

牛血清白蛋白 Langmuir 膜控制方解石形成取向生长的球形微晶

薛中会 戴树玺 张兴堂 李蕴才 黄亚彬 杜祖亮*

(河南大学特种功能材料省重点实验室, 开封 475001)

摘要: 本文以生物矿化模型系统为基础, 利用 LB 技术, 采用本体交换的方法, 制备了牛血清白蛋白(BSA)Langmuir 膜, 以更加接近生物矿化的方法研究了 BSA Langmuir 膜对碳酸钙晶体生长的取向、形貌和晶型的控制作用。XRD 分析表明晶体为碳酸钙的方解石晶型, 且晶体仅沿(104)晶面有取向生长。SEM 分析表明结晶初期碳酸钙以球状的晶体存在, 随着时间的延长, BSA 对晶体形貌的控制作用逐渐减弱, 直到完全不起作用, 在结晶后期形成菱形晶体, 但晶体生长取向和晶型始终没有发生变化。说明 BSA Langmuir 膜对碳酸钙的生长取向、晶型和形貌有较好的控制作用。

关键词: Langmuir 膜; 牛血清白蛋白; 取向生长; 方解石

中图分类号: O614.23*1

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2006)06-1049-06

Oriented Global Calcite Microcrystal Controlled by BSA Langmuir Film

XUE Zhong-Hui DAI Shu-Xi ZHANG Xing-Tang LI Yun-Cai HUANG Ya-Bin DU Zu-Liang*

(Key Lab for Special Functional Material, Henan University, Kaifeng, Henan 475001)

Abstract: LB (Langmuir-Blodgett) technique was used to prepare the BSA Langmuir film. The influence of bovine serum albumin (BSA) on the polymorph, morphology and growth orientation of calcium carbonate was studied in the process of the biomineralization. XRD and SEM were used to characterize the polymorph, growth orientation and morphology of the crystal induced by BSA Langmuir film. The results of XRD show that the calcium carbonate initially formed has only one diffraction peak due to the (104) crystal plane of calcite; the calcium carbonate shows two diffraction peaks corresponding to the (104) and (208) crystal planes of calcite with time, indicating a well oriented face and a stable polymorph under the BSA Langmuir film. SEM shows that the calcium carbonate manifests different morphologies at different time. In the beginning of crystallization, the global calcite microcrystal came into being, subsequently, with gradually reduction in the action of BSA, the calcium carbonate change rhombohedral calcite microcrystal from the global microcrystal; in the end, all the crystal manifest rhombohedral shape. All results suggest that BSA Langmuir film can be used as a template to promote the calcium carbonate to form oriented global calcite microcrystal.

Key words: Langmuir film; bovine serum albumin; oriented growth; calcite

生物矿化是生物界广泛存在的现象。至今为止, 已经在生物体中发现 60 多种生物矿物材料, 这些生物材料在不同尺寸上分级组装和有序排列, 形成特定结构, 从而具有特别的物理性能^[1,2]。近 20 年来, 作

为和生物矿化联系较为密切的两个课题——分子识别、有机/无机材料相互作用, 得到了较广泛的研究^[3-5]。利用生物矿化方法合成纳米和微米尺寸取向生长和分级有序的晶体材料, 而且具有更高的硬度、

收稿日期: 2006-02-20。收修改稿日期: 2006-04-20。

国家自然科学基金(No.90306010&20371015)和教育部新世纪人才支持计划资助项目。

*通讯联系人。E-mail: zld@henu.edu.cn; Tel&Fax: 0378-2867282

第一作者: 薛中会, 男, 31 岁, 河南理工大学讲师, 博士研究生; 研究方向: 生物矿化和仿生合成。

更好的生物、环境相容性的生物材料逐渐成为材料合成的一种趋势^[6-9]。目前研究蛋白质对晶体形貌、生长取向和晶型的控制作用,一般采用蛋白质和晶体的过饱和溶液混溶的方法。该方法和生物体的实际情况相差甚远,不利于对生物矿化真实过程的模拟研究和在位的观测。著名的生物矿化和仿生纳米材料学家,英国 Bristol 大学 Mann 教授曾指出,生物矿物通常在有机模板如生物大分子框架、脂膜或细胞壁表面合成^[10]。Langmuir 膜具有半双磷脂膜结构,与生物膜具有类似的结构形态。利用 Langmuir 膜作为生物矿化模板,更接近生物体的矿化条件,对了解生物矿化过程以及制备新型结构功能材料都具有重要意义。

碳酸钙是一种重要的生物材料,是贝壳、珍珠、牡蛎和蛋壳等的主要成分^[11,12]。蛋白质在碳酸钙的成核、生长及其组装过程中起着重要作用^[13,14],更为重要的是蛋白质对碳酸钙的控制作用是形成不同结构和取向生物材料的基础。因此,采用接近生物体系的方法来研究蛋白质对碳酸钙晶体结构和形貌的影响,对了解生物矿化机理和利用生物矿化方法来制备具有新颖结构的功能材料有重要的作用^[15-20]。在本工作中,利用更加接近生物体系的牛血清白蛋白(BSA)Langmuir 膜作为模板,在位诱导生长了碳酸钙晶体。系统研究了 BSA Langmuir 膜对碳酸钙晶体形貌、取向和晶型的控制作用,结果发现在 BSA Langmuir 膜影响下初始阶段碳酸钙形成球状方解石微晶,晶体形貌随时间有显著的变化,最后形成菱方形方解石微晶。

1 实验部分

1.1 试剂及样品的制备

BSA 为天津正江高科技有限公司的产品,电泳纯试剂;碳酸钙为上海市化学试剂厂生产的分析纯试剂;氯化钠为分析纯试剂;去离子水为实验室自制的三次蒸馏后的去离子水;所用 LB 槽为实验室自制的微型 LB 槽,所有程序全部实现计算机控制。

将 0.5 g 的 BSA 溶于 1 000 mL 质量分数为 0.9% 的 NaCl 水溶液中,待 BSA 完全溶解后,缓慢倒入 LB 槽中,保持约 3.5 h 左右,BSA 通过吸附达到平衡,利用本体交换(所谓本体交换是指将 BSA Langmuir 膜下没有吸附的 BSA 溶液和要作为亚相的无机相溶液用 2 个蠕动泵同时进行交换,一个蠕动泵从膜下抽取没有吸附的 BSA 溶液,另外一个蠕

动泵向膜下泵入无机相溶液,在交换的过程中保持 Langmuir 膜不受干扰)的方法先将去离子水和 BSA Langmuir 膜下没有吸附的 BSA 溶液进行交换,然后将碳酸氢钙过饱和溶液与去离子水亚相交换(所用的本体交换器为 2 个型号完全相同的蠕动泵,交换时设定相同的泵入和泵出速率,并且交换速率极其缓慢,所用时间皆为 24 h)。待交换完毕后,分别保持 0 h、12 h、1 d、2 d、3 d 和 4 d,然后提膜,将不同生长时间的晶体转移至亲水玻璃基底上,温度保持在 25 ℃。提 2~3 个样品,用于 X 射线粉末衍射仪(XRD)和扫描电子显微镜(SEM)表征。所有实验结果都在相同的条件下重复 4 次。

1.2 SEM 和 XRD 表征

形貌采用 JSM-5600LV 型扫描电子显微镜(日本电子株式会社)进行表征,扫描电压为 30 kV,样品喷金后进行扫描。XRD 光谱采用 X'Pert Pro MPD 型 X 射线粉末衍射仪(荷兰飞利浦)测试,扫描步长为 $0.040^{\circ} \cdot s^{-1}$,扫描的角度范围 $20^{\circ} \sim 80^{\circ}$ 、电压为 40 kV、电流为 40 mA,测试时先把拉在亲水玻璃片上的样品作干燥处理。

2 结果与讨论

2.1 蛋白质吸附交换曲线分析

如图 1 所示为 BSA 在 LB 槽中吸附达到平衡的曲线(曲线 1)和在交换过程中保持平衡的曲线(曲线 2)。从交换吸附曲线可以看出 BSA 吸附达到平衡状态所用的时间约为 3.5 h 左右;另外,在用去离子水和蛋白质交换的过程中以及去离子水和碳酸氢钙过饱和溶液交换的过程中 BSA Langmuir 膜的表面压

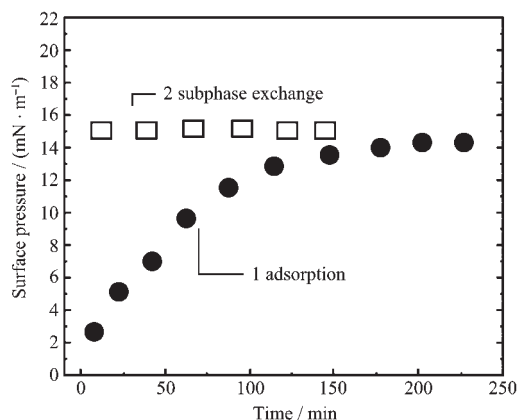


图 1 蛋白质吸附曲线和交换过程中的平衡曲线

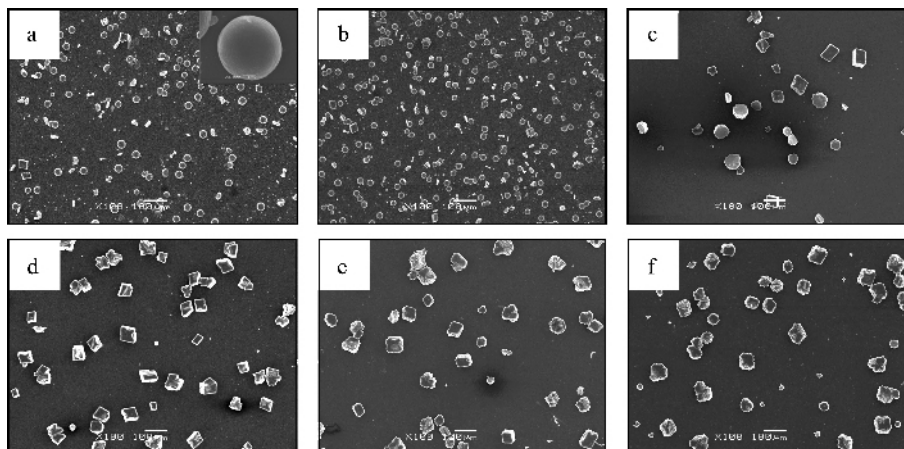
Fig.1 Curve of adsorption and subphase exchange of bovine serum albumin

力没有发生变化。这说明 BSA 的吸附是一个不可逆过程,为制备 BSA Langmuir 膜提供了实验上的保证。

2.2 SEM 分析

图 2 是不同结晶时间形成的方解石的 SEM 图。可以看出晶体的形貌对生长时间有很大的依赖关系。图 2a 为交换完毕时形成的晶体的形貌图,可以看出碳酸钙形成尺寸均匀且单分散的球形方解石晶体(见图 2a 插图)。图 2b 为在 BSA Langmuir 膜诱导下结晶 12 h 的 SEM 图,出现球形晶体和极少量菱方形晶体。图 2c 是在 BSA Langmuir 膜下,碳酸钙结晶 1 d 的形貌,晶体基本保持结晶 12 h 的形貌,即球形和菱方形,但晶体的尺寸明显大于结晶 12 h 的样品,而且在晶界处晶体有部分缺陷出现。图 2d 为保持 2 d 时形成的碳酸钙的形貌,从图中可以看出

菱方形晶体的数量远大于球形微晶的数量,说明 BSA 控制形貌的作用逐渐减弱。图 2e 是结晶 3 d 样品的 SEM 图,可以看出晶体的形貌呈现不很规则的菱方形的方解石晶体,说明 BSA 的控制作用已经变得很弱。图 2f 是结晶 4 d 的样品的形貌图,SEM 表明晶体的形貌基本上都变成菱方形。对比实验表明,无膜诱导时碳酸钙的结晶呈现不规则形状,而在其他一般二嗜性分子形成的 Langmuir 膜(如脂肪酸 Langmuir 膜)诱导下一般形成三角形晶体^[21]。显然本工作中所观察到的晶体形貌从球形到菱方形的逐渐变化是 BSA 参与的直接结果。在初期阶段,晶体生长由于受到 BSA Langmuir 膜的控制,晶体的形貌呈现规则的球形,随着结晶时间的延长,BSA 对形貌的控制作用越来越弱,直到 BSA 对形貌的控制作用完全消失,形成菱方形晶体。



a: 0 h, b: 12 h, c: 1 d, d: 2 d, e: 3 d, f: 4 d

图 2 BSA 诱导不同时间的方解石的 SEM 照片

Fig.2 SEM images of the as-synthesized calcite at different time

2.3 XRD 分析

图 3a、3b 分别为在 BSA Langmuir 膜诱导下结晶 0 h 和 12 h 的样品的 XRD 图。从图 3a 中可以看出,交换完毕即有晶体生成,XRD 表明在 BSA Langmuir 膜控制下形成的晶体为碳酸钙的方解石晶型,而且形成的晶体沿(104)面取向生长;图 3b 显示,结晶 12 h 形成的晶体仍为碳酸钙的方解石晶型,XRD 图保持单一(104)面的衍射峰。图 3c、3d、3e 和 3f 分别是 BSA Langmuir 膜控制结晶 1 d、2 d、3 d 和 4 d 的样品的 XRD 图。从中可以看出,当晶体结晶 24 h 后,形成的晶体除了在(104)晶面处出现衍射峰外,在(208)晶面处出现了较高级的衍射峰,由于(104)晶面和(208)晶面属于同一晶面族,所以 BSA Langmuir 膜控制下形成的晶体是沿单一的晶面成核生长的。

这与脂肪酸 Langmuir 膜诱导下一般以单一晶面成核、但在生长过程中形成多晶面完全不同^[21]。总之,衍射图表明 BSA Langmuir 膜对碳酸钙晶体生长方向和晶型有很好的控制作用。

目前,关于 Langmuir 膜诱导无机盐矿化的作用机制,尚没有统一的认识。通常认为在此过程中有多种因素起作用。蛋白质对生物矿物的调控机制主要包括以下几个方面:静电作用、几何匹配、立体化学结构互补、氢键相互作用和协同效应等^[13]。蛋白质在调控晶体生长时,通过一级结构以及氢键和晶体发生静电相互作用,通过二级结构的改变来满足几何匹配和空间立体化学互补^[22,23]。

从不同结晶时间样品的 SEM 和 XRD 可以看出,碳酸钙晶体在 BSA 的影响下,形貌先以单一取

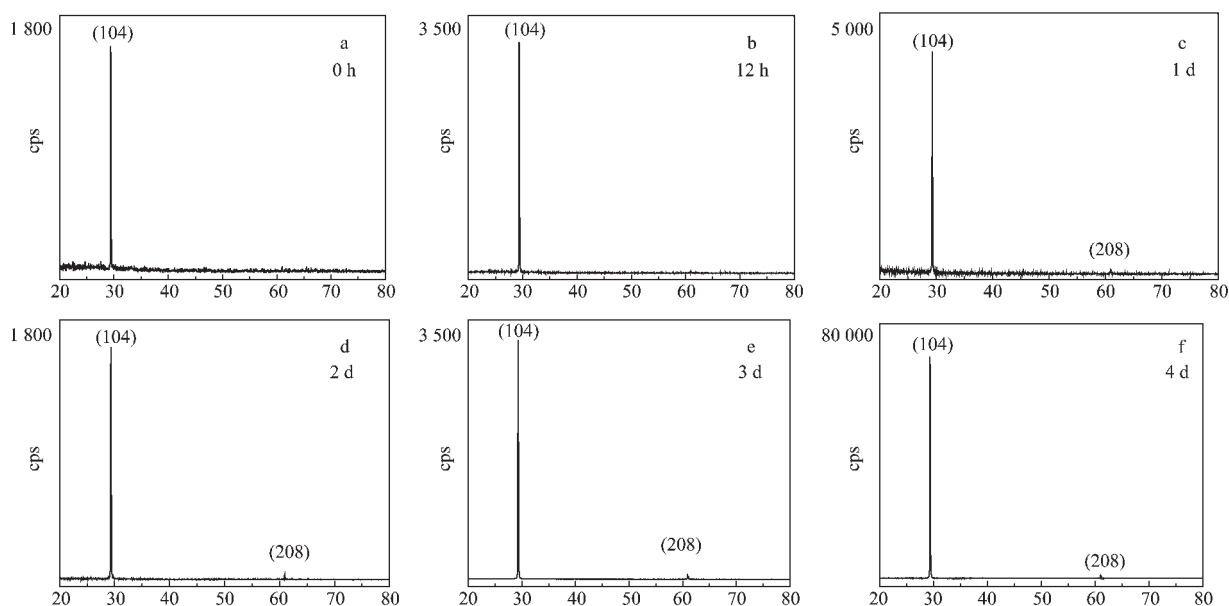


图 3 不同结晶时间形成的样品的 XRD 图

Fig.3 XRD patterns of the as-prepared at different time

向球状方解石晶型存在,最后形成沿(104)晶面取向生长的菱方形方解石晶体。在整个结晶过程中,形貌经历了一个连续变化,而晶体的生长取向始终保持单一取向。分析认为,BSA Langmuir 膜在方解石生长过程中同时起到骨架和基质的作用,BSA 作为一种可溶性蛋白,通过吸附在气液界面成膜,同时自身的二级结构发生了变化^[24],二级结构中同时存在极性基团和非极性基团,极性基团深入亚相中作为成核的位点,非极性基团处在气液界面表面作为成核位点框架。在 BSA 的二级结构基础之上,深入亚相的极性基团和亚相中的钙离子先通过静电吸引形成双电荷层,其次,BSA Langmuir 膜的二级结构和方解石的晶格通过几何匹配和立体化学结构互补选择性地促进方解石晶体(104)面的成核和生长,抑制碳酸钙其他晶型和方解石其他晶面的生长,并且最终通过二者之间的分子识别形成特定取向的(104)晶面;因此 BSA Langmuir 膜促进了方解石(104)晶面的生长,同时伴随着对其他晶面和晶型的抑制,从而形成具有特定取向和晶型的材料。

3 理论分析与讨论

在生物矿化的过程中,蛋白质通过吸附到晶体或者晶核表面起作用。在溶液中有吸附物质存在时,由于吸附,表面张力将会发生变化,Gibbs' general 变化时经典的吸附理论公式是^[25],

$$Q = -\frac{C}{RT} \cdot \frac{d\gamma_{CL}}{dC} \quad (1)$$

公式中 Q 是吸附蛋白质的量, C 是溶液中溶质浓度, γ_{CL} 是晶体和液体界面的界面张力。该公式表明当有吸附分子存在时,界面张力将变小,使得成核能降低,晶体成核变得更加容易^[25]。当溶液中的无机相在 BSA Langmuir 膜表面成核时,亦可以用该公式解释: Q 是 BSA Langmuir 膜的量; C 是 BSA Langmuir 膜/溶液界面处的溶液中溶质的浓度,即碳酸氢钙的浓度; γ_{CL} 是碳酸钙和液体界面的界面张力。由于吸附蛋白质界面附近的 C 是不断增大, Q 是一个固定的量,界面张力将减小,使得碳酸钙的成核能降低,同时蛋白质和晶体之间的协同作用,也使得表面自由能降低,碳酸钙晶体的成核变得更加容易,因此,吸附到 BSA Langmuir 膜表面的无机离子在结晶的过程中和表面的蛋白质进行选择,从而使特定的晶面得到了选择。这种现象还可以从广义的异相成核理论来解释,见公式(2)^[25]。

$$\Delta G_{het} = \Phi \Delta G_{hom} \quad (2)$$

ΔG_{het} 是异相成核所需的自由能, ΔG_{hom} 是均相成核所需的自由能。 Φ 是小于 1 的参数因子。该公式表明, 当有外来的物质在溶液中或者外来物质以界面的形式存在时,异相成核比均相成核容易,这样就可以促使更多晶核产生。BSA Langmuir 膜的存在不但满足了外来物质存在的条件,而且还是一个非常

好的超分子界面,从而为晶体的生长提供了非常好的超分子模板。

综合以上理论的分析,认为蛋白质 Langmuir 膜作为一个有效的成核模板,诱导和控制了碳酸钙晶体的成核和生长,总的来讲可以用有机/无机界面的模板诱导和控制理论 (Template Inducing and Controlling)来解释我们的实验现象,见公式(3)和(4)^[13]。

$$\Delta G_N = 16\pi(\Delta G_i)^3 / (3\Delta G_B) \quad (3)$$

$$\Delta G_B = KT \ln S \quad (4)$$

ΔG_N 是晶体成核的活化能,在此代表方解石晶体成核的活化能; ΔG_i 是指当有新相从亚稳态过饱和溶液中析出时,形成界面所需要的能量,在此代表方解石晶体从碳酸氢钙过饱和溶液中析出时,形成新界面所需要的能量; ΔG_B 作为过饱和度 S 的函数是晶核积聚键合时释放出来的能量,同理在此 ΔG_B 是碳酸氢钙溶液过饱和度 S 的函数,代表了方解石晶核积聚键合时释放出来的能量。众所周知,一方面 Langmuir 膜的存在,降低了表面的能量。因此使得 ΔG_i 降低,从而 Langmuir 膜的存在造成了异相成核,这一点在公式(2)中已经得到了很好的解释;另一方面 Langmuir 膜是一种有序的分子膜,当该种有序分子集聚体存在于 LB 槽亚相表面时,由于有机/无机识别作用使得 Langmuir 膜下局部环境的亚相也变得有序化,从而使得和晶体晶化相联系的一些物理和化学参数如:过饱和度、静电场、能量、物质的传输发生了变化,尤其重要的是过饱和度的变化直接影响了晶体成核热力学和动力学效应,从而造成 ΔG_B 变大,结果使得晶体成核活化能进一步降低。从而在 BSA Langmuir 膜的诱导下开始成核和生长,随着时间的延长,晶体尺寸逐渐变大,BSA Langmuir 膜的诱导的作用逐渐变弱,晶体生长由经典扩散生长理论来控制。

理论分析表明,BSA Langmuir 膜的存在,浓缩了界面处的钙离子,造成了膜界面局部较高的过饱和度,提高了碳酸钙方解石晶型的成核能力,从而促进和调节了方解石的成核和生长,同时 BSA Langmuir 膜的存在对碳酸钙其他晶型和方解石其他晶面的生长起到一定的抑制作用,这一点和蛋白质的控制作用理论相一致。

4 结 论

综上所述,本文系统研究了在 BSA Langmuir 膜影响下碳酸钙的生长过程,表明在 BSA Langmuir 膜

影响下,初始阶段碳酸钙以球状方解石微晶的形状存在,晶体沿(104)晶面取向,并且在 12 h 以前晶体始终保持单一的取向,其他晶面的生长得到抑制;随着结晶时间的延长,晶体的形貌经历了一个不断变化的过程,最后形成菱形方解石微晶。由于(104)晶面和(208)晶面属于同一晶面族,所以(208)晶面衍射峰的出现仅仅是同一晶面族较高级衍射,晶体取向没有发生变化。这些说明,在 BSA 和碳酸钙晶体之间存在着复杂的相互作用,通过该相互作用,BSA Langmuir 膜实现了对碳酸钙生长取向和晶型的控制,可望为制备新型结构功能材料提供一种尝试。

参考文献:

- [1] Lowenstam H A. *Science*, **1981**,**211**:1126~1131
- [2] Mann S. *Biomaterialization Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*. Oxford: Oxford University Press, **2001**.6~23
- [3] Heuer A H, Fink D J, Laraia V J, et al. *Science*, **1992**,**255**:1098~1105
- [4] Mann S, Archibald D D, Didymus J M, et al. *Science*, **1993**,**261**:1286~1292
- [5] Bunker B C, Rieke P C, Tarasevich B J, et al. *Science*, **1994**,**264**:48~55
- [6] Nicholas A P, Robert L. *Science*, **1994**,**263**:1715~1720
- [7] Amir B, Dong J A, Anna L, et al. *Science*, **1995**,**269**:515~518
- [8] Davis M E. *Science*, **2004**,**305**:480~480
- [9] Hunter G K. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, **1996**,**158**:430~435
- [10] FEING Qing-Ling. *J. T. Singhua. Univ.(Sci. & Tech.)*, **2005**,**45**:378~383
- [11] XIE An-Jian(谢安建), SHEN Yu-Hua(沈玉华), MAO Jian-Qiang(郭建强). *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi(Spectroscopy and Spectral Analysis)*, **2001**,**21**(3):347~349
- [12] Berman A, Addadi L, Weiner S. *Nature*, **1988**,**311**(11):546~548
- [13] Mann S. *Nature*, **1988**,**332**:119~124
- [14] Belcher A M, Wu X H, Christensen R J, et al. *Nature*, **1996**,**381**:56~58
- [15] SHEN Yu-Hua(沈玉华), YANG Zhan-Lan(杨展澜), WU Jin-Guang(吴瑾光), et al. *Wuli Huaxue Xuebao(Acta Physico-Chemistry)*, **1999**,**15**(12):1064~1069
- [16] 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):781~784
- [17] ZHANG Qun(张群), SHEN Yu-Hua(沈玉华), XIE An-Jian(谢安建), et al. *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi(Spectro-*

- scopy and Spectral Analysis*), **2002**,**22**(2),267~269
- [18]Fan Y W, Cui F Z, Ge J. *Single Molecules*, **2001**,**2**(2):121~124
- [19]Nayar S, Sinha A. *J. Mater. Sci. Lett.*, **2003**,**22**:167~170
- [20]Becker A, Becker W, Marxen J C, et al. *Z. Anorg. Allg. Chem.*, **2003**,**629**:2305~2311
- [21]Mann S, Heywood B R. *Chem. Mater.*, **1994**,**6**:311~318
- [22]Reeves N J, Evans J S. *J. Phys. Chem.*, **1997**,**101B**:6665~6669
- [23]Gotliv B A, Addadi L, Weiner S. *Chem. Biochem*, **2003**,**4**:522~529
- [24]Sánchez-González J, Ruiz-García J, Gálvez-Ruiz M J. *J. Colloid Interface Sci.*, **2003**,**267**:286~293
- [25]Combes C, Rey C. *Biomaterials*, **2002**,**23**:2817~2823