

# Co@SiO<sub>2</sub>核壳式纳米磁性粒子的合成、性质表征及在细胞分离和细胞芯片上的应用

郭小英<sup>1</sup>, 王永宁<sup>2</sup>, 顾林岗<sup>3</sup>, 贺艳峰<sup>4</sup>, 张春秀<sup>1</sup>, 唐祖明<sup>1</sup>, 陆祖宏<sup>1</sup>

(1. 东南大学生物科学与医学工程系, 吴健雄生物分子与电子学国家重点实验室, 南京 210096;

2. 中国科学院理化技术研究所, 北京 100080; 3. 江苏省公安厅物证鉴定中心, 南京 210024;

4. 东南大学公共卫生学院, 南京 210009)

**摘要** 合成了 Co@SiO<sub>2</sub>核壳式纳米粒子, 并采用透射电镜(TEM)、X射线衍射(XRD)、扫描电镜(SEM)和振动样品磁强计(VSM)对其形状、尺寸、荧光及磁特性进行了表征, 探讨了其在细胞分离和细胞芯片上的应用和原理.

**关键词** 核壳式; 纳米磁珠; 细胞芯片; 细胞分离

**中图分类号** O647.2

**文献标识码** A

**文章编号** 0251-0790(2006)09-1725-04

纳米化的磁性粒子由于同时具备磁性颗粒和纳米颗粒的双重优势, 受到越来越多的关注, 已被广泛应用于生物、医学、化学、环境保护等领域中. 细胞(尤其是造血干细胞)的分离<sup>[1]</sup>是近年来纳米磁性粒子的一个重要研究方向. 由于它同时具有磁性颗粒的磁性和纳米粒子的大比表面积, 使得它比传统的大粒径磁珠具有更大的优势, 但也存在其自身难以克服的缺点, 影响了它的大规模制备和保存, 这是因为高比表面积造成了大量原子变成活泼的表面原子, 形成众多的表面晶格缺陷, 具有很高的表面能, 这些因素使得纳米粒子从生成的瞬间开始就具有强烈的自发团聚的倾向.

根据胶体理论, 二氧化硅容易在溶液中生成单分散粒子, 许多文献已证明这些粒子可以靠吸附带电基团来防止团聚, 因此用它来作为纳米粒子的壳层受到了很多研究者的关注<sup>[2]</sup>.

本文合成了球形的 Co@SiO<sub>2</sub>核壳式纳米粒子, 对它的结构、性质进行了表征, 同时将其应用于细胞分离和细胞芯片. 这种核壳式纳米粒子的壳层不仅能够隔绝空气的氧化, 而且能够防止纳米粒子增大. 但这种粒子也存在一些缺陷, 使其应用受到局限.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

无水乙醇(分析纯, 南京化学试剂有限公司); 柠檬酸(分析纯, 上海试剂四厂); 六水硝酸钴, 硼氢化钾, 正硅酸乙酯(TEOS), 均为分析纯(上海化学试剂有限公司); 3-氨基丙基三甲氧基硅烷(APTES), 纯度 >98% (Sigma 公司); Millipore 超纯水, 阻抗值为 18.2 MΩ; 纯度为 99.9% 的高纯氮气(南京 55 所); 质量浓度为 0.2 g/L 的抗体 anti-CD45(晶美生物技术公司); AOB 血型分型试剂(南京军区军事医学研究所).

密闭 PMMA 手套箱(本实验室自行设计); 磁力加热搅拌器, SHA-B 型恒温振荡器(常州国华电器有限公司); Avanti™ J-30I 离心机(Beckman Coulter 公司); 箱式电炉 SX2 系列(上海浦东荣丰科学仪器有限公司). S-3000N 型扫描电镜(SEM)(Hitachi 公司). X 射线衍射图谱分析仪(日本理学 Rigaku 公

收稿日期: 2005-09-21.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 60121101, 60223002)和国家高新技术研究发展计划项目(批准号: 2002AA2Z2041, 2004AA302070)资助.

联系人简介: 陆祖宏(1960 年出生), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物芯片、生物信息学与系统生物学研究.

E-mail: zhlu@seu.edu.cn

司). JEM-200CX 型透射电镜(TEM)(日本电子公司). TE300 倒置显微镜(日本 Nikon 公司).

## 1.2 实验过程

1.2.1 磁性纳米粒子的制备 参照文献[3]的方法,在手套箱中于氮气保护下,将 0.2 mL 浓度为 0.4 mol/L 的  $\text{CoCl}_2$  水溶液加入到 200 mL 含有柠檬酸的经过排氧处理的  $4 \times 10^{-3}$  mol/L 的硼氢化钾水溶液中,灰黑色分散系出现表示钴的生成.在 800 mL 乙醇中加入 14.4  $\mu\text{L}$  的 APTES 和 170  $\mu\text{L}$  的 TEOS,在磁力搅拌下将合成的 200 mL Co 水溶胶快速倒入上述溶液中,搅拌 5 min 后陈化 30 min,然后以 10 000 r/min 的转速离心 20 min,最后在箱式电炉中于 500  $^\circ\text{C}$  煅烧 2 h.

1.2.2 表面处理过程 参考文献[4]和[5]的方法,将经煅烧处理的磁珠用 0.001 mol/L 的稀盐酸超声清洗 10 min,磁性分离后,加入含有 APTES 的质量分数为 95% 的丙酮水溶液,振摇 20 min,磁性分离后加入质量分数为 5% 的戊二醛-磷酸盐(PBS)缓冲液,震荡 3 h,洗涤后磁性分离,于 37  $^\circ\text{C}$  下烘干.

1.2.3 表征 采用透射电镜(TEM),X 射线衍射(XRD),扫描电镜(SEM)和振动样品磁强计(VSM)等方法进行表征.

## 2 结果与讨论

### 2.1 性质表征

2.1.1 形貌特征 图 1 为所制得的磁性纳米粒子的 TEM 照片.

从图 1 可以看出,制得的核壳式  $\text{Co}@ \text{SiO}_2$  的形状呈现规则的球形,粒子之间存在明显的界限,粒子的核与壳结合紧密.壳层致密,基本为单核.单个核的直径在 20 ~ 30 nm 之间,外壳的厚度约为 30 ~ 40 nm,整个粒子的直径约为 80 ~ 120 nm.根据文献[3],调整反应中柠檬酸的用量可以调整核的大小.在实验中,加大柠檬酸的用量会导致硼氢化钾的用量成倍提高,但其核的直径仍无法低于 10 nm,最小大于 15 nm.达不到单磁筹所需要的粒子尺寸要求,因此这种粒子很难达到超顺磁性,撤去磁场后将会存在剩磁.

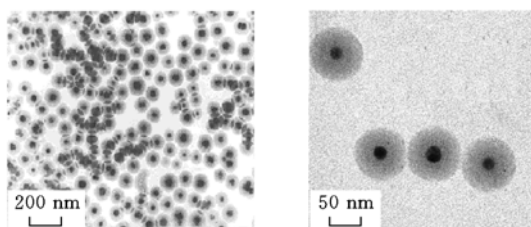


Fig. 1 TEM pictures of the core-shell  $\text{Co}@ \text{SiO}_2$

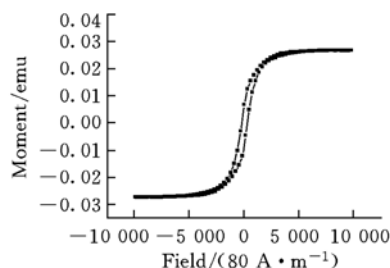


Fig. 2 Magnetic loop by VSM of  $\text{Co}@ \text{SiO}_2$

2.1.2 磁特性 用 VSM 测得的磁滞回线的结果如图 2,在撤去磁场后,该粒子仍有少量剩磁,其矫顽力(Coercivity)为  $5.8 \times 10^6$  A/(m·g),经过磁化后剩磁为 2.290 6 emu/g,饱和磁化强度为 8.437 5 emu/g.这种剩磁将导致磁场作用后粒子的轻度聚集,但它比超顺磁粒子对磁场的反应快,对磁场强度的要求低.

### 2.2 在血细胞分离中的应用

将磁性粒子的表面经过硅烷化和醛基化处理后,分别与抗 A 型红细胞抗体和抗 CD45 抗体进行连接,所得到的特异性磁珠可以用来分离血液中的 A 型红细胞和含 CD45 表面抗原的白细胞.取 A 型或 AB 型血液标本,分离出红细胞和淋巴细胞,加入相应的抗体偶联磁珠,在 37  $^\circ\text{C}$  下振荡 30 min 后,进行磁性分离,用质量分数为 2.5% 的戊二醛溶液浸泡 1 h 后,用体积分数为 60%, 70%, 80%, 90% 和 100% 的酒精溶液依次浸泡 30 min 后,在扫描电镜下观察.

图 3(A)为红细胞与磁珠反应后的 SEM 图像.由图 3(A)可见,光滑的红细胞表面结合了大量磁珠,而且从图 3(B)可以看出,这些磁珠并非都是单层排列,这是由于磁珠上的剩磁造成的.图 3(C)为含有 CD45 表面抗原的 B 淋巴细胞,其表面有很多微绒毛,直径大约为 100 nm,大量的绒毛之间则集中了很多磁珠,几乎所有绒毛都被磁珠包裹,说明这种淋巴细胞的 CD45 表面抗原大量处在有伸展的微绒毛部分.磁珠的大量不规则富集也说明剩磁造成了磁珠的大量聚集,从而大大降低了磁珠的利

用效率. 图 3(D) 是没有经过磁珠免疫反应的红细胞与白细胞, 表面光滑类似柿饼状的为红细胞 (RBC), 其围的细胞为白细胞. 图 3(E) 是表面经过磁珠免疫反应的中性粒细胞, 属于 3 叶粒细胞, 核与核之间由细丝相连, 总长约 15  $\mu\text{m}$ .

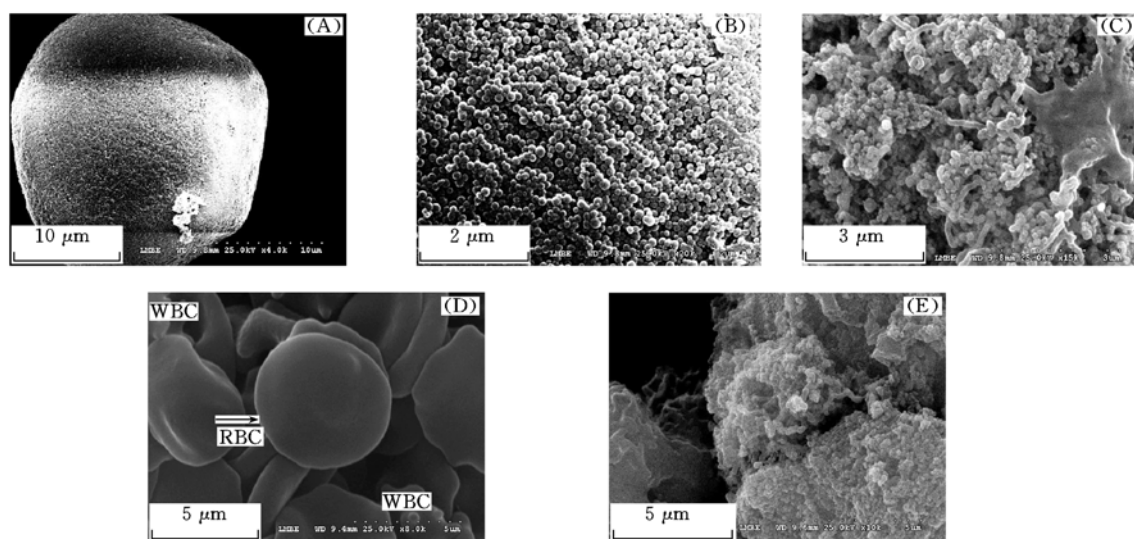


Fig. 3 SEM pictures of red blood cells and white blood cells

(A) A red blood cell combined with immuno magnetic Co@SiO<sub>2</sub>; (B) magnified picture of the picture(A), which was filled with 100 nanometer magnetic Co@SiO<sub>2</sub>; (C) lymphocyte with many tiny magnetic particles among its naps; (D) blank red blood cells (RBC) and white blood cells(WBC); (E) 3 leaves neutrophilic granulocyte.

### 2.3 应用于白细胞分型芯片

本实验室曾成功地开发了白血病免疫分型芯片<sup>[6,7]</sup>, 实验中用于分型的特异性抗体需要固定在经过修饰的玻璃片上. 玻璃片的修饰需要繁杂的处理手续, 而且必须将白细胞从血液标本中分离出来, 不能使用全血溶液.

采用修饰有 CD45 抗体的核壳式 Co@SiO<sub>2</sub> 纳米粒子, 在简单清洗干净的玻片上点布上同样大小的连有抗体的磁珠点阵, 将玻片放在磁板的上方, 取适量的全血溶液用 PBS 溶液稀释平铺后, 连同磁板一起放在 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温振荡器中温育 20 min, 在磁板的保护下用 PBS 溶液冲洗掉玻片上位结合的红细胞, 显微镜下观察玻片上的细胞情况.

图 4 中的白色小点为表面有 CD45 的白细胞. 由图 4 可以看出, 虽然有众多红细胞的干扰, 直接分离白细胞的效率仍然较高. 这是由于磁珠表面结合的大量抗体呈立体分布, 它与血液中细胞的接触是一个立体的球面. 固定在磁珠表面上的抗体与血液中相应的细胞接触的几率要远远大于在玻璃表面固定的抗体.

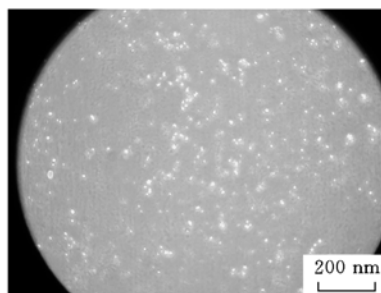


Fig. 4 The microscope picture of attachment-free immunophenotyping leukemias and lymphomas biochip by utilizing of Co@SiO<sub>2</sub>

## 3 结 论

采用硼氢化钾还原后直接进行表面包敷的方法合成了 Co@SiO<sub>2</sub> 粒子, 其操作简单, 合成的粒子形状完美, 生成的纳米钴在二氧化硅的保护下稳定, 不易被氧化. 将这种核壳式纳米粒子用于细胞分离, 方法简单, 分离效率高. 但其工艺尚存在一些缺点: 纳米钴核的直径较大, 改善合成条件虽然能够调节粒径, 但很难使其小到 10 nm 以下, 因此很难达到超顺磁性; 磁珠表面的二氧化硅层不能在酸或碱性溶液中长久存放, 否则会降低磁珠的稳定性. 这些缺点的存在使得这种核壳式粒子在生物上的应用受到了一定限制.

## 参 考 文 献

- [ 1 ] McCloskey K. E. , Chalmers J. J. , Zborowski M. . *Anal. Chem.* [J], 2003, **75**: 6868—6874
- [ 2 ] Wagner J. , Autenrieth T. , Hempelmann R. . *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*[J], 2002, **252**: 4—6
- [ 3 ] Kobayashi Y. , Horie M. , Konno M. *et al.* . *J. Phys. Chem. B*[J], 2003, **107**: 7420—7425
- [ 4 ] ZHANG Chun-Xiu(张春秀), MEI Qian(梅茜), GU Ying(顾莹) *et al.* . *Chinese Journal of Laboratory Medicine(中华医学检验杂志)*[J], 2003, **26**(4): 219—221
- [ 5 ] JIANG Zhong-Hua(蒋中华), ZHANG Jin-Hui(张津辉). *Immobilization Technologies of Biomolecules and Their Applications(生物分子固定化技术及应用)*[M], Beijing: Chemical Industry Press(化学工业出版社), 1998
- [ 6 ] YANG Yu-Zhi(杨玉志), ZHANG Chun-Xiu(张春秀), TANG Zu-Ming(唐祖明) *et al.* . *Chinese Journal of Laboratory Medicine(中华医学检验杂志)*[J], 2005, **28**(4): 437
- [ 7 ] Yang Y. Z. , Zhang C. X. , Tang Z. M. *et al.* . *Clinical Chemistry*[J], 2005, **51**(5): 910—911

## Synthesis Property Characterization of Core-shell Co@SiO<sub>2</sub> Magnetic Nanoparticle and Its Biomedical Applications to Cell Separation and Cell Chip

GUO Xiao-Ying<sup>1</sup>, WANG Yong-Ning<sup>2</sup>, GU Lin-Gang<sup>3</sup>, HE Yan-Feng<sup>4</sup>,  
ZHANG Chun-Xiu<sup>1</sup>, TANG Zu-Ming<sup>1</sup>, LU Zu-Hong<sup>1\*</sup>

- (1. *State Key Laboratory of Molecular and Biomolecular Electronics, Southeast University, Nanjing 210096, China;*
- 2. Technical Institute of Physical and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;*
- 3. Division of the Criminal Investigation, Department of Jiangsu Provincial Public Security, Nanjing 210024, China;*
- 4. College of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009, China)*

**Abstract** In this paper, Co@SiO<sub>2</sub> nanoparticles with the apparent core-shell magnetic nanostructure were synthesized by reducing and hydrolysis in aqueous solutions. The TEM, VSM, SEM, and the confocal fluorescence microscope were utilized to characterize the morphology, size, magnetism of the Co@SiO<sub>2</sub> nanoparticles, and the core-shell materials were applied to the cell separation, immunophenotyping of leukemias and lymphomas diagnostics chip, in which strenuous procedures were omitted by the use of the magnetic core-shell nanoparticles, and separation. These core-shell nanoparticles were proved to have obvious cores and shell, and the cores have strong magnetism, and the shell protected these nanosized metal particles from coagulation due to anisotropic dipolar attraction and oxidation very well. However this method could not limited the original cores below the size of 10 nm, which is the critical size of superparamagnetism, as a result coagulation due to remanent magnetism limited this core-shell particles from further applications in bioseparation.

**Keywords** Core-shell; Magnetic nanoparticle; Immunophenotyping of leukemias and lymphomas; Cell separation

(Ed. : V, I)