

一套研究黑膜的新装置和三类脂膜电特性的测定

华士锦 陈孝一

(四川大学分析测试中心,成都)

在板形双分子膜的研究中,目前有两种成膜技术:(1)从单层到双层^[1],(2)从脂滴到双层。由于后者是一个自动变薄过程,在显微镜视野中,可见膜的干涉光彩色花纹逐渐消失,膜黑区面积不断扩大,最终留下一个稳定的,四周由P-G边界包围的黑色膜,早期文献中常把用这种方法产生的膜称作黑膜(Black Membrane)。

本文介绍用直流法研究黑膜电特性的一套实验装置,全部采用国产器材,利用这套装置,我们初步测试了三种板形人工双层类脂膜的电特性。

一、实验装置

已知黑膜的实测膜电阻—— R_m 为 10^5 — $10^{11}\Omega$, 因此要求测试仪器有较高的输入阻抗。文献报道^[2]用 pH 计作为研究黑膜的工具具有局限性,本文选用 FJ-2700 型 MOS 场效应管静电计作为测试仪器,它除了有较高的输入阻抗(可达 $10^{13}\Omega$)外,还带有一个直径为 165mm,高 100mm 的输入屏蔽罩,为电极的屏蔽提供了方便。以下分别介绍实验装置中各部分:

1. 电极 选用国产 222 型甘汞电极两支,吸出饱和 KCl 溶液,用蒸馏水冲洗干净,弯成直角,固定在有机玻璃液槽盖上(图 2)。

2. 膜池 文献报道,膜池结构,有多种形式^[4,5],本文介绍的一种是由两部分组成:(1)侧壁钻有直径为 1—2mm 小孔的聚四氟乙烯杯(图 1)。(2)侧面带有观察窗口的有机玻璃液槽和有机玻璃液槽盖(图 2)。为满足实验要求,膜池必须(1)使膜沉浸在被膜分隔的电解质溶液中;(2),便于用注射器在小孔上加成膜

溶液和插入电极,(3)侧面有不漏水的玻璃窗,以使用显微镜观察黑膜的形成过程。

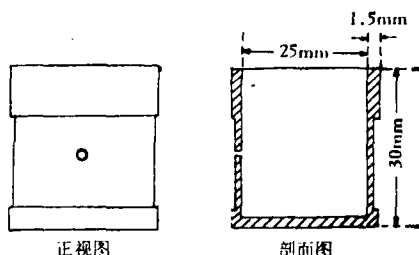


图 1 具成膜小孔的聚四氟乙烯杯

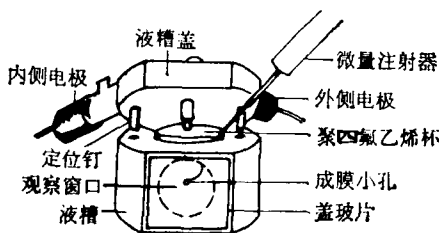


图 2 膜池及成膜点样

3. 微量注射器 通常用 100 微升微量注射器把成膜溶液定量地移注在成膜小孔上。为点样方便,可把金属针头弯曲成烟斗形(见图 2)。

4. 电源箱设计 用直流法测量膜电阻和膜电容时,必须依靠电源箱来对膜两侧施加已知电压。测量膜电阻时,电源箱的内阻与膜电阻构成分压器。测量膜电容时,电源箱内阻与膜电阻一起构成膜电容的并联放电回路(图 3)。测试系统的总装配图见图 4。

5. 膜电阻的测量 按公式(1)计算。

$$R_m = R_i \left[\frac{V_m}{V_i - V_m} \right] \quad (1)$$

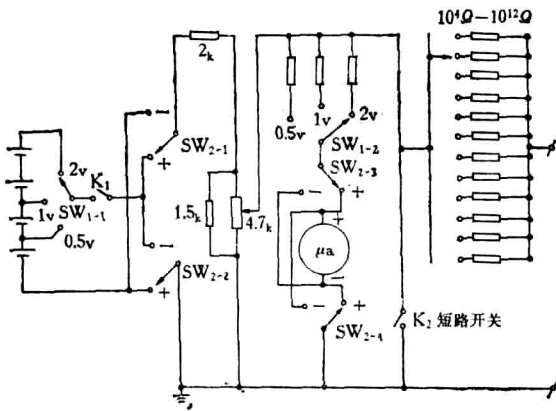


图3 电源箱电路图

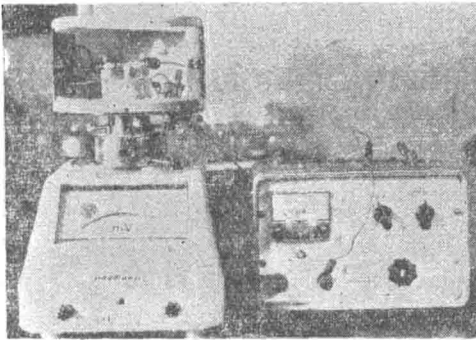


图4 测试装置总图

式中 V_m 为静电计读数, V_i 为电源箱的输出电压, R_i 为膜电阻和电源箱电池间的串联高电阻。

文献中为了统一, 采用单位膜电阻, 即 $R_M = R_m \cdot A$, A 为黑膜的实际面积, 可通过读数显微镜在膜稳定后, 测量 P—G 边界内黑区直径后求得, 膜电阻的统一单位为欧姆·厘米² ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)。

6. 膜电容的测量 按公式(2)计算:

$$E_{m(t)} = E_{m(0)} e^{-t/Rc_m} \quad (2)$$

式中 $E_{m(0)}$ 为膜被电源箱充电到稳定值时的初始电压, R 是并联电阻, $R = R_m \cdot R_i / (R_m + R_i)$, $E_{m(t)}$ 为放电时间 t 时的膜电压。当 $E_{m(t)} = E_{m(0)} / e$ 时, 则 $C_m = t/R$ 。只要用实验

方法测出此时的 t 值, 便可计算出膜电容。

测量 t 值的方法有两种: (1) 利用秒表手工记录 $E_{m(t)} = E_{m(0)} / e$ 的到达时间; 但当膜电容很小时(小于 1 秒), 难以取得可靠数据; (2) 在静电计的记录输出端接上函数记录仪, 绘制充放电曲线, 找出纵坐标为 $E_{m(0)} / e$ 的点, 求出 t 值及计算出膜电容, 比较切实可行。

公式(2)中, C_m 为实测膜电容, 为了统一, 同样应换算为单位膜电容, 即 $C_M = C_m / A$, 单位为 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ 。

7. 成膜液的配制 (1) 卵磷脂正辛烷成膜液 每毫克蛋卵磷脂(上海禽蛋二厂出品)加入 200 μl 的正辛烷。

(2) 胆固醇卵磷脂正辛烷成膜液 按每毫克胆固醇(乙醇重结晶)加入上述 (1) 成膜液 400 μl 。

(3) 卵磷脂正辛烷正丁醇成膜液 吸取上述成膜液(1) 100 μl , 加入正丁醇 64 μl 。

二、测定三类脂膜电特性

利用上述装置测量三种人工板形双分子脂膜的结果见表 1。

表 1 三种双分子脂膜电特性的比较*

膜名称	膜电阻 $R_M(\Omega \cdot \text{cm}^2)$	电容 $C_M(\mu\text{F}/\text{cm}^2)$
卵磷脂辛烷膜	1.4×10^8	0.064
胆固醇卵磷脂辛烷膜	6.5×10^8	0.053
卵磷脂辛烷正丁醇膜	2.5×10^6	

* 本实验中膜池内的电解质溶液为 0.1M KCl 溶液

从上表可见膜的电性质受膜组成成份明显影响, 在卵磷脂正辛烷膜中加入胆固醇, 膜电阻值增加, 膜电容值却减小, 如果在卵磷脂辛烷膜中加入正丁醇, 膜电阻值竟下降了两个数量级, 这可能是由于正丁醇中的功能基团——羟基插入双层膜结构中, 在外加电场的作用下, 电离成 H^+ 和 R-O^- 时, 增加了膜内正负电荷的密度, 导致膜电阻的明显下降。以上结果对进一步了解活细胞内生物膜的结构和功能有所启发。

美国密执安州立大学生物物理系田心棣教授、本

(下转第 69 页)

右。加酶水解的膜与在 50℃ 保温的对照膜,在冰冻断裂面上的球形颗粒无明显差别(图 2 见封 2)因此可以认为链霉蛋白酶 E 对冰冻断裂面的颗粒并未起到水解作用。

膜的外周蛋白通过离子键或静电作用与膜类脂极性头部相结合,用比较温和的条件处理,(如改变溶液的离子强度或 pH、加入金属螯合剂等)很容易使它们从膜上溶解下来。内部蛋白主要是通过与膜脂双层水区相作用结合在膜上,它们有的插入脂双层内部,有的贯穿整个脂双层,只有用比较剧烈的手段(如超声波,去污剂等处理)才能把它们从膜上溶解下来。链霉蛋白酶对外周蛋白能全部水解。冰冻断裂电镜技术证明生物膜脂双层中嵌有内部蛋白,且为不对称分布。内部蛋白嵌入脂双层深度因蛋白质种类不同而各异。

关于支原体膜的冰冻断裂面显示出球形颗粒,并证明其为蛋白质,已有报道。1973 年 Tourtellotte 等人^[9]将莱氏衣原体,在缺氨基酸或加有抑制蛋白质生物合成的嘌呤霉素的莱氏衣原体的培养基中,培养一定时间后,再制备膜,并用冰冻断裂技术观察膜断裂面,结果发现球形颗粒明显减少。他们认为这些球形颗粒为蛋白质,在膜上的功能与主动运送有关。Branton^[10]等报道,用链霉蛋白酶水解红细胞膜,发现被水解后的膜的冰冻断裂面上的颗粒有 70% 消失。Tourtellotte^[9]等报道,用链霉蛋白酶水解莱氏衣原体膜后,不能肯定膜的冰冻断裂面上的颗粒是否发生改变。我们用链霉蛋白酶 E 水解鸡败血支原体膜,发现膜蛋白被水解后,

冰冻断裂面上仍有球形颗粒存在,膜蛋白含量为 20% 左右。其分布情况与对照膜相似,但球形颗粒略大于 100 Å,这可能是由于长时间保温蛋白颗粒发生聚集所致。若增加链霉蛋白酶 E 至 1 毫克/毫升,仍未能使蛋白含量继续降低,这似乎表明因剩余的 20% 蛋白已嵌入脂双层内部,链霉蛋白酶 E 不能与之作用。Morowitz^[11],用链霉蛋白酶水解莱氏衣原体膜后,用超薄切片电镜观察,发现膜的厚度减少,反差降低。酶虽可使膜蛋白大部分水解,但即使继续增加酶量,也仍残存少量蛋白质,他们认为这部分膜蛋白可能深嵌在膜的内部。这种设想与我们的实验结果一致。

参 考 文 献

- [1] Tillack, T. W. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **219**, (1), 1970, 123.
- [2] Tourtellotte, M. E. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **66** (3), 909, 1970.
- [3] Rottem, S. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **323** (4) 495, 1973.
- [4] Bernstein-Ziv, R.: *Can. J. Microbiol.*, **15**, 1125, 1969.
- [5] Razin, S.: *J. Bacteriol.*, **116**, 1421, 1973.
- [6] 吴玉薇等:《生物化学与生物物理进展》,1,46,1979.
- [7] 黄芬等:《实验生物学报》,14,117,1981.
- [8] 中国科学院生物物理所三室生物膜组:《生物化学与生物物理进展》,4,1,1978.
- [9] Tourtellotte, M. E. et al.: *Science*, **179** (4068), 84, 1973.
- [10] Branton, D.: *Phil. Trans. Roy. Soc., Lond. B*, **261**, 133, 1971.
- [11] Morowitz, H. J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **183** (2) 276, 1969.

[本文于1983年5月30日收到]

(上接第 71 页)

中心赵华明教授、陈豫副教授对本文提出了宝贵意见,一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 田心棣:《生物化学与生物物理进展》,2,72,1983.
- [2] M. Montal et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, Vol. **69** No. 12, 1972.

- [3] William A. Huemoeller et al.: *Journal of Chemical Education*, Vol. **47**, 469, 1970.
- [4] H. T. Tien: *Bilayer Lipid Membrane (BLM): Theory and Practice*, 14, 562, Marcel Dekker INC. New York, 1974.
- [5] 孙纹琦等:《生物化学与生物物理进展》,4,38,1981.

[本文于1983年9月19日收到]