

بررسی اثر متقابل نانوذرات نیمه‌هادی کادمیوم تلوراید بر لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی و سینتیک آنزیمی

صادق فرهادیان^{1*}، لیدا مومنی^{2*}، بهزاد شارق³

- 1- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، ایران
- 2- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران
- 3- استاد، تمام گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، ایران

*نویسنده‌های مسئول: lida.momeni@pnu.ac.ir sadeghfarhadian@gmail.com

صندوق پستی 19395-4697

پذیرش: 1401/1/14

دریافت: 1400/3/24

چکیده

در این مقاله، تعامل بین لیزوزیم و نانوذرات کادمیوم تلوراید با استفاده از طیف‌سنجی UV-Vis، فلئورسانس، پایداری حرارتی، سینتیک و روش‌های اسپکتروسکوپی دورنگ نمایی دورانی (CD) در pH 7/25 بررسی شد. ثابت شد که خاموشی فلئورسانس لیزوزیم به‌وسیله نانوذرات کادمیوم تلوراید به‌طور عمده نتیجه تشکیل کمپلکس نانوذرات کادمیوم تلوراید-لیزوزیم بود. به‌وسیله نتایج خاموشی فلئورسانس، ثابت خاموشی استرن ولمر (K_{SV})، ثابت اتصال (K_a) و جایگاه‌های اتصال (n) محاسبه شد. در pH 7/25 سطح ثابت اتصال براساس نتایج فلئورسانس برابر $2/33 \times 10^3$ بود. پیوند هیدروژن و نیروی وان‌دروالس در فرایند اتصال مؤثر است. بلو شیفت طیف جذبی فلئورسانس پروتئین پس از افزودن نانوذرات کادمیوم تلوراید نشان می‌دهد که ریزمحیط در اطراف بقایای تریپتوفان به‌وسیله نانوذرات کادمیوم تلوراید آشفته شده است. اثر نانوذرات کادمیوم تلوراید بر صورت‌بندی لیزوزیم با استفاده از طیف‌های UV-Vis و طیف‌های CD تجزیه و تحلیل شد که شواهدی را ارائه می‌دهد که ساختار ثانویه لیزوزیم با میان‌کش نانوذرات کادمیوم تلوراید با لیزوزیم تغییر کرده است.

کلید واژگان: لیزوزیم، کادمیوم تلوراید، خاموشی فلئورسانس، پایداری حرارتی، فعالیت.

مقدمه

برهم‌کنش پروتئین‌ها با نانوذرات بخش مهمی از پژوهش‌ها است که کاربردهای عملی بسیاری دارد. نانوذرات به دلیل خصوصیات منحصر به فرد خود در تولید صنعتی و زندگی روزمره استفاده می‌شوند [1-2]، برای مثال برخی از نانوذرات در ضدآفتاب‌ها برای جذب نور ماورای بنفش و در خمیردندان و رنگ‌ها برای ایجاد رنگ سفیدی دائمی استفاده می‌شوند. علاوه بر این، نانوذرات در پزشکی، تجهیزات ورزشی، آرایشی، روکش، سلول‌های سوختی، صنعت الکترونیک و سایر صنایع نیز کاربردهای وسیعی دارند [3-6]. امروزه برخی از نانوذرات‌ها به عنوان محصولات تحویل دارویی آزمایش می‌شوند و به عنوان نقاط کوانتومی که می‌توانند تجسم سلول‌های سرطانی در بدن باشند، به تشخیص بیماری کمک می‌کنند. این مواد معایب متعددی نیز دارند و به دلیل اینکه اندازه نانوذرات از سلول‌ها کوچک‌تر است، می‌توانند در سلول‌ها نفوذ کنند، آسیب جسمی و یا واکنش التهابی مضر ایجاد کنند. استرس اکسیداتیو ناشی از نانوذرات می‌تواند به لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها آسیب برساند و پراکسیداسیون لیپیدها منجر به تغییر در مشخصات غشای سلولی می‌شود [7]. ردیاب‌های تابش هسته‌ای نیمه‌هادی و نانوذرات نیمه‌هادی در چند سال گذشته پیشرفت به نسبت سریعی را تجربه کرده‌اند. آنها اکنون در زمینه‌های مختلفی از جمله فیزیک هسته‌ای، نجوم اشعه ایکس و اشعه گاما و پزشکی هسته‌ای استفاده می‌شوند. قابلیت‌های تصویربرداری، قدرت تفکیک انرژی مناسب و توانایی ساخت سیستم‌های جمع و جور، طیف گسترده تحریک، طیف نشر باند باریک و متقارن، تنظیم دقیق اوج نشر آنها، جمع‌آوری نوری ناچیز و پایداری شیمیایی، در مقایسه با انواع دیگر ردیاب‌ها مانند ردیاب‌های گاز و صیقل‌دهنده‌ها، ویژگی‌های بسیار جذابی هستند. این

خصوصیات منحصر به فرد نانوذرات نیمه‌هادی پتانسیل بسیار خوبی در کریستال‌های فوتونی [8]، دستگاه‌های انتشار نور نازک [9] و به‌ویژه برچسب‌های بیولوژیکی [9-13] نشان داده‌اند. در میان نیمه‌هادی‌های ترکیبی، کادمیوم تلوراید از جمله امیدوارکننده‌ترین مواد برای ردیاب‌های تابش با تفکیک‌پذیری انرژی خوب، راندمان تشخیص بالا و عملکرد دمای اتاق هستند. کادمیوم تلوراید یکی از مواد نانوذرات نیمه‌هادی II-IV و III-V است. نانوذرات نیمه‌هادی کادمیوم تلوراید محلول در آب، در سیستم فاز آبی می‌توانند سنتز شوند و سنتز آن تجدیدپذیرتر و ارزان‌تر است. آنها پتانسیل تبدیل شدن به یکی از مهم‌ترین مواد برچسب‌گذاری نیمه‌هادی را برای کاربردهای بیولوژیکی و پزشکی دارند. با این وجود، هنوز مشکلاتی در مورد چگونگی استفاده ایمن و مؤثر از آنها در سیستم‌های بیولوژیکی وجود دارد [14].

آنزیم‌ها، بیوکاتالیست‌های بسیار خاص و کارآمد در طیف گسترده‌ای از برنامه‌های کاربردی هستند [15؛ 16]. لیزوزیم که در سفیده تخم‌مرغ، اشک انسان، بزاق و سایر مایعات بدن وجود دارد، قادر به از بین بردن دیواره سلولی باکتری‌های خاص است و به عنوان ضد عفونی‌کننده ضعیف عمل می‌کند. این ویژگی در سال 1922 توسط الکساندر فلمینگ کشف شد. لیزوزیم به عنوان آنزیم مدل در مطالعات آنزیمولوژی، زیست‌شناسی مولکولی، ژنتیک، شیمی پروتئین و ایمونولوژی استفاده شده است [17]. لیزوزیم پروتئین کروی مونومر کوچکی حاوی 129 اسید آمینه است که در ساختار آن مارپیچ آلفا، صفحات بتا، ترن‌ها و ساختارهای بی‌نظم وجود دارد. در ساختار لیزوزیم شش تریپتوفان، سه تیروزین و چهار پیوند دی‌سولفیدی نیز دیده می‌شود. لیزوزیم از راه اتصال به آنتی بیوتیک‌ها برای درمان التهاب، آبسه، استوماتیت و غیره استفاده می‌شود [18؛ 19]. بنابراین مطالعات در مورد برهم‌کنش نانوذرات کادمیوم تلوراید و لیزوزیم از

مختلف محلول نانوذرات کادمیوم تلوراید انجام شد. تغییرات جذب ناشی از حضور و عدم حضور نانوذرات کادمیوم تلوراید در مقابل غلظت نانوذرات ترسیم شد.

پایداری حرارتی لیزوزیم

پایداری حرارتی لیزوزیم آزاد و کمپلکس‌های لیزوزیم- نانوذرات کادمیوم تلوراید با ثبت شدت جذب آنزیم در دماهای مختلف بررسی شدند. طیف UV-Vis لیزوزیم در 280 نانومتر در حضور و غیاب مقادیر مختلف نانوذرات کادمیوم تلوراید با اسپکتروفتومتر UV-Vis به دست آمد. نخست دستگاه با بافر فسفات سدیم بلانک شد و سپس طیف لیزوزیم با تیتراسیون نانوذرات کادمیوم تلوراید به دست آمد. تمام مطالعات در کوتهای کوارتز شامل 0/1 میلی گرم بر میلی لیتر لیزوزیم و غلظت‌های مختلف نانوذرات کادمیوم تلوراید انجام شد. سرعت اسکن دما برای محلول‌های لیزوزیم 0/1 میلی گرم بر میلی لیتر در حضور و عدم حضور نانوذرات کادمیوم تلوراید یک درجه سانتیگراد در هر دقیقه در طول موج 280 نانومتر بود. داده‌های جذب به عنوان تابعی از دما ترسیم شدند. دمای ذوب، T_m ، به عنوان دمایی که ΔG° در آن صفر تعریف شده بود، به عنوان نقطه میانی منحنی ذوب تعیین شد. تمامی آزمایش‌های انجام شده حداقل سه بار تکرار شده‌اند، بنابراین تکرارپذیر هستند.

مطالعه اسپکتروفلوریمتری لیزوزیم در حضور نانوذره

کادمیوم تلوراید در دماهای مختلف

به منظور انجام این آزمایش از دستگاه اسپکتروفلوریمتر شیمادزو مدل RF-5301PC مجهز به سیستم کنترل الکترونیکی دما و نمونه لیزوزیم با غلظت 0/1 میلی گرم در میلی لیتر استفاده شد. آزمایش‌ها در حضور نانوذرات کادمیوم تلوراید، در pH 7/25 و در دماهای مختلف با

جنبه‌های مختلف به توضیح ذات شیمیایی برهم‌کنش بین ماکرومولکول‌های زیستی و نانومواد نیمه‌هادی کمک می‌کند [20؛ 21]. در این مطالعه، آثار نانوذرات کادمیوم تلوراید بر تغییرات کنفورماسیونی و فعالیت لیزوزیم به وسیله طیف سنجی فلئورسانس و طیف‌سنجی UV-Vis بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

دستگاه‌ها و مواد

طیف‌های فلئورسانس محلول‌ها با دستگاه طیف‌سنجی فلئورسانس (اسپکتروفتومتر فلئورسانس شیمادزو مدل RF-5301PC) ثبت شد. مطالعات سینتیک آنزیم لیزوزیم به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis فارماسیا مدل 4000، مجهز به سیستم کنترل الکترونیکی دما انجام شد. از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) برای اندازه‌گیری اندازه و شکل نانوذرات کادمیوم تلوراید (اندازه 20 نانومتر) استفاده شد. کادمیوم تلوراید در آب دیونیزه شده، به حالت تعلیق درآمد. در سه تکرار ده دقیقه‌ای قبل از استفاده به کمک دستگاه مافوق صوت، مخلوط شد. لیزوزیم سفیده تخم مرغ (خریداری شده از سیگما) در بافر سدیم فسفات (pH 7/25) حل و در دمای کمتر از 4 درجه سانتیگراد نگهداری شد.

روش‌ها

مطالعه اسپکتروفتومتری لیزوزیم

طیف جذب فرابنفش با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis مجهز به سیستم کنترل الکترونیکی دما اندازه‌گیری شد. غلظت لیزوزیم 0/1 میلی گرم در میلی لیتر بود. این دستگاه به کمک بافر فسفات سدیم به صورت پایه تنظیم شد و پس از تیتراسیون نانوذرات کادمیوم تلوراید، طیف لیزوزیم به دست آمد. تغییرات جذب در طول موج 280 نانومتر ثبت شد. تمام مطالعات در کوتهای کوارتز حاوی 0/1 میلی گرم در میلی لیتر لیزوزیم و غلظت‌های

دیواره باکتری 450 نانومتر است، زیرا در اثر تخریب دیواره باکتری کدورت سوسپانسیون حاوی باکتری کاهش پیدا می‌کند که در طول موج مرئی قابل ثبت است. تمام مطالعات در کووت‌های کوارتز حاوی 0/1 میلی گرم بر میلی لیتر لیزوزیم و غلظت متفاوت سوسپانسیون نانوذرات کادمیوم تلوراید انجام شد. بعد از جمع‌آوری اطلاعات نمودار لینووربرک رسم شد.

طیف دورنگ نمایی دورانی (CD)

با استفاده از کووت به طول مسیر 1 میلی متر، طیف‌های CD از 190 تا 260 نانومتر با گام داده ای 1 نانومتر و اسکن در محلول بافر فسفات با pH 7/25 جمع‌آوری شد. زمان پاسخ و پهنای باند به‌ترتیب 0/3 ثانیه و 1 نانومتر بود.

نتایج و بحث

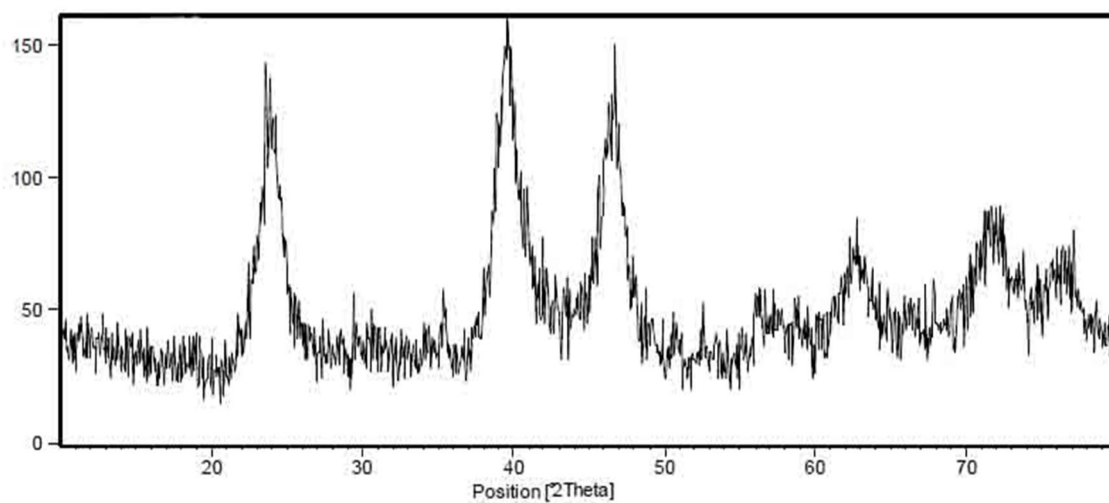
تعیین اندازه ذرات نانوذرات کادمیوم تلوراید

الگوی XRD محصول با زاویه پراش 80-10 بررسی شد و نشان داد نانوذرات کادمیوم تلوراید ساختار بلورین خوبی دارند (شکل 1 الف). مورفولوژی نانوذرات کادمیوم تلوراید به‌وسیله SEM بررسی شد. تصویر SEM (شکل 1 ب) نشان می‌دهد که نانوذرات کادمیوم تلوراید مورفولوژی کروی با قطر حدود 20 نانومتر دارند [22].

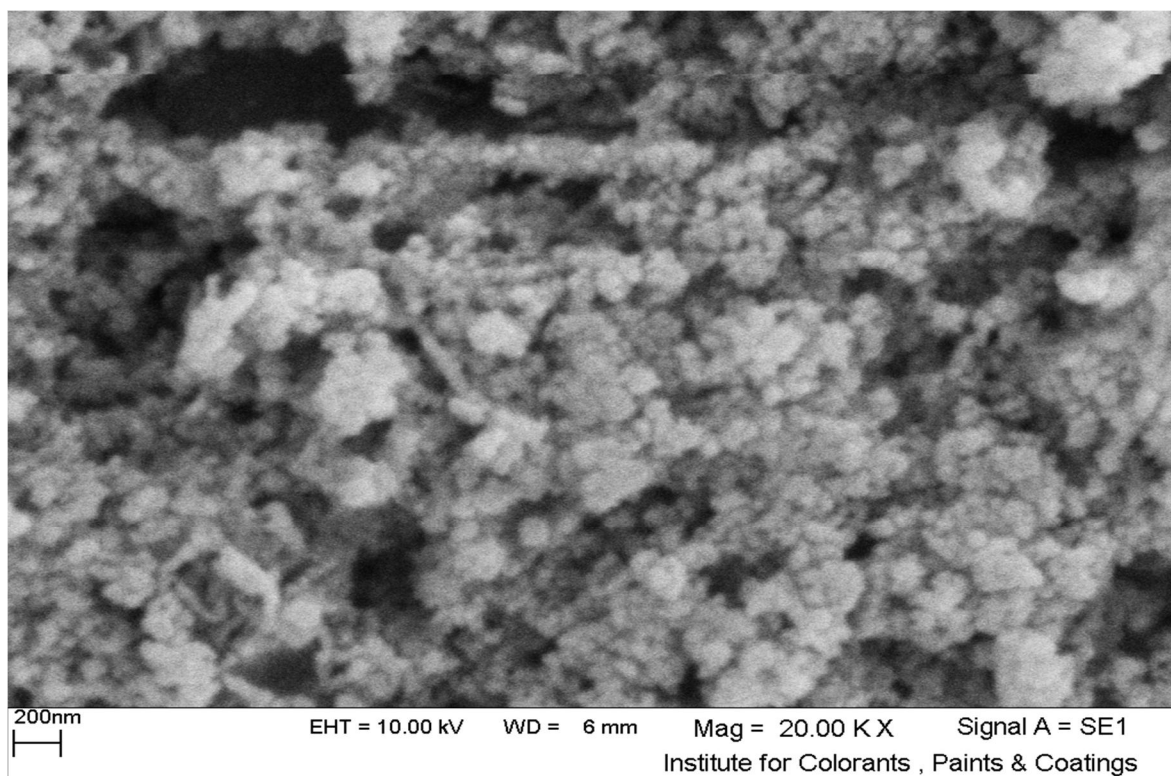
استفاده از طول موج برانگیزش 280 نانومتر صورت گرفت. طیف نشر از طول موج 290 تا 450 نانومتر در حضور و غیاب غلظت‌های مختلف نانوذرات کادمیوم تلوراید و در دماهای 298، 308 و 318 کلوین اندازه‌گیری شد که طول موج تحریک در 280 نانومتر بود. طیف فلئورسانس در هر مرحله از فرایند، با بالابردن دما ثبت شد. محلول‌ها به مدت 1 دقیقه قبل از اسکن انکوبه شدند تا به تعادل برسند. فلئورسانس لیزوزیم با طول موج 280 نانومتر، به‌وسیله یک لامپ قوسی زنون برانگیخته شد. اندازه‌گیری‌ها بر سیستم‌های لیزوزیم- بافر، لیزوزیم- نانوذرات کادمیوم تلوراید- بافر به‌عنوان تابعی از دما انجام شد. تمام مطالعات در کووت‌های کوارتز حاوی 0/1 میلی گرم در میلی لیتر لیزوزیم و غلظت‌های مختلف محلول نانوذرات کادمیوم تلوراید انجام شد.

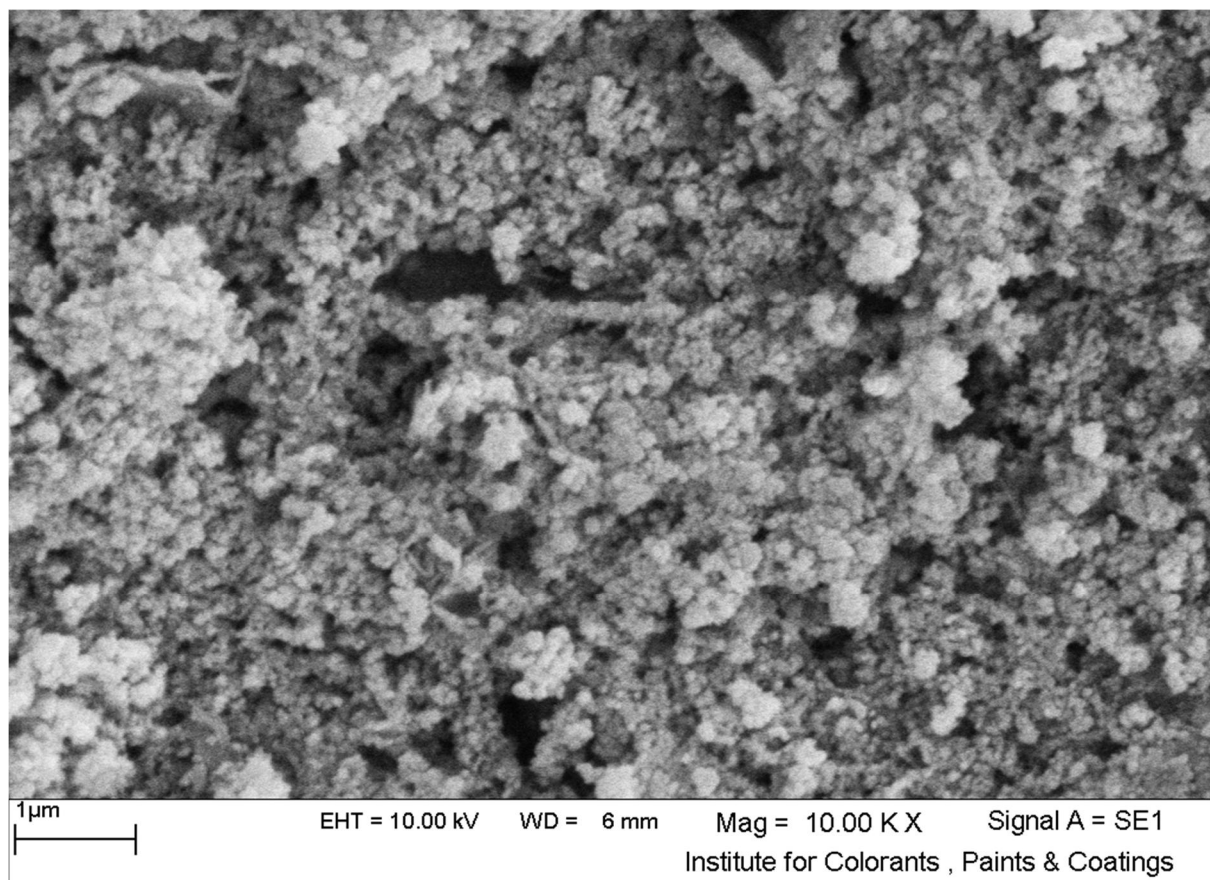
سنجش فعالیت آنزیمی

سنجش توریدیمتری (فعالیت) لیزوزیم با کاهش تراکم نوری کدورت سوسپانسیون (در حدود 0/3 میلی گرم در میلی لیتر در میکروکوکوس لیزودیکتیکوس) به‌صورت فوتومتریک انجام شد. فعالیت لیزوزیم با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-Vis در طول موج 450 نانومتر در pH 7/25 و دمای 308 درجه کلوین در حضور و غیاب مقادیر مختلف نانوذرات کادمیوم تلوراید مورد بررسی قرار گرفت. طول موج منتخب، جهت پیگیری تخریب



Peak List	
15-0770; Cd Te	





شکل 1 الف) الگوی XRD نانوذرات کادمیوم تلوراید ب) تصاویر SEM نانوذرات کادمیوم تلوراید

جذب (هایپرکرومیسم) مشاهده شد (شکل 2). افزایش اندک در شدت جذب لیزوزیم نشان داد که ساختار لیزوزیم پس از اتصال به نانوذرات کادمیوم تلوراید تغییراتی دارد. نتایج نشان از تشکیل کمپلکس حالت پایه جدید بین نانوذرات کادمیوم تلوراید و لیزوزیم است. احتمالاً این کمپلکس ضریب جذب مولی بالاتری نسبت به حالت جذب نشده دارد. به محض برهم‌کنش با نانوذرات کادمیوم تلوراید با لیزوزیم، آگریزی ریزمحیط باقیمانده‌های تریپتوفان تغییر کرده است و صورت‌بندی آنزیم دچار تغییر می‌شود [24].

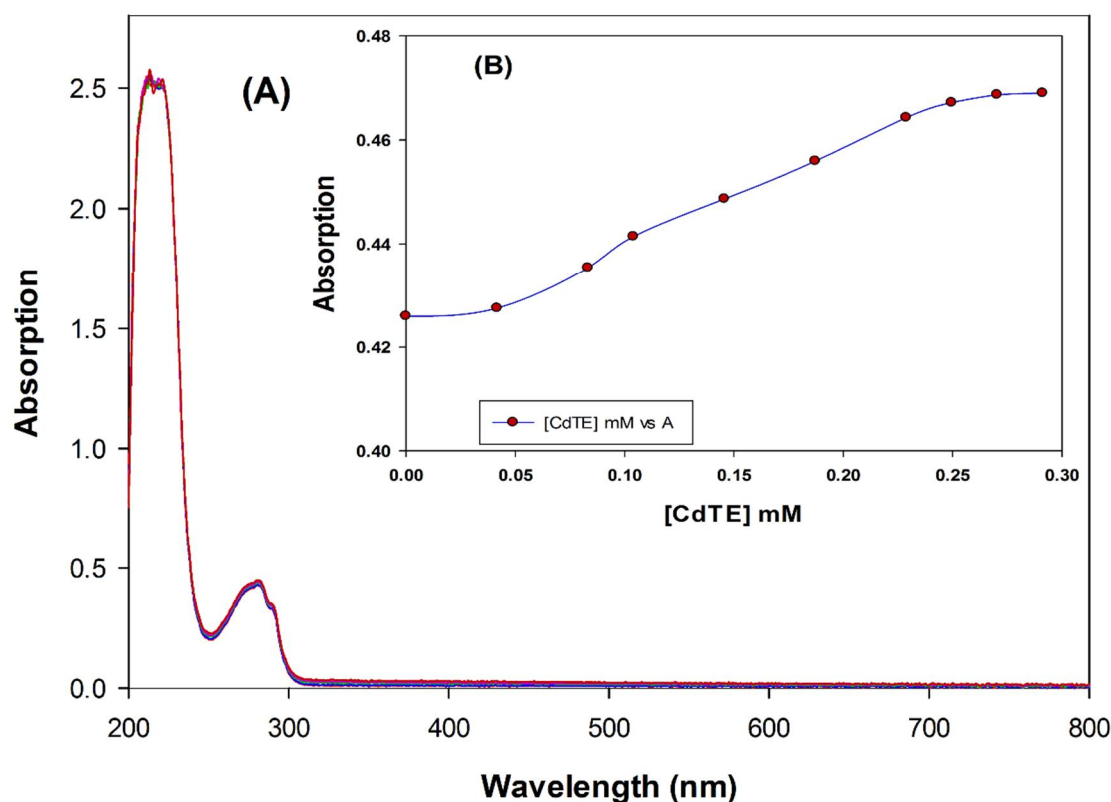
نقطه ایزوالکتریک نانوذرات کادمیوم تلوراید در 4/5 pH است، درحالی‌که نقطه ایزوالکتریک لیزوزیم در 11 pH است و این آنزیم دارای 18 باقیمانده‌های اسید آمینه کاتیونی (شش لیزیل) شامل یک ترمینال N، یازده آرژینیل

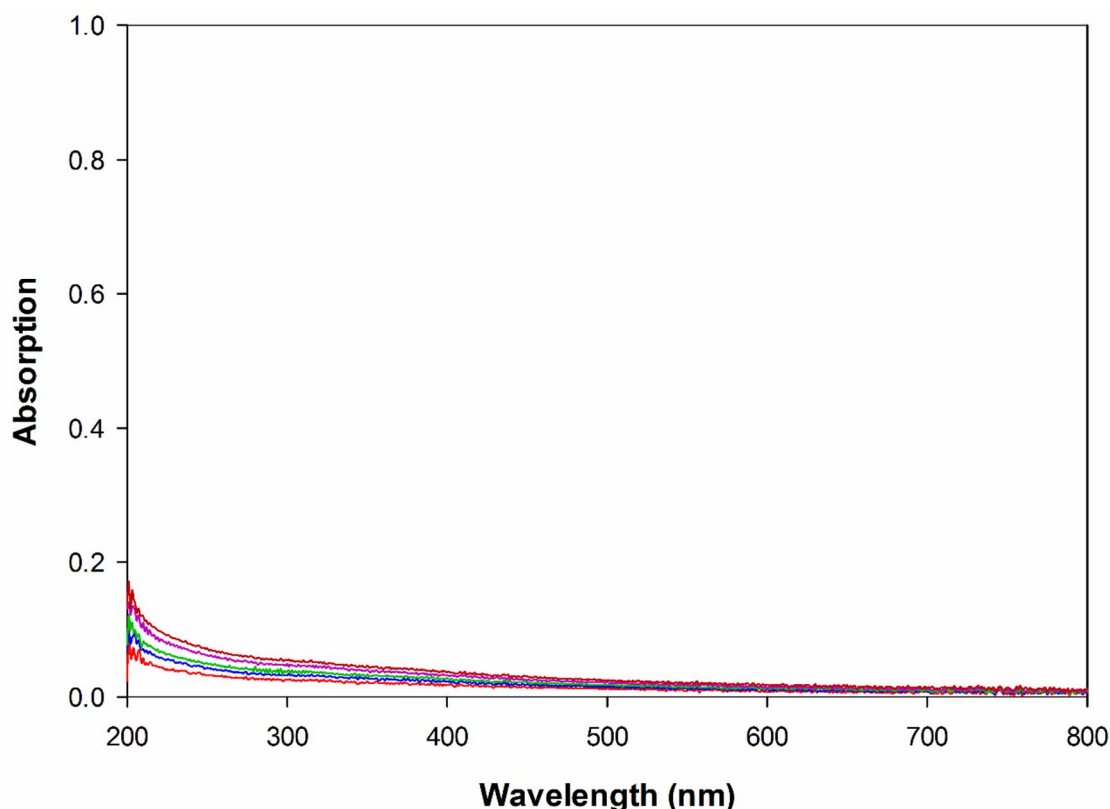
طیف‌سنجی UV-Vis

تکنیک طیف‌سنجی جذب UV-Vis می‌تواند برای کشف تغییرات ساختاری یک پروتئین استفاده شود [25]. به‌طور خاص، پیک جذب قوی در حدود 208 نانومتر، ساختار چارچوب پروتئین را منعکس می‌کند [23]. برای درک ماهیت برهم‌کنش نانوذرات کادمیوم تلوراید با لیزوزیم، طیف جذب UV-Vis کمپلکس لیزوزیم- نانوذرات کادمیوم تلوراید ثبت شد. طیف جذب UV-Vis لیزوزیم در حضور و غیاب غلظت مشخصی از نانوذرات کادمیوم تلوراید در شکل 2 الف نشان داده شده است. قله‌های اصلی جذب در محدوده طول موج 260-300 نانومتر قرار دارند. جذب UV-Vis نانوذرات کادمیوم تلوراید در شکل 2 ب نشان داده شده است. با افزودن غلظت نانوذرات کادمیوم تلوراید، در قله 280 نانومتر افزایش

باقیمانده‌های آروماتیک را تغییر دهد. لیزوزیم دو باند جذب اصلی دارد. پیک جذب قوی که در حدود 205 نانومتر قرار دارد، منعکس‌کننده پیک جذب پیوند پپتیدی است که به دلیل انتقال $C=O \pi \rightarrow \pi^*$ است و جذب لیزوزیم در حدود 280 نانومتر به‌طور عمده به‌وسیله باقیمانده‌های تیروزین و تریپتوفان میزان بسیار کمی باقیمانده‌های فنیل آلانین ایجاد می‌شود. زمانی که نانوذرات کادمیوم تلوراید به‌تدریج اضافه می‌شوند، شدت پیک جذب در حدود 205 نانومتر افزایش پیدا می‌کند. کاهش جزئی قله در حدود 280 نیز مشاهده می‌شود. نتایج نشان می‌دهد که ریزمحیط دو باقیمانده آروماتیک و صورت‌بندی پروتئین تغییر می‌کند [26].

و یک هیستیدیل است. بنابراین، سطح نانو کادمیوم تلوراید در pH 7/25 بارهای منفی زیادی را حمل می‌کند و لیزوزیم بارهای مثبت زیادی را در محیط خنثی به همراه دارد [25]. بنابراین بین سطح نانوذرات کادمیوم تلوراید و لیزوزیم، برهم‌کنش الکترواستاتیکی برقرار می‌شود. زمانی که فاصله بین لیزوزیم و نانوذرات کادمیوم تلوراید به اندازه کافی کوتاه شد، پیوند هیدروژنی بین لیگاند و زنجیره‌های قطبی آمینواسیدها تشکیل می‌شود. ترکیب برهم‌کنش‌های غیرکوالان الکترواستاتیک منجر به محکم‌شدن اتصال لیزوزیم و نانوذره نانوذرات کادمیوم تلوراید می‌شود. با افزودن تدریجی نانوذرات کادمیوم تلوراید به محلول پروتئین، نانوذرات کادمیوم تلوراید باید اسکلت پروتئین را شل کند و آبگریزی ریزمحیط

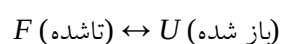




شکل 2 الف) طیف‌های جذب UV-Vis لیزوزیم در حضور و غیاب نانوذرات کادمیوم تلوراید (0-0/06 میلی مولار) در pH 7/25 و دمای 298 درجه کلوین ب) جذب در 280 نانومتر در حضور و غیاب نانوذرات کادمیوم تلوراید (0-0/06 میلی مولار)

پایداری حرارتی لیزوزیم

پایداری خالص یک پروتئین به صورت تفاوت در انرژی آزاد (ΔG°) بین حالت‌های طبیعی (تاشده) و دگرگون شده (بازشده) تعریف می‌شود [27]. ما می‌توانیم با استفاده از مکانیسم ساده‌ای که در زیر نشان داده شده است، تعادل بین این دو حالت را نمایان کنیم:



پایداری حرارتی آنزیم لیزوزیم، با اندازه‌گیری تغییرات انرژی آزاد گیبس و T_m محاسبه می‌شود. برای این هدف با تغییر آنزیم از حالت طبیعی به حالت دگرگون‌شده، کسر دگرگون‌سازی، F_U ، با رسم منحنی‌های دگرگون‌سازی و استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$F_u = \frac{(Y - Y_F)}{Y_U - Y_F} \quad (1)$$

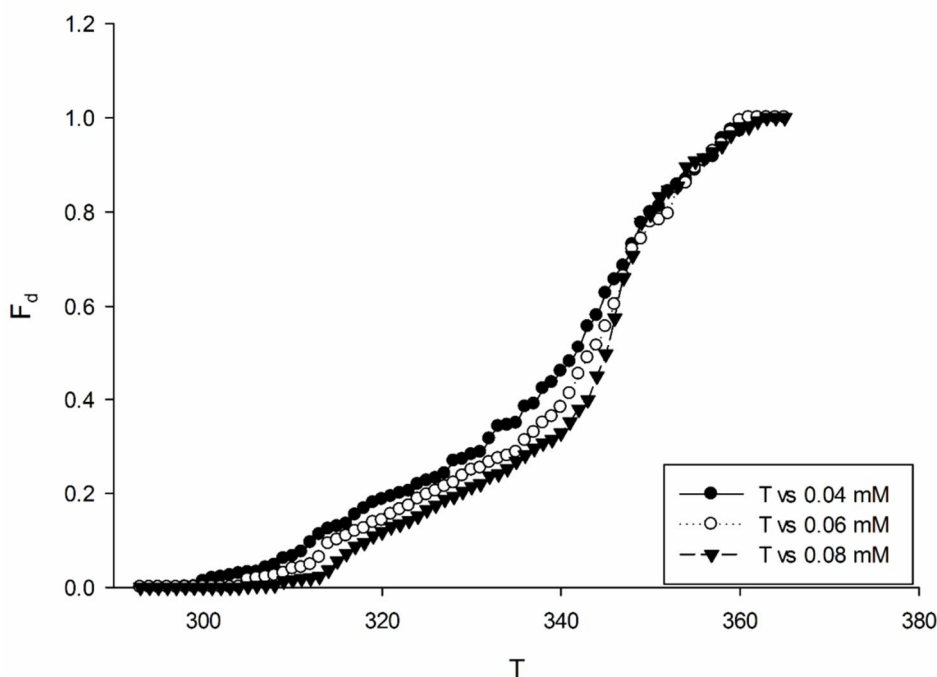
در این معادله، Y جذب مشاهده‌شده در غلظت لیگاند را نشان می‌دهد. Y_U و Y_F به ترتیب جذب حالت‌های طبیعی و دگرگون‌شده هستند [28]. تغییرات حاصل در F_U در حضور و غیاب نانوذرات کادمیوم تلوراید، در مقابل دما رسم شد (شکل 3 الف). ثابت تعادل، K_U ، با استفاده از مقادیر F_U محاسبه شد. مقادیر K_U بین حالت‌های تا خورده و باز شده پروتئین در غلظت خاصی از لیگاند می‌تواند با استفاده از فرمول 2 محاسبه شود:

$$K_U = \frac{F_u}{1 - F_u} = \frac{Y_F - Y}{Y - Y_u} \quad (2)$$

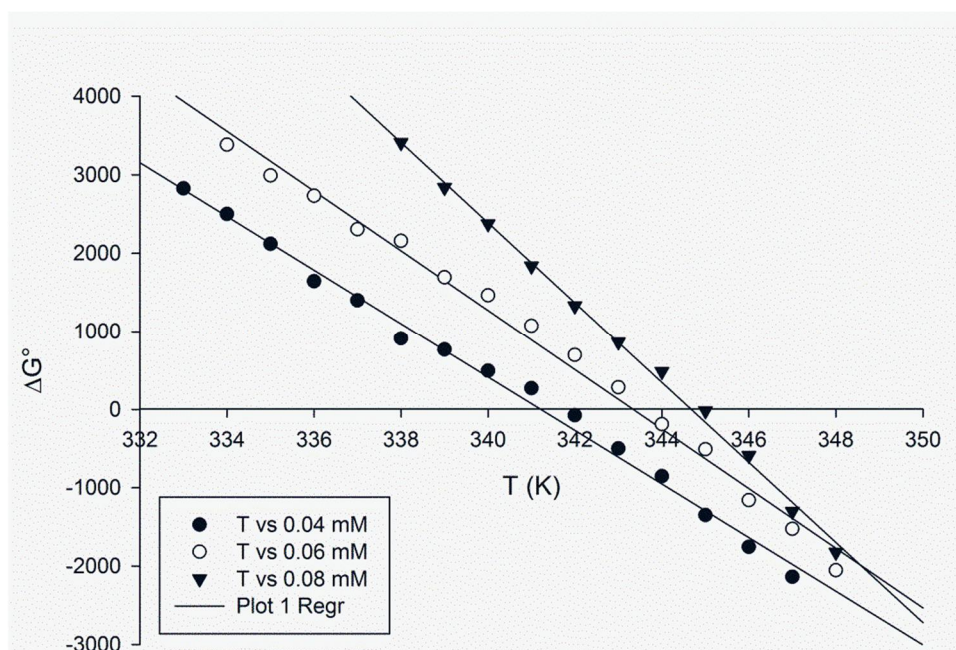
تغییرات انرژی آزاد گیبس از راه فرمول زیر (3) محاسبه می‌شود [27، 29]:

$$\Delta G^\circ = G^\circ_U - G^\circ_F = -RT \ln K = -RT \ln \frac{[U]}{[F]} \quad (3)$$

نتایج ما نشان می‌دهد که با افزایش غلظت نانوذرات کادمیوم تلوراید، منحنی‌های دگرگون‌سازی به دمای بالاتر منتقل می‌شوند (شکل 3 الف). همان‌طور که در جدول 1 و شکل 3 ب نشان داده شده است، تغییرات T_m لیزوزیم تابعی از غلظت نانوذرات کادمیوم تلوراید است به گونه‌ای که با افزایش غلظت نانوذرات کادمیوم تلوراید، T_m لیزوزیم افزایش پیدا می‌کند. براساس نتایج به دست آمده مقادیر ΔS°_m و ΔH°_m همگی افزایش پیدا می‌کنند. این نتایج بیان‌کننده این واقعیت است که با افزایش غلظت لیگاند، پایداری آنزیم لیزوزیم، افزایش پیدا کرده است. نتایج به دست آمده در قسمت دورنگ نمایی دورانی نشان دادند که میزان صفحات بتا همچنین پیچ‌های بتا در حضور نانوذرات کادمیوم تلوراید افزایش یافته است که این تأییدکننده نتایج حاصل از پایداری حرارتی می‌باشد.



در اینجا $[U]$ و $[F]$ و $G^{\circ}U$ و $G^{\circ}F$ به ترتیب غلظت و انرژی آزاد حالت‌های دگرگون‌شده و طبیعی را نشان می‌دهند. K ثابت تعادل، R ثابت گازها و T دمای مطلق است [30]. پارامترهای ترمودینامیکی، انرژی آزاد استاندارد (ΔG°) و T_m برای ارزیابی ماهیت گرمایی روند جذب برآورد شد. نمودار انرژی آزاد گیبس بازشدن، ΔG° ، به عنوان تابعی از دما برای لیزوزیم در حضور و غیاب نانوذرات کادمیوم تلوراید، در شکل 3 ب نشان داده شده است. دمای نقطه ذوب آنزیم، T_m ، دمایی است که در آن ΔG° برابر با صفر است. نکته دیگر این است که شیب خط منحنی ΔG° ، برابر ΔS°_m (تغییر آنتروپی در نقطه T_m) می‌باشد. همچنین می‌توان از رابطه $\Delta H^{\circ}_m = T_m \Delta S^{\circ}_m$ تغییرات آنتالپی را نیز به دست آورد [31].



شکل 3 الف) کسر دگرگون‌سازی لیزوزیم در حضور و غیاب نانوذرات کادمیوم تلوراید در pH 7/25 ب) نمودار تغییرات ΔG° برحسب دما در حضور و غیاب نانوذرات کادمیوم تلوراید در pH 7/25

جدول 1 تغییرات T_m ، آنتالپی و آنتروپی لیزوزیم در غلظت‌های مختلف نانوذرات کادمیوم تلوراید

ΔS_m° (ژول بر مول کلوین)	ΔH_m° (کیلوژول بر مول)	T_m (درجه کلوین)	غلظت نانوذرات کادمیوم تلوراید (mM)
342/24	116/738	341/1	0/04
380/54	130/677	343/4	0/06
511/09	176/172	344/7	0/08

ممکن است از راه برهم‌کنش الکترواستاتیک بین لیگاند و پروتئین باعث ایجاد تغییر در ساختار لیزوزیم شود [31].

تجزیه و تحلیل فلئورسانس برهم‌کنش لیزوزیم-نانوذرات کادمیوم تلوراید

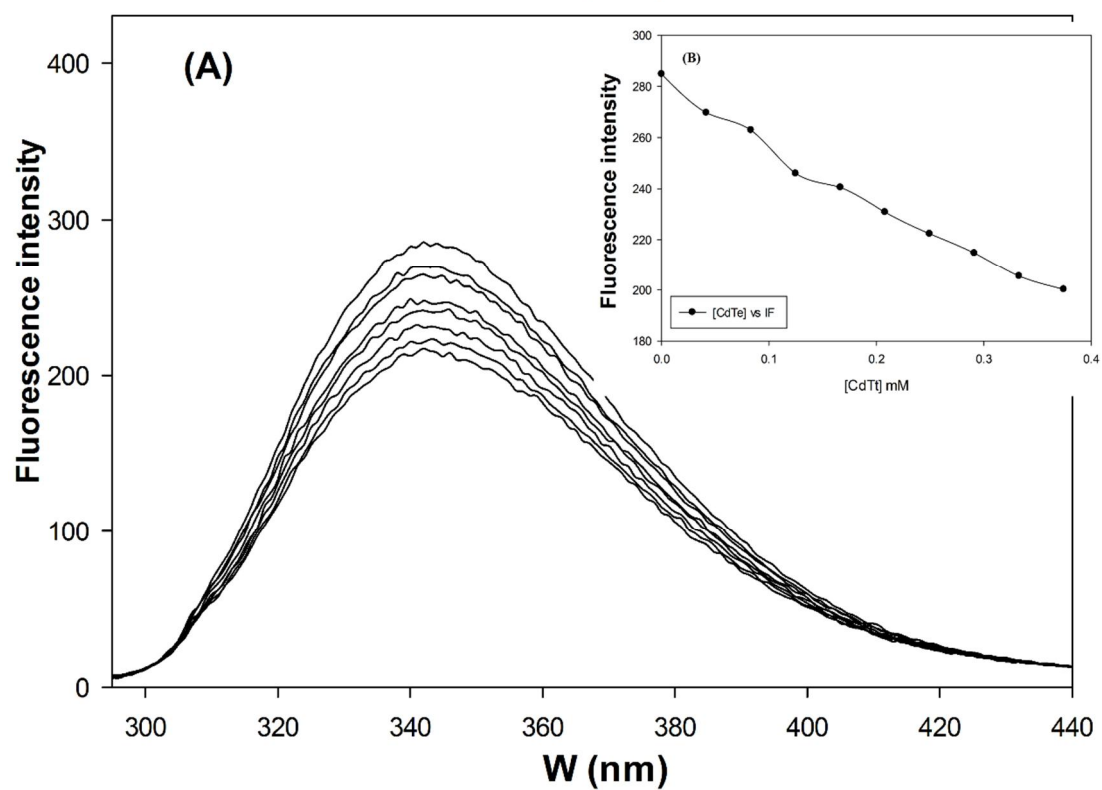
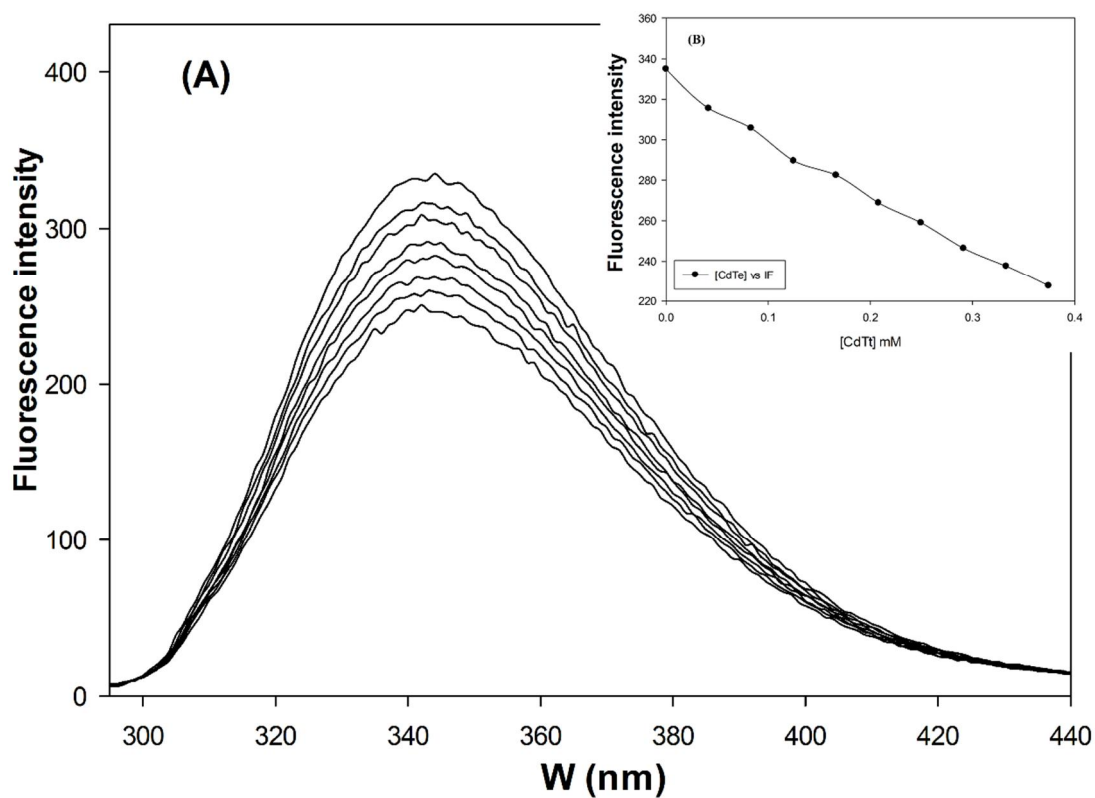
شدت فلئورسانس یک ترکیب را می‌توان با انواع فعل و انفعالات مولکولی از جمله واکنش حالت هیجان، بازآرایی مولکولی، انتقال انرژی، تشکیل کمپلکس حالت پایه و خاموش شدن تصادفی کاهش داد که به این پدیده خاموشی فلئورسانس گفته می‌شود [32]. لیزوزیم شش

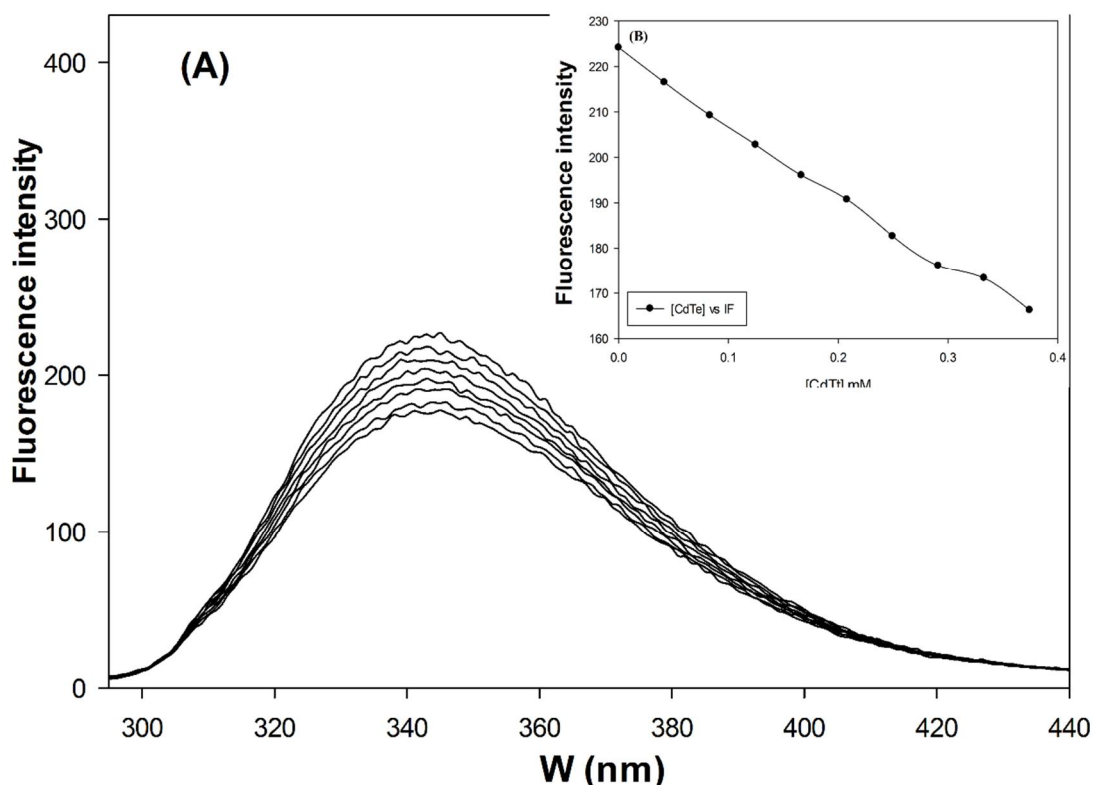
اتصال غیرکووالانسی اغلب ضعیف و غیراختصاصی است، اما ترکیبی از چندین پیوند غیرکووالانسی ممکن است ترکیب و عملکرد پروتئین را تغییر دهد. عملکرد آنزیم در صورت پیوند با هر ماده شیمیایی به ناچار تحت تأثیر قرار می‌گیرد [30]. همان‌طور که پیش‌تر بیان شد، لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ پروتئین کروی با pH ایزوالکتریک 11 است. هسته داخلی آن آبگریز است و توزیع باقیمانده‌های بار مثبت در سطح آن وجود دارد. نانوذرات کادمیوم تلوراید در pH 7/25 بار منفی دارند و

به دلیل آثار موضعی روی این باقیمانده‌ها در زمان اتصال لیگاند باشد. انتظار می‌رود که هیدروفوبیسیته اطراف باقیمانده‌ها کمتر شود و یا در برخی موارد این باقیمانده‌ها به گروه‌های باردار نزدیک شوند.

در یک مطالعه میان‌کنش نانوذرات کادمیوم تلوراید با آنزیم آلفاکیموتریپسین در pHهای مختلف با نظارت بر تغییرات شدت فلوئورسانس ذاتی آنزیم آلفاکیموتریپسین پس از افزودن نانوذرات کادمیوم تلوراید ارزیابی شد. نشر آنزیم آلفاکیموتریپسین در حضور نانوذرات کادمیوم تلوراید خاموش شد. فلوئورسانس آنزیم آلفاکیموتریپسین از باقیمانده‌های تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین نشأت می‌گیرد. افزودن نانوذرات کادمیوم تلوراید منجر به یک رد شیفت مشخص در حداکثر طول موج و کاهش متناظر در شدت فلوئورسانس شد که به این معنا است که اتصال نانوذرات کادمیوم تلوراید به آنزیم آلفاکیموتریپسین رخ می‌دهد و ریزمحیط اطراف فلوئوروفور آنزیم آلفاکیموتریپسین تغییر می‌کند. علاوه بر این، تغییر فلوئورسانس آنزیم آلفاکیموتریپسین در دو مقدار pH متفاوت است. همچنین در مطالعه‌ای دیگر اثر نانوذرات کادمیوم تلوراید بر پروتئین آلبومین سرم انسانی بررسی شد که نشان‌دهنده این امر بود که نشر پروتئین آلبومین سرم انسانی در حضور نانوذرات کادمیوم تلوراید خاموش شد [26].

باقیمانده تریپتوفان شامل Trp 28، Trp 62، Trp 63، Trp 108، Trp 111 و Trp 123 دارد [33]. پیش‌تر گزارش شد که 80 درصد نشر فلوئورسانس لیزوزیم به دلیل Trp 62 و Trp 108 بوده و اکسیداسیون Trp 62 یا Trp 108 با کاهش شدید شدت نشر فلوئورسانس همراه است [34]. به‌منظور بررسی جایگاه‌های اتصال لیزوزیم برای نانوذرات کادمیوم تلوراید، تغییر نشر فلوئورسانس با افزایش غلظت نانوذرات کادمیوم تلوراید (0-0/1 میلی‌مولار) بررسی شد. با اندازه‌گیری خاموشی نشر ذاتی فلوئورسانس لیزوزیم، می‌توان میزان دسترسی خاموش‌کننده‌ها به گروه‌های فلوئوروفور لیزوزیم را تخمین زد. این اطلاعات می‌تواند در پیش‌بینی سازوکارهای اتصال نانوذرات کادمیوم تلوراید به لیزوزیم کمک کند. تغییر محیط و ساختار پروتئین را می‌توان با اندازه‌گیری فلوئورسانس بررسی کرد [35]. براساس نتایج به‌دست‌آمده افزایش غلظت نانوذرات کادمیوم تلوراید باعث کاهش شدت نشر فلوئورسانس می‌شود (شکل‌های 4 الف، ب و ج). شکل 4 بخش الف نشان‌دهنده تغییرات نشر برحسب طول موج می‌باشد. بخش ب نشان‌دهنده شدت نشر در حداکثر طول موج در غلظت‌های مختلف نانوذره کادمیوم تلوراید می‌باشد. به نظر می‌رسد که نانوذرات کادمیوم تلوراید شدت نشر فلوئورسانس باقیمانده Trp 62 و Trp 108 لیزوزیم را خاموش می‌کند. تغییرات شدت نشر طیف آنزیم می‌تواند





شکل 4 الف) طیف‌های خاموشی نشر فلئوئورسانس لیزوزیم در حضور و غیاب نانوذرات کادمیوم تلوراید در $\lambda_{\text{exi}} = 280$ ، $\lambda_{\text{emi}} = 290-450$ pH 7/25 و دمای 298 درجه کلوین ب) طیف‌های خاموشی نشر فلئوئورسانس لیزوزیم در حضور و غیاب نانوذرات کادمیوم تلوراید در $\lambda_{\text{exi}} = 280$ ، $\lambda_{\text{emi}} = 290-450$ pH 7/25 و دمای 308 درجه کلوین ج) طیف‌های خاموشی نشر فلئوئورسانس لیزوزیم در حضور و غیاب نانوذرات کادمیوم تلوراید در $\lambda_{\text{exi}} = 280$ ، $\lambda_{\text{emi}} = 290-450$ pH 7/25 و دمای 318 درجه کلوین

که در آن F و F_0 شدت نشر فلئوئورسانس لیزوزیم در حضور و غیاب نانوذرات کادمیوم تلوراید (خاموش‌کننده)، $[Q]$ غلظت کل کادمیوم تلوراید و K_{sv} ثابت خاموش‌شدن استرن-ولمر است که با استفاده از رگرسیون خطی معادله استرن-ولمر تعیین می‌شود، k_q از راه رابطه زیر به دست می‌آید [44].

$$K_{sv} = k_q \tau_0 \quad (5)$$

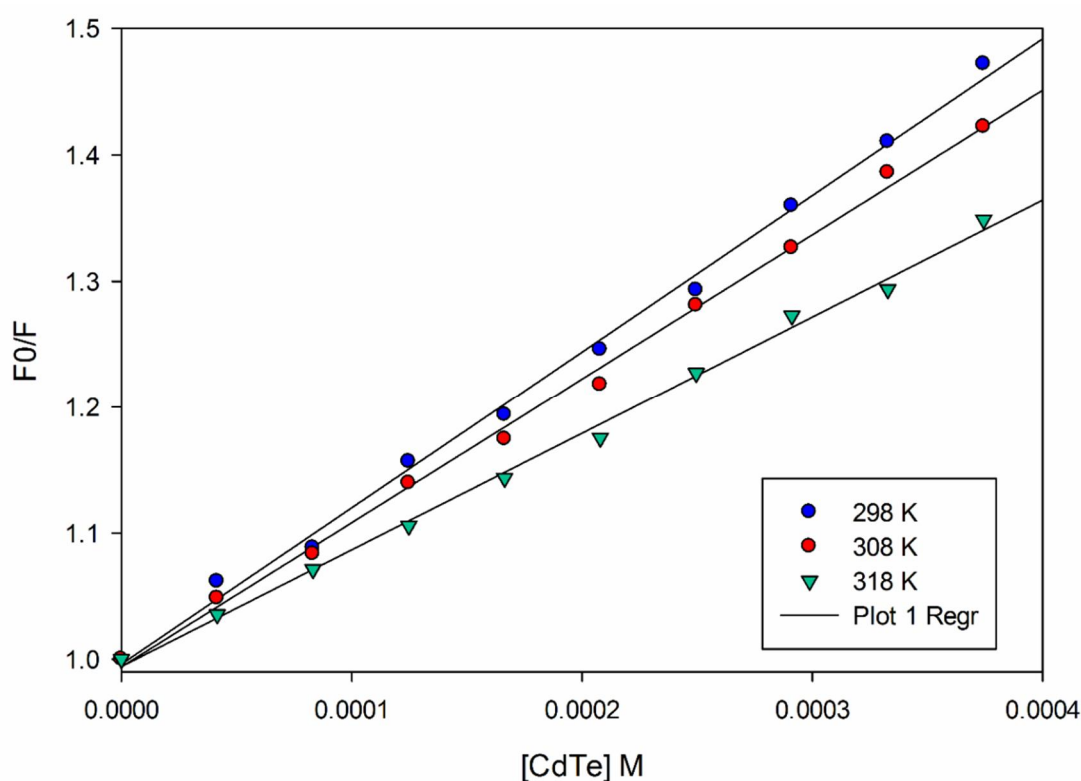
در اینجا k_q ثابت سرعت خاموشی ماکرومولکول‌های بیولوژیکی و τ_0 میانگین نیمه عمر فلئوئورسانس فلئوئورفور (در این مورد Trp) است که برای باقیمانده‌های Trp لیزوزیم در pH خنثی 0.5×10^{-8} ثانیه گزارش شده است [45]. مقادیر K_{sv} از شیب خط نمودار استرن ولمر (F_0/F در برابر غلظت نانو کادمیوم تلوراید)

خاموش‌شدن شدت نشر فلئوئورسانس از راه سازوکارهای مختلف خاموشی دینامیک و استاتیک انجام می‌شود. در فرایند خاموشی دینامیک فلئوئورفور و خاموش‌کننده (لیگاند) در زمان نیمه عمر با یکدیگر تصادم دارند و تماس مولکولی بین آنها برقرار می‌شود ولی در خاموشی استاتیک کمپلکس خاموش‌کننده-فلئوئورفور ایجاد می‌شود. خاموشی استاتیک یا دینامیک به‌وسیله وابستگی آنها به دما شناسایی می‌شوند. سازوکار خاموشی نشر فلئوئورسانس به‌وسیله معادله استرن-ولمر (5) توصیف شده است [36-43].

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (4)$$

افزایش دما مقادیر K_{SV} و k_q کاهش پیدا می‌کند. افزایش K_{SV} با دما نشان‌دهنده خاموشی دینامیک است. مقادیر K_{SV} و k_q به‌دست‌آمده از معادله استرن ولمر برای نانوذرات کادمیوم تلوراید با لیزوزیم در جدول 2 ذکر شده است. این مقادیر k_q بزرگ‌تر از 2×10^{10} لیتر بر مول ثانیه است. این نتیجه همچنین نشان داد که سازوکار خاموشی نشر فلوئورسانس لیزوزیم به‌وسیله نانوذرات کادمیوم تلوراید از نوع خاموشی استاتیک است.

به دست آمد. شکل 4 د نمودار معادله استرن ولمر آنزیم لیزوزیم در غلظت‌های مختلف نانوذرات کادمیوم تلوراید را در دماهای مختلف و pH 7/25 را نشان می‌دهد. رابطه دما با ثابت‌های خاموشی استرن ولمر و ثابت سرعت خاموشی، نوع سازوکار خاموشی استاتیک و دینامیک را مشخص می‌کند. اگر نمودار استرن ولمر به‌صورت خطی باشد، خاموشی نشر فلوئورسانس از یک نوع سازوکار استفاده کرده است. در سازوکار استاتیک خاموشی با



شکل 4 د نمودار استرن ولمر خاموشی لیزوزیم توسط نانوذرات کادمیوم تلوراید در دمای 298-318 کلین، در $\lambda_{\text{exi}} = 280$ ، $\lambda_{\text{emi}} = 290$ ، pH 7/25، و نمودار $\log [(F_0-F)/F]$ در برابر $\log [Q]$ لیزوزیم در حضور و غیاب نانوذرات کادمیوم تلوراید، $\blacklozenge$ 298 درجه کلین، $\blacksquare$ 308 درجه کلین و $\blacktriangle$ 318 درجه کلین،

جدول 2 ثابت‌های خاموشی استرن ولمر کمپلکس‌های لیزوزیم با نانوذرات کادمیوم تلوراید

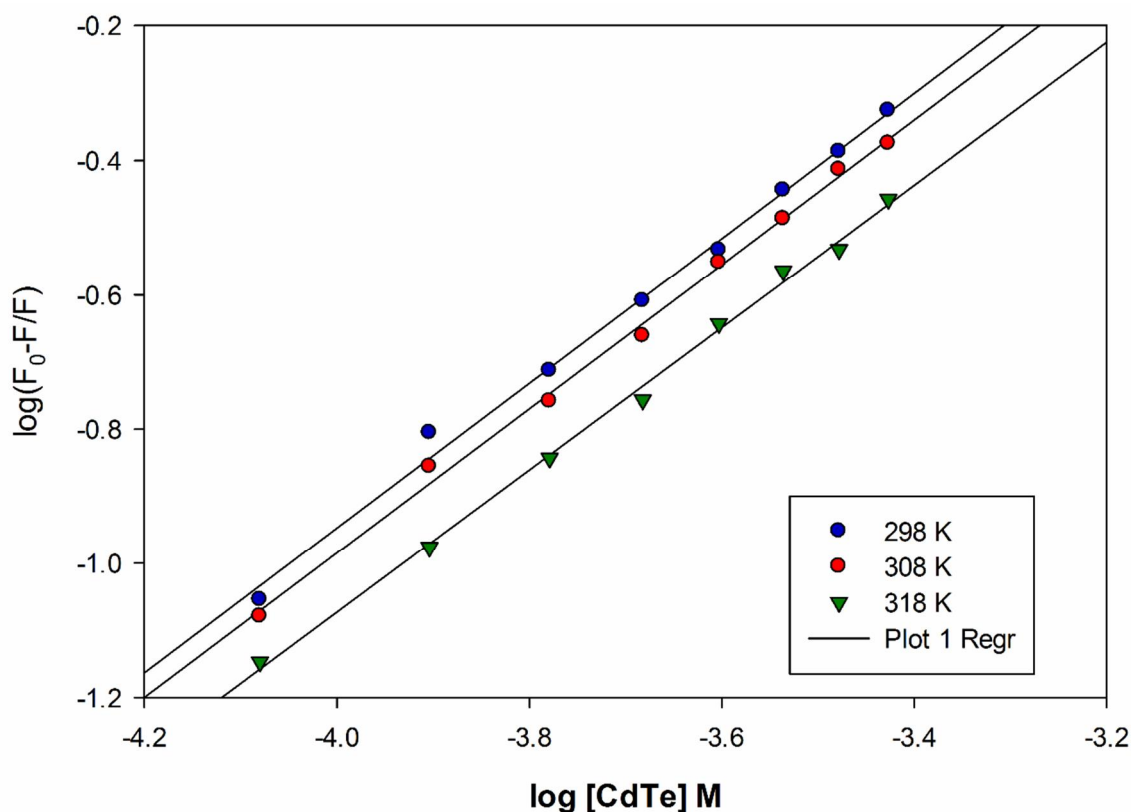
دما (کلین)	K_{SV} (لیتر بر مول)	k_q (لیتر بر مول ثانیه)	R^2
298	1211	$1/2 \times 10^{11}$	0/99
308	1128	$1/2 \times 10^{11}$	0/99
318	894	$0,89 \times 10^{11}$	0/99

برای برهم‌کنش خاموشی استاتیک، زمانی که لیگاند کوچک به‌طور مستقل به مجموعه‌ای از جایگاه‌های کوالان روی پروتئین متصل شود، ثابت اتصال (K_a) و تعداد جایگاه‌های اتصال (n) را می‌توان با معادله زیر ارزیابی کرد: [47-46].

$$\log\left(\frac{F_0-F}{F}\right) = \log K_a + n \log [Q] \quad (6)$$

نمودار رگرسیون دولگاریتمی $\log [(F_0-F)/F]$ درمقابل $\log [Q]$ برای کمپلکس لیزوزیم- نانوذرات

کادمیوم تلوراید در دماهای مختلف و pH 7/25 در شکل 4 نشان داده شده است. مقادیر ثابت اتصال و تعداد جایگاه اتصال نیز در جدول 3 آورده شده است. شیب خط نمودار سازوکار خاموشی استاتیک $\log [(F_0-F)/F]$ در مقابل $\log [Q]$ نشان‌دهنده تعداد جایگاه اتصال است [36، 48] مشخص شد که با افزایش دما مقادیر K_a کاهش پیدا کرده است. مقدار n تقریباً برابر با 1 بود. بنابراین یک جایگاه اتصال در لیزوزیم برای نانوذرات کادمیوم تلوراید در طول برهم‌کنش آنها وجود دارد.



شکل 4 ن

تعیین پارامترهای ترمودینامیکی

وابستگی ثابت اتصال به دما نشان می‌دهد که فرایند ترمودینامیکی مسئول تشکیل کمپلکس (لیزوزیم- نانوذرات کادمیوم تلوراید) است. بنابراین این وابستگی به‌منظور توصیف نیروهای موجود بین نانوذرات

کادمیوم تلوراید و لیزوزیم استفاده شد. در اصل، چهار نوع از فعل و انفعالات غیرکووالانسی وجود دارد که می‌توانند نقش مهمی در اتصال لیگاند به لیزوزیم داشته باشند، از جمله پیوند هیدروژن، الکترواستاتیک و نیروی آبگریزی و همچنین فعل و انفعالات

(شکل 4 ه). مقادیر K ، ΔH° ، ΔS° و ΔG° در جدول 3 خلاصه شده است. مقادیر منفی ΔG° نشان می‌دهد که فرایند برهم‌کنش، به‌صورت خودبه‌خودی انجام شده است. نیروهای عمل‌کننده بین پروتئین‌ها و لیگاندها براساس بزرگی و علامت پارامترهای ترمودینامیکی به سه گروه از فعل و انفعالات غیرکووالانسی طبقه‌بندی شدند: الف) $\Delta H^\circ > 0$ و $\Delta S^\circ > 0$: برهم‌کنش‌های آبگریز؛ ب) $\Delta H^\circ < 0$ و $\Delta S^\circ < 0$: برهم‌کنش واندروالسی و پیوند هیدروژن و ج) $\Delta H^\circ < 0$ و $\Delta S^\circ > 0$: برهم‌کنش الکتروستاتیک [49، 48]. برای کمپلکس‌های لیزوزیم-نانوذرات کادمیوم تلوراید، براساس نتایج به‌دست‌آمده نیروهای غالب در اتصال نانووذرات کادمیوم تلوراید به لیزوزیم برهم‌کنش‌های واندروالسی است.

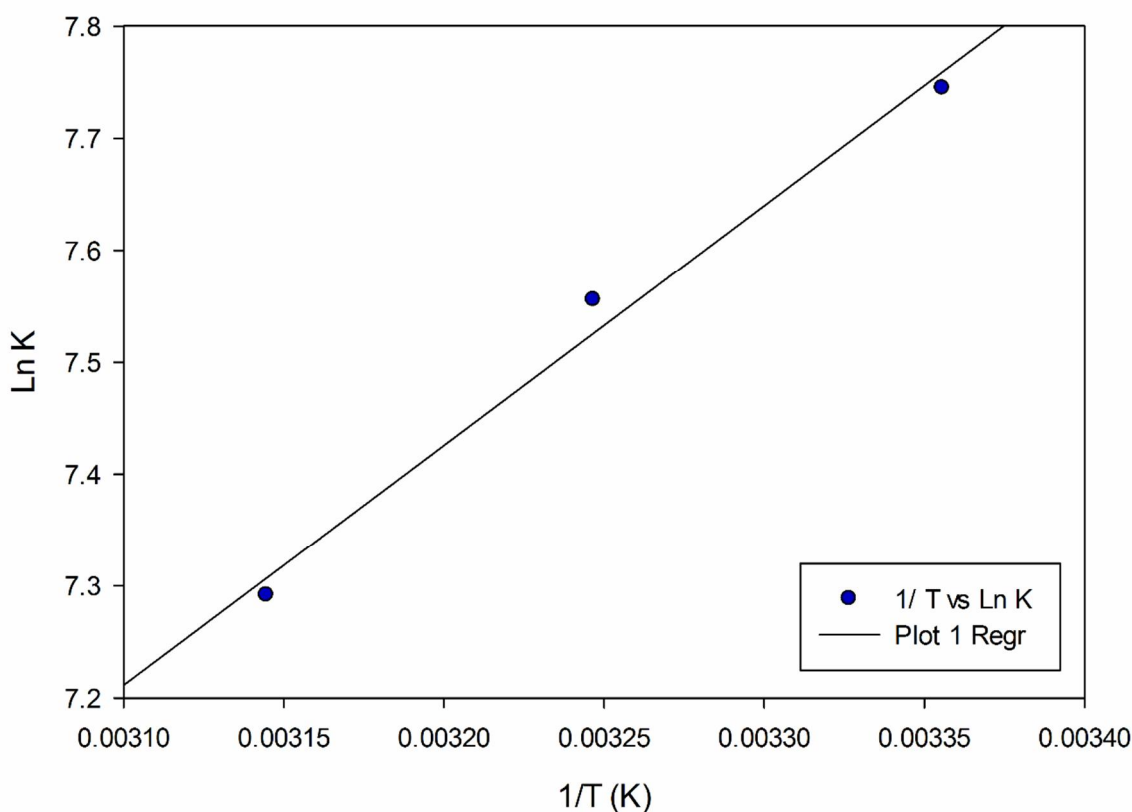
واندروالسی [47، 49]. علامت و بزرگی پارامترهای ترمودینامیکی (ΔH° و ΔS°) اطلاعات مهمی برای تأیید نیروهای اصلی درگیر در واکنش اتصال ارائه می‌دهند [50]. دمای انتخاب‌شده 303، 313، 323، 333 و 343 درجه کلوین بود که در آنها لیزوزیم هیچ تخریب ساختاری و دگرگونی نداشته است. تغییرات آنتالپی (ΔH°) و تغییرات آنتروپی (ΔS°) را می‌توان از معادله ونت هوف ارزیابی کرد [51، 52]:

$$\ln K_{eq} = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (7)$$

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

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq} \quad (8)$$

نمودار رابطه 7 به‌صورت $\ln K_{eq}$ در مقابل $1/T$ رسم شد تا مقادیر پارامترهای ترمودینامیکی محاسبه شوند



شکل 4 ه) نمودار $\ln K_{eq}$ در مقابل $1/T$

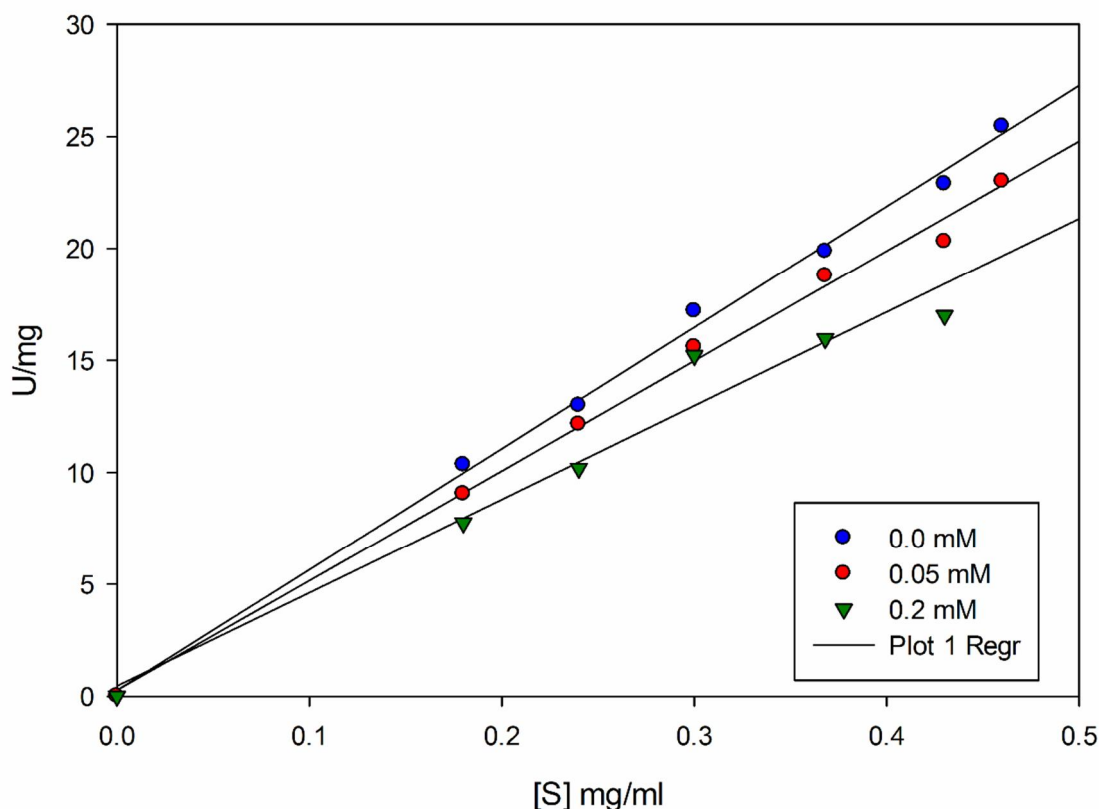
جدول 3 پارامترهای ترمودینامیکی و اتصال برهم کنش لیزوزیم - نانوذرات کادمیوم تلوراید در pH 7/25 و دماهای مختلف

دما (کلوین)	K_a (بر مول)	n	R^2	ΔH° (کیلوژول بر مول)	ΔS° (ژول بر مول کلوین)	ΔG° (کیلوژول بر مول)
298	691/194	1/08	0/99			-19/73
308	667/882	1/06	0/99	-28/50	-29/33	-19/51
318	651/170	1/05	0/99			-19/14

فعالیت لیزوزیم تحت تأثیر نانوذرات کادمیوم تلوراید آزمایش‌های ذکر شده در بالا ثابت کرده‌اند که نانوذرات کادمیوم تلوراید می‌توانند ساختار لیزوزیم را به طرز چشمگیری تغییر دهند. از آنجایی که عملکرد یک پروتئین ارتباط نزدیکی با ساختار آن دارد، بنابراین لازم است بررسی شود که آیا اتصال نانوذرات کادمیوم تلوراید با لیزوزیم بر فعالیت آنزیم لیزوزیم تأثیر می‌گذارد یا خیر. لیزوزیم (β -N-4.1- استیل مورامیداز، EC 3,2,1,17) از نوع آنزیم‌های لیتیک است که باعث تخریب دیواره سلول باکتریایی می‌شود و پیوند بتا یک به چهار بین N- استیل گلوکز آمین و N- استیل مورامیک اسید را در باکتری‌های گرم مثبت می‌شکند. این آنزیم در اشک، بزاق، شیر، ترشحات تنفسی و گردن رحم یافت شده است [53]. همچنین به وسیله سلول‌های پانت روده کوچک نیز ترشح می‌شود [54؛ 55] و به عنوان بخشی از سیستم ایمنی

ذاتی مورد توجه است [56]. لیزوزیم سفیده تخم مرغ از دو دومین تشکیل شده است: دومین آلفا با ساختار ماریچ و دومین صفحه بتا به طور عمده با ساختار صفحه بتا که به وسیله شکاف فعالی از هم جدا می‌شوند. شکاف بین دو دومین جایگاه اتصال سوپسترا (میکروکوکوس لیزودیکتیکوس) است [50]. شکل 5 نمودار فعالیت لیزوزیم را نشان می‌دهد. با افزایش غلظت نانوذرات کادمیوم تلوراید فعالیت لیزوزیم (V_{max}) کاهش پیدا می‌کند (جدول 4).

نانوذرات کادمیوم تلوراید می‌توانند وارد جایگاه فعال لیزوزیم شده و با باقیمانده‌های کاتالیزوری Glu35 و Asp52 و فلونوروفورهای غالب Trp62 و Trp108، که در محل‌های اتصال قرار دارند، تعامل کنند. بنابراین فعالیت لیزوزیم با افزایش نانوذرات کادمیوم تلوراید به طور پیوسته کاهش پیدا می‌کند.



شکل 5 نمودار فعالیت لیزوزیم در حضور و غیاب نانوذرات کادمیوم تلوراید

جدول 4 مقادیر V_{max} لیزوزیم در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات کادمیوم تلوراید

V_{max}	غلظت نانوذرات کادمیوم تلوراید (میلی مولار)
1/470	0
0/684	0/2
0/437	0/4
0/286	0/5

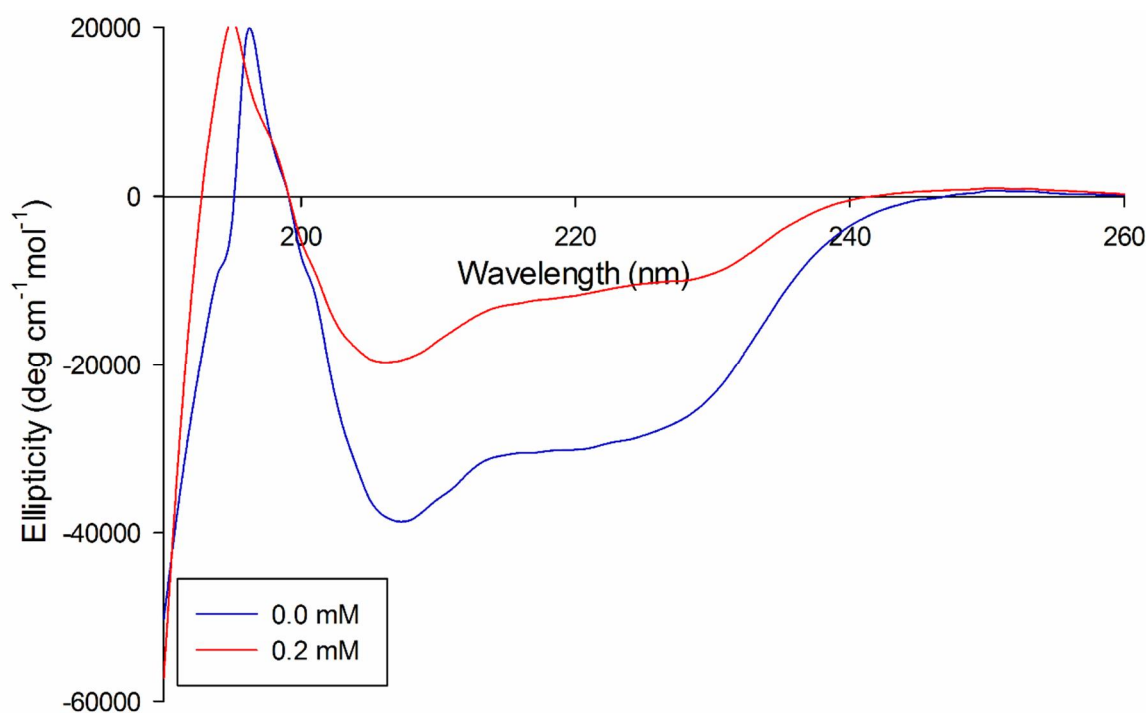
اندازه‌گیری دورنگ‌نمایی دورانی

دورنگ‌نمایی دورانی را می‌توان برای بررسی تغییرات ساختاری حساس لیزوزیم و منعکس کردن تغییرات ساختارهای ثانویه به صورت کمی در زمان تعامل با لیگاندها استفاده کرد [57]. برای بررسی بیشتر آثار احتمالی بر تغییر ساختاری لیزوزیم بر اتصال نانوذرات کادمیوم تلوراید، طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی در مطالعه حاضر انجام شد. طیف دورنگ‌نمایی دورانی لیزوزیم در شکل 6 نشان داده شده است. دو پیک منفی را

می‌توان در ناحیه فرابنفش در طول موج‌های 208 و 218 نانومتر مشاهده کرد که پیک‌های مشخص ساختار ثانویه مارپیچ آلفا در لیزوزیم هستند. شکل 6 نشان داد که افزودن نانوذرات کادمیوم تلوراید منجر به تغییر در شدت پیک‌های منفی شد و تغییرات ساختار ثانویه در لیزوزیم را آشکار کرد. محتوای مارپیچ آلفا بعد از میان‌کنش با نانوذرات کادمیوم تلوراید کاهش پیدا کرد. این نتایج نشان می‌دهد که ساختار اسکلت لیزوزیم به وسیله نانوذرات کادمیوم تلوراید شل شده و باقیمانده‌های Trp آن در

میزان صفحات بتا و پیچ‌های بتا در حضور نانوذرات کادمیوم تلوراید افزایش پیدا کرده است که این نکته تأییدکننده نتایج حاصل از پایداری حرارتی می‌باشد.

ناحیه آبریز داخلی در معرض محیط قرار گرفته‌اند که با نتایج مطالعات طیف‌سنجی UV-Vis و فلئورسانس مطابقت دارد. همچنین نتایج به‌دست‌آمده نشان دادند که



شکل 6 نمودار دورنگ نمایی دورانی لیزوزیم در حضور و غیاب کادمیوم تلوراید

پایداری لیزوزیم و نوع برهم‌کنش‌های نانوذرات کادمیوم تلوراید با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی بررسی شد. بررسی پایداری لیزوزیم در حضور نانوذرات کادمیوم تلوراید افزایش دمای T_m یا پایداری لیزوزیم را نشان داد. در طیف‌سنجی فلئورسانس، در حضور نانوذرات کادمیوم تلوراید شدت نشر کاهش پیدا کرد و در نتیجه خاموش شدن نشر رخ داد. براساس محاسبه پارامترهای ترمودینامیکی سازوکار خاموش کردن استاتیک، تشکیل کمپلکس خودبه‌خود و به‌طور عمده برهم‌کنش‌های هیدروژن و اندروالس در تشکیل کمپلکس غالب بودند. همچنین، طیف جذبی UV-Vis، افزایش جذب لیزوزیم را در حضور نانوذرات کادمیوم تلوراید نشان داد که تشکیل کمپلکس لیزوزیم - نانوذرات کادمیوم تلوراید را

نتیجه‌گیری

زمانی‌که نانوذرات از راه سیستم تنفسی یا گوارشی وارد بدن می‌شوند، می‌توانند با لیزوزیم تعامل داشته باشند. کارهای قبلی بر بررسی تعاملات بین انواع مختلف نانوذرات و پروتئین‌ها متمرکز شده است. با این حال، سازوکار تعامل بین لیزوزیم و نانوذرات مختلف هنوز به اندازه کافی گزارش نشده است. بررسی میان‌کنش نانوذرات ازجمله نانوذرات کادمیوم تلوراید با لیزوزیم، به‌منظور درک بیشتر خطرهای ایمنی بالقوه نانوذرات کادمیوم تلوراید مهم است. شناسایی آثار ساختاری و نوع برهم‌کنش‌های بین نانوذرات و زیست‌مولکول‌ها قبل از استفاده گسترده از آنها در صنعت و پزشکی بسیار مهم و کاربردی است. در این مطالعه، تغییرات ساختاری و

Daphnia magna and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*. 71, 1308-1316.

[8] A. Rogach, N. Kotov, D. Koktysh, J. Ostrander, G. Ragoisha. (2000) Electrophoretic deposition of latex-based 3D colloidal photonic crystals: A technique for rapid production of high-quality opals. *Chemistry of Materials*. 12, 2721-2726.

[9] A.A. Mamedov, A. Belov, M. Giersig, N.N. Mamedova, N.A. Kotov. (2001) Nanorainbows: graded semiconductor films from quantum dots, *Journal of the American Chemical Society*. 123, 7738-7739.

[10] W.C. Chan, S. Nie. (1998) Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*. 281 2016-2018.

[11] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A.P. Alivisatos. (1998) Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels, *science*. 281, 2013-2016.

[12] H. Mattoussi, J. Mauro, E. Goldman, T. Green, G. Anderson, V. Sundar, M. Bawendi. (2001) Bioconjugation of highly luminescent colloidal CdSe-ZnS quantum dots with an engineered two-domain recombinant protein, *physica status solidi (b)*, 224, 277-283.

[13] M. Han, X. Gao, J.Z. Su, S. Nie. (2001) Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules, *Nature biotechnology*. 19, 631-635.

[14] Y.L. Wu, F. He, X.W. He, W.Y. Li, Y.K. Zhang. (2008) Spectroscopic studies on the interaction between CdTe nanoparticles and lysozyme, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. (2008) 71 1199-1203.

[15] A. Schmid, J. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature*, 409, 258-268.

[16] E. Katz, I. Willner. (2004) Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. *Angewandte Chemie International Edition*. 43, 6042-6108.

[17] H. Van Dael. (1998) Chimeras of human lysozyme and α -lactalbumin: an interesting

تأیید می‌کند. مطالعات طیف‌سنجی CD نشان داده است که تغییرات در ساختار ثانویه پروتئین لیزوزیم به‌واسطه کاهش ساختارهای ثانویه ماریچ آلفا بروز می‌کند. همچنین فعالیت آنزیم کاهش پیدا کرد.

منابع

[1] K. Hund-Rinke, M. Simon. (2006) Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and daphnids. *Environmental Science and Pollution Research*. 13, 225-232.

[2] V. Stone, H. Johnston, M.J. Clift. (2007) Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions, *NanoBioscience, IEEE Transactions on*. 6, 331-340.

[3] J.J. Wang, B.J. Sanderson, H. Wang. (2007) Cyto-and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 628 99-106.

[4] S.B. Lovern, J.R. Strickler, R. Klaper. (2007) Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C60, and C60HxC70Hx). *Environmental science & technology*. 41, 4465-4470.

[5] N. Lu, Z. Zhu, X. Zhao, R. Tao, X. Yang, Z. Gao. (2008) Nano titanium dioxide photocatalytic protein tyrosine nitration: a potential hazard of TiO₂ on skin. *Biochemical and biophysical research communications*. 370, 675-680.

[6] X.-H. Chen, L. Zhang, Y.-X. Weng, L.-C. Du, M.-P. Ye, G.-Z. Yang, R. Fujii, F.S. Rondonuwu, Y. Koyama, Y.-S. Wu. (2005) Protein structural deformation induced lifetime shortening of photosynthetic bacteria light-harvesting complex LH2 excited state. *Biophysical journal*. 88, 4262-4273.

[7] M. Heinlaan, A. Ivask, I. Blinova, H.-C. Dubourguier, A. Kahru. (2008) Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans

- surfactant-protein ratios. *International journal of biological macromolecules*. 33, 67-73.
- [26] B. Yang, R. Liu, X. Hao, Y. Wu, J. Du. (2012) The interactions of glutathione-capped CdTe quantum dots with trypsin. *Biological trace element research*. 146, 396-401.
- [27] A. Saboury, A. Moosavi-Movahedi. (1995) Derivation of the thermodynamic parameters involved in the elucidation of protein thermal profiles. *Biochemical education*. 23, 164-167.
- [28] H.N. Ong, B. Arumugam, S. Tayyab. (2009) Succinylation-induced conformational destabilization of lysozyme as studied by guanidine hydrochloride denaturation. *Journal of biochemistry*. 146, 895-904.
- [29] A. Saboury, F. Karbassi. (2000) Thermodynamic studies on the interaction of calcium ions with alpha-amylase. *Thermochimica acta*. 362, 121-129.
- [30] P. Venkatesu, M.-J. Lee, H.-m. Lin. (2007) Thermodynamic characterization of the osmolyte effect on protein stability and the effect of GdnHCl on the protein denatured state. *The Journal of Physical Chemistry B*. 111, 9045-9056.
- [31] L. Momeni, B. Shareghi, S. Farhadian, F. Raisi. (2019) Making bovine trypsin more stable and active by Erythritol: A multispectroscopic analysis. docking and computational simulation methods. *Journal of Molecular Liquids*. 292, 111389.
- [32] R.R. Zhu, S.L. Wang, R. Zhang, X.Y. Sun, S.D. Yao. (2007) A novel toxicological evaluation of TiO₂ nanoparticles on DNA structure. *Chinese Journal of Chemistry*. 25, 958-961.
- [33] G.R. Behbehani, A. Divsalar, A. Saboury, A. Hekmat. (2009) A thermodynamic study on the binding of PEG-stearic acid copolymer with lysozyme. *Journal of solution chemistry*. 38, 219-229.
- [34] T. Imoto, L.S. Forster, J. Rupley, F. Tanaka, (1972) Fluorescence of lysozyme: emissions from tryptophan residues 62 and 108 tool for studying partially folded states during protein folding. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 54 1217-1230.
- [18] Z. Gu, X. Zhu, S. Ni, Z. Su, H.-M. Zhou. (2004) Conformational changes of lysozyme refolding intermediates and implications for aggregation and renaturation. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 36, 795-805.
- [19] F. Yang, Y. Liang, F. Yang. (2003) Unfolding of lysozyme induced by urea and guanidine hydrochloride studied by" phase diagram" method of fluorescence. *ACTA CHIMICA SINICA-CHINESE EDITION*-. 61, 803-807.
- [20] J. Tang, F. Luan, X. Chen. (2006) Binding analysis of glycyrrhetic acid to human serum albumin: fluorescence spectroscopy, FTIR, and molecular modeling. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 14, 3210-3217.
- [21] C. Dufour, O. Dangles. (2005) Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1721, 164-173.
- [22] M. Salavati-Niasari, M. Bazarganipour, M. Ghasemi-Kooch. (2015) Facile Sonochemical Synthesis and Characterization of CdTe Nanoparticles, Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry. 45, 1558-1564.
- [23] H. Sun, E. Cui, Z. Tan, R. Liu. (2014) Effects of N-Acetyl-L-Cysteine-Capped CdTe Quantum Dots on Bovine Serum Albumin and Bovine Hemoglobin: Isothermal Titration Calorimetry and Spectroscopic Investigations. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 28, 549-557.
- [24] Y. Li, X. Zhang, C. Deng. Functionalized magnetic nanoparticles for sample preparation in proteomics and peptidomics analysis. *Chemical Society Reviews*. 42, (2013) 8517-8539.
- [25] J.M. Ruso, A. González-Pérez, G. Prieto, F. Sarmiento. (2003) Study of the interactions between lysozyme and a fully-fluorinated surfactant in aqueous solution at different

- [43] B. Delavari, A.A. Saboury, M.S. Atri, A. Ghasemi, B. Bigdeli, A. Khammari, P. Maghami, A.A. Moosavi-Movahedi, T. Haertlé, B. Goliaei. (2015) Alpha-lactalbumin: A new carrier for vitamin D 3 food enrichment. *Food Hydrocolloids*. 45, 124-131.
- [44] L. Momeni, B. Shareghi, A.A. Saboury, S. Farhadian, F. Reisi. (2017) A spectroscopic and thermal stability study on the interaction between putrescine and bovine trypsin, *International journal of biological macromolecules*. 94, 145-153.
- [45] L. Momeni, B. Shareghi, A.A. Saboury, S. Farhadian. (2016) The effect of spermine on the structure, thermal stability and activity of bovine pancreatic trypsin. *RSC advances*. 6, 60633-60642.
- [46] S. Tabassum, W.M. Al-Asbahy, M. Afzal, F. Arjmand, Synthesis. (2012) characterization and interaction studies of copper based drug with human serum albumin (HSA): spectroscopic and molecular docking investigations. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 114, 132-139.
- [47] A.S. Roy, P. Ghosh. (2016) Characterization of the binding of flavanone hesperetin with chicken egg lysozyme using spectroscopic techniques: effect of pH on the binding. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 84, 21-34.
- [48] B. Ghalandari, A. Divsalar, M. Eslami-Moghadam, A.A. Saboury, T. Haertlé, M. Amanlou, K. Parivar. (2015) Probing of the interaction between β -lactoglobulin and the anticancer drug oxaliplatin. *Applied biochemistry and biotechnology*. 175, 974-987.
- [49] G. Vignesh, Y. Manojkumar, K. Sugumar, S. Arunachalam. (2015) Spectroscopic investigation on the interaction of some polymer-cobalt (III) complexes with serum albumins. *Journal of Luminescence*. 157, 297-302.
- [50] B. Ghalandari, A. Divsalar, A.A. Saboury, T. Haertlé, K. Parivar, R. Bazl, M. Eslami-Moghadam, M. Amanlou. (2014) Spectroscopic and theoretical investigation of oxali-palladium interactions with β -lactoglobulin. *Spectrochimica Acta Part A*: and energy migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 69, 1151-1155.
- [35] T. Yamamoto, T. Kobayashi, K. Yoshikiyo, Y. Matsui, T. Takahashi, Y. Aso. (2009) A ^1H NMR spectroscopic study on the tryptophan residues of lysozyme included by glucosyl- β -cyclodextrin. *Journal of Molecular Structure*. 920, 264-269.
- [36] Q. Yue, L. Niu, X. Li, X. Shao, X. Xie, Z. Song. (2008) Study on the interaction mechanism of lysozyme and bromophenol blue by fluorescence spectroscopy. *Journal of fluorescence*. 18, 11-15.
- [37] Z.-D. Qi, B. Zhou, X. Qi, S. Chuan, Y. Liu, J. Dai. (2008) Interaction of rofecoxib with human serum albumin: determination of binding constants and the binding site by spectroscopic methods. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 193, 81-88.
- [38] M.-F. Zhang, Z.-Q. Xu, Y.-S. Ge, F.-L. Jiang, Y. Liu. (2012) Binding of fullerol to human serum albumin: spectroscopic and electrochemical approach. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 108, 34-43.
- [39] J.R. Lakowicz, G. Weber. (1973) Quenching of fluorescence by oxygen. Probe for structural fluctuations in macromolecules. *Biochemistry*. 12, 4161-4170.
- [40] J. Min, X. Meng-Xia, Z. Dong, L. Yuan, L. Xiao-Yu, C. Xing. (2004) Spectroscopic studies on the interaction of cinnamic acid and its hydroxyl derivatives with human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*. 692, 71-80.
- [41] B. Ghalandari, A. Divsalar, A.A. Saboury, K. Parivar. (2015) β -Lactoglobulin nanoparticle as a chemotherapy agent carrier for oral drug delivery system. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 12, 613-619.
- [42] M. Saeidifar, H. Mansouri-Torshizi, A.A. Saboury. (2015) Biophysical study on the interaction between two palladium (II) complexes and human serum albumin by Multispectroscopic methods. *Journal of Luminescence*. 167, 391-398.

- [54] Y. Yue, X. Chen, J. Qin, X. Yao. (2009) Spectroscopic investigation on the binding of antineoplastic drug oxaliplatin to human serum albumin and molecular modeling. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 69, 51-57.
- [55] P. Jollès, J. Jollès. (1984) What's new in lysozyme research?, *Molecular and cellular biochemistry*. 63, 165-189.
- [56] T. Peeters, G. Vantrappen. (1975) The Paneth cell: a source of intestinal lysozyme. *Gut*. 16, 553-558.
- [57] D. Mason, C. Taylor. (1975) The distribution of muramidase (lysozyme) in human tissues. *Journal of clinical pathology*. 28, 124-132.
- Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 118, 1038-1046.
- [51] P.D. Ross, S. Subramanian. (1981) Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*. 20, 3096-3102.
- [52] A. Bonincontro, G. Onori. (2004) Investigation by dielectric spectroscopy of domain motions in lysozyme: effect of solvent and binding of inhibitors. *Chemical physics letters*. 398, 260-263.
- [53] M. Moradi, A. Divsalar, A. Saboury, B. Ghalandari, A. Harifi. (2015) Inhibitory effects of deferasirox on the structure and function of bovine liver catalase: a spectroscopic and theoretical study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 33, 2255-2266.

Interaction of cadmium telluride semiconductor nanoparticles on egg white lysozyme using spectroscopic methods and enzymatic kinetics

Sadegh Farhadian^{1,*}, Lida Momeni^{2,*}, Behzad Shareghi¹

1- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahrekord University.
Shahrekord, P. O. Box. 115, Iran

2- Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Payam Noor University, Tehran.
Iran

3- Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord.

Corresponding authors: lida.momeni@pnu.ac.ir, sadeghfahadian@gmail.com

Received: 2021/6/14

Accepted: 2022/4/3

Abstract

In this article, the interaction between lysozyme and CdTe nanoparticles was investigated by UV-Vis spectroscopy, fluorescence, thermal stability, kinetics, and circular dichroism (CD) spectroscopic methods at pH 7.25. It was proved that the fluorescence quenching of lysozyme by CdTe NPs was mainly a result of the formation of the CdTe-lysozyme complex. By the fluorescence quenching results, the Stern-Volmer quenching constant (K_{SV}), binding constant (K_a), and binding sites (n) were calculated. Under pH 7.25 conditions, the level of the binding constant is determined to be 2.33×10^3 from fluorescence data. The hydrogen bond or van der Waals force is involved in the binding process. The blue shift of the fluorescence spectral peak of protein after the addition of CdTe nanoparticles reveals that the microenvironments around tryptophan residues are disturbed by CdTe nanoparticles. The effect of CdTe NPs on the conformation of lysozyme has been analyzed using UV-Vis spectra and CD spectra, which provided evidence that the secondary structure of lysozyme has been changed by the interaction of CdTe NPs with lysozyme.

Keywords: Lysozyme, cadmium telluride, Fluorescence quenching, Thermal stability, Activity