

مطالعه میانکنش نانوذره اکسید مس با آلبومین سرم انسانی با استفاده از تکنیک فلورسانس

علی ریاحی مدوار^{۱*} و علیرضا قاسمی نسب^۲^۱ کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی.^۲ کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲۱

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۳۱

چکیده

در این مطالعه، برهمکنش بین آلبومین سرم انسانی (HSA) با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید مس (CuO) با استفاده از روش طیف سنجی فلورسانس در شرایط شبه فیزیولوژیک بررسی گردید. نتایج نشان داد که در حضور این نانوذره، نشر فلورسانس ذاتی پروتئین کاهش می‌یابد که با غلظت نانوذره در محیط هماهنگ است. بر اساس نتایج مربوط به ثابت سرعت خاموشی (K_q) چنین استنباط می‌شود که مکانیسم برهمکنش از نوع پایا (Static) است. پارامترهای ترمودینامیکی شامل آنتالپی (ΔH°) و آنتروپی (ΔS°) میانکنش بین نانوذره با HSA به ترتیب $-18/06$ (KJ mol^{-1}) و $0/0195$ ($\text{KJ mol}^{-1} \text{ K}$) محاسبه گردید که نشان دهنده نقش مهم میانکنش‌های الکتروستاتیک در این اتصال می‌باشد. در این میانکنش، علامت منفی مربوط به تغییرات انرژی آزاد (ΔG°) بیانگر انرژی‌زا بودن واکنش و تمایل این ذره به اتصال با HSA می‌باشد. همچنین افزایش نشر فلورسانس ANS در حضور نانوذره بیانگر افزایش هیدروفوبیسیته سطحی پروتئین می‌باشد. بر اساس نتایج به دست آمده چنین استنباط می‌شود که ساختار HSA در حضور این نانوذره دچار تغییر شده که می‌تواند بر عملکرد آن نیز تأثیر گذارد.

واژه‌های کلیدی: آلبومین سرم انسانی، خاموشی، فلورسانس، نانوذره اکسید مس.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۴۳۳۷۷۶۶۱۱، پست الکترونیکی: riahi.ali@gmail.com

مقدمه

همچنین، پتانسیل ایجاد خطر توسط نانوذرات برای سلامتی انسان، به دلیل سمیتی که بر سلول‌های ریه (۳۴) و سلول‌های قرمز خون (۲۸) نشان دادند، را دارا می‌باشند.

نانوذرات فلزی با سطح ویژه بالا و واکنش‌پذیری سطحی بالا، نه تنها می‌تواند به تنهایی توسط تماس فیزیکی معمولی جذب شوند بلکه می‌تواند با پروتئین‌های زیستی میانکنش دهند و توسط سلول‌ها جذب گردند (۳۲). درک بهتر رابطه متقابل نانوذرات و سلول‌های زنده می‌تواند منجر به پیشرفت در درک دریافتها، تواناییهای تشخیصی و درمانی جدید از قبیل دارورسانی هدفمند، ژن درمانی و تشخیص سلاح‌های بیولوژیک شود (۲۴). سریم اکسید در مقیاس نانو می‌تواند با سرم آلبومین گاوی واکنش دهد و

علم نانوتکنولوژی به ساختار و عملکرد مواد و ترکیباتی می‌پردازد که حداقل یکی از ابعاد عملکردی آنها بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر باشد (۴). استفاده از نانوذرات به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد آنها، که خود ناشی از اندازه و ابعاد آنهاست، به طور روز افزون در حال افزایش است (۲۶). تاکنون سمیت نانوذرات برای رده‌های سلولی پستانداران (۷)، خرچنگها (۵)، ماهیها (۱۴)، گیاهان (۲۰) و موشها (۳۸) گزارش شده است. مطالعات مختلف حاکی از اثرات مضر و زیانبار ترکیبات نانویی مختلف همچون نانولوله‌های کربنی و اکسید تیتانیوم بر روی سلول‌های جانوری در محیط آزمایشگاه و همچنین بر اندام‌های مختلف بدن جانوران از قبیل ریه می‌باشد (۱۰ و ۲۰).

مختلف درگیرند. به عنوان مثال، Roy و Das (۲۹) نشان دادند که میانکشی بین نانوذرات نقره با سرم آلبومین گاوی از طریق مکانیسم پویا با استفاده از میانکشیهای هیدروفوب و الکتروستاتیک انجام می‌شود. در مطالعات انجام شده توسط Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۵ مشخص گردید که میانکشی نانوذرات Fe_2O_3 با پروتئین فیبرینوزن اساساً از طریق پیوند هیدروژنی صورت می‌گیرد (۳۷). همچنین مطالعات انجام شده توسط Bhogale و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داد که میانکشی بین نانوذرات مس (با اندازه حدود ۷/۵ نانومتر) با سرم آلبومین گاوی از طریق مکانیسم پایا و با استفاده از میانکشیهای هیدروفوب صورت می‌گیرد (۶).

در این مطالعه، میانکشی آلبومین سرم انسانی با غلظتهای مختلف نانوذره CuO در شرایط شبه فیزیولوژیک با استفاده از تکنیک فلورسانس مورد آنالیز قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد مورد استفاده در این تحقیق شامل سرم آلبومین انسانی (جرم مولکولی ۶۵۴۰۰ دالتون) و 8-Anilino-naphthalene-1-sulfonic acid (ANS) از شرکت سیگما تهیه شدند. نمکهای فسفات شامل K_2HPO_4 و KH_2PO_4 از شرکت مرک تهیه شدند. نانوذره اکسید مس (CuO) با درصد خلوص ۹۹/۲ درصد، میانگین اندازه ۶۰ نانومتر و مساحت سطح $55m^2g^{-1}$ از شرکت NaBond Technology تهیه گردید.

برای اندازه‌گیری شدت فلورسانس از اسپکتروفلورومتر VarianCary Eclipse ساخت کشور استرالیا استفاده شد.

آماده‌سازی مواد: استوک HAS با غلظت ۰/۵ میلی‌مولاردر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با $pH=7/4$ تهیه شد. همچنین استوک یک میکرومولار نانوذره اکسید مس در بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار در $pH=7/4$ تهیه شد. به منظور تهیه سوسپانسیون یک دست از نانوذره، استوک تهیه

توسط سلولهای سرطانی ریه جذب شود (۲۳). اخیراً مطالعات گسترده‌ای بر روی میانکشی نانوذرات با پروتئینها انجام شده است (۶، ۲۹، ۲۵ و ۳۷).

آلبومین سرم انسانی (HSA) پروتئینی کروی با ۵۸۵ اسیدآمین، جزء فراوان‌ترین پروتئین موجود در پلاسما خون است و حدود ۸۰ درصد فشار اسمزی خون را تأمین می‌نماید (۲۱). این پروتئین با دارا بودن سه جایگاه اتصال اختصاصی (I، II و III) که هر کدام از آنها دارای دو زیر دُمین A و B می‌باشند (۸ و ۱۱)، نقش مهمی در انتقال و پخش داروها در خون دارد (۸). تحقیقات زیادی بر روی میانکشی بین HSA و مولکولهای دارویی با استفاده از تکنیک فلورسانس انجام شده است (۹ و ۱۸). میانکشی بین یک مشتق آکریدین (Acridine) و HSA با استفاده از مطالعات اسپکتروفتومتری فلورسانس در شرایط شبه فیزیولوژیک، نشان داد که این میانکشی از طریق مکانیسم پایا و با استفاده از پیوندهای هیدروژنی و میانکشیهای هیدروفوب انجام می‌گیرد (۹). اساساً در اتصال لیگاند به پروتئین چهار نوع میانکشی غیرکوالانسی شامل پیوندهای هیدروژنی، نیروی واندروالسی، میانکشیهای هیدروفوبی و الکتروستاتیک می‌تواند دخیل باشند. از روی علامت و بزرگی پارامترهای ترمودینامیکی (آنتالپی و آنتروپی) می‌توان به نوع نیروی دخیل در میانکشیهای لیگاند- پروتئین در یک واکنش پی‌برد. Ross و Subramanian (۲۷) علامت و اهمیت پارامترهای ترمودینامیکی در ارتباط با انواع مختلف میانکشیهایی که در روند اتصال به پروتئینها ممکن است رخ دهد را مشخص کردند؛ اگر آنتالپی و آنتروپی هر دو بزرگتر از صفر باشند؛ نوع میانکشی هیدروفوب می‌باشد. اگر هر دو پارامتر مذکور کوچکتر از صفر باشند میانکشی واندروالسی و پیوند هیدروژنی در اتصال نقش دارند و اگر آنتالپی کوچکتر از صفر و آنتروپی بزرگتر از صفر باشد، میانکشیهای الکتروستاتیک عامل اصلی اتصال می‌باشد. مطالعات مختلف بیانگر این است که در اتصال نانوذرات به پروتئینهای مکانیسمها و نیروهای

سرعت خاموشی پروتئین، K_{SV} ؛ ثابت نمودار استرن-ولمر (عکس مولار بر ثانیه)، $[Q]$ ؛ غلظت خاموش کننده برحسب مولار می‌باشند (۱۳، ۱۸). τ_0 متوسط نیمه عمر پروتئین بدون خاموش کننده (۵ نانوثانیه) (۳۵) می‌باشد. برای محاسبه مقدار k_q از معادله ۲ استفاده شد.

$$K_{SV} = K_q \tau_0 \quad \text{معادله ۲}$$

بر اساس معادله ۳ می‌توان ثابت اتصال و تعداد جایگاههای اتصال پروتئین برای یک لیگاند را محاسبه نمود.

معادله ۳

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_A + n \log [Q]$$

در این معادله F_0 و F به ترتیب شدتهای فلورسانس در عدم حضور و حضور خاموش کننده، K_A ؛ ثابت اتصال برحسب مولار و n ؛ تعداد جایگاههای اتصال پروتئین برای هر لیگاند می‌باشد (۱۶).

تعیین پارامترهای ترمودینامیکی: جهت تعیین نیروهای دخیل در میانکنش پروتئین با نانوذره، پارامترهای ترمودینامیکی شامل آنتالپی و آنتروپی با استفاده از معادله ۴ محاسبه شدند.

معادله ۴

$$\ln K = \frac{-\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}$$

در این معادله؛ K ؛ ثابت استرن ولمر در دماهای مختلف برحسب عکس مولار، ΔH^0 ؛ تغییرات آنتالپی استاندارد واکنش بر حسب کالری بر مول بر درجه کلونین، ΔS^0 ؛ تغییرات آنتروپی استاندارد واکنش بر حسب (مول.کلونین بر ژول) و R ؛ ثابت گازها (مول.کلونین بر ژول) است (۹، ۳۰).

مقدار تغییرات انرژی آزاد گیبس استاندارد (کیلوکالری بر مول) از معادله ۵ محاسبه گردید.

شده به مدت پنج دقیقه با فاصله زمانی یک دقیقه استراحت با استفاده از دستگاه سونیکاتور در یخ سونیکت گردید.

اندازه‌گیری شدت فلورسانس ذاتی HSA در میانکنش با نانو ذره اکسید مس: جهت مطالعه برهمکنش نانوذره اکسید مس با HSA آزمایش به این صورت انجام شد:

طول موج تحریک (λ_{ex}): ۲۹۵ نانومتر، محدوده طول موج نشر (λ_{em}): ۳۰۰-۵۰۰ نانومتر، سرعت اسکن (Scan Speed): ۵۰۰ نانومتر بر دقیقه و (پهنای باند نور تابیده شده یا ثبت شده توسط دکتور): ۵ نانومتر.

در سل کوارتز یک سانتیمتری، حجم نهایی ۲/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷/۴، پروتئین با غلظت نهایی میکرومولار و نانوذره با غلظتهای نهایی صفر، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۲، ۱/۶، ۲/۰، ۲/۴، ۲/۸، ۳/۲، ۳/۶ و ۴ نانومولار اضافه شد، پس از ۱۰ دقیقه انکوبه شدن در دمای ۲۹۸ درجه کلونین طیف فلورسانس ذاتی پروتئین در طول موج تحریک ۲۹۵ نانومتر ثبت گردید. علاوه بر این، فلورسانس ذاتی پروتئین در دماهای ۳۰۳ و ۳۱۰ درجه کلونین در حضور غلظتهای مختلف این نانو ذره اندازه‌گیری شد.

بررسی نوع مکانیسم میانکنش (پایایا پویا): جهت بررسی نوع مکانیسم میانکنش نانوذره با پروتئین، نمودار استرن-ولمر مربوط به هر یک از دماها، بر حسب شدت فلورسانس در طول موج ۳۴۰ نانومتر و غلظت نانوذره (نانومولار) ترسیم گردید. پس از به دست آوردن معادله خط مربوط به نمودار، ثابتهای خاموشی بر اساس معادله ۱ محاسبه گردید.

معادله ۱

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

در این معادله؛ F_0 و F به ترتیب شدتهای فلورسانس پروتئین در عدم حضور و حضور خاموش کننده، k_q ؛ ثابت

معادله ۵

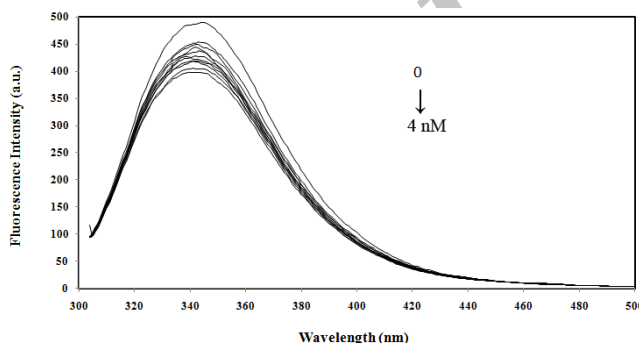
$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

نتایج

تغییرات فلورسانس ذاتی HSA در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید مس: همان‌طور که در شکل ۱ قابل مشاهده است، با افزایش غلظت نانوذره در محیط شدت فلورسانس در طول موج تحریکی ۲۹۵ نانومتر کاهش یافته است. نتایج به دست آمده از معادله استرن-ولمر در طول موج نشری ۳۴۰ نانومتر بر حسب غلظت‌های مختلف نانوذره نشان می‌دهد که میزان خاموش‌شدگی نشر فلورسانس با غلظت نانوذره تقریباً رابطه خطی داشته و هماهنگ با افزایش غلظت نانوذره در محیط میزان نشر نیز کاهش می‌یابد (شکل ۲).

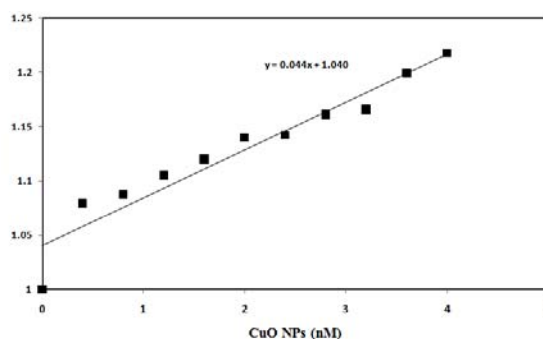
اندازه‌گیری فلورسانس ANS: فلورسانس ANS در غلظت پروتئینی یک میکرومولار و غلظت ۳۰ میکرومولار ANS در بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷/۴ در حضور و عدم حضور نانوذره (۲ نانومولار) با شرایط زیر انجام شد.

طول موج تحریک (λ_{ex}): ۳۵۰ نانومتر، محدوده طول موج نشر (λ_{em}): ۴۰۰-۶۰۰ نانومتر، سرعت اسکن: ۵۰۰ نانومتر بر دقیقه، Slit (پهنای باند نور تابیده شده یا ثبت شده توسط دکتور): ۵ نانومتر.

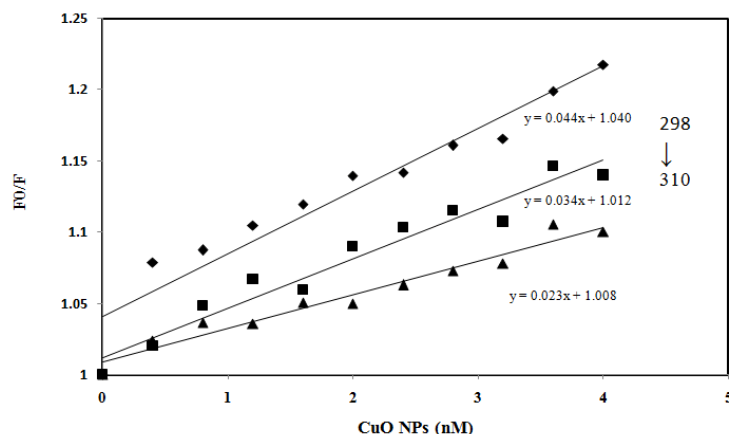


شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید مس (صفر، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۲، ۱/۶، ۲/۰، ۲/۴، ۲/۸، ۳/۲، ۳/۶ و ۴ نانومولار) بر طیف نشری فلورسانس ذاتی HSA در طول موج تحریکی ۲۹۵ نانومتر (دمای ۲۹۸ درجه کلوین، بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار و pH=۷/۴).

فلورسانس ذاتی HSA در حضور نانوذره اکسید مس در دماهای ۲۹۸، ۳۰۳ و ۳۱۰ درجه کلوین: تأثیر دما بر میانگین پروتئین با نانوذره اکسید مس، با اندازه‌گیری شدت فلورسانس ذاتی HSA در طول موج ۲۹۵ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. همانند آنچه در شکل ۱ مشاهده می‌گردد، در دماهای بالاتر نیز با افزایش غلظت نانوذره در محیط شدت فلورسانس کاهش یافت. از مقایسه نمودارهای استرن-ولمر به دست آمده در طول موج نشری ۳۴۰ نانومتر، مشاهده می‌گردد که با افزایش دما، میزان کاهش شدت فلورسانس کمتر شده است (شکل ۳).



شکل ۲- نمودار استرن-ولمر برهمکنش غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید مس (صفر، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۲، ۱/۶، ۲/۰، ۲/۴، ۲/۸، ۳/۲، ۳/۶ و ۴ نانومولار) با HSA (طول موج نشر: ۳۴۵ نانومتر، بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار، pH=۷/۴ و دمای ۲۹۸ درجه کلوین).

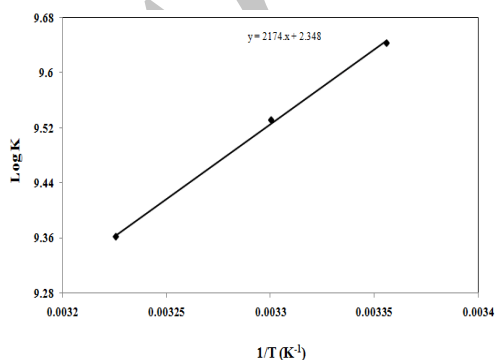


شکل ۳- مقایسه نمودار استرن-ولمر برهمکنش پروتئین HSA با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید مس (صفر، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۲، ۱/۶، ۲/۰، ۲/۴، ۲/۸، ۳/۲، ۳/۶ و ۴ نانومولار) در دماهای ۲۸۰ درجه کلوین (◆)، ۳۰۳ درجه کلوین (■) و ۳۱۰ درجه کلوین (▲).

تعیین نوع میانکنش HSA و نانوذره اکسید مس: ثابت خاموشی استرن-ولمر (K_{sv}) و ثابت سرعت خاموشی فلورسانس (K_q) از روی معادله خط مربوط به هریک از نمودارهای استرن-ولمر در دماهای مختلف در جدول ۱

جدول ۱- ثابت‌های خاموشی میانکنش HSA با نانوذره اکسید مس

دما (کلوین)	K_{sv} ($1 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1}$)	K_q ($1 \times 10^{17} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
۲۹۸	۴/۴	۸/۸
۳۰۳	۳/۴	۶/۸
۳۱۰	۲/۳	۴/۶



شکل ۴- نمودار وانت‌هوف مربوط به میانکنش نانوذره اکسید مس با آلومین سوم انسانی.

تعیین پارامترهای ترمودینامیکی در میانکنش HSA و نانوذره اکسید مس: با استفاده از معادله خط به دست آمد از نمودار وانت‌هوف (شکل ۴)، و بر اساس معادله ۴، آنتالپی و آنتروپی میانکنش نانوذره اکسید آهن با HSA محاسبه گردید (جدول ۲). همان‌طور که در جدول قابل مشاهده است علامت ΔH منفی و علامت ΔS مثبت می‌باشد.

از طرف دیگر بر اساس معادله ۵، مقدار تغییرات انرژی آزاد برای این میانکنش در دماهای مختلف محاسبه گردید. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌گردد علامت این پارامتر منفی بوده و با افزایش دما افزایش یافته است.

جدول ۲- پارامترهای ترمودینامیکی میانکنش نانوذره اکسید مس با آلبومین سوم انسانی

دما (کلوین)	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (kJ mol ⁻¹ K)
۲۹۸	-۲۳/۸۷		
۳۰۳	-۲۳/۹۶	-۱۸/۰۶	۰/۰۱۹۵
۳۱۰	-۲۴/۱		

دما ثابت اتصال و همچنین n افزایش می‌یابد (به استثنای n در دمای ۳۱۰ درجه کلوین که نسبت به دمای ۳۰۳ درجه کاهش نشان می‌دهد).

تعیین ثابت اتصال و جایگاههای اتصال نانوذره بر روی HSA: مقادیر Ka و n برای برهمکنش نانوذره اکسید مس به پروتئین سرم آلبومین انسانی در جدول ۳ نشان داده شده است. همان طور که در جدول مشاهده می‌گردد با افزایش

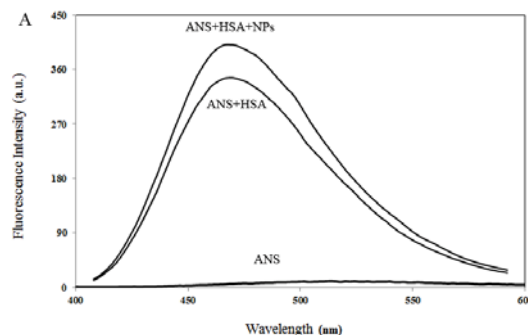
جدول ۳- ثابت اتصال و تعداد جایگاه برای نانوذره اکسید مس با HSA

دما (کلوین)	K_a ($1 \times 10^9 M^{-1}$)	n
۲۹۸	۹/۶۳	۰/۴۴۲
۳۰۳	۲۱/۱۸	۰/۷۹۴
۳۱۰	۲۷/۹۸	۰/۷۲۰

بحث

اگرچه نانوفناوری دارای مزایا و پتانسیل‌های زیادی است اما سمیت ناشی از باقیمانده‌های نانو ذرات یک نگرانی بزرگ است (۲۲). آلبومین فراوان‌ترین پروتئین در پلاسما است که نقشهای فیزیولوژیکی و فارماکولوژیکی مختلفی دارد. این پروتئین نقش مهمی در انتقال و پخش داروهای موجود در خون دارد (۸). نظر به اینکه، غیر از داروها، مولکولهای دیگر نیز امکان اتصال به این پروتئین را دارند، مطالعه اتصال مولکولهای کوچک به این پروتئین اهمیت زیادی دارد (۹). تولید و استفاده بیش از حد نانوذرات منجر به راه‌یابی این ذرات به اکوسیستمهای مختلف می‌شود و این در حالی است که از سرنوشت این ذرات پس از ورود به اکوسیستم اطلاعات کامل و جامعی در دست نیست (۲۲). مطالعات انجام شده توسط امجدی و همکاران نشان داد که نانو اکسید مس علاوه بر مهار رشد باکتری اشريشیاکلی باعث تغییر توالی DNA آن در برخی نقاط می‌شود (۱).

فلورسانس ANS در حضور و عدم حضور نانو ذره اکسید مس: همان طور که در شکل ۵ مشاهده می‌گردد شدت فلورسانس ANS در حضور پروتئین HAS نسبت به ANS به تنهایی افزایش یافته است. همین طور، نشر این فلوروفور در حضور پروتئین میانکنش داده با نانوذره نسبت به پروتئین تنها بیشتر شده است.



شکل ۵- فلورسانس ANS به تنهایی، در حضور HSA و در حضور HSA ترکیب شده با نانوذره اکسید مس.

۲۹۸ درجه کلون به ۳۱۰ درجه کلون این پارامترها کاهش می‌یابد (جدول ۱). نتایج مشابهی در اتصال کوانتوم دات $CdTe:Zn^{2+}$ به HSA توسط Huang و همکاران گزارش شد. آنها کاهش این پارامترها را به مکانسیم پایا میانکنش بین کوانتوم دات و HSA مرتبط دانستند (۱۶). از طرف دیگر، با توجه به اینکه ثابت سرعت خاموشی (K_q) در تمامی دماها از ثابت سرعت (maximum diffusion rate constant) یا K_q مربوط به این مولکول زیستی ($2.0 \times 10^{10} L mol^{-1} s^{-1}$) بیشتر است پیشنهاد می‌شود که خاموشی فلورسانس HSA از طریق مکانسیم پایا انجام می‌شود (۹، ۱۲، ۱۶ و ۱۸). علامت منفی مربوط به مقدار انرژی آزاد شده (ΔG) و علامت مثبت تغییرات آنتروپی (ΔS) در میانکنش HSA با این نانوذره، بیانگر خود به خودی بودن واکنش می‌باشد (۱۶).

بر اساس ثابت مربوط به نمودارهای استرن-ولمر در دماهای مختلف (۹)، پارامترهای ترمودینامیکی از روی معادله خط مربوط به نمودار وانت‌هوف محاسبه شدند (جدول ۲). همان‌طور که در جدول نشان داده شده است، آنتالپی کوچکتر از صفر و آنتروپی بزرگتر از صفر می‌باشد، بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که میانکنشهای الکتروستاتیک عامل اصلی اتصال نانوذره با پروتئین می‌باشند (۲۷). این نتایج با نتایج منتشر شده توسط Huang و همکاران در سال ۲۰۱۵ مطابقت دارد. آنها نشان دادند که اتصال این پروتئین با کوانتوم دات $CdTe:Zn^{2+}$ از طریق میانکنشهای الکتروستاتیک صورت می‌گیرد (۱۶). در حالی که مطالعات Rabbani و همکاران نشان داد که میانکنش اتصال نانوذرات اکسید مس با آنزیم بتا گالاکتوزیداز از طریق پیوند هیدروژنی و نیروهای واندروالس انجام می‌شود (۲۵). به نظر می‌رسد که نوع مکانسیم اتصال و نیروهای دخیل در اتصال تابعی از اندازه، غلظت و همچنین ماهیت نانوذره در محیط باشد.

تکنیک فلورسانس به دلیل حساسیت و دقت یک ابزار قدرتمند جهت مطالعه برهمکنش مولکولهای کوچک با پروتئینها به حساب می‌آید (۳۳). در ساختار HSA یک مولکول تریپتوفان در موقعیت ۲۱۴ وجود دارد که فلورسانس ذاتی آن به لیگاندهای پیوند شده مجاور حساس است (۱۵).

همان‌طور که در نتایج مشاهده می‌گردد با افزایش غلظت نانوذره در محیط، شدت فلورسانس ذاتی پروتئین HSA (در طول موج ۲۹۵ نانومتر) در دمای ۲۹۸ درجه کلون کاهش یافته است (شکل ۱). کاهش نشر فلورسانس ذاتی این پروتئین (مربوط به تریپتوفان) در حضور نانوذرات طلا نیز گزارش شده است (۳۱). از نمودار استرن-ولمر مربوط به طیف فلورسانس ذاتی پروتئین چنین استنباط می‌شود که بین خاموشی فلورسانس با غلظت نانوذره تقریباً رابطه خطی وجود دارد. همچنین رابطه مشابهی بین میزان خاموشی و غلظت نانوذره در دماهای بالاتر (۳۰۳ و ۳۱۰ درجه کلون) نیز مشاهده گردید.

نتایج منتشر شده توسط Huang و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داد که خاموشی فلورسانس HSA توسط کوانتوم دات $CdTe:Zn^{2+}$ تابعی از غلظت بوده و با افزایش غلظت کوانتم دات میزان نشر فلورسانس ذاتی تریپتوفان کاهش می‌یابد (۱۶). این مشاهدات با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد. بر اساس نمودار استرن-ولمر مربوط به خاموشی فلورسانس در دماهای مختلف (شکل ۳) چنین مشاهده می‌شود که با افزایش دما شیب نمودار مربوطه کاهش می‌یابد. به عبارت دیگر، با افزایش دما، میزان خاموشی فلورسانس ذاتی مربوط به تریپتوفان در حضور غلظتهای مختلف نانوذره به صورت تابعی از غلظت نانو ذره کاهش می‌یابد.

پارامترهای مربوط به ثابت خاموشی شامل K_{sv} و K_q که از معادله خط مربوط به هر یک از نمودارهای استرن-ولمر در دماهای مختلف به دست آمد نشان داد که با افزایش دما از

آمده از طیف فلورسانس ذاتی در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره همخوانی دارد. تغییر ساختار HSA پس از اتصال به نانوذرات طلا توسط Sen و همکاران در سال ۲۰۱۱ گزارش شده است. آنها مشاهده کردند که در حضور نانوذرات طلا میزان آلفا هلیکس ساختار پروتئین HAS کاهش می‌یابد (۳۱). از طرف دیگر، مطالعات انجام شده توسط شارق‌ی و همکاران نشان داد که نانوذرات اکسیدروی و اکسید آهن بر پایداری آنزیم پپسین تأثیر ندارد (۲).

در مجموع این مشاهدات بیانگر تغییر ساختار پروتئین پس از اتصال به نانوذره اکسید مس می‌باشد که می‌تواند عملکرد آن را تحت تأثیر قرار دهد. لذا مهم است که جنبه‌های محیطی، سلامتی و ایمنی در مراحل ابتدایی استفاده از نانومواد در نظر گرفته شود (۵).

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته با قرارداد شماره ۱/۴۰۳۱ انجام شده است. بنابراین مجری و همکاران مراتب سپاس و قدردانی خود را از آن دانشگاه محترم اعلام می‌دارند.

مطالعات انجام شده توسط ایرانفر و همکاران نشان دادند که با تغییر اندازه نانوذره نقره در محیط رفتارهای متفاوتی رخ می‌دهد، به طوری که با افزایش اندازه نانوذره نقره در حضور Ciprofloxacin، ثابت سرعت خاموشی و همچنین ثابت معادله استرن-ولمر افزایش می‌یابد. آنها نتیجه گرفتند که نانوذرات با ابعاد مختلف عملکردهای متفاوتی در محلول پروتئینی دارد که می‌تواند با لایه‌های مختلف آبپوشی اطراف آنها مرتبط باشد (۱۷).

ANS یک فلوروفور هیدروفوب است که پس از اتصال به محیط‌های هیدروفوب نشر آن افزایش می‌یابد (۳ و ۳۴). همان طور که در نتایج نشان داده شده است نشر این فلوروفور پس از اتصال به پروتئین متصل شده به نانوذره نسبت به پروتئین میانکنش نداده افزایش یافته است. این مشاهدات با نتایج منتشر شده توسط Sen و همکاران مغایرت دارد. آنها مشاهده کردند طیف نشری فلورسانس ANS در پروتئین متصل شده به نانوذرات طلا نسبت به پروتئین متصل نشده به نانوذره کمتر است (۳۱). افزایش نشر فلورسانس این فلوروفور، نشان دهنده این واقعیت است که میزان هیدروفوبیسیته سطحی پروتئین در اثر میانکنش با این ذره افزایش یافته است که با نتایج به دست

منابع

- ۱- امجدی، ف.، گلستانی ایمانی، ب. و کریمی، ف. ۱۳۹۴. بررسی اثر نانوذرات اکسید مس روی ژنوم باکتری اشریشیاکلی با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). (۴) ۲۸، ۴۸۷-۴۷۵.
- ۲- شارق‌ی، ب.، شهدادنژاد، ک. و محمدی، ه. ۱۳۹۴. مطالعه پایداری ساختاری آنزیم پپسین در حضور نانوذرات اکسیدروی و اکسید آهن. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). (۳) ۲۸، ۳۵۱-۳۴۴.
- 3- Andrade, J.D. Hlady, V. Feng, L. and Tingey, K. 1996. Protein at interfaces: principles, problems, and potential. In: Brash JL, Wojciechowski PW, editors. Interfacial phenomena and bioproducts. New York: Marcel Dicker. 19-55.
- 4- Ball, P. 2002. Natural strategies for the molecular engineer. Nanotechnology, 13: 15-28.
- 5- Baun, A. Hartmann, N.B. Grieger, K. and Kusk, K.O. 2008. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. Ecotoxicology. 17(5): 387-95.
- 6- Bhogale, A. Patel, N. Mariam, J. Dongre, P.M. Miotello, A. Kothari, D.C. 2014. Comprehensive studies on the interaction of copper nanoparticles with bovine serum albumin using various spectroscopies. Colloids Surf B Biointerfaces. 113: 276-84.
- 7- Brunner, T.J. Wick, P. Manser, P. Spohn, P. Grass, R.N. Limbach, L.K. Bruinink, A. and Stark, W.J. 2006. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. Environmental science & technology. 40(14): 4374-4378.
- 8- Carter, D. C. and Ho, J.X. 1994. Structure of serum albumin. Advances in Protein Chemistry. 45: 153-203.

- 9- Chen, L. Wu, M. Lin, X. and Xie, Z. 2011. Study on the interaction between human serum albumin and a novel bioactive acridine derivative using optical spectroscopy. *Luminescence*. 26: 172-177.
- 10- Corredor, E. Testillano, P.S. Coronado, M.J. Gonzalez-Melendi, P. Fernandez-Pacheco, R. Marquina, C. Ibarra, M.R. Fuente, J.M. Rubiales, D. Perez-de-Luque, A. and Risueno, M.C. 2009. Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin plants: in situsubcellular identification. *BMC Plant Biology*. 9: 1-11.
- 11- Curry, S. Brich, P. and Frank, N.P. 1999. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystal-lographic studies. *BiochimicaetBiophysicaActa*. 14: 41-131.
- 12- Eftink, M.R. 1991. Fluorescence quenching reactions: probing biological macro-molecular structures. In: Dewey TG, editor. *Biophysical and biochemical aspects of fluorescence spectroscopy*. New York: Plenum.
- 13- Gelamo, E.L. Silva, C.H.T.P. Imasato, H. and Tabak, M. 2002. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modeling. *BiochimicaetBiophysicaActa*. 1594: 84-99.
- 14- Griffitt, R.J. Weil, R. Hyndman, K.A. and et al. 2007. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental science & technology*. 41(23): 8178-8186.
- 15- He, X.M. and Carter, D.C. 1992. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*. 358: 209-15.
- 16- Huang, S., Qiu, H., Liu, Y., Huang, C., Sheng, J., Wei Su, W. and Xiao, Q. 2015. Molecular interaction investigation between three CdTe:Zn²⁺ quantum dots and human serum albumin: A comparative study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 136: 955-962.
- 17- Hu, Y. Liu, Y. Wang, J. Xiao, X. Qu, S. 2004. Study of the interaction between monoammoniumglycyrhizinate and bovine serum albumin. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 36: 915-19.
- 18- Iranfar, H. Rajabi, O. Salari, R. and Chamani, J. 2012. Probing the Interaction of Human Serum Albumin with Ciprofloxacin in the Presence of Silver Nanoparticles of Three Sizes: Multispectroscopic and ζ Potential Investigation. *The Journal of Physical chemistry B*. 116, 1951-1964.
- 19- Lakowicz, J.R. 1999. *Principles of fluorescence spectroscopy*, 2nd edn. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 368.
- 20- Lee, W.M. An, Y.J. Yoon, H. and Kweon, H.S. 2008. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolusradiatus*) and wheat (*Triticumaestivum*): Plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27(9): 1915-1921.
- 21- Li, Y. He, W.Y. Liu, H. Yao, X. and Hu, Z. 2007. Daidzein interaction with human serum albumin studied using optical spectroscopy and molecular modeling methods. *Journal of Molecular Structure*. 83: 144-150.
- 22- Monica, R.C. and Cremonini, R. (2009) Nanoparticles and higher plants. *Caryologia*. 62(2): 161-165.
- 23- Patil, S. Sandberg, A. Heckert, E. Self, W. and Seal S. 2007. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials*. 28:4600-4607.
- 24- Pinto-Alphandary, H. Andremon, A. and Couvreur, P. 2000. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles, research and applications. *International journal of antimicrobial agents*. 13: 155-168.
- 25- Rabbani, G. Khan, M.J. Ahmad, A. YusofMaskat, M. and Khan, R.H. 2014. Effect of copper oxide nanoparticles on the conformation and activity of β-galactosidase. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 123: 96-105.
- 26- Roco, M.C. 1999. Nanoparticles and nanotechnology. *Journal of Nanoparticle Research I*: 1-6.
- 27- Ross, P.D. and Subramanian, S. 1981. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*. 20(11): 3096-102.
- 28- Rothen-Rutishauser, B.M. Schurch, S. Haenni, B. and et al. 2006. Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environmental science & technology*. 40(14): 4353-4359.
- 29- Roy, S. Das, T.K. 2014. Spectroscopic studies of interaction between biologically synthesized silver nanoparticles and bovine serum albumin. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 14(7): 4899-4905.
- 30- Sanei, H. Asoodeh, A. Hamedakbari-Tusi, S. and Chamani, J. 2011. Multi-spectroscopic Investigations of Aspirin and Colchicine Interactions with Human Hemoglobin: Binary and Ternary Systems. *Journal of Solution Chemistry*. 40: 1905-1931.
- 31- Sen, T., Mandal, S., Haldar, S., Chattopadhyay, K. and Amitava Patra, A. 2011. Interaction of Gold Nanoparticle with Human Serum Albumin

- (HSA) Protein Using Surface Energy Transfer. *J. Phys. Chem. C*. 115: 24037–24044
- 32- Wang, B.X. Li C.H. and Peng X.F. 2005. Adsorption of nanoparticles on bubble surface in nano-particle suspension. *China Particuology*. 3: 208-212.
- 33- Wei, Y. Li, J. Dong, C. Shuang, S. Liu, D. and Huie, C.W. 2006. Investigation of the association behaviors between biliverdin and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy. *Talanta*. 70 (2): 377–382.
- 34- Worle-Knirsch, J.M. Kern, K. Schleh, C. and et al. 2007. Nanoparticulate vanadium oxide potentiated vanadium toxicity in human lung cells. *Environmental science & technology*. 41(1): 331-6.
- 35- Xie, M. Long, M. Liu, Y. Qin, C. and Wang, Y. 2006. Characterization of the interaction between human serum albumin and morin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1760:1184–91.
- 36- Yousefi-Nejad, M. Hosseinkhani, S. Khajeh, K. Ranjbar, B. 2006. Expression, purification and immobilization of firefly luciferase on alkyl-substituted Sepharose 4B. *Enzyme and Microbial Technology*. 40: 740–746.
- 37- Zhang, H. Wu, P. Zhu, Z. and Wang, Y. 2015. Interaction of γ -Fe₂O₃ nanoparticles with fibrinogen. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 151: 40–47.
- 38- Zhu, M.T. Feng, W.Y. Wang, Y. and et al. 2009. Pharmacokinetics and extrapulmonary translocation of intratracheally instilled ferric oxide nanoparticles in rats and the potential health risk assessment. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. 107(2): 342-51.

Study of the CuO nanoparticles interaction with human serum albumin using fluorescence technique

Riahi-Madvar A.¹ and Ghaseminesab A.²

¹Biotechnology Dept., Institute of Science and High technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran.

²Biotechnology Dept., Faculty of Science and Modern Technology, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran.

Abstract

In this study, interaction between human serum albumin and CuO nanoparticle (NP) at different concentrations was studied using fluorescence method under the simulative physiological condition. The results showed the intrinsic fluorescence reduced in the presence of the NP as the manner increase NP concentration in media. According to the results of quenching rate constant (K_q), it deduced that the interaction take place through static mechanism. Thermodynamic parameters including enthalpy and entropy were calculated as -18.06 (kJ mol⁻¹) and 0.0195 (kJ mol⁻¹ K) respectively, which shows the importance of electrostatic interaction in HAS and NP interaction. Affinity of this particle to HAS deduced as the negative sign of free energy (ΔG°) that shows the interaction is exergonic process. Evaluation of ANS fluorescence intensity indicated that hydrophobicity of the surface protein increased in the presence of the NP. Based on the results it established, the protein structure changed in the presence of NP which may be affected its function.

Key words: CuO nanoparticles, Fluorescence, Human serum albumin, Quenching.