

СТМ ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛ ГРАМИЦИДИНА А, ВСТРОЕННЫХ В ПЛЕНКУ ЛЭНГМЮРА–БЛОДЖЕТТ

С.А. Виноградова, А.О. Голубок, О.В. Коломыткин, С.Я. Типисев

С использованием СТМ при атмосферном давлении визуализированы ионные каналы, образуемые молекулами грамицидина А, встроенными в пленку Лэнгмюра–Блоджетт в виде бислоя молекул дипальмитоиллецитина на поверхности графита. Полученные результаты согласуются с существующими молекулярными моделями.

Структура и электронные свойства пленок Лэнгмюра–Блоджетт (ЛБ) вызывают интерес при решении разнообразных фундаментальных и прикладных задач. Например, ЛБ пленки из липидных и моно- и бимолекулярных слоев, модифицированные молекулами, представляют собой модели клеточных мембран с ионными каналами и используются для выяснения молекулярных механизмов ионной проводимости клеточных стенок¹. Применяемые до сих пор экспериментальные методы регистрируют лишь функциональные свойства каналов. Новый подход к изучению ионных каналов, встроенных в липидные мембранны, связан с использованием сканирующего туннельного микроскопа (СТМ)², с помощью которого уже проводятся исследования чистых ЛБ пленок^{3–5}. В отличие от традиционных методов электронной микроскопии и спектроскопии туннельная микроскопия^{6, 7} характеризуется низкой энергией воздействия и работает с высоким пространственным разрешением не только

в вакууме, но также в газе и в жидкости ⁸, что особенно важно для биологических объектов ^{9, 5}.

В данной работе исследовалась ЛБ пленка из дипальмитоиллесцитина (ДПМЛ) со встроенным ионными каналами, образованными молекулами грамицидина А. В качестве подложки использовался чистый скол пиролитического графита, который хорошо изучен в СТМ и имеет достаточное количество атомно-гладких участков ¹⁰. На подложке формировался бислой из молекул ДПМЛ по методу ОЛБ ³. Затем на поверхность подложки, покрытую липидным бислой, добавлялся раствор грамицидина в спирте (10^{-4} г/л), при этом молекулы грамицидина встраивались в бислой липида. Исследования проводились при атмосферном давлении в СТМ, описанном в ^{10, 11}.

Для сравнения были изучены СТМ изображения чистой графитовой подложки, липидного бислоя и липидного бислоя, модифицированного молекулами грамицидина. В случае чистого графита наблюдалась гексагональная структура с известным периодом ^{6, 7, 10}, которая использовалась для пространственной калибровки последующих изображений. После нанесения бислоя ДПМЛ наблюдалась значительно более зашумленная регулярная структура с характерным пространственным масштабом $\sim 0,6 - 0,7$ нм, что существенно превышает пространственный масштаб графита. Поэтому мы связываем наблюдаемое СТМ-изображение с наружным монослоем мембранны.

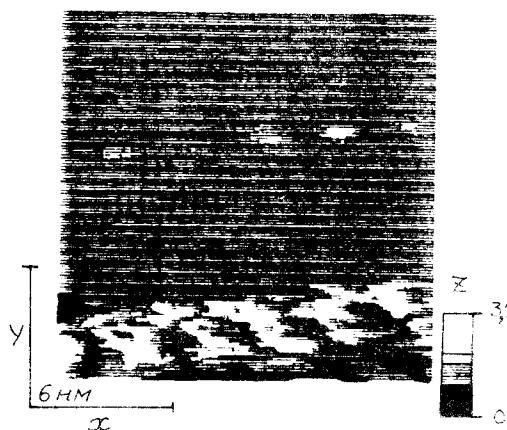


Рис.1

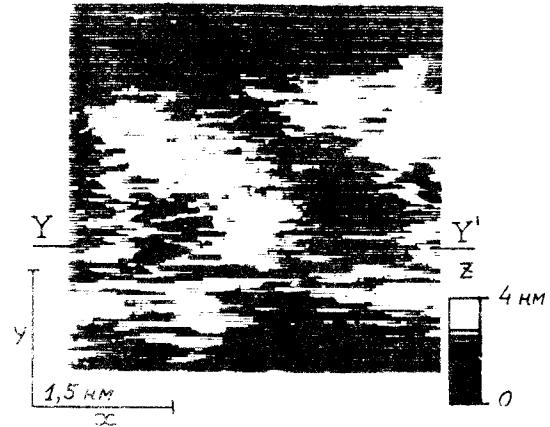


Рис.2

Рис. 1, 2. СТМ-изображение ионных каналов (вид сверху) в ЛБ пленке ДПМЛ. $V_g = 30$ мВ, $I_T = 0,3$ нА, на острие положительный потенциал

На рис. 1 представлено СТМ изображение липидного бислоя, модифицированного молекулами грамицидина А. На рис. 2 приведено СТМ изображение, полученное при повторном сканировании по участку меньшей площади в районе характерных особенностей на рис. 1. На рис. 3 представлено сечение СТМ изображения вдоль линии $Y - Y'$ рис. 2.

Характерные структуры, наблюдаемые на рис. 1, 2, возникали только в случае липидного слоя, модифицированного молекулами грамицидина. Этот факт, а также размеры и форма наблюдаемых структур позволяют сделать предположение о том, что на рис. 1, 2 визуализированы молекулы грамицидина А, встроенные в липидный бислой. Характерный размер молекулы, полученный из СТМ изображения, имеет величину $\sim 1,5$ нм, при этом в центре изображения наблюдается "провал" с характерным размером $\sim 0,5$ нм (рис. 3). Полученные данные согласуются с существующими молекулярными моделями ¹², из которых следует, что молекула грамицидина А представляет собой цилиндр с диаметром 1,2 нм, высотой 1,5 нм с внутренним каналом диаметром 0,4 нм.

Следует отметить, что оптимальные значения туннельного тока I_T и напряжения V_T , при которых получались качественные СТМ изображения молекул грамицидина А и ДПМЛ, несколько отличались друг от друга. Поэтому нам не удалось подобрать режим, при котором в одном кадре наряду с СТМ изображением отдельных молекул грамицидина проявлялась бы периодическая структура липидного бислоя. Однако контрольный эксперимент с различными режимами сканирования показал, что между молекулами грамицидина наблюдается слой из плотно упакованных молекул ДПМЛ с межмолекулярным расстоянием 0,6 – 0,7 нм.

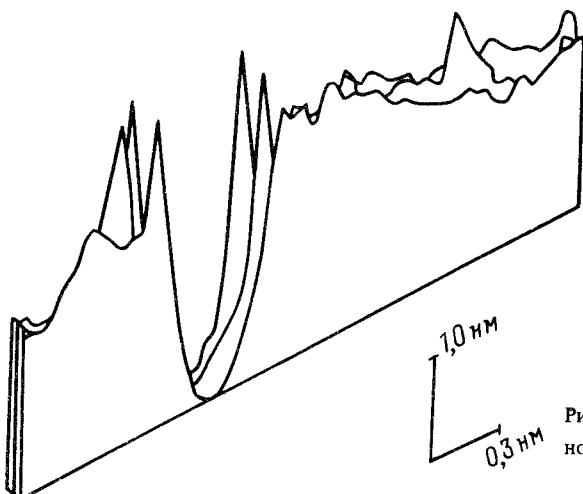


Рис. 3. Поперечное сечение СТМ-изображения ионного канала

Таким образом, в работе впервые продемонстрирована возможность визуализации отдельных ионных каналов в липидной мембране при помощи СТМ, что открывает большие возможности для выяснения молекулярных механизмов их функционирования. В заключение подчеркнем, что контраст полученных СТМ изображений может быть связан как с геометрическими факторами, так и с локальными электронными свойствами исследуемых объектов (высотой туннельного барьера, локальной плотностью состояний и т. п.). Для выяснения природы контраста проводятся дополнительные измерения локальной работы выхода, $I_T(V_T)$, dI_T/dV_T .

Авторы выражают благодарность Д.Н.Давыдову и В.А.Тимофееву за участие в экспериментах и Н.А.Тарасову и М.Л.Фельштыну за полезные обсуждения.

Литература

1. Kolomytkin O.V., Kuznetsov V.I. Studia biophysica, 1986, **115**, 157.
2. Kolomytkin O.V. et al. Forth International conference on STM/STS-89, Japan, July 9 – 14, 1989, 19.
3. Smith D.P.E. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biophysics, 1987, **84**, 969.
4. Albrecht T.R. et al. J. Appl. Phys., 1988, **64**, 1178.
5. Coombs J.H. et al. Thin Sol. Films, 1988, **159**, 293.
6. Hansma P.K., Tersoff J. J. Appl. Phys., 1987, **61**, R-1.
7. Эдельман В.С. ПТЭ, 1989, **5**, 25.
8. Хайкин М.С., Троицкий А.М. Письма в ЖТФ, 1985, **11**, 1236.
9. Алекперов С.Д. и др. ДАН. 1988, **303**, 341.
10. Голубок А.О. и др. Поверхность, 1989, **3**, 146.
11. Голубок А.О. и др. В кн.: Научное приборостроение. Электронноионная оптика / Сб. науч. тр. НТО АН СССР. Л.: Наука, 1989, 72.
12. Ермишкин Л.Н., Зильберштейн А.Я. Итоги науки и техники. Биофизика мембран. М.: ВИНИТИ, 1982, **2**.