

双球形模型膜系统及其在膜通道研究中的应用

邵丽清

董仁杰

(中国兽药监察所, 北京 100081)

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

提 要

介绍了一种双球形人工模型膜系统。提供了研究跨两个双层膜之间细胞连接重组和通道活性的机会。通常研究通道性质和膜重组所使用的脂质体和板形膜仅是一个细胞的双层膜模型, 而此系统则为两个相邻细胞间的联接模型。这里报告了该系统的制备和在胞间通道研究中的应用。

关键词 模型膜系统, 通道活性, 膜通道重组, 通道蛋白 MIP-26K

生物膜的研究在分子生物学和细胞生物学的研究中是个很活跃的领域。生命的最小单元——细胞, 在生长发育、遗传变异等过程中无不与各种膜系统相关。生物学家除了直接研究细胞的质膜、核膜、线粒体膜、叶绿体膜等膜外, 为了方便和简化, 还根据生物膜系统是由磷脂和蛋白组成而设计了各种各样的人工膜^[1-3]。这些人工膜的应用, 为生物膜的研究开辟了新的途径。本文介绍一种新的有实用价值的双球形模型膜系统。其在药物对膜的作用及各种因素对膜功能的影响, 膜脂与膜蛋白的相互作用, 尤其是胞间通道的性质等等的研究中, 有广泛的应用前景。

1 模型膜的组成和制备方法

双球形模型膜系统是由两个球形(直径 1mm)磷脂双层和内外电介质组成(见图 1)。在两个注射器尖端的毛细管头部沾上膜形成液(一定浓度的磷脂加蛋白), 注射器内吸入内电解质(模拟细胞内液), 将尖端插入比色杯内的外电介质(模拟细胞间液), 推动活塞在注射器尖端形成一个 1mm 直径的球形膜, 在该膜变薄成双层脂膜后将两个这样的膜用微动器调至相互接触, 待稳定后, 在两个球形膜之间形成了一个由两个单位膜组成的双层膜(如图 1b)。这

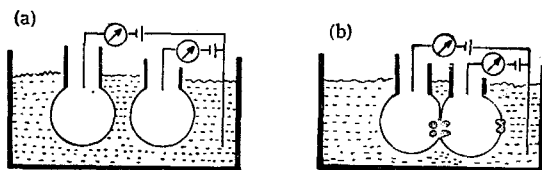


图 1 双球形模型膜系统示意图
两膜粘接后(如图 1b 所示)每个膜上的半连接器结合成全连接器(全通道)

时分散在单位膜上的通道蛋白(半连接器)接合成通道(组成全连接器)。

2 双电压钳电流信号的记录和分析

应用跨膜电压钳位技术测定两个膜间连接的电导, 如图 2 所示。当一个膜(R)上电压为 0mV 时, 另一个膜(L)上电压为 -5, -10, -15, -20mV 等等, 用两个电导仪(Dagan 8900)可测出两个膜间的电导(R_j)。同样的电压用在对应的膜上去, 两个膜上的电流通过一个信号放大器(Neurocorder 和一个录像机(Emerson)被记录到录像带上去也可以直接记录到 XYY' 记录仪上去。用光学显微镜可直接观察膜, 并可通过图象放大器将膜显示到电视屏幕上。这样, 很容易测定膜的直径和判断

是否变成双层膜.已记录的电流通过一个 20Hz 8 孔滤波器由录像带显示在 100Hz 的显示器上 (Labmaster 接口板), 分析单位的转换用 pCLAMP 软件, 在 PC/AT 计算机上进行. 下一步的资料分析、曲线符合及作图用 Plotl T 软件完成, 整个系统的配置如图 3 所示^[3].

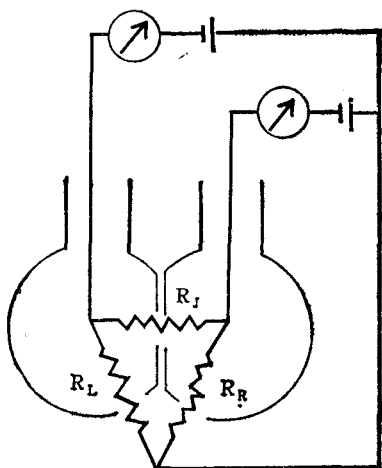


图 2 测定两个膜之间电导方法示意图

当右侧之膜电压在 0mV 时无电流通过 R_R ，用电压钳方法测定右侧的电流全是由 R_I 流过的

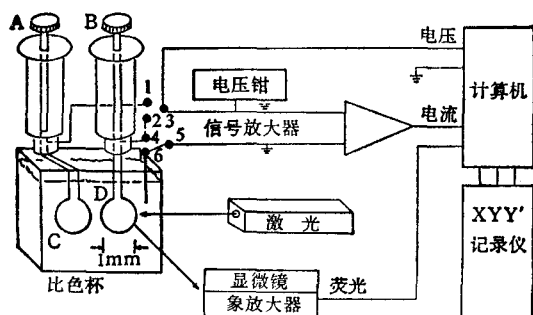


图3 监测双球形模型膜系统的装置示意图

A, B 是两个注射器; C, D 是形成的两个膜。1, 2, 3, 4, 5, 6 为开关。其中 1, 4 与内电极相通, 6 与外电极相通。双电压钳等不同测定方法均由开关控制

3 双球形模型膜系统在通道活性重组等研究中的应用

自该系统问世以来,已经发挥出其特点和长处,以前的脂质人工膜虽然种类繁多,但共同

的特点是仅有一个双层膜(一个单位膜), 如果这样的膜系统在生物机体内存在, 组织将失去其低分子量组分和不能保持膜电压。这里介绍的双球形膜系统, 是模仿真正两个细胞间的两个双层膜体系。随着该体系被更多的人了解和认识, 一定会在很多方面发挥它的作用。

3.1 药物对膜的作用

神经节苷脂 (ganglioside) 是含有单糖和乙酰神经氨酸的神经酰胺寡糖苷, 其在人体内的积累可导致代谢缺陷, 并伴有神经发育迟缓。将其与膜形成液混合后制成模型膜。在两个双层膜粘接后测定其电导。当神经节苷脂的浓度增加 0—15% 时, 则降低通道电导 3 倍。这表明该药物是通过控制通道来影响人体代谢而产生生理和药理作用的。由此可见, 也可以利用该系统试验不同药物的药理作用。膜上组装的蛋白质、酶, 多糖和磷脂的组分也可以有不同的变化和选择。

3.2 晶状体纤维细胞间隙连接蛋白的结构和功能的研究^[5,6]

本实验系统可以研究一些蛋白质的结构和功能之间的关系。晶状体间隙连接蛋白是晶状体纤维细胞间物质和信息转运的執行者，其结构变化将改变晶状体功能，导致某些眼病的发生。将一定量的间隙连接蛋白与磷脂（1-oleoyl-2-palmitoyl phosphatidylcholine）混合，制成模型膜。然后测定单个双层膜和跨连接的两个双层膜的电学性质变化。再加入某些影响蛋白结构的因子，研究该蛋白通道功能的变化。如将该蛋白的抗体加入膜内液可测定抗体对通道的阻断作用。通道是由 MIP-26kD（major intrinsic protein-26000）蛋白组成的，因为 MIP-26kD IgG 抗体阻断通道可使电导值大幅度减小。凡是有通道功能的蛋白质都可以在此系统上测定和研究。

3.3 Ca^{2+} 和钙调蛋白 (calmodulin) 对通道活性调节作用的研究^[7]

球形模型膜由卵磷脂和牛晶状体膜碎片组成。Ca²⁺ 的浓度用荧光探针 (Indo-1) 来测定。这种技术能够测定由钙调蛋白调节的膜内 Ca²⁺

浓度增加 100 倍。在多通道的膜中, Ca^{2+} 的浓度小于 100nmol/L 时, 可增加膜的电导。跨单个膜时平均增加 2 倍, 而跨两个膜间的连接时增加 4.6 倍。对比之下, 在加入 $9\mu\text{mol/L}$ 钙调蛋白时, Ca^{2+} 不仅不增加电导, 反而减少 40%。由晶体蛋白制备的膜中, 可明显地观察到单通道(通过该通道膜电流的平均振幅相同)的活动。

在低 Ca^{2+} 又无钙调蛋白存在时, 通道大小的变化不受电压的影响, 也不受微克分子 Ca^{2+} 离子的影响。值得注意的是, 在低电压时, 若加入钙调蛋白, 无论测定单个膜还是测定跨双膜连接, 结果都会因微克分子钙的存在使通道大小明显减小 50% 至 90%。这些结果进一步证实了由 Girsch 和 Peracchia^[8] 报告的钙调蛋白对晶状体膜通道在脂质体中重组的作用, 并指出当 Ca^{2+} 进入时关于钙调蛋白在防止晶状体纤维细胞渗漏的重要生理作用。

参 考 文 献

- 1 杨福愉. 生物科学参考资料, 北京: 科学出版社, 1981; 第13集: 92—98
- 2 Chapman D. *Liposome technology*. CRC Press, 1984: 1—18
- 3 Brew G J, Thoma P D. Role of gangliosides in adhesion and conductance changes in large spherical model membranes. *Biochem Biophys Acta*, 1984; 776: 279
- 4 Brew G J, Thomas P D. Glycolipid modulation of membrane adhesion. *Neurochem Res*, 1986; 111: 1321
- 5 Brew G J, Takemot L J, Dong R J *et al*. Voltage dependence and antibody sensitivity of lens channel across reconstituted single membranes and junctions between two membranes. *Biophys J*, 1989; 55: 218
- 6 Dong R J, Brewer G J, Takemoto L J *et al*. *Third China-Japan Bilateral Symposium on Biophysics*. Xian, 1991: 104
- 7 Brewer G J, Dong R J. Transjunctional lens channels reconstituted: regulation by Ca^{2+} and calmodulin. *J Cell Biol*, 1990; 111: 348
- 8 Girsch S T, Peracchia J. Lens cell-to-cell channels protein, I. Self-assemble into liposomes and permeability regulation by calmodulin. *J membran Biol*, 1985; 83: 217

蛋白质酪氨酸脱磷酸化和信号传导

朱 茂 祥 吴 国 利

(北京师范大学分子生物学及生物化学研究室, 北京 100875)

提 要

蛋白质酪氨酸磷酸酶 (PTPP) 能特异地催化蛋白质酪氨酸残基的脱磷酸化反应。它是一个由很多结构相关的酶组成的家族。比较氨基酸的序列发现 PTPP-1B 和跨膜蛋白 CD45 的胞内区有结构相似性。现已证明 CD45 确实具有内在 PTPP 活性。通过研究 CD45 在淋巴 T 细胞中的功能, 揭示了一个新的信号传导机制。蛋白质酪氨酸残基的脱磷酸化在这一信号传导途径中起着关键性作用。

关键词 酪氨酸蛋白激酶 (PTK), 蛋白质酪氨酸磷酸酶 (PTPP), CD 45, 信号传导

蛋白质的可逆磷酸化共价修饰是细胞调控的一个重要机制^[1]。特别是蛋白质酪氨酸激酶 (PTK), 在细胞生长、增殖、分化、转化等过程中起着主要调节作用, 并与肿瘤的发生密切相

关^[2]。最近的研究表明, PTK 的所有这些调控作用最终又是通过 PTPP 的作用而实现的。