

## 荧光探针法研究囊泡融合的动力学\*

何 煦<sup>2</sup> 顾新华<sup>1</sup> 赵国玺<sup>2</sup> 戴光松<sup>1</sup> 吴世康<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院感光化学研究所, 北京 100101; <sup>2</sup> 北京大学化学系, 北京 100871)

**摘要** 应用荧光探针法研究双(月桂酸)三乙醇胺酯形成囊泡的融合动力学过程。工作中合成和应用了含长烷基链的荧光探针一十六烷基罗丹明 B, 以保证其进入囊泡的双分子层。随着融合的进行, 探针浓度被稀释, 探针分子逐渐由二聚体离解成为单体, 从而使其荧光强度增强。研究发现, 由双(月桂酸)三乙醇胺酯形成的囊泡, 其融合速率和膜结构与介质酸度、环境温度等密切相关, 当介质酸度处于一定的 pH 范围时, 形成的囊泡膜具有最致密的结构, 其融合也最慢。

**关键词:** 荧光探针, 囊泡融合, 动力学

在众多的生理过程中, 细胞膜融合是一个至关重要的现象<sup>[1,2]</sup>, 譬如, 细胞的生长、细胞间物质的传输、以及胞吞、胞泌等都与此有关; 另外, 对生物膜融合问题的深入研究, 还将使药物通过载药脂质体直接引入细胞成为可能<sup>[3]</sup>。从物理分析的角度看, 对合成囊泡及脂质体形成的模拟膜的研究可以为从分子水平来研究膜融合的机理提供独特的机会。

七十年代以来, 对模拟生物膜之间融合的研究方兴未艾, 并提出和应用了多种实验方法及手段, 如自旋标记、NMR 等来观察囊泡体系的变化, 但这些方法都存在致命的缺点, 即其实验结果不能绝对地归因于膜的融合, 根据 Martin 等<sup>[4,5]</sup>的研究发现, 这些实验结果也可很好地用囊泡间包容物的相互交换来加以解释, 但也有文献<sup>[5,6]</sup>报导, 当含有长疏水链的蛋白质溶于生物膜时, 所引起的相变温度变化不能用自由分子的交换来解释, 而可以比较肯定地认为是由膜融合所引起。

本工作是利用一种含长链的两亲化合物—十六烷基罗丹明 B (简称 CERB) 作为荧光探针来研究囊泡融合与环境酸度及温度之间的关系。根据我们以前的工作<sup>[7]</sup>, 当 CERB 从二聚体变成单体形态时, 其荧光强度将增强, 据此可以清楚、直观地用以研究囊泡融合的动力学过程。

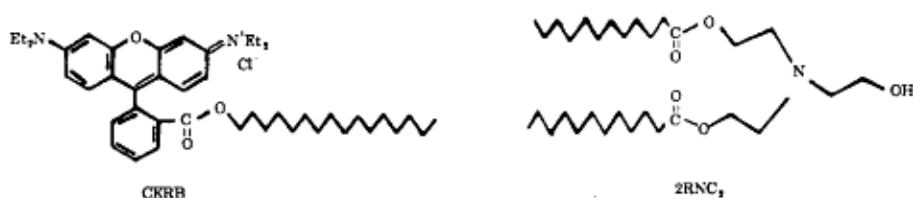
### 1 实验部分

实验中所用的荧光探针 (CERB) 及用以形成囊泡的化合物 (双(月桂酸)三乙醇胺酯, 简称 2RNC<sub>2</sub>), 具有如下的结构, 经表征结构正确无误。

实验中所有的荧光光谱均在 Hitachi MPF-4 型荧光光谱仪上记录, 荧光光谱仪带有超级恒

1994-07-01 收到初稿, 1994-09-29 收到修改稿。联系人: 吴世康。 \* 国家自然科学基金资助项目

温槽以控制测定温度.



囊泡的制备均采用超声法. 分别配制两种含  $2RNC_2$  的水溶液 ( $2RNC_2$  浓度均为  $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 其中一种加有探针化合物 ( $[CERB] = 4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). 然后在  $50 \sim 60 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴中用上海产 CQ 250 型超声仪 (功率为 250W) 超声 20 分钟, 此时用电镜观察可以看到大量囊泡产生, 如图 1. 室温下存放  $\sim 10$  小时后进行以下实验.

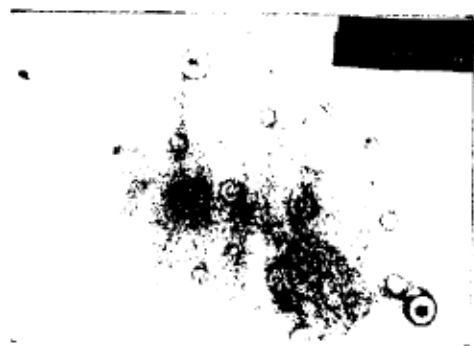


图 1 双(月桂酸)三乙醇胺酯在  $\text{pH}=1.2$  水溶液中经超声后的电镜照片

Fig.1 Electron micrograph of vesicles of triethanolamine dilaurate in  $\text{pH}=1.2$  solution by ultrasonic dispersion ( $\times 24000$ ) (concentration:  $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

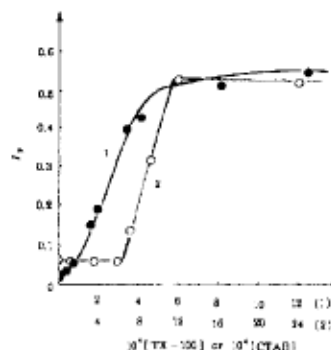


图 2 CERB 在 Triton X-100 (1) 和 CTAB (2) 溶液中的荧光相对强度与表面活性剂浓度的作图

Fig.2 Plot of relative emission intensity of CERB in TX-100 (1) and CTAB (2) solutions vs. their concentrations ( $[CERB] = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  
●: in Triton X-100, ○: in CTAB

取  $0.10 \text{ mL}$  含有探针的囊泡溶液, 与  $1.90 \text{ mL}$  不含探针的囊泡溶液混合均匀后, 以  $540 \text{ nm}$  光激发, 并持续记录  $580 \text{ nm}$  处荧光强度的变化情况. 然后根据式 (1)<sup>[8]</sup> 计算囊泡融合的程度.

$$f = \frac{F_t - F_0}{F_\infty - F_0} \times 100 \quad (1)$$

式中  $f$  为囊泡融合程度 (% Fusion),  $F_0$  和  $F_t$  分别是起始及  $t$  时刻的荧光强度,  $F_\infty$  是当  $F_t$  值随时间变化已很小时在石英液槽中加入 1 滴 Triton X-100 时的荧光强度. 根据实验<sup>[9]</sup>, 当 Triton X-100 浓度达到  $1.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 可使  $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $2RNC_2$  溶液的囊泡完全破坏而转化为混合胶束, 而在  $2 \text{ mL}$  溶液中加入 1 滴 Triton X-100 相当于 Triton X-100 的浓度为  $2.4 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 此时, 可以认为 CERB 分子全部以单体形式分布于混合胶束中.

实验中所有试剂均经纯化后应用.

## 2 结果与讨论

CERB 属于两亲化合物, 在水中主要以二聚体 (浓度高时以三聚体) 形式存在. 但在表面活性剂溶液中, 当表面活性剂形成胶束时, 由于疏水作用的影响, CERB 分子很容易由水相转移到胶束的油相中, 二聚体解离成为单体, 从而使其 580nm 处的单体荧光强度增强, 如图 2 所示.

虽然 CERB 单体的荧光强度  $F$  与介质的酸度及环境温度等因素有关, 增加溶液酸度 (可使 CERB 质子化从而猝灭单体荧光) 和升高温度 (可以增加非辐射衰减效率从而使单体荧光猝灭) 都可使 580nm 处的荧光强度降低, 但  $F/F_{\infty}$  的比值与 pH 值和温度  $T$  的关系不大, 如表 1、表 2 所示. 因此, 可以认为: 在改变酸度和温度的情况下以荧光强度的比值  $((F_t - F_0)/(F_{\infty} - F_0))$  来衡量囊泡融合的程度是可行的.

表 1 在不同 CERB 浓度条件下  $F/F_{\infty}$  与 pH 值的关系  
Table 1 The relationship between  $F/F_{\infty}$  and pH value of solution in different concentrations of CERB

pH	[CERB]/mol·L <sup>-1</sup>			
	2.0×10 <sup>-5</sup>	1.0×10 <sup>-5</sup>	4.0×10 <sup>-6</sup>	2.0×10 <sup>-6</sup>
2.9	0.11	0.17	0.25	0.35
2.0	0.10	0.17	0.26	0.36
1.2	0.12	0.18	0.26	0.35

表 2 在不同 CERB 浓度条件下  $F/F_{\infty}$  与温度  $T$  的关系  
Table 2 The relationship between  $F/F_{\infty}$  and temperature in different concentrations of CERB

$T/^\circ\text{C}$	[CERB]/mol·L <sup>-1</sup>			
	2.0×10 <sup>-5</sup>	1.0×10 <sup>-5</sup>	4.0×10 <sup>-6</sup>	2.0×10 <sup>-6</sup>
25	0.10	0.17	0.26	0.36
40	0.10	0.17	0.26	0.37

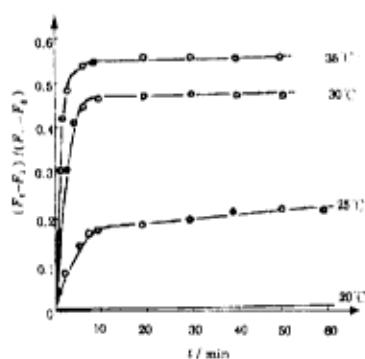


图 3 pH=1.2 体系囊泡的融合曲线  
Fig.3 Kinetics of fluorescence enhancement of CERB in vesicle when pH=1.2  
( [CERB] = 2.0 × 10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup> )

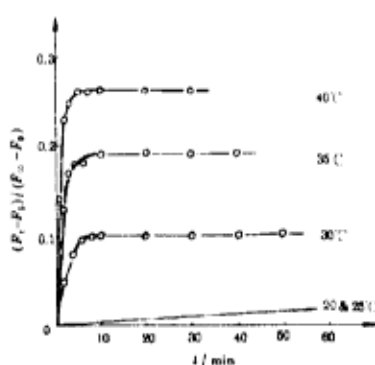


图 4 pH=2.0 体系囊泡的融合曲线  
Fig.4 Kinetics of fluorescence enhancement of CERB in vesicle when pH=2.0  
( [CERB] = 2.0 × 10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup> )

图 3- 图 5 分别为囊泡在不同 pH 值 (1.2, 2.0, 2.9) 和不同温度下的融合曲线. 从图中可以发现, 三种不同 pH 条件下的囊泡在 20 °C 时都不发生融合, 其  $F_t$  值在 1 小时以内无明显变化;

但当温度升高到 25 °C 时, pH1.2 的囊泡体系已发生了明显的融合, 而 pH2.0 的体系仍没有融合的迹象, 这说明当体系的 pH 值从 1.2 变到 2.0 时, 形成的囊泡在某些性质上发生了变化. 另外, 从图 3- 图 5 中我们可看到: 各体系的融合速率都随温度升高而加快, 以  $((F_t - F_0)/(F_\infty - F_0)) \sim t$  曲线的初始斜率代表融合速率  $k$ , 然后以  $k \sim T$  作图, 可以得到图 6 的结果. 从图 6 可以发现各体系囊泡融合速率随温度变化时具有以下规律:  $k(\text{pH}=1.2) > k(\text{pH}=2.9) > k(\text{pH}=2.0)$ . 这个次序与用 DSC 法测得囊泡的相变温度 ( $T_c$ ) 得到的结果基本一致, 即 pH=1.5、2.4 和 3.2 时所形成囊泡的  $T_c$  分别为 28.5 °C、30.8 °C 和 28.2 °C. 另外, 对含囊泡的 2RNC<sub>2</sub> 溶液的的表面张力及发泡能力的测试中都发现具有类似的次序 [9].

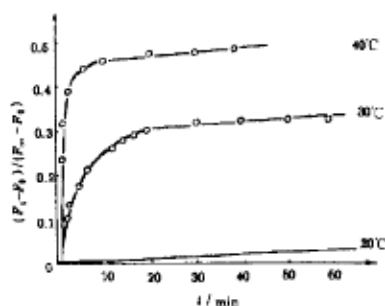


图 5 pH=2.9 体系囊泡的融合曲线  
Fig.5 Kinetics of fluorescence enhancement of CERB in vesicle when pH=2.9  
( [CERB] =  $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  )

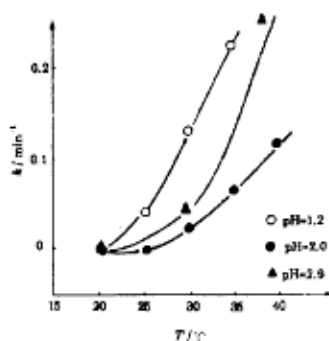
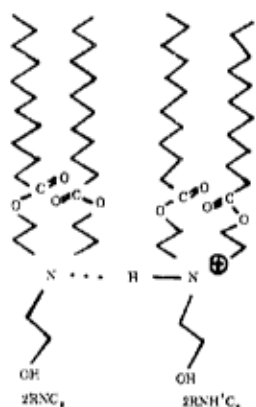


图 6 各体系在不同温度下的融合速率  
Fig.6 Fusion rate at various temperatures

在不同 pH 条件下, 所以出现如上述的变化次序, 可以认为有如下原因. 由于囊泡融合的速率及相变温度都与囊泡膜的结构特征密切相关. 一般说来, 内在晶形越好, 结构越致密, 囊泡的相变温度就越高, 融合也越慢. 因此以上结果表明: 在上述不同 pH 条件下, 以 pH2.0 时的囊泡



结构排列最紧密, 这可能与该条件下存在着较强的氢键作用力有关. 这是因为非离子形式的 2RNC<sub>2</sub> 在酸性水溶液中会生成正铵离子, 非离子 (2RNC<sub>2</sub>) 与正铵离子 (2RNH<sup>+</sup>C<sub>2</sub>) 之间除了范氏作用力外还存在氢键作用 (如左图所示). 随溶液 pH 值变化, 溶液中非离子和正离子的相对比例发生变化, 只有当 pH 值适中 (如 pH=2.0 ~ 2.4) 时, 正铵离子与非离子的比例相当, 形成的整体氢键结合条件最佳, 于是双分子膜的有序排列也最紧密, 从而出现了如上述的变化次序.

**结论:** 综上所述, 荧光探针法能较直观地观察囊泡融合的动力学过程, 并籍此了解囊泡的结构情况. 在用这种方法研究双 (月桂酸) 三乙醇胺酯形成的囊泡融合速率时, 发现介质的酸度和环境温度对囊泡的形成和融合有着密切的关系.

## 参 考 文 献

- 1 Hoekstra D, Boer T D, Klappe K, Wilschut J. *Biochemistry*, 1984, 23:5675
- 2 Steinman R M, Mellmen J S, Muller W A, Cohn Z A. *J. Cell Biol.*, 1983, 96:1
- 3 Struck D K, Hoekstra D, Pagano R E. *Biochemistry*, 1981, 20:4093
- 4 Martin F J, MacDonald R C. *Biochemistry*. 1976, 15:321
- 5 Papahadjopoulos D, Hui S, Vail W J, Poste G. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1976, 448:245
- 6 Papahadjopoulos D, Vail W J, Moscarello M. *J. Membrane Biol.*, 1975, 22:143
- 7 顾新华, 戴光松, 吴世康. 感光科学与光化学, 1995, 13:78
- 8 Pozzi D, Lisi A, Ros I D et al. *Photochem. Photobiol.*, 1993, 57:426
- 9 何 煦. 北京大学博士研究生学位论文. 1994

### Fluorescence Method for Studying the Fusion of Vesicle

He Xu<sup>2</sup> Gu Xinhua<sup>1</sup> Zhao Guoxi<sup>2</sup> Dai Guangsong<sup>1</sup> Wu Shikang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Photographic Chemistry, Academia Sinica, Beijing 100101;

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Beijing University, Beijing 100871, P.R.China)

**Abstract** Fluorescence method was used to measure the kinetics of fusion of vesicles, which was formed by triethanolamine dilaurate by means of ultrasonic dispersion. The method relies upon the dequenching of Cetyl Rhodamine B (CERB) in vesicles. The concentration of CERB was diluted with the fusion, and dimer of CERB was dissociated into the monomer, resulting in the enhancement of fluorescence intensity of CERB. Result indicated that the fusion rate of the vesicles formed by triethanolamine dilaurate closely related to the structure of bilayer and acidity of the media, and when the acidity of the media was in the certain range of pH, the vesicles formed had closer packed structure as well as slower fusion rate.

**Keywords:** Fluorescence probe, Vesicle fusion, Kinetics