

荧光偏振法测定生物膜的流动性

刘桂琴¹ 岳慧琴¹ 张勇²

(1.南开大学生命科学学院 天津 300071)

(2.天津体育学院 天津 300381)

摘要 本文采用荧光偏振法,研究剧烈运动前后线粒体质膜的流动性与粘度的关系。

关键词 荧光偏振法 生物膜 流动性

生物膜合适的流动性,对生物膜执行能量转换、物质转运、信息传递等重要生物学功能,有着密切的关系。这种动态构型是由液晶态决定的,质膜中脂双层结构如有磷脂与水分子存在,就产生液晶态,是固相转向液相的过渡状态,它既有液体的流动性,又有固体(晶体)的光学特性,其双折射现象,可采用荧光偏振法进行测定¹。

1 材料与仪器

1.1 试剂

0.25mol/L 蔗糖-1mmol/L EDTA pH7.6 缓冲液
2mmol/L DPH(1,6-二苯基-1,3,5-己三烯)
的四氢呋喃贮备液
毛地黄皂苷

1.2 材料

实验动物:雄性大鼠,每组6只。

运物模型:采用渐增负荷运动,第一级坡度 0° ,跑速8.2m/min;第二级坡度 5° ,跑速15m/min;第三级坡度 5° ,跑速19.5m/min。总运动时间 66 ± 24 min。

1.3 仪器

日立20PR-52D高速冷冻离心机;岛津带有偏振装置RF-540荧光分光光度计;贝克曼DU-7型紫外/可见分光光度计。

2 实验方法

2.1 大鼠心肌、骨骼线粒体的提取,采用差速离心法。取匀浆1000g离心的上清液,7000g离心15min纯化制备,线粒体蛋白含量的测定采用A205/A280紫外光度法²。

2.2 线粒体内膜(Inner mito chondria membrane; IMM)的制备与荧光探针DPH的标记,按Shinifzky法稍加修改³。毛地黄皂苷与线粒体悬液蛋白以0.7:1.0混匀,冰浴15min,12000g离心20min,两次洗

涤后,获得IMM,再与2mmol/L DPH(每mg内膜蛋白加 $2\mu\text{L}$)25 $^\circ\text{C}$ 温育30min,8000g离心15min,用释放7.5倍的DPH贮备液洗涤后,悬浮沉淀备用。

2.3 偏光装置及分析条件⁴

(1)偏光装置由起偏镜和检偏镜组成,并配有控制偏光镜角度的调节杆(见图1)。偏光器以螺丝固定于样品室,入射光线狭缝与起偏镜垂直,检偏镜与发射光线狭缝垂直。

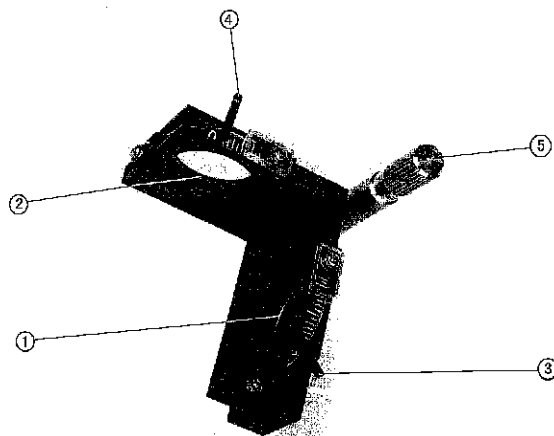


图1 偏光装置

1.起偏镜 2.检偏镜 3.起偏镜角度调节杆
4.检偏镜角度调节杆 5.固定螺丝

(2)偏振器标尺的角度的改变可以控制偏光前进的方向(见图2)。

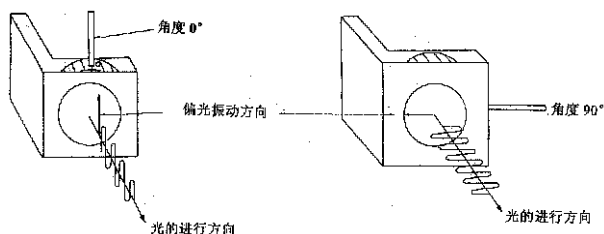


图2 偏光镜角度与偏光方向的关系

(3)偏光度的测定与计算:激发波长362nm,发射波长432nm,首先以无标记的IMM悬浊液测定。

$I_{90^{\circ},0^{\circ}}, I_{90^{\circ},90^{\circ}}$ 的荧光强度, 得出标正值 $G = \frac{I_{90^{\circ},0^{\circ}}}{I_{90^{\circ},90^{\circ}}}$, 然后再测样品, 按公式 $P = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}}$ 计算标

记 IMM 的偏振度;

I_{VV} ——起偏器和检偏器光轴均在垂直方向的荧光强度;

I_{VH} ——起偏器处于垂直, 检偏器处于水平方向的荧光强度;

G ——荧光偏振校正因子。

3 结果与讨论

3.1 运动前后大鼠线粒体内膜荧光偏振度的变化

无论是心肌线粒体内膜, 还是骨骼肌线粒体内膜, 在递增负荷力竭运动后, 偏振度增高, 心肌线粒体内膜增高 48.99%, 骨骼肌线粒体内膜增高 34.86% (见表 1)。

表 1 运动前后 IMM 的变化

| | 运动前安静时 | 运动后即刻 |
|---------|----------------|----------------|
| 心肌 IMM | 0.0992 ±0.0174 | 0.1478 ±0.0157 |
| 骨骼肌 IMM | 0.1090 ±0.0145 | 0.1470 ±0.0164 |

3.2 生物膜粘度的变化

根据 Sninitzky 等⁵ 人建立的经验公式, 偏振度与质膜的关系为: 膜微粘度 n (泊) = $\frac{2P}{0.46 - P}$ 。由此可得, 大鼠心肌线粒体内膜粘度运动前为 0.5568 泊, 运动后为 0.9710 泊, 粘度增加 74.39%, 而骨骼肌线粒体内膜的粘度由 0.6248 泊增加到 0.7800 泊, 增率为 24.84%。

3.3 对测定结果的分析

线粒体的主要生物学功能是通过氧化磷酸化形成腺苷三磷酸(ATP) 高能分子供给生物体活动的能

量, 这种生物化学反应过程, 需质膜具有合适的流动性⁵。偏振度增加, 粘度增加, 显示出质膜流动性下降, 酶蛋白功能受阻, 氧化磷酸化作用降低, 能量供应不足导致机体呼吸加深, 刺激无反应的疲劳病态现象。

本文实验结果与 Hackenbrock 和 Slater 等的“扩散”和“碰撞”假说基本相符⁶。力竭性的运动改变膜蛋白侧向运动的微环境, 限制各组分之间的碰撞过程, 影响到 ATP 的合成。

4 结论

采用荧光偏振法测定生物膜流动性, 设备要求简单, 测定方法亦可规范化, 对于病理诊断、药理鉴定和生物膜结构和功能的研究, 都是非常简而易行的适用技术。若与小角 X 光衍射、中子衍射相结合, 可从分子水平研究生物膜流动的方式, 探索药物分子作用的位点。

参考文献

- 1 孙志贤. 现代生物化学理论与研究技术, 北京: 军事医学科学出版社, 1995
- 2 张丰德、王秀玲. 近代生物学技术, 第二版, 天津: 南开大学出版社, 2001
- 3 程德基, 冯元怡, 林克椿. 呼吸链底物和抑制剂对线粒体内膜流动性的影响, 生物化学杂志, 1986(2): 37~42
- 4 日本岛津制作所, RF-540 用偏光测定附件说明书
- 5 M Shinitzky and Y Barenholz. Fluidity parameters of Lipid regions determined by Fluorescence polarization. Biochimic et Biophysica Acta, 1978, 515: 367~394
- 6 C R Hackenock. Lateral diffusion and electron transfer in the mitochondria inner membranes. Trends Biochem Sci., 1881, 6: 151~154

Determination of the biological membranes fluidity by the fluorescence polarization

Liu Guiqin¹ Yu Huiqin¹ Zhang Yong²

(1. College of Life Sciences, Nankai Univ., Tianjin 300071)

(2. Tianjin Institute of physical Education, Tianjin 300381)

Abstract The polarization of the mitochondria membranes in rats were determined in this article, and that research into the reation between membranes and fluidity during the fatigue after the incremental exercise.

Key words Fluorescence polarization Biological membranes Fluidity