

L-半胱氨酸修饰的Au/Fe₃O₄磁性复合粒子的制备及其对牛血清蛋白的吸附性能

陈志军, 汤凯, 杨清香, 王雪兆, 朱海燕, 魏永豪

(郑州轻工业学院 材料与化学工程学院, 河南 郑州 450001)

摘要:采用L-半胱氨酸在Fe₃O₄表面链接Au纳米粒子的方法,制备了L-半胱氨酸修饰的Au/Fe₃O₄磁性复合粒子(LC-Au/Fe₃O₄),并将其用于吸附牛血清蛋白(BSA)。通过紫外可见分光光度计、X-射线衍射仪、傅里叶红外光谱仪、扫描电镜、透射电子显微镜、Zeta电位仪对样品的光学性质、结构形貌、稳定性进行表征。结果表明:复合粒子中的Fe₃O₄具有尖晶石结构,粒径在200 nm左右,稳定性较好。对BSA的吸附实验结果表明:LC-Au/Fe₃O₄的BSA单位吸附量达到161.5 mg/g。

关键词: Au/Fe₃O₄磁性复合粒子; L-半胱氨酸; 牛血清蛋白吸附

中图分类号: TB383.1; Q513+.1 文献标志码: A DOI: 10.3969/j.issn.2095-476X.2013.06.010

Preparation of L-cysteine modified Au/Fe₃O₄ magnetic composite particle and its adsorption for bovine serum albumin

CHEN Zhi-jun, TANG Kai, YANG Qing-xiang, WANG Xue-zhao, ZHU Hai-yan, WEI Yong-hao
(College of Material and Chemical Engineering Zhengzhou University of Light Industry Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The L-cysteine modified Au/Fe₃O₄ magnetic composite particles(LC-Au/Fe₃O₄) were synthesized and their adsorption properties for bovine serum albumin (BSA) were investigated. The obtained samples were characterized by UV-Vis spectrophotometer(UV-vis), X-ray diffraction(XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), scanning electron microscope(SEM), transmission electron microscope(TEM) and Zeta potential, respectively. The results showed that Fe₃O₄ of LC-Au/Fe₃O₄ has a spinel structure; its diameter was about 200 nm and the particles showed good stability. The adsorption capacity of LC-Au/Fe₃O₄ composite particles for BSA was 161.5 mg/g.

Key words: Au/Fe₃O₄ magnetic composite particle; L-cysteine; bovine serum albumin adsorption

0 引言

蛋白质的磁分离技术是在磁性粒子表面修饰-COOH, -CHO, -NH₂, -SH等配基,与目标蛋白质结合形成蛋白质-磁性粒子复合物,在外加磁

场的作用下将复合物从原体系中分离出来,经洗脱富集实现蛋白质的快速分离纯化^[1-2]。与传统分离方法相比,蛋白质磁分离技术具有快速、高纯、高收率等优点^[3-4]。Au/Fe₃O₄磁性复合粒子作为一种新型的生物分离介质,不仅具有Au纳米粒子优异的

收稿日期: 2013-08-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(20976168, 21271160); 河南省高校科技创新人才支持计划项目(2008HASTIT019)

作者简介: 陈志军(1963—),男,河南省信阳市人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为高分子及复合材料。

光、电、表面化学性能和 Fe_3O_4 磁粒子独特的磁响应性,还避免了常规网状分离介质内部扩散阻力的限制,在蛋白质分离中展现出很好的应用潜力^[5-9].合成具有高效、快速分离能力的 $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性复合粒子已成为纳米材料、生物医学以及生物工程等领域的重要研究课题^[10-14].

目前,制备 $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性复合粒子的方法可分为2种^[15-17]:一种以磁性 Fe_3O_4 粒子为母体,还原 HAuCl_4 制备 Au 纳米粒子并将其附着或包覆在 Fe_3O_4 粒子表面,包括种子聚合^[18-19]、化学还原^[20]以及 γ 射线辐照还原等^[21];另一种采用偶联剂将事先合成的 Fe_3O_4 磁性粒子与 Au 纳米粒子键接得到复合粒子,因粒子间以化学键连接, $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性复合粒子更稳定.

本文使用水热法合成 Fe_3O_4 磁性粒子,再将 Au 纳米粒子键接在氨基化处理后的 Fe_3O_4 磁性粒子表面,以期得到粒径分布均匀、稳定性好的 $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合粒子,并将其用于牛血清蛋白(BSA)的吸附性能研究.

1 实验

1.1 试剂与仪器

试剂: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaOH , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, 乙二醇,均为分析纯,天津风船化工试剂科技有限公司产;3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES),分析纯,南京康普顿曙光有机硅化工有限公司产; $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$,分析纯,天津市化学试剂三厂产;牛血清蛋白,生物试剂,上海尚宝生物科技有限公司产.

仪器:T6 紫外可见分光光度计,北京普析通用产;NICOLET380 傅里叶红外光谱仪,美国 NICOLET 公司产;AXS D8 X-射线衍射仪,德国 Bruker 公司产;JSM-6490LV 扫描电镜, JEM-2100 型透射电子显微镜,日本 JEOL 公司产;ZetaPlus Zeta 电位仪,美国布鲁克海文仪器公司产;LS7307-9309 型高场振动样品磁强计,美国 Lakeshore 公司产.

1.2 样品制备

1.2.1 Fe_3O_4 磁性粒子的制备及其氨基化 采用水热法^[22]制得 Fe_3O_4 磁性粒子.参照文献[23]氨基修饰 Fe_3O_4 表面方法,制得氨基修饰的 Fe_3O_4 粒子,用乙醇定容至 1 g/L(本文中所有磁性粒子的制备

及后处理过程均采用磁分离方法分离和纯化磁性纳米粒子,不再赘述).

1.2.2 胶体 Au 溶胶的制备及 L-半胱氨酸修饰

用 Frens 法^[24]合成胶体 Au 溶胶. L-半胱氨酸对 Au 溶胶的修饰参照文献[25],并做一些改进:将 25 mL 0.1% HAuCl_4 水溶液、10 mL 的 1% 柠檬酸三钠溶液和 4 mg 的 L-半胱氨酸依次置入 100 mL 的三口烧瓶中,在 97 °C 水浴中加热并以 415 r/min 的速度搅拌 15 min,得到 L-半胱氨酸修饰的胶体 Au 溶胶.

1.2.3 $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性复合粒子的制备 取 25 mL 氨基化的 Fe_3O_4 粒子悬浮液,室温下以 180 r/min 速度搅拌,迅速加入 25 mL L-半胱氨酸修饰的 Au 溶胶,混合溶液由棕色逐渐变淡,低速搅拌反应 12 h 后,使用超纯水洗涤至中性,得到 L-半胱氨酸修饰的 $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性复合粒子,并与未修饰的 $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性复合粒子对比.

1.2.4 蛋白质吸附 常温条件下,配制 1 mg/mL 的 BSA 溶液,取 9 支试管,各加入 5 mL BSA 溶液,然后向 9 只试管中分别加入 2.5 mg, 5.0 mg, 7.5 mg, 10.0 mg, 12.5 mg, 15.0 mg, 17.5 mg, 20.0 mg, 22.5 mg L-半胱氨酸修饰的 $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性复合粒子,超声分散 1 min 后静置吸附 30 min,在外磁场作用下分离出复合粒子,取上清液.

2 结果与讨论

2.1 紫外测试

图 1 是样品的紫外-可见吸收光谱图(图 1—图 3 及图 6 中的 *a* 为 Fe_3O_4 曲线, *b* 为 $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 曲线, *c* 为 L-半胱氨酸修饰的 $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 曲线, *d* 为纳米 Au 曲线).由图 1 可知, Fe_3O_4 粒子的紫外-可见吸收曲线(*a*) 在 500 ~ 600 nm 之间无特征吸收峰出现; Au 纳米溶胶的紫外-可见吸收曲线(*d*) 在 520 nm 附近有 Au 的特征吸收峰,其粒径在 3 ~ 20 nm 范围内^[26]; $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 水溶液的紫外-可见吸收曲线(*b*, *c*) 在 556 nm 附近有明显的 Au 吸收峰,说明 Fe_3O_4 粒子表面有 Au 纳米粒子存在.

2.2 物相分析

图 2 为样品的 X-射线衍射(XRD) 谱图.由图 2 可知,在 18.94°, 30.16°, 35.54°, 43.07°, 53.6°, 57.1°, 62.70°, 74.1° 处出现的衍射峰为尖晶石结构 Fe_3O_4 的特征峰;在 38.2°, 44.4°, 64.6°, 77.6°, 88.2°, 90.2°, 91.2°, 92.2°, 93.2°, 94.2°, 95.2°, 96.2°, 97.2°, 98.2°, 99.2° 处出现的衍射峰为 Au 的特征峰.

81.7°处出现的衍射峰分别对应于 Au 的 (111), (200), (220), (311), (222) 晶面, 从而表明在 Fe₃O₄ 中有 Au 存在.

2.3 红外光谱分析

图 3 是样品的傅里叶红外光谱图. 从图 3 可以看出, 578 cm⁻¹ 处吸收峰对应于 Fe₃O₄ 的 Fe—O 特征吸收峰. 1 073 cm⁻¹ 处的吸收峰对应于 Si—O 的伸缩振动峰. 1 412 cm⁻¹, 1 555 cm⁻¹, 1 629 cm⁻¹ 处

的吸收峰可能对应于—NH₂ 的吸收峰. 2 930 cm⁻¹ 和 2 973 cm⁻¹ 的谱带对应—CH₂ 中—C—H 伸缩振动. 3 340 cm⁻¹ 附近出现的谱带则为 N—H 伸缩振动, 它与—OH 的伸缩振动峰发生了重叠, 说明 Fe₃O₄ 纳米粒子表面已被氨基化. 图 3 曲线 c 中 2 923 cm⁻¹ 和 2 953 cm⁻¹ 附近处的吸收峰对应—CH₂—中—C—H 伸缩振动, 3 421 cm⁻¹ 附近出现的谱带则为—OH 的伸缩振动峰, 说明 Fe₃O₄ 粒子表面铆接有 L-半胱氨酸, 即 Fe₃O₄ 磁性粒子表面铆接有 Au 纳米粒子.

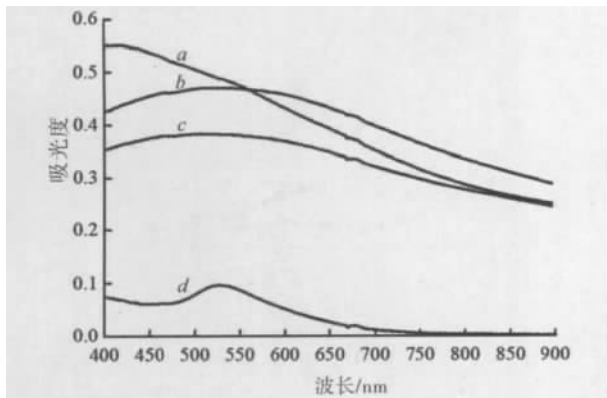


图 1 样品的紫外-可见吸收光谱图

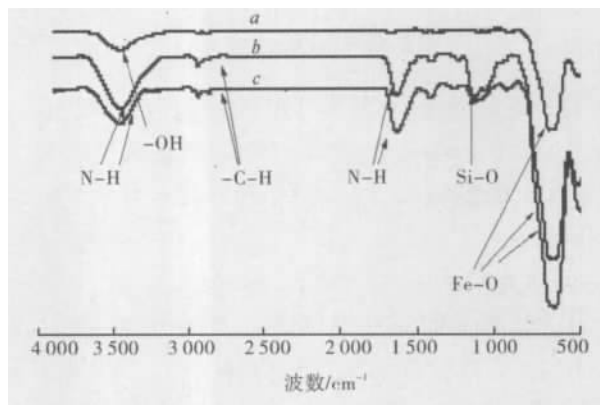


图 3 样品的傅里叶红外光谱图

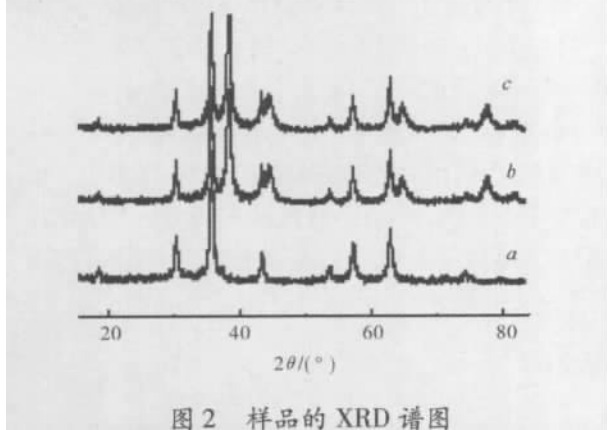


图 2 样品的 XRD 谱图

2.4 形貌表征

图 4 为样品的扫描电镜 (SEM) 和透射电子显微镜 (TEM) 图片. 由图 4 可以看出, Au 纳米粒子平均粒径约 20 nm; Au/Fe₃O₄ 磁性复合粒子尺寸均匀, 粒径约 200 nm; 形状近似规整球形的 Fe₃O₄ 磁性粒子表面铆接有 Au 纳米粒子.

2.5 磁性能测试

图 5 给出 L-半胱氨酸修饰的 Au/Fe₃O₄ 磁性

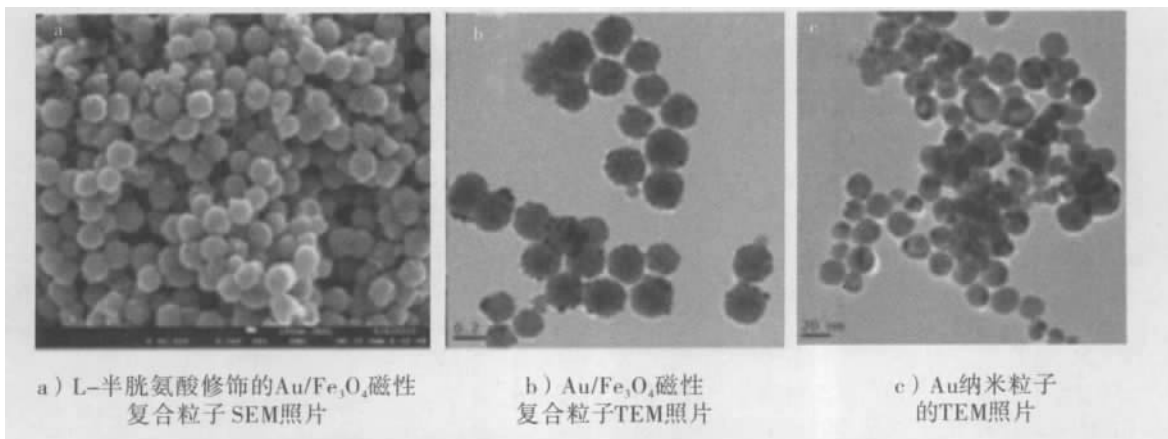


图 4 样品的 SEM 和 TEM 图片

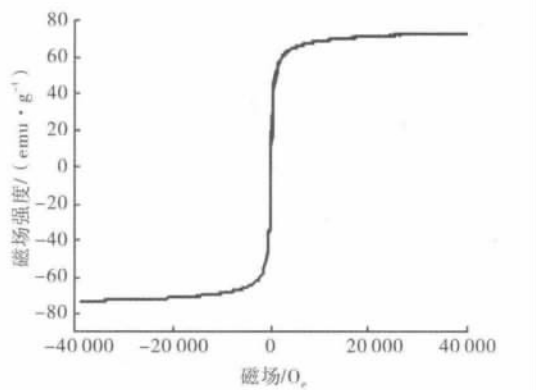


图5 L-半胱氨酸修饰的 Au/Fe₃O₄ 磁性复合粒子磁滞回线

复合粒子磁滞回线.从图5可知,复合粒子饱和磁化强度为 73.0 emu/g,磁矫顽力和剩余磁强度都极低,趋近于 0.这表明 Au/Fe₃O₄ 磁性复合粒子具有超顺磁性.

2.6 Zeta 电位测试

图6为样品的 Zeta 电位图.由图6可知,Fe₃O₄ 纳米粒子、氨基化 Au/Fe₃O₄ 磁性粒子、L-半胱氨酸修饰的 Au/Fe₃O₄ 磁性粒子的 Zeta 电位值分别为 -20.12 mV, -38.21 mV, -43.92 mV,表明用 L-半胱氨酸修饰的 Au/Fe₃O₄ 磁性复合粒子较 Au/Fe₃O₄ 磁性复合粒子和 Fe₃O₄ 磁性粒子稳定性明显提高.

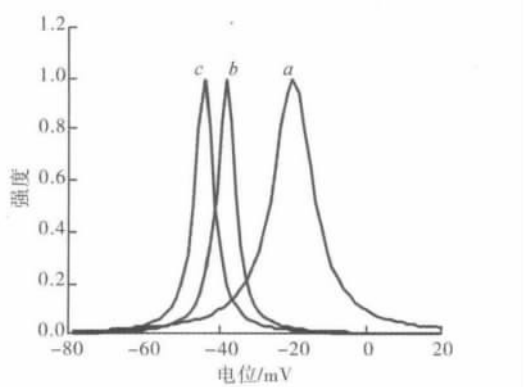


图6 样品的 Zeta 电位图谱

2.7 牛血清蛋白吸附实验测定

图7为 Au/Fe₃O₄ 磁性复合粒子对蛋白质的单位吸附量曲线.由图7可知,经 L-半胱氨酸修饰后,Au/Fe₃O₄ 磁性粒子对 BSA 的吸附能力明显增强;随着 Au/Fe₃O₄ 磁性粒子质量的增加,单位质量磁粒子的吸附量呈现降低的趋势,修饰后的复合粒子对 BSA 单位吸附量最高达到 161.5 mg/g,明显高

于未修饰复合粒子的最高单位吸附量(55 mg/g).这可能是由于 L-半胱氨酸增加了 Au/Fe₃O₄ 复合粒子表面的氨基和羧基的数量,从而增大了磁粒子表面和蛋白质分子之间的作用力,因而 L-半胱氨酸化的 Au/Fe₃O₄ 复合粒子单位质量的 BSA 吸附量增大.

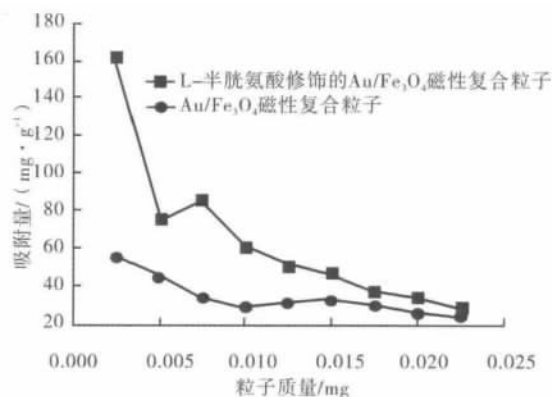


图7 磁性复合粒子对蛋白质的单位吸附量曲线

3 结论

本文制备了 L-半胱氨酸修饰 Au/Fe₃O₄ 的纳米复合粒子,并对其进行了结构和性能表征.结果表明:复合粒子中的 Fe₃O₄ 具有尖晶石结构,粒径在 200 nm 左右,稳定性好. L-半胱氨酸修饰 Au/Fe₃O₄ 对牛血清蛋白吸附实验结果表明:随着 L-半胱氨酸修饰的 Au/Fe₃O₄ 磁性粒子质量的增加,其对 BSA 的吸附量也随之增加,单位吸附量最高达到 161.5 mg/g.

参考文献:

- [1] Bao J, Chen W, Liu T, et al. Bifunctional Au-Fe₃O₄ nanoparticles for protein separation [J]. *ACS Nano*, 2007, 1(4): 293.
- [2] Wei Y, Li Y, Tian A, et al. Ionic liquid modified magnetic microspheres for isolation of heme protein with high binding capacity [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2013(1): 2066.
- [3] Reddy A N, Anjaneyulu K, Basak P, et al. A simple approach to the design and functionalization of Fe₃O₄-Au nanoparticles for biomedical applications [J]. *Chem Plus Chem* 2012, 77(4): 284.
- [4] He X, Chen Y, Wang K, et al. Selective separation of proteins with pH-dependent magnetic nanoadsorbents [J]. *Nanotechnology* 2007, 18(36): 365.
- [5] Franzreb M, Siemann-Herzberg M, Hobbey T J, et al. Pro-

- tein purification using magnetic adsorbent particles [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70 (5): 505.
- [6] Shao M, Ning F, Zhao J, et al. Preparation of Fe₃O₄@SiO₂@layered double hydroxide core shell microspheres for magnetic separation of proteins [J]. Journal of the American Chemical Society 2012, 134(2): 1071.
- [7] Xie H Y, Zhen R, Wang B, et al. Fe₃O₄/Au core/shell nanoparticles modified with Ni²⁺-nitrilotriacetic acid specific to histidine-tagged proteins [J]. Journal of Physical Chemistry C 2010, 114(11): 4825.
- [8] Fang W, Chen X, Zheng N. Superparamagnetic core-shell polymer particles for efficient purification of his-tagged proteins [J]. Journal of Materials Chemistry, 2010, 20(39): 8624.
- [9] Hui W, Shi F, Yan K, et al. Fe₃O₄/Au/Fe₃O₄ nanoflowers exhibiting tunable saturation magnetization and enhanced bioconjugation [J]. Nanoscale 2012, 4(3): 747.
- [10] Song Y, Tao L, Shen X. Synthesis of new type of Au-magnetic nanocomposite and application for protein separation thereof [J]. Nanoscale research letters 2012, 7(1): 1.
- [11] Tian Y, Chen L, Zhang J, et al. Bifunctional Au-nanorod@Fe₃O₄ nanocomposites: synthesis, characterization, and their use as bioprobes [J]. Journal of Nanoparticle Research 2012, 14(7): 1.
- [12] Behrens S. Preparation of functional magnetic nanocomposites and hybrid materials: recent progress and future directions [J]. Nanoscale 2011, 3(3): 877.
- [13] Gu H, Xu K, Xu C, et al. Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection [J]. Chemical Communications 2006, 3(9): 941.
- [14] Gao J, Gu H, Xu B. Multifunctional magnetic nanoparticles: design, synthesis, and biomedical applications [J]. Accounts of Chemical Research 2009, 42(8): 1097.
- [15] Tamer U, Gündoğdu Y, Boyacı H, et al. Synthesis of magnetic core-shell Fe₃O₄-Au nanoparticle for biomolecule immobilization and detection [J]. Journal of Nanoparticle Research 2010, 12(4): 1187.
- [16] Wang C N, Fang J H. Preparation and spectral properties of Fe₃O₄@Au nano materials [J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory 2011, 28(4): 1869.
- [17] Lin F, Chen W, Liao Y H, et al. Effective approach for the synthesis of monodisperse magnetic nanocrystals and M-Fe₃O₄ (M = Ag, Au, Pt, Pd) heterostructures [J]. Nano Research 2011, 4(12): 1223.
- [18] Lyon J L, Fleming D A, Stone M B, et al. Synthesis of Fe oxide core/Au shell nanoparticles by iterative hydroxylamine seeding [J]. Nano Letters 2004, 4(4): 719.
- [19] Lu Q H, Yao K L, Xi D, et al. Synthesis and characterization of composite nanoparticles comprised of gold shell and magnetic core/cores [J]. Journal of Magnetism and Magnetic Materials 2006, 301(1): 44.
- [20] Chen M, Yamamuro S, Farrell D, et al. Gold-coated iron nanoparticles for biomedical applications [J]. Journal of Applied Physics 2003, 93(10): 7551.
- [21] Seino S, Kinoshita T, Nakagawa T, et al. Radiation induced synthesis of gold/iron-oxide composite nanoparticles using high-energy electron beam [J]. Journal of Nanoparticle Research 2008, 10(6): 1071.
- [22] 陈志军, 朱海燕, 郝营, 等. Fe₃O₄-壳聚糖磁性微球的制备及对Cu²⁺的吸附性能 [J]. 郑州轻工业学院学报: 自然科学版 2012, 27(2): 1.
- [23] Wu W, He Q, Chen H, et al. Advances of magnetic nanoparticle for biosensor applications [J]. Chemistry 2007, 65(13): 1273.
- [24] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions [J]. Nature 1973, 241(105): 20.
- [25] Wang X X, Huang S, Shan Z, et al. Preparation of Fe₃O₄@Au nano-composites by self-assembly technique for immobilization of glucose oxidase [J]. Chinese Science Bulletin 2009, 54(4): 430.
- [26] Link S, El-Sayed M A. Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles [J]. J Phys Chem B 1999, 103(5): 4212.