

# Tycho NT.6

# 用户手册





目录

1. 关	于本手册
2. Ty	rcho NT.6系统
2.1.	常规5
2.1.1.	预期用途
2.1.2.	IEC标准要求5
2.1.3.	识别标签5
2.2.	技术资料6
2.2.1.	技术规格6
2.2.2.	输入和输出连接7
2.3.	法规7
2.4.	有限保修8
3. 安	天全信息9
3.1.	符号和描述9
3.2.	使用和误用9
3.3.	安全说明10
<b>4.</b> Ty	rcho NT.6设置11
4.1.	交付范围11
4.2.	拆箱11
4.3.	启动12
4.4.	时区设置12
4.5.	毛细管架12
4.6.	电源支架13
4.7.	清洗14
4.8.	远程访问14
4.9.	软件更新15
5. 使	期Tycho NT.6
5.1.	术语和定义16
5.2.	检测原理及结果输出16
5.3.	一般用法17
5.4	应用

$\sim$			
	5.4.1.	<b>ニマルーニス</b> 相似性检测	. 18
	5.4.2.	功能检测	. 19
	5.4.3.	分析优化	. 20
	5.5.	帮助功能	. 20
	5.6.	运行实验	. 21
	5.6.1.	Tycho毛细管	. 21
	5.6.2.	上样	. 22
	5.6.3.	检测	. 24
	5.7.	注释	. 24
	5.8.	搜索检测数据结果	25
	6. 结果	具和数据评估	. 26
	6.1.1.	热变性曲线和显示选项	. 26
	6.1.2.	比率Ratio	. 27
	6.1.3.	拐点温度(T <sub>i</sub> )	. 27
	6.1.4.	样品亮度	. 28
	6.2.	比较和参照	. 28
	6.3.	数据导出	. 29
	6.3.1.	原始和处理后的数据	. 29
	6.3.2.	热变性曲线图片	. 30
	7. 故障	〕排除	. 31
	7.1.	毛细管断裂	. 31
	7.2.	停止测量	. 31
	7.3.	打开Tycho NT.6系统的舱门	. 31
	7.4.	重启Tycho NT.6	. 32
	7.5.	客户支持	. 32
	8. 运输	前和处置	. 33
	8.1.	重新包装运输	. 33
	8.2.	废物处理	. 33
	8.3.	系统处置	. 33

# 1. 关于本手册

本手册为正确使用Tycho NT.6系统提供指导,涵盖了系统规格、安全注意事项和安装,以及为何及如何使用Tycho NT.6进行实验。请在开始之前仔细阅读本手册,并确保完全理解其内容。请将此手册保留在系统附近,以备将来参考。如果丢失,请访问Nanotempertech.com/explorer的NanoTemper Technologies Explorer Community,以下载本手册。

## 2. Tycho NT.6 系统

### 2.1. 常规

#### 2.1.1. 预期用途

Tycho NT.6执行快速、精确的热稳定性检测,以检查蛋白质的质量。该系统仅用于研究目的,不用于诊断目的。

#### 2.1.2. IEC标准要求

考虑了以下安全和电磁标准:

- IEC 61010-1:2010 检测、控制和实验室用电气设备的安全要求。第1部分:一般要求
- IEC 61010-2-010:2014 检测、控制和实验室用电气设备的安全要求。第2-010部分:对实验室材料加热设备的特殊要求。
- IEC 61326-1:2006 EMC,用于检测、控制和实验室用途的电气设备 EMC 要求。
- IEC 61000-3-2:2006 EMC,谐波电流发射限值(设备输入电流高达每相 16A(含 16A))。
- IEC 61000-3-3:2008 电磁兼容性, 限制

#### 2.1.3. 识别标签

识别标签 (图1)位于设备的后面板上。它包括制造商信息、系统型号名称和序列号 (SN)、电气 要求以及 CE 符合性符号。

<del></del>			DC Power
		Tycho NT.6	
Manufactured by			
NanoTemper Technologies GmbH		Voltage 12V DC	
81369 Muenchen   Germany		Polarity ⊖–€–⊕	
nanotempertech.com		Max. Current Input 4 A	
Made in Germany		SN: T6 - XXX	🚱 (E 🕱

图1: Tycho NT.6的识别标签。

通过点击"Start"界面上的 ①,可以找到系统的序列号及其软件和固件版本及其 IP 地址(如果连接到 LAN)。



## 2.2. 技术资料

## 2.2.1. 技术规格

电流		
外部输入电源	90-264 VAC ± 10%, 47-	63 Hz, 230 VA max
外部输出电源	12 VDC, 4.75 A max	
输入Tycho NT.6系统电流	12 VDC, 4 A	
环境		
工作温度	15-30 ℃(仅限室内 用)	计使
储存温度	-20-30 °C	
湿度	0-80%,无冷凝	
工作高度	max 1000 m	
Tycho NT.6尺寸	仅限系统	包括毛细管站和电源支架
宽度	31 cm (12.2")	35.5 cm (14")
高度	37 cm (14.5")	37 cm (14.5")
深度	18 cm (7")	21.5 cm (8.5")
重量	6.6 kg (14.6 lbs) net	7.4 kg (16.3 lbs) net
所需的工作台空间	31 cm W x 27.5 cm D	35.5 cm W x 31 cm D
电源尺寸		
宽度	10.1 cm (4")	
高度	3.5 cm (1.4 ")	
深度	5 cm (2")	
重量	0.23 kg (0.51 lbs) net	
温度控制		
加热范围	35°C-95°C	
热变性升温速度	30°C/分钟	
温控精度	±0.05 °C/分钟	

#### 2.2.2. 输入和输出连接



类型	功能	位置
以太网	通过以太网电缆将系统连接到 LAN 的步骤 背板	
直流电源	将系统连接到电源 背板	
USB	连接 U 盘,以进行数据导出。请只连接usb兼容的存储媒体	前面板

### 2.3. 法规

- 1. NanoTemper Technologies不对因产品使用而造成的任何间接损害承担直接或间接 责任。
- 2. 禁止使用NanoTemper Technologies 软件:
  - 为备份以外的目的复制软件
  - 将软件使用权转让或许可给第三方
  - 有关软件的机密信息的披露
  - 修改软件
  - 在多个工作站、网络终端或通过其他方法使用软件,
- 3. 本手册的内容如有更改, 恕不另行通知, 以便进行产品改进。
- 4. 本手册在出版时被认为是完整和准确的。
- 5. 本手册不保证任何专利权或其他权利的有效性。
- 6. 如果NanoTemper Technologies软件程序失败导致错误或操作不当,则可能是由笔记本电脑 (PC)上运行的另一个程序的冲突引起的。在这种情况下,请通过卸载冲突的软件来采取纠正 措施。
- 7. NanoTemper是NanoTemper Technologies GmbH在德国和其他国家/地区的注册商标。
- 8. 未经授权的转售是不允许的。



#### 2.4. 有限保修

除非另有说明,否则NanoTemper Technologies销售的产品自发货之日起一年内不得在材料和工艺方面存在缺陷。如果在此保修期内发现产品中的任何缺陷,NanoTemper Technologies将免费维修或更换有缺陷的部件或产品。

本保修不适用于由以下原因导致的缺陷:

- 1. 安装不当或不充分。
- 2. 操作、维护、调整或校准不当或不充分。
- 3. 未经授权的修改或误用。
- 4. 使用未经授权的毛细管和配件。
- 5. 使用非授权 NanoTemper Technologies 分销商提供的耗材、一次性用品和零件。
- 6. 由于使用不当的溶剂、样品或周围气体造成的腐蚀。
- 7. NanoTemper Technologies无法控制的事故,包括自然灾害。

本保修不包括毛细管、试剂、标签试剂盒等耗材,也不包括正常的磨损。

本保修单项下提供的所有零部件和维修的保修期与原产品的保修期相同。有关维修服务的查询,请在确认NanoTemper Technologies系统的型号名称和序列号后联系NanoTemper Technologies (见 2.1.3)。

## 3. 安全信息

为确保操作安全,该系统必须正确运行。在操作系统之前,请仔细阅读本章内容,以充分了解所 有必要的安全预防措施。

### 3.1. 符号和描述

本章介绍本手册中使用的安全符号和说明,以及系统上的标签。

请花点时间了解一下警告信号词!、警告和注意在本手册中的含义。

- **警告! 警告!** 表示潜在的危险情况,如果不加以避免,可能导致严重伤害甚至死亡。
- **小心** "小心"表示存在潜在危险情况,如果不加以避免,可能会导致轻度或中度伤害。"小心"也可用于提醒不要损坏设备或系统。

不要超出"警告"或"小心"范围,直到您了解危险情况并采取适当措施。

**注意**"**注意**"提供附加信息,帮助操作员实现最佳的体系和分析性能。



阅读手册标签。此标签表明您在使用本系统前必须阅读使用手册。该标签位 于设备的背面

警告标志。这个符号表示表面可能会发热并引起烧伤。此警告标签放置在样 品托盘上。

### 3.2. 使用和误用

只有在阅读并完全理解本用户手册后,才能使用Tycho NT.6系统。只有在完全符合要求状态下才能使用系统。如果系统出现任何损坏迹象,请停止操作并联系NanoTemper Technologies客户支持。 不要以任何方式修改系统。请勿将其用于其预期用途以外的任何目的。



3.3. 安全说明

警告系统门可能会夹到手指。打开和关闭门时保持手指安全。

**注意** 热表面会导致皮肤灼伤。检测完成后,请勿立即触摸热敏元件(毛细管托盘的反光二氧化硅表面)。等到系统冷却下来。托盘温度在系统显示屏上显示。

警告系统中所含的UV-LED在运行时会发出不可见的紫外线辐射(UVB辐射),即使在短暂的暴露时间内也可能对眼睛和皮肤有害。请勿在操作过程中直接观察UV-LED。不要把手伸进仪器内。如果系统按预期使用,则不会暴露在紫外线辐射下。

**警告** 电击,火灾和皮肤灼伤的危险。请勿通过门以外的方式打开系统。不要伸手进入舱门内。仅 使用提供的电源或根据系统规格(例如SPU63-105,由Sinpro电子有限公司提供)的有限电源。请 勿使用延长线。立即更换损坏的电缆。

警告系统内的机械运动部件可能会伤害手或手指。不要伸手进入舱门内。

警告系统必须以一种不妨碍访问外部电源及其电源插头的方式安装

注意碎玻璃会割伤皮肤。如果显示屏玻璃破碎,请勿使用。

**警告** 在系统中使用有害或传染性物质可能会造成爆炸、内爆、气体释放或感染的风险。仅使用 非危险、非传染性的水性样品。根据毛细管中所含的物质以及当地适用的有关化学和玻璃废物 的规定处理用过的毛细管。

**注意** 供气不足会导致系统过热,从而导致性能欠佳。通过不覆盖系统背面的冷却风扇来确保足够的 空气供应。在系统和墙壁之间留出约5厘米的空间。

## 4. Tycho NT.6 设置

## 4.1. 交付范围

收到系统后,请检查包装内容的完整性。Tycho NT.6系统包包含以下物品:

项目	描述
Tycho NT.6系统	-
Tycho NT.6毛细管	用于Tycho NT.6检测的高精度玻璃毛细管 Cat# TY-C001
毛细管架	金属支架安装在系统的任一侧。包括毛细管和废物容器的位置
U盘	用于从系统拷贝数据
快速入门指南	信纸大小的工作表,解释Tycho NT.6的安装和设置。
应用指南	信纸大小的工作表,解释典型的应用实例和数据解释。
用户手册	本用户手册
电源	-
电源支架	金属支架,用于将电源固定在系统背面的位置

## 4.2. 拆箱

打开箱子,去掉上面的填充层。从隔间中取出较小的物品(电源,毛细管等),并取下第二层衬垫。 将手伸入Tycho NT.6 系统两侧的切口中,然后将其取出。打开仪器舱门,取下运输锁带(红色钩环) (见图2)。





图2:运输锁带(红色钩环扣)将样品托盘固定在Tycho的门上。抬起锁带的末端以将其取下。 建议保留所有原始包装,以备将来系统的运输之用。

#### 4.3. 启动

通过插入电源线,将Tycho NT.6系统连接到电源。系统将自动启动。准备就绪后,触摸显示屏将显示 "Start"。

如果需要远程访问,则通过背面的以太网网将系统连接到局域网(LAN)(请参见 4.8)。

### 4.4. 时区设置

首次使用Tycho NT.6时,系统会要求用户设置时区。检测的数据将以正确的时区时间显示。

可以在没有正确时区设置的情况下使用Tycho NT.6。在这种情况下,所有检测日期和时间都显示为UTC(协调世界时)。

若要修改时区设置,请导航到 "Start" 界面。点按<sup>①</sup>图标。点击编辑符号,然后从下拉菜单中选择正确的时区。

#### 4.5. 毛细管架

Tycho NT.6系统配有一个方便的毛细管架,便于毛细管处理(见图3)。通过向上倾斜来插入或取出 抽屉(图3B)。通过将支撑板滑入导轨直到其卡入到位,将毛细管架安装在Tycho NT.6的左侧或右 侧(Figure 3C)。 使用毛细管架储存毛细管小瓶。也用它来放置打开的毛细管小瓶,以方便取用毛细管进行上样(图3D)。完成后盖上毛细管小瓶。毛细管架的抽屉可用于收集用过的毛细管进行处理。



图3: Tycho NT.6毛细管架。(A)毛细管架底座(1)和抽屉(2)。(B)如何将抽屉插入底座。通过反转操作从底座上 取下抽屉。(C)通过将支撑板滑入导轨直到卡入到位,将毛细管架安装在Tycho NT.6系统的左侧或右侧。(D)在上样时, 将打开的毛细管小瓶放置在毛细管架的顶部,便于取用单个毛细管。

## 4.6. 电源支架

电源支架可以安装在Tycho NT.6系统的背面(见图4)。只需将支架板滑入后面的导轨,直到其 卡入到位。

13/34





图4: 在系统背面安装Tycho NT.6电源支架(1)。

### 4.7. 清洗

Tycho NT.6系统不需要任何定期维护。

在进行实验之前,请确保毛细管托盘(反光表面)无污垢和灰尘。用无尘纸蘸取99.8%乙醇清洁。

要清洁系统的外表面,请拔下背面的电源插头。用沾有水或乙醇的布擦拭表面,包括触摸显示屏。

## 4.8. 远程访问

Tycho NT.6界面可以通过浏览器从同一网络中的任何计算机远程访问,允许用户在办公桌上进行数据分析和导出。

要访问,请确保Tycho NT.6系统通过背面的以太网连接器连接到局域网(LAN)。打开浏览器窗口, 在地址栏中输入Tycho系统的IP地址。可以通过点击"Start"界面上的<sup>①</sup>找到该地址。远程访问功能 针对谷歌浏览器进行了优化,也可以使用其他浏览器。

Tycho在连接到网络时会自动分配一个 IP 地址。请注意,这仅适用于使用 DHCP 服务器并自动将 IP 地址分配给新设备的网络。

根据确切的网络配置,有必要通过将新设备的MAC地址列入白名单来手动"允许"新设备进入网络。也可以通过点击"Start"界面上的 ① 找到 MAC 地址。

根据本地网络配置,在重启Tycho NT.6系统时,IP地址可能会改变。如果连接在浏览器中被添加为书签,则在重新启动后可能需要使用新的IP地址更新书签。

目前不支持 IP 地址固定和/或手动分配的其他类型的网络。

## 4.9. 软件更新

将包含软件更新文件的 U 盘连接到Tycho NT.6 系统。更新将自动开始。按照用户界面上的说明继续操作。

软件更新文件可从NanoTemper Technologies获得。有关详细信息,请联系客户支持。

当前在系统上运行的软件和固件版本可以通过点击"Start"界面 ① 找到。



# 5. 使用Tycho NT.6

## 5.1. 术语和定义

本节介绍使用Tycho NT.6检测的参数。有关更多详细信息,请参见第5.8章。

样品的相对总荧光强度量化为样品亮度。Tycho NT.6系统使用一个确定的
参考样品进行校准,该样品产生的样品亮度为1。样品亮度与激发功率无
关,因此可以作为定量比较不同样品荧光强度的检测方法。如果样品含有
相同的蛋白质,例如在比较不同批次时,样品亮度也可用于精确确定蛋白
质浓度的差异。

 Ratio
 在检测过程中,仪器将记录每个样品在330nm和350nm处的荧光强度。在

 350nm/330nm
 单波长检测中,监测在定义波长下荧光强度(亮度)随温度的变化。然

 而,350 nm/330 nm比值是色氨酸(Trp)残基发射光谱变化的检测值。

Initial ratio	35°C时350 nm / 330 nm比值。
Δ ratio	35℃和95℃之间的比率差(检测的开始和结束)。
Similarity	检测毛细管和参考毛细管变性轮廓的相对相似性。轮廓相似性是通过比较轮廓曲线下的面积来确定的。

### 5.2. 检测原理和结果输出

蛋白质的变性导致其荧光氨基酸残基(主要是色氨酸和酪氨酸)的荧光发射特性的变化。Tycho NT.6通过在热变性期间记录样品在330nm和350nm处的荧光来跟踪变性过程。对样品施加30℃/min 的恒定加热,加热幅度为35℃至95℃。

记录的荧光信号显示为亮度,并对温度作图。生成的曲线称为热变性曲线,并自动分析曲线拐点,也称为拐点温度 (T<sub>i</sub>)。亮度比350nm/ 330nm用于确定Initial ratio (在35°C时)和△ ratio (35℃时的初始比值与95℃时的最终比率之间的差异)。所有这些参数都将以如图5样所示。它们可用于比较热变性曲线,以分析样品之间相似性。



图 5: 典型热变性,示出Initial ratio和Δ ratio和Ti。

## 5.3. 一般用法

Tycho NT.6执行快速,精确的热稳定性检测,以检查蛋白质的质量。它记录热变性曲线,自动确定 拐点温度(T<sub>i</sub>)并量化样品亮度,Initial ratio和 a ratio。这些参数可以对蛋白质样品的稳定性 和相对浓度得出深入的结论。有关应用示例,请参阅以下部分。

Tycho NT.6系统通过其内置屏幕进行控制。简单直观的用户界面使所有经验水平的用户都可以运行 实验。集成的帮助功能可解释所有功能和术语。除门外,没有杠杆,开关或可移动部件。无需关 闭系统。在检测之间,它将进入待机模式以节省能源。点击屏幕以唤醒系统。



图 6: Tycho NT.6通过进行3分钟的稳定性、功能性和相似性测试来辅助蛋白质纯化和表征工作流程的例子



5.4. 应用

#### 5.4.1. 相似性检测

相似性测试几乎可以在蛋白质研究的任何步骤中发挥作用。由Tycho NT.6量化的样品亮度参数也允 许浓度评估。因此,相似性测试可以极大地帮助您确保样品的可重复性。下面对一些示例进行了 解释,如图7所示:

- 建立最佳完整性的参考,以便与后期阶段或未来的表达批次进行比较。
- 将样品在任何时间点与先前的表达步骤或先前表达的同一蛋白质批次进行比较,以确定 它是否仍然具有折叠结构(或者它是否已经降解或变性)。
- 比较每种蛋白的不同储存或加速条件,以进行优化处理。 •

批次间比较



储存和稳定性



与参考样品相比, Δratio的降低表明折叠蛋白质(批次 Δratio的降低表明蛋白质在存储过程中发生变性 1) 较少。不同的热变性曲线表明蛋白质制备(批次2) 之 间的主要差异。

- 在蛋白质纯化制备的每个步骤中进行检测,以 确保批次间的相似性
- 识别和优化纯化工作流程中的关键步骤
- 快速识别蛋白质批次之间的主要差异

- 记录存储前后的热变性曲线
- 使用比较功能量化热变性曲线相似性,以监控制剂的 相对质量和一致性
- 在测试条件之前和之后相同的变性曲线表明,储存对 蛋白质质量的影响最小或没有影响

图 7: 相似性测试应用示例。

请注意,不同的缓冲液会影响蛋白质样品的荧光特性。我们建议仅当蛋白质处于同一缓冲 液中时才分析蛋白质的相似性。

#### 5.4.2. 功能检测

当已知配体可用以结合感兴趣的蛋白质时,可以进行功能测试,例如辅助因子,辅酶,抑制剂,ATP 等。当比较纯蛋白质和与配体混合的蛋白质的热变性曲线时,热变性曲线及其拐点温度(T<sub>i</sub>)的变 化表明两者是结合的。通常,实验开始时的Initial ratio和/或蛋白质的拐点温度(T<sub>i</sub>)在加入配体 时发生偏移,而未折叠状态的ratio是相似的,除非配体本身发出荧光。在这种情况下,建议使用单 波长数据来评估结合。

热漂移分析(Thermal shift)可以得出有关蛋白质功能性的结论。检查蛋白质表达中间步骤进行功能测试可以帮助识别关键步骤,并就后续检测及其有用性做出决定。下面对这些中间步骤的一些示例进行了解释,如图8所示:

- 在最初的纯化之后,了解蛋白质是否有足够的表达量和功能是否符合预期有助于决定如何向下进行。
- 色谱(尺寸排阻,离子交换,亲和力等)后,可以评估不同的洗脱馏分最佳活性蛋白含量。
- 在储存前测试最终纯化的蛋白质可以建立最佳完整性和功能的参考,以便与后期阶段 或未来的表达批次进行比较。
- 储存后再次测试可确保后续检测仅使用活性/功能蛋白进行。

折叠和功能

分析优化



纯化过程中样品无热变性拐点或热漂移表明蛋白质变性。

- 在纯化过程的每个步骤中执检测以验证蛋白质功能
- 关于配体、底物、离子或小分子的结合,快速回答 是/否
- 在配体存在的情况下, Initial ratio和/或T<sub>i</sub>的迁移 (热漂移)表明样品具有功能并发生结合

图 8: 功能测试和分析开发应用示例。



优化并确定能够更好地维持蛋白质稳定性的缓冲液或配 方。T<sub>i</sub>的缺失或迁移,或Δ ratio的减少表示样品不稳定和 变性。

- 进行更好的分析开发和优化
- 快速筛选用于检测或固定条件的缓冲液,例如 用于生物传感器实验



#### 5.4.3. 分析优化

分析优化也可以从Tycho NT.6的检测中受益。找到最佳的实验条件并排除那些破坏蛋白质稳定性的 条件(图8)。例如,在进行 SPR 实验之前,快速测试不同的固定和再生条件,以节省时间和金钱。 另一个例子是测试基于细胞检测的孵育条件,以确保蛋白质在整个测定过程中具有功能性。

#### 5.5. 帮助功能

Tycho NT.6用户界面包括一个帮助功能,该功能显示每个屏幕的解释性信息。点击上方栏中的 ② 图标可显示。该功能对屏幕上的各个项目都进行了简要说明(请参见图 9)。点击 <sup>③</sup>符号(位于屏 幕左上角)或屏幕底部以关闭帮助窗口并返回到常规用户界面。

$\in$ $\otimes$				Ready
Tycho NT.6 unfolding signal □ The unfolding signal can be displayed and analyz	ed in three different ways.	Display options  Unfolding profiles can be shown as derivative.	raw data points, smootl	ned curves or first
1.45 1.4 1.39				
Unfolding profiles I The chart displays the brightness signal of th temperatures (Ti) are indicated by vertical lines.	e individual capillaries plotted aga	inst the temperature. Detected inflection	Capillaries	capillaries to Sample3
	Tap here	e to close		

图 9: *帮助界面*。将显示相关主题的简要说明。每个屏幕都有自己的上下文相关信息。书籍符号表示有关此主题的更多 信息可在NanoPedia中获取。

对于标有书籍符号 □ 的项目,可在Tycho NT.6 NanoPedia知识库中找到更多详细信息(参见 图10)。点击该项目以打开NanoPedia。



图 10: Tycho NT.6 NanoPedia 知识库。NanoPedia包含与Tycho NT.6检测相关的信息。NanoPedia 内容标题按字母顺序排 序。链接到其他文章的单词将突出显示为蓝色。屏幕左侧的导航窗格允许轻松浏览。

NanoPedia包含与Tycho NT.6检测相关的信息。NanoPedia 内容标题按字母顺序排序。链接到其他文章的单词将突出显示为蓝色。屏幕左侧的导航窗格允许轻松浏览。

在 "Start" 界面上, ② 该图标将替换为 ③ 图标。点击它以获取有关NanoTemper Technologies客 户支持或Tycho NT.6系统(机身号, IP地址等)的信息,或更改时区。

## 5.6. 运行实验

#### 5.6.1. Tycho 毛细管

将样品装入一次性Tycho NT.6毛细管中。NanoTemper Technologies高科技毛细管旨在实现最大的 易用性和功能性。高纯度玻璃和精确的内径/外径具有出色的灵敏度和数据再现性。毛细管是自填 充的,以减少处理步骤,并且只需要几µL样品。每次检测最多可加载6个样品。



#### 5.6.2. 上样

在进行实验之前,请确保毛细管托盘(反光表面)无污垢和灰尘。用无尘纸蘸取99.8%乙醇清洁。

将样品吸取到毛细管中。有关如何吸取样品的可视化说明,请参见Tycho NT.6 用户界面和图11。若要在用户界面中访问这些说明,请点击"Start"界面上的"New measurement"。

- 1. 打开仪器舱门。
- 2. 打开毛细管托盘的磁性盖。
- 3. 在实验之前,用无尘纸蘸取99.8%乙醇清洁毛细管托盘的反光表面。保持托盘表面无灰尘、 污垢和划痕。

**注意** 热表面会导致皮肤灼伤。检测后不要立即触摸热敏元件(毛细管托盘的反光二氧化 硅表面)。等到系统冷却下来。托盘温度显示在显示屏上。

- 通过将毛细管浸入液体中来吸取样品。避免毛细血管外侧有液体。为此,请从样品表面吸 取,而不是将毛细管浸入样品中。完全填充毛细管。不要触摸毛细管的中心。
- 5. 将毛细管放在毛细管托盘上。确保毛细管是直插入,而不是斜插入。
- 6. 合上磁性盖。
- 7. 关门。点按"Start measurment"。















图 11: 如何将样本加载到Tycho NT.6 系统中。有关各个步骤的详细说明,请参阅文本。

23/34

#### MOTEMPER

#### 5.6.3. 检测

可以从"Start"界面开始检测,也可以通过点击"New measurement"从之前的检测结果界面开始检测。 从之前的检测结果界面开始新的检测时,用户可以决定是否将注释(毛细管标签和关键字)和 reference转移至新的检测中。这对于重复检测或类似样品的其他检测非常有用。

所有检测均以 30 ℃/min 的加热速率从 35 ℃ 升温至 95 ℃。在检测运行时,数据采集是实时显示的。对样品的注释或者对仪器数据的分析可并行进行。

要停止检测,请打开系统门。

**注意** 热表面会导致皮肤灼伤。加热时请勿触摸热敏元件(毛细管托盘的反光二氧化硅表面)。等待 系统冷却。托盘温度显示在系统显示屏上。

检测完成后, Tycho NT.6会自动冷却以进行下一次检测。在冷却期间保持门关闭,系统将以最快的速度冷却。显示屏显示开始下一次检测之前的剩余时间。在 20-25 ℃ 的环境温度下冷却大约需 要 3.5 分钟(舱门关闭)。

只有当系统内部温度低于 34 ℃ 时,才能开始检测。系统舱门可以随时打开,但建议仅在冷却完成 后才加载新样品,以尽量减少样品升温。

#### 5.7. 注释

有关注释的教学视频,请参阅随系统提供的 USB内文件。

可以通过两种方式对检测进行注释。首先,可以将关键字添加到检测本身。对检测关键字的建议是: 用户缩写,项目缩写,蛋白质名称,检测目的,如"批量比较","pH筛选","缓冲液测试"等。每个检 测可以有不限数量的关键字,每个关键字最多包含100个字符。检测的日期和时间将自动注释。

其次,可以对检测的每个单独的毛细管进行注释。一个注释标签最多可以包含40个字符。毛细管标记的典型例子是:蛋白质名称,浓度,批号,缓冲液类型以及"野生型","未处理"等细节。

关键词和注释标签都是可搜索的。要搜索检测结果,请点"Start"界面上的"Measurements",或点击屏幕 Q 左上角显示的放大镜符号。

注释的关键字和标签可以复制和粘贴。双击或长按某个字词以突出显示该字词。通过移动突出手柄 根据需要调整突出显示的部分。点按"Copy"。若要粘贴复制的文本,请长按要粘贴文本的位置, 然后轻点"Paste"。

#### 5.8. 搜索检测数据结果

有关搜索Tycho检测数据结果的教学视频,请参阅随系统提供的 USB。

可以通过点击检测或屏幕顶部的放大镜符号Q来访问检测数据结果。

可以通过以下方式(组合)搜索数据结果:

- 检测关键字或毛细管标签(请参阅5.7): 只需输入搜索字词即可。结果列表中将仅 显示包含搜索词的检测结果。
- 检测时间:轻点左上角的 "Select dates",然后使用滑块将时间范围缩小到所需的时间段/天。 结果列表中只会显示所选时间范围内的检测结果。

点击结果列表中的检测结果以查看或编辑它。再次点击放大镜符号 Q 返回到结果筛选列表。

需要再次显示检测的完整列表(不经过滤)时,请删除所有搜索词和时间范围选择。

Tycho可以保存大约 30 000个检测数据结果。

25/34

## 6. 结果和数据评估

#### 6.1.1. 热变性曲线和显示选项

蛋白质的变性导致其荧光氨基酸残基(主要是色氨酸和酪氨酸)的荧光发射特性的变化。Tycho NT.6通过在加热过程中监测样品在330nm和350nm处的荧光(亮度)来跟踪变性过程。将350nm/ 330nm的亮度比对温度作图,并且得到的图形称为热变性曲线(图12给出了说明和详细信息)。自动计算拐点温度 (T<sub>i</sub>)。 热变性曲线可以以不同的方式进行分析和显示。热变性曲线、亮度比、Δ ratio和拐点温度(T<sub>i</sub>)可以作为蛋白质的指纹。

通过比较这些参数,可以得出分析样本之间相似性的结论。请注意,不同的缓冲液会影响蛋白质 样品的荧光特性。我们建议仅当蛋白质处于同一缓冲液中时才分析蛋白质的相似性。

在某些情况下,显示原始数据点可查看最详细的信息,或者显示平滑的曲线以获得更好的概览。 平滑曲线的一阶导数是一种替代显示选项,可更轻松地可视化数据。在一阶导数中,变性的事件 以峰值(最大值和最小值)而不是拐点的形式呈现,后者在视觉上更容易识别。



图 12: Ratio模式(左)、Ratio的一阶导数(中心)和350 nm处的单波长检测模式下显示的典型热变性曲线 (右)。图中标明了拐点温度(T<sub>i</sub>)、Initial ratio(初始)比和 $\Delta$  ratio。

Tycho NT.6允许检测单波长亮度信号。在单波长检测(330 nm或350 nm)中,我们观察在定义波长下亮度随温度的变化。然而, 350 nm/330 nm的比率是色氨酸(Trp)残基的荧光发射曲线光谱变化的检测结果。这种转变发生在大多数未变性的事件中,并且是由Trp残基在蛋白质变性时所经历的环境变化引起的:在折叠状态下,色氨酸残基(Trp)通常被埋在蛋白质的疏水核心中,并在变性过程中暴露于表面。

由于350 nm / 330 nm的比率通常会随着温度的升高,从而消除自发荧光添加剂和一般荧光衰减的影响,因此这种检测模式通常比单波长检测更可靠。因此,单波长模式下无明显拐点的样品可能在350 nm / 330 nm的比率模式下得到明显且可信的拐点温度(T<sub>i</sub>)。

反之亦然,也可能在350nm/330nm的比率模式检测不到T<sub>i</sub>,但在单个波长数据中可见。因此,建议检查所有获得的数据,通过比较三种分析模式下的热变性曲线来获得重要的结构信息。

#### 6.1.2. 比率Ratio

350 nm / 330 nm比率(在35℃时)的初始值包含有价值的信息。该值主要取决于色氨酸(Trp)残基的量,特别是它们在蛋白质中的位置。典型的蛋白质350 nm / 330 nm比率范围从0.35(所有Trp残基均被埋藏)到1.4(所有Trp残基都暴露在溶剂中)。因此,初始比率的变化,例如在蛋白质储存后,可以表明去折叠蛋白质量的变化。对于没有Trp残基的蛋白质,起始值非常低(通常为<0.35)。

ΔRatio是与参考品进行比较的有价值的参数。它描述了35℃和95℃时比率的差异。该值也可以用作折 叠蛋白质含量的指标:例如,当比较同一蛋白质的不同批次时,较大的ΔRatio表示较高的折叠蛋白 质含量。相反,小的ΔRatio表示较低的折叠蛋白质含量。请注意,绝对ΔRatio特定于某一种蛋白质。 它只允许评估相对于同一蛋白的参考品的折叠蛋白质含量。



图 13: 典型热变性曲线,标注Ratio、Δ Ratio和 Ti。

#### 6.1.3. 拐点温度(T<sub>i</sub>)

每个拐点温度(T<sub>i</sub>)代表在样品中检测到的热变性事件。对比率信号自动计算拐点,并与轮廓曲线的拐点相对应。检测到的Ti在变性曲线标注为垂直线(参见图13)。在结果表中,列出了发生拐点温度。

色氨酸(和酪氨酸)荧光对其环境非常敏感,并且其所处环境在变性时会发生巨大变化。在折叠的蛋白质中,荧光残基通常位于其疏水核心区域。变性后,残基与(通常是水性)缓冲液接触。 这导致样品的荧光在发射强度和发射峰值波长方面发生变化,在热变性曲线上显示为拐点。

如果检测到一种蛋白质有多个Ti,这意味着该蛋白质具有多个独立变性的结构域。

如果在样本中未检测到 T<sub>i</sub>,则可能具有以下原因:

- 样品中的蛋白质没有变性,因为它已经变性。
- 变性的事件没有诱导内在荧光的可检测变化(罕见)。

#### MOTEMPER

#### 6.1.4. 样品亮度

样品的相对总荧光强度量化为样品亮度。Tycho NT.6系统使用定义的参考样品进行校准,该样品产生的样品亮度为1。样品亮度与激发功率无关,因此可以作为定量比较不同样品荧光强度的检测方法。如果样品含有相同的蛋白质,例如在比较不同批次时,样品亮度也可用于精确确定蛋白质浓度的差异。请注意,不同的缓冲液会影响蛋白质样品的荧光特性。我们建议仅当蛋白质处于同一缓冲液中时才分析蛋白质的相似性。

样品亮度是350 nm和330 nm处的亮度之和。

## 6.2. 比较和参照

Tycho NT.6允许比较来自不同检测的热变性曲线。有关比较和参照的教学视频,请参阅随系统提供的 USB。

在包含您要比较的毛细管的检测结果界面,点按"Comparison"。在左侧选择要比较的毛细管,然后 在右侧选择要比较的参照。使用检测关键字或毛细管标签搜索参照毛细管。搜索结果可以按最新优 先、选择频率或毛细管标签相似性进行排序。对要比较的所有毛细管重复上述步骤。完成后,点按 "Save"和"show"。屏幕上显示的比较结果与检测结果一起保存。

可以从不同的角度进行比较: 查看热变性曲线、拐点温度T<sub>i</sub>, 或数据(样品Intial ratio、 $\Delta$ ratio、样品亮度和热变性曲线相似性的汇总)。



"PROFILES"选项显示变性的热变性曲线。在左侧选择要显示的毛细管。彩色的热变性曲线为要比较的样品,而灰色热变性曲线为参照样品。垂直线表示拐点温度(T<sub>i</sub>)。



"T;" 选项显示比较中所有毛细管的拐点温度 (T<sub>i</sub>),按温度排列。彩色数字是指要比较的样品,而灰色数字是指参照样品。

DATA

"DATA"选项列出了样本的Intial ratio、Δratio和样品亮度。对于所有参数,彩色数 字是指要比较的样品,而灰色数字是指参照样品。最后,通过计算热变性曲线之 间的面积差,分析比较的热变性曲线的相似性,计算得到一个百分比值,具有完 美的相似性时,相似性为100%。

可以通过点击"Export USB"(在系统上)或单击"Download data"(远程访问时)来导出比较数据的 结果。比较数据结果始终与包含比较样品的检测结果(而不是包含参照样品的检测结果)一起导出。

比较将自动保存在系统中,并可在重新打开结果文件时访问。要覆盖以前保存的比较解雇,请点击" Select references"。接下来,只需选择要比较的样品,然后选择参照样品,如上所述。在覆盖之前, 不必删除现有选择。

#### 6.3. 数据导出

数据可以直接在系统上导出,也可以远程导出。

要直接从系统导出,请在仪器前面插入U盘,然后点击"Export to USB"。U盘必须是单一FAT32分区。

要通过远程访问导出,请单击"Download",然后选择保存文件的位置。

所有数据都导出到以检测时间戳命名的.zip文件中。.zip文件包含排序到子文件夹中的各种格式结果,包括原始数据和图像。以下各节将介绍更多详细信息。

如果导出的检测结果包含比较,则所有比较数据也将导出。所有文件和与比较相关的Excel工作表将在名称中包含"comparison"一词。

#### 6.3.1. 原始和处理后的数据

"Raw and processed data"子文件夹包括一个Microsoft Excel电子表格文件(.xlsx),其中包含所有检测的数据点,亮度,Ratio和计算的Ti数据以及检测关键字和标签。

此Excel文件附带文档属性,可以方便地处理Windows资源管理器中的多个文件。若要在Windows资源管理器中显示这些属性,请导航到"View"选项,然后选择"Details",单击"Columns",然后单击 "Add Columns"。以下文档属性可用:



文档属性名称	包含的信息
Tags	用户应用的所有检测关键字(请参阅 5.7)
Title	用于运行检测的Tycho系统的机身号和软件版本
Authors	用于导出数据的Tycho系统的机身号和软件版本

当然,这些文档属性也可以通过所有可用的路由访问(在Windows资源管理器中左键单击文件和 selecting Properties等)。

.xlsx文件针对 Microsoft Excel 2016 进行了优化。也可以使用其他电子表格软件。下面描述的某些功能可能仅适用于 Microsoft Excel 2016。

Excel 文件中的信息排列在工作表上。预先准备好的图表包含在电子表格中。根据您的需要修改图 表,调整颜色、字体、大小等。通过简单地删除或复制粘贴来删除或添加数据行:选择图表将突 出显示包含绘制数据的单元格。修改/拖动突出显示的单元格以在图表中添加或删除数据。

热变性曲线(原始、平滑处理后和一阶导数)中显示T<sub>i</sub>拐点包括在内。要在图表中显示 T<sub>i</sub>温度值,请 右键单击 T<sub>i</sub>点并启用数据标签。再次右键单击设置数据标签格式以显示x值(温度)。移动标签的方 法如下:单击以选择单个标签,然后将其拖动到所需位置。

所有工作表都具有预定义的打印布局,以实现方便的单页打印。如果在打印时选择了图表,则该 图表将以整页格式打印。选择正确的页面方向以匹配图表的宽高比。

除电子表格外,还包括原始和已处理的数据文件夹和用于NanoTemper Technologies远程诊断的数据 库文件(.json格式)。它们还可用于自动数据处理。如果您想了解更多信息,请联系NanoTemper Technologies客户支持。

#### 6.3.2. 热变性曲线图片

此文件夹包含排序到子文件夹中的检测的所有热变性图像: 原始曲线和平滑后的曲线以及Ratio一阶 导数图。如果检测结果包含比较,则相关文件也包含在相应的子文件夹中。

请注意,导出的图像文件(.svg和.png)将准确显示在Tycho NT.6 用户界面中选择的内容。隐藏的毛 细管不会显示在导出的图像中,但会包含在.xlsx文件中。

## 7. 故障排除

#### 7.1. 毛细管断裂

如果毛细管托盘上的毛细管破裂,请使用刷子或纸巾小心地取出玻璃碎片,并避免划伤托盘。 注意碎玻璃会割伤皮肤。不要触摸玻璃碎片。根据有关玻璃废物的适用法规处理毛细管。

### 7.2. 停止检测

要停止运行检测,只需打开系统门即可。完全打开舱门将立即停止检测并开始冷却。在中断之前 收集的所有数据都可以正常查看。

中断的检测无法恢复。冷却后可以开始新的检测。

请注意,如果检测或冷却中断,毛细管托盘可能仍然发热。建议仅在冷却完成后再加载样品,以避 免使样品升温。

**注意** 热表面会导致皮肤灼伤。打开仪器舱门后,请勿立即触摸热敏元件(毛细管托盘的反光二氧化 硅表面)。等待系统冷却。托盘温度显示在系统显示屏上。

如果舱门仅部分打开,检测可能会继续,但由于日常光干扰,由此产生的数据质量将很差。请完全打开舱门(停止检测)或保持关闭(检测)。

## 7.3. 打开Tycho NT.6系统的舱门

Tycho NT.6的舱门可以随时打开:空闲模式、检测期间或在冷却期间。打开门是停止运行检测的方法(见7.2)。

如果门仅部分打开,检测可能会继续,但由于日常光干扰,由此产生的数据质量将很差。请完全打开舱门门(停止检测)或保持关闭(检测)。

请注意,如果检测或冷却中断,毛细管托盘可能仍然发热。建议仅在冷却完成后才上样,以避免对 样品进行升温。

31/34



## 7.4. 重启Tycho NT.6

如果系统冻结,请等待一分钟。如果它没有恢复正常,请断开系统背面的电源,等待30秒钟以完全 关机,然后重新连接电源。系统将自动再次启动。

## 7.5. 客户支持

对于本用户手册中未描述任何问题,请访问 NanoTemper Technologies Explorer Community,网 址为 nanotempertech.com/explorer。在NanoTemper Technologies Explorer Community中,您可 以找到用户手册、常见问题解答、应用说明和更多支持,并且您可以与NanoTemper Technologies客户支持人员联系。

## 8.运输和处置

## 8.1. 重新包装运输

在运输之前从系统中卸下所有毛细管。

始终重复使用原包装进行运输。如果原始包装被丢弃,请联系NanoTemper Technologies进行更换。

确保使用随附的运输锁带(红色钩环扣具)将样品托盘固定在舱门上(见图14)。



图 14: 使用红色钩环扣将样品托盘固定在舱门上。

## 8.2. 废物处理

请根据毛细管中所含的物质以及当地适用的有关化学品和玻璃废物的规定处理用过的毛细管。

## 8.3. 系统处置

该系统在处置前可能需要进行净化。请联系NanoTemper Technologies以获取更多信息。



此符号表示该系统不得作为未分类的城市垃圾处置,必须单独收集。它必须根据 当地适用的电子设备法规进行处理。符号位于设备的背面。



#### 联系

#### NanoTemper Technologies GmbH

Global headquarters: Floessergasse 4 81369 Munich Germany 电话: +49 (0) 89 4522895 0 传真: +49 (0) 89 4522895 60

info@nanotempertech.com nanotempertech.com nanotempertech.com/explorer

Tycho™ is a trademark.

NanoTemper<sup>®</sup> is a registered trademark and registered in the U.S.

Patent and Trademark Office.

V08\_20191022