NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.12/47 , 2022

Scan online to view this article

Comparison of the effects of functionalized MNPs by mesoporous silica and L-lysine (NH_2-Si@Fe_3O_4) on structural changes of egg white lysozyme protein (HEWL)

Forough Zakernezhad[1], Behnam Rasekh[2], Parvaneh Maghami[3*], Fatemeh Yazdian [4]

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran
2 Environment & Biotechnology Division, Research Institute of Petroleum Industry (RIPI), P.O. Box: 14665-137, Tehran, Iran
3 Department of Biophysics, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran
4 Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: Adsorption of protein on inorganic surfaces leads to structural and functional changes that depend on the nature of the adsorbed protein and the physicochemical properties of inorganic surfaces. Magnetic nanoparticles (MNPs) with biocompatible coatings are the only FDA-approved nanostructured materials with various applications in medical sciences and unique properties that have become a high-potential material. The study of the bioimmunity of MNPs requires detailed knowledge of the interaction of MNPs with biological molecules, especially proteins. The present study, Comparison of the effects of functionalized MNPs by mesoporous silica and L-lysine (NH_2-Si@Fe_3O_4) on structural changes of egg white lysozyme protein (HEWL**).**

Material and Methods: Structural properties and physicochemical characteristics of functionalized MNPs by FTIR, XRD, TEM, FESEM, VSM, and DLS analyses and Protein-nanoparticle interaction were performed using intrinsic fluorescence techniques, ANS test, thioflavin T (ThT) and ATR-FTIR and protein thermal aggregation. The structure change of HEWL on interaction with MNPs was studied.

Conclusion: Investigation of the interaction of HEWL and MNPs with the help of intrinsic fluorescence showed that the binding of proteins to MNPs is influenced by the type of ligand attached to MNPs. Screening thermal aggregation of HEWL in the presence of MNPs revealed the effective role of NH2-Si@Fe3O4 in inhibiting thermal aggregation of HEWL.

Results: A comparison of nanoparticle performance with the functional group and without the functional group showed that functionalized nanoparticles had better performance; therefore, it is important to consider the environmental, health, and safety aspects in the early stages of nanoparticle use. This report provides an integrated picture of protein-MNP interaction and the change in protein structure after binding to MNPs.

Keywords: Magnetic nanoparticles, Mesoporous silica, L-lysine, Lysozyme protein, Iau Science.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.7.4]

Corresponding author:
Department of Biophysics, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran
Email: maghami.p@srbiau.ac.ir

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۲ - شماره۴۷ - تابستان۱۴۰۱
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

مقایسه اثرهای MNPs عامل‌دار شده با سیلیکای مزوپور و L-لیزین (NH_2-Si@Fe_3O_4) بر تغییرهای ساختاری پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ (HEWL)

فروغ ذاکرنژاد[۱]، بهنام راسخ[۲]، پروانه مقامی[۳*]، فاطمه یزدیان[۴]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه پژوهش میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران
۳. گروه بیوفیزیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۴. گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: جذب پروتئین بر سطوح غیرآلی، منجر به تغییرهای ساختاری و عملکردی می‌گردد که وابسته‌به طبیعت پروتئین جذب‌شده و خصوصیت‌های فیزیکوشیمیایی سطوح غیرآلی است. نانوذرات مغناطیسی (MNPs) با پوشش‌های زیست‌سازگار تنها مواد نانوساختار مورد تأیید FDA هستند که با کاربردهای متنوع در زمینه‌های مختلف علوم پزشکی و خصوصیت‌ها ویژه به ماده‌ای با پتانسیل بالا تبدیل شده‌اند. بررسی ایمنی زیستی MNPs، نیاز به دانش دقیق در مورد بر هم-کنش MNPs با مولکول‌های زیستی به‌ویژه پروتئین‌ها است. مطالعه حاضر، مقایسه اثرهای MNPs عامل‌دار شده با سیلیکای مزوپور و L-لیزین (NH_2-Si@Fe_3O_4) بر تغییرهای ساختاری پروتئین لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ (HEWL) را ارائه می‌دهد.

مواد و روش‌ها: خصوصیت‌های ساختاری و شاخص‌های فیزیکوشیمیایی MNPs عامل‌دار شده توسط آنالیزهای FTIR، XRD، TEM، FESEM، VSMو DLS و بر هم‌کنش پروتئین- نانوذرات با استفاده از تکنیک‌های فلورسانس ذاتی، تست ANS، تیوفلاوین‌تی (ThT)، ATR-FTIR و تجمع حرارتی پروتئین انجام شد. تغییر ساختار HEWL برتعامل با MNPs مطالعه گردید.

یافته‌ها: بررسی تعامل HEWL و MNPs با کمک فلورسانس ذاتی، نشان داد اتصال پروتئین‌ها با MNPs تحت تأثیر نوع لیگاند متصل به MNPs است. غربالگری تجمع حرارتی HEWL درحضورMNPs، نقش‌مؤثر NH_2-Si@Fe_3O_4 را در مهار تجمع حرارتی HEWL بیان نمود.

نتیجه‌گیری: مقایسه روی عملکرد نانوذرات با گروه عاملی و بدون گروه عاملی، نشان داد نانوذره عامل‌دار شده عملکرد مناسب تری داشته است، لذا مهم است جنبه‌های محیطی، سلامتی و ایمنی در مراحل اولیه استفاده از نانوذرات درنظر گرفته شود. دراین تحقیق تعامل پروتئین و MNPs و تغییر ساختار پروتئین پس از اتصال به MNPs مورد بررسی قرار گرفته است.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات مغناطیسی، سیلیکای مزوپور، L-لیزین، پروتئین لیزوزیم، Iau Science.

مقدمه

بازآرایی ساختار پروتئین‌ها به راحتی در برهم‌کنش با عوامل برون‌زا مانند سورفکتانت‌ها، یون‌ها، نانوذرات (NPs) و غیره اتفاق می‌افتد. عوامل زیادی در بر هم‌کنش نانوذرات و پروتئین‌ها ازجمله ماهیت نانوذرات، اندازه، شکل و میزان بارسطحی NPs تأثیر دارند. ویژگی‌های ساختاری و پایداری ذاتی و ترمودینامیکی پروتئین نیز در برهم‌کنش آن با NPs موثر می باشد (۲،۱). Kathiravan و همکاران نشان دادند NPs باعث ایجاد اختلال در ساختار ثانویه پروتئین‌ها شده که در برخی موارد غیرقابل برگشت است (۳).

نویسنده مسئول:
گروه بیوفیزیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
پست الکترونیکی: maghami.p@ut.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۹

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.7.4]

نانوذرات سیلیس (۴)، نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 (۵)، طلا (۶) و نقره (۷) انواع مختلف NP هستند که تأثیر آن-ها بر ساختار پروتئین بررسی شده است. به تازگی، کاربرد نانوذرات مغناطیسی (MNP_s) در زیست‌فناوری و زیست-پزشکی به‌دلیل ویژگی‌های ارائه شده توسط این نانومواد هم-چون اندازه بسیار ریز NPs، حساسیت مغناطیسی بالا، دمای کوری پایین، زیست‌سازگار بودن و بروز رفتارهای سوپرپارامغناطیس بسیار مورد توجه است (۸). مطالعات نشان داده فعالیت زیستی MNPs به اندازه، شکل، هسته و پوسته آن‌ها بستگی دارد. سطح وسیع MNPs برای ورود به محیط زیستی باید اصلاح سطح شود (۹). اگر MNPs به‌طور مستقیم درمحیط زیستی استفاده گردد، به‌دلیل خواص مغناطیسی و مساحت سطح بالا، تمایل به لخته‌شدن و اکسیداسیون درآن‌ها وجود دارد. برای جلوگیری از این مشکل، فرآیند پوشش‌دار کردن نانوذرات به‌وسیله عوامل حفاظتی ضروری است(۱۰). نانوذرات دارای پوشش مناسب اثرات کم‌تری برسمیت سلولی داشته و زیست‌سازگاری بیش‌تری نشان می‌دهند. سورفکتانت‌ها و پلی‌مرها (۱۱) متداول‌ترین عوامل حفاظتی آلی هستند، هم‌چنین ترکیبات معدنی متعدد نظیر سیلیکا (۱۲)، پلی‌مرهای مصنوعی و آلومینا به‌منظور حفاظت از MNPs استفاده می‌شوند (۱۳). افزودن گروه عاملی به MNPs فرصتی برای مهندسی خواص‌سطحی در رابطه با کاربردهای هدفمند فراهم می‌کند (۱۴).

اصلاح نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 با آرژنین به‌عنوان یک گروه عملکردی توسط Kashanian و همکاران انجام شد، ساختار و فعالیت لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ (HEWL) به-عنوان پروتئین مدل درذخیره‌سازی، دناتوراسیون و فرآیندهای بازتاخوردگی مورد بررسی قرارگرفت و غلظت مناسب جهت بهبود عملکرد نانوذره تعیین شد. طبق نتایج، MNPs اصلاح‌شده با L-آرژنین [Fe_3O_4@Arg]، می‌تواند مزایای زیادی برای استفاده در برنامه‌های کاربردی زیستی داشته باشد (۱۵). Thanh و همکاران، MNPs را به‌وسیله مجموعه‌ای از اتصال دهنده‌ها شامل-تتراتیل‌ارتوسیلیکات (TEOS)، ۳-آمینوپروپیل‌تری-اتوکسی سیلان (APTES) و گلوتارآلدهید (GA) برای تولید ساختار $Fe_3O_4/Sio_2/NH_2/CHO$ جهت تثبیت پروتئین A تغییر دادند. طبق نتایج، این ذرات با گروه‌های عملکردی روی سطحشان، کاندیدای مناسب برای کاربردهای پزشکی هستند (۱۶).

در بین موادمعدنی، پوشش بی‌اثر سیلیکا رایج‌ترین شیوه برای حفاظت سطح MNPs است، زیرا از تجمع MNPs در محلول جلوگیری کرده، پایداری شیمیایی نانوذرات و محافظت از آن‌ها در برابر سمیت را افزایش می‌دهد (۱۷). توسعه نانوذرات سیلیکای مزوپور (MSN_s)، MNPs، نقاط کوانتومی و نانولوله‌های کربنی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (۱۸) که در میان این حامل‌ها، MSN_s، از مؤثرترین و موفق‌ترین ذرات برای کاربردهای پزشکی است (۱۹). استفاده از ساختارهای MSN_s در انتقال دارو از طریق واکنش‌های کاتالیزوری به‌دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد از جمله ظرفیت بارگیری بالا، منافذ قابل تنظیم، سطح وسیع، پایداری، سهولت سنتز، تخلخل تنظیم‌پذیر و زیست‌سازگاری بسیارخوب درحال افزایش است (۲۰). در مطالعه Park، هیالورونیک‌اسید به MSN_s متصل شد. HA-MSN_s، بارگذاری دارویی بالاتری را در مقایسه با MSN_s به‌تنهایی، نشان داد (۲۱). در پژوهشی، گرافن-اکسید به MNPs اکسیدآهن‌پوشش‌دار شده با سیلیکای-مزوپور متصل شد. طبق نتایج GO/MNP@SiO_2 می-تواند برای جداسازی پروتئین مورد استفاده قرار گیرد (۲۳،۲۲). در پژوهش Tavakoli و همکاران، به‌منظور افزایش دسترسی پروتئین، هسته نانوذرات مغناطیسیFe_3O_4، توسط MSN_s و گروه آمین، عامل‌دار شد و توانایی نانوذرات عامل‌دار شده برای جداسازی پروتئین ارزیابی گردید. طبق نتایج، ظرفیت جذب به‌طور قابل توجه با نانوذرات پوشش‌دار شده با MSN_s افزایش یافت (۲۴). مطابق تحقیقی، برهم‌کنش‌پروتئین با NP_sباردار ممکن است بدون توجه‌به علامت بار سطحی آنها رخ دهد (۲۵). در حالی‌که پروتئین به‌شدت به‌NP_s با بارمخالف متصل می‌شود، جذب پروتئین در NP_s با بار مشابه امکان‌پذیر است (۲۶). شرایط محلول مانند pH، دما و قدرت یونی نیز در تنظیم سیستم پروتئین-NP_s نقش دارند (۲۷).

به‌طور معمولی پروتئین‌های کروی به‌عنوان پروتئین هدف MNP_s به‌دلیل در دسترس بودن، هزینه کم و خلوص بالا، حلالیت و پایداری انتخاب می‌شوند (۲۸) HEWL؛ از رایج‌ترین مدل‌های پروتئین کروی با ساختار سه‌بعدی شناخته شده است (۲۹).

وجود بار مثبت در pH فیزیولوژیک ۷/۴ بر HEWL (۳۰)، دلیل دیگر جهت مطالعات جذب پروتئین روی MNPs است. HEWL یک پلی‌پپتید تک زنجیره با وزن‌مولکولی ۱۴/۳۰۷ کیلودالتون، حاوی ۱۲۹ رزیدوی آمینواسید با ۴ باند دی‌سولفیدی داخل مولکولی و نقطه ایزوالکتریک نزدیک به ۱۱/۳ است که به‌راحتی در محیط آبی حل می-شود (۳۱). مطالعه برهم‌کنش MNP_s و HEWL، به

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.7.4]

شفاف‌سازی ماهیت شیمیایی تعاملات بین‌مولکول‌های زیستی و MNP_s کمک می‌کند (۱۵). طبق گزارش Kashanian و همکاران، پایداری HEWL در غلظت‌های پایین MNPs بهبود یافت. استفاده از pHهای مختلف و به‌کارگیری لیگاند با ویژگی‌های متمایز، به‌عنوان دو استراتژی درک مکانیسم تعامل پروتئین-MNPs انتخاب شدند. توسط طیف‌سنجی UV-vis بینش در مورد سینتیک تجمع پروتئین درحضور غلظت‌های مختلف Fe_3O_4 فراهم شد. نتایج تحقیق، اهمیت زیادی در کنترل فعل و انفعالات پروتئین-MNPs برای تولید NP مؤثرتر برای کاربردهای آینده داشت (۳۲). با توجه‌به نقش گروه های عاملی در عملکرد بهتر و زیست سازگار شدن MNPs، در تحقیق حاضر L-لیزین (گروه عاملی $-NH_2$) روی سطح MNPs پوشیده شده با MSNs قرار داده شد تا امکان جذب پروتئین در سطح نانوذرات و در فضای منافذ مزوپروس فراهم شود. در این مطالعه، اثرات نانوذره اکسیدآهن عامل‌دار شده با سیلیکای مزوپروس ($Si@Fe_3O_4$) و نانوذره سیلیکای مزوپور آراسته شده با گروه عاملی NH_2-، (NH_2-$Si@Fe_3O_4$)، بر تغییرات ساختاری، پایداری وعملکرد HEWL، بررسی و مقایسه شد. مشخصه های مربوط به نانوذرات و پروتئین بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

لیزوزیم سفیده تخم مرغ (HEWL) (EC.3.2.1.17,Mw=14.3KDa)، تیوفلاوین‌تی(ThT) و ۸-آنیلینو ۱-نفتالن‌سولفونیک‌اسید (ANS) از سیگما آلدریچ خریداری شد. مواد شیمیایی و حلال‌های آلی از Merck تهیه شدند. دیواره سلولی خشک شده باکتری گرم مثبت *میکروکوکوس لوتئوس* (*M.Luteus*)، از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه و به‌عنوان سوبسترای لیزوزیم استفاده گردید.

سنتز نانوذرات $Si@Fe_3O_4$ و NH_2-$Si@Fe_3O_4$

نانوذرات مغناطیسی به‌عنوان هسته نانوذرات $Si@Fe_3O_4$ و NH_2-$Si@Fe_3O_4$ با استفاده از روش هم‌رسوبی طبق فرمول واکنش (۱) سنتز گردید(۳۳):

$$Fe^{2+} + 2Fe^{3+} + 8OH^- \longrightarrow Fe(OH)_2 + 2Fe(OH)_3 \xrightarrow{-4H_2O} Fe_3O_4 \quad (1)$$

ابتدا ۰/۵گرم $FeCl_2.4H2O$ و ۱/۳۵گرم $FeCl_3.6H20$، تحت گاز نیتروژن در یک بالن سه دهانه در ۲۵ ml آب دیونیزه حل شدند. محلول حاصل تحت استیرر، حرارت داده شد. زمانی‌که دمای محلول ۸۰°C و رنگ محلول نارنجی شد، جهت قلیایی شدن محیط، مقداری آمونیاک ۲۵٪ آهسته و قطره قطره به محلول اضافه و هم زده شد. با تبدیل رنگ محلول از نارنجی به سیاه، تولید نانوذرات مگنتیت تأیید گردید. پس از جدا شدن نانوذرات به‌وسیله آهن‌ربا، نمونه‌ها ۳ بار با آب دیونیزه و ۲ بار با اتانول برای حذف یون‌های اضافی شسته شد و مدت یک شبانه روز در خشک‌کن انجمادی با دمای ۵۰°C- خشک شدند (۲۴). جهت سنتز $Fe_3O_4.SiO_2$، تکنیک سل-ژل مورد استفاده قرار گرفت (۳۴). به این‌صورت که مخلوطی از ۱۵۰ mg نانوذره مغناطیسی در اتانول تهیه و سه بار با آب دیونیزه شسته شد. ۵۰ ml هیدروکلریک اسید ۳۷٪ با مولاریته ۰/۱٪ اضافه شد و محلول ۳۰ دقیقه تحت اولتراسونیک قرار گرفت. سوپرناتانت جدا شد و ذرات باقی‌مانده در ۸۰ ml اتانول و ۲۰ ml آب دیونیزه مدت ۱۰ دقیقه تحت سونیکاسیون قرار گرفتند. در شرایط هم زدن، ۱ ml آمونیوم هیدروکسید (۲۸ wt%) و ۰/۸ ml ترا اتیل ارتوسیلیکات (TEOS) و ۰/۳ گرم ستیل‌تری متیل آمونیوم‌برومید (CTAB) به محلول اضافه شد. جهت اصلاح نانوذرات، ۰/۹ گرم L-لیزین تحت استیرر شدید اضافه شد و واکنش ۶ ساعت در ۳۰°C مداوم ادامه یافت. نانوذرات تحت خلأ و دمای ۶۰°C به‌مدت ۸ ساعت خشک شدند (۳۵).

مشخصه‌یابی نانوذرات $Si@Fe_3O_4$ و NH_2-$Si@Fe_3O_4$

بعد از سنتز و عامل‌دارکردن نانوذرات، با استفاده از روش-های تحلیلی مختلف، مشخصه‌یابی انجام شد. آزمون XRD برای نانوذرات مغناطیسی $Si@Fe_3O_4$ و NH_2-$Si@Fe_3O_4$ با دستگاه پراش پرتو ایکس مدل PW 1730، تحت تابش Cu-Kα (λ=۱/۵۴۰۵۶A°)، در ولتاژ ۴۰ کیلوولت و جریان ۳۰ میلی‌آمپر انجام گرفت. محدوده اسکن 2θ از۸۰-۱۰درجه قرار داده شد. تحلیل و بررسی نتایج حاصل از این آزمون توسط نرم‌افزار XPERT high score plus نسخه ۵،۰،۳ انجام شد. بررسی پیوندهای نانوذرات و تأیید عامل‌دار شدن نانوذرات با دستگاه FT-IR Spectrophotometer مدل Spectrum Two در محدوده cm^{-1} ۴۰۰۰-۴۰۰ انجام شد. مغناطیس اشباع (MS) نمونه‌ها با دستگاه مغناطیس‌سنج نمونه مرتعش (VSM, MDK;Meghnatis Daghigh Kavir Co.; Iran) در دمای اتاق اندازه‌گیری شد. ارزیابی پتانسیل زتا و اندازه نانوذرات در بافر سدیم فسفات (PBS, 7.4 ۱۰۰100mM,pH)، با دستگاه پراکندگی نور

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.7.4]

دینامیکی (DLS) از سری Malvern ZS-Nano تعیین شد. مورفولوژی سطحی نانوذرات (شکل، صافی، زبری و توده‌ای شدن) با دستگاه FESEM و TEM بررسی گردید. بارسطحی و پتانسیل زتای نانوذرات با استفاده ازدستگاه زتاسایزر شرکت Brookhaven Instruments Corp اندازه‌گیری‌گردید. محدوده توزیع اندازه ذرات، با استفاده از دستگاه پراکندگی نور دینامیکی (DLS) از سری Malvern ZS-Nano تعیین شد.

طیف سنجی ATR-FTIR

طیف‌سنجی انعکاس‌کل تضعیف شده تبدیل فوریه مادون قرمز (ATR-FTIR) برای ارزیابی ساختار ثانویه پروتئین استفاده گردید. غلظت‌پروتئین، ۰/۲میلی‌گرم/میلی‌لیتر و غلظت نانوذرات ۰/۰۲ و ۰/۱میلی‌گرم/میلی‌لیتر انتخاب شدند (۳۶). نمونه‌ها ۲۴ ساعت در ۲۰۰ rpm، در شرایط محیطی انکوبه شدند. جهت بررسی ویژگی‌های ساختاری از طیف‌سنج تبدیل فوریه مادون قرمز (Nicolet NEXUS, Thermo Nicolet Co. America) متصل به‌نرم‌افزار OMNIC، مجهزبه‌ثبت‌انعکاسی ATR استفاده شد. محدوده بررسی $4000\text{-}600\,cm^{-1}$ انتخاب شد.

فلورسانس ذاتی

طیف نشری فلوئورسانس تریپتوفان HEWL (غلظت ۰/۲میلی‌گرم/میلی‌لیتر) در بافر سدیم فسفات ۰/۱ مولار pH=۷/۴، در غیاب نانوذرات به‌عنوان کنترل و در حضور غلظت‌های مختلف MNP_s (۰/۱-۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر)، پس از قرارگرفتن نمونه‌ها مدت ۴ ساعت در شیکر rpm ۲۰۰ و انکوبه‌شدن در شرایط محیطی، با استفاده از اسپکتروفلوریمتر (BioTek, Synergy^{TM} H_4 Hybrid microplate reader) در پلیت ۹۶ چاهکی در دمای اتاق ثبت شد. طول‌موج برانگیختگی تریپتوفان در۲۸۰ نانومتر تنظیم شد و طیف نشری فلوئورسانس در محدوده ۳۰۰-۴۰۰ نانومتر و در فواصل ۵ نانومتر ارزیابی گردید. داده‌ها، میانگین ۴ اندازه‌گیری برای هر نمونه است.

آنالیز بر هم‌کنش پروتئین-نانوذرات توسط ANS

۸-آنیلینو نفتالن ۱-سولفونات (ANS) یک رنگ فلورسانس است که به بر هم‌کنش آب‌گریز بسیار حساس بوده و جهت اندازه‌گیری میزان آب‌گریزی سطح پروتئین‌ها و نظارت بر روند بازشدن/ تاشدن استفاده می‌شود (۳۷). نمونه‌های پروتئین با غلظت ۰/۲میلی‌گرم/میلی‌لیتر در بافر ۰/۱مولار سدیم‌فسفات و pH=۷/۴ و غلظت‌های مختلف MNPs (۰/۱-۰میلی‌گرم/میلی‌لیتر) تهیه شد. استوک ۵۰۰μM از ۸-آنیلینو نفتالن ۱-سولفونیک اسید در آب- مقطر ساخته شد. ۵۰ μl محلول کار (نمونه حاوی پروتئین و نانوذرات) و ۱۵۰ μl محلول استوک ANS در هر چاهک ریخته شد. آنالیز فلورسانس دردو زمان انجام گرفت: ۱-بلافاصله بعدازافزودن نانوذرات به محلول حاوی پروتئین، ۲-بعد از ۴ ساعت انکوباسیون پروتئین با نانوذرات. طول موج برانگیختگی در۳۸۰ نانومتر تنظیم و طیف نشری فلورسانس در محدوده طول‌موج ۶۰۰-۴۰۰ نانومتر در فواصل ۵ نانومتر اسکن شد. این آزمایش با استفاده از اسپکتروفلوریمتر (BioTek, Synergy^{TM} H_4 Hybrid microplate reader) در یک پلیت کوارتز ۹۶ چاهکی و در دمای اتاق ثبت شد.

آنالیز بر هم‌کنش پروتئین-نانوذرات توسط تیوفلاوین تی (ThT)

نمونه‌های پروتئین با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در بافر ۰/۱ مولار سدیم‌فسفات و pH=۷/۴ و غلظت‌های مختلف MNPs (۰/۱-۰میلی‌گرم/میلی‌لیتر) تهیه شد. استوک ۲۵۰ μm از ThT در بافر سدیم فسفات ساخته شد. مقدار ۵۰ μl از نمونه‌های حاوی پروتئین و نانوذرات و ۱۵۰ μl از محلول استوک ThT در هر یک از چاهک‌های پلیت ریخته شد. پلیت با فویل پوشانده شده و مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق، دور از نور قرار داده شد. برای این تست، آنالیز فلورسانس در دو زمان انجام گرفت:

۱) بلافاصله بعد از اضافه نمودن نانوذرات به محلول‌های حاوی پروتئین،
۲) بعد از ۴ ساعت انکوباسیون پروتئین با نانوذرات.

این آزمایش با استفاده از اسپکتروفلوریمتر (BioTek, Synergy^{TM} H_4 Hybrid microplate reader) در یک پلیت کوارتز ۹۶ چاهکی و دمای اتاق انجام شد. طول‌موج برانگیختگی در۴۲۰ نانومتر تنظیم و طیف نشری فلوئورسانس در محدوده ۶۶۰ -۴۴۰ نانومتر و در فواصل ۵ نانومتر سنجیده شد.

سنجش فعالیت HEWL

جهت سنجش فعالیت آنزیم لیزوزیم، دیواره سلولی خشک‌شده باکتری‌گرم مثبت *میکروکوکوس-لیزودیکتیکوس* (*M.Luteus*) در بافر سدیم‌فسفات ۰/۱مولار با pH=۷/۴ به‌عنوان سوبسترا استفاده شد. سنجش فعالیت آنزیم درغیاب و درحضور غلظت‌های مختلف نانوذرات (۰/۱-۰میلی‌گرم/میلی‌لیتر) با اسپکترو فوتومتر UV-vis انجام شد. ۴۰ μl محلول پروتئینی (۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) به ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون‌باکتری (۰/۰۱ ٪ w/v) اضافه شد. سرعت شکسته شدن دیواره

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.7.4]

سلولی باکتری با اندازه‌گیری جذب در ۴۵۰ نانومتر بررسی گردید.

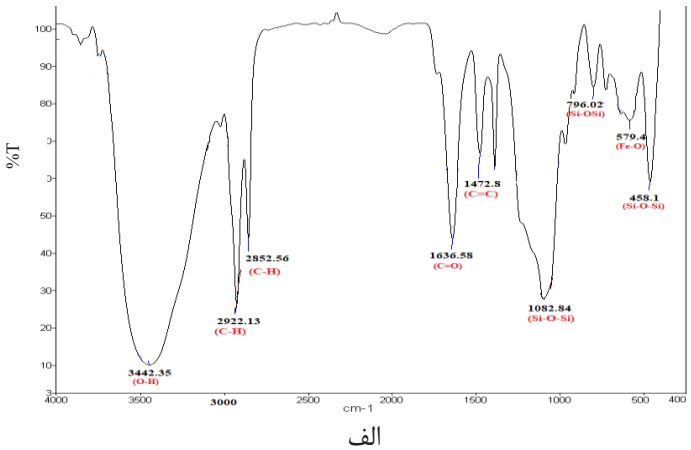
آنالیز تجمع پروتئین با استفاده از ANS

نمونه‌های پروتئین با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر لیزوزیم در بافر سدیم فسفات ۰/۱ مولار pH=۷/۴ آماده شد. غلظت‌های مختلفMNPs (۰/۱-۰میلی‌گرم/میلی-لیتر) استفاده شد. نمونه‌ها جهت تشکیل توده پروتئینی در دمای ۹۰°C یک ساعت حرارت داده شدند. برای انجام تست، استوک ANS ۳۰ µM در آب مقطر ساخته شد. ۵۰ µl نمونه حاوی توده پروتئینی و ۱۵۰ µl استوک ANS، در هر چاهک ریخته شد. سنجش فلورسانس در طول موج ۳۸۰ نانومتر انجام گرفت و طیف‌های نشری بین ۶۰۰-۴۰۰ نانومتر ذخیره شدند.

نتایج

سنتز و مشخصه‌یابی MNP_s

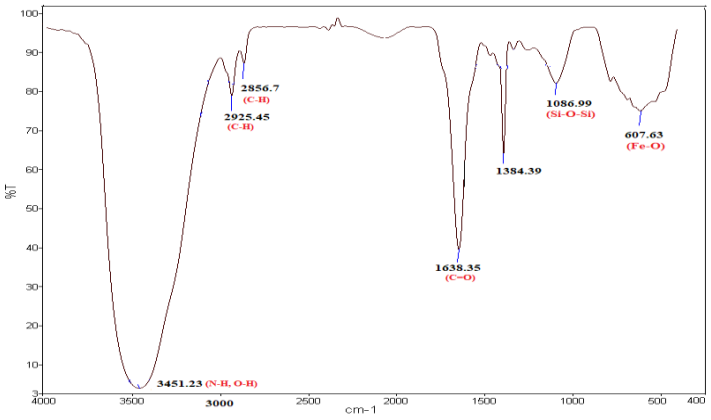
نانوذرات Fe_3O_4@Si وNH_2-Si@Fe_3O_4 پس از سنتز، با استفاده از روش‌های مکمل، شامل طیف FTIR، مغناطیس‌سنجی VSM، پراش اشعه‌ایکس XRD و پراکندگی نوردینامیکی DLS مشخصه‌یابی شدند. طیف FT-IR برای نظارت بر روند عامل‌دار شدن MNPs به کار گرفته شد. بررسی پیوند سیلیکا با سطح MNPs به‌وسیله طیف‌سنجی FTIR قبل و بعد از آمین‌دار شدن انجام گرفت (شکل ۱ الف و ب). مطابق شکل ۱ الف (Fe_3O_4@Si)، پیک جذبی در ناحیه ۵۷۹/۴ Cm^{-1} مشخص‌کننده ارتعاش کششی پیوند Fe-O در نمونه‌های مگنتیت است. ناحیه ارتعاش کششی Fe-O در نمونه‌های مغناطیسی به‌صورت توده، اغلب در حدود ۵۷۰ Cm^{-1} است. در مقایسه با نانوذرات مغناطیسی اصلاح نشده، باندهای‌جذبی Fe–O نانوذرات مغناطیسی پوشش‌دار شده با سیلیکا به طول‌موج بالاتر جابه‌جا شده‌اند که دلیل آن تشکیل پیوندهای Fe–O–Si بر سطح نانوذرات است (۳۸). پیک در ۱۴۷۲/۸ Cm^{-1} مربوطبه ارتعاشات‌کششی C=C است. پیک موجود در ۱۶۳۶/۵ Cm^{-1} نشان‌دهنده ارتعاشات کششی C=O است. پیک‌ها در ۲۹۲۲/۱۳ Cm^{-1} و ۲۸۵۲/۵۶ Cm^{-1} به ارتعاش کششی پیوندهای C-H اشاره دارند. هم‌چنین قله پهن در ۳۴۴۲/۳۵ Cm^{-1} ناشی از ارتعاشات کششی پیوند O-H است. پیک ارتعاش کششی نامتقارن و کششی متقارن Si-O-Si به‌ترتیب در ۱۰۸۲/۶ Cm^{-1} و ۷۹۶/۰۲ Cm^{-1} ظاهر شدند. ارتعاشات خمشی پیوند Si-O-Si در ناحیه ۴۵۸/۱ Cm^{-1} ظاهر شده است. وجود این قله‌ها نشان‌دهنده تشکیل لایه‌سیلیکا اطراف نانوذرات‌مغناطیسی است. در دو منحنی طیف‌ها (A و B ۱) قله در محدوده ۱۰۸۲ Cm^{-1} مشاهده شده که به ارتعاش کششی نامتقارن Si-O-Si نسبت داده می-شود. درشکل ۱ ب، (NH_2-Si@Fe_3O_4)، قله‌ای‌که در ۱۰۸۶/۹۹ Cm^{-1} ظاهر شده مربوط به ارتعاش‌کششی نامتقارن Si-O-Si است که حاکی از وجود پوشش SiO_2 روی سطح نانوذرات مغناطیسی است. قله‌های جذب در منطقه ۲۸۵۰ Cm^{-1} و ۲۹۲۶ به ارتعاش کششی‌گروه‌های متیلن NH_2-Si@Fe_3O_4 نسبت داده می‌شوند (۳۹). پیک جذبیFe–O در۶۰۷/۶۳ Cm^{-1} ظاهر شده است. ارتعاشات کششی N-H با ارتعاشات کششی پیوند O-H در ناحیه۳۴۵۱/۲۳ Cm^{-1} همپوشانی دارد. طیف FTIR حاصله، تشکیل یک پوسته سیلیکای مزوپور روی نانوذرات مغناطیسی و عامل‌دارکردن پوسته سیلیکا با L-لیزین را تأیید کرد.



الف

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.7.4]

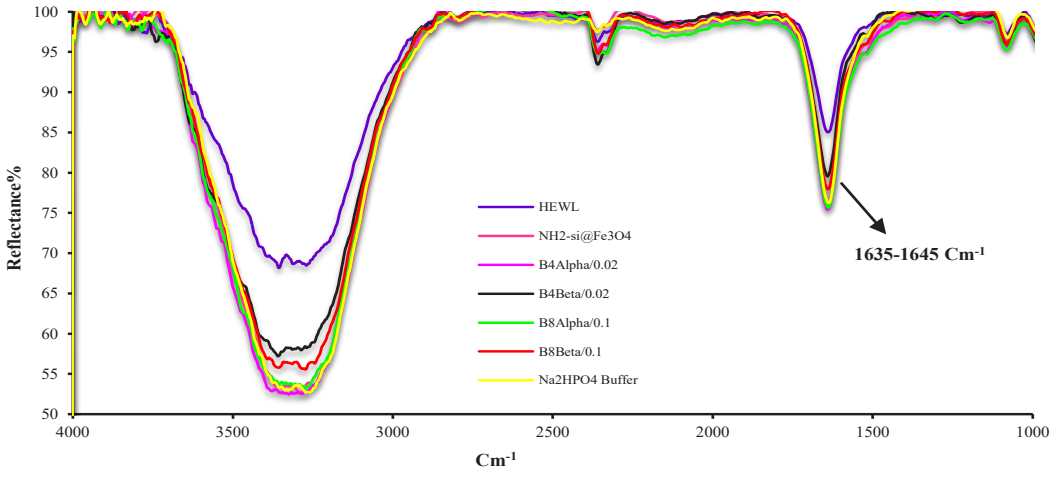


ب

شکل ۱- طیف FTIR نانوذرات الف) $Si@Fe_3O_4$، که نشان‌دهنده تشکیل پوسته سیلیکای مزوپور روی نانوذرات مغناطیسی و ب) NH_2-$Si@Fe_3O_4$ نشان‌دهنده عامل‌دارکردن پوسته سیلیکا با L-لیزین

طیف سنجی ATR-FTIR

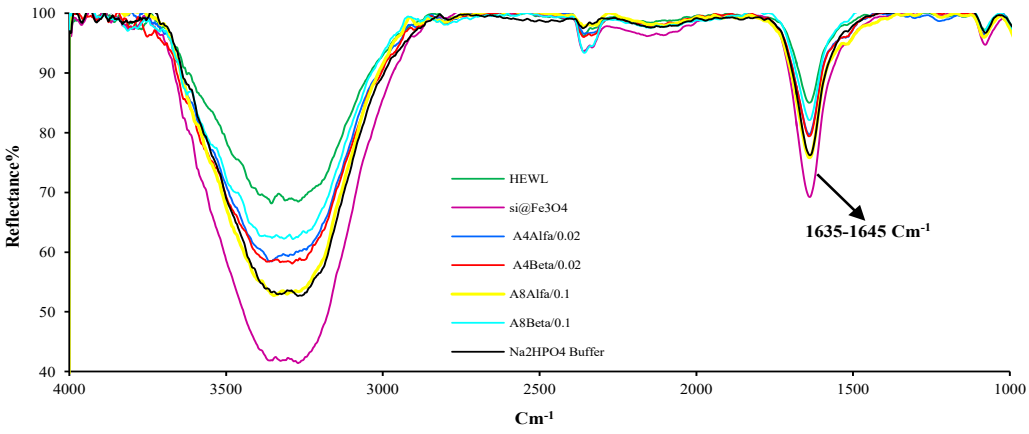
شاخص‌ترین طیف در شناسایی ساختمان دوم پروتئین‌ها در محیط آبی، باند آمید I است. عدد موج این باند در محدوده $1600-1699 Cm^{-1}$ ظاهر می‌شود. شکل ۲ (الف و ب)، طیف‌های به دست آمده از بررسی تغییرات ساختار ثانویه پروتئین در حضور دو غلظت مختلف نانوذرات الف) NH_2-$Si@Fe_3O_4$ و ب) $Si@Fe_3O_4$ با استفاده از طیف-سنج تبدیل فوریه مادون قرمز را نشان می‌دهد. طیف‌های پیوند آمید I لیزوزیم در حضور هردو نانوذرات در محدوده $1630-1670 Cm^{-1}$ (محدوده شاخص $1600-1699 Cm^{-1}$) ظاهر شده‌اند. هم‌چنین شدت پیوند پروتئین در حضور دو غلظت مختلف نانوذرات کاهش یافته است. با توجه‌به شکل ۲ (الف و ب) مشاهده می‌شود شدت پیوند پروتئین لیزوزیم کاهش یافته و در حضور دو غلظت مختلف نانوذرات NH_2-$Si@Fe_3O_4$ و $Si@Fe_3O_4$ کمابیش به یک نسبت کاهش داشته که نشان‌دهنده ایجاد تغییرجزئی این نانوذرات، در ساختار ثانویه پروتئین است.



الف

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

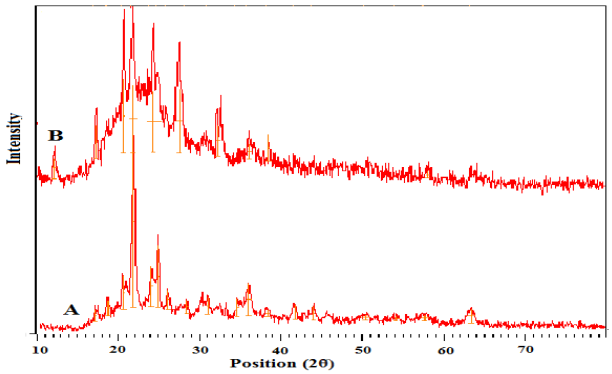
[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.7.4]



ب

شکل ۲- طیف ATR-FTIR بررسی تغییرهای ساختار ثانویه لیزوزیم در حضور دو غلظت مختلف نانوذرات (B4 غلظت۰/۰۲ mg/ml نانوذرات، B8 غلظت ۰/۱ mg/ml نانوذرات ،Alpha و Beta نمونه و تکرار آن) الف) NH_2-$Si@Fe_3O_4$ و ب) $Si@Fe_3O_4$ ، که شـدت پیوند پروتئیـن لیزوزیم درحضـور دو غلظـت مختلف نانوذرات NH_2-$Si@Fe_3O_4$ و $Si@Fe_3O_4$ کمابیش به یک نسبت کاهش داشته که نشان‌دهنده ایجاد تغییرجزئی این نانوذرات، در ساختار ثانویه پروتئین است.

شکل۳، الگوی تفرق اشعـه‌ایکس نانـوساختارهای A:$Si@Fe_3O_4$ و B:NH_2-$Si@Fe_3O_4$ را نشان می‌دهد. الگـوی XRD نانـوساختار $Si@Fe_3O_4$ در موقعـیت 2θ=21-28°، SiO_2 را نشان می‌دهد. قله‌های قوی موجود در۲θ=۳۰/۲°،۳۶/۴°، ۴۲/۷°،۵۱/۵°،۵۴/۳°، ۶۳/۳° وجود نانـوذرات مغناطیسی را نشان می‌دهند. همین‌مجموعه قله‌های مشخصه برای NH_2-$Si@Fe_3O_4$ نیز مشاهده شد. شکل ۳ به‌وضوح نشان می‌دهد که تأثیر اصلاح کننده‌ها بر ساختار بلوری نمونه‌های پوسته هسته‌ای ناچیز است، به بیان دیگر ساختار نانوذرات $Si@Fe_3O_4$ پس از عامل‌دار شدن با NH_2- دست‌خوش تغییر چندانی نشده است (۳۹). هم‌چنین استنباط می‌شود که نانوذرات با موفقیت تشکیل شده و پوشش ایجاد شده حول نانوذرات آمورف بوده و بلوری نیست.



شکل ۳- طیفXRD نانوذرات A) $Si@Fe_3O_4$ و B) NH_2-$Si@Fe_3O_4$

ساختار نانوذرات$Si@Fe_3O_4$ پس از عامل‌دار شدن با NH_2- دستخوش تغییر چندانی نشده است.

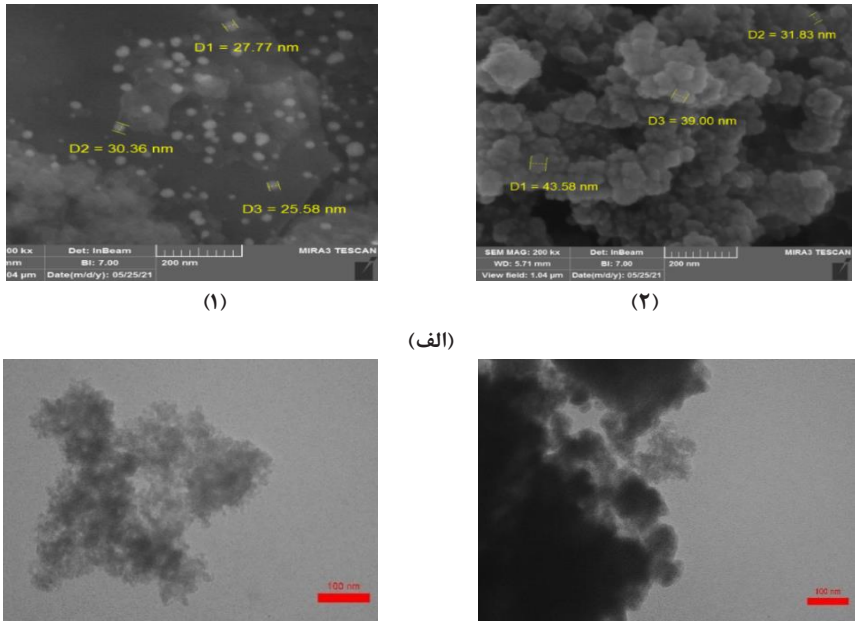
مورفولوژی $Si@Fe_3O_4$ و NH_2-$Si@Fe_3O_4$

طبق تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FESEM)، (شکل۴ الف) قطر متوسط $Si@Fe_3O_4$ در محدوده ۳۰/۳۶–۲۵/۵۸ نانومتر و قطر متوسط NH_2-$Si@Fe_3O_4$ در محدوده ۴۳/۵۸-۳۱/۸۳ نانومتر به‌دست آمد. با توجه‌به تصاویر، نانوذرات دارای ساختار متراکم جامد هستند. سطح نانوذرات همگن به‌نظر می‌رسدکه نشان‌دهنده سازگاری خوب بین Si،Fe_3O_4 و NH_2 است. طبق تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبـوری (TEM) (شکل ۴ ب)، نانوذرات هم از نظر شکل و هم از نظر اندازه یکنواخت بودند. قطر هیدرودینامیکی و توزیع اندازه ذرات نانوذرات توسط DLS تعیین شد. مطابق شکل ۵، میانگین اندازه $Si@Fe_3O_4$ برابر ۹۰/۴ نانومتر و میانگین اندازه NH_2-$Si@Fe_3O_4$۲۶۳ نانومتر به‌دست آمد. در بررسی

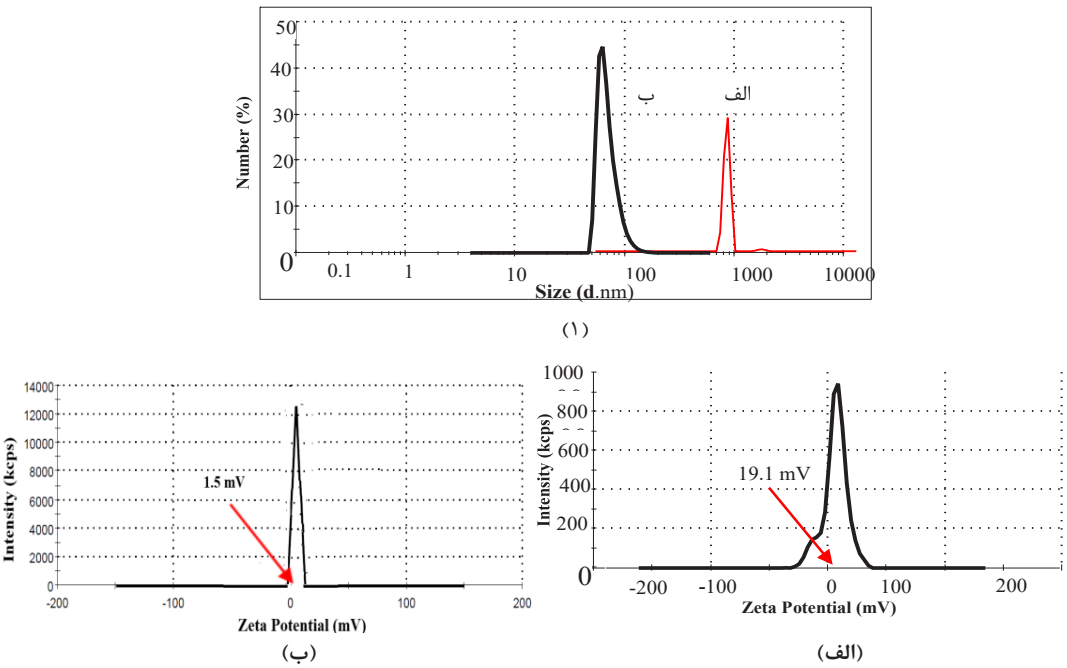
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.7.4]

مورفولوژی $Si@Fe_3O_4$ وNH_2-$Si@Fe_3O_4$ ، تفاوت اندازه ذرات به‌دست آمده از طریق FESEM و DLS به این دلیل است که DLS قطر هیدرودینامیکی در محلول سوسپانسیون را اندازه می‌گیرد که در حالت تعلیق ذرات به هم متصل شده و سایز بزرگ‌تر است، FESEM اندازه قطر ذرات در حالت خشک که سایز نانوذرات کم‌تراست را نشان‌می‌دهد.



شکل ۴ - الف) تصاویر FESEM نانوذرات ۱) $Si@Fe_3O_4$ و ۲) NH_2-$Si@Fe_3O_4$- نانوذرات دارای ساختار متراکم جامد بوده، سطح همگن نانوذرات نشان‌دهنده سازگاری خوب بین Fe_3O_4، Si و NH_2 است.
ب) تصاویر TEM ۱) $Si@Fe_3O_4$ و ۲) NH_2-$Si@Fe_3O_4$ نانوذرات هم از نظر شکل و هم از نظر اندازه یکنواخت هستند.



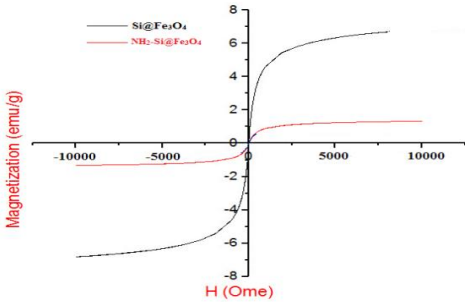
شکل ۵- توزیع اندازه ذرات الف) نانوساختار $Si@Fe_3O_4$ و ب) NH_2-$Si@Fe_3O_4$ میانگین اندازه $Si@Fe_3O_4$ برابر۹۰/۴ نانومتر و میانگین اندازه NH_2-$Si@Fe_3O_4$ ۲۶۳ نانومتر ۲- زتاپتانسیل الف) NH_2-$Si@Fe_3O_4$ و ب) $Si@Fe_3O_4$ به‌ترتیب ۱/۵ mV+ و ۱۹/۱ mV+ نشان داده شد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.7.4]

ثبات ذرات نانوسامانه با مقادیر پتانسیل زتا آن تایید می-شود. اهمیت اندازه‌گیری پتانسیل زتا این است که مقدار آن نقش مهمی در پایداری نانوذرات در برابر تجمع، الحاق،

مغناطیس‌سنج نمونه ارتعاشی (VSM)

جهت‌سنجش خواص مغناطیسی نانوذرات $Si@Fe_3O_4$ و NH_2-$Si@Fe_3O_4$، منحنی پسماند[1] مربوطه، در محدوده میدان‌مغناطیسی ۱۰۰۰۰+ و ۱۰۰۰۰- بررسی شد (شکل ۶). مغناطیس اشباع‌نانوذرات $Si@Fe_3O_4$ در دمای اتاق، ۶/۳ emu/g حاصل شد، این مقدار برای نانوذرات NH_2-$Si@Fe_3O_4$ با کاهش قابل‌توجهی، ۱/۱ emu/g به‌دست‌آمد. کاهش مغناطیس اشباع در نانوذرات NH_2-$Si@Fe_3O_4$ به‌علت محصور شدن $Si@Fe_3O_4$ توسط NH_2- است. مغناطیس‌پسماند[2] و وادارندگی[3] مغناطیسی ناچیز در نتایج حاصله بیانگر سوپر پارامغناطیس بودن نانوذرات مغناطیسی در دو نمونه است.



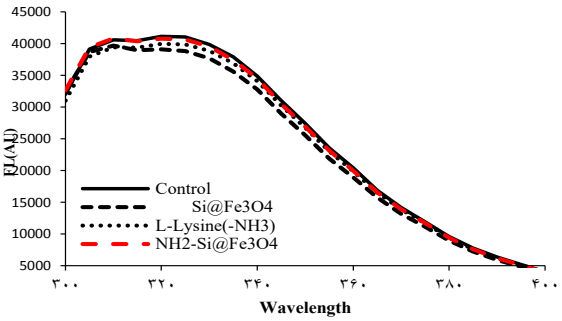
شکل۶- نتایج آزمون VSM نانوذرات $Si@Fe_3O_4$ و NH_2-$Si@Fe_3O_4$. کاهش مغناطیس اشباع در نانوذرات NH_2-$Si@Fe_3O_4$ به‌علت محصور شدن $Si@Fe_3O_4$ توسط NH_2- است.

تست فلورسانس ذاتی

از روش‌های مطالعه ساختار پروتئین‌ها، طیف‌سنجی فلورسانس جهت مطالعه ساختار سوم پروتئین‌ها است. فلورسانس‌ذاتی پروتئین‌ها از اسیدآمینه‌های تریپتوفان (Trp)، تیروزین (Tyr) و فنیل‌آلانین (Phe) ناشی می-شود، زیرا به قطبیت محیط حساس بوده، و هرگونه تغییر در ساختار پروتئین منجر به تغییر محیط اطراف این اسیدآمینه‌ها شده و طیف نشری آن‌ها تغییر می‌کند. به-منظور حذف اثرهای اسیدآمینه‌های تیروزین و فنیل-آلانین، تهییج در ناحیه ۴۰۰-۳۰۰ نانومتر انجام شد (۴۰). نمودار ۱ تغییرهای نشر پروتئین را در حضور لیگاند و نانـوذرات نشان می‌دهد. با اضافه شـدن $Si@Fe_3O_4$،

و تداخل بین مواد باردار دارد. پتانسیل زتا نانوساختارهای NH_2-$Si@Fe_3O_4$ و $Si@Fe_3O_4$ به‌ترتیب ۱/۵ mV+ و ۱۹/۱mV+ نشان داده شد (شکل ۶-۲ الف وب).

L-Lysine(-NH_3) و NH2-Si@Fe3O4 به‌ترتیب نشر پروتئین کاهش می‌یابد.



نمودار ۱- مقایسه تست فلورسانس $Si@Fe_3O_4$، NH_2-$Si@Fe_3O_4$، L-Lysine(-NH_3)و نمونه کنترل. با اضافه شدن $Si@Fe_3O_4$، L-Lysine(-NH_3) و NH_2-$Si@Fe_3O_4$ به‌ترتیب نشر پروتئین کاهش می‌یابد.

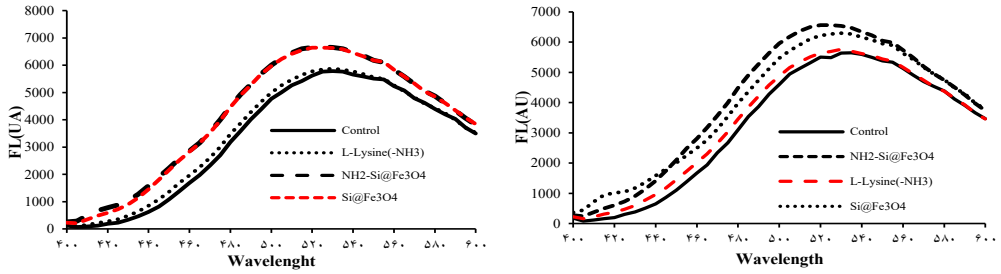
آنالیز بر هم‌کنش پروتئین – نانوذرات توسط ANS

این آنالیز جهت اطمینان از اثرهای تثبیت‌کننده MNPs روی پروتئین‌ها استفاده می‌شود (۳۵). جهت بررسی اثر MNPs بر برهم‌کنش پروتئین‌ها، آنالیز فلوئورسانس در دو زمان، بلافاصله بعد از اضافه نمودن نانوذرات به محلول‌های حاوی پروتئین، و پس از ۴ ساعت انکوباسیون پروتئین با نانوذرات انجام گرفت. میزان افزایش نشر فلورسانس پس از انکوباسیون، نشان‌دهنده بر هم‌کنش نانوذرات و پروتئین است. نمودار ۲ (الف و ب) به‌طور واضح انتشار بالای ANS را برای پروتئین در حضور $Si@Fe_3O_4$ و NH_2-$Si@Fe_3O_4$ نشان می‌دهد. مشاهده می‌گردد شدت فلورسانس ANS پروتئین، بلافاصله بعد از اضافه نمودن نانوذرات به محلول‌های حاوی پروتئین نسبت‌به نمونه کنترل افزایش یافته و در حضور $Si@Fe_3O_4$ و NH_2-$Si@Fe_3O_4$ افزایش به یک میزان است (نمودار ۲ الف). شدت فلورسانس ANS پروتئین، بعد از ۴ ساعت انکوباسیون پروتئین با نانوذرات افزایش یافته و میزان این افزایش در حضور NH_2-$Si@Fe_3O_4$ بیش‌تر است، که نشان‌دهنده بر هم‌کنش و تعامل قوی‌تر NH_2-$Si@Fe_3O_4$ با پروتئین است (نمودار ۲ ب). نتایج این آنالیز با نتایج فلورسانس ذاتی هم‌راستا است. مشخص شد درطول موج ۵۳۰- ۵۲۵ نانومتر، شدت فلورسانس بیش-ترین مقدار و با افزایش طول موج، شدت فلورسانس کاهش می‌یابد.

[1] Hysteresis
[2] Remanent magnetization
[3] Coercivity

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.7.4]

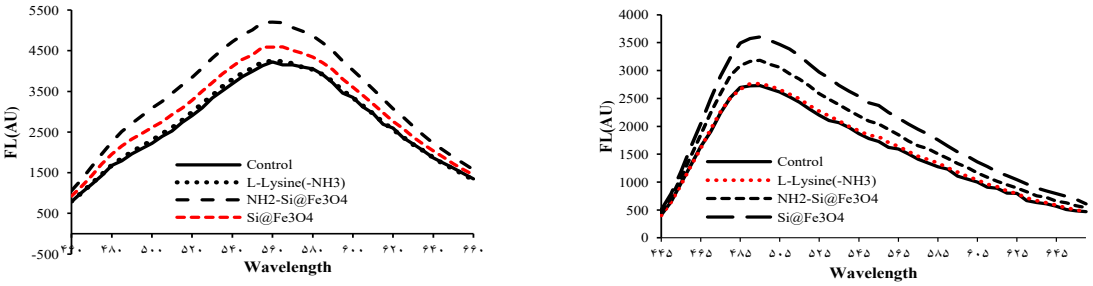


(الف) (ب)

نمودار ۲. مقایسه ANS : الف) بلافاصله بعداز اضافه نمودن نانوذرات، شدت فلورسانس ANS پروتئین، نسبت به نمونه کنترل افزایش یافته و در حضور $Si@Fe_3O_4$ و NH_2-$Si@Fe_3O_4$ افزایش به یک میزان است و ب) بعد از ۴ ساعت انکوباسیون پروتئین با نانوذرات، شدت فلورسانس افزایش یافته و میزان این افزایش درحضورNH_2-$Si@Fe_3O_4$ بیش‌تر بوده، که نشان‌دهنده بر هم‌کنش و تعامل قوی‌تر NH_2-$Si@Fe_3O_4$ با پروتئین است.

آنالیز بر هم‌کنش پروتئین - نانوذرات توسط تیوفلاوین‌تی (ThT)

آنالیز فلورسانس ThT در زمان‌های بعد از اضافه نمودن نانوذرات به‌محلول‌های حاوی پروتئین، و بعد از ۴ ساعت انکوباسیون پروتئین با نانوذرات انجام گرفت. میزان افزایش نشر فلورسانس ThT در هر دو زمان، نشان‌دهنده بر هم-کنش نانوذرات و پروتئین است. نمودار ۳ (الف و ب) انتشار بالای ThT را برای پروتئین در حضور نانوذرات $Si@Fe_3O_4$ و NH_2-$Si@Fe_3O_4$ و لیگاند L-lysine نشان می‌دهد. مطابق نمودار ۳ ب شدت فلورسانس ThT پروتئین، بعد از ۴ ساعت انکوباسیون پروتئین با نانوذرات در طول موج‌های بالاتر نسبت‌به نمودار ۳ الف ظاهر شده و میزان این افزایش در حضور NH_2-$Si@Fe_3O_4$ بیش‌تر است، که نشان‌دهنده بر هم‌کنش قوی‌تر NH_2-$Si@Fe_3O_4$ با پروتئین است. این نتایج تأییدی بر نتایج فلورسانس ANS نیز است.



(ب) (الف)

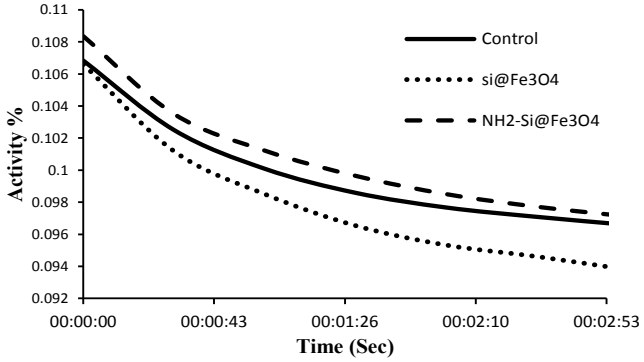
نمودار ۳. مقایسه ThT الف) بلافاصله بعد از اضافه نمودن نانوذرات و ب) بعد از ۴ ساعت انکوباسیون پروتئین با نانوذرات، شدت فلورسانس ThT پروتئین، بعد از ۴ ساعت انکوباسیون پروتئین با نانوذرات در طول موج‌های بالاتر ظاهر شده و میزان این افزایش درحضور NH_2-$Si@Fe_3O_4$ بیش‌تر است، که نشان‌دهنده بر هم‌کنش قوی‌تر NH_2-$Si@Fe_3O_4$ با پروتئین است.

سنجش فعالیت HEWL

نمودار ۴ مربوط به تغییرهای فعالیت HEWL در غیاب و حضور نانوذرات است. طبق نمودار، میزان جذب در حضور نانوذرات NH_2-$Si@Fe_3O_4$ نسبت به نمونه کنترل و $Si@Fe_3O_4$ در زمان‌های مختلف افزایش پیدا کرده که نشان دهنده فعالیت بیش‌تر HEWL در حضور NH_2-$Si@Fe_3O_4$ است، با گذشت زمان شدت جذب در سه نمونه کاهش یافته و پایداری HEWL بیش‌تر می‌شود.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

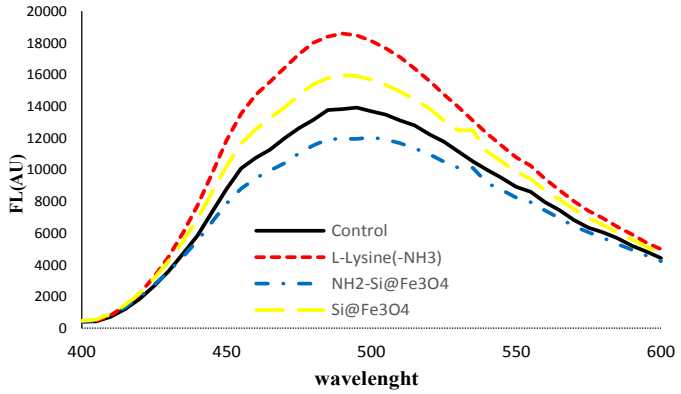
[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.7.4]



نمودار ۴- بررسی فعالیت HEWL درحضور نانوذرات در طول موج ۴۵۰ نانومتر در زمان های مختلف، میزان جذب در حضور نانوذرات NH_2-$Si@Fe_3O_4$ نسبت به نمونه کنترل و $Si@Fe_3O_4$ در زمان‌های مختلف افزایش پیدا کرده که نشان دهنده فعالیت بیش‌تر HEWL در حضور NH_2-$Si@Fe_3O_4$ است.

بررسی تجمع حرارتیHEWL با استفاده از ANS

تجمع نابجای پروتئین‌ها یک مشکل اساسی در سیستم-های زیستی به‌خصوص تولید مقیاس بزرگ پروتئین‌ها است (۴۱). بنابراین، بسیاری از تکنیک‌های تثبیت‌کننده از جمله روش افزودن لیگاند، برای جلوگیری از تجمع پروتئین ایجاد شده است. در این آزمایش، میزان تجمع HEWL درحضور نانوذرات بعد از ۱ ساعت گرماگـذاری در دمای ۹۰°C ارزیـابی شد. همان‌طور که در نمودار ۵ مشاهده می‌شود، شدت فلورسانس در حضور NH_2-$Si@Fe_3O_4$ کاهش یافته که نشان‌دهنده نقش مؤثر این نانوذرات در مهار تجمع HEWL ناشی از گرما نسبت به $Si@Fe_3O_4$ و L-Lysine(-NH_3) است (شدت فلورسانس در حضـور $Si@Fe_3O_4$ و L-Lysine(-NH_3) افزایش یافته). این امر نشان می‌دهد جذب در NH_2-$Si@Fe_3O_4$، نسبت به $Si@Fe_3O_4$ و L-Lysine(-NH_3)، از پروتئین در برابر تجمع ناشی از گرما محافـظت می‌کند و بیانـگر نقش مؤثر NH_2-$Si@Fe_3O_4$ در مهار تجمع حرارتی HEWL است.



نمودار ۵. مقایسه مهارتجمع حرارتی با استفاده از ANS، شدت فلورسانس در حضور NH_2-$Si@Fe_3O_4$ کاهش یافته که نشان‌دهنده نقش مؤثر این نانوذرات در مهار تجمع HEWL ناشی از گرما نسبت‌به $Si@Fe_3O_4$ و L-Lysine(-NH_3) است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.7.4]

بحث

خصوصیت‌های سطح نانوذرات (ویژگی‌هایی مثل شکل، موقعیت شیمیایی، عملکرد سطحی، تخلخل، بلورینگی، هیدروفوبیسیتی و هیدروفیلیسیتی)، نحوه اتصال نانوذرات را با پروتئین مشخص می‌کند. نیروهای اصلی مسئول اتصال بین نانوذرات و پروتئین‌ها، نیروهای واندروالسی، پراکندگی لاندن، دوقطبی و پیوند هیدروژنی هستند (۴۲). برخی مواد واکنش‌دهنده با پروتئین‌ها می‌توانند منجر به تغییرهای ساختاری پروتئین شده و عملکرد زیستی آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهند (۴۳). بررسی بر هم-کنش مولکولی پروتئین و لیگاند یک فرآیند اساسی جهت تشخیص و درمان برخی بیماری‌هاست. تعامل پروتئین با نانوذرات و تغییرهای ساختاری پروتئین پس از جذب آن‌ها در سطوح نانوذرات بررسی شده است. بنابراین، درک تغییرهای ساختاری و روند بازشدن پروتئین‌ها برای تسریع کاربردهای زیست پزشکی نانوذرات بسیار مهم است. طبق مطالعه‌ها، نانوذرات Fe_3O_4 منجر به تغییر ساختار پروتئین و در نهایت تغییر رنگ و فیبریلاسیون پروتئین می‌شود (۳۶). بر این اساس، Hao و همکاران مطالعه فلورومتری بررسی تعامل BSA با Fe_3O_4 انجام دادند که نشان‌دهنده از بین رفتن ساختار سطح سوم در حضور نانوذرات مغناطیسی آب‌دوست یا آب‌گریز است (۴۴).

HEWL مولکول پروتئینی کلیدی در سیستم ایمنی است و در سیستم دفاعی بسیاری از گونه‌ها نقش اساسی در انهدام گونه‌های بیماری‌زای باکتریایی برعهده دارد. بنابراین تغییرهای ساختار و عملکرد HEWL در حضور نانوذرات نقش مهمی در ارزیابی اثرهای زیستی آن در سطح مولکولی دارد (۴۵). بنابراین، باید توجه بیش‌تری به کاربردهای زیستی MNPs شود، به‌ویژه هنگامی‌که فعالیت پروتئین جذب شده اهمیت بالایی دارد.

در مطالعه حاضر، تأثیر نانوذرات مغناطیسی عامل‌دار شده با سیلیکای مزوپور و L-لیزین ($Si@Fe_3O_4$ و NH_2-$Si@Fe_3O_4$)، بر تغییرهای ساختاری، پایداری و عملکرد HEWL، بررسی و مقایسه شد. بررسی تعامل HEWL و MNPs با کمک فلورسانس ذاتی انجام گرفت. تکنیک فلورسانس به‌دلیل حساسیت و دقت یک ابزار قدرتمند جهت مطالعه بر هم‌کنش مولکول‌های کوچک با پروتئین‌ها به حساب می‌آید. نتایج فلورسانس ذاتی این پژوهش حاکی از آن است که میزان نشر فلورسانس HEWL با اضافه شدن $Si@Fe_3O_4$ ، NH_2-L-Lysine(NH_3) ، $Si@Fe_3O_4$ به‌ترتیب کاهش می-یابد. نانوذرات NH_2-$Si@Fe_3O_4$ بیش‌ترین کاهش در نشر پروتئین را نشان دادند، که بیانگر خاموشی و ایجاد کمپلکس است. خاموشی نشان‌دهنده تغییر قطبیت محیط اطراف اسیدآمینه آروماتیک است که نتیجه آن ایجاد کمپلکس پروتئین- نانوذره و پیوندشدن نانوذرات به پروتئین است. در اثر این پیوند ماکزیمم طول موج به سمت طول موج‌های بلندتر انتقال می‌یابد. این انتقال به-دلیل القاء تغییر کنفورماسیون در محیط لیزوزیم در اثر اتصال نانوذرات است، در واقع حضور نانوذرات در محیط اطراف اسیدآمینه پروتئین را دست‌خوش تغییر کرده و قطبش‌پذیری را افزایش داده و باعث حرکت این اسید آمینه‌ها از مرکز پروتئین به سطح است. با توجه‌به افزایش میزان نشر فلورسانس ANS پروتئین و جابه‌جایی ایجاد شده، می‌توان نتیجه گرفت افزودن نانوذرات منجر به-تغییرهای ساختاری HEWL شده و بر هم‌کنش قوی نانوذرات NH_2-$Si@Fe_3O_4$ با HEWL را نشان می‌دهد. در مطالعه Fattah و همکاران، در مورد اثر MNPs روی پروتئین‌ها، افزودن MNPs در دو زمان ۰ و ۴ ساعت باعث افزایش شدت فلورسانس ANS پروتئین لیزوزیم گردید که تأییدی بر نتایج تحقیق حاضر است (۳۶).

طیف FTIR نانوساختارها نشان داد پوسته سیلیکای مزوپور روی نانوذرات مغناطیسی تشکیل شده و پوسته سیلیکا با L-لیزین (گروه عاملی NH_2) عامل‌دار شده است، پژوهش Tayebee و همکاران در ارتباط با مشخصه‌یابی نانو ساختار NH_2-$Si@Fe_3O_4$، تأییدی بر نتایج تحقیق حاضر است (۴۶). مطابق شکل ۷، مغناطیس‌سنج نمونه ارتعاشی، رفتار سوپرپارامغناطیس را در نانوذرات مغناطیسی سنتز شده نشان داد و بیان کرد روند تولید پوشش به‌طور قابل‌توجه بر ساختار Fe_3O_4 تأثیر نمی‌گذارد. این نتایج هم‌راستا با نتایج Ansari و همکاران بود که اشباع مغناطیسی نانوذرات سنتز شده به روش هم‌رسوبی را، در دمای محیط ۱۰ emu/g به‌دست آوردند (۴۷).

به‌منظور بررسی بیش‌تر اثر MNPs برتغییرهای ساختاری لیزوزیم، از طیف‌سنجی ATR-FTIR استفاده شد. طبق نتایج شکل ۲ (الف و ب)، عدد موج مربوط به پیوندآمید I که مختص ساختار دوم پروتئین است، در حضور نانوساخـتارهای NH_2-$Si@Fe_3O_4$ و $Si@Fe_3O_4$ ظاهر شده و شدت این پیوند کاهش یافته است. این ظاهر شدن پیوند آمید I بیانگر تغییرهای جزئی در ساختار ثانویه لیزوزیم است (۴۸). نتایج مطالعه Valipour و Maghami تأییدی بر نتایج تحقیق حاضر است (۴۹).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.7.4]

با توجه‌به تغییر ساختار لیزوزیم در حضور نانوذرات و اثبات این موضوع با به‌کارگیری ابزار دقیق طیف‌سنجی ATR-FTIR، بررسی عملکرد این پروتئین در حضور MNPs ضروری به‌نظر رسید، زیرا همواره ارتباط تنگاتنگی میان ساختار و عملکرد پروتئین‌ها و ماکرومولکول‌ها وجود دارد. بدین منظور فعالیت HEWL به‌وسیله طیف‌سنجی-فرابنفش (UV) سنجش شد. طبق نتایج، میزان جذب درحضور $Si@Fe_3O_4$ در زمان‌های مختلف کاهش یافته که نشان‌دهنده کاهش فعالیت HEWL در حضور این نانوذرات است. می‌توان بیان کرد $Si@Fe_3O_4$ با تخریب ساختار لیزوزیم، عملکرد آن را مختل می‌کند، اما در حضور NH_2-$Si@Fe_3O_4$ فعالیت HEWL بیش‌تر است. بررسی تجمع حرارتی HEWL با استفاده از ANS نشان داد شدت فلورسانس در حضور NH_2-$Si@Fe_3O_4$کاهش یافته که بیانـگر نقش مؤثر این نانوذرات در مهار تجمع-حرارتی HEWL و ثبات حرارتی پروتئین است. در تحقیق Momeni و همکاران، مطالعه‌های مربوط به پایداری و ثبات حرارتی لیزوزیم در حضور نانوذره ZnO نشان داد در ابتدا نانوذره ZnO پایداری حرارتی را نسبت به لیزوزیم طبیعی کم می‌کند و در غلظت‌های بعدی نانوذره ZnO ثبات حرارتی لیزوزیم افزایش می‌یابد (۵۱،۵۰).

نتیجه‌گیری

مقایسه روی عملکرد نانوذرات با گروه‌عاملی و بدون گروه-عاملی انجام شد، نانوذره عامل‌دار شده در بر هم‌کنش با آنزیم لیزوریم اثرهای زیستی مناسب‌تری دارد. بنابراین در نظر گرفتن جنبه‌های محیطی، سلامتی و ایمنی در مراحل اولیه استفاده از نانوذرات ضروری می باشد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.7.4]

منابع

1. Srivastava R, Alam MS. Effect of pH and surfactant on the protein: A perspective from theory and experiments. Int J Biol Macromol, 2018; 107:1519–1527.

2. Das RP, Singh BG, Kunwar A, Priyadarsini KI. Interaction of a Model Hydrophobic Drug Dimethylcurcumin with Albumin Nanoparticles, Protein J. 2019.

3. Kathiravan A, Paramaguru G, Renganathan R. Study on the binding of colloidal zinc oxide nanoparticles with bovine serum albumin, J Mol Struct. 2009; 934: 129–137.

4. Kurtz-Chalot A, Villiers C, Pourchez J, et al., Impact of silica nanoparticle surface chemistry on protein corona formation and consequential interactions with biological cells, Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017; 75: 16–24.

5. Varkhede N, Peters BH, Wei Y, et al. Effect of Iron Oxide Nanoparticles on the Oxidation and Secondary Structure of Growth Hormone, J Pharm Sci. 2019; 108: 3372–3381.

6. Durán N, Silveira CP, Durán M, et al. Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review, J Nano biotechnol. 2015;13: 55.

7. Khan S, Gupta A, Verma NC, et al. Kinetics of protein adsorption on gold nanoparticle with variable protein structure and nanoparticle size, J Chem Phys. 2015; 143: 164709.

8. Bucak S, Yavuztürk B, Sezer AD. Magnetic nanoparticles: synthesis, surface modifications and application in drug delivery. Recent Adv Novel Drug Carr Sys.2012; 2:165-200.

9. Khirwadkar P, Kumar V, Dashora K, Magnetic Np for drug delivery. Pharm Res. 2014; 4(12).

10. Zhang Y, Kohler N, Zhang M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. Biomaterials. 2002; 23(7):1553-61.

11. Keyhanian F, Shariati S, Faraji M, Hesabi M. Magnetite Np with surface modification for removal of methyl violet from aqueous solutions. Arabian J Chem. 2016; 9: 348-354.

12. Barala S, Arora M, Saini P. Magnetite Decorated Activated Carbon Composites for Water Purification. 2013;1244-1245.

13. Li XS, Zhu GT, Luo YB, Yuan BF, Feng YQ. Synthesis and applications of functionalized magnetic materials in sample preparation. TrAC Trend Analyt Chem. 2013; 45:233-47.

14. Kashanian F, Kokkinis G, Bernardi J, et al. A novel magnetic microfluidic platform for on-chip separation of 3 types of silica coated magnetic nanoparticles (Fe_3O_4@SiO_2), 2017.

15. Kashanian F, Habibi-Rezaei M, Moosavi-Movahedi A, et al., The ambivalent effect of Fe_3O_4 nanoparticles on urea-induced unfolding and dilution-based refolding of lysozyme. Biomed Mater. 2018; 13(4):045014.

16. Thanh BT, Van Sau N, Ju H, et al., Immobilization of Protein A on Monodisperse Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications. J Nanomater. 2019; 2019.

17. Sun Y, Duan L, Guo Z, DuanMu Y, et al., An improved way to prepare superparamagnetic magnetite-silica core-shell nanoparticles for possible biological application. J Magnetis Magnetic Mater. 2005; 285(1-2):65-70.

18. Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobaya T. Medical application of functionalized magnetic Np. J biosci bioeng.2005; 100(1):1-11.

19. Ulu A, Noma SAA, Koytepe S, Ates B. Magnetic Fe_3O_4@MCM-41 core–shell Np functionalized with thiol silane for efficient l-asparaginase immobilization. Artificial cells, nanomed biotech. 2018; 46:1035-1045.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.7.4]

20. Wang Y, Zhao Q, Han N, et al. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. Nanomed: Nano technol Biolog Med. 2015;11(2):313-27.

21. Park S, Park H, Jeong S, Yi BG, Park K, Key J. Hyaluronic Acid-Conjugated Mesoporous Silica Nanoparticles Loaded with Dual Anticancer Agents for Chemophotodynamic Cancer Therapy. J Nanomat. 2019; 2019:11.

22. Mirzaei M, Babaei Zarch M, Sayyadi Kh, Keshavarz ST, Sayyadi J, Fallah A, Maleki H. Silica Mesoporous Structures: Effective Nano carrier in Drug Delivery and Nano catalysts, Appl Sci. 2020; 10(21), 7533.

23. Pham XH, Hahm E, Kim HM, et al., Silica-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles Grafted onto Graphene Oxide for Protein Isolation. Nanomat. 2020;10(1):117.

24. Tavakoli Z, Rasekh B, Yazdian F, et al. One-step separation of recombinant protein by using amine-functionalized magnetic mesoporous silica nanoparticle; an efficient and facile approach. Int j biol macromol. 2019; 135: 600-8.

25. Rezwan K, Studart AR, Vörös J, Gauckler LJ. Change of ζ potential of biocompatible colloidal oxide particles upon adsorption of bovine serum albumin and lysozyme, J Phys Chem B. 2005; 109: 14469–14474.

26. Yadav I, Kumar S, Aswal VK, Kohlbrecher J. Structure and Interaction in the pH- Dependent Phase Behavior of Nanoparticle-Protein Systems, Langmuir. 2017;33: 1227 1238.

27. Wang X, Zhang S, Xu Y, et al. Ionic Strength-Responsive Binding between Nanoparticles and Proteins, Langmu. 2018; 34: 8264–8273.

28.Yadav I, Kumar S, Aswal VK, et al. Small-angle neutron scattering study of differences in phase behavior of silica nanoparticles in the presence of lysozyme and bovine serum albumin proteins, Phys Rev E-Stat Nonlinear. Soft Matter Phys. 2014; 89:1–9.

29. Zeng HJ, Miao M, Yang R, Qu LB, Effect of silybin on the fibrillation of hen egg white lysozyme, J Mol Recognit. 2017; 30.

30. Atale SS, Dyawanapelly S, Jagtap DD, et al. Understanding the nanobio interactions using real-time surface plasmon resonance tool, Int J Biol Macromol. 2019;123: 97–107.

31. Ma B, Zhang F, Wang X, Zhu X. Investigating the inhibitory effects of zinc ions on amyloid fibril formation of hen egg-white lysozyme, Int J Biol Macromol. 2017; 98: 717-722.

32. Kashanian F, Habibi-Rezaei M, Bagherpour AR, et al. Magnetic nanoparticles as double-edged swords: concentration-dependent ordering or disordering effects on lysozyme, RSC Adv. 2017; 7:54813–54822.

33. Jadhav SA, Patil SV. Facile synthesis magnetic iron oxide Np. and their characterization. Front Mat Sci. 2014; 8(2):193-198.

34. Lu Y, Yin Y, Mayers BT, Xia Y, Modifying the surface properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through a sol−gel approach. Nano lett. 2002; 2(3):183-6.

35. Ni Q, Chen B. Preparation of core–shell structure Fe_3O_4@SiO_2 superparamagnetic microspheres immobilized with imino di acetic acid as immobilized metal ion affinity adsorbents for His-tag protein purification. Biomed Chromatogr. 2016; 30(4):566-573.

36. Fattah R, Rashedi H, Yazdian F, et al. Promising insights into the kosmotropic effect of magnetic

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.7.4]