

Gắn human serum albumin lên hạt nano Fe_3O_4 phủ APTES

•Bùi Trung Thành

•Phạm Hùng Vân

Đại học Y Dược TP HCM

•Trần Hoàng Hải

Viện Vật lý TP HCM

(Bài nhận ngày 30 tháng 07 năm 2013, nhận đăng ngày 16 tháng 01 năm 2015)

TÓM TẮT

Các hạt nano Fe_3O_4 được tổng hợp bằng phương pháp đồng kết tủa từ Fe^{2+} và Fe^{3+} với $NH_3.H_2O$ và 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) được phủ lên các hạt nano Fe_3O_4 bằng phản ứng silanization. Sau khi được thay đổi bề mặt bởi APTES, cấu trúc nano $Fe_3O_4/APTES$ được hoạt hóa bởi glutaraldehyde để hình thành các nhóm chức năng trên bề mặt các hạt nano. Human serum albumin (HSA) được gắn kết với các

Từ khóa: APTES, Hạt nano Fe_3O_4 , Human serum albumin, gắn kết.

cấu trúc nano $Fe_3O_4/APTES$ và $Fe_3O_4/APTES/GA$. Hình dạng và tính chất của các hạt nano được xác định bởi kính 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 và phân tích nhiệt trọng lượng (TGA). Phương pháp Bradford được sử dụng để xác định hiệu suất kết dính của HSA.

MỞ ĐẦU

Những năm gần đây, nhiều công trình nghiên cứu về các hạt từ Fe_3O_4 có kích thước nano, micro mét ứng dụng trong tách chiết, làm giàu, dẫn truyền thuốc, sắp xếp thứ tự DNA, phân tích tế bào... đã được công bố [1,4]. Có nhiều cách tổng hợp hạt nano từ Fe_3O_4 trong đó bao gồm phương pháp vật lý và hóa học [5,8]. Để tổng hợp được các hạt đồng nhất, nhiều phương pháp khác nhau đã được sử dụng: Đồng kết tủa [5], vi nhũ tương [6], bốc bay [7], nhiệt phân LASER [8]... Vật liệu hạt nano Fe_3O_4 được biết đến như một loại vật liệu với những tính năng vượt trội được kể đến đó là kích thước và tính siêu thuận từ. Khi kích thước của vật liệu giảm đến cỡ nano mét thì tỉ số giữa diện tích bề mặt và thể tích của vật liệu tăng cao đáng kể do đó làm tăng khả năng kết dính giữa bề mặt hạt nano với các protein [9]. Trong khi đó với tính siêu thuận từ của hạt nano

Fe_3O_4 , protein được cố định lên bề mặt hạt từ có thể dễ dàng được tập trung lại bằng từ trường ngoài và điều này được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như tách chiết, làm giàu, chẩn đoán...[4]. Các hạt nano từ Fe_3O_4 có xu hướng kết đám lại với nhau trong chất lỏng mang bởi tồn tại sự tương tác lưỡng cực từ mạnh giữa các hạt và lực Van der Waals, ngoài ra chúng còn dễ bị oxi hóa. Để ngăn ngừa sự kết đám và sự oxi hóa cũng như làm tăng khả năng tương thích sinh học của chúng, hạt nano từ Fe_3O_4 với vai trò lớp lõi cần được thay đổi bề mặt bởi những lớp vỏ là các chất có hoạt tính bề mặt hoặc polymer [1,3,10]. Thực vậy, với cấu trúc lõi-vỏ hạt nano có thể mang nhiều thành phần với các nhóm chức khác nhau như epoxy, amino và aldehyde, có thể đáp ứng cho nhiều ứng dụng khác nhau [11]. Cấu trúc lõi-vỏ có nhiều thuận lợi vì ổn định trong độ

pH thấp, dễ thay đổi bề mặt, dễ điều khiển độ dày của lớp vỏ và dễ dàng tái phân tán sau khi kết tụ do tác dụng của từ trường ngoài [12]. Những thông số quan trọng nhất của hạt nano từ sau khi được thay đổi bề mặt là kích thước, cấu trúc, tính ưa nước, mật độ các nhóm chức năng và tính siêu thuận từ [13]. Để gia tăng số lượng các protein kết dính lên bề mặt hạt từ, cũng như cải thiện độ bền của các protein đã kết dính, thì hạt từ sau khi được thay đổi bề mặt có thể hòa tan trong nước, tương hợp sinh học tốt và có nhiều nhóm chức năng [14]. Thông qua các nhóm chức năng, hạt từ có thể liên kết đồng hóa trị với các protein như human serum albumin, kháng thể, bovine serum albumin (BSA) ... [1,3,15]. Có hai cách chính để gắn protein lên hạt từ đã được thay đổi bề mặt, là hấp thụ vật lý và liên kết đồng hóa trị [15]. Gắn kết protein dựa trên liên kết đồng hóa trị có thể làm tăng lượng protein kết dính thông qua việc gia tăng các nhóm chức năng trên hạt từ. Hơn nữa, protein được gắn kết bằng liên kết đồng hóa trị có thể gia tăng độ bền của protein đã kết dính cũng như gia tăng những vị trí gắn kết protein [16,17]. Đã có những công trình nghiên cứu về gắn kết protein là BSA lên hạt nano Fe_3O_4 có cấu trúc $Fe_3O_4/SiO_2/APTES/PEG/GA$ [17], $Fe_3O_4/APTES/GA$ [18]. Tuy nhiên, tùy thuộc vào cấu trúc và chất lượng của các hạt nano cùng với những protein khác nhau sẽ cho hiệu suất kết dính của các hạt nano với protein là khác nhau.

Trong nghiên cứu này, các hạt nano được sử dụng để gắn kết protein khác là human serum albumin (HSA). HSA là protein có trong huyết tương người chiếm tỷ lệ cao nhất 58-74% tổng lượng protein, khối lượng phân tử 66,437 kDa, cấu trúc hóa học của HSA chứa liên kết amine, nhóm amino và hydroxy [15]. Đầu tiên, các hạt nano Fe_3O_4 được tổng hợp bằng phương pháp đồng kết tủa từ Fe^{2+} và Fe^{3+} với $NH_3.H_2O$. Kế đến, các hạt nano Fe_3O_4 được thay đổi bề mặt bởi chất 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES),

APTES được cho là khá phù hợp trong việc thay đổi trực tiếp bề mặt hạt Fe_3O_4 với những thuận lợi như khả năng tương thích sinh học cũng như mật độ nhóm amino cao [15]. Sau khi được thay đổi bề mặt bởi APTES, các hạt nano được hoạt hóa bởi glutaraldehyde (GA) để hình thành những nhóm aldehyde trên bề mặt hạt nano và các nhóm aldehyde của hạt nano liên kết với nhóm amino của HSA bằng liên kết đồng hóa trị.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Ferrous chloride tetrahydrate ($FeCl_2.4H_2O$), Ferric chloride hexahydrate ($FeCl_3.6H_2O$), Ammonium hydroxide ($NH_3.H_2O$, 25%, w/w), Ethanol (>99%), Coomassie Brilliant Blue G-250, Acid phosphoric (85%) do hãng Merck (Germany) sản xuất. 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES), glutaraldehyde (GA, 25%, v/v), human serum albumin (HSA, 96%), được cung cấp bởi hãng Sigma Aldrich (USA). Dung dịch Bradford và phosphate buffered saline (PBS: pH 7,4) được làm theo hướng dẫn [19,20].

Phương pháp

Tổng hợp các hạt nano Fe_3O_4

Hạt nano được tổng hợp bằng phương pháp đồng kết tủa [5] và có sự thay đổi về tỷ phần mol $Fe^{3+}:Fe^{2+} = 1,75:1$, theo đó 7,5684g $FeCl_3.6H_2O$ và 3,1736g $FeCl_2.4H_2O$ được hòa tan trong 280mL nước cất bằng khuấy cơ trong 30 phút trong môi trường khí N_2 , nhiệt độ của hỗn hợp dung dịch duy trì ở $70^\circ C$. Kế đến, 50mL dung dịch $NH_3.H_2O$ được thêm nhanh vào hỗn hợp dung dịch trên (pH~9,5) và khuấy thêm 1 giờ nữa cũng trong môi trường khí N_2 và ở nhiệt độ $70^\circ C$ để phản ứng xảy ra hoàn toàn. Sau đó để hỗn hợp dung dịch nguội đến nhiệt độ phòng, các hạt kết tủa được rửa nhiều lần bằng nước cất và được tách bằng nam châm. Sau cùng, các hạt kết tủa được sấy khô trong môi trường chân không ở $70^\circ C$.

Phủ APTES lên các hạt nano Fe_3O_4

Hạt nano Fe_3O_4 được phủ APTES ($Fe_3O_4/APTES$) bằng phản ứng silanization [21]. Một cách tóm tắt, 250 mg Fe_3O_4 hòa tan trong 150mL ethanol/nước (tỷ lệ thể tích 1:1), hỗn hợp dung dịch được rung siêu âm trong 30 phút để hạt phân tán đều. 118 μ L APTES được thêm nhanh vào hỗn hợp dung dịch trên và khuấy cơ trong 7 giờ ở nhiệt độ 40°C trong môi trường khí N_2 . Sau đó, hỗn hợp dung dịch được làm nguội đến nhiệt độ phòng. Sau cùng, các hạt nano Fe_3O_4 phủ APTES được tách bằng nam châm và rửa bằng nước cất nhiều lần và được sấy khô trong môi trường chân không ở nhiệt độ phòng.

Hoạt hóa $Fe_3O_4/APTES$ bởi Glutaraldehyde

75 mg hạt $Fe_3O_4/APTES$ được phân tán trong 24,5 mL nước cất bằng cách rung siêu âm trong 30 phút, 0,5 mL dung dịch GA 25% được thêm vào và được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ, sau đó các hạt nano được tách bằng nam châm và được rửa bằng nước cất nhiều lần.

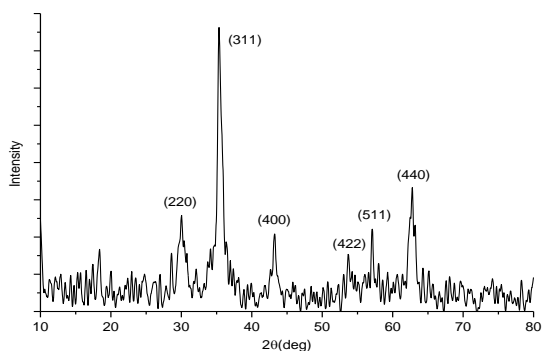
Gắn Human Serum Albumin

12,3 mg hạt nano được cho vào 1 mL dung dịch PBS (pH 7,4) có nồng độ HSA khác nhau (0,123; 0,246; 0,431 và 0,824 mg/mL). Hỗn hợp các hạt nano-HSA được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 5 giờ. Sau đó được tách bởi nam châm và thu được

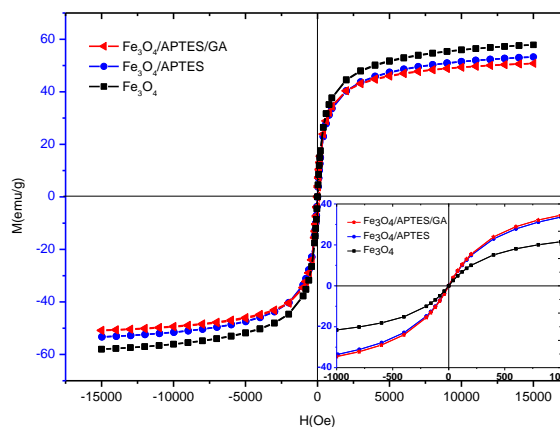
các hạt nano gắn kết HSA (nano/HSA) và dung dịch HSA sau khi gắn kết với các hạt nano (dung dịch HSA sau gắn kết). Các hạt nano/HSA được rửa bằng nước cất ba lần và lưu trữ ở 4°C để làm các phân tích sau đó; dung dịch HSA sau gắn kết được dùng để định lượng HSA còn lại.

Các kỹ thuật phân tích

Ảnh hiển vi điện tử truyền qua (TEM) được ghi bởi máy JEM-1400 (Joel, Japan). Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR) được ghi bởi máy quang phổ TENSOR 27 (Bruker, Germany). Đường cong từ hóa được đo ở nhiệt độ phòng bởi từ kế mẫu rung (VSM) MicroSense (USA). Giải đồ nhiễu xạ tia X (XRD) được đo bởi máy D8-ADVANCE (Bruker, Germany), điện áp gia tốc 40 KV, cường độ dòng 30 mA, bức xạ Cu-K α với bước sóng $\lambda = 1,5406$, góc quét $2\theta = 10 - 80^\circ$, tốc độ quét 0.03°/s. Phân tích nhiệt trọng lượng (TGA) được thực hiện trên máy TGA Q500 V20.13 Build 39 (TA instruments, USA) với khối lượng mẫu từ 10-25 mg, nhiệt độ thay đổi từ nhiệt độ phòng đến 900°C, tốc độ gia nhiệt 10°C/phút trong môi trường khí N_2 với tốc độ thổi khí 60 mL/phút. Máy quang phổ UV-Vis NanoDrop 2000 (Thermo, United States). Và máy quang phổ PD-303 (Apel, Japan) tất cả được sử dụng để xác định hình dạng, kích thước, tính chất của các hạt nano và sự kết dính của các lớp



Hình 1. Giải đồ XRD của các hạt nano Fe_3O_4 .



Hình 2. Đường cong từ hóa của các hạt nano Fe_3O_4 , $Fe_3O_4/APTES$ và $Fe_3O_4/APTES/GA$.

phủ.

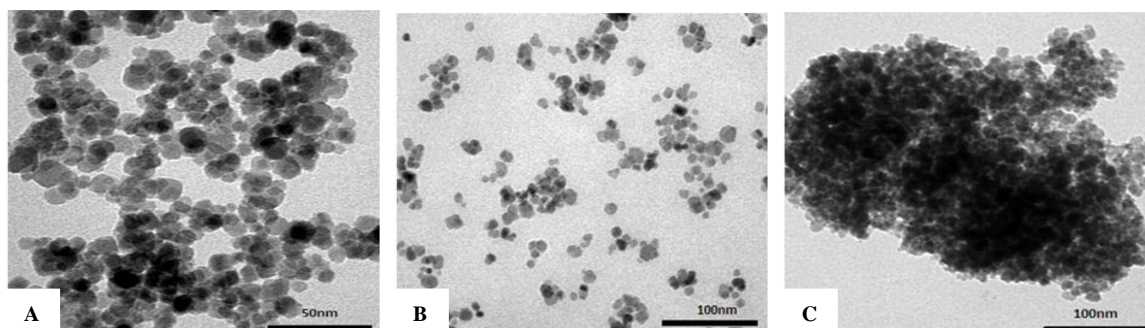
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Cấu trúc tinh thể của các hạt nano được xác định bởi phép đo XRD. Giản đồ XRD của các hạt nano được trình bày ở Hình 1, về cơ bản các hạt thu được là các hạt nano Fe_3O_4 . Tất cả các peak nhiễu xạ khá phù hợp với các peak nhiễu xạ trên giản đồ XRD của Fe_3O_4 chuẩn (JCPDS# 19-629). Áp dụng công thức Scherrer với đỉnh nhiễu xạ (311) ở góc $2\theta \sim 35,45^\circ$ cho thấy các hạt nano Fe_3O_4 có đường kính xấp xỉ 9 nm.

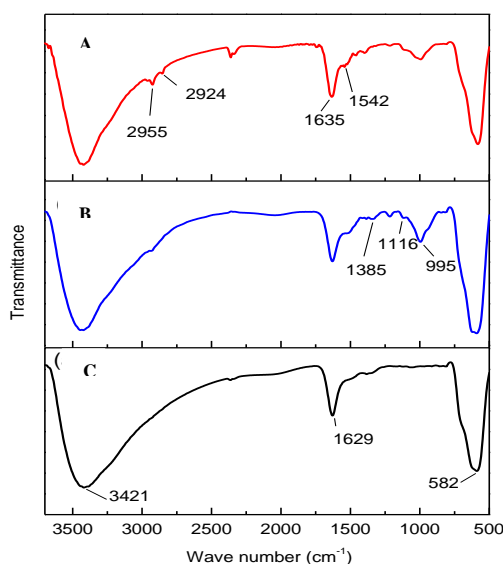
Tính chất từ của các hạt nano được xác định bởi VSM ở nhiệt độ phòng. Hình 2 cho thấy giá trị bão hòa từ của các hạt nano $Fe_3O_4/APTES$ là

50,84 emu/g nhỏ hơn giá trị bão hòa từ 53,27 emu/g của các hạt nano Fe_3O_4 . Sự khác biệt này được cho là do lớp phủ APTES [10], điều này cũng chứng minh rằng lớp phủ APTES đã phủ lên hạt nano Fe_3O_4 . Giá trị bão hòa từ của các hạt $Fe_3O_4/APTES/GA$ là 49,70 emu/g không giảm đáng kể so với giá trị bão hòa từ của các hạt $Fe_3O_4/APTES$ (50,84 emu/g). Hình bên phải phía dưới ở trong Hình 2 cũng cho thấy các hạt nano Fe_3O_4 , $Fe_3O_4/APTES$ và $Fe_3O_4/APTES/GA$ đều siêu thuận từ.

Hình 3A, 3B và 3C lần lượt là ảnh TEM của các hạt nano Fe_3O_4 , $Fe_3O_4/APTES$ và $Fe_3O_4/APTES/GA/HSA$.



Hình 3. Ảnh TEM của các hạt nano A) Fe_3O_4 , B) $Fe_3O_4/APTES$ và C) $Fe_3O_4/APTES/GA/HSA$.



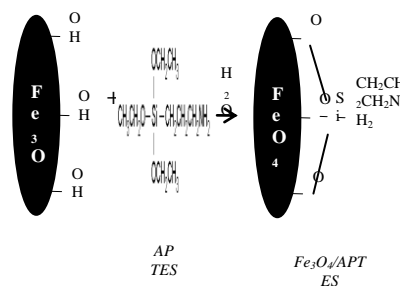
Hình 4. Phổ FTIR của A) Fe_3O_4 , B) $Fe_3O_4/APTES$, C) $Fe_3O_4/APTES/GA/HSA$.

Quan sát ảnh TEM ở Hình 3A của các hạt nano Fe_3O_4 thấy các hạt có hình dạng gần cầu với kích thước khoảng 8 -12 nm, đường kính trung bình khoảng 10,58 nm khá phù hợp với kết quả thu được từ cách dùng công thức Scherrer là 9 nm. Ở Hình 3B là ảnh TEM của các hạt $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$, sau khi được xử lý bề mặt bởi APTES các hạt $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$ đã phân tán tốt hơn và hình dạng cũng tương đối cầu. Ảnh TEM ở Hình 3C được thực hiện trên mẫu hạt nano $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}/\text{GA}/\text{HSA}$ cho thấy HSA đã gắn kết được với các hạt nano.

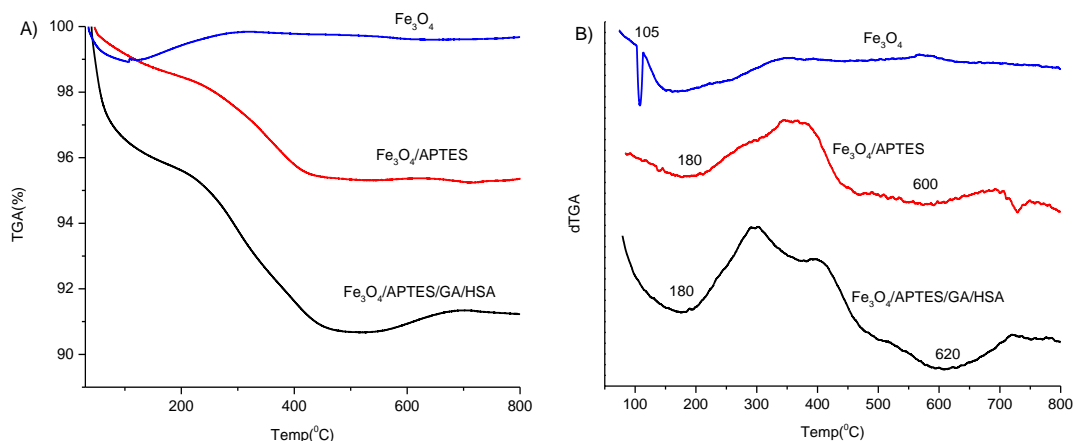
Phổ FTIR được sử dụng để nghiên cứu sự thay đổi bề mặt của các hạt nano. Hình 4A là phổ FTIR của các hạt nano Fe_3O_4 . Đỉnh gần 582, 3421 và 1629 cm^{-1} lần lượt là dao động kéo căng Fe-O, dao động kéo căng O-H và dao động bị biến dạng O-H [22]. Sự xuất hiện đỉnh 3421 và 1629 cm^{-1} của dao động O-H là do các hạt nano Fe_3O_4 được tổng hợp trong môi trường nước nên được phủ một số nhóm OH. Do vậy, APTES có thể phủ được lên bề mặt hạt nano Fe_3O_4 thông qua phản ứng silanization với nhóm OH [10]. Quá trình phản ứng giữa các hạt nano Fe_3O_4 với lớp phủ APTES được thể hiện ở Hình 5. Phổ FTIR ở Hình 4B của các hạt Fe_3O_4 phủ APTES, xuất hiện các đỉnh ở gần 995, 1116 cm^{-1} được cho là của dao động kéo căng Si-O [15]. Đỉnh tại 1385 cm^{-1} do dao động kéo căng C-N [10]. Từ đây cho thấy có sự hình thành liên kết đồng hóa trị Fe-O-Si sau khi Fe_3O_4 được thay đổi bề mặt bởi APTES. Hình 4C là phổ FTIR của các hạt Fe_3O_4 phủ APTES, được xử lý glutaraldehyde và gắn kết HSA. Trên phổ xuất hiện các đỉnh đặc trưng của protein. Đỉnh tại 1635 và 1542 cm^{-1} khá phù hợp với đỉnh đặc trưng của nhóm amide I là 1639 cm^{-1} [17,23] và nhóm amide II là 1545 cm^{-1} [23]. Hơn nữa, dao động của O-H tại 1629 cm^{-1} cũng góp phần làm tăng thêm cường độ dao động của nhóm amide I. Vùng phổ xuất hiện

trong khoảng 2850-2960 cm^{-1} là do dao động đối xứng và bất đối xứng của các nhóm CH_2 và CH_3 được tìm thấy trong protein và lipid [24]. Tại đỉnh 3421 cm^{-1} là do dao động kéo căng của O-H và N-H có trong H_2O và protein [24]. Từ những kết quả này chỉ ra rằng APTES đã phủ được trên bề mặt hạt nano thông qua phản ứng silanization với các nhóm OH và HSA đã gắn kết được với các hạt nano.

Độ bền nhiệt của các hạt nano Fe_3O_4 , Fe_3O_4 phủ APTES và HSA gắn kết các hạt nano được nghiên cứu bởi TGA và đạo hàm bậc nhất của nó. Hình 6 cho thấy sự mất khối lượng của các hạt nano trong khoảng nhiệt độ 60-180 $^{\circ}\text{C}$ chủ yếu do mất lượng nước hấp thụ trên vật liệu [15]. Sự mất khối lượng do nước của các hạt Fe_3O_4 khoảng 1,15%, Fe_3O_4 phủ APTES là 1,35% và HSA phủ các hạt nano là 4%. Sự phân rã của APTES xảy ra trong khoảng nhiệt độ 250-500 $^{\circ}\text{C}$ [15], của protein bắt đầu từ nhiệt độ 220 đến 500 $^{\circ}\text{C}$ mà chủ yếu tại 280 $^{\circ}\text{C}$ [25]. Do vậy, trong khoảng 250-600 $^{\circ}\text{C}$ khối lượng của các hạt nano phủ APTES giảm khoảng 2,65% chủ yếu do lớp phủ APTES. Cũng khoảng nhiệt độ này sự mất khối lượng của các hạt nano gắn kết HSA là do mất khối lượng của lớp phủ APTES và HSA khoảng 5%.



Hình 5. Quá trình phản ứng giữa lớp phủ APTES với hạt nano Fe_3O_4 .



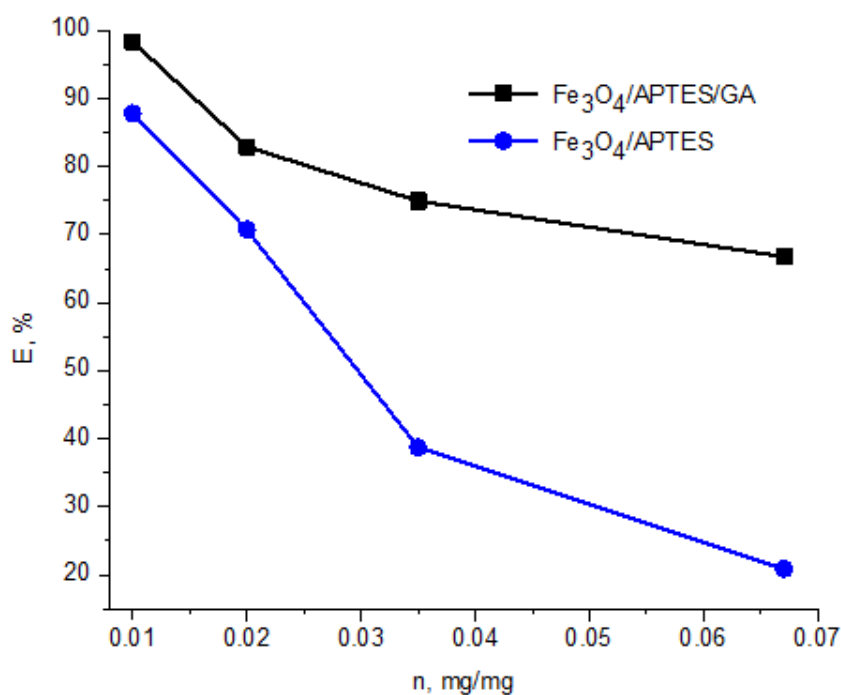
Hình 6. A) TGA và B) đạo hàm bậc nhất của TGA của các hạt nano Fe₃O₄, Fe₃O₄/APTES, Fe₃O₄/APTES/GA/HAS

Dựa vào lượng protein không gắn kết được với các hạt nano có thể suy ra hiệu suất gắn protein [2,9,17,18]. Biểu thức xác định hiệu suất gắn protein với các hạt nano $E\% = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100$ (1) [9]. Trong đó E là hiệu suất gắn protein, C₀ và C₁ lần lượt là nồng độ protein có trong dung dịch trước và sau khi gắn. Bằng phương pháp Bradford (1976) [19] có thể xác định được nồng độ dung dịch HSA sau gắn kết. Theo đó, 3mL dung dịch Bradford được cho vào 100 μl dung dịch mẫu, trong đó sáu mẫu dung dịch HSA chuẩn và các mẫu dung dịch HSA sau gắn kết. Độ hấp thụ được ghi ở bước sóng 595nm. Từ các mẫu chuẩn suy được phương trình $f(x) = 1,1232x + 0,0059$; $R^2 = 0,9945$ (2), từ phương trình (2) suy được nồng độ dung dịch HSA sau gắn kết. Hiệu suất gắn HSA được cho ở Bảng 1. Kết quả ở Bảng 1 và Hình 7 cho thấy, tăng lượng HSA phủ lên các cấu trúc nano, nói chung làm tăng lượng HSA gắn được với các

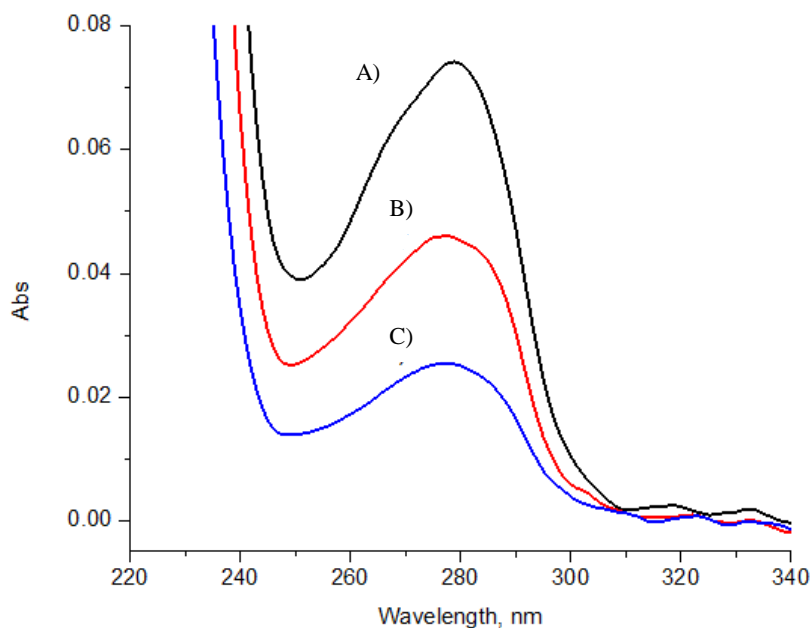
hạt nano nhưng lại làm giảm hiệu suất gắn kết. Tỷ số n giữa lượng HSA (mg) và lượng hạt nano (mg) là 0,067 thì 12,3 mg hạt Fe₃O₄/APTES/GA gắn được 0,55 mg HSA cho hiệu suất 66,75%, trong khi n = 0,01 với các hạt nano trên gắn được 0,121 mg HSA cho hiệu suất 98,37%. Tỷ số n càng nhỏ hiệu suất gắn protein càng cao. Kết quả ở Bảng 1 chỉ ra rằng với cùng tỷ số n thì hạt nano có cấu trúc Fe₃O₄/APTES/GA cho hiệu suất kết dính HSA tốt hơn cấu trúc Fe₃O₄/APTES. Do mỗi phân tử GA có hai nhóm aldehyde (CHO), một nhóm CHO liên kết đồng hóa trị với nhóm NH₂ của lớp APTES phủ Fe₃O₄, nhóm CHO còn lại liên kết với nhóm NH₂ của protein. Tỷ số n = 0,067, cấu trúc Fe₃O₄/APTES/GA cho hiệu suất kết dính HSA 66,75 % cao hơn so với cấu trúc Fe₃O₄/APTES là 20,87%. Do vậy, tùy thuộc vào chất lượng cũng như cấu trúc các hạt nano và tùy thuộc vào protein sẽ cho kết quả gắn kết protein với cấu trúc hạt nano khác nhau.

Bảng 1. Hiệu suất gắn kết HSA trên cấu trúc Fe₃O₄/APTES/GA và Fe₃O₄/APTES với nồng độ dung dịch HSA trước khi gắn kết và tỷ số n khác nhau.

| Hạt nano, mg | Cấu trúc | Nồng độ HSA trước gắn kết, (mg/mL) | n (mg/mg) | Độ hấp thu (dung dịch HSA sau gắn kết) | Nồng độ HSA sau gắn kết, (mg/mL) | Nồng độ HSA gắn kết với hạt nano, (mg/mL) | Hiệu suất gắn kết HSA, (%) |
|--------------|--|------------------------------------|-----------|--|----------------------------------|---|----------------------------|
| 12,3 | Fe ₃ O ₄ /APTES/GA | 0,123 | 0,010 | 0,008 | 0,002 | 0,121 | 98,37 |
| | | 0,246 | 0,020 | 0,053 | 0,042 | 0,204 | 82,93 |
| | | 0,431 | 0,035 | 0,127 | 0,108 | 0,323 | 74,94 |
| | | 0,824 | 0,067 | 0,314 | 0,274 | 0,550 | 66,75 |
| | Fe ₃ O ₄ /APTES | 0,123 | 0,010 | 0,023 | 0,015 | 0,108 | 87,80 |
| | | 0,246 | 0,020 | 0,087 | 0,072 | 0,174 | 70,73 |
| | | 0,431 | 0,035 | 0,303 | 0,264 | 0,167 | 38,74 |
| | | 0,824 | 0,067 | 0,738 | 0,652 | 0,172 | 20,87 |



Hình 7. Sự phụ thuộc hiệu suất gắn HSA vào n.



Hình 8. Phổ UV-Vis của dung dịch HSA trước và sau khi gắn kết với các hạt nano. A) Trước khi gắn kết, nồng độ 0,824 mg/mL. B) Sau khi gắn kết với các hạt $Fe_3O_4/APTES$, tỷ số $n = 0,067$. C) Sau khi gắn kết với các hạt $Fe_3O_4/APTES/GA$, tỷ số $n = 0,067$.

Hình 8 thể hiện phổ hấp thụ UV-Vis của dung dịch HSA có nồng độ 0,824 mg/mL trước khi gắn kết với các hạt nano và dung dịch HSA sau khi gắn kết với các hạt nano với cùng tỷ lệ $n = 0,067$. Sự giảm cường độ hấp thụ ở gần đỉnh 280 nm cho thấy nồng độ dung dịch HSA sau khi gắn kết với các hạt nano có cấu trúc $Fe_3O_4/APTES/GA$ nhỏ hơn nồng độ dung dịch HSA sau khi gắn kết với các hạt thuộc cấu trúc $Fe_3O_4/APTES$. Nồng độ dung dịch HSA sau gắn kết thuộc cả hai cấu trúc trên đều nhỏ hơn nồng độ của dung dịch HSA trước khi gắn kết. Từ kết quả này cho thấy một phần HSA đã gắn được với các cấu trúc hạt nano và khả năng gắn kết HSA của cấu trúc $Fe_3O_4/APTES/GA$ tốt hơn so với cấu trúc $Fe_3O_4/APTES$.

KẾT LUẬN

Các hạt nano Fe_3O_4 được tổng hợp bằng phương pháp đồng kết tủa có đường kính trung

bình khoảng 10,58 nm, giá trị bão hòa từ 53,27 emu/g và siêu thuận từ. Sau khi được thay đổi bề mặt bởi lớp phủ APTES các hạt nano đã phân tán tốt hơn và có thể gắn kết được protein là HSA. Tỷ số n giữa lượng HSA và lượng hạt nano càng nhỏ, hiệu suất gắn HSA càng cao. Trong nghiên cứu này cấu trúc $Fe_3O_4/APTES/GA$ gắn kết HSA tốt hơn so với cấu trúc $Fe_3O_4/APTES$. Việc nghiên cứu gắn kết thành công HSA lên cấu trúc hạt nano Fe_3O_4 sẽ là cơ sở để gắn kết các kháng thể lên cấu trúc hạt nano được sử dụng để chẩn đoán sớm một số bệnh nhất là các bệnh truyền nhiễm và ung thư.

LỜI CẢM ƠN: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Công ty Nam Khoa Biotek, Phòng Năng lượng và Môi trường, Viện Vật lý TpHCM, Phòng Thực tập Vật lý ĐHYD TpHCM đã hỗ trợ thiết bị để thực hiện nghiên cứu này.

Human serum albumin immobilization on APTES coated magnetite nanoparticles

•Bui Trung Thanh

•Pham Hung Van

Medical and Pharmaceutical University, HCM

•Tran Hoang Hai

Institute of Physics, HCM

ABSTRACT

Magnetite nanoparticles were synthesized by co-precipitation of Fe^{2+} and Fe^{3+} with $NH_3.H_2O$, and then 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) was coated on the magnetite nanoparticles by silanization reaction to achieve $Fe_3O_4/APTES$ nanostructures. After modified by APTES, the nanostructures were activated by glutaraldehyde (GA) to obtain functional groups on the nanostructures surface. Human Serum Albumin (HSA) was

immobilised on the $Fe_3O_4/APTES$ and $Fe_3O_4/APTES/GA$ nanostructures. The morphology and properties of the nanoparticles were characterized by transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD), vibrating sample magnetometer (VSM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), UV-vis spectroscopy and thermal gravimetric analysis (TGA). The HSA binding efficiency was estimated by the Bradford method.

Key words: APTES, human serum albumin, immobilization, magnetite nanoparticles.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. X. Xue, J. Wang, L. Mei, Z. Wang, K. Qi, B. Yang, Recognition and enrichment specificity of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles surface modified by chitosan and *Staphylococcus aureus* enterotoxins A antiserum, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 103, 107-113 (2013).
- [2]. F. Šulek, Ž. Knez, M. Habulin, Immobilization of cholesterol oxidase to finely dispersed silica-coated magnetic nanoparticles based magnetic fluid, *Applied Surface Science*, 256, 4596-4600 (2010).
- [3]. X. Wang, G. Zhou, H. Zhang, S. Du, Y. Xu, C. Wang, Immobilization and catalytic activity of lipase on mesoporous silica prepared from biocompatible gelatin organic template, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 357, 3027-3032 (2011).
- [4]. S. Mornet, A. Vekris, J. Bonnet, E. Duguet, F. Grasset, J.H. Choy, J. Portier, DNA-magnetic nanocomposite materials, *Materials Letters*, 42, 183-188 (2000).
- [5]. M. Tajabadi, M.E. Khosroshahi, New finding on magnetite particle size reduction by changing temperature and alkaline media concentration, *APCBEE Procedia*, 3, 140-146 (2012).
- [6]. A.B. Chin, I.I. Yaacob, Synthesis and characterization of magnetic iron oxide

- nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure, *Journal of Materials Processing Technology*, 191, 235-237 (2007).
- [7]. D. Dosev, M. Nichkova, R.K. Dumas, S.J. Gee, B.D. Hammock, K. Liu, I.M. Kennedy, Magnetic/luminescent core/shell particles synthesized by spray pyrolysis and their application in immunoassays with internal standard, *Nanotechnology*, 18, 55102 (2007).
- [8]. O. Bomati-Miguel, P. Tartaj, M.P. Morales, P. Bonville, U. Golla-Schindler, X.Q. Zhao, S. Veintemillas-Verdaguer, Core-shell iron-iron oxide nanoparticles synthesized by laser-induced pyrolysis, *Small*, 2, 1476-83 (2006).
- [9]. B. Hu, J. Pan, H.L. Yu, J.W. Liu, J.H. Xu, Immobilization of *Serratia marcescens* lipase onto amino-functionalized magnetic nanoparticles for repeated use in enzymatic synthesis of Diltiazem intermediate, *Process Biochemistry*, 44, 1019-1024 (2009).
- [10]. X.C. Shen, X.Z. Fang, Y.H. Zhou, H. Liang, Synthesis and characterization of 3-aminopropyltriethoxysilane-modified superparamagnetic magnetite Nanoparticles, *Chemistry Letters*, 33, 1468-1469 (2004).
- [11]. C. Vogt, M.S. Toprak, M. Muhammed, S. Laurent, J.L. Bridot, R.N. Müller, High quality and tuneable silica shell-magnetic core nanoparticles, *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 1137-1147 (2009).
- [12]. C. Wu, H. He, H. Gao, G. Liu, R. Ma, Y. An, L. Shi, Synthesis of Fe₃O₄@SiO₂@polymer nanoparticles for controlled drug release, *Science China Chemistry*, 53, 514-518 (2010).
- [13]. M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, T. Sen, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 24-46 (2011).
- [14]. A. Dyal, K. Loos, M. Noto, S.W. Chang, C. Spagnoli, K.V.P.M. Shafi, A. Ulman, M. Cowman, R.A. Gross, Activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on γ -Fe₂O₃ magnetic nanoparticles, *J. AM. CHEM. SOC.*, 125, 1684-1685 (2003).
- [15]. K. Can, M. Ozmen, M. Ersoz, Immobilization of albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 71, 154-9 (2009).
- [16]. Y. Liu, Y. Li, An Antibody-Immobilized capillary column as a bioseparator/bioreactor for detection of *Escherichia coli* O157:H7 with absorbance measurement, *Anal. Chem.*, 73, 5180-5183 (2001).
- [17]. R. Khatiri, A. Reyhani, S.Z. Mortazavi, M. Hossainipour, Immobilization of serum albumin on the synthesized three layers core-shell structures of superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19, 1642-1647 (2013).
- [18]. E. Maltas, M. Ozmen, H.C. Vural, S. Yildiz, M. Ersoz, Immobilization of albumin on magnetite nanoparticles, *Materials Letters*, 65, 3499-3501 (2011).
- [19]. M.M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254 (1976).
- [20]. R. Dulbecco, M. Vogt, Plaque Formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses, *J. Exp. Med.*, 99, 167-182 (1954).

- [21]. M. Ma, Y. Zhang, W. Yu, H.y. Shen, H.q. Zhang, N. Gu, Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 212, 219-226 (2003).
- [22]. X. Liu, Z. Ma, J. Xing, H. Liu, Preparation and characterization of amino-silane modified superparamagnetic silica nanospheres, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 270, 1-6 (2004).
- [23]. H.Y. Cheng, L.J. Lai, F.H. Ko, Rapid and sensitive detection of rare cancer cells by the coupling of immunomagnetic nanoparticle separation with ELISA analysis, *Int J Nanomedicine*, 7, 2967-2973 (2012).
- [24]. N. Jamin, P. Dumas, J. moncuit, W.H. Fridman, J.L. Teillaud, G.L. Carr, G.P. Williams, Highly resolved chemical imaging of living cells by using synchrotron infrared microspectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 4837-4840 (1998).
- [25]. K. Csach, A. Juríková, J. Mikuf, M. Koneracká, V. Záviová, M. Kubovčíková, P. Kopřanský, Thermogravimetric study of the decomposition of BSA-coated magnetic nanoparticles, *Proceedings of the European Conference Physics of Magnetism*, 121, 1293-1295 (2011).