

**Н.Є. Стасюк, Г.З. Гайда, А.Є. Закальський, О.М. Закальська,
Л.Р. Фаюра, О.І. Вовк, О.В. Стасик, А.А. Сибірний, М.В. Гончар**

Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14/16, Львів, 79005, Україна
Тел. +380 32 261 2108, факс +380 32 261 2148, e-mail: galina.gayda@gmail.com

РЕКОМБІНАНТНІ ФОРМИ АРГІНАЗИ ТА АРГІНІНДЕІМІНАЗИ ЯК КАТАЛІТИЧНІ СКЛАДОВІ ЕНЗИМАТИЧНОГО НАБОРУ «АРГІТЕСТ» ДЛЯ АНАЛІЗУ L-АРГІНІНУ



На сьогодні скринінгові тест-системи для моніторингу L-аргініну у біологічних рідинах, зокрема, у крові, в арсеналі засобів вітчизняної клінічної діагностики відсутні. Ензиматичний набір «Аргітест» базується на розробленому ензиматично-хімічному методі кількісного аналізу L-аргініну з використанням різних форм рекомбінантної аргінази I печінки людини та аргініндеїмінази. Метод є високоселективним, економічно вигідним, простим та швидким у виконанні, відзначається стабільністю препаратів ензимів та продукту реакції. У статті доведено можливість використання препаратів рекомбінантних аргініно-селективних ензимів у складі набору «Аргітест». В результаті досліджень вивчено каталітичні та аналітичні характеристики цих препаратів та показано, що кожен з них може бути використано як складову ензиматичного набору.

Ключові слова: L-аргінін, аргіназа I, аргініндеїміназа, 2,3-бутандіонмонооксим, уреаза, ензиматичний набір «Аргітест».

Амінокислота L-аргінін (далі – Arg) – попередник L-орнітину, L-цитруліну, L-глутатіону, γ -аміномасляної кислоти, спермідину та інших сполук – одна із найбільш поляризованих, позитивно заряджених амінокислот [1]. Метаболізм Arg йде, як мінімум, двома альтернативними шляхами: 1) окисним (за участі NO-синтази) з утворенням L-цитруліну та NO; 2) неокисним (за участю аргінази I) з утворенням L-орнітину та сечовини. Можливе і одночасне протікання цих двох процесів [2]. Практично весь ланцюг перетворень Arg в похідні сполуки відбувається в трьох органах – кишківнику, печінці та нирках [3].

Вміст Arg зазвичай визначають методами іонообмінної хроматографії, флуориметрії, спектро-

фотометрії, капілярного електрофорезу, полярографії, проточно-інжекційного аналізу, лазерної флуоресцентної спектроскопії та ін. [4–5]. Найбільшого поширення набули хроматографічні методи кількісного аналізу Arg, зокрема, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ). ВЕРХ ґрунтується на попередній обробці зразків дериватизуючими реагентами з подальшим розділенням цих похідних хроматографічними методами та визначенням цих сполук за допомогою тандемної мас-спектрометрії (ТМС) та флуоресцентної детекції (ФЛ). Хоча метод ВЕРХ є достатньо чутливим, відтворюваним і дає змогу визначати весь набір амінокислот (в 15–20 мкл плазми крові), проте він має і низку недоліків, які обмежують його широке використання, насамперед, у експрес-діагностиці. Перш за все, ВЕРХ вимагає високоякісного обладнання та реактивів, що

робить відповідні аналізи недешевими для рутинного клінічного аналізу. Метод потребує значної кількості органічних розчинників високої якості та дорогих дериватизуючих реагентів. По-друге, час підготовки та аналізу зразка є тривалим і становить 1–2 доби від моменту дериватизації до одержання кількісних даних [5].

В галузі аналітичної біотехнології існує обмежена кількість даних щодо ензиматичних методів визначення Arg. Найперспективнішими для розробки таких методів є ензими метаболізму Arg, зокрема, аргіназа I, аргініндеїміназа (АДІ), аргініндекарбоксилаза. Існуючі комерційні ензиматичні тест-системи (виробництва Sigma, Enzytec™, Elisa, Megazyme та ін.) є, переважно, мультиензимними із спектрофотометричним (СФ) детектуванням кінцевого продукту реакції [6–8]. Мультиензимні методи визначення Arg мають низку недоліків, зокрема, неабсолютну селективність до цільового аналіту, спричинену позитивною реакцією на гуанідинові сполуки. Необхідність використання каскаду із кількох (3–5) ензимів і екзогенних ко-факторів підвищує вартість методів та ускладнює процедуру аналізу.

У попередніх дослідженнях авторами було запропоновано біосенсорні підходи [9] та економічно вигідні ензиматично-хімічні методи визначення Arg [9–16] із використанням одного або двох ензимів. На рис. 1 зображено принципіві схеми розроблених нами методів, а в табл. 1 наведено їхні аналітичні характеристики, порівняно з аналогічними параметрами відомих мультиензимних методів.

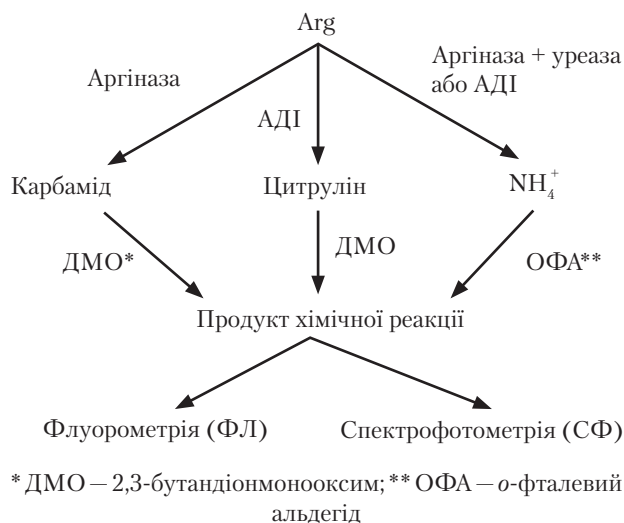
Вказані на рис. 1 методи базуються на використанні рекомбінантних аргініно-гідролізуючих ензимів — аргінази I печінки людини (аргіназа¹) та бактерійної аргініндеїмінази, одержаних за власними технологіями з клітин мікробних рекомбінантних штамів-продуцентів, створених авторами статті (табл. 2).

Як видно з таблиці 1, метод «Аргіназа-ДМО» має низку переваг порівняно з іншими методами, зокрема, це висока чутливість та широкий

діапазон тестованих концентрацій Arg. Цей метод не потребує попереднього відокремлення Arg з досліджуваних зразків, є простим у виконанні, високоселективним, надійним і комерційно доступним; можливість його практичного застосування було продемонстровано на зразках промислових фармацевтичних препаратів та комерційних вин [9, 11].

На сьогодні тест-системи для моніторингу Arg у біологічних рідинах, зокрема в крові, в арсеналі засобів вітчизняної клінічної діагностики відсутні. У 2015 р. авторами було виконано проект науково-дослідної роботи за науково-технічною програмою НАН України «Розробка, тестування та випуск пробної серії ензиматичного набору «Аргітест» для аналізу аргініну в клінічних зразках. Розділ 1. Оптимізація складу набору, умов проведення аналізу та розробка науково-технічної документації». У результаті виконання цього проекту метод «Аргіназа-ДМО» було успішно протестовано на зразках крові. На основі ензиматично-хімічного методу «Аргіназа-ДМО» створено ензиматичний набір «Аргітест» для визначення Arg і розроблено науково-технічну документацію на зазначений набір.

Одним із завдань вищевказаного проекту НДР було визначити оптимальну ензиматич-



* ДМО — 2,3-бутандіонмонооксим; ** ОФА — *o*-фталевий альдегід

Рис. 1. Ензиматично-хімічні методи аналізу Arg

Порівняльна характеристика ензиматично-хімічних методів визначення Arg

Метод	Фермент	Лінійний діапазон, μМ	Чутливість, μМ	Джерело
<i>Відомі ензиматичні методи</i>				
Мультиензимний, СФ, λ = 340 нм	Аргіназа, уреаза, глутаматдегідрогеназа	До 470	2,0	[6]
Мультиензимний, СФ, λ = 340 нм	Аргіназа, уреаза, глутаматдегідрогеназа	2,9–100	2,1	[7]
Мультиензимний, СФ, λ = 555 нм	АДІ, аргініносукцинатсинтаза; піруватфосфатдікіназа; піруватоксидаза, пероксидаза хрому	До 100	—	[8]
<i>Методи, розроблені авторами даної публікації</i>				
ДМО-СФ, λ = 480 нм	Аргіназа	7–100	5,0	[9–11]
ДМО-ФЛ, λ _{зб} = 360 нм, λ _{ем} = 510 нм	Аргіназа	0,06–200	0,04	[9, 11, 12]
ОФА-СФ, λ = 362 нм	Аргіназа-уреаза	0,9–60,0	0,85	[13]
ОФА-ФЛ, λ _{зб} = 364 нм, λ _{ем} = 425 нм	Аргіназа-уреаза	0,09–6,0	0,08	[14]
ОФА-ФЛ, λ _{зб} = 364 нм, λ _{ем} = 415 нм	АДІ	0,35–24	0,25	[15]
ОФА-СФ, λ = 340 нм	АДІ	0,7–50	0,55	[16]

ДМО – 2,3-бутандіонмонооксим; СФ – спектрофотометрична детекція кінцевого продукту; ФЛ – флуориметрична детекція кінцевого продукту; ОФА – о-фталевий альдегід.

ну складову набору «Аргітест». Об'єктами дослідження слугували рекомбінантні аргініно-гідролізуючі ензими (табл. 2), виділені та охарактеризовані авторами статті.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі використано рекомбінантні штами мікроорганізмів з музею Інституту біології клітини НАН України. Рекомбінантні клітини дріжджів та бактерій було створено у попередніх дослідженнях та застосовано як джерела цільових рекомбінантних ензимів (табл. 2).

Питому активність рекомбінантних ензимів (далі – ензими) виражали в мкмоль продукту, утвореного за 1 хв в перерахунку на 1 мг протеїну (мкмоль · хв⁻¹ · мг⁻¹) за стандартних умов реакції. Активність аргінази визначали за швидкістю утворення сечовини [17–19]. Аналіз ак-

тивності АДІ виконували у два етапи, визначаючи швидкість утворення аміаку [20, 21].

Внутрішньоклітинні ензими виділяли з безклітинних екстрактів (БЕ), секретований ензим (аргіназу³) – із культуральної рідини відповідних рекомбінантних мікробних продуцентів з подальшим очищенням шляхом колонкової хроматографії за розробленими схемами (див. посилення в табл. 2).

Для виділення аргінази¹ використовували синтезований власноруч афінний сорбент «Аргінін-макропористе скло». Препарати ензиму із питомою активністю 1500–2600 Од/мг протеїну було одержано із 40–60-кратною очисткою, із 42%-им виходом у найбільш вдалих фракціях. Препарати зберігали при –10 °С у 50 мМ Трис-НСІ буфері (ТБ), з рН 8,0, що містив 1М NaCl, 1 мМ MnCl₂ та 10%-й гліцерол.

Аргініногідролізуючі ензими

Назва фермента	Позначення	Властивості фермента	Продуцент фермента	Джерело
Природна аргіназа І печінки людини	Аргіназа ¹	Mn ²⁺ -залежний, внутрішньо-клітинний	NCYC 495 <i>Hansenula polymorpha</i> pGAP1-HsARG1 leu2car1:ScLEU2	17
(His) ₆ -тагована аргіназа І печінки людини	Аргіназа ²	Mn ²⁺ -залежний, внутрішньо-клітинний	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 303/pYEX-4-ARG1 (MATa leu2-3/112 ura3-1 trp1-1 his3-11/15 ade2-1 can1-100)	18
Модифікована аргіназа І печінки людини	Аргіназа ³	Co ²⁺ -залежний, секретований	<i>H. polymorpha</i> pFDM-ScMfa-HIS6-HsARG1	19
Аргініндеїміназа <i>Mycoplasma hominis</i>	АДІ	Внутрішньо-клітинний	<i>Escherichia coli</i> BL-21(pET3d-ADI)	20, 21

Вони не втрачали своєї активності протягом року, а через 3 роки зберігання їх ензиматична активність знижувалася лише вдвічі.

Виділення препаратів аргінази² та аргінази³ здійснювали шляхом афінної хроматографії на сорбенті Ni-NTA-Superflow (Qiagen). Вихід ензимів з найвищою активністю складав 70 % (6 мг/л культури) та 35 % (5 мг/л культуральної рідини) відповідно. Препарати аргінази² і аргінази³ зберігали при -20 °С без втрати активності протягом року в Трис-фосфатному буфері з рН 8,0 та в фосфатному буфері, рН 7,2 відповідно. Обидва буфери містили 0,15 М NaCl та 20%-й гліцерол.

Аргініндеїміназу (АДІ) виділяли з нерозчинних «тілець включення» та очищали за допомогою аніонообмінної та гідрофобної хроматографії на сорбентах QAE-сефароза та феніл-сефароза відповідно. Одержаний шляхом електрофорезу гомогенний препарат АДІ зберігали при +4 °С у 20 мМ фосфатному буфері з рН 8,0, що містив 1 М NaCl, без втрати активності упродовж 20 місяців.

Було вивчено каталітичні та аналітичні характеристики високоочищених ензимів. Оптимальні умови проведення ензиматичної та хімічної реакцій, а також процедури реєстрації кінцевих продуктів докладно описано в попередніх публікаціях [9–11]. Як результат, створено калібрувальні графіки залежності ана-

літичного сигналу (інтенсивності випромінювання або світлопоглинання реакційної суміші), тобто відповіді на ензиматичне перетворення субстрату, від концентрації Arg. Для побудови калібрувальних графіків в скляні пробірки відбирали по 0,1 мл стандартних розчинів Arg в 30 мМ ТБ з рН 8,8. Реакцію запускали додаванням 0,01 мл розчину ензиму в 30 мМ ТБ з рН 8,8, до кінцевої концентрації 1,5–3,0 Од/мл. Інкубаційну суміш перемішували та витримували 10 хв при 37 °С. Надалі в суміш додавали 3 мл 0,5%-го розчину 2,3-бутандіонмонооксиду (ДМО) в 1,7 М H₂SO₄ та кип'ятили на водяній бані протягом 50 хв. Реєстрували оптичну густину (на спектрофотометрі SHIMADZU UV-1650 PC) або інтенсивність флуоресценції кінцевого продукту реакції (на флуориметрі TECAN Infinite H200 із хвилею збудження 360 нм) порівняно з контрольною пробою (0,1 мл 30 мМ ТБ з рН 8,8 замість розчину Arg).

Досліди проводили у чотирьох–шести повтореннях, а виміри — у 3-х паралелях. Для кожної вибірки показників визначали середнє арифметичне значення (*M*), дисперсію, стандартне відхилення середнього результату, відносне стандартне відхилення та довірчий інтервал. Розрахунок статистичних показників і побудову графіків здійснювали за допомогою програми Origin 8.0. Лінеаризацію графіків про-

води́ли за рівнянням регресії $Y = A + BX$ (де A і B – параметри рівняння), розраховували коефіцієнт кореляції R та рівень достовірності лінійного зв'язку p . Параметр B відповідає тангенсу кута нахилу, за допомогою якого визначають чутливість методу. Коефіцієнт A є показником фонового впливу додаткових інгредієнтів на ідентифікацію аргініну, тобто вказує рівень селективності методу [22]. Параметри та статистичні показники наведені на рисунках та в таблицях.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Принципова схема реакцій, що лягли в основу ензиматично-хімічного методу визначення Arg за використання аргінази, представлена на рис. 2. Метод ґрунтується на ферментативному гідролізі Arg до L-орнітину та карбаміду (ензиматична реакція, стадія 1). Карбамід взаємодіє із ДМО на хімічній стадії реакції (стадія 2), із утворенням продукту, який кількісно оцінюється спектрофотометрично (СФ) за оптичною густиною при $\lambda = 480$ нм або флуорометрично (ФЛ) при 510 нм із хвилею

збудження 360 нм [11]. Кінцевим продуктом хімічної реакції є (2E)-бутан-2,3-діон-2-семікарбазон та інші сполуки, зокрема, циклічні.

Застосування АДІ в ензиматичному методі визначення Arg забезпечує високоселективну та ефективну деградацію Arg до цитруліну. Принципова схема реакцій, що лягли в основу «АДІ-ДМО»-методу визначення Arg (за утворенням цитруліну), представлена на рис. 3. Концентрацію кінцевого продукту хімічної реакції визначали спектрофотометрично за оптичною густиною при $\lambda = 490$ нм та флуорометрично при 515 нм із хвилею збудження 360 нм.

Вибір оптимального ензиму здійснювали, порівнюючи аналітичні характеристики досліджених ензимів (табл. 2) за оптимізованих умов аналізу [11]. Для цього вивчали залежність інтенсивності флуоресценції та світлопоглинання реакційної суміші від концентрації Arg у кінцевій пробі. На рис. 4 наведено графічні результати вивчення залежності інтенсивності флуоресценції (а, б) та світлопоглинання (в, г) реакційної суміші від концентрації

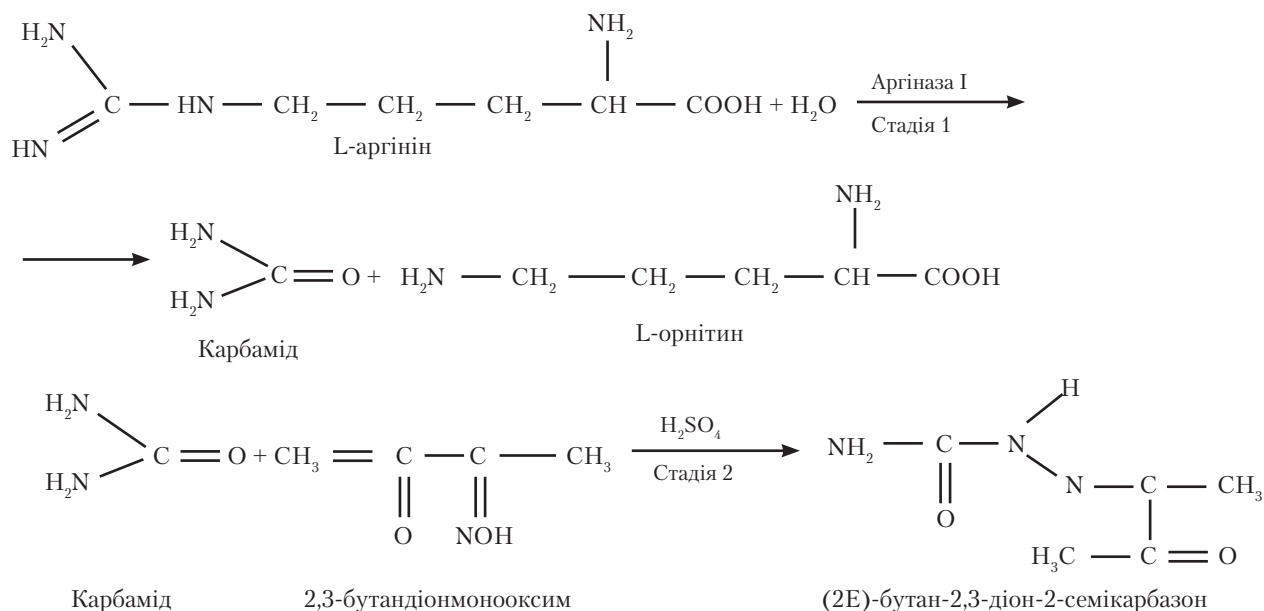


Рис. 2. Загальна схема реакцій при визначенні Arg ензиматично-хімічним методом «Аргіназа-ДМО» за утворенням карбаміду

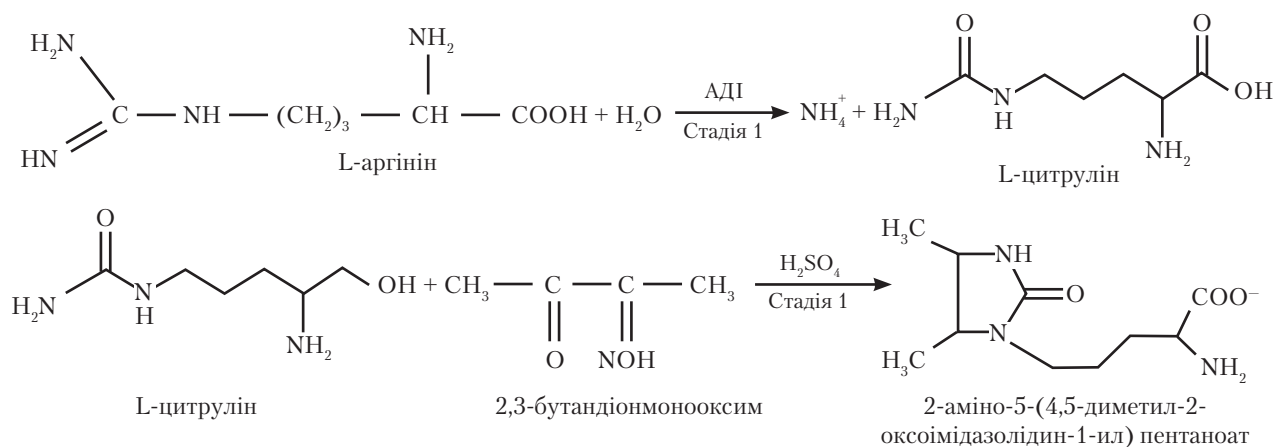


Рис. 3. Загальна схема реакцій при визначенні Arg ензиматично-хімічним методом «АДІ-ДМО» за утворенням цитруліну

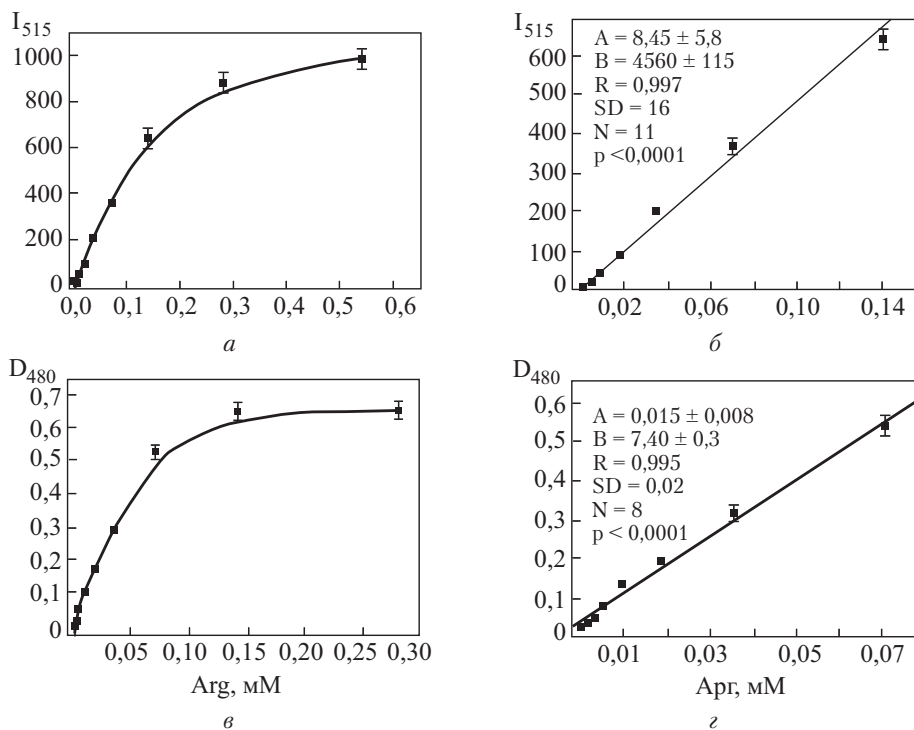


Рис. 4. Основні аналітичні характеристики ДМО-методу за використання аргінази². Залежність інтенсивності випромінювання реакційної суміші від концентрації Arg (а) та діапазон лінійності ФЛ методу (б). Залежність світлопоглинання від концентрації Arg у фотометрованій суміші (в) та діапазон лінійності СФ методу (г)

Arg за використання аргінази². Аналогічні графіки отримували й при обробці експериментальних даних з використанням інших ензимів.

У табл. 3 підсумовано аналітичні характеристики (лінійність калібрувального графіку та порогова чутливість) ензиматично-хімічного ДМО-методу для кожного досліджуваного ензиму.

Як видно з наведених даних, властивості ензимних препаратів при використанні їх в ДМО-методі є близькими, особливо при ФЛ реєстрації продуктів реакції. Як каталітичну складову в аналітичному наборі «Аргітест» було використано препарат аргінази². Набір «Аргітест» із спектрофотометричною та флуориметричною детекцією продукту реакції було

Таблиця 3

Основні аналітичні характеристики ДМО-методу за використання різних препаратів ензимів

Ензим	Параметр			
	лінійний діапазон, μМ		чутливість, μМ	
	ФЛ	СФ	ФЛ	СФ
Аргіназа ¹	0,06–280	7–100	0,04	5,0
Аргіназа ²	0,28–140	1,1–70	0,15	0,28
Аргіназа ³	0,55–140	0,55–140	0,30	0,30
АДІ	0,55–140	4,4–280	0,30	2,5

випробувано на реальних зразках сироватки крові людини, та, як результат, встановлено межі вмісту Arg та середні значення для практично здорових людей, які добре корелюють із літературними даними [23].

ВИСНОВКИ

Вперше досліджено аналітичні характеристики рекомбінантних аргініно-гідролізуєчих ензимів як каталітичних складових аналітичного набору «Аргітест». Принцип роботи набору «Аргітест» полягає у ензиматичному перетворенні L-аргініну і спектрофотометричному або флуориметричному детектуванні кінцевого продукту хімічної реакції карбаміду (за дії аргінази) або цитруліну (за дії аргініндеїмінази) із диметилмонооксимом. Показано, що кожен із досліджених ензимів може бути використаний для визначення L-аргініну, але як каталітичну складову при створенні набору «Аргітест» було використано препарат (His)₆-тагованої аргінази І печінки людини (аргіназа²). Можна прогнозувати, що комерційний випуск економічно вигідного аналітичного набору «Аргітест» дасть можливість започаткувати моніторинг вмісту Arg в крові людини у вітчизняній клінічній практиці та буде перспективним, окрім медицини, також і для застосування у ветеринарії, харчовій та фармацевтичній промисловості.

Роботу виконано за фінансової підтримки НАН України в рамках науково-технічної про-

грами «Розробка, тестування та випуск пробної серії ензиматичного набору «Аргітест» для аналізу аргініну в клінічних зразках». Розділ 1. Оптимізація складу набору, умов проведення аналізу та розробка науково-технічної документації» (Проект 29-2015) у 2015 р., комплексної науково-технічної програми «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація» (Проект № 13-2017) у 2013–2017 рр. та стипендії президента України для молодих вчених (Стасюк Н.Є.) у 2016–2017 р.

ЛІТЕРАТУРА

1. Yokoro M., Suzuki M., Murota K. et al. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous NOS inhibitor, metabolized in rat erythrocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012. Vol. 76, no. 7. P. 1334–1342.
2. Marini J. Arginine and ornithine are the main precursors for citrulline synthesis in mice. *J. Nutr.* 2012. Vol. 142, no. 3. P. 572–580.
3. Yan X., Takahara M., Xie L. et al. Arginine metabolism in soft tissue sarcoma. *J. Dermatol. Sci.* 2011. Vol. 61, no. 3. P. 211–215.
4. Martens-Lobenhoffer J., Bode-Böger S.M.J. Chromatographic-mass spectrometric methods for the quantification of L-arginine and its methylated metabolites in biological fluids. *Chromatography B.* 2007. Vol. 851, no. 1–2. P. 30–41.
5. Bhandare Pravin, Madhavan P., Rao B.M., Someswar Rao N. Determination of arginine, lysine and histidine in drug substance and drug product without derivatisation by using HILIC column LC technique. *J. Chem. Pharm. Res.* 2010. Vol. 2, no. 5. P. 0580–586.
6. Mira O.R.J. Quantitative determination of L-arginine by enzymatic End-Point analysis. *Agric. Food Chem.* 2001. Vol. 49, no. 2. P. 549–552.
7. L-Arginine/Urea/Ammonia, UV method. URL: www.nzytech.com/products-services/analytical-test-kits/ak00171/ (дата звернення 20.04.2017).
8. Yasuhisa A., Masafumi K. Rapid enzymatic assays for L-citrulline and L-arginine based on the platform of pyrophosphate detection. *Enz. Microb. Technol.* 2014. Vol. 57, no. 10. P. 36–41.
9. Гайда Г.З., Стасюк Н.Є., Гончар М.В. Методи аналізу L-аргініну. *Biotechnologia Acta.* 2014. № 1. С. 31–39.
10. Стасюк Н.Є., Гайда Г.З., Гайда А.В., Гончар М.В., Ковальчук Є.П. Ензиматичний метод визначення вмісту L-аргініну за використання рекомбінантної аргінази І людини. *Ukr. Biorg. Acta.* 2012. Т. 1. С. 31–37.

11. Stasyuk N., Gaida G., Gonchar M. L-arginine assay with the use of arginase I. *App. Biochem. Microbiol.* 2013. No. 5. P. 529–534.
12. Гайда Г., Стасюк Н., Сибірня Н., Гончар М. Визначення L-Аргініну у крові щурів ензиматичним методом. *Scientific Journal «ScienceRise»*. 2015. № 11/6 (16). С. 33–38.
13. Стасюк Н.Є., Басс С.Р., Гайда Г. З., Єпремян Н.С., Гончар М.В. Новий ензиматичний метод визначення L-аргініну за використання аргінази I людини та уреаз. *Scientific Journal «ScienceRise»*. 2015. № 6/1 (11). С. 43–48.
14. Stasyuk N.Ye., Gayda G.Z., Yepremyan H.S., Gonchar M.V. Simultaneous fluorometric arginase/urease-based assay of L-arginine, urea and ammonium. *Spectrochimica Acta, Part A*. 2017. Vol. 170. P. 184–190.
15. Stasyuk N., Gayda G., Fayura L., Boretsky Y.R., Gonchar M.V., Sibirny A.A. Novel arginine deiminase-based method to assay L-Arginine in beverages. *Food chemistry*. 2016. Vol. 201. P. 320–326.
16. Патент України на корисну модель № 108773. Стасюк Н.Є., Гайда Г.З., Фаюра Л.Р., Борецький Ю.Р., Сибірний А.А., Гончар М.В. Ензиматично-хімічний метод визначення вмісту L-аргініну в харчових продуктах та алкогольних напоях.
17. Стасюк Н.Є., Гайда Г.З., Ковальчук Є.П., Стасик О.В., Гончар М.В. Виділення та характеристика аргінази I людини із рекомбінантних дріжджів *Hansenula polymorpha*. *Укр. біохім. журн.* 2010. Т. 6. С. 14–21.
18. Zakalskiy A.E., Zakalska O.M., Rzhpetskyu Y.A., Stasyuk O.V., Horak D., Gonchar M.V. Overexpression of (His)₆-tagged human arginase I in *Saccharomyces cerevisiae* and enzyme purification using metal affinity chromatography. *Protein Expr. Purif.* 2012. Vol. 81. P. 63–68.
19. Stasyuk O.V., Boretsky Y.R., Gonchar M.V., Sibirny A.A. Recombinant arginine-degrading enzymes in metabolic anticancer therapy and biosensors. *Cell Biol. Intern.* 2015. Vol. 39 (3). P. 246–252.
20. Fayura L.R., Boretsky Y.R., Pynyaha Y.V., Wheatley D.N., Sibirny A.A. Improved method for expression and isolation of the *Mycoplasma hominis* arginine deiminase from the recombinant strain of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 2013. Vol. 4. P. 420–426.
21. Фаюра Л.Р., Борецький Ю.Р., Пиняга Ю.В., Мартинюк Н.Б., Скороход В.В., Сибірний А.А. Розробка технології культивування рекомбінантного штаму-продуцента *Escherichia coli* з метою отримання аргініндеімінази *Mycoplasma hominis*. *Наука та інновації*. 2014. № 4. С. 32–39.
22. Дерффель К. *Статистика в аналитической химии*. Москва, 1994. 267 с.
23. Патент України на корисну модель № 107543. Стасюк Н.Є., Гайда Г.З., Закальський А.Є., Закальська О.М., Гончар М.В. Ензиматичний метод визначення L-аргініну в крові людини.

Стаття надійшла до редакції 21.12.16

REFERENCES

1. Yokoro M., Suzuki M., Murota K., Otsuka C., Yamashita H., Takahashi Y., Tsuji H., Kimoto M. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous NOS inhibitor, metabolized in rat erythrocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012. 76(7): 1334–1342.
2. Marini J. Arginine and ornithine are the main precursors for citrulline synthesis in mice. *J. Nutr.* 2012. 142(3): 572–580.
3. Yan X., Takahara M., Xie L., Gondo C., Setsu N., Oda Y., Takeuchi S., Tu Y., Moroi Y., Furue M. Arginine metabolism in soft tissue sarcoma. *J. Dermatol. Sci.* 2011. 61(3): 211–215.
4. Martens-Lobenhoffer J., Bode-Böger S.M. Chromatographic-mass spectrometric methods for the quantification of L-arginine and its methylated metabolites in biological fluids. *J. Chromatography B*. 2007. 851(1–2): 30–41.
5. Bhandare Pravin, Madhavan P., Rao B.M., Someswar Rao N. Determination of arginine, lysine and histidine in drug substance and drug product without derivatisation by using HILIC column LC technique. *J. Chem. Pharm. Res.* 2010. 2(5): 580–586.
6. Mira O.R.J. Quantitative determination of L-arginine by enzymatic End-Point analysis. *Agric. Food Chem.* 2001. 49(2): 549–552.
7. L-Arginine/Urea/Ammonia, UV method. URL: <https://www.nzytech.com/products-services/analytical-test-kits/ak00171/> (Last accessed: 20.04.2017).
8. Yasuhisa A., Masafumi K. Rapid enzymatic assays for L-citrulline and L-arginine based on the platform of pyrophosphate detection. *Enz. Microb. Technol.* 2014. 57(10): 36–41.
9. Gayda G.Z., Stasyuk N.Ye., Gonchar M.V. Methods for L-arginine assay. *Biotechnologia Acta*. 2014. 1: 31–39 [in Ukrainian].
10. Stasyuk N.Ye., Gayda G.Z., Gayda A.V., Gonchar M.V., Kovalchuk Ye.P. Enzymatic method for L-arginine assay by the use of recombinant human liver arginase I. *Ukr. Biorg. Acta*. 2012. 1: 31–37 [in Ukrainian].
11. Stasyuk N., Gayda G., Gonchar M. L-arginine assay with the use of arginase I. *App. Biochem. Microbiol.* 2013. 49(5): 529–534.
12. Gayda G., Stasyuk N., Sybirna M., Gonchar M. Enzymatic method of L-arginine determination in rat serum. *Scientific Journal "ScienceRise"*. 2015. 11/6(16): 33–38 [in Ukrainian].
13. Stasyuk N.Ye., Bass S.R., Gayda G.Z., Yepremyan H.S., Gonchar M.V. New enzymatic method for L-arginine assay based on human arginase I and urease. *Scientific Journal «ScienceRise»*. 2015. 6/1(11): 43–48 [in Ukrainian].
14. Stasyuk N.Ye., Gayda G.Z., Yepremyan H.S., Gonchar M.V. Simultaneous fluorometric arginase/urease-based assay of L-arginine, urea and ammonium. *Spectrochimica Acta, Part A*. 2017. 170: 184–190.

15. Stasyuk N., Gayda G., Fayura L., Boretsky Y.R., Gonchar M.V., Sibirny A.A. Novel arginine deiminase-based method to assay L-Arginine in beverages. *Food chemistry*. 2016. 201: 320–326.
16. *Patent of Ukraine No. 108773*. Stasyuk N., Gayda G., Fayura L., Boretsky Y.R., Sibirny A.A., Gonchar M.V. Enzymatic-chemical method for L-arginine assay in foods and alcoholic beverages [in Ukrainian].
17. Stasyuk N., Gayda G., Kovalchuk Ye., Stasyk O., Gonchar M. Isolation and characterization of arginase I from the recombinant yeast *Hansenula polymorpha*. *Ukr. Biochem. J.* 2010. 82(6): 14–21 [in Ukrainian].
18. Zakalskiy A.E., Zakalska O.M., Rzhepetskiy Y.A., Stasyk O.V., Horak D., Gonchar M.V. Overexpression of (His)₆-tagged human arginase I in *Saccharomyces cerevisiae* and enzyme purification using metal affinity chromatography. *Protein Expr. Purif.* 2012. 81:63–68.
19. Stasyk O.V., Boretsky Y.R., Gonchar M.V., Sibirny A.A. Recombinant arginine-degrading enzymes in metabolic anticancer therapy and biosensorics. *Cell Biol. Intern.* 2015. 39(3): 246–252.
20. Fayura L.R., Boretsky Y.R., Pynyaha Y.V., Wheatley D.N., Sibirny A.A. Improved method for expression and isolation of the *Mycoplasma hominis* arginine deiminase from the recombinant strain of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 2013. 167(4): 420–426.
21. Fayura L., Boretsky Y., Pynyaha Y., Martynyuk N., Skorohod V., Sibirny A. Development of cultivation technology for the *Escherichia coli* recombinant strain producing arginine deiminase of *Mycoplasma hominis*. *Nauka i innovacii (Science and Innovation)*. 2014. 10(4): 32–39 [in Ukrainian].
22. Derffel K. *Statistics in Analytical Chemistry*. Moscow, 1994. 267 p. [in Russian].
23. *Patent of Ukraine No. 107543*. Stasyuk N., Gayda G., Zakalskiy A.Ye., Zakalska O.M., Gonchar M.V. Enzymatic method for L-arginine assay in human serum [in Ukrainian].

Received 21.12.16

Stasyuk, N., Gayda, G., Zakalskiy, A., Zakalska, O., Fayura, L., Vovk, O., Stasyk, O., Sibirny, A., and Gonchar, M.

Institute of Cell Biology, the NAS of Ukraine,
14/16, Drahomanov St., Lviv,
79005, Ukraine; tel.: +380 32 261 2108,
fax. +380 32 261 2148, E-mail: galina.gayda@gmail.com

RECOMBINANT FORMS OF ARGINASE
AND ARGININE DEIMINASE AS CATALYTIC
COMPONENTS OF ARGITEST ENZYMATIC KIT
FOR L-ARGININE ANALYSIS

For the time, no screening test kits for L-arginine monitoring in biological fluids, including the blood, have been available in the arsenal of domestic clinical diagnostics. The Argi-

test enzymatic kit is based on the enzymatic-chemical method of L-arginine quantitative analysis developed using different forms of recombinant human liver arginase I (arginase) and arginine deiminase. The method is highly selective, cheap, simple, and fast. It is remarkable for stability of enzymes and final products. The article demonstrates the possibility of using recombinant arginine-selective enzymes in composition of Argitest kit. The catalytic and analytic characteristics of these enzymes have been studied. It has been shown that each enzyme can be used as a component of enzymatic kit.

Keywords: L-arginine, arginase I, arginine deiminase, 2,3-butanedione monoxime, urease, and Argitest enzymatic kit.

Н.Е. Стасюк, Г.З. Гайда, А.Е. Закальский,
О.М. Закальская, Л.Р. Фаюра, Е.И. Вовк,
О.В. Стасюк, А.А. Сибирний, М.В. Гончар

Институт биологии клетки НАН Украины,
ул. Драгоманова, 14/16, Львов, 79005, Украина,
Тел. +380 32 261 2108, факс +380 32 261 2148
E-mail: galina.gayda@gmail.com

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ФОРМЫ АРГИНАЗЫ
И АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ
КАК КАТАЛИТИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ
ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО НАБОРА «АРГИТЕСТ»
ДЛЯ АНАЛИЗА L-АРГИНИНА

В настоящее время скрининговые тест-системы для мониторинга L-аргинина в биологических жидкостях, в том числе, в крови, в отечественной клинической диагностике отсутствуют. Энзиматический набор «Аргитест» базируется на разработанном энзиматическо-химическом методе количественного анализа L-аргинина с использованием разных форм рекомбинантной аргиназы I печени человека и аргининдеиминазы. Метод является высокоселективным, экономично выгодным, простым и быстрым в исполнении, отличается стабильностью энзиматических препаратов и продукта реакции. В статье продемонстрирована возможность использования препаратов рекомбинантных аргинин-селективных энзимов в составе набора «Аргитест». В результате исследований определены каталитические и аналитические характеристики энзиматических препаратов и показано, что каждый из них может быть использован как компонент энзиматического набора.

Ключевые слова: L-аргинин, аргиназа I, аргининдеиминаза, 2,3-бутандионмонооксим, уреазы, энзиматический набор «Аргитест».