

Г.В. Котельников, С.П. Моисеева, В.Я. Гринберг, А.Р. Хохлов

МОДУЛЯЦИОННЫЙ КАПИЛЛЯРНЫЙ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЙ ТИТРАЦИОННЫЙ КАЛОРИМЕТР

Аннотация

Создан модуляционный капиллярный дифференциальный титрационный калориметр. В нем реализован модуляционный режим работы, основанный на последовательности коротких интервалов нагрева и изотермических интервалов во всем интересующем диапазоне температур. Впервые выполнены измерения теплоемкостной и кинетической составляющих тепловой мощности при нагреве разбавленного раствора коллагена. Эти данные важны для фундаментальных исследований в области конформационной энергетики белков и открывают перспективы для развития предложенного метода модуляционной калориметрии.

Введение

Титрационная микрокалориметрия позволяет определять термодинамические параметры процессов молекулярных взаимодействий и изучать кинетику ферментативных реакций. Термодинамическое описание процессов связывания характеризуется числом связывающих участков, или стехиометрией реакции n ; константой связывания K , выражающей силу связывания и определяющей свободную энергию Гиббса, где $\Delta G = -RT \cdot \ln K$; вкладом энтальпии и энтропии в свободную энергию Гиббса, где $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ [1].

При изучении кинетики ферментативных реакций определяется константа скорости ферментативной реакции k_{cat} и константа Михаэлиса K_m , характеризующая сродство фермента к субстрату. Этот метод обеспечивает работу с системами, характеризующимися высокой мутностью, исследование которых традиционными оптическими методами невозможно [2].

Традиционно использование термодинамических методов ограничивалось определением константы связывания и стехиометрии связывания молекул, уже идентифицированных и оптимизированных с помощью других методов. К настоящему времени показано, что алгоритмы, базирующиеся на термодинамике, обеспечивают точное руководство по оптимизации сродства связывания основных компонентов; улучшению селективности связывания между сходными мишенями; обеспечению в процессах связывания адап-

тивности к мутациям мишени, вызванным применением к лекарству [1].

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии с модуляцией по температуре (TMDSC) разрабатывается с 90-х годов прошлого века. Этот метод реализован в дифференциальных сканирующих калориметрах: «Diamond» («PerkinElmer», Inc., USA), DSC822e («Mettler Toledo Instrument», Switzerland) и ряде других динамических сканирующих калориметров (Q1000, Q100 etc., Corporation «TA Instruments», USA). Метод TMDSC защищен патентами EP0803061, US5224775 и рядом других патентов. Калориметрические камеры TMDSC имеют высокие динамические характеристики, что обеспечивает быстрое действие этих приборов на уровне нескольких секунд. Метод TMDSC позволяет изучать очень малые тепловые эффекты, такие как, например, стеклование в тонких полимерных пленках при скоростях сканирования до десятков градусов в минуту. Однако TMDSC не применяется для изучения разбавленных растворов биомолекул, поскольку их водные растворы анализируются при низких скоростях сканирования, где максимальная скорость не превышает нескольких градусов в минуту, и при такой скорости чувствительность DSC недостаточна для измерения возникающего теплового потока низкой интенсивности. Изучение разбавленных растворов биомолекул и пептидов, мембранных и белок-мембранных систем, нуклеиновых кислот, полисахаридов, клеток и тканей, искусственных

полимеров до настоящего времени проводится на дифференциальных адиабатических сканирующих микрокалориметрах типа ДАСМ [3]. Важным достоинством адиабатических сканирующих калориметров является их высокая чувствительность. Однако эти приборы и новые модели отечественных и зарубежных аналогов не обеспечивают модуляционного температурного режима сканирования [3], что не позволяет выделить кинетическую и теплоемкостную составляющие из измеряемой на этих приборах тепловой мощности. Актуальность создания калориметра для изучения разбавленных растворов веществ различной природы в модуляционном режиме подтверждается результатами измерения теплоемкостной и кинетической составляющих измеряемой тепловой мощности при изучении разбавленных растворов белков и других веществ [4].

Принципиально новое техническое решение калориметрического узла капиллярного титрационного калориметра обеспечило создание на его основе модуляционного капиллярного дифференциального титрационного калориметра (МКТД) [4], [5], необходимого, благодаря своим новым

возможностям, для проведения современных исследований.

Структурная схема МКТД

На рис. 1 представлена структурная схема модуляционного капиллярного дифференциального титрационного калориметра с электрической калибровкой шкалы измеряемой тепловой мощности, имеющий электрические выводы 1, 2, 3 и 4 нагревательного элемента 5, расположенного на конце дозирующей иглы для рабочей камеры 6. При этом выводы 1 и 2 расположены на игле для рабочей камеры 6, а выводы 3 и 4 – на игле для эталонной камеры 7. Предложенный калориметр имеет рабочую 6 и эталонную 7 калориметрические камеры в виде прямых капиллярных трубок с внутренним диаметром 2,0 мм. Полный объем калориметрической камеры равен 385 мкл, рабочий объем равен 156 мкл. Рабочим объемом калориметрических камер является объем части трубок, расположенный между дном камер и границей контакта с пассивным тепловым шунтом 8. Длина капилляров рабочего объема камер равна 50 мм. Калориметрические камеры заключены в

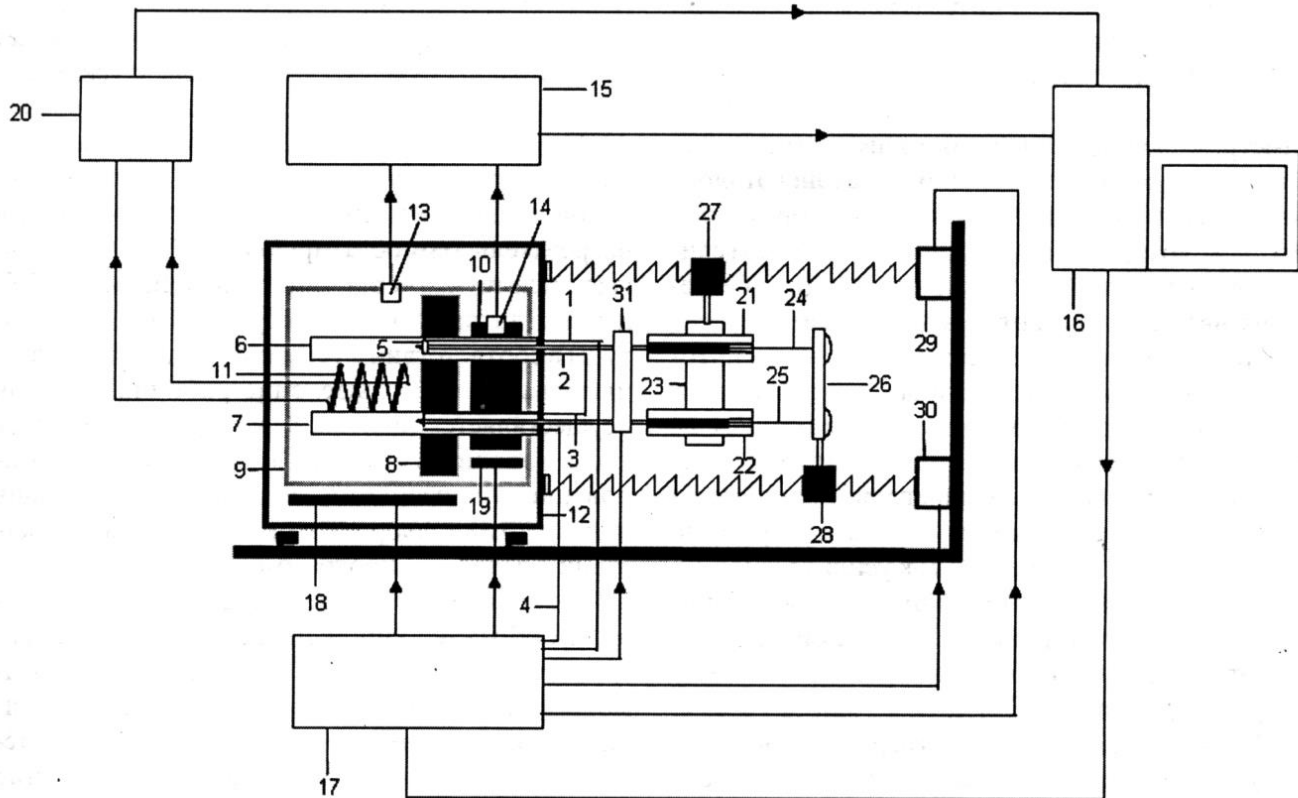


Рис. 1. Структурная схема МКТД

термостатирующую оболочку 9. На выводных концах капилляров калориметрических камер установлен активный тепловой шунт 10, который снижает тепловой шум и исключает теплообмен калориметрических камер и пассивного теплового шунта с внешней средой через выводную часть капиллярных трубок. Данное построение не требует подводящих элементов в виде дополнительных трубок. Калориметрические камеры снабжены измерительной термобатареей 11. Калориметрические камеры, заключенные в термостатирующую оболочку 9, установлены в термохолодильник 12. На термостатирующей оболочке установлен датчик температуры 13, а на активном шунте – датчик температуры 14. Датчики температуры 13 и 14 подсоединены к многоканальному измерительному усилителю 15, связанному с компьютером 16, содержащим многоканальный аналого-цифровой преобразователь (АЦП) и модуль РС-ТЮ-10, включающий в себя таймеры, связанные с блоком усилителей мощности 17, соединенным с нагревателем 18 термостатирующей оболочки и нагревателем 19 активного шунта. Калориметр снабжен измерителем мощности тепловых процессов, состоящим из термобатареи 11, связанной своим выходом с входом нановольтметра 20, который снабжен интерфейсом RS-232, связывающим нановольтметр с компьютером 16.

Калориметр снабжен инъекционным устройством, служащим для введения реагентов в калориметрические камеры и состоящим из шприца 21 для рабочей камеры и шприца 22 для эталонной камеры, размещенных в одном корпусе 23. Поршни дозирующих шприцов 24 и 25 объединены связывающей их пластиной 26. Для обеспечения введения реагентов в калориметрические камеры корпус шприцов связан с первым винтовым механизмом 27, а пластина – со вторым винтовым механизмом 28. Винтовой механизм 27 приводится в движение шаговым двигателем 29, а винтовой механизм 28 – шаговым двигателем 30. Управление шаговыми двигателями осуществляется компьютером через блок усилителей мощности 17. Колебательный режим дозирующих игл обеспечивается вибрационным устройством 31, частота колебаний которого управляется компьютером через блок усилителей мощности 17.

Для калибровки шкалы измеряемой мощности используется нагреватель 5, снабженный вы-

водами 1, 2, 3, 4, и источник электрической энергии блока усилителей мощности 17.

Предлагаемый калориметр работает следующим образом.

Устанавливается заданная температура термостатирующей оболочки 9 в окне «Уставка температуры», затем камеры 6 и 7 и дозирующие шприцы 21 и 22 заполняются реагентами с помощью соответствующих заправочных шприцов.

В окне «Дозирование» устанавливается величина дозы вводимого реагента.

Устанавливается исходное положение дозирующих шприцов 21 и 22 из окна «Дозирование», при этом дозирующие иглы занимают положение максимального погружения в калориметрические камеры.

После окончания наблюдаемого в окне «Измерение» переходного процесса, связанного с введением игл в камеры, производится запуск архивирования данных.

Изотермические условия калориметрических камер МКТД обеспечиваются термостатирующей оболочкой и активным тепловым шунтом, размещенными в термохолодильнике. Температура термостатирующей оболочки и активного теплового шунта автоматически регулируется по сигналам датчиков соответственно 13 и 14, связанных с компьютером через многоканальный измерительный усилитель. Сигналы с усилителя 15 поступают в компьютер на многоканальный АЦП. Сформированные сигналы управления с широтно-импульсной модуляцией (ШИМ) с выходов таймеров модуля РС-ТЮ-10 подаются в нагреватель термостатирующей оболочки и нагреватель шунта через усилитель мощности, обеспечивая автоматическое регулирование температуры в соответствии с уставкой, заданной на компьютере. Точное выделение рабочих объемов осуществляется шунтом 8, который охватывает часть калориметрических камер. В окне «Дозирование» производится подача дозы. Операция подачи дозы повторяется многократно в соответствии с заданной программой.

Дозирование реагентов осуществляется следующим образом. Заполненные реагентами шприцы посредством винтового механизма, приводимого во вращение шаговым двигателем 29, управляемым от компьютера через блок усилителей 17, устанавливаются в положение

максимального погружения в заполненные реагентами калориметрические камеры.

После опускания шприцов осуществляется фиксация поршней планкой 26.

При введении дозы производится продольное перемещение шприцов механизмом 27 на всю длину калориметрических камер. Одновременно с этим производится перемещение поршней механизмом 28. За счет различной величины перемещений механизмов 27 и 28 шприцами осуществляется дозирование заданного количества реагентов. Возможен вариант дозирования из крайнего верхнего положения в сторону погружения игл в камеры.

Каждое новое дозирование производится из исходного положения.

Для приведения игл инъекционного устройства в колебательное движение с компьютера 16 подается сигнал заданной частоты, который через блок 17 подается на вибрационное устройство 31.

Калориметрический узел МКТД построен на основе разработанной теоретической модели этого прибора. Ее расчет и экспериментальное исследование положены в основу создания указанного калориметра.

Эти теоретические исследования касаются ключевых проблем: метода выделения рабочего объема калориметрических камер, метода выравнивания концентраций реагентов в калориметрической камере, метода введения добавки в калориметрическую камеру.

Метод выделения рабочего объема калориметрической камеры дал расчетное соотношение (1), позволяющее оценивать рабочий объем с погрешностью не более 0,02 % [5]:

$$K = \left[\frac{2\alpha \cdot L \cdot r_2 + \frac{n \cdot r_{np}^2 (\lambda_{конст} + \lambda_m)}{l_{np}}}{\frac{2\lambda_{ш} \cdot h}{\ln \frac{R_{ш}}{r_2}} + \frac{(r_2^2 - r_1^2) \cdot \lambda_k + r_1^2 \cdot \lambda_{жс}}{d}} \right] \times \left[\frac{1}{1 + \frac{2l_{np} \alpha \cdot L^2 \cdot r_2 + n L r_{np}^2 (\lambda_{конст} + \lambda_m)}{2l_{np} [(r_2^2 - r_1^2) \cdot \lambda_k + r_1^2 \cdot \lambda_{жс}]}} \right], \quad (1)$$

где α – коэффициент теплоотдачи; r_1 – внутренний радиус калориметрической камеры; r_2 – внешний радиус калориметрической камеры; L – высота рабочего объема; h – высота шунта; $R_{ш}$ – радиус шунта; n – число ветвей медь-константановой измерительной термобатарей, установленной между камерами; r_{np} – радиус проводов ветвей термобатарей; l_{np} – длина каждой ветви термобатарей; $\lambda_{конст}$ – коэффициент теплопроводности константана; λ_m – коэффициент теплопроводности меди; λ_k – коэффициент теплопроводности материала камеры; $\lambda_{ш}$ – коэффициент теплопроводности материала шунта; $\lambda_{жс}$ – коэффициент теплопроводности жидкости; d – зазор между шунтами.

Теоретическая оценка времени выравнивания концентрации титранта по образцу в рабочем объеме калориметрической камеры (2) определила требуемый диаметр калориметрической камеры [6]:

$$\tau = \frac{R_0^2}{2D_k} \left(1 - \frac{V_d}{V_k} \right) \ln \left[\frac{1}{k} \left(\frac{V_k}{V_d} - 1 \right) \right], \quad (2)$$

где V_d – объем жгута (дозы титранта); R_0 – радиус жгута; V_k – рабочий объем калориметрической камеры; D_k – коэффициент диффузии титранта в образце; k – коэффициент выравнивания концентрации титранта в образце.

Полученная зависимость критической скорости перемещения иглы с титрантом (3) обеспечила выбор конструкции активного теплового шунта, позволяющего осуществлять введение иглы с титрантом в калориметрическую камеру без каких-либо ограничений на режим ввода добавки в камеру [7]:

$$v_{кр} = \frac{\alpha \cdot F \cdot H_{ш}}{2C_{ш}}, \quad (3)$$

где α – коэффициент теплоотдачи от иглы к шунту; F – площадь иглы в зоне контакта с тепловым шунтом; $C_{ш}$ – теплоемкость иглы; $H_{ш}$ – высота шунта.

Максимальная скорость введения иглы равна 13,7 мм/с. При прохождении иглой зоны активного теплового шунта обеспечивается выравнивание температур иглы и камеры. Принудительная турбулизация жидкости, характеризуемая коэффициентом Рейнольдса порядка 17 при температуре 30 °С, образуется вибрирующей дозирующей иглой, что обеспечивает эффективность теплового шунта.

При этом крайне важно, что предложенное техническое решение калориметрического узла МКТД обеспечивает практическое равенство температуры термостатирующей оболочки 9 температуре теплового шунта 8 с калориметрическими камерами 6 и 7 [4]. Благодаря этому калориметрический узел калориметра, состоящий из калориметрических камер, теплового шунта и термостатирующей оболочки, позволяет изменять динамические характеристики систем измерения и управления калориметра в широком диапазоне, используя возможности современных систем автоматического регулирования [8]. Высокие динамические характеристики данных систем калориметра обеспечили реализацию в нем модуляционного режима работы с температурной модуляцией StepScan DSC. Этот метод основан на последовательности коротких интервалов нагрева и изотермических интервалов во всем интересующем интервале температур.

При выборе временных интервалов температурного сканирования и изотерм учитывается граничная частота регистрируемого сигнала тепловой мощности ω_c [9].

Параметры и характеристики МКТД

Процессы связывания:

- n – стехиометрия реакции;
- K – константа связывания, определяющая сво-

бодную энергию Гиббса, где $\Delta G = -RT \cdot \ln K$;

- ΔH – энтальпия связывания;
- $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ – вклад энтальпии и энтропии в свободную энергию Гиббса.

Ферментативные реакции:

- k_{cat} – константа скорости катализа;
- K_m – константа Михаэлиса.

Технические характеристики:

- измерительный объем – 156 мкл;
- объем добавки титранта – 1...10 мкл;
- концентрация образцов – 10^{-4} ... 10^{-5} М;
- чувствительность – 50 нВт;
- температурный диапазон – 5...50 °С.

Режимы работы:

- изотермический;
- линейный нагрев со скоростью до 0,2 К/мин;
- линейное охлаждение со скоростью до 0,2 К/мин;
- модуляционный StepScan.

На рис. 2 представлена фотография МКТД.

Измерение на МКТД теплоемкостной и кинетической составляющих полного теплового потока при нагреве разбавленного раствора коллагена

Используемые реагенты

Для калориметрических экспериментов кислый раствор коллагена 1,9%, поставляемый ОАО «Лужский завод «Белкозин» (г. Луга, Россия),

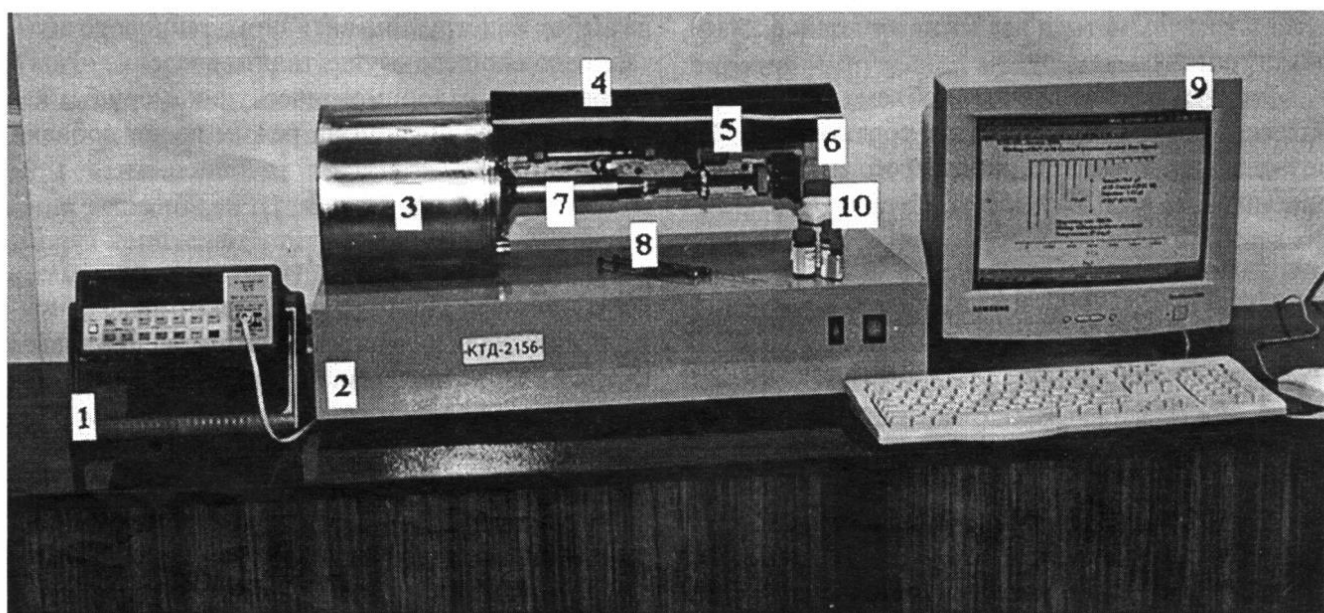


Рис. 2. Модуляционный капиллярный дифференциальный титрационный калориметр: 1 – цифровой нановольтметр; 2 – блок электроники; 3 – термостат; 4 – экран; 5 – винтовые механизмы; 6 – привод титрационного узла; 7 – дозирующие шприцы; 8 – заправочные шприцы; 9 – компьютер; 10 – реактивы для тестирования

разбавлялся 0,1 М уксусной кислоты до концентрации 1 мг/мл.

Условия эксперимента, результаты и обсуждение

Температурная программа состояла из последовательности, содержащей интервал нагрева, за которым следовал изотермический интервал, которые повторялись выбранное число раз. Теплоемкостная составляющая полного теплового потока определялась по тепловому потоку на интервале нагрева, а кинетическая составляющая полного теплового потока – соответственно на изотермическом интервале. Этот метод измерения используется «PerkinElmer Corporation» (USA) в «Diamond DSC» и называется StepScan DSC [10], [11].

Для измерений рабочая камера заполнялась 156 мкл раствора коллагена, а камера сравнения – 156 мкл 0,1 М уксусной кислоты с pH 3,0. Время сканирования составляло 4,5 мин при скорости 0,44 К/мин. Время изотермического интервала равнялось 1,5 мин. Диапазон температурного сканирования – от 23 до 44,2 °С.

Данные, представленные на рис. 3, были получены на МКТД с использованием метода

StepScan [7], [8], который также применялся при обработке уравнения $dQ/dt = Cp dT/dt + f(t, T)$. Кривая С представляет собой отклик сигнала дифференциального теплового потока dQ/dt на скорость нагрева dT/dt . Кривая В – теплоемкостная составляющая $Cp dT/dt$, где Cp – теплоемкость образца. Кривая А – кинетическая составляющая $f(t, T)$ и представляет собой тепловой поток, связанный кинетически ограниченными процессами вследствие физических или химических изменений в образце. Для данного образца коллагена с концентрацией 1 мг/мл была также получена термограмма на адиабатическом сканирующем калориметре ДАСМ-4 в режиме линейного нагрева при скорости сканирования 1 К/мин в температурном диапазоне 10...50 °С (рис. 4).

Сигнал полного теплового потока, представляющий собой сумму кинетической и теплоемкостной составляющих, записанный на МКТД (рис. 3), повторяет сигнал денатурации коллагена (кривая А, рис. 4), полученный на ДАСМ-4 (рис. 4). Таким образом, представление сигнала, записанного при непрерывном температурном сканировании в качестве изменения теплоемкости образца, может дать существенную ошибку в оценку тепло-

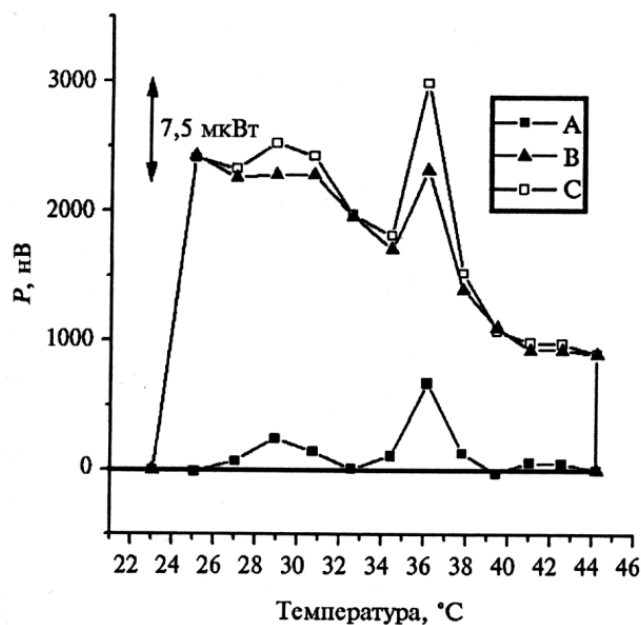


Рис. 3. Данные, полученные с использованием метода StepScan: кривая С – полный тепловой поток; А – выделенная кинетическая и В – теплоемкостная части полного теплового потока, полученные на МКТД для образца коллагена

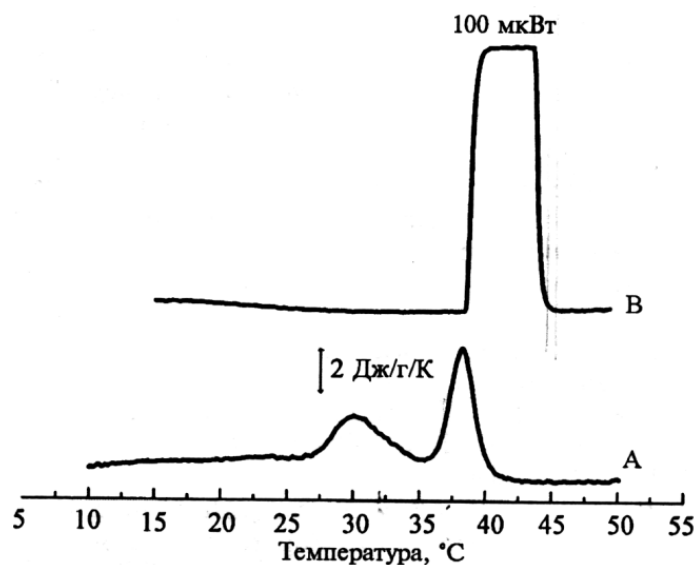


Рис. 4. Кривая полного теплового потока, полученная на ДАСМ-4 для образца коллагена (кривая А); кривая В показывает калибровку электрической мощностью 100 мкВт

емкости образца при наличии кинетической составляющей сигнала тепловой мощности.

Заключение

Выполнены измерения процесса денатурации разбавленного раствора коллагена на созданном впервые в мировой практике модуляционном капиллярном дифференциальном титрационном калориметре. Полученные экспериментальные данные отличаются от экспериментальных данных, получаемых при непрерывном температурном сканировании, при котором регистрируемый сигнал представляется как изменение теплоемкости образца. Тепловой процесс денатурации раствора коллагена по данным МКТД содержит значительную по величине кинетическую составляющую, которая в сумме с теплоемкостной составляющей дает суммарный тепловой поток исследуемого теплового процесса.

Эти данные, полученные на МКТД, важны для фундаментальных исследований в области конформационной энергетики белков и открывают перспективы для развития предложенного метода модуляционной калориметрии.

Список литературы:

1. 2003 Current Trends in Microcalorimetry: Proc. of the Conference July 20-26, 2003, Boston, MA. – MicroCal Inc.: Northampton, MA. USA, 2003.
2. Todd M.J., Gomez J. Enzyme kinetics determined using calorimetry: A general assay for enzyme activity // Analytical Biochemistry. 2001. Vol. 296. P. 179-187.
3. Котельников Г.В., Моисеева С.П., Гринберг В.Я., Хохлов А.Р. Модуляционный капиллярный титрационный калориметр / Фундаментальные и прикладные проблемы приборостроения, информатики и экономики. Научные труды XI Международной научно-практической конференции. Книга «Приборостроение». – Москва: МГАПИ, 2008. С. 167-171.
4. Kotelnikov G.V., Moiseyeva S.P. and Mezhdur E.V. Modulated Capillary Titration Calorimeter: Theoretical and experimental studies // Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2008. Vol. 92. № 2. P. 631-634.
5. Kotelnikov G.V., Moiseyeva S.P., Mezhdur E.V. and Krayev V.P. Method of Separating the Sensitive Volume of Calorimetric Cells in a Differential Titration Calorimeter // Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2000. Vol. 62. P. 39-50.
6. Kotelnikov G.V., Moiseyeva S.P., Mezhdur E.V. and Krayev V.P. New Isothermal Titration Calorimeter for Investigations on Very Small Samples: Theoretical and experimental studies // Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2002. Vol. 68. P. 803-818.
7. Kotelnikov G.V., Moiseyeva Sophia P., Mezhdur E.V., Maevsky E.I. and Grishina Elena V. Studying Dispersoid Systems: Method of introducing an injecting needle into calorimetric chamber of capillary titration calorimeter // Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2005. Vol. 81. P. 255-259.
8. Kotelnikov G.V., Moiseyeva S.P. and Krayev V.P. Calorimetric method for adjusting the mass of culture fluid in a bioreactor // Review of Scientific Instruments. 1998. Vol. 69. № 5. P. 2137-2140.
9. Котельников Г.В., Моисеева С.П., Межбурд Е.В., Плетнев К.В. Модуляционный микрокалориметр КГМ3100 // Научное приборостроение. 2009. Т. 19. № 1. С. 97-102.
10. Schawe J. and Margulies M. Apparatus and method for differential analysis using real and imaginary signal components / European Patent EP 0 803 061, Int.Cl.7:G01N 25/00. 23 p.
11. Chromcikova M., Holubova J., Liska M., Cernosek Z., Cernoskova E. Modeling of the Reversible Part of Stepscan DSC Measurement of the Glass Transition // Ceramics – Silikaty. 2005. Vol. 49. № 2. P. 91-96.

Григорий Владимирович Котельников,
канд. техн. наук,
зав. лабораторией,
Софья Петровна Моисеева,
канд. техн. наук,
ст. научный сотрудник,
Институт биологического
приборостроения РАН,
г. Пущино, Московская область,
Валерий Яковлевич Гринберг,
д-р хим. наук,
ведущ. научный сотрудник,
Алексей Ремович Хохлов,
д-р физ.-мат. наук,
зав. кафедрой и лабораторией,
Институт элементоорганических
соединений им. А.Н. Несмеянова РАН,
г. Москва,
e-mail: gvkotelnikov@rambler.ru