

# 电子顺磁共振技术在细胞膜研究中的应用

李 曦 葛志强 \*

(天津大学化工学院制药工程系, 天津 300072)

**摘要** 电子顺磁共振(EPR)技术具有高灵敏度、高分辨率的特性, 通过自旋标记方法, 可以用来研究膜蛋白质拓扑学、膜蛋白间相互作用、膜蛋白与磷脂膜相互作用过程中膜蛋白的结构变化以及细胞膜的流动性。在膜脂和膜蛋白的细胞生物学研究中具有广阔的应用前景。现对 EPR 技术在细胞膜研究中的应用进展做一综述。

**关键词** 电子顺磁共振; 蛋白质拓扑学; 蛋白质间相互作用; 膜的流动性

细胞膜是由脂类和蛋白质以非共价键相互作用结合而共同形成的二维流动体系。在膜中, 脂类以双分子层形式存在, 具有流动性。膜的流动性对细胞的生活及正常功能的实现是必需的, 因此它与细胞的许多重要过程有关。膜蛋白是一类与膜脂相互作用的蛋白质, 执行很多重要的生物学功能。了解膜蛋白在细胞膜上的结构特征对研究膜蛋白的功能具有重要意义。膜蛋白可分为外周膜蛋白, 内在膜蛋白, 脂锚定膜蛋白(lipid-anchored protein)等。外周膜蛋白一般为水溶性, 容易分离、纯化, 也较易进行 X 射线衍射分析。内在膜蛋白为疏水性, 需要与细胞膜共同形成稳定的结构。因此, 传统的研究方法, 如 X 射线结晶衍射法和可溶性核磁共振技术(NMR)对细胞膜结构的研究受到很大限制。近年来随着科学仪器制造技术的快速发展, 这一难题有望得到解决, 例如原子力显微镜技术(AFM)、固相核磁共振技术(SSNMR)、电子顺磁共振(election paramagnetic resonance, EPR)技术在细胞膜的结构研究中均显示出了良好的潜力。

EPR 是对含有未成对电子的顺磁性物质在磁场中的吸收信号进行检测的现代分析方法。自从 EPR 现象被发现以来, EPR 理论得到很大发展, 仪器技术日益完善, 实验方法不断改进。其中, 利用自旋标记(spin label)对膜流动性以及膜蛋白进行研究的 EPR 方法十分引人注目。该方法是将顺磁性自旋标记物与膜脂结构相连, 或者利用标记物的硝基氧与被检测蛋白质中的氨基酸残基相连, 从而将具有顺磁性的结构整合入无顺磁性的膜脂以及膜蛋白分子中, 再利用自旋标记物的 EPR 吸收信号进行分析。EPR 技术具有高分辨率、高灵敏度的优点, 可以得到大量精确的结构信息。

## 1 EPR 自旋标记物

EPR 常用的蛋白质自旋标记物有胆固醇氧化亚氮, 脂肪酸氧化亚氮, doxyl-硬脂酸(DSA)(图 1), 3-2-碘醋酸-丙谷胺(IPSL), 顺丁烯二酰亚胺(MSL), 1-炔氧基-2, 2, 5, 5-四甲基-D3-吡咯啉-3-甲基磺酸酯(MTSSL)(图 2)以及 2, 2, 6, 6-四甲基哌啶-1-炔氧基-4-氨基-4-羧酸(TOAC)等<sup>[1-3]</sup>。较为常用的 IPSL 和 MTSSL 是以共价键与被测蛋白质中的半胱氨酸残基结合, 在还原条件下, MTSSL 与二硫化物的结合是可逆的, 而 IPSL 的结合则更加稳定。这两个自旋标记物结构类似, 都由一个五元环组成。不同的是 MTSSL 具有双键以及更短的连接, 从而连接更紧密, 具有更小的结构可变性以及对蛋白质主链的变化更敏感。所以, MTSSL 比 IPSL 更为常用。

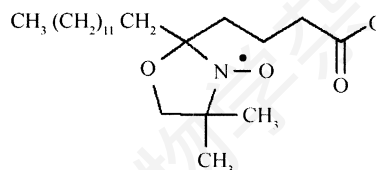


图 1 DSA 自旋标记物

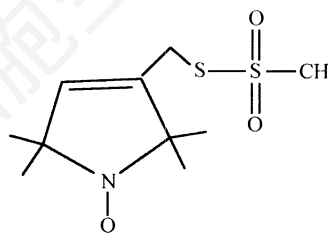


图 2 MTSSL 自旋标记物

收稿日期: 2006-10-18 接受日期: 2007-01-10

\* 通讯作者。Tel: 022-27401149, E-mail: gezhiq@eyou.com

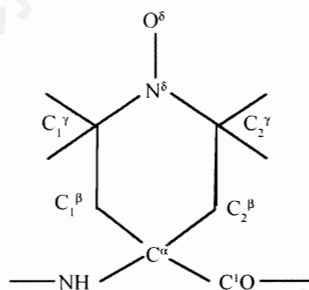


图3 TOAC 自旋标记物

TOAC自旋标记物是一类非天然氨基酸,由于其具有特殊的结构性质,使其能刚性连接(rigidly coupled)到蛋白质或肽段<sup>[4]</sup>(图3)。TOAC 优先标记晶体结构为扭船式构象的氨基酸<sup>[5]</sup>。在内生膜蛋白结构以及动力学研究中,TOAC 自旋标记物比传统的MTSSL 方法有更独特的优势。对于传统的自旋标记方法,自旋标记物与半胱氨酸侧链结合,使硝基氧基团与肽段形成较松散的结合物。因此,MTSSL 标记的肽段或蛋白质产生的 EPR 波谱主要依赖于相应侧链的运动。但是,TOAC 刚性的连接到肽段的主链,能够更精确的描绘出肽段主链的位置、方向、动力学特性。TOAC 与 $\alpha$ 碳严格的配对,因此能够直接体现肽段主链动力学特征,TOAC 自旋标记物与肽段主链的刚性连接使得它能够用类似于 $^{15}\text{N}$ -SSNMR的方法取得更精确的肽段主链动力学检测结果,使得EPR 技术能够在膜以及溶液中检测,并具有相当高的灵敏度<sup>[3]</sup>。此外,有研究表明 TOAC 不改变膜蛋白的二级结构<sup>[6]</sup>。这些优点使得 TOAC 在 EPR 研究膜蛋白结构及动力学特征中成为有力的工具。

## 2 EPR 技术在细胞膜研究中的应用

### 2.1 膜蛋白拓扑学

膜蛋白拓扑学主要研究膜蛋白的跨膜方式,即膜蛋白相对于膜的位置信息。其包括膜蛋白的跨膜部分及其动力学特征,即膜蛋白的哪些部位插入膜内,有何种运动方式;膜蛋白在膜上的整体取向,即膜蛋白的哪一端位于细胞膜的外侧,哪一端位于细胞膜的内侧等。由于直接解析蛋白质在膜内的结构非常困难,因此人们设计了很多办法,以便在不知道蛋白质空间结构的情况下尽可能地获得蛋白质相对于膜的拓扑学信息。

最近,Inbaraj 等<sup>[3]</sup>开发了一项利用 EPR 技术研究

膜蛋白拓扑学的新方法,并应用于乙酰胆碱受体(AChR)的拓扑学研究上。利用 Fmoc 固相肽段合成法将自旋标记物 TOAC 附加在 *T.californica* AChR 的跨膜结构域(M2 $\alpha$ )第 18 位上,形成 TOAC18-AChR。体外合成两种膜双分子层模型,将合成并经过一系列纯化的 TOAC18-AChR M2 $\alpha$  肽段融合到膜双分子层模型中。观察相应的 EPR 谱线宽度及超精细分裂值,分析得出 $\alpha$ 螺旋的螺旋运动倾角。

先前的研究表明,视紫红质复合物中的膜蛋白 NpHtrII 存在跨膜区和胞浆区,并由 HAMP 结构域连接。Bordignon 等<sup>[7]</sup>利用 EPR 技术研究了 NpHtrII 中 HAMP 结构域相对于膜的拓扑学特征。其利用基因技术定向诱变大肠杆菌表达带有 HAMP 结构域的视紫红质复合物蛋白,经过分离纯化、自旋标记构建在紫膜脂中,进行 EPR 波谱分析。趋近性与动力学数据表明,HAMP 结构域部分以卷曲螺旋微管束的形式存在于细胞膜内侧。该方法与目前常用的 SSNMR 法相比,具有更经济更有效的特点:(1)磷脂双层膜模型更易制得;(2)EPR 波谱法比 $^{15}\text{N}$ -SSNMR 光谱法灵敏度大约高 1 000 倍(检测下限 EPR 为  $\mu\text{g}$ ; SSNMR 为  $\text{mg}$ )。这项新的 EPR 方法还能很好的研究膜蛋白在不同的脂双分子层内的螺旋运动,而且拓扑学的主要特征(即 $\alpha$ 螺旋倾斜角度)可以直接从相应的 EPR 波谱计算,不用进行模拟。

### 2.2 膜蛋白相互作用

膜蛋白间的相互作用发挥着重要的生物学功能。膜蛋白间的相互结合一旦离开特定的疏水环境,其结构和功能将改变或丧失。目前常用于检测蛋白质相互作用的生化方法,如免疫沉淀、化学交联等很难应用于疏水环境中蛋白质间相互作用的研究,而 EPR 技术可以应用在疏水环境中蛋白质间相互作用构象变化的研究,并具有很高的灵敏性。

Zamoon 等<sup>[8]</sup>用 NMR 法以及 TOAC 标记的 EPR 光谱法研究了肌浆网磷酸受钠蛋白(PLN)与肌浆网上  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶的相互作用及其结构变化。把  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶与 TOAC 标记的 PLN 融合在两种脂双分子层模型中,分析 EPR 谱线宽度及化学位移的变化。构建了一个 PLN 与  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶相互作用的模型,并对作用表面的分子细节进行了详尽的描述。Karim 等<sup>[9]</sup>利用 EPR 法与 NMR 法研究了磷酸化在膜蛋白 PLN 调节  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶中的作用。将 TOAC 标记的 PLN 融合在脂类模型中。EPR 检测结果显示 PLN 胞浆区具有两种构象,一种为排列有序的紧凑状态,一种为动力学

上无序的松弛状态。相关研究表明磷酸化能够影响紧凑-松弛的构象转换,引起从无序到有序的转变<sup>[10]</sup>。PLN通过磷酸化的这种作用改变两种状态间的平衡来获得更大的运动性。与NMR法相比,EPR法可以应用在更具生物学活性的脂类模型中,更重要的是,EPR还可以直接检测与Ca<sup>2+</sup>-ATP酶结合的PLN,而NMR只能检测游离的PLN。

### 2.3 膜蛋白与膜相互作用

内在膜蛋白与部分外周膜蛋白能够与细胞膜形成多种结构形式,并且可根据功能的需要进行结构的改变。EPR技术是一项研究膜蛋白与膜脂相互作用的有力工具<sup>[10]</sup>。

Kweon等<sup>[11]</sup>利用EPR技术研究了EPSIN-N末端同源性结构域的 $\alpha$ 螺旋结构与源于生物体的磷脂膜的相互作用。利用基因技术定向诱导大肠杆菌表达带有ENTH结构域的蛋白质,把自旋标记物MTSSL标记的蛋白质经过分离纯化构建在源于生物体的磷脂膜上,进行EPR检测。从EPR谱线可以分析出 $\alpha$ 螺旋存在于膜的头部基团区域。该研究表明EPR技术可以应用于真正细胞膜研究,也为更好的模拟细胞环境下膜蛋白与膜脂的相互作用研究提供了依据。

Isas等<sup>[12]</sup>应用EPR技术研究了膜联蛋白的螺旋发夹结构与膜结合后的结构及动力学特征。膜联蛋白质是一类被钙离子活化后通过其螺旋发夹结构可与膜磷脂间接结合的蛋白质。为了研究螺旋发夹结构与膜结合的机制,将可溶的及与膜结合的膜联蛋白B12经过自旋标记后,由EPR进行检测。EPR趋进性及移动性参数表示,螺旋发夹结构经Ca<sup>2+</sup>诱导后与膜形成静止的复合物,起到分子栅栏的作用。此外,Thomas等<sup>[13]</sup>还利用EPR技术研究了神经肽Y(NPY)与脂质体膜的相互作用。利用Fmoc固相肽段合成法将TOAC标记在猪NPY(只在NPY的第17位与人类的不同)肽段主链的第2、32、34位,利用EPR、NMR检测与脂质体膜的结合能力及渗透能力。从EPR、NMR谱线可以分析出游离的、二聚的以及及与膜结合的NPY,并构建出一个NPY与带电膜结合的模式。脂质体是真正的磷脂双层膜的组成成分,因而是一种更好的膜模型,但超出了NMR法的分子量限制,使其不能用来研究与膜结合的肽段的结构。SSNMR要求膜模型定向良好,增加了研究复杂程度。EPR法不受上述限制,可以应用于脂质体膜模型,是肽段或蛋白质与膜磷脂相互作用模型的最有前景的研究手段。

此外,Jaud等<sup>[14]</sup>利用EPR技术研究了外周膜蛋白与膜相互作用的机制。其首先建立了磷脂酶A<sub>2</sub>的C2结构域与POPC双分子层膜结合的分子动力学模型,通过EPR技术监测C2结构域与膜结合的深度和方向,研究膜对接蛋白与膜的相互作用。结果表明,联合应用EPR技术,分子动力学模型以及具有高分辨率的蛋白质结构是一项很有效的研究膜对接蛋白与膜脂分子间相互作用的方法。

### 2.4 细胞膜流动性

膜的流动性对细胞正常的生理功能是必需的,可以说它对细胞的作用是多方面的。首先,膜上的酶活性与膜的流动性有关:在一定范围内,膜的流动性较大有利于膜中酶分子侧向扩散和旋转运动,使酶活性增加;其次,膜的流动性与跨膜的物质运输的关系:在促进扩散和主动运输中,一些载体蛋白的运动强度决定于它们所在细胞膜的流动性。此外,由受体介导的内吞作用没有适宜的膜流动性是不能完成的;第三,药物的治疗作用以及不良反应与细胞膜的流动性相关。自旋标记的EPR技术是检测细胞膜流动性微小变化的有力工具。

Rodi等<sup>[15]</sup>利用DSA自旋标记的EPR技术,比较研究了不同浓度去污剂的增溶能力对牛血红细胞以及人血红细胞膜流动性的影响,以及细胞膜脂的组成。通过解读EPR谱图发现,膜流动性随超精细参数A<sub>max</sub>的升高而降低。牛血红细胞膜的流动性低于人红细胞,而牛红细胞膜鞘磷脂含量较高。结论认为细胞膜中鞘磷脂含量的高低与膜流动性程度紧密相关。揭示出膜流动性受到细胞膜组成的影响,进而可以解释膜组成的差异对物质传递以及酶功能的影响。

Marczak等<sup>[16]</sup>利用EPR技术研究了抗癌药羟基柔红霉素和去甲氧基柔红霉素对急性髓性白血病患者红细胞膜的流动性,膜蛋白构象,细胞内微黏度的影响。分别应用自旋标记物DSA、顺丁烯二酰亚胺(MSL)(与具有巯基的膜蛋白结合)、TEMPAMINE与细胞作用,通过分析超精细分裂值、W/S比率等参数,发现羟基柔红霉素对上述3个指标有明显影响,而去甲氧基柔红霉素没有对上述指标产生具有统计学意义的影响。说明去甲氧基柔红霉素对人红细胞的不良作用较小。

## 3 小结

细胞膜结构与功能的研究是目前细胞生物学研

究的一个热点,尤其是镶嵌于其中的蛋白质的结构与功能更是该领域研究的难点之一。EPR 技术具有高灵敏度、高分辨率的特性,在膜蛋白结构与膜流动性的研究中具有很大优势。但是到目前为止,还没有利用该技术研究膜蛋白  $\beta$  折叠的报道<sup>[4]</sup>,用肽段合成法配合 EPR 技术研究膜蛋白还受肽段大小的限制 (<60 个氨基酸)<sup>[3]</sup>,所以,从目前对细胞膜的研究来看,拥有广阔前景的 EPR 技术仍需通过开发新的自旋标记物以及 EPR 技术来扩大研究应用的范围。

#### 参考文献 (References)

- [1] Luis GM *et al. Biochim Biophys Acta*, 2007, **1768**: 52
- [2] Kirby TL *et al. Biochemistry*, 2004, **43**: 5842
- [3] Inbaraj JJ *et al. J Am Chem Soc*, 2006, **128**: 9549
- [4] Marsh D. *J Magn Reson*, 2006, **180**: 305
- [5] Crisma M *et al. J Pept Res*, 2005, **65**: 564
- [6] Karim CB *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 14437
- [7] Bordignon E *et al. J Biol Chem*, 2005, **280**: 38767
- [8] Zamoon J *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 4747
- [9] Karim CB *et al. J Mol Biol*, 2006, **358**: 1032
- [10] Metcalfe EE *et al. Biochemistry*, 2005, **44**: 4386
- [11] Kweon DH *et al. Mol Cells*, 2006, **21**: 428
- [12] Isas JM *et al. Biochemistry*, 2005, **44**: 16435
- [13] Thomas L *et al. Biochim Biophys Acta*, 2005, **1714**: 103
- [14] Jaud S *et al. Biophys J*, 2007, **92**: 517
- [15] Rodi PM *et al. Biophys Chem*, 2006, **122**: 114
- [16] Marczak A *et al. Cell Biol Int*, 2006, **30**: 127

## Application in Cell Membrane By EPR

Xi Li, Zhi-Qiang Ge\*

(Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology,  
Tianjin University, Tianjin 300072, China )

**Abstract** Spin-labeled electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy is highly sensitive on determining the topology of membrane protein, the interaction of protein-protein and the structural variation of membrane protein during the interaction with phospholipids and membrane fluidity. It is a promising way of cell biology research. This paper reviewed the progression on applying spin-labeled EPR on research of cell membrane.

**Key words** EPR; protein topology; protein interaction; membrane fluidity

Received: October 18, 2006 Accepted: January 10, 2007

\*Corresponding author. Tel: 86-22-27401149, E-mail: gezhiq@eyou.com