

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 543.555+577.15

DOI: 10.18524/1815-7459.2021.2.235200

РОЗРОБКА КОНДУКТОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ АРГІНІНДЕІМІНАЗИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АРГІНІНУ

*О. О. Солдаткін^{1,2}, І. С. Кучеренко¹, О. Я. Саяпіна¹, Д. Ю. Кучеренко¹,
С. В. Марченко¹, О. П. Солдаткін^{1,2}, С. В. Дзядевич^{1,2}*

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
вул. Заболотного, 150, 03680, м. Київ, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, 01003, м. Київ, Україна

e-mail авторів: alex_sold@yahoo.com, kucherenko.i.s@gmail.com, oysaiapina@gmail.com,
svmarchenkosv@gmail.com, a_soldatkin@yahoo.com, dzyad@yahoo.com

РОЗРОБКА КОНДУКТОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ АРГІНІНДЕІМІНАЗИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АРГІНІНУ

*О. О. Солдаткін, І. С. Кучеренко, О. Я. Саяпіна, Д. Ю. Кучеренко,
С. В. Марченко, О. П. Солдаткін, С. В. Дзядевич*

Анотація. Вперше розроблено кондуктометричний ферментний біосенсор для визначення концентрацій аргініну. При виготовленні біоселективної мембрани біосенсора використовували аргініндеїміназу, яка була іммобілізована ковалентною зшивкою глутаровим альдегідом з бичачим сироватковим альбуміном на поверхні золотого планарного перетворювача. В роботі було перевірено вплив параметрів розчину (іонна сила, буферна ємність) на функціонування біосенсора для визначення аргініну. Показано, що запропонований моноферментний біосенсор характеризувався гарною селективністю відносно можливих інтерферуючих речовин. Біосенсор характеризувався високою чутливістю до аргініну (мінімальна границя визначення – 5 мкМ). Лінійний діапазон біосенсорного визначення аналіту був від 10 до 800 мкМ. Чутливість біосенсора до аргініну - 72 мкСм/мМ. Показано, що розроблений біосенсор є перспективним для застосування при аналізі концентрацій аргініну в реальних зразках.

Ключові слова: аргінін, кондуктометрія, біосенсор, іммобілізований фермент, аргініндеїміназа

DEVELOPMENT OF ARGININE DEIMINASE BASED CONDUCTOMETRIC BIOSENSOR FOR ARGININE DETERMINATION

*O. O. Soldatkin, I. S. Kucherenko, O. Ya. Sayapina, D. Yu. Kucherenko,
S. V. Marchenko, A. P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych*

Abstract. For the first time, a conductometric enzyme biosensor was developed to determine arginine concentrations. The bioselective membrane of the biosensor was formed by immobilization of arginine deiminase on the surface of gold planar transducer using covalent crosslinking of glutaraldehyde with bovine serum albumin. An effect of the solution characteristics (ionic strength, buffer capacity) on the biosensor functioning was studied. The proposed monoenzyme biosensor was shown to have high sensitivity to arginine (minimum limit of detection - 5 μM) and good selectivity towards possible interferents. The linear range of determination was from 10 to 800 μM . The biosensor sensitivity to arginine is 72 $\mu\text{S}/\mu\text{M}$. The developed biosensor was demonstrated to be promising for the arginine analysis in real samples.

Keywords: arginine, conductometry, biosensor, immobilized enzyme, arginine deiminase

РАЗРАБОТКА ФЕРМЕНТНОГО КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АРГИНИНА

*A. A. Солдаткин, И. С. Кучеренко, О. Я. Саяпина, Д. Ю. Кучеренко,
С. В. Марченко, А. П. Солдаткин, С. В. Дзядевич*

Аннотация. Впервые был разработан кондуктометрический ферментный биосенсор для определения концентраций аргинина. При изготовлении биоселективных мембран биосенсора использовали аргининдеиминазу, которая была иммобилизована ковалентной сшивкой глутаровым альдегидом с бычьим сывороточным альбумином на поверхности золотого планарного преобразователя. В работе было проверено влияние параметров раствора (ионная сила, буферная емкость) на функционирование биосенсора для определения аргинина. Показано, что предложенный моноферментный биосенсор характеризовался хорошей селективностью в отношении возможных интерферирующих веществ. Предложенный биосенсор характеризовался высокой чувствительностью к аргинину (минимальная граница определения - 5 μM). Линейный диапазон биосенсорного определения аналита был от 10 до 800 μM . Чувствительность биосенсора к аргинину - 72 $\mu\text{См}/\mu\text{M}$. Показано, что разработанный биосенсор является перспективным для применения при анализе концентраций аргинина в реальных образцах.

Ключевые слова: аргинин, кондуктометрия, биосенсор, иммобилизованный фермент, аргининдеиминаза

1. ВСТУП

Амінокислота L-аргінін відноситься до найбільш лужних амінокислот і має найбільшу ізоелектричну точку 10,76 у порівнянні з іншими 20 амінокислотами, відіграє важливу роль в поділі клітин, загоюванні ран, синтезі білку, імунних реакціях і багатьох інших біологічних функціях. До того ж аргінін є фізіологічним попередником оксиду азоту (NO) [1], який відіграє роль ключового посередника в судинному гомостазі. Коли кількість аргінін-похідних речовин значно зменшується це може бути шкідливим для здоров'я, і навіть небезпечним для життя.

L-аргінін є важливим біомаркером низки захворювань, пов'язаних з порушенням обміну речовин, зокрема гіпераргінінемії, викликаній генетичним дефектом в гені ARG1 (дефіцит аргінази) [2-3]. Кількість L-аргініну в сечі є показником наявності гомозиготної цистинурії [4], гепатокарциноми, меланоми шкіри та колоректального раку, туберкульозу легенів. Зокрема встановлено, що у хворих на туберкульоз легень спостерігається зниження загального рівня амінокислот у сироватці крові. При діагностиці колоректального раку L-аргінін виконує роль додаткового маркера до аргінази сироватки крові на початковій та метастатичній стадіях раку.

На даний момент в світі для аналізу концентрації L-аргініну використовують такі методи, як спектрофотометрія, флуориметрія, хроматографія, полярографія, високоефективна рідинна хроматографія та інші [5]. Запропоновані методи є досить складними, коштовними та потребують складної попередньої підготовки проб. Наприклад, для спектрофотометричних методів реакція з нінгідрином є низькоспецифічною, а реакція на основі двохферментної системи (аргіназа/уреаза) можлива лише у випадку відсутності сечовини у аналізованих зразках. Значним недоліком інших, згаданих вище, методів є вплив інтерферуючих речовин, зокрема, лізину, проліну, цитруліну, сечовини. Відповідно для їх реалізації, необхідна додаткова обробка аналізованих проб.

Окрім традиційних методів аналізу аргініну існують і біосенсорні. Серед цих розробок ви-

різняються біосенсори на основі різних типів електрохімічних перетворювачів, переважна більшість з яких на основі амперметричних перетворювачів. При розробці амперметричних біосенсорів використовують в основному одноферментну систему на основі оксидази L- та D-амінокислот або ж декарбоксилази аргініну. Нажаль, дані типи біосенсорів є не достатньо селективними, особливо для визначення аргініну в складних багатокомпонентних зразках (кров, соки тощо).

У випадку розробки кондуктометричних та потенціометричних біосенсорів використовується двохферментна система на основі аргінази/уреази [6, 7]. Вагомим недоліком такої біосенсорної системи є певна втрата чутливості у зв'язку з використанням кількох ферментів, крім того, неможливість аналізу складних зразків, що містять сечовину, зокрема кров, сеча, тощо.

Відомий біосенсор на основі іон-селективного електроду для визначення L-аргініну у фруктових соках, що базується на використанні лише одного ферменту – аргініндеімінази [8]. Нажаль, для функціонування він потребує технологічно складного електроду порівняння і має ряд недоліків таких як світлочутливість, складність технології його подальшої мініатюризації, неможливість використання недорогої тонкоплівчастої технології виготовлення. До того ж чутливість використаних в роботі іон-селективних електродів є не найкращою.

Тому головною метою даної роботи є створення такого кондуктометричного біосенсора на основі аргініндеімінази для кількісного визначення аргініну в рідинах біологічного походження, який би дозволив більш швидко та селективно визначати концентрацію аргініну та був би більш перспективним та дешевим для подальшого масового виробництва.

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У дослідженнях використовувалися препарат ліофілізованого ферменту аргініндеіміназа (АДІ) з *E. Coli* фірми „MyBioSource” (USA). Бичачий сироватковий альбумін (БСА) (фракція V), гліцерин та 50%-й водний розчин глутарового альдегіду (ГА) були отримані від фірми

„Sigma-Aldrich Chemie” (Steinheim, Germany). Як субстрат і аналізовану речовину використовували L-аргінін, як буферний розчин - калій-фосфатний розчин ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$), рН 7,2 фірми “Merck” (Німеччина). Інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти “х.ч.” та „ч.д.а.”.

У роботі використано кондуктометричні перетворювачі, виготовлені згідно наших рекомендацій та ескізів в Інституті фізики напівпровідників ім. Лашкарьова (м. Київ, Україна). Вони складаються з двох ідентичних пар золотих гребінчастих електродів, виготовлених вакуумним напиленням золота на основу з ситалу розміром 5x40 мм. Чутлива поверхня кожної електродної пари була приблизно 1,0x1,5 мм. Відстань між пальцями гребінок та ширина самих пальців гребінок складала 20 мкм.

Кондуктометричний біосенсор на основі аргініндеїмінази для кількісного аналізу аргініну підключали до експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань, що працювала у режимі кондуктометричних вимірювань при частоті струму 37 кГц та амплітуді 14 мВ. В роботі використовували вимірювальну установку та перетворювачі, детально описані в попередніх роботах [9]

Для виготовлення робочої мембрани готували розчин з вмістом 10% аргініндеїмінази, 5% сироваткового альбуміну бика (БСА), 10% гліцерину у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,5. Суміш для приготування референтної мембрани готували таким же чином, але замість ферментів брали тільки БСА (15 %). Перед нанесенням на поверхню перетворювача приготувані розчини (для референтної і робочої мембран) змішували з водним розчином глутарового альдегіду (1 %) у співвідношенні 1:1. Отримані розчини зразу ж наносили на робочу частину перетворювачів. Обидві мембрани були з однаковим вмістом білка. Потім сенсори висушували протягом різного часу на повітрі за кімнатної температури. Перед початком роботи для вимивання надлишку глутарового альдегіду сенсор розміщували у буферному розчині, в якому і проводились подальші дослідження. До складу гелів додавався гліцерин для стабілізації ферментів при іммобілізації та за-

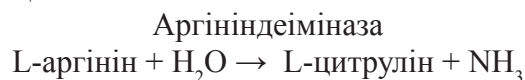
побігання передчасному підсиханню розчину, нанесеного на поверхню перетворювача. В свою чергу, сироватковий альбумін бика в складі ферментних мембран відіграв роль стабілізуючого агенту для ферментів.

Вимірювання проводились в 10 мМ калій-фосфатному буферному розчині рН 7,5 при кімнатній температурі у відкритій комірці з інтенсивним перемішуванням. Спочатку сенсор розміщували у комірці для вимірювання об'ємом 2 мл, заповнений фосфатним буферним розчином. Для отримання стабільного початкового сигналу (базової лінії) сенсор вимочували деякий час в буферному розчині. Потім для отримання сигналу на субстрат необхідної концентрації в комірку додавали певну аліквоту стандартного концентрованого вихідного розчину субстрату. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, зв'язані з коливаннями температури, рН середовища, коливаннями напруги в мережі нівелювалися завдяки використанню в роботі диференційного режиму вимірювань, тобто вимірювалась різниця сигналів з двох пар електродів з активною та неактивною мембраною, розташованих на одному перетворювачі. Дослідження проводились щонайменше у трьох повторностях.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Принцип функціонування біосенсора для визначення аргініну

В основі роботи кондуктометричного біосенсора на основі аргініндеїмінази для кількісного аналізу аргініну в рідинах біологічного походження лежить наступна ферментативна реакція:



В процесі проходження ферментативної реакції аргініндеїміназа розщеплює аргінін при цьому змінюється провідність розчину в приелектродному просторі, яку і можна реєструвати за допомогою кондуктометричного перетворювача [10].

З метою перевірки працездатності, свіже-виготовлений кондуктометричний біосенсор на основі аргініндеїмінази поміщали до

робочої комірки об'ємом 2,0 мл, заповненої 10 мМ калій-фосфатним буфером, рН 7,5, та витримували декілька хвилин для отримання стабільної базової лінії. Потім додавали певну аліквоту модельного розчину аргініну та отримували сигнал біосенсора. Сигнал від біосенсорів автоматично оброблявся персональним комп'ютером і виводився у графічному вигляді. Графічне зображення відгуків кондуктометричного біосенсора на основі аргініндеїмінази на послідовне додавання декількох аліквот модельного розчину аргініну показано на Рис. 1.

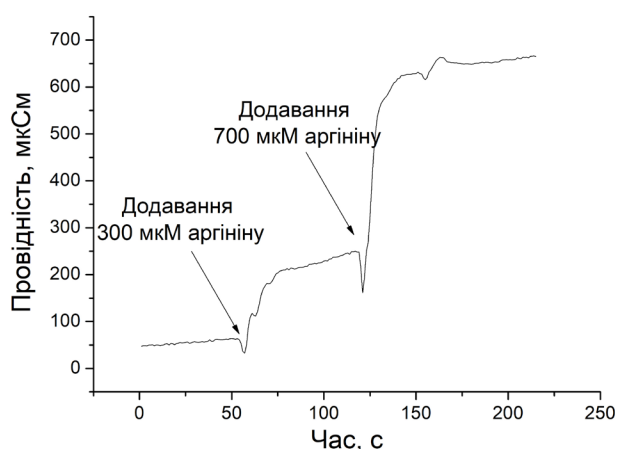


Рис. 1. Типові відгуки кондуктометричного біосенсора для визначення аргініну на реальному прикладі проведення експерименту

3.2. Вплив буферної ємності на роботу аргінін-чутливого біосенсора

В основі кондуктометричного методу, як відомо, лежить вимірювання зміни провідності розчину, що аналізується. Ця зміна провідності може залежати як від самої ферментативної реакції, так і від характеристик розчину в якому ця реакція проходить. Тому перш за все було досліджено вплив параметрів розчину на величину відгуку нашого сенсора.

Однією з важливих характеристик буфера, що може негативно впливати на вимірювання за допомогою кондуктометричного біосенсора, є іонна сила. Щоб дослідити цей вплив, було проведено вимірювання величини сигналу на три концентрації субстрату (30 мкМ, 300 мкМ та 1 мМ аргініну) із додаванням у

розчин різних концентрацій КСІ (від 1 мМ до 50 мМ) (Рис. 2). З отриманого графіка видно, що при збільшенні іонної сили відгуки на усі концентрації субстрату зменшуються за експонентою: спочатку спостерігається значне зменшення величини відгуків біосенсора, а при концентрації 20 мМ КСІ величина сигналу падає до 15%, і при подальших додаваннях КСІ сигнал залишається стабільним. Одна з головних причин такої залежності пов'язана із зростанням фонові провідності розчину. Тому при проведенні вимірювань за допомогою кондуктометричного біосенсора дуже важливим є контроль іонної сили аналізованих зразків.

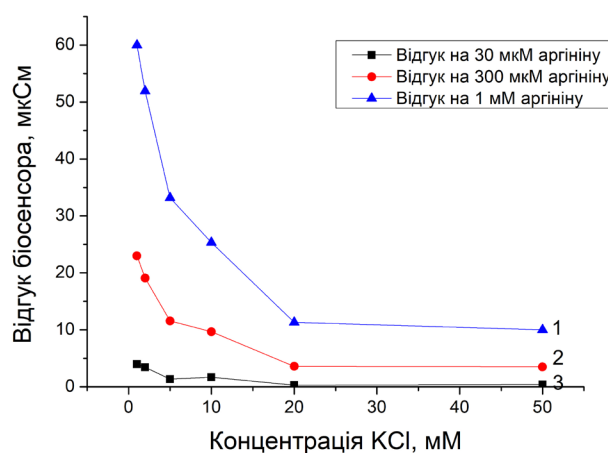


Рис. 2. Залежність величини відгуку біосенсора від іонної сили розчину. Концентрація аргініну 1 мМ (1), 300 мкМ (2) та 30 мкМ (3). Вимірювання проводились в 10 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,5

Ще одним параметром робочого буфера, що сильно впливає на функціонування кондуктометричних біосенсорів є буферна ємність. Тому було перевірено вплив концентрації буферного розчину на величину відгуків біосенсора (Рис. 3). Видно, що при зміні концентрації буферного розчину в певній мірі змінюються величини відгуків біосенсора. Чутливість кондуктометричного біосенсора щодо наявності аргініну у вимірювальній комірці виявилася найбільшою у 1 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,5. Нажаль робочий розчин за такої буферної ємності має слабкі буферні властивості, а відповідно, сенсор буде працювати нестабільно. Далі при підвищенні концентрації буфера,

відгуки біосенсора на усі три концентрації аргініну експоненційно зменшувались. При роботі біосенсора в 5 мМ буфері чутливість біосенсора до субстрату падала на 50-60%. У випадку роботи біосенсора в 10 та 20 мМ фосфатному буфері чутливість біосенсора щодо аргініну падала менше 30%. Тому використовуючи для проведення аналізу буферні розчини різної концентрації можна знаходити компроміс між чутливістю біосенсора до субстрату та стабільною роботою в розчині, що характеризується буферними властивостями.

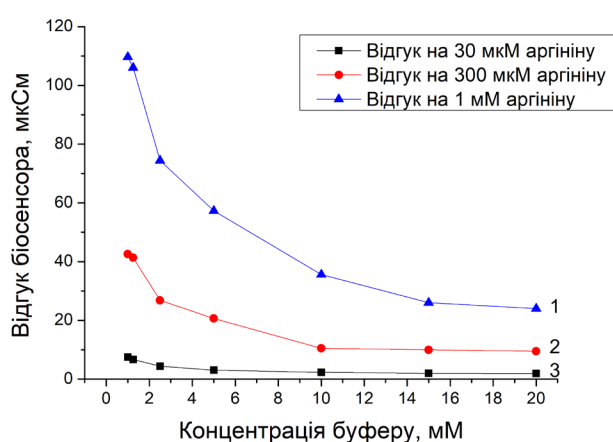


Рис. 3. Графіки залежності відгуків сенсора на різні концентрації аргініну від концентрації буфера. Концентрація аргініну 1 мМ (1), 300 мкМ (2) та 30 мкМ (3). Вимірювання проводились у калій-фосфатному буфері, рН 7,5

3.3. Аналіз селективності аргінін-чутливого біосенсора

Основною проблемою відомих амперометричних біосенсорів для визначення аргініну є погана селективність відносно електроактивних речовин, типу аскорбінової кислоти. Використання кондуктометричного методу аналізу теоретично мало значно покращити селективність біосенсора. Проблемою двоферментного біосенсора на основі коїммобілізованих уреаз з аргіназою є чутливість до сечовини, яка присутня майже у всіх реальних біологічних зразках. Використання біоселективної мембрани біосенсора на основі аргініндеїмінази має вирішити проблему з чутливості біосенсора до сечовини. Відповідно для практичного засто-

сування запропонованого кондуктометричного біосенсора для визначення концентрації аргініну у реальних зразках потрібно було довести, що селективність його роботи є достатньою. Для цього було проведено ряд експериментів із дослідження впливу інтерферуючих речовин на роботу розробленого біосенсора. В експериментальну комірку вносили розчин з 300 мкМ та 1 мМ інтерферуючої речовини (сечовина, ЕДТА, глутамін, глюкоза, глутамат, аскорбінова кислота, лимона кислота, дофамін, та ін.). Відгуки на можливі інтерферуючі речовини порівнювали з відгуками біосенсора на тіж самі концентрації аргініну. Результати експерименту свідчать про те, що розроблений кондуктометричний біосенсор проявляє достатню селективність до аргініну відносно ряду можливих інтерферуючих речовин (Табл. 1). Відповідно запропонований біосенсор можна рекомендувати для аналізу аргініну в реальних біологічних зразках.

Таблиця 1
Селективність розробленого біосенсора на основі аргініндеїмінази

Речовина	Відгук біосенсора на речовину, мкСм	
	300 мкМ	1000 мкМ
Сечовина	4	10
ЕДТА	2,5	9
Глутамін	2,3	8
Глюкоза	2	7
Глутамат	3,5	10
Лим. к-та	1,5	4
NaCl	2,5	7
Аск. к-та	0	0
Гліцин	1,7	6,3
Бенз. к-та	0	0
Дофамін	0,9	2,7
Аспартаг	4	11
Аргінін	23,2	59,7

3.4. Перевірка аналітичних характеристик кондуктометричного біосенсора для визначення аргініну

Останнім етапом розробки будь-якого біосенсора є аналіз його аналітичних характеристик та перспектив застосування для роботи

з реальними зразками. Відповідно, в роботі було проаналізовано робочі параметри розробленого біосенсора на основі аргініндеїмінази для визначення концентрації аргініну.

Мінімальну межу визначення аргініну враховували як концентрацію аргініну, додавання якої у вимірювальну комірку призводить до відгуку біосенсора в три рази більшого за величину шуму базової лінії. Виявилось, що мінімальна межа вимірювання аргініну дорівнювала 5 мкМ. Для встановлення лінійного діапазону функціонування біосенсора було побудовано калібрувальна крива визначення аргініну (Рис. 4). Лінійний діапазон роботи розробленого біосенсора був від 10 до 800 мкМ. Лінійна ділянка даної калібрувальної кривої описується рівнянням $G=0,06 \cdot C+2,96$, де G – зміна провідності (мкСм), C – концентрація аргініну (мкМ). Чутливість біосенсора до аргініну була 72 мкСм/мМ.

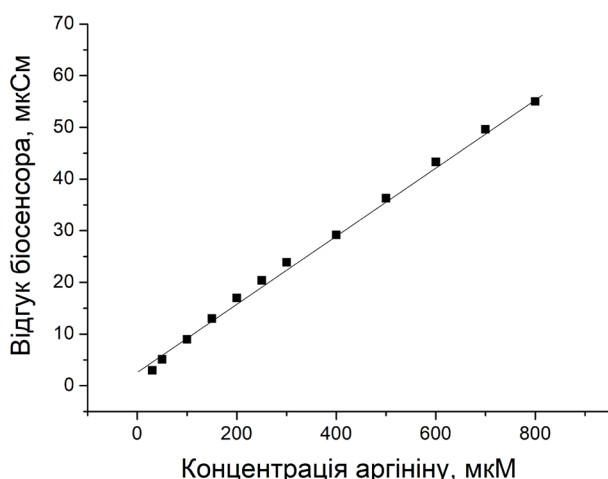


Рис. 4. Лінійна ділянка калібрувальної кривої біосенсора для визначення аргініну. Вимірювання проводились в 10 мМ калій-фосфатному буфері рН 7,5

Отримані аналітичні характеристики свідчать про перспективність подальшого застосування розробленого біосенсора для кількісного аналізу аргініну в реальних зразках.

4. ВИСНОВКИ

В роботі, розроблено новий кондуктометричний біосенсор на основі аргініндеїмінази для кількісного визначення аргініну. Визначе-

но вплив основних параметрів робочого буферу (іонна сила, буферна ємність) на величину відгуків аргінін-чутливого біосенсора. Оптимальними робочим буферним розчином для функціонування запропонованого біосенсора був 10 мМ калій-фосфатний буфер, рН 7,5.

Також в роботі перевірена селективність біосенсора на основі аргініндеїмінази відносно можливих інтерферентних речовин (сечовина, ЕДТА, глутамін, глюкоза, глутамат, аскорбінова кислота, лимона кислота, дофамін, та ін.). Величини відгуків на ці речовини не перевищували 15 %, що свідчить про не погану специфічність розробленого біосенсора.

Перевірено аналітичні характеристики розробленого біосенсора: чутливість, лінійний діапазон, мінімальна межа визначення, тощо. Показано, що біосенсор має високу чутливість до аргініну: мінімальна межа визначення – 5 мкМ. Лінійний діапазон роботи біосенсора знаходився в межах від 10 до 800 мкМ.

Отримані параметри біосенсора свідчать про перспективність використання розробленого біосенсора на основі аргініндеїмінази для визначення концентрації аргініну в реальних біологічних зразках.

5. ПОДЯКА

Робота виконана за рахунок коштів гранту НАН України дослідницьким лабораторіям/групам молодих учених НАН України для проведення досліджень за пріоритетними напрямками розвитку науки і техніки у 2021 р.

6. СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- [1]. O. Ikkert, N. Kurhaliuk, S. Hordii, Vplyv L-argininu ta N ω -nitro – l-argininu na stan enerhozabezpechennia mitokhondrii pechinky shchuriv iz riznoiu rezystentnistiu do hipoksii v razi dii stresovykh navantazhen, Visnyk Lviv. un-tu., 2002, No. 28. S. 271–278 (in Ukrainian).
- [2]. N. Ye. Stasiuk, S. R. Bass, H. Z. Haida, Kh. S. Yepriemian, M. V. Honchar Novyi enzymatychnyi metod vyznachennia L-argininu za vykorystannia arginazy liudyny ta ureazy, Scientific Journal «ScienceRise» 2015, No. 6/1(11), S. 43–48 (in Ukrainian).

- [3]. B. Vynnytska Myronovska, Y. Bobak, Y. Garbe, C. Dittfeld, O. Stasyk, L. A. Kunz-Schughart Single amino acid arginine starvation efficiently sensitizes cancer cells to canavanine treatment and irradiation, *Inter. Journal of Cancer*. 2012, Vol. 130, Issue 9. P. 2164–2175.
- [4]. S. M. Morales Cystinuria: diagnosis and therapeutic approach. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2011, Vol. 34, Issue 3. P. 453–461.
- [5]. H. Z. Haida, N. Ye. Stasiuk, M. V. Honchar. *Metody analizu l-argininu // Biotechnologia acta*, 2014, Vol. 7(1). P. 31–39 (*in Ukrainian*).
- [6]. O. V. Soldatkina, O. O. Soldatkin, T. P. Velychko, V. O. Prilipko, M. A. Kuibida, S. V. Dzyadevych, Conductometric biosensor for arginine determination in pharmaceuticals. *Bioelectrochemistry*, 2018, Vol. 124, Pages 40–46.
- [7]. M. Shelyakina, V. Arkhypova, O. Saiapina, B. Akata, S. Dzyadevych, Urease-based ISFET biosensor for arginine determination. *Talanta*, 2014, Vol. 121, P. 18–23.
- [8]. N. Verma, A.K. Singh, P.J. Kaur, Biosensor based on ion selective electrode for detection of L-arginine in fruit juices, *Anal. Chem.* 2015, Vol. 70. P. 1111–1115.
- [9]. V. G. Mel'nik, A. D. Vasilenko, A. E. Dudchenko, V. D. Pogrebnyak, *Issledovaniya podavleniya sinfaznoj pomekhi v biosensornoj konduktometricheskoj sisteme s differencial'nymi datchikami. Sensor Electronics and Microsystem Technologies* 2014, Vol. 11, № 3, C. 49–61 (*in Russian*).
- [10]. S. V. Dziadevych *Konduktometrychni fermentni biosensory: teoriia, tekhnolohiia, zastosuvannia. Biopolimery i klityna* 2005, Vol. 21, C. 91–106 (*in Ukrainian*).

Стаття надійшла до редакції 15.05.2021 р.

UDC 543.555+577.15

DOI: 10.18524/1815-7459.2021.2.235200

DEVELOPMENT OF ARGININE DEIMINASE BASED CONDUCTOMETRIC BIOSENSOR FOR ARGININE DETERMINATION

O. O. Soldatkin^{1,2}, *I. S. Kucherenko*^{1,2}, *O. Ya. Sayapina*¹, *D. Yu. Kucherenko*¹,
*S. V. Marchenko*¹, *A. P. Soldatkin*^{1,2}, *S. V. Dzyadevych*^{1,2}

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, 150 Zabolotnogo str., 03680, Kyiv, Ukraine

²Taras Shevchenko Kyiv National University, 64 Volodymyrska str., 01601, Kyiv, Ukraine

Summary

L-arginine plays an important role in cell division, protein synthesis, immune reactions, wound healing, and has a lot of other biological functions. When the amount of arginine-derived substances decreases significantly, it can be harmful for health and even life-threatening. L-arginine is an important biomarker of a number of metabolic disorders. At present, spectrophotometry, fluorimetry, chromatography, polarography, high performance liquid chromatography, etc. are used to analyze the L-arginine concentration throughout the world. These methods are rather complex and expensive, they require complex pretreatment of samples. Biosensors may be an alternative to known techniques.

The aim of this work was to develop a new conductometric monoenzyme biosensor for arginine concentrations determination

Methods: The conductometric method of analysis with differential measurement mode was used in the work. Two pairs of gold interdigitated electrodes deposited on a sital substrate were used as a

conductometric transducer. To create a bioselective element of the monoenzyme biosensor we used the arginine deiminase, which was immobilized on the surface of the physical transducer by covalent crosslinking of glutaraldehyde with bovine serum albumin.

Results: An effect of the solution characteristics (ionic strength, buffer capacity) on the biosensor functioning was studied. The proposed monoenzyme biosensor was shown to have high sensitivity to arginine and good selectivity towards possible interferents. The main analytical characteristics of the developed biosensor have been studied.

Conclusion: The linear range of determination was from 10 to 800 μM arginine. The minimum limit of monoenzyme biosensor detection - 5 μM . The biosensor sensitivity to arginine is 72 $\mu\text{S}/\mu\text{M}$. The developed biosensor was demonstrated to be promising for the arginine analysis in real samples.

Keywords: arginine, conductometry, biosensor, immobilized enzyme, arginine deiminase

УДК 543.555+577.15

DOI: 10.18524/1815-7459.2021.2.235200

РОЗРОБКА КОНДУКТОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ АРГІНІНДЕІМІНАЗИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АРГІНІНУ

*О. О. Солдаткін^{1,2}, І. С. Кучеренко¹, О. Я. Саяпіна¹, Д. Ю. Кучеренко¹,
С. В. Марченко¹, О. П. Солдаткін^{1,2}, С. В. Дзядевич^{1,2}*

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
вул. Заболотного, 150, 03680, м. Київ, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, 01003, м. Київ, Україна

e-mail авторів: alex_sold@yahoo.com, kucherenko.i.s@gmail.com, oysaiapina@gmail.com,
svmarchenkosv@gmail.com, a_soldatkin@yahoo.com, dzyad@yahoo.com

Реферат

Амінокислота L-аргінін відіграє важливу роль в поділі клітин, загоюванні ран, синтезі білку, імунних реакціях і багатьох інших біологічних функціях. Коли кількість аргінін-похідних речовин значно зменшується, це може бути шкідливим для здоров'я і навіть небезпечним для життя. L-аргінін є важливим біомаркером низки захворювань, пов'язаних з порушенням обміну речовин. На даний момент в світі для аналізу концентрації L-аргініну використовують такі методи як спектрофотометрія, флуориметрія, хроматографія, полярографія, високоефективна рідинна хроматографія та інші. Запропоновані методи є досить складними, дороговартісними та потребують складної попередньої підготовки проб. Альтернативою відомим методикам можуть бути біосенсиори.

Мета даної роботи полягала в розробці нового кондуктометричного ферментного біосенсора для селективного визначення концентрацій аргініну.

Методи дослідження: В роботі застосовували кондуктометричний метод аналізу з диференційним режимом вимірювання. Як кондуктометричний перетворювач використовувались дві пари золотих гребінчастих електродів, нанесених на силалову підкладку. Для створення біоселективного елемента моноферментного біосенсора використовували аргініндеїміназу, яка була іммобілізована ковалентною зшивкою глутаровим альдегідом з бичачим сироватковим альбуміном на поверхні фізичного перетворювача.

Результати дослідження: В роботі було перевірено вплив параметрів розчину (іонна сила, буферна ємність) на функціонування біосенсора для визначення аргініну. Показано, що запропонований моноферментний біосенсор характеризувався гарною селективністю відносно можливих інтерферуючих речовин. Досліджено основні аналітичні характеристики розробленого біосенсора при визначенні концентрацій аргініну.

Висновки: Запропонований біосенсор характеризувався високою чутливістю до аргініну (мінімальна границя визначення – 5 мкМ). Лінійний діапазон біосенсорного визначення аналіту був від 10 до 800 мкМ. Чутливість біосенсора до аргініну - 72 мкСм/мМ. Показано, що розроблений біосенсор є перспективним для застосування при аналізі аргініну в реальних зразках.

Ключові слова: аргінін, кондуктометрия, біосенсор, іммобілізований фермент, аргініндеїміназа