

Облікова картка ДіР



I. Загальні відомості

Державний обліковий номер: 0217U007292

Державний реєстраційний номер: 0116U002208

Особливі позначки: відкрита

Дата реєстрації: 27-12-2017

II. Етап виконання ДіР

Номер етапу: 2

Назва етапу: Опрацювання ензиматичного та біосенсорного методів визначення вмісту креатиніну в біологічних рідинах на основі рекомбінантної креатиніндеїмінази та створення лабораторного прототипу амперометричного біосенсора

Початок етапу: 01.2017

Закінчення етапу: 12.2017

Вид звітнього документа: Проміжний звіт

III. Відомості про виконавця ДіР

Повне найменування юридичної особи (або ПІБ фізичної особи): Інститут біології клітини Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 25255758

Місцезнаходження: вул. Драгоманова, буд. 14/16, м. Львів, Львівська обл., 79005, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Розмір організації:

Телефон: 380322612108, 380322728508, 380322740363

IV. Відомості про співвиконавців ДіР

V. Відомості про замовника ДіР

Повне найменування юридичної особи (або ПІБ фізичної особи): Національна академія наук України

Код за ЄДРПОУ: 00019270

Місцезнаходження: вул. Володимирська, буд. 54, м. Київ, 01601, Україна

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Розмір організації:

Телефон: 380442343243

VI. Джерела, напрями та обсяги фінансування ДіР

Підстава для проведення ДіР: 34 - договір (замовлення) з центральним органом виконавчої влади, академією наук (головними розпорядниками бюджетних коштів на проведення НДДКР)

Напрямок фінансування: 2.2 - прикладні дослідження і розробки

Джерела фінансування

7713 - кошти держбюджету

Код програмної класифікації видатків і кредитування (КПКВК): 6541030

Фактичний обсяг фінансування (тис. грн.): 1216.950

VII. Відомості про ДіР

Назва роботи українською:

Створення нових біосенсорних та ензиматичних методів визначення вмісту креатиніну як біомаркера функціонального стану нирок та контролю процесу гемодіалізу.

Назва роботи англійською:

Development of new biosensor and enzymatic methods for determination of the content of creatinine as a biomarker of kidney function and control process of hemodialysis.

Реферат українською:

Основними завданнями поточного етапу НДР було оптимізація препаративного виділення креатиніндеімінази (КДІ) із клітин рекомбінантного штама-продуцента, стабілізація фермента, його іммобілізація на мікроелектродах та нанокompозитних носіях, створення лабораторного прототипу біосенсора на креатинін та опрацювання нового ензиматичного методу аналізу креатиніну за використання рекомбінантної КДІ. Опрацьовано оптимальну схему препаративного виділення та очищення (His)⁶-тегрованої рекомбінантної КДІ з клітин штама-продуцента *Escherichia coli* BL21 із використанням метало-афінної хроматографії на Ni-NTA-агарозі. Досліджено стабільність отриманих препаратів КДІ та протестовано різні підходи для стабілізації фермента. Показано, що фермент стабільний упродовж тижня при 5 °С в 0,05 М фосфатному буфері, рН 7,5 (ФБ). Препарати фермента можна зберігати без значної втрати активності не менше 4 місяців при -20 °С у ФБ з додатком 20 % гліцеролу або у вигляді суспензії у цьому ж буфері при 70 % насичення сульфатом амонію, або ж у ліофілізованій формі в присутності трегалози як стабілізатора. Методом електрохімічного осадження здійснено синтез гібридних Cu-вмісних наночастинок на поверхні графітового електрода. Проведено дослідження структурних, фізико-хімічних та каталітичних властивостей одержаних наночастинок та досліджено електрохімічну активність сконструйованої хемосенсорної мембрани до іонів амонію. Електрофоретично гомогенний препарат КДІ з питомою активністю 10 мкмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка використано для створення нового амперометричного біосенсора на основі амоній-чутливої хемосенсорної мембрани на основі електроосаджених гібридних Cu-вмісних наночастинок. Проведено тестування різних методів ковалентної іммобілізації КДІ на поверхні електрода та вибрано найбільш оптимальний підхід за використання формування на поверхні Cu-вмісних наночастинок моношару ?-меркаптогексадеканої кислоти, карбоксильну групу якої конденсують з аміногрупою білка N-гідроксисукцинімід-карбодіімідним методом. Сконструйований біосенсор характеризується широким діапазоном лінійності (0,02 – 7 мМ), швидкою відповіддю на аналіт (1 хв.), задовільною стабільністю при зберіганні (50% збереження вихідного сигналу після 14 днів) та високою селективністю до креатиніну. Опрацьовано високочутливий метод ензиматичного аналізу креатиніну за використання рекомбінантної КДІ з спектрофотометричною та флуориметричною детекцією продукту реакції (іонів амонію) з пороговою чутливістю близько 6 мМ та 0,2 мМ, відповідно. Опубліковано 19 статей (9 – у зарубіжних журналах, 6 – у вітчизняних часописах, 2 розділи в іноземній монографії та 2 – у вітчизняній книзі), 13 тез доповідей. Подано до друку 4 статті в міжнародні видання та 1 патент України на винахід. 9 статей – у Scopus. Сумарний імпакт-фактор публікацій – 21,7.

Реферат англійською:

The main tasks of the current stage of research were optimization of the preparation of creatinine deiminase (CDI) from recombinant producer's cells, stabilization of the enzyme, its immobilization on microelectrodes and nanocomposite carriers, creation of a laboratory prototype of biosensor selective for creatinine, and elaboration of a new enzymatic method for creatinine assay using recombinant CDI. An optimal scheme for isolation and purification of (His)⁶-tagged recombinant CDI from the *Escherichia coli* BL21 transformant cells using metal affinity chromatography on Ni-NTA agarose has been worked out. The stability of the isolated CDI preparations

has been studied and various approaches for stabilizing the enzyme have been tested. It was shown that the enzyme is stable over a week at 5 °C in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.5 (PB). The enzyme preparations can be stored without significant loss of activity for at least 4 months at -20 ° C in PB with the addition of 20% glycerol or as a suspension in the same buffer at 70% saturation with ammonium sulfate, or in the freeze-dried form in the presence of trehalose as a stabilizer. By the method of electrochemical deposition, hybrid Cu-containing nanoparticles were synthesized on the surface of a graphite electrode. The study of structural, physico-chemical and catalytic properties of the obtained nanoparticles has been carried out and the electrochemical activity of the constructed ammonium-selective chemosensing membrane has been investigated. Electrophoretically homogeneous preparation of CDI with a specific activity of $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein was used to create a new amperometric biosensor based on an ammonium-selective chemosensing membrane, prepared by electrochemical deposition of hybrid Cu-containing nanoparticles on the electrode. Different methods of physical and covalent immobilization of CDI on the electrode surface have been tested, and the most optimal approach has been chosen. It includes the formation of a monolayer of γ -mercaptohexadecanoic acid on the surface of Cu-containing nanoparticles, condensation of carboxyl groups with amino groups of the protein by the N-hydroxysuccinimide-carbodiimide method. The designed biosensor is characterized by a wide range of linearity (0.02 – 7 mM), fast response to the analyte (1 min.), satisfactory storage stability (50% preservation of the original signal after 14 days) and a high selectivity to creatinine. Using recombinant CDI, a highly sensitive method for the enzymatic assay of creatinine has been developed, based on spectrophotometric and fluorometric detection of the reaction product (ammonium ions), with a threshold sensitivity of about 6 μM and 0.2 μM , respectively. There were published 19 articles (9 - in international journals, 6 - in Ukrainian journals, 2 chapters in international monograph and 2 - in the Ukrainian book), and 13 abstracts. 4 articles were submitted for publication in international editions and 1 Ukrainian patent for invention has been prepared. 9 articles are in Scopus. Total Impact Factor of publications is 21,7.

Індекс УДК: 577.21:576.314;576.52;577.352, 543.94+547.495.9+577.152.35

Коди тематичних рубрик: 34.15.37

Керівники роботи

Власне Прізвище Ім'я По-батькові: Гончар Михайло Васильович

Науковий ступінь: д. б. н.

Вчене звання: професор

Ідентифікатор ORCID ID:

Додаткова інформація:

VIII. Наукова (науково-технічна) продукція (НТП)

Назва НТП українською: Опрацювання ензиматичного та біосенсорного методів визначення вмісту креатиніну в біологічних рідинах на основі рекомбінантної креатиніндеімінази та створення лабораторного прототипу амперометричного біосенсора.

Назва НТП англійською: Development of enzymatic and biosensor methods for determination of creatinine content in biological fluids on the basis of recombinant creatinine deiminase and creation of a laboratory prototype of amperometric biosensor

НТП, яку передбачалося створити:

Причини, через які НТП не було створено:

Отримані результати:

Галузь застосування: Дослідження та розробки в галузі природничих та технічних наук

Реєстраційний номер картки технології:

Опис НТП: Біоаналітичні методи на основі рекомбінантних ферментів

Соціально-економічна спрямованість НТП:

Вплив НТП на довкілля:

Впровадження НТП: Не впроваджено

Практична реалізація НТП

Початок етапу: -

Закінчення етапу:

Споживачі продукції: НАНУ

Перспективні ринки: Україна

Характер співробітництва з інвестором

Потрібний обсяг інвестицій, тис. грн.:

Права, що надаються інвестору після завершення роботи:

Наявність бізнес-плану:

Техніко-економічне обґрунтування:

Потенціальний обсяг продажу, тис. грн.:

Очікуваний термін окупності (років):

Додаткова інформація:

IX. Бібліографічний опис

Список статей співробітників відділу аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України за 2017 р.:

1. Demkiv O., Smutok O., Gonchar M., Nisnevitch M. Reagentless amperometric formaldehyde-selective chemosensor based on using platinized gold electrode // Materials. – 2017. – V.10, N.5 – E503 (1-11) doi:10.3390/ma10050503 (IF = 2.654).
2. Gayda G., Gonchar M., Sibirny A. Yeast-based systems for environmental control // In the Book "Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi" (Ed. A.A. Sibirny). – Springer, 2017. – P.

373-386.3. Gayda G.Z., Stasyuk N.Ye, Serkiz R.Ja, Gonchar M.V. Fluorescent nanoparticles of noble metals for cell imaging // В книзі: "Багатофункціональні наноматеріали для біології і медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування" (ред. Р.С. Стойка) - 2017. - С. 156-165. 4. Gonchar M., Smutok O., Karkovska M., Stasyuk N. Yeast-based biosensors for clinical diagnostics and food control // In the Book "Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi" (Ed. A.A. Sibirny). - Springer, 2017. - P. 392-400. 5. Kavetsky T., Smutok O., Gonchar M., Demkiv O., Klepach H., Kukhazh Y., ?au?a O., Petkova T., Boev V., Ilcheva V., Petkov P., Stepanov A.L. Laccase-containing ureasil-polymer composite as the sensing layer of an amperometric biosensor // Journal of Applied Polymer Science. - 2017. - V.134 (36). - P. 45278-45285 (IF=1.866). 6. Kavetsky T., ?au?a O., ?echov? K., ?vajdlenkov? H., Mat'ko I., Petkova T., Boev V., Ilcheva V., Smutok O., Kukhazh Y. and Gonchar M. Network Properties of Ureasil-Based Polymer Matrixes for Construction of Amperometric Biosensors as Probed by PALS and Swelling Experiments / Acta Physica Polonica A. - 2017. - V. 132, N 5. - P. 1515-1519 (IF=0.469). 7. Kovalyshyn Y., Konovska M., Milanese C., Saldan I., Serkiz R., Pereviznyk O., Reshetnyak O., Kuntiyi O. Electrochemical properties of the composites synthesized from polyaniline and modified MWCNT // Chem. Chem. Technol., - 2017, - V. 11, N. 3, - P. 261-269 (in Scopus). 8. Smutok O., Karkovska M., Serkiz Ya., Vus B., ?enas N., Gonchar M. A Novel Mediatorless Biosensor Based On Flavocytochrome b2 Immobilized Onto Gold Nanoclusters For Non-invasive L-lactate Analysis Of Human Liquids // Sensor & Actuators B. - 2017. - V. 250. - P. 469-475, DOI: 10.1016/j.snb.2017.04.192 (IF = 5.401). 9. Stasyuk N., Gayda G., Serkiz R., Gonchar M. The "green" synthesis of gold nanoparticles by the yeast *Hansenula polymorpha* // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. - 2016. - Вип. 73. - С. 96-102. 10. Stasyuk N., Gayda G., Yepremyan H., Gonchar M. Fluorometric enzymatic assay of L-arginine / Spectrochimica Acta. Part A. - 2017. - V. 170. - P. 184-190 (IF = 2.653). 11. Stasyuk, N., Gayda, G., Klepach, H., Semashko, T., Gonchar, M., 2017. Nanoparticles of noble metals for enzymatic sensors: an amperometric glucose biosensor for wine analysis / Sensor Letters. - 2017 - V.15, N8. - P. 647-654 (IF = 0.558). 12. Stepien A.E., Zebrowski J., Piszczek ?, Boyko V.V., Riabov S.V., Dmitrieva T., Bortnitskiy V.I., Gonchar M., Wojnarowska-Nowak R., Ryszkowska J. Assessment of the impact of bacteria *Pseudomonas denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and yeast *Yarrowia lipolytica* on commercial poly(ether urethanes) / Polymer Testing. - 2017. - V.63. - P.484-493. (IF=2.464). 13. Toporovska L.R., Hryzak A.M., Turko B.I., Rudyk V.P., Tsybul'skiy V.S., Serkiz R.Y.. Photocatalytic properties of zinc oxide nanorods grown by different methods // Optical and Quantum Electronics, - 2017, - Vol.49, - N. 12, - P.408-417 (IF=1.055). 14. M.T. Zhybak, L.Y. Fayura, Y.R. Boretsky, M.V. Gonchar, A.A. Sibirny, E. Dempsey, A.P. F. Turner, Y.I. Korpan. amperometric l-arginine biosensor based on a novel recombinant arginine deiminase // Microchimica Acta.- 2017. - DOI 10.1007/s00604-017-2290-4 (IF=4.580). 15. Демків О.М., Банах С.Я., Павлішко Г.М., Гайда Г.З., Смуток О.В., Гончар М.В. Оксидози мікроскопічних грибів: скринінг штамів-продуцентів та перспективи біоаналітичного використання // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. - 2016. - Вип. 73. - С. 55-64. (не увійшла в звіт 2016 р.). 16. Демків О.М., Банах С.Я., Притула С.В., Гайда Г.З., Гончар М.В. Скринінг штамів мікроскопічних грибів ? продуцентів лаккази // ScienceRise: Biological Science". - 2016. - №3 (3). - С. 64-69. 17. Карковська М.І., Стасюк Н.Є., Гайда Г.З., Смуток О.В., Гончар М.В. Наноматеріали у конструюванні біосенсорів біомедичного призначення // В книзі: Багатофункціональні наноматеріали для біології і медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування" (ред. Р.С. Стойка) - 2017. - С. 165-177. 18. Стасюк Н.Є., Гайда Г.З., Закальський А.Є., Закальська О.М., Фаюра Л.Р., Вовк О.І., Стасик О.В., Сибірний А.А., Гончар М.В. Рекombінантні форми аргінази та аргініндеімінази як каталітичні складові ензиматичного набору "Аргітест" для аналізу L-аргініну // Наука та інновації. - 2017. - Т.13, № 4. - С. 65-74. 19. Ціко У., Яцишин М., Кулик Ю., Серкіз Р., Пандяк Н. Твердофазовий синтез поліаніліну та композита каолін/поліанілін // Вісник Львівського університету. Серія хімічна. - 2017. - Випуск 58., Ч. 2. - С. 393-405. Тези доповідей: 1. Broda D., Nechai H., Gonchar M. Extracellular capacity of yeast *ogataea polymorpha* to reduce toxic chromate and formation of chromium(iii) biocomplexes / 7th International Weigl Conference (26-29 September 2017, Lviv, Ukraine). - 2017. - P.78. 2. Demkiv O., Banakh S., Broda D., Gayda G., Gonchar M. Screening of fungal producers of extracellular laccase. 7th International Weigl Conference (26-29 September 2017, Lviv, Ukraine). - 2017. - P.179. 3. Fedorovych D., Prokopiv T., Kolodii O., Kurylenko O., Kaszycki P., Sibirny A. Chromium: biological importance, toxicity and detoxification strategies in yeasts / 7th International Weigl Conference (26-29 September 2017, Lviv, Ukraine). -

2017. - P.36.4. Gayda G., Stasyuk N., Fayura L., Gonchar M., Sibirny A. Application of arginine-hydrolyzing enzymes in bioanalytics / XV З'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (11-15 вересня 2017, Одеса, Україна). - 2017. - С.239.5. Gayda G., Stasyuk N., Klepach H., Zakalskiy A., Zakalska O., Semashko T., Gonchar M. Peroxidase-like nanozymes as efficient platforms for oxidase-based amperometric biosensors / 7th International Weigl Conference (26-29 September 2017, Lviv, Ukraine). - 2017. - P.100. 6. Kavetsky T., ?au?a O., ?echova K., ?vajdlenkova H., Ma?ko I., Petkova T., Boev V., Ilcheva V., Smutok O., Kukhazh Y., Gonchar M. Network properties of ureasil-based polymer matrixes for construction of amperometric biosensors as probed by PALS and swelling experiments / Abstracts of 2th International Workshop on Positron and Positronium Chemistry (28 August-1 September 2017, Lublin, Poland). - 2017. - P. O13.7. Prokopiv T., Smutok O., Karkovska M., Sibirnyj W., Gonchar M. D-lactate-selective amperometric biosensor based on the mitochondrial fraction of *Ogataea* (*Hansenula*) polymorpha recombinant cells for dairy products control / 7th International Weigl Conference (26-29 September 2017, Lviv, Ukraine). - 2017. - P.143.8. Banakh S., Demkiv O., Gayda G., Gnatush S. Production of extracellular fungal laccase by *Stachybotris chartarum* and *Monilinia fructicola* strains. "Youth and progress of biology", Lviv, 25-27 April 2017. - P. 170.9. Smutok O., Karkovska M., Serkiz R., Vus B., ?enas N., Gonchar M. A. Novel mediatorless biosensor for non-invasive L-lactate analysis of human liquids / 7th International Weigl Conference (26-29 September 2017, Lviv, Ukraine). - 2017. - P.153. 10. Stasyuk N., Zakalskyi A., Zakalska O., Gonchar M. (His)₆-tagged *Corynebacterium glutamicum* creatinine deiminase as a biosensing element for creatinine assay / 7th International Weigl Conference (26-29 September 2017, Lviv, Ukraine). - 2017. - P.34.11. Гончар М.В., Стасюк Н.Є., Закальський А.Є., Закальська О.М. Рекомбінантна (His)₆-тагована креатиніндеіміназа *Corynebacterium glutamicum* як біосенсорний елемент для аналізу креатиніну / XV З'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (11-15 вересня 2017, Одеса, Україна). - 2017. - С.256. 12. Куцяба В.І., Гончар М.В., Нево Е., Сибірний А.А. Генетичне конструювання термо-, осмо- та етанолотолерантних штамів дріжджів-сахароміцетів, здатних до ефективного зброджування вуглеводів кукурудзяного суслу при підвищених температурах / XV З'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (11-15 вересня 2017, Одеса, Україна). - 2017. - С.275. 13. Прокопів Т.М., Борецький Ю.Р., Капустяк К.Є., Гончар М.В., Федорович Д.В. Причини виникнення надсинтезу рибофлавіну у дріжджів за дії іонів перехідних металів / XV З'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (11-15 вересня 2017, Одеса, Україна). - 2017. - С.146.

Х. Заключні відомості

Керівник юридичної особи

Сибірний Андрій Андрійович

д. б. н., 03.00.07, 03.00.11

Перелік осіб-виконавців

Іваш М.Ф.

Гайда Г.З.

Демків О.М.

Закальська О.М.

Закальський А.Є.

Куцяба В.І.

Прокопів Т.М.

Серкіз Р.Я.

Смуток О.В.

Стасюк Н.Є.

**Відповідальний за підготовку
облікових документів**

Телефон

Реєстратор

**Керівник відділу УкрІНТЕІ, що є
відповідальним за реєстрацію наукової
діяльності**

