NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.12/48 , 2022

Scan online to view this article

Extracting the creatininease enzyme and investigating the effect of different concentrations of gold nanoparticles on the enzyme activity

Shirin Jalili[1], Fereshteh Rahmati[2] *, Mehdi Abdollahzadeh Parsa[2]

Abstract

Aim and Background: The use of creatininase is an enzymatic method for measuring amount of creatine and creatinine in body fluids to assess kidney health. The aim of this study was to investigate the effect of gold nanoparticles on the activity and stability of creatininase enzyme for use in creatine and creatinine assay kits.

Materials and Methods: In this study, E. coli BL21 containing pET28a amplification vector containing creatininase gene was first cultured in liquid LB medium and then induced at 28°C. After sonication, purification of enzyme was performed by affinity chromatography. After confirmation of expression by SDS-PAGE, The expressed enzyme concentration was measured by Bradford method. Then the activity of the enzyme was examined and compared by colorimetric method in the presence and absence of gold nanoparticles. Finally, the effect of gold nanoparticles on the structure of creatininase enzyme was investigated by fluorescence spectroscopy.

Results: Creatininase activity in the absence of gold nanoparticles 14.6 U/ml and in the presence of gold nanoparticles with concentrations of 1.97, 3.94, 7.88, 11.82, 15.76, 19.7 and 39.4 ngr/l 14/1, 12.4, 11.2, 10.1, 8.4, 7.5, 4.7 U/ml were calculated which indicates a decrease in creatininase activity in the presence of gold nanoparticles. On the other hand, fluorescence spectroscopy of creatininase in the presence and absence of gold nanoparticles at the excitation wavelength of 295 nm showed a decrease in fluorescence intensity in the presence of gold nanoparticles.

Conclusion: Gold nanoparticles reduced the activity of the creatininase enzyme. Gold nanoparticles also reduced the fluorescence intensity of creatininase enzyme, which could indicate a change in the microenvironment of the amino acid tryptophan in the structure of the creatininase enzyme, so using gold nanoparticles is not a good option for stable structure and activity of creatininase for use in commercial kits.

Key word: Creatininase, Expression, Gold nanoparticles, Colorimetry, Fluorescence spectroscopy, Iau Science.

Corresponding author:
Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, North-Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Email: f.rahmati@iau-tnb.ac.ir

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.6.5]

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۲ - شماره۴۸ - پاییز۱۴۰۱
NCMBJ
مقاله پژوهشی

استخراج آنزیم کراتینیناز و بررسی اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات طلا بر فعالیت آنزیم

شیرین جلیلی [۱]، فرشته رحمتی [۲*]، مهدی عبداله زاده پارسا [۲]

۱. پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی ناجا، تهران، ایران.
۲. گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از آنزیم کراتینیناز یک روش آنزیمی جهت سنجش میزان کراتین و کراتینین در مایعات بدن با هدف بررسی سلامت ا است. هدف از این تحقیق، بررسی اثر نانوذرات طلا بر فعالیت و پایداری آنزیم کراتینیناز به جهت استفاده در کیت‌های سنجش کراتین و کراتینین است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ابتدا باکتری *E.Coli BL21* حاوی وکتور تکثیری *pET28a* حاوی ژن آنزیم کراتینیناز در محیط LB مایع کشت و سپس در دمای ۲۸ درجه القاء بیان گردید. در ادامه پس از سونیکاسیون، تخلیص آنزیم با کمک کروماتوگرافی تمایلی انجام شد. پس از تأیید بیان با SDS-PAGE، غلظت آنزیم بیان شده با روش برادفورد سنجش شد. در ادامه فعالیت آنزیم با روش رنگ‌سنجی در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا بررسی و مقایسه گردید. در نهایت اثر نانوذرات طلا بر ساختار آنزیم کراتینیناز با روش طیف‌سنجی فلورسانس، بررسی گردید.

یافته‌ها: فعالیت آنزیم کراتینیناز در عدم حضور نانوذرات طلا U/ml ۱۴/۶ و در حضور نانوذرات طلا با غلظت‌های ۱/۹۷، ۳/۹۴، ۷/۸۸، ۱۱/۸۲، ۱۵/۷۶، ۱۹/۷و ۳۹/۴ نانوگرم بر لیتر به‌ترتیب U/ml ۱۴/۱، ۱۲/۴، ۱۱/۲، ۱۰/۱، ۸/۴، ۷/۵، ۴/۷ محاسبه گردید که نشان از کاهش فعالیت آنزیم کراتینیناز در حضور نانوذرات طلا دارد. از طرفی طیف‌سنجی فلورسانس آنزیم کراتینیناز در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا در طول موج تهییج ۲۹۵ نانومتر کاهش شدت فلورسانس در حضور نانوذرات طلا را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نانوذرات طلا باعث کاهش فعالیت آنزیم کراتینیناز شدند. هم‌چنین نانوذرات طلا باعث کاهش شدت فلورسانس آنزیم کراتینیناز گردیدند که می‌تواند نشانگر تغییر در ریزمحیط اسید آمینه تریپتوفان در ساختار آنزیم کراتینیناز باشد، در نتیجه استفاده از نانوذرات طلا گزینه مناسبی برای پایدارسازی فعالیت و ساختار آنزیم کراتینیناز جهت استفاده در کیت‌های تجاری نیستند.

واژگان کلیدی: کراتینیناز، بیان، نانوذرات طلا، رنگ‌سنجی، طیف‌سنجی فلورسانس، Iau Science .

مقدمه

در سال‌های اخیر، استفاده از پروتئین‌ها و آنزیم‌های نوترکیب در تحقیقات علمی افزایش یافته است. یکی از روش‌های تولید پروتئین نوترکیب، همسانه سازی مولکولی DNA خارجی، به درون DNA کروموزومی باکتریایی است. از این تکنولوژی، امروزه برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در تحقیقات بالینی و صنعتی استفاده می‌شود (۱). آنزیم‌های میکروبی از لحاظ اقتصادی، با داشتن مراحل تهیه کشت میکروبی ساده‌تر، سریع‌تر و ارزان‌تر نسبت‌به آنزیم‌های تولید شده توسط حیوانات و گیاهان، مناسب‌تر هستند. از طرفی میکروارگانیسم‌های مولد آن‌ها، به‌سادگی می‌توانند از لحاظ ژنتیکی، برای تولید هرچه بیش‌تر و در جهت بهبود کمیت و کیفیت مورد نظر محصولات، دست‌کاری شوند (۲).

نویسنده مسئول:
گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
پست الکترونیکی: f.rahmati@iau-tnb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۰

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.6.5]

یکی از این آنزیم‌ها، آنزیم کراتینیناز با نام سیستمیک کراتینین آمیدوهیدرولاز (EC 3.5.2.10) است که یک پروتئین هوموهگزامر با ۲۵۹ اسید آمینه و وزن مولکولی ۲۸ کیلو دالتون برای هر مونومر است و متعلق‌به خانواده بزرگ آمیدوهیدرولازها است (۳). آنزیم کراتینیناز هیدرولیز کراتینین را به کراتین کاتالیز می‌کند، که سپس می‌تواند توسط آنزیم کراتیناز به اوره و سارکوزین متابولیزه شود. از این آنزیم می‌توان در سنجش بالینی کراتین و کراتینین در مایعات بدن استفاده کرد (۴). این آنزیم در بسیاری ازباکتری‌ها از جمله: *سودوموناس‌ها، آرتروباکترها، فلاووباکتریوم‌ها، باسیلوس‌ها، پاراکوکوس و آلکالیژنزها* یافت می‌شود. این باکتری‌ها از این آنزیم جهت تجزیه میکروبی کراتین به‌عنوان منبع کربن و نیتروژن و در چرخه متابولیسم آرژنین و پرولین استفاده می‌کنند (۵).

کراتین در افزایش سنتز آدنوزین تری‌فسفات (ATP) نقش دارد، هم‌چنین در بدن در تعادل با کراتینین بوده و از طرفی شاخص مهمی برای سنجش سلامت کلیه‌ها و هم‌چنین عضلات است. بنابراین اندازه‌گیری میزان کراتین و کراتینین در سرم خون و ادرار، می‌تواند نشان دهنده عملکرد کلیه‌ها و عضلات باشد (۶).

ژن کدکننده این آنزیم در باکتری‌های اشاره شده یافت می‌شود ولی این باکتری‌ها، این آنزیم را تنها به میزان مورد نیاز خود تولید کرده و همین مقادیر کم نیز ناپایدار بوده و از طرفی جداسازی و خالص‌سازی آنزیم از این باکتری‌ها به‌صورت طبیعی مشکلات خاص خود را داشته و ممکن است باکتری تولید کننده بعد از چندین پاساژ متوالی بر روی محیط کشت، توانایی تولید این آنزیم را از دست بدهند، لذا برای تولید انبوه این آنزیم در صنعت، از تکنیک تولید پروتئین نوترکیب (تولید آنزیم در میزبانی دیگر که دارای قدرت بیان بالاتر و تحت کنترل است) استفاده می‌شود. یکی از باکتری‌های مولد این آنزیم، *سودوموناس پوتیدا* است که آنزیم تولیدی آن، مقدار و فعالیت بالاتری از خود نشان می‌دهد. برای تولید انبوه این آنزیم به‌کمک مهندسی ژنتیک می‌توان ژن کراتینیناز را از باکتری مولد (*سودوموناس پوتیدا*) استخراج و در یک وکتور تکثیری (*pET28a*) کلون کرده و در نهایت به سویه بیانی هم‌چون *E.coli BL21* جهت بیان انبوه، استخراج و خالص‌سازی پروتئین هدف، منتقل کرد (۷). از طرفی با توجه‌به ناپایدار بودن آنزیم تولید شده، لازم است از روشی برای پایدارسازی آنزیم استفاده کرد. به‌طور کلی برای پایدارسازی آنزیم‌ها از روش‌های مختلفی از جمله: ایجاد پیوندهای عرضی درون مولکولی (۸)، متصل کردن پلی‌مرهای محلول درآب مانند پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) (۹) و سایر پلی‌مرهای سازگار با زیست هم‌چون کیتوزان (۱۰)، افزودن قندها و الکل‌های قندی مانند گلیسرول (۱۱)، استفاده از سورفاکتانت ها (۱۱)، جهش‌زایی تصادفی و مستقیم موضعی (۱۲) و هم‌چنین افزودن نانوذرات (۱۳) استفاده می‌شود. نانوذرات طلا پایدارترین ذرات فلزی هستند که باتوجه‌به خصوصیت‌های مختلفی چون شکل، سایز، ویژگی‌های نوری و مغناطیسی مشخصی که دارند کاربردهای جذابی را ارائه می‌دهند (۱۴).

یکی از روش‌های بررسی ساختاری پروتئین‌ها، طیف-سنجی فلورسانس است. به‌طوری‌که در صورت تابش نور مرئی به یک مولکول یا ماده، باعث برانگیخته شدن آن مولکول به سطح بالاتری از انرژی شده و در هنگام بازگشت به حالت اولیه، مقداری از انرژی به‌صورت گرما آزاد شده و مابقی به‌صورت طیف فلورسانس گسیل می‌گردد که با کمک یک آشکار ساز می‌توان آن را به-صورت نمودار به نمایش در آورد (۱۵). با توجه‌به وجود اسید آمینه تریپتوفان در ساختار آنزیم کراتینیناز و بالا بودن میزان جذب این اسید آمینه و تأثیرگذاری بیش-تر آن بر یافته‌های طیف‌سنجی فلورسانس (طبق منابع معتبر)، در صورت استفاده از طول موج تهییج ۲۹۵ نانومتر و بررسی طیف فلورسانس حاصله می‌توان به وضعیت اسید آمینه تریپتوفان در پروتئین پی برد (۱۶). بدین‌ترتیب می‌توان اثر نانوذرات طلا بر ساختار آنزیم کراتینیناز را با مقایسه طیف‌سنجی فلورسانس در طول موج ۲۹۵ نانومتر در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا مورد بررسی قرار داد.

هدف از این تحقیق بررسی اثر نانوذرات طلا بر فعالیت و پایداری آنزیم کراتینیناز جهت تولید انبوه آنزیم کراتینیناز فعال‌تر و پایدارتر به‌منظور استفاده در کیت-های تشخیصی سنجش میزان کراتین و کراتینین سرم و ادرار است.

مواد و روش‌ها

مواد: در این پژوهش از ایمیدازول (مرک)، ترپیپتوفان (مرک)، عصاره مخمر (مرک)، کلرید سدیم (مرک)، کلرید پتاسیم (مرک)، هیدروکسید سدیم (مرک)، IPTG (فرمنتاز)، بیس اکریلامید (بیو بیسیک)، APS (مرک)، برمو فنول بلو (مرک)، آگارز (کیاژن)، استیک

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.6.5]
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

اسید (مرک)، تریس باز (مرک)، TEMED (مرک)، گلایسین (سیگما)، BSA (مرک) استفاده گردید.

بیان، تخلیص و سنجش غلظت پروتئین‌ها

به‌منظور بیان بالای آنزیم کراتینیناز و سهولت در تخلیص آنزیم مذکور، ابتدا باکتری *E.Coli* سویه *BL21* که وکتور بیانی *pET28a* حاوی ژن کراتینیناز سودوموناس پوتیدا در آن ترانسفورم شده است، در محیط کشت LB مایع کشت گردید. پس از القای ژن آنزیم مورد نظر جهت بیان بالای آن (Over Expression)، به‌کمک دستگاه سونیکاتور (۲۰ ثانیه سونیکه و ۴۰ ثانیه استراحت تا ۱۵ پالس) دیواره سلول باکتری تخریب گردید. به‌منظور تخلیص آنزیم از روش کروماتوگرافی تمایلی (به‌کمک ستون نیکل-سفارز) استفاده شد. آنزیم‌های نوترکیب بیان شده دارای دنباله هیستیدینی (His_6-tag) در انتهای آمین (N-Terminal) خود هستند. این دنباله هیستیدینی تمایل زیادی به نیکل داشته و میانکنش محکمی با آن برقرار می‌کند. در نهایت برای جداسازی پروتئین‌های متصل‌به ستون از بافر جداکننده (Elution Buffer) حاوی NaCl ۳۰۰ میلی‌مولار، Imidazole ۲۵۰ میلی‌مولار، Tris/Hcl ۵۰ میلی‌مولار با PH ، ۸ استفاده شد. در ادامه برای حصول اطمینان و تأیید حضور و خلوص نمونه‌ها از روش الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد و در نهایت برای سنجش غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده گردید. با رسم منحنی استاندارد به کمک پروتئین BSA و معرف برادفورد، غلظت نمونه آنزیمی مشخص گردید (۱۷).

بررسی فعالیت آنزیم با روش رنگ‌سنجی

برای بررسی فعالیت آنزیم از روش رنگ‌سنجی استفاده گردید. بدین‌منظور آنزیم کراتینیناز حاصل از بیان با محلول کراتین در PBS به‌عنوان سوبسترا در ۳۷ درجه به‌مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شده و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول بالا را به ۰/۹ میلی‌لیتر آب یخ استریل اضافه نموده و سپس ۱ میلی‌لیتر NaOH (۱ مولار) و ۱ میلی‌لیتر محلول پیکریک اسید افزوده و در دمای اتاق ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه انکوبه کرده و در ادامه میزان جذب آن در ۵۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانش گردید. با استفاده از روش رنگ-سنجی، فعالیت آنزیم کراتینیناز بر حسب U/ml محاسبه گردید.

بررسی اثر نانوذرات طلا بر فعالیت آنزیم کراتینیناز

در این تحقیق از نانوذرات طلا به‌صورت نانوکلوئید طلا(ppm ۱۰۰) به رنگ شرابی با اندازه ذرات ۲۰ نانومتر استفاده شده است.

برای بررسی اثر نانوذرات طلا بر فعالیت آنزیم کراتینیناز ابتدا استوک نانوذرات طلا رقیق شده و از غلظت‌های ۱/۹۷، ۳/۹۴، ۷/۸۸، ۱۱/۸۲، ۱۵/۷۶، ۱۹/۷و ۳۹/۴ نانوگرم بر لیتر نانوذرات طلا استفاده گردید. پس از انکوبه کردن هر غلظت از نانوذرات طلا با آنزیم کراتینیناز به‌مدت ۵ دقیقه، فعالیت آنزیم در حضور نانوذرات طلا محاسبه گردید.

بررسی سینتیکی آنزیم کراتینیناز در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا

به‌منظور بررسی سینتیک آنزیم کراتینیناز در میانکنش با نانوذرات طلا، ابتدا غلظت‌های ۰/۰۶، ۰/۰۷، ۰/۰۸، ۰/۰۹، ۰/۱، ۰/۱۱، ۰/۱۲ و ۰/۲ میلی‌مولار بر لیتر سوبسترا (کراتین در PBS) تهیه گردید و سپس فعالیت آنزیم با همان روش رنگ‌سنجی مذکور در بالا در هر یک از این غلظت‌ها بررسی گردید. این آزمون یک بار با آنزیم آزاد (عدم حضور نانوذرات) و یک بار با آنزیم انکوبه شده با نانوذرات طلا با غلظت ۱۹/۷ نانوگرم بر لیتر انجام شد. به‌منظور دقت بیش‌تر هر کدام از آزمون‌ها با سه بار تکرار صورت پذیرفت. در ادامه نمودارهای میکائیلیس- منتن و لاینویور- برک مربوط به فعالیت آنزیم بر غلظت سوبسترا در حضور و عدم حضور نانو ذرات طلا با نرم‌افزار Prism نسخه ۸ رسم گردیده و پارامترهای سینتیکی آنزیم (Vmax و Km) با کمک نمودار به‌دست آمد.

بررسی ساختاری آنزیم کراتینیناز با روش طیف-سنجی فلورسانس

به‌منظور بررسی ساختاری آنزیم از روش طیف‌سنجی فلورسانس استفاده شد. با توجه‌به این‌که آنزیم کراتینیناز حاوی اسید آمینه تریپتوفان است و این اسید آمینه آروماتیک بالاترین میزان جذب را دارد، بدین‌منظور ابتدا بافرفسفات پتاسیم (۵۰ میلی‌مولار) در آب مقطر با pH، ۷/۴ آماده شد، آنزیم کراتینیناز در بافر حل شد. طول موج برانگیختگی ۲۹۵ نانومتر و دمای ۲۹۸ درجه کلوین و طول موج خوانش در بازه ۳۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر در این آزمون مورد استفاده قرار گرفت تا فقط اسید آمینه تریپتوفان تحریک شود در

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.6.5]

نتیجه طیف فلورسانس حاصله مربوط به موقعیت تریپتوفان در آنزیم کراتینیناز است.

بررسی اثر نانوذرات طلا بر ساختار آنزیم کراتینیناز

برای بررسی اثر نانوذرات طلا بر ساختار آنزیم کراتینیناز از غلظت های ۱/۹۷، ۳/۹۴، ۷/۸۸، ۱۱/۸۲، ۱۵/۷۶، ۱۹/۷و ۳۹/۴ نانوگرم بر لیتر نانوذرات طلا استفاده گردید. پس از انکوبه کردن هر غلظت از نانوذرات طلا با آنزیم کراتینیناز حل شده در بافر به‌مدت ۵ دقیقه، طیف فلورسانس حاصل از هر یک در طول موج تهییج ۲۹۵ نانومتر رسم شده و در انتها طیف‌های فلورسانس حاصله در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا مورد مقایسه قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به‌منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون شاپیروویلک استفاده گردید که نرمال بودن داده‌ها تأیید شد. هم‌چنین از تحلیل واریانس (ANOVA) در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ جهت بررسی تفاوت میانگین داده‌ها استفاده گردید که میانگین داده‌ها در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ متفاوت بوده است.

نتایج

سنجش غلظت آنزیم کراتینیناز حاصل از بیان

به‌منظور سنجش غلظت آنزیم از روش برادفورد استفاده گردید. در ابتدا با کمک غلظت‌های ۰، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از BSA، نمودار استاندارد غلظت رسم و معادله خط به‌دست آمد تا به‌کمک آن بتوان غلظت پروتئین‌های تخلیص شده در ویال‌ها را اندازه‌گیری کرد. سپس با جاگذاری میزان جذب هر ویال در معادله خط، غلظت آنزیم در هر ویال به‌ترتیب ۱/۴۵۶، ۱/۲۴۳، ۱/۰۸۵، ۰/۸۷۰، ۰/۷۴۵، ۰/۶۳۲ و ۰/۴۵۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. (جدول ۱).

جدول ۱. نتایج غلظت آنزیم کراتینیناز در هر ویال

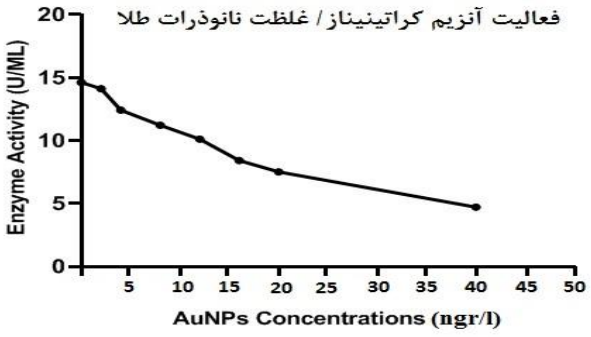
ویال	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
میزان پروتئین بر حسب mg/ml	۱/۴۵۶	۱/۲۴۳	۱/۰۸۵	۰/۸۷۰	۰/۷۴۵	۰/۶۳۲	۰/۴۵۷

بررسی فعالیت آنزیم کراتینیناز

میزان فعالیت آنزیم کراتینیناز حاصل از بیان در دمای القا ۲۸ درجه سانتی‌گراد در غلظت ۰/۱ مولار از سوبسترا (کراتین حل شده در PBS) ۱۴/۶ U/ML تعیین شد.

بررسی اثرنانوذرات طلا بر فعالیت آنزیم کراتینیناز

برای بررسی اثر نانوذرات طلا بر فعالیت آنزیم کراتینیناز ابتدا آنزیم با غلظت‌های مختلفی از نانوذرات طلا به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید و در ادامه فعالیت آنزیم در غلظت ثابت سوبسترا (۰/۱ مولار) اندازه‌گیری شد. بدین‌ترتیب فعالیت آنزیم کراتینیناز در حضور نانوذرات طلا با غلظت‌های ۱/۹۷، ۳/۹۴، ۷/۸۸، ۱۱/۸۲، ۱۵/۷۶، ۱۹/۷و۳۹/۴ نانوگرم بر لیتر به‌ترتیب ۱۴/۱ U/ML، ۱۲/۴، ۱۱/۲، ۱۰/۱، ۸/۴، ۷/۵ و ۴/۷ تعیین شد (جدول ۲). در ادامه نمودار اثر نانوذرات طلا بر فعالیت آنزیم کراتینیناز رسم گردید (نمودار ۱).



نمودار ۱. اثر نانوذرات طلا بر فعالیت آنزیم کراتینیناز

جدول ۲. فعالیت آنزیم کراتینیناز در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا

غلظت نانوذرات طلا ngr/l	۰	۱/۹۷	۳/۹۴	۷/۸۸	۱۱/۸۲	۱۵/۷۶	۱۹/۷	۳۹/۴
فعالیت آنزیم بر حسب U/ml	۱۴/۶	۱۴/۱	۱۲/۴	۱۱/۲	۱۰/۱	۸/۴	۷/۵	۴/۷

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.6.5]

بررسی سینتیک آنزیم کراتینیناز در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا

نتایج فعالیت آنزیم کراتینیناز در عدم حضور نانوذرات طلا در غلظت‌های M/L ۰/۰۶، ۰/۰۷، ۰/۰۸، ۰/۰۹، ۰/۱، ۰/۱۱، ۰/۱۲ و ۰/۲ سوبسترا به‌طور میانگین به‌ترتیب U/ML ۱۰/۵۶، ۱۱/۵۷، ۱۲/۶۴، ۱۳/۷۸، ۱۴/۶، ۱۵/۱۹، ۱۵/۶۴ و ۱۵/۹۱ محاسبه گردید (جدول ۳).

در ادامه نتایج فعالیت آنزیم کراتیناز در حضور نانوذرات طلا در غلظت‌های فوق به‌طور میانگین به-ترتیب U/ML ۵/۴۲، ۵/۹۵، ۶/۴۹، ۷/۰۸، ۷/۵، ۷/۷۹، ۸/۰۲ و ۸/۱۷ تعیین شد(جدول ۴).

هم‌چنین نمودارهای میکائیلیس منتن و لاینویر برک براساس فعالیت آنزیم کراتینیناز بر غلظت سوبسترا در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا رسم گردید (نمودار ۲و۳) و پارامترهای سینتیکی آنزیم در حالت آزاد Vmax=۲۱/۵۱ Unit/ML و Km=۰/۰۵۳ M/L و در حضور نانوذرات طلا Vmax=۱۱/۰۳ Unit/ML و Km=۰/۰۵۳M/L بەدست آمد. نتایج حاصل شده نشان می‌دهد که با افزایش غلظت مهارکننده، حداکثر سرعت واکنش (V_{max}) کاهش یافته ولی km ثابت می‌ماند؛ از طرفی با افزایش غلظت سوبسترا کاهش فعالیت آنزیم جبران نشده و میزان فعالیت و اثر مهاری تغییر نکرد که مبین مهار از نوع غیر رقابتی است.

جدول ۳. فعالیت آنزیم کراتینیناز در غلظت های مختلف سوبسترا

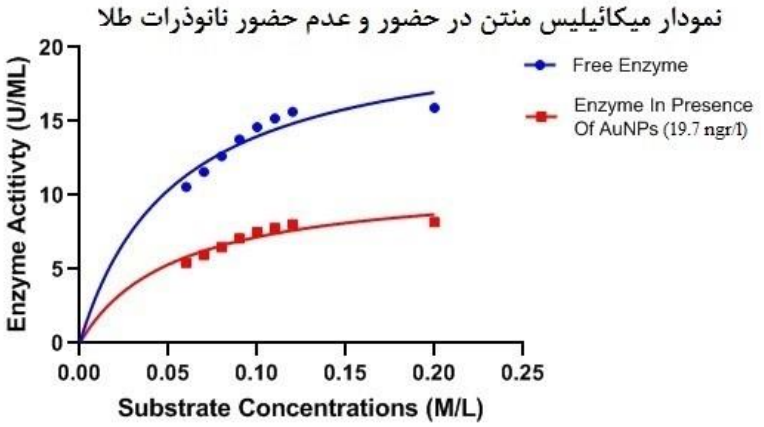
غلظت سوبسترا M/L(کراتین در PBS)	۰/۰۶	۰/۰۷	۰/۰۸	۰/۰۹	۰/۱	۰/۱۱	۰/۱۲	۰/۲
فعالیت آنزیم (سری۱) بر حسب U/ml	۱۰/۱۶	۱۱/۹۵	۱۲/۳۵	۱۴/۱۲	۱۵/۰۶	۱۵/۴۳	۱۵/۷۹	۱۵/۹۷
فعالیت آنزیم (سری۲) بر حسب U/ml	۱۰/۶	۱۱/۲۷	۱۳/۱۲	۱۳/۵۹	۱۴/۶۸	۱۴/۵۹	۱۵/۲۳	۱۵/۷۶
فعالیت آنزیم (سری۳) بر حسب U/ml	۱۰/۹۲	۱۱/۴۹	۱۲/۴۵	۱۳/۶۳	۱۴/۱۷	۱۵/۵۶	۱۵/۹۲	۱۶
میانگین فعالیت آنزیم بر حسب U/ml	۱۰/۵۶	۱۱/۵۷	۱۲/۶۴	۱۳/۷۸	۱۴/۶	۱۵/۱۹	۱۵/۶۴	۱۵/۹۱

جدول شماره ۴. فعالیت آنزیم کراتینیناز در حضور نانوذرات طلا و غلظت های مختلف سوبسترا

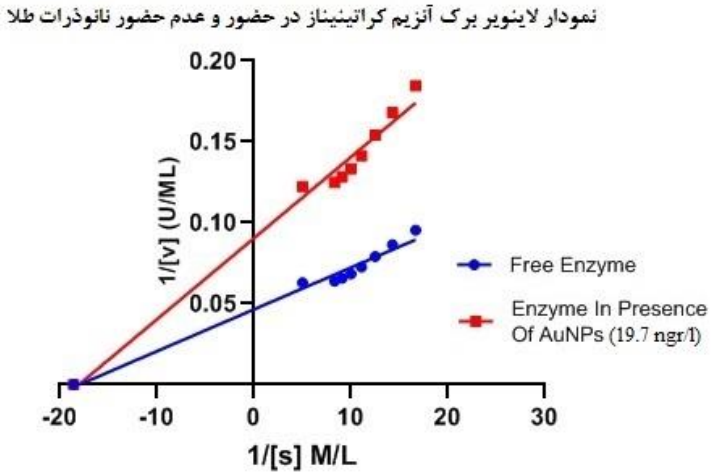
غلظت سوبسترا M/L(کراتین در PBS)	۰/۰۶	۰/۰۷	۰/۰۸	۰/۰۹	۰/۱	۰/۱۱	۰/۱۲	۰/۲
فعالیت آنزیم در حضورAuNP (۱۹/۷ ng/l) بر حسب U/ml (سری ۱)	۵/۳۴	۶/۱۵	۶/۹۳	۷/۲۵	۷/۳۵	۷/۷۳	۸/۱۲	۸/۲۳
فعالیت آنزیم در حضورAuNP (۱۹/۷ ng/l) بر حسب U/ml (سری ۲)	۵/۶۸	۶/۰۲	۶/۱۹	۷/۱۸	۷/۴۹	۷/۵۹	۸/۰۷	۸/۳۱
فعالیت آنزیم در حضورAuNP (۱۹/۷ ng/l) بر حسب U/ml (سری ۳)	۵/۲۴	۵/۶۸	۶/۳۵	۶/۸۴	۷/۶۶	۸/۰۵	۷/۸۷	۷/۹۷
فعالیت آنزیم در حضورAuNP (۱۹/۷ ng/l) بر حسب U/ml	۵/۴۲	۵/۹۵	۶/۴۹	۷/۰۸	۷/۵	۷/۷۹	۸/۰۲	۸/۱۷

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.6.5]



نمودار ۲. نمودار میکاییلیس منتن آنزیم کراتینیناز در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا (۱۹/۷ ng/l)



نمودار ۳. نمودار لاینویر برک آنزیم کراتینیناز در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا (۱۹/۷ ng/l)

طیف‌سنجی فلورسانس آنزیم کراتینیناز در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا

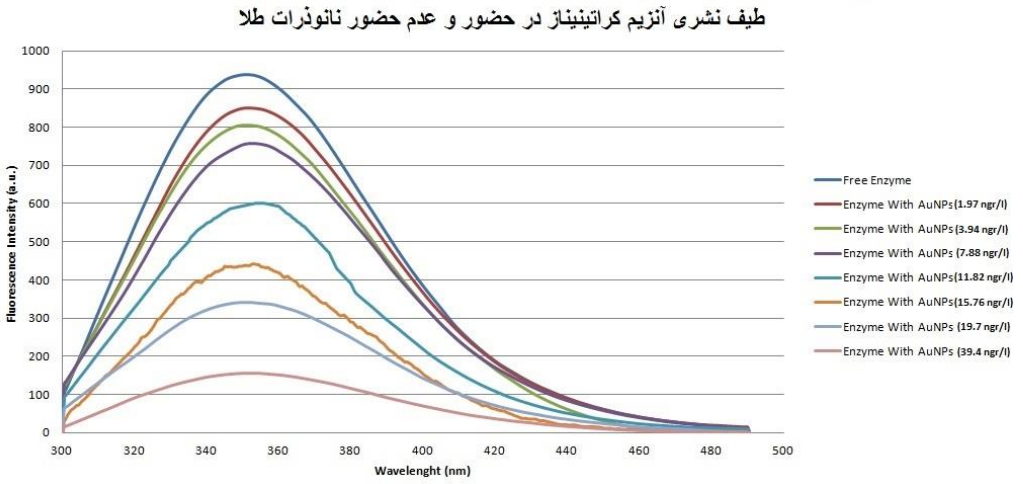
در ابتدا طیف فلورسانس نشر شده آنزیم کراتینیناز (عدم حضور نانوذرات طلا) حاصل از تهییج در طول موج ۲۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفلوریمتر آنالیز و رسم گردید. در ادامه به‌منظور بررسی اثر نانوذرات طلا بر ساختار آنزیم کراتینیناز، آنزیم با غلظت های ۱/۹۷، ۳/۹۴، ۷/۸۸، ۱۱/۸۲، ۱۵/۷۶، ۱۹/۷ و ۳۹/۴ نانوگرم بر لیتر نانوذرات طلا به‌مدت ۵ دقیقه انکوبه شده و سپس طیف فلورسانس نشری حاصل از تهییج در طول موج ۲۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفلوریمتر آنالیز و رسم گردید. نمودار حاصله نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات طلا، میزان شدت فلورسانس به‌وضوح کاهش یافته است که می‌تواند نشانگر تغییر در ریز محیط اسید آمینه تریپتوفان در ساختار آنزیم کراتینیناز باشد نمودار(۴). طیف فلورسانس حاصل از آنزیم کراتینیناز در عدم حضور و حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات طلا را نشان می‌دهد.

بحث

هدف از انجام این مطالعه، ارائه روشی مطلوب برای پایدارسازی آنزیم کراتینیناز به‌جهت استفاده در کیت‌های سنجش کراتین وکراتینین بود. با توجه به ناپایداری این آنزیم (۱۹)، اثر نانوذرات طلا بر پایداری آنزیم کراتینیناز مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور پس از کشت باکتری در محیط LB مایع از دمای القای ۲۸ درجه استفاده گردید. چرا که طبق تحقیقاتی که پیش‌تر انجام شده بود، آنزیم کراتینیناز بیان شده در دمای القای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، آنزیمی فعال‌تر ارائه داده بود (۲۰). پس از بیان و تخلیص آنزیم به کمک روش کروماتوگرافی تمایلی، سنجش فعالیت آنزیم با روش رنگ‌سنجی انجام شد و مقدار ۱۴/۶ U/ML ثبت گردید.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.6.5]



نمودار ۴. طیف فلورسانس آنزیم کراتینینازدر طول موج تهییج (۲۹۵ nm) در حضور و عدم حضور AuNPs

در گذشته مطالعه‌هایی با هدف پایدارسازی آنزیم کراتیناز انجام شده که از آن‌ها می‌توان به ایجاد موتاسیون‌های تصادفی به‌صورت تکی، جفت و سه گانه بر روی آنزیم کراتینیناز اشاره کرد که در نهایت جهش های سه گانه ایجاد شده باعث پایداری نسبی آنزیم گردیده ولی اثر نامطلوب بر فعالیت آنزیم داشته است (۲۱). در مطالعه دیگری اثر یون‌های نقره برآنزیم کراتینیناز بررسی شده که حاکی از مهار فعالیت آنزیم بود (۲۲). مطالعه‌ای دیگر اثر نانو ذرات اکسید آهن و کیتوزان بر آنزیم کراتینیناز را بررسی کرده که باعث ثبات نسبی در ساختار وفعالیت آنزیم شده بود (۲۳). با توجه‌به این که نانوذرات طلا جزو پایدارترین عناصر فلزی هستند، لذا در این تحقیق سعی شد اثر نانوذرات طلا بر پایداری آنزیم کراتینیناز نوترکیب مورد بررسی قرار گیرد تا شاید گزینه مناسبی برای پایداری ساختاری و فعالیت آنزیم کراتینیناز باشد. بدین‌منظور آنزیم کراتینیناز استخراجی با غلظت‌های مختلفی از نانوذرات طلا انکوبه شد و فعالیت آنزیم دوباره بررسی گردید. نتایج حاصله نشانگر کاهش فعالیت آنزیم کراتینیناز در میانکنش با نانوذرات طلا بود که این کاهش فعالیت با افزایش غلظت نانوذرات طلا چشم-گیرتر بود. هم‌چنین پارامترهای سینتیکی آنزیم کراتینیناز در حالت آزاد (Vmax=21.51 Unit/ML و Km=0.053 M/L) و در حضور نانوذرات طلا (Vmax= ۱۱/۰۳Unit/ML و Km=۰/۰۵۳ M/L) نشان داد که Vmax در میانکنش با نانوذرات طلا کاهش چشم‌گیری یافته است در حالی‌که Km ثابت مانده است، این مسئله نشان می‌دهد که حضور نانوذرات طلا به‌صورت یک مهارکننده غیررقابتی عمل کرده و باعث کاهش فعالیت آنزیم کراتینیناز شده‌اند. از طرفی بررسی ساختاری آنزیم کراتینیناز با کمک طیف‌سنجی فلورسانس در طول موج تهییج ۲۹۵ نانومتر، در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا، کاهش میزان شدت فلورسانس در حضور نانوذرات طلا را نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات طلا، کاهش شدت فلورسانس بیش‌تری حاصل شد. کاهش نشر فلورسانس ذاتی می‌تواند نشان‌دهنده تغییر در ریز محیط آمینواسید فلورسانت تریپتوفان در ساختار آنزیم کراتینیناز باشد. از آنجایی‌که آمینو اسیدهای فلوروفور با حضور در محیط‌های آبی کاهش نشر و در محیط‌های هیدروفوب رفتار افزایش نشر را نشان می‌دهند، لذا کاهش نشر فلورسانس آنزیم در حضور نانوذرات طلا، به‌احتمال بیانگر بروز تغییرات در ساختار سوم آنزیم است. در نتیجه استفاده از نانوذرات طلا به جهت پایدارسازی آنزیم کراتینیناز گزینه مناسبی به نظر نمی‌رسد.

با توجه‌به ناپایداری آنزیم کراتینیناز، محدودیت زمانی جهت بررسی فعالیت و ساختار این آنزیم وجود داشت. لذا در این مطالعه، بررسی فعالیت و ساختار آنزیم بلافاصله پس از تخلیص آنزیم انجام پذیرفت. چرا که با گذشت ۴۸ الی ۷۲ ساعت از تخلیص آنزیم به شرط استفاده از گلیسرول و نگهداری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد، شاهد کاهش چشم‌گیر فعالیت آن بودیم. هم‌چنین تمامی بررسی‌ها در شرایط دمایی یکسان صورت پذیرفت. با توجه‌به نتایج حاصل از اثر نانوذرات طلا بر آنزیم کراتینیناز، روش‌های دیگری برای پایدارسازی آنزیم کراتینیناز پیشنهاد می‌شود از جمله: بررسی اثر مهارکننده‌ها و فعال کننده‌ها بر روی آنزیم کراتینیناز، ایجاد جهش‌های هدفدار در توالی آنزیم و

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.6.5]

بررسی پایداری و فعالیت آنزیم، بررسی پایداری آنزیم در برابر عوامل گوناگون دیگر و هم‌چنین بررسی ساختار کریستالوگرافی آنزیم کراتینیناز به جهت شناخت بهتر آنزیم و انتخاب گزینه بهتر برای پایدارسازی آنزیم به جهت مصارف تجاری.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد که کشت باکتری *E.Coli BL21* حاوی وکتور تکثیری *pET28a* در محیط کشت LB مایع و القای آن در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۶ ساعت، آنزیم کراتینیناز با میزان بیان بالا جهت استفاده در کیت‌های سنجش کراتین و کراتینین در اختیارمان قرار می‌دهد. در ادامه بررسی اثر نانوذرات طلا بر پایداری آنزیم کراتینیناز نشان داد، با توجه‌به کاهش فعالیت آنزیم کراتینیناز در حضور نانوذرات طلا و هم‌چنین احتمال تغییر در ریز محیط آمینو اسید فلورسانت در ساختار آنزیم کراتینیناز در حضور نانوذرات طلا، این ترکیب‌های گزینه مناسبی جهت پایداری آنزیم کراتینیناز نیستند. لذا استفاده از روش‌ها و ترکیب‌های دیگر جهت پایدارسازی آنزیم کراتینیناز به‌منظور استفاده در کیت‌های تجاری سنجش کراتین و کراتینین توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از همکاری آزمایشگاه الکتروشیمی دانشگاه تهران که در انجام این طرح تحقیقاتی همکاری لازم را داشته‌اند تقدیر و تشکر می-نمایند.

تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تعارض منافعی در قبال مطالعه حاضر وجود ندارد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.6.5]

منابع

1. Rosano GL, Morales ES, Ceccarelli EA. New tools for recombinant protein production in Escherichia coli: A 5-year update. Protein science. 2019 Aug;28(8):1412-22.

2. Puetz J, Wurm FM. Recombinant proteins for industrial versus pharmaceutical purposes: a review of process and pricing. Processes. 2019 Jul 24;7(8):476.

3. Hinkel LA, Willsey GG, Lenahan SM, Eckstrom K, Schutz KC, Wargo MJ. Creatine utilization as a sole nitrogen source in Pseudomonas putida KT2440 is transcriptionally regulated by CahR. bioRxiv. 2021 Jan 1.

4. Kong J, Li Z, Zhang H, Gao XD, Nakanishi H. Production of encapsulated creatinase using yeast spores. Bioengineered. 2017 Jul 4;8(4):411-9.

5. Rikitake, K., et al., *Creatinine amidohydrolase (creatininase) from Pseudomonas putida: ePurification and some properties.* The Journal of Biochemistry, 1979. **86**(4): p. 1109-1117.

6. Tabata M, Totani M, Endo J. Coimmobilized enzyme columns in determining serum creatinine using creatininase, creatinase and sarcosine oxidase by flow-injection analysis and chemiluminescence detection. Analytica chimica acta. 1992 Jun 5;262(2):315-21.

7. Hou GS, Lin Y, Liang SL. Expression of Creatininase from Pseudomonas putida in Escherichia coli and Its Enzymatic Characteristics Analysis. Xiandai Shipin Keji. 2017;33:77-82.

8. Luo Y, Bai CC, Liu MX, Wang D, Chen MY, Yu SS, Bu XY, Wang XH. PEGylation of boronate-affinity-oriented surface imprinting magnetic nanoparticles with improved performance. Talanta. 2022 Feb 1;238:122992.

9. Treetharnmathurot B, Ovartlarnporn C, Wungsintaweekul J, Duncan R, Wiwattanapatapee R. Effect of PEG molecular weight and linking chemistry on the biological activity and thermal stability of PEGylated trypsin. International journal of pharmaceutics. 2008 Jun 5;357(1-2):252-9.

10. Sun M, Cheng G, Ge X, Chen M, Wang C, Lou L, Xu X. Aqueous Hg (II) immobilization by chitosan stabilized magnetic iron sulfide nanoparticles. Science of the Total Environment. 2018 Apr 15;621:1074-83.

11. Stepankova V, Bidmanova S, Koudelakova T, Prokop Z, Chaloupkova R, Damborsky J. Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. Acs Catalysis. 2013 Dec 6;3(12):2823-36.

12. Iyer PV, Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization—aqueous and non-aqueous environment. Process biochemistry. 2008 Oct 1;43(10):1019-32.

13. Moehlenbrock MJ, Minteer SD. Introduction to the field of enzyme immobilization and stabilization. InEnzyme stabilization and immobilization 2017 (pp. 1-7). Humana Press, New York, NY.

14. Verma A, Nakade H, Simard JM, Rotello VM. Recognition and stabilization of peptide α-helices using templatable nanoparticle receptors. Journal of the American Chemical Society. 2004 Sep 8;126(35):10806-7.

15. Lakowicz JR, editor. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer science & business media; 2013 Apr 17.

16. Hellmann N, Schneider D. Hands on: using tryptophan fluorescence spectroscopy to study protein structure. InProtein Supersecondary Structures 2019 (pp. 379-401). Humana Press, New York, NY.

17. He F. Bradford protein assay. Bio-protocol. 2011 Mar 20:e45-.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.6.5]

18. Grace AN, Pandian K. Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles—A brief study. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2007 Apr 5;297(1-3):63-70.

19. Appleyard G, Woods DD. The pathway of creatine catabolism by Pseudomonas ovalis. Microbiology. 1956 Apr 1;14(2):351-65.

20. Amini-Bayat Z, Bakhtiari N. Cloning, Expression and Purification of Creatininase From Pseudomonas Pseudoalkaligene KF707 in E. coli. Biomacromolecular Journal. 2017 Jul 1;3(1):75-82.

21. Nishiya Y. Structural comparison of creatinases for investigating substrate binding. Int J Anal Bio-Sci Vol. 2014;2(4).

22. Berberich JA, Chan A, Boden M, Russell AJ. A stable three-enzyme creatinine biosensor. 3. Immobilization of creatinine amidohydrolase and sensor development. Acta Biomaterialia. 2005 Mar 1;1(2):193-9.

23. Bai X, Li D, Ma F, Deng X, Luo M, Feng Y, Yang G. Improved thermostability of creatinase from Alcaligenes Faecalis through non-biased phylogenetic consensus-guided mutagenesis. Microbial cell factories. 2020 Dec;19(1):1-3.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.6.5]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.48.6.5]
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-01]