



Scan online to view this article

Comparison of the effects of functionalized MNPs by mesoporous silica and L-lysine (NH₂-Si@Fe₃O₄) on structural changes of egg white lysozyme protein (HEWL)

Forough Zakernezhad¹, Behnam Rasekh², Parvaneh Maghami^{3*},
Fatemeh Yazdian⁴

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 (NH₂-Si@Fe₃O₄) 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.

Corresponding author:

Department of Biophysics, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

Email: maghami.p@srbiau.ac.ir



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

مقایسه اثرهای MNPs عامل دار شده با سیلیکای مزوپور و L-لیزین ($\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$) 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 وابسته به طبیعت پروتئین جذب شده و خصوصیت‌های فیزیکوشیمیایی سطوح غیرآلی است. نانوذرات مغناطیسی (MNPs) با پوشش‌های زیست‌سازگار تنها مواد نانو ساختار 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 برهم-کنش MNPs با مولکول‌های زیستی به‌ویژه پروتئین‌ها است. مطالعه حاضر، مقایسه اثرهای MNPs عامل‌دار شده با سیلیکای مزوپور و L-لیزین ($\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$) 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، VSM و DLS و برهم‌کنش پروتئین-نانوذرات با استفاده از تکنیک‌های فلورسانس ذاتی، تست ANS، تیوفلاوین تی (ThT)، ATR-FTIR و تجمع حرارتی پروتئین انجام شد. تغییر ساختار HEWL برتعال 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 در حضور MNPs، نقش مؤثر $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ 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 در نظر گرفته شود. در این 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)

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

و غیره اتفاق می‌افتد. عوامل زیادی در برهم‌کنش نانوذرات و پروتئین‌ها از جمله ماهیت نانوذرات، اندازه، شکل و میزان بارسطحی NPs تأثیر دارند. ویژگی‌های ساختاری و پایداری ذاتی و ترمودینامیکی پروتئین نیز در برهم‌کنش آن با NPs مؤثر می‌باشد (۲، ۱). Kathiravan و همکاران نشان دادند NPs باعث ایجاد اختلال در ساختار ثانویه پروتئین‌ها شده که در برخی موارد غیرقابل برگشت است (۳).

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 به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد از جمله ظرفیت بارگیری بالا، منافذ قابل تنظیم، سطح وسیع، پایداری، سهولت سنتز، تخلخل تنظیم‌پذیر و زیست‌سازگاری بسیار خوب در حال 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 اکسید آهن پوشش‌دار شده با سیلیکای-مزوپور متصل شد. طبق نتایج $GO/MNP@SiO_2$ می‌تواند برای جداسازی پروتئین مورد استفاده قرار گیرد (۲۲، ۲۳). در پژوهش Tavakoli و همکاران، به‌منظور افزایش دسترسی پروتئین، هسته نانوذرات مغناطیسی Fe_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، برهم‌کنش پروتئین با NP_s باردار ممکن است بدون توجه به علامت بار سطحی آنها رخ دهد (۲۵). در حالی که پروتئین به‌شدت به NP_s با بار مخالف 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 وزن مولکولی 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 می‌شود (۳۱). مطالعه برهم‌کنش MNP_s و HEWL، به

نانوذرات سیلیس (۴)، نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 (۵)، طلا (۶) و نقره (۷) انواع مختلف NP هستند که تأثیر آن‌ها 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 سوپراپارامغناطیس 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 در محیط زیستی استفاده گردد، به‌دلیل خواص مغناطیسی و مساحت سطح بالا، تمایل به لخته‌شدن و اکسیداسیون در آن‌ها وجود دارد. برای جلوگیری از این مشکل، فرآیند پوشش‌دار کردن نانوذرات به‌وسیله عوامل حفاظتی ضروری است (۱۰). نانوذرات دارای پوشش مناسب اثرات کم‌تری بر سمیت 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 خواص سطحی 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 در ذخیره‌سازی، دناتوراسیون و فرآیندهای بازتآوردگی مورد بررسی قرار گرفت 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-تترااتیل‌ارتوسیلیکات (TEOS)، ۳-آمینوپروپیل‌تری-اتوکسی سیلان (APTES) و گلو تار آلدهید (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 $MNPs$

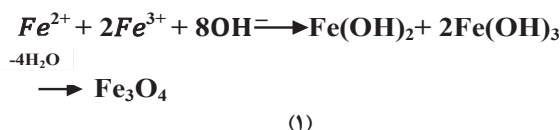
شفاف سازی ماهیت شیمیایی تعاملات بین مولکول های زیستی و MNP_s کمک می کند (۱۵). طبق گزارش Kashanian و همکاران، پایداری HEWL در غلظت های پایین MNPs بهبود یافت. استفاده از pH های مختلف و به کارگیری لیگاند با ویژگی های متمایز، به عنوان دو استراتژی درک مکانیسم تعامل پروتئین- MNPs انتخاب شدند. توسط طیف سنجی UV-vis بینش در مورد سینتیک تجمع پروتئین در حضور غلظت های مختلف Fe₃O₄ فراهم شد. نتایج تحقیق، اهمیت زیادی در کنترل فعل و انفعالات پروتئین- MNPs برای تولید NP مؤثرتر برای کاربردهای آینده داشت (۳۲). با توجه به نقش گروه های عاملی در عملکرد بهتر و زیست سازگار شدن MNPs، در تحقیق حاضر L-لیزین (گروه عاملی -NH₂) 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 اکسید آهن عامل دار شده با سیلیکای مزوپروس (Si@Fe₃O₄) و نانوذره سیلیکای مزوپور آراسته شده با گروه عاملی -NH₂، (NH₂-Si@Fe₃O₄)، بر تغییرات ساختاری، پایداری و عملکرد HEWL، بررسی و مقایسه شد. مشخصه های مربوط به نانوذرات و پروتئین بررسی گردید.

مواد و روش ها

لیزوزیم سفیده تخم مرغ (HEWL) (EC.3.2.1.17, Mw=14.3KDa)، تیوفلاوین تی (ThT) و ۸-آنیلینو ۱-نفتالن سولفونیک اسید (ANS) از سیگما آلد ریچ خریداری شد. مواد شیمیایی و حلال های آلی از Merck تهیه شدند. دیواره سلولی خشک شده باکتری گرم مثبت میکروکوکوس لوتئوس (*M. Luteus*)، از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه و به عنوان سوبسترای لیزوزیم استفاده گردید.

سنتز نانوذرات Si@Fe₃O₄ و NH₂-Si@Fe₃O₄

نانوذرات مغناطیسی به عنوان هسته نانوذرات Si@Fe₃O₄ و NH₂-Si@Fe₃O₄ با استفاده از روش هم رسوبی طبق فرمول واکنش (۱) سنتز گردید (۳۳):



ابتدا ۰/۵ گرم FeCl₂.4H₂O و ۱/۳۵ گرم FeCl₃.6H₂O تحت گاز نیتروژن در یک بالن سه دهانه در ۲۵ ml آب

دیونیزه حل شدند. محلول حاصل تحت استیرر، حرارت داده شد. زمانی که 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 به وسیله آهن ربا، نمونه ها ۳ بار با آب دیونیزه و ۲ بار با اتانول برای حذف یون های اضافی شسته شد و مدت یک شبانه روز در خشک کن انجمادی با دمای ۵۰ °C - خشک شدند (۲۴). جهت سنتز Fe₃O₄.SiO₂، تکنیک سل-ژل مورد استفاده قرار گرفت (۳۴). به این صورت 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 باقی مانده 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 تترائیل ارتوسیلیکات (TEOS) و ۰/۳ گرم ستیل تری متیل آمونیوم برومید (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 به مدت ۸ ساعت خشک شدند (۳۵).

مشخصه یابی نانوذرات Si@Fe₃O₄ و NH₂-Si@Fe₃O₄

بعد از سنتز و عامل دار کردن نانوذرات، با استفاده از روش های تحلیلی مختلف، مشخصه یابی انجام شد. آزمون XRD برای نانوذرات مغناطیسی Si@Fe₃O₄ و NH₂-Si@Fe₃O₄ با دستگاه پراش پرتو ایکس مدل PW 1730، تحت تابش Cu-Kα (λ=۱/۵۴۰۵۶Å°)، در ولتاژ ۴۰ کیلوولت و جریان ۳۰ میلی آمپر انجام گرفت. محدوده اسکن ۲θ از ۱۰-۸۰ درجه قرار داده شد. تحلیل و بررسی نتایج حاصل از این آزمون توسط نرم افزار XPERT high score plus نسخه ۵،۰،۳ انجام شد. بررسی پیوندهای نانوذرات و تأیید عامل دار شدن نانوذرات با دستگاه FT-IR Spectrophotometer مدل Spectrum Two در محدوده ۴۰۰-۴۰۰۰ cm⁻¹ انجام شد. مغناطیس اشباع (MS) نمونه ها با دستگاه مغناطیس سنج نمونه مرتعش (VSM, MDK; Meghnatis Daghigh Kavir Co.;) (Iran) در دمای اتاق اندازه گیری شد. ارزیابی پتانسیل زتا و اندازه نانوذرات در بافر سدیم فسفات (PBS،) (۱۰۰ mM, pH 7.4)، با دستگاه پراکندگی نور

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 از دستگاه زتاسایزر شرکت Brookhaven Instruments Corp اندازه‌گیری گردید. محدوده توزیع اندازه ذرات، با استفاده از دستگاه پراکندگی نور دینامیکی (DLS) از سری Malvern ZS-Nano تعیین شد.

طیف سنجی ATR-FTIR

طیف‌سنجی انعکاس کل تضعیف شده تبدیل فوریه مادون قرمز (ATR-FTIR) برای ارزیابی ساختار ثانویه پروتئین استفاده گردید. غلظت پروتئین، $0.2/0.1$ میلی گرم/میلی لیتر و غلظت نانوذرات $0.2/0.1$ و $0.1/0.1$ میلی گرم/میلی لیتر انتخاب شدند (۳۶). نمونه‌ها ۲۴ ساعت در 200 rpm ، در شرایط محیطی انکوبه شدند. جهت بررسی ویژگی‌های ساختاری از طیف‌سنج تبدیل فوریه مادون قرمز (Nicolet NEXUS, Thermo Nicolet Co. America) متصل به نرم‌افزار OMNIC، مجهز به ثبت انعکاسی ATR استفاده شد. محدوده بررسی $4000-600\text{ cm}^{-1}$ انتخاب شد.

فلورسانس ذاتی

طیف نشری فلوروسانس تریپتوفان HEWL (غلظت $0.2/0.1$ میلی گرم/میلی لیتر) در بافر سدیم فسفات $0.1/0.1$ مولار $\text{pH}=7.4$ ، در غیاب نانوذرات به عنوان کنترل و در حضور غلظت‌های مختلف MNP_s ($0.1/0.1$ میلی گرم/میلی لیتر)، پس از قرار گرفتن نمونه‌ها مدت ۴ ساعت در شیکر 200 rpm و انکوبه شدن در شرایط محیطی، با استفاده از اسپکتروفلوریمتر (BioTek, SynergyTM H₄ Hybrid microplate reader) در پلیت ۹۶ چاهکی در دمای اتاق ثبت شد. طول موج برانگیختگی تریپتوفان در ۲۸۰ نانومتر تنظیم شد و طیف نشری فلوروسانس 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 باز شدن/تاشدن استفاده می‌شود (۳۷). نمونه‌های پروتئین با غلظت $0.2/0.1$ میلی گرم/میلی لیتر در بافر $0.1/0.1$ مولار سدیم فسفات و $\text{pH}=7.4$ و غلظت‌های مختلف MNP_s ($0.1/0.1$ میلی گرم/میلی لیتر) تهیه شد. استوک $500\text{ }\mu\text{M}$ از ۸-آنیلینو نفتالن ۱-سولفونیک اسید در آب-

مقطر ساخته شد. $50\text{ }\mu\text{l}$ محلول کار (نمونه حاوی پروتئین و نانوذرات) و $150\text{ }\mu\text{l}$ محلول استوک ANS در هر چاهک ریخته شد. آنالیز فلورسانس در دو زمان انجام گرفت: ۱- بلافاصله بعد از افزودن نانوذرات به محلول حاوی پروتئین، ۲- بعد از ۴ ساعت انکوباسیون پروتئین با نانوذرات. طول موج برانگیختگی در ۳۸۰ نانومتر تنظیم و طیف نشری فلورسانس در محدوده طول موج ۴۰۰-۶۰۰ نانومتر در فواصل ۵ نانومتر اسکن شد. این آزمایش با استفاده از اسپکتروفلوریمتر (BioTek, SynergyTM H₄ 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 $0.2/0.1$ میلی گرم/میلی لیتر در بافر $0.1/0.1$ مولار سدیم فسفات و $\text{pH}=7.4$ و غلظت‌های مختلف MNP_s ($0.1/0.1$ میلی گرم/میلی لیتر) تهیه شد. استوک $250\text{ }\mu\text{M}$ از ThT در بافر سدیم فسفات ساخته شد. مقدار $50\text{ }\mu\text{l}$ از نمونه‌های حاوی پروتئین و نانوذرات و $150\text{ }\mu\text{l}$ 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, SynergyTM H₄ Hybrid microplate reader) در یک پلیت کوارتز ۹۶ چاهکی و دمای اتاق انجام شد. طول موج برانگیختگی در ۴۲۰ نانومتر تنظیم و طیف نشری فلوروسانس در محدوده ۴۴۰-۶۶۰ نانومتر و در فواصل ۵ نانومتر سنجیده شد.

سنجش فعالیت HEWL

جهت سنجش فعالیت آنزیم لیزوزیم، دیواره سلولی خشک‌شده باکتری گرم مثبت میکروکوکوس-لیزودیکتیکوس (*M. Luteus*) در بافر سدیم فسفات $0.1/0.1$ مولار با $\text{pH}=7.4$ به عنوان سوبسترا استفاده شد. سنجش فعالیت آنزیم در غیاب و در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات ($0.1/0.1$ میلی گرم/میلی لیتر) با اسپکترو فوتومتر UV-vis انجام شد. $40\text{ }\mu\text{l}$ محلول پروتئینی ($0.2/0.1$ میلی گرم/میلی لیتر) به ۱ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری ($0.1/0.1$ w/v) اضافه شد. سرعت شکسته شدن دیواره

سلولی باکتری با اندازه گیری جذب در ۴۵۰ نانومتر بررسی گردید.

آنالیز تجمع پروتئین با استفاده از ANS

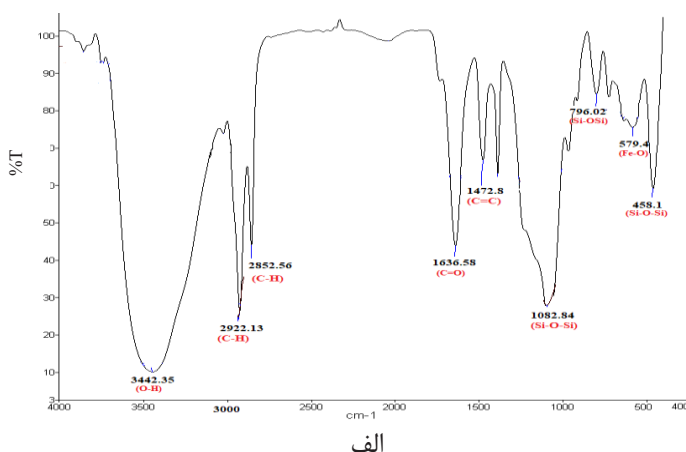
نمونه های پروتئین با غلظت ۰/۵ میلی گرم/میلی لیتر لیزوزیم در بافر سدیم فسفات ۰/۱ مولار pH=۷/۴ آماده شد. غلظت های مختلف MNPs (۰/۱-۰ میلی گرم/میلی-لیتر) استفاده شد. نمونه ها جهت تشکیل توده پروتئینی در دمای ۹۰ °C یک ساعت حرارت داده شدند. برای انجام تست، استوک ۳۰ μM ANS در آب مقطر ساخته شد. ۵۰ μl نمونه حاوی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

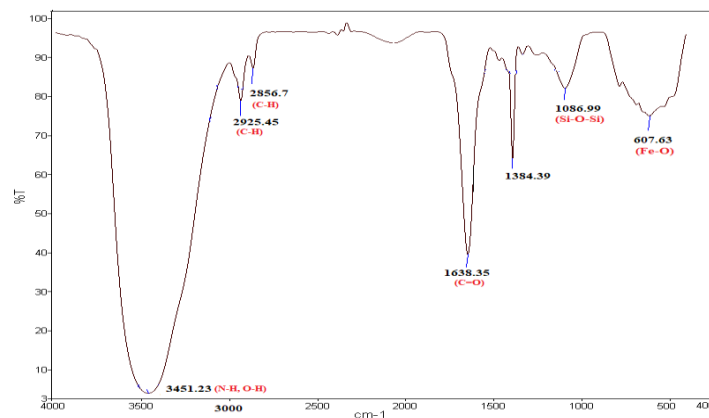
نتایج

سننر و مشخصه یابی MNPs

نانوذرات $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ و $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ پس از سننر، با استفاده از روش های مکمل، شامل طیف FTIR، مغناطیس سنجی VSM، پراش اشعه ایکس XRD و پراکندگی نور دینامیکی DLS مشخصه یابی شدند. طیف FT-IR برای نظارت بر روند عامل دار شدن MNPs به کار گرفته شد. بررسی پیوند سیلیکا با سطح MNPs به وسیله طیف سنجی FTIR قبل و بعد از آمین دار شدن انجام گرفت (شکل ۱ الف و ب). مطابق شکل ۱ الف $(\text{Si@Fe}_3\text{O}_4)$ ، پیک جذبی در ناحیه 579.4 cm^{-1} مشخص کننده ارتعاش کششی پیوند Fe-O در نمونه های مگنتیت است. ناحیه ارتعاش کششی Fe-O در نمونه های مغناطیسی به صورت توده، اغلب در حدود 570 cm^{-1} است. در مقایسه با نانوذرات مغناطیسی اصلاح نشده،

باند های جذبی Fe-O نانوذرات مغناطیسی پوشش دار شده با سیلیکا به طول موج بالاتر جابه جا شده اند که دلیل آن تشکیل پیوندهای Fe-O-Si بر سطح نانوذرات است (۳۸). پیک در 1472.8 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی C=C است. پیک موجود در 1636.58 cm^{-1} نشان دهنده ارتعاشات کششی C=O است. پیک ها در 2922.13 cm^{-1} و 2852.56 cm^{-1} به ارتعاش کششی پیوندهای C-H اشاره دارند. هم چنین قله پهن در 3442.35 cm^{-1} ناشی از ارتعاشات کششی پیوند O-H است. پیک ارتعاش کششی نامتقارن و کششی متقارن Si-O-Si به ترتیب در 1082.84 cm^{-1} و 796.02 cm^{-1} ظاهر شدند. ارتعاشات خمشی پیوند Si-O-Si در ناحیه 458.1 cm^{-1} ظاهر شده است. وجود این قله ها نشان دهنده تشکیل لایه سیلیکا اطراف نانوذرات مغناطیسی است. در دو منحنی طیف ها (A و B) قله در محدوده 1082 cm^{-1} مشاهده شده که به ارتعاش کششی نامتقارن Si-O-Si نسبت داده می شود. در شکل ۱ ب، $(\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4)$ ، قله ای که در 1086.99 cm^{-1} ظاهر شده مربوط به ارتعاش کششی نامتقارن Si-O-Si است که حاکی از وجود پوشش SiO_2 روی سطح نانوذرات مغناطیسی است. قله های جذب در منطقه 2850 cm^{-1} و 2926 cm^{-1} به ارتعاش کششی گروه های متیلن $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ نسبت داده می شوند (۳۹). پیک جذبی Fe-O در 570.63 cm^{-1} ظاهر شده است. ارتعاشات کششی N-H با ارتعاشات کششی پیوند O-H در ناحیه 3451.23 cm^{-1} هم پوشانی دارد. طیف FTIR حاصله، تشکیل یک پوسته سیلیکای مزوپور روی نانوذرات مغناطیسی و عامل دار کردن پوسته سیلیکا با L-لیزین را تأیید کرد.





ب

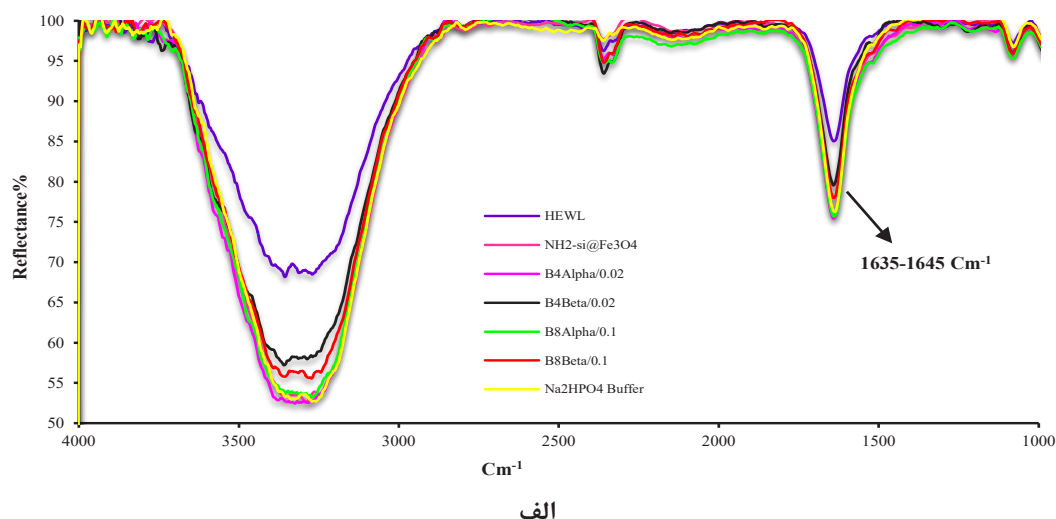
شکل ۱- طیف FTIR نانوذرات الف) $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ ، که نشان دهنده تشکیل پوسته سیلیکای مزوپور روی نانوذرات مغناطیسی و ب) NH_2 - $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ نشان دهنده عامل دار کردن پوسته سیلیکا با L-لیزین

طیف سنجی ATR-FTIR

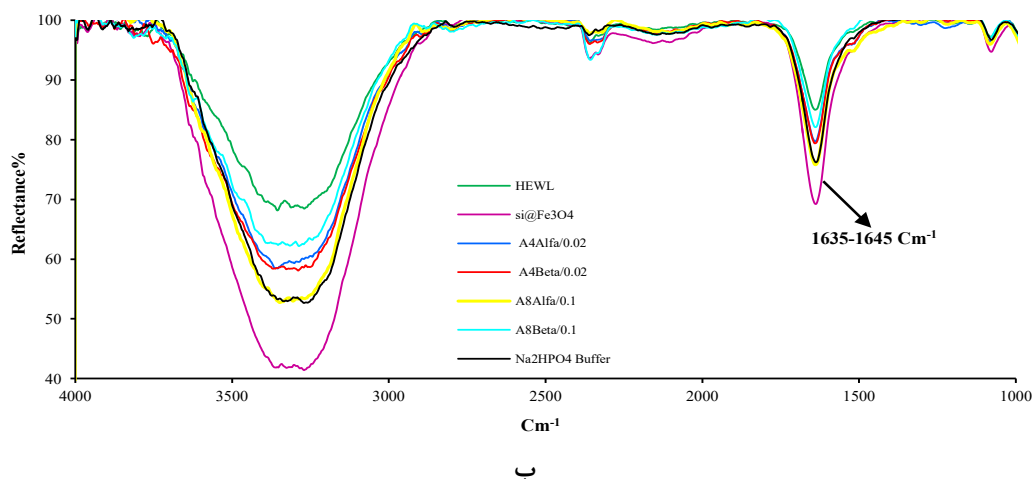
شاخص ترین طیف در شناسایی ساختمان دوم پروتئین ها در محیط آبی، باند آمید I است. عدد موج این باند در محدوده $1600\text{--}1699\text{ cm}^{-1}$ ظاهر می شود. شکل ۲ (الف) و ب)، طیف های به دست آمده از بررسی تغییرات ساختار ثانویه پروتئین در حضور دو غلظت مختلف نانوذرات الف) $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ و ب) $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ با استفاده از طیف-سنج تبدیل فوریه مادون قرمز را نشان می دهد. طیف های پیوند آمید I لیزوزیم در حضور هردو نانوذرات در محدوده

$1630\text{--}1670\text{ cm}^{-1}$ (محدوده شاخص $1600\text{--}1699\text{ cm}^{-1}$)

ظاهر شده اند. همچنین شدت پیوند پروتئین در حضور دو غلظت مختلف نانوذرات کاهش یافته است. با توجه به شکل ۲ (الف و ب) مشاهده می شود شدت پیوند پروتئین لیزوزیم کاهش یافته و در حضور دو غلظت مختلف نانوذرات $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ و $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ کمابیش به یک نسبت کاهش داشته که نشان دهنده ایجاد تغییر جزئی این نانوذرات، در ساختار ثانویه پروتئین است.



الف

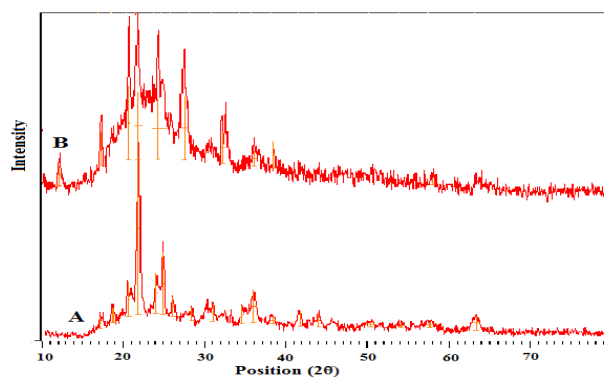


ب

شکل ۲- طیف ATR-FTIR بررسی تغییرهای ساختار ثانویه لیزوزیم در حضور دو غلظت مختلف نانوذرات (B4 غلظت ۰/۰۲ mg/ml نانوذرات، B8 غلظت ۰/۱ mg/ml نانوذرات، Alpha و Beta نمونه و تکرار آن) الف) $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ و ب) $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ ، که شدت پیوند پروتئین لیزوزیم در حضور دو غلظت مختلف نانوذرات $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ و $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ کمابیش به یک نسبت کاهش داشته که نشان دهنده ایجاد تغییر جزئی این نانوذرات، در ساختار ثانویه پروتئین است.

شکل ۳ به وضوح نشان می دهد که تأثیر اصلاح کننده ها بر ساختار بلوری نمونه های پوسته هسته ای ناچیز است، به بیان دیگر ساختار نانوذرات $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ پس از عامل دار شدن با NH_2 - دست خوش تغییر چندانی نشده است (۳۹). هم چنین استنباط می شود که نانوذرات با موفقیت تشکیل شده و پوشش ایجاد شده حول نانوذرات آمورف بوده و بلوری نیست.

شکل ۳، الگوی تفرق اشعه ایکس نانوساختارهای $\text{B:NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ و $\text{A:Si@Fe}_3\text{O}_4$ را نشان می دهد. الگوی XRD نانوساختار $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ در موقعیت $2\theta=21\text{-}28^\circ$ را SiO_2 ، $2\theta=21\text{-}28^\circ$ ، $36/4^\circ$ ، $42/7^\circ$ ، $51/5^\circ$ ، $54/3^\circ$ ، $63/3^\circ$ در نانوذرات مغناطیسی را نشان می دهند. همین مجموعه قله های مشخصه برای $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ نیز مشاهده



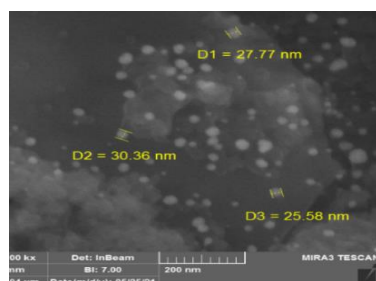
شکل ۳- طیف XRD نانوذرات A) $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ و B) $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ ساختار نانوذرات $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ پس از عامل دار شدن با NH_2 - دست خوش تغییر چندانی نشده است.

نشان دهنده سازگاری خوب بین Si ، Fe_3O_4 و NH_2 است. طبق تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (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 $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ برابر ۹۰/۴ نانومتر و میانگین اندازه $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ ۲۶۳ نانومتر به دست آمد. در بررسی

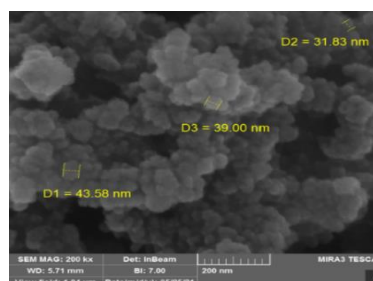
مورفولوژی $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ و $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$
طبق تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FESEM)، (شکل ۴ الف) قطر متوسط $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ در محدوده ۲۵/۵۸-۳۰/۳۶ نانومتر و قطر متوسط $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ در محدوده ۳۱/۸۳-۴۳/۵۸ نانومتر به دست آمد. با توجه به تصاویر، نانوذرات دارای ساختار متراکم جامد هستند. سطح نانوذرات همگن به نظر می رسد که

هم متصل شده و سایز بزرگتر است، FESEM اندازه قطر ذرات در حالت خشک که سایز نانوذرات کمتر است را نشان می‌دهد.

مورفولوژی $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ و $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ ، تفاوت اندازه ذرات به دست 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

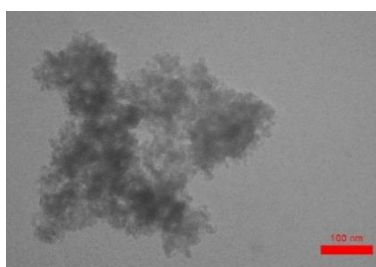


(۱)



(۲)

(الف)



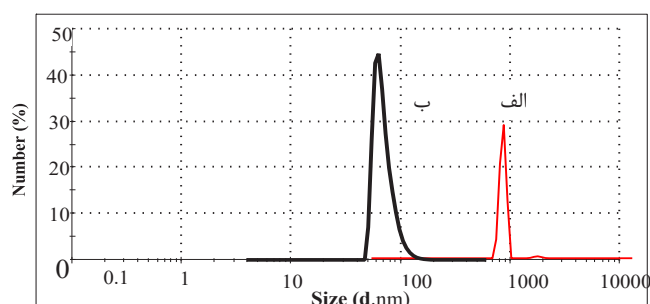
(۱)



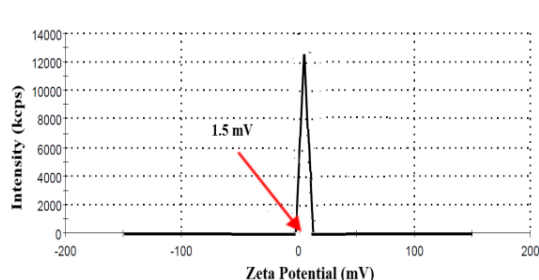
(۲)

(ب)

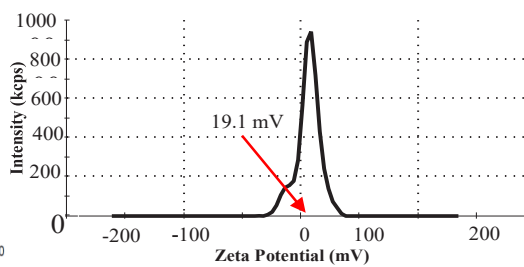
شکل ۴ - الف) تصاویر FESEM نانوذرات $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ (۱) و $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ (۲) نانوذرات دارای ساختار متراکم جامد بوده، سطح همگن نانوذرات نشان‌دهنده سازگاری خوب بین Si ، Fe_3O_4 و NH_2 است.
ب) تصاویر TEM $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ (۱) و $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ (۲) نانوذرات هم از نظر شکل و هم از نظر اندازه یکنواخت هستند.



(۱)



(ب)



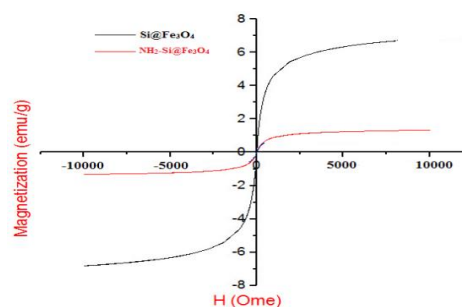
(الف)

شکل ۵ - توزیع اندازه ذرات الف) نانوساختار $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ و ب) $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ میانگین اندازه $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ برابر $90/4$ نانومتر و میانگین اندازه $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ 263 نانومتر ۲- زتاپتانسیل الف) $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ و ب) $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ به ترتیب $1/5$ mV و $19/1$ mV نشان داده شد.

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

مغناطیس سنج نمونه ارتعاشی (VSM)

جهت سنجش خواص مغناطیسی نانوذرات $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ و $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ ، منحنی پسماند^۱ مربوطه، در محدوده میدان مغناطیسی +۱۰۰۰۰ و -۱۰۰۰۰ بررسی شد (شکل ۶). مغناطیس اشباع نانوذرات $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ در دمای اتاق، ۶/۳ emu/g حاصل شد، این مقدار برای نانوذرات $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ با کاهش قابل توجهی، ۱/۱ emu/g به دست آمد. کاهش مغناطیس اشباع در نانوذرات $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ به علت محصور شدن $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ توسط NH_2 - است. مغناطیس پسماند^۲ و وادارندگی^۳ مغناطیسی ناچیز در نتایج حاصله بیانگر سوپر پارامغناطیس بودن نانوذرات مغناطیسی در دو نمونه است.



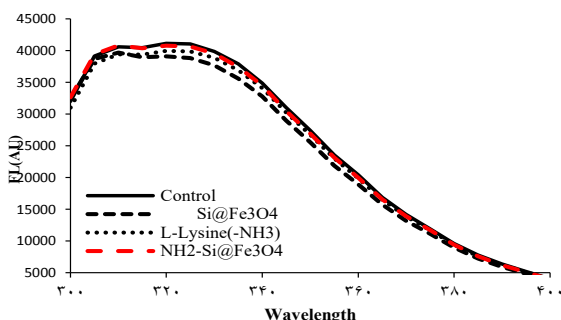
شکل ۶- نتایج آزمون VSM نانوذرات $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ و $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$. کاهش مغناطیس اشباع در نانوذرات $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ به علت محصور شدن $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ توسط NH_2 - است.

تست فلورسانس ذاتی

از روش های مطالعه ساختار پروتئین ها، طیف سنجی فلورسانس جهت مطالعه ساختار سوم پروتئین ها است. فلورسانس ذاتی پروتئین ها از اسید آمینه های تریپتوفان (Trp)، تیروزین (Tyr) و فنیل آلانین (Phe) ناشی می-شود، زیرا به قطبیت محیط حساس بوده، و هرگونه تغییر در ساختار پروتئین منجر به تغییر محیط اطراف این اسید آمینه ها شده و طیف نشری آن ها تغییر می کند. به-منظور حذف اثرهای اسید آمینه های تیروزین و فنیل آلانین، تهیج در ناحیه ۴۰۰-۳۰۰ نانومتر انجام شد (۴۰). نمودار ۱ تغییرهای نشر پروتئین را در حضور لیگاند و نانوذرات نشان می دهد. با اضافه شدن $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$

و تداخل بین مواد باردار دارد. پتانسیل زتا نانوساختارهای $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ و $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ به ترتیب +۱/۵ mV و +۱۹/۱ mV نشان داده شد (شکل ۶- الف وب).

$\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ و L-Lysine(-NH₃) به ترتیب نشر پروتئین کاهش می یابد.



نمودار ۱- مقایسه تست فلورسانس $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ ، $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ ، L-Lysine(-NH₃) و نمونه کنترل. با اضافه شدن $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ ، L-Lysine(-NH₃) و $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ به ترتیب نشر پروتئین کاهش می یابد.

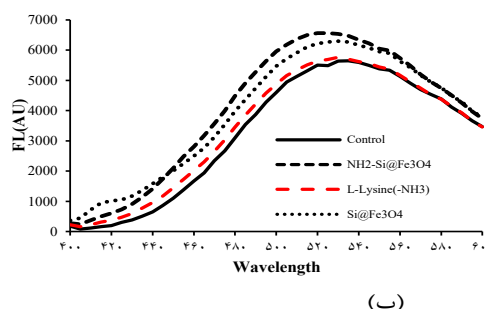
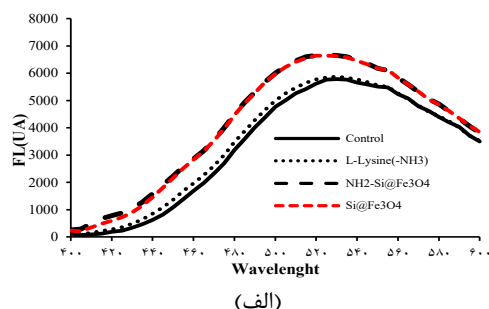
آنالیز برهم کنش پروتئین - نانوذرات توسط ANS

این آنالیز جهت اطمینان از اثرهای تثبیت کننده MNPs روی پروتئین ها استفاده می شود (۳۵). جهت بررسی اثر MNPs بر برهم کنش پروتئین ها، آنالیز فلورسانس در دو زمان، بلافاصله بعد از اضافه نمودن نانوذرات به محلول های حاوی پروتئین، و پس از ۴ ساعت انکوباسیون پروتئین با نانوذرات انجام گرفت. میزان افزایش نشر فلورسانس پس از انکوباسیون، نشان دهنده برهم کنش نانوذرات و پروتئین است. نمودار ۲ (الف و ب) به طور واضح انتشار بالای ANS را برای پروتئین در حضور $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ و $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ نشان می دهد. مشاهده می گردد شدت فلورسانس ANS پروتئین، بلافاصله بعد از اضافه نمودن نانوذرات به محلول های حاوی پروتئین نسبت به نمونه کنترل افزایش یافته و در حضور $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ و $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ کنترل 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 $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ بیش تر است، که نشان دهنده برهم کنش و تعامل قوی تر $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ با پروتئین است (نمودار ۲ ب). نتایج این آنالیز با نتایج فلورسانس ذاتی هم راستا است. مشخص شد در طول موج ۵۳۰-۵۲۵ نانومتر، شدت فلورسانس بیش-ترین مقدار و با افزایش طول موج، شدت فلورسانس کاهش می یابد.

¹ Hysteresis

² Remanent magnetization

³ Coercivity

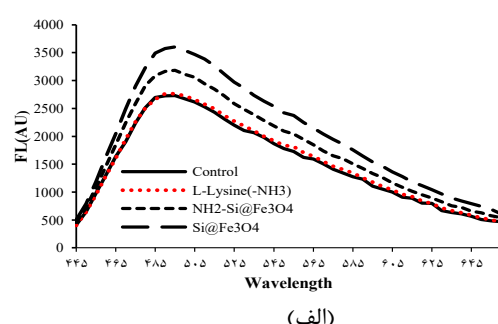
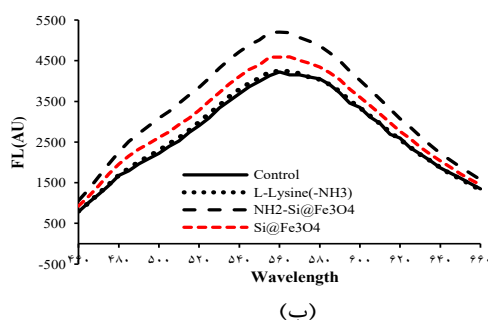


نمودار ۲. مقایسه ANS : الف) بلافاصله بعد از اضافه نمودن نانوذرات، شدت فلورسانس ANS پروتئین، نسبت به نمونه کنترل افزایش یافته و در حضور $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ و $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ افزایش به یک میزان است و ب) بعد از ۴ ساعت انکوباسیون پروتئین با نانوذرات، شدت فلورسانس افزایش یافته و میزان این افزایش در حضور $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ بیش تر بوده، که نشان دهنده بر هم کنش و تعامل قوی تر $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ با پروتئین است.

L-lysine و $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ و $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ لیگاند نشان می دهد. مطابق نمودار ۳ ب شدت فلورسانس ThT پروتئین، بعد از ۴ ساعت انکوباسیون پروتئین با نانوذرات در طول موج های بالاتر نسبت به نمودار ۳ الف ظاهر شده و میزان این افزایش در حضور $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ بیش تر است، که نشان دهنده بر هم کنش قوی تر $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ با پروتئین است. این نتایج تأییدی بر نتایج فلورسانس ANS نیز است.

آنالیز بر هم کنش پروتئین - نانوذرات توسط تیوفلاوین تی (ThT)

آنالیز فلورسانس ThT در زمان های بعد از اضافه نمودن نانوذرات به محلول های حاوی پروتئین، و بعد از ۴ ساعت انکوباسیون پروتئین با نانوذرات انجام گرفت. میزان افزایش نشر فلورسانس ThT در هر دو زمان، نشان دهنده بر هم کنش نانوذرات و پروتئین است. نمودار ۳ (الف و ب) انتشار بالای ThT را برای پروتئین در حضور نانوذرات

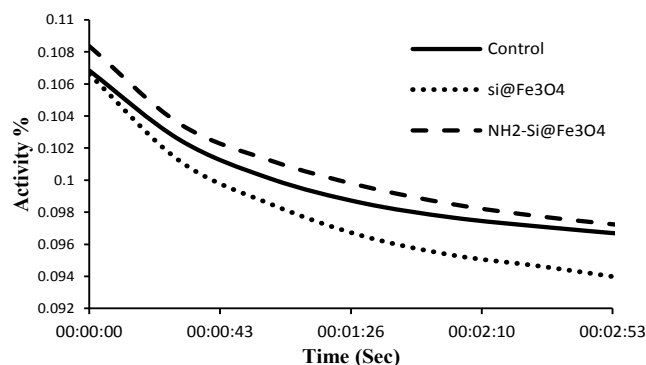


نمودار ۳. مقایسه ThT : الف) بلافاصله بعد از اضافه نمودن نانوذرات و ب) بعد از ۴ ساعت انکوباسیون پروتئین با نانوذرات، شدت فلورسانس ThT پروتئین، بعد از ۴ ساعت انکوباسیون پروتئین با نانوذرات در طول موج های بالاتر ظاهر شده و میزان این افزایش در حضور $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ بیش تر است، که نشان دهنده بر هم کنش قوی تر $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ با پروتئین است.

$\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ در زمان های مختلف افزایش پیدا کرده که نشان دهنده فعالیت بیش تر HEWL در حضور $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ است، با گذشت زمان شدت جذب در سه نمونه کاهش یافته و پایداری HEWL بیش تر می شود.

سنجش فعالیت HEWL

نمودار ۴ مربوط به تغییرهای فعالیت HEWL در غیاب و حضور نانوذرات است. طبق نمودار، میزان جذب در حضور نانوذرات $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ نسبت به نمونه کنترل و

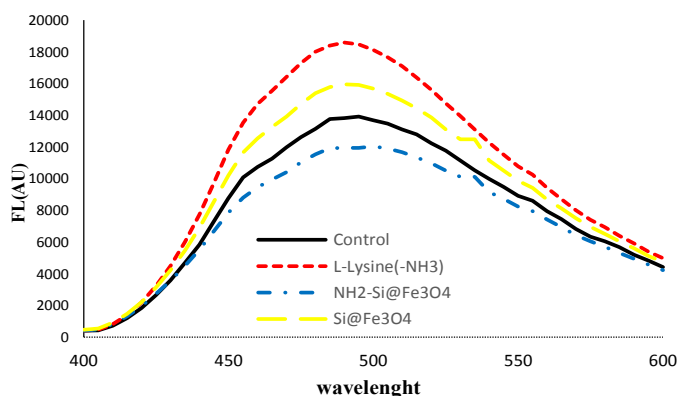


نمودار ۴- بررسی فعالیت HEWL در حضور نانوذرات در طول موج ۴۵۰ نانومتر در زمان های مختلف، میزان جذب در حضور نانوذرات $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ نسبت به نمونه کنترل و $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ در زمان های مختلف افزایش پیدا کرده که نشان دهنده فعالیت بیش تر HEWL در حضور $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ است.

بررسی تجمع حرارتی HEWL با استفاده از ANS

نانوذرات در مهار تجمع HEWL ناشی از گرما نسبت به $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ و $\text{L-Lysine(-NH}_3\text{)}$ است (شدت فلورسانس در حضور $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ و $\text{L-Lysine(-NH}_3\text{)}$ افزایش یافته). این امر نشان می دهد جذب در $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ نسبت به $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ و $\text{L-Lysine(-NH}_3\text{)}$ از پروتئین در برابر تجمع ناشی از گرما محافظت می کند و بیانگر نقش مؤثر $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ در مهار تجمع حرارتی HEWL است.

تجمع نابجای پروتئین ها یک مشکل اساسی در سیستم های زیستی به خصوص تولید مقیاس بزرگ پروتئین ها است (۴۱). بنابراین، بسیاری از تکنیک های تثبیت کننده از جمله روش افزودن لیگاند، برای جلوگیری از تجمع پروتئین ایجاد شده است. در این آزمایش، میزان تجمع HEWL در حضور نانوذرات بعد از ۱ ساعت گرماگذاری در دمای 90°C ارزیابی شد. همان طور که در نمودار ۵ مشاهده می شود، شدت فلورسانس در حضور $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ کاهش یافته که نشان دهنده نقش مؤثر این



نمودار ۵. مقایسه مهارت تجمع حرارتی با استفاده از ANS، شدت فلورسانس در حضور $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ کاهش یافته که نشان دهنده نقش مؤثر این نانوذرات در مهار تجمع HEWL ناشی از گرما نسبت به $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ و $\text{L-Lysine(-NH}_3\text{)}$ است.

بحث

خصوصیت‌های سطح نانوذرات (ویژگی‌هایی مثل شکل، موقعیت شیمیایی، عملکرد سطحی، تخلخل، بلورینگی، هیدروفوبیسیستی و هیدروفیلیسیستی)، 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 برهم‌کنش 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 هنگامی که فعالیت پروتئین جذب شده اهمیت بالایی دارد.

در مطالعه حاضر، تأثیر نانوذرات مغناطیسی عامل‌دار شده با سیلیکای مزوپور و L-لیزین ($\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$) و $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ ، بر تغییرهای ساختاری، پایداری و عملکرد HEWL، بررسی و مقایسه شد. بررسی تعامل HEWL و MNPs با کمک فلورسانس ذاتی انجام گرفت. تکنیک فلورسانس به دلیل حساسیت و دقت یک ابزار قدرتمند جهت مطالعه برهم‌کنش مولکول‌های کوچک با پروتئین‌ها به حساب می‌آید. نتایج فلورسانس ذاتی این پژوهش حاکی از آن است که میزان نشر فلورسانس HEWL با اضافه شدن $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ ، $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ ، $\text{L-Lysine(NH}_3\text{)}$ به ترتیب کاهش می‌یابد. نانوذرات $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ 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 توجه به افزایش میزان نشر فلورسانس ANS پروتئین و جابه‌جایی ایجاد شده، می‌توان نتیجه گرفت افزودن نانوذرات منجر به تغییرهای ساختاری HEWL شده و برهم‌کنش قوی نانوذرات $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ 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 Tayebce و همکاران در ارتباط با مشخصه‌یابی نانو ساختار $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ ، تأییدی بر نتایج تحقیق حاضر است (۴۶). مطابق شکل ۷، مغناطیس‌سنج نمونه ارتعاشی، رفتار سوپرپارامغناطیس را در نانوذرات مغناطیسی سنتر شده نشان داد و بیان کرد روند تولید پوشش به‌طور قابل توجه بر ساختار Fe_3O_4 تأثیر نمی‌گذارد. این نتایج هم‌راستا با نتایج Ansari و همکاران بود که اشباع مغناطیسی نانوذرات سنتر شده به روش هم‌رسوبی را، در دمای محیط 10 emu/g به دست آوردند (۴۷).

به‌منظور بررسی بیش‌تر اثر MNPs بر تغییرهای ساختاری لیزوزیم، از طیف‌سنجی ATR-FTIR استفاده شد. طبق نتایج شکل ۲ (الف و ب)، عدد موج مربوط به پیوند آمید I که مختص ساختار دوم پروتئین است، در حضور نانوساختارهای $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ و $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ 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).

با توجه به تغییر ساختار لیزوزیم در حضور نانوذرات و اثبات این موضوع با به کارگیری ابزار دقیق طیفسنجی ATR-FTIR، بررسی عملکرد این پروتئین در حضور MNPs ضروری به نظر رسید، زیرا همواره ارتباط تنگاتنگی میان ساختار و عملکرد پروتئین ها و ماکرومولکول ها وجود دارد. بدین منظور فعالیت HEWL به وسیله طیفسنجی-فرابنفش (UV) سنجش شد. طبق نتایج، میزان جذب در حضور $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ در زمان های مختلف کاهش یافته که نشان دهنده کاهش فعالیت HEWL در حضور این نانوذرات است. می توان بیان کرد $\text{Si@Fe}_3\text{O}_4$ با تخریب ساختار لیزوزیم، عملکرد آن را مختل می کند، اما در حضور $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ فعالیت HEWL بیش تر است. بررسی تجمع حرارتی HEWL با استفاده از ANS نشان داد شدت فلورسانس در حضور $\text{NH}_2\text{-Si@Fe}_3\text{O}_4$ کاهش یافته که بیانگر نقش مؤثر این نانوذرات در مهار تجمع-حرارتی HEWL و ثبات حرارتی پروتئین است. در تحقیق Momeni و همکاران، مطالعه های 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 می کند و در غلظت های بعدی نانوذره ZnO ثبات حرارتی لیزوزیم افزایش می یابد (۵۰، ۵۱).

نتیجه گیری

مقایسه روی عملکرد نانوذرات با گروه عاملی و بدون گروه-عاملی انجام شد، نانوذره عامل دار شده در بر هم کنش با آنزیم لیزوزیم اثرهای زیستی مناسب تری دارد. بنابراین در نظر گرفتن جنبه های محیطی، سلامتی و ایمنی در مراحل اولیه استفاده از نانوذرات ضروری می باشد.

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 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$), 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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MCM-41}$ core-shell Np functionalized with thiol silane for efficient l-asparaginase immobilization. *Artificial cells, nanomed biotech*. 2018; 46:1035-1045.

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 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 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