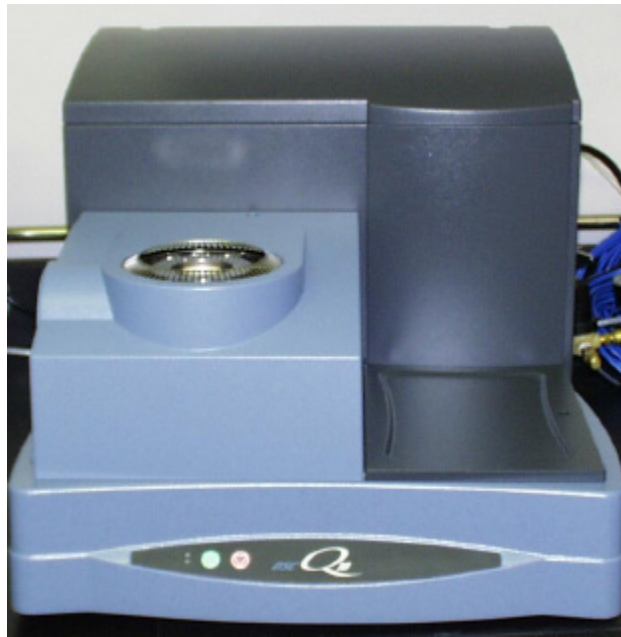


生物巨分子熱力學實驗



生物巨分子熱穩定性實驗

作者：葉旭成 助教

張家靖 教授

一、前言

蛋白質在某種機制下而產生如立體結構上的改變、溶解度降低、生物活性喪失、及結晶能力消失等...，我們即稱之為蛋白質變性（denaturation）。其變性後所破壞的通常是穩定蛋白質結構的作用力，而並不會影響蛋白質的一級結構。

要將蛋白質變性的方式很多，包含了物理方法、化學方法、與生物方法等。而本實驗則是使用物理方法中的熱來使蛋白質變性，來了解變性前後能量上的差異，進而探討蛋白質結構之熱穩定性。

二、實驗方法

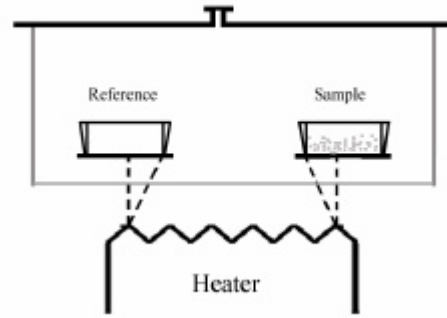
將蛋白質密封至一鋁製的 Cell 中，然後使用 Differential Scanning Calorimetry（DSC）對含蛋白質之緩衝溶液採取持續性的線性升溫動作，然後觀察蛋白質之比熱容量改變（heat capacity change）之狀況。

三、儀器原理

■ 儀器構造與計算原理

DSC 顧名思義的是利用一持續性的線性加熱（scanning）方式，然後觀測樣品與參考物的差異性（differential）。當一吸放熱之現象產生時，即可得到熱量變化，而此變化是以溫度為參數的方程式，我們稱之為熱流（heat flux）變化。通常利用此儀器來觀測 Tg、melting、crystallization、curing、cure kinetics、onset of oxidation、以及 heat capacity。儀器的基本構造（Fig 1）為一爐體所構成，主要有兩端，一為樣品端，另一為參考端，外圍則纏繞加熱線圈可使爐體升溫。

Fig 1 右圖為 DSC 之示意圖。爐體內部有兩端可放置樣品，一為參考另一為樣品端，外圍則有加熱器可對內部加溫，來使爐內溫度增加。虛線所對其部分為兩個 thermal couple。



此時同一個 Cell 的溫度差可以代入熱歐姆定律中, 左右能量差即可求得 Cell 的熱流為何。(Fig 2)

$$Q_s = \frac{T_s - T_{fs}}{R_s} \quad ; \quad Q_r = \frac{T_r - T_{fr}}{R_r}$$

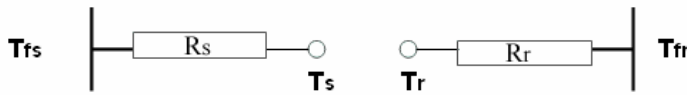


Fig 2 右圖為溫度差異所得到之圖形。其中 Rs 與 Rr 分別為兩端的熱阻抗係數

於是熱流及為

$$\Delta Q = Q_s - Q_r = \frac{T_s - T_{fs}}{R_s} - \frac{T_r - T_{fr}}{R_r}$$

現在假設 $R_s = R_r = R$, $T_{fs} = T_{fr}$; 最後可得

$$\Delta Q = \frac{T_s - T_r}{R} = \frac{\Delta T}{R}$$

■ 比熱容量 (Specific Heat Capacity)

比熱容量就是單位質量的物體升高 1 所需要的熱量大小。於是可以得到下列公式：

$$\Delta H = Cp\Delta T$$

微分後可得

$$\frac{dH}{dt} = Cp \frac{dT}{dt}$$

其中 dH/dt 為 Heat flow ; dT/dt 為 Heating rate

■ 實際實驗之做法

雖然經由微分之公式即可得到理論之比熱容量大小, 由於環境的熱量散失、heating rate 之不穩定性、熱流不平均等的問題, 在測量時會有十分多的

誤差產生，所測量到的 Heat flow 並非完全相等於 dH/dt 。於是使用藍寶石來校準其比熱容量之大小，扣除背景之比熱大小差異後，利用比例方式即可求得實際樣品之比熱大小。

四、實驗步驟

■ 開啟機器

1. 先開啟 Q10 儀器之總開關（位於機器之背面）
2. 設定 Purge Gas 流量，通常為 30~50ml/min
3. 開啟電腦後選擇 program → Q series Explore → Q10

■ 檢驗基線

1. 開始前先 run 一個 baseline 確定基線沒問題。在蛋白質實驗中，因為實驗範圍通常於室溫與水的沸點之間，可以選擇約 30 ~120 的 heating rate 來觀察。將爐體上方三個蓋子都蓋上去之後，即可以開始實驗。
2. Program method:
 - (1) Equilibrate at 30
 - (2) Rate is 2 /min to 120
3. 若此時基線沒問題即可開始實驗，若有問題則請重新校正^{註2}。

■ 開始實驗（請依實際狀況調整）

1. 取約 10~20 μ l 的蛋白質樣品放入鋁製 cell 後，將 sample 利用壓片機壓緊。壓緊後如 Fig 3-3 所示



Fig 3-1 實際上之液態樣品盤，分為上蓋與下蓋。

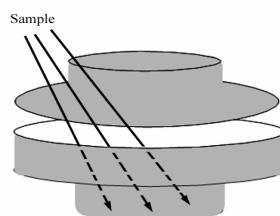


Fig 3-2 樣品放入後，將上蓋放入。

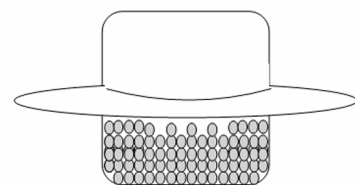


Fig 3-3 壓緊後之 Cell

2. 設定之 Program method:
 - (1) Equilibrate at 35

- (2) Isothermal at 35 for 5 min
 - (3) Rate is 2 /min to 97
 - (4) Isothermal at 97 for 5 min
3. 先取兩個空的樣品盤分別放入 Reference 與 Sample 端 (Fig 4), 輸入檔名與質量為 0 mg , run 第一個實驗。此實驗稱之為 Baseline。

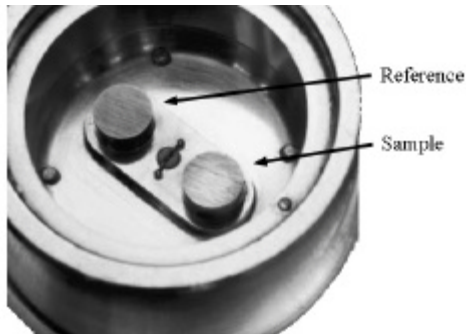


Fig 4 爐體鳥瞰圖，上為 reference 端，下即為 Sample 部份。

4. 為了更快速的進行實驗，於上一個實驗結束時，可放上 Quench cooler (Fig 5), 慢慢加入冰塊使爐體降溫。
5. 等溫度降低至 40 左右時，Reference 端不動，Sample 端換成藍寶石，輸入檔名與質量，此為第二個實驗。此實驗稱之為 Reference。
6. 第三個實驗則是樣品的實驗，Reference 端仍然不動，Sample 則放入 1.所壓好的蛋白質樣品，採取同樣的實驗步驟，完成之後，實驗結束。切記不可放顛倒，否則樣品溢出來會使得爐體嚴重污染致無法修復，若不小心污染，請進行 Clean^{註2} 的動作。
7. 更改 heating rate 為 5 /min 重覆 3.4.5.的實驗步驟。

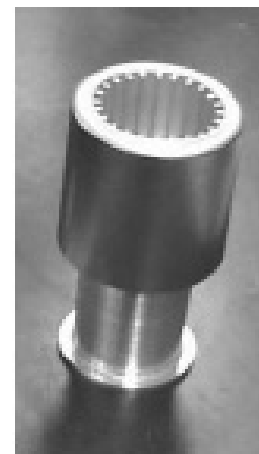


Fig 5 Quench Cooler

■ 數據分析

1. 開啟 program → TA Advantage Specialty Lib
2. 點選  開新分析檔案，選擇 DSC Heat Capacity Analysis。
3. 出現視窗如下圖 Fig 6 分別開啟上述的 Baseline, Reference, and Sample

之實驗檔案後點選 ok 即完成。

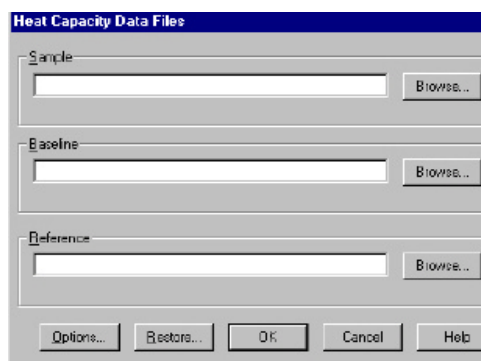


Fig 6 Heat Capacity Analysis 選項頁

4. 一開始顯現之圖形為 Heat Flow 之對應圖，由工具列 Graph → Heat Capacity，即可得到 Heat Capacity 之圖形。
5. 將數據先畫出一條 Baseline，再行積分，積分所得之值，便是為 ΔH_{cal} 。

■ 關閉儀器

1. 先跳離 Program 之視窗，關閉電腦。
2. 關閉儀器之後才關閉氮氣。

五、問題

1. 為何要使用藍寶石來當比熱容量校準用之物品？除了藍寶石之外，請試著選擇一樣物質來當標準物，並說明選擇之理由。
2. 在 Program method 的設計上，為什麼一開始需要 isothermal 5 min，功用為何？
3. Method 最後的 isothermal 5 min 後，Heat flow 值應該為多少？為什麼？
4. 不同的升溫速率，是否會產生不一樣的結果呢？請解釋之。

六、備註：

1. 感謝立源興業提供廣大的 DSC 儀器原理資訊。
2. 有關儀器校正與 Clean Cell 之部分，請參考附錄之 DSC Q10 使用者操作手冊（From 立源興業）。