

心磷脂与二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱混合体系的自旋共振研究

林克椿

(北京医学院生物物理教研室)

两种脂类组成的体系,其物理性质可用多种技术研究,例如光谱与波谱技术,冰冻蚀刻技术以及差示量热扫描术等。在条件合适时,能获得有关侧向相分离的相图^[1-3]。其中最常见的是固相(凝胶相)与液相(液晶相)之间的平衡关系。然而,细胞膜脂是一种液态结构,膜脂的侧向扩散测量表明并不存在这一类固态与液态的不可混合性。在液态结构中可能有另一种平衡,即液-液不可混合, Melchior 等^[4]就曾对这一问题进行过讨论。这类平衡常常不能用上述方法监测,但用自旋标记的电子自旋共振(ESR)技术能较满意地显示其相的行为。

本文用自旋标记物 TEMPO (2, 2, 6, 6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl), 研究其在水相与心磷脂(简称 CL)及二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(简称 DMPC)所组成脂质体在无 Ca^{2+} 与有 Ca^{2+} 条件下的分配。结果可以看出,在这二种磷脂混合物中,加 Ca^{2+} 后形成 Ca^{2+} 与 CL 的复合物,这种体系中有液相的相分离现象,即存在液-液不可混合性。

试剂与方法

试剂 DMPC (sigma), 纯度 98%, 用无水酒精制成 2mM 储液, 充氩气保存。牛心 CL (sigma), 溶于无水酒精中, 浓度为 3.34mg/ml, 充氩气保存。TEMPO (SYVA), 配制成 10^{-4}M 磷酸缓冲液 (PBS, pH7.2) 保存, 其中含有 2mM EDTA。 CaCl_2 , EDTA、氯仿、甲醇均为分析纯。

样品制备 根据 DMPC 与 CL 储液浓度

分别取不同体积, 配制成 CL 的克分子百分数为 0 至 100 的各种样品, 每一样品所含总脂重均为 5mg。样品分别置于 5ml 带磨口圆底烧瓶中, 用旋转蒸发器在 45°C 水浴中抽干。为使样品在瓶中成均匀薄层, 用氯仿: 甲醇 (10:1V/V) 0.3ml 再溶, 重新用旋转蒸发器抽干。为防止脂类氧化, 每次抽干后均在烧瓶中充氩气。然后加 $160\mu\text{l}$ TEMPO PBS/EDTA 液, 45°C 温育 5'—10', 用多用振荡器振动 20'', 使之形成均匀的多层脂质体。放置 10'' 后, 用滴管拉成合适的细管, 取脂质体悬液装入 $50\mu\text{l}$ 样品管, 样品管另一端随即用喷灯烧封。

测量 用 Varian EL-12 型电子自旋共振仪测定样品的顺磁共振谱。测量条件为: 微波频率 9.085GHz, 微波功率 20mW, 调谐频率

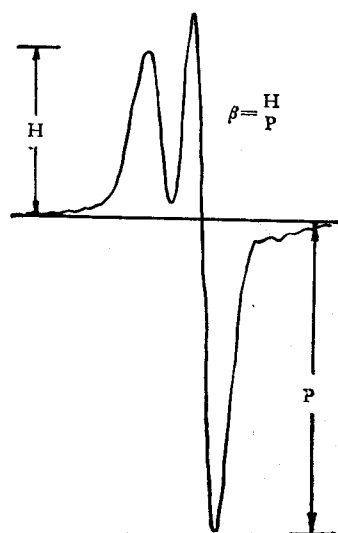


图1 TEMPO 在脂相与水相中的分配

100kHz, 调谐振幅 0.8。由于 TEMPO 一部分结合于膜双层, 另一部分在水相中, 因此在高场部分将同时显示出疏水讯号与极性部分的讯号 (见图 1)。取分配系数 β 等于疏水讯号高度 H 与极性讯号高度 P 之比, 即

$$\beta = \frac{H}{P}$$

样品腔温度用调节氮气流的方法加以控制, 读数式温度计的热电偶丝插入样品腔内, 温度计显示的数字是经过校正并已换算为℃表示的温度。

结果与讨论

图 2 是不同温度下 β 值与 CL 在混合脂中所占克分子百分数之间的关系。这些曲线表明, 由 CL 和 DMPC 所组成的体系, β 与 CL mol% 之间呈现出极为复杂的关系。但有以下几个特征: (1)任何温度下, 在 ~37mol% 与 ~58mol% CL 之处 β 显示很明显的锐峰, 而在其附近仅差 2—3mol% 之处则显著下降形成图线中的“谷”。(2)在 45—50mol% CL 之处通常能见隆起, 温度越高, 此现象越明显。(3)在 ~10mol% CL 之处, 在 DMPC 的相变温度 (~23.5℃) 以上可见较明显的峰, 相变温度以下此峰消失。(4)CL 大于 65mol% 后 β 值变化不大。(5)上述峰与谷的位置不随温度而变 (在实验所用温度范围

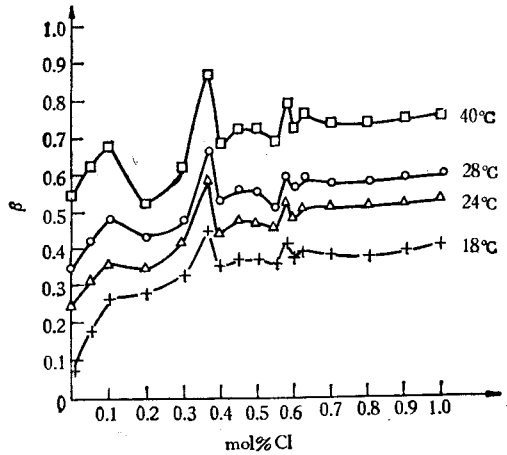


图 2 不同温度下 β 值与 CL 在混合脂中所占克分子百分数之间的关系

内)。在任何温度下, 高场处的疏水峰和极性峰均明显分离, 而线形或间隔则无变化。

在 CL 为 0, 37, 58mol% 的样品中加不同量 Ca^{2+} 后, β 均显著减小, 但在 Ca^{2+}/CL 值为 2 时, 不同温度下的 β 值趋于一致。图 3 示纯 CL 时的表现。可见加入 Ca^{2+} 将改变体系的状态, 极限情况下, 一个 Ca^{2+} 离子与二个 CL 分子结合。

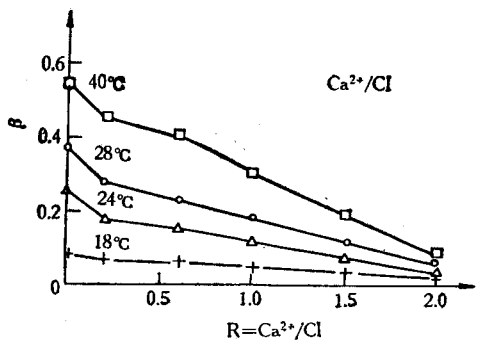


图 3 不同温度下纯 CL 的 β 与 Ca^{2+}/CL 关系

在 $\text{Ca}^{2+}/\text{CL} = 2$ 时测定不同温度下 β 与 CL mol% 之间的关系见图 4。从图 4 可见, 无 Ca^{2+} 时出现的各种峰与谷均已消失, 而表现出类似一般两相混合物的关系。由于 I、III 两区表现为直线关系, 因此不能用 DMPC、DMPC+CL 与 CL 组成的相的简单相平衡关系解释此图。假定 CL 在脂质体中是以一种复合物 $(\text{CL})_2\text{Ca}^{2+}$ 的形式存在, 而以 β 对 $(\text{CL})_2\text{Ca}^{2+}$ 的克分子比作图, 则得图 5 所示曲线。此时很容

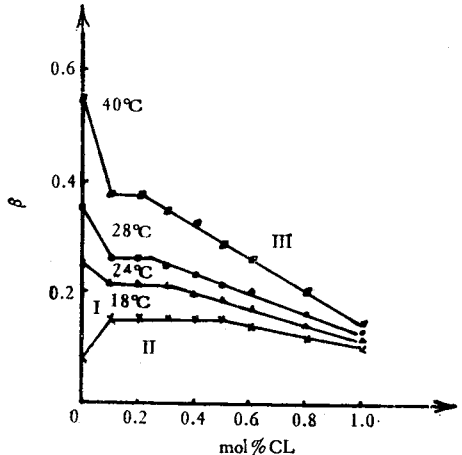


图 4 有 Ca^{2+} 时 β 与 mol% CL 关系

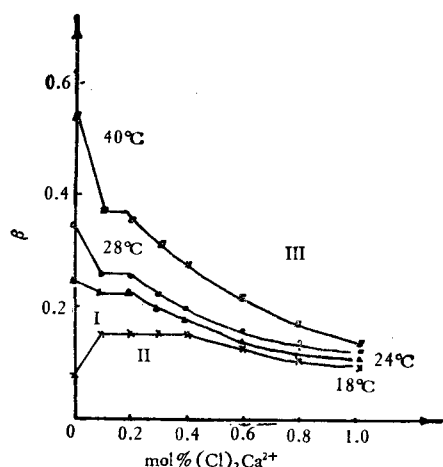


图5 有 Ca^{2+} 时 β 与 $\text{mol}\%$ $(\text{CL})_2\text{Ca}^{2+}$ 关系

易用相平衡关系说明。

真核细胞中, CL 几乎无例外地位于线粒体内膜。内膜上除 CL 外主要脂类为磷脂酰胆碱 (PC) 与磷脂酰乙醇胺 (PE), 而线粒体有积聚 Ca^{2+} 的能力也已证实^[5]。因此研究由上述脂类所组成脂质体在有 Ca^{2+} 条件下的生物物理性质, 将有助于了解线粒体内膜的结构及脂在线粒体功能中的作用。本文首先分析只含有 CL 与 DMPC 的体系在有或无 Ca^{2+} 条件下的相行为。

图2所示的 β 与 $\text{mol}\%$ CL 关系是以往在两相系统中从未见到过的极为复杂的情况。鉴于在某些锐峰(例如 37 与 58 $\text{mol}\%$ CL 处)附近 2—3 $\text{mol}\%$ CL 之差即可引起 β 的明显改变, 而且峰位不随温度而变, 可以认为 CL 与 DMPC 并非以均匀方式混合, 而是在双层的某些部位有较小的一群分子特异成堆, 按照一定的化学计量关系形成某种复合物。目前由于所得到的信息还很少, 试图用一般相图关系加以解释还为时过早。值得考虑的是在这类系统中是否有非双层结构, 例如 Cullis 与 Verkleij 等所指出的 H_{11} 相脂粒^[5-6], 有待进一步研究。

图3中显然可以分三个不同的区: 在 CL < 10 $\text{mol}\%$ 的 I 区 β 值变化很快; 在中间的 II 区 β 不随 CL 含量改变; 而在 III 区则随着 CL 增加, β 值缓慢减小。考虑到 β 是体系的一个热力学参量, 因此其斜率 $d\beta/dx$ (x 代表 CL 的

$\text{mol}\%$) 不连续之点应是单相和两相的交界之处。这样就只有二种可能: 或者 I、III 为两相区, II 为单相区; 或者 II 为两相区, I、III 为单相区。但 β 代表 TEMPO 在脂相与水相中的分配系数, 而在 II 区中 β 保持不变, 如 II 区为两相, 很难设想随着 CL $\text{mol}\%$ 的增大 β 能维持一定水平, 因这将要求二种不同相具有相同的 β 。因此 II 应为单相, 而 I、III 则为两相区。

两相体系 (A 与 B) 相图的杠杆原理应有如下形式:

$$f^{(i)} = [X_B^{(j)} - X_B] / [X_B^{(j)} - X_B^{(i)}] \quad (1)$$

关于此式之推导可见附录。式中 i, j 为二种不同之相, $X_B^{(i)}$ 与 $X_B^{(j)}$ 为 B 成分在 (i) 相与 (j) 相中的克分子百分数, X_B 为样品中 B 的克分子百分数 $f^{(i)}$ 为样品中处于 i 相的全部分子之百分数。如设样品总重为 W , 其中处于 (i) 相与 (j) 相者之重为 $W(i)$ 与 $W(j)$ 则

$$W = W(i) + W(j) \quad (2)$$

而

$$W(i) = M_A X_A^{(i)} f^{(i)} + M_B X_B^{(i)} f^{(i)} \quad (3)$$

$$W(j) = M_A X_A^{(j)} f^{(j)} + M_B X_B^{(j)} f^{(j)} \quad (4)$$

式中 M_A, M_B 分别为 A 与 B 的分子量。从以上四式可知重量百分数 $W(i)/W$ 与 $W(j)/W$ 一般不是 X_B 的线性函数, 因 X_B 同时出现在这些百分数的分子与分母上。因此, 如令 X_B 为 CL, 则根据分配系数的定义:

$$\beta = \frac{1}{W} [W(\text{DMPC})\beta(\text{DMPC}) + W(\text{DMPC/CL})\beta(\text{DMPC/CL})] \quad (5)$$

式中 $W(\text{DMPC})$ 为 DMPC 相的重量, $W(\text{DMPC/CL})$ 为含有 DMPC 与 CL 这一相的重量。从 (5) 式可得 β 与 CL 的 $\text{mol}\%$ 数不是线性关系。由此可见, 图4中的直线区 (特别是 III 区) 不能用相图说明。但假定此体系为 $(\text{CL})_2\text{Ca}^{2+}$ 与 $\text{DMPC}/(\text{CL})_2\text{Ca}^{2+}$ 的两相体系, 则

$$\beta = \frac{1}{W} [W(\text{CL}_2\text{Ca}^{2+})\beta(\text{CL}_2\text{Ca}^{2+}) + W(\text{DMPC/CL}_2\text{Ca}^{2+})\beta(\text{DMPC/CL}_2\text{Ca}^{2+})] \quad (6)$$

此时所得 β 与 $(\text{CL})_2\text{Ca}^{2+}$ 所作之图和实验结果

(图 5) 拟合较好。可见在加 Ca^{2+} 后实际上形成了 Ca^{2+} 与 CL 的复合物, 因而在实验中除 CL 为 0mol% 与 100mol% 处以外, 是一个由 $(\text{CL})_2\text{Ca}^{2+}$ 与 DMPC/ $(\text{CL})_2\text{Ca}^{2+}$ 所组成的两相体系。

整个实验都在 CL 与 DMPC 的相变温度以上进行, 因此实验本身说明在液态体系存在着液-液不可混合性, 即有相分离现象。

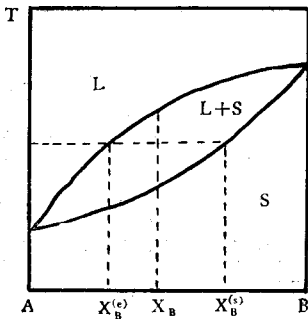


图 6 两相体系的固-液相图

附 录

设 A 与 B 组成两相体系, 以纵轴为绝对温度 T , 横轴为 A 与 B 所占克分子比 X_A 与 X_B , X_A 由左向右递增, X_B 由左向右递减。常见的相变为固相 (s) 与液相 (l) 之间的转变, 则相图如图(6)所示。设

N = 样品中 A、B 分子之总数

则

$$\begin{aligned} X_B &= \frac{B \text{ 分子数}}{N} \\ &= \frac{\text{处于液相的 } B \text{ 分子数} + \text{处于固相的 } B \text{ 分子数}}{N} \\ &= \frac{f^{(l)}NX_B^{(l)} + f^{(s)}NX_B^{(s)}}{N} \end{aligned}$$

由于

$$f^{(l)} + f^{(s)} = 1,$$

故

$$\begin{aligned} X_B &= f^{(l)}X_B^{(l)} + (1 - f^{(l)})X_B^{(s)} \\ \therefore f^{(l)} &= \frac{X_B^{(s)} - X_B}{X_B^{(s)} - X_B^{(l)}} \end{aligned}$$

将上式写成更为普遍的形式, 即以 i, j 代替上式中的 l 与 s 即得(1)式:

$$f^{(i)} = \frac{X_B^{(j)} - X_B}{X_B^{(j)} - X_B^{(i)}}$$

参 考 文 献

- [1] Shimshick, E. J. et al.: *Biochemistry*, 12, 2531, 1973.
- [2] Luna, E. J. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 470, 306, 1977.
- [3] Mabrey, S. et al.: *Biochemistry*, 17, 2464, 1978.
- [4] Melchior, D. L. et al.: *Progress in Surface and Membrane Science*, Vol. 13, 211, (Academic press, New York) 1979.
- [5] De Kruijff, B. et al.: *International Cell Biology*, 559, 1980.
- [6] Cullis, P. R. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, 559, 399, 1979.

[本文于1982年11月29日收到]

Northern 转移与人珠蛋白 mRNA 的探测

吴冠芸 沈 岩 王申五

(中国医学科学院基础医学研究所)

组织中某种特异 mRNA 的探测, 对于该基因的转录活性, 以及它的表达与调控等方面的研究具有重要意义。如果我们已经制得了某种特异的基因探针, 欲使它探测组织中特异的 mRNA, 目前, 多采用液相分子杂交法, 也有用固相膜分子杂交法的报道^[1]。后者, 即将 mRNA 分离后用化学法把它结合到重氮化纤维素纸膜上, 然后与探针进行 DNA-RNA 分子杂交。由

于 Southern 转移法^[2]是将 DNA 片断分离变性后直接吸附在硝酸纤维素膜上, 而这种纸膜吸附 RNA 的能力很低, 它只适于 DNA-DNA 的分子杂交, 因此, 人们将上述 RNA-DNA 的膜上杂交法称为 Northern 转移法。

McMaster 等人^[3]建立了使 DNA 和 RNA 变性后, 经电泳分离测定其分子量的方法。此法不但可以在同一胶板上同时分析天然的和变