

用注射法制备大单层脂质体

谢 静 平 黄 芬

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

提 要

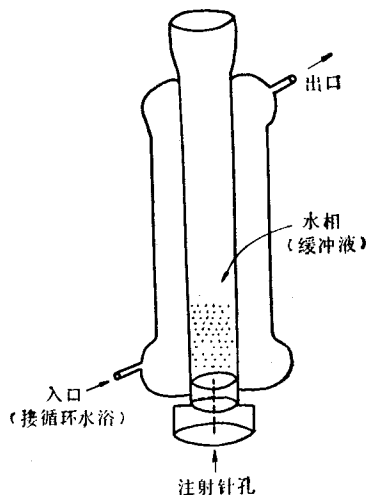
本文介绍了经我们修改的 Deamer 和 Bangham 提出的用注射法制备大单层脂质体的方法。给出了制备较均匀的、直径约 950 Å 的大单层脂质体的条件, 并对此方法的优缺点与其它一些方法进行了比较和讨论。

脂质体是研究生物膜结构和功能的模型。二十多年来采用此模型对膜的电学性质, 脂质的相变行为和构象, 膜的融合, 非脂双层结构, 药物作用及各种离子和水的通透性等各方面作了深入而广泛的研究。同时, 脂质体和纯化的膜蛋白重组是研究各种因素对脂质和蛋白酶相互作用的一个重要手段。近年来, 脂质体还被用作具有药理活性物质的载体, 充当免疫佐剂等。这是膜生物学研究中出现的一个十分引人注目的领域。而有效地制备脂质体是进行上述各项研究的重要前提。因此, 研究其制备方法就显得十分必要。本文介绍经我们修改由 Deamer 和 Bangham^[1] 提出的用注射法制备大单层脂质体的方法。用此我们获得了较理想的结果。

材 料 与 方 法

二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC), 二棕榈酰磷脂酸(DPPA), 美国 Sigma 公司产品。¹⁴C-甘氨酸(英) Amersham 放射药品中心出品。葡聚糖凝胶 G-50, 瑞典 Pharmacia 公司产。其它试剂均为分析纯。

大单层脂质体(LUV)的制备 所用设备(见简图)为一截掉斜口的直心冷凝管(1 × 18 cm)。用一聚四氟乙烯塞子封住底部, 塞上打一细注射针头(ZY76 号)粗细的小孔, 然后固定在铁架上, 冷凝水进出口接循环水浴。实验操



注射法制备脂质体所用设备示意图

作过程如下: 取一定量(约 5mg)的磷脂于小烧杯内, 按每毫升 1.5 毫克磷脂加入乙醚与甲醇(9:1, V/V) 将磷脂分散, 用一注射器吸出。通过冷凝管底部塞上小孔以 0.25 ml/分 的速度注射到恒温在 70℃ 的缓冲液 (25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 50 mM KCl pH7.5) 中。缓冲液体积为 1.2 ml, 在有机溶剂挥发过程中 LUV 自然形成。

磷脂含量的测定 采用测无机磷确定磷脂含量的方法。取 0.5 ml 脂质体悬液置于一粗长的硼硅酸玻璃管中, 加 5—6 滴(约 1ml) 98% 的浓 H₂SO₄, 上盖一小漏斗, 在沙浴(160—180℃) 上处理至有 SO₂ 放出, 冷却后再加 3—4 滴

72% 的高氯酸,在煤气上加热消化至透明。用重蒸水反复洗脱试管和漏斗,定容后,取一定量按 Chen^[2]的方法测定无机磷量,然后计算磷脂量。

¹⁴C 同位素测定脂质体的圈套体积 在 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)中加入 50 μC 的 ¹⁴C-甘氨酸,按上述注射法制备脂质体,样品在 Sephadex G-50 (18 × 1cm) 上过柱,除去脂质体外未圈套的同位素标记物和溶液中残留的有机溶剂,在洗脱峰处收集 2.4ml 脂质体悬液,取 15—30 μl 分散到一圆形滤纸上,烘干,置于装有 8 ml 闪烁液的液闪瓶中,在 (美) Beckman LS9800 液闪仪上测量放射性强度。以过柱后样品的放射强度为 I_s , 取样量 V_s , 磷脂浓度为 $[P]$, 未过柱脂质体悬液在稀释 N 倍后的放射强度为 I_0 , 取样量 V_0 , 则圈套体积 $V_T = I_s V_s / N I_0 V_0 [P]$, 单位为 $\mu\text{l}/\mu\text{gP}_i$, 磷脂含量按上述方法测定。

结果与讨论

按上述注射法制备的脂质体的大小与溶解在有机溶剂中的磷脂浓度,注射速度及水相(缓冲液)液面高度有关。在保证脂质体稳定性的前提下,磷脂浓度越高,注射速度越慢,则制备的脂质体相应越大。大小分布主要取决于注射时速度的均匀性。而脂质体的层数则与有机溶剂中磷脂浓度,注射器孔径的大小及注射速度等因素相关。因此,在作对照实验时,应严格控制这些条件。考虑到一些磷脂(如磷脂酸、大豆磷脂等)不能溶于乙醚,我们在乙醚中加入少量甲醇,相应提高水相温度。使原著提出方法的应用范围得以扩大。并对相应的注射速度,磷脂浓度及水相体积等条件进行了摸索,获得了较理想的数值(见方法部分)。按我们给出的条件制备的脂质体经钨酸铋负染电镜观察表明:它们是相对均匀的,而且大部分具有单层结构(结

果未列出)。用 ¹⁴C 同位素法我们测得注射法(用 DPPC 与 4% DPPA, 克分子比)制备的脂质体与我们实验室采用超声振荡所制得脂质体的圈套体积分别为 0.183 和 0.049 $\mu\text{l}/\mu\text{gP}_i$ 。这说明,对相同的磷脂量,注射法制备的脂质体所提供的内部空间是超声振荡法的四倍。根据上述测得的圈套体积值,取脂双层厚度为 50 Å, 每个磷脂分子所占表面积为 70 Å², 则推算得单层脂质体的平均直径为 950 Å。我们用此方法制备的脂质体研究磷脂膜对 Ca²⁺ 的通透性,同时比较药物(山莨菪碱)的影响,都得到了比较满意的结果。

注射法制备脂质体的半径较用超声法^[3]的大 5—10 倍。与其它制备大单层脂质体的方法相比,它较逆向蒸发法(REV)^[4]所用设备要简单;比透析法^[5]周期要短;较滴定 pH 值的方法^[6]适用范围要广且比微孔过滤和抽提法^[7]的产率要高。此外,此方法也无 Harry 和 Strittmatter^[8]的方法对所用缓冲液有特定要求这一限制,也排除了 Kim 等人^[9]的方法需引入辅助溶质可能产生的干扰。综上所述,我们认为本方法是一种值得推广的脂质体制备方法。

参考文献

- [1] Deamer, D. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **443**, 629, 1976.
- [2] Chen, T. P. S. et al.: *Anal. Chem.*, **28**, 1756, 1956.
- [3] Huang, C. H.: *Biochemistry*, **8**, 344, 1969.
- [4] Szoka, F. Jr. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4194, 1978.
- [5] Milsman, M. H. W. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **512**, 147, 1978.
- [6] Hauser, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1683, 1982.
- [7] Hope, M. J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **812**, 55, 1985.
- [8] Harry, G. E. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 145, 1979.
- [9] Kim, S. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **812**, 793, 1985.

[本文于 1986 年 11 月 19 日收到]