ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2022;11(1):e15

Journal of Police Medicine

Original Article

OPEN ACCESS

Expression Optimization, Purification, and Fluorescence Spectroscopic Assessment of Creatinase Enzyme in the Presence of Gold Nanoparticles

Mehdi Abdollahzadeh Parsa[1] MSc, **Saman Hosseinkhani**[2] PhD, **Shirin Jalili**[3] PhD, **Fereshteh Rahmati**[1] PhD

[1] Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, North-Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[2] Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[3] Research Center for Life & Health Sciences & Biotechnology in the Police, Directorate of Health, Rescue & Treatment, Police Headquarter, Tehran, Iran.

ABSTRACT

AIMS: Nowadays, the use of laboratory methods based on enzymatic reactions to monitor the health of individuals, especially in the field of military forces, has become widespread. One of the enzymatic methods is the use of creatinase enzyme for clinical measurement of creatine and creatinine in body fluids, through which the health of kidneys, muscles, and thyroid gland can be understood. This study aimed to optimize the expression of the creatinase enzyme and to investigate the effect of gold nanoparticles on the stability of the creatinase enzyme.

MATERIALS & METHODS: This research was conducted in the spring and summer of 2021 in the electrochemical institute located at the University of Tehran, Iran. In this study, E. coli BL21 containing pET28a amplification vector was cultured in TB medium and then induced at 18, 22, 28, 32, and 37°C. After sonication, purification of enzymes was performed by affinity chromatography. After confirmation of expression by SDS-PAGE, the concentrations of enzymes expressed at different induction temperatures were measured and compared by the Bradford method. Then the activity of enzymes was evaluated and compared by the colorimetric method. Finally, the effect of gold nanoparticles on the structure of the creatinase enzyme was investigated by fluorescence spectroscopy.

FINDINGS: Examination of creatinase expression at different temperatures in the TB medium showed that at 28°C the highest amount of enzyme with the highest activity was obtained. On the other hand, fluorescence spectroscopy of creatinase enzyme with the presence and absence of gold nanoparticles at excitation wavelength of 295 nm showed a decrease in fluorescence intensity in the presence of gold nanoparticles.

CONCLUSION: The induction temperature of 28°C in the TB medium provides a more active and more concentrated enzyme. Also, the presence of gold nanoparticles reduced the fluorescence intensity of the creatinase enzyme, which could indicate a change in the fluorescent amino acid microenvironment of the creatinase enzyme structure.

KEYWORD: Creatinase; Enzymes; Purification; Gold; Nanoparticles; Fluorescence Spectroscopy

How to cite this article:

Abdollahzadeh Parsa M, Hosseinkhani S, Jalili S, Rahmati F. *Expression Optimization, Purification, and Fluorescence Spectroscopic Assessment of Creatinase Enzyme in the Presence of Gold Nanoparticles.* J Police Med. 2022;11(1):e15

***Correspondence:**

Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, North-Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
Postal code: 1651153311
Tel: -
Mail: f.rahmati@iau-tnb.ac.ir

Article History:

Received: 07/01/2021
Accepted: 05/02/2021
ePublished: 13/04/2022

Copyright © 2022, Journal of Police Medicine | This open access article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

Introduction

... [1]. Nowadays, the use of laboratory methods and kits based on enzymatic reactions to monitor the health of individuals, especially in the field of military forces, has become widespread. The use of the creatinase enzyme is one of the enzymatic methods for the clinical assay of creatine and creatinine in body fluids [2]. The use of recombinant proteins and enzymes in scientific research has increased. Molecular cloning of DNA is one way to produce recombinant proteins into bacterial chromosomal DNA. Today, this technology is used to produce recombinant proteins in clinical and industrial research [3]. ... [4]. One of these enzymes is creatinase (creatine aminohydrolase) [5]. Due to the role of creatine in increasing the synthesis of adenosine triphosphate (ATP) and its equilibrium reaction with creatinine, this enzyme is an important indicator for measuring the health of the kidneys as well as muscles. Therefore, measuring the level of creatine and creatinine in blood serum and urine can indicate the function of the kidneys and muscles [6]. Pseudomonas putida is one of the bacteria that produce this enzyme. Genetic engineering is used for the mass production of this enzyme [7]. ... [8-12]. Due to the instability of the enzyme produced, it is necessary to use a method to stabilize the enzyme. Various methods are used to stabilize enzymes, including the addition of nanoparticles [13]. ... [14-16]. In 2012, *Yadav et al*. investigated the effect of iron oxide and chitosan nanoparticles on keratinase stability [17]. Also in 2017, *Afshari et al*. examined the activity and expression of the keratinase enzyme in a liquid LB growth medium at different expression temperatures [18].

Aim (s)

This study aimed to optimize the induction temperature for mass production of more active keratinase enzyme and also to investigate the effect of gold nanoparticle stability on the structure of keratinase enzyme for use in serum and urinary creatinine and creatinine kits for faster and more accurate diagnosis of kidney and muscle diseases.

Research Society, Place, And Time

This research was conducted in the spring and summer of 2021 in the Electrochemical Institute at the University of Tehran, Iran.

Used Devices & Materials

The materials used were growth medium (Merck), IPTG (Fermentas), kanamycin (Duchefa), SDS-PAGE (Merk), BSA (Merck), Ni-NTA Sepharose (QIAGEN), and buffer (Merck). To use the enzyme creatinase to measure creatine and creatinine in body fluids enzymatically, it is necessary to express the enzymes highly and purify them. For this purpose, E. coli strain BL21 (expression vector pET28a containing Pseudomonas putida creatinase gene has been transformed) was first cultured in a liquid TB medium. After induction of the gene of the enzyme for its high expression (Over Expression), the bacterial cell wall was destroyed by a sonicator (20s sonike and 40s rest up to 15 pulses). To purify the enzyme, the affinity chromatography method (using a nickel-Sepharz column) was used. The expressed recombinant enzymes have a histidine sequence (*His6-tag*) at the amine end (N-*Terminal*). This histidine sequence has a strong affinity for nickel and interacts strongly with it. Finally, to separate the proteins attached to the column, (*Elution Buffe*r) containing 300 *mM NaCl*, Imidazole 250 *mM, Tris / HCl 50 mM with pH=8* was used. Then, *SDS-PAGE* electrophoresis was used to confirm the presence and purity of the samples, and finally, the Bradford method was used to measure the protein concentration. The concentration of enzyme samples was determined by drawing a standard curve using *BSA* protein and Bradford assay [19]. To determine the optimum temperature for enzyme expression, *E. coli* containing *pET28a* vector in which the keratinase gene was cloned and was cultured overnight in TB medium, and then expression induction was performed at ,22 ,18 32 ,28, and °37C. After purifying and measuring the concentration of proteins, the results were compared and the optimal induction temperature was determined. The colorimetric method (Sigma-Aldrich) was used to evaluate the enzyme activity. For this purpose, the keratinase enzyme expressed at different temperatures was incubated with creatine solution in PBS as a substrate at °37C for 5 minutes, and then concentrated dimethyl amino benzaldehyde and HCL were added and after 20 minutes incubated at room temperature, its absorption at 435 nanometers was read. With the help of adsorption, the activity of expressed enzymes at different temperatures was calculated and compared. Fluorescence spectroscopy was used to evaluate the structure of the protein. Since keratinase contains the amino acid tryptophan and this aromatic amino acid has the highest absorption, the excitation wavelength of 295 nm was used in this test to stimulate only the amino acid tryptophan and the resulting fluorescence spectrum was related to the tryptophan position in creatinase enzyme. Concentrations of 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 and 0.2 nM gold nanoparticles were used to investigate the effect of gold nanoparticles on the structure of keratinase enzyme. After 5-minute incubating

each concentration of gold nanoparticles with keratinase enzyme, the fluorescence spectrum of each was plotted at the excitation wavelength of 295 nm, and finally, the fluorescence spectra obtained in the presence and absence of gold nanoparticles were compared.

Finding by Text

After culturing the bacteria and inducing the expression of keratinase gene for its over-expression at 18, 22, 28, 32, and 37°C, purification of enzymes by inclination chromatography (using nickel Sepharz column) and confirmation of the presence and purity of proteins were determined using SDS-PAGE electrophoresis technique and the concentration of proteins was determined by Bradford method. By comparing the concentrations of purified proteins, the optimal induction temperature was determined. The results of measuring the concentration of proteins showed that the highest protein content was at the induction temperature of 28°C lasted for 16 hours (Table 1).

Table 1) Protein concentrations at different induction temperatures (volume of each vial collected is 1 ml)

Temperature induced protein expression (ºC)	Protein concentration in vials collected from purification (mg/ml)						
	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	E_6	E_7
18	1.37	1.16	0.93	0.74	0.48	0.26	0.18
22	1.53	1.28	1.05	0.85	0.54	0.38	0.25
28	2.13	1.98	1.78	1.53	0.82	0.76	0.64
32	1.92	1.73	1.48	1.11	0.68	0.49	0.32
37	2.04	1.85	1.68	1.25	0.73	0.57	0.38

Then, the structural study of the keratinase enzyme was performed by fluorescence spectroscopy in the presence and absence of gold nanoparticles and the effect of gold nanoparticles on the structure of the keratinase enzyme was determined. The activity of expressed enzymes was calculated at induction temperatures of 18, 22, 28, 32, and 37 under equal conditions. The results showed that the induction enzyme was more active at 28°C for 16 hours (Table 2).

Table 2) Creatinase activity at different induction temperatures

Temperature induced protein expression(ºC)	18	22	28	32	37
Absorption at 435 nm (dilution 1.2)	0.623	0.665	0.758	0.736	0.683
Creatinase Enzyme activity	11.64 U/ml	12.42 U/ml	14.17 U/ml	13.27 U/ml	12.76 U/ml

The emitted fluorescence spectrum of keratinase enzyme resulting from excitation at 295 nm was performed by Perkin Elmer Ls 45 spectroscopy fluorescence device with quartz cuvette with a diameter of 1 cm, the resulting fluorescence replication diagram is shown in Figure 1.

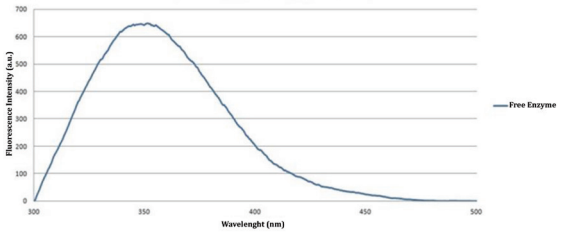


Figure 1) Fluorescence spectrum of Ceratinase enzyme at excitation wavelength (295 nm)

The graph obtained from the effect of gold nanoparticles on the structure of the keratinase enzyme showed that with increasing the concentration of gold nanoparticles, the fluorescence intensity decreased. Figure 2 shows the fluorescence spectrum of the keratinase enzyme with different concentrations of gold nanoparticles.

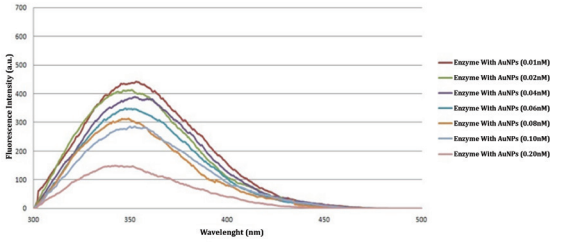


Figure 2) Fluorescence spectrum of Ceratinase enzyme at the excitation wavelength (295 nm)

To compare the fluorescence spectroscopy of keratinase enzyme in the presence and absence of gold nanoparticles, a diagram of the emission spectrum in the presence and absence of gold nanoparticles was drawn. This diagram showed that the fluorescence intensity decreased in the presence of gold nanoparticles, which decreased further with the increasing concentration of gold nanoparticles (Figure 3).

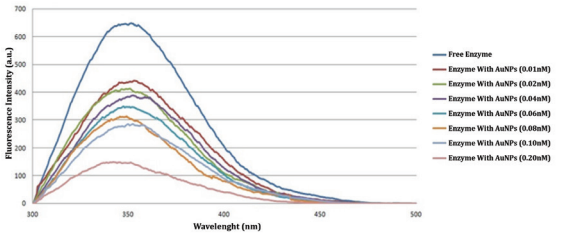


Figure 3) Fluorescence spectrum of Ceratinase enzyme at the excitation wavelength (295 nm) in the presence and absence of AuNPs

Main Comparison to the Similar Studies

The results of this study showed better expression and higher activity of the keratinase enzyme at an induction temperature of 28 ° C for 16 hours in a liquid TB medium. Compared to previous studies on the expression of keratinase enzyme in liquid LB medium and similar temperature conditions [18], the enzyme expressed in this study showed a higher concentration and higher activity, which indicates a more favorable expression of keratinase rather than previous methods. ... [19, 20]. In the past, studies have been performed to stabilize the enzyme keratinase such as evolvement of single, pair, and triple random mutations on the enzyme keratinase in which the triple mutations created caused relative stability of the enzyme but had an adverse effect on enzyme activity [21]. In another study, the effect of silver ions on the keratinase enzyme was investigated, which indicates inhibition of keratinase activity [22]. Another study investigated the effect of iron oxide and chitosan nanoparticles on the keratinase enzyme, which caused relative stability in the structure and activity of the enzyme [23]. The results of this study showed a decrease in the intensity of fluorescence in the presence of gold nanoparticles, and with increasing the concentration of gold nanoparticles, a greater decrease in fluorescence intensity was seen. This may indicate a change in the fluorescent amino acid microenvironment in the structure of the enzyme keratinase. As a result, the use of gold nanoparticles to stabilize the enzyme keratinase does not seem to be a good option.

Limitations

There was a time limit to evaluate the activity and structure of this enzyme due to the instability of the keratinase enzyme. Therefore, in this study, the activity and structure of the enzyme were investigated immediately after its purification of the enzyme.

Suggestions

Considering the results of the effect of gold nanoparticles on the keratinase enzyme, other methods for stabilization of keratinase enzyme are proposed, including study on the effect of inhibitors and activators on the keratinase enzyme, targeted mutations in enzyme sequence and evaluation of enzyme stability and activity, consideration of enzyme stability versus various other factors as well as examining the crystallographic structure of the enzyme keratinase for a better understanding of the enzyme and selecting a better option for enzyme stabilization for commercial use.

Conclusions

The results of this study showed that in the culture of E. coli BL21 containing pET28a amplification vector in liquid TB medium and its induction at 28 ° C for 16 hours, the keratinase enzyme was more active with higher expression for use in creatine and creatinine assessment kits. Further study of the effect of gold nanoparticles on the structure of the keratinase enzyme has shown that due to the possibility of changes in the fluorescent amino acid microenvironment in the structure of the keratinase enzyme in the presence of gold nanoparticles, these compounds are not a good option for keratinase enzyme stability. Therefore, the use of other methods and compounds to stabilize the creatinase enzyme is recommended for use in commercial creatine and creatinine assay kits.

Clinical & Practical Tips in Police Medicine

The use of accurate and rapid creatine and creatinine measurement kits in military laboratories can monitor the health of military personnel as well as future employees in this field.

Acknowledgments

This article is taken from the Ph.D. thesis in Health Psychology, Islamic Azad University, Central Tehran Branch, code 10120709981008. We sincerely thank all the people who helped us in this research.

Conflict of Interest

The authors state that there is no conflict of interest in the present study.

Funding Sources

The present study had no financial support.

ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2022;11(1):e15

مجله طب انتظامی

مقاله اصیل

دسترسی آزاد

بهینه‌سازی بیان، تخلیص و ارزیابی طیف سنجی فلوئورسانس آنزیم کراتیناز در حضور نانوذرات طلا

مهدی عبداله زاده پارسا[۱] MSc، سامان حسینخانی[۲] PhD، شیرین جلیلی[۳] PhD، فرشته رحمتی[۱] PhD

[۱] گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

[۲] گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

[۳] مرکز تحقیقات علوم و فناوری‌های زیستی و سلامت در پلیس، معاونت بهداشت، امداد و درمان، فرماندهی انتظامی، تهران، ایران.

چکیده

اهداف: امروزه استفاده از روش‌های بر پایه واکنش‌های آنزیمی با هدف پایش سلامت افراد به خصوص در حوزه نیروهای نظامی و انتظامی رواج گسترده‌ای یافته است. یکی از روش‌های آنزیماتیک، استفاده از آنزیم کراتیناز برای سنجش کراتین و کراتینین در مایعات جهت بررسی سلامت کلیه‌ها، عضلات و غده تیروئید است. هدف این تحقیق بهینه‌سازی بیان آنزیم کراتیناز و بررسی اثر نانوذرات طلا بر پایداری آنزیم کراتیناز بود.

مواد و روش‌ها: این پژوهش در بهار و تابستان سال ۱۴۰۰ در مؤسسه الکتروشیمی واقع در دانشگاه تهران انجام شد. در این مطالعه ابتدا باکتری *E.Coli BL21* حاوی وکتور تکثیری *pET28a* در محیط TB کشت شد سپس در دماهای ۱۸، ۲۲، ۲۸، ۳۲ و ۳۷ درجه القا گردید. در ادامه پس از سونیکاسیون، تخلیص آنزیم‌ها با کروماتوگرافی تمایلی انجام شد. پس از تأیید بیان با SDS-PAGE، غلظت آنزیم‌های بیان‌شده در دماهای القای متفاوت با روش برادفورد اندازه‌گیری و مقایسه شد. در ادامه فعالیت آنزیم‌ها با روش رنگ‌سنجی بررسی و مقایسه گردید. نهایتاً با روش طیف‌سنجی فلورسانس، اثر نانوذرات طلا بر ساختار آنزیم کراتیناز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی میزان بیان آنزیم کراتیناز در دماهای مختلف در محیط کشت TB نشان داد که در دمای ۲۸ درجه، بیشترین مقدار آنزیم با بالاترین میزان فعالیت حاصل شد. از طرفی طیف‌سنجی فلورسانس آنزیم کراتیناز در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا در طول موج تهییج ۲۹۵ نانومتر، کاهش شدت فلورسانس در حضور نانوذرات طلا را نشان داد.

نتیجه‌گیری: القای بیان در ۲۸ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت TB، آنزیمی فعال‌تر و غلیظ‌تر ارائه می‌دهد. همچنین نانوذرات طلا باعث کاهش شدت فلورسانس آنزیم شد که می‌تواند نشانگر تغییر در ریزمحیط آمینواسید فلورسانت در ساختار آنزیم کراتیناز باشد.

کلیدواژه‌ها: کراتیناز، آنزیم، تخلیص، طلا، نانوذرات، طیف‌سنجی فلورسانس

نحوه استناد به این مقاله:

Abdollahzadeh Parsa M, Hosseinkhani S, Jalili S, Rahmati F. *Expression Optimization, Purification, and Fluorescence Spectroscopic Assessment of Creatinase Enzyme in the Presence of Gold Nanoparticles.* J Police Med. 2022;11(1):e15

نویسنده مسئول*:

آدرس پستی: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی

کد پستی: ۱۶۵۱۱۵۳۳۱۱

تلفن: -

پست الکترونیک: f.rahmati@iau-tnb.ac.ir

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۷

پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۶

چاپ: ۱۴۰۱/۰۱/۲۴

Copyright © 2022, Journal of Police Medicine | This open access article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

مقدمه

نیروی انسانی ارزشمندترین سرمایه نظامی و از پایه‌های اساسی سازمان‌های نظامی و انتظامی هر کشور، از جمله ایران، محسوب می‌شود. موفقیت یا عدم موفقیت در مأموریت‌ها علاوه بر تسلیحات و تکنولوژی‌های گران‌قیمت به سلامت جسمی و روانی و میزان آمادگی جسمانی نیروها بستگی دارد. سلامت نیروهای عملیاتی نظامی و انتظامی با توجه به ماهیت کاری آنها، همواره از دغدغه‌های حوزه بهداشت و درمان به شمار می‌آید. لذا پایش سلامت جسمانی و آمادگی بدنی نیروهای عملیاتی فعال انتظامی ازجمله یگان‌های ویژه، نیروهای حفاظت از شخصیت‌ها و غیره، به لحاظ مأموریت‌های عملیاتی ویژه‌ای که دارند از حیث سلامت و توده بافت عضلانی، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بررسی سلامت و آمادگی این افراد و از طرف دیگر، متمایز ساختن این نیروها از افراد عادی جامعه و درنهایت جذب افراد کارآمد، نیازمند تکنیک‌های جدید و به روز پزشکی است، تا با گزینش دقیق افراد با سلامت بدنی بالا و همچنین پایش مداوم سلامت این افراد، پلیس را قادر سازد مأموریت‌های عملیاتی محوله را با توفیق حداکثری انجام دهند [۱].

امروزه استفاده از روش‌ها و کیت‌های آزمایشگاهی بر پایه واکنش‌های آنزیمی با هدف پایش سلامت افراد به خصوص در حوزه نیروهای نظامی و انتظامی رواج گسترده‌ای یافته است. یکی از روش‌های آنزیماتیک، استفاده از آنزیم کراتیناز به جهت سنجش بالینی کراتین و کراتینین در مایعات بدن است [۲]. در سال‌های اخیر، استفاده از پروتئین‌ها و آنزیم‌های نوترکیب در تحقیقات علمی افزایش یافته است. یکی از روش‌های تولید پروتئین نوترکیب، همسانه‌سازی مولکولی DNA خارجی، به درون DNA کروموزومی باکتریایی است. از این تکنولوژی، امروزه برای تولید پروتئین‌های نوترکیب درتحقیقات بالینی و صنعتی استفاده می‌شود [۳]. آنزیم‌های میکروبی از لحاظ اقتصادی، با داشتن مراحل تهیه کشت میکروبی ساده‌تر، سریع‌تر و ارزان‌تر نسبت به آنزیم های تولیدشده توسط حیوانات و گیاهان، مناسب‌تر هستند. از طرفی میکروارگانیسم‌های مولد آنها، به سادگی می‌توانند از لحاظ ژنتیکی، برای تولید هرچه بیشتر و در جهت بهبود کمیت و کیفیت مورد نظر محصولات، دستکاری شوند [٤]. یکی از این آنزیم‌ها، آنزیم کراتیناز (کراتین آمیدینوهیدرولاز) است که پروتئینی هومودایمر با وزن مولکولی تقریبی ۹۷ کیلودالتون است و باعث تسریع هیدرولیز کراتین به اوره و سارکوزین می‌شود [۵]. آنزیم کراتیناز برای اولین بار توسط *Roche* و همکارانش در سال ۱۹۵۰ کشف شد. این آنزیم در بسیاری از باکتری‌ها ازجمله سودوموناس‌ها، آرتروباکترها، فلاووباکتریوم‌ها، باسیلوس‌ها، پاراکوکوس و آلکالیژنزها یافت می‌شود. این باکتری‌ها از این آنزیم جهت تجزیه میکروبی کراتین به عنوان منبع کربن و نیتروژن و درچرخه متابولیسم آرژنین و پرولین استفاده می‌کنند. از این آنزیم در پزشکی می‌توان برای سنجش بالینی کراتین و کراتینین استفاده نمود [۲].

با توجه به نقش کراتین در افزایش سنتز آدنوزین تری فسفات (ATP) و واکنش تعادلی آن با کراتینین، این آنزیم شاخص مهمی به جهت سنجش سلامت کلیه‌ها و همچنین عضلات است. بنابراین اندازه‌گیری میزان کراتین و کراتینین در سرم خون و ادرار، می‌تواند نشان‌دهنده عملکرد کلیه‌ها و عضلات باشد [۶]. ژن کدکننده این آنزیم در باکتری‌های اشاره‌شده 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 به صورت طبیعی مشکلات خاص خود را داشته و ممکن است باکتری تولیدکننده 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 به کمک مهندسی ژنتیک می‌توان ژن کراتیناز 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، ترانسفورم کرد [۷]. از طرفی با توجه به ناپایدار بودن آنزیم تولیدشده، لازم است از روشی برای پایدارسازی آنزیم استفاده کرد. به طور کلی برای پایدارسازی آنزیم‌ها از روش‌های مختلفی از جمله ایجاد پیوندهای عرضی درون مولکولی [۸]، متصل کردن پلیمرهای محلول در آب مانند پلی اتیلن گلیکول (PEG) [۹] و سایر پلیمرهای سازگار با زیست همچون کیتوزان [۱۰]، افزودن قندها و الکل‌های قندی مانند گلیسرول [۱۱]، استفاده از سورفاکتانت‌ها [۱۲]، جهش‌زایی تصادفی و مستقیم موضعی سایت [۱۳] و همچنین نانوذرات طلا پایدارترین ذرات فلزی هستند که با توجه به خصوصیات مختلفی چون شکل، سایز، ویژگی‌های نوری و مغناطیسی مشخصی که دارند، کاربردهای جذابی را ارائه می‌دهند [۱۴].

یکی از روش‌های بررسی ساختاری پروتئین‌ها، طیف‌سنجی فلورسانس است. به طوری که در صورت تابش نور مریی به یک مولکول یا ماده، باعث برانگیخته‌شدن آن مولکول به سطح بالاتری از انرژی شده و در هنگام بازگشت به حالت اولیه، مقداری از انرژی به صورت گرما آزاد شده و مابقی به صورت طیف فلورسانس گسیل می‌گردد که با کمک یک آشکارساز می‌توان آن را به صورت نمودار به نمایش در آورد [۱۵]. با توجه به وجود اسیدآمینه تریپتوفان در ساختار آنزیم کراتیناز و بالا بودن میزان جذب این اسیدآمینه و تأثیرگذاری بیشتر آن بر یافته‌های طیف‌سنجی فلورسانس (طبق منابع معتبر)، در صورت استفاده از طول موج تهییج ۲۹۵ نانومتر و بررسی طیف فلورسانس حاصل، می‌توان به وضعیت اسید آمینه تریپتوفان در پروتئین پی برد [۱۶]. بدین ترتیب می‌توان اثر نانوذرات طلا بر ساختار آنزیم کراتیناز را با مقایسه طیف‌سنجی فلورسانس در طول موج ۲۹۵ نانومتر در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا مورد بررسی قرار داد.

در سال ۲۰۱۲ *Yadav* و همکاران اثر نانوذرات اکسید آهن و کیتوزان بر پایداری آنزیم کراتیناز را بررسی کرده‌اند [۱۷]. همچنین در سال ۲۰۱۷ نیز *افشاری* و همکاران میزان فعالیت و بیان آنزیم کراتیناز در محیط کشت LB مایع در دماهای مختلف بیان را بررسی کرده‌اند [۱۸]. هدف از مطالعه حاضر بهینه‌سازی دمای القا جهت تولید انبوه آنزیم کراتیناز فعال‌تر و همچنین بررسی اثر پایداری نانوذرات طلا بر ساختار آنزیم کراتیناز برای

استفاده در کیت‌های تشخیصی سنجش میزان کراتین و کراتینین سرم و ادرار به جهت تشخیص سریع‌تر و دقیق‌تر بیماری‌های کلیوی و عضلانی بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش کاربردی در بهار و تابستان سال ۱۴۰۰ در مؤسسه الکتروشیمی واقع در دانشگاه تهران انجام شد. مواد مورد استفاده در محیط کشت (Merck)، IPTG (Fermentas)، کانامایسین (Duchefa)، مواد SDS-PAGE (Merck)، BSA (Merck)، ستون Ni-NTA Sepharose (QIAGEN) و مواد بافرها (Merck) بود.

بیان، تخلیص و سنجش غلظت پروتئین‌ها: به منظور استفاده از آنزیم کراتیناز جهت سنجش کراتین و کراتینین مایعات بدن به روش آنزیماتیک، نیاز به بیان بالای آنزیم‌ها و خالص‌سازی آنها است. با این هدف ابتدا باکتری E.*Coli* سویه *BL21*(وکتور بیانی *pET28a* حاوی ژن کراتیناز سودوموناس پوتیدا در آن ترانسفورم شده است) در محیط کشت TB مایع کشت گردید. پس از القای ژن آنزیم مورد نظر جهت بیان بالای آن (Over Expression)، به کمک دستگاه سونیکاتور (20s سونیکه و 40s استراحت تا ۱۵ پالس) دیواره سلول باکتری تخریب گردید. به منظور تخلیص آنزیم از روش کروماتوگرافی تمایلی (به کمک ستون نیکل-سفارز) استفاده شد. آنزیم های نوترکیب بیان‌شده 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 آخر برای جداسازی پروتئین‌های متصل به ستون، از بافر جداکننده (Elution Buffer) حاوی NaCl 300mM، Imidazole 250mM، Tris/Hcl 50mM با PH=8 استفاده شد. در ادامه برای حصول اطمینان و تأیید حضور و خلوص نمونه‌ها از روش الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد و درنهایت برای سنجش غلظت پروتئین‌ها از روش برادفورد استفاده گردید. با رسم منحنی استاندارد به کمک پروتئین BSA و معرف برادفورد، غلظت نمونه‌های آنزیمی مشخص گردید [۱۹].

بررسی دمای بهینه برای بیان آنزیم: به منظور تعیین دمای بهینه بیان آنزیم، ابتدا باکتری *E.Coli* حاوی وکتور *pET28a* که ژن کراتیناز در آن کلون شد، در محیط کشت TB مایع کشت شبانه شد و سپس القای بیان در دماهای ۱۸، ۲۲، ۲۸،۳۲ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد و پس از تخلیص و سنجش غلظت پروتئین‌ها، نتایج حاصل‌شده مقایسه و دمای القای بهینه تعیین شد.

بررسی فعالیت آنزیم با روش رنگ‌سنجی: برای بررسی فعالیت آنزیم از روش رنگ‌سنجی (سیگما-الدریچ) استفاده گردید. بدین منظور آنزیم کراتیناز حاصل از بیان در دماهای القا متفاوت با محلول کراتین در PBS به عنوان سوبسترا در ۳۷ درجه به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد و سپس دی‌متیل‌آمینوبنزالدهید و HCL غلیظ اضافه شد و پس از ۲۰ دقیقه انکوبه در دمای اتاق، جذب آن در ۴۳۵ نانومتر خوانش گردید. با کمک میزان جذب، فعالیت آنزیم های حاصل از بیان در دماهای مختلف محاسبه و مقایسه گردید.

بررسی ساختاری پروتئین نوترکیب با روش طیف‌سنجی فلورسانس: به منظور بررسی ساختاری پروتئین از روش طیف‌سنجی فلورسانس استفاده شد. با توجه به اینکه آنزیم کراتیناز حاوی اسیدآمینه تریپتوفان است و این اسیدآمینه آروماتیک بالاترین میزان جذب را دارد، بدین منظور طول موج برانگیختگی ۲۹۵ نانومتر در این آزمون مورد استفاده قرار گرفت تا فقط اسیدآمینه تریپتوفان تحریک شود و طیف فلورسانس حاصل‌شده مربوط به موقعیت تریپتوفان در آنزیم کراتیناز بود.

بررسی اثر نانوذرات طلا بر ساختار آنزیم کراتیناز: برای بررسی اثر نانوذرات طلا بر ساختار آنزیم کراتیناز از غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۶، ۰/۰۸، ۰/۱ و ۰/۲ نانومولار نانوذرات طلا استفاده گردید. پس از انکوبه کردن هر غلظت از نانوذرات طلا با آنزیم کراتیناز به مدت ۵ دقیقه، طیف فلورسانس حاصل از هریک در طول موج تهییج ۲۹۵ نانومتر رسم شد و در انتها طیف‌های فلورسانس حاصل‌شده در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا مورد مقایسه قرار گرفت.

ملاحضات اخلاقی: در همه مراحل پژوهش موازین اخلاقی رعایت شد. تمامی آزمون‌ها در شرایط یکسان و استاندارد انجام شد و هیچ‌گونه سوگیری و دخل و تصرفی از جانب محققین در مراحل انجام پژوهش صورت نگرفت.

یافته‌ها

پس از کشت باکتری و القای بیان ژن آنزیم کراتیناز جهت بیان بالای آن (Over Expression) در دماهای ۱۸، ۲۲، ۲۸، ۳۲ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تخلیص آنزیم‌ها به روش کروماتوگرافی تمایلی (به کمک ستون نیکل سفارز) و تأیید حضور و خلوص پروتئین‌ها با استفاده از تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE و تعیین غلظت پروتئین‌ها به روش برادفورد انجام و با مقایسه غلظت پروتئین‌های تخلیص‌شده، دمای القای بهینه مشخص شد. نتایج حاصل از سنجش غلظت پروتئین‌ها نشان داد که در دمای القای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت، میزان پروتئین بالاتری بیان گردید (جدول ۱).

جدول ۱) غلظت پروتئین در دمای القای متفاوت (حجم هر ویال جمع‌آوری‌شده ml ۱ بود)

دمای القا بیان پروتئین	غلظت پروتئین در ویال‌های جمع‌آوری‌شده از تخلیص (mg/ml)						
(°C)	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	E_6	E_7
۱۸	۱/۳۷	۱/۱۶	۰/۹۳	۰/۷۴	۰/۴۸	۰/۲۶	۰/۱۸
۲۲	۱/۵۳	۱/۲۸	۱/۰۵	۰/۸۵	۰/۵۴	۰/۳۸	۰/۲۵
۲۸	۲/۱۳	۱/۹۸	۱/۷۸	۱/۵۳	۰/۸۲	۰/۷۶	۰/۶۴
۳۲	۱/۹۲	۱/۷۳	۱/۴۸	۱/۱۱	۰/۶۸	۰/۴۹	۰/۳۲
۳۷	۲/۰۴	۱/۸۵	۱/۶۸	۱/۲۵	۰/۷۳	۰/۵۷	۰/۳۸

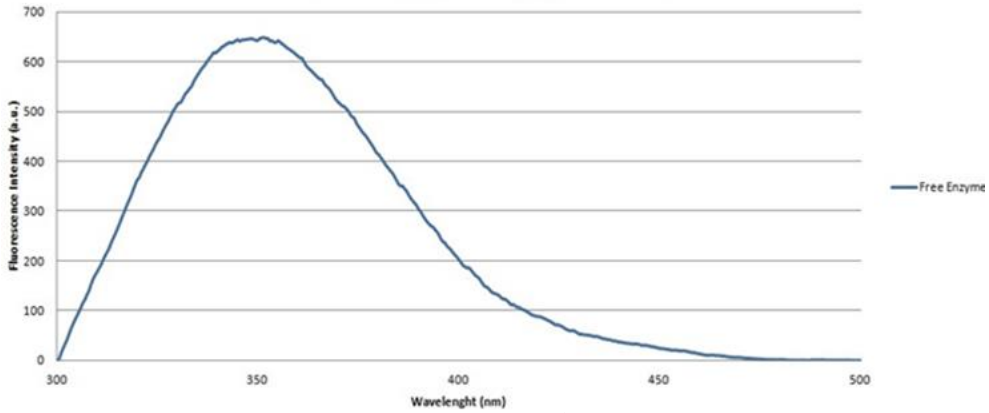
در ادامه بررسی ساختاری آنزیم کراتیناز به کمک طیف سنجی فلورسانس در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا انجام شد و اثر نانوذرات طلا بر ساختار آنزیم کراتیناز مشخص گردید. فعالیت آنزیم های حاصل از بیان در دماهای القا ۱۸، ۲۲، ۲۸، ۳۲ و ۳۷ در شرایط برابر محاسبه گردید که نتایج حاصل نشان‌دهنده فعالیت بیشتر آنزیم حاصل از القا در ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت بود (جدول ۲). بررسی طیف فلورسانس نشرشده آنزیم کراتیناز حاصل از تهییج در طول موج ۲۹۵ نانومتر توسط دستگاه فلورسانس اسپکترومتر Perkin

Elmer مدل Ls 45 با کووت کوارتز با قطر ۱ سانتی‌متر انجام شد که نمودار حاصل از آن بازنشر فلورسانس در شکل ۱ نشان داده شد.

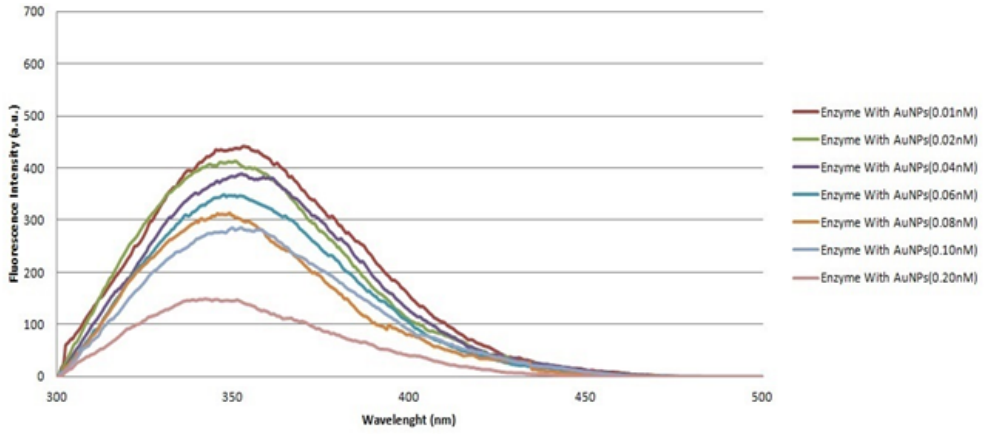
جدول ۲) فعالیت آنزیم کراتیناز در دمای القای متفاوت

دمای القا بیان پروتئین (°C)	۱۸	۲۲	۲۸	۳۲	۳۷
جذب در ۴۳۵ نانومتر (رقت ۱/۲)	۰/۶۲۳	۰/۶۶۵	۰/۷۵۸	۰/۷۳۶	۰/۶۸۳
میزان فعالیت آنزیم کراتیناز (U/ml)	۱۱/۶۴	۱۲/۴۲	۱۴/۱۷	۱۳/۲۷	۱۲/۷۶

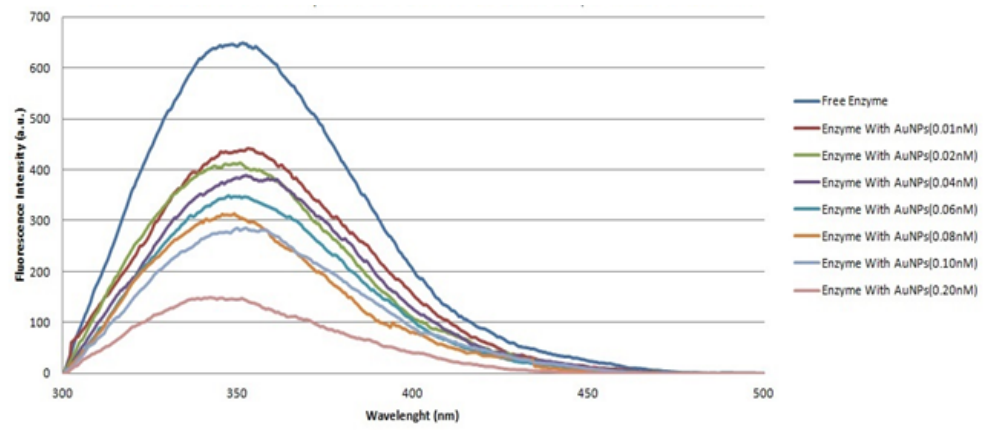
نمودار حاصل از بررسی اثر نانوذرات طلا بر ساختار آنزیم کراتیناز نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات طلا، میزان شدت فلورسانس به وضوح کاهش یافت. شکل ۲ طیف فلوروسانس حاصل از آنزیم کراتیناز همراه با غلظت‌های مختلف نانوذرات طلا را نشان می‌دهد. برای بررسی مقایسه‌ای طیف‌سنجی فلورسانس آنزیم کراتیناز در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا، نمودار طیف نشری در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا رسم گردید. این نمودار نشان داد که میزان شدت فلورسانس در حضور نانوذرات طلا کاهش یافت که این کاهش شدت نشر با افزایش غلظت نانوذرات طلا، کاهش بیشتری را نشان داد (شکل ۳).



شکل ۱) طیف فلورسانس آنزیم کراتیناز در طول موج تهییج (۲۹۵ nm)



شکل ۲) طیف فلورسانس آنزیم کراتیناز درطول موج تهییج (۲۹۵ nm) درحضور AuNPs



شکل ۳) طیف فلورسانس آنزیم کراتیناز در طول موج تهییج (۲۹۵ nm) در حضور و عدم حضور AuNPs

بحث

هدف از انجام این مطالعه، ارائه روشی مطلوب برای تولید انبوه آنزیم کراتیناز به جهت استفاده در کیت‌های سنجش کراتین و کراتینین بود. از طرفی با توجه به ناپایداری این آنزیم، اثر نانوذرات طلا بر پایداری این آنزیم مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق دمای بهینه القا برای بیان بیشتر و فعالیت بالاتر آنزیم کراتیناز نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از دماهای القای ۱۸، ۲۲، ۲۸، ۳۲ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به صورت جداگانه استفاده گردید و در نهایت پس از تخلیص آنزیم کراتیناز به کمک روش کروماتوگرافی تمایلی، نتایج سنجش غلظت پروتئین تخلیص‌شده با روش برادفورد با یکدیگر مقایسه گردید. سپس با کمک روش رنگ‌سنجی فعالیت آنزیم کراتیناز در دماهای القا مذکور محاسبه و مقایسه گردید. نتایج حاصل از این مطالعه نشانگر بیان مطلوب‌تر و فعالیت بالاتر آنزیم کراتیناز در دمای القا ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت در محیط کشت TB مایع بود. در مقایسه با تحقیقاتی که در گذشته بر روی بیان آنزیم کراتیناز در محیط LB مایع و شرایط دمایی مشابه صورت گرفته است [۱۸]، آنزیم بیان‌شده در این مطالعه غلظت بالاتر و فعالیت بیشتری از خود نشان داد که بیانگر بیان مطلوب‌تر آنزیم کراتیناز نسبت به روش‌های پیشین است.

نکته مهم و حائز اهمیت در مورد این آنزیم، ناپایداربودن آن است [۲۰]. لذا نیازمند روشی برای پایدارسازی آنزیم کراتیناز جهت استفاده در کیت‌های تجاری سنجش کراتین و کراتینین هستیم. در گذشته مطالعاتی با هدف پایدارسازی آنزیم کراتیناز انجام شده است که از آن می‌توان به ایجاد موتاسیون‌های تصادفی به صورت تکی، جفت و سه‌گانه بر روی آنزیم کراتیناز اشاره کرد که نهایتاً جهش‌های سه‌گانه ایجادشده باعث پایداری نسبی آنزیم گردیده ولی اثر نامطلوب بر فعالیت آنزیم داشته است [۲۱]. در مطالعه دیگری اثر یون‌های نقره بر آنزیم کراتیناز بررسی شده که حاکی از مهار فعالیت آنزیم کراتیناز است [۲۲]. مطالعه‌ای دیگر اثر نانو ذرات اکسید آهن و کیتوزان بر آنزیم کراتیناز را بررسی کرده که باعث ثبات نسبی در ساختار و فعالیت آنزیم شده است [۲۳]. نتایج حاصل از این پژوهش، نشان‌دهنده کاهش میزان شدت فلورسانس در حضور نانوذرات طلا بود که با افزایش غلظت نانوذرات طلا، کاهش شدت فلورسانس بیشتری را شاهد بودیم. این مسئله می‌تواند نشان‌دهنده تغییر در ریزمحیط آمینواسید فلورسانت در ساختار آنزیم کراتیناز باشد. در نتیجه استفاده از نانوذرات طلا به جهت پایدارسازی آنزیم کراتیناز گزینه مناسبی به نظر نمی‌رسد.

با توجه به ناپایداری آنزیم کراتیناز، 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؛ زیرا با گذشت ۴۸ الی ۷۲ ساعت از تخلیص آنزیم به شرط استفاده از گلیسرول و نگهداری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد، شاهد اگریگه شدن آنزیم و همچنین کاهش چشمگیر فعالیت آن بودیم. همچنین تمامی بررسی‌ها در شرایط دمایی یکسان صورت پذیرفت. با توجه به نتایج حاصل از اثر نانوذرات طلا بر آنزیم کراتیناز، روش‌های دیگری برای پایدارسازی آنزیم کراتیناز پیشنهاد می‌شود از جمله، بررسی اثر مهارکننده‌ها و فعال‌کننده‌ها بر آنزیم کراتیناز، ایجاد جهش‌های هدفدار در توالی آنزیم و بررسی پایداری و فعالیت آنزیم، بررسی پایداری آنزیم در برابر عوامل گوناگون دیگر و همچنین بررسی ساختار کریستالوگرافی آنزیم کراتیناز به جهت شناخت بهتر آنزیم و انتخاب گزینه بهتر برای پایدارسازی آنزیم برای مصارف تجاری.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد که کشت باکتری *E.Coli BL21* حاوی وکتور تکثیری *pET28a* در محیط کشت *TB* مایع و القای آن در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت، آنزیم کراتیناز فعال‌تر با میزان بیان بالاتری جهت استفاده در کیت‌های سنجش کراتین و کراتینین در اختیارمان قرار می‌دهد. در ادامه بررسی اثر نانوذرات طلا بر ساختار آنزیم کراتیناز نشان داده است که با توجه به احتمال تغییر در ریزمحیط آمینواسید فلورسانت در ساختار آنزیم کراتیناز در حضور نانوذرات طلا، این ترکیبات گزینه مناسبی جهت پایداری آنزیم کراتیناز نیستند. لذا استفاده از روش‌ها و ترکیبات دیگر جهت پایدارسازی آنزیم کراتیناز به منظور استفاده در کیت‌های تجاری سنجش کراتین و کراتینین توصیه می‌گردد.

نکات بالینی و کاربردی در طب انتظامی: با توجه به اینکه برخی مشاغل نیاز مبرم به آمادگی و سلامت جسمانی و روحی دارند، لذا پایش مداوم سلامت این افراد ضروری است. از این مشاغل می‌توان به نظامی‌گری ازجمله یگان ویژه، نیروهای عملیاتی و غیره اشاره کرد که احتمال ابتلای کارکنان این حوزه به امراض روان‌تنی، عضلانی-اسکلتی و قلبی-عروقی زیاد است. از طرفی برای استخدام افراد در این حوزه نیازمند به روش غربالگری کارآمدی هستیم تا با سرعت و دقت به غربال سلامت این افراد منتهی شود. بدین منظور استفاده از کیت‌های سنجش دقیق و سریع کراتین و کراتینین در آزمایشگاه‌های نظامی می‌تواند به پایش سلامت کادر نظامی و همچنین مستخدمین آتی در این حوزه بیانجامد.

تشکر و قدردانی: این مقاله برگرفته از رساله دکتری روان‌شناسی سلامت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی با کد ۱۰۱۲۰۷۰۹۹۸۱۰۰۸ است. از تمام افرادی که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند، صمیمانه سپاسگزاریم.

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

سهم نویسندگان: مهدی عبداله‌زاده پارسا، ارایه ایده، جمع‌آوری داده‌ها؛ سامان حسینخانی، تحلیل داده؛ شیرین جلیلی، روش‌شناس؛ فرشته رحمتی، طراحی مطالعه و ارایه ایده؛ همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله و بازنگری آن سهیم بودند و همه با تأیید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

منابع مالی: این مطالعه بدون هیچ‌گونه حمایت مالی انجام شد.

References

1- Khajeamiri A.R, Heidari A. Evaluation the efficiency of health watch checkup in the diagnosis and treatment of diseases from the perspective of Hamedan police force. Paramed Sci Mil Health. 2019;14(1):25-33. [Persian]. http://jps.ajaums.ac.ir/article-1-174-en.html

2- Padmanabhan B, Horikoshi M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of creatine amidinohydrolase from Actinobacillus. Acta Crystallogr D Bio Crystallogr. 2002 ;58(2):322-3. https://doi.org/10.1107/s0907444901019928
3- Hacker D.L., Wurm, F.M. Comprehensive Biotechnology Second ed. Academic Press, Burlington.2011 https://www.sciencedirect.com/referencework/9780080885049/comprehensive-biotechnology
4- Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv. 2009;27(3):297-306. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008
5- Hoeffken HW, Knof SH, Bartlett PA, Huber R, Moellering H, Schumacher G. Crystal structure determination, refinement and molecular model of creatine amidinohydrolase from Pseudomonas putida. J Mol Biol. 1988;204(2):417-33. https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90586-4
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;262(2):315-21. https://in.booksc.eu/book/1978276/944cd5
7- Chang MC, Chang CC, Chang JC. Cloning of a creatinase gene from Pseudomonas putida in Escherichia coli by using an indicator plate. Appl Environ Microbiol. 1992;58(10):3437-40. https://doi.org/10.1128/aem.58.10.3437-3440.1992
8- Jeng FY, Lin SC. Characterization and application of PEGylated horseradish peroxidase for the synthesis of poly (2-naphthol). Process Biochem. 2006;41(7):1566-73. http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2006.02.021
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. Int J Pharm. 2008;357(1-2):252-9. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.01.016
10- Gómez L, Ramírez HL, Villalonga ML, Hernández J, Villalonga R. Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation. Enzym Microbial Technol. 2006;38(1-2):22-7. http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.10.008
11- Stepankova V, Bidmanova S, Koudelakova T, Prokop Z, Chaloupkova R, Damborsky J. Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. Acs Catal. 2013 ;3(12):2823-36. https://doi.org/10.1021/cs400684x
12- Iyer PV, Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization—aqueous and non-aqueous environment. Process Biochem. 2008;43(10):1019-32. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.06.004
13- Matsuura T, Miyai K, Trakulnaleamsai S, Yomo T, Shima Y, Miki S, Yamamoto K, Urabe I. Evolutionary molecular engineering by random elongation mutagenesis. Nature Biotechnol. 1999;17(1):58-61. https://www.nature.com/articles/nbt0199_58
14- Verma A, Nakade H, Simard JM, Rotello VM. Recognition and stabilization of peptide a-helices using templatable nanoparticle receptors. J A C S. 2004;126(35):10806-7. https://doi.org/10.1021/ja047719h
15- Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer Sci Bus Media. 2013:673p. https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-46312-4
16- Hellmann N, Schneider D. Hands on: using tryptophan fluorescence spectroscopy to study protein structure. Methods Mol Biol. 2019;1958:379-401. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9161-7_20
17- Yadav S, Devi R, Bhar P, Singhla S, Pundir CS. Immobilization of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase on iron oxide nanoparticles/chitosan-g-polyaniline modified Pt electrode for detection of creatinine. Enzyme Microb Technol. 2012;50(4-5):247-54. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.01.008
18- Afshari E, Amini-Bayat Z, Hosseinkhani S, Bakhtiari N. Cloning, expression and purification of Pseudomonas putida ATCC12633 Creatinase. Avicenna J Med Biotechnol. 2017;9(4):169-75. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29090065/
19- He F. Bradford protein assay. Bio-Protocol. 2011:e45-. https://doi.org/10.21769/BioProtoc.45
20- Appleyard G, Woods DD. The pathway of creatine catabolism by Pseudomonas ovalis. J Gen Microbiol. 1956;14(2):351-65. https://doi.org/10.1099/00221287-14-2-351
21- Nishiya Y. Structural comparison of creatinases for investigating substrate binding. Int J Anal Bio-Sci. 2014;2(4). 143-7. https://plaza.umin.ac.jp/~e-jabs/2/2.143.pdf
22- Berberich JA, Yang LW, Bahar I, Russell AJ. A stable three enzyme creatinine biosensor. 2. Analysis of the impact of silver ions on creatine amidinohydrolase. Acta Biomater. 2005;1(2):183-91. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2004.11.007
23- Bai X, Li D, Ma F, Deng X, Luo M, Feng et al. Improved thermostability of creatinase from Alcaligenes Faecalis through non-biased phylogenetic consensus-guided mutagenesis. Microb Cell Fact. 2020;19(1):1-3. http://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-49252/v2.