

## 牛血清蛋白单层膜诱导形成网状结构的羟基磷灰石

薛中会<sup>1</sup> 张兴堂<sup>1</sup> 陈艳辉<sup>1</sup> 戴树奎<sup>1</sup> 李蕴才<sup>1</sup> 黄亚彬<sup>1</sup> 李铁津<sup>2</sup> 杜祖亮<sup>\*1</sup>

(<sup>1</sup> 河南大学特种功能材料省重点实验室, 开封 475001)

(<sup>2</sup> 吉林大学化学系光化学实验室, 长春 130023)

关键词: 牛血清蛋白(BSA) 羟基磷灰石(HAP) 生物矿化 取向生长  
分类号: O613.62 O614.23<sup>\*1</sup>

### 0 引 言

近来利用生物矿化的方法来合成具有特殊结构的晶体材料成为材料合成的一个热点<sup>[1,2]</sup>。羟基磷灰石(HAP)作为一种生物材料,广泛地存在于人和动物的骨骼和牙齿中,是生物矿化的产物。在骨骼的修复、替代和仿生抗菌陶瓷薄膜中有重要的应用<sup>[3]</sup>。因此,利用生物矿化的方法合成具有生物活性的羟基磷灰石,有重要的应用价值。在生物矿化过程中蛋白质等生物大分子对 HAP 的形貌、晶型和晶体的复杂结构具有很好的控制作用。羟基磷灰石与蛋白质相互作用形成的高级自组装结构,使羟基磷灰石具有优良的物理性质和生物功能<sup>[4]</sup>。然而生物矿化过程是一个非常复杂的过程,其机理至今尚不清楚,一直是化学、生物、物理和材料科学研究的热点和难点<sup>[5-7]</sup>。

在我们最近的研究工作中发现,利用 LB 技术通过吸附的方法把牛血清白蛋白(BSA)制备成单层膜,在牛血清白蛋白单层膜诱导下生长羟基磷灰石。扫描电子显微镜(SEM)研究表明,在牛血清白蛋白单层膜诱导下,形成的羟基磷灰石晶体呈网状分布;XRD 研究证明,形成的晶体沿(112)晶面择优取向生长。这表明牛血清白蛋白单层膜的存在是羟基磷灰石形成特定取向和特殊结构的关键。这种沿特定晶面择优取向的结构可望有特殊的物理、化学性质和特定的生物功能<sup>[8-12]</sup>。

### 1 实验部分

#### 1.1 试剂及样品的制备

牛血清白蛋白(BSA)为天津正江高科技有限公司的产品,电泳纯试剂;羟基磷灰石[Ca<sub>10</sub>(OH)<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>]为上海生化试剂厂的产品,生化试剂;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。

0.5 g 的 BSA 溶于 1 000 mL 浓度为 0.9% 的 NaCl 水溶液中,待牛血清白蛋白完全溶解后,倒入 LB 膜槽中,保持 5 h 后牛血清白蛋白吸附达到平衡,利用本体交换(所谓本体交换是指将蛋白质单层膜下没有吸附的蛋白质溶液和要作为亚相的无机相溶液用两个蠕动泵进行交换,一个蠕动泵从膜下抽取没有吸附的蛋白质溶液,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保持单层膜不受干扰)的方法将 HAP 过饱和溶液和牛血清白蛋白单层膜下没有吸附的蛋白质溶液进行交换(所用的本体交换器为两个型号完全相同的蠕动泵,交换时设定的速率相同),待交换完毕后,保持 4 d 进行提膜。提 2~3 个样品,分别用于 X-射线粉末衍射仪和扫描电子显微镜表征。

#### 1.2 X-射线衍射谱和扫描电镜形貌测定

X-射线衍射(XRD)采用 Philips X'Pert Pro X 射线粉末衍射仪(荷兰)测试,步长为 0.02°,扫描范围为 20°~60°、电压为 40 kV、电流为 40 mA,测试时先把拉在玻璃基底上的样品干燥;表面形貌采用

收稿日期:2004-04-05。收修改稿日期:2004-06-08。

国家自然科学基金资助项目(No.90306010,20371015)和“973”前期专项资助课题(No.2002CCC02700)。

\* 通讯联系人。E-mail:zld@henu.edu.cn

第一作者:薛中会,30 岁;研究方向:纳米结构材料。

JSM-5600LV 型扫描电子显微镜 (SEM)(日本电子)观察,扫描电镜所用的电压为 30 kV,样品喷金后进行扫描。

## 2 结果与讨论

### 2.1 XRD 图谱结果与讨论

图 1a 为没有牛血清白蛋白时放置 10 d 自然结晶形成的羟基磷灰石的 X-射线衍射光谱。图 1b 为在牛血清白蛋白单层膜诱导下保持 4 d 的羟基磷灰石晶体的 X-射线衍射光谱。比较二者的结果可以看出,没有牛血清白蛋白参与时,形成的 HAP 的衍射峰和体相 HAP 的衍射峰相同,没有任何取向性;相反在牛血清白蛋白单层膜诱导下形成的 HAP 具有很好的取向性,XRD 表明在牛血清白蛋白诱导下形成的晶体是羟基磷灰石相,并且沿(112)晶面择优取向生长。

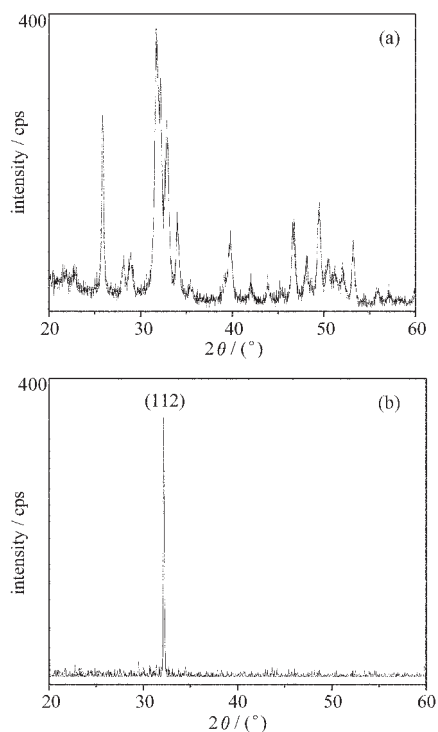


图 1 HAP 晶体在不同体系中的 XRD 图

Fig.1 XRD patterns of HAP in different systems

a: HAP obtained without BSA,

b: HAP obtained in the presence of BSA Langmuir film

### 2.2 SEM 结果与讨论

图 2a 为没有牛血清白蛋白时放置 10 d 自然结晶形成的羟基磷灰石的扫描电镜图,从图中可以看出有大量的晶体形成,但是晶体的排列没有一定的

规律性,在玻璃基底上呈现较零乱分布;从图 2b 中可以看出,在牛血清白蛋白的作用下结晶形成的羟基磷灰石具有较好的网状结构。分析认为,牛血清白蛋白单层膜的存在为羟基磷灰石的吸附创造了条件,在牛血清白蛋白单层膜的吸附下气液界面的羟基磷灰石的浓度增加,使得牛血清白蛋白单层膜下的羟基磷灰石的过饱和度远远的大于下面亚相中的羟基磷灰石的过饱和度,从而为羟基磷灰石的结晶提供了充足的无机相,进而在牛血清白蛋白活性位的诱导下成核和生长。我们认为形成网状结构可能的原因是牛血清白蛋白二级结构的诱导所致。在牛血清白蛋白向表面吸附的过程中其自身的二级结构发生了变化,进而在表面形成了网状结构的牛血清白蛋白单层膜<sup>[12]</sup>,接着羟基磷灰石的无机相在牛血清白蛋白网状基质上取向成核和择优生长,从而形成网状结构。从图 b 中的选区电子衍射图可以看

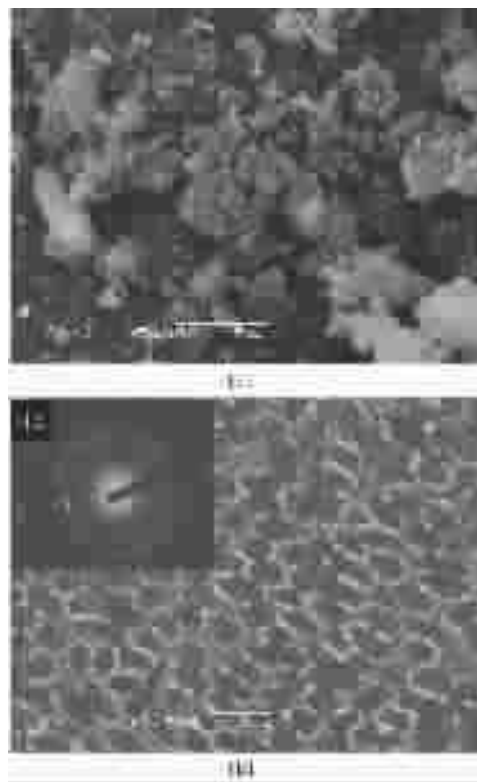


图 2 在不同体系中形成的羟基磷灰石的扫描电镜图,图 b 中的插图为选区电子衍射

Fig.2 SEM patterns of the samples crystallized in different systems

a: HAP obtained without BSA,

b: HAP obtained in the presence of BSA Langmuir film

The inset shows the electron diffraction pattern of the HAP by TEM.

出形成的晶体为磷酸钙盐的 HAP 相。

## 参 考 文 献

## 3 结 论

在牛血清白蛋白单层膜的作用下方,羟基磷灰石的形貌和晶体生长的取向性发生了变化。一方面,羟基磷灰石在生物分子/无机界面的浓度大幅度的提高,为牛血清白蛋白诱导羟基磷灰石成核和生长提供充足的无机相;另一方面,在牛血清白蛋白的影响下,牛血清白蛋白通过其活性位与羟基磷灰石发生相互作用,作用方式可能是多种形式的氢键或 BSA 与钙离子的配位作用,从而抑制了 HAP 在其他方向上成核和生长的速度,促进了其在网状基质上的生长速度。在生物体内,正是由于蛋白质和羟基磷灰石之间复杂的相互作用诱导和控制着生物矿物的成核和生长,进而形成特定的结构,在生命活动中起着重要的作用。

综上所述,我们利用 LB 技术以牛血清白蛋白单层膜为模板,在位诱导出了图案化取向生长的羟基磷灰石晶体。结果表明牛血清白蛋白与羟基磷灰石之间存在复杂的相互作用,利用该种相互作用可以控制晶体的形貌和生长的方向。该方法为更好的通过仿生途径来合成具有择优取向和特殊结构的晶体材料提供了一种思路。

- [1] Mann S. *Nature*, **1988**,**332**(10),119.
- [2] Addadi L. *Zeitschrift für Kardiologie*, **2001**,Band 90,Supplement 3.
- [3] Eiden-Aßmann S. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2002**,**91**,481.
- [4] Katharina Flade *Chemistry Material*, **2001**,**13**,3596.
- [5] HU Jia-Ping(胡加平) *Dissertation of Peking Medical University*(北京医科大学博士论文), **1991**.
- [6] Cooper S. J., Session R. B., Lubetkin S. K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**,**120**,2090.
- [7] CHEN Rong(陈 荣), HAN Wan-Shu(韩万书), WANG Kui(王 夔) *Huanxue Jinzhan(Progress in Chemistry)*, **1999**,**(11)**, 217.
- [8] SHEN Yu-Hua(沈玉华), YANG Zhang-Lan(杨展澜), WU Jin-Guang(吴瑾光) *Wuli Huaxue Xuebao(Acta Physico-Chemia Sinica)*, **1999**,**15**(12),1064.
- [9] SHEN Yu-Hua(沈玉华), YANG Zhang-Lan(杨展澜), XIE An-Jian(谢安键), WU Jin-Guang(吴瑾光) *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi(Spectroscopy and Spectral Analysis)*, **2000**,**20**(6),781.
- [10] ZHANG Qun(张 群), SHEN Yu-Hua(沈玉华), XIE An-Jian(谢安键), XIA Bing(夏 兵) *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi(Spectroscopy and Spectral Analysis)*, **2002**,**22**(2),267.
- [11] SHEN Wei(沈 卫), GU Yan-Fang(顾燕芳), LIU Chang-Sheng(刘昌胜), SUN Xiang-Ming(孙祥明), HU Li-Ming(胡黎明) *Guisuanyan Tongbao(Bulletin of the Chinese Ceramic Society)*, 1996,1,45.
- [12] Fan Y. W., Cui F. Z., Ge J. *Single Molecules*, **2001**,**2**(2),121.

## Synthesis of a Network Structure Hydroxyapatite by Bovine Serum Albumin Monolayer Induction

XUE Zhong-Hui<sup>1</sup> ZHANG Xing-Tang<sup>1</sup> CHEN Yan-Hui<sup>1</sup> DAI Shu-Xi<sup>1</sup>

LI Yun-Cai<sup>1</sup> HUANG Ya-Bin<sup>1</sup> LI Tie-Jin<sup>2</sup> DU Zu-Liang<sup>\*1</sup>

<sup>(1)</sup>Key Lab of Special Functional Materials, Henan University, Kaifeng 475001)

<sup>(2)</sup>Lab of Photochemistry, Jilin University, Changchun 130023)

LB (Langmuir-Blodgett) technology was used to prepare the BSA monolayers more closely related to the half-layer biological membrane structure. The influence of bovine serum albumin (BSA) was studied on the polymorph, morphology and growth orientation of hydroxyapatite in the process of the biomineralization. XRD and SEM were respectively used to analysis the polymorph and morphology of the crystal induced by BSA monolayers. The results of XRD show that the HAP grows only along the (112) face, indicating a well oriented face in HAP. In addition, SEM shows that the morphologies of the HAP is of a network structure. In conclusion, when the BSA form monolayers, it can be used as a template to induce the HAP to crystallize. Accordingly, the monolayers of the protein can be used to induce the inorganic materials to grow with a complex morphology and a well oriented face by biomimetic approach.

**Keywords:** bovine serum albumin      calcium hydroxyapatite      biomineralization      oriented growth