

脂双层膜表面结构与稳定性的原子力显微镜研究

孙润广 张 静* 齐 浩*

(陕西师范大学 物理学与信息技术学院、食品工程系和生命科学院 西安 710062)

摘要 用原子力显微镜研究了 1,2-二油酸甘油-3-磷酸-1-甘油 (DOPG) 脂双层膜的表面结构与稳定性. 实验结果表明, 原子力显微镜的探针与脂双层膜的相互作用导致脂双层膜表面产生一个永久的损伤. 静电相互作用对脂双层膜结构和稳定性的影响表明, 在 NaCl 溶液中制成的脂质体, 随着 NaCl 浓度的增加, 它们的双层膜更稳定. 在低的 NaCl 浓度则经常被损伤, 在 1 mol/L NaCl 溶液中制备的脂双层膜变得更稳定. 在 KCl 溶液中结果恰好相反. 在高的 KCl 浓度中经常被损伤, 随着 KCl 浓度的降低, 它们的双层膜更稳定. 葡萄糖和蔗糖对脂双层膜结构有稳定作用.

关键词 原子力显微镜, 脂双层膜, 稳定性

Study of Stability and Structure of Lipid Bilayer Membrane by Atomic Force Microscope

SUN, Run-Guang ZHANG, Jing* QI, Hao

(College of Physics and Information Technology, Department of Food Engineering,
College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062)

Abstract Stability and structure of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-1-glycerol] (DOPG) were investigated with an atomic force microscope (AFM). The results of experiments showed how the surface structure of lipid bilayer membrane could be created by the interaction between the AFM tip and lipid membrane. The tip produced a persistent deformation on the lipid bilayer membrane. Effects of electric interaction on the structure and stability of lipid bilayer membrane showed that the lipid bilayer membrane was more stable with increasing NaCl concentration. The bilayer membrane prepared in 1 mol/L NaCl was rather stable, whereas that formed at low concentration was destabilized. Using KCl instead of NaCl led to the opposite results. The lipid bilayer membrane prepared in KCl solutions at high concentration was destabilized. Stabilizing effects of the glucose and sucrose solutions on the structure of lipid bilayer membranes were also observed.

Key words atomic force microscope, lipid bilayer membrane, stability

原子力显微镜 (AFM) 对研究纳米材料以及生物膜是一个十分有力的工具^[1~3]. 它已经被广泛应用到各种物体表面的研究, 包括原子范围内的摩擦、弹性和表面力, 而且可以在分子水平测量作用力. 用它研究导体和非导体表面形状^[4], 探索施加在原子力显微镜探针与样品表面分子之间纳米范围的作用

力, 理解原子力显微镜探针与样品表面分子的相互作用, 是一个非常吸引人的研究课题. 在 Leung 和 Goh 的实验中发现^[5], (i) 结构的均一性使影像显示周期性; (ii) 束状物的形成是沿扫描的长轴方向. 他们假设这可能是起先聚合物分子的几个链被拖在一起, 随后其它链也被拖在一起, 在表面产生一个块状

* E-mail: sunrun @pub. xonline. com, 通讯地址: 西安陕西师范大学 27-3-18 信箱.

Received October 8, 2001; revised January 29, 2002; accepted March 5, 2002.

国家自然科学基金 (No. 29672024) 和教育部青年骨干教师基金 (教科司 2000-65) 资助项目.

结构. 聚合物分子通过它们长轴的纠缠形成表面膜. 在这种情况下, 探针和表面相互作用产生的损伤在外观上是长形的. Singh 和 Keller^[2]的实验结果表明, 聚合物膜能被原子力显微镜的探针损伤. 在这个损伤过程中, 聚合物链的不同构象可能已经形成, 结果导致表面结构被长时间保留. Maas 等^[6]的实验结果表明, 原子力显微镜的探针在微米范围内产生一个镜框结构. 在镜框的扫描区域内, 没有聚合物留在表面. 在扫描的过程中, 样品表面的分子被拖或拉, 导致图像扭曲或不出现. 我们研究了脂双层膜粘着在氧化硅薄膜表面的稳定性以及脂双层膜表面结构, 观察到了原子力显微镜的探针与脂双层膜的相互作用是如何产生一个有趣的表面结构的图像, 这对了解脂双层膜的结构和稳定性有重要意义.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1,2-二油酸甘油-3-磷酸-1-甘油 (1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-[phospho-rac-1-glycerol], DOPG) 从 Sigma 化学试剂公司购买. 葡萄糖、蔗糖、氯仿、甲醇、NaCl、KCl 等所有的其它有机与无机化学试剂均为分析纯. 水为离子交换、二次蒸馏水.

1.2 脂质体的制备方法^[7,8]

首先, 脂质按 10 ~ 20 mg/mL 的量溶于氯仿-甲醇 ($V/V = 3/1$) 溶液中. 当脂质被完全溶解时, 溶液用氮气吹干. 然后, 按实验要求加入溶解液 ($w = 0.9\%$ 盐、5% 葡萄糖、10% 蔗糖). 盐溶液分别为 NaCl 1 mol/L, 0.1 mol/L, 0.01 mol/L, 0.001 mol/L. 最后, 在水浴中超声震荡 1 h, 过滤制成脂质体.

1.3 AFM 的测量方法

氧化硅薄膜用氧化加热的方法制备. 用 SE-400 激光测厚仪测得氧化层厚约 80 nm. 将其置于 Digital Instruments Nanoscope 原子力显微镜上测试薄膜表面的光滑程度. 当氧化硅薄膜表面的平均算术偏差小于 2 nm 时, 就认为达到了实验要求. 对表面光滑程度达到实验要求的氧化硅薄膜, 用旋转涂层的方法, 在其上制备脂双层膜^[9~11]. 为了得到薄的吸附层, 多余的材料用水洗的方法移去. 样品被置于 Digital Instruments Nanoscope 原子力显微镜上用接触式扫描测试. 测试在室温进行, 湿度为 50% ~ 60%. 探针为 Si_3N_4 , 悬臂的弹性常数为 0.06 N/m. 扫描速度是以 512 行线性点阵, 线性频率为 5 ~ 8 Hz.

2 实验结果

2.1 脂双层膜的损伤与皱纹膜的形成

我们研究了原子力显微镜探针缓慢通过样品表面对膜的影响. 在开始扫描几分钟后, 我们观测到了脂双层膜被逐渐损伤的图象. 当连续扫描并且保持力不变时, 我们得到了时间作为函数的脂双层膜的图象. 在脂质体沉淀并且溶液蒸发以后, 从立即扫描得到的图象发现, 样品表面是均匀且光滑的. 几分钟后, 表面的粗糙程度在宽和厚的方向增大. 随着扫描时间的增长, 表面的粗糙程度在宽和厚的方向增大得更加明显. 当在一个更小的区域扫描时, 表面的粗糙程度和形成的皱褶可以看得更清楚 (图 1a). 当在一个较大的区域扫描时, 一个正方形的区域内形成大大小小的皱褶 (图 1b). 这意味着原子力显微镜的探针使脂双层膜表面产生一个永久的损伤.

由图 1 看出, 在样品中心一个小的区域扫描 30 min 后能看见一些凹凸不平的影像. 在 $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ 区域内接触扫描的抓伤皱纹表明, 在 DOPG 脂双层膜的表面有一些脊和沟在一个正方形的区域内形成大大小小的皱褶. 这意味着完整的脂双层膜被原子力显微镜的探针从表面推起. 实验结果表明, 吸附在氧化硅表面的脂双层膜可能被原子力显微镜的探针损伤.

在扫描得到的图片中, 样品表面是一些明暗交替的区域 (图 1a, b). 明亮的条纹可归属于被拖起的脊, 暗的碎片是被压下去的区域, 象一些沟. 明暗区域之间的高度差大约 10 nm. 显然, 沟和脊之间的距离也有很大的差别. 这些距离和高度不仅与 DOPG 脂双层膜脂的功能有关, 而且依赖于 DOPG 脂质分子的长度^[4,6]. 从抓伤的膜表面图像可以看出, 在较大的力和较高频率的原子力显微镜探针的作用下, 在两个脊之间可能没有脂质体被留下. 观测结果表明吸附的 DOPG 脂双层膜能被损伤并容易从氧化硅表面被推成脊和拖成沟.

在中心的上下和左右, 先用较高的表面排斥力 (通常在 ~ 10 nN 以上) 在其表面上扫描, 然后用低于 10 nN 的力, 在较大的区域扫描, 观测损伤结果, 看到三个被损伤的正方形区域 (图 1c). 这些崎岖不平的碎片是损伤的结果. 这表明吸附在氧化硅薄膜上的 DOPG 脂双层膜不稳定. 在图 2 中, 扫描得到一些损伤碎片, 测量这些小的碎片厚度为 13 nm.

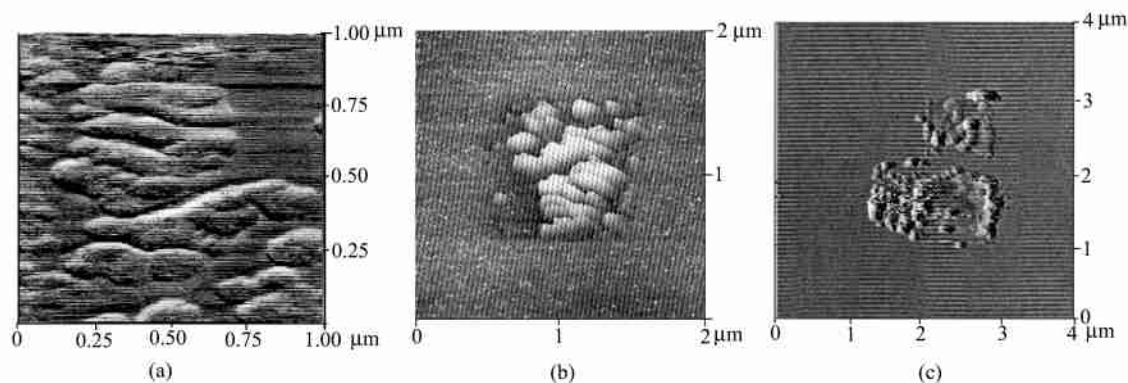


图1 (a) 在 $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ 区域内, 扫描 30 min 后能看见一些凹凸不平的影像; (b) 在 $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$ 区域内扫描, 观测到一个正方形的区域内形成大大小小的皱褶; (c) 在 $4\mu\text{m} \times 4\mu\text{m}$ 区域的中心上下和左右, 用较高的表面排斥力 (通常在 $\sim 10\text{ nN}$ 以上) 在其表面上扫描, 看到三个正方形区域被损伤

Figure 1 (a) Some ridge and groove were showed on the surface of DOPG membranes after a small region of $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ in the center was scanned for 30 min; (b) Forming less and larger corrugation were observed in a square region of $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$; (c) the three squares, roughened patches in the upper and lower center of a large area of $4\mu\text{m} \times 4\mu\text{m}$, were created in the membranes by scanning at high force (10 nN)

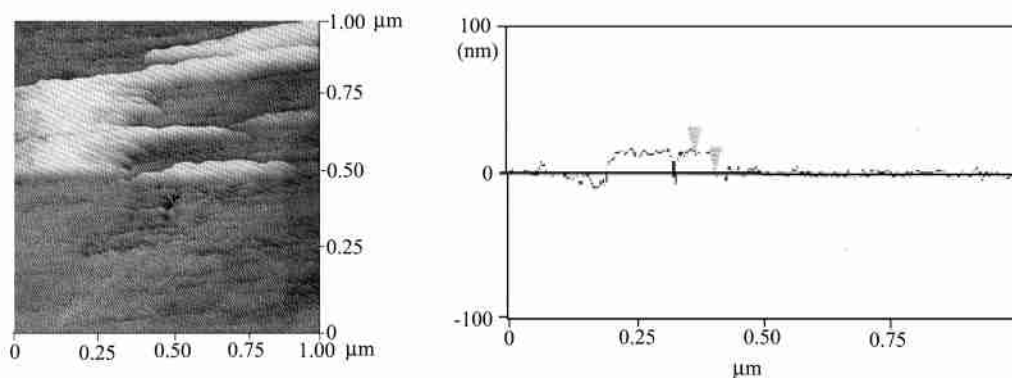


图2 用原子力显微镜测量得到液晶态的多层膜的厚度约为13 nm

Figure 2 Measurements of the membranes are consistent with the thickness about 13 nm by AFM

原子力显微镜应用到生物系统中, 遇到的主要问题是探针与样品之间的相互作用力对样品的损伤. 我们的实验结果表明, 膜的损伤是由于用大的力扫描吸附样品表面所致, 但在一般的图象扫描条件下也偶然出现对膜的损伤. 这可能是探针离样品太近所致.

2.2 脂双层膜的损伤机理

当原子力显微镜的探针与样品的表面相互接近时, 它们之间的相互作用力增大. 当相互作用力超过某临界值时, 这个过程可能在样品表面产生损伤. 理论计算与实验研究表明, 10^{-8} N 力能导致表面损伤^[12~14]. 我们研究发现, 单层膜与氧化硅的脱附力在 10^{-9} N 和 10^{-10} N 之间 (图像没有给出). 当施加的作用力在 10^{-8} N 和 10^{-11} N 之间时, 可以得到样品的表面结构图像. 当施加的作用力在 10^{-8} N 时, 不稳定引起探针和表面的跳跃接触, 可能使探针推

或拉其周围的分子, 导致脂双层膜永久损伤, 从而使影像扭曲或消失. 这项研究工作表明, 在 10^{-8} N 力的作用下, 双层膜的损伤是由于上面一层与探针的吸附力大于下面一层与氧化硅的脱附力. 故膜表面在纳米范围产生的损伤是由原子力显微镜的探针和样品之间的作用力所致. 这可能对揭示分子的结构具有重要的生物学意义.

我们根据所获得的脂双层膜损伤过程的原子力显微镜图象, 提出了原子力显微镜探针与样品表面相互作用对脂双层膜稳定性影响的模型. 图3是DOPG脂双层膜的损伤过程模型图像. 首先, 当原子力显微镜的探针接近样品表面时, 探针与样品的表面发生相互作用. 当探针距离表面非常近时, 在扫描过程中探针可能推或拉其周围的分子. 当相互作用力达到并超过某临界值时, 探针离开样品表面. 随后, 这个过程继续进行, 导致脂双层膜永久损伤. 通

过原子力显微镜获得了一个有趣的表面结构.

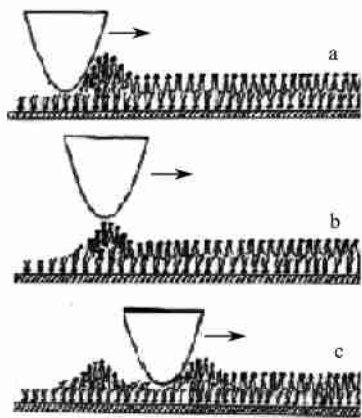


图3 脂双层膜的损伤过程模型图象

(a) 原子力显微镜的探针接近样品表面,在扫描过程中探针可能推或拉其周围的分子;(b) 当探针与样品之间的作用力达到某一临界值时,探针离开样品表面;(c) 随后,这个过程继续,导致脂双层膜永久损伤

Figure 3 A model of deformational processes of lipid membrane (a) While scanning over the surface of lipid membrane, the AFM tip starts pulling and collecting the lipid membrane from the surface. (b) The total amount of lipid molecules will increase until the tip-lipid-molecules adhesion reaches a critical level. The tip jumps over the first creased-ridge. (c) After that, the process starts again and the tip will jump over the second creased-ridge

2.3 静电相互作用对脂双层膜稳定性的影响

我们研究了静电相互作用对脂双层膜结构和稳定性的影响(图4). 当DOPG脂质体在NaCl溶液中

被制备时,随着 NaCl 浓度的增加,它们的双层膜更稳定. 实验结果表明,在低于 1 mol/L NaCl 溶液(分别为 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} mol/L NaCl 溶液)中制备的脂双层膜,用 10^{-8} N 力扫描时,经常观测到脂双层膜表面被损伤的图像(图像没有给出). 这是由于在低的 NaCl 浓度,Na⁺ 离子与 DOPG 分子极性头部的静电相互作用力不能达到平衡,形成的脂双层膜不稳定. 在扫描过程中,双层膜上面一层与探针的吸附力大于下面一层与氧化硅的脱附力,导致脂双层膜表面被损伤. 在 1 mol/L NaCl 溶液中制备的脂双层膜,用 10^{-8} N 力或大于 10^{-8} N 力扫描时,未能观测到脂双层膜表面被损伤的图像. 这是由于在 1 mol/L NaCl 溶液中,Na⁺ 离子与 DOPG 分子极性头部的静电相互作用力达到平衡,形成的脂双层膜变得更稳定. 在静电力的作用下,双层膜与氧化硅的黏着力增强. 因此,脂双层膜表面不容易被损伤. 在 KCl 溶液中结果恰好相反. 在 KCl 溶液中制备的脂双层膜,随着 KCl 浓度的降低,它们的双层膜更稳定,在高的 KCl 浓度则经常被损伤(图像没有给出). 实验结果表明,在 10^{-3} mol/L KCl 溶液中制备的脂双层膜,用 10^{-8} N 力扫描时,未能观测到脂双层膜表面被损伤的图像. K⁺ 离子与 DOPG 分子极性头部的静电相互作用力达到平衡,形成稳定的脂双层膜结构. 因此,在扫描过程中,脂双层膜表面不容易被损伤. 随着 KCl 浓度的增加,K⁺ 离子增多,K⁺ 离子与 DOPG 分子极性头部的静电相互作用力失去平衡,从而导致形成的脂双层膜不稳定. 在扫描过程中,脂双层膜表面容易被损伤. 我们也分别研究了葡萄糖和蔗糖对脂双层膜结构和稳定性的影响. 当DOPC脂质体在

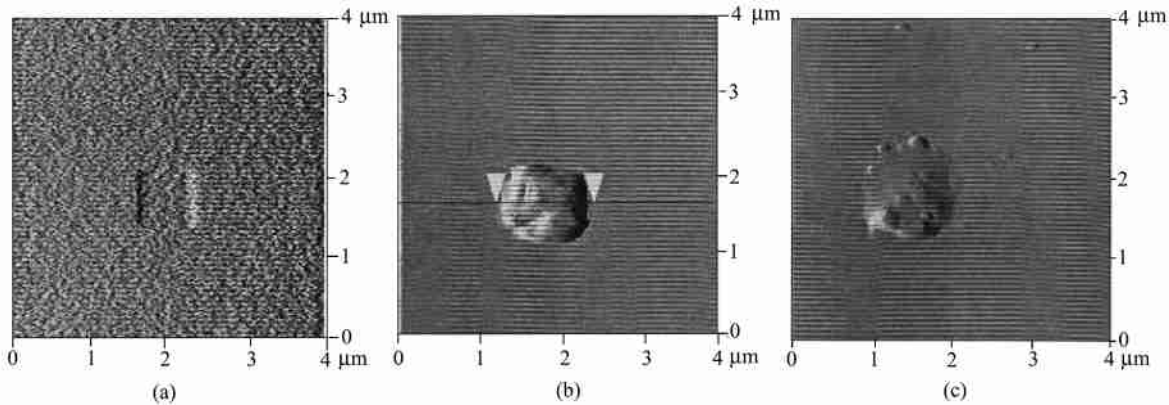


图4 NaCl、葡萄糖和蔗糖对脂双层膜结构和稳定性的影响

(a) 在 1 mol/L NaCl 溶液中制备的 DOPG 脂质体双层膜;(b) 在葡萄糖溶液中制备的 DOPG 脂质体双层膜;(c) 在蔗糖溶液中制备的 DOPG 脂质体双层膜

Figure 4 Effect of NaCl solutions, glucose and sucrose solutions on the structure of DOPG bilayers
The DOPG vesicles form double layers for preparation at 1 mol/L NaCl solutions (a) and in the glucose (b) and sucrose solutions (c)

葡萄糖和蔗糖溶液中被制备时,它们形成稳定的双层膜.在实验中,用 10^{-8} N 力或大于 10^{-8} N 力扫描时,我们没有观察到脂双层膜表面被损伤的影像.综上所述,在原子力显微镜实验中,没有观察到在高浓度的 NaCl 溶液、葡萄糖溶液和蔗糖溶液中制备的 DOPG 脂质体的脂双层膜表面被损伤的影像,说明高浓度的 NaCl 溶液以及葡萄糖溶液和蔗糖溶液对脂双层膜的形成有稳定作用.

3 讨论

当样品距离探针非常近时,相互作用增大.这个距离是如此地小,以致于能使探针追踪样品的表面形状.在理论计算和分子动力学的模拟中, Singh 和 Keller^[2] 研究发现,在较高的探针和样品的排斥力(大于 10 nN)的作用下,出现了两个正方形的嵌片结构.在这个力模型的基础上,我们用原子力显微镜检测探针与脂质体双层膜之间的相互作用.当施加的作用力为 10^{-8} N 时,10 min 后,形成大约 20 nm 高, 30 nm 宽的皱褶.这些不均匀的皱褶是由于探针与脂双层膜相互作用所致.我们研究结果的主要特点是:在原子力显微镜探针的作用下,脂双层膜表面形成一些脊和沟,一个正方形的区域内,形成的一些大大小小的皱纹图像,显示了很强的随意性.这意味着在扫描区域内,整个膜被原子力显微镜探针从表面拖起或推起,吸附在氧化硅表面的脂双层膜可能被原子力显微镜的探针损伤.我们进一步证明,探针和样品表面相互作用对表面结构的损伤,必须满足下列条件:(1)损伤的样品与制备时所用溶液及其浓度有关;(2)施加的作用力不应该大于 10^{-8} N 和小于 10^{-11} N,当超过 10^{-8} N 可能导致表面较大的损伤,当施加的作用力在 10^{-8} N 和 10^{-11} N 之间时,可以得到样品的表面结构图像;(3)用探针在样品表面 $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ 区域内,用较高的作用力连续扫描 30 min,形成一个被损伤的正方形区域.用这个方法可以探测脂双层膜结构的稳定性.

我们通过观察探针和样品表面相互作用,研究了其对表面结构的形成和损伤机理.结果表明,葡萄糖和蔗糖对脂双层膜结构有稳定作用.当施加的作用力大于 10^{-8} N 时,也未能观测到脂双层膜表面被损伤的图像.因为,葡萄糖是最常见的单糖之一,具有手性特征,其分子中有多个羟基,增加了它的水溶性.葡萄糖分子和水分子缔合与 DOPG 分子极性头部相互作用,增大了脂双层膜结构的稳定性.葡萄糖又是许多寡糖(蔗糖)和多糖的组成部分,所以,蔗糖

对脂双层膜结构也有稳定作用.葡萄糖和蔗糖对细胞膜双层结构的稳定性的影响可能与物质输送、能量转换和信息传递密切相关.因为,糖是细胞膜的主要成分之一,约占人红细胞膜的 7.2%,在生命系统中起着非常重要的作用.

静电相互作用对脂双层膜结构和稳定性的影响表明,随着 NaCl 浓度的增加,它们的双层膜更稳定.在 1 mol/L NaCl 制备的脂双层膜变得更成熟稳定,在低的 NaCl 浓度则经常被损伤.因为,离子的半径对液晶态生物膜的双层结构和非双层结构有一定的影响,在一定的浓度下,半径大的离子有稳定脂双层结构的机理,半径小的离子有诱发非双层结构形成的作用^[15,16]. Na^+ 离子的半径小,所以,在低浓度的 NaCl 溶液中,离子半径小的 Na^+ 离子与 DOPG 分子极性头部的静电相互作用力不能达到平衡,容易诱发非双层结构形成.因此,在扫描过程中,脂双层膜经常被损伤.随着 NaCl 浓度的增加, Na^+ 离子与 DOPG 分子极性头部的静电相互作用增大,当相互作用达到平衡时,形成稳定的脂双层结构,所以,在扫描过程中,脂双层膜不容易被损伤.在 KCl 溶液中结果恰好相反.在高的 KCl 浓度中经常被损伤,随着 KCl 浓度的降低,它们的双层膜更稳定.因为, K^+ 离子的半径大,在低的 KCl 溶液中,离子半径大的 K^+ 离子与 DOPG 分子极性头部的静电相互作用力容易达到平衡,使其形成稳定的双层结构,所以,在扫描过程中,脂双层膜不容易被损伤.随着 KCl 浓度的增加, K^+ 离子的浓度增大.过多的 K^+ 离子与 DOPG 分子极性头部的静电相互作用失去平衡,容易诱发非双层结构形成.所以,在扫描过程中,经常导致脂双层膜结构被损伤.众所周知在动物体内,高 Na^+ 离子与低 K^+ 离子浓度是维持正常生理活动的重要条件之一.我们的实验结果表明,液晶态的生物膜在高 Na^+ 离子盐溶液或低 K^+ 离子盐溶液中形成稳定的脂双层膜结构.这与动物体通常处于高 Na^+ 离子与低 K^+ 离子浓度的生物微环境一致.由此可见,研究脂双层膜的静电相互作用与稳定性的关系,对探索生物膜的结构和功能有非常重要的意义,是一个值得探讨的问题.

References

- 1 Radmacher, M.; Fritz, M.; Kacher, C. M.; Cleveland, J. P.; Hansma, P. K. *Biophys. J.* **1996**, 70, 556.
- 2 Singh, S.; Keller, D. J. *Biophys. J.* **1991**, 60, 1401.
- 3 Landman, U.; Luedtke, W. D.; Burnham, N. A.; Colton,

- R. J. *Science* **1990**, 248, 454.
- 4 Drake, B.; Prater, C. B.; Weisenhorn, A. L.; Gould, S. A. C.; Albrecht, T. R.; Quate, C. F.; Cannell, D. S.; Hansma, H. G.; Hansma, P. K. *Science* **1989**, 243, 1586.
- 5 Leung, M. O. M.; Goh, C. *Science* **1992**, 255, 64.
- 6 Maas, J. H.; Cohen Stuart, M. A.; Fleer, G. J. *Thin Solid Films* **2000**, 358, 234.
- 7 Sun, R.-G.; Zhang, J.; Qi, H. *Acta Biophys. Sinica* **2001**, 17(1), 53 (in Chinese).
(孙润广, 张静, 齐浩, 生物物理学报, **2001**, 17(1), 53.)
- 8 Sun, R.-G.; Zhang, J.; Wang, Y.-C. *Prog. Biochem. Biophys.* **2000**, 27(3), 296 (in Chinese).
(孙润广, 张静, 王永昌, 生物化学与生物物理进展, **2000**, 27(3), 296.)
- 9 Sun, R.-G.; Zhang, J.; Wang, Y.-C. *Acta Biophys. Sinica* **1999**, 15(4), 675 (in Chinese).
(孙润广, 张静, 王永昌, 生物物理学报, **1999**, 15(4), 675.)
- 10 Sun, R.-G.; Zhang, J.; Dai, Z.-H.; Xu, F.-X.; Wang, D.-H. *Acta Phys. Sinica* **1994**, 43(4), 616 (in Chinese).
(孙润广, 张静, 戴正华, 徐逢勋, 王德华, 物理学报, **1994**, 43(4), 616.)
- 11 Zhang, J.; Sun, R.-G. *Acta Phys. Sinica* **1994**, 43(9), 1495 (in Chinese).
(张静, 孙润广, 物理学报, **1994**, 43(9), 1495.)
- 12 Mou, J. X.; Yang, J.; Huang, C.; Shao, Z. F. *Biochemistry* **1994**, 33, 9981.
- 13 Person, B. N. *Chem. Phys. Lett.* **1987**, 54, 366.
- 14 Abraham, F. F.; Barra, I. P. S. *Surf. Sci.* **1989**, 209, L125—L132.
- 15 Sun, R.-G.; Wang, D.-H.; Wang, Z.-H.; Zhang, J. *Chin. Sci. Bull.* **1991**, 36(18), 1382 (in Chinese).
(孙润广, 王德华, 王子浩, 张静, 科学通报, **1991**, 36(18), 1382.)
- 16 Sun, R.-G.; Zhang, J.; Wang, Y.-C. *Sci. China, Ser. B* **1998**, 41(1), 1.
(孙润广, 张静, 王永昌, 中国科学 (B 辑), **1998**, 41(1), 1.)

(A0110085 CHENG, B.; LING, J.)