

介绍一套从水—空气界面的脂单层制备 水相中平面脂双层的新装置

吴 震 荣 刘 文 龙

(复旦大学生物物理教研室, 上海)

提 要

本文介绍了一种从水—空气界面的脂单层形成平面双分子脂膜的新装置。它可以控制膜两侧溶液的不同成分; 脂双层两边的脂单层具有不同成分; 还可使脂双层膜中少带或不带碳氢溶剂, 因而其电容性质与生物膜更为接近。我们用它测定了不对称双分子层脂膜的电特性, 进行了膜上离子通道性质及脂质体与 BLM 的融合等的研究。

在水相中用毛刷法、注射法制备的平面双分子层脂膜(BLM)对生物膜的模拟研究十分有用^[1-3], 但此法有其局限性。首先膜两侧必然是同样的溶液, 相同的浓度, 因为在膜未铺成前两侧溶液通过小孔是相通的。其次, 双层的两边脂分子只能是同样的, 因它们本是从一个脂滴扩展而成。但实际上生物膜往往两个单层的脂分子是不对称的, 膜内外的溶液浓度、离子种类亦不相同, 因此上述缺点使许多模拟实验无法进行。为了克服这一缺点, Montal 等^[6]曾设计一种方法从脂单层形成双分子层脂膜, 它不但可以控制膜两侧溶液的不同成分, 脂双层两边的脂单层不同, 还可使脂双层中不带碳氢溶剂, 因而其电容性质与生物膜更为接近。但他们是用马达控制膜池隔板向下移动, 并用硅油使移动的隔板保持左右两室的绝缘性, 这些均不易做到。我们设计了一种简便方法, 同样能从水—空气界面的脂单层制备水相中的平面脂双层, 并用它以直流法测定了不对称双分子层脂膜的电特性; 进行了两性霉素 B 在膜上的通道性质; 含两性霉素 B 通道的脂质体与 BLM 的融合; 兔脑皮层细胞膜 Na^+ 通道掺入 BLM 等的研究。

现将此种制备水相中 BLM 的装置介绍如下。

一 实 验 装 置

1. 等量同步推进装置 由同步推进的有机玻璃架和两支等容积的注射器组成。使用时将灌有等量不同溶液的注射器, 通过乳胶管与具有小孔的聚四氟乙烯隔膜的左右两槽(称膜池)连通, 同步推进溶液, 使二槽的液面升至小孔下方 2—3 毫米时, 在两槽的液面上滴加等量 BLM 制备液。待滴加的制备液在液面上扩展为薄层后再同步推进注射器, 使液面在同一水平上均匀上升。当二侧液面脂单层上升经过小孔时, 由于孔壁的亲脂疏水性, 就吸住了脂单层中脂分子的疏水端, 而亲水端仍在水溶液中, 在孔上能自然地形成双分子层膜, 并将液面超过

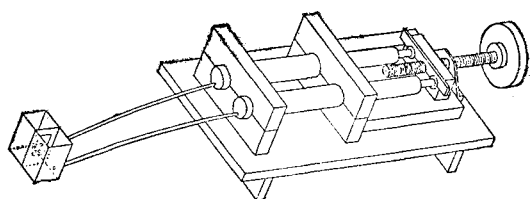


图 1 制备两侧溶液不对称的 BLM 装置

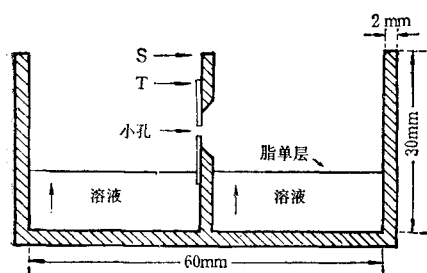


图2 膜池剖面图

T: 聚四氟乙烯薄膜 S: 隔板

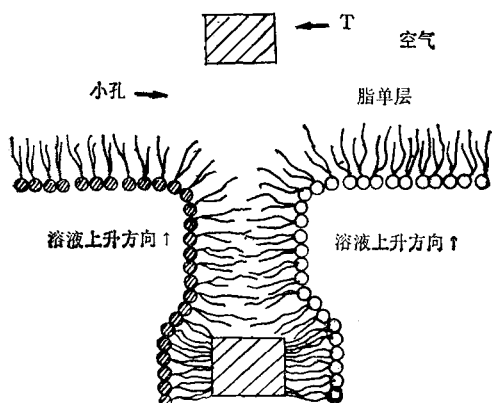


图3 水-空气界面的脂单层形成 BLM 的示意图

T: 聚四氟乙烯薄膜

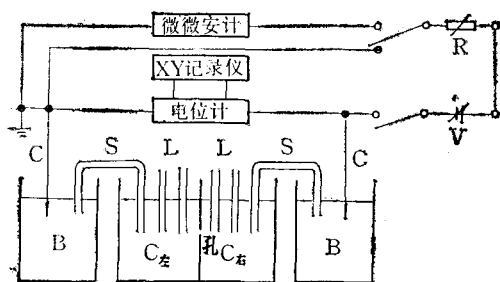


图4 BLM 电测量示意图

R: $10^4 - 10^{12} \Omega$ 电阻器 V: 6V 电源 C: 甘汞电极 B: 保持溶液稳定的液槽 S: 盐桥 C_左、C_右: 制备 BLM 的膜池, 分左、右两侧, 中央有成膜小孔 L: 连通管, 与二同步注射器(或微量泵)接通, 控制 C_左、C_右 液面升降或调换溶液。

小孔以上 2—3 毫米, 保持恒定。实验装置见图 1。

2. 膜池 用 2 毫米厚的有机玻璃制成高 3 厘米、长 6 厘米、宽 3 厘米的液槽。在长轴方向

的中间由隔板分隔成左右两室。隔板上粘合聚四氟乙烯薄膜, 膜中央具有直径 1 毫米的小孔作为 BLM 形成支架。见图 2、3。

为符合实验要求, 膜池左右两侧容积必须相等, 中间隔板与聚四氟乙烯薄膜的粘合要牢固, 具有良好的绝缘性。通过测量膜的电阻值并与毛刷法形成的膜相比较, 可知膜池是否有泄漏。

3. 电测量装置 按 Tien^[7] 方法对 BLM 进行电特性的测量。因膜两侧为不对称溶液, 分别以同类离子浓度的盐桥与盛有该溶液的聚四氟乙烯小杯连通, 杯中各置一甘汞电极, 通过甘汞电极引导至测量装置。见图 4

二 实验结果与讨论

利用上述装置测量了多种两侧溶液不对称的 BLM 的电特性。结果见表 1

表 1 所用膜的制备液为 5% 脑磷脂加 1% 胆固醇的辛烷溶液, 在两侧溶液均为 0.1MKCl 时, 膜电阻值与注射法形成的 BLM 相接近, 唯膜电容值增加 30% 左右。这是由于由脂单层形成的 BLM 不含或少含碳氢溶剂的缘故。

当溶液中加入两性霉素 B 后, 它能与膜上的固醇类发生作用, 形成通道而增加膜的通透性。膜两侧溶液中两性霉素 B 的浓度由 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 增加至 $0.4 \mu\text{g/ml}$ 时, 膜电阻值下降了三个数量级。若一侧 KCl 溶液中不含两性霉素, 另一侧 KCl 溶液中的两性霉素浓度即使增至 $1 \mu\text{g/ml}$ 时, 膜电阻亦只有轻微下降, 其原因是一侧有两性霉素, 在 BLM 上形成的主要是半孔, 有的半孔能行使通道职能, 有的则不能, 故膜的通透性增加不大。这与 Marty 等^[8]报道的结果是一致的。若 BLM 两侧 KCl 溶液浓度不同, C_左 为 0.1MKCl, C_右 为 0.01MKCl, 两侧所含两性霉素的浓度相同 ($1 \mu\text{g/ml}$), 随着两性霉素扩散进 BLM, 不但 BLM 的电阻下降, 而且出现 KCl 的浓差电位。

在以两性霉素 B 通道为探针, 研究脂质体与 BLM 融合作用时, 当一侧溶液中含有两性霉素 B 通道的脂质体, 并有 Ca^{2+} 存在, 脂质体

表1 由水—空气界面的脂单层形成 BLM 的电性质比较

溶 液 种 类		膜电阻 $\Omega \cdot \text{cm}^2$	膜电容 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$	击穿电压 mV	注
$C_{\text{左}}$	$C_{\text{右}}$				
(1) 0.1MKCl	0.1MKCl	$1 \times 10^8 - 5 \times 10^8$	0.8	310	
(2) 0.1MKCl + 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 两性霉素 B 0.1MKCl + 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 两性霉素 B 0.1MKCl + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 两性霉素 B	0.1MKCl + 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 两性霉素 B	10^7			
	0.1MKCl + 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 两性霉素 B	10^4			
	0.1MKCl	0.8×10^7			
(3) 0.1MKCl + 1mM CaCl_2 + 含两性霉素 B 通道的脂质体 0.1MKCl + 含两性霉素 B 通道的脂质体	0.1MKCl	10^4			脂质体与 BLM 融合不融合
	0.1MKCl	10^8			
(4) 0.08MNaCl + 1mM CaCl_2 + 1 μM MgCl_2 + 50 μM Tris + 0.32M 蔗糖 + 兔脑 Na^+ 通道的膜微囊	不加膜微囊 Ca^{2+} 为 10 μM 其余同 $C_{\text{左}}$	10^6			膜微囊与 BLM 融合

与 BLM 产生融合作用,原来在脂质体上的两性霉素通道转移到 BLM 上,因而大大地降低了膜的电阻值。如不加 Ca^{2+} 或将 Ca^{2+} 加在对侧(不含脂质体一侧),都不能引起融合,亦即 Ca^{2+} 必须与脂质体及 BLM 接触才能对融合起作用^[9]。

利用上述装置,我们又进行了兔脑皮层细胞膜 Na^+ 通道掺入 BLM 的研究。可以观察到含 Na^+ 通道的膜微囊与 BLM 融合后电阻下降,当 BLM 两侧电压在 -70 毫伏至 -10 毫伏时,膜电流很小,当电压降到 -10 毫伏以下时,电流值增大。这表明 -10 毫伏以上时,通道处于关闭状态,故电流小;当膜去极化达到一定值时,通道开放,电流增大。我们还分别加 Na^+ 通道特异性兴奋剂 Veratridine 及抑止剂 TTX,以证实 BLM 上存在的是 Na^+ 通道。如果减少 $C_{\text{左}}$ 侧的膜微囊的数量,并在融合作用发生后用微量泵灌注的方法(见图 4)以不含膜微囊的溶液代换 $C_{\text{左}}$ 原有溶液,则有可能只有少数、甚至单个膜微囊融合到 BLM 上去,可进行单个 Na^+ 通道的研究。

用此法制备 BLM,只要槽两侧的容积,二个注射器的容积及二个注射器每次吸入的溶液

量相等,基本上都可以成功。这似乎比经典的毛刷法与注射法方便。每次耗费的脂溶液量较注射法要多,但比毛刷法少。此法可以保证隔壁左右两侧使用不同溶液。从理论上讲还可制备出两边不同脂单层的双分子层膜,但要用实验方法证明这一点比较困难。如果用易挥发的脂溶剂作为磷脂或胆固醇的溶剂,则当脂溶液滴至槽两侧液面上后,脂溶剂从脂薄层中迅速挥发,最后形成的 BLM 中不含脂溶剂,使其更适合做生物膜的模型。

参 考 文 献

- [1] 孙纹琦等:《生物化学与生物物理进展》,(4),38,1981。
- [2] 华士锦等:《生物化学与生物物理进展》,(4),7C,1984。
- [3] 胡坤生等:《生物化学与生物物理学报》,17(1),42,1985。
- [4] 魏美德等:《太阳能学报》,2(2),146,1981。
- [5] 吴震荣等:《生物物理学报》,2(2),110,1986。
- [6] Montal, M. et al.: *Pro. Nat. Acad. Sci. USA*, 69(12), 3561, 1972。
- [7] Tien, H. T., *Bilayer Lipid Membranes (BLM) Theory and Practice*, Marcel Dekker, New York, 119, 1974。
- [8] Marty, A. et al.: *J. Gen. Physiol.*, 65, 515, 1975。
- [9] 刘文龙等:《复旦学报(自然科学版)》23(3),313,1984。

[本文于 1986 年 8 月 13 日收到]