

贝壳生物矿化的研究进展

Progress in the studies on shell biomineralization

张文兵, 姚春凤, 麦康森

(中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

中图分类号: Q51

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)02-0074-06

生物体硬组织是高度结构化多功能复合材料的绝佳典范。这些硬组织包括骨组织(骨和茸角)、牙组织(牙本质和牙釉质)、棘皮动物骨骼单位、海绵动物骨针和贝类贝壳。在遗传因素的控制下,生物体通过节能和环境友好途径合成这些生物复合材料。这些有关生物硬组织功能和结构的研究,在医学和工程学上找到了广阔的应用前景。一方面使更好地促进骨骼和牙齿的再生成为可能。另一方面由于仿照生物硬组织的结构和独特的形成过程,使得人们能够制造出高效、节能和对环境友好的新材料^[1]。贝壳是自然界合成的多功能复合材料的成功例子。犹如其他生物材料(骨骼、牙齿等),贝壳是分子或纳米结构体的聚合体,其总质量的95%以上是CaCO₃质晶体,表现为方解石和(或)文石两种物相。典型的贝壳结构分为角质层、柱状层和珍珠质层。角质层位于贝壳的最外层,将贝壳与周围环境隔离开,为CaCO₃质晶体的沉积提供框架。柱状层CaCO₃质晶体表现为方解石物相,位于珍珠质层与角质层之间。珍珠质层位于贝壳最里层,为文石物相。

贝壳的形成是一个有机-无机分子之间相互识别的过程。分子操作意味着借助有机分子控制无机凝聚态纳米结构材料的形成^[2]。CaCO₃质晶体的核化、生长、物相转换和空间定位等都严格受到只占贝壳总质量1%~5%的生物大分子的调控。因而将这种由生物大分子指导的CaCO₃质晶体沉积形成贝壳的现象称为贝壳的生物矿化(shell biomineralization)^[3,4]。生物矿化形成的贝壳具有许多优良的机械特性,能很好地抗扭曲、抗折断和抗挤压。矿质相和有机相的相互作用是生物材料显著力学特性的关键所在。这表明生物策略的高度智能性,使得本质上各向异性的一维大分子和矿质结构体自组装产生各向同性的纳米结构体^[5]。在贝壳形成过程中,生物大分子同时控制晶体生长和通过吸附特殊专一晶面控制纳米结构体的形状。生物大分子的作用使得形成的矿质纳米结构体增加了材料硬度,可能的机理与晶体生长解理面偏差和偏差引起能量的吸收有关。同时,生物矿化形成的CaCO₃纳米复合物的内聚轴长是无机合成物的1/4~1/3,从而使得这种生

物材料具有无机晶体所不能比拟的强度和硬度。纳米化学家已从生物体系矿化过程的模式中了解到一些基本规律,并运用生物学概念如形态发生(morphogenesis)、复制(replication)、自组织(self-organization)和形态变形(metamorphosis)等作为无机材料合成策略,为纳米化学的发展提供了诱人的前景。因而目前探讨贝壳的形成机制不仅是生物矿化学的研究热点之一,同时也引起了材料学界日益浓厚的兴趣,为纳米材料、矿物质聚合材料和模板晶体等新材料的开发开启了一个新的思路^[5,6]。

贝壳生物矿化的研究现状可以概括为一句话:一条主线,两个分支。即围绕贝壳形成的机理问题,对贝壳有机质和CaCO₃质晶体的特性展开了广泛而深入的研究。

1 贝壳有机质

有机质可以改变生物矿化纳米结构材料的特性。这类有机大分子包括蛋白质、糖蛋白、多糖、磷脂等,它们可以控制无机矿质相成核,操纵生物矿化纳米材料的生长,且赋予其新的禀性^[3,4]。根据贝壳有机质的溶解特性分为可溶性有机质(soluble matrix, SM)和不可溶有机质(insoluble matrix, IM)。

1.1 贝壳蛋白质

人们可以通过各种途径得到贝壳蛋白质:(1)外套膜外腔液。在贝类的外套膜和贝壳之间有一个生物结构意义上的腔,称为外套膜外腔。形成贝壳所需的有机质和Ca²⁺、CO₃²⁻等无机离子都由外套膜分泌,集合于外套膜外腔中。可以这样说,外套膜外腔液是形成贝壳的物质库,当然包括了贝壳蛋白质。但是由于外套膜外腔液很少,同时还很难解决收集技

收稿日期:2005-12-10;修回日期:2006-05-10

基金项目:国家863计划项目(2001AA628080,2004AA628100);国家自然科学基金项目(30200215)

作者简介:张文兵(1973-)男,四川宜宾人,博士,副教授,从事营养与生物矿化学研究,E-mail:wzhang@ouc.edu.cn;麦康森,通讯作者,教授,博士生导师,E-mail:kmai@ouc.edu.cn

术问题,使得从这一途径获取一系列分析所需的足量蛋白质变得非常困难。(2) 贝壳。从贝壳中提取贝壳蛋白质是目前最常用的方法,这种方法的主要流程包括脱钙、脱盐、离心、冻干。

1.1.1 可溶性贝壳蛋白质(soluble matrix protein, SMP)

在贝壳生物矿化过程中起决定性作用的是可溶性贝壳蛋白质(SMP),它控制着 CaCO_3 质晶体物相的转换和定向^[7]。因而探讨 SMP 的各种生化特性、空间结构以及与之有关的基因特征成为了贝壳生物矿化研究中的热点。

人们最初的研究主要集中在分离提纯 SMP 的各组分蛋白,测定其分子质量、等电点和氨基酸组成等。SMP 的分子质量大小在不同贝类间表现出较大差异,从 5 ku 到 500 ku 不等^[8,9]。同样,不同贝类的 SMP 的氨基酸组成也存在较大差异,但是也表现出了一些普遍存在的共性。SMP 中以 Gly, Asx (Asp 和 Asn) 和 Glx (Glu 和 Gln) 为主,可占总氨基酸的 60% 以上^[9,10]。由此可以看出 SMP 属于酸性蛋白质。同时, SMP 的氨基酸组成在同一贝壳的柱状层和珍珠质层之间表现出较大差异。柱状层的 SMP 指导生成方解石,而珍珠质层的 SMP 对文石的形成负责^[7]。Grégoire 研究双壳贝类 (*Meleagrina* 和 *Pinna*) 的 SMP 后证明:与珍珠质层相比较,柱状层的 SMP 中 Tyr 和 Gly 的含量较高,而 Arg, Ser, Glu 和 Asp 的含量较低^[11]。统计 SMP 中酸性氨基酸和碱性氨基酸之比 $[(\text{Asx} + \text{Glx}) / (\text{Lys} + \text{Arg} + \text{His})]$ 可以看出:方解石质贝壳中酸性与碱性氨基酸比值大于文石质贝壳的该比值。也就是说方解石质贝壳的 SMP 中酸性氨基酸的含量高于文石质贝壳。这一现象在不同种的贝类和营养背景不同的同一种贝类的相关研究中都得到了证实^[12-15]。

为了深入了解 SMP 调控 CaCO_3 质晶体的核化、生长,以及方解石和文石两种物相之间的相互转换,研究者将目光转向探讨 SMP 的结构上。有关确定 SMP 初级结构的研究在 20 世纪 70 年代才展开。由于 SMP 中 Asp 的含量较高,在富含 Asp 肽段周围的氨基酸残基形成封闭的环,使得用 Edman 降解法测定其序列在技术上遇到了极大困难^[16,17]。同时这类蛋白质很难用常规的化学或酶裂解方法来获得测序所需的短肽^[18]。因此最初的研究只能对 N 末端 10 个左右的氨基酸残基有所了解。尽管如此,人们通过努力仍然得到了许多相关数据。研究结果表明 SMP 的氨基酸链中主要的氨基酸序列是 $(\text{Asp-Gly})_n$ 和 $(\text{Asp-Ser})_n$,同时含有独立的多聚阴离子和疏水氨基酸区域^[13,19,20]。这些独立的区域对 SMP

的功能是必不可少的^[21,22]。为了能够更准确地掌握 SMP 的结构与功能的相互关系,研究者利用现代分子生物学的手段获得了几种贝类 SMP 的全序列,它们是珠母贝 (*Pinctada fucata*)^[23]、*P. maxima*^[24]、红鲍 (*Haliotis rufescens*)^[25]。另外 Miyamoto 等^[26]还成功地在珠母贝的珍珠中提取出了一种含有碳酸酐酶(CA)功能区的可溶性蛋白质,并获得了该蛋白质的全序列。在这类研究中,研究者都是采用以下方法获得目的蛋白质的全序列:(1) 提取外套膜中的总 RNA,纯化出 mRNA,构建 cDNA 文库;(2) 分离提纯 SMP,并测定其 N 末端的部分氨基酸序列;(3) 根据上述氨基酸序列设计基因特异性引物,筛选 cDNA 文库;(4) 将所得的目的 cDNA 进行全序列分析;(5) 根据目的 cDNA 的全序列推导 SMP 的全序列。利用这一方法,研究者获得了大量的有价值的信息。Shen 等^[25]研究红鲍 SMP 中 Lustrin A 的全序列后发现该蛋白中含有由大量 Ser, Pro, Gly 和 Cys 组成的高度模块化的结构,这些模块结构表明 Lustrin A 是一种多功能蛋白质。Samata 等^[23]从珠母贝贝壳中分离出命名为 N16 的 SMP。在此类蛋白质中含有 Asn-Gly 重复序列区,能够形成类似于 Gly 环的结构单元,这种柔性结构在蛋白质与其他分子相互作用中扮演着重要的角色,它使得 N16 能够同其他贝壳蛋白质、 CaCO_3 质晶体和 Ca^{2+} 结合,从而控制晶体的形成。Miyamoto 等^[26]在珠母贝珍珠中提取了一种命名为 nacrein 的多聚阴离子蛋白质,含有两个主要的功能结构区:碳酸酐酶(CA)功能区和 Gly-Xaa-Asn (Xaa = Asp, Asn 或 Glu) 重复区。Kono 等^[24]在 *P. maxima* 的 SMP N66 中也发现了碳酸酐酶功能区和插入其中的重复区。其中 nacrein 的 CA 功能区与人类的 CAII 有极高的同源性,而 N66 的 CA 功能区却与人类的 CAVII 有较高的同源性。N66 主要通过 CA 功能区提供 HCO_3^- ,而 Gly-Xaa-Asn 重复区调控晶体的形成^[24]。Donachy 等曾经利用原子力显微镜 (AFM) 观察发现牡蛎 (*Crasostrea virginica*) 的 SMP 中 RP-1 组分的空间结构呈椭圆形,最短轴长为 75 nm,最大轴长为 100 nm,周长为 276 nm。同时还证实了在 RP-1 蛋白中存在一个环状结构,这是阻碍利用 Edman 降解法对 SMP 进行测序的主要因素^[17]。但是由于在分离提纯 SMP 中使用了可能导致蛋白质变性的弱酸性溶剂(乙酸或 EDTA),很难借助各种仪器对蛋白质直接进行高级结构分析。因而目前在分析 SMP 的高级结构方面还没有一个十分有效的方法。可幸的是随着生物信息学的发展,现在人们可以通过蛋白质的氨基酸全序列来间接推断其二级和三级结构。然而

这种方法也存在其局限性,因为分泌到外套膜外腔的蛋白质是基因表达并且经翻译后修饰过的产物,使得利用 cDNA 序列演绎出的蛋白质全序列并不能真实地反映该蛋白质的完整信息。

1.1.2 不可溶贝壳蛋白质 (insoluble matrix protein, IMP)

不可溶贝壳蛋白质 (IMP) 是贝壳的构架蛋白,主要为 CaCO_3 质晶体的核化、生长和空间伸展等提供结构上的支持。由于不可溶这一特性使得有关 IMP 的各项研究相对较困难,因而这方面的报道也较少。IMP 中含有大量的 Gly, Ala 和其他疏水性氨基酸^[9, 19, 27]。与 SMP 一样,对 IMP 分子结构更深入的探讨同样是利用现代分子生物学的手段,获取 IMP 蛋白质的全序列信息,从而进行其他各项研究。Sudo 等^[28]分别从 *P. fucata* 贝壳的文石层和方解石层分离出了两种含有信号肽的 IMP,命名为 MSI60 和 MSI31,分子量分别是 60 ku 和 31 ku。X-射线衍射分析表明 IMP 为 折叠构象,MSI60 的 折叠区由 9~13 个氨基酸残基构成。MSI60 中较长的块可以形成密集的 折叠蛋白晶体。MSI60 中含有 39 个复合 Gly 块,每个块含有 3~15 个氨基酸残基。复合 Gly 块参与了 折叠蛋白晶体的形成。N 末端和 C 末端的复合 Asp 块却与 Ca^{2+} 结合。而位于 N 末端和 C 末端区的 Cys 残基则与形成分子内和分子间的二硫键有关。MSI31 为方解石柱状层的 IMP,其分子结构中没有复合 Ala 块,而在 N 末端区含有 10 个复合 Gly 块和在 C 末端区含有由 6 个连续的 ESEEDX 基元组成的大型酸性区域。Gly 块参与形成 折叠结构,C 末端的酸性区域负责与 Ca^{2+} 和其他蛋白质的结合。MSI31 的 N 末端和 C 末端的两个 Cys 残基同样参与形成分子内和分子间的二硫键。

1.2 贝壳碳水化合物

人们对贝壳有机质的研究主要集中在蛋白质上,很少有关于碳水化合物的报道。随着研究范围的扩大,人们发现碳水化合物在贝壳的生物矿化中也扮演了重要的角色^[14, 29, 30]。几丁质在许多贝类贝壳中都能检测到,并被认为是构建贝壳框架结构中发挥着重要的作用^[31, 32]。几丁质被夹在两层 SMP 之间,从而形成三明治结构的蛋白质-多糖网络,这种网络结构在贝壳形成的初期起着极其重要的作用^[33]。

碳水化合物在 SM 中还通过与蛋白质结合,以糖蛋白的形式影响贝壳的生物矿化。双脐螺 (*Biomphalaria glabrata*) 的贝壳 SM 中的一种主要蛋

白质(分子量:19.6 ku;等电点:7.4)就是一种糖蛋白,其末端为葡糖基或甘露糖基^[34]。由于 SM 中酸性蛋白质的末端大多连接有碳水化合物,因此 SM 极有可能是由蛋白聚糖、糖胺聚糖和糖蛋白组成的异源混合物^[34]。在其他贝类的贝壳中也发现有黏多糖的存在^[35]。Marxen 等^[34]证实双脐螺贝壳的 IM 中含有葡萄糖、甘露糖、半乳糖和 N-乙酰葡萄糖胺。在 SM 中除含有上述碳水化合物外,还检测到了 N-乙酰半乳糖胺。然而是否这些碳水化合物都参与了贝壳的生物矿化,以及其影响 CaCO_3 质晶体沉积的机制问题目前还不明确。

1.3 贝壳脂类物质

Emily 等^[36]在双壳贝类 *Arca zebra* 和 *Codakia orbicularis* 的贝壳中发现的脂类物质有:脂肪酸、胆固醇、植物二烯、甲酮和 n 链烷。他们进一步利用同位素分析发现,脂肪酸是在贝壳生物矿化过程中衍生出来的。但是到目前为止仍不清楚是否脂类物质在生物矿化中发挥作用。

2 贝壳中 CaCO_3 质晶体及化学元素组成

2.1 贝壳 CaCO_3 质晶体的多态及与其他化学元素的关系

CaCO_3 质晶体在自然界中存在 3 种物相:方解石、文石和球霏石。晶体形状通常分别为六角形、针形和球形。方解石和文石有着非常类似的晶体结构和热动力稳定性,只是前者对温度和压力的稳定性不如后者。

根据所含 CaCO_3 质晶体物相的不同,可将贝壳分为 3 类:方解石质贝壳、文石质贝壳和方解石-文石混合型贝壳。后者最为常见。球霏石在贝壳中很少见,只是在一些受伤贝壳的愈合过程中有所发现,但也只能存在极短时间^[37]。

文石与方解石晶体结构虽然类似,但仍有显著不同:文石的晶格结构中的 Ca^{2+} 和 CO_3^{2-} 是按六方最紧密堆积方式排列,每个 Ca^{2+} 周围虽然围绕着 6 个 CO_3^{2-} ,但与其相接触的氧离子不是 6 个,而是 9 个; Ca^{2+} 的配位数为 9,每个 O 与 3 个 Ca 和 1 个 C 连接。这样文石晶体的晶格比方解石的更开放, CaO 键的距离更长。因此文石可以容纳一些直径较大的原子,如 Sr 和 Pb。而方解石的晶格结构使其更易接纳直径较小的原子,如 Zn, Fe 和 Mg。所以 Lorens 和 Bender^[38]指出贝壳的矿物学特征是影响其化学元素组成的最主要和最直接的原因。类似的结果在其他一些研究中也得到了证实^[39]。

2.2 CaCO₃ 质晶体的核化

晶体的成核过程意味着从超饱和溶液相克服能障形成固相。在生物环境中,界面能障可因成核位点有机分子的存在而降低。有序的生物高分子模板表面有确定的位点提供给矿质成核生长。专一性的成核生长形成特定晶体结构的关键在于有机分子功能基团和晶核表面离子间分子互补作用。在作用位点上极性电荷和立体化学关系使得有机-无机界面相匹配,满足一定大小和拓扑构型。有机模板表面发生成核的分子专一性识别过程,类似蛋白-蛋白或蛋白-细胞膜作用。无机-有机界面间分子识别,导致专一性生物矿化成核,可能是分子间弱相互作用力、空间结构一致和立体化学三者协同作用的结果^[40]。Wierzbicki 等^[41]利用能量最优化计算表明:含有多聚 Asp 的贝壳蛋白质与方解石晶体的最佳结合面为 {001} 面。这样方解石就从 {001} 面开始核化,使得晶体沿 c 轴方向定位,并与贝壳有机质平面垂直。这种由贝壳有机质指导的晶体核化是按晶体的取向附生机制进行的。那就是说有机质与新生晶体之间的晶格匹配降低了面际自由能障,有利于临界晶核的形成^[42]。离体研究表明富含 Asp 的贝壳蛋白质从 {001} 面开始核化方解石。方解石晶体是由 Ca²⁺ 层和 CO₃²⁻ 层交叉排列组成,CO₃²⁻ 就位于 {001} 面^[43]。但是对于已定位的球霏石晶体的核化而言,其核化面与 CO₃²⁻ 所在面垂直^[4]。

同一贝壳蛋白质分子既可能促使 CaCO₃ 质晶体核化,也可能抑制晶体的形成。也就是说,当一特定的蛋白质呈溶解态时可以抑制 CaCO₃ 质晶体的形成,但当这一蛋白质分子附着在不溶的支持物(如 IM)上时又可以激发 CaCO₃ 质晶体的核化^[21,43]。

2.3 CaCO₃ 质晶体的生长

离体研究表明贝壳蛋白质和多糖与 CaCO₃ 质晶体特定面结合,从而抑制其在该面垂直方向上的生长。例如尽管人工合成的方解石是有着发达的 {104} 面的菱形晶体,但是一旦有贝壳蛋白质的介入就会使晶体的其他面也得到很好的发展^[43]。这些由蛋白质诱导的晶面通常为阶梯状^[41]。

2.4 CaCO₃ 质晶体物相的转换

Falini 等^[32]利用几丁质和丝心蛋白作为构架物,在其表面黏结从贝壳中提取得来的 SMP。随后将这些有机质底物浸入 CaCO₃ 饱和溶液中,在一定条件下进行晶体培育。结果表明由方解石质贝壳分离提纯的 SMP 诱导方解石的生成,而来自文石质贝壳的 SMP 则诱导产生文石。CaCO₃ 质晶体的形状、

大小和组织都由 SMP 决定。CaCO₃ 质晶体表现出何种物相受到核化位点三维结构特点所控制,这种三维结构包括生物大分子的构象和位点所在的微环境,这两个因素缺一不可。Belcher 等^[7]证实在没有贝壳蛋白质介入的情况下生成的方解石为菱形,而当加入从方解石质贝壳提取的 SMP 后,生成的方解石却表现为球粒状。同样,从文石质贝壳获取的 SMP 诱导生成针状的文石。如果同时加入从方解石质贝壳和文石质贝壳提取的 SMP 则会在菱形方解石上长出针状的文石。当从反应液中去掉文石质贝壳的 SMP 后,CaCO₃ 质晶体又由文石物相转变为稳定态的方解石物相。在此基础上重新加入文石质贝壳 SMP 后,在第二层方解石上又新生成了针状的文石。这一研究结果表明在没有改变反应液温度、压力和元素组成的情况下,不同来源的 SMP 的有无就足以完成 CaCO₃ 晶体在方解石和文石两种不同物相之间的转换。

3 贝壳生物矿化研究的展望

阐明贝壳的形成机制仍然是今后生物矿化研究的核心。贝壳的形成过程受到遗传特性的控制,同时也受到环境因素的影响。随着现代分子生物学理论和技术手段的日趋完善,揭开与贝壳形成有关的遗传奥秘的进程也会加快。贝壳的形成过程实质上是有关基因的开启和关闭的过程。找到这些基因,并对其特性进行研究被认为是人为控制贝壳生物矿化的第一步。在研究与贝壳生物矿化相关基因的同时,还必需进一步认识蛋白质在贝壳形成过程中所扮演的角色。目前还没有贝壳蛋白质序列-结构-功能三者对应关系模式的报道,其中最主要的原因是不能获得贝壳蛋白质准确的空间结构信息。今后在这一研究中急需解决的问题是找到一种能完整保持其空间结构信息的分离纯化贝壳蛋白质的技术手段。当然,在这一问题上采取对贝壳蛋白质结构进行直接观察和间接推导联合的方式是最可取的。贝壳形成过程所受环境因素的影响也是值得进一步研究的方向。这些因素包括贝类生活环境的温度、盐度、pH 值和其食物等。

贝壳生物矿化的理论研究在今后必定会上与生产实践相结合的道路。与之相关的产业有:新材料、医学、珍珠生产和贝类养殖。目前国际上有关贝壳生物矿化的研究成果还未实现产业化,但是欧美以及日本等发达国家正逐渐将该方面的研究成果推向市场,其在纳米材料和矿物聚合材料等新材料开发中的重要指导作用已初露端倪。在日本已有科研单位和大公司联合进行贝壳生物矿化分子机制的研

究,并开始将研究成果应用到体外培养优质珍珠的产业上。但是要真正实现贝壳生物矿化研究成果的产业化,大量获得相关蛋白质和建立稳定、高效的固体矿化系统是必须解决的首要技术问题。

参考文献:

- [1] Arias J L, Fernández M S. Biomimetic processes through the study of mineralized shells[J]. **Materials Characterization**, 2003, 50:189-195.
- [2] Berman A, Hanson J, Leiserowitz L, et al. Biological control of crystal texture: a widespread strategy for adapting crystal properties to function [J]. **Science**, 1993, 259: 776-779.
- [3] Lowenstam H A. Minerals formed by organisms[J]. **Science**, 1981, 211:1 126-1 131.
- [4] Mann S. Molecular recognition in biomineralization[J]. **Nature**, 1988, 332:119-124.
- [5] Weiner S, Addadi L. Design strategies in mineralized biological materials[J]. **J Mater Chem**, 1997, 7:689-702.
- [6] Stupp S I, Braun P V. Molecular manipulation of microstructures: biomaterials, ceramics, and semiconductors[J]. **Science**, 1997, 277:1 242-1 248.
- [7] Belcher A M, WU X H, Christensen R J, et al. Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusk-shell proteins[J]. **Nature**, 1996, 381:56-58.
- [8] Borbas J E, Wheeler A P, Sikes C S. Molluscan shell matrix phosphoproteins: correlation of degree of phosphorylation to shell mineral microstructure and to in vitro regulation of mineralization[J]. **J Exp Zool**, 1991, 258:1-13.
- [9] Keith J, Stockwell S, Ball D, et al. Comparative analysis of macromolecules in mollusk shells[J]. **Comp Biochem Physiol**, 1993, 105B:487-496.
- [10] Gotlib B A, Addadi L, Weiner S. Mollusk shell acidic proteins: in search of individual functions[J]. **Chem Bio Chem**, 2003, 4:522-529.
- [11] Grégoire C. Structure of the molluscan shell[A]. Florkin M, Scheer B T. Chemical Zoology, Vol. VII, Mollusca [C]. New York and London: Academic Press, 1972. 45-102.
- [12] Kawaguchi T, Watabe N. The organic matrices of the shell of the American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin[J]. **J Exp Mar Biol Ecol**, 1993, 170:11-28.
- [13] Halloran B A, Donachy J E. Characterization of organic matrix macromolecules from the shells of the Antarctic scallop, *Adamsium colbecki* [J]. **Comp Biochem Physiol**, 1995, 111B:221-231.
- [14] Marxen J C, Becker W. The organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*[J]. **Comp Biochem Physiol**, 1997, 118B:23-33.
- [15] Mai K, Zhang W, Tan B, et al. Effects of dietary zinc on the shell biomineralization in abalone *Haliotis discus hannai*, Ino [J]. **J Exp Marine Biol Ecol**, 2003, 283:51-62.
- [16] Weiner S. Separation of acidic proteins from mineralized tissues by reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. **J Chromat**, 1982, 245:148-154.
- [17] Donachy J E, Drake B, Sikes C S. Sequence and atomic-force microscopy analysis of a matrix protein from the shell of the oyster *Crassostrea virginica*[J]. **Marine Biology**, 1992, 114:423-428.
- [18] Rusenko K W. Studies on the structure and function of shell matrix proteins from the American oyster, *Crassostrea virginica* [D]. Clemson, SC: Clemson University, 1988. 287.
- [19] Rusenko K W, Donachy J E, Wheeler A P. Purification and characterization of a shell matrix phosphoprotein from the American oyster[A]. Sikes C S, Wheeler A P. Surface Reactive Peptides and Polymers: Discover and Commercialization[C]. Washington, DC:ACS Books, 1991. 107-124.
- [20] Addadi L, Weiner S. Control and design principles in biological mineralization[J]. **Angew Chem Int ed Engl**, 1992, 31:153-169.
- [21] Sikes C S, Wheeler A P. Control of crystallization by polyanionic hydrophobic polypeptides[A]. Sikes C S, Wheeler A P. Chemical Aspects of Regulation of Mineralization[C]. Mobile, Alabama: University of South Alabama Publication Service, 1988. 15-20.
- [22] Wheeler A P, Low K C, Sikes C S. CaCO₃ crystal binding properties of peptides and their influence on crystal growth[A]. Sikes C S, Wheeler A P. Surface Reactive Peptides and Polymers: Discover and Commercialization[C]. Washington, DC:ACS Books, 1991. 72-84.
- [23] Samata T, Hayashi N, Kono M, et al. A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata* [J]. **FEBS Letters**, 1999, 462: 225-229.
- [24] Kono M, Hayashi N, Samata T. Molecular mechanism of the nacreous layer formation in *Pinctada maxima*[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2000, 269:213-218.
- [25] Shen X, Belcher A M, Hansma P K, et al. Molecular cloning and characterization of lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens* [J]. **J Biol Chem**, 1997, 272:32 472-32 481.
- [26] Miyamoto H, Miyashita T, Okushima M, et al. A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster

研究综述

REVIEWS

- pearls[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1996, 93:9 657-9 660.
- [27] Wheeler A P, Rusenko K W, Swift D M, *et al.* Regulation of in vitro and in vivo CaCO₃ crystallization by fractions of oyster shell organic matrix[J]. **Mar Biol**, 1988, 98:71-80.
- [28] Sudo S, Fujikawa T, Nagakura K, *et al.* Structures of mollusc shell framework proteins [J]. **Nature**, 1997, 387:563-564.
- [29] Samata T, Krampitz G. Ca²⁺-binding polypeptides in oyster shells[J]. **Malacologia**, 1982, 22:225-233.
- [30] Yang L, Zhang X, Liao Z, *et al.* Interfacial molecular recognition between polysaccharides and calcium carbonate during crystallization[J]. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2003, 97:377-383.
- [31] Weiner S, Traub W. Macromolecules in mollusk shells and their functions in biomineralization[J]. **Philos Trans R Soc Lond B**, 1984, 304:425-434.
- [32] Falini G, Albeck S, Weiner S, *et al.* Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules[J]. **Science**, 1996, 271:67-69.
- [33] Weiner S, Traub W. X-ray diffraction study of the insoluble organic matrix of mollusk shells [J]. **FEBS Lett**, 1980, 111:311-316.
- [34] Marxen J C, Hammer M, Gehrke T, *et al.* Carbohydrates of the organic shell matrix and the shell-forming tissue of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say) [J]. **Biol Bull**, 1998, 194:231-240.
- [35] Worms D, Weiner S. Mollusc shell organic matrix: Fourier transform infrared study of the acidic macromolecules[J]. **J Exp Zool**, 1986, 237:11-20.
- [36] Emily A, Cobabe M P. Molecular and isotopic compositions of lipids in bivalve shells: a new prospect for molecular paleontology[J]. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, 1995, 59:87-95.
- [37] Kunigelis S C, Saleuddin A S M. Shell repairs rates and carbonic anhydrase activity during shell repair in *Helisoma duryi* (Mollusca) [J]. **Can J Zool**, 1983, 61:597-602.
- [38] Lorens R B, Bender M L. The impact of solution chemistry on *Mytilus edulis* calcite and aragonite[J]. **Geochim Cosmochim Acta**, 1980, 44: 1 265-1 278.
- [39] Carriker M R, Palmer R E, Sick L V, *et al.* Interaction of mineral elements in sea water and shell of oysters (*Crassostrea virginica* (Gmelin)) cultured in controlled and natural systems[J]. **J Exp Mar Biol Ecol**, 1980, 46:279-296.
- [40] Addadi L, Weiner S, Geva M. On how proteins interact with crystals and their effect on crystal formation [J]. **Z Kardiol**, 2001, 90:92-98.
- [41] Wierzbicki A, Sikes C S, Madura J D, *et al.* Atomic force microscopy and molecular modeling of protein and peptide binding to calcite [J]. **Calcif Tissue Int**, 1994, 54:133-141.
- [42] Garside J. Nucleation[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1982. 23-35.
- [43] Addadi L, Weiner S. Interactions between acidic proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1985, 82:4 110-4 114.

(本文编辑:张培新)