莱氏衣原体膜磷脂对脂质体相变及分相的影响

黄　芬　吴玉薇　张占勤

（中国科学院生物物理研究所）

生物膜主要由类脂与蛋白质所组成．膜类脂的相变特性直接影响生物膜的各种生理功能．研究膜类脂的相变，过去曾用差示扫描量热法、自旋标记顺磁共振波谱以及核磁共振波谱等技术．近年来采用冰冻断裂电子显微镜技术来研究人工合成磷脂脂质体的相变与分相；从冰冻断裂面上可直接观察到脂质体的晶相，液晶相以及分相图相．Stewart 等[1]曾用差示扫描量热法与冰冻断裂电子显微镜等技术研究从牛脑中分离出来的磷脂酰丝氨酸（PS）对纯磷脂脂质体相变的影响．本文报道从莱氏衣原体膜上分离出的磷脂酰甘油对纯磷脂脂质体晶相图形的改变．

材料与方法

材料　二棕榈酰磷脂酰胆碱（DPPC）、二豆蔻酰磷脂酰胆碱（DMPC）均系美国 Sigma 公司产品；磷脂酰胆碱（PC，从卵黄中提取）为英国 BDH 产品；莱氏衣原体 AIH089 菌种系江苏省农业科学院畜牧兽医所赠与；磷脂酰甘油（PG）（从莱氏衣原体膜上分离[2]）．

脂质体制备　在 10 毫升小烧杯中，秤取一定量磷脂或磷脂混合物，加入氯仿使磷脂溶解．然后真空干燥使形成薄层，并在冰箱中放置过夜．将干燥磷脂加入一定体积的重蒸馏水，使磷脂悬液最终浓度为 40 毫克/毫升，放入塑料小管中，在国产超声波发生器中超声波处理 10 分钟（10—15 千赫，250W），超声处理时温度为 45℃，则形成脂质体．

冰冻断裂电子显微镜技术　本实验用我所自行改装的简易冰冻断裂装置[3]，脂质体在冰冻断裂前，先加入甘油，使脂质体在甘油悬浮，甘油最终浓度为 12%，将脂质体悬液在实验要求温度平衡二小时，取样滴入相应温度的样品台中，迅速投入液氮冷冻，冷刀断裂，抽真空达 5×10^{-5}Torr，用铂-碳投影．复型用氯仿-甲醇清洗，置于铜网上，在 JEM-100cx 电子显微镜下进行观察．

结果与讨论

用 DPPC 形成的脂质体（相变温度为 41.6℃）在冰冻断裂前平衡温度为 34℃，断裂面上可见有规则的带状条纹（晶相），带状条纹间周期性重复距离大部分约为 140—160 Å（图 1）．当 DPPC 脂质体平衡温度在其相变温度以上（60℃）时，脂质体冰冻断裂面出现无序波纹（液

本文 1981 年 9 月 5 日收到．

晶相)(图 2). 用 DPPC 与 DMPC 按等克分子比例混合形成脂质体,平衡温度为 34℃,从断裂面上可观察到有规则的带状条纹与无序波纹同时存在(图 3). 由于 DMPC 脂质体的相变温度为 24℃,因而规则带状条纹为 DPPC 的晶相结构,而无序波纹为 DMPC 的液晶相结构. 此时为固液共存状态,称为分相现象.

若在 DPPC 中加入 10% 卵黄 PC 形成脂质体,在 0℃ 平衡后,用纯 DPPC 脂质体作为对照,在含 10% 卵黄 PC 的 DPPC 脂质体冰冻断裂面出现的规则带状条纹周期性重复距离变宽,约为 380 Å (图 4). DPPC 加入莱氏衣原体膜上分离出的 PG,当 PG 加入量为 34% 时,34℃ 温度平衡,脂质体断裂面带状条纹间距变宽,有时在宽的条纹中出现细的条纹表示有

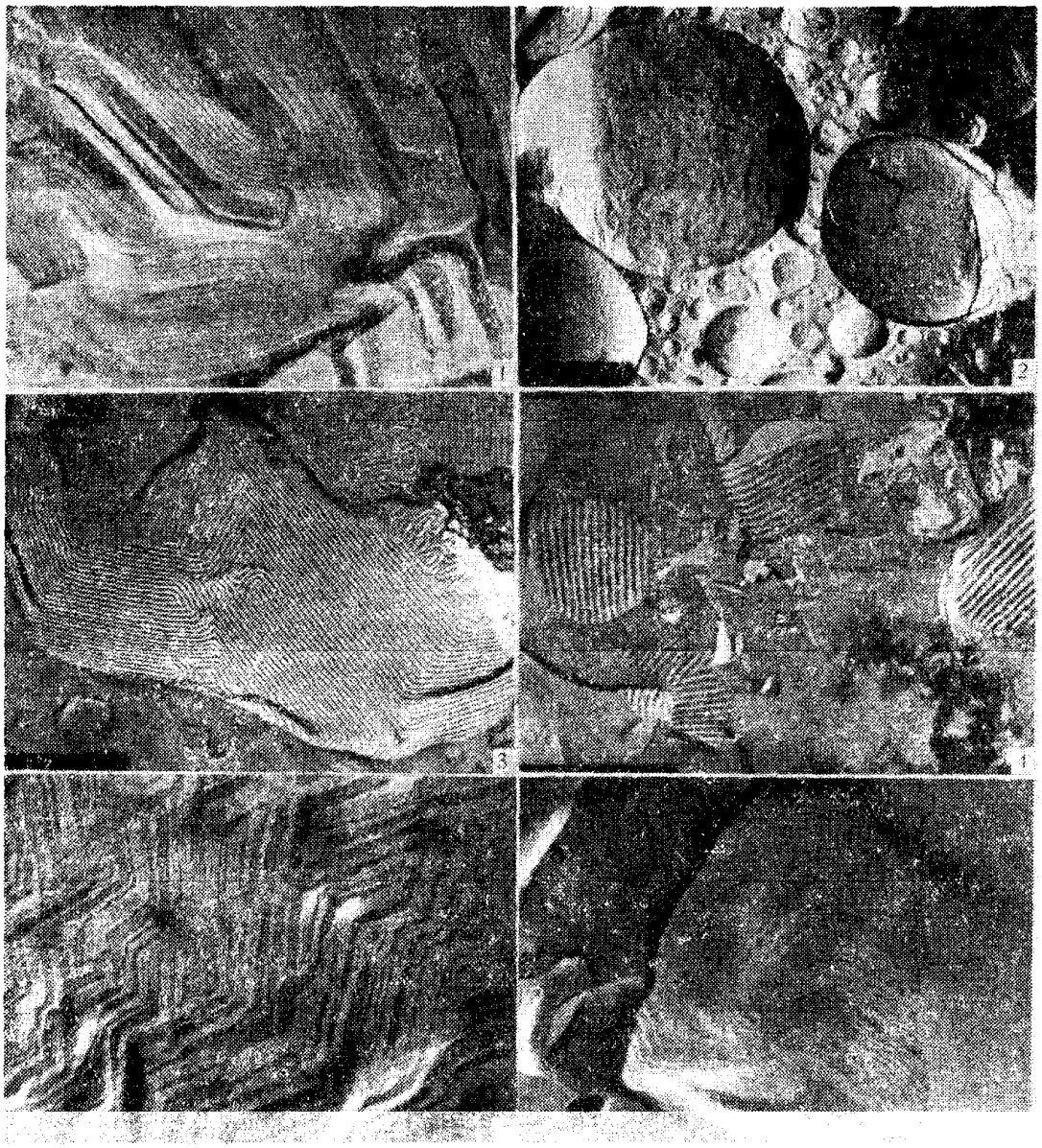

图 1—6

1. 100% DPPC 脂质体在34℃ 平衡后的冰冻断裂电镜照片, ×50,000;
2. 100%DPPC 脂质体在 60℃ 平衡后的冰冻断裂电镜照片, ×30,000;
3. DPPC:DMPC (50:50 克分子%) 脂质体在 34℃ 平衡后的冰冻断裂电镜照片, ×30,000;
4. DPPC 脂质体含 10% 卵黄 PC 在 0℃ 平衡后的冰冻断裂电镜照片, ×30,000;
5. DPPC 脂质体中加入 34% 从莱氏衣原体膜上提取的 PG, 在 34℃ 平衡后的冰冻断裂电镜照片, ×30,000;
6. DPPC 脂质体中加入 50% 从莱氏衣原体膜上提取的 PG, 在 34℃ 平衡后的冰冻断裂电镜照片, ×30,000

序状态发生扰乱(图5)当 DPPC 与 PG 比例为 50:50(w/w)时，则可见有规则带状条纹已变为细波纹状，波纹中又出现重叠的深浅间隔(图6)．这种变化可能为脂质体从结晶状态向液晶状态转变的一个中间阶段．

采用冰冻断裂电子显微镜技术研究磷脂脂质体的相变及分相，近 10 年来已开展一些工作．Verkleij 等[4]曾用 DMPC，二反油酰磷脂酰胆碱（DEPC）等磷脂分别形成脂质体．结果发现，在高于脂质体相变温度时，冰冻断裂面为光滑状，低于其相变温度时，可观察到有规则的带状条纹．Grant 等[5]用 DPPC 与 DEPC 以等克分子比例混合形成脂质体，经 30℃ 平衡后，可见有规则带状条纹与无序波纹共存．Stewart 等发现：在 DPPC 中，加入 30% PS 时，对脂质体带状图形有明显影响；如加入 50% PS 时，脂质体则产生梯田状图形．Copeland 等[6]在 DMPC 脂质体中加入不同比例胆固醇，当胆固醇在 DMPC 中含量为 15 克分子%以内时，脂质体带状重复距离变宽，若胆固醇在 DPPC 中含量超过 20 克分子%时，脂质体冰冻断裂面完全呈光滑状．

生物膜上的类脂包括各种复杂的磷脂；磷脂中所含脂肪酸，从 12 个碳至 20 个碳不等，脂肪酸的饱和程度也不一样；因而一般从生物膜上分离出的磷脂形成脂质体后，在任何温度平衡均不能观察到晶相或液晶相图形．从我们实验结果可以看出，从卵黄中分离出来的 PC 加入 DPPC 后，对脂质体冰冻断裂面的晶相图形有明显影响．支原体是最小的原核细胞，细胞外只有一层质膜，没有细胞壁，细胞内无细胞内膜体系．莱氏衣原体是属于不需要提供胆固醇即能在培养基中生长的支原体．它的膜上磷脂，主要是磷脂酰甘油．这种磷脂中脂肪酸也比较复杂，在其甘油骨架上，第一位碳上主要为棕榈酸，第二位碳上主要是油酸，这两种脂肪酸占其总脂肪酸 80% 左右．我们从莱氏衣原体 AIH089 菌株膜分离出磷脂酰甘油，取其一定比例加入 DPPC 内，对 DPPC 脂质体晶相图形发生明显影响．若将 PG 按等量与 DPPC 混合形成脂质体，就不能观察到分相现象．这似乎意味着生物膜上类脂双层可能呈复合相状态，即使最简单的原核细胞支原体膜也是如此．

致谢：张兰萍同志协助磷脂提取及分析，鲁崎唔、吴莲英两同志提供电镜观察条件，谨此致谢．

参 考 文 献

[1] Stewart, T. P., Hui, S. W. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 550 (1979), 1—16.
[2] Veerkamp, J. H. & Broekhuyse, R. H., in *Biochemical Analysis of Membranes* (Ed. Maddy, A. H.) 1976, 252—282.
[3] 吴玉薇、鲁崎唔等，生物化学与生物物理进展，1979, 1: 46—48.
[4] Verkleij, A. J. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 238 (1972), 326—332.
[5] Grant, C. W. M., Wu, S. H. W. & McConnell, H. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **363** (1974), 151—158.
[6] Copeland, B. R. & McConnell, H. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **599** (1980), 95—109.