

УДК 547.466

МЕТОД АНАЛИЗА L-АРГИНИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АРГИНАЗЫ I

© 2013 г. Н. Е. Стасюк*, Г. З. Гайда*, М. В. Гончар* **

*Институт биологии клетки НАН Украины, Львов, 79005

**Жешувский университет, 36-100 Кольбушова, Польша

e-mail: galina_gayda@yahoo.com

Поступила в редакцию 21.02.2013 г.

Разработан высокоселективный и чувствительный метод количественного определения L-аргинина (Арг) с флуоресцентной детекцией продукта реакции. Метод основан на использовании аргиназы I печени человека, выделенной из рекомбинантного штамма-продуцента – дрожжей *Hansenula polymorpha*, и 2,3-бутандионмонооксида в качестве реагента на мочевины – продукт ферментативной реакции. Линейный диапазон концентраций определения Арг в конечной реакционной смеси – от 0.2 до 250 мкМ, предел детекции – 0.16 мкМ. Апробация нового метода на образцах коммерческих фармацевтических препаратов, содержащих Арг, продемонстрировала высокую корреляцию результатов ($R = 1.0$) с данными производителя и результатами других методов определения Арг.

DOI: 10.7868/S0555109913050139

Большинство известных химических и физико-химических методов определения концентрации L-аргинина (Арг) имеет ряд недостатков – низкую селективность и чувствительность, высокую стоимость и сложность аппаратуры (для физико-химических методов), недостаточную стабильность операционную и при хранении (для биосенсорных методов). В связи с этим необходима разработка новых высокоселективных и чувствительных методов количественного анализа Арг, в том числе энзиматических. Перспективными инструментами для разработки таких методов могут служить ферменты метаболизма Арг – аргиназа, аргининдеиминаза, аргинин-декарбоксилаза.

Аргиназа (КФ 3.5.3.1; L-аргинин-амидиногидролаза) катализирует гидролиз Арг до L-орнитина (Орн) и мочевины. Цитоплазматическая аргиназа I печени человека принимает непосредственное участие в цикле мочевины, а митохондриальная аргиназа II различных органов (почек и др.), не участвуя в цикле мочевины, поддерживает гомеостаз Арг и Орн [1–4]. Исследования последних лет показали, что аргиназа I может быть перспективным препаратом в энзимотерапии онкологических заболеваний, вызывая голодание раковых клеток по Арг, в первую очередь, гепатокарциномы и меланомы [5–8]. Для контроля за таким лечением требуется постоянный мониторинг уровня Арг в крови. Другой важной сферой, где необходимо проводить анализ Арг, является пищевая промышленность, в частности виноделие, поскольку Арг и мочевина в процессе термической обработки продуктов образуют в присутствии этанола канцерогенный продукт – этилкарбамат (уретан) [9].

В силу высокой стоимости препарата аргиназы I, актуальны поиск альтернативного источника фермента и разработка эффективной технологии его выделения.

В Институте биологии клетки НАН Украины были получены рекомбинантные дрожжевые штаммы-продуценты аргиназы I печени человека (далее – аргиназа), разработаны оптимальные схемы получения высокоочищенных стабильных препаратов фермента [10–12]. Препараты аргиназы успешно применялись для иммобилизации на золотых и серебряных наночастицах, для конструирования биосенсоров на Арг [13–16], а также для разработки энзиматического метода анализа Арг со спектрофотометрической (СФ) детекцией продукта реакции [17].

Однако недостаточная чувствительность разработанных прежде методов (предел детекции Арг в анализируемом образце – 100 мкМ для СФ метода и потенциометрического биосенсора) не позволяла измерять концентрацию этой аминокислоты в реальных образцах биологических жидкостей.

Цель работы – разработка чувствительного энзиматического метода определения Арг, основанного на применении аргиназы и 2,3-бутандионмонооксида, с флуориметрической регистрацией продукта реакции (мочевины) и апробация нового метода на образцах фармацевтических препаратов.

МЕТОДИКА

В качестве продуцента аргиназы использовали рекомбинантный штамм дрожжей NCYC 495

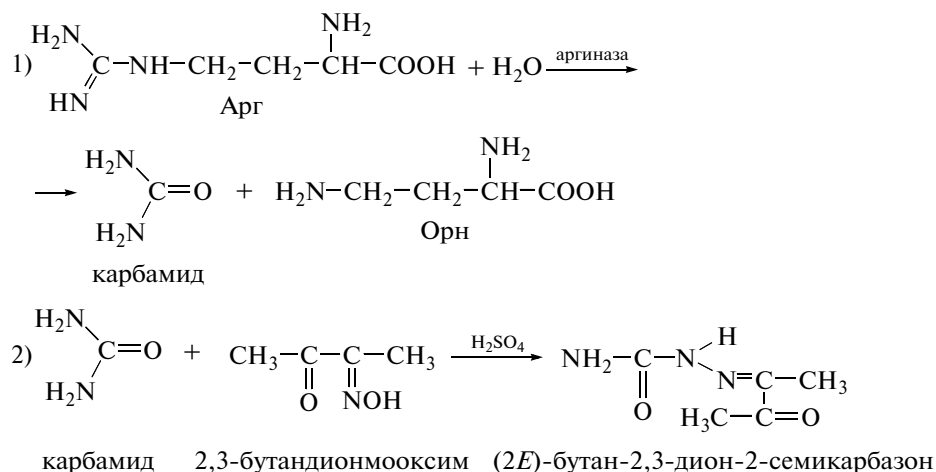


Рис. 1. Схема реакций при определении Арг с использованием аргиназы.

Hansenula polymorpha pGAP1-HsARG1(леu2car1 Sc:LEU2), содержащий целевой ген *HsARG1* под контролем конститутивного промотора гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [10].

Фермент выделяли из бесклеточного экстракта штамма-продуцента и очищали хроматографически на аффинном сорбенте Арг-макропористое стекло [12–13]. Препарат фермента с удельной активностью 600 мкмоль мин⁻¹ мг⁻¹ белка (600 ед./мг) использовали для разработки энзиматического метода анализа Арг.

В работе анализировали следующие образцы фармацевтических препаратов, содержащие Арг: Тивортин, производства “Юрія Фарм” (Украина), Цитрагинин – “Laphal Industria” (Франция) и Аминоплазмаль 10% Е – “Mr Brown Melzunhen AG” (Германия). Все образцы хранили при –20°C.

Референтный химический анализ Арг, основанный на использовании 8-гидроксихинолина [18], осуществляли методом добавок. Оптическую плотность продукта реакции регистрировали на спектрофотометре “Shimadzu UV-1650 PC” (Япония), при 500 нм, против контрольного образца, не содержащего Арг. Концентрацию Арг в фотометрируемом образце определяли по калибровочному графику.

Процедуру количественного анализа Арг проводили по схеме, разработанной ранее для энзиматического метода с СФ регистрацией продукта [17]. В стеклянные пробирки вносили по 0.1 мл проб, разведенных 30 мМ трис-НСl буфером (ТБ), рН 8.8, а для калибровочных проб – по 0.1 мл стандартных растворов Арг в ТБ с концентрациями от 0.05 мМ до 12 мМ. Реакцию запускали добавлением 0.01 мл раствора аргиназы (16.5 ед./мл) в ТБ. Инкубационную смесь выдерживали при 37°C в течение 15 мин, затем добавляли 1.8 мл

0.5%-ного раствора 2,3-бутандионмооксима (ДМО) в воде, 1.2 мл 3.0 М H₂SO₄ и кипятили на водяной бане 30 мин.

Оптимальные условия регистрации флуоресценции конечного продукта, в частности выбор длины волны эмиссии, осуществляли на приборе Hitachi – MPF-4 (Япония) с возбуждением при 380 нм. Эксперименты по определению диапазона линейности и селективности метода, а также измерение концентрации Арг в пробах методом сравнения со стандартным образцом [19] проводили на приборе Quantech Digital Filter Fluorometer (“Thermo Scientific”, США), используя светофильтры для возбуждения флуоресценции (λ = 360 нм) и для регистрации эмиссии (λ = 535 нм).

Результаты измерений обрабатывали статистически. Статистическую обработку проводили с помощью программы OriginPro 8.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Предложенный нами метод основан на ферментативном гидролизе Арг до Орн и карбамида (I стадия реакции энзиматическая). Карбамид при прогревании в кислой среде взаимодействует с ДМО (II стадия, химическая), образуя продукт желтого цвета, концентрацию которого можно количественно оценить спектрофотометрически при 480 нм или флуориметрически при 510 нм [20]. Конечным продуктом химической реакции может быть как (2E)-бутан-2,3-дион-2-семикарбазон, так и другие соединения, в том числе циклические [21–23]. Принципиальная схема предполагаемых реакций, на которых основан метод определения Арг, представлена на рис. 1.

На рис. 2 представлены спектры продуктов химической реакции ДМО с растворами карбамида разной концентрации. Абсорбционный макси-

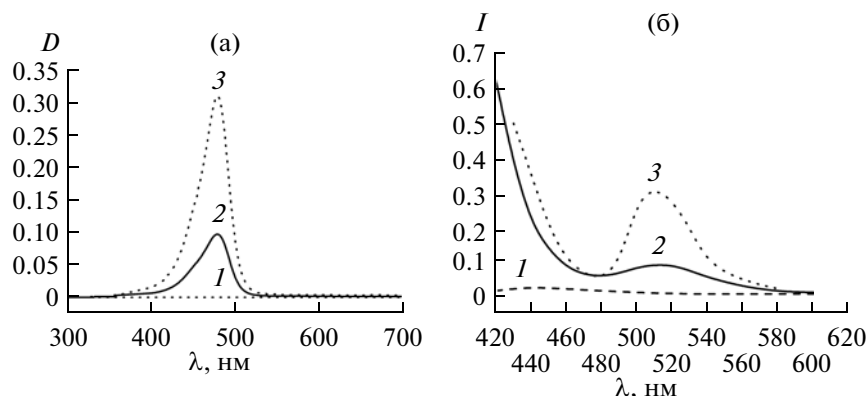


Рис. 2. Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) модельных реакционных смесей ДМО-мочевина: контроль (1); 0.01 мМ (2) и 0.028 мМ мочевины (3). Флуоресценцию регистрировали на приборе Hitachi – MPF-4 с возбуждением при $\lambda = 380$ нм.

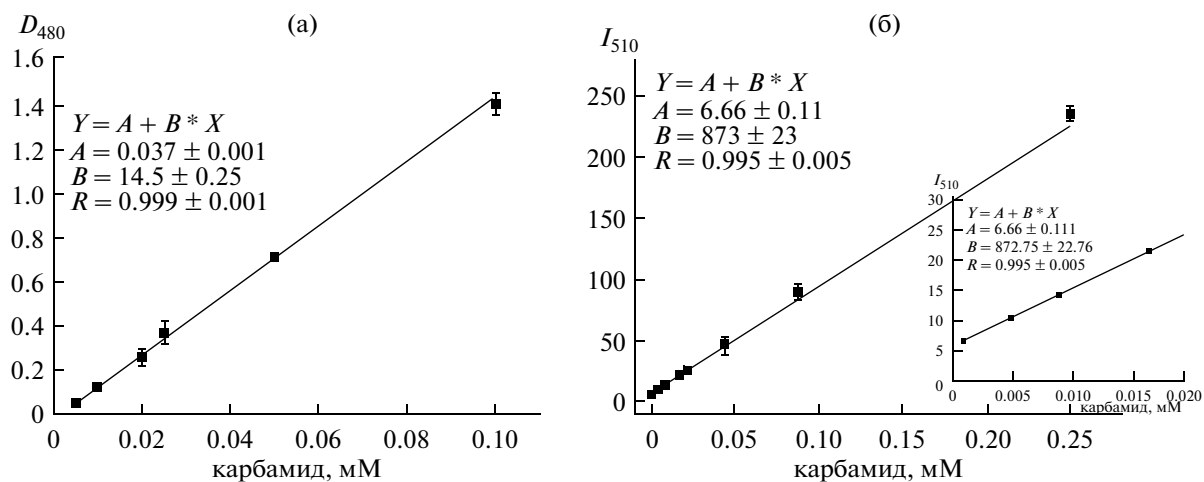


Рис. 3. Калибровочные графики для определения мочевины спектрофотометрическим (а) и флуориметрическим (б) методами. Флуоресценцию регистрировали на флуориметре Thermo Scientific, с фильтрами возбуждения при $\lambda = 360$ нм и эмиссии при $\lambda = 535$ нм.

мум поглощения окрашенного продукта находится в коротковолновой видимой области при 480 нм (рис. 2а), а пик эмиссии флуоресценции – при 510 нм (рис. 2б).

Для оптимизации условий проведения химической реакции экспериментально подбирали концентрацию ДМО и время кипячения на химической стадии реакции для получения максимальной флуоресценции [17]. На рис. 3 представлены калибровочные графики определения мочевины энзиматическим методом со спектрофотометрической (рис. 3а) и флуориметрической (рис. 3б) детекцией продукта реакции ДМО-мочевины в конечной реакционной смеси. Миллимолярный коэффициент экстинкции (ϵ) совпадает по величине с наклоном линии регрессии калибровочного

графика [19]. Как видно из рис. 3, ϵ мочевины для СФ метода составляла $14.5 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [17], а для флуоресцентного – $873 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$, что свидетельствовало о возможности 60-кратного повышения чувствительности флуориметрического способа регистрации по сравнению со спектрофотометрическим.

Сравнение калибровочных графиков для энзиматического определения мочевины (рис. 3) позволило сделать вывод, что при флуориметрической регистрации продукта реакции диапазон линейности определяемых концентраций гораздо шире, чем при СФ детекции.

Все последующие эксперименты проводили в оптимальных условиях энзиматической стадии реакции, установленных ранее [17]: кон-

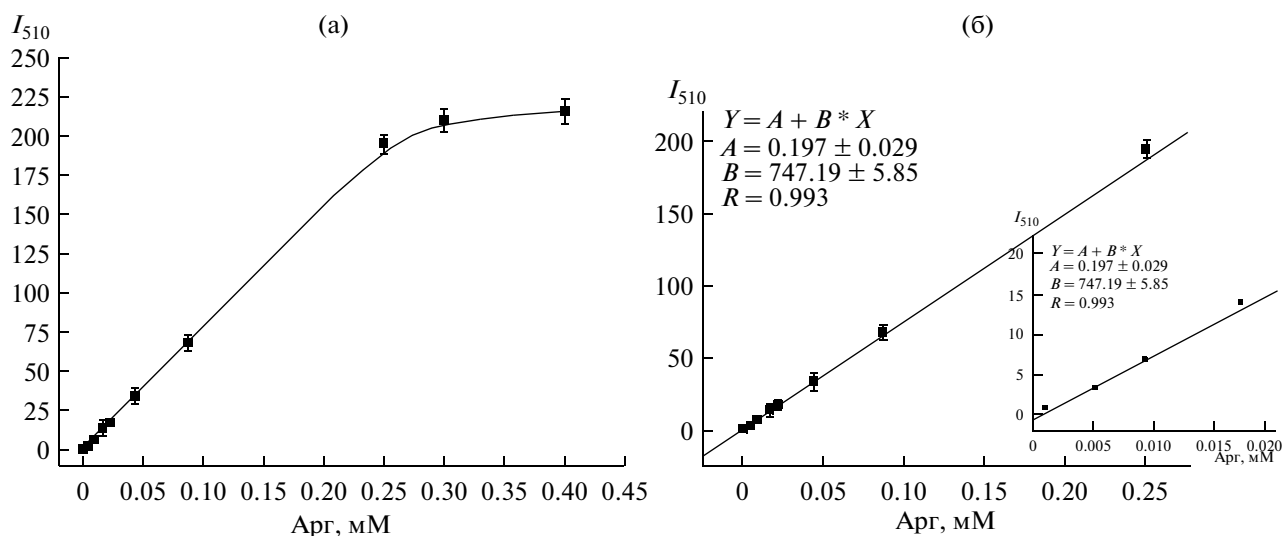


Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции конечной реакционной смеси от концентрации Арг (а) и диапазон линейности метода (б). Флуоресценцию регистрировали на флуориметре Thermo Scientific, с возбуждением при $\lambda = 360$ нм и эмиссией при $\lambda = 535$ нм.

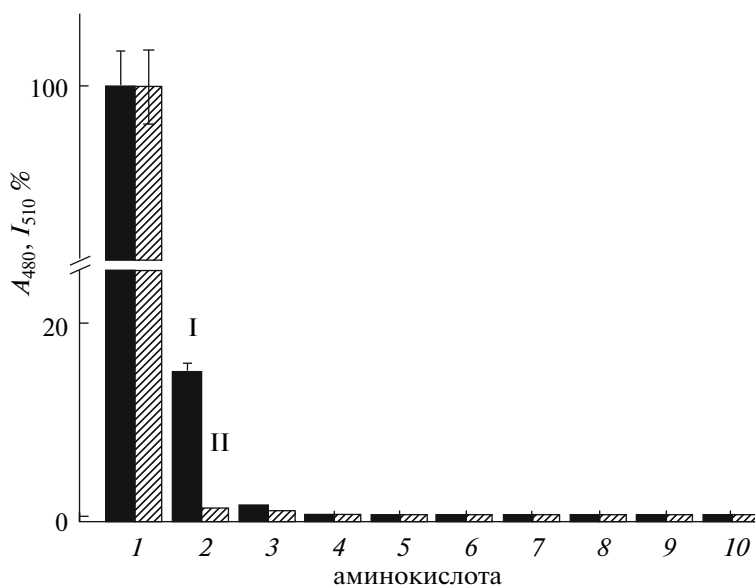


Рис. 5. Сравнение селективности ферментативных методов, основанных на применении ДМО: поглощение при 480 нм (I) и интенсивность излучения (II). В качестве тестируемых соединений использовали 1.0 мМ растворы L-аминокислот: 1 – Арг, 2 – Цит, 3 – Кан, 4 – Лиз, 5 – Глн, 6 – Глу, 7 – Про, 8 – Мет, 9 – Трп, 10 – Орн. Флуоресценцию регистрировали на флуориметре Thermo Scientific, с возбуждением при $\lambda = 360$ нм и эмиссией при $\lambda = 535$ нм.

центрация аргиназы в инкубационной смеси – 1.5 ед./мл, время инкубации – 15 мин. На рис. 4 представлены результаты изучения зависимости интенсивности флуоресценции конечного продукта реакции (ДМО-мочевина) от концентрации Арг и определения диапазона линейности метода. Линейность калибровочного графика сохранялась в диапазоне концентраций Арг 2×10^{-4} –0.25 мМ в конечной пробе, предел обнаружения Арг – 1.6×10^{-4} мМ. Сравнение ϵ для

чистого карбамида ($873 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) и карбамида, образовавшегося из Арг ($747 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) в результате ферментативного гидролиза свидетельствовало о 85%-ной конверсии Арг, т.е. при избытке аргиназы на первой стадии реакции можно ожидать еще 1.2-кратного повышения чувствительности метода.

Изучение стабильности измеряемого конечного продукта от времени показало, что интенсивность флуоресценции через 1 сут снижалась всего

Результаты анализа Арг в фармацевтических препаратах

Метод, ссылка	Концентрация Арг в образцах, мМ		
	Тиворгин	Цитраргинин	Аминоплазмаль
Данные производителя $R = 1.0$	199.3	475.0	8.0
Спектрофотометрия $R = 1.0$ [17]	199.4 ± 0.9	480.1 ± 0.9	8.2 ± 0.1
Референтный химический [эта статья] $R = 0.9999$	198.5 ± 3.5	481.6 ± 4.1	8.0 ± 0.4
Амперометрия [16] $R = 0.9999$	200.3 ± 2.5	479.9 ± 4.7	7.8 ± 0.3
Потенциометрия [15] $R = 0.9998$	200.7 ± 4.5	447.2 ± 3.3	8.5 ± 0.3
Флуорометрия [эта статья]	200.1 ± 3.6	477.5 ± 0.6	8.1 ± 0.1

R – коэффициент корреляции при сравнении с флуорометрическим методом.

на 15% при хранении реакционной смеси в темноте при комнатной температуре.

Таким образом, предложен высокочувствительный энзиматический метод количественного определения Арг в модельных растворах с флуоресцентной регистрацией продукта реакции, не уступающей большинству известных на сегодня физико-химических методов по чувствительности [24].

Однако высокая чувствительность – это не единственное требование к методу. Одной из важнейших характеристик каждого аналитического метода является селективность. Уровень селективности предлагаемого метода (рис. 5) оценивали в относительных единицах (%) интенсивности флуоресценции к величине максимального сигнала (для 1 мМ Арг), принятой за 100%. В случае СФ регистрации наблюдались положительные сигналы: 15% на канаванин (**Кан**) и 1% на цитруллин (**Цит**). Положительный сигнал на Кан в СФ методе обусловлен способностью аргиназы гидролизовать эту аминокислоту до мочевины [26]. При флуориметрической детекции влияние Кан и Цит незначительно – 0.4 и 0.7% соответственно.

Отсутствие сигнала на остальные исследуемые аминокислоты объясняется высокой селективностью аргиназы к природному субстрату – Арг и высокой степенью чистоты ферментного препарата. Положительный сигнал на Кан не может быть существенной помехой при анализе реальных образцов, по крайней мере биологических жидкостей и пищевых продуктов, поскольку Кан встречается, как правило, только в семенах некоторых растений [25].

Предложенный энзиматический флуориметрический метод тестировали на образцах коммерческих фармацевтических препаратов, содержащих Арг, путем сравнения со стандартом. Результаты количественного определения Арг несколькими методами представлены в таблице. Соответствующие коэффициенты корреляции (R) между результатами анализа Арг, полученными различными методами, близки к 1 при высокой степени достовер-

ности таких связей ($p < 0.006$). Воспроизводимость результатов анализа предложенным методом также достаточно высока, коэффициент вариации составлял 0.1–2.0%.

Предварительные исследования показали (данные не представлены), что разработанный ферментативный метод можно применять для мониторинга Арг в биологических жидкостях и пищевых продуктах. Учитывая высокую стабильность полученного нами препарата аргиназы (за 3 г. хранения фермента при -10°C в трис-буфере, содержащем 1М NaCl и 1 мМ MnCl_2 , его активность уменьшалась только в 2 раза), можно прогнозировать перспективность разработки и выпуска энзиматического набора для определения Арг на основе предложенного метода для использования его в лабораторной практике.

Таким образом, разработан энзиматический метод количественного анализа Арг с флуориметрической детекцией продукта реакции – мочевины. Метод основан на применении ДМО и высокоочищенного фермента – аргиназы I печени человека, полученного из клеток рекомбинантного штамма дрожжей *H. polymorpha*. Новому методу присущи высокая пороговая чувствительность определения Арг (0.16 мкМ), широкий диапазон линейности 0.2–250 мкМ, а также нечувствительность к интерферирующему влиянию других аминокислот. Метод прост в исполнении, не требует сложной подготовки образцов для анализа и может применяться для количественного определения Арг в реальных образцах.

Работа выполнена при финансовой поддержке проектов НАТО NUKR.SFPP 984173 и комплексной научно-технической программы НАН Украины “Сенсорные приборы для медико-экологических и промышленно-технологических потребностей: метрологическое обеспечение и опытная эксплуатация” 5/3-2013, а также индивидуально-гранта FEMS (UA-SMU2013-1Stasyuk).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Guoyao W.U., Morris S.M. // J. Biochem. 1998. V. 366. P. 1–17.
2. Kepka-Lenhart D., Mistry S.K., Wu G., Morris S.M. Jr. // Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2000. V. 279. № 6. P. 2237–2242.
3. Morris S.M. Jr., Bhamidipati D., Kepka-Lenhart D. // Gene. 1997. V. 193. № 2. P. 157–161.
4. Visek W.J. // J. Nutr. 1985. V. 116. № 1. P. 36–46.
5. Wheatley D.N., Campbell E., Lai P.B.S., Cheng P.N.M. // Gene Ther. Mol. Biol. 2005. V. 9. P. 33–40.
6. Glazer E.S., Stone E.M., Zhu C., Massey K.L., Hamir A.N., Curley S.A. // Transl. Oncol. 2011. V. 4. № 3. P. 138–146.
7. Mauldin J.P., Zeinali I., Kleypas K., Woo J.H., Blackwood R.S., Jo C.H., Stone E.M., Georgiou G., Frankel A.E. // Transl. Oncol. 2012. V. 5. № 1. P. 26–31.
8. Vynnytska-Myronovska B., Bobak Y., Garbe Y., Dittfeld C., Stasyk O., Kunz-Schughart L.A. // Int. J. Cancer. 2012. V. 130. № 9. P. 2164–2175.
9. Weber J.V., Sharypov V.I. // Sustainable Agriculture Reviews. / E. Lichtfouse. Springer, 2009. V. 2. P. 429–452.
10. Нагорний В.О., Фаюра Л.Р., Борецький Ю.Р., Стасюк О.В., Сибірний А.А. // Збірка наукових праць “Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології” IX з’їзду Українського товариства генетиків та селекціонерів. Алушта. 2007. Київ: Логос, 2007. Т. 1. С. 366–371.
11. Zakalskiy A.E., Zakalska O.M., Rzhepetsky Y.A., Potocka N., Stasyk O.V., Horak D., Gonchar M.V. // Protein Expr. Purif. 2012. V. 81. P. 63–68.
12. Стасюк Н.Є., Гайда Г.З., Ковальчук Є.П., Стасюк О.В., Гончар М.В. // Укр. біохім. журн. 2010. Т. 82. № 6. С. 14–21.
13. Stasyuk N., Serkiz R., Mudry S., Gayda G., Zakalskiy A., Koval’chuk Y., Gonchar M., Nisnevich M. // Nanotech. Develop. 2011. V. 1:e3. P. 11–14.
14. Патент України. 2011. № 64025.
15. Stasyuk N., Smutok O., Gayda G., Koval’chuk Y., Gonchar M. // J. Mater. Sci. Eng. 2011. V. 1. P. 819–827.
16. Stasyuk N., Smutok O., Gayda G., Vus B., Gonchar M., Koval’chuk Ye. // Biosens. Bioelectron. 2012. V. 37. № 1. P. 46–52.
17. Стасюк Н.Є., Гайда Г.З., Гайда А.В., Гончар М.В., Ковальчук Є.П. // Ukrainica Biorganica Acta. 2012. Т. 1. С. 31–37.
18. Wang H., Liang X.-H., Zhao R.-X., Feng Li.-D., Li H. // Agric. Sci. China. 2008. V. 7. № 10. P. 1210–1215.
19. Золотов Ю.А., Дорохова Е.Н., Фадеева В.И. Основы аналитической химии. М.: Высшая школа, 2010. 416 с.
20. Rho J.H. // Clin. Chem. 1972. V. 18. № 5. P. 476–478.
21. Lugosi R., Thibert R.J., Holland W.J., Lam L.K. // Clin. Biochem. 1972. V. 5. P. 171–181.
22. Butler A.R., Hussain I., Leitch E. // Clin. Chim. Acta. 1981. V. 112. P. 357–360.
23. Rosenthal G.A., Dahlman D.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 1. P. 14–18.
24. Francis P.S., Lewis S.W., Lim K.F. // Trends Anal. Chem. 2002. V. 21. № 5. P. 389–400.
25. Ekanayake S., Skog K., Asp N.G. // Food Chem. Toxicol. 2007. V. 45. № 5. P. 797–803.

L-Arginine Assay with the Use of Arginase I

N. E. Stasyuk^a, G. Z. Gaida^a, and M. V. Gonchar^{a, b}^a Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 79005 Ukraine^b Rzeszow University, 36-100 Kolbuszowa, Poland

e-mail: galina_gayda@yahoo.com

Received February 21, 2013

Abstract—A highly selective and sensitive method for the quantitative determination of L-arginine (Arg) with a fluorescent detection of the reaction product has been developed. The method is based on the use of human liver arginase I isolated from a recombinant producer strain, yeast *Hansenula polymorpha*, and 2,3-butanedione monoxime, which is used to detect carbamide—the product of enzymatic reactions. The linear concentration range for determining Arg in the final reaction mixture varies from 0.2 to 250 μM , and the detection limit is 0.16 μM . Tests of the new method using commercial Arg-containing pharmaceutical preparations showed a high correlation ($R = 1.0$) of the results with the manufacturer’s data and the results of other methods for Arg detection.

Сдано в набор 29.04.2013 г.	Подписано к печати 10.07.2013 г.	Дата выхода в свет 23 нечетн.	Формат 60 × 88 ¹ / ₈
Цифровая печать	Усл. печ. л. 13.0	Усл. кр.-отт. 1.5 тыс.	Уч.-изд. л. 13.0
	Тираж 111 экз.	Зак. 1582	Цена свободная

Учредитель: Российская академия наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Издатель: Академиздатцентр “Наука”, 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90
 Оригинал-макет подготовлен МАИК “Наука/Интерпериодика”
 Отпечатано в ППП “Типография “Наука”, 121099 Москва, Шубинский пер., 6