

生物大分子热容的研究

傅 亚 珍

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

热容是描述宏观系统状态的基本热力学函数——焓对温度的导数, 即

$$C_p = \frac{dH(T)_p}{dT}$$

人们之所以要对于一个系统进行热容测量, 是因为用作为焓的导数的热容去描述系统的状态对温度的依赖关系要比用焓去描述更为严谨。某些热分析技术(如差示扫描量热技术 DSC)直接测量的正是热容而不是焓变参数。

如果一个系统的热容 $C_p(T)$ 在某个温度范围 (T_0 — T) 内是已知的, 那么我们就不仅能够测定该系统在此范围内的焓参数

$$H(T) = H(T_0) + \int_{T_0}^T C_p(T) dT$$

还可以测定该系统的熵参数

$$S(T) = S(T_0) + \int_{T_0}^T \frac{C_p(T)}{T} dT$$

同时也可导出该系统的 Gibbs 自由能

衰老从 10~12 岁即开始了, 这与胸腺开始退化并萎缩而造成 T 细胞承担的免疫功能降低有关。实验发现, 退化胸腺的网状结构破坏, 皮质淋巴细胞稀释, 特别有意思的是出现充满类脂颗粒的巨噬细胞, 这些类脂颗粒易在自由基作用下过氧化, 并产生更多的自由基而向邻近胸腺组织扩散, 从而引起胸腺的进一步萎缩, 很可能胸腺的萎缩退化自始至终有脂质过氧化的伴行。

现在脂质过氧化问题已经成为一个非常活跃的研究领域, 但目前只停留在细胞生化、分子生化水平, 还没有进入到基因亚细胞水平。积极开展这方面的研究, 搞清机理, 了解细胞损伤的起因、发生及发展, 并采取措施保护细胞不受过氧化损伤, 都有重要的理论意义和实践意义。

本文承潘华珍老师热情指导, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] T. F. Slater: *Biochem. J.*, **222**(1): 1—14, 1984.
- [2] B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge: *Biochem. J.*, **219**(1): 1—15, 1984.
- [3] D. Chiu, and S. B. Shohet, et al.: *Free-radicals in Biology*, Vol. V 115—160, Acad. Press N. Y., 1982.
- [4] J. F. Mead and S. Hirar et al.: *Lipid Peroxidation in Biology and Medicine*, 161—178, 305—314, 1982.
- [5] N. A. Porter et al.: *Methods in Enzymology*, Vol. **105**, 273—356, Acad. Press Inc., 1984.
- [6] D. G. Harman: *Geront.*, **11**, 298, 1956.
- [7] E. Cadenas et al.: *Biochem. J.*, **223**(3), 755—759, 1984.
- [8] Pan Huazhen et al.: *The Third International Symposium on Biology and Medicine*, May-June, 123, 1984.
- [9] 刘时中: 《生理科学进展》, **14**(2), 147—149, 1983.
- [10] 孔祥瑞: 《生物科学动态》, **4**, 11—18, 1984.
- [11] E. L. Schneider: *J. Amer. Geriatr. Soc.*, **32**(4), 293—295, 1984.
- [12] 潘华珍等: 《生物科学动态》, **5**, 9—14, 1984.
- [13] 张之南等: 《生理科学进展》**15**(3), 222—227, 1984.
- [14] R. A. Floyd: *Free-radicals and Cancer*, 1—59, Marcel Dekker Inc. N. Y., 1982.
- [15] S. C. Sharma et al.: *Cell and Membrane Biology*, **12**(9), 236—237, 1984.
- [16] T. Ramasarma et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **694**(69), 69—93, 1982.
- [17] K. D. Rainsford et al.: *Biology and Chemistry of Active Oxygen*, 105—205, Elsevier N. Y., 1984.
- [18] G. Hacman: *Inc. J. Biochem.*, **13**, 659—692, 1981.

[本文于 1985 年 5 月 7 日收到]

$$G(T) = H(T) - TS(T)$$

因此,如果能够在较宽的温度范围内测得热容的话,我们就能比较完整地描述一个系统。若能测得绝对零度下的热容,那么就能确定上述各热力学函数的绝对值。不过,在一般情况下并不需要对一个系统进行完整的描述。如果对一个系统的液态感兴趣,那么研究的范围就可以缩小到在液态存在的温度限度内。例如,水溶性生物大分子溶液是最接近生命系统的模型,因此 273—373K (即 0—100℃) 是研究这类系统最有意义的温度范围。

蛋白质和核酸的结构以及结构的形式、结构的稳定性乃至结构与功能关系的研究,都是生物化学家和生物物理学家们研究的重要课题。对这些课题进行研究的重要手段之一就是热分析方法。由于目前已知水对生物大分子的结构和功能有着极为重要的作用,因此干的生物大分子、水合生物大分子以及溶液大分子均为研究的对象。生物学家为着研究生物大分子本身的内在性质,往往要求在忽略分子间相互作用的情况即稀溶液(浓度 < 0.3%) 下进行研究。而在稀溶液中大分子成分的表现热容仅为总热容的 10% 左右,因此需要特别准确的测量。目前已有一种绝热式差示扫描微量热计问世,测量相对热容的精确度为 $8 \times 10^{-5} \text{J K}^{-1} \text{ml}^{-1}$, 它可以满足这一要求。

一、生物大分子在一定温度范围内的热容

Hutchens^[1] 和 Andronikashvili^[2] 等人测量了胶原蛋白、胰凝乳蛋白酶原、血清白蛋白、角蛋白和 DNA 的无水制品从邻近绝对零度到室温范围内的热容,发现 DNA 的比热容明显地不同于蛋白质样品。但是各种蛋白质尽管它们的结构有较大差异,但其比热容并无较大差别。由此看来,无水蛋白质的热容本身不带有何有关它们结构的特定信息。

如果将少量水加到干的生物大分子例如胶原蛋白、胰凝乳蛋白酶原、角蛋白、DNA 上去,其水的热容函数没有大的差别。尽管这些样品

代表结构不同的生物大分子(特别是 DNA),然而没有看到水的偏热容有什么大的差别。最令人惊奇的是在测量这些含少量水的生物样品的热容时,看不到冰-水的熔融所产生的任何热吸收。可见样品中的少量水不是游离水,而是与大分子紧密结合着的结合水。结合水的偏比热容在 150K 以下时接近冰的比热容,随着温度的升高它缓慢地接近液态水的比热容,在室温时达到液态水的比热容。一些科学家认为这种结合水呈类冰结构。在 298K 当少量水存在时,生物大分子和水的比热容具加和性,但是随着水量的增加这种加和性又消失。生物大分子的偏热容随水量增加的同时,水-生物大分子系统中出现了新的变化,在热容的温度依赖性上出现了两段分开的温度区域即 220—273K 及 320—373K。图 1 和图 2 为具不同含水量的胶原蛋白-水系统的热容随温度的变化而改变的图示,即 DSC 加热扫描曲线。如图所示,随着水含量的增加在两段区域内的吸热峰面积增加、半峰宽变窄且峰温分别逐渐漂移到一限定值 273K 和 310K。对于球蛋白也有类似现象,只是不同的蛋白质其高温峰的限定值不同。低温峰的出现毋庸置疑与蛋白质-水系统中非结合水的出现有关。这部分水在冷却时可以冻结,加热后又可熔融。实验证明这种冻-熔循环

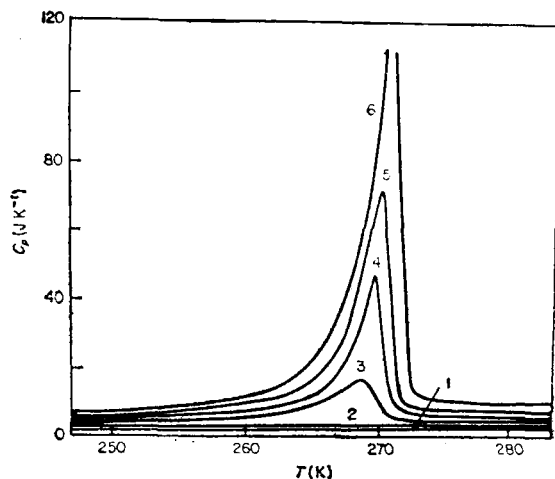


图 1 1g 胶原蛋白 + w g 水系统在 300K 以下的 DSC 扫描曲线
w 分别为: 1. 0; 2. 0.35; 3. 0.64; 4. 0.93; 5. 1.26; 6. 2.0

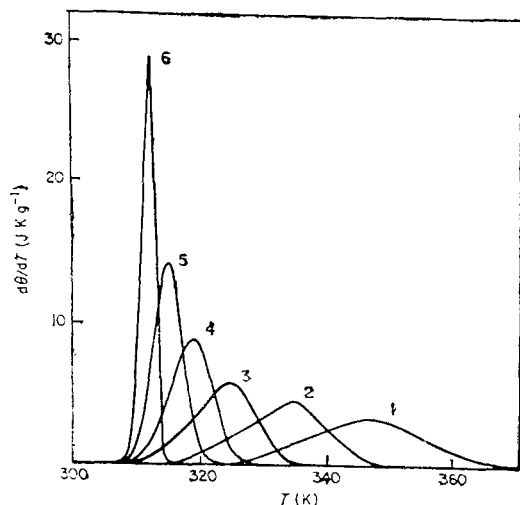


图2 胶原蛋白(大鼠皮肤)在300K以上的DSC扫描曲线
 每条曲线所代表的含水量(克水/克蛋白):
 1. 0.43; 2. 0.71; 3. 1.45;
 4. 2.70; 5. 9.5; 6. 17.0

对生物大分子在溶液中的天然性质没有实质性的影响。但是高温峰出现以后,蛋白质便失去

了它的所有的天然性质成为变性蛋白质。如果将变性过程视为生物大分子有序的天然结构的瓦解过程,我们可以说蛋白质分子经受了一个分子内的熔融过程。低温峰及高温峰的出现都有着重要的生物学意义。目前不少科学家都在从事有关这方面的研究。

二、氨基酸的热“指纹”

P. G. Olafsson, 和 A. M. Bryan,^[3] 用差示扫描量热计检测了十九种固体氨基酸的解体过程(图3)。他们利用曲线解析法将所得的解体曲线进行剖析,发现许多种氨基酸的总解体曲线都可解析成几个分解体曲线。作者按照分解体曲线的个数,将这些氨基酸划分为四类(表1)。又根据解体曲线的形状及数目建立了鉴定氨基酸的“指纹法”,把它们的特定的解体曲线称为它们各自的“指纹”。作者还通过改变加热速率从相应的DSC加热曲线上求得各个分解体曲线的分解温度随加热速率的变化,利用Kissinger法^[4]求得单个解体反应的活化能。利用加

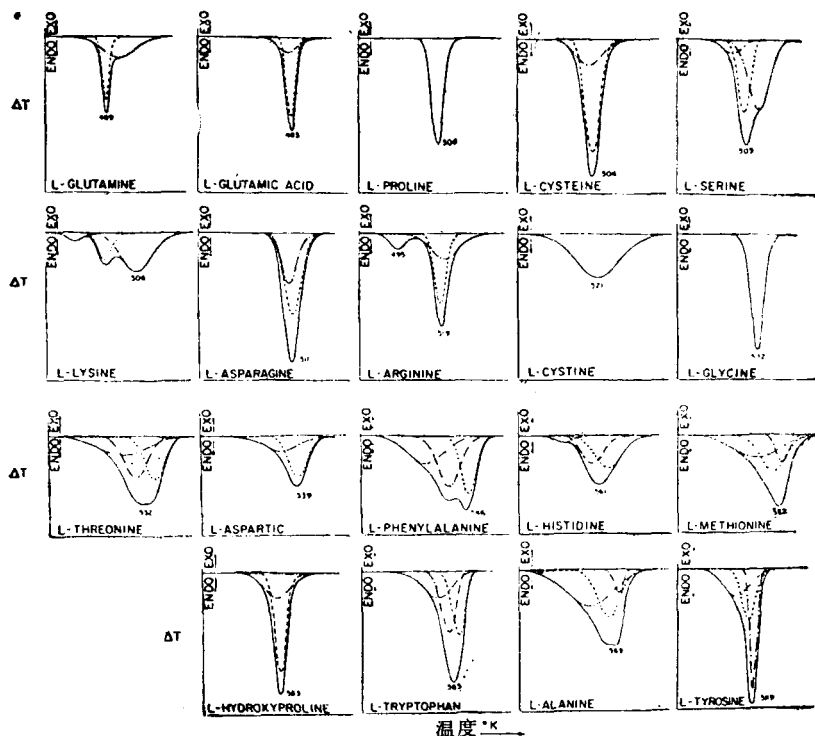


图3 19种氨基酸热解体的DSC曲线

热速率和吸热峰最大值处的温度 T_m 还可以计算出反应的频率因子 $A^{[5]}$ 。

表 1 氨基酸按分解曲线个数分类表

单解体曲线	双解体曲线	三解体曲线	预解体曲线
L-脯氨酸	L-谷氨酸	丝氨酸	赖氨酸
L-胱氨酸	L-谷酰胺	羟丁氨酸	精氨酸
L-甘氨酸	半胱氨酸	苯丙氨酸	组氨酸
	天门冬氨酸	甲硫氨酸	
	天门冬氨酸	色氨酸	
	羟脯氨酸	丙氨酸	
		酪氨酸	

三、蛋白质分子内的熔融

生物学家对蛋白质分子内的熔融即变性热的研究颇有兴趣，这不仅因为变性是生物大分子特别是蛋白质的重要特性，而且更重要的是因为对变性现象的研究是解决生物大分子独特的空间结构、结构的稳定性以及维持结构稳定机理的重要手段，是更好地了解蛋白质结构与功能关系的基础。在这些研究方面热分析技术比其它技术更胜一筹，它可以直接测量在热力学意义上的结构稳定性的参数，另外也只有通过热力学的方法才能用热力学的标准核实生物大分子的结构模型。

生物大分子和水的影响是相互的。不仅大分子的存在影响了周围水的状态，同时水的存

在也影响了大分子本身的状态。当生物大分子溶液稀释到一定程度时，热变性转变的中点温度 T_{trs} （也称熔融温度 T_m 或变性温度 T_d ）及转变的偏比焓变 ΔH_{trs} （也称变性焓 ΔH_d ）接近一个确定值，该值对一个给定的蛋白质在一定的条件下是特定值。例如，大鼠皮肤的胶原蛋白在 pH 为 3.5 的无盐稀溶液中热变性温度为 314K，变性焓为 $70Jg^{-1}$ 。该蛋白质的分子量为 3.6×10^5 道尔顿，所以它的摩尔变性焓为 $26 \times 10^5 J/mol$ 。可见瓦解这个大分子的天然结构要花费极大的能量。

在天然状态下，胶原蛋白是一个较刚硬的类棒状分子。它是由三个多肽链缠绕成的一个三联超螺旋结构。变性后它被打碎成三个多肽链且呈随机卷曲状态。因此胶原蛋白的热变性过程是在一个窄的温度间隔内三股螺旋的解缠绕过程。虽然所有的胶原蛋白都有相同的结构，但人们发现不同种动物的胶原蛋白具不同的热变性函数。动物的体温越低则变性焓越小、越不稳定、变性焓也越小。

球蛋白和纤维类的胶原蛋白不同，它们是致密的类球形大分子，具有很复杂的三维结构。对它的热力学，研究最多^[6-9]。

图 4 表明几种球蛋白在相应于它们变性处有大的热吸收峰，其位置取决于 pH 值，且随着热稳定性的增加变性焓也增加。

从球蛋白和胶原蛋白热变性的 DSC 曲线中可以明显地看到：球蛋白比胶原蛋白更稳

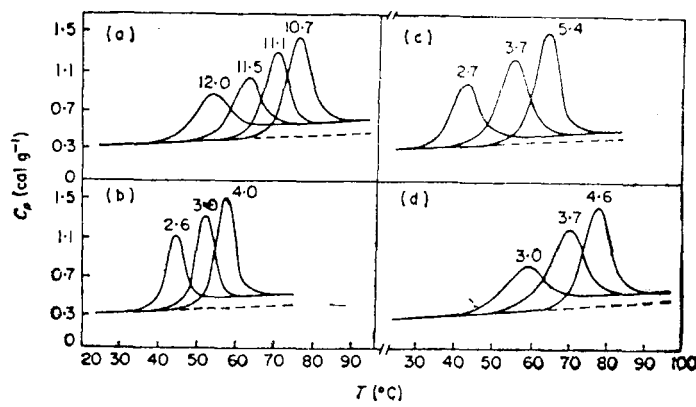


图 4 几个球蛋白在不同 pH 溶液中的偏比热容
a) 高铁肌红蛋白 b) α -乳白蛋白 c) 核糖核酸酶 A d) 细胞色素 c

定;球蛋白变性过程发生的温度间隔较宽,且变性前后的偏比热容有明显差异 ($\Delta_a^d C_p$) 即变性球蛋白的热容 C_p^d 比天然球蛋白的热容 C_p^a 大得多。球蛋白分子熔融的 DSC 曲线的另一显著特点是峰面积直接与峰宽有关即变性焓越大半峰宽越小、转变越尖锐。因此热吸收峰的高度明显地随蛋白质热稳定性的增加而增加。

对于一个双态转变,可以用 Van't Hoff 等式描述:

$$\frac{1}{\phi(1-\phi)} \frac{d\phi}{dT} = \frac{\Delta H^{VH}}{RT^2}$$

此处 ϕ 是表征反应进行的任何一个参数,对量热学的测量而言, ϕ 是热吸收的分数。在转变中点温度 T_{trs} 时 $\phi = 1/2$ 所以

$$\Delta H^{VH} = \frac{4RT_{trs}^2}{Q_d} (\Delta C_p)_{trs}$$

由上式不难看出用吸收峰的最大高度即 $(\Delta C_p)_{trs}$ 可以计算出 Van't Hoff 焓或称为有效焓。 Q_d 为整个峰面积的热吸收,给出的是量热学的或表观的转变焓。实验表明,在小而致密的球蛋白热变性的情况下, Van't Hoff 焓很接近量热学的焓值。由于 Van't Hoff 等式只适用于双态转变,因此可以推断小而致密的球蛋白的热变性过程是双态转变过程的一级近似过程,即在天然的和变性的球蛋白状态之间不存在稳定的中间媒介态。这意味着这个宏观系统的热转变行为可以看作是一个不可分割的系统或一个单一的协同单位的转变。这是小而致密的球蛋白的最基本的性质之一。

Gönül Velicelebi 等人^[10]用高灵敏度的差示扫描量热计检测了溶菌酶在甲醇、乙醇、丙醇的水溶液中的热变性。证实了溶菌酶在这些溶剂系统中的热变性确属双态转变过程,并发现醇可以显著降低溶菌酶的热稳定性。Hatsuho Uedana 等人^[11]发现糖可以明显地提高溶菌酶的热稳定性。

至于高分子量的蛋白质,热转变就不是如此简单了。例如,分子量为 50000 道尔顿的 Bence-Jones 蛋白(本琼氏蛋白为多发性骨髓瘤患者尿中之特种蛋白质),其 Van't Hoff 焓是

实验测得的量热学焓值的 $1/2^{[12]}$ 。由此推断该蛋白有两个相同的协同单元。已知该蛋白有 4 个结构域(domains),所以我们可以得出结论,该蛋白的每个协同单元是由两个结构域所组成。

对于更复杂的由几个具不同稳定性的协同区域组成的蛋白质而言,其熔融曲线也更复杂。

目前关于蛋白质结构的稳定性及结构转变的协同性机制问题仍不十分清楚。根据实验结果和蛋白质功能的表现可以推测:蛋白质的结构应具有一定的刚性,其结构不因轻微的环境变化而改变,同时又应具有一定的柔顺性,以适应其功能的发挥。

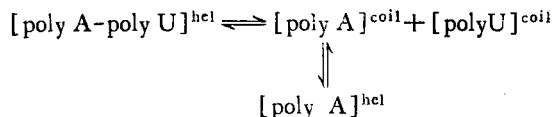
用 DSC 方法对蛋白质分子内熔融的研究还可以探知一些化合物对蛋白质分子构象的影响。例如 S. C. Helen, 等人^[13]利用这种方法研究了甲胺和血纤维蛋白溶酶对人的 α_2 巨球蛋白构象的影响。

四、核酸分子内的熔融

对核酸分子内的熔融过程即核酸分子中双股螺旋结构展开过程的研究,不仅对于弄清核酸三维结构的稳定性机制,而且对于弄清其功能发挥的机制都是十分重要的。

简单的人工合成的 poly A-poly U 复合物的熔融过程。它的双股螺旋的熔融过程是在一个很窄的温度间隔内发生的,熔融时热容的变化是 $73 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ 。由改变溶液中离子强度而改变复合物的稳定性及测量在不同温度时的熔融焓,发现熔融焓随熔融温度的增加而增加。

已知 poly A-poly U 的熔融过程是:



当 poly A-poly U 复合物熔融后,被释放的随机卷曲型 poly A 又可缠绕成螺旋结构,因此对该复合物熔融时的焓变和热容变化都要进行修正^[14]。

天然核酸的熔融曲线远比合成的均匀得

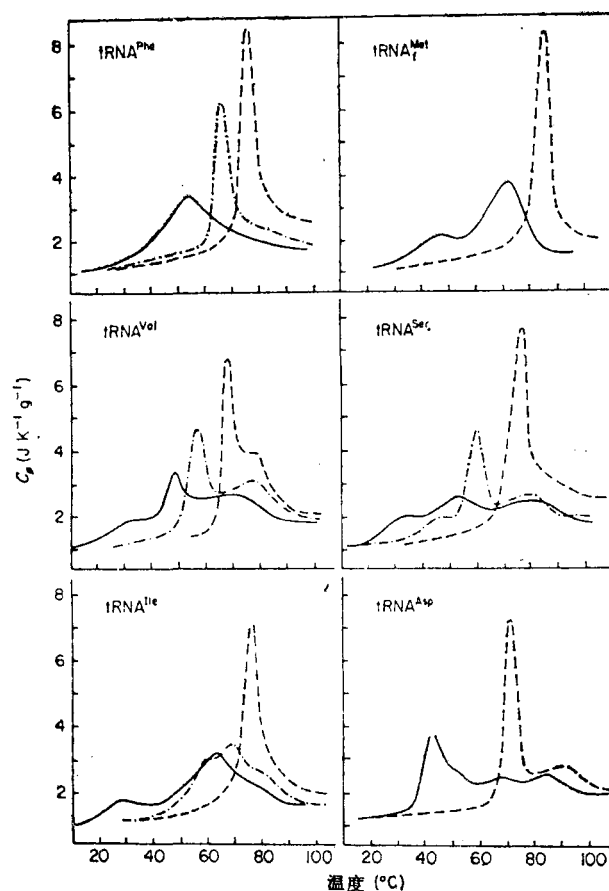


图5 几种 tRNA 在不同盐浓度溶液中的 DSC 曲线

-----: 1mM MgCl₂; ———: 150 mM NaCl;
- · - · - : 150mM NaCl + 1mMMgCl₂

表2 核酸熔融比焓及平均熔融温度

核 酸	T_m K	ΔH_m Jg ⁻¹
poly A	313	38
poly A-poly U	331	60
poly A-poly T	—	45
tRNA ^{Val}	323	52
tRNA ^{Phe}	328	51
tRNA ^{Ile}	333	51
tRNA ^{Ser}	328	48
5S RNA	323	50
16S RNA	323	50
噬菌体 T ₂ DNA	354	54
蛙 DNA	338	46

多核苷酸要复杂的多。天然核酸分子内含有不同的稳定性区域。图5为几种 tRNA 在不同盐浓度溶液中的熔融曲线^[15]。这些熔融过程包括几个伸展峰。热力学分析表明,这几个伸展峰是完全独立的连续的转变,分别相应于该大分子中特定部位的伸展。如果已知核酸大分子的结构,便可通过其熔融曲线上的单个的转变计算出碱基配对的热力学参数。Privalov 及 Filimonov^[15] 曾计算出 (A. U) 碱基配对焓是 38KJ mol⁻¹, (G. C) 配对焓是 60KJ mol⁻¹。如果不知道核酸大分子的结构,我们仍可从量热学的数据得到一些有关它的结构情况的信息。例如目前我们不知道 5S 核糖体 RNA 的三维结构,但是根据它的熔融焓值可以从表 2 中确定它是 tRNA 的类似物。由于它的熔融曲线非常简单,故可推断它可能具较少的结构单元。

核酸的分子量越大,以熔融曲线上得到有价值的结构信息的可能性就越小。表 3 为几个核酸热变性的热力学数据^[16]。

表3 几个核酸热变性的热力学数据

核 酸	变性温度 °C	变性焓 KJ/摩尔 碱基对	变性熵 J/摩尔碱 基对·度
小牛胸腺 DNA	72	29.3	—
T ₂ 噬菌体 DNA	78	35.6	—
T ₂ 噬菌体 DNA, pH7	75	38.8	—
蛙精 DNA, pH7	60.6	32.8	99
小牛胸腺 DNA, pH7	77	30.1	88
小牛胸腺 DNA, pH10.3	68.6	43.5	126
小牛胸腺 DNA, pH6.8	72.6	33.8	98
小牛胸腺 DNA, pH7.5	66	31.4	92

五、生物大分子稀溶液的热容测量

现介绍一种 DASM-IM 型差示扫描微量量热计,它是由苏联科学院设计制造的^[17]。其主

要性能如下:

操作温度范围	270—390K
加热速率	0.1—2.0K min ⁻¹
操作容量	1ml
灵敏度	1×10 ⁻⁵ JK ⁻¹
相对热容测定精确度	8×10 ⁻⁵ JK ⁻¹ ml ⁻¹
温度精确度	0.1K

该仪器的灵敏度和精确度不仅可以用来测量微量样品的分子内转变的热效应,而且还可以在一个宽的温度范围内对稀溶液中的微量样品进行偏热容的测量。该仪器的样品池体积等于参考池的体积,所以从测量溶液的扫描曲线和具相同体积的溶剂的扫描曲线上对应温度的纵坐标之差,可以算得各个温度的溶质成分的偏热容。该差值表示为:

$$\Delta C_p = C_{p,A} \Delta m_A - C_{p,B} m_B$$

A 和 B 分别代表溶剂和溶质, m_B 是在样品池中溶质的质量; Δm_A 是替换溶质的溶剂质量。因为

$$\Delta m_A = m_B \frac{V_B}{V_A}$$

此处 V_A 和 V_B 分别为溶剂和溶质的偏比体积,将上式代入前式可得:

$$C_{p,B} = C_{p,A} \frac{V_B}{V_A} - \frac{\Delta C_p}{m_B}$$

因此只要我们知道溶质和溶剂的密度关系,我们便能用该量热计测定溶质在所有实验温度范围内的偏热容。

该绝热式差示扫描微量量热计的样品池和参考池被双重绝热屏蔽所环绕,又被同一个电源加热,两个绝热屏蔽通过屏蔽控制器来调整屏蔽的温度使之跟踪池子的温度。测量时如果一个池中热容增加,那么控制器便监测和控制加热能量,使两个池子间没有温度差,这个补偿的能量作为温度的函数被记录下来,这就是相对的热容函数,因此该仪器属于功率补偿型

的微量热分析仪。

用该仪器测量时,最重要的是要保证样品量的准确性。

M. Pfeil 等人^[18]用这种仪器对几种小的球蛋白(溶菌酶、核糖核酸酶 A、细胞色素 A、正铁肌红蛋白及 α -胰凝乳蛋白酶)稀溶液的热力学参数(天然和变性蛋白质在不同温度、不同 pH 值时的标准焓、标准熵、标准自由能)进行了细致的测量和精彩的立体描述。

参 考 文 献

- [1] Hutchens, J. O. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 25, 1969.
- [2] Andronikashvili, E. L. et al.: *Biopolymers*, **15**, 1991, 1976.
- [3] Olafsson, P. G. et al.: *Mikrochim. Acta*, **5**, 871, 1970.
- [4] Kissinger, H. E.: *Analyt. Chemistry*, **29**, 1702, 1957.
- [5] Olafsson, P. G. et al.: *Anal. Lett.*, **4**, 395, 1971.
- [6] Beck, K. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 901, 1965.
- [7] Jackson, W. M. et al.: *Biochemistry*, **9**, 2294, 1970.
- [8] Privalov, P. L. et al.: *Biopolymers*, **10**(10), 1971.
- [9] Privalov, P. L. et al.: *J. Mol. Biol.*, **86**, 665, 1974.
- [10] Gönül Velicelebi et al.: *Biochemistry*, **18**(7), 1979.
- [11] Hatsuho Uedana, et al.: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **53**, 2451, 1980.
- [12] Zavyalov, V. S. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **492**, 102, 1977.
- [13] Helen, S. C. et al.: *Biophysical J.*, **45**, 721, 1984.
- [14] Filimonov, V. V. et al.: *J. Mol. Biol.*, **122**, 465, 1978.
- [15] Privalov, P. L. et al.: *J. Mol. Biol.*, **122**, 447, 1978.
- [16] Hinz, H. J.: in *Biochemical Thermodynamics*, 1979, p159.
- [17] Privalov, P. L. et al.: *J. Chem. Thermodynamics*, **7**, 41, 1975.
- [18] Pfeil, M. et al.: in *Biochemical Thermodynamics*, 106—113, 1979.

[本文于 1985 年 4 月 9 日收到]