

GẮN PROTEIN A LÊN HẠT NANO Fe_3O_4 VÀ KHẢO SÁT TÍNH CHẤT CỦA VẬT LIỆU

Nguyễn Văn Sáu¹, Trần Vũ Thiên², Bùi Trung Thành³

Tóm tắt – Hạt nano Fe_3O_4 được chế tạo bằng phương pháp đồng kết tủa với các kích thước hạt nano Fe_3O_4 khác nhau, hạt được chức năng hóa bởi các chất phủ tetraethyl orthosilicate (TEOS), 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES), glutaraldehyde (GA) để hình thành cấu trúc $Fe_3O_4/SiO_2/NH_2/CHO$ có chức năng gắn kết protein A. Các kỹ thuật hiển vi điện tử truyền qua (TEM), nhiễu xạ tia X (XRD), từ kế mẫu rung (VSM), phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR), phổ UV-Vis (UV-Vis) và hiển vi điện tử huỳnh quang được thực hiện để xác định tính chất, hình dạng và cấu trúc của các hạt nano. Bằng phương pháp Bradford có thể xác định được hiệu suất gắn kết protein A của cấu trúc $Fe_3O_4/SiO_2/NH_2/CHO$ với các kích thước hạt nano Fe_3O_4 khác nhau. Kết quả cho thấy hạt Fe_3O_4 nhỏ cho hiệu suất gắn kết protein A tốt hơn. Tuy nhiên, hạt Fe_3O_4 với kích thước lớn hơn có từ độ bão hòa cao hơn và gần bằng từ độ bão hòa của Fe_3O_4 khối nhưng vẫn giữ được tính siêu thuận từ.

Từ khóa: gắn, protein A, hạt nano từ Fe_3O_4 .

Abstract – Magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles were synthesized by co-precipitation method and the surface of the magnetite nanoparticles was then modified by series of tetraethyl orthosilicate (TEOS), 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde (GA) to form the $Fe_3O_4/SiO_2/NH_2/CHO$ structure, which can be used for immobilization of protein A. In this work, we used Transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD), Vibrating sample magnetometer (VSM), Fourier spectrum (FTIR), UV-Vis spectrum (UV-Vis) and Fluorescence electron microscopy rays for characterization of the properties, including shape

and structure of the nanoparticles. Additionally, immobilization of protein A on functional Fe_3O_4 particles ($Fe_3O_4/SiO_2/NH_2/CHO$) with different sizes was determined by using Bradford method. Results showed that the small magnetite nanoparticles with functional group are more efficient for binding of protein A. However, the magnetite nanoparticles with large sizes have higher saturation magnetization than the smaller ones. This saturation magnetization is close to the values of bulk Fe_3O_4 , but they are still superparamagnetic materials.

Keywords: immobilization, protein A, magnetic nanoparticles.

I. GIỚI THIỆU

Vật liệu nano từ tính với những tính chất đặc biệt, như siêu thuận từ, từ độ bão hòa cao đã mở ra các tiềm năng ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như y sinh, môi trường [1]. Trong số ấy, vật liệu nano Fe_3O_4 với tính chất siêu thuận từ, từ độ bão hòa cao, ít độc, và có khả năng tương tác sinh học tốt đang được quan tâm hơn cả, nhất là với các ứng dụng trong y sinh, như tách chiết tế bào, xét nghiệm miễn dịch, phân phối thuốc, và hình ảnh [2]. Hạt nano Fe_3O_4 với nhiều kích thước khác nhau sẽ đáp ứng được nhu cầu ứng dụng trong chẩn đoán y sinh với nhiều phân tử sinh học có kích thước khác nhau như tế bào 10–100 μm , virus 20–450 nm, protein 5–50 nm và gene 2 nm rộng, 10–100 nm dài [3]. Thêm vào đó, hạt nano từ với kích thước nhỏ sẽ mang lại hiệu suất gắn kết protein cao hơn do tăng diện tích bề mặt riêng của các hạt nano [4]. Hơn nữa, khi thay đổi kích thước hạt nano Fe_3O_4 sẽ dẫn đến sự thay đổi tính siêu thuận từ, từ độ bão hòa và khả năng đáp ứng từ trường ngoài của hạt nano từ. Với nhiều tính chất có thể điều khiển được, điều này làm cho hạt nano Fe_3O_4 mang lại nhiều khả năng ứng dụng trong thực tiễn [5]. Hạt nano Fe_3O_4 sau khi được chế tạo chúng có xu hướng kết tụ với nhau do tương tác lưỡng cực từ mạnh và lực Van der

^{1,2}Khoa Khoa học Cơ bản, Trường Đại học Trà Vinh

³Khoa Khoa học Cơ bản, Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài: 24/10/2016, ngày nhận kết quả bình duyệt: 17/11/2016, ngày chấp nhận đăng: 20/12/2016

Waal [2]. Do vậy, hạt nano từ tính cần được bao bọc bởi các chất không từ tính, để tránh sự kết tụ, giảm sự lắng đọng, hạn chế sự oxy hóa của các hạt nano cũng như tạo bề mặt của chúng có những tính chất đặc thù phù hợp với từng ứng dụng. Protein A là protein bề mặt được tìm thấy trong thành tế bào của khuẩn *Staphylococcus aureus*. Theo nhà sản xuất Sigma thì protein A có thể gắn kết với FITC, biotin, kháng thể ở vùng Fc,... Do vậy, nếu protein A gắn kết với các hạt nano Fe_3O_4 đã được chức năng hóa bề mặt thì thông qua protein A, các hạt nano có thể gắn kết với kháng thể, FITC, biotin. Và qua đó mở ra nhiều ứng dụng trong tách chiết và chẩn đoán.

Trong nghiên cứu này, hạt nano Fe_3O_4 được chúng tôi chế tạo bằng phương pháp đồng kết tủa, được điều khiển để thu được các hạt nano với kích thước khác nhau. Hạt nano Fe_3O_4 được chức năng hóa bởi các chất phủ để hình thành cấu trúc $Fe_3O_4/SiO_2/NH_2/CHO$ có chức năng gắn kết protein A. Và qua đó, chúng tôi cũng khảo sát tính chất của vật liệu để làm tăng khả năng gắn kết protein A của cấu trúc $Fe_3O_4/SiO_2/NH_2/CHO$, cũng như khả năng ứng dụng của vật liệu trong y sinh.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

A. Vật liệu

Ferrous chloride tetrahydrate ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$), ferric chloride hexahydrate ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), sodium hydroxide (NaOH), ethanol (C_2H_5OH), ammonium hydroxide ($NH_3 \cdot H_2O$, 25 % w/w) và phosphate-buffered saline (PBS, pH 7,4) do hãng Merck sản xuất. Tetraethyl orthosilicate (TEOS, $Si(OC_2H_5)_4$), 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES, $C_9H_{23}NO_3Si$), glutaraldehyde (GA, $CH_2(CH_2CHO)_2$, 25 % v/v), biotin ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$) và biotin-fluorescein isothiocyanate (biotin-FITC, $C_{33}H_{32}N_4O_8S$) do hãng Sigma Aldrich sản xuất.

B. Phương pháp

1) Tổng hợp hạt Fe_3O_4

Hạt Fe_3O_4 được tổng hợp theo phương pháp đồng kết tủa [6]. Theo đó, 4,314 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ và 1,587 g $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ được phân tán trong 120 mL nước cất ở 80 °C trong môi trường khí N_2 và chia làm hai phần bằng nhau. 25 mL dung dịch

NaOH 2M được đưa nhanh vào phần thứ nhất của hỗn hợp dung dịch muối sắt và 25 mL dung dịch NaOH 2M được đưa nhỏ giọt vào phần dung dịch muối sắt còn lại. Các mẫu được khuấy thêm 45 phút, rồi để nguội đến nhiệt độ phòng, tách bằng nam châm, sau cùng rửa ba lần với nước cất và sấy trong chân không ở 40 °C.

2) Chức năng hóa hạt Fe_3O_4

Hai mẫu hạt Fe_3O_4 thu được ở mục 1 lần lượt được chức năng hóa bề mặt và gắn kết với protein A. SiO_2 được phủ lên hạt Fe_3O_4 (Fe_3O_4/SiO_2) bằng phương pháp Stober [7]. Theo đó, 200 mg Fe_3O_4 phân tán trong 50 mL ethanol/nước (tỷ lệ thể tích 3:2), thêm 2 mL TEOS và 4 mL $NH_3 \cdot H_2O$ và khuấy trong 24 h ở 40 °C trong khí N_2 , rửa hạt với nước cất ba lần và sấy ở 40 °C trong chân không. 250 mg hạt Fe_3O_4/SiO_2 phân tán trong 100 mL ethanol/nước (tỷ lệ thể tích 1:2), thêm 0,125 - 0,625 mL APTES vào dung dịch và khuấy trong 24 h ở 40 °C trong môi trường N_2 , hạt được rửa bằng nước cất ba lần rồi sấy ở 40 °C trong chân không. Hạt thu được sẽ mang cấu trúc $Fe_3O_4/SiO_2/NH_2$. 200 mg hạt $Fe_3O_4/SiO_2/NH_2$ được phân tán trong 100 mL nước cất, thêm 1 mL dung dịch GA 25 % và khuấy trong 24 h ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các hạt được rửa bằng PBS ba lần, hạt thu được sẽ hình thành cấu trúc $Fe_3O_4/SiO_2/NH_2/CHO$.

Gắn protein A

100 mg hạt $Fe_3O_4/SiO_2/NH_2/CHO$ và 0,5 mg protein A phân tán trong 15 mL dung dịch PBS và ủ trong 12 h ở 37 °C. Thu được các hạt gắn protein A và dung dịch protein A sau khi gắn. Hạt gắn protein A được rửa với dung dịch PBS ba lần và dung dịch protein A sau khi gắn được dùng để tính nồng độ protein A còn lại.

3) Gắn biotin-FITC và biotin

5 mg mỗi mẫu $Fe_3O_4/SiO_2/NH_2/CHO$ /protein A được phân tán trong 2 mL biotin-FITC (0,25 $\mu g/mL$) ở 37 °C trong 30 phút, rồi được rửa với PBS ba lần. 5 mg mỗi mẫu $Fe_3O_4/SiO_2/NH_2/CHO$ /protein A hòa trong 2 mL biotin (0,125 $\mu g/mL$) ở 37 °C trong 30 phút và được rửa bằng PBS ba lần, sau đó tiếp tục cho phản ứng với 2 mL biotin-FITC (0,25 $\mu g/mL$) ở 37 °C trong 30 phút và rửa với PBS ba lần.

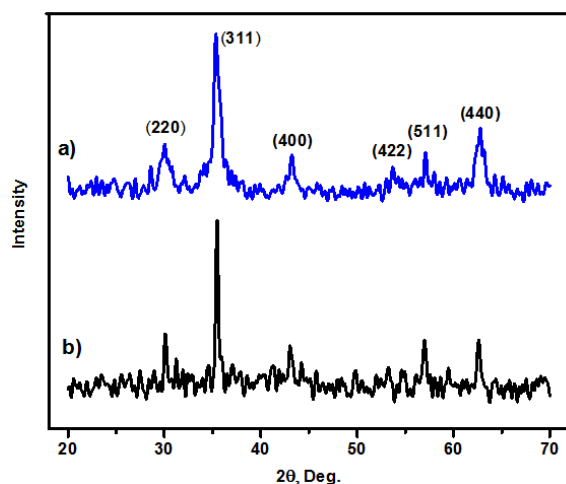
4) Các kỹ thuật phân tích

Các thiết bị được sử dụng cho phân tích mẫu bao gồm: kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM,

JEM-1400, Joel), máy đo nhiễu xạ tia X (XRD, D8-ADVANCE, Bruker), từ kế mẫu rung (VSM, MicroSense), máy đo phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR, TENSOR 27, Bruker), phổ UV-Vis (UV-Vis, NanoDrop 2000, Thermo) và kính hiển vi điện tử huỳnh quang (Olympus BX51). Chúng được dùng để xác định tính chất, hình dạng cũng như khả năng gắn kết của các hạt với protein A.

C. Kết quả và thảo luận

Hình 1 trình bày giản đồ XRD của các hạt nano được tổng hợp bằng phương pháp đồng kết tủa theo hai phương cách. Ở hình 1a, các hạt nano được tổng hợp theo cách đưa nhanh bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối sắt II và sắt III.



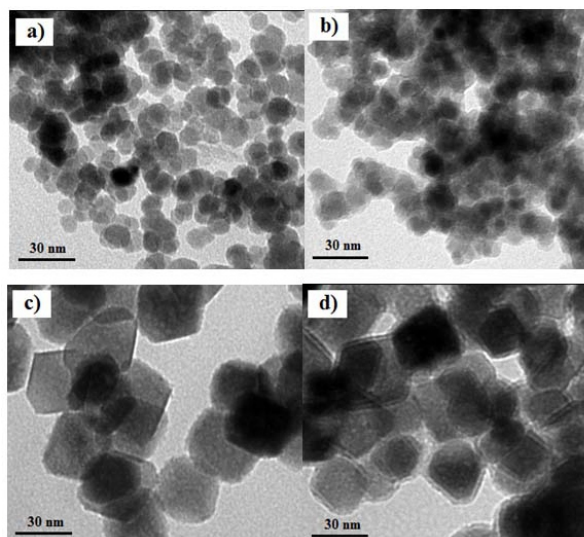
Hình 1: Giản đồ XRD của các hạt nano Fe_3O_4 : a) đưa nhanh bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối sắt và b) đưa nhỏ giọt bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối sắt.

Áp dụng công thức Scherrer

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

trong đó D , K , λ , θ và β lần lượt là kích thước trung bình của các hạt nano, hằng số Scherrer, bước sóng tia X, góc nhiễu xạ Bragg và độ bán rộng (FWHM) đối với đỉnh (311), từ đó suy được kích thước tinh thể trung bình khoảng 10 nm.

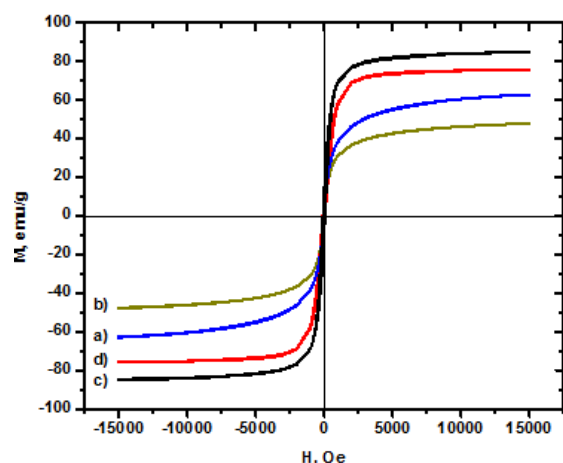
Trong khi đó, ở hình 1b, hạt nano được tổng hợp bằng cách đưa nhỏ giọt bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối sắt, và cũng theo công thức



Hình 2: Ảnh TEM của các hạt nano: a) Fe_3O_4 và b) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ với cùng kích thước hạt Fe_3O_4 10 nm; c) Fe_3O_4 và d) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ với cùng kích thước hạt Fe_3O_4 30 nm.

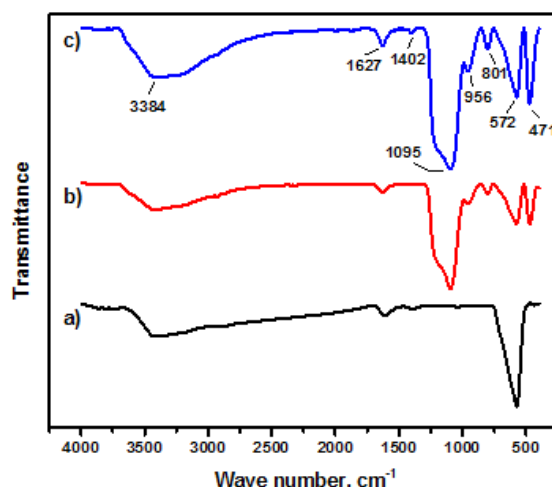
Scherrer với đỉnh (311), kích thước trung bình của tinh thể khoảng 30 nm. Có sự khác biệt về kích thước tinh thể thu được 10 và 30 nm theo hai phương cách là do kích thước tinh thể phụ thuộc vào sự cân bằng giữa tốc độ tạo mầm và tốc độ phát triển tinh thể. Tinh thể có xu hướng nhỏ hơn khi tốc độ tạo mầm lớn hơn tốc độ phát triển tinh thể [5]. Trong thực nghiệm này, khi cho nhanh bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối sắt làm tăng tốc độ tạo mầm vì vậy hạt thu được sẽ nhỏ hơn. Ngược lại, khi cho nhỏ giọt bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối sắt làm giảm tốc độ tạo mầm vì thế kích thước hạt thu được sẽ lớn hơn. Và cũng từ giản đồ XRD ở hình 1a và 1b cho thấy, các đỉnh nhiễu xạ (220), (311), (400), (422), (511) và (440) phù hợp với các đỉnh nhiễu xạ của Fe_3O_4 chuẩn (JCPDS file No. 01-075-1372) do vậy các hạt nano thu được chủ yếu là Fe_3O_4 .

Hình 2, thể hiện ảnh TEM của các hạt nano với kích thước khác nhau. Ở hình 2a và 2c cho thấy kích thước của các hạt Fe_3O_4 lần lượt vào khoảng 10 và 30 nm khá phù hợp với kích thước tinh thể Fe_3O_4 tính theo công thức Scherrer. Hơn nữa, các hạt nano Fe_3O_4 thu được tương đối đồng đều. Ngoài ra, các hạt này có xu hướng kết tụ lại với nhau do tương tác lưỡng cực từ mạnh và lực Van der Waals giữa các hạt, làm mất tính



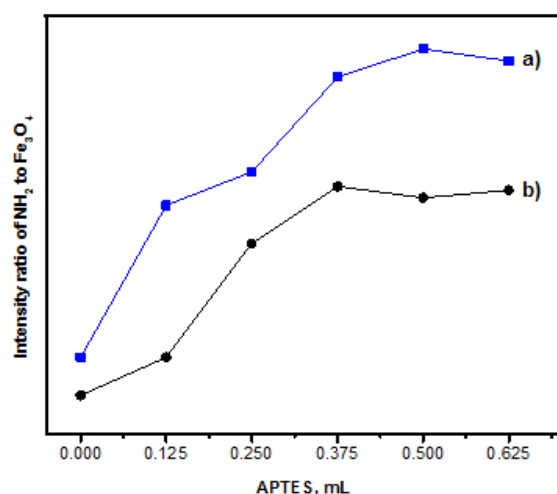
Hình 3: Đường cong từ hóa của các hạt nano: a) Fe_3O_4 và b) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ với cùng kích thước hạt Fe_3O_4 10 nm; c) Fe_3O_4 và d) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ với cùng kích thước hạt Fe_3O_4 30 nm.

chất đặc trưng của hạt nano vì thế làm chúng không đáp ứng được các yêu cầu của ứng dụng [2]. Hình 2b và 2d lần lượt là ảnh TEM của các hạt nano Fe_3O_4 có kích thước 10 và 30 nm được phủ TEOS, sau khi được phủ lên trên bề mặt của hạt nano Fe_3O_4 xuất hiện lớp phủ tương đối đồng đều với độ dày khoảng 2 – 3 nm, theo Hou, Y thì lớp phủ ấy là SiO_2 [2]. Hình 3 mô tả đường cong từ hóa của các hạt nano Fe_3O_4 và $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ở nhiệt độ phòng. Ở hình 3a và 3c lần lượt thể hiện từ độ bão hòa của các hạt nano Fe_3O_4 có kích thước 10 và 30 nm là 63 và 85 emu/g. Trong khi từ độ bão hòa của Fe_3O_4 khối là 92 emu/g. Sự khác biệt về từ độ bão hòa là do sự khác biệt về kích thước tinh thể Fe_3O_4 . Kích thước tinh thể tăng, từ độ bão hòa tăng [5]. Tuy nhiên, khi kích thước tinh thể tăng quá 30 nm hạt nano Fe_3O_4 sẽ không còn tính siêu thuận từ do tinh thể đã chuyển từ trạng thái đơn domain sang đa domain [8]. Trong thực nghiệm này, kích thước tinh thể thu được cỡ 10 và 30 nm và nằm trong giới hạn siêu thuận từ. Hình 3b và 3d, thể hiện đường cong từ hóa của các hạt nano $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ với kích thước hạt Fe_3O_4 lần lượt 10 và 30 nm với từ độ bão hòa tương ứng 48 và 76 emu/g. Sự giảm từ độ bão hòa của các hạt $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ so với các hạt Fe_3O_4 là do lớp phủ SiO_2 [9]. Từ hình 3 cũng chỉ ra rằng, lực kháng từ cũng như từ dư có giá trị không đáng kể, do vậy các hạt nano



Hình 4: Phổ FTIR của các hạt nano a) Fe_3O_4 , b) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ và c) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2$.

Fe_3O_4 và hạt nano Fe_3O_4 phủ SiO_2 thu được từ thực nghiệm này có thể xem là siêu thuận từ. Từ đây còn cho thấy, hạt Fe_3O_4 với kích thước 30 nm có ưu thế vượt trội về từ độ bão hòa khi so với hạt Fe_3O_4 có kích thước 10 nm, đây là ưu điểm rất đáng kể đối với các ứng dụng trong y sinh, giúp hạt tái phân tán khi ngừng tác động của từ trường ngoài và dễ dàng tập trung khi có từ trường ngoài đủ lớn tác động. Phổ FTIR của các hạt nano được trình bày trên hình 4 với kích thước hạt Fe_3O_4 là 30 nm. Các hình 4a, 4b và 4c tương ứng với phổ của các hạt nano Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ và $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2$. Đỉnh gần 572 cm^{-1} thuộc vùng dao động của liên kết Fe – O, là đỉnh đặc trưng của Fe_3O_4 xuất hiện trên hình 4a, 4b và 4c [1]. Ngoài ra, vùng dao động của liên kết Fe – O còn xuất hiện xung quanh đỉnh 471 cm^{-1} với cường độ yếu được thể hiện trên hình 4a [1]. Hơn nữa, không xuất hiện đỉnh gần 632 cm^{-1} là minh chứng cho thấy không tồn tại pha Fe_2O_3 trong các mẫu [10]. Do đó hạt thu được chủ yếu là Fe_3O_4 . Ở hình 4b và 4c dao động uốn cong của liên kết Si–O–Si cũng xuất hiện gần đỉnh 471 cm^{-1} góp phần làm tăng cường độ đỉnh tại 471 cm^{-1} [11]. Và các đỉnh xung quanh $1095, 801\text{ cm}^{-1}$ tương ứng với các dao động kéo căng bất đối xứng và dao động kéo căng của liên kết Si–O–Si, trong khi đỉnh gần 956 cm^{-1} tương ứng với các dao động kéo căng của liên kết Si–OH [11]. Sự hiện diện của các liên kết Si–O–Si

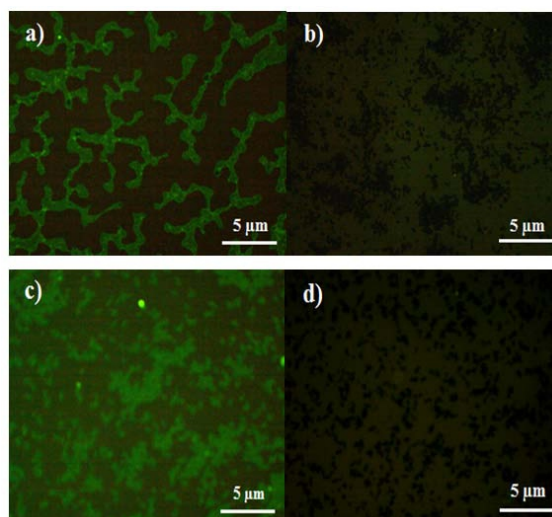


Hình 5: Sự thay đổi tỷ số cường độ của NH₂ và Fe₃O₄ khi thay đổi lượng APTES phủ lên cấu trúc Fe₃O₄/SiO₂ với kích thước hạt Fe₃O₄: a) 10 và b) 30 nm.

và Si-OH cho thấy lớp phủ TEOS đã phủ lên được bề mặt hạt nano Fe₃O₄. Vùng xung quanh đỉnh 3384, 1627 và 1402 cm⁻¹ tương ứng với các dao động kéo căng OH, dao động uốn cong HOH và dao động uốn cong OH do vật liệu hấp thụ nước được thể hiện trên các Hình 4a, 4b và 4c [12]. Ngoài ra, ở Hình 4c, hai vùng gần 3384, 1627 cm⁻¹ còn tương ứng với các dao động kéo căng N-H và dao động uốn cong NH₂ của nhóm NH₂ tự do có trong lớp phủ APTES, chúng làm tăng cường độ đỉnh 3384, 1627 cm⁻¹ khi vật liệu được phủ APTES [1]. Qua khảo sát phổ FTIR nhận thấy, cả hai kích thước hạt nano Fe₃O₄ 30 nm và 10 nm (phổ của các hạt 10 nm cũng cho kết quả tương tự và không trình bày ở đây) đều gắn kết tốt các lớp phủ TEOS và APTES và hình thành cấu trúc Fe₃O₄/SiO₂/NH₂.

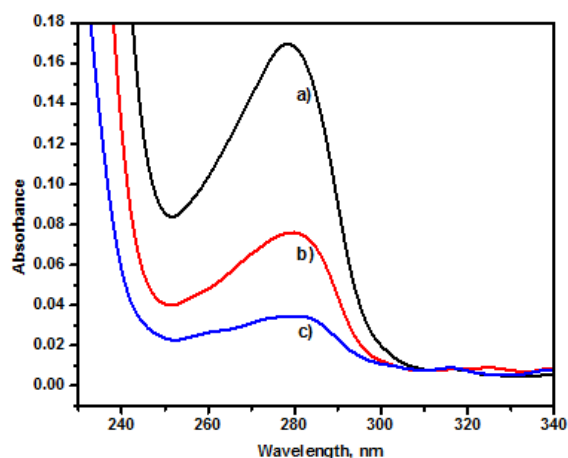
Vùng phổ 1627 cm⁻¹ thể hiện dao động uốn cong NH₂ của nhóm NH₂ tự do [1] và cũng thể hiện dao động uốn cong HOH [12]. Vì vậy, sự gia tăng các nhóm NH₂ tự do trên bề mặt hạt nano Fe₃O₄/SiO₂ sẽ làm tăng cường độ đỉnh vùng 1627 cm⁻¹.

Hình 5 thể hiện tỷ số cường độ đỉnh NH₂ tự do (1627 cm⁻¹) với cường độ đỉnh của Fe₃O₄ (572 cm⁻¹). Lượng APTES phủ lên cùng 0,2 g hạt nano Fe₃O₄/SiO₂, tăng đến 0,5 mL (hình 5a, hạt Fe₃O₄ 10 nm) và đến 0,375 mL (hình 5b, hạt



Hình 6: Ảnh hiển vi điện tử huỳnh quang của các hạt nano Fe₃O₄/SiO₂/NH₂/CHO/protein A khi gắn biotin-FITC: a) hạt Fe₃O₄ 10 nm, c) hạt Fe₃O₄ 30 nm. Và ảnh hiển vi điện tử huỳnh quang của các hạt nano Fe₃O₄/SiO₂/NH₂/CHO/protein A/biotin khi gắn biotin-FITC: b) hạt Fe₃O₄ 10 nm, d) hạt Fe₃O₄ 30 nm.

Fe₃O₄ 30 nm) thì thu được các nhóm NH₂ trên bề mặt hạt nano Fe₃O₄/SiO₂ là nhiều nhất. Sự khác biệt về lượng APTES gắn kết trên bề mặt hạt Fe₃O₄/SiO₂ (0,5 và 0,375 mL) có thể do kích thước hạt Fe₃O₄. Với cùng lượng hạt nano, nếu kích thước hạt nhỏ hơn sẽ có tổng diện tích bề mặt lớn hơn, và có nhiều nhóm chức năng hơn. Vì vậy, với cùng lượng hạt nano Fe₃O₄/SiO₂, hạt Fe₃O₄ có kích thước nhỏ hơn sẽ gắn kết được nhiều nhóm NH₂ tự do hơn. Các hạt nano Fe₃O₄/SiO₂/NH₂ được hoạt hóa bởi GA để trở thành cấu trúc Fe₃O₄/SiO₂/NH₂/CHO, cấu trúc này có thể gắn kết protein A. Protein A là một protein có chứa nhóm NH₂, các nhóm chức CHO của cấu trúc nano sẽ gắn kết với nhóm NH₂ của protein dựa trên liên kết cộng hóa trị [1]. Thông qua protein A, hạt có thể gắn với kháng thể, biotin... Thực nghiệm này, biotin-FITC được dùng để gắn với các hạt Fe₃O₄/SiO₂/NH₂/CHO/protein A, để minh chứng cho sự gắn kết của các hạt nano Fe₃O₄/SiO₂/NH₂/CHO với protein A. Hình 6 là ảnh điện tử huỳnh quang của các hạt nano Fe₃O₄/SiO₂/NH₂/CHO/protein A khi gắn biotin-FITC. Hình 6a và 6c tương ứng với kích thước



Hình 7: Phổ UV-Vis của dung dịch protein A: a) trước khi gắn; b) sau khi gắn với $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2/\text{CHO}$, kích thước hạt Fe_3O_4 30 nm; và c) sau khi gắn với $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2/\text{CHO}$, kích thước hạt Fe_3O_4 10 nm.

hạt nano Fe_3O_4 10 và 30 nm, cho thấy hầu hết các hạt nano phát ánh sáng xanh sau khi được chiếu xạ, nguyên nhân là do các hạt nano đã gắn được với protein A, đồng thời protein A đã gắn với biotin-FITC, chất có thể phát ánh sáng ở bước sóng 485 nm. Ngoài ra, hình 6a còn cho thấy do các hạt Fe_3O_4 có kích thước nhỏ hơn nên có sự kết tụ nhiều hơn. Trong khi đó, ở hình 6c, các hạt Fe_3O_4 với kích thước lớn hơn nên kết tụ ít hơn. Ở chiều ngược lại, hình 6b và 6d tương ứng với kích thước hạt Fe_3O_4 là 10 và 30 nm, cho thấy các hạt không phát sáng, nguyên nhân do các hạt nano gắn protein A được gắn biotin, trước khi gắn biotin-FITC, nên hầu hết các protein A đã gắn với biotin và gần như không còn protein A nào gắn với biotin-FITC nên các hạt không phát sáng.

Trong vùng phổ UV-Vis, đỉnh tại 280 nm đặc trưng cho protein. Vì thế, phổ UV-Vis được sử dụng để xác định khả năng gắn kết của các hạt nano với protein thông qua việc so sánh cường độ đỉnh tại 280 nm của dung dịch protein trước và sau khi gắn kết với các hạt nano. Phổ UV-Vis của dung dịch protein A trước khi gắn với các hạt nano được thể hiện ở hình 7a có đỉnh tại 280 nm cao hơn đỉnh tại 280 nm ở hình 7b và c là các phổ của dung dịch protein A sau khi gắn kết với các hạt nano $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2/\text{CHO}$.

Từ đây cho thấy, nồng độ của dung dịch protein A sau khi gắn với các hạt nano đã giảm là do một phần protein A có trong dung dịch đã gắn kết được với các hạt nano. Ngoài ra, đỉnh tại 280 nm trong hình 7b ứng với hạt Fe_3O_4 30 nm, cao hơn đỉnh tại 280 nm ở hình 7c ứng với hạt Fe_3O_4 10 nm, và điều này cũng cho thấy hạt Fe_3O_4 có kích thước nhỏ có khả năng gắn kết với nhiều nhóm chức hơn và qua đó làm tăng khả năng gắn kết protein. Sử dụng phương pháp Bradford

Bảng 1: Hiệu suất gắn kết protein A với các hạt nano.

Lượng hạt $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2/\text{CHO}$, (mg)	Kích thước hạt Fe_3O_4 , (nm)	Nồng độ dung dịch protein A, mg/mL		Hiệu suất gắn kết (%)
		Trước gắn kết	Sau gắn kết	
20	10	0,034	0,006	82,35
20	30	0,034	0,013	61,76

[13] để xác định hiệu suất gắn kết của các hạt nano với dung dịch protein A. Theo đó, 3 mL dung dịch Bradford được cho vào các tube chứa 100 μL dung dịch các mẫu, trong đó năm mẫu chuẩn đã biết nồng độ và các mẫu cần xác định nồng độ. Độ hấp thụ của các dung dịch được thực hiện bằng máy quang phổ UV – Vis ở bước sóng 595 nm, và phương trình đường chuẩn là $f(x) = 8,7536x + 0,1495$; $R^2 = 0,9401$, với x là nồng độ dung dịch và $f(x)$ là độ hấp thụ tương ứng với dung dịch đó. Từ đây, có thể suy được nồng độ của dung dịch protein A sau gắn kết. Hiệu suất gắn kết protein A với các hạt nano được xác định dựa vào biểu thức

$$E\% = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100$$

[4]. Trong đó, C_0 , C_1 lần lượt là nồng độ dung dịch protein A trước và sau khi gắn kết. Kết quả từ Bảng 1 chỉ ra rằng, hạt Fe_3O_4 có kích thước 10 nm sau khi được chức năng hóa có thể gắn protein A tốt hơn và đạt 82,35 %. Trong khi hạt Fe_3O_4 30 nm với cùng điều kiện gắn kết lại cho hiệu suất gắn kết protein A thấp hơn và chỉ đạt 61,76 %.

III. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, các hạt nano Fe_3O_4 với các kích thước 10 và 30 nm được chế tạo bằng

phương pháp đồng kết tủa và kích thước của các hạt được điều chỉnh thông qua thay đổi tốc độ đưa dung dịch bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối sắt II và III. Các hạt được chức năng hóa bề mặt để hình thành cấu trúc $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2/\text{CHO}$.

Với cấu trúc này, hạt có thể gắn kết được protein A. Hạt Fe_3O_4 có kích thước 10 nm, sau khi được chức năng hóa, cho khả năng gắn kết nhóm chức tốt hơn và hiệu suất gắn kết protein A cũng cao hơn và đạt 82,35 %. Trong khi ở cùng điều kiện gắn kết, hạt Fe_3O_4 với kích thước 30 nm lại cho khả năng gắn kết protein A thấp hơn và chỉ đạt 61,76 %. Tuy nhiên, hạt Fe_3O_4 với kích thước 30 nm lại có ưu điểm nổi bật là từ độ bão hòa lớn và đạt 85 emu/g, gần bằng từ độ bão hòa của Fe_3O_4 khối 92 emu/g, nhưng vẫn mang thuộc tính siêu thuận từ. Điều này giúp hạt đáp ứng tốt với từ trường ngoài và tái phân tán sau khi ngừng tác động của từ trường ngoài, một tính chất quan trọng đối với các ứng dụng trong y sinh nhất là các ứng dụng ngoài cơ thể.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Can K, Ozmen M, et al. Immobilization of albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2009;71(1):154–159.
- [2] Hou Y, Han X, et al. Isolation of PCR-ready genomic DNA from aspergillus niger cells with $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ microspheres. *Separation and Purification Technology*. 2013;116:101–106.
- [3] Pankhurst QA, Connolly J, et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*. 2003;36:167–181.
- [4] Hu B, Pan J, et al. Immobilization of *Serratia marcescens* lipase onto amino-functionalized magnetic nanoparticles for repeated use in enzymatic synthesis of Diltiazem intermediate. *Process Biochemistry*. 2009;44(99):1019–1024.
- [5] Andrade, Fulkerson B, M A, et al. Preparation of size-controlled nanoparticles of magnetite. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2012;324(10):1753–1757.
- [6] Massart R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE transactions on magnetics*. 1981;17:1247–1248.
- [7] Stober W, Fink A. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1968;26:62–69.
- [8] res LV, Chaneac C, et al. Size Tailoring of Magnetite Particles Formed by Aqueous Precipitation: An Example of Thermodynamic Stability of Nanometric Oxide Particles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1998;205:205–212.
- [9] Girginova PI, da Silva ALD, et al. Silica coated magnetite particles for magnetic removal of Hg^{2+} from water. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2010;345(2):234–240.
- [10] Zou J, Peng YG, et al. A facile bi-phase synthesis of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ core-shell nanoparticles with tunable film thicknesses. *RSC Advances*. 2014;4:9693.
- [11] Klotz M, Ayrat A, et al. Silica Coating on Colloidal Magnetite Particles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1999;220:357–361.
- [12] Paul RC, Narula RC, et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*. 2003;36:167–181.
- [13] Bradford M, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72:248–254.