

Формирование липидного монослоя при помощи АСМ-зонда

Д.В.Клинов, В.В.Прохоров, В.В.Демин

Институт биоорганической химии РАН

Атомно-силовая микроскопия - относительно новый метод, позволяющий получать структурную информацию о поверхности исследуемого образца в нанометровом масштабе. Исследование искусственно полученных липидных образований (мультислойных пленок, липосом и т. д.) дает возможность понять принципы функционирования биомембран и создания различного рода биодатчиков и поверхностно - активных покрытий. Использование АСМ для изучения различных структур, образованных при самоорганизации липидов, дало уникальную возможность изучить их морфологию, и упаковку в пределах монослоя. В настоящее время существует ограниченное количество методов формирования моно и мультислоев. Как правило, монослой формируется на границе раздела воздух - вода в ленгмюровской ванне¹ и затем, для дальнейшего изучения переносится на подложку. Методы переноса могут быть различными. Большое число работ было посвящено АСМ-исследованиям структуры липидных пленок, перенесенных на слюду или на какие - либо другие подложки.² Другим, альтернативным методом формирования липидных пленок - является самоорганизация молекул липида непосредственно на подложке. Причем возможно формирование как монослоя, так и бислоя. Монослой образуется при растекании по слюде раствора липида в летучем растворителе, бислой - при нанесении везикул определенного размера³. Все эти методы имеют те или иные преимущества или недостатки и применяются для определенного круга задач. Например, формирование двумерных кристаллов холеро-токсина происходит на заранее сформированном липидном бислое⁴.

В этом докладе представлены результаты работы по исследованию обнаруженного нами явления переноса липидов при помощи АСМ-зонда в пределах сканируемой поверхности образца, и с поверхности одной подложки на другую.

При приготовлении образцов использовались 2 варианта нанесения исследуемых веществ на слюду. В первом - капля раствора вещества объемом 3 мкл наносилась на поверхность слюды с последующим высушиванием при комнатной температуре. Во втором - адсорбция вещества на поверхность осуществлялась в процессе стекания капли нанесенного вещества по наклонной поверхности слюды.

При высушивании капли такого же объема обычным способом (без стекания) наблюдалось образование объемных структур, среди которых иногда встречались мультислои (рис. 1).

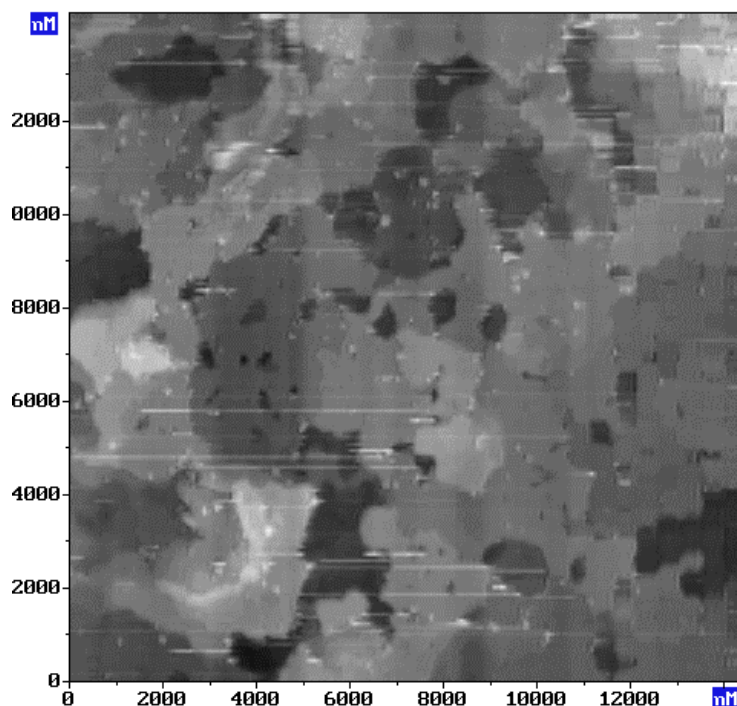
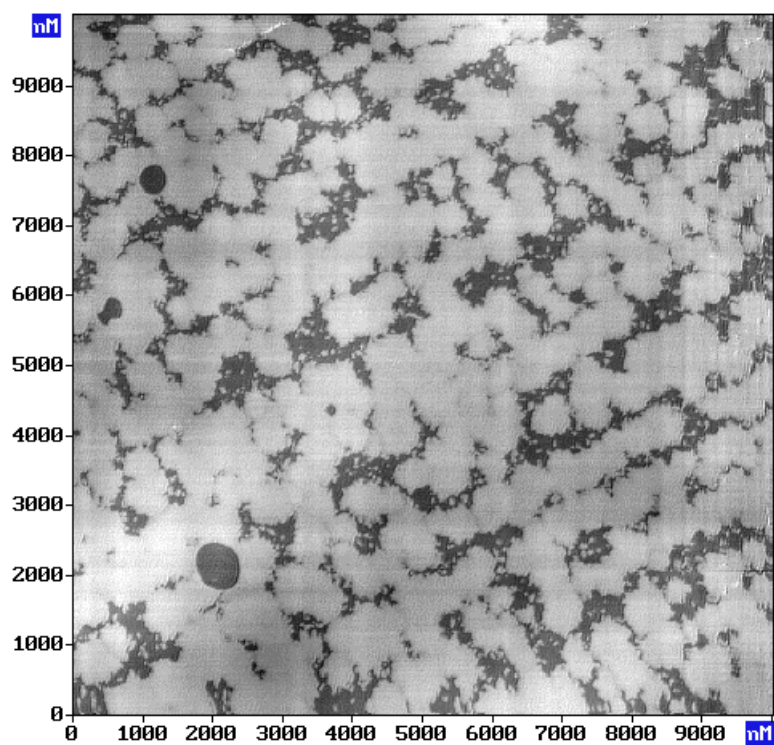


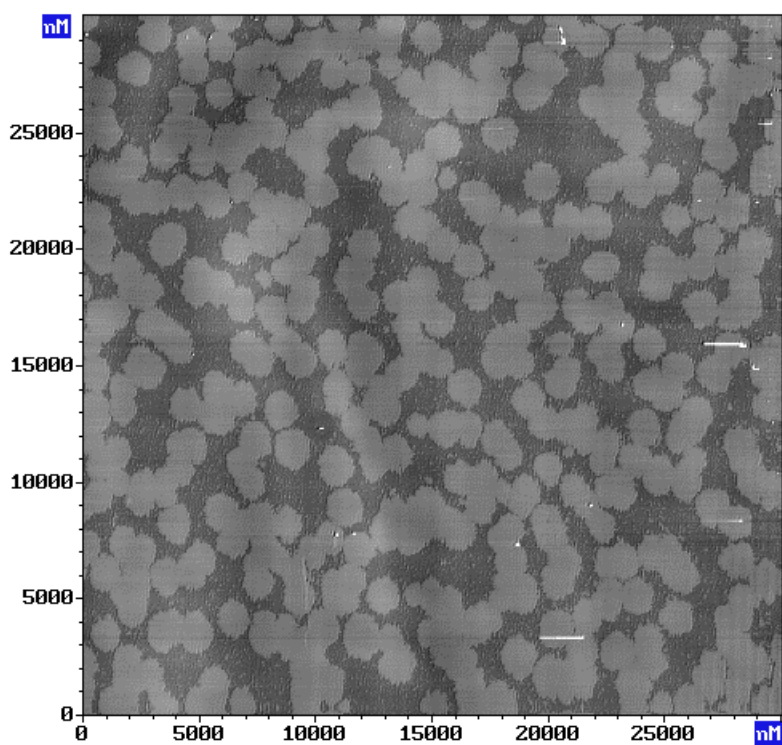
Рис.1 Мультислой ФК на слюде, полученные при высушивании образца, без растекания.

При растекании раствора по поверхности слюды, происходило самопроизвольное формирование монослоя (рис. 2), который был достаточно стабилен при сканировании. На рис. 2 приведены характерные изображения поверхностных структур ФК, полученные методом стекания. Обращает на себя внимание округлая форма монослойных доменов ФК и их примерно одинаковый диаметр в пределах области сканирования. Форма доменов сохранялась при смещении по образцу, размер же доменов мог меняться в 1.5-3 раза. В отдельных участках образца домены ФК образовывали упорядоченные линейные структуры (рис. 2). Кроме монослоя на поверхности образца были обнаружены структуры большей высоты чем монослой, которые разрушались кантилевером при повторном сканировании.

Нами было замечено, что при долгом сканировании липидного образца фосфатидовой кислоты (ФК) происходит появление новых и увеличение площади уже существующих островков монослоя на поле сканирования. По-видимому, липиды, составляющие подобные структуры после их (структур) разрушения в процессе сканирования "прилипали" к острию микрозонда, и когда их количество на поверхности зонда превышало определенное значение начинали "стекать" обратно на подложку. Во время сканирования на поверхности подложки формировался монослой. Была изучена динамика этого процесса (рис. 3). Также исследовано влияние некоторых параметров сканирования на морфологию получаемого монослоя.



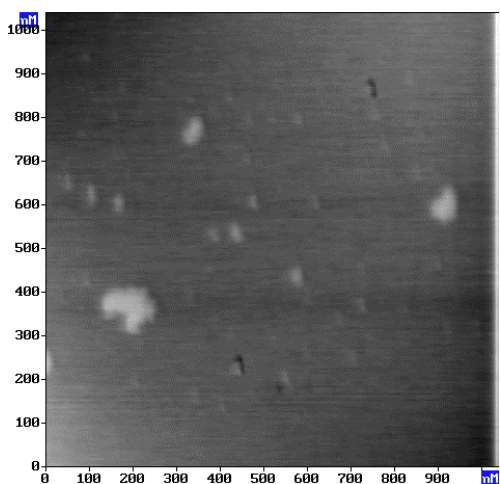
A)



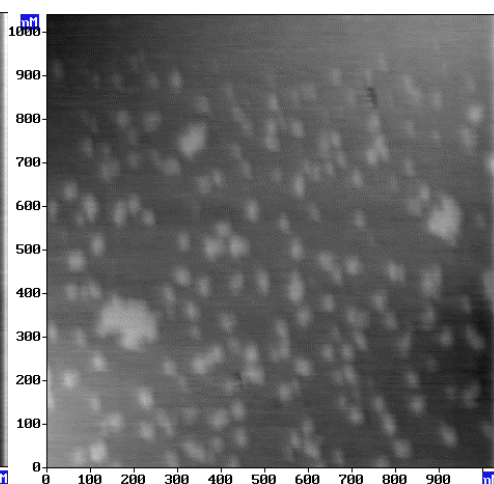
Б)

Рис 2 Монослои ФК на слюде образованные при стекании капли р-ра ФК по слюде. А)- в виде упорядоченных при стекании доменов. Б) в виде неупорядоченных при стекании доменов.

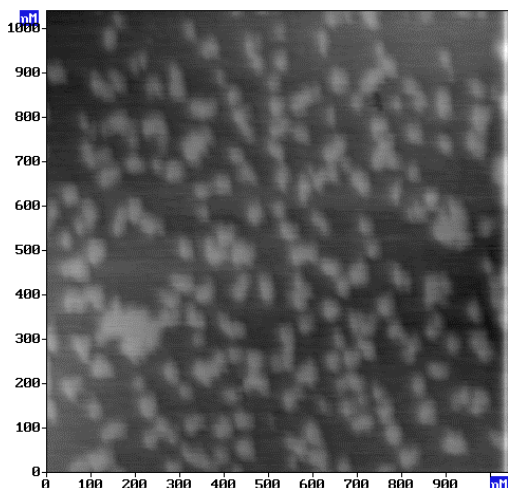
а)



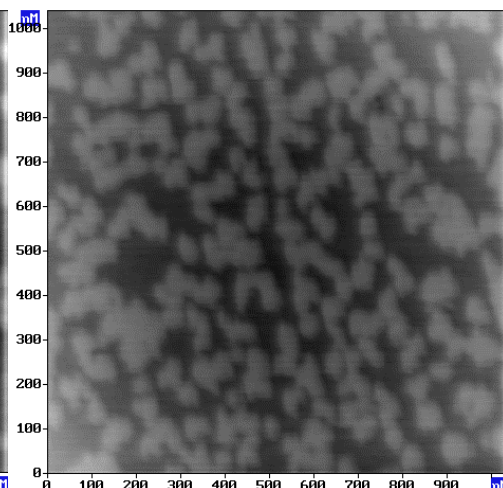
б)



в)



г)



д)

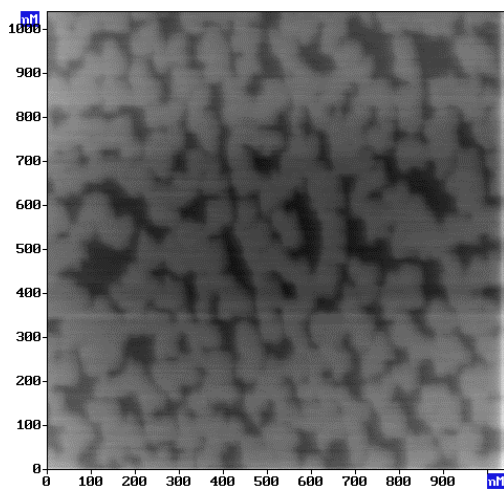
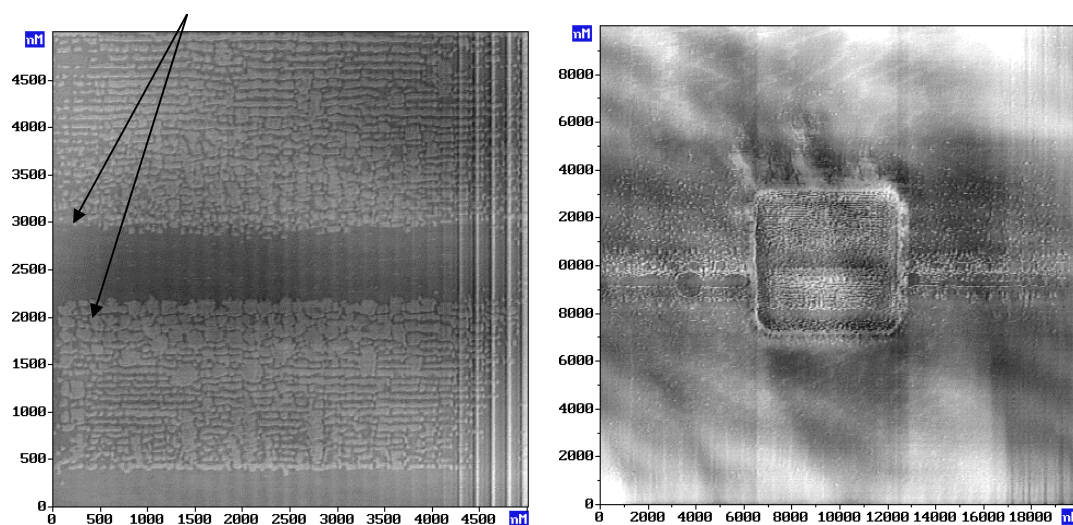


Рис. 3 Процесс переноса ФК и формирование монослоя при помощи АСМ-зонда, в пределах одной подложки. На рисунке представлены последовательные (а-д) изображения одного и того же участка сканирования. Более светлые участки на рисунке соответствуют монослою

Долго сканируя образец ФК и сознательно “испачкав” кантилевер в липиде, мы попробовали перенести его на свежесколотую поверхность слюды. Это удалось. При первых попытках, когда зонд сильно загрязнен, скорость переноса липидов очень большая. Так, даже при частоте сканирования 14 Hz с первого скана не удаётся зафиксировать чистую подложку. Монослой в этом случае формируется в виде полос, упорядоченных вдоль сканирования кантилевера (рис. 4б). Увеличивая поле сканирования, можно убедиться в том, что перенос действительно имеет место.

а)

б)



в)

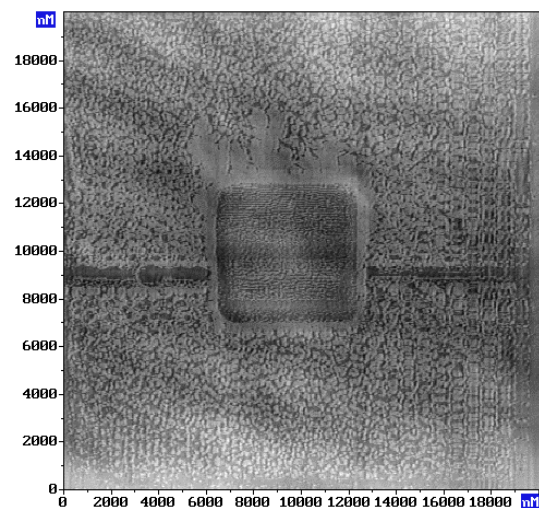


Рис. 4 Процесс переноса ФК на свежесколотую слюду в последовательных кадрах.

Необходимо упомянуть ещё об одном интересном факте. Участок чистой слюды, на котором начиналось сканирование (область, обозначенная стрелками на рис. 4а), не покрывался в дальнейшем липидом, и имел фиксированную ширину, в два раза превышающую ширину монослоя, сформированного за пределами сканирования. По-

видимому, формирования монослоя происходит не на подложке, а на поверхности “шлейфа” вокруг кантилевера, за тем монослой сползает на поверхность слюды при сканировании (рис. 5).

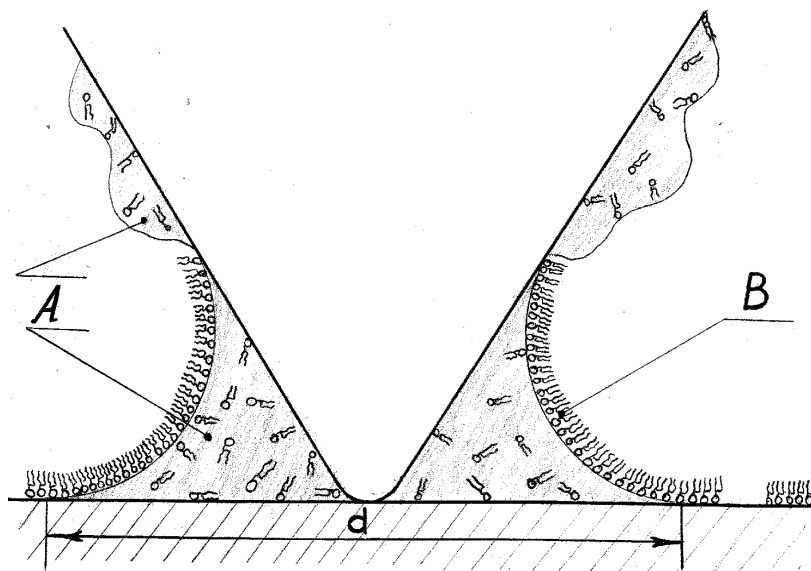


Рис 5 Схематичное изображение контакта микрозонда с поверхностью слюды. Область А - хаотично упакованные липиды. Область В - монослой липидов на поверхности “шлейфа”.

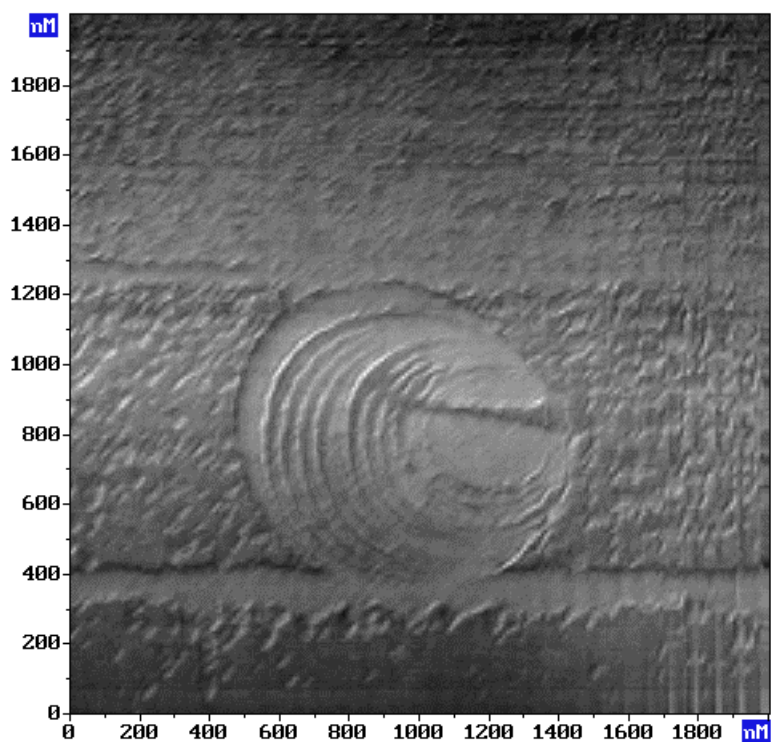


Рис. 38 Перенос ФК на свежесколотую слюду, начальное сканирование при 0 nm скане.

Для выяснения формы и размеров липидного “шлейфа” было проделано следующее: начинали сканирование на чистом участке слюды с нулевым размером скана, за тем увеличивали его до 2000 nm. В результате этого, получалась характерная картина с пятном (рис 6). Диаметр пятна совпадал с шириной не покрытого липидом участка А на рис. 36а, и составлял ≈ 1000 nm. Сканирование образца АСМ-зондом начинается с середины кадра, и при первых сканах структура приводимая на рис. 37 не успевает сформироваться. Формирование монослоя за пределами участка сканирования (по ширине равного половине диаметра “шлейфа”) происходит потому, что “шлейф” выходит за пределы кадра.

Процесс переноса был изучен также для фосфатидилхолина (ФХ) с насыщенными углеводородными хвостами. Оказалось, что по степени переноса ФХ сильно отличается от ФК и ЯФХ. В контрольном эксперименте образец с мультислоями ФХ сканировался такое же время, что и образец ФК, однако его перенос на свежесколотую слюду проходил в незначительной степени. Плохая способность ФХ к переносу (по сравнению с ФК и ЯФХ) объясняет то, что перенос липидов не был до сих пор замечен исследователями, несмотря на большое количество работ по АСМ пленок фосфатидилхолина. При повышении температуры наблюдения до 60°C (при помощи системы обдува горячим азотом), перенос ФК аналогичен переносу ЯФХ. Пленка, получаемая на подложке при данных условиях, не имеет фиксированной высоты и разрушается при сканировании.

Таким образом, в ходе исследований показана возможность формирования локального липидного монослоя новым методом, имеющим перспективу применения в нанотехнологии. Данный метод, использующий прецизионную точность пьезосканера АСМ, позволяет создавать монослойное липидное покрытие с различной степенью заполнения, формой, в заданном месте образца. Перспективой дальнейших исследований в данной области является изучение процесса переноса для различных биополимеров и поверхностей.

¹ Roberts, G. Langmuir-Blodgett Films. New York and London: Plenum Press., 1990.

² Zasadzinski, J., Helm, C., Longo, M., Weisenhorn, A., Gould, S., Hansma, P., Atomic Force Microscopy of hydrated phosphatidylethanolamine. / Biophys. J., 59, 755-760.

³ Mou, J., Yang, J., Shao, Z. Tris induced ripple phase in supported unilamellar phospholipid bilayers. / Biochemistry, Philad., 1994, 33, 4439-4443.

⁴ Mou, J., Yang, J., Shao, Z. Atomic Force Microscopy of cholera toxin B-oligomer bound to bilayers of biologically relevant lipids. / J. Molec. Biolog., 1995.