



جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران

Iran National Standardization Organization



استاندارد ملی ایران
۲۳۱۰۹
چاپ اول
۱۴۰۰

INSO
23109
1st Edition
2022

Identical with
ISO/TS 23459:
2021

فناوری نانو – ارزیابی ساختار ثانویه
پروتئین هنگام برهم کنش با نانومواد با
استفاده از رنگ تابی دورانی فرابنفش

**Nanotechnologies — Assessment of
protein secondary structure during an
interaction with nanomaterials using
ultraviolet circular dichroism**

ICS: 07.120

استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۱۰۹ (چاپ اول): سال ۱۴۰۰

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۳۹ تهران - ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۱۰۳ و ۸۸۸۸۷۰۸۰

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۳۱۵۸۵-۱۶۳ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: standard@isiri.gov.ir

وبگاه: <http://www.isiri.gov.ir>

Iran National Standardization Organization (INSO)

No. 2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@isiri.gov.ir

Website: <http://www.isiri.gov.ir>

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک ماده ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ شده در دی ماه ۱۳۹۶، وظیفه تعیین، تدوین، به روزرسانی و نشر استانداردهای ملی را برعهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادهای در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند در کمیته ملی طرح، بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)^۱، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)^۲ و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)^۳ است و به عنوان تنها رابط^۴ کمیسیون کدکس غذایی (CAC)^۵ در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاها را صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر کارکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization

2- International Electrotechnical Commission

3- International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)

4- Contact point

5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«فناوری نانو- ارزیابی ساختار ثانویه پروتئین هنگام برهم کنش با مواد نانو با استفاده از رنگ تابی دورانی فرابنفش»

رئیس:

قاضی خوانساری، محمود
(دکتری تخصصی سم شناسی)

دبیر:

نژاد ابراهیمی، صمد
(دکتری تخصصی فیتوشیمی)

سمت و/یا محل اشتغال:

عضو هیئت علمی - دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی تهران

عضو هیئت علمی - دانشگاه شهید بهشتی

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

اسلامی پور، الهه
(کارشناسی ارشد زیست شناسی)

بوذری، مطهره
(دکتری تخصصی فارماکونوزی)

قاسم پور، علیرضا
(دکتری تخصصی شیمی تجزیه)

رضادوست، حسن
(دکتری تخصصی فیتوشیمی)

عمرانی، مرضیه
(کارشناسی ارشد فیتوشیمی)

عضو مستقل

ویراستار:

نایب رئیس-کمیته فنی متناظر فناوری نانو ISRI/TC 229

سیفی، مهوش
(کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)

مندرجات

صفحه	عنوان
و	پیش‌گفتار
ز	مقدمه
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۲	۳ اصطلاحات و تعاریف
۳	۴ کوتاه‌نوشت‌ها
۳	۵ برهم‌کنش مواد پروتئینی با نانومواد
۵	۶ آماده‌سازی نمونه
۵	۱-۶ کلیات
۵	۲-۶ خواص موردنظر سل کوارتز UV-CD
۵	۳-۶ تهیه محلول پروتئینی
۶	۴-۶ شرایط تنظیمات دستگاهی
۶	۵-۶ مراحل ثبت طیف UV-CD
۸	۶-۶ آماده‌سازی تعلیق پروتئین - نانوذرات هم‌یوغ
۹	۷-۶ اندازه‌گیری و ثبت طیف UV-CD
۹	۸-۶ محاسبه درجه بیضوی مولی
۱۰	۹-۶ تحلیل داده‌ها
۱۲	۷ گزارش آزمون انجام‌شده
۱۳	پیوست الف (آگاهی‌دهنده) طیف‌های معمول UV-CD پروتئین‌ها
۱۴	پیوست ب (آگاهی‌دهنده) بررسی منابع در مورد تغییرات ساختاری NOAA و پروتئین‌ها
۲۲	پیوست پ (آگاهی‌دهنده) شرح بافرهای قابل استفاده برای محلولیت پروتئین
۲۸	پیوست ت (آگاهی‌دهنده) تبدیل واحد در اندازه‌گیری CD
۲۹	پیوست ث (آگاهی‌دهنده) محاسبه محدوده غلظت برای نمونه
۳۰	پیوست ج (آگاهی‌دهنده) روش‌های تخمین ساختارهای ثانویه پروتئین
۳۱	پیوست چ (آگاهی‌دهنده) داده‌های متداول از UV-CD مورد استفاده برای تخمین ساختارهای ثانویه
۳۲	کتاب‌نامه

پیش‌گفتار

«فناوری‌های نانو- ارزیابی ساختار ثانویه پروتئین هنگام برهم‌کنش با نانومواد با استفاده از رنگ‌تابی دورانی فرابنفش» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی/منطقه‌ای به عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره شده در مورد الف، بند ۷، استاندارد ملی ایران شماره ۵ تهیه و تدوین شده، در یکصدوششمین اجلاس کمیته ملی استاندارد فناوری نانو مورخ ۱۴۰۰/۱۱/۰۶ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک ماده ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ شده در دی ماه ۱۳۹۶، به‌عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران براساس استاندارد ملی ایران شماره ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوه نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط، مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

این استاندارد ملی بر مبنای پذیرش استاندارد بین‌المللی زیر به روش «معادل یکسان» تهیه و تدوین شده و شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی می‌باشد و معادل یکسان استاندارد بین‌المللی مزبور است:

ISO/TS 23459: 2021, Nanotechnologies — Assessment of protein secondary structure during an interaction with nanomaterials using ultraviolet circular dichroism

مقدمه

در حال حاضر در جهان، نانوآشیا و انبوهه‌ها و کلوخه‌های آنها (NOAA)^۱ در مقادیر بالا تولید می‌شوند که کاربردهای متنوعی دارند. هرچند، برهم‌کنش این مواد با سیستم‌های زیستی از جمله پروتئین‌ها می‌تواند نگران‌کننده باشد که منجر به تغییرات برگشت‌پذیر یا برگشت‌ناپذیر در ساختار ثانویه پروتئین‌ها می‌شوند. بروز تغییرات برگشت‌ناپذیر در ساختار پروتئین می‌تواند بر کارکرد و صورت‌بندی پروتئین تأثیر بگذارد که این تغییرات به نوبه خود ممکن است بر واکنش‌پذیری زیستی کلی پروتئین‌ها نیز تأثیرگذار باشد. بنابراین پیش‌بروز چنین تغییراتی می‌تواند اطلاعات مهمی در مورد برهم‌کنش NOAA با سیستم‌های زیستی فراهم کند.

فرآیند تا خوردن پلی‌پپتیدها در محیط‌های زیستی، ساختار ثانویه پروتئین‌ها را تولید می‌کند که تعیین‌کننده فعالیت زیستی پروتئین‌ها است. از خصیصه‌های مهم این ساختار می‌توان به وجود پیوندهای هیدروژنی بین اتم‌های هیدروژن آمینی و اکسیژن کربونیل در ساختار پایه پپتیدی و پیوندهای دی‌سولفیدی بین دو واحد سیستم^۲ اشاره کرد.

زمانی که پروتئین در معرض یون‌های فلزی خاص و ترکیبات فعال زیستی قرار می‌گیرد، ساختار ثانویه آن تحت تأثیر قرار می‌گیرد. علاوه بر این، ساختار ثانویه پروتئین تحت تأثیر عواملی مانند بافرهای مختلف با قدرت یونی، مقادیر pH و دما نیز قرار دارد [1]. تغییرات ایجادشده در کارکرد و صورت‌بندی پروتئین‌ها را می‌توان به ساماندهی مجدد پروتئین (به اصطلاح کژتاب^۳) و تغییرات در ابعاد کلی مولکولی که با فرآیند تاشدن ایجاد می‌شود، نسبت داد. برخی بیماری‌ها، مانند «اسکلروز جانبی آمیوتروفیک» (ALS)^۴، آلزایمر و پارکینسون، نتیجه پروتئین‌های کژتاب هستند [2].

چندین روش استاندارد برای تعیین ساختارها / صورت‌بندی مولکولی و فرآیند تا خوردن پروتئین و برهم‌کنش آنها با NOAA وجود دارد. این روش‌ها شامل طیف‌سنجی‌های تشدید مغناطیسی هسته‌ای (NMR)^۵، تبدیل فوریه فروسرخ (FT-IR)^۶، طیف‌سنجی رامان^۷ و رنگ‌تابی دورانی پرتو فرابنفش (UV-CD)^۸ هستند [3]-[6]. علاوه بر این، روش جدیدی به نام «طیف‌سنجی رنگ‌تابی دورانی تابش سنکروترون» (SRCD)^۹ به‌عنوان یک روش حساس به‌کار گرفته می‌شود که اطلاعاتی در مورد ساختارهای ثانویه و تاشدن پروتئین ارائه می‌دهد [7].

1- Nano-objects and their Aggregates and Agglomerates

2- Cysteine

3- Misfolding

4- Amyotrophic Lateral Sclerosis

5- Nuclear Magnetic Resonance

6- Fourier-transform infrared

7- Raman spectroscopy

8- Ultraviolet Circular Dichroism

9- Synchrotron Radiation Circular Dichroism

فناوری‌های نانو - ارزیابی ساختار ثانویه پروتئین هنگام برهم‌کنش با نانومواد با استفاده از رنگ‌تابی دورانی فرابنفش (UV-CD)

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین پروتکل‌های اندازه‌گیری و شرایط آزمون برای تعیین تغییرات ایجادشده در ساختار ثانویه پروتئین در نتیجه برهم‌کنش با نانومواد با استفاده از طیف‌سنجی رنگ‌تابی دورانی پرتو فرابنفش (UV-CD) است.

این استاندارد برای مشخصه‌یابی تغییرات ایجادشده در صورت‌بندی پروتئین‌های بی‌نظم‌شده، کاربرد ندارد.

۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند.

در صورتی که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

۱-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۴-۱۸۳۹۲، فناوری نانو- واژه نامه - قسمت ۴: مواد نانو ساختار یافته

۲-۲ استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴، فناوری نانو- واژه نامه - قسمت ۱: اصطلاحات اصلی

۳-۲ استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴، فناوری نانو- واژه نامه - قسمت ۲: نانو اشیاء

۴-۲ استاندارد ملی ایران - ایزو شماره ۶-۸۰۰۰۴، فناوری نانو- واژه نامه - قسمت ۶: مشخصه یابی نانو اشیاء

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، علاوه بر اصطلاحات و تعاریف ارائه شده در استاندارد ملی ایران شماره ۴-۱۸۳۹۲، استانداردهای ملی ایران - ایزو شماره‌های ۱-۸۰۰۰۴، ۲-۸۰۰۰۴ و ۶-۸۰۰۰۴، اصطلاحات و تعاریف زیر نیز به کار می‌رود^۱.

۱-۳

نانوذرات

nanoparticle

نانوشیئی با تمام ابعاد خارجی در مقیاس نانو که در آن طول بلندترین و کوتاه‌ترین محورهای نانوشیئی به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای با یکدیگر تفاوت نداشته باشد.

یادآوری - چنانچه ابعاد به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای با یکدیگر تفاوت داشته باشند (معمولاً بیشتر از سه برابر)، ممکن است اصطلاحاتی مانند نانولیف یا نانوصفحه بر نانوذره ترجیح داده شود.

[منبع: زیربند ۴-۴، استاندارد ملی ایران - ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۲-۳

نانومواد

nanomaterial

ماده‌ای که هر بعد خارجی آن یا ساختار داخلی یا ساختار سطحی آن نانومقیاس است.

یادآوری ۱ - این اصطلاح عمومی شامل نانوشیئی و ماده نانساختار است.

یادآوری ۲ - نانوماده مهندسی‌شده، نانوماده ساخته‌شده و نانوماده تصادفی نیز مشاهده شوند.

[منبع: زیربند ۲-۴، استاندارد ملی ایران - ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۳-۳

رنگ‌تابی دورانی

circular dichroism

روشی مبتنی بر طیف‌سنجی است که براساس تفاوت در میزان جذب نور قطبیده راست دوران‌کننده و نور قطبیده چپ دوران‌کننده به‌وسیله مولکول فعال از لحاظ نوری استوار است.

یادآوری - از طیف‌سنجی رنگ‌تابی دورانی پرتو فرابنفش برای بررسی ساختار ثانویه پروتئین‌ها استفاده می‌شود.

۱- اصطلاحات و تعاریف به‌کاررفته در استانداردهای ISO و IEC در وبگاه‌های <https://www.iso.org/obp> و <http://www.electropedia.org> قابل‌دسترس است.

۴ کوتاه‌نوشت‌ها

کوتاه نوشت	عنوان انگلیسی	معادل فارسی
Ag-NP	Silver Nanoparticle	نانوذره نقره
Au-NP	Gold Nanoparticle	نانوذره طلا
AU	Absorbance Unit	واحد جذب
BSA Bovine	Bovine Serum Albumin	سرم آلبومین گاوی
UV-CD	Ultraviolet-Circular Dichroism	رنگ‌تابی دورانی پرتو فرابنفش
DLS	Dynamic Light Scattering	پراکندگی نورپویا
HSA	Human Serum Albumin	سرم آلبومین انسانی
MRE	Mean Residue Ellipticity	میانگین باقی‌مانده بیضوی
NOAA	Nano-Objects and Their Aggregates And Agglomerates	نانومواد - انبوهه‌ها و کلوخه‌های حاصل از این مواد
PAA-GNP	Poly (Acrylic Acid)-Coated Gold Nanoparticles	نانوذرات طلای پوشش داده‌شده با پلی (اسید اکریلیک)
SRCD	Synchrotron Radiation Circular Dichroism	رنگ‌تابی دورانی تابش سنکروترون
SWCNT	Single-Wall Carbon Nanotubes	نانولوله‌های کربنی تک‌جداره
MWCNT	Multiwall Carbon Nanotubes	نانولوله‌های کربنی چندجداره
UV-Vis	Ultraviolet-Visible	فرابنفش - مرئی

۵ برهم‌کنش مواد پروتئینی با نانومواد

در یک محیط زیستی، NOAA می‌تواند به راحتی با پروتئین‌هایی مانند آپولیپوپروتئین‌ها^۱، فیبرونکتین^۲، سرم آلبومین انسانی (HSA)^۳، ویترونکتین^۴ و غیره برهم‌کنش ایجاد کند [5]. لایه‌های پروتئینی که به NOAA متصل شده و یا اطراف آن جذب شده باشند، تاج پروتئین^۵ نامیده می‌شود [8]. مشخصات فیزیکی و شیمیایی نانومواد (به‌عنوان مثال، اندازه، مساحت سطح، آب‌گریزی، چگالی بار، شیمی سطح و ریخت‌شناسی) می‌تواند بر برهم‌کنش آن با ترکیبات زیستی محیط اطراف، تأثیر بگذارد. برهم‌کنش احتمالی بین نانومواد و ترکیبات زیستی به کینتیک^۶ کلوخگی و تفکیک پروتئین بستگی دارد. طول عمر کمپلکس‌های ایجادشده از نانومواد و لیگاند از

1- Apolipoproteins
 2- Fibronectin
 3- Human Serum Albumin
 4- Vitronectin
 5- Protein corona
 6- Kinetic

میکروثانیه تا روز متغیر است [3]-[9]. برهم‌کنش نانومواد و پروتئین می‌تواند منجر به تغییرات صورت‌بندی برگشت‌پذیر یا برگشت‌ناپذیر در ساختارهای ثانویه پروتئین‌ها شود. تغییرات جزئی ایجادشده در ساختار ثانویه پروتئین‌ها پس از برهم‌کنش با نانومواد به‌طور بالقوه برگشت‌پذیر هستند، درحالی‌که تغییرات پایدار می‌توانند برگشت‌ناپذیر باشند. با ثبت طیف UV-CD می‌توان این تغییرات را پایش کرد [9]. منشا روش طیف‌سنجی UV-CD از یک فرایند نورفیزیکی با برانگیخته‌شدن الکترون از حالت پایه به حالت برانگیخته الکترونی است. از طیف‌سنجی UV-CD به‌طور گسترده‌ای در مشخصه‌یابی ساختار ثانویه، ویژگی‌های تاخوردن و اتصال پروتئین‌ها استفاده می‌شود [4][5][6]. در این روش از نور قطبیده استفاده شده و اختلاف بین جذب نور قطبیده دورانی چپ‌گرد و راست‌گرد منجر به ایجاد یک سیگنال UV-CD می‌شود. جذب زیر ۲۴۰ nm ناشی از وجود پیوندهای پپتیدی و جذب در محدوده ۲۶۰ nm تا ۳۲۰ nm به‌دلیل وجود زنجیره‌های جانبی اسیدآمینو آروماتیک است. مارپیچ α ، صفحات β و پیچ β رایج‌ترین حالت‌های ساختار ثانویه هستند (پیوست الف و شکل پ-۱). لازم به ذکر است که زنجیره‌های جانبی آمینواسید آروماتیک نیز می‌توانند به اثر طیف CD در ناحیه زیر ۲۴۰ nm کمک کنند. همچنین باید توجه داشت که پیوندهای دی‌سولفید می‌توانند به مشاهده طیف CD در هر دو ناحیه طول موج کمک کنند. خصوصیات ساختار سوم پروتئین خارج از هدف و دامنه کاربرد این استاندارد است.

تغییر ساختاری در پروتئین‌های حیاتی انسان پس از برهم‌کنش با نانوذرات با استفاده از UV-CD گزارش شده است (جدول ب-۱). به‌عنوان مثال، تغییرات ساختاری برگشت‌ناپذیر ناشی از برهم‌کنش ترانسفرین^۱ انسانی با نانوذرات اکسید آهن ابرپارامغناطیسی (SPION)^۲ و فیبرینوژن^۳ با Au-NPs، منجر به از دست دادن کارکرد زیستی اولیه آنها می‌شود [10]. نقش انرژی فیزیکی در برهم‌کنش نانوذره-سلول مورد مطالعه قرار گرفته است که این مطالعه با بررسی برهم‌کنش بین Ag-NPs و HSA با استفاده از روش‌های اندازه‌گیری فرابنفش مرئی UV-Vis، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)^۴ و طیف‌سنجی UV-CD انجام شده است. مشخص شده است که اتصال Ag-NPs-HSA به واسطه پیوند هیدروژنی، برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک و آب‌گریز ایجاد می‌کند که این اتصال باعث کاهش مارپیچ‌های α و افزایش صفحات β ، در نتیجه تغییر کارکرد زیستی پروتئین می‌شود [11]. میزان برهم‌کنش و پایداری HSA-AgNP به‌وسیله طیف‌سنجی رنگ‌تابی دورانی تشعشع سینکروترون بررسی شده است و نتایج نشان می‌دهد که درصد مارپیچ α در ساختار پروتئین کاهش یافته است [12],[13]. اتصال PAA-GNP باعث ایجاد پروتئین کژتاب Mac-1 و منجر به بهبود برهم‌کنش با گیرنده اینتگرین^۵ می‌شود. فعال‌سازی این گیرنده باعث افزایش مسیر سیگنالینگ NF-kB و در نتیجه منجر به آزادسازی سیتوکین‌های التهاب‌آور می‌شوند [14].

1- Transferrin

2- Superparamagnetic iron oxide NP

3- Fibrinogen

4- Transmission Electron Microscopy

5- Integrin receptor

۶ آماده‌سازی نمونه

۱-۶ کلیات

برای ثبت طیف‌ها، به دستگاه UV-CD با دامنه ثبت داده‌ها از ۱۷۵ nm تا ۷۰۰ nm و با قابلیت کنترل دما نیاز است. یک سل شیشه‌ای کوارتز (مستطیل یا استوانه‌ای) با طول مسیر به اندازه ۰٫۵ میلی‌متر تا ۱۰ میلی‌متر مورد نیاز است. برای ثبت طیف UV-CD، تمام مواد، حلال‌ها و بافرها باید جذب ناچیز در ناحیه UV مورد مطالعه داشته باشند. همچنین مواد مورد استفاده باید تا حد ممکن شفاف باشند. کار با بافرهای فعال نوری، چالش‌های جدید ایجاد می‌کند و تا حد امکان استفاده از این بافرها توصیه نمی‌شود (به جدول‌های پ-۱، پ-۲ و پ-۳ مراجعه شود). توصیه می‌شود برای استفاده از پروتئین‌ها از ظروف شیشه‌ای عامل‌دار شده که تمایل کمی به اتصال با پروتئین دارند، استفاده شود. علاوه بر این تمام محلول‌ها باید با آب دیونیزه تهیه شوند.

۲-۶ خواص موردنظر سل کوارتز UV-CD

برای ثبت طیف UV-CD باید از سل‌های کوارتز بسیار شفاف استفاده شود. سل‌ها نباید هیچ فعالیت نوری داشته باشند و طول مطلوب برای آنها از ۰٫۵ mm تا ۱۰٫۰ mm (مستطیل یا استوانه‌ای) است. همچنین سل‌ها باید بین هر اندازه‌گیری کاملاً تمیز شوند (به پیوست پ مراجعه شود).

۳-۶ آماده‌سازی محلول پروتئین

برای توزین پروتئین از یک لوله آزمایش که سطح آن تمایل کمی به پروتئین داشته باشد استفاده کنید. سپس به پروتئین توزین شده محلول بافر را اضافه کنید تا یک محلول استوک با غلظت مناسب ایجاد شود. غلظت موردنیاز را می‌توان با استفاده از ضرایب جذب مولی با روش اسپکتروفتومتری تعیین کرد [11]. انتخاب بافر باید با توجه به نوع پروتئین و نوع نانوذره مورد استفاده در مطالعه انجام شود. از یک محلول استوک پروتئین در محدوده غلظت ۱ mg/ml تا ۵ mg/ml تهیه کنید. سپس می‌توان برای اندازه‌گیری UV-CD، محلول موجود را رقیق کرده و غلظت موردنظر را به دست آورد. طیف UV-CD مربوط به پروتئین‌ها در سل‌های ۰٫۵ میلی‌متر تا ۱۰ میلی‌متر ثبت می‌شود و غلظت مورد استفاده در محدوده ۰٫۰۵ mg/ml تا ۵ mg/ml است و بسته به طول مسیر و نوع بافر می‌تواند متفاوت باشد. به منظور ثبت یک طیف UV-CD قابل قبول، باید میزان پروتئین موردنظر بین ۰٫۰۵ mg/ml تا ۰٫۳۰۰ mg/ml باشد که این مقدار به طول مسیر سل بستگی دارد. ویژگی‌هایی که برای ثبت اندازه‌گیری معمول به وسیله UV-CD مطرح هستند عبارتند از:

- در سل ۰٫۵ میلی‌متر: ۰٫۲ mg/ml تا ۱٫۰ mg/ml پروتئین و حجم موردنیاز ۰٫۲۵ میلی‌لیتر تا ۰٫۰۵ میلی‌لیتر؛

- در سل ۱ میلی‌متر: ۰/۵ mg/ml تا ۰/۲ mg/ml پروتئین و حجم موردنیاز ۰/۳ میلی‌لیتر تا ۰/۴ میلی‌لیتر؛
- در سل ۲ میلی‌متر: ۰/۱ mg/ml تا ۰/۳ mg/ml پروتئین و حجم موردنیاز ۰/۹ میلی‌لیتر تا ۱ میلی‌لیتر؛
- در سل ۱۰ میلی‌متر: ۰/۰۰۵ mg/ml تا ۰/۰۱ mg/ml پروتئین و حجم موردنیاز ۳ میلی‌لیتر تا ۴ میلی‌لیتر.

پروتئین باید یک سیگنال قابل‌قبول در UV و UV-CD ایجاد کند. میزان UV مطلوب برای محلول‌های پروتئینی در طول موج و طول مسیر موردنظر باید از ۰/۵ AU تا ۱ AU باشد. این میزان جذب در حالت بهینه ۰/۸۹ AU است (شکل پ-۲).

۴-۶ شرایط تنظیمات دستگاهی

تجهیزات باید حدود ۳۰ دقیقه تا ۶۰ دقیقه قبل از شروع به کار دستگاه و با استفاده از گاز نیتروژن پاکسازی شود (زمان براساس پیشنهاد سازنده متغیر خواهد بود). برای کنترل دمای آنالیز، وجود حمام آب چرخشی ضروری است که با استفاده از «نگهدارنده سل / نرم‌افزار کنترل‌کننده دما» می‌توان به آن دست یافت. دمای حمام باید در دمای موردنظر تنظیم شده و در طول اندازه‌گیری ثابت باشد. لامپ باید قبل از انجام آزمون روشن شود و اجازه داده شود تا خروجی آن ثابت بماند (۳۰ دقیقه تا ۴۰ دقیقه).

۵-۶ روش اجرایی ثبت طیف UV-CD

۱-۵-۶ کلیات

قبل از شروع اندازه‌گیری و ثبت طیف UV-CD، دما را در مقدار مورد نظر (۲۵ °C) قرار دهید [3]، [4]. برای به‌دست آوردن نسبت سیگنال به نویز (نوفه) مناسب و دستیابی به وضوح طیفی مناسب، پهنای باند را بین ۱ nm تا ۱/۵ nm تنظیم کنید. تنظیم طول موج به نمونه و سل مورد استفاده بستگی دارد:

- از ۱۹۰ nm تا ۲۶۰ nm برای نمونه‌های پروتئین با غلظت ۰/۲ mg/ml تا ۰/۸ mg/ml در سل ۰/۱ میلی‌متر؛
- از ۱۹۰ nm تا ۲۶۰ nm برای نمونه‌های پروتئین با غلظت ۰/۱ mg/ml تا ۰/۲ mg/ml در سل‌های ۱ میلی‌متری و ۲ میلی‌متری؛
- از ۱۹۰ nm تا ۲۶۰ nm برای نمونه‌های پروتئین با غلظت ۰/۰۱ mg/ml تا ۰/۰۲ mg/ml در سل‌های ۱۰ میلی‌متری.

برای نمونه‌هایی که درجه بیضوی^۱ آنها کمتر است و نمونه‌هایی با نسبت سیگنال به نویز nm ۰/۱۰ تا nm ۰/۲۵، باید از فاصله جمع آوری داده‌های nm ۱ استفاده شود. محدوده توصیه‌شده برای اندازه‌گیری‌های طیف UV-CD از nm ۱۹۰ تا nm ۲۶۰ است. همچنین داده‌ها باید به‌صورت یک نانومتر در ثانیه جمع‌آوری شوند.

۲-۵-۶ بافر

طیف بافر را ثبت کنید و اطمینان حاصل کنید که اثر بیضوی وجود نداشته باشد. همچنین اطمینان حاصل کنید که در زمان ثبت طیف بافر پارامترهای اندازه‌گیری مانند پهنای شکاف، مرحله روبش، زمان یکپارچه‌سازی، سرعت روبش/زمان یکپارچه‌سازی، همان مقادیری است که برای اندازه‌گیری نمونه‌ها استفاده می‌شود. وجود هرگونه همپوشانی اثر UV-CD مربوط به بافر با UV-CD مربوط به پروتئین می‌تواند موجب به‌دست آمدن نتایج نادرست شود. با افزایش جذب بافر در مقایسه با آب دیونیزه، نسبت سیگنال به نویز کاهش پیدا می‌کند. در حالتی که خطایی در انجام آزمون وجود داشته باشد، طیف بافر و آب دیونیزه روی هم قرار می‌گیرند، اما طیف بافر معمولاً در مقایسه با طیف آب دیونیزه در طول موج‌های پایین، نسبت سیگنال به نویز کمتری دارد [4].

- بافری که برای حل کردن پروتئین توصیه شده، سدیم یا پتاسیم فسفات با غلظت مطلوب mM ۱۰ است که به‌عنوان نمونه شاهد استفاده می‌شود.
- از استفاده بافرهایی که باعث ایجاد تداخل در طیف UV-CD می‌شوند مانند سیترات‌ها^۲، MOPS^۳، ایمیدازول^۴ و دیتیوتریتول^۵ (DTT) خودداری کنید. فهرست بافرها و ناحیه برش^۶ UV در جدول پ-۳ ارائه شده است.
- قبل از شروع ثبت طیف مربوط به نمونه، یک طیف UV-CD از بافر را به تنهایی ثبت کنید. توصیه می‌شود طیف به‌دست آمده از بافر خالی نسبتاً مسطح باشد و پیکی مشاهده نشود تا اطمینان حاصل شود که جذب بافر نگران‌کننده نیست و مشکلی ایجاد نمی‌کند.

۳-۵-۶ نمونه پروتئینی

پس از تمیز کردن سل، آن را با محلول پروتئین پر کرده و طیف‌های UV-CD ثبت می‌شوند. اندازه‌گیری را ۵ تا ۶ بار تکرار کنید. طیف‌های به‌دست آمده را روی هم قرارداداده و میانگین^۷ داده‌ها را به‌دست آورید. طیف‌های به‌دست آمده از نمونه شاهد و بافر را مرتب و ساده کرده و نویزهای اضافی را حذف کنید [3]. رویکردهای

1- Ellipticity
2- Citrates
3- 3-(Morpholin-4-yl) Propane-1-Sulfonic acid
4- Imidazole
5- Dithiothreitol
6- Cut off
7- Average

متعددی برای ساده‌سازی^۱ و تمیز کردن طیف وجود دارد، به‌طور معمول از الگوریتم ساده‌سازی Savitsky-Golay به همراه «ترتیب چندجمله‌ای»^۲ درجه ۳ و محدوده صاف کردن ۲۰ pts^۳ استفاده می‌شود. خط پایه صاف‌شده را از طیف صاف‌شده مربوط به نمونه کم کنید [4] تا [15]. حدود درجه بیضوی برای بیشتر پروتئین‌ها باید نزدیک به صفر بین ۲۵۰ nm و ۲۶۰ nm باشد.

یادآوری- برای جلوگیری از ایجاد خطا و انحراف در قبل و بعد از صاف کردن و مرتب کردن طیف‌ها، داده‌ها بررسی دقیق می‌شوند.

۴-۵-۶ پایداری تعلیقه نانوذرات در محلول پروتئین

برای جلوگیری از کلوخگی تعلیقه نانوذرات، نیاز است پایداری نانوذرات در بافرهای مورد استفاده برای حل پروتئین، مورد آزمون قرار گیرد. در حالت ایده‌آل، باید حالت کلوخگی نانوذرات در نمونه مورد آزمون و کنترل یکسان باشد، با این حال، بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که پروتئین‌ها کلوخگی ذرات را افزایش می‌دهند و بنابراین ممکن است همیشه عملیاتی نباشد. مطالعات مقدماتی به کلوخگی نانوذرات باید قبل از تجزیه و تحلیل UV-CD و به‌عنوان بخشی از طراحی آزمایشگاهی می‌پردازد و بر اساس این مطالعات می‌توان در مورد انتخاب بافرها و غلظت ذرات تصمیم‌گیری کرد. اندازه‌گیری‌های را می‌توان با روش DLS انجام داد (به مرجع [15] و استاندارد ISO 22417 [16] مراجعه شود).

۶-۶ آماده‌سازی تعلیقه پروتئین- نانوذرات هم‌یوغ^۴

تعلیقه پروتئین-نانوذرات هم‌یوغ را به‌شرح زیر آماده کنید:

- الف- از ظروف شیشه‌ای با میل ترکیبی کم به پروتئین استفاده کنید.
- ب- مقدار از پیش محاسبه‌شده محلول مادر پروتئین را در هر ویال با همان غلظت پی‌پت کنید.
- پ- ظروف شیشه‌ای را با مقدار کافی آب پر کنید تا غلظت پروتئین ثابت باقی بماند.
- ت- ویال‌ها را به آرامی تکان داده و در حدود ۵ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ °C) نگهداری کنید.
- ث- حجم ثابتی از تعلیقه نانوذرات (۱۰ μg/ml تا ۱۰۰ μg/ml) را به محلول پروتئین با غلظت ثابت اضافه کنید و به آرامی با هم مخلوط کنید (نسبت صحیح پروتئین و نانوذرات در پیوست ت موجود است).
- ج- نمونه‌های آماده‌شده را به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق (۲۵ °C) نگهداری کنید.

1- Smoothing
2- Polynomial order
3- Points per windows
4- Conjugated

ح- محلول به دست آمده را به سل‌های UV-CD منتقل کنید.

خ- طیف‌ها را با استفاده از سل UV-CD در محدوده ۱۹۰ nm تا ۲۶۰ nm و در دمای اتاق (۲۵ °C) ثبت کنید. داده‌ها را در ۱٫۰ mm با پهنای باند ۱ nm، در ۵۰ nm در دقیقه جمع‌آوری کنید و به‌طور متوسط تعداد روبش بیش از پنج تا شش بار باشد. خط پایه طیف نهایی باید از ابتدا اصلاح شود و داده‌ها به‌صورت میانگین باقی‌مانده بیضوی (MRE) ارائه شود که در زیربند ۶-۸ توضیح داده شده‌است.

۷-۶ اندازه‌گیری طیف UV-CD

طیف UV-CD را به شرح زیر اندازه‌گیری کنید:

الف- طیف UV-CD مربوط به بافر موردنظر را ثبت کنید (جدول پ-۱ و پ-۲).

ب- ممکن است مقداری از واکنشگرها در مخلوط نانوذرات باقی بمانند. در نتیجه بهتر است طیف UV-CD از محلول مربوطه را نیز ثبت کنید.

پ- میزان جذب UV نانوذرات مورد استفاده را در محدوده ۱۹۰ nm تا ۲۶۰ nm تعیین کنید. اگر میزان جذب نانوذرات در این ناحیه بیشتر از ۱ AU باشد، این ذره برای آزمایش UV-CD مناسب نیست (به پیوست پ، شکل پ-۱ و پ-۲ مراجعه شود).

ت- برای تعیین قابلیت تکرارپذیری، حداقل پنج تا شش بار طیف UV-CD مربوط به پروتئین‌های نگهداری شده در دمای اتاق با نانوذرات را انجام دهید. اگر قابلیت تکرار به دست آمده قابل قبول نباشد، می‌تواند ناشی از زمان تعادل ناکافی یا بی‌ثباتی تعلیق به دست آمده باشد.

ث- طیف زمینه/شاهد را از طیف نمونه کم کنید.

طیف CD مربوط به NOAA در محدوده ۱۹۰ nm تا ۲۶۰ nm باید ثبت شود. NOAA غیرکایرال (غیردستواره) هیچ اثر CD را در محدوده موردنظر نشان نمی‌دهد (به بند پ-۳ مراجعه شود). همچنین NOAA که اثر CD قوی نشان می‌دهد برای این نوع تحقیق مناسب نخواهد بود. تمام روش‌های اجرایی ثبت CD باید برای NOAA، نمونه شاهد و پروتئین یکسان باشد.

۸-۶ محاسبه درجه بیضوی مولی

محاسبه کمی میزان مارپیچ آلفا را با استفاده از تبدیل سیگنال UV-CD (شکل پ-۲ و جدول ت-۱) به متوسط درجه بیضوی باقی‌مانده (MRE) و با استفاده از فرمول (۱) می‌توان محاسبه کرد:

$$[\theta] = \frac{\theta}{10Cnl} \quad (1)$$

که در آن:

$[\theta]$ متوسط درجه بیضوی باقی مانده در ۲۲۲ nm؛

θ بیضوی شدگی مشاهده شده به mdeg؛

C غلظت مولی پروتئین؛

n تعداد باقی مانده آمینواسیدها؛

l طول مسیر بر حسب cm.

درصد مارپیچی با استفاده از معادله زیر محاسبه می شود:

$$H = \frac{([\theta] - 3000)}{(-36000 - 3000)} \quad (2)$$

که در آن:

H درصد مارپیچ آلفا؛

$[\theta]$ متوسط درجه بیضوی باقی مانده در ۲۲۲ nm؛

۳۰۰۰ میزان $MRE[\theta]$ برای حالت پیچه تصادفی^۱ و گذر صورت بندی β در ۲۲۲ nm؛

۳۶۰۰۰ میزان $MRE[\theta]$ برای حالت مارپیچ α خالص در ۲۲۲ nm.

۹-۶ تحلیل داده‌ها

برآورد ساختار ثانویه پروتئین با تحلیل کمی داده‌های به دست آمده از طیف UV-CD انجام می‌شود. بسیاری از طیف‌های مرجع صحنه‌گذاری شده از طریق بانک اطلاعات رنگ‌تابی دورانی مربوط به پروتئین (PCDDDB)^۲ در دسترس عموم قرار گرفته‌اند [17]. با استفاده از روش‌های مختلف می‌توان ساده‌سازی طیف UV-CD را انجام داد (جدول ج-۱). برای تخمین محتوای ساختاری پروتئین می‌توان از نرم‌افزارهای مختلف مانند [18] CDPro، [19] ValiDichro، [19] PDB2CD، [19] K2D3، [19] DichroCalc، [19] DICHROWEB، [20] CCA+، انتخاب ساختار

1- Random coil

2- Protein Circular Dichroism Data Bank

بتا (BeStSel)^۱ استفاده کرد [21][22]. روش‌های ساده دیگری نیز برای تعیین محتوای ساختاری پروتئین‌ها وجود دارد [23][24][25][4]. با استفاده از چنین روش‌هایی می‌توان ساختار ثانویه پروتئین‌ها را مشخص کرد و تغییراتی را که در نتیجه برهم‌کنش با نانوذرات در ساختار سه‌بعدی پروتئین ایجاد شده، پیش‌بینی و اندازه‌گیری کرد. تغییرات بالای ۵٪ در ساختار ثانویه پروتئین‌ها را می‌توان جزء تغییرات قابل توجه دسته‌بندی کرد و تغییرات بالای ۹۰٪ در ساختار ثانویه پروتئین‌ها موجب دناتوره‌شدن (واسرشته شدن)^۲ پروتئین می‌شود [57].

طیف UV-CD اندازه‌گیری شده را می‌توان به‌عنوان یک فایل متنی به کارساز^۳ شبکه منتقل کرد (به پیوست چ مراجعه شود) یا به‌صورت قالب داده دو ستونی رونویسی شود: واحد داده‌های دلتا اپسیلون، MRE یا mdeg است. فواصل طول موجی داده‌های ورودی ۱ nm توصیه شده‌است. خروجی تخمین محتوای ساختاری به‌عنوان یک نمایش نگاشتاری^۴ برهم‌نهی^۵ طیف‌های تجربی و تخمینی، فهرست‌بندی ترکیب ساختار ثانویه، محتوای کل و برآزش طیفی با داده‌های انحراف میانگین مربعات ریشه (RMSD)^۶ و داده‌های RMSD نرمال‌شده (NRMSD)^۷ به‌دست می‌آید. این داده‌ها را می‌توان به‌صورت نگاشتاری یا در قالب متن برای پردازش بیشتر داده‌ها یا آماده‌سازی شکل، ذخیره کرد. کاربران می‌توانند محدوده طول‌موج را تنظیم کرده و از یک ضریب مقیاس برای محاسبه مجدد نتایج استفاده کنند. شکل داده‌های خروجی را می‌توان برای راحتی کاربر تغییر داد.

-
- 1- Beta Structure Selection
 - 2- Denaturation
 - 3- Server
 - 4- Graphical
 - 5- Overlay
 - 6- Root Mean Square Deviation
 - 7- Normalized Root Means Square Deviation

۷ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید شامل اطلاعات مندرج در جدول ۱ باشد

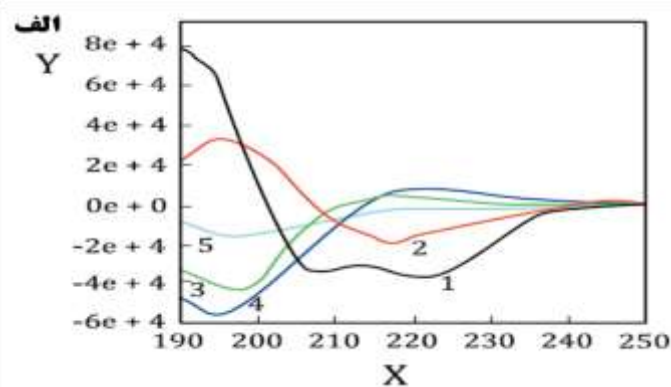
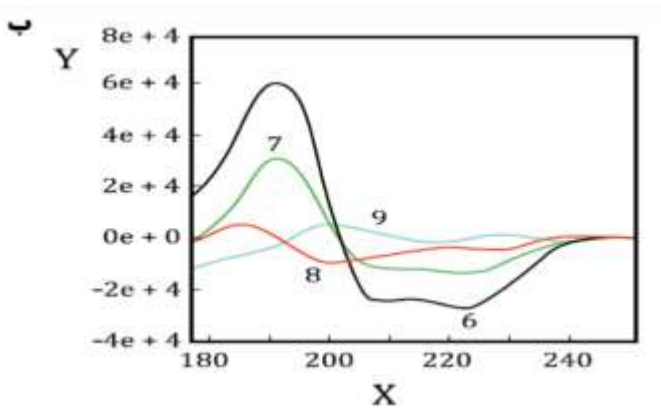
جدول ۱-گزارش آزمون

کلیات			
نام محصول:		کاربرد	
روش ساخت:		شماره بچ شماره بهر	
آدرس آزمایشگاه:		نام آزمایشگاه:	
مشخصات NOAA			
اندازه		ترکیب	
شکل		شیمی سطح	
غلظت (M) ^a			
مشخصات پروتئین			
غلظت پروتئین (mg/ml)		pH	
محتوای تخمین زده شده از ساختار ثانویه			
محتوای ساختاری	پروتئین قبل از برهم کنش با NOAA (%)	پروتئین پس از برهم کنش با NOAA (%)	
مارپیچ			
ضدموازی			
موازی			
سایر موارد			
RMSD			
NRMSD			
نوع پایگاه داده که برای تحلیل اجزای ساختار پروتئینی مورد استفاده قرار گرفته است:			
^a غلظت برحسب mg/ml بیان می شود			

پیوست الف

(آگاهی‌دهنده)

طیف‌های معمول UV-CD پروتئین‌ها



ب- طیف‌های UV-CD از پروتئین‌های نشان داده‌شده با صورت‌بندی‌های مختلف

الف- طیف‌های UV-CD از ساختارهای ثانویه مختلف پروتئین‌ها در far-UV

راهنما:

X	طول موج (nm)
[θ]	درجه (cm ² dmol ⁻¹)
1	مارپیچ آلفا
2	صفحات ضدموازی بتا ^۱
3	پروتئینی با ساختار دوم
4	کلاژن (مارپیچ سه‌گانه) ^۲
5	کلاژن (دنا توره‌شده)
6	میوگلوبین ^۳
7	LDH ^۴
8	کیموتریپسین ^۵
9	بنس جونز ^۶

شکل الف-۱- طیف‌های معمول UV-CD پروتئین‌ها

-
- 1- Antiparallel β
 - 2- Triple helix
 - 3- Myoglobin
 - 4- Lactate dehydrogenase
 - 5- Chymotrypsin
 - 6- Bence Jones

پیوست ب
(آگاهی‌دهنده)

بررسی منابع در مورد تغییرات ساختاری NOAA و پروتئین‌ها

جدول ب-۱- تغییرات صورت‌بندی پروتئین‌ها به‌وسیله نانوآشیا و انبوه‌ها و کلوخه‌های آنها (NOAAs)

منبع	نتیجه‌گیری	pH	غلظت پروتئین	غلظت نانوذره	خواص سطح نانوذره	اندازه نانوذره	شکل نانوذره	نوع پروتئین	نوع نانوذره
[26]	برگشت‌ناپذیر، برای همه اندازه ذرات با کاهش pH میزان جذب سطحی لیزوزوم کاهش می‌یابد. بیشترین پروتئین باز شده برای ۱۰۰ nm است.	۹٫۲ ۶٫۹ ۵٫۰	۵۰ μg/ml	۱:۱۰۰۰ (۱:۲۵۰) برای ۱۰۰ nm $۲٫۳ \times ۱۰^{۱۸}$ nm $۵٫۹ \times ۱۰^{۱۶}$ nm $۶٫۴ \times ۱۰^{۱۴}$ nm	دارای بار منفی	۴ nm ۲۰ nm ۱۰۰ nm	کروی	لیزوزوم	نانوذره نقره
[27]	برگشت‌پذیر، اندکی از ساختار دوم در نانوذرات نقره بزرگتر از بین می‌رود.	۷٫۰	۲۰ μg/ml ۲۰۰ μg/ml	-	دارای بار منفی	۴ nm ۱۵ nm ۳۵ nm	-	سیتوکروم C	نانوذره نقره
[28]	برهم‌کنش آب‌گریز باعث جذب سطحی سیتوکروم C در نانوذرات ۲ nm تا ۴ nm می‌شود. کمترین نسبت سیتوکروم C به ۲ nm تا ۴ nm تعداد ۲۰ عدد پروتئین به ازای هر نانوذره طلا است و براساس برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک برای سیتوکروم C با نانوذره طلا ۱۶ nm نسبت ۲۰۰ سیتوکروم C به ازای هر نانوذره است.	۷٫۲	۳٫۵ μM	nm صفر تا ۱۸ nm	-	۲ nm ۴ nm ۱۶ nm	سطح جامد	سیتوکروم	نانوذره نقره

جدول ب-۱ (ادامه)

منبع	نتیجه‌گیری	pH	غلظت پروتئین	غلظت نانوذره	خواص سطح نانوذره	اندازه نانوذره	شکل نانوذره	نوع پروتئین	نوع نانوذره
[29]	تاخوردگی برگشت‌پذیر، کاهش بیشتر ثبات آنزیم در نانوذره‌های بزرگتر با انحنای سطح کمتر اتفاق می‌افتد.	۷٫۴	۱۰ mg/ml	-	دارای بار منفی	۴ nm ۱۵ nm	کروی	ریبونوکلئاز A	SiO ₂
[30]	برای واجذب از دستگاه اولتراسانتریفیوژ و کروماتوگرافی نفوذ ژل استفاده می‌شود، تغییر ایجاد شده در ساختار ثانویه پروتئین به وسیله نانوذراتی با قطر ۱۵ nm تقریباً شش برابر بیشتر از ذرات با قطر ۶ nm است.	۸٫۴	۵۰ μM	۱٫۱۲ × ۱۰ ^{۱۷} nm ^{۰٫۹} ۵ × ۱۰ ^{۱۷} nm ۷٫۳۰ × ۱۰ ^{۱۷} nm (تعداد ذرات در هر میلی‌لیتر)	دارای بار منفی	۶ nm ۹ nm ۱۵ nm	سطح جلمد	(HCAI) انیدراز کربنیک انسانی I	نانوذره نقره
[31]	نانوذره‌های دارای بار منفی می‌توانند فیبرینوژن را باز کنند و افزودن PAA-GNP منجر به از دست دادن ساختار ثانویه پروتئین می‌شود.	۷٫۴	۱۰ μg/ml	۱۰ μg/ml ۲۰ μg/ml ۳۰ μg/ml ۴۰ μg/ml	دارای بار منفی	۵ nm ۱۰ nm ۲۰ nm	کروی	فیبرینوژن	نانوذره طلا- PAA
[32]	تغییر برگشت‌ناپذیر، هم‌بوغ پروتئین زیستی نانو در غلظت بالاتر صورت می‌گیرد. تاج پروتئینی تشکیل شده با غلظت بالاتر نانوذره نقره عمل آنزیمی اوره‌آز را به شکل کلی مهار می‌کند.	۸	۴۰ μM	۱۰۰۰ μM نسبت JBU به نانوذره تفره [۱:۱، ۱:۲، ۱:۳، ۱:۴] [۱:۴، ۱:۵ (V/V)]	دارای بار مثبت	۱۰ nm	کروی	جک بین اوره‌آز ^۱ (JBU)	نانوذره نقره

جدول ب-۱ (ادامه)

منبع	نتیجه‌گیری	pH	غلظت پروتئین	غلظت نانوذره	خواص سطح نانوذره	اندازه نانوذره	شکل نانوذره	نوع پروتئین	نوع نانوذره
[33]	ساختار مارپیچ آلفا در پروتئین BSA به دلیل برهم‌کنش آن با نانوذره‌های مس کاهش می‌یابد.	-	۵ μM	$1,58 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ $3,53 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ $7,34 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ $11,66 \times 10^{-4} \mu\text{M}$	ساختار مکعبی	۷,۵ nm	کروی	آلبومین سرم گاوی (BSA)	نانوذرات مس
[34]	نتیجه‌گیری می‌شود که اتصال نانوذره‌های نقره به پروتئین خارج سلولی قارچ می‌تواند باعث تغییر برگشت‌ناپذیر در پروتئین شود.	۷,۴	۱ mg/ml	۱:۰ μM ۲: ۱۲,۵ μM ۳: ۲۵ μM (نانوذره: پروتئین)	-	۵ nm	-	پروتئین قارچی (<i>Aspergillus foetidus</i>)	نانوذرات نقره
[35]	نانوذرات نقره-PVT ساختار ثانویه پروتئین را کمی تغییر می‌دهند.	۷,۴	۱,۵ μM	$2,4 \times 10^{-5} \text{ ol/dm}^3$ $4 \times 10^{-5} \text{ ol/dm}^3$ $8 \times 10^{-5} \text{ ol/dm}^3$ $16 \times 10^{-5} \text{ ol/dm}^3$ $24 \times 10^{-5} \text{ ol/dm}^3$ $32 \times 10^{-5} \text{ ol/dm}^3$ $40 \times 10^{-5} \text{ ol/dm}^3$ $60 \times 10^{-5} \text{ ol/dm}^3$ $80 \times 10^{-5} \text{ ol/dm}^3$	-	-	-	آلبومین سرم انسانی (HSA)	نانوذرات نقره-PVT

جدول ب-۱ (ادامه)

منبع	نتیجه گیری	pH	غلظت پروتئین	غلظت نانوذره	خواص سطح نانوذره	اندازه نانوذره	شکل نانوذره	نوع پروتئین	نوع نانوذره
[36]	اتصال بین نانوذرات اکسیدروی و پروتئین می‌تواند الکترواستاتیک، آب‌گریز و یا تلفیقی از هر دو برهم‌کنش باشد. برهم‌کنش آب‌گریز برای ساختار پروتئین مضر است درحالی‌که برهم‌کنش الکترواستاتیک باعث تثبیت پروتئین می‌شود.	۷٫۴	۱۰ μM	۱ : ۱ تا ۱۰ : ۱ (نانوذره : پروتئین)	دارای بار مثبت	۴ nm تا ۷ nm	کروی	آلفا لاکتالبومین	نانوذرات اکسیدروی
[37]	درصد مارپیچ آلفا در پروتئین HSA افزایش‌یافته و پروتئین با این نانوذره فشرده‌تر می‌شود.	۷٫۴	۷٫۳ μM	۳٫۳۸ μM ۵٫۶۳ μM ۱۱٫۸ μM	-	۵۰ nm تا ۱۱۰ nm	کروی	آلبومین سرم انسانی (HSA)	نانوذرات C ₆₀
[38]	کاهش ناگهانی درصد مارپیچ آلفا در پروتئین هنگامی مشاهده شد که غلظت CdS-QD به $۲٫۴ \times ۱۰^{-۵}$ مول بر لیتر رسید و پروتئین لیزوزیم شروع به دناتورده شدن کرد.	۷٫۴	۰٫۱۱ μM	۰٫۱۶ μM ۴٫۰ μM ۸ μM $۱٫۲ \times ۱۰^{-۶}$ μM ۱٫۶ μM ۲۴ μM	دارای بار منفی MPA-capped, GSH- capped, Lcys-capped	۲ nm تا ۳ nm	کروی	لیزوزیم	نانوذرات CdS-QD

جدول ب-۱ (ادامه)

منبع	نتیجه‌گیری	pH	غلظت پروتئین	غلظت نانوذره	خواص سطح نانوذره	اندازه نانوذره	شکل نانوذره	نوع پروتئین	نوع نانوذره
[39]	این نانوذره باعث دناتوره‌شدن و بازشدن پروتئین، هموگلوبین و میوگلوبین می‌شود.	۷٫۴	۵ μM	تا ۰٫۵ mg/L ۱۰ mg/L	الکترون (هیدروژن) دهنده	قطر ۱ nm تا ۲ nm و طول ۵ μm تا ۳۰ μm	استوانه‌ای جامد	هموگلوبین و میوگلوبین	نانوذرات HO-SWCNT
[40]	اتصال نانوذره به پروتئین باعث تغییر اتصالات پروتئین و فشرده‌شدن ساختار می‌شود.	۷٫۸	۲۰۰ μg/m	۱۰ μg/ml ۵۰ μg/ml ۱۰۰ μg/ml	دارای بار منفی و آب‌گریزی کمتر	قطر ۱ nm تا ۲ nm	لوله‌ای شکل	پروتئین تاو	نانوذرات SWCNT
[40]	اتصال نانوذره MWCNT ساختار ثانویه پروتئین تاو را تغییر نداده‌است	۷٫۸	۲۰۰ μg/m	۱۰ μg/ml ۵۰ μg/ml ۱۰۰ μg/ml	دارای بار منفی و آب‌گریزی بیشتر	قطر ۱۰ nm تا ۲۰ nm	لوله‌ای شکل	پروتئین تاو	نانوذرات MSWCNT
[41]	پروتئین لیزوزیم متصل به نانولوله‌ها به فرم اصلی و طبیعی نسبت به فرم دناتوره نزدیکتر است زیرا هیچ تغییری در حداقل طول موج مشاهده نشده‌است.	-	$6,9 \times 10^{-6} M$	۳۰ μg/ml	آب‌گریز	-	لوله‌ای شکل	لیزوزیم	نانوذرات SWCNT
[42]	درصد مارپیچ آلفاکاهش می‌یابد، اما سایر ساختارهای ثانویه با افزایش غلظت GQDs افزایش پیدا می‌کند و فعالیت زیستی HSA در اثر برهم‌کنش با GQD کاهش پیدا می‌کند.	۷٫۴	۸٫۵۵ μM ۱٫۷۱ μM ۳۴٫۲ μM	دارای مساحت سطحی بالا	۱٫۲ nm	کروی	آلبومین سرم انسانی (HSA)	نانوذرات GQDs	

جدول ب-۱ (ادامه)

منبع	نتیجه گیری	pH	غلظت پروتئین	غلظت نانوذره	خواص سطح نانوذره	اندازه نانوذره	شکل نانوذره	نوع پروتئین	نوع نانوذره
[42]	درصد ماریپیج آلفاکاهش می یابد، اما سایر ساختارهای ثانویه با افزایش غلظت GQDs افزایش پیدا می کند و فعالیت زیستی HSA در اثر برهم کنش با GQD کاهش پیدامی کند.		۷/۴	۸,۵۵ μM ۱,۷۱ μM ۳۴,۲ μM	دارای مساحت سطحی بالا	۱,۲ nm	کروی	آلبومین سرم انسانی (HSA)	نانوذرات GQDs
[43]	اتصال نانوذره نقره منجر به تبدیل آلفا-بتا می شود و باعث ایجاد تغییر جزئی بازشدگی در ساختار و اتصالات پروتئین می شود.	۷/۴	۰,۲۵ μM	۱۸,۷ μM ۳۷,۴ μM ۷۴,۸ μM	-	۵ nm تا ۱۰ nm	-	بتاهیدروکسی بوتیرات (BHb)	نانوذرات نقره
[44]	ساختار BSA عمدتاً ماریپیچی است و ساختار ثانویه این پروتئین در حضور نانوذره طلا-Morin به طور چشمگیری تغییر می کند.	۷/۴	۵ μM	۱,۵ μM	کاهش داده شده	۳۰ nm تا ۴۰ nm	کروی	آلبومین سرم گاوی (BSA)	نانوذره طلا-Morin
[45]	ساختار آلبومین های سرم حتی پس از اتصال نانوذره CdS غالباً ماریپیج آلفا است. که این ماریپیج آلفا در اثر هم یوغ شدن با نانوذره CdS ماریپیج آلفا باقی می ماند.	۷/۴	۴ μM	۴ صفر تا μM	دارای مساحت سطحی بالا	۵ nm تا ۱۰ nm	صفحه ای شکل	آلبومین سرم انسانی (HSA)	نانوذرات CdS

جدول ب - ۱ - (ادامه)

منبع	نتیجه‌گیری	pH	غلظت پروتئین	غلظت نانوذره	خواص سطح نانوذره	اندازه نانوذره	شکل نانوذره	نوع پروتئین	نوع نانوذره
[46]	اتصال این پروتئین به نانوذرات اکسید روی می‌تواند منجر به تغییرات عمده ساختاری شود و درصد قابل توجهی از ساختار ثانویه از بین می‌رود.	^۸	۱۰ μM	۱:۱ (نانوذره : پروتئین)	دارای بار مثبت	۲/۵ nm	کروی	ToxR	نانوذرات اکسیدروی
[47]	نانوذرات اکسید روی به سطح پروتئین متصل می‌شوند و می‌توانند ساختارهای ثانویه را در درجه بیشتری حفظ کنند و حتی در شرایط دنا توره شدن فعالیت آنزیمی از خود نشان دهند.	۷٫۴	۱۰ μM	-	دارای بار مثبت	۷ nm تا ۴ nm	کروی	لیزوزیم	نانوذرات اکسید روی
[48]	ساختار اصلی پروتئین پس از اتصال با نانوذره اکسید روی حفظ می‌شود اما در محتوای مارپیچ آلفا کاهش وجود دارد.	-	-	۰٫۰۹ μM ۰٫۱۲ μM	ساختار ورتزیت ^۲ شش ضلعی	۵ nm تا ۱۱ nm	کروی	آلبومین سرم گاوی (BSA)	نانوذرات اکسیدروی
[49]	پیوندهای هیدروژنی زمانی درگیر می‌شوند که pH برابر ۹٫۰۵ باشد در حالیکه برهم‌کنش آب‌گریز و الکترواستاتیک زمانی که pH برابر ۷٫۰۲ باشد وجود دارند. CdTe می‌تواند ترکیب این پروتئین را تغییر دهد اما می‌تواند فعالیت زیاد خود را در pHهای مختلف و در حضور CdTe به مدت ۲۴ ساعت حفظ کند.	۷٫۰۲ ۹٫۰۵	۱٫۶ μM	۰٫۶ μM	-	۴ nm تا ۳ nm	کروی	آلفا- کیموتریپسین	نانوذرات CdTe QD

جدول ب-۱ (ادامه)

منبع	نتیجه‌گیری	pH	غلظت پروتئین	غلظت نانوذره	خواص سطح نانوذره	اندازه نانوذره	شکل نانوذره	نوع پروتئین	نوع نانوذره
[50]	HSA در هر دو سطح ساختار ثانویه و سوم تحت تغییرات صورت‌بندی قرار گرفت و تغییرات در غلظت بالاتر QDs بیشتر معنی‌دار بود. فعالیت زیست‌شناختی HSA در حضور QD ضعیف شد.	۷٫۴	۰٫۱ μM	۲٫۵ μM ۵ μM ۰٫۱ μM	دارای بار منفی	۴٫۴۳ nm	شبه کروی	آلبومین سرم انسانی (HSA)	نانوذرات CdSe/ZnS QD
[51]	QD می‌تواند تغییرات ساختاری HSA را القا کند که در نتیجه ممکن است فعالیت زیست‌شناختی HSA را تغییر دهد.	۷٫۴	۰٫۱ μM	۰٫۵ μM ۱ μM ۲ μM	دارای بار منفی	۵ nm	-	آلبومین سرم انسانی (HSA)	Glutathione-CdTe-QDs
[52]	برهم‌کنش بین HSA و QDهای دارای بار منفی هیچ ارتباطی با اصلاح سطح ندارد. QDs می‌توانند بر محتوای مارپیچ آلفا در پروتئین تأثیر بگذارند و تغییرات صورت‌بندی HSA می‌تواند فعالیت زیستی HSA را تغییر دهد.	۷٫۴	۰٫۱ μM	۱ μM (۲۰:۱) (۱۰:۱) (۵:۱) (HAS: QDs)	MPA Capped GSH Capped CA Capped NAC Capped	۲ nm ۳٫۱ nm ۳٫۷ nm ۴٫۸ nm	-	آلبومین سرم انسانی (HSA)	نانوذرات CdTe-QDs
1- Jack Bean Urease 2- Wurtzite									

پیوست پ

(آگاهی دهنده)

شرح بافرهای قابل استفاده برای محلولیت پروتئین

پ-۱ بافر

خواص بافر توصیه شده در جدول پ-۱، نشان داده شده است. بافرهایی که توصیه نمی شوند در جدول پ-۲ فهرست شده اند.

جدول پ-۱ - خواص توصیه شده برای بافر [4]

حد مجاز طول موج پایین (nm)	بافر الف
۱۸۵	۱۰ mM پتاسیم فسفات، ۱۰۰ mM پتاسیم فلوراید
۱۸۵	۱۰ mM پتاسیم فسفات، ۱۰۰ mM امونیوم سولفات
۱۸۵	۱۰ mM پتاسیم فسفات، ۱۰۰ mM سدیم سولفات
۱۹۵	۱۰ mM پتاسیم فسفات، ۱۰۰ mM پتاسیم کلراید
۱۹۵	۲۰ mM سدیم فسفات، ۱۰۰ mM سدیم کلراید
۲۰۰	نمک فسفات دولبکو: ۹/۳۳ mM پتاسیم فسفات، ۱۳۶ mM سدیم کلراید، ۲/۷ mM پتاسیم کلراید، ۰/۶ mM منیزیم کلراید، ۰/۹ mM کلسیم کلراید
۲۰۰	۲ mM HEPES، ۵۰ mM سدیم کلراید، ۲ mM EDTA، ۱ mM دی تیوتریتول
۲۰۱	۵۰ mM تریس (هیدروکسی متیل) آمینومتان، ۱۵۰ mM سدیم کلراید، ۱ mM دی تیوتریتول، ۱ mM EDTA
الف DMSO و فرمایدها قدرت جذب بالایی دارند و نمی توان از آنها برای اندازه گیری CD استفاده کرد.	

جدول پ-۲- بافرهایی که توصیه نمی‌شود

حد مجاز طول موج پایین (nm)	بافر الف
۲۰۰	هگزافلورو-۲-پروپانول
۲۰۰	تری فلوروواتانول (TFE)
الف DMSO و فرمامیدها قدرت جذب بالایی دارند و نمی‌توان از آنها برای اندازه‌گیری CD استفاده کرد.	

پ-۲: عوامل مورد استفاده برای تمیز کردن

مراحل زیر هنگام استفاده از ماده پاک‌کننده سل توصیه می‌شوند.

الف- محلول استوک برای تمیز کردن سل باید همان‌گونه که توسط شرکت سازنده شرح داده شده‌است، با آب دیونیزه مخلوط شود.

ب- سل را در محلول تمیزکننده غوطه‌ور کنید و محلول را بین ۵۰ °C تا ۶۰ °C به مدت حدود ۲۰ دقیقه حرارت دهید. سپس سل را چندین بار با آب یونیزه بشویید.

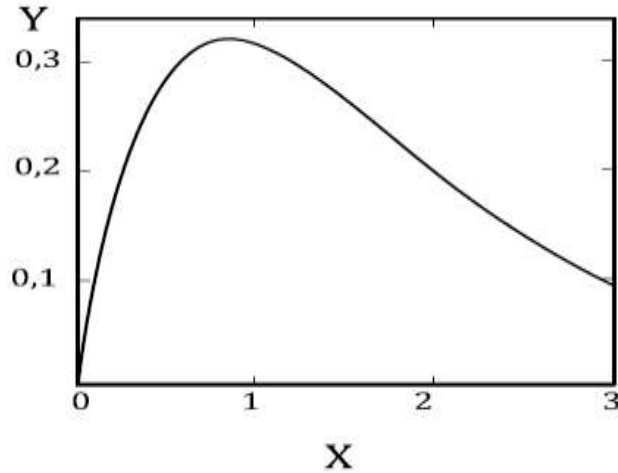
پ- برای حذف نانوذرات از سل، می‌توانید از محلول Aqua regia استفاده کنید که با ترکیب کلریدریک اسید و نیتریک اسید مطابق واکنش زیر تولید می‌شود:



ت- مخلوط کردن دو اسید باعث تولید Aqua regia می‌شود که با رنگ زرد طلایی قابل تشخیص است. برای بیشتر نانوذرات فلزی، Aqua regia مناسب است. هرچند برای برخی نانوذرات دیگر، بسته به نوع نانوذره، حلال‌های مناسب‌تری نیز توصیه می‌شوند.

ث- سل را در مقدار کمی Aqua regia به مدت حدود ۵ دقیقه بجوشانید.

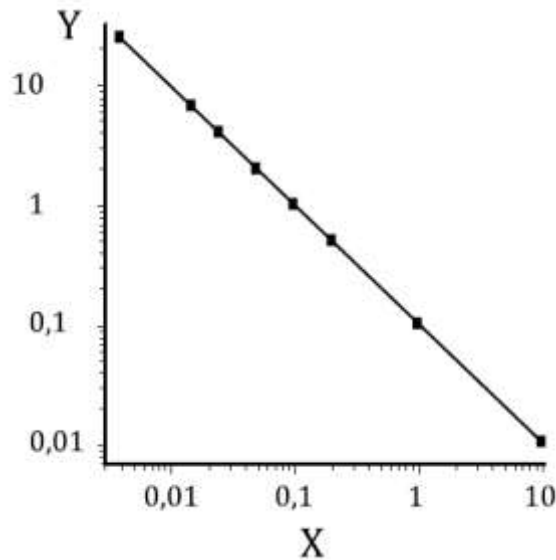
ج- سل را چهار بار با آب دیونیزه بشویید. برای اطمینان از شستشوی کل Aqua regia از سل، pH آب را بعد از شستشو را بررسی کنید و تا رسیدن آن به pH خنثی، شستشو را ادامه دهید.



راهنما:

X واحد جذب Y $S/N(-2.303\lg\Delta\varepsilon,\varepsilon)$

شکل پ-۱- نسبت سیگنال به نویز در اندازه‌گیری CD به عنوان تابعی از واحد جذب [4]



راهنما:

X طول مسیر (میلی‌متر)

Y [پروتئین] (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

یادآوری- نمودار نشان می‌دهد که غلظت پروتئین موردنیاز جذب ۰,۵ را ایجاد می‌کند.

شکل پ-۲- غلظت بهینه پروتئین تابعی از طول مسیر سل است [4]

پ-۳ جذب نانوذرات در آزمایش‌های UV-CD

اکثر NOAAs با اندازه بزرگتر از ۱۰ nm غیرکایرال هستند و سیگنال‌های CD قابل‌اندازه‌گیری را نشان نمی‌دهند [53]. هنگامی که مولکول‌های نانو به مولکول‌های کایرال یا مولکول‌های زیستی هم‌یوغ می‌شوند، در روش CD فعال خواهند شد و قابل‌اندازه‌گیری خواهند بود [54]. نانومواد با اندازه کوچکتر از ۱۰ nm قابلیت جذب سیگنال‌های CD از طریق تشدیدهای سطح پلاسمونیک ساختار فلزی در ناحیه قابل‌مشاهده را دارند. همچنین، نانومواد می‌توانند خوشه‌هایی (۵ nm تا ۲۰ nm) تولید کنند که آنها را به اجسام کایرال تبدیل کرده و قادر به جذب سیگنال‌های CD شوند [55].

پ-۴ جذب بافرها در ناحیه فرابنفش-دور

جدول پ-۳- جذب انواع نمک و مواد بافر در ناحیه فرابنفش-دور [56]

جذب محلول ۱۰ میلی مول در یک کووت ۱/۰ میلی متری				بدون جذب بالاتر از این طول موج	pH	نام ماده
۲۱۰ nm	۲۰۰ nm	۱۹۰ nm	۱۸۰ nm			
۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۱۷۰ nm		سدیم پرکلرات
۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۱۷۰ nm		سدیم فلوئورید پتاسیم
۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۱۸۰ nm		بوریک اسید
۰/۰۰	۰/۰۲	>۰/۵۰	>۰/۵۰	۲۰۵ nm		سدیم کلراید
۰/۰۰	۰/۰۵	۰/۳۰	>۰/۵۰	۲۱۰ nm		دی سدیم هیدروژن فسفات
۰/۰۰	۰/۰۵	۰/۳۰	>۰/۵۰	۲۱۰ nm		مونو سدیم هیدروژن فسفات
۰/۰۳	۰/۱۷	>۰/۵۰	>۰/۵۰	۲۲۰ nm		سدیم استات
۰/۰۳	۰/۱۰	>۰/۵۰	>۰/۵۰	۲۲۰ nm		گلیسین
۰/۴۰	>۰/۵۰	>۰/۵۰	>۰/۵۰	۲۴۰ nm		دی اتیل آمین
>۰/۵۰	>۲/۰۰	>۲/۰۰	>۲/۰۰	۲۳۰ nm	۱۲/۰	سدیم هیدروکسید
۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۹	۰/۳۰	۲۰۰ nm	۹/۱	بوریک اسید، سدیم
۰/۲۲	۰/۴۴	>۰/۵۰	>۰/۵۰	۲۳۰ nm	۸/۵	تریسین
۰/۰۲	۰/۱۳	۰/۲۴	>۰/۵۰	۲۲۰ nm	۸/۰	تریس ^۱
۰/۳۷	۰/۵۰	>۰/۵۰	>۰/۵۰	۲۳۰ nm	۷/۵	HEPES ^۲
۰/۲۰	۰/۴۹	۰/۲۹	>۰/۵۰	۲۳۰ nm	۷/۰	PIPES ^۳
۰/۱۰	۰/۳۴	۰/۲۸	>۰/۵۰	۲۳۰ nm	۷/۰	MOPS ^۴
۰/۰۷	۰/۲۹	۰/۲۹	>۰/۵۰	۲۳۰ nm	۶/۰	MES ^۵
۰/۰۱	۰/۲۰	۰/۲۲		۲۱۰ nm	۷/۰	کاکودیلیک اسید

1- Tris (hydroxymethyl)aminomethane
 2- 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
 3- Piperazine-n,n'-bis(2-ethanesulfonic acid)
 4- 3-(n-morpholino)propanesulfonic acid
 5- 2-(n-morpholino)ethanesulfonic acid

پ-۵ کنترل برای آماده‌سازی نمونه و ثبت طیف‌هایی با کیفیت مطلوب

هنگام استفاده از UV-CD:

الف- بافرها و یا نمونه‌ها در کووت‌ها باید قبل و بعد از اندازه‌گیری UV-CD برای موارد زیر بازرسی چشمی شوند:

۱- آیا حباب هوا در نمونه وجود دارد (هنگام اندازه‌گیری امکان خروج گاز از نمونه وجود دارد)؟

۲- آیا نمونه در محلول پایدار است؟

۳- آیا نمونه قابلیت پراکنده کردن مقدار زیادی نور را دارد؟

ب- بافر باید از نظر وجود سیگنال در UV-CD بررسی شود. در صورت وجود سیگنال، اگر با دقت اطمینان حاصل شود که بافر و نمونه موردنظر با هم مطابقت دارند، می‌توان این مورد را کم کرد.

پ- آیا کووت به روشی قابل تکرار در دستگاه قرار گرفته‌است؟ در غیر این صورت، به نظر می‌رسد بافر و طیف‌های نمونه به‌طور عمودی همدیگر را جابه‌جا می‌کنند. همانطور که در متن اشاره شد، انتظار می‌رود در ناحیه بین ۲۵۰ nm تا ۲۶۰ nm نزدیک به صفر mdeg باشد.

ت- بررسی کنید که آیا نمونه در باریکه اندازه‌گیری، مورد تجزیه نوری قرار می‌گیرد؟ روبش‌های تکراری را ثبت کرده و آنها را با دقت بررسی کنید تا قابلیت تکرار داشته باشند. کاهش شدت سیگنال ممکن است به دلیل تجزیه نوری نمونه باشد.

ث- استفاده از ابزاری که به روبش سریع نیاز دارد، می‌تواند به‌طور تصادفی داده‌ها و طیف‌های به‌دست آمده را بیشتر از حد معمول ساده کند یا تغییر دهد. کتابچه راهنمای کاربر هر دستگاه، نحوه انتخاب سرعت روبش مناسب را توضیح می‌دهد.

پیوست ت

(آگاهی‌دهنده)

تبدیل واحد در اندازه‌گیری CD

جدول ت-۱- تبدیل واحد در اندازه‌گیری CD

یکای اصلی	جذب ^۱	جذب مولی ^۲	مولاریته خاموشی ^۳	درجه‌ها ^۴	میلی‌درجه‌ها ^۵	مولاریته درجه بیضوی
(A)	A	$A \times 1000$	$A \times M / (C \times L)$	$A \times 3298$	$A \times 32980$	$A \times M \times 3298 / (L \times C)$
(mA)	$mA \times 1000$	mA	$A \times M / (C \times L \times 1000)$	$mA \times 0.003298$	$mA \times 3298$	$mA \times M \times 3298 / (L \times C)$
(ε)	$\epsilon \times C \times L / M$	$\epsilon \times C \times L \times 1000 / M$	ε	$\epsilon \times C \times L \times 3298 / M$	$\epsilon \times C \times L \times 32980 / M$	$\epsilon \times 3298$
(°)	$^{\circ} / 3298$	$^{\circ} / 0.003298$	$m^{\circ} \times M / (C \times L \times 3298)$	°	$^{\circ} \times 1000$	$^{\circ} \times M \times 100 / (L \times C)$
(m°)	$m^{\circ} / 32980$	$m^{\circ} / 3298$	$m^{\circ} \times M / (C \times L \times 32980)$	$m^{\circ} / 1000$	m°	$m^{\circ} \times M / (10 \times L \times C)$
[θ]	$[\theta] \times C \times L / (3298 \times M)$	$[\theta] \times C \times L / (3298 \times M)$	$[\theta] / 3298$	$[\theta] \times C \times L / (1000 \times M)$	$[\theta] \times C \times L \times 10 / M$	[θ]

^۱ واحدها بر حسب جذب (Abs) هستند.
^۲ واحدها بر حسب میلی‌جذب (mAbs) هستند.
^۳ واحدها بر حسب $cm \times A \times L / mol$ هستند.
^۴ واحدها بر حسب درجه (°) هستند.
^۵ واحدها بر حسب میلی‌درجه (m°) هستند.
^۶ واحدها بر حسب $deg \times cm^2 / dmol$ هستند.

پیوست ث

(آگاهی‌دهنده)

محاسبه محدوده غلظت برای نمونه

غلظت مناسب برای نانوذرات باید نسبت به پروتئین در نظر گرفته شود که با استفاده از تعداد پروتئین‌های موردنیاز برای تشکیل یک لایه در سطح نانوذرات محاسبه می‌شود. غلظت نانوذرات را به اندازه‌ای انتخاب کنید تا اطمینان حاصل شود که از نظر تئوری، مجموع سطح نانوذرات موجود در کل مخلوط برای اینکه تمام پروتئین‌های موجود را در خود جای دهد، کافی خواهد بود. پایداری تعلیق نانوذرات در بافر به وسیله DLS آزمایش می‌شود [56].

سطح نانوذرات موجود در یک غلظت مشخص را می‌توان به سادگی با ضرب این مقدار در تعداد نانوذرات در یک لیتر و تقسیم بر ثابت آووگادرو ($N_A = 6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) تعیین کرد که در فرمول (۱) زیر نشان داده شده است:

$$C_{\text{surface site concentration}} \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right] = \frac{C_{\text{surface sites}} [L^{-1}]}{N_A [\text{mol}^{-1}]} \quad (\text{ث-۱})$$

پیوست ج

(آگاهی‌دهنده)

روش‌های تخمین ساختارهای ثانویه پروتئین

جدول ج-۱- قابلیت اطمینان برای روش‌های مختلف به‌منظور تخمین ساختار ثانویه پروتئین به‌وسیله طیف CD [21]

پیچ خورده و سایر موارد		صفحات بتا		موازی		ضدموازی		همبستگی ^a		تعداد دفعات ناموفق	نام روش
Corr	RMSD	Corr	RMSD	Corr	RMSD	Corr	RMSD	Corr	RMSD		
۰٫۹۵	۰٫۰۳۳	۰٫۹۹	۰٫۰۳۹	۰٫۹۷	۰٫۰۳۲	۰٫۹۸	۰٫۰۵۰	۰٫۹۹	۰٫۰۳۸	-	BeStSel
۰٫۷۴	۰٫۱۳۰	۰٫۷۳	۰٫۱۳۳	-۰٫۰۸	۰٫۸۶۰	۰٫۶۲	۰٫۱۵۵	۰٫۹۷	۰٫۰۸۹	۵	VARSLC
۰٫۵۹	۰٫۲۳۲	۰٫۵۱	۰٫۲۳۰	۰٫۵۹	۰٫۱۹۸	۰٫۴۵	۰٫۲۱۴	۰٫۹۱	۰٫۱۱۹	-	LINCOMB
۰٫۸۱	۰٫۱۱۵	۰٫۸۹	۰٫۱۰۲	۰٫۹۱	۰٫۰۷۶	۰٫۸۳	۰٫۱۲۲	۰٫۹۷	۰٫۰۸۳	-	CDNN
۰٫۷۳	۰٫۰۷۷	۰٫۸۲	۰٫۱۲۲					۰٫۸۶	۰٫۱۴۷	-	SELCON
۰٫۷۳	۰٫۰۷۴	۰٫۹۶	۰٫۰۶۸					۰٫۹۵	۰٫۰۹۵	۲	CONTIN
۰٫۷۱	۰٫۰۹۹	۰٫۷۵	۰٫۱۳۹					۰٫۷۶	۰٫۲۰۱	-	CDSSTR
۰٫۵۵	۰٫۱۵۳	۰٫۷۹	۰٫۱۵۲					۰٫۸۴	۰٫۱۹۸	-	K2D
۰٫۶۸	۰٫۰۸۸	۰٫۷۱	۰٫۱۶۲					۰٫۷۰	۰٫۲۲۲	-	K2D2
۰٫۶۵	۰٫۱۴۳	۰٫۶۴	۰٫۱۸۴					۰٫۸۷	۰٫۱۳۶	-	K2D3
۰٫۷۰	۰٫۱۴۷	۰٫۸۵	۰٫۱۶۱					۰٫۵۷	۰٫۲۶۰	-	CAPITO

^a Correlation

پیوست چ

(آگاهی دهنده)

داده‌های متداول از UV-CD مورد استفاده برای تخمین ساختارهای ثانویه

جدول چ-۱- داده‌های متداول از UV-CD مورد استفاده برای تخمین ساختارهای ثانویه

طول موج	دلتا اپسیلون	طول موج	دلتا اپسیلون	طول موج	دلتا اپسیلون
۲۰۰	۲,۷۸۴۷	۲۱۷	-۲,۲۶۳۹	۲۳۴	-۰,۰۳۴۶۲
۲۰۱	۳,۱۷۵۵	۲۱۸	-۲,۲۸۹۶	۲۳۵	۰,۰۳۱۳۷
۲۰۲	۳,۳۲۶۱	۲۱۹	-۲,۳۱۱	۲۳۶	۰,۰۹۸۴۲
۲۰۳	۳,۲۵۱۸	۲۲۰	-۲,۲۷۰۶	۲۳۷	۰,۱۱۱۴
۲۰۴	۲,۹۹۸۴	۲۲۱	-۲,۲۲۰۵	۲۳۸	۰,۱۵۵۷۲
۲۰۵	۲,۵۵۱۷	۲۲۲	-۲,۰۸۲۶	۲۳۹	۰,۱۹۲۴۷
۲۰۶	۱,۹۴۳۴	۲۲۳	-۱,۹۰۳۶	۲۴۰	۰,۲۰۲۱۷
۲۰۷	۱,۲۸۶۴	۲۲۴	-۱,۷۲۸۹	۲۴۱	۰,۲۱۰۸
۲۰۸	۰,۶۰۳۵	۲۲۵	-۱,۶۰۵۲	۲۴۲	۰,۲۱۸۳۴
۲۰۹	-۰,۰۴۰۱۶	۲۲۶	-۱,۴۶۷۵	۲۴۳	۰,۱۸۱۵۶
۲۱۰	-۰,۵۳۳۹	۲۲۷	-۱,۳۱۶۸	۲۴۴	۰,۱۶۵۳۳
۲۱۱	-۰,۹۲۰۱۱	۲۲۸	-۱,۱۳۹	۲۴۵	۰,۱۳۲۹
۲۱۲	-۱,۲۴۲۲	۲۲۹	-۰,۹۱۱۵۷	۲۴۶	۰,۱۱۲۳۶
۲۱۳	-۱,۵۵۳۴	۲۳۰	-۰,۶۶۷۹۸	۲۴۷	۰,۱۱۹۹
۲۱۴	-۱,۸۰۰۵	۲۳۱	-۰,۴۷۹۴۸	۲۴۸	۰,۱۴۹۰۵
۲۱۵	-۲,۰۵۳	۲۳۲	-۰,۲۹۱۱۲	۲۴۹	۰,۱۳۶۰۷
۲۱۶	-۲,۱۸۶۱	۲۳۳	-۰,۱۲۹۸۵	۲۵۰	۰,۱۰۱۵

کتابنامه

- [1] Tadepalli S, Wang Z, Slocik J, Naik RR, Singamaneni S. Effect of size and curvature on the enzyme activity of bionanoconjugates. *Nanoscale* 2017; 9: 15666-15672
- [2] Ramirez-Alvarado M, Kelly JW, Dobson CM. *Protein Misfolding Diseases: Current and Emerging Principles and Therapies*: Wiley; 2010
- [3] Rahman M, Laurent S, Tawil N, Yahia L, Mahmoudi M. *Protein-nanoparticle interactions*: Springer; 2013
- [4] Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols* 2006; 1: 2876-2890.
- [5] Fasman GD. *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*: Springer Science & Business Media, 2013
- [6] Herron JN, Jiskoot W, Crommelin DJ. *Physical methods to characterize pharmaceutical proteins*: Springer Science & Business Media; 2013
- [7] Wallace BA, Janes RW. Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins: secondary structure, fold recognition and structural genomics. *Current Opinion in Chemical Biology* 2001; 5: 567-571
- [8] Nguyen VH, Lee BJ. Protein corona: a new approach for nanomedicine design. *Int J Nanomedicine* 2017; 12: 3137-3151
- [9] Zeinabad HA, Kachooei E, Saboury AA, Kostova I, Attar F, Vaezzadeh M, Falahati M. Thermodynamic and conformational changes of protein toward interaction with nanoparticles: a spectroscopic overview. *RSC Advances* 2016; 6: 105903-105919
- [10] Treuel L, Malissek M, Gebauer JS, Zellner R. The Influence of Surface Composition of Nanoparticles on their Interactions with Serum Albumin. *ChemPhysChem* 2010; 11: 3093-3099
- [11] Chen R, Choudhary P, Schurr RN, Bhattacharya P, Brown JM, Chun Ke P. Interaction of lipid vesicle with silver nanoparticle-serum albumin protein corona. *Appl Phys Lett* 2012; 100: 13703-137034
- [12] Laera S, Ceccone G, Rossi F, Gilliland D, Hussain R, Siligardi G, Calzolari L. Measuring Protein Structure and Stability of Protein-Nanoparticle Systems with Synchrotron Radiation Circular Dichroism. *Nano Letters* 2011; 11: 4480-4484
- [13] Hussain R, Siligardi G. Characterisation of Conformational and Ligand Binding Properties of Membrane Proteins Using Synchrotron Radiation Circular Dichroism (SRCD). In: Moraes I ed, *The Next Generation in Membrane Protein Structure Determination*. Cham: Springer International Publishing; 2016: 43-59

- [14] Deng ZJ, Liang M, Monteiro M, Toth I, Minchin RF. Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. *Nat Nano* 2011; 6: 39-44
- [15] Treuel L, Malissek M. Interactions of nanoparticles with proteins: Determination of equilibrium constants. In, *Cellular and Subcellular Nanotechnology*: Springer; 2013: 225-235
- [16] ISO 22412, Particle size analysis — Dynamic light scattering (DLS)
- یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۲۴۷: سال ۱۳۹۲، آنالیز اندازه ذره- پراکندگی نور دینامیک . DLS با استفاده از استاندارد ISO 2241: 2017 تدوین شده است .
- [17] Whitmore L, Woollett B, Miles AJ, Klose DP, Janes RW, Wallace BA. PCDDDB: the protein circular dichroism data bank, a repository for circular dichroism spectral and metadata. *Nucleic Acids Research* :۲۹ ;۲۰۱۱ D480-D486
- [18] Sreerama N. CDPro. In: <http://sites.bmb.colostate.edu/sreeram/CDPro/>; 2017
- [19] Woollett B, Whitmore L, Janes RW, Wallace BA. ValiDichro: a website for validating and quality control of protein circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Research* 2013; 41: W417-W421
- [20] OMICtools. Circular dichroism (CD) spectroscopy data analysis software tools. In; 2017
- [21] Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee Y-H, Goto Y, Réfrégiers M, Kardos J. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015; 112: E3095-E3103
- [22] Micsonai A, Wien F, Bulyaki E, Kun J, Moussong E, Lee YH, Goto Y, Refregiers M, Kardos J. BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Research* 2018; 46: W315-W322
- [23] Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee YH, Goto Y, Refregiers M, Kardos J. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015; 112: E3095-3103
- [24] Li CH, Nguyen X, Narhi L, Chemmalil L, Towers E, Muzammil S, Gabrielson J, Jiang Y. Applications of circular dichroism (CD) for structural analysis of proteins: qualification of near-and far-UV CD for protein higher order structural analysis. *Journal of pharmaceutical sciences* 2011; 100: 4642-4654

- [25] Ravi J, Rakowska PD, Garfagnini T, Baron B, Charlet P, Jones C, Milev S, Lorenz JD, Plusquellic D, Wien F. International comparability in spectroscopic measurements of protein structure by circular dichroism: CCQM-P59. 1. Metrologia 2010; 47: 631
- [26] Vertegel AA, Siegel RW, Dordick JS. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. Langmuir 2004; 20: 6800-6807
- [27] Shang W, Nuffer JH, Muñiz-Papandrea VA, Colon W, Siegel RW, Dordick JS. Cytochrome c on silica nanoparticles: influence of nanoparticle size on protein structure, stability, and activity. Small 2009; 5: 470-476
- [28] Jiang X, Jiang J, Jin Y, Wang E, Dong S. Effect of Colloidal Gold Size on the Conformational Changes of Adsorbed Cytochrome c: Probing by Circular Dichroism, UV-Visible, and Infrared Spectroscopy. Biomacromolecules 2005; 6: 46-53
- [29] Shang W, Nuffer JH, Dordick JS, Siegel RW. Unfolding of ribonuclease A on silica nanoparticle surfaces. Nano letters 2007; 7: 1991-1995
- [30] Lundqvist M, Sethson I, Jonsson B-H. Protein adsorption onto silica nanoparticles: conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability. Langmuir 2004; 20: 10639-10647
- [31] Deng ZJ, Liang M, Monteiro M, Toth I, Minchin RF. Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. Nature nanotechnology 2011; 6: 39
- [32] Ponnuvel S, Subramanian B, Ponnuraj K. Conformational change results in loss of enzymatic activity of jack bean urease on its interaction with silver nanoparticle. The protein journal 2015; 34: 329-337
- [33] Bhogale A, Patel N, Mariam J, Dongre P, Miotello A, Kothari D. Comprehensive studies on the interaction of copper nanoparticles with bovine serum albumin using various spectroscopies. Colloids Surf B Biointerfaces 2014; 113: 276-284
- [34] Roy S, Das TK. Spectroscopic Study of Interaction Between Extracellular Fungal Proteins and Biosynthesized Silver Nanoparticles. Int J Sci Eng Res 2014; 5: 238-241
- [35] Ali MS, Al-Lohedan HA, Atta AM, Ezzat AO, Al-Hussain SA. Interaction of human serum albumin with silver nanoparticles functionalized with polyvinylthiol. Journal of Molecular Liquids 2015; 204: 248-254
- [36] Chakraborti S, Sarwar S, Chakraborti P. The effect of the binding of ZnO nanoparticle on the structure and stability of α -lactalbumin: a comparative study. The Journal of Physical Chemistry B 2013; 117: 13397-13408
- [37] Song M, Liu S, Yin J, Wang H. Interaction of human serum albumin and C60 aggregates in solution. International journal of molecular sciences 2011; 12: 4964-4974

- [38] Huang D, Geng F, Liu Y, Wang X, Jiao J, Yu L. Biomimetic interactions of proteins with functionalized cadmium sulfide quantum dots. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2011; 392: 191-197
- [39] Wang Y-Q, Zhang H-M, Cao J. Binding of hydroxylated single-walled carbon nanotubes to two hemoproteins, hemoglobin and myoglobin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2014; 141: 26-35
- [40] Zeinabad HA, Zarrabian A, Saboury AA, Alizadeh AM, Falahati M. Interaction of single and multi wall carbon nanotubes with the biological systems: tau protein and PC12 cells as targets. *Scientific reports* 2016; 6: 26508
- [41] Bomboi F, Bonincontro A, La Mesa C, Tardani F. Interactions between single-walled carbon nanotubes and lysozyme. *Journal of colloid and interface science* 2011; 355: 342-347
- [42] Huang S, Qiu H, Lu S, Zhu F, Xiao Q. Study on the molecular interaction of graphene quantum dots with human serum albumin: combined spectroscopic and electrochemical approaches. *Journal of hazardous materials* 2015; 285: 18-26
- [43] Zolghadri S, Saboury A, Golestani A, Divsalar A, Rezaei-Zarchi S, Moosavi-Movahedi A. Interaction between silver nanoparticle and bovine hemoglobin at different temperatures. *Journal of Nanoparticle Research* 2009; 11: 1751
- [44] Yue H-L, Hu Y-J, Chen J, Bai A-M, Ouyang Y. Green synthesis and physical characterization of Au nanoparticles and their interaction with bovine serum albumin. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014; 122: 107-114
- [45] Naveenraj S, Asiri AM, Anandan S. Interaction between serum albumins and sonochemically synthesized cadmium sulphide nanoparticles: a spectroscopic study. *Journal of nanoparticle research* 2013; 15: 1671
- [46] Chatterjee T, Chakraborti S, Joshi P, Singh SP, Gupta V, Chakrabarti P. The effect of zinc oxide nanoparticles on the structure of the periplasmic domain of the *Vibrio cholerae* ToxR protein. *The FEBS journal* 2010; 277: 4184-4194
- [47] Chakraborti S, Chatterjee T, Joshi P, Poddar A, Bhattacharyya B, Singh SP, Gupta V, Chakrabarti P. Structure and activity of lysozyme on binding to ZnO nanoparticles. *Langmuir* 2009; 26: 3506-3513
- [48] Bhogale A, Patel N, Sarpotdar P, Mariam J, Dongre P, Miotello A, Kothari D. Systematic investigation on the interaction of bovine serum albumin with ZnO nanoparticles using fluorescence spectroscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013; 102: 257-264
49. Tian J, Wei S, Zhao Y, Liu R, Zhao S. Studies on interaction between CdTe quantum dots and α -chymotrypsin by molecular spectroscopy. *Journal of chemical sciences* 2010; 122: 391-400

- [50] Xiao Q, Huang S, Qi Z-D, Zhou B, He Z-K, Liu Y. Conformation, thermodynamics and stoichiometry of HSA adsorbed to colloidal CdSe/ZnS quantum dots. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 2008; 1784: 1027-1020 ;
- [51] Lai L, Lin C, Xu Z-Q, Han X-L, Tian F-F, Mei P, Li D-W, Ge Y-S, Jiang F-L, Zhang Y-Z. Spectroscopic studies on the interactions between CdTe quantum dots coated with different ligands and human serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A :Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2012; 97: 366-376
- [52] Xiao Q, Huang S, Su W, Li P, Ma J, Luo F, Chen J, Liu Y. Systematically investigations of conformation and thermodynamics of HSA adsorbed to different sizes of CdTe quantum dots. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013; 102: 76-82
- [53] Collins JT, Kuppe C, Hooper DC, Sibilica C, Centini M, Valev VK. Chirality and chiroptical effects in metal nanostructures: fundamentals and current trends. *Advanced Optical Materials* 2017; 5: 1700182
- [54] Tang Z. *Chiral Nanomaterials: Preparation, Properties and Applications*: John Wiley & Sons; 2018
- [55] Govorov AO, Fan Z, Hernandez P, Slocik JM, Naik RR. Theory of circular dichroism of nanomaterials comprising chiral molecules and nanocrystals: plasmon enhancement, dipole interactions, and dielectric effects. *Nano Lett* 2010; 10: 1374-1382
- [56] Stott K. Maman J. <http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk> (last updated 13/08/13)
- [57] Sreerama N, Venyaminov SY, Woody RW. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis. *Anal. Biochem.* 2000, 287, pp. 243–251