

Kinetic study of the creatininase enzyme and evaluation of the peroxidase-mimicking activity of gold nanoclusters|

Fatemeh Araghi¹, Saman Hosseinkhani^{2*}, Hanieh Jafary¹, Morteza Hosseini³

1- Department of Biology, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences & Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

***Corresponding Author:** Dr Saman Hosseinkhani, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences & Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran; **Email:** saman_h@modares.ac.ir.

| Received | 08/02/2025

| Revised | 16/08/2025

| Accepted | 22/09/2025

| **A**bstract |

Background and Aim: Peroxidases are vital enzymes in biochemical processes, but high purification costs and instability limit their applications. This study investigated the synthesis of gold nanoclusters and optimized reaction conditions, including the concentration and volume of the substrate and the effect of the inhibitor on the peroxidase reaction.

Materials and Methods: Gold nanoclusters based on the creatininase (Crn-AuNCs) were synthesized using a modified protocol. The kinetics of creatininase were analyzed to measure K_m and V_{max} values, and the optimization of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (H_2O_2) concentrations was performed using a UV-Vis spectrophotometer.

Results: In this study, (Crn-AuNCs) were synthesized, yielding K_m and V_{max} values of 0.0882 M and 24.5 $u.ml^{-1}$, respectively. The gold nanoclusters exhibited peroxidase-mimicking activity, effectively catalyzing peroxidation reactions with TMB and H_2O_2 . The optimal concentrations and volumes of TMB and H_2O_2 were determined to be 10 mM (20 μL) and 0.1 M (2 μL), respectively.

Conclusion: This study focused on synthesizing (Crn-AuNCs) that exhibited green fluorescence. It was found that the enzymatic activity of creatininase decreased significantly due to high temperature and alkaline pH. The investigation into the pseudo-enzymatic (peroxidase) activity of the nanoclusters revealed that the presence of Tris during synthesis significantly affected this activity. Additionally, variations in the concentrations of creatine, creatinine, and urea did not influence the fluorescence intensity of the nanoclusters. Overall, the findings suggest the potential application of Crn-AuNCs in biotechnology, particularly in biosensor development.

| **K**eywords |

Creatininase enzyme|
gold nanoclusters|
peroxidase mimicking activity|
colorimetric detection|

| **Iau Science** |

اسپکتروفتومتریک (شامل فلورسنت و لومینسنت)، حسگرهای زیستی، حذف پراکسیدها از مواد غذایی و زیادهای صنعتی، صنایع کاغذ و نساجی، فرایندهای ازنیزاسیون^۲ آب و هوا، محصولات غذایی، سیستم‌های گزارشگر، در تکنیک‌های ایمنی‌سنجی، حفظ محیط‌زیست، صنایع آرایشی، ایمونوهیستوشیمی و درمان سرطان اشاره کرد (۱۲-۱۸). پراکسیدها از جمله آنزیم پراکسیداز ترب کوهی^۳ (HRP) به دلیل کارایی و اختصاصیت بالا، دارای کاربردهای فراوانی در حوزه صنعت، پزشکی، بیوسنسورها و غیره هستند. اما متأسفانه دارای نواقص ذاتی متعددی نیز می‌باشند. از جمله این موارد می‌توان به هزینه بالای آماده‌سازی، تخلیص، ذخیره کردن، دناوره شدن در شرایط نامناسب دمایی، pH، تجزیه توسط پروتازها و پایداری کم اشاره نمود. این نواقص ذاتی بیان شده به‌طور جدی بر روی کاربرد طبیعی آنزیم‌ها اثر می‌گذارد و برای خاتمه دادن به این نواقص استفاده از کمپلکس‌های شبه‌پراکسیداز از جمله همین^۴، هماتین^۵، پورفیرین^۶ و نانوزیم‌ها^۷ گسترش یافته است (۱۹ و ۲۰). به‌تازگی تلاقی علوم نانوفناوری و زیستی منجر به طراحی نانوخوشه‌های دارای فعالیت کاتالیتیکی شبه‌آنزیمی تحت عنوان نانوزیم‌ها شده است که ویژگی‌های عملکردی متنوعی از آنزیم‌های طبیعی به نمایش می‌گذارند. نانوزیم‌ها نوعی از مواد در مقیاس یک تا صد نانومتر، با خاصیت کاتالیتیکی آنزیمی هستند و فعالیت آنزیم را تقلید می‌کنند که با دستکاری اندازه، شکل، مورفولوژی و اصلاح سطح ترکیب می‌توان فعالیت کاتالیتیکی نانوزیم‌ها را تنظیم نمود. چون فعالیت کاتالیزوری معمولاً در سطح نانوزیم‌ها صورت می‌گیرد تغییرهای پوشش سطح و اندازه نانوزیم‌ها از اهمیت بیشتری به‌منظور تغییر فعالیت کاتالیتیکی نانوزیم برخوردار می‌باشد. نانوزیم‌ها، جایگزین آنزیم‌های طبیعی در زمینه‌های مختلف از جمله در زمینه‌های پزشکی، صنعتی و زیستی می‌باشند (۱۹، ۲۱ و ۲۲). در سال‌های اخیر محققان بر توسعه آنزیم‌های مصنوعی به‌عنوان جایگزین‌های بسیار پایدار و کم‌هزینه برای آنزیم‌های طبیعی برای استفاده در

آنزیم کراتینیناز^۱ (Cm) یک پروتئین هوموگزامر با وزن مولکولی تقریبی ۲۸ کیلودالتون برای هر مونومر است که از ۲۵۹ اسیدآمینو تشکیل شده است. این آنزیم از شش زیرواحد به‌صورت دایمرهای تریمر آرایش یافته و به خانواده بزرگ آمیدوهیدرولازهای مرتبط با اوره‌آز تعلق دارد (۱ و ۲). کراتینیناز یک متالوآنزیم وابسته به روی (Zn^{+2}) و منگنز (Mn^{+2}) است که هر زیرواحد آن حاوی یک مرکز دو هسته‌ای روی (Zn^{+2}) در رشته‌های β نزدیک C-terminal و ماریچ‌های α نزدیک ناحیه N-terminal می‌باشد (۳-۵). فعالیت‌های کاتالیتیکی این آنزیم شامل کاتالیز واکنش رفت‌وبرگشتی تبدیل کراتینین به کراتین است که کاربردهای مهم در پزشکی دارد (۶). با وجود کاربردهای خاص آنزیم‌ها، مواردی مانند عدم پایداری، عملکرد پایین، حساسیت نسبت به شرایط محیطی، مشکلات بازیابی و هزینه بالای تولید و خالص‌سازی، موجب محدودیت کاربرد آن‌ها شده است (۷). این محدودیت‌ها باعث شده‌اند تا به‌دنبال جایگزین‌هایی با پایداری و کارایی بیشتر باشیم. یکی از راهکارهای موردتوجه برای غلبه بر محدودیت‌های آنزیم‌های طبیعی، توسعه آنزیم‌های مصنوعی یا شبه‌آنزیم‌ها است. این مواد، با تقلید فعالیت‌های کاتالیتیکی آنزیم‌های طبیعی، می‌توانند در زمینه‌های مختلف از جمله تشخیص و درمان بیماری‌ها، سنجش‌های زیستی و صنایع مختلف کاربرد داشته باشند (۸ و ۹). پراکسیدازها آنزیم‌هایی متعلق به گروه اکسیدوردوکتازها می‌باشند. این آنزیم‌ها در تمامی سلول‌های بدن موجودات زنده از قبیل باکتری‌ها، قارچ‌ها، جلبک‌ها، جانوران و گیاهان یافت می‌شوند (۱۰ و ۱۱). این آنزیم با استفاده از هیدروژن پراکسید به‌عنوان سوبسترا، واکنش‌های اکسیداتیو متعددی را کاتالیز می‌کنند. سوبستراهای رایج پراکسیدازی شامل O-فنیل‌دی‌آمین (OPD)، آزیوبیس-۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سلفونیک اسید (ABTS) و ۳،۳′،۵،۵′-تترامتیل‌بنزیدین (TMB) هستند. به‌دلیل غیرسمی بودن، TMB به‌عنوان پروب معمولی در سنجش رنگ‌سنجی بر پایه فعالیت‌های پراکسیدازی مورد استفاده قرار می‌گیرد. پراکسیدازها در صنعت، پزشکی و زیست‌شناسی کاربردهایی دارند. از جمله این کاربردها می‌توان به سیستم‌های تشخیص

² Ozonation

³ Horseradish Peroxidase

⁴ Hemin

⁵ Hematin

⁶ Porphyrin

⁷ Nanozymes

¹ Creatininase

۱-۲ | بیان و تخلیص آنزیم کراتینیناز

آنزیم کراتینیناز، در سلول‌های *E. coli*، به‌ویژه سویه BL21، با استفاده از سیستم بیان Pet 28a سنتز شد. این آنزیم دارای دنباله هیستیدینی (His tag) در انتهای کربوکسیل (C-terminal) خود است. این دنباله تمایل زیادی به نیکل دارد و میان‌گنشی محکمی با آن برقرار می‌کند. پس از آن، تخلیص پروتئین نوترکیب به روش کروماتوگرافی تمایلی^۱ و با استفاده از ستون نیکل سفاروز^۲ ساخت شرکت شیمادزو، ژان انجام گرفت. برای از بین بردن ایمیدازول، آنزیم خالص شده تحت فرایند دیالیز قرار گرفت. خلوص کراتینیناز توسط SDS-PAGE تأیید و در نهایت، غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد تعیین شد.

۲-۲ | سنتز و خصوصیات ساختاری نانوخوشه‌های طلا

نانوخوشه‌های طلائی تثبیت‌شده بر پایه آنزیم کراتینیناز با استفاده از یک پروتکل اصلاح‌شده سنتز شدند (۲۸). این روش شامل افزودن اسید آسکوربیک به محلول پروتئین و سپس افزودن تدریجی محلول آبی HAuCl_4 با هم‌زدن مداوم بود. در نهایت، محلول سود اضافه شده و مخلوط در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت یک شبانه‌روز انکوبه گردید. تکنیک میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) به‌طور فزاینده‌ای در زمینه نانوتکنولوژی محبوب شده است، زیرا قابلیت ارائه نتایج دقیق و قابل تکرار را دارد. این تکنیک معمولاً برای تعیین اندازه و ساختار نانوخوشه‌ها استفاده می‌شود. در این مطالعه، از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) به‌منظور بررسی اندازه و ساختار نانوخوشه‌های طلا بر پایه آنزیم کراتینیناز استفاده شد.

۳-۲ | سنجش فعالیت آنزیم

برای سنجش فعالیت آنزیم کراتینیناز، ابتدا ۰/۹ میلی‌لیتر محلول کراتینین ۱۰۰ میلی‌مولار را در بافر پتاسیم‌فسفات با ۷/۵pH به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر آنزیم کراتینیناز به مخلوط اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در همان دما انکوبه گردید. در ادامه، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول بالا به ۰/۹ میلی‌لیتر آب یخ استریل شده و ۲ میلی‌لیتر محلول سود و پیکریک اسید اضافه شد و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق

طیف وسیعی از کاربردها تمرکز کرده‌اند. نانوخوشه‌ها دارای فعالیت مقلد پراکسیدازی هستند و در مقایسه با آنزیم طبیعی (پراکسیداز ترب کوهی) دارای مزایایی مانند آماده‌سازی آسان و پایداری عالی هستند (۲۳ و ۲۴). نانوخوشه‌های طلا با روکش پروتئین مزایای زیادی نسبت به سایر سیستم‌های نانوخوشه‌های طلا نشان دادند از جمله سنتز سبز و آسان، سازگاری زیستی، عدم سمیت، حلالیت زیاد در آب را دارا می‌باشند، زیرا پروتئین‌ها به‌عنوان مولکول‌های کاهنده و تثبیت‌کننده محیطی عمل می‌کنند. فقط به شرایط واکنش ملایم، حلالیت در آب و زیست‌سازگاری طبیعی نیاز دارند (۲۵). علاوه بر این ساختارهای سه‌بعدی پروتئین‌ها می‌توانند طیف وسیعی از pH را تحمل کنند و به‌راحتی با سایر سیستم‌ها ترکیب شوند. الگوهای پروتئینی به‌دلیل تنوع در محتویات و توالی اسیدهای آمینه بر تشکیل و خواص نانوخوشه‌ها تأثیر می‌گذارند (۲۶). نانوخوشه‌های طلائی تثبیت‌شده با ارائه دلیل سازگاری زیستی، فوتولومینسانس و سهولت سنتز، گزینه مناسبی برای کاربردهای بیولوژیکی هستند (۲۷). در این پژوهش، به بررسی سنتز نانوخوشه‌های طلا بر روی آنزیم کراتینیناز و ویژگی‌های سینتیکی آن پرداخته شده است. به‌طور خاص، فعالیت پراکسیدازی نانوخوشه‌های طلائی تثبیت‌شده بر روی آنزیم کراتینیناز با استفاده از TMB و هیدروژن پراکسید با روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت و عوامل مؤثر بر آن نیز مطالعه شده است. همچنین بررسی تأثیر آنالیت‌های مختلف مانند اوره، کراتین و کراتینین بر روی نشر نانوخوشه‌ها مورد توجه قرار گرفته است.

۲ | مواد و روش‌ها

تمامی محلول‌ها در سطح تجزیه‌ای و با استفاده از آب دیونیزه به‌صورت روزانه تهیه شدند. هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، NaCl، ایمیدازول، کاناماسین، تریس، سولفات آمونیوم، اوره، کراتین، TMB، گلیسرول، EDTA، کراتینین، پیکریک اسید، آسکوربیک اسید از شرکت مرک تهیه گردیدند. پیتون و مخمر از شرکت Quela و HAuCl_4 از شرکت سینوفارم تهیه شدند. همچنین دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش و فلورسانس از شرکت Perkin Elmer، دستگاه استیرر از شرکت Heroes، سانتریفوژ از شرکت MPW و انکوباتور از شرکت Memmert تهیه گردیدند.

¹ Affinity Chromatography

² Nickel-Sephareose

که نشان‌دهنده تشکیل تجمع‌های پروتئینی غیرمحلول و غیرفعال بود؛ درحالی‌که پس از دیالیز، شفافیت محلول افزایش یافت و ذرات تجمع‌یافته مشاهده نشدند. همچنین، اندازه‌گیری فعالیت آنزیم نشان داد که دیالیز موجب افزایش قابل توجه در فعالیت آنزیمی شده است که احتمالاً ناشی از حذف ناخالصی‌ها و بهبود پایداری ساختاری آنزیم می‌باشد.

۲-۶ | بررسی فعالیت شبه‌پراکسیدازی نانوخوشه‌های طلا و بهینه‌سازی غلظت و حجم‌های مختلف TMB و H₂O₂ به‌عنوان سوبسترا

در فعالیت‌های پراکسیدازی نانوخوشه‌های طلا، واکنش با استفاده از سوبسترای TMB موردبررسی قرار گرفت. به این منظور، ۵ میکرولیتر از محلول TMB ۱۰ میلی‌مولار، ۵ میکرولیتر از نانوخوشه‌های طلا و ۵ میکرولیتر هیدروژن پراکسید (H₂O₂) باهم مخلوط شدند. در ادامه مخلوط واکنش در اتاق انکوبه شد. پس از انکوباسیون، جذب محلول در طول موج ۶۵۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر مری-فرابنفش اندازه‌گیری شد. به‌منظور بهینه‌سازی غلظت و حجم سوبستراهای TMB و هیدروژن پراکسید (H₂O₂) در واکنش پراکسیدازی، مجموعه‌ای از آزمایش‌های متوالی طراحی و اجرا گردیدند. در مرحله اول بهینه‌سازی، اثر غلظت و حجم‌های مختلف TMB بر فعالیت پراکسیدازی موردبررسی قرار گرفت. این آزمایش‌ها در حضور غلظت و حجم ثابت نانوخوشه‌های طلا و نیز هیدروژن پراکسید انجام شد. غلظت‌ها و حجم‌های مورداستفاده برای TMB به ترتیب شامل ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌مولار و همچنین ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میکرومولار بودند. در مرحله دوم، بهینه‌سازی غلظت و حجم هیدروژن پراکسید (H₂O₂) انجام شد. در این مرحله، غلظت و حجم نانوخوشه‌های طلا و همچنین غلظت و حجم بهینه‌شده TMB از آزمایش بالا ثابت نگه داشته شد و غلظت و حجم H₂O₂ در آزمایش متغیر بود. غلظت‌ها و حجم‌های موردبررسی برای H₂O₂ به ترتیب شامل ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۱، ۲/۵ و ۲ میلی‌مولار و همچنین ۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۷ و ۱۰ میکرومولار بودند. شدت جذب محلول در طول موج ۶۵۲ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

انکوبه شد. نهایتاً، تغییرهای جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

۲-۴ | اندازه‌گیری پارامترهای سینتیکی آنزیم کراتینیناز قبل و بعد از سنتز

به‌منظور اندازه‌گیری و تعیین پارامترهای سینتیکی مانند Km و Vmax آنزیم کراتینیناز قبل و بعد از سنتز، آزمایش‌هایی با استفاده از غلظت‌های مختلف کراتین در محدوده ۰ تا ۰/۲ مولار انجام شد. غلظت‌های مختلف کراتین شامل ۰/۰۵، ۰/۰۶، ۰/۰۷، ۰/۰۸، ۰/۰۹، ۰/۱، ۰/۱۱، ۰/۱۲ و ۰/۲ مولار به‌منظور بررسی تأثیر این غلظت‌ها بر فعالیت آنزیم کراتینیناز قبل و بعد از سنتز مورداستفاده قرار گرفت. میزان جذب نمونه‌ها در طول مدت ۴۰ دقیقه ثبت شد. این داده‌ها به‌منظور تعیین Km و Vmax آنزیم قبل و بعد از سنتز تجزیه و تحلیل گردید. با استفاده از داده‌های به‌دست‌آمده، منحنی میکائلیس-منتن^۱ برای آنزیم کراتینیناز به‌صورت مجزا رسم شد. در این مرحله، غلظت نهایی کراتین در حجم محلول موجود در کووت محاسبه گردید. داده‌ها در نرم‌افزار Excel وارد و تجزیه و تحلیل شدند. همچنین، نمودار لاینیوور-برک^۲ با استفاده از معکوس غلظت سوبسترا و معکوس سرعت واکنش رسم شد. همچنین با استفاده از معادله خط به‌دست‌آمده از نمودارها، مقادیر Km و Vmax نیز محاسبه شد.

۲-۵ | دیالیز نمونه آنزیم کراتینیناز

به‌دلیل قابلیت بالای آنزیم کراتینیناز در تشکیل فرم‌های تجمع‌یافته و برگشت‌ناپذیر، این تجمع‌ها می‌توانند تأثیر منفی بر فعالیت آنزیم بگذارند. جهت حذف ناخالصی‌ها و جلوگیری از این مشکل از تکنیک دیالیز استفاده شد. محلول دیالیز شامل گلیسرول ۱ درصد، NaCl ۱۵۰ میلی‌مولار، سولفات آمونیوم ۰/۸ میلی‌مولار، EDTA ۱ میلی‌مولار می‌باشد. دیالیز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در بافری به حجم ۱ لیتر به مدت ۲۴ ساعت انجام گردید و در طی این زمان، نمونه‌ها با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه (rpm) سانتی‌فیوژ شدند. برای ارزیابی اثربخشی دیالیز، تغییرهای ظاهری محلول آنزیم و فعالیت آنزیمی موردبررسی قرار گرفت. پیش از دیالیز، محلول حاوی آنزیم دارای کدورت و ذرات معلق قابل مشاهده با چشم غیرمسلح بود

¹ Michaelis-Menten

² Lineweaver-Burk

۲-۷ | اثر آنالیت‌های مختلف بر نانوخوشه طلا بر پایه آنزیم کراتینیناز

به منظور ارزیابی تأثیر آنالیت‌های مختلف بر فعالیت نانوخوشه‌های طلا مبتنی بر آنزیم کراتینیناز، آزمایش‌هایی با استفاده از آنالیت‌های کراتین، کراتینین و اوره انجام شد. در این آزمایش‌ها، غلظت‌های متفاوتی از هر آنالیت در حضور نانوخوشه‌های طلا مورد بررسی قرار گرفتند. در این آزمایش محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف از کراتین، کراتینین و اوره تهیه گردیدند. سپس نانوخوشه‌های طلا با غلظت مشخص به هریک از محلول‌های آنالیت اضافه و مخلوط حاصل انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، پاسخ ناشی از حضور هر آنالیت توسط طیف‌سنجی فلورسانس ارزیابی شد و داده‌های حاصل از اندازه‌گیری، با یکدیگر مقایسه و تجزیه و تحلیل شدند.

۳ | نتایج

۳-۱ | آنزیم اسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)

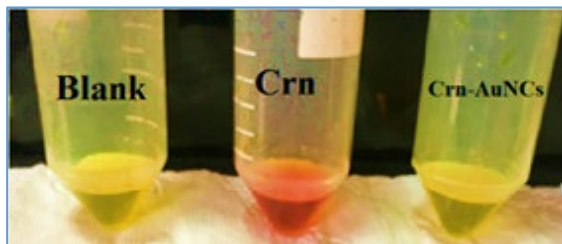
برای بیان و تولید بالای آنزیم کراتینیناز، نو ترکیب از باکتری *Sudomonas pseudocalcaligenes* از محیط کشت LB برای پیش‌کشت و محیط کشت XYT2 برای کشت نهایی استفاده شد. به منظور القای بیان، مخلوطی از لاکتوز و IPTG با مقادیر ۸ میلی‌مولار و ۰/۵ میلی‌مولار به ترتیب به کار گرفته شد. وکتور PET28A دارای دنباله His6-Tag است و این پروتئین‌های کراتینیناز به صورت متصل به این دنباله تولید می‌شوند. برای خالص‌سازی کراتینیناز، از ستون کروماتوگرافی تمایلی^۲ با نیکل سفاروز استفاده شد. برای ارزیابی سطح بیان و خلوص آنزیم استخراج‌شده، از تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE بهره گرفته شد. این روش یکی از متداول‌ترین و مؤثرترین تکنیک‌ها برای تفکیک و جداسازی پروتئین‌ها بر اساس جرم مولکولی (وزن مولکولی) آن‌هاست. نتایج به دست آمده از الکتروفورز SDS-PAGE در شکل نشان داد که این تکنیک قادر است که ترکیب‌ها را به طور دقیق از یکدیگر جدا کرده و خلوص آنزیم کراتینیناز را به خوبی بررسی کند. همان‌طور که در شکل ۱-الف مشاهده شد، وزن مولکولی آنزیم کراتینیناز ۲۸ کیلوالتون است.

۳-۲ | سنتز و تعیین خصوصیت ساختاری نانوخوشه‌های طلا بر پایه آنزیم کراتینیناز

پس از سنتز نانوخوشه‌های طلا، نمونه‌های تهیه شده تحت تابش نور فرابنفش قرار گرفتند تا ویژگی‌های نوری آن‌ها مورد بررسی قرار گیرد. در این آزمایش، تابش نور سبز-آبی به صورت کاملاً واضح در شکل ۱-ب مشاهده شد که این پدیده به عنوان یک شاخص نوری، نشان‌دهنده موفقیت آمیز بودن فرایند سنتز نانوخوشه‌های طلا بر پایه آنزیم کراتینیناز است. این تابش که ناشی از خواص فلورسانس ویژه نانوخوشه‌هاست، می‌تواند به عنوان روشی حساس و غیرمخرب جهت تأیید صحت سنتز نانوخوشه‌ها مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر این، به منظور ارزیابی پایداری نانوخوشه‌ها، نمونه‌های سنتز شده در شرایط خاص نگهداری می‌شوند. نمونه‌ها به صورت پودر و محلول، در محیط عاری از نور و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند. که این شرایط نگهداری به حفظ ساختار نانوخوشه‌ها کمک می‌کند و مانع از تخریب یا تغییرهای ساختاری آن‌ها در طول زمان می‌شود. این پایداری بالا، نشان‌دهنده پتانسیل مناسب نانوخوشه‌های طلا برای کاربردهای طولانی‌مدت در آزمایش‌های زیستی، دارورسانی و دیگر حوزه‌های مرتبط است. برای تحلیل خصوصیات ساختاری نانوخوشه‌های طلا، از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) بهره گرفته شد. این روش که در شکل ۱-پ به تصویر کشیده شده است، مورفولوژی نانوخوشه‌های طلایی را که بر پایه آنزیم کراتینیناز سنتز شده‌اند، به طور دقیق نشان می‌دهد. نتایج حاصل از TEM نشان می‌دهند که نانوخوشه‌ها دارای شکلی تقریباً کروی هستند و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری با وضوح بالا اندازه‌گیری شده‌اند. اندازه نانوخوشه‌ها در محدوده ۶ تا ۸ نانومتر قرار دارند و به طور یکنواخت در نمونه پراکنده شده‌اند. این یکنواختی در توزیع اندازه و شکل نانوخوشه‌ها، نشان‌دهنده کنترل دقیق فرایند سنتز و تأثیر مثبت آنزیم کراتینیناز در تثبیت و شکل‌دهی نانوخوشه‌ها است. استفاده از TEM به عنوان یک ابزار قدرتمند در تحلیل ساختاری، امکان مشاهده دقیق و تحلیل جزئیات ساختاری نانوخوشه‌ها را فراهم می‌کند که این امر برای درک بهتر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن‌ها ضروری است. این تحلیل ساختاری، اطلاعات ارزشمندی را در مورد نحوه تشکیل و پایداری نانوخوشه‌ها ارائه می‌دهد و می‌تواند به عنوان پایه‌ای برای بهینه‌سازی فرایندهای سنتز و کاربردهای آینده در زمینه‌های مختلف علمی و صنعتی مورد استفاده قرار گیرد.

¹ *Pseudomonas pseudoalcaligenes*

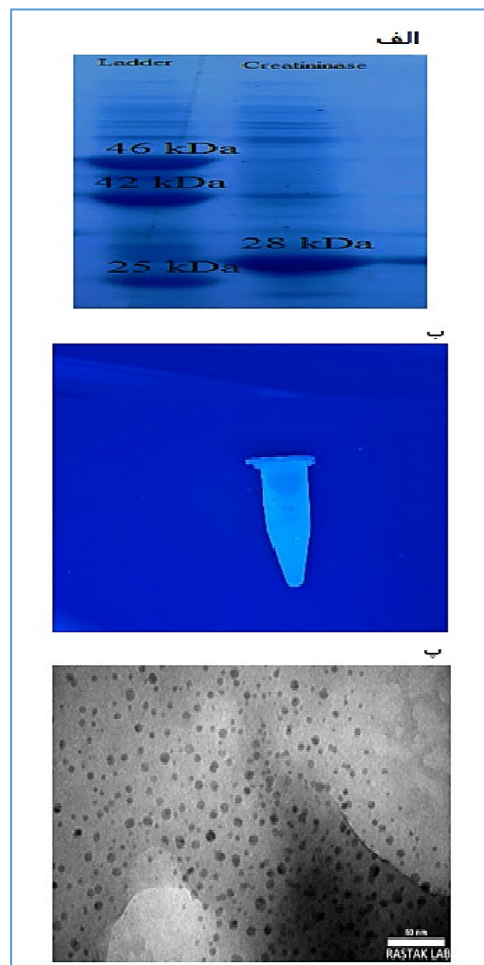
² Affinity Chromatography



شکل ۲- مقایسه شدت رنگ واکنش ناشی از فعالیت آنزیم کراتینیناز قبل و بعد از سنتز.

۴-۳ | خصوصیات سینتیک آنزیم کراتینیناز قبل و بعد از سنتز

در این مطالعه، سینتیک آنزیم کراتینیناز با استفاده از سوبسترای کراتین مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین پارامترهای سینتیک، اثر غلظت‌های مختلف سوبسترا بر سرعت واکنش ارزیابی شد. براساس داده‌ها، جذب نوری (OD) اندازه‌گیری شد. با تحلیل داده‌ها، پارامترهای سینتیک نظیر ثابت میکائلیس-منتن (Km)، عدد کاتالیتیک (kcat)، حداکثر سرعت واکنش (Vmax) و نسبت $kcat/Km$ محاسبه و در جدول ۱ ارائه شدند. براساس نتایج به دست آمده در شکل ۳-الف و ب نمودارهای میکائلیس-منتن و لینویور-برک برای آنزیم کراتینیناز ترسیم گردید که این نمودارها نمایانگر رفتار سینتیک این آنزیم در حضور سوبسترای کراتین می‌باشد. این نتایج، مشخصه‌های سینتیک دقیق آنزیم کراتینیناز را با استفاده از روش‌های استاندارد تعیین می‌کند. در مقایسه با نتایج سینتیک به دست آمده برای آنزیم کراتینیناز، مطالعه‌ها نشان داده‌اند که پس از سنتز، آنزیم کراتینیناز فعالیت کاتالیتیک قابل توجهی از خود نشان نمی‌دهد. این کاهش یا از بین رفتن فعالیت ممکن است ناشی از تغییر در ساختار سه‌بعدی آنزیم، از بین رفتن جایگاه فعال آنزیم در شرایط سنتز باشد. در نتیجه امکان انجام تحلیل‌های سینتیک و تعیین پارامترهای مرتبط با فعالیت آنزیم، از جمله رسم نمودارهای سینتیک فراهم نشد. این نتایج نشان می‌دهند که فرایند سنتز تأثیر منفی بر فعالیت کاتالیتیک آنزیم کراتینیناز داشته و آن را از انجام فعالیت کاتالیتیک طبیعی خود باز داشته است.

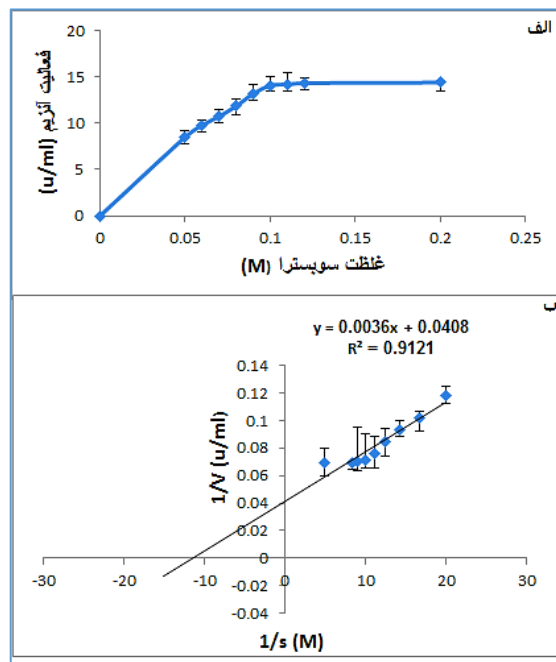


شکل ۱- الف) ژل SDS-PAGE الکتروفورز، Ladder: به عنوان مارکر پروتئین، Fraction ۱: آنزیم کراتینیناز تخلیص شده از ستون نیکل سفاروز. ب) نانوخوشه‌های طلا تثبیت شده‌های بر پایه آنزیم کراتینیناز در زیر نور فرابنفش. پ) تصویر TEM نانوخوشه‌های طلا بر پایه آنزیم کراتینیناز در بزرگ‌نمایی‌های ۵۰ نانومتر.

۳-۳ | سنجش فعالیت آنزیم کراتینیناز

هر (u) از فعالیت آنزیم کراتینیناز، مقدار آنزیم کراتینیناز مورد نیاز برای تشکیل یک میکرولیتر کراتین در دقیقه بر میلی‌لیتر تحت شرایط استاندارد تعریف شده است. فعالیت آنزیم کراتینیناز را از شدت رنگ واکنش و میزان جذب آن‌ها می‌توان مشاهده نمود. فعالیت آنزیم کراتینیناز قبل از سنتز $2/28 \text{ u.ml}^{-1}$ و بعد از سنتز $0/1 \text{ u.ml}^{-1}$ است که نشان‌دهنده غیرفعال شدن جایگاه‌های فعال آنزیم کراتینیناز بعد از سنتز است زیرا با تغییرهای pH و حرارت در حین سنتز آنزیم دناتوره می‌شود و فعالیت خود را از دست می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده شد، محصول این واکنش آنزیمی یک ترکیب قرمز-نارنجی رنگ است که پس از سنتز به رنگ زرد مشابه با بلانک تغییر می‌کند.

نانوخوشه‌های طلا اکسیداسیون TMB به ox-TMB را به‌واسطه H_2O_2 کاتالیز می‌کنند. این فرایند منجر به ایجاد رنگ آبی و جذب در طول موج ۶۵۲ نانومتر می‌شود. تغییرهای شدت جذب، نشان‌دهنده میزان ox-TMB تولیدی در واکنش بین TMB و H_2O_2 در حضور AuNC است. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهند که نانوخوشه‌های طلا رفتاری مشابه پراکسیدازها از خود نشان می‌دهند. از آنجاکه نانوخوشه‌های طلا از طریق دیالیز برای حذف یون‌های طلا (III) اضافی خالص‌سازی شده است، اثر کاتالیزوری آن‌ها به‌طور واضح بدون حضور یون‌های فلزی آزاد در محلول حاصل می‌شود. علاوه بر این، در این مطالعه به حضور Au^+ (۰) و $Au(I)$ در ساختار AuNC و همچنین جذب H_2O_2 بر سطح نانوخوشه‌ها اشاره شده است. این فرایند منجر به تجزیه پیوند O-O در H_2O_2 توسط نانوخوشه‌های طلا و تبدیل آن به رادیکال‌های OH می‌شود. همان‌طور که در شکل ۴-الف مشاهده می‌شود، حضور نانوخوشه‌های طلا به‌طور قابل‌توجهی سرعت واکنش اکسیداسیون TMB را افزایش داد و تغییر رنگ آن از بی‌رنگ به آبی به‌وضوح نمایان شد. همچنین در عوض، در غیاب نانوخوشه‌های طلا، واکنش اکسیداسیون به مراتب کندتر بوده و تغییر رنگ به‌طور واضحی مشهود نبود. در این پژوهش، به‌منظور بررسی اثر غلظت و حجم سوبسترای TMB بر واکنش پراکسیدازی، آزمایش‌هایی با حفظ شرایط ثابت و با تغییر غلظت و حجم‌های مختلف TMB در حضور نانوخوشه‌های طلا و H_2O_2 انجام شد. نتایج حاصل، همان‌گونه که در نمودارهای ب و پ از شکل ۴ نشان داده شده است، حاکی از آن است که با افزایش غلظت و حجم TMB، به‌ترتیب تا مقادیر ۱۰ میلی‌مولار و ۲۰ میکرولیتر، شدت جذب افزایش می‌یابد و پس از این مقادیر، کاهش تدریجی در شدت جذب مشاهده می‌شود. همچنین، نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت و حجم H_2O_2 ، که در نمودارهای ت و ث از شکل ۴ ارائه شده‌اند، نشان می‌دهد که با افزایش غلظت و حجم H_2O_2 تا مقادیر ۰/۱ مولار و ۲ میکرولیتر، میزان جذب افزایش و پس از آن کاهش می‌یابد. نتایج حاصل نشان می‌دهند که نانوخوشه‌های طلا دارای فعالیت شبه‌پراکسیدازی بوده و می‌تواند به‌عنوان یک کاتالیزور کارآمد در واکنش‌های پراکسیداسیون با استفاده از TMB و H_2O_2 عمل کند. غلظت و حجم‌های بهینه برای TMB و H_2O_2 به‌ترتیب ۱۰ میلی‌مولار (۲۰ میکرولیتر) و ۰/۱ مولار (۲ میکرولیتر) تعیین شدند. این مقادیر بهینه، تعادل مناسبی بین سرعت واکنش و شدت جذب را فراهم می‌کنند و به‌عنوان شرایط بهینه در



شکل ۳-الف) نمودار میکائیلیس-منتن در حضور غلظت‌های مختلف کراتین. ب) نمودار لینوور-برک در حضور غلظت‌های مختلف کراتین.

جدول ۱- پارامترهای سینتیکی آنزیم کراتینیناز قبل از سنتز.

سوبسترا	K_m (M)	V_{max} ($u \cdot ml^{-1}$)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($s^{-1} M^{-1}$)
کراتین	۰/۰۸۸۲	۲۴/۵	۱۱/۶۶	۱۳۲/۱

۳-۵ | دیالیز

در این پژوهش، با توجه به مشاهده‌های انجام‌شده، واکنش پراکسیدازی به‌دلایلی امکان‌پذیر نبود. در نتیجه، بررسی‌های لازم برای رفع مشکل ترکیب‌های غیرضروری موجود در محلول آنزیمی انجام شد. در این فرایند، نمک تریس به‌عنوان یک عامل بازدارنده واکنش پراکسیدازی شناسایی شد. با انجام دیالیز و حذف این عامل، خاصیت پراکسیدازی نانوخوشه‌ها دوباره نمایان شد. علاوه بر این، نتایج آزمایش‌های متعدد نشان دادند که نمک تریس دارای ویژگی کاتالازی است و تبدیل ox-TMB به TMB را داراست. این یافته‌ها توجه به ترکیب‌ها در سیستم‌های آنزیمی و تأثیر آن‌ها بر فعالیت‌های کاتالیزوری را نمایان می‌کند. در نهایت، حذف نمک تریس از محلول به بهبود فعالیت‌های پراکسیدازی نانوخوشه‌ها و افزایش کارایی آن‌ها منجر شد.

۳-۶ | بررسی فعالیت شبه‌پراکسیدازی نانوخوشه‌های

طلا و بهینه‌سازی شرایط واکنش اکسیداسیون

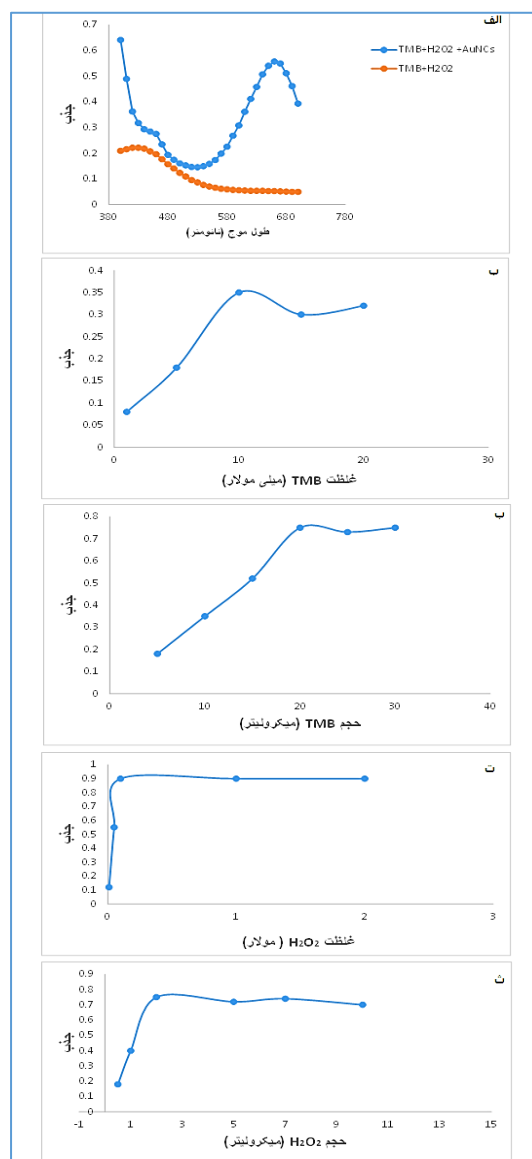
به‌منظور ارزیابی فعالیت‌های کاتالیزوری، TMB به‌طور معمول برای مطالعه فعالیت شبه‌پراکسیدازی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

شکل ۴- الف) طیف جذبی TMB و H₂O₂ در حضور و عدم حضور نانوخوشه‌های طلا. ب) اثر غلظت TMB بر واکنش پراکسیدسازی: حجم TMB ۱۰ میکرولیتر، غلظت نانوخوشه‌های طلا (mg/mL⁻¹) و غلظت و حجم H₂O₂ (۰/۰۱ مولار، ۵ میکرولیتر). پ) اثر حجم TMB بر واکنش پراکسیدسازی: غلظت TMB (۱۰ میلی مولار)، غلظت نانوخوشه‌های طلا (mg/mL⁻¹) و غلظت و حجم H₂O₂ (۰/۰۱ مولار، ۵ میکرولیتر). ت) اثر غلظت H₂O₂ بر واکنش پراکسیدسازی: غلظت و حجم TMB (۱۰ میلی مولار، ۲۰ میکرولیتر) و غلظت نانوخوشه‌های طلا (۰/۲ mg/mL⁻¹) و غلظت H₂O₂ (۰/۱ مولار).

۳-۷ | اثر آنالیت‌های مختلف بر روی نانوخوشه‌های طلا

آنزیم کراتینیناز به‌عنوان یکی از آنزیم‌های مهم در فرایندهای بیوشیمیایی، کاربردهای گسترده‌ای در حوزه‌های پزشکی و بالینی دارد. این آنزیم واکنش برگشت‌پذیر تبدیل کراتینین به کراتین را کاتالیز می‌کند و در ارزیابی سلامتی کلیه‌ها و عملکرد سیستم‌های مختلف بدن، به‌ویژه در تشخیص بیماری‌های کلیوی، عضلانی و تیروئیدی نقش مهمی ایفا می‌کند. اندازه‌گیری سطح کراتینین در سرم و ادرار به‌عنوان یکی از معیاری‌های اصلی ارزیابی عملکرد کلیوی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این پژوهش، اثر آنالیت‌های مختلف بر روی نانوخوشه‌های طلای سنتز شده بر پایه آنزیم کراتینیناز در شکل ۵-الف مورد بررسی قرار گرفت. آنالیت‌هایی همچون کراتین، کراتینین و اوره که از ترکیب‌های اصلی موجود در افراد مبتلا به بیماری‌های کلیوی هستند، به‌عنوان سوبسترا برای آنزیم بررسی شد و تأثیر آن‌ها بر شدت نشر فلورسانس نانوخوشه‌های طلا آزمایش گردید. این آنالیت‌ها به‌طور گسترده‌ای در آزمون‌های بالینی برای بررسی وضعیت سلامت کلیه‌ها و سایر دستگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. نتایج نشان دادند که آنالیت‌های کراتین، کراتینین و اوره تأثیری بر شدت فلورسانس نانوخوشه‌های طلا ندارند. این یافته نشان‌دهنده پایداری نانوخوشه‌های طلا در حضور این آنالیت‌هاست. به این معنی که نانوخوشه‌ها به‌نظر نمی‌رسد که در واکنش‌های کاتالیزوری یا تغییرهای شدت نشر فلورسانس با این ترکیب‌ها وارد شوند. این ویژگی می‌تواند به‌عنوان یک مزیت برای استفاده از نانوخوشه‌ها در کاربردهای پزشکی و بالینی مطرح شود، زیرا امکان استفاده از آن‌ها در محیط‌های پیچیده بیولوژیکی بدون تأثیر بر ویژگی‌های فلورسانس وجود دارد. پاسخ غیرحساس نانوخوشه‌های طلا به تغییرهای غلظت‌های آنالیت‌ها ممکن است ناشی از پایداری

مطالعه‌های بعدی مورد استفاده قرار خواهند گرفت. در غلظت‌های پایین‌تر از غلظت بهینه، واکنش پراکسیداسیون به‌طور کامل انجام نمی‌شود و شدت رنگ‌گیری به اندازه کافی قابل مشاهده نیست. در غلظت‌های بالاتر از غلظت بهینه، واکنش اشباع‌شده و تغییرهای قابل توجهی در شدت جذب ایجاد نمی‌شود. به‌طور مشابه، حجم‌های بالاتر از حجم بهینه می‌توانند باعث رقیق شدن واکنش‌دهنده‌ها و کاهش شدت جذب شوند، در حالی که حجم‌های ناکافی منجر به عدم تکمیل واکنش و تولید سیگنال‌های ضعیف می‌شوند.



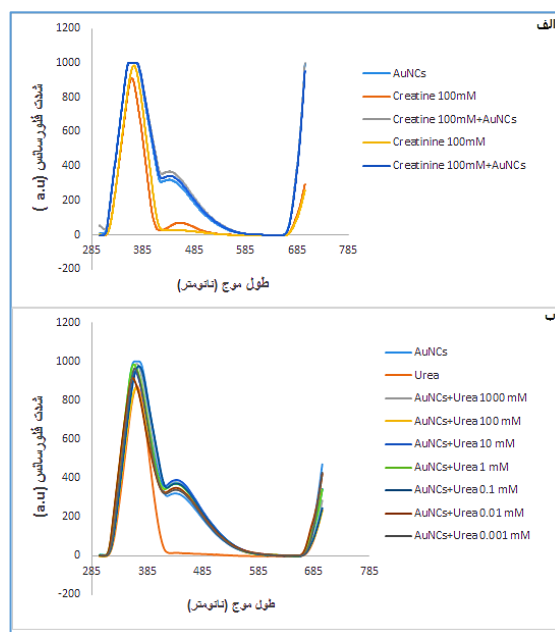
فعالیت آنزیمی موجب افزایش پایداری سیستم، کاهش احتمال بروز واکنش‌های جانبی، فراهم‌سازی بستری یکنواخت و کنترل‌شده برای تثبیت نانوکلاسترها می‌شود. همچنین، ساختار سه‌بعدی آنزیم حتی در حالت غیرفعال می‌تواند نقش کلیدی در جهت‌دهی و سازمان‌دهی کلاسترها ایفا کند، بدون آن‌که عملکرد نهایی سیستم تحت تأثیر فعالیت زیستی قرار گیرد. نانوخوشه‌های طلا به‌عنوان کاتالیزور در واکنش پراکسیداسیون با TMB مورد بررسی قرار گرفتند؛ علاوه بر این، نمک تریس به‌عنوان یک بازدارنده در فعالیت پراکسیداسیون نانوخوشه‌های طلا عمل کرد و حذف آن باعث بهبود فعالیت پراکسیدازی شد. نتایج نشان دادند که نانوخوشه‌های طلا سرعت واکنش پراکسیداسیون را افزایش داده و تغییر رنگ از بی‌رنگ به آبی را ایجاد می‌کنند. غلظت بهینه TMB، ۱۰ میلی‌مولار و حجم ۲۰ میکرولیتر و برای H_2O_2 ، غلظت ۰/۱ مولار و حجم ۲ میکرولیتر تعیین شدند. نانوخوشه‌های طلا در حضور آنالیت‌های کراتین، کراتینین و اوره پایدار بودند و این آنالیت‌ها تأثیری بر شدت فلورسانس نداشتند. با توجه به پایداری و خواص کاتالیزوری، نانوخوشه‌های طلا پتانسیل بالایی در کاربردهای تشخیصی و بالینی دارند.

کائورو ریکی‌تاکه^۱ و همکاران مقدار Km آنزیم کراتینیناز از سویه *Pseudomonas putida* را برای سوبسترای کراتین ۰/۱۳ مولار گزارش کردند (۳). الکس کاپلان^۲ و همکاران مقدار Km این آنزیم را ۰/۱۲۵ مولار گزارش کردند (۲۹). مقدار Km به‌دست‌آمده آنزیم در این مطالعه، برابر با ۰/۰۸۸۲ مولار است که کمتر از مقدار گزارش‌شده می‌باشد. این کاهش نشان‌دهنده تمایل بیشتر آنزیم به سوبستراست، زیرا غلظت کمتری از سوبسترا برای رسیدن به نصف حداکثر سرعت واکنش (V_{max}) نیاز است. بهبود اتصال آنزیم به سوبسترا می‌تواند کارایی بالاتر آن را در این مطالعه نسبت به مطالعه بیان‌شده نشان دهد.

۵ | نتیجه‌گیری

در این مطالعه، نانوخوشه‌های طلا بر پایه آنزیم کراتینیناز سنتز شدند که در زیر نور فرابنفش خاصیت فلورسانس سبز از خود

بالای ساختار نانوخوشه‌های طلا در برابر این ترکیب‌ها باشد. طلا، به‌عنوان یک ماده با خواص کاتالیزوری ویژه در نانومواد، معمولاً در برابر ترکیب‌های بیولوژیکی مقاوم است و تغییرهای فیزیک‌وشیمیایی آن در شرایط آزمایشگاهی معمولی محدود است. این موضوع می‌تواند یک مزیت مهم در کاربردهای تشخیصی به‌شمار آید، زیرا نانوخوشه‌های طلا قادر خواهند بود که بدون تغییر چشمگیر در ویژگی‌های فلورسانس خود، در محیط‌های بیولوژیکی مختلف به‌کار گرفته شوند.



شکل ۵- الف) شدت نشر فلورسانس نانوخوشه‌های طلا در حضور غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار کراتین و کراتینین. ب) شدت نشر فلورسانس نانوخوشه‌های طلا در حضورهای مختلف اوره.

۴ | بحث

در این مطالعه، نمودارهای میکائیلیس-منتن و لینیپور-برک رفتار سینتیکی آنزیم کراتینیناز را نشان دادند و مقادیر V_{max} و Km آن به ترتیب ۰/۰۸۸۲ مولار و $u.ml^{-1}$ ۲۴/۵ محاسبه شد. با این حال آنزیم کراتینیناز بعد از سنتز در این شرایط فعالیت کاتالیتیکی از خود نشان نداد. در این مطالعه، از آنزیم کراتینیناز به‌عنوان داربست زیستی برای سنتز کلاسترهای (خوشه‌ها) طلا استفاده شده است. اگرچه این آنزیم پیش از فرایند سنتز دارای فعالیت زیستی بوده، اما به دلیل شرایط خاص دما و pH در طول سنتز، فعالیت آنزیمی خود را از دست داده است. با این حال، استفاده از آنزیم کراتینیناز فاقد فعالیت ساختار نهایی دارای اهمیت قابل توجهی است؛ زیرا حذف

¹ Kaoru Rikitake

² Alex Kaplan

۶ | ملاحظات اخلاقی

این پژوهش بر پایه استفاده از آنزیم نوترکیبِ خالص سازی شده استوار بوده و به دلیل عدم استفاده از نمونه‌های انسانی یا حیوانی، ملاحظات اخلاقی ویژه‌ای متوجه آن نیست.

۷ | تشکر و قدردانی

بدین وسیله، از تمامی حامیان و راهنمایانی که در نگارش این مقاله یاری رساندند، صمیمانه قدردانی می‌گردد. پشتیبانی مالی این پژوهش نیز توسط شرکت نوراژن پیشرو تأمین گردیده است که مراتب سپاس از ایشان ابراز می‌گردد.

۸ | تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که تعارض منافی وجود ندارند.

۹ | سهم نویسندگان

سامان حسینخانی: ارائه موضوع پژوهش، تأمین بخشی از مواد و امکانات آزمایشگاهی، نظارت علمی بر اجرای پژوهش، و ویرایش علمی مقاله.

هانیه جعفری: بررسی و اصلاح نهایی مقاله، نظارت بر روند پژوهش، و تأیید نسخه نهایی.

مرتیضی حسینی: مشارکت در ایده پردازی پژوهش، ارائه برخی مواد/ماده اولیه مورد نیاز و بازبینی نهایی متن.

فاطمه عراقی: انجام آزمایش‌ها، سنتز نانوخوشه‌های طلا، بررسی فعالیت شبه‌پراکسیدازی، جمع‌آوری و تحلیل داده‌ها، و نگارش اولیه مقاله.

۱۰ | کد اخلاق

ندارد.

ساطع می‌کنند. یافته‌های پژوهش نشان می‌دهند که آنزیم کراتینیناز پیش از فرایند سنتز، فعالیت آنزیمی بالایی از خود نشان می‌دهد، اما پس از سنتز نانوخوشه‌ها، به‌ویژه به دلیل شرایط دمایی و pH قلیایی در حین سنتز، فعالیت آنزیمی نانوخوشه‌ها کاهش چشمگیری می‌یابد. این افت فعالیت آنزیمی نشان‌دهنده حساسیت نانوخوشه‌ها به شرایط محیطی مختلف است که در فرایند سنتز تأثیرگذار هستند. آنزیم کراتینیناز قادر است واکنش برگشت‌پذیر تبدیل کراتینین به کراتین را کاتالیز کند که این ویژگی آن را به یکی از آنزیم‌های مهم در ارزیابی بالینی محتویات کراتینین در سرم و ادرار انسان تبدیل می‌کند. با توجه به این کاربردهای بالینی مهم، این پژوهش به‌طور خاص به بررسی تأثیرهای مختلف آنالیت‌ها مانند کراتین، کراتینین و اوره بر فعالیت نانوخوشه‌های طلا پرداخته است. نتایج نشان دادند که تغییرهای غلظتی این آنالیت‌ها تأثیری بر شدت نشر فلورسانس نانوخوشه‌های طلا نداشته و خاصیت پراکسیدازی نانوخوشه‌ها تحت تأثیر این تغییرها قرار نمی‌گیرد. در عین حال، این پژوهش به نقش تریس موجود در بستر نانوخوشه‌ها اشاره دارد. نتایج نشان دادند که تریس دارای خاصیت کاتالازی است که با دیالیز و حذف آن، فعالیت پراکسیدازی نانوخوشه‌ها مجدداً فعال می‌شود. این موضوع بر اهمیت دقت در انتخاب بسترهای مورد استفاده در سنتز نانوخوشه‌ها و تأثیر آن‌ها بر ویژگی‌های کاتالیزوری نانوخوشه‌ها تأکید دارد. با توجه به یافته‌های این مطالعه، استفاده از نانوخوشه‌های طلا به‌عنوان آنزیم‌های مصنوعی در کاربردهای بیوتکنولوژی و پزشکی، به‌ویژه در تشخیص و ارزیابی ترکیب‌های بالینی، می‌تواند چشم‌اندازهای جدیدی را در زمینه درمان و تشخیص بیماری‌ها فراهم کند. همچنین، این پژوهش به‌طور غیرمستقیم به پتانسیل استفاده از نانوخوشه‌های طلا در واکنش‌های کاتالیزوری و شبه‌پراکسیدازی نیز اشاره دارد. برای بهبود پایداری نانوخوشه‌های طلا در برابر تغییرهای محیطی پیشنهاد می‌شود که روش‌های بهینه‌سازی سنتز با هدف افزایش مقاومت نانوخوشه‌ها نسبت به تغییرهای pH و دما مدنظر قرار گیرد. این کار می‌تواند شامل استفاده از بافرهای مناسب و همچنین انتخاب مواد اولیه‌ای باشد که توانایی حفظ عملکرد کاتالیزوری نانوخوشه‌ها را در شرایط متغیر فراهم نمایند. بنابراین در پژوهش‌های آینده باید بر بهینه‌سازی سنتز و کاربردهای بالینی این نانوخوشه‌ها تمرکز شود.

| Extended Abstract

Peroxidases are vital enzymes that play key roles in a wide range of biochemical processes. However, their broad application is limited by the high cost of purification and their instability under various conditions. In this study, the synthesis of gold nanoclusters and the optimization of the reaction conditions were investigated, including the concentration and volume of the substrate used in the peroxidase reaction, as well as the effect of an inhibitor on the reaction process. Gold nanoclusters based on the creatininase (Crn-AuNCs) were synthesized using a modified protocol. To characterize the enzymatic activity, the kinetics of creatininase were analyzed for the determination of K_m and V_{max} values. In addition, the optimal concentrations of 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide (H_2O_2) were optimized via UV-Vis spectrophotometry. In this study, (Crn-AuNCs) were synthesized, yielding K_m and V_{max} values of 0.0882 M and 24.5 $u.ml^{-1}$, respectively. The gold nanoclusters exhibited peroxidase-mimicking activity, effectively catalyzing peroxidation reactions with TMB and H_2O_2 . The optimal concentrations and corresponding volumes of TMB and H_2O_2 were determined to be 10 mM (20 μL) and 0.1 M (2 μL), respectively, under the selected experimental conditions. This study aimed at the successful synthesis of creatininase-based gold nanoclusters (Crn-AuNCs), which exhibit a characteristic green fluorescence emission. Experimental results demonstrated that the enzymatic activity of creatininase was significantly diminished under conditions of elevated temperature and alkaline pH. Probing the peroxidase-mimicking activity of the nanoclusters demonstrated that the presence of Tris during the synthesis process exerted a significant inhibitory effect on their pseudo-enzymatic performance. Furthermore, the fluorescence intensity of the synthesized nanoclusters remained unaffected by changes in the concentrations of creatine, creatinine, and urea, demonstrating no significant interference from these analytes. Overall, these findings highlight the potential applications of creatininase-based gold nanoclusters in biotechnology, particularly in the development of advanced biosensors.

| Keywords

Creatininase Enzyme, Gold Nanoclusters, Peroxidase Mimicking Activity, Colorimetric Detection.

1. Tsuru D, Oka I, Yoshimoto T. Creatinine decomposing enzymes in *Pseudomonas putida*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1976;40(5):1011-8.
2. Holm L, Sander C. An evolutionary treasure: unification of a broad set of amidohydrolases related to urease. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 1997;28(1):72-82.
3. Rikitake K, OKA I, ANDO M, YOSHIMOTO T, TSURU D. Creatinine amidohydrolase (creatininase) from *Pseudomonas putida*: ePurification and some properties. *The Journal of Biochemistry*. 1979;86(4):1109-17.
4. Ito K, Kanada N, Inoue T, Furukawa K, Yamashita K, Tanaka N, et al. Preliminary crystallographic studies of the creatinine amidohydrolase from *Pseudomonas putida*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2002;58(12):2180-1.
5. Yoshimoto T, Tanaka N, Kanada N, Inoue T, Nakajima Y, Haratake M, et al. Crystal structures of creatininase reveal the substrate binding site and provide an insight into the catalytic mechanism. *Journal of molecular biology*. 2004;337(2):399-416.
6. Fitch CD, Sinton DW. A study of creatine metabolism in diseases causing muscle wasting. *The Journal of clinical investigation*. 1964;43(3):444-52.
7. Lin Y, Ren J, Qu X. Catalytically active nanomaterials: a promising candidate for artificial enzymes. *Accounts of chemical research*. 2014;47(4):1097-105.
8. Long YJ, Li YF, Liu Y, Zheng JJ, Tang J, Huang CZ. Visual observation of the mercury-stimulated peroxidase mimetic activity of gold nanoparticles. *Chemical Communications*. 2011;47(43):11939-41.
9. Hu A-L, Liu Y-H, Deng H-H, Hong G-L, Liu A-L, Lin X-H, et al. fluorescent hydrogen peroxide sensor based on cupric oxide nanoparticles and its application for glucose and l-lactate detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014;61:374-8.
10. Clark RA. Peroxidases: A historical overview of Milestones in Research on Myeloperoxidase. The peroxidase multigene family of enzymes: biochemical basis and clinical applications. 2000:1-10.
11. Pandey VP, Awasthi M, Singh S, Tiwari S, Dwivedi UN. A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochem Anal Biochem*. 2017;6(1):308.
12. Jangi ARH, Jangi MRH, Jangi SRH. Detection mechanism and classification of design principles of peroxidase mimic based colorimetric sensors: A brief overview. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2020;28(6):1492-503.
13. Azevedo AM, Martins VC, Prazeres DM, Vojinovic V, Cabral JM, Fonseca LP. Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. *Biotechnology annual review*. 2003;9(3):1387-2656.
14. Somasundrum M, Kirtikara K, Tanticharoen M. Amperometric determination of hydrogen peroxide by direct and catalytic reduction at a copper electrode. *Analytica chimica acta*. 1996;319(1-2):59-70.
15. Bansal N, Kanwar SS. Peroxidase (s) in environment protection. *The Scientific World Journal*. 2013;2013(1):714639.
16. Mulchandani A, Rudolph DC. Amperometric determination of lipid hydroperoxides. *Analytical biochemistry*. 1995;225(2):277-82.
17. Schachner M, Ruberg M, Carnow T. Histological localization of nervous-system antigens in the cerebellum by immunoperoxidase labeling. *Brain research bulletin*. 1976;1(4):367-77.
18. Folkes LK, Greco O, Dachs GU, Stratford MR, Wardman P. 5-Fluoroindole-3-acetic acid: a prodrug activated by a peroxidase with potential for use in targeted cancer therapy. *Biochemical pharmacology*. 2002;63(2):265-72.
19. Huang Y, Ren J, Qu X. Nanozymes: classification, catalytic mechanisms, activity regulation, and applications. *Chemical reviews*. 2019;119(6):4357-412.
20. Liu L, Shi Y, Yang Y, Li M, Long Y, Huang Y, et al. Fluorescein as an artificial enzyme to mimic peroxidase. *Chemical Communications*. 2016;52(96):13912-5.
21. Liu X, Huang D, Lai C, Qin L, Zeng G, Xu P, et al. Peroxidase-like activity of smart nanomaterials and their advanced application in colorimetric glucose biosensors. *Small*. 2019;15(17):1900133.
22. Zhang B, Huan Y, Wang J, Wang W, Zhang Q, Zhang H. Synthesis of CeO₂ nanoparticles with different morphologies and their properties as peroxidase mimic. *Journal of the American Ceramic Society*. 2019;102(4):2218-27.
23. Wei H, Wang E. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. *Chemical Society Reviews*. 2013;42(14):6060-93.
24. Xie J, Zhang X, Wang H, Zheng H, Huang Y. Analytical and environmental applications of nanoparticles as enzyme mimetics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2012;39:114-29.
25. Chevrier DM, Chatt A, Zhang P. Properties and applications of protein-stabilized fluorescent gold nanoclusters: short review. *Journal of Nanophotonics*. 2012;6(1):064504-.
26. Yu Y, Luo Z, Teo CS, Tan YN, Xie J. Tailoring the protein conformation to synthesize different-sized gold nanoclusters. *Chemical Communications*. 2013;49(84):9740-2.
27. Zhu Y, Qian H, Jin R. Catalysis opportunities of atomically precise gold nanoclusters. *Journal of Materials Chemistry*. 2011;21(19):6793-9.
28. Xie J, Zheng Y, Ying JY. Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters. *Journal of the American Chemical Society*. 2009;131(3):888-9.
29. Kaplan A, Szabo LL. Creatinine hydrolase and creatine amidinohydrolase: II. Partial purification and properties. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1974;3:17-25.