

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

ХИМИЯ
CHEMISTRY

УДК [577.112.853+577.112.854]:577.113
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2025-69-4-279-290>

Поступило в редакцию 03.12.2024
Received 03.12.2024

**Д. А. Семенов¹, Л. Н. Валентович², Е. В. Охремчук², Т. С. Серченя¹,
И. И. Вашкевич¹, О. В. Свиридов¹**

¹Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА
С ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ**

(Представлено членом-корреспондентом С. А. Усановым)

Аннотация. Изучена способность рекомбинантного лактоферрина человека (рчЛФ), выделенного в чистом виде из молока трансгенных коз, к неспецифическим взаимодействиям и к специфическому комплексообразованию с природной и синтетическими фрагментами ДНК с использованием интактного рчЛФ, содержащего в металлсвязывающем центре ион европия, обладающего долгоживущей флуоресценцией. В микропланшетной системе меченый рчЛФ взаимодействует с адсорбционно иммобилизованной общей двухцепочечной ДНК из тимуса теленка с $K_a = 1,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. В этой же гетерофазной системе одно- и двухцепочечные (ds-) олигонуклеотиды со специфической (L) или неспецифической (S) последовательностями связываются в растворе с рчЛФ–Eu³⁺ и конкурентно ингибируют взаимодействие меченого белка с ДНК на твердой фазе. Ингибирующий эффект зависит от специфичности, структуры и длины нуклеотидной последовательности, уменьшаясь в ряду: ds-L₂₅ > ds-S₅₀ > ds-S₂₁₅ > ds-S₁₈₀ > ds-S₁₁₅ > L₂₅ > S₅₀. В другой системе на твердой фазе, покрытой биотинсвязывающим белком стрептавидином, иммобилизовались биотинилированные через длинный подвижный линкер специфический (ds-L₂₅) и неспецифический (ds-S₅₀) олигонуклеотиды. Сродство рчЛФ к этим лигандам характеризуется K_a соответственно $6,4 \cdot 10^7$ и $7,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Связывание с неспецифической нуклеотидной последовательностью отличалось также гораздо большей чувствительностью к ионной силе раствора и содержанию инертного белка. Способность рчЛФ взаимодействовать с ДНК послужило бы дальнейшему подтверждению идентичности природного и рекомбинантного белков и повышению оценки рчЛФ как биологически активной пищевой добавки и фармацевтической субстанции.

Ключевые слова: рекомбинантный лактоферрин человека, взаимодействия белок–ДНК, времяразрешенная флуориметрия

Для цитирования: Взаимодействия рекомбинантного лактоферрина человека с дезоксирибонуклеиновыми кислотами / Д. А. Семенов, Л. Н. Валентович, Е. В. Охремчук [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2025. – Т. 69, № 4. – С. 279–290. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2025-69-4-279-290>

**Dmitry A. Semenov¹, Leonid N. Valentovich², Katsiaryna U. Akhremchuk²,
Tatyana S. Serchenya¹, Irina I. Vashkevich¹, Oleg V. Sviridov¹**

¹Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

INTERACTIONS OF RECOMBINANT HUMAN LACTOFERRIN WITH DEOXYRIBONUCLEIC ACIDS

(Communicated by Corresponding Member Sergey A. Usanov)

Abstract. The present study investigated the ability of recombinant human lactoferrin (rhLF), isolated in pure form from the milk of transgenic goats, to nonspecific interactions and specific complex formation with natural DNA and synthetic DNA fragments. Intact rhLF was utilized, containing a europium ion in the metal-binding center possessing long-lived fluorescence. In a microplate system, rhLF–Eu³⁺ interacted with adsorption-immobilized total double-stranded DNA from the calf thymus with $K_a = 1.7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. In the same heterophase system, single- and double-stranded (ds-) oligonucleotides

with specific (L) or nonspecific (S) sequences were bound in solution to rhLF–Eu³⁺ and competitively inhibited the interaction of the labeled protein with DNA on the solid phase. The inhibitory effect was contingent upon the specificity, structure, and length of the nucleotide sequence, exhibiting a decrease in the following sequence: ds-L₂₅ > ds-S₅₀ > ds-S₂₁₅ > ds-S₁₈₀ > ds-S₁₁₅ > L₂₅ > S₅₀. In an alternative system, specific (ds-L₂₅) and nonspecific (ds-S₅₀) oligonucleotides, biotinylated through a long mobile linker, were immobilized onto the solid phase coated with biotin-binding protein streptavidin. The affinity of rhLF for these ligands was characterized by K_a of 6.4 · 10⁷ and 7.1 · 10⁶ M⁻¹, respectively. The binding to the nonspecific nucleotide sequence was also much more sensitive to the ionic strength of the solution and the concentration of an inert protein. The ability of rhLF to interact with DNA would confirm the identity of natural and recombinant proteins and encourage the use of rhLF as a biologically active food supplement and pharmaceutical substance.

Keywords: recombinant human lactoferrin, protein-DNA interactions, time resolved fluorescence

For citation: Semenov D. A., Valentovich L. N., Akhremchuk K. U., Serchenya T. A., Vashkevich I. I., Sviridov O. V. Interactions of recombinant human lactoferrin with deoxyribonucleic acids. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* = *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2025, vol. 69, no. 4, pp. 279–290 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2025-69-4-279-290>

Введение. Лактоферрин (ЛФ) – это гликопротеин, с высоким сродством связывающий ионы железа и некоторых других металлов. Данный белок обладает разнообразными биологическими функциями, играя важную роль в поддержании здоровья. В норме он продуцируется в тканях взрослого человека, а в детский организм поступает с материнским молоком. Человеческий ЛФ имеет молекулярную массу около 80 кДа, состоит из двух олигосахаридных фрагментов и одной полипептидной цепи, свернутой в мультидоменную третичную структуру с двумя металлсвязывающими центрами, несет высокий положительный заряд (изоэлектрическая точка при pH ~ 8,7) и содержит участки взаимодействия с другими биологическими макромолекулами (белки, нуклеиновые кислоты, гликозаминогликаны, липополисахариды) [1].

ЛФ ценен для биохимии, физиологии, нутрициологии, фармацевтической промышленности и пищевой индустрии. Поэтому в мире проводятся научные исследования и выполняются технологические разработки по созданию и практическому применению различных форм рекомбинантного лактоферрина человека (рчЛФ) [2].

Так, важными результатами работ, основанными на достижениях мировой науки в области трансгенеза млекопитающих [3; 4], явились формирование в Беларуси специализированной животноводческой базы и разработка биотехнологии производства чистого рчЛФ, который секретируется молочными железами трансгенных коз-продуцентов как биоаналог ЛФ женского молока [5]. В Национальной академии наук Беларуси в настоящее время действует комплексный план научных работ по получению и применению рчЛФ. В рамках этого плана Институт биоорганической химии НАН Беларуси изучает свойства рчЛФ и разрабатывает методы тестирования производственного препарата для подтверждения биоаналогии между рекомбинантным и природным ЛФ. Кроме того, задачей таких исследований является установление характеристик, которые можно рассматривать как показатели качества рчЛФ. В предыдущих работах этого цикла, в частности, описано иммуноаналитическое определение рчЛФ в системах с поликлональными и моноклональными антителами, специфичными в отношении рчЛФ и ЛФ, с ферментной колориметрической или флуоресцентной детекцией [6; 7]. В экспериментах по изучению металлсвязывающих свойств сравниваемых белков оптимизирован количественный спектрофотометрический тест на максимальную степень насыщения рчЛФ и природного ЛФ ионом Fe³⁺. В этих же исследованиях получен и охарактеризован устойчивый комплекс рчЛФ с Eu³⁺, способный к интенсивной долгоживущей флуоресценции [8]. Аналитические преимущества рчЛФ, меченного европием по металлсвязывающему центру без какого-либо нарушения периферической белковой структуры, использованы для установления количественных параметров специфического взаимодействия рчЛФ с иммобилизованным белковым конъюгатом гепарина как моделью гепарансульфатпротеогликанов клеток [9].

В развитие работы с рчЛФ–Eu³⁺ и биологическими полианионами представлялось интересным определить характеристики связывания меченого белка с другими отрицательно заряженными биополимерами, важнейшими из которых являются дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК). Это также можно рассматривать как оценку качества рчЛФ при его производстве. Так, в одной из ранних работ в данной области [10] изучено сродство природного ЛФ к макромолекулам

кулярным анионам, в том числе к одноцепочечной неспецифической ДНК. Полученные данные сопоставлены с характеристиками взаимодействия рчЛФ из молока трансгенных мышей с теми же объектами, и сделаны выводы об идентичности структур природного и рекомбинантного белков и об их одинаковых биологических свойствах.

Можно полагать, что эффективным тестом на структурную и функциональную полноценность рчЛФ как биоаналога природного ЛФ будет его связывание со специфической нуклеотидной последовательностью двунитевой ДНК, что является необходимой стадией некоторых характерных для ЛФ внутриклеточных эффектов. Действительно, многофункциональность ЛФ – это результат его взаимодействий с разнообразными биоорганическими молекулами в организме хозяина и в патогенных микроорганизмах. К таким молекулярным мишеням относится и ядерная ДНК. Найдено, в частности, что ЛФ действует как транскрипционный фактор, запускающий экспрессию целого ряда генов. Есть также отдельные сведения о защитной роли ЛФ в отношении ДНК при повреждающих воздействиях. Защитные механизмы через сбалансированные процессы репарации генетического материала, пролиферации и апоптоза препятствуют накоплению мутаций в геноме человека и развитию широкого спектра заболеваний. Предполагается, что свою функцию защиты генома хозяина чЛФ выполняет за счет связывания с поврежденной или модифицированной ДНК и модулирования процессов репарации или апоптоза в клетках [11].

Из литературы известно, что ЛФ может проникать в клетку, транспортироваться в ядро и взаимодействовать с ДНК. Обнаружены три специфические нуклеотидные последовательности, к которым белок проявляет повышенное сродство [12]. В более поздней работе выполнено системное исследование механизмов распознавания природным ЛФ человека специфических и неспецифических одно- и двунитевых ДНК различной длины, рассчитаны термодинамические параметры взаимодействий и идентифицированы контактирующие химические группировки в комплексах ЛФ-ДНК [13].

Цель настоящей работы состоит в оценке способности рчЛФ как возможной фармацевтической субстанции сохранять выявленные ранее у ЛФ функциональные активности, основанные на взаимодействиях с ДНК. Для этого дана общая характеристика и установлены количественные параметры связывания рекомбинантного белка с природной ДНК и синтезированными *in vitro* олигодезоксирибонуклеотидами. Важной особенностью примененного нами методического подхода является использование в экспериментах интактного рчЛФ, биологически меченного по металлсвязывающему центру ионом европия, что обеспечивает детекцию комплексообразования между рчЛФ и ДНК спектроскопией времязрешенной флуоресценции.

Материалы и методы исследования. Реактивы, препараты и приборы. В экспериментальной работе использовали стрептавидин из бактерий *Streptomyces avidinii*, бычий сывороточный альбумин (БСА), трис, проклин 300 (Sigma-Aldrich, США), хлорид натрия, твин-20 (Merck, Германия), NaHCO_3 , сахарозу и сорбит (Riedel-de Haën, Германия), тринатриевую соль нитрилотриуксусной кислоты (Alfa Aesar, США). Применявшиеся реактивы отечественных и российских производителей – гидроокись натрия, азид натрия, соляная кислота – имели классификацию не ниже «ч. д. а.».

Для приготовления растворов использовали деионизированную воду с удельным электрическим сопротивлением 17–18 МОм · см, полученную в модульной системе очистки воды Arium® pro VF (Sartorius, Германия).

Раствор хлорида европия (III) приготовлен в Институте химии новых материалов НАН Беларуси и любезно передан авторам. Концентрацию Eu^{3+} в этом растворе определяли методом прямого комплексонометрического титрования с использованием трилона Б и ксиленолового оранжевого в качестве индикатора.

Для возбуждения флуоресценции ионов европия при 340 нм применяли диссоциативно-усиливающий раствор, изготовленный в Институте биоорганической химии НАН Беларуси. Регистрацию интенсивности сигнала проводили с временной задержкой 400 мкс при 615 нм в микропланшетном флуориметре DELFIA 1234 (Wallac Oy, Финляндия).

Высокоочищенный препарат биоаналога лактоферрина человека (рчЛФ), выделенный из молока коз-продуцентов [14], в виде лиофилизированного порошка передан от НПЦ НАН Беларуси

по животноводству. Концентрацию белка после его растворения в 0,05 М трис-НСl буферном растворе, pH 7,4, определяли с помощью спектрофотометра Specord M40 (Carl Zeiss, Германия) по характеристикам поглощения, установленным ранее, используя экспериментально полученный коэффициент поглощения $E_{280}^{1\%} = 11,2 \text{ л} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [8]. В работе использовали интактный белок, меченный по металлсвязывающему центру способным к флуоресценции лантанидом. Препарат получали по разработанной методике [8] простым смешиванием растворов рчЛФ с десятикратным мольным избытком EuCl_3 в трис-НСl, pH 7,4, содержащем нитрилтриацетат Na и NaHCO_3 . Такое мечение по активному центру в отличие от химической модификации позволяет сохранить структурные участки белка, которые вовлечены во взаимодействия с биополимерами. Очистку от не связанных в активном центре белка ионов Eu^{3+} осуществляли путем многократной ультрафильтрации в центрифужном концентраторе Vivaspin® Turbo 4 с мембраной из полиэфирсульфона, обладающей низкой адсорбционной способностью по отношению к белкам и пропускающей молекулы с массой менее 10 кДа (Sartorius, Германия). Промывку меченого белка проводили до полного отсутствия ионов европия в фильтрате, контролируя сигнал флуоресценции лантанида в диссоциативно-усиливающем растворе. Полученный меченый препарат рчЛФ характеризовался степенью включения около 40 % и удельной активностью 4000000 отн. ед. на пмоль белка. Раствор хранили при 4–6 °С в трис-НСl буфере, pH 7,4, с добавлением 0,1 % азида натрия в качестве консерванта.

Тотальная ДНК тимуса теленка получена в лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологии Института биоорганической химии НАН Беларуси. Концентрацию общей ДНК измеряли на приборе NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США). Наличие белковых примесей определяли по соотношению A_{260}/A_{280} .

Получение меченых фрагментов ДНК бактерий Salmonella enterica. Такие фрагменты гена *invA* в виде ампликонов ДНК, меченных флуоресцеином (FAM) и биотином (Bt) на противоположных концах, получали путем постановки ПЦР на матрице ДНК непатогенного штамма бактерий *S. enterica* SL7207 серотипа Typhimurium с применением 4 праймеров (Праймтех, Беларусь). Использовали один прямой праймер с Bt и три обратных праймера с FAM, присоединенными по 5'-концу. Очистку продуктов ПЦР проводили с помощью набора Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (NEB, США) в соответствии с рекомендациями производителя. По данным электрофореза в 0,8 %-ном агарозном геле с бромистым этидием (0,5 мкг/мл) длины полученных олигонуклеотидов соответствовали расчетным и были равны 115 п. н. (ds- S_{115}), 180 п. н. (ds- S_{180}) и 215 п. н. (ds- S_{215}).

Одноцепочечные олигонуклеотиды длиной 50 нуклеотидов получали в ОДО «Праймтех» (Беларусь). Один из них содержал метки FAM на 5'-конце и Bt на 3'-конце (S_{50}), другой представлял собой комплементарную цепь без меток. Двухцепочечную молекулу ds- S_{50} получали из этих фрагментов методом гибридизации. Для этого взаимокплементарные олигонуклеотиды смешивали в эквимольном количестве и выдерживали в термоциклере при 95 °С в течение 15 с и затем при 45 °С в течение 15 с.

Получение олигонуклеотидов со специфической последовательностью. С целью получения двухцепочечного биотинилированного олигонуклеотида, потенциально способного к специфическому связыванию с ЛФ, синтезированы взаимокплементарные цепи нуклеотидов TTTTТТТТТТТТТАGAAGATCAAТТТ с биотиновой меткой на 5'-конце (L_{25}) и AAATTTGATCTTCTAAAAАААААААААА. Данные фрагменты были сконструированы на основе последовательности олигонуклеотида, к которому по литературным данным человеческий ЛФ проявляет повышенное сродство [12]. Синтезированные фрагменты нуклеиновых кислот обеспечили получение двухцепочечной ds- L_{25} методом гибридизации в соответствии с условиями, описанными выше. Длина такого олигонуклеотида составила 25 п. н.

Молекулярные массы всех синтезированных олигонуклеотидов определяли с помощью ресурса Oligo Calc¹, а концентрации двухцепочечных нуклеиновых кислот измеряли флуориметрически на приборе QFX Fluorometer (DeNovix, США). В качестве красителя использовали ZUBR

¹ Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator. – [Chicago, IL], 2015–2024. – URL: <http://oligocalc.eu/> (date of access: 11.03.2024).

Green-1 (Праймтех, Беларусь). Концентрации одноцепочечных олигонуклеотидов с биотиновой меткой в растворе устанавливал ОДО «Праймтех».

Взаимодействие рчЛФ с ДНК и синтезированными фрагментами нуклеиновых кислот. Для изучения взаимодействия рчЛФ с нуклеиновыми кислотами применяли гетерофазные системы лантанидного иммунофлуориметрического анализа (ЛИФМА). Для конструирования таких систем использовали полистирольные микропланшеты с 96 полностью разделяемыми лунками повышенной сорбционной емкости КН-М-02 от Хема-Медика (Россия), в которых пассивно адсорбировали общую ДНК из тимуса телят или биотинсвязывающий белок стрептавидин. Подготовленные реагенты с концентрацией 10 мкг/мл в 0,1 М NaHCO_3 , pH 8,3 вносили в лунку в объеме 100 мкл. Инкубировали планшеты 16 ч при 4 °С, затем содержимое лунок аспирировали, дважды промывали 200 мкл моющего буфера (0,05 М трис-HCl буфер, содержащий 0,15 М NaCl, 0,02 % Твин 20, pH 7,8). Далее в лунки вносили по 200 мкл блокирующего раствора, приготовленного на основе моющего буфера, содержащего 1 мг/мл БСА с добавлением сахарозы и сорбита соответственно до 3 и 2 %, и снова инкубировали 16 ч при 4 °С. После ночной инкубации удаляли раствор из лунок и высушивали планшеты при комнатной температуре с последующей герметизацией в металлизированных пакетах под вакуумом.

Посадку биотинилированных фрагментов двухцепочечных нуклеиновых кислот в концентрации 2 нМ осуществляли в лунках стрептавидинизированных планшетов из объема 100 мкл в 0,05 М трис-HCl буфере, содержащем 0,15 М NaCl, 0,02 % Твин 20 и 1 мг/мл БСА, pH 7,8 (далее ЛИФМА-буфер) в течение 1 ч при 25 °С. После удаления реагентов и промывки (трижды по 200 мкл) моющим буфером планшет с иммобилизованными фрагментами ДНК сразу использовали в биоанализе.

Для установления количественных характеристик связывания рчЛФ- Eu^{3+} с иммобилизованными ДНК или олигонуклеотидами в лунки вносили возрастающие количества меченого белка в диапазоне 3,0–500 нМ в исходном ЛИФМА-буфере в объеме 100 мкл и инкубировали планшеты в течение 1 ч при 25 °С при встряхивании. Удаляли непрореагировавшие компоненты, троекратно промывали планшет моющим буфером и вносили 100 мкл диссоциативно-усиливающего раствора. Через 20 мин инкубации при слабом встряхивании проводили измерение интенсивности времяразрешенной флуоресценции (TRF) – F в отн. ед. в микропланшетном флуориметре. Обработку экспериментальных данных и графические построения проводили для иммобилизованных ДНК и олигонуклеотидов в координатах Скэтчарда.

Для исследования специфичности взаимодействия исследуемых олигонуклеотидов с рчЛФ в растворе была использована следующая методика. В микропланшет с адсорбированной общей ДНК из тимуса телят последовательно вносили по 50 мкл растворов одно- и двухцепочечных нуклеиновых кислот в концентрациях (0,01–100,0 нМ) и рчЛФ- Eu^{3+} в концентрации 250 нМ в ЛИФМА-буфере. После инкубации, проведенной со встряхиванием при 100 об/мин в течение 1 час при 25 °С, осуществляли промывку моющим буфером и измерение TRF образовавшегося комплекса рчЛФ- Eu^{3+} с общей ДНК. Определяли зависимость F / F_0 в % от концентрации в нМ для каждого исследуемого олигонуклеотида, где F_0 – сигнал флуоресценции в отсутствие олигонуклеотидов в растворе. Для каждого олигонуклеотида по форме установленных зависимостей определяли показатель IC_{50} как концентрацию олигонуклеотида, нмоль/л, которая ингибирует взаимодействие рчЛФ- Eu^{3+} с ДНК из тимуса телят на 50 % по сравнению с исходными условиями эксперимента.

Полученные результаты обрабатывали с помощью программы Microsoft Excel и представляли в виде средних значений двух независимых экспериментов.

Результаты и их обсуждение. В нашей работе объектами и предметом исследования были природная и синтетические одно- и двухцепочечные ДНК, содержащие специфическую и неспецифические нуклеотидные последовательности, сродство которых к рекомбинантному лактоферрину человека в форме рчЛФ- Eu^{3+} определялось в гетерофазных системах связывания путем измерения интенсивности времяразрешенной флуоресценции Eu^{3+} в образующихся комплексах рчЛФ-ДНК.

Компоненты систем связывания. Постоянным компонентом гетерофазных систем нековалентного связывания исследуемого белка с различными ДНК был комплекс рчЛФ–Eu³⁺ в растворе с известной удельной интенсивностью TRF (отн. ед/моль). Высокая константа ассоциации ($K_a \approx 1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$) обеспечивает долговременную стабильность этого комплекса в течение эксперимента и при хранении [8]. Тем не менее, неповрежденная структура рчЛФ–Eu³⁺ в ходе применения подтверждалась оценкой его иммунореактивности по отношению к специфическим поликлональным антителам [6], а содержание иона лантанида определялось путем диссоциации, измерения флуоресценции Eu³⁺ с разрешением во времени и расчетами по калибровочному графику [8]. Таким образом, главной особенностью использованного в системах связывания меченого рчЛФ явилось отсутствие на заряженной поверхности белковой глобулы посторонних химически присоединенных органических молекул, так как флуоресцентная активность обуславливалась ионом редкоземельного металла, «биологически» внедренным в активный центр внутри третичной структуры белка.

Вначале для установления самого факта взаимодействия рчЛФ с биологическими объектами в виде ДНК в качестве лиганда была использована очищенная общая ДНК из тимуса теленка. Этот биореагент иммобилизовали в лунках полистирольного микропланшета путем физической адсорбции. Меченный европием рчЛФ вносился в жидкую фазу, солевой состав которой (0,05 М трис–HCl, 0,15 М NaCl) существенно не нарушает катион-анионные взаимодействия биополимеров, как мы показали на примере связывания рчЛФ с иммобилизованным гепарином [8]. После инкубации комплекс ДНК–рчЛФ количественно определялся на твердой фазе по интенсивности флуоресценции Eu³⁺ в добавленном диссоциативно-усиливающем растворе. Величина флуоресцентного сигнала связанного рчЛФ–Eu³⁺ возрастала с увеличением количества меченого белка, внесенного в систему, и находилась на уровне 1 млн отн. ед. для 125 нМ раствора рчЛФ–Eu³⁺. В то же время фоновый сигнал, измеренный в лунках, покрытых БСА, в отсутствие ДНК не превышал 1000 отн. ед. Это указывало на тот факт, что рчЛФ обладает базовым свойством природного ЛФ человека – способностью образовывать комплексы с природными ДНК, в частности, с двунилевой ДНК из тимуса теленка [15]. Графические построения и расчеты по методу Скэтчарда, включающие найденные концентрации свободного и связанного рчЛФ, дали значение константы аффинитета $1,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Разработанная конструкция и установленные свойства данной гетерофазной системы позволили применить ее для определения характеристик связывания рчЛФ с рядом синтетических ДНК в растворе. Общая характеристика этих ДНК дана в табл. 1. Дополнительно отметим, что помимо одно- и двухцепочечного олигонуклеотидов из 25 оснований или пар оснований, включающих специфическую последовательность в отношении ЛФ (L₂₅ и ds-L₂₅), исследовались и неспецифические ДНК (S₅₀, ds-S₅₀, ds-S₁₁₅, ds-S₁₈₀ и ds-S₂₁₅). Они представляют собой различающиеся по длине и структуре фрагменты гена *invA* бактерий *Salmonella enterica*, полученные в результате полимеразной цепной реакции. Последние три из перечисленных фрагментов представляют собой перекрывающиеся участки ДНК *S. enterica* и включают отрезки с одинаковыми последовательностями. Одно- и двухцепочечный олигонуклеотиды S₅₀ и ds-S₅₀ происходят из другой области данной ДНК. Выбор указанных пяти объектов обусловлен известным фактом антибактериальной активности ЛФ [1]. Кроме того, мы руководствовались намерениями оценить неспецифическое связывание этих синтетических объектов с белками и получить полезную информацию для их целевого применения в комбинированных системах ПЦР и иммунофлуоресцентного анализа ДНК бактерий *S. enterica*.

Важно отметить, что все изученные специфические и неспецифические ДНК, синтезированные *in vitro*, содержали биотиновую метку на 5'-конце. При этом функциональное ядро биотина было присоединено к фосфатной группе олигонуклеотида через 24 атома в составе синтетического линкера, конъюгированного с боковой цепью биотина. Такая модификация позволила нам сконструировать альтернативную систему связывания рчЛФ–фрагмент ДНК, в которой биотинилированные олигонуклеотиды иммобилизовались на твердой фазе через биотинсвязывающий белок стрептавидин, адсорбированный на поверхности лунок микропланшета.

Т а б л и ц а 1. Конкурентное ингибирование связывания рчЛФ–Eu³⁺ с общей ДНК из тимуса теленка олигонуклеотидами различной структуры

Table 1. Competitive inhibition of rhLF–Eu³⁺ binding to the calf thymus DNA by various oligonucleotides

Обозначение Designation	Олигонуклеотид Oligonucleotide Описание Description	IC ₅₀ , нмоль/л IC ₅₀ , nmol/L
ds-L ₂₅	Двухцепочечный, содержит специфическую для рчЛФ последовательность TAGAAGATCAAA, длина 25 п. н.	0,14
ds-S ₅₀	Двухцепочечный, неспецифическая последовательность 50 п. н. из ДНК <i>S. enterica</i>	0,77
ds-S ₂₁₅	Двухцепочечный, неспецифическая последовательность 215 п. н. из ДНК <i>S. enterica</i>	0,81
ds-S ₁₈₀	Двухцепочечный, неспецифическая последовательность 180 п. н. из ДНК <i>S. enterica</i>	0,94
ds-S ₁₁₅	Двухцепочечный, неспецифическая последовательность 115 п. н. из ДНК <i>S. enterica</i>	1,15
L ₂₅	Одноцепочечный, содержит специфическую для рчЛФ последовательность TAGAAGATCAAA, длина 25 нуклеотидов	1,63
S ₅₀	Одноцепочечный, неспецифическая последовательность 50 нуклеотидов из ДНК <i>S. enterica</i>	12,72

Связывание рчЛФ с олигонуклеотидами в растворе. В гетерофазной системе с адсорбированной ДНК из тимуса теленка в раствор вместе с рчЛФ–Eu³⁺ добавляли олигонуклеотиды различной структуры в возрастающих количествах и наблюдали падение интенсивности флуоресценции твердой фазы за счет связывания олигонуклеотида с рчЛФ и блокирования тем самым его взаимодействия с иммобилизованной ДНК. На основании построенных графиков зависимости процента ингибирования флуоресценции от концентрации олигонуклеотидного ингибитора (в статье не приводятся) рассчитывали для него значение IC₅₀ как концентрацию, при которой количество твердофазного комплекса рчЛФ–ДНК уменьшается в 2 раза. Результаты эксперимента представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что ингибирующий эффект олигонуклеотидов на комплексообразование между рчЛФ и ДНК из тимуса теленка падает в следующем ряду: ds-L₂₅ > ds-S₅₀ > ds-S₂₁₅ > ds-S₁₈₀ > ds-S₁₁₅ > L₂₅ > S₅₀. Значит, наибольшей силой связывания с рчЛФ в растворе обладает ds-L₂₅ – двухцепочечный олигонуклеотид длиной 25 пар оснований, содержащий специфическую для рчЛФ последовательность. Сродство его одноцепочечного варианта к данному белку было более чем на порядок ниже. Еще большее уменьшение связывания с рчЛФ наблюдается для неспецифических фрагментов ДНК при переходе от двухцепочечного ds-S₅₀ к одонитевому S₅₀ с той же длиной и последовательностью. Это согласуется с литературными данными о снижении в 8 раз аффинитета олигонуклеотида к природному ЛФ в результате удаления комплементарной цепи [13]. На примере ds-S₂₁₅, ds-S₁₈₀ и ds-S₁₁₅ с родственными последовательностями можно видеть неярко выраженную зависимость: чем длиннее цепь, тем сильнее взаимодействие с рчЛФ. Из этого ряда выпадает ds-S₅₀, имеющий повышенное сродство к исследуемому белку, т. е. сила неспецифического связывания может определяться конкретной структурой олигонуклеотида.

Взаимодействия рчЛФ с иммобилизованными олигонуклеотидами. Мы использовали преимущества концевой биотиновой метки с очень длинным гидрофильным линкером в синтезированных олигонуклеотидах для их контролируемого и очень прочного прикрепления нековалентными связями к высокоаффинному биотинсвязывающему белку, нанесенному на твердую фазу. Иммобилизация через такой линкер специфического и неспецифического олигонуклеотидов ds-L₂₅ и ds-S₅₀, которые были выбраны для сравнительного исследования, должна была обеспечить высокие подвижности лигандов и приблизить условия твердофазного связывания с рчЛФ к таковым в растворе. В жидкую фазу добавляли возрастающие количества рчЛФ–Eu³⁺ и после достижения равновесия в системе определяли по сигналу флуоресценции концентрации связанного с иммобилизованным олигонуклеотидом и свободного рчЛФ. Последующее построение кривых насыщения (рис. 1, а) и их линеаризация в координатах Скэтчарда (рис. 1, б) позволили рассчитать равновесные константы ассоциации. Значения K_а для взаимодействия рчЛФ с неспецифическим ds-S₅₀ и связывание этого белка со специфической последовательностью в ds-L₂₅

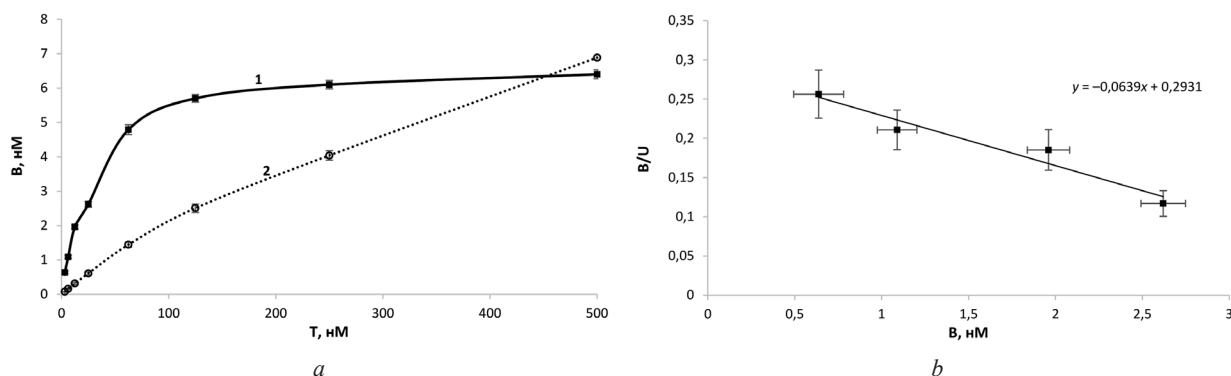


Рис. 1. Зависимость концентрации рчЛФ–Eu³⁺, связанного с олигонуклеотидами на твердой фазе (B), от общего количества (T), внесенного в гетерофазную систему, где 1 – ds-L₂₅, 2 – ds-S₅₀ (a).
Пример линеаризации кривой 1 на графике Скэтчарда (b)

Fig. 1. The relationship between the concentrations of rhLF–Eu³⁺ bound to oligonucleotides on the solid phase (B) and the total amount (T) introduced into the heterophase system, where 1 – ds-L₂₅, 2 – ds-S₅₀ (a).
Example of curve 1 linearization by Scatchard plot (b)

оказались равными соответственно $7,1 \cdot 10^6$ и $6,4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Такое соотношение показателей двух типов связывания с ДНК соответствует литературным данным для природного ЛФ человека [13].

Далее в сравнительном плане было изучено влияние ионной силы раствора и различных концентраций инертного белка на комплексообразование рчЛФ со специфическими и неспецифическими последовательностями ДНК в тех же системах (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Влияние состава жидкой фазы на связывание рчЛФ с иммобилизованными олигонуклеотидами в гетерофазной системе

Table 2. Effect of liquid phase composition on the binding of rhLF to immobilized oligonucleotides in the heterophase system

Олигонуклеотид Oligonucleotide	$F/F_0, \%$						
	NaCl, M			БСА, г/л BSA, g/L			
	0,15	0,3	0,5	0,0	1,0	5,0	10,0
ds-L ₂₅	100	84	67	100	98	93	87
ds-S ₅₀	100	19	6	100	96	42	23

П р и м е ч а н и е. Интенсивность (F_0) сигнала TRF связанного рчЛФ–Eu³⁺ в среде 0,15 М NaCl и в отсутствие БСА приняты за 100 %.

N o t e. The intensity (F_0) of TRF signal of bound rhLF–Eu³⁺ in 0,15 M NaCl and in the absence of BSA were taken as 100 %.

Выявлено, что высокие концентрации соли и белка приводят к подавлению связывания в случае неспецифического взаимодействия на примере ds-S₅₀ в отличие от специфического комплексообразования с ds-L₂₅, где ингибирующие эффекты выражены весьма умеренно. Можно предположить, что неспецифическое взаимодействие обусловлено главным образом ионными мостиками между положительно заряженным N-концевым аргининовым участком рчЛФ и отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом олигонуклеотида. Поэтому увеличение ионной силы раствора или концентрации инертного белка создает экранирование заряженных участков молекул, что приводит к резкому ослаблению связывания. В случае специфического комплексообразования между рчЛФ и ds-L₂₅ вклад катион-анионных взаимодействий не является доминирующим. Нековалентные связи, играющие здесь главную роль, обсуждаются в следующем разделе.

Возможный механизм специфического связывания рчЛФ с ДНК. Ранее было показано, что ЛФ человека можно отнести к сиквенс-специфичным ДНК-связывающим белкам [12]. В последующей работе [13] олигонуклеотиды со специфическими последовательностями были синтези-

рованы и использованы как лиганды для сравнительного исследования взаимодействий с природным ЛФ методами, основанными на эффекте сдвига полосы лиганда при электрофорезе и тушении собственной флуоресценции ЛФ в результате комплексообразования. Авторы нашли, в частности, что ЛФ образует комплекс с 12-мерным олигонуклеотидом TAGAAGATCAAA, который характеризуется $K_a = 1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, а одноцепочечный аналог имеет в 8 раз меньшую константу сродства. В подобных комплексах связывание через слабые аддитивные контакты с межнуклеозидными фосфатными группами, как и в случае неспецифических последовательностей, усиливалось на порядок величины за счет сиквенс-специфичных взаимодействий боковых цепей аминокислотных остатков ЛФ с экспонированными в раствор функциональными группами оснований олигонуклеотида. В нашем исследовании рчЛФ связывался с олигонуклеотидами L_{25} и ds- L_{25} аналогично взаимодействию природного ЛФ с одно- и двухцепочечной специфической последовательностью.

Согласно обобщенным данным о взаимодействиях в комплексах белков с ДНК большая часть аминокисотно-нуклеотидных контактов (72,9 %) образована с участием атомов сахарофосфатного остова ДНК, остальную долю точек связывания формируют атомы нуклеиновых оснований, поверхностные функциональные группы которых экспонированы в большой и малой бороздках [16]. При избирательном связывании со специфическим сайтом ДНК белок распознает конкретную последовательность пар оснований путем образования энергетически выгодных структурных контактов, включающих силы Ван-дер-Ваальса и водородные связи с нуклеотидами, дополненные ионными мостиками между катионизированными боковыми цепями аминокислотных остатков и отрицательно заряженными фосфатами [17]. При этом альфа-спирали вторичной структуры белка, из которых, кстати, сформирована укладка ЛФ [1], в результате конформационных изменений должны проникнуть в бороздку ДНК и занять в ней строго определенную ориентацию. Наиболее важными структурными элементами в таком специфическом взаимодействии, как было показано в [13], являются тринуклеотид ТСА в структуре олигонуклеотидов и N-концевой аргининовый кластер ЛФ [15]. Можно предположить, что один остаток аргинина,

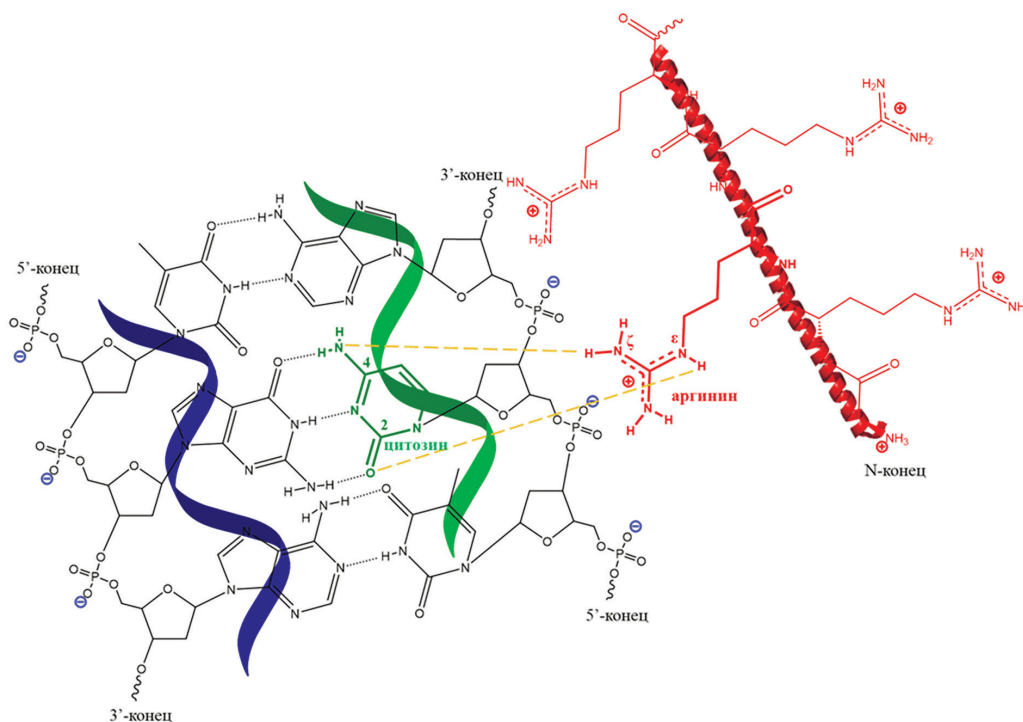


Рис. 2. Модель специфического связывания лактоферрина человека с олигонуклеотидом ds- L_{25} на примере контактов аргининового кластера на N-конце белка и цитозина в составе тринуклеотида ТСА

Fig. 2. The model of human lactoferrin specific binding to the ds- L_{25} oligonucleotide using the example of contacts between the arginine cluster at the N-terminus of the protein and cytosine in the TCA trinucleotide

например, из N-концевого тетрааргинилового кластера у рекомбинантного биоаналога ЛФ, может распознавать цитозиновое основание путем образования между двумя атомами азота Arg и атомами основания N4 и O2 двух водородных связей, которым, возможно, и принадлежит приоритетная роль в специфичности белок-нуклеинового взаимодействия (рис. 2). Также могут образовываться водородные связи между остатком Arg белка и атомами основания N7 и O6, принадлежащими гуанину. Существенную, но все же вторичную роль здесь играют силы Ван-дер-Ваальса. При участии аргинила эти силы могут действовать между триметиленовым фрагментом аминокислотного остатка и метильной группой тимина. Дополнительно у активного аргинила, а в случае ЛФ и у его соседей по кластеру, вероятны зарядовые взаимодействия с сахарофосфатным остовом по типу ионного мостика. Возможная структурная схема комплекса рчЛФ–ds-L₂₅ и его компонентов представлена на рис. 2.

Остается отметить, что, согласно полученным нами результатам, макромолекулы рчЛФ и природного ЛФ имеют одинаково организованные уровни структуры, ответственные за связывание со специфической нуклеотидной последовательностью ДНК. Первоначально связавшись с длинной ДНК по ее любой последовательности ЛФ может «скользить» по нуклеотидной цепи до специфической последовательности или поврежденного участка и останавливаться в нем вследствие значительного увеличения сродства, индуцируя структурно-конформационные изменения ДНК и разнообразные биологические эффекты [1].

Заключение. Способность природного ЛФ взаимодействовать с ДНК может быть важным фактором поддержания нормального функционирования организма человека и его защиты от инфекционных агентов. Обнаружение такого же свойства у биоаналога ЛФ, очищенного из молока трансгенных коз, послужило бы дальнейшему подтверждению идентичности природного и рекомбинантного белков и повышению оценки рчЛФ как биологически активной пищевой добавки и фармацевтической субстанции. Поэтому мы впервые провели исследование комплексообразования рчЛФ с природной ДНК и синтетическими фрагментами ДНК различной структуры, используя преимущества рчЛФ, содержащего способный к долгоживущей флуоресценции ион европия в металлсвязывающем центре белка.

В гетерофазной системе с адсорбционно иммобилизованной общей двухцепочечной ДНК из тимуса телят одно- и двухцепочечные (ds-) олигонуклеотиды со специфической (L) или неспецифической (S) последовательностями связывались в жидкой фазе с рчЛФ–Eu³⁺ и конкурентно ингибировали взаимодействие меченого белка с ДНК. По измеренному соотношению IC₅₀ лигандов их ингибирующий эффект падал в ряду: ds-L₂₅ > ds-S₅₀ > ds-S₂₁₅ > ds-S₁₈₀ > ds-S₁₁₅ > L₂₅ > S₅₀. В другой системе на твердой фазе, покрытой биотинсвязывающим белком стрептавидином, иммобилизовались биотинилированные через длинный подвижный линкер специфический (ds-L₂₅) и неспецифический (ds-S₅₀) олигонуклеотиды. Сродство рчЛФ к этим лигандам характеризовалось K_a соответственно 6,4 · 10⁷ и 7,1 · 10⁶ М⁻¹. В отличие от специфического олигонуклеотида связывание с неспецифической нуклеотидной последовательностью отличалось значительной чувствительностью к ионной силе раствора и содержанию инертного белка.

Установленная в нашей работе способность рчЛФ, как и хорошо изученного ЛФ человека, к специфическим и неспецифическим взаимодействиям с ДНК подтверждает факт сохранения неповрежденной структуры биоаналога, полученного из молока коз-продуцентов, и обосновывает возможность замены им природного ЛФ в составе пищевых добавок и фармпрепаратов.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект X23РНФ-185).

Acknowledgements. This work has been done under the financial support of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (project X23РНФ-185).

Список использованных источников

1. Борзенкова, Н. В. Лактоферрин: физико-химические свойства, биологические функции, системы доставки, лекарственные препараты и биологически активные добавки (обзор) / Н. В. Борзенкова, Н. Г. Балабушевич, Н. И. Ларинова // Биофармацевтический журнал. – 2010. – Т. 2, № 3. – С. 3–19.
2. Мировая практика получения рекомбинантного человеческого лактоферрина (обзор) / И. С. Агиевич, А. А. Костеневич, У. В. Фальковская, Р. Н. Бирюков // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – 2017. – Т. 9. – С. 9–30.

3. Использование трансгенных животных в биотехнологии: перспективы и проблемы / О. Г. Максименко, А. В. Дейкин, Ю. М. Ходарович, П. Г. Георгиев // *Acta Naturae*. – 2013. – Т. 5, № 1. – С. 33–46. <https://doi.org/10.32607/20758251-2013-5-1-33-46>
4. Production of human lactoferrin in animal milk / I. L. Goldman, S. G. Georgieva, Ya. G. Gurskiy [et al.] // *Biochemistry and Cell Biology*. – 2012. – Vol. 90, N 3. – P. 513–519. <https://doi.org/10.1139/o11-088>
5. Получение рекомбинантного лактоферрина человека из молока коз-продуцентов и его физиологические эффекты / В. С. Лукашевич, А. И. Будевич, И. В. Семак [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2016. – Т. 60, № 1. – С. 72–81.
6. Семенов, Д. А. Новые иммуноаналитические системы на основе рекомбинантного лактоферрина человека / Д. А. Семенов, И. И. Вашкевич, О. В. Свиридов // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2021. – Т. 65, № 3. – С. 290–302. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-3-290-302>
7. Семенов, Д. А. Лабораторная иммунофлуоресцентная система для количественного определения лактоферрина человека в биологических жидкостях / Д. А. Семенов, И. И. Вашкевич, О. В. Свиридов // Новости медико-биологических наук. – 2022. – Т. 22, № 3. – С. 119–120.
8. Некоторые металлсвязывающие свойства рекомбинантного лактоферрина человека из молока трансгенных коз / Д. А. Семенов, О. С. Купrienko, И. И. Вашкевич, О. В. Свиридов // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 43–54. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-43-54>
9. Взаимодействие рекомбинантного лактоферрина человека и вируса SARS-CoV-2 с белковым конъюгатом гепарина / Д. А. Семенов, И. И. Вашкевич, А. С. Владыко, О. В. Свиридов // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 4. – С. 404–413. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-4-404-413>
10. Characterization of recombinant human lactoferrin secreted in milk of transgenic mice / J. H. Nuijens, P. H. C. van Berkel, M. E. J. Geerts [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272, N 13. – P. 8802–8807. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.13.8802>
11. Lactoferrin as a human genome “Guardian” – an overall point of view (review) / I. Bukowska-Ośko, D. Sulejczak, K. Kaczyńska [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23, N 9. – Art. 5248. <https://doi.org/10.3390/ijms23095248>
12. He, J. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA / J. He, P. Furmanski // *Nature*. – 1995. – Vol. 373. – P. 721–724. <https://doi.org/10.1038/373721a0>
13. Guschina, T. A. Recognition of specific and nonspecific DNA by human lactoferrin / T. A. Guschina, S. E. Soboleva, G. A. Nevinsky // *Journal of Molecular Recognition*. – 2013. – Vol. 26, N 3. – P. 136–148. <https://doi.org/10.1002/jmr.2257>
14. Goats producing biosimilar human lactoferrin / D. M. Bogdanovich, V. F. Radchikov, V. N. Kuznetsova [et al.] // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – 2021. – Vol. 848. – Art. 012080. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/848/1/012080>
15. N-terminal stretch Arg², Arg³, Arg⁴ and Arg⁵ of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA / P. H. C. van Berkel, E. J. M. Geerts, A. H. van Veen [et al.] // *Biochemical Journal*. – 1997. – Vol. 328, N 1. – P. 145–151. <https://doi.org/10.1042/bj3280145>
16. Взаимодействия белок-ДНК: статистический анализ межатомных контактов в большой и малой бороздках / А. А. Анашкина, Е. Н. Кузнецов, А. В. Батыновский [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – Т. 21, № 8. – С. 887–894. <https://doi.org/10.18699/vj17.309>
17. Garvie, C. W. Recognition of Specific DNA Sequences / C. W. Garvie, C. Wolberger // *Molecular Cell*. – 2001. – Vol. 8, N 5. – P. 937–946. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00392-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00392-6)

References

1. Borzenkova N. V., Balabushevich N. G., Larionova N. I. Lactoferrin: physical and chemical properties, biological functions, delivery systems, pharmaceutical and nutraceutical preparations (review). *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Biopharmaceutical Journal*, 2010, vol. 2, no. 3, pp. 3–19 (in Russian).
2. Agievitch I. S., Kastsianevich A. A., Falkouskaya U. V., Birukou R. M. World practice for production of recombinant human lactoferrin (review). *Mikrobynye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty = Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects*, 2017, vol. 9, pp. 9–30 (in Russian).
3. Maksimenko O. G., Deykin A. V., Khodarovich Yu. M., Georgiev P. G. Use of transgenic animals in biotechnology: prospects and problems. *Acta Naturae*, 2013, vol. 5, no. 1, pp. 33–46. <https://doi.org/10.32607/20758251-2013-5-1-33-46>
4. Goldman I. L., Georgieva S. G., Gurskiy Ya. G., Krasnov A. N., Deykin A. V., Popov A. N., Ermolkevich T. G., Budzevich A. I., Chernousov A. D., Sadchikova E. R. Production of human lactoferrin in animal milk. *Biochemistry and Cell Biology*, 2012, vol. 90, no. 3, pp. 513–519. <https://doi.org/10.1139/o11-088>
5. Lukashevich V. S., Budzevich A. I., Semak I. V., Kuznetsova V. N., Malyushkova E. V., Pyzh A. E., Novakovskaya S. A., Rudnichenko J. A., Popkov N. A., Ivashkevich O. A., Zalutsky I. V. Production of recombinant human lactoferrin from the milk of goat-producers and its physiological effects. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2016, vol. 60, no. 1, pp. 72–81 (in Russian).
6. Semenov D. A., Vashkevich I. I., Sviridov O. V. New immunoassay systems based on recombinant human lactoferrin. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2021, vol. 65, no. 3, pp. 290–302 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-3-290-302>

7. Semenov D. A., Vashkevich I. I., Sviridov O. V. Laboratory immunofluorescence system for the quantitative determination of human lactoferrin in biological fluids. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk = News of Biomedical Sciences*, 2022, vol. 22, no. 3, pp. 119–120 (in Russian).
8. Semenov D. A., Kuprienko O. S., Vashkevich I. I., Sviridov O. V. Some metal binding properties of recombinant human lactoferrin from the milk of transgenic goats. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 1, pp. 43–54 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-43-54>
9. Semenov D. A., Vashkevich I. I., Vladyko A. S., Sviridov O. V. Interaction of recombinant human lactoferrin and SARS-CoV-2 virus with heparin-protein conjugate. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 4, pp. 404–413 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-4-404-413>
10. Nuijens J. H., van Berkel P. H. C., Geerts M. E. J., Hartevelt P. P., de Boer H. A., van Veen H. A., Pieper F. R. Characterization of recombinant human lactoferrin secreted in milk of transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, vol. 272, no. 13, pp. 8802–8807. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.13.8802>
11. Bukowska-Oško I., Sulejczak D., Kaczyńska K., Kleczkowska P., Kramkowski K., Popiel M., Wietrak E., Kowalczyk P. Lactoferrin as a human genome “Guardian” – an overall point of view (review). *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, vol. 23, no. 9, art. 5248. <https://doi.org/10.3390/ijms23095248>
12. He J., Furmanski P. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature*, 1995, vol. 373, pp. 721–724. <https://doi.org/10.1038/373721a0>
13. Guschina T. A., Soboleva S. E., Nevinsky G. A. Recognition of specific and nonspecific DNA by human lactoferrin. *Journal of Molecular Recognition*, 2013, vol. 26, no. 3, pp. 136–148. <https://doi.org/10.1002/jmr.2257>
14. Bogdanovich D. M., Radchikov V. F., Kuznetsova V. N., Petrushko E. V., Spivak M. E., Sivko A. N. Goats producing biosimilar human lactoferrin. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2021, vol. 848, art. 012080. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/848/1/012080>
15. Van Berkel P. H. C., Geerts E. J. M., van Veen A. H., Mericskay M., de Boer A. H., Nuijens J. H. N-terminal stretch Arg², Arg³, Arg⁴ and Arg⁵ of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA. *Biochemical Journal*, 1997, vol. 328, no. 1, pp. 145–151. <https://doi.org/10.1042/bj3280145>
16. Anashkina A. A., Kuznetsov E. N., Batianovskii A. V., Uroshlev L. A., Tumanyan V. G., Esipova N. G. Protein-DNA interactions: statistical analysis of interatomic contacts in major and minor grooves. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2017, vol. 21, no. 8, pp. 887–894 (in Russian). <https://doi.org/10.18699/vj17.309>
17. Garvie C. W., Wolberger C. Recognition of Specific DNA Sequences. *Molecular Cell*, 2001, vol. 8, no. 5, pp. 937–946. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00392-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00392-6)

Информация об авторах

Семенов Дмитрий Александрович – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: dsemenov@iboch.by.

Валентович Леонид Николаевич – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: valentovich@mbio.bas-net.by.

Охремчук Екатерина Владимировна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: katerina_akhr@bio.bsu.by.

Серченя Татьяна Сергеевна – канд. хим. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: serchenya@iboch.by.

Вашкевич Ирина Игнатьевна – канд. хим. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vashkevich@iboch.by.

Свиридов Олег Васильевич – д-р хим. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sviridov@iboch.by.

Information about the authors

Semenov Dmitry A. – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dsemenov@iboch.by.

Valentovich Leonid N. – Ph. D. (Biology), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: valentovich@mbio.bas-net.by.

Akhremchuk Katsiaryna U. – Ph. D. (Biology), Senior Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: katerina_akhr@bio.bsu.by.

Serchenya Tatyana S. – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: serchenya@iboch.by.

Vashkevich Irina I. – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vashkevich@iboch.by.

Sviridov Oleg V. – D. Sc. (Chemistry), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sviridov@iboch.by.