

等溫滴定熱量儀：蛋白質形變、動力學暨結合常數奈米熱量測

Isothermal Titration Calorimetry: Measurements of Conformational Change, Kinetics and Binding Constant for Proteins at Nanocalory Scale

王裕銘、陳吉良、黃榮山、李世元、李世光、林世明

Yu-Ming Wang, Ji-Liang Chen, Long-Sun Huang, Chih-Yuan Lee, Chih-Kung Lee, Shiming Lin,

量測蛋白質形變、動力學暨結合常數的方法非常多，例如 ELISA、RIA、SPR、DPI 等方法，然而這些方法有其缺點，就是必須將樣品固定於固體表面或作螢光或放射線標定，無法於真實溶液中直接偵測，而等溫滴定熱量儀具有可在分子之間反應過程中量測其熱力學的微小變化值，直接測得焓變化量 (enthalpy, ΔH)，僅需微量樣品以及 30 至 60 分鐘，自動分析結果等優點。若是酵素反應可測得其 K_m 及 k_{cat} 值，並可量測蛋白質摺疊過程之焓變化量。

There are many methods to analyze the biomolecular interactions, such as ELISA, RIA, SPR and DPI etc. However, the disadvantages of these methods have to fix the samples on substrate or to label in indirect analysis in non-physiological solution. Isothermal titration calorimetry can detect these small changes in heat at this process of biomolecular interactions to measure the change in enthalpy directly. ITC systems permit to complete the molecular interactions with as little as a few nanomoles of material and take only 30–60 min to complete and are highly automated, including instrument operation and data collection and analysis. It is also to get enzyme kinetic parameters and the changes of enthalpy on protein folding.

一、前言

生物巨分子的相互作用，如蛋白質－DNA、抗體－抗原、荷爾蒙－接受器等，顯示出分子辨識的複雜性與多樣性，而這些相互作用在免疫反應、訊息傳遞以及基因表現上就顯得特別重要。在自然

狀況下其作用力穩定了分子之間相互作用的關係，已有許多方法，如酵素結合免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、放射免疫分析檢查 (radioimmunoassays, RIA)、表面電漿共振 (surface plasmon resonance, SPR) 及雙偏極化干涉術 (dual polarisation interferometry, DPI) 等，可間接量

測出分子間相互作用關係。而等溫滴定熱量儀 (isothermal titration calorimetry, ITC) 透過偵測分子間作用時的熱能微小變化，不僅可計算出結合常數 (the binding constant, K_a)，還可得到結合位置數目 (the number of binding site, n)、焓 (enthalpy)、熵 (entropy) 以及自由能 (free energy)。ITC 的優點是分子結合時是處於真實的平衡狀態，僅需少量樣本 (~ nanomole)，而且樣品不需要標示任何分子也不必固定於固體表面上，可在 30–60 分鐘完成測量⁽¹⁾。

生物化學研究的重點之一是酵素活性及功能的確定，每一生化反應催化途徑必須依賴酵素的參與，此外酵素對藥物的發現與研發也是同樣重要。目前藥物的作用對象是酵素，也佔有一定的份量，而研究人員也不斷發現新酵素與研發新藥來探究其作用關係。酵素分析需要量測催化活性 (反應物變成產生)，確定反應物對酵素之親和性。在研發治療試劑之前，我們需要了解酵素與反應物是如何的運作，傳統偵測方法是使用分光儀或化學探測方式，然而有許多酵素是無法使用普通的方法作量測，所以透過 ITC 可以求的酵素動力學之 K_m 及 k_{cat} ⁽²⁾。

市場上已有商品化之 ITC 問世，且美國 Calorimetry Sciences 公司推出新型等溫滴定熱量儀 Nano ITC Series III (N-ITC)，幾乎可以量測任何反應或相互結合作用，並在短時間 (約 30 分鐘) 內求得 K_{eq} 、 ΔH 、 ΔS 及 n 等各種參數，具有高靈敏度、快速反應、微體積需求 (0.75 mL)、溫度範圍廣 (2–80 °C)、訊號穩定之優點⁽³⁾。本文除介紹等溫滴定熱量儀裝置及原理外，還有其量測各種生物分子作用之應用。

二、設備與實驗分析

圖 1 為等溫滴定熱量儀 (ITC) 之設備示意圖，此裝置使用樣品槽 (sample cell) 與參考槽 (reference cell)，所有相互結合的實驗皆在樣品槽中完成，其溫度與參考槽中之溫度作比較。兩個槽內之溫度與外面溫度完全隔絕，以免干擾槽中溫度變化時之量測。在操作期間，會提供穩定熱源至參考槽中，而樣品槽也維持與參考槽相同溫度並隨時校正溫度。

假設配體 (ligand) 與大分子 (macromolecule) 之間會專一性結合，若樣品槽有一放熱反應 (exothermic reaction) 發生，會有熱能釋放至樣品槽中，而回饋電源裝置自動使溫度調回原來溫度，真正放熱反應所釋放之熱能，即等同於回饋當中所減少之熱能，而樣品槽溫度可以再度回到與參考槽相同溫度，以便進行下一個實驗。一個實驗包含數個等體積的配體溶液注入至裝有大分子的樣品槽中，典型的分子之間結合的放熱反應如圖 2(a) 所示，每一個峰值代表單一注射的結果，可以看到初期注射的峰值幾乎相等，顯示差不多所有的配體與大分子結合。在注射過程中峰值漸漸變小，表示結合位置幾近飽和而配體可結合的位置也就減少的關係。在最後幾次注射當中峰值皆很小，顯示完全飽和，實驗終了。透過軟體分析得到圖 2(b)，每次注射的所有熱能 (kcal/mole injectant) 相對於配體—大分子莫爾濃度比 (molar ratio) 作圖求得分子之間的結合等溫線 (binding isotherm)。結合等溫線的型態包含所有分子結合反應的完整資訊，經由曲線套配軟體分析，可提供相關熱力學的資訊⁽¹⁾。

三、理論模型

等溫滴定熱量儀 (ITC) 是利用樣品槽與參考槽的溫度差異進行生物結合能量 (binding energy)、親合性常數 (affinity constant) 及結合熵 (binding entropy) 等參數檢測。樣品槽與參考槽起始皆含有

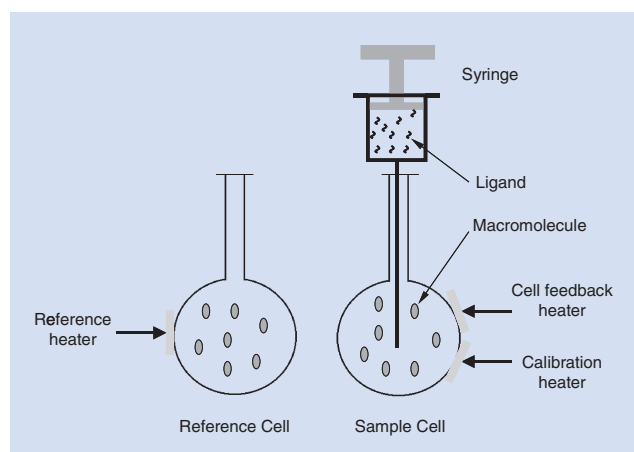


圖 1. 等溫滴定熱量儀 (ITC) 之示意圖。

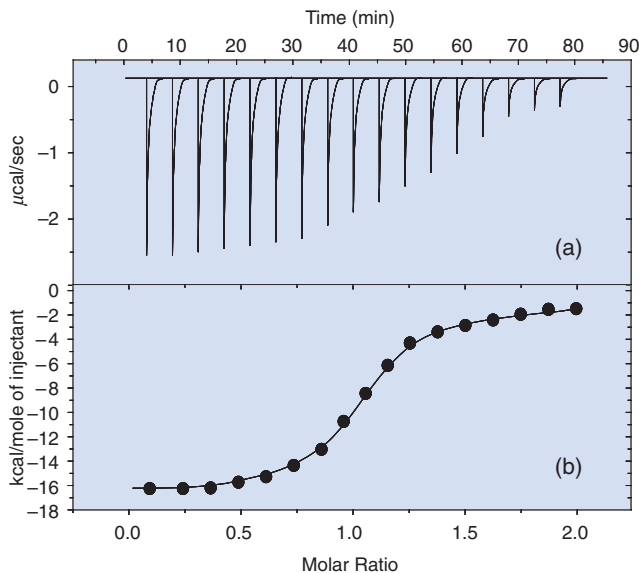


圖2. 等溫滴定熱量儀之結果反應圖。

相同濃度之待測生物分子，當加入具專一性生物分子進入樣品槽時，兩生物分子會進行結合，並產生熱量 q_i ，其熱量方程式可寫成：

$$q_i = v \times \Delta H \times \Delta L_i \quad (1)$$

其中： q_i 為兩生物分子結合時所產生之熱量。 v 為樣品槽之體積。 ΔH 結合焓 (binding enthalpy)。 ΔL_i 為第 (i) 與第 $(i + 1)$ 次加入具專一性生物分子之濃度差⁽⁴⁾。

在每次注入具專一性生物分子與樣品槽內生物分子反應時，其所產生之熱能會逐漸降低，其原因為當樣品槽內之生物分子大都完成結合，所產生之能量會逐漸降低。因此，生物分子與其專一性生物分子之濃度比例與熱能之關係式可寫成：

$$q_i = v \times \Delta H \times [P] \times \left[\frac{K_a [L]_i}{1 + K_a [L]_i} - \frac{K_a [L]_{i-1}}{1 + K_a [L]_{i-1}} \right] \quad (2)$$

其中： ΔH 為結合焓可由方程式 (1) 得到。 $[L]_i$ 為第 i 次加入具專一性生物分子之濃度。 $[L]_{i-1}$ 為第 $(i-1)$ 次加入具專一性生物分子之濃度。 K_a 為生物分子之結合常數可由 (2) 式得到。當實驗總結結合之

生物分子濃度遠大於自由生物分子 (具專一性分子濃度) 時，方程式 (2) 之濃度須更改為總結合生物分子濃度。

考慮任何生物分子結合過程所需能量反應式： $[A] + [B] \xrightarrow{\text{Binding energy}} [AB]$ 。其反應式所需能量可寫成爲：

$$K_a = e^{-\Delta G/RT} \text{ 或 } \Delta G = -RT \ln K_a \quad (3)$$

其中： ΔG 為自由能或生物結合所需能量⁽⁵⁾。當生物分子未結合時擁有最大之自由能，而當生物分子與其專一性生物分子產生結合時會有較小之自由能。當自由能藉由方程式 (3) 求得，可根據熱力學定律求得焓：

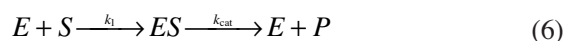
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

當 ITC 實驗在不同溫度下操作，可求得熱容積常數 (heat capacity) C_p ，其理論模型如下所示：

$$\Delta C_p = \frac{\partial \Delta H}{\partial T} \quad (5)$$

由上式可知，當改變生物結合過程之操作溫度時，其焓也會隨之改變，其原因為生物分子在不同溫度時之活性會不一樣，因此會影響其結合能力。

等溫滴定熱量儀也可應用於酵素動力學分析檢測。當酵素 (E) 與其反應物 (S) 結合時會形成複合物 (ES)，此複合物轉變成其過渡型式 (ES^*)，然後是酵素 (E) 與產物 (P) 的複合物 (EP)，最後酵素－產物複合物解離，產生游離態的酵素與產物。如下反應式：



k_1 是形成 ES 的速率常數， $[E]$ 是反應中所有酵素的濃度， k_{cat} 是催化速率常數，反應速率 R_t 由以下 Michaelis-Menten 方程式而得：

$$R_i = \frac{V_{\max} \times [S]_i}{K_M + [S]_i} \quad (7)$$

V_{\max} 是最大反應速率， $[S]_i$ 是初始反應物濃度， K_m 是 Michaelis 常數，而且 V_{\max} 等同於 $k_{\text{cat}} \times [E]$ 時，方程式 (7) 可改寫為：

$$R_i = \frac{k_{\text{cat}} \times [E] \times [S]_i}{K_m + [S]_i} \quad (8)$$

熱能會隨著反應物經由酵素催化形成產物過程中出現變化，因此熱能可被定義為：

$$\text{Power} = \frac{dQ}{dt} = q_i \quad (9)$$

由上式可知，總熱量為所有時間之熱能總和。因此總熱量方程式可改寫為：

$$Q = n \times \Delta H_{\text{app}} = [P]_{\text{total}} \times \nu \times \Delta H_{\text{app}} \quad (10)$$

其中： P 為產物產生之莫爾濃度， ΔH_{app} 為反應所需之總莫爾焓，結合方程式 (9) 與 (10) 式，可得：

$$\text{Power} = \frac{dQ}{dt} = \frac{d[P]_{\text{total}}}{dt} \times \nu \times \Delta H_{\text{app}} \quad (11)$$

其中： $d[P]_{\text{total}}/dt \equiv R_i$ ，即反應速率。因此，酵素之反應速率可由方程式 (11) 改寫成：

$$R_i = \frac{1}{\nu \times \Delta H_{\text{app}}} \times \frac{dQ}{dt} \quad (12)$$

結合方程式 (8) 與 (12) 式，即可求得 K_m 及 k_{cat} ⁽²⁾。

四、應用

等溫滴定熱量儀 (ITC) 已是商品化並且應用非常廣泛的儀器，不論是分子間熱力學定量分析或者動力學的研究以及甚至蛋白質摺疊皆可精確的量測。ITC 在生物醫學上的應用，作者在此做一整理與介紹。

1. 分子與分子間相互作用

會與蛋白質結合的配體，包括小分子 (例如輔因子)、藥物/抑制劑 (天然與合成的抑制劑)、核苷酸、金屬離子、多醣類、脂質，以及其他蛋白質 (或胜肽衍生物)，此外，還有其他分子之間的作用以及一些與表面化學有關之研究，已有許多文章發表⁽⁶⁾。

Velazquez-Campoy 等人⁽⁷⁾ 使用 ITC 量測治療人類免疫缺乏病毒 (HIV) 感染的藥物與 HIV-1 蛋白酶 (protease) 的熱力學參數，如表 1 所示，用於治療人類免疫缺乏病毒 (HIV) 感染的藥物例如 indinavir、saquinavir、ritonavir 以及第二代抑制劑 KNI-764，皆為 HIV-1 蛋白酶的抑制劑，KNI-764 具有很強的結合特性 ($K_d \leq 1$ nM)，一般滴定是無法提供精確的量測。Gilli 等人⁽⁸⁾ 研究 Ca^{2+} 與 Mg^{2+} 與攜鈣素 (calmodulin, CaM) 相互作用時焓與熵的變化，可以了解 CaM 與離子之作用機制。他們發現 Ca^{2+} 會誘導 CaM 動力學的改變在 CaM 活化標的蛋白的功能上扮演重要角色。在 Ca^{2+} 的四個結合位置 Mg^{2+} 不是扮演競爭的角色而是異位調控的功能。Wenk 與 Seeling⁽⁹⁾ 研究抗微生物胜肽 magainin 2 amide (M2a) 與脂雙層作用，帶有正電荷之 M2a 會攻擊帶負電荷之脂雙層，並插入脂雙層形成孔洞是透過靜電反應。他們認為在高比例的 M2a 與脂雙層之下作用，而且是吸熱反應。

System	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)	K_d (nM)
HIV-1 protease subtype C/ indinavir	2.4	14.5	-12.1	1.41
HIV-1 protease subtype C/ saquinavir	2.1	14.5	-12.4	0.77
HIV-1 protease subtype C/ ritonavir	-3.1	10.3	-13.4	0.16
HIV-1 protease subtype C/ KNI-764	-7.5	7.4	-14.9	0.0122

表 1. 經由 ITC 量測 HIV-1 protease subtype C 與其抑制劑之熱力學結合參數⁽⁷⁾。

Enzyme/substrate	Calorimetric		Literature values	
	K_m	k_{cat}	K_m	k_{cat}
DHFR ^a /DHF ^b	1.2 μM	6 s^{-1}	6 μM	3 s^{-1}
Yeast hexokinase/glucose	72 μM	270 s^{-1}	100 μM	450 s^{-1}
trypsin/BAEE ^c	4 μM	15 s^{-1}	5 μM	22 s^{-1}
rubisco/ribulose biphosphate	0.15 μM	1.95 s^{-1}	0.053 μM	1.76 s^{-1}

^aDHFR: dihydrofolate reductase; ^bDHF: dihydrofolate; ^cBAEE: benzoylarginine ethyl ester

表 2.

經由 ITC 量測酵素動力學參數 K_m 及 k_{cat} ⁽²⁾。

2. 動力學量測

酵素在催化生化反應扮演關鍵性角色，如何有效及快速測的酵素之催化活性也非常重要。ITC 應用在量測酵素動力學上，於本文理論模型中可得知酵素催化反應之 K_m 值及催化速率常數 k_{cat} 。 K_m 值表示反應達到最大反應速率 (V_{max}) 的一半時，所需反應物的濃度，其值越低表示反應物與酵素親和性越大。Todd 等人⁽²⁾ 分析六大類酵素的動力學特性，例如二氫葉酸還原酶 (DHFR, EC 1.5.1.3) 其反應物為二氫葉酸 (DHF)，參與氧化及還原作用，其 K_m 及 k_{cat} 之 ITC 量測值為 1.2 μM 及 6 s^{-1} ，跟以往非使用 ITC 文獻數值也很相近 (表 2)，其他例子如表 2 所示。

3. 蛋白質摺疊

表面活性劑與蛋白質之間會產生很大的作用，導致蛋白質聚集或變性 (denaturation)。Lad 等人⁽¹⁰⁾ 研究表面活性劑 SDS 與溶菌酶 (lysozyme) 之間的作用，結果顯示在低濃度 SDS 時 ITC 結果顯示為放熱反應，在於 SDS 與溶菌酶表面帶正電荷胺基酸產生專一性靜電結合，並導致電荷中和以及沉澱。大約有 8 個 SDS 分子會與溶菌酶結合。在高濃度 SDS 作用下，形成疏水性協同結合的現象。另外，Lopez 等人⁽¹¹⁾ 研究含丙胺酸 (alanine) 胜肽鏈 (有二種長度 16 與 19 個胺基酸鏈) 形成螺旋 (helix) 的熱力學，其焓的變化為 $-0.9 \pm 0.1 \text{ kcal/mol}$ ，而且焓的變化量與鏈長、溫度 (5–45 °C) 並無明顯相關，並認為在螺旋形成當中熱容積改變量非常小。

產物的生成來評估反應的效率，或將樣品固定於固體表面量測 (ELISA 或 SPR) 其動力學，或將樣品進行螢光或放射線標定的間接方式量測，皆無法真實量測分子之間的反應變化，本文所介紹之等溫滴定熱量儀 (ITC) 可以透過分子之間作用，會有吸熱或放熱反應發生，於此過程中偵測微小熱能變化，並經由熱力學原理以及分子動力學，可獲得各種分子反應參數，其不管是在分子之間結合反應機制、藥物研發及篩選上已有多方面的進展，以及某些分子無法使用傳統方法量測的，可以透過 ITC 精準的量測。相信 ITC 將廣泛應用於各方面之研究。

參考文獻

1. M. M. Pierce, C. S. Raman, and B. T. Nall, *Methods*, **19**, 213 (1999).
2. M. J. Todd and J. Gomez, *Anal. Biochem.*, **296**, 179 (2001).
3. <http://www.calorimetrysciences.com/>
4. S. Leavitt and E. Freire, *Current Opinion in Structural Biology*, **11**, 560 (2001).
5. M. J. Cliff and J. E. Ladbury, *J. Mol. Recognit.*, **16**, 383 (2003).
6. M. J. Cliff, A. Gutierrez, and J. E. Ladbury, *J. Mol. Recognit.*, **17**, 513 (2004).
7. A. Velazquez-Campoy, S. Vega, and E. Freire, *Biochemistry*, **41**, 8613 (2002).
8. R. Gilli, D. Lafitte, C. Lopez, M. C. Kilhoffer, A. Makarov, C. Briand, and J. Haiech, *Biochemistry*, **37**, 5450 (1998).
9. M. R. Wenk and J. Seeling, *Biochemistry*, **37**, 3909 (1998).
10. M. D. Lad, V. M. Ledger, B. Briggs, R. J. Green, and R. A. Frazier, *Langmuir*, **19**, 5098 (2003).
11. M. M. Lopez, D. H. Chin, R. L. Baldwin, and G. I. Makhatazde, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 1298 (2002).

五、結論

以往我們常使用傳統方法量測反應物的消耗或

- 王裕銘先生現就讀於國立台灣大學應用力學研究所博士班。

- 陳吉良先生現就讀於國立台灣大學微生物與生化學研究所博士班。
- 黃榮山先生為美國加州大學洛杉磯分校機械工程博士，現任國立台灣大學應用力學研究所助理教授。
- 李世元先生為美國加州大學河濱分校化學博士，現任淡江大學化學系教授兼系主任。
- 李世光先生為美國康乃爾大學理論與應用力學博士，現任國立台灣大學應用力學研究所教授。
- 林世明先生為英國劍橋大學生物技術博士，現任國立台灣大學光電生醫中心暨應力所副教授。
- Yu-Ming Wang is a Ph.D. student in the Institute of Applied Mechanical at National Taiwan University.
- Ji-Liang Chen is a Ph.D. student in the Institute of Microbiology and Biochemistry at National Taiwan University.
- Long-Sun Huang received his Ph.D. in mechanical

engineering from the University of California at Los Angeles, USA. He is currently an assistant professor in the Institute of Applied Mechanical at National Taiwan University.

- Chih-Yuan Lee received his Ph.D. from the University of California at Riverside, USA. He is currently a professor in the Department of Chemistry at Tamkang University.
- Chih-Kung Lee received his Ph.D. in theoretical and applied mechanics from Cornell University, USA. He is currently a professor in the Institute of Applied Mechanical at National Taiwan University.
- Shiming Lin received his Ph.D. in biotechnology from Cambridge University, UK. He is currently an associate professor in the Center for Optoelectronic Biomedicine and Institute of Applied Mechanical at National Taiwan University.