

**ХОЛО- І АПО-ФОРМИ РЕКОМБІНАНТНОЇ АРГІНАЗИ І ЛЮДИНИ
ЯК БІОАНАЛІТИЧНІ ІНСТРУМЕНТИ**

Н. Стасюк, А. Закальський, О. Закальська, Г. Гайда, М. Гончар

*Інститут біології клітини НАН України
вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна
e-mail: mykhailo1952@gmail.com*

N. Stasyuk, A. Zakalskiy, O. Zakalska, G. Gayda, M. Gonchar. HOLO-AND APO-FORMS OF HUMAN RECOMBINANT ARGINASE I AS BIOANALYTICAL TOOLS. Using holoenzyme of recombinant human arginase I, biosensoric and enzymatic approaches for assaying L-arginine (Arg) have been developed. Biosensor is based on using two enzymes (arginase and commercial urease) and amperometric detection of ammonium ions monitored by chemosensing Polyaniline-Nafion membrane. Enzymatic approaches are based on fluorimetric detection of urea (monoenzymatic approach) or ammonia (bienzymatic approach). Apoenzyme of Mn^{2+} -dependent arginase has been used for very sensitive analysis of manganese(II) and cobalt(II) ions after reconstruction of active holoenzyme at the presence of analyzed ions at different pH values.

У сучасних біоаналітичних технологіях значна увага приділена розробці нових підходів до аналізу різноманітних метаболітів – важливих маркерів поширених захворювань за використання високоселективних елементів біологічного походження, зокрема, ферментів.

L-аргінін (Arg) не тільки входить до складу білків, але й бере участь у багатьох метаболічних процесах клітини, зокрема, він необхідний для синтезу нітроген(II) оксиду NO, поліамінів, проліну, глутамату, креатину і агматину. Визначення рівня Arg у плазмі крові особливо актуальне для виявлення дефіциту цієї напівзамінної амінокислоти у вагітних, дітей і спортсменів. Визначення вмісту Arg у сироватці крові дає змогу діагностувати, вивчати особливості перебігу та проводити контроль над ензимотерапією деяких аргінінозалежних пухлин, зокрема, гепатокарцинами, меланоми шкіри та колоректального раку.

На основі рекомбінантної аргінази I людини (аргіназа), яка каталізує гідроліз Arg до орнітину та карбаміду, створено нові біосенсорні та флюорометричні ензиматичні методи визначення вмісту Arg. Біосенсорний підхід до аналізу Arg ґрунтується на двоферментній (аргіназа + комерційна уреаза) конверсії Arg до орнітину й амонію і амперометричній детекції йонів амонію за допомогою хемосенсорного шару на основі комплексу поліанілін-Нафіон.

Ензиматичний флюорометричний аналіз Arg опрацьовано в моноензимному та двоензимному варіантах, які ґрунтуються, відповідно: 1) на детекції флуоресценції продукту аргіназної реакції розкладу Arg – карбаміду – при взаємодії з 2,3-бутандіонмонооксидом; 2) на моніторингу флуоресценції аргіназно-уреазного продукту гідролізу Arg – йонів амонію – у реакції з ортофталевим альдегідом. Порогова чутливість першого методу – 45 нМ (діапазон лінійності: 57 нМ – 0,2 мМ), а другого – 80 нМ (діапазон лінійності: 100 нМ – 6 мкМ). Створені методи характеризуються високою селективністю до цільового аналіту – Arg. Показано можливість використання розроблених біоаналітичних методів для аналізу Arg в реальних зразках фармацевтичних препаратів та біологічних рідин.

На моделі високоочищеної Mn^{2+} -залежної аргінази (з питомою активністю до 1600 мкмоль \cdot хв $^{-1}$ \cdot мг $^{-1}$ білка) проведено дослідження з отримання препаратів апоферменту, позбавленого металу, та реконструкції холоферменту. Апофермент аргінази використано для розробки методів аналізу йонів марганцю(II) та кобальту(II). Досягнуто високу чутливість визначення йонів Mn^{2+} і Co^{2+} в діапазоні лінійності 0,01-3 нМ і 0,24-125 нМ, відповідно. Надійність створених методів успішно підтверджено при аналізі вказаних йонів у реальних зразках стічних вод золотих і мідних копалень порівняно з результатами референтного методу ($R = 0,998$).

Подяка: Роботу виконано за фінансової підтримки НАН України в рамках наукової програми «Сенсори для медичних, екологічних, промислових і технологічних потреб» (проект 5/3-2016) та НАТО (проект СБР.NUKR.SFP 984173).