

盐溶液中磷脂膜的组装及电场诱导的结构转变

毕洪梅* 郭柳纯 张英媚 曾心如 许柳怡

(广东石油化工学院生物与食品工程学院, 茂名 525000)

摘 要 在与生理介质等渗的盐溶液中,借助于原子力显微镜(AFM)和荧光漂白恢复(FRAP)技术,分别研究了中性磷脂和带电磷脂在高定向热解石墨(HOPG)表面上的分子排列、组装以及施加电场对其结构的诱导变化。结果表明,所考察的磷脂在室温下均以凝胶态的单层膜形式铺展在 HOPG 上,并组装形成纳米尺度的半胶束结构,表面呈现波纹形貌。施加适度的电场(± 1.0 V)在诱导磷脂分子的排列和结构发生转变时起主要作用,界面溶剂化力和离子效应起次要作用。研究结果对生物电化学功能器件的模拟以及基于磷脂的实验室芯片开发等具有重要意义。

关键词 磷脂单层膜; 电场; 盐溶液; 结构转变

生物膜是主要由磷脂双层膜和膜蛋白等组装成的复杂二维结构,可有效分隔细胞内部与周围环境,能够响应膜外界的信号刺激并发挥相应的细胞功能^[1]。生物膜内外始终保持一定的跨膜电位,这不仅是维持细胞稳定的主要能量来源,在膜上蛋白质功能以及许多生物反应的激活过程中也具有重要作用^[2]。膜中的带电“脂筏”也参与膜蛋白的固定、配体-受体识别、物质和信号传导等多种重要的生命活动^[3],膜中的带电组分在外电场驱动下的结构转变或运动对膜的功能解析也具有重要的研究价值^[4]。然而,天然生物膜的复杂性和精细结构性质使得在纳米尺度的膜原位研究具有很大挑战性,特别是在考虑跨膜电位时的研究难度更大^[5-6]。平板固体支撑磷脂膜限制了磷脂的自然空间波动^[7-8],便于直接施加可控跨膜电位,是目前开展生物膜高分辨率研究的最佳模型,电场中磷脂膜的组装及其结构转变可以为跨膜电位对膜应答行为和功能的影响提供重要线索^[9-10]。荧光光谱、超分辨率显微镜和原子力显微镜(AFM)等微表征技术逐渐成为在纳米尺度研究磷脂膜模型的重要手段^[11-12]。AFM 可以同时获得关于磷脂膜在分子水平的形貌和机械力信息^[13],还可与电场结合实现磷脂膜上的电化学测量等^[14-15]。关于磷脂双层膜在金基底上的组装及电化学行为的研究表明,施加电场可诱导磷脂膜发生缓慢的结构转变^[16-17]。膜的整体稳定性与外加电场的大小有关^[18]。光谱技术也是研究膜结构变化及跨膜电位的极佳技术^[19]。如红外反射吸收光谱可用于分析磷脂膜中嵌入特定蛋白分子时,不同跨膜电位对膜组分的构象和取向变化,而且偶极作用力可对蛋白的嵌入进行驱动和调控^[20]。采用红外光谱分析膜中特定位置的氢交换也是检测分子结构变化的一种强有力方法。借助于结构转变过程中的氢交换对酰胺键振动的位移测定,可用于检测膜蛋白在膜中的特定位置^[21]。拉曼光谱也可以捕获氢交换导致的烷基拉曼峰偏移,用于解析各种 DNA 结构表现出的高度敏感性及原位结构变化^[22],为探索细胞中膜电位的作用及应用提供了有力工具。金基底是构建平板固体支撑磷脂膜的常用基底,但金基底作电极时易对生物分子产生非特异性粘附,导致分子变形或变性^[23],其表面暴露的 Au(III)也会影响测定^[24]。液态金属汞电极可以克服上述问题^[25],但汞电极本身的脆性和长期不稳定性使其难以用于表征磷脂膜的电化学行为^[26]。高定向热解石墨(HOPG)作为一种实用且经济的电极替代品,具有高导电性、稳定性和大面积原子级别的平整平面,已成为利用 AFM 研究生物分子组装及特性研究的优异基底^[27-28]。

本研究将 AFM 表征技术与电场相结合,研究了 HOPG 支撑的凝胶态磷脂膜在电场下的磷脂组装及

2022-09-20 收稿; 2022-12-23 接受

广东省自然科学基金项目(Nos. 2020A1515010522, 2022A1515012070)、广东省特色创新项目(No. 2019KTSCX109) 和 GDUP 人才科研项目(No. 2019rc114)资助。

* E-mail: hongmei_bi@126.com

纳米级的结构变化,并探讨了电场对磷脂组装的控制作用,为探索生物膜中带电组分在电场下的结构转变及其功能作用提供了参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Cypher ES 原子力显微镜(美国 Asylum Research 公司); PGSTAT204 电化学工作站(瑞士万通公司); 610020 微型挤压器(美国 Avanti Polar Lipids 公司); RC800 PSA 探针(日本 Olympus 公司); EZ-C1 共聚焦显微镜(英国 Nikon 公司)。

1,2-二棕榈酸甘油-3-磷脂酰胆碱(1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, DPPC), 二棕榈酰基磷酸(1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphate, DPPA) 和罗丹明-1,2-二棕榈酸甘油-3-磷脂乙醇胺 (1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(lissamine Rhodamine B sulfonyl), Rh-DPPE)的纯度均>99%,购于美国 Avanti Polar Lipids 公司; 高定向热解石墨(HOPG, 1 cm×1 cm×2 mm)和不锈钢圆盘(1.2 cm×1 mm) 购于美国 Supplies/Structure Probe 公司。其它试剂均为分析纯,购自美国 Sigma Aldrich 公司。薄金属铂片(厚度<1 μm),购于英国 Gold Leaf Supplies 公司; 银丝(直径 75 μm)购于 Sigma Aldrich(中国)公司。实验用水为采用 Milli-Q 纯水仪(美国 Merck-Millipore 公司)制备的超纯水 (18.2 MΩ·cm)。

1.2 实验装置

实验测定装置是由三电极体系组成的电场与原子力显微镜相结合组成(如图 1 所示)。采用 HOPG (SPI 提供, West Chester, PA)基底作为磷脂单层膜的支撑基底和电场体系中的工作电极。采用双面胶将 HOPG 粘在不锈钢圆盘上(SPI 供应),利用磁吸作用将圆盘固定到 AFM 扫描仪测定盘上,并用导线直接与 HOPG 进行连接。薄金属铂片(厚度<1 μm, Gold Leaf Supplies, Bridgend, UK)均匀覆盖并粘贴在 AFM 悬臂支架的背面圆盘区域,作为电场体系中的对电极,该设计方案可确保获得均匀的电场。每次测量前用 1.0 mol/L KCl 溶液电镀新鲜银丝(直径 75 μm, Sigma Aldrich)得到 Ag/AgCl 电极,穿过 AFM 悬臂上方的小孔并固定,作为参比电极。以 Autolab 电化学工作站(PGSTAT204, Switzerland)提供施加的电场,实验中所有施加的电场都是相对于参比电极设置的电位。

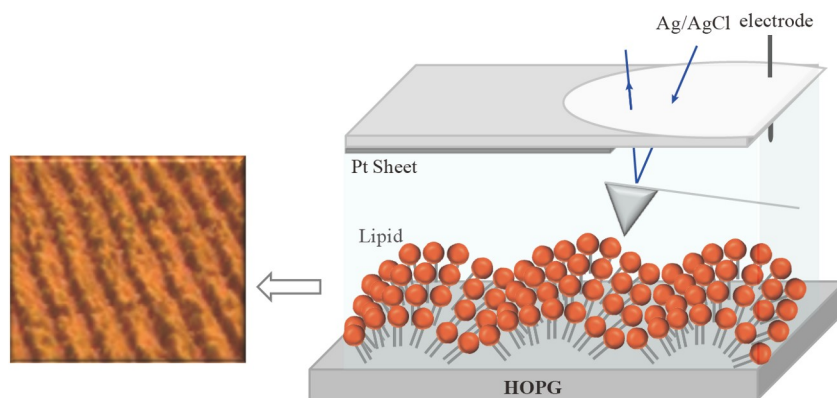


图1 实验装置组成示意图

Fig.1 Schematic of the experiment setup

1.3 磷脂膜制备

采用囊泡融合法制备基底上的支撑磷脂膜^[29-30]。将 2 mg 磷脂真空干燥 24 h 后,加入 1 mL 超纯水,在 70 °C 下超声 15 min 促进磷脂水合,再使用微型挤压器挤压制备 100 nm 的磷脂囊泡。取 20 μL 上述囊泡溶液与 150 mmol/L NaCl 溶液混合后滴加在新鲜的 HOPG 基底上,在 70 °C 下孵育 40 min。采用 2 mL 150 mmol/L NaCl 溶液轻轻冲洗样品,使用内置温度控制系统使温度在 6 h 内渐进式冷却至 25 °C,平衡 20 min 后进行实验。

1.4 AFM测定

所有 AFM 测定均在 Cypher ES 系统上完成,样品和悬臂/针尖完全浸入成像溶液 (150 mmol/L NaCl) 中。悬臂采用光热激发(蓝光驱动器)振荡以提高精度和稳定性。驱动频率设置为与悬臂的第一或第二振动峰一致。所有图像都是在恒定的扫描速度 2.44 Hz(每秒行数)下拍摄的。力矩测量在探针针尖速度接近 200 nm/s 的情况下进行,最大作用力由触发器控制。使用内置温度控制系统将样品保持在 $(25.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ 。利用 Igor Pro (美国 Wavemetric 公司)软件进行 AFM 测定结果的数据分析。

1.5 荧光漂白恢复实验(FRAP)

在磷脂中标记荧光磷脂(Rh-DPPE, Avanti Polar Lipids, 摩尔比为 0.04%),制备 100 nm 磷脂囊泡及支撑磷脂膜。荧光磷脂提供了测量所需的荧光强度,但添加量不会影响原有磷脂的性质及流动状态^[31]。使用共聚焦荧光显微镜在反射模式下对磷脂膜成像并进行 FRAP 测量,以 20 μm 直径区域为漂白面积,分析其荧光恢复率。每个样本至少进行 3 次单独的测量,数据分析利用 Image J 软件(版本 1.44p)处理^[32],横向扩散系数 D 的计算公式^[33]为:

$$D = 0.224R^2/t_{1/2} \quad (1)$$

其中, D 为扩散系数($\mu\text{m}^2/\text{s}$), R 为漂白斑点半径(μm), $t_{1/2}$ 为荧光恢复半衰期(s)。

2 结果与讨论

2.1 HOPG基底的稳定性

首先考察了 HOPG 基底表面本身的电学稳定性。在 150 mmol/L NaCl 溶液中, HOPG 的开路电位为 0.02 V,接近于 0,基底本身具有一定的稳定性。分别对 HOPG 基底施加-1.0、0 和+1.0 V 额外的电场,其 AFM 图像如图 2 所示。在扫描的纳米范围区域内,未发现 HOPG 的表面发生明显变化,数据分析显示其表面粗糙度的平均偏差分别为 144.8、146.5 和 153.8 pm, 表面粗糙度几乎没有变化,说明 HOPG 基底在此实验条件下及电场范围内稳定性较好,可以用于后续实验研究。

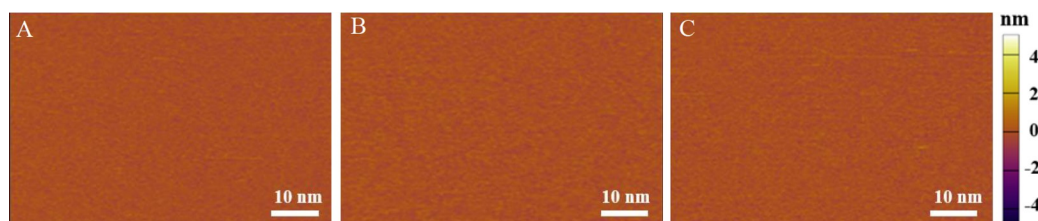


图2 裸高定向热解石墨(HOPG)在不同电场下的原子力显微镜(AFM)扫描图: (A) +1.0 V; (B) 0 V; (C) -1.0 V

Fig.2 Atomic force microscopy (AFM) micrographs of bare highly ordered pyrolytic graphite (HOPG) in different electric fields: (A) +1.0 V; (B) 0 V; (C) -1.0 V

2.2 磷脂膜的表征

本研究选用的磷脂 DPPC 为中性分子,相转变温度为 41°C ; DPPA 为负电磷脂,其相转变温度为 67°C 。因此,实验中磷脂囊泡的制备及铺展过程的孵育温度均需高于其相转变温度(孵育温度设置为 70°C), 便于磷脂囊泡的形成及在 HOPG 基底上的铺展成膜。冷却到室温后,以铺展的 DPPC 磷脂膜为例,首先测定膜厚度,确定铺展在 HOPG 基底上的磷脂膜状态。AFM 测定采用接触模式,利用探针垂直按压磷脂膜表面,穿透磷脂膜层得到相应的力矩测定结果如图 3A 所示。随着探针逐渐接近和接触磷脂膜表面,针尖与膜表面的作用力迅速增加,当针尖穿透磷脂膜时,突然减小的作用力会呈现台阶式的破裂力变化(黑色进针曲线),探针接触基底后回弹,穿过磷脂膜回至原位,进针曲线与回针曲线在基线重合。“单台阶”的单次穿透力和回退力显示基底上的磷脂膜为单层膜,而且 HOPG 新鲜基底的接触角约为 65° (图 3B),属于中度疏水性的表面,磷脂分子也会以单层膜的形式铺展。根据曲线计算得出膜厚度约 3.8~4.1 nm。盐溶液中存在的界面水化膜层和离子效应会影响膜的表现厚度^[27]。针尖在刺穿磷脂膜

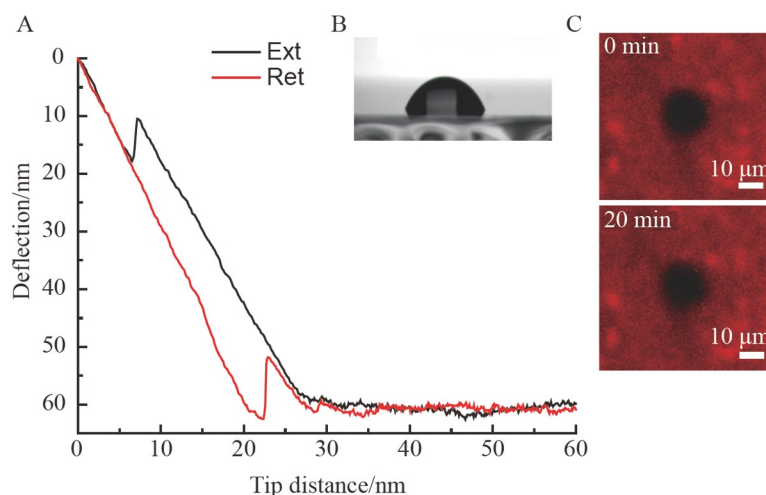


图3 (A) DPPC 单层膜的厚度测定; (B) HOPG 表面的接触角; (C) 荧光漂白恢复实验照片

Fig.3 (A) Thickness measurement of DPPC monolayer; (B) Contact angle of HOPG surface; (C) Images of fluorescence recovery after photobleaching experiment

后接触 HOPG 基底时,水合层的变化会影响厚度测量。温度降低到磷脂相转变温度以下(25 °C)时,凝胶态的磷脂膜流动性将明显减小,图 3C 是对室温下 HOPG 基底上的 DPPC 单层膜进行荧光漂白 0 和 20 min 后的荧光显微镜照片,对比可见漂白的斑点未见明显的荧光恢复,说明磷脂分子的流动性较差,对其估算(60 min 后)的磷脂扩散系数 $D = (0.05 \pm 0.01) \mu\text{m}^2/\text{s}$,恢复比例仅为 0.09。磷脂单层膜中磷脂分子与基底之间缺乏水介质的润滑,单层膜的流动性本身会低于双层膜的流动性^[34]。其次,室温下的 DPPC 磷脂为凝胶态,分子流动性与液晶态的磷脂流动性相差甚远。以上结果表明, HOPG 基底上铺展的为磷脂单层膜,室温下为凝胶态,流动性较差。

2.3 电场对中性磷脂膜的诱导与结构转变

将电场与 AFM 结合,对制备并稳定的中性 DPPC 磷脂膜进行测定。所有测定均在 150 mmol/L NaCl 溶液中采用“轻敲模式”进行。图 4 为采用电化学工作站分别施加+1.0、0 和-1.0 V 电场时对磷脂膜的 AFM 扫描图片,图中白色划线处为剖面高度曲线,虚线框显示的是周期性的波纹剖面单元以及统计的波纹宽度数据。

测定结果显示,在此条件下的 DPPC 单层膜表面均呈现周期性的波纹结构,这些波纹结构不依赖于

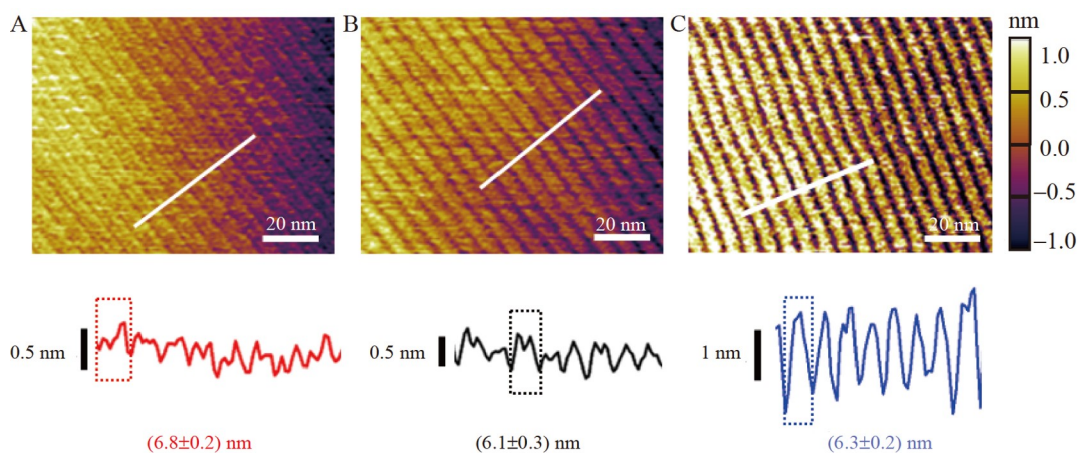


图4 电场诱导的 1,2-二棕榈酸甘油-3-磷脂酰胆碱(DPPC)单层膜结构转变的 AFM 图像: (A) +1.0 V; (B) 0 V; (C) -1.0 V

Fig.4 AFM images of structure transformation of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) monolayers induced by electric field: (A) +1.0 V; (B) 0 V; (C) -1.0 V

针尖的扫描方向而发生变化,表明这是磷脂膜在此条件下的固有特征结构。在未额外施加电场的情况下,磷脂分子的疏水尾部主要依靠与基底的分子间作用力吸附和铺展在基底表面,结合膜表面张力及磷脂的相态变化,DPPC 分子在 HOPG 基底上自发转变为较稳定的胶束状态,呈现如图 4B 所示的周期性波纹结构。DPPC 为中性磷脂,但极性头部的 P-N 偶极会因离子的选择性吸附使其发生极化带弱负电^[35],使其对电场的敏感性增加。施加+1.0 V 的电场会对磷脂分子头部产生极化,增强对磷脂分子的整体吸附,导致胶束的波峰高度略有降低,波纹结构变宽(图 4A),局部电场也可改变膜内的平均分子排列和磷脂胆碱层的状态^[36]。当施加-1.0 V 电场时,波纹的周期性变化更显著,波纹深度也明显增加。波纹剖面处的数据分析显示波纹宽度变小为 (6.3 ± 0.2) nm,高度差增加 2 倍以上。因此,电场的斥力影响了磷脂分子间及磷脂分子与基底之间的作用力。相对而言,-1.0 V 电场对 DPPC 胶束的结构转变的影响更明显。施加的电场可以引起磷脂分子的排列及结构的改变^[36],局域离子效应也会参与诱导磷脂分子的新排列^[31]。

2.4 电场对带电磷脂膜的诱导与结构转变

采用与 DPPC 相同的方法制备带负电荷的 DPPA 磷脂膜。图 5 显示了不同电场对 DPPA 磷脂膜形貌的影响。在未额外施加电场时,DPPA 也呈现与 DPPC 类似的波纹结构,可能由于 HOPG 表面富含的电子增加了对 DPPA 分子的排斥,使得表面波纹的清晰性和规则性比 DPPC 结构稍差(图 5B)。当对体系施加+1.0 V 正电场时,明显可见波纹的规律性和清晰度增强,波纹深度也明显增加,其平均宽度约为 (5.6 ± 0.2) nm,深度约为 1 nm(图 5A),说明正电场诱导了原来表面不规则或者排列不整齐的 DPPA 分子重新排列,使其变得规则有序,深度也有所增加。施加-1.0 V 电场时,表面的波纹形貌逐渐变得不规则,波纹深度逐渐减小甚至消失,划线处的剖面图也显示表面高度变得不规则,高度差逐渐变小(图 5C),说明施加的负电场增加了基底对磷脂分子的斥力,并引起结构上的变化。再次交替施加以上正负电场时,波纹结构状态也会发生相应变化,说明确实是电场诱导了磷脂膜的结构转变,并且具有可逆性。

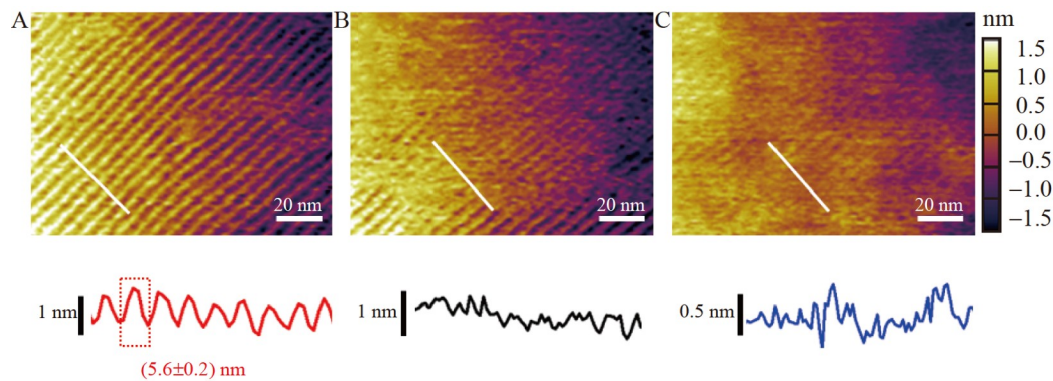


图5 电场诱导的二棕榈酰基磷脂酸(DPPA)单层膜结构转变:(A) +1.0 V;(B) 0 V;(C) -1.0 V

Fig.5 Structure transformation of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (DPPA) monolayers induced by electric field: (A) +1.0 V; (B) 0 V; (C) -1.0 V

2.5 相同电场下不同磷脂的膜结构变化对比

对中性的 DPPC 及负电的 DPPA 磷脂膜施加相同的额外电场,实验结果表明,正电场对 DPPA 表面的波纹形貌影响较大,而负电场对 DPPC 表面的波纹形貌影响较大(均与未施加额外电场的状态相比)。上述影响均是以波纹清晰度及高度差的变化为参考,并且认为是电场诱导的分子极化,分子间作用力以及分子与基底间的作用力导致了二者之间的差别。DPPA 是单纯负电磷脂,受正电场的吸引或负电场的排斥均比较明显,只是正电场作用导致的波纹规律性和深度变化在 AFM 扫描图中表现的更直接和明显。但是,DPPC 是具有两性结构的中性磷脂,可受到环境 pH 值、电场和介质离子等诱导发生极化而产生弱负电电荷^[35],施加的负电场强化了极性头部的极化及相互作用,进而导致其在结构上表现出更明显的宽度和深度变化。

2.6 结构转变机制分析

实验结果显示,施加电场可以诱导磷脂分子发生排列及波纹结构的改变,电场在此过程中起主导作用,基于此,本研究提出电场对磷脂分子的诱导过程及结构转变机制模型(图6)。DPPC 和 DPPA 分子在 HOPG 基底上的半胶束状态剖面及电场诱导的结构转变过程如图 6A 和 6B 所示,显示额外施加的电场诱导磷脂分子排列发生变化以及呈现的宏观结构转变。图 6C 是 DPPC 磷脂分子受电场诱导的作用力分析及结构变化示意图。DPPC 的两性离子结构使得其在外界溶液介质及离子影响下呈中性或弱负电性,极性头部的正负电作用力相差较小(见图 6C 中间图)。施加的正电场会加强基底对负电磷酸基团的吸引,并使其发生角度旋转而尽可能靠近基底,与之相连接的带正电的胆碱头部也需调整角度以达到稳定状态。极性头部中正负电基团所受电场力大小也发生变化,电场对磷脂头部较强的电场吸引力也在一定程度上压缩了磷脂分子的疏水尾部及磷脂分子与基底间的距离(图 6C 左图),表现出电场诱导整个磷脂胶束的波纹变宽,波纹高度略有变小。施加负电场时,基底对磷酸负电荷基团的斥力强于对胆碱头部的吸引,整个头部结构也会以最大角度伸展以降低上述作用力,拉伸磷脂分子的疏水尾部的同时又使其尽量远离基底。胶束中的磷脂分子会进行结构调整,波纹顶端的磷脂分子在斥力及空间的影响下被“挤出”,形成更高更尖的波峰,表现出 -1.0 V 电场诱导了高度差更明显的波纹结构变化(图 6A)。因为 DPPC 存在两性结构,可受正负电场的极化和影响,表现出较为清晰且差异明显的波纹结构变化。DPPA 为负电磷脂,基底的疏水作用和微排斥作用使得 DPPA 在 HOPG 表面本身形成的半胶束所呈现的波纹规则性稍差(图 5)。 $+1.0\text{ V}$ 的电场展现出其对磷脂分子头部的绝对吸引,使得胶束波纹底部的磷脂分子更靠近基底,其它位置的分子也会更加紧密排列,挤压甚至隆起,形成波纹更规则更清晰的波纹形貌(图 6B)。施加 -1.0 V 电场起相反作用,叠加的基底疏水作用和电场斥力推动胶束远离基底,削弱胶束内的分子间稳定性和排列的规律性,表现为扫描的波纹形貌不显著或部分消失。电场是诱导磷脂胶束发生结构转变的主要因素,界面离子作用、水化膜作用和表面张力对磷脂膜结构的改变也起到一定的辅助作用。

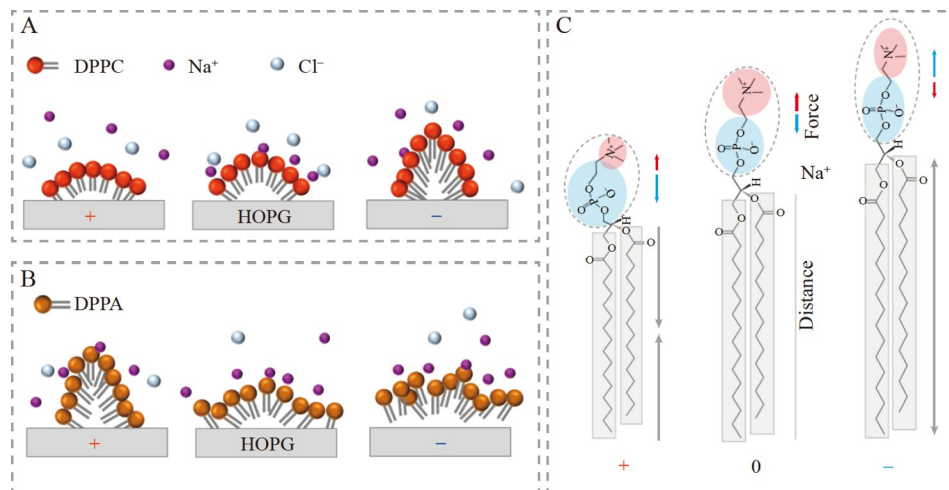


图6 电场诱导的结构转变机制: (A) DPPC 胶束结构变化示意图; (B) DPPA 胶束结构变化示意图; (C) DPPC 分子在电场下的结构变化

Fig.6 Schematic of the structure transformation mechanism induced by electric field: Schematic of the structure transformation of (A) DPPC micelle and (B) DPPA micelle; (C) Structure transformation of DPPC molecules in electric field

3 结论

在与生理介质等渗的盐溶液中,借助于高分辨 AFM 和 FRAP 技术,分别研究了中性磷脂和带电磷脂在 HOPG 表面上的组装以及施加电场对其结构的影响。结果表明,中性磷脂 DPPC 和负电磷脂 DPPA 均以单层膜形式铺展在 HOPG 上,室温下呈现凝胶态,并组装形成纳米尺度的半胶束结构。施加的外界电

场(± 1.0 V)通过诱导磷脂分子的头部极化,引起分子间作用力及其与基底间的作用力,进而导致磷脂分子发生重新排列和胶束的结构转变。施加 -1.0 V 电场有利于 DPPC 磷脂分子向更规则的胶束状态转变,而施加 $+1.0$ V 电场有利于 DPPA 磷脂向更规则的胶束结构转变,并且施加正负电场引起的结构转变具有可逆性。电场是诱导磷脂分子重排及结构转变的主要因素,界面离子作用、水化膜作用和表面张力对磷脂膜结构的改变也起到一定的辅助作用。本研究结果对于解析跨膜电位对生物膜中特定结构排列现象,模拟生物电化学功能以及开发基于磷脂的实验室芯片等研究具有参考价值。

致谢 感谢Kislon Voïtchovsky实验室(Durham University)对本研究提供的技术支持与指导。

References

- [1] CHEETHAM M R, BRAMBLE J P, MCMILLAN D G G, KRZEMINSKI L, HAN X, JOHNSON B R G, BUSHBY R J, OLMSTED P D, JEUKEN L J C, MARRITT S J, BUTT J N, EVANS S D. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133(17): 6521-6524.
- [2] STRAHL H, HAMOEN L W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, 107(27): 12281-12286.
- [3] NAJBAUER E E, TEKWANI MOVELLAN K, GILLER K, BENZ R, BECKER S, GRIESINGER C, ANDREAS L B. *J. Am. Chem. Soc.*, 2022, 144(7): 2953-2967.
- [4] HAN X, CHEETHAM M R, SHEIKH K, OLMSTED P D, BUSHBY R J, EVANS S D. *Integr. Biol.*, 2009, 1(2): 205-211.
- [5] PLUHACKOVA K, BÖCKMANN R A. *J. Phys.: Condens. Matter*, 2015, 27(32): 323103.
- [6] FUENTES N R, SALINAS M L, KIM E, CHAPKIN R S. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 2017, 1859(9): 1668-1678.
- [7] HAN X, CRITCHLEY K, ZHANG L, PRADEEP S N D, BUSHBY R J, EVANS S D. *Langmuir*, 2007, 23(3): 1354-1358.
- [8] HAN X, PRADEEP S, CRITCHLEY K, SHEIKH K, BUSHBY R, EVANS S. *Chem. -Eur. J.*, 2007, 13(28): 7957-7964.
- [9] BAO P, CARTRON M L, SHEIKH K H, JOHNSON B R G, HUNTER C N, EVANS S D. *Chem. Commun.*, 2017, 53(30): 4250-4253.
- [10] EL-BEYROUTHY J, MAKHOUL-MANSOUR M M, FREEMAN E C. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2022, 14(4): 6120-6130.
- [11] ZHAO G, LI H, GAO J, CAI M, XU H, SHI Y, WANG H, WANG H. *Anal. Chem.*, 2021, 93(42): 14113-14120.
- [12] DI LEONE S, KYROPOULOU M, KÖCHLIN J, WEHR R, MEIER W P, PALIVAN C G. *Langmuir*, 2022, 38(21): 6561-6570.
- [13] BEASLEY M, FRAZEE N, GROOVER S, VALENTINE S J, MERTZ B, LEGLEITER J. *J. Phys. Chem. B*, 2022, 126(16): 3067-3081.
- [14] LEBÈGUE E, SMIDA H, FLINOIS T, VIÉ V, LAGROST C, BARRIÈRE F. *J. Electroanal. Chem.*, 2018, 808: 286-292.
- [15] JUHANIEWICZ J, SEK S. *Electrochim. Acta*, 2015, 162: 53-61.
- [16] ABBASI F, LEITCH J J, SU Z F, SZYMANSKI G, LIPKOWSKI J. *Electrochim. Acta*, 2018, 267: 195-205.
- [17] LI M, CHEN M, SHEEPWASH E, BROSSEAU C L, LI H, PETTINGER B, GRULER H, LIPKOWSKI J. *Langmuir*, 2008, 24(18): 10313-10323.
- [18] CHEN M, LI M, BROSSEAU C L, LIPKOWSKI J. *Langmuir*, 2009, 25(2): 1028-1037.
- [19] ZIMMERMANN R, KÜTTNER D, RENNER L, KAUFMANN M, ZITZMANN J, MÜLLER M, WERNER C. *Biointerphases*, 2009, 4(1): 1-6.
- [20] SU Z F, SHODIEV M, LEITCH J J, ABBASI F, LIPKOWSKI J. *Langmuir*, 2018, 34(21): 6249-6260.
- [21] BRIELLE E S, ARKIN I T. *J. Phys. Chem. Lett.*, 2018, 9(14): 4059-4065.
- [22] BI X, MIAO K, WEI L. *J. Am. Chem. Soc.*, 2022, 144(19): 8504-8514.
- [23] DONALDSON S H, VALTINER M, GEBBIE M A, HARADA J, ISRAELACHVILI J N. *Soft Matter*, 2013, 9(21): 5231-5238.
- [24] KYCIA A H, WANG J, MERRILL A R, LIPKOWSKI J. *Langmuir*, 2011, 27(17): 10867-10877.
- [25] VAKUROV A, GALLUZZI M, PODESTÀ A, GAMPER N, NELSON A L, CONNELL S D A. *ACS Nano*, 2014, 8(4): 3242-3250.
- [26] STOODLEY R, BIZZOTTO D. *Analyst*, 2003, 128(6): 552-561.
- [27] BI H, WANG X, HAN X, VOÏTCHOVSKY K. *Langmuir*, 2018, 34(32): 9561-9571.
- [28] VOÏTCHOVSKY K, GIOFRÈ D, JOSÉ SEGURA J, STELLACCI F, CERIOTTI M. *Nat. Commun.*, 2016, 7: 13064.
- [29] TREWBY W, LIVESEY D, VOÏTCHOVSKY K. *Soft Matter*, 2016, 12(9): 2642-2651.
- [30] WANG X, ZHANG Y, BI H, HAN X. *RSC Adv.*, 2016, 6(76): 72821-72826.
- [31] PIANTANIDA L, BOLT H L, ROZATIAN N, COBB S L, VOÏTCHOVSKY K. *Biophys. J.*, 2017, 113(2): 426-439.
- [32] SCHNEIDER C A, RASBAND W S, ELICEIRI K W. *Nat. Methods*, 2012, 9(7): 671-675.

- [33] MCKIERNAN A E, RATTO T V, LONGO M L. *Biophys. J.* , 2000, 79(5): 2605-2615.
[34] ZHANG Y, WANG X, MA S, JIANG K, HAN X. *RSC Adv.* , 2016, 6(14): 11325-11328.
[35] ZHOU Y, RAPHAEL R M. *Biophys. J.* , 2007, 92(7): 2451-2462.
[36] WANG B, ZHANG L, BAE S C, GRANICK S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* , 2008, 105(47): 18171-18175.

Assembly of Lipid Membrane in Salt Solution and Structure Transformation Induced by Electric Field

BI Hong-Mei*, GUO Liu-Chun, ZHANG Ying-Mei, ZENG Xin-Ru, XU Liu-Yi

(College of Biological and Food Engineering, Guangdong University of Petrochemical Technology,
Maoming 525000, China)

Abstract The nanoscale organisation and transformation of self-assembled lipid membranes is central to the biological function of cell analysis and bionic structure construction as well as the biosensor research. While lots of work have focused on chemical interactions of component within the membrane, limited results address the impact of a trans-membrane potential on the molecular behaviour of the lipids and the related effects, especially in physiological media solutions. Here, in a salt solution that was isotonic to the physiological medium and utilizing a combination of atomic force microscopy (AFM) and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) techniques, the nanoscale molecular arrangement, assemble of neutral and charged lipids at the surface of highly ordered pyrolytic graphite (HOPG) and its structure transition under electrical potentials were studied. The results showed that these lipids were spread on HOPG in the form of monolayers at gel-phase because of the hydrophobic effect between substrate and lipid legs at room temperature. These lipids further assembled to form nanoscale semi-micellar structures and exhibited corrugations morphology in AFM images. When a moderate electric field (± 1.0 V) was applied on HOPG substrate, it was found to play a major role in inducing the arrangement of lipid molecules and structural transformation, while interfacial solvation forces and ion effects played a minor role. This work provided reference for the simulation of bioelectrochemical devices and the development of phospholipid-based macromolecule laboratory chips.

Keywords Lipid monolayer; Electric field; Salt solution; Structural transformation

(Received 2022-09-20; accepted 2022-12-23)

Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (Nos. 2020A1515010522, 2022A1515012070), the Characteristic Innovation Projects of Universities in Guangdong Province (No. 2019KTSCX109) and the Projects of Talents Recruitment of GDUPT (No. 2019rc114).