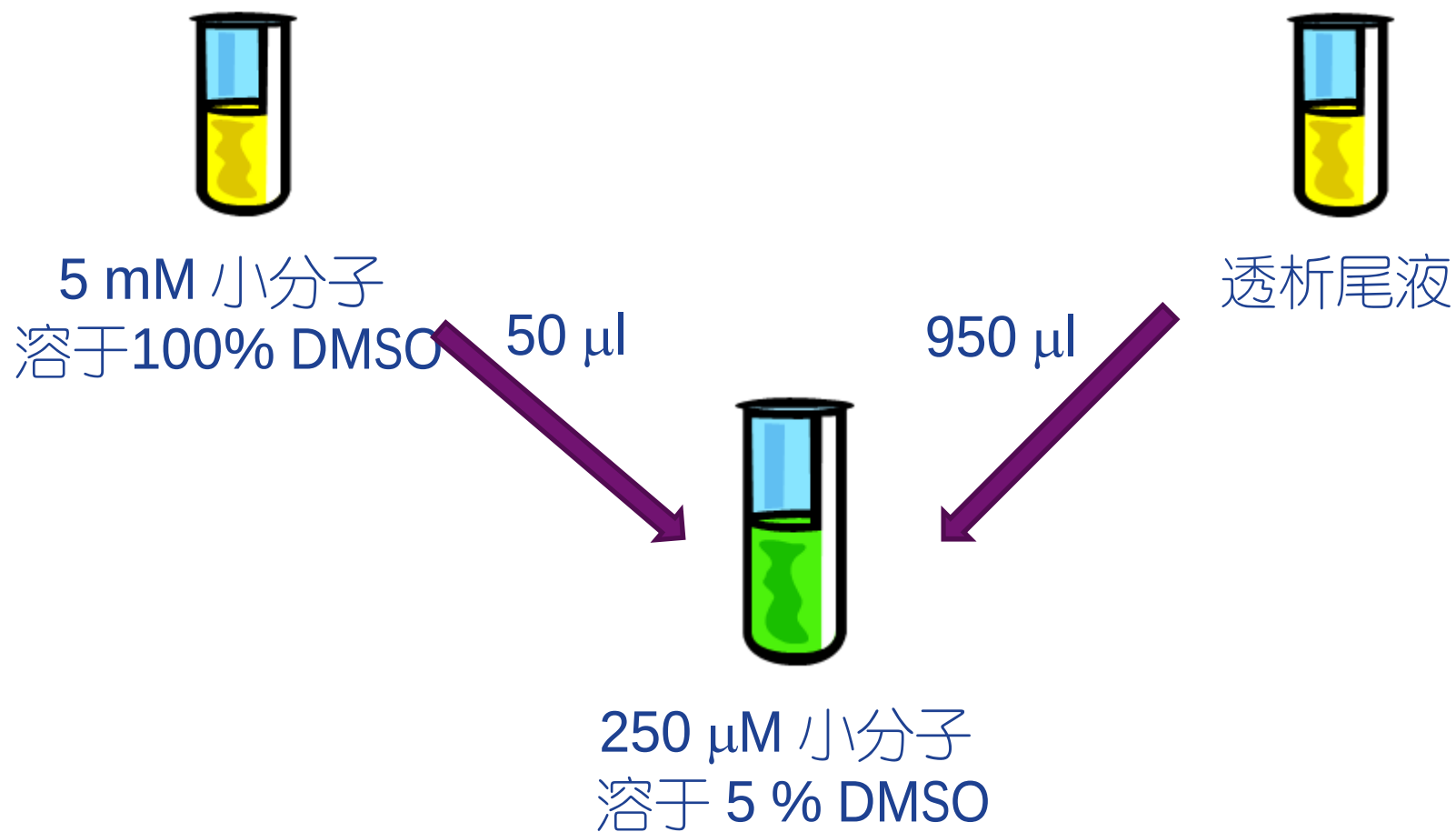
- 小分子

由**100%DMSO**溶解的小分子母液，使用蛋白的透析尾液稀释至目标**DMSO**含量，比如**5%**。

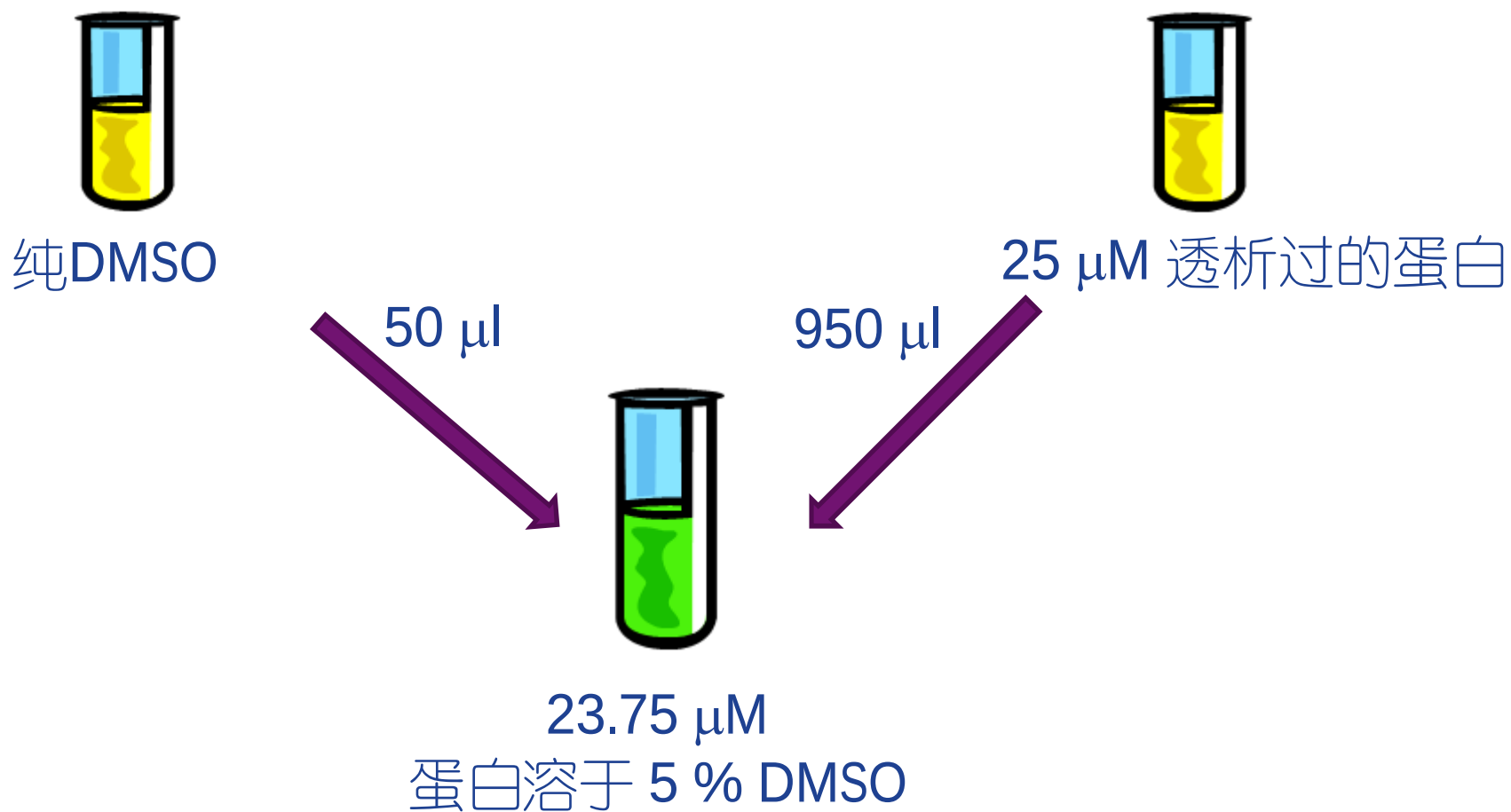
- 蛋白

向透析过的蛋白添加**DMSO**，达到与小分子相同的**DMSO**含量。

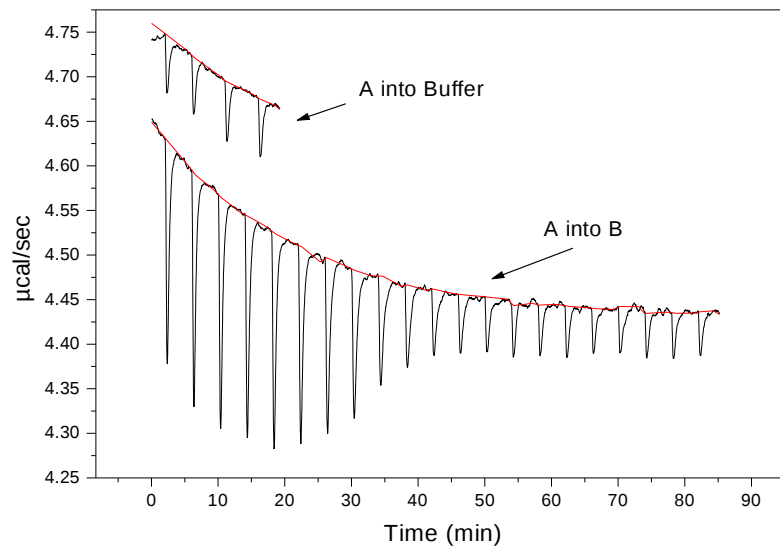
样品制备举例-DMSO



样品制备举例-DMSO



Control实验—小分子滴定透析尾液



- 必须在正式实验之前进行**Control**实验，以检测匹配。
- 使用与正式实验完全相同的参数。
- **Control**放热峰须恒定、高度较小、与正式试验最后几滴的稀释放热接近。



imagination at work

Controls实验

如果Control放热不恒定？

- 缓冲液或者pH不匹配。
- 滴定样品为多聚体。
- 个别样品稀释放热较大。

最终滴定结果可以扣减掉Control放热值，来消除轻微稀释放热对结果的影响。



imagination at work

缓冲液的选择

- ITC 几乎可以兼容所有缓冲液类型。例如： HEPES, PBS, glycine, acetate。
- 选择最能保持分子活性、水溶性和稳定性的缓冲液。
- 避免DTT
- 如果必须使用还原性试剂，可选择：
 - Tris(2-carboxyethylphosphine) hydrochloride (TCEP)
 - β -mercaptoethanol (BME)。

ITC样品制备小结

要求

- ✓ 透析或超滤样品
- ✓ 准确定量样品
- ✓ 确保缓冲液、pH、DMSO匹配
- ✓ 实验前进行Control实验

目的

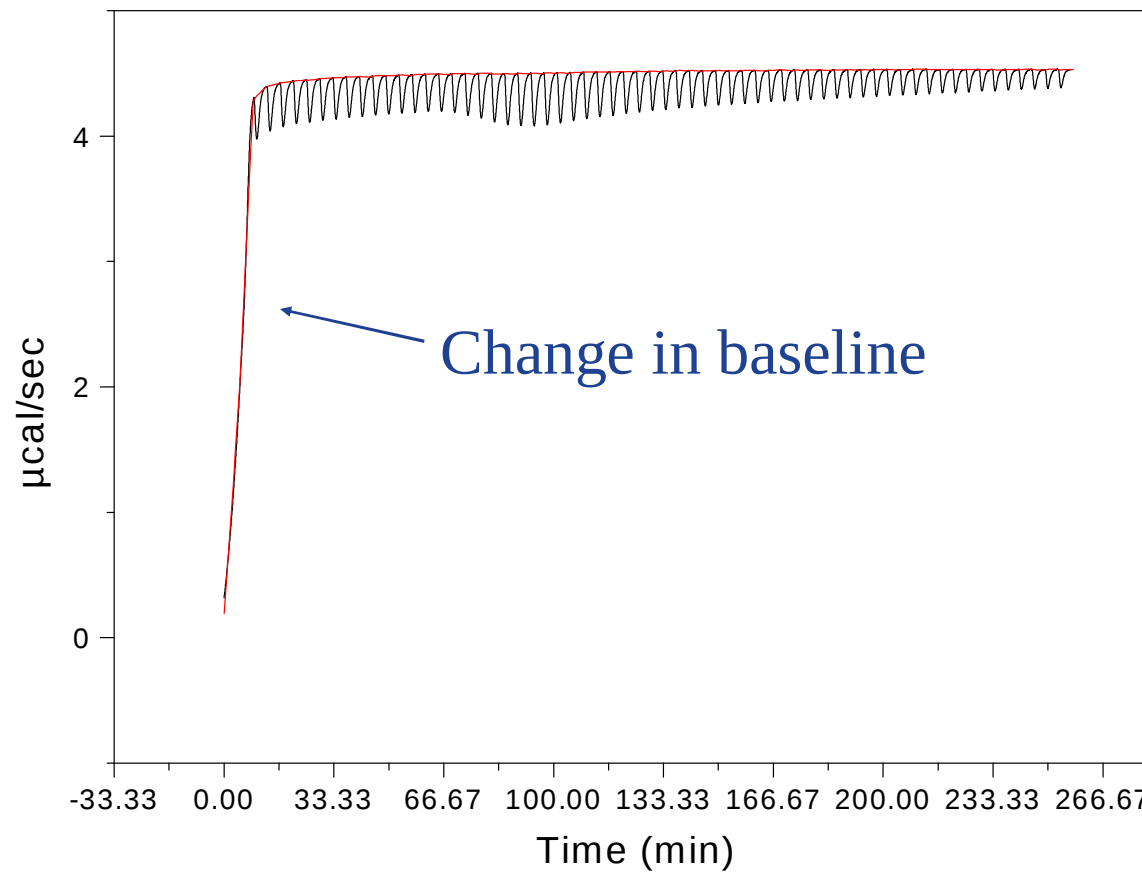
- ✓ 消除背景稀释放热
- ✓ 获得准确的热力学数据
- ✓ 消除背景稀释放热
- ✓ 监控匹配，扣除背景放热

样品池的清洗

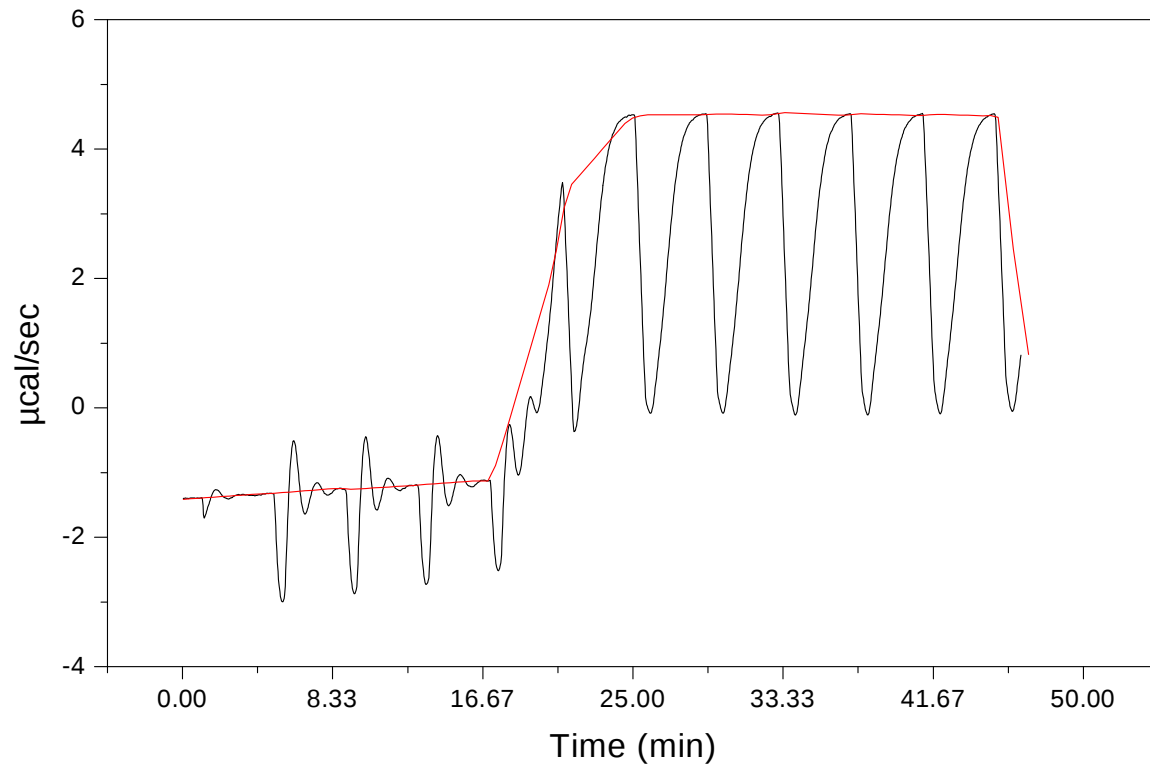


imagination at work

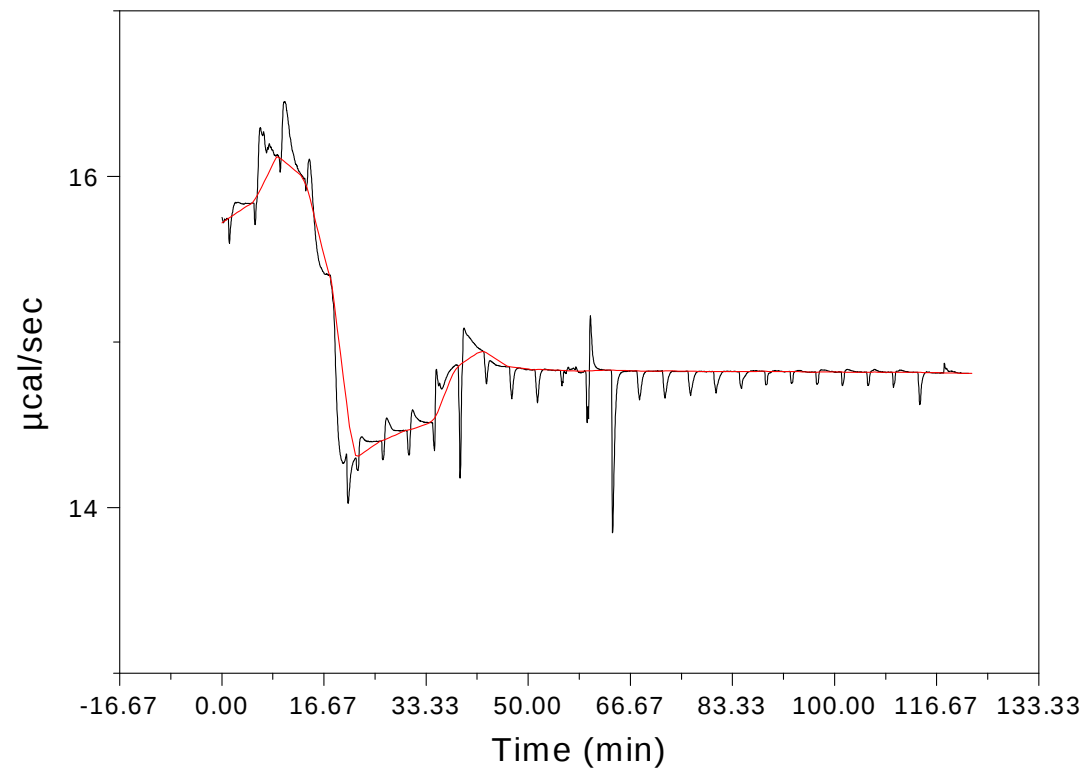
“粘性”蛋白或者样品池不清洁



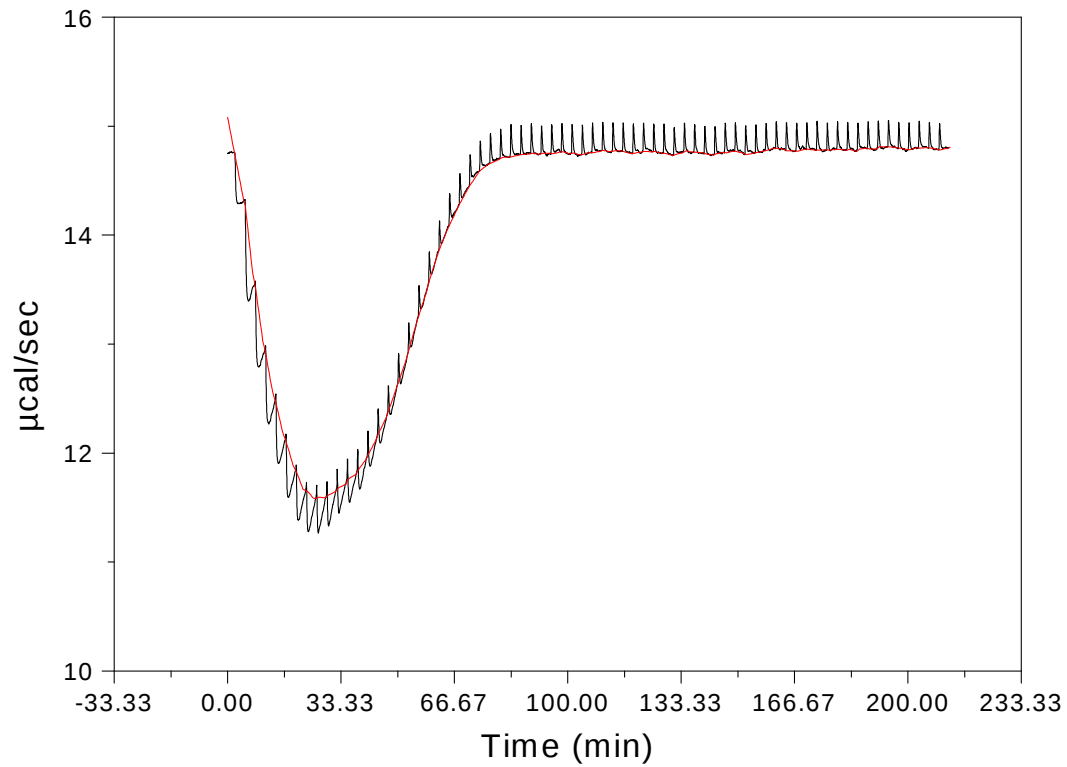
“粘性”蛋白或者样品池不清洁



“粘性”蛋白或者样品池不清洁



“粘性”蛋白或者样品池不清洁



样品池清洗

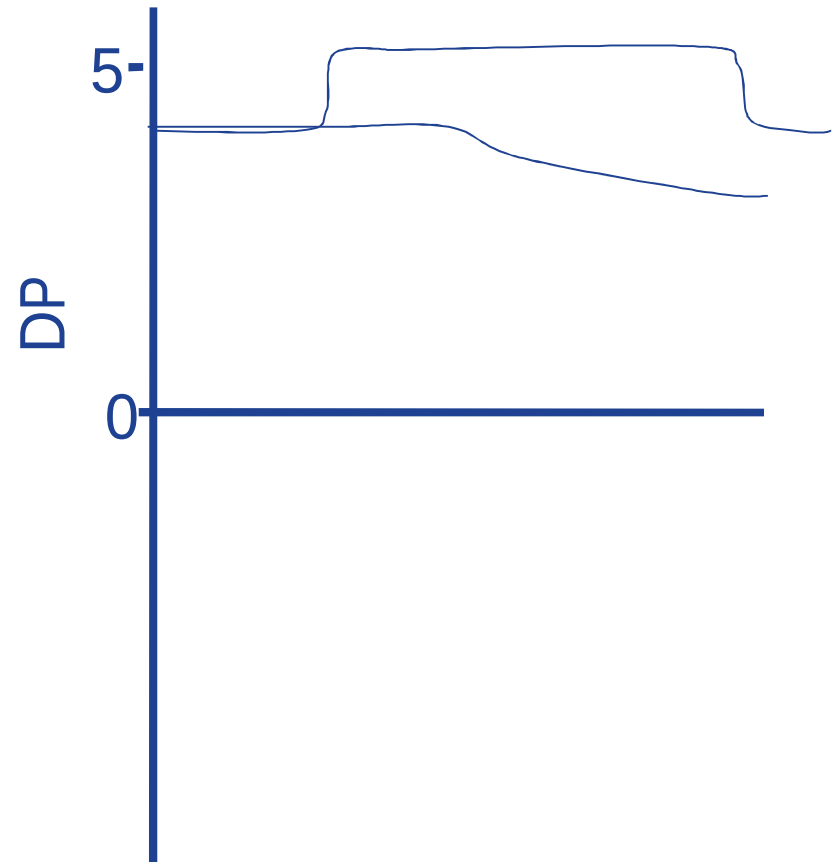
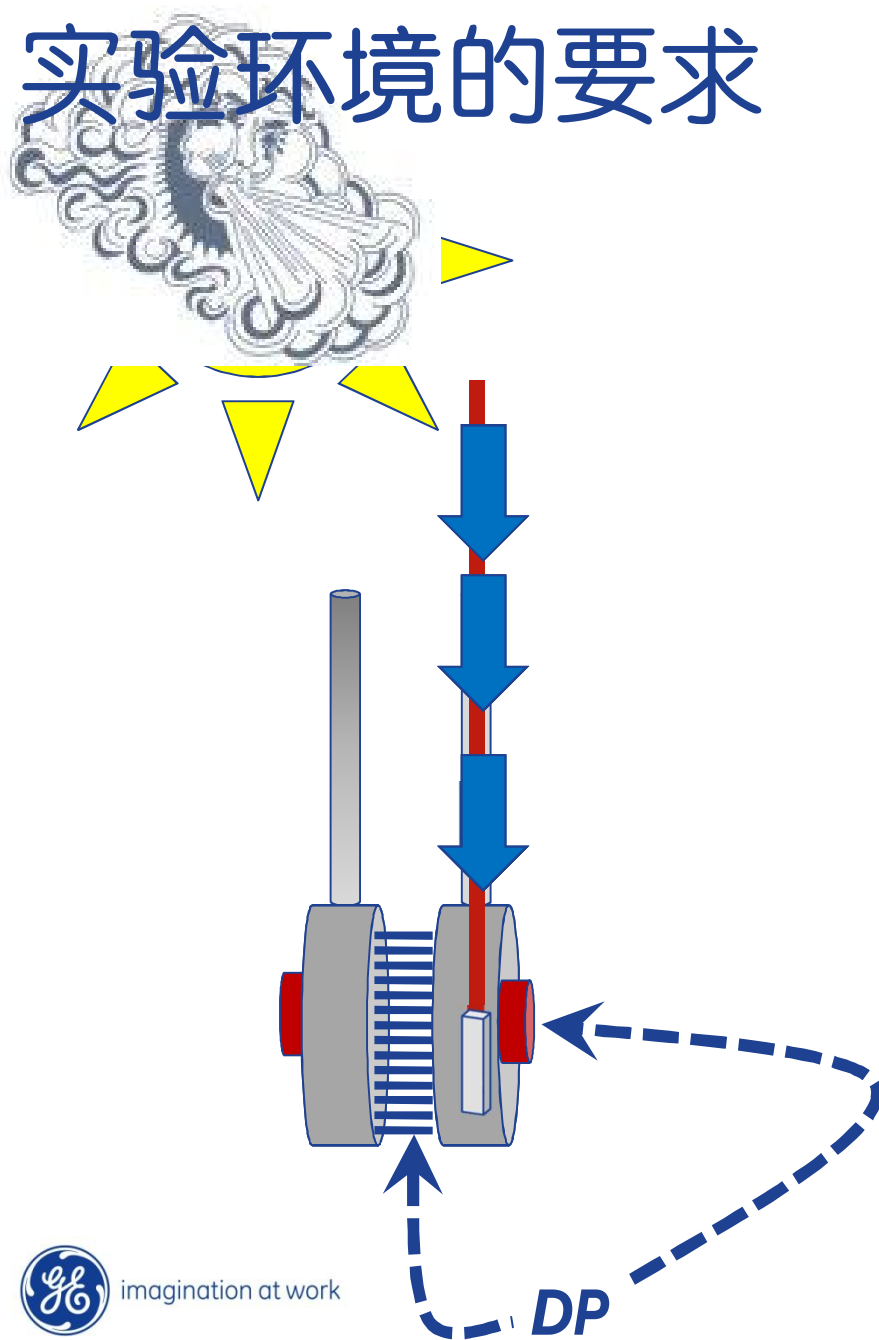
- 按照要求坚持每日、每周的清洗。
- 使用20%Contrad-70或者Decon-90清洗。
- 发现蛋白沉淀现象，立即进行清洗。

实验环境的要求

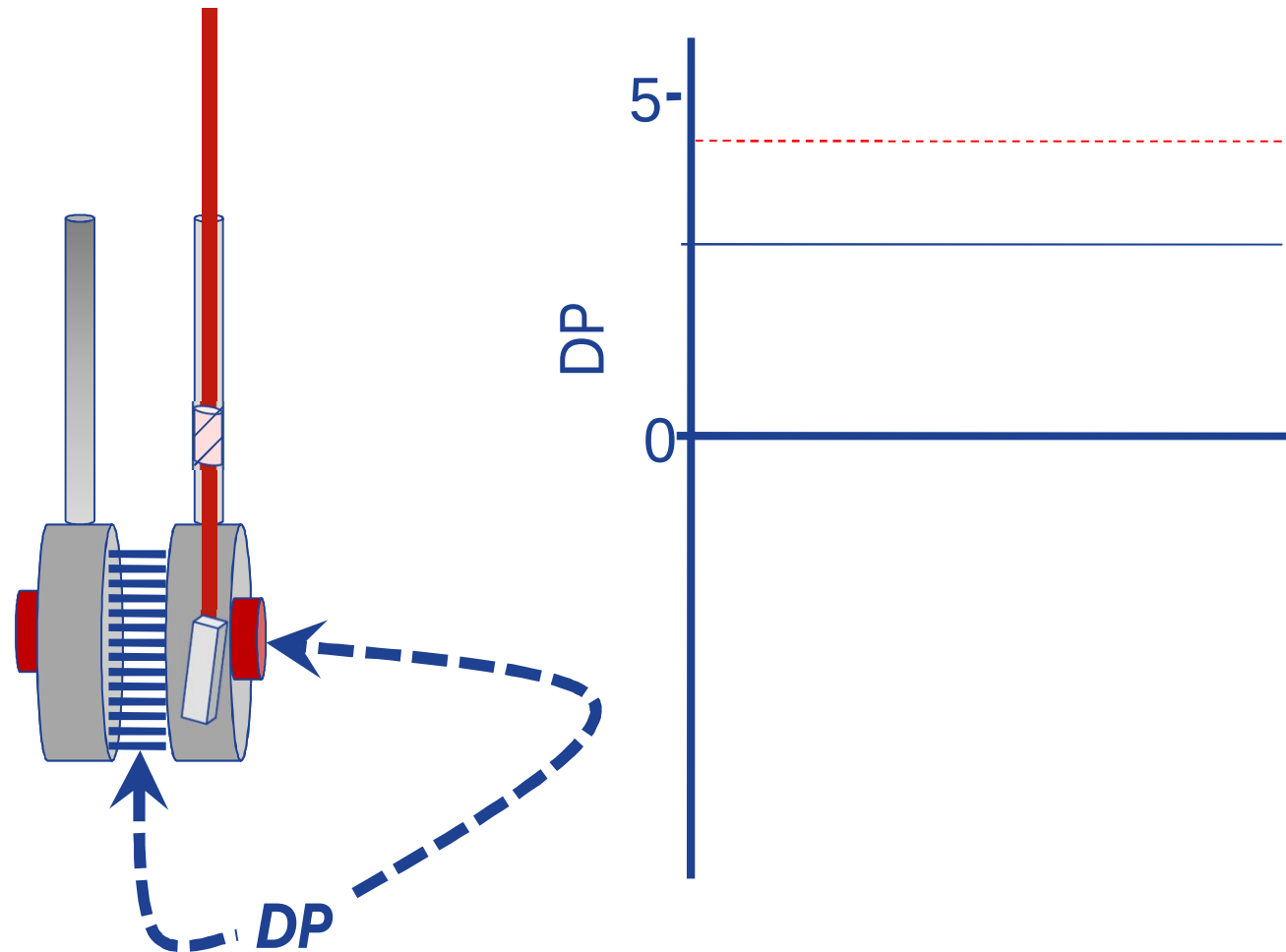


imagination at work

实验环境的要求

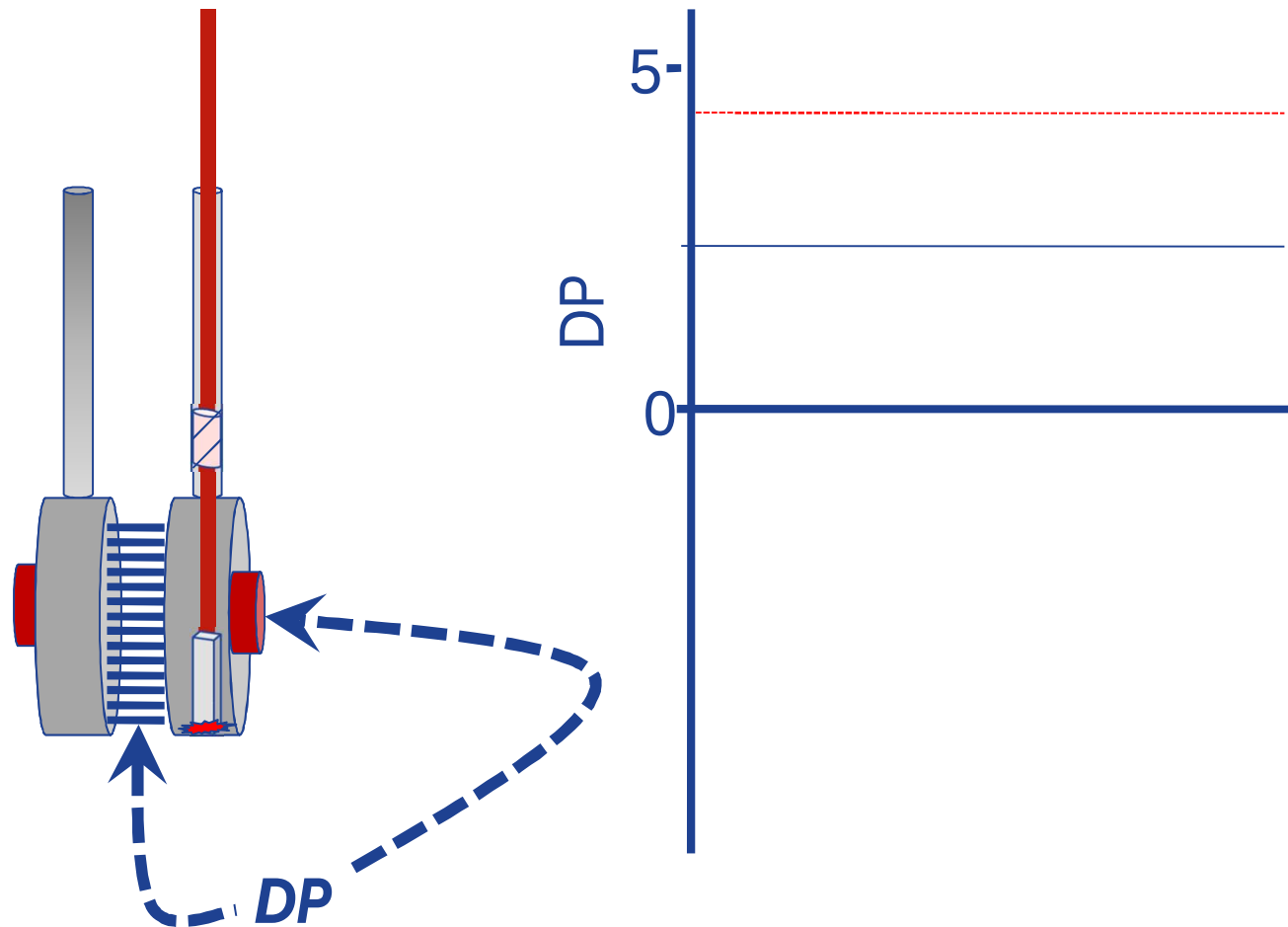


滴定针弯曲

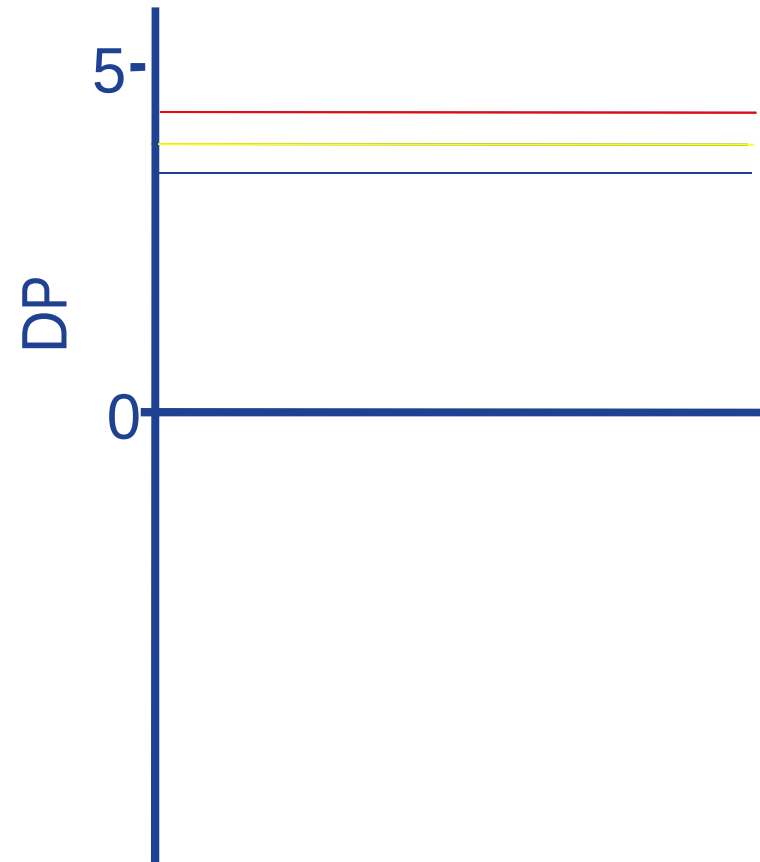
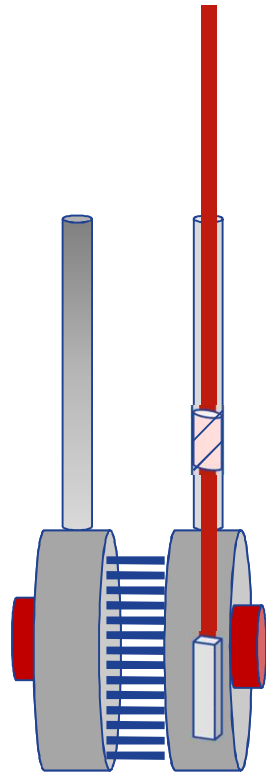


滴定针高度不够

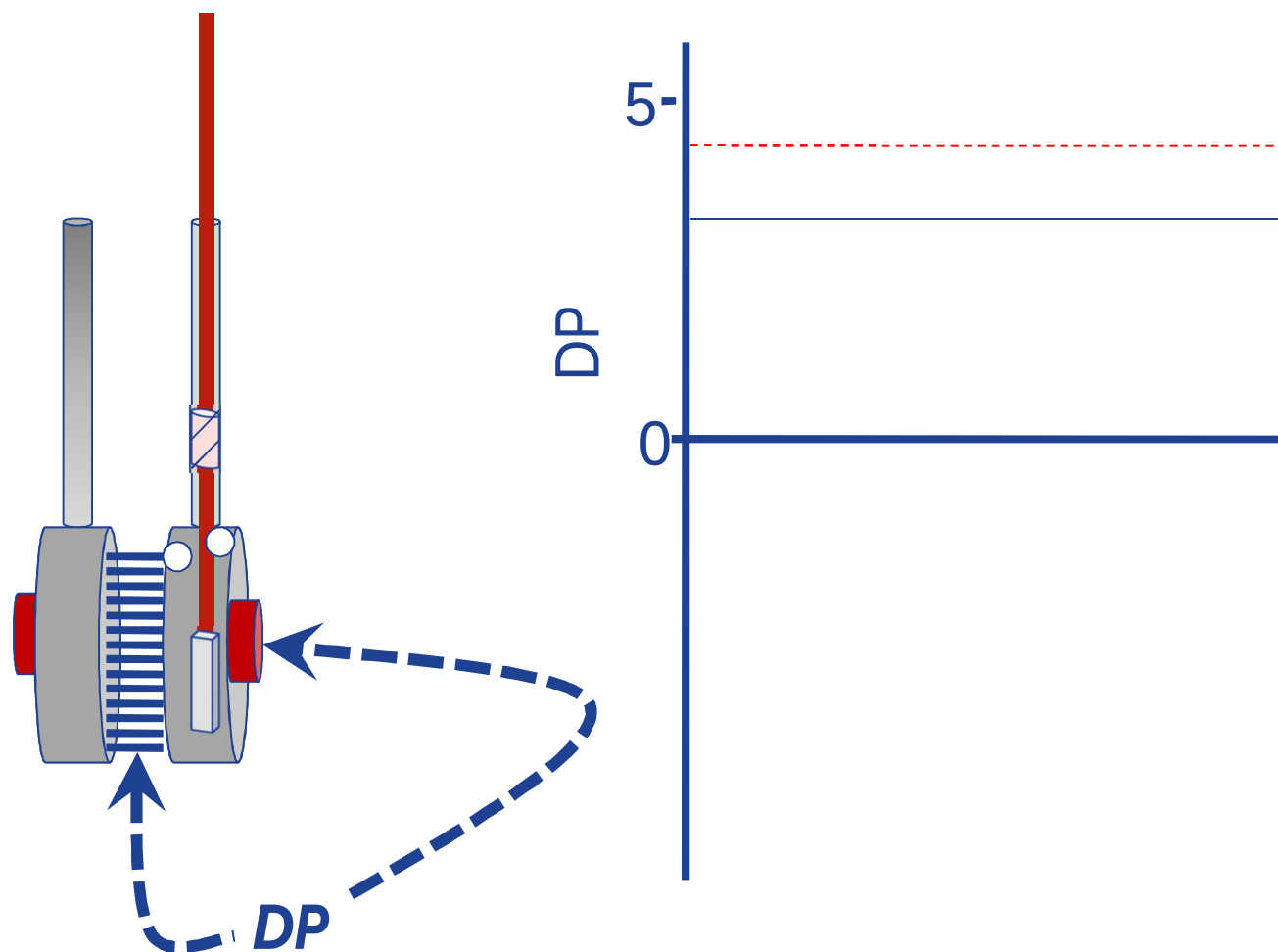
iTC₂₀₀ - Syringe Holding Nut Loose



搅拌速度不一致



样品池有气泡



实验参数的选择和优化



imagination at work

实验参数- MicroCal™ iTC₂₀₀

Volume-Typical 2-3 μl (range 0.1-38 μl)

--An initial injection of 0.5 μl is made followed by 18, 2 μl injections

Duration-2*vol (μl) e.g. 3 μl s injected over 6 secs

Spacing-Typical 150s

Filter period -5 s



imagination at work

实验参数- MicroCal™ iTC₂₀₀

- Temp :25°C or other of your interests.
- Number of injections -12 –18 (3-2 μ Ls)
- Reference power-5 ~10 μ cal/sec
- Initial delay-60 sec
- Stir speed-1000 rpm
- Feedback mode - high



imagination at work

实验参数– MicroCal™ VP-ITC

Volume-Typical 15 ul

Duration-2*vol (ul) e.g. 15 uls injected over 30 secs

Spacing-Typical 300 secs

Filter period –2 secs-the time span of data acquisition for data averaging



imagination at work

实验参数– MicroCal™ VP-ITC

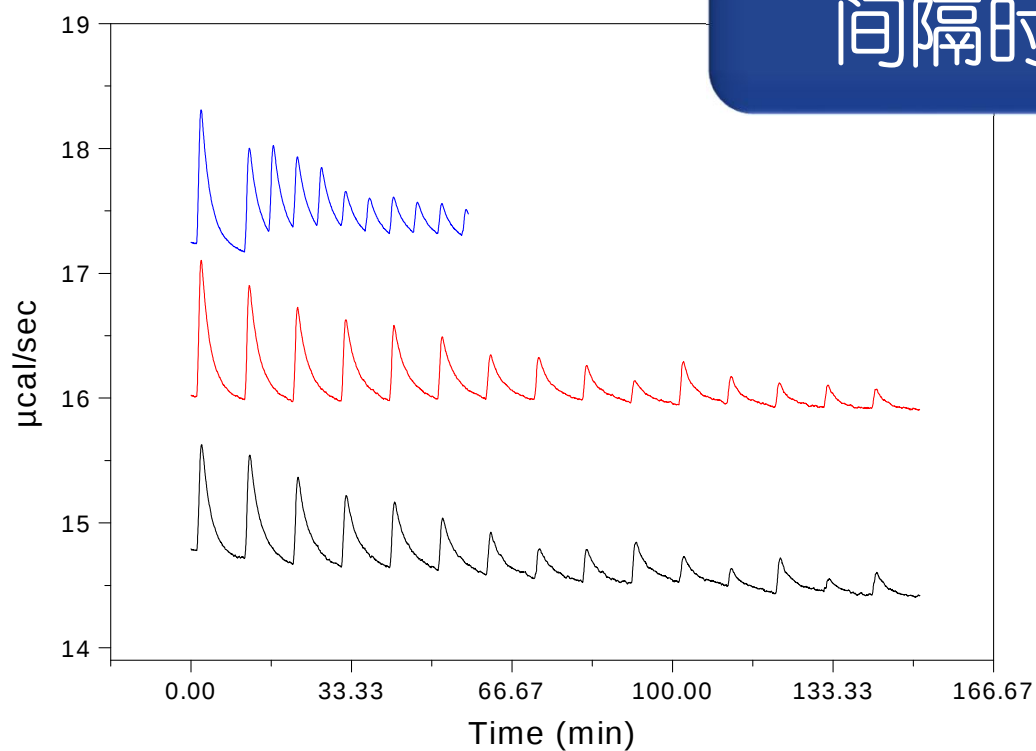
- Temp :25°C
- Number of injections -12 injection at least(25 μ l)
- Reference power-10 μ cal/sec (34 as max)
- Initial delay-60 sec
- Stir speed-300 rpm normally
- Feedback mode - high



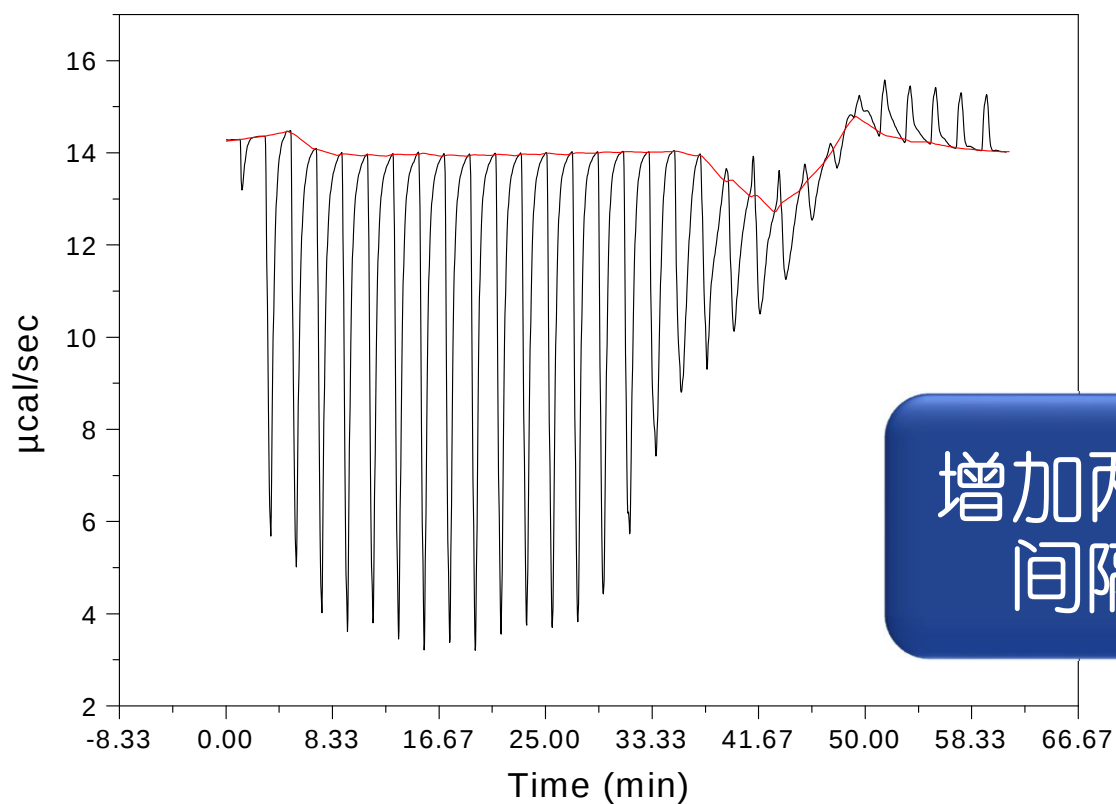
imagination at work

滴定间隔(Spacing)时间不够

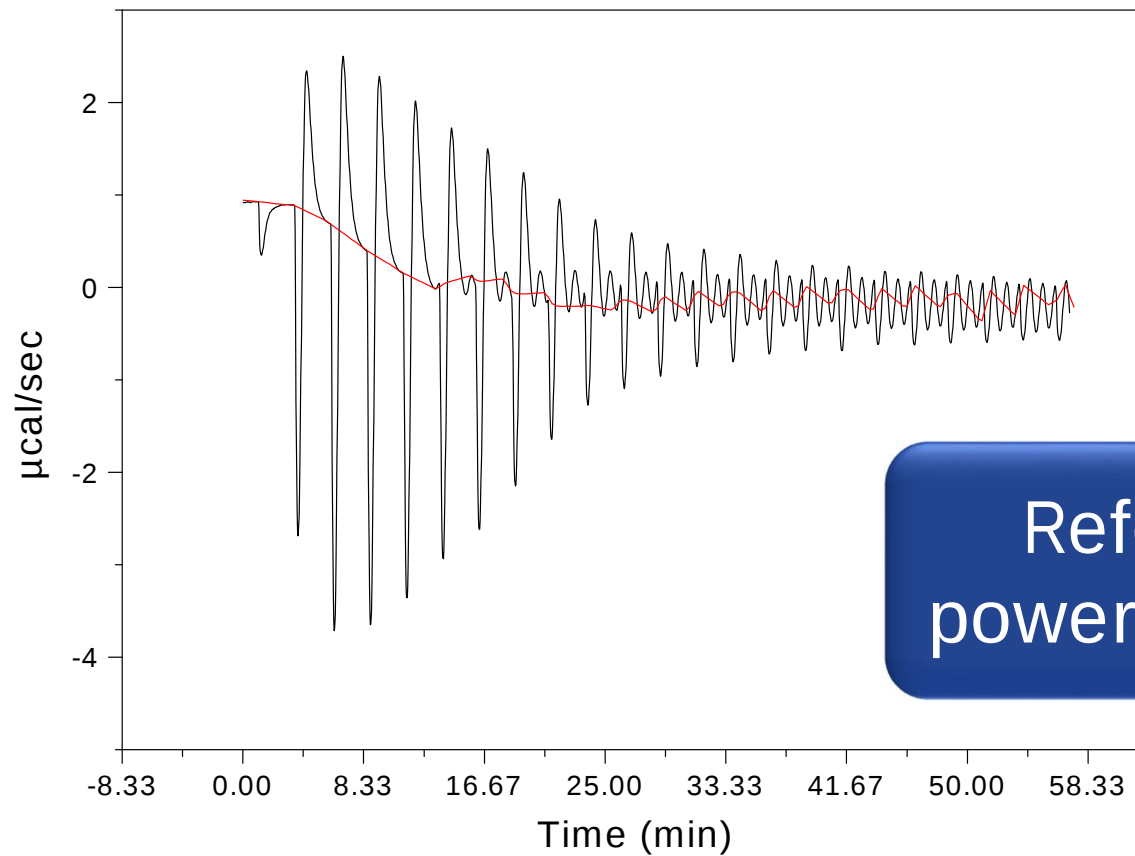
增加两滴之间
间隔时间



滴定间隔(Spacing)时间不够



“振荡波” “反弹波”



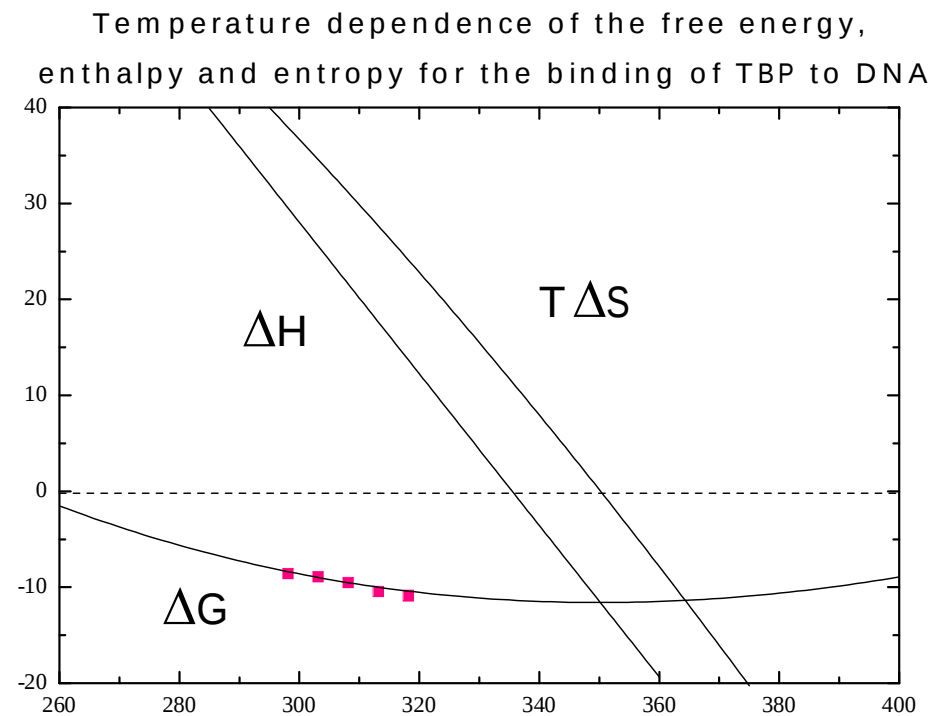
Reference
power 设置太低

合适的放热值

- 对于第二滴（完整滴）放热峰面积理想应超过2.5 $\mu\text{cal/s}$
- 对于第二滴至少应该~1 $\mu\text{cal/s}$

放热太低?

1. 提高样品池样品浓度可以提高放热量，同时提高了c-value
2. 改变实验条件 (例如. pH).
3. 改变温度 (至少10摄氏度)



Take home message

- C-value
- Buffer-matching
- Clean cell

