

差示扫描量热法 (DSC) 及其在生物学和生物化学中的应用(二)

傅 亚 珍

(中国科学院生物物理研究所)

三、DSC 在生物学和生物化学中的应用

生物学和生物化学研究的过程都存在焓的变化,这是量热法在生物学和生物化学中得以广泛应用的基础。在此我们仅着重介绍它在几个方面的应用。

1. 对生命体系中水的研究

水在生命体系中具有极其重要的作用。水约占人体重的 70%,没有水,人连形体也保持不了。人进行新陈代谢的介质是水。维系细胞具一定渗透压,从而维系一定结构的也是水。

生物大分子构象的变化是生命活动的主要体现。而水是保持大分子结构稳定的重要因素。

生命体系中的水如此重要,那么它在体内究竟处于什么状态,又有什么特性,这是人们目前正在探讨的重要课题。

对生命体系中水的研究有很多手段。其中量热法是一种卓有成效的研究方法。一般把远离大分子表面、与普通水性质无显著区别的称为“游离水”或“自由水”,而把与大分子表面相邻接且与之具有很强相互作用的水分子称为“结合水”。结合水与普通水性质不同,它有较高的密度和比热,有较低的流动性,且冰点大大降低,以至被称为“不冻水”。研究证明,含有数量不同的结合水和游离水的相同大分子,具有不同的稳定结构,从而表现出不同的功能。因此,可以通过测量大分子所含有的结合水量和游离水量,研究细胞和大分子的结构与功能。

DSC 可以简便、快速地测量细胞,组织以及大分子中的游离水量和结合水量。方法是,先将样品降至零下若干度使游离水冻结,然后再

程序升温致使在 0℃ 出现冻结的游离水的熔融吸热峰,将总的峰面积所代表的总焓变除以水的熔融焓(79.7 毫卡/毫克),则可知游离水量。由样品的总含水量(将其在 105℃ 下干燥 24 小时或更长时间,直至样品恒重,所失去的重量即为样品的总含水量)减去 DSC 测得的游离水量便可算出样品的结合水量^[14]。

用 DSC 测得的一些生物试样及大分子的结合水量的结果如下^[14]。

试 样	结合水量(克水/克干重)
球蛋白	0.3—0.5
纤维蛋白	0.3—0.5
DNA	0.6—0.65
细胞膜	0.25
肌肉细胞	0.8

2. 对生物膜流动性的研究

近十年来,国际上关于生物膜的研究已深入到生物学、医学的各个领域,成为当前分子生物学中最活跃的领域之一。而 DSC 已成为膜研究的重要方法。

生物膜具有多种功能,与机体的物质代谢、能量转换、信息传递、细胞免疫、细胞识别、肿瘤发生、细胞起源以及生物进化等都有密切关系。许多研究证明,生物膜的多种功能与其流动性密切相关。所谓生物膜的流动性,是指它的组成成分的代谢更新、分子运动以及状态的改变等等。例如,随环境条件的变化,脂分子可处于晶态也可处于液晶态。由晶态向液晶态的转变结果,使其膜的流动性增加。

(1) 生物膜的 DSC 曲线 1968 年 Stein^[15]作了 *A. laidlawii* (莱氏无胆甾原体) 细胞和膜的 DSC 曲线,如图 6 所示。

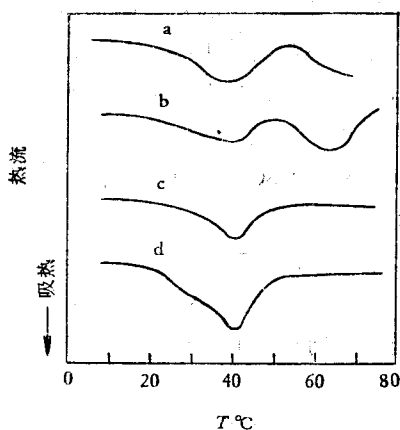


图6 *A. laidlawii* 细胞和膜的 DSC 曲线

a. 整个细胞 b. 细胞膜 c. 热变性以后的膜
d. 抽提出的脂

由图不难分析出第一个峰是脂的吸热峰，第二个峰是蛋白变性峰。脂的吸热峰就是脂分子从固态转变为液晶态的结果，它可以反映膜的流动性的变化。在一些因素的影响下，如果这个吸热峰的面积越大说明膜的流动性变化越大，此相变温度越低说明膜的流动性越高。因此，DSC 可以测定膜的流动性的程度。

用 DSC 进行研究的结果证明，膜的流动性与脂分子的脂肪酸链的长度和不饱和度有关，即脂肪酸链越长，相变温度越高，说明流动性越小，脂肪酸的不饱和程度越高，则相变温度越低，说明它的流动性越大。

(2) 用 DSC 研究膜流动性对膜功能的影响 ① 对酶活影响的研究 1975年，Morrisett 等人^[16]测试了大肠杆菌膜上的 NADH 氧化酶和 D-lactate 氧化酶的酶活与温度倒数的关系，如图 7 所示。

这两个酶活曲线上都有两个拐点，用 DSC 实验证明较低温的拐点和较高温的拐点处，分别是膜脂从凝胶态向液晶态转变的开始和结束的温度。因此证明膜上的酶活性和膜的流动性有关，即与酶周围的脂环境的物理状态有关。膜的流动性越大，越有利于膜中酶分子的旋转和移动，从而致使酶的活性增加。

② 对细胞凝聚影响的研究 正常细胞间的相互作用，包括“生长接触抑制”，它对于组织

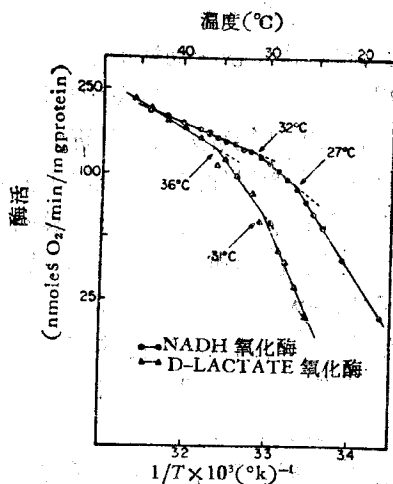


图7 NADH 氧化酶和 D-lactate 氧化酶的酶活与温度倒数的关系曲线

的形态发生和组织的完整性都是很重要的，恶性细胞因为失去了“生长接触抑制”作用，因此出现了恶性生长和增殖。

细胞间的相互作用，首先是质膜间的相互作用，即一个细胞膜上的特异受体与邻近细胞的质膜上的互补供体分子的相互作用。由于这种相互作用就使细胞具有了各种生理功能。

Jones 和 Perry, 1978^[17]，研究了温度对体外培养细胞的凝聚的影响。他们发现，在一个特定的温度范围内存在着凝聚性的突然增加，用 DSC 实验证明，这个温度正是处在细胞膜从凝胶态到液晶态的转变温度范围。这说明细胞的凝聚作用与膜的流动性是密切相关的。

③ 对信息传递影响的研究 Papahadjopoulos 等 (1976) 通过 DSC 实验证实了局麻和全麻药物以及吗啡衍生物、抗降压药物均能影响生物膜从凝胶态到液晶态的转变。对这种转变的深入研究，可以使人们更好地理解这些药物诱发膜性质改变的分子机理。

这里有一个问题需要弄清，既然人的体温是恒定的，那么究竟是什么因素影响膜的流动性，近来国外报道的一些 DSC 实验结果表明，胆固醇可以瞬时调节膜的流动性。根据是，在晶态磷脂中加入胆固醇时，使得磷脂从凝胶态到液晶态转变的温度降低，即使流动性增加。反之，在液晶态磷脂中加入胆固醇，则发现流动性

减小。也有人发现一价阳离子会使磷脂流动性增大,而二价阳离子使流动性减小。

采用 DSC 测定相变温度及相变焓,可以进行几乎所有与膜功能有关的机理研究。用 DSC 研究生物膜具有明显优点,研究时不需要在样品中添加任何标记,因而不会破坏膜的原来状态;可以连续研究,节省时间,节省样品。

3. 对生物大分子构象的研究

对生物大分子结构和功能的研究,是当前分子生物学的中心课题。研究生物大分子结构的生物物理和生物化学的方法很多,如 X 射线衍射法,能够直接测出大分子结构中诸原子的位置。但是这些方法都不能给出有关生物大分子结构稳定与否的信息,而 DSC 可以给出对应一定构象的生物大分子的结构稳定能,以及它与一些结构参数间的关系。这是 DSC 研究生物大分子构象的独到之处。

当蛋白质被加热时,它所吸收的热量不断地克服结构上的束缚能,而当蛋白质吸收了可以完全克服束缚能的足够的热的时候,就会发生构象的极端变化,从有序的天然结构变成无序的变性状态。蛋白质所吸收的产生热变性的热能可以衡量其构象的稳定能。因此从生物大分子热变性的 DSC 曲线上,可以得出有关大分子结构稳定程度的一系列热力学参数。

目前已有许多关于对小分子量球蛋白的热变性进行 DSC 研究的报道,其中包括对已知空间结构的核糖核酸酶、溶菌酶、胰凝乳蛋白酶、细胞色素 C 和肌球蛋白所进行的热变性研究。

这些小分子量球蛋白的稳定能,根据各种稳定力理论计算一般均为 10—20 千卡/克分子,实验值与理论值很好吻合。它们的稀溶液的 DSC 曲线见图 8。

从图 8 的 DSC 曲线可以看出,上述几种球蛋白在变性前的比热大小近似,且均随温度的升高而线性增加。变性后的比热均高于变性前的比热。而二者之差 ΔC_p^d 则随蛋白种类而异,这可能与不同种类的蛋白所含疏水键的数量有关。

由变性峰的锐度计算出的 Van't Hoff 转变焓 ($\Delta H_{v,H}$) 与量热学由峰面积测得的转变焓 (ΔH_{cal}) 近似相等。对这五种球蛋白而言 $\frac{\Delta H_{cal}}{\Delta H_{v,H}} = 1.05 \pm 0.03$,因此可将这些蛋白稀溶液的热变性过程视为双态过程,即为两种不同的状态间的协同作用的转变。

一些学者还就蛋白对生物膜流动性的影响进行了 DSC 研究。例如 Papahadjopoulos 研究了多种蛋白与磷脂双层膜的相互作用及对膜流动性的影响。他的实验表明,一个特定的蛋白对膜的相变温度和焓值的影响取决于该蛋白的类型及它渗透进双层的程度。

关于另一重要生物大分子——核酸的热力学参数,部分测定结果见下表^[4]。

总之,用 DSC 可以测定各种生物大分子(蛋白、核酸、脂、脂蛋白、酶、多糖等)在不同状态(干、水合或溶液)、不同条件(温度、pH、离子强度、溶剂、浓度等)下的结构稳定能,从而为结构与功能的研究提供热力学的依据。另外,用 DSC 对生物大分子与抗菌素等药物的相互作用进行研究,也可加深对医学上的一些重要基础过程的理解。

4. 用于低温生物学的研究

关于低温对细胞影响的研究,对血液、精液、农作物、种子的保存以及肉类、鱼类、蛋类和水果的冷冻保存很有意义。目前一般认为,低温保存活细胞的关键是

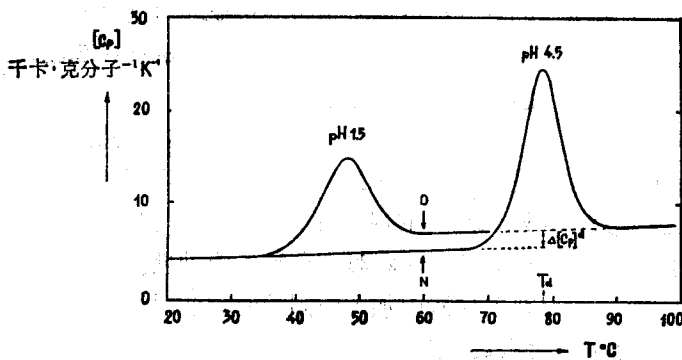


图 8 溶菌酶在不同 pH 时热变性的 DSC 曲线

核酸热变性的热力学参数

核酸种类	变性温度 (T ^o C)	变性焓 焦耳/克分子碱基对
小牛胸腺 DNA	72	29.3
T ₂ 噬菌体 DNA	78	35.6
T ₂ 噬菌体 DNA, pH 7	75	38.8
蛙精 DNA, pH 7	60.6	32.8
小牛胸腺 DNA, pH 7	77	30.1
小牛胸腺 DNA, pH 10.3	68.6	43.5
小牛胸腺 DNA, pH 6.8	72.6	33.8
小牛胸腺 DNA, pH 7.5	66	31.4

在冰融过程中水与冰晶的相位变更。因此，利用低温保存活细胞就要选择适宜的低温和冷却速度，DSC 适于此研究目的。

以上介绍的仅是 DSC 在生物学和生物化学中的部分应用，实际上它几乎可以应用于生命科学任一领域、任一水平的研究工作。差示扫描量热法是用于生命科学研究的一种大为作为、大有发展前途的方法。

四、差示扫描量热计 (Differential Scanning Calorimeter) 及实验技术

1. 差示扫描量热计 (简称 DSC) 的构造和原理

六十年代,美国 Perkin-Elmer 公司设计制造了差示扫描量热计 DSC-1, 七十年代又生产了新型的 DSC-2 (功率补偿型)。这种仪器可以精确、灵敏地测量热效应,是当前国际上先进的差

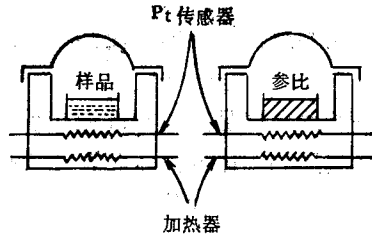


图 10 DSC 支架部分图

示扫描量热计。它的工作温度范围为-175℃—+725℃,最大灵敏度为 0.1 毫卡/秒·满刻度,使用的样品量仅为几毫克。

差示扫描量热计主要由程序器、量热计和记录器三部分组成(图 9)。程序器是使试样和参比物以一定的速率升温或降温的装置。量热计是仪器的核心部分,它把测得的热量转换成电信号。记录器放大并记录信号。量热计主要由两个支架(样品架和参比架)组成(图 10)。这两个支架是由铂-铑合金做成的两个杯子。在每个杯子底部的夹层中各有一个温度传感器和一个加热器。两个支架的热质量很小且在导热性能上完全一样。在程序器的控制下样品杯中的样品和参比杯中的参比物以相同的程序速率升温或降温,若样品中产生伴有热效应的物理或化学变化,就会因样品的吸热或放热而使样品架的温度降低或升高,样品架和参比架间便产生了温度差。与此同时一个感受温度差的高增益反馈回路系统,控制支架加热器,维持两个支架的温度相等,为保持“零温度差”所需的能量差,直接以毫卡/秒数记录在图的纵坐标上,它与实验期间样品热量的吸收(或放出)速率相对应,在记录图的横坐标上记录的是相应的温度或时间。

2. DSC 的实验技术

使用 DSC 做定量测量必须正确掌握制样技术,必须对量热计校准以得到能量校准常数以及准确的温度尺度,否则影响测量的灵敏度、分辨率和准确性。

(1) 制样技术 虽然定量测量的准确性不拘于样品的物理状态,然而 DSC 曲线的形状却受样品物理状态的影响。为使 DSC 曲线具有

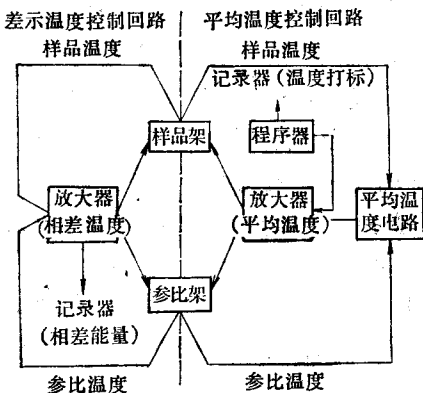


图 9 DSC-2 的主要构成及控制回路

最佳的峰锐度和分辨率，需使样品与样品盘之间有尽可能大的热接触，即应使样品呈薄膜或细颗粒状。

测量一般固体样品须用标准铝样品盘。若测量有高蒸气压的固体或液体时，须用挥发型铝样品盘。如测量水溶性的生物溶液或具有挥发性溶剂、挥发性反应产物的样品时，为免除蒸发发热的干扰，需使用大体积的不锈钢盘，它可以经受 20 个大气压力。

为了得到高灵敏度及高分辨率，必须兼顾试样用量和扫描速率。因为高灵敏度需要大试样量及快扫描速率，而高分辨率却需小试样量及慢扫描速率，因此要根据实验的具体需要选择合适的样品量和扫描速率。

(2) 能量校准 通常人们采用已精确知道的高纯度金属的熔融热焓值作为校准标准。最常用的校准物质是铟，其 ΔH (熔融) = 6.80 卡/克，熔点为 156.6°C。用微量天平称取 5—10 毫克的铟，把它放在铝制样品盘中，然后，选定加热速率 (dT_p/dt)、灵敏度(量程)、记录仪走纸速率，描出铟熔融过程的 DSC 曲线。求出峰面积。依照下式求出仪器校准常数 K (毫卡/单位面积)

$$K = \frac{\Delta H(\text{熔融}) \times m_c}{A_c} \text{ 毫卡/单位面积}$$

其中， ΔH (熔融) 是校准物质的熔融焓 (毫卡/毫克)， m_c 是校准物质的质量 (毫克)， A_c 是校准曲线的峰面积。

求出 K 值以后，便可根据下式求出其它样品的热焓值 ΔH_s

$$\Delta H_s = \frac{K \times C_s \times r_c \times M \times A_s}{C_c \times r_s \times m_s} \times 10^{-3} \text{ (千卡/克分子)}$$

其中， C_c 和 C_s 分别是校准实验和样品测定中使用的扫描速率， r_c 和 r_s 分别是校准实验和样品测定中采用的灵敏度 (量程) (单位为毫卡/秒)， M 是样品的分子量， m_s 是样品的质量 (毫克)， A_s 是样品的 DSC 曲线的峰面积。为提高精确度，务必使校准物质和样品有相同的加热

速率，以保证 R_0 (样品盘和支架间的热阻) 为常数。

(3) 温度校准 通常人们使用已知精确熔点的高纯金属铟和铝作温度校准。它们的熔点分别为 156.6°C 和 327.47°C。经过校准后，在 50°C—725°C 之间指示温度的误差为 $\pm 2^\circ\text{C}$ 。

即使作了上述温度校准，DSC 曲线峰顶的温度也并不正好就是相变的温度。当样品很少、加热速率很慢时，样品温度近似样品盘的温度，而样品盘和支架之间的热阻 (R_0) 使样品盘的温度滞后于支架的温度。这种热滞，可以通过一种在所研究温度范围内，熔融的高纯度化合物的 DSC 曲线的方法求出。例如，测高纯金属铟的熔融峰，此峰的前沿斜率与扫描基线的交点为铟的熔点，前沿的斜率为 $(1/R_0)(dT_p/dt)$ ，如图 11 中 CB 所示。因此，样品 (例如三苯甲烷，其熔融的 DSC 曲线示于图 11) 的真正熔点应当由点 B 给出，而不是由点 A 给出。一般不需作出比热为零的样品的真正的“恒温”基线，因为与扫描基线的交点 B' 已能给出足够精确的温度值。

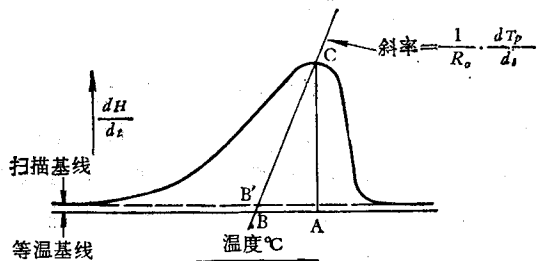


图 11 纯度为 99.9% 的三苯甲烷的熔融曲线

因为样品盘温度对支架温度的滞后程度与热阻 (R_0) 及扫描速率 (dT_p/dt) 有关，因此做温度校准时，样品盘要干净，盘底不能畸变，否则会影响 R_0 进而影响温度的校准。同时，也要注意在改变扫描速率以后，必须再做相应于新的 dT_p/dt 的温度校准。

Pella 和 Nebuloni^[18] 曾详细讨论了能使差示扫描量热计的温度精确到 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 的方法。

(4) 比热校准 样品以一个固定的速率加

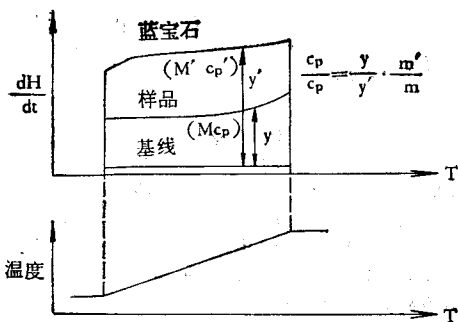


图 12 用比例法测定比热

温时, 进入样品的热流率 (dH/dt) 与它的瞬时比热成正比, 即:

$$\frac{dH}{dt} = m \times C_p \times \frac{dT_p}{dt}$$

其中, m 是样品的质量 (克), C_p 是比热 (卡/克), $\frac{dT_p}{dt}$ 是给定的程序升温速率。

虽然可以直接用此式求得 C_p 值, 但是由于记录读数和升温速率可能有误差, 会降低结果的准确度。为避免这一误差, 一般采用比例法测比热。原理如图 12 所示。先在所需要测定的温度范围内, 做已知准确比热的蓝宝石的 DSC 曲线 ($\frac{dH}{dt}$ 随时间的变化曲线), 再做空样品盘的 DSC 曲线, 最后做样品的 DSC 曲线, 从三条 DSC 曲线上, 可以分别求得在某温度时蓝宝石和样品相对于空样品盘的纵坐标的偏移值 y' 和 y , 从而由蓝宝石和样品的质量 m' 和 m 及蓝宝石的比热 C'_p , 根据下式求出样品的比热:

$$\frac{C_p}{C'_p} = \frac{y}{y'} \times \frac{m'}{m}$$

$$\text{所以 } C_p = \frac{y}{y'} \times \frac{m'}{m} \times C'_p$$

由上式可知, 样品比热测量的准确性与纵坐标的严格校准无关, 从而简化了测量方法, 提高了测量的准确性。采用差示扫描量热法所测的比热数值的精确度为 0.3%, 近似绝热量热法, 但是差示扫描量热法优点是可以很快得出数据, 且只需很少的样品量。

测定比热的差示扫描量热技术能够探测到热容量函数的间断现象 (例如“玻璃化”转变和

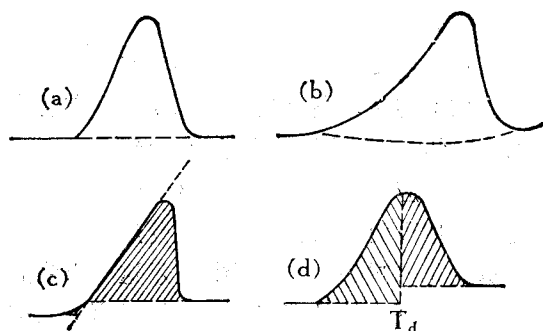


图 13 基线修正图

居里点相变), 以及发生这些间断时的温度。

只要采用专门装挥发性物质的样品盘, DSC 还可以测定液体 (包括含水的生物样品) 的比热。

(5) 测量热焓时的基线修正 DSC 曲线和基线所围成的面积代表了试样热效应的大小, 因此要准确地测量峰面积, 就要合理地确定曲线下的基线。基线的确定需注意以下几种情况: 当热效应发生之前和之后热容量改变非常小, 热效应发生的温度范围不大时, 延伸前后基线即可, 见图 13(a)。

当热效应发生之前和之后热容量改变很小, 但热效应发生的温度范围很宽时, 则需用空样品盘在同一测量温度范围内扫一基线, 将它重样品的 DSC 曲线下作为确定峰面积的基线, 如图 13(b) 所示。

当热效应发生之前和之后热容量变化较大, 而 DSC 曲线后缘较陡时, 则可按图 13(c)

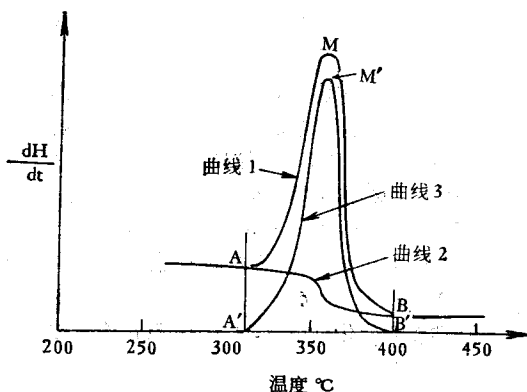


图 14 热容量的变化对实测的热焓数据所作的修正

所示方法确定积分基线。

当热效应发生之前和之后热容变化较大,前后缘均不陡时,则可按图 13(d) 所示方法确定积分基线。 T_1 为热效应进行一半的温度。

当热效应情况同上述时, Brennan 等人^[19]提出了一种可使焓的变化 ΔH 不受热效应前后热容量变化影响的新方法。图 14 示这一方法的原理。图中画出的是棉花样品热解过程的 DSC 曲线 AMB 。点 A 代表因棉花和样品盘的比热而偏离基线 $A'B'$ 上的点 A' 向上的移位,而点 B 代表因热解产物和样品盘的比热而偏离 B' 点向上的移位。假若热解焓是零(热中性反应),则棉花和热解产物的比热变化为连接 A 与 B 的曲线 2,对实测的 DSC 曲线 AMB 上的各点,就比热效应进行修正的结果得到了曲线 $A'M'B'$ (曲线 3)。峰 $A'M'B'$ 在基线 $A'B'$ 上方的面积就代表了 $\Delta C_p = 0$ 的反应物和反应产物的焓的变化。

这种考虑到比热变化而对实测的焓数据进行修正的办法,实际上是假定所研究系统中没有热滞现象,严格说,它只适用于在大的温度范围内发生的相变。为了更精确地确定基线,Heuvel 和 Lind^[20] 提出了一种理论,不仅考虑到了初始状态和最终状态之间热容量的差别,而且也考虑到了热滞现象。他们把这一理论编制

成计算机程序,其中也修正了温度定标的非线性带来的误差。

参 考 文 献

- [1] Plato, C.: *Anal. Chem.* 44, 1531, 1972.
- [2] Marti, E. E.: *Thermochim. Acta*, 5, 173, 1972.
- [3] Sondack, D. L.: *Anal. Chem.*, 44, 888, 1972.
- [4] Julian M. Sturtevant: *Annual Review of Biophysics & Bioengineering*, 3, 39, 1974.
- [5] Brennan, W. P. Thesis, ph. D.: *Princeton University* 1971.
- [6] Carroll, R. W. et al.: *Proc. 2nd Int. Conf. Thermal Analysis*, 1, 189, 1969.
- [7] Ortiz, L. M. et al.: *Thermochim. Acta*, 3, 383, 1972.
- [8] Wunderlich, B.: *Thermochim. Acta*, 5, 369, 1973.
- [9] Rogers, R. N.: *Thermochim. Acta*, 3, 437, 1972.
- [10] Frenman, E. S.: *J. Phys. Chem.*, 62, 394, 1958.
- [11] Newkirk, A. E.: *Anal. Chem.*, 32, 1558, 1960.
- [12] Doyle, C. D.: *Anal. Chem.*, 33, 77, 1961.
- [13] Šesták, J. et al.: *Thermochim. Acta*, 3, 1, 1971.
- [14] Cook, R. et al.: *Annual Review of Biophysics & Bioengineering*, 3, 1974.
- [15] Stein, J. M.: *Adv. Chem. Series*, 84, 259, 1968.
- [16] Jones, M. N.: *Biochemical Thermodynamics*, 212, 1979.
- [17] Jones, M. N. et al.: *Exp. Cell. Res.*, 112, 167, 1978.
- [18] Pella, E. et al.: *J. Thermal. Anal.*, 3, 229, 1971.
- [19] Brennan, W. P. et al.: *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, 8, 314, 1969.
- [20] Heuvel, H. M. et al.: *Anal. Chem.*, 42, 1044, 1970.

[本文于 1981 年 8 月 26 日收到]

学术动态

1982 年有关国际细胞生物学方面的学术活动

英国细胞生物学协会, 1982 年 4 月 5 日在苏格兰格拉斯哥召开, 讨论离体及活体真核细胞基因组行为。联系人: Dr. J. D. Pitts (格拉斯哥大学生化系)。

第一届欧洲细胞生物学会会议 7 月 19 日在法国巴黎召开, 联系人: Dr. P. Favard。

国际脑研究会议, 4 月将在瑞士召开, 主办单位 I. B. R. O.

细胞功能与分化讨论会, 4 月 10 日在希腊雅典召开, FEBS 主办。

第五届国际癌预防与检测讨论会, 2 月 16 日在巴西召开, 联系处: 1212 ave., 纽约。

第五届国际植物组织和细胞培养讨论会, 7 月在日本召开, 东京大学植物系, A. Komamuna 教授。

国际第十二届生化会议, 8 月 15 日在澳大利亚召开, 迈阿密 Prof. W. J. Whelan。

国际第 10 届电镜会议, 8 月 17 日在西德汉堡召开。

国际第二届生物系统中水及离子讨论会, 9 月 6 日在罗马尼亚召开, 罗医学科学协会主办。

第十三届国际肿瘤会议, 9 月 9 日在英国召开。联系人: Dr. E. A. mirand (美国)。

中子及其应用讨论会, 9 月 12 日在英国剑桥召开。