

脂质体结构特性的原子力显微镜研究*

孙润广¹⁾ 齐浩²⁾ 张静³⁾

¹⁾ 陕西师范大学物理学与信息技术学院, 西安 710062)

²⁾ 陕西师范大学生命科学院, 西安 710062)

³⁾ 陕西师范大学食品工程系, 西安 710062)

(2001 年 10 月 16 日收到, 2001 年 11 月 10 日收到修改稿)

用原子力显微镜 (AFM) 研究了 1,2-二油酸甘油-3-磷酸-1-甘油 (DOPG) 脂质体胞囊的形态和脂双层膜结构. 报道了 AFM 探针与吸附在氧化硅膜上脂质体的相互作用结果. 实验结果表明, 在液晶态的 DOPG 中, AFM 图像是一些球形或椭球形颗粒. 这些球形或椭球形颗粒与液晶态的 DOPG 脂质体的结构特性有关. 当 AFM 的探针与脂质体表面相互作用力超过某临界值时, 脂质体胞囊破裂, 变成脂双层结构. 从图上可以看到, 第二层的 DOPG 膜吸附在第一层上, 膜的厚度约为 5nm.

关键词: 原子力显微镜, 脂质体, 纳米结构

PACC: 0779, 8720, 6146

1. 引 言

1,2-二油酸甘油-3-磷酸-1-甘油 (DOPG) 是线粒体、叶绿体以及细菌膜中的主要成分之一, 在生物膜中起着十分重要的作用. 液晶态的脂质体经常作为研究生物膜的简单模型系统^[1-3]. 在生命科学的研究中, 脂质体的结构与特性一直是科学前沿的研究热点问题之一^[4-6]. 原子力显微镜 (AFM) 是一个相当新颖并且十分有效的研究工具^[7-9], 在纳米范围内, 它对生物过程的研究起着非常重要的作用. 用它不仅可以在分子水平上对作用力进行测量, 得到表面形状的图像^[10,11], 而且也可以用于弹性特性的研究^[12]. 原子力显微镜的影像既可以从接触模型 (contact model) 得到, 也可以从轻敲模型 (tapping model) 得到. 它记录的影像不但显示样品的形状特性, 而且也受到样品柔软性的影响^[12]. 本文应用这个技术研究了吸附在氧化硅薄膜上脂质体胞囊的形态和结构特性, 以及当脂质体胞囊被吸附在氧化硅薄膜上, AFM 的探针在其表面扫描时, 脂质体胞囊表面如何变化的问题, 发现了一系列有趣的现象.

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

DOPG 从 Sigma 化学试剂公司购买. 葡萄糖、蔗糖、氯仿、甲醇、NaCl、KCl 等所有的其他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.

2.2. 脂质体的制备方法

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 (0.9wt% 盐、5wt% 葡萄糖、10wt% 蔗糖). 盐溶液分别为 NaCl 1, 0.1, 0.01, 0.001 mol/L. 最后, 在水浴中超声震荡 1h, 过滤制成脂质体.

2.3. AFM 的测量方法

氧化硅薄膜用氧化加热的方法制备. 氧化层厚约 80nm. 用旋转涂层的方法, 在氧化硅薄膜上制备脂质体膜. 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 Nano-

* 国家自然科学基金 (批准号 29672024) 和国家教育部骨干教师资助计划 (批准号: 教技司 2000-65) 资助的课题.

† E-mail: sunrun@pub.xaonline.com 或 sunrun@netscape.net

scope III 原子力显微镜上测试. 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 0.58N/m.

3. 实验结果与讨论

3.1. AFM 的探针与脂质体的相互作用

用旋转涂层的方法将 DOPG 脂质体的悬浮物沉淀到底物上, DOPG 脂质体小滴通过在氧化硅膜表

面上的滚动吸附到底物上. 放置几分钟后, DOPG 脂双层膜在氧化硅膜表面形成. 当吸附 DOPG 脂质体在氧化硅膜上时, 一些球形或椭球形脂质体胞囊镶嵌在脂双层上. 为了得到单层的吸附脂质体膜, 用水洗的方法, 将多余的脂质体移去. 将 DOPG 脂质体的吸附膜放置在 AFM 探针下实施扫描. 用接触的方法, 反复扫描, 样品表面形状是以地形地貌图被记录下来. 多次扫描之后, 在扫描范围内, 我们观察到一些大大小小的球形或椭球形颗粒. 它们可能是一些不同大小和形状的脂质体胞囊(图 1(a)).

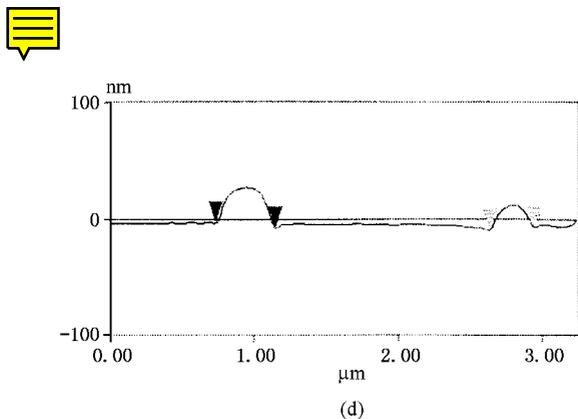
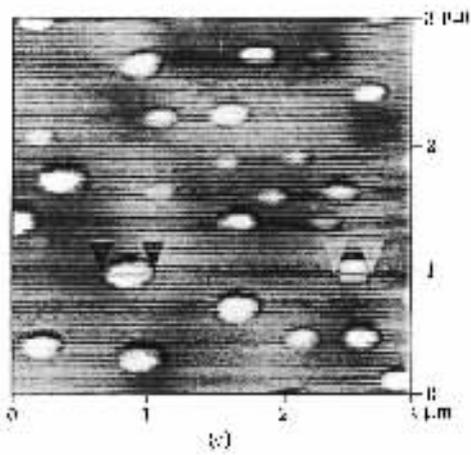
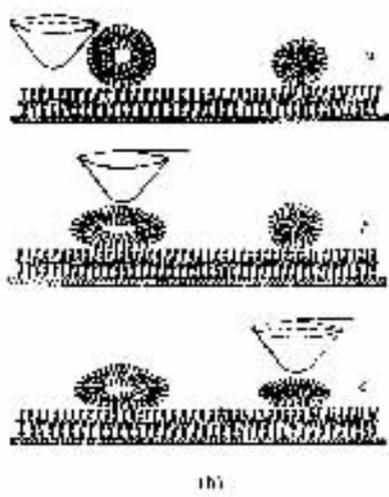
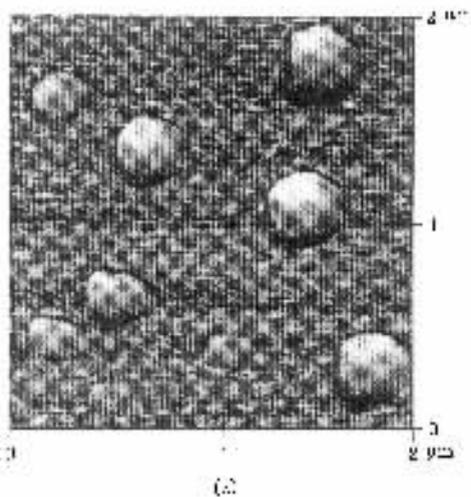


图 1 AFM 的接触扫描方法对 DOPG 脂质体吸附在氧化硅膜上的扫描影像 (a) 球形或椭球形脂质体胞囊的扫描影像的立体图 (b) 扫描过程的模型图 (c) 球形或椭球形脂质体胞囊的扫描影像的平面图 (d) 脂质体胞囊大小的测量图

图 1 概要的描述了用原子力显微镜的接触扫描方法对 DOPG 脂质体吸附在氧化硅膜上的扫描过程. 首先, AFM 探针开始在吸附脂质体胞囊层的表面扫描. 当探针遇见脂质体胞囊时, 开始相互作用. AFM 上悬臂的探针对表面的分子施加一个弹性力;

同样, 悬臂的探针也受到一个反作用力. 当施加的力在 10^{-11}N 到 10^{-8}N 之间时, 在 AFM 上获得了脂质体胞囊的形态图像. 当作用力达到某临界值时, 探针跳过或掠过脂质体胞囊. 之后重复上述过程, 最后, 探针又跳过或掠过第二个脂质体胞囊(图 1(b)). 在探

针与表面相互作用力非常小的条件下,所得到的影像最具有代表性.对于生物样品,施加的力应该在 10^{-11}N 到 10^{-8}N 之间.在实验中,我们观测到脂质体胞囊的球形或椭球形颗粒.在扫描范围内,发现了一些大大小小的球形或椭球颗粒,这意味着,在液晶态 DOPG 系统中,这些球形或椭球突起物可能与吸附在氧化硅表面上的脂质体胞囊有关.在图 1(c)和 (d)中,我们测量了一个较大的脂质体胞囊和一个小的脂质体胞囊.较大的脂质体胞囊的长轴约为 380nm,短轴约为 240nm.较小的脂质体胞囊的长轴约为 310nm,短轴约为 220nm.实验结果表明,通过原子力显微镜的探针与液晶态脂质体的相互作用可以

获得脂质体表面结构图像.

3.2. 脂质体胞囊的损伤

我们研究了 DOPG 脂质体胞囊在氧化硅薄膜表面的黏着行为.当 AFM 探针与 DOPG 分子的膜表面的接触非常近时,经常受到一个排斥作用力.当施加的力大于 10^{-8}N 时,可能导致表面出现大的损伤.在这种情况下,真正的扫描接触是当悬臂将要开始倾斜的那一瞬间.从原子力显微镜的观察中,在氧化硅薄膜表面不仅看到了类似于脂质体胞囊的球形或椭球形突起物,而且也观察到了一些沉淀在表面上的锥形和弧形突起物.

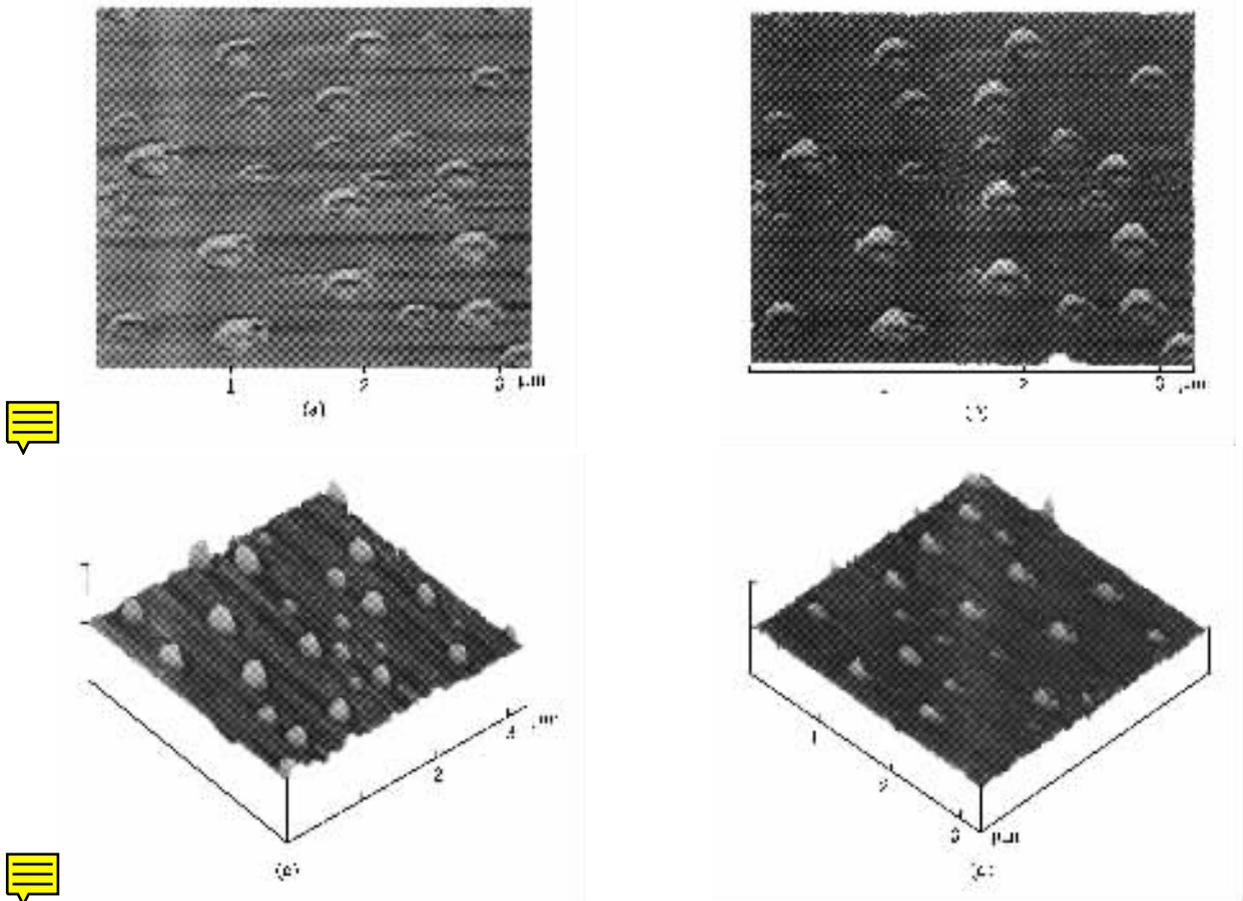


图 2 DOPG 脂质体胞囊的 AFM 图像 (a)DOPG 脂质体胞囊的球形或椭球形结构图像 (b)和(c)DOPG 脂质体胞囊的锥形结构图像 (d) DOPG 脂质体胞囊表面损伤成弧形膜的图像

图 2 给出吸附在氧化硅薄膜表面的 DOPG 脂质体胞囊以及损伤过程的 AFM 图像.用 0.01 mol/L NaCl 溶液将 DOPG 脂质体稀释 10 倍后,吸附在氧化硅薄膜表面形成 DOPG 脂质体平面双层膜.在扫描图像中,观察到 DOPG 分子的第二层脂质体胞囊形

成一个锥形或弧形膜结构,并覆盖在第一层上.第二层 DOPG 分子的吸附特征是以锥形或弧形膜结构存在.这表明锥形或弧形突起物比单层 DOPG 分子的厚度大.在 DOPG 系统中,锥形或弧形突起物可能与吸附在第一层上的 DOPG 脂质体胞囊的形态有关.

在这个研究中,悬臂探针的倾斜是由于它与脂质体胞囊表面相互作用所致.这个力可能导致 DOPG 脂质体胞囊表面损伤.图 2(d)为损伤的弧形膜.我们用 AFM 测得弧形膜的厚约为 5nm.这意味着,一个 DOPG 双层膜在氧化硅表面形成.研究结果表明, DOPG 分子的头部在氧化硅薄膜上的黏着亲和力比 DOPG 分子的头部之间的相互作用力强.也就是说,第二层 DOPG 脂质体胞囊与第一层之间的黏着亲和力比第一层脂质体胞囊与氧化硅薄膜之间的黏着亲和力弱.实际上,磷脂分子之间的相互作用力,也可能是它们表面的水合作用力影响黏着在氧化硅薄膜上的脂质体胞囊的损伤过程.

3.3. 脂双层的 AFM 影像

图 3 给出了一个典型的 DOPG 双层黏着在氧化硅薄膜上的 AFM 影像.由图可见,一个平面脂质双层形成.一个典型的第二层 DOPG 膜在第一层膜上形成一些梯形的结构,部分覆盖在第一层膜上.第二层 DOPG 膜的黏着特点是以三角形或梯形的突起物存在.这些三角形或梯形的突起物可能是一些双层的 DOPG 膜吸附在第一层 DOPG 双层膜上.但从图上可见,第二层 DOPG 膜吸附量很少.这进一步证实第二层 DOPG 脂质体胞囊与第一层之间的黏着亲和力比第一层脂质体胞囊与氧化硅薄膜之间的黏着亲和力弱.

4. 结 论

综上所述,AFM 对研究生物样品的结构、弹性形变以及稳定性等方面都是十分有力的工具.我们

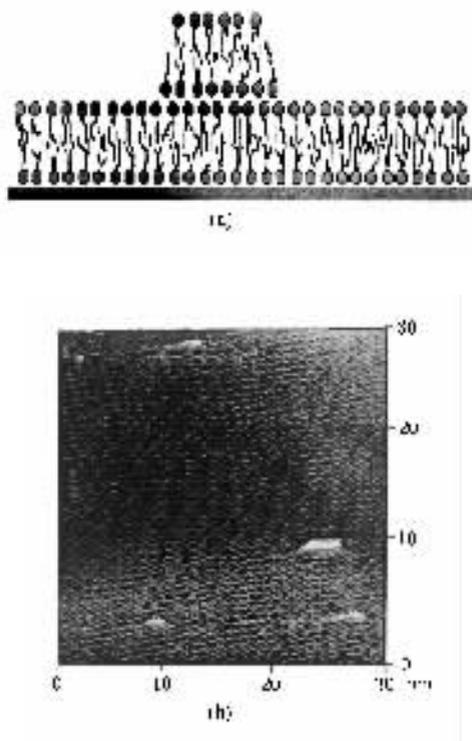


图 3 DOPG 双层黏着在氧化硅薄膜上的 AFM 影像 (a)模型图; (b)AFM 影像

已经证实,用 AFM 可以直接观察脂双层结构.也可以观察脂质体胞囊黏着在氧化硅表面的形态.当第二层脂质体胞囊或双层膜结构黏着在第一层膜上时,如果施加在生物样品上的力超过某临界值,它可能导致 DOPG 脂质体胞囊表面损伤.即观察到一些锥形或弧形膜.这表明脂质体胞囊的稳定性可能与表面的水合作用、静电相互作用有关.这是一个具有理论探讨和潜在应用意义的研究课题,有待进一步深入探讨和研究.

[1] Sun R G, Zhang J, Dai Z H, Xu F X and Wang D H 1994 *Acta Phys. Sin.* **43** 616 (in Chinese) [孙润广、张 静、戴正华、徐逢勋、王德华 1994 物理学报 **43** 616]

[2] Sun R G, Zhang J, Wang D H, Wang F R and Wang Z H 1993 *Acta Phys. Sin.* **42** 360 (in Chinese) [孙润广、张 静、王德华、王丰然、王子浩 1993 物理学报 **42** 360]

[3] Sun R G, Wang D H, Wang Z H and Zhang J 1991 *Chinese Science Bulletin* **36** 1382 (in Chinese) [孙润广、王子浩、王德华、张 静 1991 科学通报 **36** 1382]

[4] Sun R G, Zhang J and Wang Y C 1998 *Science in China (Series B)* **41** 1

[5] Zhang J and Sun R G 1994 *Acta Phys. Sin.* **43** 1495 (in Chinese) [张 静、孙润广 1994 物理学报 **43** 1495]

[6] Sun R G, Wang D H, Wang Z H and Zhang J 1992 *Acta Phys. Sin.* **41** 554 (in Chinese) [孙润广、王子浩、王德华、张 静 1992 物理学报 **41** 554]

[7] Radmacher M, Fritz M, Kacher C M, Cleveland J P and Hansma P K 1996 *Biophysical Journal* **70** 556

[8] Singh S and Keller D J 1991 *Biophysical Journal* **60** 1401

[9] Egawa H and Furusawa K 1999 *Langmuir* **15** 1660

[10] Drake B, Prater C B, Weisenhorn A L, Gould S A C, Albrecht T R, Quate C F, Cannell D S, Hansma H G and Hansma P K 1989 *Science* **243** 1586

[11] Leung O M and Goh M C 1992 *Science* **255** 64

[12] Domke J and Radmacher M 1998 *Langmuir* **14** 3320

Structures and properties of liposome by atomic force microscope *

Sun Run-Guang¹⁾ Qi Hao²⁾ Zhang Jing³⁾

¹⁾ College of Physics and Information Technology, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

²⁾ College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

³⁾ Department of Food Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

(Received 16 October 2001 ; revised manuscript received 10 November 2001)

Abstract

Bilayer structure and morphology of 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-[phospho-rac-1-Glycerol] (DOPG) liposomes has been investigated by atomic force microscope (AFM). Results of studies on the interaction between the tip of an atomic force microscope and the liposomes adhered on the silicon wafers are also reported. Experiments demonstrated that there are some spherical and elliptical relief in the AFM image, which they can be regarded as the vesicles of DOPG liposome in the liquid crystalline state. When the operating force of interaction between AFM tip and the surface of liposome are beyond critical values, the liposomes rupture into bilayers. Experiments show that a single DOPG second layer adhered on the DOPG first layer. The membranous thickness in the topographic image is about 5.0 nm.

Keywords : atomic force microscope, liposome, nanometers-size structure

PACC : 0779, 8720, 6146

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 29672024), and the Foundation for University Key Teachers by the Ministry of Education, China (Grant No. 2000-65).