

基于荧光漂白恢复技术检测乳脂肪球膜上生物分子的流动性

陈晨, 李靖雯, 李丹, 韦伟, 王兴国

(江南大学食品学院, 食品安全与营养协同创新中心, 江苏无锡 214122)

摘要:为了推动乳制品的精准评价,采用高分辨率激光共聚焦显微镜(CLSM)结合多荧光探针技术观察乳脂肪球的微观结构,并利用荧光漂白恢复技术(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)定量检测母乳、牛乳、羊乳中乳脂肪球膜上生物分子的流动性。结果表明:3种乳的微观结构基本一致,均出现了新月区,证明了新月区是局部磷脂富集区;乳脂肪球中甘油三酯和水溶性蛋白质的动态分子比例较高,极性脂质和磷脂酰胆碱的动态分子比例较为接近,鞘磷脂的动态分子比例最差;牛乳中甘油三酯的流动性慢于母乳和羊乳,母乳中极性脂的流动性最慢。FRAP可以直观地表征乳脂肪球膜上生物分子的流动性,可为乳状液中膜界面的生化特性研究提供新的方法。

关键词:母乳脂;乳脂肪球膜;极性脂;荧光漂白恢复技术(FRAP);流动性

中图分类号:O657;TS207

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2022)01-0137-06

Biomolecules mobility on milk fat globule membrane using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)

CHEN Chen, LI Jingwen, LI Dan, WEI Wei, WANG Xingguo

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: In order to promote the accurate evaluation of milk products, a high-resolution confocal laser microscope (CLSM) combined with multi-fluorescence probe technology was used to observe the microstructure of different mammalian milk, including human milk, cow milk, and goat milk, and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) was used to quantitatively detect the biomolecules mobility on the milk fat globule membrane in different mammalian milk. The results showed that the microstructures of the three kinds of milk were basically the same, and crescents areas appeared in the CLSM diagram of the three kinds of milk were proved to be the local phospholipids enrichment areas. The mobile fraction of triacylglycerol and water soluble proteins in milk fat globules was relatively high, the mobile fraction of polar lipids and phosphatidylcholine in different milk was relatively close, while the sphingomyel showed the lowest mobile fraction. The mobility of triglycerides in cow milk was slower than that of goat milk and human milk, and the mobility of polar lipids in human milk was the slowest. FRAP could intuitively characterize the biomolecules mobility on the milk fat globule membrane, and could provide a new method for the study of the biochemical properties of the membrane interface in the emulsion.

Key words: human milk fat; milk fat globule membrane; polar lipids; fluorescence recovery after photobleaching; mobility

收稿日期:2021-04-06;修回日期:2021-09-27

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31701558)

作者简介:陈晨(1987),女,硕士研究生,研究方向为光谱分析和仪器检测分析(E-mail)8272700223@jiangnan.edu.cn。

通信作者:韦伟,副教授(E-mail)weiw@jiangnan.edu.cn。

母乳是人类提供给新生婴儿最理想的食物,也是婴幼儿喂养的黄金标准,其中50%以上的能量是由脂肪供给的^[1]。母乳中的脂肪是以大小不同的乳脂肪球的形式存在的,其主要结构是外部生物膜包裹内部的甘油三酯核心,外部的生物膜是由极性

脂和蛋白质等所形成的,具有三层膜结构,通常称为乳脂肪球膜(Milk fat globule membrane, MFGM)^[2]。目前,对乳脂肪球膜微观结构已有了较为初步的认识^[3-5],但是对于乳脂肪球膜上成分的分布情况以及一些特殊结构(如新月区)还未有进一步的认识^[6]。乳脂肪球膜同其他生物膜一样具有一定的流动性,整个膜系统中不断进行着物质运输、新陈代谢与成分更新,这些动态过程的发生也是各项生命活动正常进行的必要条件,但目前对乳脂肪球膜特定成分流动性的研究还比较匮乏。

在食品分析检测领域中,乳状液的流动性主要是通过物理方法进行测定的,比如通过测定黏度随剪切速度的变化表征其流变学的性质,也有研究报道通过测定乳脂肪中磷脂脂肪酸组成的差异性来表征乳脂肪球膜的流动性,脂肪酸链越短,不饱和程度越高,乳脂肪球膜的流动性越大^[7]。但这些测试方法检测时间长,且并不能够直观精准地表征乳状液单个分子特定成分的流动性。

本研究通过荧光漂白恢复技术(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)直接定量测定乳脂肪球膜上不同生物分子的流动性,该方法的原理主要是利用高能激光照射样本的某一特定区域,使该区域内标记的荧光分子不可逆地猝灭,这一区域称荧光漂白区,随后由于样本中脂质分子或蛋白质分子的运动,周围非漂白区荧光分子不断向荧光漂白区迁移,使得荧光漂白区的荧光强度逐渐地恢复到原有水平^[8]。荧光漂白恢复的参数值能够直接比较被标记单个分子特定成分(脂质和蛋白质)的流动性差异,可直观评价其他乳与母乳的接近程度,推动乳制品的精准评价。同时通过精准表征天然乳结构特性,优选天然乳成分的添加,可全方位模拟天然乳^[9],为配方奶粉的开发提供基础。

乳脂肪球主要由脂肪、蛋白质和碳水化合物组成的,本实验利用尼罗红标记乳脂肪球内核的甘油三酯,尼罗蓝标记乳脂肪球膜上的水溶性蛋白,Rh-DOPE标记乳脂肪球膜上的磷脂内层与外层,Rh-DOPE是一种外源性磷脂荧光探针,其头部接有荧光团^[4],NBD-PC和NBD-SM分别标记分布在磷脂双层膜外层上的磷脂酰胆碱(PC)和鞘磷脂(SM),NBD-PC和NBD-SM分别为PC和SM疏水尾部的脂肪酸链上接有荧光基团的外源性染料^[10]。利用高分辨率激光共聚焦显微镜(CLSM)结合FRAP技术观测各体系的微观结构,定量分析乳脂肪球的生物分子流动性,该方法直观地表征天然乳特定成分的流动性,可为乳状液中膜界面的生化

特性研究提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

新鲜母乳,本实验随机选取一位无锡产妇的成熟乳,该产妇无任何与脂质代谢相关疾病;羊乳,由杭州彩洋牧业有限公司提供;牛乳,由无锡天资乳业有限公司提供。天然乳样品储藏在 -18°C 下,并在收集24 h之内对其进行物理结构的表征和定量分析。1-palmitoyl-2-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine(16:0~12:0 NBD-PC)、尼罗红,美国Sigma-Aldrich公司;N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)di-oleoyl-phosphatidylethanolamine(Rh-DOPE)、N-[12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-sphingosine-1-phosphocholine(C12-NBD-SM),美国Avanti公司;尼罗蓝,阿拉丁生化科技有限公司;多聚赖氨酸玻片,南通臻盛实验器材有限公司。

ZEISS LSM 880 with Airyscan 高分辨率激光共聚焦显微镜(CLSM),德国Zeiss公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品染色

取10 μL 乳样,分别与0.1 mg/mL 尼罗红、1 mg/mL Rh-DOPE、0.1 mg/mL 尼罗蓝、1 mg/mL NBD-PC、0.5 mg/mL NBD-SM 按照体积比5:1、40:1、50:1、40:1、5:1 混合,避光染色30 min 以上,取10 μL 样本放置于多聚赖氨酸玻片上,盖上盖玻片,待观测。

1.2.2 乳脂肪球微观结构的测定

采用高分辨率激光共聚焦显微镜(CLSM)观测乳脂肪球的微观结构。CLSMM工作参数设置:尼罗红、NBD-SM 与 NBD-PC 荧光探针由 Ar^+ 激光器激发,其中尼罗红荧光探针激发波长为514 nm, NBD-SM 与 NBD-PC 荧光探针激发波长均为488 nm;尼罗蓝与 Rh-DOPE 荧光探针由 He-Ne 激光器激发,激发波长分别为633 nm 和543 nm。发射光接收范围为405~740 nm,针孔为90.2~156,增益值为700~909,均用40 \times 镜进行观测,扫描范围为512 nm \times 512 nm。

1.2.3 FRAP 检测乳脂肪球膜上生物分子的流动性

在FRAP实验中,先按照1.2.1方法对乳脂肪球的蛋白质或脂质进行荧光标记,通过前期实验建立的5种荧光探针的FRAP实验参数条件(表1),对乳脂肪球上较小区域内的分子施加不同高强度激

光激发脉冲和不同的漂白次数,使其不可逆地被光漂白,然后再使用低激光强度成像观测荧光漂白恢复情况,CLSM配置的高分辨率检测器可监测乳

脂肪球膜周围区域中漂白分子与未漂白分子的交换过程。同一平行3组数据,优选乳脂肪球尺寸基本一致。

表1 不同荧光探针的漂白条件

荧光探针	激光器	激发波长/nm	激光强度/%	漂白次数	漂白区域直径/ μm
尼罗红	Ar ⁺	514	0.01	30	
尼罗蓝	He-Ne	633	1.5	500	
NBD-PC	Ar ⁺	488	0.6	80	7.5(或30 pixel)
Rh-DOPE	He-Ne	543	1.8	400	
NBD-SM	Ar ⁺	488	0.2	3	

在FRAP定量分析中,通过CLSM图获得荧光漂白恢复曲线,可计算出单个分子的迁移情况,主要采用以下两个参数表征分子的流动性^[11-12]:一是荧光恢复到最后稳定值的一半时间的值,即 $t_{1/2}$,是荧光恢复后的最大稳定值与漂白所达到的最小值之差的一半与最小值的和所对应的时间减去最小值所对应的时间,它是荧光恢复速率快慢的一个简单直接的表征;二是动态分子比例(Mobile fraction, M_f),是荧光恢复后的最大稳定值与最小漂白值之间的差与漂白起始值与最小值之间的差之比,其代表了所测乳脂肪球中特定成分的动态分子比例。

1.2.4 统计分析

本文数据表示为“平均值 \pm 标准偏差”,除部分实验重复次数已作说明以外,其余实验均重复测定3次。采用IBM SPSS软件(20.0版,IBM,美国)中

ANOVA的Duncan检验法进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 时具有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 乳脂肪球的微观结构

图1为利用尼罗红标记的乳脂肪球中甘油三酯及尼罗蓝标记的水溶性蛋白质的CLSM图。由图1可见,3种乳中甘油三酯处于乳脂肪球内核的位置,呈实心球状,荧光探针尼罗红能够穿透乳脂肪球膜标记球心的甘油三酯,也说明了乳脂肪球膜是一层动态的生物膜,既可以完成物质运输等动态过程,也可以将乳脂肪球与外界环境隔开,从而保障内部物质存在的稳定性。而水溶性蛋白质环绕包裹于甘油三酯外围,母乳脂肪球结构完整,轮廓清晰,牛乳中有碎片化的水溶性蛋白质的存在,而羊乳脂肪球结构略有破损。

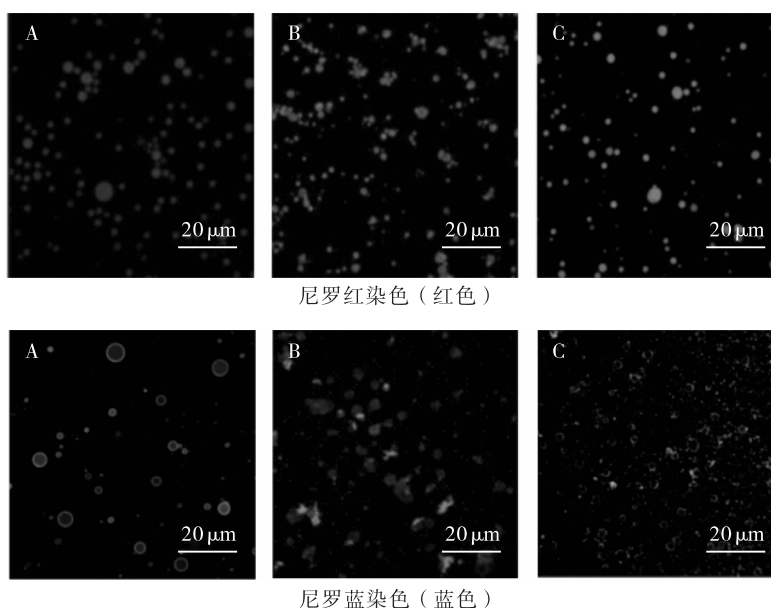


图1 母乳(A)、牛乳(B)、羊乳(C)乳脂肪球的CLSM图

图2为利用Rh-DOPE标记的乳脂肪球膜上的极性脂、NBD-SM标记的鞘磷脂和NBD-PC标记的磷脂酰胆碱的CLSM图。由图2可见,Rh-DOPE标记的乳脂肪球膜上的极性脂类在乳脂肪球

的二维赤道平面外围呈现环状荧光,能够直观地证明磷脂呈空心球状环绕包裹于甘油三酯外围,形成了外部的乳脂肪球膜包裹内部甘油三酯的结构状态。在不同的极性脂质种类中,鞘磷脂是成熟母乳

的主要极性脂质, NBD - SM 标记的鞘磷脂在乳脂肪球膜上呈现非均匀分布, 有研究者认为乳脂肪球膜上具有类似于细胞膜的鞘磷脂与胆固醇相间形成的具有紧密结构的区域^[10], 维持乳脂肪球结构。母乳中的甘油磷脂的含量仅次于鞘磷脂, 主要由 PC、磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰肌醇(PI)与磷脂酰乙醇胺(PE)组成, 是乳脂肪球膜上主要的不饱和磷脂。NBD - PC 荧光探针在母乳脂肪球上染色呈球状且乳脂肪球内核并未被染色, 说明 PC 主要集中于乳脂肪球膜上, 但用 NBD - PC 标记的

牛乳和羊乳的内核已被染色, 可能是因为样品过冷藏。

从图 2 可见, 母乳、牛乳和羊乳中 Rh - DOPE、NBD - SM、NBD - PC 标记的乳脂肪球的外围均出现了放射状且表面凸起的荧光染色区域, 形状似月牙, 被称为新月区(白色箭头指示), 另外可明显观察到凸起状荧光为附着在乳脂肪球的实体, 且此部分实体是依附于乳脂肪球的, 它们不对应乳脂肪球的部分合并或非球形乳脂肪球, 这表明附着实体被磷脂包裹, 或实体的组成中富含磷脂^[3]。

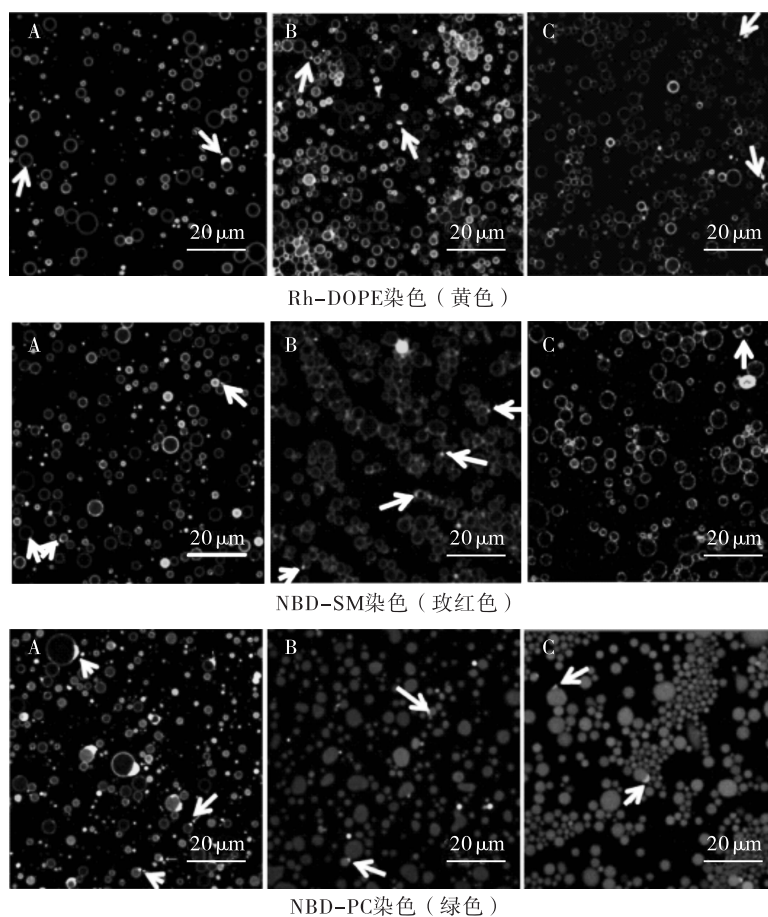


图 2 母乳(A)、牛乳(B)、羊乳(C)乳脂肪球的 CLSM 图

2.2 乳脂肪球膜上生物分子的流动性

前期的实验结果表明, 漂白区域的大小决定了荧光恢复的速度, 即相对漂白区域越大, 荧光恢复所需的时间越长^[12]。为更好地说明漂白区域的一致性, 以牛乳为例, 在漂白前的 CLSM 图中, 用圈设置了 3 个区域, 分别为用白色箭头指明的漂白区域(直径为 30 pixel)、对照区域(直径为 30 pixel)和背景区域(直径为 15 pixel), 观测荧光漂白恢复过程中这 3 个区域的变化情况, 结果如图 3 所示。

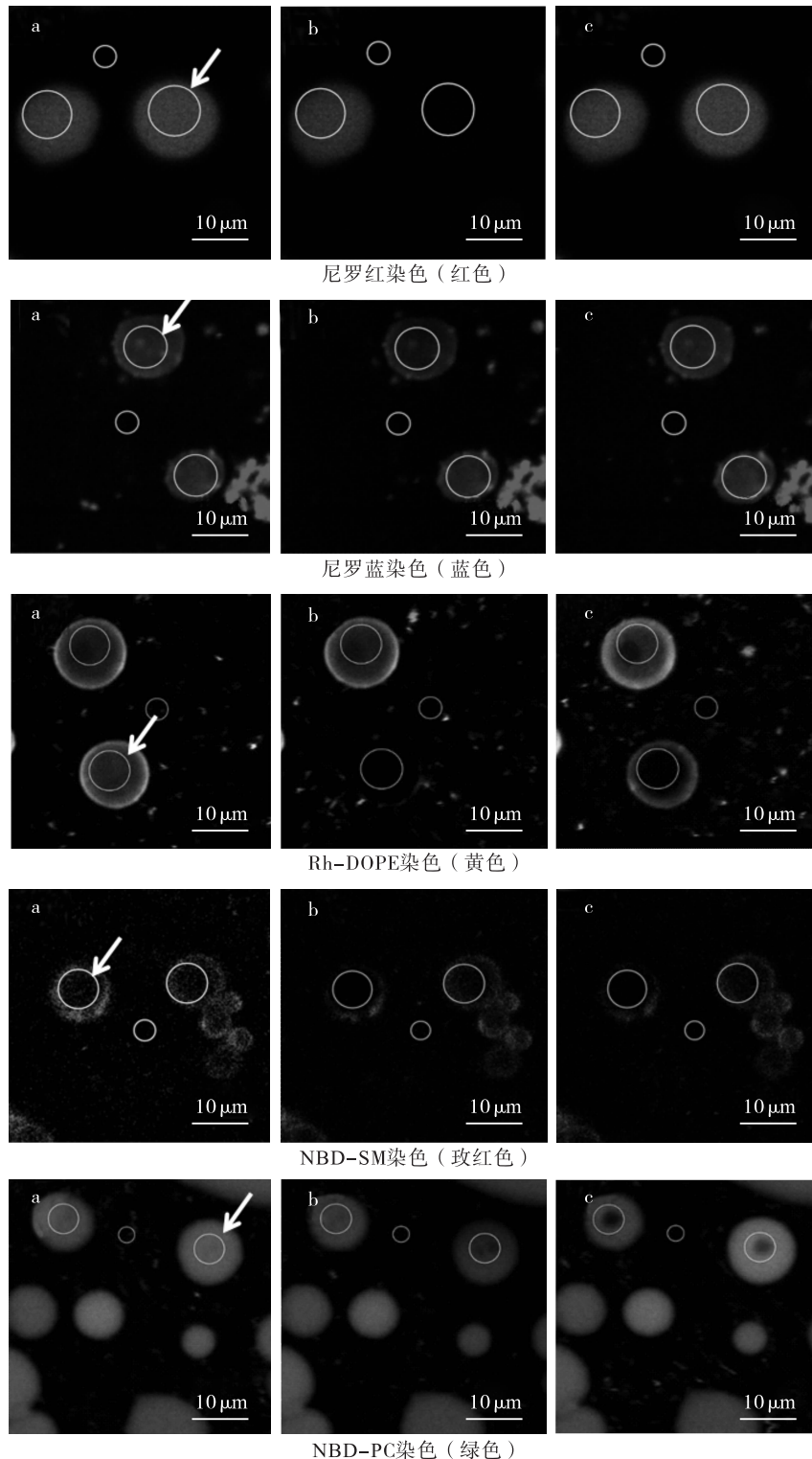
通过测定图 3 中漂白区域在荧光漂白恢复过程中的荧光强度, 绘制漂白恢复曲线。母乳、牛乳、羊乳中乳脂肪球膜上生物分子的漂白恢复曲线如图 4

所示。由图 4 可见: 漂白前选取了 5 个测试点(时间点), 荧光强度维持稳定; 在第 6 个测试点开始漂白, 荧光强度显著降低, 由于不同乳脂肪球膜上的生物分子处于流动状态, 且生物分子的微观结构不同, 导致不同乳脂肪球膜漂白区内的荧光恢复时间不同。根据图 4 计算 3 种乳中 5 种荧光探针标记的生物分子的 $t_{1/2}$ 和 M_f , 结果如表 2 所示。

由表 2 可见, 3 种乳的甘油三酯的 M_f 均在 60% ~ 70% 之间, 且 3 种乳差异不显著, 牛乳的 $t_{1/2}$ 为 (70.54 ± 14.25) s, 流动性相对较慢。牛乳和羊乳的水溶性蛋白质的 M_f 分别为 $(78.64 \pm 6.81)\%$ 和 $(86.91 \pm 1.59)\%$, 均显著高于母乳, 可能是由于乳

中的蛋白质补充至膜结构的漂白区域,牛乳和羊乳中蛋白质结构已呈现略有不完整的原因,另外3种乳的水溶性蛋白质的 $t_{1/2}$ 差异不显著。牛乳中Rh-DOPE标记的极性脂和NBD-PC标记的磷脂酰胆碱的 M_f 分别为 $(42.05 \pm 4.54)\%$ 和 $(47.12 \pm 0.63)\%$,均显著高于母乳和羊乳,母乳中极性脂的流动性相对另2种动物乳较慢。这可能是由于母乳

中含有的不饱和脂肪酸^[7]比羊乳和牛乳低,而磷脂脂肪酸的不饱和程度与脂肪球膜的流动性有很大关系,脂肪酸的不饱和度越高,乳脂肪球膜的流动性越大。3种乳中鞘磷脂的 M_f 低,这可能是由于鞘磷脂包裹胆固醇形成的具有紧密结构的区域是脂筏域^[13],从而对其流动性起到一定程度的束缚作用。



注:a.漂白前;b.漂白后;c.漂白恢复。

图3 尼罗红、尼罗蓝、Rh-DOPE、NBD-SM、NBD-PC标记的牛乳的荧光漂白恢复过程的CLSM图

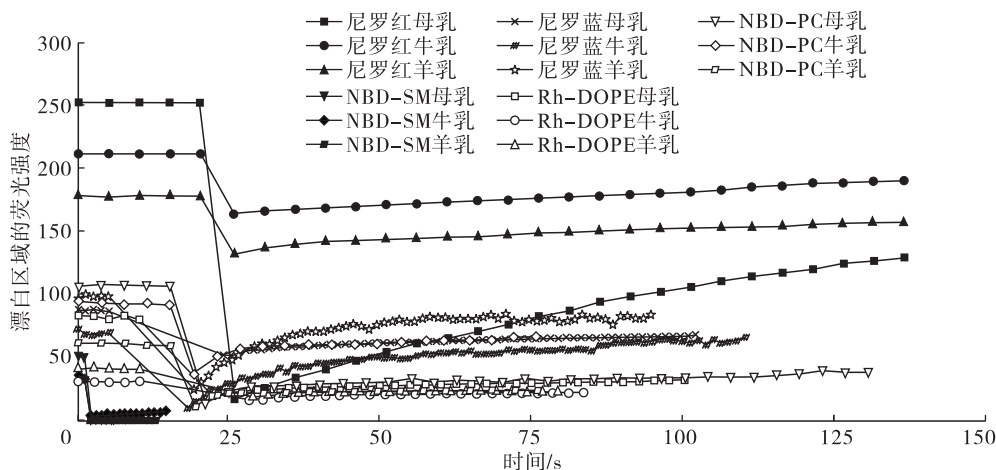


图4 母乳、牛乳和羊乳中乳脂肪球膜上生物分子的漂白恢复曲线

表2 5种荧光探针标记的母乳、牛乳和羊乳脂肪球的荧光漂白恢复特征值

荧光探针	$M_f/\%$			$t_{1/2}/s$		
	母乳	牛乳	羊乳	母乳	牛乳	羊乳
尼罗红	61.51 ± 3.20	65.56 ± 1.99	69.74 ± 3.16	56.36 ± 1.32 ^a	70.54 ± 14.25 ^b	50.50 ± 6.97 ^a
尼罗蓝	45.04 ± 1.11 ^a	78.64 ± 6.81 ^b	86.91 ± 1.59 ^b	11.98 ± 2.68	11.35 ± 1.78	8.83 ± 0.01
Rh-DOPE	21.35 ± 3.82 ^a	42.05 ± 4.54 ^b	23.70 ± 3.67 ^a	20.21 ± 0.09 ^a	8.82 ± 1.78 ^b	6.29 ± 1.78 ^b
NBD-SM	3.60 ± 1.77 ^{ab}	10.37 ± 0.51 ^a	0.90 ± 1.40 ^b	2.84 ± 1.34	1.19 ± 1.00	3.95 ± 2.91
NBD-PC	25.02 ± 5.49 ^a	47.12 ± 0.63 ^b	24.81 ± 8.57 ^a	5.46 ± 2.61	3.01 ± 1.10	2.46 ± 1.27

注:不同字母表示不同乳之间的数据具有显著性差异($P < 0.05$)。

3 结论

3种哺乳动物乳(母乳、牛乳、羊乳)乳脂肪球的微观结构基本一致,均观察到了新月区,证实新月区是磷脂富集区。FRAP实验结果证明乳脂肪球不同生物分子的流动性有差异。乳脂肪球中甘油三酯和水溶性蛋白质的动态分子比例大于极性脂质、鞘磷脂和磷脂酰胆碱,母乳中极性脂的流动性相对另2种哺乳动物乳较慢,NBD-PC标记的磷脂酰胆碱和NBD-SM标记的鞘磷脂在3种乳中流动性差异不显著。

参考文献:

[1] KOLETZKO B, RODRIGUEZ-PALMERO M, DEMMELMAIR H, et al. Physiological aspects of human milk lipids[J]. Early Hum Dev, 2001, 65(1): 3-18.

[2] 蒋文笛. 人乳脂肪球的微观结构随泌乳过程的变化规律及其对脂类消化的影响[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2019.

[3] LOPEZ C. Milk fat globules enveloped by their biological membrane: unique colloidal assemblies with a specific composition and structure [J]. Curr Opin Colloid In, 2011, 16(5):391-404.

[4] GALLIER S, GRAGSON D, EVERETT D. Using confocal laser scanning microscopy to probe the milk fat globule membrane and associated proteins [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(7):4250-4257.

[5] EVERS J M. The milk fat globule membrane compositional

and structural changes post secretion by the mammary secretory cell[J]. Int Dairy J, 2004, 14(8):661-674.

[6] LOPEZ C, MENARD O. Human milk fat globules: polar lipid composition and in situ structural investigations revealing the heterogeneous distribution of proteins and the lateral segregation of sphingomyelin in the biological membrane[J]. Colloid Surface B, 2011, 83(1): 29-41.

[7] 邹孝强. 人乳脂替代品的评价模型建立及其酶法制备[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2013.

[8] KENWORTHY A K. Fluorescence recovery after photobleaching studies of lipid rafts [J]. Method Mol Biol, 2007, 398: 179-192.

[9] 王兴国. 人乳脂及人乳替代脂[M]. 北京: 科学出版社, 2018.

[10] 杨洁. 人乳脂肪球的磷脂组成、结构及低温储存性能研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2018.

[11] 张志毅, 周涛, 巩伟丽, 等. 荧光漂白后恢复技术及其在活细胞分子机制研究中的应用[J]. 生物技术通讯, 2008(4):635-637.

[12] HOUTSMULLER A B. Fluorescence recovery after photobleaching: application to nuclear proteins [M]//RIETDORF J. Microscopy Techniques. Switzerland: Springer Nature Switzerland AG, 2005:177-199.

[13] WEI W, JIN Q Z, WANG X G. Human milk fat substitutes: past achievements and current trends [J]. Prog Lipid Res, 2019, 74: 69-86.