



中国人民大学化学与生命资源学院
SCHOOL OF CHEMISTRY AND LIFE RESOURCES, RENMIN UNIVERSITY OF CHINA

理化分析测试中心
INSTRUMENTAL ANALYSIS CENTER (IAC)

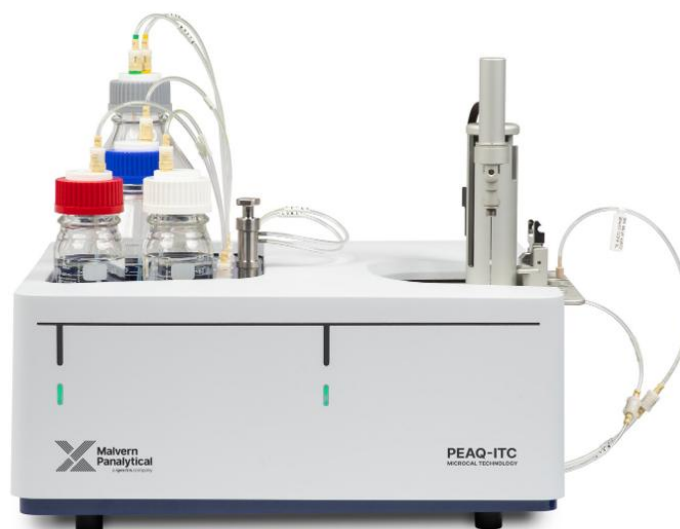
[ITC 等温量热测定仪 +马尔文 MicroCal PEAQ-ITC] 操作指南

制作团队：黄佳豪, 杨世涛

指导老师：袁斌

中国人民大学化学与生命资源学院

一、仪器基本信息



1. 仪器型号：马尔文 MicroCal PEAQ-ITC 等温滴定量热仪
2. 生产厂家：马尔文帕纳科公司
3. 核心功能：高精度检测分子结合过程中释放或吸收的微小热量，能够直接测定分子间相互作用的完整热力学参数，广泛应用于表征生物分子的相互作用，也可用于酶动力学研究。
4. 关键参数：温度范围：2 °C - 80 °C，亲和力测量范围：直接测量范围为 10^{-2} 至 10^{-9} M
5. 放置位置：理工楼 111 实验室
6. 责任人：袁斌 + 15120000730

二、操作前准备

2.1 人员要求

- 操作人员需完成 [马尔文 MicroCal PEAQ-ITC] 专项培训并通过考核，持“仪器操作资格证”预约使用；

2.2 仪器准备与清洁度检查

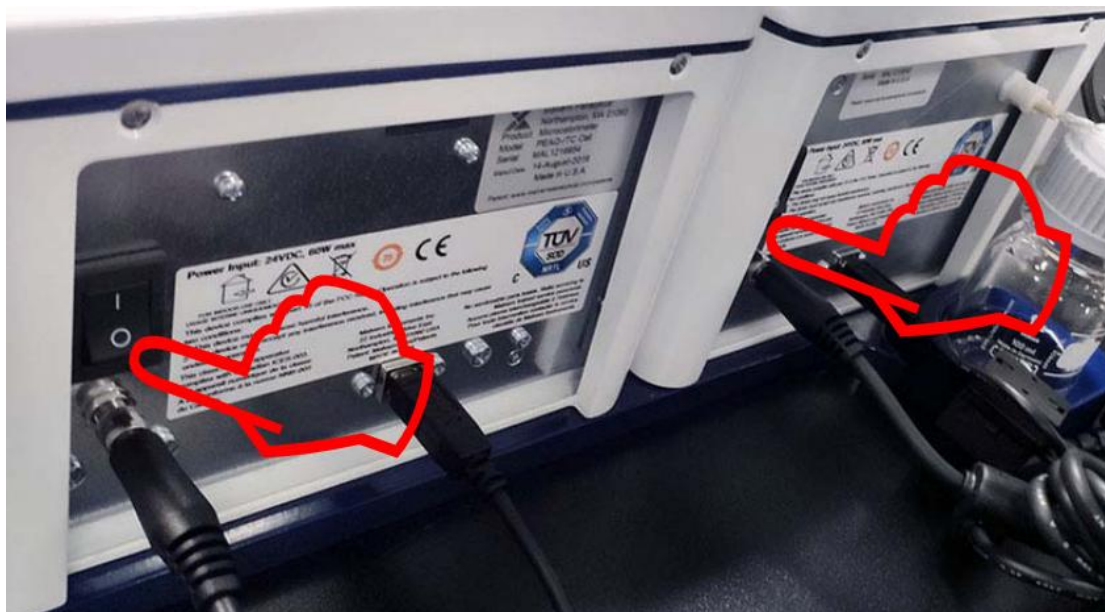
- 外观检查：确认仪器外壳无破损、接口无松动，电源线 / 数据线连接牢固；
- 初步清洁度检查：在开始正式实验前，可通过进行一个“水滴水”实验（即用水作为滴定物和水作为被滴定物）来检查样品池的清洁度和仪器基线噪音水平。如果基线噪音较大，说明清洁度不够，需要彻底清洗；
- 样品池与注射器清洗：如果样品池较脏，可使用 5%-20% 的专用去垢剂（Contrad 70 或 Decon 90）浸泡。操作时在软件中选择 Detergent Soak and Rinse (long) 命令，将去垢剂加入样品池并加热至 50-60°C 浸泡约 30 分钟，以彻底去除黏附的杂质。随后使用 Cell water rinse 命令，用超纯水彻底清洗样品池。使用 Syringe wash 命令清洗滴定注射器。对于反向滴定（蛋白质装入注射器）或每月预防性维护，可抽取 $2 \times 100 \text{ uL}$ 的上述去垢液进入注射器，然后用水进行长时间冲洗（在标准操作流程中作详细讲解）。
- 样品与缓冲液准备：滴定物与被滴定物必须溶解在完全相同的缓冲液中（包括 pH、离子强度、添加剂等），建议对样品池中的大分子溶液进行透析，并使用透析液作为配体的溶剂。样品需要具有较高的纯度 (>95%)，一般建议注射器中配体的浓度是样品池中大分子浓度的 10-20 倍。所有样品和缓冲液在使用前应进行脱气处理（约 15-20 分钟），以减少气泡干扰的风险。

三、标准操作流程

3.1 开机与软件启动

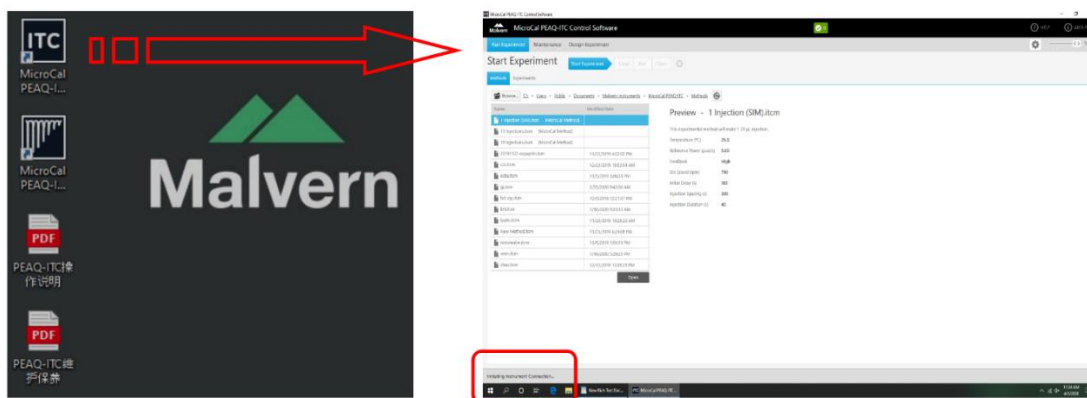
3.1.1 打开电脑和仪器

开启计算机且 Windows 运行后，打开仪器右侧后部的主机电源。



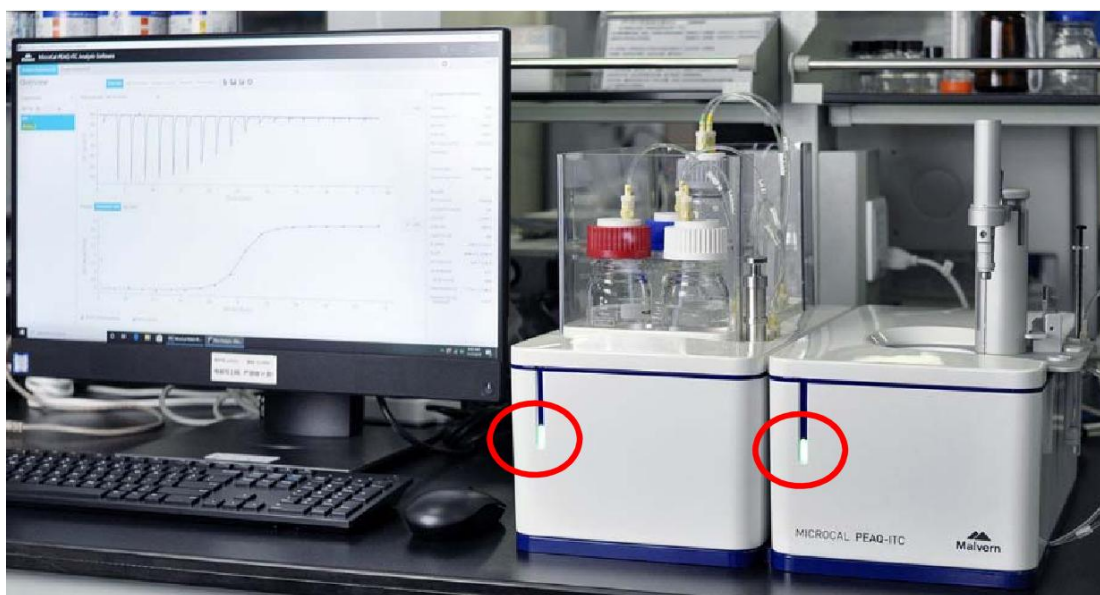
3.1.2 打开软件

双击桌面上的“MicroCal PEAQ-ITC Control”图标，启动 MicroCal PEAQ-ITC 控制软件。系统初始化过程后，MicroCal PEAQ-ITC 控制软件将打开。



3.1.3 确认仪器正常工作

确认仪器前部的绿灯亮起。

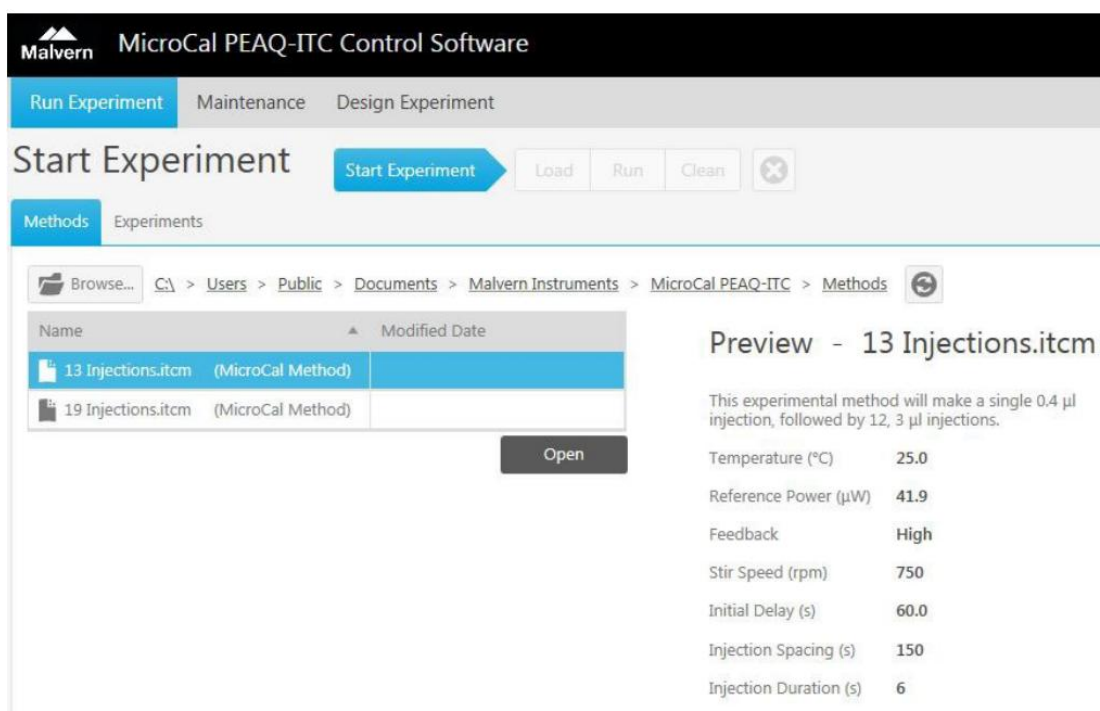


方法软件将自动初始化并与仪器通信，等待状态指示灯变为绿色。



3.1.4 打开方法

打开默认的“13 Injections”方法（图右边有相应的方法参数，方法参数可以后面的“Run”界面中修改，见 3.3）。



3.2 系统清洗

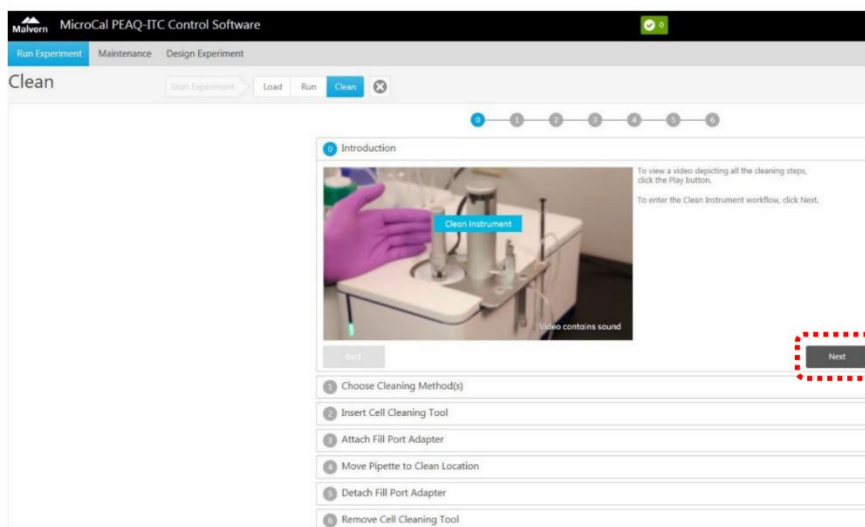
3.2.1 调用清洗步骤

打开方法后会弹出工作区，在工作区上方选择“Clean”工作区。单击“Clean”以清洁样品池和注射器。每次使用前和使用结束均需要清洗样品池与注射器。



3.2.2 观看分步视频

按照分步视频说明并使用默认设置，在“Introduction”步骤中单击“Next”（每个步骤中均有视频演示）。



3.2.3 选择清洗方法执行清洗

在步骤 1 中选择软件中默认的清洗方法，单击“Next”继续按照指示执行清洁程序的步骤 2-6（确保每一步完成后再点“Next”）。执行最后一步“Remove Cell Cleaning Tool”后，单击“Done”。

1 Choose Cleaning Method(s)

Cell Cleaning Method	Syringe Cleaning Method
<input type="radio"/> Rinse Rinse with water.	<input checked="" type="radio"/> Rinse Rinse with water, then dry using methanol.
<input checked="" type="radio"/> Wash Wash with detergent, then rinse with water.	<input type="radio"/> Wash Wash with detergent, rinse with water, then dry using methanol.
<input type="radio"/> Soak Soak in detergent for 30 minutes at 60 °C, then rinse with water.	<input type="radio"/> None
<input type="radio"/> None	

Back Next

3.3 实验设置与方法编辑

3.3.1 设置样品浓度

在工作区上，单击“Run”返回运行工作区。分别输入注射器和样品池中样品的浓度，确保每一步完成后再点“Next”。

Malvern MicroCal PEAQ-ITC Control Software

Run Experiment Maintenance Design Experiment

Run Start Experiment Load Run Clean X

Experiment Information

[Syr] (M)	1.00e-3
[Cell] (M)	100e-6

Comment

Instrument Settings

Temperature (°C) 25.0

This experimental method will make a single 0.4 µL injection, followed by 18, 2 µL injections.

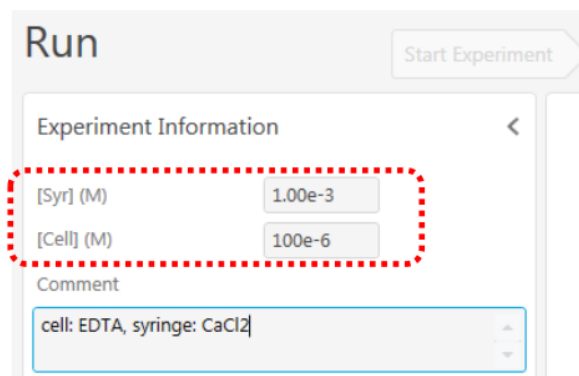
The following settings will be used:

Reference Power (µcal/s)	5.00
Feedback	High
Stir Speed (rpm)	750
Initial Delay (s)	60
Injection Spacing (s)	150
Injection Duration (s)	4.0


DP (µcal/s)

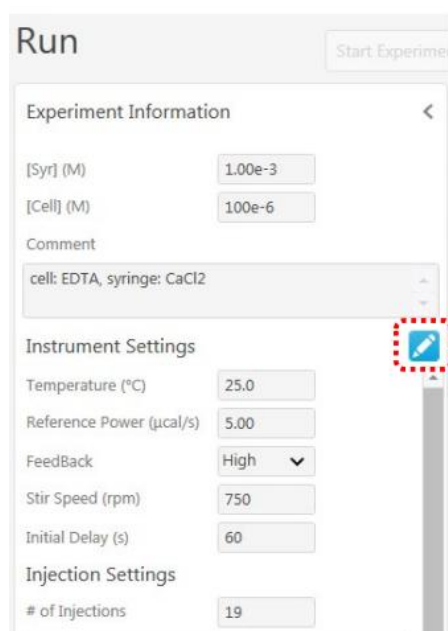
3.3.2 添加样品备注

在“Comment”框中，输入对样本的描述，例如 cell: EDTA, syringe: CaCl₂。



3.3.3 编辑方法

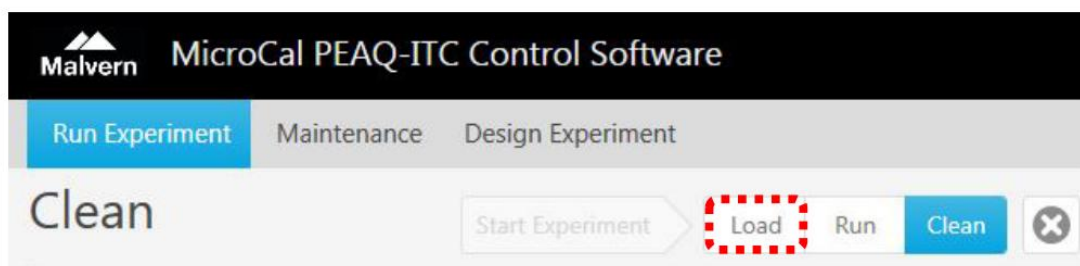
单击编辑设置图标编辑方法（温度、搅拌速率、注射次数和注射量等），修改完后再次单击以接受修改。单击“Save As Method”将设置另存为新方法以供以后使用。输入名称，例如“EDTA method.item”，然后单击保存（下次使用该方法时可直接在 3.1 步骤中打开）。



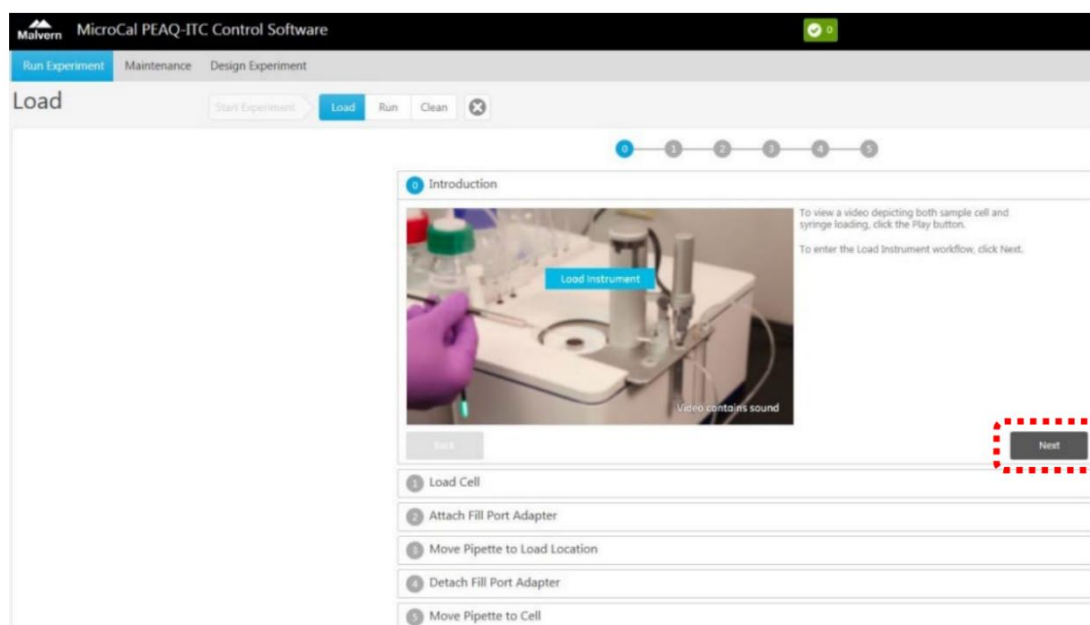
3.4 样品装载与实验执行

3.4.1 观看样品装载视频

在工作区上，单击“Load”工作区。



按照“Introduction”中的分步视频说明将被滴定溶液装载到样品池中，滴定溶液装载到注射器中。单击“Next”继续执行加载过程的模块。




3.4.2 装载样品池

在装载样品池之前，用注射器吸取缓冲液冲洗样品池，再将缓冲液吸出，重复三次。将上样注射器轻轻插入样品池，直到它接触到底部，并从池中清除剩余的液体。在上样注射器中装入 300 μ L EDTA 溶液。倒置注射器并轻敲以消除气泡，然后按下柱塞直到所有空气都被排除。将注射器轻轻插入样品池直到接触到底部，然后将注射器抬到底部上方 1-2mm 处，缓慢将 EDTA 注入样品池（约

250 μ L)，从样品池顶部边缘上吸取出多余的 EDTA 溶液，完成后点击“Next”。

1 Load Cell



Move the pipette out of the way (i.e to the Clean Location).

Fill the loading syringe with 300 μ l of sample.

Slowly insert the loading syringe into the sample cell port, gently touch the cell bottom, and move up approximately 1 mm.

Slowly dispense approximately 150 μ l of sample.

Introduce a small volume, quickly, to dislodge any bubbles. Repeat this several times.

Slowly dispense the remaining sample while being careful not to introduce air bubbles.

Remove any excess sample in the cell port overflow cup using the loading syringe.


Back

Next

3.4.3 连接上样适配器

将上样适配器上的孔与吸液管旋转组件上的孔对齐。插入上样适配器，感觉到轻微的咔嗒声，点击“Next”。

2 Attach Fill Port Adapter



If the pipette is in the Clean Location, you must press the clamp's release lever.

Move the pipette to the Rest Location.

Align the hole in the pipette's housing to the hole in the pipette's rotating assembly.

Insert the fill port adapter. A soft click should be felt.

Click Next.

Back


* - Requires Instrument Connection

Next *

3.4.4 移动吸液管上样

将含有滴定溶液的微量离心管放入管架中。检查离心管底部是否没有气泡，将吸液管推到支架底部，点击“Next”。

3 Move Pipette to Load Location



Load approximately 60 μ l of titrant in one of the supplied microcentrifuge tubes.

Ensure the microcentrifuge tube has its lid properly situated in the keyed Load Location.

Move the pipette to the Load Location.

Click Next.

Back


* - Requires Instrument Connection

Next *

3.4.5 拆下上样适配器

将吸液管移到静止位置。然后将上样适配器从吸液管上拆下，并将其放回储存位置，点击“Next”。

4 Detach Fill Port Adapter



Move the pipette to the Rest Location.

Detach the fill port adapter from the pipette and return it to its Storage Location.

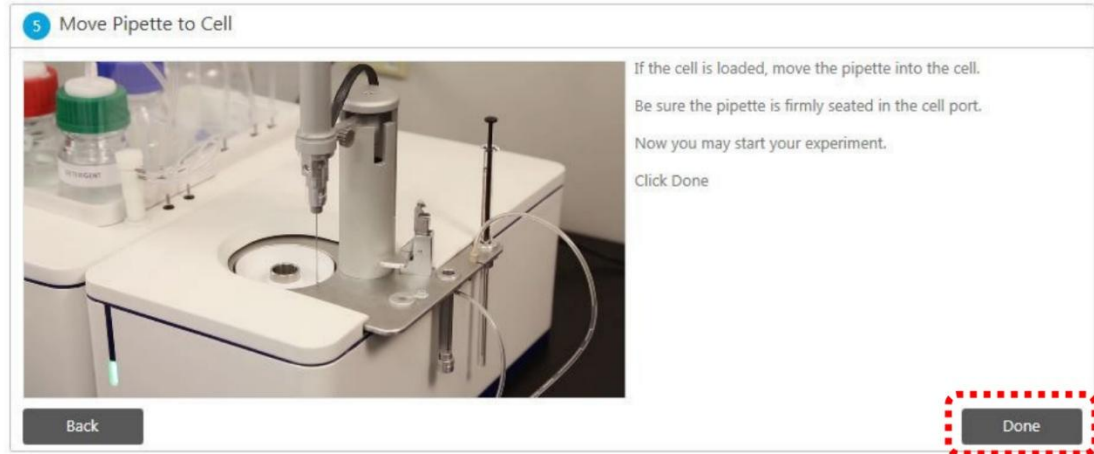
Click Next.

Back

Next

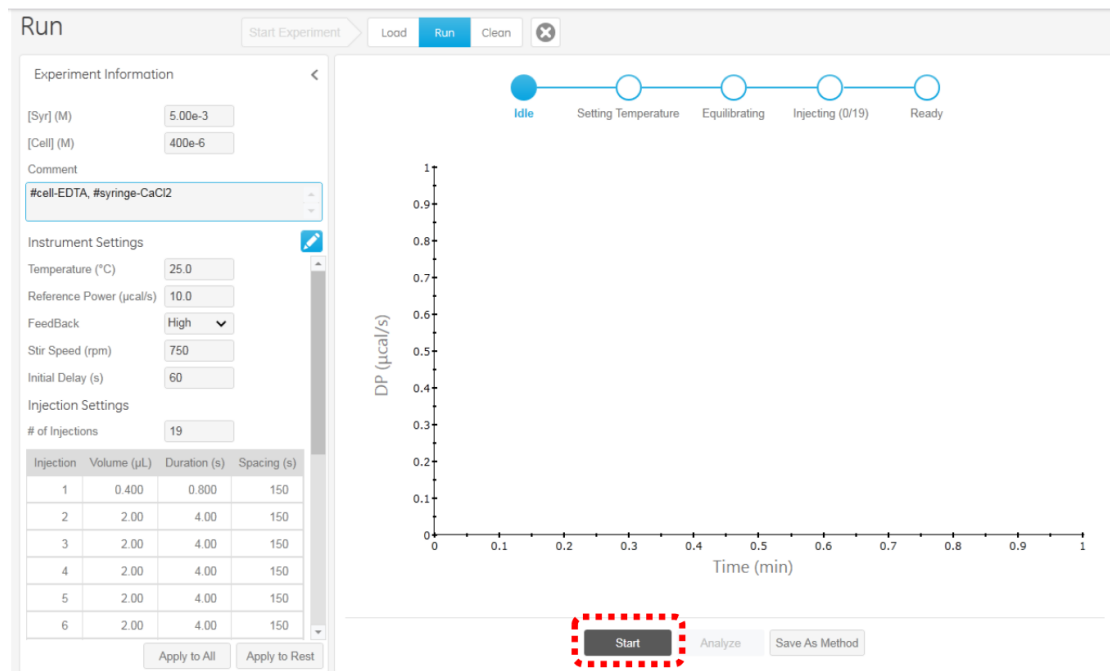
3.4.6 吸液管移至样品池

样品池已装载，将吸液管移入样品池。确保吸液管牢固地固定在样品池中，点击“Done”后自动返回至“Run”工作区。



3.4.7 实验执行

点击“Start”按钮开始实验，输入结果文件的名称，并保存在默认的文件夹 Experiments 中。



3.5 结束操作

实验结束后应清洁系统。单击“Clean”工作区以执行样品池和注射器清洗，具体操作见步骤 3.2。

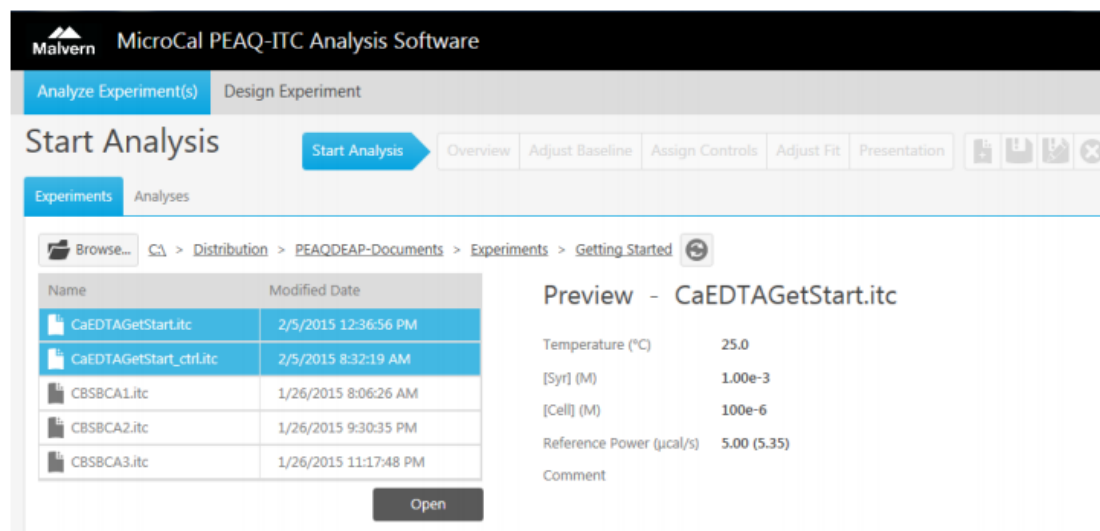
四、数据处理

4.1 打开软件

通过单击 MicroCal PEAQ-ITC 控制软件中的分析按钮或双击桌面上的图标打开 MicroCal PEAQ-ITC Control Software。

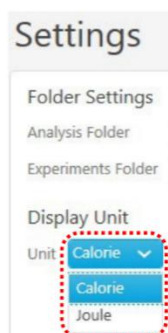
4.2 打开文件

在“Start Analysis”工作区中，打开步骤 3.4.7 中命名的文件，默认情况下将显示“Experiments”文件夹中的可用数据。



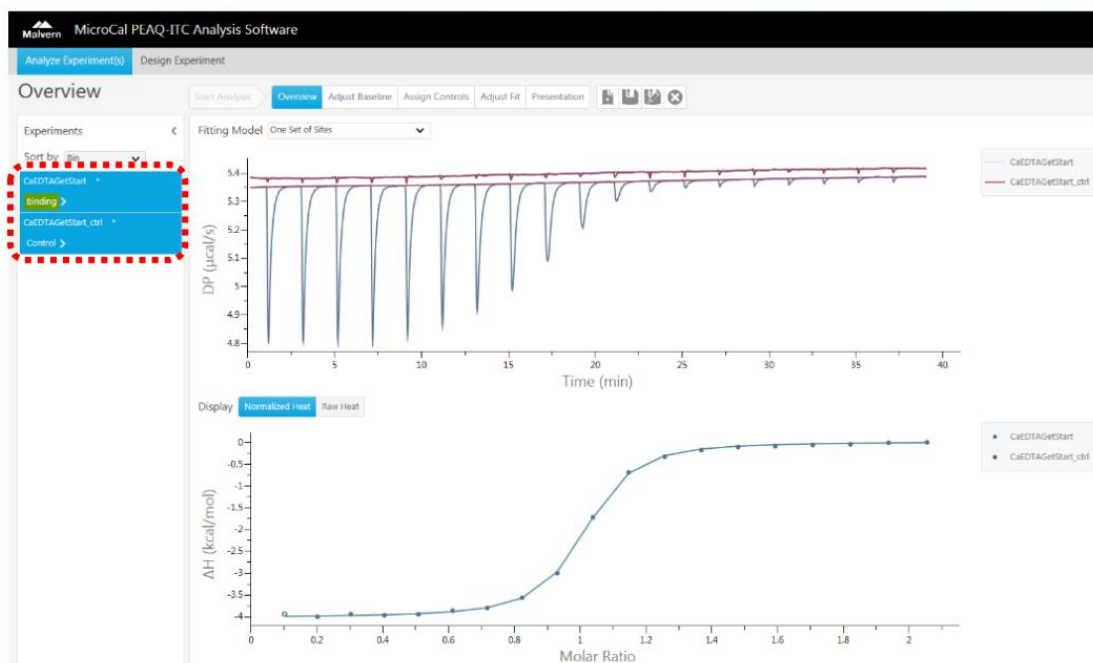
4.3 单位选择

MicroCal PEAQ-ITC 将以英制或国际单位显示测量和计算数据。要选择英制（卡路里）或国际单位制（焦耳），请单击设置图标并在下拉列表中进行选择，点击“Analyze Experiment(s)”返回上一页。

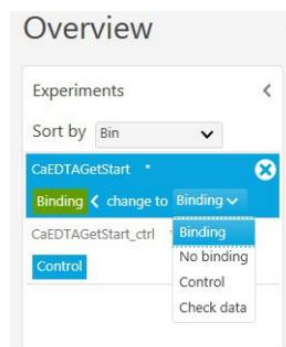


4.4 Bin 的设置

打开文件后，将自动打开“Overview”工作区。



分析中使用的文件及其分配的“Bin”显示在 Experiments 窗格中（左侧）。Bin 是一种基于预定义数据的质量/结合标准的分类。数据文件可以按 Bin、Name、Bin and Name 或 Modified Date 进行排序。软件会自动为每个实验分配一个 Bin，但是可以通过单击标签右侧的箭头选择下拉菜单中列出的选项之一来手动设置 Bin。



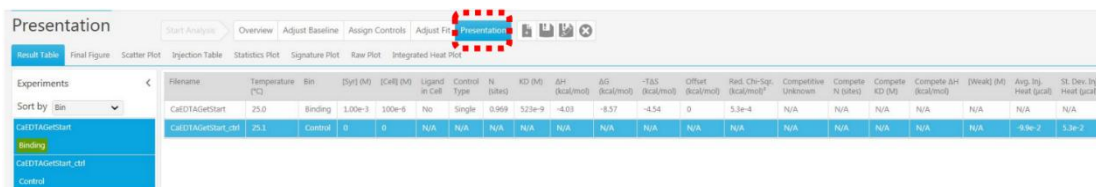
4.4 数据的选择

中间窗格显示了原始数据图（微分功率 DP 与时间的函数）和注入的摩尔比与相应积分热的函数。可以从综合图中手动排除不良数据点。排除数据点（实心圆环）右键单击该数据点并选择“Exclude”。采用数据点（空心圆）右键单击该数据点并选中

“Include”。当排除（或包含）数据点时，将使用当前包含的数据点集自动重新计算拟合模型。第一次注射已被自动排除。

4.5 结果的展示

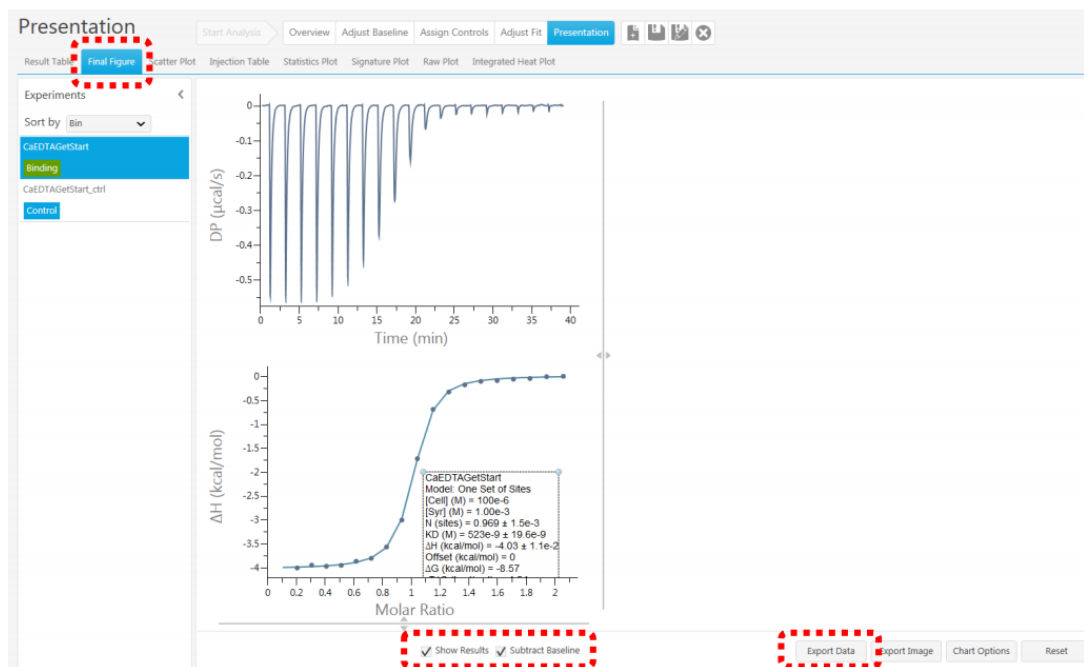
实验信息和分析结果显示在“Experiment Information”窗格中（右侧）。单击工作区中的“Presentation”以打开实验的分析结果。工作区分为两个窗格，顶部窗格按照侧重的分类展示相应的结果，左侧窗格列出了可以选择的实验数据。默认情况下，选择“Result Table”，并列出所选拟合模型特有的所有参数。




Filename	Temperature (°C)	Bin	[Syr] (M)	[Cell] (M)	Ligand in Cell	Control Type	N (sites)	KD (M)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (kcal/mol)	$-\Delta G$ (kcal/mol)	Offset (kcal/mol)	Red. Chi-Sqr (kcal/mol) ²	Competitive Unknown	Compete N (sites)	Compete KD (M)	Compete ΔH (kcal/mol)	(Weak) (M)	Avg. Sig. Heat (kcal)	St. Dev. Sig. Heat (kcal)
CaEDTAGetStart	25.0	Binding	1.00e-3	1.00e-6	No	Single	0.969	5.23e-9	-4.03	-8.57	-4.54	0	5.3e-4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CaEDTAGetStart_ctrl	25.1	Control	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	8.9e-2	5.3e-2

4.5 数据的导出

单击“Final Figure”以创建最后要导出的数据图。此数据图包含两个表，上图是 DP 随时间的函数，下图是拟合数据。点击“Show Results”以在图中显示分析结果，点击“Export Image”以所需的文件格式导出实验数据。



4.5 数据的保存

点击“Save”按钮, 将分析的全部内容保存到名 XXX(你的命名).apj 的文件中。

五、常见故障处理

1. 机械故障:

a. 常见 wash module 清洗 cell 和 syringe 均无液体, 泵声音沉闷, 可能是内部滤膜堵塞, 需及时更换滤膜。

b. Wash module 清洗 cell 有液体, 清洗 syringe 无液体, 可能是 C1/C2/FPA/Syringe/Filing port 堵塞, 需用 cleaning wire 疏通和清洗; 也可能是外部连接某处有漏气, 需调节或更换 FPA 和密封圈。

c. 软件无法打开或提示有错误, 请检查电源线和数据线是否连接良好, 重启或重新安装控制软件。

d. 如果 Syringe 断裂或弯曲, 应及时更换 Syringe。如果 plunger tip 松动或者其上部有液体泄漏, 应及时更换 plunger tip。

2. 数据问题:

a. Baseline 偏离设定值过大($> \pm 1 \mu\text{cal}$), 过程中有怪峰出现, 可能是 cell 不干净或者有气泡导致。应彻底清洗 cell 和重新上样。

b. 数据重复性差或者噪音过大, 应彻底清洗 cell, 并做水滴水测试, 并将 .itc 文件发给工程师远程分析协助解决。

六、注意事项

1. 实验前和实验后都需要彻底清洗 Syringe(甲醇干燥)和 cell(去垢剂 14%Decon90 或 20%Controd70), 及时清洗非常重要。去垢剂浸泡清洗 cell 后, 应手动吸走 cell 内部的去垢剂, 手动使用注射器清洗 1-2 遍后再用 wash module 清洗。避免产生气泡引起 wash module 内部滤膜堵塞。

2. 样品不能对仪器任何部件产生腐蚀，请参考相关文献和马尔文公司提供的化学兼容性材料《Hasteloy C-276 Alloy》。
3. 样品一定要经 0.22 um 滤膜过滤或离心，尤其是 syringe 内样品不能有颗粒、沉淀或过于黏稠，以免引起 Syringe、Filling Port、FPA 或者 Wash module 外部/内部管路的堵塞。
4. 样品 pH 尽量控制在 2-12 之间，强酸或强碱均会对仪器产生一定程度的腐蚀。
5. 仪器经常使用的话，cell 要彻底清洗后加满 ddH₂O，Syringe 要彻底清洗后保持干燥；如果很长时间不用，cell 要彻底清洗后将水吸走，Syringe 保持干燥。
6. 检查 Syringe 是否有腐蚀、裂纹和弯曲，如有以上情形，应马上更换 Syringe，避免引起 Pipette 腐蚀和数据问题。
7. 检查 Pipette 转动是否卡顿或者有异响，如有以上情形，应及时报修，否则会导致 Pipette 内部腐蚀加重而无法维修和使用。
8. FPA 使用时应垂直缓慢送入 Pipette 上样口，不用时应拧于 Wash module 台上小孔内。如果发现 FPA 漏气或中者头部密封垫裂开，应及时更换 FPA。
9. 建议每 300 次实验需更换 plunger tip，以免导致漏液而腐蚀 Pipette。
10. 洗液(尤其是 Buffer 或者水)至少应每周更换一次，以免滋生细菌而污染样品或堵塞管道。
11. 电脑拷数据须用光盘或格式化的优盘。
12. 严禁使用的 Buffer: 含氟的有机物、挥发性的、有腐蚀性的有机物、强酸、强碱等；纯有机物，如纯乙醇等；

七、维护与保养

1. 每天维护：样品要离心或者过滤，实验前后均应彻底清洗 syringe 和 cell。
2. 每周维护：更换洗液，并使用 14%Decon90 于 60°C 浸泡 60 min 彻底清洗两个 cell。观察 syringe 和 plunger tip 是否需要更换。
3. 年度维护：需工程师来维护(收费)。
4. 长期存放：如果仪器需要长期闲置，样品池和参比池应保持充满状态。运行彻底的清洗脚本（Plates Clean）。断开电源，并盖上防尘罩。