



ISO 9001 : 2008

TRƯỜNG ĐẠI HỌC TRÀ VINH  
**HỘI ĐỒNG KHOA HỌC**

**BÁO CÁO TỔNG KẾT**  
**ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CẤP TRƯỜNG**

**NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO HẠT NANO OXIT SẮT**  
**TỪ VỚI LỚP PHỦ TƯƠNG THÍCH SINH HỌC**  
**GẮN PROTEIN**  
**ĐỂ ỨNG DỤNG TRONG CHẨN ĐOÁN Y SINH**

**Chủ nhiệm đề tài: ThS. NGUYỄN VĂN SÁU**

**Chức danh: Giảng viên**

**Đơn vị: Khoa Khoa học Cơ bản, Trường Đại học Trà Vinh**

*Trà Vinh, ngày 25 tháng 01 năm 2017*



**ISO 9001 : 2008**

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC TRÀ VINH**  
**HỘI ĐỒNG KHOA HỌC**

**BÁO CÁO TỔNG KẾT**  
**ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CẤP TRƯỜNG**

**NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO HẠT NANO OXIT SẮT**  
**TỪ VỚI LỚP PHỦ TƯƠNG THÍCH SINH HỌC**  
**GẮN PROTEIN**  
**ĐỂ ỨNG DỤNG TRONG CHẨN ĐOÁN Y SINH**

**Xác nhận của cơ quan chủ quản**

*(Ký, đóng dấu, ghi rõ họ tên)*

**Chủ nhiệm đề tài**

*(Ký, ghi rõ họ tên)*

**Nguyễn Văn Sáu**

*Trà Vinh, ngày 25 tháng 01 năm 2017*

## Tóm tắt

Vật liệu nano từ tính với những tính chất đặc biệt, như siêu thuận từ, giá trị bão hòa từ cực đại cao đã mở ra các tiềm năng ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như y sinh, môi trường... Hạt nano từ tính có thể được chế tạo theo hai phương pháp cơ bản: một là từ vật liệu khối được nghiền nhỏ đến kích thước nano, hai là hình thành hạt nano từ các nguyên tử. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chọn phương pháp thứ hai - phương pháp đồng kết tủa.

Hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  được chế tạo bằng phương pháp đồng kết tủa với các kích thước hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  khác nhau, hạt được chức năng hóa bởi các chất phủ tetraethyl orthosilicate (TEOS), 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES), glutaraldehyde (GA) để hình thành cấu trúc  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2/\text{CHO}$  có chức năng gắn kết protein A. Các kỹ thuật 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 (UV-Vis) và hiển vi điện tử huỳnh quang được thực hiện để xác định tính chất, hình dạng và cấu trúc của các hạt nano. Bằng phương pháp Bradford có thể xác định được hiệu suất gắn kết protein A của cấu trúc  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2/\text{CHO}$  với các kích thước hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  khác nhau.

Kết quả cho thấy hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  kích thước nhỏ (10nm) cho hiệu suất gắn kết protein A tốt hơn hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  kích thước lớn (30nm). Tuy nhiên, hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  với kích thước lớn hơn (30nm) có từ độ bão hòa cao hơn và gần bằng từ độ bão hòa của  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  khối nhưng vẫn giữ được tính siêu thuận từ.

## MỤC LỤC

Tóm tắt.....	i
Danh mục chữ viết tắt .....	v
Danh mục hình .....	vi
Lời cảm ơn.....	viii
PHẦN I: MỞ ĐẦU .....	1
1. Tính cấp thiết của đề tài:.....	1
2. Tổng quan tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước.....	2
2.1. Tình hình nghiên cứu trong nước .....	2
2.2. Tình hình nghiên cứu ngoài nước .....	2
3. Mục tiêu của đề tài.....	3
4. Đối tượng, phạm vi và phương pháp nghiên cứu .....	3
4.1. Đối tượng: .....	3
4.2. Phạm vi nghiên cứu: .....	4
4.3. Phương pháp nghiên cứu và kỹ thuật đã sử dụng.....	4
PHẦN II: NỘI DUNG .....	4
Chương 1: CHẾ TẠO HẠT NANO SẮT TỬ.....	5
1.1. Hạt nano.....	5
1.2. Hạt nano oxit sắt .....	6
1.3. Các phương pháp chế tạo hạt nano.....	6
1.4. Vật liệu, Thiết bị.....	15
1.5. Quy trình chế tạo hạt Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> bằng phương pháp đồng kết tủa.....	17

1.6. Thực nghiệm: Chế tạo hạt nano oxít sắt từ.....	18
<b>Chương 2: CHỨC NĂNG HÓA BỀ MẶT HẠT NANO.....</b>	<b>21</b>
2.1. Bao phủ bề mặt hạt nano bởi chất silane.....	21
2.2. Quy trình bọc lớp tương thích sinh học.....	23
2.3. Thực nghiệm bọc lớp tương thích sinh học.....	24
<b>Chương 3: GẮN PROTEIN LÊN HẠT NANO TỪ ĐÃ ĐƯỢC BỌC LỚP TƯƠNG THÍCH SINH HỌC .....</b>	<b>25</b>
3.1. Linker .....	25
3.2. Hạt nano gắn với protein thông qua linker .....	26
3.3. Quy trình gắn protein A lên hạt nano từ.....	30
3.4. Gắn protein A lên hạt nano từ đã được bọc lớp tương thích sinh học .....	31
3.5. Gắn biotin-FITC và biotin .....	31
3.5. Các kỹ thuật phân tích. ....	32
PHẦN III: KẾT LUẬN.....	33
4. 1. Kết quả đề tài và thảo luận .....	33
4.1.1. Tổng hợp các hạt nano từ tính.....	33
4.1.2. Các hạt nano Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> và hạt nano đã được bọc lớp tương thích ..	34
4.1.3. Các hạt nano Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , hạt nano đã được bọc lớp tương thích gắn với linker .....	37
4.1.4. Gắn protein A lên các hạt nano, các hạt nano đã gắn protein A gắn với biotin-FITC và gắn với biotin.....	39

<b>4.1.5. Hiệu suất gắn kết protein A với các hạt nano từ .....</b>	<b>42</b>
<b>4.2. Kết luận và kiến nghị.....</b>	<b>42</b>
<b>Tài liệu tham khảo .....</b>	<b>44</b>
<b>Phụ lục 1.....</b>	<b>49</b>
<b>Phụ lục 2.....</b>	<b>50</b>
<b>Phụ lục 3.....</b>	<b>51</b>
<b>Phụ lục 4 - Công trình công bố :.....</b>	<b>52</b>
<b>Tạp chí khoa học trường đại học trà vinh.....</b>	<b>52</b>

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

STT	Chữ	Chữ viết tắt
1	3- amino propyl triethoxysilane	APTES
2	anti-Staphylococcus aureus enterotoxin A	anti-SEA
3	Biotin-fluorescein isothiocyanate	biotin-FITC
4	Bovine serum albumin	BSA
5	Enzyme - Linked ImmunoSorbent Assay,	ELISA
6	Fourier spectrum	FTIR
7	Glutaraldehyde	GA
8	Khoa học và công nghệ	KH&CN
9	Nghiên cứu cơ bản	NCCB
10	Polymerase Chain Reaction	PCR
11	Sodium Dodecyl Sulfate	SDS
12	Transmission electron microscopy	TEM
13	Tetraethyl orthosilicate	TEOS
14	Tetraethylammoniumhydroxide	TEAOH
15	UV-Vis spectrum	UV-Vis
16	Vibrating sample magnetometer	VSM
17	X-ray diffraction	XRD

## DANH MỤC HÌNH

STT	Hình	Trang
1	Hình 1. Hai cách chế tạo hạt nano: từ trên xuống và từ dưới lên	7
2	Hình 2. Sơ đồ minh họa quá trình tạo hạt nano bằng phương pháp laser ablation	8
3	Hình 3. Ba khả năng phát triển mầm thành hạt nano.	11
4	Hình 4. Cơ chế hình thành các hạt nano	12
5	Hình 5. Một số máy phục vụ thí nghiệm	17
6	Hình 6. NaOH 2M được đưa nhanh vào hỗn hợp dung dịch muối sắt	18
7	Hình 7. NaOH 2M được đưa nhỏ giọt vào hỗn hợp dung dịch muối sắt	19
8	Hình 8. Quá trình hình thành liên kết giữa chất silane với hạt nano	22
9	Hình 9. Chức năng hóa bề mặt hạt nano Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> với APTES	23
10	Hình 10. Rung siêu âm Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	24
11	Hình 11. Hạt nano oxit sắt từ bao phủ bởi lớp bảo vệ silane gắn với linker	25
12	Hình 12. Một số linker thường gặp	26
13	Hình 13. Hạt nano gắn kết với protein thông qua linker glutaraldehyde	27
14	Hình 14. Phản ứng giữa NHS ester với amine sơ cấp của protein	27
15	Hình 15. Hạt nano gắn kết với protein thông qua linker NHS ester	28
16	Hình 16. Phản ứng giữa nhóm maleimide và sulfhydryl có trong protein	28
17	Hình 17. Hạt nano gắn kết với protein thông qua linker NHS-PEGn – maleimide.	29
18	Hình 18. Hạt nano gắn kết với N <sub>3</sub> -Glycoprotein thông qua linker NHS-Proparyl	30
19	Hình 19. Biểu đồ XRD của các hạt nano Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	33
20	Hình 20. Ảnh TEM của các hạt nano	35
21	Hình 21. Đường cong từ hóa của các hạt nano	36
22	Hình 22. Phổ FTIR của các hạt nano	37



23	Hình 23. Sự thay đổi tỷ số cường độ của NH <sub>2</sub> và Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> khi thay đổi lượng APTES phủ lên cấu trúc Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub>	38
24	Hình 24. Ảnh hiển vi điện tử huỳnh quang của các hạt nano	40
25	Hình 25. Phổ UV-Vis của dung dịch protein A trước và sau khi gắn với Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> /NH <sub>2</sub> /CHO	41

## LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin chân thành cảm ơn Ban Giám hiệu, Phòng Khoa học Công nghệ, Khoa Khoa học Cơ bản, Trường Đại học Trà Vinh đã tạo điều kiện và cho phép tôi được thực hiện đề tài này.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn quý thầy cô Phòng Thí nghiệm Hóa – Sinh thuộc Khoa Khoa học Cơ bản, Trường Đại học Trà Vinh; Phòng Thí nghiệm Y – Sinh thuộc Khoa Khoa học Cơ bản, Trường Đại học Y Dược Thành Phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ các thiết bị và tạo điều kiện cho tôi để thực hiện các thí nghiệm trong đề tài này.

Sau cùng, tôi xin chân thành cảm ơn Tiến sĩ Thi Trần Anh Tuấn, Tiến sĩ Nguyễn Tấn Tài - Khoa Khoa học Cơ bản, Trường Đại học Trà Vinh, Tiến sĩ Huỳnh Thanh Tuấn - Khoa Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ đã có những ý kiến góp ý hết sức khoa học và đầy ý nghĩa để tôi hoàn thành tốt báo cáo này.

Xin chân thành cảm ơn.

Trà Vinh, ngày 25 tháng 01 năm 2017

## PHẦN I: MỞ ĐẦU

### 1. Tính cấp thiết của đề tài:

Vật liệu nano từ tính với những tính chất đặc biệt, như siêu thuận từ, giá trị bão hòa từ cực đại cao đã mở ra các tiềm năng ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như y sinh (Pimpha, Chaleawlert-umpon. 2011; Felton, Karmakar . 2014), môi trường (Shen, Tang . 2009; Peng, Wang . 2011). Trong số ấy, vật liệu nano từ tính  $Fe_3O_4$  với tính chất siêu thuận từ, giá trị bão hòa từ cực đại cao, ít độc, và có khả năng tương thích sinh học tốt đang được quan tâm hơn cả, nhất là với các ứng dụng trong y sinh, như tách chiết tế bào (Pimpha, Chaleawlert-umpon . 2011; Bai, Du .2014), xét nghiệm miễn dịch , dẫn truyền thuốc (Cleek, R. L. 1997) và hình ảnh (Veiseh, Gunn. 2010). Hạt nano  $Fe_3O_4$  với nhiều kích thước khác nhau sẽ phù hợp hơn với các ứng dụng và các đối tượng, như kích thước của tế bào 10  $\mu m$ –100  $\mu m$ , virus 20 nm–450 nm, protein 5 nm–50 nm và gene 2 nm rộng, 10 nm–100 nm dài (Pankhurst, Q.A. 2003). Ngoài ra, khi kích thước của các hạt giảm sẽ làm tăng diện tích bề mặt dẫn đến số protein được gắn kết trên một đơn vị khối lượng hạt thường cao ( Hu, B. 2009). Hơn nữa, sự thay đổi kích thước tinh thể nano  $Fe_3O_4$  có thể làm thay đổi giá trị bão hòa từ cực đại, tính siêu thuận từ và khả năng đáp ứng với từ trường ngoài của hạt nano  $Fe_3O_4$ , yếu tố đặc biệt quan trọng trong các ứng dụng (Andrade, Valente . 2012). Hạt nano  $Fe_3O_4$  sau khi được chế tạo chúng có xu hướng kết tụ với nhau do tương tác lưỡng cực từ mạnh và lực van der Waals (Shao, Xia . 2008; Hou, Han. 2013). Do vậy, hạt nano từ tính cần được bao bọc bởi các chất không từ tính để tránh sự kết tụ, giảm sự lắng đọng, hạn chế sự oxi hóa của các hạt nano cũng như tạo bề mặt của chúng có những tính chất đặc thù phù hợp với từng ứng dụng (Chi, Yuan. 2012).

Protein A là protein bề mặt được tìm thấy trong thành tế bào của khuẩn *Staphylococcus aureus*. Theo nhà sản xuất Sigma thì protein A có thể gắn kết với FITC, biotin, kháng thể ở vùng Fc. Do vậy, protein A nếu gắn được với các hạt nano  $Fe_3O_4$  đã được chức năng hóa bề mặt thì thông qua protein A hạt nano có thể gắn kết với kháng thể, FITC, biotin. Và qua đó mở ra nhiều ứng dụng trong tách chiết và chẩn đoán.

Trên cơ sở đó, chúng tôi đề xuất hướng nghiên cứu chế tạo các hạt nano oxit sắt từ ( $Fe_3O_4$ ) với những lớp phủ có khả năng thích nghi sinh học và hút bám tốt

protein A. Các hạt nano oxit sắt từ có thể gắn được với protein A thì cũng có thể gắn được với những protein khác như kháng thể, DNA, RNA, virus, vi khuẩn. Khi các hạt nano oxit sắt được gắn kết với kháng thể, kháng thể liên kết đặc hiệu với kháng nguyên cùng loại. Bằng từ trường ngoài có thể tập trung các hạt nano oxit sắt lại một chỗ nhờ tính chất siêu thuận từ. Do đó, có thể tập trung các kháng nguyên lại hay nói theo cách khác là có thể làm tăng mật độ kháng nguyên và do vậy có thể chẩn đoán sớm được một số bệnh như ung thư, sốt xuất huyết, phát hiện khuẩn liên cầu lợn trong các mẫu bệnh phẩm.

## **2. Tổng quan nghiên cứu**

### *2.1. Tình hình nghiên cứu trong nước*

Nghiên cứu tổng hợp các hạt nano từ tính với các lớp phủ sinh học để phục vụ cho các ứng dụng trong chẩn đoán chính xác bệnh trên người và gia súc của nhóm PGS. Trần Hoàng Hải tại Viện Vật lý TP HCM; nhóm đã thực hiện xong đề tài NCCB được Quỹ Nafosted tài trợ năm 2009 “Tổng hợp các hạt nano từ tính với các lớp phủ sinh học để phục vụ cho nghiên cứu y sinh học, đặc biệt ứng dụng để chẩn đoán chính xác bệnh trên người và gia súc”. Năm 2012, nhóm cũng đã hoàn thành đề tài nghiên cứu tại Đồng Nai: “Nghiên cứu tổng hợp các hạt nano từ tính để ứng dụng chẩn đoán bệnh tiêu chảy cấp do Ecoli O157:H7 và ung thư cổ tử cung do HPV18” (Hai, T. H. 2011).

Nghiên cứu công nghệ chế tạo các hạt nano vô cơ ( hạt nano từ và hạt nano vàng ) để sử dụng trong y học; nghiên cứu hiệu ứng đốt từ ứng dụng cho nhiệt trị ung thư và điều trị không can thiệp của nhóm GS Nguyễn Xuân Phúc và cộng sự tại Viện KH&CN Việt Nam. Nhóm đã triển khai một đề tài NCCB “Nghiên cứu một số vấn đề đốt nóng các hệ hạt nano dưới tác động sóng điện từ” và một đề tài nghiên cứu cấp nhà nước thuộc chương trình nghiên cứu cơ bản định hướng ứng dụng ‘Nghiên cứu công nghệ chế tạo các hạt nano vô cơ, hữu cơ được bọc bởi lớp phủ tương thích sinh học dùng trong y học’”;

### *2.2. Tình hình nghiên cứu ngoài nước*

Keziban Can và cộng sự (Can, K., Ozmen, M., & Ersoz, M. 2009) cũng công bố kết quả tổng hợp hạt  $Fe_3O_4$ : kích thước hạt thu được vào khoảng 7 nm -10 nm, độ từ hóa 55,3 emu/g. Và, một số kết quả nghiên cứu khác (Abid, J. P. 2002;

Kim, D. 2006) đạt được kích thước hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  từ 9 nm – 14 nm, độ từ hóa vào khoảng 60 emu/g – 64 emu/g.

Các tác giả đã tổng hợp được các hạt nano từ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  bằng phương pháp đồng kết tủa. Kích thước hạt vào khoảng 5 nm – 20nm, độ từ hóa khoảng 55 emu/g – 68 emu/g, hình dạng tương đối cầu. Một số yếu tố ảnh hưởng đến tính chất vật lý của hạt như: nhiệt độ tổng hợp, thời gian tổng hợp, tốc độ khuấy, tỷ phần mol  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ , độ pH của dung dịch.

Bin Hu và cộng sự (Hu, B.2009), cũng cố định được *Serratia marcescens* lipase lên hạt nano từ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Tỷ lệ gắn được lên đến trên 70%.

Xiuheng Xue và cộng sự (Xue, X. 2013), cố định thành công kháng huyết thanh anti-*Staphylococcus aureus* enterotoxin A (anti-SEA) lên hạt nano từ được bọc bằng Chitosan, nhằm làm giàu và phát hiện SEA.

**Tóm lại:** Các công trình nghiên cứu của các tác giả cho thấy, đã gắn thành công một số thực thể sinh học lên hạt nano từ được bao phủ những lớp thích nghi sinh học; kích thước hạt nano tràn trong phạm vi: 5 nm – 10 nm, 15 nm – 20 nm, 30 nm, 40 nm tùy loại thực thể sinh học; độ từ hóa sau phủ ở mức thấp nhất 15 emu/g, cao nhất 60 emu/g; tỷ lệ kết dính hạt nano với thực thể sinh học từ 40 – 90%.

### 3. Mục tiêu của đề tài

Chế tạo được các hạt nano oxit sắt từ tính có kích thước 8-20 nm, 20 nm-40nm, độ từ hóa bão hòa 50-70 emu/g, siêu thuận từ. Lớp phủ tương thích sinh học có các nhóm chức  $\text{NH}_2$ , CHO để liên kết đồng hóa trị với protein. Gắn được protein là BSA lên hạt nano với tỷ lệ gắn kết trên 70%. Cấu trúc nano này có thể áp dụng để gắn kết các protein khác như kháng thể, tách chiết DNA... để ứng dụng trong chẩn đoán.

### 4. Đối tượng, phạm vi và phương pháp nghiên cứu

#### 4.1. Đối tượng:

- Hạt nano từ tính  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .
- Hạt nano từ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  đã được phủ lớp phủ tương thích sinh học.
- Hạt nano từ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  đã được phủ lớp phủ tương thích sinh học gắn kết protein A.

#### 4.2. Phạm vi nghiên cứu:

Phòng thí nghiệm Vật lý, Phòng Thí Nghiệm Hóa, Khoa Khoa học Cơ bản trường Đại học Trà Vinh và Phòng thí nghiệm Vật lý, Khoa Khoa học Cơ bản Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh.

#### 4.3. Phương pháp nghiên cứu và kỹ thuật đã sử dụng

Nghiên cứu lý thuyết và thực nghiệm các quá trình:

Tổng hợp các hạt nano từ tính  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  bằng phương pháp đồng kết tủa. Sử dụng kỹ thuật khuấy cơ có đếm tốc độ, môi trường khí  $\text{N}_2$ , nhiệt độ  $80^\circ\text{C}$ , lắng bằng nam châm và sấy chân không ở  $40^\circ\text{C}$ .

Tạo các lớp phủ lên bề mặt hạt từ bằng phương pháp hóa học (sol – gel). Sử dụng kỹ thuật khuấy cơ kết hợp rung siêu âm ở nhiệt độ  $40^\circ\text{C}$  trong môi trường khí  $\text{N}_2$ .

Gắn kết thực thể sinh học lên hạt từ thông qua các cơ chế hấp thụ vật lý, hấp phụ hóa học, hoặc tạo liên kết giữa các nhóm chức. Sử dụng kỹ thuật rung siêu âm kết hợp khuấy cơ. Ủ ở  $40^\circ\text{C}$  trong máy ủ có lắc nhẹ.

Phương pháp định lượng dùng để xác định các tính chất đặc trưng của vật liệu, sản phẩm (XRD, SEM, TEM, FTIR, VSM...).

Xác định tỷ lệ gắn kết của thực thể sinh học lên hạt từ bằng phương pháp Bradford và một số phương pháp khác.

Sử dụng phương pháp ELISA (Enzyme - Linked ImmunoSorbent Assay), PCR (Polymerase Chain Reaction) để phát hiện protein có trong mẫu cần phân tích.

## PHẦN II: NỘI DUNG

### CHƯƠNG 1: CHẾ TẠO HẠT NANO SẮT TỪ

#### 1.1. Hạt nano

Vật liệu nano có những tính chất khác biệt khi so với các tính chất của vật liệu ở trạng thái khối. Sự khác biệt về tính chất của vật liệu nano bắt nguồn từ hai hiện tượng: hiệu ứng bề mặt và hiệu ứng kích thước. Các ứng dụng của vật liệu nano có liên quan đến những tính chất khác biệt của nó có thể được kể đến như: Hạt nano vàng được bọc bởi các nguyên tử *Gadolinium* (Gd, có mômen từ nguyên tử rất lớn) được dùng làm tăng độ tương phản trong cộng hưởng từ hạt nhân; Bạc có tác dụng diệt khuẩn là do các ion bạc đã tác động lên enzym liên quan đến quá trình hô hấp của các vi khuẩn và hạt nano bạc làm tăng hiệu quả diệt khuẩn (Faraji, M. 2010). Hạt nano với tính chất siêu thuận từ, được ứng dụng nhiều trong lĩnh vực y sinh như tách chiết DNA/RNA (Melzak, K.A., 1996), làm giàu kháng nguyên (Liu, X., 2004).

Hiện nay, các chất siêu thuận từ đang được quan tâm nghiên cứu, dùng để chế tạo các chất lỏng từ (Magnetic Fluid) dành cho các ứng dụng y sinh. Đối với vật liệu siêu thuận từ, từ dư và lực kháng từ bằng không, chúng có các đặc tính như chất thuận từ, nhưng lại nhạy với từ trường hơn, có từ độ lớn như của chất sắt từ. Điều đó có nghĩa là, vật liệu sẽ phản ứng dưới tác động của từ trường ngoài nhưng khi ngừng tác động của từ trường ngoài, vật liệu sẽ không còn từ tính nữa, đây là một đặc điểm rất quan trọng khi dùng vật liệu này cho các ứng dụng y sinh học.

**Hạt nano từ tính dùng trong y sinh cần phải thỏa mãn ba điều kiện sau:**

- Tính đồng nhất của các hạt cao.
- Từ độ bão hòa lớn.
- Và, vật liệu có tính tương hợp sinh học (không có độc tính).

Tính đồng nhất về kích thước phụ thuộc nhiều vào phương pháp chế tạo. Còn từ độ bão hòa và tính tương hợp sinh học liên quan đến bản chất của vật liệu.

Trong tự nhiên, Fe là vật liệu có từ độ bão hòa lớn nhất ở nhiệt độ phòng, không độc đối với cơ thể người và tính ổn định khi được sử dụng trong môi trường

không khí nên các vật liệu như oxit sắt được nghiên cứu nhiều để làm hạt nano từ tính.

### 1.2. Hạt nano oxit sắt

Hạt nano oxit sắt ứng dụng phổ biến trong y học hiện nay, được phân làm 2 lớp chính dựa trên kích thước của chúng, bao gồm: lớp có đường kính từ 50-100 nm và lớp còn lại có đường kính dưới 50 nm. Cả hai đều là thành phần của các tinh thể nano ferrite là magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) hoặc maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), với  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  khối có giá trị bão hòa từ lên đến 92-96 emu/g, trong khi  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  thì vào khoảng 60-80 emu/g. Những vật liệu oxit sắt khác được nghiên cứu phổ biến gồm những oxit hỗn hợp ( $\text{Fe}_{(3-x)}\text{O}_{(4-y)}$ ;  $1 \geq x, y \geq 0$ ), các cấu trúc sắt/sắt oxit ( $\text{Fe}/\text{Fe}_{(3-x)}\text{O}_{(4-y)}$ ), các cấu trúc  $\text{FePt}/\text{Fe}_{(3-x)}\text{O}_{(4-y)}$  hoặc những ferrite ( $\text{MFe}_2\text{O}_4$  với  $\text{M} = \text{Mn}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Ni}^{2+}, \dots$ ) với giá trị bão hòa từ từ 52 emu/g đến 110 emu/g [19].

Hạt nano được chế tạo theo nhiều phương pháp, mỗi phương pháp có những thuận lợi và khó khăn nhất định. Và, tùy vào mục đích sử dụng các hạt nano cho mỗi ứng dụng mà các phương pháp khác nhau được dùng nhằm đáp ứng yêu cầu của mỗi ứng dụng.

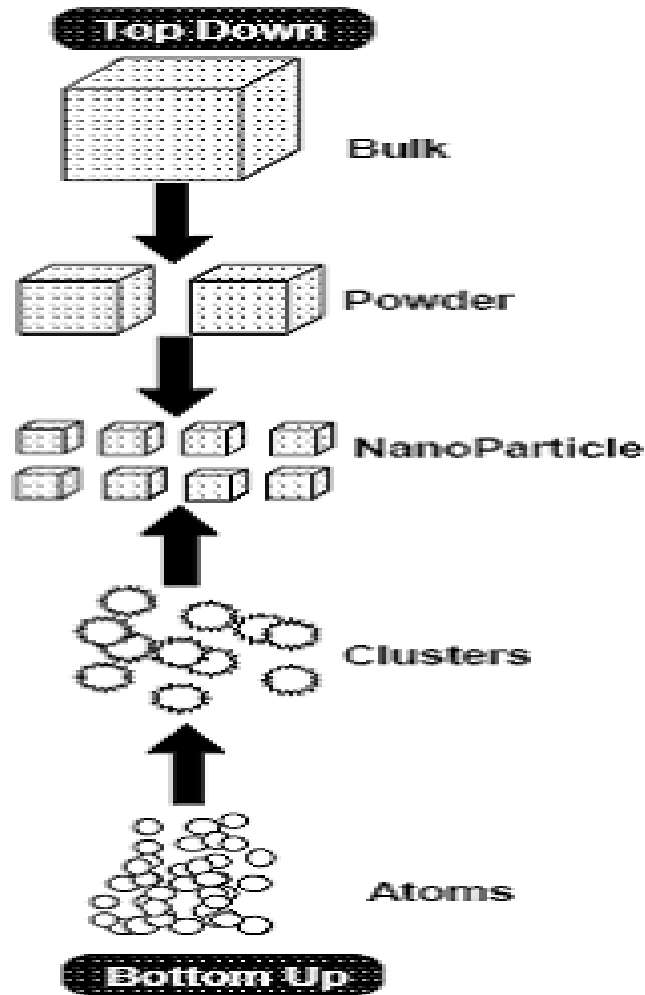
### 1.3. Các phương pháp chế tạo hạt nano

Vật liệu nano được chế tạo bằng hai phương pháp là từ trên xuống (top-down) và từ dưới lên (bottom-up).

Phương pháp từ trên xuống là phương pháp tạo vật liệu nano từ vật liệu khối ban đầu gồm phương pháp nghiền, sử dụng các kỹ thuật laser.

Phương pháp từ dưới lên là tạo hạt nano, từ các ion hoặc các nguyên tử, phân tử kết hợp lại với nhau. Các ion, nguyên tử, phân tử sau khi được xử lý bằng các tác nhân hóa học, vật lý sẽ kết hợp với nhau hình thành các hạt nano.





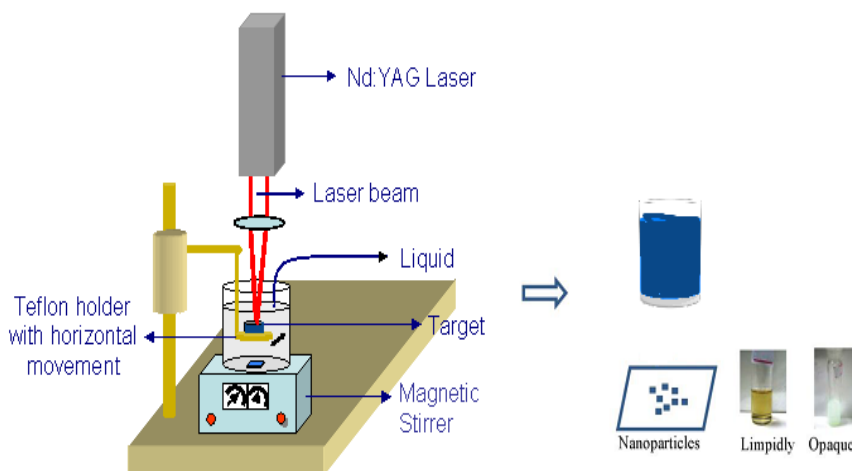
**Hình 1.** Hai cách chế tạo hạt nano: từ trên xuống và từ dưới lên.

Hạt nano từ tính có thể được chế tạo theo hai phương pháp cơ bản: một là từ vật liệu khối được nghiền nhỏ đến kích thước nano, hai là hình thành hạt nano từ các nguyên tử. Phương pháp thứ nhất gồm các phương pháp nghiền và biến dạng như nghiền hành tinh, nghiền rung. Phương pháp thứ hai được phân thành hai loại là phương pháp vật lý (phún xạ, bốc bay,...) và phương pháp hóa học (phương pháp kết tủa từ dung dịch, hình thành từ pha khí).

### 1.3.1. Phương pháp Laser Ablation

Đây là phương pháp từ trên xuống, vật liệu ban đầu ở dạng khối. Dưới tác động của chùm laser, các nguyên tử, phân tử bứt ra khỏi vật liệu khối và đi vào dung dịch. Tại bề mặt của mẫu, nơi được chiếu xạ bởi chùm laser và tại đây hình

thành chùm plasma. Quá trình hình thành mầm và phát triển mầm thành các hạt nano xảy ra chủ yếu trong chùm plasma, nơi có nhiệt độ và áp suất cao.



**Hình 2.** Sơ đồ minh họa quá trình tạo hạt nano bằng phương pháp laser ablation [Klotz, M., et al., 1999]

Các tác giả (Franzel, L. 2012) đã sử dụng vật liệu khối  $\text{Fe}_3\text{C}$  trong môi trường ethanol, nguồn laser Nd:YAG, bước sóng 1064 nm, bề rộng xung 750 ps (The pulses had a duration of 750 ps), tần số 10 Hz, năng lượng mỗi xung 12 mJ, tốc độ ăn mòn 0,3 mg/h và thu được các hạt nano có kích thước khoảng 1-20 nm, giá trị bão hòa từ  $M_s = 124$  emu/g. Các hạt nano thu được là sự pha trộn của các hạt  $\text{Fe}_3\text{C}$  và  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

**Thuận lợi của phương pháp:**

- Không sử dụng hóa chất và vì thế loại trừ được những bước làm tinh sạch sản phẩm như những phương pháp hóa ướt phải sử dụng hóa chất (Franzel, L., et al. 2012).

- Các hạt nano thu được tinh khiết.

- Sự kết tụ hoặc phân tán của các hạt nano có thể điều khiển được tùy thuộc loại dung dịch.

**Khó khăn:**

- Thiết bị đắt tiền và sản lượng thu được thấp (4,4 mg/h, hạt nano phát triển trong nước).

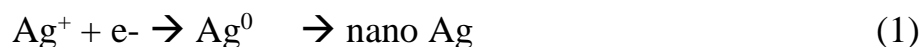
- Khi các hạt nano được hình thành, nó sẽ làm giảm sự ăn mòn mẫu do các hạt nano hấp thụ hoặc tán xạ một phần của chiếu xạ laser.

### 1.3.2. Phương pháp khử:

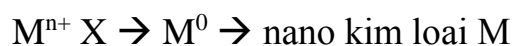
*Phương pháp khử có thể sử dụng tác nhân vật lý, hóa học, hóa lý... để khử các ion kim loại thành các kim loại.*

- **Tác nhân vật lý:** Điện tử, tia gamma, tia tử ngoại, tia laser khử ion kim loại thành kim loại. Dưới tác dụng của các tác nhân vật lý, làm xuất hiện sự biến đổi của dung môi và các phụ gia trong dung môi để hình thành các gốc hóa học có tác dụng khử ion thành kim loại. Các tác giả (Abid, J.P. 2002) đã sử dụng nguồn laser Nd<sup>3+</sup>-YAG có bước sóng 500 nm, độ dài xung 6 ns, tần số 10 Hz, năng lượng trung bình của mỗi xung 12-14 mJ chiếu vào dung dịch chứa AgNO<sub>3</sub> như là nguồn ion kim loại và Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) như là chất hoạt hóa bề mặt để thu được hạt nano bạc có kích thước khoảng 15 nm.

Cơ chế hình thành hạt nano bạc như sau: Dưới tác dụng chiếu xạ của chùm laser các phân tử AgNO<sub>3</sub> trong dung dịch bị tách thành các gốc Ag<sup>+</sup> và (NO<sub>3</sub>)<sup>-</sup>; Hơn nữa, sự chiếu xạ của chùm laser vào dung dịch mà dung môi là nước cũng tạo các gốc OH, H<sup>•</sup> và e<sup>-</sup>. Qua đó các hạt nano Ag được hình thành:



- **Tác nhân hóa học:** Các tác nhân hóa học sẽ khử các ion kim loại thành các kim loại và sau đó chúng hình thành nên hạt nano kim loại. Nguyên lý cơ bản được thể hiện như sau:



Ion M<sup>n+</sup> dưới tác động của chất khử X, sẽ bị khử thành các kim loại M<sup>0</sup> và sau đó chúng kết hợp lại hình thành nên hạt nano kim loại.

Các chất hóa học như Citric acid, Sodium Borohydride NaBH<sub>4</sub>, Ethylene Glycol với vai trò là các chất khử, khử ion kim loại thành kim loại. Các hạt nano kim loại được hình thành trực tiếp từ dung dịch muối của kim loại đó. Nhiệt độ của dung dịch được điều khiển để làm thay đổi động học của quá trình kết tủa để thu được các hạt có hình dạng và kích thước xác định.

Các nguyên tử Ag được hình thành bằng cách Ethylenglycol khử  $\text{AgNO}_3$  theo cơ chế sau (Khodashenas, B., et al. 2015):



Dung dịch ban đầu chứa các muối của các kim loại như  $\text{HAuCl}_4$ ,  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ ,  $\text{AgNO}_3$ , các tác nhân sẽ khử ion kim loại  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Au}^+$ ,  $\text{Pt}^{2+}$  thành các  $\text{Ag}^0$ ,  $\text{Au}^0$ ,  $\text{Pt}^0$  và sau đó các nguyên tử này kết hợp lại hình thành nên các hạt nano Ag, Au, Pt. Bằng phương pháp này người ta có thể chế tạo được các hạt nano kim loại Ag, Au, Pt, Pd, Rh với kích thước từ 10 nm đến 100 nm (Kim, D., et al. 2006).

- **Tác nhân hóa lý:** Đây là phương pháp kết hợp giữa hóa học và vật lý, nguyên lý là dùng phương pháp điện phân kết hợp với siêu âm để tạo hạt nano. Phương pháp điện phân, thông thường được dùng để chế tạo màng mỏng kim loại. Dưới sự tác động của quá trình điện phân, các nguyên tử kim loại sẽ bị tan ra khỏi điện cực dương và bám lên điện cực âm để hình thành các hạt nano trước khi hình thành màng mỏng. Cùng lúc này người ta tác dụng một xung siêu âm đồng bộ với xung điện phân thì hạt nano kim loại sẽ rời khỏi điện cực và đi vào dung dịch (Zhu, J. 2000).

**Thuận lợi của phương pháp:**

Chế tạo được các hạt nano từ nhiều loại vật liệu với nhiều kích cỡ khác nhau.

**Khó khăn:**

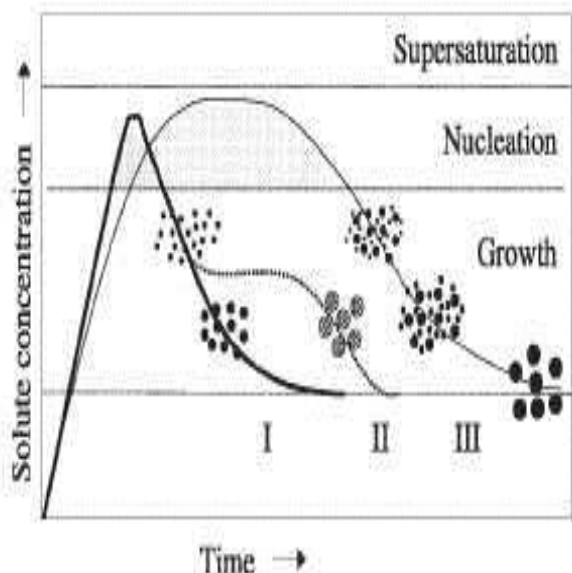
- Tác nhân vật lý: Thiết bị đắt tiền, sử dụng nguồn năng lượng lớn.
- Tác nhân hóa học: Sản phẩm chứa các tạp chất, phải qua các bước làm tinh sạch sản phẩm.

### ***1.3.3. Phương pháp kết tủa từ dung dịch***

**Cơ chế hình thành:**

Khi nồng độ các phân tử của các chất được tạo thành đạt đến trạng thái bão hòa tới hạn, trong dung dịch sẽ xuất hiện các mầm. Các mầm đó sẽ phát triển thành các hạt nano theo các khả năng như sau (Faraji, M. 2010): (i) Mầm phát triển thành hạt nano nhờ sự khuếch tán của các phân tử lên bề mặt của mầm (đường cong I);

- (ii) Hạt được hình thành do sự kết tụ của các phân tử với mầm (đường cong II). Và, (iii) do kết hợp của nhiều mầm lại với nhau (đường cong III).



**Hình 3.** Ba khả năng phát triển mầm thành hạt nano: Mầm phát triển nhờ sự khuếch tán của các phân tử lên mầm (đường cong I); Do sự kết tụ của các phân tử với mầm (đường cong II) và do sự kết tụ của nhiều mầm với nhau (đường cong III). (Tartaj, P. 2006).

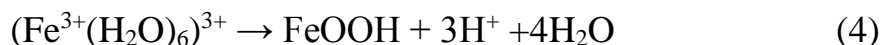
#### 1.3.4. Phương pháp đồng kết tủa và phương trình phản ứng hình thành Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Phương pháp kết tủa từ dung dịch: khi nồng độ của chất đạt đến một trạng thái bão hòa tới hạn, trong dung dịch sẽ xuất hiện đột ngột những mầm kết tụ. Các mầm kết tụ đó sẽ phát triển thông qua quá trình khuếch tán của vật chất từ dung dịch lên bề mặt của các mầm cho đến khi mầm trở thành hạt nano. Để thu được hạt có độ đồng nhất cao, người ta cần phân tách hai giai đoạn hình thành mầm và phát triển mầm. Trong quá trình phát triển mầm, cần hạn chế sự hình thành của những mầm mới.

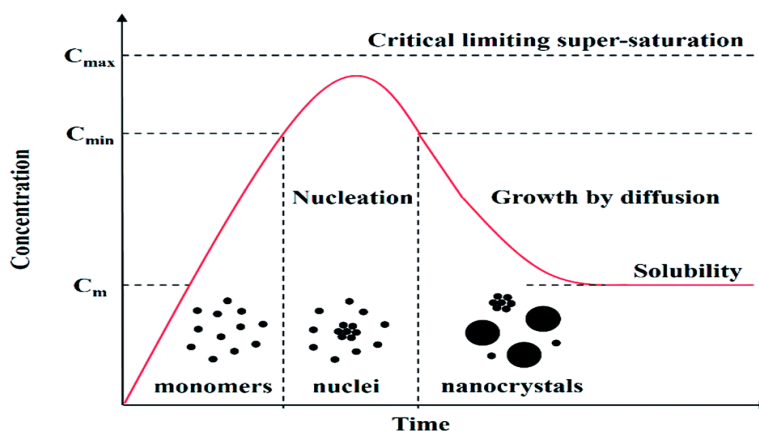
Phương pháp đồng kết tủa được xem là phương pháp hóa học đơn giản nhất để tổng hợp các hạt nano oxit sắt. Được phát hiện đầu tiên bởi Massart (Massart, R. 1981) cách đây hơn 30 năm. Nguyên lý cơ bản của phương pháp:



Phản ứng không xảy ra một cách trực tiếp mà được hình thành thông qua một vài phức hợp sắt:



### 1.3.5. Cơ chế hình thành hạt nano $\text{Fe}_3\text{O}_4$



**Hình 4.** Cơ chế hình thành các hạt nano. Nồng độ chất trong dung dịch vượt quá giá trị bão hòa ( $C_{min}$ ) và gần giá trị bão hòa tới hạn ( $C_{max}$ ), trong dung dịch xuất hiện các mầm, các mầm phát triển thành các hạt nano thông qua sự khuếch tán của các chất. (LaMer, V. K., & Dinegar, R. H. 1950)

Khi nồng độ các phân tử của các chất được tạo thành đạt đến trạng thái bão hòa tới hạn, trong dung dịch sẽ xuất hiện các mầm kết tụ. Các mầm kết tụ đó sẽ phát triển thông qua quá trình khuếch tán các phân tử chất được tạo thành từ dung dịch lên bề mặt của các mầm cho đến khi hình thành nên các hạt nano. Đây là mô hình cổ điển được đề xuất bởi Lamer và Dinegar (LaMer, V. K., & Dinegar, R. H. (1950)) được thể hiện trên Hình 4.

Quá trình hình thành hạt nano thông qua hai giai đoạn: hình thành mầm và phát triển mầm. Quá trình hình thành mầm: Sự tăng nồng độ của phân tử đến gần nồng độ bão hòa tới hạn ( $C_{max}$ ), khi đó trong dung dịch sẽ xuất hiện các mầm. Quá trình phát triển mầm thành các hạt nano: Trong quá trình này, nồng độ dung dịch giảm do một lượng phân tử đã chuyển thành các hạt nano.

Theo phương trình (3) để hình thành  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  thì tỷ lệ mol hợp lý giữa  $\text{Fe}^{2+}$  và  $\text{Fe}^{3+}$  là 1:2 và được thực hiện trong môi trường bazơ (pH từ 8 đến 14). Do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  rất dễ bị oxi hóa, nên trong suốt quá trình tổng hợp hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , khí trơ được đưa vào hệ thống để ngăn ngừa sự chuyển từ pha  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sang  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ .



Ưu điểm lớn nhất của phương pháp tổng hợp này ở chỗ dễ thực hiện, chi phí thấp và sản lượng thu được cho một lần tổng hợp là khá cao.

Một đặc điểm quan trọng nữa ở phương pháp này, là giới hạn về kích thước của các hạt nano vào khoảng 5-15 nm, giá trị bão hòa từ cực đại 50-60 emu/g và siêu thuận từ. Tuy nhiên, phương pháp tổng hợp này lại có yếu điểm là sự phân bố kích thước hạt nano ít đồng đều. Nguyên nhân chính nằm ở quá trình hình thành mầm và phát triển mầm thành hạt nano. Khi nồng độ của các phân tử  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  đạt tới trạng thái bão hòa tới hạn, quá trình hình thành mầm xảy ra, sau đó mầm phát triển thành các hạt nano thông qua sự khuếch tán của các phân tử  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  lên bề mặt của mầm. Nguyên nhân chính dẫn đến hạt nano được hình thành có kích thước ít đồng đều được cho là tốc độ phản ứng xảy ra nhanh và do đó số mầm mới được hình thành song song với quá trình phát triển mầm. Các mầm được hình thành ở giai đoạn đầu sẽ phát triển thành các hạt nano có kích thước lớn hơn so với kích thước của các hạt nano được hình thành từ những mầm được tạo ở giai đoạn sau ((Faraji, M., et al. 2010).

Kích thước và hình dạng của các hạt nano có thể được điều khiển thông qua việc điều chỉnh các thông số sau như độ pH, nồng độ các ion trong dung dịch, nhiệt độ, gốc muối (chloride, sulfate và nitrate), tỷ số nồng độ của  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ .

### **Một số thông số ảnh hưởng đến kích thước, tính chất, hình dạng hạt:**

#### **a) Độ pH**

Theo Massart, R. (Massart, R. 1981), kích thước hạt nano giảm khi pH tăng, các tác giả (Mascolo, M. 2013) cho rằng khi tăng độ pH, nồng độ quá bão hòa trong suốt quá trình đồng kết tủa tăng cao hơn, làm tăng thêm số mầm, do vậy hạt có kích thước nhỏ hơn.

#### **b) Loại bazơ**

Tùy thuộc loại bazơ mà các hạt nano được hình thành có kích thước khác nhau. Các loại bazơ mà nhóm tác giả (Mascolo, M. 2013) khảo sát gồm NaOH, KOH, TEAOH (tetraethylammoniumhydroxide). Các hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> được tổng hợp với chất bazơ TEAOH cho kích thước hạt nhỏ hơn là vì hai lý do: Trong môi trường kiềm là TEAOH, năng lượng nhiệt chiếm ưu thế so với năng lượng tương tác từ; Hơn nữa ion OH<sup>-</sup> có trong dung dịch được hấp thụ trên bề mặt hạt nano làm cho các hạt mang điện tích âm, trong khi đó các ion dương tetraethylammonium hình thành xung quanh hạt nano như một lớp vỏ, vì thế làm tăng năng lượng cần thiết để các hạt không kết tụ, tạo độ ổn định. Ở Bảng 1 cho thấy kích thước hạt giảm dần khi sử dụng lần lượt các bazơ theo thứ tự sau: NaOH, KOH, TEAOH.

**Bảng 1. Kích thước hạt nano thay đổi theo loại bazơ (Mascolo, M. 2013)**

Mẫu	mol	Kích thước, nm
S <sub>NaOH</sub>	0,09	10
S <sub>KOH</sub>	0,09	7,6
S <sub>TEAOH</sub>	0,09	6,9

**a) Nồng độ ion trong dung dịch**

Các dung dịch như NaNO<sub>3</sub>, NaCl sẽ được thêm vào hệ thống phản ứng. Khi NaCl được phân ly trong dung dịch thành các ion Na<sup>+</sup> và Cl<sup>-</sup>, các ion Na<sup>+</sup> này sẽ liên kết với các mầm hoặc các tinh thể nano theo tương tác tĩnh điện, do các hạt nano oxit sắt được chế tạo theo phương pháp này mang điện tích bề mặt âm. Do vậy, chúng sẽ ngăn chặn và làm giảm tốc độ tạo mầm và quá trình hình thành hạt nano, điều này dẫn đến kích thước hạt giảm và sản lượng thu được cũng giảm theo (Tartaj, P. 2006).

**b) Nhiệt độ**

Theo các tác giả (Wang, B. & Wei, Q. Qu, S. 2013), thì nhiệt độ tăng làm tăng kích thước hạt nano. Điều này là do, các hạt nhỏ có năng lượng bề mặt lớn, trong quá trình phát triển, mầm nhỏ hơn kích thước mầm tới hạn, hòa tan và di chuyển vào trong những hạt có kích thước lớn hơn để tạo hình thành những hạt lớn hơn nữa với năng lượng tổng cộng thấp hơn.

**c) Tỷ lệ mol Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>**



Theo tác giả (Babes, L. 1999) cho thấy tỷ lệ mol  $Fe^{2+}/Fe^{3+} > 0,8$  hoặc  $Fe^{2+}/Fe^{3+} < 0,3$  thì không hình thành hoặc hình thành rất ít pha  $Fe_3O_4$ . Và, không có sự thay đổi một cách rõ ràng kích thước của các hạt nano thu được khi thay đổi tỷ số mol  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  trong khoảng từ 0,4 - 0,7.

Điều chỉnh các thông số kể trên có thể điều chỉnh được kích thước hạt.

#### 1.4. Vật liệu, Thiết bị

Trong phần đề tài này, chúng tôi sử dụng các thiết bị hóa chất và sau đây:

##### **Các dụng cụ thí nghiệm:**

Ống sinh hàn, bình khí Nitơ, lọ thủy tinh, đũa khuấy, pipet, cân điện tử, lọ sứ, cối – chày sứ, kẹp gấp, giấy cân, muỗng nhỏ, micropipette, ống bảo quản, tủ đông, nam châm vĩnh cửu.

**Bảng 2.** Danh mục hóa chất sử dụng

STT	Hóa chất	Công thức phân tử	Hãng sản xuất	Độ tinh khiết
1	Sắt (II) clorua	$FeCl_2.4H_2O$	Merck	$\geq 99.5\%$
2	Sắt (III) clorua	$FeCl_3.6H_2O$	Merck	$\geq 99.0\%$
3	Ammonium hydroxide (25 % w/w)	$NH_3.H_2O$	Merck	$\geq 96.0\%$
4	Sodium hydroxide	NaOH 2M	Merck	$\geq 99.8\%$
5	Ethanol	$C_2H_5OH$	Merck	$\geq 96.0\%$
6	Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7,4)		Merck	$\geq 99.8\%$
7	3 – amino propyl triethoxysilane – ( APTES )	$C_9H_{23}NO_3Si$	Sigma Aldrich	$\geq 99.8\%$
8	Glutaraldehyde (25%)	$C_5H_8O_2$	Sigma Aldrich	$\geq 99.8\%$

9	Biotin	$C_{10}H_{16}N_2O_3$ S)	Sigma Aldrich	$\geq 98\%$
10	Biotin-fluorescein isothiocyanate (biotin-FITC)	$C_{33}H_{32}N_4O_8$ S	Sigma Aldrich	$\geq 98\%$
11	Tetraethyl orthosilicate (TEOS, $Si(OC_2H_5)_4$ )	$Si(OC_2H_5)_4$	Sigma Aldrich	$\geq 98\%$



a) Máy sấy chân không



b) Máy cất nước hai lần



c) Máy rung siêu âm



d) Máy ly tâm



e) Máy khuấy cơ



f) Bếp gia nhiệt

**Hình 5.** Một số máy phục vụ nghiên cứu.

### 1.5. Quy trình chế tạo hạt $Fe_3O_4$ bằng phương pháp đồng kết tủa

#### 1.5. 1. Hạt nano từ được tổng hợp theo cách cho nhanh bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối $Fe^{2+}$ và $Fe^{3+}$

Theo sơ đồ 1 (Phụ lục 1), quy trình chế tạo hạt nano sắt từ  $Fe_3O_4$  được thực hiện các nước như sau:

Bước 1: Chuẩn bị muối  $FeCl_3$  và  $FeCl_2$ ; lắp đặt thiết bị.

Bước 2: Hòa tan hỗn hợp muối  $FeCl_3$  và  $FeCl_2$  với nước cất ở nhiệt độ  $80^\circ C$ , trong điều kiện có sục khí  $N_2$  để chống quá trình oxy hóa xảy ra;

Bước 3: Khuấy đều hỗn hợp với tốc độ 800 vòng/phút trong điều kiện có sục khí nitơ ( $N_2$ ) 45 phút;

Bước 4: Cho nhanh bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối  $FeCl_3$ ,  $FeCl_2$  và tiếp tục khuấy đều ở nhiệt độ  $80^\circ C$  trong 45 phút; sau đó để nguội đến nhiệt độ phòng;

Bước 5: Dùng nam châm để tách hạt  $Fe_3O_4$ , rửa 3 lần bằng nước cất;

Bước 6: Sấy chân không ở nhiệt độ  $40^\circ C$  trong 24 giờ;

Bước 7: Thu hạt  $Fe_3O_4$  tinh khiết.

#### 1.5.2. Hạt nano từ được tổng hợp theo cách cho nhỏ giọt bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối sắt II và sắt III:

Bước 1, Bước 2, Bước 3: thực giống như 1.5.1

Bước 4: Đối với quy trình này thì trong Bước 4 không cho nhanh bazơ vào hỗn hợp muối  $Fe^{2+}$  và  $Fe^{3+}$  mà cho nhỏ giọt bazơ vào hỗn hợp muối  $Fe^{2+}$  và  $Fe^{3+}$ . Sau khi cho hết lượng bazơ cần thiết vào hỗn hợp muối, tiếp tục cho khuấy hỗn hợp thêm 45 phút ở nhiệt độ  $80^{\circ}C$ , sau đó để nguội đến nhiệt độ phòng.

Bước 5, Bước 6 và Bước 7: thực hiện giống như 1.5.1.

### 1.6. Thực nghiệm: Chế tạo hạt nano oxít sắt từ

#### Cách 1: Cho nhanh bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối $Fe^{2+}$ và $Fe^{3+}$

Sơ đồ bố trí thí nghiệm như Hình 6



**Hình 6.**  $NaOH$  2M được đưa nhanh vào hỗn hợp dung dịch muối sắt;  
1- Động cơ; 2- Đũa khuấy; 3- Bình ba cổ; 4- ống dẫn khí Nitơ; 5- Bình chứa khí Nitơ; 6- Bếp gia nhiệt;

Hạt  $Fe_3O_4$  được tổng hợp theo phương pháp đồng kết tủa (Massart, R. 1981).

Bước 1: Chuẩn bị 2,157 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  và 0,794 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 60 mL nước cất và bình Nitơ; Lắp đặt thiết bị như hình 6.

Bước 2: Cho 2,157 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  và 0,794 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  được hòa tan trong 60 mL nước cất ở 80 °C trong môi trường khí  $\text{N}_2$ ;

Bước 3: Khuấy đều hỗn hợp vừa được hòa tan với tốc độ 800 vòng/phút, trong 15 phút.

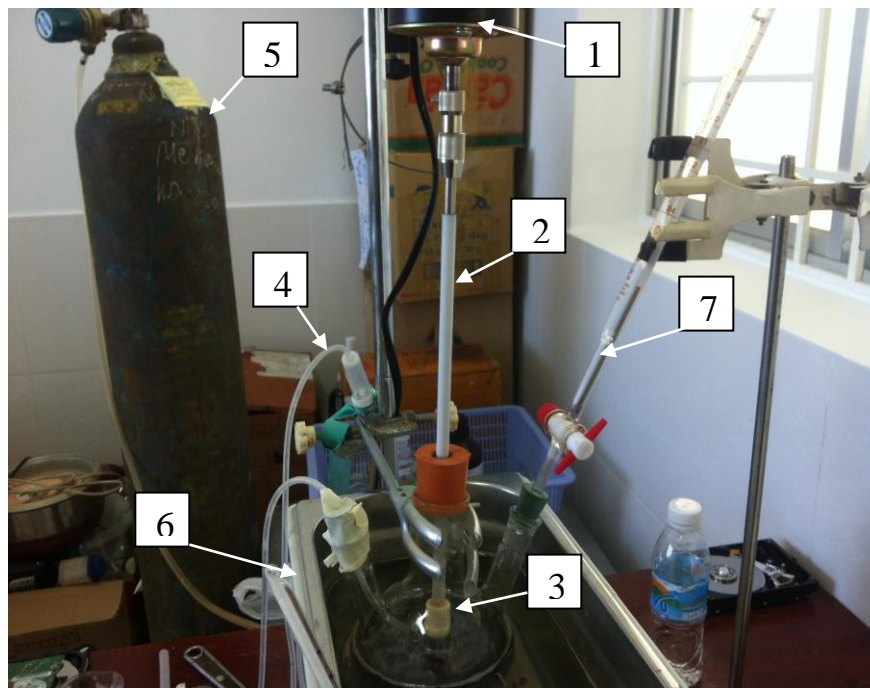
Bước 4: Cho nhanh 25 mL dung dịch  $\text{NaOH}$  2M vào hỗn hợp dung dịch muối sắt. Mẫu được khuấy thêm 45 phút, rồi để nguội đến nhiệt độ phòng;

Bước 5: Dùng nam châm để tách hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  và rửa hạt ba lần với nước cất;

Bước 6: Sấy hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  trong chân không ở 40 °C, trong 24h;

Bước 7: Thu được hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

**Cách 2: Cho nhỏ giọt bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối  $\text{Fe}^{2+}$  và  $\text{Fe}^{3+}$**  Sơ đồ bố trí thí nghiệm như Hình 7



**Hình 7.**  $\text{NaOH}$  2M được đưa nhỏ giọt vào hỗn hợp dung dịch muối sắt; 1- Động cơ; 2- Đĩa khuấy; 3- Bình ba cổ; 4- ống dẫn khí Nitơ; 5- Bình chứa khí Nitơ; 6- Bếp gia nhiệt; 7-Pipet chứa  $\text{NaOH}$

Bước 1: Chuẩn bị 2,157 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  và 0,794 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 60 mL nước cất và bình Nitơ; lắp đặt thiết bị như Hình 7.

Bước 2, bước 3: thực hiện giống cách một.

Trong cách 2 chỉ khác cách 1 ở chỗ cách cho 25 mL dung dịch NaOH vào hỗn hợp muối sắt. Trong cách 2 này: cho nhỏ giọt NaOH 2M vào hỗn hợp muối sắt. Khi cho hết 25mL dung dịch NaOH vào hỗn hợp muối sắt cho tiếp tục khuấy thêm 45 phút như cách 1.

Bước 5, bước 6 và bước 7: thực hiện giống cách 1.

## CHƯƠNG 2: CHỨC NĂNG HÓA BỀ MẶT HẠT NANO

Các hạt nano sau khi được chế tạo chúng có xu hướng kết tụ lại với nhau thành từng đám, điều này dẫn đến hạt nano kém ổn định và phân tán không tốt trong dung môi. Nguyên nhân của hiện tượng kết tụ liên quan đến tỷ số giữa diện tích bề mặt và thể tích của các hạt nano là cao nên có năng lượng bề mặt lớn. Do vậy, chúng có xu hướng kết tụ lại để giảm năng lượng bề mặt. Hầu hết các ứng dụng của các hạt nano đều đòi hỏi độ ổn định trong thời gian dài và với ứng dụng trong y sinh còn đòi hỏi thêm yếu tố không độc trong khoảng thời gian ấy. Do vậy, người ta thường dùng phương pháp bao bọc hạt nano bởi chất hoạt hóa bề mặt, phương pháp tuy phức tạp nhưng đa năng hơn, nó cho phép thực hiện trên nhiều ứng dụng (Kango, S. 2013).

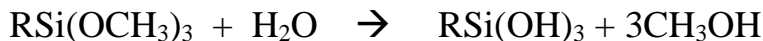
### *2.1. Bao phủ bề mặt hạt nano bởi chất silane*

Sự thay đổi bề mặt hạt nano thông qua cách xử lý hóa chất chẳng hạn như hấp thụ chất silane là một trong những phương pháp hiệu quả để làm tăng độ ổn định của hạt nano trong các dung môi khác nhau.

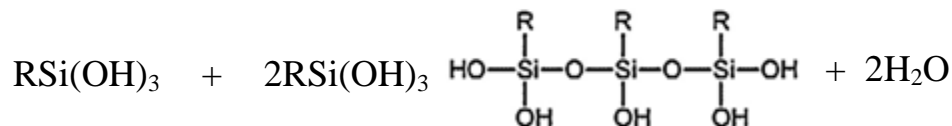
#### **Sự hình thành liên kết giữa chất silane với hạt nano**

Chất silane được hấp thụ trên bề mặt hạt nano do khả năng hút nước của các hạt nano và sau đó các chất silane phản ứng với các nhóm hydroxyl có trên bề mặt hạt nano thông qua các quá trình thủy phân, ngưng tụ và sau cùng là hình thành liên kết. Một số chất được sử dụng phổ biến như: 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES), (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPTMS), 3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (Hình 8). Sự hình thành liên kết giữa chất silane với hạt nano thông qua ba quá trình (Zhao, J. 2012).

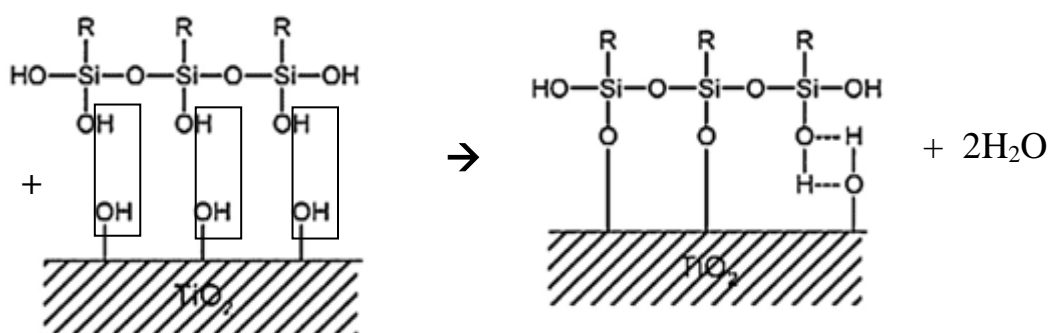
*Quá trình thủy phân*



*Quá trình ngưng tụ*



*Quá trình hình thành liên*



**Hình 8.** *Quá trình hình thành liên kết giữa chất silane với hạt*

### ***Aminopropyl triethoxysilane (APTES)***

Chất 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) được dùng để thay đổi bề mặt hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  được thể hiện trên Hình 9. Bề mặt của các hạt nano khi chưa được xử lý chỉ được phủ bởi các nhóm  $-\text{OH}$ . Sau khi được xử lý, bề mặt hạt được phủ bởi các phân tử APTES chứa nhóm  $\text{NH}_2$ .

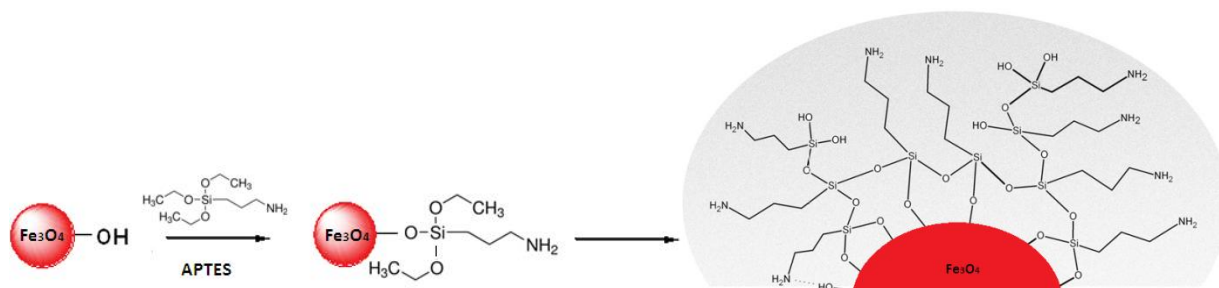
Phản ứng silane hóa bề mặt hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  bằng APTES diễn ra theo các quá trình (Can, K. 2009):

- Quá trình thủy phân: Nhóm alkoxide ( $-\text{OC}_2\text{H}_5$ ) được thay thế bằng nhóm hydroxyl ( $-\text{OH}$ ) để hình thành nhóm hoạt động silanol ( $\text{Si}-\text{OH}$ ) trên phân tử APTES.

- Quá trình ngưng tụ: Nhóm silanol này sẽ liên kết với silanol khác khác và hình thành liên kết siloxane ( $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ ) thông qua phản ứng khử nước.

- Sau cùng là quá trình hình thành liên kết: Các nhóm OH trên hạt nano liên kết cộng hóa trị với các nhóm OH trên chất silane.





**Hình 9.** Chức năng hóa bề mặt hạt nano  $Fe_3O_4$  với APTES

Hiện nay, có rất nhiều chất silane chứa các nhóm chức năng đã được sử dụng để phủ lên bề mặt hạt nano. Tùy thuộc vào loại nhóm chức mà hạt nano có được sau khi được bao phủ, các hạt nano có thể gắn kết trực tiếp với các phân tử mục tiêu hoặc phải thông qua một chất khác. Các chất trung gian ấy gọi là các linker.

## 2.2. Quy trình bọc lớp tương thích sinh học

Quy trình bọc lớp tương thích được thực hiện như sơ đồ 2 ( phụ lục 2) với các bước sau:

Bước 1: Phân tán hạt nano từ  $Fe_3O_4$  trong ethanol, bằng cách cho rung siêu âm hạt nano từ  $Fe_3O_4$  trong thời gian 30 phút trong ethanol .

Bước 2: Cho TEOS, và 4 ml  $NH_3.H_2O$  vào dung dịch  $Fe_3O_4$ ;

Bước 3: Khuấy cơ 60 vòng/phút trong dung dịch  $Fe_3O_4$ ,  $C_2H_5OH$ , TEOS,  $NH_3$  trong điều kiện có khí  $N_2$  ở nhiệt độ  $40^\circ C$  trong 24 giờ;

Bước 4: Rửa bằng nước cất, sau đó dùng nam châm để tách hạt  $Fe_3O_4/SiO_2$  ;

Bước 5: Sau khi tách, rửa xong cho hạt vào buồng sấy trong chân không trong 24 giờ ở nhiệt độ  $40^\circ C$ , ta có được hạt  $Fe_3O_4$  đã phủ  $SiO_2$ .

Bước 6: Cho  $Fe_3O_4/SiO_2$  vào ethanol và khuấy cơ với tốc độ 60 vòng/phút;

Bước 7: Cho APTES vào hỗn hợp dung dịch  $Fe_3O_4/SiO_2$ ,  $C_2H_5OH$ , sau đó cho khuấy đều trong 24 giờ ở nhiệt độ  $40^\circ C$  trong môi trường có khí  $N_2$ ;

Bước 8: Dùng nước cất rửa hạt  $Fe_3O_4/SiO_2/NH_2$ , sau đó dùng nam châm để tách hạt;

Bước 9: Đưa hạt vào buồng sấy chân không ở nhiệt độ  $40^\circ C$  trong 24 giờ, ta thu được hạt  $Fe_3O_4$  đã phủ APTES;

### 2.3. Thực nghiệm bọc lớp tương thích sinh học

Hai mẫu hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  thu được ở mục 1.6 lần lượt được chức năng hóa bề mặt và bọc lớp tương thích.  $\text{SiO}_2$  được phủ lên hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ) bằng phương pháp Stöber.

Bước 1: Cho 200 mg  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  phân tán trong 50 mL ethanol/nước (tỷ lệ thể tích 3:2) bằng cách cho hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  rung siêu âm trong thời gian 30 phút trong ethanol;

Bước 2: Thêm 2 mL TEOS và 4 mL  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  vào dung dịch  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ;

Bước 3: Khuấy hỗn hợp (TEOS,  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) trong 24 h ở 40 °C trong khí  $\text{N}_2$ ;

Bước 4: Dùng nam châm thu hạt và rửa hạt ba lần bằng nước cất;

Bước 5: Sấy ở 40 °C trong chân không, thu được hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ;

Bước 6: Cho 250 mg hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  phân tán trong 100 mL ethanol/nước (tỷ lệ thể tích 1:2) bằng cách cho khuấy nhẹ  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  trong ethanol với tốc độ 60 vòng/phút trong 15 phút;

Bước 7: Thêm 0,125 - 0,625 mL APTES vào dung dịch  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  và khuấy đều 100 vòng/ phút trong 24 h ở 40 °C trong môi trường  $\text{N}_2$ ;

Bước 8: Dùng nam châm thu hạt, hạt thu được rửa bằng nước cất ba lần;

Bước 9: Sấy hạt thu được ở 40 °C trong chân không. Hạt thu được sẽ mang cấu trúc  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2$



**Hình 10.** Rung siêu âm  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

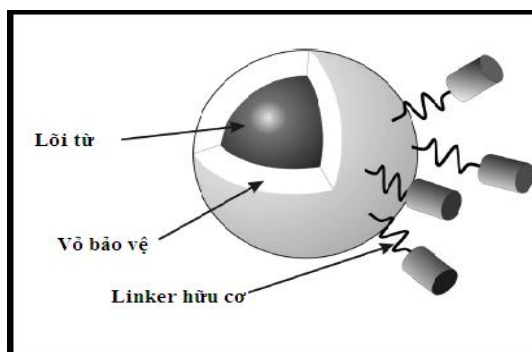
## CHƯƠNG 3: GẮN PROTEIN LÊN HẠT NANO TỪ ĐÃ ĐƯỢC BỌC LỚP TƯƠNG THÍCH SINH HỌC

### 3.1. Linker

Linker là hợp chất hữu cơ có ít nhất hai nhóm phản ứng, các nhóm phản ứng của linker phản ứng với nhiều nhóm chức khác như amine sơ cấp, carboxyl, sulfhydryl, carbohydrate và carboxylic acid, và tạo các liên kết cộng hóa trị giữa hai hoặc nhiều phân tử.

Trong khi đó các hạt nano sau khi được bao phủ bởi chất silane cũng chứa những nhóm chức như amine, thiol, carboxyl, epoxy... có khả năng gắn kết với linker.

Do vậy, các hạt nano có thể gắn kết với protein thông qua các linker.



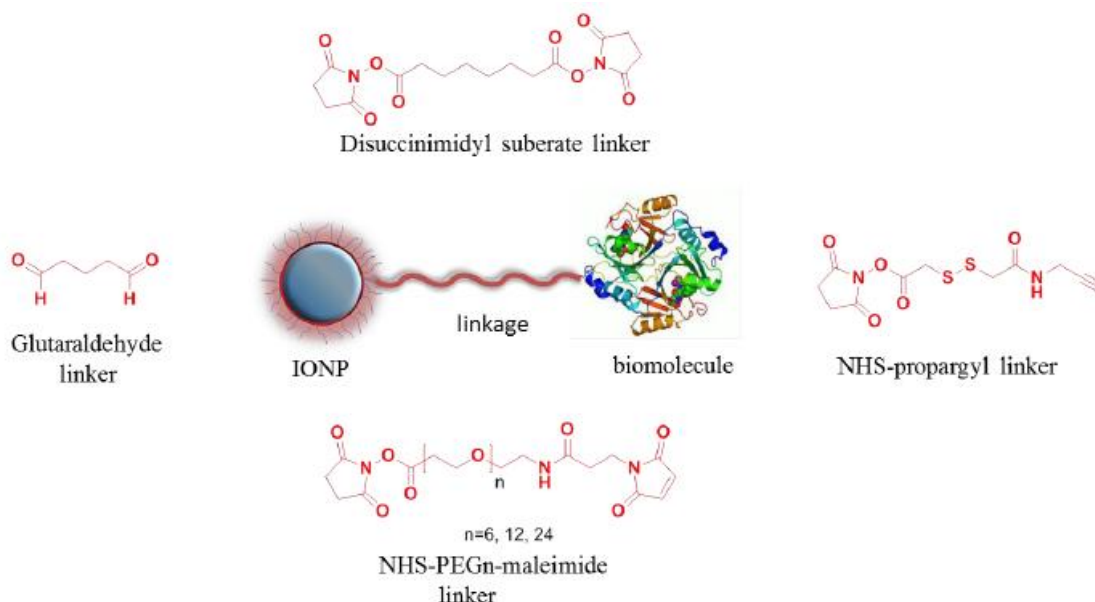
**Hình 11.** Hạt nano oxit sắt từ bao phủ bởi lớp bảo vệ silane gắn với linker (Bull, E. 2014).

Các phân tử protein chứa nhiều nhóm chức amine sơ cấp, carboxyl, sulfhydryl, carbohydrate và carboxylic acid và vì đó các protein và peptide có thể gắn kết được với các linker.

Các linker có thể được chia làm hai nhóm tùy thuộc vào số nhóm chức giống nhau:

- **Homobifunctional** là các linker có hai đầu phản ứng, mỗi đầu chứa một nhóm chức, các nhóm chức này giống nhau.
- **Heterobifunctional** là các linker có hai đầu phản ứng, mỗi đầu chứa một nhóm chức, các nhóm chức này khác nhau.

Một số linker thường gặp hình 12:



**Hình 12.** Một số linker thường gặp (Turcheniuk, K. 2013).

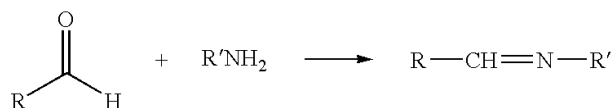
### 3.2. Hạt nano gắn với protein thông qua linker

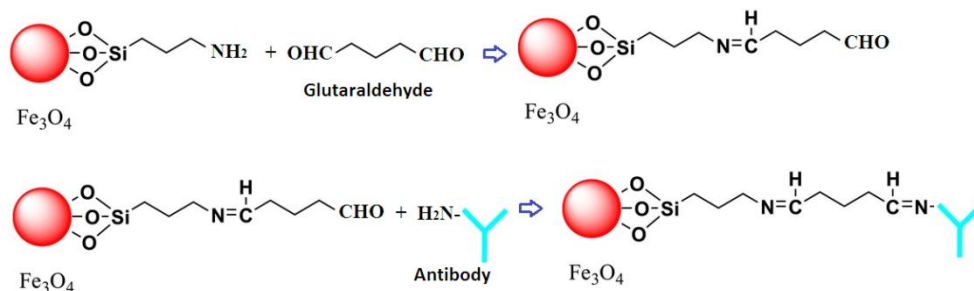
#### 3.2.1. Glutaraldehyde

**Glutaraldehyde** là một hợp chất hữu cơ có công thức cấu tạo  $\text{H}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{H}$ , công thức phân tử  $\text{OHC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$ , có hai nhóm chức giống nhau là CHO và là loại linker amine-to-amine, hai đầu phản ứng của linker này phản ứng với hai nhóm chức amine.

Bề mặt hạt nano sau khi được chức năng hóa bởi APTES sẽ chứa các nhóm chức  $\text{NH}_2$ , nhóm  $\text{NH}_2$  này phản ứng với một đầu của linker glutaraldehyde chứa nhóm CHO, đầu CHO còn lại của linker sẽ phản ứng với nhóm  $\text{NH}_2$  có trong protein.

Phản ứng giữa nhóm CHO và  $\text{NH}_2$  xảy ra theo sơ đồ sau:





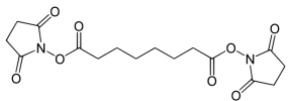
**Hình 13.** Hạt nano gắn kết với protein thông qua linker glutaraldehyde .

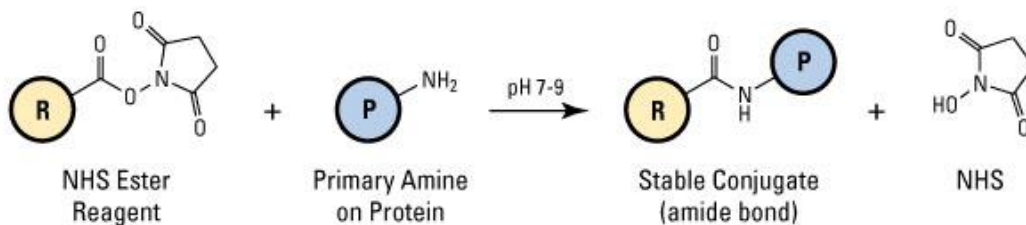
Các tác giả (Can, K. 2009) đã sử dụng linker glutaraldehyde gắn kết bovine serum albumin lên hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  phủ APTES ( Hình 13 ). Trong khi các tác giả (Hu, B. 2009) sử dụng cho việc gắn kết *Serratia marcescens* lipase.

Thuận lợi: glutaraldehyde, có giá thành thấp, được sử dụng phổ biến trong nhiều lĩnh vực như: chất xúc tác sinh học, gắn kết protein với hạt nano.

### 3.2.2. *N*-hydroxysuccinimide ester (NHS ester)

**N-hydroxysuccinimide ester** hay còn gọi là disuccinimidyl subarate (DSS),

là một hợp chất hữu cơ có công thức cấu tạo, , công thức phân tử  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_8$ , có hai đầu phản ứng là hai nhóm chức succinimidyl giống nhau và là loại linker amine-to-amine.

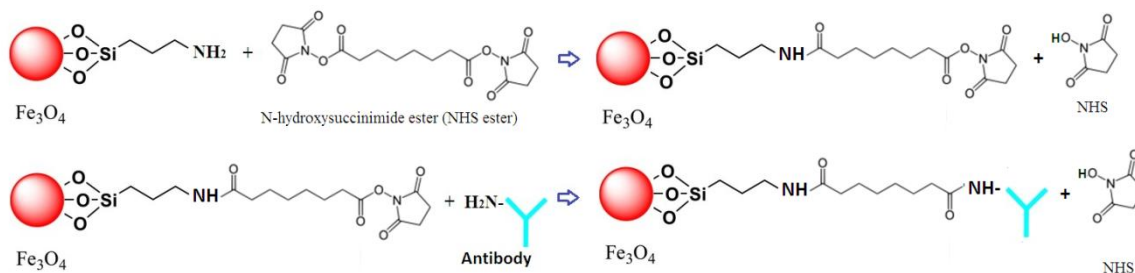


**Hình 14.** Phản ứng giữa NHS Ester với amine sơ cấp của protein (<https://www.thermofisher.com>)

NHS ester phản ứng với amine sơ cấp và hình thành liên kết amine bền vững, cùng với việc giải phóng nhóm N-hydroxysuccinimide (NHS). Protein, bao gồm kháng thể, nói chung có nhiều nhóm amine sơ cấp bên trong chuỗi lysine (K) và N-terminus của mỗi polypeptide và do vậy NHS ester là linker phù hợp trong việc gắn kết protein.

Phản ứng giữa NHS Ester với amine sơ cấp của protein được thể hiện như hình 14.

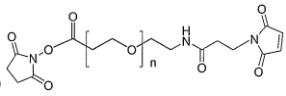
Sau khi thay đổi bề mặt bởi APTES, các hạt nano sẽ mang nhóm chức NH<sub>2</sub>. Do vậy một đầu của linker NHS ester sẽ phản ứng với NH<sub>2</sub> có trên hạt nano và đầu phản ứng còn lại sẽ phản ứng với NH<sub>2</sub> sơ cấp của protein.

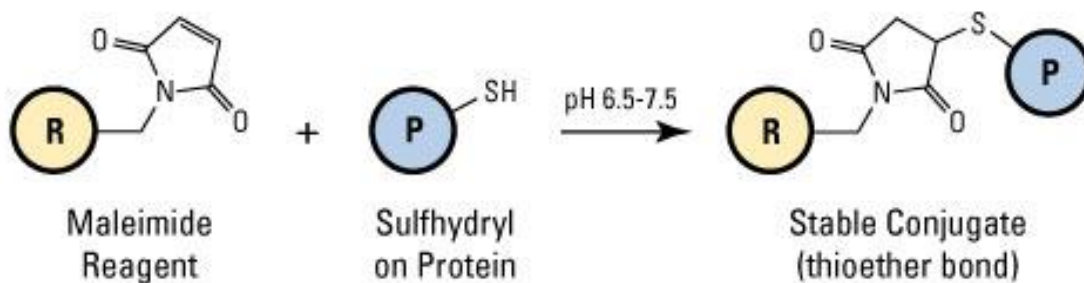


**Hình 15.** Hạt nano gắn kết với protein thông qua linker NHS ester

Các tác giả (Rudashevskaya, E.L. et al. 2013) đã sử dụng linker này cho việc gắn kết các phân tử mục tiêu như chitin, amylase, heparine... với các hạt nano.

### 3.2.3. NHS-PEGn-maleimide

**NHS-PEGn-maleimide** là một polymer, có công thức cấu tạo , n có các giá trị 2-24 và là loại linker amine-to-sulfhydryl.

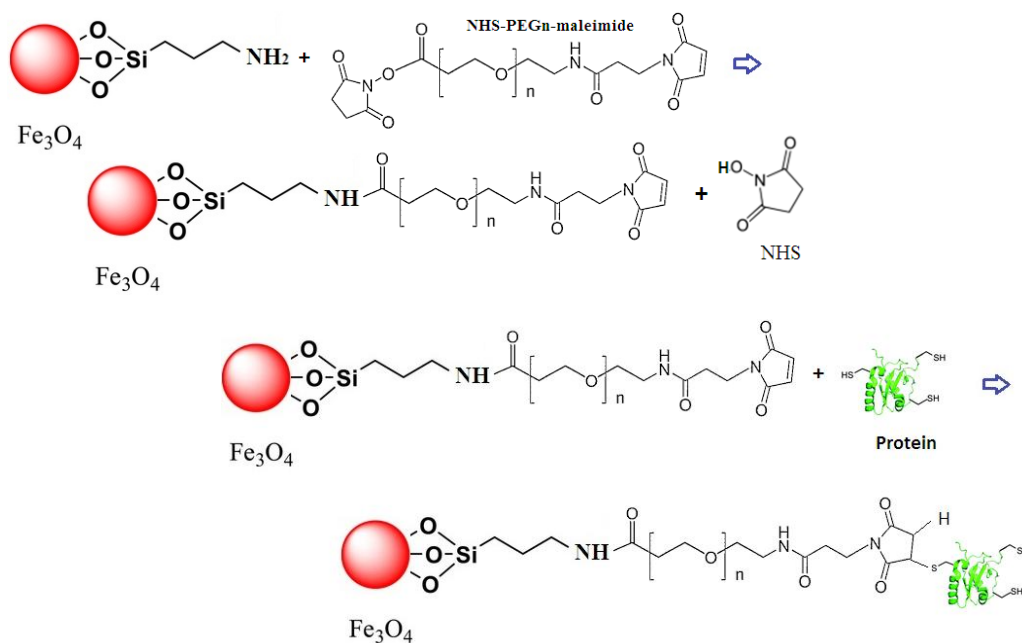


**Hình 16.** Phản ứng giữa nhóm maleimide và sulfhydryl có trong protein

(<https://www.thermofisher.com>)

Sơ đồ phản ứng giữa nhóm maleimide và sulfhydryl có trong protein như Hình 16: NHS-PEGn-maleimide có hai nhóm phản ứng là NHS ester và maleimide, nhóm NHS ester phản ứng với nhóm amino, trong khi nhóm maleimide phản ứng với sulfhydryl (còn được gọi là thiol). Sulfhydryl, là một nhóm chức tồn tại trong protein ở bên trong chuỗi cysteine (Cys, C) của amino acid.

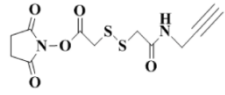
Các hạt nano được chức năng hóa bởi nhóm  $\text{NH}_2$ , sẽ phản ứng với nhóm NHS ester. Sau đó các hạt nano gắn nhóm chức NHS ester phản ứng với các sulfhydryl có trong protein.



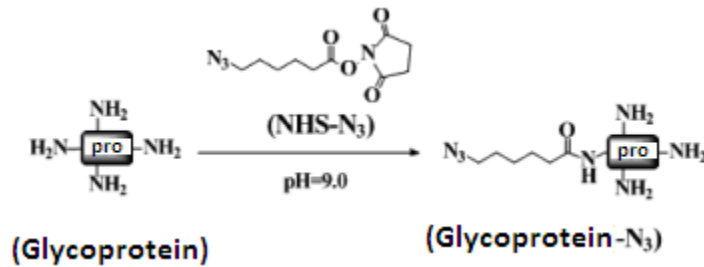
**Hình 17.** Hạt nano gắn kết với protein thông qua linker NHS-PEGn-maleimide .

Các tác giả (Grüttner, C. 2013) đã sử dụng linker NHS-PEGn-maleimide để gắn kết immunoglobulin với hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> được chức năng hóa bởi các nhóm  $\text{NH}_2$  (Hình 17).

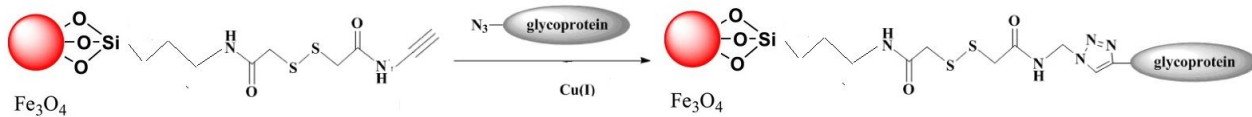
### 3.2.4. NHS-Propargyl

**NHS-Propargyl** là một hợp chất hữu cơ có công thức cấu tạo , công thức phân tử  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , có hai nhóm phản ứng là NHS ester và CH. Các tác giả (Cui, Q. 2013) đã sử dụng linker này để gắn kết hạt nano oxit sắt với protein. Đầu tiên các hạt nano oxit sắt đã được chức năng hóa bởi nhóm chức  $\text{NH}_2$ , sau đó chúng phản ứng với một đầu phản ứng của linker chứa nhóm NHS ester. Đầu còn lại của linker chứa nhóm CH sẽ phản ứng với protein.

Nhóm CH của linker sẽ phản ứng với glycoprotein như sau: Glycoprotein được gắn kết nhóm  $\text{N}_3$  (azide) thông qua chất NHS- $\text{N}_3$  (N-hydroxysuccinimide-azide) để trở thành  $\text{N}_3$ -glycoprotein.



Sau đó N<sub>3</sub>-glycoprotein phản ứng với nhóm chức CH có trên hạt nano, sơ đồ minh họa phản ứng như Hình 18.



**Hình 18.** Hạt nano gắn kết với N<sub>3</sub>-Glycoprotein thông qua linker NHS-Propargyl

Thuận lợi của các linker: NHS ester, NHS-PEG<sub>n</sub>-maleimide, NHS-Propargyl... là tạo các liên kết amide bền vững giữa linker và protein. Tuy nhiên, giá thành của các linker này rất cao.

### 3.3. Quy trình gắn protein A lên hạt nano từ

Quy trình gắn protein A lên hạt nano từ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> thực hiện như sơ đồ 3 (Phụ lục 3) với các bước sau:

#### **Gắn hạt nano từ (đã được bọc lớp tương thích sinh học) với các linker**

Bước 1: Pha Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/ NH<sub>2</sub> với nước cất;

Bước 2: Cho GA 25% vào ta được hỗn hợp dung dịch Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/ NH<sub>2</sub> , GA, sau đó khuấy đều dung dịch Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/ NH<sub>2</sub> , GA ở nhiệt độ phòng trong 24h;

Bước 3: Rửa các hạt bằng PBS 3 lần, thu được hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/CHO;

#### **Gắn protein A lên các hạt nano từ (đã được bọc lớp tương thích sinh học) thông qua các linker**

Bước 4: Cho protein A, dung dịch PBS vào Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/CHO;

Bước 5: Ủ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/CHO, protein A, PBS ở nhiệt độ phòng (37°C ) trong 12h;

Bước 6: Rửa Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/NH<sub>2</sub>/CHO, protein A, PBS bằng PBS 3 lần, dùng nam châm tách hạt ra, ta được hạt từ có gắn protein A.



### 3.4. Gắn protein A lên hạt nano từ đã được bọc lớp tương thích sinh học

#### • Gắn hạt nano từ (đã được bọc lớp tương thích sinh học) với các linker

Bước 1: Cho 200 mg hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2$  được khuấy cơ với tốc độ 100 vòng/phút trong 12h ở nhiệt độ phòng để các hạt được phân tán trong 100 ml nước cất;

Bước 2: Thêm 1 mL dung dịch GA 25% vào dung dịch  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2$  và khuấy cơ trong 24h ở nhiệt độ phòng;

Bước 3: Rửa hạt ba lần bằng PBS, hạt thu được sẽ hình thành cấu trúc  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2/\text{CHO}$ .

#### • Gắn protein A lên các hạt nano từ (đã được bọc lớp tương thích sinh học) thông qua các linker

Bước 4; Tiếp theo, cho 100 mg hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2/\text{CHO}$  và 0,5 mg protein A phân tán trong 15 ml dung dịch PBS;

Bước 5: Ủ hỗn hợp ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2/\text{CHO}$ , protein A và PBS) được ủ bằng cách khuấy cơ với tốc độ 100 vòng/phút trong 12h ở  $37^\circ\text{C}$ ;

Bước 6: Dùng nam châm để tách các hạt đã gắn với protein A và dung dịch protein A còn lại sau khi gắn, hạt đã gắn protein A được rửa với dung dịch PBS ba lần;

Dung dịch protein A còn lại sau khi gắn được dùng để tính nồng độ protein A còn lại.

### 3.5. Gắn biotin-FITC và biotin

Cho 5 mg mỗi mẫu  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2/\text{CHO}/\text{protein A}$  được phân tán trong 2 mL biotin-FITC (0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ở  $37^\circ\text{C}$  bằng cách cho khuấy cơ (tốc độ 100 vòng/phút) trong 30 phút, rồi được rửa với PBS ba lần.

Đồng thời cho 5 mg mỗi mẫu  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2/\text{CHO}/\text{protein A}$  hòa trong 2 mL biotin (0,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ở  $37^\circ\text{C}$  trong 30 phút và được rửa bằng PBS ba lần, sau đó tiếp tục cho phản ứng với 2 mL biotin-FITC (0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ở  $37^\circ\text{C}$  trong 30 phút và rửa lại 3 lần với PBS.

Sử dụng phương pháp Bradford ( Bradford, M. 1976), để xác định hiệu suất gắn kết của các hạt nano với dung dịch protein A.

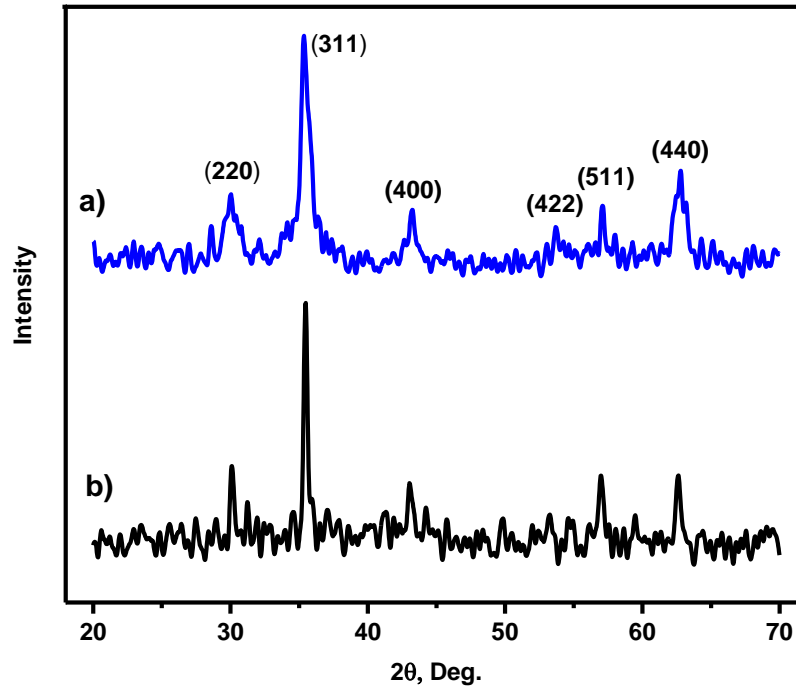
### *3.5. Các kỹ thuật phân tích.*

Các thiết bị được sử dụng cho phân tích mẫu bao gồm: kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM, JEM-1400, Joel), máy đo nhiễu xạ tia X (XRD, D8-ADVANCE, Bruker), từ kế mẫu rung (VSM, MicroSense), máy đo phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR, TENSOR 27, Bruker), phổ UV-Vis (UV-Vis, NanoDrop 2000, Thermo) và kính hiển vi điện tử huỳnh quang (Olympus BX51). Chúng được dùng để xác định tính chất, hình dạng cũng như khả năng gắn kết của các hạt với protein A.

## PHẦN III: KẾT LUẬN

### 4.1. Kết quả đề tài và thảo luận

#### 4.1.1. Tổng hợp các hạt nano từ tính



**Hình 19.** *Giản đồ XRD của các hạt nano  $Fe_3O_4$ : a) đưa nhanh bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối sắt và b) đưa nhỏ giọt bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối sắt.*

Hình 19 trình bày giản đồ XRD của các hạt nano được tổng hợp bằng phương pháp đồng kết tủa theo hai phương cách. Ở hình 19a, các hạt nano được tổng hợp theo cách đưa nhanh bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối sắt II và sắt III.

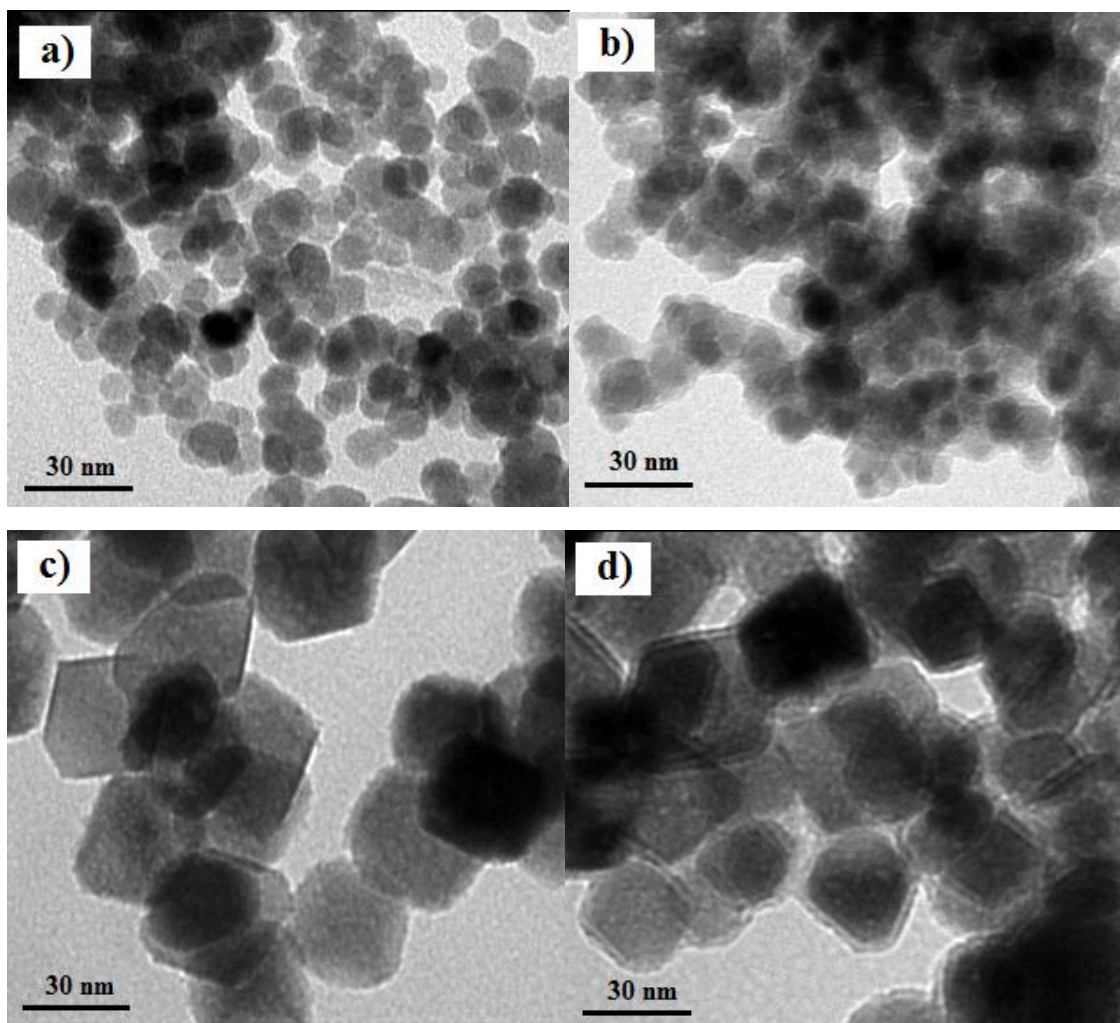
Áp dụng công thức Scherrer  $D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$ , trong đó  $D$ ,  $K$ ,  $\lambda$ ,  $\theta$  và  $\beta$  lần lượt là kích thước trung bình của các hạt nano, hằng số Scherrer, bước sóng tia X, góc nhiễu xạ Bragg và độ bán rộng (FWHM) đối với đỉnh (311), từ đó suy được kích thước tinh thể trung bình khoảng 10 nm.

Trong khi đó, ở hình 19b, hạt nano được tổng hợp bằng cách đưa nhỏ giọt bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối sắt, và cũng theo công thức Scherrer với đỉnh (311), kích thước trung bình của tinh thể khoảng 30 nm. Có sự khác biệt về kích

thước tinh thể thu được 10 nm và 30 nm theo hai phương cách là do kích thước tinh thể phụ thuộc vào sự cân bằng giữa tốc độ tạo mầm và tốc độ phát triển tinh thể. Tinh thể có xu hướng nhỏ hơn khi tốc độ tạo mầm lớn hơn tốc độ phát triển tinh thể (Andrade, A. L. 2012). Trong thực nghiệm này, khi cho nhanh bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối sắt làm tăng tốc độ tạo mầm và vì vậy hạt thu được sẽ nhỏ hơn. Ngược lại, khi cho nhỏ giọt bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối sắt làm giảm tốc độ tạo mầm và vì thế hạt thu được sẽ lớn hơn. Và cũng từ giản đồ XRD ở hình 19a và 19b cho thấy, các đỉnh nhiễu xạ (220), (311), (400), (422), (511) và (440) phù hợp với các đỉnh nhiễu xạ của  $Fe_3O_4$  chuẩn (JCPDS file No. 01-075-1372) do vậy các hạt nano thu được chủ yếu là  $Fe_3O_4$

#### 4.1.2. Các hạt nano $Fe_3O_4$ và hạt nano đã được bọc lớp tương thích

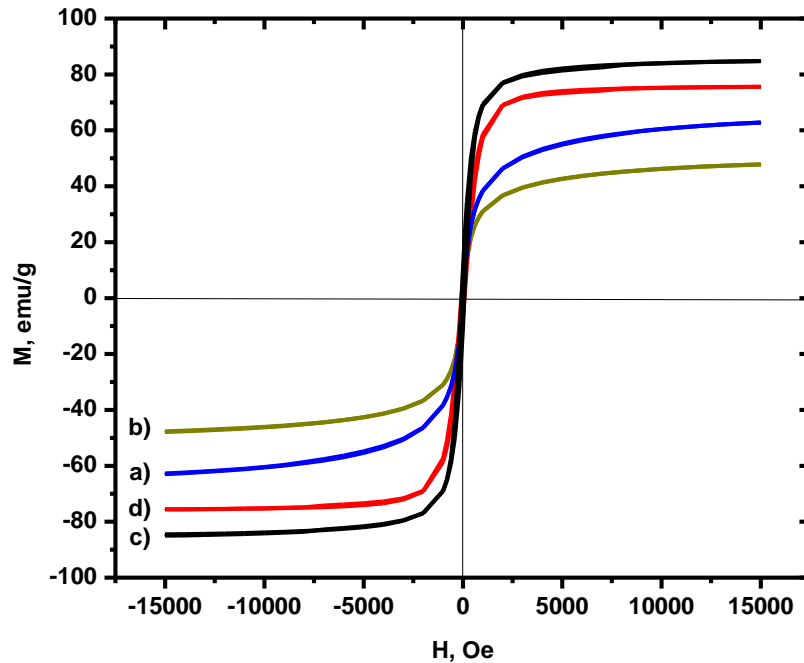
Hình 20, thể hiện ảnh TEM của các hạt nano với kích thước khác nhau. Từ các hình 20a và 20c cho thấy kích thước của các hạt  $Fe_3O_4$  lần lượt vào khoảng 10 nm và 30 nm khá phù hợp với kích thước tinh thể  $Fe_3O_4$  tính theo công thức Scherrer. Hơn nữa, các hạt nano  $Fe_3O_4$  thu được khá đồng đều. Ngoài ra, các hạt này có xu hướng kết tụ lại với nhau do tương tác lưỡng cực từ mạnh và lực Van der Waals giữa các hạt, làm mất tính chất đặc trưng của hạt nano vì thế làm chúng không đáp ứng được các yêu cầu của ứng dụng (Hou, Y. 2013). Hình 20b và 20d lần lượt là ảnh TEM của các hạt nano  $Fe_3O_4$  có kích thước 10 nm và 30 nm được phủ TEOS, sau khi phủ được phủ bề mặt của các hạt  $Fe_3O_4$  xuất hiện lớp phủ tương đối đồng đều với độ dày khoảng 2 – 3 nm, theo Hou, Y., thì lớp phủ ấy là  $SiO_2$  (Hou, Y. 2013).



**Hình 20.** Ảnh TEM của các hạt nano: a)  $Fe_3O_4$  và b)  $Fe_3O_4/SiO_2$  với cùng kích thước hạt  $Fe_3O_4$  10 nm; c)  $Fe_3O_4$  và d)  $Fe_3O_4/SiO_2$  với cùng kích thước hạt  $Fe_3O_4$  30 nm.

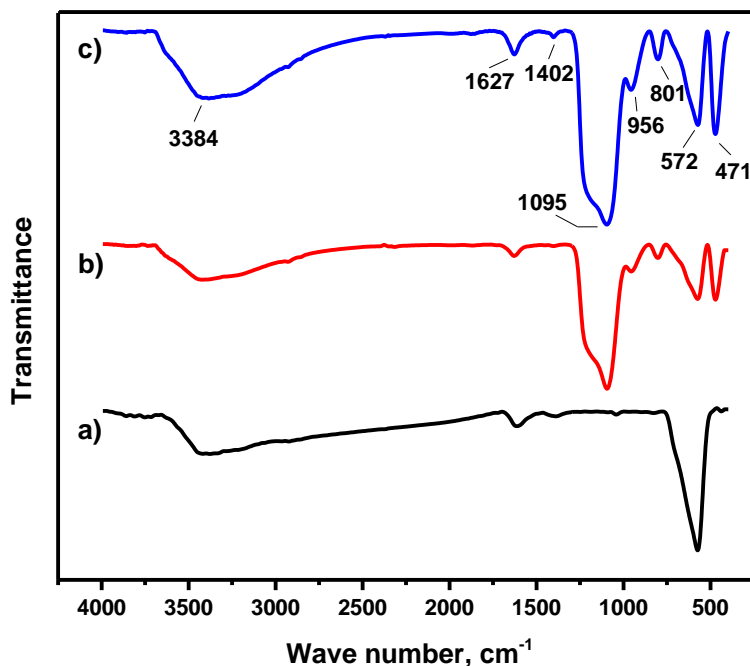
Hình 21 mô tả đường cong từ hóa của các hạt nano  $Fe_3O_4$  và  $Fe_3O_4/SiO_2$  ở nhiệt độ phòng. Ở hình 21a và 21c lần lượt thể hiện từ độ bão hòa của các hạt nano  $Fe_3O_4$  có kích thước 10 nm và 30 nm tương ứng là 63 emu/g và 85 emu/g. Trong khi từ độ bão hòa của  $Fe_3O_4$  khối là 92 emu/g. Sự khác biệt về từ độ bão hòa là do sự khác biệt về kích thước tinh thể  $Fe_3O_4$ . Kích thước tinh thể tăng, từ độ bão hòa tăng (Andrade, A. L. 2012). Tuy nhiên, khi kích thước tinh thể tăng quá 30 nm hạt nano  $Fe_3O_4$  sẽ không còn tính siêu thuận từ do tinh thể đã chuyển từ trạng thái đơn domain sang đa domain (Vayssière, L., C. 1998). Trong thực nghiệm này, kích thước tinh thể thu được cỡ 10 nm và 30 nm và nằm trong giới hạn siêu thuận từ. Hình 21b và 21d, thể hiện đường cong từ hóa của các hạt nano  $Fe_3O_4/SiO_2$  với kích

thước hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  lần lượt 10 nm và 30 nm với từ độ bão hòa tương ứng 48 emu/g và 76 emu/g. Sự giảm từ độ bão hòa của các hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  so với các hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  là do lớp phủ  $\text{SiO}_2$  (Girginova, P. I. 2010). Từ hình 21 cũng chỉ ra rằng, lực kháng từ cũng như từ dư có giá trị không đáng kể, do vậy các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  và hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  phủ  $\text{SiO}_2$  thu được từ thực nghiệm này có thể xem là siêu thuận từ. Từ đây còn cho thấy, hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  với kích thước 30 nm có ưu thế vượt trội về từ độ bão hòa khi so với hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  có kích thước 10 nm, đây là ưu điểm rất đáng kể đối với các ứng dụng trong y sinh, giúp hạt tái phân tán khi ngừng tác động của từ trường ngoài và dễ dàng tập trung khi có từ trường ngoài đủ lớn tác động.



**Hình 21.** Đường cong từ hóa của các hạt nano: a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  và b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  với cùng kích thước hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  10 nm; c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  và d)  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  với cùng kích thước hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  30 nm.

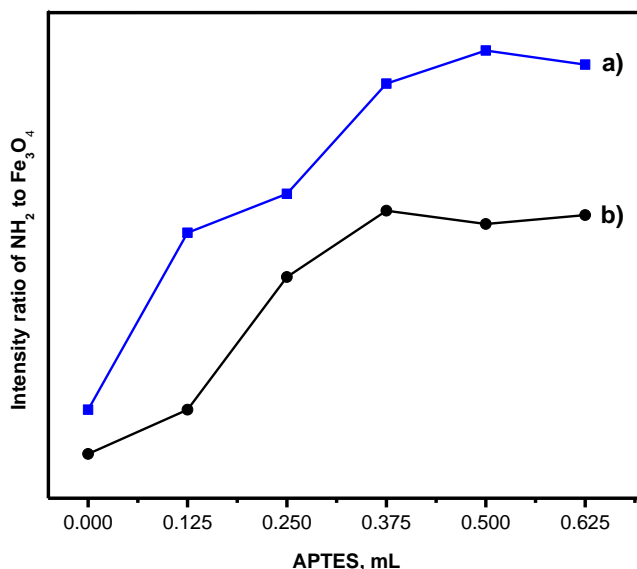
### 4.1.3. Các hạt nano $Fe_3O_4$ , hạt nano đã được bọc lớp tương thích gắn với linker



**Hình 22.** Phổ FTIR của các hạt nano a)  $Fe_3O_4$ , b)  $Fe_3O_4/SiO_2$  và c)  $Fe_3O_4/SiO_2/NH_2$ .

Phổ FTIR của các hạt nano được trình bày trên hình 22 với kích thước hạt  $Fe_3O_4$  là 30 nm. Các hình 22a, 22b và 22c tương ứng với phổ của các hạt nano  $Fe_3O_4$ ,  $Fe_3O_4/SiO_2$  và  $Fe_3O_4/SiO_2/NH_2$ . Đỉnh gần 572  $cm^{-1}$  thuộc vùng dao động của liên kết Fe – O, là đỉnh đặc trưng của  $Fe_3O_4$  xuất hiện trên hình 22a, 22b và 22c (Can, K. 2009) Ngoài ra, vùng dao động của liên kết Fe – O còn xuất hiện xung quanh đỉnh 471  $cm^{-1}$  với cường độ yếu được thể hiện trên hình 22a (Can, K. 2009). Hơn nữa, không xuất hiện đỉnh gần 632  $cm^{-1}$  là minh chứng cho thấy không tồn tại pha  $Fe_2O_3$  trong các mẫu (Zou, J. 2014). Do đó hạt thu được chủ yếu là  $Fe_3O_4$ . Ở hình 22b và 22c dao động uốn cong của liên kết Si–O–Si cũng xuất hiện gần đỉnh 471  $cm^{-1}$  góp phần làm tăng cường độ đỉnh tại 471  $cm^{-1}$  (Klotz, M. 1999). Và các đỉnh xung quanh 1095, 801  $cm^{-1}$  tương ứng với các dao động kéo căng bất đối xứng và dao động kéo căng của liên kết Si-O-Si, trong khi đỉnh gần 956  $cm^{-1}$  tương ứng với các dao động kéo căng của liên kết Si-OH (Klotz, M. 1999). Sự hiện diện của các liên kết Si-O-Si và Si-OH cho thấy lớp phủ TEOS đã phủ lên được bề

mặt hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Vùng xung quanh đỉnh 3384, 1627 và 1402  $\text{cm}^{-1}$  tương ứng với các dao động kéo căng OH, dao động uốn cong HOH và dao động uốn cong OH do vật liệu hấp thụ nước được thể hiện trên các hình 22a, 22b và 22c (Paul, R. C. 1977). Ngoài ra, ở hình 22c, hai vùng gần 3384, 1627  $\text{cm}^{-1}$  còn tương ứng với các dao động kéo căng N-H và dao động uốn cong  $\text{NH}_2$  của nhóm  $\text{NH}_2$  tự do có trong lớp phủ APTES, chúng làm tăng cường độ đỉnh 3384, 1627  $\text{cm}^{-1}$  khi vật liệu được phủ APTES (Can, K. 2009). Qua khảo sát phổ FTIR nhận thấy, cả hai kích thước hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  30 nm và 10 nm (phổ của các hạt 10 nm cũng cho kết quả tương tự và không trình bày ở đây) đều gắn kết tốt các lớp phủ TEOS và APTES và hình thành cấu trúc  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2$ .



**Hình 23.** Sự thay đổi tỷ số cường độ của  $\text{NH}_2$  và  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  khi thay đổi lượng APTES phủ lên cấu trúc  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  với kích thước hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ : a) 10 nm và b) 30 nm.

Vùng phổ 1627  $\text{cm}^{-1}$  thể hiện dao động uốn cong  $\text{NH}_2$  của nhóm  $\text{NH}_2$  tự do (Can, K. 2009) và cũng thể hiện dao động uốn cong HOH (Paul, R. C. 1977). Vì vậy, sự gia tăng các nhóm  $\text{NH}_2$  tự do trên bề mặt hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  sẽ làm tăng cường độ đỉnh vùng 1627  $\text{cm}^{-1}$ .

Hình 23 thể hiện tỷ số cường độ đỉnh  $\text{NH}_2$  tự do (1627  $\text{cm}^{-1}$ ) với cường độ đỉnh của  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (572  $\text{cm}^{-1}$ ). Lượng APTES phủ lên cùng 0,2 g hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , tăng đến 0,5 mL (hình 23a, hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  10 nm) và đến 0,375 mL (hình 23b, hạt



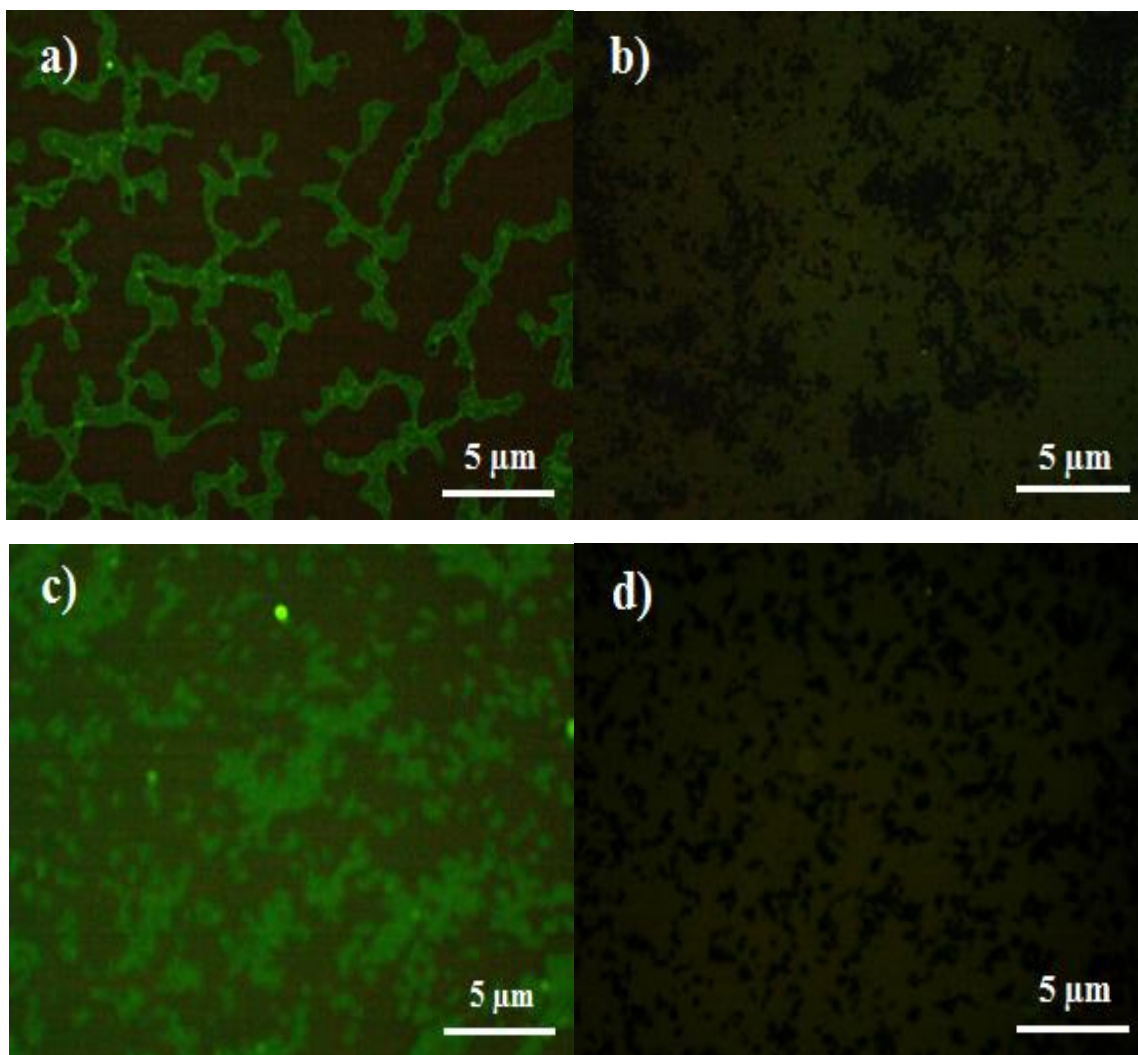
$\text{Fe}_3\text{O}_4$  30 nm) thì thu được các nhóm  $\text{NH}_2$  trên bề mặt hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  là nhiều nhất. Sự khác biệt về lượng APTES gắn kết trên bề mặt hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  (0,5 mL và 0,375 mL) có thể do kích thước hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Với cùng khối lượng hạt nano, nếu kích thước hạt nhỏ hơn sẽ có tổng diện tích bề mặt lớn hơn, và có nhiều nhóm chức năng hơn. Vì vậy, với cùng lượng hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  có kích thước nhỏ hơn sẽ gắn kết được nhiều nhóm  $\text{NH}_2$  tự do hơn.

#### 4.1.4. Gắn protein A lên các hạt nano, các hạt nano đã gắn protein A gắn với biotin-FITC và gắn với biotin.

Các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2$  được hoạt hóa bởi GA để trở thành cấu trúc  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2/\text{CHO}$ , cấu trúc này có thể gắn kết protein A. Thông qua protein A, hạt có thể gắn với kháng thể, biotin.

Thực nghiệm này, biotin-FITC được dùng để gắn với các hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2/\text{CHO}/\text{protein A}$ , để minh chứng cho sự gắn kết của các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2/\text{CHO}$  với protein A.

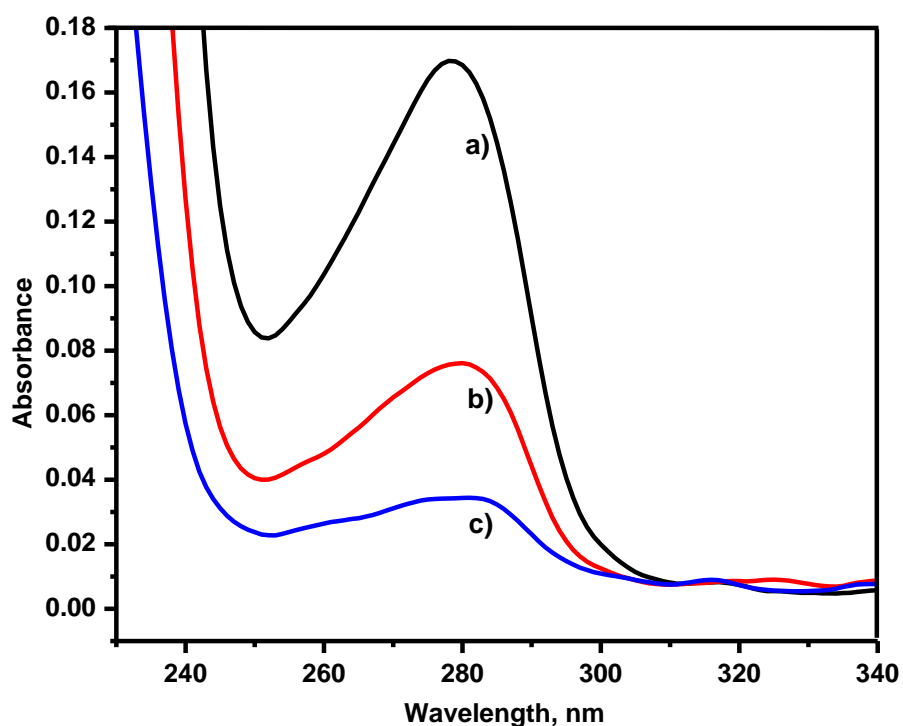
Hình 24 là ảnh điện tử huỳnh quang của các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2/\text{CHO}/\text{protein A}$  khi gắn biotin-FITC. Hình 24a và 24c tương ứng với kích thước hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  10 nm và 30 nm, cho thấy hầu hết các hạt nano phát ánh sáng xanh sau khi được chiếu xạ, nguyên nhân là do các hạt nano đã gắn được với protein A, đồng thời protein A đã gắn với biotin-FITC, chất có thể phát ánh sáng ở bước sóng 485 nm. Ngoài ra, hình 24a còn cho thấy do các hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  có kích thước nhỏ hơn nên có sự kết tụ nhiều hơn. Trong khi đó, ở hình 24c, các hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  với kích thước lớn hơn nên kết tụ ít hơn. Ở chiều ngược lại, hình 24b và 24d tương ứng với kích thước hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  là 10 nm và 30 nm, cho thấy các hạt không phát sáng, nguyên nhân do các hạt nano gắn protein A được gắn biotin, trước khi gắn biotin-FITC, nên hầu hết các protein A đã gắn với biotin và gần như không còn protein A nào gắn với biotin-FITC nên các hạt không phát sáng.



**Hình 24.** Ảnh hiển vi điện tử huỳnh quang của các hạt nano  $Fe_3O_4/SiO_2/NH_2/CHO/protein A$  khi gắn biotin-FITC: a) hạt  $Fe_3O_4$  10 nm, c) hạt  $Fe_3O_4$  30 nm. Và ảnh hiển vi điện tử huỳnh quang của các hạt nano  $Fe_3O_4/SiO_2/NH_2/CHO/protein A/biotin$  khi gắn biotin-FITC: b) hạt  $Fe_3O_4$  10 nm, d) hạt  $Fe_3O_4$  30 nm.

Trong vùng phổ UV-Vis, đỉnh đặc trưng cho protein là 280 nm (Pan, B., Gao, F., & Gu, H. 2004). Vì thế, phổ UV-Vis được sử dụng để xác định khả năng gắn kết của các hạt nano với protein, thông qua việc so sánh cường độ đỉnh tại 280 nm của dung dịch protein trước và sau khi gắn kết với các hạt nano. Phổ UV-Vis của dung dịch protein A trước khi gắn với các hạt nano được thể hiện ở hình 25a có đỉnh tại 280 nm cao hơn đỉnh tại 280 nm so với ở hình 25b và 25c, vì ở đây chúng là các phổ của dung dịch protein A sau khi gắn kết với các hạt nano

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2/\text{CHO}$ . Điều này cho thấy rằng, nồng độ của dung dịch protein A sau khi gắn với các hạt nano đã giảm, là do một phần protein A có trong dung dịch đã gắn kết được với các hạt nano. Ngoài ra, đỉnh tại 280 nm trong hình 25b ứng với hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  30 nm, cao hơn đỉnh tại 280 nm ở hình 25c ứng với hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  10 nm, cho thấy hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  có kích thước nhỏ có khả năng gắn kết với nhiều nhóm chức hơn và qua đó làm tăng khả năng gắn kết protein.



**Hình 25.** Phổ UV-Vis của dung dịch protein A: a) trước khi gắn; b) sau khi gắn với  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2/\text{CHO}$ , kích thước hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  30 nm; và c) sau khi gắn với  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2/\text{CHO}$ , kích thước hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  10 nm.

#### 4.1.5. Hiệu suất gắn kết protein A với các hạt nano từ

**Bảng 3.** Hiệu suất gắn kết protein A với các hạt nano.

Lượng hạt Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SiO <sub>2</sub> /NH <sub>2</sub> /CHO, mg	Kích thước hạt Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , nm	Nồng độ dung dịch protein A, mg/ml		Hiệu suất gắn kết, %
		Trước gắn kết	Sau gắn kết	
20	10	0,034	0,006	82,35
20	30	0.034	0,013	61,76

Sử dụng phương pháp Bradford (Bradford, M. 1976), để xác định hiệu suất gắn kết của các hạt nano với dung dịch protein A. Theo đó, 3 mL dung dịch Bradford được cho vào 100 µl dung dịch các mẫu, trong đó 5 mẫu chuẩn đã biết nồng độ và các mẫu cần xác định nồng độ. Độ hấp thụ của các dung dịch được thực hiện bằng máy quang phổ ở bước sóng 595 nm, từ các mẫu chuẩn suy được phương trình  $f(x) = 8,7536 x + 0,1495$ ;  $R^2 = 0.9401$ . Từ đó, có thể suy được nồng độ của dung dịch protein A sau gắn kết. Và hiệu suất gắn kết protein A với các hạt nano được xác định dựa vào biểu thức  $E\% = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100$  (Hu, B. 2009), trong đó  $C_0$ ,  $C_1$  lần lượt là nồng độ dung dịch protein A trước và sau khi gắn kết. Kết quả từ Bảng 1 chỉ ra rằng hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> có kích thước 10 nm sau khi được chức năng hóa có thể gắn protein A tốt hơn và đạt 82,35%. Trong khi hạt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 30 nm với cùng điều kiện gắn kết lại cho hiệu suất gắn kết protein A thấp hơn và chỉ đạt 61,76%.

#### 4.2. Kết luận và kiến nghị

Trong nghiên cứu này, các hạt nano Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> với các kích thước 10 nm và 30 nm được chế tạo bằng phương pháp đồng kết tủa và kích thước của các hạt được điều chỉnh thông qua thay đổi tốc độ đưa dung dịch bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối sắt II và III. Kết quả thực nghiệm cho thấy, các hạt nano được tổng hợp theo cách đưa nhanh bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối sắt II và sắt III cho hạt có kích thước 10 nm, các hạt nano được tổng hợp theo cách đưa nhỏ giọt bazơ vào hỗn hợp dung dịch muối sắt II và sắt III cho hạt có kích thước 30 nm. Các hạt được chức

năng hóa bề mặt để hình thành cấu trúc  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2/\text{CHO}$ . Với cấu trúc này, hạt gắn kết được protein A. Hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  có kích thước 10 nm, sau khi được chức năng hóa, cho khả năng gắn kết nhóm chức tốt hơn và hiệu suất gắn kết protein A cũng cao hơn và đạt 82,35 %. Trong khi ở cùng điều kiện gắn kết, hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  với kích thước 30 nm lại cho khả năng gắn kết protein A thấp hơn và chỉ đạt 61,76 %. Tuy nhiên, hạt  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  với kích thước 30 nm lại có ưu điểm nổi bật là từ độ bão hòa lớn và đạt 85 emu/g, gần bằng từ độ bão hòa của  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  khối 92 emu/g, nhưng vẫn mang thuộc tính siêu thuận từ. Điều này giúp hạt đáp ứng tốt với từ trường ngoài và tái phân tán sau khi ngừng tác động của từ trường ngoài, một tính chất quan trọng đối với các ứng dụng trong y sinh nhất là các ứng dụng ngoài cơ thể.

Kết quả nghiên cứu cho thấy đã tạo được hạt nano oxít sắt từ có kích thước 10nm và 30nm với lớp phủ tương thích sinh học và gắn được với protein A. Theo nhà sản xuất Sigma thì protein A có thể gắn kết với FITC, biotin, kháng thể ở vùng Fc. Protein A gắn được với các hạt nano  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  đã được chức năng hóa bề mặt thì thông qua protein A hạt nano từ có thể gắn kết với kháng thể, FITC, biotin. Do đó, chúng tôi đề xuất phát triển đề tài này: dùng hạt nano từ với lớp phủ tương thích sinh học có gắn protein A “bắt” virus viêm gan B trong chẩn đoán bệnh viêm khàng, bắt protein Fibrinogen (một protein đặc hiệu bệnh tim mạch) trong chẩn đoán bệnh tim mạch./.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Abid, J. P., Wark, A. W., Brevet, P. F., & Girault, H. H. (2002). Preparation of silver nanoparticles in solution from a silver salt by laser irradiation. *Chemical Communications*, (7), 792-793.
- [2] Andrade, Â. L., Valente, M. A., Ferreira, J. M., & Fabris, J. D. (2012). Preparation of size-controlled nanoparticles of magnetite. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 324(10), 1753-1757.
- [3] Babes, L., Denizot, B., Tanguy, G., Le Jeune, J. J., & Jallet, P. (1999). Synthesis of iron oxide nanoparticles used as MRI contrast agents: a parametric study. *Journal of colloid and interface science*, 212(2), 474-482.
- [4] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- [5] Bull, E., Madani, S. Y., Sheth, R., Seifalian, A., Green, M., & Seifalian, A. M. (2014). Stem cell tracking using iron oxide nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 9, 1641.
- [6] Can, K., Ozmen, M., & Ersoz, M. (2009). Immobilization of albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71(1), 154-159.
- [7] Chi, Y., Yuan, Q., Li, Y., Tu, J., Zhao, L., Li, N., & Li, X. (2012). Synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-Ag magnetic nanocomposite based on small-sized and highly dispersed silver nanoparticles for catalytic reduction of 4-nitrophenol. *Journal of colloid and interface science*, 383(1), 96-102.
- [8] Cleek, R. L., Ting, K. C., Eskin, S. G., & Mikos, A. G. (1997). Microparticles of poly (DL-lactic-co-glycolic acid)/poly (ethylene glycol) blends for controlled drug delivery. *Journal of controlled release*, 48(2), 259-268.
- [9] Cui, Q., Hou, Y., Hou, J., Pan, P., Li, L. Y., Bai, G., & Luo, G. (2012). Preparation of functionalized alkynyl magnetic microspheres for the selective enrichment of cell glycoproteins based on click chemistry. *Biomacromolecules*, 14(1), 124-131.
- [10] Faraji, M., Yamini, Y., & Rezaee, M. (2010). Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 7(1), 1-37.

- [11] Franzel, L., Bertino, M. F., Huba, Z. J., & Carpenter, E. E. (2012). Synthesis of magnetic nanoparticles by pulsed laser ablation. *Applied Surface Science*, 261, 332-336.
- [12] Girginova, P. I., Daniel-da-Silva, A. L., Lopes, C. B., Figueira, P., Otero, M., Amaral, V. S., ... & Trindade, T. (2010). Silica coated magnetite particles for magnetic removal of Hg<sup>2+</sup> from water. *Journal of colloid and interface science*, 345(2), 234-240.
- [13] Gruttner, C., Muller, K., & Teller, J. (2013). Comparison of strain-promoted alkyne-azide cycloaddition with established methods for conjugation of biomolecules to magnetic nanoparticles. *IEEE Transactions on Magnetics*, 49(1), 172-176.
- [14] Hai, T. H., Phuc, L. H., Vinh, L. K., Long, B. D., Kieu, T., Bich, N., ... & Tam, N. (2011). Immobilising of anti-HPV18 and E. coli O157: H7 antibodies on magnetic silica-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> for early diagnosis of cervical cancer and diarrhoea. *International Journal of Nanotechnology*, 8(3-5), 383-398.
- [15] Hou, Y., Han, X., Chen, J., Li, Z., Chen, X., & Gai, L. (2013). Isolation of PCR-ready genomic DNA from *Aspergillus niger* cells with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> microspheres. *Separation and Purification Technology*, 116, 101-106.
- [16] Hu, B., Pan, J., Yu, H. L., Liu, J. W., & Xu, J. H. (2009). Immobilization of *Serratia marcescens* lipase onto amino-functionalized magnetic nanoparticles for repeated use in enzymatic synthesis of Diltiazem intermediate. *Process Biochemistry*, 44(9), 1019-1024.
- [17] Kango, S., Kalia, S., Celli, A., Njuguna, J., Habibi, Y., & Kumar, R. (2013). Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic–inorganic nanocomposites—a review. *Progress in Polymer Science*, 38(8), 1232-1261.
- [18] Khodashenas, B., & Ghorbani, H. R. (2015). Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. *Arabian Journal of Chemistry*.
- [19] Kim, D., Jeong, S., & Moon, J. (2006). Synthesis of silver nanoparticles using the polyol process and the influence of precursor injection. *Nanotechnology*, 17(16), 4019-4024.
- [20] Klotz, M., Ayrál, A., Guizard, C., Ménager, C., & Cabuil, V. (1999). Silica coating on colloidal maghemite particles. *Journal of colloid and interface science*, 220(2), 357-361.

- [21] LaMer, V. K., & Dinegar, R. H. (1950). Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. *Journal of the American Chemical Society*, 72(11), 4847-4854.
- [22] Liu, X., Ma, Z., Xing, J., & Liu, H. (2004). Preparation and characterization of amino-silane modified superparamagnetic silica nanospheres. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 270(1), 1-6.
- [23] Mascolo, M. C., Pei, Y., & Ring, T. A. (2013). Room temperature coprecipitation synthesis of magnetite nanoparticles in a large pH window with different bases. *Materials*, 6(12), 5549-5567.
- [24] Massart, R. (1981). Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE transactions on magnetics*, 17(2), 1247-1248.
- [25] Melzak, K. A., Sherwood, C. S., Turner, R. F., & Haynes, C. A. (1996). Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions. *Journal of colloid and interface science*, 181(2), 635-644.
- [26] Minko, S. (2008). Grafting on solid surfaces: "Grafting to" and "grafting from" methods. In *Polymer surfaces and interfaces* (pp. 215-234). Springer Berlin Heidelberg.
- [27] Pan, B., Gao, F., & Gu, H. (2004). Synthesis and characterization of surface-hyperbranched magnetite nanoparticle for bovine serum albumin immobilization. *China Particuology*, 2(6), 261-265.
- [28] Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K., & Dobson, J. J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*, 36(13), R167..
- [29] Paul, R. C., Narula, R. C., & Vasisht, S. K. (1977). Some compounds of iron (III) with bidentate bases. *Transition Metal Chemistry*, 2(1), 152-154.
- [30] Pimpha, N., Chaleawler-umpon, S., Chruengkamlow, N., & Kasinrerak, W. (2011). Preparation of anti-CD4 monoclonal antibody-conjugated magnetic poly (glycidyl methacrylate) particles and their application on CD4+ lymphocyte separation. *Talanta*, 84(1), 89-97.
- [31] Cleek, R. L., Ting, K. C., Eskin, S. G., & Mikos, A. G. (1997). Microparticles of poly (DL-lactic-co-glycolic acid)/poly (ethylene glycol) blends for controlled drug delivery. *Journal of controlled release*, 48(2), 259-268.
- [32] Rudashevskaya, E. L., Breitwieser, F. P., Huber, M. L., Colinge, J., Müller, A. C., & Bennett, K. L. (2013). Multiple and sequential data acquisition method: An improved method for fragmentation and detection of cross-linked peptides on a



hybrid linear trap quadrupole Orbitrap Velos mass spectrometer. *Analytical chemistry*, 85(3), 1454-1461.

[33] Shao, D., Xia, A., Hu, J., Wang, C., & Yu, W. (2008). Monodispersed magnetite/silica composite microspheres: preparation and application for plasmid DNA purification. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 322(1), 61-65.

[34] Shen, Y. F., Tang, J., Nie, Z. H., Wang, Y. D., Ren, Y., & Zuo, L. (2009). Preparation and application of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for wastewater purification. *Separation and Purification Technology*, 68(3), 312-319.

[35] Stöber, W., Fink, A., & Bohn, E. (1968). Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of colloid and interface science*, 26(1), 62-69.

[36] Tartaj, P., Morales, M. P., Veintemillas-Verdaguer, S., Gonzalez-Carreño, T., & Serna, C. J. (2006). Synthesis, properties and biomedical applications of magnetic nanoparticles. *Handbook of magnetic materials*, 16(5), 403-482..

[37] Turcheniuk, K., Tarasevych, A. V., Kukhar, V. P., Boukherroub, R., & Szunerits, S. (2013). Recent advances in surface chemistry strategies for the fabrication of functional iron oxide based magnetic nanoparticles. *Nanoscale*, 5(22), 10729-10752.

[38] Vayssieres, L., Chanéac, C., Tronc, E., & Jolivet, J. P. (1998). Size tailoring of magnetite particles formed by aqueous precipitation: An example of thermodynamic stability of nanometric oxide particles. *Journal of colloid and interface science*, 205(2), 205-212.

[39] Veisheh, O., Gunn, J. W., & Zhang, M. (2010). Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced drug delivery reviews*, 62(3), 284-304.

[40] Wang, B., Wei, Q., & Qu, S. (2013). Synthesis and characterization of uniform and crystalline magnetite nanoparticles via oxidation-precipitation and modified co-precipitation methods. *Int J Electrochem Sci*, 8, 3786-3793.

[41] Xue, X., Wang, J., Mei, L., Wang, Z., Qi, K., & Yang, B. (2013). Recognition and enrichment specificity of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles surface modified by chitosan and Staphylococcus aureus enterotoxins A antiserum. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 107-113.

[42] Zhao, J., Milanova, M., Warmoeskerken, M. M., & Dutschk, V. (2012). Surface modification of TiO<sub>2</sub> nanoparticles with silane coupling agents. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, 413, 273-279.

[43] Zhu, J., Liu, S., Palchik, O., Kolytyn, Y., & Gedanken, A. (2000). Shape-controlled synthesis of silver nanoparticles by pulse sonoelectrochemical methods. *Langmuir*, 16(16), 6396-6399.

[44] Zou, J., Peng, Y. G., & Tang, Y. Y. (2014). A facile bi-phase synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ SiO<sub>2</sub> core-shell nanoparticles with tunable film thicknesses. *RSC Advances*, 4(19), 9693-9700.

**Trên Internet:**

[44] <http://www.gitam.edu/eresource/nano/nanotechnology/topdow>.

[ 45 ] <https://www.thermofisher.com>

[ 46 ] <https://www.thermofisher.com>.