



マイクロカロリメトリー: ITC & DSC

New Castle, DE USA

Lindon, UT USA

Saugus, MA USA

Hüllhorst, Germany

Shanghai, China

Beijing, China

Tokyo, Japan

Seoul, South Korea

Taipei, Taiwan

Bangalore, India

Sydney, Australia

Guangzhou, China

Eschborn, Germany

Wetzlar, Germany

Brussels, Belgium

Etten-Leur, Netherlands

Paris, France

Elstree, United Kingdom

Barcelona, Spain

Milano, Italy

Warsaw, Poland

Prague, Czech Republic

Sollentuna, Sweden

Copenhagen, Denmark

Chicago, IL USA

São Paulo, Brazil

Mexico City, Mexico

Montreal, Canada





マイクロカロリメトリー

等温滴定カロリメトリー(ITC)および示差走査カロリメトリー(DSC)は分子の結合現象および構造安定性の詳細な特性評価のための優れた分析技術です。ITCによる熱力学の結合シグネチャーは結合現象の強さだけでなく、特異的あるいは非特異的な駆動力を伴う作用も表しています。DSCの構造安定性プロファイルは高次構造の強弱を明白にし、個々のドメインおよび相互作用を定義します。TAインスツルメントのAffinity ITC, Nano ITC, Nano DSCは創薬、タンパク質相互作用、構造機能特性など様々なアプリケーションに必要な性能、信頼性、使い易さを提供します。

Affinity ITC & ITC Auto

等温滴定カロリメータ



Affinity ITCおよび **Affinity ITC Auto**は高感度、高再現性、そしてより高度なITCテクノロジーを必要とするライフサイエンスのラボ用に設計されています。**Affinity ITC** は最高品質のITCデータを保証することで測定のすべての重要な局面に優れた技術を提供します。

特徴:

- AccuShot™ 最良の攪拌のために適切な位置に滴定サンプルを送液
- FlexSpin™ 革新的な低速攪拌、効率的な混合と最高の感度を提供
- 完全に自動化され、ユーザーが選択可能なクリーニングシステムは、測定間に生じるコンタミを排除
- 正確で信頼性の高い滴定のためのインテリジェントハードウェアポジショニング
- 等温温度制御用の固体素子アクティブヒーティング＆クーリング
- 標準容量セル(1.0mL)または低容量セル(190 μ L)を選択可能
- 業界実績の高い96ウェル、温度制御型液体オートサンプラー
オートサンプラーは最初に購入、あるいは後日追加購入も可能
- 強力な制御用ソフト"ITCRun"と、測定の最適化、モデルフィットティング、バッチ解析、グラフ作成、データエクスポートなど多岐にわたる機能の優れた解析用ソフト"NanoAnalyze™"

TAインスツルメントはこれまで行われてきたITC測定をさらに完璧にします。
Affinity ITCは、幅広い分子間相互作用の測定のための優れたツールです。
優れたITCデータ生成おいて、経験の浅いITCユーザーおよび上級のITCユーザー双方にもっとも高い信頼性を提供します。



Affinity ITC のセルは、広範囲のサンプルの化学的性質において最大の測定精度を提供するために形状、材料、および容量において最適化されています。

セル容量の選択:

Affinity ITCは滴定するサンプルセルおよびリファレンスセルの2つ固定式セルを特徴とします。1.0mL(標準容量)と190 μ L(低容量)の2つのセル容量を選択可能です。

どちらの構成においても自動化が可能です。セル容量の選択は測定するかい離定数(K_d : mM~nM)の範囲および利用可能なサンプル量により決まります。TAインスツルメントの経験豊かなアプリケーションチームが、特定の測定条件に最適な装置構成をご推奨します。

円筒セルジオメトリ:

円筒セルジオメトリは攪拌の効率を最大化し、競合装置のデザインに起こりがちなデッドゾーン(攪拌効率が悪くなる領域)や気泡発生を排除します。

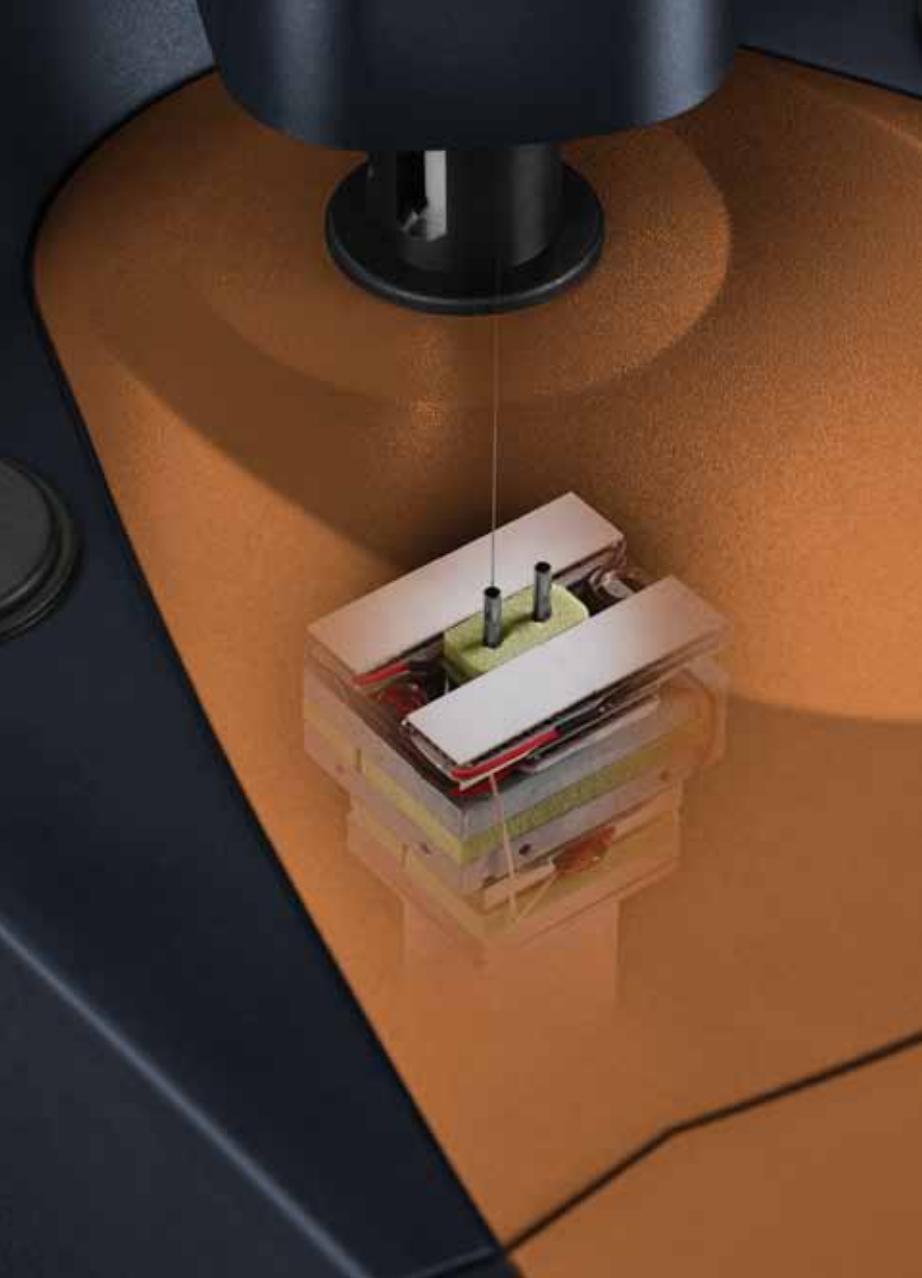
セル構成:

測定精度と応答性を最大限にするために、Affinity ITC標準容量型は99.999%の24金(Au0)あるいはハステロイから構成されます。低容量型は金(Au0)のセルのみに選択可能です。高い熱伝導率および強酸や強塩基で洗浄可能である金の不活性な化学的特性は超高感度ITC装置の望ましい選択肢となるでしょう。



低容量
(190 μ L)

標準容量
(1.0mL)



固体素子による温度制御および入力補償操作。Affinity ITCはサンプルおよびリファレンスセルの積極的な加熱-冷却(アクティブヒーティング/クーリング)に複数の固体熱電素子を利用します。

アクティブヒーティング/クーリングの利点:

- ・設定温度間における素早いヒーティングおよびクーリング
- ・設定温度への迅速な温度平衡化
- ・長時間のITC測定におけるドリフトを排除

結合反応の結果として起こる発熱あるいは吸熱は、ヒーター出力がサンプルとリファレンスセル間の温度差をゼロに維持するために調整された後の変化量として熱電素子により検出されます。入力補償と熱電温度制御の組み合わせはITCのための最速の応答性および最高の分解能を保証します。

FlexSpin™

新しい FlexSpin テクノロジーはITC測定のもっとも重要な面のひとつである攪拌を劇的に改善します。

特徴:

- 革新的なパドル形状、そして滴定機構からの分離により、よりよい攪拌、よりシャープなピーク、より早いベースラインへの復帰を実現
- より効果的な攪拌および滴定サンプルの正確な送液はピーク幅を最大50%まで減少
- 改善されたサンプル送液システムは40%まで平衡時間を減少
- 繊細なサンプル構造を保護しながら最高の感度を得るためによりゆっくりとした攪拌速度（競合装置の約1/10）
- 円筒セル形状との組み合わせによりデッドゾーンを排除
- 柔軟な支持体による懸架で、位置ずれによる損傷の可能性を排除





滴定の精度や位置は最高品質のITCデータを入手するために重要です。AccuShot滴定システムはこれらの要素を最適化するために設計されています。AccuShotはいつでも適切な位置に正確なサンプル量を滴定します。

特徴:

- ・滴定システムは攪拌メカニズムから分離
- ・シリンジニードルはより効率的な混合、よりシャープなピークのために攪拌パドルの上部に滴定サンプルを送液
- ・高精度ステップモーターにより0.01～250 μ Lのもつとも正確な送液を実現
- ・改良されたサンプル送液システムにより40%まで平衡時間を減少
- ・非常に細い滴定カニューラの採用による最初の滴定に起こりがちなサンプルの拡散を最小化
- ・どのような測定にも対応できるシングルシリンジ
- ・迅速かつ容易に交換可能なシリンジ
- ・滴定シリンジを外すことなく容易に滴定サンプルをローディング可能
- ・滴定カニューラの内部、外部の完全自動クリーニング

Affinity ITC Auto

テクノロジー



これまで行われてきた測定をTAインスツルメントはさらに完璧にします。Affinity ITCが使われている今日のライフサイエンスラボにおいて、一般的な自動化と液体ハンドリングテクノロジーの組み合わせによりTAは自動化、高スループットITC測定のための最も優れたプラットフォームを作成しました。

Affinity ITC オートサンプラー:

- HPLCグレード液体ハンドリングシステム
- 設置面積の小さい卓上型
- サンプルは2つの96ウェルプレートに設定
- ユーザー選択可能な温度制御(4°C～室温)
- サンプル流路全体をクリーニング可能
- 迅速な分析および記録のためのバッチファイル処理
- サンプルスループット:測定条件により1日あたり10～50検体
- NanoAnalyze™における最適化ツールはユーザーを適切な測定パラメータに導きスループットを最大化



Affinity ITC Auto

インテリジェントハードウェアポジショニング

これまでのITCオートサンプラーは、シリンジの位置ずれ、破損や湾曲、信頼性の問題がありました。インテリジェントハードウェアポジショニングによりこれらの問題が解消され、Affinity ITCにおける正確で信頼性のあるシリンジの自動配置が保証されます。

特徴:

- ・アライメントタブはセルローディングニードル、攪拌メカニズムおよび滴定カニューラをサンプルセルへ正確に配置することを保証します。
- ・独自設計のセルフアライメントアームは、安全で間違いのないポジショニングを提供します。

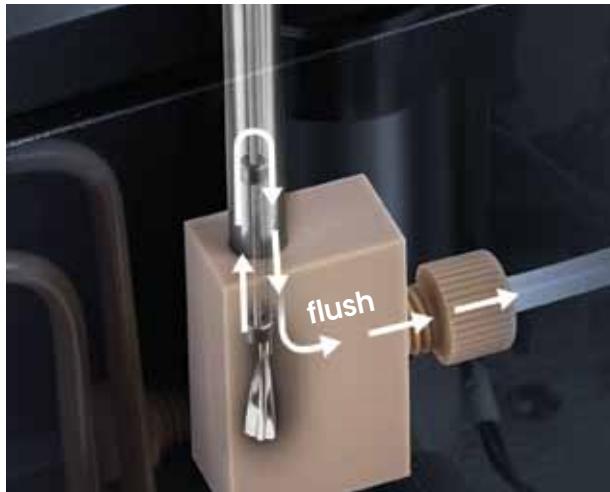
Affinity ITCのインテリジェントハードウェアポジショニングは、ユーザーに安全性、確実性、無人の連続操作のための新しいレベルの信頼性を提供します。



Affinity ITC Autoに搭載されている自動クリーニングシステムは、システム全体がサンプル測定ごとに洗浄されることを保証します。これにより測定間で生じるクロス-コンタミネーションを完全に排除します。

クリーニング特徴:

- ・攪拌/滴定シリンジおよびセルクリーニング/充填のための専用洗浄/リヌスステーション
- ・ユーザーがプログラム可能なクリーニングルーチンは保存、検索が可能
- ・オートサンプラー送液シリンジとニードルを含む主要コンポーネントの内部および外部表面の完全自動クリーニング
- ・ユーザーが選択可能な5つの洗浄用溶液
- ・サンプル流路の完全クリーニング



専用洗浄ステーション



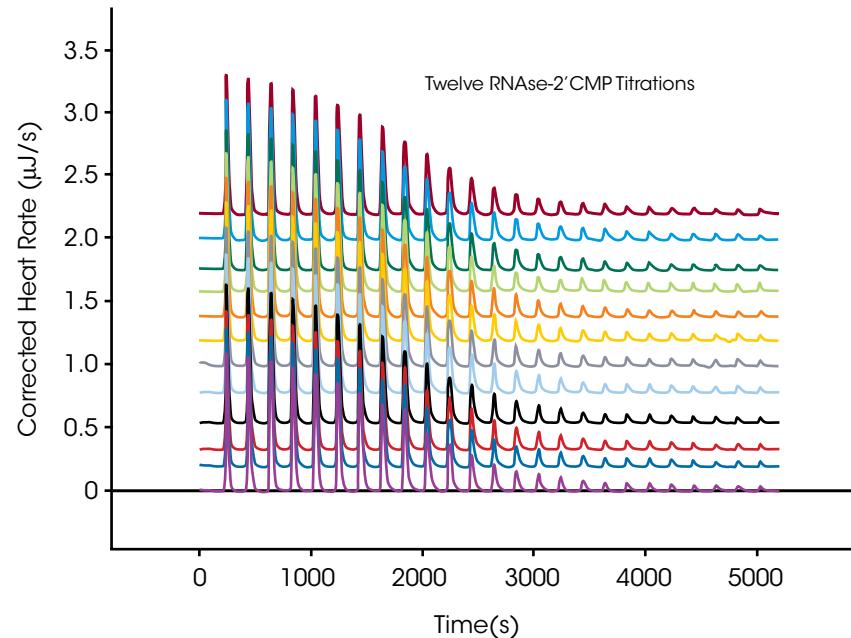
オートサンプラー流路選択バルブ

	Affinity ITC Auto	Affinity ITC
滴定/攪拌 クリーニング	完全自動化	完全自動化
セルクリーニング	完全自動化	クリーニングツール
セルフリーリングクリーニング	完全自動化	マニュアル

Affinity ITC Auto

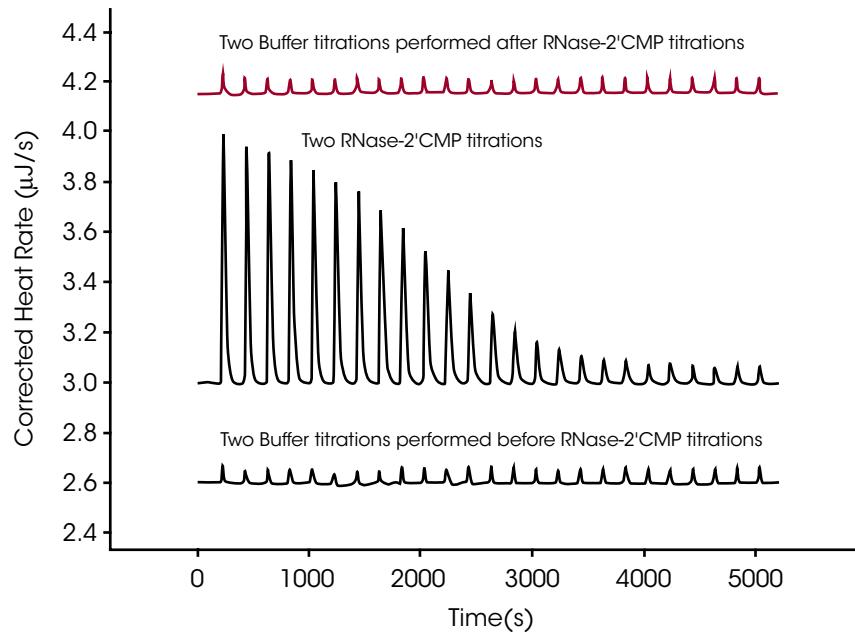
性能データ

Affinity ITC Auto 再現性



Affinity ITC Autoは最高の感度および信頼性を伴う優れたサンプル再現性を提供します。図は各測定間にシステム洗浄を行なながら実行された12測定の結果を示しています。データプロットはわかりやすいようにオフセットされています。

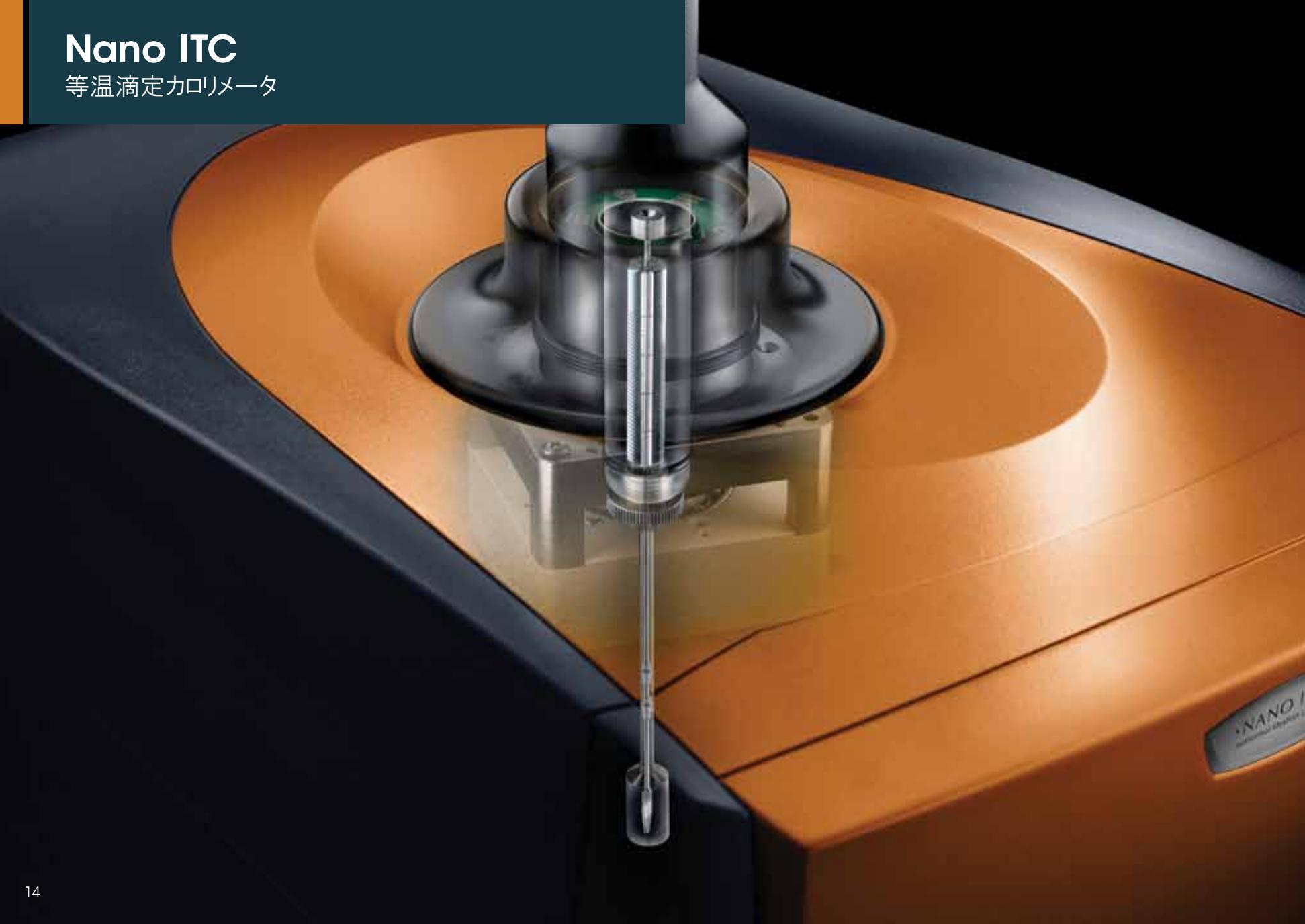
Affinity ITC Auto クリーニング効果



完全なシステム洗浄はAffinity ITC Autoの装置制御ソフトウェアによりユーザーがプログラム可能です。5つの溶媒ポートから選択することにより、サンプル流路全体が清潔であることが保証されます。タンパク質-リガンド滴定後のバッファー滴定の結果はAffinity ITC Autoの洗浄プロトコルにおいて高い信頼性があることを示しています。

Nano ITC

等温滴定カロリメータ



NANO ITC は **Affnity ITC** に備わっている多くの高性能技術を特徴とします。広範囲のアプリケーションにおいて競合システムよりも優れた汎用性のある、高感度および費用効の高い等温滴定カロリメータです。

特徴:

- ・標準容量(1.0mL)あるいは低容量(190 μ L)セルを選択可能
- ・真の等温温度制御のための固体素子アクティピヒーティング&クーリング
- ・正確な滴定サンプル送液のための高精度滴定ピュレット
- ・迅速で信頼性のあるローティングおよびクリーニングのための独自の取り外し可能な滴定シリジ
- ・強力な制御用ソフト"ITCRun"と、測定の最適化、モデルフィッティング、バッチ解析、グラフ作成、データエクスポートなど多岐にわたる機能の優れた解析用ソフト"NanoAnalyze™"



NANO ITCのセルは広範囲のサンプルの化学的性質において最大の測定精度を提供するために形状、材料および容量において最適化されています。

セル容量の選択:

Nano ITCはサンプルセルおよび参照用リファレンスセルの2つの固定式セルを特徴とします。1.0mL(標準容量)と190 μ L(低容量)の2つのセル容量が選択可能です。

セル容量の選択は測定するかい離定数(K_d : $\text{mM} \sim \text{nM}$)の範囲および利用可能なサンプル量により決まります。TAインストルメントの経験豊かなアプリケーションチームが、特定の測定条件に最適な装置構成をご推奨します。

円筒セルジオメトリ:

円筒セルジオメトリは攪拌の効率を最大化し、競合装置のデザインに起こりがちなデッドゾーン(攪拌効率が悪くなる領域)や気泡発生を排除します。

セル構成:

測定精度と応答を最大限にするために、Nano ITC標準容量型は99.999%の24金(Au0)あるいはハステロイから構成されます。低容量型は金(Au0)のセルのみに選択可能です。高い熱伝導率および強酸や強塩で洗浄可能である金の不活性な化学的特性は超高感度ITC装置の望ましい選択肢となるでしょう。



低容量
(190 μ L)

標準容量
(1.0mL)

Nano ITCはサンプルおよびリファレンスセルの積極的な加熱-冷却アクティブヒーティング/クーリングに複数の固体熱電素子を利用して、ユニークな取り外し可能なビュレットおよび滴定シリンジは容易なサンプルローディングと正確なサンプル送液を行うことができます。

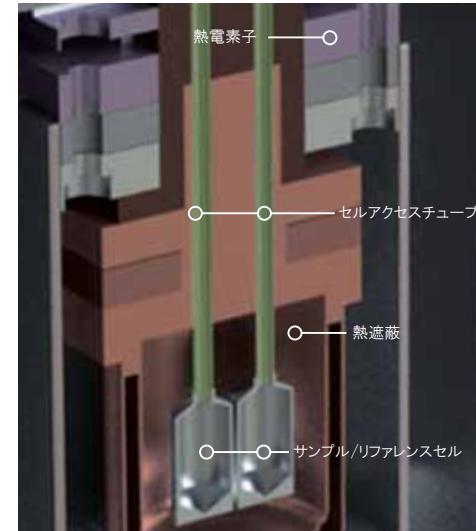
アクティブヒーティングおよびクーリングによる正確な温度制御:

- ・設定温度間における素早いヒーティングおよびクーリング
- ・設定温度への迅速な温度平衡化
- ・長時間のITC測定におけるドリフトを排除

結合反応の結果として起こる発熱あるいは吸熱は、ヒーター出力がサンプルとリファレンスセル間の温度差をゼロに維持するために調整された後の熱電素子により検出されます。入力補償と熱電温度制御の組み合わせは、ITCのための最速応答および最高の分解能を保証します。

独自の滴定ビュレットおよび取り外し可能なシリンジ:

- ・滴定量送液の正確な制御およびユーザーが選択可能な攪拌スピードは独自の容易に取り外しできるビュレットにより可能
- ・取り外しできる滴定シリンジはクリーニングと容易なサンプルローディングが可能
- ・短時間の滴定用のシリンジへの部分充填は装置制御ソフトウェアでユーザーがプログラム可能



The Power of ITC

理論

ITC 理論

すべての分子間相互作用は、以下により特徴づけられる熱力学特性を持っています。

- ・結合定数 (K_a)
- ・エンタルピー (ΔH)
- ・エントロピー (ΔS)
- ・化学量論 (n)

ITCはラベルフリーによる直接測定で結合反応間の熱の発生および吸収を検出します。

一般的な結合測定から得られるデータを右図に示します。それぞれの滴定ピーク毎の積算領域は活性種のモル比に対してプロットします。次に結合モデルとフィッティングさせることで、エンタルピー (ΔH)、結合定数 (K_a) および化学量論比 (n) を直接決定します。

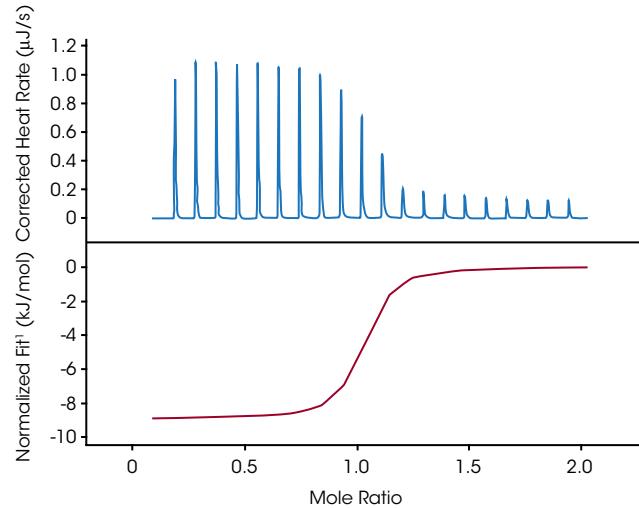
ギブズ(自由)エネルギーは結合係数 K_a から直接計算されます。

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a$$

エントロピー (ΔS) 項における変化も直接計算されます。

$$\Delta G^\circ = \Delta H - T\Delta S$$

ITCはラベル化あるいは固定化を必要とせず、薬剤探索やバリデーション、分子変異体の比較およびタンパク質間相互作用などの生命科学分野におけるラボの生産性を最適化するためのもっとも高感度で正確な測定方法と考えられる優れた分析技術です。



熱力学は結合の性質を明らかにする

ΔG°	結合定数
ΔH	エンタルピー
ΔS	エントロピー

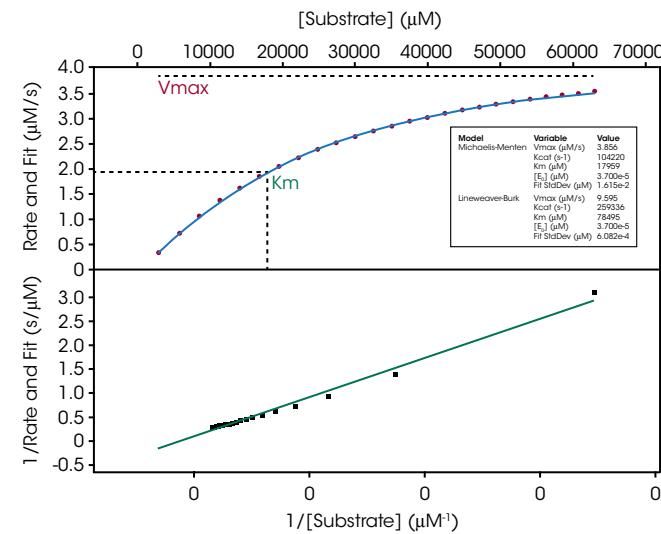
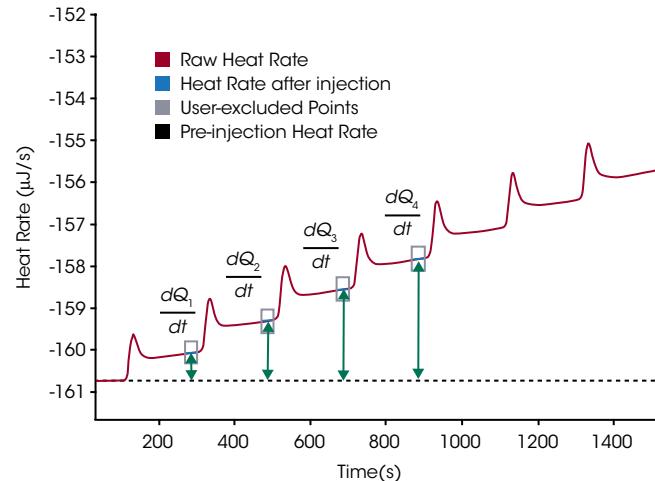
ITCを用いた酵素反応速度論

結合に加えて、等温滴定カロリメータは酵素反応速度論分析を行うための優れたツールです。酵素反応の基質濃度依存熱流束は速度論分析およびミカエリメンテン式の反応パラメータの決定に用いられます。:

利点:

- ・ラベル化、固定化あるいは修飾が不要
- ・溶液濁度による制限なし
- ・新規酵素-基質反応の理想的な特性評価
- ・反応が停止することなく連続測定

熱流束変化および反応エンタルピーはマルチプル・インジェクション法(上図)を用いて容易に、かつ正確に決定されます。ミカエリメンテン、ラインウィーバー-バークプロット(下図)は、反応速度論パラメータを決定するための上図のデータ適合に用いられます。



低容量と標準容量の比較

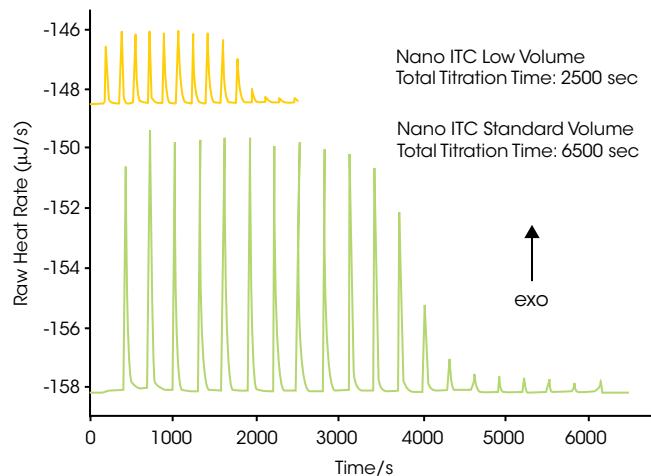
Nano ITC LVの感度は、より短時間に少ないサンプルで正確かつ再現性のある結果を生成します。Nano ITC SVとLVは様々なITC測定を行うための柔軟性や感度を提供します。

Nano ITC(LV)低容量型:

- サンプルセル = KHCO_3 ; 0.36 mM
- 滴定シリンジ = HCl; 4.2 mM
- 滴定量 = 1.4 μL
- 滴定間隔 = 175 秒
- 高度な感度
- 短時間の滴定
- 最小のサンプル量でデータを最大化

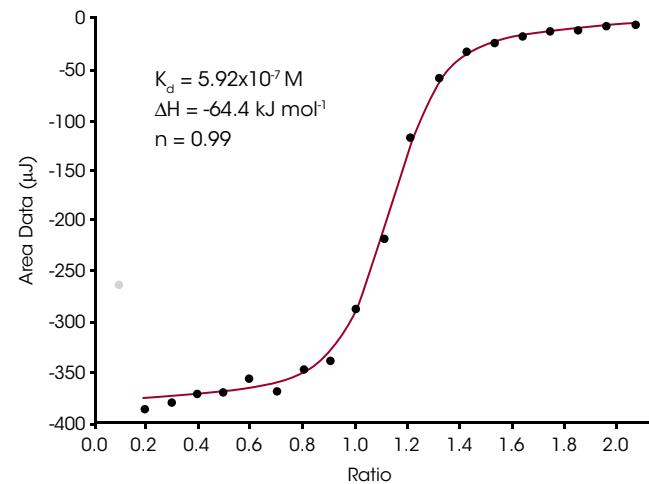
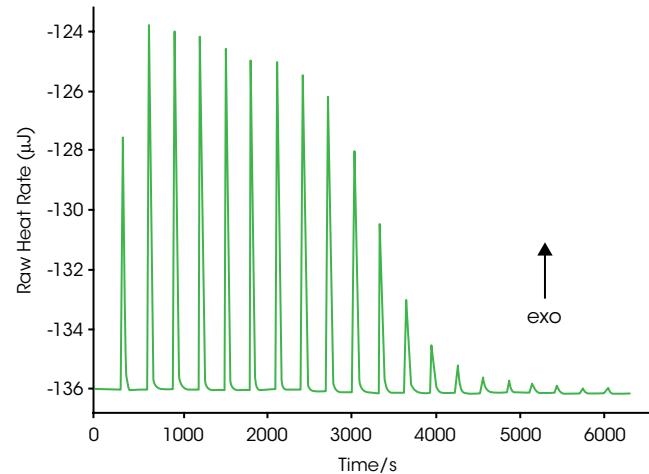
Nano ITC(SV)標準容量型:

- サンプルセル = KHCO_3 ; 0.36 mM
- 滴定シリンジ = HCl; 5.6 mM
- 滴定量 = 5 μL
- 滴定間隔 = 300 秒
- より多くのサンプル量をロード可能
- 分子間相互作用が高親和性および低熱量値の時でも高品質データを生成



ITCによる結合相互作用のキャラクタリゼーション

すべての結合現象は、発熱または吸熱に伴ってエンタルピー(ΔH)変化を伴います。1回のITC測定で結合反応の完全な熱力学キャラクタリゼーションを得ることができます。適切な実験計画により現象の進行に伴って結合の化学量論比(n)およびかい離定数(K_d)のような分子間相互作用に関する基本的な情報が取得できます。最初の図はRNase A中に阻害剤として2'-CMPを5 μ lずつ20回、逐次滴定したときの典型的な滴定結果を示します。 $(n=0.99, K_d = 5.92 \times 10^{-7} \text{ M}, \Delta H = -64.4 \text{ kJ mol}^{-1})$ 下図は同じ実験を示しており、横軸に2つの結合分子の割合、縦軸に積分して求めたピーク面積をプロットしたものです。結合が飽和状態になるにつれて、1回の滴定で発生する熱量が減少していきます。結果として得られる滴定曲線は、熱量計内で起こる反応のエンタルピー(ΔH)、エントロピー(ΔS)、ギブズ(自由)エネルギー(ΔG^0)の情報を明らかにします。ITCは優れた分析ツールであり分子の結合反応の基本的な駆動力を特徴づけるためのもつとも感度の高い分析法です。

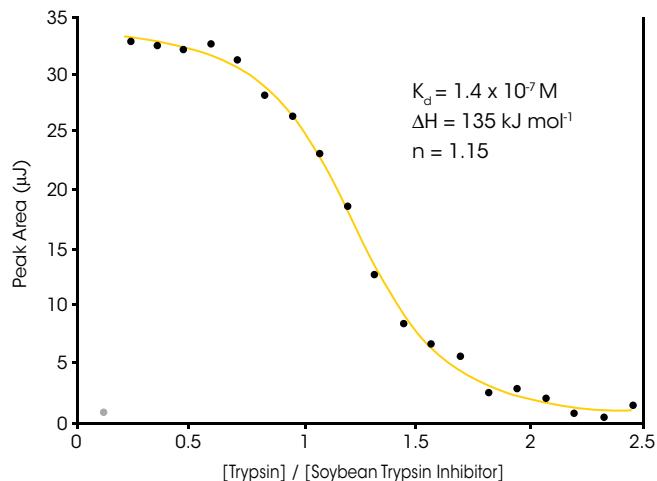
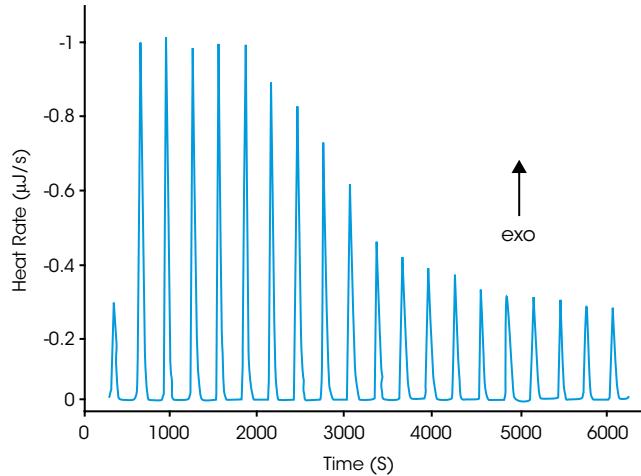


タンパク質相互作用:

2つのタンパク質が相互作用して結合することでコンフォメーションが変化し、結合部位付近にある溶媒が再配列するとき、結果として吸熱または発熱が起ります。ITCによる反応熱の定量化により、結合相互作用の熱力学的考察、結合の化学量論比、結合定数を提供することができます。Nano ITCを使用して大豆トリプシン阻害剤にブタ臍臓トリプシンを滴定した結果です。装置温度を25°Cに保ちつつリガンド5 μLを20回サンプルセルに滴定しました。

上図: 阻害剤にタンパク質を逐次滴定したときに発生したシグナル(熱)

下図: 発熱ピークの面積を継続的に積分; 阻害剤に対する滴定液のモル比
[トリプシン/トリプシン阻害剤]を横軸、各ピークの μ Jを縦軸にプロット
しています。

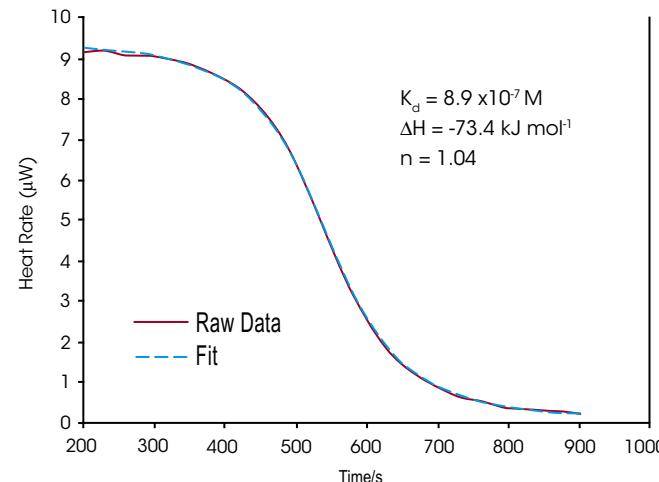
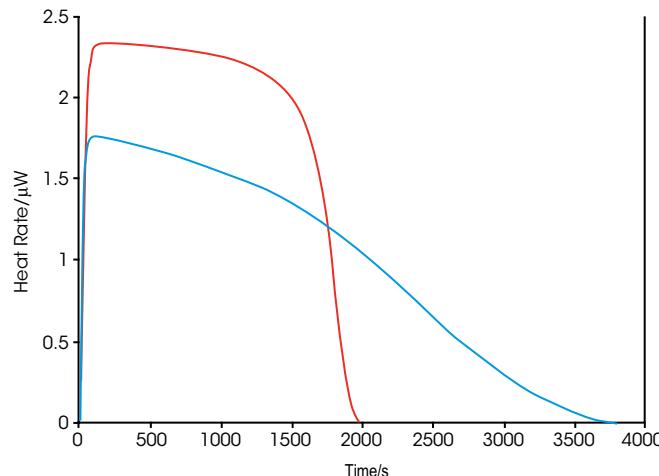


酵素反応速度のキャラクタゼーション

あらゆる反応は発熱または吸熱するので、原理的に熱量測定によって調べることができます。実際に反応速度論的にITCを使用することでEC分類の代表的な酵素を分析できることが示されています。また、ITC分析は迅速、正確、非破壊で、生理合成および人工合成基質両方と適合し、分光学的手法のように高感度であり、蛍光標識や化学修飾が不要です。重要なことは、酵素の反応速度のITC分析も簡単であることです。図は拮抗阻害剤であるベンズアミジンが存在する(赤)、または存在しない(青)BAEE溶液中に10 μ Lのトリプシン溶液を1回滴定した加水分解の結果を示しています。両曲線下の面積(物質が完全に生成物に代わるために要した熱量を示す)は、阻害剤のあるなしにかかわらず同じであり、両条件での反応濃度(K_M)とエンタルピー(k_{cat})と同様に阻害定数も計算できます。

連続滴定法

連続滴定法は非常に速い結合反応を示すサンプルについて、従来の逐次滴定法に代わる魅力的な手段となります。連続滴定試験は、通常の逐次滴定よりも短時間で完了することができます。この手法により広い結合定数範囲で化学量論比(n)とエンタルピー(ΔH)を正確に決定することができます。連続滴定と逐次滴定はNano ITC SV, LV両装置で実行でき、装置やソフトウェアの改良は必要ありません。



Nano DSC, DSC Auto

示差走査熱量計



Nano DSCは分子安定性のキャラクタリゼーション、高親和性リガンド結合の決定およびマルチドメイン構造の解析のための汎用性と精度を有します。 **Nano DSC** や **Nano DSC Auto**のような独自の技術、高性能およびサンプルスループットを備えるDSCは他にありません。

特徴:

- ・最高感度、優れた性能の低容量セル
- ・凝集あるいは沈殿しやすいサンプル分析用に設計されたキャピラリーセル
- ・セル内の圧力を正確かつ一定に維持する内蔵型の高精度加圧システム
- ・加熱および冷却スキャン中の正確な温度制御のための固体熱電素子
- ・信頼性のある高サンプルスループットのための業界実証済のHPLCグレードオートサンプラーシステムへのアップグレードが可能



Nano DSCは希釈溶液内の生体分子が加熱あるいは冷却されることにより、構造変化に伴って発生する吸熱または発熱現象を超高感度に測定するように設計されています。

キャピラリーセル、固体熱電温度制御および容易な洗浄は多種多様なアプリケーションのための最高の感度とデータ再現性を保証します。

特徴：

- 疎水性サンプル分析用の300 μ L実効体積キャピラリーセル
- ラボ用ピペットマンを用いて簡便、正確なサンプルローディング
- 内蔵型のユーザープログラム可能の加圧システム(最大6atm)
- 容易な実験セットアップのための柔軟なデータ収集インターフェース
- 正確なモデルフィッティングや複数ファイルのバッチ処理のための
NanoAnalyzeTMソフトウェア



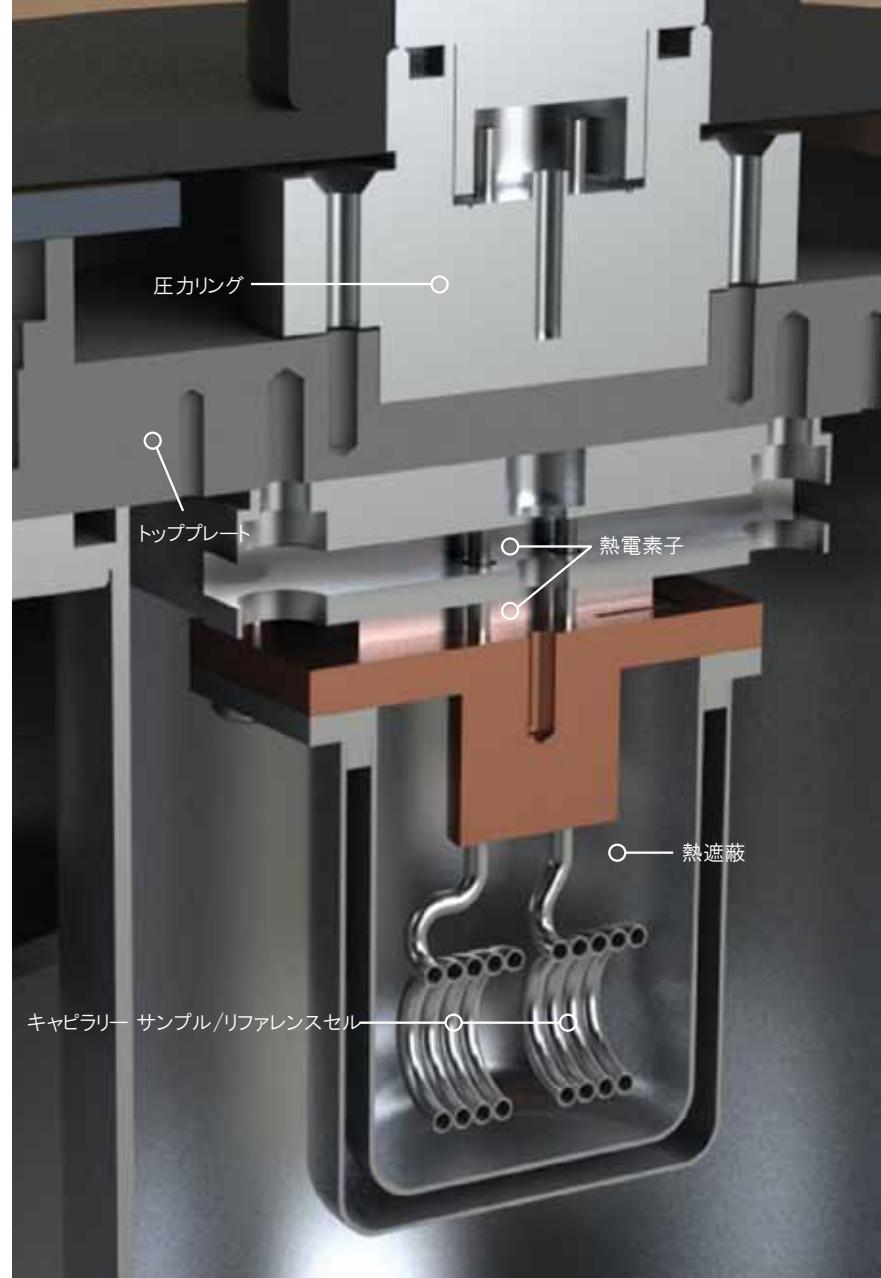
Nano DSC は、300 μL キャピラリーセル設計および固体熱電温度制御を用いた優れた熱走査装置です。

Nano DSC キャピラリープラチナセル

- ・固定キャピラリーセルにより凝集および沈殿が減少
- ・プラチナセルは不活性であり、強酸や強塩基およびタンパク質洗浄酵素と互換性がある
- ・300 μL の実効セル容量によるサンプル消費の最小限化
- ・ラボ用ピペットマンによるサンプルセルローディングは簡単かつ気泡発生を排除

Nano DSC 固体熱電温度制御

- ・加熱および冷却スキャンにおける最高の感度と優れたベースライン再現性のための正確で再現性のある温度制御
- ・水の特性や分子構造の複合体分析のため、革新的かつユーザーがプログラム可能な内蔵型圧力システム
- ・スキャンの柔軟性およびデータ分析においてもっとも信頼性の高い、ユーザーがプログラム可能なスキャン速度



Nano DSC オートサンプラーは感度および信頼性のどちらも犠牲にすることなく、真の`自動化'を実現します。DSCセルにサンプルをロードおよび送液する、業界実績のある96ウェルプレートオートサンプラーです。ユーザープログラム可能な洗浄ルーチンはサンプルのコンタミを防ぎ、96ウェルフォーマットによりサンプルスループットを最大化します。

オートサンプラー特徴：

- ・信頼性の高い業界実績のあるHPLCオートサンプラー
- ・オートサンプラーインターフェースを通してNano DSCと容易に接続
- ・2つの96ウェルプレートは4°Cまでの温度でサンプルを保管
- ・オートサンプラーインターフェースにおける4つのウォッシュ/リンス溶媒ポートはユーザーがプログラム可能
- ・2つの排出口は、サンプルおよびリファレンスセルからのサンプルあるいはマッチングバッファー/溶媒溶液の収集が可能
- ・オートサンプラーはNano DSC制御用ソフトウェアによりプログラム可能

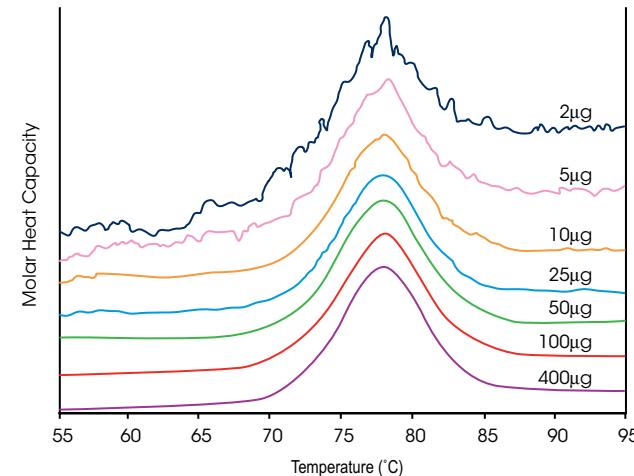


Nano DSC

アプリケーション

DSC測定にどのくらいのタンパク質が必要か?

表面プラズモン共鳴または蛍光分析とほぼ同量のタンパク質を使用して、Nano DSCで示差走査熱量測定(DSC)によるタンパク質の熱力学的パラメータを決定することができます。極めて高感度でベースラインの再現性もよく、少ないサンプル量(300 μ L)で測定できるため、研究対象のタンパク質の正確な測定結果を得ることができます。装置の感度と正確度は右表によって裏付けられます。これはpH4.0グリシン緩衝液中のニワトリ卵白リゾチームを様々な濃度で調製し測定を行いました。キャピラリーセル内のわずか2 μ gのリゾチームでも表記載の4つ全ての熱力学的パラメータの正確な値を示すことができます。



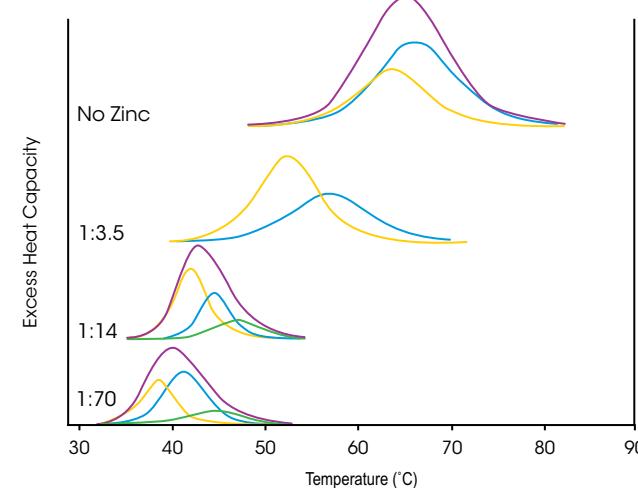
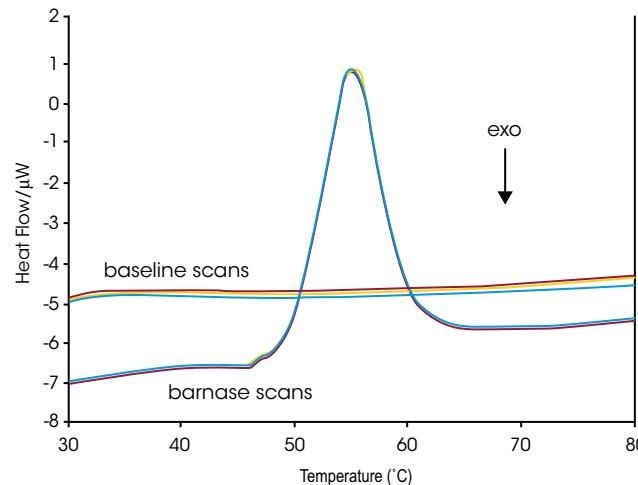
Lysozyme in cell (50 μ g)	Calorimetric		Van't Hoff	
	ΔH (kJ mol $^{-1}$)	ΔS (kJ K $^{-1}$ mol $^{-1}$)	T_m (°C)	ΔH (kJ mol $^{-1}$)
400	512	1.46	78.0	515
100	512	1.46	78.0	509
50	517	1.47	77.9	513
25	513	1.46	77.8	513
10	515	1.47	78.0	515
5	490	1.40	78.0	510
2	503	1.43	77.8	499

タンパク質安定性のキャラクタリゼーション

希薄溶液中のタンパク質の安定性を分析する方法の一つに、定圧下での部分モル熱容量(ΔC_p)の変化を研究する方法があります。熱量測定された熱容量(部分比容)のタンパク質への寄与は、解析前のサンプルデータから緩衝液ブランクを引き算することによって求められます。タンパク質サンプルを加熱すると、最初はベースラインがわずかに上昇しますが、加熱し続けると、ある温度領域以上では熱によってアンフォールディング(変性)してしまうので、吸熱ピークを生じます。変性が完了すると、吸熱は収まり新しいベースラインに落ち着きます。ブランクを引き算した後のデータが、変性過程の完全な熱力学キャラクタリゼーションの研究のための分析に使用されます。

タンパク質構造のキャラクタリゼーション

リガンドの特異的結合(レセプター結合部位への薬剤の結合等)または非特異的結合(タンパク質表面の疎水性パッチと界面活性剤の結合等)の特徴付けにDSCを用いることができます。リガンド結合では、たとえ特異的なレセプター結合部位であっても、複合体全体を不安定化さく質構造の再配列が起こることがあります。図は様々なタンパク質/Zn²⁺比についてのウシ α ラクトアルブミンをCa²⁺で飽和させたサンプルを1°C/minでDSC測定した結果を示しています。タンパク質が熱変性するT_m値は、Zn²⁺が存在しない場合は65°Cですが、Zn²⁺比が1:70の時は35°Cまで減少します。変性のエンタルピーも高濃度のZn²⁺によって大幅に減少しています。

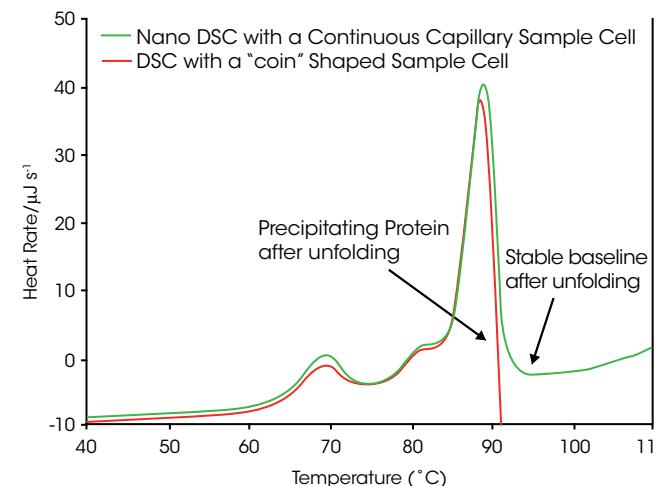
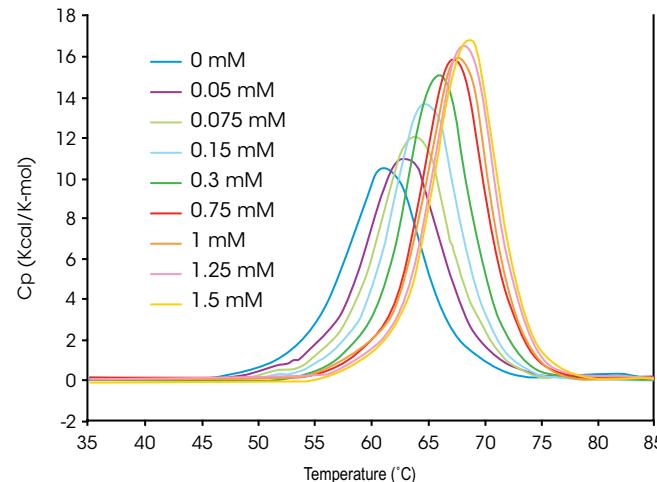


タンパク質リガンド結合の研究

DSCは生体高分子と薬剤のような生体巨大分子のリガンドとの結合を研究するための重要なツールです。DSCはITCと異なり、最低限の加熱昇温をすることで結合反応が引き起こす高分子のコンフォメーション変化を促します。極めて強い結合または相互作用がゆっくりおこる結合の特徴付けに特に有効です。また、DSCはITC測定では使用できない有機溶媒溶液(ITCに必要な有機溶媒へのリガンドの溶解によってタンパク質を変性させてしまう可能性がある)を使って結合反応の特徴付けを行うことができます。図は、2'-CMP濃度を増加させたときの RNaseAの DSCスキャンを示し、タンパク質が高濃度の阻害剤によって安定化したことを示しています。有機溶媒はDSC測定と相性が良いことが確かめられており、5% DMSOの存在下でもほぼ同じデータが得られます。

Nano DSC キャピラリーセルの利点

図は2種類のDSCによる生理緩衝液中のヒトIgG-1_0.5mg/mlを測定した結果を示しています。”コイン型”のサンプルセルを持つDSCのデータでは89~90°Cで、大きな凝集/沈殿によっておこる発熱反応が確認できます。一方、キャピラリーセルを持つNano DSCのデータは、融解温度(T_m 値)とエンタルピー(ΔH)を完全かつ正確に測定できる安定したベースラインを示しています。



装置制御およびデータ入手ソフトウェア

AffinityおよびNanoシリーズの装置制御および入手機能は、Windows対応のソフトウェアインターフェイスのITCRunあるいはDSCRunにより実行されます。すべての実験パラメータおよびサンプル情報は直感的なグラフィカルユーザーインターフェースで入力され、将来の使用のための実験テンプレートとして保存できます。

実験の進行に伴う生データのリアルタイムモニタリングにより、個々のタブでデータ品質と機器性能を迅速に評価することができます。測定中のリアルタイムベースライン減算のようなユニークなアイコン制御機能は、ディスプレイ上で常に使用できます。

ITCRun & DSCRun 特徴：

- ・自動あるいは非自動装置のユーザーインターフェースの自動設定
- ・装置の性能特性および生データ取得のリアルタイムモニタリングのための各個の表示タブ
- ・容易な実験設定
- ・自動化された装置のオートサンプラーの直接プログラミングと制御
- ・ソフトウェアはすべての実験パラメータをNanoAnalyze™へ伝達



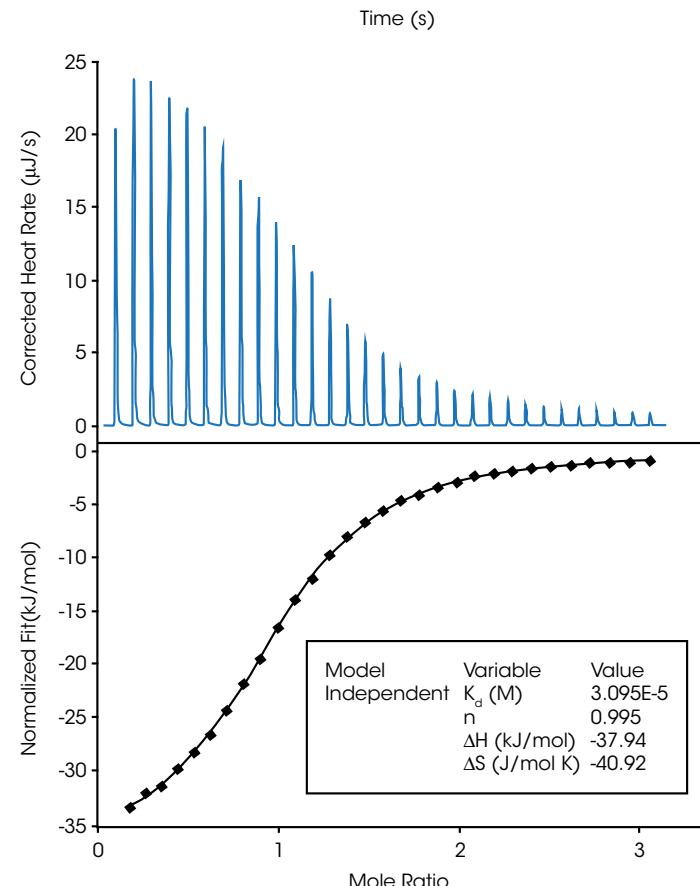
NanoAnalyze™ によるデータ分析

すべてのITCおよびDSCの生データファイルは、優れたITC/DSCデータ解析ソフトウェアNanoAnalyzeにより簡単かつ迅速に分析されます。各処理ステップの個々のウインドウタブは個々の生データファイルあるいは複数のファイルのバッチ処理の分析を介してユーザーを導きます。

NanoAnalyze™ 特徴：

- すべてのITCおよびDSCの生データファイルを容易にインポート
- ユーザーが選択可能なITCおよびDSCのフィッティングモデル
- 新たなフィッティングモデルも簡単にセットアップ
- ベースラインブランクファイルのドラッグおよびドロップ減算
- 優れた実験デザイン最適化ツール
- 迅速なデータ比較のための柔軟なグラフ重ね合わせ機能
- 熱力学的プロファイルの棒グラフの作成
- テキストファイルにすべてのデータを簡単にエクスポート
- 出版品質の画像を作成するためのフル機能を備えた編集ツール

ITCおよびDSC用の装置制御、データ取得およびデータ解析ソフトウェアはAffinityおよびNanoシリーズの装置に備えられています。またすべてのソフトウェアアップデートと機能改善は弊社のウェブサイトから入手できます。



Affinity ITC & ITC Auto

	標準容量	低容量
最小検出熱	0.1 μ J	0.04 μ J/0.05 μ J
最大検出熱	5,000 μ J	5,000 μ J
低ノイズレベル	0.0025 μ W	0.0013 μ W/0.0014 μ W
ベースライン安定性	0.02 μ W/hr	0.02 μ W/hr
温度安定性	$\pm 50 \mu$ C (25°C 設定時)	$\pm 8 \mu$ C/ $\pm 50 \mu$ C(25°C 設定時)
温度安定性	アクティブヒーティング & クーリング	アクティブヒーティング & クーリング
操作温度範囲	2 ~ 80°C	2 ~ 80°C
サンプルセルサイズ	1.0 mL	190 μ L
滴定シリジ容量	最大250 μ L	最大250 μ L
最小滴定容量	0.01 μ L	0.01 μ L
攪拌速度範囲	0 ~ 200 rpm	0 ~ 200 rpm
応答時間	13 秒 / 18 秒	3.3 秒/11 秒
セルジョメトリ	固定円筒	固定円筒
セル材質	24金またはハステロイ	24金またはハステロイ

オートサンプラー仕様

オートサンプルートレイ 温度

保存温度	4°C～室温	4°C～室温
サンプル収容数	96 検体(96穴タイタープレート)	96 検体(96穴タイタープレート)
洗浄/リンスバッファーポート	5個	5個

Nano ITC

	標準容量	低容量
最小検出熱	0.1 μ J	0.05 μ J
最大検出熱	5,000 μ J	5,000 μ J
低ノイズレベル	0.0025 μ W	0.0014 μ W
ベースライン安定性	0.02 μ W/hr	0.02 μ W/hr
温度安定性	±0.00005 °C (25°C 設定時)	±0.00005 °C (25°C 設定時)
温度安定性	アクティブヒーティング & クーリング	アクティブヒーティング & クーリング
操作温度範囲	2 ~ 80°C	2 ~ 80°C
サンプルセルサイズ	1.0 mL	190 μ L
滴定シリジ容量	100 μ L, 250 μ L	50 μ L
最小滴定容量	0.12 μ L/0.26 μ L	0.06 μ L
攪拌速度範囲	0 ~ 400 rpm	0 ~ 400 rpm
応答時間	13 秒 / 18 秒	11 秒
セルジオメトリ	固定円筒	固定円筒
セル材質	24金またはハステロイ	24金またはハステロイ

Nano DSC & DSC Auto

短期ノイズ	0.015 μ W
ベースライン安定性	0.028 μ W
応答時間	5 秒
操作温度範囲	-10 ~ 130°C
温度スキャン速度	0.001 ~ 2°C/分
圧力摂動	6 atmまで内蔵
セル容量	300 μ L/330 μ L
セルジオメトリ	固定キャビラリー/円筒
セル材質	プラチナ/金
熱測定タイプ	入力補償

オートサンプラー

サンプル容量	490 μ L/サンプルウェル/800 μ L/リファレンスウェル
サンプルトレイ保存温度	4 °C ~ 室温
洗浄/リンスバッファーポート	サンプル/リファレンスセル用4つ;サンプルハンドリングシリジ用2つ

References

- Garbett, N., DeLeeuw, L. and J.B. Chaires. MCAPN-2010-04.
High-throughput DSC: A Comparison of the TA Instruments Nano DSC Autosampler System™ with the GE Healthcare VP-Capillary DSC™ (2010)
- Demarse, N. and L.D. Hansen. MCAPN-2010-01.
Analysis of Binding Organic Compounds to Nanoparticles by Isothermal Titration Calorimetry (ITC). (2010)
- Quinn, C.F. MCAPN-2010-02. Analyzing ITC Data for the Enthalpy of Binding Metal Ions to Ligands. (2010)
- Quinn, C.F. and L.D. Hansen. MCAPN-2010-03. Pressure Perturbation Calorimetry: Data Collection and Fitting. (2010)
- Román-Guerrero, A., Vernon-Carter, E.J. and N.A. Demarse. MCAPN-2010-05. Thermodynamics of Micelle Formation. (2010)
- TA Instruments, Microcalorimetry Technical Note MCTN-2010-02.
Advantages of Using a Nano DSC when Studying Proteins that Aggregate and Precipitate when Denatured. (2010)
- TA Instruments, Microcalorimetry Technical Note, MCTN-2010-03. How to Choose an ITC Cell Volume. (2010)
- Baldoni, D., Steinhuber, A., Zimmerli, W. and A. Trampuz. Antimicrob Agents Chemother 54(1):157-63. In vitro activity of gallium malto-late against Staphylococci in logarithmic, stationary, and biofilm growth phases: comparison of conventional and calorimetric susceptibility testing methods. (2010)
- Choma, C.T. MCAPN-2010-01. Characterizing Virus Structure and Binding by Calorimetry. (2009)
- Wadsö, L. and F.G. Galindo. Food Control 20: 956-961. Isothermal calorimetry for biological applications in food science and technology. (2009)
- Baldoni, D., Hermann, H., Frei, R., Trampuz, A. and A. Steinhuber. J Clin Microbiol. 7(3):774-6.
Performance of microcalorimetry for early detection of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. (2009)
- Trampuz, A., Piper, K.E., Hanssen, A.D., Osmon, D.R., Cockerill, F.R., Steckelberg, J.M. and R. Patel. J Clin Microbiol. 44(2):628-631.
Sonication of explanted prosthetic components in bags for diagnosis of prosthetic joint infection is associated with risk of contamination. (2006)
- Microcalorimetry - A Novel Method for Detection of Microorganisms in Platelet Concentrates and Blood Cultures. Andrej Trampuz, Simone Salzmann, Jeanne Antheaume, Reno Frei, A.U. Daniels University of Basel & University Hospital Basel, Switzerland (2006)
- Data provided by Svensson, Bodycote Materials AB, Sweden (2003)
- Wingborg and Eidsater, Propellants, Explosives and Pyrotechnics, 27, 314 -319, (2002).
- Schmitt, E.A., Peck, K., Sun, Y. and J-M Geoffroy. *Thermochimica Acta* 380 (2):175-184. Rapid, practical and predictive excipient compatibility screening using isothermal microcalorimetry. (2001)
- Schmitt, Peck, Sun & Geoffroy, *Thermochim. Acta*, 380, 175-183, (2001).
- Thermometric Application Note 22034 (2001).
- Hogan, S.E. & G. Buckton. *Int. J. Pharm.*, 207, 57-64. The quantification of small degrees of disorder in lactose using solution calorimetry. (2000)
- Chemical & Engineering News, June 18, 2007, Page 31. Hongisto, Lehto & Laine, *Thermochim. Acta*, 276, 229-242, (1996).
- Bermudez, J., Bäckman, P. and A. Schön. *Cell. Biophys.* 20, 111-123.
Microcalorimetric Evaluation of the Effects of Methotrexate and 6-Thioguanine on Sensitive T-lymphoma Cells and on a Methotrexate-Resistant Subline. (1992)
- Bystrom, Thermometric Application Note 22004, (1990).
- Thermometric Appl. Note 22024.



tainstruments.co.jp

ティー・エイ・インスツルメント・ジャパン株式会社

本 社 〒141-0031 東京都品川区西五反田5-2-4レキシントン・プラザ西五反田6F
TEL(03)5759-8500 FAX(03)5759-8508

大阪営業所 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10新大阪トヨタビル10F
TEL(06)6303-6550 FAX(06)6303-6540

www.tainstruments.co.jp

*製品の仕様は予告なく変更される場合があります。ご了承ください。