

[Article]

doi: 10.3866/PKU.WHXB201304233

www.whxb.pku.edu.cn

非支撑磷脂双层膜制备及温度对其力学性质的影响

王 洋 颜佳伟* 朱在稳 赵雪芹 钟贇鑫 毛秉伟
(厦门大学化学化工学院化学系, 固体表面物理化学国家重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 结合聚苯乙烯球刻蚀和微机电系统技术加工氮化硅纳米多孔膜, 并在其上用囊泡法制备非支撑磷脂双层膜, 通过温控原子力显微术(AFM)的成像模式和力曲线模式对非支撑磷脂双层膜的形貌和力学性质进行研究. 实验结果表明, 该方法制备的非支撑磷脂双层膜具有流动性, 能进行自我修复, 该特点有利于提供足够的非支撑磷脂双层膜区域用于其性质研究; 非支撑磷脂双层膜的膜破力和粘滞力均随着温度的升高而减小, 即膜的机械稳定性随着温度的升高而降低. 非支撑磷脂双层膜膜破力小于支撑磷脂双层膜的膜破力, 并且非支撑磷脂双层膜粘滞力随温度的变化趋势与支撑磷脂双层膜的变化趋势相反.

关键词: 原子力显微术; 非支撑磷脂双层膜; 氮化硅纳米多孔膜; 囊泡; 温度
中图分类号: O647

Preparation of Freestanding Bilayer Lipid Membranes and the Effect of Temperature on Their Mechanical Properties

WANG Yang YAN Jia-Wei* ZHU Zai-Wen ZHAO Xue-Qin
ZHONG Yun-Xin MAO Bing-Wei

(State Key Laboratory of Physical Chemistry of the Solid Surfaces, Department of Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, P. R. China)

Abstract: Nanoporous silicon nitride membranes are fabricated by combining polystyrene colloidal lithography with Micro-Electro-Mechanical Systems, and then freestanding bilayer lipid membranes are constructed across the nanopores by the vesicle method. The topography and mechanical properties of the freestanding bilayer lipid membranes are investigated using the imaging and force curve modes of variable-temperature atomic force microscopy (AFM). The fluidity and self-repair of the freestanding bilayer lipid membranes are observed by AFM, which gives enough freestanding area for further investigations. Force curve measurements demonstrate that both breakthrough and adhesion forces decrease as the temperature increases; i.e., the mechanical stability of freestanding bilayer lipid membranes decreases as the temperature rises. The breakthrough force of freestanding bilayer lipid membranes is smaller than that of supported membranes. Moreover, the adhesion force of freestanding bilayer lipid membranes varies in the opposite manner to that of supported membranes.

Key Words: Atomic force microscopy; Freestanding bilayer lipid membrane; Nanoporous silicon nitride membrane; Vesicle; Temperature

Received: January 31, 2013; Revised: April 22, 2013; Published on Web: April 23, 2013.

*Corresponding author. Email: jwyan@xmu.edu.cn; Tel: +86-592-2186862.

The project was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province, China (2012J01054), National Natural Science Foundation of China (21021002), and Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (2012121026).

福建省自然科学基金(2012J01054), 国家自然科学基金(21021002)及中央高校基本科研业务费专项资金(2012121026)资助项目

© Editorial office of *Acta Physico-Chimica Sinica*

1 引言

平面磷脂双层膜(BLMs)是一种自组装动态双分子膜,其结构与生物膜的基本结构类似,因此作为生物膜模型被广泛应用于生命科学、医药、传感器等研究领域。¹⁻⁴随着温度变化,磷脂双层膜的凝胶相与液晶相会发生相互转化,这一过程被称为磷脂双层膜相变。相变行为主要与两层分子以及基底和分子层之间相互作用力有关。因此,研究温度对磷脂双层膜的影响,有助于认识磷脂双层膜的性质,理解生物膜的流动性和物质运输方面的行为,并且对磷脂双层膜的功能化研究具有重要意义,其研究涉及生物化学、物理化学和材料化学等多个学科。⁵⁻⁹

平面磷脂双层膜主要包括支撑磷脂双层膜和非支撑磷脂双层膜。支撑磷脂双层膜建立在固体表面,机械性质比较稳定,但是固体基底的存在会对磷脂双层膜本身的性质产生影响,因此不能很好地模拟生物膜两侧的环境。非支撑磷脂双层膜建立在孔上,两侧都是溶液体相,相比支撑磷脂双层膜能很好地模拟生物膜两侧的环境,但是非支撑磷脂双层膜机械稳定性较差,寿命较短。¹⁰

原子力显微术(AFM)具有纳米尺度甚至分子水平的空间分辨率,可以通过成像观察磷脂双层膜的相变行为,而且可以利用AFM力曲线模式获得磷脂双层膜力学数据,^{11,12}从而探究双层膜中分子间相互作用信息。¹³⁻²²Dufrene及其合作者^{13,14}较早开展平面磷脂膜体系的AFM研究。对支撑磷脂双层膜性质的主要影响因素研究涉及组成成分、离子强度、温度等。Garcia-Manyes等¹⁵用AFM研究支撑磷脂双层膜的力学性质,当针尖与样品之间相互作用力增大到一定程度,针尖就会穿破磷脂膜到达支撑基底,在力曲线上表现为一个突跃,突跃处力值即为磷脂双层膜的膜破力。实验表明,随着构成支撑磷脂双层膜的磷脂疏水链的增长,支撑磷脂双层膜的膜破力逐渐增加,支撑磷脂双层膜的稳定性逐渐增强。当离子强度增大时,支撑磷脂双层膜中的磷脂分子排列更为紧密,支撑磷脂双层膜更加牢固,针尖戳破支撑磷脂双层膜所需要的力更大。¹⁶温度变化会影响磷脂分子之间的相互作用,从而发生相变行为,而这一过程会在磷脂双层膜力学性质上体现出来,磷脂双层膜的膜破力会随着温度的变化而改变。¹⁷近年来,随着纳米孔技术的发展,基于纳米孔构建的非支撑磷脂双层膜的稳定性得到改善,这为非支撑磷脂双层膜的制备以及利用AFM开展非支撑

磷脂双层膜性质和应用等方面的研究提供了保证,对逐步认识和调控生物膜功能具有重要意义。^{23,24}

本文结合胶体微球刻蚀技术和半导体微加工技术制备氮化硅纳米多孔膜,并在多孔膜表面用囊泡法制备非支撑磷脂双层膜,利用AFM研究了温度对非支撑磷脂双层膜性质的影响。

2 实验部分

2.1 试剂与材料

浓硫酸(H_2SO_4),双氧水(H_2O_2),浓盐酸(HCl),氢氟酸(HF),氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$),高氯酸(HClO_4),硝酸铈铵($(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$),乙醇($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$),丙酮($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$),甲苯(C_7H_8),甲醇(CH_3OH),三氯甲烷(CHCl_3),氯化钾(KCl),氢氧化钾(KOH),磷酸二氢钾(KH_2PO_4),磷酸氢二钾(K_2HPO_4),氟化铵(NH_4F),四甲基氢氧化铵($(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$),过硫酸铵($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$),以上试剂均是国药集团上海化学试剂公司生产的分析纯试剂;光刻胶(BP 212 正性光刻胶,北京化学试剂研究所);显影液(RZX-3038 正胶显影液,苏州瑞红公司);聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA, 20% (质量分数), $M_w=100000-200000$, Alfa Aesar);聚苯乙烯球(PS 球,直径为 200 nm, Duke Scientific, USA);铬块(Cr, 纯度 99.2%, Alfa Aesar);磷脂 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC, Avanti Polar Lipids, USA); Millipore 超纯水($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

2.2 仪器

ICP-2B 刻蚀机(中国北京创微纳科技有限公司), PECVD-2 型等离子体淀积台(中国北京创微纳科技有限公司), ZSX-500A 电子束镀膜机(中国北京仪器厂), 匀胶机(中国中科院微电子研究所), DQ-500 双管等离子体去胶机(中国石家庄开发达神通机电有限公司), Karl Suss MA6/BA6 光刻键合对准机(德国 Karl Suss 公司), 以上仪器用于制备氮化硅纳米多孔膜; Nikon L150 金相显微镜(日本 Nikon 公司)用于悬浮氮化硅膜的表征; Lake Shore 325 型温度控制仪(美国 Lakeshore 公司)用于进行温度控制; MI 5500 原子力显微镜(美国 Agilent 公司)用于对非支撑磷脂膜性质研究。

2.3 氮化硅纳米多孔膜制备及亲水化

氮化硅纳米多孔膜基底按照我们研究组提出的聚苯乙烯球(PS)刻蚀和微机电系统(MEMS)联用技术制备,详细制备方法见我们以前的工作。²⁵该过程简述如下,在硅基底两面生长约 200 nm 厚氮化硅

的硅片,通过光刻、腐蚀、组装PS球、蒸镀Cr、PS球剥离、ICP刻蚀等一系列步骤后,即完成硅基纳米多孔膜的制备。

要构建非支撑磷脂双层膜,需要对氮化硅膜进行亲水化修饰,亲水化过程如下:(1)将多孔氮化硅膜依次用丙酮、乙醇、超纯水清洗5 min,用N₂吹干;(2)将清洗过的氮化硅芯片置于体积比V(NH₃·H₂O):V(H₂O₂):V(H₂O)=1:2:5的溶液中浸泡2 h,然后用N₂吹干。

2.4 构建非支撑磷脂双层膜

用移液器移取100 μL采用电诱导法制备的囊泡溶液滴加到氮化硅基底上,然后再移取100 μL超纯水滴加到氮化硅基底上的囊泡溶液中,静置15 min,利用渗透压的作用使溶液中的囊泡破裂,然后将芯片上的液珠吸走,重复上面的步骤5次,然后在AFM电解池中注满浓度为1.0 mol·L⁻¹的磷酸缓冲溶液(PBS)溶液,再将溶液吸出来,多次重复这个过程,以便除去溶液中多余的囊泡,最后加上PBS溶液,至此完成非支撑磷脂双层膜制备。

3 结果与讨论

3.1 非支撑磷脂双层膜表征

我们利用光学显微镜对悬浮的氮化硅多孔膜两侧进行成像表征。如图1(a, b)所示,从芯片上方(a)和下方(b)可以观察到悬浮的200 nm厚度的氮化硅

膜,氮化硅膜具有一定的透光性,反面可以看到湿法腐蚀形成的倒金字塔型凹槽,中间小正方形为悬浮的氮化硅膜。如图1c所示,AFM可清楚观察到氮化硅膜存在着一些直径约200 nm的孔,这些纳米孔很好地分散在氮化硅膜不同区域,这为制备非支撑磷脂双层膜提供了基础。一般来说,随着孔直径增大,非支撑磷脂双层膜的机械稳定性变差。正是由于稳定性的限制,导致非支撑磷脂双层膜性质方面的研究相对于支撑磷脂双层膜困难。而基于纳米孔构建的非支撑磷脂双层膜的稳定性得到显著改善,这为制备非支撑磷脂双层膜以及利用AFM开展其性质研究提供了契机。直径200 nm的孔上制备的非支撑磷脂双层膜具有足够的稳定性,从而为研究温度对磷脂双层膜性质影响提供了平台。

电诱导法制备的囊泡尺寸较大,囊泡的粒径能达到1.5–2 μm,远大于我们制备的硅基纳米孔的孔径,因此囊泡的融合过程就不再是必需步骤。囊泡首先吸附在悬浮氮化硅纳米多孔膜上,吸附在悬浮氮化硅纳米多孔膜上的囊泡会发生破裂,覆盖着氮化硅基底上,在有纳米孔的地方形成非支撑磷脂双层膜。因为囊泡直接破裂就可以得到微米大小的磷脂双层膜,所以制备非支撑磷脂双层膜的成功率和孔处磷脂双层膜的覆盖率均能满足实验要求。

我们利用AFM对制备的非支撑磷脂膜进行表征。在液相中采取接触模式获得的非支撑磷脂双层

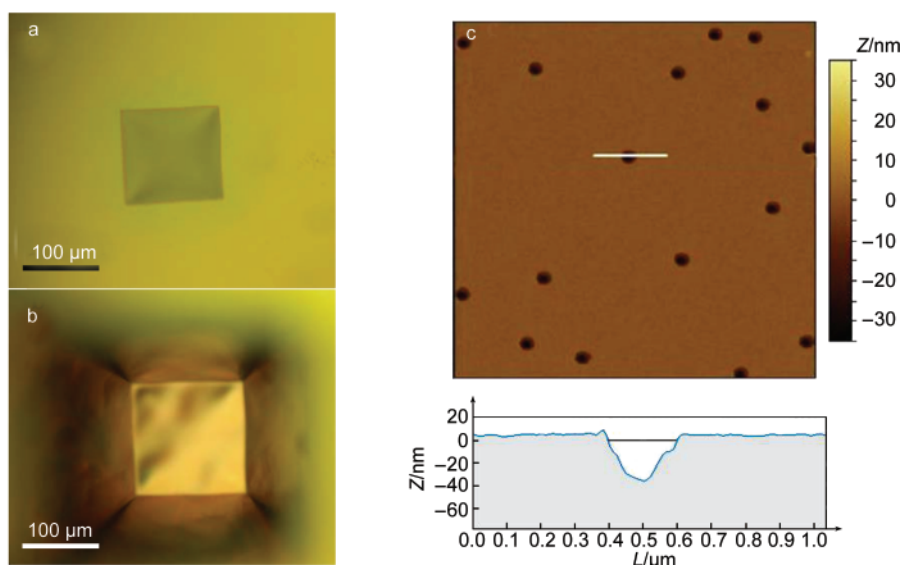


图1 悬浮氮化硅多孔膜(a)俯视光学图和(b)仰视光学图;(c)镶嵌在悬浮氮化硅多孔膜中的纳米孔原子力显微镜图像(5 μm×5 μm)以及白色线对应的剖面图

Fig.1 Optical image of (a) top-view and (b) bottom-view of freestanding nanoporous silicon nitride membrane; (c) AFM image of nanopores of freestanding nanoporous silicon nitride membrane (image size: 5 μm×5 μm) and the cross sectional profile corresponding to the white line

膜 AFM 图像如图 2 所示, 在 $5\ \mu\text{m}\times 5\ \mu\text{m}$ 范围内有较大范围的磷脂双层膜存在, 有些纳米孔上面有磷脂膜覆盖住, 纳米孔上的磷脂双层膜就是我们所需要的非支撑磷脂双层膜, 在非支撑磷脂双层膜的两面都是液相环境. 图 2b 为 $400\ \text{nm}\times 400\ \text{nm}$ 范围内的原子力显微镜图像, 但在此条件下仍难以观察到非支撑磷脂双层膜的精细结构. 图 2c 为图 2a 中实线处的剖面线, 可以看到磷脂双层膜的厚度为 $4.5\ \text{nm}$ 左右, 这与文献中报道的平面磷脂双层膜的厚度一致. 图 2d 为图 2a 中虚线处的剖面线, 此剖面线经过两个孔, 测量所得的孔 1 深度明显要比孔 2 深度小,

这是由于孔 1 处有非支撑磷脂双层膜存在, 而孔 2 四周虽然有磷脂双层膜, 但孔本身却没有被磷脂双层膜覆盖. 这种高度差充分证明非支撑磷脂双层膜能在部分纳米孔处存在.

这种方法制备的 DMPC 非支撑磷脂双层膜有一定的流动性, 如图 3 所示, 在图 3a 中箭头所指的纳米孔处没有磷脂双层膜的存在, 经过 2 h 之后, 这些原来没有磷脂双层膜的纳米孔被磷脂双层膜覆盖 (如图 3b). 以上表明该非支撑磷脂双层膜具有流动性. 非支撑磷脂双层膜由磷脂分子自组装形成, 磷脂分子之间存在相互作用, 这种流动性使得非支撑

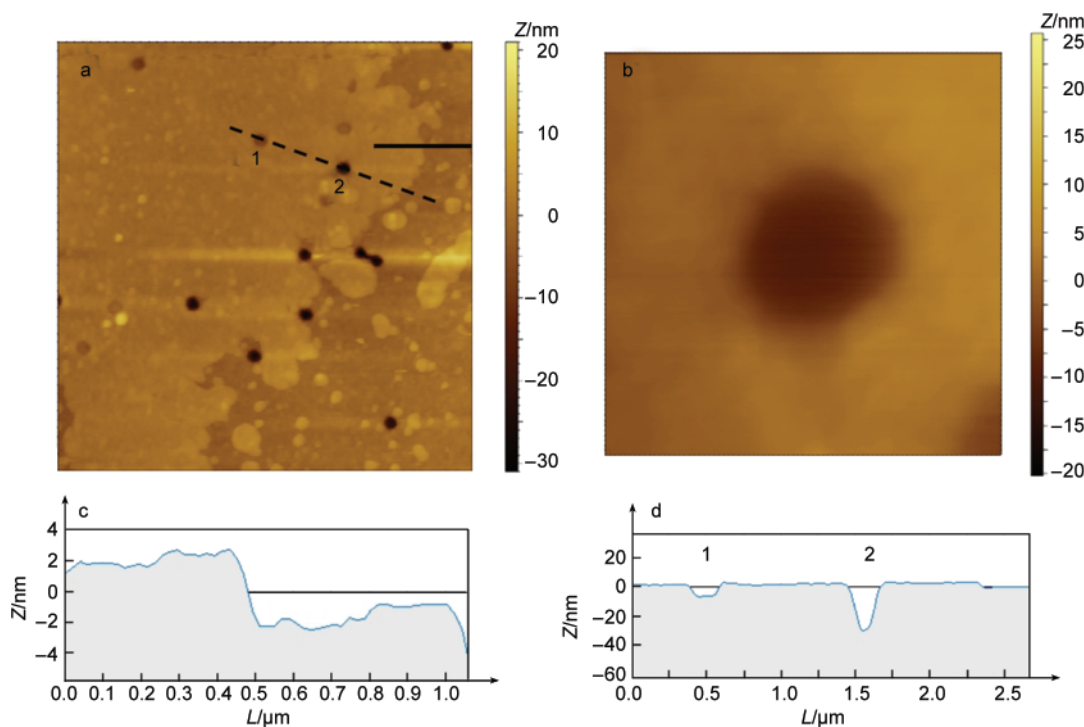


图 2 DMPC 非支撑磷脂双层膜原子力显微镜图像

Fig.2 AFM images of DMPC free-standing bilayer lipid membranes

(a) image size: $5\ \mu\text{m}\times 5\ \mu\text{m}$; (b) image size: $400\ \text{nm}\times 400\ \text{nm}$; (c) cross-sectional profile along the solid line in Fig.a; (d) cross-sectional profile along the dashed line in Fig.a

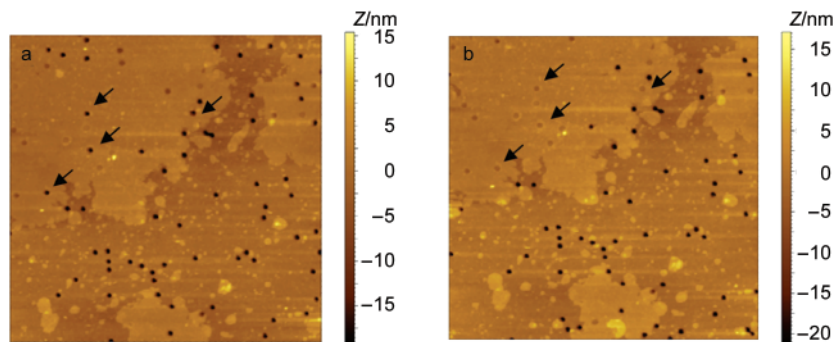


图 3 表现出流动性的 DMPC 非支撑磷脂双层膜原子力显微镜图像

Fig.3 AFM images of DMPC free-standing bilayer lipid membranes showing the fluidity

Image b was recorded 2 h after image a, image size: $10\ \mu\text{m}\times 10\ \mu\text{m}$

磷脂双层膜能进行自我修复, 该自我修复性质为研究提供了足够多的非支撑磷脂双层膜区域, 有利于对其性质进行研究.

3.2 非支撑磷脂双层膜性质研究

3.2.1 非支撑磷脂双层膜膜破力随温度的变化

AFM 力曲线可测量 AFM 探针与样品间相互作用力. 在实验中, 首先利用 AFM 接触模式成像确定非支撑磷脂双层膜存在的位置, 然后利用力曲线模式测量非支撑磷脂双层膜体系的力学性质, 提拉速率为 $0.5 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$. 图 4 为 AFM 探针与非支撑磷脂双层膜之间相互作用的典型力曲线, 由逼近线和提拉线组成. 在力曲线的逼近线区间, 初始阶段针尖没有与非支撑磷脂双层膜接触时, 力曲线为一段水平曲线, 如图中 AB 段所示; AFM 针尖逐渐逼近非支撑磷脂双层膜, 当针尖与非支撑磷脂双层膜接触并发生相互作用时, 力值开始增加, 力曲线出现转折, 即 B 处; 随着针尖的继续运动, 针尖和非支撑磷脂双层膜的作用力逐渐增大, 直到非支撑磷脂膜承受不住, 发生膜破, 即图中 C 处为膜破处, 力曲线在膜破处会发生一个新的转折. 通过获得力曲线的逼近线可以测量膜破力, 而膜破力本质上与磷脂双层膜中分子间作用力相关. 当 AFM 针尖刺破磷脂双层膜后, 针尖会快速向前移动, 因为氮化硅膜上孔的直径约 200 nm, AFM 针尖的侧面会被孔壁挡住, 相当于 AFM 针尖作用在较硬的基底, 从而作用力还会持续增加, 这一过程对应力曲线中的 CD 段. 当 AFM 针尖从 D 点开始回撤时, 磷脂双层膜仍然粘附在在 AFM 针尖上, 直至针尖脱离磷脂双层膜(E 点), 这一过程对应力曲线的 DE 段. 针尖与磷脂双层膜脱离后, 双层膜具有的流动性仍然可能使其回复原状.

我们分别测量了 16、20、23、26、30 °C 五个温度

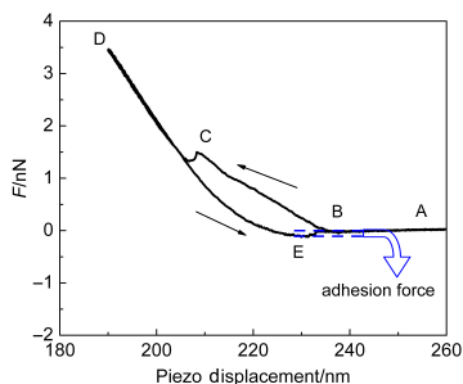


图4 DMPC 非支撑磷脂双层膜的典型力曲线
Fig.4 Typical force curve of DMPC free-standing bilayer lipid membranes

下的力曲线, 设定好每个温度之后至少要保持半小时以上, 以便使整个电解池的温度达到恒定均匀. 通过比较这五个温度下膜破力数值可以确定膜破力随着温度的变化趋势. 为了保证测量到的膜破力可靠, 每个温度下的膜破力均通过统计 100 条力曲线的膜破力而得到. 以 30 °C 温度下获得的膜破力统计分布情况为例(见图 5a), 膜破力的统计分布符合高斯分布, 膜破力约为 1.10 nN. 通过统计得到的 16、20、23、26 °C 四个温度下的膜破力分别为 4.20、3.80、3.00、1.46 nN, 以上数据明显小于支撑磷脂双层膜的膜破力. 支撑磷脂双层膜的膜破力大约为支撑磷脂双层膜的 4–5 倍, 这是由于支撑磷脂双层膜基底对于磷脂双层膜的支撑作用, 使磷脂双层膜更加稳定. 将以上数据对温度作图, 得到膜破力随温度的变化曲线, 见图 5b. 由此可知随着温度的逐渐增大, 膜破力逐渐减小. 这一变化趋势与支撑磷脂双层膜的膜破力随着温度变化趋势一致.¹⁷ 磷脂双层膜的膜破力随着温度的增加而减小是由于磷脂双层膜在温度较低时, 呈凝胶相存在, 磷脂分子排列较为紧密, 其稳定性较好, 需要较大的力才能

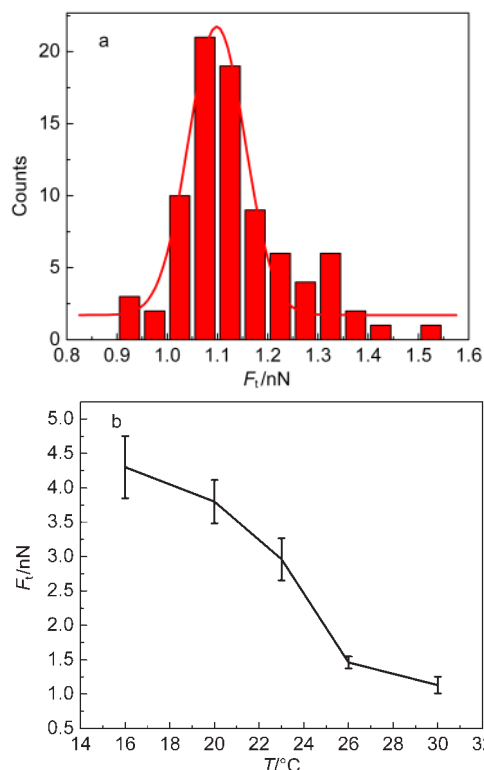


图5 (a) DMPC 非支撑磷脂双层膜 30 °C 下膜破力统计图;
(b) 膜破力随温度的变化曲线

Fig.5 (a) Histogram of threshold force value for DMPC free-standing bilayer lipid membrane at 30 °C; (b) influence of temperature on the threshold force value

发生膜破,当温度升高后,磷脂双层膜从凝胶相逐渐转变为液晶相,液晶相时磷脂分子的排列较为松散,稳定性较差,膜破需要的力也较小.磷脂双层膜在不同相态时,磷脂分子本身的状态以及磷脂分子排列存在差异.即便在同样的相态下,不同温度时,其分子状态和排列也存在一定的差异,因此,膜破力也会产生一定的差异.图5b表明,在23℃左右膜破力变化较显著,而相对偏离23℃时,膜破力变化较为缓慢.差示扫描量热仪(DSC)测试表明,DMPC的相变温度为23℃,该相变温度与AFM测试观察到的膜破力变化较显著的温度值一致.²⁶

3.2.2 非支撑磷脂双层膜粘滞力随温度的变化

利用AFM力曲线模式测量非支撑磷脂双层膜的力学性质时,针尖既有逐渐逼近进而接触非支撑磷脂双层膜的过程,也有针尖离开非支撑磷脂双层膜的过程,力曲线中的提拉曲线可以反映针尖离开非支撑磷脂双层膜的过程.当AFM针尖从接触非支撑磷脂双层膜到离开非支撑双层膜,由于非支撑磷脂双层膜本身粘附在AFM针尖上,从AFM力曲线中,我们可以获得非支撑磷脂双层膜的粘连性信息.

典型的非支撑磷脂双层膜力曲线中的提拉线如图4所示,在提拉过程中,AFM针尖试图离开磷脂双层膜,由于非支撑磷脂双层膜与AFM针尖之间有粘滞力存在,图4中DE段,AFM针尖从与非支撑磷脂双层膜紧密接触到E点处时,粘滞力已不能支持针尖与磷脂双层膜继续接触,因此磷脂双层膜会迅速脱离针尖,从而在力曲线上会表现出一个力的突跃.图4中虚线标识出的力差值,即这个突跃力的数值,就是非支撑磷脂双层膜的粘滞力.

与获得膜破力的做法一样,我们通过分别统计16、20、23、26、30℃五个温度下100条力曲线的粘滞力分布情况,以保证获得的这五个温度下粘滞力数值的可靠性.

以30℃温度下获得的粘滞力统计分布情况为例(见图6a),粘滞力的统计分布符合高斯分布,粘滞力约为0.064 nN.通过统计得到的16、20、23、26℃四个温度下的粘滞力分别为0.257、0.154、0.109、0.087 nN.图6b为粘滞力随温度的变化曲线,从图中可知,随着温度的逐渐增大,粘滞力逐渐减小.据文献报道,支撑磷脂双层膜的粘滞力随着温度升高而增大,其数值在3–10 nN之间.²⁰因此,对于粘滞力随温度的变化情况,非支撑磷脂双层膜的变化趋势

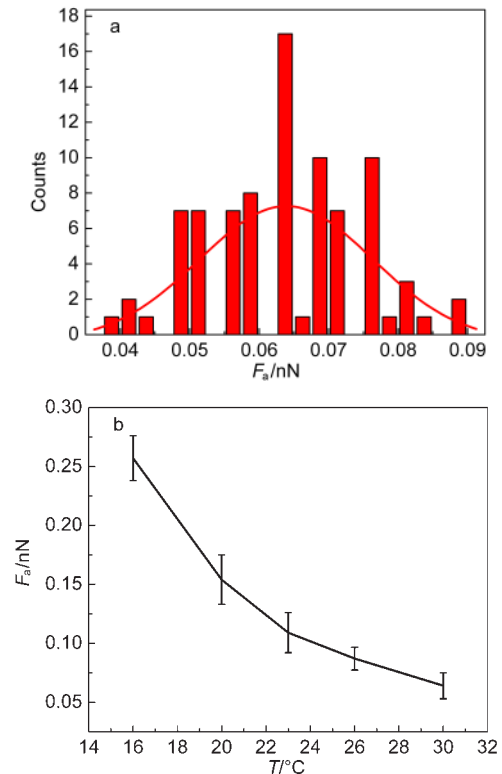


图6 (a) DMPC非支撑磷脂双层膜30℃温度下粘滞力统计图;(b)粘滞力随温度的变化曲线

Fig.6 (a) Histogram of adhesion force value for DMPC free-standing bilayer lipid membrane at 30 °C; (b) influence of temperature on the adhesion force value

与支撑磷脂双层膜的变化趋势相反.对于产生相反变化趋势的原因,我们认为与是否存在支撑基底有关.文献²⁰中报道,粘滞力随温度升高而增大的直接原因是与AFM针尖相互作用的磷脂分子数目增多.在提拉速度较慢时,与AFM针尖发生相互作用的磷脂分子较多,粘滞力也较大,这可以证明磷脂分子数目增多可导致粘滞力增大.对于非支撑磷脂双层膜,随温度升高,相对于凝胶相,液晶相的磷脂分子排列较疏松,与针尖发生相互作用的分子较少,粘滞力也较小.对于支撑磷脂双层膜,由于支撑基底的作用,可能导致温度升高时,磷脂分子排列较疏松的液晶相反比凝胶相有更多的分子与AFM针尖发生相互作用,从而导致粘滞力增大.以上分析表明,支撑基底可能会导致实验数据理解方面的困难.由于非支撑磷脂双层膜避免了基底的影响,因此实验数据更加接近生物膜的真实状态.

4 结论

本文利用聚苯乙烯球蚀刻和微机电系统联用技术加工氮化硅纳米多孔膜,并在其上用囊泡法制

备了非支撑磷脂双层膜。AFM 成像实验表明, 该方法制备的非支撑磷脂双层膜具有一定的流动性和自我修复能力, 该特点有利于提供更多非支撑磷脂双层膜区域用于其性质研究。温控 AFM 力曲线研究表明, 该非支撑磷脂双层膜的膜破力和粘滞力均随着温度的升高而减小, 即非支撑磷脂双层膜的机械稳定性会随着温度的升高而降低。由于非支撑磷脂双层膜避免了支撑基底的影响, 其膜破力小于支撑磷脂双层膜的膜破力, 并且非支撑磷脂双层膜粘滞力随温度的变化趋势与支撑磷脂双层膜的变化趋势相反。

References

- (1) Nielsen, C. H. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 697. doi: 10.1007/s00216-009-2960-0
- (2) Ma, W. B.; Zhang, L. Z. *Chem. Ind. Eng. Pro.* **2007**, *26*, 1538. [马文宝, 张立志. 化工进展, **2007**, *26*, 1538.]
- (3) Wang, L. G.; Li, Y. H.; Tien, H. T. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1995**, *36*, 145.
- (4) Yabuki, S.; Mizutani, F.; Hirata, Y. J. *Electroanal. Chem.* **1999**, *468*, 117. doi: 10.1016/S0022-0728(99)00088-1
- (5) Yang, C. Y.; Liu, Y.; Li, Q. G.; Li, L. W. *Acta Phys. -Chim. Sin.* **2007**, *23*, 635. [杨昌英, 刘义, 李强国, 李林蔚. 物理化学学报, **2007**, *23*, 635.] doi: 10.1016/S1872-1508(07)60040-0
- (6) Hao, C. C.; Sun, R. G.; Zhang, J. *Chem. J. Chin. Univ.* **2009**, *30*, 913. [郝长春, 孙润广, 张静. 高等学校化学学报, **2009**, *30*, 913.]
- (7) Han, X. J.; Song, Y. H.; Wu, Z. Y.; Zhang, B. L.; Wang, E. K. *Chem. J. Chin. Univ.* **2001**, *22*, 1298. [韩晓军, 宋永海, 吴正岩, 张柏林, 汪尔康. 高等学校化学学报, **2001**, *22*, 1298.]
- (8) Mabrey, S.; Sturtevant, J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1976**, *73*, 3862. doi: 10.1073/pnas.73.11.3862
- (9) Janiak, M. J.; Small, D. M.; Shipley, G. G. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 6068.
- (10) Cheng, Y.; Bushby, R. J.; Evans, S. D.; Knowles, P. R.; Miles, R. E.; Ogier, S. D. *Langmuir* **2001**, *17*, 1240. doi: 10.1021/la001423h
- (11) Steltenkamp, S.; Müller, M. M.; Deserno, M.; Hennessal, C.; Steinem, C.; Janshoff, A. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 217. doi: 10.1529/biophysj.106.081398
- (12) Mey, I.; Stephan, M.; Schmitt, E. K.; Müller, M. M.; Ben Amar, M.; Steinem, C.; Janshoff, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7031. doi: 10.1021/ja809165h
- (13) Dufrene, Y. F.; Boland, T.; Schneider, J. W.; Barger, W. R.; Lee, G. U. *Faraday Discuss.* **1998**, *111*, 79.
- (14) Dufrene, Y. F.; Barger, W. R.; Green, J. B.; Lee, G. U. *Langmuir* **1997**, *13*, 4779. doi: 10.1021/la970221r
- (15) Garcia-Manyes, S.; Lorena, R. M.; Gerard, O.; Sanz, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12874. doi: 10.1021/ja1002185
- (16) Garcia-Manyes, S.; Oncins, G.; Sanz, F. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 1812. doi: 10.1529/biophysj.105.064030
- (17) Garcia-Manyes, S.; Oncins, G.; Sanz, F. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 4261. doi: 10.1529/biophysj.105.065581
- (18) Seeger, H. M.; Cerbo, A. D.; Alessandrini, A.; Facci, P. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 8926. doi: 10.1021/jp1026477
- (19) Keller, D.; Larsen, N. B.; Moller, I. M.; Mouritsen, O. G. *Physical Review Letters* **2005**, *94*, 025701. doi: 10.1103/PhysRevLett.94.025701
- (20) Leonenko, Z. V.; Finot, E.; Ma, H.; Dahms, T. E.; Cramb, D. T. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 3783. doi: 10.1529/biophysj.103.036681
- (21) Seeger, H. M.; Marino, G.; Alessandrini, A.; Facci, P. *Biophys. J.* **2009**, *97*, 1067. doi: 10.1016/j.bpj.2009.03.068
- (22) Charrier, A.; Thibaudau, F. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 1094. doi: 10.1529/biophysj.105.062463
- (23) Li, J.; Stein, D.; McMullan, C.; Branton, D.; Aziz, M. J.; Golovchenko, J. A. *Nature* **2001**, *412*, 166. doi: 10.1038/35084037
- (24) Romer, W.; Steinem, C. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 955.
- (25) Zhang, X.; Zhu, Z. W.; Sun, C. F.; Zhu, F.; Luo, Z. Z.; Yan, J. W.; Mao, B. W. *Microchim. Acta* **2009**, *167*, 135. doi: 10.1007/s00604-009-0216-5
- (26) Yu, Z. W.; Quinn, P. J. *Biophys. J.* **1995**, *69*, 1456.