

羧基磁流体制备和牛血清白蛋白表面修饰

闫妍^{1,2}, 赵凌云¹, 王晓文¹, 张晓冬¹, 高福平¹, 唐劲天¹

1. 清华大学工程物理系; 粒子技术与辐射成像教育部重点实验室, 北京 100084
2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘要 磁性纳米粒已被用作肿瘤磁感应热疗的介质, 目前常用纳米 Fe_3O_4 , 其经典制备方法是化学共沉淀法, 得到具有超顺磁性的纳米 Fe_3O_4 粒径约为 10~15nm。本文采用改进的化学共沉淀法制备聚丙烯酸 (PAA) 修饰的羧基纳米 Fe_3O_4 , 通过 EDC、NHS 活化法偶联模型蛋白牛血清白蛋白 (BSA), 用 BCA 定量分析磁粒对 BSA 的偶联效率, 并进一步偶联荧光标记的抗体, 观察偶联效果。结果表明, 改进的化学共沉淀法制备的羧基纳米粒粒径约 10nm, 水相分散性良好; 定量分析和光学观察结果均显示, 采用 EDC、NHS 活化法能使蛋白质与羧基化磁性颗粒稳定结合。本研究为靶向磁性纳米粒的制备提供一种新方法。

关键词 磁性纳米粒; 聚丙烯酸; 牛血清白蛋白; 靶向

中图分类号 R318.08

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)19-0073-04

Preparation of Carboxyl Magnetic Fluid and Surface Modification by Bovine Serum Albumin

YAN Yan^{1,2}, ZHAO Lingyun¹, WANG Xiaowen¹, ZHANG Xiaodong¹, GAO Fuping¹, TANG Jintian¹

1. Key Laboratory of Particle & Radiation Imaging, Ministry of Education; Department of Engineering Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China
2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract Magnetic nanoparticles are now used in magnetic-mediated hyperthermia for tumor treatment. Magnetic Fe_3O_4 nanoparticles with a mean diameter of 10~15nm, in the range of superparamagnetism, are normally prepared by the traditional method of co-precipitation from ferrous and ferric electrolyte solutions. This work presents a novel and efficient way to prepare a stable aqueous nanomagnetite dispersion. A stable ferrofluid containing Fe_3O_4 nanoparticles coated by carboxyl groups was synthesized via improved co-precipitation in the presence of polyacrylic acid. Furthermore, Bovine Serum Albumin (BSA) used as the model targeting molecule was conjugated with magnetic nanoparticles via activation by N-ethyl-N'-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS). The results indicate that the average diameter of PAA oligomers coated Fe_3O_4 particles was about 10nm, and had a good dispersion in aqueous phase. In addition, both quantitative analysis and fluorescent microscopy observation confirmed that BSA can be stably conjugated with carboxyl- Fe_3O_4 particles via EDC and NHS activation.

Keywords magnetic nanoparticles; polyacrylic acid; bovine serum albumin; targeting

0 引言

近年来随着纳米生物技术的发展, 磁性纳米粒不仅在光学、电学、磁学等传统领域应用, 而且在对人类生命至关重要

的生物医学领域也表现出广阔的应用前景。磁性材料具有在外加交变磁场中产生热量的特性, 已被用作肿瘤磁感应热疗的介质; 并且磁性纳米粒可以通过共价键结合生物素、细胞、

收稿日期: 2010-04-14; 修回日期: 2010-08-07

基金项目: 北京市科委基金项目 (Z07000200540704)

作者简介: 闫妍, 硕士研究生, 研究方向为靶向磁性纳米颗粒用于肿瘤磁感应热疗, 电子信箱: 0222ym815@sina.com; 唐劲天 (通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: S0900800253M, E190003065S), 教授, 研究方向为肿瘤磁感应治疗, 电子信箱: tangjt@mail.tsinghua.edu.cn

抗体、细胞表面蛋白分子、DNA 或 RNA 等生物活性物质^[1-3], 因此, 将生物分子修饰的磁性颗粒作为磁热疗介质可能实现肿瘤分子特异性磁感应热疗。目前肿瘤磁感应热疗用磁性介质多采用 Fe_3O_4 纳米粒, 而传统化学共沉淀法制备的 Fe_3O_4 纳米粒极易聚集, 为了使其能够更广泛地应用, 必须增加磁性纳米粒子在水相的溶解性。短链聚丙烯酸(PAA)可以作为表面修饰剂和表面活性剂, PAA 链上的羧基团结合于 Fe_3O_4 纳米粒表面, 具有疏水性质的羧基使纳米粒稳定分散于水性溶剂中。牛血清白蛋白(BSA)作为人血清白蛋白(HSA)的模型蛋白, 可以内源或外源配体形式结合于药物, 在药物体内传递和代谢过程中起到重要作用^[4]。

本实验通过改进的化学共沉淀法制备具有高度水溶性的羧基磁性纳米粒, 采用 EDC、NHS 活化法将 BSA 偶联于羧基磁粒表面, 为磁性纳米粒的制备及其在生物医学领域的应用提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 试剂

无水 FeCl_3 (分析纯, 汕头市西陇化工厂有限公司); $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (分析纯, 北京现代东方精细化学品有限公司); 氢氧化钠(NaOH) (分析纯, 北京现代东方精细化学品有限公司); 二甘醇 (DEG) (纯度 99%, Acros Organics 公司); PAA (分子量 1800, Sigma 公司); N-hydroxysuccinimide (NHS) (纯度 $\geq 98\%$, Acros Organics 公司); 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) (纯度 99%, 百灵威化学技术有限公司); BSA (纯度 $\geq 98\%$, Amresco 公司); 2-(N-吗啉)乙烷磺酸(MES) (纯度 $\geq 99\%$, Amresco 公司); 吐温-20 (分析纯, Amresco 公司); 羊抗人 IgG-FITC (北京拜尔迪公司); BCA 蛋白定量检测试剂盒 (北京集思佳扬生物公司)。

1.2 水溶性羧基磁性纳米粒的制备

制备水溶性羧基磁性纳米粒(PAA-MNP)以二甘醇为溶剂, 首先配制浓度为 0.037mol/L 的 PAA 溶液和 5mol/L 的 NaOH 水溶液。然后分别取 0.65g 无水 FeCl_3 与 0.4g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶解于 60mL 超纯水中, 加热搅拌至固体全部溶解, 此时溶液呈透明黄色。当温度稳定于 80~85℃时, 向混合液中加入 10mL 5mol/L 的 NaOH 溶液, 溶液迅速变黑, 反应 1min 后, 迅速加入已配制好的 15mL 0.037mol/L 的 PAA 溶液, 继续加热搅拌 30min。整个实验过程在恒温水浴和氮气保护条件下进行。将制备得到的产物在外加磁场下用无水乙醇洗涤 3 次, 得到的沉淀分散于超纯水中保存。

1.3 PAA-MNP 的表征

1.3.1 PAA-MNP 的形态学观察

将样品滴在有碳膜的铜网上, 置于 60℃烘箱中烘干后, 在透射电子显微镜 TEM (JEM-2010F 型) 下观察磁性纳米颗粒的形貌。

1.3.2 傅里叶变换红外光谱检测

将制备好的 PAA-MNP 冷冻干燥后, 加入 KBr 压片。以相

同方法处理作为对照的 Fe_3O_4 、PAA 粉末。通过傅里叶红外变换光谱仪 (560 型) 记录波数在 0~4000 cm^{-1} 范围内的傅里叶变换红外光谱 (FTIR)。

1.3.3 PAA-MNP 的磁性检测

采用振动样品磁强计 (BHV-50HTI 型) 检测纳米粒的磁性, 磁场强度范围为 (-1~1) T。

1.4 磁性纳米粒偶联 BSA

采用 EDC、NHS 活化法偶联抗体。首先用 25mmol/L、pH 值为 5.12 的 MES 缓冲液在外加磁场作用下清洗磁颗粒, 使磁颗粒分散于 MES 缓冲液中, 最终质量浓度为 30mg/mL。然后分别配制 EDC、NHS 的 MES 溶液, 浓度均为 50mmol/L。取 30mg/mL 的磁颗粒 100 μL , 依次加入 50mmol/mL 的 EDC、NHS 溶液各 50 μL , 在室温条件下缓慢震荡 30min。在磁场作用下弃去上清液, 用 MES 溶液清洗 3 次, 洗去未参与活化反应的 EDC 和 NHS。

取 1mg/mL BSA 溶液 100 μL 加入已活化的磁颗粒中, 在室温下缓慢震荡 30min。磁性分离, 收集上清液; 用 0.01mol/L、pH 值为 7.4 的 PBST 溶液多次洗涤磁颗粒, 尽量洗去未偶联的 BSA; 偶联 BSA 的磁颗粒保存在 4℃备用。

1.5 BCA 法测定偶联效率

1.5.1 蛋白质标准曲线的绘制

首先稀释试剂盒提供的蛋白质标准品为 1000, 750, 500, 250, 100, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准液; 将 25mL A 液 (含有 BCA) 与 500 μL B 液 (含有铜离子) 进行混合, 配成标准工作液; 将 100 μL 各质量浓度标准液与 2mL 标准工作液混合; 混匀后放入 40℃水浴 30min; 吸取 100 μL 至 96 孔板中, 每浓度 5 孔, 以 100 μL MES 缓冲液为空白在 570nm 下测定吸光度值; 取每一浓度下吸光度平均值作为该浓度下的吸光度值, 并以此值为横坐标、蛋白质浓度为纵坐标作曲线, 并计算出方程。

1.5.2 偶联反应前后蛋白质浓度的测定

分别取偶联反应前配制的 BSA 溶液 500 μL 、偶联反应后上清液 500 μL , 将 25mL 的 A 液与 500 μL 的 B 液进行混合, 配成标准工作液; 各取 100 μL 偶联前后液体与 2mL 标准工作液进行混合; 混匀后放入 40℃水浴 30min; 吸取 100 μL 至 96 孔板中, 每样品 5 孔, 以 100 μL 的 MES 缓冲液为空白在 570nm 下测定吸光度值; 取各样品吸光度值的平均值作为该样品的吸光度值, 根据标准品绘制的曲线及标准曲线方程计算两样品的蛋白质浓度。

1.6 EDC、NHS 活化法偶联蛋白的有效性检测

1.6.1 MNP-PAA 偶联荧光抗体

按照上述磁性颗粒偶联 BSA 的方法, 将 PAA-MNP 与羊抗人 IgG-FITC 偶联; 再将同样剂量的未经 EDC、NHS 活化的 PAA-MNP 与羊抗人 IgG-FITC 偶联, 作为对照组; 以羊抗人 IgG-FITC 纯品作为阳性对照。整个实验过程需要避光操作。

1.6.2 荧光显微镜观察

将 3 个样品分别滴于载玻片上, 压好盖玻片后吸去周围溢出液体, 放在荧光显微镜 (Leica DMIRB 型) 下观察。

2 结果与讨论

2.1 透射电子显微镜检测

图1为PAA-MNP的透射电镜照片。结果显示,制备的PAA-MNP颗粒直径约为10nm,分散性良好。经典的化学共沉淀法利用 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 在碱性介质中反应:



这种经典的化学共沉淀法合成的磁流体容易聚集。为了防止聚集、提高分散性,采用PAA聚合物修饰共沉淀法制备的超顺磁性纳米粒。PAA聚合物链上的羧基与铁离子配位结合后聚集于 Fe_3O_4 颗粒表面,未配位的羧基延伸到水溶液中,这种结合能够使磁性纳米粒的水相分散体系具有高度稳定性。此外,纳米粒表面大量的羧基可作为与生物分子偶联的结合位点,通过各种生物共轭化学作用实现超顺磁性磁流体的分子靶向性,为制备肿瘤分子特异性磁感应热疗用的靶向介质提供基础。

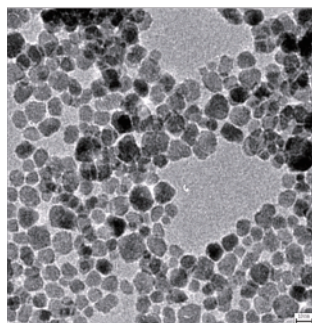


图1 PAA修饰的磁流体(PAA-MNP)

Fig. 1 TEM photographs of Fe_3O_4 nanoparticles coated by PAA oligomers (PAA-MNP)

2.2 傅里叶变换红外光谱检测

图2为PAA修饰磁纳米粒的红外光谱。宏观状态 Fe_3O_4 中 $Fe-O$ 键的特征吸收峰位于 $570cm^{-1}$ 和 $375cm^{-1}$,当 Fe_3O_4 的形态减小到纳米尺寸时,大量的表面原子之间的结合力被破坏,导致粒子的表面电子重排,因此纳米 Fe_3O_4 颗粒的FTIR中 $Fe-O$ 键的特征吸收峰出现蓝移现象,约位于 $580cm^{-1}$ [5]。PAA的FTIR中在 $1710cm^{-1}$ 处显示出强吸收,主要是由于在PAA低聚物中存在大量可伸缩振动的羧基。制备的PAA-MNP粒子在 $1710cm^{-1}$ 处仍保持存在吸收峰,这是由于部分PAA低聚物以配体形式结合于纳米颗粒上。PAA-MNP粒子的FTIR在 $1600cm^{-1}$ 处产生新的吸收峰,是由于羧基与表面铁原子以螯合物形式结合于纳米 Fe_3O_4 表面,使 COO^- 反对称振动与 COO^- 对称振动而产生特征吸收[6]。图2中显示出的特征吸收峰,表明PAA已成功修饰于纳米 Fe_3O_4 表面。

2.3 PAA-MNP的磁性检测

纳米 Fe_3O_4 已被证实在室温下具有超顺磁性,而经过PAA修饰后,纳米 Fe_3O_4 表面的羧基对粒子的磁性无明显影响。图3是室温下由振动样品磁强计测定的PAA修饰磁流体的磁滞回线。该磁滞回线显示出样品的矫顽力趋近于零,几

乎没有磁滞现象,表现出良好的超顺磁性。

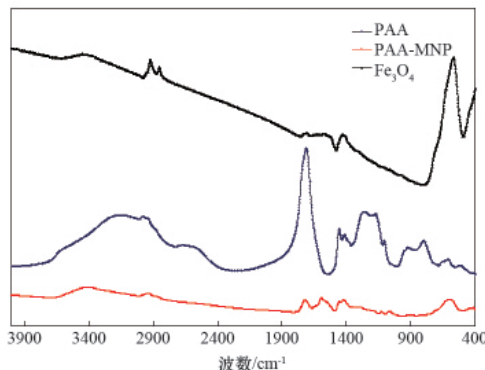


图2 FTIR光谱分析

Fig. 2 FTIR analysis of Fe_3O_4 nanoparticles, PAA oligomers and the ferrofluid coated by PAA oligomers

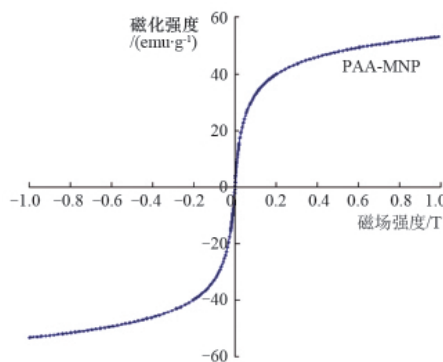


图3 PAA-MNP的磁滞回线

Fig. 3 VSM magnetization curve of the ferrofluid particles coated by PAA oligomers

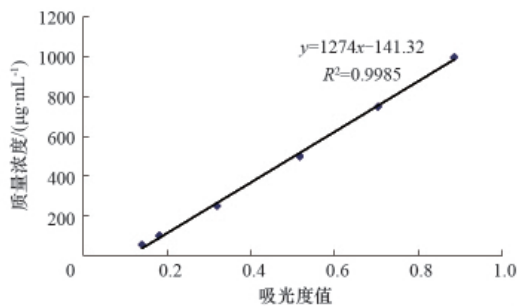
2.4 BCA法测定偶联前后蛋白质溶液浓度

图4为利用BCA蛋白定量试剂盒测定的偶联前后蛋白溶液浓度。蛋白质能够使工作液中的 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ , Cu^+ 在工作液中形成紫色络合物,测定溶液的吸光度值后与标准曲线对比,计算偶联前后蛋白溶液的浓度。

根据标准曲线方程,偶联前蛋白质溶液的吸光度值为0.8483,计算得蛋白质质量浓度为 $939.41\mu g/mL$;偶联后蛋白溶液的吸光度值为0.169,计算得蛋白质质量浓度为 $73.986\mu g/mL$ 。磁颗粒的偶联效率为 $(939.41-73.986)/30=28.5\mu g/mg$ 。由此可得,偶联前后蛋白质溶液的吸光度值差异显著。

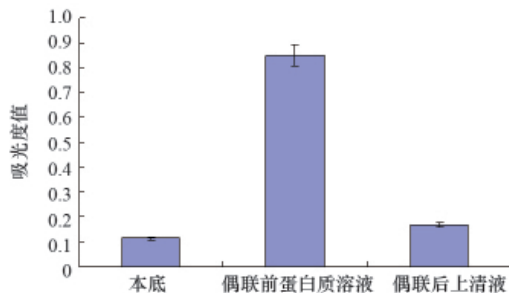
BSA的结构包含3个重复区域,每个区域又分为两个子域(A、B)。结构中的亲水部分位于蛋白质的表面,而疏水部分位于蛋白质的内部。已有大量研究是针对血清白蛋白的内部疏水结构与药物之间的结合作用的,因此,以血清白蛋白表面的活性结构作为与磁性颗粒的结合部位不会影响蛋白质与其他药物分子的结合。BSA与磁性颗粒结合主要有两种作用方式,一种是两个氨基经过戊二醛活化后相互作用,另一种是氨基与羧基的酯化反应[7]。当BSA与氨基修饰的磁颗粒

偶联时,这两种作用方式都可以选用,但 BSA 的疏水羧基是药物分子的结合部位,因此多用 BSA 的氨基作为偶联磁颗粒的基团^[8]。BSA 与羧基磁性纳米粒的结合是通过 EDC、NHS 的活化作用实现的。在 EDC 存在的条件下,磁颗粒表面的羧基首先与 NHS 作用形成复合物,活化后的复合物再与 BSA 的氨基发生酯化反应。



(a) BSA 浓度标准曲线

(a) Standard curve of BSA concentration



(b) 偶联前后吸光度值比较

(b) Comparison of absorbance pre and post coupling with PAA-MNP

图 4 BCA 测定偶联前后蛋白质浓度

Fig. 4 Concentration of the BSA solution before and after its coupling with PAA-MNP

2.5 MNP-PAA 偶联荧光抗体

图 5 为制备的 PAA-MNP 粒子偶联羊抗人 IgG-FITC 的荧光图,图 5(a)为阳性对照羊抗人 IgG-FITC,图 5(b)为未经 EDC、NHS 活化的 PAA-MNP 偶联荧光抗体,图 5(c)为经活化处理后的 PAA-MNP 与荧光标记抗体偶联。结果显示,经 EDC、NHS 活化后的 PAA-MNP 与抗体偶联的效率明显高于未活化处理的磁颗粒,证明活化后磁颗粒与抗体的结合比较稳定,且荧光标记的抗体结构未出现明显改变。

将荧光标记的抗体与羧基磁性纳米粒偶联,可通过荧光显微镜直接观察到偶联效果,这更有力地证明了这种偶联方法的可行性。几乎所有的蛋白质结构中都含有未结合的氨基,因此,EDC、NHS 活化法也可应用于将羧基磁性颗粒与其他蛋白质偶联,在药物靶向输送、磁性细胞分选及磁靶向病毒富集分离等方面有广阔的应用前景。

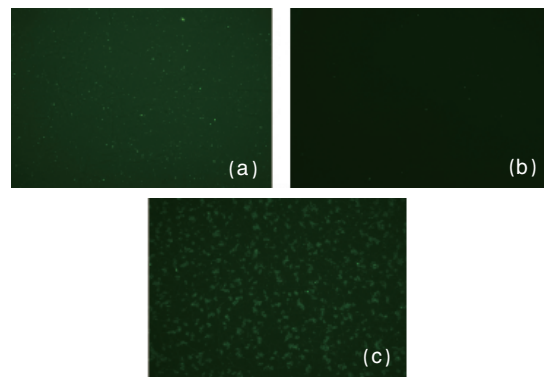


图 5 PAA-MNP 偶联荧光抗体 (50×)

Fig. 5 Images of MNP-PAA coupling with gold anti-human IgG (50×)

3 结论

通过改进的化学共沉淀法能够制备水相分散性良好的羧基磁性纳米粒,采用 EDC、NHS 活化法能以较高效率将 BSA 与磁性纳米粒偶联,偶联荧光抗体的结果表明,EDC、NHS 活化能够使抗体与磁颗粒稳定结合,同时也证明了此方法可以适用于羧基化磁颗粒与不同的蛋白质偶联。本研究为肿瘤分子特异性磁感应热疗提供新的靶向介质,同时也为磁性纳米粒在结合蛋白、细胞靶向分选、药物靶向传递等方面的应用提供新的基础。

参考文献 (References)

- [1] Lien K Y, Lin J L, Liu C Y, *et al.* Purification and enrichment of virus samples utilizing magnetic beads on a microfluidic system [J]. *Lab Chip*, 2007, 7(7): 868-875.
- [2] Sakudo A, Ikuta K. Efficient capture of infectious H5 avian influenza virus utilizing magnetic beads coated with anionic polymer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377(1): 85-88.
- [3] Chui L, Drebot M, Andonov A, *et al.* Comparison of 9 different PCR primers for the rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus using 2 RNA extraction methods [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2005, 53(1): 47-55.
- [4] Yu C H, Al-Saadi A, Shih S J, *et al.* Immobilization of BSA on silica-coated magnetic iron oxide nanoparticle[J]. *J Phys Chem C*, 2009, 113(2): 537-543.
- [5] Bellamy L J. The Infrared spectra of complex molecules [M]. Wiley, New York: Springer, 1975.
- [6] Lin C L, Lee C F, Chiu W Y. Preparation and properties of poly(acrylic acid) oligomer stabilized superparamagnetic ferrofluid [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, 291(2): 411-420.
- [7] Wang Y, Wang X, Luo G, *et al.* Adsorption of bovin serum albumin (BSA) onto the magnetic chitosan nanoparticles prepared by a microemulsion system[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 99(9): 3881-3884.
- [8] Bora D K, Deb P. Fatty acid binding domain mediated conjugation of ultrafine magnetic nanoparticles with albumin protein [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2009, 4(2): 138-143.

(责任编辑 吴晓丽)