

# Chế tạo hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nhiều kích thước ứng dụng trong tách chiết DNA từ mẫu sinh học

Bùi Trung Thành<sup>1,2</sup>, Phạm Hùng Vân<sup>3,\*</sup>, Trần Hoàng Hải<sup>4</sup>

## TÓM TẮT

Các mẫu huyết thanh chứa virus viêm gan siêu vi B (hepatitis B virus, HBV) được dùng như mẫu sinh học để khảo sát khả năng tách chiết DNA (deoxyribonucleic acid) theo kích thước và lượng hạt nano sử dụng, được thực hiện trong nghiên cứu này. Hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> được tổng hợp bằng phương pháp đồng kết tủa (co-precipitation) có kích thước khoảng 10 nm với độ bão hòa từ 60,02 emu/g. Sử dụng phương pháp dung môi nhiệt (solvothetmal) với thời gian tổng hợp khác nhau thu được các kích thước hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> khoảng 32, 60 và 100 nm với độ bão hòa từ tương ứng 88,82; 83,69 và 80,29 emu/g. Các hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> tổng hợp được đều có tính chất siêu thuận từ. Bằng phương pháp Stöber, hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> được phủ SiO<sub>2</sub> (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>) để tạo nhóm Si-OH qua đó hạt nano có thể hấp phụ DNA thông qua liên kết hydro. Tính chất, hình dạng, kích thước và khả năng hấp phụ DNA của các hạt nano được xác định bởi sự nhiễu xạ tia X (XRD), hiển vi điện tử truyền qua (TEM), từ kế mẫu rung (VSM), phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR), phương pháp Brunauer–Emmett–Teller (BET) và polymerase chain reaction (PCR). Kết quả cho thấy các hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> đều có thể tách chiết DNA HBV. Hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> thu được từ hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 10 nm có khả năng tách chiết DNA HBV tốt hơn. Ở nồng độ HBV cao (10<sup>9</sup> copies/mL), việc sử dụng 3 hoặc 4 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 10 nm) có thể tách chiết được nhiều DNA HBV hơn so với dùng 2 mg.

**Từ khoá:** hạt nano, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, kích thước, tách chiết, DNA

<sup>1</sup>Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

<sup>3</sup>Trường Đại học Phan Châu Trinh

<sup>4</sup>Viện Vật lý Thành phố Hồ Chí Minh

## Liên hệ

**Phạm Hùng Vân**, Trường Đại học Phan Châu Trinh

Email: van.phh@gmail.com

## Lịch sử

- Ngày nhận: 31-10-2018
- Ngày chấp nhận: 27-3-2019
- Ngày đăng: 31-3-2019

## DOI:

<https://doi.org/10.32508/stdjns.v3i1.726>



## Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



## ĐẶT VẤN ĐỀ

Tách chiết DNA từ các mẫu bệnh phẩm là một phần việc quan trọng trong xét nghiệm sử dụng kỹ thuật polymerase chain reaction (PCR) dùng trong chẩn đoán, như chẩn đoán bệnh, pháp y, quan hệ huyết thống, định danh loài, đánh giá chất lượng thực phẩm<sup>1</sup>. Một số phương pháp truyền thống tách chiết DNA sử dụng hạt silica và cột silica dựa trên phương pháp ly tâm để loại bỏ các dịch nổi, các hóa chất sau tách chiết và thu hồi DNA, vì thế tiêu tốn nhiều thời gian cho một quy trình tách chiết và nhất là chưa thể tự động hoàn toàn. Hiện nay, hạt từ được phủ lớp bề mặt có chức năng hấp phụ DNA đang được nghiên cứu và ứng dụng. So với phương pháp tách chiết dùng kỹ thuật ly tâm, phương pháp hạt từ sử dụng nam châm thu hồi hạt từ mang đến những thuận lợi, như đơn giản, nhanh chóng, hoàn toàn tự động, thực hiện được với lượng mẫu lớn, độ tinh sạch cao và nhất là tránh nhiễm và ít sai sót kỹ thuật, ngoài ra hiệu suất tách chiết DNA của phương pháp hạt từ không thua kém bất kỳ một phương pháp tách chiết nào<sup>2</sup>. Hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> được ứng dụng nhiều trong y sinh vì tính siêu thuận từ, độ bão hòa từ cao, ít độc, và sau khi

được chức năng bề mặt chúng có thể gắn kết được các phân tử sinh học<sup>3</sup>. Độ bão hòa từ phụ thuộc mạnh vào kích thước và tùy kích thước mà hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> được dùng trong các ứng dụng khác nhau<sup>4</sup>.

Trong nghiên cứu này, hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> được tổng hợp với các kích thước 10, 32, 60 và 100 nm, và được phủ SiO<sub>2</sub> để tách chiết DNA. Mẫu được dùng để thử nghiệm khả năng tách chiết DNA của các kích thước hạt nano cũng như lượng hạt nano sử dụng cho mỗi lần tách chiết là các mẫu huyết thanh chứa HBV.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

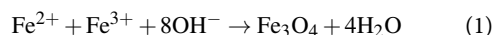
Ferrous chloride tetrahydrate (FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O); ferric chloride hexahydrate (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O); ammonium hydroxide (NH<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O, 25 % w/w); ethylene glycol (EG); sodium acetate trihydrate (NaAc.3H<sub>2</sub>O); poly(ethylene glycol)-2000 (PEG); ethanol và tetraethyl orthosilicate (TEOS) do Merck sản xuất. Dung dịch ly giải: 2M guanidinium thiocyanate (GuSCN); 20 mM ethylene diamine tetra actic acid (EDTA); 250 mM sodium chloride (NaCl); 1 mg proteinase K, pH 5,5; dung dịch rửa 1: 2M GuSCN;

**Trích dẫn bài báo này:** Thành B T, Vân P H, Hải T H. **Chế tạo hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nhiều kích thước ứng dụng trong tách chiết DNA từ mẫu sinh học.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 3(1):55-64.

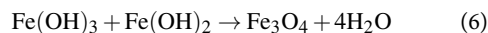
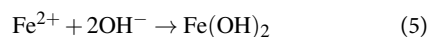
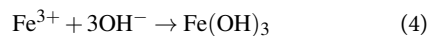
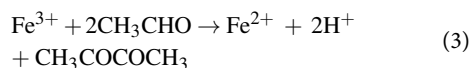
50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) – HCl, pH 6,4; dung dịch rửa 2: ethanol 70%; dung dịch rửa 3: ethanol 99,99%; dung dịch giải hấp phụ: 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8; các hóa chất có trong các dung dịch do Merck sản xuất. Kit dùng cho các phản ứng PCR<sup>NK</sup>PCR-VB và<sup>NK</sup>qPCR-VBquant do Nam Khoa Biotek sản xuất.

### Tổng hợp hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>

Hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> được tổng hợp bằng phương pháp đồng kết tủa và dung môi nhiệt. Theo phương pháp đồng kết tủa<sup>5</sup>, 2,434 g FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O và 0,895 g FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O được hòa tan trong 65 mL nước cất ở 80°C trong môi trường khí N<sub>2</sub>, 25 mL dung dịch NH<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O được thêm vào dung dịch (pH ~10) và khuấy thêm 1 giờ. Các phân tử Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> được hình thành dựa trên phản ứng<sup>6</sup>:



Theo phương pháp dung môi nhiệt<sup>7</sup>, hòa tan 2,7g FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O trong 40 mL EG, sau đó lần lượt thêm vào dung dịch 4,8 g NaAc và 0,5 g PEG, khuấy mạnh trong 30 phút ở nhiệt độ phòng trong môi trường khí N<sub>2</sub>, dung dịch được chuyển vào nồi hấp, tăng dần nhiệt độ và duy trì ở 200°C trong 12, 18 hoặc 24 giờ. Sau cùng, các dung dịch sau phản ứng được để nguội đến nhiệt độ phòng, các hạt được tách bằng nam châm, rửa nhiều lần với nước cất, ethanol và sấy khô trong chân không ở 70°C. Ở 200°C, Fe<sup>3+</sup> bị khử bởi EG và NaAc để trở thành Fe<sup>2+</sup> qua đó Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> được hình thành và được thể hiện dưới các phản ứng<sup>8</sup>:



Hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> được phủ SiO<sub>2</sub> (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>) bằng phương pháp Stöber<sup>9</sup> với một vài thay đổi, theo đó 150 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> được phân tán trong 40 mL dung dịch ethanol/nước theo tỉ lệ thể tích 3:1, sau đó 3 mL NH<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O và 0,3 mL TEOS được thêm vào và khuấy trong 12 giờ trong môi trường N<sub>2</sub>. Các hạt nano được rửa bằng nước, ethanol, tách bằng nam châm và sấy khô trong chân không.

### Tách chiết DNA

DNA được tách chiết theo phương pháp Boom<sup>10</sup>, trong đó hạt silica được thay bởi hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> và hạt nano được thu hồi bằng nam châm thay vì ly tâm. Mẫu thử chứa 200 μL huyết thanh với các nồng độ HBV khác nhau và có hoặc không có 20 μL chứng nội tại của kit PCR. Hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> được cho vào tube chứa mẫu thử cùng 700 μL dung dịch ly giải, vortex nhẹ, và ủ hỗn hợp dung dịch ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Hạt nano được tách bởi nam châm và lần lượt rửa với dung dịch rửa 1, 2 và 3 mỗi loại 1 mL, sấy khô mẫu ở 56°C trong 10 phút, thu được các hạt nano hấp phụ DNA. Sau cùng, dung dịch giải hấp phụ (100 μL) được thêm vào tube chứa hạt nano hấp phụ DNA, vortex và ủ mẫu ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, loại bỏ hạt nano thu được dịch chứa DNA.

Hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> (3 mg) được chế tạo từ hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 10, 32, 60 và 100 nm lần lượt được dùng để tách chiết DNA. Ngoài ra, liều lượng 2, 3 hoặc 4 mg hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> được chế tạo từ hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 10 nm được dùng cho một lần tách chiết cũng được thử nghiệm trong thực nghiệm này.

### Khuếch đại DNA bằng PCR

Dịch DNA tách chiết được (10 μL) và 15 μL dung dịch (<sup>NK</sup>PCR-VB với PCR hoặc <sup>NK</sup>qPCR-VBquant với realtime PCR) được cho vào ống phản ứng và thực hiện PCR với 40 chu kỳ.

### Các kỹ thuật phân tích

Giản đồ nhiễu xạ tia X (XRD, D8-ADVANCE, Bruker), ảnh hiển vi điện tử truyền qua (TEM, JEM-1400, Joel), đường cong từ hóa (VSM, MicroSense), phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR, TENSOR 27, Bruker), phương pháp Brunauer-Emmett-Teller (BET, Nova 3200e, Quantachrome Instruments) và polymerase chain reaction (PCR, CFX96, Bio-Rad) tất cả được sử dụng để xác định hình dạng, tính chất và khả năng tách chiết DNA của hạt nano.

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Giản đồ XRD của các mẫu được tổng hợp bằng phương pháp đồng kết tủa và dung môi nhiệt cho thấy sản phẩm chủ yếu là Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, các đỉnh nhiễu xạ (220), (311), (400), (422), (511) và (440) khá phù hợp với các đỉnh nhiễu xạ của Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> chuẩn (JCPDS file No. 01-075-1372) (**Hình 1**). Áp dụng công thức Scherrer với đỉnh (311), từ đó tính được kích thước của các tinh thể 9,15 nm với phương pháp đồng kết tủa (**Hình 1a**); 28,92; 29,02 và 28,75 nm với phương pháp dung môi nhiệt ứng với thời gian tổng hợp 12, 18 và 24 giờ (**Hình 1b-d**).

Ảnh TEM (**Hình 2**) cho thấy sự khác biệt về kích thước của các hạt được tổng hợp theo hai phương pháp. Phương pháp đồng kết tủa, kích thước hạt khoảng 10 nm (**Hình 2a**), trong khi phương pháp dung môi nhiệt thu được hạt có kích thước lớn hơn 30 nm (**Hình 2b-d**). Sự khác biệt này là do cơ chế hình thành hạt  $Fe_3O_4$  của hai phương pháp. Với phương pháp đồng kết tủa, các phân tử  $Fe_3O_4$  được hình thành theo phản ứng (1) và hình thành ngay sau khi dung dịch muối sắt được đưa vào dung dịch bazo. Và thời gian để phản ứng xảy ra hoàn toàn không quá 1 giờ<sup>3</sup>. Trong khi với phương pháp dung môi nhiệt, các phân tử  $Fe_3O_4$  được hình thành thông qua các phản ứng (2-6), trong hệ thống phản ứng đã hình thành các thành phần trung gian trước khi hình thành  $Fe_3O_4$ . Hơn nữa, thời gian để phản ứng xảy ra hoàn toàn có thể lên đến nhiều giờ. Chính sự hình thành các thành phần trung gian trong hệ thống phản ứng đã hình thành các hạt  $Fe_3O_4$  có kích thước lớn hơn<sup>11</sup>. **Hình 2b-d**, các hạt được tổng hợp theo phương pháp dung môi nhiệt với thời gian tổng hợp lần lượt là 12, 18 và 24 giờ thu được kích thước hạt tương ứng 32, 60 và 100 nm. Sự tăng kích thước là do tăng thời gian tổng hợp<sup>7</sup>.

Giản đồ XRD ở **Hình 1b-d** ứng với thời gian tổng hợp 12, 18 và 24 giờ cho biết kích thước tinh thể không thay đổi đáng kể, khoảng 29 nm. Trong khi cũng những mẫu này, **Hình 2b-d** thể hiện các hạt  $Fe_3O_4$  có kích thước lớn hơn 30 nm. Do các hạt  $Fe_3O_4$  tổng hợp theo phương pháp dung môi nhiệt, được hình thành từ sự kết tụ của các tinh thể  $Fe_3O_4$  nhỏ hơn<sup>12</sup>. Nghiên cứu này, hạt  $Fe_3O_4$  tổng hợp theo phương pháp dung môi nhiệt, được hình thành từ sự kết tụ của các tinh thể nano có kích thước nhỏ hơn 29 nm và thời gian tổng hợp kéo dài chỉ làm tăng kích thước hạt  $Fe_3O_4$  nhưng không làm thay đổi đáng kể kích thước tinh thể nano cấu thành hạt  $Fe_3O_4$ .

**Hình 3** thể hiện các hạt  $Fe_3O_4$  phủ  $SiO_2$ , bề dày lớp phủ khoảng 3-10 nm và hầu hết các hạt đều được phủ. Các hạt nano ở **Hình 2a** và **Hình 3a** có kích thước nhỏ hơn nên có sự kết tụ nhiều hơn là do tương tác lưỡng cực từ mạnh, và tỷ số giữa diện tích và thể tích lớn hơn.

**Hình 4** và **Bảng 1** thể hiện đường cong từ hóa và độ bão hòa từ ( $M_s$ ) của các hạt nano ở nhiệt độ phòng. Giá trị  $M_s$  của  $Fe_3O_4$  có kích thước 10 nm được tổng hợp theo phương pháp đồng kết tủa là 60,02 emu/g (**Hình 4a**) nhỏ hơn giá trị  $M_s$  của các hạt  $Fe_3O_4$  được tổng hợp theo phương pháp dung môi nhiệt là 88,82; 83,69 và 80,29 emu/g ứng với kích thước 32, 60 và 100 nm (**Hình 4b-d**) là do kích thước tinh thể của chúng nhỏ hơn. Sự khác biệt về các giá trị  $M_s$  của các hạt nano  $Fe_3O_4$  được tổng hợp theo hai phương pháp chủ

yếu do khác biệt về kích thước tinh thể. Kích thước tinh thể tăng  $M_s$  tăng<sup>4</sup>. Tuy nhiên, kích thước tinh thể vượt quá 30 nm sẽ không còn siêu thuận từ, nghĩa là vẫn còn từ dư khi ngừng tác động của từ trường ngoài và làm các hạt phân tán không tốt trong dung dịch. Do trong nghiên cứu này, các tinh thể cấu thành hạt  $Fe_3O_4$  có kích thước nhỏ hơn giới hạn siêu thuận từ là 30 nm<sup>13</sup>, nên có thể xem các hạt  $Fe_3O_4$  là siêu thuận từ. Ngoài ra, giá trị  $M_s$  của mẫu tổng hợp theo phương pháp dung môi nhiệt lên đến 88,82 emu/g gần bằng với giá trị  $M_s$  của  $Fe_3O_4$  khối là 92 emu/g. Kết quả ở **Bảng 1** và **Hình 4** thể hiện sự giảm giá trị  $M_s$  của các hạt  $Fe_3O_4@SiO_2$  so với các hạt  $Fe_3O_4$  là do lớp phủ  $SiO_2$ <sup>14</sup>.

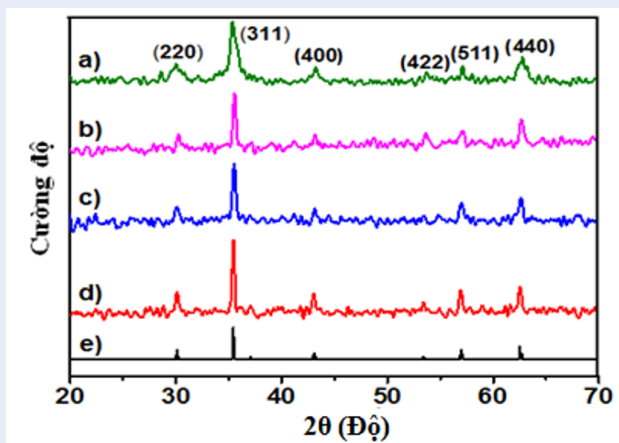
### Chức năng hóa bề mặt hạt nano $Fe_3O_4$

**Hình 5** thể hiện phổ FTIR của các hạt nano  $Fe_3O_4@SiO_2$ . Các đỉnh quanh 570 và 473  $cm^{-1}$  thuộc về dao động Fe-O<sup>3</sup>. Ở 473  $cm^{-1}$  còn có sự hiện diện của dao động uốn cong Si-O-Si<sup>15</sup> nó góp phần làm tăng cường độ đỉnh này. Ngoài ra, các đỉnh quanh 1090 và 804  $cm^{-1}$  lần lượt của các dao động bất đối xứng và kéo căng của Si-O-Si, trong khi vùng phổ quanh đỉnh 950  $cm^{-1}$  liên quan đến dao động kéo căng Si-OH<sup>15</sup>. Sự xuất hiện các đỉnh 3379, 1628 và 1401  $cm^{-1}$  là do các dao động kéo căng O-H, uốn cong H-O-H<sup>16</sup>. Ngoài ra, đỉnh quanh 1401  $cm^{-1}$  cũng liên quan đến dao động biến dạng của CH<sub>2</sub> và dao động uốn cong CH<sub>3</sub><sup>17</sup>. Sự hình thành lớp phủ silica trên bề mặt hạt nano  $Fe_3O_4$  được dựa trên phản ứng giữa nhóm OH của hạt nano  $Fe_3O_4$  và nhóm OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> của TEOS<sup>18</sup>. Kết quả cho thấy các hạt nano  $Fe_3O_4$  với các kích thước 10, 32, 60 và 100 nm đã được phủ bởi silica. Trong môi trường pH ~ 5, các hạt nano  $Fe_3O_4@SiO_2$  mang các nhóm Si-OH có thể hấp phụ DNA thông qua liên kết hydro và DNA được giải hấp phụ trong môi trường pH ~ 8<sup>19</sup>.

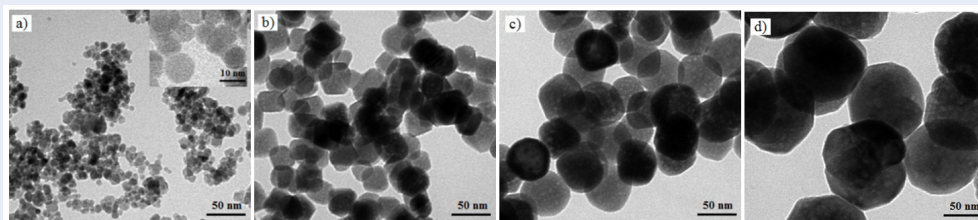
### Sự ảnh hưởng kích thước hạt nano $Fe_3O_4$

$Fe_3O_4@SiO_2$  (3 mg) với kích thước hạt  $Fe_3O_4$  10, 32, 60 và 100 nm lần lượt được dùng để tách chiết DNA của 220  $\mu$ L mẫu thử gồm 200  $\mu$ L huyết thanh có HBV( $10^9$  copies/mL) và 20  $\mu$ L mẫu chứng nội tại. Độ tinh sạch của DNA được tính bởi  $Q = (A_{260\text{ nm}} - A_{320\text{ nm}}) / (A_{280\text{ nm}} - A_{320\text{ nm}})$  với  $A_{260}$ ,  $A_{280}$  và  $A_{320\text{ nm}}$  ứng với độ hấp thụ ở bước sóng 260, 280 và 320 nm. Kết quả cho thấy các giá trị  $Q > 1,7$  (**Bảng 2**), do đó có thể thực hiện PCR để khuếch đại DNA tách chiết được<sup>20</sup>.

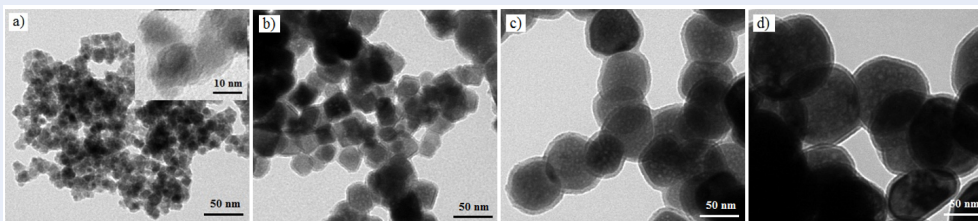
Chứng nội tại được cho vào cùng mẫu HBV để kiểm tra khả năng tách chiết DNA của các hạt nano, do vậy sản phẩm tách chiết có DNA của chứng nội tại



**Hình 1:** Giảm đồ XRD của  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  được tổng hợp bởi a) phương pháp đồng kết tủa; b-d) phương pháp dung môi nhiệt với thời gian tổng hợp tương ứng 12, 18 và 24 giờ; và e) của  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  thuần khiết.



**Hình 2:** Ảnh TEM của các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  được tổng hợp bởi a) phương pháp đồng kết tủa; và b-d) phương pháp dung môi nhiệt với thời gian tổng hợp tương ứng 12, 18 và 24 giờ.



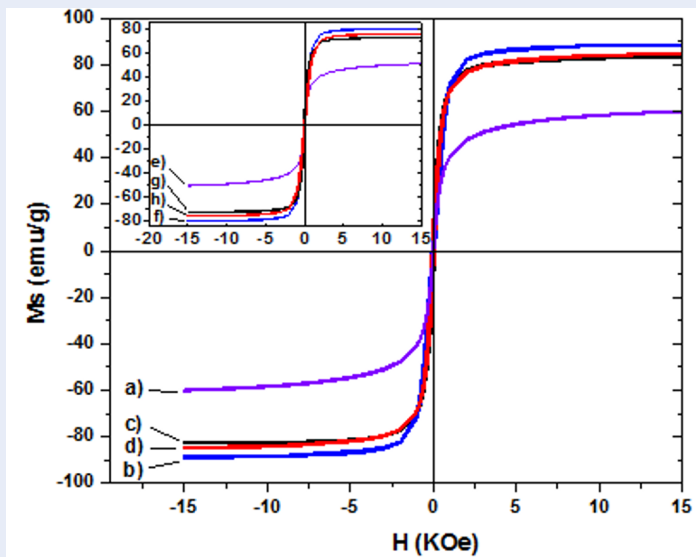
**Hình 3:** Ảnh TEM của các hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$  với kích thước hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a) 10, b) 32, c) 60, và d) 100 nm.

**Bảng 1:** Độ từ hóa bão hòa của các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  và  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$

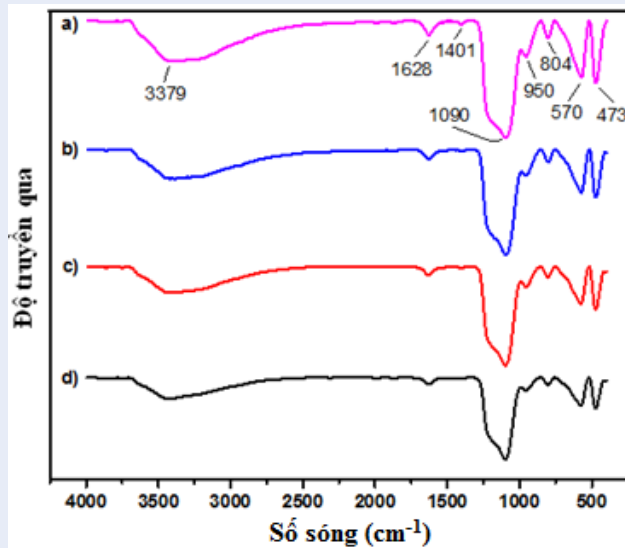
Kích thước hạt $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (nm)	10	32	60	100
$M_s$ (emu/g) của $\text{Fe}_3\text{O}_4$	60,02	88,82	83,69	80,29
$M_s$ (emu/g) của $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$	50,90	76,04	75,61	73,28

**Bảng 2:** Độ tinh sạch của DNA được tách chiết bởi các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$  với kích thước hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  10, 32, 60 và 100 nm

Hạt $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ với kích thước $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (nm)	10	32	60	100	
Độ tinh sạch Q		1,75	1,82	1,79	1,77



**Hình 4:** Đường cong từ hóa ở nhiệt độ phòng của các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  và  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$  (phía trên bên trái) với kích thước hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a, e) 10; b, f) 32; c, g) 60; và d, h) 100 nm.



**Hình 5:** Phổ FTIR của các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$  với kích thước hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a) 10, b) 32, c) 60 và d) 100 nm.

và DNA của HBV. PCR là một kỹ thuật khuếch đại đoạn DNA đích thành nhiều bản sao DNA, nếu bắt đầu bằng một DNA đích là mạch đôi DNA, thì sau n chu kỳ khuếch đại, số bản sao DNA thu được là  $2^n$ . Do đó, nếu bắt đầu với N DNA đích là mạch đôi DNA thì sau n chu kỳ số bản sao DNA thu được là  $N \times 2^n$ ; nghĩa là với cùng số chu kỳ khuếch đại, số DNA đích càng lớn, số DNA bản sao thu được càng tăng. **Hình 6** thể hiện sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2%, các giếng chứa HBV và chứng nội tại được tách

chiết bởi hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$  với kích thước hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  tương ứng a) 10, b) 32, c) 60 và d) 100 nm; giếng (-) chứa mẫu âm HBV (0 copies/mL) và chứng nội tại được tách chiết bởi hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$  kích thước hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  10 nm.

Theo nhà sản xuất kit PCR, đoạn DNA của HBV và DNA của chứng nội tại được khuếch đại có kích thước lần lượt 259 và 190 bps. Kết quả cho thấy vạch ở 259 bps xuất hiện trên các giếng a-d) là của DNA HBV, không xuất hiện trên giếng (-); trong khi tất cả các

giếng đều xuất hiện vạch ở 190 bps, đó là sản phẩm khuếch đại của đoạn DNA đích của chúng nội tại. Kết quả này cho thấy các loại hạt nano đã có thể tách chiết được DNA của mẫu HBV và của chúng nội tại, DNA đủ tinh sạch cho phép thực hiện PCR. Tuy nhiên, quan sát dải 259 bps của các giếng, khó nhận biết dải của giếng nào sáng hơn. Dải sáng hơn ứng với hạt nano tách chiết được DNA HBV của giếng đó nhiều hơn.

Realtime PCR là một kỹ thuật PCR, sản phẩm khuếch đại được đọc dựa trên tín hiệu huỳnh quang (RFU, relative fluorescence units) phát ra từ các DNA bản sao, cho phép xác định số DNA đích của mẫu. Số DNA bản sao được gia tăng sau các chu kỳ, cường độ huỳnh quang phát ra từ các DNA gia tăng và đến một chu kỳ nào đó cường độ huỳnh quang vượt qua đường huỳnh quang nền, chu kỳ đó gọi là chu kỳ ngưỡng (Ct, threshold cycle)<sup>21</sup>. Do vậy, số DNA đích càng lớn giá trị Ct càng nhỏ và ngược lại. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> (3 mg) với kích thước hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 10, 32, 60 và 100 nm lần lượt được dùng để tách chiết DNA của 200 µL mẫu HBV (10<sup>9</sup> copies/mL). Và sản phẩm tách chiết được khuếch đại bằng realtime PCR (Hình 7) cho thấy cả bốn mẫu Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> với hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 10, 32, 60 và 100 nm đều có thể tách chiết DNA và sản phẩm khuếch đại tương ứng với các đường a-d) với các giá trị Ct lần lượt là 13,39; 14,31; 15,13 và 15,86. Giá trị 13,39 Ct (Hình 7a) nhỏ nhất trong các giá trị Ct là do hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 10 nm) tóm bắt được DNA HBV nhiều nhất, kể đến là các hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> với hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 32, 60 và 100 nm. Giếng (-) (Hình 7(-)), do không có HBV nên đường biểu diễn khuếch đại không vượt qua đường huỳnh quang nền.

Bảng phương pháp BET có thể xác định được diện tích (bề mặt) riêng của các hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> và kết quả cho ở Bảng 3, kích thước hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> giảm, diện tích riêng của Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> tăng. Vì thế, chúng làm tăng khả năng gắn các nhóm chức và tăng khả năng liên kết các phân tử sinh học. Với cùng lượng, hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 10 nm) tóm bắt được DNA nhiều hơn là do diện tích riêng của chúng lớn hơn. Hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> được tổng hợp từ hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> có kích thước nhỏ hơn có khả năng tóm bắt DNA tốt hơn.

### Sự ảnh hưởng của lượng hạt nano

Lần lượt dùng 2, 3 và 4 mg hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 10 nm) để tách chiết DNA của 200 µL các mẫu HBV có nồng độ 10<sup>3</sup>, 10<sup>6</sup> và 10<sup>9</sup> copies/mL. Sản phẩm tách chiết được khuếch đại bằng realtime PCR (Hình 8). Ở nồng độ HBV 10<sup>3</sup> copies/mL, sử dụng 2, 3 và 4 mg hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> để tách chiết DNA đều nhận được

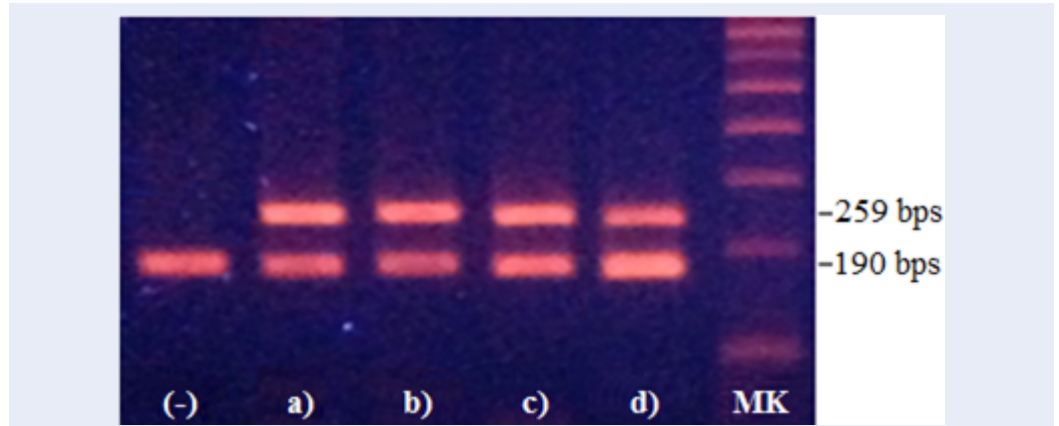
các đường biểu diễn ứng với các giá trị Ct xấp xỉ nhau 33,70; 33,41 và 33,68 (Hình 8a-c). Tương tự với nồng độ HBV 10<sup>6</sup> copies/mL, các giá trị Ct nhận được xấp xỉ nhau là 23,84; 23,15 và 23,41 tương ứng với Hình 8a-c, nghĩa là tách chiết được số DNA xấp xỉ nhau là do với 2 mg hạt nano đã có thể tách chiết được hầu hết DNA của mẫu. Tuy nhiên, ở nồng độ HBV 10<sup>9</sup> copies/mL, dùng 3 hoặc 4 mg hạt nano nhận được các giá trị Ct là 13,13 hoặc 13,15 (Hình 8b-c) thấp hơn giá trị Ct 14,20 (Hình 8a) ứng với dùng 2 mg hạt nano là vì tăng lượng hạt nano đã làm tăng diện tích bề mặt dẫn đến tăng số nhóm chức và kết quả là tách chiết được nhiều DNA hơn. Kết quả này cho thấy với mẫu có nồng độ HBV cao (10<sup>9</sup> copies/mL), dùng 3 hoặc 4 mg sẽ tách chiết được nhiều DNA hơn so với dùng 2 mg hạt nano.

## KẾT LUẬN

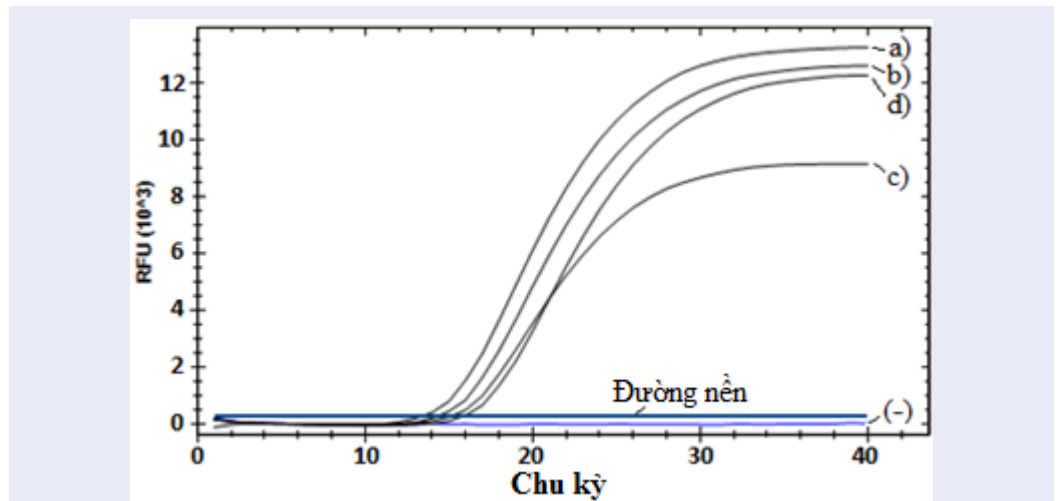
Đã tổng hợp được các hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> có kích thước 10, 32, 60 và 100 nm với độ bão hòa từ tương ứng 60,02; 88,82; 83,69 và 80,29 emu/g và được xem như siêu thuận từ. Độ bão hòa từ của các hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (88,82; 83,69 và 80,29 emu/g) gần bằng độ bão hòa từ của Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> khối (92 emu/g). Các hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> đều tách chiết được DNA HBV và DNA đủ tinh sạch. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> với hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 10 nm cho khả năng tách chiết HBV DNA tốt hơn. Ở nồng độ HBV cao (10<sup>9</sup> copies/mL), dùng 3 hoặc 4 mg hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 10 nm) cho kết quả tách chiết HBV DNA tốt hơn so với 2 mg hạt nano cùng loại, trong khi ở nồng độ HBV thấp hơn (10<sup>3</sup> hoặc 10<sup>6</sup> copies/mL) không có sự khác biệt đáng kể. Kết quả này là cơ sở để ứng dụng các hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> này cho việc tách chiết DNA/RNA (ribonucleic acid) từ các mẫu sinh học khác.

## DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

**DNA:** Deoxyribonucleic acid  
**RNA:** Ribonucleic acid  
**HBV:** Virus viêm gan B  
**XRD:** Nhiễu xạ tia X  
**TEM:** Hiển vi điện tử truyền qua  
**VSM:** Từ kế mẫu rung  
**FTIR:** Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier  
**BET:** Brunauer–Emmett–Teller  
**PCR:** Polymerase chain reaction  
**Tris:** Tris(hydroxymethyl)aminomethane  
**EG:** Ethylene glycol  
**NaAc:** Sodium acetate trihydrate  
**PEG:** Poly(ethylene glycol)-2000  
**TEOS:** Tetraethyl orthosilicate  
**GuSCN:** Guanidinium thiocyanate  
**EDTA:** Ethylene diamine tetraacetic acid  
**RFU:** relative fluorescence units



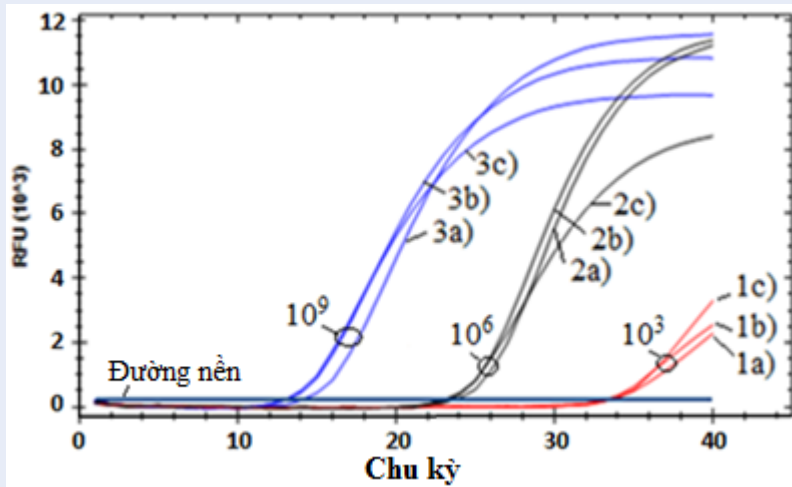
**Hình 6:** Sản phẩm PCR điện di trên gel agarose 2%; MK (marker), thang DNA; các giếng chứa HBV ( $10^9$  copies/mL) và chứng nội tại được tách chiết bởi hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> với kích thước hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> tương ứng a) 10, b) 32, c) 60 và d) 100 nm; giếng (-) chứa mẫu âm HBV và chứng nội tại được tách chiết bởi hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> với hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 10 nm.



**Hình 7:** Đồ thị RFU của phản ứng realtime PCR, các giếng chứa HBV ( $10^9$  copies/mL) được tách chiết bởi hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> với kích thước hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> tương ứng a) 10, b) 32, c) 60 và d) 100 nm; giếng (-) chứa mẫu âm HBV được tách chiết bởi hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> với hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 10 nm.

**Bảng 3:** Diện tích riêng các hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>

Kích thước hạt Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (nm)	10	32	60	100
Diện tích riêng của Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> (m <sup>2</sup> /g)	48,012	33,452	23,185	12,171



**Hình 8:** Đồ thị RFU của phản ứng realtime PCR; HBV với các nồng độ  $10^3$ ,  $10^6$  và  $10^9$  copies/mL được tách chiết với lượng hạt nano  $Fe_3O_4@SiO_2$  a) 2, b) 3 và c) 4 mg.

MK: Thang DNA  
 N: Số DNA đích  
 Ct: Chu kỳ ngưỡng  
 Ms: Độ bão hòa từ  
 Q: Độ tinh sạch của DNA  
 NPs: Nanoparticles

### XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả tuyên bố không có xung đột lợi ích.

### ĐÓNG GÓP CỦA TÁC GIẢ

Bùi Trung Thành thực hiện các thực nghiệm, xử lý số liệu và viết bản thảo.

Phạm Hùng Vân và Trần Hoàng Hải có đóng góp quan trọng trong việc giải thích kết quả thực nghiệm và góp ý cho bản thảo.

### ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU Y SINH

Nghiên cứu được thực hiện dưới sự cho phép của hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh của Nam Khoa Biotek Co..

### LỜI CẢM ƠN

Xin chân thành cảm ơn Nam Khoa Biotek Co. đã tài trợ kinh phí; Phòng Năng lượng và Môi trường Viện Vật lý Thành phố Hồ Chí Minh và Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ thiết bị.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tan SC, C YB. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol.* 2009;p. 1–10.

2. Akutsu J, Tojo Y, Segawa O, K O, M O, H T, et al. Development of an integrated automation system with a magnetic bead-mediated nucleic acid purification device for genetic analysis and gene manipulation. *Biotechnol Bioeng.* 2004;86:667–71.

3. Can K, Ozmen M. Ersoz M. Immobilization of albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.*

4. Andrade AL, Valente MA, Ferreira JMF, JD F. Preparation of size-controlled nanoparticles of magnetite. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 2012;324:1753–1757.

5. Massart R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans on Magn.* 1981;MAG-17:1247–1248.

6. El-kharrag R, Amin A, Greish YE. Low temperature synthesis of monolithic mesoporous magnetite nanoparticles. *Ceramics International.* 2012;38:627–634.

7. Deng H, Li X, Q P, X W, J C, Y L. Monodisperse Magnetic Single-Crystal Ferrite. *Microspheres Angew Chem.* 2005;117:2842–2845.

8. Sun H, Zeng X, Liu M, Elingarami S, Li G, Shen B, et al. Synthesis of Size-Controlled  $Fe_3O_4@SiO_2$  Magnetic Nanoparticles for Nucleic Acid Analysis. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* 2012;12:267–273.

9. Stöber W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J Colloid Interface Sci.* 1968;26:62–69.

10. Boom R, Sol CJ, MM S, CL J, PMWV D, JVD N. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology.* 1990;28:495–503.

11. Nishio K, Ikeda M, Gokon N, Tsubouchi S, Narimatsu H, Mochizuki Y, et al. Preparation of size-controlled (30–100 nm) magnetite nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 2007;310:2408–2410.

12. Zheng J, Liu ZQ, XS Z, M L, X L, W C. One-step solvothermal synthesis of  $Fe_3O_4@C$  core-shell nanoparticles with tunable sizes. *Nanotechnology.* 2012;23:165601.

13. Ge J, Hu Y, Biasini M, WP B, Y Y. Superparamagnetic magnetite colloidal nanocrystal clusters. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2007;46:4342–4345.

14. Girginova PI, da Silva AL D, CB L, P F, M O, VS A, et al. Silica coated magnetite particles for magnetic removal of  $Hg^{2+}$  from water. *J Colloid Interface Sci.* 2010;345:234–240.

15. Klotz M, A A, C G, C M, V C. Silica Coating on Colloidal Magnetite Particles. *J Colloid Interface Sci.* 1999;220.



16. Paul RC, RC N, SK V. Some compounds of iron(III) with bidentate bases. *Transition Metal Chemistry*. 1977;2:152–154.
17. Li K, Zeng Z, Xiong J, Yan L, Guo H, Liu S, et al. Fabrication of mesoporous Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@CTAB–SiO<sub>2</sub> magnetic microspheres with a core/shell structure and their efficient adsorption performance for the removal of trace PFOS from water. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2015;465:113–123.
18. Zhao J, Milanova M, MMCG W, V D. Surface modification of TiO<sub>2</sub> nanoparticles with silane coupling agents. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2012;413:273–279.
19. Melzak KA, Sherwood CS, Turner RFB, CA H. Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1996;181:635–644.
20. Elkins KM. Determination of DNA Quality and Quantity Using UV-Vis Spectroscopy. *Forensic DNA Biology*. 2013;p. 59–62.
21. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51:263–273.

# Synthesis of magnetite nanoparticles with different sizes for application in DNA extraction from biological sample

Bui Trung Thanh<sup>1,2</sup>, Pham Hung Van<sup>3,\*</sup>, Tran Hoang Hai<sup>4</sup>

## ABSTRACT

Serum samples containing hepatitis B virus (HBV) used as biological sample to examine DNA extraction capability at different nanoparticles (NPs) sizes and amounts were investigated in this study. The magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) NPs synthesized by co-precipitation method were size about of 10 nm with the magnetic saturation of 60.02 emu/g. Using solvothermal method with different synthesis times obtained the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs sizes of about 32, 60 and 100 nm with the magnetic saturations of 88.82, 83.69 and 80.29 emu/g, respectively. The synthesized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs had superparamagnetic properties. By Stöber method, the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs were coated with SiO<sub>2</sub> (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>) to form Si-OH groups through which the NPs could adsorb DNA via hydrogen bonds. The properties, morphology, size and DNA adsorption capacity of the NPs were determined by X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM), vibrating sample magnetometer (VSM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Brunauer–Emmett–Teller (BET) method, and polymerase chain reaction (PCR). The results showed that synthesized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> NPs could extract HBV DNA. The Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> NPs obtained from 10 nm Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs had better HBV DNA extraction. At high HBV concentration (10<sup>9</sup> copies/mL), using 3 or 4 mg of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> NPs (10 nm Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) could extract more HBV DNA than using 2 mg.

**Key words:** DNA, Extraction, Magnetite, Nanoparticles, Sizes

<sup>1</sup>Department of Physics, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City

<sup>2</sup>Solid State Physics Department, University of Science, VNUHCM

<sup>3</sup>Phan Chau Trinh University

<sup>4</sup>Institute of Physics, Ho Chi Minh City

## Correspondence

**Pham Hung Van**, Phan Chau Trinh University

Email: van.phh@gmail.com

## History

- Received: 31-10-2018
- Accepted: 27-3-2019
- Published: 31-3-2019

## DOI :

<https://doi.org/10.32508/stdjns.v3i1.726>



## Copyright

© VNU-HCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



**Cite this article :** Trung Thanh B, Hung Van P, Hoang Hai T. **Synthesis of magnetite nanoparticles with different sizes for application in DNA extraction from biological sample.** *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 3(1):55-64.