

超声波处理提高磁性微小铁葡聚糖颗粒的产量及对纤毛虫细胞的应用

孙晓婷 吴加旺 高欣 杨仙玉*

(浙江林学院林业与生物技术学院 临安 311300)

摘要: 共沉淀法是制备磁性微小铁葡聚糖颗粒的常用方法之一,其简单、易操作,但是温度、pH、氨水滴加速度等多种因素影响粒径的大小,而且很多颗粒聚集成束,因而微小铁葡聚糖颗粒的回收率低。为提高微小铁葡聚糖颗粒的回收量,对反应初产物离心后的沉淀部分进行了超声波处理,使回收量由处理前的 0.5 g 提高到处理后的 10 g 以上。利用回收的微小铁葡聚糖颗粒进行纤毛虫接合对分离,接合率高达 95% 以上。

关键词: 超声波;铁葡聚糖颗粒;共沉淀法;纤毛虫

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2010) 01-90-04

To Enhance the Production of Magnetic Iron-Dextran Particles by Ultrasonic Treatment and Its Applications in Ciliate Studies

SUN Xiao-Ting WU Jia-Wang GAO Xin YANG Xian-Yu*

(School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry University, Lin'an 311300, China)

Abstract "Co-precipitation" is one of the most popular methods for preparation of magnetic iron-dextran particles, which is simple and easy to operate. These particles can be obtained by dissolving FeCl_2 , FeCl_3 together with dextran in H_2O in a proper ratio and adding NH_4OH into this solution. After the chemical reaction completed, the product is dark-brown including numerous different sized magnetic iron-dextran particles and their aggregates due to the effects of temperature, pH, the speed of NH_4OH addition and some other factors. In fact, the primary reaction product is centrifuged to eliminate the large particles and to obtain ideal-sized particles, while this centrifugation results in the loss of the most primary reaction product and low production of the ideal-sized particles. In this experiment, the pellet from the centrifugation was treated with ultrasound, and as the result, the production of magnetic iron-dextran particles was increased to 20 times of the original production from 0.5 g to 10 g. When these particles were added to the mixtures of single cells and conjugating pairs of *Paramecium caudatum*, highly synchronized conjugating pairs were obtained, which indicates its high quality of the particles. The importance of the current improvement for preparation of magnetic iron-dextran particles can be evaluated by its universal use in bioscience, biomedical and bioengineering due to their excellent biocompatibility and targeting performance.

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30670297), 浙江省人事厅 2006 年度留学人员科技活动项目择优资助经费, 浙江省临安市科技发展专项基金项目 (No. 2006021), 教育部留学回国人员科研启动基金项目 (No. [2007] 1108), 浙江林学院创新团队支持计划项目 (No. 2006B03);

*通讯作者, E-mail: xianyu_yang@hotmail.com;

第一作者介绍 孙晓婷, 女, 本科生; 研究方向: 生物科学; E-mail: sunxiaoting666837@163.com.

收稿日期: 2009-08-06, **修回日期:** 2009-10-30

Key words: Ultrasound; Iron-dextran particles; Co-precipitation; Ciliates

磁性微小铁葡聚糖颗粒 (magnetic iron-dextran particles) 是以 Fe_3O_4 为核、葡聚糖为壳的结构,具有良好的生物相容性和优异的靶向性能。因此,磁性微小铁葡聚糖颗粒日益受到关注,作为药物、细胞、酶的载体广泛应用于医疗诊断及生物技术工程和工业工程等领域^[1-2]。在纤毛虫研究领域,微小铁葡聚糖颗粒应用于食物泡、分裂球以及接合对的分离^[3-5]。长期以来,本研究室通过共沉淀法中的一步法制备微小铁葡聚糖颗粒,每次的回收量很低^[3,6]。为了提高铁葡聚糖颗粒的回收量,通过超声波处理反应初产物的方法,解决了此问题。

1 材料与方法

1.1 微小铁葡聚糖颗粒制备方法

过去文献^[3,6]中制备微小铁葡聚糖颗粒的方法为:在 250 ml 三角锥形瓶中加入 60 ml 蒸馏水,置于恒温磁力搅拌器上 (60)。将葡聚糖 8.00 g、氯化铁 9.06 g 和氯化亚铁 3.84 g 先后加入锥形瓶中,搅拌至彻底溶解。用蠕动泵将 100 ml 氨水 (7.5%) 以 0.8 ml/min 的流速,滴入上述锥形瓶的混合液中,氨水加完后在 60 保持 3 min。将上述反应物混匀后分装于 4 个 50 ml 离心管,进行离心 (400 g, 2 min)。将上清分别倒入 100 ml 烧杯中并在杯底部放置强力磁铁,以回收上清中的微小铁葡聚糖颗粒。将回收的微小铁葡聚糖颗粒悬浮于 40 ml Tris-HCl (100 mmol/L, pH 7.4) 中,用滴管充分吹吸,以去除残留的氨水,然后再用磁铁回收微小铁葡聚糖颗粒。该步骤重复 3 次。最后将回收的微小铁葡聚糖颗粒悬浮于 20 ml Tris-HCl (100 mmol/L, pH 7.4) 中,离心 (600 g, 2 min),回收上清。这时,上清中含粒径约 1 μm 或更小粒径的铁葡聚糖颗粒。

1.2 微小铁葡聚糖颗粒制备方法的改良

在上述方法中,步骤 离心后的沉淀是扔掉的。本次改良是将这部分沉淀悬浮于 40 ml Tris-

HCl (100 mmol/L, pH 7.4) 中,然后用超声波细胞粉碎机 (KS-450F) 进行超声波处理 (振幅 35%, 5 min) 并离心。留在上清中的铁葡聚糖颗粒用改良前的方法回收。

1.3 尾草履虫接合对的分离及其发育时期的检测

在混有单体尾草履虫 (*Paramecium caudatum*) 及其接合对的细胞培养液中滴入几滴通过上述方法制备的微小铁葡聚糖颗粒,然后通过前人描述的方法分离尾草履虫的接合对^[5-6]。对已分离的接合对,首先利用吖啶橙 (acridine orange, AO) 和 Hoechst 33342 (HO) 进行细胞核染色^[7],然后通过体积定量法制备临时装片^[8],并在荧光显微镜下对细胞进行观察。由于荧光的淬灭性质,随着观察时间的延长,细胞的荧光减弱,与背景之间的反差降低,体现在图片上颜色较淡^[9]。

2 结果

将传统方法中通过离心或过滤去除的沉淀部分悬浮于 40 ml Tris-HCl (100 mmol/L, pH 7.4) 溶液并进行超声波处理的结果,铁葡聚糖颗粒回收量由原来的 0.5 g 增至 10.2 g (表 1)。实验共重复 3 次,结果都十分接近。利用该方法回收的铁葡聚糖颗粒进行纤毛虫接合对分离^[5-6]的结果,接合率达 95% 以上,细胞发育过程也比较同步 (图 1)。

表 1 超声波处理前后铁葡聚糖颗粒回收量的比较

Table 1 Comparison of magnetic iron-dextran particle production before and after ultrasonic treatment

超声波处理 Ultrasonic treatment	每只离心管中的回收量 Production (g)			
	1	2	3	4
处理前 Before treatment	0.15	0.10	0.15	0.10
第一次处理后 After first treatment	2.00	1.60	1.80	2.00
第二次处理后 After second treatment	0.50	0.90	0.50	0.10

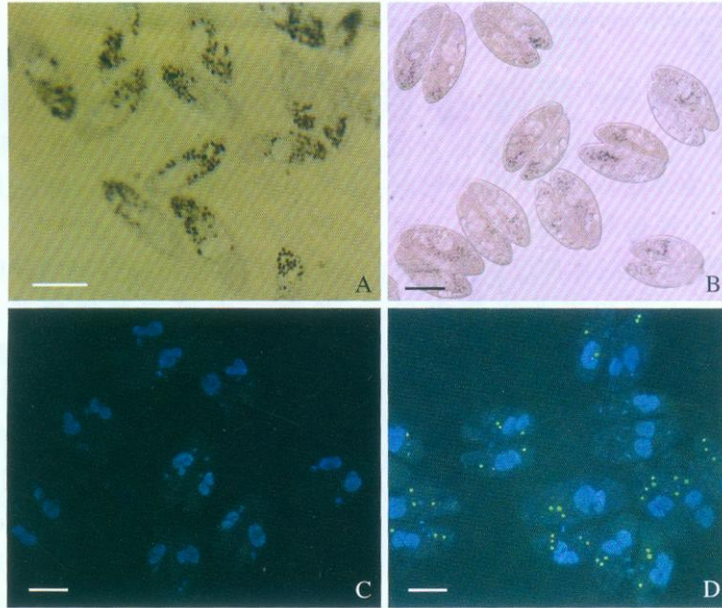


图 1 通过饲喂磁性微小铁葡聚糖颗粒分离的单体尾草履虫及其接合对

Fig. 1 Single cells and conjugating pairs of *Paramecium caudatum* separated by feeding magnetic iron-dextran particles

A: 单体尾草履虫, 细胞内有大量含有磁性微小铁葡聚糖颗粒的食物泡; B: 明视野下观察的接合对; C: 吖啶橙 (AO) 和 Hoechst 33342 (HO) 活体荧光染色, 接合对处于减数第一次分裂中、后期; D: AO/HO 染色, 多数接合对处于配前第三次分裂时期, 细胞中可观察到 3 个凋亡中的减数分裂退化核。标尺 = 100 μm 。

A: Single cells of *P. caudatum* having many food vacuoles containing magnetic iron-dextran particles; B: Conjugating pairs observed under a bright field microscope; C: AO/HO stained conjugating pairs at the 1st meiotic metaphase and anaphase; D: AO/HO stained conjugating pairs at the 3rd prezygotic division stage mostly with three apoptotic meiotic nuclei. Bar = 100 μm .

3 讨论

按共沉淀法中的一步法制备磁性微小铁葡聚糖颗粒的过程中, 反应液中形成很多由小颗粒聚集成块的大颗粒, 通常通过离心将这部分大颗粒去除^[10-13]。作者认为正是这一步离心操作降低了铁葡聚糖颗粒的回收量。本文利用超声波在液体介质中传播时, 在界面产生强烈的冲击和空化现象的特性, 对原方法^[5-6]中反应初产物离心后得到的沉淀部分进行了超声波处理, 结果回收量由原来的 0.5 g 增至 10.2 g (表 1)。利用超声波处理得到的微小铁葡聚糖颗粒进行尾草履虫接合对分离, 接合率达到 95% 以上, 细胞同步发育程度也很高 (图 1)。这些结果表明, 超声波处理在提高微小铁葡聚糖颗粒产量的同时, 也保证了质量, 从根本上解

决了磁性铁葡聚糖颗粒低回收量的问题。这项改良在实际研究与生产中都具有重要的参考价值。

参 考 文 献

- [1] Lambert G, Fattal E, Couvreur P. Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47(1): 99 - 112
- [2] Tanimoto A, Kuribayashi S. Application of superparamagnetic iron oxide to imaging of hepatocellular carcinoma. *Europ J Rad*, 2006, 58(2): 200 - 216.
- [3] Vosskuhler C, Tiedtke A. Magnetic separation of phagosomes of defined age from *Tetrahymena thermophila*. *J Eukaryot Microbiol*, 1993, 40: 556 - 562
- [4] Harekaki T, Sugai T, Takahashi M. Involvement of active cellular mechanisms on the disorganization of oral apparatus in micronucleate cells in *Tetrahymena thermophila*. *Cell Struct Funct*, 1996, 21: 73 - 80.

- [5] Yang X, Takahashi M. Disturbance of determination of germinal and somatic nuclei by heat shock in *Paramecium caudatum*. *J Eukaryot Microbiol*, 1999, 46: 49 - 55.
- [6] 魏锦瑜, 高欣, 杨仙玉. 利用铁葡聚糖分离纤毛虫接合对的方法. *动物学杂志*, 2008, 43 (2): 77 - 80.
- [7] 杨仙玉, 章鑫炯, 黄幸. 活体荧光染料在纤毛虫研究中的应用. *水生生物学报*, 2008, 32 (增刊): 80 - 83.
- [8] 杨仙玉, 黄幸, 章鑫炯, 等. 减缓草履虫运动的活体观察方法. *生物学教学*, 2008, 33 (9): 34 - 35.
- [9] Yang X, Gao X, Shi X. Detection of haploid nuclear death in living *Paramecium caudatum*. *Jpn J Protozool*, 2007, 40: 7123 - 7130.
- [10] 丁军, 赵继红, 李祎, 等. 中等粒径葡聚糖超顺磁性氧化铁纳米颗粒的制备. *中国实验诊断学*, 2007, 11 (1): 102 - 104.
- [11] 谌志强, 段惠丽, 李君文, 等. 葡聚糖纳米磁性颗粒的制备及表征. *解放军预防医学杂志*, 2007, 25 (6): 394 - 397.
- [12] 曹正国, 周四维, 孙凯, 等. 超顺磁性葡聚糖氧化铁纳米颗粒的制备及其作为基因载体的可行性研究. *癌症*, 2004, 23 (10): 105 - 109.
- [13] 陶凯雄, 夏泽锋, 王国斌. 医用葡聚糖磁性纳米微粒的制备及特性研究. *华中科技大学学报: 医学版*, 2006, 35 (5): 653 - 636.