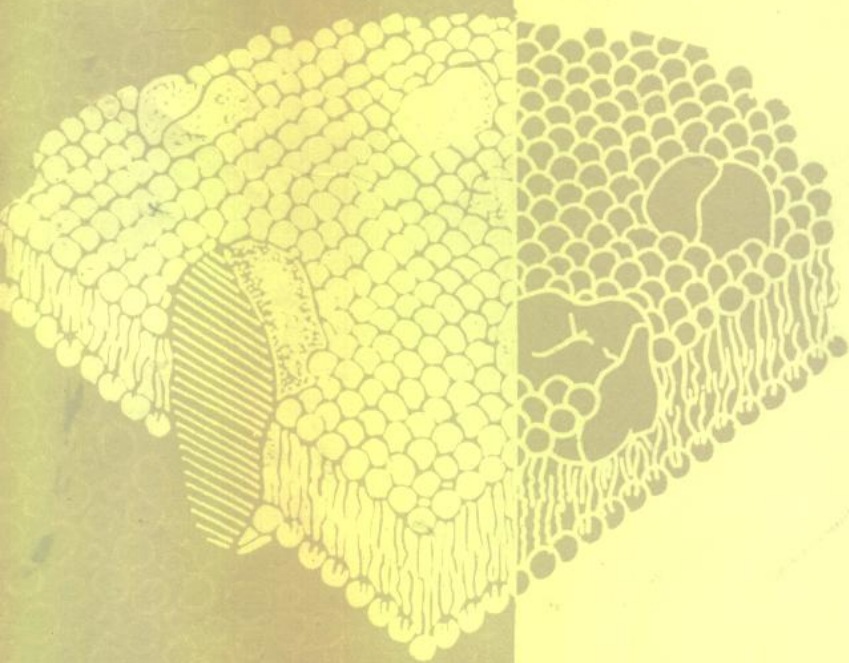


生物化学丛书

生物膜的 结构与功能

林其谁 编著



科学出版社

生物膜的结构与功能

林其谁 编著

科学出版社

1982

内 容 简 介

《生物化学丛书》是依据生物化学研究所开办的“生化训练班”的教材加以补充修改而成,将陆续以分册出版。

本分册主要从分子生物学角度介绍生物膜的基本知识,同时反映了有关研究的新进展。内容包括:生物膜的化学组成和结构;细胞的膜系统;生物膜的模拟;生物膜的传送作用;线粒体的结构与功能;生物膜的制备。

可供生化研究工作者及大专院校有关专业教师和高年级学生参考。

生物膜的结构与功能

林其谁 编著

责任编辑 吴铁双

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1982 年 11 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

1982 年 11 月第一次印刷 印张:5 1/4

印数:0001—5,000 字数:117,000

统一书号:13031·2093

本社书号:2857·13-10

定 价: 0.85 元

序 言

生物化学研究所举办的生化训练班始自 1950 年,开始时着重实验室训练,我们的目的是为了使青年生化工作者掌握这门学科研究的一些新方法、新技术。以后随着我所高研人员的增多,又添加了讲课内容,围绕当时的生化生长点,系统地讲述国际生化的新进展。课文内容逐渐发展充实,并结合在上海科技大学讲授高级生化课的需要,编写成高级生化训练班讲义。1960 年中国科学院在上海召开第一次全国生化学术会议,会议期间各地代表纷纷要求生化所举办一次大型高级生化训练班,为全国各有关单位培训生化人才。因此,生化所于 1961 年举办了一次有四百多学员参加的高级生化训练班,以系统介绍生化学科新知识为主,部分学员并参加了实验训练。十几年来,我们发现通过该次训练班学习的学员,大部分已成为各有关单位的生化科研或教学骨干。这个发现给予生化所同志以极大鼓舞。“文化大革命”中,高级生化训练班横遭批判,但 1972 年以后,各方面仍不断有呼声,要求生化所再次举办高级生化训练班。1976 年我们在所内作一次小型尝试,着重发挥部分中级科研人员在教学中的作用,从编写讲义到讲课。1979 年在中国科学院一局的催促和支持下,为克服住宿的困难,我们再次在沪、杭两地同时举行一次大型高级生化训练班,人数近五百人,课程内容大为扩充,包括十余年来进展最迅速的生化或分子生物学领域。如分子遗传、DNA 重组、生物膜、免疫生化等等。为适应国内广大生化工作者的需要,特将上述讲课内容整理成书,分册付印,定名为“生物化学丛书”。尚望国内同行对本书内容不吝批评指正,供今后再版时修改参考。

王 应 睐

目 录

序言

第一章 引言.....	1
第二章 生物膜的结构.....	3
第三章 细胞的膜系统.....	17
第四章 生物膜的模拟.....	22
第五章 生物膜的传送作用.....	27
第六章 线粒体的结构与功能.....	38
第七章 生物膜的研究与一些实际问题的关系.....	58
第八章 生物膜的制备.....	74
第九章 结束语.....	78
后记.....	79

第一章 引言

生物膜是细胞的重要组份，具有独特的结构与功能。早在 1885 年 de Vries 首先设想细胞有细胞膜，1897 年 Pfeiffer 与 1899 年 Overton 先后证明植物细胞随着外界渗透压的改变在渗透作用上有相应的变化。然而由于细胞膜很薄不能用光学显微镜观察到，而且它的边界往往与细胞表面的其它结构区分不清，所以早期关于膜结构的概念是从研究膜功能而推想的。到了廿世纪卅年代一些新技术的发展，例如微量技术、表面化学技术、电测定、X 射线衍射、电子显微镜等促进了膜的研究。1931 年 Plowe 用显微操作技术确凿地证明细胞膜的存在。电子显微镜的发明与发展更促进了生物膜的研究。现已知道真核细胞除了有包围整个细胞的膜——质膜外，还有构成各种细胞器的膜，如线粒体膜、内质网系膜、溶酶体膜、高尔基体膜、核膜等，这些统称为细胞内的膜（图 1-1）。

在真核细胞中，膜结构约占整个细胞干重的 70—80 %。这些膜结构对于细胞内环境的恒定、能量的转换、刺激的传递等都起着主要作用，对细胞的生存、生长、分裂等都是十分关键的。此外，生物膜在细胞与细胞之间的相互识别、相互作用、细胞与外界的相互作用中更起着主导作用。人体约有 1,800 亿个细胞，构成一个完整的有机体。这么多的细胞要协调一致地活动就需要神经与内分泌的调节，而这些调节作用的基本过程也都离不开生物膜。可以说生物学的形态发生、分化、分裂，生理学的神经传递、感觉，肌肉收缩，消化吸收，免疫学的细胞免疫与体液免疫，分子生物学的代谢调节控制、能量转换，以及药物、毒物的作用等等，无不与生物膜有着密切的关系。因此，正确认识生物膜的结构与功能不仅对揭开生命的奥秘有很大的意义，而且对于解决工农业、医学和国防上的一些实际问题将会起重要的作用。目前国外已有不少学者利用对生物膜的研究试图解决海水淡化和太阳能利用等问题，利用人工模拟试图达到生物膜的高效率与专一性。近年来生物膜的研究作为生物科学各个分支的汇集点，受到生理、生化、生物物理、细胞学、免疫学、药理学等许多方面的重视。也吸引了一些物理学家、化学家从事生物膜的研究。有关生物膜的文章近年来明显增多，以生物化学与生物物理学报（BBA）为例，1978 年生物膜专卷达到 10 卷，超过了蛋白质、酶、核酸，而且生物能力学专卷中绝大多数也涉及到生物膜的问题。1978 年诺贝

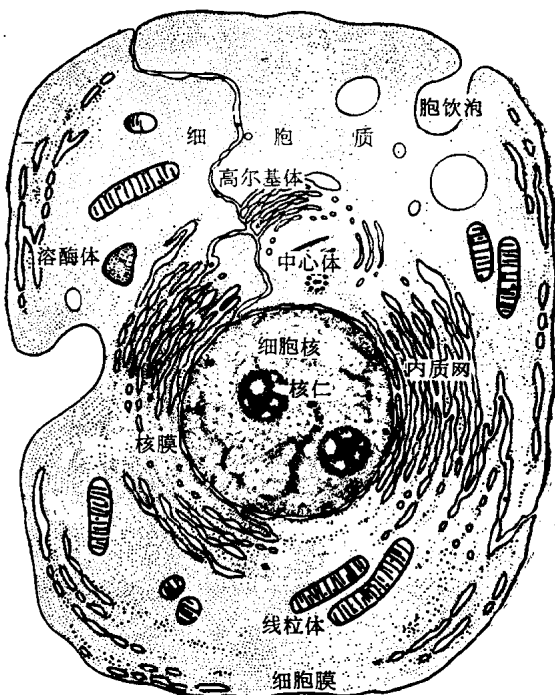


图 1-1 真核细胞模式图

尔生理学奖获得者。生物膜的研究在 1978 年取得了重大突破，这标志着生物膜的研究已成为生物科学中的一个重要领域。生物膜的研究不仅对揭开生命的奥秘有很大的意义，而且对于解决工农业、医学和国防上的一些实际问题将会起重要的作用。目前国外已有不少学者利用对生物膜的研究试图解决海水淡化和太阳能利用等问题，利用人工模拟试图达到生物膜的高效率与专一性。近年来生物膜的研究作为生物科学各个分支的汇集点，受到生理、生化、生物物理、细胞学、免疫学、药理学等许多方面的重视。也吸引了一些物理学家、化学家从事生物膜的研究。有关生物膜的文章近年来明显增多，以生物化学与生物物理学报（BBA）为例，1978 年生物膜专卷达到 10 卷，超过了蛋白质、酶、核酸，而且生物能力学专卷中绝大多数也涉及到生物膜的问题。1978 年诺贝

尔化学奖金获得者 Mitchell 是第一个研究生物膜的诺贝尔奖金获得者。生物膜是一门年轻的科学,然而由于它直接关系到象恶性肿瘤的诊断与治疗、异体器官移植等许多迫切需要解决的实际问题,所以目前正在飞跃地发展着,成为生物科学的一个极为活跃的领域。生物膜包括的范围很广,这里只能作一个轮廓性的介绍,重点放在膜的分子生物学方面。

第二章 生物膜的结构

虽然不同的生物膜有着不同的生物功能,但它们在结构上有着明显的共同性:从化学组成来看,生物膜主要由脂类与蛋白质通过非共价键结合形成,糖则通过共价键与某些膜的脂或蛋白质结合;从形态上来看,生物膜呈薄片结构,厚度只有 60—100 Å,也就是说只有几个分子厚。近 40 年来不少学者运用各种技术方法来研究生物膜:测定总膜区域与体积和膜上脂所占区域,测定膜的表面张力,研究一些膜的双折射、X 射线衍射、红外光谱、电子显微镜,利用荧光标记、顺磁标记、核磁共振、差热分析等,以及进行酶水解、化学分析等,获得不少关于膜结构的知识,先后提出了许多种膜结构模型。到 70 年代随着生物膜研究的蓬勃开展,对生物膜的结构开始有了比较一致的认识。

2.1 生物膜的化学组成

生物膜主要由脂质和蛋白质构成,有的膜还含有少量多糖,生成糖蛋白或糖脂(表 2-1)。不同生物膜上脂与蛋白质所占的比例不同,范围可从 1:4 到 4:1。一般说来功能复杂或多样的膜蛋白质比例较大,髓鞘的功能比较简单,主要起绝缘作用,髓鞘膜含脂量就很高,而蛋白质种类少,只有三种。

表 2-1 生物膜的化学组成

膜	蛋白质 (%)	脂 (%)	糖 (%)
髓鞘	18	79	3
质膜			
血小板	33—42	58—51	7.5
人红血球	49	43	8
阿米巴	54	42	4
小鼠肝细胞	46	54	2—4
大鼠肝细胞	58	42	(5—10)
L 细胞	60	40	(5—10)
HeLa 细胞	60	40	2.4
牛视网膜杆状细胞	51	49	4
大鼠肝细胞核膜	59	35	2.9
内质网系膜	67	33	
线粒体外膜	52	48	2.4
线粒体内膜	76	24	(1—2)
菠菜叶绿体片层膜	70	30	
革兰氏阳性菌	75	25	
类菌质体	58	37	1.5

2.1.1 膜脂

2.1.1.1 膜脂的分类 膜上脂质以磷脂为主,有的膜还含有胆固醇和糖脂。膜脂

由于其独特的化学结构，因此在生物膜上具有很大的重要性。

I. 磷脂

膜上磷脂主要是磷酸甘油酯。它以甘油为骨架，甘油的 1 位与 2 位两个羟基与两条脂肪酸链生成酯，3 位羟基与磷酸生成酯，这样的结构就是最简单的磷酸甘油酯——磷脂酸(二脂酰甘油-3-磷酸)。在生物膜中，虽然磷脂酸的含量不多，但它是其它甘油磷酸酯合成的前体，它的磷酸基团可以与其它醇生成酯，因而形成许多类的磷脂：磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、二磷脂酰甘油等(图 2-1)。不同类的磷脂性质不同，例如二磷脂酰甘油属于酸性磷脂。在磷脂与蛋白质的相互作用上往往会显示出蛋白质对磷脂的一定的专一性。例如 β -羟基丁酸脱氢酶活力必须有磷脂酰胆碱，细胞色素氧化酶活力必须要有二磷脂酰甘油存在。

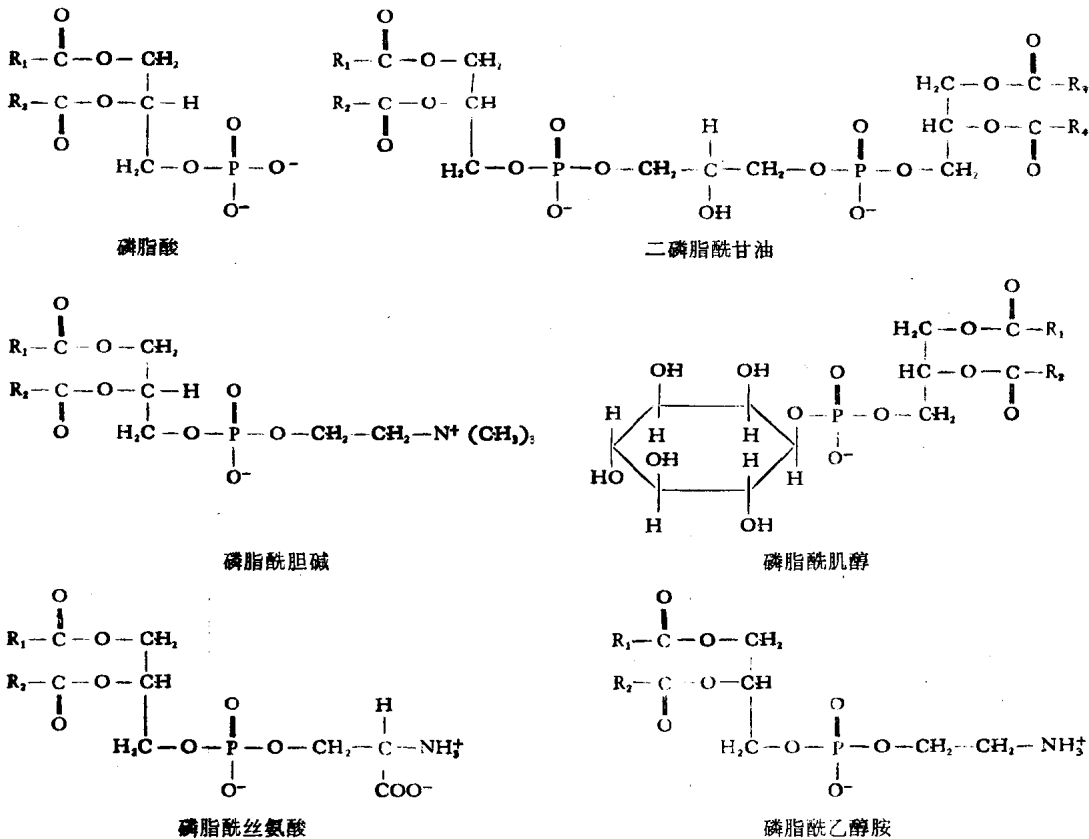


图 2-1 磷脂的化学结构

在同一类磷脂中，脂肪酸链的长短和不饱和度也有不同。一般说来磷脂上脂肪酸的碳原子数在 14—24 之间，都是偶数，其中以 16 碳和 18 碳为最常见。脂肪酸可以有不同程度的不饱和，不饱和脂肪酸的双键一般都是顺式。磷脂上脂肪酸链的长短及其不饱和度对生物膜的流动性有着密切的关系。

生物膜上除了甘油磷酸酯外还有鞘磷脂(图 2-2)。它的结构和构象与磷脂酰胆碱相似，但以神经鞘氨醇代替甘油为骨架，而且只有一条脂肪酸链以酰胺键与神经鞘氨醇相连。

II. 糖脂

顾名思义糖脂是含糖的脂类，也是神经鞘氨醇的衍生物，结构与鞘磷脂很相象，只是糖基代替了磷脂酰胆碱而与神经鞘氨醇的羟基结合。最简单的糖脂是脑苷脂，它只有一个单糖残基，这可以是葡萄糖或半乳糖(图 2-2)。神经节苷脂是比较复杂的糖脂，含有多达七个糖残基的分支链。神经节苷脂本身就是一类膜上受体，现在知道破伤风毒素、霍乱毒素、干扰素、促甲状腺素、绒毛膜促性腺激素、5-羟色胺等的受体就是不同的神经节苷脂。

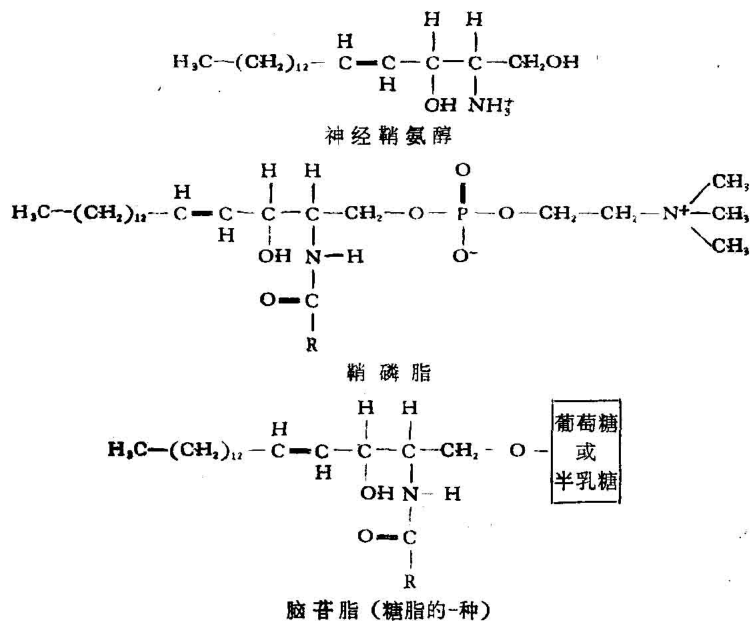


图 2-2 鞘磷脂与糖脂的化学结构

III. 胆固醇

胆固醇为中性脂。一些真核细胞如红血球、肝细胞、有髓鞘神经细胞的质膜中含有相当量的胆固醇，它可能起着调节生物膜中脂质的物理状态的作用。通过核磁共振研究发现胆固醇与磷脂的碳氢链有相互作用。从热分析法的测定也表明胆固醇对磷脂相转变温度有显著影响。很可能由于胆固醇的存在防止了磷脂碳氢链生成凝胶或结晶状态，因而保持了膜的流动性。例如，从髓鞘膜抽提出来的磷脂在 37℃ 下仍然处于结晶状态，这些磷脂由于在髓鞘膜中与大量胆固醇一起存在，防止了结晶的生成。

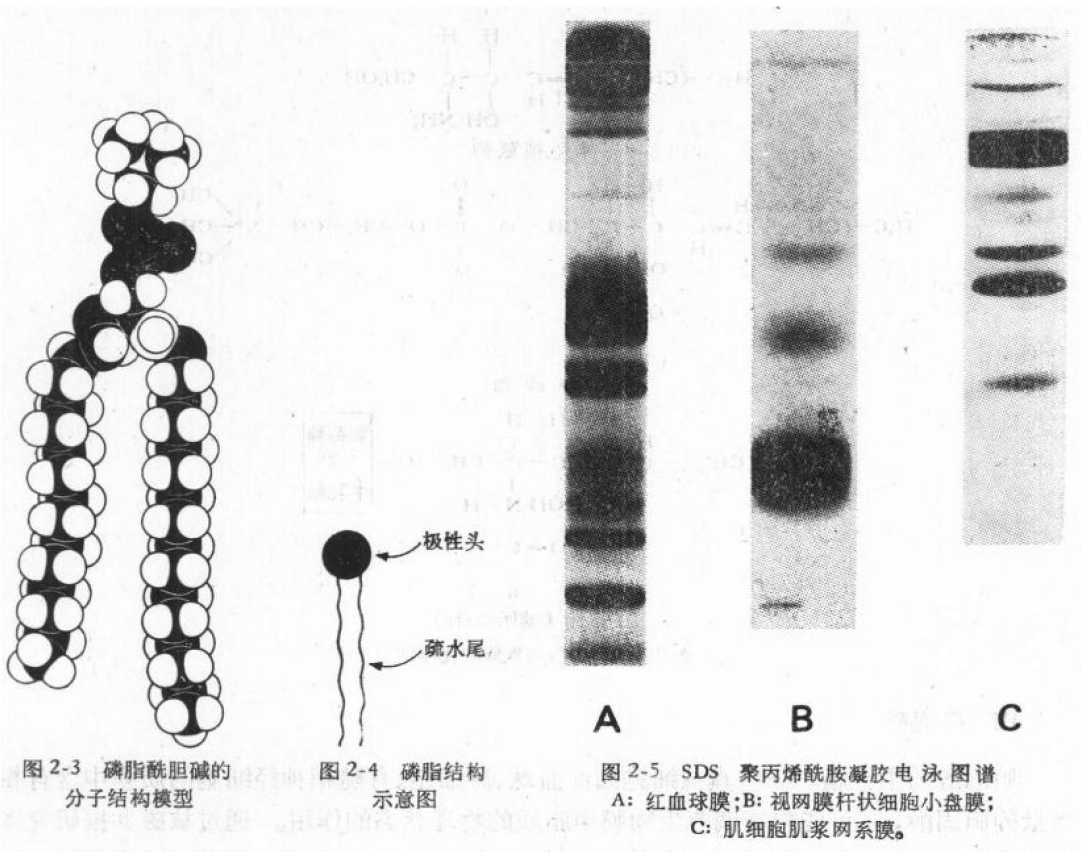
2.1.1.2 膜脂的结构特点 虽然生物膜上有磷脂、糖脂、胆固醇,磷脂又有许多类,每一类磷脂由于脂肪酸碳链长短和饱和度不同更有许多种,糖脂由于糖基的不同也有许多种,但是膜脂都有共同的结构特点,它们都是两性分子,既含亲水部分又含疏水部份(表2-2)。

从磷脂的结构模型看它们的结构特点就很明显了。图 2-3 是磷脂酰胆碱的结构模型图,总的看来它象是音叉形的,二条脂肪酸链几乎彼此平行,而磷脂酰胆碱部份则朝着另一个方向。图 2-4 是示意的磷脂结构的方式。一般人们把脂的亲水部份称之为极性头,

疏水部份称之为疏水尾。糖脂也有与磷脂相似的构象，糖基构成极性头，脂肪酸链与神经鞘氨醇的碳氢链则构成二条疏水尾。

表 2-2 脂质的亲水部份与疏水部份

膜 脂	疏 水 部 份	亲 水 部 份
磷酸甘油酯	脂肪酸链	磷酸醇基
鞘磷脂	脂肪酸链与神经鞘氨醇的碳氢链	磷酸胆碱
糖脂	同上	糖残基
胆固醇	除 OH 基外整个分子	C 3 上的 OH 基



2.1.2 膜蛋白

膜蛋白是膜功能的主要负担者，不同生物膜由于所含蛋白质不同而有显然不同的功能。图 2-5 分别是红血球膜、视网膜杆状细胞小盘膜与肌细胞肌浆网系膜的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱，显然它们的蛋白质含量和分子量是不相同的。在各种生物膜中，髓鞘的作用主要是作为神经纤维的绝缘体，它只含 18% 蛋白质，大量脂质有助于完成这种功能。但大多数细胞的质膜含有多种酶、受体、通道、“泵”，一般蛋白质含量均在 50% 左右。大多数参与能量转换的膜如线粒体内膜、叶绿体片层膜，蛋白质含量可高达 75% 左右。

膜蛋白的研究是蛋白质研究的一个新的领域。提纯的酶远远少于非膜蛋白，目前大约有近 30 种膜蛋白已经提纯并测定了氨基酸组成，有 5 种膜蛋白的氨基酸排列顺序已经得到阐明，其中细胞色素 b₅ 与细胞色素 c 的空间结构也已经搞清楚了。

虽然生物膜只有 60—100 Å 厚,主要是在二度空间上伸展,但膜蛋白却是球状蛋白。从旋光色散与圆二色性来看,膜蛋白一般含 25—50% 的 α 螺旋。从红外光谱来看,膜蛋白酰胺 I 带在 1648厘米^{-1} ,而没有 1630厘米^{-1} 的成份,这说明膜蛋白没有 β 构型。从冰冻蚀刻来看,膜上有许多球状颗粒,但这种球状颗粒在经过蛋白水解酶作用的膜上却大为减少(图 2-6)。

一般说来膜蛋白的氨基酸组成并不特殊,非极性氨基酸的含量并不比一般水溶性蛋白质高多少。但膜蛋白却大多不溶于水,这很可能是由于膜蛋白的表面极性基团分布不均匀所致。例如细胞色素 b_5 的氨基酸排列就表现出有“一个非常疏水的尾”,细胞色素 b_5 N 端 44 个氨基酸中 60% 含有疏水侧链,这段肽好象起着锚链抛在膜中的作用,使球状的极性较大的结合部位与催化部位能固定在膜上。再如人红血球膜主要糖蛋白,它横穿整个红血球膜。它的一端突出在膜的内侧,另一端突出在膜的外侧。从氨基酸顺序来看,这个蛋白质的 C 端肽段与 N 端肽段的极性都较大,而中间一段肽段却含较多非极性侧链。

质膜上的蛋白质有一些与糖以共价键相连接生成糖蛋白,这种糖蛋白不少是膜抗原的主要部份。例如组织相容抗原 HLA 的二种亚基中有一个就是糖蛋白。糖蛋白与大多数细胞表面现象与行为有关。一些基本的生物学现象只要是和细胞与外界环境相互作用有关的都牵涉到糖蛋白。因此有人形象地把糖蛋白中的糖部份比喻为细胞表面的天线,以此来说明它起到了相互识别和接受外界信息的作用。

2.1.3 其它成分

生物膜上尚含有少量的水和无机盐。膜上的水约 20% 呈结合状态,其余则是自由水。膜上金属离子和一些膜蛋白与膜的结合有关,其中钙离子对于调节膜的生物功能更有相当重要的作用。

2.2 生物膜的结构

2.2.1 脂双层是生物膜的基本结构

磷脂与糖脂的结构特点使得它们在水溶液中会自动形成团粒或者片状双层结构,它们的极性头通过静电引力与氢键对水有亲和力,因而面向水,而疏水尾则互相聚集,尽量

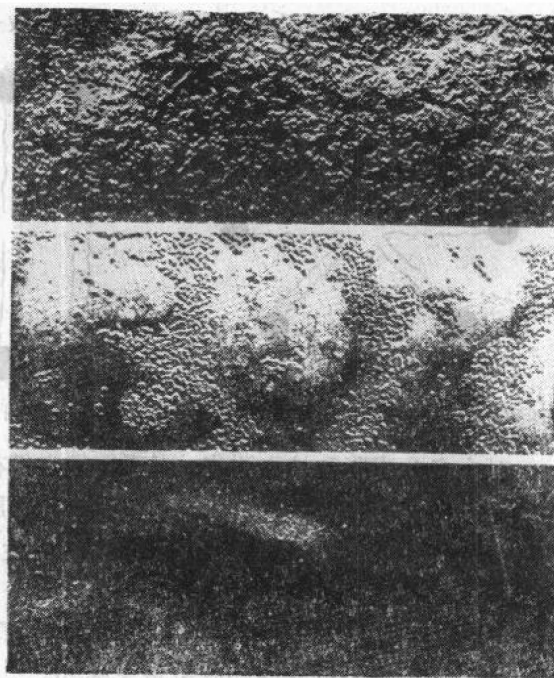


图 2-6 兔红细胞冰冻蚀刻电子显微镜图

上: 红细胞膜中有许多 50—85 Å 直径的颗粒; 中: 红细胞膜先用蛋白水解酶水解, 而后作冰冻蚀刻切片, 可见 45% 颗粒已消失; 下: 进一步用蛋白水解酶水解再作切片, 70% 颗粒消失, 说明消失的颗粒已被蛋白酶水解, 证明这些颗粒是蛋白质。

避免与水接触(图 2-7, 2-8)。这二种结构都是热力学上稳定的结构, 在这里疏水键起主要作用。由于疏水键主要是非极性基团在热力学上不利于与水相互作用的结果, 而不是彼此吸引的结果, 所以疏水键与水的结构有关。近年来用使水结构受到破坏的 chaotropic 试剂削弱疏水键, 因而拆分膜, 用这个方法提取一些膜上蛋白获得较好的结果。

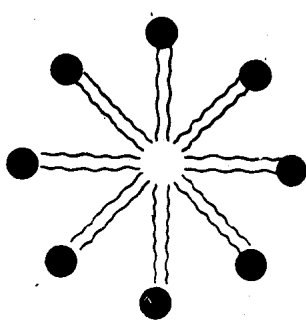


图 2-7 磷脂分子形成团粒的切面示意图

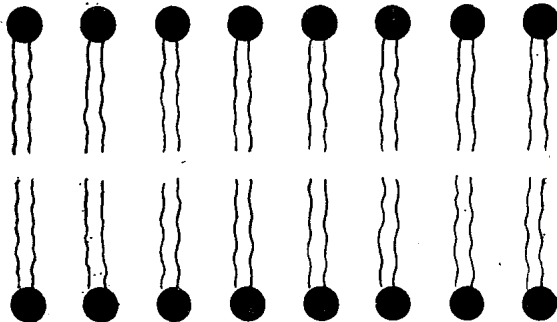


图 2-8 磷脂分子形成双层膜的切面示意图

对大多数磷脂和糖脂说来, 脂双层是它们在水溶液中最有利的结构。这一点有很大的意义, 一个团粒的直径最大只有 $200 \text{ \AA}$, 而脂双层可以大到 1 毫米 ($10^7 \text{ \AA}$), 甚至更大些。正因为磷脂和糖脂的这个特点, 所有的生物膜都具有脂双层这个基本结构。

脂双层是通过非共价相互作用而形成的, 它不仅由自装配生成, 而且有自融合的倾向, 即使脂双层上有一个小裂孔也是热力学上不利的。因此对每一个脂双层说来都是连续性的结构, 是没有暴露的碳氢链末端的。

脂双层作为生物膜的骨架, 使蛋白质可以镶嵌与附着。它的疏水环境使一些膜蛋白能够维持一定的构象, 同时也有利于一些化学反应的进行。它是极性化合物的通透屏障, 因而保持了内环境的相对恒定, 同时也是些生理现象例如可兴奋膜的兴奋性的基础。表 2-3 比较了生物膜与人工双层脂膜的一些物化性质, 二者是很相似的, 这也说明了脂双层是生物膜的基本结构。

表 2-3 生物膜与人工双层脂膜的一些物化性质

性 质	生 物 膜	人工双层脂膜
电子显微镜映象	三层	三层
厚度($\text{\AA}$)电子显微镜	40—130	60—90
X 射线	40—85	—
光学方法	—	40—80
电阻(欧姆/厘米 ²)	10^2 — 10^3	10^6 — 10^9
电容(毫微法/厘米 ²)	0.5—1.3	0.38—1.0
表面张力(达因/厘米 ²)	0.03—1	0.5—2
水通透性(微米/秒)	0.37—400	32
水通透活化能(千卡/克分子)	9.6	12.7

2.2.2 蛋白质以二种方式与脂双层结合

膜上蛋白质按它们与脂双层相互作用的方式可分为二类: 外周蛋白与固有蛋白(图 2-9)。

2.2.2.1 外周蛋白 外周蛋白通过离子键和氢键与膜脂的极性头相结合, 它不伸

入脂双层之中。一般用比较温和的处理如改变溶液的离子强度或 pH，加入金属螯合剂等就能使外周蛋白从膜上溶解下来，外周蛋白从膜上溶解下来后都能溶于水溶液。线粒体膜上的细胞色素 c、己糖激酶、F₁-ATP 酶、红血球膜的纤维状蛋白、髓鞘的碱性蛋白等都属于这一类。

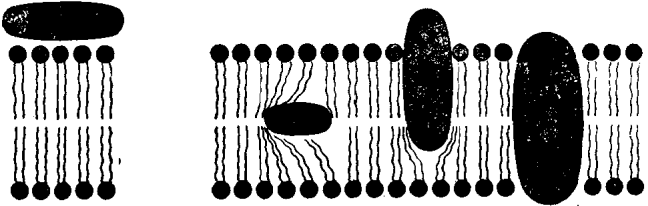


图 2-9 外周蛋白与固有蛋白

2.2.2.2 固有蛋白 固有

蛋白主要通过脂双层疏水尾的疏水相互作用而结合在膜上。有的插入脂双层中，有的贯穿整个脂双层，有的埋在脂双层内。通常只有用去垢剂、有机溶剂、破坏水结构的 chaotropic

试剂以及用磷酸酯酶处理才能把它们从膜上溶解下来。但其中有的并不是真正的溶解而是与去垢剂微团结合在一起，因而当从溶液中去除了去垢剂或有机溶剂后，这些固有蛋白往往会凝聚起来。

冰冻蚀刻电子显微技术是说明生物膜上确有固有蛋白的一个有力的手段。图 2-10 示意地表示了冰冻蚀刻的操作。由于脂双层主要是通过疏水键维持的，在低温情况下疏水键削弱，切面就会沿着脂双层的疏水碳氢尾平面也即脂双层的中央裂开。冰冻蚀刻技术避免了化学固定以及脱水的操作，因而也避免了可能产生的人为矫作现象。从冰冻蚀刻切片电镜来看，所有生物膜除髓鞘外都含有固有蛋白。人工双层磷脂酰胆碱膜的冰冻蚀刻切片图象却是非常光滑没有颗粒的。

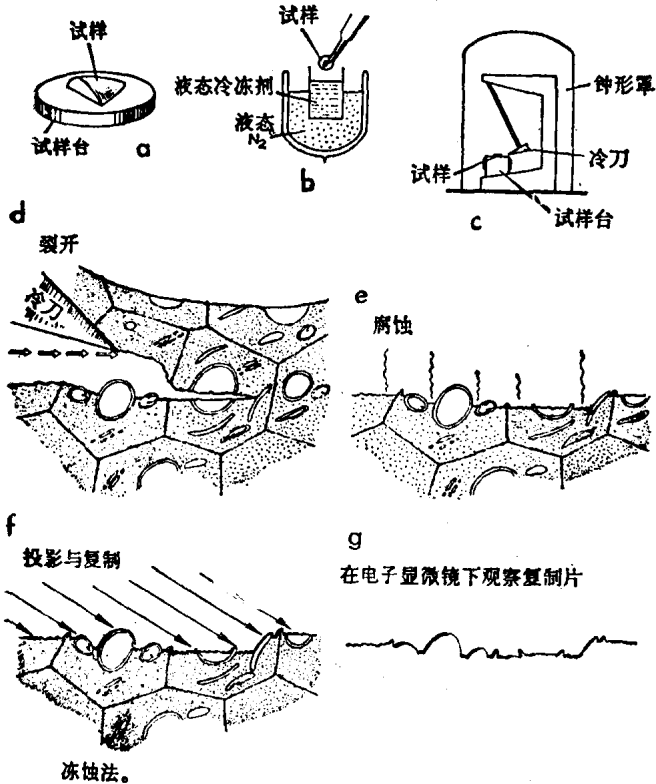


图 2-10 冰冻蚀刻操作示意图。新鲜的试样 a：放在铜台上；b：在液态 N₂ 号冷冻剂中快速冷冻；c：放在一个预冷的冻蚀真空室中；d：用一把冷的微解剖刀把冻好的试样裂开；e：有时候并把新裂开的面腐蚀；f：对此表面用铂和碳投影并复制；把试样溶掉之后；g：留下的复制片在电子显微镜下作观察。

2.2.3 生物膜在结构与功能上的二侧不对称性

2.2.3.1 膜蛋白分布的二侧不对称性 从冰冻蚀刻得到的生物膜二个剖面可以清楚地看到颗粒分布并非随机的，而是有明显的差异。这说明有的蛋白质对膜的这一侧结合得比另一侧紧密。表 2-4 列举的数字可以看到稠密面上颗粒数目可以比稀疏面上颗粒数目多许多倍。

表 2-4 冰冻蚀刻面上颗粒密度

膜 类 型	每平方微米颗粒数目		颗粒占膜表面 积(%)
	稠密面	稀疏面	
人工卵磷脂膜	0	0	0
髓鞘	0	0	0
根尖内质网系	1,700	380	12
根尖核膜	1,790	420	12
肌微粒体	4,300	0	35
叶绿体片层	3,860	1,800	80
人红血球	2,800	1,400	23

Bretscher 利用不能通透膜而具有放射性的蛋白质作用试剂, 将它与红血球和除去血红蛋白后没有重新封闭的红血球空泡作用, 由于完整红血球只有质膜外表面上膜蛋白能与试剂反应, 而没有重新封闭的红血球空泡的质膜内外两表面都能与试剂反应, 因此容易地表明了红血球膜两侧的蛋白质分布是不同的。

目前研究膜蛋白分布常用的是乳过氧化物酶催化碘标记的方法。由于乳过氧化物酶不能通透膜, 利用放射性碘可以大大提高检测灵敏度。现已知道在质膜外表面有非专一 Mg^{++} -ATP 酶, 5'-核苷酸酶、磷酸二酯酶 I、对硝基酚磷酸酯酶、各种激素、毒素受体, 在质膜内表面有腺苷环化酶等。在研究膜蛋白分布时也常用一些对膜可以穿透的试剂。表 2-5 列举了一些鉴定膜蛋白分布的试剂, 在这里特别值得一提的是亚胺酸酯、磺乙基亚胺酸酯和乙基亚胺酸酯。二者均与氨基反应, 但前者不穿透膜, 后者可穿透膜。如果分别用 ^{14}C 与 3H 标记这二个化合物, 再让它们与膜反应, 就很容易从 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳上看出哪些肽链位于膜内侧, 哪些肽链位于膜外侧, 哪些又是穿透整个膜的。

表 2-5 鉴定膜上成份不对称性的常用试剂

试剂	作用基团
神经氨酸酶	末端唾液酸残基
半乳糖氧化酶 + NaB^3H_4	末端半乳糖与 N-乙酰半乳糖胺
重氮化对氨基苯磺酸	氨基, 蛋白质侧链
异氰基芪二磺酸	氨基
甲酰甲硫氨酸(磺酰)甲基磷酸 (FMMP)	氨基
三硝基苯磺酸 (TNBS)	氨基
磺乙基亚胺酸酯与乙基亚胺酸酯	氨基
磷酸吡哆醛 + NaB^3H_4	氨基
N-(4-叠氮基-2-硝基酚)-2-氨基乙烷磺酸盐	不专一
乳过氧化物酶 + $Na^{125}I$	酪氨酸残基
蛋白水解酶	肽键
磷脂酶	磷脂
磷脂交换蛋白	磷脂
小泡的非催化性交换	胆固醇

膜蛋白分布的二侧不对称性是绝对的, 没有一个蛋白质的多肽既位于膜的这一侧, 也位于膜的另一侧。在膜外侧的蛋白质它们的合成部位及穿过双层膜的过程与膜内侧的蛋白质不同。从膜蛋白的合成可以说明膜上蛋白质分布的不对称性, 而膜蛋白的这种不对称性有助于说明膜装配的机制。

2.2.3.2 膜脂分布的二侧不对称性 一般说来脂双层二侧的膜脂有组份上的不同,但这种不对称性不是绝对的,仅含量比例上有差异。脂双层小泡其外侧曲率小于内侧曲率,因此脂分子在二层上的密度不同,而且带不同电荷,占据不同大小空间的脂在二层上会有不同分布。从理论上探讨,如果将中性磷脂与极性磷脂混合在一起而让它们组成脂双层,则外层所含带电荷的脂质会比内层多。然而有时酸性磷脂反而会在膜内层聚集,很可能磷脂极性头的大小是一个更为重要的因素。分析各种生物膜内层和外层脂质的化学组成,以及利用红血球及重新封闭的内翻外的红血球空泡用磷酸酯酶水解来测定,也都表明膜脂在脂双层上的分布是不对称的(图2-11)。

生物膜的磷脂不对称性与磷脂交换蛋白有关,磷脂交换蛋白在试管内还表现纯磷脂转移的活力。由于膜上磷脂的更新率很高,所以这种不对称性的维持与磷脂的合成、交换、转移、降解都有密切的关系。

膜上磷脂不对称性的生理意义还不太清楚,它可以使膜的二层流动性有所不同,可以关系到膜蛋白的装配机制,以及关系到药物与电介质对细胞形态改变的影响,这方面的工作还有待进一步深入。

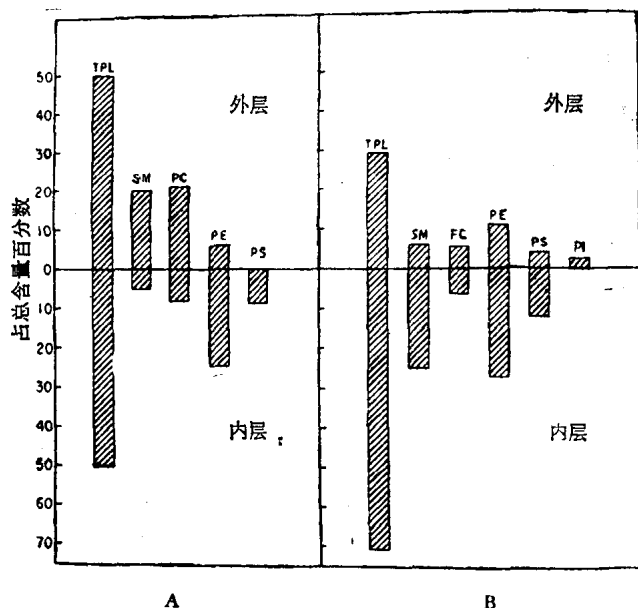


图 2-11 膜上磷脂分布的二侧不对称性。A: 人红血球膜; B: 在 MDBK 细胞中生长的流感病毒膜。
TPL: 总磷脂; PC: 磷脂酰胆碱;
SM: 鞘磷脂; PE: 磷脂酰乙醇胺;
PS: 磷脂酰丝氨酸; PI: 磷脂酰肌醇。

2.2.3.3 膜上糖基分布的二侧不对称性 所有哺乳动物物质膜上的糖基都位于膜的外表面, Singer 用铁蛋白标记外源凝集素的方法证明了这一点。糖蛋白的不对称性由蛋白质的不对称性所维持。糖脂的不对称性由于糖基的亲水性,因此使糖脂要比磷脂更难以进行膜上的翻转运动。

生物膜结构上的二侧不对称性保证了膜的方向性的功能,这是生物膜发挥作用所必不可少的。例如能量转换过程中的质子梯度的产生、物质与离子传送的过程都是具有方向性的。而膜结构的不对称性保证了膜二侧在功能上的不同。 Na^+ 、 K^+ 泵的作用是调节细胞内 Na^+ 、 K^+ 的含量,它的运转需要 ATP,ATP 是细胞内产生的, Na^+ 、 K^+ -ATP 酶的 ATP 结合点正是位于膜的内侧。不少激素需要通过血液运输而到达靶细胞再发挥作用,它们的受体正是位于质膜的外侧。

在研究生物膜的时候,有时制备内翻外的膜制剂,也即膜的内侧翻到外侧,外侧翻到内侧。研究正常定向及内翻外制剂并进行比较,对于阐明生物膜的结构与功能是一个有用的手段。

2.2.4 膜蛋白与膜脂在膜上迅速扩散

生物膜并不是僵硬的结构。过去有人把膜上酶比拟为固相酶是不确切的。膜蛋白和膜脂在膜上都不断地运动着,这是由于膜脂在生理状态下是处于流动状态的,其粘度大约相当于橄榄油。一种生物膜的流动性是由膜脂的脂肪酸组成和(或)胆固醇含量所决定的,是受温度影响的,随着温度下降生物膜的粘度增加,一般每下降 10°C 粘度增加三倍,当温度下降到“熔点”温度(相转变温度)以下时脂肪酸链就以一定的次序排列,膜便处于比较固定的状态。每一种生物膜由于脂肪酸链的长度和不饱和度不同,胆固醇含量不同,这种“液相”与“固相”间的相转变温度也不同。长链饱和脂肪酸之间彼此相互作用强,因此含长链饱和脂肪酸多的生物膜其相转变温度就高。不饱和脂肪酸的顺式双键会产生碳氢链的弯曲(图 2-12),并且会促进双键二侧的碳氢链的旋转运动,这样就削弱了碳氢链之间的相互作用。短链脂肪酸之间的相互作用比长链脂肪酸弱,这是显而易见的。一般说来,每增加一个 $-\text{CH}_2-$ 基团,使相邻的二个碳氢链相互作用自由能变化增加 -0.5 千卡/克分子,所以,含不饱和脂肪酸多,脂肪酸链较短的膜,流动性就大,相转变温度就低。这种影响在细菌膜上显得格外清楚,一方面在含不同脂肪酸培养基中培养的细菌,它们的膜的相转变温度有相应的不同,另一方面若在 42°C 培养大肠杆菌,它的膜上饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸之比是 1.6;若在 27°C 培养,比值是 1.0,这样保证了在较低温度时膜还有一定的流动性,从而保证生物膜正常的功能。在真核细胞中,膜的流动性主要是由膜上胆固醇的含量来影响的。

生物膜的流动性使膜上的蛋白质能够象船在海上一样漂游,但是蛋白质插入膜的深度并不能因而改变。由于蛋白质的这种运动,使生物膜在通常情况下在大范围内蛋白质的分布是不规则的、比较均匀的,这也提示了大部分的脂质与蛋白质并没有相互作用。

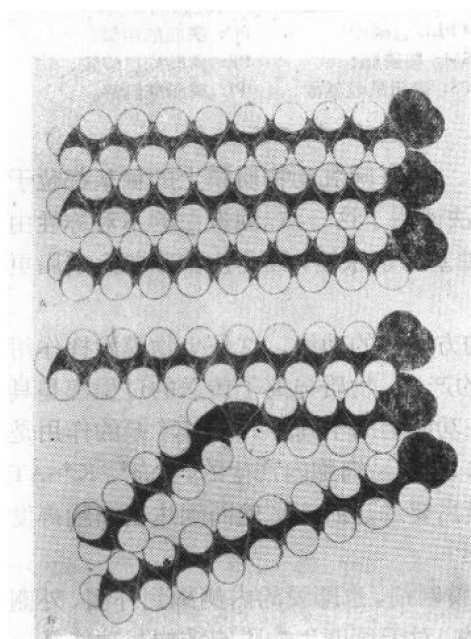


图 2-12 脂肪酸碳氢链的相互作用。A: 三分子硬脂酸(饱和的 18 碳脂肪酸); B: 一分子油酸(不饱和的 18 碳脂肪酸)在二分子硬脂酸之间。

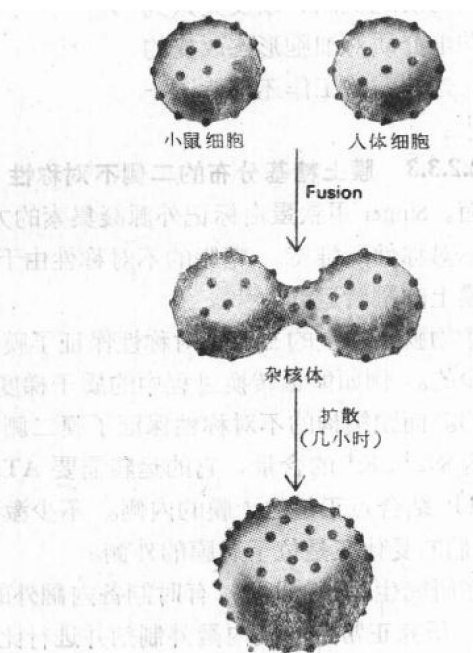


图 2-13 Frye 的细胞融合实验