

Synthesis of nickel (II) complex stabilized on magnetic nanoparticles and evaluation of its efficiency in separating OPH and OmpW proteins

Maedeh Faraji¹, Manzarbanou Asnaashariisfahani¹, Habibollah Baharvand*², Hassan Kabiri Fard¹

1. Department of Chemistry, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Faculty of Polymer Science, Iran Polymer and Petrochemical Institute, Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: High efficiency and purity protein purification is a serious challenge in the production of recombinant proteins. This study is proposing an easy and new strategy for fabricating and describing magnetic microspheres consisting of a silica-coated magnetic core and a polyvinyl acetate shell modified with iminodiacetic acid and complexed with Ni^{2+} , ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{PVA}@\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$) for the separation and purification of organophosphorus hydrolase (OPH) protein and histidine-containing outer membrane protein (OmpW).

Material and Methods: The nanoparticles were synthesized in the following four steps: 1) synthesis of nanoparticles with vinyl groups on their surface, 2) grafting of polyvinyl alcohol (PVA) to these particles, 3) conversion of the hydroxyl groups of PVA to iminodiacetic acid, and 4) charging with nickel ions to form chelate groups. Structural properties and physicochemical parameters of nanoparticles were determined by FTIR, DLS, SEM, TEM, EDX, TGA and VSM analyzes. Recombinant protein subunits OPH and OmpW were expressed and purified as recombinant and their structure was confirmed. In this study, the genes encoding the recombinant proteins OPH and OmpW were cloned into the expression vector pet-۲۶b (+) and expressed in *E. coli* BL ۲۱(DE۳) as a host and secreted into bacterial culture medium. Gene expression and purification were assessed by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel (SDS-Page and Bradford test).

Results: The results confirm that uniform and spherical magnetic polymer nanoparticles with high magnetization and superparamagnetic properties were successfully synthesized. According to the SEM images, the average diameter of the nanostructure was observed in the range of 24.56-62.19 nm. The formation of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ nanoparticles was confirmed by the peaks identified at 1405 and 1600 cm^{-1} corresponding to the symmetric and asymmetric stretching vibration of the $\text{O}=\text{C}-\text{O}-$ group and the removal of the peak at 1740 cm^{-1} . These microspheres showed a high degree of recovery of protein bands regardless of the nature of the protein. OmpW and OPH proteins as a His-tagged recombinant protein were expressed and purified using the final nanoparticles.

Conclusion: According to the SDS-PAGE results, there was a high degree of resolution in protein separation. The synthesized nanoparticles have a high protein binding capacity of about 1.25 mg of protein per mg of nanoparticles.

Keywords: Magnetic nanoparticles, Protein separation, Polymer coating, Polyvinyl alcohol, Metal chelating, Iau Science.

Corresponding author:

Faculty of Polymer Science, Iran Polymer and Petrochemical Institute, Tehran, Iran

Email: h.baharvand@ippi.ac.ir

سنتز کمپلکس نیکل (II) تثبیت شده بر نانوذرات

مغناطیسی و ارزیابی کارایی آن در

جداسازی پروتئین‌های OPH و OmpW

مأنده فرجی^۱، منظر بانو اثنی‌عشری اصفهانی^۱، حبیب الله بهاروند^{۲*}، حسن کبیری فرد^۱

۱. گروه شیمی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. دانشکده علوم پلیمر، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران (IPPI)، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: تخلیص پروتئین با بازده و خلوص بالا چالشی جدی در تهیه پروتئین‌های نوترکیب است. این مطالعه یک استراتژی آسان و جدید جهت ساخت و توصیف میکروکره‌های مغناطیسی متشکل از یک هسته مغناطیسی پوشش‌دار شده با سیلیکا و یک پوسته پلی‌وینیل‌استات اصلاح شده با ایمینودی‌استیک‌اسید و کمپلکس شده با Ni^{2+} ($Fe_3O_4@SiO_2@PVA@IDA-Ni^{2+}$)، برای جداسازی و تخلیص پروتئین ارگانوفسفر هیدرولاز (OPH) و پروتئین غشاء خارجی^۱ (OmpW) حاوی هیستیدین ارائه می‌دهد.

مواد و روش‌ها: نانوذرات در چهار مرحله زیر سنتز شدند: (۱) سنتز نانوذرات وینیل دار، (۲) پیوند پلی وینیل الکل (PVA) به این نانوذرات، (۳) تبدیل گروه‌های هیدروکسیل PVA به اسید ایمینودی استیک و (۴) کلات شدن با یون‌های نیکل برای تشکیل گروه‌های کی‌لیت. خصوصیات ساختاری و شاخص‌های فیزیکوشیمیایی نانوذرات توسط آنالیزهای FTIR، SEM، DLS، TGA، EDX، TEM، VSM تعیین شد. زیر واحدهای پروتئین نوترکیب (OPH) و OmpW به صورت نوترکیب بیان شده و تخلیص گردیدند و ساختار آن‌ها مورد تایید قرار گرفت. در این مطالعه ژن کدکننده پروتئین نوترکیب OPH و OmpW در ناقل بیانی (+) pet-26b کلون شدند و در *E. coli* BL21 (DE3) به عنوان میزبان بیان و به محیط کشت باکتری ترشح گردیدند. بیان ژن و فرآیند خالص سازی از طریق سدیم دودسیل سولفات-ژل پلی آکریل آمید (SDS-Page) و تست برادفورد (Bradford) ارزیابی شد.

یافته‌ها: طبق نتایج، نانوذرات پلیمری مغناطیسی دارای ساختار کروی و یکنواخت، با خاصیت مغناطیسی بالا، محل‌های اتصال فراوان و فرآیند سنتز آسان است. طبق تصاویر SEM قطر متوسط نانوساختار در محدوده ۶۲/۱۹-۲۴/۵۶ nm مشاهده شد. تشکیل نانوساختار $Fe_3O_4@SiO_2@PVA/IDA-Ni^{2+}$ با پیک‌های مشخص در 1405 cm^{-1} و 1600 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی متقارن و نامتقارن گروه $O=C-O-$ و حذف پیک در 1740 cm^{-1} تأیید شد. این نانوساختار درجه بالایی از بازیابی باندهای پروتئینی بدون توجه به طبیعت پروتئین نشان داد. پروتئین‌های OmpW و OPH به عنوان پروتئین نوترکیب با برچسب هیستیدین بیان و با استفاده از نانوساختار نهایی خالص شدند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج SDS-PAGE، وضوح بالایی در جداسازی پروتئین وجود داشت. نانوساختار سنتز شده دارای حداکثر ظرفیت جذب پروتئین حدود ۱/۲۵ میلی گرم پروتئین در هر میلی گرم نانوذرات می‌باشد.

واژگان کلیدی: نانوذرات مغناطیسی، جداسازی پروتئین، پوشش پلیمری، پلی وینیل‌الکل، کی‌لیت فلزی، Iau Science.

مقدمه

قبل از توصیف ساختار و مکانیسم عملکرد یک پروتئین، ابتدا باید آن را خالص کرد. تخلیص پروتئین با بازده و خلوص بالا چالشی جدی در تهیه پروتئین‌های نوترکیب دارویی است (۱). جداسازی و تخلیص پروتئین یک فرآیند اساسی و مورد نیاز برای بسیاری از مطالعات بیولوژیکی است. به همین منظور از روش‌ها و

نویسنده مسئول:

دانشکده علوم پلیمر، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران (IPPI).

تهران، ایران

پست الکترونیکی: h.baharvand@ippi.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۲۸

¹Outer membrane protein W

۲. ظرفیت بالای بارگذاری پروتئین به دلیل سطح ویژه بزرگ

۳. نداشتن محدودیت نفوذ در محلول‌ها
با این حال، آنها هنوز هم فقط برای مقیاس‌های آزمایشگاهی استفاده می‌شوند، عمدتاً به دلیل ظرفیت جذب پایین و سرعت انتقال پایین (۱۵). عوامل زیادی در برهم‌کنش نانوذرات و پروتئین‌ها از جمله ماهیت نانوذرات، اندازه، شکل و میزان بارسطحی نانوذرات تأثیر دارند. ویژگی‌های ساختاری و پایداری ذاتی و ترمودینامیکی پروتئین نیز در برهم‌کنش آن با نانوذرات تأثیر دارد (۱۶ و ۱۷).

برای داشتن ذرات با ظرفیت جذب بالا، یا سطح تماس آنها با محیط افزایش می‌یابد یا درشت مولکول‌هایی با یون‌های فلزی کلات شده به ذرات مغناطیسی پیوند می‌زنند. افزایش سطح تماس یا با کاهش اندازه ذرات انجام می‌شود و یا ذرات مغناطیسی به شکل ماکرو متخلخل سنتز می‌شوند. با کاهش اندازه ذرات، ظرفیت جذب افزایش می‌یابد، اما پاسخ ذرات کوچک در میدان مغناطیسی کاهش می‌یابد و در نتیجه فرآیند جداسازی با موفقیت انجام نمی‌شود (۱۹ و ۱۸). به دلیل خواص مغناطیسی و مساحت سطح بالا در نانوذرات مغناطیسی، تمایل به لخته شدن و اکسیداسیون در آنها وجود دارد. برای جلوگیری از این مشکل، فرآیند پوشش دار کردن نانوذرات به وسیله عوامل حفاظتی ضروری است (۲۰). سورفکتانت‌ها (۲۱) و پلیمرها (۲۲) متداول‌ترین عوامل حفاظتی آلی هستند که این مواد را می‌توان در هنگام سنتز یا بعد از سنتز نانوذرات مغناطیسی به آن اضافه کرد. ترکیبات معدنی متعددی نظیر سیلیکا، کربن (۲۳)، پلیمرهای مصنوعی و آلومینا (۲۴) به منظور حفاظت از نانوذرات مغناطیسی استفاده می‌شوند (۲۵). نانوذرات مغناطیسی کپسوله شده در یک پلیمر مناسب درعین حال که می‌توانند اجزای محلول در آب را از ذرات مغناطیسی جدا نگه‌دارند، قادرند با استخراج مغناطیسی به سرعت از مخلوط جدا شوند، همین امر امکان استفاده از این ذرات در سیستم‌های جداسازی بسیاری از ترکیبات شیمیایی از جمله فلزات سنگین، داروها، آنزیم‌ها، پروتئین‌ها را می‌دهد. در تحقیقی اصلاح نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 با آرژنین به عنوان یک گروه عملکردی انجام شد و ساختار و فعالیت لیئوزیم به عنوان پروتئین مدل مورد بررسی قرار گرفت و غلظت مناسب جهت بهبود عملکرد نانوذره تعیین شد (۲۶). در بین مواد معدنی، پوشش بی‌اثر سیلیسیم بسیار مورد توجه

استراتژی‌های متنوعی برای تخلیص پروتئین هدف از سایر پروتئین‌های غیراختصاصی و ناخالصی‌های محیط کشت و سلول‌های میزبان به کار گرفته می‌شود تا با کمترین هزینه به بیشترین مقدار محصول نهایی با بالاترین میزان خلوص و فعالیت بیولوژیکی دست یافت (۲). در فرایند خالص سازی، قسمت پروتئینی و غیرپروتئینی از یکدیگر جدا می‌شوند. بیشترین چالش مربوط به زمانی است که پروتئین مورد نظر باید از سایر پروتئین‌ها جدا گردد. مراحل خالص سازی معمولاً به اندازه پروتئین، ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی، تمایل اتصالی و فعالیت زیستی پروتئین موردنظر بستگی دارد. محصول نهایی فرایند تخلیص، پروتئین جداسازی شده نام دارد. معمولاً فرایند تخلیص پروتئین، شامل فیلتراسیون و یک یا چند مرحله کروماتوگرافی است. با استفاده از روش‌هایی مانند کروماتوگرافی و بهینه سازی آن، مولکول‌های خالص-تری بدست می‌آید و تحقیقات دقیق‌تری انجام می‌گیرد. در نتیجه، با تخلیص مولکول مورد نظر، می‌توان از آن در صنایع مختلف از جمله پزشکی استفاده کرد (۳).

یکی از موفق‌ترین تکنیک‌ها جهت جداسازی پروتئین، استفاده از پپتیدهای برچسب‌گذاری شده است که با پروتئین مورد نظر ترکیب شده و فرآیند جداسازی بر اساس کروماتوگرافی میل ترکیبی انجام می‌شود. به منظور تسهیل تخلیص، پروتئین‌ها غالباً به برچسب تمایلی متصل می‌شوند (۴). کروماتوگرافی میل ترکیبی یون فلزی بی-حرکت^۲ (IMAC) یکی از این روش‌هاست که برای پالایش پروتئین‌های دارای برچسب هیستیدین (His) استفاده می‌شود. هیستیدین به دلیل حضور گروه‌های دهنده الکترون روی حلقه هیستیدین ایمیدازول، برهم‌کنش‌های قدرتمند با ماتریس‌های حاوی یون فلزی بی‌حرکت (از جمله Co^{2+} ، Ni^{2+} ، Cu^{2+} و Zn^{2+}) دارد. در نهایت، پروتئین‌های برچسب هیستیدین را می‌توان با تغییر pH یا غلظت ایمیدازول بافر شستشو جدا کرد (۴). سوبستراهای آلی و معدنی مختلف با یون‌های فلزی کلات شده در اشکال مختلف برای جداسازی پروتئین‌ها استفاده شده است. یکی از آنها نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده با یون‌های فلزی کلات شده است که جهت خالص سازی پروتئین‌های برچسب گذاری شده استفاده می‌شود (۱۴-۵). این نانوذرات، اگر تکنیک‌های سنتز آنها به درستی انتخاب شود دارای مزایای زیر هستند:

۱. امکان جمع‌آوری ساده، سریع و کم هزینه پروتئین از مخلوط با استفاده از یک میدان مغناطیسی خارجی

²Immobilized metal-ion affinity chromatography

مواد و روش‌ها

دو پروتئین نوترکیب ompW ۲۶KDa و OPH ۳۵KDa متصل شده به یک دنباله حاوی ۶ اسید آمینه هیستیدین، از شرکت سیگما آلد ریچ خریداری شد. دیواره سلولی خشک شده باکتری *E. coli* از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. همه مواد شیمیایی و حلال‌های آلی از جمله: کلرید آهن (II)، کلرید آهن (III)، محلول آمونیاک ۲۵٪، تترااتیل‌اورتو سیلیکات (TEOS)، ۳-تری متوکسی سیلیل پروپیل متاکریلات (MPS)، وینیل استات، ایمینودی استیک اسید (IDA)، اپی کلروهیدرین (EC)، نیکل کلراید، سدیم هیدروکسید، آزوبیس ایزوبوتیرونیتیل (AIBN)، اتانول، اتیل استات و دی-متیل فرمامید از شرکت مرک خریداری شد.

سنتز نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن Fe_3O_4

مقدار ۵/۸۴ gr کلرید آهن (III) و ۲/۱۵ gr کلرید آهن (II) در بالن ۲۵۰ ml مجهز به همزن مکانیکی در ۲۰۰ ml آب مقطر دمای $85^{\circ}C$ حل شد. تحت اتمسفر نیتروژن و همزدن، ۱۵ ml محلول ۲۵٪ آمونیاک به آن اضافه شد. واکنش مدت ۱ ساعت ادامه داشت. رنگ محلول از نارنجی به مشکی تغییر کرد. رسوب سیاه رنگ حاصل چند بار با آب مقطر و در انتها با محلول سدیم کلراید ۰/۰۲ مولار شسته شد و در آب مقطر برای مراحل بعد نگهداری شد (۳۰).

پوشش دهی نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن با سیلیکا (Fe_3O_4/SiO_2)

جهت پوشش دهی نانوذرات حاصل با سیلیکا، ابتدا فاز آب با ۲۰۰ ml اتانول جایگزین و دریک بالن مجهز به همزن، ۲/۳ ml محلول آمونیاک و ۲ ml تترا اتیل اورتو سیلیکات به ترتیب در حین همزدن اضافه شد و واکنش در دمای محیط مدت ۱۲ ساعت انجام شد. در انتها ذرات با آب مقطر کافی شسته و برای انجام مراحل بعدی نگهداری شد (۳۱).

وینیل دار کردن سطح نانوذرات ($Fe_3O_4@SiO_2@PVA$)

پس از پوشش دهی نانوذرات مغناطیسی با تترا اتیل اورتو سیلیکات، جهت قرار گرفتن باندهای دوگانه فعال روی سطح ذرات از ۳-تری متوکسی سیلیل پروپیل متاکریلات استفاده شد. در این مرحله، ابتدا فاز آب روی نانوذرات با ۲۰۰ ml اتانول جایگزین و دریک بالن مجهز به همزن، ۲/۳ ml آمونیوم هیدروکسید ۲۵٪ و ۲/۶ ml ۳-تری متوکسی سیلیل پروپیل متاکریلات بترتیب اضافه و در دمای $60^{\circ}C$ در حین همزدن مدت ۲۴ ساعت واکنش انجام شد (۳۲).

محققین است زیرا از تجمع نانوذرات مغناطیسی در محلول جلوگیری کرده، پایداری شیمیایی نانوذرات و محافظت از آنها در برابر سمیت را افزایش می‌دهد. پوشش باسیلیکا رایج‌ترین شیوه برای حفاظت سطح نانوذرات مغناطیسی است (۲۷). در پژوهش Park و همکاران؛ هیالورونیک اسید (HA) به نانوذرات سیلیکا متصل شد. HA-MSNs، بارگذاری دارویی بالاتری را در مقایسه با نانوذرات سیلیکا به تنهایی، نشان داد (۱۴). در پژوهشی، گرافن اکسید به نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن پوشش داده شده با سیلیکا متصل شد. نتایج نشان داد $GO/MNP@SiO_2$ می‌تواند برای جداسازی پروتئین مورد استفاده قرار گیرد (۲۹) و (۲۸). از آنجا که فعالیت زیستی پروتئین‌ها به ترکیبات آنها بستگی دارد، مطالعه اثرات ساختاری MNP_s بر روی ساختار پروتئین برای جلوگیری از هرگونه تهدید به فعالیت های بیولوژیکی آنها ضروری است (۲۹).

آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز (OPH) یک پروتئین همودایمر است که اولین بار از باکتری *Sordomonas diminitota* و فلاویوباکتریوم جدا شده و قادر به تجزیه گستره وسیعی از ترکیبات ارگانوفسفره سمی می‌باشد. استفاده از فرم تثبیت شده این آنزیم در مقابل فرم آزاد آن باعث افزایش پایداری آنزیم شده و هزینه‌ها را به واسطه امکان بازیافت و استفاده مجدد از آن کاهش می‌دهد. همچنین، با تثبیت آنزیم امکان جداسازی آسان و سریع آن از محیط واکنش نیز فراهم می‌گردد. ترکیبات ارگانوفسفره به وفور در آفت-کش‌ها و عوامل عصبی شیمیایی استفاده شده و خطرات زیادی را برای انسان و محیط زیست ایجاد نموده‌اند. گزارشات زیادی از سم‌زدایی این ترکیبات با روش‌های مختلف وجود دارد که از آن میان، هیدرولیز آنزیمی این ترکیبات با آنزیم ارگانوفسفره هیدرولاز، بیشتر مورد توجه محققین واقع شده است. در این مطالعه نوع جدیدی از نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده با پلیمر کیلاتور با ظرفیت جذب و گزینش پذیری بالا برای جداسازی و تخلیص پروتئین‌های ompW ۲۶KDa و OPH ۳۵ KDa حاوی هیستیدین تهیه گردید. دو پروتئین ompW و OPH به صورت نوترکیب متصل شده به یک دنباله حاوی ۶ اسید آمینه هیستیدین، در باکتری *E. coli* بیان شده و وارد آزمایش گردیدند. با توجه به نقش گروه‌های عاملی در عملکرد بهتر و زیست سازگار شدن نانوذره، PVA اصلاح شده با ایمینودی استیک اسید و کمپلکس شده با نیکل، روی سطح نانوذرات مغناطیسی پوشیده شده با سیلیکا قرار داده شد تا امکان جذب و جداسازی دو پروتئین ompW و OPH در سطح نانوذره فراهم شود.

بررسی و مشخصه‌یابی نانوذرات

Fe_3O_4 ، $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ ، $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA})$

و $(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+})$

بعد از سنتز و عامل‌دار کردن نانوذرات، با روش‌های تحلیلی مختلف، بررسی و مشخصه‌یابی انجام شد. بررسی برهمکنش شیمیایی میان نانوذرات و تأیید عامل‌دار شدن نانوذرات توسط دستگاه FT-IR مدل Spectrum Two در محدوده $4000-400\text{ cm}^{-1}$ انجام شد. آزمون XRD برای نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 و $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ با دستگاه پراش پرتو ایکس مدل PW 1730، تحت تابش $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda=1.5418\text{ \AA}$)، در ولتاژ ۴۰ کیلوولت و جریان ۳۰ mA انجام گرفت. محدوده اسکن ۲۰ از ۱۰ تا ۸۰ درجه قرار داده شد. خواص مغناطیسی نمونه‌ها با دستگاه مغناطیس‌سنج نمونه-ارتعاشی (MDK; Meghnatis Daghigh Kavir Co.; Iran) و VSM/AFGM در دمای اتاق اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری قطر هیدرودینامیکی نانوذرات در بافر سدیم فسفات (PBS ۱۰۰ mM, pH ۷/۴)، با استفاده از دستگاه پراکندگی نور دینامیکی (DLS) از سری Malvern ZS-Nano تعیین شد. مورفولوژی نانوذرات با استفاده از SEM و TEM و جهت تعیین درصد فاز پلیمری روی سطح ذرات از آزمون توزین حرارتی یا تجزیه گرما وزنی TGA مجهز به سیستم خنک‌کننده دستی نیتروژن مایع استفاده شد. مقدار ۱۵-۱۰ mg نانوساختار سنتز شده داخل بوته‌ای از جنس پلاتین یا آلومینا، داخل کوره دستگاه قرار گرفت. نمونه‌ها در دما ۶۵۰-۰°C با سرعت‌دهی ۱۰°C در دقیقه در شرایط اتمسفر نیتروژن مورد آزمون قرار گرفتند. برای حضور و نوع عناصر موجود در نمونه از EDX استفاده شد. الکتروفورز ژل سدیم دودسیل سولفات-پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) و آزمون برادفورد برای ارزیابی عملکرد ذرات در جداسازی پروتئین استفاده شد. الکتروفورز در جریان ثابت ۱۴ میلی‌آمپر و ولتاژ ۸۰ ولت انجام شد. غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد (۳۳) با آلومین سرم گاوی به عنوان استاندارد تعیین شد.

تهیه دو پروتئین نوترکیب 26 KDa omp و 35 KDa OPH

حاوی هیستیدین

باکتری *E. Coli* حاوی سازه ژنی بیان‌کننده دو پروتئین 26 KDa omp و 35 KDa OPH تهیه شد. به منظور تولید پروتئین نوترکیب، ۵ ml از کشت اولیه باکتری وارد ۵۰۰ ml محیط کشت LB Broth شد و در دمای ۳۷°C و سرعت ۱۵۰ rpm گرماگذاری شد. پس از رسیدن جذب نوری نمونه‌ها به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ nm، به لوله تست در شرایط استریل، القاء‌کننده

گرافت پلی‌وینیل استات و اصلاح آن با ایمینودی‌استیک-اسید

$(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA})$

فاز پیوسته ذرات سنتز شده در مرحله قبل با ۲۰۰ ml اتیل-استات جایگزین شد، ۴/۵ gr وینیل استات و ۰/۰۰۵ gr AIBN اضافه شد و در دمای ۶۵°C در اتمسفر نیتروژن مدت ۱۲ ساعت در حین همزدن، واکنش گرافت شدن روی سطح ذرات انجام شد. در انتها، جهت خارج شدن پلی‌وینیل استات گرافت نشده، ذرات چندبار با اتانول شسته شدند. جهت اصلاح پلی‌وینیل استات گرافت شده روی سطح ذرات با ایمینودی‌استیک اسید، این پلیمر با استفاده از سود هیدرولیز و گروه استات به گروه هیدروکسیل فعال تبدیل شد و اپی کلروهیدرین با ایمینودی-استیک در راکتور جداگانه واکنش داد. محصول به دست آمده برای اصلاح پلیمر هیدرولیز شده روی سطح نانوذرات (پلی وینیل الکل) و تهیه پلی‌وینیل استات اصلاح شده با ایمینودی‌استیک اسید روی سطح نانوذرات به کار رفت. بعد از گرافت شدن پلی وینیل استات به ذرات، در ۲۰۰ ml مخلوط آب/الکل (نسبت وزنی ۱۵/۸۵) حاوی ۳۲ gr سدیم هیدروکسید دیسپرس شدند و در ۶۰°C در اتمسفر نیتروژن با همزدن واکنش هیدرولیز پلی‌وینیل استات انجام شد. در انتها نانوذرات با آب مقطر شسته و در ۲۰۰ ml آب مقطر دیسپرس شدند.

عامل‌دار کردن اپی کلروهیدرین با ایمینو دی استیک اسید

مقدار ۱/۶۸ gr سدیم هیدروکسید در ۵۰ ml آب حل شد و ۲/۸۰ gr ایمینودی‌استیک اسید اضافه شد. به این محلول، ۱/۹۴ gr اپی کلروهیدرین اضافه و در دمای ۶۰°C مدت ۲ ساعت، واکنش انجام گرفت. سپس مخلوط واکنش تا دمای اتاق سرد و به دیسپرس نانوذرات حاصل بعد از هیدرولیز پلی‌وینیل استات گرافت شده، اضافه و در دمای ۶۰°C مدت دو ساعت، تحت اتمسفر نیتروژن گروه‌های هیدروکسیل فعال شده با سود به گروه‌های دی‌استیک اسید تبدیل شدند. در انتها نانوذرات با آب مقطر شسته و در ۲۰۰ ml آب مقطر دیسپرس شدند.

کمپلکس‌دار کردن نانوذرات مغناطیسی با نیکل

$(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+})$

مقدار ۲/۷۲ gr نیکل کلراید به مخلوط حاصل از مرحله قبل اضافه شد (با توجه به مقدار مصرف ایمینو دی استیک اسید) و ۴ ساعت در دمای اتاق در حین همزدن تبادل یون اتفاق افتاد و کمپلکس مورد نظر تشکیل شد.

رسانده شد. سپس به میکروتیوپ بلانک $1000 \mu\text{l}$ آب مقطر اضافه و به دو لوله تست به ترتیب $10 \mu\text{l}$ ، $20 \mu\text{l}$ محلول پروتئین افزوده شد و با آب مقطر به حجم 1000 ml رسانده شد. به هرکدام از لوله‌ها 1 ml محلول برادفورد افزوده و به خوبی ورتکس شد. پس از انکوباسیون مدت 10 دقیقه در دمای آزمایشگاه جذب نوری با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج 595 nm اندازه‌گیری شد. با استفاده از نمودار استاندارد حاصل از جذب غلظت‌های مختلف محلول پروتئینی آلومین سرم گاوی، غلظت نمونه‌های پروتئینی مجهول بدست آمد.

نتایج

مشخصه‌یابی نانو ساختارهای Fe_3O_4 و $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$
نانوذرات Fe_3O_4 و $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ پس از سنتز، با استفاده از روش‌های مکمل، شامل طیف FTIR، مغناطیس سنجی VSM، پراش اشعه ایکس XRD، پراکندگی نور دینامیکی DLS، EDX و TGA مشخصه‌یابی شدند. طیف FTIR برای نظارت بر روند عامل‌دار شدن نانوذرات مغناطیسی به کار گرفته شد. در شکل ۱ طیف FTIR (a) Fe_3O_4 ، $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ (b)، $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ (c) و $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ (d) نشان داده شده است. مطابق شکل ۱a، پیک جذبی عمیق در ناحیه 583 cm^{-1} مشخص‌کننده ارتعاش کششی پیوند Fe-O های مگنتیت می‌باشد. پیک در محدوده 1437 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی C=C می‌باشد. پیک‌ها در محدوده 2921 و 2852 cm^{-1} به ارتعاش کششی پیوندهای C-H اشاره دارند. همچنین قله پهن در 3428 cm^{-1} ناشی از ارتعاشات کششی پیوند O-H است.

در بررسی نانوذرات هسته-پوسته $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ مطابق شکل ۱b، جذب کششی پیوند Fe-O-Si در $583/51 \text{ cm}^{-1}$ ظاهر شده است. پیک در محدوده 583 cm^{-1} که در تمام منحنی‌ها (a, b, c, d) ظاهر شده به ارتعاش کششی Fe-O در Fe_3O_4 نسبت داده می‌شود. ناحیه ارتعاش کششی Fe-O در نمونه‌های مغناطیسی به صورت توده، اغلب در حدود 570 cm^{-1} است. درمقایسه بانانوذرات مغناطیسی اصلاح نشده، باندهای جذب Fe-O نانوذرات مغناطیسی پوشش دار شده با سیلیکا به طول موج بالاتر جابجا شده‌اند که دلیل آن تشکیل پیوندهای Fe-O-Si بر سطح نانوذرات است (۳۵). پیک ارتعاش کششی نامتقارن و کششی متقارن Si-O-Si به ترتیب در $1105/44$ و $804/59 \text{ cm}^{-1}$ ظاهر شده‌اند. ارتعاشات خمشی پیوند Si-O-Si در ناحیه 461 cm^{-1} ظاهر شده است. وجود این قله‌ها نشان‌دهنده تشکیل لایه سیلیکا اطراف نانوذرات مغناطیسی

ایزوپروپیل-بتا-1-D-گالاکتوپیرانوزید (IPTG) با غلظت نهایی 1 ml میلی‌مولار اضافه گردید. مدت یک شبانه روز در شیکر انکوباتور دمای 37°C و سرعت 150 rpm گرماگذاری شدند. به منظور جمع آوری باکتری‌های کشت داده شده، نمونه کشت مدت 10 دقیقه با سرعت 5000 g سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب حاصله جهت ادامه تخلیص پروتئین جمع آوری گردید.

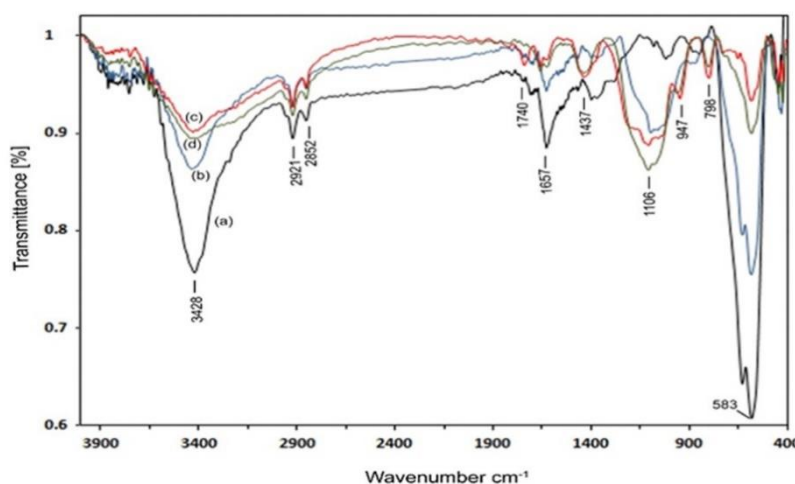
تخلیص پروتئین‌های نو ترکیب با استفاده از نانوذرات مغناطیسی حاوی کمپلکس‌های فلزی میل ترکیبی نیکل
در این مرحله، 6 ml نانوذرات معادل 300 میکرولیتر نانوذرات دیسپرس شده نهایی، به 1 ml بافر فسفات 50 میلی‌مولار حاوی 20 میلی‌مولار ایمیدازول، 300 میلی‌مولار NaCl، $8/0 \text{ pH}$ اضافه شد و 1 ml رسوب باکتری حاوی پروتئین نو ترکیب اضافه گردید و مدت 30 دقیقه در دمای اتاق رها شد. سپس نانوذرات با استفاده از آهنربا جدا شده و 300 میکرولیتر از مایع رویی مرحله قبل به آن اضافه شد و به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق با تکان دادن انکوبه شد. سپس مخلوط روی آهنربا قرار داده شد. نانوذرات در انتهای فالكون جمع‌آوری شدند و مایع رویی جمع آوری شد (این نمونه "جریان" نامیده می‌شود). سپس، نانوذرات-نیکل دو بار با یک بافر شستشو (50 میلی‌مولار NaH_2PO_4 ، 500 میلی‌مولار NaCl، و 20 میلی‌مولار ایمیدازول، $8/0 \text{ pH}$)، هر بار با 5 ml به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق شسته شد و مایع رویی به‌عنوان محلول شستشو ۱ و محلول شستشوی ۲ جمع‌آوری شد. برای استخراج پروتئین نو ترکیب متصل به Ni-MNPs، 500 میکرولیتر بافر 50 میلی‌مولار NaH_2PO_4 ، 500 میلی‌مولار NaCl، و ایمیدازول در غلظت‌های 100 و 250 میلی‌مولار، 8 pH به فالكون اضافه و محلول استخراج‌شده جمع‌آوری شد. پس از خروج کامل بافر خارج‌کننده اول، 1 ml بافر خارج‌کننده ۲ (غلظت 500 میلی‌مولار ایمیدازول) به فالكون اضافه و محلول خروجی در ظرفی جمع‌آوری شد. جهت بررسی تخلیص پروتئین‌های نو ترکیب، $50 \mu\text{l}$ از نمونه‌های خروجی برداشته شد تا پس از تیمار با بافر توسط SDS-PAGE ژل الکتروفورز بررسی شوند. تمام مراحل تخلیص در دمای اتاق صورت گرفت و پروتئین‌های بدست آمده بلافاصله در دمای 20°C - ذخیره شدند (۳۴).

اندازه‌گیری غلظت پروتئین‌ها در نمونه‌ها

جهت اندازه‌گیری غلظت پروتئین‌ها در نمونه‌های تخلیص شده و خام از روش برادفورد استفاده شد (۳۳). سه لوله آزمایش شاهد، استاندارد و تست انتخاب گردید، به هرکدام از لوله‌های استاندارد به ترتیب $5 \mu\text{l}$ ، $10 \mu\text{l}$ ، $15 \mu\text{l}$ ، $20 \mu\text{l}$ آلومین سرم گاوی (BSA) در حجم 1 ml اضافه و با آب مقطر به حجم 1000 ml

در شکل ۱d طیف نانوذرات هسته-پوسته کمپلکس شده با نیکل $(\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+})$ مشاهده می‌شود که جذب کششی پیوند Fe-O در ناحیه $582/31 \text{ cm}^{-1}$ ظاهر شده است که بیانگر وجود نانوذرات Fe_3O_4 می‌باشد. نوارهای جذبی در $1658/17 \text{ cm}^{-1}$ به ارتعاش کششی پیوند دوگانه $\text{CH}=\text{HC}$ اشاره دارد. قله پهن موجود در ناحیه $3442/17 \text{ cm}^{-1}$ به ارتعاشات کششی پیوند O-H اشاره دارد. پیک موجود در $1107/92 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی نامتقارن پیوند Si-O-Si است. پیک در محدوده 422 cm^{-1} ارتعاشات Ni^{2+} را توصیف می‌کند (۲۹). طیف FTIR حاصله، تشکیل یک پوسته سیلیکا روی نانوذرات مغناطیسی و عامل-دار کردن پوسته سیلیکا با پلی‌وینیل استات اصلاح شده با ایمینودی‌استیک اسید و کمپلکس کردن با نیکل را تأیید کرد.

است. در تمام منحنی طیف‌ها (b, c, d) قله در محدوده 1105 cm^{-1} مشاهده شده که به ارتعاش کششی نامتقارن Si-O-Si نسبت داده می‌شود. قله پهن موجود در ناحیه $3405/30 \text{ cm}^{-1}$ به ارتعاشات کششی پیوند O-H اشاره دارد. بر اساس شکل ۱c، $(\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{PVA}/\text{IDA})$ ، جذب در ناحیه 1740 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی گروه کربونیل $\text{C}=\text{O}$ وینیل استات است. نوارهای جذبی در 798 cm^{-1} و 1657 cm^{-1} به ترتیب به ارتعاش خمشی پیوند $\text{C}-\text{H}$ و ارتعاش کششی پیوند دوگانه $\text{CH}=\text{HC}$ مربوط است. پیک در ناحیه $1107/92 \text{ cm}^{-1}$ به ارتعاشات خمشی پیوند Si-O-Si اشاره دارد. قله ظاهر شده در $1107/92 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی نامتقارن Si-O-Si است که حاکی از وجود نانوذرات SiO_2 می‌باشد. پیک جذبی Fe-O در $583/28 \text{ cm}^{-1}$ ظاهر شد. قله پهن در $3428/81 \text{ cm}^{-1}$ به ارتعاش کششی پیوند O-H اشاره دارد.

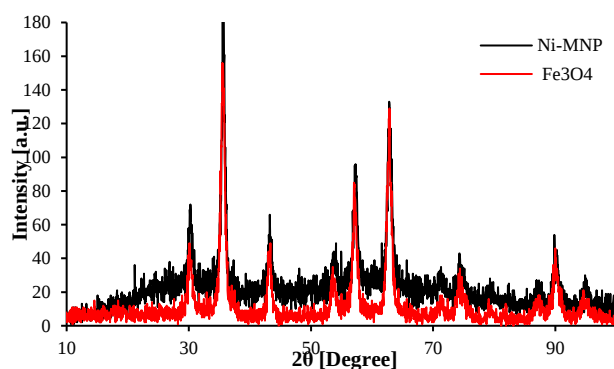


شکل ۱- طیف FTIR نانوذرات: (a) Fe_3O_4 ، (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ ، (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{PVAc}$ و (d) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{PVA}-\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$

نانوساختار $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ شبیه نانوذرات Fe_3O_4 است به عبارتی ساختار بلور نانوذرات Fe_3O_4 پس از قرار گرفتن پوشش SiO_2 و عامل دار شدن با پلی‌وینیل استات اصلاح شده با ایمینودی‌استیک اسید و قرار گرفتن Ni^{2+} حول آن دستخوش تغییر نشده است. همچنین استنباط می‌شود نانو ساختار با موفقیت تشکیل شده و پوشش ایجاد شده حول نانو ذرات آمورف بوده و بلوری نیست.

الگوی تفرق اشعه ایکس (XRD)

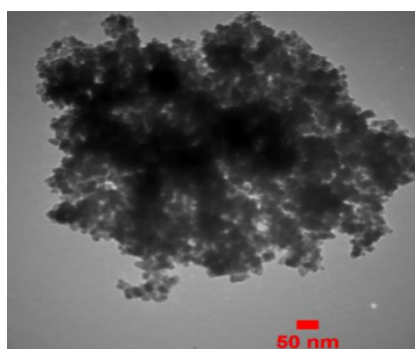
شکل ۲، الگوی تفرق اشعه ایکس نانوذرات Fe_3O_4 و نانوساختار $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ را نشان می‌دهد. همانطور که در الگوی تفرق برای نانوذرات Fe_3O_4 مشاهده می‌شود هیچ گونه پیک اضافی ناشی از فاز دیگر در نمونه، مشاهده نشد و به حالت کریستالی و متبلور است. الگوی پراش اشعه ایکس نانوساختار $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ در موقعیت $2\theta = 21-28^\circ$ ، SiO_2 با ساختار آمورف را نشان می‌دهد. شکل ۲ به وضوح نشان می‌دهد الگوی تفرق اشعه ایکس



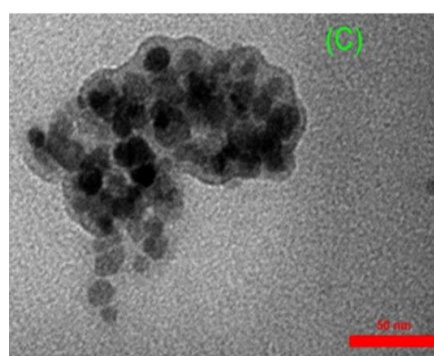
شکل ۲- الگوی تفرق اشعه ایکس نانوذرات Fe_3O_4 و نانوساختار $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$

Ni^{2+} در شکل ۳ الف و ب نشان داده شده است. طبق تصویر ۳، ذرات مغنتیک به صورت کره‌های تیره درون پوسته‌های پلیمری، که به صورت لایه روشن متمایز هستند، جای گرفته‌اند. تصاویر TEM تاییدی بر موفقیت تشکیل ساختار پلیمری روی سطح نانوذرات است.

مورفولوژی نانوساختارهای Fe_3O_4 ، $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ و $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{PVA}/\text{IDA}$ و $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) Fe_3O_4 و نانوساختار هسته/پوسته- $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{PVA}/\text{IDA}$



(الف)

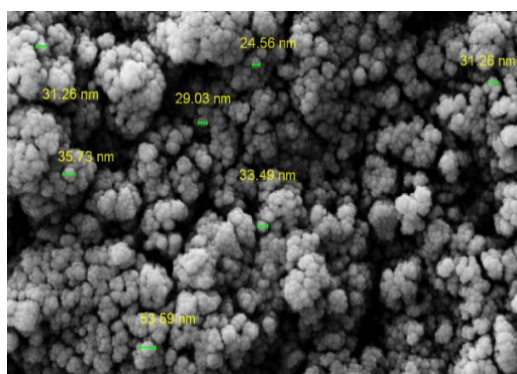


(ب)

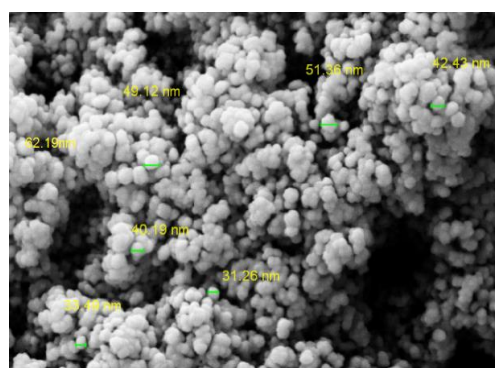
شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوساختار (الف) Fe_3O_4 و (ب) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$

Fe_3O_4 هسته و پوسته $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ می‌باشد. قطر متوسط نانوساختار Fe_3O_4 و میکروکره‌های هسته/پوسته $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ به ترتیب- در محدوده ۵۶/۶۹nm-۲۴/۵۳ و ۶۲/۱۹-۳۱/۲۶ مشاهده شد.

طبق تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی شکل ۴، نانوساختارهای Fe_3O_4 و $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ دارای اشکال کروی و ساختار یکنواخت بوده، سطح نانوسامانه همگن به نظر می‌رسد که نشان‌دهنده سازگاری خوب بین



(الف)

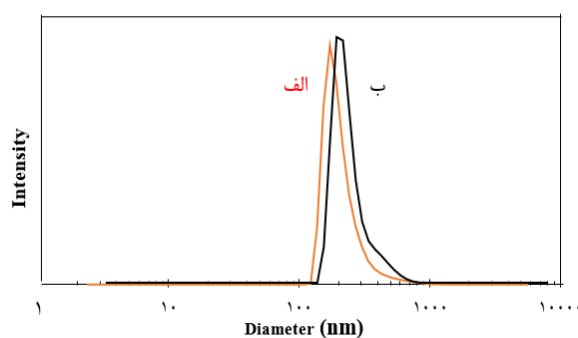


(ب)

شکل ۴- تصاویر SEM نانوساختار الف) Fe_3O_4 و ب) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ برابر $296/9\text{nm}$ به- دست آمد.

قطر هیدرودینامیکی و توزیع اندازه ذرات نانوساختارها توسط DLS تعیین شد. مطابق شکل ۵، میانگین اندازه نانوذرات Fe_3O_4 برابر $273/4\text{nm}$ و میانگین اندازه نانو ساختار



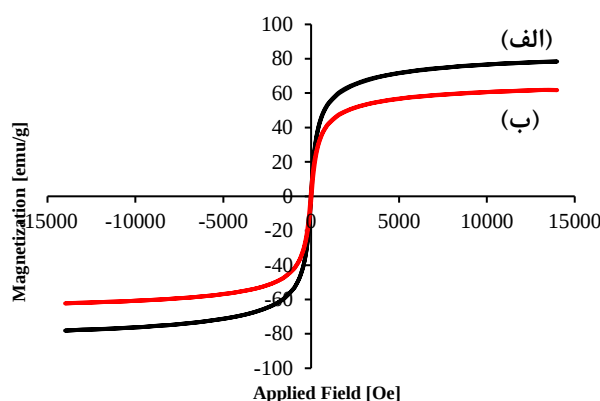
شکل ۵- نمودار DLS جهت تعیین اندازه ذرات نانوساختار الف) Fe_3O_4 و ب) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ با کاهش قابل- توجه، $61/93\text{g.emu}$ به دست آمد. کاهش مغناطش اشباع در نانوساختار $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ به علت محصور شدن نانوذرات Fe_3O_4 توسط $\text{IDA}-\text{PVA}-\text{SiO}_2$ و کمپلکس دار کردن با نیکل می باشد. نانوساختار مورد مطالعه بیشترین مقدار Ni^{2+} را برای غنی سازی پروتئین کمپلکس کرد.

مغناطیس سنج ارتعاشی (VSM)

جهت سنجش خواص مغناطیسی نانوساختار، منحنی هیستریزیس^۴ مربوطه، با تغییر میدان مغناطیسی H بین 12000 و -12000 - اورستد تهیه شد (شکل ۶). مغناطش- اشباع (M_s) نانوذرات Fe_3O_4 در دمای اتاق، $78/39716\text{g.emu}$ بود که این مقدار برای نمونه نانوساختار

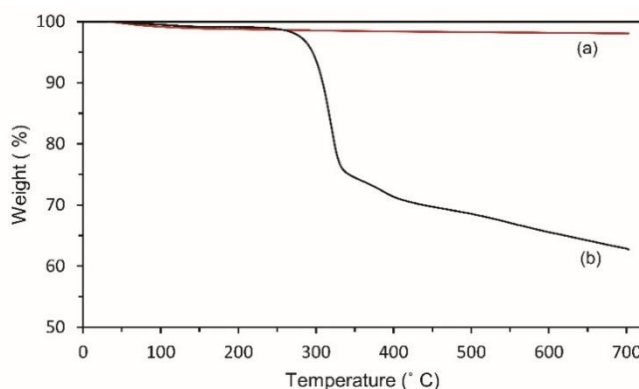
⁴ Hysteresis



شکل ۶- نتایج آزمون VSM برای نانوساختارهای (الف) Fe_3O_4 و (ب) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$

و نانوساختارهای $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ و $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ در شکل ۷ نشان داده شده است.

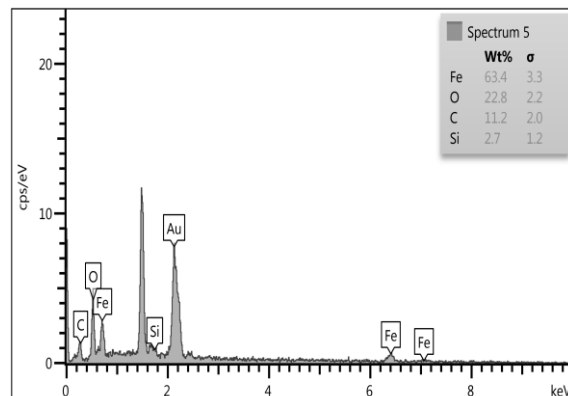
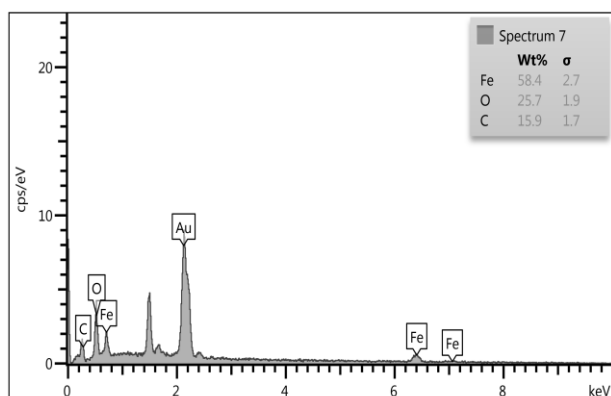
آزمون TGA نانوساختارهای $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ و $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ برای تعیین حضور و مقدار پلیمر تشکیل شده روی نانوذرات نهایی از آزمون TGA استفاده شد. TGA به‌دست آمده برای



شکل ۷- نمودار TGA (a) $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ و (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$

آنالیز میزان درصد وزنی عنصر Fe را ۵۸/۴٪، O ۲۵/۷٪ و C را ۱۵/۹٪ نشان داده شد، مطابق شکل ۹ میزان درصد وزنی عنصر Fe ۶۳/۴٪، O ۲۲/۸٪، C ۱۱/۲٪ و Si ۲/۷٪ مشاهده شد. نتایج EDX در تکمیل سایر نتایج به‌دست‌آمده، تشکیل نانوساختارهای $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ را تایید نمود.

طیف EDX نانوساختارهای Fe_3O_4 و $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ جهت تعیین نوع و درصد عناصر اصلی موجود در نانوساختارهای $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ و Fe_3O_4 از دستگاه EDAX-SEM استفاده شد. براساس شکل ۸ الف، طبق این



(الف)

(ب)

شکل ۸- طیف EDX نانوساختار الف) Fe_3O_4 و ب) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$

تعدالی بدست آمده را نشان می‌دهد. داده‌ها را می‌توان با مدل ساده لانگمویر^۵ توصیف نمود که در آن q و C به ترتیب غلظت پروتئین فاز آبی و مقدار پروتئین جذب شده روی جاذب در حالت تعادل است، q_m ظرفیت جذب و K_d ثابت تفکیک است. برای بدست آوردن ترمودینامیک جذب و مقادیر K_d از معادله وانت هوف استفاده شد.

۹۱

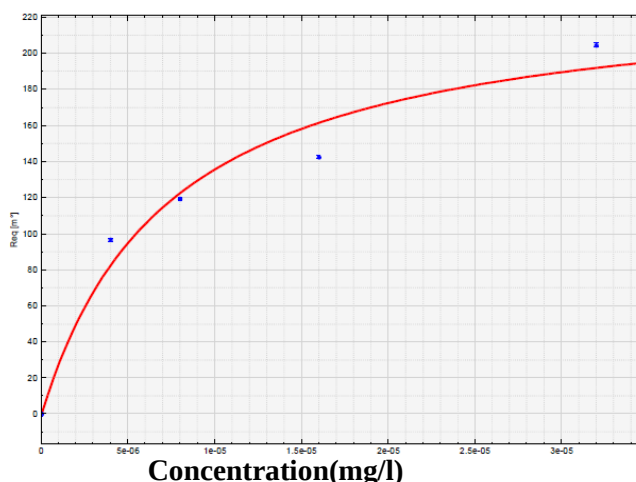
$$q = \frac{q_m C}{K_d + C}$$

$$K_d = \frac{q_e}{C_e}$$

q_e مقدار ماده جذب شونده (mg/g) و C_e غلظت پروتئین فاز آبی (mg/li) را نشان می‌دهد. با توجه به نمودار شکل ۹ مقدار K_d برابر 6.42×10^{-6} و مقدار ظرفیت جذب (q_m) برابر ۱/۲۵ میلی گرم پروتئین در هر میلی گرم نانوذرات به دست آمد.

بررسی جذب پروتئین در نانوذرات مغناطیسی $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{PVA}@\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$

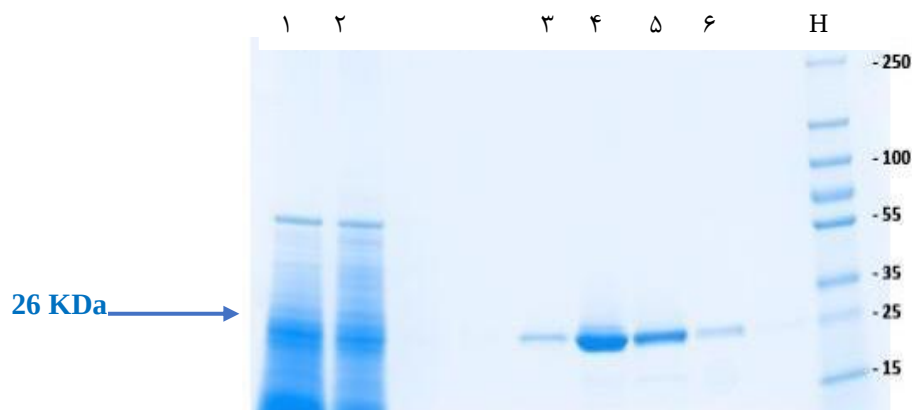
یک معیار در توصیف فرآیند جذب پروتئین با نانوساختار تعیین پارامتر ترمودینامیکی K_d (ثابت تفکیک) است. پروتئین ompW ۲۶KDa باکتری *E.coli* با ۶ اسید آمینه هیستیدین در معرض بررسی ظرفیت جذب پروتئین در نانوذرات مغناطیسی $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ قرار گرفت. آزمایش‌های جذب در pH ۸/۰ انجام شد تا اطمینان حاصل شود گروه‌های دهنده الکترون در سطح پروتئین محافظت نشده‌اند. نمک طعام با غلظت ۱ مولار در تمام بافرهای اتصال و شستشو، برای به حداقل رساندن فعل و انفعالات یونی بین زنجیره‌های جانبی اسید آمینه پایه در دسترس روی پروتئین‌ها و لیگاندهای IDA روی نانوذرات مغناطیسی قرار داده شد. شکل ۹ ایزوترم جذب



شکل ۹- ایزوترم جذب ompW با نانوساختار مغناطیسی $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$

تخلیص پروتئین

همانطور که در شکل ۱۰ مشاهده می‌شود پروتئین ۲۶ کیلو دالتونی OmpW بیان شده در باکتری *E.coli* از طریق ژل SDS-Page به صورت زیر تخلیص شد.

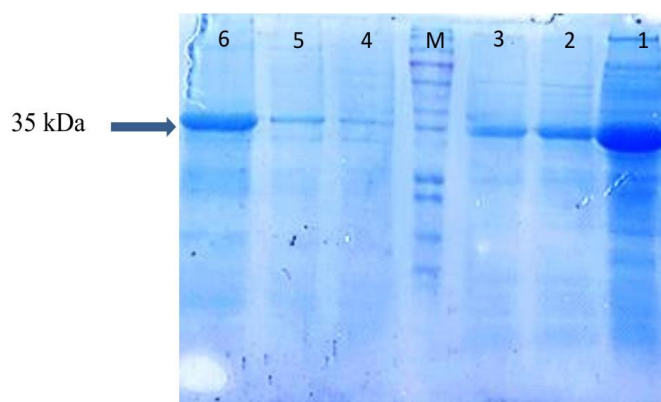


شکل ۱۰- الکتروفورز تخلیص پروتئین نوترکیب OmpW با استفاده از نانوذرات مغناطیسی میل ترکیبی نیکل و غلظت‌های مختلف ایمیدازول با استفاده از ژل SDS-PAGE ۱۵٪

۹۲

اول ستون با بافرهای شستشو، ۴: شستشوی دوم، ۵: محلول حاصل پس از شستشوی ستون نیکل با ایمیدازول ۱۰۰ میلی‌مولار، ۶: محلول حاصل پس از شستشوی ستون نیکل با ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار، H: نشانگر پروتئینی

ردیف ۱: پروتئین حل شده در اوره ۸ مولار، ۲: میزان جریان (محلول عبور داده شده از ستون که نشان می‌دهد میزان پروتئین بارگذاری شده از میزان ظرفیت ستون بیشتر بوده بنابراین مقداری از پروتئین جذب نشده است)، ۳: شستشوی پروتئین ۳۵ کیلودالتونی OPH که در باکتری *E.coli* بیان شده با استفاده از ژل SDS-PAGE تخلیص شد. نتایج مطابق شکل ۱۱ می‌باشد.



شکل ۱۱- الکتروفورز تخلیص پروتئین نوترکیب OPH با استفاده از نانوذرات مغناطیسی میل ترکیبی نیکل و غلظت‌های مختلف ایمیدازول با استفاده از ژل ۱۵٪ SDS-PAGE ردیف ۱: پروتئین حل شده در اوره ۸ مولار، ۲: میزان جریان (محلول عبور داده شده از ستون که نشان می‌دهد میزان پروتئین بارگذاری شده از میزان ظرفیت ستون بیشتر بوده بنابراین مقداری از پروتئین جذب نشده است)، ۳: شستشوی اول ستون با بافرهای شستشو، ۴: شستشوی دوم، ۵: محلول حاصل پس از شستشوی ستون نیکل با ایمیدازول ۱۰۰ میلی‌مولار، ۶: محلول حاصل پس از شستشوی ستون نیکل با ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار، M: نشانگر پروتئینی

جدول ۱- نتایج پروتئین سنجی OmpW

درصد جذب %	غلظت سوپرناتانت پروتئین (mg/ml)	غلظت پروتئین (mg/ml)
۱۷٪	۸/۳	۱۰
۳۶٪	۳/۲	۵
۶۸٪	۰/۸	۲/۵
۱۰۰	۰	۱/۲۵
۱۰۰	۰	۰/۶۴
۱۰۰	۰	۰/۳۲

نتایج مراحل پروتئین سنجی OmpW در جدول ۱ نشان داده شده است. بر اساس نتایج حاصل از پروتئین سنجی به روش برادفورد ظرفیت جذب نانوذرات ۱/۲۵ میلی گرم به ازای هر میلی گرم نانوذره می باشد. مراحل پروتئین سنجی پروتئین

OPH طبق روش برادفورد انجام گرفت و نتایج آن در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج حاصل از پروتئین سنجی، ظرفیت جذب نانوذرات ۱/۲۵ میلی گرم به ازای هر میلی گرم نانوذره می باشد.

جدول ۲- نتایج پروتئین سنجی پروتئین OPH

درصد جذب %	غلظت سوپرناتانت پروتئین (mg/ml)	غلظت پروتئین (mg/ml)
۱۰٪	۹	۱۰
۲۰٪	۴	۵
۴۴٪	۱/۴	۲/۵
۱۰۰	۰	۱/۲۵
۱۰۰	۰	۰/۶۴
۱۰۰	۰	۰/۳۲

طبق نتایج، نانوذراتی که در مرحله قبل توسط پروتئین اشباع شده بودند (با بیش از ۱/۲۵ میلی گرم پروتئین انکوبه شده به ازای هر میلی گرم نانوذره) مجدداً توانایی جذب پروتئین را دارند.

بحث

زمانی که نانوذرات به محیط زیستی وارد می شوند، سطح آن ها با مولکول های زیستی مانند پروتئین ها، مواد آلی طبیعی و آنزیم ها پوشیده می شود. شکل نانوذرات تأثیر مهمی بر میزان جذب پروتئین ها بر سطح آن ها و به دنبال آن برهمکنش با

سلول ها دارد. خصوصیات سطح نانوذرات (ویژگی هایی مثل شکل، موقعیت شیمیایی، عملکرد سطحی، تخلخل، بلورینگی، هیدروفوبیسیته و هیدروفیلیسیته)، نحوه اتصال نانوذرات را با پروتئین مشخص می کند. نیروهای اصلی مسئول اتصال بین نانوذرات و پروتئین، نیروهای واندروالسی، پراکندگی لاندن، دوقطبی و پیوند هیدروژنی هستند (۳۶). بررسی برهمکنش

می‌گیرد که در حالت تعلیق ذرات به هم متصل شدگی و سایز بزرگتر است، اما SEM اندازه قطر ذرات در حالت خشک که سایز نانوساختار کمتر است را نشان می‌دهد. قطر بزرگتر-Ni MNPs نشان داده شده توسط DLS در مقایسه با قطر اندازه-گیری شده توسط SEM نیز می‌تواند ناشی از تشکیل لایه پلیمری آبدوست روی سطح ذرات باشد. باتوجه به نتایج مغناطش اشباع (Ms)، کاهش مغناطش اشباع نانوذرات-Ni MNP ممکن است به دلیل محصور شدن نانوذرات

Fe_3O_4 توسط Ni- باشد. مغناطش اشباع نانوذرات نهایی به اندازه کافی قوی و مناسب برای جداسازی مغناطیسی می‌باشد. مقادیر اندک مغناطش پسماند و وادارندگی^۷ مغناطیسی نشان می‌دهد نانوذرات مغناطیسی تهیه شده سوپراپارامغناطیس هستند. در نتایج آنالیز TGA مشاهده شد، کاهش وزن ذرات-اکسید آهن (ناشی از آب جذب شده) کمتر از ۴٪ بوده و با تشکیل پلیمر روی سطح ذرات تا حدود ۴۰٪ افزایش می‌یابد. نتایج تحقیق حاضر همراستا با نتایج مطالعه علی‌محمدی و همکاران در سنتز و مشخصه‌یابی نانوذرات مغناطیسی عامل-دار شده با آلکیل ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TMOS}$) و نتایج مطالعه Zhang و همکاران در استفاده از نانوساختارهای مغناطیسی $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PVIM-Ni}^{2+}$ برای جداسازی ویژه پروتئین‌های غنی از هیستیدین بود (۴۰ و ۴۱). مطابق شکل ۸a، شیب نمودار ابتدا به صورت نزولی است که نشان‌دهنده کاهش جرم ناخالصی با افزایش دما است. در این نمودار در دمای 100°C تغییری در جرم نمونه رخ داد که می‌توان آن را به رطوبت نمونه نسبت داد که در دمای 100°C (دمای تبخیر آب) رطوبت از بین رفته و ماده خشک می‌شود. در انتها ۹۸/۰۵٪ وزنی از نانوساختار $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ باقی ماند. سپس Ni^{2+} از طریق کمپلکس Ni^{2+} با ایمینودی‌استیک‌اسید برای اتصال بیشتر با پروتئین‌های غنی از هیستیدین روی نانوساختارها گنجانیده شد. با توجه به اینکه نمی‌توان Ni^{2+} را در اتمسفر N_2 سوزاند، جرم کل حفظ خواهد شد و منطقی است که بعد از کمپلکس شدن با Ni^{2+} ، کاهش وزن صورت گیرد (شکل ۸b). نتایج Zhang و همکاران با یافته‌های این تحقیق همراستا بود. نتایج مطالعه اخیر تایید می‌کند پروتئین‌های OmpW و OPH به عنوان دو پروتئین نو ترکیب با برجسب هیستیدین بیان و با استفاده از نانوذرات نهایی خالص‌سازی شدند. در مطالعه Huang و همکاران به بررسی پروتئین ompW باکتری اسینتوباکتر بومانی پرداخته شد. این محققان پروتئین ompW

مولکولی پروتئین و لیگاند یک فرایند اساسی جهت تشخیص و درمان برخی بیماری‌ها است. تعامل پروتئین با نانوذرات و تغییرات ساختاری پروتئین پس از جذب آنها در سطوح نانوذرات بررسی شده است. بنابراین، درک تغییرات ساختاری و روند باز شدن پروتئین‌ها برای تسریع کاربردهای زیست پزشکی نانوذرات بسیار مهم است. طبق مطالعات، نانوذرات Fe_3O_4 منجر به تغییر ساختار پروتئین و در نهایت تغییر رنگ و فیبریلاسیون پروتئین می‌شود (۳۷).

نانوذرات سوپراپارامغناطیس اکسید آهن به علت توانمندی‌های گسترده مانند جداسازی سلولی، گرمادرمانی و رهایش کنترل شده دارو به عنوان نانوذرات امیدبخش برای کاربردهای درمانی شناخته شده‌اند (۳۸). کارهای تحقیقاتی متعددی روی تهیه نانوذرات مغناطیسی (MNPs) جهت خالص‌سازی و غنی‌سازی انتخابی پروتئین‌ها انجام شده است (۳۹). نانوذرات سنتز شده اغلب دارای ساختار هسته-پوسته هستند و جذب پروتئین نمی‌تواند فراتر از یک لایه در سطح ذرات گسترش یابد و بسیاری از کیلاتورها دست نخورده باقی می‌مانند. بنابراین، سنتز نانوساختارهای مغناطیسی متصل به زنجیره‌های پلیمری کیلاتور ممکن است راهی آسان و کارآمد برای افزایش ظرفیت اتصال پروتئین باشد. مشخصه‌یابی نانوذرات توسط SEM، TEM، DLS، FTIR، XRD و VSM TGA مشخص شدند. همان‌طور که در تصاویر SEM مشاهده می‌شود (شکل ۵ الف و ب)، قطر نانوساختارهای Fe_3O_4 و Ni-MNP به ترتیب در محدوده ۵۰-۲۰ نانومتر و ۶۰-۳۰ نانومتر مشاهده شد. همان‌طور که مشهود است در بزرگنمایی یکسان برای دو نمونه در نانوساختار آهن وینیل‌ه شده و کمپلکس شده با Ni^{2+} قطر ذرات افزایش یافته که مؤید پوشش‌دار شدن نانوذرات هسته آهن است. طبق تصاویر فرایند پوشش‌دار کردن مغناطیسی باعث تجمع و توده‌ای شدن غیرطبیعی نانوذرات اصلاح شده نمی‌گردد. تصاویر SEM نشان می‌دهد خوشه‌های مغناطیسی از بسیاری از نانوکریستال‌های کوچک تشکیل شده که با مطالعات قبلی مطابقت دارند (۴۰). تصاویر TEM نیز تشکیل یک پوشش شفاف روی ذرات هسته را نشان می‌دهد، ممکن است به دلیل تشکیل یک پلیمر روی ذرات اکسید آهن باشد. در بررسی مورفولوژی نانوساختار Fe_3O_4 و نانوساختار هسته/پوسته $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{PVA}@\text{IDA-Ni}^{2+}$ تفاوت بین اندازه ذرات به دست آمده از طریق SEM و DLS به این دلیل است که DLS شعاع هیدرودینامیکی در محلول سوسپانسیون را اندازه

⁷ Coercivity

⁶ Remanent magnetization

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، به طور خلاصه، یک استراتژی آسان و جدید برای سنتز نانوذرات مغناطیسی متشکل از یک هسته مغناطیسی پوشش داده شده با سیلیس متصل به یک کمپلکس پلیمری جهت جداسازی و تخلیص پروتئین OPH و OmpW حاوی هیستیدین ارائه شد. نانوذرات در چهار مرحله سنتز شدند. خصوصیات ساختاری و شاخص‌های فیزیکوشیمیایی نانوذرات - توسط آنالیزهای FTIR، DLS، SEM، TEM، EDX، TGA و VSM تعیین شد. زیر واحدهای پروتئین‌های OPH و OmpW به صورت نوترکیب بیان شده و تخلیص گردیدند. در این مطالعه ژن کدکننده پروتئین نوترکیب OPH و OmpW در ناقل بیانی (+) pet-26b کلون شدند و در *E. coli* BL21 (DE3) به عنوان میزبان بیان و به محیط کشت باکتری ترشح گردیدند. بیان ژن و فرآیند خالص‌سازی از طریق سدیم دودسیل سولفات-ژل پلی‌آکریل‌آمید (SDS-PAGE) و تست - برادفورد ارزیابی شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد، نانو ذرات پلیمری مغناطیسی $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{PVA}/\text{IDA}-\text{Ni}^{2+}$ دارای ساختار کروی و یکنواخت، با خاصیت مغناطیسی بالا، محل‌های اتصال فراوان و فرآیند سنتز آسان است. این نانوساختارها درجه بالایی از بازیابی باندهای پروتئینی را بدون توجه به طبیعت پروتئین نشان دادند. پروتئین‌های OPH و OmpW به عنوان پروتئین نوترکیب با برچسب هیستیدین بیان و با استفاده از نانوذرات نهایی خالص شدند. با توجه به نتایج SDS-PAGE، وضوح بالایی در جداسازی پروتئین وجود داشت. می‌توان گفت نانوذرات سنتز شده دارای حداکثر ظرفیت جذب پروتئین حدود ۱/۲۵ میلی گرم پروتئین در هر میلی گرم نانوذرات است.

را بین دو سایت آنزیمی *BamHI* و *EcoRI* در پلاسمید *pThioHisA* کلون‌سازی نمودند و پروتئین نوترکیب را به باکتری *E. coli* سویه BL21 منتقل نمودند. این پروتئین در باکتری میزبان بیان بسیار بالایی را نشان داد (۴۲). نتایج جذب پروتئین نشان می‌دهد وجود پروتئین بر سطح نانوذرات باعث بهبود ظرفیت جذب در نانوساختار مربوطه شده است. به علاوه، با خاصیت آبگریزی ذاتی PVA، میزان تورم نانوذرات مغناطیسی در آب حداقل است. همچنین، گروه‌های عاملی IDA واقع در امتداد زنجیره‌های پلیمری انعطاف‌پذیر، به یون‌های فلزی غیرمتحرک اجازه می‌دهند تا به خوبی در محل‌های اتصال روی سطح پروتئین مرتب شوند. بنابراین، پروتئین می‌تواند به نانوذرات مغناطیسی در چندین لایه بچسبد و ظرفیت جذب بسیار افزایش می‌یابد. جذب پروتئین بالایی از نانوذرات نهایی تقریباً ۱/۲۵ میلی گرم پروتئین در هر میلی گرم نانوذرات مشاهده شد. با توجه به نتایج SDS-PAGE، درجه وضوح بالایی در جداسازی پروتئین نیز مشاهده شد. با مزایایی مانند هزینه کم، ظرفیت جذب پروتئین بالا، درجه انتخاب-پذیری بالا در فرآیند جداسازی پروتئین، سوپرپارامغناطیس و خواص مغناطیسی قوی، می‌توان از ذرات سنتز شده در مقیاس بزرگ برای جداسازی پروتئین‌ها استفاده کرد. لازم به ذکر است که ظرفیت جذب نانوذرات سنتز شده در این تحقیق بسیار بالاتر از نمونه‌های تجاری است. دانه های مغناطیسی موجود در بازار اغلب ظرفیت کمی دارند (معمولاً کمتر از ۲۵ میلی گرم پروتئین در هر گرم مهره) (۴۳ و ۴۴).

منابع

1. Seyedinkhorasani M, Keramati M, Ahangari Cohan R, Roohvand F, Norouzian D. Evaluation and comparison of affinity chromatography and precipitation-based methods on purification of recombinant streptokinase. *Med Sci J Islamic Azad Uni*, 2020; 30(4): 387-395.
2. Gräslund S, Nordlund P, Weigelt J, Hallberg BM, Bray J, Gileadi O, et al. Protein production and purification. *Nat Methods*, 2008; 5:135.
3. Babaie M. Proteins Separation and Purification Methods with Focus on Chromatography: a Review Study, *J Ardabil Uni Med Sci*, 2020; 20(2): 151-175.
4. Rezaei Younaki L, Ayat H, Ahadi A.M. Design and construction of pET32b (+) Rh expression vector based on pET system to facilitate purification, *Cellular Molecular Res (Iranian J Biol)*, 2021; 34(2): 169-181.
5. Li XS, Zhu GT, Luo Y.B, Yuan B.F, Feng YQ. Synthesis and applications of functionalized magnetic materials in sample preparation. *TrAC Trends Anal Chem*. 2013; 45: 233-247.
6. Zhang Y, Li D, Yu M, Ma W, Guo J, Wang Ch. Fe₃O₄/PVIM-Ni²⁺ Magnetic Composite Microspheres for Highly Specific Separation of Histidine-Rich Proteins. *ACS Appl Mater Interfac*, 2014; 6: 8836-8844.
7. Wang Y, Wang G, Xiao Y. Yang Y, Tang R. Yolk-Shell Nanostructured Fe₃O₄@NiSiO₃ for Selective Affinity and Magnetic Separation of His-Tagged Proteins. *ACS Appl Mater Interfac*, 2014; 6(21): 19092-19099.
8. Zou X, Li K, Zhao Y. Ferro ferric oxide/L-cysteine magnetic Nano spheres for capturing histidine-tagged proteins. *J Mater Chem B1*, 2013; (38): 5108-5113.
9. Pham X.H, Hahm E, Kim H.M, Son B.S, Jo A, An J. Silica-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles Grafted onto Graphene Oxide for Protein Isolation. *Nanomater*, 2020; 10(1): 117.
10. Zhou Y, Yan D, Yuan S. *Protein Expr Purif*, 2018; 144: 5-11.
11. Kashanian F, Habibi-Rezaei M, Moosavi-Movahedi A, Bagherpour A, Vatani M. *Biomed Mater*, 2018; 13(4): 045014.
12. Zhang Y, Zhang M, Yang J, Ding L, Zheng J, Xu J. Facile synthesis of sea urchin-like magnetic copper silicate hollow spheres for efficient removal of hemoglobin in human blood. *J Alloy Comp*, 2017; 695: 3256-3266.
13. Zhou Y, Yuan S, Liu Q. Synchronized purification and immobilization of his-tagged β -glucosidase via Fe₃O₄/PMG core/shell magnetic nanoparticles. *Sci Rep*, 2017; 7: 41741
14. Park S, Park H, Jeong S, Yi BG, Park K, Key J. Hyaluronic Acid-Conjugated Mesoporous Silica Nanoparticles Loaded with Dual Anticancer Agents for Chemophoto dynamic Cancer Therapy. *J Nanomateri*, 2019; 2019:11.
15. Xue B, SunY. Fabrication and characterization of a rigid magnetic matrix for protein adsorption. *J Chromatog A*, 2002; 947: 185.
16. 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.
17. Das RP, Singh BG, Kunwar A, Priyadarsini KI. Interaction of a Model Hydrophobic Drug Dimethylcurcumin with Albumin Nanoparticles, *Protein J*. 2019.
18. Liao Y, Cheng Y, Li Q. Preparation of nitrilotriacetic acid/Co²⁺-linked, silica/boron-coated magnetite nanoparticles for purification of 6×histidine-tagged proteins. *J Chromatog A*, 2007;1143: 65-71.
19. Tural B, Kaya M, Ozkan N, Volkan M. Preparation and Characterization of Ni-Nitrilotriacetic Acid Bearing Poly (Methacrylic Acid) Coated Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles. *J Nano Sci Nano technol*, 2008; 8: 695-701.
20. Ye X-R, Daraio C, Wang C, Talbot J, Jin S. Room temperature solvent-free synthesis of monodisperse magnetite nanocrystals. *J Nano Sci Nano technol*, 2006; 6(3): 852-856.
21. Keyhanian F, Shariati S, Faraji M, Hesabi M. Magnetite nanoparticles with surface modification for removal of methyl violet from aqueous solutions. *Arabian J Chem*, 2016; 9: S348-S354.
22. Businova P, Chomoucka J, Prasek J, Hrdy R, Drbohlavova J, Sedlacek P, et al. Polymer coated iron oxide magnetic nanoparticles: preparation and characterization. *Nanocon*. 2011; 9: 21-23.
23. Barala S, Arora M, Saini P. Magnetite Decorated Activated Carbon Composites for Water Purification. 2013; 1244-1245. doi: 10.1063/1.4810691

24. Sun L, Zhang C, Chen L, Liu J, Jin H, Xu H, et al. Preparation of alumina-coated magnetite nanoparticle for extraction of trimethoprim from environmental water samples based on mixed hemimi celles solid-phase extraction. *Analytic Chimica Acta*, 2009; 638(2):162-168.
25. Li X-S, Zhu G-T, Luo Y-B, Yuan B-F, Feng Y-Q. Synthesis and applications of functionalized magnetic materials in sample preparation. *TrAC Trends Analyt Chem*. 2013; 45: 233-247.
26. Kashanian F, Habibi-Rezaei M, Moosavi-Movahedi A, Bagherpour A, Vatani M. The ambivalent effect of Fe₃O₄ nanoparticles on the urea-induced unfolding and dilution-based refolding of lysozyme. *Biomed Mater*. 2018;13(4): 045014.
27. Chen Z, Xu R, Zhang Y, Gu N. Effects of proteins from culture medium on surface property of silanes-functionalized magnetic nanoparticles. *Nanoscal res letters*, 2009; 4(3): 204.
28. Pham X-H, Hahm E, Kim H-M, Son BS, Jo A, An J, et al. Silica-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles Grafted onto Graphene Oxide for Protein Isolation. *Nanomater*, 2020; 10(1):117.
29. 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.
30. Dastjerdi Z. Aarabi A.M, Shafiee Afarani M, Ghasemi E. Synthesis of Fe₃O₄ and Fe₃O₄-CuO Magnetic Nanopigments by Precipitation Method. *J Color Sci Technol*, 2018; 11: 287-295.
31. Mohammed Ali, N.S, Alalwan, H.A, Alminshid, A.H, Mohammed M.M. Synthesis and Characterization of Fe₃O₄-SiO₂ Nanoparticles as Adsorbent Material for Methyl Blue Dye Removal from Aqueous Solutions. *Pollution*, 2022; 8(1): 295-302. doi: 10.22059/poll.2021.328697.1157.
32. Mehrabi F, Mohamadi M, Mostafavi A, Hakimi H, Shamspur T. Magnetic solid phase extraction based on PVA - TEOS / grafted Fe₃O₄@SiO₂ magnetic nanofibers for analysis of sulfamethoxazole and trimethoprim in water samples. *J Solid State Chem*, 292; 2020: 121716.
33. Bradford M.M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248-254.
34. Ghasemi A, Salari MS, Zarnani AH, et al. Immune reactivity of Brucella melitensis vaccinated rabbit serum with recombinant Omp31 and DnaK proteins. *Iran J Microbiol*, 2013; 5: 19-23.
35. Ma M, Zhang Y, Yu W, Shen HY, Zhang HQ, Gu N. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. *Colloid Surfaces A: physicochem eng aspect*, 2003; 23, 212(2-3): 219-226.
36. Arakha M. Investigation on the effect of zinc oxide nanoparticles in the aggregation of hen egg lysozyme. National Institute of Technology Rourkela. Department Biotechnol Medical Eng. 2012.
37. Fattah R, Rashedi H, Yazdian F, et al. Promising insights into the kosmotropic effect of magnetic nanoparticles on proteins: The pivotal role of protein corona formation. *Biotechnol Prog*. 2020; e3051.
38. Gasemi F, Hormozinejad M.R, Mahmoudi M. Determination of Protein Absorption Profile at the Surface of Biocompatible Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Using Gel Electrophoresis, *Irani J Chem Eng*, 2018; 37(2): 33-44.
39. Khizar S, M. Ahmad N, Zine N, Jaffrezic-Renault N, Errachid-el-salhi A.H, A.H Elaissari. Magnetic Nanoparticles: From Synthesis to Theranostic Applications, *ACS Appl Nano Mater*. 2021; 4(5), 4284-4306.
40. Alimohammadi V, Kashanian F, Seyyed Ebrahimi S.A, Habibi Rezaei M, Bagherpour A. Synthesis and characterization of functionalized magnetite nanoparticles by alkyl group (Fe₃O₄@TMOS). *Metallurgical Engineering* 2019; 21(4): 275-283 <http://dx.doi.org/10.22076/me.2019.88002.1199>.
41. Yuting Zhang, Dian Li, Meng Yu, Wanfu Ma, Jia Guo, Changchun Wang. Fe₃O₄/PVIM-Ni²⁺ Magnetic Composite Microspheres for Highly Specific Separation of Histidine-Rich Proteins. *ACS Appl Mater Interfac*, 2014; 6: 8836-8844.
42. Huang W, Wang S, Yao Y, Xia Y, Yang X, Long Q, et al. OmpW is a potential target for eliciting protective immunity against *Acinetobacter baumannii* infections. *Vaccine*, 2015; 33(36): 4479- 85.
43. Zhang L, Chen L, Wan QH. Preparation of Uniform Magnetic Microspheres through Hydrothermal Reduction of Iron Hydroxide Nanoparticles Embedded in a Polymeric Matrix. *Chem Mater*, 2008; 20: 3345-3353.

44. Di Corato R, Piacenza P, Musaro M, Buonsanti R, Cozzoli PD, Zambianchi M, et al. *Macromol Biosci*, 2009; 9: 952–959.