

研究简报

生理盐水中牛血清白蛋白与碳酸钙的相互作用研究

谢安建 沈玉华* 张胜义 谢复新

(安徽大学化学化工学院, 合肥 230039)

关键词: 牛血清白蛋白 碳酸钙 相互作用 生物矿化
分类号: O614.23+1 Q512+1

珍珠、贝壳和甲壳是生物矿化的产物, 具有高强度、高韧性。人们已对它们的组成、结构等进行了大量的研究^[1~4]。结果表明, 它们的主要成分是碳酸钙, 但由于含有少量的蛋白质等有机基质, 使其结构具有特殊的组装方式, 从而显示出与纯碳酸钙迥然不同的优良物理性质和重要的生物功能。另一些研究表明胆结石、尿结石等异常生物矿化产物中也含有一定量的碳酸钙^[5]。然而生物矿化过程非常复杂, 其机理至今尚无统一说法。因此模拟生物矿化过程, 了解有机基质在矿化过程中的作用, 已成为化学、生物、医学和材料等多学科相互渗透和相互交叉的前沿课题^[6~8]。

我们的研究发现, 将固体羟基磷灰石及其与碳酸钙的混合物分别同牛血清白蛋白 (BSA) 溶液进行反应时, 形成了可溶性的 BSA-羟基磷灰石、BSA-羟基磷灰石-碳酸钙复合物^[9,10]。本文将水溶液作为模拟体系, 以 FT-IR 光谱为手段, 结合 ICP-AES 分析, 研究牛血清白蛋白与碳酸钙间的相互作用, 以探讨生物矿化的机理。

1 实验部分

1.1 试剂及样品制备

牛血清白蛋白为江苏省常熟市福山生化试剂厂产品, 电泳纯。CaCO₃ 由北京红星化工厂生产, 分析纯。BSA 溶液的浓度为 5% (质量分数), 用生理盐水 (0.9% 的 NaCl) 溶液配制。将不同量的碳酸钙加入到 BSA 溶液中去, 使 BSA 与碳酸钙的反应摩尔比分别为 1:13、1:130、1:1300、1:13000, 搅拌、浸泡十天。减压过滤, 弃取沉淀, 滤液待测定。

1.2 光谱的测定

显微红外光谱的测定使用 Nicolet Magna 750 傅立叶变换红外光谱仪, Nic-Plan 红外显微镜。反应滤液制成水化膜后扫描。扫描次数 128, 测定范围 800~4000cm⁻¹, 分辨率 4cm⁻¹。

1.3 ICP-AES 分析

取适量反应滤液, 以优级纯硝酸完全消解后, 配成 2% 的硝酸溶液, 测量仪器为美国 Leemans Lab 电感耦合等离子体原子发射光谱仪。

收稿日期 2001-03-22。收修改稿日期: 2001-05-10。

国家自然科学基金资助项目 (No. 20031010, 29971001), 国家教育部重点项目 (No. 00180) 以及安徽省自然科学基金资助项目 (No. 0045115)。

* 通讯联系人。

第一作者 谢安建, 男, 44 岁, 副研究员 研究方向 生物无机化学及分子有序膜。

2 结果与讨论

2.1 FT-IR 光谱

图 1 B ~ E 为不同反应摩尔比的系列 BSA-CaCO₃ 反应滤液水化膜的显微红外光谱, 与纯 BSA 溶液(图 1A)相比, 总体形状虽然相似, 但有所变化, 主要谱带频率列于表 1a 部分。可以观察到: (1)位于 3290cm⁻¹ 的 BSA 的 NH 伸缩振动谱带在滤液水化膜中位移至 ~3299cm⁻¹, 酰胺 III 带 (~1302cm⁻¹) 和 ~1396cm⁻¹ 的 COO⁻ 振动谱带也移向高频; (2) 酰胺 I、II 带位置变化不大, 但从图 1 B ~ C, 半峰宽逐渐减小, 变得较为尖锐, 且相对强度之比 (I / II) 总体呈增加趋势; (3) 当反应摩尔比达 1: 13000 时, 1349 ~ 1540cm⁻¹ 区间谱带强度大大增加, 明显地观察到与碳酸钙 C-O 不对称伸缩振动有关的较强的特征峰 (1442cm⁻¹), 与纯碳酸钙相比 (1448cm⁻¹), 发生了位移, 它的出现预示着碳酸钙在 BSA 溶液中溶解度的增加。上述谱带的变化表明水溶液中 BSA 与碳酸钙之间存在着较强的相互作用, 主要发生在 CO、CN、NH、COO⁻ 等极性基团之间。

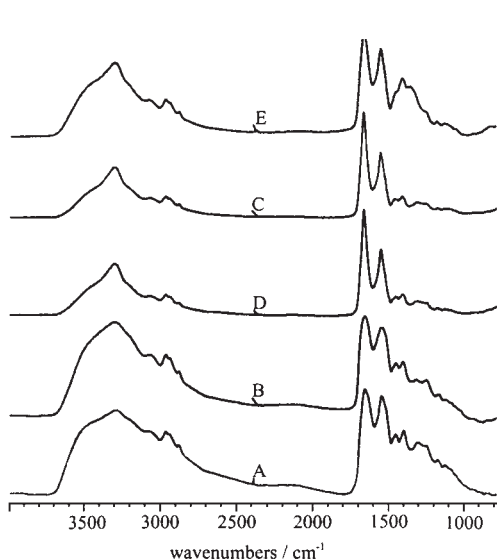


图 1 滤液水化膜的显微红外光谱

Fig. 1 FT-IR spectra of filtrates by hydration film

A: BSA by hydration film

B ~ E: The initial ratios of BSA to calcium carbonate are 1: 13, 1: 130, 1: 1300, 1: 13000

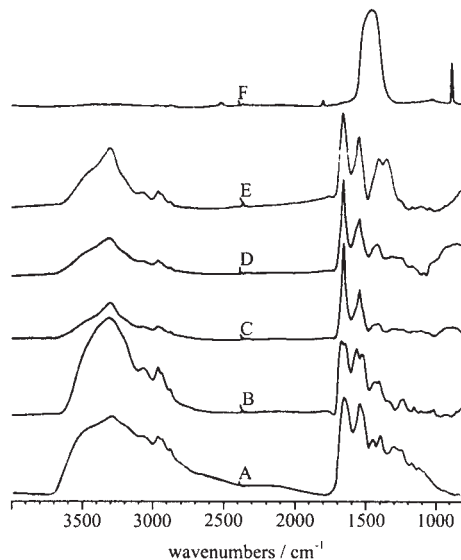


图 2 滤液水化膜的红外光谱差谱

Fig. 2 FT-IR subtraction spectra of filtrates by hydration film

A: BSA by hydration film

B ~ E: The initial ratios of BSA to calcium carbonate are 1: 13, 1: 130, 1: 1300, 1: 13000

F: calcium carbonate(s)

2.2 红外减谱

为了详细了解 BSA 与碳酸钙的相互作用对彼此微观结构的影响, 我们采用了红外光谱减法技术。图 2 为反应滤液与 BSA 溶液水化膜的红外光谱减谱, 主要光谱数据见表 1b 部分。在减谱中可以看到, BSA 和碳酸钙的特征谱带均发生很大的变化。BSA 谱带的变化主要表现在: (1) 酰胺 I 带和 II 带在反应摩尔比为 1: 13 或 1: 130 时分裂为双峰; (2) N-H 振动频率已由 3290 cm⁻¹ 移动至 3304 ~ 3313cm⁻¹; (3) COO⁻ 振动谱带已由 1396cm⁻¹ 移动至 1410cm⁻¹ 附近。碳酸钙谱带的变化主要表现在: (1) 在图 1B ~ E 均难以观察到位于 878cm⁻¹ 区间的碳酸钙 O-C-O

表 1 滤液水化膜红外光谱及其差谱的主要谱带频率
Table 1 Main Frequencies of Filtrates by Hydration Film in FT-IR Spectra cm⁻¹

samples		frequencies / cm ⁻¹							
BSA (hydration film)		3290	1653	1542	1450	1396	1302	1247	
initial mole ratios of BSA to calcium carbonat	1: 13	3299	1652	1539	1450	1401	1314	1246	
	1: 130	3302	1657	1545	1453	1401	1309	1246	
	1: 1300	3298	1657	1545	1448	1401	1307	1246	
	1: 13000	3298	1655	1544	1442	1400	1349		
calcium carbonate(s) assignment	1: 13	3313	1670	1644	1565	1529	1439	1408	1236
	1: 130	3304	1662	1654	1541			1419	1312
	1: 1300	3305	1657		1543			1404	1313
	1: 13000	3306	1656		1544			1405	1349
						1448			878
		NH	amide I	amide II	CO	COO ⁻	amide III	O-C-O	

Note: a: FT-IR spectra; b: FT-IR subtraction spectra.

面外弯曲振动谱带,而在图 2 中该谱带已清晰可见,与纯碳酸钙相比,该峰出现在较低的频率。其峰位不仅随反应摩尔比的减小逐渐向低波数(868 → 827cm⁻¹)移动,而且相对强度也总体随着相应增加。表明 BSA 与碳酸钙的作用一方面使 O-C-O 基团的存在形式发生了变化,另一方面导致碳酸钙的水溶性增强;(2)纯碳酸钙的 C-O 不对称伸缩振动谱带位于 1448cm⁻¹,与 BSA 的 CO 振动谱带叠合在一起。在图 2A 中,我们可以观察到分别位于 1450cm⁻¹ 和 1396cm⁻¹ 处 BSA 的 CO 和 COO⁻ 两个振动谱带;而在图 2B-C 中,由于碳酸钙的加入,此两峰的界限逐渐模糊,最后合并为单峰,并向低频移动(1419 ~ 1404cm⁻¹),其强度呈逐渐增加之势。在图 2 E 中,该峰已很强,并出现了 1349cm⁻¹ 的低频新峰。该区间谱带强度的增加、峰形的改变主要是 BSA 与碳酸钙间的相互作用以及更多的碳酸钙溶解在水中而引起的。上述分析表明,在反应滤液中,BSA 与碳酸钙之间的强烈相互作用是复杂多样的,两者的作用方式既可能有 BSA 的 C=O、C-N 等基团与 Ca²⁺ 的配位以及 N-H、COOH 等基团与碳酸钙 CO 或 OCO 之间的氢键结合,又可能有 Ca²⁺ 与蛋白质的阴离子基团(COO⁻)、CO₃²⁻ 与蛋白质的阳离子基团(-NH₃⁺) 的静电吸引等。比较图 2 B ~ E 可知,随反应摩尔比的不同,两者相互作用的程度有所不同,其微观结构也随着改变。

2.3 ICP-AES 分析

利用 ICP-AES 法测定了反应滤液中 Ca²⁺ 的含量(见表 2),远大于其在饱和水溶液中的浓度。显而易见,BSA 与碳酸钙的作用使碳酸钙在水溶液中的溶解度大大增加。我们推测,碳酸钙不可能完全以游离态的 Ca²⁺ 进入水中,可能主要是以与 BSA 结合的形式存在,也可能形成水溶性复合物、部分吸附于 BSA,或许还有少量以超微粒子的形式溶解于水中,这有待于进一步的研究确定。表 2 还显示,滤液中 Ca²⁺ 的含量随反应摩尔比的减小而增大,因此滤液中 BSA 与碳酸钙的比例也随着变化,组成不定,表现出与生物矿化产物类似的性质。

表 2 滤液中 Ca²⁺ 浓度的测定
Table 2 Determination of the Concentration of Calcium Ion in Filtrates

samples	saturation solution	initial ratio of BSA to calcium carbonate			
	of CaCO ₃	1: 13	1: 130	1: 1300	1: 13000
concentration of Ca ²⁺ / (mmol · L ⁻¹)	0.0529	4.47	5.24	6.25	12.3

另外,我们还利用紫外和紫外二阶导数谱对反应滤液进行了分析。发现碳酸钙的存在使

BSA 的芳香族残基(主要是酪氨酸 Tyr)的微环境受到扰动。对滤液水化膜红外光谱中 BSA 的酰胺 I 带进行二阶导、退卷积及曲线拟合处理,结果表明,蛋白质的二级结构明显改变, α -螺旋结构的含量大大增加,蛋白质的有序性增强,这些已另文报道。

综上所述,水溶液中蛋白质与碳酸钙之间存在着多重复杂的相互作用和多种形式的结合,这对于生物矿化过程的发生和顺利进行具有极为重要的意义:一方面可以使碳酸钙在蛋白质构成的基质表面成核,为碳酸钙的进一步析出与自组装创造条件;另一方面又可以增大碳酸钙的水溶性,控制结晶速度,防止无定形沉淀的产生;同时还可以使蛋白质的有序程度增加,这些均将有利于生物矿物高度有序结构的形成。可见,蛋白质与碳酸钙的特殊结合在生物矿化过程中起着诱导和调控生物矿物形成的作用。

参 考 文 献

- [1] Xu Y., Chen Y. et al *Appl. Magn. Reson.*, **1990**, **5**(2), 283.
- [2] CHEN Ding-Yi(陈定一), WANG Jing-Zhu(王静竹), XUE Lan(薛 岚) et al *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*(*Crude Product Research and Development*), **1990**, **2**(3), 10.
- [3] SHEN Yu-Hua(沈玉华), XIE An-Jian(谢安建) *Dongnan Daxue Xuebao*(*Journal of Southeast University*), **1998**, **28**(6), 182.
- [4] CHUI Fu-Zhai(崔福斋), FENG Qing-lin(冯庆玲) Ed. *Biomaterials*(*生物材料学*), Beijing: Science Press, **1996**.
- [5] HU Jia-Ping(胡加平) *Dissertation of Peking Medical University*(*北京医科大学博士学位论文*), **1991**.
- [6] Cooper S. J., Session R. B., Lubetkin S. D. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, **120**, 2090.
- [7] CHEN Rong(陈 荣), HANG Wang-Shu(韩万书), WANG Kui(王 夔) *Huaxue Jinzhan*(*Progress in Chemistry*), **1999**, (11), 217.
- [8] Calvert P., Mann S. *Nature*, **1997**, **386**, 127.
- [9] SHEN Yu-Hua(沈玉华), YANG Zhan-Lan(杨展澜), WU Jin-Guang(吴瑾光) *Wuli Huaxue Xuebao*(*Acta Physico-Chimica Sincia*), **1999**, **15**(12), 1064.
- [10] SHEN Yu-Hua(沈玉华), YANG Zhan-Lan(杨展澜), XIE An-Jian(谢安建) et al *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi*(*Spectroscopy and Spectral Analysis*), **2000**, **20**(6), 781.

Study on Interactions between BSA and Calcium Carbonate in Saline Solution

XIE An-Jian SHEN Yu-Hua ZHANG Sheng-Yi XIE Fu-Xin

(College of Chemistry and Engineering, Anhui University, Hefei 230039)

In this paper, Fourier transform infrared spectroscopy and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry were used to study the filtrates produced by reactions of different initial mole ratios of bovine serum albumin (BSA) and calcium carbonate (CaCO_3) in saline solution. The results demonstrated that there were strong interactions between BSA and calcium carbonate by hydrogen bonds or coordination or electrostatic attraction, which made the solubility of calcium carbonate in aqueous solution increased and the microstructure of BSA and CaCO_3 changed. The interaction helped to form biomineral containing protein and CaCO_3 in organism.

Keywords: bovine serum albumin calcium carbonate interaction
 biomineralization