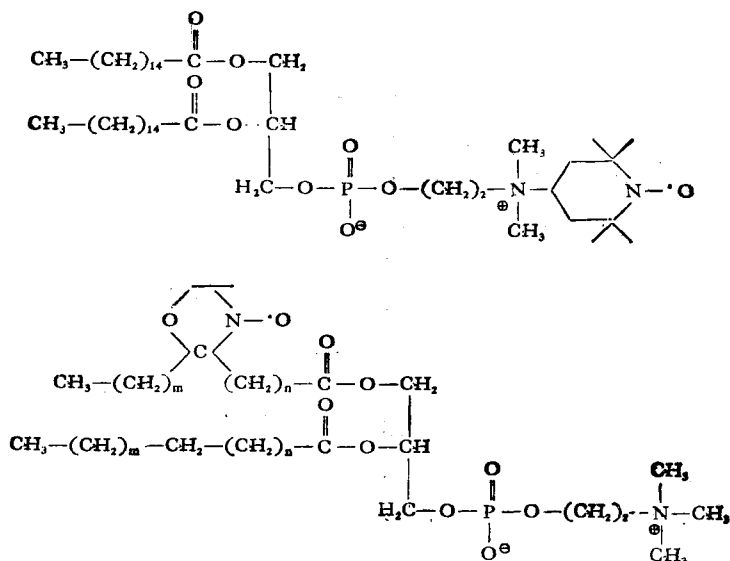


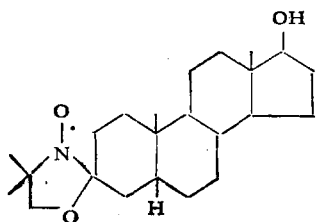
电子自旋标记技术在生物膜研究中的应用

电子自旋共振技术是研究生物膜的一个重要工具,近几年来发展很快,应用很广。有些膜蛋白含有顺磁性的金属离子,可以直接用顺磁共振研究。如细胞色素氧化酶,有两个血红素和二铜离子。然而大部分膜成分都是抗磁性的,不能直接用顺磁共振技术研究。自旋标记技术的出现,解决了这一矛盾,它可以将具有未成对电子的标记化合物结合到或插入细胞膜成分上,从而可以用顺磁共振研究生物膜的结构和性质。关于电子自旋共振和自旋标记技术的基本原理,已作过介绍(见本刊1982年第1期第13页)。此处只将陈长谦教授讲的自旋标记技术在膜研究中的应用作一简单介绍。

3. 磷脂自旋标记

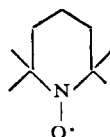


4. 胆固醇自旋标记

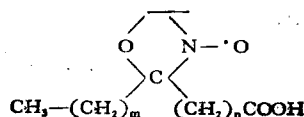


一、研究膜常用的几种自旋标记化合物

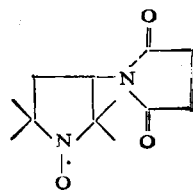
1. TEMPO (2, 2, 6-四甲基哌啶-1-氮氧基)



2. 脂肪酸自旋标记 FA(m, n)



5. 马来酰亚胺自旋标记



二、自旋标记的 ESR 波谱特征

自旋标记的氮氧自由基上带有一个未成对电子。设氮原子的 P_x 轨道为 z 轴, $N-O$ 键为 x 轴, y 轴垂直 xy 平面。自旋标记化合物的 ESR 波谱可以用包括塞曼项和超精细相互作用项的哈密顿描述:

$$\mathcal{H} = \beta \mathbf{S} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{H} + \mathbf{S} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{I}$$

这里 $\mathbf{g}$ 和 $\mathbf{A}$ 都是张量形式。因而自旋标记的 ESR 波谱受自旋标记分子相对于磁场的运动以及它们的空间排列的影响。

1. 不运动自旋标记的波谱

取向自旋标记。在样品中自旋标记分子作有序排列,如在晶体中。这时,

$$\mathbf{g}_{\text{有效}} = g_{xx} \sin^2 \theta \cos^2 \phi + g_{yy} \sin^2 \theta \sin^2 \phi + g_{zz} \cos^2 \theta$$

$$\mathbf{A}_{\text{有效}} = A_{xx} \sin^2 \theta \cos^2 \phi + A_{yy} \sin^2 \theta \sin^2 \phi + A_{zz} \cos^2 \theta$$

若 $H_0 // x$ 轴, $\mathbf{A}_{\text{有效}} = \mathbf{A}_{xx} = 7.6$ 高斯, $\mathbf{g}_{\text{有效}} = g_{xx} = 2.0088$ 得 g 值在 2.0088, 间隔为 7.6 高斯的三条线。若 $H_0 // y$ 轴, $\mathbf{A}_{\text{有效}} = \mathbf{A}_{yy} = 6.09$ 高斯, $\mathbf{g}_{\text{有效}} = g_{yy} = 2.0062$, 得 g 值在 2.0062, 间隔为 6.09 高斯的三条线。若 $H_0 // z$ 轴, $\mathbf{A}_{\text{有效}} = \mathbf{A}_{zz} = 31.8$ 高斯, $\mathbf{g}_{\text{有效}} = g_{zz} = 2.0027$, 得 g 值在 2.0062, 间隔为 31.8 高斯的三条线。

粉末谱。在样品中若自旋标记分子取向是任意,如在多晶中。这时得到的波谱应当是以上各种取向谱线的叠加。

2. 运动对自旋标记波谱的影响

轴对称谱。若将自旋标记如脂肪酸自旋标记插入细胞膜中,它将绕分子 z 作快速旋转,因而平均掉了 $\mathbf{g}$ 和 $\mathbf{A}$ 中 x 和 y 方向各向异性,得

$$\mathbf{A}_{\parallel} = \mathbf{A}_{zz} = 32.8 \text{ 高斯,}$$

$$g_{\parallel} = g_{zz} = 2.0022,$$

$$\mathbf{A}_{\perp} = (\mathbf{A}_{xx} + \mathbf{A}_{yy})/2 = 5.6 \text{ 高斯,}$$

$$g_{\perp} = (g_{xx} + g_{yy})/2 = 2.0073$$

图 1 表示了 $H_0 // z$ (a), $H_0 \perp z$ (b) 及随机取向(c)的情形。

溶液谱。在稀溶液中自旋标记分子可以自

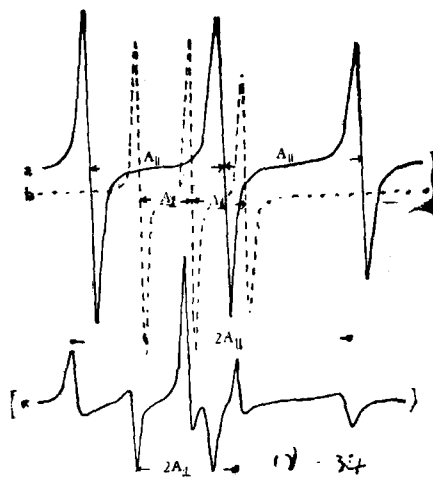


图 1 脂肪酸自旋标记的 ESR 波谱

a 取向膜 $H_0 // z$ b 取向膜 $H_0 \perp z$ c 细胞膜

由运动,与磁场的相对取向不断变化,因此要对 θ 和 ϕ 取平均,得各向异性的 $\mathbf{g}$ 和 $\mathbf{a}$ 。

$$\mathbf{g}_{\text{有效}} = g_{xx} \overline{\sin^2 \theta \cos^2 \phi} + g_{yy} \overline{\sin^2 \theta \sin^2 \phi} + g_{zz} \overline{\cos^2 \theta}$$

$$= \frac{1}{3} (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) = g$$

$$\mathbf{A}_{\text{有效}} = A_{xx} \overline{\sin^2 \theta \cos^2 \phi} + A_{yy} \overline{\sin^2 \theta \sin^2 \phi} + A_{zz} \overline{\cos^2 \theta}$$

$$= \frac{1}{3} (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) = a$$

这时得三条等强度,等间隔的三条谱线。若溶液很稀,则三条谱线很尖,若溶液粘度增加,谱线增宽。

三、自旋标记技术在膜研究中的几个应用

1. 指示极性

当介质是疏水或亲水的时候,自旋标记可以告诉环境的极性如何? 自旋标记的各向同性 $\mathbf{g}$ 因子和超精细分裂常数 $\mathbf{a}$ 与环境的极性很有关系,极性越大, $\mathbf{g}$ 值越小,越精细分裂常数越大。

一个很有创造性的实验是用 TEMPO 检查兔子神经细胞膜的极性。其 ESR 波谱图 2 所示。在高场的两个峰来自不同环境的自旋标

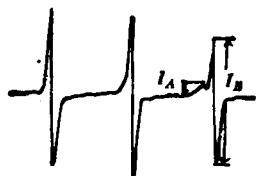


图2 自旋标记 TEMPO 在疏水和亲水环境中的 ESR 波谱

记,一个来自疏水环境,另一个来自水溶液。将麻醉剂加入样品后,这两个峰的高度比发生改变。用这种方法很好地区分了标记物在不同环境中的变化。

2. 相行为

在固相和液晶相中自旋标记分布不同,波谱在高场出现两个峰,当自旋标记进入液晶相时,疏水峰增大。定义自旋标记溶解因子 f

$$f = \frac{I_A}{I_A + I_B}$$

其中 I_A 和 I_B 如图2所示。当温度改变时, f 值发生改变。如图3所示,用 TEMPO 测试 DPPC 人工膜的相变曲线。在 41°C 左右 f 值有一个突然的改变,此点称为相变点。

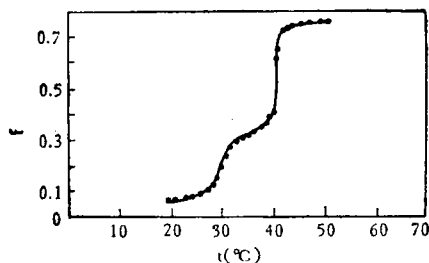


图3 用自旋标记 TEMPO 作的 DPPC 的相变曲线

用其它方法也可以测量膜的相变。但用自旋标记技术还可以作膜的相图。DPPC 和 DEPC 混合人工膜的相图如图4所示。这是自旋标记技术很有创造性的另一个应用。

3. 指示膜的流动性和运动性

用自旋标记方法可以测量膜的序参数,但所得结果与选用什么自旋标记很有关系。这一点需要特别强调。

用 TEMO 测膜双层上的序参数 $S = 0$, 因为它可以在膜表面自由运动。

用脂肪酸自旋标记 $F(m, n)$ 测膜的序参

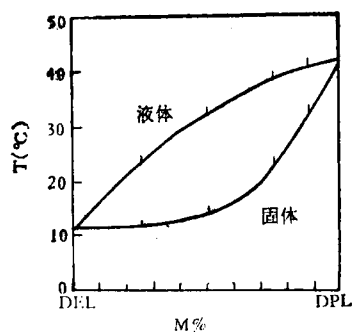


图4 用 TEMPO 作的 DPPC 和 DEPC 混合人工膜的相图

数 $S \approx 0$; 随着 n 的改变,流动性有一个梯度。

用磷脂自旋标记所得结果与脂肪酸自旋标记基本一致,但也有不同。

用自旋标记研究膜的运动性不如用 NMR 方法直接。加入自旋标记后,会扰动膜的运动情况。另外需要用计算机模拟波谱,所得结果才比较精确可靠。

4. 侧向扩散

这里自旋标记不是用作探针,而是用作一个指示器。通过跟踪自旋标记物在膜脂中的扩散,就可以测出扩散系数 $D_{||}$ 。当自旋标记相距很近时,它们之间有很强的偶极-偶极相互作用,这时得一根宽的谱线(图5a),当自旋标记经过扩散成随机分布时,其 ESR 波谱如图5b所示。将由开始到随机分布这一段时间记下来。用这种方法第一次测出了磷脂在膜上的侧

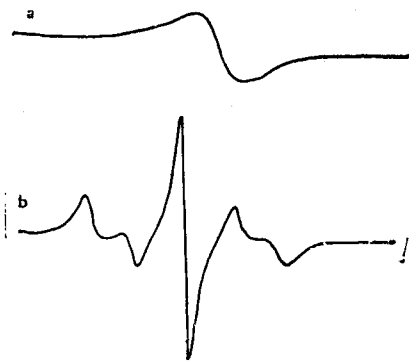


图5

(a) 由于偶极-偶极相互作用,自旋标记的 ESR 谱变为一加宽的谱; (b) 经过一段时间自旋标记随机分布的 ESR 谱。

【下转第72页】

中心穿 0.5 cm 小孔(根据玻管大小而定),将玻管插入胶瓶塞的中孔内,然后将带胶塞的玻璃管塞入制凝胶装置的小孔内,即完成装管工作(图 3)。

二、梯度凝胶的制备

按上述方法将玻管全部装入制胶装置中,取一条小塑料管,在其一端套上一个链霉素胶瓶塞,将瓶塞塞入制胶装置中心小孔。小塑料管另一端接上一支注射器,注入蒸馏水,驱赶出管道中的气泡,然后反抽蒸馏水,待水达玻璃管底部夹死塑料管再将塑料管接上梯度发生器。将已配好的 4% 和 30% 聚丙烯酰胺溶液分别加入发生器前后两圆筒中,开动电磁搅拌器混合

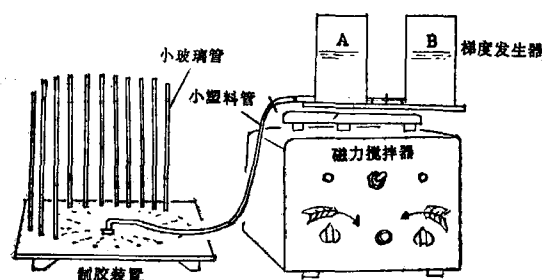


图 4 梯度凝胶制备装置(总图)

1. 为了清楚,图中只画出部分玻璃管。2. 为使剥胶容易,可在梯度凝胶中加入约 1% Triton X-100, (Triton X-100 是分离膜结合蛋白必须加的一种非离子去垢剂)。即使不加 Triton X-100,只要小心操作梯度凝胶也较其它高浓度凝胶容易剥出,可得到满意的结果。

前面圆筒中溶液,打开两圆筒之间和流出口前的夹子,由于发生器与制胶装置高度不同,混合好的凝胶可缓缓地流入各个小玻璃管中。如果用电子微动泵控制流速更为理想。当凝胶溶液一流完(约 10 分钟),立即用注射器注入含溴酚兰的 40% 蔗糖溶液(注意防止带入气泡),当紫色液达小玻管底部后夹死塑料管。待凝胶聚合后就可用来进行电泳。图 4 是梯度凝胶制备装置全貌。

三、实际应用举例

我们曾对人胎肝、肾、胰等组织和胆汁的 γ -谷氨酰转肽酶分子量进行测定,其方法是将制好的 4—30% 浓度梯度凝胶管装入立式电泳槽中,电泳槽加入 pH8.9 Tris-HCl 凝胶缓冲液, 10℃, 70 伏电压预电泳 20—30 分钟。除去凝胶缓冲液再换上 pH8.3 的 Tris-甘氨酸电极缓冲液,分别在小管顶部加 γ -谷氨酰转肽酶样品和高分子量标准蛋白质(pharmacia 出品),样品中含 20% 蔗糖,以 5 μ l 溴酚兰指示。先 70 伏电泳 15 分钟,再升高电压至 220 伏, 10℃ 恒压电泳 3—4 小时。电泳后用一般方法剥胶,酶样品凝胶进行酶定位染色,标准蛋白凝胶进行蛋白染色。将标准蛋白质的分子量对数值对其相应的 Rf 值作图得一曲线,再由曲线求酶的分子量。由曲线求得人胎肝和胆汁小分子 γ -谷氨酰转肽酶分子量是 86,000 (见本期第 55 页图 2)。

[上接第 35 页]

向扩散系数大约为 $D_{\parallel} \approx 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{sec}$ 。这是自旋标记技术一个非常重要的贡献。后来用光致漂白和荧光技术测得的结果与此基本一致。

5. 两个单层膜之间的翻转运动

测量这一运动的方法也很著名。使用一个双层脂质体泡,在内外两层的自旋标记浓度开始是一样的,然后用抗坏血酸将外层的自旋标记还原,这时自旋标记都集中在内层。根据 ESR

波谱确定有多少自旋标记。等一段时间,再看两边自旋标记的数量,直至自旋标记在膜双层两边平均分布。由此就可以知道磷脂在膜双层之间的翻转运动速率,测得的半衰期为

$$t_{1/2} = 11 \text{ 小时}$$

这个运动比侧向扩散慢得多。这种现象在生物学上是很有意义的。

[赵保路整理]