

NMR 在膜研究中的应用(上)

一、膜的结构和动力学

生物膜主要是由膜蛋白和类脂组成的,大多数生物膜的类脂成分主要是磷脂。磷脂水悬浮液表现出天然膜的许多性质,所以在 NMR 实验中它被广泛作为生物膜的模型予以研究。磷脂悬浮液是以多相形式存在的,这取决于温度和水的含量。在生物膜模型中起重要作用的是凝胶相和液晶相。在凝胶相,分子的局部运动很慢,在 NMR 时标上,分子间和分子内的偶极矩相互作用没被有效地平均,所以 NMR 的谱线很宽、缺乏明显的特征。而在液晶相,分子局部运动受到的限制减小,运动变快,这就使 NMR 谱谱线很窄,易于分辨。在多成分的磷脂系统中,往往发生各成分不混溶和相分离,因而使相图变得十分复杂。所以,为了研究方便,大多数的 NMR 实验是在单一成分的磷脂系统并在凝胶—液晶相相变温度以上进行的。

在这种模型膜体系中,有关膜的结构信息,主要是通过序参数的测量来获得的,它反映了磷脂分子的无序性 (flexibility); 而膜上脂分子的动力学行为则由反映分子可动性 (mobility) 的弛豫时间来描述。本文将从这两方面介绍有关膜结构和动力学的某些结果及其影响因素。

1. 膜的结构研究

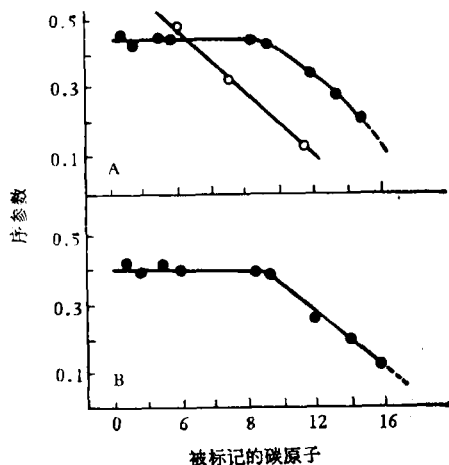


图1 DPL 多层膜中不同碳原子部位的序参数

(A)41°C: (●)1H 的序参数 (DPL48.5%; H₂O51.5%)
(○)ESR 自旋标记数据(DPL20%, H₂O80%), (B)50°C:
1H 的数据 (DPL48.5%, H₂O51.5%)

对磷脂悬浮液的质子、氘和 ³¹P 的 NMR 测量表明,在液晶态磷脂,分子的有效对称轴是与磷脂双层膜平面大致垂直的。对选择氘化脂肪酸和 DPL,从氘四极矩裂分得出的序参数表明,分子链的不同部位序参数是不同的(图1)^[1]。这表明分子链的不同部位无序性也是不同的。但从图可看出,NMR 实验测得的序参数与电子自旋共振 ESR 实验测得的序参数数值不同,变化规律也不一致。ESR 实验提示,沿着烃链,流动性是逐渐变化的。而 NMR 实验指出,在烃链的前三分之二流动性基本不变。Seelig 等人^[1]认为这种不同是由于 ESR 实验中采用了大量硝基氧化自旋标记化合物造成的。而 Gaffney 等人^[2]指出,NMR 和 ESR 实验的时标不同,NMR 实验结果可以包括一些 ESR 实验测不出的运动信息,这就造成了两套序参数的差别。

自旋标记结果给出这样一种磷脂双层膜的结构图象:链上每个 C-C 键由于 trans (反式)和 gauche (扭曲)构象间的旋转异构化而具有固有的无序性;脂链的一端固定在脂-水界面上不动,而另一端则可自由运动;越靠近极性表面,运动就越受限制,而越接近双脂层的中心运动就越快。

根据氘的序参数对双层膜结构的描述则有所不同,各脂分子的酰基链基本保持平行,只是在链的某些部位存在一种叫做 kink (纽结)的构象变化,它是 β -耦合的 trans-gauche 转动形成的并沿链传播。当 kink 形成时,这条类脂链的一部分变得与分子轴垂直,kink 两边的反式片段仍然平行,但与它们原在全反链中的位置偏离约 1.5 Å,同时整条链的长度缩短了一个 CH₂ 单元。kink 的形成在能量上比分立的 trans-gauche 异构化有利,因为这种结构减小了邻近链间的相互作用^[3]。从氘的序参数、Seelig 等人^[1]计算出 C-C 键处在全反构象的概率大约为 0.7,这就是说,一条软脂酸酰基链平均含有四个 gauche 键即二个 kink。

¹H NMR 得到的序参数也用于检验双脂层结构的理论模型。Marčelja^[4]用平均分子场模型 (the mean molecular field model) 成功地计算了类皂双分子层 (soap-like bilayers) 的氘序参数。Schindler 等人^[5]把 Marčelja 模型用于双脂层也得到了满意的结果。用 Marčelja 模型算出的 P_i(C-C 键处于全反式构象的概率)为 0.69,这个数值与 Seelig^[1]以前对磷脂体系估计的数值一致,也与 Marčelja 本人在类皂双分子层体

系估计的值一致。Marčelja 模型认为每条类脂链上平均有 0.6 个 kink 和 0.2 个 jog ($g^{+}tg^{-}$ 顺序的构象), 另外还有一些在统计学上不大重要的其它构象。

上述关于类脂双层膜序参数的解释都是假设分子内的运动是分子有序性减小的唯一原因, 而未考虑链本身的刚体运动。然而 Ukleja 等人关于液晶体系的研究指出, 双亲性分子 (amphiphilic molecules) 的取向不是不变, 而是绕着一平均方向改变。如果类脂分子或类脂分子的链在双层膜内也发生类似的重取向 (reorientation), 那么有效的对称轴一定是与链的平均取向一致而不是与链瞬时取向一致。

Petersen 和 Chan^[3] 最近又提出了一个关于双层膜内磷脂分子运动的模型, 认为类脂分子有序性的减小, 链的异构化和链的重取向运动都起重要的作用。

陈长谦教授在报告中说, 他们对双层膜内外层的曲率也用 NMR 技术进行了研究。用超声波处理磷脂水悬浮液可以得到单壁双层膜小球——脂质体。NMR 实验指出, 脂质体内外层胆碱甲基质子的化学位移和自旋—晶格弛豫率均不相同。将选择氘化类脂插入脂质体, 测得的 ^{19}F 的化学位移也不同。这些事实说明脂质体内外层上的烃链排列状态是不同的。根据 ^{31}P NMR 和其它一些测量, Chrzesczyk 等人^[4]指出, 在小脂质体中曲率能使脂质体内层厚度较外层厚度减小 25%。他们认为, 脂质体内外层厚度的不同是由于内层中的烃链产生另外一些扭结; 他们也认为, 内外层中链取向的分布不同也导致内外层厚度不同。

胆固醇可以使膜结构稳定, 此外它在生物膜中还有其它一些作用。据陈长谦报告说, 将胆固醇掺入脂质体中, 通过电子显微镜观察发现胆固醇在脂质体内外层中的分布是不同的, 当掺入的胆固醇量较小 (<25%) 时, 胆固醇只分布在脂质体内层上, 当胆固醇量增加到 40% 时, 它才开始插入脂质体外层。但这时所得到的脂质体直径也由未加入胆固醇时的 250—300 Å 增大到 300 Å 以上。这个事实说明胆固醇能把曲率大的膜变成曲率小的膜, 即较平直的膜。

最近, 陈长谦等人用 500M NMR 仪研究了胆固醇对脂质体表面曲率的影响。他们测定了胆固醇含量不同的脂质体内外层的化学位移和弛豫时间随温度的变化, 同样证明了胆固醇在脂质体内外层是不等分布的。他们根据 NMR 测定资料对胆固醇掺入脂质体的过程提出了如下模型 (图 2)。

掺入的胆固醇先与附近磷脂结合形成 1:1 络合物, 这个络合物又与其它磷脂结合形成联系较弱的 2:1 络合物, 所形成的络合物绕着某些轴自由地旋转。

谈洪等人用 NMR 研究了胆固醇对界面水的影响。在脂质体悬浮液中, 脂质体的每个磷脂分子的极性头都与 10—20 个 H_2O 分子紧密结合在一起。将这些 H_2O 氘化, 在 NMR 谱中就出现氘四极矩裂分。谈洪测

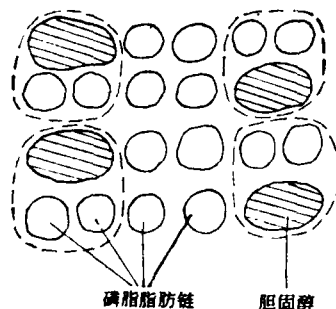


图 2 胆固醇与磷脂的结合示意

定了不同温度下胆固醇含量不同的脂质体体系中四极矩裂分的情况, 看到胆固醇对界面水的排列有很大影响: 随着胆固醇含量的增加, 界面水的有序性逐渐减小, 当胆固醇含量达到 40% 时, 界面水的有序性几乎完全丧失了。界面水的严格有序将妨碍极性分子穿过细胞膜, 而胆固醇使这一有序性下降, 对极性分子穿过细胞膜是有利的, 这对细胞与周围环境的物质交换有重要意义。若在上述体系中加入 NaCl, 则胆固醇对界面水的有序性影响将被抵消, 其它某些固醇的 NMR 实验, 也得到类似结果。

2. 膜的动力学研究

序参数的测量为确定双层膜体系中分子运动的有限程度提供了一个手段, 但只有分子运动的快慢被确定, 才能完全了解体系的运动状态。自旋—晶格弛豫和自旋—自旋弛豫过程的研究就能给出这方面的信息。关于这二种弛豫过程 (其弛豫时间分别表示为 T_1 和 T_2) 的基本概念已如前述, 这里着重介绍一下对弛豫过程的研究所得到的关于双层膜体系中磷脂分子运动的某些动力学信息。

质子 NMR T_1 的测量表明, 多层膜中的链亚甲基质子的 FID 大致是一单一指数, 提示系统中的自旋扩散可能是一个重要的弛豫机制。在磷脂中, 终端甲基和附近的三四个亚甲基可能起热陷阱的作用^[5]。

多层膜和双层膜的 ^{13}C 自旋—晶格弛豫时间很相近, 在这些体系中 T_1 随温度升高而增长。这与用 1H NMR 对这些体系测得的结果相一致。此外, 多层膜 1H 自旋—晶格弛豫时间以及脂质体 1H 和 ^{13}C 自旋—晶格弛豫时间也随辐射频率增加而增加。这些结果说明, 支配着 T_1 的链的运动在多层膜和脂质体中是类似的。表 1^[7] 列出的是对脂质体各个碳原子所测的 ^{13}C 自旋—晶格弛豫时间。从表中看出, 从上部酰基链到终端甲基弛豫时间逐渐增加。这与越向双层膜中心脂肪链的可动性越大的观点是一致的。将选择氘化的脂肪酸插入类脂双层膜所测得 1H NMR T_1 , 也得到类似结果。

自旋—晶格弛豫时间受温度和频率的影响, 说明与弛豫过程关联的偶极矩相互作用一定受到至少二个

表1 超声处理得到的脂质体中卵磷脂 ^{13}C
自旋—晶格弛豫时间

片 断	T_1 (秒)
$-\text{CH}_3$	2.8
$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	1.4
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	0.64
$-(\text{CH}_2)_n-$	0.40
$-\text{CH}_2\text{CO}-$	0.26
羧基	1.8
$-\text{PO}-\text{CH}_2-$	0.41
$-\text{CH}_2\text{N}-$	0.30
$\text{N}(\text{CH}_3)_3$	0.62

运动的调节。这二个运动的相关时间分别为 $\tau_{\parallel}$ 和 $\tau_{\perp}$ ，并且 $(\omega_0\tau_{\parallel})^2 \ll 1, (\omega_0\tau_{\perp})^2 \gg 1$ 。在这些条件下，Kroon^[8]提出自旋—晶格弛豫率可近似表示为

$$\frac{1}{T_1} \approx A\tau_{\parallel} + B \frac{1}{\omega_0^2\tau_{\perp}},$$

式中第一项是 $\tau_{\parallel}$ 对弛豫率的贡献，第二项是 $\tau_{\perp}$ 的贡献。根据对 ^1H NMR T_1 的测量，Feigenson 和 Chan 对液晶相的相关时间作出的估计是

$$\tau_{\parallel} \approx 10^{-9} - 2 \times 10^{-10} \text{ 秒}, \tau_{\perp} \geq 10^{-7} \text{ 秒}.$$

因为自旋—晶格弛豫时间主要由较快的运动决定，所以偶极矩相互作用被发生在 $\tau_{\parallel}$ 时间范围内的运动的调节就是最有效的 T_1 过程。Kimmich 根据Kink扩散模型对凝胶相的 ^1H 弛豫率进行了计算，Gent 考虑到 Kink 形成和湮灭的效应及分立的 trans-gauche 异构化，计算出了液晶相 ^1H 和 ^{13}C 的弛豫率。这些计算结果与实验相当吻合，比以前只考虑单个键的异构化所得到的结果要满意得多。

[聂玉生 整理]

二、膜中类脂与蛋白质的相互作用

类脂与蛋白质在膜中的相互作用十分复杂，它们影响到膜的结构与功能。由于目前直接研究多种成份复杂结构的生物膜仍有困难，一般多以重组膜系统为对象，用不同的物理手段从膜的结构变化入手去了解类脂与蛋白的相互作用。例如：用电子显微镜观察其结构的变化，用圆二色性(CD)谱测量蛋白的构象变化，用电子自旋共振(ESR)、喇曼光谱以及核磁共振(NMR)等测定膜系统的流动性。本文只介绍脂与蛋白相互作用在膜的流动性方面的反映。

1. 蛋白质对膜中脂流动性的影响

对此问题已用以下几种不同的方法进行了研究。

ESR 自旋标记

在此方法中，首先标记磷脂，然后把有关蛋白放入膜中，分别测量存在蛋白的膜以及没有蛋白存在的膜的 ESR 谱，从中分析膜中类脂与蛋白的相互作用。

无蛋白与有蛋白存在的膜的 ESR 谱不同，前者是

单一成分谱，后者由两部分组成，这两部分中一部分与无蛋白存在时的膜谱相同，它是由非界面脂产生的，另一成分相应的可动性则较小 (immobilized spectrum)，它是由界面脂产生的。据此人们认为非界面脂的可动性大于界面脂。每个蛋白周围都有一层脂包围着。由于界面脂与非界面脂之间的交换的速度与 ESR 的测量时间相比是很慢的，故 ESR 可测到快慢两种成分的谱。目前，用 ESR 对许多蛋白与类脂的相互作用进行了研究，如：细胞色素氧化酶，钠-钾 ATP 酶，以及钙 ATP 酶等。

喇曼光谱测量法

此方法主要测量碳链进动情况，结果表明，蛋白质加入类脂双层膜后，增加膜的有序性，这与 ESR 得到的结果一致。

NMR 谱的研究，又分以下三种：

①质子谱 1970 年陈长谦等人分别测量了完整的红血球细胞膜的质子谱以及用磷脂酶 C 处理过的红血球细胞膜的质子谱^[9]。结果如图 3 所示

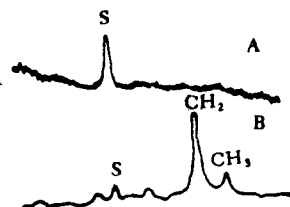


图 3

A. 未用磷脂酶 C 处理的红血球细胞膜的质子磁共振谱(18°C)
B. 用磷脂酶 C 处理过的红血球细胞膜的质子磁共振谱(18°C)

从谱线上可以看到，用磷脂酶 C 处理过的膜的质子谱要比未处理过的谱多二条谱线；即未处理的膜上不出现 CH_2 和 CH_3 的谱线。如果温度升高到 82°C，则未被磷脂酶 C 处理过的膜也会多出其它一些谱线。可见类似于温度升高的影响，用酶处理过的膜的脂肪链比没有处理的更具有可动性。

陈长谦等 1974 年也用质子磁共振谱研究了卵磷脂的脂质体和多聚 L-谷氨酸的相互作用^[10]，结果发现，在相变温度之上，超声产生的卵磷脂的脂质体的质子谱有三条线，分别是胆碱甲基 ($\text{CH}-\text{CH}_3$)、亚甲基 ($(\text{CH}_2)_n$) 和末端甲基 ($\text{T}-\text{CH}_3$) 线(图 4)。

从谱线上也看到，在温度 44°C，加入多聚 L-谷氨酸到卵磷脂的脂质体之后 $\text{CH}-\text{CH}_3$ 的强度大大降低了(其它两条谱线强度也下降)。随着加入的多聚谷氨酸量的增加， $\text{CH}-\text{CH}_3$ 的谱强度进一步下降。这是由于 $\text{CH}-\text{CH}_3$ 的不可动性 (immobilization) 下降引起的。他们认为，加入多聚 L-谷氨酸使脂质体的双层膜产生横向紧缩。

从以上质子谱的研究结果可看到，加入蛋白质后对膜脂的影响在相变温度以上以及相变温度以下是不

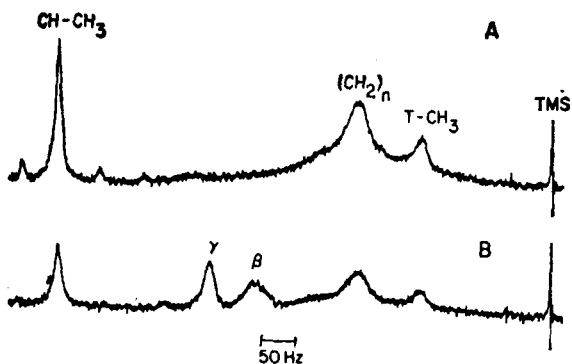


图 4

A. 未加多聚 L-谷氨酸的卵磷脂的脂质体的质子谱(44℃)
B. 加多聚 L-谷氨酸的卵磷脂的脂质体的质子谱(44℃)

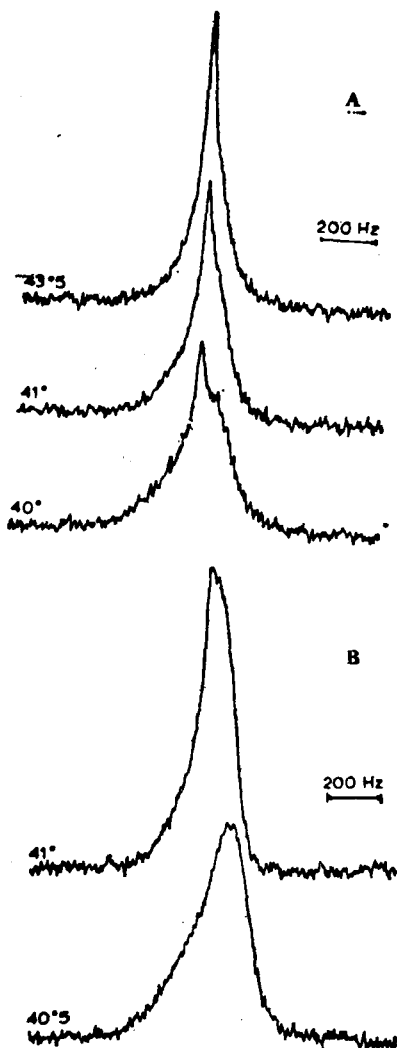


图 5

A. 不同温度下加血型糖蛋白的 DPPC* 的 ^{13}C 谱
B. 不同温度下未加血型糖蛋白的 DPPC* 的 ^{13}C 谱

同的。

② ^{13}C 核磁谱 H. M. McConnell 等人 1976 年分别测量了从人的红血球细胞分离得到 DPPC* 的磷脂双层膜中加与不加血型糖蛋白的 ^{13}C 谱(图 5)^[11]。

从谱中可见,在相变温度 $T_c = 41^\circ\text{C}$ 时,加入血型糖蛋白的 DPPC* 的谱有两种成份,一种是窄的成份,另一种是宽的成份。而没有加入血型糖蛋白的 DPPC* 的谱只有一种宽成份。在相变温度以上,二者的谱都只有一种成份。

他们认为,在相变温度以下,窄成份的谱是由邻近蛋白质的比较可动的界面脂产生的,宽成份的谱是由相对不可动的非界面脂产生的。因此可以认为:相变温度以下,蛋白质邻近的 DPPC* 的运动自由度比其它的 DPPC* 的运动自由度高,同时蛋白质周围的 DPPC* 分子不可能与其它的 DPPC* 的脂分子进行迅速的交换。

③ 氘的核磁谱 通过选择氘化,测量加入蛋白质与无蛋白质存在的类脂膜所得的序参数 S_{CD} , 不完全相同;加入蛋白质后序参数减小 10—25%^[12]。然而,两种情况都只有一种谱成份,即流动性是均匀的。另外弛豫时间 T_1 , 缩短 20—30%, 即可动性下降,这结果与 ^{13}C 的结果一致,因此,序参数的减小不一定表示可动性的增加。对于这些结果,有两种不同的分析, a) 按陈长谦观点,可以把序参数分为两个部分:

$$S_{\text{CD}} = S_r \cdot S_a,$$

其中 S_r 是速率较快的异构化的贡献, S_a 则来自较慢的链的摆动。在时标较短的 ESR 测量中,只能测量到 S_r , 而在氘的核磁谱中,既能测量到 S_r , 也能测量到 S_a 部分;当蛋白质加入到类脂双层膜中, S_r 增加,但 S_a 下降,故 NMR 所测到的序参数 S_{CD} 基本上保持不变,即蛋白质加入双层类脂膜,并不影响膜的有序性。b) 蛋白质加入使界面脂有序性减小,但界面脂与非界面脂的交换相对 NMR 时快,结果这两部分脂区有序性难以区分,只有一种谱成份,然而平均的有序性减小了,所以总的结果是有序性减小。

从上述几种测量方法所得的大多数结果可以看到,蛋白质(或多肽)加到双层类脂膜中,在相变温度以下,可动性增加,在相变温度以上则有相反的结果,但序参数下降或基本保持不变。结果不完全相同。因为测量手段不同,时标不同以及测量到的运动方式不同。

2. 膜中类脂对蛋白聚集的作用

蛋白质放入类脂双层膜中,不仅影响邻近的脂,其它层的脂也受到扰动。有人认为蛋白质对脂的扰动直至脂的第六层,但作用的程度随距离增大而减弱。因此一些脂分子上可能受到不只一个而是更多的蛋白质分子的同时作用。反过来说,这些脂分子同时与两个或更多的蛋白分子相互作用,于是脂分子作为媒介,使

(下转第 67 页)

DNA 的常规方法之一。

本文采用如下缩写: 克隆: 基因无性繁殖; A_p^r : 氨基苄青霉素抗性; Tc^r : 四环素抗性; c.c.c DNA 质粒: 共价闭合环状质粒 DNA; o.c DNA 质粒: 开放环状质粒 DNA; chr. DNA: 染色体 DNA。

参 考 文 献

- [1] Radloff, R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 57, 1514, 1967.
- [2] Kahn, M. et al.: *Methods in Enzymol.*, 68, 268, 1979.
- [3] Meyers, J. A. et al.: *J. Bacteriol.*, 116, 1064, 1973.

- [4] Humphreys, G. O. et al.: *Biochem. Biophys. Acta.*, 383, 457, 1975.
- [5] Johnston, J. B. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 75, 13, 1977.
- [6] Colman, A. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 91, 303, 1978.
- [7] Birnboim, H. C. et al., *Nucleic Acids Research*, 7, 1513, 1979.
- [8] 敖世洲等: <生物化学与生物物理学报>12, (3), 243, 1980.
- [9] Elwell, L. P. et al.: *Antibiotics in Laboratory Medicine* (Larian Victo ed.), Baltimore, Williams and Wilkins. 433, 1980.
- [10] *Pharmacia Fine Chemicals. Catalogue.*, 1983.

[本文于1983年8月7日收到]

(上接第28页)

得相距较远的蛋白质分子之间通过它们发生间接的相互作用。这就是膜上蛋白分子间的远程作用,其力程可达 $150 \text{ \AA}$, 远超过分子间正常的范氏力。蛋白质分子之间还有一种互相排斥的短程力。陈长谦教授的学生通过计算认为:正是这种通过脂分子的远程作用使得本来在双层膜内随机分布的蛋白质分子分别聚集成团,产生了所谓的簇分布。蛋白质分子在簇内的分布由吸引力及相互排斥的短程力的平衡所维系。它们在簇内运动所需的能量并不大,如果要脱离这个簇而运动,所需能量则很大。

蛋白质分子在膜中的分布的最好表示方式是粒子分布函数,它与蛋白质本身的能量、蛋白与脂的相互作用等因素有关,条件改变则分布函数也就改变。

有人发现加入药物后可以加速蛋白从膜上的随机分布到簇分布的过程。蛋白质在膜上聚集成簇的现象可以加以利用,例如,把胰岛素受体放入膜内,可以成簇后进入细胞,从而可作用于核膜。

[胡坤生 整理]

参 考 文 献

- [1] Seelig, J. and Seelig, A. *Biochemistry*. 13, 4839

- 45, 1974.
- [2] Gaffney, B. et al.: *J. Magn. Reson.*, 16, 1—28, 1974.
- [3] David F. Bocian and Sunney I. Chan: *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 29, 307—35, 1978.
- [4] Marčelja, S.: *Biochim. Biophys. Acta*, 367, 165—76, 1974.
- [5] Schindler, H. et al.: *Biochemistry*, 14, 2883—87, 1975.
- [6] Chruszcz, A. et al.: *Biochim Biophys. Acta*, 470, 161—69, 1977.
- [7] Godici, P. E. et al.: *Biochemistry*, 13, 362—68, 1974.
- [8] Kroon, P. A. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 433, 282—93, 1976.
- [9] Michael, Glaser, Sunney I. Chan: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 65 (3), 721—728, 1970.
- [11] Philippe Brûlet and Harden M. McConnell: *Bio-13*, (21), 4381—4385, 1974.
- [11] Philippe Brûlet and Harden M. McConnell: *Biochem. Biophys. Research Communication*, 68 (2), 363—368, 1976.
- [12] J. Seelig and A. Seelig: *Q. Rev. Biophys.*, 13, 19—61, 1980.