

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

Г 681

P14-87-803

В.И.Горделий, Л.С.Ягужинский*

ОРИЕНТИРОВАННЫЕ МОДЕЛЬНЫЕ
ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ
ДЛЯ НЕЙТРОНОГРАФИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Направлено в журнал "Биофизика"

* Московский государственный университет

Дифракция нейтронов и рентгеновских лучей — эффективные методы исследования структуры модельных и биологических мембран^{1,2}. Успех их применения во многом определяется возможностью получения ориентированных липидных мультислоев и биологических мембран. Особое значение это имеет для нейтронографии, так как их применение позволяет сократить время эксперимента от нескольких часов до нескольких минут³. Кроме того, использование ориентированных мультислоев дает возможность исследовать их структуру со значительно лучшим пространственным разрешением. Действительно, пространственное разрешение дифракционного эксперимента $\Delta x \sim d/n$, где d — период структуры, n — количество наблюдаемых дифракционных отражений⁴. Для липидных дисперсий (хаотически ориентированные структуры), как правило, $n \leq 3$. На высокоориентированных липидных мультислоях на подложке наблюдается от 8 до 14 дифракционных отражений. Для характерного для модельных мембран $d \approx 6$ нм Δx соответственно равно ≈ 2 нм и $\approx 0,4$ нм, т.е. ориентирование модельных мембран позволяет определить структуру мембран с разрешением, близким к размерам отдельных молекулярных групп липидов.

Ориентирование липидных слоев представляет интерес также с точки зрения использования жидких кристаллов в электронике⁵ и в некоторых исследованиях модельных липидных мембран методом ЯМР⁶.

Два основных метода применяются для получения ориентированных липидных мультислоев: метод Лэнгмюра-Блоджетта^{7,8} и метод испарения растворителя из раствора, нанесенного на подложку⁸. Метод Лэнгмюра-Блоджетта позволяет готовить высокоориентированные липидные мембраны, но количество получаемых при этом бислоев не превышает величины $\sim 10^{2/9}$, в то время как методом испарения можно получать до 10^5 ориентированных бислоев. Так как интенсивность рассеянного излучения $I \sim N$, где N — количество бислоев в структуре, то метод Лэнгмюра-Блоджетта практически не используется при приготовлении липидных мембран для нейтронографических исследований. К сожалению, до сих пор еще нет ясности в понимании основных физических факторов, влияющих на степень ориентирования структур, получаемых методом испарения. Рекомендации по приготовлению ориентированных образцов имеют процедурный, описательный характер^{1,8,9}. Использование этих методик затрудняет то, что в них не определяют даже наиболее существенные параметры процесса

(такие, как: состояние подложки, скорость испарения растворителя из раствора и ее связь с количеством липида на единицу площади подложки).

В настоящей работе проанализирован опыт приготовления различных ориентированных модельных мембран, определены основные условия, существенные для относительно простого и быстрого (по сравнению с изложенной в⁸ методикой) приготовления высокоориентированных мультислойных липидных структур (мозаичностью $\sim 2^\circ$) для нейтроно-, рентгенографических и ЯМР-исследований.

Образцы готовились путем медленного испарения растворителя из раствора, нанесенного на подложку. Изучалось влияние на мозаичность следующих факторов:

1) температуры — образцы готовились при температурах до и выше точки Крафта (температуры фазового перехода гель — жидкий кристалл $T_{фп}$);

2) времени (скорости) испарения растворителя — оно варьировалось от одной минуты до нескольких десятков минут;

3) количества растворенного липида (или от среднего количества бислоев на подложке) — масса липида изменялась от 5 до 50 мГ (от $N = 1,7 \cdot 10^3$ до $N = 1,7 \cdot 10^4$ бислоев);

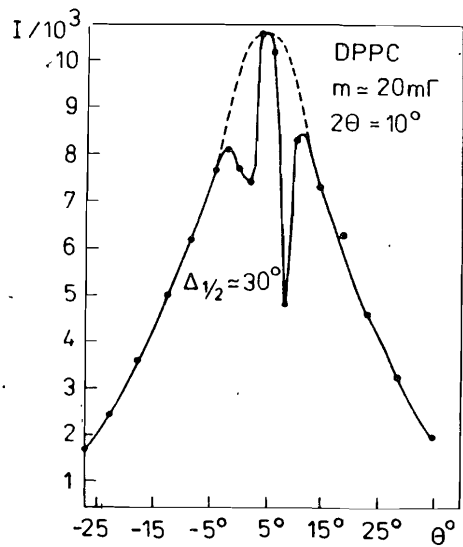
4) состояния подложки — использовались два типа подложек: обычные покровные стекла для микроскопов и полированные кварцевые стекла размером 24×24 мм².

Исследовались образцы, приготовленные из следующих липидов: дипальмитоиллецитина (ДРПС), яичного лецитина (EYL), общей липидной фракции из яичного желтка (PL), 1-пальмитоил, 2-гексадецил фосфотидилхолина, 1-пальмитоил, 2-олеил-фосфотидилхолина, дигексадецил фосфотидилхолина. Кроме того, были изучены образцы, состоящие из некоторых указанных выше липидов, в присутствии различных добавок: 1) неводных полярных растворителей — диметилсульфоксида и этиленгликоля, 2) солей — CsCl и LiCl, 3) эстеров (дизэфиров фосфоновой кислоты PAE₆ и PAB₆). В качестве растворителей использовались этанол, хлороформ и смесь метанола с хлороформом. На подложку наносилось, как правило, $0,2 \pm 0,4$ мл раствора.

Эксперименты по измерению рокинг-кривых для определения мозаичности образцов велись на нейтронном дифрактометре ДН-2 с однокоординатным позиционно-чувствительным детектором¹⁰ на импульсном реакторе ИБР-2 ОИЯИ. В случае высокоориентированных образцов оценка мозаичности получалась из угловых размеров дифракционного пика на двумерных нейтронограммах, измеренных в координатах $(\theta, \lambda)^{11}$.

Типичная рокинг-кривая для образцов с массой $m \geq 20$ мГ ($N \geq 7 \cdot 10^3$ слоев) при времени испарения растворителя из раствора $\sim 2 \pm 3$ мин. показана на рис.1. Кривая измерена от мультислойной

Рис.1. Рокинг-кривая для образца из дипальмитоиллецитина (ДРРС). Мозаичность (ширина распределения на половине высоты максимума) равна $\Delta_{1/2} \approx 30^\circ$.



структуры образца из ДРРС с $m = 20$ мГ ($N \approx 7 \cdot 10^3$), приготовленного при $T_n \approx 70^\circ\text{C}$. Мозаичность образца (ширина рокинг-кривой на половине высоты максимума) $\Delta_{1/2} \approx 30^\circ$. Два минимума на кривой соответствуют положениям плоскости подложки вдоль падающего и отраженного пучков нейтронов. Эксперименты показали, что включение в мембрану перечисленных выше добавок существенно не меняет мозаичности образцов.

На рис.2 приведена рокинг-кривая для образца ДРРС с солью CsCl (мольное отношение 1:1). Масса образца и условия приготовления такие же, как и для образца из ДРРС. Мозаичность в данном случае $\Delta_{1/2} \approx 25^\circ$.

Если температура приготовления образца меньше $T_{ф.п.}$, то мозаичность образца существенно увеличивается.

Уменьшение массы липида при том же времени испарения растворителя из раствора (~2 мин.) приводит к существенному уменьшению мозаичности образца. На рис.3 показаны рокинг-кривые для образца из EYL с $m \approx 5$ мГ ($N \approx 1,7 \cdot 10^3$). Мозаичность при этом составляет $\Delta_{1/2} \approx 2^\circ$. К аналогичному эффекту приводит увеличение времени испарения растворителя в несколько раз при массе образца $m = 20$ мГ. Этот результат можно объяснить следующим образом. Для получения высокоориентированных образцов необходимо, чтобы в процессе испарения растворителя не нарушалась их од-

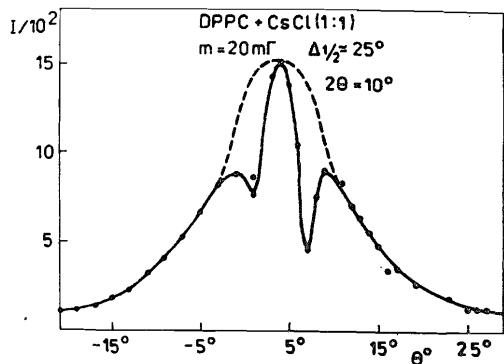


Рис.2. Рокинг-кривая для образца из дипальмитоиллецитина (ДРРС) и соли CsCl. Мозаичность $\Delta_{1/2} \approx 25^\circ$.

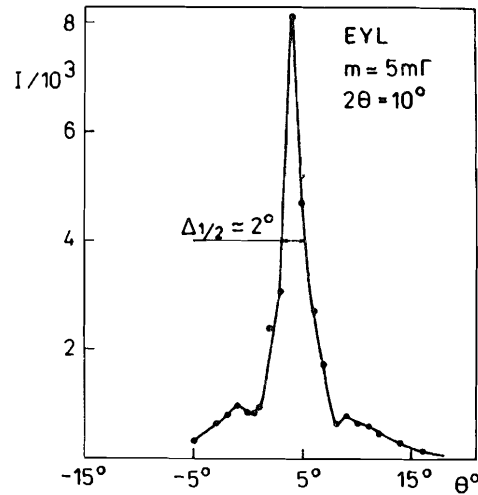


Рис.3. Рокинг-кривая для образца из яичного лецитина (EYL). Мозаичность $\Delta_{1/2} \approx 2^\circ$.

нородность. В противном случае из-за конвекции возникает механическое перемешивание раствора, препятствующее ориентированию мультислоев. Относительная однородность образца может быть обеспечена, только если постоянная времени диффузии молекул растворителя (и молекул растворенного вещества) τ_D меньше постоянной времени испарения растворителя с поверхности образца $\tau_{и}$, т.е.:

$$\tau_D < \tau_{и}. \quad (1)$$

В соответствии с соотношением Эйнштейна

$$\tau_D \sim L^2/D, \quad (2)$$

(где L — толщина пленки раствора, пропорциональная массе образца, D — коэффициент диффузии растворителя или растворенных молекул в растворе), увеличение массы образца с 5 мГ до 50 мГ приводит к 100-кратному увеличению τ_D . И, следовательно, для сохранения условия (1) необходимо увеличить $\tau_{и}$ на два порядка.

Существенную роль в ориентировании мультислоевых липидных структур играет состояние подложки. Использование полированных кварцевых подложек вместо покровных стекол для микроскопов позволило уменьшить мозаичность образцов в $2 \div 3$ раза. Это связано со значением ближайшего к подложке бислоя для ориентации всей мультислоевой структуры, в свою очередь ориентация которого во многом определяется состоянием подложки^{5/}.

Но даже при больших временах испарения растворителя из раствора для образцов с $\sim 5 \cdot 10^4$ бислоев не удастся получить хорошо ориентированные мультислои. Это, по-видимому, определяется потерей "ориентационного" влияния подложки на расстоянии 0,25 мм и связано с взаимодействием между бислоями.

Из общих соображений можно было бы предположить, что фактором, определяющим верхний предел времени приготовления (ориентации) мультислоев, является время флип-флоп перехода^{12/}. Однако постоянная времени этого процесса $\tau_{ф-ф}$ принимает значение

от нескольких часов до нескольких суток^{/12/}, что значительно больше времени приготовления образцов с $N = 1,7 \cdot 10^3$ ($m = 5$ мГ). Это указывает на то, что формирование мультислойной структуры начинается еще в присутствии некоторого количества растворителя, когда время перестройки молекул в структуре существенно меньше $\tau_{\text{ф-ф}}$.

Таким образом, мозаичность образцов зависит от времени испарения растворителя из раствора, а оптимальное время испарения является функцией массы образца на единицу площади (количества бислоев). Высокоориентированные образцы получаются при температурах приготовления выше температуры фазового перехода гель — жидкий кристалл, мозаичность образцов уменьшается при использовании в качестве подложек полированных подложек. Малые времена, необходимые для приготовления ориентированных образцов при $N \sim 2 \cdot 10^3$, могут быть объяснены в предположении о начале образования мультислойной липидной структуры еще в присутствии некоторого количества растворителя.

Авторы выражают свою признательность А.М.Балагурову и Ю.В.Кравцову за помощь в проведении измерений, приготовлении образцов и полезные обсуждения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Worchester D.L. In: *Biological Membranes* (Ed. D.Chapman, D.Wallach). Acad. Press., London, 1976, p.1.
2. Blaurock A.E. *Bioch. et Bioph. Acta*, 1982, v.650, p.167.
3. Балагуров А.М., Горделий В.И., Ягужинский Л.С. *Биофизика*, 1986, т.31, в.6, с.1004.
4. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. *Липидный бислой биологических мембран*. М.: Наука, 1982.
5. Кан Д., Тейлор К., Шонхорн Г. *ТННЭР*, 1973, т.61, №7, с.28.
6. Finer E.G., Darke A. *Chem.Phys.Lipids*, 1974, v.12, No.1, p.1.
7. Blodgett K.B., Langmir I. *Phys.Rev.*, 1937, v.55, p.964.
8. Powers L., Pershan P.S. *Biophys.Journal*, 1977, v.20, p.137.
9. Green J.P., Phillips M.C., Shipley G.G. *Bioch. et Bioph.Acta*, 1973, v.330, p.243.
10. Zaccai G., Blasie V.K., Schoenborn B.P. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA*, 1975, v.72, p.376.
11. Balagurov A.M. et al. *Phys.Stat.Sol.*, 1979, 5, p.367.
12. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. *Динамическая структура липидного бислоя*. М.: Наука, 1981.

Рукопись поступила в издательский отдел
12 ноября 1987 года.

Горделий В.И., Ягужинский Л.С.

P14-87-803

Ориентированные модельные липидные мембраны для нейтронографических исследований

В настоящей работе проанализирован опыт приготовления ориентированных мультислойных липидных структур (методом испарения растворителя из раствора) для нейтронографических исследований. Степень ориентации мембран определялась методом дифракции нейтронов. Показано, что для получения высокоориентированных образцов (мозаичность $\sim 2^\circ$) необходимо поддерживать достаточно малой скорость испарения растворителя из раствора, которая зависит от среднего количества бислоев в мультислойной структуре. Наблюдается зависимость степени ориентации бислоев от состояния подложки. Для получения высокоориентированных образцов также необходимо поддерживать температуру приготовления образцов выше температуры перехода гель — жидкий кристалл.

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики ОИЯИ.
Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1987

Перевод Т.Ф.Дроздовой

Gordeliy V.I., Yaguzhinskiy L.S.

P14-87-803

Oriented Model Lipid Membranes for Neutronographical Studies

The experience acquired in preparing the oriented multilamellar lipid structures (by the method of evaporation of a solvent from solution) employed in neutron-, X-ray diffraction and NMR studies is analysed. A mosaic spread of multilayer structures was measured by the neutron diffraction method. A slow velocity of evaporation of solvent from solution, which depends on the number of bilayer in multilayer structures is shown to be essential for the preparation of high-oriented samples. The dependence of mosaic spread on the state of substrate has been observed. The temperature needed for preparing high-oriented samples must be higher than the temperature of phase transition from gel to liquid crystal.

The investigation has been performed at the Laboratory of Neutron Physics, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1987