

А. В. Говоруха

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН ИЗ МОНОСЛОЕВ

Бислойные липидные мембраны (БЛМ), предложенные Мюллером и Рудиным как экспериментальная модель клеточных мембран, по ряду параметров (толщина, удельная емкость, сопротивление и т. д.) приближаются к клеточным мембранам [3,9]. Однако они не отражают одно из важнейших свойств клеточной мембраны — асимметрию строения ее монослоев, т. е. наличие в каждом из них липидов разного состава [2].

Метод получения искусственных мембран из монослоев, предложенный Монталом и Мюллером [8], позволил решить эту проблему. К сожалению, из материалов статьи [8] трудно представить все тонкости в конструкции экспериментальной установки, но имеющиеся данные, а также наши попытки воспроизвести метод Монтала и Мюллера показали, что у сборных камер, разделенных тонкой тефлоновой перегородкой, толщиной меньше 25 мкм, отсутствует надежная электрическая изоляция. Это требование к конструкции камеры особенно важно, т. к. исследуемые мембраны обладают очень высоким сопротивлением: порядка 10^9 Ом. При движущейся тефлоновой перегородке, а имен-

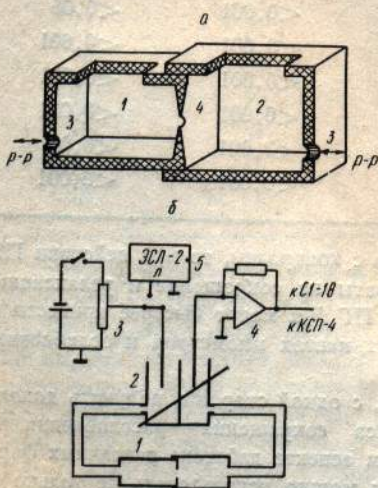


Рис. 1. Экспериментальная камера — продольный разрез (а) и принципиальная схема измерения электрических характеристик бислойных мембран (б).

Объяснения в тексте.

но так формировалась бислойная мембрана из монослоев в [8], вероятность увеличения сопротивления утечки возрастает, не говоря о сложности конструкции перемещения изолирующей перегородки. Возможно, поэтому предложенный метод, несмотря на ряд модификаций [4,7], не нашел широкого применения.

Нами предлагается видоизмененный метод формирования искусственных БЛМ из монослоев, в котором используется более простое решение. Для формирования бислойной искусственной мембраны разработана система, состоящая из двух камер (рис. 1а). Камеры изготавливаются из материала, обладающего высокими электроизоляционными гидрофобными свойствами (полиэтилен, тефлон). В описываемой конструкции использовался полиэтилен. В меньшей камере 1 торцевая стенка утончается до минимально возможной толщины и в центре вырезается отверстие 4. Диаметр отверстия составляет 0,35 мм (площадь — $9,6 \cdot 10^{-4}$ см²). В камере 2 одна из торцевых стенок отсутствует. При сборке камера 1 вставляется в камеру 2, герметически закрывая ее. Отверстия 3 служат для подачи растворов по обе стороны перегородки. Липид для формирования монослоев подается через верхнее отверстие в камерах 1 и 2. Камеры (рис. 1б) соединяются полиэтиленовыми трубками с двумя одинаковыми емкостями [2], смонтированными на общем основании. С помощью микровинта эти емкости можно одновременно поднимать и опускать, изменяя тем самым уровень растворов в камерах 1. При этом монослои липидов, проходя отверстие 4 (рис. 1а), соединяются, образуя бислой.

Процесс «слипания» монослоев удобно контролировать по величине электрической емкости мембраны. При этом емкость определяется с помощью моста переменного тока либо подачей на мембрану прямоугольных электрических импульсов и регистрации релаксационных кривых [8].

Для регистрации емкостного тока на мембрану через хлорсеребряные электроды (рис. 1б) подавали прямоугольные импульсы напряжения длительностью 300 мс, частотой 50 Гц и амплитудой до 100 мВ от электронного стимулятора ЭСЛ-2 (рис. 1б, 5). Проходящий через мембрану ток регистрировался в режиме фиксации напряжения операционным усилителем. Источник поддерживаемого напряжения 3 использовался для работы с мембранами после их формирования.

Монослой формировались при комнатной температуре из общих липидов мозга крупного рогатого скота, полученных по методу Мюллера [9] и Бужинского [1], яич-

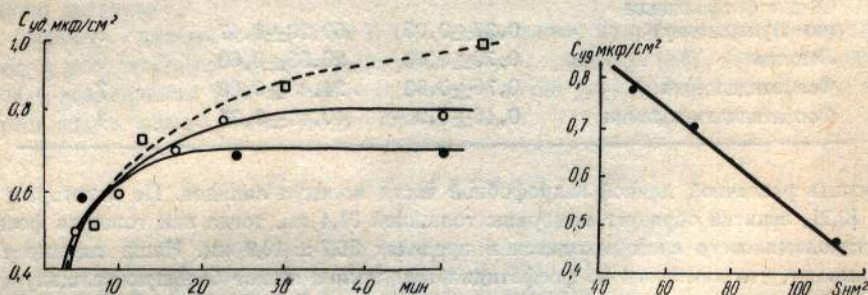


Рис. 2. Изменение удельной емкости ($C_{уд}$) при формировании различных бислоевых липидных мембран (БЛМ).

Черные кружки — симметричная мембрана из лецитина, белые кружки — симметричная БЛМ из фосфатидилсерина, белые квадраты — асимметричная мембрана из лецитина и фосфатидилсерина.

Рис. 3. Зависимость удельной емкости бислоевых мембран от площади поперечного сечения молекулы липида.

ного лецитина, яичного фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина мозга. В камерах находился раствор 50 ммоль NaCl и 50 mM KCl, pH 7,2.

0,1—1,0 % раствор липида в гептане (0,1—0,2 мл) наносили на поверхность жидкости в камерах 1 и 2 (рис. 1а), по обе стороны перегородки. Затем уровень жидкости повышали. После образования бислоя мембраны полностью формировались за 25—30 мин. По истечении этого времени не наблюдалось изменения в емкости мембран, а значит и в их толщине (рис. 2). Для асимметричных мембран время полного формирования находится в том же интервале, что и для мембран из одинаковых липидов (рис. 2.).

Концентрация липида в растворе не является решающим фактором, влияющим на процесс формирования БЛМ и ее конечную емкость. Очень важным параметром является время, прошедшее после нанесения липида на поверхность растворов. Если соединение монослоев происходит через 25—30 с после нанесения липида, то БЛМ не стабильны и рвутся, не успев полностью сформироваться, т. е. для получения стабильных мембран соединение монослоев должно происходить не позже указанного срока.

На основании полученных нами данных о величине электрической емкости БЛМ была рассчитана толщина углеводородной (гидрофобной) части мембраны (полная толщина мембраны, включающая и толщину полярных головок — обычно 4,5—6 нм [7], может быть получена другими методами, например, при использовании электронной микроскопии [6]).

Согласно [7], длина молекулы растворителя значительно влияет на величину емкости мембраны. В нашем случае формирование мембраны происходило после того, как растворитель практически «уходил» из монослоев и, кроме того, для всех липидов применялся один и тот же растворитель — гептан. Поэтому, сравнивая величины емкости мембран, можно говорить о размерах липидного слоя без учета влияния растворителя.

Приведенные в табл. 1 данные показывают, что БЛМ, образованные из монослоев одинаковых липидов, имеют меньшую толщину для ряда чистых липидов (лецитин, фосфатидилсерин), чем для смесей (общие липиды мозга). Резкое отличие емкости мембран из фосфатидилэтаноламина от лецитиновых и фосфатидилсериновых можно

Таблица 1

Удельная емкость и толщина углеводородной части симметричных бислойных липидных мембран

Вид липида	Удельная емкость (мкф/см ²)	Толщина (нм)	Количество мембран
Общие фосфолипиды (по Мюллеру)	$0,46 \pm 0,03$	$40,40 \pm 0,37$	4
Общие фосфолипиды (по Бужинскому)	$0,37 \pm 0,05$	$50,20 \pm 0,47$	5
Лецитин	$0,70 \pm 0,03$	$26,55 \pm 0,60$	6
Фосфатидилсерин	$0,76 \pm 0,03$	$24,45 \pm 0,60$	7
Фосфатидилэтаноламин	$0,46 \pm 0,05$	$40,40 \pm 0,37$	4

объяснить различной длиной гидрофобной части молекул липидов. По некоторым данным [2,7], лецитин образует мембраны толщиной 31,4 нм, тогда как толщина фосфатидилэтаноламинового слоя находится в пределах $36,7 \pm 10,9$ нм. Наши данные также показывают, что мембраны из фосфатидилэтаноламина имеют большую толщину (табл. 1), чем лецитиновые мембраны. По данным Ровина [3], липиды с более короткими и более ненасыщенными жирнокислотными остатками образуют более тонкие БЛМ с большей электрической емкостью.

Емкость мембраны, возможно, зависит и от плотности упаковки молекул липида, т. е. от их количества на единицу площади мембраны. В таком случае емкость должна быть в обратной зависимости от площади, приходящейся на молекулу липида. Сравнивая наши данные (табл. 1) с литературными [6,7], можно показать именно такую зависимость (рис. 3).

Бислойные липидные мембраны с асимметричными монослоями, отличаются большей емкостью, чем мембраны с симметричными монослоями (табл. 2).

Таблица 2

Удельная емкость и толщина углеводородной части асимметричных бислойных липидных мембран

Вид липида	Удельная емкость (мкф/см ²)	Толщина (нм)	Количество мембран
Общие фосфолипиды (по Мюллеру)			
Общие фосфолипиды (по Бужинскому)	$0,81 \pm 0,05$	$22,94 \pm 0,47$	3
Лецитин			
Фосфатидилсерин	$1,16 \pm 0,12$	$18,02 \pm 0,15$	4
Лецитин			
Фосфатидилэтаноламин	$0,58 \pm 0,06$	$38,04 \pm 0,30$	4

Из общих липидов, полученных разными способами и содержащих липиды в разных количествах и соотношениях, формируются асимметричные мембраны, емкость которых в два раза больше, чем у симметричных мембран (табл. 1 и 2). Еще большая емкость у асимметричных мембран из чистых липидов — лецитина и фосфатидилсерина ($1,16 \pm 0,12$ мкф/см²).

Отметим одну особенность при формировании асимметричных мембран из лецитина и фосфатидилсерина. Из каждого липида в отдельности легко формируются симмет-

ричные БЛМ. Для формирования же асимметричных мембран необходимо было нейтрализовать заряд фосфатидилсерина, так как в противном случае мембраны не слипались. После добавления в камеру с фосфатидилсерином 5 ммоль Ca^{++} мембраны формировались легко и существовали более часа.

Емкость асимметричных мембран, в состав которых входит фосфатидилэтанол-амин, намного меньше, чем асимметричных БЛМ, состоящих из других липидов (табл. 2). Объяснить это явление за счет влияния отрицательного заряда фосфатидилэтанол-амина не представляется возможным, тем более что добавление в раствор Ca^{++} не изменяет ситуацию.

Сравнение данных о свойствах БЛМ из монослоев, полученных предлагаемым методом, с результатами, представленными в других работах [4,8], позволяет сделать вывод о возможности успешного использования такой упрощенной системы для исследования искусственных бислойных мембран.

Список литературы

1. Бужинский Э. П. Моделирование электрохимических свойств протоплазматических мембран: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1970. 21 с.
2. Ненашев В. А., Берестовский Г. Н. Физико-химические свойства бимолекулярных липидных мембран. 1976. 82 с. Рукопись деп. в ВИНТИ. 28.4.76. № 1888.
3. Ровин Ю. Г. Исследование структуры углеводородных пленок в водных средах и межмолекулярного взаимодействия в них: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук. Новосибирск, 1972. 19 с.
4. Россельс А. К. Структура и функция биологических мембран.— Труды 2-го МОЛГМИ им. Н. И. Пирогова, М., 1971, с. 53—74.
5. Benz R., Frohlich O., Lauger P., Montal M. Electrical capacity of black lipid films and of lipid bilayers made from monolayers.— *Biochimica et biophysica acta*, 1975, 394, N 2, p. 323—334.
6. Deamer D. W., Pranton D. Fracture planes in an ice-bilayer model membrane system.— *Science*, 1967, 158, N 4, p. 635—637.
7. Fettiplace R., Andrews D. M., Haydon D. A. The thickness, composition and structure of some bilayers and natural membranes.— *J. Membranae Biol.*, 1971, 5, p. 277—296.
8. Montal M., Muller P. Formation of biomolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, 69, N 12, p. 3561—3566.
9. Muller P., Rudin D. O., Tien H. T., Wescott W. C. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system.— *Nature*, 1962, 194, N 7, p. 979—981.

Лаборатория биохимии нервной
системы Института физиологии
им. А. А. Богомольца АН УССР, Киев

Поступила в редакцию
23. IV 1980 г.