

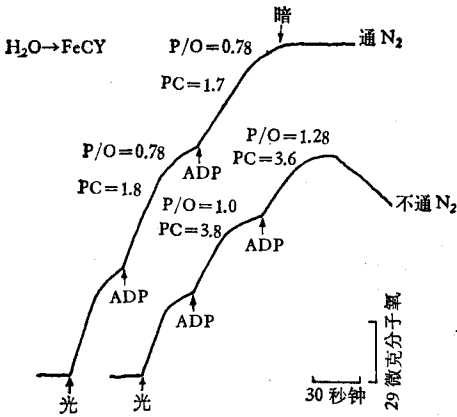


图5 反应液通 N_2 或不通 N_2 对 P/O 及 PC 比值测定影响

不严,或者溶液中留有气泡,将会带来测定上的误差,它不仅影响 Hill 反应速率或 P/O 比值等

测定,也会影响诸如完整叶绿体以 CO_2 为底物时的放氧速率测定的准确性。这对于评价用氧电极法所测到的较高 P/O 比值时尤为重要,必须予以注意。

参 考 文 献

- [1] 李德耀,叶济宇:《植物生理学通讯》,1980年,第77卷,第1期,第35页。
- [2] Fork, D. C.: *Methods in Enzymology*, Vol. XXIX, Part B. pp. 113, 1972.
- [3] Krogmann, D. W. et al.: *Plant Physiology*, 32, 373, 1957.
- [4] Arnon, D. I.: *Encyclopedia of Plant Physiology*, new series, Vol. 5, (ed by Trebst, A. et al.), pp. 7, 1977.
- [5] Hall, D. O.: *Intact chloroplast*, (ed by Barber) pp 135, 1976.

【本文于1982年6月8日收到】

一种制备大直径多层脂质体的简易方法 ——液体快速混合振荡法

吴玉薇 黄 芬

(中国科学院生物物理研究所)

脂质体是一种双分子磷脂组成的人工膜,它已广泛地作为研究生物膜的模型。近年来脂质体做为药物载体,又获得不少的进展。因用途不同,对脂质体的大小和均一程度要求也不一致。制备脂质体的方法有几种,如手摇法,注射法,透析法、超声法和机械振荡法等。这些方法制备的脂质体的大小一般为几十毫微米至1微米。本文介绍一种简易法,采用国产快速混合器振荡,可制备直径大多数为2微米的多层脂质体,适用冰冻断裂电子显微术研究,可直接观察到人工合成 DPPC (二棕榈酰磷脂酰胆碱) 脂质体晶相结构。

一、材料和方法

DPPC 系美国 Sigma 公司产品,用薄层层析鉴定为单一成份。HEPES(N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸)系瑞士 Fluka 产品。其它试剂均

为分析纯。

脂质体的制备

1. 超声法 秤一定量磷脂溶于氯仿,在小烧杯中真空抽干,形成一薄层;样品放真空干燥器中在冰箱过夜。干燥磷脂用 30mM HEPES 缓冲液 (pH5.8) 重悬,磷脂最终浓度为 20 毫克/毫升。用国产 H66025-P 超声波发生器 (28 千赫, 250W) 超声,温度 $45^{\circ}C$, 即形成脂质体。

2. 液体快速混合振荡法 DPPC 脂质体制备方法同上。改用国产 YKH-1 型液体快速混合器振荡,代替超声处理。

电镜负染

取上述两种方法制备的脂质体悬液,用 HEPES 缓冲液分别稀释 20 倍,取 5 微升样品滴在铺有 Formvar 膜的载网上,用 2% 磷钨酸 (pH7.0) 负染 30 秒钟,用滤纸吸去多余负染液,自然干燥。在 JEM 7 电子显微镜下进行观察。

冰冻断裂电镜技术

取一定量 DPPC 脂质体悬液加入甘油,使脂质体在甘油中悬浮,甘油最终浓度为 12% 左右。取一滴样品滴入样品台内,在实验要求的温度平衡 15 分钟,迅速投入液氮冷冻。样品在 HUS-5GB 冰冻断裂装置中断裂,抽真空至 1×10^{-5} torr,用铂——碳投影,复型用氯仿——甲醇清洗,置于铜网上,在 JEM-100X 电子显微镜下进行观察。

二、实验结果与讨论

由图 1a, b (见封二)可见,两种方法形成的

脂质体大小差别明显;用超声法制备的 DPPC 脂质体其直径约为几十毫微米。图 2a, b (见封二)为用两种方法形成的 DPPC 脂质体冰冻断裂电镜照片。图 2b 中可见脂质体直径为 2 微米,并为多层。上述脂质体平衡温度均在 30°C 以下。图 3a 为液体快速混合器制备的 DPPC 脂质体冰冻断裂照片,可观察到 DPPC 脂质体的晶相结体冰构,其带状条纹周期性重复距离约为 $150 \text{ \AA}$,结果与我们过去报道^[1]一致。图 3b 为大直径 DPPC 脂质体的冰冻断裂电镜照片,脂质体直径约为 6 微米,在其冰冻断裂面上也可清晰地观察到周期性带状条纹。

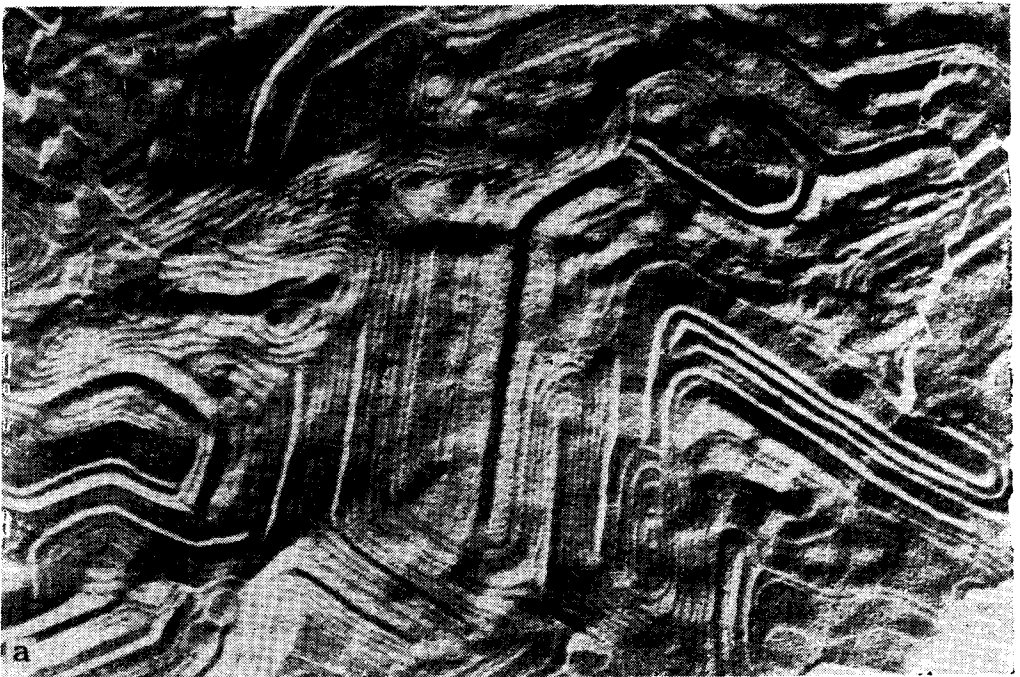


图 3a 用液体快速混合器制备的 DPPC 脂质体冰冻断裂电镜照片

样品冰冻断裂前平衡温度为 35°C ($\times 52,000$)

关于制备不同直径的脂质体,前人进行过不少研究。Banghan 等^[2]曾用手摇法可制备直径约为 1 微米的大脂质体。Bartzri 等^[3]用注射法可制备直径为 25 毫微米小脂质体。Deamer 等^[4]将溶解于乙醚中的类脂缓慢注射于 60°C 的水相,可导致乙醚自然蒸发,结果可形成直径大约为 1 微米的多层脂质体。此法只需用少量磷脂,比上述方法使用磷脂的量少得多。Papahadjopoulos 等^[5]曾报道一种制备大直径单层脂质

体的方法,他们用从牛脑中分离出来的 PS (磷脂酰丝氨酸),用超声处理先形成脂质体,然后加入 Ca^{2+} ,使脂质体融合,再用 EDTA 透析除去 Ca^{2+} ,则可得到单层大直径(1 微米左右)脂质体。

最近 Kim 等^[6]报道了一种制备大型脂质体的方法,大小可达 6—7 微米,与红细胞大小相近。我们采用国产液体快速混合器制备的大直径多层脂质体方法简便易行,可适用于冰冻断

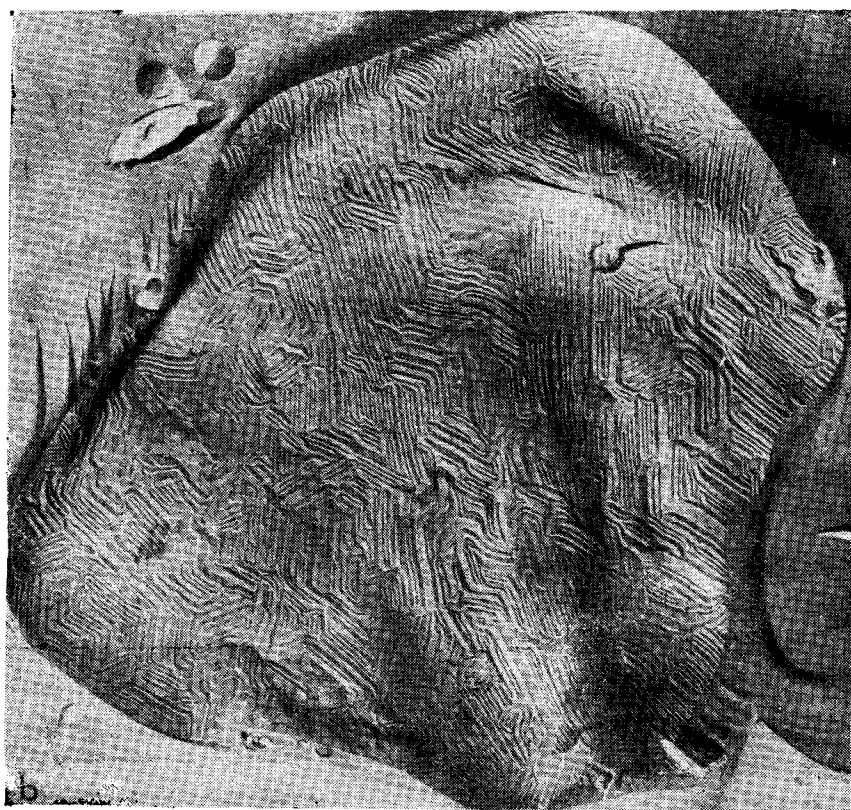


图 3b 用液体快速混合器制备的 DPPC 脂质体的冰冻断裂电镜照片

实验条件同 3a, DPPC 脂质体直径约为 6 微米 ($\times 20,000$)

裂电镜研究,也可经过凝胶过滤法进一步分离大小均一的脂质体供生物膜研究用。

参 考 文 献

- [1] 黄芬等:《科学通报》,1982 年,第 5 期,305 页。
[2] Bangham, A. D. et al., *Methods in Membrane Biology* (Korn E. D. ed), Vol. 1, 1—68, 1974.

- [3] Bartzri, S., et al: *J. Cell. Biol.*, 66, 621, 1975.
[4] Deamer, D. W., et al.: *Biophys. J.*, 16, AIII, 1976.
[5] Papahadjopoulos, D., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 394, 483, 1975.
[6] Kim, S. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 646, 1, 1981.

[本文于 1982 年 9 月 9 日收到]

(上接第 6 页)

的试验的结果一致。可见,本法方法简易,特别适合作常规试验,可用于化学物质致癌性的筛选。

参 考 文 献

- [1] Monica, H. et al.: *Mutat. Res.*, 65, 133, 1979.
[2] Lieberman, M. W. et al.: *Cancer Res.*, 31, 1297, 1971.
[3] Scudiero, D. et al.: *Cancer Res.*, 36, 1397, 1976.

- [4] Lake, R. S. et al.: *Cancer Res.*, 38, 2091, 1978.
[5] Lake, R. S. et al.: *Mutat. Res.*, 74, 357, 1980.
[6] Martiu, C. H. et al.: *Cancer Res.*, 38, 2621, 1978.
[7] Brouns, R. E. et al.: *Mutat. Res.*, 64, 425, 1979.
[8] Michalopoulos, G. et al.: *Cancer Res.*, 38, 1866, 1978.
[9] 余应年:《国外医学》(卫生学分册),第 8 卷,第 2 期,第 65 页。
[10] Scientific Commifftee Food Safety Conncil: *Food Cosmet Toxicol. Suppl.*, 2 (16) 4, 1978.

[本文于 1982 年 4 月 21 日收到]

“一种制备大直径多层脂质体的简易方法——液体快速混合振荡法”一文的图

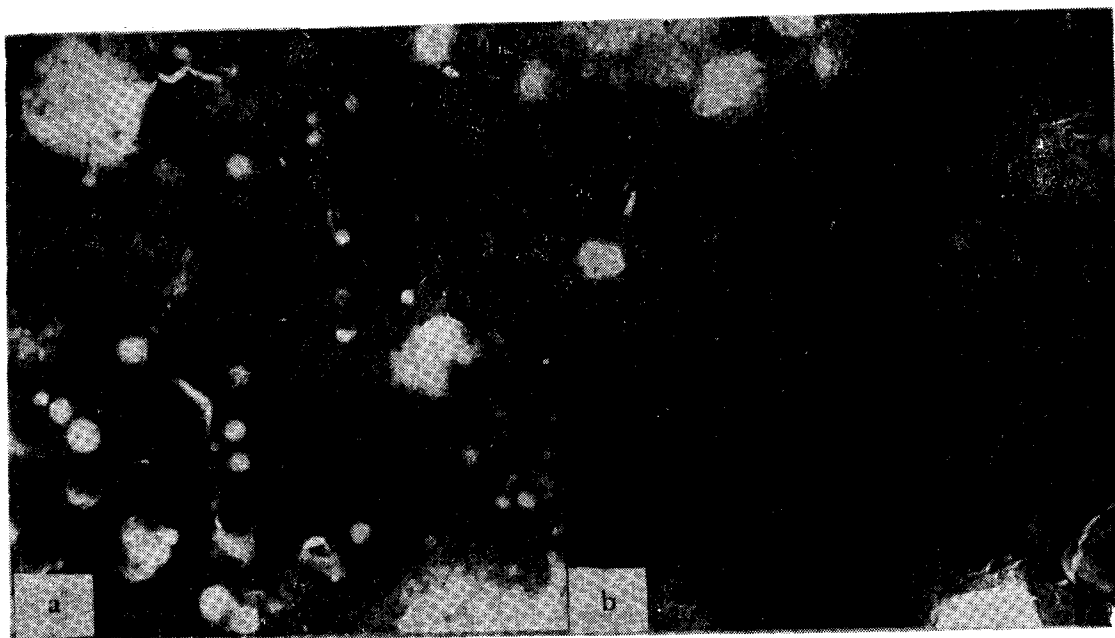


图 1a 用超声法制备 DPPC 脂质体电镀负染照片(超声 8 分钟) ($\times 32,000$)

图 1b 用液体快速混合器制备 DPPC 脂质体的电镀负染照片(快速混合 8 分钟) ($\times 10,800$)

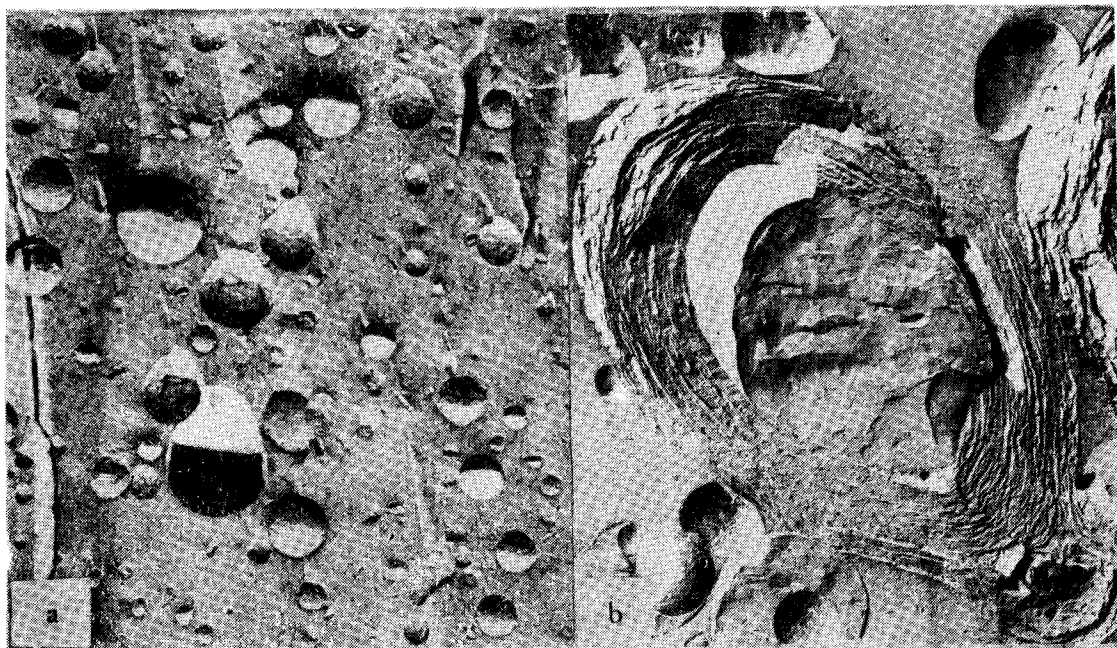


图 2a 用超声法制备 DPPC 脂质体的冰冻断裂电镀照片(超声 8 分钟) ($\times 40,000$)

图 2b 用液体快速混合器制备 DPPC 脂质体的冰冻断裂电镀照片(多层, 快速混合 8 分钟) ($\times 26000$)