

生物热分析和生物量热分析

周传佩^{*†} 陈文生^{*‡} 刘义^{*} 周向明[†] 屈松生^{*}

(^{*} 武汉大学化学与环境科学学院, 武汉 430072; [†] 湖北省药检高等专科学校, 武汉 430064;

[‡] 湖北教育学院, 武汉 430060)

[摘要] 综述了生物热分析和生物量热分析对生物系统的运用。认为二者与其他学科结合对于了解生命系统的复杂生理过程及开拓物理化学的理论研究及技术应用等具有重要意义。

[关键词] 生物热分析, 生物量热分析, 热动力学

量热分析是生物分析中的一个重要方法。微量热技术和热分析技术在许多科学领域内获得极其广泛的应用。20世纪70年代以来, 生命科学成为主导学科, 处于优先发展的地位。目前解决生命科学的最重要特点是多学科性的共同探索, 如数学、物理、化学、医学、药学甚至控制论等诸学科的综合应用。微量热技术和热分析技术为现代生物分析的重要研究手段, 在生命科学研究方面也起到不可忽略的作用。

1 生物热分析

所谓热分析, 是在程序控温下, 测量物质的物理性质与温度的关系的一类技术。是一类多科学通用的分析测试技术。所谓程序控温, 一般指线性升温或线性降温, 当然也包括恒温、循环或非线性升温、降温。定义中的物理性质范围很广, 包括质量、温度、热量、力学量、声学量、光学量、电学量、磁学量等。定义中的物质则指试样本身, 及其中间产物及反应物, 如果将来自生物系统的各种物质作为试样进行热分析, 就是所谓的“生物热分析”(Biothermal Analysis)。

即使是静态下的生物系统, 也是我们至今所遇到的范围最广、多种成分组成且彼此交织在一起的复杂系统, 近年来由于高灵敏度热分析的出现, 人们对生物系统的热性质研究产生了极大兴趣, 使生物热分析获得快速发展。生物热分析主要用于对类脂、蛋白质、生物膜和酶等的分析研究上。由于上述

物质都是生物体的基本组成部分, 因此可试图通过对它们热性质的分析测定来了解生命系统的复杂生理过程。

(1) 生物大分子的结构与功能关系的热分析研究

某些具有高级结构的生物大分子如蛋白质、核酸等, 其功能与结构有密切的关系。蛋白质的生物活性, 除与氨基酸的化学序列有关, 还由其特殊的空间结构(螺旋结构)所造成。在一定条件下, 有序的螺旋结构会降解成不规则的卷曲结构而变性。用热分析法(DSC)测定蛋白质分子热变性时的构型变化所产生的焓变及变性温度, 可探讨溶剂对结构稳定性的影响, 还可从生物大分子热变性的DSC曲线上, 得出有关大分子结构稳定程度的系列热力学参数及分解的动力学参数。目前已有对核糖核酸酶、溶菌酶、肌球蛋白、胰凝乳蛋白酶等蛋白质热变性的研究, 测得这类蛋白质的稳定能约为40—80 kJ/mol, 与理论计算值相吻合^[1]。结合对蛋白质的研究, P·G·Olafsson等用DSC法检测了19种固体氨基酸的分解历程, 根据其DSC分解曲线的形状及数目建立了鉴定氨基酸的“指纹图”。

(2) 类脂的热分析研究

类脂在生物体中除了用于能量贮存外, 主要是作为重要的结构组分存在于细胞膜中。类脂的相变温度与它的稳定性、多晶现象和分子间的相互作用密切相关。利用热分析可以测定抗菌素、抗抑制剂、麻醉和镇静剂等药物对类脂相变的影响; 类脂与胆

固醇的作用;类脂从液晶态转变为凝胶态的影响因素以及类脂相变温度与双分子层中流动的碳氢键之间的关系等。

(3)生物膜的热分析研究

生物膜是由脂类、蛋白质及少量多糖组成的一种薄膜结构,它与生命过程的物质代谢、能量转换、信息传递、细胞识别、细胞起源及生物进化等密切相关。近年来人们关于生物膜的研究已成为当前分子生物学中最活跃的领域之一。人们用物理学和生物学技术证明膜流动性是膜结构的一个基本特征,是膜行使多种功能的重要体现。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。如膜分子可随条件的变化,既可处于晶态也可处于液晶态,则由晶态向液晶态转变的结果是膜的流动性增加。DSC法已成为生物膜研究的重要方法,可通过测定膜的热致相变温度、相变焓、相变熵及协同性相变单元的大小,对与膜结构和功能有关的机理进行研究。近年来人们在研究药物的吸收作用时,认为药物与膜脂成分的相互作用引起膜流动性的改变可能是药物作用的最重要方式。目前已对植物细胞膜、支原体膜、细菌膜、动物细胞膜及近年热门的LB膜进行了热相变研究。此外,膜的流动性对酶的活性影响很大。由于生物膜的稳定性关系到生物细胞的正常生理代谢、生物体的生死存亡、药物的正常吸收等,故将热分析用于生物膜的研究,有重大的现实意义,可帮助我们进行许多有意义的探索。

(4)生物体中水的热分析研究

水是生命物质的主要组成部分。人体能生存是因为机体能不断地与外环境进行新陈代谢,水则为这种代谢的介质。人们从分子生物学的研究得知,大分子构象的变化是生命过程的主要体现,水的存在则是使得生物大分子结构稳定的重要因素。DNA分子要维持双螺旋的结构,水含量必须大于30%;人工膜要维持双层结构,水含量也须大于20%以上。没有水便没有蛋白质。不同蛋白质内水含量须大于不同特定值时,蛋白质才具有活性,才能发挥其生物功能。用热分析方法可以对生命体系中不同状态的水量进行测定,还可进行水对生物大分子结构及其对结构稳定性的影响等方面的研究。如用DSC法可以很方便快速地测定细胞和生物大分子中的游离水量和结合水量。例如:测定卵磷脂在0℃附近的熔融热,就可计算出游离水的含量,剩下的便是结合水。另外,还可直接测量不同水含量下生物大分

子结构稳定性的热力学参数。付亚珍等人^[2]用DSC法对牛血清白蛋白、溶菌酶等蛋白质的热稳定性进行了分析,还测定了11个高纯水合蛋白质曲线,找出其含水量对其热稳定性的影响,对揭示蛋白质的变性过程及蛋白质和水之间的相互作用机理提供有意义的数据,有助于研究生物大分子的结构和功能。

除此之外,热分析在药学研究和药物生产中,在医学和微生物学中都有广泛的应用。如药物成分的分析,药物纯度的测定,乃至人的血液分析,羊水分析,皮肤、毛发、骨组织的分析等。因此对生物试样的生化研究,热分析法可获取更多有关生物体的热力学及动力学信息。

2 生物量热分析

化学反应及生物化学反应都伴随着一系列的热效应,而且这些热效应与反应物的变化间有定量的相关性。将基于测量化学、生物化学、生物过程的温度变化或热变化的速率来确定待测成分含量的学科称为分析量热学(Aalytical Calorimetry),而这种用量热法来处理分析问题的工作称之为量热分析(Calorimetric Analysis)。它与热分析在指定物理性质为温度和热量时,二者是相同的,如果分析的系统是属于生物化学及生物过程,即称为生物量热分析(Biocalorimetric Analysis)。

生物产热过程的强度低、反应速率慢、周期长,因此用一般的量热技术很难获得满意的结果。微量热分析技术是近代热化学,尤其是生物热化学领域的基本实验手段,它用于生物系统的研究有许多独特之处。如它具有能直接监测生物系统所固有的热过程,不需要添加任何试剂,可直接检测离体的生物组织和悬浮液,灵敏度高,能准确测定缓慢过程的热效应等特点。尽管生物量热缺乏特异性,但由于生物系统本身所固有的新陈代谢特异性,因此这种非特异性的方法可得到用特异性方法得不到的结果。

在量热分析中所需要的热量计种类很多,微量热量计多采用热导孪生式结构,即在量热腔和恒温块之间装置多对热电偶(热电堆),当反应体系中有热量释出时,它将经过热电堆传递给环境。同时,热电堆把量热腔与恒温块之间的温差转换成电信号,经放大后用记录仪记录下来,随着反应过程的终止和热量的传出,反应系统的温度与环境的温度渐趋于平衡,根据记录仪上给出的数值绘成热谱图,就能得到反应过程中的不同信息。近代热量计已向微量化、自动化、多功能化的方向迅速发展。能直接用于

测量各种缓慢过程的微小热效应,使过去不能直接测量的生化、生物代谢过程的热效应(如细菌生长、酶催化动力学过程等)能够直接测量,且可连续自动跟踪和监测各种慢过程的热效应,从静态和动态的角度来研究它们。

2.1 细胞水平上的微量热分析

代谢是生物体中所有化学变化的总称。在生物活体与环境不断交换物质的过程中,含从体外吸收营养和物质在体内的变化。在活细胞中有旧物质的分解和新物质的合成,彼此互为消长来维持活体的生命,所以代谢是生命现象的基本特征。在生物量热过程中,测定代谢热谱,从中可获取丰富的信息。微量热法为生物量热分析在细胞水平上的研究奠定了基础。常见这方面的研究有:

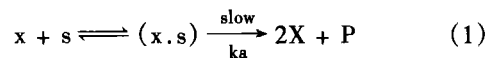
(1) 细菌生长热谱的测定

用微量热计连续跟踪监测细胞(如某种细菌)在生长繁殖过程中热效应的变化时,便能获得该细胞在一定条件下的生长热谱图。1973年 Boling 等人^[3]对肠杆菌科的6种细菌进行了量热研究,发现在较短时间内可得重现性良好的热曲线,且不同细菌其热谱图区别明显,连生化鉴定上不易区别的细菌如产气肠杆菌和克雷伯氏菌,其区别在热谱图上也一目了然。Monk 等人^[1]也进行了这方面的研究。完整的细胞生长热谱包括生长过程的4个阶段:停滞期、指数生长期、稳定期和衰减期。但 Boling 等人的实验热谱中缺乏停滞期,指数生长期也不完整。谢昌礼等人^[4]首次在国内用微量热法对大肠希氏菌等13种细菌进行了研究,测得了更为完整的热谱。结果表明在相同条件下,每种细菌的热谱都具有精确的重现性和明显的特征性,说明可利用这些热谱作为细菌的“指纹图”来快速鉴定细菌种属和进行临床诊断等。

(2) 微生物代谢过程的热动力学

通过微量热法获得细菌的生长热谱后,进一步用反应动力学的基本原理对这些生长热谱进行剖析,可获得细菌生长方面的动力学和热力学信息。张洪林等人^[5]用微量热法测定几种细菌在不同温度下的生长速率常数,并拟合了 K-T 非线性方程(有极大值),从该方程出发找出细菌的最佳生长温度;刘义等人^[6]用微量热法进行了系列性细胞不同代谢类型的量热学研究;周培疆等人^[7]进行了大肠杆菌有限生长的微量热及非线性动力学研究。由于微生物的代谢热谱包含丰富的动力学及热力学信息,故用物理化学的基本原理对细菌热谱进行处理亦能得到

微生物生长代谢过程有关的热力学参数。设细菌的生长按以下模式进行^[1]:



式中, x:细菌; s:底物; x.s 细菌·底物复合物; P:代谢产物; K_a :生长速率常数。

按上述模式,细菌在生长过程中首先形成 x.s, 随后 x.s 解体,慢步骤决定细菌的生长速率。细菌的这种生长模式和动力学中的过渡态理论很类似,因此由过渡态理论可得:

$$K_a = (kT/h) \cdot e^{\Delta a^\ddagger/R} \cdot e^{-E_a/RT} \quad (2)$$

只要测得 K_a 和 E_a ,即可求得细菌和底物形成复合物的活化熵。屈松生等人^[8]根据这一模式用微量热法测定了细菌生长代谢的速率常数 K_a 和活化能 E_a ,再从上式可求有关过程的热力学参数 ΔS^\ddagger 和 ΔG^\ddagger 。

(3) 组织细胞和细胞器水平上的微量热分析

这方面研究包括很多内容,如线粒体、癌细胞的代谢特征的研究。线粒体为亚细胞,是真核细胞中的一个重要细胞器,是能量代谢的重要场所,因此,其能量代谢的研究很有意义。屈松生等人^[9]在这方面进行了深入研究,用微量热法测定动物肝细胞的线粒体代谢热谱,探讨有亲缘关系的2种鲤鱼肝细胞线粒体热谱与其遗传方面的关系;刘义等人^[10]用微量热法研究了毒物对线粒体代谢的影响,以模拟地方病和毒物间的关系,这些工作为细胞和亚细胞水平上的量热研究开拓一个新的领域。

另外,还可用微量热法直接研究活体与抑制剂,活体与抗生素等药物间的相互作用。这是因为热谱能反映细胞的生长代谢过程,当改变有关因素时,热谱即会发生相应的变化。如正常细胞的分裂增殖有一定热效应,若一旦分裂增殖失控,就会形成癌细胞。正常细胞和癌细胞的产热效应有明显差别,因此在加入抗癌药物后,癌细胞在分裂增殖过程中的产热必然发生改变。用微量热法可准确测出其间的差别。目前因微量热法研究抗癌药物与癌细胞间相互作用的报道较多,如李强国等人^[11]用微量热法研究了富勒烯衍生物对 HL-60 细胞的代谢作用,探讨了可溶性富勒烯衍生物对癌细胞代谢的影响。实验证明微量热法对探索理想的抗癌药物、探讨药物的构效关系,以及药物的筛选、检验等有重要的意义。

2.2 分子间相互作用的量热分析

生物大分子可与小分子发生特异性反应。这类反应是分子识别的决定因子。量热法可测定这类反

应的热效应,能估算反应的键合常数及计算反应的自由能及熵。还可通过对反应热力学参数的分析,找出其与大分子构象变化间的关系。近年来,小分子与DNA的相互作用已成为研究的重点,这是因为许多药物治疗疾病是通过进入到人体细胞中的DNA双螺旋里发生嵌插作用来实现的,因此,研究一些小分子化合物和DNA的相互作用不仅能够发现其药用活性,还能探索药用机理,并且能为临床实验的新合成药物设计和提供模型。Kagemoto等人用量热学和光谱学方法研究了DNA与顺铂、DNA与染料的相互作用;熊亚等人^[12]用微量热法对水溶性卟啉与DNA的相互作用进行了研究,在寻求抗肿瘤药物的模型物方面取得一定进展。

另外,生物大分子之间的相互作用也是研究的热点。由于在生物体中,大分子之间的相互作用是很重要的,因此这类研究的意义很大。可用量热法来研究蛋白质和DNA之间的作用。

2.3 生物个体的量热学分析

生物个体相对细胞而言,是一个更高级、更复杂的系统,对其进行深入和定量的研究要更为困难,但人们仍然力图对生物个体发育中的各阶段或各细节进行研究。如邓凤娇等人用微量热法测定了白鲢鱼、大鳞副泥鳅胚胎发育的热谱^[13,14],Cuaiger等人则测量鲑鱼卵的发育过程,分析了氧压力与鲑鱼卵发育过程中发热功率的关系^[15]。人们还对植物细胞的代谢特征进行了研究^[16];对植物生长的能量效应研究也做了一些工作,对其生长发育过程的动力学进行了探索^[17]。生物整体量热学已作为一种基本工具广泛应用于营养与代谢、运动生理、生物调温及和疾病有关的能量交换等方面。

生物量热分析内容广泛,除以上内容之外,还包括对酶系统的分析,如酶的活性、酶的抑制等都可考虑用量热法进行^[18]。死亡的有机体,可被异养生物分解成能溶于水域的各种物质,对于监测这些异养生物是比较困难的。靠常规方法很难提供全部生长条件,在样品分析前还需作预处理。为了得到更接近于自然条件下的数据,生物量热分析可提供这项分析技术,它可用于“嗜氧”、“厌氧”和“兼性”3个不同系统,在任何溶液状态不需要作预处理即可直接进行分析。

现代微量热系统对生物检测的范围大至可做到:

细菌:例:37℃时大肠杆菌(葡萄糖,有氧)0.8 pW/cell, 10^6 cells/mL;

酵母:例:30℃梨酒裂殖酵母菌(同步培养)63 pW/cell, 1.6×10^4 cells/mL;

组织细胞:例:Hela细胞,20—40 pW/cell, 10^5 cells/mL;

血细胞:例:红细胞,9 fW/cell, 10^9 cells/mL;

小动物:例:蚂蚁,20℃ 2.6 mW/g,活重;

生态系统:例:水中沉积物,5—25 μ W/mL, 0.2mL.

3 结束语

生命科学为近年来最具蓬勃活力的主导学科之一。生物热分析和生物量热分析则是用途很广,富有生命力的分析方法。微量热对生物系统可进行动态连续测定,热分析则可进行动态跟踪扫描。在对生物体系不同层次不同结构水平上的研究中,二者相辅相成,对解决生命科学中的许多复杂问题,并开拓物理化学的基础理论研究与技术应用领域有极重要的理论意义与广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 温德才,刘义,赵儒铭等.量热技术在生命科学中的应用.自然杂志,1999,21(1):37—41.
- [2] 刘振海.热分析导论.北京:化学工业出版社,1991,453.
- [3] Boling E A, Blanchard G C, Rassed W T. Bacterial identification by microcalorimetry. Nature, 1973, 241: 472—473.
- [4] 谢昌礼,汤厚宽,屈松生等.微量热法测定细菌生长的热谱.物理化学学报,1986,2(6):481—483.
- [5] 张洪林,李济生,南昭东等.微量热法测定细菌的最佳生长温度.物理化学学报,1994,10(10):928—930.
- [6] 颜承农,刘义,宋昭华等.细胞不同代谢类型的量热学研究.物理化学学报,1997,13(5):477—480.
- [7] 周培疆,谢昌礼,杨锋等.大肠杆菌有限生长的微量热及非线性动力学研究.物理化学学报,1998,14(2):174—176.
- [8] 谢昌礼,汤厚宽,屈松生等.细菌生长速率的测定及其热力学性质的研究.物理化学学报,1989,5(5):608—610.
- [9] Wang Xiaoqiang, Xie Changli, Qu Songsheng. Microcalorimetric study of mitochondrial Metabolism. Thermochimica Acta, 1991, 176: 69—74.
- [10] Liu Yi, Xie Changli, Qu Songsheng. Microcalorimetric study of metabolic inhibition by humic acids in mitochondria from *Oryctolagus cuniculus domestica* liver cells. Chemosphere, 1997, 33(1):99.
- [11] 李强国,曾煌,冯英等.微量热法研究富勒烯衍生物对HL-60细胞代谢.武汉大学学报,1999,45(4):419—422.
- [12] 熊亚,黄素秋,吴鼎泉等.两种水溶性卟啉与DNA相互作用的研究.物理化学学报,1996,12(6):543—546.
- [13] 曹丕超,谢昌礼,屈松生等.白鲢胚胎发育热谱的测定.武汉大学学报,1987,(4):99—103.
- [14] 邓凤娇,王小强,谢昌礼等.大鳞副泥鳅胚胎发育的热化学研究.武汉大学学报,1990,(1):127—128.
- [15] LKB Bromma. 9001 8697, Bioactivity Monitoring Seminar Notes, 75—

77. 力学研究. 物理化学学报, 1999, 15(3): 274—278.
- [16] 刘义, 谭智群, 熊亚等. 细胞动力学研究. 物理化学学报, 1997, 13(1): 68—70. [18] 梁毅, 汪存信, 吴鼎泉等. 微量热法研究单底物酶促反应的产物抑制作用. 化学学报, 1996, 54: 38—44.
- [17] 周培疆, 胡云楚, 凌杏元等. 种子萌发生长的微量热及非平衡热

BIOHERMAL ANALYSIS AND BIOCALORIMETRIC ANALYSIS

Zhou Chuanpei*[†] Chen Wensheng*[‡] Liu Yi* Zhou Xiangming[†] Qu Songsheng*

(* College of Chemistry and Environment Science, Wuhan University, Wuhan 430072;

† Hubei College of Pharmacy and Clinical Laboratory Science, Wuhan 430064; ‡ Hubei Education College, Wuhan 430060)

Abstract Biothermal Analysis and Biocalorimetric Analysis are important methods on modern bioanalysis. Microcalorimetric technique can monitor biological system continually, it gives the base for biocalorimetric analysis research on cellular level. Biothermal analysis can monitor biological system by dynamic scanning method. By combining other methods, biothermal analysis and biocalorimetric analysis can be used to study many complicated problems on life science and to elucidate the complicated physiological process of life. Biothermal analysis and biocalorimetric analysis can be also used to study the theory and technology of physical chemistry.

Key word biothermal analysis, biocalorimetric analysis, thermokinetics

·资料·信息·

2000 年度日本科技振兴要点

日本面临着严峻的国际竞争和迅速发展的人口老龄化等社会问题。为了解决这些问题,日本非常重视科技的作用。

1996年,日本政府制定了科学技术基本计划。1999年,日本科学技术会议政策委员会对上一阶段工作进行了回顾和总结。基于2000年是日本本五年计划的最后一年,政策委员会根据各部委就国家、社会需要进行的调查结果,就当前科学技术应该解决的问题进行了整理,并且归纳出2000年度科学技术重点发展方向。

1. 创造“知识型国家”

(1) 培育新兴的交叉学科研究领域(例如生物信息技术等);

(2) 完善支撑科学技术的知识资本基础建设(例如遗传基因、细胞银行、染色体信息中心等);

(3) 构筑足以吸引国外顶尖水平研究人员的COE。

2. 以创造新的产业来加强国家竞争力和提高就业率

(1) 推进对于开创新兴产业有重要意义、革新型

技术的研究开发。(例如生命科学:染色体、脑科学、致病基因的发生、分化、再生、人工脏器、医疗器械、食品生产、发酵等;信息科学技术:信息的基础、基础研究、社会各个领域的信息化、新型的信息通讯系统等)。

(2) 其他:材料、新交通系统、航空、航天、能源等。强化产、学、官联合,推进国家的研究、开发成果能够在产业界得以转化。

(3) 以日本独创的革新性技术为基础的国际标准。

3. 建造一个完全、稳定、高生活水准的社会

(1) 维持、创造一个良好的生活环境。鼓励有助于解决地球环境问题、粮食问题之类的科技研究开发。

(2) 有助于形成一个充满活力的老龄社会的科学技术。

(3) 防止或减轻由于灾害造成损失的科学技术。

(4) 保障社会安全的科学技术。

(国际合作局 王逸 白鸽 供稿)