

بررسی اثر نانوذره اکسید مس بر فعالیت و ساختار آنزیم پراکسیداز لیپیدوم در ابا (LDP)

علی ریاحی مدوار^{۱*}، فرشید برزگری دهج^۲، رضا میرازیبی^۳، فهیمه بهرام نژاد^۲

چکیده

مقدمه: ورود نانوذرات به محیط زیست، امکان ورود آنها به بدن موجودات زنده را مهیا می‌نماید. ورود آنها به بدن می‌تواند بر روی ماکرومولکول‌های زیستی اثر گذاشته و حیات آنها را تحت تاثیر قرار دهد. در این مطالعه، به منظور بررسی تاثیر نانوذره اکسید مس (nCuO) بر آنزیم نوترکیب پراکسیداز لیپیدوم در ابا، تغییرات فعالیت و ساختار آنزیم در nCuO مورد آنالیز قرار گرفتند. **روش‌ها:** فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف nCuO و با سه بار تکرار اندازه‌گیری شدند. نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS و در سطح معنی‌داری ۵ درصد مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. از مطالعات فلورسانس ذاتی در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره به منظور بررسی تغییرات ساختاری آنزیم در حضور نانوذره استفاده گردید. از این مطالعات در حضور دماهای مختلف جهت تعیین پارامترهای ترمودینامیکی مانند نوع نیروهای درگیر در میانکنش نانوذره- آنزیم استفاده شد. **نتایج و بحث:** فعالیت آنزیم در حضور nCuO بصورت معنی‌داری در سطح ۵ درصد نسبت به نمونه شاهد افزایش نشان داد. بیشترین فعالیت آنزیم مربوط به محدوده غلظت ۸۰ تا ۱۸۰ نانومولار نانوذره است که بیش از ۴۶ درصد نسبت به نمونه کنترل افزایش یافت. شدت فلورسانس ذاتی در حضور نانوذره در روندی وابسته به غلظت کاهش یافت. پارامترهای ترمودینامیکی شامل آنترپی (ΔS°) و آنتالپی (ΔH°) مربوط به میانکنش آنزیم با نانوذره برترتیب ۰/۱۰۸ و ۳/۸۱ محاسبه گردید. مثبت بودن این پارامترها، نشان دهنده نقش مهم میانکنش‌های هیدروفوب در این فرایند است. از طرف دیگر، منفی بودن تغییرات انرژی آزاد واکنش (ΔG°) نشان دهنده این است که این فرایند انرژی‌زا بوده و بصورت خودبخودی پیش می‌رود.

واژه‌های کلیدی: پارامترهای ترمودینامیکی، فلورسانس، میانکنش‌های هیدروفوب.

۱. دانشیار، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کوثر جنورد، جنورد، ایران (*ایمیل نویسنده مسئول: Riahi.ali@gmail.com)

۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

۳. استادیار، دانشگاه علوم پزشکی جیرفت، جیرفت، ایران.

مقدمه

امروزه استفاده از نانوذرات (مواد و ترکیباتی که حداقل یکی از ابعاد عملکردی آن‌ها بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر باشد) به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد آن‌ها، که خود ناشی از اندازه و ابعاد آن‌ها است، به طور روز افزون در حال افزایش است (Ball, 2002; Brandes et al., 2006). تولید و استفاده بیش از حد نانوذرات می‌تواند منجر به راه‌یابی این ذرات به اکوسیستم‌های مختلف شود (Monica & Cremonini, 2009). 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 جمله ریه است (Brunner et al., 2006; Lee et al., 2008).

نانوذرات فلزی با سطح ویژه بالا و واکنش‌پذیری سطحی بالا، نه تنها می‌توانند توسط تماس فیزیکی معمولی جذب شوند بلکه می‌توانند با پروتئین‌های زیستی میانکنش دهند و توسط سلول‌ها جذب گردند (Wang et al., 2005). سریم اکسید (CeO_2) در مقیاس نانو می‌تواند با سرم آلبومین گاوی واکنش دهد و توسط سلول‌های سرطانی ریه جذب شود (Patil et al., 2007). نانوذرات می‌توانند باعث تغییرات ساختاری در پروتئین‌ها شوند که عموماً بر واکنش‌های بیولوژیکی آن‌ها اثر می‌گذارند (Brandes et al., 2006). اندازه، شیمی سطح، بار و شکل نانوذرات، نقش اصلی در تعامل بین آن‌ها و پروتئین‌ها دارد (Saptarshi et al., 2013).

از میان نانوذرات اکسید فلزی، نانوذرات اکسید مس با توجه به خواص جذاب آنها مانند ثبات بالا، واکنش‌پذیری و دمای کریستال بالا، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. به همین دلیل است که در ابررساناها، سنسورهای گاز، لوازم آرایشی و کاربردهای فوتوثرمال مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Chang et al., 2012; Dai et al., 2000). بررسی‌های انجام شده بر روی جذب CuO توسط ریشه گیاه گندم با کمک یون‌ها (Na^{+2} ، Mg^{+2} و La^{+3}) و همچنین سورفاکتانت‌ها (مانند سدیم دودسیل بنزن سولفونات) و عواملی مانند Na_4EDTA و تکنیک اولتراسونیک صورت گرفته، نشان داد که این نانوذره به شدت توسط ریشه این گیاه جذب

می‌گردد و در بخش‌هایی بصورت مکانیکی به آن متصل می‌گردد. مواد Na_4EDTA باعث حل بهتر نانوذره CuO و در نتیجه جذب بهتر آن شد (Zhou et al., 2011).

آنزیم پراکسیداز به‌طور گسترده در طبیعت توزیع شده و می‌توان این آنزیم را به آسانی از بیشتر سلول‌های گیاهی، بعضی اندام‌ها و بافت‌های حیوانی استخراج نمود. آنزیم پراکسیداز از گروه اکسیدوردوکتازها است و حاوی گروه هم به‌عنوان گروه پروستتیک است. محدوده وزن مولکولی آن‌ها از ۳۰ تا ۱۵۰ کیلو دالتون است (Welinder, 1976). این آنزیم‌ها به‌طور گسترده در ایمنی‌سنجی، ژنتیک، بیوشیمی بالینی، پزشکی، کیت‌های تشخیصی، تصفیه فاضلاب‌ها، هیستوشیمی و سیتوشیمی، بیوسنسورها، سنتز پلیمر و ژن‌درمانی سرطان کاربرد دارند (Hamid et al., 2009). به دلیل اهمیت پراکسیدازها در بیوتکنولوژی، اخیراً ژن کدکننده آنزیم پراکسیداز از گیاه *Lepidium draba* (LDP) جداسازی و پس از شناسایی و تعیین توالی، در میزبان *E. coli* کلون و بیان شد. این آنزیم، از پلی‌پپتیدی با طول ۳۰۸ اسیدآمینو تشکیل شده است و وزن مولکولی آن ۳۴ کیلودالتون تخمین زده می‌شود. بر اساس این‌که pH ایزوالکتریک آن حدود ۷/۷ است و اینکه بالاترین تشابه را با ایزوآنزیم‌های خنثی HRP دارد این آنزیم متعلق به ایزوآنزیم‌های پراکسیداز خنثی ارزیابی شده است (Fattahian et al., 2017a).

مطالعات مختلف نشان داده است که اتصال مواد و حتی داروها (لیگاندها) به پروتئین‌ها می‌تواند ساختار و حتی عملکرد آنها را تحت تاثیر قرار دهد (Carter & Ho, 1994). اساساً در اتصال لیگاند به پروتئین چهار نوع میانکنش غیرکوالان شامل پیوندهای هیدروژنی، نیروهای واندروالس، میانکنش‌های هیدروفوبی و الکتروستاتیک می‌تواند دخیل باشد. از روی علامت و بزرگی پارامترهای ترمودینامیکی (آنتالپی و آنتروپی) می‌توان به نوع نیروی دخیل در میانکنش‌های لیگاند- پروتئین در یک واکنش پی‌برد. مطالعات مختلف بیانگر این است که در اتصال نانوذرات به پروتئین‌های مکانیسم‌ها و نیروهای مختلف درگیرند. به عنوان مثال، Roy و همکاران، برهمکنش بین نانوذره اکسید مس با پروتئین آلبومین سرم گاوی را در سه دمای ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی

قرار دادند. آنها نتیجه گرفتند که نانو ذره اکسید مس از طریق میانکنش‌های الکتروستاتیک و هیدروفوب به آلبومین سرم گاوی متصل و باعث تغییراتی در ساختار آنزیم می‌شود ولی تخریب کامل ساختار آنزیم در حضور نانوذره صورت نمی‌گیرد (Roy & Das, 2014).

Mahanthappa و همکاران، برهمکنش نانوذره سولفید مس با آلبومین سرم گاوی را در سه دمای ۲۵، ۲۸ و ۳۴ سانتی‌گراد مورد بررسی قرار دادند. آنها نتیجه گرفتند که نانوذره سولفید مس از طریق پیوند های واندروالسی و هیدروژنی به آلبومین سرم گاوی متصل و باعث تغییراتی در ساختار آنزیم می‌شود (Mahanthappa *et al.*, 2018). Yang و همکاران، برهمکنش بین نانوذره اکسید آهن با آلبومین سرم گاوی را در سه دمای ۱۸، ۲۵ و ۴۰ سانتی‌گراد مورد بررسی قرار دادند. آنها نتیجه گرفتند که نانو ذره اکسید آهن از طریق پیوند الکتروستاتیکی به آلبومین سرم گاوی متصل و باعث برخی تغییراتی در ساختار آنزیم می‌شود (Yang *et al.*, 2009).

نظر به استفاده گسترده از نانوذره اکسید مس در صنایع مختلف و از آنجائیکه آنزیم پراکسیداز در بدن تمام موجودات زنده از جمله انسان وجود داشته و نقش کلیدی در حذف رادیکال‌های آزاد H_2O_2 دارد، در این مطالعه تغییرات فعالیت و ساختاری آنزیم پراکسیداز LDP در میانکنش با نانوذره اکسید مس مورد آنالیز قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده

مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش شامل عصاره مخمر، تریپتون، کلرید سدیم، آگار جهت تهیه محیط کشت LB و LB-آگار، تترا متیل اتیل دی آمین، بیس آکریل آمید، SDS، تریس باز، اسید کلریدریک، ایزوپروپنول، ۲-بتا مرکاپتواتانول، بروموفنول بلو، کوماسی بلو، ایمیدازول، کلرید کلسیم، IPTG، از شرکت Merk آلمان تهیه گردید. آنتی بیوتیک کانامایسین از شرکت Roche خریداری شد.

8-Anilino-naphthalene-1-sulfonic acid (ANS) نمک‌های دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4) ، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (KH_2PO_4) ، Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) و 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) از شرکت سیگما خریداری شدند. نانوذره اکسید مس (CuO) با درصد خلوص ۹۹/۲، مساحت سطح $55 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ و میانگین اندازه ۶۰ نانومتر از شرکت ناباند تکنولوژی (NaBond Technologies Co., Ltd., China) خریداری گردید. جهت تخلیص پروتئین نوترکیب از ستون Ni-NTA agarose resin استفاده شد که از شرکت Invitrogen خریداری شد. جهت تغلیظ پروتئین و حذف نمک‌ها از فیلتر Amicon استفاده شد (Fattahian *et al.*, 2017a). این فیلتر از شرکت Milipor خریداری گردید.

روش‌ها

بیان و تخلیص آنزیم پراکسیداز LDP

جهت تخلیص آنزیم نوترکیب LDP ابتدا باکتری حاوی ژن پراکسیداز لپیدیوم درایا با استفاده از محیط کشت LB حاوی کانامایسین در دمای 37°C کشت داده شد و پس از رسیدن OD_{600} به ۰/۷، بیان بیشتر با استفاده از ۱ IPTG میلی مولار به مدت ۷ ساعت در دمای 18°C انجام گرفت. آنزیم نوترکیب توسط ستون نیکل سفارز تخلیص گردید (Fattahian *et al.*, 2017a). جهت تأیید خلوص پروتئین از ژل SDS-PAGE استفاده شد. به منظور تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976).

سنجش فعالیت آنزیم LDP

فعالیت آنزیم از روش Krainer و همکاران اندازه‌گیری شد (Krainer *et al.*, 2014). بطور خلاصه، مخلوط واکنش شامل ۰/۰۷۱ میلی گرم بر میلی لیتر آنزیم LDP، ۱ میلی مولار H_2O_2 و ۰/۶ میلی مولار TMB به‌عنوان سوبستراهای آنزیم و در حجم نهایی ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار pH ۶/۷۵ آماده شد. افزایش جذب در طول موج ۶۵۳

۱۴۰ / بررسی اثر نانوذره اکسید مس بر فعالیت و ساختار آنزیم پراکسیداز لیپیدیوم درابا (LDP)

نانومتر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰۰ ثانیه و در فواصل ۳۰ ثانیه‌ای سنجیده شد. جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم از ضریب خاموشی TMB اکسید شده در این طول موج ($3/9 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) استفاده شد.

بررسی فعالیت آنزیم LDP در حضور نانوذره CuO

جهت بررسی فعالیت آنزیم در حضور نانوذره، بر اساس روش Sarvandi-Dehghanpoor و همکاران (۲۰۱۸) با اندکی تغییر انجام شد. مخلوط واکنش با حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر و با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار H_2O_2 ، ۰/۶ میلی‌مولار TMB، ۷۰ میکرولیتر آنزیم با غلظت نهایی ۰/۰۷۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در حضور غلظت‌های متفاوت صفر (به عنوان کنترل)، ۳۵، ۸۰، ۱۸۰، ۱۳۰، و ۲۱۰ نانو مولار* نانوذره تهیه شد. مخلوط واکنش به مدت ۴ ساعت در دمای محیط انکوبه گردید. سپس فعالیت آنزیم مطابق روش ذکر شده سنجیده شد. میانگین داده‌های حاصل از سه بار تکرار با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ توسط آزمون دانکن (Duncan test) با در نظر در سطح معنی‌دار ۵ درصد مورد تجزیه واریانس یک عاملی (ANOVA way One) قرار گرفتند. *مولار در اینجا همان مولاریته ذره یا Particle molarity است که برای نانوذرات مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مطالعات ساختاری

به منظور بررسی اثرات نانوذره بر ساختار آنزیم از مطالعات فلورسانس ذاتی و خارجی استفاده شد. برای جلوگیری از ایجاد اختلال در طیف فلورسانس، ایمیدازول و نمک‌های موجود در محلول پروتئین با استفاده از فیلتر آمیکون ۱۰ کیلودالتونی حذف شدند (Fattahian *et al.*, 2017). طیف‌های مربوطه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Cary Elips (Varian, Australia) ثبت شد.

اندازه‌گیری شدت فلورسانس خارجی

جهت بررسی تغییرات هیدروفوبیسیته آنزیم در حضور نانوذره از طیف نشری فلورسانس مربوط به فلوروفور ANS استفاده شد (Riahi-Madvar *et al.*, 2021). فلورسانس ANS در غلظت ۳۰ میکرومولار و غلظت ۷ میکرومولار آنزیم به صورت زیر انجام شد. ابتدا طیف فلورسانس ANS در محلول بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۶/۷۵ ثبت شد طبق شرایط ذیل ثبت گردید.

طول موج تحریک (λ_{ex}): ۳۵۰ نانومتر، محدوده طول موج نشر (λ_{em}): ۴۰۰-۶۰۰ نانومتر، Slit (پهنای باند نور تابیده شده یا ثبت شده توسط دتکتور): ۱۰ نانومتر. سپس طیف مربوط به آنزیم LDP کمپلکس شده با ANS و آنزیم LDP کمپلکس با نانوذره CuO (غلظت ۲۱۰ نانومولار) با ANS که به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شده بود طبق شرایط ذکر شده ثبت گردید.

اندازه‌گیری شدت فلورسانس ذاتی LDP در میانکنش با نانوذره CuO

جهت مطالعه برهمکنش نانوذره اکسید مس با LDP آزمایش به صورت زیر انجام شد:

طول موج تحریک (λ_{ex}): ۲۸۰ نانومتر، محدوده طول موج نشر (λ_{em}): ۳۰۰-۵۰۰ نانومتر، سرعت اسکن ۵۰۰ نانومتر بر دقیقه و پهنای باند نور تابیده شده (۵ نانومتر) و ثبت شده توسط دتکتور: ۱۰ نانومتر.

حجم نهایی شامل پروتئین با غلظت نهایی ۰/۰۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نانوذره با غلظت‌های نهایی صفر، ۳۵، ۴۵، ۵۵، ۸۰، ۹۰، ۱۱۰، ۱۳۰، ۱۵۰، ۱۷۰ و ۱۹۰ نانومولار در یک میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۶/۷۵ در سل کوارتز یک سانتی‌متری بود. طیف فلورسانس ذاتی پروتئین در طول موج تحریک ۲۸۰ نانومتر پس از ۵ دقیقه انکوبه شدن در دمای ۲۹۸ درجه کلوین ثبت گردید. علاوه بر این، فلورسانس ذاتی پروتئین در دماهای ۳۰۳، ۳۰۸ و ۳۱۳ درجه کلوین در حضور غلظت‌های مختلف این نانوذره اندازه‌گیری شد.

بررسی نوع مکانیسم میانکنش

جهت بررسی نوع مکانیسم میانکنش نانوذره با پروتئین، نمودار استرن-ولمر مربوط به هر یک از دماها، برحسب شدت فلورسانس در طول موج ۳۴۰ نانومتر و غلظت نانوذره (نانو مولار) ترسیم گردید (Riahi-Madvar *et al.*, 2021). پس از بدست 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 غیاب و حضور خاموش کننده، K_q ثابت سرعت خاموشی پروتئین، K_{SV} ثابت خاموشی دینامیک یا ثابت استرن-ولمر (عکس مولار.ثانیه)، $[Q]$ غلظت خاموش کننده برحسب مولار است (Gelamo *et al.*, 2002; Lakowicz, 1999). τ_0 متوسط نیمه عمر پروتئین بدون خاموش کننده (۵ نانوثانیه) است (Xie *et al.*, 2006).

مقدار K_q را می‌توان از معادله ۲ بدست آورد.

معادله ۲

$$K_{SV} = K_q \tau_0$$

تعیین پارامترهای ترمودینامیکی

جهت تعیین نیروهای دخیل در میانکنش پروتئین با نانوذره، پارامترهای ترمودینامیکی شامل آنتالپی و آنتروپی با استفاده از معادله ۳ محاسبه شدند.

معادله ۳

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

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

مقدار تغییرات انرژی آزاد گیبس استاندارد (کیلوکالری بر مول) بر اساس معادله ۴ محاسبه گردید.

در این رابطه K: ثابت استرن ولمر در دماهای مختلف بر حسب عکس مولار، ΔH^0 :
آنتالپی واکنش بر حسب کالری بر مول بر درجه کلوین، ΔS^0 : آنتروپی واکنش بر حسب
(مول.کلوین) بر ژول) و R: ثابت گازها (مول.کلوین بر ژول) است (Sanei *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011).

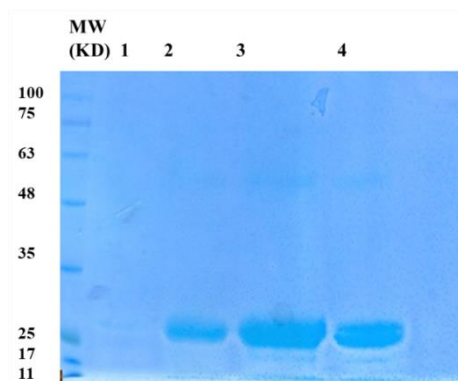
معادله ۴

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

نتایج

بیان و تخلیص آنزیم LDP

کیفیت نمونه‌های تخلیص شده با استفاده از ژل الکتروفورز SDS-PAGE مشخص گردید (شکل ۱). از نمونه‌های تفکیک شده مربوط به ردیف‌های ۲ تا ۴ که از خلوص بالاتری برخوردارند جهت ادامه آزمایشات استفاده شد.

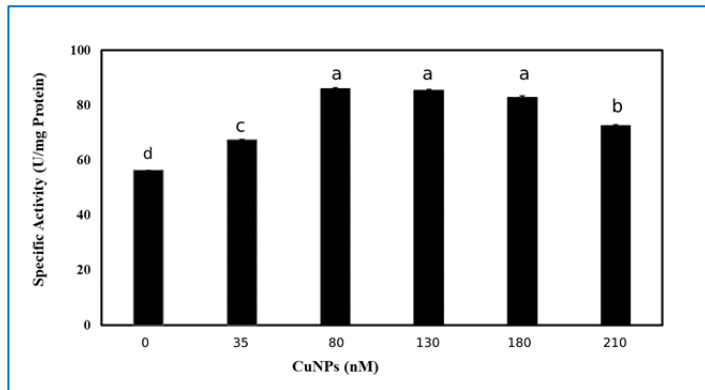


شکل ۱- تخلیص پروتئین نو ترکیب LDP با غلظت‌های مختلف ایمیدازول. MW نشانگر وزن مولکولی پروتئین، شماره‌های ۱، ۲، ۳، ۴ به ترتیب مربوط به نمونه‌های تخلیص شده با ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار ایمیدازول است.

Figure 6. Purification of recombinant LDP with different concentrations of imidazole. Lane MW is the protein ladder, numbers 1-4 are the purified sample related to the imidazole concentrations of 50, 100 and 200 300 mM respectively.

تغییرات فعالیت آنزیم LDP در حضور نانوذره CuO

همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد، فعالیت آنزیم کمپلکس شده با نانوذره در تمامی غلظت‌ها نانوذره نسبت به آنزیم آزاد به‌طور معنی‌داری در سطح ۵ درصد افزایش نشان می‌دهد. بیشترین فعالیت آنزیم مربوط به محدوده غلظت ۸۰ تا ۱۸۰ نانومولار نانوذره است که بیش از ۴۶ درصد نسبت به نمونه کنترل افزایش یافته است. در حالی که افزایش فعالیت آنزیم در حضور بیشترین غلظت نانوذره و کمترین غلظت نانوذره به ترتیب ۲۸ و ۱۹ درصد است.

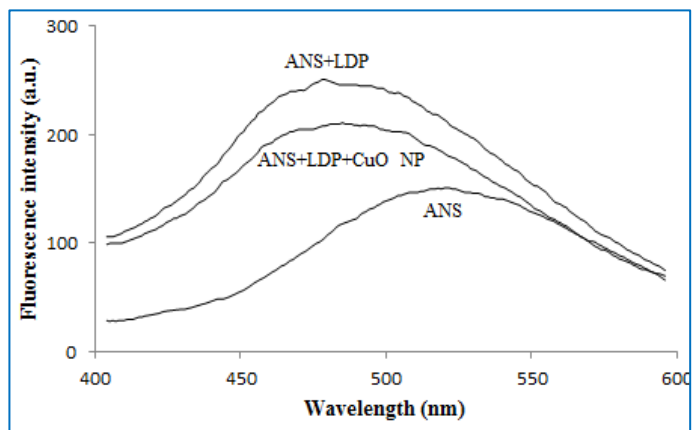


شکل ۲- تغییرات فعالیت ویژه آنزیم LDP در حضور نانوذره اکسید مس. ستون‌ها نشان دهنده میانگین حاصل از سه تکرار \pm انحراف معیار می‌باشد. حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است.

Figure 2. Changes of LDP specific enzyme activity in the presence of nCuO. Bars represent means \pm SD, n = 3. Signs with different letters are significantly different at $P \leq 0.05$ according to Duncan's multiple range tests.

فلورسانس ANS

با توجه به شکل ۳، ماکزیمم شدت نشر فلورسانس ANS در مورد آنزیم کمپلکس شده با نانوذره نسبت به آنزیم آزاد کاهش نشان می‌دهد.



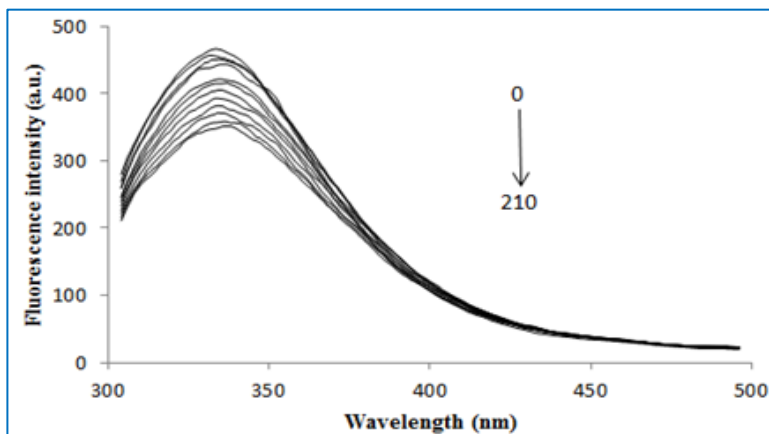
شکل ۳- طیف نشری فلورسانس ANS، ANS+LDP و ANS+LDP+NP

Figure 3. ANS, ANS-LDP and ANS+LDP+nCuO fluorescence spectra

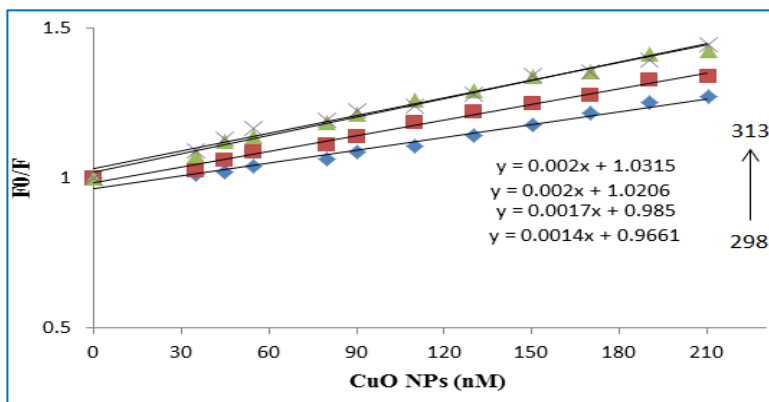
فلورسانس ذاتی LDP در حضور نانوذره اکسید مس در دماهای ۲۹۸، ۳۰۳، ۳۰۸ و ۳۱۳ درجه کلوین

تأثیر دما بر میانگین پروتئین با نانوذره اکسید مس، با اندازه‌گیری شدت فلورسانس ذاتی LDP در طول موج ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. همانند آنچه در شکل ۴ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت نانوذره در محیط، شدت نشر فلورسانس ذاتی آنزیم کاهش می‌یابد. نتایج مشابهی در دماهای بالاتر نیز بدست آمد.

نتایج بدست آمده از معادله استرن-ولمر در طول موج نشری ۳۴۰ نانومتر بر حسب غلظت‌های مختلف نانوذره نشان می‌دهد که میزان خاموش شدگی نشر فلورسانس با غلظت نانوذره رابطه خطی داشته و هماهنگ با افزایش غلظت نانوذره در محیط میزان نشر نیز کاهش می‌یابد. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود با افزایش دما میزان کاهش شدت فلورسانس کمتر شده است.



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف (۰ تا ۲۱۰ نانومولار) نانوذره اکسید مس بر فلورسانس ذاتی LDP
 Figure 4. Effects of nCuO different doses (0-210 nM) on LDP intrinsic fluorescence



شکل ۵- مقایسه نمودار استرن-ولمر برهمکنش پروتئین LDP با غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید مس در دماهای مختلف

Figure 5. Stern-Volmer plat comparison of interaction LDP with different concentrations of nCuO in different temperatures

تعیین نوع میانکنش LDP 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 محاسبه و در

جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که در جدول قابل مشاهده است هر دو ثابت خاموشی و ثابت سرعت با افزایش دما افزایش یافته است.

جدول ۱- ثابت‌های خاموشی مربوط به میانکنش LDP با نانوذره اکسید مس

Table 1. Quenching constants related to the LDP interaction with nCuO

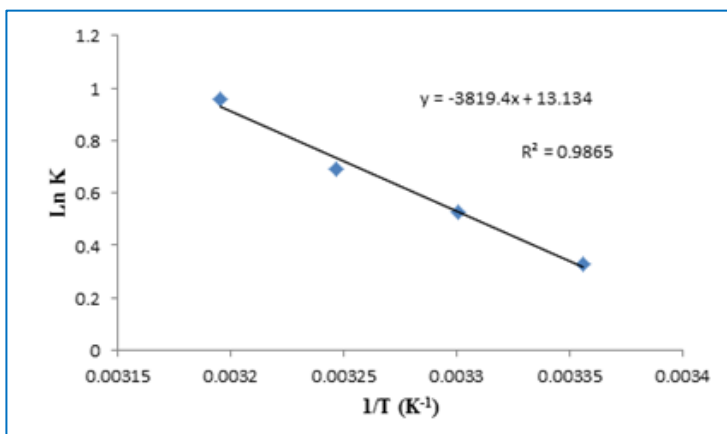
دما (کلوین)	K_{sv} ($1 \times 10^{-12} \text{L mol}^{-1}$)	K_q ($1 \times 10^{-3} \text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$)
۲۹۸	۱/۴	۰/۲۸
۳۰۳	۱/۷	۰/۳۴
۳۰۸	۲	۰/۴
۳۱۳	۲	۰/۴

تعیین پارامترهای ترمودینامیکی در میانکنش LDP و نانوذره اکسید مس

با استفاده از معادله خط بدست آمد از نمودار وانت‌هوف (شکل ۶)، آنتالپی و آنتروپی

میانکنش نانوذره اکسید مس با LDP محاسبه گردید. همانطور که در جدول ۲ قابل

مشاهده است علامت ΔH و ΔS مثبت است.



شکل ۶- نمودار وانت هوف مربوط به میانکنش نانوذره اکسید مس با LDP.

Figure 6. Van't Hoff plat of interaction LDP with nCuO

از طرف دیگر بر اساس معادله ۴، 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 کاهش یافته است.

جدول ۲- پارامترهای ترمودینامیکی میانکنش نانوذره اکسید مس با LDP.

Table 2. Thermodynamic parameters of interaction LDP with nCuO

Temp (K)	ΔG° (kJ mol ⁻¹)	$H\Delta$ (kJ mol ⁻¹)	ΔS (kJ mol ⁻¹ K)
۲۹۸	-۲۸/۳۸		
۳۰۳	-۲۸/۹		
۳۰۸	-۲۹/۴	۳/۸۱	۰/۱۰۸
۳۱۳	-۳۰		

بحث و نتیجه گیری

با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد نانوذرات از قبیل اندازه و ابعاد آن‌ها در سال‌های اخیر استفاده از آنها در محصولات تجاری و صنعتی بطور چشمگیری افزایش یافته است (Roco, 1999). بنابراین دور از انتظار نیست که آنها راهی برای ورود به اکوسیستم‌ها پیدا نموده و حیات موجودات زنده را تحت تاثیر قرار دهند (Riahi-Madvar *et al.*, 2021). با توجه به اینکه، آنزیم پراکسیداز در بدن تمام موجودات زنده از جمله انسان وجود داشته و نقش کلیدی در حذف رادیکال‌های آزاد H₂O₂ دارد، در این تحقیق، بمنظور بررسی تغییرات فعالیت و ساختاری آنزیم پراکسیداز LDP در میانکنش با نانوذره اکسید مس، ابتدا آنزیم نو ترکیب LDP با استفاده از ستون نیکل سفارز تخلیص شد و سپس کیفیت خلوص آن با تفکیک بر روی ژل SDS PAGE مورد تأیید قرار گرفت. بررسی فعالیت آنزیم LDP در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره CuO نشان داد که فعالیت آنزیم در روندی وابسته به غلظت نانوذره تحت تاثیر قرار گرفته است و در حضور تمامی غلظت‌ها، فعالیت آنزیم نسبت به نمونه شاهد بطور معنی‌داری در سطح ۵ درصد افزایش یافته است.

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد، کمترین افزایش فعالیت در حضور پایین‌ترین غلظت نانوذره یعنی غلظت ۳۵ نانومولار مشاهده می‌شود و با افزایش غلظت نانوذره در محیط در محدوده غلظت ۸۰ تا ۱۸۰ نانومولار، آنزیم بیشترین فعالیت را نشان می‌دهد و با افزایش غلظت نانوذره در محیط، فعالیت آنزیم روند کاهشی بخود می‌گیرد. پژوهش‌های متعددی نشان داده است، زمانی که آنزیم‌ها در معرض نانوذرات قرار می‌گیرد، فعالیت آن‌ها تحت تاثیر قرار می‌گیرد. مطالعات انجام شده توسط Kim و همکاران نشان داد که فعالیت آنزیم پراکسیداز ترب‌کوهی (HRP) در حضور نانوذره مگنتیک (Fe_3O_4) افزایش می‌یابد (Kim *et al.*, 2016). این مشاهدات با نتایج بدست آمده از این تحقیق همخوانی دارد. احتمال می‌رود که تغییر فعالیت آنزیم‌ها در حضور نانوذره احتمالاً به دلیل تغییر در ساختار آنزیم است.

روش‌های مختلفی جهت مطالعه تاثیر مواد بر ساختار پروتئین‌ها مورد استفاده قرار گرفته است که از مهمترین آنها می‌توان به روش‌های طیف‌سنجی فلورسانس، طیف‌سنجی مرئی-ماورای بنفش، دورنگ‌نمایی حلقوی (CD) و رزونانس مغناطیس هسته‌ای (NMR) اشاره نمود (Kandagal *et al.*, 2007; Volkova *et al.*, 2007). از بین روش‌های مذکور، فلورسانس به دلیل حساسیت بالا، انتخابگری و سهولت کار با آن به صورت گسترده‌تری مورد استفاده قرار گرفته است (Chen *et al.*, 2011). سنجش فلورسانس، اطلاعاتی در مورد محیط اطراف یک کروموفور خاص مانند ANS (فلورسانس خارجی) و یا اسید آمینه‌های آروماتیک (فلورسانس ذاتی) در یک پروتئین می‌دهد (Rodrigues *et al.*, 2013). گزارش شده که در ساختار آنزیم LDP یک تریپتوفان، ۶ تیروزین و ۱۹ فنیل آلانین وجود دارد (Fattahian *et al.*, 2017b). در این مطالعه جهت بررسی تغییرات ساختار آنزیم در حضور نانوذره مس از مطالعات فلورسانس ذاتی و خارجی استفاده گردید.

همانطور که در نتایج آمده است در دما ۲۹۸ درجه کلوین، در حضور نانوذره اکسید مس، فلورسانس ذاتی آنزیم کاهش یافته است. نمودار استرن-ولمر مربوطه (شکل ۵) نشان داد که رابطه بین میزان کاهش نشر و غلظت نانوذره خطی است. نتایج مشابهی

توسط Huang و همکاران در برهمکنش HSA با کوانتوم دات $CdTe:Zn^{2+}$ گزارش شده است (Huang *et al.*, 2015) که با نتایج بدست آمده در این تحقیق همخوانی دارد. همچنین نتایج مشابهی در برهمکنش نانوذره اکسید مس با HSA گزارش گردیده است (Riahi-Madvar & Ghaseminesab, 2018).

جهت بررسی تغییر در پاکت‌های هیدروفوب سطحی آنزیم در کمپلکس با نانوذره نسبت به آنزیم آزاد، از فلورسانس خارجی ANS استفاده شد. ANS یک فلوروفور هیدروفوب است که پس از اتصال به محیط‌های هیدروفوب، نشر آن افزایش می‌یابد. نتایج بررسی فلورسانس خارجی با استفاده از فلوروفور ANS نشان داد که نشر این فلوروفور پس از اتصال به پروتئین متصل شده به نانوذره نسبت به نمونه کنترل کاهش یافته است. این مشاهدات با نتایج منتشر شده توسط Sen و همکاران (۲۰۱۱) همخوانی دارد. آن‌ها مشاهده کردند که طیف نشری فلورسانس ANS در پروتئین آلبومین متصل شده به نانوذرات طلا نسبت به پروتئین متصل نشده به نانوذره کمتر است (Sen *et al.*, 2011). کاهش نشر فلورسانس این فلوروفور، نشان دهنده این واقعیت است که میزان هیدروفوبیسیته سطحی پروتئین در اثر میانکنش با این ذره کاهش یافته است. این مشاهدات با نتایج گزارش شده توسط Riahi-Madvar و Ghaseminesab در ارتباط با میانکنش نانوذره اکسید مس با آلبومین سرم انسانی مغایرت دارد. آنها گزارش کردند که نشر فلورسانس ANS در حضور آلبومین سرم انسانی میانکنش داده با نانوذرات اکسید مس نسبت به سرم آلبومین میانکنش نداده افزایش یافته است (Riahi-Madvar & Ghaseminesab, 2018).

مجموع نتایج مربوط به تغییر فعالیت آنزیم و تغییرات فلورسانس ذاتی و خارجی در حضور نانوذره اکسید مس بیانگر نوعی میانکنش بین آن‌ها است. جهت بررسی نوع میانکنش بین نانوذره اکسید مس با آنزیم از مطالعات فلورسانس ذاتی در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره در دماهای مختلف (۲۹۸، ۳۰۳، ۳۰۸ و ۳۱۳ درجه کلوین) استفاده شد. نتایجی مشابه آنچه که در دما ۲۹۸ درجه کلوین مشاهده می‌شود (شکل ۴) در دماهای بالاتر (۳۰۳، ۳۰۸ و ۳۱۳ درجه کلوین) نیز مشاهده گردید. بر اساس نمودار استرن-ولمر مربوط به خاموشی فلورسانس در دماهای مختلف (شکل ۵) چنین استنباط

می‌شود که با افزایش دما، شیب نمودار مربوطه افزایش می‌یابد. به عبارت دیگر، با افزایش دما، میزان خاموشی فلورسانس ذاتی مربوط به اسیدآمینه‌های آروماتیک در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره بصورت تابعی از غلظت نانوذره افزایش می‌یابد. این نتایج با مشاهدات مربوط به میانکنش نانوذره اکسید مس با HSA که نشان داد با افزایش دما، شیب نمودار استرن-ولمر مربوط به خاموشی فلورسانس کاهش می‌یابد مغایرت دارد (Riahi-Madvar & Ghaseminesab, 2018).

بر اساس نتایج (جدول ۱) پارامترهای مربوط به ثابت خاموشی (K_q و K_{sv}) با افزایش دما از ۲۹۸ درجه کلوین به ۳۱۳ درجه کلوین افزایش می‌یابند. این مشاهدات با نتایج گزارش شده در اتصال کوانتوم دات $CdTe:Zn^{2+}$ به HSA توسط Huang و همکاران (Huang *et al.*, 2015) و همچنین نتایج گزارش شده در ارتباط با میانکنش HSA با نانوذره اکسید مس مغایرت دارد (Riahi-Madvar & Ghaseminesab, 2018). مطالعات مختلف نشان داده است که تاثیر نانوذرات بر پروتئین‌ها، علاوه بر نوع پروتئین، به ماهیت نانوذره و اندازه آن نیز بستگی دارد (Iranfar *et al.*, 2012; Riahi-Madvar & Ghaseminesab, 2018).

نقش و اهمیت پارامترهای ترمودینامیکی، در ارتباط با انواع مختلف میانکنش‌هایی که در روند اتصال به پروتئین‌ها ممکن است رخ دهد توسط Ross و Subramanian سال ۱۹۸۱ مشخص گردید. آنها مطرح کردند که اگر آنتالپی و آنتروپی هر دو بزرگتر از صفر باشد؛ میانکنش از نوع هیدروفوب و اگر هر دو پارامتر مذکور کوچکتر از صفر باشد، میانکنش‌های واندروالسی و پیوند هیدروژنی در اتصال نقش دارد و اگر آنتالپی کوچکتر از صفر و آنتروپی بزرگتر از صفر باشد، میانکنش‌های الکتروستاتیک عامل اصلی اتصال است (Ross & Subramania, 1981). بر اساس نتایج حاصل هر دو پارامترهای ترمودینامیکی شامل، آنتالپی و آنتروپی بزرگتر از صفر است. بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که میانکنش‌های هیدروفوب عامل اصلی اتصال نانوذره با آنزیم است. مطالعات اخیر نشان داده است که در میانکنش HSA با نانوذره اکسید مس میانکنش‌های الکتروستاتیک دخیل است که با نتایج حاصل از این تحقیق مغایرت دارد (Riahi-Madvar & Ghaseminesab, 2018). از طرف دیگر، مطالعات Rabbani و همکاران نشان داده است که در میانکنش اتصال

نانوذرات اکسید مس با آنزیم بتا گالاکتوزیداز، پیوند هیدروژنی و نیروهای واندروالس دخالت دارد (Rabbani *et al.*, 2014). نظر می‌رسد که نوع مکانسیم اتصال و نیروهای دخیل در اتصال تابعی از اندازه، غلظت و همچنین ماهیت نانوذره در محیط باشد (Riahi-Madvar & Ghaseminesab, 2018). مطالعات انجام شده توسط ایرانفر و همکاران نیز نشان دادند که با تغییر اندازه نانوذره نقره در محیط رفتارهای متفاوتی رخ می‌دهد، بطوریکه 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 از خود نشان می‌دهد که می‌تواند با لایه‌های مختلف آبپوشی اطراف آنها مرتبط باشد (Iranfar *et al.*, 2012). علاوه بر این، ΔG° منفی بیانگر انرژی‌زا بودن واکنش میانکنش بین نانوذره اکسید مس با آنزیم LDP است که بطور خود به خودی پیش می‌رود (Huang *et al.*, 2015). این نتیجه با مشاهدات مربوط به میانکنش HSA با نانوذره اکسید مس، همخوانی دارد (Riahi-Madvar & Ghaseminesab, 2018).

بر اساس نتایج ترمودینامیکی چنین استنباط می‌شود که میانکنش بین نانوذره اکسید مس و آنزیم LDP به صورت خود به خودی و با استفاده از میانکنش‌های هیدروفوب پیش می‌رود. مطالعات فلورسانس ذاتی و خارجی نشان داد که این میانکنش با تغییراتی در ساختاری آنزیم همراه است بطوریکه فشردگی ساختار آنزیم نسبت به نمونه کنترل کمتر شده است. تغییر در ساختار آنزیم پس از در معرض قرار گرفتن با نانوذره می‌تواند دلیلی بر تغییر فعالیت آنزیم در این شرایط باشد. از طرف دیگر، مغایرت‌هایی در مطالعه میانکنش نانوذره اکسید مس با آنزیم LDP در مقایسه با مطالعات مشابه مشاهده گردید که می‌تواند به دلیل رفتار متفاوت نانوذرات که ناشی از تغییر اندازه، ماهیت و همچنین شکل نانوذرات باشد که با پروتئین‌های مختلف به صورت‌های متفاوتی بروز می‌کند. در هر صورت، مطالعات بیشتری از قبیل زمان در معرض قرار گرفتن، دما، pH و ... باید مد نظر قرار گیرد تا رفتارهای نانوذرات با پروتئین‌ها مورد ارزیابی دقیق‌تر قرار گیرد.

سیاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی جیرفت با قرارداد شماره ۱۹۵-۹۸-P انجام شده است. بنابراین مجری و همکاران مراتب سپاس و قدردانی خود را از آن دانشگاه محترم اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

تعارض منافی در این مقاله وجود ندارد.

منابع

- Ball, P. (2002). Natural strategies for the molecular engineer. *Nanotechnology* 13: 15-28.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72(1-2): 248-254.
- Brandes, N., Welzel, P.B., Werner, C. and Kroh, L.W. (2006) Adsorption-induced conformational changes of proteins onto ceramic particles: differential scanning calorimetry and FTIR analysis. *J Colloid Interface Sci* 299(1): 56-69.
- 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. *Environ Sci Technol* 40(14): 4374-4378.
- Carter, D.C. and Ho, J.X. (1994). Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem* 45: 153-203.
- Chang, Y.N., Zhang, M., Xia, L., Zhang, J. and Xing, G. (2012). The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials* 5(12): 2850-2871.
- Chen, L., Wu, M., Lin, X. and Xi, Z. (2011). Study on the interaction between human serum albumin and a novel bioactive acridine derivative using optical spectroscopy. *Luminescence* 26: 172-177.
- Dai, P., Mook, H.A., Aeppli, G., Hayden, S.M. and Doğan, F. (2000). Resonance as a measure of pairing correlations in the high-T_c superconductor YBa₂Cu₃O_{6.6}. *Nature* 406(6799): 965.
- Fattahian, Y., Riahi-Madvar, A., Mirzaee, R., Torkzadeh-Mahani, M. and Asadikaram, G. (2017a). Heterologous Expression, Purification and Characterization of a Peroxidase Isolated from *Lepidium draba*. *The protein journal* 36(6): 461-71.
- Fattahian, Y., Riahi-Madvar, A., Mirzaee, R., Torkzadeh-Mahani, M. and Asadikaram, G., Mohammad Reza Rahbar, M.R. (2017b). In silico locating the immune-reactive segments of *Lepidium draba* peroxidase and designing a less immune-reactive enzyme derivative. *Computational biology and chemistry* 70: 21-30.
- 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. *Biochimica et Biophysica Acta* 1594: 84-99.

- Hamid, M. (2009) Potential applications of peroxidases. *Food chemistry* 15; 115(4):1177-86.
- Huang, S., Qiu, H., Liu, Y., Huang, C., Sheng, J., 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.
- 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, *J. Phys. Chem. B*, 116, 1951–1964
- Kandagal, P.B., Shaikh, S.M.T., Manjunatha, D.H., Seetharamappa, J. and Nagaralli, B.S. (2007). Spectroscopic studies on the binding of bioactive phenothiazine compounds to human serum albumin. *J Photochem Photobiol A: Chem* 189: 121–7.
- Kim, S., Lee, J., Jang, S., Lee, H., Sung, D. and Chang, J.H. (2016). High efficient chromogenic catalysis of tetramethylbenzidine with horseradish peroxidase immobilized magnetic nanoparticles. *Biochemical Engineering Journal* 105: 406-411.
- Krainer, F.W., Pletzenauer, R., Rossetti, L., Herwig, C., Glieder, A. and Spadiut O. (2014). Purification and basic biochemical characterization of 19 recombinant plant peroxidase isoenzymes produced in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification* 95: 104-112.
- Lakowicz, J.R. (1999). Principles of fluorescence spectroscopy, 2nd edn. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers 368.
- 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 (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): Plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environ Toxicol Chem* 27(9): 1915-1921.
- Mahanthappa, M., Savanur, M.A., Puthusseri, B. and Yellappa, S. (2018). Spectroscopic and electrochemical studies on the molecular interaction between copper sulphide nanoparticles and bovine serum albumin. *J Mater Sci* 53(1): 202-214.
- Monica, R.C. and Cremonini R. (2009). Nanoparticles and higher plants. *Caryologia* 62(2): 161-165.

- Park, W.J., Choi, K.J., Kim, M.H., Koo, B.H., Lee, J.L. and Baik, J.M. (2013). Self-assembled and highly selective sensors based on air-bridge-structured nanowire junction arrays. *ACS Appl Mater Interfaces* 5(15): 6802-6807.
- 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.
- Rabbani, G., Khan, M.J., Ahmad, A., Yusof Maskat, 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.
- Riahi-Madvar, A., Ghaseminesab, A., Barzegary-Dehaj, F., Zamani, Z. and Rezaee F. (2021). Investigation of the Fe₂O₃ nanoparticles interaction with human serum albumin using fluorescence and circular dichroism (CD) techniques. *Molecular and Cellular Researches*. In Press (in Persian).
- Riahi-Madvar, A. and Ghaseminesab, A. (2018). Study of the CuO nanoparticles interaction with human serum albumin using fluorescence technique. *Molecular and Cellular Researches* 30(4): 339-348. (in Persian).
- Roco MC. (1999). Nanoparticles and nanotechnology. *JNR* 1: 1-6.
- Rodrigues, R.C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Torres, R., Roberto Fernández-Lafuente, R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews* 42(15): 6290-6307.
- Ross, P.D. and Subramania, S. (1981). Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry* 20(11): 3096-102.
- Roy, S. and Das, T.K. (2014). Spectroscopic studies of interaction between biologically synthesized silver nanoparticles and bovine serum albumin. *J Nanosci Nanotechnol* 14(7): 4899-4905.
- 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. *J Solution Chem* 40: 1905–1931.
- Saptarshi, S.R., Duschl, A. and Lopata, A.L. (2013). Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J Nanobiotechnol* 11(1): 26.
- Sen, T., Mandal, S., Haldar, S., Chattopadhyay, K. and Patra, A. (2011). Interaction of gold nanoparticle with human serum albumin (HSA) protein using surface energy transfer. *The Journal of Physical Chemistry C* 115(49): 24037-24044.

- Volkova, K.D., Kovalska, V.B., Tatarets, A.L., Patsenker, L.D., Kryvorotenko, D.V. and Yarmoluk, S.M. (2007). Spectroscopic study of squaraines as protein-sensitive fluorescent dyes. *Dyes Pigments* 72: 285–92.
- 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.
- Welinder, K.G. (1976). Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11. 1.7). *FEBS letters* 72(1):19-23.
- 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.
- Yang, Q., Liang, J. and Han, H. (2009). Probing the interaction of magnetic iron oxide nanoparticles with bovine serum albumin by spectroscopic techniques. *J Phys Chem B* 113(30): 10454-10458.
- Zhou, D., Jin, S., Li, L., Wang, Y. and Weng, N. (2011). Quantifying the adsorption and uptake of CuO nanoparticles by wheat root based on chemical extractions. *Journal of environmental sciences*. 23(11): 1852-1857.

Investigation of the CuO nanoparticles effect on activity and structure of *Lepidium draba* peroxidase enzyme

A. Riahi-Madvar^{1*}, F. Barzegary-Dehaj², R. Mirzaee³, F. Bahramnejad²

Received: 2022.08.06

Accepted: 2023.02.12

Abstract

Introduction: Entrance of nanoparticles into the environment provides possibility of their entry into living organisms. Their entry into the body can affect biological macromolecules and affect their life. Here, to investigate effect of copper oxide nanoparticle (nCuO) on recombinant *Lepidium draba* peroxidase, changes in enzyme activity and structure were analyzed in presence of nCuO. **Methods:** Enzyme activity was measured in the presence of different concentrations of nCuO and repeated three times. Results were statistically analyzed using SPSS software at a significance level of 5 percent. Intrinsic fluorescence studies in the presence of nanoparticles were utilized to investigate structural changes of the enzyme. These studies were done at different temperatures to determine thermodynamic parameters such as the type of forces involved in the nanoparticle-enzyme interaction. **Results and discussion:** Enzyme activity in the presence of nCuO significantly increased at the level of 5 percent. The most enzyme activity were attributed to the concentration ranges of 80-180 nM nanoparticles, which it increased more than 46 percent compared to the control. Intrinsic fluorescence intensity decreased in the manner nanoparticles concentrations increased in media. Decrease intrinsic fluorescence emission indicates changes in the enzyme structure in presence of nanoparticle. Thermodynamic parameters including entropy (ΔS°) and enthalpy (ΔH°) related to the interaction of enzyme with nanoparticle were calculated as 0.108 and 3.81 respectively. The positive sign of these parameters indicates the important role of hydrophobic interactions in this process. On the other hand, negativity of free energy (ΔG°) changes indicates that this process is exergonic and proceeds spontaneously.

Keywords: *Fluorescence, Hydrophobic interactions, Thermodynamic parameters.*

1. Associate Professor, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, Kosar University of Bojnord, Bojnord, Iran (*Corresponding Author: riahi.ali@gmail.com)

2. MSc Graduate, Department of Biotechnology, Institute of Science and High technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.

3. Assistance Professor, Jiroft University of Medical Sciences, Jiroft, Iran.