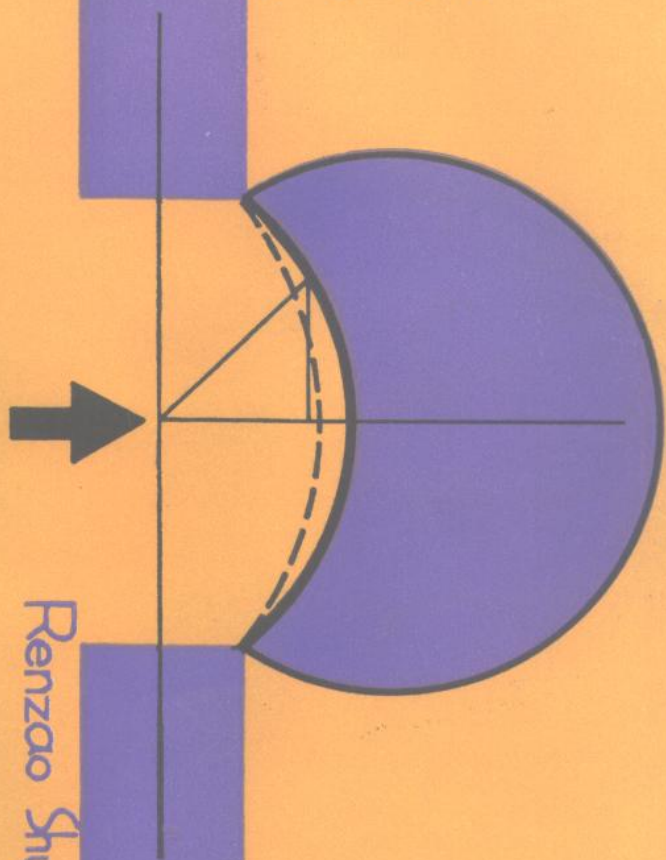


★ 田心棣 著
★ 肖 科 译



Renzao Shuangfenziceng Mo

人造双分子层膜

高等教育出版社

人造双分子层膜

H. Ti Tien 著

肖 科 译

高等教育出版社

人造双分子层膜

H. Ti Tien 著

肖 科 译

•

高等教育出版社出版

新华书店北京发行所发行

国防工业出版社印刷厂印装

•

开本 850×1168 1/32 印张5 字数127 000

1987年11月第1版 1987年11月第1次印刷

印数0 001—2 900

ISBN 7-04-000840-8/Q·55 定价1.30元

译 者 的 话

能把田心棣教授的《人造双分子层膜》一书介绍给我国读者，是译者之幸。

对这么薄 (7nm)、这么小的双层脂膜 (BLM)，田教授进行了如此广博精深的阐述。其中许多新奇的科学设想（如：有机分子结、膜分子电子器件、膜生物传感器、BLM的生理、药理、免疫、应用等）将成为十分迷人的研究课题。同时，本书也为对膜科学产生浓厚兴趣的学生们提供了指南。老实讲，由于涉猎范围广，研究程度深，真正达到融会贯通也非易事。好在近十年来，田教授为中国培养了多名访问学者和学生，并且多次归国讲学，国内进行这一领域教学和研究的基础已经形成。

对于初学者，不妨先读一下程极济和林克椿主编的《生物物理学》2.4“人工双分子层脂膜”。当然，如果拙译能引起讨论，则不胜荣幸。

最后，译者真诚感谢田教授的耳提面命之教。

肖 科

于美国东兰辛

1987. 2. 20

前 言

生物膜目前已成为分子生物学中的一个很重要的研究领域。由于它的种类繁多，功能迥异，要了解膜的生物物理和生物化学等现象，人造双分子层膜(Artificial Bilayer Lipid Membrane——BLM 和 Liposomes) 在目前使用得最为广泛。今天这本书能和读者见面，功劳应归于肖科先生。

作者第一次碰见肖科是在1985年10月。那时，我在北京参加由中国科学院感光化学所主办的首届“北京国际光化学会议”。在匆忙的开会期间，短短的交谈之后，作者感到肖科对科学有浓厚和真挚的兴趣。后来看到他翻译的H. Gerischer 所作有关用半导体电极利用太阳能的文章(见Topics Applied Physics, 31, 115, 1979)，使作者进一步地知道肖科在中文、英文方面也很有造诣。当他表示愿意把作者还没有出版的、有关人造双分子层膜的书翻译成中文，作者即欣然同意了。

本书能与国内读者见面，作者感到非常荣幸。此书总结了作者的实验室和其他很多工作者二十多年来对人造双分子层膜的研究和经验。

在今天这个时代，搞科研需要采用很多学科的理论及实验方法。这些也许可以从本书的内容中看出来。本书的最后一章，展望了BLM的将来，尤其是在各个领域的应用方面，若能对读者有所启发，作者的目的则已达到。此外，作者特趁此机会向肖科致谢。

田心棟

1987年元月10日

于美国密西根州东兰辛

• 1 •

目 录

一、引言	1
二、双层脂膜体系	4
A. 实验技术	4
1. 生成BLM的溶液	4
2. BLM的池子及其生成过程	5
3. BLM的生成特征	8
4. 非脂类物质嵌入BLM	9
B. 研究方法	10
1. 膜厚度测定	10
2. 界面和热力学性质的测定	12
3. 通透性测定	12
4. 电学性能测定	13
5. 染料修饰BLM中的光诱导效应的测定	20
三、双层脂膜的界面性质和稳定性	22
A. 变薄机制	22
B. 双层脂膜的双面张力	23
C. 双层脂膜的相变	26
D. 双层脂膜/水溶液界面的相互作用	27
1. BLM-溶液的界面	27
2. BLM-BLM和BLM-脂质体的相互作用	29
E. 双层脂膜的电容	30
F. 双层脂膜中的界面区和瞬时微孔	32
G. 电场对双层脂膜的影响	33
四、双层脂膜中的运输现象	35
A. 基本原理	35

1. 扩散、通透性和运输	35
2. 运输的驱动力	35
3. 基本关系式	36
B. 水通过双层脂膜的运输	37
1. 膜限制的扩散情形 ($k_{ms} > k_{sm} > k_m$)	38
2. 界面限制的扩散情形 ($k_m \gg k_{ms}$)	39
3. 膜-界面限制的扩散情形 ($k_m = k_{ms}$)	39
C. 气体和非电解质的通透性	40
D. 光诱导的水流	42
五、膜的电化学	44
A. 两相之间的电位差和双电层	44
1. 界面的各向异性	44
2. 双电层的定义	44
3. 双电层理论和BLM	45
B. Nernst-Planck关系式和跨膜电位	46
1. Nernst-Planck关系式	46
(a) Nernst关系式	48
(b) Goldman关系式	48
(c) Hodgkin-Huxley-Katz关系式	49
(d) Ussing关系式	50
(e) 其它关系式	50
C. 跨膜电位与双层脂膜	50
1. 跨膜电位	50
2. BLM电位	53
3. 跨膜电位差	55
4. 各种膜电位之间的关系	58
D. 电子过程	59
1. 生物膜中电子过程的证明	60
2. 循环伏安法的基础	60
3. 导电的BLM	64
4. 一些最新实验	68

六、膜生物能学和双层脂膜	72
1. 化学渗透假说	72
2. 解偶联剂	75
七、双层脂膜与膜生理学	80
A. 双层脂膜作为生物膜的模型系统	80
B. 细胞膜	83
C. 神经膜	86
1. 神经脉冲的传导	87
2. 用BLM进行的实验	88
D. 细胞器膜与间隙结	93
八、双层脂膜和膜的光化学	95
A. 回顾与展望	95
B. 基本量子转换步骤	96
C. 光合作用	102
D. 视觉过程	107
E. 嗜盐菌	110
F. 混合研究	112
G. 电活性和光活性化合物的分子设计	114
九、应用	119
A. 特殊电极、生物传感器和分子电子器件	119
1. 特殊电极	119
2. 生物传感器	119
3. 分子电子器件	120
B. 双层脂膜在医学中的应用	122
1. 免疫学	122
2. 癌	124
3. 药物、麻醉和有毒化合物的试验	125
C. 太阳能转换	127
1. 光伽伐尼-伏打电池	129
2. 核孔膜支撑的半导体晶粒太阳电池	130

3. 用于光解水的膜基系统	131
十、结束语	134
参考文献	136

一、引言

我在本书中论述的主题，将触及“黑洞”、彩虹、膜生物物理学、电生理学、能量转换、超分子装配等许多有趣问题。在这众多问题中穿针引线的是，分隔两个水溶液相的、厚度小于10nm的人造**双层脂膜**（BLM）。为了在一开始就不致令人感到困惑，我要特别指出：上面提及的“黑洞”并非宇宙学研究中的那种含义，而是在普普通通肥皂膜上的东西。早在三百年前，由提出著名Hooke定律的Robert Hooke首次描述了它。从那时起，对于普通肥皂膜上黑洞的研究，吸引了不同历史时期的许多著名科学家，例如1704年的牛顿、1871年的吉布斯、1918年的Perrin、1927年的Dewar、1929年的Laurence、1939年的Bragg以及后来的许多学者（见Chinard和Mauro, 1968; Clunie等, 1970）。为什么这么多著名科学家把他们宝贵的精力花费在一个不起眼的肥皂膜上？我猜想其原因之一可能是，肥皂膜上变幻无穷的虹彩唤起了他们对童年的回忆。从分子水平上看，这些超薄的“黑”皂膜确实是在二维平面上的超分子装配。也许是巧合，Robert Hooke幸运地杜撰了“细胞”这个词，来描述在自制旧式显微镜下观察到的软木塞切片的细小阵列。由于细胞是一切有生命体的基本单元，必须用一个限界膜将每个细胞包封起来，以便于这些包在膜中的生物分子（RNA、氨基酸等）能够进行自我复制。确有证据表明，史前期的双层脂膜，很有可能是在无生命的原始海洋里，通过磷脂分子自发装配产生的（Hair, 1971）。然而，从早期的脂双层囊进化到有生命的细胞，再到出现人类，大约需要 3.5×10^9 年。与其相比，本书中心议题的平面双层脂膜的起源只不过是一瞬。而正如我们将要讨论的那样，一个双层脂膜的寿命甚至就更短了。

对于双层脂膜的深入研究,开始于本世纪50年代末。那时,Rudin及其助手们在两篇发人深省的文章(见Burton, 1967)中指出,作为神经膜的模型系统,发现了脂单层膜和多层膜(Langmuir-Blodgett型)的离子专一性。这些文章的确极大地影响了早期研究者的思想,并且改变了他们的研究课题。首先,重印了C. V. Boys关于肥皂泡的经典著作(见Tien, 1974)。随后,又出现了一本献给N. K. Adam的新著(Danielli等, 1958)。在这本书中,A. S. C. Lawrence简明地阐述了单分子层、皂膜和胶体化学的发展前景。特别是他点到了各个课题之间关系的要害:在各种现象中,最重要的是牛顿对黑皂膜观察的表述(在Boys的书中有详细叙述)。通过对下述问题的研究,如Langmuir在1917年推断的分子在“空气/水”界面单分子层中的定向;自牛顿起,包括Perrin和Dewar在内的许多研究者测定的黑皂膜厚度;分别由Gorter和Grendel、Fricke在1920年提出,后来已被许多研究者所接受的细胞膜生物分子叶状模型(见Robertson, 1981);以及最为重要的,多年前被Gibbs和最近被其他人(Clunie等, 1970年)建议的黑皂膜结构等等,所有这些研究结果都支持了这样一种观点:即在皂膜变薄的最后阶段,它具有由两个脂分子单层夹着一个液相层的夹心结构。在这些背景知识的基础上,Rudin和他的合作者在60年代初,力图直接做成一个插入到两个水溶液相之间的黑双层脂膜,他们的努力没有落空(见Fishman, 1962)。一旦生成了一个BLM(黑色脂膜或双层脂膜),人们的兴趣就不仅限于此了。自那时起,双层脂膜体系已被广泛地用于对物理、化学、生物学现象的研究,包括在太阳能转换和癌症研究中应用可能性的各种研究中。

对双层脂膜性质的广博论述已被收在两篇专题论文、1968年的许多综述文章(Bangham, 1968; Antonov等, 1979),以及一些著作的某些章节中(Milazzo, 1983)。感兴趣的读者可以从这些文章中找到更详尽的叙述。本书的目的有两个:(1)对于那

些不太熟悉双层脂膜体系的读者，这里提纲挈领式的论述，已可算是相当详尽；（2）对于本领域的研究学者，如果想纵览一下双层脂膜的研究历史和当前的发展状况，或者想判断需要进行何种实验的话，本书也是很有参考价值的。由于篇幅所限，甚至无法将80年代发表的有关双层脂膜的好文章都一一引论，因此，在本书末尾为感兴趣的研究工作者列出了一些最相关的参考文献和综述文章。

二、双层脂膜体系

本章给出生成和研究平面构型双层脂膜的实验方法一览，在后面的讨论中将称平面BLM或简称BLM。研究方法更详细的操作过程以及许多研究双层脂膜的通用仪器和装置，包括生成双层脂膜的溶液、生成方法、厚度测定、光谱特性和光诱导特性等等方面，可以在有关双层脂膜的专题论文中找到（Jain, 1972; Tien, 1974）。

A. 实验技术

1. 生成BLM的溶液

能否成功制备一个稳定双层脂膜的关键，是生成双层脂膜溶液的适当配方。在过去二十年中，按照不同研究者的兴趣和目的，尝试了用于生成双层脂膜的各种脂溶液。广泛用于生成双层脂膜的材料包括：合成类脂、氧化胆固醇、表面活性剂、类胡萝卜素染料，以及脑、鸡蛋、叶绿体、线粒体、红细胞和细菌的抽提物等等。除了这些物质以外，还常常需要用到液态烷烃（己烷到十六烷），和/或其它有机溶剂如氯仿、甲醇和丁醇等（Tien, 1974）。目前，常用专门制备的合成化合物来生成双层脂膜。Kunitake 和 Okahata 在1980年合成了单链（十六烷基）、双链（双十二烷基和双十八烷基）和三链（三辛烷基）的铵中极两性化合物，以及那些含有二苯基甲亚胺化合物片段的合成化合物。他们证明这些化合物的一部分具有脂解反应性。Bagaveev 等在1979年报导了与胆固醇相连接的溴化烷基三甲基胺。Ringsdorf 和助手们（Hub等, 1980; Benz等, 1982）合成了用于模型膜研究的一系列可聚合磷脂模拟物。Benz 等人在用合成脂类和含有可聚合丙烯酸、丁二烯

或丁二炔单元的溶血脂,用来生成双层脂膜方面取得了成功。这些溶血磷脂分子中,既含有亲水部分,也含有疏水部分。纯脂类,例如单酸甘油酯、二油酸甘油酯和三酸甘油酯,在无烷烃溶剂中也生成了双层脂膜。这些双层脂膜的特点是,具有较大的电容($0.59\sim 0.96\mu\text{F}/\text{cm}^2$)和流动性(Laprade和Lapointe, 1982)。对于刚入门的研究者,我们更倾向于选用氧化胆固醇。这种化合物虽然已有市售(P-L生物化学公司, Milwaukee, Wis.),但也不难自己制备,方法是将氧或空气通过含4%胆固醇的辛烷溶液,在回流温度(125°C)下处理5~6个小时。氧化胆固醇已经被系统地研究过了(Robinson和Strickholm, 1978; Jian等, 1981)。甚至存贮一个月之后,由氧化胆固醇生成的双层脂膜仍可以稳定达3小时。表1中列出了已知可生成稳定BLM的一些典型溶液。

2. BLM的池子及其生成过程

适于做进行双层脂膜研究的池子和支撑物的材料,受到对水溶液和有机溶液两者都必须具有化学惰性、电绝缘性和光学透明度等要求的限制。玻璃器件满足上述要求,所以常被用来做成BLM体系的容器。浇铸卢塞特树脂(树脂玻璃)也是不导电、透光和抗若干种有机溶剂的。另外卢塞特树脂易于加工和粘接,它也被用来代替玻璃。可是,在含卤化物溶剂时不能使用卢塞特树脂,例如用氯仿和亚甲基氯化物作为脂溶剂时,就不能采用它。聚四氟乙烯、聚乙烯和聚碳酸酯也能满足化学性能和电性能的要求,并且可以加工或浇铸,但是它们的透明度和刚性较差。实验表明,聚四氟乙烯可以用来制做O环和有孔的插板、或者盛装BLM的杯子。

分隔两个水溶液相的BLM,可以用一系列方法来生成,包括刷涂技术、浸涂技术、吹泡技术、注射技术、以及单分子层技术(详细描述见Tien, 1974)。在理论上和实验上,一个BLM的制备是很简单的,然而它却涉及了由适当中极两性化合物(如磷脂)

表1 一些典型的生成BLM的脂溶液*

溶 液 组 分	水溶液组分	双面张力 (N/m ²)	参考文献
含4%氧化胆固醇的 <i>n</i> -辛烷	0.001~0.1 mol·L ⁻¹ NaCl 或KCl	0.14~0.24	Tien, 1974 Robison 和 Strickholm, 1978
十二烷基磷酸酯 (PAP), 在 <i>n</i> -辛烷 中含 0.04 % DAP + 0.75 % 胆固醇	0.1 KCl, Ringer氏溶液	0.13~0.29	
单油酸甘油酯 (GMO), 在 <i>n</i> - 癸烷中含0.016%GMO+0.6% 胆固醇	0.1mol·L ⁻¹ KCl	0.13	Fisher, Stokes, Tien, 1981, 未出版
磷脂酰胆碱在 <i>n</i> -癸烷中含1% 的磷脂酰胆碱	0.1mol·L ⁻¹ KCl	0.09	
十八烷基胺 (ODA), 与 <i>n</i> - 癸烷的体积比为0.2:1	0.1mol·L ⁻¹ CaCl ₂ , Ringer 氏溶液	0.05 0.06	Morse 和 Tien, 1982, 未出版
磷脂酰丝氨酸 (PS) 磷脂酰胆碱 (PC) 磷脂酰乙醇胺 (PE)	0.1 mol·L ⁻¹ KCl 0.1mol·L ⁻¹ ·NaCl		Lopez 和 Tien, 1980
胆固醇 (在 <i>n</i> -癸烷中的比例 为1:3.1:1.7:1.1)			

* 对化合物和生成过程的详细说明见Tien1974年的文章

稳定的两个共存油/水界面 (或一个双表面) 的生成。图3中画出了一个10ml的聚四氟乙烯杯子。其中有一个带1mm小孔的卢塞特树脂玻璃挡板, 将其分隔成具有两个大约等体积的室。杯子和容器都盛满了水溶液。然后, 用小注射器或吸液管将少许脂溶液注入到挡板上的小孔中。由于一个脂膜的面积一般很小, 需要用—个低倍 (20~60×) 显微镜在反射白光下进行观察。

当在单纯水溶液组分中生成一个双层脂膜时, 各种跨膜梯度

为零。膜本身及其周围支撑着膜的Plateau-Gibbs(P-G)边缘都是可变的,对这些变化还不能很好地进行人工控制。在一个完整的BLM系统中,脂的总量应该在P-G边缘和双层脂膜之间理想地分布。在平衡状态下,BLM的脂量可以按照膜体积从理论上估算出来,用膜面积乘以膜厚度就可以求出膜体积,而膜厚度是按照单分子层膜平衡方法模拟的。光学和电学方法的使用很有意义,用它们可以测定双层脂膜的面积和估算厚度。当然,对厚度的估算要依赖于后面所讨论的假设。1965年,Takagi等人首先描述了单分子层技术和浸涂技术结合的方法(见Tien, 1974)。把带有一个小孔(直径0.25~1mm)的聚四氟乙烯薄片(25~500 μ m厚)做成的挡板放在池子中央,将池分为两个部分,并使小孔露出水面。先用水溶液充满小池,当液面清洗干净以后,再用通常方法将适当脂溶液滴在表面。溶剂挥发以后,在液面生成了单分子层,再将聚四氟乙烯挡板慢慢地压入到水溶液中,于是就在小孔上生成了一个双层脂膜(见Tien, 1974)。也可以反过来,先将聚四氟乙烯挡板上的小孔暴露在空气中,然后使表面上已覆盖单分子层的两侧水溶液液面同时升高到小孔之上,从而通过两个脂单分子层的碳氢链咬合而生成双层脂膜。Takagi技术的另一个改进,是使用通常进行水通透性研究的一个封闭池(Fettiplace等, 1980; Tien, 1974)。在其一侧带有一个孔的封闭池暴露在空气中。当将这个封闭池的小孔浸入水溶液时,它就被水溶液灌满了。将几滴BLM生成溶液(*n*-辛烷或苯的脂溶液)溶在外部水溶液表面。溶剂挥发之后,外部水溶液液面就被一个脂单分子层覆盖住。先使外部水溶液液面慢慢降到小孔以下,然后再小心地将液面升高,这样就生成了一个双层脂膜(图2)。上述过程可以多次重复,直至得到一个双层脂膜为止(Vodyanoy等, 1982)。可用测量仪器指示的电容或电阻变化来监视是否生成了膜。我们还应该进一步注意到,用Takagi技术从单分子层生成脂双层膜是与溶剂有关的,因为必须用石油液凝胶(凡士林)或硅酮脂覆盖住膜的支撑物(Shite, 1980;

Tancrede等, 1983)。Laprade和Lapointe 在1982年曾研究过另一类无溶剂双层脂膜。

用一个灌满水溶液的注射器管头, 在水溶液中吹起一个脂泡, 就可以产生球型结构的双层脂膜。用这样的方法, 甚至可以得到直径大于1cm的球型双层脂膜 (Tien, 1974)。

为了研究平面的双层脂膜, Procopio等人在1982年曾报导过一个使用石英池的很有趣的装置。与此相关, Yoshida和 Okabayashi在1982年的一系列文章中, 报导了几平方厘米那么大面积的双层脂膜的物理化学性质。与研究这些大面积双层脂膜的努力相反, 人们也研究了约为 μm 直径的长寿命双层脂膜 (Mountz 和 Tien, 1978b; Sanderman, 1979; Kossi 和 Le Blanc, 1981; Thompson等, 1982)。这些微小的双层脂膜, 是在已知直径和密度的普通聚碳酸脂膜 (核孔膜过滤器) 的平面圆孔上生成的。在理想情况下, 这种新的 BLM 系统, 可以在聚碳酸脂支撑物上同时产生成百上千个微双层脂膜。用这种方法生成的双层脂膜的行为, 具有超稳定性和可控性, 并且具有较长寿命和比普通BLM更大的面积。由于这个新的 BLM 系统具有长期稳定的优点, 它不仅对于进行下面几章谈到的困难和难重复的实验是十分有趣的, 而且也可以进行一些新的实验。例如, 研究抗原-抗体的互补相互作用、运输和能量转换, 以及目前流行的, 通过 BLM 不稳定问题来研究迄今的瘟疫等等。

3. BLM的生成特征

在膜刚刚生成时, 具有两个表面的脂膜通常较厚, 当通过10—40倍显微镜在反射白光下观察时, 也看不到干涉色彩。在适宜的条件下, 较厚的膜开始自动变薄。依赖于所用脂溶液的密度, 在孔的顶部及底部, 不久后就开始出现水平带的虹彩。最初, 仅能显示出浅粉色和浅绿色色带。这些带一般渐渐加宽变深。在某些时候, 按照不同的脂溶液, 随着脂膜变薄而显示出明亮的漩涡型干涉色彩。最后, 还可以看到单个或多个“黑洞”, 并且它们的面积快

• 8 •