مقاله پژوهشی

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

Maedeh Faraji [1], Manzarbanou Asnaashariisfahani [1], Habibollah Baharvand*[2], Hassan Kabiri Fard[1]

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 iminodiastic-acetic acid and complexed with Ni^{2+}, (Fe_3O_4@SiO_2@PVA@IDA-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 Fe_3O_4@SiO_2@PVA/IDA-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 O=C−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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

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 وOmpW

مائده فرجی[۱]، منظر بانو اثنی‌عشری‌اصفهانی[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 فیزیکوشیمیایی‌نانوذرات توسط آنالیزهایFTIR، DLS، SEM ،TEM، EDX ، TGAو VSM تعیین شد. زیر واحدهای پروتئین نوترکیب (OPH)و OmpW به‌صورت 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) به‌عنوان میزبان بیان و به محیط کشت باکتری ترشح گردیدند. بیان ژن و فرآیند خالص‌سازی از طریق سدیم دودسیل‌سولفات-ژل‌پلی‌آکریل‌آمید (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 قطرمتوسط نانوساختار در محدوده nm ۶۲/۱۹-۲۴/۵۶ مشاهده شد. تشکیل نانوساختار Fe_3O_4@SiO_2@PVA/IDA-Ni^{2+} با پیک‌های مشخص در$۱۴۰۵Cm^{-1}$و۱۶۰۰ مربوط به ارتعاش کششی متقارن و نامتقارن گروه O=C−O− و حذف پیک در $۱۷۴۰Cm^{-1}$ 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 میلی‌گرم پروتئین در هر میلی‌گرم نانوذرات می‌باشد.

واژگان کلیدی: نانوذرات مغناطیسی، جداسازی پروتئین، پوشش پلیمری، پلی‌وینیل‌الکل، 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 پروتئین های 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

[1]Outer membrane protein W

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

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 خالص‌سازی معمولاً به اندازه پروتئین، ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی، تمایل اتصالی و فعالیت زیستی پروتئین موردنظر بستگی دارد. محصول نهایی فرایند تخلیص، پروتئین جداسازی‌شده نام دارد. معمولاً فرایند تخلیص‌پروتئین، شامل فیلتراسیون و یک یا چند مرحله کروماتوگرافی است. با استفاده از روش‌هایی مانند کروماتوگرافی و بهینه سازی آن، مولکول‌های خالص‌تری 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. به‌منظور تسهیل تخلیص، پروتئین‌ها غالباً به برچسب تمایلی متصل می‌شوند (۴). کروماتوگرافی میل ترکیبی یون فلزی بی‌حرکت[۲] (IMAC) یکی از این روش‌هاست که برای پالایش پروتئین‌های دارای برچسب هیستیدین (His) استفاده می‌شود. هیستیدین به‌دلیل حضورگروه‌های 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 کلات‌شده است که جهت خالص‌سازی پروتئین‌های برچسب گذاری‌شده 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
۲. ظرفیت بالای بارگذاری پروتئین به دلیل سطح ویژه بزرگ
۳. نداشتن محدودیت نفوذ در محلول‌ها

با این‌حال، 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 ازجمله 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 (۱۷ و ۱۶).

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 درعین‌حال 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 لیزوزیم به عنوان پروتئین مدل مورد بررسی قرار گرفت و غلظت مناسب جهت بهبود عملکرد نانوذره تعیین شد (۲۶). در بین موادمعدنی، پوشش بی‌اثر سیلیسیم بسیار مورد توجه

[2] Immobilized metal-ion affinity chromatography

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

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). درپژوهش Park و همکاران؛ هیالورونیک‌اسید (HA) به نانوذرات سیلیکا متصل شد. HA-MSNs، بارگذاری دارویی بالاتری را در مقایسه با نانوذرات سیلیکا به تنهایی، نشان داد (۱۴). در پژوهشی، گرافن‌اکسید به نانوذرات مغناطیسی اکسیدآهن‌پوشش‌دارشده 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 پروتئین ها 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 *سودوموناس دیمینوتا* و *فلاوباکتریوم* جدا شده و قادر به تجزیه گستره وسیعی از ترکیبات ارگانوفسفره سمی می باشد. استفاده از فرم تثبیت شده این آنزیم در مقابل فرم آزاد آن باعث افزایش پایداری آنزیم شده و هزینه ها 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 می گردد. ترکیبات ارگانوفسفره به وفور در آفت-کش‌ها و عوامل عصبی شیمیایی استفاده شده و خطرات زیادی را برای انسان و محیط زیست ایجاد نموده اند.گزارشات زیادی از سم‌زدایی این ترکیبات با روش های مختلف وجود دارد که از آن میان، هیدرولیز آنزیمی این ترکیبات با آنزیم ارگانوفسفر هیدرولاز، بیشتر موردتوجه 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 هیستدین تهیه گردید. دو پروتئین ompW وOPH 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 گروه های عاملی در عملکرد بهتر و زیست سازگار شدن نانوذره، PVA اصلاح شده با ایمینودی‌استیک‌اسید و کمپلکس شده با نیکل، روی سطح نانوذرات مغناطیسی پوشیده شده با سیلیکا قرار داده شد تا امکان جذب و جداسازی دو پروتئینompW وOPH در سطح نانوذره فراهم شود.

مواد و روش‌ها

دو پروتئین نوترکیب ompW ۲۶KDa و OPH ۳۵KDa متصل شده به یک دنباله حاوی۶ اسید آمینه هیستیدین، از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شد. دیواره سلولی خشک شده باکتری *E.coli* از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. همه مواد شیمیایی و حلال‌های آلی از جمله: کلریدآهن (II)، کلریدآهن (III)،محلول‌آمونیاک۲۵٪، تترااتیل‌اورتو سیلیکات (TEOS)، ۳-تری متوکسی سیلیل پروپیل‌متاکریلات (MPS)، وینیل‌استات، ایمینودی‌استیک‌اسید (IDA)، اپی‌کلروهیدرین(EC)، نیکل‌کلراید، سدیم‌هیدروکسید، آزوبیس ایزوبوتیرونیتریل (AIBN)، اتانول، اتیل‌استات و دی-متیل‌فرمامید از شرکت مرک خریداری شد.

سنتز نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن Fe_3O_4

مقدار ۵/۸۴ gr کلریدآهن (III) و ۲/۱۵ gr کلریدآهن (II) در بالن ۲۵۰ml مجهز به همزن مکانیکی در ۲۰۰ml آب مقطر دمای ۸۵°C حل شد. تحت اتمسفر نیتروژن و همزدن، ۱۵ml محلول ۲۵٪ امونیاک 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 ودر 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 پوشش‌دهی نانوذرات حاصل با سیلیکا، ابتدا فاز آب با ۲۰۰ml اتانول جایگزین و دریک بالن مجهز به همزن، ۲/۳ml محلول آمونیاک و۲ml تترا اتیل اورتوسیلیکات به ترتیب در حین همزدن اضافه شد و واکنش در دمای محیط مدت ۱۲ساعت انجام شد. در انتها ذرات با آب مقطرکافی شسته و برای انجام مراحل بعدی نگهداری شد (۳۱).

وینیل‌دار کردن سطح نانوذرات ($Fe_3O_4@SiO_2@PVA$)

پس از پوشش‌دهی نانوذرات‌مغناطیسی با تترااتیل‌اورتو سیلیکات، جهت قرارگرفتن باندهای دوگانه فعال روی سطح ذرات از (۳-تری متوکسی سیلیل) پروپیل‌متاکریلات استفاده شد. در این مرحله، ابتدا فاز آب روی نانوذرات با ۲۰۰ml اتانول جایگزین و دریک بالن مجهز به همزن، ۲/۳ml آمونیوم هیدروکسید ۲۵٪ و ۲/۶ml (۳-تری متوکسی سیلیل) پروپیل-متاکریلات بترتیب اضافه و دردمای ۶۰°C در حین همزدن مدت ۲۴ ساعت واکنش انجام شد (۳۲).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

گرافت پلی‌وینیل‌استات و اصلاح آن با ایمینودی‌استیک-اسید ($Fe_3O_4/SiO_2/PVA/IDA$)

فاز پیوسته ذرات سنتز شده در مرحله قبل با۲۰۰ ml اتیل-استات جایگزین شد،۴/۵ gr وینیل‌استات و۰/۰۰۵ gr AIBN اضافه شد و در دمای۶۵°C در اتمسفر نیتروژن مدت ۱۲ ساعت درحین همزدن، واکنش گرافت شدن روی سطح ذرات انجام شد.در انتها، جهت خارج شدن پلی‌وینیل‌استات گرافت نشده، ذرات چندبار با اتانول شسته شدند. جهت اصلاح پلی‌وینیل استات گرافت شده روی سطح ذرات با ایمینودی استیک‌اسید، این پلیمر با استفاده از سود هیدرولیز وگروه‌استات به‌گروه هیدروکسیل فعال تبدیل شد و اپی‌کلروهیدرین با ایمینودی-استیک در راکتور جداگانه واکنش داد. محصول به‌دست آمده برای اصلاح پلیمر هیدرولیز شده روی سطح نانوذرات (پلی‌وینیل الکل) و تهیه پلی‌وینیل‌استات اصلاح شده با ایمینودی‌استیک اسیدروی سطح نانوذرات به‌کار رفت. بعد ازگرافت شدن پلی وینیل‌استات به ذرات، در۲۰۰ml مخلوط آب/ الکل (نسبت وزنی ۱۵/۸۵) حاوی ۳۲gr سدیم‌هیدروکسید دیسپرس شدند و در ۶۰°C در اتمسفر نیتروژن باهمزدن واکنش هیدرولیز پلی‌وینیل استات انجام شد. درانتها نانوذرات با آب مقطر شسته و در ۲۰۰ml آب مقطر دیسپرس شدند.

عامل‌دار کردن اپی‌کلروهیدرین با ایمینو دی استیک اسید

مقدار ۱/۶۸gr سدیم‌هیدروکسید در ۵۰ml آب حل شد و ۲/۸۰gr ایمینودی‌استیک‌اسید اضافه شد. به این محلول، ۱/۹۴gr اپی‌کلروهیدرین اضافه و در دمای ۶۰°Cمدت ۲ ساعت، واکنش انجام گرفت. سپس مخلوط واکنش تا دمای اتاق سرد و به دیسپرس نانوذرات‌حاصل بعد از هیدرولیز پلی‌وینیل استات گرافت شده، اضافه و دردمای۶۰°C مدت دو ساعت، تحت اتمسفر نیتروژن گروه‌های هیدروکسیل فعال شده با سود به گروه‌های دی‌استیک‌اسید تبدیل شدند. درانتها نانوذرات با آب مقطر شسته و در۲۰۰ ml آب مقطر دیسپرس شدند.

کمپلکس‌دار کردن نانوذرات مغناطیسی با نیکل ($Fe_3O_4/SiO_2/PVA/IDA\text{-}Ni^{2+}$)

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.

بررسی و مشخصه‌یابی نانوذرات Fe_3O_4، SiO_2/Fe_3O_4، ($Fe_3O_4/SiO_2/PVA/IDA$) و($Fe_3O_4/SiO_2/PVA/IDA\text{-}Ni^{2+}$)

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 درمحدوده $۴۰۰۰\text{-}۴۰۰\,cm^{-1}$ انجام شد. آزمون XRD برای نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 و $Fe_3O_4/SiO_2/PVA/IDA\text{-}Ni^{2+}$ با دستگاه پراش پرتو ایکس مدل PW 1730، تحت تابش Cu-Kα (λ°=۱/۵۴۰۵۶A)، در ولتاژ۴۰ کیلوولت و جریان ۳۰mA انجام گرفت. محدوده اسکن 2θ از ۱۰ تا ۸۰ درجه قرار داده شد. خواص مغناطیسی نمونه‌ها با دستگاه مغناطیس‌سنج نمونه-ارتعاشی (MDK;Meghnatis Daghigh Kavir Co.; Iran VSM/AFGM[۳]) در دمای اتاق اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری قطر هیدرودینامیکی نانوذرات در بافر سدیم فسفات (PBS۱۰۰ 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 وزنیTGA مجهز به سیستم خنک‌کننده دستی نیتروژن مایع استفاده شد. مقدارmg ۱۵-۱۰ نانوساختار سنتز شده داخل بوته‌ای از جنس پلاتین یا آلومینا، داخل کوره دستگاه قرارگرفت. نمونه‌ها در دامنه حرارتی ۶۵۰°C-۰ 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 دودسیل‌سولفات-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 آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد تعیین شد.

تهیه دو پروتئین نوترکیب ompW۲۶ KDa و ۳۵ KDa OPH، حاوی هیستیدین

باکتری *E.Coli* حاوی سازه ژنی بیان کننده دو پروتئین KDa ompW۲۶ و OPH ۳۵KDa تهیه شد. به‌منظور تولید پروتئین نوترکیب، ۵ml 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 ۰/۶در طول‌موج ۶۰۰nm، به لوله تست در شرایط استریل، القاءکننده

[3] Vibrating Sample Magnetometer

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

ایزوپروپیل-بتا-*D*-1-گالاکتو پیرانوزید (IPTG) با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار اضافه گردید. مدت یک شبانه روز در شیکر انکوباتور دمای ۳۷°C و سرعت۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند. به منظور جمع آوری باکتری‌های کشت داده شده، نمونه کشت مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ g سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب حاصله جهت ادامه تخلیص پروتئین جمع آوری گردید.

تخلیص پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از نانوذرات مغناطیسی حاوی کمپلکس‌های فلزی میل ترکیبی نیکل

در این مرحله، ۶ ml نانوذرات معادل ۳۰۰ میکرولیتر نانوذرات دیسپرس شده نهایی، به ۱ ml بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار حاوی ۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl، ۸/۰pH اضافه شد و ۱ ml رسوب باکتری حاوی پروتئین نوترکیب اضافه گردید و مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق رها شد. سپس نانوذرات با استفاده از آهنربا جدا شده و ۳۰۰ میکرولیتر از مایع رویی مرحله قبل به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق با تکان دادن انکوبه شد. سپس مخلوط روی آهنربا قرار داده شد. نانوذرات در انتهای فالکون جمع‌آوری شدند و مایع رویی جمع آوری شد (این نمونه "جریان" نامیده می‌شود). سپس، نانوذرات-نیکل دو بار با یک بافر شستشو (۵۰ میلی‌مولار NaH_2PO_4، ۵۰۰ میلی‌مولار NaCl، و ۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ۸/۰pH)، هر بار با ۵ ml به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق شسته شد و مایع رویی به‌عنوان محلول شستشو ۱ و محلول شستشوی ۲ جمع‌آوری شد. برای استخراج پروتئین نوترکیب متصل به Ni-MNPs، ۵۰۰ میکرولیتر بافر۵۰ میلی‌مولارNaH_2PO_4، ۵۰۰ میلی‌مولار NaCl، و ایمیدازول در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌مولار، ۸pH به فالکون اضافه و محلول استخراج‌شده جمع‌آوری شد. پس از خروج کامل بافر خارج‌کننده اول، ۱ml بافر خارج‌کننده ۲ (غلظت ۵۰۰ میلی-مولار ایمیدازول) به فالکون اضافه و محلول خروجی در ظرفی جمع‌آوری شد. جهت بررسی تخلیص پروتئین های نوترکیب، ۵۰µl از نمونه‌های‌خروجی 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 دمای۲۰°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 ترتیب۵ µl، ۱۰، ۱۵، ۲۰ آلبومین سرم گاوی (BSA) در حجم ۱ml اضافه و با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ ml رسانده شد. سپس به میکروتیوپ بلانک۱۰۰۰ µl آب مقطر اضافه و به دو لوله تست به ترتیب ۱۰ µl، ۲۰ محلول پروتئین افزوده شد و با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ ml رسانده شد. به هرکدام از لوله‌ها ۱ ml محلول برادفورد افزوده و به خوبی ورتکس شد. پس از انکوباسیون مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه جذب نوری با دستگاه اسپکتروفوتومتردر طول‌موج ۵۹۵nm اندازه‌گیری شد. با استفاده از نمودار استاندارد حاصل از جذب غلظت‌های مختلف محلول پروتئینی آلبومین سرم گاوی، غلظت نمونه‌های پروتئینی مجهول بدست آمد.

نتایج

مشخصه‌یابی نانوساختارهای Fe_3O_4 و $Fe_3O_4/SiO_2/PVA/IDA\text{-}Ni^{2+}$

نانوذرات Fe_3O_4 و$Fe_3O_4/SiO_2/PVA/IDA\text{-}Ni^{2+}$ پس از سنتز، با استفاده از روش‌های مکمل، شامل طیف FTIR، مغناطیس سنجیVSM، پراش اشعه ایکسXRD ، پراکندگی نور دینامیکی DLS، EDX و TGA مشخصه یابی شدند.

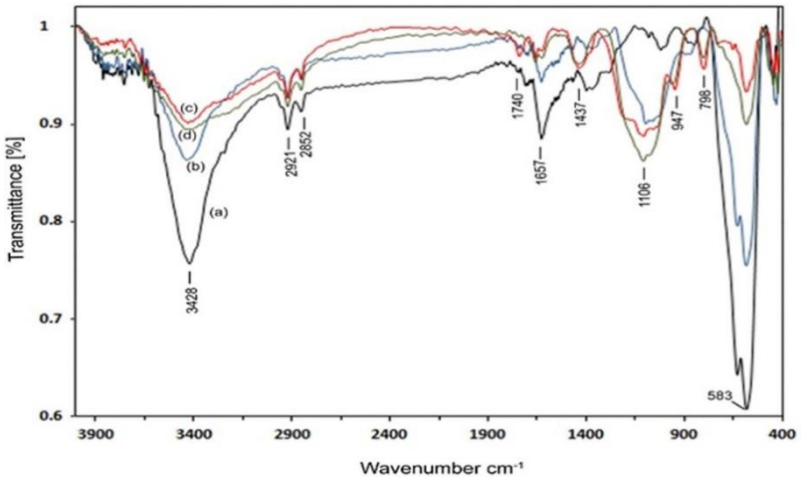
طیف FTIR برای نظارت بر روند عامل‌دار شدن نانوذرات مغناطیسی به کار گرفته شد. در شکل ۱ طیف FTIR (a) Fe_3O_4، $Fe_3O_4@SiO_2$(b)، $Fe_3O_4@SiO_2@PVAc$ (c)و $Fe_3O_4@SiO_2@PVA/IDA\text{-}Ni^{2+}$ (d)نشان داده شده است.مطابق شکل ۱a، پیک جذبی عمیق در ناحیه $583\ Cm^{-1}$ مشخص‌کننده ارتعاش کششی پیوند Fe-O در نمونه های مگنتیت می‌باشد. پیک در محدوده$1437Cm^{-1}$مربوط به ارتعاشات‌کششی C=C می‌باشد. پیک‌ها در محدوده Cm^{-1} ۲۹۲۱ و $2852\ Cm^{-1}$ به ارتعاش کششی پیوندهای C-H اشاره دارند. همچنین قله پهن در $3428Cm^{-1}$ ناشی از ارتعاشات کششی پیوند O-H است.

در بررسی نانوذرات هسته-پوسته Fe_3O_4/SiO_2 مطابق شکل ۱b، جذب‌کششی‌پیوند Fe-O-Si در$583/51\ Cm^{-1}$ ظاهر شده است. پیک در محدوده $583\ Cm^{-1}$ که در تمام منحنی‌ها (۱ 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$570Cm^{-1}$ 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 برسطح نانوذرات است (۳۵). پیک ارتعاش کششی نامتقارن و کششی متقارن Si-O-Si به ترتیب درCm^{-1} ۱۱۰۵/۴۴و $804/59Cm^{-1}$ ظاهر شده اند. ارتعاشات خمشی پیوند Si-O-Si درناحیه$461Cm^{-1}$ ظاهر شده است. وجود این قله‌هانشان‌دهنده تشکیل لایه‌سیلیکا اطراف‌نانوذرات مغناطیسی

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

است. در تمام منحنی طیف‌ها (۱b, c, d) قـله در محدوده $۱۱۰۵Cm^{-1}$ مشاهده شده که به ارتعاش کششی نامتقارن Si-O-Si نسبت داده می‌شود. قلـه پهن موجود در ناحیه Cm^{-1} ۳۴۰۵/۳۰ به ارتعاشات کششی پیوند O-H اشاره دارد. بر اساس شکل۱c، (Fe_3O_4@SiO_2@PVA/IDA)، جذب در ناحیه $۱۷۴۰Cm^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی گروه کربونیل C=O وینیل‌استات است. نوارهای جذبی در $۷۹۸ Cm^{-1}$ و $۱۶۵۷ Cm^{-1}$ به ترتیب به ارتعاش خمشی پیوند C–H= و ارتعاش کششی پیوند دوگانه CH=HC مربوط است. پیک در ناحیه Cm^{-1} ۴۴۱/۸۳ به ارتعاشات خـمشی پیـوند Si-O-Si اشاره دارد. قله ظاهرشده در $۱۱۰۷/۹۲ Cm^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی نامتقارن Si-O-Si است که حاکی از وجود نـانوذراتSiO_2 می باشد. پیک جذبی Fe–O در $۵۸۳/۲۸ Cm^{-1}$ ظاهر شد. قلـه پهن در $۳۴۲۸/۸۱ Cm^{-1}$ به ارتعاش کششی پیوند O-H اشاره دارد.

در شکل ۱d طیف نانوذرات هسته-پوسته کمپلکس‌شده با نیکل (Fe_3O_4@SiO_2@PVA/IDA-Ni^{2+}) مشاهده می‌شود که جذب کششی پیوند Fe–O درناحیه$۵۸۲/۳۱ Cm^{-1}$ ظاهر شده است که بیانگر وجود نانوذراتFe_3O_4 می باشد. نوارهای جذبی در$۱۶۵۸/۱۷ Cm^{-1}$به ارتعاش کششی پیوند دوگانه CH=HC اشاره دارد. قلـه پهن موجود در ناحیه $۳۴۴۲/۱۷ Cm^{-1}$ به ارتعاشـات کششی پیوند O-H اشاره دارد. پیـک موجـود در$۱۱۰۷/۹۲Cm^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی نامتقارن پیـوند Si-O-Si است. پیک در محـدوده$۴۲۲Cm^{-1}$ ارتعاشات Ni^{2+} را توصیف می‌کند (۲۹). طیف FTIR حاصله، تشکیل یک پوسته سیلیکا روی نانوذرات مغناطیسی و عامل-دارکردن پوسته سیلیکا با پلی‌وینیل‌استات اصلاح شده با ایمینودی‌استیک‌اسید و کمپلکس کردن با نیکل را تأیید کرد.

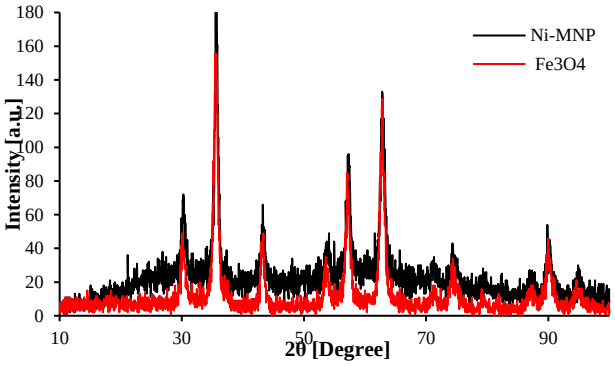


شکل ۱- طیفFTIR نانوذرات:(a) Fe_3O_4 ، (b) Fe_3O_4@SiO_2، (c) Fe_3O_4@SiO_2@PVAc و (d) Fe_3O_4@SiO_2@PVA-IDA-Ni^{2+}

الگوی تفرق اشعه ایکس (XRD)

شکل ۲، الگوی تفرق اشعه ایکس نانوذرات Fe_3O_4 و نانوساختارFe_3O_4@SiO_2@PVA/IDA-Ni^{2+} را نشان می-دهد. همانطور که در الگوی تفرق برای نانوذراتFe_3O_4 مشاهده می‌شود هیچ گونه پیک اضافی ناشی از فاز دیگر در نمونه، مشاهده نشد و به حالت‌کریستالی و متبلور اسـت. الگوی پراش اشعه ایکس نانوساختارFe_3O_4@SiO_2@PVA/IDA-Ni^{2+}، در موقعیت ۲۸-۲۱= 2θ، SiO_2 با ساختار آمورف را نشان می دهد. شکل ۲ به وضوح نشان می‌دهد الگوی تفرق اشعه ایکس نانوساختارFe_3O_4/SiO_2/PVA/IDA-Ni^{2+} شبیه نانوذرات Fe_3O_4 است به‌عبارتی ساختار بلور نانوذرات Fe_3O_4 پس از قرارگرفتن پوشش SiO_2 و عامل‌دارشدن با پلی‌وینیل‌استات اصلاح شده با ایمینودی‌استیک‌اسید و قرارگرفتنNi^{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.

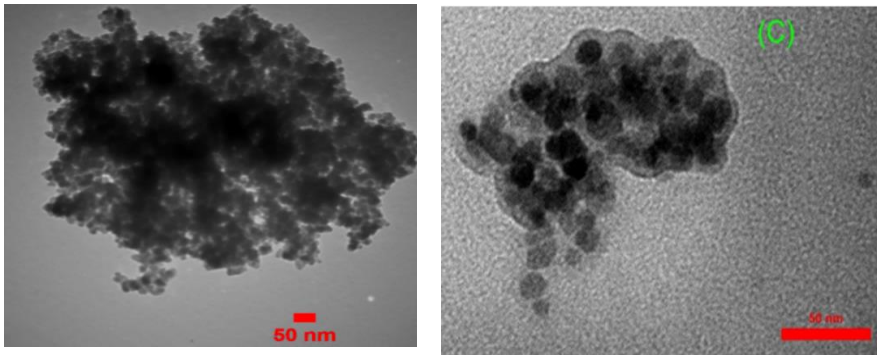
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]



شکل ۲- الگوی تفرق اشعه ایکس نانوذراتFe_3O_4 و نانوساختار$Fe_3O_4@SiO_2@PVA/IDA\text{-}Ni^{2+}$

مورفولوژی نانوساختارهای Fe_3O_4، $Fe_3O_4@SiO_2$، $Fe_3O_4@SiO_2@PVA/IDA$ و $Fe_3O_4@SiO_2@PVA@IDA\text{-}Ni^{2+}$

تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبـوری(TEM) Fe_3O_4 و نانوساختار هسته/پوستـه-$Fe_3O_4@SiO_2@PVA@IDA$ Ni^{2+} در شکل ۳ الف و ب نشان داده شده است. طبق تصویر ۳ب، ذرات مگنتیک به‌صورت کره‌های تیره درون پوسته‌های پلیمری، که به‌صورت لایه روشن متمایز هستند، جای گرفته‌اند. تصاویر TEM تاییدی بر موفقیت تشکیل ساختار پلیمری روی سطح نانوذرات است.

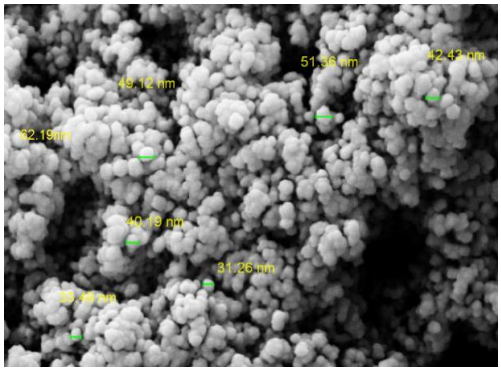


(الف) (ب)

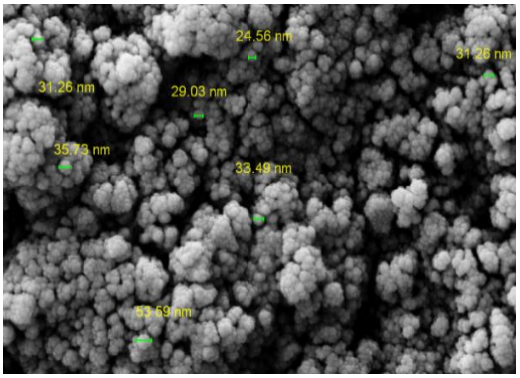
شکل۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبـوری نانوساختار الف) Fe_3O_4و ب) $Fe_3O_4/SiO_2/PVA/IDA\text{-}Ni^{2+}$

طبق تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی شکل ۴، نانوساختارهای Fe_3O_4 و $Fe_3O_4/SiO_2/PVA/IDA\text{-}Ni^{2+}$ دارای اشکال کروی و ساختار یکنواخت بوده، سطح نانوسامانه همگن به نظر می‌رسد که نشان‌دهنده سازگاری خوب بین هسته Fe_3O_4 و پوسته $Fe_3O_4@SiO_2@PVA@IDA\text{-}Ni^{2+}$ می‌باشد. قطر متوسط نانوساختار Fe_3O_4 و میکروکره‌های هسته/پوسته$Fe_3O_4@SiO_2@PVA@IDA\text{-}Ni^{2+}$ به‌ترتیب- درمحدوده ۵۶/۶۹nm-۲۴/۵۳ و۶۲/۱۹-۳۱/۲۶ مشاهده شد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]



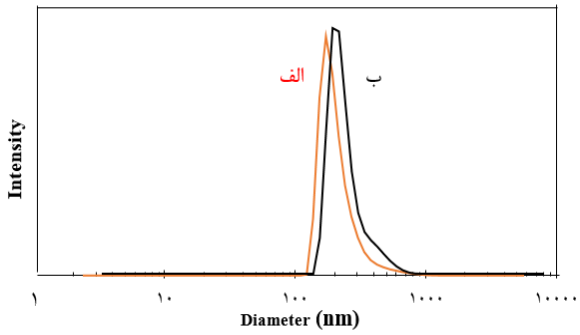
(ب)



(الف)

شکل۴- تصاویر SEM نانوساختار الف) Fe_3O_4 و ب) $Fe_3O_4/SiO_2/PVA/IDA\text{-}Ni^{2+}$

قطرهیدرودینامیکی وتوزیع‌اندازه‌ذرات‌نانوساختارها توسط DLS تعیین شد. مطابق شکل۵، میانگین اندازه نانوذرات Fe_3O_4 برابر ۲۷۳/۴nm و میانگین اندازه نانو ساختار $Fe_3O_4@SiO_2@PVA@IDA\text{-}Ni^{2+}$ برابر ۲۹۶/۹nm به‌دست آمد.



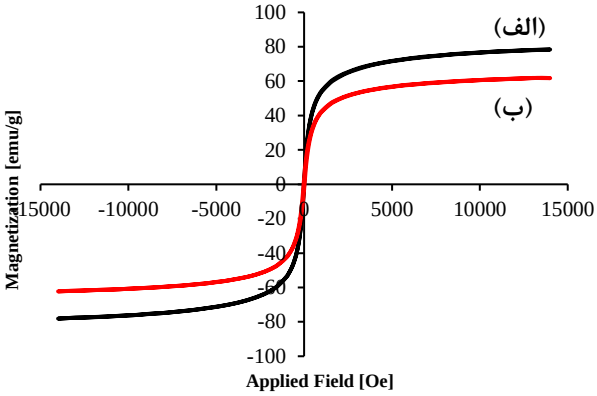
شکل ۵- نمودار DLS جهت تعیین اندازه ذرات نانوساختار الف) Fe_3O_4 و ب) $Fe_3O_4@SiO_2@PVA/IDA\text{-}Ni^{2+}$

مغناطیس سنج ارتعاشی(VSM)

جهت سنجش خواص مغناطیسی نانوساختار، منحنی هیسترزیس[4]مربوطه، با تغییر میدان مغناطیسی H بین ۱۲۰۰۰+ و ۱۲۰۰۰- اورستد تهیه شد (شکل۶). مغناطش-اشباع(Ms) نانوذراتFe_3O_4 در دمای اتاق، ۷۸/۳۹۷۱۶ g.emu بود که این مقدار برای نمونه نانوساختار $Fe_3O_4@SiO_2@PVA@IDA\text{-}Ni^{2+}$ با کاهش قابل-توجه، ۶۱/۹۳g.emu به دست آمد. کاهش مغناطش اشباع در نانوساختار$Fe_3O_4@SiO_2@PVA@IDA\text{-}Ni^{2+}$ به علت محصور شدن نانوذرات Fe_3O_4 توسط $IDA\text{-}PVA\text{-}SiO_2$ و کمپلکس‌دار کردن با نیکل می‌باشد. نانوساختار مورد مطالعه بیشترین مقدارNi^{2+} را برای غنی‌سازی پروتئین کمپلکس کرد.

[4] Hysteresis

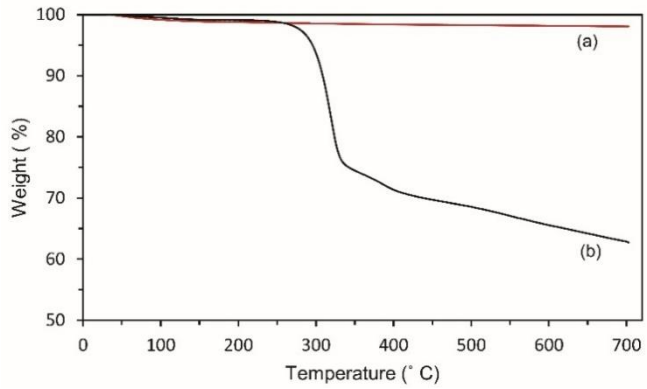
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]



شکل۶- نتایج آزمون VSM برای نانوساختارهای الف) Fe_3O_4 وب) $Fe_3O_4/SiO_2/PVA/IDA\text{-}Ni^{2+}$

آزمون TGA نانوساختارهای $Fe_3O_4@SiO_2$ و $Fe_3O_4@SiO_2@PVA@IDA$ و $Fe_3O_4@SiO_2@PVA/IDA\text{-}Ni^{2+}$

برای تعیین حضور و مقدار پلیمر تشکیل شده روی نانوذرات نهایی از آزمون TGA استفاده شد. TGAبه‌دست آمده برای نانوساختارهای $Fe_3O_4@SiO_2$ و $Fe_3O_4@SiO_2@PVA@IDA\text{-}Ni^{2+}$ در شکل ۷ نشان داده شده است.

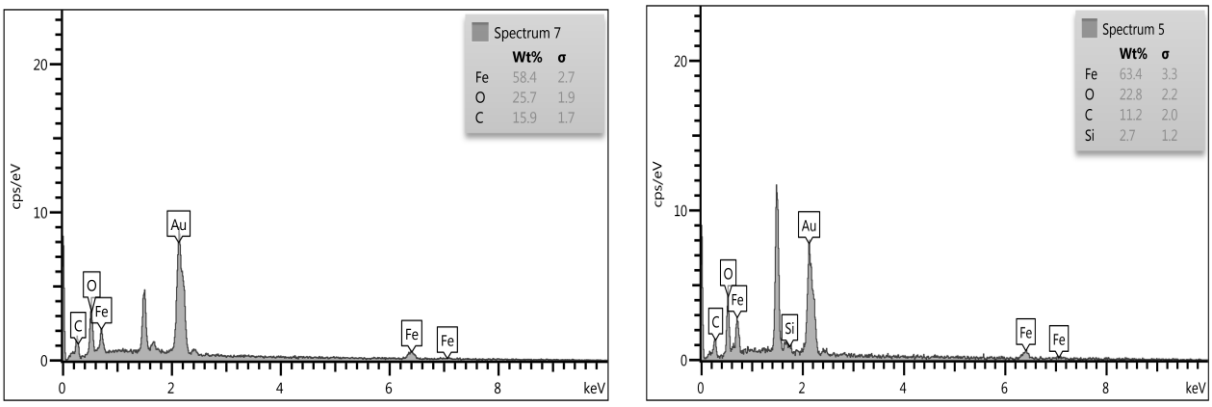


شکل ۷- نمودار TGA (a: $SiO_2@Fe_3O_4$, b) $Fe_3O_4@SiO_2@PVA@IDA\text{-}Ni^{2+}$

طیف EDX نانوساختارهای Fe_3O_4 و $Fe_3O_4@SiO_2@PVA@IDA\text{-}Ni^{2+}$

جهت تعیین نوع و درصدعناصـراصلی موجود در نانوساختارهای Fe_3O_4 و $Fe_3O_4/SiO_2/PVA/IDA\text{-}Ni^{2+}$ از دستگاه EDAX-SEM استفاده شد. براساس شکل ۸ الف، طبق ایـن آنالیز میزان درصد وزنی عنصر Fe را ٪۵۸/۴، O ٪۲۵/۷ و C را ٪۱۵/۹ نشان داده شد، مطابق شکل ۹ب 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 $Fe_3O_4/SiO_2/PVA/IDA\text{-}Ni^{2+}$ را تایید نمود.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]



(الف) (ب)

شکل ۸- طیف EDX نانوساختار الف) Fe_3O_4 و ب) $Fe_3O_4/SiO_2/PVA/IDA\text{-}Ni^{2+}$

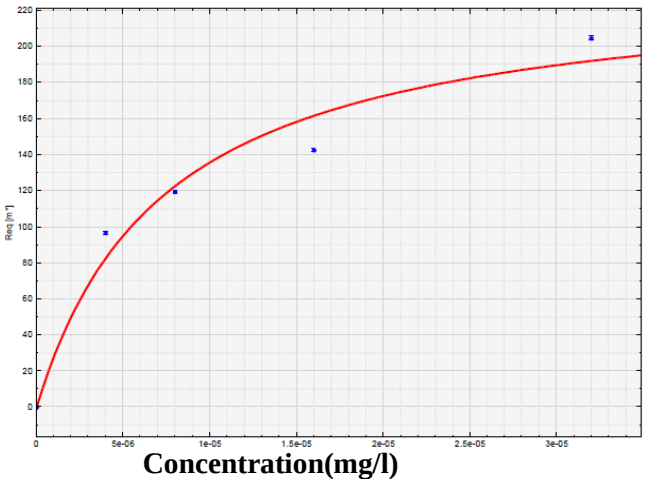
بررسی جذب پروتئین در نانوذرات مغناطیسی $Fe_3O_4@SiO_2@PVA@IDA\text{-}Ni^{2+}$

یک معیار در توصیف فرآیند جذب پروتئین با نانوساختار تعیین پارامترترمودینـامیکی K_d (ثابت تفکیک) است. پروتئین ompW ۲۶KDa باکتری *E.coli* با ۶ اسید آمینه هیستیدین در معرض بررسی ظرفیت جذب پروتئین درنانوذرات مغناطیسی $Fe_3O_4/SiO_2/PVA/IDA\text{-}Ni^{2+}$ 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 ۱مولار 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 تعادلی بدست آمده را نشان می‌دهد. داده‌ها را می‌توان با مدل ساده لانگمویر[5] توصیف نمود که در آن c و q 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 بدسـت آوردن ترمودینامیک جذب و مقـادیرKd از معادلـه وانـت هـوف استفاده شد.

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

$$Kd = \frac{qe}{Ce}$$

q_e مقدار ماده جـذب شـونده (mg/g) و C_e غلظت پروتئین فاز آبی(mg/li) را نشان می‌دهد. با توجه به نمودار شکل ۹ مقدار K_d برابر$۷/۴۲۲\times۱۰^{-۶}$ و مقدار ظرفیت جذب (q_m) برابر۱/۲۵ میلی‌گرم پروتئین در هر میلی‌گرم نانوذرات به‌دست آمد.



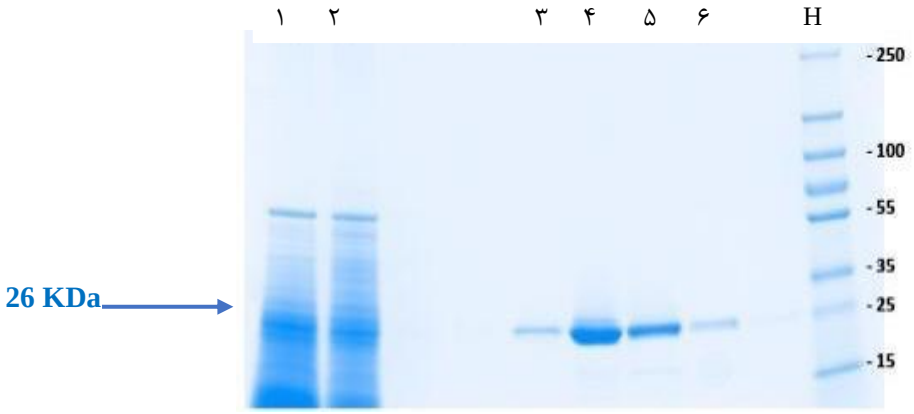
شکل۹- ایزوترم جذب ompW با نانوساختار مغناطیسی $Fe_3O_4/SiO_2/PVA/IDA\text{-}Ni^{2}$

[5] Langmuir

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

تخلیص پروتئین

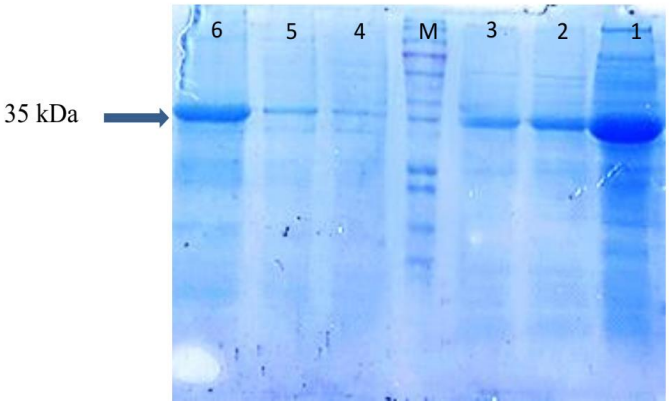
همانطور که در شکل ۱۰ مشاهده می‌شود پروتئین ۲۶ کیلو دالتونی OmpW بیان شده در باکتری *E.coli* از طریق ژل SDS-Page به صورت زیر تخلیص شد.



شکل۱۰- الکتروفورز تخلیص پروتئین نوترکیب OmpW با استفاده از نانوذرات مغناطیسی میل ترکیبی نیکل وغلظت‌های مختلف ایمیدازول با استفاده از ژل SDS-PAGE ٪۱۵

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 پس‌از شستشوی ستون نیکل با ایمیدازول ۱۰۰ میلی‌مولار ، ۶: محلول حاصل پس از شستشوی ستون نیکل با ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار ، H: نشانگر پروتئینی

پروتئین ۳۵ کیلودالتونی OPH که در باکتری*E.coli* بیان شده با استفاده از ژلSDS-PAGE تخلیص شد. نتایج مطابق شکل ۱۱ می‌باشد.



شکل۱۱- الکتروفورز تخلیص پروتئین نوترکیب OPH با استفاده از نانوذرات مغناطیسی میل ترکیبی نیکل وغلظت‌های مختلف ایمیدازول با استفاده از ژل 15%. 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 پس‌از شستشوی ستون نیکل با ایمیدازول ۱۰۰ میلی‌مولار ، ۶: محلول حاصل پس از شستشوی ستون نیکل با ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار ، M: نشانگر پروتئینی

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

جدول۱- نتایج پروتئین سنجی پروتئین OmpW

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

نتایج مراحل پروتئین سنجی OmpW در جدول ۱ نشان داده شده است. بر اساس نتایج حاصل از پروتئین‌سنجی به روش برادفورد ظرفیت جذب نانوذرات ۱/۲۵ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌گرم نانوذره می‌باشد. مراحل پروتئین‌سنجی پروتئین OPHطبق روش برادفورد انجام گرفت و نتایج آن در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج حاصل از پروتئین‌سنجی، ظرفیت جذب نانوذرات ۱/۲۵ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌گرم نانوذره می‌باشد.

جدول۲- نتایج پروتئین سنجی پروتئینOPH

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

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

بحث

زمانی که نانوذرات به محیط زیستی وارد می‌شوند، سطح آن‌ها با مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، مواد آلی طبیعی و آنزیم‌ها پوشیده می‌شود. شکل نانوذرات تأثیر مهمی بر میزان جذب پروتئین‌ها بر سطح آن‌ها و به دنبال آن برهمکنش با سلول‌ها دارد. خصوصیات سطح نانوذرات (ویژگی‌هایی مثل شکل، موقعیت شیمیایی، عملکرد سطحی، تخلخل، بلورینگی، هیدروفوبیسیتی و هیدروفیلیسیتی)، نحوه اتصال نانوذرات را با پروتئین مشخص می‌کند. نیروهای اصلی مسئول اتصال بین نانوذرات و پروتئین، نیروهای واندروالسی، پراکندگی لاندن، دوقطبی و پیوند هیدروژنی هستند (۳۶). بررسی برهمکنش

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

مولکولی پروتئین و لیگاند یک فرایند اساسی جهت تشخیص و درمان برخی بیماری‌ها ست. تعامل پروتئین با نانوذرات و تغییرات ساختاری پروتئین پس از جذب آنها در سطوح نانوذرات بررسی شده است. بنابراین، درک تغییرات ساختاری و روند بازشدن 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 سوپرپارامغناطیس 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 نمی-تواند 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، VSMو TGA مشخص شدند. همان‌طورکه در تصاویر SEM مشاهده می‌شود (شکل ۵ الف و ب)، قطر نانوساختارهای Fe_3O_4 و Ni-MNP به ترتیب در محدوده۵۰-۲۰ نانومتر و ۶۰-۳۰ نانومتر مشاهده شد. همان طور 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 پوشش‌دارکردن مغناطیسی باعث تجمع و توده‌ای شدن غیرطبیعی نانوذرات اصلاح شده نمی-گردد. 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 می دهد، ممکن است به دلیل تشکیل یک پلیمر روی ذرات اکسیدآهن باشد. در بررسی مورفولوژی نانوساختار Fe_3O_4 و نانوساختار هسته/پوسته $Fe_3O_4@SiO_2@PVA@IDA-Ni^{2+}$ تفاوت بین اندازه ذرات به‌دست آمده از طریق SEM و DLS به این دلیل است که DLS شعاع هیدرودینامیکی در محلول سوسپانسیون را اندازه می‌گیرد که در حالت تعلیق ذرات به‌هم متصل شدگه و سایز بزرگتر است، اما SEM اندازه قطر ذرات در حالت خشک که سایز نانوساختار کمتراست را نشان می‌دهد. قطر بزرگتر-Ni MNPs نشان داده شده توسط DLS در مقایسه با قطراندازه-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 MNPممکن است به دلیل محصورشدن نانوذرات Fe_3O_4توسط Ni- باشد. مغناطش اشباع نانوذرات نهایی به اندازه کافی قوی و مناسب برای جداسازی مغناطیسی می‌باشد. مقادیر اندک مغناطش‌پسماند[6]و وادارندگی[7]مغناطیسی نشان می‌دهد نانوذرات مغناطیسی تهیه شده سوپرپارامغناطیس هستند. در نتایج آنالیز TGA مشاهده شد، کاهش وزن ذرات-اکسیدآهن (ناشی از آب جذب شده) کمتر از ٪۴ بوده و با تشکیل پلیمر روی سطح ذرات تا حدود ٪۴۰ افزایش می یابد. نتایج تحقیق حاضر همراستا با نتایج مطالعه علی‌محمدی و همکاران در سنتز و مشخصه‌یابی نانوذرات مغناطیسی عامل-دارشده باآلکیل ($Fe_3O_4@TMOS$) و نتایج مطالعه Zhang و همکاران در استفاده از نانوساختارهای مغناطیسی$Fe_3O_4@PVIM-Ni^{2+}$ برای جداسازی ویژه پروتئین‌های غنی از هیستیدین بود (۴۰و۴۱). مطابق شکل ۸a، شیب نمودار ابتدا به صورت نزولی است که نشان‌دهنده کاهش جرم ناخالصی با افزایش دما است. در این نمودار در دمای$100^{o}C$تغییری در جرم نمونه رخ داد که می‌توان آن را به رطوبت نمونه نسبت داد که در دمای $100^{o}C$ (دمای تبخیر آب) رطوبت ازبین رفته و ماده خشک می‌شود. در انتها ٪۹۸/۰۵ وزنی از نانوساختار $Fe_3O_4@SiO_2$ باقی ماند. سپسNi^{2+} از طریق کمپلکسNi^{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 ۲N سوزاند، جرم کل حفظ خواهد شد و منطقی است که بعداز کمپلکس شدن باNi^{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 OPHبه عنوان دو پروتئین نوترکیب با برچسب 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

[6] Remanent magnetization

[7] Coercivity

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

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. به‌علاوه ، با خاصیت آبگریزی ذاتیPVA ، میزان تورم نانوذرات مغناطیسی در آب حداقل است. همچنین،گروه‌های عاملی IDAواقع در امتداد زنجیره‌های پلیمری انعطاف‌پذیر، به یون‌های فلزی غیرمتحرک اجازه می‌دهند تا به‌خوبی 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 میلی‌گرم پروتئین درهرمیلی‌گرم 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 پروتئین ها 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 میلی‌گرم پروتئین در هرگرم مهره) (۴۴ و ۴۳).

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 وOmpW حاوی هیستیدین ارائه شد. نانوذرات درچهار مرحله سنتز شدند. خصوصیات ساختاری و شاخص‌های فیزیکوشیمیایی‌نانوذرات - توسط آنالیزهایFTIR، DLS، SEM، TEM، EDX ، TGAو VSM تعیین شد. زیر واحدهای پروتئین‌های OPHو OmpW به‌صورت 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 فرآیندخالص‌سازی از طریق سدیم دودسیل‌سولفات-ژل‌پلی‌آکریل‌آمید (SDS-Page) و تست - برادفورد ارزیابی شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد، نانو ذرات پلیمری‌مغناطیسی $Fe_3O_4/SiO_2/PVA/IDA\text{-}Ni^{2+}$ 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 OmpW و OPH 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 ۱/۲۵میلی‌گرم پروتئین در هر میلی‌گرم نانوذرات است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

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. Fe_3O_4/PVIM-Ni^{2+} 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 Fe_3O_4@$NiSiO_3$ 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. Nanomat, 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 Fe_3O_4/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/Co^{2+}-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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

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. Nanomat, 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 melitensisvaccinated 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, Hormozinezad 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 (Fe_3O_4@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, Fe_3O_4/PVIM-Ni^{2+} 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-10-18]