



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102072971 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 25

(21) 申请号 200910199231. 9

(22) 申请日 2009. 11. 20

(71) 申请人 复旦大学

地址 200433 上海市邯郸路 220 号

(72) 发明人 鲍稔 李莉 邱枫 杨玉良

(74) 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

31200

代理人 包兆宜

(51) Int. Cl.

G01Q 30/20 (2010. 01)

G01N 1/28 (2006. 01)

G01N 1/44 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 7 页

(54) 发明名称

一种在液相中原位制备脂双分子层膜的方法

(57) 摘要

本发明属膜制备技术领域,涉及一种在液相中原位制备脂双分子层膜的方法,形成的双分子层膜可供原子力显微镜观测研究。该方法改进了现有技术制备方法,使得膜的形成过程及膜的表面形貌处于原子力显微镜的实时监测之下,还可通过微量进样器及循环泵,原位改变膜所处的液相环境,实现控制膜表面的化学及物理吸附、膜表面的化学反应及膜表面的晶体生长等,本方法还可用于制备及改性其它两亲性分子膜,控制膜所处介质性质。本方法为从分子分辨的尺度原位实时地研究生理环境下生物膜表面及液相环境下材料表面的各种物理化学过程提供了一条可行可靠的途径,具有非常重要的研究和应用价值。

1. 一种在液相中原位制备脂双分子层膜的方法,其特征在于,采用原位高温囊泡融合法,结合原子力显微镜液池针架设计进样装置,于高温条件下融合囊泡,在液相中原位制备脂双分子层膜。

2. 按权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的进样装置包括可控温样品台 (0),液池针架 (1),液池内腔 (2),液体进样器 (3),温度计 (4),软管 (5) 和进样器通道 (6-8),其中,所述的进样装置置于可控温样品台 (0) 上,液池针架 (1) 底部安装原子力显微镜的探针,侧面有三个连接口,其右侧连接口连接液体进样器 (3),中间连接口连接温度计 (4),左侧连接口连接普通软管 (5),液体进样器 (3) 设有进样器通道 (6-8) 连接不同种类的液体或溶液。

3. 按权利要求 2 所述的方法,其特征在于,所述的液池内腔 (2) 周围有 O 型圈。

4. 按权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的方法包括以下步骤:

1) 原位注入囊泡溶液:在连接进样装置前,将有光滑表面的云母或盖玻片固体置于原子力显微镜的可控温样品台上,将液池针架 (1) 置于固体表面,在液池内腔 (2) 中注入脂类囊泡溶液;

2) 安装进样装置:将进样装置与液池针架 (1) 连接,关闭进样器总阀,进样器的通道 (6-8) 中连接装有所需溶液的注射器,同时安装温度计 (4) 和软管 (5);

3) 高温融合:打开样品台温控电源,根据体系中所用脂类设定温度,以温度计 (4) 读数达到设定温度时,开始计时,持续加热囊泡溶液,在云母或盖玻片表面,囊泡彼此融合形成双分子膜;

4) 原位去除多余囊泡,获得平整的双分子膜。

5. 按权利要求 4 所述的方法,其特征在于,所述的步骤 1) 中,在液池内腔 (2) 中注入的脂类囊泡溶液为 60-100 μ l,脂类囊泡溶液的脂浓度为 0.5-2.0mg/ml,囊泡尺寸小于 300nm。

6. 按权利要求 4 所述的方法,其特征在于,所述的步骤 2) 中,连接装有 20-100ml 所需溶液的注射器。

7. 按权利要求 4 所述的方法,其特征在于,所述的步骤 3) 中,所述设定的温度范围为 30-60 $^{\circ}$ C。

8. 按权利要求 4 所述的方法,其特征在于,所述的步骤 3) 中,所述持续加热囊泡溶液的时间为 30-60 分钟。

9. 按权利要求 4 所述的方法,其特征在于,所述的步骤 4) 中,通过关闭样品台温控电源,冷却至室温,打开进样器总阀和溶液通道,10-20ml 的溶液通过液池内腔 (2),带走内腔未融合的囊泡,废液由软管 (5) 导出液池内腔 (2)。

一种在液相中原位制备脂双分子层膜的方法

技术领域

[0001] 本发明属于膜制备技术领域,涉及固体表面支撑的脂双分子层膜的制备方法,具体涉及一种在液相中原位制备脂双分子层膜的方法。

背景技术

[0002] 固体表面支撑的平面脂双分子层膜 (Supported Lipid Bilayer, SLB),是模型生物膜的主要形式之一。通过控制脂双分子层的组成比例以及膜周围的介质性质等影响因素,人们可以借助原子力显微镜 (AFM) 定性及定量地研究生物膜对外部环境变化的响应及特定生理过程的内在机制。常用的制备平面支持膜的方法有旋涂法、LB 膜转移法和囊泡融合法三大类。其中,旋涂法是借助旋涂仪在云母表面直接旋涂脂类的有机溶液得到多层脂类干膜;LB 膜转移法是借助 LB 膜仪,将液槽中的单分子层膜镀覆到云母等固体表面得到单层脂类干膜。这两种方法方便快捷,但是制得的脂膜不具备生物流动性,即使长时间浸泡于溶液中也无法得到具有二维流动性的分子层膜,因而应用范围有限。所述的囊泡融合法是最近提出的一种制备脂双分子层膜的方法,利用脂类囊泡能自发在云母等固体表面自发融合调整的特点,促使脂类在固体表面形成规整的单层双分子层脂膜,同时整个制备过程是发生在液相环境中,因而能保证脂膜的二维流动性,能促进对模型膜的研究。但是目前提出的各种囊泡融合法均存在如下一些缺点:(1) 囊泡在固体表面上自发融合成膜所需的时间很长,约 4~12 小时;(2) 得到效果较好双分子层膜的几率不够高;(3) 在冲洗表面多余囊泡的过程中常常会造成膜的损坏;(4) 在具体实施过程中,尤其是在转移到 AFM 样品台上观测时,膜表面常应接触空气而失去流动性。此外,目前各种制备方法均存在如下两个共同的问题:在操作及转移过程中难以保持所需的温度,尤其对于多组分体系,可能导致不可消除的分相及相变痕迹;不可能实现对膜表面的任何进一步的修饰或改性,从而不能用于原位改性和相应的动力学研究。

[0003] 因此,研究一种便捷制备均匀稳定的固体表面支撑脂双分子层膜的方法,并实现用 AFM 实时监测溶液环境中温度及分子离子种类等对膜结构的影响与作用,是一个能更大促进生物膜研究并具有实际应用价值的课题。

[0004] 与本发明相关的现有技术有:

[0005] 1. 杨福愉 主编. 生物膜 [M]. 北京:科技出版社,2005.

[0006] 2. W. Binder, V. Barragan, F. Menger. Domains and Rafts in Lipid Membranes[J]. Angew. Chem. Int. Ed. 2003(42):5802-5827.

[0007] 3. S. Connell, D. Smith. The atomic force microscope as a tool for studying phaseseparation in lipid membranes. Molecular Membrane Biology, 2006(23):17-28.

[0008] 4. E. Sackmann. Supported membranes: Scientific and practical applications[J]. Science 1996(271):43-48.

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提出一种固体表面支撑的脂双分子层膜的新制备方法,具体涉及一种在液相中原位制备脂双分子层膜的方法。

[0010] 本发明通过在原子力显微镜 (AFM) 的可控温样品台上原位制备脂双分子层膜,借助高温条件加速囊泡融合,实现快速制样。该方法同时还能灵活有效控制双层膜所处的温度、周围液体介质的性质等影响膜形貌的因素。

[0011] 为实现上述目的,本发明提供了一种在液相中原位制备脂双分子层膜的方法,其特征在于,采用原位高温囊泡融合法,结合原子力显微镜液池针架设计进样装置,于高温条件下融合囊泡,在液相中原位制备脂双分子层膜。

[0012] 本发明中,温度可控、AFM 样品台上、液池中、原位生成固体表面的支撑膜,并可通过置换不同液相溶液引发膜表面的各种物理化学反应,用原子力显微镜实时监测这些过程中膜表面形貌的变化。

[0013] 本发明中,在原子力显微镜的可控冷热扫描器的样品台上,建立以云母为衬底的样品液池装置,插入微型温度计与自动液体进样器。样品液池中,溶液的种类及冲洗置换液的流速、用量精确可控,以保证液相的性质及浓度的可靠性,同时不损坏膜的结构。

[0014] 为了获得稳定的平整的固体支撑膜,目前的囊泡融合方法大多是在常温下先用大量的囊泡溶液 (1-10 毫升) 将固体表面完全过量润湿,进行 4-12 小时不等的融合得到较平整的支撑膜。

[0015] 鉴于脂类囊泡是由一种或多种脂类形成的,每种脂类都有其特定的相变温度;当处于该温度之上时,脂类处于相对柔软的液相。本发明中,通过加温囊泡溶液,使得所有脂类处于高于相变点的温度环境中,使得脂类囊泡相对柔软,刚性较小。所述的柔软的囊泡在接触到固体表面后易于融合。同时高温环境下,溶液中的囊泡与固体表面碰撞机率增加。这两种效应必然会加速固体表面脂双分子支撑膜的形成。

[0016] 本发明中所述的进样装置 (如图 1 图 2 所示),包括,可控温样品台 0,液池针架 1,液池内腔 2,液体进样器 3,温度计 4,软管 5 和进样器通道 6-8。

[0017] 该装置置于原子力显微镜的可控温样品台 0 上,其中商用原子力显微镜的液池针架 1 底部用于安装原子力显微镜的探针,侧面有三个连接口,方便外部溶液进入液池内腔 2,或连接外部器件探测液池内腔 2 中的温度,此外,液池内腔 2 周围有 O 型圈保护,能减少水分挥发和流动。

[0018] 本发明所述的进样装置,其中,液池针架 1 的右侧连接口连接液体进样器 3,中间连接口连接温度计 4,左侧连接口连接普通软管 5 作为废液通道。液体进样器有三个进样器通道 6-8 连接不同种类的液体或溶液,常用的液体或溶液有 Milli-Q 水、各种缓冲溶液、生物小分子水溶液以及大分子水溶液等,并可以通过进样器的阀门控制溶液的选择、进样速度以及进样量。进样装置、温度计以及软管都可自由装卸。

[0019] 具体而言,本发明提供了一种在液相中原位制备脂双分子层膜的方法,其特征在于,采用上述装置在高温条件下制备双分子层脂膜供原子力显微镜观测,包括以下具体步骤:

[0020] (1) 原位注入囊泡溶液:在连接进样装置前,将有光滑表面的云母或盖玻片等固体置于原子力显微镜的可控温样品台上,将液池针架置于固体表面上,在液池内腔中注入 60-100 μ l 的脂类囊泡溶液;其中脂类囊泡溶液的脂浓度为 0.5-2.0mg/ml,囊泡尺寸小于

300nm。

[0021] (2) 安装进样装置:将进样装置与液池针架连接,关闭进样器总阀,进样器的三个通道 6-8 中连接装有 20-100ml 实验所需溶液的注射器;同时安装好温度计 4 和软管 5。

[0022] (3) 高温融合:打开样品台温控电源,设定温度,其中温度范围为 30-60℃,具体温度设定取决于体系中所用脂类。以温度计 4 读数达到设定温度时,开始计时,持续加热囊泡溶液 30-60 分钟,在云母或盖玻片表面,囊泡彼此融合形成双分子膜。

[0023] (4) 原位去除多余囊泡,获得平整的双分子膜。关闭样品台温控电源,冷却至室温。打开进样器总阀和溶液通道,10-20ml 的溶液通过液池内腔,带走内腔未融合的囊泡,废液由软管导出液池内腔。云母或盖玻片表面形成平整的双分子层膜。

[0024] 本发明的优点是:采用本发明公开的制备方法,与常用的融合方法相比,融合时间短,低于 2 小时;在融合和除去多余囊泡的过程中彻底排除了空气,保证了膜的平整性和流动性;并且该方法具有更强的灵活性和应用前景,在形成双分子层膜后,还可通过进样器的其它通道改变液池内腔的溶液种类和溶质质量,进一步观测各种分子对脂双分子层膜的影响。

[0025] 本方法还可用于制备及改性其它两亲性分子膜,如高分子膜等,并同样可以控制膜所处介质性质。

[0026] 本方法改进了制备固体表面支撑膜常用的旋涂法、囊泡融合法和 LB 膜转移法,不仅使得膜的形成过程及膜的表面形貌处于原子力显微镜的实时监测之下,还可通过微量进样器及循环泵,原位改变膜所处的液相环境,从而实现控制膜表面的化学及物理吸附、膜表面的化学反应及膜表面的晶体生长等等。本发明方法为液相环境下研究材料表面的各种物理化学过程提供了一条可行可靠的途径,具有非常重要的研究和应用价值。

[0027] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步说明。

附图说明

[0028] 图 1 为本发明中使用到的装置侧视图,其中,0 为可控温样品台;1 为液池针架;2 为液池内腔;3 为液体进样器。

[0029] 图 2 为本发明中使用到的装置俯视图,其中,1 为液池针架;2 为液池内腔;3 为液体进样器;4 为温度计,测量 2 中温度;5 为软管;6-8:为进样器通道,可连接不同液体。

[0030] 图 3 为实施例 1 制得的三组分脂类 (DOPC/ESM/Cho1) 膜的 AFM 形貌图,其中相貌尺寸为 $8\mu\text{m}\times 8\mu\text{m}$;图的高度标尺为 20nm。

[0031] 图 4 为实施例 2 制得的三组分脂类 (DOPC/ESM/Cho1) 膜的 AFM 形貌图,其中相貌尺寸为 $8\mu\text{m}\times 8\mu\text{m}$;图的高度标尺为 10nm。

[0032] 图 5 为实施例 3 制得的三组分脂类 (DOPC/ESM/Cho1) 双分子层膜的 AFM 形貌图,其中相貌尺寸为 $8\mu\text{m}\times 8\mu\text{m}$;图的高度标尺为 10nm。

[0033] 图 6 为实施例 4 制得的三组分脂类 (DOPC/ESM/Cho1) 双分子层膜的 AFM 形貌图,其中相貌尺寸为 $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$;图的高度标尺为 10nm。

[0034] 图 7 为实施例 5 制得的两组分脂类 (POPC/BSM/) 双分子层膜的 AFM 形貌图,其中相貌尺寸为 $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$;图的高度标尺为 10nm。

[0035] 图 8 为实施例 6 制得的两组分脂类 (DOPC/GM1) 双分子层膜的 AFM 形貌图,其中相

貌尺寸为 $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$;图的高度标尺为 10nm。

[0036] 图 9 为实施例 7 制得的双分子层膜的 AFM 形貌图。其中相貌尺寸为 $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$;图的高度标尺为 10nm。

具体实施方式

[0037] 实施例 1 旋涂法制备三组分脂类 (DOPC/ESM/Chol) 的固体表面支撑脂膜。

[0038] 二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC)、蛋鞘脂 (ESM) 以及胆固醇 (Chol) 三种磷脂的氯仿溶液按 2 : 2 : 1 的摩尔比混合得到脂类原液,其中脂类原液的浓度为 1.0mg(脂类)/ml(氯仿)溶液。用旋涂仪在云母表面以原液镀膜,室温置于 AFM 下观察,得图 3。旋涂仪的参数为:转速 1000rpm,旋涂时间 20s,在 AFM 扫描之前,样品保持在 45℃的真空烘箱中。从图 3 中可以看出,通过旋涂法得到的支撑膜表面不平整,膜内部分为数层,不利于观测分析膜的形貌和内部分相。

[0039] 实施例 2 用水浸泡旋涂法制得的三组分脂类 (DOPC/ESM/Chol) 的固体表面支撑脂膜。

[0040] 将上述实施例 1 中制得到的脂膜浸泡在 Milli-Q 水中 12 小时。用 Milli-Q 水冲洗后,置于 AFM 液池中在室温下扫描得图 4。可以看出,干膜即使在水中充分溶胀后,也无法得到平整的表面。

[0041] 实施例 3 普通囊泡融合法制备三组分脂类 (DOPC/ESM/Chol) 的固体表面支撑脂膜。

[0042] 取 2ml 实施例 1 中的原液,将其制备成 1.0mg(脂类)/ml(Milli-Q 水)的囊泡悬浮溶液。其中囊泡的平均尺寸小于 200nm。取 1ml 该囊泡悬浮液置于新鲜剥离的云母表面,在 30℃的烘箱中保温 4 小时,然后小心地用 Milli-Q 水,冲去剩余的溶液,并反复冲洗 10 次,期间尽量保持表面处于水相中。将冲洗后得到的支撑膜置于 AFM 液池中成像,得到图 5。可以看出,相对实施例 1,2 中得到的支撑膜,用普通囊泡融合法制得的膜平整,相区边界明显。但是,该方法花费的融合时间长,同时有序相区(图中明亮色块)形状不规整。

[0043] 实施例 4 用本方法制备三组分脂类 (DOPC/ESM/Chol) 的固体表面支撑脂膜。

[0044] 取 60 μl 实施例 3 中制得的囊泡悬浮溶液注入液池内腔,装上进样器,其中进样器第一通道连接 50ml Milli-Q 水。将样品台温度设为 45℃,保温 30 分钟后用 Milli-Q 水冲洗,然后降温至 30℃,静置 10 分钟。用原子力显微镜扫描得到图 6 所示的形貌图。可以看出,用本发明制得的支撑膜表面平整,相区清晰可辨。同时,在图 6 中的有序相区都呈现圆形和椭圆形,符合 DOPC/ESM/Chol 三组分在膜内分相后的有序相区的形貌特征。

[0045] 实施例 5 用本方法制备两组分脂类 (POPC/BSM) 的固体表面支撑脂膜

[0046] 取油酰磷脂酰胆碱 (POPC) 和脑鞘脂 (BSM) 囊泡 PBS 溶液 100 μl 注入液池内腔,装上进样器,其中进样器一通道连接 100ml PBS 缓冲液,POPC 和 BSM 的摩尔比为 1 : 1,囊泡水溶液的浓度为 1.0mg(脂类)/ml(PBS)溶液,囊泡尺寸小于 150nm。将样品台温度设定为 50℃,保温 40 分钟后用 PBS 缓冲液,然后降温至室温(25-28℃),静置 20 分钟。用原子力显微镜扫描得到图 7 所示的形貌图。可以看出,用本发明制得的两组分支撑膜同样表面平整,相区边界明显,相区边界不规则,有序相区彼此相连且尺寸较大,符合 POPC/BSM 两组分在膜内分相后的形貌特征。

[0047] 实施例 6 用本方法制备两组分脂类 (DOPC/GM1) 的固体表面支撑脂膜

[0048] 取 DOPC 和神经节苷脂 (GM1) 囊泡水溶液 80 μ l 注入液池内腔, 装上进样器, 其中进样器第一通道连接 100mL Milli-Q 水, DOPC 和 GM1 的摩尔比为 4 : 1, 囊泡水溶液的浓度为 2.0mg (脂类)/ml (Milli-Q 水) 溶液, 囊泡尺寸小于 200nm。将样品台温度设为 55 $^{\circ}$ C, 保温 35 分钟后用 Milli-Q 水冲洗, 然后降温至 30 $^{\circ}$ C, 静置 15 分钟。用原子力显微镜扫描得到图 8 所示的形貌图。可以看出, 用本发明制得的两组分支撑膜同样表面较平整, 相区边界明显。相区边界不规则, 相区内部表面平整度低于周围相区, 但相区高度高 (体现为相区颜色更明亮), 符合 DOPC/GM1 两组分在膜内分相后的形貌特征。

[0049] 实施例 7 液相中 GM1 在三组分类脂 (DOPC/ESM/Chol) 支撑膜上的插入与分布

[0050] 在上述实施例 5 中的制得的支撑膜的基础上, 在进样器的第三通道连接浓度为 0.1 μ g/ml 的 GM1 水溶液 10ml, 打开通道阀和总阀, 注入 GM1 水溶液, 使得液池内腔中的 Milli-Q 水被置换出内腔, 关闭 GM1 水溶液通道阀和总阀。静置, 让注入的 GM1 水溶液与三组分类脂 (DOPC/ESM/Chol) 支撑膜作用。30 分钟后, 打开 Milli-Q 水的通道阀和总阀, 向内腔注入 Milli-Q 水, 置换出在内腔中的 GM1 水溶液。然后再次扫描, AFM 形貌图见图 9。

[0051] 本实施例旨在说明本发明的灵活性和更广泛的应用前景:

[0052] (1) 由于整个操作不涉及到 AFM 仪器和针尖的位移, 因此图 7 和图 5 对应的是同一区域, 即通过本发明中的进样装置, 本发明实现了原位观测, 这对于膜形貌的动力学研究具有十分重要的意义。而普通囊泡融合法是无法实现在原位观察膜的变化及其过程的。

[0053] (2) 图 7 中多处有亮色突起 (如箭头所示), 表明 GM1 分子进入了支持膜。这是由于 GM1 分子较大, 一旦插入支持膜后, 将高于周围的基膜表面。进一步对比, 可发现这些突起主要集中在相区边界, 表明了 GM1 分子在多组分膜内的分布情况。即通过本发明能实现原位改变支持膜所处的物理环境, 从而改变了支持膜的形貌; 在不需重新制样的前提下, 增加了支持膜的组分, 并观测到新组分所在区域。普通囊泡融合法则要求从制备囊泡溶液就重新制样, 花费大量时间。

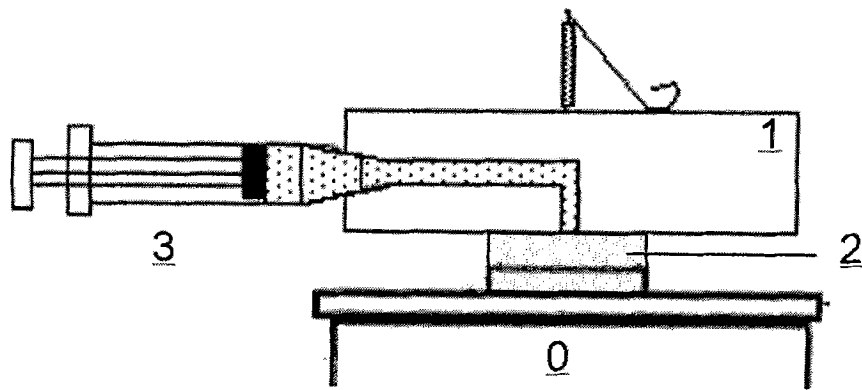


图 1

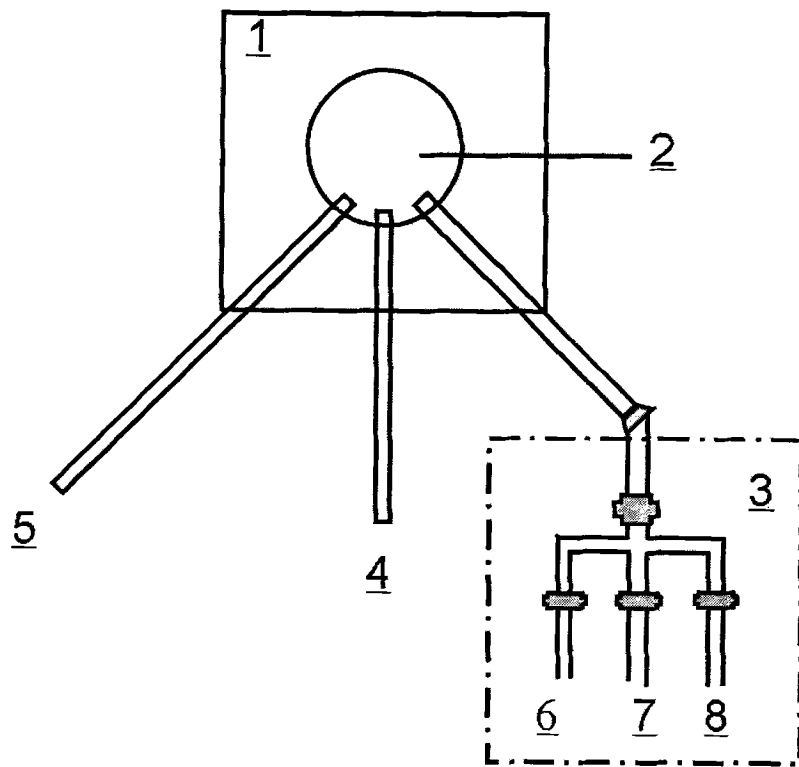


图 2



图 3

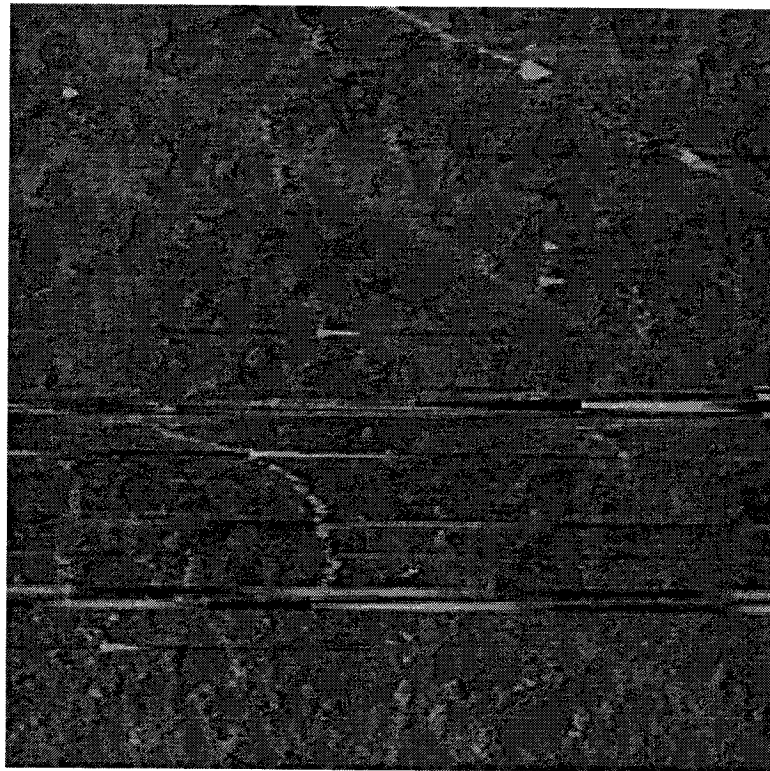


图 4

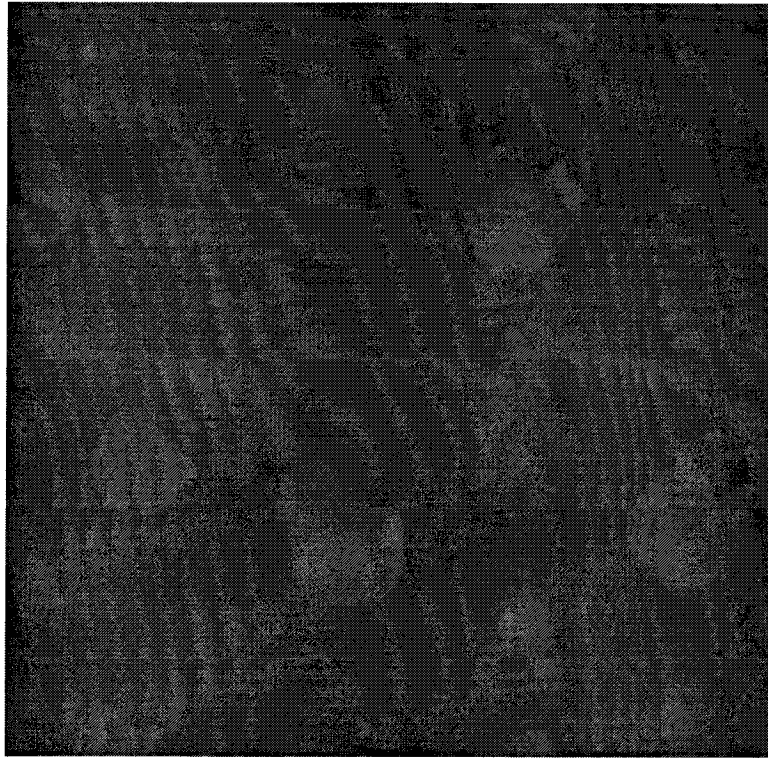


图 5

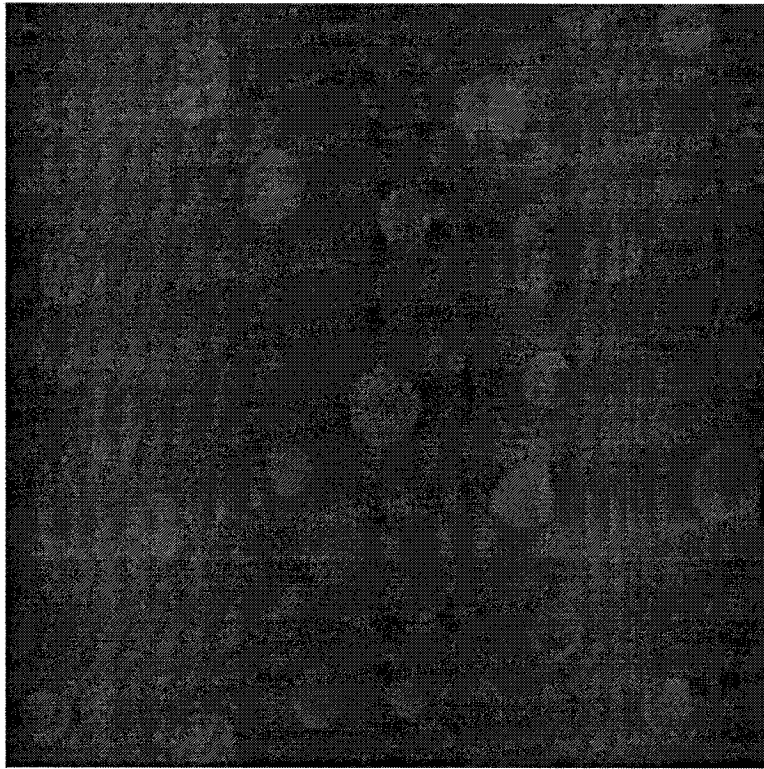


图 6

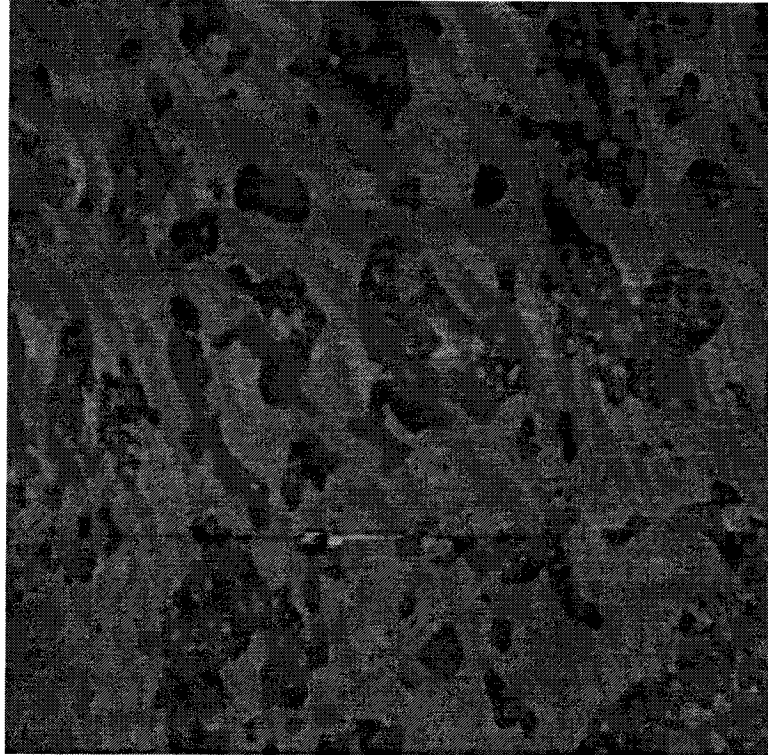


图 7

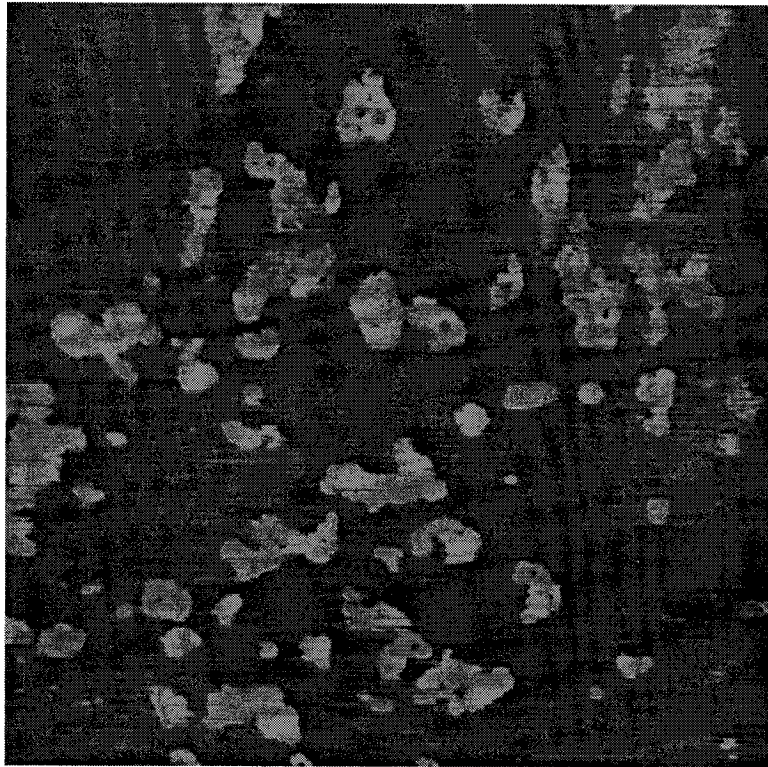


图 8

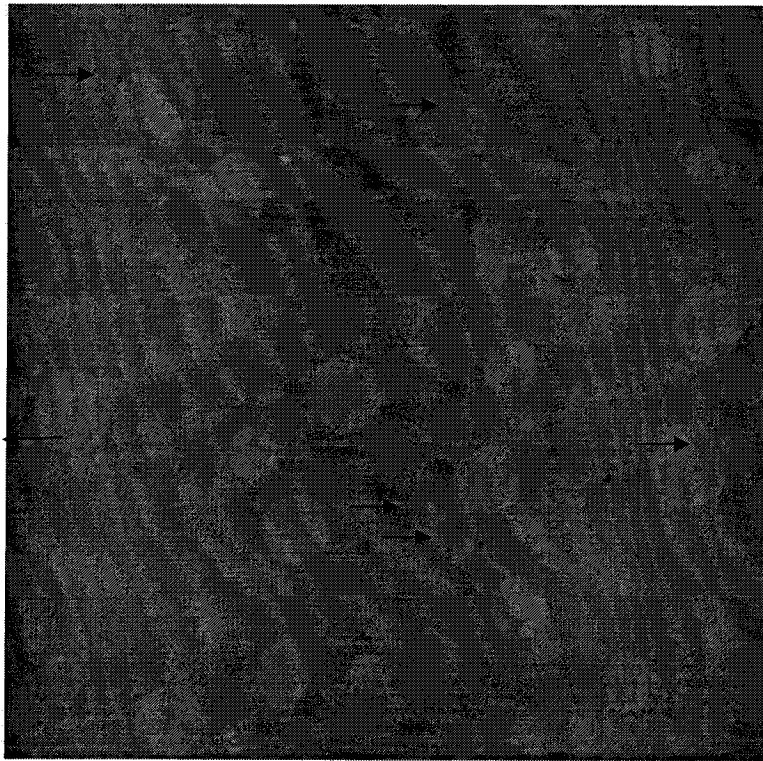


图9