

蛋白质嵌入脂质体的研究(一)

——细胞色素 c 嵌入脂质体的研究

中国科学院生物物理研究所三室生物膜组

建立一个比较理想的膜模型对研究生物膜的结构与功能,研究膜蛋白与类脂,膜蛋白与膜蛋白之间的相互作用都是很重要的。有关生物膜结构模型的假说虽然很多,但无论哪一种假说都认为双分子类脂是生物膜的一个重要组成部分。黑脂膜(Black lipid membrane)和脂质体(liposome)都是由双分子磷脂组成的人工膜,经常作为膜的模型来进行研究。由于脂质体系封闭的囊泡,对研究生物膜的很多功能(如能量转换,通透性,膜表面抗原抗体的相互作用等等)都具有优越性,因此近年来应用更为广泛^[1]。脂质体的制备可用天然的磷脂(如大豆磷脂,脑磷脂,线粒体磷脂等),也可以混合一定比例的纯磷脂作为原料,然后将分离,提纯的膜蛋白嵌入脂质体中来研究它的功能以及与类脂的相互关系等等。有关膜蛋白嵌入脂质体的方法虽然有不少研究,但基本上还处于摸索阶段^[2, 3]。本工作研究了用超声法将细胞色素 c 嵌入由大豆磷脂制备的脂质体的有关条件和影响因素,比较了超声法、透析法、胆酸盐稀释法嵌入细胞色素 c 的效果。利用荧光探针 1-苯胺-8 奈磺酸镁(ANS)测试细胞色素 c 在氧化还原过程中是否有构型变化。除生化测定外,对嵌有细胞色素 c 的脂质体还进行了电镜观察。

一、实验材料和方法

(一) 实验材料

大豆磷脂由北京南苑植物油厂提供;细胞色素 c 系北京大学制药厂出品;1-苯胺-8 奈磺酸镁(ANS)系上海东风生化试剂厂产品。

(二) 实验方法

1. 细胞色素 c 嵌入脂质体的方法

(1) 超声法 称 62.5 毫克大豆磷脂(含 45.6 微克分子磷)悬浮于 0.95 毫升, 0.015 M KCl, pH7.3 的溶液中。加入 50 微升细胞色素 c (含 0.324 微克分子)搅匀后装入塑料安培瓶中,充 N₂ 后封口。在超声波清洗槽中处理(10—15 千赫, 250 瓦)10 分钟左右,超声时温度维持在 0℃ 左右。超声后悬浮液成红棕色乳状液体。于 10,000 × g, 0℃ 离心 30 分钟。沉淀用 0.15 M KCl, pH7.3 洗两次,最后将沉淀悬浮于 1.4 毫升 0.015 M KCl 中, pH7.3, 制成悬浮液。

(2) 胆酸盐稀释法 将 187.5 毫克大豆磷脂(含 136.8 微克分子磷)悬浮于 1.5 毫升 0.015 M KCl, pH7.3 溶液中。搅拌后装入塑料安培瓶中进行超声处理,制得脂质体悬浮液。取出 0.25 毫升与 25 微升(0.162 微克分子)细胞色素 c 分别加到含有 0.25%, 0.5% 及 1% 胆酸盐的 Tris 缓冲液中, Tris 的最终浓度为 50 mM, pH7.3。反应液的最终体积为 0.5 毫升。这样的混合液在冰浴内放置 20—40 分钟,然后用 0.125 M, pH7.3 磷酸缓冲液稀释 30—100 倍后进行测定。

(3) 透析法 称 0.25 克大豆磷脂(含 182.4 微克分子磷)悬浮于含 2% 胆酸钠, 0.015 M KCl, pH7.3, 体积为 2 毫升的溶液中,搅匀后装入安培瓶中进行超声处理直至溶液透亮为止。然后加入 1.3 微克分子细胞色素 c,并移至玻璃纸透析袋中于甲醇: 0.015 M KCl (1:4 v/v) 溶液中,在 0℃ 左右进行透析,10 小时后更换一次溶液,继续透析 13 小时。必要时,开始先进行 3 小时

流动透析(120 转/分),而后再静透析 20 小时。最终体积约 2 毫升。

2. 测定方法

(1) 细胞色素 c 浓度的测定 按其被抗坏血酸还原后在 550 毫微米处光吸收的增加来测定($E_{550} = 2.81 \times 10^{-7}$ 克分子)。测定时 0.1 毫升样品加于 3 毫升、0.125M、pH7.3 的磷酸缓冲液中,搅匀后,加入 0.15M 抗坏血酸 0.05 毫升,3 分钟后测定光密度的变化,嵌入脂质体的细胞色素 c 不能为抗坏血酸直接还原,而需加入脂溶性的中间电子递体——二氮蒽甲硫酸(PMS)。加入 3 微升 0.083M PMS 后 6 分钟继续测定光密度的变化。对照不加抗坏血酸和 PMS。根据加入 PMS 前后光密度的变化可以算出脂质体内细胞色素 c 嵌入量。

细胞色素 c 嵌入百分比

$$= \frac{\text{细胞色素 c 嵌入量}}{\text{原加细胞色素 c 量}} \times 100\%$$

细胞色素 c 浓度是用 CF₄R 双光束分光光度计测定的。

(2) ANS 荧光测定 在 2.75 毫升反应液中(0.125M 磷酸缓冲液,1mM EDTA, pH7.3)加入 0.1 毫升 0.4mM ANS, 0.1 毫升超声制备的脂质体(嵌有细胞色素 c 或不嵌细胞色素 c)悬浮液,0.05 毫升 0.15M 抗坏血酸,0.003 毫升 100mM 四甲基对苯二胺(TMPD),用我所自制的荧光分光光度计测定。激发波长为 370 毫微米,发射荧光光谱高峰在 525 毫微米附近。

3. 电镜观察

将用胆酸盐稀释法制备的嵌有细胞色素 c 的脂质体悬浮液加入等体积的 0.015M KCl 溶液中,混匀后取 4 微升滴于铺有聚乙烯醇缩甲醛(Formvar)支持膜的样品网上。自然凉干后再用 2% 钼酸铵溶液(内含 300mM 正丁醇) pH7.0 负染 3 分钟,在空气中凉干后用 JEM60 电子显微镜进行观察。未经嵌入细胞色素 c 的脂质体悬浮液也用同样方法制样、观察。

二、实验结果和讨论

(一) 用超声法将细胞色素 c 嵌入脂质体

的研究

1. 离子强度的影响

用超声法将细胞色素 c 嵌入脂质体的效果与悬浮介质的离子强度有关。我们比较了不同 KCl 浓度(0.005M—0.15M)对细胞色素 c 嵌入量的影响。实际结果如图 1 所示。从图中可以

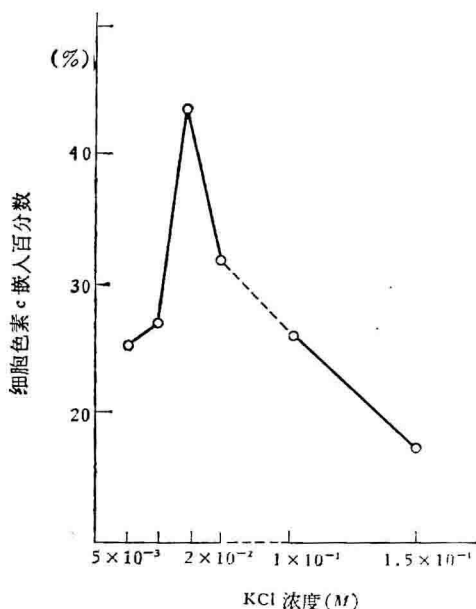


图 1 KCl 浓度与细胞色素 c 嵌入量的关系

看出,在 0.015M KCl 时,细胞色素 c 嵌入脂质体的量最多。随着 KCl 浓度增加,细胞色素 c 的嵌入量逐渐降低。当 KCl 浓度低于 0.015M 时,细胞色素 c 的嵌入量也有减少。这一结果说明,细胞色素 c 与大豆磷脂作用主要系通过静电作用。离子强度的增加会减弱细胞色素 c 与磷脂的结合量因而降低嵌入量。但离子强度过低也会导致嵌入量的减少,这一现象尚待进一步研究。

2. pH 的影响

细胞色素 c 是一种碱性蛋白质,其等电点为 pH10.3。我们比较了 pH 5.3—10.3 时细胞色素 c 的嵌入量。从图 2 可以看出,当反应液的 pH 小于 10.3 时,细胞色素 c 嵌入脂质体的数量并没有明显的差别(其变化并未超出正常波动范围)。这进一步说明细胞色素 c 与酸性大豆磷脂(由 40% 磷脂酰胆碱,33% 磷脂酰乙醇胺,14% 磷脂酰甘油,5% 溶血磷脂酰胆碱,4% 心

磷脂组成^[4])的结合主要系通过静电力。

3. 超声时间

我们曾比较了超声 5, 10, 15 分钟对细胞色素 c 嵌入脂体的影响。从图 3 可以看出, 随着超声时间的增加, 嵌入细胞色素 c 的量也相应增加。这可能与单层脂质体与多层脂质体的比例因超声时间延长而进一步增大有关, 因而扩大了脂质体的表面面积, 增加了细胞色素 c 的嵌入量。

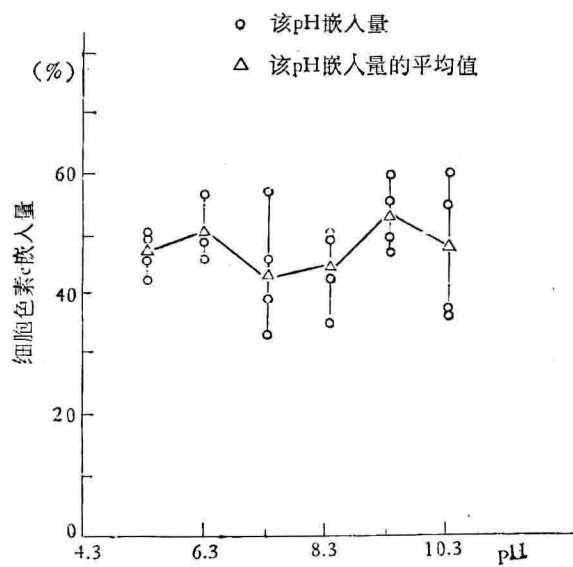


图 2 pH 与细胞色素 c 嵌入量的关系

综上所述, 我们的实验结果表明, 在最适条件下细胞色素 c 用超声法嵌入脂质体的量一般

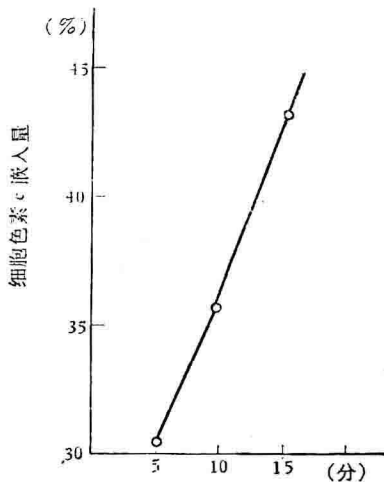


图 3 超声时间与细胞色素 c 嵌入量的关系

为 50% 左右, 最高时可达 60%。

(二) 细胞色素 c 用超声法、透析法、胆酸盐稀释法嵌入脂质体的比较

除超声法外, 我们还比较了透析法、胆酸盐稀释法将细胞色素 c 嵌入脂质体的效果。应用透析法时, 首先将大豆磷脂在一定浓度胆酸盐存在下进行超声处理, 这时磷脂均匀分散不以微囊(脂质体)形式存在。然后加入细胞色素 c 进行透析, 在透析过程中, 随着胆酸盐浓度不断降低, 脂质体逐渐形成。在此过程中, 细胞色素 c 也就嵌入进去了。与超声法相比较, 用透析法将细胞色素 c 嵌入脂质体的量要少得多。一般不超过 30%。值得注意的是, 透析的速度不宜过快。流动透析结合静置透析的效果不如静置透析(见表 1)。这可能因为如果胆酸盐迅速透出, 会造成较大的浓度梯差, 因而使脂质体的形成过程不均匀, 影响细胞色素 c 嵌入量。此外, 用透析法形成嵌有细胞色素 c 的脂质体一般不易沉淀收集。

当用胆酸盐稀释法将细胞色素 c 嵌入脂质体时, 先将大豆磷脂悬浮液用超声处理。然后在一定浓度的胆酸盐存在下与细胞色素 c 一起在 0℃放置 30 分钟左右。最后稀释 30—100 倍进行测定。结果总结于表 2。从表中可以看出, 胆酸盐的浓度以 0.5% 较为合适。在

表 1 用透析法嵌入细胞色素 c 的结果

透 析 方 法	胆酸盐浓度(%)	嵌入量(%)
静止透析 23 小时	2	28.3
静止透析 23 小时	4	29.0
流动透析 3 小时+静止透析 20 小时	2	17.5

表 2 用胆酸盐稀释法嵌入细胞色素 c 的结果

胆酸盐浓度 (%)	1	0.5			0.25
稀释倍数	1:60	1:30	1:60	1:100	1:60
细胞色素 c 嵌入量(%)	35.1	28.1	47.4	47.8	31.7

这样的条件下, 稀释倍数在 60 倍以上, 可以获得较为理想的结果。总的看来, 用胆酸盐稀释

法将细胞色素 c 嵌入脂质体的效果要比透析法好得多,但仍然不及超声法。我们也曾尝试将超声法和稀释法结合使用,但并未能增加细胞色素 c 的嵌入量。

(三) 嵌入脂质体的细胞色素 c 在还原过程中 ANS 荧光反应的变化

ANS 是一种带负电荷的小分子荧光探针,它在水中的荧光很弱,但在非极性溶剂中荧光很强。有人报道^[5,6],细胞色素 c-磷脂复合物能大大增加 ANS 的荧光强度,而且当细胞色素 c 被还原后,ANS 的荧光强度会进一步增加。但没有磷脂时,细胞色素 c 的还原并不引起 ANS 荧光变化。这说明细胞色素 c 还原后 ANS 结合点周围的疏水性有所增加,这可能是细胞色素 c 构型变化所引起的。因而认为位于膜上的细胞色素 c 在氧化还原过程中可能会产生变构现象。但后来也有人对这种现象表示异议^[7]。我们测定了嵌有细胞色素 c 的脂质体在加入还原剂(抗坏血酸加四甲基对苯二胺 TMPD)后 ANS 的变化,并与不含细胞色素 c 的脂质体在同样条件下的相应变化进行了比较。在我们的测定条件下,激发波长为 370 毫微米,ANS 在反应液中发射荧光光谱的高峰则在 525 毫微米左右。实验结果如表 3 所示。

从表中可以看出,含有 ANS 的反应液加入脂质体后荧光强度即有显著增加,加入抗坏血酸和 TMPD 后不论脂质体中是否含有细胞色素 c 都能引起荧光进一步增强。两者并无明显的差别。因此 ANS 荧光变化并不反映嵌入脂质体的细胞色素 c 在还原过程中有无构型变化的问题。

(四) 电镜观察结果

我们对脂质体和嵌有细胞色素 c 的脂质体悬浮液进行了电镜观察。用负染法处理脂质体样品一般不易得到较理想的结果。但如果加入少量正丁醇则能明显改进观察效果。封二中图

1 系脂质体的电子显微图,其中电子稠密部分系负染液渗入所引起的^[4]。封二中图 2 系嵌入细胞色素 c 的脂质体。与封二中图 1

表 3 嵌有细胞色素 c 与不含有细胞色素 c 的脂质体加入抗坏血酸和 TMPD 后 ANS 荧光反应的比较

样 品	ANS 荧光强度	%
反应液*+ANS	1	
反应液+ANS + L _c **	53	100
反应液+ANS + L _c + 抗坏血酸	55	104
反应液+ANS+L _c +抗坏血酸+TMPD	62	117
反应液+ANS	0	
反应液+ANS + L ₀ ***	69	100
反应液+ANS + L ₀ + 抗坏血酸	70	101
反应液+ANS+L ₀ +抗坏血酸+TMPD	79	106

* 反应液内 含 0.125M 磷酸缓冲液, 0.001M EDTA, pH7.3;
** L_c 系超声法制备的嵌入细胞色素 c 的脂质体悬浮液;
*** L₀ 系超声法制备的不含细胞色素 c 的脂质体悬浮液

相比较虽没有明显差异,但嵌有细胞色素 c 的脂质体外形稍有不同,其电子稠密内含物的分布也比较均匀。

综上所述,细胞色素 c 与磷脂组成的脂质体相结合可能有几种方式:①以静电作用相互结合于脂质体的表面,这一部分易被 0.15M KCl 所洗脱,而且能被抗坏血酸直接还原。②以静电力、疏水力(或两者兼而有之)与磷脂双分子层一定基团相结合,面向脂质体内含水相的一侧^[8]这一部分与线粒体内源细胞色素 c 很相似,不能被 0.15M KCl 洗脱,也不被抗坏血酸直接还原而需通过脂溶性的电子中间递体,如 PMS, TMPD 等(见图 4)。③细胞色素 c 纳入脂质体中或多层脂质体之间的水相中,它们并不是以静电作用方式与磷脂相结合。这部分细胞色素 c 不能被 0.15M KCl 抽提,也不被抗坏血

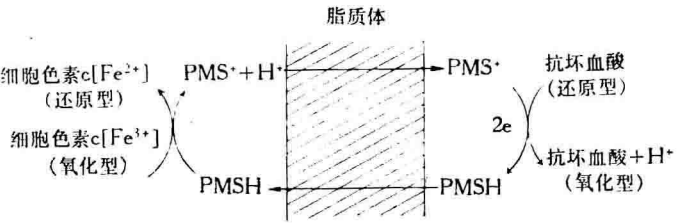


图 4 抗坏血酸通过中间电子递体 PMS 还原嵌入脂质体的细胞色素 c

酸直接还原。我们将 ②、③ 两部分的细胞色素 c 都称之为“嵌入”脂质体的细胞色素 c。

将功能蛋白组装到人工膜(脂质体)上的方法很多。一般常用的有超声法、透析法和胆酸盐稀释法。这三种方法各有利弊。超声法比较简便,但一些对超声比较敏感的功能蛋白就不适宜。透析法重复性较好,但功能蛋白必须经受较高浓度(2%以上)胆酸盐的处理,而且慢透析也比较费时。胆酸盐稀释法的优点在于组装的功能蛋白既可以不受超声处理,也可以免受较高浓度胆酸盐的作用,但这种方法并不是所有功能蛋白都能获得成功的^[8]。究竟采用哪种方法才能获得较理想的结果?这一问题要根据具体对象具体分析。从细胞色素 c 嵌入脂质体的三种方法效果比较来看,是否可以认为对于与磷脂主要以静电作用相结合的一类功能蛋

白(如细胞色素 c)以超声法嵌入脂质体较为合适。还需要积累更多的实验资料来加以验证。

参 考 文 献

- [1] 杨福愉:《生物物理与生物化学进展》,1977年,第6期,第36页。
- [2] Kagawa, Y. et al.: *J. Biol. Chem.* **246**, 5477, 1971.
- [3] Eytan, G. et al.: *FEBS Letters* **57**, 121, 1976.
- [4] Papahadjopoulos, D. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 624, 1967.
- [5] Azzi, A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 322, 1969.
- [6] Kaminsky, L. S. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **51**, 40, 1973.
- [7] Nicholls, P. et al.: *Biochem. Soc. Trans.* **1**, 372, 1973.
- [8] Miller, G. et al.: *J. Memb. Biol.* **26**, 319, 1976.

[本文于1978年2月5日收到]

乙型肝炎表面抗原的分离及沉降性质的初步研究

中国科学院生物物理研究所六室二组
湖北省微生物研究所肝炎组

肝炎是严重危害人民健康的常见病、多发病,急待研究解决。自发现乙型肝炎表面抗原(HB_sAg)后,对肝炎的研究有了很大发展。1972年湖北省微生物研究所从临床肝炎病人及多次输血的血友病人血清中分离出 HB_sAg,制成乙型肝炎表面抗原抗体^[1],并用电子显微镜观察了 HB_sAg 的形态^[2]。HB_sAg 由三种形态颗粒组成:(1)直径 200 埃的球状颗粒,含量最大。(2)棒状颗粒,直径 200 埃,长度由几百埃到几千埃不等。(3)直径 420 埃的大球状颗粒,含量极少。目前许多研究结果指出直径 420 埃的大颗粒很可能就是病毒颗粒^[3]。本文主要研究:(1)试用分部离心法和差速区带离心法分离 200 埃小颗粒及 420 埃大颗粒。(2)纯化后 HB_sAg 的稳定性。(3)测定 200 埃小颗粒及棒状颗粒的沉降系数。

一、材料与方 法

1. 血清

由血库选取 HB_sAg 阳性血清用不连续免疫电泳法^[4]测定乙型肝炎表面抗原活性(HB_sAg),选活性较高者再用免疫电泳法^[5]检查,选择含有 420 埃大颗粒较多的血清为分离样品。我们选用的分离血清其 HB_sAg 活性为 1:8。

2. 分部离心法^[1]

步骤如下:(见下页)。

3. 差速区带离心法

(1) 梯度溶液的制备 用自制的梯度混合装置(图 1),先在混合器中加 3 毫升 5.5% CsCl 溶液,后在搅拌下由注射器慢慢滴入 26% CsCl 溶液,由于混合器是密封的,混合溶液仍由另一管压出,慢慢流入 5 毫升离心管底部,等到液面

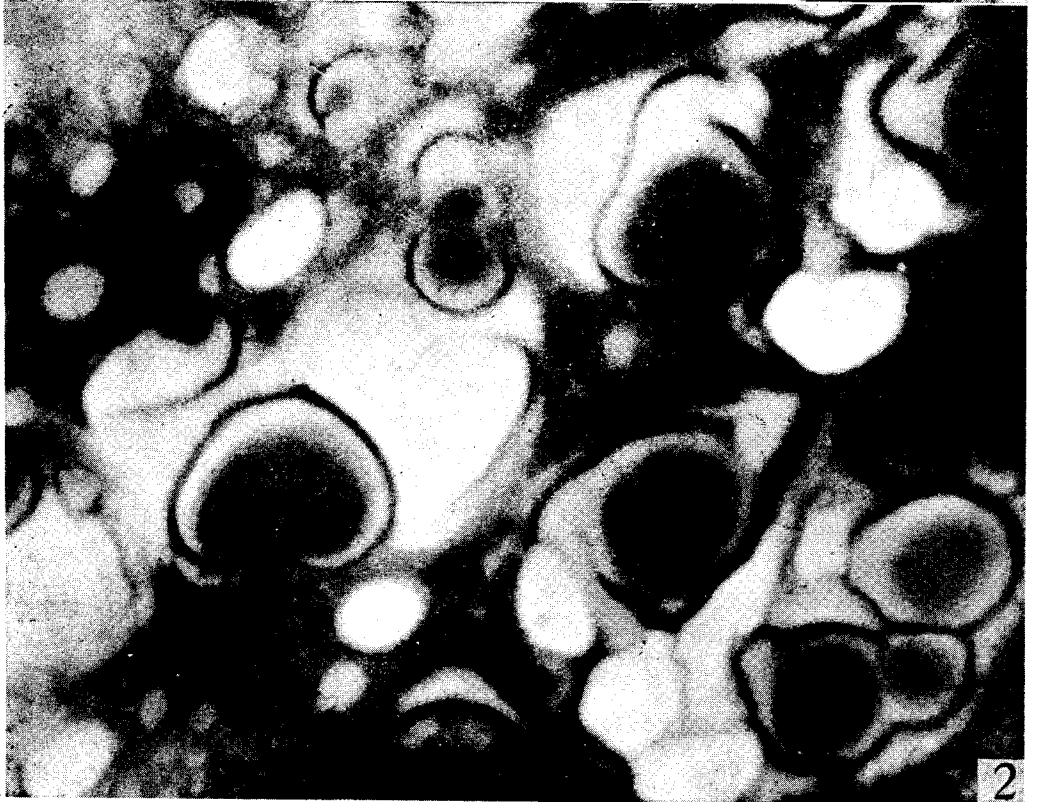
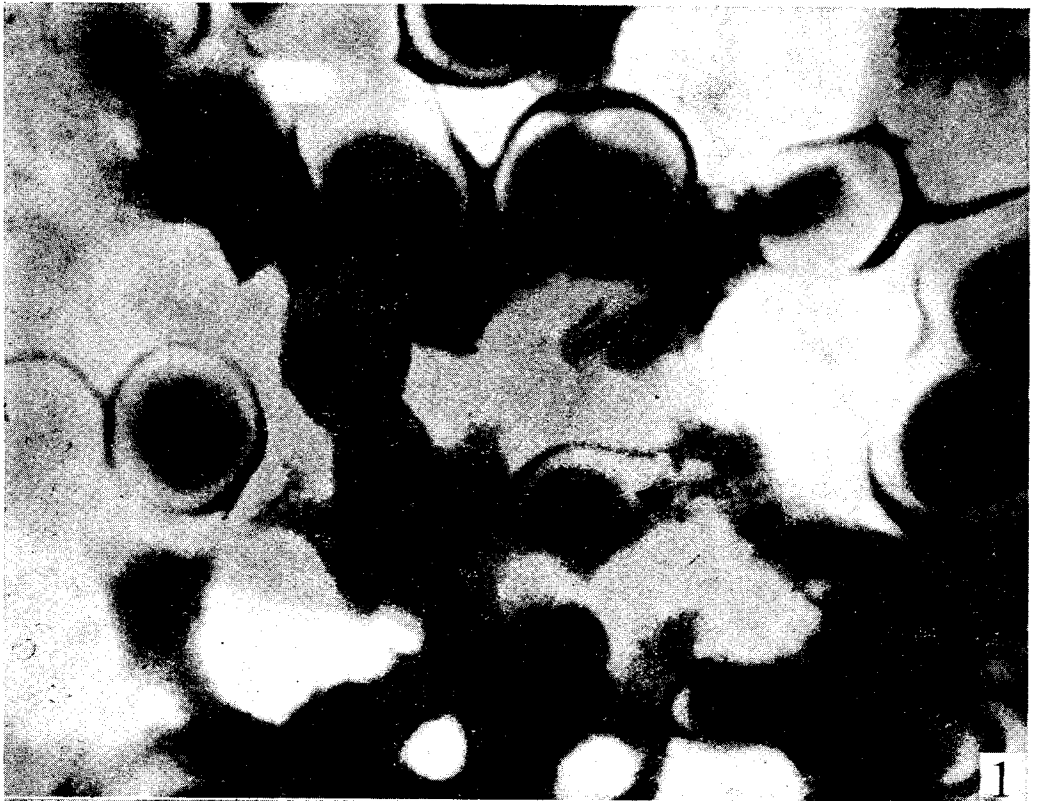


图 1 未嵌入细胞色素 c 的脂质体 22,000 $\times$ 图 2 嵌入细胞色素 c 的脂质体 36,000 $\times$