

以牛奶为样品对裸磁珠法分离蛋白质和核酸可行性的初步评价

中国科学技术大学 材料科学与工程系 赧科材 PB20030874

摘要

新冠疫情流行以来，能否快速提取核酸已经成为控制疫情的关键。为快速、高效地分离核酸，人们开发了以磁性 Fe_3O_4 为吸附介质的磁珠法。本实验使用牛奶这一简单样品，期望通过一些简单的检验方法评价这一新兴技术，并给出一些建议。分析发现，使用裸磁珠简单实现牛奶中蛋白质或者核酸的分离提纯的方法不可靠。但磁珠产生的类似生色效应的影响不容忽视。

1.引言

核酸提取是分子生物学检测的首要步骤，常用方法有酚-氯仿抽提法、阴离子交换法、硅介质吸附法等。近年来，采用磁性 Fe_3O_4 为吸附介质的磁珠法，不仅避免了使用有毒有机溶剂，而且可采用磁分离装置实现自动化、批量化操作，逐渐成为核酸提取的主导方法，在医学检验、疾病诊断、基因工程等领域发挥了重要作用。

磁珠法又称磁固相萃取法，是 21 世纪分离富集领域的革命性技术。 Fe_3O_4 的粒径分布、表面理化性质和分散性是影响其吸附性能的主要因素。纳米 Fe_3O_4 比表面积大、表面具有丰富的官能团，既可作为吸附位点直接结合目标物，又可通过表面修饰改善性能。与此同时，为了获得更加稳定的纳米磁珠，人们采取了许多保护手段。其中最主要的是使用 SiO_2 涂层覆盖带有磁性的内核。然而，这些涂层的制备通常需要较长的时间和更加复杂的实验设备，为分离步骤的简化带来了困难。

目前报道了一种使用裸磁珠分离酵母内 RNA 的成功案例，然而文中一些表述并不是很清晰，且数据较少，可能有些许错误。基于此，本实验将待分离的样品从复杂的酵母细胞更换为另一种更为简单且常见的材料——牛奶，并讨论使用裸磁珠分离蛋白质的可行性。

牛乳中大约含 0.5% 的含氮物，其中 95% 为乳蛋白质，5% 为非蛋白质含氮物，蛋白质含量大约在 32 mg/ml。牛乳蛋白质主要分以下四类：酪蛋白、白蛋白、球蛋白和脂肪膜蛋白，含有 25 种不同的氨基酸。除此而外，还含有少量酶类。牛乳中核酸含量约为蛋白质的千分之一。

初步实验表明，虽然使用超声条件能够制备得到具有磁性的纳米铁磁珠，但不稳定，容易聚集沉降，在本实验的条件下无法完成牛奶中蛋白质的提取任务。但实验数据中呈现的磁珠对大分子的生色效应及其条件、磷酸缓冲液和大分子相互作用时扮演的角色，仍然值得继续深入研究。

2. 实验部分

2.1 实验原理

2.1.1 纳米 Fe_3O_4 的制备

超声已经被证明是一种制备金属氧化物纳米颗粒的有效方法。本实验使用超声辅助反相共沉淀法，期望在空气氛围下快速温和地制备粒径约 20 nm 的 Fe_3O_4 。在反相沉淀法中，超声激发出的活性物质能使制得的纳米颗粒展现均一的形貌；而充分的搅拌作用能够保证将混合铁盐逐滴加入碱性溶液时，周围的 PH 值不至于在局部范围迅速改变。超声波的“空化泡”效应和剪切作用也会进一步抑制粒径生长，加速反应进行。

2.1.2 牛奶中大分子的提取原理

乳蛋白质主要分为酪蛋白、白蛋白、球蛋白和脂肪膜蛋白，其中酪蛋白约占牛乳总蛋白质的 78%。由于酪蛋白对宽范围的波长反射，液态牛奶呈现乳白色。在我们的预实验中，除非多次梯度稀释，否则无法直接通过分光光度法检测牛奶中蛋白质的含量，且难以绘制标准曲线作为定量对照。

当高浓度盐存在时，蛋白质往往凝聚并析出沉淀，得到含有较少蛋白质的上清液。硫酸铵作为蛋白质沉淀剂往往用于处理新鲜组织提取液，获得具有活性的蛋白质沉淀，且具有效果明显、沉淀 pH 范围广、溶解度高、溶液散热少、较为经济等优点。本实验通过先预处理牛奶样品，利用硫酸铵使蛋白质盐析，离心得到上清液，作为磁珠吸附的蛋白质原液。

核酸和蛋白质均是生物大分子，有着复杂多样的结构。而纳米 Fe_3O_4 能够通过表面官能团静电、氢键以及配位作用吸附种类广泛的基团。而对于核酸含量只在 10⁻³ mg/ml 量级的牛奶体系，对核酸的吸附大约可以忽略。磷酸盐能够破坏上述作用，置换出原本吸附的大分子，让目标产物再次进入溶液。

核酸和蛋白质中均存在共轭结构，分别在 260 nm 和 290 nm 附近有强吸收。可用紫外光度法测定其含量，评价吸附及解吸情况。

2.2 实验材料与仪器设备

六水三氯化铁 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、氯化亚铁四水合物 ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、13.38 mol/L 浓氨水 (NH_3)、磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)、磷酸二氢钠 (NaH_2PO_4)、PBS、硫酸铵 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)、纯牛奶 (特仑苏)、钕铁硼强磁铁 (国为)、超声仪、离心机、紫外-可见分光光度计、光谱仪。

2.3 实验步骤

2.3.1 预实验

2.3.1.1 牛奶的直接离心

取 10 ml 牛奶于离心管中，设置 2000 r/min，离心 10 min，观察牛奶分层情况。

2.3.1.2 纳米 Fe_3O_4 的制备条件探索

称量 2.0 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (7.5 mmol) 和 1.5 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (7.5 mmol) 用 20 ml、50 ml、100 ml 水充分搅拌溶解，得到铁盐混合溶液。将超声波清洗器的温度分别设置为室温和 60 °C，功率 140 W，将 100 ml、1.33 M (浓氨水稀释十倍)、100 ml、3.34 M (浓氨水稀释四倍) 的氨水分别置于其中。取 20 ml 上述铁盐溶液，分别逐滴加入氨水中，加完后继续超声 30 min。通过磁分离收集所得沉淀，并用水洗涤至溶液 pH 近中性。最后，将 Fe_3O_4 超声分散于 100.00 ml 水中，测试磁响应性能，取少量测试 240 nm - 500 nm 吸光度曲线。

2.3.1.3 磷酸缓冲液的配制

称量 1.09 g Na_2HPO_4 (0.0077 mol) 和 1.46 g NaH_2PO_4 (0.0122 mol) 于 100 ml 烧杯中，加入 100 ml 水充分溶解，作为解吸剂备用。取少量测试从 240 nm - 310 nm 的吸光度曲线。

2.3.1.4 未处理的牛奶与磁珠的相互作用

取约 5 ml 上述磁珠分散液，直接加入约 10 ml 纯牛奶中，超声 5 min 后静置吸附 30 min。磁分离去除上清液，向残留固体中加入约 20 ml 磷酸缓冲液，摇匀静置 5 min。用磁铁分离固液，取上清液测试其 240 nm - 310 nm 的吸光度曲线。

2.3.2 正式实验

2.3.2.1 牛奶预处理

取两块 PBS 溶于 200 ml 蒸馏水中，搅拌均匀，获得 PBS 缓冲液。使用移液管移取 10 ml 牛奶样品，搅拌中缓缓 (5-10 min) 加入 10 ml 缓冲溶液和 13.04 g 硫酸铵，加完后继续搅拌 20 min，使其充分沉淀。以 5000 r/min 的转速离心 10 min，抽滤，取上清液作为蛋白质原液。

2.3.2.2 纳米 Fe_3O_4 的制备

称量 2.0 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (7.5 mmol) 和 1.5 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (7.5 mmol)，用 50 ml 水充分搅拌溶解，得到铁盐混合溶液。不使用超声波清洗器的加热功能 (保持室温)，设置功率 140 W，将 100 ml、1.33 M 氨水置于其中。取 20 ml 上述铁盐溶液，逐滴加入氨水中。继续超声 30 min，通过磁分离收集所得沉淀，并用水洗涤至溶液 pH 近中性。最后使用 100

ml 水超声分散所得产品。

2.3.2.3 使用纳米 Fe_3O_4 提取蛋白原液的蛋白质

测量蒸馏水在 240 nm - 310 nm 的吸光度曲线。

取蛋白质原液 5 ml，加入 1 ml 水，测量 240 nm - 310 nm 的吸光度曲线。

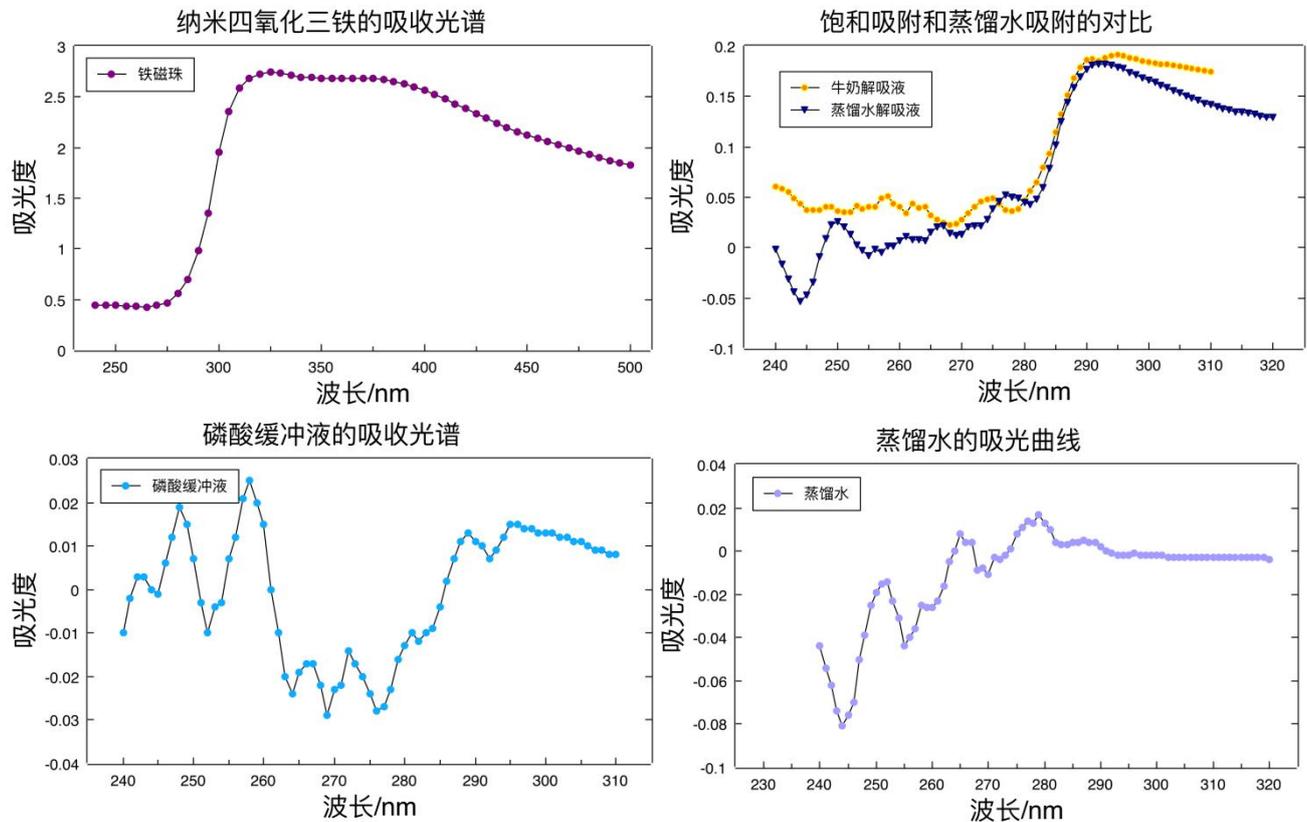
取蛋白质原液 5 ml，加入 1 ml 上述纳米 Fe_3O_4 分散液，摇匀后超声 5 min，静置吸附 30 min。磁分离去除上清液，向残留的固体中加入 6 ml 磷酸盐溶液，摇匀后静置 5 min。用磁铁分离固液，取上清液测试其在 240 nm - 310 nm 的吸光度曲线。

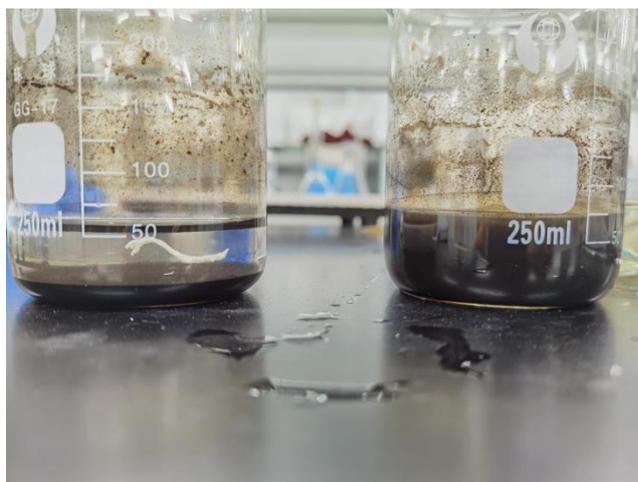
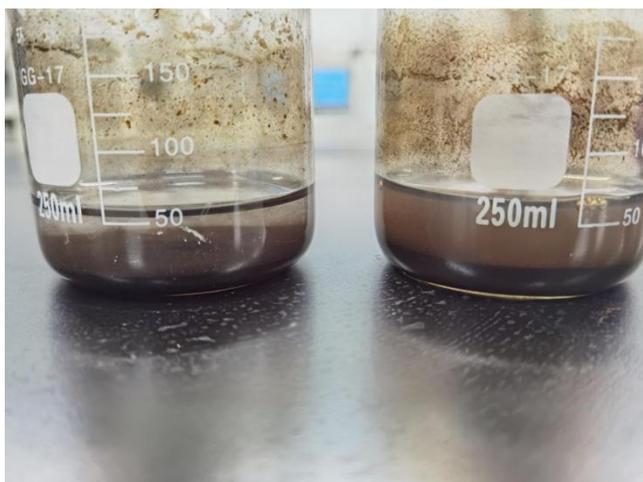
取清水 5 ml，加入 1 ml 上述纳米 Fe_3O_4 分散液，摇匀后超声 5 min，静置吸附 30 min。磁分离去除上清液，向残留的固体中加入 6 ml 磷酸盐溶液，摇匀后静置 5 min。用磁铁分离固液，取上清液测试其在 240 nm - 310 nm 的吸光度曲线。

3. 实验结果

3.1 预实验

离心后的牛奶在表面和底部均有少量白色沉淀，未在试管下端看到明显的细胞聚集，且其他部分和未经离心的纯牛奶没有明显区别。这表明牛奶中大部分物质以游离形式存在。所以对于核酸，无法通过离心细胞的方式直接分离得到。

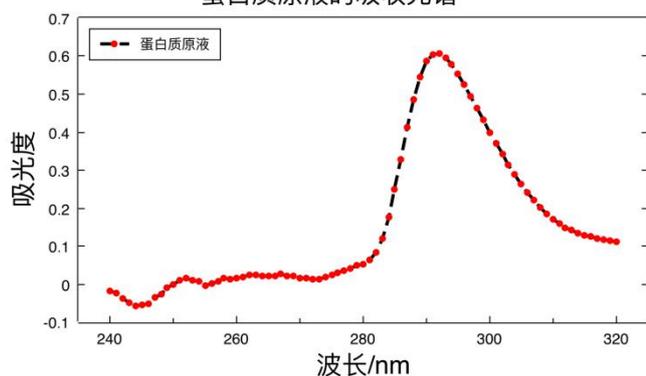




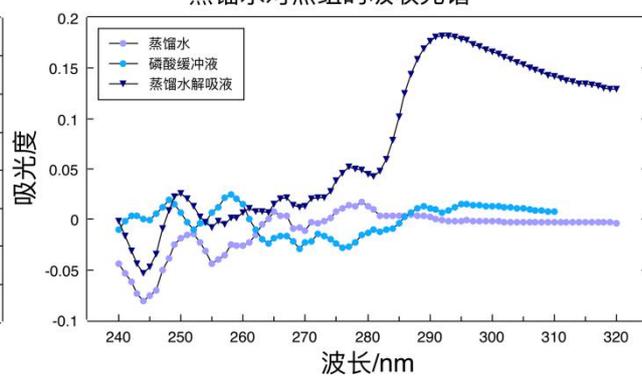
两图中位于左侧的烧杯中放置 60℃ 条件下使用 100 ml、3.34 M 的氨水制备得到的纳米磁珠，右侧烧杯是室温条件下使用 100 ml、1.33 M 的氨水制备得到的纳米磁珠。左图为静置 10 min 后的对比，右图是静置更长时间的对比。

3.2 正式实验

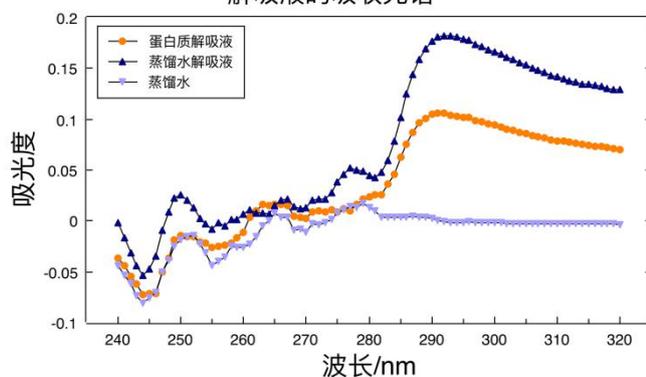
蛋白质原液的吸收光谱



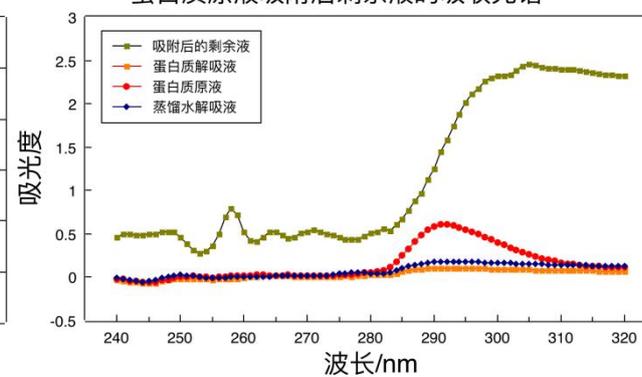
蒸馏水对照组的吸收光谱



解吸液的吸收光谱



蛋白质原液吸附后剩余液的吸收光谱



4. 结果讨论

4.1 预实验

从纳米 Fe_3O_4 的吸收光谱中可以看出，吸光度从大约 280 nm 处开始有显著上升，可能不利于蛋白质目标峰形的分辨。而磷酸缓冲液和蒸馏水的全波段低吸收则表明，它们不足以影响蛋白质或者核酸的吸收峰。

探究磁珠合适制备条件时我们发现，室温下使用 50 ml 水溶解的混合铁盐和 100 ml、1.33 M 的氨水制备纳米 Fe_3O_4 ，分散效果最好，磁响应性能和其他组也有所提升。第一周预实验中有一组以较为粗放方式制备的磁珠，一周后虽然仍旧在水中保持均匀分散，但磁性基本丧失。而按照 60°C 的条件制备的产品，在超声分散时在靠近烧杯边缘出现的颗粒肉眼可见，且大约静置 10 min 就能观察到明显的分离，形貌显然没有达到“纳米”的要求。

制备过程中也观察到，虽然超声能够将磁珠均匀分散至蒸馏水中，但是停止超声后，随着时间的推移，和其他条件较为优良的磁珠产品相比，总是会沉降大部分，只剩下小部分能够继续维持分散状态。这可能是因为虽然在超声仪中能够制得符合条件的纳米 Fe_3O_4 ，然而随着多次的洗涤和分散，没有任何形貌控制手段来限制磁珠的长大，导致纳米 Fe_3O_4 非常容易聚集沉降，失去了原本的纳米形貌。此外，由于裸磁珠很容易和溶解于水中的氧气接触而被氧化，制得的纳米磁珠也非常不稳定。这也从反面支持了人们通常会在氮气保护下缓慢制备纳米四氧化三铁的方法。

由于使用纯牛奶做饱和吸附时，使用的是温度条件 60°C 和 100 ml、3.34 M 的氨水做的纳米铁磁珠，所以出现牛奶解吸液曲线形状和清水解吸液形状基本相同的现象也就不难理解：因为使用的磁珠完全没有达到制备目标的要求，自然也不会对牛奶中的物质有所响应。

4.2 正式实验

蛋白质原液的吸收光谱符合预期，在波长 292 nm 处呈现峰值 0.607，而无法观察到 260 nm 附近的核酸吸收峰。可以认为经过硫酸铵处理后的蛋白质原液中，含有能够响应磁珠吸附的足量蛋白质。

从蒸馏水对照组的吸收光谱可以得知，经过磁珠处理的蒸馏水空白对照对应曲线明显高于磷酸缓冲液和蒸馏水的吸收曲线，且在 280 nm 之前和磷酸缓冲液的吸收曲线相似，不过有不同程度的提升。这一结果说明，磁珠的确可以和磷酸缓冲液发生相互作用，可能可以从已经吸

附的磁珠-蛋白质体系中置换出蛋白质。而 280 nm 以后的强吸收应当和磁珠本身性质关系更密切。不过吸收峰值 0.182 同样出现在蛋白质的 292 nm 处，导致除了通过吸收强度的变化外，无法判断磁珠是否对蛋白质有吸附。

在蛋白质解吸液和蒸馏水解吸液的对比中，我们可以清楚地看到在 292 nm 的地方出现属于蛋白质的峰值 0.106——一个远远低于原液、也低于蒸馏水解吸液的结果。首先这证明磁珠法远未完成分离原液蛋白质的任务。其次，曲线和峰值和蒸馏水相比，均有所变化，这说明磁珠和蛋白质之间仍然存在较强的相互作用。可能是因为实验制备的 0.2 M、PH=7 的磷酸缓冲液对于蛋白质而言不是一个合适的解吸液，导致一些吸附后的蛋白质未能和磁珠分离。从而将微小的磁珠带入上清液。

磁珠法未能完成吸附蛋白质的事实，也被吸附后剩余液的吸收光谱证明：剩余液在 292 nm 处的吸收值甚至高于原液，增加到了 1.577，并在 304 nm 处达到最高的 2.44。如果说 304 nm 的吸收峰可以被仍然留存在溶液中的少量纳米磁珠解释，但 292 nm 处、甚至之前全波段吸收的大幅增加则着实令人费解。但是可以肯定，磁珠显著影响了蛋白质原液中的某些物质，产生类似生色效应的效果。同时，和预实验中磁珠分散液的吸收光谱对比，可以认为因未完全分离而残余在清液内的磁珠，不足以主导 240 nm - 280 nm 的吸光值。

值得关注的是，在 258 nm 处能明显观察到 0.8 的吸收值——靠近核酸的预测吸收波长，而此处的吸收峰是在前面任何一个吸光曲线都没有出现的。然而核酸吸收峰却出现在剩余液中，这表明应该和蛋白质的情况一样，磁珠和核酸结合后充当生色基团，显著增加了核酸的吸收值。但是磁珠无法通过磷酸缓冲液实现分离，从而随核酸一起，分散在剩余液中。

5. 实验结论

本实验通过一些基于牛奶的简单实验，测试了文献中报道的裸磁珠分离技术。基本可以肯定，超声制备裸磁珠的 60℃ 条件不可行。而不稳定的裸磁珠的使用，在实现牛奶中蛋白质的分离提纯上效果堪忧。不仅如此，蒸馏水空白对照的吸收峰和蛋白质峰位置的重合，让人更加难以判断磁珠是否能够真正吸附蛋白质。实验制备的磷酸缓冲液对于蛋白质而言，也不是一个良好的解吸剂。

然而，实验的一些意外发现也值得后来者继续深究。

第一处，是蛋白质解吸液的光谱吸收显著低于空白蒸馏水的解吸液；但剩余液的吸收远高于蛋白质原液的明显对比。如果认为磁珠对蛋白质有增强吸收的生色效应，那么解吸液和剩余液的情况应该相同，即蛋白质解吸液的吸收也应当高于蒸馏水的解吸液。这很有可能是加入的磷酸缓冲液造成的：未加缓冲液时磁珠增强吸收；加入缓冲液后磁珠抑制吸收。

第二处，是在剩余液吸收光谱中出现的靠近核酸吸收的可疑峰。猜测是因为一定尺寸的磁珠和核酸结合后充当生色团，显著增加了核酸的吸收值。由于磁珠无法通过磷酸缓冲液实现分离，从而随核酸一起，分散在剩余液中。结合等浓度核酸吸收峰值约为蛋白质十倍的事实，纳米 Fe_3O_4 对核酸的生色效应的猜测很有可能成立。这需要使用红外光谱得到磁珠表面情况。

鸣谢

蛋白质原液的获得方法由张成涛同学设计提供，并由他制备。在预实验和正式实验的实验设计和更改中也给予了本文作者莫大帮助。

实验设计和操作过程中也得到了来自何元毅助教和刘红瑜老师的修改建议和大力支持，在此一并感谢。

可能的疑问

由于在讨论和操作过程中遭遇了许多未曾设想的阻力，本文和最初的设计区别较大。

在配制 100 ml、0.2 M 的磷酸缓冲液 (PH=7) 时，由于没有查到现成的比例配方，所以采取去公式化的精确求解方法。即以溶液中电荷守恒式 (Charge Balance Equation) 为中心，通过分部分数化简方程，再使用 MATLAB 求解。具体参见邵利民《分析化学 (第二版)》。

为使用实验室提供的 NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 配制总浓度 0.2 M、PH=7 ($[\text{H}^+]=[\text{OH}^-]=10^{-7}$) 的磷酸缓冲液，计算可得 NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 物质的量之比约为 1.58。通过简单的代数计算，即可得到 Na_2HPO_4 需要 1.09 g、 NaH_2PO_4 需要 1.46 g。

放置一周仍然保持良好分散性能的一组纳米 Fe_3O_4 ，除了条件是室温、铁盐使用 50 ml 水溶解以外，还有可能是因为那一次是等待一滴混合铁盐溶液反应完全后，再滴加下一滴。滴入铁盐的快慢对磁珠性质是否有影响仍然是未知数。

原始数据和相关的图片视频保存在随文附带的文件夹中。

对于实验过程中遭遇的阻力和设计变动的一些说明

本实验最初主要参考的文章是《磁性纳米四氧化三铁制备及在酵母 RNA 提取分析中的应用》，其中有许多实际问题却避而不谈，造成了实验过程中的许多阻碍，导致设计方案和相应分析不断调整。

第一，超声制备的纳米 Fe_3O_4 的制备条件和稳定性问题。首先，预实验证明，使用文中那样浓的氨水和混合铁盐，在 60°C 条件下无法得到合适的纳米磁珠。其次，不少文献指出，纳米形貌的四氧化三铁表面其实是疏水的，在没有保护的情况下非常容易团聚。文章采用的超声反相制备法来自《Sono-assisted preparation of highly-efficient peroxidase-like Fe_3O_4 magnetic nanoparticles for catalytic removal of organic pollutants with H_2O_2 》，仅仅根据文中纳米磁珠形貌的 SEM 图像，根本无法分辨“珠”的特征。

第二，文中竟然期望使用 3000 r/min、离心 5 min 来去除细胞膜、细胞壁和蛋白质沉淀。根据生物化学手册，这一转速只能让细胞核和一些大型细胞器沉淀。而对于细胞中丰富的由蛋白质和 rRNA 组成的核糖体而言，无法通过仅仅 3000 转的速度让它下沉。实际对牛奶的直接离心中也只能让部分白色蛋白质（可能是酪蛋白）富集到试管上层。

第三，磷酸解吸液的作用问题。文章仅仅测量了单一波长的吸光度，所以没有机会发现体现在本实验中的异常现象。按照文中的思路，无法解释为什么本实验解吸液吸收低于清水，但是残留液吸附显著提升的实验事实。而且残留液在 258 nm 处突然产生的吸收峰更是匪夷所思。如果磁珠能够对微量的核酸都有如此显著的生色效应，那么使用分光光度法评价这一实验方案便失去了价值。因为即使能够吸附很少的核酸，解吸液中的吸附曲线峰值仍然能够达到甚至超过原有峰值，无法通过标准曲线来说明一定的吸光度对应了多少的核酸浓度。

基于在讨论过程中的一些思考，作者决定放弃原先使用黄豆粉（更加复杂的植物细胞体系）的设计，改为使用较为简单的牛奶体系。在预实验的讨论时，决定和同样分析牛奶的张成涛同学合作，由他提供使用硫酸铵处理后的上清液作为本实验的蛋白质原液。

参考文献

- [1] Guanglu Ge Atta Ullah Khan, Lan Chen. Recent development for biomedical applications of magnetic nanoparticles. *Inorganic Chemistry Communications*, 134(108995), 2021.
- [2] K. Simeonidis C. Martinez-Boubeta a. Airborne magnetic nanoparticles may contribute to covid-19 outbreak: Relationships in greece and iran. *Environmental Research*, 204(112054), 2022.
- [3] Torres-Rodríguez Jorge. Cobalt - zinc ferrite and magnetite sio₂ nanocomposite powder for magnetic extraction of dna. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 91(33-43), 2019.
- [4] Marek Biziuk Marta Wierucka. Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 59(50-58), 2014.
- [5] Alireza akbari Nahid Shahabadi. Functionalization of fe₃o₄@sio₂ magnetic nanoparticles with nicotinamide and in vitro dna interaction. *Journal of Molecular Liquids*, 224(227-233), 2016.
- [6] Yueping Guana Qingqian Fana. A new method of synthesis well-dispersion and dense fe₃o₄@sio₂ magnetic nanoparticles for dna extraction. *Chemical Physics Letters*, 715(7-13), 2019.
- [7] Daniel Roncancio Yalong Baia. A method based on amino-modified magnetic nanoparticles to extract dna for pcr-based analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 59(50-58), 2014.
- [8] Mohamad Zandieh and Juewen Liu. Spherical nucleic acid mediated functionalization of polydopamine-coated nanoparticles for selective dna extraction and detection. *Bioconjugate Chem*, 32(801-809), 2021.
- [9] 姜展樾, 乔倩. 加工肉制品自动化 dna 提取体系建立及其验证. *食品科技*, 46(08), 2021.
- [10] 周之超, 石明明. 猪肝组织核酸的分离纯化及鉴定. *湖北畜牧兽医*, 8, 2009.
- [11] 宋明辉张易. 速冻面食制品中金黄色葡萄球菌 dna 提取方法的比较分析. *中国食品学报*, 17(11), 2017.
- [12] 肖 剑梁美丹. 磁珠法提取植物蛋白饮料 dna. *食品科学技术学报*, 2021.
- [13] 王萍萍, 李浩辰. 磁性纳米 fe₃o₄ 制备及在酵母 rna 提取分析中的应用. *大学化学*, 36(1 of 11), 2021.
- [14] 曹 强肖雨诗. 磁珠提取技术在副溶血弧菌检测中的应用. *食品科学技术学报*, 2021.
- [15] 刘国强郭梁. 乳及乳制品中 dna 提取方法的比较研究. *农业与技术*, 41(20), 2021.
- [16] 田玉玲马贞丽. 探讨磁珠法与煮沸法对乙型肝炎病毒基因分型检出率及其与 hbv dna 定量的关系. *中国社区医师*, 37(27), 2021.