

NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP TÁCH PHÂN TỬ ACID NUCLEIC TỪ MẪU PHẨM SINH HỌC BẰNG HẠT NANO SẮT TỪ

RESEARCH ON A METHOD OF NUCLEIC ACID ISOLATION FROM BIOLOGICAL SAMPLES USING FERROMAGNETIC NANO PARTICLES

Nguyễn Tường Vân¹, Phạm Thị Thu Vân¹, Ngô Diệu Quỳnh², Đặng Đức Long²

¹Bệnh viện C Đà Nẵng

²Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng; ddlong@dut.edu.vn

Tóm tắt - Việc tách chiết các phân tử acid nucleic từ các mẫu sinh học là một việc cơ bản được tiến hành thường xuyên trong sinh học phân tử. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu ứng dụng hạt nano sắt từ trong thu tách acid nucleic, cụ thể xây dựng một quy trình tách DNA từ mẫu vi khuẩn một cách đơn giản, nhanh tại phòng thí nghiệm. Hạt nano sắt từ được tổng hợp theo phương pháp đồng kết tủa sử dụng hỗn hợp muối Fe_2SO_4 và FeCl_3 trong môi trường kiềm với điều kiện không có oxy, pH = 12,3. Các yếu tố ảnh hưởng đến số lượng và chất lượng DNA được khảo sát, qua đó, quy trình thu tách DNA được thực hiện với các thông số pH = 8, nồng độ dung dịch NaCl 3M, PEG 6000 10%, 25°C và được rửa bằng ethanol 99%.

Từ khóa - hạt nano từ tính; thu tách acid nucleic; PEG; NaCl; ethanol.

1. Đặt vấn đề

Với sự phát triển nhanh chóng của mảng sinh học phân tử, nhu cầu tìm ra phương pháp tách chiết các phân tử acid nucleic số lượng lớn, nhanh hơn, đơn giản hơn ngày càng cấp thiết, mà các phương pháp hóa học truyền thống phenol-cloroform không đáp ứng được. Trong lĩnh vực phân tách và tinh sạch sinh học, kỹ thuật sử dụng chất mang từ tính đang trở thành công cụ ngày càng phổ biến để tách các phân tử sinh học như acid nucleic, protein [2].

Những năm gần đây, hạt nano từ tính, cụ thể là hạt nano sắt từ được ứng dụng rộng rãi trong một số lĩnh vực của y sinh học, sinh học phân tử nhờ tính chất ưu việt của vật liệu nano từ [2], [8], [9]. Với mức kích thước nano, các hạt nano từ tính giúp cho chúng ta có thể thao tác ở qui mô phân tử và tế bào. So với vật liệu từ dạng khối, hạt nanosắt từ Fe_3O_4 có lực kháng từ rất nhỏ (gần bằng không) và từ độ bão hòa cao hơn nên chúng rất nhạy với sự thay đổi của từ trường bên ngoài [10].

Có hai hướng tạo hạt nano sắt từ: thứ nhất là nghiền vật liệu khối đến kích thước nano; thứ hai là tổng hợp hạt nano từ các nguyên tử. Cách thứ hai đang được sử dụng rộng rãi hơn so với cách thứ nhất vì hiệu suất cao, dễ thực hiện và dễ điều khiển kích thước hạt tạo thành [10]. Trong đó, phương pháp tiêu biểu của nguyên tắc này là phương pháp đồng kết tủa. Khi tổng hợp hạt nano sắt từ bằng phương pháp đồng kết tủa thì kích thước hạt phụ thuộc vào pH môi trường, nồng độ các tiền chất [8], [4].

Bên cạnh khả năng thu tách acid nucleic từ mẫu bằng hạt nano sắt từ, chất lượng và độ tinh sạch của các phân tử này cũng là một yếu tố quan trọng cần phải đảm bảo. Các hạt nano sắt từ có thể liên kết không chọn lọc với cả acid nucleic và protein. Do đó, quá trình thu tách acid nucleic cần sử dụng thêm chất giúp hấp phụ chọn lọc acid nucleic với hạt nano

Abstract - Isolating nucleic acids from biological samples is a basic task carried out frequently in molecular biology field. The application of ferromagnetic nanoparticles for a simple, quick nucleic acid isolation process is the goal of this study. Ferromagnetic nanoparticles are synthesized by a coprecipitation method using a mixture of Fe_2SO_4 and FeCl_3 in a non - oxygen condition and a strong alkaline medium with pH = 12.3. Factors affecting quantity and quality of isolated DNA were investigated. Based on this, DNA isolation process was formed with identified parameters: pH = 8, NaCl solution 3M, PEG 6000 10%, 25°C, then washed by EtOH 99%.

Key words - ferromagnetic nanoparticles; nucleic acid isolation; PEG; NaCl; ethanol.

sắt từ. Thông thường các phân tử protein chia các nhóm ưa nước ra bề mặt, tạo nên khả năng tan trong nước của protein. Nồng độ muối cao là một yếu tố gây tủa protein, hạn chế sự hòa tan của protein trong môi trường [5]. Polyethylene glycol (PEG) có trọng lượng phân tử cao được nhận thấy có khả năng giảm sự hút bám của protein lên hạt nano sắt từ [6].

Từ các vấn đề nói trên, nghiên cứu được thực hiện hướng đến tìm ra phương pháp tách chiết acid nucleic, mà cụ thể ở đây là Deoxyribo Nucleic Acid (DNA) mới bằng hạt nano sắt từ tự tổng hợp tại phòng thí nghiệm. Phương pháp này nhanh hơn, đơn giản hơn, an toàn hơn so với phương pháp hóa học truyền thống.

2. Kết quả nghiên cứu và khảo sát

2.1. Tổng hợp hạt nano sắt từ

2.1.1. Khảo sát ảnh hưởng của oxy lên từ tính của hạt nano sắt từ

Hạt nano sắt từ được tổng hợp theo phương pháp đồng kết tủa dung dịch Fe_2SO_4 0,1 M và dung dịch FeCl_3 0,2 M trong môi trường kiềm. Mỗi thí nghiệm tổng hợp được lập 3 lần.

Thí nghiệm được thực hiện ở pH = 12, nhiệt độ 60°C và khuấy từ 400 vòng/phút. Tỷ lệ mol Fe^{2+} : Fe^{3+} : OH^- là 1:2:8. Dung dịch amoniac được dùng làm chất tạo môi trường kiềm và nhỏ giọt từ từ vào hỗn hợp dung dịch muối Fe_2SO_4 và FeCl_3 . Sản phẩm thu được sau phản ứng được rửa nhiều lần bằng nước cất đến khi pH nước rửa về 7 và bảo quản trong nước cất đã sục khí trơ.

Trong thí nghiệm 1 phản ứng thực hiện trong môi trường sục khí trơ. Ở thí nghiệm 2, phản ứng đồng kết tủa xảy ra trong điều kiện không sục khí trơ. Sản phẩm của thí nghiệm 1 và thí nghiệm 2 lần lượt gọi là MNP a và MNP b.

Phản ứng đồng kết tủa xảy ra trong thí nghiệm:



Thời gian hạt nano sắt từ lắng xuống đáy bình thủy tinh và tạo ra sự phân lớp được dùng để so sánh sơ bộ tương đối kích thước và từ tính của MNP a và MNP b. Thời gian để nam châm hút sạch hạt sắt từ ra khỏi môi trường dùng để so sánh tương đối từ tính của hai mẫu sản phẩm.

Không có sự chênh lệch lớn về thời gian lắng của MNP a và MNP b. Tuy nhiên, mẫu MNP a bị hút bởi nam châm nhanh hơn so với mẫu MNP b.

2.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường lên kích thước và từ tính hạt nano oxit sắt từ

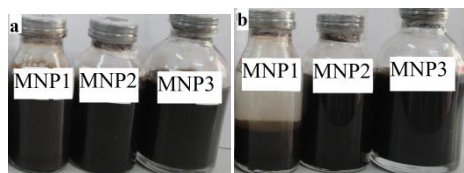
Yếu tố pH môi trường được thay đổi tại các giá trị pH là 12; 12,3 và 12,6. Phản ứng tổng hợp được tiến hành trong điều kiện sức khí trơ, nhiệt độ môi trường nhiệt độ 60°C và khuấy từ 400 vòng/phút. Mỗi thí nghiệm được lặp 3 lần.

Ba thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện không có oxi, nhiệt độ 60°C và khuấy từ 400 vòng/phút.

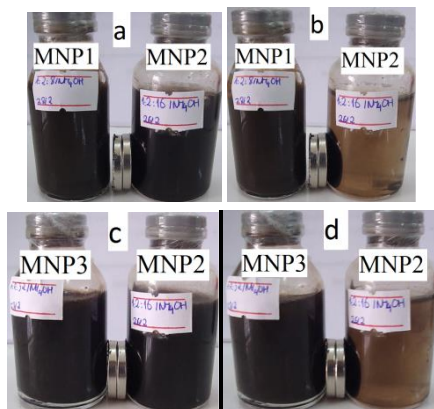
Bảng 1. Điều kiện của các hệ phản ứng

STT	Thí nghiệm	Tỷ lệ mol $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}:\text{OH}^-$	pH môi trường	Ký hiệu sản phẩm
1	TN 1	1:2:8	12	MNP1
2	TN 2	1:2:16	12,3	MNP2
3	TN 3	1:2:32	12,6	MNP3

Về kích thước hạt, MNP 2 và MNP 3 có thời gian lắng lâu hơn MNP1. Sau 10 phút, MNP1 đã tách lớp rõ rệt.



Hình 1. Hạt nano sắt từ: (a) Huyền phù hạt nano sắt từ; (b) Hạt nano sắt từ sau thời gian lắng 10 phút



Hình 2. Hạt nano sắt từ: (a)-(b) Mẫu MNP1 và MNP2 trước và sau khi bị nam châm hút; (c)-(d) Mẫu MNP2 và MNP3 trước và sau khi bị nam châm hút

Về từ tính, MNP2 có từ tính mạnh nhất trong 3 mẫu sản phẩm. Sau 10 giây, hầu hết các hạt nano oxit sắt từ MNP2 đã bị hút lại bởi nam châm, trong khi MNP1 và MNP3 bị hút chậm hơn.

2.2. Tách chiết DNA bằng hạt nano sắt từ

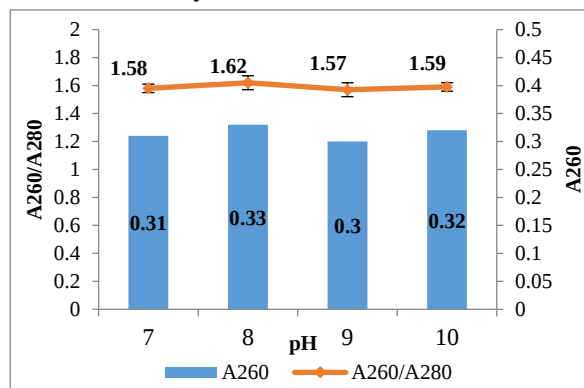
Dịch tế bào vi khuẩn *Bacillus subtilis* sau khi nuôi qua đêm được thu nhận và tiến hành ly giải phá màng tế bào bằng

SDS. pH môi trường được duy trì bằng đệm TE 1X. Dịch ly giải được trộn đều với binding buffer (PEG 6000 10%, NaCl 1,5 M), rồi ủ với 1mg hạt nano sắt từ trong 10 phút. Tiếp theo, loại dịch, thu giữ hạt nano sắt từ và rửa lần 1 trong ethanol tuyệt đối, rửa lần 2 với ethanol 70%. Sau cùng, giải hấp DNA khỏi hạt nano sắt từ bằng đệm TE 1X, pH=8. Lượng DNA tách được đánh giá bằng phương pháp đo độ hấp thụ quang ở bước sóng A260 và A280 và phương pháp điện di.

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường

Các giá trị pH môi trường khảo sát: 7, 8, 9 và 10 pH môi trường không ảnh hưởng rõ rệt lên lượng DNA vi khuẩn tách bằng hạt nano sắt từ. Lượng DNA thu được cao nhất khi pH môi trường bằng 8. Quan hệ giữa lượng DNA tách được và pH môi trường được thể hiện ở Hình 3.

DNA được coi là tinh sạch khi tỷ số A260/A280 nằm trong khoảng 1,8-2. Tại các mức pH khảo sát, DNA thu được đều chưa đạt yêu cầu tinh sạch.



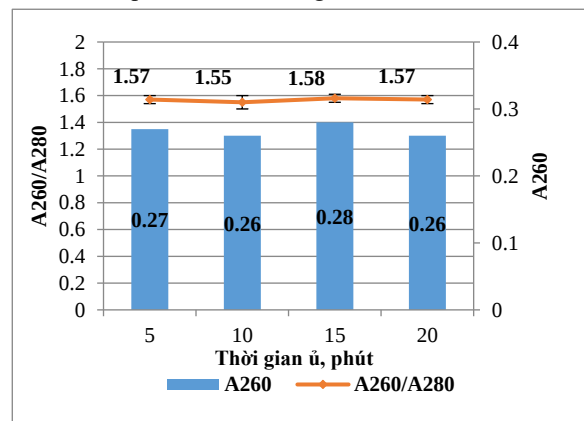
Hình 3. Giá trị A260 và độ tinh sạch của DNA thu được khi tách ở các pH khác nhau

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian ủ

Các thí nghiệm khảo sát được thực hiện ở pH = 8. Các giá trị khảo sát: 5 phút, 10 phút, 15 phút và 20 phút.

Tại các thời gian ủ khác nhau, lượng DNA thu được không có sự chênh lệch đáng kể.

Nhìn chung, DNA thu được chưa tinh sạch. Hình 4 biểu diễn các kết quả khảo sát thời gian ủ.



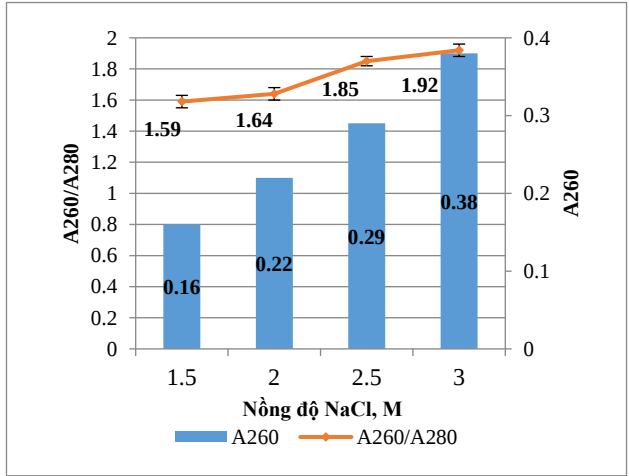
Hình 4. Giá trị A260 và độ tinh sạch của DNA khảo sát thời gian ủ

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NaCl

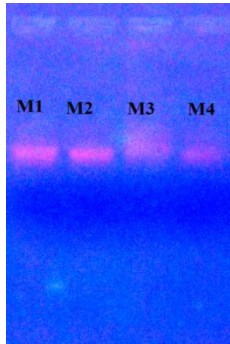
Yếu tố pH và thời gian ủ được giữ cố định lần lượt ở pH = 8 và 5 phút. Các mức nồng độ NaCl được khảo sát là 1,5M; 2M; 2,5 M và 3M.

Lượng DNA thu được tăng theo sự tăng nồng độ NaCl trong binding buffer, DNA tách được nhiều nhất tại nồng độ NaCl 3M (Hình 5).

Tỷ số A260/A280 tăng dần khi nồng độ NaCl khảo sát tăng. Tại giá trị khảo sát 2,5 M và 3M thì tỷ số A260/A280 nằm trong khoảng 1,8-2; DNA tách chiết đạt yêu cầu tinh sạch.



Hình 5. Giá trị A₂₆₀ và độ tinh sạch của DNA thu được khi tách ở các nồng độ NaCl khác nhau



Hình 6. Kết quả điện di DNA tách từ tế bào vi khuẩn bằng các nồng độ NaCl khác nhau (Ghi chú: M1, M2, M3 và M4 lần lượt là các sản phẩm tách tương ứng với nồng độ NaCl 3M; 2,5M; 2M và 1,5 M)

2.2.4. Khảo sát lượng hạt nano sắt từ cần sử dụng

Yếu tố pH, thời gian ủ và nồng độ NaCl được giữ cố định lần lượt ở pH = 8 và 15 phút và 3M.

Các băng DNA điện di có bề dày tăng dần từ mẫu a đến mẫu e. Điều này cho thấy lượng DNA thu được tăng dần với sự tăng lượng hạt sử dụng. Kết quả này phù hợp với giá trị độ hấp thụ quang mà các mẫu khi ở bước sóng A260.

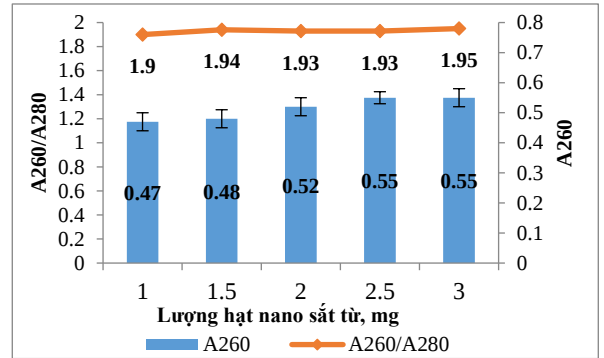
Với kết quả thu được, có thể ước lượng tương đối lượng hạt nano sắt từ cần sử dụng để thu tách tối đa lượng DNA từ mẫu vi khuẩn có mật độ 10^9 tế bào/ml là 2,5-3 mg cho 1,5ml dịch nuôi cấy.

2.2.5. Khảo sát các nồng độ ethanol trong giai đoạn rửa tủa

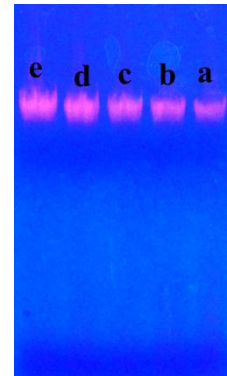
Lượng DNA thu được khi rửa tủa bằng ethanol tuyệt đối cho giá trị A260 cao nhất; 0,63. Trong khi, lượng DNA thu được giảm dần khi sử dụng ethanol nồng độ thấp làm chất rửa; cụ thể là giá trị A260 của mẫu khi rửa với ethanol 99% và ethanol 70% đạt 0,55; mẫu rửa với ethanol 99% và ethanol 50% đạt 0,51. Trong khi đó, các mẫu đều đạt độ tinh sạch với tỷ số A260/A280 nằm trong khoảng 1,8-2,0.

2.2.6. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng thu hồi DNA

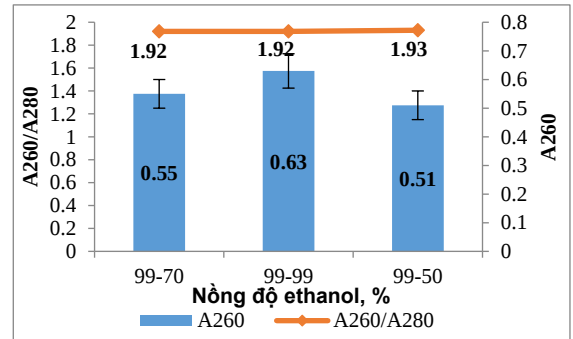
Các mức nhiệt độ khảo sát: 25°C, 37°C, 65°C. Yếu tố pH, thời gian ủ, nồng độ NaCl và nồng độ ethanol được giữ cố định lần lượt ở 8,15 phút, 3M và 99%.



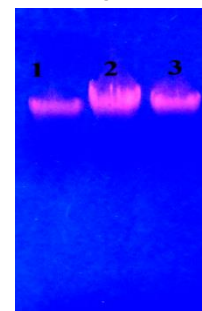
Hình 7. Giá trị A₂₆₀ và độ tinh sạch của DNA khi thu tách với các lượng hạt sắt từ khác nhau



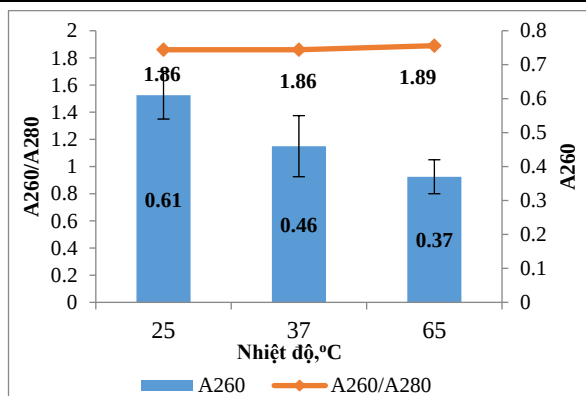
Hình 8. Kết quả điện di các mẫu DNA tách bằng các lượng hạt nano sắt từ khác nhau. a, b, c, d và e: lần lượt là mẫu sử dụng các lượng hạt sắt từ 0,5mg; 1mg; 1,5mg; 2mg; 2,5mg và 3mg.



Hình 9. Giá trị A₂₆₀ và độ tinh sạch của DNA khi rửa tủa ở các nồng độ ethanol khác nhau



Hình 10. Kết quả điện di các mẫu DNA rửa với ethanol các nồng độ. 1, 2 và 3: lần lượt là mẫu rửa với ethanol 50%, 99% và 70%



Hình 11. Giá trị A_{260} và độ tinh sạch của DNA khi giải hấp ở các nhiệt độ khác nhau

Có sự giảm rõ rệt lượng DNA thu được khi tăng giá trị nhiệt độ giải hấp (Hình 11). Khi nhiệt độ giải hấp bằng 65°C, lượng DNA thu được chỉ còn bằng một nửa lượng DNA thu được khi giải hấp ở 25°C.

3. Bàn luận

3.1. Tổng hợp nano oxit sắt từ

3.1.1. Ảnh hưởng của oxy

Từ kết quả so sánh sản phẩm tổng hợp trong điều kiện có và không có oxy, có thể thấy là sự có mặt của oxy làm giảm từ tính của hạt sắt từ. Nguyên nhân của việc giảm từ tính có thể giải thích là do Fe_3O_4 bị oxi hóa một phần thành sắt(III) hydroxyt theo phản ứng sau:



3.1.2. Ảnh hưởng của pH môi trường

Bảng 2. pH môi trường trước và sau phản ứng

STT	Hệ phản ứng	pH trước phản ứng	pH sau phản ứng	Tỷ lệ mol $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}:\text{OH}^-$
1	Hệ 1	12	8	1:2:8
2	Hệ 2	12,3	9	1:2:16
3	Hệ 3	12,6	9	1:2:32

Lực ion trong dung dịch phản ứng là một yếu tố ảnh hưởng tới độ từ hóa của hạt sắt từ. Môi trường phản ứng có lực ion cao hơn thì hạt sắt từ tạo thành có độ từ hóa thấp hơn [7]. Điều này đúng với kết quả thí nghiệm, MNP2 bị hút bởi nam châm nhanh hơn MNP3. Tuy nhiên MNP1 có từ tính yếu hơn MNP2, nguyên nhân có thể là do pH môi trường chưa đạt yêu cầu. pH môi trường sau phản ứng của hệ 1 là 8, thấp hơn mức tối thiểu cần thiết cho phản ứng pH = 9.

Kích thước hạt sắt từ phụ thuộc vào độ pH và lực ion trong môi trường. Lực ion và pH môi trường càng cao thì kích thước hạt càng nhỏ, bởi vì hai tham số này ảnh hưởng cấu trúc hóa học bề mặt tinh thể hạt sắt từ và dẫn đến sự tích điện bề mặt hạt [8]. Kết quả là MNP1 có thời gian lắng nhanh hơn MNP2 và MNP3.

3.2. Tách chiết DNA bằng hạt nano oxit sắt từ

3.2.1. Ảnh hưởng của pH môi trường

Yếu tố pH môi trường được khảo sát nhằm đánh giá sự ảnh hưởng đến khả năng keo tụ của hạt nano sắt từ với DNA và sự hấp phụ của protein với hạt nano sắt từ.

Về nguyên lý, mỗi loại protein bị tủa và tách khỏi pha nước tại giá trị pH đẳng điện (pI) tương ứng. Tại một giá

trị pH khảo sát có thể không biến tính hết các loại protein có trong dịch ly giải. Kết quả là protein với DNA cùng bị tách chiết, dẫn đến DNA thu được không tinh sạch.

Trong thời gian ủ, dịch ly giải và hạt nano sắt từ được vortexed, DNA và hạt sắt từ kết khối lại với nhau dưới tác dụng của lực quay [3]. pH môi trường không ảnh hưởng đến sự kết khối này. Do vậy, lượng DNA thu được tại các giá trị pH khảo sát không có sự chênh lệch đáng kể.

3.2.2. Tác động của thời gian ủ

Để đảm bảo tách được hầu hết DNA ra khỏi dịch ly giải, thời gian ủ được khảo sát. Từ Hình 5, có thể thấy sau khi ủ 5 phút thì lượng DNA bám vào hạt nano oxit sắt từ đạt lớn nhất và không đổi theo thời gian.

3.2.3. Ảnh hưởng của nồng độ muối

Dung dịch NaCl nồng độ cao đóng vai trò làm chất gây kết tủa protein. Các chuỗi PEG bao phủ bề mặt hạt nano sắt từ, từ đó hạn chế sự hút bám của protein [6]. Vì vậy, khi đã bị tủa thì protein không thể hấp thụ lên hạt nano sắt từ và DNA thu được sẽ không còn bị nhiễm protein.

3.2.4. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol

Phức hệ DNA và hạt nano sắt từ sau khi thu tách cần được xử lý để loại các ion, chất bám sót lại. Ethanol với các nồng độ khác nhau được dùng làm chất loại rửa trong nghiên cứu này. Tuy nhiên, một vấn đề đặt ra là liệu DNA có bị rửa trôi, trong khi DNA có khả năng tan trong nước. Kết quả khảo sát cho thấy giá thiết đặt ra là đúng.

3.2.5. Ảnh hưởng của nồng độ nhiệt độ

Khi thêm đệm TE vào tủa để giải hấp, các phân tử nước sẽ tương tác với các phân tử DNA bằng liên kết hydro và phá bỏ sự hấp phụ giữa DNA và hạt nano sắt từ. Nhiệt độ cao giúp đẩy nhanh quá trình giải hấp, tuy nhiên, DNA dễ bị phân hủy ở nhiệt độ cao. Từ kết quả thu được thấy rằng lượng DNA thu được giảm khi nhiệt độ giải hấp tăng.

4. Kết luận

Với kết quả nghiên cứu đem lại, quy trình tổng hợp hạt sắt từ cơ bản đã hoàn chỉnh và tự tổng hợp được sản phẩm mong muốn.

Việc thu tách các phân tử acid nucleic, mà cụ thể là DNA, bằng hạt sắt từ tự tổng hợp cũng đã thành công; DNA tách được đạt yêu cầu tinh sạch. Phương pháp này hoàn toàn có thể mở rộng áp dụng cho việc tách chiết RNA trong mẫu phẩm sinh học khác như huyết thanh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Bandyopadhyay, S. Chatterjee and K. Sarkar (2011). "Rapid isolation of genomic DNA from E. coli XL1 Blue strain approaching bare magnetic nanoparticles". *Current science*, vol. 101, no. 2.
- [2] An-Hui Lu, E. L. Salabas, and Ferdi Schuth (2007). "Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application". *Angewandte Chemie Int.*, Vol 46, pp 1222 – 1244.
- [3] Daniel C. Leslie, Jingyi Li, Briony C. Strachan, Matthew R. Begley, David Finkler, A. L. Bazydlo, N. Scott Barker, Doris M. Haverstick, Marcel Utz, and James P. Landers (2012). "New Detection Modality for Label-Free Quantification of DNA in Biological Samples via Superparamagnetic Bead Aggregation". *Journal of the American Chemical Society Article*, Vol 134, pp 5689–5696.
- [4] http://vietsciences.free.fr/thuctap_khoahoc/thanhthuukhoahoc/chetao_hatnanooxysattutinh.htm

- [5] Lê Ngọc Tú (2002). *Hóa sinh công nghiệp*. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội.
- [6] Martina Pilloni, Julien Nicolas, Véronique Marsaud, Kawthar Bouchemal, Francesca Frongia, Alessandra Scano, Guido Ennas, Catherine Dubernet (2010). "PEGylation and preliminary biocompatibility evaluation of magnetite-silicananocomposites obtained by high energy ball milling", *International Journal of Pharmaceutics*, vol 401, pp 103–112.
- [7] M. Mohapatra and S. Anand (2010), "Synthesis and applications of nano-structured iron oxides/hydroxides– a review". *International Journal of Engineering, Science and Technology*, Vol. 2, No. 8, pp. 127-146.
- [8] Pedro Tartaj, Maria del Puerto Morales, Sabino Veintemillas-Verdaguer, Teresita Gonzalez-Carre no and Carlos J Serna (2003). "TOPICAL REVIEW: The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine", *Journal of physics d: applied physics*, Institute of physics publishing.
- [9] Sophie Laurent, Delphine Forge, Marc Port, Alain Roch, Caroline Robic, Luce Vander Elst and Robert N. Muller (2008), "Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications", *Chemical Reviews*, Vol. 108, pp 2064-2110.
- [10] Trần Yến Mi, Dương Hiếu Đầu và Lê Văn Nhận (2011). "Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ tiền chất lên kích thước và từ tính hạt nano oxid sắt". *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ* 2011:20b 272-280.

(BBT nhận bài: 20/07/2015, phản biện xong: 24/07/2015)