

# 基于蚕丝蛋白的低温保护剂的热物性分析\*

周新丽\*\*, 杜羽琨, 滕芸, 张宵敏

(上海理工大学生物热科学研究所, 上海 200093)

(Tel:86-021-5527-0218, Email:zjulily@163.com)

**摘要:** 细胞低温保存是临床治疗和科学研究常用的细胞保存方法。10%二甲基亚砜 (DMSO) 和 20%胎牛血清 (FBS) 是目前冻存细胞常用的保护剂。但是 DMSO 对细胞具有毒性损伤, FBS 存在携带病毒、感染疾病的风险, 因此寻找更安全高效的冷冻替代方案显得越来越重要。蚕丝蛋白是一种天然的高分子纤维蛋白, 主要由丝胶蛋白和丝素蛋白组成, 具有良好的生物相容性, 本文将蚕丝蛋白用于低温保护剂中, 配制基于丝胶蛋白的无血清低温保护剂和基于丝素蛋白的低毒性低温保护剂, 并使用 DSC 测量了保护剂溶液在熔融过程中的相变温度、熔融焓以及未冻水份, 分析基于蚕丝蛋白低温保护剂的热物性和水合性质。结果发现 1%丝胶蛋白和 10%丝素蛋白同时添加到 5%DMSO 中, 保护剂的热物性参数与对照组 (20%FBS+10%DMSO) 较为接近。此外, 本文还使用 DSC 测量了蚕丝蛋白的热滞活性 (THA), 得出 1% (m/v) 丝胶蛋白的 THA 为 0.96°C, 10% (v/v) 丝素蛋白的 THA 为 1.15°C。说明基于蚕丝蛋白的低毒性、无血清低温保护剂是一种具有潜力的低温保护剂, 有一定抑制冰晶重结晶的能力。

**关键词** 低温保护剂; 无血清保护剂; 天然; 蚕丝蛋白

## ANALYSIS OF THERMOPHYSICAL PROPERTIES FOR SILK PROTEIN BASED CRYOPROTECTANTS\*

Zhou Xinli\*\*, Du Yukun, Teng Yun, Zhang Xiaomin

(Institute of Biothermal Technology, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

**Abstract:** Cells cryopreservation is a common method for cell preservation in clinical application and scientific research. 20%(v/v) FBS supplemented with 10%(v/v) DMSO are widely used cryoprotectant. However, high concentration of DMSO is toxic to cells, and FBS presents problems related to diseases such as bovine spongiform encephalopathy and viral infections. Therefore, it is important to look for safer and more efficient alternatives for freezing protocol. Silk protein is a kind of natural macromolecule fiber protein with good biocompatibility and hydrophilicity, which mainly composed of sericin and fibroin. Silk protein was used as cryoprotectant in this paper. FBS-free CPA with sericin protein and low toxicity CPA with fibroin protein were prepared. DSC was used to measure the melting enthalpy, the phase transition temperature and the unfrozen water volume during the melting process, thermal properties and hydration properties of silk protein cryoprotectants were analysed. The novel FBS-free and low toxicity freezing medium contains 5%DMSO and 1% sericin and 10% fibroin showed similar results as the control group(20%FBS+10%DMSO).In addition, the thermal hysteresis activity (THA) of fibroin was also measured using DSC. It was found that the THA of 1% (m/v) sericin was 0.96°C, and the THA of 10% (v/v) silk fibroin was 1.15°C. The low-toxicity, serum-free cryogenic agent based on silk protein is a potential cryoprotectant, which can inhibit the recrystallization of ice crystals.

**Keywords :** cryoprotectant; serum-free protective agent; natural; silk protein

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (51376132) 项目。(The project was supported by the Natural Science Foundation of China (No.51376132).)

\*\* 通讯作者: 周新丽 Tel: +86-021-5527-0218; E-mail: zjulily@163.com

## 0 引言

细胞冻存是保存细胞的主要方法之一，目前在临床治疗以及科学研究中应用广泛。然而在冷冻保存的过程中，细胞会受到低温损伤和冰晶损伤，低温保护剂的添加至关重要<sup>[1]</sup>。10%二甲基亚砜（DMSO）和20%胎牛血清（FBS）是目前冻存细胞常用的保护剂。但是 DMSO 对细胞具有毒性损伤，FBS 存在携带病毒、感染疾病的风险，因此寻找更安全高效的冷冻替代方案显得越来越重要。

蚕丝是一种天然的高分子材料，无污染且来源丰富，主要由丝胶蛋白和丝素蛋白组成。近年来，丝胶蛋白被应用于细胞的低温保存领域，发现其具有替代 FBS 作为冷冻介质的作用，据文献报道，基于丝胶蛋白的无血清保护剂相继成功冻存了仓鼠骨髓瘤细胞、杂交瘤细胞、卵巢细胞<sup>[2]</sup>，小鼠的杂交瘤细胞、大鼠胰岛瘤细胞<sup>[3-5]</sup>，人的肝细胞<sup>[6]</sup>，大鼠胰岛细胞<sup>[7]</sup>以及牛精子和胚胎<sup>[8,9]</sup>。10%DMSO 被认为是最适合细胞冻存的浓度<sup>[10,11]</sup>，但 DMSO 的毒性随着剂量的增加而升高，细胞冻存效果明显下降。目前，已有研究者使用氨基酸等物质来减弱 DMSO 的浓度，并取得了一定效果。丝素蛋白中含有丰富的氨基酸，其中甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸含量约占 87%，滕芸等已将丝素蛋白运用至低温保护剂中，以猪耳成纤维细胞为模板，探究丝素蛋白是否能够替代 DMSO，结果发现，当保护剂中 DMSO 浓度为 0%时，在添加 10%丝素蛋白后，细胞的存活率相比较于不添加 DMSO 组从 11.88%提高至 43.07%。说明丝素蛋白对冻存的保护作用明显。

低温保护剂溶液对冰晶具有抑制作用，主要表现为低温保护剂取代了溶液中部分纯水的份额；同时与水溶液中的水分子结合形成氢键，将溶液中的自由水束缚成结合水，即未冻水，从而减少了冰晶的形成。未冻水份额的大小反映了低温保护剂溶液结合水能力的强弱。胥义等<sup>[12,13]</sup>利用差示扫描量热仪(DSC)分步扫描法，研究了不同浓度低温保护剂对兔主动脉冻结过程中未冻水份额的影响，发现低温保护剂中 DMSO 的浓度越大，比热容越小，未冻水份额含量越高。杨波等<sup>[14]</sup>采用 DSC 法，测量了 DMSO、葡萄糖、蔗糖等七种低温保护剂的熔融温度、熔融热量以及水合性质。从物质的分子结构研究发现，未冻水份额与物质分子结构中羟基线性排列和数目有关，且低温保护剂中羟基含量越多，低温保存效果越好。丝胶和丝素蛋白溶液中存在大量的能与水形成分子间氢键的羟基、氨基和羧基，这些亲水性基团将溶液中的自由水束缚，减少溶液中自由水的含量，提高未冻水份额，从而弱化水溶液的结晶过程<sup>[15]</sup>，起到低温保护剂的作用效果。

抗冻蛋白是一类能控制冰晶生长和抑制冰晶之间发生重结晶的蛋白质，可以特异地吸附于冰晶表面，阻止冰晶生长，非依数性地降低水溶液的冰点，但不影响溶液的熔点，从而导致水溶液的熔点和冰点之间出现差值，这种差值称为热滞活性(THA)<sup>[16]</sup>。溶液中冰晶初始含量越低，则冰晶表面抗冻蛋白的吸附覆盖程度就越高，对冰晶继续生长的抑制作用就越强<sup>[17]</sup>。在冻结过程中，蚕丝蛋白通过与冰晶表面的氧原子形成氢键吸附于冰晶表面，因此推断，蚕丝蛋白可能具有与抗冻蛋白相同的作用机制，从而产生抗冻作用。

本文分别制备了基于丝胶蛋白的无血清低温保护剂和基于丝素蛋白的低毒性低温保护剂以及基于蚕丝蛋白的新型复合低温保护剂，并利用 DSC 测量低温保护剂溶液的熔融曲线、相变温度、热焓值等参数，研究基于蚕丝蛋白的低温保护剂的热物性参数变化，最后通过 DSC 检测蚕丝蛋白的热滞活性，同时结合未冻水份额分析，为筛选最优低温保护剂提供理论依据，希望开发一种基于天然蚕丝蛋白的高效、低毒性的无血清低温保护剂。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

实验中所用化学试剂除特别说明外，均购自国药集团化学试剂有限公司，胎牛血清（fetal bovine serum, FBS）购自 BIOSERA 公司，丝胶蛋白购自日本和光纯药，蚕茧购自广西平果桑移天下丝绸有限公司

### 1.2 设备与耗材

差式扫描量热仪（DSC200 F3，德国）；电子天平（赛多利斯科学仪器有限公司）；恒温磁力搅拌器（常州翔天实验仪器厂）；旋转蒸发仪（德国 IKA 公司）电热恒温鼓风干燥箱（上海慧泰仪器制造有限公司）；循环水式真空泵（上海豫康科教仪器设备有限公司）；电热恒温水浴锅（金坛市科析仪器有限公司）；低速台式离心机（上海安亭科学仪器厂）；一次性无菌过滤器（赛默飞世尔科技(中国)有限公司）；透析袋（美国 Spectrum 公司）。

### 1.3 丝素蛋白的制备

根据文献<sup>[18]</sup>的制备方法。将蚕茧除杂处理后，在 0.02M 碳酸钠溶液中进行脱胶处理 30min。得到的丝素纤维冲洗烘干后，60°C 条件下用 9.3M 溴化锂溶解 4h。将丝素蛋白溶液进行透析、离心、浓缩等处理，于 4°C 冰箱中保存备用。

### 1.4 低温保护剂的配置

丝胶蛋白保护剂：以 DMEM 为基础冻存液。对照组 1 和 2 分别为添加和不添加 20%FBS 的低温保护剂，比较添加和不添加 FBS 保护剂溶液热物性参数的变化。保护剂 3~7 在不添加 FBS 的情况下添加 10%、5%、2%、1%、0.5% 的丝胶蛋白，比较保护剂溶液热物性参数的变化，具体保护剂配方见表 1。

丝素蛋白保护剂：实验组 1~4 为添加 10%、5%、2.5% 及不添加 DMSO 的低温保护剂，比较不同浓度 DMSO 保护剂溶液的热物性参数变化。实验组 5~17 为 10%、5%、2.5% 及不添加 DMSO 配比 1%、2%、4%、8%、10% 的丝素蛋白，比较保护剂溶液的热物性参数变化，具体保护剂配方见表 2。

筛选出丝胶蛋白和丝素蛋白的最优浓度后，选择其最优浓度进行联用，配制基于天然蚕丝蛋白的新型、低毒性的无血清低温保护剂，以期达到替代 FBS 和降低 DMSO 浓度的作用。

### 1.5 热物性分析

(1) DSC 扫描方法：每次称取样品质量在 10.0~20.0mg，精确到  $\pm 0.01$ mg。测量温度范围：-80°C~40°C。设定程序为：40°C 恒温 10 min，10°C/min 降温至 -80°C，恒温 10 min，再以 10°C / min 升温至 40°C，恒温 10 min。每一个样品都按照相同的升降温程序对样品皿和空皿进行扫描。所有数据都来自于至少三组平行独立实验，实验数据采用平均值的形式。

(2) 热流曲线读取方法：由于升温过程变化相对平缓，冰晶熔融速率相对结晶速率较慢，温度区域较大，热物性数值区分明显，因此选择升温过程进行热物性分析。如图 1 所示，起始点温度代表熔融过程中的相变温度，终止点温度代表结束温度，峰值为最高点的温度，面积为热焓值。

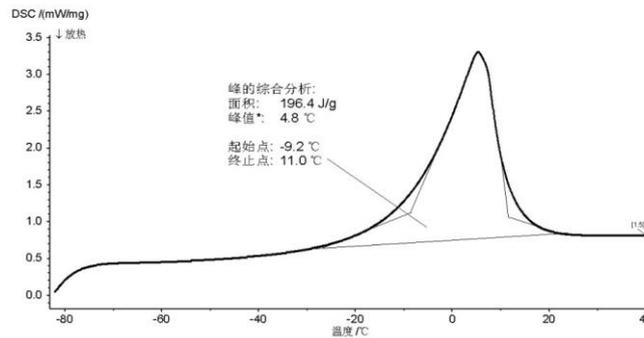


图 1. 20%FBS+10%DMSO 保护剂溶液的熔融过程 DSC 热流曲线

(3) 未冻水份额计算方法：选取升温过程中的相变温度和熔融焓，运用经验公式，计算得到基于蚕丝蛋白的无血清低温保护剂的未冻水份额<sup>[19]</sup>。由于纯水的热焓值受温度的影响，整理得到经验公式：

$$\Delta H(T_f) = 334 + 2.05 \times (T_f - 273) \quad (1)$$

式中  $T_f$  代表升温过程中的相变温度 (K)。

未冻水份额公式为

$$\mu = 1 - \frac{\Delta H(T_f)_{DSC}}{\Delta H(T_f)} \frac{1}{\omega} \quad (2)$$

式中， $\mu$  代表未冻水份额； $\Delta H(T_f)_{DSC}$  代表 DSC 测得的熔融焓 (J/g)； $\Delta H(T_f)$  由公式 (1-1) 计算得出， $\omega$  表示水分含量 (g/g)。

### 1.6 热滞活性

将丝胶蛋白和丝素蛋白用 PBS 分别制备成 1% (m/v) 和 10% (v/v) 浓度的样品。用双蒸水作为对照。先 1°C/min 的速率慢速降温降温至至-25°C，平衡 5min，使样品结冰固化，再以 1°C/min 速率慢速升温至 10°C，从样品熔融峰上得到样品的熔点  $T_m$  和熔融焓值  $\Delta H_m$ 。样品再以 1°C/min 的速率慢速降温至-25°C，平衡 5min，使其固化。再 1°C/min 的速率慢速复温，当温度略低于  $T_m$  时停止，平衡 5min，使样品处于部分熔融状态，这一温度称为“停滞温度”，即  $T_h$ 。再 1°C/min 的速率慢速降温至-15°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  $T_0$ 。若样本具有抗冻活性，结晶峰的出现将被延迟。 $T_0$  和  $T_h$  存在差异。改变  $T_h$ ，重复这一实验过程，由 DSC 曲线求得不同停滞温度下体系的冰核含量和样品的热滞活性。因此可定义保护剂的热滞活性为：

$$THA=T_0-T_h \quad (3)$$

在  $T_h$  温度时，部分融化的样品中初始冰晶量 ( $\phi$ ) 可由延迟的冰晶放热量即冻结焓  $\Delta H_r$  与完全融化的热量即熔融焓  $\Delta H_m$  之比得到：

$$\phi = \left(1 - \frac{-\Delta H_r}{\Delta H_m}\right) \times 100\% \quad (4)$$

利用 NETZSCH-Proteus 的分析软件 Proteus Analysis 对热流曲线进行再分析，选取曲线，确定温度区间为  $T_h-2<T_0<T_h$ ，再次冻结起始温度为沿该温度区间两节点所做切线相交点对应的温度。例如图 2 为丝胶蛋白溶液热滞活性分析曲线，当停滞温度为-3.2°C 时，通过软件分析所确定的起始点温度  $T_0$  为-3.89°C。

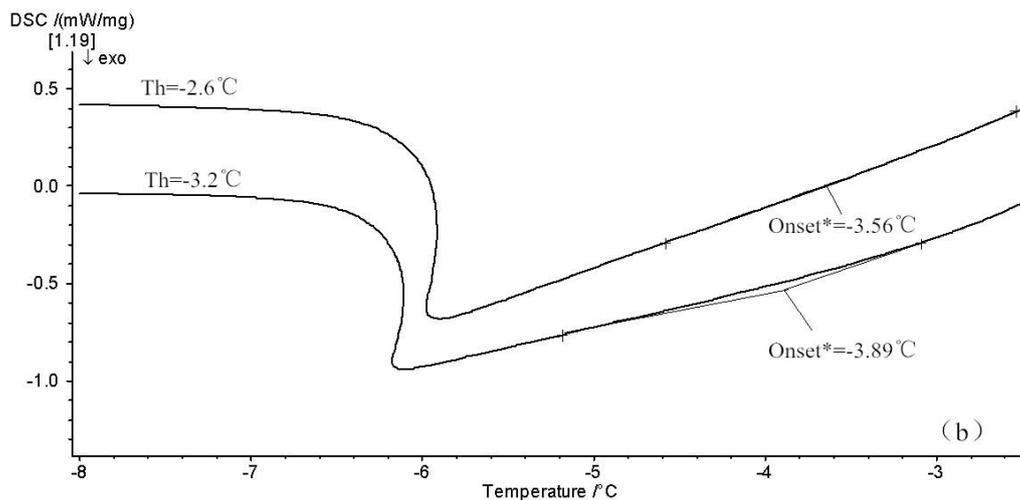


图 2.丝胶蛋白溶液 DSC 测量热滞活性分析曲线

## 2 结果与讨论

### 2.1 基于丝胶蛋白低温保护剂热物性参数的结果分析

将丝胶蛋白作为 FBS 的替代物添加到低温保护剂中，对基于丝胶蛋白的无血清低温保护剂进行 DSC 测量，表 1 列出了 7 种低温保护剂的熔融相变温度和熔融焓未冻水份额等参数。

比较对照组保护剂 1 和 2 可以得出添加 20%FBS+10%DMSO，与仅添加 10%DMSO 相比，相变温度降低，峰面积减小，热焓值降低，未冻水份额增大。说明添加 20%FBS 后，升温过程中融化冰晶的热量降低，溶液中形成结合水的能力增强，即降温过程中产生的冰晶减少，降低了对细胞的机械损伤，有利于细胞的低温保存。因此添加 20%FBS+10%DMSO 对细胞的冻存效果优于仅添加 10%DMSO。分析保护剂 3~6，对比去除 FBS 并添加添加 10%、5%、2%、1%丝胶的无血清低温保护剂溶液的热物性参数可得，随着丝胶蛋白浓度的降低，相变温度降低，峰面积减小，热焓值减小，未冻水份额随浓度的降低而增大。说明在一定温度范围内，丝胶蛋白的浓度越低，保护效果较好。当丝胶蛋白浓度继续降低至 0.5% 时，相变温度升高，热焓值增大未冻水份额开始降低。说明丝胶蛋白浓度低于 1% 时，降温过程产生的冰晶增加，融化过程需要的热量也增多，冻存效果开始下降。出现这种现象的原因可能是丝胶蛋白的二级构象主要为无规卷曲，

空间构象不紧凑。丝胶蛋白浓度过高时，空间构象稀疏，阻碍分子的相互靠拢，从而抑制与水分子形成氢键作用，弱化了形成结合水的能力；当浓度过低时，保护剂溶液中含有的亲水基团浓度低，弱化与溶液的结晶过程，无法起到抑制冰晶的生长作用。因此，本实验中添加 1% 丝胶蛋白的无血清低温保护剂，理论上冻存效果最好。

表 1 基于丝胶蛋白低温保护剂的熔融相变温度、热焓值、未冻水份额

序号	保护剂	T <sub>f</sub> (°C)	End (°C)	Δ H(T <sub>f</sub> ) DSC (J/g)	Peak (°C)	Δ H(T <sub>f</sub> ) (J/g)	ω	μ
1	DMEM+20%FBS+10%DMSO	-9.17	11.3	192.20	6.2	315.202	0.980	0.378
2	DMEM+10%DMSO	-9.07	11.3	219.93	5.2	315.407	0.971	0.281
3	DMEM+10%DMSO+10%SP	-8.83	11.4	226.93	5.1	315.899	0.882	0.186
4	DMEM+10%DMSO+5%SP	-9.5	10.2	220.63	2.7	314.525	0.888	0.210
5	DMEM+10%DMSO+2%SP	-9.57	10.7	215.43	4.6	314.382	0.936	0.268
6	DMEM+10%DMSO+1%SP	-10.13	10.1	205.633	4.5	313.234	0.956	0.313
7	DMEM+10%DMSO+0.5%SP	-9.13	11.3	237.97	4.9	315.284	0.977	0.228

注：丝胶蛋白缩写：SP。

## 2.2 基于丝素蛋白低温保护剂的热物性参数的结果分析

将丝素蛋白添加到保护剂中替代 DMSO，测量基于丝素蛋白低温保护剂的熔融曲线，相变温度、热焓值等参数。表 2 列出了 19 种低温保护剂的熔融相变温度和熔融焓、未冻水份额等参数。

表 2 基于丝素蛋白低温保护剂的熔融相变温度和热焓值

序号	保护剂	T <sub>f</sub> (°C)	End (°C)	Δ H (T <sub>f</sub> ) DSC (J/g)	Peak (°C)	Δ H(T <sub>f</sub> ) (J/g)	ω	μ
1	DMEM+20%FBS+10%DMSO	-9.17	11.3	192.2	5.2	315.202	0.98	0.378
2	DMEM+20%FBS+5%DMSO	-6.03	10.6	248.67	6.5	321.639	0.940	0.178
3	DMEM+20%FBS+2.5%DMSO	-3.87	10.9	276.8	7.4	326.067	0.966	0.121
4	DMEM+20%FBS	-1.53	13.6	295.73	9.5	330.864	0.959	0.068
5	DMEM+20%FBS+5%DMSO+1% FP	-6.17	9.4	239.37	5.7	321.352	0.925	0.195
6	DMEM+20%FBS+2.5%DMSO+1% FP	-3.97	11.4	272.73	7.6	325.862	0.959	0.127
7	DMEM+20%FBS+1%FP	-1.77	13.4	287.77	9.0	330.372	0.95	0.084
8	DMEM+20%FBS+5%DMSO+2% FP	-6.23	9.9	236.07	5.9	321.229	0.918	0.199
9	DMEM+20%FBS+2.5%DMSO+2% FP	-4.5	12.1	270.87	8.0	324.775	0.951	0.123
10	DMEM+20%FBS+2%FP	-2.27	12.9	282.27	8.9	329.347	0.941	0.089
11	DMEM+20%FBS+5%DMSO+4% FP	-6.37	8.9	228.77	5.6	320.942	0.894	0.203
12	DMEM+20%FBS+2.5%DMSO+4% FP	-4.57	10.6	256.2	6.9	324.632	0.918	0.141
13	DMEM+20%FBS+4%FP	-3.03	13.1	274.27	9.1	327.789	0.933	0.103
14	DMEM+20%FBS+5%DMSO+8% FP	-6.47	10.2	220.83	6.1	320.737	0.883	0.221
15	DMEM+20%FBS+2.5%DMSO+8% FP	-4.57	11.7	244.33	7.6	324.632	0.891	0.155
16	DMEM+20%FBS+8%FP	-3.07	14.5	262.73	9.9	327.707	0.902	0.112
17	DMEM+20%FBS+5%DMSO+10% FP	-6.5	9.5	205.5	5.6	320.675	0.853	0.248
18	DMEM+20%FBS+2.5%DMSO+10%FP	-4.83	12.6	220.37	8.3	324.099	0.849	0.199
19	DMEM+20%FBS+10%FP	-3.13	12.0	253.9	8.1	327.584	0.881	0.120

注：丝素蛋白缩写：FP。

从表 4 可以发现，六组（19 种）保护剂的熔融起始温度和熔融焓值参数也存在相同的变化趋势。比较

保护剂 2 和保护剂 5、8、11、14、17 可以发现，当 DMSO 浓度为 5% 时，分别添加 0、1%、2%、5%、8%、10% 的丝素蛋白，保护剂的相变温度和热焓值均逐渐降低，未冻水份额从 0.178 增大至 0.248，说明当 DMSO 浓度不变时，随着丝素蛋白浓度的增加，保护剂溶液在降温过程中形成的冰晶减少，相应融化过程中冰晶融化所需的热量降低，且随着丝素蛋白的添加，保护剂未冻水份额也会随之上升，则保护剂越有利于细胞的冻存。同样的方法，比较保护剂 3、6、9、12、15、18 和保护剂 4、7、10、13、16、19，当 DMSO 浓度分别为 2.5% 和 0 时，随着丝素蛋白浓度的增加，保护剂相变温度、热焓值均表现出同样的降低趋势，而未冻水份额逐渐上升，说明当 DMSO 浓度较低时，添加丝素蛋白也能起到影响冻存效果的作用。比较保护剂 1（20%FBS+10%DMSO）与保护剂 17（20%FBS+5%DMSO+10%丝素蛋白），熔融过程中所测的热焓值较为接近。将 DMSO 浓度降至 5%，并添加 10% 丝素蛋白后，保护剂溶液的相变温度和热焓值变化较小，未冻水份额最大，说明添加 10% 丝素蛋白后体系内自由水含量减少，弱化了水的结晶作用，抑制了冰晶的生长，这可能是由于丝素蛋白的二级结构主要为反平行  $\beta$ -折叠结构，该结构相对稳定，与水分子形成氢键作用最好，可使溶液粘性增大，保护剂能够达到最佳的保存效果。

### 2.3 基于蚕丝蛋白低温保护剂的热物性参数的结果分析

通过 2.1 和 2.2 的结果得出，当丝胶蛋白的浓度为 1%，丝素蛋白浓度为 10% 时，保护剂溶液所得的相变温度、热焓值和峰面积都最小，因此将丝胶蛋白和丝素蛋白同时添加到含有 5% DMSO 的保护剂中，制备新型、低毒性无血清保护剂。图 4 为基于蚕丝蛋白低温保护剂及对照组的熔融过程 DSC 热流曲线。表 5 为 3 种低温保护剂的熔融相变温度、熔融焓、未冻水份额等参数。

表 3 基于蚕丝蛋白低温保护剂的熔融相变温度和热焓值

序号	保护剂	T <sub>f</sub> (°C)	End (°C)	$\Delta H$ (T <sub>f</sub> ) DSC (J/g)	Peak (°C)	$\Delta H(T_f)$ (J/g)	$\omega$	$\mu$
1	DMEM+20%FBS+10%DMSO	-9.17	11.3	192.20	6.2	315.202	0.980	0.378
2	DMEM+10%DMSO	-9.07	11.3	249.93	5.2	315.407	0.971	0.281
3	DMEM+5%DMSO+1% SP +10%FP	-9.11	11.2	201.70	4.5	315.325	0.914	0.300

注：丝胶蛋白缩写：SP；丝素蛋白缩写：FP。

比较三种低温保护剂的相变温度、热焓值，发现保护剂 3 与保护剂 1 的相变温度和热焓值较接近，保护剂 2 的相变温度最高，热焓值最大。较低的相变温度和热焓值意味着溶液中形成的冰晶较少，对细胞的损伤较小，越有利于细胞的冻存。同时保护剂 3 在降低 DMSO 浓度的基础上添加了 1% 丝胶和 10% 丝素蛋白，保护剂 3 相比保护剂 2 的未冻水份额增大，但低于保护剂 1，说明保护剂溶液结合水的能力较强，添加的丝胶和丝素蛋白具有一定的结合水能力，可以减少溶液中冰晶的形成，降低冰晶对细胞的机械损伤，因此保护剂 3 对细胞的保护效果应该介于保护剂 1 和 2 之间。

### 2.4 蚕丝蛋白的热滞活性分析

以双蒸水作为蚕丝蛋白溶液的对照组进行 DSC 实验，双蒸水、丝胶蛋白、丝素蛋白的熔点分别为 -1.1°C、-3.0°C、-1.4°C，故双蒸水停滞温度 T<sub>h</sub> 取值分别为：-0.6°C、-0.8°C、-1.0°C、-1.2°C；丝胶蛋白溶液，停滞温度取值分别为：-3.4°C、-3.2°C、-3.0°C、-2.8°C、-2.6°C；丝素蛋白溶液，停滞温度取值分别为：-1.8°C、-1.6°C、-1.4°C、-1.2°C、-1.0°C，得部分融化状态开始冷却结晶的 DSC 热流曲线，从曲线上分析可得三种样品的停滞温度 (T<sub>h</sub>)、再次冻结起始温度 (T<sub>0</sub>)、THA 以及冰核含量 ( $\phi$ )，见表 4。

通过比较发现两种溶液的冰核含量都随 T<sub>h</sub> 的升高而逐渐减小，THA 随着冰核含量的减少而逐渐增大，体系中冰核含量越少时 (~6%)，溶液的抗冻活性越强。因此，当丝胶蛋白浓度为 1% 时，其热滞活性为 0.96°C，此时体系内冰核含量为 6.45%；当丝素蛋白浓度为 10% 时，其热滞活性为 1.15°C，此时体系内冰核含量为 6.04%。

抗冻蛋白的热滞活性的大小，是抗冻蛋白对冰晶的吸附-抑制作用机制的表现。抗冻蛋白会吸附在冰晶表面，增大冰晶表面积与体积之比，形成较大的表面自由能。冰晶继续生长，需要降低温度，把能量从体系中排出，因此认为在较低温度下形成的冰晶具有更低的凝固点<sup>[15]</sup>。抗冻蛋白的热滞活性还随初始冰晶量

的减少而增大，这一关系也与上述吸附-抑制机制相符。溶液中冰晶初始含量越低，则冰晶表面抗冻蛋白的吸附覆盖程度就越高，因此对冰晶继续生长的抑制作用就越强<sup>[17]</sup>。因此我们推断，蚕丝蛋白可能具有与抗冻蛋白相同的作用机制，在冻结过程中，蚕丝蛋白通过与冰晶表面的氧原子形成氢键吸附于冰晶表面，从而产生抗冻作用。

表 4 双蒸水和蚕丝蛋白溶液的热滞活性和冰晶含量

样品	T <sub>h</sub> (°C)	T <sub>0</sub> (°C)	THA (°C)	(%)
双蒸水	-1.2	-1.20	0.00	71.01
	-1.0	-1.01	0.01	69.78
	-0.8	-0.82	0.02	66.50
	-0.6	-0.63	0.03	60.16
1% (m/v) 丝胶蛋白	-3.4	-3.94	0.54	34.18
	-3.2	-3.89	0.69	32.02
	-3.0	-3.75	0.75	21.63
	-2.8	-3.62	0.82	11.52
10% (v/v) 丝素蛋白	-2.6	-3.56	0.96	6.45
	-1.8	-2.49	0.69	33.45
	-1.6	-2.41	0.81	32.34
	-1.4	-2.35	0.95	25.91
	-1.2	-2.28	1.08	16.67
	-1.0	-2.15	1.15	6.04

### 3 结论

本文创新性的将丝胶蛋白和丝素蛋白同时添加到保护剂中，通过差示扫描量热分析，得到了基于蚕丝蛋白低温保护剂溶液在熔融过程中的相关参数，从相变温度、熔融焓值以及计算所得的未冻水份额、热滞活性进行分析，发现将 1%丝胶蛋白和 10%丝素蛋白同时添加到 5%DMSO 中，制备的新型低毒性的无血清低温保护剂，测量所得的相变温度、热焓值和未冻水份额与对照组（20%FBS+10%DSMO）较为接近。说明基于蚕丝蛋白的低毒性、无血清低温保护剂是一种具有潜力的低温保护剂。

#### 参考文献

- [1] John G Baust, Dayong Gao, and John M Baust. Cryopreservation: An emerging paradigm change[J]. *Organogenesis*, 2009, 5(3):90.
- [2] Sasaki M, Kato Y, Yamada H, et al. Development of a novel serum-free freezing medium for mammalian cells using the silk protein sericin[J]. *Biotechnology and applied biochemistry*, 2005, 42(2): 183-188.
- [3] Toyosawa T, Sasaki M, Kato Y, et al. Development of A Novel Serum-free Cryopreservative Solution[M]//*Cell Technology for Cell Products*. Springer Netherlands, 2007:225-231.
- [4] Toyosawa T, Oumi Y, Ogawa A, et al. Novel Serum-Free Cryopreservation of Mammalian Cells Using Seric[M]//*Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*. Springer Netherlands, 2008:41-45.
- [5] Ikeda K, Oumi Y, Ogawa A, et al. Cryopreservative Solution Using Sericin[M].*Cells and Culture*. Springer Netherlands, 2010:675-678.
- [6] Miyamoto Y, Teramoto N, Hayashi S, et al. An improvement in the attaching capability of cryopreserved human hepatocytes by a proteinaceous high molecule, sericin, in the serum-free solution.[J]. *Cell Transplantation*, 2010, 19(6):701-6.
- [7] Kenji Ohnishi, Makoto Murakami, Mitsuhiko Morikawa, et al. Effect of the silk protein sericin on cryopreserved rat islets[J]. *Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences*, 2012, 19(4): 354-360.
- [8] Isobe T, Ikebata Y, Onitsuka T, et al. Cryopreservation for bovine embryos in serum-free freezing medium containing silk protein sericin[J]. *Cryobiology*, 2013, 67(2): 184-187.

- [9] Kumar P, Kumar D, Sikka P, et al. Sericin supplementation improves semen freezability of buffalo bulls by minimizing oxidative stress during cryopreservation[J]. *Animal Reproduction Science*, 2015, 152:26.
- [10] Da Violante Georges,Zerrouk Naima, et al. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures[J].*Biological and pharmaceutical bulletin*, 2002,25(12): 1600-1603.
- [11] 王欣, 华泽钊, 刘宝林, 等. Me<sub>2</sub>SO 浓度及预处理条件对组织工程化真皮活性的影响[J]. *上海理工大学学报*, 2007, 29(4):311-314. (Effects of Me<sub>2</sub>SO and loading conditions on the cell viability of tissue-engineered dermal replacement[J]. *Journal of University of Shanghai for Science & Technology*, 2007, 29(4):311-314.)
- [12] 胥义, 华泽钊, 周国燕. 兔主动脉冻结过程中未冻水份额的研究[J]. *工程热物理学报*, 2006, 27(3):478-480.
- [13] 胥义, 高才, 华泽钊. 用 DSC 测定兔主动脉血管冻结相变区间的表观比热容及其影响因素[J]. *制冷学报*, 2005, 1:38-43.
- [14] 杨波, 刘宝林, 李娟. 低温保护剂与其分子中羟基排列的关系[J]. *制冷学报*, 2015, 36(3):114-118.
- [15] Brian W, Michael D. Effects of solute methoxylation on glass-forming ability and stability of vitrification solutions[J]. *Cryobiology*, 1999, 39: 215-231.
- [16] Wilson P W. Explaining thermal hysteresis by the Kelvin effect[J]. *Cryoletters*, 1993, 14:31-36.
- [17] 任禾盛, 许娜飞, 华泽钊. 抗冻蛋白活性的差示扫描量热测定及其吸附-抑制机制[J]. *中国细胞生物学学报*, 2004, 26(4):413-416.
- [18] Kato N , Sato S, Yamanaka A, et al.Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tryosinase activity[J] .*Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62(1):145-147.
- [19] Cheng C C, Devries A L. The Role of Antifreeze Glycopeptides and Peptides in the Freezing Avoidance of Cold-Water Fish[M]. *Life Under Extreme Conditions*. Springer Berlin Heidelberg, 1991:1-14.