

# 质膜微囊的分离及原子力显微镜研究

陈莹莹, 孙润广, 王 博, 张 明

(陕西师范大学物理学与信息技术学院生物物理与生物医学工程实验室, 西安 710062)

**摘要** 采用非去污剂在 OptiPrep 梯度中漂浮超声处理质膜的方法, 从鼠肺中分离质膜微囊, 在原子力显微镜下以不同条件进行了观察. 该非去污剂法能分离出完整的质膜微囊, 在去离子水稀释 500 倍条件下得到了清晰的质膜微囊的原子力显微镜图片, 建立了一种新的快速分离完整质膜微囊的方法和用原子力显微镜观测质膜微囊结构的新方法.

**关键词** 质膜微囊; 非去污剂法; 原子力显微镜

**中图分类号** O621.14\*5

**文献标识码** A

**文章编号** 0251-0790(2007)12-2299-04

质膜微囊(Caveolae)是直径为 50~100 nm 的球状、椭球状和烧瓶状细胞表面凹陷, 在 20 世纪 50 年代由日本科学家 Yamada<sup>[1]</sup> 于美国华盛顿大学发现. 20 世纪 90 年代 Rothberg 等<sup>[2]</sup> 发现了质膜微囊标志蛋白 Caveolin, 最终确认了这种结构的存在.

质膜微囊富含胆固醇、鞘磷脂、糖鞘脂、酰基鞘氨醇、GPI 锚定蛋白及标志蛋白 Caveolin-1, Caveolin-2 和 Caveolin-3, 在 4 °C 下不溶于非离子去污剂. 质膜微囊参与跨细胞运输(Transcytosis, 包括内吞和外排)、胆固醇转运、信号转导、胞外毒素、细菌、病毒的内吞和胞内  $\text{Ca}^{2+}$  稳态平衡的维持等多种生物学过程<sup>[3]</sup>. 为了对质膜微囊进行深入细致的研究, 对其进行分离是非常重要的实验环节. 目前从组织或组织培养细胞中分离质膜微囊的常用方法有两种: (1) 在蔗糖梯度中漂浮非离子去污剂 Triton X-100 不溶的质膜<sup>[4]</sup>; (2) 在 OptiPrep 梯度中漂浮超声处理质膜<sup>[5,6]</sup>.

本文将上述两种方法结合并对其进行了改进, 采用非去污剂法在 OptiPrep 梯度中漂浮超声处理质膜, 克服了去污剂法可能将质膜微囊中易溶于 Triton X-100 的脂成分或蛋白除去的缺点; 通过改变超声条件、离心速率以及 OptiPrep 与缓冲液的比例, 克服了在 OptiPrep 梯度中漂浮超声处理质膜中难以除去部分组织碎片的缺点, 简便快速地从鼠肺中分离出完整的质膜微囊, 并用原子力显微镜在不同条件下对质膜微囊进行了观察, 得出了最佳观察条件, 获得了清晰的质膜微囊原子力显微镜图片. 建立了一种新的快速分离完整质膜微囊的方法和用原子力显微镜观测质膜微囊结构的新方法.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine)和乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA 二钠盐)购自 Amresco 公司; Percoll 细胞分离液购自 Pharmacia 公司; OptiPrep 密度梯度分离液购自 AXIS-SHIELD 公司; 其它试剂均为国产分析纯. SPM-9500J3 原子力显微镜, 日本岛津公司; CF16RX 高速离心机、CS150GXL 超速离心机、DGF-U 全自动密度梯度制备取出设备, 日本日立公司; KQ3200B 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; DY89-1 型电动玻璃匀浆机, 宁波新芝生物科技股份有限公司.

### 1.2 方 法

1.2.1 质膜微囊的分离 参考文献[5,6]的方法并作了适当的改进, 即采用非去污剂法在 OptiPrep 梯

收稿日期: 2007-05-16.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20772077)、教育部科学技术研究重点项目(批准号: 104167)和陕西师范大学研究生培养创新基金(批准号: 2007CXS023)资助.

联系人简介: 孙润广, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物物理和生物医学工程研究. E-mail: sunrun Guang@snnu.edu.cn

度中漂浮超声处理质膜. 实验用体重 18 ~ 26 g 的雄性 ICR 小鼠 6 只, 下述实验在碎冰上进行, 将小鼠断颈处死, 取其肺, 用生理盐水涮洗, 用滤纸吸干后称重为 1.013 g. 剪碎, 加入 6.75 mL 缓冲液 A (0.25 mol/L 蔗糖, 1 mmol/L EDTA 二钠盐, 20 mmol/L Tricine, pH = 7.8) 充分匀浆. 在 4 °C 下以 3930 r/min 的速度离心 10 min (高速离心机, T15A36 转子), 得到 6 mL 不含细胞核的上清液, 置于容量瓶中固定在超声波清洗器振源处, 在冰浴冷却下超声 1 h (始终保持超声波清洗器内为冰水混合物, 下同).

在 5 mL 离心管中加入含体积分数 30% Percoll 的缓冲液 A 3.7 mL, 再将 0.8 mL 超声后的上清液小心加载其上, 在 4 °C 下, 以 29000 r/min 的速度离心 1 h (超速离心机, S52ST 转子, 下同). 取出离心管, 可见上层红色溶液与下层乳白色半透明溶液间有一条明显的 2 ~ 3 mm 厚的白色 (略带黄色) 不透明环带, 距离心管底约 3 cm, 此即质膜组分. 用 1 mL 注射器抽出, 共得约 3.7 mL 抽出物, 置于容量瓶中固定在超声波清洗器振源处冰浴超声 3 h.

在超声后的样品中加入 3.4 mL 体积分数为 50% 的 OptiPrep (预先以缓冲液 B 稀释, 缓冲液 B: 0.25 mmol/L 蔗糖, 6 mmol/L EDTA 二钠盐, 120 mmol/L Tricine, pH = 7.8) 和 0.3 mL 缓冲液 A, 使 OptiPrep 的最终体积分数为 23%.

在 5 mL 离心管底部加入 1.5 mL 处理后的样品, 用全自动密度梯度制备取出设备在样品上铺体积分数为 20% 到 10% 的 OptiPrep 连续梯度, 在 4 °C 下以 23000 r/min 的速度离心 2 h 后, 取出离心管, 用 1 mL 注射器从每管上部抽出 1.5 mL 溶液, 共得约 7.5 mL 抽出液.

在抽出液中加入 4.5 mL 50% OptiPrep 和 3 mL 缓冲液 B, 使 OptiPrep 的最终体积分数为 20%. 在 5 mL 离心管底部加入 3 mL 处理后的样品, 小心铺上 1.5 mL 5% OptiPrep, 在 4 °C 下以 23000 r/min 的速度离心 90 min. 取出离心管, 在距管底约 3 cm 处明显可见约 1 ~ 2 mm 厚的白色絮状环带, 用 1 mL 注射器抽出, 此即富含质膜微囊的组分, 共得到约 2 mL 富含质膜微囊的组分.

1.2.2 原子力显微镜观察 将提取出来的质膜微囊分别用缓冲液 B 和去离子水稀释不同的倍数, 摇匀, 取 4  $\mu$ L 稀释后的溶液, 直接滴在新鲜解离的云母片上, 在室温下于空气中晾干. 观测质膜微囊的表面形貌. 微悬臂为  $\text{Si}_3\text{N}_4$  (OLYMPUS), 探针呈菱形, 尖端半径小于 20 nm, 采用恒力模式, 操作电压 -0.103 V, 扫描速度 2 Hz, 将接触作用力控制在 3 ~ 4 nN 量级以内作用.

## 2 结果与讨论

### 2.1 质膜微囊的分离

目前最常用的分离质膜微囊的方法是根据它在低温下不溶于非离子去污剂 Triton X-100 的性质<sup>[4]</sup>. 由于去污剂的影响, 用该方法得到的质膜微囊常常呈 U 形或不完整的弧形结构<sup>[7]</sup>. 同时, 由于脂筏也具备低温下不溶于非离子去污剂的性质, 因此采用该方法很难将质膜微囊与脂筏分离开来.

非去污剂法纯化质膜微囊的方法是利用质膜微囊独特的浮力密度进行分离. 质膜微囊的膜脂组分主要是鞘磷脂类和胆固醇, 相对密度较小, 且具有较高的脂质/蛋白质比率<sup>[5]</sup>, 因此在密度梯度离心中漂浮在离心管的上部, 从而使它们与其它质膜区域分离开. 用非去污剂法分离出的质膜微囊比用其它方法获得的质膜微囊纯度更高<sup>[5,7,8]</sup>, 同时, 提取出的质膜微囊富含异源三聚体  $G_\beta$ <sup>[5]</sup>, 而去污剂处理过的质膜微囊中并不含有异源三聚体  $G_\beta$ , 说明非去污剂法克服了去污剂法可能除去质膜微囊包含的某些蛋白的缺陷, 分离出的质膜微囊更接近细胞中的真实情况. 非去污剂法分离质膜微囊的关键步骤是两次冰浴冷却超声, 其目的是破碎细胞质膜. 第一次超声使细胞质膜变成小的碎片, 第二次超声进一步破碎细胞质膜, 使质膜微囊与其它质膜部分脱离.

### 2.2 原子力显微镜观察

2.2.1 不同溶液对质膜微囊原子力显微镜图像的影响 将实验得到的质膜微囊溶在含 5% OptiPrep 的缓冲液 B 中, 分别用缓冲液 B 和去离子水将其稀释 10 倍, 用原子力显微镜观察.

结果表明, 在用缓冲液 B 稀释 10 倍的质膜微囊的原子力显微镜图像中质膜微囊边界模糊. 进一步缩小扫描范围可提高分辨率, 质膜微囊边界仍非常模糊, 无法得到清晰的图像. 用去离子水稀释 10 倍的质膜微囊的原子力显微镜图像 (图 1) 边界较清晰, 但有明显的聚团现象, 说明需要进一步稀释.

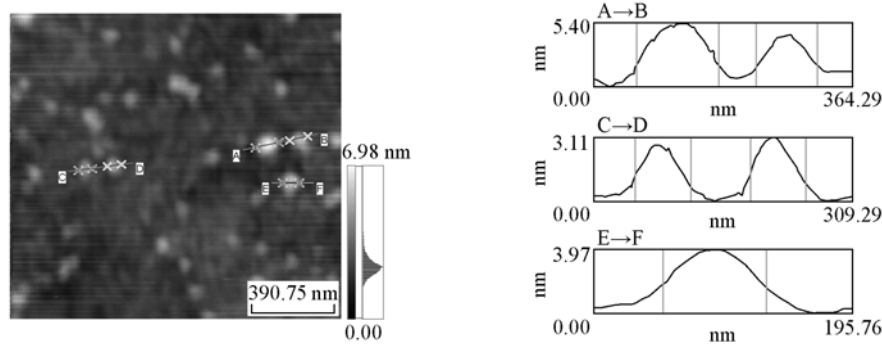


Fig. 1 Caveolae diluted 10 times with deionized water (size:  $1.56 \mu\text{m} \times 1.56 \mu\text{m}$ )

2.2.2 浓度对质膜微囊原子力显微镜图像的影响 用去离子水稀释 100 倍的质膜微囊的原子力显微镜图像见图 2(A). 质膜微囊分布较均匀, 边界较清晰. 进一步缩小扫描范围, 从图 2(B) 中可见到质膜微囊边界稍稍模糊. 这是由于提取出来的质膜微囊溶于含 5% OptiPrep 的缓冲液 B 中, 稀释 100 倍时 OptiPrep 和缓冲液 B 中 EDTA 二钠盐及蔗糖的影响仍较大, 在较高分辨率下这些因素会影响观察.

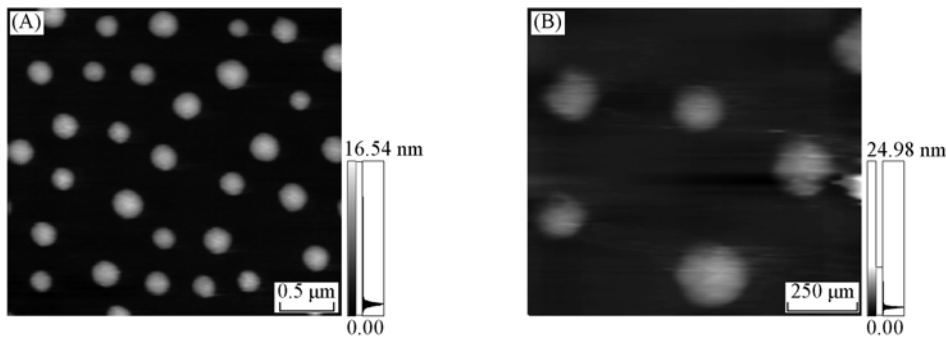


Fig. 2 Caveolae diluted 100 times with deionized water

(A) Size:  $3.12 \mu\text{m} \times 3.12 \mu\text{m}$ ; (B) size:  $1.17 \mu\text{m} \times 1.17 \mu\text{m}$ .

用去离子水稀释 500 倍, 原子力显微镜观察[图 3(A)]可见质膜微囊完全分散开, 分布均匀, 边界清晰. 进一步缩小扫描范围, 由图 3(B) 可见质膜微囊边界十分清晰, 说明用去离子水稀释 500 倍时 OptiPrep 和缓冲液 B 中的蔗糖影响已经基本消除. 图 3(C) 中可见一些三维球状、椭球状和烧瓶状的质膜微囊. 用去离子水稀释 1000 倍时, 质膜微囊浓度过小, 在原子力显微镜下很难观察到.

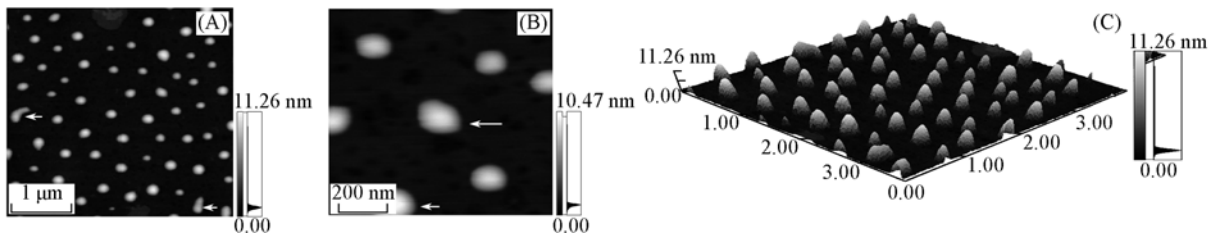


Fig. 3 AFM images of caveolae diluted 500 times with deionized water

(A) Size:  $3.75 \mu\text{m} \times 3.75 \mu\text{m}$ ; (B) size:  $937 \text{ nm} \times 937 \text{ nm}$ ; (C) three-dimensional image of the image (A).

2.2.3 质膜微囊的原子力显微镜图像 由图 3 可见, 质膜微囊呈球状、椭球状[图 3(B) 中箭头所示]和烧瓶状[图 3(A) 中箭头所示]结构, 大小在  $66 \sim 300 \text{ nm}$  范围内, 超过  $100 \text{ nm}$  的结构应为相互融合的质膜微囊. 经超声处理后的质膜碎片由于没有去污剂的影响, 在疏水作用下在水溶液中自动形成完整的囊泡. 比较图 1 和图 3, 前者明显可见大量聚团, 后者质膜微囊完全分散开, 据此推测质膜微囊的密度依赖于其初始浓度及其沉积到云母表面的量. 图像的对比度依赖于针尖上的作用力, 作用力太大易破坏质膜微囊, 太小则对比度差, 很难得到清晰、稳定的图像, 最佳作用力在  $3 \sim 4 \text{ nN}$  量级以内.

### 3 结 论

质膜微囊是细胞膜上特定的、直径约为  $50 \sim 100 \text{ nm}$  的微区域, 一般呈球状、椭球状和烧瓶状凹陷

结构,也可以在细胞膜上平铺,或形成管状结构,或形成分离的小泡,并且融合成直径大于 100 nm 的结构<sup>[9~11]</sup>. 质膜微囊广泛存在于各种细胞中,尤其富含于内皮细胞、脂肪细胞、血管平滑肌细胞、成纤维母细胞和肺上皮细胞<sup>[10]</sup>. 在本实验中,不但观测到烧瓶状凹陷结构,而且还观测到大量的球状和椭球状结构. 这可能与质膜微囊微环境的改变有关.

本文采用非去污剂法在 OptiPrep 梯度中漂浮超声处理质膜提取质膜微囊,克服了去污剂法可能将质膜微囊中易溶于 Triton X-100 的脂成分或蛋白质除去的缺点. 同时,由原子力显微镜图片与电子显微镜图片<sup>[5,6]</sup>对比可知,通过改变超声条件、离心速率以及 OptiPrep 与缓冲液的比例,克服了在 OptiPrep 梯度中漂浮超声处理质膜难以除去部分组织碎片的缺点,简便快速地从鼠肺中分离出完整的质膜微囊,建立了一种快速分离完整质膜微囊的新方法. 该方法简便易行,能够得到完整的质膜微囊,为进一步在原位研究质膜微囊与信号转导、质膜微囊与疾病的关系奠定了基础.

目前,国内外对质膜微囊进行形态研究多采用电子显微镜观察,需要对样品进行固定、染色等处理,而用原子力显微镜可以直接对样品进行观测,无需过多处理. 同时,电子显微镜观察过程中电子束对生物样品破坏较大,而用原子力显微镜对质膜微囊进行观测时仅有 3~4 nN 量级以内的接触作用力,对样品伤害很小. 因此,用原子力显微镜观测到的质膜微囊更接近于生理状态下的真实情况.

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Yamada E. . J. Biophys. Biochem. Cytology[J], 1955, **1**(5): 445—458
- [ 2 ] Rothberg K. G. , Heuser J. E. , Donzell W. C. , *et al.* . Cell[J], 1992, **68**(4): 673—682
- [ 3 ] Zajchowski L. D. , Robbins S. M. . Eur. J. Biochem. [J], 2002, **269**(3): 737—752
- [ 4 ] Sargiacomo M. , Sudol M. , Tang Z. L. , *et al.* . J. Cell Biology[J], 1993, **122**(4): 789—807
- [ 5 ] Smart E. J. , Ying Y. S. , Mineo C. , *et al.* . Cell Biology[J], 1995, **92**(22): 10104—10108
- [ 6 ] JIANG Yan(姜艳), PAN Zui(潘最), CHEN Jian-Wen(陈建文), *et al.* . Chinese Science Bulletin(科学通报)[J], 1999, **44**(3): 304—307
- [ 7 ] Lisanti M. P. , Scherer P. E. , Vidugiriene J. , *et al.* . J. Cell Biology[J], 1994, **126**(1): 111—126
- [ 8 ] Chang W. J. , Ying Y. S. , Rothberg K. G. , *et al.* . J. Cell Biology[J], 1994, **126**(1): 127—138
- [ 9 ] Shin J. S. , Gao Z. M. , Abraham S. N. . Science[J], 2000, **289**(5480): 785—788
- [ 10 ] Smart E. J. , Graf G. A. , McNiven M. A. , *et al.* . Mol. Cell Biology[J], 1999, **19**(11): 7289—7304
- [ 11 ] Pelkmans L. , Kartenbeck J. , Helenius A. . Nature Cell Biology[J], 2001, **3**(5): 473—483

## Separation of Caveolae and Atomic Force Microscopy Study of Them

CHEN Ying-Ying, SUN Run-Guang\*, WANG Bo, ZHANG Ming  
(Laboratory of Biophysics and Biomedicine, College of Physics and Information Technology,  
Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

**Abstract** Caveolae were spherical, elliptical or flask-shaped invaginations(50—100 nm in diameter) on the surface of cell plasma membrane. They play important roles in many biological processes, such as endocytosis, pinocytosis, cholesterol transport, signal transduction, internalization of bacteria and viruses, and so on. In this research, caveolae were separated from rat lungs by floating plasma membrane treated with ultrasonic in OptiPrep gradient(a detergent-free method), and were observed by atomic force microscopy(AFM) under different conditions. By using this method, intact caveolae were isolated from plasma membrane, and the best AFM images of caveolae were obtained by diluting them 500 times with deionized water. So, a new method for separating caveolae rapidly and completely was established, and a new way to observe the structures of caveolae was set up.

**Keywords** Caveolae; Detergent-free method; Atomic force microscopy(AFM)

(Ed.: J, H, Z)