

牛血清白蛋白 LB 膜诱导方解石的生长

贾秀玲 薛中会 胡彬彬 王海威 戴树玺 张兴堂 杜祖亮*

(河南大学特种功能材料教育部重点实验室, 开封 475004)

摘要: 采用模拟生物矿化的方法, 研究了牛血清白蛋白(BSA) LB 膜对碳酸钙晶体成核和生长的诱导控制作用。XRD、SEM 结果表明: 在 BSA 单层 LB 膜诱导下, 形成形状规则、边缘清晰的多层盘状方解石晶体, 且沿(104)晶面取向生长。说明牛血清白蛋白(BSA) LB 膜对碳酸钙的形貌、生长取向性有很好的调控作用。

关键词: LB 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(2008)10-1615-06

Calcite Crystals Growth was Induced by BSA LB film

JIA Xiu-Ling XUE Zhong-Hui HU Bin-Bin WANG Hai-Wei

DAI Shu-Xi ZHANG Xing-Tang DU Zu-Liang*

(Key Lab of Special Functional Materials of Ministry of Education, Henan University, Kaifeng, Henan 475004)

Abstract: The influence and control of the bovine serum albumin (BSA) LB film on the nucleation and growth orientation of calcium carbonate were studied in the process of the biomineralization. The results of XRD show that the crystal grows only along the (104) and (208) faces, indicating a well orientation of calcite; SEM result shows that calcite crystal manifests the clear edge and multilayer disk-like crystal morphology. All the results suggest that BSA LB film can be used as a template to induce and regulate the calcium carbonate to crystallize with a special growth orientation and complex morphologies.

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

生物矿化研究, 涉及生物、化学、医学、材料、地质、物理以及考古等领域, 为人工合成具有特殊结构和功能的晶体材料、生物智能材料和生物相容性材料提供了一种新的思路, 因此引起了各学科研究人员的广泛关注和高度重视。生物矿化区别于一般矿化的显著特征是, 它通过有机大分子和无机离子在界面处的相互作用, 从分子水平控制无机矿物的析出, 从而使生物矿物具有特殊的多级结构和组装方式; 同时, 生物矿化为纳米生物材料的设计加工提供了有效的手段^[1,2]。自然界通常利用有机大分子

来诱导控制具有特定取向、结构和形貌的晶体生长^[3]。受生物矿化的启发, 许多新的利用有机模板合成材料的方法在生物矿化研究和材料科学领域已经取得了巨大的成就^[4-8]。

CaCO₃ 作为一种自然界广泛存在的生物矿物, 是贝壳、珍珠、牡蛎和蛋壳等的主要成分^[9,10], 其矿化过程受到了人们的广泛关注, 在该过程中蛋白质等生物大分子起着重要的作用。蛋白质作为生物基质调控生物矿物的成核和生长, 影响晶体的形貌、尺寸和晶型, 并且控制晶体形成复杂的结构。因此, 采

收稿日期: 2008-03-07。收修改稿日期: 2008-06-02。

国家自然科学基金(No.20371015); 教育部新世纪人才支持计划(No.NCET-04-0653); 河南省教育厅自然科学研究项目(No.2007140001)和河南省科技厅基础与前沿技术研究项目(No.72300420100)资助。

*通讯联系人。E-mail: zld@henu.edu.cn; Tel&Fax: 0378-3881358

第一作者: 贾秀玲, 女, 29 岁, 硕士研究生; 研究方向: 生物矿化和仿生合成。

用接近生物体系的方法来研究蛋白质对晶体的调控作用,对了解生物矿化的机理以及利用仿生的方法制备具有新颖结构的功能材料显得尤为重要^[11-14]。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^[9],LB 膜所具有的物理结构和化学性质与生物膜很相似,具有半层结构,常被用来作为生物膜的模型,蛋白质又是生物膜的主要成分,因此我们采用牛血清白蛋白 LB 膜进行生物矿化的模拟研究具有重要的意义和潜在的应用前景。

在我们以前的研究工作中,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,在位诱导生长了磷酸钙、碳酸钙晶体^[15,16]。发现在蛋白质单层膜诱导下,BSA Langmuir 膜对磷酸钙、碳酸钙的生长取向、晶型和形貌都有较好的控制作用。该方法的优点在于:BSA Langmuir 膜具有类似于生物膜的半层结构,而且具有一定的流动性和柔韧性,这种柔性模板非常接近生物体系的实际情况。但是通过吸附的方法把牛血清白蛋白 BSA 制备成单层膜,需要的时间较长,而且牛血清白蛋白的消耗量太大,成本较高。另外,在本体交换过程中,液体的流动也会对磷酸钙、碳酸钙晶体的生长有很大的扰动,不利于理解 BSA 的真实作用。因此,基于以上几点的考虑,我们在原来的实验基础上改进实验方案,直接利用 BSA 的 LB 膜为模板,研究它对碳酸钙结晶的调控。LB 膜相对于 Langmuir 膜来说是一种固态膜,没有流动性,但是牛血清白蛋白(BSA)是一种柔性蛋白,因而它的 LB 膜在溶液中能调整自身的结构以适应晶体生长的需要^[17,18]。我们期待建立一种较为简单可行的生物膜模型,探索生物矿化中蛋白质对无机材料的作用机理,为合成具有特殊结构的新型功能材料提供一种思路和借鉴。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

牛血清白蛋白(BSA)为美国 Sigma 公司产品,电泳纯试剂;正戊醇为天津市科密欧化学试剂开发中心生产的分析纯试剂;氟硅烷($n\text{-CF}_3(\text{CF}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ (FAS-17))为日本 Chisso Corporation 公司生产的分析纯试剂;碳酸钙为上海市化学试剂厂生产的分析纯试剂;实验用水均为 Milli-Q 水。

LB 槽(芬兰 KSV-5000Minitrough);扫描电子显

微镜(日本电子株式会社 JSM-5600LV 型);X 射线粉末衍射仪(荷兰飞利浦 X'Pert Pro MPD 型)。

1.2 实验方法

基片的处理:基片依次在水、丙酮、乙醇、水中超声处理 30 min;氮气吹干后放入新配制的 Piranha($V_{\text{H}_2\text{SO}_4}:V_{\text{H}_2\text{O}_2}=7:3$)溶液,90 ℃水浴 8~10 h;取出时氮气吹干,取适量氟硅烷放入 15 mL 小烧杯,用半滴水引发其反应,用保鲜膜密封,保持 12 h;取出在烘箱内恒温 120 ℃处理 1 h。处理后的基片其疏水角度能达到 104 ℃,具有良好的疏水性能。

LB 膜的制备:将 0.335 g 的 BSA 溶于 50 mL 去离子水加入体积比 0.05% 的正戊醇,制得 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 BSA 溶液。以去离子水为亚相,用微量进样器在 LB 槽内铺展 BSA 的水溶液,待水面上正戊醇溶剂完全挥发后(30 min),以 $3\text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度压膜,控制膜压 $15\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$,保持 5 min,然后采用垂直提拉法将单分子膜转移到疏水玻璃基片上,其亲水功能基团朝外(一次提 3 片),提膜速度 $3\text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$,室温 25 ℃。

晶体的生长:配制 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的碳酸氢钙过饱和溶液,取 25 mL 小烧杯 3 个分别倒入适量碳酸氢钙过饱和溶液,待提膜后的基片干燥后分别斜插入小烧杯中。为防止由于溶剂水的挥发而造成体系过饱和驱动晶体形成,用保鲜膜将烧杯密封并用针扎 6 个小孔,生长时间为 20 h。整个实验在一个无尘箱内完成,温度为 $(25\pm 1)\text{ }^\circ\text{C}$ 。

样品的检测:用 XRD 仪对 LB 膜诱导形成的晶体进行物相分析,测试条件为:Cu 的 $K\alpha$ 辐射,扫描速度 $0.080^\circ\cdot\text{s}^{-1}$,扫描范围 $(2\theta)20^\circ\sim 80^\circ$,电压为 40 kV,电流为 40 mA,测试时先把样品做干燥处理。用扫描电镜进行形貌观察,测试条件为:样品先被喷金处理,扫描电压 20 kV。

2 结果与讨论

2.1 牛血清白蛋白(BSA)成膜性能研究

图 1(a)为 BSA 成膜的表面压-面积等温曲线。研究结果表明 BSA 具有很好的成膜性能,从图中可以看出,起始单分子平均面积约 80.6 nm^2 ,说明 BSA 分子(体积为 $4\text{ nm}\times 4\text{ nm}\times 14\text{ nm}$)以肩并肩(单分子面积 56 nm^2)^[19]形式疏松地排列在水面上。当表面压为 $15\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ 时,BSA 单分子平均面积约 16.78 nm^2 ;BSA 分子为面对面紧密排列、直立于水面上,形成致密的单层膜。图 1(b)为此表面压下,牛血清白

蛋白(BSA)在云母基片上的原子力显微图。我们可以看出牛血清白蛋白能在云母片上成均匀致密的单层膜。而且有文献报导^[20]:在室温 25 °C, 10~15 mN·

m⁻¹ 的表面压下 BSA 在疏水玻璃上转移比最大, 能够获得较高质量的 LB 膜, 这为我们下一步工作提供了保证。

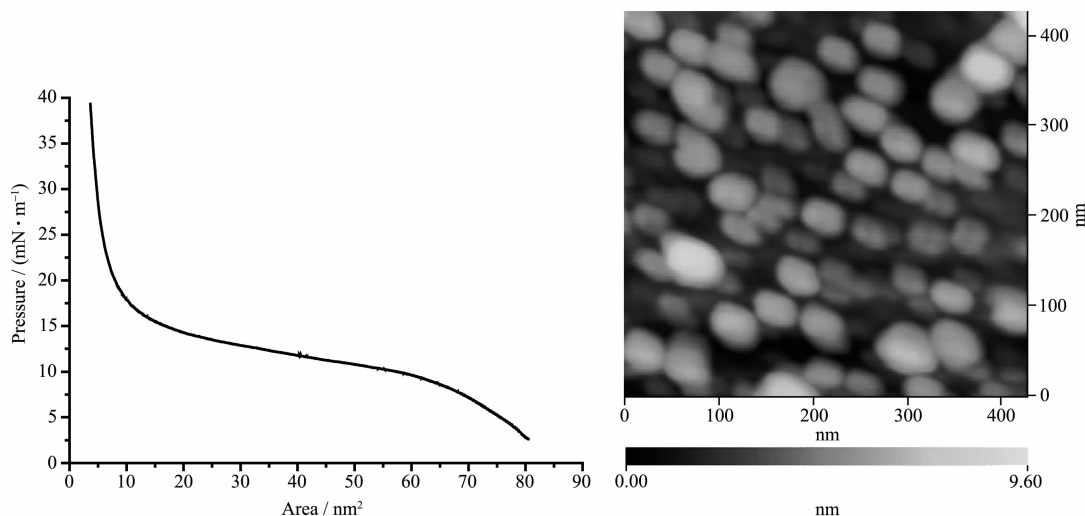


图 1 BSA 成膜的表面压-面积等温曲线(a)和 15 mN·m⁻¹ 下 BSA 在云母片上 AFM 图(b)

Fig.1 BSA isotherm obtained experimentally (a); AFM image of BSA LB monolayer deposited onto a mica substrate (b)

2.2 SEM 分析

图 2a、2b 为无 BSA 膜诱导生长的 CaCO₃ 晶体的 SEM 照片。从图中可以看出晶体形状很不规则。而 LB 膜诱导生长的 CaCO₃ 晶体(图 2c、2d), 形状较规则, 呈多层盘状而且边缘清晰。造成上述差异的主要原因在于: 牛血清白蛋白 LB 膜是两亲性生物大分子, 它的存在既增加了溶质在界面处的局域浓

度, 又会降低一部分表面能垒, 从而有利于减小成核过程中所需要克服的成核活化能^[21], 使诱导晶体生长的时间变短。此外, 在牛血清白蛋白 LB 膜的存在下, 晶核首先在膜界面某一特定位置产生, 随之在有机-无机界面处分子识别的作用下沿膜界面取向生长, 所以生成的晶体形状规则, 尺寸也较大。

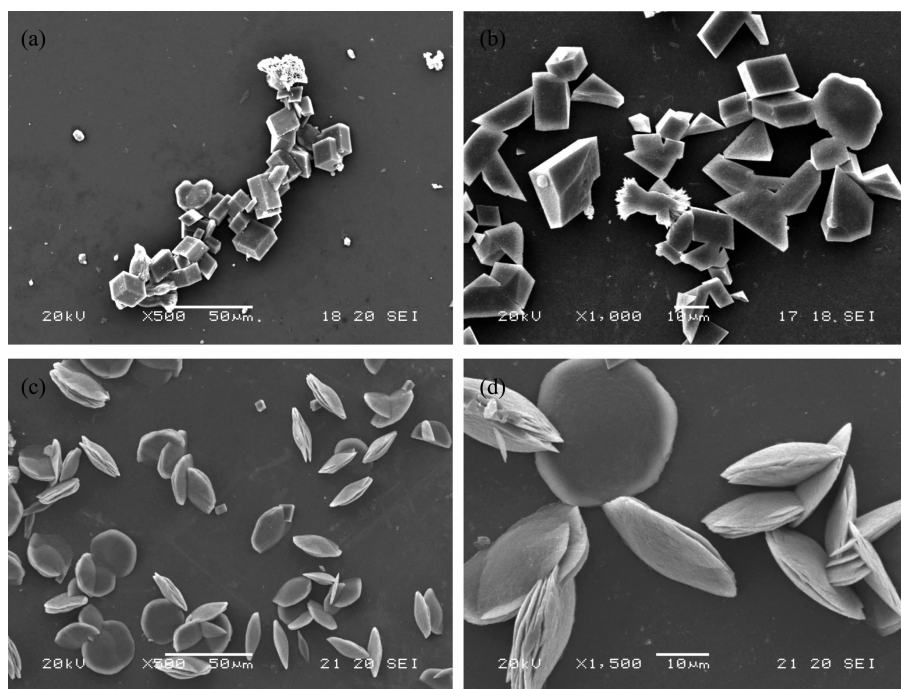


图 2 无膜诱导生长 CaCO₃ 晶体(a,b)和有 LB 膜诱导生长 CaCO₃ 晶体(c,d)的 SEM 照片

Fig.2 SEM images of the as-synthesized calcite at 20 hours without film (a, b) and with film (c, d)

2.3 XRD 分析

图 3a、3b 分别给出了有 LB 膜和无膜诱导生长的 CaCO_3 晶体的 XRD 图。从图 3a 中可看出:在有 LB 单层膜存在的情况下,衍射峰的强度明显比无膜诱导时强; CaCO_3 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,所以在 BSA 的 LB 膜控制下形成的晶体沿单一的晶面取向生长。图 3b 表明,无 BSA LB 膜存在的情况下,晶体出现的衍射峰有若干组,所有的衍射峰都归属于方解石的斜方相,和 PDF:86-2342 标准数据相对应,没有任何取向性。通过对有膜和无膜时的衍射图比较,我们发现 BSA LB 膜对碳酸钙晶体生长方向和晶型有很好的控制作用。

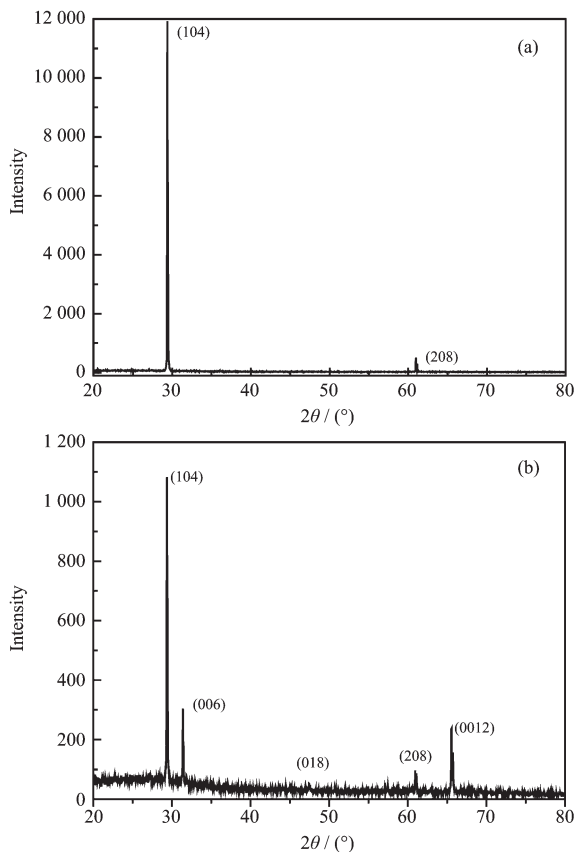


图 3 有膜(a)和无膜(b)诱导碳酸钙晶体生长的 XRD 图
Fig.3 XRD patterns of the crystal induced with film (a) and without film (b)

3 分析与讨论

在生物矿化过程中,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、晶格匹配、立体化学结构互补、氢键相互作用和协同效应等^[21]。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晶格匹配和空间立体化学互补^[22,23]。

从无膜、有膜样品的 SEM 和 XRD 图可以看出,碳酸钙晶体在牛血清白蛋白 BSA 的影响下,以形貌规则的多层盘状方解石晶型存在,且沿(104)晶面取向生长。分析认为,BSA 作为一种可溶性双亲大分子蛋白,它的 LB 膜中疏水基团伸向基片,亲水基团伸向溶液,牛血清白蛋白的等电点 $pI=4.7$,碳酸氢钙饱和溶液的 pH 值大约为 6.5~6.8,所以 BSA 带负电,在 LB 膜附近形成带负电的极性区域,由于静电吸引作用, Ca^{2+} 有规则地排布在亲水基附近,同时,蛋白质 LB 膜板在饱和溶液中自身的二级结构也在调整变化^[20],二级结构中存在极性和非极性基团,非极性基团伸向基片,作为成核位点的框架;极性基团伸向溶液,其中极性基团又分为不带电的极性基团和带电的极性基(带正电荷、负电荷两种),带负电荷极性基团会吸引 Ca^{2+} ,带正电荷极性基团也会吸引 CO_3^{2-} ,以上因素造成了膜液界面电荷富集和双电荷层的形成,为晶体的成核提供了保证。

一般来讲,晶体生长的取向性与取向成核紧密相关。晶体的成核率 J_n 受成核自由能垒的控制,这个自由能垒来自于矿物相的过剩自由能。确定成核率的最重要的参数是表面自由能 α ^[24]。

$$J_n = A \exp(-B\alpha^3/\sigma^2) \quad (1)$$

A 和 B 是常数, σ 是溶液的过饱和度。从(1)式中可以看出:当溶液的过饱和度高时,固相成核率不一定最大,相反,当表面自由能最低时固相成核率可能最大^[25]。在方解石成核前期,溶液的过饱和度是相同的。因此,能导致取向成核的唯一因素就是 α 。

牛血清白蛋白 LB 膜的引入提供了一个新的界面,从而引起了 α 变化,促使方解石(104)晶面的成核概率急剧增加。实际上,蛋白质 LB 膜与晶体表面存在复杂的相互作用,我们推测了可能存在的单分子膜控制模式。第一,在和氨基酸表面接触的情况下,由于静电作用和其他非特定相互作用,方解石(104)晶面的界面能可能减小;第二,在(104)晶面和 LB 膜的氨基酸之间的特定立体化学或取向外延关系可能赋予了一种特殊的相互作用,从而促使了各向异性自由界面能的减少;第三,在成核的初期阶段,BSA 和 Ca^{2+} 、 CO_3^{2-} 之间的协同相互作用可能导致牛血清白蛋白 LB 膜的局部重排及二级结构的变化,而 LB 膜中这些有序排列的区域在晶体生长中又起着模板的作用。换句话说,晶体与单分子 LB 膜

二者互为模板。而且,已经有人提出有机单分子膜的结构适应性是模板诱导取向结晶的一个重要特征^[18]。因此,牛血清白蛋白 LB 膜的存在促使方解石晶体沿(104)晶面有较高的取向成核率。

此外,BSA 单层 LB 膜头部基团与 Ca^{2+} 离子某一晶面之间晶格结构之间的匹配关系也是影响取向成核的关键。当 LB 膜的晶格与碳酸钙的某一特定晶面的晶格结构具有相似性,则将大大降低成核过程的活化能,使这个晶面更容易形成,从而导致晶体的取向生长。BSA 单层 LB 膜是一种高度有序的分子膜,研究表明 BSA 在气液界面采取 α -螺旋构象^[26],在 BSA 螺旋结构中, x 代表与螺轴相垂直的方向,2 个相邻螺轴之间的距离为 $a_j=0.58\text{ nm}$, y 代表螺距方向,螺距之间的距离为 $b_i=0.54\text{ nm}$ ^[27]。方解石是六方晶系,晶格常数 a 为 0.498 nm , c 为 1.7018 nm ,其(104)面上 Ca 原子排列成正交晶格结构,Ca-Ca 之间的距离为 $a_i=0.4048\text{ nm}$, $b_i=0.499\text{ nm}$ 。从图 4 比较容易看出:在 x 方向上 $3a_i\approx 2a_j$,失配率为 2%;在 y 方向上 $b_i\approx b_j$,失配率为 8%。另外,由于 BSA 自身结构的适应性可以减小这种失配,使它们在空间尽可能地达到较好的匹配。这种较好的匹配关系使得晶核形成过程中出现选择性并最终导致方解石晶型的选择。

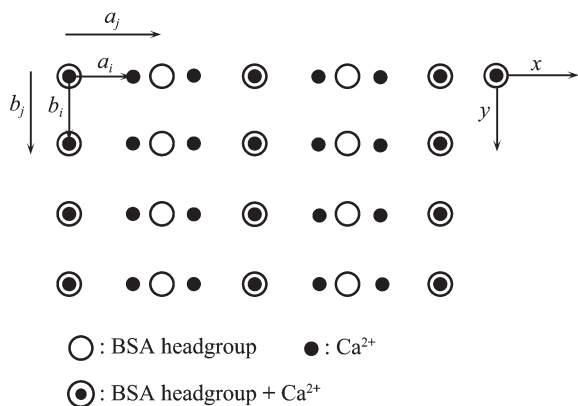


图 4 BSA 单层膜的二维堆积与方解石(104)晶面中 Ca^{2+} 匹配示意图

Fig.4 Schematic of the possible matching between the (104) face of calcite crystal and the headgroups of the LB film

综上所述,我们认为:在方解石成核前期,BSA LB 膜与晶体界面的特殊物理化学相互作用和模板作用^[27]导致在(104)晶面取向成核率较高。同时,在晶体的成核和生长过程中,牛血清白蛋白的 LB 膜的二级也发生了变化以适应晶体生长的需要,它和晶

体互为模板协同作用,通过晶格匹配和立体化学结构互补选择性地促进了方解石晶体(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,从而形成了具有特定取向的多层盘状方解石晶体。因此,水溶性的牛血清白蛋白 LB 膜在碳酸钙晶体生长中具有诱导晶核形成抑制晶体生长的双重功能^[28]。而这种类似于贝壳外表面的多层盘状方解石晶体,为我们探索生物矿化的机理和仿生合成特殊结构和性能的材料提供了一种新的途径。

4 结 论

我们用牛血清白蛋白(BSA)LB 单层膜作为膜板来诱导 CaCO_3 晶体的生长,得到了较大尺寸的多层盘状方解石晶体,该晶体沿(104)晶面取向生长。这些说明 BSA 和碳酸钙之间存在特殊、复杂的相互作用,通过该相互作用,BSA LB 膜实现了对碳酸钙晶体生长和晶型的控制。在 CaCO_3 晶体取向生长过程中,晶体和牛血清白蛋白 LB 膜互为模板协同作用来适应晶体生长的需要。蛋白质 LB 膜的存在及其结构适应性在晶体沿(104)晶面取向生长中起着决定性的作用。该方法为我们探索生物矿化的机理和用仿生的途径制备结构新颖的特殊功能材料提供了一种尝试。

参考文献:

- [1] Whitesides G M, Mathias J P, Seto C T. *J. Mol. Sci.*, **1991**, **254**(5036):1312~1319
- [2] Cha J N, Stucky G D, Morse D E, et al. *Nature*, **2000**,**403** (6767):289~292
- [3] (a)Falini G, Albeck G S, Weiner S, et al. *Science*, **1996**,**271** (5245):67~69
(b)Belcher A M, Wu X H, Christensen R J, et al. *Nature*, **1996**,**381**(6577):56~58
(c)Mann S. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1997**, (21):3953~3962
(d)Choi C S, Kim Y W. *Biomaterials*, **2000**,**21**(3):213~222
- [4] (a)Colfen H, Mann S. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2003**,**42**(21): 2350~2365
(b)Kato T, Sugawara A, Hosoda N. *Adv. Mater.*, **2002**,**14**(2): 869~877
(c)Estroff L A, Hamilton A D. *J. Chem. Mater.*, **2001**,**13**(10): 3227~3235
- [5] Yu S H, Cofen H, Tauer K, et al. *Nat. Mater.*, **2002**,**4**(1):51~55
- [6] Mann S, Heywood B R, Rajam S, et al. *Nature*, **1988**,**334**(6184):

- 692~695
- [7] Heywood B R, Mann S. *Langmuir*, **1992**,**8**(5):1492~1498
- [8] Zhao X K, Yang J, Fendler J H. *J. Phys. Chem.*, **1992**,**96**(24):9933~9939
- [9] XIE An-Jian(谢安建), SHEN Yu-Hua(沈玉华), MAO Jian-Qian(茆建强), et al. *Spectroscopy and Spectral Analysis (Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi)*, **2001**,**21**(3):347~349
- [10] Berman A, Addadi L, Weiner S. *Nature*, **1988**,**331**(11):546~548
- [11] SHEN Yu-Hua(沈玉华), YANG Zhan-Lan(杨展澜), WU Jin-Guang(吴瑾光), et al. *Acta Phys.-Chem. Sin. (Wuli Huaxue Xuebao)*, **1999**,**15**(12):1064~1069
- [12] ZHANG Qun(张群), SHEN Yu-Hua(沈玉华), XIE An-Jian(谢安建), et al. *Spectroscopy and Spectral Analysis (Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi)*, **2002**,**22**(2):267~269
- [13] Nayar S, Sinha A. *J. Mater. Sci. Lett.*, **2003**,**22**(3):167~170
- [14] Becker A, Becker W, Marxen J C, et al. *Z. Anorg. Allg. Chem.*, **2003**,**629**(12):2305~2311
- [15] XUE Zhong-Hui(薛中会), ZHANG Xing-Tang(张兴堂), DU Zu-Liang(杜祖亮), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2004**,**12**(20):1426~1428
- [16] XUE Zhong-Hui(薛中会), DAI Shu-Xi(戴树玺), DU Zu-Liang(杜祖亮), et al. *Chinese J. Inorg. Chem. (Wuji Huaxue Xuebao)*, **2006**,**6**(22):1049~1054
- [17] Popescu D C, Smulders M J, Pichon B P, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**,**129**(45):14058~14067
- [18] Masi E D, Kwak S Y, Pichon B P, et al. *Cryst. Eng. Comm.*, **2007**,**9**(12):1192~1204
- [19] McClellan S J, Franses E I. *Colloids Surf. B*, **2003**,**28**(1):63~75
- [20] Sánchez-González J, Ruiz-García J, Gálvez-Ruiz M J. *J. Colloid Interface Sci.*, **2003**,**267**(2):286~293
- [21] Mann S. *Nature*, **1988**,**332**(6160):119~124
- [22] Lochhead M J, Letellier S R, Vogel V. *J. Phys. Chem. B*, **1997**,**101**(50):10821~10827
- [23] Gotliv B A, Addadi L, Weiner S. *Chem. Biochem.*, **2003**,**4**(6):522~529
- [24] Lee J R, Han Y J, Willey T M, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**,**129**(34):10370~10381
- [25] Han Y J, Aizenberg J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**,**42**(31):3668~3670
- [26] Lu J R, Su T J, Thomas R K. *J. Colloid Interface Sci.*, **1999**,**213**(2):426~437
- [27] GUO Zi-Jian(郭子建), SUN Wei-Yin(孙为银). *Bioinorganic Chemistry(生物无机化学)*. Beijing: Science Press, **2006**.
- [28] ZHANG Yong(张勇), XIAO Rui(肖锐), LING Li(凌立), et al. *Marine Sciences(Haiyang Kexue)*, **2004**,**28**(1):33~37