

生物膜核磁共振新技术及类脂静态、动态结构研究的进展

洪水根 胡友川

(厦门大学细胞生物学研究室)

生物膜的研究是当代生命科学研究的三大领域之一。目前,有关膜的静态结构已基本清楚,而对膜结构组分的动力学特征还了解不多。

运用 ^1H 、 ^2H 、 ^{13}C 和 ^{31}P 核磁共振(NMR)技术,可以了解膜中类脂的动力学状态。七十年代中期以前,人们通过测量NMR波谱、峰宽、弛豫时间,对类脂的烃链长度与饱和程度、蛋白质和胆固醇的含量、水质子信号特征以及外加的抗菌素和局麻药物的作用进行探讨,并发展了癌细胞的检测技术^[1]。

近年来,由于核磁共振仪的不断改善,计算技术和傅立叶变换脉冲程序的应用,现在已可以研究固态细胞膜的类脂分子中几乎所有原子的运动速率和运动类型^[2,3]。

一、生物膜固态 NMR 研究中常用的几种新技术

在 NMR 实验中,完整的生物膜常表现出固相的性质。由于微粒或分子无法快速翻滚,静电偶极、四极矩的相互作用就无法平均化,所以在傅立叶变换(FT)脉冲实验的波谱中常常观察到分辨率很差的宽吸收峰,同时类脂和蛋白质分子的运动受到一定限制而表现出各向异性。最近几年由于广泛采用样品快速旋转技术和自旋-回波脉冲技术,显著改善了固相 NMR 的实验结果。下面介绍这两种技术在生物膜同位素标记固态 NMR 波谱分析中的应用。

在膜的 NMR 研究中,常借助同位素标记的方法研究膜脂中各基团(或分子片段)的动力学性质。重氢标记是常用的标记法。其原理是:采用适当的合成方法或生理代谢方法,用

^2H 取代分子中的某个或某些质子。由于这两种同位素的范德华半径一样,所以 ^2H 取代后实际上膜并未发生变化。因为 ^2H 的天然丰度可以忽略(0.016%),故 ^2H 选择取代后 ^2H -NMR信号是波谱中唯一信号,从而大大简化谱图并避免共振峰的重叠。 ^2H -NMR的更大优点还在于:可以由 ^2H 的四极分裂直接测定分子中某片段的各向异性^[3],即定量地研究分子运动的有限性(测定序参数)及运动的速率(测定弛豫时间),而且能提供生物膜中磷脂的详细构象^[4]。

在 ^2H -NMR研究中常遇到所谓的“粉状图形”(“powder-pattern”),它是非定向样品,比如粗糙脂质体的波谱所具有的特征。在固体样

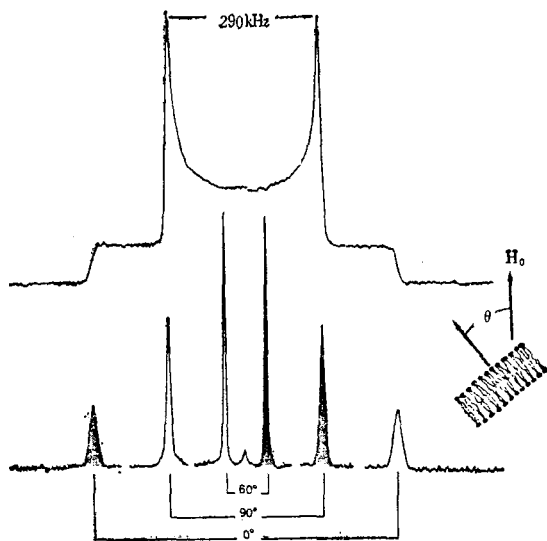


图1 选择 ^2H -标记样品在45MHz的 ^2H -NMR波谱
样品重量百分比组成是辛酸钠34%, [1, 1- $^2\text{H}_2$]
辛醇30%, 水36%

品中,所有小区 (microdomain) 散布在空间的各个角度上,粉状图形表达了所有可能取向的共振的平均效果^[5]。在 ^2H 标记磷脂的人工膜 NMR 研究中,可以由粉状图形两峰间隔 $\Delta\nu_0$ 求出序参数 S_{CD} ,从而了解膜脂分子运动的有限性及取向分布:

$$\Delta\nu_0 = \frac{3}{4} \left(\frac{e^2qQ}{h} \right) S_{CD} (3 \cos^2 \theta - 1) \quad (1)$$

式中 $\left(\frac{e^2qQ}{h} \right)$ 是四极矩耦合常数, θ 是膜法线与外场 H_0 的夹角(图 1)。图 1 所示波谱的样品因具有表面活性而形成双层结构人工膜系统。图 1 的上半部分是 $\theta = 90^\circ$ 的粉状图形,其四极矩分裂 $\Delta\nu_0 = 29.0\text{kHz}$ 。把 $\Delta\nu_0$ 值代入(1)式中, ^2H 的四极矩耦合常数约 170kHz ,可求出序参数 S_{CD} ^[6]。

1. “魔角”快速旋转技术 近年来,研究者常用快速旋转技术改善固相 NMR 波谱的峰宽。其原理是:在磁场中按适当取向 ($\theta = 54.7 \pm 1^\circ$) 使样品快速旋转(100,000—20,000 转/分),具有把各种磁场的相互作用平均化的功能,这样,化学位移的各向异性就平均化为各向同性,从而导致谱线变窄的结果。

图 1 的下半部表明在不同的 θ 角取向情况下的 ^2H -NMR 波谱。图中有阴影峰和无阴影峰表示 $-1 \leftrightarrow 0$ 和 $0 \leftrightarrow +1$ 两种不同的跃迁, $\Delta\nu_0$ 就是这两种跃迁的频率差。若膜法线的取向与外场 H_0 成 $\theta = 54.73^\circ$ (“魔角”),则 $3\cos^2 54.73^\circ - 1 = 0$, 所以 $\Delta\nu_0 = 0$, 四极矩分裂兼并为中心单峰。此外,还应注意, ν_0 除了取决于上述相对于外场 H_0 的取向因素,也取决于膜分子的性质,并反映在序参数 S_{CD} 上。

对于 ^{13}C -NMR, 还要结合使用交叉极化和大功率双共振质子去偶的方法^[7]。图 2 表示在“魔角”下高速旋转的类脂 DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) 无晶体的 37.7MHz ^{13}C -NMR 波谱。这是一个典型的高分辨固相类脂的 ^{13}C -NMR 波谱,吸收峰显然是比较窄的。

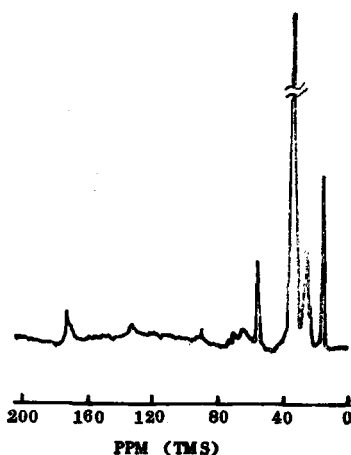


图 2 类脂 DMPC 无晶体在“魔角”下旋转的 37.7MHz 的 ^{13}C -NMR 波谱

不过,应用高速旋转技术势必导致丧失一部分化学位移所包含的信息,而且它要求专用仪器;但是这种技术受到干扰因素少,并且在固相 NMR 研究中已显示出其独特的优越性。可以预料,在不久的将来,可使用这种技术对膜的静态和动态结构作更深入的探讨。

2. 自旋回波脉冲法 由于生物膜的固相性质,在 NMR 波谱中往往不是表现为严重加宽的吸收峰,就是出现迅速衰减的时间域信号。图 3 是在不同实验条件下给出的重氢标记缬氨酸 NMR 谱。A 和 B 是 ^2H -标记缬氨酸水溶液的 NMR 谱,标记位置是 $[\gamma\text{-}^2\text{H}_6]$ 。A 表现出正常的自由诱导衰减 (FID) 时间域信号, B 是 A 经傅立叶变换后的频率域波谱,典型的溶液态尖峰。C 是固体 $[\gamma\text{-}^2\text{H}_6]$ 缬氨酸经常规 FT-NMR 脉冲法所得的时间域信号,与 A 相比,该信号衰减过于迅速,势必丧失部分波谱信息。D 是经 FT 后的频率域谱。一方面,它表现出重氢的四极矩分裂,这是重氢固相 NMR 的特征,另一方面,峰形过于尖锐,这是时间域信号 C 衰减过于迅速的结果。

由于采用自旋-回波脉冲程序 ($90^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ_{90}\text{-回波}$),能形成一个在仪器 rf 脉冲应答平息之后才出现的四极自旋回波^[7],如 E 所示,在回波最大值处开始获取数据。F 表示 FT 后的自旋 $I = 1$ 的粉状图。与图 D 不同,它没有

失真。

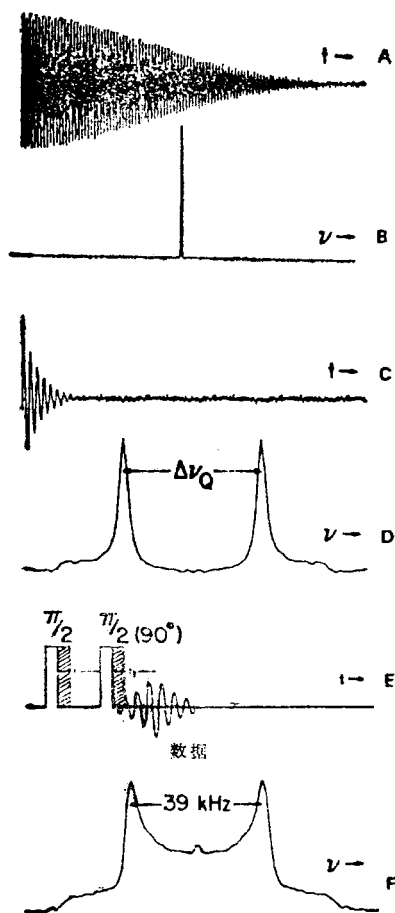


图3 ²H 标记的缬氨酸 55.3MHz 重氢 NMR 波谱

二、类脂的 NMR 研究

1. 磷脂

近年来，已经对磷脂双层结构进行了深入研究。目前，已经成功地应用 ²H-NMR 波谱学方法确定类脂极性端基、甘油骨架范围和类脂结晶相的脂肪链的结构^[8]。现在已经证明，采用 100mg 至 500mg 的纯磷脂样品进行实验，饱和磷脂的脂肪酰链的结构，包括至今所研究的所有的磷脂中的 sn-2' 链位置上的弯头 (bend) 的结构，基本上都是相似的。

(I) 磷脂极性端基区的研究 研究类脂的双层结构，除了早期测量 ¹³C 的 T₁ 的方法，最近不少人采用 ²H 与 ³¹P-NMR 结合的方法，对

磷脂极性端基区进行研究^[8]。他们提出关于磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰胆碱 (PC)、磷脂酰丝氨酸 (PS) 及磷脂酰甘油 (PG) 的各种端基之静态及动态结构模型。综合这些研究工作，可以认为各种磷脂端基都具有各自独立的一系列特征波谱参数，与分子其余部分结构的关系并不密切；PC、PE 和 PG 的端基有比较类似的结构，而 PS 的刚性较显著，但有一个共同之处，即它们的运动都颇受限制；PC 和 PE 的端基受所加入的胆固醇影响不大，但这两者对二价和三价阳离子却十分敏感^[9]。

(2) 类脂凝胶相动态结构的研究 早在十多年前，已有胶态完全重氢取代磷脂双层的 NMR 波谱报道。在 X 射线衍射的实验中，PC 的胶相具有 4.1 Å⁻¹ 尖锐的 Bragg 反射的特点，在胶相中的链被认为与结晶链是同一类的，后者很少发生偏离晶轴的分子运动。不过，胶相的刚性导致峰加宽，其信噪比很差，因而采用常规的 ¹H 或 ²H-NMR 的 FT 技术很难获得结构信息。由于应用自旋-回波脉冲程序技术，就可以获得无失真的胶相磷脂的 ²H-NMR 波谱。

图 4 的 PC 凝胶相波谱是一个有代表性的例子^[7]。在相变温度附近，PC 凝胶相在 Pβ' 和

DMPC, T_c = 23°

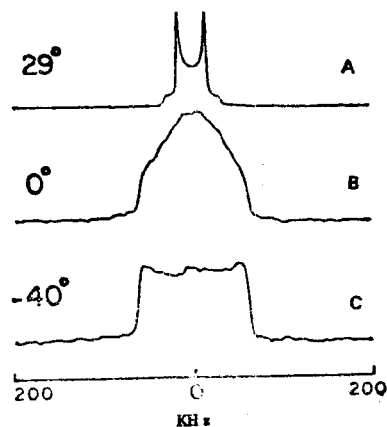


图4 1-myristoyl-2-[6'-6-²H₂]myristoyl-sn-glycero-3-phospholipine (50% 水溶液中), 在不同温度下的 45.2 MHz 重氢 FT-NMR 波谱

$L\beta'$ 形式中的波谱都仍具有比较宽的缺乏特征的外形。但是在较低的温度下,可以得到典型的自旋 $I = 1$ 零反对称参数的波谱,该波谱具有完全刚性的晶格宽度(约相当于 168 kHz 的一个四极偶合常数 e^2qQ/h), PC_6 的 2H -NMR 波谱表现出分子的复杂运动方式,包括可能发生快速的歪扭一反式异构化。

凝胶相 PE 的波谱则单纯由于磷脂分子快速的轴跳跃引起。在略低于由凝胶向液晶相转变的温度下, PE 波谱具有四极分裂 $\Delta\nu_Q = 63$ kHz 的 2H -NMR 波谱的特征^[10]。

另外,有人报道了二棕榈磷脂酰胆碱 sn-2 链的羰基位置上 ^{13}C 标记的 ^{13}C 波谱^[11]。在 $L\beta'$ 相中,可以观察到宽度为 112ppm 的轴对称波谱,但在 $L\alpha$ 相中,出现一个类似各向同性的峰,宽度约 7ppm,而在介质 ($P\beta'$) 相中则显示出这两个波谱的温度相关叠加。所以可以认为, $P\beta'$ 相表现了 $L\beta'$ 与 $L\alpha$ 两相的微观结构和动力学性质。分析上述的波谱可以得出如下结论: 在 $P\beta'$ 相出现类似各向同性的峰,主要是由于 sn-2 羰基的构象发生变化;在 $P\beta'$ 相中提高轴扩散速率,可能有助于峰变窄。

有关完整的生物膜及其类脂提取物中的磷脂烃链、甘油骨架和端基的组成,已有不少报道^[12]。在这些实验中,常用的膜样品干重约 100—300mg,样品体积约 $1cm^3$,并且几乎都用到 ^{13}C 或 2H 标记。通过对完整的生物膜的磷脂构造进行研究所得的主要结论是: 无蛋白质的人工膜的类型与完整的生物膜的类型之间的差异是非常小的。

2. 糖脂 在许多情况下,糖脂是细胞膜不可缺少的主要成份,然而相对于磷脂而言,对糖脂的研究却为数极少。鉴于糖脂在细胞识别中所起的重要作用,理应使它成为详细研究的对象。

Skarjune 和 Oldfield^[13] 已经报道过在液晶相中,对糖的端基和脂肪酰链上进行标记的糖脂(N-棕榈半乳糖脑苷脂类)的 2H -NMR 波谱。他们采用 50mg 样品,在适当的场强 (85KG) 下,在信号均衡的几分钟内获取数据。若在同

样的对比温度下进行比较,液晶相中的糖脂与液晶相中的磷脂的实验结果并无显著差别^[10]。但是,在低于 $82^\circ C$ 所生成的 N-棕榈半乳糖脑苷脂类的晶体相中,得到的 2H -NMR 谱形却有点异常^[14], 现已证明这是凝胶相中非零反对称参数所引起的,并且关系到两位点(或多位点)跳跃(hopping)的问题。这种水分子绕 HOH 平分轴快速翻转的运动在盐类的水合物晶体中并非罕见。与此相似,在各种不同的生物体系中苯环会在固相中翻转,这就证实了这种两位点跳跃的过程^[15]。图 5 B 和 C 表示典型的脑苷脂类凝胶态的波谱,并与标准的晶体 ($-40^\circ C$) 波谱 A 和液晶 ($85^\circ C$) 波谱 D 比较。在 $55^\circ C$ 观察到的三角形的峰形是非零反对称参数所特有的。由于 C-D 矢量次远大于 $\Delta\nu_Q^1$ 的速率穿过四面角,进行从一个位点到另一个位点的运动而产

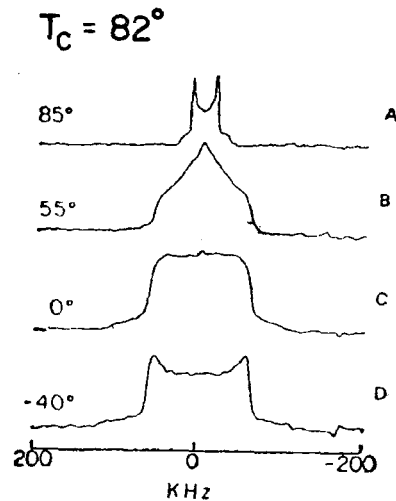


图 5 $N[6,6-^2H_6]$ 棕榈半乳糖脑苷脂类(重量比为 50% 的水溶液)在指定温度下的 45.2MHz 2H -FT-NMR 波谱
凝胶-液晶相变温度是 $82 \pm 1^\circ C$

生这个参数。

通过分析大量当前通用的 2H -NMR 数据,可以比较清楚地确定在液晶类脂双层中糖脂端基的结构: 糖基朝外直接指向水区。

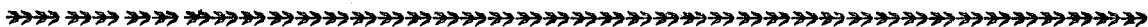
在 NMR 波谱领域从事研究的多数人目前倾向于认为类脂分子并没有接受蛋白质的大量指令。对此也有人持相反意见。随着 NMR 波

谱技术的不断完善,尤其随着新的超高场超导磁体的出现,相信对膜脂的动态结构将有更全面、更深入的认识。

参 考 文 献

- [1] 北京医学院生物物理教研组等:《北京市肿瘤防治研究》,2期,50—54,1978.
- [2] Rajan, S. et al.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 1160—1166, 1981.
- [3] Kinsey, R. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 9028—9036, 1981.
- [4] Seelig, J and A.: *Q. Rev. Biophys.*, **13**, 19—61, 1980.
- [5] Levine, Y. K. et al.: *Biochemistry*, **11**, 1416, 1972.
- [6] Jost, P. C. and Griffith, O. H., ed. *Lipid—protein interactions*. v. 2. New York, Wiley, p. 128—134, 1983.
- [7] Oldfield, E., *Lipid and Membrane Biochemistry*, B4, 27, 1—23, 1982.
- [8] Seelig, J. et al.: *Biochemistry*, **19**, 2215—2219, 1980.
- [9] Brown, M. F. and Seelig, J., *Nature*, **269**, 721—723, 1977.
- [10] Rice, D. M. et al.: *Proceeding of the Symposium: Biomolecular Stereodynamics*, Vol II. Adenine Press, N. Y.
- [11] Wittebort, R. J. et al.: *Biochemistry*, **20**, 4223, 1981.
- [12] Kang, S. Y. et al.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 1155—1159, 1981.
- [13] Skarjune, R. and Oldfield, E.: *Biochim. Biophys. Acta*, **556**, 208—218, 1979.
- [14] Huang, T. H. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 7377—7379, 1980.
- [15] Kinsey, R. A. et al.: *J. Biol. Chem.* **256**, 9028—9036, 1981.

[本文于1985年7月25日收到]



科技消息



生物物理学名词审定委员会成立

中国生物物理学会于1986年元月27日在北京科学会堂召开了生物物理学名词审定委员会成立会。议程有:(1)传达了全国委员会成立大会文件以及会上领导同志讲话的主要内容;(2)宣布了生物物理学名词审定委员会的成立;(3)讨论并通过了生物物理学名词审定委员会工作条例;(4)讨论了生物物理学名词审定工作规划。

会议明确了审定与统一的范围,主要是生物物理学各分支学科的基本名词,要反映出八十年代的科技水平。为了便于进行名词审定工作,组成三个专业审查组(成员由各委员分别兼任):(1)第一组:包括分子生物物理学(聂松青)、细胞与膜生物物理学(林治焕)以及生物物理仪器与技术(江丕栋),组长为聂松青同志。(2)第二组:包括感觉器官与神经生物物理学(刁云程)、生物信息论与控制论和生物数学(汪云九、吴本玠)以及理论生物物理学(丁达夫),组长为汪云九同志。(3)第三组:包括光生物学(暂缺)、辐射与环境生物物理学(纪极英)以及生物力学与生物流变学(施永德),组长为纪极英同志。各委员将于1986年4月底前按分工专业提出基本名词词条,5月召开第一次审定工作会议,对所汇总的名词进行讨论和修改,然后打

印成草案,广泛征求有关单位和工作者意见。争取在1987年第二季度定稿。

自然科学学术名词的审定与统一工作的重要意义,钱三强同志在全国自然科学名词审定委员会成立会(1985年4月)上已指出:“这一工作对于科技知识的传播(包括科技教育和科学普及两方面的工作),新学科的开拓,新概念的引进,国际、国内的科技学术交流,科技图书文献的编纂、出版和检索,科技情报信息的传递以及计算机技术在科技信息交流工作中的应用等都具有非常重要的意义。”对生物物理学这一新兴学科尤其如此。可以相信这项工作在全国广大生物物理科学工作者的支持和帮助下是一定能够胜利完成的。

生物物理学名词审定委员会成员名单

主任委员: 吴本玠 秘书: 王成典

顾问: (以下均以姓氏笔划为序)

沈淑敏 林克椿 徐京华

委员:

刁云程 丁达夫 江丕栋

纪极英 汪云九 林治焕

施永德 聂松青

[北京医科大学 吴本玠]