NanoAnalyze-nITC manual v. 2013 Aug.

나노 ITC 결과 분석 manual v. 2013년 8월

Number MMK0002-1

(2013-08-20 renewal from old version)

1. nITC 결과 분석 …… 2
2. NanoAnalyze 프로그램 …… 2
   1) menu bar …… 2
   2) toolbar …… 2
   3) 분석 과정 ; data tab …… 3
   4) 분석 과정 ; analysis tab …… 5
      (1) baseline …… 5
      (2) area …… 9
      (3) modeling …… 11
      (4) statistics …… 14

© TA Instruments Korea – Waters LLC. MMK0002-1 Tel. 02-3415-1500, Fax. 02-3415-1515
Contact to ; http://www.tainstruments.co.kr/contactus.asp

1. nITC 결과 분석

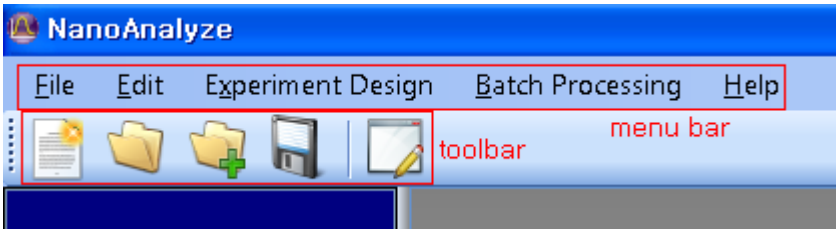
nITC에서 적정(titration) 결과를 얻고 나서 실험의 주요 목적인 *K*(평형 상수), *n*(stoichiometric constant), *ΔH*(enthalpy change) 값을 구하려면 분석 및 특정 model에 fitting하는 과정을 거쳐야 한다. TA Instruments의 nano ITC에서는 이것을 NanoAnalyze라는 프로그램에서 수행한다.

2. NanoAnalyze 프로그램



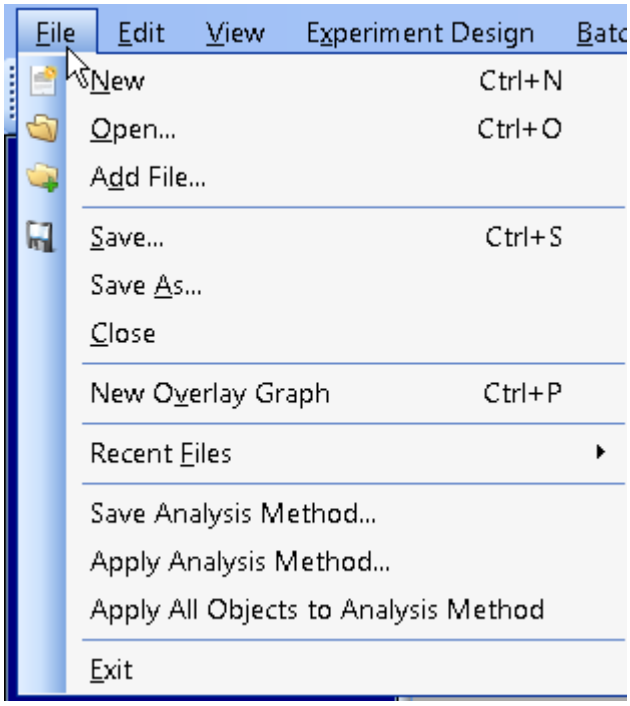
프로그램 인스톨을 마치면 바탕 화면에 오른편 그림의 icon이 생긴다. 이것이 NanoAnalyze이다.

이 프로그램을 띄우면 초기 화면은 오른편 그림과 같다.

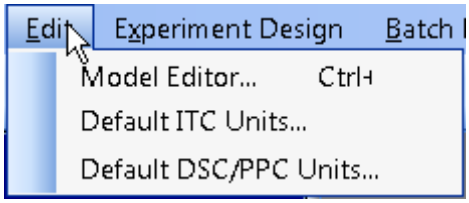


1) Menu bar

- File ; 통상적인 Windows 프로그램들의 file을 다루는 여러 기능들. 오른편 그림을 참조. 하나의 file을 열어 놓은 상태에서 다른 file을 열려면, 'Add File...' 기능을 써야 한다.



- Edit ; 찍어 보면 아래 기능이 있다.



  - Model editor ; fitting에 적합한 model을 선택한다. 뒤에서 결과를 fitting할 때 다시 설명할 예정.
  - Default ITC Units ; program default는 μJ/s(μW)며, μcal/s으로 전환 가능하다.
- Experiment design ; ITC 실험을 위해 적절한 실험 설계를 수행. 특히 sample이 비싼 경우 사전 실험 설계는 대단히 중요함(이 메뉴 설명은 MMK0005에 있다)
- Batch processing ; nDSC에만 관계 있음
- Help ; 프로그램 안내서를 보여준다.

2) **Toolbar ;** 맨 왼편 icon부터 

-  New dataset ; 새 파일을 프로그램에 띄운다.

© TA Instruments Korea – Waters LLC. MMK0002-1 Tel. 02-3415-1500, Fax. 02-3415-1515
Contact to ; http://www.tainstruments.co.kr/contactus.asp

-  Open ; 이미 만들어 놓은 data 분석 파일(.csc)을 불러온다. Default extension 은 .csc지만, titration 실험을 할 때 처음에 저장되는 raw data인 .jet file 등도 당연히 불러올 수 있다.
-  Add ; data file을 불러온다. (.dsc, .scn, .jet)
-  Save ; 현재 (분석까지 마친) 상태를 .csc file로 저장한다.
-  model editor ; 사용 가능한 모든 fitting 가능한 모델을 보여 준다. Subwindow 가 뜨면서, 오른편에서 nDSC인지 nITC인지 선택 가능. 뒤에서 설명 예정

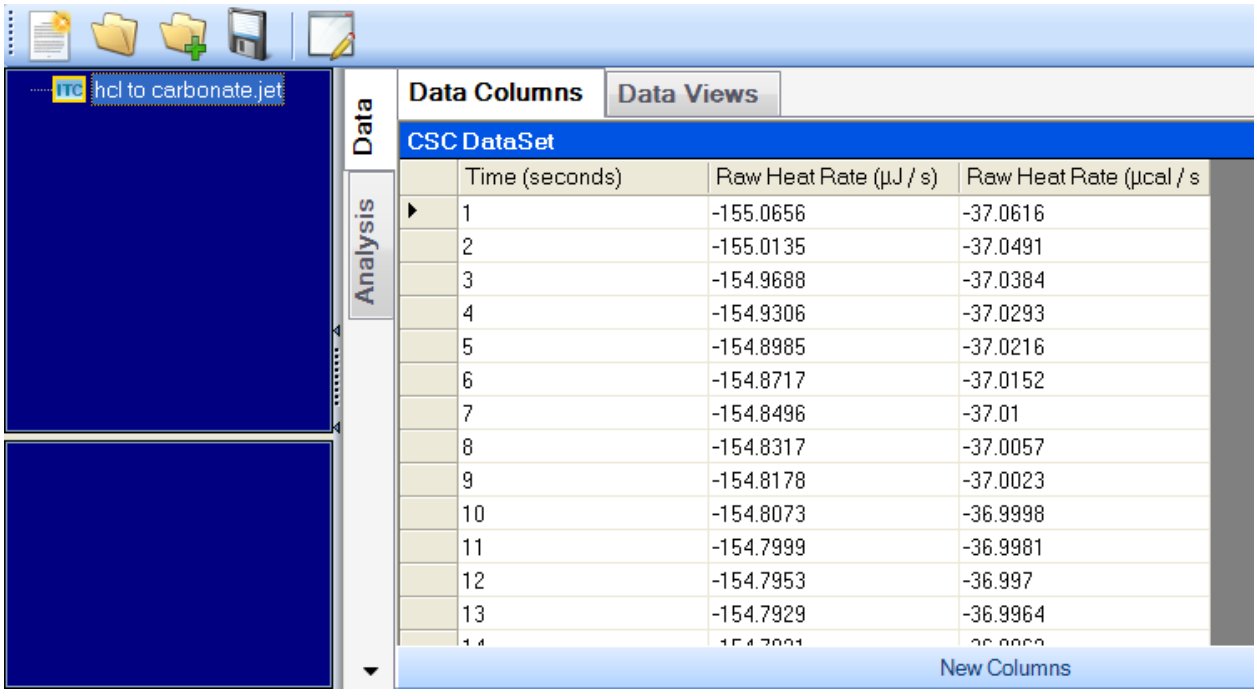
3) 분석 과정; Data tab

nITC 결과 파일(확장자 .jet)을 open하여 부르면 초기 화면은 아래와 같다(그림 3-1).



◀ 그림 3-1. Data open 화면 1

여기서 왼편의 file name 부분을 click하면 다음 화면이 보인다.



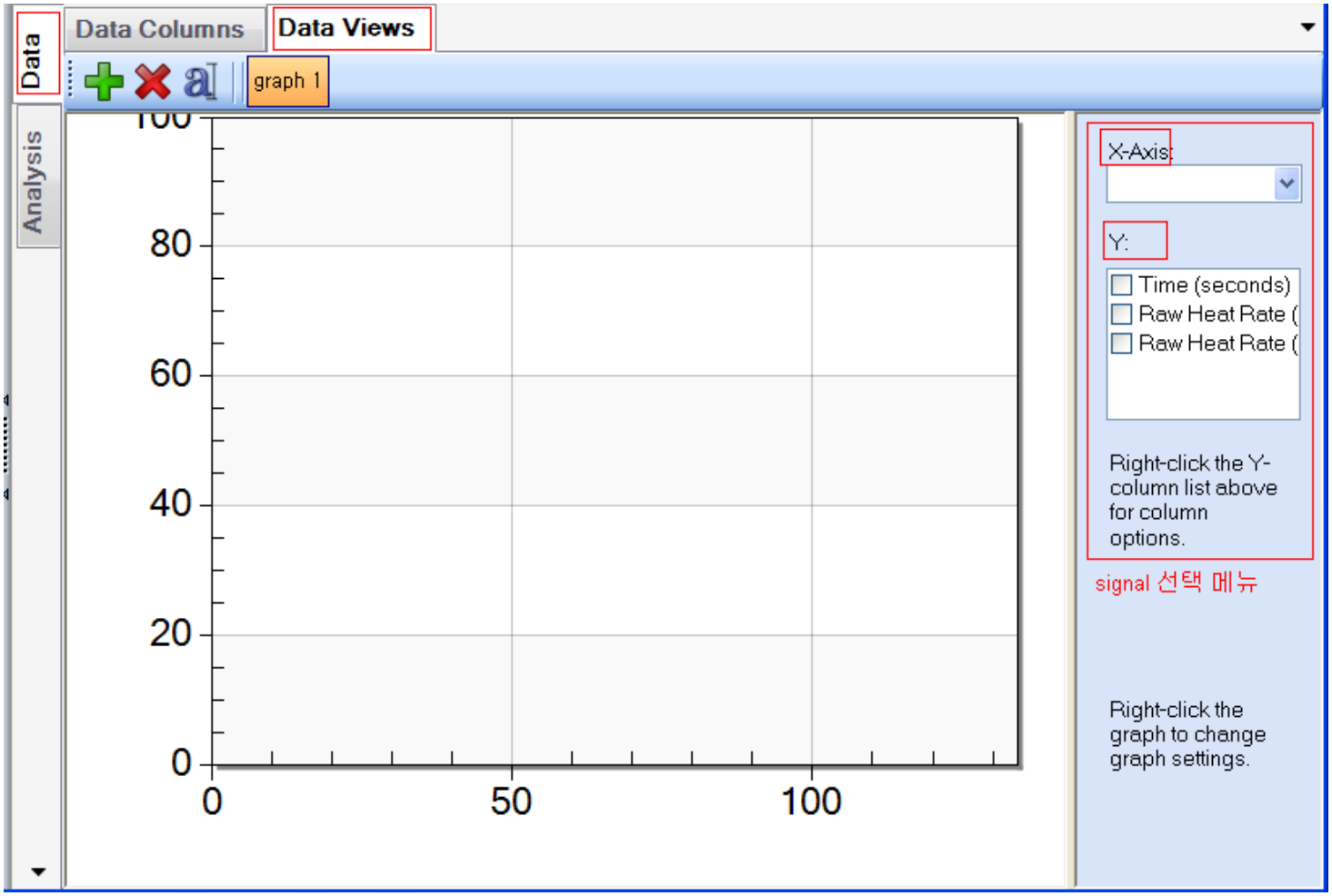
▲ 그림 3-2. .jet file(nITC 적정 raw data)을 열었을 때의 초기 화면 2. 단위 두 개가 보인다.

© TA Instruments Korea – Waters LLC. MMK0002-1 Tel. 02-3415-1500, Fax. 02-3415-1515
Contact to ; http://www.tainstruments.co.kr/contactus.asp

(1) Data columns subtab ; 위에서 보듯이, raw heat rate(μJ/s) 값을 보여 준다.

(2) Data views tab

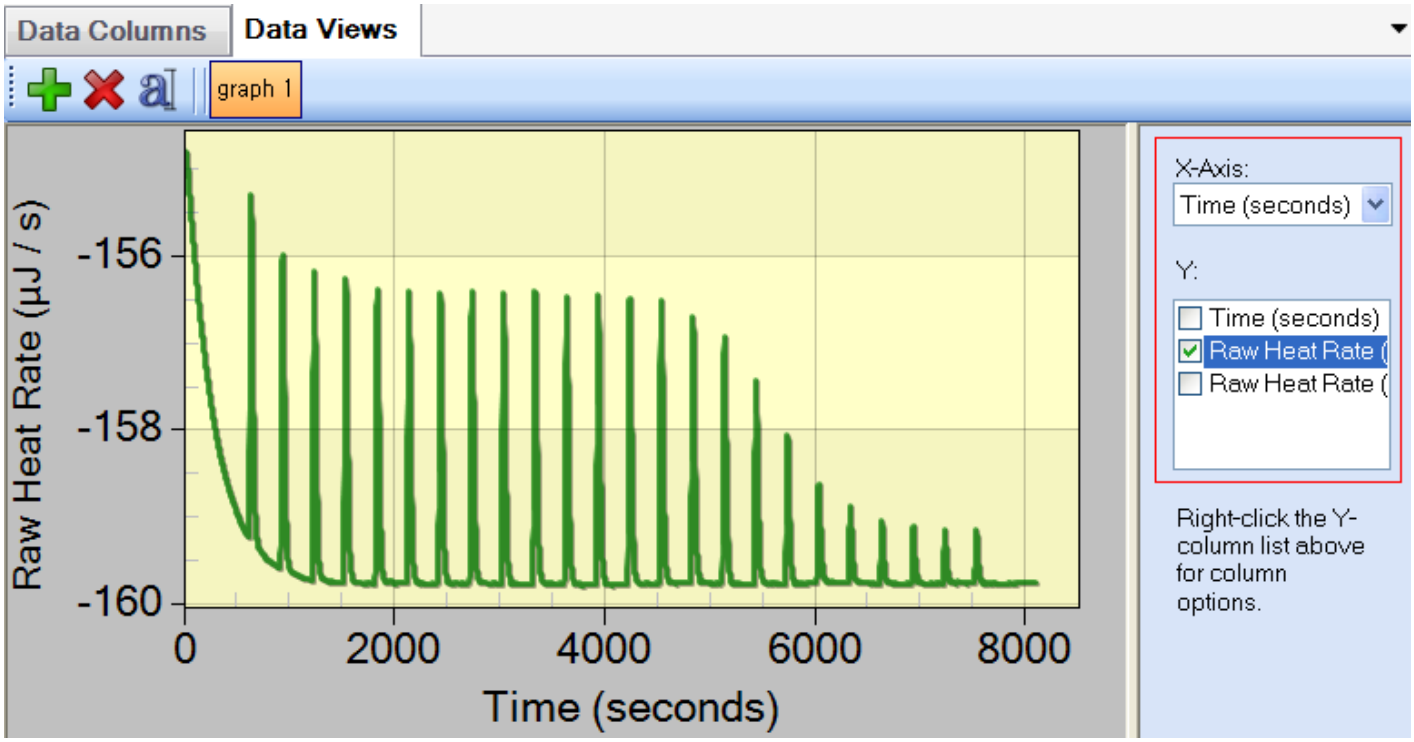
Data Views subtab에서는 개략적으로 그래프를 그려 볼 수 있다. 아래 그림 3-3은 초기 화면이다.



▲ 그림 3-3. Data Views ; 그래프를 그려 보는 초기 화면

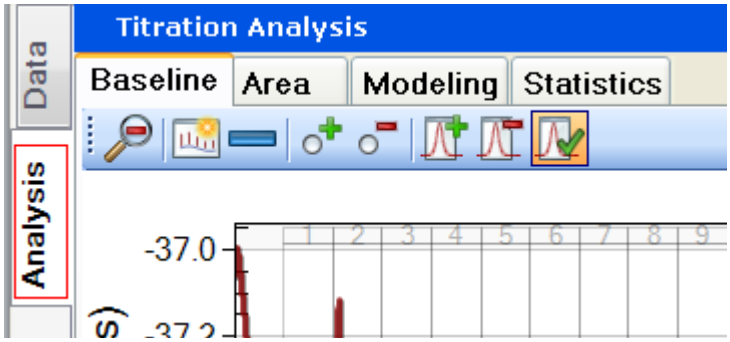
위 화면 오른편에서는 signal을 선택할 수 있다. Signal 쪽에서는 X축과 Y축을 별도로 선택할 수 있으므로 원하는 그래프를 그릴 수 있다. 그래프의 X/Y축을 선택하면 다음 페이지 그림 3-4처럼 graph가 화면에 보인다.

© TA Instruments Korea – Waters LLC. MMK0002-1 Tel. 02-3415-1500, Fax. 02-3415-1515
Contact to ; http://www.tainstruments.co.kr/contactus.asp



▲ 그림 3-4. Data Views ; 그래프를 선택

4) 분석 과정; Analysis tab



▲ 그림 4-1. Analysis caption

graph를 분석하려면 data tab 바로 아래의 analysis tab으로 간다(오른편 그림 4-1). 각 titration peak 면적들을 제대로 잡으려면 peak 들을 적분해야 하기 때문이다.

Analysis tab에는 subtab 네 개가 있는데, baseline subtab에서 적분을 진행할 수 있다.

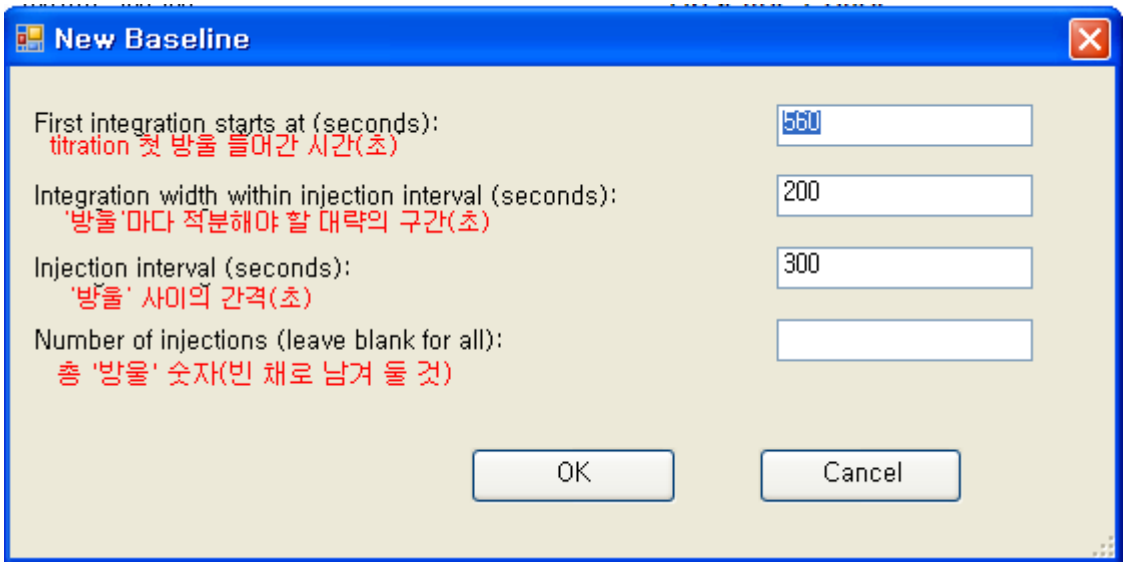
(1) Baseline subtab

위 그림 4-1의 toolbar를 보면 왼편부터 icon이 다음처럼 배열되어 있다.

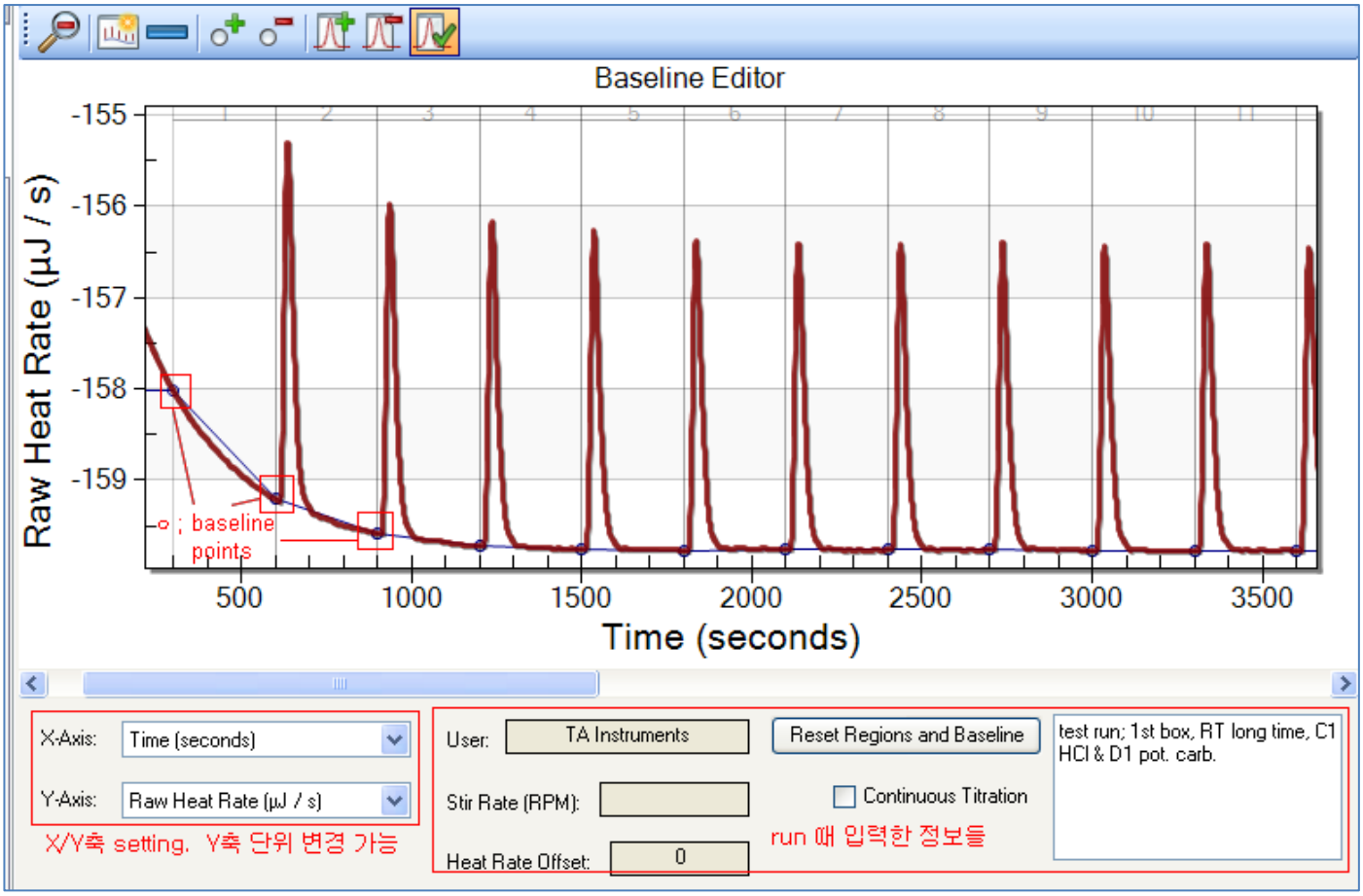


-  Undo zoom ; 그래프 특정 부분을 zoom했다가 전체 화면으로 되돌릴 때 사용
-  Create new baseline ; 누르면 titration 실험을 할 때의 지정 수치가 보임(다음 페이지 그림 4-2). 확인 또는 수정 후 OK button을 누르면 된다. 이 때 baseline point를 바꿀 수 있도록 pivot point mark가 보인다(그림 4-3).

© TA Instruments Korea – Waters LLC. MMK0002-1 Tel. 02-3415-1500, Fax. 02-3415-1515
Contact to ; http://www.tainstruments.co.kr/contactus.asp



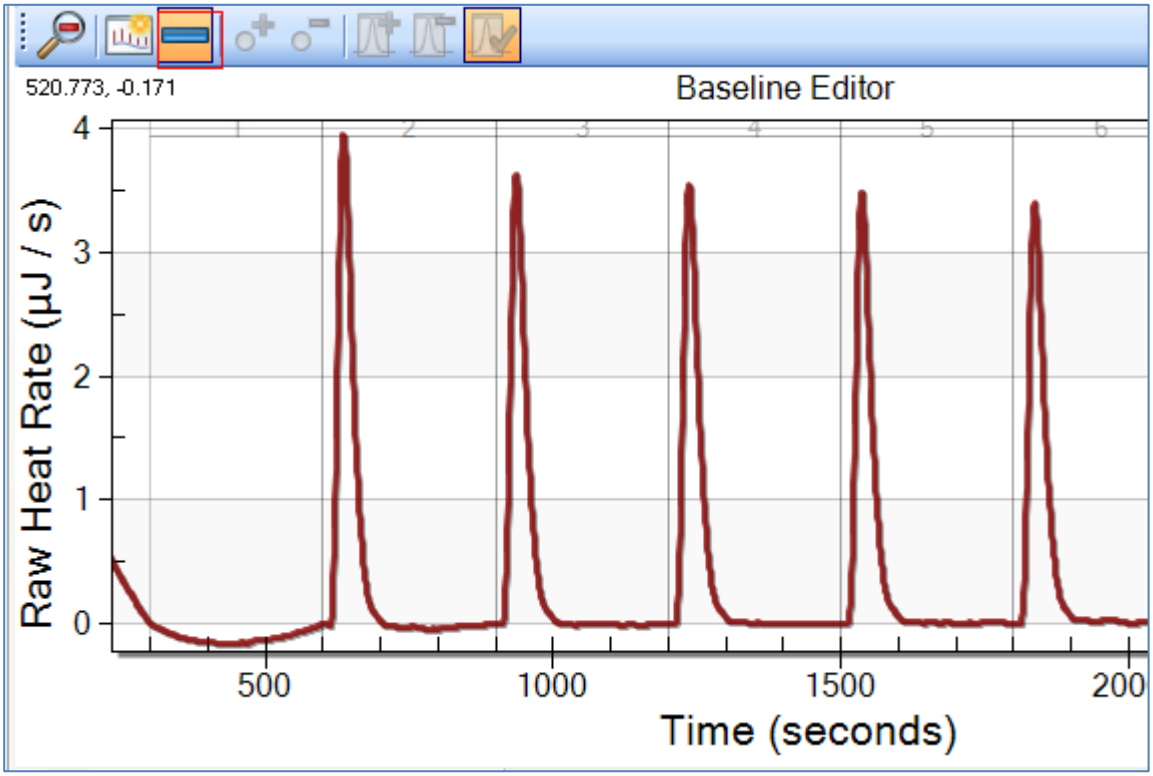
▲ 그림 4-2. 'Create new baseline' setting 화면. 확인 또는 수정 후 OK button 누르면 된다.



▲ 그림 4-3. Analysis에서 baseline subtab으로 들어왔을 때 초기 화면

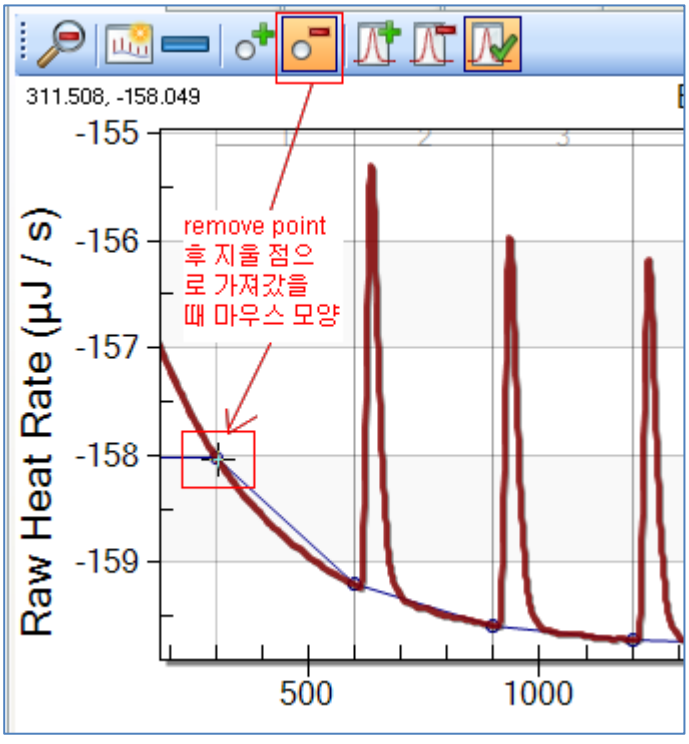
-  subtract baseline ; 위에서 잡은 baseline을 빼 주어서 얻은 graph. 그림 4-3에서 이 기능을 쓰면 다음 페이지 그림 4-4처럼 보일 것이다.

© TA Instruments Korea – Waters LLC. MMK0002-1 Tel. 02-3415-1500, Fax. 02-3415-1515
Contact to ; http://www.tainstruments.co.kr/contactus.asp



▲ 그림 4-4. 'Subtract baseline' 기능. Baseline 수준이 0으로 맞춰진 것이 보인다.

-  Add and remove baseline point; 위에서 언급한 pivot point를 더하거나 없애려면, Add와 remove를 사용하면 된다. Add를 누른 후 point를 추가할 자리를 click하면 되고, 지우려면 remove를 누른 후 지울 point 위로 마우스를 가져가면 마우스 pointer가 +자로 바뀐다. 그 때 click하면 지워진다.



▶ 그림 4-5. Remove baseline point

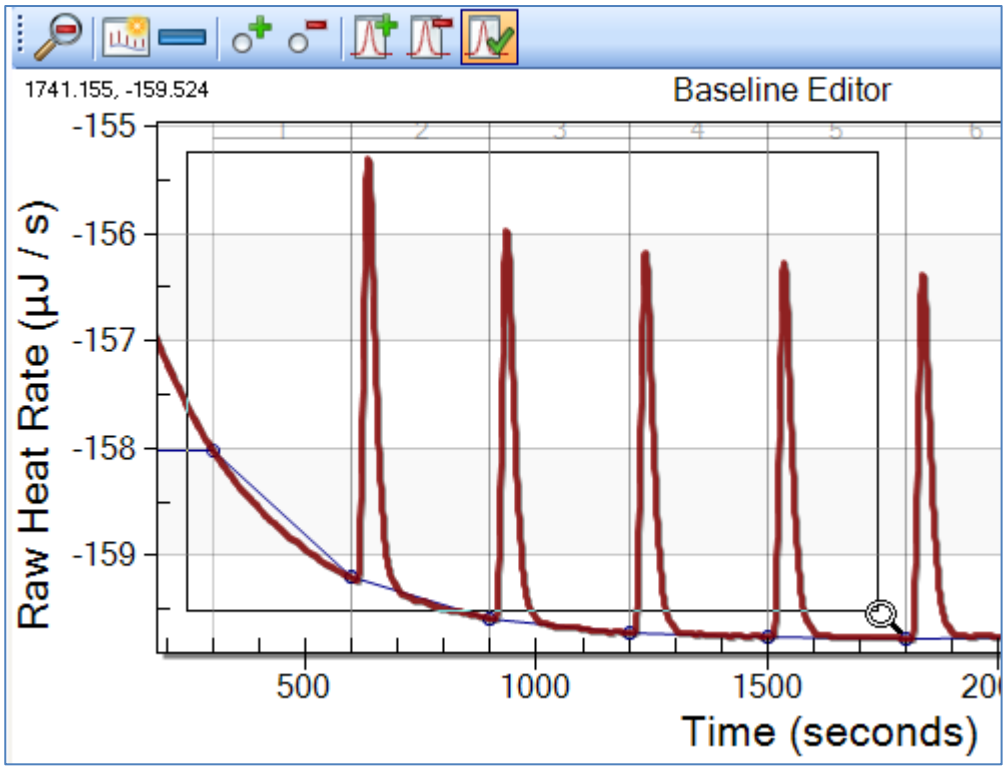
-  Add, remove, show/hide integration region; 위 그림 4-5를 보면, 그래프 위편에 차례로 1, 2, 3... 식으로 된 'integration region'이 있을 것이다. Incremetnal titration 실험을 할 때[1]

[1] MMK0001-1의 실험 setup 부분에서 설명을 잘 놓았듯이, '한 방울씩' 넣어서 반응열을 보는 실험 방식.

© TA Instruments Korea – Waters LLC. MMK0002-1 Tel. 02-3415-1500, Fax. 02-3415-1515
Contact to ; http://www.tainstruments.co.kr/contactus.asp

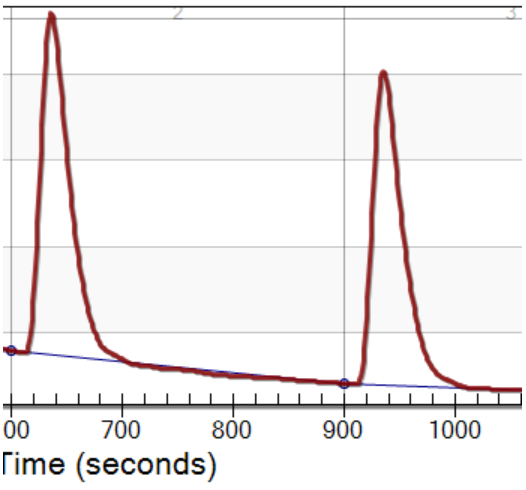
injection 시작 시점에서 다음 peak가 나올 때까지의 시점까지 peak를 적분해야 peak area가 정확히 계산되므로, 이 영역은 앞의 'creating new baseline'에서 정확하게 시간을 정해야 한다. (default는 당연히 실험할 때의 injection time 설정값에서 들어가므로 그리 신경 안 써도 될 것이다) 이 적분 영역의 수를 바꾸려면, 그림 4-9에 보이는 것처럼 적분 창 추가/삭제 icon으로 가능한다. (물론 pivot point 숫자를 바꾸는 방법도 가능)

- Baseline 등 특정 부분을 더 크게 보고 싶을 때는(cropping), toolbar에서 선택한('엷은 주황색으로 표시된' 것처럼 보이는) icon이 없는 상태에서 graph 위를 'click & drag'하면 된다. '선택한' icon이 있으면 '눌려 있는' 상태를 해제한 후(사용/해제는 click toggle 방식임) 사용 가능하다. 아래 그림에서 맨 오른편 icon이 눌려 있는데, 이것은 show/hide integration region이므로 cropping과 상관이 없으므로 그냥 진행해도 된다.



▲ 그림 4-6. 부분 확대(cropping); click & drag 동작

- 확대 상태를 끝내려면 toolbar 맨 왼편의  icon(*undo zoom*)을 누르면 된다.

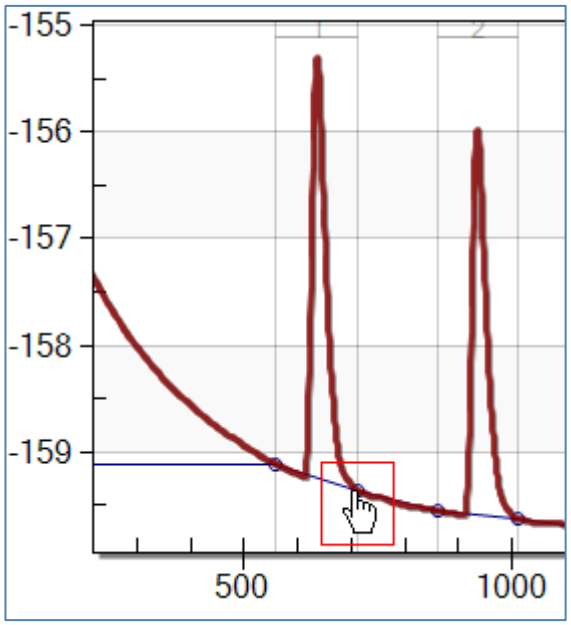


▶ 그림 4-7. 부분 확대 후. 그림 4-6에서 2와 3 부분을 확대한 것.

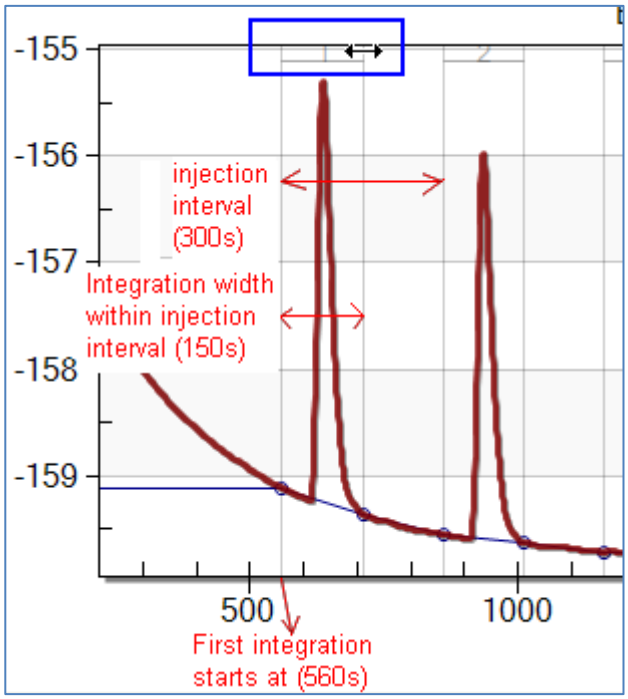
- Tip ; peak의 적분 범위를 바꾸려면, pivot point 자체를 5페이지 'create new baseline'

© TA Instruments Korea – Waters LLC. MMK0002-1 Tel. 02-3415-1500, Fax. 02-3415-1515
Contact to ; http://www.tainstruments.co.kr/contactus.asp

으로 전체 위치를 한 번에 이동시킬 수도 있고, 하나씩 맞추려면 아래 왼편 그림 4-8이나 4-9처럼 가능하다. 4-8에서는 'click & drag'이고, 4-9에서는 위의 integration region 번호 부분에 마우스를 가져가면 모양이 바뀌는데 그 때 옮기면 된다.



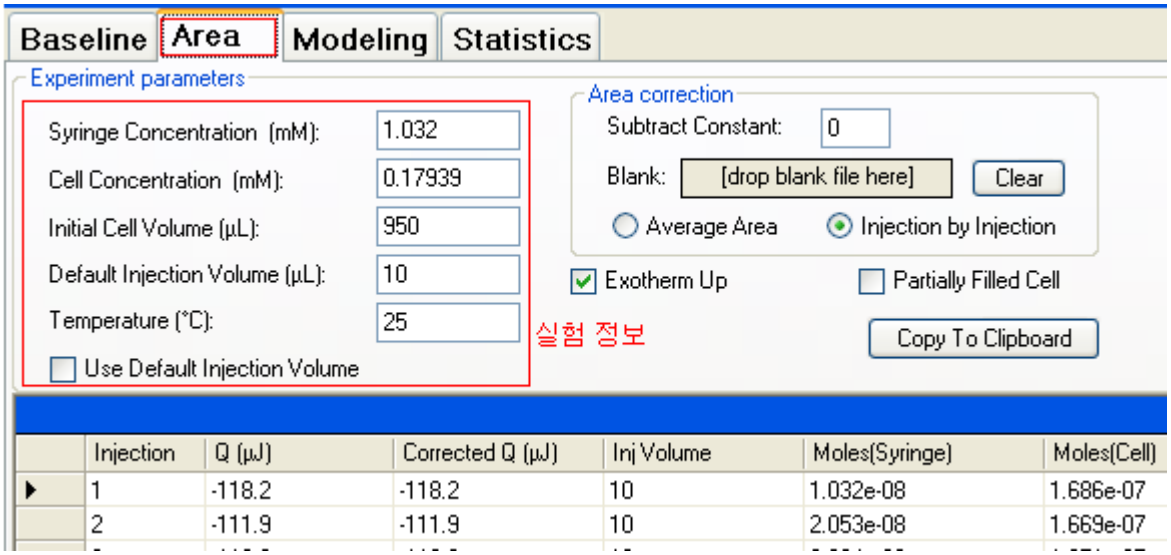
▲ 그림 4-8. Pivot point 이동



▲ 그림 4-9. 적분 범위 변경하기

(2) Area subtab

여기로 들어가면 아래 그림 4-10와 같은 화면이 나타난다.

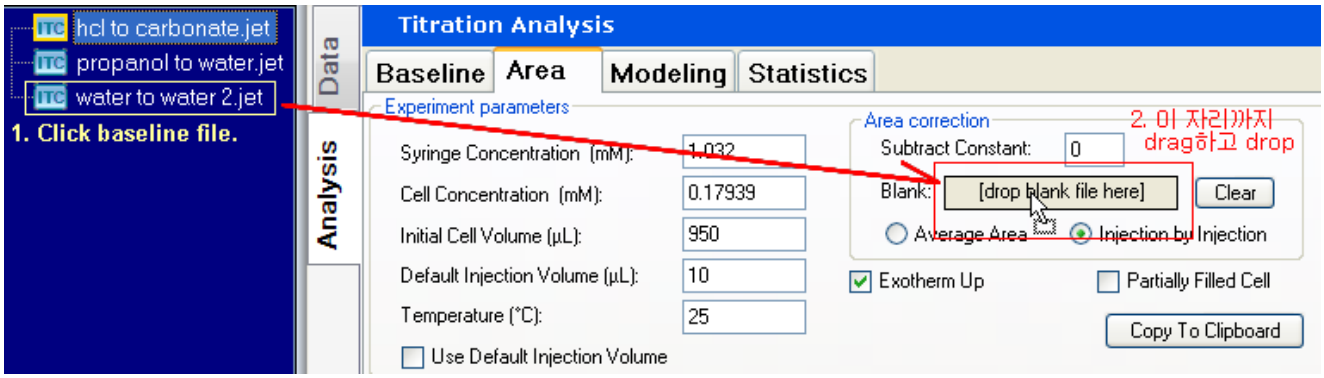


▲ 그림 4-10. Area subtab 메인 화면

- 위에서 보듯이, default는 'Exotherm up'(발열 peak가 위편으로 향함)이다. 반대로 하고 싶으면 이것을 Uncheck하면 된다.

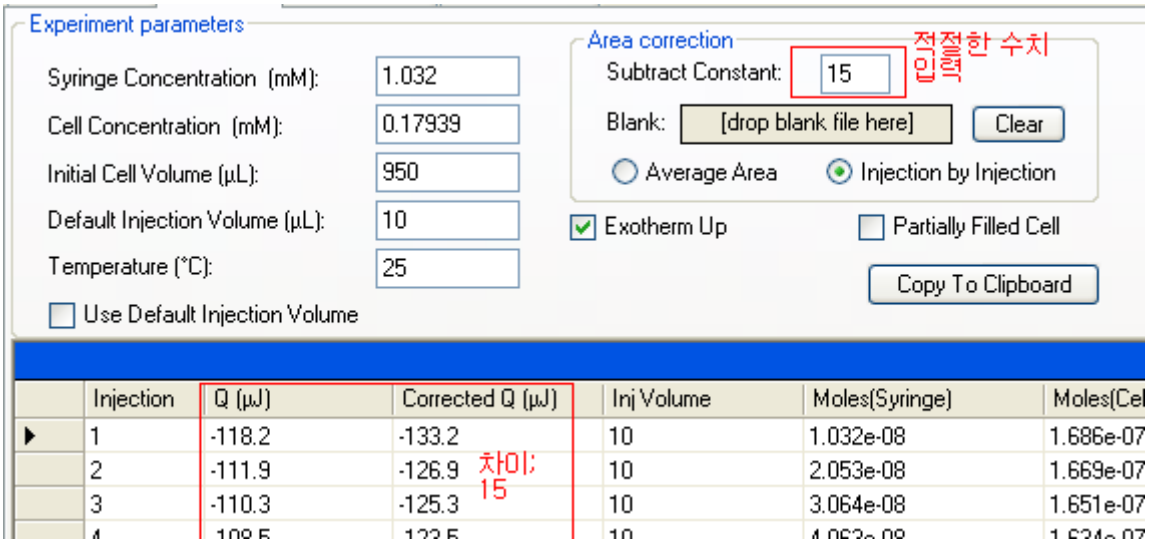
© TA Instruments Korea – Waters LLC. MMK0002-1 Tel. 02-3415-1500, Fax. 02-3415-1515
Contact to ; http://www.tainstruments.co.kr/contactus.asp

- 위에서 주사기(syringe) 및 cell 용액 농도를 실험 때 입력해 놓았으면 현재 ITCRun version에서는 자동적으로 load되니 문제가 없다.
- Initial cell volume은 '장비 공식 volume'에서 cell에 연결되는 도관의 부피 약간을 빼고 입력해야 한다. **Standard volume ITC(공식 volume 1000㎕)은 950, low volume ITC(공식 volume 190㎕)는 170을 입력해야 한다. (실제 default 값대로 들어가기 때문에 거의 신경쓸 필요가 없다)**
- 만약 blank titration test(e.g. 물을 물에 적정해도 온도차 때문에 peak가 뜬다) 결과가 있다면, 이 test file 결과를 baseline subtraction 용으로 사용할 수 있다. 그 방법은 아래 그림을 참조. Blank file을 사용하지 않으려면, 아래 그림 4-13에서 [drop blank file here]의 오른편에 있는 clear button을 누르면 된다. 아래에서 이 영역에 있는 마우스 모양(네모가 '달려' 있는)을 주목하라.
-



▲ 그림 4-11. Baseline drop 방법

- Blank를 baseline으로 쓰더라도 적절한 상수만큼 더 빼고 싶다면, 아래 그림 14의 'subtract constant' 부분에 상수를 입력하면 된다. 그러면 아래 data가 바뀐다.



▲ 그림 4-12. Baseline ; 일정한 상수만큼 바꾸는 방법

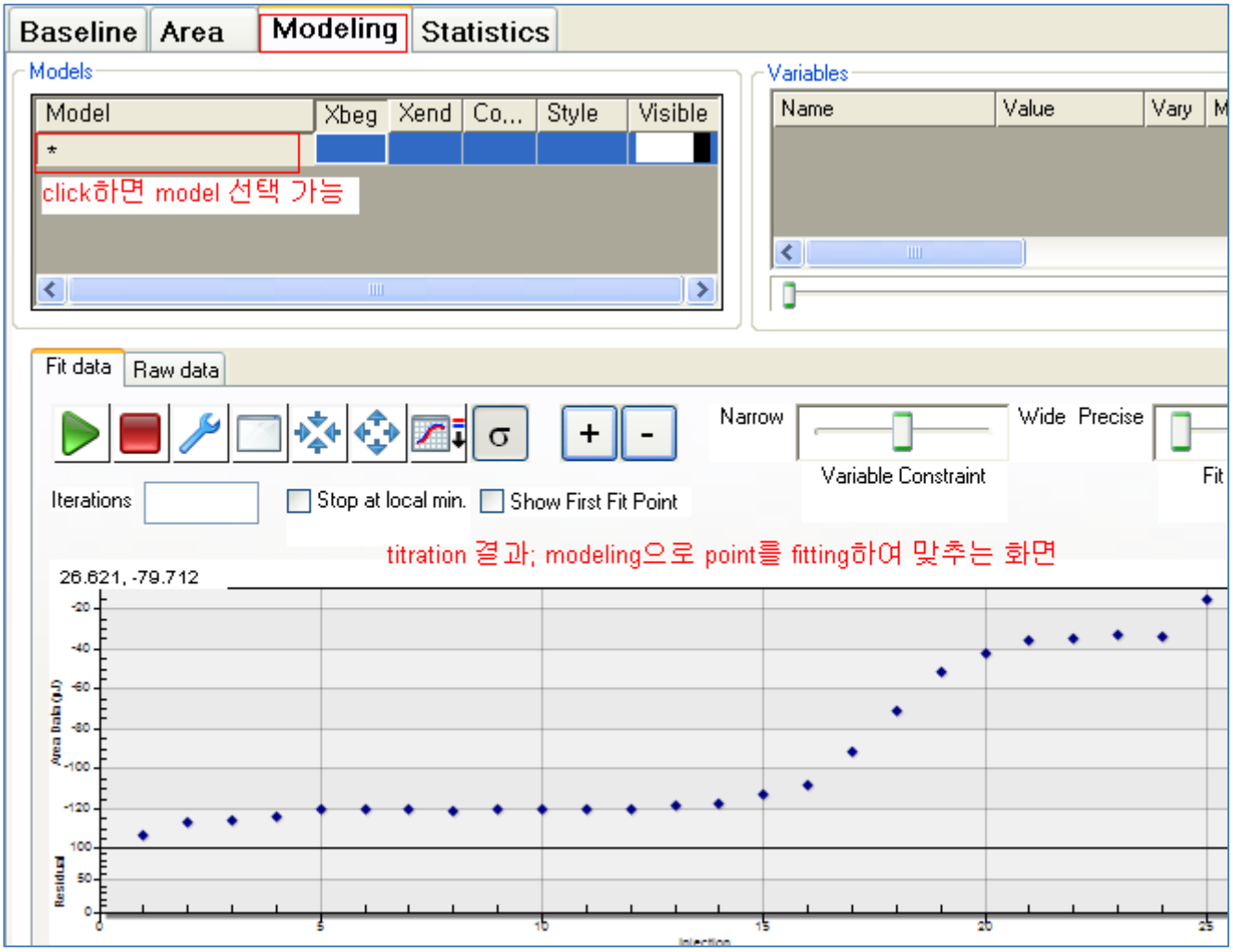
실제로는 modeling 과정에서 다 fitting으로 해결되기 때문에 위의 두 기능을 쓸 필요는 거

© TA Instruments Korea – Waters LLC. MMK0002-1 Tel. 02-3415-1500, Fax. 02-3415-1515
Contact to ; http://www.tainstruments.co.kr/contactus.asp

의 없을 것이다.

(3) Modeling subtab

area tab에서 각 적정 peak의 면적을 다 제대로 정하면 modeling tab으로 와야 한다.



▲ 그림 4-13. Modeling tab 초기 화면

- 우선 fitting model 선택부터 해야 한다. 그림 4-13 왼편 위의 model 선택 부분에서 * 표 부분을 click하면, model manager가 보이다(그림 4-14; 다음 페이지).
- Model manager ; 여러 가지 모델을 선택할 수 있다. 설명은 MMK0008 참고.

(1) Blank(constant) ; 상수만큼만 수치를 옮겨 주는 model

(2) Blank(linear) ; y = mx + b. intercept(b)와 slope(m)가 필요

(3) Competitive replacement ; 활성 자리 하나를 놓고 두 물질이 경쟁하는 경우. 평형 상수 K와 ΔH 값이 2개씩 필요하다.

(4) Independent ; 1:1 적정에서 가장 흔히 사용하는 model. K와 ΔH, n(stoichiometric constant)이 필요.

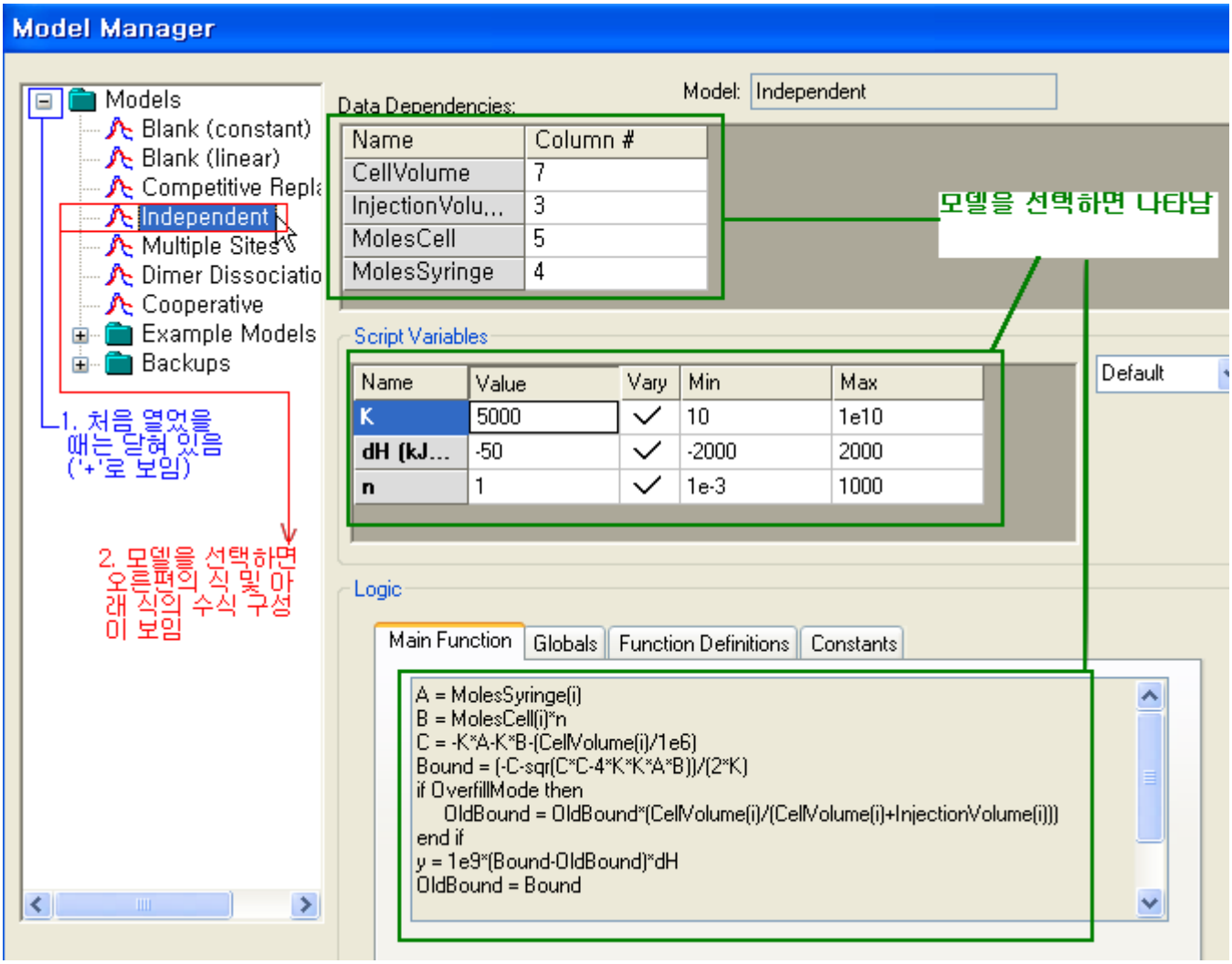
(5) Multiple sites ; binding site가 하나 이상인 경우. 마찬가지로 평형 상수 K와 ΔH 값

© TA Instruments Korea – Waters LLC. MMK0002-1 Tel. 02-3415-1500, Fax. 02-3415-1515
Contact to ; http://www.tainstruments.co.kr/contactus.asp

이 2개 이상씩(site 수만큼) 필요하다.

(6) Dimer dissociation ; 한 분자가 두 개로 갈라져 나가는 과정. 평형 상수 K와 ΔH 값만 알면 된다.

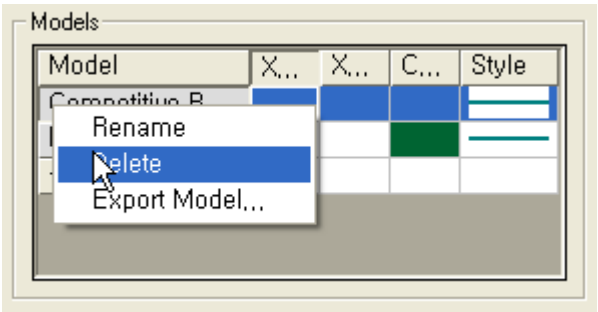
(7) Cooperative (binding) ; 적어도 둘 이상의 결합 장소가 있고, 두 개의 결합 가능한 분자들과 상호작용 하는 경우에 해당



▲ 그림 4-14. Model manager 화면

위 model manager 화면에서는 model 선택뿐 아니라 함수도 바꿀 수 있지만, 대부분의 경우 함수를 조절할 필요 없이 선택만 하여 해결할 수 있을 것이다.

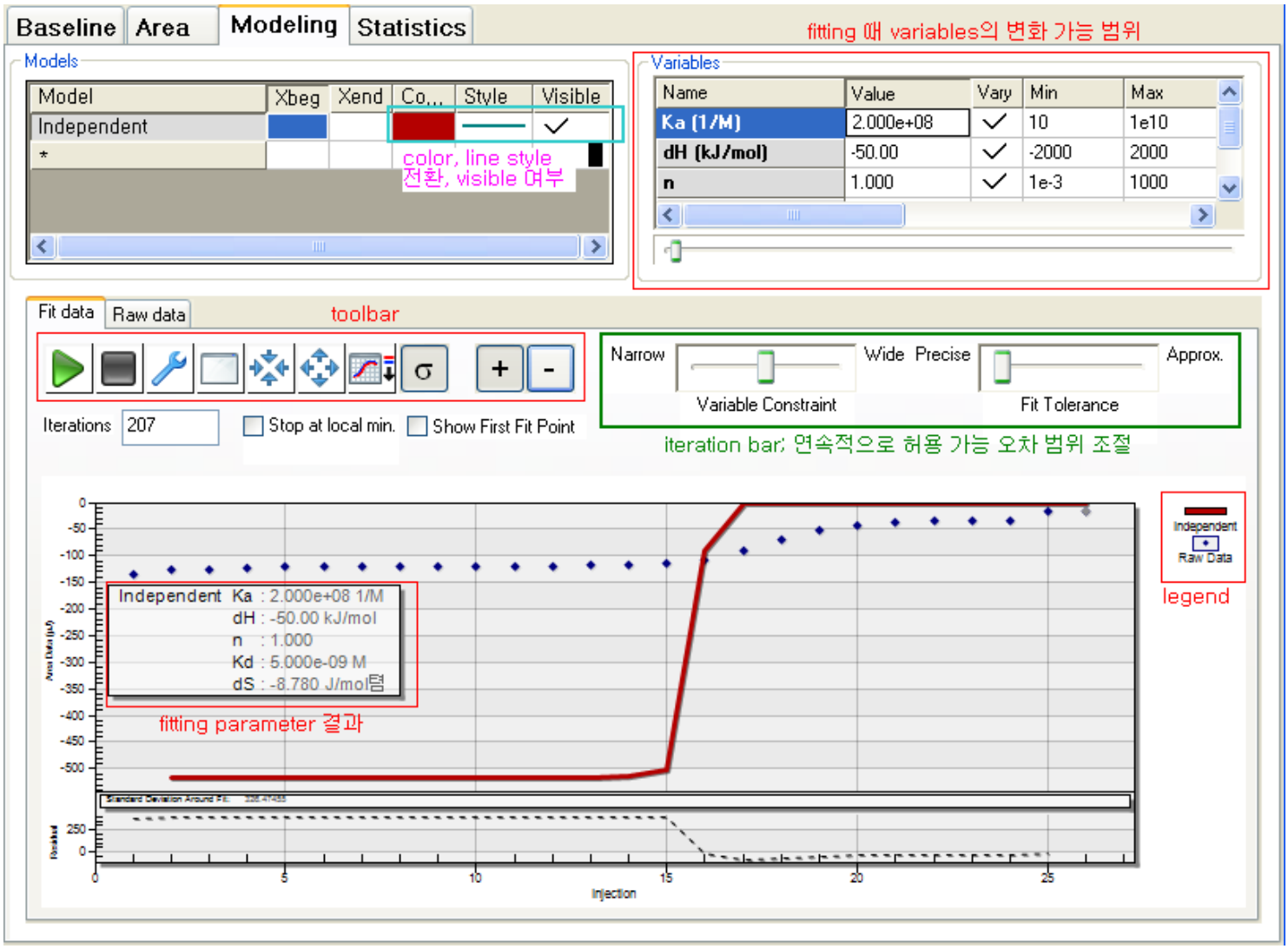
Model은 하나만 사용하는 것이 아니고 2개 이상을 조합하여 fitting할 수 있다. 이 경우 한 개를 우선 선택한 후, * mark 부분을 다시 누르면 두 번째를 다시 고를 수 있다. 나중에 그 중 어떤 것을 지우려면, 지울 model 위에서 마우스 오른편 button을 눌러 pop-up menu를 띄우고, delete button으로 지울 수 있다.



▶ 그림 4-15. 선택한 model 지우기

© TA Instruments Korea – Waters LLC. MMK0002-1 Tel. 02-3415-1500, Fax. 02-3415-1515
Contact to ; http://www.tainstruments.co.kr/contactus.asp

Model 선택이 끝났으면 오른편의 select button 또는 enter를 누르면 된다. 다음 페이지 그림 4-16은 independent(가장 많이 사용하는 model)을 선택한 상태에서, fitting run을 하기 이전 보이는 화면 상태이다.



▲ 그림 4-16. Modeling subtab; model로 independent를 선택한 후의 화면(fitting 개시 전)

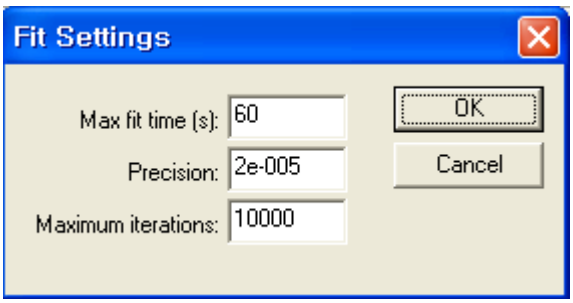
- Model을 고른 후에는(위에서 설명했듯이 2개 이상을 조합하여 고를 수 있음) fitting을 진행해야 한다.
- Fit data subtab을 선택하면 toolbar에 다음 몇 icon들이 있다.

1] fitting menu  맨 왼편 icon부터 설명하면

[1] 개시 ; 문자 그대로 fit start

[2] 중지 ; 왼편의 개시 버튼을 눌러 fitting 진행 중에 중지시키는 것

[3] 설정 ; icon을 누르면 오른편 그림의 창이 나타난다. fitting time, 정밀도, 최대



© TA Instruments Korea – Waters LLC. MMK0002-1 Tel. 02-3415-1500, Fax. 02-3415-1515
Contact to ; http://www.tainstruments.co.kr/contactus.asp

반복계산(iteration) 수 등을 미리 정해 준다.

2] 화면 설정 ;  왼편부터 설명하면

[1]  전 화면 설정 ; fitting 부분을 전 화면으로 보여준다.

[2]  parameter table 글씨 설정 ; fitting parameter 결과 부분의 글씨 크기를 조절할 수 있다.

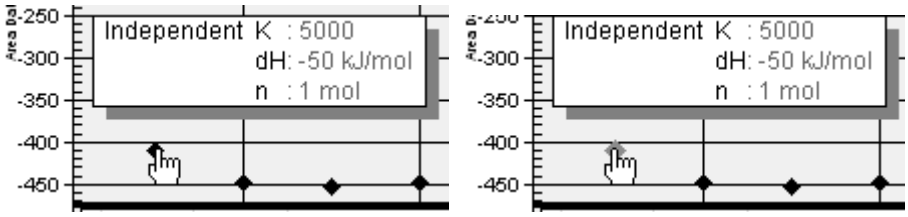
[3]  legend 위치 이동 ; 한 번 누를 때마다 legend가 화면 주위를 돌아가면서 이동한다.

[4] Residual 보여주기 ; fit 곡선과 실제 data의 차이(residual)을 toggle로 보였다/감췄다 한다.

3] '이상한 점'을 fitting 때 빼는 방법

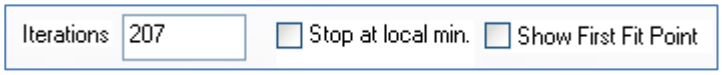
[1] fitting 화면에서, 제외할 점 위로 마우스를 가져간다. 이러면 마우스 모양이 손으로 바뀐다(아래 그림 4-17).

[2] 마우스 왼편 버튼을 한 번 클릭하면, 제외할 점의 색이 약간 흐리게 바뀐다(아래 그림 4-18).



▲ 그림 4-17/18. fitting 개시 전 특정 점을 제외시키는 방법

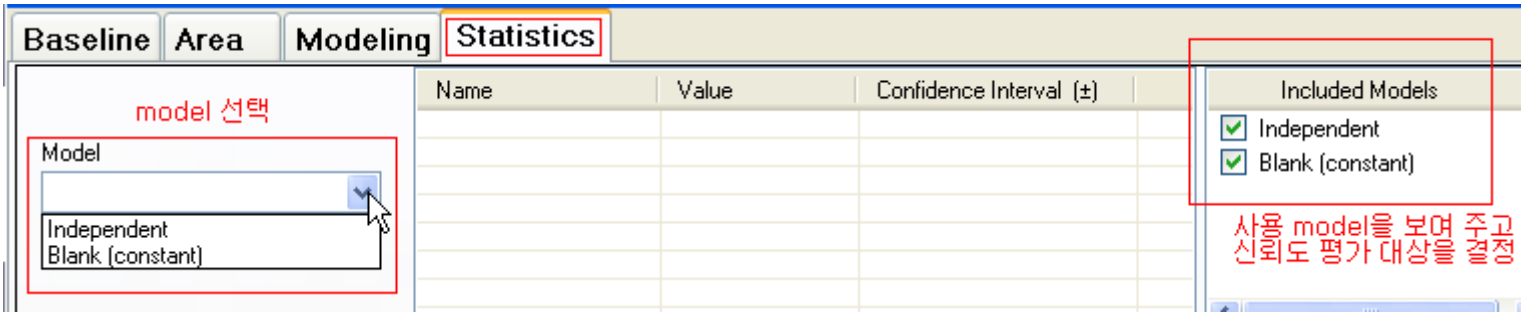
cf. 참고로, 평형을 기다리는 중 주사기 내 titrant가 확산해 나오기 때문에 peak 면적이 감소하는 수가 있으며 첫 점은 거의 어긋난다. 따라서 **첫 점은 거의 채택 안 함.** 화면의 아래 메뉴에서 'show first fit point'를 check하면 첫 점이 fitting에 들어간다. Check 안 하면 첫 점은 default로 아예 제외해 버린다.



(4) Statistics tab ; fitting 결과에 대한 신뢰도 평가

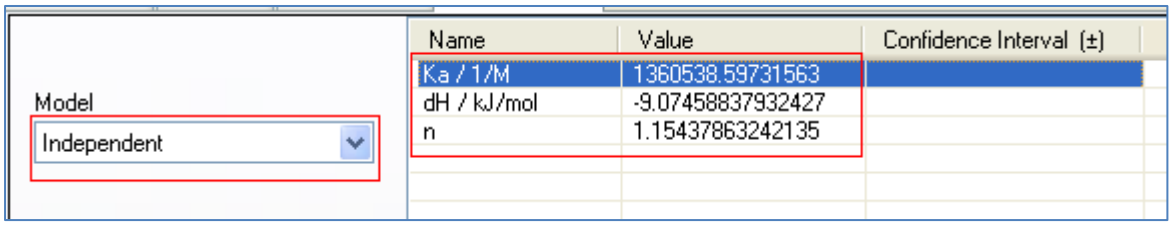
- 상단 ; 모델을 선택하고, 이 모델에 대한 신뢰도 평가를 보여줌. 아래 그림이 초기 화면이다.

© TA Instruments Korea – Waters LLC. MMK0002-1 Tel. 02-3415-1500, Fax. 02-3415-1515
Contact to ; http://www.tainstruments.co.kr/contactus.asp



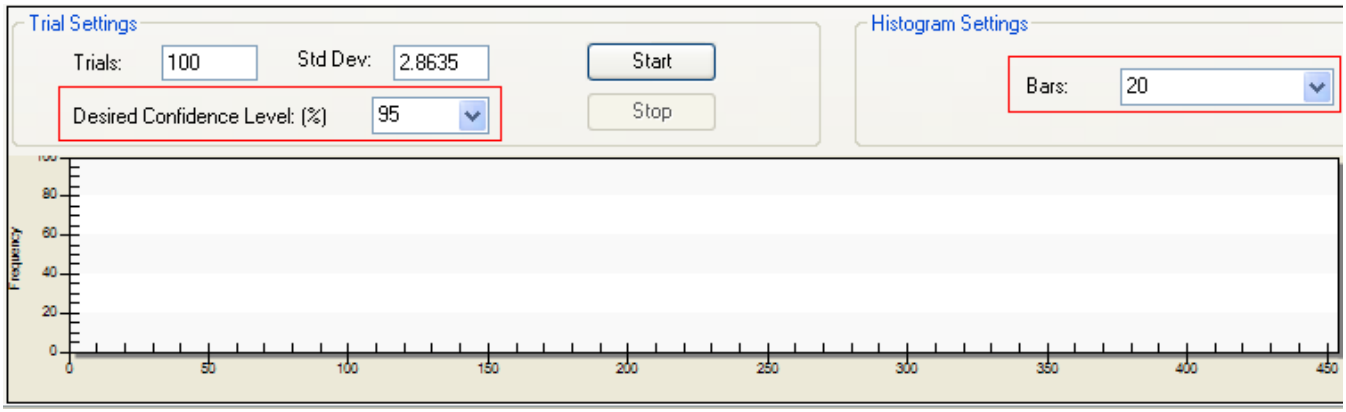
▲ 그림 4-19. fitting 결과의 통계적 신뢰도 평가. 열었을 때 초기 화면

위에서 모델을 선택한 후에는 그림 4-20처럼 바뀐다.



▲ 그림 4-20. Model 선택 후 화면. 해당 model의 parameter들이 나타난다.

- 하단 ; 평가에 필요한 통계 변수들을 지정하고 graph로 보여 주는 화면이다.



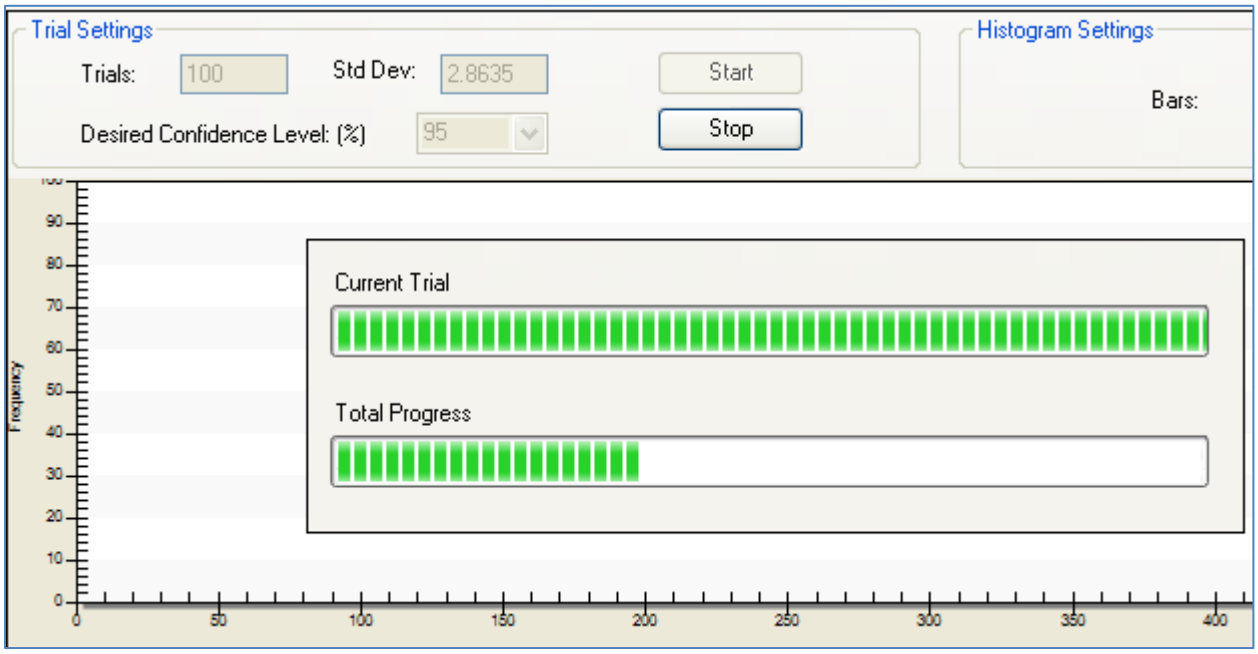
▲ 그림 4-21. 평가 그래프 화면으로, 변수를 정해 평가를 시작하기 전 그래프가 없는 상태

[1] desired confidence level; 68.3, 90, 95, 99%를 선택 가능. Default는 위에서처럼 95인데, 눈치 채셨겠지만 이것은 차례로 정규분포 곡선에서 1, 1.64, 2, 3σ의 위치다.

[2] 옆의 'Bars'는 막대그래프 구간의 숫자다.

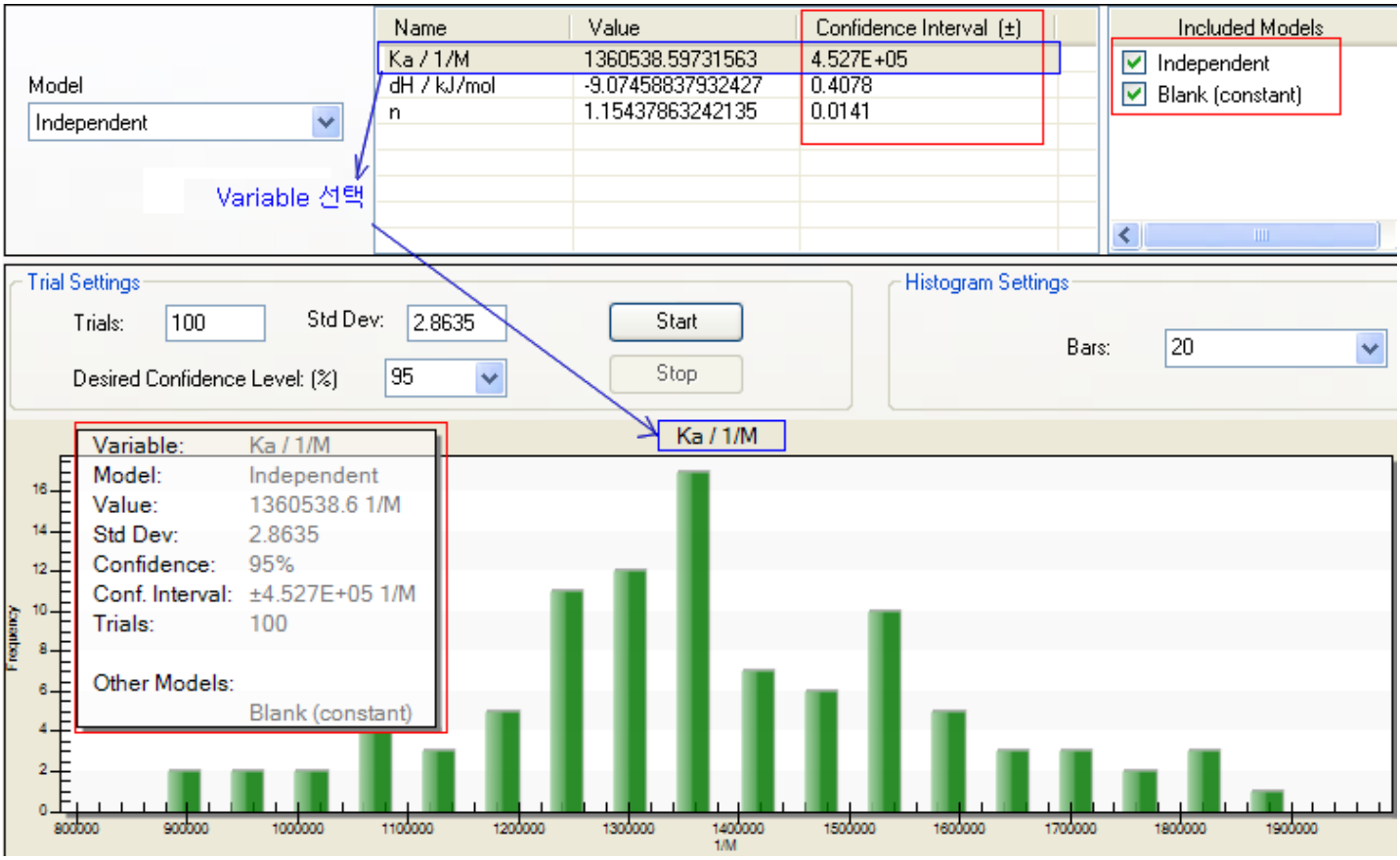
위의 start button을 누르면 아래처럼 화면이 바뀌면서 평가 계산이 진행된다. 도중에 stop button을 누르면 물론 중단된다.

© TA Instruments Korea – Waters LLC. MMK0002-1 Tel. 02-3415-1500, Fax. 02-3415-1515
Contact to ; http://www.tainstruments.co.kr/contactus.asp



▲ 그림 4-22. 평가 run 진행 과정

NB] 이렇게 run button을 누르기 전에, 그림 4-23 오른편 위의 model checkbox를 선택해 두어야 한다. 선택하지 않으면 결과가 나오지 않는다.

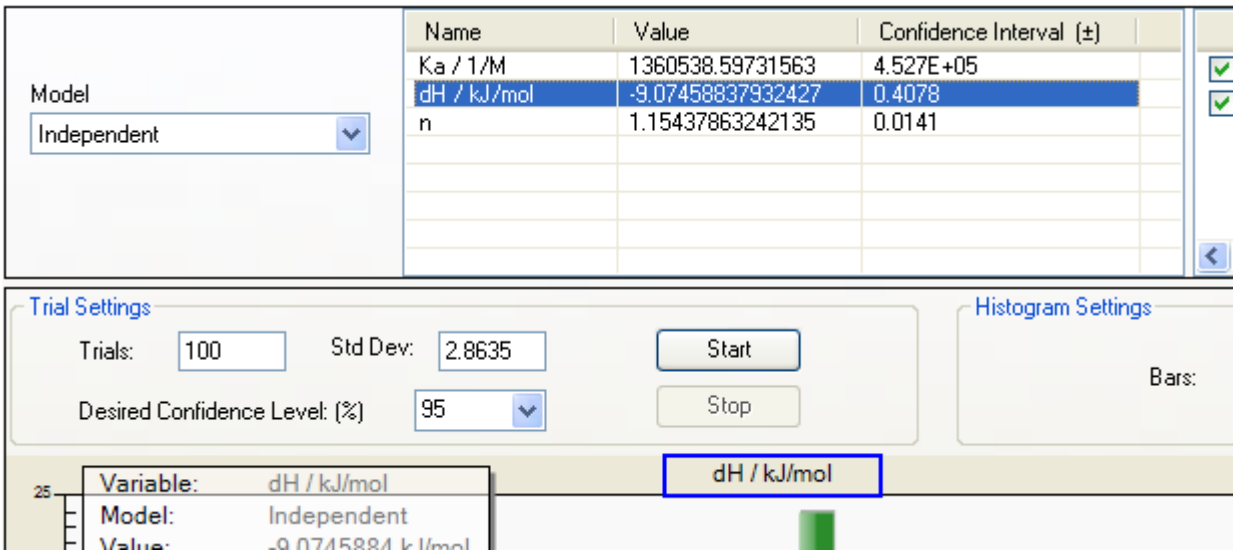


▲ 그림 4-23. 신뢰도 평가 run이 다 끝난 화면; K 선택

© TA Instruments Korea – Waters LLC. MMK0002-1 Tel. 02-3415-1500, Fax. 02-3415-1515
Contact to ; http://www.tainstruments.co.kr/contactus.asp

앞 막대그래프의 의미는, 'Trial 100회 중 각 구간 값이 얼마나 나왔는지 빈도(frequency)'를 알려 준다.

앞 페이지 그림 4-23에서 강조해 놓은 부분은 신뢰도를 평가한 수치 및 결과 table이다. 그림 위쪽에서 K를 선택했기 때문에 아래 화면에서는 K에 대한 신뢰도가 나타나는데, 만약 다른 parameter를 선택했다면 화면이 바뀐다. 아래 그림 4-24는 ΔH를 선택했을 때의 화면이다.



▲ 그림 4-24. 신뢰도 평가 run이 다 끝난 화면; ΔH를 선택

© TA Instruments Korea – Waters LLC. MMK0002-1 Tel. 02-3415-1500, Fax. 02-3415-1515
Contact to ; http://www.tainstruments.co.kr/contactus.asp