

研究工作

固体支撑的自组装的双层类脂膜*

H Ti TIEN (田心棣) Z. SALAMON

(Membrane Biophysics Laboratory, Department of Physiology, Michigan
state University, East Lansing, MI 48824 U. S. A.,
美国密执安州立大学生理系膜生物物理实验室)

提 要

具有通常 BLM, 某些相似特性的固体支撑的双层类脂膜 (S-BLM) 能够通过两步自组装到新劈开的金属丝上面。如: (1) 包有聚四氟乙烯的铂丝头部浸在类脂溶液里, 用解剖刀把顶部切开; (2) 包有类脂溶液的新铂丝末端转移到 0.1mol/L KCl 溶液里, 电测定证实, 数分钟后, 在金属丝末端自动地形成了稳定的类脂双层。本文报道了这种固体支撑的 BLM (S-BLM) 在检测 Pb^{2+} 离子中的应用。S-BLM 为液晶结构, 它可用于基础研究、生物传感器和分子电子器件等技术上的应用。

关键词 BLM (双层类脂膜), S-BLM (固体支撑的双层类脂膜), 生物传感器, 分子电子器件

引 言

1. 背景

早在 75 年前, Gorter 和 Grendel 就认为红血球细胞的原生质膜是双分子类脂膜。他们从红血球细胞提取的类脂单层铺在 Langmuir 槽里后发现, 单层占据的面积正好是红血球细胞表面积的 2 倍。由此得出结论, 红血球细胞中类脂分子一定是呈双层排列的。现已公认, 细胞和细胞器膜的基本超细结构均为双层结构。例如神经轴突膜, 光感受器膜, 线粒体膜和光合内囊体膜等^[1]。

只是在 1950 年以后, 人们才公认类脂双层是基本生物膜的结构^[2]。Rudin 和他的同事于 1960 年在两水溶液之间成功地重组了双层类脂膜, 并把它作为神经膜的实验模型系统^[3]。双层类脂膜(平板 BLM, 及后不久由 Bangham 发展的球形脂质体) 已经广泛地作为许多种生物

膜的模型^[4-11]。现已清楚, 存在这种双层结构是由于类脂分子的性质决定的。类脂分子的一头是疏水碳氢键, 分子的另一头是亲水的极性基团。类脂分子在水相中, 这种结构使得它们自动地组装成双层构型^[1, 12-14]。象脂质体一样, 非修饰的 BLM, 为动态的结构, 容易嵌入不同组分而赋予它们功能特性。修饰的 BLM, 是研究电子、机械、生物免疫、光电及与生物膜类脂双层有关的其它基质性质的理想工具^[6-10, 12-14]。一些实验室最新发表的文章表明, BLM 系统在太阳能转换, 生物传感器和分子电子器件方面有迷人的前景^[15-17]。

分隔两水相物体中间的小孔以通常方式形成的 BLM, 很不稳定, 一般很少能维持数小时。为了实际应用和进行长时间的研究, 就需要有一个持久的类脂双层膜。我们在本文中介绍一

* 本文为英文稿, 由中国科学院生物物理研究所胡坤生翻译整理

种简单的机械方法,在固体支撑物上形成自组装的类脂双层。这种固体支撑的类脂双层膜寿命长,它提供了制作各种探针,用于膜生物物理学、生物化学、生理学和生物技术等方面研究的可能性。

2. 支撑的 BLM 的自动组装技术

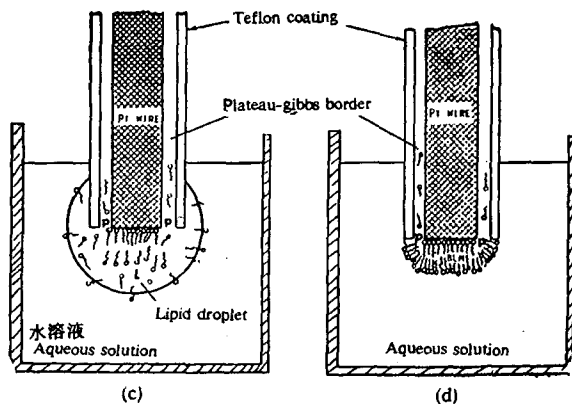
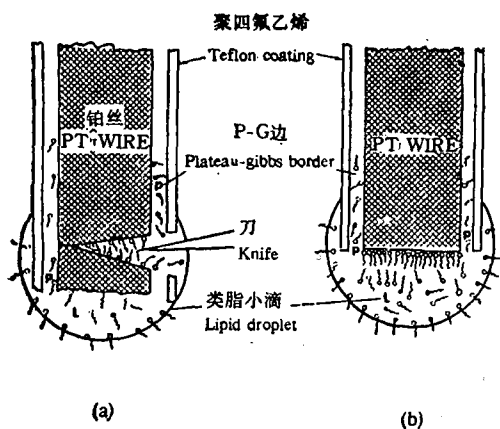


图 1 固体支撑的双层类脂膜形成示意图

Fig. 1 The schematic diagram of experimental procedure of solid supported bilayer lipid membranes

类脂分子的极性头,由圆圈表示,疏水的碳氢键由曲折线表示。(a)(b)(c)(d)表示自组装过程
hydrophilic polar head group (indicated by a circle), non-polar hydrophobic hydrocarbon chains
(indicated by zigzagged lines). (a)(b)(c)(d) indicated the steps of self-assembling

二油酸甘油酯溶液)用锋利的刀切开包有聚四氟乙烯的金属(如铂,银或不锈钢)的顶部。当刚切开的金属表面暴露于类脂溶液中时,单层类脂分子不可逆地结合到金属表面,如图 1b 所示。含有自由碳氢键的吸附类脂单层与其它类脂分子的疏水链相互作用。当包有类脂的金属浸入如图 1c 所示的水溶液中(0.1mol/L KCl)时,在合适的条件下能自动地形成稳定的自组装的类脂双层,如图 1d 所示。图 1d 中的最终结构,即类脂分子的确切排列和有序度,尚不完全清楚,但在金属-类脂表面和类脂-水溶液界面上自组装的双层很可能是自由能变化的热动力学的必然结果^[14]。支撑类脂双层的电学性质测量与通常的 BLM,和与其密切相关的其它系统一致^[19-27]。

3. 支撑的类脂双层用作探针的实验

在我们的报告中^[18]已叙述了有关嵌入锌酞花青染料支撑在铂丝上的光活性类脂双层。用

支撑的双层类脂或类脂双层膜(S-BLM)是通过两个相连的自组装步骤而形成的。(a)类脂分子和新劈开的金属表面接触。(b)类脂层吸附在水溶液里的金属表面上^[18]。我们对此方法仅作简单介绍。

在图 1a 中,在类脂溶液中(含百分之一的

电学和光谱技术对这种含有金属复合物的类脂双层进行检验。新 BLM 系统的实验包括:(1)铅离子的检测。(2)表面状态对穿透支撑的色素类脂双层的电子转移的影响。(3)作为三价亚铁氰化物离子电流传感器的二茂铁的固定性。(4)TCNQ(7,7,'8,8'-四氰基-P-奎诺二甲烷)存在下的氧化还原反应。我们将较详细地叙述含 TCNQ 修饰的固体支撑的 BLM 在测定铅离子中的应用。

实验步骤

按照上述步骤形成了支撑类脂双层(S-BLM)^[18]。包有聚四氟乙烯的铂丝直径是 0.5mm。BLM 形成液为 TCNQ 饱和鲨烯液(体积比 1:5)中的 4,4'-正辛脂氰基联二苯(8-CB)。池子里的溶液是 0.1mol/L KCl。全部化学试剂均从市场买来,并不要求进一步纯化。8-CB 购自英国 BDH 试剂公司。TCNQ 从

Aldrich 化学公司得到(美国未尔沃基)。

在实验中用三组电极, S-BLM 作为工作电极, 铂丝卷用作反向电极。一个带有盐桥的甘汞电极用作参考电极。用带有 IBMEC/225 伏安分析器的周期伏安表 (CV) 研究了 S-BLM 系统的电化学特性。扫描速率为 100mV/s。扫描范围为 $\pm 700\text{mV}$ 。

结果和讨论

铂上 S-BLM 电阻的时间变化与通常简单的 BLM 所观察的变化很类似。对于许多非修饰的 BLM_s, 在变薄过程中电阻下降, 达到 10^6 — $10^7\Omega\text{cm}^2$ 数量级的稳定值。对于铂支撑的 (8CB + TCNQ) 双层电阻则下降到 $10^3\Omega\text{cm}^2$ 。

在扫描速率为 100mV/s 时, 支撑的 8CB/TCNQ 双层在 0.1mol/L KCl 溶液中的典型周期伏安图有三个氧化峰, 分别出现在 -650mV , -90mV 和 $+450\text{mV}$ 。多于两个氧化峰的出现表示形成了电荷转移复合物 ($8\text{CB}^+\text{TCNQ}^{\cdot-}$)。考虑到不同溶剂下 TCNQ 以前的 CV 结果, 我们可以假设出现在 -90mV 和 $+450\text{mV}$ 的两个峰各是 $\text{TCNQ}^{\cdot-}$ ($\text{TCNQ}^{\cdot-} \rightarrow \text{TCNQ}^0 + \text{e}$) 和 TCNQ^0 ($\text{TCNQ}^0 \rightarrow \text{TCNQ}^+ + \text{e}$) 的氧化作用而引起的, 而第三个峰 -650mV 是电荷转移复合物 ($8\text{CB}^+\text{TCNQ}^{\cdot-}$) 氧化作用 ($8\text{CB}^+\text{TCNQ}^{\cdot-} \rightarrow 8\text{CB}^+ + \text{TCNQ}^0 + \text{e}$) 的结果。在池溶液中含有 $100\mu\text{mol/L}$ 和 $300\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 体系的周期伏安图显示了一个 -608mV 还原峰和一个 -448mV 的氧化峰。峰之间的电荷分离表示本体系为不可逆的。随着铅离子浓度的增加, 氧化峰的高度迅速增加。峰高度与浓度的关系在 $1\mu\text{mol/L}$ 铅离子浓度以上是线性的, 最低可检测的离子水平大约为 $100\mu\text{mol/L}$ 。

由聚四氟乙烯包着的相同直径的铂丝 (表面没有积累 BLM) 表现了可逆的 CV 信号 (在峰之间的电压分离是 60 — 80mV)。由这样的体系检测到的池子溶液中最低铅离子浓度要低三个数量级 (100mmol/L $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)。有证据表明, (8CB + TCNQ) 双层在铂丝表面的存

在, 修饰了铂电极对铅离子的作用, 它大大地增加了对铅离子的灵敏度, 改变了峰的高度, 峰电位和峰的形状等。

与没有双层的电极结果相比, 用 (8CB + TCNQ) 双层包的铂电极增加了三个数量级的灵敏度是很重要的发现, 灵敏度的增加表示: (a) 存在于双层体系中的 TCNQ 和铅之间相互作用足够强以致于保持铅在铂支撑的双层体系的表面浓度高于溶液里的浓度。(b) (8CB + TCNQ) 体系和铅之间的电子交换的能垒可能低于不包的铂电极和铅离子的能垒。

展 望

本文所述的固体支撑的双层类脂膜 (S-BLM_s) 自组装方法是常规 BLM 技术的补充, 对于常规 BLM, 已深入地进行了膜的重组和其它基础研究^[6-10, 12-14, 19-27]。由于 S-BLM_s 的稳定性以及容易形成, 它提供了基于传感器和分子器件的类脂双层的研究和应用的方便条件^[15-17]。

为了便于描述, 我们把生物传感器看作传感器, 即把嵌入的生物分子作为基本的敏感元件。生物分子包括天然成分或人造的模拟物。例如人工合成的 meso-四苯卟啉 (TPP) 和酞花青染料 (PLC) 是具有天然叶绿素的基本结构的化合物。所以可把它们看作“生物分子”。其它例子, 有缬氨酶素和冠醚以及一类能嵌入人类脂双层可灵敏地和其它邻近环境成分 (如离子, 分子和大分子) 相互作用的物质。在这种意义上我们正在考虑某种生理活性的基质, 其中之一是离子/分子的识别。在分子水平, 配体比受体小, 把某些这类活性统称为“受体-配体接触相互作用”。例如: 受体可以是嵌入类脂双层中的酶, 抗体, 蛋白复合物, 载体, 通道或氧化还原系统, 相应的配体可以是底物, 抗原 (半抗原), 激素, 离子或电子受体或给体^[28]。配体和受体接触相互作用的基本原理表示在图 2 中。当配体和受体相互作用时, S-BLM 两侧可能发生一些电参数的变化, 因此产生一个外边仪器能检测到的转换信号 (电输出)。

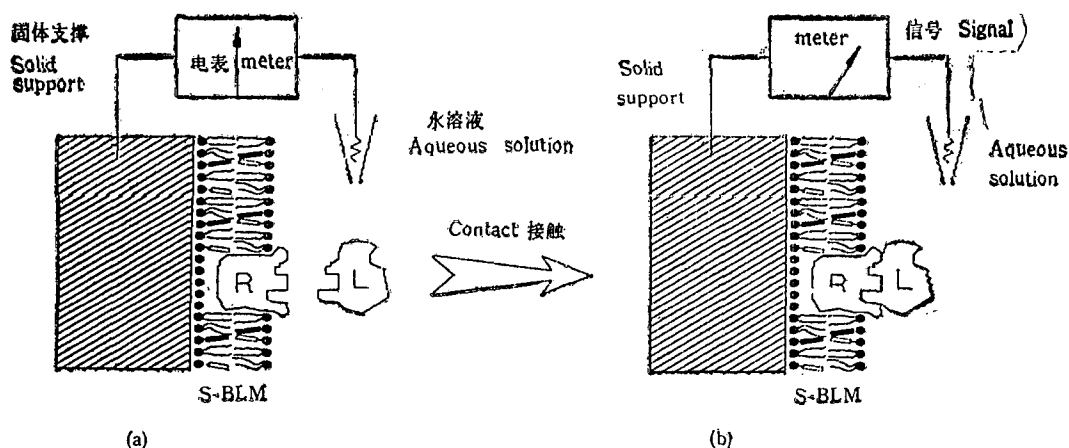


图2 嵌入受体(R)的固体支撑的双层类脂膜(S-BLM)配体-受体接触相互作用的基本作用原理简图
 Fig. 2 A solid supported bilayer lipid membrane (s-BLM) with embedded receptor (R), Schematic diagram of the basic action mechanism of ligand-receptor contact interactions
 (a) 假设电接触是在固体支撑物(金属)和 BLM 的另一边通过参考电极(带盐桥的甘汞电极)和外界仪器(电表)相连。(b) 受体(R)和配体(L)接触相互作用的结果产生了电信号,用相应的技术检测,放大,转换和显示此电信号

(a) Electrical contact is assumed between the solid support (e. g., a metal) and one side of the BLM. The other side of the BLM is connected to external instrumentation (a meter) via a reference electrode (e. g., a calomel electrode with a salt bridge). (b) As a result of contact interaction between the receptor (R) and ligand (L), and electrical signal is produced. The signal is then detected, amplified, transduced, and displayed by appropriate state-of-the-art technology

首先,活性生物分子(受体)嵌人类脂双层的能力是制作支撑 BLM 生物传感器成功的关键,这与活性及专一性的完整性有关。因为很难模拟在天然受体中发生的结合过程,它需要具有各种背景的科学家的专门知识和经验。

因为支撑类脂双层的各种探针共有的基本设计的实验技术已具备,在生物传感器和分子器件发展中最终会发生这种技术与其它技术的竞争。

结 论

从 1960 年以来,双层类脂膜系统 (BLM) 用于生物膜模型并作了详细地研究,但直到最近才试图把它实际应用于传感器和分子器件上。从膜的生物物理和生理学观点上看,生物膜本质上具有天然传感器和器件的基本结构。例如,绿色植物内囊体膜的功能与能量转换器相同,它把太阳能转换成电/化学能;在视觉过程,视杆外段的光感受器膜能检测光子;细胞和细胞器的原生质膜具有感受离子的能力,并有

强的专一性的区分 Na^+ 和 K^+ 的能力。另外原生质膜为配体和受体接触提供了相互作用的基质,例如抗原-抗体的形成。事实上,以上功能及许多其它生物功能都与细胞膜有关,因此过去 20 年来有很多研究工作与膜有关是不足为奇的。重组的平板 BLM,和球形脂质体在此研究中起了核心作用。本文叙述了一个新的 BLM 系统,由于它易形成,稳定和寿命长,为生物传感器和分子电子学的应用开辟了新的途径。

参 考 文 献

- 1 Kerker M. *Surface chemistry and colloids*, MTP international review of science, Baltimore: University park press, 1972; 7: 25—78
- 2 Robertson J D. *J Cell Biol*, 1981; 91: S189
- 3 Mueller P, Rudin D O, Tien H T *et al.* *J Phys Chem*, 1963; 6: 534
- 4 Bangham A D. In: Butler J A V, Noble D eds, *Progress in biophysics and molecular biology*, New york: Pergamon press, 1968; 18: 29—95
- 5 Ringsdorf H, Schlarb B, Vezer J. *Angew Chem*, 1988; 27: 113
- 6 Issaurat B, Amblard G, Gavach C. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1983; 11: 37

- 7 Ostermayer B, Albrecht O, Vogt W. *Chem and Phys of Lipids*, 1986; 41: 265
- 8 Krull V J. *Anal Chim Acta*, 1987; 197: 203
- 9 Bhowmik B B, Dutta R, Nandy P. *J Colloid and Interfac Sci*, 1988; 122(2): 450
- 10 Zhao X K, Picard G Fendler J H. *J Phys Chem*, 1988; 92: 7161
- 11 Yova D, Boudouris G. *Il Nuovo Cimento*, 1989; 11D (4), 525
- 12 Moglich P M, Kretzschmar G. *Colloid and Polym Sci*, 1988; 266: 739
- 13 Jain T K, Maitra A. *Colloids and Surfaces* 1989; 36: 87
- 14 Mittal K L. *Proc sixth int symposium on surfactants in solution*, New York: Plenum publishing corp, 1990; in press
- 15 Davison S G. *Progress in Surface Science*, 1989; 30: 1—2
- 16 Ivanov I. *Thin liquid films*. New York: Marcel Dekker, 1988: 181
- 17 Carter F L, Siatkowski R E, Wohltjen H et al. *Molecular electronic devices*. Proc third int'l symposium, North-Holland, Amsterdam, 1988: 1
- 18 Tien H T, Salamon Z. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1989; 276(2): in press
- 19 Kryszinski P, Tien H T. *Prog in Surf Sci*, 1986; 28 (4): 317
- 20 Kunitake T, Shimomura M. *J Am Chem Soc*, 1987; 109: 5175
- 21 Feldberg S W, Armen G H, Bell J A. *Biophys J*, 1981; 34: 149
- 22 Rohatgi-Mukherjee K K, Roy S, Bhowmik B B. *Ind J Chem*, 1985; 241: 5
- 23 Taylor D M, MacDonald A G. *J phys D: Appl Phys*, 1987; 20: 1277
- 24 Harima Y, Yamashita K. *J Electroanal Chem*, 1985; 186: 313
- 25 Hong F T. In: Attia y A, Moudgil B M, Chandler S eds, *Interfacial phenomena in biotechnology and materials processing*, Amsterdam: Elsevier, 1988: 89
- 26 Antonenko Yu N, Yaguzhinsky L S. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1988; 19: 499
- 27 Tabushi I, Hamachi I, Kobuke Y. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1989; 1: 383
- 28 Tien H T. *J Surface Sci Technol*, 1988; 4: 1

[本文于 1990 年 2 月 8 日收到]

SELF-ASSEMBLING BILAYER LIPID MEMBRANES ON SOLID SUPPORT

H. Ti TIEN, Z. SALAMON

(Department of Physiosogy, Michigan State University East Lansing, MI 48824, U. S. A.)

ABSTRACT

Solid supported bilayer lipid membranes (S-BLM) that posses some properties similar to those of conventional BLM, can be self-assembled on a freshly cleaved metal wire by a two-step procedure: 1. The tip of a Teflon-coated platinum wire, while immersed in a lipid solution, is cut off with a scalpel; 2. The new tip of the wire, having become coated with lipid solution, is transferred into 0.1 mol/l KCl. After a few minutes, a stable lipid bilayer forms spontaneously on the tip of wire, as verified by electrical measurements. This paper reports an application of such a supported BLM (S-BLM) in the detection of Pb^{2+} ions. The S-BLM is liquidcrystalline in structure, which makes it amenable to modification for basic studies, as well as for technological applications such as biobiosensors and molecular electronic devices.

Key words BLM (bilayer lipid membrane), S-BLM (solid supported bilayer lipid membrane) biosensors, molecular electronic devices