

引用格式:盛浩原,苑金磊,刘长霞. 动态反应釜制备超顺磁性 Fe_3O_4 粒子及其 DNA 提取[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2019, 46(6): 45-50.

SHENG HaoYuan, YUAN JinLei, LIU ChangXia. Fabrication of superparamagnetic Fe_3O_4 particles in a dynamic reaction kettle and their application in DNA extraction[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science), 2019, 46(6): 45-50.

动态反应釜制备超顺磁性 Fe_3O_4 粒子及其 DNA 提取

盛浩原 苑金磊 刘长霞*

(北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘要: 使用动态反应釜制备得到磁性粒子, 与静态反应釜相比单次制备量提高 20 倍; 通过扫描电子显微镜 (SEM)、傅立叶红外光谱 (FT-IR)、X 射线衍射 (XRD)、振动样品磁强计 (VSM) 等手段对产物进行表征, 证明获得了粒径 200 nm 左右的单分散 Fe_3O_4 粒子, 并具有超顺磁性; 对其表面进行 SiO_2 包覆, 获得具有良好分散性的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 粒子。研究发现 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 对 DNA 提取具有可重复利用性, 并且质粒 DNA 吸附到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 上后可直接加入聚合酶链式反应 (PCR) 体系作为扩增模板。

关键词: 动态反应釜; 超顺磁性 Fe_3O_4 粒子; $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$; DNA 提取; 重复利用

中图分类号: TQ138.1 **DOI:** 10.13543/j.bhxbzr.2019.06.007

引言

超顺磁性 Fe_3O_4 粒子是一种安全性高、生物相容性好的介质材料, 目前被广泛应用于酶的固定化、生化分离等^[1-2] 生物工程领域, 以及免疫监测、核磁成像、抗菌、抗癌等^[3-5] 生物医学领域, 此外, 其在环保领域也有巨大的应用潜力^[6-8]。

研究者们对铁基磁性粒子的合成方法进行了大量研究^[9-12], 其中溶剂热法因反应条件简单、尺寸及形貌可控、结晶好、饱和磁化强度高, 并且容易实现物化性能的改进而受到关注^[11-12]。目前文献报道的溶剂热法大都是用静态反应釜合成超顺磁性 Fe_3O_4 粒子, 因传热传质影响导致放大困难, 所以大都使用 100~200 mL 的小容积反应釜, 合成量低且成本高, 难以满足实验和市场的需要。此外, 出于 DNA 分子分离提取自动化和高通量快速提取的需要, 对超顺磁 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 粒子的需求量日益增加, 有关其制备及核酸提取等方面的研究仍在持续进行中^[13-16]。

本文通过溶剂热法使用动态反应釜制备超顺磁性 Fe_3O_4 粒子, 为动态反应放大奠定基础; 将动态反应合成的 Fe_3O_4 粒子表面包覆 SiO_2 , 以获得具有良好分散性的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 粒子用于质粒 DNA 的提取, 并对其可重复利用性进行研究。

1 实验部分

1.1 实验原料和仪器

1.1.1 实验原料

六水合氯化铁 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、醋酸钠 (NaAc)、氯化钠 (NaCl)、乙二胺四乙酸二钠 (EDTANa_2)、聚乙二醇 (PEG) 4000、PEG 8000、乙二醇、三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 国药集团化学试剂有限公司; NaOH 、正硅酸乙酯 (TEOS)、无水乙醇、乙酸钾 (KAc), 25.0%~28.0% 的氨水, 北京化工厂; TritonX-100, $\geq 90.0\%$, 北京拜尔迪生物技术有限公司。以上试剂均为分析纯。

E. coli p^{UC-18} 为实验室保藏菌种, *E. coli* p^{UC-18-PT7-EGFP-TT7(1)} 为本校其他课题组提供; PCR 上游引物序列为 TTTGATTCGGTAATCTCCGAAC, 下游序列为 TTACCTCACTCATTAGGCACCC, 生工生物 (上海) 股份有限公司; $2 \times \text{Taq PCR Mix}$, RNA 酶 A, 北京拓英坊生物技术有限公司。

1.1.2 实验仪器

LEO-1530 型扫描电子显微镜 (SEM), 英国

收稿日期: 2019-02-25

基金项目: 厦门市产学研协同创新及科技合作项目

(3502Z20172020)

第一作者: 男, 1994 年生, 硕士生

* 通信联系人

E-mail: liucx@mail.buct.edu.cn

Oxford 公司;JEM-2100F 型电子透射显微镜(TEM),日本电子株式会社;7410 型振动样品磁强计(VSM),美国 Lake Shore 公司;3100 型傅里叶红外光谱仪(FT-IR),美国 Varian 公司;D/max-Ultima III 型 X 射线衍射仪(XRD),日本 Rigaku 公司;BioDoc 2 ItM 紫外成像系统,英国 UVP 公司;K5500 型微量分光光度计,北京奥凯科技发展有限公司。

1.2 试剂配制

溶液 I、溶液 II、溶液 III、TE 缓冲液及 PEG 结合液的配制方法与文献[17]一致。

溶液 I 25 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、10 mmol/L EDTA (pH 8.0)、50 mmol/L 葡萄糖,121 °C 下高压灭菌 15 min,4 °C 保存备用。

溶液 II 使用前配制 0.2 mol/L NaOH、1% SDS。

溶液 III 3 mol/L 醋酸钾缓冲液 (KAc, pH 5.2),4 °C 保存备用。

TE 缓冲液 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)、1 mmol/L EDTA (pH8.0),121 °C 下高压湿热灭菌 20 min,4 °C 保存备用。

PEG 结合液 2 mol/L NaCl,20% PEG8000,4 °C 保存备用。

1.3 实验方法

1.3.1 超顺磁性 Fe₃O₄ 粒子的制备

称取一定量的 FeCl₃·6H₂O 置于乙二醇溶液中,搅拌直至完全溶解,再加入一定量的无水 NaAc、PEG4000,常温下继续剧烈搅拌 30 min,然后将混合液体转入动态反应釜中,在一定的搅拌速率和反应温度下连续反应 8 h。将反应产物在磁场条件下进行分离,将得到的固体粉末分别用去离子水和无水甲醇反复洗涤 3~5 次,置于真空干燥箱中 50 °C 干燥 6 h,即可得到超顺磁性 Fe₃O₄ 粒子。

1.3.2 Fe₃O₄@SiO₂ 粒子的制备

采用 Stöber 法制备 Fe₃O₄@SiO₂ 粒子^[18]。称取 Fe₃O₄ 粒子 4.0 g,加入一定量的 TEOS 和 8 mL Triton X-100 超声分散 2 min,再加入 250 mL 去离子水,超声分散 20 min,转移至 1 L 圆底烧瓶,向其中加入 100 mL 氨水和 250 mL 无水乙醇,在室温条件下以一定速率搅拌反应 4 h。停止搅拌,用去离子水和乙醇分别清洗数次,磁性分离,60 °C 真空干燥 6 h,得到 Fe₃O₄@SiO₂ 复合粒子。

1.3.3 Fe₃O₄@SiO₂ 磁性粒子提取质粒 DNA

将 *E. coli* p^{UC-18} 接种于 LB 液体培养基,37 °C 培

养过夜。摇匀培养基,吸取 1.5 mL 置于 1.5 mL 离心管中,以离心力 10 600 g 离心 1 min,收集菌体。加入预冷的 250 μL 溶液 I (含 RNA 酶 A),用微量移液器反复吸打,进行菌体重悬浮,室温条件下静置 5 min;加入等体积的溶液 II,温和反复颠倒 2~3 次,混匀,静置 5 min;再加入等体积溶液 III,温和反复颠倒 2~3 次混匀,10 600 g 离心 5 min,弃沉淀。取 400 μL 上清液至另一支离心管中,加入 50 μL 自制的 Fe₃O₄@SiO₂ 磁性粒子(溶液 I 配制,100 mg/mL)悬液,再加入 400 μL PEG 结合液,混匀,静置 5 min。磁性分离,用 500 μL 70% 乙醇洗涤磁性粒子 2 次,60 °C 烘箱中放置 10 min 挥去乙醇,用 50 μL TE 缓冲液 (pH 8.0) 洗脱。含 DNA 分子的 TE 缓冲液用于琼脂糖凝胶电泳。洗脱 DNA 后的 Fe₃O₄@SiO₂ 再次用于质粒 DNA 提取。

将 *E. coli* p^{UC-18-P17-EGFP-T17(1)} 用上述同样方法进行质粒 DNA 提取,但质粒 DNA 吸附到 Fe₃O₄@SiO₂ 上后,一部分不经 TE 缓冲液洗脱(即 Fe₃O₄@SiO₂@DNA)直接用作聚合酶链式反应(PCR)扩增模板,另一部分用 TE 缓冲液洗脱后再次用于质粒 DNA 吸附。PCR 扩增反应体系为 ddH₂O 23 μL、2 × Taq PCR Mix 25 μL、上游引物 1 μL、下游引物 1 μL,混匀,用枪头沾取些许 Fe₃O₄@SiO₂@DNA 加入上述反应体系中。置 PCR 仪上 94 °C 预变性 5 min 后进入扩增循环阶段:94 °C 变性 0.5 min、55 °C 退火 3 min、72 °C 延伸 1.5 min,循环 33 次;72 °C 保温 7 min,4 °C 保存。

1.3.4 质粒 DNA 琼脂糖凝胶电泳

取 6 μL 提取质粒 DNA 溶液或 PCR 扩增产物与 2 μL 6 × 上样缓冲液混匀,上样 0.8% 琼脂糖凝胶上样孔,100 V 电泳 50 min。取下凝胶,通过凝胶成像系统观察电泳结果。

2 结果与讨论

2.1 Fe₃O₄ 磁性粒子的制备与表征结果

通过对反应底物 FeCl₃·6H₂O 的加入量、反应时间、反应温度、反应釜搅拌速率等条件优化,获得最佳的反应条件为:1.6 L 乙二醇中 FeCl₃·6H₂O、PEG4000、NaAc 加入量分别为 35 g、25 g、90 g,反应温度 200 °C,时间 10 h,反应釜的搅拌速率 450 r/min。通过 SEM 图(图 1(a)、(b))可知,得到的磁性粒子粒径约 200 nm,并具有良好的分散性和均一性。该粒径小于本实验室用 100 mL 静态反应釜制备的超

顺磁性 Fe_3O_4 粒子(粒径 400 nm 左右)^[1], 制备量也从 0.4 ~ 0.5 g 提高到 8 ~ 10 g, 单次单釜制备量提高近 20 倍。

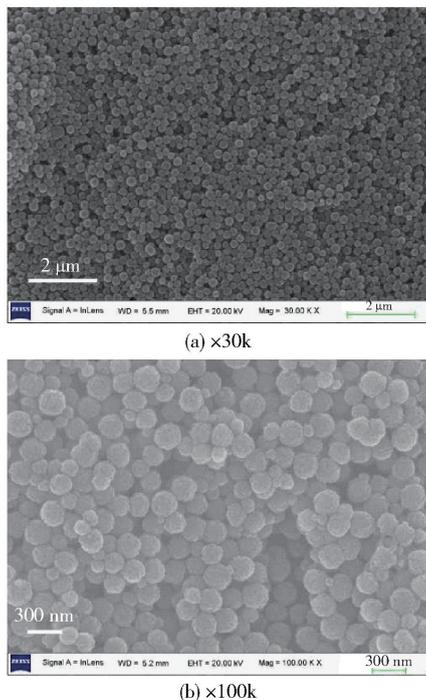


图 1 Fe_3O_4 粒子 SEM 图及其放大图

Fig. 1 SEM and enlarged SEM images of Fe_3O_4 particles

通过 XRD 对 Fe_3O_4 粒子进行表征的结果如图 2 所示。可以看出, 谱图中出现 220、311、400、422、511 及 440 晶面峰, 无其他杂峰, 结晶良好, 为反尖晶石结构, 与 Fe_3O_4 标准卡片 (JCPDS 79-4019) 一致, 也与本课题组通过静态反应釜合成的 Fe_3O_4 粒子晶体结构相同^[1]。

图 3 为 VSM 测试得到的 Fe_3O_4 粒子磁化曲线。可以看出, Fe_3O_4 粒子的饱和磁化强度达到 86 emu/g ,

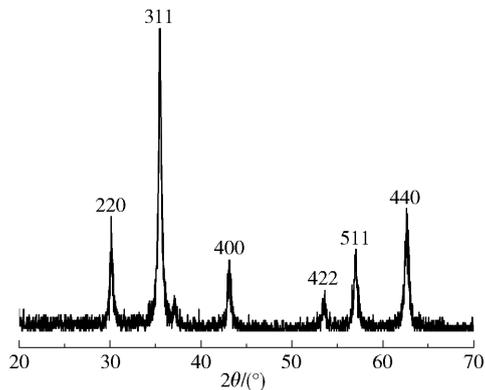


图 2 Fe_3O_4 粒子 XRD 图

Fig. 2 XRD pattern of Fe_3O_4 particles

具有较小的矫顽力 (44.4 G) 和剩磁 (12.8 emu/g)。说明合成的 Fe_3O_4 粒子磁响应性能良好, 并具有超顺磁性, 即, 在无磁场条件下粒子可分散在反应体系中, 在有磁场条件下可以方便地从分散体系中分离。

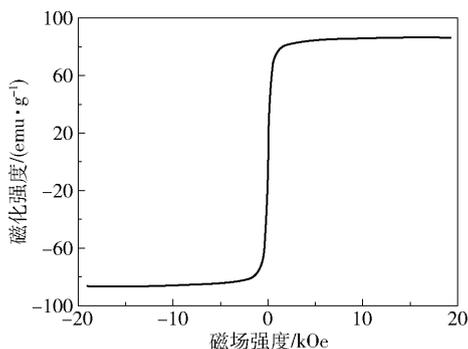


图 3 Fe_3O_4 粒子磁化曲线

Fig. 3 Magnetization curves of Fe_3O_4 particles

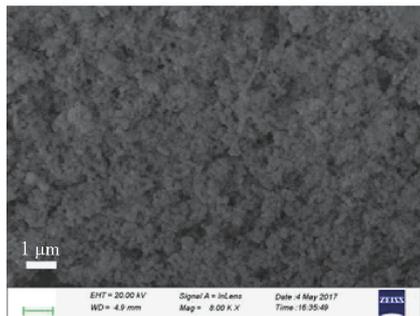
2.2 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 粒子的表征结果及其 DNA 分离

以 TEOS 为原料通过聚合反应生成 SiO_2 , 形成的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 容易团聚, 影响其分散性。本文实验表明将搅拌速率提高到 600 r/min , 可获得到具有核壳结构、分散性良好的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 粒子(图 4(a)、(b)), SiO_2 壳层厚度约为 20 nm(图 4(c))。

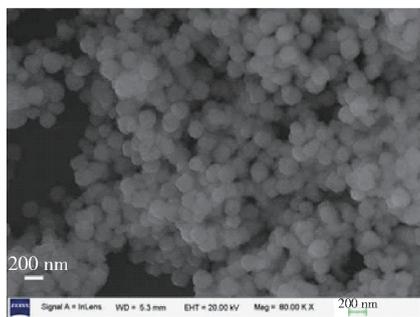
图 5 为 Fe_3O_4 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 的 FT-IR 谱图, 其中 590 cm^{-1} 左右为 Fe_3O_4 中 $\text{Fe}-\text{O}$ 键的吸收峰, 3400 cm^{-1} 和 1600 cm^{-1} 处附近分别为 $\text{O}-\text{H}$ 键的伸缩振动峰和弯曲振动峰; 而 1100 cm^{-1} 附近为 $\text{Si}-\text{O}$ 键的吸收峰, 进一步说明 SiO_2 包覆在 Fe_3O_4 表面^[14-15]。

将 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 粒子作为介质进行质粒 DNA 提取分离。吸附了质粒 DNA 的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 粒子用 TE 缓冲液洗脱后, 再次用于质粒 DNA 的提取, 共使用 9 个批次, 将得到的质粒 DNA 溶液进行琼脂糖凝胶电泳, 结果见图 6。

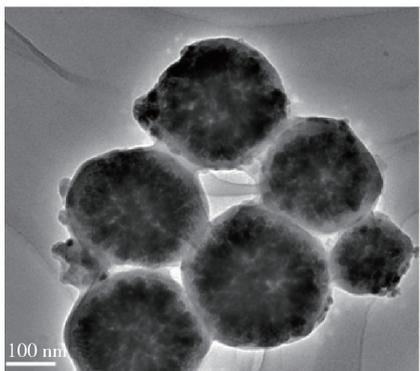
由图 6 可知, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 可反复用于 *E. coli* 质粒 DNA 提取, 但随着使用批次的增加, 对应条带变暗, 提取量有下降的趋势。对各批次进行 DNA 浓度测定(表 1), 可以看出随着提取批次增加, DNA 提取量降低, 与电泳结果一致。但各批次提取浓度均在 100 ng/mL 以上, 并且各个批次的 A_{260}/A_{280} 值大都接近或高于 1.8, 说明所提取的质粒 DNA 无蛋白质污染, 提取效果较好。由此可以表明, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 对于 DNA 提取分离具有较好的可重复利用性, 此结果在其他文献中尚未见有报道。



(a) SEM, × 8 k



(b) SEM, × 80 k



(c) TEM, × 12 k

图 4 $Fe_3O_4@SiO_2$ 的 SEM 图及其放大图与 TEM 图

Fig. 4 SEM, enlarged SEM and TEM images of $Fe_3O_4@SiO_2$ particles

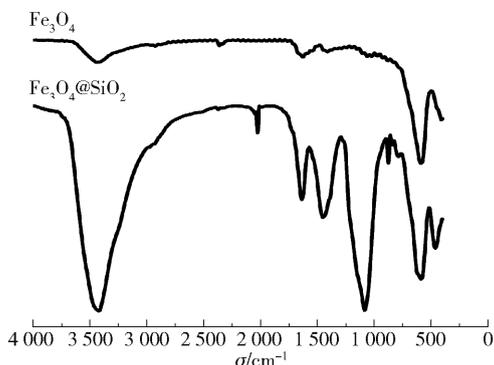
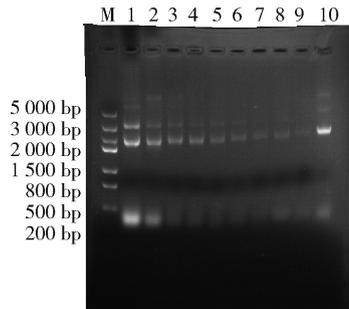


图 5 Fe_3O_4 和 $Fe_3O_4@SiO_2$ 的 FT-IR 谱图

Fig. 5 FT-IR spectra of Fe_3O_4 and $Fe_3O_4@SiO_2$



M—DNA Marker; 1~9—不同提取批次;10—商品试剂盒。

图 6 $Fe_3O_4@SiO_2$ 分离提取质粒 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

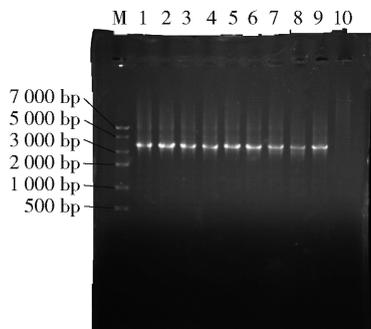
Fig. 6 Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA isolated using $Fe_3O_4@SiO_2$

表 1 $Fe_3O_4@SiO_2$ 提取各批次质粒 DNA 的浓度及 A_{260}/A_{280} 值

Table 1 The concentration and A_{260}/A_{280} of plasmid DNA in different batches of $Fe_3O_4@SiO_2$

批次	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	A_{260}/A_{280}
1	452.2	1.98
2	390.9	1.98
3	290.9	1.82
4	241.2	1.78
5	131.5	1.83
6	133.2	1.80
7	128.5	1.84
8	102.6	1.84

研究发现,质粒 DNA 不经洗脱吸附在 $Fe_3O_4@SiO_2$ 上作模板,即将 $Fe_3O_4@SiO_2@DNA$ 直接加至 PCR 反应体系中进行 PCR 扩增,重复吸附 9 个批次均获得相同的 DNA 条带,并与预期设计结果一致(图 7)。该结果说明 $Fe_3O_4@SiO_2$ 对 PCR 扩增无抑



M—DNA Marker; 1~9— $Fe_3O_4@SiO_2@DNA$;10— $Fe_3O_4@SiO_2$ 。

图 7 质粒 DNA 吸附到 $Fe_3O_4@SiO_2$ 为模板 PCR 产物电泳图

Fig. 7 PCR electropherogram of $Fe_3O_4@SiO_2@DNA$

制作用, $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2@ \text{DNA}$ 上的 DNA 无需洗脱分离, 可直接作为 PCR 扩增模板, 从而减少了 DNA 分离提取步骤。

3 结论

通过底物添加量、搅拌桨搅拌速率、温度等条件的优化, 用动态反应釜放大获得粒径均一、单分散的超顺磁性 Fe_3O_4 粒子, 制备量达 8 ~ 10 g, 为 Fe_3O_4 的放大制备奠定了基础。对获得的 Fe_3O_4 粒子进行 SiO_2 修饰, 制备出分散性良好的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 磁性粒子并用于质粒 DNA 提取, 发现 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 提取 DNA 具有良好的可重复利用性, 降低了使用成本; DNA 可与分离介质 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 一起加至 PCR 扩增反应体系作模板, 实现正常的 PCR 反应。

参考文献:

- [1] ZHANG Q, ZHENG Z, LIU C X, et al. Biodiesel production using lipase immobilized on epoxychloropropane-modified Fe_3O_4 sub-microspheres [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016, 140: 446–451.
- [2] ZHAO Y, HAO C L, YONG Q Q, et al. Systematic comparisons of genetically modified organism DNA separation and purification by various functional magnetic nanoparticles [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2012, 47(5): 910–917.
- [3] CHEN S, YUAN Y X, YAO J L, et al. Magnetic separation and immunoassay of multi-antigen based on surface enhanced Raman spectroscopy [J]. *Chemical Communications*, 2011, 47(14): 4225–4227.
- [4] HUANG J, ZHONG X D, WANG L Y, et al. Improving the magnetic resonance imaging contrast and detection methods with engineered magnetic nanoparticles [J]. *Theranostics*, 2012, 2(1): 86–102.
- [5] SANGAIYA P, JAYAPRAKASH R. A review on iron oxide nanoparticles and their biomedical applications [J]. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*, 2018, 31: 3397–3413.
- [6] SHEN Y F, TANG J, NIE Z H, et al. Preparation and application of magnetic Fe_3O_4 nanoparticles for wastewater purification [J]. *Separation and Purification Technology*, 2009, 68(3): 312–319.
- [7] KEFENI K K, MAMBA B B, MSAGATI T A M. Application of spinel ferrite nanoparticles in water and wastewater treatment: a review [J]. *Separation and Purification Technology*, 2017, 188: 399–422.
- [8] KHAZAEI A, SARMASTI N, SEYF J Y. Waste to wealth: conversion of nano-magnetic eggshell ($\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Eggshell}$) to $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Ca}(\text{HSO}_4)_2$: cheap, green and environment-friendly solid acid catalyst [J]. *Applied Organometallic Chemistry*, 2018, 32: e4308.
- [9] MASSART R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media [J]. *IEEE Transactions on Magnetics*, 1981, 17(2): 1247–1248.
- [10] MONTAGNE F, MONDAIN-MONVAL O, PICHOT C, et al. Preparation and characterization of narrow sized (o/w) magnetic emulsion [J]. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2002, 250: 302–312.
- [11] DENG H, LI X L, PENG Q, et al. Monodisperse magnetic single-crystal ferrite microspheres [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2005, 117(18): 2842–2845.
- [12] KEFENI K K, MSAGATI T A M, MAMBA B B. Ferrite nanoparticles: synthesis, characterisation and applications in electronic device [J]. *Materials Science and Engineering B*, 2017, 215: 37–55.
- [13] VUOSKU J, JAAKOLA L, JOKIPII S, et al. Does extraction of DNA and RNA by magnetic fishing work for diverse plant species? [J]. *Molecular Biotechnology*, 2004, 27: 209–215.
- [14] FAN Q Q, GUAN Y P, ZHANG Z, et al. A new method of synthesis well-dispersion and dense $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ magnetic nanoparticles for DNA extraction [J]. *Chemical Physics Letters*, 2019, 715: 7–13.
- [15] AN G S, CHAE D H, HUR J U, et al. Hollow-structured $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ nanoparticles: novel synthesis and enhanced adsorbents for purification of plasmid DNA [J]. *Ceramics International*, 2018, 44: 18791–18795.
- [16] MALEKI A, GHALAVAND R, HAJI R F. Synthesis and characterization of the novel diamine-functionalized $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ nanocatalyst and its application for one-pot three-component synthesis of chromenes [J]. *Applied Organometallic Chemistry*, 2018, 32: e3916.
- [17] 刘长霞, 罗施中. 分子生物学实验技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2018.
LIU C X, LUO S Z. *Experimental technique in molecular biology* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2018. (in Chinese)
- [18] STÖBER W, FINK A. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1968, 26: 62–69.

Fabrication of superparamagnetic Fe_3O_4 particles in a dynamic reaction kettle and their application in DNA extraction

SHENG HaoYuan YUAN JinLei LIU ChangXia*

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Monodispersed 200 nm superparamagnetic Fe_3O_4 particles have been prepared in a dynamic reaction kettle under optimized conditions, giving a product yield 20 times that of a static reaction. The product was characterized by SEM, FT-IR, XRD and VSM. The surfaces of Fe_3O_4 particles were coated with SiO_2 to obtain $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ particles, with high dispersibility. $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ particles could be used repeatedly for plasmid DNA extraction leading to reduced costs. Plasmid DNA on $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ could be used as DNA templates for PCR.

Key words: dynamic reactor; superparamagnetic Fe_3O_4 particles; $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$; DNA extraction; reutilization

(责任编辑:吴万玲)