

Streulichtmessungen an ebenen Lipidmembranen. Modulation des Streulichts durch eine elektrische Wechselspannung an der Membran

Modulation of Light Scattering by an Electric Voltage at Planar Lipid Membranes

W. Carius

Universität Regensburg, Chemisches Institut

Z. Naturforsch. 33 c, 174–177 (1978); received March 6, 1978

Lipid Bilayer, Light Scattering, Voltage Dependent, Torus, Lenses

Light scattered at a planar lipid membrane is modulated by an electric a.c. voltage across the membrane. This effect is studied by a schlieren optic method. It shows a large contribution from the bilayer/torus border. From the inner part of the membrane no modulation of scattered light was detectable. Membranes were made from egg lecithin+cholesterol/decane in 0.1 N KCl aqueous solution.

Streulichtmessungen an Liposomen sind eine wichtige Methode zum Nachweis von Strukturveränderungen an bimolekularen Lipidmembranen. So gibt z.B. die Temperaturabhängigkeit des Streulichtes Hinweise auf Phasenumwandlungen [1, 2]. Elektrische Felder können sowohl die Struktur als auch die geometrische Gestalt von Lipidmembranen beeinflussen, so daß die Streulichtintensität durch eine elektrische Spannung an der Membran moduliert werden kann. Solch ein Effekt konnte am Riesenaxon des Tintenfisches nachgewiesen werden [3]. Wegen der Komplexität der biologischen Membran war es jedoch nicht möglich, die zugrunde liegende physikalische Ursache zu klären. Da der spannungsabhängige Streulichteffekt nicht von den Ionenkanälen (zu geringer Flächenanteil), sondern nur von der Membranmatrix ausgehen kann, liegt es nahe, solche Effekte an künstlichen ebenen Lipidmembranen zu untersuchen. Die Brauchbarkeit dieses Modellsystems für optische Untersuchungen kann jedoch durch Lösungsmittelartefakte (z.B. Linsen in der Membran) stark eingeschränkt sein [4].

In dieser Arbeit wird eine schlierenoptische Meßmethode beschrieben und Ergebnisse zur Spannungs- und Frequenzabhängigkeit des modulierten Streulichts am Membransystem Eilecithin + Cholesterin/n-Decan mitgeteilt.

Optischer Aufbau

Der optische Aufbau ist in Abb. 1 skizziert. Er entspricht einem abbildenden Schlierenverfahren [5], wobei sich das Schlierenobjekt im parallelen

Sonderdruckanforderungen an Dr. W. Carius, Universität Regensburg, Chemisches Institut, D-8400 Regensburg.

Strahlengang befindet. Als Lichtquelle dienten bei den hier beschriebenen Versuchen eine 30 W-Projektionsglühlampe oder eine 100 W-Halogenglühlampe, die mit geregelter Gleichspannung betrieben wurden. Die Glühwendel wird über die asphärische Kondensorlinse L_1 und die plankonvexe Linse L_2 in der Ebene der Lochblende B_1 abgebildet. Dazwischen befindet sich im parallelen Strahlengang ein Wärmeabsorptionsfilter F_1 und ein Farbglasfilter F_2 , z.B. Schott RG 630 (dunkelrot). Die Lochblende B_1 (1 mm Durchmesser) und der Achromat L_3 (Brennweite $f = 300$ mm) bilden einen Kollimator. Mit der Irisblende B_2 wird der Durchmesser des parallelen Lichtstrahls in der Küvette auf etwa 3,5 mm begrenzt. Das Loch von 2,2 mm Durchmesser im Septum der Küvette wirkt als Objektfeldblende B_3 . Die Brennebene des Achromats L_4 ist die RichtungsauswahlEbene (Fourier-Ebene). In ihr wird mit einer Scheibenblende B_4 das Bild der Lochblende B_1 abgedeckt. Möglichst nahe dieser Ebene ist eine Irisblende B_5 , die als Aperturblende des Abbildungsstrahlenganges dient. Die Achromate L_4 und L_5 bilden die Ebene von B_3 (Schlierenobjekt) in die Ebene der Irisblende B_6 (Bildfeldblende) ab. Durch Einfügen des Strahlenteilerspiegels S_2 ist die visuelle Beobachtung des Bildes durch ein Okular möglich (Gesamtvergrößerung $\times 62$).

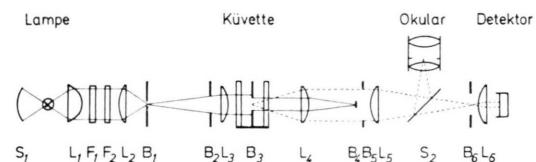


Abb. 1. Schlierenoptischer Aufbau. Erläuterungen siehe im Text.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Zum Messen des Streulichtflusses wird die Öffnung von L_5 mittels Kondensor L_6 auf die lichtempfindliche Detektorfläche abgebildet. Als Detektor diente eine Si-Photodiode mit 5 mm^2 Fläche und integriertem Verstärker, Typ OSI 5 K von Centronic (Vertrieb in BRD: Laser-Optronic). Die geregelte Spannungsversorgung für den Detektor wurde mit Batterien betrieben. Zum Aufbau wurden Bauteile des optischen Banksystems von Spindler & Hoyer (Göttingen) verwendet.

Elektrischer Meßaufbau

Der Aufbau für elektrische Messungen an der Lipidmembran ist eine Weiterentwicklung des früher beschriebenen Aufbaus zur Messung der Spannungsabhängigkeit der Membrankapazität [6]. Man kann damit an die Membran eine Spannung

$$u(t) = U_0 + U_1 \sin \omega t \quad (1)$$

anlegen. Außerdem werden die Spannungen

$$u_1(t) = U_2 \cos \omega t$$

$$u_2(t) = Z_2 U_2^2 \cos 2 \omega t$$

$$u_3(t) = Z_3 U_2^3 \sin 3 \omega t$$

als Referenzsignale für den Synchrondetektor (Ithaco Dynatrac 391 A) erzeugt. Die mit der Anregungsspannung $u(t)$ (Frequenz $\nu = \omega/2\pi$) korrelierten Anteile des Detektorsignals Φ mit den Frequenzen ν , 2ν und 3ν lassen sich auf diese Weise messen. Sie werden je nach Ordnung der Harmonischen und Phasenlage in bezug auf das Referenzsignal mit $\Phi(\nu|90^\circ)$, $\Phi(\nu|180^\circ)$, $\Phi(2\nu|90^\circ)$ usw. bezeichnet.

Wenn der modulierte Anteil des Streulichtsignals der Anregungsspannung $u(t)$ momentan folgen konnte, so entsprach eine Abnahme des Streulichtes mit wachsender Spannung folgender Phasenlage:

$$\begin{aligned} U_0 \cdot \Phi(\nu|90^\circ) &\leq 0; \quad \Phi(\nu|180^\circ) = 0 \\ \Phi(2\nu|180^\circ) &\geq 0; \quad \Phi(2\nu|90^\circ) = 0. \end{aligned}$$

Material

Die Lipidlösung zur Herstellung der Membranen enthielt 40 mg Eilecithin + 10 mg Cholesterin in 1 ml Decan. Das Eilecithin wurde in unserem Labor noch Standardmethoden aus Hühnerei präpariert [7]. Cholesterin p.A. war von Serva. Der Elektrolyt in der Küvette war 0,1 N KCl mit 4 mM Phosphatpuffer pH 7,4. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ aufgeführt.

Ergebnisse

Die Modulation des Streulichtes durch eine Wechselspannung $u(t)$ an der Membran wurde im Frequenzbereich von 1,7 Hz bis 2 kHz gemessen. Mit $u(t)$ gemäß Gl. (1) enthielt das Streulicht Komponenten mit den Frequenzen ν und 2ν . Die Spannungsabhängigkeit der Streulichtkomponenten $\Phi(\nu)$ bzw. $\Phi(2\nu)$ ist in Abb. 2 und Abb. 3 dargestellt

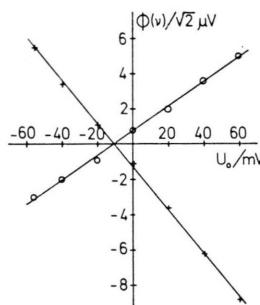


Abb. 2. Streulichtkomponente $\Phi(\nu)$ in Abhängigkeit von der Gleichspannung U_0 . $+$ $\Phi(\nu|90^\circ)$ \circ $\Phi(\nu|180^\circ)$. Anregung mit der Wechselspannung $U_1/\sqrt{2}=25 \text{ mV}$, Frequenz $\nu=340 \text{ Hz}$.

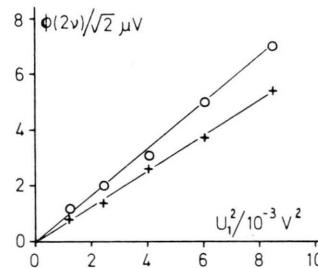


Abb. 3. Streulichtkomponente $\Phi(2\nu)$ in Abhängigkeit von der Wechselspannung U_1 . $+$ $\Phi(2\nu|90^\circ)$, \circ $\Phi(2\nu|180^\circ)$. Anregung mit der Frequenz $\nu=340 \text{ Hz}$.

für $\nu=340 \text{ Hz}$. Messungen bei anderen Frequenzen ergaben qualitativ gleiche Kurven. Den Frequenzgang von $\Phi(2\nu)$ zeigt Abb. 4, mit der Amplitude $|\Phi(2\nu)| = [\Phi^2(2\nu|90^\circ) + \Phi^2(2\nu|180^\circ)]^{0.5}$

und der Phase

$$\varphi = -\arctan \frac{\Phi(2\nu|90^\circ)}{\Phi(2\nu|180^\circ)}.$$

Im Frequenzbereich 1...2 kHz wurden die Meßergebnisse um Phasendrehung und Amplitudenfehler des Lock-in-Verstärkers korrigiert. Die maximale Korrektur war $+20^\circ$ bzw. $+15\%$ bei 2 kHz.

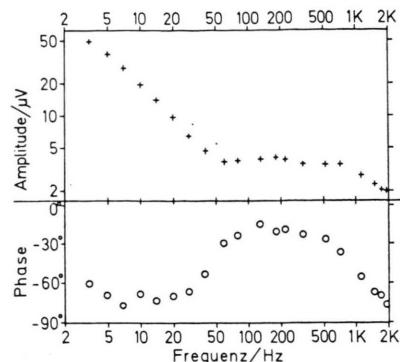


Abb. 4. Frequenzgang der Streulichtkomponente $\Phi(2\nu)$ bei Anregung mit der Wechselspannung $U_1/\sqrt{2}=35$ mV.

Die in Abb. 2 bis 4 dargestellten Ergebnisse stammen von einer Membran und sind typisch für das untersuchte Membransystem. Die spezifische Kapazität C_s betrug bei dieser Membran ($0,52 \pm 0,04$) $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ und ihr Spannungskoeffizient $\beta = 0,09 \text{ V}^{-2}$ bei 340 Hz.

Abb. 5 zeigt Lichtmessungen in Abhängigkeit von der Öffnung der Bildfeldblende (B_6 in Abb. 1). Zur Überprüfung der gleichmäßigen Ausleuchtung des Objektfeldes wurde auch der direkte Lichtfluß Φ_0 gemessen. Hierzu war die Scheibenblende (B_4 in Abb. 1) entfernt worden.

Bei obigen Messungen war die Aperturblende stets voll geöffnet (30 mm Durchmesser). Dies entsprach einer numerischen Apertur von 0,18. Bei visueller Beobachtung der Membran im Streulicht erschien der Torus (Lipidlösung am Rande der Membran) als heller Ring, gemustert mit schwachen Interferenzstreifen. Bei Verkleinerung der Aperturblende unter ca. 18 mm Durchmesser wurde das Bild des Torus von außen her abgedunkelt.

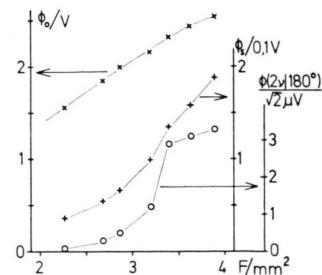


Abb. 5. Direktes Licht Φ_0 , Streulicht Φ_s und modulierte Komponente des Streulichts $\Phi(2\nu|180^\circ)$ in Abhängigkeit von der Öffnung der Bildfeldblende. F ist die betrachtete Fläche des Objektfeldes. Anregung mit der Wechselspannung $U_1/\sqrt{2}=35$ mV, Frequenz $\nu=220$ Hz.

Dies entspricht dem bikonkaven keilförmigen Querschnitt des optisch dichteren Torus. Linsen aus Filmlösung in der Membran erschienen als helle Scheibchen im Bild. Bei Membranen, die mindestens eine halbe Stunde alt waren, konnten Linsen nur vereinzelt in der Nähe des Torus beobachtet werden, auch bei Anlegen hoher elektrischer Feldstärken.

Diskussion

Bei einer ebenen künstlichen Lipidmembran ist Streulicht vor allem von Inhomogenitäten in der Membran sowie von nicht planparallelen brechenden Flächen zu erwarten, z. B. vom Torus sowie von Lösungsmitteltropfen (Linsen) in der Membran. Der aus der optisch dichten Lipidlösung bestehende Torus stellt einen Ring mit bikonkav keilförmigem Querschnitt dar, der minimale Keilwinkel liegt an der Grenzlinie Lipidlösung/Membran. Die Hälfte dieses Winkels wird Kontaktwinkel ϑ genannt. Bei einer Linse ist der maximale Keilwinkel 2ϑ . Eine elektrische Modulation des Streulichts ist durch die Spannungsabhängigkeit des Kontaktwinkels zu erwarten [8, 9]:

$$\cos \vartheta = (2 \sigma_L)^{-1} \cdot (\sigma_0 - 0.5 C_s u^2).$$

Hierbei ist σ_L die Grenzflächenspannung Lipidlösung/Elektrolytlösung, σ_0 die Grenzflächenspannung der Lipidmembran ohne äußeres elektrisches Feld und C_s die Kapazität der Membran pro Flächeneinheit. Ohne äußeres elektrisches Feld liegt der Kontaktwinkel bei vielen Lipidmembransystemen im Bereich $2^\circ \dots 6^\circ$ [8]. Bei Anlegen einer elektrischen Spannung stellt sich, abhängig von u^2 , ein größerer Kontaktwinkel ein. Dadurch verringert sich die Querschnittsfläche, die Torus und Linsen in der Membranebene einnehmen, so daß auch das Streulicht mit u^2 abnimmt. Hiermit können Spannungsabhängigkeit und Vorzeichen der gemessenen Effekte erklärt werden. Abb. 4 zeigt einen steilen Abfall der modulierten Streulichtkomponente, wenn die Bildfeldblende soweit zugezogen wird, daß der Torus ausgeblendet ist. Dieser Abfall wäre sicher noch steiler, wenn die Grenzlinie Torus/Membran kreisrund und genau konzentrisch zur Bildfeldblende wäre, was sich jedoch experimentell bei vertikaler Membran kaum realisieren läßt. Aus Abb. 4 wird jedoch ersichtlich, daß der Bereich der Grenzlinie Torus/Membran den größten Beitrag zum modulierten Streulicht erbringt.

Das modulierte Streulicht vom Inneren der Membran lag unterhalb der Auflösungsgrenze von $\Phi(2\nu)/\Phi_0 \cong 10^{-7}$. Auch Messungen bei niedrigen Frequenzen ($\nu = 15$ Hz, $U_1 = 55$ mV_{eff}) ergaben kein meßbares modulierte Streulicht vom Inneren der Membran. Aus Berechnungen zur Dynamik von Linsen in einer bimolekularen Membran (Carius, unveröffentlicht) folgt damit eine obere Abschätzung für den Flächenanteil von Linsen im Inneren der Membran. Wenn es Linsen dort überhaupt gibt, so ist ihr Flächenanteil kleiner als 10^{-4} . Bei genauerer Kenntnis des Kontaktwinkels ϑ könnte diese Abschätzung noch bis um den Faktor 20 verbessert werden. Beim Auflösungsvermögen der Abbildungsoptik wären Linsen von $3\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser noch visuell erkennbar gewesen. Linsen können jedoch auch nicht beliebig klein sein, da ihr Innendruck umgekehrt proportional zum Krümmungsradius anwächst. Dies wurde in früheren Arbeiten nicht berücksichtigt [10]. Linsen im Inneren der Membran können daher unter diesen experimentellen Bedingungen mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. (Es sind jedoch andere experimentelle Bedingungen denkbar, unter denen Linsen in der Membran mit Sicherheit auftreten, z. B. wenn die wäßrige Phase vorher mit dem organischen Lösungsmittel des Lipids, z. B. Decan, gesättigt wurde [11].)

Der Frequenzgang des modulierten Streulichts in Abb. 4 zeigt im untersuchten Frequenzbereich einen Abfall der Amplitude mit ν^{-1} bis etwa 50 Hz, dann ein Plateau bis etwa 800 Hz, gefolgt von einem weiteren Abfall. Bei einer Diskussion dieses Frequenzgangs muß darauf hingewiesen werden, daß der Torus bei senkrechter Membran nicht gleichmäßig breit ist wegen des Auftriebs, den die Lipidlösung in der wäßrigen Phase erfährt. Die niedrfrequente Dispersion bis 50 Hz zeigt, daß die Gleichgewichtseinstellung der Torusform bereits bei

Frequenzen über 3 Hz der elektromechanischen Anregung nicht mehr folgen kann. Das breite Plateau kann durch Resonanz des Torus erklärt werden, d. h. Anregung stehender Kapillarwellen auf der Oberfläche Lipidlösung/Wasser. In diesem Frequenzbereich entspricht die Streulichtamplitude von $4\text{ }\mu\text{V}$ (Gesamtlichtstrom ca. 2 V) einer relativen Flächenänderung der bimolekularen Membran von 2×10^{-6} . Bei ca. 2 mm Membrandurchmesser ergibt das eine Schwingungsamplitude der Grenzlinie Torus/Membran von 1 nm bei einer Anregung mit 35 mV_{eff} Wechselspannung. Der Beitrag dieser Torusschwingungen zum Spannungskoeffizienten der Membrankapazität errechnet sich zu $\beta_T = 1,6 \times 10^{-3}\text{ V}^{-2}$. Dies sind nur etwa 2% des bei 340 Hz gemessenen Spannungskoeffizienten. Der Beitrag von Flächenänderungen zum Spannungskoeffizienten der Membrankapazität bei Frequenzen von $\nu > 50$ Hz kann daher unter diesen experimentellen Bedingungen vernachlässigt werden.

Zusammenfassung

Zur Modulation des Streulichts trägt Torus und Torusumgebung bei. Diese Beiträge sind aber so gering, daß sie beim schnellen Kapazitätszuwachs nicht ins Gewicht fallen. Das Meßverfahren gestattet eine Abschätzung des Flächenanteils von Linsen im Innern der Membran. Unter den hier beschriebenen experimentellen Bedingungen können Linsen im Innern der Membran ausgeschlossen werden.

Der beschriebene optische Aufbau kann auch zur Messung der Spannungsabhängigkeit der Absorption und Fluoreszenz membrangebundener Farbstoffe benutzt werden.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell gefördert (Aktenzeichen Ca 82/2 und 3).

- [1] P. N. Yi u. R. C. MacDonald, Chem. Phys. Lipids **11**, 114 (1973).
- [2] T. Y. Tsong, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **71**, 2684 (1974).
- [3] L. B. Cohen, R. D. Keynes u. D. Landowne, J. Physiol. **224**, 701 (1972).
- [4] D. M. Andrews u. D. A. Haydon, J. Mol. Biol. **32**, 149 (1968).
- [5] H. Wolter, Handbuch der Physik Bd. **24**, p. 556, S. Flügge, Hrsg., Springer-Verlag, Berlin 1956.
- [6] W. Carius, J. Colloid Interface Sci. **57**, 301 (1976).
- [7] B. J. White, C. L. Tipton u. M. Dressel, J. Chem. Education **51**, 533 (1974).
- [8] J. Requena, Ph. D. Dissertation, University of Cambridge, 1974.
- [9] J. Requena u. D. A. Haydon, J. Colloid Interface Sci. **51**, 315 (1975).
- [10] S. H. White u. T. E. Thompson, Biochim. Biophys. Acta **323**, 7 (1973).
- [11] D. M. Andrews, E. D. Manev u. D. A. Haydon, Special Disc. Faraday Soc. **No 1**, 46 (1970).