

• 研究简报 •

巨型囊泡的侧向相分离与出芽

李莉 林美玉 邱枫* 杨玉良*

(复旦大学高分子科学系 聚合物分子工程教育部重点实验室 上海 200433)

摘要 用电形成法制备含三组分二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)/二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)/胆固醇(Chol)的巨型囊泡, 以 TR-DPPE 为荧光染色剂, 在荧光显微镜下直接观察膜的侧向相分离与微区相凸起出芽的耦合. 发现囊泡膜内的相分离具有诱导期, 相分离速度很快, 形成的微相区在整个囊泡球面上均衡分布. 各微相区的出芽不是同时进行, 为逐个随机发生. 每次出芽的时间小于 0.5 s. 分相与出芽的耦合使球面上的不同微区之间不会相互融合成更大的微区.

关键词 巨型囊泡; 侧向相分离; 出芽

Lateral Separation and Budding of Giant Vesicles

LI, Li LIN, Mei-Yu QIU, Feng* YANG, Yu-Liang*

(Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers of Ministry of Education, Department of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract Lateral phase separation and budding of giant vesicles prepared by electroformation with a model mixture, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)/1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC)/Cholesterol (Chol), were observed directly by fluorescence microscopy. It was found that the separation after a short retardation time was a fast process and the domains thus formed were regularly distributed on the surface of the vesicles. Budding of the microdomains occurred one by one and the time to finish a budding process was less than 0.5 s. The coupling of the separation and budding stopped further fusing and growing of the microdomains.

Keywords giant vesicle; lateral phase separation; budding

脂双层膜^[1]在生物体系中无处不在, 如细胞质膜, 细胞内的叶绿体、线粒体、高尔基体、液泡和内质网等的包覆. 这类双层膜大多由多组分的两亲性脂类分子构成, 分子的排列通常为极性基团朝外, 烃类尾链朝内, 形成一片双层分子层膜. 二维双分子层生物膜常常不是均相的, 而是在侧向上存在着复杂的微区(micro-domain), 这些微区易在膜内移动, 与细胞中的蛋白质运输及细胞内信息传递等重要过程密切相关^[2]. 细胞的微区形成与出芽是细胞的囊泡分泌、蛋白质定向运输的首要过程. 因此, 研究细胞膜侧向相分离及出芽的机制已是近年来膜生物学家与膜生物物理学家关注的中心之

一. Rothman 和 Schekman 就因发现了配合膜泡出芽与融合的普遍的分子结构而获 2002 年度的拉斯克(Lasker)基础医学研究奖. 但是直接研究细胞这些功能的机理仍有许多困难, 如尚未能用标准显微镜直接观察细胞膜中的微区, 原因是尺寸太小, 难以分辨. 近几年, 人们通过研究模型囊泡更深入地了解细胞膜侧向相分离与出芽的机理^[3-5], 提出了一些理论模型^[6-9]. 目前, 用显微法直接研究的实验报导还很少, 如 Allain 等^[10]观察到了管状囊泡在相分离界面处的断开, 认为是光引发胆固醇的氧化而触发了相分离, 用弹性膜理论证明两相间弹性常数的差异是管子断裂的原因; Staneva 等^[11]报导了磷脂

* E-mail: fengqiu@fudan.edu.cn; ylyang@fudan.edu.cn.

Received December 8, 2004; revised February 15, 2005; accepted March 17, 2005.

国家自然科学基金(No. 20221402)资助项目.

酶在囊泡表面的吸附引起膜弯曲进而出芽, 酶还调整了微区边缘的线张力, 使芽泡最终分离; Veatch 与 Keller^[12,13]研究了胆固醇含量及饱和磷脂的尾链长度对巨型囊泡膜侧向相分离温度与相形态的影响, 给出了部分温度下定性的三元相图; Baumgart 等^[14]借助双光子荧光扫描显微镜, 研究了某些特定组成的囊泡分相后的截面相分布图, 定性分析了膜弯曲弹性模量及线张力与对应相的形变及相区分布的关系. 但是, 有关球面囊泡上分相发芽的动态过程的研究尚未见报导. 本文用电形成法^[15]制备具有模型组分的巨型囊泡, 用荧光显微镜直接观察球面上的侧向相分离与微区相凸起发芽的耦合现象, 并首次观察到一种类似于成核-增长的出芽机制.

1 实验部分

1.1 材料

二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)和胆固醇(Chol)均购于 Sigma Chemical Co (美国), 荧光染色剂为德克萨斯红修饰的二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(TR-DPPE), 购于 Molecular Probes Inc (美国). Milli-Q 水, 电阻率 18.2 MΩ/cm. ITO 导电玻璃购于深圳南玻显示器件科技有限公司.

1.2 巨型囊泡的制备

样品溶液在室温下配制, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, DOPC/DPPC/Chol 的摩尔比为 1:1:1, 溶于体积比 9:1 的氯仿/甲醇中, 浓度为 1.9 mg/mL, 染色剂与溶质的质量比为 1:400.

将连有导线的 ITO 玻片置于 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱预热, 3 μL 上述样品滴在玻片导电层一面, 真空烘箱中保温约 20 h, 得到一完全干燥的干膜滴, 干膜随后在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 热水饱和的氮气下预水合 3~5 h, 使水汽完全渗入干膜各层之间. 将三层普通双面胶粘合在一起作为隔离片, 中间冲一 5 mm 内径的圆孔, 与带干膜的玻片和另一空白 ITO 玻片构成密闭水浴室, 轻放在 Linkam Co (英国)的 THMS600 热台上, 两玻片由导线与 XJ1631(上海新建仪器设备有限公司)信号发生器相连. 热台初始温度 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 加正弦交变外场(10 Hz, 0.6 V). 经过 2 h 孵化后, 以 $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 保温 20 min, 再以 $8\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 先降至 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 续之以 $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降至 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 等温观察.

1.3 显微镜观察

GV 在正置荧光显微镜(Olympas BX51, 日本)下观察, 物镜 $40\times$ (Semi-Achroplane, SLD, cor), 数值孔径 0.55. Pixelink 的 CCD 摄像头记录, 130 万像素. 采集软件为 Linkam 公司的 Linksys32DV. 摄像头在工作时被

人工强迫制冷以提高荧光图像质量.

2 结果和讨论

用显微镜原位观察不同温度下 DOPC/DPPC/Chol 混合物干膜的形成过程, 发现随着溶剂的挥发, 样品液滴周边首先形成极细小的粒状脂质体, 并作布朗运动. 这一区域的内边界同时快速向液滴中心推进, 部分脂质体相互融合而略微增大, 但由于溶剂的挥发速度大于边界推进速度, 最终得到的是不均一的干膜. 干膜各区域成分的差异使由此水合生长出来的囊泡的成分很难保持完全一致. 实验中也发现: 同一视野中, 各个囊泡发生相分离的诱导期不同, 分相后两种相区域各自所占的比例也不同. 由于该体系液-液两相共存的范围很宽^[14], 由摩尔比 1:1:1 的 DPPC/DOPC/Chol 体系制备的囊泡大多能在同一温度下发生相分离.

胆固醇在微区的形成及其功能中所起的作用非常复杂, 在 DPPC 及 DOPC 中的溶解度也无法在显微镜下原位确定. 本文实验中, 当 DPPC/DOPC/Chol 体系从高温均相区淬冷到液-液两相区后, 应得到以高相变温度磷脂(DPPC, $41.4\text{ }^{\circ}\text{C}$)为主的短程有序液相与低相变温度磷脂(DOPC, $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$)为主的无序液相. 通常认为这时的胆固醇倾向于富集在短程有序相中^[15], 荧光探针 TR-DPPE 被认为富集在以 DOPC 为主的无序液相中^[13]. 体系相分离后, 明亮的红色区域对应较柔软易流动的 DOPC 富集相, 较暗的区域是比较刚性的 DPPC/Chol 富集相.

当样品从 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的均相区淬冷至 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后, 视域中部分囊泡表面开始出现微弱的不均匀起伏, 由于荧光的光晕作用, 这种不均匀性起初只能肉眼感觉, CCD 记录的图像上无法分辨, 但数秒钟之后, 这种微弱的不均匀起伏就转变成具有足够清楚反差的两相, 明亮的红色液滴分散在暗色球面上. 如果球面比较完整, 没有与其它囊泡接壤或缺陷, 液滴经最初的自发调整(迁移及融合)后将均衡地分布在球面上, 但若球面不完整, 部分液滴会自发迁移并沿缺陷聚集.

相分离后, 随着微区的形成与融合长大, 部分微区开始出芽, 但荧光下常常难以分辨巨型球形囊泡正面的微区是否已出芽, 除囊泡很小的情况或聚焦在巨型囊泡圆周上的情况. 而明场下, 出芽的微区呈暗色的圆形液滴, 未出芽的微区则与周围基底没有区别. 图 1(a)和(b)分别为同一巨型囊泡的明场和荧光照片, 时间间隔为 16 s. 图 1(b)中, 与图 1(a)暗色液滴相对应的微区特别明亮, 由此可以判断该微区已经出芽.

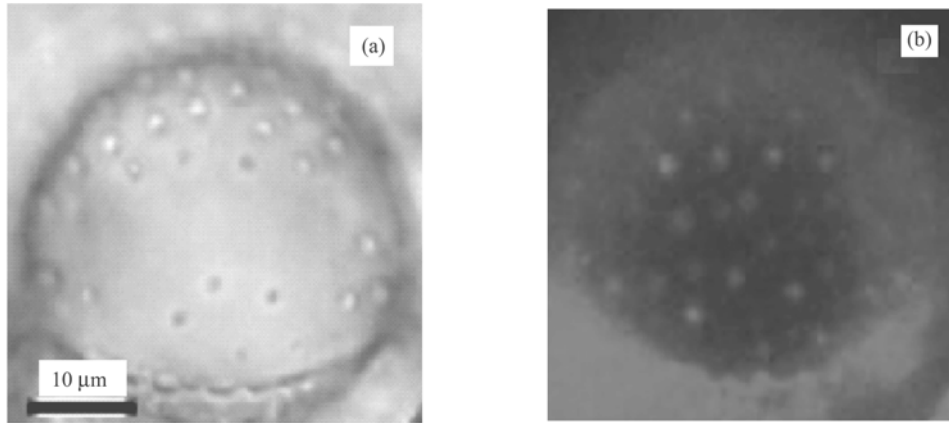


图 1 巨型囊泡出芽后，明场与荧光照片的比较

(a)为明场像，囊泡表面只能看到凸芽；(b)为荧光像，特别明亮的微区与图(a)中的凸芽对应。

Figure 1 Comparison of budding vesicles in bright and in fluorescence

(a) In bright field, only buds appear on surface; (b) the same budding vesicles in fluorescence, both domains and buds are seen.

出芽与微区的融合过程是相互关联的，随着膜表面大。这时的出芽是逐个随机先后出现，过程非常快。本实验以每秒2帧的频率拍照，出芽发生在两次记录之间，如图2(a)与(b)，(c)与(d)，(e)与(f)所列三组明场照片的时间间隔均为0.5 s，每组照片上箭头所指处均有一个新芽出现。因此，和原先的理论普遍推测的 spinodal 机理不同，我们观察到的可能是一种类似成核-生长机理。

图3是明场下同一样品中某些不完整囊泡上凸芽与球面的连接情况。可见凸芽与母球相互连通，各个凸芽的形状不完全相同，有的呈管状，管端光滑或狭小，有的呈水滴状，但颈部位置不在球面上。不管凸芽的形状如何，凸芽在球面上接口的直径几乎相同，与

Lipowsky^[9]的模型不同。他认为微区引起出芽，在与母体连接处形成颈缩，最后在该处断裂，分离出小囊泡。而在本实验中，实验后期凸芽很稳定，放置一天未见分离，也未见完整球形囊泡上凸芽与凸芽的相互融合，只在不完整球面上见到极个别相邻凸芽发生了融合。

引起囊泡分相后出芽的原因可能是淬冷深度较深，冷却速度较快。这时，囊泡膜与溶剂中单体两亲分子的交换速率跟不上膜与囊泡内溶剂的收缩率差异，使囊泡存在内外压差。一旦相分离发生，较柔软的一相通过形变出芽释放压差，另一相由于弯曲刚性增加必须保持在较小的曲率，这就抑制了凸芽与凸芽的融合，甚至抑制了部分微区的出芽，使得微区与凸芽共存的球面成为比

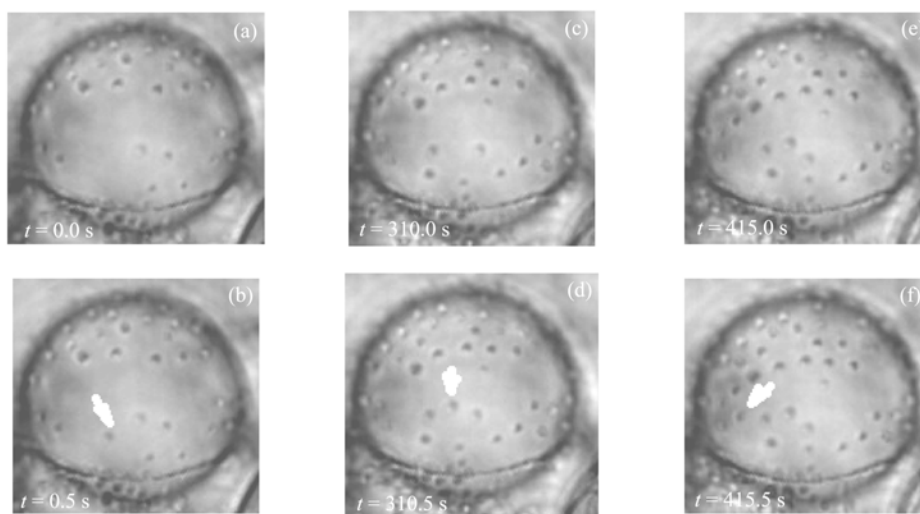


图 2 微区出芽瞬间的明场记录

(a)和(b)，(c)和(d)，(e)和(f)为三组照片，分别对应一个新芽的出现，位置见图中箭头所指。标尺为10 μm

Figure 2 Evolution of budding process in bright

(a) and (b), (c) and (d), (e) and (f) are three sets of CCD pictures respectively. Each set shows the birth of a new bud as marked by arrows. Scale bar=10 μm

较稳定的构象. 微区出芽的现象不仅出现在球形囊泡, 也发生在管形囊泡, 不同的是管形囊泡会因相分离出芽而剧烈形变接近球形. 图 4 是细颈相连的胃形球形小囊泡与管形囊泡, 样品制备时直接水合, 未加外电场. 图 4 (a)为相分离初期囊泡未发生形变时的形态; (b)为相分离及开始出芽时的形态; (c)是相分离后期的形态. 可见管形囊泡相分离较早, 微区相互融合并出芽使管子发生

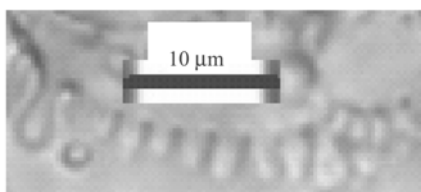


图 3 凸芽的形状及与母体的连接方式

Figure 3 Shapes of the buds and the connection between the buds and their parent vesicle

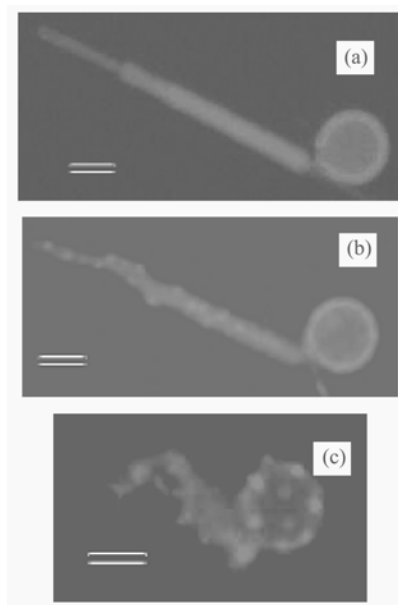


图 4 管形囊泡与球形囊泡的侧向相分离、出芽及形变

(a)为相分离初期; (b)为开始出芽时的形态; (c)为相分离后期的形态. 图中标尺为 10 μm

Figure 4 Lateral phase separation, budding, and deformation of tubular and sphere vesicles

(a) Initial stage of phase separation; (b) morphology of vesicles during budding; (c) late stage of separation. All scale bars are 10 μm

强烈的形变, 倾向于使曲率减小; 而该球形囊泡是一内翻的几乎闭合的双层囊泡, 发生相分离所需的诱导期明显较长, 出芽后的形态依然保持为球形. 因此, 囊泡的形状及膜厚对分相、出芽与形变都会产生很强的影响.

3 结论

巨型球形囊泡相分离与出芽耦合的现象及形态说明, DOPC/DPPC/Chol 体系相分离后的短程有序液相与无序液相的弯曲刚性差别较大, 两相之间的界面能较高. 相分离形成的微区经初期的融合调整后保持相对稳定的分布, 相界面不会因与后继相分离微区的进一步融合而长大, 而是通过出芽, 或使原凸芽继续长大的方式来达到体系能量最低.

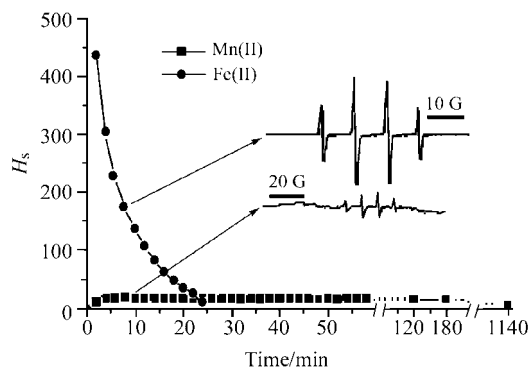
References

- 1 McKee, T.; McKee, J. R. *Biochemistry: An Introduction*, 2nd ed.; Science Press/McGraw-Hill Companies Inc, Beijing, 2000, p. 215.
- 2 Simans, K.; Ikonen, E. *Nature* **1997**, 387, 569.
- 3 Menger, F. M.; Gabrielson, K. D. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 2091.
- 4 Binder, W. H.; Barragan, V.; Menger, F. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, 42, 5802.
- 5 Seifert, U. *Adv. Phys.* **1997**, 46, 13.
- 6 Lipowsky, R. *J. Phys. II France* **1992**, 2, 1825.
- 7 Jülicher, F.; Lipowsky, R. *Phys. Rev. Lett.* **1993**, 70, 2964.
- 8 Kumar, P. B. S.; Gompper, G.; Lipowsky, R. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, 86, 3911.
- 9 Taniguchi, T. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, 76, 4444.
- 10 Allain, J.-M.; Storm, C.; Roux, A.; Ben Amar, M.; Joanny, J.-F. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, 93, 158104-1.
- 11 Staneva, G.; Angelova, M. I.; Koumanov, K. *Chem. Phys. Lipids* **2004**, 129, 53.
- 12 Veatch, S. L.; Keller, S. L. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, 89, 268101.
- 13 Veatch, S. L.; Keller, S. L. *Biophys. J.* **2003**, 85, 3074.
- 14 Baumgart, T.; Hess, S. T.; Webb, W. W. *Nature* **2003**, 425, 821.
- 15 Angelova, M. I.; Soléau, S.; Méléard, P.; Faucon, J. F.; Bothorel, P. *Prog. Colloid Polym. Sci.* **1992**, 89, 127.

(A0412081 LU, Y. J.; LING, J.)

Manganous Participation in Fenton Like Reaction Studied by HPLC and ESR Spectroscopy

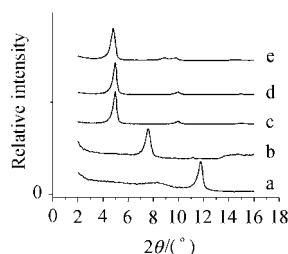
YU, Huai-Dong; FANG, Ru; CHEN, Shi-Ming; ZOU, Guo-Lin*
Acta Chimica Sinica **2005**, 63(14), 1357



In 10 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4), the different behavior of Fe^{2+} and Mn^{2+} in Fenton reaction system has been shown in the figure. Fe^{2+} (without EDTA) initiated $\bullet\text{OH}$ radical much more rapidly and drastically than Mn^{2+} participated Fenton like reaction at the beginning of the reaction. However, the signal could not be maintained for more than 30 min. Yet the signal of the $\bullet\text{OH}$ radical adduct induced by Mn^{2+} was much more stable (19 h). The ordinate represents the ratio of EPR signal height (H_s) of the DMPO/ $\bullet\text{OH}$ spin adduct. EPR spectra obtained with 0.03% H_2O_2 , 100 mmol/L DMPO and 1.2 mmol/L Mn^{2+} were compared with those of 1.2 mmol/L Fe^{2+} in the presence of phosphate buffer.

Study on the Different Layered Zirconium Phosphates Hosts for Intercalating Soluble Cationic Porphyrins

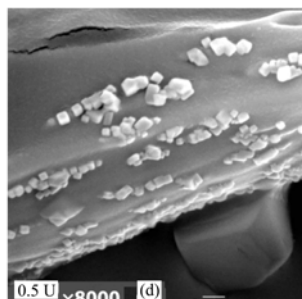
WANG, Hai-Yan; HAN, Da-Xiong; XIANG, Ming-Hui; PENG, Tao; LI, Na*; LI, Ke-An
Acta Chimica Sinica **2005**, 63(14), 1361



The different intercalation behavior of TMPyP into α -ZrP, γ -ZrP and *n*-butylamine (BA) pre-intercalated zirconium phosphates was investigated by XRD, visible spectrum and IR spectrum.

Synthesis of PMMA/Inorganic Nanoparticle/EG Nanocomposite through Reverse Micelle Template and its Characterization

MO, Zun-Li*; SUN, Yin-Xia; CHEN, Hong; WANG, Kun-Jie; LIU, Yan-Zhi; LI, He-Jun
Acta Chimica Sinica **2005**, 63(14), 1365

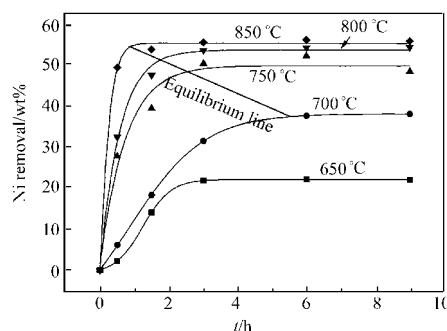


Thus a new ternary graphite intercalation nanocomposite was synthesized successfully.

The PMMA/inorganic nanoparticle/EG nanocomposites were efficiently prepared by polymerization of methyl methacrylate (MMA) *in situ* through reverse micelle template, in which the methyl methacrylate (MMA) and CHCl_3 were used as oily phase. It can be clearly seen that the graphite layers and PMMA connected to each other and formed a continuous matrix in this figure. At the same time, some inorganic nanoparticles were found which were uniformly dispersed on the graphite surfaces.

Removal of Ni on FCC Catalyst Reduced by Hydrogen

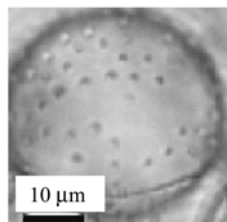
LI, Chun-Yi*; YUAN, Qi-Min; TIAN, Hua; SHA, You-Xin; SHAN, Hong-Hong; YANG, Chao-He
Acta Chimica Sinica **2005**, 63(14), 1371



NiAl_2O_4 and Ni_2SiO_4 on the FCC catalyst could be reduced by H_2 to metal Ni, which was dissolved by dilute nitric acid to form $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$. Thus, Ni was removed from the catalyst. High temperature favors the reduction of Ni species and their movement from the catalyst bulk to the surface. The movement was limited by equilibriums.

Lateral Separation and Budding of Giant Vesicles

LI, Li; LIN, Mei-Yu; QIU, Feng*; YANG, Yu-Liang*
Acta Chimica Sinica **2005**, 63(14), 1375



Evolution of lateral phase separation and budding processes on the vesicle surfaces was observed directly in both bright and fluorescence fields. It was found that the domains and buds are regularly distributed on the vesicle surfaces. The birth of a new bud was observed to occur within 0.5 s. The coupling of the separation and budding stopped further fusing and growing of the microdomains.