

Effect of iron oxide nanoparticles on thermal stability and kinetics of trypsin

تأثیر نانوذره اکسید آهن بر پایداری حرارتی و سینتیک آنزیم تریپسین

Lida Momeni*

Assistant Professor of Biology, Department of Science, Payame Noor University, Iran.

لیدا مومنی*

استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، ایران.

(Received: Apr. 25, 2020 - Accepted: Apr. 10, 2021)

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۲۱)

Abstract

In this study, the effect of iron oxide nanoparticles on the structure, thermal stability and activity of bovine pancreatic trypsin was investigated. Various spectroscopic techniques including UV absorption, circular dichroism, thermal stability, fluorescence and kinetics at pH 8 were used to achieve this goal. Thermodynamic and kinetic results showed that trypsin stability decreased in the presence of iron oxide nanoparticles and increased its activity. Fluorescence spectroscopy showed that the nanoparticles can reduce trypsin fluorescence through static quenching. Based on the thermodynamic parameters, the process of binding the nanoparticles to trypsin is performed as a spontaneous reaction which the electrostatic forces play the main role in. Circular dichroism studies showed changes in the secondary structure of trypsin as an increase in α -Helix I content and a decrease in β -sheets. UV spectroscopy showed that iron oxide nanoparticles bind to trypsin and cause changes in protein structure. The interaction studies of Fe_3O_4 nanoparticles and trypsin show that not only water and solvent molecules can affect on 3D structure of trypsin and protein but also play an important role in adsorption nanoparticles.

Keywords: Iron oxide nanoparticles (Fe_3O_4), Kinetic, Spectroscopy, Thermodynamic, Trypsin.

چکیده

در این مطالعه، چگونگی تأثیر نانوذره اکسید آهن در ساختار، پایداری حرارتی و فعالیت آنزیم تریپسین پانکراس گاوی بررسی شد. برای دستیابی به این هدف از تکنیک‌های مختلف طیف‌سنجی از جمله جذب UV، دو رنگی دورانی، پایداری حرارتی، فلورسانس و سینتیک در pH 8 استفاده شد. نتایج ترمودینامیک و سینتیک نشان داد، که پایداری تریپسین در حضور نانوذره اکسید آهن کاهش و فعالیت آن افزایش یافت. طیف‌سنجی فلورسانس نشان داد که نانوذره می‌تواند فلورسانس تریپسین را از طریق خاموشی استاتیک کاهش دهد. براساس پارامترهای ترمودینامیکی، فرایند اتصال نانوذره به تریپسین به صورت واکنش خودبه‌خودی انجام شده که نیروهای الکتروستاتیک نقش اصلی را ایفا می‌کند. مطالعات دورنگی نمایش دورانی دور تغییرات در ساختار دوم تریپسین را به صورت افزایش در محتوای ماریچ آلفا و کاهش ساختارهای بتا نشان داد. مطالعه طیف‌سنجی UV ثابت کرد که نانوذره اکسید آهن به تریپسین متصل شده و باعث تغییراتی در ساختار پروتئین شده است. مطالعات واکنش بین نانوذره اکسید آهن و تریپسین نشان می‌دهد که نه تنها آب و مولکول‌های حلال می‌توانند بر روی ساختار سه بعدی تریپسین و به‌طور کلی پروتئین محلول اثر بگذارند، بلکه نقش مهم و حیاتی در جذب سطحی مواد نانو دارند.

واژه‌های کلیدی: ترمودینامیک، تریپسین، سینتیک، طیف‌سنجی، نانوذره اکسید آهن (Fe_3O_4).

مقدمه

پایداری پروتئین‌ها به‌ویژه آنزیم‌ها فاکتور تعیین‌کننده در کاربرد آنزیم‌ها به‌صورت تجاری است. پایداری آنزیم محدودیت اصلی عملکرد آنزیم در محیط‌های غیر طبیعی است بنابراین افزایش پایداری آنزیم هدف ارزشمند مهندسی پروتئین می‌باشد (Shaw & Bott 1996). روش‌های مختلفی برای افزایش پایداری آنزیم وجود دارد از جمله این روش‌ها اصلاح آنزیم، مهندسی پروتئین و مهندسی محیط، اتصال متقاطع، جذب فیزیکی، اتصال یونی و فلزی، اتصال کووالانسی و روش‌های جذبی نظیر جذب ژلی، جذب فیبری، برای آنزیم‌های نامحلول و در عین حال غشاهای اولترا فیلتری برای آنزیم‌های محلول می‌باشند (Shami, 1989; Kim, 2006). در مهندسی محیط به‌جای آن‌که ساختار آنزیم را تغییر دهند، با تغییر محیط اطراف، ساختار آنزیم را پایدار می‌کنند. در این روش با استفاده از حلال‌های آلی غیر آبی و یا با تغییر ترکیب نمکی محلول آبی محیط اطراف آنزیم را تغییر داده و می‌توان آنزیم را پایدارتر کرد (Shami *et al.*, 1989). پژوهش‌گران در سال‌های اخیر به نانوذرات به‌عنوان ناقل ماکرومولکول‌های آبگریزی مانند پروتئین‌ها، واکسن‌ها و پلی‌نوکلئوتیدها علاقه زیادی نشان داده‌اند (Panyam & Labhasetwar 2003). نانوذرات به‌عنوان مواد افزودنی در خمیر دندان، ضد آفتاب و رنگ استفاده می‌شوند و به‌دلیل کوچک بودن می‌توانند وارد بدن شوند و واکنش التهابی مضر را در بافت‌های حساس ایجاد کنند (Momeni, 2017). این ذرات می‌توانند جذب لوله گوارش شده و از طریق عروق به سیستم عصبی برسند و باعث استرس اکسیداتیو و تغییرات پاتولوژیکی در بدن شوند (Momeni *et al.*, 2017). نانوساختارهای مختلف، به‌طور کلی یک منطقه بزرگ برای بی‌حرکتی مولکول‌های آنزیم فراهم می‌کنند که آنزیم را پایدارتر می‌کنند (Momeni *et al.*, 2017). نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی (Fe_3O_4) به‌دلیل

سازگاری زیستی، پایداری شیمیایی و تجمع قابل توجه در محل بیمار، به‌طور گسترده برای کاربردهای پزشکی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Shareghi *et al.*, 2016). چالش مهم برای ایمنی نانوذرات برای کاربردهای زیست‌پزشکی این است، که پروتئین می‌تواند هنگام تعامل با نانوذرات و هنگام قرار گرفتن در معرض محیط فیزیولوژیکی دنا توره شود که در حالت دنا توراسیون پروتئین، فعالیت آن می‌تواند تغییر کند (Momeni *et al.*, 2017). از آنجاکه فعالیت‌های بیولوژیکی پروتئین‌ها به کنفورماسیون آنها بستگی دارد، دانستن کنفورماسیون پروتئین پس از تعامل با نانوذرات بسیار مهم است (Mahmoudi *et al.*, 2011). ما تعامل تریپسین با نانوذرات TiO_2 ، MgO و NiO را با شرایط متفاوت مطالعه کرده‌ایم (Momeni *et al.*, 2017; Momeni *et al.*, 2018; Mahmoudi *et al.*, 2011) ساختار دوم پروتئین ترانسفرین انسانی اشباع‌شده آهن را پس از تعامل با نانوذرات Fe_3O_4 ، مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند که کنفورماسیون پروتئین با توجه به ره‌اشدن آهن از ساختار اصلی به‌طور غیرقابل بازگشت باز شده است. Shareghi *et al.* (2016) گزارش کردند که نانوذره Fe_3O_4 فعالیت و پایداری حرارتی آنزیم لیزوزیم را افزایش داده است. در بین انواع مختلف نانوذرات که کاربرد پزشکی دارند نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن به‌دلیل زیست‌سازگاری، خواص مغناطیسی، شکل و اندازه قابل کنترل مورد توجه قرار گرفته‌اند (Mahmoudi *et al.*, 2011). نانوذرات مغناطیسی برای جداسازی سلول، تصویربرداری با رزونانس مغناطیسی تشخیصی، سیستم‌های انتقال ژن و دارو و درمان سرطان از طریق هایپرترمی استفاده می‌شوند (Mahdavian & Mirrahimi, 2010; Mahmoudi *et al.*, 2011). علاوه بر این، نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن در کاربردهای کاتالیزی، ذخیره داده‌های مغناطیسی، تصویربرداری زیست‌پزشکی

آب مقطر دوبار تقطیر حل شد و سپس عمل انحلال کامل با استفاده از امواج صوتی (سونیکیشن) روی آنها انجام گرفت. سونیکیشن برای دو بار متوالی هر کدام ۱۰ دقیقه در دستگاه سونیکیتور صورت گرفت.

مطالعه طیف‌سنجی نوری آنزیم تریپسین در حضور نانوذره Fe_3O_4

طیف‌های جذب الکترونی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV/Vis مدل فارماسیا ۴۰۰۰ مجهز به دستگاه تنظیم دما (PLT) ثبت شد. اثر غلظت‌های مختلف نانوذره Fe_3O_4 (صفر تا ۱۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در طول موج‌های ۲۸۰-۴۰۰ نانومتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر روی آنزیم تریپسین با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در محلول ۵۰ میلی‌مولار بافر تریس با pH ۸ بررسی شد. پایداری حرارتی آنزیم در دامنه حرارتی ۲۰-۹۰ درجه سانتی‌گراد نیز توسط طیف‌های جذب الکترونی مورد ارزیابی قرار گرفت (Wang et al., 2011).

مطالعه برهمکنش نانوذره Fe_3O_4 با تریپسین به کمک طیف‌سنجی فلورسانس

طیف‌های فلورسانس توسط دستگاه اسپکتروفلوریمتر شیمادزو مدل RF-5103PC ثبت شد. ابتدا مخلوط دارای ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تریپسین و ۵۰ میلی‌مولار بافر تریس در طول موج ۲۸۰ نانومتر برانگیخته و شدت نشر فلورسانس آن بین ۲۹۰-۴۵۰ ثبت شد. سپس غلظت‌های متفاوتی از نانوذره Fe_3O_4 (صفر، ۱، ۳، ۵ و ۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به محلول تریپسین- بافر تزریق شد و پس از هر تزریق طیف فلورسانس آنها در دو دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد ثبت گردید (Momeni et al., 2017).

مطالعه طیف دورنگ نمایی دورانی (CD) آنزیم تریپسین در حضور نانوذره Fe_3O_4 طیف‌های دورنگی‌سنجی حلقوی (CD) در ناحیه

چندحالتی، تحویل داروهای هدفمند، تشخیص و درمان سرطان مورد توجه قرار دارند و عنصر غالب ذرات محیطی و شغلی هستند (Powers et al., 2006).

تریپسین، سرین پروتئاز، یک پروتئین کروی دارای ۲۲۳ اسید آمینه است که از پانکراس گاو ترشح می‌شود و ترکیبات پپتیدی را در رزیدیوهای آرژینین و لیزین برش می‌دهد (Rawlings & Salvesen 2013). تریپسین به دلیل داشتن تعداد زیادی تیروزین، سیستئین و رزیدیوهای باردار که تمایل دارند به کمپلکس‌های یون آهن متصل شوند، انتخاب مهمی برای فرایندهای نانوفناوری می‌باشد. نقطه ایزوالکتریک (pI) تریپسین و نانوذره Fe_3O_4 به ترتیب ۱۰/۵ و ۶/۵ است و در pH ۸ به ترتیب دارای بار مثبت و بار منفی هستند (Rawlings & Salvesen 2013). تحقیقات در مورد تعامل نانوذره اکسید آهن و تریپسین در زمینه‌های مختلف به توصیف اساس شیمیایی تعامل بین زیست‌مولکول‌های زیستی و نانوذرات مغناطیسی کمک می‌کند. در این کار ثابت آنزیم در حضور نانو ساختارهای Fe_3O_4 مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این کار، بررسی پایداری حرارتی، فعالیت و تغییرات کنفورماسیونی دوم و سوم تریپسین بر روی سطوح نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 با استفاده از Tm، طیف‌های UV-Vis، فلورسانس و دورنگی نمایی دورانی و مطالعات سینتیکی است.

مواد و روش‌ها

آنزیم تریپسین از منبع پانکراس گاو، سوبسترای آنزیم α -N-بنزوئیل-L-آرژینین اتیل استر (BAEE) و بافر تریس از شرکت سیگما و نانوذره Fe_3O_4 از شرکت US NANO خریداری شد. کلیه آزمایش‌ها سه بار تکرار شد.

انحلال نانوذره Fe_3O_4

جهت تهیه محلول استوک ۰/۲۵ mg/ml نانوذره Fe_3O_4 ، ابتدا ۱/۲ mg از این نانوذره وزن و در ۴/۸ ml

بنفش معمولاً با اندازه‌گیری‌های تکنیک CD مطابقت دارند، که می‌تواند به‌عنوان ابزاری ساده و عالی برای بررسی برهمکنش آنزیم با لیگاند و تعیین گذارهای ساختاری در آنزیم در نظر گرفته شود. این گذار توسط تغییرات در طول موج جذب و قدرت جذب آنها ارائه می‌شود (Wang & Zhang, 2014). تریپسین دارای حداکثر جذب در طول موج ۲۱۶ نانومتر بوده و شدت جذب آن پس از افزودن نانوذره Fe_3O_4 کاهش یافته است که دلیل آن، انتقالات از $\pi \leftarrow \pi^*$ ساختار ستون فقرات پلی پپتیدی به $\text{C}=\text{O}$ تریپسین می‌باشد که نشان‌دهنده تغییر ساختار ثانویه بیومولکول‌ها است (Kotormán *et al.*, 2003). همچنین، تریپسین به‌دلیل جذب اسیدهای آمینه آروماتیک (تیروزین، تریپتوفان و فنیل آلانین) دارای قله جذب ضعیفی در طول موج ۲۸۰ نانومتر است که تغییر ریز محیط کروموفور را نشان می‌دهد (Wang *et al.*, 2015). می‌توان مشاهده کرد که با افزودن غلظت نانوذره Fe_3O_4 ، شدت جذب تریپسین تغییر یافته و اثر هیپوکرومیک جزئی در حداکثر قله‌های جذب تریپسین در ۲۱۶ و ۲۸۰ نانومتر مشاهده شده است، اما موقعیت اوج طیف‌های جذب هیچ شیفت آبی یا قرمز نداشت. شواهد نشان می‌دهد در اثر برهمکنش بین نانوذره Fe_3O_4 و تریپسین، یک کمپلکس پروتئین-لیگاند با کنفورماسیون جدید خاص تشکیل شده است. شکل گیری کمپلکس باعث تغییر ساختار زنجیره پپتید و موقعیت رزیدیوهای کروموفور تریپسین می‌شود. کروموفورهایی مانند تیروزین، تریپتوفان و فنیل آلانین موجود در تریپسین مسئول جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر هستند (Chi *et al.*, 2010). شدت جذب کمپلکس Fe_3O_4 -تریپسین در طول موج ۲۸۰ نانومتر کاهش یافته است. این نتایج نشان می‌دهد ساختار اسکلت پروتئین تغییر یافته است (Liu & Chanphai *et al.*, 2016; Liu, 2012). این احتمال وجود دارد که کمپلکس Fe_3O_4 -تریپسین از ضریب جذب مولی پایین‌تری نسبت به آنزیم آزاد

Far-UV (۲۶۰-۲۰۰ نانومتر) و توسط دستگاه اسپکتروپلاریومتر مدل AVIV۲۱۵ ثبت شد. ضخامت سل‌های آزمایش Far-UV ۱ میلی‌متر و غلظت تریپسین در آزمایش‌های Far-UV ۰/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر تریس (۵۰ میلی‌مولار با pH ۸) بود. ابتدا محلول آنزیم با غلظت‌های (۳ و ۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نانوذره مخلوط شد و طی زمان ۴ دقیقه به تعادل رسید؛ سپس طیف‌ها ثبت شد. تغییرات مربوط به ساختار دوم پروتئین به‌وسیله برنامه CDNN ورژن ۲/۱/۰/۲۲۳ تعیین شد. نتایج CD براساس وزن متوسط رزیدیوهای آمینو اسید (MRW) تریپسین (۹۸/۵ دالتون) در بیضوی مولار (ellipticity) $[\theta]$ ($\text{deg cm}^2 \text{mol}^{-1}$) بررسی شد (Wang, Zhu *et al.*, 2011).

بررسی سینتیک آنزیم تریپسین در حضور نانوذره Fe_3O_4
در این آزمایش، از دستگاه اسپکتروفتومتری UV/Vis مدل فارماسیا ۴۰۰۰ استفاده شد. غلظت نمونه آنزیم تریپسین مورد استفاده ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود و بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار مورد استفاده قرار گرفت. سوبسترای مورد استفاده در این آزمایش، $\alpha\text{-N}$ -بنزوئیل-L-آرژینین اتیل استر (BAEE) بود. طول موج ۲۵۴ نانومتر جهت پیگیری میزان تجزیه سوبسترا توسط تریپسین استفاده شد. در این مطالعه، اثر غلظت‌های مختلف نانوذره Fe_3O_4 (صفر، ۱، ۳، ۵ و ۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در دمای ۳۰۸ درجه کلون و pH بر سنتیک آنزیم تریپسین مورد بررسی قرار گرفت (Rajabi *et al.*, 2019).

نتایج

طیف جذب الکترونی (UV-Vis spectra)

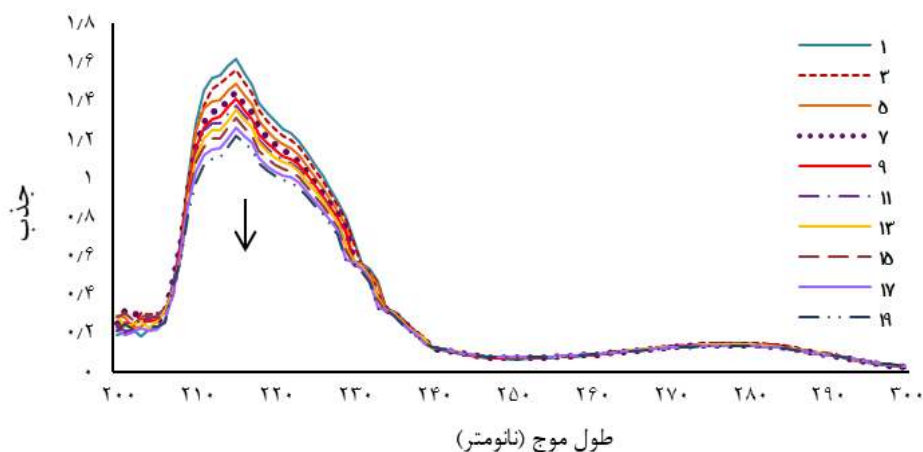
طیف‌های جذب الکترونی کمپلکس‌های نانوذره Fe_3O_4 -تریپسین در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج به‌دست‌آمده از طیف‌های جذب اشعه ماورای

آزمایشگاهی است؛ غلظت پروتئین و طول کووت ثابت است و طبق فرمول اگر جذب کاهش یابد نتیجه می‌گیریم که کاهش جذب به‌طور مستقیم با کاهش ضریب مولی رابطه دارد. بنابراین تغییرات ساختار پروتئین منجر به تغییر ضریب مولی و در نهایت تغییرات جذب می‌شود (Schmid, 2001). Wang *et al.* (2011) در مطالعات پیشین گزارش دادند که نانوذرات TiO_2 به سطح تریپسین متصل شده و برهمکنشی قوی بین نانوذرات و پروتئین انجام شده که این برهمکنش منجر به کاهش جذب اشعه UV توسط آنزیم تریپسین شده است.

پایداری حرارتی

تغییر در پارامترهای محیط پیرامون پروتئین مانند دما، حلال و pH می‌تواند منجر به تغییرات شدیدی در خصوصیات فیزیکی و از بین رفتن عملکرد بیولوژیکی پروتئین شود. به این پدیده دگرگون شدن یا دناتوراسیون پروتئین گفته می‌شود (Murphy 2001). دگرگون شدن به‌عنوان یک پدیده دو حالتی بین حالت‌های باز و تاخوردیده دیده می‌شود. نیروهای نگهدارنده پروتئین در طی فرایند دگرگون‌سازی آزاد می‌شوند (Oobatake & Ooi, 1993).

برخوردار باشد (Momeni *et al.*, 2016; Momeni *et al.*, 2017). رزیدیوی تریپتوفان نسبت به تغییر در محیط به‌دلیل تغییر گرما یا اتصال لیگاند حساس است. محیط اطراف تریپتوفان‌ها با تغییر هیدروفوبیسیته محیط به‌دلیل تغییر دما یا اتصال لیگاند، تغییر یافته و در نتیجه مقدار جذب آنزیم کاهش می‌یابد (Lu *et al.*, 2011). نتایج طیف جذب پیش‌بینی می‌کند که مکانیسم خاموشی احتمالی فلورسانس تریپسین توسط نانوذره استاتیک باشد. این امر به این دلیل است که خاموشی دینامیک تا حد زیادی به‌دلیل برخورد و انتقال انرژی از تریپسین به خاموش‌کننده است (Wang *et al.*, 2015). چون تریپسین (pI ۱۰/۵) در pH ۸ بار مثبت و نانوذره Fe_3O_4 (pI ۶/۵) بار منفی دارد، بنابراین نیروی الکتروستاتیک فرایند باز شدن تریپسین را رهبری می‌کند (Rawlings & Salvesen 2013). کاهش محسوس در جذب اشعه UV نشان می‌دهد که برهمکنشی نسبتاً قوی بین نانوذرات و پیوندهای سطحی تریپسین رخ داده و بدنبال آن تغییر خاصی در کنفورماسیون این پروتئین‌ها ایجاد می‌شود. بر اساس قانون بیرلامبرت $A = \epsilon \cdot c \cdot l$ که A نشان‌دهنده جذب، ϵ ضریب جذب مولی پروتئین در حضور و غیاب نانوذره، c غلظت پروتئین و l طول کووت



شکل ۱. طیف جذب تریپسین در حضور و غیاب نانوذره Fe_3O_4 (صفر تا ۱۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در دمای ۳۱۰ درجه کلون و بافر تریس (۵۰ میلی‌مولار و pH ۸).

برای ارزیابی اثر دگرگون‌سازی غلظت‌های مختلف نانوذره Fe_3O_4 بر پایداری و ساختار تریپسین، ارزیابی‌های حرارتی با استفاده از تکنیک دگرگون‌سازی حرارتی انجام شد. بسیاری از اندازه‌گیری‌های ترمودینامیکی با استفاده از مدل دو حالت، ساختار طبیعی (N) و دگرگون شده (D) تفسیر می‌شوند. ساختمان طبیعی (N) پروتئین دارای تاخوردگی مناسب است و انرژی آزاد کم‌تر از حالت دگرگون شده دارد. حالت دگرگون‌سازی همراه با از دست رفتن فعالیت پروتئین است ولی از دست رفتن فعالیت همیشه با دگرگون‌سازی همراه نیست چون تغییرات آرایش فضایی کوچک هم می‌تواند بدون برهم زدن ساختار تاخورده طبیعی پروتئین، منجر به از دست رفتن فعالیت پروتئین شود (Murphy, 2001). حالت‌های دگرگون شده و طبیعی پروتئین با هم‌دیگر در حالت تعادل هستند و همچنین حالت طبیعی دارای حداقل مطلق انرژی آزاد است که بدون شکستن پیوندهای کووالان به‌دست آمده است. این فرض به‌عنوان فرضیه ترمودینامیک شناخته شده است بنابراین واکنش‌های تاخوردگی بر حسب ترمودینامیک تعریف می‌شوند. تعادل بین حالت‌های دگرگون شده (D) و طبیعی (N) با ثابت تعادل K تعریف می‌شود (Murphy, 2001):

برای ارزیابی اثر دگرگون‌سازی غلظت‌های مختلف نانوذره Fe_3O_4 بر پایداری و ساختار تریپسین، ارزیابی‌های حرارتی با استفاده از تکنیک دگرگون‌سازی حرارتی انجام شد. بسیاری از اندازه‌گیری‌های ترمودینامیکی با استفاده از مدل دو حالت، ساختار طبیعی (N) و دگرگون شده (D) تفسیر می‌شوند. ساختمان طبیعی (N) پروتئین دارای تاخوردگی مناسب است و انرژی آزاد کم‌تر از حالت دگرگون شده دارد. حالت دگرگون‌سازی همراه با از دست رفتن فعالیت پروتئین است ولی از دست رفتن فعالیت همیشه با دگرگون‌سازی همراه نیست چون تغییرات آرایش فضایی کوچک هم می‌تواند بدون برهم زدن ساختار تاخورده طبیعی پروتئین، منجر به از دست رفتن فعالیت پروتئین شود (Murphy, 2001). حالت‌های دگرگون شده و طبیعی پروتئین با هم‌دیگر در حالت تعادل هستند و همچنین حالت طبیعی دارای حداقل مطلق انرژی آزاد است که بدون شکستن پیوندهای کووالان به‌دست آمده است. این فرض به‌عنوان فرضیه ترمودینامیک شناخته شده است بنابراین واکنش‌های تاخوردگی بر حسب ترمودینامیک تعریف می‌شوند. تعادل بین حالت‌های دگرگون شده (D) و طبیعی (N) با ثابت تعادل K تعریف می‌شود (Murphy, 2001):

$$N \leftrightarrow U$$

$$K = \frac{[U]}{[N]}$$

همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده، منحنی دگرگون‌سازی حرارتی کمپلکس تریپسین- نانوذره

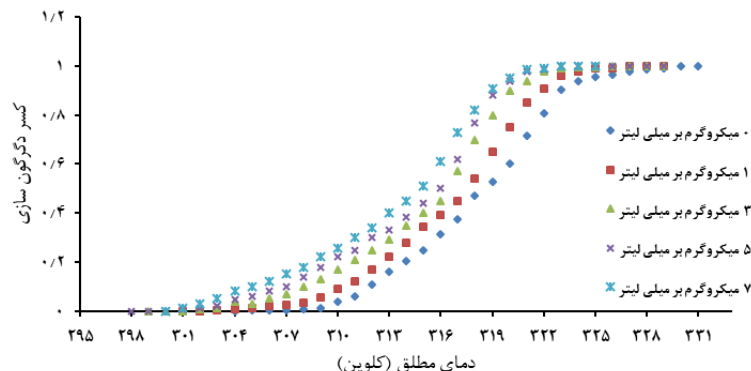
برای این معادله، F_d کسر دگرگون شده تریپسین است و Y_{obs} ، Y_n و Y_d به ترتیب جذب مشاهده شده و جذب حالت طبیعی و جذب حالت کاملاً دگرگون شده هستند. شکل ۲ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت نانوذره Fe_3O_4 منحنی‌ها به دمای پایین‌تر منتقل می‌شوند که نشان‌دهنده تغییر کسر از تریپسین دگرگون شده است.

تغییرات انرژی آزاد گیبس (ΔG°) برای توصیف مطالعات تاخوردگی پروتئین مفید است. همچنین، دمای ذوب (T_m) و تغییرات آنتالپی (ΔH°) برای شناسایی نیروهای غیر کووالانسی که حالت‌های ساختاری مختلف پروتئین را پایدار می‌کنند مفید هستند. همچنین، این پارامترهای ترمودینامیکی ارتباط مستقیمی با ساختار پروتئین دارند و می‌توانند اطلاعات دقیقی از پایداری ساختاری مولکول در حلال ارائه دهند. تغییرات انرژی آزاد گیبس (ΔG°) از معادله (۲) به‌دست آمد:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq} \quad (2)$$

$$= -RT \ln \left(\frac{F_d}{1-F_d} \right) = -RT \ln \left[\frac{Y_n - Y_{obs}}{Y_{obs} - Y_d} \right]$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ m - T \Delta S^\circ m$$



شکل ۲. کسر دگرگون‌سازی حرارتی تریپسین علیه دما در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره Fe_3O_4 (۰، ۱، ۳، ۵، ۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر)

ساختاری پروتئین به سمت ساختاری بازتر نسبت داده شود. به عبارت دیگر، نانوذرات پیوندهای جدید و ضعیفی را با سطح پروتئین برقرار می‌کند که باعث شکسته شدن ساختار تاخورد پروتئین و پیوندهای مربوطه در داخل پروتئین می‌شود (Aghili *et al.*, 2016). با افزایش غلظت نانوذره Fe_3O_4 ، پایداری آنزیم به صورت خطی کاهش یافت. این احتمال نیز هست که نانوذرات با سطح آنزیم ارتباط مطلوبی برقرار کنند و این نشان‌دهنده اختلال در پیوندهای دی سولفید آنزیم و ایجاد اتصال ترجیحی با سطح آنزیم است (Kumar *et al.*, 2012). تغییرات آنروپی کمپلکس، اختلاف آنروپی حالت باز شده و آنروپی مشاهده شده در آزمایش است و با افزایش غلظت نانوذره T_m و پایداری آنزیم کمتر شده و آنزیم بازتر می‌شود، بنابراین آنروپی مشاهده شده در آزمایش بیشتر شده و اختلاف آنروپی با افزایش غلظت نانوذرات کمتر می‌شود (Oobatake & Ooi, 1993).

خاموشی فلورسانس تریپسین توسط نانوذره

Fe_3O_4

طیف‌سنجی فلورسانس ابزاری بسیار قدرتمند و دقیق برای مطالعه برهمکنش‌های لیگاند- پروتئین و تغییرات کنفورماسیونی ناشی از لیگاند در اطراف محل اتصال است. این روش تجزیه و تحلیل سریع و حساس را برای تعیین اتصال ترکیبات شیمیایی مختلف به پروتئین فراهم می‌کند.

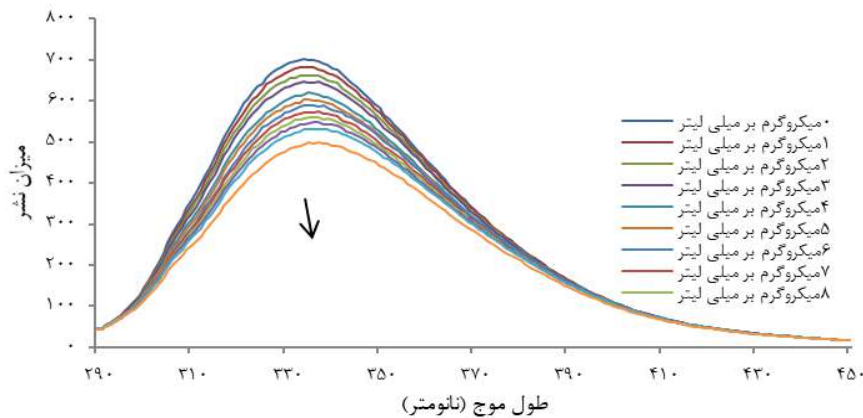
در این معادله، K_{eq} ، T و R به ترتیب ثابت تعادل، دمای مطلق و ثابت گاز هستند. طبق معادله (۲)، میزان K_{eq} با کسر دگرگون سازی ارتباطی دارد که در فرمول جایگزین شده است. نتایج پارامترهای ترمودینامیکی تریپسین در دماهای مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است. با افزایش غلظت نانوذره Fe_3O_4 دمای ذوب تریپسین کاهش می‌یابد. عقیلی و همکاران در مطالعات پیشین گزارش کرده‌اند که نانوذرات آهن دمای ذوب آنزیم لیزوزیم را نیز کاهش داده و گونه‌ای ناپایدارتر نسبت به آنزیم طبیعی ایجاد کرده‌اند (Aghili *et al.*, 2016). ΔS_m° را می‌توان از شیب منحنی دگرگون سازی در نقطه دمای ذوب به دست آورد، و ΔH_m° را می‌توان به کمک معادله $\Delta H_m^\circ = T_m \Delta S_m^\circ$ محاسبه کرد. مقدار ΔH_m° و ΔS_m° تریپسین در حضور نانوذره Fe_3O_4 به صورت خطی با افزایش غلظت لیگاند کاهش یافته که نشان‌دهنده بازتر شدن ساختار آنزیم و تغییر کسر دگرگون شده آن می‌باشد (Bahamin & Shareghi, 2014). از این نتایج، می‌توان فهمید که نانوذره Fe_3O_4 با سطح تریپسین ارتباط متقابل دارند. برهمکنش بین نانوذرات و پروتئین‌ها معمولاً با تغییر در دمای ذوب باعث ایجاد تغییر در ثبات حرارتی پروتئین می‌شوند. این تغییرات می‌تواند به صورت تغییر در کنفورماسیون پروتئین و انعطاف‌پذیری ساختاری نمایان شود. در واقع، اتصال نانوذرات باعث کاهش T_m می‌شود که این کاهش ممکن است به تغییرات

جدول ۱. پارامترهای ترمودینامیکی تریپسین در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره Fe_3O_4 (۷، ۵، ۳، ۱، ۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در دمای ذوب

$m^\circ S \Delta$ $^{-1} Jmol$	ΔH_m° $kJmol^{-1}$	mT کلوین	نانوذره Fe_3O_4 میکروگرم بر میلی‌لیتر
۱۲۵۴/۷±۱۰۲/۱	۳۹۸/۹۹۴±۱۱/۱۰	۳۱۸/۰±۰/۴۵	۰
۱۱۴۷/۴±۱۲۱/۰	۳۶۴/۱۸۴±۱۲/۰۹	۳۱۷/۴±۰/۲۳	۱
۱۰۷۸/۷±۱۰۸/۲	۳۴۱/۶۲۴±۱۰/۸۸	۳۱۶/۷±۰/۵۷	۳
۱۰۰۷/۴±۱۰۳/۸	۳۱۸/۳۵۹±۱۱/۶۷	۳۱۶/۰±۰/۳۹	۵
۹۰۴/۱±۵۴/۵	۲۸۴/۶۱۰±۹/۵۵	۳۱۴/۸±۰/۷۱	۷

معرض حلال است. همچنین مشاهده شد که شدت نشر فلئورسانس با افزودن نانوذره Fe_3O_4 به محلول تریپسین (در طول موج ۳۳۴ نانومتر) کاهش یافته است، در نتیجه نشان می‌دهد که بین نانوذره Fe_3O_4 و تریپسین برهمکنشی رخ داده است. پس از اتصال نانوذره Fe_3O_4 به تریپسین، اسیدهای آمینه آبگریز کمتر در معرض حلال و محیط قرار گرفته‌اند. تغییرات کنفورماسیونی منعکس شده در کاهش شدت فلئورسانس می‌تواند ناشی از تغییر برهمکنش بین نانوذره Fe_3O_4 و کلیه رزیدیوهای تریپسین باشد که به افزایش هیدروفیلیسیتی سطح کمک کرده است (Kaushik & Bhat, 1998). از آنجا که، در محیط آبدوست (در معرض حلال)، بازده کوانتومی آنها کاهش یافته، شدت نشر فلئورسانس نیز کم شده است. در مقابل، در محیط آبگریز (مخفی شده در هسته پروتئین)، تریپتوفان عملکرد کوانتومی بالایی داشت و بنابراین، شدت فلئورسانس بالایی مشاهده شد (Kaushik & Bhat, 1998). حداکثر طول موج نشر فلورسانس تریپسین در تعامل با نانوذره Fe_3O_4 در دمای ۳۰۸ درجه کلون از ۳۳۴ نانومتر به ۳۴۰ نانومتر انتقال یافته است (شکل ۳). تغییر در کنفورماسیون پروتئین، مانند باز شدن، اغلب به تغییرات بزرگی در نشر فلورسانس منجر می‌شود. در پروتئین حاوی رزیدیوهای Trp، هر دو تغییر در طول موج و تغییر در شدت معمولاً هنگام باز شدن ساختار مشاهده می‌شوند (Ghosh, 2008). بنابراین نتایج خاموشی نشر فلورسانس نتیجه طیف CD را تأیید می‌کند. Momeni et al. (2017) در مطالعات پیشین گزارش دادند که نانوذرات TiO_2 ، NiO و MgO شدت نشر فلورسانس تریپسین را کاهش داده‌اند (Momeni et al., 2017; Aghili et al., 2018). (Mahmodian et al., 2016) نیز در مطالعات پیشین خود کاهش شدت نشر فلورسانس لیزوزیم را در حضور نانوذرات آهن گزارش کرده‌اند.

فلئورسانس انتشار فوتون است به دلیل انتقال یک الکترون از یک مدار با انرژی بالاتر به مدار سطح پایین‌تر اتفاق می‌افتد. برخی رزیدیوهای اسید آمینه آنزیم‌ها مانند تیروزین، تریپتوفان و فنیل‌آلانین به طور ذاتی فلئورسانس هستند. هر فرایندی که باعث کاهش شدت فلئورسانس یک پروتئین می‌شود، خاموش شدن فلئورسانس گفته می‌شود. فنیل‌آلانین دارای عملکرد کوانتومی پایینی است و تیروزین اگر نزدیک رزیدیو تریپتوفان، گروه کربونیل، گروه آمینو باشد و یا زمانی که یونیزه می‌شود نشر آن خاموش می‌شود. تریپسین دارای چهار رزیدیو تریپتوفان (Trp_{51} ، Trp_{141} ، Trp_{215} و Trp_{237}) است که همراه با رزیدیو تیروزین نقش عمده‌ای در نشر فلئورسانس تریپسین ایفا می‌کنند (Oobatake & Ooi, 1993). سیستمین مهارکننده قوی نشر فلورسانس تریپتوفان است و تریپتوفان‌های مجاور رزیدیوهای سیستمین به میزان قابل توجهی در انتشار کلی فلورسانس نقشی ندارند، فقط Trp_{51} نقش عمده را در نشر فلورسانس دارد زیرا نسبت به گروه‌های سیستمین نسبتاً دور است (Koutsopoulos et al., 2007). گروه ایندول رزیدیو تریپتوفان مسئول سیگنال فلئورسانس پروتئین‌های حاوی این رزیدیو است (Millan et al., 2016). بنابراین، برای ارزیابی خاموشی فلئورسانس، فلئورسانس ذاتی رزیدیوی تریپتوفان در پروتئین در حضور و عدم حضور نانوذره Fe_3O_4 اندازه‌گیری شد. تغییرات در طیف‌های نشر تریپتوفان مربوط به انتقال کنفورماسیونی پروتئین یا دگرگون‌سازی مستقیم است (Farhadian et al., 2018). شکل ۳ طیف نشر فلورسانس تریپسین را در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره Fe_3O_4 در طول موج انگیزشی ۲۸۰ نانومتر و دماهای ۲۹۸ و ۳۰۸ درجه کلون در بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس (pH ۸) نشان می‌دهد. بیشترین میزان نشر فلئورسانس تریپسین در طول موج ۳۳۴ نانومتر مشاهده شد که نشان می‌دهد Trp اختصاصی تریپسین تاحدی در



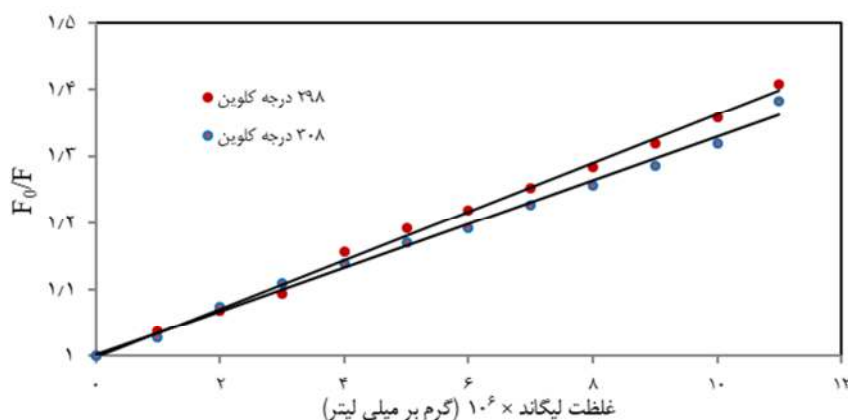
شکل ۳. طیف نشر فلئورسانس تریپسین در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره Fe_3O_4 (صفر تا ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در دمای ۳۰۸ درجه کلونین

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (3)$$

در اینجا F_0 و F شدت فلئورسانس حالت پایدار تریپسین در غیاب و حضور نانوذره Fe_3O_4 هستند، τ_0 میانگین نیمه‌عمر تریپسین در غیاب خاموش‌کننده (10^{-8} ثانیه)، k_q ثابت خاموشی بیومولکولی، K_{SV} ثابت خاموشی استرن-ولمر و $[Q]$ غلظت نانوذره Fe_3O_4 است (Rajabi *et al.*, 2019). شکل ۴ نشان داد که نمودار کسر F_0/F در برابر $[Q]$ در محدوده نسبی غلظت خطی است؛ در نتیجه نشانگر یک نوع مکانیسم خاموشی دینامیک یا استاتیک است. با استفاده از رگرسیون خطی نمودار کسر F_0/F در برابر غلظت نانوذره Fe_3O_4 ، مقادیر K_{SV} برای کمپلکس نانوذره Fe_3O_4 -تریپسین در دو درجه دما ۲۹۸ و ۳۰۸ درجه سانتی‌گراد محاسبه و نتایج در جدول ۲ درج شد. اطلاعات به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که نانوذره Fe_3O_4 می‌تواند به تریپسین متصل شده و کمپلکس تریپسین-نانوذره Fe_3O_4 را تشکیل دهد. نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که مقادیر ثابت خاموشی (K_{SV}) و مقادیر ثابت خاموشی بیومولکولی (k_q)، با دما رابطه عکس دارند و مقادیر k_q بزرگ‌تر از $M^{-1}s^{-1}$ (2×10^{10} ماکزیمم ثابت خاموشی دینامیک) هستند. بنابراین، کاهش قابل توجه میزان نشر فلئورسانس تریپسین توسط نانوذره Fe_3O_4 نشان‌دهنده مکانیسم خاموشی استاتیک است.

تجزیه و تحلیل ویژگی‌های اتصال

انواع فعل و انفعالات مولکولی می‌تواند بازده کوانتومی فلوروفور را خاموش کند. این فعل و انفعالات شامل واکنش‌های حالت برانگیخته، آرایش مجدد مولکولی، انتقال انرژی، تشکیل کمپلکس حالت پایه (خاموشی استاتیک) و خاموشی برخورد (خاموشی دینامیک) است (Lakowicz, 2013). فرایندهای خاموشی فلئورسانس معمولاً توسط دو مکانیسم توضیح داده می‌شوند؛ نوع دینامیک و یا استاتیک. هنگامی که مکانیسم خاموشی استاتیک غالب است، در برهمکنش میان فلوروفور و خاموش‌کننده در حالت پایه، گونه‌ای جدید و فاقد لومینسانس تشکیل می‌شود. در مکانیسم خاموشی استاتیک با افزایش دما مقدار ثابت استرن ولمر (K_{SV}) کاهش یافته و در نتیجه پایداری این کمپلکس در دماهای بالاتر کاهش می‌یابد و برعکس، در مکانیسم خاموشی دینامیک بین خاموش‌کننده و حالت برانگیخته فلوروفور، از طریق برخوردهای پخش شده در نیمه‌عمر حالت برانگیخته فلوروفور برهمکنش رخ می‌دهد با افزایش دما مقدار ثابت استرن ولمر (K_{SV}) افزایش می‌یابد (Zhang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015; Saaidifar *et al.*, 2011). رفتار اتصالی نانوذره و تریپسین به‌وسیله داده‌های خاموشی فلئورسانس به‌دست‌آمده در آزمایش‌های فوق و معادله استرن-ولمر ارزیابی شده است (Lakowicz 2013):



شکل ۴. نمودار استرن ولمر خاموشی تریپسین در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره Fe_3O_4 (۰، ۱، ۳، ۵، ۷، میکروگرم بر میلی‌لیتر) در دو دمای ۲۹۸ و ۳۰۸ درجه کلون

جدول ۲. ثابت‌های خاموشی و پارامترهای ترمودینامیکی تریپسین حضور غلظت‌های مختلف نانوذره Fe_3O_4 (۰، ۱، ۳، ۵، ۷، میکروگرم بر میلی‌لیتر)

$^{\circ}\Delta G$ (kJ mol^{-1})	ΔS° ($\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$)	ΔH° (kJ mol^{-1})	n	K_a (M^{-1})	k_q ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	K_{sv} (M^{-1})	دما (کلون)
-۸/۲۲۵	۵/۳۲	-۶/۶۳۸	۱/۰۰۱	۰/۰۳۶	$۳/۶۳ \times ۱۰^{-۱۰}$	$۳/۶۳ \times ۱۰^{-۲}$	۲۹۸
-۸/۷۳۲	۶/۷۹	-۶/۶۳۸	۱/۰۱۲	۰/۰۳۳	$۳/۲۶ \times ۱۰^{-۱۰}$	$۳/۲۶ \times ۱۰^{-۲}$	۳۰۸

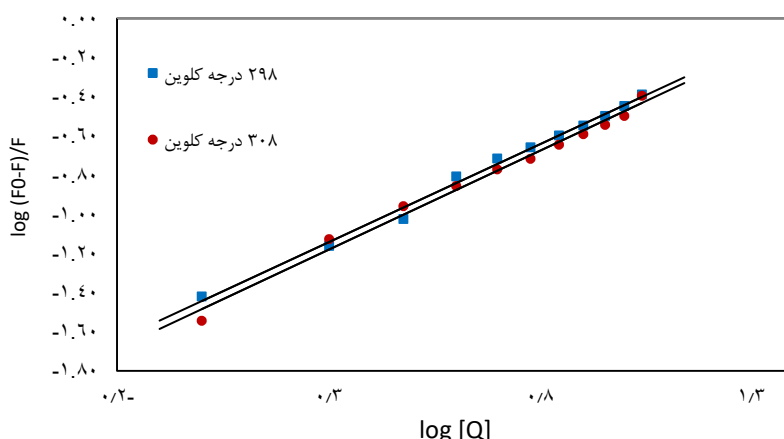
کمپلکس حالت پایه‌ای است که پایداری آن نیز با افزایش دما کاهش می‌یابد (Lakowicz, 2013). مطالعه‌ای دیگر مشاهده کردند که نانوذرات ZnS در فلورسانس آلومین سرم انسانی را با مکانیسم خاموشی استاتیک کاهش داده‌اند. Aghili *et al.* (2016) گزارش کرده‌اند که نانوذرات آهن توانسته‌اند فلورسانس آنزیم لیزوزیم را نیز کاهش دهند. آنها معتقدند تمام گونه‌های نانوذرات آهن با استفاده از پیوندهای هیدروژنی به انواع مختلف پروتئین‌ها متصل می‌شوند.

تجزیه و تحلیل پارامترهای ترمودینامیکی نیروهای بین مولکولی که بین بیومولکول و سوبستراهای مولکولی کوچک عمل می‌کنند شامل برهمکنش‌های الکترواستاتیک، پیوندهای هیدروژن، نیروهای آبگریز، برهمکنش‌های واندروالسی و غیره می‌باشند (Hu *et al.*, 2005).

تجزیه و تحلیل اتصال و خصوصیات ترمودینامیکی آن ثابت اتصال (K_a) و تعداد جایگاه اتصال (n) را می‌توان از رابطه اصلاح‌شده استرن-ولمر (معادله ۴) به دست آورد (Lakowicz, 2013):

$$\log\left[\frac{F_0-F}{F}\right] = \log K_a + n \log [Q] \quad (4)$$

شکل ۵ نشان داد که نمودارهای استرن-ولمر اصلاح شده $[(F_0-F)/F]$ در برابر $\log [Q]$ در دو دما خطی بودند. مقادیر K_a و n در جدول ذکر شده است. مقادیر n معادل تعداد جایگاه‌های اتصال است و مقدار آن تقریباً برابر یک بود که نشان می‌دهد حدوداً یک جایگاه اتصال‌دهنده در تریپسین برای نانوذره Fe_3O_4 وجود دارد. مشخص شد مقادیر K_a رابطه معکوس با دما دارند و مطابق با روند Ksv که در بالا گفته شد با افزایش دما کاهش یافته است. بنابراین، نتیجه ثابت کرد در واکنش اتصال، کمپلکس ناپایداری ایجاد شده و این کمپلکس با افزایش دما تضعیف و جدا می‌شود. مکانیسم خاموشی استاتیک ناشی از ایجاد



شکل ۵. نمودار $\log (F_0-F)/F$ در برابر $\log [Q]$ تریپسین در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره Fe_3O_4 (۰، ۱، ۳، ۵، ۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر)

کمی منفی ΔH° نشان می‌دهد که برهمکنش‌های الکتروستاتیک، واندروالسی و پیوندهای هیدروژنی نیروهای اصلی اتصال دهنده بین تریپسین و نانوذره Fe_3O_4 بودند. Momeni *et al.* (2017) و Wang *et al.* (2011) در مطالعات پیشین خود به‌طور جداگانه گزارش کردند که نانوذرات TiO_2 از طریق برهمکنش‌های الکتروستاتیک همراه با برهمکنش‌های واندروالسی و پیوندهای هیدروژنی در فرایند اتصال تریپسین و نانوذرات درگیر بودند.

طیف سی دی

طیف‌سنجی دو رنگی دورانی (CD) ابزار مناسبی برای تشخیص تغییر ساختاری پروتئین هنگام تعامل با لیگاندها است. تجزیه و تحلیل طیف CD-UV دور (۲۶۰-۲۰۰ نانومتر) برای کشف تغییرات ساختارهای دوم پروتئین استفاده می‌شود. طیف CD-UV دور جذب نوری پیوند پپتیدی و ساختار دوم پپتید را مشخص می‌کند (Momeni *et al.*, 2016). شکل ۶ طیف‌های CD-UV دور کمپلکس‌های تریپسین-نانوذره Fe_3O_4 را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل مشخص است، حداقل گلوبال در حدود ۲۰۸ نانومتر که به مارپیچ آلفا در ساختار مولکولی تریپسین مربوط است با افزودن نانوذره Fe_3O_4 تغییر یافت

با توجه به وابستگی ثابت اتصال به دما، یک فرایند ترمودینامیکی به‌عنوان مسئول تشکیل کمپلکس در نظر گرفته شد. به منظور توصیف بیشتر برهمکنش بین نانوذرات Fe_3O_4 و تریپسین، برخی از پارامترهای ترمودینامیکی وابسته به دما مانند تغییر آنتالپی، ΔH° ، تغییر آنتروپی، ΔS° و تغییر انرژی آزاد، ΔG° ، را می‌توان با معادله وانت هوف ارزیابی کرد (Li *et al.*, 2013):

$$\ln K_a = \frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (5)$$

در اینجا K_a ثابت اتصال لینور-برک و R ثابت گاز است. پارامترهای ترمودینامیکی در جدول ۲ ذکر شده‌اند. مقادیر منفی ΔG° نشان داد که فرایند برهمکنش به‌صورت خودبه‌خودی اتفاق افتاده و علامت منفی ΔH° و علامت مثبت ΔS° نشان می‌دهد که فرایند اتصال واکنش گرمایی است. طبق دیدگاه رز و ساپرامانیان، اگر ΔH° و ΔS° مثبت باشد، برهمکنش‌های آگریز نیروی اصلی اتصال دهنده هستند.

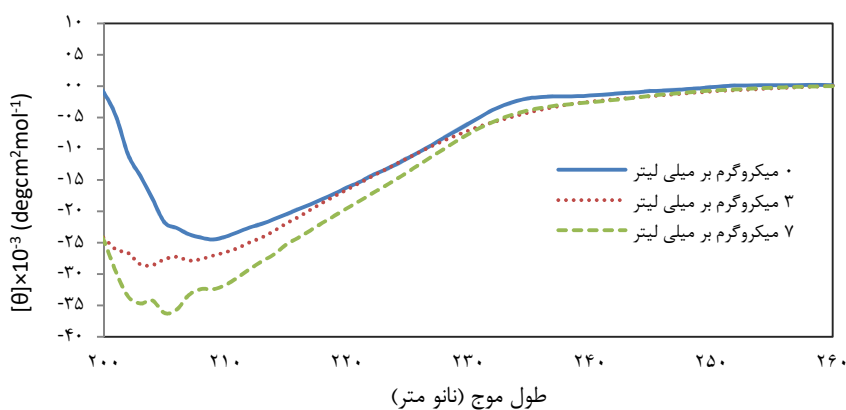
اگر ΔH° و ΔS° هر دو منفی باشد، برهمکنش‌های واندروالسی و پیوندهای هیدروژنی نقش اصلی را در واکنش اتصالی دارند و اگر ΔH° منفی و نزدیک صفر و ΔS° مثبت باشد، برهمکنش‌های الکتروستاتیک پیونددهنده‌های اصلی هستند (Ross & Subramanian, 1981). مقادیر مثبت ΔS° و مقادیر

صفحات بتا وجود دارد. یکی از این صفحات، رزیدیوی سرین کاتالیتیک را به‌طور صحیح در جایگاه فعال قرار داده است در حالیکه صفحه دوم بخشی از شکاف شناسایی سوپسترا را تشکیل می‌دهد (Prasad & Roy, 2010). می‌توان استنباط کرد که صفحات بتاتریپسین به‌طور مستقیم به نانوذرات Fe_3O_4 متصل می‌شود و استحکام این صفحات را تغییر می‌دهد که منجر به تغییر فعالیت تریپسین می‌شود.

فعالیت تریپسین

افزایش دما به‌طور کلی سرعت واکنش را افزایش می‌دهد و کاهش دما سرعت واکنش را کاهش می‌دهد. با این‌حال، درجه حرارت بسیار بالا یا پایین می‌تواند ساختار و فعالیت یک آنزیم را از بین ببرد. حلال‌ها می‌توانند آنزیم‌ها یا ساختار پروتئین‌ها را تثبیت یا بی‌ثبات کنند و بر فعالیت آن تأثیر بگذارند. فعالیت و حداکثر سرعت فعالیت تریپسین با افزایش غلظت نانوذره Fe_3O_4 به‌طور متناسب افزایش یافته است (شکل ۷).

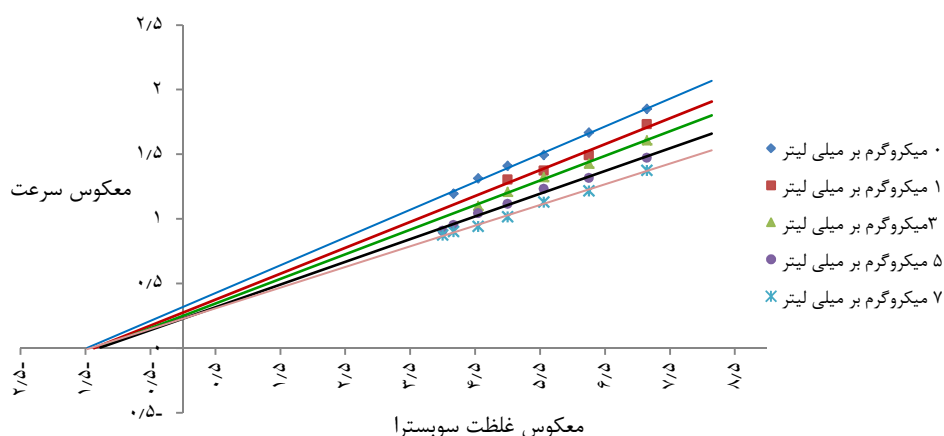
(Kotormán *et al.*, 2003). بنابراین، تغییرات اندکی در ساختار دوم تریپسین رخ داده است. با افزودن نانوذره Fe_3O_4 درصد ماریچج آلفا افزایش (از ۵/۳۴٪ به ۵/۹۵٪) و صفحات بتا اندکی کاهش (از ۴۰/۸۹٪ به ۳۸/۹۴٪) یافت (جدول ۳). این پدیده مشابه مطالعات قبلی مشاهده شده است. Xu *et al.* (2010) نشان دادند که میزان صفحات بتا در ساختمان DNase II در هنگام جذب نانوذرات SiO_2 کاهش و میزان ساختار ماریچج آلفا افزایش یافته‌اند. Wang *et al.* (2011) نیز نتایج مشابهی در برهمکنش نانوذرات TiO_2 با تریپسین مشاهده کردند. Aghili *et al.* (2016) تغییری در ساختار ثانویه لیزوزیم در حضور نانوذرات آهن مشاهده نکردند. نانوذرات سطح تماس بیشتری برای پروتئین‌های جذب‌شده فراهم می‌کنند که منجر به اثر متقابل بین پروتئین‌ها و نانوذرات می‌شود. درجه بیشتر برهمکنش، منجر به آشفستگی بیشتر در ساختار پروتئین می‌شود (Fei & Perrett, 2009). در بین دو دومین تریپسین، پیوندهای هیدروژنی فراوانی بین شبکه‌های



شکل ۶. طیف Far-UV CD تریپسین در حضور نانوذره Fe_3O_4

جدول ۳. درصد عناصر ساختار دوم تریپسین در حضور نانوذره Fe_3O_4

ساختار	۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر
ماریچج آلفا	۵/۳۴٪	۵/۴۳٪	۵/۹۵٪
صفحات بتا	۴۰/۸۹٪	۴۰/۸۴٪	۳۸/۹۴٪
ترن بتا	۱۹/۶۷٪	۲۰/۰۰٪	۲۰/۶۸٪
رندوم کویل	۳۴/۱۰٪	۳۴/۰۸٪	۳۴/۳۴٪



شکل ۷. فعالیت تریپسین در حضور نانوذره Fe_3O_4 (صفر، ۱، ۳، ۵، ۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر)

استفاده از تریپسین گاوی به‌عنوان مدل پروتئینی، اثر تحریکی و اتصال نانوذرات Fe_3O_4 بر تریپسین مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش از تکنیک‌های اسپکتروسکوپی شامل طیف جذب UV-Vis، پایداری حرارتی، طیف نشر فلورسانس، CD و سینتیک استفاده شد. تحقیقات ما نشان داد که نانوذره Fe_3O_4 فعالیت سینتیکی تریپسین را تا حدودی افزایش می‌دهد. نتایج ترمودینامیک مطالعات پایداری گرمایی آنزیم تریپسین در حضور نانوذرات Fe_3O_4 حاکی از آن است که تریپسین به سطح نانوذره جذب شده و منجر به کاهش پایداری حرارتی آن می‌شود. ΔS°_m و ΔH°_m نیز به همین صورت تغییر پیدا می‌کنند. آزمایشات مختلف نشان داده‌اند که وقتی آنزیم بر روی سطح نانوذره مغناطیسی Fe_3O_4 جذب می‌شود، محتوای ساختار دوم آن تغییر می‌یابد بنابراین طبق نتایج طیف CD، محتوی صفحات بتا تریپسین با افزودن نانوذرات کاهش و محتوی مارپیچ آلفا افزایش می‌یابد. در طیف‌سنجی فلورسانس مشاهده می‌شود که نانوذره Fe_3O_4 شدت فلورسانس تریپسین را کاهش می‌دهد که این امر نشان می‌دهد یا محیط اطراف تریپتوفان، قطبی می‌شود و یا تریپتوفان به یک گروه باردار نزدیک می‌گردد. نتایج حاصل از مطالعات ترمودینامیکی نیز نشان می‌دهد یک جایگاه اتصال در اطراف رزیدیوی تریپتوفان در تریپسین برای نانوذره

این افزایش در فعالیت تریپسین به دلیل تغییر در ترکیب آنزیم بود. ساختار پروتئین ممکن است در حضور نانوذره Fe_3O_4 بازتر شود و مرکز فعالیت کاتالیزوری بیشتر در معرض بستر و حلال است (Rajabi *et al.*, 2019). (Bayramoglu *et al.*, 2014) در مطالعات پیشین مشاهده کردند که نانوذرات Fe_3O_4 سرعت ماکزیمم فعالیت آنزیم پروتئیناز K از خانواده سرین پروتئاز را کاهش می‌دهد و به‌عنوان مهارکننده غیرقابل رقابت از این نانوذره نام برده‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه از نانوذرات در زمینه‌های گوناگون استفاده می‌شود که این امر می‌تواند بر دستگاه گوارش تأثیر بگذارد. بنابراین، ارزیابی دقیق تأثیر نانوذرات مسأله مهمی است. اخیراً از نانوذرات مغناطیسی استفاده‌های زیادی می‌شود برای مثال در تصویربرداری رزونانس مغناطیسی، افزایش دما برای درمان تومور، رساندن دارو و غیره کاربرد زیادی دارند. همچنین مشخص شده است که بعضی از نانوذرات مغناطیسی مانند نانوذره Fe_3O_4 ، از تشکیل تجمعات آمیلوئیدی جلوگیری می‌کنند و یا تجمعات تشکیل شده آمیلوئیدی را از بین می‌برند و از این طریق در درمان بیماری آلزایمر مؤثر می‌باشند (Bellova *et al.*, 2010). با

محیط‌های تریپتوفان بخاطر تشکیل حالت پایه بین تریپسین و نانوذرات Fe_3O_4 می‌باشد. می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات تأثیر عمده‌ای بر ساختار تریپسین نشان می‌دهند. از این‌رو، برای استفاده پزشکی از نانوذرات Fe_3O_4 ممکن است نیاز باشد که قبل از گسترش کاربرد آنها در سیستم‌های سلولی و بین سلولی، سمیت آنها بیشتر سنجیده شود. در سال‌های اخیر نانوذرات برای سنتز و آنالیزهای بیوالکتروکاتالیتیکی و الکتروشیمیایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در میان آنها نانوذرات Fe_3O_4 بیشترین استفاده را در میان مواد مغناطیسی دارد چون سازگاری بالا، خصوصیات فوق پارامغناطیسی قوی، مسمومیت پایین و آماده‌سازی آسانی دارد. این نانوذرات برهمکنش‌های الکتروستاتیک و هیدروفوبیک در این ساختارها دارند که ممکن است منجر به تغییرات بیشتر گردد (Zhang *et al.*, 2006). فرایند غیرمتحرک شدن تریپسین توسط نانوکمپوزیت و Fe_3O_4 سبب می‌شود که تریپسین ثابت‌شده روی الکتروود خصوصیات انتقال الکترونی مستقیم، پایداری حرارتی پایین‌تر و بهبود واکنش کاتالیزوری را نشان دهد (Wu & Narsimhan, 2008).

سپاسگزاری

از تمامی عزیزانی که در انجام این مطالعات با ما همکاری کرده‌اند، همچنین از دانشگاه پیام نور مرکز شهرکرد و آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه شهرکرد محل انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Aghili, Z.; Taheri, S.; Zeinabad, H. A.; Pishkar, L., Saboury, A.A.; Rahimi, A.; & Falahati, M. (2016). Investigating the interaction of Fe nanoparticles with lysozyme by biophysical and molecular docking studies. *PloSone*; 11: (10).
Bahamin, N.; & Shareghi, B. (2014). The Effect of Cadmium Sulfate on the

وجود دارد. مقادیر ΔG° منفی، مقادیر ΔH° منفی و مقادیر ΔS° مثبت بود، از این‌رو، نیروهای برهمکنش الکتروستاتیک نیروی غالب در این فرایند اتصال است. چون میزان ΔH° کمی منفی است برهمکنش‌های واندروالسی و پیوندهای هیدروژنی نیز ساختار دوم تریپسین را تغییر داد. تغییر فعالیت تریپسین در اثر تغییر در کنفورماسیون آنزیم ایجاد شده و تغییر ساختار توسط نیروی الکتروستاتیک همراه با پیوندهای هیدروژنی و واندروالسی ایجاد شده است. در طیف جذب اسپکتروسکوپی، تأثیر نانوذره Fe_3O_4 بر جذب تریپسین در طول موج ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهند که وقتی غلظت نانوذره Fe_3O_4 زیاد می‌شود، میزان جذب تریپسین در طول موج ۲۸۰ نانومتر افزایش می‌یابد. چنانچه قبلاً گفته شد، در pH ۸ آنزیم تریپسین بار مثبت دارد چون pH ایزوالکتریک آن ۶/۵ است؛ بنابراین تریپسین از طریق پیوند الکتروستاتیک به نانوذره Fe_3O_4 متصل شده و در نتیجه باعث می‌شود که میزان جذب این آنزیم در طول موج ۲۸۰ نانومتر زیاد شود (Liu *et al.*, 2010). بر اساس نتایج تحقیق استنباط می‌کنیم که نانوذرات Fe_3O_4 با تریپسین برهمکنش می‌دهند و برهمکنش‌های الکترواستاتیک نیروهای بین مولکولی غالب برای پایداری ساختار این کمپلکس حالت پایه هستند. تغییر پیک جذب ۲۸۰ نانومتر نشان‌دهنده تغییرات فضایی ساختار آنزیم می‌باشد و همچنین ثابت‌کننده این امر است که این اتصال سبب کاهش هیدروفوبیسیته ریز

Thermal Stability and Kinetics of Peroxidase at Different Temperatures. *eab.journals.pnu.ac.ir*; 2 (6): 7-16.
Bayramoglu, G., Ozalp, V.C., & Arica, M.Y. (2014). Magnetic polymeric beads functionalized with different mixed-mode ligands for reversible immobilization of trypsin. *Industrial &*

- Engineering Chemistry Research; 53(1): 132-140.
- Bellova, A., Bystrenova, E.; Koneracka, M.; Kopcansky, P.; Valle, F.; Tomasovicova, N.; Timko, M.; Bagelova, J.; Biscarini, F.; & Gazovaet, Z. (2010). Effect of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles on lysozyme amyloid aggregation. *Nanotechnology*; 21(6): 065103.
- Brena, B.; González-Pombo, P.; & Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of enzymes: a literature survey. *Immobilization of enzymes and cells*, Springer: 15-31.
- Chanphai, P.; Thomas, T.; & Tajmir-Riahi, H. (2016). Conjugation of biogenic and synthetic polyamines with trypsin and trypsin inhibitor. *RSC Advances*; 6 (59): 53690-53697.
- Chi, Z.; Liu, R.; & Zhang, H. (2010). Noncovalent interaction of oxytetracycline with the enzyme trypsin. *Biomacromolecules*; 11(9): 2454-2459.
- Farhadian, S.; Shareghi, B.; Momeni, L.; Abou-Zied, O.K.; Sirotkin, V.A.; Tachiya, M.; & Saboury, A.A. (2018). Insights into the molecular interaction between sucrose and α -chymotrypsin. *International Journal of Biological Macromolecules*; 114: 950-960.
- Fei, L.; & Perrett, S. (2009). Effect of nanoparticles on protein folding and fibrillogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*; 10(2): 646-655.
- Ghosh, S. (2008). Interaction of trypsin with sodium dodecyl sulfate in aqueous medium: a conformational view. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*; 66 (2): 178-186.
- Hemmateenejad, B.; & Yousefinejad, S. (2013). Interaction study of human serum albumin and ZnS nanoparticles using fluorescence spectrometry. *Journal of Molecular Structure*; 1037: 317-322.
- Hu, Y.-J.; Liu, Y.; Zhang, L.-X.; Zhao, R.-M. & Qu, S.-S. (2005). Studies of interaction between colchicine and bovine serum albumin by fluorescence quenching method. *Journal of Molecular Structure*; 750(1-3): 174-178.
- Kaushik, J.K.; & Bhat, R. (1998). Thermal stability of proteins in aqueous polyol solutions: role of the surface tension of water in the stabilizing effect of polyols. *The Journal of Physical Chemistry B*; 102(36): 7058-7066.
- Kim, J.; Grate, J.W.; & Wang, P. (2006). Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science*; 61(3): 1017-1026.
- Kotormán, M.; Laczkó, I.; Szabó, A.; & Simon, L. (2003). Effects of Ca²⁺ on catalytic activity and conformation of trypsin and α -chymotrypsin in aqueous ethanol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 304(1): 18-21.
- Koutsopoulos, S.; Patzsch, K.; Bosker, W.T.; & Norde, W. (2007). Adsorption of trypsin on hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Langmuir*; 23 (4): 2000-2006.
- Kumar, A.; Attri, P.; & Venkatesu, P. (2012). Effect of polyols on the native structure of α -chymotrypsin: A comparable study. *Thermochimica Acta*; 536: 55-62.
- Lakowicz, J.R. (2013). *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer Science & Business Media.
- Li, H.; Pu, J.; Wang, Y.; Liu, C.; Yu, J.; Li, T. & Wang, R. (2013). Comparative study of the binding of Trypsin with bifendate and analogs by spectrofluorimetry. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*; 115: 1-11.
- Liu, F.-F.; Ji, L.; Zhang, L.; Dong, X.Y.; & Su, Y. (2010). Molecular basis for polyol-induced protein stability revealed by molecular dynamics simulations. *The Journal of Chemical Physics*; 132(22): 06B605.
- Liu, Y.; & Liu, R. (2012). The interaction of α -chymotrypsin with one persistent organic pollutant (dicofol): Spectroscopy and molecular modeling identification. *Food and Chemical Toxicology*; 50(9): 3298-3305.

- Lu, D.; Zhao, X.; Zhao, Y.; Zhang, B.; Zhang, B.; Geng, M.; & Liu, R. (2011). Binding of Sudan II and Sudan IV to bovine serum albumin: comparison studies. *Food and Chemical Toxicology*; 49 (12): 3158-3164.
- Mahdavian, A.R.; & Mirrahimi, M.A.-S. (2010). Efficient separation of heavy metal cations by anchoring polyacrylic acid on superparamagnetic magnetite nanoparticles through surface modification. *Chemical Engineering Journal*; 159(1-3): 264-271.
- Mahmodian, S.; Momeni, L. & Shareghi, B. (2018). Investigating the MgO nanoparticles and trypsin interaction through spectroscopic methods. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*; 149(11): 2131-2136.
- Mahmoudi, M.; Shokrgozar, M.A., Sardari, S.; Moghadam, M.K.; Vali, H.; Laurent, S.; & Stroeve, P. (2011). Irreversible changes in protein conformation due to interaction with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Nanoscale*; 3(3): 1127-1138.
- Millan, S.; Satish, L.; Kesh, S.; Chaudhary, Y.S.; & Sahoo, H. (2016). Interaction of Lysozyme with Rhodamine B: A combined analysis of spectroscopic & molecular docking. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*; 162: 248-257.
- Momeni, L.; Shareghi, B.; Farhadian, S.; Vaziri, S.; Saboury, A.A.; & Raisi, F. (2018). A molecular simulation and spectroscopic approach to the binding affinity between trypsin and 2-propanol and protein conformation. *International Journal of Biological Macromolecules*; 119: 477-485.
- Momeni, L.; Shareghi, B.; Saboury, A.; & Evini, M. (2017). Interaction of TiO₂ nanoparticle with trypsin analyzed by kinetic and spectroscopic methods. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*; 148 (2): 199-207.
- Momeni, L.; Shareghi, B.; & Saboury, A.A. (2017). Spectroscopic analysis of the interaction between NiO nanoparticles and bovine trypsin. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*; 35(6): 1381-1388.
- Momeni, L.; Shareghi, B.; Saboury, A.A.; & Farhadian, S. (2016). Comparative studies on the interaction of spermidine with bovine trypsin by multispectroscopic and docking methods. *the Journal of Physical Chemistry B*; 120(36): 9632-9641.
- Momeni, L.; Shareghi, B.; Saboury, A.A.; Farhadian, S.; & Reisi, F. (2017). A spectroscopic and thermal stability study on the interaction between putrescine and bovine trypsin. *International Journal of Biological Macromolecules*; 94: 145-153.
- Murphy, K.P. (2001). Protein structure, stability, and folding, Springer Science & Business Media.
- Oobatake, M.; & Ooi, T. (1993). Hydration and heat stability effects on protein unfolding. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*; 59(3): 237-284.
- Panyam, J.; & Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 55(3): 329-347.
- Powers, K.W.; Brown, S.C.; Krishna, V.B.; Wasdo, S.C.; Moudgil, B.M.; & Roberts, S.M. (2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicological Sciences*; 90(2): 296-303.
- Prasad, S.; & Roy, I. (2010). Effect of disaccharides on the stabilization of bovine trypsin against detergent and autolysis. *Biotechnology Progress*; 26(3): 627-635.
- Rajabi, M.; Shareghi, B.; Farhadian, S.; & Momeni, L. (2019). Evaluation of maltose on conformation and activity parameters of trypsin. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*; 1-6.
- Rawlings, N.D.; & Salvesen, G. (2013). Handbook of proteolytic enzymes, Academic press Amsterdam.

- Ross, P.D.; & Subramanian, S. (1981). Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*; 20(11): 3096-3102.
- Saeidifar, M.; Mansouri-Torshizi, H.; & Saboury, A.A. (2015). Biophysical study on the interaction between two palladium (II) complexes and human serum albumin by Multispectroscopic methods. *Journal of Luminescence*; 167: 391-398.
- Schmid, F.X. (2001) Biological macromolecules: UV-visible spectrophotometry. e LS.
- Shami, E.; Rothstein, A.; & Ramjeesingh, M. (1989). Stabilization of biologically active proteins. *Trends in Biotechnology*; 7 (7): 186-190.
- Shareghi, B.; Farhadian, S.; Zamani, N.; Salavati-Niasari, M.; & Gholamrezaei, S. (2016). Stability and enzyme activity of lysozyme in the presence of Fe₃O₄ nanoparticles. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*; 147(2): 465-471.
- Shaw, A.; & Bott, R. (1996). Engineering enzymes for stability. *Current Opinion in Structural Biology*; 6(4): 546-550.
- Wang, G.; Chen, Y.; Yan, C.; & Lu, Y. (2015). Study on the interaction between gold nanoparticles and papain by spectroscopic methods. *Journal of Luminescence*; 157: 229-234.
- Wang, W.-R.; Zhu, R.-R.; Xiao, R.; Liu, H.; & Wang, S.-L. (2011). The electrostatic interactions between nano-TiO₂ and trypsin inhibit the enzyme activity and change the secondary structure of trypsin. *Biological Trace Element Research*; 142 (3): 435-446.
- Wang, Y.-Q.; & Zhang, H.-M. (2014). Effects of bisphenol S on the structures and activities of trypsin and pepsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 62(46): 11303-11311.
- Wu, X.; & Narsimhan, G. (2008). Effect of surface concentration on secondary and tertiary conformational changes of lysozyme adsorbed on silica nanoparticles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*; 1784 (11): 1694-1701.
- Xu, Z.; Wang, S.-L.; & Gao, H.-W. (2010). Effects of nano-sized silicon dioxide on the structures and activities of three functional proteins. *Journal of Hazardous Materials*; 180(1-3): 375-383.
- Zhang, H.-M.; Wang, Y.-Q.; & Jiang, M.-L. (2009). A fluorimetric study of the interaction of CI Solvent Red 24 with haemoglobin. *Dyes and Pigments*; 82(2): 156-163.
- Zhang, R., Song, M.; Li, X.; Guan, Zh.; & Wang, X. (2006). In situ electrochemical contact angle study of hemoglobin and hemoglobin-Fe₃O₄ nanocomposites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 386(7-8): 2075-2079.