

УДК 542.06 + 577:112.083

*Наталія СТАСЮК^{1,2}, Галина ГАЙДА¹, Анатолій ГАЙДА¹, Олег СТАСИК¹,
Володимир КАРП'ЯК², Євген КОВАЛЬЧУК², Михайло ГОНЧАР¹*

**СИНТЕЗ АФІННИХ СОРБЕНТІВ ДЛЯ ОЧИЩЕННЯ
АРГІНАЗИ І ЛЮДИНИ ІЗ РЕКОМБІНАНТНИХ ДРІЖДЖІВ
*HANSENULA POLYMORPHA***

¹Інститут біології клітини НАН України,
вул. Драгоманова 14/16, 79005 Львів, Україна

²Хімічний факультет, Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Кирила і Мефодія 6/8, 79005 Львів, Україна
stasuk_natalia@ukr.net

*Здійснено синтез афінних сорбентів із використанням мінеральних матриць: силохрому С-120 амінопропілового (розмір пор 50 нм), макропористого скла із контрольованим розміром пор (3680 нм) і силохромів С-80 та С-120 (65 та 44 нм). Для активації силохрому амінопропілового було використано глутаровий альдегід, для макропористого скла і силохромів С-80 та С-120 – γ -гліцидооксипропіл-триетоксисилан. Активовані матриці було функціоналізовано L-аргініном. Порівняння різних афінних сорбентів показало, що аргінін-модифікований сорбент на основі макропористого скла з контрольованим розміром пор є оптимальним для виділення аргінази І печінки людини із безклітинних екстрактів рекомбінантних штамів-надпродуцентів, сконструйованих на основі дріжджів *Hansenula polymorpha*. Запропоновано спосіб виділення та очищення аргінази І людини, який дозволяє в одну стадію афінної колонкової хроматографії отримати з 11 %-ним виходом 200-кратно очищені (за питомою активністю) препарати фермента, гомогенні за результатами електрофоретичного аналізу в денатуруючому поліакриламідному гелі.*

*Ключові слова: рекомбінантна аргіназа, афінний сорбент, макропористе скло, силохром, дріжджі *Hansenula polymorpha*.*

Аргіназа – потенційно важливий фермент у терапії деяких видів пухлин, ауко-трофних за аргініном [1]. Лікування аргіназою є менш шкідливим, ніж традиційними фізичними та хімічними методами, а використання людського ферменту, особливо у пегельованій формі, може спричинити лише незначний імуногенний ефект [2]. Актуальною проблемою для практичного впровадження аргінази в клінічну практику є виділення та очистка ферменту в достатніх кількостях та високоочищеному стані. Є низка робіт по виділенню та характеристиці аргінази із природних джерел (внутрішні органи ссавців та людини [3–4], еритроцити крові [5], злочкисні

пухлини [6, 7–9], рослини [10–11], цвільові гриби [12]) та рекомбінантних мікроорганізмів, зокрема, дріжджів [13].

Найбільш ефективними методами отримання очищених білкових препаратів є різноманітні хроматографічні методи, які базуються на використанні похідних целюлози, агарози чи синтетичних органічних полімерів. Неорганічні полімери (силохроми, силікагелі, макропористе скло) мають високу пористість, стійкі до дії механічних, хімічних та біологічних факторів, для них достатньо детально розроблені методи хімічної модифікації поверхні, однак до початку наших досліджень питання про використання їх для очистки та виділення аргінази в науковій літературі не обговорювалось.

Афінна хроматографія – це один із методів очищення білків, який базується на взаємодії між двома біологічно активними речовинами, одна із яких ковалентно приєднана до інертного носія. Афінна хроматографія використовується для очищення білків, зокрема, антитіл, ферментів, гормонів, рецепторів та інших біополімерів – полісахаридів та нуклеїнових кислот, а також біологічних мікрочастинок, наприклад вірусів та клітин [14].

Часто афінну хроматографію з успіхом використовують на заключному етапі виділення, після часткової очистки з допомогою менш специфічних рутинних методів, наприклад, осадження сульфатом амонію, гель-фільтрації чи іонообмінної хроматографії.

Часто афінну хроматографію з успіхом використовують на заключному етапі виділення, після часткової очистки з допомогою менш специфічних рутинних методів, наприклад, осадження сульфатом амонію, гель-фільтрації чи іонообмінної хроматографії.

Аналіз даних літератури по одержанню очищеної аргінази з різних джерел показав, що всі способи виділення та хроматографічної очистки здійснювалися в декілька етапів [2-12], а вихід кінцевого продукту є зазвичай низьким. Тому розробка нових ефективних методів очистки аргінази є важливим завданням біотехнології, тому наше дослідження скеровано на синтез економічно вигідних сорбентів на основі неорганічних матриць, вивчення хроматографічних властивостей отриманих сорбентів, а також розробку технології виділення високоочищеного препарату аргінази за допомогою афінної хроматографії.

Матеріали та методи

Матрицями для синтезу афінних сорбентів були силохроми С-80 і С-120 (“Реахім”, Ставропольський завод хімреактивів та люмінофорів, Росія), макропористе скло з контрольованим розміром пор СРG – 10 (Сігма, Англія) та силохром С-120 амінопропіловий (НПО “Біолар”, Латвія). Характеристики неорганічних матриць подано в табл. 1.

Для порівняння використовували комерційні афінні сорбенти *L*-Arg-Діасорб і *L*-Lys- Діасорб (БіоХімМак СТ, Росія).

Синтез модифікованих аргініном сорбентів проводили за методами, розробленими раніше для одержання афінних сорбентів на основі силохрому із метою виділення високоочищених факторів крові, зокрема, тромбіну і плазміногену [15]. Для активації силохрому С-120 амінопропілового (силохром АП) було використано глутаровий альдегід, а для силохромів С-80 та С-120 – γ -гліцидооксипропіл-триетоксисилан (ГПТС). Модифікували активовані сорбенти лігандом – аргініном (рис. 1, 2).

Таблиця 1

Характеристика сорбентів за параметрами матриць

Сорбенти	Розмір пор, нм	Лінійний розмір гранул, мкм	Питома поверхня, м ² ·г ⁻¹
Макропористе скло	3680	0,2–0,4	64
Силохром С-80	65	0,1–0,2	80
Силохром С-120	44	0,1–0,2	120
Силохром С-120 амінопропіловий	50	0,25–0,5	120
L-Arg-Діасорб	50	0,25–0,5	120
L-Lys-Діасорб	50	0,25–0,5	120

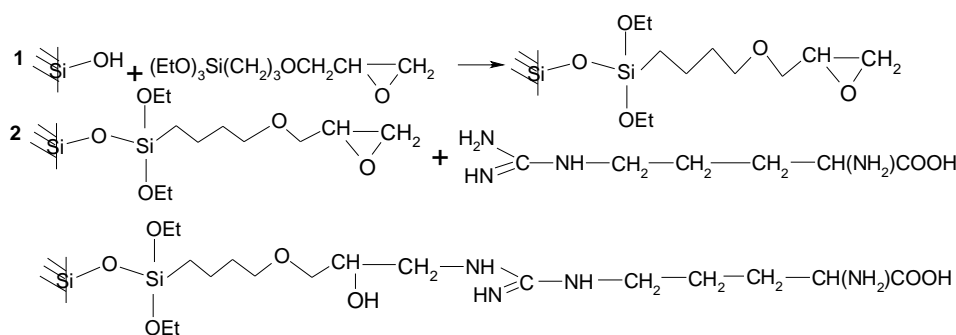


Рис. 1. Схема отримання афінних сорбентів за допомогою ГПТС: 1 – стадія активації сорбента; 2 – стадія модифікації L-аргініном.

Для активації мінеральних матриць ГПТС, в колбу із зворотнім холодильником та мішалкою поміщали по 20 г силохрому С-80, силохрому С-120 або макропористого скла з контрольованим розміром пор (МПС) і додавали 100 мл 0,1 М ацетатного буферу, рН 5,6–5,7. Суспензію нагрівали при помірному перемішуванні на водяній лазні до температури 90 – 95 °С і додавали 5 мл ГПТС. Суміш перемішували при помірному нагріванні протягом 3 год, потім промивали на фільтрі дистильованою водою і ацетоном.

Модифікацію аргініном сорбентів, активованих ГПТС, проводили наступним чином: в колбу з мішалкою і зворотнім холодильником поміщали активований сорбент з розрахунку 5 груп/нм². До кожної активованої матриці додавали по 4 г аргініну, а також розчин, що містив 20 мл 1,4-діоксану, 15 г карбонату калію та 150 мл води. Суміш при помірному перемішуванні нагрівали при 80–95 °С протягом 1,5 год. Синтезовані афінні сорбенти промивали декантацією гарячою і холодною водою, переносили на фільтр, промивали ацетоном і висушували на повітрі.

Для синтезу сорбента на основі силохрому АП, до 25 мл сорбента додавали 50 мл 0,25 М Na-фосфатного (ФБ), рН 8,0 та 5 мл 25%-го глутарового альдегіду. Суміш при помірному перемішуванні на шейкері залишали на ніч при температурі 28 С. Розчин декантували і промивали 250 мл 0,05 М ФБ, рН 8,0. Додавали 5 г L-аргініну в 0,05 М ФБ, рН 8,0. Суміш помірно перемішували протягом 3–5 год. Сор-

бент промивали декантацією 0,05 М ФБ рН 8,0 та 0,5 М NaCl, а потім водою. Модифікований силохром АП сушили на повітрі.

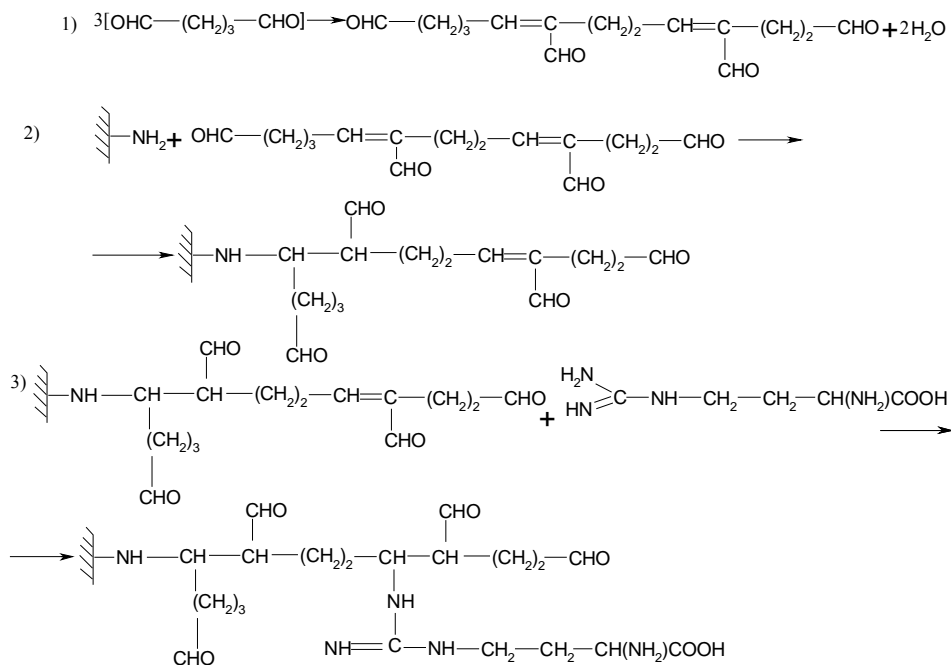


Рис. 2. Схема отримання афінного сорбента №4 на основі силохрому АП: 1 – стадія утворення тримеру; 2 – стадія активації сорбенту; 3 – стадія модифікації L-аргініном.

Для виділення рекомбінантного фермента аргінази I печінки людини використовували рекомбінантний генетично-модифікований штам NCYC 495 (*pGAP1-HsARG1*), сконструйований в ІБК НАН України на основі термотолерантних метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* [16].

Клітини продуцента культивували 2 доби, до концентрації біомаси 2 мг/мл, в колбах при 30 °С на шейкері при постійній аерації (240 об./хв) у мінеральному середовищі наступного складу: KH_2PO_4 – 1 г/л; $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ – 3,5 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г/л; CaCl_2 – 0,1 г/л, сахароза – 20 г/л; дріжджовий екстракт – 0,1 г/л; біотин – 5 мкг/л; аргінін – 74 мг/л.

Оптичну густина дріжджових культур вимірювали турбідиметрично на фотоелектроколориметрі КФК-2МП, і, використовуючи калібрувальну криву, визначали їх суху біомасу в 1 мл середовища.

Відмиті від середовища клітини руйнували на планетарному гомогенізаторі (діаметр скляних кульок 0,5 мм, 1000 об./хв, $r_{\text{сер}}$ 10 см, 6 хв, 4 °С). Безклітинні екстракти (БЕ) відділяли від осколків клітин центрифугуванням при 15000 об./хв, $r_{\text{сер}}$ 8 см, 15 хв, 4 °С).

Концентрацію білка в розчинах визначали за методом Лоурі.

Визначення активності аргінази проводили у два етапи. 1 стадія – проведення ферментативної реакції. 250 мкл субстрату, що містив 65 мМ *L*-Arg, 2 мМ манган (II) хлорид в 20 мМ розчині Тріс-ОН, рН 9,5, преінкубували 10 хв при 37 °С на водяній лазні. Додавали 20 мкл досліджуваного зразка з визначеною концентрацією білка (аліквоту безклітинного екстракту розводили до концентрації 0,1 мг/мл; очищені препарати аргінази – до 0,001 – 0,002 мг/мл). Реакційну суміш інкубували протягом 15 хв при 37 °С, реакцію зупиняли додаванням 30 мкл 50 %-го розчину трихлороцтової кислоти. Отриманий після центрифугування (14000 об./хв, $r_{\text{сер}} = 4$ см, 10 хв) супернатант використовували для визначення в ньому концентрації сечовини.

2 стадія – хімічна. Кількість утвореної в результаті ферментативної реакції сечовини визначали за кількістю забарвленого червоно-рожевого комплексу із діацетиллом, що має максимум поглинання при 520 нм. Для визначення сечовини застосовували комерційні набори реактивів виробництва НВФ “СІМКО”, Львів [17].

Аналіз гомогенності препаратів в ході очистки контролювали електрофоретично за Леммлі, в денатуруючому 12, 5 %-ому ПААГ, в присутності додецилсульфату натрію (SDS). Гелеві пластини фарбували Кумасі R-250.

Усі досліди повторювали тричі, а виміри – у 3-х паралелях.

Результати та їх обговорення

Синтез афінних сорбентів для виділення аргінази І людини із безклітинних екстрактів (БЕ) здійснювали із використанням мінеральних матриць.

Загальний принцип отримання сорбентів на основі МПС, силохромів С-80 і С-120 полягав у модифікації кремнеземів кремнійорганічним модифікатором ГПТС, з наступним ковалентним приєднанням L-аргініну. Таким чином, модифіковані аргініном афінні сорбенти на основі МПС, силохромів С-80 і С-120, позначені у табл. 2 як сорбенти №1–3, відповідно, одержували за схемою, яку зображено на рис. 1.

Таблиця 2

Порівняльна характеристика сорбентів за здатністю до зв'язування аргінази І людини

Хроматографічна стадія	Активність аргінази, Од.						
	Сорбенти, V =1 мл						
	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7
До нанесення на сорбент	304	304	304	304	304	304	304
“Проскок” та промивні розчини	5	52	64	125	71	89	6
Ємність, Од./мл сорбента	300	252	240	179	233	215	298
Елюат 25% ізопропанолом, 2 М NaCl /ТБ	292	245	234	169	167	158	6

Синтез афінного сорбента на основі силохрому АП (сорбент №4, табл. 2), здійснювали шляхом активації глутаровим альдегідом з наступною функціоналізацією сорбенту L-аргініном. Механізм активації матриці полягає в здатності молекули глутарового альдегіду відщеплювати дві молекули води з утворенням тримеру, який містить два подвійні зв'язки вказаного типу. Приєднання по амідній групі матриці відбувається з насиченням одного подвійного зв'язку, а приєднання ліганду (рис. 2) відбувається внаслідок насичення іншого подвійного зв'язку [18].

Для вибору найбільш ефективного сорбента проводили порівняння сорбентів за зв'язуючими властивостями. Як контроль, використовували фірмові комерційні сорбенти *L-Arg*-силохром, *L-Lys*-силохром та немодифіковану матрицю силохром С-80, які у табл. 2 позначено як сорбенти № 5, 6 та 7, відповідно. Для дослідження здатності сорбентів до зв'язування аргінази, наносили по 1 мл БЕ із активністю 304 од./мл на зрівноважені Тріс-буфером, рН 8,8 (ТБ) сорбенти № 1–7. У “проскоку” та промивних розчинах (10 мл, ТБ) визначали активність аргінази. Питому ємність сорбенту визначали за різницею сумарної активності фермента, нанесеного на колонку і сумарної активності “проскоку” та промивів, у розрахунку на 1 мл сорбента.

Як і очікувалось, найефективніше зв'язування фермента відбувається на афінному сорбенті №1 (табл. 2), матриця якого має найбільший розмір пор (табл. 1): середній діаметр пор для МПС складає 3680 нм, тоді як для С-80, С-120 та силохрому амінопропілового – лише 44, 65 та 80 нм. Як видно з даних табл. 2, за ознакою найменшої сумарної активності фермента в проскоках та промивах, сорбенти №1 і 7 мають більшу питому ємність, ніж інші. Але при порівнянні активності в елюатах (25% ізопропанолом, 2 М NaCl в ТБ), стає очевидним, що на сорбенті №7 відбулася неспецифічна сорбція фермента: після проведення елюції аргіназа не десорбувалась. Тому вибір сорбента для афінної хроматографії залежить не лише від здатності сорбувати на поверхні біологічні речовини, але і від здатності їх ефективно десорбувати їх під впливом відповідних елюентів. Таким вимогам відповідає сорбент №1, саме тому його було використано для розробки протоколу виділення аргінази.

Підбір умов хроматографічного виділення аргінази проводили на обраному нами афінному сорбенті №1 (див. табл. 2). Для цього на колонку (2 x 10 см), заповнену 10 мл сорбенту №1 у ТБ, наносили розчин БЕ, промивали стартовим буфером ТБ. Фермент елюювали послідовно зростаючими концентраціями 0,1 М – 2 М NaCl в ТБ, а також розчином, що містив 25% ізопропанол і 1 М NaCl в ТБ. Фракції збирали за допомогою колектора фракцій. “Проскок” і промивні розчини відбирали для вимірювання концентрації білка та активності фермента, який не зв'язався із сорбентом на першій стадії хроматографічної очистки. Ступінь очищення цільового фермента від баластних білків характеризували, визначаючи його активність та концентрацію білка в кожній фракції елюату та за допомогою електрофорезу в ПААГ за денатуруючих умов у присутності SDS (рис. 3).

Результати хроматографічного очищення аргінази із БЕ подано у табл. 3.

Як видно з рис. 3, шляхом хроматографії на синтезованому нами афінному сорбенті аргінін-макропористе скло, ми одержали електрофоретично гомогенні препарати рекомбінантної аргінази І печінки людини.

Аналіз даних літератури по одержанню очищеної аргінази з різних джерел показав, що всі способи виділення та хроматографічної очистки здійснювалися в декілька етапів [2–12]. Спільними методами очищення аргінази із різних джерел є іонообмінна хроматографія – на целюлозі або сефарозі, гель-фільтрація на сефадексі G-200. Як додатковий, для очищення аргінази використовують метод афінної хроматографії, зазвичай, на сефарозі 4В з привитим лігандом – аргініном, а також метод адсорбційної хроматографії на гідроксиапатиті.

Оскільки процес виділення аргінази із різних джерел відбувається в декілька етапів (табл. 4), вихід кінцевого продукту є зазвичай низьким, однак ступінь очистки є високим. Найбільшого виходу рекомбінантної аргінази – 57%, із очисткою у

93 рази, досягнуто при виділенні із рекомбінантних дріжджів *S. cerevisiae* [13], а найменшого – при очищенні із еритроцитів крові людини – 0,08%, із очисткою у 230 разів [4–5]. Низькі виходи пов’язані із втратами активності фермента після кожної стадії виділення.

Таблиця 3

Характеристика хроматографічного очищення аргінази на сорбенті №1 аргінін-макропористе скло

	V, мл	C _{білка} , мг/мл	Σбілок, мг	Питома активн. (A)		ΣA, Од.	Вихід (%)	Очистка (раз)
				Од./мл	Од./мг			
Вихідний БЕ	75	4,72	354	104	22	7800	=100	
Проскок+промив ТБ	77,5	0,21	16,3	0,53	2,5	41,1	0,53	
Промив 0,1М NaCl в ТБ	60	0,15	9	0,16	1,1	9,6	0,12	
Промив 0,5М NaCl в ТБ	60	0,11	6,6	1,45	13,2	87	1,11	
Елюція 1М NaCl/ТБ	58	0,26	15,1	12,5	48	725	9,3	2
Елюція 2М NaCl/ТБ	35	0,2	6,9	88	440	3080	39	20
Елюція 25% ізопропанолом, 1 М NaCl в ТБ, фракції:								
1	4,5	0,08	0,36	98	1225	441	5,6	56
2	3,5	0,05	0,18	240	4700	840	10,8	214
3	3,5	0,15	0,53	250	1651	875	11,2	75

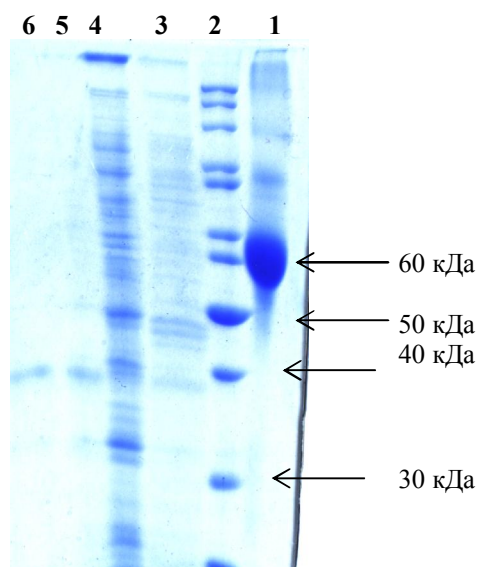


Рис. 3. Електрофоретична характеристика препаратів аргінази в 12% SDS-ПААГ в ході очистки: сироватковий альбумін людини (1), маркери мол. маси (2), БЕ до нанесення на колонку (3), проскок (4); елюати 25% ізопропанолом, 1 М NaCl в ТБ, фракції 1 (5) і 2 (6).

Таблиця 4

Виділення та очищення аргінази із різних джерел

Джерела виділення	Стадії виділення			Хроматографічні методи очищення				Очистка (разів)	Вихід (%)	Літ.
	t°	С. А.*	Ацетон	Гель-фільтрація	Іонообмінна	Афінна	Адсорбційна			
Печінка людини	1* 60°C	3	2	5 сефадекс G-200	4 - DEAE-целюлоза	-	-	418	17,1	[4]
Печінка корови	1 45°C	3 40%	2	5 сефадекс G-200	4 - DEAE-целюлоза	-	-	1216	39	[10]
Печінка кроля	1 60°C	3 40%	2	5 сефадекс G-200	4 - DEAE-целюлоза	-	-	1216	39	[7]
Печінка щура	2 45°C	1-35% 3-55% 5-75%	-	-	4 - DEAE-целюлоза	-	-	139	45	[3]
Еритроцити з крові людини	1 60°C	3 40-55%	2	5 сефадекс G-200	4 - DEAE-целюлоза	-	-	230	0,03	[5]
Нирка щура	2 58°C	1-58% 3-64%	-	-	4 - DEAE-целюлоза	-	-	36	0,8	[3]
Насіння гороху <i>Vigna catjang</i>	-	1 35%	-	2 Bio-Gel P150	3 - DEAE-целюлоза	4 аргінін-АН – сефароза 4В	-	64	1,6	[10]
Насіння сої <i>Glycine max</i>	-	1 40%	-	2 сефадекс G-200	3 - DEAE-целюлоза	5 аргінін-АН – сефароза 4В	4 гідрокси-апатит	152	3,8	[11]
Рекомбінантні дріжджі <i>S. cerevisiae</i>	1 60°C	2 45-70%	-	4 TSK G-3000, HPLC	3 - сефароза Green - А	-	-	93	57	[13]
Рекомбінантні дріжджі <i>H. polymorpha</i>	-	-	-	-	-	1 аргінін-МПС	-	200	11,3	Ця праця

Як видно з табл. 4, розроблений нами метод виділення аргінази на синтезованому афінному сорбенті складається лише з однієї стадії, а вихід в ході очистки в порівнянні із іншими методами є достатньо високим. Отже, технологія виділення аргінази за розробленою нами схемою є зручною і економічно вигідною.

Таким чином, здійснено синтез афінних сорбентів, модифікованих L-аргініном, із використанням мінеральних матриць: макропористого скла із контрольованим розміром пор, силохромів С-80 і С-120 та силохрому амінопропілового. Проведено порівняльне вивчення синтезованих сорбентів за їх здатністю до сорбції/десорбції аргінази І печінки людини із рекомбінантного штама-надпродуцента, сконструйованого на основі дріжджів *Hansenula polymorpha*. Запропоновано просту схему виділення та очищення рекомбінантної аргінази із безклітинних екстактів дріжджового штама-продуцента на кращому афінному сорбенті – аргінін-макропористе скло, яка дозволила отримати у аналітичній кількості 200-кратно очищені (за питомою активністю), електрофоретично гомогенні препарати фермента із 11 %-им виходом.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Cheng P. N. M., Leung Y. C., Lo W. H., Tsui S. M., Lam K. C.* Remission of hepatocellular carcinoma with arginine depletion induced by systemic release of endogenous hepatic arginase due to transhepatic arterial embolisation, augmented by high-dose insulin: arginase as a potential drug candidate for hepatocellular carcinoma // *J. Cancer Letters*. – 2005. – Vol. 224. – P. 67–80.
2. *Hsueh E. C., Knebel S., Collier I., Kadze M., Hsueh C., Lo T., Cheng P. Leung T.* Recombinant arginase as a novel anti-melanoma agent // *J. Clinical Oncology*. – 2006. – Vol. 24. – P. 18–25.
3. *Reczkowski R.S., Ash D.E.* Rat liver arginase: kinetic mechanism, alternate substrates, and inhibitors // *J. Biochim Biophys Acta*. – 1994. – Vol. 312. – P. 31–37.
4. *Beruter J.J., Bachman C.P.* Purification and properties of arginase from human liver and erythrocytes // *J. Biochem*. – 1978. – Vol. 75. – P.449–454.
5. *Nishibe H., Makino H.* Automated Determination of Arginase in Human Erythrocytes // *J. Anal. Biochem*. – 1971. – Vol. 43. – P. 357–359.
6. *Manning R., Sumner D.* Crystallization of Arginase from Normal and Cirrhotic Human Liver // *J. Nature*. – 2001. – Vol. 207. – P. 79–86.
7. *Gopalakrishna R., Aggar A.J.* Arginase from rabbit fibrosarcoma // *J. Biosci*. – 1980. – Vol. 2. – P.267–274.
8. *Cheng P.N., Leung Y.C., Lo H.W., Tsui K.S.* Remission hepatocellular carcinoma with arginine depletion induced by systematic release of endogenous hepatic arginase due to transhepatic arterial embolisation, augmented by high-dose insulin: arginase as a potential drug candidate for hepatocellular carcinoma // *J. Cancer*. – 2005. – Vol. 224. – P. 67–80.
9. *Straus B., Capelak I., Festa G.* Arginase, a new marker of Mammary Carcinoma // *J. Clin. Chim. Acta*. – 1992. – Vol. 210. – P. 5–12.
10. *Dabir S., Dabir P., Somvanshi B.* Purification, properties and alternate substrate specificities of arginase from two different sources: *Vigna catjang* and buffalo liver // *J. Biol*. – 2005. – Vol. 1. – P. 114–122.
11. *Downun K.R., Rosenthal G.A., Cohen W.S.* L-arginine and L-canavanine metabolism in jack bean, *Canavalia ensiformis*, soybean *Glycine max* // *J. Plant Physiol*. – 1983. – Vol. 73. – P. 965–968.

12. *O'malley K.L., Terwilliger R.D.* Structure and properties arginase from the Polyhaete Annelid *Pista Pacifica* Berkeley // *J. Biochem.* – 1974. – Vol. 75. – P. 449–454.
13. *Green S.M., Eisenstein E, McPhie P, Hensley P.* The purification and characterization of arginase from *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol Chem.* – 1990. – Vol. 265, №3. – P. 1601–1607.
14. *Alder A.J., Kong A.S., Friedman E.A.* Effect of cell-free murine liver extract on lymphocyte blastogenesis in vitro // *J. Cell. Immunol.* – 1997. – Vol. 36. – P. 271–282.
15. *Швачко Л.П., Киберев В.К., Гайда А.В., Магеровський Ю.В., Монастирський В. А.* Получение тромбина человека с помощью аффинной хроматографии на грамицидин С - силохроме С – 80 // *Укр. биохим. ж.* – 1988. – № 60. – С. 3–7.
16. *Нагорний В.О., Фаюра Л.Р., Борецький Ю.Р., Стасик О.В., Сибірний А.А.* Розробка платформи для надекспресії та оптимізації кінетичних властивостей аргіназ на основі метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* // Зб. наукових праць “Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології” з'їзду Українського товариства генетиків та селекціонерів. Алушта, 2007 р. Т. 1., С. 366–371.
17. *Меньшикова В.В.* Лабораторные методы исследования в клинике. – М.: Медицина, 1987. – С. 215–219.
18. *Остерман Л.А.* Хроматография белков и нуклеиновых кислот. – М.: Наука. – 1985. – 536 с.

SUMMARY

Nataliya STASYUK^{1,2}, Galyna GAYDA¹, Anatoliy GAYDA¹, Oleh STASYK¹, Volodymyr KARPIAK², Yevgen KOVAL'CHUK², Mykhailo GONCHAR¹

THE SYNTHESIS OF AFFINITY SORBENTS FOR PURIFICATION OF HUMAN ARGINASE I FROM THE RECOMBINANT YEAST STRAIN *HANSENULA POLYMORPHA*

¹Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine,
Drahomanov Street 14/16, 79005 Lviv, Ukraine

²Chemical Faculty, Ivan Franko National University of Lviv,
Kyryla and Mefodia str. 6, 79005 Lviv, Ukraine
stasuk_natalia@ukr.net

The synthesis of affinity sorbents was performed using mineral matrixes: aminopropyl-silochrome C-120 (pore diameter – 50 nm), controlled pore glass (3680 nm), silochromes S-80 and S-120 (pore diameter – 65 and 44 nm). For activation of aminopropyl-silochrome and – glutaric aldehyde was used; for activation of controlled pore glass and silochromes – γ -glycidoxypolytriethoxysilane was used. For functionalization of the sorbents, the *L*-arginine was coupled to the synthesized glycidyl- and aldehyde-containing matrixes. Comparison of different sorbents allowed to conclude that arginine-modified sorbent based on controlled pore glass, is optimal for isolation of human arginase I from the cell-free extracts of the recombinant yeast *Hansenula polymorpha*.

One-step column affinity chromatography was developed and, as a result, a 200-fold purified preparation of recombinant arginase was obtained with 11% yield. The homogeneity of the arginase preparation was approved by PAAGE-SDS electrophoresis.

Keywords: recombinant arginase, affinity sorbent, macroporous glass, silochrome, yeasts *Hansenula polymorpha*.

РЕЗЮМЕ

Наталья СТАСЮК^{1,2}, Галина ГАЙДА¹, Анатолий ГАЙДА¹, Олег СТАСИК¹,
Владимир КАРПЬЯК², Евгений КОВАЛЬЧУК², Михаил ГОНЧАР¹

**СИНТЕЗ АФФИННЫХ СОРЕБЕНТОВ ДЛЯ ОЧИСТКИ АРГИНАЗЫ І ЧЕЛОВЕКА ИЗ
РЕКОМБИНАНТНЫХ ДРОЖЖЕЙ *HANSENULA POLYMORPHA***

¹Институт биологии клетки НАН Украины,
ул. Драгоманова 14/16, 79005 Львов, Украина

²Химический факультет, Львовский национальный университет имени Ивана Франка
ул. Кирилла и Мефодия 6/8, 79005 Львов, Украина
stasuk_natalia@ukr.net

Осуществлен синтез аффинных сорбентов с использованием минеральных матриц: силохрому С-120 аминопропилового (размер пор 50 нм), макропористого стекла с контролируемым размером пор (3680 нм) и силохромов С-80 и С-120 (65 и 44 нм). Для активации силохрома аминопропилового был использован глутаровый альдегид, для макропористого стекла и силохромов С-80 и С-120 - γ -глицидо-оксипропил-три-этоксисилан. Активированные матрицы были функционализированы L-аргинином. Сравнение различных аффинных сорбентов показало, что аргинин-модифицированный сорбент на основе макропористого стекла с контролируемым размером пор является оптимальным для выделения аргиназы І печени человека из бесклеточных экстрактов рекомбинантных штаммов-надпродуцентов, сконструированных на основе дрожжей *Hansenula polymorpha*. Предложен способ выделения и очистки аргиназы І человека, который позволяет в одну стадию аффинной колоночной хроматографии получить с 11%-ным выходом 200-кратно очищенные (по удельной активности) препараты фермента, гомогенные по результатам электрофоретического анализа в денатурирующем полиакриламидном геле.

Ключевые слова: рекомбинантная аргиназа, аффинный сорбент, макропористое стекло, силохром, дрожжи *Hansenula polymorpha*.

Надійшла: 18.01.2011.
Прийнята до друку: 26.04.2011.