

抗冻蛋白活性的差示扫描量热测定 及其吸附-抑制机制

任禾盛* 许娜飞 华泽钊

(上海理工大学热工程研究所, 上海 200093)

摘要 用差示扫描量热技术(DSC)测定了从黄粉虫(*Tenebrio molitor*)幼虫体内提取的抗冻蛋白(AFP)的活性, 结果表明 AFP 活性随其浓度的增加及初始冰晶量的减少而增大, 这与 AFP 对冰晶的吸附-抑制机制相一致。

关键词 抗冻蛋白; 热延迟; 差示扫描量热

在一些极地鱼类和越冬昆虫的体液中, 由于存在具有特殊功能的蛋白质, 即抗冻蛋白(antifreeze protein, AFP)或抗冻糖蛋白(antifreeze glycoprotein, AFGP), 使其凝固点明显低于熔点。二者的差异, 称之为热延迟(thermal hysteresis)。因此 AFP 和 AFGP 也被称为热延迟蛋白^[1]。抗冻蛋白的另一特性, 是使水溶液中冰晶在棱面的优势生长受到抑制, 而只能限制在基面上生长。抗冻蛋白的这些特性吸引了很多低温生物学家, 除了对其热延迟进行研究, 提出一些作用机制; 还进一步探索应用抗冻蛋白对细胞及其他生物材料进行低温保存。

已经分离出四种类型的抗冻蛋白, 即抗冻糖蛋白和类型 I、类型 II、类型 III 三种抗冻蛋白^[2]。尽管它们的结构不尽相同, 但都具有非依数性的降低凝固点而不影响熔点, 以及使冰晶生长发生类似的习性变化的功能。这是因为它们的抗冻作用机制是相同的, 即抗冻蛋白能吸附到冰晶表面从而抑制冰晶进一步生长。通常定义抗冻蛋白的活性为其熔点温度与延迟的凝固点温度之差。这一活性正是其吸附-抑制机制的表现。

检测抗冻蛋白活性的传统方法是用显微镜进行观察^[1]。直接置于显微镜冷却载物台的样品, 通过植晶, 使样品中存在冰晶。然后慢慢降温, 直至观察到冰晶生长为止。如果样品中无 AFP, 冰晶立即生长。而对于 AFP 样品, 开始出现冰晶再一次生长的温度将被延迟。这种方法设备简单, 但是由于肉眼观察冰晶开始生长和消失, 不仅使熔化温度和延迟的凝固温度的确定引入误差, 而且不可能定

量确定冰晶迟滞生长前样品中已存在的冰晶量。研究表明, 这一初始冰晶量会影响抗冻蛋白的活性。

差示扫描量热(differential scanning calorimetry, DSC)是一种热分析方法, 在低温生物学中, 可定量分析低温抗冻剂溶液发生结晶、熔化、玻璃化、反玻璃化等转变过程的转变温度以及放热, 吸热反应等^[3,4]。DSC 用于测定抗冻蛋白的活性可避免显微镜直接观察法的缺陷。本文用 DSC 技术测定从黄粉虫 *Tenebrio molitor* 中提取的抗冻蛋白的活性, 分析了 AFP 浓度和初始冰晶量对活性的影响。作为比较也测定了无抗冻活性的牛血清白蛋白(BSA)的结晶。

1 材料与方法

1.1 材料

AFP 样品是从黄粉虫 *Tenebrio molitor* 幼虫体内提取。幼虫在 25 °C 下, 经 16 h 光照, 8 h 遮光饲养, 可诱发其体内产生抗冻蛋白。将此幼虫在 20 mM 的 Tris 缓冲液(pH 7.5)中匀浆搅碎, 离心(10 000 g, 4 °C, 30 min), 收集上清液, 用(NH₄)₂SO₄ 沉淀(饱和度为 40%~70%)。沉淀物加少量蒸馏水, 并置于 Tris 缓冲液中透析, 最后将 AFP 提取液经冷冻真空干燥处理, 制成粉剂。实验时, 称取一定量的 AFP 粉剂, 加蒸馏水, 可配制各种浓度(% W/W)的 AFP 悬液。

收稿日期: 2003-09-10 接受日期: 2004-02-20

国家自然科学基金资助项目(No.59576011)

* 通讯作者。 Tel: 021-65681990, Fax: 021-65682376, E-mail:

hsrenb@online.sh.cn

试验用抗冻蛋白是由纽约州立大学低温生物研究中心的 W. Tang 博士赠送。Tang 曾从 *Tenebrio molitor* 中分离提纯出四种富含亲水性氨基酸的类型 III 抗冻蛋白, 其分子量范围为 10~14 kDa^[5]。

牛血清白蛋白(BSA)购自中科院上海生化所东风生化技术公司。

1.2 仪器

差示扫描量热仪 Du Pont 910 DSC 系统用于测量。这是一种热流型差示扫描量热仪, 低温时用液氮作冷却剂, 以动态氮气作试样气氛控制, 可使用温度范围为 -180~725 °C。仪器用环己烷和钢作低温和高温标定校正。在实验温度范围内, 能保持良好的线性升温 and 降温速率。样品由分析天平称重, 控制其质量在 1~4 mg。参比物为空铝皿。

应用 DSC 可给出样品在降温 and 升温过程中焓变随温度变化的热流扫描曲线。如果样品发生相变, 热流曲线将形成一放热或吸热峰。相变温度以及相应的焓变就可由此确定,

1.3 方法

在实验中, 首先以 1 °C/min 的速率, 使样品在室温至 -25 °C 的范围内降温 and 升温, 可分别得到出现结晶放热峰 and 熔化吸热峰的热流扫描曲线。结晶温度 T_f , 可由结晶峰起始点温度确定, 而 T_m 则相应于熔化峰值温度。结晶固化热 and 熔化热 Q_m 可由相应的峰与基线所围面积得到。

样品再次从 5 °C 降温至 -25 °C, 使之固化, 并稳定 5 min 然后以 0.5 °C/min 的升温速率加热复温, 当温度升至略低于 T_m 时停止, 并保持稳定 5 min。此时样品呈部分熔化状态, 这一温度称之为“保持温度” T_{hd} 。从 T_{hd} 再以 1 °C/min 降温至 -10 °C。由于冰晶生长, DSC 降温曲线上出现结晶放热峰, 其起始温度为 T_o 。若样品中包含具有抗冻活性的 AFP, 结晶峰的出现将被延迟, T_o 与 T_{hd} 存在差异。反之, 对于无热延迟活性的样品, 结晶从 T_{hd} 就开始, T_o 与 T_{hd} 几近相等。因此可定义 AFP 的抗冻活性为:

$$\psi = T_{hd} - T_o \quad (1)$$

在 T_{hd} 时, 部分熔化的样品中的初始冰晶量可由延迟的结晶放热量 Q_i 与完全熔化热 Q_m 之比得到, 即百分冰晶量为:

$$X = (1 - Q_i / Q_m) \times 100\% \quad (2)$$

2 结果

2.1 AFP 与 BSA 的 T_f 、 T_m 、 Q_m

表 1 中给出了两种 AFP 样品以及 12%BSA 在降温 and 升温速率分别为 1 °C/min 时测得的结晶温度 T_f 、熔化温度 T_m 、完全熔化吸热量 Q_m 。值得提及的是, 这里 T_f 与 T_m 的差, 并不反映样品的热延迟, 而是由于结晶成核所需的过冷。一般溶液发生异相成核, 其结晶温度则介于相应浓度的凝固温度与均相成核温度之间^[3]。

2.2 AFP 与 BSA 的 DSC 热流曲线

图 1 给出了 12% AFP(W/W) 溶液样品, 从三种前期部分熔化状态开始冷却结晶的 DSC 热流曲线。这部分熔化状态使得样品中存在一定的冰晶量。从图中可清楚地看到, 当样品再次冷却时, 结晶峰明显地出现延迟, 即结晶起始温度 T_o 与保持温度 T_{hd} 存在差异。这种差异并不是由过冷引起, 因为在有晶种存在的条件下, 不可能过冷。从图中还可看出, T_{hd} 越高, 相应的延迟结晶峰面积越大, 也即由式(2)表示的部分熔化的样品中冰晶量越少, 而由式(1)定义的 AFP 活性 ψ 则越大。作为比较, 图 2 给出了牛血清白蛋白(BSA)的 DSC 热流曲线, 其测试过程与 AFP 溶液相同, 但 BSA 在从部分熔化状态下冷却时, 结晶峰即刻出现, 并不延迟。这表明热延迟确实是抗冻蛋白所独有的特性。

表 1 AFP 与 BSA 的 T_f 、 T_m 、 Q_m

样品(W/W)	T_f (°C)	T_m (°C)	Q_m (J/g)
12% AFP	-16.8	-0.7	174
6% AFP	-11.1	-0.2	196
12% BSA	-8.1	-0.1	164

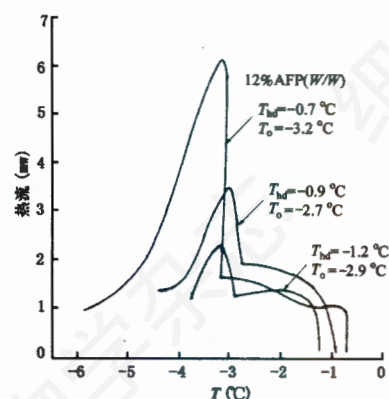


图 1 12%AFP(W/W)的 DSC 热流曲线

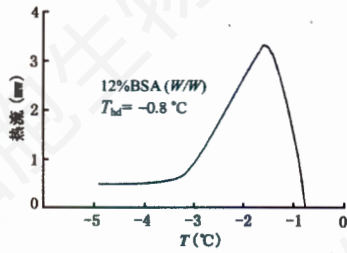


图2 12%BSA(W/W)的DSC热流曲线

表2 AFP活性与初始冰晶量

AFP (W/W)	T_{bd} (°C)	T_0 (°C)	Ψ (°C)	X (%)
12%	-0.7	-3.2	2.5	6.9
	-0.9	-2.7	1.8	57.1
	-1.2	-2.9	1.7	68.7
6%	-0.6	-1.9	1.3	23.0
	-0.9	-1.9	1.0	62.4
	-1.7	-2.3	0.6	90.2
2.2%	-0.7	-1.4	0.7	55.3
	-1.5	-1.8	0.3	88.9

2.3 AFP的活性与其浓度及初始冰晶量之间的关系

表2给出了三种浓度的AFP的活性。在一定浓度下,都显示了活性随 T_{bd} 的升高或冰晶量减少而增加。从表中也可看到,在初始冰晶量相近的条件下,AFP的活性随其浓度的增加而增大。例如,初始冰晶量约为60%左右时,AFP浓度为12%活性最大,而2.2%浓度时活性最小。

3 讨论

在热力学平衡条件下,溶液的熔化温度与凝固温度是相同的,而且按照依数性,如果形成的固相是纯溶剂,则两者随溶质浓度的增加而降低。然而,抗冻蛋白主要不是作为溶质而使水溶液凝固点下降,其抗冻作用机制是非依数性的。在水溶液中,AFP与液相水分子的水合作用并不比一般蛋白质水溶液更强^[6]。而且在凝固过程中,随着冰晶从水溶液中析出,AFP并不象其他溶质那样会被浓缩于液相,而使剩余的未冻溶液浓度提高。它们同样分布于固相和液相^[7]。这些都说明抗冻蛋白不是通过与液相水的相互作用,而是与冰晶表面的水分子形成氢键吸附于冰晶表面产生抗冻作用。因此,当样品直接从室温开始冷却时,液相溶液中并不存在可为AFP吸附的晶核,其热延迟活性不能产生作

用。由此看来,抗冻蛋白并不能抑制冰晶成核,而是抑制其生长。

将鱼类AFP加入到抗冻剂溶液中,对红细胞、水稻细胞悬液等进行低温保存时,可以观察到AFP具有双重效应,即AFP可抑制冰晶的生长、再结晶,而在某种条件下,AFP也可能与溶液或细胞膜中的其他分子相结合,诱发冰晶成核。前者使细胞低温保存活率提高,而后者则相反^[8]。双重效应的产生与众多因素相关,也说明了AFP亲水的侧链是通过与冰晶棱面的水分子键合,阻止冰晶进一步生长的。

AFP的DSC热流曲线显示的热延迟,是抗冻蛋白对冰晶的吸附-抑制机制的表现。当系统中存在六角晶系的晶种时,抗冻蛋白分子就会吸附到冰晶的六个棱柱面上,迫使冰晶只能在未被抗冻蛋白覆盖的区域生长,使原来平直的冰晶棱柱面变成被许多抗冻蛋白分子隔开的短曲面。这些曲面凸缘使冰晶表面积与体积之比增大,具有更大的表面自由能。冰晶要继续生长,必须降低温度,把能量从系统中排出。因此可认为在更低的温度下出现的冰晶是具有更低的凝固点^[9]。若冰晶的棱柱面完全被抗冻蛋白吸附覆盖,从而有效地阻止了水分子结合到冰晶表面,冰晶沿a轴方向的生长则完全被抑制,而只能被限制在基面上(抗冻蛋白并不吸附于基面)沿c轴方向生长,最终形成细小的针尖状冰晶。

AFP活性随其浓度的增加,以及初始冰晶量的减少而增大。这一关系,与上述吸附-抑制机制相符。一定浓度的AFP溶液,其初始冰晶量低,则冰晶表面AFP的吸附覆盖程度就高,因此对冰晶继续生长的抑制作用越强。同样,在一定的初始冰晶量条件下,AFP的浓度越高,样品中参与吸附的AFP分子越多,则冰晶表面为AFP分子覆盖程度就越高,因而对冰晶生长的抑制作用就越强。

总之,对不同浓度的AFP样品,在相同的保持温度 T_{bd} 下,其初始冰晶量可能差别很大,因此在报道及表示抗冻蛋白活性时,应标明其浓度以及部分熔化状态时的初始冰晶量。而对不同来源的AFP活性比较也应在相同浓度和初始冰晶量的条件下进行。用传统的显微镜直接观察法由于难以定量测定和控制初始冰晶量,得到的AFP活性数据往往存在很大分歧。DSC分析避免了这些缺陷,但不能可视观察抗冻蛋白使冰晶生长习性改变而形成针

状冰晶的形态。应用带有摄录系统的显微差示扫描量热技术^[3],既能探测冰晶生长习性改变所特有的结构形态动态显微图象,又能定量测定相应的热反应数据,可能为抗冻蛋白的研究及其作用机制提供更丰富的实验佐证。抗冻蛋白能否作为一种生物性的大分子低温保护剂而应用于细胞及其他生物材料的低温保存,仍需作进一步的细胞生物学、生化及生物物理方面的研究。

参考文献 (References)

- [1] DeVries AL. *Science*, 1971, **172**: 1152
- [2] Davies PL *et al.* *FASEB J*, 1990, **4**: 2460
- [3] 华泽钊等著。低温生物医学技术。北京: 科学出版社, 1994
- [4] Ren HS *et al.* *Cryobiology*, 1994, **31**: 47
- [5] Tang W *et al.* *Cryobiology*, 1992, **29**: 729
- [6] Brown RA *et al.* *Biopolymers*, 1985, **24**: 1265
- [7] Raymond JA *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, **74**: 2589
- [8] Wang JH. *Cryobiology*, 2000, **41**: 1
- [9] DeVries AL. *Phil Trans R Soc Lond*, 1984, **B304**: 575

Calorimetric Analysis of Antifreeze Activity and the Absorption-inhibition Mechanism of Antifreeze Protein

He-Sheng Ren*, Na-Fei Xu, Ze-Zhao Hua

(*Institute of Thermal Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China*)

Abstract The activity of antifreeze protein (AFP) in *Tenebrio molitor* is analyzed by differential scanning calorimetry (DSC). It is shown that the antifreeze activity of AFP increases with decrease of initial ice crystal, and increase of concentration of AFP. These results are accordant with the absorption-inhibition mechanism of AFP.

Key words antifreeze protein (AFP); thermal hysteresis; differential scanning calorimetry (DSC)

Received: September 10, 2003 Accepted: February 20, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.59576011)

*Corresponding author. Tel: 86-21-65681990, Fax: 86-2165682376, E-mail: hsrenb@online.sh.cn