

# بررسی برهمکنش میسل‌های معکوس آنیونی AOT و DNA

## در فرایند نانوکپسوله‌سازی DNA

شهریار عصفوری

دانشگاه خلیج فارس، دانشکده مهندسی، گروه مهندسی شیمی

پست الکترونیکی: [osfourir@pgu.ac.ir](mailto:osfourir@pgu.ac.ir)

### چکیده

میسل‌های معکوس سامانه‌هایی با ابعاد نانومتری بوده که در فرایندهای متفاوتی از جمله فرایندهای جداسازی و سینتیکی کاربرد دارند. همچنین از این نانوسامانه‌ها می‌توان برای مدل‌سازی برخی از فرایندهای غشاءهای زیستی در محیط خارج از بدن نیز استفاده نمود. در این تحقیق، نانوکپسوله‌سازی ماکرومولکول DNA در محلول میسلی معکوس آنیونی AOT و برهمکنش میان این ماکرومولکول و میسل معکوس مورد بررسی قرار گرفت. برای این مقصود، از طیف UV برای اثبات فرایند انحلال، نانوکپسوله‌سازی، و از طیف سیرکولاردیکروویزم برای بررسی برهمکنش ایجاد شده استفاده گردید. نتایج آزمایشگاهی نشان‌دهنده قابلیت استفاده از نانوسامانه‌های میسلی معکوس برای نانوکپسوله‌سازی این ماکرومولکول و همچنین فرایند تراکم مولکولی می‌باشند.

کلمات کلیدی: میسل معکوس، نانوکپسوله‌سازی، تراکم، سیرکولاردیکروویزم، DNA

### مقدمه

محلول میسلی معکوس به لحاظ ساختار شامل لخته‌هایی است که بی‌درنگ بر اثر خود سامانگی<sup>۱</sup> مولکول‌های ماده فعال سطحی در حلال‌های آلی شکل می‌گیرند. مدارک مشخص و آشکاری وجود دارند که برای اولین بار مک‌باین<sup>۲</sup> و همکارانش در یک مجموعه مقاله که از سال ۱۹۱۰ به بعد چاپ شد، شکل‌گیری لخته‌های کلئیدی توسط صابون‌های اسید چرب را گزارش نموده‌اند [۴-۱]. مک‌باین در مطالعه‌اش در خصوص خواص مقداری و رسانایی مولار محلول‌های

صابونی به این نتیجه رسید که بخشی از صابون در محلول آبی تشکیل لخته‌های بزرگی به نام میسل داده است. وی دریافت که شکل‌گیری میسل می‌بایست در اثر تجمع برگشت‌پذیر یون‌های با بار مساوی باشد، هر چند که جزئیات این مدل بعداً مورد تجدید نظر قرار گرفت. در طی سال‌های ۱۹۱۰ تا ۱۹۲۰ این ایده بیشتر یک فرض جسورانه به حساب می‌آمد؛ زیرا محققین در آن زمان عمدتاً بر این عقیده بودند که سامانه‌های کلئیدی هرگز به صورت ترمودینامیکی پایدار نبوده و خواص آنها وابسته به روش تهیه این سامانه‌ها می‌باشد. در سال ۱۹۱۳ ریچلر<sup>۳</sup> نشان داد که سدیم ستیل سولفات رفتاری شبیه به صابون‌های

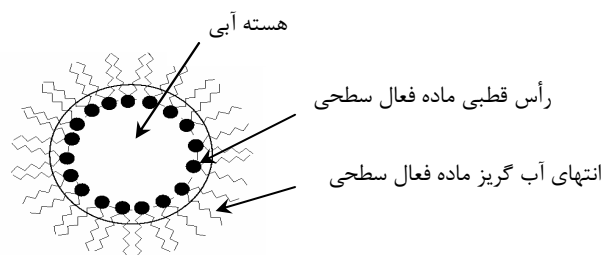
1. Self assembling  
2. McBin

3. Reychler

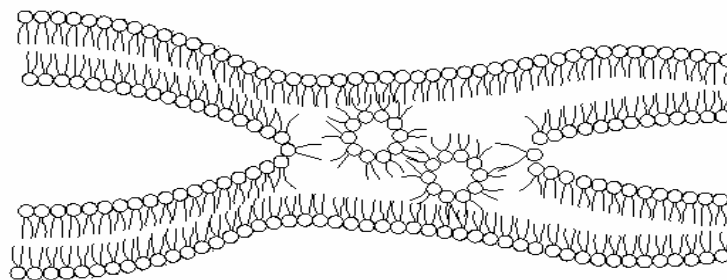
بلکه در شرایط معینی افزایش فعالیت زیستی نیز ایجاد می‌گردد. از این رو، می‌توان از سامانه‌های میسلی معکوس برای واکنش‌های آنزیمی نیز استفاده نمود. با افزایش توجه محققان به توسعه علوم نانوفناوری در دهه اخیر، تحقیقات متعددی در خصوص تولید ترکیبات نانومواد چون کادمیم، مس، طلا و نانولوله‌ها در سامانه‌های میسلی معکوس به عنوان نانوراکتور به عمل آمده است [۱۳-۹]. با مطالعاتی که اخیراً به عمل آمده است این سامانه‌ها می‌توانند به عنوان گزینه مناسبی برای ژن رسانی در فرایند ژن درمانی مطرح باشند [۱۵-۱۴]. جنبه دیگر از کاربرد سامانه‌های میسلی معکوس، استفاده از آنها به عنوان مدل‌های زیستی در محیط آزمایشگاهی خارج از بدن می‌باشد. تحقیقات نشان داده است که میسل‌های معکوس می‌توانند در جدار دو لایه غشاءهای زیستی نیز وجود داشته باشند [۱۶-۱۸]. در این حالت، میسل‌های معکوس به صورت فشرده بین دو لایه غشاء حضور می‌یابند. شکل (۲) نمایی از این میسل‌های معکوس درون غشایی را نشان می‌دهد.

اسید چرب داشته و حدس زد که مولکول‌ها در میسل به گونه‌ای مرتب می‌شوند که هسته آب گریز توسط گروه‌های انتهایی آب دوست مولکول ماده فعال سطحی احاطه می‌شود [۵]. اکنون پذیرفته شده است که لخته‌های شکل گرفته در مخلوط‌های سه‌تایی حلال آلی - ماده فعال سطحی - و مقدار بسیار کم آب به طور عمده دارای یک شکل کروی با شعاع ۰/۵ تا ۵ نانومتر بوده و میسل معکوس نامیده می‌شوند. همانگونه که در شکل (۱) نشان داده شده است، این نانوساختارها به واسطه‌ی دارا بودن هسته آبی<sup>۱</sup> قادر به انحلال مولکول‌های آب دوست در توده‌ی فاز آلی می‌باشند.

در دو دهه اخیر، از سامانه‌های میسلی معکوس برای اهداف متعددی در فرایندهای جداسازی با گزینش‌پذیری بالا<sup>۲</sup> مانند جداسازی پروتئین از مخلوط‌ها [۶]، جداسازی پیوسته آنزیم‌ها از محیط کشت [۷] و ایزوله کردن پروتئین‌های درون سلولی از سلول‌های باکتریایی [۸] استفاده شده است. آزمایش‌های متفاوت نشان داده است که نه تنها فعالیت زیستی برخی از آنزیم‌ها در این نانوسامانه‌ها کاهش نمی‌یابد،



شکل ۱- نمایی از ساختار میسل معکوس



شکل ۲- نقش و چگونگی قرار گرفتن میسل‌های معکوس در غشاءهای زیستی و تبادلات بین غشایی

1. Water pool
2. Highly selective separation

توسط مولکول‌ها که به صورت زیر نشان داده شده است:

$$CD = A_l - A_r \quad (1)$$

زیرنویس‌های  $l$  و  $r$  به ترتیب جذب را در حالت‌های چپ گرد و راست گرد نشان می‌دهند. شکل (۳) نمایی ساده از نحوه کار دستگاه سیرکولاردیکروویزم را نشان می‌دهد.

از طیف سنج سیرکولاردیکروویزم می‌توان برای تعیین ساختمان ثانویه پروتئین‌ها، مقایسه ساختمان پروتئین‌های یکسان با منابع تولیدی متفاوت، مطالعه برهمکنش‌های موجود در محلول، مطالعه پایداری پروتئین‌ها تحت تنش و دما استفاده نمود. در این تحقیق، از دستگاه طیف سنج *JASCO J-600* در دمای ثابت برای مطالعه ساختمان *DNA* در محلول‌های میسلی معکوس و آبی مورد استفاده قرار گرفت. در دستگاه سیرکولاردیکروویزم برای تولید نورهای پلاریزه راست گرد و چپ گرد از دو ستون<sup>۴</sup> نور پلاریزه راست گرد و چپ گرد استفاده می‌شود. این دو ستون نور از یک کریستال عبور کرده و سپس وارد محلول می‌شود. ویژگی این کریستال که سلول پکلز<sup>۵</sup> نامیده می‌شود عبور انتخابی این دو ستون نور راست گرد و چپ گرد نسبت به ولتاژ اعمال شده از یک میدان الکتریکی می‌باشد. بنابراین، نوری که از سلول مذکور عبور داده می‌شود متناوباً راست گرد و چپ گرد خواهد بود. نور حاصل پس از عبور از محلول وارد تقویت‌کننده نور<sup>۶</sup> شده و تغییرات جذب این دو ستون نوری نسبت به طول موج اندازه‌گیری می‌شود [۲۱].

### نتایج و بحث

از آنجا که *DNA* یک ماکرومولکول آب دوست است؛ لذا تنها موقعیتی که می‌توان برای قرار گرفتن آن در فاز میسلی معکوس متصور بود، هسته آبی این نانوسامانه‌ها می‌باشد. به عبارت دیگر، نانوکپسوله‌سازی *DNA* انحلال آن را در فاز آلی مقدور می‌نماید. برای اثبات انحلال *DNA* در فاز میسلی معکوس از طیف سنج *UV* استفاده می‌شود. شکل (۴) مقدار جذب *UV* برای ماکرومولکول *DNA* در فازهای آبی و میسلی معکوس را نشان می‌دهد. مشاهده نقطه اوج در حوالی طول

در مطالعات بسیاری نشان داده شده که تبادلات بین غشاء و میسل معکوس فشرده بسیار سریع صورت می‌گیرد [۱۹]؛ به طوری که محققان تصور می‌کنند پروتئین می‌تواند با وارد شدن به این میسل‌های معکوس از یک سمت غشاء زیستی به سمت دیگر انتقال پیدا کند [۲۰].

### مواد و روش‌ها

ماده فعال سطحی بیس (۲-اتیل هگزیل) سولفوسوکسینات سدیم (*AOT*) و *Tris-HCl* از شرکت سیگما خریداری گردید. *DNA* مشتق شده از شیر ماهی، *EDTA* و ایزواکتان از شرکت فلوکا (سوئیس) سفارش داده شد. فاز آبی حاوی *DNA* و فاز میسلی معکوس حاوی *AOT* به ترتیب با غلظت‌های ۴ میلی گرم بر میلی لیتر و ۱۰۰ میلی مولار تهیه گردید. ناخالصی‌ها در سامانه‌های میسلی معکوس اولیه مانند ذرات معلق جامد و غبار<sup>۱</sup> با استفاده از صافی میلی پور<sup>۲</sup> خارج گردید. در این تحقیق، برای انحلال *DNA* در سامانه میسلی معکوس از روش تزریق مستقیم فاز آبی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد استفاده شد. همچنین اندازه‌گیری غلظت *DNA* در سامانه‌های میسلی معکوس به وسیله دستگاه *UV* واریان مدل *Cary IE* در طول موج ۲۶۰ نانومتر با استفاده از سل کوارتز با طول مسیر ۱ سانتیمتر انجام گردید. حالت مرجع در تمام آزمایش‌ها سامانه بدون *DNA* بوده که دقیقاً مشابه سامانه‌های مورد آزمایش می‌باشند. همچنین در فاز میسلی معکوس، نسبت مولی آب به ماده فعال سطحی برابر با ۱۸/۵ اختیار گردید.

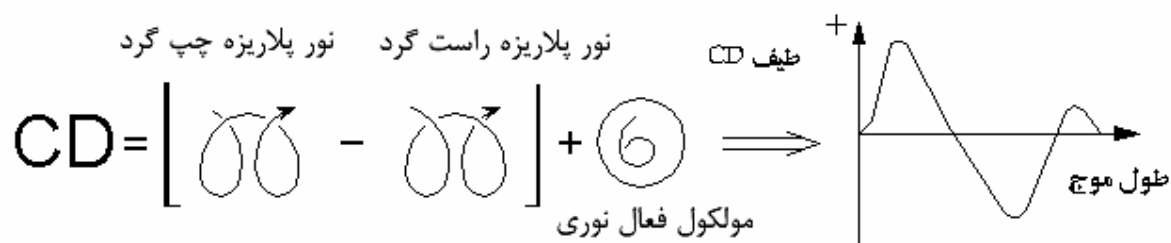
پس از معین نمودن حضور *DNA* در فاز میسلی معکوس، لازم است که بر همکنش بین میسل‌های معکوس و مولکول‌های *DNA* مورد بررسی قرار گیرد. در این خصوص، از دستگاه سیرکولاردیکروویزم<sup>۳</sup> استفاده گردید. این دستگاه یک فناوری ایده آل برای مطالعه ساختمان مولکول‌هایی است که از خود فعالیت نوری نشان می‌دهند، به طوری که این روش، نوری منحصراً نسبت به مولکول‌های نامتقارن حساس بوده و استفاده از آن در سامانه‌های زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. اساس اندازه‌گیری سیرکولاردیکروویزم عبارت است از: اختلاف در جذب،  $A$ ، نورهای پلاریزه مدور چپ گرد و راست گرد

4. Double beam  
5. Pockels cell  
6. Photomultiplier

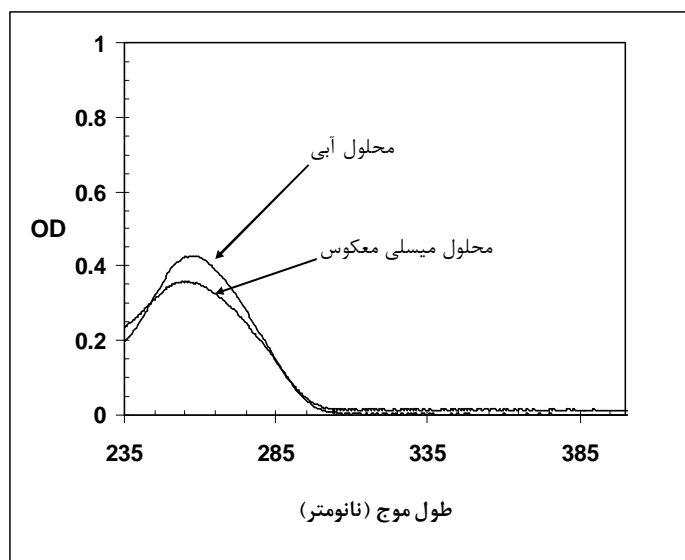
1. Dust  
2. Milllex ®-GV 0.22 (µm) (Millipore, Bedford, USA)  
3. Circular dichroism

سیرکولاردیکرویزم استفاده گردید. برای بررسی طیف سیرکولاردیکرویزم DNA نانوکپسوله شده لازم است در ابتدا، طیف مربوط به DNA در محلول آبی و در شرایطی برابر با غلظت توده فاز آلی میسلی معکوس بدست آید. برای این منظور، می‌بایست به موازات تزریق فاز آلی حاوی DNA به فاز میسلی معکوس، همان مقدار نیز به فاز آبی بدون DNA تزریق شده و طیف آن مورد بررسی قرار گیرد. شکل (۵) طیف سیرکولاردیکرویزم DNA در محلول آبی و فاز میسلی معکوس را نشان می‌دهد.

موج ۲۶۰ نانومتر مبین حضور DNA در فاز مذکور می‌باشد. چنانچه شرایط به گونه‌ای تغییر کند که DNA نانوکپسوله نشده و به طور مستقیم به درون حلال آلی وارد شود، بلافاصله از شکل طبیعی خود خارج شده و طیف سنج UV به جای منحنی، خطی نسبتاً افقی که نشان‌دهنده جذب نورهای متفرق شده<sup>۱</sup> است را نشان می‌دهد. وجود مقداری جذب در طول موج‌های بیش از ۲۹۰ نانومتر در اثر تفرق نور می‌باشد که در اثر تراکم مولکول DNA حاصل شده است. پس از تأیید نانوکپسوله‌سازی DNA، برای بررسی برهمکنش بین این ماکرومولکول و میسل معکوس آنیونی AOT از طیف

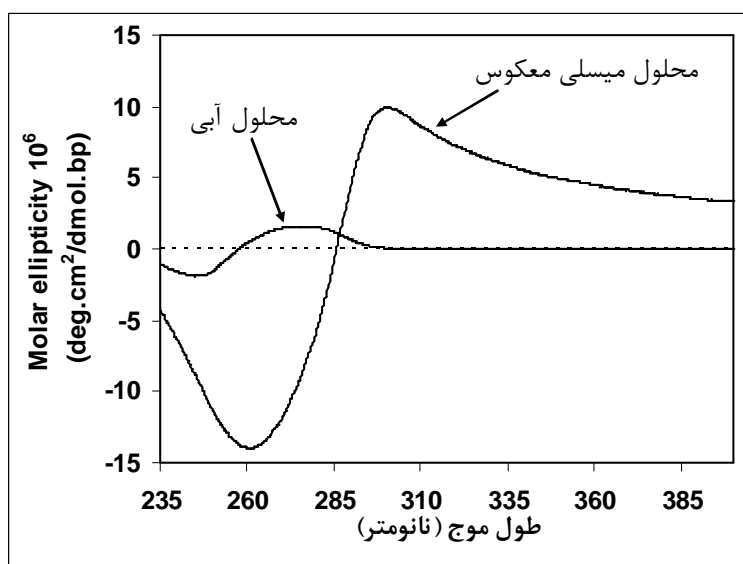


شکل ۳- نمایی از فرایند سیرکولاردیکرویزم



شکل ۴- نمودار طیف UV برای ماکرومولکول DNA در فازهای آبی و میسلی معکوس

1. Scattered light



شکل ۵- طیف سیرکولاردیکروویزم برای ماکرومولکول DNA در محلول آبی و میسلی معکوس

### مراجع

- [1] Luisi P. L., Straub B. E., "In Reverse Micelles. Biological and Technological Relevance of Amphiphilic Structure in Apolar Media", Plenum Publishing Corporation, New York, USA, 1-21, (1982).
- [2] McBain J. W., Brock C. C., Vold R. D., Vold M. J., "Phase rule studies of soap. II. The system sodium laurate-sodium chloride-water", *J. Am. Chem. Soc.*, 60, 1870-1876, (1938).
- [3] McBain J. W. and McBain M. E. L., "The spontaneous stable formation of colloids from crystals or from true solution through the presence of a protective colloid", *J. Am. Chem. Soc.*, 58, 2610-2612, (1938).
- [4] McBain J. W. and Salmon C. S., "Colloidal electrolysis. Soap solutions and their constitution", *J. Amer. Chem. Soc.*, 42, 426-460, (1920).
- [5] Marsden S. S., McBain J. W., "Aqueous systems of non-ionic detergents as studied by X-ray diffraction", *J. Phys. Chem.*, 52, 110-130, (1948).
- [6] Gaikar V. G. and Kulkarni M. S., "Selective reverse micellar extraction of penicillin acylase from E coli", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 76, 729-736, (2001).
- [7] Jarudilokkul S. and Stuckey D. C., "Continuous forward and backward extraction of lysozyme from egg white using reverse micelles", *Sep. Sci. Technol.*, 36, 657-669, (2001).
- [8] Stefan A., Palazzo G., Ceglie A., Panzavolta E. and Hochkoeppler A., "Water-in-oil macroemulsions sustain long-term viability of microbial cell in organic solvents", *Biotechnol. Bioeng.*, 81, 323-328, (2003).

ماکرومولکول DNA می‌تواند دارای صورت‌بندی‌های متفاوتی مانند A، B و... باشد. رایج‌ترین صورت‌بندی این ماکرومولکول که به لحاظ ترمودینامیکی پایدارترین وضعیت نیز محسوب می‌شود، کانزواسیون B<sup>1</sup> می‌باشد. همانگونه که در شکل (۵) نیز مشاهده می‌شود، ویژگی این صورت‌بندی مشاهده یک نقطه اوج و یک نقطه حداقل به ترتیب در حوالی طول موج‌های ۲۷۵ نانومتر و ۲۴۵ نانومتر می‌باشد. مشاهده نتایج آزمایشگاهی طیف سیرکولاردیکروویزم مربوط به DNA نانوکپسوله شده مبین رزونانس ایجاد شده در طیف نرمال و جایابی نقاط اوج و حداقل این طیف می‌باشد. رزونانس صورت گرفته که قبلاً نیز توسط برخی از محققین گزارش شده است نشان‌دهنده متراکم شدن ماکرومولکول DNA می‌باشد [۱۴]. بدیهی است شدت رزونانس نشان‌دهنده شدت تراکم مولکولی می‌باشد. لازم به توضیح است که برای ایجاد وضوح بهتر نتایج آزمایشگاهی، نتایج ارائه شده در شکل (۵)، میانگین ۹ بار تکرار متوالی آزمایش‌ها می‌باشند. به طور کلی، می‌توان نتیجه گرفت که نانوسامانه میسلی معکوس آنیونی AOT با فرایند نانوکپسوله‌سازی، ضمن انحلال DNA قادر به متراکم نمودن آن نیز می‌باشد و این موضوع آن چیزی است که انتظار می‌رود به طور طبیعی در بدن وجود داشته باشد.

### 1. B-conservation

- [9] Palkovits R., Althues H., Ruplecker A., Tesche T., Dreier A., Holle U., Fink G., Cheng C. H., Shantz D. F. and Kaskel S., "Polymerization of w/o microemulsions for the preparation of transparent SiO<sub>2</sub>/PMMA nanocomposites", *Langmuir*, 21, 6048-6053, (2005).
- [10] Shukla D. and Mehra A., "Modeling shell formation in core-shell nanocrystals in reverse micelle systems", *Langmuir*, 22, 9500-9506, (2006).
- [11] Hoefelmeyer J. D., Liu H., Somorjai G. A. and Tilley T. D., "Reverse micelle synthesis of rhodium nanoparticles", *J. Colloid. Interface. Sci.*, 309, 86-93, (2007).
- [12] Sugimoto T., "Underlying mechanisms in size control of uniform nanoparticles", *J. Colloid Interface Sci.*, 309, 106-118, (2007).
- [13] Jang J. and Yoon H., "Formation mechanism of conducting polypyrrole nanotubes in reverse micelle systems", *Langmuir*, 21, 11484-11489, (2005).
- [14] Pietrini A. V. and Luisi P. L., "Circular dichroic properties and average dimensions of DNA-containing reverse micellar aggregates", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1562, 57-62, (2002).
- [15] Osfouri Sh., Stano P., Luisi P. L., "Condensed DNA in lipid microcompartments", *J. Phys. Chem. B*, 109, 19929-19935, (2005).
- [16] de Kruijff B., Cullis P. R., Verkleij A. J., Hope M. J., Van Echteld C. J. A. and Taraschi T. F., "Enzymes of Biological Membrane", A. Martinosi ed., Plenum Press, New York, 131-204, (1984).
- [17] Cullis P. R., Hope M. J. and Tilcock C. P. S., "lipid polymorphism and the roles of lipids in membrane", *Chem. Phys. Lipids*, 40, 127-144, (1986).
- [18] de Kruijff B., Verkleij A. J., Van Echteld C. J. A., Gerritsen W. J., Mommers C., Noordam P. C. and deGier J., "The occurrence of lipidic particles in lipid bilayers as seen by P NMR and freeze-fracture electron-microscopy", *Biochim. Biophys. Acta*, 555, 200-209, (1979).
- [19] Van Venetie R. and Verkleij A. J., "Analysis of the hexagonal II phase and its relations to lipidic particles and the lamellar phase A freeze-fracture study", *Biochim. Biophys. Acta*, 645, 262-269, (1981).
- [20] de Kruijff B. and Cullis P. R., "The influence of poly(l-lysine) on phospholipids polymorphism evidence that electrostatic polypeptide-phospholipid interactions can modulate bilayer/non-bilayer transition", *Biochim. Biophys. Acta*, 601, 235-240, (1980).
- [21] Campbell I. D., Dwek R. K., In Biological Spectroscopy, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California USA, 61-91, (1984).