مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال چهارم، شماره چهارم، پیاپی شانزدهم، بهار ۱۳۹۵ (۹-۱)

مطالعات اسپکتروسکوپی برهمکنش لیزوزیم و نانوذره اکسید روی

لیدا مومنی[۱*]، صادق فرهادیان[۲]، بهزاد شارقی[۳]
۱. مربی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، ایران
۲. دانشجوی دکتری بیوشیمی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، ایران
۳. دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۲/۵)

چکیده
جذب پروتئین درسطح غیرآلی، منجر به تغییرات ساختاری و عملکردی می‌گردد که وابسته به طبیعت پروتئین جذب شده و خصوصیات فیزیکوشیمیایی سطح غیرآلی است. لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ (E.C 3.2.1.17) با وزن مولکولی ۱٤/٦ کیلودالتون، پروتئین کروی کوچکی متشکل از ۱۲۹ اسید آمینه با چهار پیوند دی سولفید است. هدف از این تحقیق، مطالعه اثر نانوذره اکسید روی، بر پایداری و ساختار آنزیم لیزوزیم سفیده تخم مرغ از طریق تکنیک‌های پایداری حرارتی، اسپکتروسکوپی فلورسانس و سینتیک آنزیمی در حضور و غیاب نانوذره اکسید روی در بافر pH ۷ بود. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که با افزایش غلظت نانوذره اکسید روی، فعالیت آنزیمی و پایداری حرارتی لیزوزیم کاهش یافت. مطالعات اسپکتروسکوپی فلورسانس نشان داد که نانوذره اکسید روی توانسته شدت نشر لیزوزیم را کاهش دهد. مطالعات واکنش بین نانوذره اکسید روی و لیزوزیم نشان می‌دهد که نه تنها آب و ملکول‌های حلال می‌توانند بر روی ساختار سه بعدی لیزوزیم و به‌طور کلی پروتئین محلول اثر بگذارند، بلکه نقش مهم و حیاتی در جذب سطحی مواد نانو دارند.

واژه‌های کلیدی: لیزوزیم، نانوذره اکسید روی، پایداری حرارتی، فعالیت آنزیم، آنالیز فلورسانس.

Spectroscopic studies of the interaction of Lysozyme and ZnO nanoparticles

Lida Momeni[1*], Sadegh Farhadian[2], Behzad Shareghi[3]
1. Instructor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Payam Noor, Iran
2. Ph. D. Student, Department of Biology, Faculty of Science, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran
3. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran
(Received: Sep. 29, 2014 - Accepted: Apr. 24, 2016)

Abstract
Adsorption of proteins on inorganic surfaces may lead to structural and functional changes that are dependent on both the nature of the adsorbed proteins and the physicochemical properties of the inorganic surfaces. Chicken egg white lysozyme (E.C 3.2.1.17, MW=14.6 kDa) is a small globular protein, that consists of 129 amino acid residues with four disulfide bonds. The aim of this study was the survey of the stability and structure of Chicken egg white lysozyme against ZnO nano through thermal stability, fluorescence and spectroscopy and enzyme activity assay in the absence or presence of ZnO nano particle at pH 7.0. The obtained results indicated that thermal stability and activity of lysozyme decreased with increase in ZnO nanoparticles concentration. Moreover, it was observed that ZnO Nano particle quenched the intrinsic fluorescence of lysozyme. The interaction studies of ZnO nanoparticles and lysozyme show that not only water and solvent molecules can effect on 3D structure of lysozyme and protein but also play an important role in adsorption nanoparticles.

Keywords: Lysozyme, ZnO nanoparticles, thermal Stability, enzyme kinetic, fluorescence analysis.

* نویسنده مسئول: E-mail: Itslida@yahoo.com

مقدمه

جذب پروتئین بر سطوح غیرآلی، ممکن است منجر به تغییرات عملکردی و ساختاری گردد که این امر به طبیعت پروتئین‌های جذب‌شده و خصوصیات فیزیکوشیمیایی سطوح غیرآلی بستگی دارد. تلاش برای شناسایی سطح پروتئین، ابزاری قدرتمند در درک برهمکنش پروتئین- پروتئین به عنوان جنبه‌ای حیاتی از عملکردهای سلول می‌باشد. نانوذرات، به واسطه اندازه کوچک دارای ویژگی‌های متمایز و مشخصی نسبت به توده‌های تشکیل شده از مواد مشابه دارند. بنابراین کاربرد وسیعی در زمینه بیوسنسورها، زیست‌پزشکی و بیونانوتکنولوژی دارند. جذب پروتئین بر روی نانوذرات و نتایج آن بر روی ساختار و فعالیت، به شدت بستگی به اندازه و شکل نانوذرات دارد. نانوذرات دارای خصوصیات فیزیکوشیمیایی منحصر به فردی از قبیل اندازه کوچک، منطقه سطحی بزرگ، فعالیت سطحی، بار و شکل هستند. از طرفی نانوذرات به دلیل اثر سمیت بالقوه می‌توانند منجر به اثرات بیولوژیکی مخالف با سیستم‌های بیولوژیکی شوند (Chakraborti *et al*., 2009; Farhadian *et al*., 2012). بیشتر نانومواد به خاطر ویژگی‌های منحصر به‌فردشان در تولیدات صنعتی و زندگی روزمره مورد استفاده قرار می‌گیرند (Xu *et al*., 2010). برای مثال برخی از آن‌ها برای جذب اشعه ماورای بنفش نور خورشید درکرم‌های ضد آفتاب، خمیردندان‌ها و به منظور تولید و فراهم کردن رنگ سفید در رنگ‌ها و برخی هم در صنایع الکترونیک مورد استفاده قرار می‌گیرند. علاوه بر این، نانوذرات، کاربردهای زیادی در تجهیزات پزشکی، ورزشی و آرایشی، تولید پارچه، سلول‌های سوختی و صنایع دیگر دارند (Wang *et al*., 2008). امروزه برخی مواد نانو به عنوان محصولات تحویل‌دهنده دارو، تشخیص‌دهنده بیماری و داروی درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرند. با افزایش استفاده از نانوذرات اجتناب‌ناپذیر است که انسان در معرض آن‌ها قرار نگیرد؛ بنابراین مهم است که مخاطرات آن‌ها در نظر گرفته شود. اندازه این ذرات از اندازه سلول‌ها و اندامک‌ها کوچک‌تر است؛ به همین خاطر می‌توانند به درون سلول‌ها و اندامک‌ها نفوذ کرده و باعث آسیب‌های فیزیکی و یا القاء پاسخ التهابی مضر شوند. استرس‌های اکسیداتیو نانوذرات می‌توانند باعث تخریب لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و DNA شود. فرایند پراکسیداسیون لیپیدها به عنوان خطرناکترین این استرس‌ها محسوب می‌شود که در نهایت، منجر به تغییر خصوصیات غشاء سلول می‌گردد (Bystrzejewska-Piotrowska *et al*., 2009; Heinlaan *et al*., 2008).

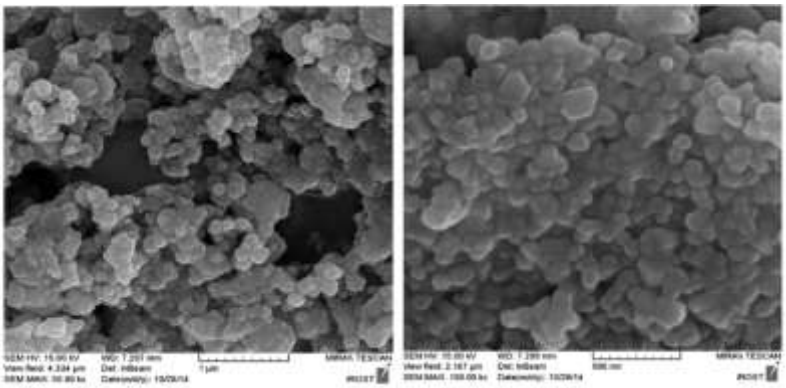
لیزوزیم به طور طبیعی در سفیده تخم مرغ، اشک چشم انسان، بزاق و سایر مایعات بدن وجود دارد و قادر است دیواره سلولی باکتری‌های خاصی را تخریب کند؛ بنابراین به‌عنوان ضدعفونی‌کننده ملایم به کار می‌رود. این خصوصیت را برای اولین بار الکساندر فلمینگ در سال ۱۹۲۲ به طور تصادفی کشف کرد. این آنزیم به طور گسترده به عنوان یک آنزیم مدل در مطالعات آنزیمولوژی، بیولوژی مولکولی، ژنتیک، شیمی پروتئین و ایمونولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ساختار لیزوزیم شامل یک زنجیره ۱۲۹ آمینو اسیدی می‌باشد که توسط پرتونگاری اشعه ایکس مورد شناسایی قرار گرفته است. تحت شرایط فیزولوژیکی طبیعی، لیزوزیم به یک ساختار کروی پیچیده با یک شکاف عمیق در سطح پیچ و تاب می‌خورد. این آنزیم دارای پنج هلیکس آلفا، سه صفحه بتا ناموازی و مقدار زیادی پیچ نامنظم و ترن بتا می‌باشد. ساختار این آنزیم توسط چهار پیوند دی سولفید پایدار می‌شود که البته بیشتر آمینواسیدهای سیستئین در بخش آلفا هلیکس قرار گرفته‌اند. شکل این آنزیم به طور کلی بیضوی با یک شکاف بزرگ است که جایگاه فعال را می‌سازد و می‌تواند همزمان به شش قند در بخش کربوهیدرات متصل شده و عمل کاتالیز را با مؤفقیت انجام دهد

(Wu & Narsimhan, 2008). لیزوزیم عملکردهای فارماکولوژی متعددی از قبیل ضدعفونی‌کننده، ضد تورم، ضد ویروس و اعمال آنتی‌نئوپلاستیک دارد. این آنزیم می‌تواند جزء پلی‌ساکاریدی دیواره باکتری‌های گرم مثبت را هیدرولیز کرده و ساختار باکتری را تخریب کند. همچنین می‌تواند باعث بهبود گردش خون و عملکرد سیستم ایمنی انسان گردد (Chen *et al*., 2009). لیزوزیم در سلول‌های خون‌ساز، گرانولوسیت‌ها، مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و همچنین مغز استخوان به مقدار زیادی بیان می‌شود (Merlini & Bellotti, 2005). عملکرد مهم دیگر لیزوزیم، توانایی حمل دارو می‌باشد. بنابراین مطالعات واکنش بین نانو ذره اکسید روی (ZnO) کلوئیدی و لیزوزیم نشان می‌دهد که نه تنها آب و ملکول‌های حلال می‌توانند بر روی ساختار سه بعدی لیزوزیم و به‌طور کلی پروتئین محلول اثر بگذارند، بلکه نقش مهم و حیاتی در جذب سطحی مواد نانو دارند (Kopac *et al*., 2008; Vörös, 2004; Yongli *et al*., 1999). بدین منظور در این تحقیق نانو ذره ZnO و لیزوزیم به عنوان نمونه‌ای از نانو ذرات و پروتئین‌ها انتخاب شدند. اثر نانوذره TiO_2 قبلاً بر روی لیزوزیم ثابت شده است، اما گزارشی در مورد اثر نانو ذره ZnO ارائه نشده است.

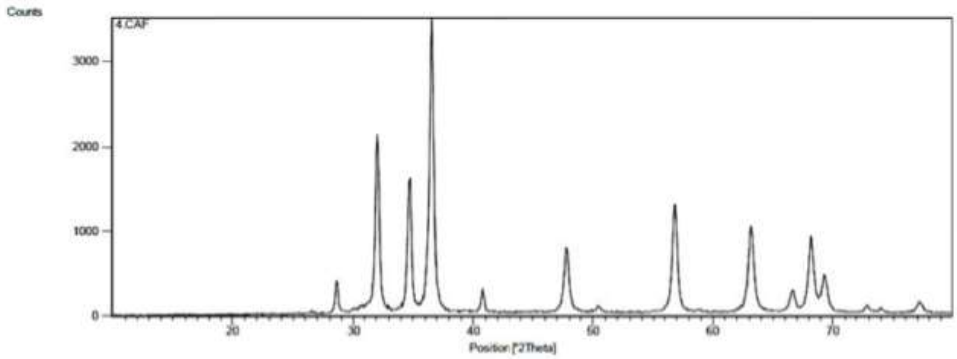
مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

آنزیم لیزوزیم سفیده تخم مرغ به صورت پودر خشک و سدیم فسفات از شرکت سیگما خریداری شدند. نانوذره ZnO تقریباً کروی، چگالی g/cm^3 ۵/۶۰۶، قطر ۱۰–۳۰nm و به رنگ سفید یا شیری است که از شرکت NanoUSA تهیه شد (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوذره *ZnO*



شکل ۲. الگوی *XRD* نانوذره *ZnO*

روش‌های مطالعاتی

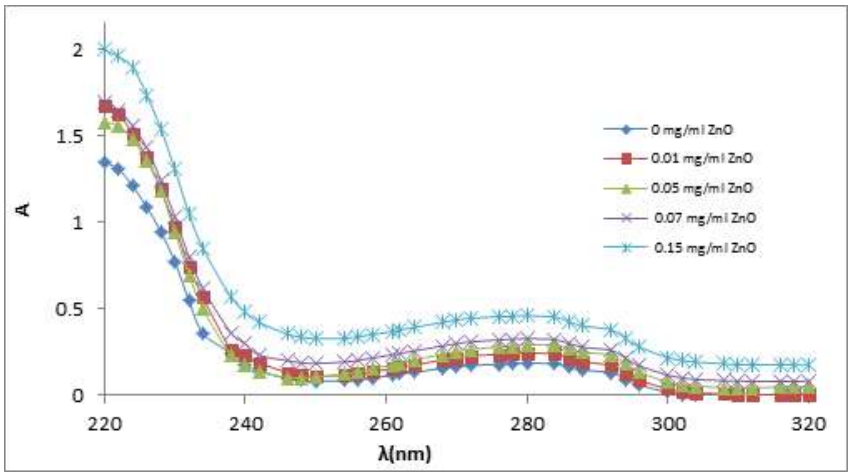
برای مطالعه پایداری حرارتی لیزوزیم سفیده تخم مرغ در دامنه حرارتی ۹۰°C–۲۰ از دستگاه اسپکتروفتومتری UV/Vis مدل فارماسیا ۴۰۰۰ استفاده شد. این دستگاه مجهز به سیستم کنترل الکترونیکی دما می‌باشد که سرعت اسکن دما یک درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه می‌باشد. نمونه لیزوزیم با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در تامپون فسفات ۰/۱ مولار با pH ۷ تهیه گردید. تمامی آزمایشات انجام شده در طی این تحقیق، حداقل سه بار تکرار شدند و بنابراین نتایج، تکرارپذیر هستند. برای تهیه محلول نانوذره ZnO در غلظت‌های مختلف، لازم است که در ابتدا مقدار مورد نیاز از آن‌ها دقیقاً وزن شود و سپس توسط آب دوبار تقطیر به حجم مورد نظر برسد و سپس عمل سونیکیشن روی آن‌ها انجام گیرد. سونیکیشن برای دو بار متوالی هر کدام ۱۰ دقیقه انجام شد و اثر نانوذره بر پایداری حرارتی و فعالیت و ساختار آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. برای مطالعات سینتیک لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ در حضور نانوذره ZnO در دمای ۳۵°C، از دستگاه اسپکتروفتومتری UV/Vis مدل فارماسیا ۴۰۰۰ استفاده شد. سوبسترای مورد استفاده باکتری گرم مثبت *Micrococcus lysodeikticus* بود که محلول غلیظ آن با غلظت ۲۰ میلی‌مولار در آب مقطر دو بار تقطیر تهیه شد. طول موج منتخب جهت پیگیری تخریب دیواره باکتری ۴۵۰ نانومتر است؛ زیرا در اثر تخریب دیواره باکتری کدورت سوسپانسیون حاوی باکتری کاهش می‌یابد که در طول موج مرئی قابل ثبت است. بعد از جمع‌آوری اطلاعات نمودارهای میکائیلیس- منتن و لینویور- برک رسم شد و با به دست آوردن طول از مبدأ (K_m) و عرض از مبدأ (V_{max}) نمودار لینویور- برک، پارامترهای سینتیکی محاسبه گردید.

به منظور انجام آزمایش‌های خاموشی فلورسانس از دستگاه اسپکتروفلوریمتری شیمادزو مدل RF-۵۳۰۱ و نمونه لیزوزیم با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده گردید. آزمایشات در حضور نانوذره ZnO، در pH ۷ و دماهای ۲۵°C و ۳۵ با استفاده از طول موج برانگیزش ۲۸۰ نانومتر صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

واکنش لیزوزیم با نانوذره *ZnO*

جذب نوری لیزوزیم- نانو ذره ZnO در شکل ۳ نشان داده شده است. جذب (A) محلول لیزوزیم با افزایش غلظت نانوذره ZnO افزایش می‌یابد، اما هیچ گونه تغییری در طول موج قله در ۲۸۰ نانومتر رخ نمی‌دهد.



شکل ۳. تغییرات جذب ۲۸۰ نانومتر در مقابل غلظت‌های مختلف نانو ذره *ZnO*

این مشاهدات به دلیل تشکیل کمپلکس حالت پایه (*lysozyme*..... ZnO) می‌باشد و این احتمال وجود دارد که کمپلکس *lysozyme*..... ZnO ضریب جذب مولی بیشتری نسبت به لیزوزیم جذب نشده بر سطح نانوذره داشته باشد، ولی کماکان حداکثر جذب در همان ناحیه ۲۸۰ نانومتر می‌باشد. نتایج به دست آمده از مطالعات، نشان می‌دهد که یک برهمکنش بین نانوذره ZnO و لیزوزیم از طریق تشکیل کمپلکس حالت پایه وجود دارد. لیزوزیم دارای ۱۸ ریشه بازی می‌باشد؛ بنابراین بار مثبت زیادی را در محیط خنثی (نقطه ایزوالکتریک۱۱) حمل می‌کند (Liu *et al*., 1995). در ابتدا با مخلوط شدن سوسپانسیون نانوذره ZnO و لیزوزیم، جذب لیزوزیم از طریق برهمکنش الکترواستاتیک صورت می‌گیرد. هنگامی که فاصله بین لیزوزیم و ZnO به اندازه کافی کوتاه شد، پیوند هیدروژنی بین نانوذره ZnO و زنجیره‌های قطبی آمینواسیدها تشکیل می‌شود. ترکیب برهمکنش‌های غیرکوالان الکترواستاتیک و پیوند هیدروژنی منجر به محکم شدن اتصال لیزوزیم و نانوذره *ZnO* می‌شود.

اثر نانوذرات *ZnO* بر پایداری حرارتی لیزوزیم

T_m یکی از شاخص‌های پایداری حرارتی پروتئین است و T_m بالاتر نشان‌دهنده پایداری بیشتر پروتئین است. دگرگون‌سازی پروتئین، روشی کلیدی در ترمودینامیک و آنالیز جایگاه اتصال است که می‌تواند درک ما را از ارتباط ساختار و عملکرد پروتئین افزایش دهد. پایداری حرارتی آنزیم لیزوزیم با محاسبه تغییرات انرژی آزاد گیبس و T_m آنزیم محاسبه می‌شود. با محاسبه کسر دناتوراسیون (F_d) و قرار دادن آن در رابطه زیر، تغییرات انرژی آزاد گیبس به دست می‌آید (Shareghi *et al*., 2015):

$$\Delta G^{\circ} = -RT\ln K_{eq} = -RT\ln[F_d/(1-F_d)]$$
$$= -RT\ln\left[\left(\frac{A_N - A_{obs}}{A_N - A_D}\right)\Big/1-\left(\frac{A_N - A_{obs}}{A_N - A_D}\right)\right]$$

در این رابطه A_N و A_D مقادیر جذب آنزیم در حالت طبیعی و دگرگون شده هستند و A_{obs} جذب مشاهده شده، ΔG° تغییرات انرژی آزاد استاندارد، F_d کسر دناتوراسیون، R ثابت گازها و T دمای مطلق می‌باشد. T_m یا دمای ذوب پروتئین، دمایی است که ΔG° برابر با صفر است. ما همچنین با استفاده از شیب خط منحنی ΔG° توانستیم ΔS_m° (تغییرات انتروپی) را به دست آورده و با قرار دادن آن در رابطه $\Delta H_m^{\circ} = T_m \Delta S_m^{\circ}$ مقدار ΔH_m° (تغییرات آنتالپی) را نیز به دست آوریم (Shareghi *et al*., 2015). با توجه به مطالب فوق، مطالعات پایداری حرارتی در حضور نانوذرات ZnO انجام شد. بر این اساس مقادیر T_m، در جدول ۱ محاسبه شده است. لیزوزیم به طور طبیعی پایداری بسیار بالایی دارد؛ به‌طوری که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت نانوذرات ZnO، T_m کاهش می‌یابد. شکل ۴ نشان‌دهنده تغییرات ΔG° در برابر دما می‌باشد (Privalov, 1979).

تغییرات T_m لیزوزیم در غلظت‌های مختلف نانوذره در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. و طبق آنچه در جدول ۱ نشان داده شده است، افزایش غلظت نانوذره باعث کاهش دمای Tm و پایداری آنزیم می‌گردد.

جدول ۱. تغییرات پارامتر T_m در غلظت‌های مختلف نانوذره ZnO در pH۷

غلظت‌های ZnO (mg/ml)	T_m (K) in pH 7
۰/۰۳	۳۵۱
۰/۰۶	۳۴۹
۰/۰۹	۳۳۸
۰/۱۲	۳۲۴
۰/۱۵	۳۱۷

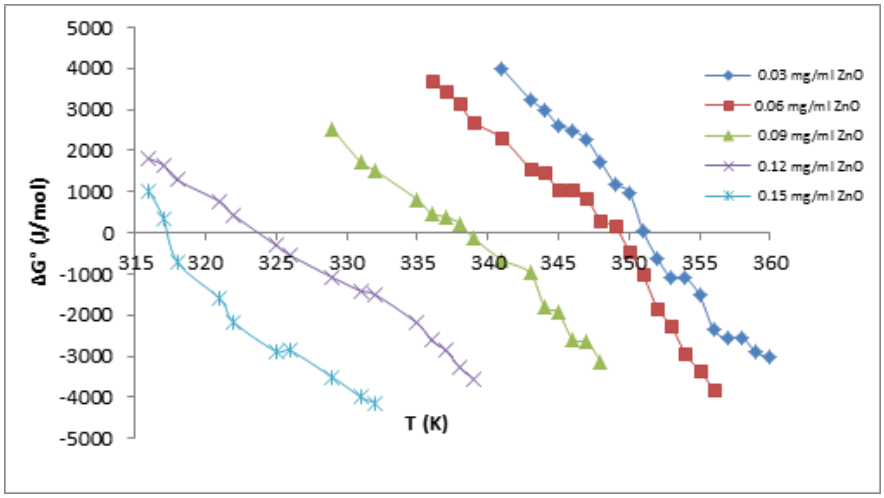
بررسی نتایج مطالعه سینتیکی لیزوزیم در حضور ZnO در دمای ۳۵ °C

در این مطالعه، اثر غلظت‌های مختلف نانوذره ZnO در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۷ بر سینتیک آنزیم لیزوزیم مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج

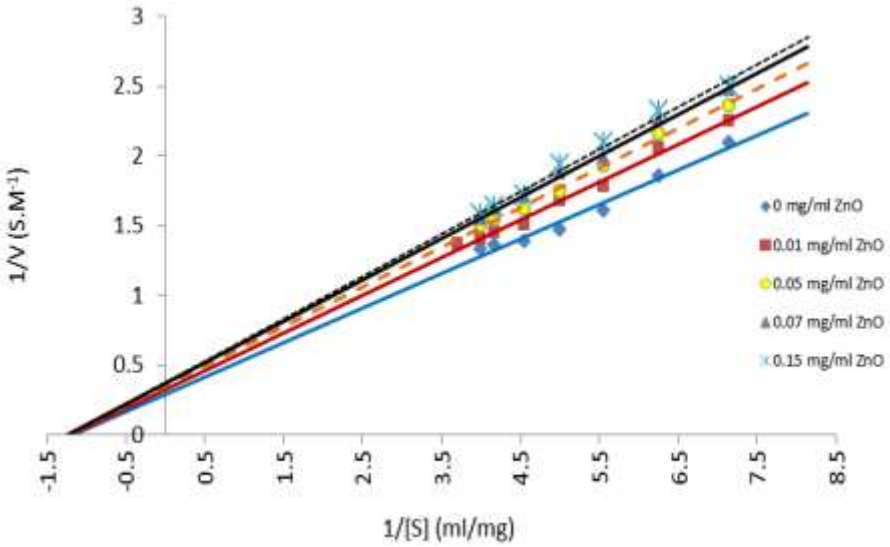
این مطالعه در شکل ۵ آورده شده است. همان‌طور که در این نمودار دیده می‌شود، با افزایش غلظت نانوذره ZnO از ۰ تا ۰/۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، V_{max} کاهش می‌یابد، اما تمایل به سوبسترا بی‌تغییر می‌ماند (K_m ثابت). در واقع نانوذره ZnO فعالیت آنزیم لیزوزیم را به روش مهارکنندگی غیررقابتی مهار کرده است. در این حالت، مهارکننده به لیزوزیم متصل شده و کمپلکس بی‌هدفی را تولید می‌کند که قادر به ایجاد محصول نخواهد بود. نانوذره ZnO به جایگاه دیگری غیر از جایگاه فعال آنزیم متصل می‌شود و سبب تغییر کنفورماسیون آنزیم شده، به طوری که واکنش کاتالیزی انجام نمی‌شود. جدول ۲، تغییرات V_{max} (فعالیت آنزیم) در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره ZnO در pH ۷ را نشان می‌دهد.

جدول ۲. تغییرات Vmax آنزیم لیزوزیم در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره ZnO در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد و pH۷

[ZnO]mg/ml	V_{max} (s/M)
۰	۳/۵
۰/۰۱	۳/۱
۰/۰۵	۲/۸
۰/۰۷	۲/۷
۰/۱۵	۲/۶



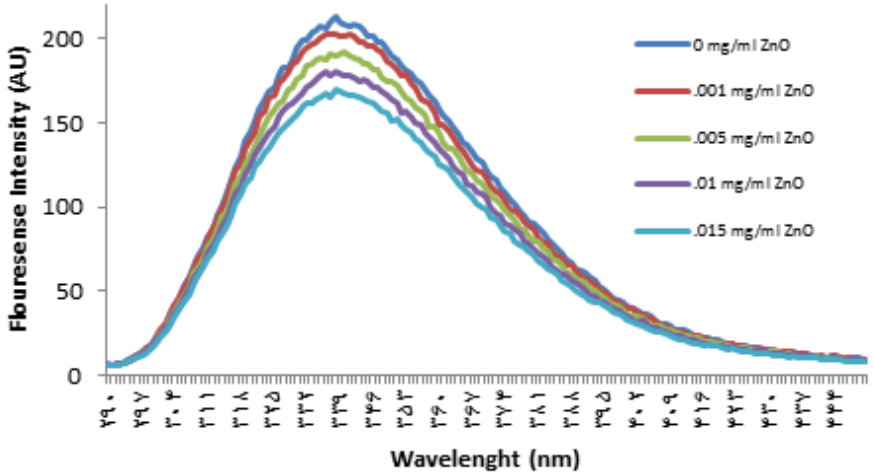
شکل ٤. تغییرات انرژی آزاد گیبس لیزوزیم در مقابل دما در غلظت‌های مختلف نانو ذرات ZnO



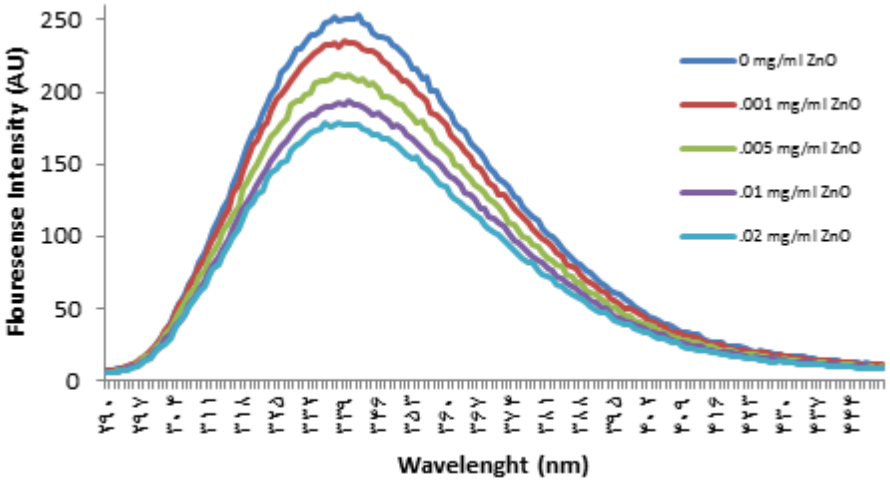
شکل ۵. نمودار لینویور– برک برای آنزیم لیزوزیم در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره ZnO در دمای ۳۵°C

بررسی نتایج مطالعه اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در حضور ZnO در دمای ۲۵°C و ۳۵

آزمایش‌ها نشان داده‌اند که با افزایش غلظت نانوذره ZnO شدت نشر لیزوزیم کاهش یافت. اتصال نانوذره ZnO به لیزوزیم، تأثیری بر ساختار تیروزین ندارد، ولی ساختار تریپتوفان را تغییر می‌دهد (Chakraborti *et al.*, 2009). در واقع با افزایش غلظت نانوذره ZnO، قطبیت محیط اطراف رزیدیوهای تریپتوفان زیاد می‌شود و تریپتوفان‌ها به محیط هیدروفیلتر انتقال می‌یابند و در نتیجه شدت فلورسانس کم می‌شود. با افزایش دما، این کاهش شدت فلورسانس دیده می‌شود؛ چون وقتی دما زیاد شود، ساختار آنزیم لیزوزیم بازتر شده و رزیدیوهای تریپتوفان بیشتری به محیط آبدوست می‌روند (شکل ۶a, b).



شکل ٦. a تغییرات نشر فلورسانس آنزیم لیزوزیم در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره ZnO در pH 7 و دمای ۲۵°C



شکل ٦. b تغییرات نشر فلورسانس آنزیم لیزوزیم در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره ZnO در pH 7 و دمای ۳۵°C

نتیجه‌گیری

زمانی که نانو ذرات، وارد بدن می‌شوند با مایعات بیولوژیک، مانند پلاسما برهم کنش می‌دهند. نانو ذرات در محیط فیزیولوژیک به پروتئین‌ها متصل می‌شوند و پوششی به نام هاله پروتئینی را تشکیل می‌دهند. خصوصیات سطح نانوذرات نحوه اتصال نانوذرات را با پروتئین‌ها مشخص می‌کند. خصوصیات سطح نانوذرات با ویژگی‌هایی مثل شکل، موقعیت شیمیایی، عملکرد

سطحی، زاویه پیچش، تخلخل، زبری، بلورینگی، هیدروفوبیسیتی و هیدروفیلیسیتی تعیین می‌گردد. نیروهای اصلی مسئول اتصال بین نانوذرات و پروتئین‌ها نیروهای واندروالسی، نیروهای پراکندگی لاندن، دوقطبی و پیوند هیدروژنی هستند (Arakha, 2012). ما در این آزمایش، تأثیر نانوذره ZnO بر فعالیت سینتیکی، پایداری حرارتی (T_m) و جذب آنزیم لیزوزیم را مورد بررسی قرار داده‌ایم. نتایج حاصل از مطالعات مربوط به فعالیت سینتیکی لیزوزیم در حضور نانوذره ZnO نشان می‌دهد که این نانوذره ZnO، فعالیت سینتیکی (V_{max}) آنزیم لیزوزیم را کاهش می‌دهد. در مطالعات اسپکتروفتومتری (جذب) آنزیم لیزوزیم در حضور نانوذره ZnO، مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت نانوذره ZnO، میزان جذب لیزوزیم در طول موج ۲۸۰ نانومتر زیاد می‌شود. این افزایش جذب به خاطر ایجاد کمپلکس لیزوزیم–ZnO و به دنبال آن افزایش کدورت محلول می‌باشد. مطالعات مربوط به پایداری حرارتی (T_m) لیزوزیم در حضور نانوذره ZnO نشان می‌دهد که در ابتدا نانوذره ZnO، Tm را نسبت به T_m لیزوزیم طبیعی کم می‌کند و در غلظت‌های بعدی نانوذره ZnO، T_m لیزوزیم زیاد می‌شود. اکتیو سایت لیزوزیم دارای دو رزیدیو Trp می‌باشد که برای اتصال سوبسترا دارای اهمیت می‌باشند. نانوذرات ZnO به نزدیک این دو رزیدیو Trp متصل می‌شود. نانوذره ZnO شدت نشر لیزوزیم را کاهش داده و بدین ترتیب ساختار پآنزیم را بازتر می‌کند. یک ملکول پروتئین با یک نانوذره برهم کنش می‌دهد. بنابراین در مجموع نانوذرات قادرند تجمعات پروتئین– پروتئین را بشکنند.

سپاسگزاری

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

REFERENCES

Arakha, M.; (2012). Investigation on the effect of zinc oxide nanoparticles in the aggregation of hen egg lysozyme. National Institute of Technology Rourkela.

Bystrzejewska-Piotrowska, G.; Golimowski, J.; Urban, P.L.; (2009). Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management. Waste Management; 29: 2587-2595.

Chakraborti, S.; Chatterjee, T.; Joshi, P.; Poddar, A.; Bhattacharyya, B.; Singh, S.P.; Gupta, V.; Chakrabarti, P.; (2009). Structure and activity of lysozyme on binding to ZnO nanoparticles. Langmuir; 26: 3506-3513.

Chen, F.-F.; Tang, Y.-N.; Wang, S.-L.; Gao, H.-W.; (2009). Binding of brilliant red compound to lysozyme: insights into the enzyme toxicity of water-soluble aromatic chemicals. Amino acids; 36: 399-407.

Farhadian, S.; Shareghi, B.; Salavati-Niasari, M.; Amooaghaei, R.; (2012). Spectroscopic studies on the interaction of nano-TiO2 with lysozyme. Journal of Nanostructures; 95-103.

Heinlaan, M.; Ivask, A.; Blinova, I.; Dubourguier, H.-C.; Kahru, A.; (2008). Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO_2 to bacteria Vibrio fischeri and crustaceans Daphnia magna and Thamnocephalus platyurus. Chemosphere; 71: 1308-1316.

Kopac, T.; Bozgeyik, K.; Yener, J.; (2008). Effect of pH and temperature on the adsorption of bovine serum albumin onto titanium dioxide. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects; 322: 19-28.

Liu, H.-S.; Wang, Y.-C.; Chen, W.-Y.; (1995). The sorption of lysozyme and ribonuclease onto ferromagnetic nickel powder 1. Adsorption of single components. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces; 5: 25-34.

Merlini, G.; Bellotti, V.; (2005). Lysozyme: a paradigmatic molecule for the investigation of protein structure, function and misfolding. Clinica chimica acta; 357: 168-172.

Privalov, P.L.; (1979). Stability of proteins: small globular proteins. Advances in protein chemistry; 33: 167.

Shareghi, B.; Farhadian, S.; Zamani, N.; Salavati-Niasari, M.; Moshtaghi, H.; Gholamrezaei, S.; (2015). Investigation the activity and stability of lysozyme on presence of magnetic nanoparticles. Journal of Industrial and Engineering Chemistry; 21, 862-867.

Vörös, J.; (2004). The density and refractive index of adsorbing protein layers. Biophysical journal; 87: 553-561.

Wang, J.; Liu, Y.; Jiao, F.; Lao, F.; Li, W.; Gu, Y.; Li, Y.; Ge, C.; Zhou, G.; Li, B.; (2008). Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO_2 nanoparticles. Toxicology; 254: 82-90.

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: 1694-1701.

Xu, Z.; Liu, X.-W.; Ma, Y.-S.; Gao, H.-W.; (2010). Interaction of nano-TiO2 with lysozyme: insights into the enzyme toxicity of nanosized particles. Environmental Science and Pollution Research; 17: 798-806.

Yongli, C.; Xiufang, Z.; Yandao, G.; Nanming, Z.; Tingying, Z.; Xinqi, S.; (1999). Conformational changes of fibrinogen adsorption onto hydroxyapatite and titanium oxide nanoparticles. Journal of colloid and interface science; 214: 38-45.