



工业和信息化部“十二五”规划专著
“十二五”国家重点图书出版规划项目

生物功能化界面

Biofunctionalized Interfaces

● 韩晓军 著



哈尔滨工业大学出版社
HARBIN INSTITUTE OF TECHNOLOGY PRESS



工业和信息化部“十二五”规划专著
“十二五”国家重点图书出版规划项目

生物功能化界面

Biofunctionalized Interfaces

● 韩晓军 著



哈尔滨工业大学出版社
HARBIN INSTITUTE OF TECHNOLOGY PRESS

内 容 简 介

随着科技的发展,生物功能化界面的构筑与应用已经成为当今的研究热点。本书基于作者在生物功能化界面领域多年的研究基础,对国内外生物功能界面领域的近期研究成果进行了系统的总结。本书共分4章,包括仿生膜界面、蛋白质修饰界面、DNA 分子修饰界面和生物功能化纳米粒子界面等方面的内容。在本书的各个章节中,对生物功能化界面的修饰方法以及它们在生物检测、细胞功能等研究领域的应用进行了详细的描述。

本书可供科研院所、高等学校从事生物界面研究的教师、研究生等阅读和参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物功能化界面/韩晓军著. —哈尔滨:哈尔滨
工业大学出版社,2017. 1
ISBN 978 - 7 - 5603 - 5930 - 4

I. ①生… II. ①韩… III. ①生物化学-研究
IV. ①Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 071801 号

策划编辑 王桂芝 张 荣 郭 然
责任编辑 郭 然
封面设计 卞秉利
出版发行 哈尔滨工业大学出版社
社 址 哈尔滨市南岗区复华四道街 10 号 邮编 150006
传 真 0451 - 86414749
网 址 <http://hitpress.hit.edu.cn>
印 刷 哈尔滨工业大学印刷厂
开 本 787mm×1092mm 1/16 印张 10 字数 246 千字
版 次 2017 年 1 月第 1 版 2017 年 1 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 978 - 7 - 5603 - 5930 - 4
定 价 38.00 元

(如因印装质量问题影响阅读,我社负责调换)

前 言

界面通常是指相与相之间的交界面,界面的修饰及功能化是物理化学领域的研究热点。本书内容是作者多年的研究成果和对近期中外文献的总结。本书前3章按照界面修饰生物分子的不同,分别介绍了仿生膜界面、蛋白质修饰界面和DNA分子修饰界面。前3章主要集中在大尺度界面,即尺寸在微米以上的界面。由于近期纳米生物界面的研究也日趋活跃,并且具有异于大尺度界面的性能,因此第4章着重归纳总结了生物功能化纳米粒子界面的研究进展。

生物膜作为细胞的骨架具有能量传递、物质传递、信息识别与传递等重要功能,这些功能在细胞的生存、生长、繁殖和分化过程中都起着十分重要的作用。然而由于生物膜本身结构的复杂性,人们便采用生物膜的组分为构建基元,人工构筑各种生物膜系统,以此研究生物膜的生物物理性质及其功能。人工制备的生物膜体系也可称之为仿生膜,本书第1章着重介绍了仿生膜种类、磷脂组装体、磷脂双层膜阵列的制备及应用。人工制备的平板双层膜可以用于多种生理过程的研究,如离子通道的形成、膜蛋白的功能等。磷脂囊泡可作为药物载体用于靶向给药研究。磷脂双层膜阵列在高通量药物筛选、生物传感器等领域有着很好的应用前景。蛋白质作为组成一切细胞、组织的重要成分,是生命活动的主要承担者。蛋白质修饰界面为科学家研发新的传感器或者其他装置提供了机会。本书第2章介绍了蛋白质修饰界面的方法,包括膜固定法、吸附法、共价键合法、包埋法等,以及这些经蛋白质修饰后具有功能性的界面在生物传感器和组织工程材料中的应用进展。DNA作为组成基因的基本单元,具有独特的双螺旋结构,该结构使其对化学和生物小分子具有特异性的选择识别性能,可作为传感器的生物识别分子,实现对特定化学和生物小分子的选择性检测。本书第3章介绍了DNA分子修饰界面的构筑方法,包括吸附法、共价键合法、自组装法、亲和法及聚合法等,并介绍了DNA生物传感器在病源基因的检测、药物分析、DNA损伤研究及环境监测等方面的应用。纳米粒子由于尺寸在纳米尺度,具有很多特殊的效应,利用生物分子将纳米粒子表面功能化,可使其具有生物靶向识别、化学及生物传感、药物靶向传输等特殊的功能。本书第4章主要介绍了纳米粒子表面的生物功能化的方法及其应用,所涉及的纳米材料包括贵金属纳米粒子及其团簇、半导体量子点、磁性纳米粒子、二氧化硅、二氧化钛、碳的同素异形体等。

作者所指导的博士生为本书的文献调研及撰写做了大量工作,这里对王雪靖、张迎、张智嘉、马生华等学生的辛勤工作表示感谢。

由于作者水平有限,书中难免存在疏漏或不妥之处,敬请读者批评指正。

作 者
2016年8月

目 录

第 1 章 仿生膜界面	1
1.1 生物膜简介	1
1.1.1 生物膜的组成	1
1.1.2 生物膜的结构	4
1.1.3 生物膜的性质	5
1.1.4 生物膜的功能	8
1.2 仿生膜种类	9
1.2.1 磷脂单层膜	9
1.2.2 平板双层膜	9
1.2.3 液滴界面双层膜	16
1.3 磷脂组装体	21
1.3.1 磷脂囊泡	21
1.3.2 磷脂管	24
1.4 磷脂双层膜阵列的制备	26
1.4.1 机械划痕法	27
1.4.2 基底预图案化法制备磷脂膜阵列	27
1.4.3 直接紫外照射法图案化磷脂双层膜	31
1.4.4 直接压印或冲压法制备磷脂双层膜阵列	32
1.4.5 微流控技术制备磷脂双层膜阵列	33
1.4.6 蘸水笔纳米加工法制备磷脂双层膜阵列	35
1.4.7 利用自动检测体系制备磷脂双层膜阵列	36
1.4.8 聚合物剥离技术制备磷脂双层膜阵列	37
1.4.9 纳米孔阵列上制备磷脂双层膜	37
1.5 磷脂双层膜阵列的应用	38
1.5.1 细胞的黏附和活性研究	38
1.5.2 磷脂双层膜阵列在高通量研究中的应用	40
1.5.3 磷脂双层膜阵列在二维膜电泳中的应用	42
1.5.4 支撑磷脂双层膜在能量转化方面的应用	45
1.6 本章小结	46
参考文献	47

第2章 蛋白质修饰界面 62

2.1 蛋白质修饰界面的方法 62

2.1.1 膜固定法 62

2.1.2 吸附法 63

2.1.3 共价键合法 64

2.1.4 包埋法 65

2.2 生物传感器 66

2.2.1 电化学生物传感器 66

2.2.2 光学生物传感器 73

2.2.3 压电生物传感器 76

2.2.4 量热式生物传感器 77

2.3 组织工程材料 77

2.3.1 心脏支架 78

2.3.2 骨支架 79

2.3.3 其他工程材料 80

2.4 本章小结 80

参考文献 81

第3章 DNA 分子修饰界面 88

3.1 DNA 分子界面的构筑方法 88

3.2 DNA 分子修饰界面在生物传感器方面的应用 91

3.2.1 病源基因的检测 93

3.2.2 药物分析 95

3.2.3 DNA 损伤研究 97

3.2.4 环境监测 98

3.2.5 其他 100

3.3 肽核酸 PNA 100

3.4 本章小结 103

参考文献 103

第4章 生物功能化纳米粒子界面 112

4.1 生物功能化纳米粒子界面的修饰方式 112

4.2 纳米粒子表面的生物功能化及其应用 113

4.2.1 贵金属纳米粒子 113

4.2.2 贵金属纳米团簇 117

4.2.3 半导体量子点 117

4.2.4 磁性纳米粒子 121

4.2.5 二氧化硅 124

4.2.6 二氧化钛	125
4.2.7 碳的同素异形体	126
4.3 本章小结	133
参考文献	133
名词索引	148

第 1 章 仿生膜界面

1.1 生物膜简介

细胞是体现生物的生命活动和各种功能的最基本单位,生物体内许多重要的生理功能和生化反应都是通过细胞来进行的。细胞周围有一层很薄的细胞膜,它把细胞内的物质与周围环境分隔开来,这层细胞膜就是一种生物膜。生物膜是细胞膜(质膜)和各种细胞器膜的统称,在地球上最早有生命迹象并由简单到复杂的演变过程中,生物膜的出现具有重要意义。由于细胞膜的存在,细胞可以与外界有选择地进行物质交换,从而维持生命。在新陈代谢过程中,它既可以吸收外界的物质,又可以排泄废物,从而保持了细胞的稳定和平衡。生物膜是一个具有特殊功能的半透膜,它具有能量传递、物质传递、信息识别与传递等重要功能,这些功能在细胞的生存、生长、繁殖和分化过程中都起着十分重要的作用。因此,正确认识生物膜的结构和功能对揭示生命活动的奥秘具有重要意义。

1.1.1 生物膜的组成

生物膜是由多种脂类、蛋白质、糖类及能与膜表面结合的离子和水组成的立体结构。脂类是一些不溶于水而溶于有机溶剂的分子,在膜中主要起骨架结构作用,其流动性可辅助蛋白质发挥功能。脂类的极性端可以参与生物膜间的相互作用,有少数几种脂类还可参与信息传递过程。膜蛋白具有一定的生物学功能,在细胞与外界的相互作用及物质和信息的交换中起着重要的作用。糖类多以复合物形式存在,通过共价键与某些脂类或蛋白质组成糖脂或糖蛋白。几种生物膜的化学组成见表 1.1。

表 1.1 几种生物膜的化学组成(占膜干重的百分比)

化合物	神经髓鞘	视网膜杆状体	红细胞质膜	线粒体	大肠杆菌内外膜	叶绿体
蛋白质	22	59	60	76	75	48
脂类	78	41	40	24	25	52
糖脂	22	9.5	痕量	痕量		23
胆固醇	17	2	9.2	0.24		
总磷脂	33	27	24	22.5	25	4.7
PC	7.5	13	6.9	8.8		
PE	11.7	6.5	6.5	8.4	18	
PS	7.1	2.6	3.1			
PI	0.6	0.4	0.3	0.75		

续表 1.1

化合物	神经髓鞘	视网膜杆状体	红细胞质膜	线粒体	大肠杆菌内外膜	叶绿体
PG					4	
CL		0.4		4.3	3	
SM	6.4	0.5	6.5			
总磷脂/脂类/%	42	66	60	94	>90	9

注 PC:磷脂酰胆碱;PE:磷脂酰乙醇胺;PS:磷脂酰丝氨酸;PI:磷脂酰肌醇;PG:磷脂酰甘油;CL:二磷脂酰甘油;SM:神经鞘磷脂

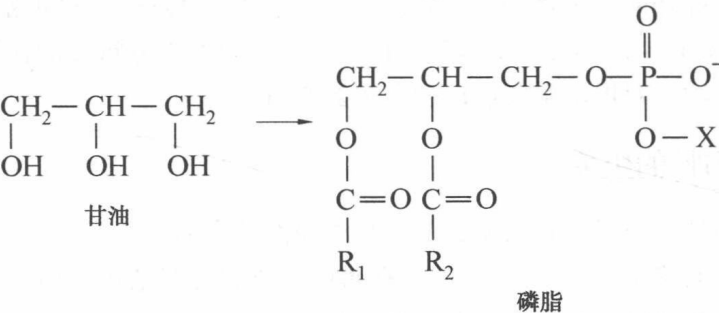
1. 脂类

生物膜中的脂类包括磷脂、糖脂和固醇。

(1)磷脂是含有磷酸基团的类脂。磷脂是生物膜中最重要的类脂,所有动物细胞的膜结构都含有磷脂。根据疏水区和亲水区之间的桥连成分不同,磷脂可分为以下两大类。

①以甘油为桥连分子的磷脂。

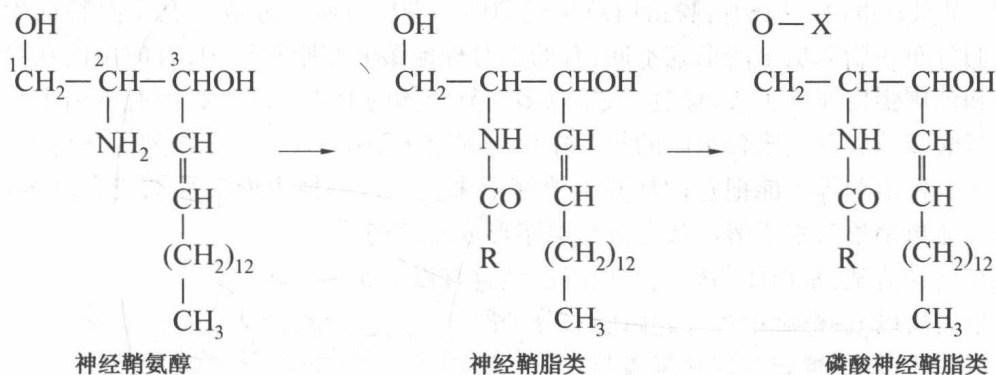
以甘油为桥连分子的磷脂,即甘油分子中 3 个羟基有 2 个与高级脂肪酸形成酯,另一个与磷酸衍生物生成酯:



其中,PE 在生理 pH 下是电中性的两性离子,当 $\text{pH} > 9$ 时,由于氨基电离而使该分子带上负电荷;PG 和 DPG 由于只带磷酸基团而带负电荷;PS 在中性 pH 时,由于有 1 个正电荷的氨基和 2 个负电荷基团(羧基和磷酸基)而净带负电荷。

②以神经鞘氨醇为桥连分子的磷脂。

神经鞘氨醇(Sphingosine)的 C-2 上的氨基与脂肪酸缩合生成神经鞘脂类(Sphingolipid),C-1 上的羟基再与磷酸衍生物(X)缩合即生成磷酸神经鞘脂类(Phosphasphingolipid):



其中 R 是脂肪酸碳氢链。如果 $\text{X} = \begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ -\text{P}-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{CH}_3 \\ | \\ \text{O}^- \end{array}$, 则生成神经鞘磷脂

(Sphingomyelin, SM 或 Sph)。如果 $\text{X} = \text{H}$, 则生成神经酰胺(Ceramide)。

(2)糖脂广泛分布于动物、植物和微生物细胞的膜系中,它是生物膜中的寡糖与磷脂结合形成的一种类脂,其种类繁多,与细胞的免疫和识别功能有关。动物细胞膜中的多数糖脂是以鞘氨醇为骨架的鞘糖脂,而植物细胞膜和微生物细胞膜中的糖脂多是以甘油为骨架的甘油糖脂。少量的甘油糖脂也存在于某些哺乳动物脑细胞膜中,其生物学意义还不十分清楚。

(3)固醇是生物膜中另一类重要的类脂,它是环戊烷多氢菲的衍生物,具有降低脂双分子层的通透性并增加其稳定性的作用。最重要的固醇是胆固醇,主要分布在动物细胞的膜系中。胆固醇在哺乳动物的质膜中含量丰富,约占总磷脂的 45%。在高尔基体膜、溶酶体膜中的含量也很丰富,而在内质网膜及线粒体膜中含量较少。动物能吸收食物中的胆固醇,也能自身合成,其生理功能与生物膜的透性、神经髓鞘的绝缘物质及动物细胞对某种毒素的保护作用有一定关系^[1,2]。另外,胆固醇的两性特点对生物膜中脂类的物理状态具有重要的调节作用^[3,4],在相变温度以上时,胆固醇阻碍脂分子脂酰链的旋转异构化运动,从而降低膜的流动性;在相变温度以下时,胆固醇的存在又会阻止脂酰链的有序排列,从而防止膜向凝胶态的转化,保持了膜的流动性。

2. 膜蛋白

膜脂是生物膜的结构骨架,膜蛋白则是生物膜功能的体现者。生物膜中含有大量蛋白质,它们直接参与物质的转运、氧化磷酸化、信息传递和放大及细胞间的相互识别等多种功能。膜中蛋白质的含量和类型反映膜的功能。髓鞘膜主要起绝缘作用,其总量的 25% (质量分数) 为蛋白质,而能量转换膜(如线粒体内膜和叶绿体)的蛋白质含量为 75% (质量分

数),一般质膜的蛋白质含量为 50% (质量分数)左右。根据蛋白质从膜上释放出来的方法不同和膜蛋白与脂的相互作用方式及其在膜中排列部位的不同,膜蛋白大体上可分为两类:膜外周蛋白(Peripheral protein)和膜固有蛋白或称内在蛋白(Integral protein)。

(1)膜外周蛋白的主要特点是它们分布在膜的外表面,被分离下来后呈水溶性,不能再与类脂聚合重新形成膜结构。它们是通过极性基团或电荷基团与脂双层结合的,故从广义上来说,凡能与膜的外表面通过极性基团或电荷基团相结合的蛋白质均属于膜外周蛋白。

(2)膜固有蛋白一般约占膜蛋白总量的 70% ~ 80% (质量分数),其主要特征为水不溶性。它们分布在脂双层中的形式不同,有的不对称地镶嵌在脂双层中,有的由内在膜固有蛋白亚基和外周蛋白亚基组成,穿过全膜,以多酶复合体的形式出现。膜固有蛋白主要依靠非极性氨基酸与磷脂双层膜疏水区的相互作用而固定于膜中,只有在较剧烈的条件下,如表面活性剂或有机溶剂等才能把它们从膜上溶解下来。一旦去掉表面活性剂或有机溶剂,膜固有蛋白又能再聚集为水不溶状态或与类脂形成膜结构。

现在已经清楚,蛋白质与磷脂双层膜的结合有以下 5 种方式^[5]:

- ①蛋白质以 α -螺旋单程穿越磷脂双分子层。
- ②蛋白质以 α -螺旋多程穿越磷脂双分子层。
- ③蛋白质在细胞质一侧,通过脂肪酸链结合到磷脂双层膜上。
- ④蛋白质通过寡糖结合到磷脂酰肌醇而位于双层膜的外单层上。
- ⑤蛋白质通过非共价与其他蛋白相互作用,再结合到磷脂双层膜上。

3. 糖类

生物膜中的糖类含量较少,主要是以寡糖侧链与膜蛋白通过共价键结合,形成糖蛋白,也有少数与神经酰胺或甘油酯形成糖脂。组成寡糖链的单糖有半乳糖(Gal)、甘露糖(Man)、葡萄糖(Glc)、岩藻糖(Fuc)等。在糖蛋白中,糖链与蛋白质的连接有两种方式:一种是 N-连接,即糖链通过 N-糖苷键与多肽链中的天冬酰胺残基相连;另一种是 O-连接,即糖链通过 O-糖苷键与多肽链中的丝氨酸残基或苏氨酸残基相连。暴露在细胞膜表面上的糖基对细胞的一些特性有重要作用,如决定血型的 ABO 抗原之间的差别仅在于寡糖链末端糖基组分的不同。

1.1.2 生物膜的结构

生物膜结构的研究开始于 19 世纪 90 年代,发展至今,科学家们提出了许多生物膜的结构和模型假说。1935 年,Danielli 和 Davson^[6]提出了在两层球状蛋白间夹杂磷脂双分子层的生物膜模型,认为质膜由双层脂类分子及其内外表面附着的蛋白质构成,这一模型结构对生物膜的研究起到了相当重要的作用。随着电子显微镜和生化技术的发展,不仅生物膜的存在得到了证明,细胞内一些复杂的内膜系统也被发现。1959 年,Robertson^[7]利用超薄切片技术获得了清晰的细胞膜照片,提出了“单位膜”模型。不过在“单位膜”模型中,将膜的动态结构描写成静止、不变的。1972 年,Singer 和 Nicolson^[8]在单位膜的基础上提出流动镶嵌模型(图 1.1(a))。该模型认为细胞膜的基本组成物质是类脂分子,尤其是磷脂分子。整个细胞膜是由磷脂分子以双层形式排列而成的,并在磷脂层中有蛋白质的镶嵌,磷脂分子和膜蛋白在膜内可流动。该模型强调了细胞膜的流动性和膜蛋白分布的不对称性。

近年来的研究^[9]肯定了大多数哺乳动物细胞质膜存在脂筏(Lipid raft)和细胞质膜微囊

(Caveolae)的微区结构(图 1.1(b))。它们富含鞘脂类和胆固醇,物理状态介于凝胶相与液晶相之间的 Lo 相(Liquid-ordered state)。在这些微囊区域的质膜脂双分子层的细胞质内侧,一般都含有内嵌膜蛋白(Caveolin),其羧基端的结构域上连接着三分子棕榈酰基,使得该蛋白与膜紧密结合。此外,这些内嵌膜蛋白也与膜中的胆固醇分子相结合,形成支架式区域,这些微区结构不能够被去垢剂所溶解,还各自含有一定量的与信号传导等功能有关的蛋白质。因此,普遍认为它们与信号传导及物质的跨膜转运等功能有密切的关系。脂筏和微囊的发现,以及在此之后科学家们提出的“板块镶嵌”都是对“流动镶嵌”模型的补充和完善。

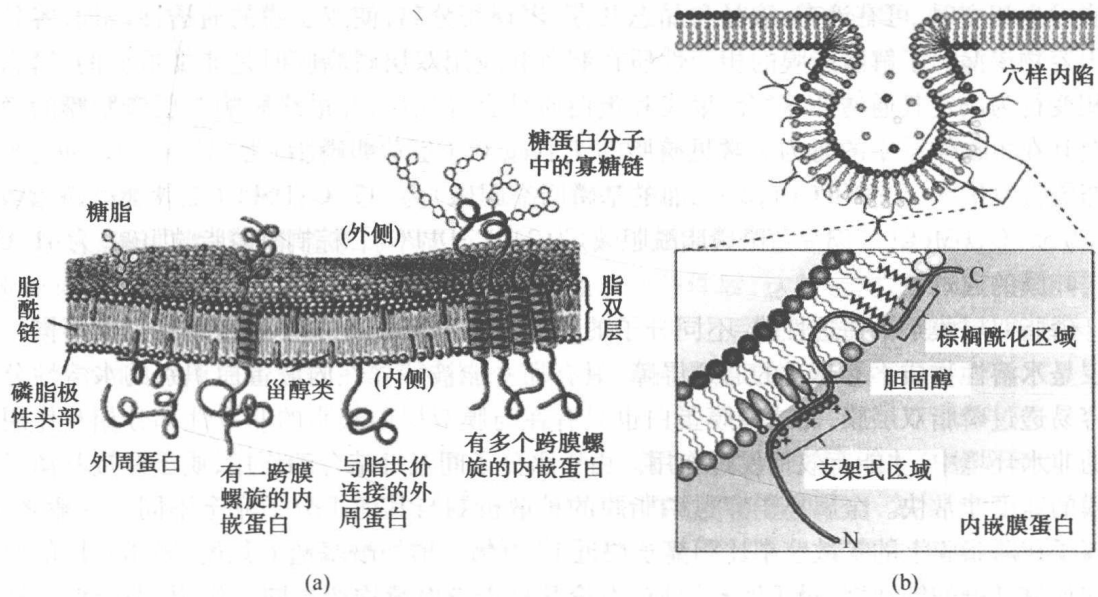


图 1.1 生物膜的流动镶嵌模型结构及微囊结构示意图^[9]

1.1.3 生物膜的性质

1. 生物膜的稳定性

生物体是以水为溶剂的体系,为保持磷脂双分子层的稳定性,必须使构成它的脂质分子的亲水性和亲油性恰好平衡,而磷脂基本符合这样的条件。磷脂在水中形成双分子层时,亲水的极性头部会自发地朝向水溶液,而疏水尾部与疏水尾部相连,构成双分子层结构。当磷脂水解成甘油酯后,便与水分离变成油滴,从而失去膜的状态。天然的磷脂要形成稳定的双分子层,其亲水性略显过强,如加入胆固醇等中性脂质,使混合膜整体的亲油性稍有提高而亲水性稍有降低,就能够使膜比较稳定。蛋白质的分子中也有亲油性(疏水性)部分,因此也可以用它代替中性脂质加入磷脂的双分子层中,使生物膜更加稳定。

2. 生物膜脂双层的非对称性

生物膜的中心物质是嵌在流动双层脂膜中的固有蛋白,膜的外侧(细胞外面)被糖蛋白的糖链所包围,内侧是由外在蛋白裱衬起来的,因此生物膜是由糖链层、类脂层、蛋白质层所形成的 3 层构造,是非对称的,外层和内层的化学组成及性质也都不相同,这一性质对研究物质的主动传输及其他的生物膜功能至关重要。另外,磷脂分子在膜两侧的分布也是不对称的,并且这种膜内的不对称分布可以长期存在。

3. 相转变温度

在不同的温度下,磷脂双层膜存在不同的相。磷脂分子从一种状态转变为另一种状态

称为“相变”,随着温度的增加,磷脂分子由结晶态转变为流动态的温度称为相转变温度(Transition temperature),用 T_c 表示。所有磷脂都具有特定的 T_c ,它依赖于极性基团的性质、酰基链的长度和不饱和度,一般来说,增加链的长度或增加链的饱和度都将增加 T_c 。如果酰基链越短,不饱和程度越高,则相转变温度越低。在温度低于相变温度以下时,由于磷脂分子的脂肪酰链排列紧密,膜刚性和膜厚度都增加,双层膜结构处于晶态;当在相变温度以上时,由于脂肪酰链的伸缩、弯曲及歪扭现象和侧向移动,双层膜结构处于“流体态”,水分子可以穿过膜层,因此 T_c 是水分子通过磷脂分子双层的最低温度,也代表酰基链的“熔点”。当磷脂发生相变时,可有液态、液晶和晶态共存,出现相分离,使双层膜的通透性增加,容易导致内容物渗漏。了解磷脂膜的相变性质在制备和应用双层磷脂膜时是非常重要的,磷脂膜的相变行为决定其通透性、融合、聚集和蛋白质结合等性质,并最终影响双层磷脂膜的稳定性及其在生物体系中的行为。常见磷脂的 T_c :egg PC(蛋黄卵磷脂)为 $-15 \sim 7^\circ\text{C}$,动物来源的卵磷脂为 $0 \sim 4^\circ\text{C}$;DOPC(1,2-二油酰基磷脂酰胆碱)为 -17°C ;DSPC(二硬脂酰磷脂酰胆碱)为 55°C ;DMPC(二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱)为 24°C ;DPPC(二棕榈酰磷脂酰胆碱)为 41°C 。

4. 膜的通透性

磷脂双层膜是半通透性膜,不同分子的扩散速率和离子穿过膜的速率有很大不同。脂双层是水溶性物质不易越过的通透屏障,只有那些能被特异性内嵌蛋白识别的水溶性分子才容易透过磷脂双层膜,而这些膜蛋白也只有在与膜双层内膜脂的非极性部分相互作用形成的非水环境中,才能有效地发挥作用。由于水分子间氢键结合的作用,质子和羟基离子穿过膜的速度非常快。金属离子穿过磷脂膜的扩散机制与其他小分子完全不同。一般来说,阴离子在磷脂膜上的扩散速率比阳离子快近10万倍。增加酰基链的长度、磷脂双层的厚度或增加酰基链的饱和度,对于所有溶质,不论其是否带电荷均产生同一作用,即降低其通过膜的扩散率。磷脂双层膜对钙和其他多价离子的通透性比单价离子(如钠离子)低得多。当温度在 T_c 或 T_c 以上时,膜对质子的通透性逐渐增高;当温度在 T_c 以下时,其通透性均降低,质子和水分子转运远比钠离子快。

上述理论基于磷脂囊泡在内外水相处于平衡状态。由于磷脂膜是半通透性膜,膜两侧的溶质浓度差异能产生渗透压,引起水分子在一侧聚集。在磷脂囊泡包裹高浓度溶质的情况下,外边是相对低浓度的缓冲溶液,磷脂囊泡将随着内部水容量的增加而膨胀以至于膜的面积明显增加,磷脂分子相邻空间随之增加。在这种情况下,等于或小于葡萄糖分子的溶质分子从膜中漏出的速度加快,但蔗糖的漏出不受影响。然而,某些情况下产生的压力足以使膜完全被破坏,磷脂囊泡在重新闭合前其内容物均漏到膜外水相中。

5. 生物膜的流动性

许多物理学和生物学的方法都证明膜的流动性是膜结构的一个基本特征,生物膜整个结构是动态的而并非静止不动的,这也是生物膜行使多种功能的重要体现。生物膜的流动性是指它的组成成分的分子运动,主要体现为膜中磷脂的流动性和膜蛋白的运动性。各部分的流动性是不均匀的,这与其所处的环境及生理状态有关。磷脂能以液晶状态存在于类脂双分子层内,在二维空间中可自由运动但并不会熔化,因液晶状态是允许膜成分在有序的骨架结构中得以流动的结构基础,所有降低 T_c 的因素均增加膜的流动性。 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 等二价阳离子可能会与磷酸头部基团形成离子键,束缚了邻近的磷脂分子,使它们的扩散性质减弱,从而影响膜的流动性。所以二价阳离子是生物膜良好的稳定剂,若除去它们,会引起

细胞的溶解和外周蛋白解离。胆固醇的极性羟基可以与膜脂的极性头部基团相互作用,当它嵌入脂肪酰链间,在磷脂双层中浓度低时所形成的“斑区”内,其相变温度曲线比纯磷脂要宽一些;如果膜中含高浓度胆固醇,便会限制磷脂碳氢链的自由运动,从而降低膜成分的流动性,引起膜“硬化”,抑制一些依赖于半流动环境的过程。例如,当向纯卵磷脂酰胆碱制成的磷脂囊泡中掺进多于20% (摩尔分数) 以上的胆固醇时,磷脂囊泡对水和葡萄糖的通透性会降低。与膜上有关的一些过程,如某些跨膜传送的催化运载反应、内吞作用和胞泌作用等都靠半流动的环境才能进行。生物膜的流动性是一切膜结构行使功能的基础,可使细胞内的各种代谢活动顺利进行,它影响膜融合、酶的功能、受体的运动和功能,还与其他诸如免疫、细胞分裂和发育、衰老、疾病等生命活动有密切关系。

6. 膜脂的多型性

膜脂是生物膜的基本组成物质,它们的存在形态多种多样。1968年, Luzzati 等人^[10] 用 X 射线衍射技术证明,从生物膜中提取的膜脂,在充分水化后,并不一定都以片层形式存在,而是根据膜脂的种类和实验条件不同,可能以多种形式存在,例如胶束 (Micelle)、六角形相 (Hexagonal phase)、立方体相 (Cubic phase) 等,在改变条件后,这些结构之间可以互相转变。人们把这种现象称为脂多型性 (Polymorphism of lipid)。之后由于技术条件的不断发展,特别是³¹P-NMR 和冰冻断裂电子显微镜技术的应用,使得脂多型性问题的研究取得了显著的进展。

磷脂是两亲性物质,即一部分是亲水头部,另一部分是疏水尾部。改变水化程度、温度和 pH 等条件,它们可能以不同的相态存在。最常见的几种相态如图 1.2(a) 所示。从图下方所示的水的质量分数可以看出,当形成胶束的脂浓度达到临界胶束浓度 (Critical micelle concentration, CMC) 后首先形成胶束溶液。胶束由头部在外、尾部在内的球体组成,这是水包油 (Oil in water) 的类型。反之,在水极少时则为油包水 (Water in oil) 的反胶束 (Inverted micelle) 形式,此时形成头部在内、尾部在外的反胶束,头部中间围绕少量水。 H_I 与 H_{II} 分别称为六角 I 相和六角 II 相,它们都是由胶束或反胶束所组成的柱状结构,其截面呈整齐的六角形二维晶体排列。值得一提的是,在研究生物膜脂多型性问题时, H_{II} 具有重要意义。图 1.2(a) 中 L_α 相为双层相。此外,近年来对立方体相有着较大的关注,立方体相的基本骨架是正立方体,但脂类是组成此立方体的单元物质,其局部结构为双层结构,如图 1.2(b) 所示。

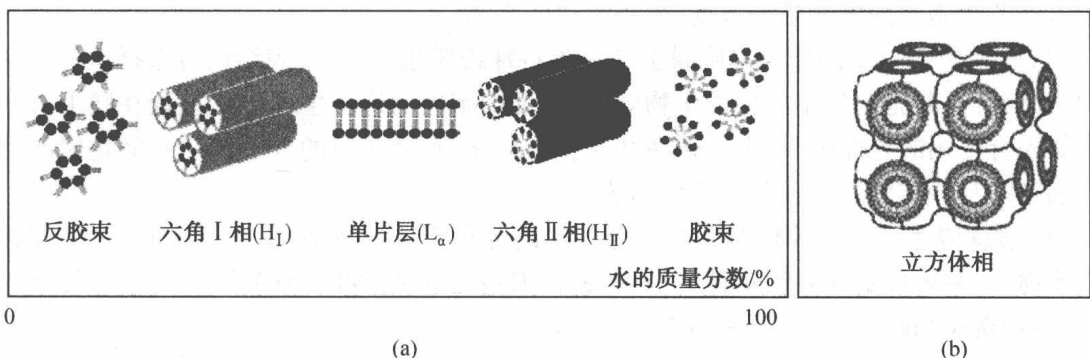


图 1.2 水的质量分数改变引起的磷脂相变示意图

因此,除 L_α 为脂双层结构外,包括立方体相在内的其他所有相都统称为非双层相。但从分子运动的观点看, L_α , L_I , H_I , H_{II} 等都是各向异性的,而立方体相和胶束等则都是各向

同性的。这一基本性质成为探测多型性结构的重要依据。

在过去的几十年里,磷脂的生物相容性和生物降解性质使得其组装体在许多领域得以应用^[11,12],比如生物医学。从简单的脂肪酸、甘油二酯到复杂的神经节苷酯和脂多糖类,越来越多的脂类得以发现。磷脂和糖脂是复杂化学成分的化学中间体,它们在一定条件下可以呈现出液晶单片层状态,如磷脂囊泡、磷脂管等结构。这些组装体在医药领域具有广泛的应用。而非单层的磷脂超分子结构,如立方体相,由于其保留了磷脂的生物相容性,从而克服了它的一些缺点。特别重要的是,与单片层磷脂组装体相比,非单层的磷脂超分子结构具有优异的物理结构稳定性,如立方体相具有耐胃液能力,可用于载带口服药物。目前,对于由一种或少数几种脂类组成的人工膜体系,脂多型性的出现及其转变条件已基本明确,对于这一现象产生的机理也已提出了相应的模型。但对于脂多型性结构可能具有的生物学意义还有待进一步研究。

1.1.4 生物膜的功能

在生命起源的最初阶段,正是有了脂性的膜,才使生命物质——蛋白质与核酸获得与周围介质隔离的屏障,从而保持聚集和相对稳定的状态,继之才有细胞的发展。因此,生物膜是任何活细胞必不可少的结构。复杂的生物膜结构是生物膜功能多样性的基础,生物膜不仅仅是细胞结构的重要组成部分,同时还与细胞所具有的一些功能息息相关。生物膜的功能复杂多样,但它们却不完全相同,在特定区域起特定的作用。总的来说,生物膜的主要功能可分为以下5种。

(1)保护和屏障作用。膜系统不仅把细胞与外界环境隔开,而且把细胞内的空间分隔,使细胞内部区域化,即形成各种细胞器,从而使细胞的代谢活动“按室进行”。各区域内均具有特定的pH、电位、离子强度和酶系等。生物膜不仅维持细胞的完整性和形状,与外界隔离以保证内部的代谢,而且维持膜内外的化学梯度,保证生理活动正常进行。同时,内膜系统又将各个细胞器联系起来,共同完成各种连续的生理生化反应。

(2)物质交换。生物膜的另一个重要特性是对物质的透过具有选择性,控制膜内外进行物质交换,可通过扩散、离子通道、主动运输及内吞外排等方式来控制物质进出细胞。各种细胞器上的膜也通过类似方式控制其小区域与胞质进行物质交换。高度的选择性使得生物膜能够调节细胞膜两侧物质的浓度,维持渗透的平衡。

(3)受体作用。受体作为细胞膜上的一类特殊跨膜蛋白,其外表结构可选择性地和细胞外物质结合,引起胞内发生相应的生物效应,保证细胞内的许多生理生化过程在膜上有序进行。如光合作用的光能吸收、电子传递和光合磷酸化、呼吸作用的电子传递及氧化磷酸化过程分别是在叶绿体的光合膜和线粒体内膜上进行的。

(4)信息传递作用。具有识别功能的多糖链分布于质膜外表面,似“触角”一样能够识别外界物质,并可接受外界的某种信号刺激,将细胞外的刺激经一系列膜上的信号传导与调控,最终转换成细胞内的应答,使细胞做出相应的反应。

(5)融合作用。融合作用可使得细胞膜的边界发生变化,有助于研究膜质和蛋白质的生物合成机理。

1.2 仿生膜种类

由于天然生物膜种类繁多且制备涉及复杂的纯化过程,因此仿生膜被用来研究生物膜的生物物理性质。仿生膜从层数上可分为单层膜、双层膜和多层膜。单层膜主要是指类脂膜;双层膜包括平板双层膜和脂质体,平板双层膜又可分为非支撑平板双层膜和支撑平板双层膜;多层膜主要指磷脂浇铸膜。支撑平板双层膜又可分为3类:固体表面支撑平板双层膜、固体支撑杂化双层膜、聚合物垫支撑磷脂双层膜。此外,近年来还发展了一类新型的双层膜模型,即液滴界面双层膜。

1.2.1 磷脂单层膜

磷脂单层膜主要是指类脂膜,最早的类脂膜是由 Langmuir 及其学生 Blodgett 发明的,因此也称为 Langmuir-Blodgett 膜,简称 L-B 膜。其形成过程如图 1.3 所示,首先是将两亲性的类脂溶于易挥发的有机溶剂中,铺展在平静的气-水界面上,待溶剂挥发后沿水面横向施加一定的表面压,这样溶质分子便在水面上形成紧密排列的有序单分子膜。尽管 L-B 膜是单层膜,但是它作为生物膜最简单的模型系统,一直受到人们的极大重视,特别是可以人为控制表面压、亚相组成、温度,或者把 L-B 膜转移到基底上,借助表面敏感技术来研究生物膜构象的变化,以及蛋白质和药物与生物膜之间的相互作用^[13]。因此,L-B 膜作为模拟生物膜具有诸多优势。但是,由于 L-B 膜为单层膜,和真实的细胞膜相比,结构和性质都相差甚远。

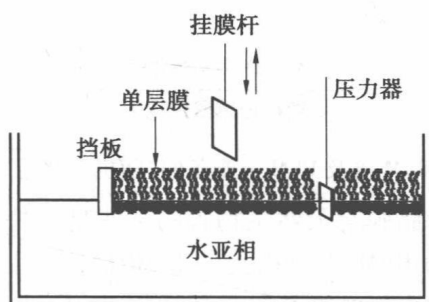


图 1.3 类脂 L-B 膜的形成过程示意图

1.2.2 平板双层膜

1. 非支撑平板双层膜

Mueller 等人^[14]于 1962 年首次制备出一种用于研究膜的电学性质的非支撑平板双层膜,从此开辟了用生物膜的基架构成简单模型、系统研究复杂的生物膜结构与功能的新途径。其制备过程如下:先准备一个有机玻璃或其他易于清洗的材料制成的实验槽,中间以聚四氟乙烯或其他疏水性能良好的材料作为隔板,在隔板中打一个小圆孔,孔的面积不超过 0.1 cm^2 。实验槽的制备关键是使隔板与槽体胶合严密,否则测量时就会因绝缘性不佳而无法进行。在槽内加入所需的水溶液,把小孔浸没,用毛刷或微量注射器将一滴磷脂溶液加到小孔中。由于隔板具有极好的亲脂疏水性,故脂滴比较容易在小孔四周附着并覆盖整个小

孔,随着脂滴从中间慢慢变薄,最后可自发形成双分子层。而沿着小孔周围积有较厚的磷脂,形成一个圈,它对磷脂双层膜起支撑作用,形成的磷脂双层膜如图 1.4 上图所示。通过光学或电学手段可以表征该方法制备的磷脂双分子层。光学方法是在反射光下,用低倍目镜观看,当膜形成时就由亮变黑(由于膜的厚度小于可见光波长的缘故),所以这种膜又称为黑膜(Black Lipid Membranes, BLM)。电学方法可测量 BLM 的电容,其特征值为 $0.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$,膜形成后,电容值就稳定在特征值左右。然而用上述方法成膜的成功率并不是很高,因此很多研究者试图改进这一方法,其中最出色的是 Montal-Muller 法^[15]。该法是先将磷脂溶液滴加到水溶液表面,待溶剂挥发后,在水面上形成磷脂单层,然后用电动机或其他驱动装置使带有小孔的疏水性隔板从液面上往下或从水面下往上拉,这样两边的单层就会叠合成双层脂膜。这种成膜方法的关键是隔板运行的速度应小于 $0.5 \text{ mm}/\text{min}$,而且隔板的绝缘和防漏性非常重要,否则就不能进行电化学测量。

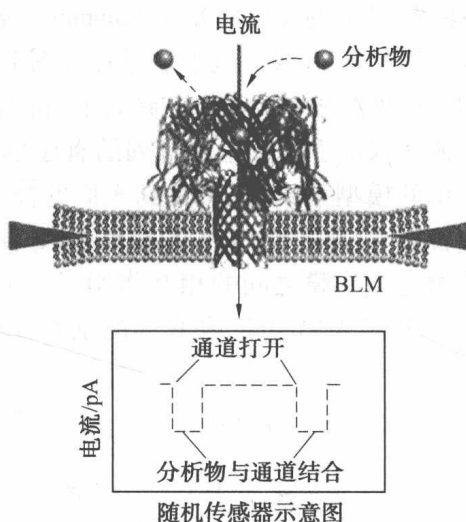


图 1.4 BLM 膜及 BLM 上制备的“随机传感器”示意图

表 1.2 是人工平板双层磷脂膜与天然生物膜的某些物理特性的比较,从表中可以看出,二者十分相似。由于面积小的 BLM 比面积大的 BLM 稳定,因此有研究者使用滤纸或聚碳酸酯膜成膜^[16],后来改用十分均匀的微孔过滤膜^[17]。还有研究人员^[18]在经疏水处理过的半圆形腔上打一个孔,将此腔旋转着从上面浸过磷脂单层,也制备出了磷脂双层膜。此膜有一定的曲率,不能认为是平板膜。

自从平板双层膜发明以来,BLM 已被用于多种生理过程的研究。其中,最重要的研究就是磷脂双层膜中离子通道的形成,这些离子通道绝大多数是通过多肽^[19]、膜蛋白^[19]、抗生素^[20]及其他能够形成孔道的生物分子与磷脂膜的相互作用产生的。Gu 等人^[21]将 α 溶血素嵌入 BLM 中,制备出了一种“随机传感器”(Stochastic sensors),如图 1.4 下图所示。 α 溶血素是由葡萄球菌产生的一种外毒素^[22],它能够跨越细胞膜形成孔道。通过基因修饰,由 α 溶血素的突变体形成的孔道可以非共价地捕获一个环糊精分子,当环糊精分子由于孔道横截面的限制作用嵌入通道中时,可以检测到固定电压下的电流改变。该电流强度会由于宿主分子与环糊精的结合而减弱。因此,通过该过程可以检测到一些较小的有机分子是否与环糊精/ α 溶血素孔道相结合^[21]。