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

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

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

Abstract

Aim and Background: High efficiency and purity protein purification is a serious challenge in the production of recombinant proteins. This study is proposing an easy and new strategy for fabricating and describing magnetic microspheres consisting of a silica-coated magnetic core and a polyvinyl acetate shell modified with iminodiastic-acetic acid and complexed with Ni^{2+} , (Fe₃O₄@SiO₂@PVA@IDA-Ni²⁺) 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- $\gamma\rho$ b (+) and expressed in E. coli BL γ_1 (DE γ) 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 Fe₃O₄@SiO₂@PVA/IDA-Ni²⁺ 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.

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

چکیدہ

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 پوشش دار شده با سیلیکا و یک پوسته پلیوینیل استات اصلاح شده با ایمینودی استیک اسید و کمپلکس شده با ،Ni²⁺ سیلیکا و یک پوسته پلیوینیل استات اصلاح شده با ایمینودی استیک اسید و کمپلکس شده با دان²⁺ (OPH) و پروتئین غشاء (Ni²⁺)، برای جداسازی و تخلیص پروتئین ارگانوفسفر هیدرولاز (OPH) و پروتئین غشاء خارجی^۱ (OmpW) حاوی هیستیدین ارائه می دهد.

مواد و روشها: نانوذرات در چهار مرحله زیر سنتز شدند: ۱) سنتز نانوذرات وینیل دار ۲۰(۱) 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 آنالیزهای SEM ،DLS ،FTIR ،SEU TGA ، EDX، TEM، معین شد. زیر واحدهای پروتئین نوترکیب (OPH) و OmpW به صورت نوترکیب بیان شده و تخلیص گردیدند و ساختار آنها مورد تایید قرار گرفت. در این مطالعه ژن کدکننده پروتئین نوترکیب ایان و Omp و Omp در ناقل بیانی (+) Pet-26b کلون شدند و در (DE3) EL21 (DE3) به عنوان میزبان بیان و به محیط کشت باکتری ترشح گردیدند. بیان ژن و فرآیند خالصسازی از طریق سدیم دودسیل سولفات-ژل پلی آکریل آمید (SDS-Page) و SDS-Page) 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 ۲۴/۵۶–۶۲/۱۹ مشاهده شد. تشکیل نانوساختار ⁺²Fe₃O4@SiO₂@PVA/IDA و ۱۶۰۰ و ۱۶۰۰ مربوط به ارتعاش کششی متقارن و نامتقارن گروه –O=C=O و حذف پیک در ¹⁻۱۷۴۰Cm 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 كليدى: نانوذرات مغناطيسى، جداسازى پروتئين، پوشش پليمرى، پلىوينيلالكل، كىليت فلزى، Iau Science.

نویسنده مسئول:

دانشکده علوم پلیمر، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران (IPPI)، تهران، ایران یست الکترونیکی: h.baharvand@ippi.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۲۸

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 صورد نیاز برای بسیاری از مطالعات بیولوژیکی است. به همین منظور از روشها و

استراتژی های متنوعی برای تخلیص پروتئین هدف از سایر پروتئین های غیراختصاصی و ناخالصی های محیط کشت و سلولهای میزبان به کار گرفته می شود تا با كمترين هزينه به بيشترين مقدار محصول نهايي با بالاترین میزان خلوص و فعالیت بیولوژیکی دست یافت (۲). در فرایند خالص سازی، قسمت پروتئینی و غيرپروتئيني از يكديگر جدا مي شوند. بيشترين چالش مربوط به زمانی است که پروتئین مورد نظر باید از سایر يروتئينها جدا گردد. مراحل خالصسازی معمولاً به اندازه پروتئین، ویژگیهای فیزیکو شیمیایی، تمایل اتصالی و فعالیت زیستی پروتئین موردنظر بستگی دارد. محصول نهایی فرایند تخلیص، یروتئین جداسازیشده نام دارد. معمولاً فرایند تخلیص پروتئین، شامل فیلتراسیون و یک یا چند مرحله کروماتوگرافی است. با استفاده از روشهایی مانند کروماتو گرافی و بهینه سازی آن، مولکول های خالص-تری بدست میآید و تحقیقات دقیقتری انجام می گیرد. در نتیجه، با تخلیص مولکول مورد نظر، می توان از آن در صنایع مختلف از جمله پزشکی استفاده کرد (۳).

یکی از موفقترین تکنیکها جهت جداسازی پروتئین، استفاده از پیتیدهای برچسب گذاری شده است که با پروتئین مورد نظر ترکیب شده و فرآیند جداسازی بر اساس كروماتو گرافى ميل تركيبى انجام مى شود. بەمنظور تسهيل تخليص، پروتئينها غالباً به برچسب تمايلي متصل مي-شوند (۴). كروماتوگرافى ميل تركيبى يون فلزى بى-حرکت^۲ (IMAC) یکی از این روش هاست که برای پالایش پروتئینهای دارای برچسب هیستیدین (His) استفاده می شود. هیستیدین به دلیل حضور گروه های دهنده الکترون روى حلقه هيستيدين ايميدازول، برهمكنشهاى قدرتمند با ماتریسهای حاوی یون فلزی بی حرکت (از جمله ۲۰٬۰۰۰، Cu^{۲+} ،Ni^{۲+} و Zn^{۲+}) دارد. در نهایت، پروتئینهای برچسب هیستیدین را می توان با تغییر pH یا غلظت ايميدازول بافر شستشو جدا كرد (۴). سوبستراهاى آلى 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 گذاری شده استفاده می شود (۱۴-۵). این نانوذرات، اگر تکنیکهای سنتز آنها به درستی انتخاب شود دارای مزایای زیر هستند:

 امکان جمع آوری 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 این حال، آنها هنوز هم فقط برای مقیاسهای آزمایشگاهی استفاده می شوند، عمدتاً به دلیل ظرفیت جذب پایین و سرعت انتقال پایین(۱۵). عوامل زیادی در برهم کنش نانوذرات و پروتئینها از جمله ماهیت نانوذرات، اندازه، شکل و میزان بار سطحی نانوذرات تأثیر دارند. ویژگیهای ساختاری و پایداری ذاتی و ترمودینامیکی پروتئین نیز در برهم کنش آن با نانوذرات تأثیر دارد (۱۷ و ۱۶).

برای داشتن ذرات با ظرفیت جذب بالا، یا سطح تماس آنها با محیط افزایش می یابد یا درشت مولکول هایی با یون های فلزى كلات شده به ذرات مغناطيسي پيوند ميزنند. افزایش سطح تماس یا با کاهش اندازه ذرات انجام می شود و یا ذرات مغناطیسی به شکل ماکرو متخلخل سنتز می-شوند. با کاهش اندازه ذرات، ظرفیت جذب افزایش می یابد، اما پاسخ ذرات کوچک در میدان مغناطیسی کاهش مییابد و در نتیجه فرآیند جداسازی با موفقیت انجام نمی شود (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 مشكل، فرآيند پوشش دار كردن نانوذرات به وسيله عوامل حفاظتی ضروری است (۲۰). سورفکتانتها (۲۱) و پلیمرها (۲۲) متداول ترین عوامل حفاظتی آلی هستند که این مواد را می توان 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 می شوند (۲۵). نانوذرات مغناطیسی کپسوله شده در یک یلیمر مناسب درعین حال که می توانند 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 Fe₃O₄ 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 بی اثر سیلیسیم بسیار مورد توجه

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 رایج ترین 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 اکسیدآهن پوششدارشده با سیلیکا متصل شد. نتایج نشان داد (۱۴). در پروهشی، گرافناکسید به برای جداسازی پروتئین مورد استفاده قرار گیرد (۲۹ و بستگی دارد، مطالعه اثرات ساختاری «MNP بر روی بستگی دارد، مطالعه اثرات ساختاری «MNP بر روی ساختار پروتئین برای جلوگیری از هرگونه تهدید به فعالیت ساختار پروتئین برای جلوگیری از هرگونه تهدید به فعالیت

آنزیم ارگانوفسفرهیدرولاز (OPH) یک پروتئین همودایمر است که اولین بار از باکتری سودوموناس دیمینوتا و فلاوباكتريوم جدا شده و قادر به تجزیه گستره وسیعی از تر کیبات ار گانوفسفره 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 یروتئینهای ompW ۲۶KDa و OPH ۳۵ KDa حاوی هیستدین تهیه گردید. دو پروتئین OpW وOPH به صورت نوتر کیب 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 ایمینودی استیک اسید و کمپلکس شده با نیکل، روی سطح نانوذرات مغناطیسی پوشیده شده با سیلیکا قرار داده شد تا امکان جذب و جداسازی دو پروتئینwompW وOPH در سطح نانوذره فراهم شود.

مواد و روشها

دو پروتئین نوترکیب ompW ۲۶KDa و OPH ۳۵KDa و OPH ۳۵KDa متصل شده به یک دنباله حاوی۶ اسید آمینه هیستیدین، از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شد. دیواره سلولی خشک شده شرکت سیگما آلدریچ خریداری شد. دیواره سلولی خشک شده باکتری ایکتری از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران آلی از جمله: کلریدآهن (اا)، کلریدآهن (اا)،محلول آمونیاک۲۵٪، ترااتیل و حلالهای بروپیل متاکریلات (TEOS)، وینیل استات، ایمینودی استیک اسید (IDA)، اپی کلروهیدرین (EC)، نیکل کلراید، سدیم هیدروکسید، پروپیل مای روهیدرین (AB)، اینول اتیل و دی-

سنتز نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن Fe₃O₄

مقدار ۳۲ ۵/۸۴ کلریدآهن (۱۱۱) و ۲/۱۵ کلریدآهن (۱۱) در بالن ۲۵۰ml مجهز به همزن مکانیکی در ۲۰۰ml آب مقطر دمای ۲۵۰۵ 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 ۲۰/۲ مولار شسته شد و در آب مقطر برای مراحل بعد نگهداری شد (۳۰).

پوشش دهی نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن با سیلیکا (Fe₃O₄/SiO₂)

جهت پوششدهی نانوذرات حاصل با سیلیکا، ابتدا فاز آب با ۲۰۰ml اتانول جایگزین و دریک بالن مجهز به همزن، ۲/۳ml محلول آمونیاک وTml 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).

وینیل دار کردن سطح نانوذرات (Fe₃O₄@SiO₂@PVA) پس از پوششدهی نانوذرات مغناطیسی با تترااتیل اور تو سیلیکات، جهت قرار گرفتن باندهای دوگانه فعال روی سطح ذرات از (۳-تری متوکسی سیلیل) پروپیل متاکریلات استفاده شد. در این مرحله، ابتدا فاز آب روی نانوذرات با ۲۰۰۳۱ 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 ۲۰°۶ در حین همزدن مدت ۲۴ ساعت واکنش انجام شد (۳۳).

گرافت پلیوینیل استات و اصلاح آن با ایمینودی استیک – اسید (Fe3O4/SiO2/PVA/IDA)

فاز پیوسته ذرات سنتز شده در مرحله قبل با۲۰۰ ml اتیل-استات جایگزین شد،۴/۵ gr وینیل استات وAIBN ۰/۰۰۵ gr اضافه شد و در دمای $^{\circ}C$ در اتمسفر نیتروژن مدت ۱۲ ساعت درحین همزدن، واکنش گرافت شدن روی سطح ذرات انجام شد.در انتها، جهت خارج شدن پلیوینیل استات گرافت نشده، ذرات چندبار با اتانول شسته شدند. جهت اصلاح پلیوینیل استات گرافت شده روی سطح ذرات با 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 براي اصلاح پليمر هيدروليز شده روي سطح نانوذرات (پليوينيل الكل) و تهیه پلیوینیل استات اصلاح شده با ایمینودی استیک اسيدروى سطح نانوذرات بهكار رفت. بعد ازگرافت شدن پلى وينيل استات به ذرات، در ۲۰۰ml مخلوط آب/ الكل (نسبت وزني 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 اییکلروهیدرین اضافه و در دمای ۲°۶۰مدت 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 دردمای۲°۶۰ مدت دو ساعت، تحت اتمسفر نیتروژن گروههای هیدروکسیل فعال شده با سود به گروههای دیاستیکاسید تبدیل شدند. درانتها نانوذرات با آب مقطر شسته و در ۲۰۰ سا

کمپلکسدار کردن نانوذرات مغناطیسی با نیکل (Fe₃O₄/SiO₂/PVA/IDA-Ni²⁺)

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 مشخصه یابی نانوذرات

بعد از سنتز و عامل دار کردن نانوذرات، با روشهای تحلیلی مختلف، بررسی و مشخصه یابی انجام شد. بررسی برهمکنش شیمیایی میان نانوذرات و تأیید عامل دار شدن نانوذرات توسط دستگاه FT-IR مدل Spectrum Two درمحدوده دستگاه FT-IR مدل XRD ترمون لاری نانوذرات مغناطیسی Fe₃O₄/SiO₂/PVA/IDA-Ni² و Fe₃O₄/SiO₂/PVA/IDA-Ni² و دستگاه پراش پرتو ایکس مدل 1730 PW، تحت تابش -Cu دستگاه پراش پرتو ایکس مدل 1730 KW، تحت تابش برد دستگاه پراش پرتو ایکس مدل 1730 MM، تحت تابش نودا داده مد. خواص مغناطیسی نمونه ها با دستگاه مغناطیس سنج نمونه-ارتعاشی MDK;Meghnatis Daghigh Kavir Co.; Iran)

، VSM/AFGM^۳) در دمای اتاق اندازه گیری شد. اندازه گیری 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 نيتروژن مايع استفاده شد. مقدار mg ١٥-١٠ نانوساختار سنتز شده داخل بوتهای از جنس پلاتین یا آلومینا، داخل کوره دستگاه قرارگرفت. نمونهها در دامنه حرارتی °۶۵۰°-۰ با سرعتدهی C^oC در دقیقه در شرایط اتمسفر نیتروژن مورد آزمون قرار گرفتند. برای حضور و نوع عناصر موجود در نمونه از EDX استفاده شد. الكتروفورز ژل سديم دودسيل سولفات-پلي آکریل آمید (SDS-PAGE) و آزمون برادفورد برای ارزیابی عملکرد ذرات در جداسازی پروتئین استفاده شد. الکتروفورز در جریان ثابت ۱۴ میلی آمپر و ولتاژ ۸۰ ولت انجام شد. غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد (۳۳) با آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد تعيين شد.

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

باکتری E. Coli و مازه ژنی بیان کننده دو پروتئین KDa و OPH ۳۵KDa تهیه شد. به منظور تولید پروتئین ompW۲۶ و OPH ۳۵KDa تهیه شد. به منظور تولید پروتئین نوترکیب، ۵۳۱ از کشت اولیه باکتری وارد ۵۰۰ ml محیط کشت LB Broth شد و در دمای C°۳۷ و سرعت ۱۵۰ rpm گرماگذاری شد. پس از رسیدن جذب نوری نمونه ها به ۶/۰در طول موج ۶۰۰nm، به لوله تست در شرایط استریل، القاءکننده

³ Vibrating Sample Magnetometer

ایزوپروپیل-بتا-*D*-۱-گالاکتو پیرانوزید (IPTG) با غلظت نهایی ۱ میلیمولار اضافه گردید. مدت یک شبانه روز در شیکر انکوباتور دمای ۲۰^oC و سرعت۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند. به منظور جمع آوری باکتریهای کشت داده شده، نمونه کشت مدت ۱۰ دقیقه با سرعت g ۵۰۰۰ 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، ml ۶ نانوذرات معادل ۳۰۰ میکرولیتر نانوذرات دیسپرس شده نهایی، به ۱ ml بافر فسفات ۵۰ میلیمولار حاوی ۲۰ میلیمولار ایمیدازول، ۳۰۰ میلیمولار ۸/۰pH ،NaCl اضافه شد و ۱ ml رسوب باکتری حاوی پروتئین نوتر کیب 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 می شود). سپس، نانوذرات-نیکل دو بار با یک بافر شستشو (۵۰ میلیمولار ،NaCl میلیمولار ۲۰ 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 به عنوان محلول شستشو ۱ و محلول شستشوی ۲ جمع آوری شد. برای استخراج پروتئین نوتر کیب متصل به Ni-MNPs، ۵۰۰ میکرولیتر بافر ۵۰ میلیمولار NaCl، میلیمولار ۵۰۰، NaH₂PO4 میلیمولار در غلظتهای ۱۰۰ و ۲۵۰ میلیمولار، ۸pH به فالکون اضافه و محلول استخراجشده جمع آوری شد. پس از خروج کامل بافر خارج کننده اول، ۱ml بافر خارج کننده 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 الكتروفورز بررسى شوند. تمام مراحل تخلیص در دمای اتاق صورت گرفت و پروتئینهای بدست آمده بلافاصله در دمایC°۲۰- ذخیره شدند (۳۴).

اندازهگیری غلظت پروتئینها در نمونهها

جهت اندازه گیری 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 ترتیباµ ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ آلبومین سرم گاوی (BSA) در حجم ۱ml اضافه و با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ ml

رسانده شد. سپس به میکروتیوپ بلانکµ ۱۰۰۰ آب مقطر اضافه و به دو لوله تست به ترتیب ۲۰ ، ۱۰ محلول پروتئین افزوده شد و با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ رسانده شد. به هرکدام از لولهها ۱۰ محلول برادفورد افزوده و به خوبی ورتکس شد. پس از انکوباسیون مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه جذب نوری با دستگاه اسپکتروفوتومتردر طولموج از میشگاه اندازهگیری شد. با استفاده از نمودار استاندارد حاصل از جذب غلظتهای مختلف محلول پروتئینی آلبومین سرم گاوی، غلظت نمونههای پروتئینی مجهول بدست آمد.

نتايج

مشخصه یابی نانوساختارهای Fe₃O₄ و -Fe₃O₄/SiO₂/PVA/IDA-Ni²⁺

نانوذرات Fe₃O₄/SiO₂/PVA/IDA-Ni²⁺ وFe₃O₄ Jin i سنتز، با استفاده از روشهای مکمل، شامل طیف FTIR مغناطیس سنجیVSM، پراش اشعه ایکسXRD ، پراکندگی نور دینامیکی VSM، DLS و XRD مشخصه یابی شدند. نور دینامیکی EDX،DLS و TGA مشخصه یابی شدند. نور دینامیکی FTIR برای نظارت بر روند عامل دار شدن نانوذرات مغناطیسی به کار گرفته شد. در شکل ۱ طیف (a) FTIR (a) مغناطیسی به کار گرفته شد. در شکل ۱ طیف (a) FTIR (b) Fe₃O₄@SiO₂@PVAc (c) بح₃O₄@SiO₂@PV₆ (c) Fe₃O₄@SiO₂(b) Fe₃O₄ GO₄@SiO₂@PVA/IDA-Ni²⁺ (d) ΔΛ۳ Cm⁻¹ میاشد. پیک جذبی عمیق در ناحیه ¹⁻ مربوط به مشخص کننده ارتعاش کششی پیوند O-Fe در نمونه های ارتعاشات کششی Te⁻ میباشد. پیکها در محدوده ¹⁻ ۲۹۲۱ و ۲۹۲۱ Cm⁻¹ به ارتـعاش کششی پیوندهای HTVCm⁻¹ زیتاشات کششی پیوند O-H دارت. دهمچنین قـله پهن در ¹⁻

در بررسی نانوذرات هسته-پوسته Fe₃O₄/SiO₂ مطابق شکل ۱۵، جذبکششیپیوند Fe-O-Si در ۲۵۸ Cm⁻¹ م ظاهر شده است. پیک در محدوده ۲-۵۸۳ که در تمام منحنیها (۱ b, c, d) ظاهر شده به ارتعاش کششی Fe-O در منحنیها (۱ b, c, d) ظاهر شده به ارتعاش کششی Fe-O در Fe₃O₄ ۵۷۰Cm⁻¹ نسبت داده میشود. ناحیه ارتعاش کششی Fe-O در نمونههای مغناطیسی به صورت توده، اغلب در حدود¹⁻۵۷۰Cm است. درمقایسه بانانوذرات مغناطیسی اصلاح نشده، باندهای بجذب Fe-O نانوذرات مغناطیسی پوشش دار شده با سیلیکا به طول موج بالاتر جابجا شدهاند که دلیل آن تشکیل پیوندهای طول موج بالاتر جابجا شدهاند که دلیل آن تشکیل پیوندهای نامتقارن و کششی متقارن Si-O-Si به ترتیب در ¹⁻Cm نامتقارن و کششی متقارن ۶-۵-۶۱ به ترتیب در ۱۰ ۲۰۵/۴۴ ظاهر شده اند. ارتعاشات خمشی پیوند Si-O-Si درناحیه¹⁻۶۱۲Cm ظاهر شده است. وجود این قلههانشان دهنده تشکیل لایه سیلیکا اطرافنانوذرات مغناطیسی

در شكل ۱d طیف نانوذرات هسته-پوسته كمپلكس شده با نیكل (Fe₃O₄@SiO₂@PVA/IDA-Ni²⁺) مشاهده می شود كه جذب كششی پیوند O-Fe درناحیه¹⁻¹⁰ MAT/۳۱ طاهر شده است كه بیانگر وجود نانوذراتFe₃O₄ می باشد. نوارهای جذبی در¹⁻¹⁰ CH=HC می باشد. نوارهای جذبی است كه بیانگر وجود نانوذرات ۲۰۵۵ (Trahino دارد. قله پهن موجود در ناحیه ¹⁻¹⁰ ۲۴۴۲/۱۷ Cm اشاره دارد. قله پهن موجود در ناحیه ¹⁻¹⁰ ۲۴۴۲/۱۷ Cm اشاره دارد. پیک موجود ارتعاشات كششی پیوند H-O اشاره دارد. پیک موجود در¹⁻¹⁰ ۲۴۴۲/۱۷ مربوط به ارتعاش كششی نامتقارن پیوند Si-O-Si است. پیک در محدوده¹⁻¹⁰ ۲۲۲Cm ارتعاشات ⁺² را توصیف میكند (۲۹). طیف FTIR حاصله، ارتعاشات ⁺² را توصیف میكند (۲۹). طیف FTIR حاصله، داركردن پوسته سیلیكا روی نانوذرات مغناطیسی و عامل-داركردن پوسته سیلیكا با پلیوینیل استات اصلاح شده با است. در تمام منحنی طیفها (۱b, c, d) قـله در محدوده Si-منبت در تمام منحنی طیفها (۱b, c, d) قـله در محدوده Si مشهر استفارن کششی نامتقارن-Si Cm⁻¹ مشاهده شده که به ارتعاش کششی نامتقارن-Si O-Si منبت داده می شود. قلـه پهن موجود در ناحیه -O-Si Motole CH به ارتعاشات کششی پیوند H-O اشاره دارد. بر اساس شکل ۱۰ (Fe₃O₄@SiO₂@PVA/IDA)، جذب در ناحیه C=O شکل ۱۰ (Fe₃O₄@SiO₂@PVA/IDA)، جذب در ناحیه C=O شکل ۱۰ (۲۰۵ مربوط به ارتعاش کششی گروه کربونیل C=O وینیل استات است. نوارهای جذبی در¹⁻Cm ۷۹۸ و NF۰Cm⁻¹ به ارتعاش خمشی پیوند H-C= و ارتعاش کششی پیوند دوگانه CH=HC مربوط است. پیک در ناحیه ⁻Cm پیوند دوگانه CH=HC مربوط است. پیک در ناحیه مشری قله ظاهر شده در¹⁻Cm ۲۰۹۲ Cm مربوط به ارتعاش کششی نامتقارن SiO-Si است که حاکی از وجود نـانوذراتSi می نامتقارن SiO-Si است که حاکی از وجود نـانوذراتSi می نامتقارن SiO-Si است که حاکی از وجود نـانوذراتSi می نامتقارن SiO-Si است که حاکی از وجود نـانوذراتSi می نامتقارن SiO-Si است که حاکی از وجود نـانوذراتCi می



شكل ١- طيفFTIR و Fe₃O₄@SiO₂@PVAc (c) ، Fe₃O₄@SiO₂ (b) ، Fe₃O₄ (a) و FTIR بشكل ١- طيف FTIR و

الگوی تفرق اشعه ایکس (XRD)

شکل ۲، الگوی تفرق اشعه ایکس نانوذرات Fe_3O_4 و شکل ۲، الگوی تفرق اشعه ایکس نانوذرات Fe_3O_4 و نانوساختار Fe_3O_4 @SiO₂@PVA/IDA-Ni²⁺ را نشان می دهد. همانطور که در الگوی تفرق برای نانوذرات Fe_3O_4 مشاهده می می شود هیچ گونه پیک اضافی ناشی از فاز دیگر در نمونه، مشاهده نشد و به حالت کریستالی و متبلور است. الگوی پراش Fe_3O_4 @SiO₂@PVA/IDA-Ni²⁺ را نشان می اشعه ایکس نانوساختار SiO_4 @SiO₂@PVA/IDA-Ni²⁺ را نشان می در موقعیت ۲۸–۲1 (آمورف را نشان می در موقعیت ۲۸–۲1 (آمورف را نشان می دهد. شکل ۲ به وضوح نشان می دهد الگوی تفرق اشعه ایکس

نانوساختار +Fe₃O4/SiO₂/PVA/IDA-Ni² شبیه نانوذرات Fe₃O4 است بهعبارتی ساختار بلور نانوذرات Fe₃O4 پس از قرارگرفتن پوشش SiO₂ و عاملدارشدن با پلیوینیل استات اصلاح شده با ایمینودی استیک اسید و قرارگرفتن +Ni² حول آن دستخوش تغییر نشده است. همچنین استنباط می شود نانو ساختار با موفقیت تشکیل شده و پوشش ایجاد شده حول نانو ذرات آمورف بوده و بلوری نیست.



 $Fe_3O_4 @SiO_2 @PVA/IDA-Ni^{2+}$ و نانوساختار $Fe_3O_4 @SiO_2 @PVA/IDA-Ni^{2+}$ هكل ۲- الگوى تفرق اشعه ايكس نانوذرات

مورفولوژی نانوساختارهای Fe3O4@SiO2 ،Fe3O4 Fe₃O₄@SiO₂@PVA/IDA و Fe₃O₄@SiO₂@PVA@IDA-Ni²⁺ تصاوير ميكروسكوپ الكتروني عبورى(TEM) ،Fe₃O₄ و

نانوساختار هسته/يوسته-Fe₃O₄@SiO₂@PVA@IDA نانوساختار

Ni²⁺ در شکل ۳ الف و ب نشان داده شده است. طبق تصویر ۳ب، ذرات مگنتیک بهصورت کرههای تیره درون پوستههای پلیمری، که به صورت لایه روشن متمایز هستند، جای گرفتهاند. تصاویر TEM تاییدی بر موفقیت تشکیل ساختار پلیمری روی سطح نانوذرات است.







 $Fe_3O_4/SiO_2/PVA/IDA-Ni^{2+}$ (شكل Fe_3O_4 (شكل Fe_3O_4) المكترونى عبورى نانوساختار الف

هسته Fe₃O₄@SiO₂@PVA@IDA-Ni²⁺ و يوسته Fe₃O₄ میباشد. قطر متوسط نانوساختار Fe₃O₄ و میکروکرههای هسته/يوسته +Fe₃O₄@SiO₂@PVA@IDA-Ni²⁺ بهترتيب در محدوده ۲۴/۵۳–۵۶/۶۹nm و ۳۱/۲۶–۳۱/۲۶ مشاهده شد.

طبق تصوير ميكروسكوپ الكتروني روبشي شكل ۴، نانوساختارهای Fe₃O₄/SiO₂/PVA/IDA-Ni²⁺ و Fe₃O₄ دارای اشکال کروی و ساختار یکنواخت بوده، سطح نانوسامانه همگن به نظر میرسد که نشاندهنده سازگاری خوب بین

Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-08-31



(ب) (ب) Fe₃O₄/SiO₂/PVA/IDA-Ni²⁺ و ب) Fe₃O₄ نانوساختار الف) SEM شكل۴- تصاویر

قطرهیدرودینامیکی وتوزیعاندازهذراتنانوساختارها توسط DLS تعیین شد. مطابق شکل۵، میانگین اندازه نانوذرات Fe₃O₄ برابر ۲۷۳/۴nm و میانگین اندازه نانو ساختار

-به- ۲۹۶/۹nm برابر Fe₃O₄@SiO₂@PVA@IDA-Ni²⁺ دست آمد.



شكل ۵- نمودار DLS جهت تعيين اندازه ذرات نانوساختار الف) Fe3O4 و ب) Fe3O4@SiO2@PVA/IDA-Ni²⁺ و ب)

مغناطیس سنج ارتعاشی(VSM)

جهت سنجش خواص مغناطیسی نانوساختار، منحنی هیسترزیس^۴مربوطه، با تغییر میدان مغناطیسی H بین ۱۲۰۰۰ و ۱۲۰۰۰ اورستد تهیه شد (شکل۶). مغناطش-اشباع(Ms) نانوذراتFe₃O4 در دمای اتاق، ۲۹۷۱۶ g.emu بود که این مقدار برای نمونه نانوساختار

[Downloaded from nembjpiau.ir on 2025-08-31]

****¶

- با کاهش قابل Fe₃O₄@SiO₂@PVA@IDA-Ni²⁺ با کاهش قابل Fe₃O₄@SiO₂@PVA@IDA-Ni²⁺ بوجه، Fe_3O_4 @SiO₂@PVA@IDA-Ni²⁺ به علت ibieulختار Fe₃O4@SiO₂@PVA@IDA-Ni²⁺ به علت محصور شدن نانوذرات Fe₃O₄ توسط IDA-PVA-SiO₂ و Adlus محصور شدن نانوذرات Fe₃O₄ میاشد. نانوساختار مورد مطالعه میشترین مقدار Ni²⁺ را برای غنی سازی پروتئین کمپلکس کرد.

⁴ Hysteresis



 $Fe_3O_4/SiO_2/PVA/IDA-Ni^{2+}$ (سکل $^{+}$ وب) Fe_3O_4 وب) VSM برای نانوساختارهای الف

آزمون TGA نانوساختارهای Fe₃O₄@SiO₂ و Fe₃O₄@SiO₂@PVA@IDA Fe₃O₄@SiO₂@PVA/IDA-Ni²⁺

نانوساختارهای Fe₃O₄@SiO₂ و Fe₃O₄@SiO₂@PVA@IDA-Ni²⁺ در شکل ۷ نشان داده شده است.

> برای تعیین حضور و مقدار پلیمر تشکیل شده روی نانوذرات نهایی از آزمون TGA استفاده شد. TGAبهدست آمده برای



شکل ۷- نمودار Fe₃O₄@SiO₂@PVA@IDA-Ni²⁺ (b, SiO₂@Fe₃O₄ (a: TGA) شکل ۷- نمودار

آنالیز میزان درصد وزنی عنصر Fe را ۲۵/۷٬ O ۲۵/۷٬ و C را ۲۵/۹٪ نشان داده شد، مطابق شکل ۹ب میزان درصد وزنی عنصر ۶۳/۴٪ Fe ۲۰/۱۰ و ۲۱/۷٪ مشاهده شد. نتایج EDX در تکمیل سایر نتایج بهدستآمده، تشکیل نانوساختارهای+Fe₃O₄/SiO₂/PVA/IDA-Ni را تایید نمود.

طيف EDX نانوساختارهای Fe₃O₄ و Fe₃O₄@SiO₂@PVA@IDA-Ni²⁺

جهت تعیین نوع و درصدعناصراصلی موجود در نانوساختارهای Fe₃O₄/SiO₂/PVA/IDA-Ni²⁺ و Fe₃O₄ از دستگاه EDAX-SEM



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

بررسی جذب پروتئین در نانوذرات مغناطیسی Fe₃O₄@SiO₂@PVA@IDA-Ni²⁺

یک معیار در توصیف فرآیند جذب پروتئین با نانوساختار تعیین پارامترترمودینامیکی K_d (ثابت تفکیک) است. پروتئین ompW ۲۶KDa باکتری *E.coli* با ۶ اسید آمینه هیستیدین در معرض بررسی ظرفیت جذب پروتئین درنانوذرات مغناطیسی قرار گرفت. آزمایشهای Fe₃O₄/SiO₂/PVA/IDA-Ni²⁺ جذب در pH انجام شد تا اطمینان حاصل شود گروههای دهنده الكترون در سطح پروتئين محافظت نشدهاند. نمك 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



شكل۹- ايزوترم جذب mpW با نانوساختار مغناطيسيFe₃O₄/SiO₂/PVA/IDA-Ni²

تعادلی بدست آمده را نشان میدهد. دادهها را میتوان با مدل ساده لانگمویر a 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 بدست آوردن ترمودینامیک جذب و مقادیر Kd از معادله وانت هوف استفاده شد.

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

 $Kd = \frac{qe}{Ce}$ مقدار ماده جـذب شـونده (mg/g) و C_{e} غلظت پروتئين فاز q_{e} آبی(mg/li) را نشان میدهد. با توجه به نمودار شکل ۹ مقدار ارم (qm) برابر (qm) برابر طرفیت جذب (qm) برابر $K_{\rm d}$ میلی گرم پروتئین در هر میلی گرم نانوذرات بهدست آمد.

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



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

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



شکل ۱۱- الکتروفورز تخلیص پروتئین نوتر کیب 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 میلی مولار ، ۶: محلول حاصل پس از شستشوی ستون نیکل با ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار ، M:

	غلظت	
	سوپرناتانت	
غلظت پروتئين	پروتئين	درصد جذب
(mg/ml)	(mg/ml)	'/.
١.	٨/٣	۱۷٪.
۵	٣/٢	۳۶٪.
۲/۵	• / \	۶۸'/.
1/80	•	۱۰۰
•/84	•	۱۰۰
•/٣٢	•	۱۰۰

جدول۱- نتايج پروتئين سنجي پروتئين OmpW

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

OPH طبق 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 میلی گرم به ازای هر میلی گرم نانوذره میباشد.

جدول۲- نتایج پروتئین سنجی پروتئینOPH

غلظت پروتئين	غلظت سوپرناتانت	درصد جذب
(mg/ml)	(mg/ml) پروتئين	7.
۱.	م	۱۰٪.
۵	۴	۲۰٪
۲/۵	١/۴	44%
۱/۲۵	•	۱۰۰
• /84	•	۱۰۰
• /٣٢	•	۱

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

بحث

زمانی که نانوذرات به محیط زیستی وارد می شوند، سطح آنها با مولکولهای زیستی مانند پروتئینها، مواد آلی طبیعی و آنزیمها پوشیده می شود. 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

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 Fe₃O4 منجر به تغییر ساختار پروتئین و در نهایت تغییر رنگ و فیبریلاسیون پروتئین میشود (۳۷).

نانوذرات سویر پارامغناطیس 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 كيلاتورها دست نخورده باقى مىمانند. بنابراين، سنتز نانوساختارهای مغناطیسی متصل به زنجیرههای پلیمری كيلاتور ممكن است راهي آسان و كارآمد براي افزايش ظرفيت اتصال پروتئین باشد. مشخصهیابی نانوذرات توسط SEM، VSM ،XRD ،FTIR ،DLS ،TEM مشخص شدند. همان طور که در تصاویر SEM مشاهده می شود (شکل ۵ الف و ب)، قطر نانوساختارهای Fe₃O₄ و Ni-MNP به ترتیب در محدوده ۵۰–۲۰ 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 ^{+Ni2} قطر ذرات افزایش یافته که مؤید یوشش دار شدن نانوذرات هسته آهن است. طبق تصاوير فرايند پوششداركردن مغناطيسي 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 Fe₃O₄ و نانوساختار هسته/پوسته Fe₃O₄@SiO₂@PVA@IDA-Ni²⁺ تفاوت بين اندازه ذرات بهدست آمده از طریق SEM و DLS به این دلیل است که DLS شعاع هیدرودینامیکی در محلول سوسیانسیون را اندازه

می گیرد که در حالت تعلیق ذرات به هم متصل شدگه و سایز بزرگتر است، اما SEM اندازه قطر ذرات در حالت خشک که سایز نانوساختار کمتراست را نشان می دهد. قطر بزرگتر-Ni MNPs نشان داده شده توسط DLS در مقایسه با قطراندازه-گیری شده توسط SEM نیز می تواند ناشی از تشکیل لایه پلیمری آبدوست روی سطح ذرات باشد. با توجه به نتایج مغناطش اشباع(Ms) ،کاهش مغناطش اشباع نانوذرات-Ni

MNPممکن است به دلیل محصورشدن نانوذرات Fe₃O₄ باشد. مغناطش اشباع نانوذرات نهایی به اندازه کافی قوی و مناسب برای جداسازی مغناطیسی میباشد. مقادير اندک مغناطش پسماند و وادارندگی مغناطیسی نشان مىدهد نانوذرات مغناطيسى تهيه شده سوپرپارامغناطيس هستند. در نتایج آنالیز TGA مشاهده شد، کاهش وزن ذرات-اکسیدآهن (ناشی از آب جذب شده) کمتر از ۴٪ بوده و با تشكيل پليمر روى سطح ذرات تا حدود 14 افزايش مى يابد. نتايج تحقيق حاضر همراستا با نتايج مطالعه علىمحمدى و همكاران در سنتز و مشخصه يابي نانوذرات مغناطيسي عامل-دارشده باآلكيل (Fe₃O₄@TMOS) و نتايج مطالعه Zhang همکاران در استفاده از نانوساختارهای 9 مغناطیسی +Fe₃O₄@PVIM-Ni²⁺ برای جداسازی ویژه پروتئینهای غنی از هیستیدین بود (۴۰و۴۱). مطابق شکل ۸۵، شیب نمودار ابتدا به صورت نزولی است که نشان دهنده کاهش جرم ناخالصی با افزایش دما است. در این نمودار در دمای°۲۰۰ تغییری در جرم نمونه رخ داد که میتوان آن را به رطوبت نمونه نسبت داد که در دمای C[°]۱۰۰ (دمای تبخیر آب) رطوبت ازبین رفته و ماده خشک می شود. در انتها ٪۹۸/۰۵ وزنی از نانوساختار Fe₃O₄@SiO₂ باقی ماند. سیس⁺¹Ni از طریق کمپلکس-Ni²⁺ با ایمینودیاستیکاسید برای اتصال بیشتر با پروتئینهای غنی از هیستیدین روی نانوساختارها گنجانیده شد. با توجه به اینکه نمی توان ⁺²Ni را در اتمسفر ۲N سوزاند، جرم کل حفظ خواهد شد و منطقی است که بعداز کمیلکس شدن با⁺²Ni، کاهش وزن صورت گیرد (شکل ۸b). نتایج Zhang و همکاران با یافتههای این تحقیق همراستا بود. نتایج مطالعه اخیر تایید می کند پروتئین های 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 اسينتوباكتر بوماني پرداخته شد. اين محققان پروتئين ompW

⁶ Remanent magnetization

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 انعطاف پذیر، به یونهای فلزی غیرمتحرک اجازه میدهند تا بهخوبی در محلهای اتصال روی سطح پروتئین مرتب شوند. بنابراین، پروتئین می تواند 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 نتايج SDS-PAGE، درجه وضوح بالایی در جداسازی پروتئین نیز مشاهده شد. با مزایایی مانند هزينه كم، ظرفيت جذب يروتئين بالا، درجه انتخاب-پذیری بالا در فرآیند جداسازی پروتئین، سوپرپارامغناطیس و خواص مغناطیسی قوی، می توان 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 میلی گرم پروتئین در هرگرم مهره) (۴۴ و ۴۳).

نتيجهگيرى

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 پليمرى جهت جداسازى و تخليص پروتئين OPH وOmpW حاوی هیستیدین ارائه شد. نانوذرات در چهار مرحله سنتز شدند. خصوصیات ساختاری و شاخصهای فیزیکوشیمیایینانوذرات -، EDX، TEM، SEM ،DLS ،FTIR توسط آناليزهاي TGAو VSM تعیین شد. زیر واحدهای پروتئینهای OPHو OmpW به صورت نوتر کیب 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 دودسیل سولفات-ژل پلی آکریل آمید (SDS-Page) و تست -برادفورد ارزیابی شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد، نانو ذرات پلیمریمغناطیسی 'Fe₃O₄/SiO₂/PVA/IDA-Ni²⁺ 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 یروتئین نشان دادند. یروتئینهای 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. می توان گفت نانوذرات سنتز شده دارای حداکثر ظرفیت جذب پروتئین حدود ۱/۲۵میلی گرم پروتئین در هر میلی گرم نانوذرات است.

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.
- Zhang Y, Li D, Yu M, Ma W, Guo J, Wang Ch. Fe₃O₄/PVIM-Ni²⁺ Magnetic Composite Microspheres for Highly Specific Separation of Histidine-Rich Proteins. ACS Appl Mater Interfac, 2014; 6: 8836–8844.
- Wang Y, Wang G, Xiao Y. Yang Y, Tang R. Yolk–Shell Nanostructured Fe₃O₄@NiSiO₃ for Selective Affinity and Magnetic Separation of His-Tagged Proteins. ACS Appl Mater Interfac, 2014; 6(21): 19092-19099.
- 8. Zou X, Li K, Zhao Y. Ferro ferric oxide/L-cysteine magnetic Nano spheres for capturing histidine-tagged proteins. J Mater Chem B1, 2013; (38): 5108-5113.
- 9. Pham X.H, Hahm E, Kim H.M, Son B.S, Jo A, An J. Silica-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles Grafted onto Graphene Oxide for Protein Isolation. 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.
- 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 βglucosidase via Fe₃O₄/PMG core/shell magnetic nanoparticles. Sci Rep, 2017; 7: 41741
- 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.
- Liao Y, Cheng Y, Li Q. Preparation of nitrilotriacetic acid/Co²⁺-linked, silica/boron-coated magnetite nanoparticles for purification of 6×histidine-tagged proteins. J Chromatog A, 2007;1143: 65–71.
- 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.
- Keyhanian F, Shariati S, Faraji M, Hesabi M. Magnetite nanoparticles with surface modification for removal of methyl violet from aqueous solutions. Arabian J Chem, 2016; 9: S348-S354.
- 22. Businova P, Chomoucka J, Prasek J, Hrdy R, Drbohlavova J, Sedlacek P, et al. Polymer coated iron oxide magnetic nanoparticles: preparation and characterization. Nanocon. 2011; 9: 21-23.
- 23. Barala S, Arora M, Saini P. Magnetite Decorated Activated Carbon Composites for Water Purification. 2013; 1244-1245. doi: 10.1063/1.4810691

- 24. Sun L, Zhang C, Chen L, Liu J, Jin H, Xu H, et al. Preparation of alumina-coated magnetite nanoparticle for extraction of trimethoprim from environmental water samples based on mixed hemimi celles solid-phase extraction. Analytic Chimica Acta, 2009; 638(2):162-168.
- 25. Li X-S, Zhu G-T, Luo Y-B, Yuan B-F, Feng Y-Q. Synthesis and applications of functionalized magnetic materials in sample preparation. TrAC Trends Analyt Chem. 2013; 45: 233-247.
- 26. Kashanian F, Habibi-Rezaei M, Moosavi-Movahedi A, Bagherpour A, Vatani M. The ambivalent effect of Fe3O4 nanoparticles on the urea-induced unfolding and dilution-based refolding of lysozyme. Biomed Mater. 2018;13(4): 045014.
- 27. Chen Z, Xu R, Zhang Y, Gu N. Effects of proteins from culture medium on surface property of silanes-functionalized magnetic nanoparticles. Nanoscal res letters, 2009; 4(3): 204.
- 28. Pham X-H, Hahm E, Kim H-M, Son BS, Jo A, An J, et al. Silica-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles Grafted onto Graphene Oxide for Protein Isolation. Nanomat, 2020; 10(1):117.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Alimohammadi V, Kashanian F, Seyyed Ebrahimi S.A, Habibi Rezaei M, Bagherpour A. Synthesis and characterization of functionalized magnetite nanoparticles by alkyl group (Fe₃O₄@TMOS). Metallurgical Engineering 2019: 21(4): 275-283 http://dx.doi.org/10.22076/me.2019.88002.1199.
- Yuting Zhang, Dian Li, Meng Yu, Wanfu Ma, Jia Guo, Changchun Wang, Fe₃O₄/PVIM-Ni²⁺ Magnetic Composite Microspheres for Highly Specific Separation of Histidine-Rich Proteins. ACS Appl Mater Interfac, 2014; 6: 8836–8844.
- 42. Huang W, Wang S, Yao Y, Xia Y, Yang X, Long Q, et al. OmpW is a potential target for eliciting protective immunity against Acinetobacter baumannii infections. Vaccine, 2015; 33(36): 4479-85.
- 43. Zhang L, Chen L, Wan QH. Preparation of Uniform Magnetic Microspheres through Hydrothermal Reduction of Iron Hydroxide Nanoparticles Embedded in a Polymeric Matrix. Chem Mater, 2008; 20: 3345–3353.

NCMBJ, volume & issue, 13/53, February 2024-۱۴۰۲ زمستان ۱۴۰۲-NCMBJ, volume & issue, 13/53, February 2024-۱۴۰۲ مصلنامه تازه های بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی، دوره ۱۳ مماره ۵۳ زمستان ۱۴۰۲-۱۹۷

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