

應用 X 光繞射／散射技術研究生物膜結構

X-Ray Diffraction/Scattering on Bio-Membrane Structure Study

李明道

Ming-Tao Lee

生物膜是細胞重要的組成成分，其分子結構為生物領域的重要課題，尺度為 3–5 nm，故 X 光是量測生物膜結構的利器。X 光繞射可用來量測多片層生物膜樣品的電子密度，以研究生物膜的精細結構；而 X 光散射技術則用來測量生物單層膜微胞在溶液中的膜厚度，可以更接近細胞生存的環境。同步輻射 X 光具有高強度、高準直性及小光束尺寸的優點，應用在生物樣品的量測將會有很大的優勢。

Bio-membrane is the important component of cell and its structure is the key issue in biology field. Due to the scale of structure is about 3–5 nm, X-ray is the powerful tool to measure the structure of membrane. Using X-ray diffraction to determine the electron density profile of lamellar membrane sample, we can study fine structure of bio-membrane. X-ray scattering on small unilamellar vesicles (SUVs) sample can be used to probe membrane thickness in solution. The conditions are more close to which the real cell live in. Synchrotron radiation X-ray source has good properties of high flux, high collimation and small beam size. Using synchrotron light source on biological sample study should be most advantaged.

一、前言

生物膜是細胞重要的組成成分，除了支持整個細胞，並作為區分細胞內外的「圍牆」外，更是掌管細胞內外物質溝通的橋樑。細胞膜上存在許多功能性的分子，如蛋白質、醣類、膽固醇和維生素⁽¹⁾，這些分子都需要和生物膜作用才能發揮功能。除此之外，生物膜也是區隔細胞內胞器及傳遞細胞內物質如 DNA 及 RNA 等的橋樑，因此生物膜結

構的研究已成為生物和醫學上的重要議題。

生物膜主要成分是脂質分子 (lipid)，其分子結構可分為親水的頭部區及親油的腳區，在水中會自己組成頭部區朝外腳區朝內的脂質雙層膜 (lipid bilayer) 結構，參見圖 1。膜的厚度因腳區碳鏈長度不同而改變，一般為 3–5 奈米，脂質雙層膜結構與物理性質會隨著溫度、濕度、壓力及酸鹼度等外在環境條件而改變，衍生多變且有趣的相變化行為，屬於複雜系統的範疇，其很適合作為研究軟凝

體及薄膜物理的二維流體系統。

X 光一直是研究分子生物學的利器，不論在生物膜結構、蛋白質結構、離子通道及最近很熱門的 DNA 相關研究上，X 光的繞射及散射技術都占了很重要的地位。生物膜是尺度 3–5 奈米的二維流體，所以生物膜結構的決定上，X 光繞射技術是公認最可信的技術，相較於電子顯微鏡需要破壞生物膜的存在環境 (需冷凍乾燥且在真空環境觀察)，X 光技術能在更接近生物真實環境中測量 (如在水溶液中或高濕度的環境下)。

早期使用 X 光繞射技術量測生物膜結構是在水溶液中製備成多層膜微胞，將樣品置於可控溫的繞射腔內，進行 X 光繞射實驗，經數據分析可得到繞射訊號。此方法的優點為樣品在水溶液中，接近生物細胞生存的環境，但缺點為在水中樣品受到之擾動很大，造成繞射訊號減弱及背景雜訊升高，因此通常只能量測到 4 個繞射峰值，準確度受到很大的限制，以致無法量測生物膜的精細結構及微小的變化，且其多層膜結構與生物細胞的單層膜結構不同，不能完全反應真實情況。

為了提昇準確度，近年來許多研究人員開始將樣品製備成在基底上的多片層生物膜，如圖 2 所示，置於精準控溫及控濕的繞射腔內，控制在高濕

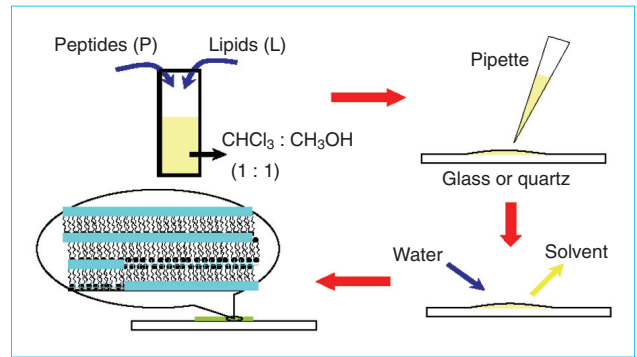


圖 2. 多片層生物膜樣品製備流程。

度 (> 90%) 的條件下，進行多片層 X 光繞射實驗 (lamellar X-ray diffraction, LXD)，經數據分析可得繞射訊號，少了溶液中的擾動，通常可以得到 6–9 個繞射峰值，大幅提高實驗的準確度，最近幾年常被應用在生物膜精細結構的測量⁽²⁾。

多片層 X 光繞射實驗雖然可以大幅提高實驗的準確度，但生物學家仍對多片層樣品與真實細胞不同的地方提出許多質疑：(1) 不在水溶液中、(2) 不是單層膜、(3) 不是球形的，所以研究人員開始嘗試量測單層生物膜微胞在水溶液中的結構。單層膜微胞不具有建設性干涉，故沒有繞射而只有微弱的散射訊號，無法直接得到生物膜的電子密度，加上水中的擾動及雜訊，增加實驗的困難度，因此發展出結合 X 光散射技術與建立模型的方法，用來量測單層生物膜在水中的厚度⁽³⁾。

X 光繞射技術可與散射技術相輔相成，不但可以得到高準確度的生物膜結構，也可以模擬細胞在水溶液環境下細胞膜的厚度及其變化，將大大提高二者在生物領域的應用，對生物分子與生物膜作用的研究更是大有幫助。

同步輻射 X 光有 (1) 高強度、(2) 高準直性與 (3) 小光束尺寸等優點，不但有助於進一步提高實驗的準確度，也可減少 90% 樣品的用量，對於極端昂貴或取得困難的生物樣品，可減低成本，對於 X 光散射實驗，更是可以將實驗時間從數小時縮短為數分鐘，大幅提高實驗的可行性及效率。本文將分別介紹在國家同步輻射研究中心光束線 BL13A 進行的 X 光繞射實驗及在光束線 BL17B 進行的 X 光散射實驗在生物膜結構方面的研究。

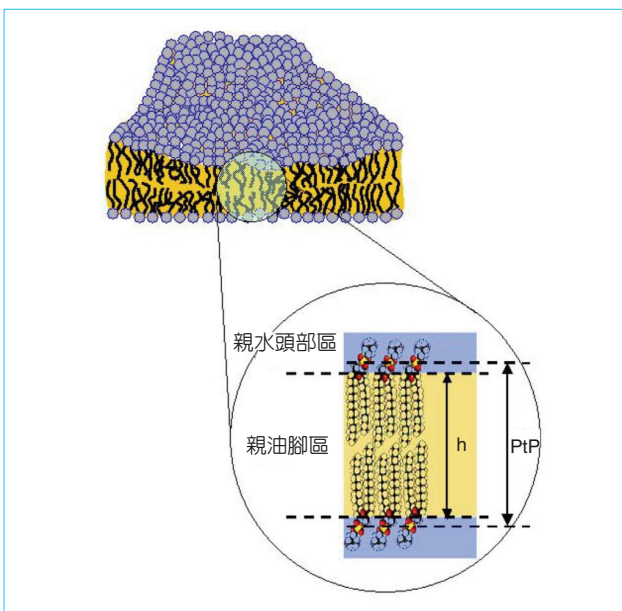


圖 1. 脂質雙層膜示意圖。

二、樣品製備

1. 多片層生物膜樣品製備

製備方法採用溶劑多重堆積法⁽⁴⁾，取適當數量的脂質分子溶在甲醇和氯仿混合溶劑（脂質分子濃度為 1 mg/20 μm 、體積比 1:1 甲醇氯仿）中，抽取其中適當數量的溶液，多次均勻地滴定在乾淨的基底（玻片、石英玻片或矽晶片）上，待 30 分鐘後溶劑揮發，即可堆積出脂質雙層膜的多片層樣品（如圖 2）。將樣品抽真空至少 3 小時以去除殘留的溶劑，然後置於高溫高濕的環境下讓生物膜樣品濕潤至流體態，並重新排列 1-3 小時，目視樣品呈半透明狀態後，即可準備進行測量。

2. 單層生物膜微胞樣品製備

先將人工合成的脂質分子溶於適當比例的甲醇及氯仿中充分混合，取適量的溶液滴於燒杯或大試管中，用氮氣吹乾，此時脂質分子會在杯底形成透明的多層薄膜，再將燒杯置於真空烤箱中，抽氣約 1-2 小時，以富含水氣的氮氣對多層薄膜進行緩慢潤濕後，加入適量緩衝溶液於燒杯中，靜置 20 分鐘後，用超音波池震盪 20 分鐘，再以液態氮及 40 °C 的溫水對燒杯中的溶液作冷凍回溫的過程 5 次，最後在充滿氮氣的環境下，將溶液用 80 W 的超音波震盪棒震盪 40 分鐘，則可得到 60 nm 大小的微胞（small unilamellar vesicles, SUVs）樣品溶液。

三、實驗方法

1. 多片層 X 光繞射實驗

多片層繞射技術的原理如圖 3 所示。圖 3(a) 為多片層脂質雙層膜之示意圖，脂質雙層膜沿垂直於基底的方向（圖中之 Z 軸方向）堆積數百層，雙層膜之間淡藍色部分為水層；X 光入射方向與膜面的夾角為 θ ，入射波向量為 \mathbf{k}_i ，經多片層脂膜反射，反射波向量為 \mathbf{k}_s ，與 \mathbf{k}_i 的夾角為 2θ ，X 光沿 Z 軸方向動量轉換的大小

$$Q = |\mathbf{k}_s - \mathbf{k}_i| = \left(\frac{4\pi}{\lambda}\right) \sin\theta \quad (1)$$

其中 λ 為 X 光的波長。由於多片層脂質雙層膜沿 Z 軸堆積，其電子密度 ρ 在 Z 軸方向會形成週期性排列，重複的週期距離 D （如圖 3(a) 所示）即為雙層膜的厚度 PtP 加上水層厚度 D_w 。此週期性多層膜產生繞射峰之條件為

$$Q_h = h \frac{2\pi}{D}; \quad h = 1, 2, 3 \quad (2)$$

結合 (1) 和 (2) 可得

$$h\lambda = 2D \sin\theta; \quad h = 1, 2, 3, \dots \quad (3)$$

即為一般所常用的布拉格繞射公式。在符合此公式的條件下，與多層膜作用的 X 光散射強度會在特定的角度有建設性干涉，形成繞射峰（如圖 3(b) 所示）。繞射數據分析的步驟如下：首先修正脂膜對不同角度入射 X 光的吸收，其吸收因子 $f_a \approx [1 - \exp(-2\mu d/\sin\theta)]$ ，其中 d 為多片層脂膜的總厚度， μ 為

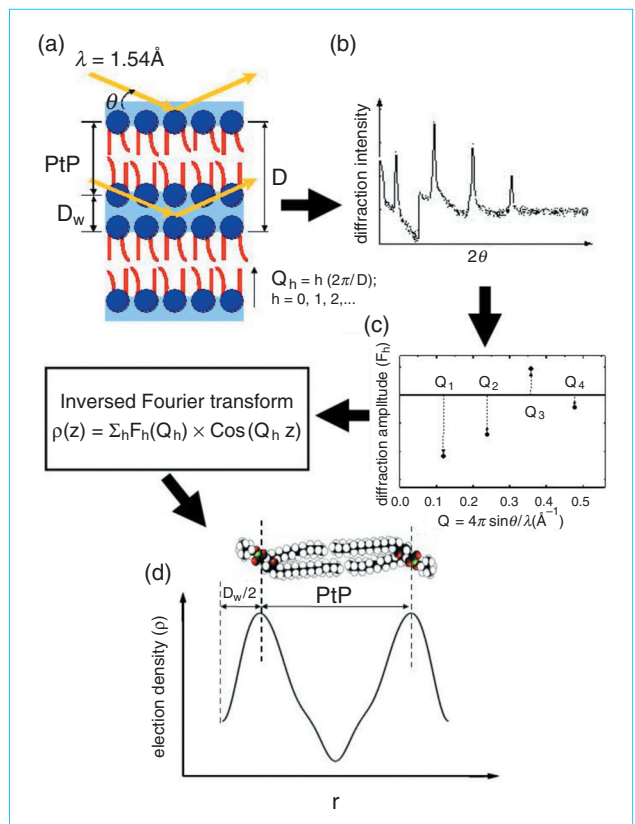


圖 3. 多片層 X 光繞射原理。

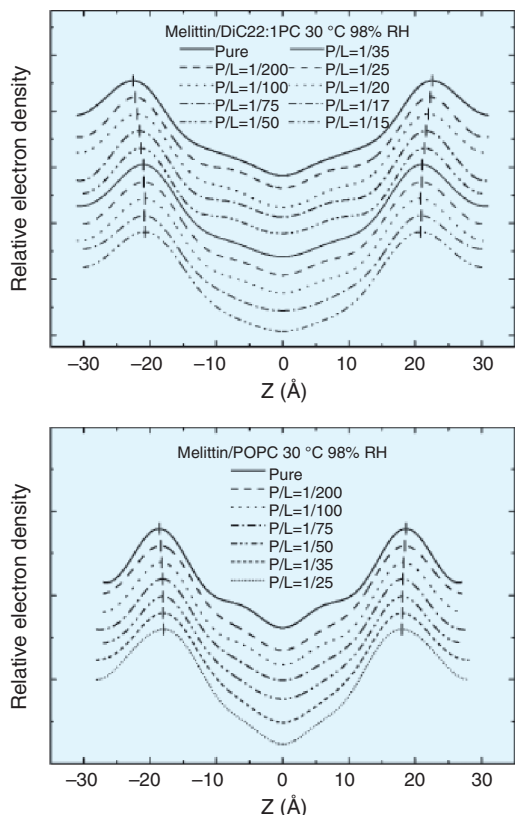


圖 4. 脂質雙層膜的電子密度圖⁽⁹⁾。

脂質分子對 X 光的吸收係數 (可由組成脂質分子的個別原子之吸收係數計算得到)。接著移除背景雜訊，再將各個繞射峰對 θ 作積分，分別得到在 Q_h 時的繞射強度 I_h 。根據片層樣品的 X 光繞射原理，

$$I_h \approx P_h \times L_h \times |F_h|^2 \quad (4)$$

其中 P_h 為極化修正因子， L_h 為羅倫茲修正因子， F_h 為 Q_h 時的繞射振幅。根據公式 (4)，對 I_h 作極化和羅倫茲修正，即可得到 $|F_h|^2$ 因脂質雙層膜為中心對稱結構，故繞射振幅 $|F_h|$ 的相位只有 +1 和 -1 兩種可能。一旦相位決定之後 (如圖 3(c) 所示)，將繞射振幅作傅利葉轉換，即可得到脂膜的相對電子密度圖 (如圖 3(d) 所示)，所作的轉換為

$$\rho(z) = \sum_h F_h \cos(Q_h z) \quad (5)$$

其中 Q_h 由 $Q_h = (4\pi/\lambda) \sin\theta_h$ 決定。因為脂質分子頭

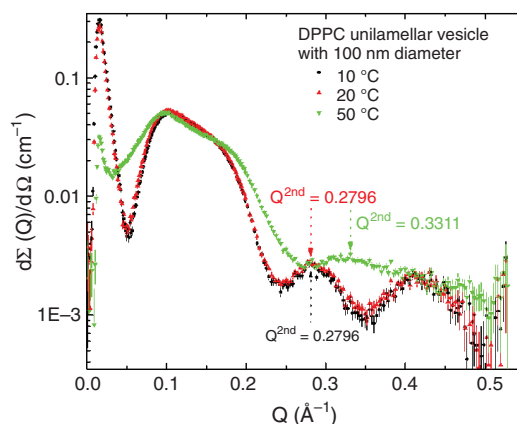


圖 5. 散射訊號強度對 Q 作圖。

部區有一個磷原子，相對於其他的碳氫氧氮原子有很大的電子密度，故電子密度圖中雙正峰間的距離 (PtP) 即代表脂質雙層膜中磷原子到磷原子的距離，此距離被定義為脂膜的厚度。

為了決定繞射振幅的相位，必須在固定溫度下，進行濕度小於 98% 不同濕度的測量，以獲得不同 D 值時的繞射圖形，將所求得之各組繞射振幅用 Blaurock 方法⁽⁵⁾ 歸一化後對 Q 作圖，再用 swelling 原理⁽⁶⁾ 決定相位即可 (圖 3(c))。圖 4 為使用多片層 X 光繞射所得到的電子密度圖，從中可以了解生物膜的細微結構和膜的厚度。

2. 單層生物膜微胞的 X 光散射實驗

利用 X 光散射技術測量單層生物膜微胞在水溶液中膜厚度的構想，最早是由 Engelman 所提出⁽⁷⁾，利用散射訊號強度對動量變化 Q 作圖，請參見圖 5 所示，其中 $Q = (4\pi/\lambda) \sin\theta$ ，找出第二個峰值的 Q 值， Q^{2nd} ，再利用

$$PtP = \frac{4\pi}{Q^{2nd}} \quad (6)$$

可得膜的厚度 PtP 。他更進一步指出，在生物膜與蛋白質等生物分子作用而受到擾動後， Q^{2nd} 受到的影響最小，仍然可以得到準確的膜厚度，如此提供一個非常簡單而直接的方法去得到單層生物膜在水溶液中的厚度。但早期受限於實驗室 X 光機強度太弱，一個數據點動輒十幾個小時，且準確度很低，

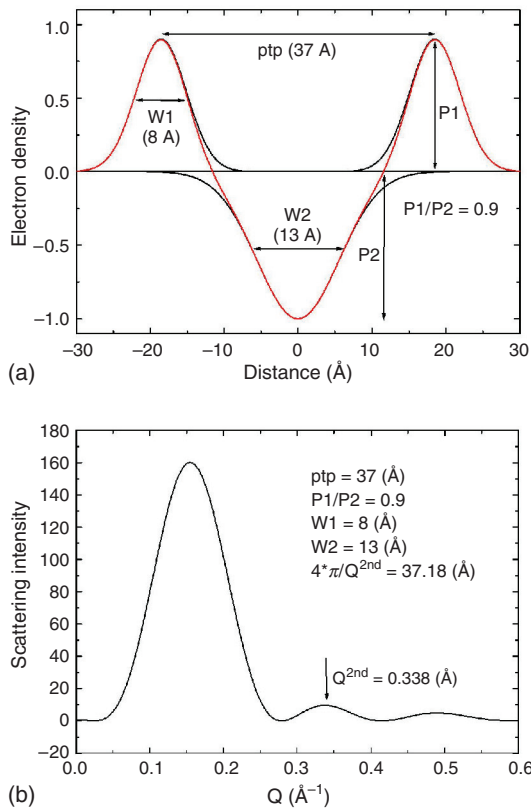


圖 6. (a) 高斯函數電子密度模型，(b) (a) 中電子密度經傅利葉轉換取平方。

使得此方法很少被使用。近年來自從同步輻射提供高品質及高強度的 X 光光源後，已縮短時間至十分鐘，且準確度大幅提升，以下將用理論上的數值分析來了解這個方法，並以實驗數據來驗證它。

根據散射理論，散射強度正比於樣品電子密度的傅利葉轉換的平方，考慮簡化的一維情況如下式：

$$I_s(k) \propto \left| \int \rho(x) e^{ikx} dx \right|^2 \quad (7)$$

其中 I_s 為散射強度， $\rho(x)$ 為一維的電子密度， $k = 2\pi/\lambda$ 為波向量。散射強度沒有相位的資訊，無法直接得到電子密度，一般的作法是先建立簡單的電子密度模型，其中包含數個可調整的參數，對其作傅利葉轉換取平方，與散射強度的實驗數據作比較，調整參數至最吻合實驗數據，即可得到正確的電子密度⁽³⁾。這種作法成功與否取決於模型的選

取，所使用之模型需具有真實樣品的電子密度之重要特徵，又不能太複雜，否則會導致運算量過大。

但是 Engelman 的方法是以這樣的基礎找到規則，可以更容易得到膜的厚度，以下將進一步探討其可行性及準確性。以生物膜為例，其典型的電子密度如圖 3(d) 所示，選取三個高斯峰 (兩正一負) 作為電子密度模型，如圖 6(a) 所示，其中調整的參數為兩正峰的距離 PtP 、正峰的寬度 W_1 、負峰的寬度 W_2 、正負峰值比 P_1/P_2 ，見圖 6(a)，選定一組參數值，將電子密度模型作傅利葉轉換取平方，結果如圖 6(b)。利用公式 (6)，可以得到膜厚度 PtP 為 37.18 Å，與電子密度模型的 37 Å 非常吻合，可以證明 Engelman 的方法是可行的。

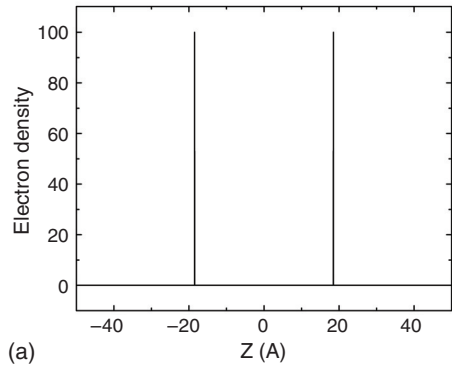
接下來，則是討論為什麼要用第二峰的 Q 值，而非第一或第三峰的 Q 值 (不考慮第四峰或以上，是因為實驗上其強度太弱，與背景雜訊同一尺度，無法正確而有效的量測)。首先考慮最簡單的電子密度模型，兩個正 δ 函數，如圖 7(a) 所示，其距離即為膜厚度 PtP ，對其作傅利葉轉換取平方，得到結果如圖 7(c) 所示，很明顯地，

$$PtP = \frac{2\pi}{Q^{1st}} = \frac{4\pi}{Q^{2nd}} = \frac{6\pi}{Q^{3rd}} \dots$$

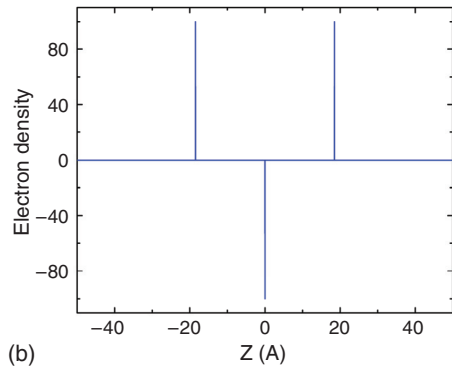
此時使用任一峰值皆相同，且無誤差。若再增加一負 δ 函數在兩個正 δ 函數的對稱中心，其結果依然不變，請見圖 7(b) 與 (c) 的藍色部分。但若是把三個 δ 函數轉換成很窄的高斯函數，再依次變寬，如圖 8(a) 所示，同樣地作傅利葉轉換取平方，結果如圖 8(b) 所示，可以看出在三個高斯函數很窄而未有重疊時，圖 8(b) 黑色及紅色線，結果與 δ 函數相同，但當三個高斯函數越來越寬而開始重疊時，傅利葉轉換取平方的結果開始變形，見圖 8(b)。使得用

$$PtP = \frac{2\pi}{Q^{1st}} = \frac{4\pi}{Q^{2nd}} = \frac{6\pi}{Q^{3rd}} \dots$$

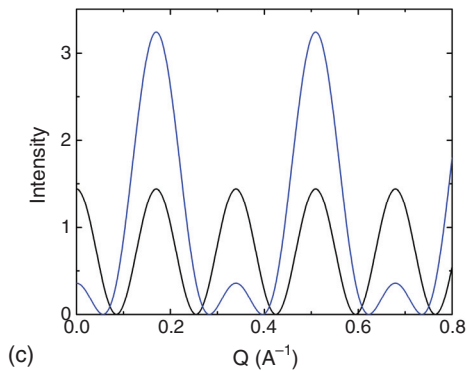
計算出來的 PtP 值誤差漸漸增加，將其誤差整理於圖 8(c)，顯而易見地，使用第二峰 Q 值的誤差最小，這也就是 Engelman 採用第二峰 Q 值的原因，



(a)



(b)

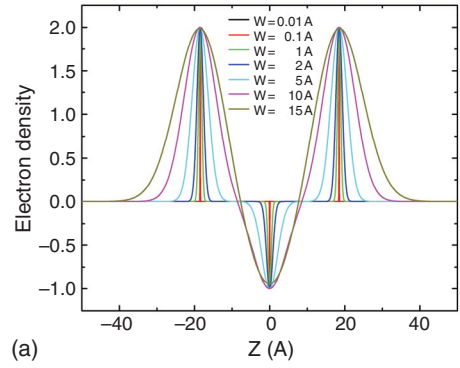


(c)

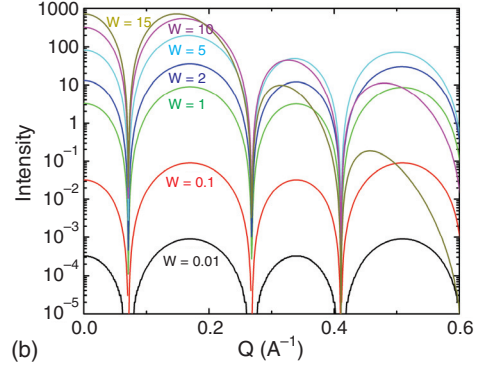
圖 7. (a) 二 δ 函數電子密度模型，(b) 三個 δ 函數電子密度模型，(c) 由 (a) 與 (b) 電子密度經傅利葉轉換取平方。

也說明了當生物膜與蛋白質等生物分子作用而受到擾動後，為什麼第二峰 Q 值受到的影響最小，且當電子密度受到擾動後，建立模型將會變得非常困難，因此使用第二峰 Q 值的方法提供了簡單又可行的方案。

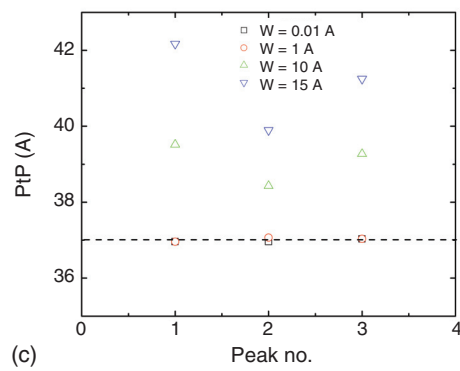
最後將採用實際的實驗數據來驗證此方法的可行性及其誤差，實驗是在同步輻射中心光束線 BL17B3X 光小角度散射實驗站進行，見圖 9 所示，X 光的能量是 10.5 keV，樣品到偵測器距離為



(a)



(b)



(c)

圖 8. (a) 不同寬度高斯函數電子密度模型，(b) (a) 中電子密度經傅利葉轉換取平方，(c) 利用圖 (b) 中第一、二、三峰的 Q 值求出膜的厚度與真實膜厚度的偏差，虛線為真實膜厚度。

1.2 公尺，濃度為 10–30 mM 的單層膜微胞溶液樣品被裝在一個可控溫的腔內，測量不同脂質組成的微胞樣品在不同溫度條件下之散射訊號，經過數據處理⁽⁸⁾，即可得到散射強度對 Q 值的關係。圖 5 為一典型的例子，找出 Q^{2nd} ，再根據 (6) 式，即可得到膜厚度。

表 1 為各種不同脂質組成的微胞樣品在低溫的有序態 (order phase) 及高溫的無序態 (disorder

	DPPC 20 °C 30 mM	DPPC 20 °C 10 mM	DPPC 50 °C 30 mM	DPPC 50 °C 10 mM	DMPC 10 mM	DMPC 10 mM
Q^{2nd}	0.2805	0.2810	0.3253	0.3262	0.3163 (10 °C) 0.3183 (10 °C)	0.3601 (30 °C) 0.3563 (30 °C) 0.3577 (35 °C)
$PtP = 4\pi/Q^{2nd}$	44.8 Å	44.7 Å	38.6 Å	38.5 Å	39.7 Å (10 °C) 39.5 Å (10 °C)	34.9 Å (30 °C) 35.3 Å (30 °C) 35.1 Å (35 °C)
PtP (ref.)	44.2 Å		38.3 Å			36.0 Å (30 °C) 35.3 Å (35 °C)

表 1.
X 光散射技術量測水溶液中單層生物膜微胞在不同溫度的膜厚度與參考文獻的比較⁽¹⁰⁾。

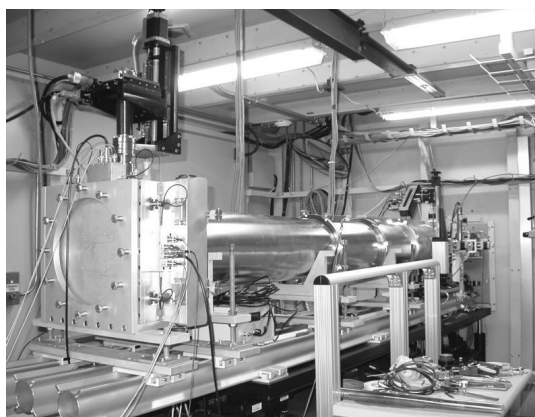


圖 9. 同步輻射中心光束線 BL17B3 X 光小角度散射實驗站。

phase) 的膜厚度及與參考文獻的比較，可以清楚地看到其差別都在百分之五以下，小於實驗的誤差，對於膜厚度的量測而言，算是非常準確。另外，圖 10 則是小蛋白 (peptide) Gramicidin A 與生物膜作用使膜厚度增加的例子，從圖中可以看到，此方法可以精準地量測到 1 Å 的膜厚度變化，再次驗證此方法適合用來研究生物分子與生物膜的作用。

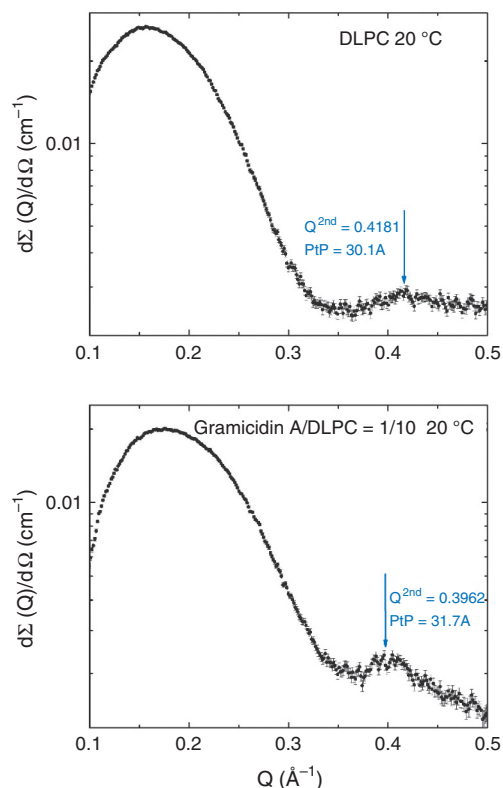


圖 10. Gramicidin A 與 DLPC 脂質雙層膜作用，使膜厚度增厚 1.6 Å。

四、結論

本文提供兩種方法來研究生物膜結構，用多片層 X 光繞射以研究材料的方式可以得到高解析度 (小於 1 Å) 的生物膜結構，單層生物膜微胞的 X 光散射則可以測量在水溶液中單層生物膜厚度，此兩種方法可以截長補短，搭配運用將成為研究生物分子與生物膜作用的利器。

參考文獻

1. Albert, B., *et al.*, *Molecular Biology of The Cell*, 4th ed., Garland Science, New York (2002).
2. F.-Y. Chen, M.-T. Lee, and H. W. Huang, *Biophys. J.*, **84**, 3751 (2003).
3. M. R. Brzustowicz and A. T. Brunger, *J. Appl. Crystallography*, **38**, 126 (2005).
4. 洪偉清, 脂膜的 X 光片層繞射, 中央大學物理系博士論文 (2000).

5. A. E. Blaurock, *J. Mol. Biol.*, **56**, 35 (1971).
6. J. Torbet and M. H. F. Wilkins, *J. Theor. Biol.*, **62**, 447 (1976).
7. D. M. Engelman, *J. Mol. Biol.*, **58**, 153 (1971).
8. Y.-H. Lai, *et al.*, *J. Appl. Crystallography*, **39**, 871 (2006).
9. M.-T. Lee, F.-Y. Chen, and H. W. Huang, *Biochemistry*, **43**, 3590 (2005).
10. J. F. Nagle and T.-N. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1469**, 159 (2000).

-
- 李明道先生為國立中央大學物理博士，現任國家同步輻射研究中心助理研究員。
 - Ming-Tao Lee received his Ph.D. in physics from National Central University. He is currently an assistant scientist at National Synchrotron Radiation Research Center.