

膜脂流动性的研究方法——DSC, ESR 与 FP

杨 玲

苏维埃

(浙江师范大学生物系, 浙江金华 321004)

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

摘 要 在介绍差示扫描量热法、电子自旋共振及荧光探针 3 种物理方法的基本原理基础上, 测定了二棕榈酰磷脂胆碱 (DPPC) 的相变温度, 讨论了 3 种方法应用于研究细胞膜或膜脂流动性上的差异。

关键词 差示扫描量热法, 电子自旋共振波谱技术, 荧光探针技术, 膜脂流动性

分类号 Q73

生物膜具有多种功能, 与机体的物质代谢、能量转换、信息传递、细胞识别、细胞起源以及生物进化等都有密切关系。研究证明, 生物膜的多种功能与其流动性密切相关^[1]。膜或膜脂的流动性还与植物抗逆性, 尤其是抗冷性呈一定相关性^[1~5]。膜流动性随着环境条件和生理功能的变化而不断受到控制和调节, 不但表现在变化程度, 而且表现在质的方面, 如相变和相分离。在相变温度时, 流动性发生较大变化。每种膜脂由于其组分不同而有其各自的相变温度。目前从不同角度对膜或膜脂流动性进行研究的主要物理技术有差示扫描量热法 (differential scanning calorimeter, 简称 DSC)、电子自旋共振 (electron spin resonance, 简称 ESR) 及荧光探针 (fluorescence probes, 简称 FP)。本文介绍这 3 种技术的原理及其应用。

1 DSC 及实验技术

1.1 原理

DSC 采用的是“零位平衡”原理^[6]。由一对放置样品和热惰性参比物的量热计组成, 按一定的程序升温或降温, 当达到某温度, 膜 (膜脂) 样品伴随着吸热或放热反应发生相转变, 此时量热计立即实施功率补偿, 通过把热量输给样品或参比物以维持两支架的温差为零, 并记录保持这些等温条件所需的热量随时间或温度的变化关系。根据 DSC 曲线中峰出现或消失点可定性得到热致相变温度, 曲线峰面积与相变的热量变化成正比例。

1.2 制样技术

为使 DSC 曲线具有最佳的峰锐度和分辨率, 样品与样品盘之间要有尽可能大的热接触, 即使应使样品呈薄膜或细颗粒状^[6]。分离的生物膜悬浮液可直接用作样品; 膜脂分为以薄膜或脂质体形式存在的液体样品和以离心沉淀物为样品两类。溶在氯仿中的脂在氮气流下除去大部分溶剂, 再真空干燥 3 h, 迅速加入 3 倍重量的 20 mmol/L Tris 醋酸缓冲液 (pH 7.2, 内含 2 mmol/L EDTA), 密封样品盘, 或超声处理 2 min 制成脂质体, 或在 25℃ 下水化 16 h 制成水散体薄膜。与以上相同的类脂缓冲液混合物可冷冻、融化 3 次, 在

收稿日期 1997-10-28

课题来源 浙江省教委资助项目

作者简介 杨玲, 女, 1965 年生, 硕士, 副教授

170 000 $\times$ g 下离心 1 h, 直接取沉淀物置于样品盘中密封。类脂量约 12 mg, 对照盘中是 6 mg 湿的 Sephadex, 它提供了类似于样品盘中脂混合物的对流条件^[5]。

1.3 测定

DPPC 为美国 Sigma 公司产品, 用 Perkin-Elmer DSC-2 型测试, 扫描速度 10 K/min, 灵敏度 0.84 mJ/s。

1.4 结果

DPPC 的吸收峰是脂分子从凝胶态转变为液晶态的结果, 而放热峰是上述逆过程的结果 (图 1)。吸热峰结束拐点和放热峰起始拐点指示膜脂热致相变起始温度。吸热峰的面积越大, 相变温度越低说明样品的流动性越高。因此, DSC 可以测定膜的流动性程度。离体的脂或脂质体已检测到相变现象, 膜流动性的变化可能与个别膜脂的相变有关^[1,3]。

1.5 讨论

由降温曲线所得相变温度比升温曲线的滞后 0.5 $^{\circ}$ C (图 1), 这种现象尤其在脂的混合物中较为明显^[5]。鉴于此, 在进行脂间或种、品种间脂相变温度比较时, 统一使用类似自然状况的降温曲线; 另 DSC 曲线是由动态法得到的“总热量”变化曲线, 故受到动力学因素的影响, 所以还要选用相同的较低降温速率。

用 DSC 研究生物膜具有明显的优点, 方法简便; 研究时不需要在样品中添加标记物质, 因而不会破坏膜的原来状态, 可以快速、连续地记录相变过程。但 DSC 法缺乏特异性^[6]。

2 ESR 波谱技术

2.1 原理

所谓自旋标记方法就是将本身足够稳定、对测定体系扰动甚微的一顺磁性报告基团, 结合到被研究物质的某个位置上, 借助于报告基团的 ESR 波谱参数敏感的变化来反映周围环境的物理、化学性质^[7]。氮氧自由基是一类理想的标记化合物, 其未偶电子和核磁矩的相互作用使 X 波段 ESR 波谱发生超精细分裂, 得到等强度、等距离的三线谱。氮氧自由基 ESR 波谱的超精细分裂常数 A 、线宽以及三条谱线的相对强度在不同情况下是不同的, 因而可以提供许多信息^[7]。

2.2 自旋标记物的标记

用于研究膜脂流动性的自旋标记物主要有脂肪酸-噁唑氮氧基和吡啶氮氧基两种。前者的形状同膜中类脂链十分相似, 最常用的是 5NS, 12NS, 16NS (5, 12, 16-氮氧基硬脂酸), 因氮氧基的位置不同, 从而插入后的 ESR 波谱分别反映了膜双层表面、类脂链中间和双层中央的信息^[7]。把溶在乙醇中的 0.1 mol/L 此类标记物加到生物膜悬浮液中, 或

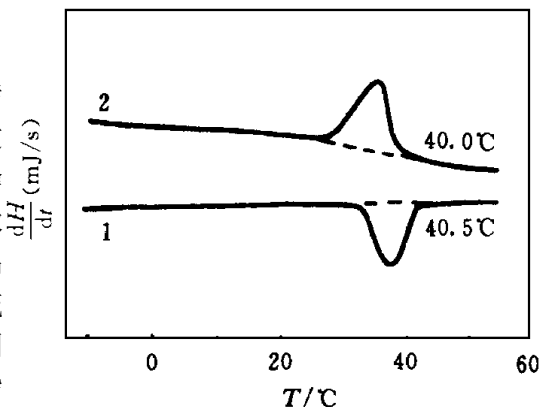


图 1 DPPC 的 DSC 图谱

1. 升温曲线; 2. 降温曲线

12 g / L 的 0.1 mol / L Tris 缓冲液 (pH7.2) 类脂中, 最终浓度控制在 10^{-4} mol / L^[1,8]。超声或在涡流搅拌器上快速搅拌 5 min 后装入毛细样品管。

哌啶氮氧基型自旋标记物的代表是 TEMPO (2, 2, 6, 6 四甲基哌啶 -1- 氮氧基) 把真空干燥的 35~ 40 μ mol 类脂样品悬浮在 200~ 250 μ L 的 0.01 mol / L 磷酸钠缓冲液 (pH7.2) 中, 在高于样品相变温度下涡流搅拌, 加入 75 μ L 的 TEMPO (2 mmol / L), 类脂最终浓度为总重量的 8% ~ 11%^[9]。

2.3 测定

用日本产 JES-FE1XG 型顺磁共振波谱仪, 温控精度为 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。实验条件: 微波功率 5 mW, 磁场 (3 300 $\pm$ 50) G, 扫描时间 2 min, 放大倍数 $\times 100$, 响应时间 0.1 s, 变温速率 $10^{\circ}\text{C} / \text{h}$ 。

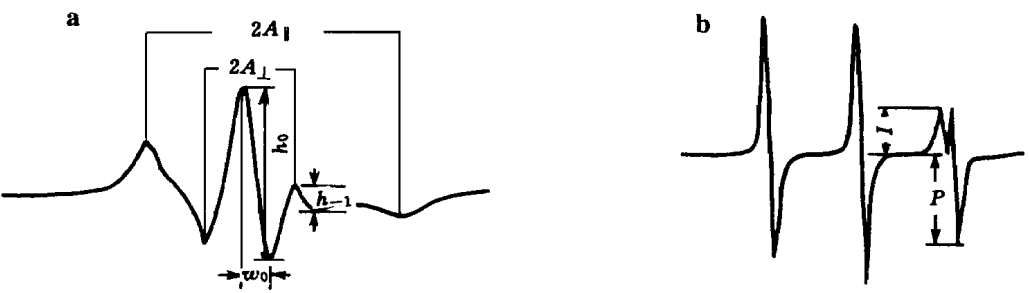


图 2 两种标记物的 ESR 波谱
a. 脂肪酸自旋标记的 ESR 波谱; b. 自旋标记 TEMPO 的 ESR 波谱

2.4 结果

从脂肪酸氮氧基标记物的 ESR 波谱 (图 2a) 上可测量内外端超精细劈裂距离 ($2A_{\parallel}$, $2A_{\perp}$), 并计算出反映分子取向平均变化的序参数 s 及反映分子运动快慢的旋转相关时间 τ_c : $s = 0.568(A_{\parallel} - A_{\perp}) / a'$, $a' = 1/3(A_{\parallel} + 2A_{\perp})$; $\tau_c = 6.5 \times 10^{-10} \times W_0 [(h_0 / h - 1)^{1/2} - 1]$ s. $2A_{\parallel}$, s 和 τ_c 值都可以反映膜或膜脂流动性的大小, 数值越大, 流动性越小。以 $\lg \tau_c$ 对 $1/T$ 作图, 得到 Arrhenius 图 (图 3a), 其折点便是相变温度^[1,2,8]。

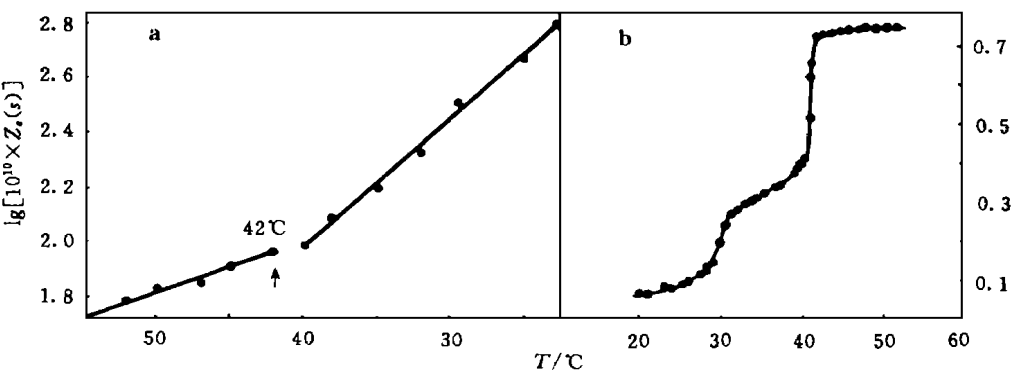


图 3 波谱参数对 T 作图

a. 12N S 标记 DPPC 的 Arrhenius 图; b. DPPC 的 TEMPO 参数 s 对 T 作图

基于各向性的 g^{-1} 值和分裂常数 A 同介质的极性有关, 可以用 TEMPO 测量类脂链的相变温度^[7,9]。高场线谱中信号 P 来自亲水区的 TEMPO, H 来自疏水区的 TEMPO, 定义 $f = H/(H+P)$ 为 TEMPO 参数 (图 2b), 以 f 对温度作图 (图 3b), f 值迅速增加时的温度, 即为碳氢链的相变温度。

2.5 讨论

由于自旋标记物的分子不可能与被测生物样品的自然组分完全一样, 因此多少会产生干扰, 可通过使用不同结构的标记物等策略尽量减少。DSC 是热致相变的唯一直接测试方法, ESR 不过是间接证据。在用 Arrhenius 图和 TEMPO 参数 f 确定相变温度时, 样品只局限于离体的膜脂, 而不能用于生物膜, 因为折点是否与蛋白质变性有关存在着争论^[10]。与 DSC 技术相比, ESR 测定过程长, 计算繁琐; 但所用样品少, 结果较为量化。

3 荧光探针法

3.1 原理

有些物质本身荧光很弱或不发光, 可以利用某些试剂与之结合, 以形成发光的络合物等再进行测定, 这就是荧光探针技术^[11]。用于测定膜或膜脂流动性的荧光探针属非极性有机探针, 其荧光强度 (F) 能反映膜脂的流动性, F 愈大, 流动性愈小^[2]。荧光偏振是由于分子结构的各向异性而表现出荧光发射特征, 用公式 $P = (F_{\parallel} - GF_{\perp}) / (F_{\parallel} + GF_{\perp})$ 计算, 还可得到偏振率 $F_{\perp} / F_{\parallel}$ ^[3], $F_{\parallel}$ 是起偏器和检偏器的矢量方向互相平行时的荧光强度, $F_{\perp}$ 是它们互相垂直时的荧光强度, 校正因子 G 为水平偏振光对垂直偏振光的透射效率比, 不同的仪器和不同波长, G 值不同^[11]。当 $P = 0$ 时, 为完全不偏振; $P = 1$ 时, 为完全偏振。当 P 在 -1 和 $+1$ 之间时, 为部分偏振。 P 值越大, 流动性越小; 反之, 流动性越大^[2,12]。经偏振入射光激发后, 其发射荧光是各向异性的, 因此同时可用公式 $r = (F_{\parallel} - F_{\perp}) / (F_{\parallel} + 2F_{\perp})$ 计算稳态各向异性^[13]。以 $\lg F$, $F_{\perp} / F_{\parallel}$, r 或 P 对 $1/T$ 作图, 其折点便是相变温度^[3,4,13]。

3.2 荧光探针的标记

测定膜或膜脂流动性的荧光探针主要有 DPH (1, 6-二苯基-1, 3, 5-乙三烯) 和 trans-PnA (反式十八碳四烯酸)。DPH 可掺入到细胞膜脂的烃链区, 是比较敏感的常用探针^[2]; 由于 trans-PnA 的荧光会被叶的色素淬灭, 所以只能用于分离的膜脂^[3]。

DPH 标记生物膜或膜脂 吸取 $20\mu\text{L}$ 溶解在四氢呋喃中 2 mmol/L 的 DPH (Sigma 产品), 在剧烈搅拌下加到 5 mL 的 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2) 缓冲液中, 避光条件下振荡 15 min , 以 $1:1$ (v:v) 的比例与 0.6 g/L 膜脂悬浮液或含蛋白质 2 g/L 的生物膜悬浮液混合, 25°C 下暗保温 $2\sim 3\text{ h}$ ^[12]。

trans-PnA 标记膜脂 在 0.8 mg 膜脂中, 加入 6 mL 的 pH 7.2 缓冲液 (100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Heps/NaOH 或 5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Heps/NaOH), 超声制成脂质体。加入溶于 10 mg/L BHT 乙醇中 1.2 mmol/L 的 trans-PnA 或 1.8 mmol/L 的 trans-PnA 甲酯, 液体与荧光探针的摩尔比约为 $100:1$, 用涡旋搅拌器混合^[3,4]。

3.3 测定

荧光探针与类脂分子上非极性的烃链区结合, 荧光峰、激发峰往往出现蓝移, 并且不同公司生产的探针纯度不一, 因此标记的样品应在高精度荧光光度计上选择激发波长。

荧光光度计为 MPF-4, 光源为 150 W 氙灯, 激发波长 362 nm, 发射波长 432 nm。

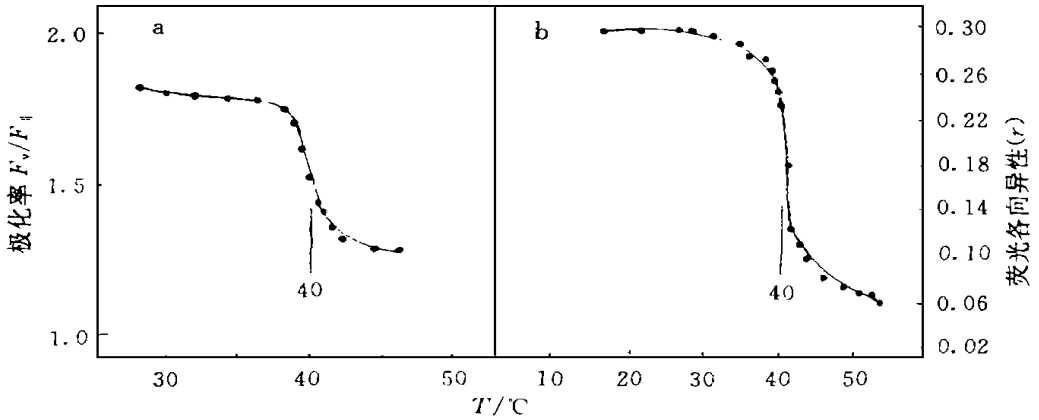


图 4 DPPC 脂质体的极化率 (a) 和荧光各向异性 (b) 对 T 作图

3.4 讨论

荧光分析灵敏度高, 可在激发和发射波长两方面进行选择, 并能提供较多的物理参数。由于它对环境因素敏感, 故在荧光测定时干扰因素较多。在膜脂的分离、纯化过程中要尽量避免使用润滑油和橡皮塞, 以防荧光污染; 所用溶剂应达到足够的纯度, 防止干扰待测样品的荧光光谱形状和强度^[11]。测定膜脂相变时, 耗时、计算繁琐。此外, 探针本身可能促进了与它直接接触区域的流动化。

参 考 文 献

- 1 杨 玲, 苏维埃. 磷脂酰甘油的热致相变与水稻抗冷性. 科学通报, 1994, 39(16): 1522
- 2 杨福愉, 邢善如, 陈文雯, 等. 抗冷与不抗冷水稻线粒体膜流动性的比较. 植物学报, 1986, 28(6): 607
- 3 Murata N, Yamaya J. Temperature-dependent phase behavior of phosphatidylglycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plants. Plant Physiol, 1984, 74: 1016
- 4 Pike C S, Berry J. Membrane phospholipid phase separations in plant adapted to or acclimated to different thermal regimes. Plant Physiol, 1980, 66: 238
- 5 Raison J K, Wight L C. Thermal phase transitions in the polar lipids of plant membranes. Biochim Biophys Acta, 1983, 731: 69
- 6 傅亚珍. 差示扫描量热法 (DSC) 及其在生物学和生物化学中的应用 (二). 生物化学与生物物理进展, 1982, (2): 26
- 7 张建中, 赵保路. 自旋标记物 ESR 波谱的基本理论 and 应用. 北京: 科学出版社, 1987. 34
- 8 Raison J K, Lyons J M. Temperature-induced phase changes in mitochondrial membranes detected by spin labeling. J Bio Chem, 1971, 246: 4036
- 9 Shimshick E J, McConnell H M. Lateral phase separation in phospholipid membranes. Biochem, 1973, 12: 2351
- 10 Martin B. Arrhenius plots and the involvement of thermotropic phase transitions of the thylakoid membrane in chilling impairment of photosynthesis in thermophilic higher plants. Plant Cell Environ, 1986, 9: 323
- 11 郭尧君. 荧光实验技术及其在分子生物学中的应用. 北京: 科学出版社, 1983

- 12 屠亚平,杨福愉.跨膜 Ca^{2+} 梯度通过调节膜脂的物理状况影响重组腺苷酸环化酶构象与活力.生物化学与生物物理进展, 1992, 24: 193
- 13 Shinitzky M, Barenholz Y. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. Biochim Biophys Acta, 1978, 515: 367

DSC, ESR and FP for the Fluidity of Membrane Lipids

Yang Ling¹ Su Wei^{1,2}

(¹ Zhejiang Normal University, Zhejiang, Jinhua 321004)

(² Shanghai Institute of Plant Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

Abstract This paper deals with the principle and application of three physical methods— differential scanning calorimeter (DSC), electron spin resonance (ESR) and fluorescence probes (FP) for the analysis of the fluidity of membrane lipids. The characteristics of the three methods are compared. And the phase transition temperature of DP-PC is determined with the methods above.

Key words DSC, EPS, FP, lipid fluidity