

ХИМИЯ
CHEMISTRYУДК [577.112.853+577.112.854]:57.083.3
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-3-290-302>Поступило в редакцию 11.02.2021
Received 11.02.2021**Д. А. Семенов, И. И. Вашкевич, О. В. Свиридов***Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь***НОВЫЕ ИММУНОАНАЛИТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ
НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА***(Представлено академиком В. А. Хрипачом)*

Аннотация. Комбинацией биохимических и синтетических методов с использованием рекомбинантного лактоферрина человека (рчЛФ) в качестве исходного соединения получены растворимые и иммобилизованные на твердой фазе иммунореагенты, включающие рчЛФ, комплекс рчЛФ с ионами европия, кроличью антисыворотку к рчЛФ, выделенный из антисыворотки антиген-аффинной хроматографией анти-рчЛФ иммуноглобулин, конъюгаты этого иммуноглобулина с хелатом Eu^{3+} или с пероксидазой из корней хрена. Биоспецифические взаимодействия реагентов в четырех иммунохимических системах различных конструкций изучены путем измерения ферментативной активности или флуоресценции с разрешением во времени. Практическим результатом исследования стала разработка тест-систем для быстрого и точного определения концентрации биологически активного рчЛФ в молоке трансгенных коз, во фракциях производственного процесса очистки этого белка, а также в фармацевтических препаратах и биологически активных пищевых добавках.

Ключевые слова: рекомбинантный лактоферрин человека, иммунореагенты на лактоферрин, иммуноанализ лактоферрина

Для цитирования. Семенов, Д. А. Новые иммуноаналитические системы на основе рекомбинантного лактоферрина человека / Д. А. Семенов, И. И. Вашкевич, О. В. Свиридов // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2021. – Т. 65, № 3. – С. 290–302. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-3-290-302>

Dmitry A. Semenov, Irina I. Vashkevich, Oleg V. Sviridov*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***NEW IMMUNOASSAY SYSTEMS BASED ON RECOMBINANT HUMAN LACTOFERRIN***(Communicated by Academician Vladimir A. Khrpach)*

Abstract. In this work, soluble and solid phase immunoreagents, including recombinant human lactoferrin (rhLF), a complex of rhLF with europium ions, rabbit antiserum to rhLF, anti-rhLF immunoglobulin purified by antigen-affinity chromatography and the conjugates of this immunoglobulin with an Eu^{3+} chelate or horseradish peroxidase have been obtained by a combination of biochemical and synthetic methods using rhLF as an initial compound. Biospecific interactions of the reagents in four immunochemical systems were assessed by measuring the enzyme activity or time-resolved fluorescence. The study resulted in the development of fast and precise immunoassays for biologically active rhLF in transgenic goat milk and in protein fractions obtained in the course of pure rhLF manufacture, as well as in pharmaceutical preparations and food additives.

Keywords: recombinant human lactoferrin, lactoferrin immunoreagents, lactoferrin immunoassay

For citation. 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>

Введение. Со времени первого выделения из женского молока чистого белка, окрашенного связанными ионами железа в красный цвет и названного лактоферрином (ЛФ), прошло уже более полувека [1]. ЛФ человека является гликопротеином с молекулярной массой ~80 кДа, состоит из одной полипептидной и двух олигосахаридных цепей N-ацетиллактозаминного типа, соединенных с остатками аспарагина N-гликозидной связью, имеет доменную третичную структуру, несет высокий положительный заряд (изоэлектрическая точка при pH ~8,7) и содержит два металлсвязывающих центра. Многочисленными исследованиями выявлены интересные особенности химической структуры ЛФ, удивительное разнообразие биологических активностей, уникальная способность взаимодействовать со многими биополимерами и малыми молекулами, а также установлена незаменимость ЛФ в обеспечении жизненно важных функций у детей, особенно новорожденных, и его полезность для взрослых людей. Механизм биологического действия ЛФ во многом обусловлен двумя факторами: хелатированием ионов железа за счет презентации аминокислотных лигандов в результате конформационной перестройки белка, а также связыванием с другими биологическими объектами, обусловленным высокой плотностью положительно заряженных группировок в макромолекуле, и особенностями ее интактной пространственной структуры. Денатурация лишает ЛФ биологической активности [2].

В настоящее время большое внимание данному белку уделяют фармацевтическая промышленность и пищевая индустрия: он перспективен как лекарственная субстанция, востребован при производстве биологически активных добавок, продуктов специализированного питания, парфюмерно-косметических изделий, биоантисептиков. Эту производственную нишу до сих пор прочно занимает ЛФ из коровьего молока, хотя преимущества человеческого ЛФ и очевидны, и подтверждены на многих экспериментальных моделях [3–5].

В последнее десятилетие важными результатами работ, основанными на достижениях мировой науки в области трансгенеза млекопитающих [6], явились создание в нашей стране специализированной животноводческой базы и разработка комплексной биотехнологии получения чистого рекомбинантного белка (рчЛФ), идентичного ЛФ женского молока, который секретируется молочными железами трансгенных коз-продуцентов [7]. Создана, стандартизирована и прошла государственную регистрацию товарная продукция на основе рчЛФ: сырье, субстанция, ветеринарное лекарство и биологически активные добавки к пище [4; 7]. Для производственного контроля содержания и биологической активности рчЛФ в существующих и будущих препаратах, а также во фракциях технологического процесса очистки данного белка необходим экспрессный метод, отличающийся аналитической надежностью и достоверностью. Таким требованиям отвечает современный иммунный анализ [8]. Формат конкурентного иммуноанализа, в котором исследуемый антиген и его модифицированный аналог связываются с ограниченным количеством антител в гетерофазной системе, ранее не изучался в применении к ЛФ человека. Что касается количественного определения данного белка в пищевой и фармацевтической продукции, то соответствующие иммуноаналитические системы и методики в литературе не описаны.

Цель нашей работы – получение компонентов, конструирование и сравнительная характеристика систем конкурентного иммуноанализа, которые могут применяться для количественного определения биологически активного рчЛФ в сырье, пищевой продукции и фармацевтических препаратах.

Материалы и методы исследования. *Соединения, препараты, продукты, приборы.* Лиофилизированный гомогенный (чистота ~98 %) рчЛФ как конечный продукт лабораторного технологического процесса выделения и очистки из молока трансгенных коз-продуцентов [7; 9], а также полуочищенные ЛФ из молока трансгенных коз и коровьего молока получены от Института микробиологии НАН Беларуси. Чистый ЛФ из молока нетрансгенных коз любезно передан доктором биологических наук А. В. Соколовым.

Окончательную очистку коровьего ЛФ от лактопероксидазы проводили катионообменной хроматографией в градиенте концентраций от 0 до 1,1 М NaCl в 20 мМ натрий-фосфатном буфере (НФБ) при pH 6,7 на колонке Mono S HR 5/5 (Pharmacia, Швеция) в автоматической системе ÄKTA pure (GE Healthcare, США), руководствуясь опубликованными теоретическими выкладками и практическими рекомендациями [10].

Подтверждение чистоты полученных продуктов и идентификацию по молекулярной массе выполняли времяпролетной масс-спектрометрией с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) в приборе Microflex LRF (Bruker, Германия).

Для последующего определения концентрации белка в растворах и приблизительной оценки содержания связанных ионов Fe^{3+} измерены характеристики поглощения рчЛФ в ультрафиолетовой и видимой областях спектра в 0,05 М НФБ с 0,15 М NaCl при pH 7,4 с помощью спектрофотометра Specord M (Karl Zeiss, Германия). При определении массы белка взвешиванием лиофилизированного порошка делалась поправка на остаточное содержание воды и солей в препарате. Для сравнения с расчетным значением коэффициента экстинкции ϵ_{280} (суммарное поглощение остатков триптофана, тирозина при 280 нм) и определения вклада Fe^{3+} в абсорбцию рчЛФ спектры снимали также в 6 М гуанидин гидрохлориде и в буфере с pH 3,5 в присутствии хелатора ионов железа.

В работе использовали высокоочищенную ($R_z \geq 3,0$) пероксидазу из корней хрена (ПХ) от Диаэм (РФ). Анти-кроличьи иммуноглобулины козы, меченные ПХ, приобретены в НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи (РФ). В Институте биоорганической химии НАН Беларуси изготовлены растворы хромогена (3,3', 5,5'-тетраметилбензидин; ТМБ от Sigma-Aldrich, США), субстрата (H_2O_2) и стоп-реагента (H_2SO_4) для ПХ в иммуноферментном анализе (ИФА), а также активированный комплексонат лантанида на основе диэтилентриаминтетраацетата Eu^{3+} (сукцинимидилкарбокси-ДТТА/ Eu^{3+}) [11] и диссоциативно-усиливающий раствор для лантанидного иммунофлуориметрического анализа (ЛИФМА). В некоторых экспериментах с системами ИФА и в составе изготовленного нами прототипа иммуноферментного набора на рчЛФ применялся стабилизированный раствор хромоген-субстратной смеси (ТМБ/ H_2O_2), приобретенный у Алкор Импэкс (РФ). Раствор EuCl_3 (0,1 М) приготовлен в Институте химии новых материалов НАН Беларуси и любезно передан авторам. Точную концентрацию Eu^{3+} в этом растворе определяли прямым комплексонометрическим титрованием динатриевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты и ксиленолового оранжевого в качестве индикатора. Также концентрацию Eu^{3+} в белковых растворах измеряли методом масс-спектрометрии с ионизацией в индуктивно-связанной плазме (ICP-MS) с помощью масс-спектрометра Agilent 7500сх фирмы Agilent Technologies (США). Колонка PD-10 (Сефадекс G-25) для обессоливания растворов биополимеров и сшитая агароза, активированная бромцианом (Сефароза CL-4В), приобретены у фирмы GE Healthcare (США). Для конструирования гетерофазных систем ИФА или ЛИФМА применяли полистирольные микропланшеты с 96 полностью разделяемыми лунками повышенной сорбционной емкости от Хема (РФ). Другими реагентами служили соли, основания и кислоты высокой степени чистоты, доступные от поставщиков химреактивов в Республике Беларусь, бычий сывороточный альбумин (БСА), NaIO_4 , NaBH_4 , детергенты, бактериостатики, приобретенные у фирмы Sigma-Aldrich (США), тринатриевая соль нитрилтриуксусной кислоты моногидрат (Alfa Aesar), сахароза (AppliChem), сорбит (Glentham Life Sciences).

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

Постановки ИФА и ЛИФМА выполняли в термостатируемой лабораторной комнате или в лабораторном инкубаторе (Heraeus, Германия) с колебаниями температуры ± 1 °С от установленного значения, используя микропланшетный встряхиватель с регулируемой интенсивностью (Biosan, Латвия). Для детекции колориметрического сигнала при 450 нм в микропланшете использовали приборы АИФ-М/340 (ПО «Витязь», Республика Беларусь) и Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Швейцария). Флуоресценцию при длинах волн возбуждения и регистрации 340 и 615 нм соответственно с временной задержкой 400 мкс измеряли в микропланшетном флуориметре DELFIA 1234 фирмы Wallac Oy (Финляндия).

Образцы грудного молока от здоровых женщин собраны в УЗ «Клинический родильный дом Минской области». Из РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству» получены образцы свежего и замороженного молока от нетрансгенных коз и коз-продуцентов рчЛФ.

Получение, очистка и химическая модификация антител к рчЛФ. Чистым рчЛФ иммунизировали кроликов породы Серый великан с массой тела 1,5–2 кг. При первичном введении иммуногена каждому кролику подкожно и внутривенно в 15–20 точек спины и шеи использовали стабильную эмульсию, полученную смешиванием раствора 1 мг/мл рчЛФ в 1,0 мл 0,9 % NaCl и равного объема полного адьюванта Фрейнда. При последующих иммунизациях с интервалами в 2–3 недели каждому кролику вводили 0,5 мг иммуногена, смешанного 1 : 1 по объему с неполным адьювантом Фрейнда. Через 5–7 дней после каждой инъекции из ушных вен отбирали пробы крови и оценивали титр продуцируемых поликлональных антител (ПАт) методом непрямого ИФА, определяя кратность разведения антисыворотки, при которой колориметрический сигнал при 450 нм (A_{450}) составляет 1,2–1,5 оптических единиц (о. е.). Альтернативно, величину A_{450} рассматривали как колориметрический показатель массы ПАт, связанных в одинаковых условиях иммобилизованным рчЛФ из одинаково разведенных антисывороток разных заборов, что являлось хорошей характеристикой эффективности иммунизации. Помимо учета титра селекцию полученных антисывороток проводили по параметрам специфичности и сродства путем внесения различных количеств чистых рчЛФ, козьего и коровьего ЛФ, а также природных ЛФ в составе молока обычных (нетрансгенных) коз, коров и грудного женского молока в систему непрямого конкурентного ИФА, содержащую рчЛФ на твердой фазе и исследуемые антисыворотки в растворе. Препарат антител с наилучшими характеристиками, выбранный для последующей работы, переводили в водный глицерин (1 : 1 по объему) и хранили при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Для очистки анти-рчЛФ ПАт синтезировали биоспецифический сорбент путем присоединения рчЛФ к CNBr-агарозе из расчета 5 мг белка на 1 мл геля активированной матрицы. К 2 мл полученного сорбента антиген-агароза добавляли 1 мл 0,2 М НФБ (рН 7,4), 0,3 мл 3 М NaCl и вносили 2 мл подготовленной антисыворотки. Инкубировали при перемешивании с использованием шейкера с ротационным вращением в течение 3–4 ч при температуре 20–25 $^{\circ}\text{C}$. После проведения реакции осторожно переносили сорбент в колонку вместимостью 4 мл и промывали 10 объемами 0,05 М НФБ, 0,15 М NaCl, рН 7,4 и затем 5 объемами деионизированной воды. Элюировали анти-рчЛФ ПАт буфером глицин-HCl с рН 3,0. Элюат концентрировали ультрафильтрацией с помощью центрифужного концентратора, 10 кДа (Millipore, США) и очищали белок от низкомолекулярных соединений на колонке PD-10, уравновешенной 0,05 М НФБ, 0,15 М NaCl, рН 7,4. Для идентификации и выявления степени чистоты десорбированного белка выполняли электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия без и после восстановления 2-меркаптоэтанолом, а также применяли масс-спектрометрию MALDI-TOF.

Ферментный конъюгат анти-рчЛФ ПАт синтезировали последовательными реакциями окисления NaIO_4 углеводной части ПХ, присоединения иммуноглобулина через свободную NH_2 -группу полипептидной цепи и восстановления образовавшегося неустойчивого имина NaNH_4 [12]. Для этого к раствору 2 мг ПХ в 1,0 мл воды добавляли 0,2 мл свежеприготовленного 0,2 М NaIO_4 . Раствор выдерживали в темноте в течение 20 мин при комнатной температуре и обессоливали на колонке PD-10, уравновешенной деионизированной водой. К раствору окисленного гликопротеина добавляли рассчитанное количество сухого порошка NaHCO_3 до концентрации 0,1 М, контролируя значение рН 8–9 по лакмусовой бумаге, и немедленно приливали по каплям раствор 1 мг анти-рчЛФ ПАт в 1 мл 0,1 М $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, рН 9,2 до достижения соотношения анти-рчЛФ ПАт : ПХ, равного 1 : 2 по массе (мг/мг). Реакцию конъюгирования проводили при комнатной температуре при постоянном встряхивании на шейкере в течение 3 ч. Затем добавляли аликвоту водного раствора борогидрида натрия до конечной концентрации восстановителя 0,2 г/л. Реакционную смесь выдерживали при 4 $^{\circ}\text{C}$ в течение 2 ч, периодически встряхивая, а потом проводили концентрирование с помощью ультрафильтрации и очищали конъюгат анти-рчЛФ ПАт-ПХ гель-фильтрацией на колонке PD-10, уравновешенной 0,05 М НФБ, 0,15 М NaCl, рН 7,4.

Анти-рчЛФ ПАт, меченный органическим комплексом европия, получали реакцией ацилирования белковых аминокислот сукцинимидилкарбокси-ДТТА/ Eu^{3+} [11]. Для этого к 0,2 мл раствора очищенных антител (3 г/л) в 0,1 М NaHCO_3 добавляли свежеприготовленный 0,035 М раствор активированного эфира комплексоната Eu^{3+} , что соответствует 100-кратному мольному

избытку по отношению к количеству белка, и инкубировали 18 ч при 4 °С. Конъюгаты очищали быстрой гель-фильтрацией под давлением на колонке с Superose 12, используя для элюции буферный раствор 0,05 М Tris-HCl, 0,15 М NaCl, pH 7,8 при скорости потока 12 мл/ч. Фракции, содержащие белок по данным спектрофотометрирования в протоке, объединяли. Флуоресцентную активность синтезированного конъюгата измеряли в диссоциативно-усиливающем растворе и определяли концентрацию включенных в иммуноглобулин ионов лантанида, используя для калибровки растворы с известным содержанием Eu^{3+} . Концентрацию белка определяли по величине оптического поглощения при 280 нм, используя характерный для иммуноглобулинов G удельный коэффициент поглощения $1,35 (\text{г/л})^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ и учитывая вклад ДТТА/ Eu^{3+} в абсорбцию при этой длине волны ($\epsilon_{280} = 1200 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).

Системы ИФА. Методом непрямого двухстадийного ИФА изучали связывание анти-рЧЛФ ПАт в составе кроличьей антисыворотки с рЧЛФ, иммобилизованным путем физической адсорбции на внутренней поверхности лунок, осуществляя детекцию комплекса анти-кроличьим иммуноглобулином (IgG), конъюгированным с ПХ. Для функционализации микропланшета в каждую лунку вносили по 0,1 мл раствора рЧЛФ с концентрацией 1,0 мг/л в 0,13 М NaHCO_3 и инкубировали в течение ночи при 4 °С. После удаления жидкости из лунок и двукратной промывки деионизированной водой блокировали непокрытую рЧЛФ поверхность и одновременно стабилизировали белковое покрытие путем добавления 0,15 мл раствора БСА (1,0 г/л) в 0,05 М НФБ (pH 7,4), 0,075 М NaCl, 2 % сахарозы, 3 % сорбита и 0,01 % тиомерсала. Высушивали планшет в условиях пониженной влажности или в установке для лиофилизации. В покрытые рЧЛФ лунки вносили по 0,1 мл антисыворотки с титром 1 : 100000 и инкубировали во временном диапазоне от 5 до 45 мин при 25 или 37 °С со встряхиванием на шейкере при 300 об/мин. После трехкратной обработки лунок промывочным раствором в ИФА (0,01 М НФБ (pH 7,4), 0,15 М NaCl, 0,05 % Твин-20 и 0,01 % тиомерсал) в них прибавляли по 0,1 мл анти-кроличьего конъюгата IgG-ПХ, разбавленного в 5000 раз раствором для разведения в ИФА (0,025 М НФБ (pH 7,4), 0,15 М NaCl, 0,02 % Твин-20, 0,01 % тиомерсал, 0,1 % БСА), и выдерживали 30 мин при 25 °С со встряхиванием. Лунки промывали, вносили по 0,1 мл свежеприготовленного раствора, содержащего 0,4 мМ ТМБ и 3 мМ H_2O_2 в 0,04 М Na-цитратном буфере (pH 4,0), или продажного готового хромоген-субстратного раствора и выдерживали 10 мин при 25 °С без встряхивания. Ферментативную реакцию в лунках останавливали внесением 0,1 мл стоп-реагента (1,0 М H_2SO_4) и сразу же измеряли A_{450} в планшетном спектрофотометре.

Изучение воздействий растворов солей и растворов с различной активностью ионов водорода на адсорбированный рЧЛФ и растворимые ПАт к рЧЛФ в гетерофазной ИФА-системе оценивали отдельно друг от друга двумя путями. Во-первых, по взаимодействию анти-рЧЛФ ПАт в 0,1 мл раствора для разведения в ИФА с покрытой рЧЛФ твердой фазой, которую предварительно выдерживали 20 мин при 25 °С со встряхиванием в 0,1 мл раствора с исследуемыми ингредиентами без ПАт. Во-вторых, по степени неспецифической адсорбции ПАт в лунках, покрытых только БСА без рЧЛФ, в которых выдерживали в аналогичных условиях 0,1 мл раствора, содержащего исследуемые низкомолекулярные эффекторы вместе с исследуемыми анти-рЧЛФ ПАт.

При работе с системой прямого одностадийного ИФА, в отличие от описанной выше методики непрямого ИФА, в лунки микропланшета, функционализированного адсорбцией рЧЛФ, последовательно прибавляли 0,05 мл пробы, содержащей 0 или от 0,4 до 32,4 мг/л рЧЛФ, и 0,05 мл раствора с концентрацией 4,0 мкг/л конъюгата анти-рЧЛФ ПАт-ПХ, и после инкубации в течение 45 мин при комнатной температуре без встряхивания, лунки промывали и сразу же выполняли этапы ферментативной детекции.

Лантанидный иммунофлуориметрический анализ. При выполнении ЛИФМА по традиционной схеме в лунки микропланшета, покрытые адсорбированным рЧЛФ, вносили 0,05 мл пробы рЧЛФ и 0,05 мл лантанидного конъюгата анти-рЧЛФ ПАт (0,15 мг/л) в растворе для разведения в ЛИФМА (0,05 М Tris-HCl (pH 7,8), 0,15 М NaCl, 0,02 % Твин-20, 0,05 % NaN_3 , 0,1 % БСА), инкубировали 45 мин при комнатной температуре без встряхивания, лунки промывали четыре раза порциями по 0,2 мл промывочного раствора в ЛИФМА (0,025 М Tris-HCl (pH 7,8), 0,075 М NaCl, 0,01 % Твин-20, 0,025 % NaN_3), вносили 0,2 мл диссоциативно-усиливающего раствора с pH 3,2,

выдерживали 30 мин при комнатной температуре и выполняли измерения в микропланшетном флуориметре.

В экспериментах по измерению константы связывания инкубацию проводили в лунках с иммобилизованным рчЛФ при 25 °С с непрерывным встряхиванием в присутствии различных точных концентраций меченного Eu^{3+} анти-рчЛФ ПАт в растворе для разведения в ЛИФМА.

В новой конструкции системы ЛИФМА в лунках планшета, покрытого анти-кроличьим IgG (5 мг/л в 0,1 мл 0,13 М NaHCO_3 (рН 8,3), инкубация в течение ночи при 4 °С), были биоспецифически иммобилизованы очищенные кроличьи анти-рчЛФ ПАт (20 мкг/л в 0,1 мл 0,05 М Tris-HCl (рН 7,8), 0,15 М NaCl, 0,02 % Твин-20, 0,05 % NaN_3 , 0,1 % БСА, инкубация в течение ночи при 4 °С), и после промывок и стабилизации белкового покрытия получен твердофазный иммуносорбент, способный специфически связывать рчЛФ и комплекс рчЛФ– Eu^{3+} из раствора.

Для получения рчЛФ с Eu^{3+} в активном центре белка, в раствор рчЛФ (5 г/л (62,5 мкМ) в 0,05 М Tris-HCl (рН 7,8), 0,15 М NaCl, 0,005 М NaHCO_3 , содержащем 62,5 мкМ соли нитрилотриуксусной кислоты) прибавляли 25 мМ раствора EuCl_3 в воде до конечной концентрации 250 мкМ и выдерживали при комнатной температуре 2 ч. Образовавшийся комплекс рчЛФ– Eu^{3+} очищали гель-фильтрацией на колонке PD-10, уравновешенной 0,05 М Tris-HCl, 0,15 М NaCl, рН 7,8. Содержание лантанида в металлсвязывающем центре белка определяли методом ICP-MS и аналитической реакцией на ион Eu^{3+} после зависимой от времени диссоциации комплекса в усиливающем флуоресценцию металла растворе при рН 3,2.

В типичном эксперименте в покрытые анти-рчЛФ ПАт лунки иммуносорбента вносили 0,05 мл раствора рчЛФ (0; 0,5–25,0 мг/л) в растворе для разведения в ЛИФМА, затем добавляли 0,05 мл раствора рчЛФ– Eu^{3+} в том же растворе (2 мг/л) и инкубировали 45 мин при комнатной температуре без встряхивания. Далее лунки промывали четыре раза порциями по 0,2 мл промывочного раствора в ЛИФМА, вносили 0,2 мл диссоциативно-усиливающего раствора, выдерживали 30 мин при комнатной температуре и измеряли интенсивность флуоресценции в лунках с разрешением во времени.

Все эксперименты проводили не менее чем в трех повторах, достоверность $p < 0,05$. Обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel. На графиках планки погрешностей обозначают доверительные интервалы экспериментальных значений.

Результаты и их обсуждение. В данной работе в исследовательских и практических целях изучались иммунохимические свойства высокочистого рчЛФ, производство которого налажено в Беларуси. Для этого наработаны, очищены антиген-аффинной хроматографией и химически модифицированы ферментной и флуоресцентной метками ПАт к рчЛФ, получен «биологически» меченый рчЛФ путем включения иона европия в металлсвязывающий центр белка и созданы конструкции нескольких иммуноаналитических систем на основе этих новых реагентов.

Антитела к рчЛФ и система непрямого ИФА. Экспериментально найденное значение молярного коэффициента экстинкции при рН 7,4 и длине волны поглощения 280 нм исходного Fe^{3+} -содержащего рчЛФ оказалось равным $89200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, а «весовой» коэффициент абсорбции при этой длине волны составил $1,12 (\text{г/л})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Измеренное спектральное соотношение $A_{280}/A_{465} = 129$ соответствовало степени насыщения рчЛФ железом, равной 11,3 % [13]. Отметим хорошее соответствие найденного и рассчитанного ($\epsilon_{280} = 85700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, по сумме молярных коэффициентов поглощения аминокислотных остатков [14], без учета вклада абсорбции связанного с белком Fe^{3+}) коэффициентов экстинкции. Полученные данные использовались в последующих экспериментах для определения концентрации рчЛФ в различных растворах, в том числе в содержащих рчЛФ средах, предназначенных для иммунизации животных.

Мы впервые применили рчЛФ в качестве иммуногена для введения животным и выработки специфических антител. Ранее только природный ЛФ человека использовался при получении поликлональных, моноклональных и рекомбинантных однодоменных антител для разработки иммунных аналитических или хроматографических систем, исследования комплексов ЛФ с другими белками и доказательства иммунохимической идентичности природного человеческого ЛФ и его рекомбинантного аналога.

Высокая иммуногенность рчЛФ была установлена нами в ходе контроля динамики продуцирования антител и определения их характеристик путем непрямого ИФА. Антитела к рчЛФ в кроличьей сыворотке, разведенной более чем в 50000 раз, обладали способностью связываться как с иммобилизованным на твердой фазе рчЛФ, так и с конкурирующим рчЛФ в растворе. При этом удаленные от рчЛФ-связывающих сайтов эпитопы ПАТ могли эффективно взаимодействовать с анти-кроличьим IgG, конъюгированным с ПХ, обеспечивая последующую ферментативную детекцию.

Связывание анти-рчЛФ ПАТ в составе антисыворотки с рчЛФ на твердой фазе конкурентно ингибировалось жидкофазным рчЛФ в диапазоне концентраций 0,4–60,0 мг/л, что указывало на достаточный для ИФА аффинитет антител. Найденные кросс-реактивности анти-рчЛФ ПАТ с чистыми коровьим и козьим ЛФ по отношению к рчЛФ (100 %) составили менее 1 %. Взаимодействие этих ПАТ с природным ЛФ в составе молока нетрансгенных коз достоверно не детектировалось: «кажущаяся» концентрация была менее 0,4 г/л при установленной концентрации рчЛФ в молоке трансгенных коз 3,6 г/л. Выявлен строгий параллелизм линейных участков кривых зависимости колориметрического сигнала A_{450} связанных антител от кратности разведений раствора рчЛФ и грудного женского молока с установленной концентрацией ЛФ 4,0 г/л. Это говорит о том, что перекрестная реакция с анти-рчЛФ ПАТ природного ЛФ человека по отношению к рчЛФ равна или очень близка к 100 %. Также в процессе изучения полученной антисыворотки было установлено, что иммунореактивность рчЛФ не зависит от степени насыщения ионами железа металлсвязывающих центров белка.

Правила надлежащей лабораторной практики в области иммуноанализа предусматривают проведение исследований кинетических и равновесных характеристик реакции антиген–антитело и воздействия различных физических и химических факторов на эту реакцию [8]. Руководствуясь этими рекомендациями, мы изучили зависимости связывания анти-рчЛФ ПАТ с иммобилизованным на твердой фазе рчЛФ от времени, температуры, pH и концентраций различных солей, формирующих ионную силу, а также хаотропный эффект среды, в которой протекали взаимодействия антиген–антитело.

По результатам предварительного эксперимента выбрана продолжительность процесса детекции кроличьих анти-рчЛФ ПАТ в составе твердофазного комплекса с рчЛФ в реакции связывания конъюгата анти-кроличьего IgG с ПХ. Найдено, что колориметрический сигнал A_{450} выходит на плато через 20 мин инкубации при комнатной температуре со встряхиванием.

В последующих экспериментах установлено, что взаимодействие анти-рчЛФ ПАТ с иммобилизованным рчЛФ зависит от температуры и достигает максимума уже через 20 мин непрерывного встряхивания. После примерно такого же промежутка времени выходила на плато реакция конкурентного ингибирования комплексообразования на твердой фазе за счет связывания антител с рчЛФ, внесенным в жидкую фазу.

При изучении возможных эффектов на взаимодействие анти-рчЛФ ПАТ с иммобилизованным рчЛФ показано, что в растворах с pH в диапазоне 3–11 и концентрациями различных солей 0,13–2,0 М не происходит десорбция рчЛФ с твердой фазы и не изменяется его иммунореактивность, о чем свидетельствует сохранение связывания практически на уровне 100 % по отношению к нормальным условиям (0,01 М НФБ, pH 7,4). Установлено также, что анти-рчЛФ ПАТ не адсорбируются на твердой поверхности, если в белковом покрытии отсутствует рчЛФ.

Найденная зависимость комплексообразования между рчЛФ и ПАТ к рчЛФ от pH имела типичную для взаимодействия антиген–антитело колоколообразную форму и очерчивала довольно широкие границы pH (5–9) эффективной работы гетерофазных иммуноаналитических систем на основе полученных базовых иммунореагентов.

Моделируя возможные эффекты матрикса пищевых и фармацевтических продуктов, содержащих рчЛФ, на иммуноанализ, мы изучили влияние широкого перечня солей, обладающих различными по направлению и силе действиями, на специфическое связывание рчЛФ с ПАТ к рчЛФ (таблица). Изменение pH вследствие гидролиза некоторых солей не принимали во внимание в виду широкого pH-диапазона максимального связывания антитело–антиген.

Влияние различных солей на образование иммунного комплекса между рчЛФ и ПАТ к этому белку
The effect of various salts on the formation of immune complex between rhLF and the polyclonal antibodies to this protein

Соль Salt	Относительная связывающая активность при двух концентрациях соли, % Relative binding activity at two salt concentrations, %	
	0,5 М	2,0 М
KF	95	74
NaF	93	–
(NH ₄) ₂ SO ₄	94	71
K ₂ SO ₄	92	–
KCl	83	49
NaCl	91	44
KNO ₃	92	58
KBr	84	50
KClO ₃	87	–
NaClO ₃	89	65
KI	61	15
KClO ₄	85	–
NaClO ₄	82	22
KSCN	65	11

Примечания: колориметрический сигнал A_{450} связанных анти-рчЛФ ПАТ в 0,01 М НФБ, рН 7,4 принят за 100 %; испытанная концентрация $KClO_4$ – 0,13 М.

Note: a colorimetric signal A_{450} of bound anti-rhLF polyclonal antibodies in 0,01 M sodium phosphate buffer, pH 7,4 was taken as 100 %; 0,13 M concentration of $KClO_4$ was tested.

Из таблицы видно, что в растворах с высокой ионной силой, создаваемой большинством солей с концентрацией 0,5 М ($KClO_4$ – 0,13 М), антитела хорошо связываются с рчЛФ, что обеспечивает необходимые условия для иммуноанализа. Однако уже в этих концентрациях действует хаотропный эффект KSCN и KI, ингибирующий комплексообразование соответственно на 35 и 39 %. Он особенно заметен на фоне незначительного влияния типичных антихаотропных агентов (K_2SO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, NaF, KF). Денатурирующее воздействие анионов SCN^- и I^- с гораздо большей силой проявляется в концентрации 2,0 М, при которой сильным ингибитором взаимодействия анти-рчЛФ ПАТ с рчЛФ становится также ClO_4^- , и существенно усиливаются эффекты Cl^- , Br^- , NO_3^- и ClO_3^- . В целом сила ингибирующего воздействия солей на комплексообразование в системе анти-рчЛФ ПАТ–рчЛФ соответствует порядку возрастания хаотропной активности анионов в отношении белков в известном лиотропном ряду Гофмейстера $F^- \approx SO_4^{2-} < PO_4^{3-} < CH_3COO^- < Cl^- < NO_3^- < Br^- < ClO_3^- < I^- < ClO_4^- < SCN^-$ [15] и расширенному перечню солей с рассчитанными мольными инкрементами поверхностного натяжения растворов как мерой лиотропности [16].

Исходя из описанных в литературе общих представлений о свойствах антител к белкам и природе связей в иммунных комплексах и основываясь на наших экспериментальных данных по взаимодействию анти-рчЛФ ПАТ с иммобилизованным антигеном, можно предположить, что нами получены антитела, включающие клоны, специфичные к конкретным аминокислотным последовательностям (линейным эпитомам) или доминантным фрагментам пространственной структуры (конформационным эпитомам), отвечающим за биологическую активность белка. Гидрофобные и электростатические взаимодействия должны быть характерны для иммунного комплекса рчЛФ из-за особенностей пространственной структуры антигена и наличия линейных положительно заряженных участков. Именно электростатические связи должны быть особенно чувствительными к изменениям ионной силы и рН раствора, в котором протекает комплексообразование рчЛФ с ПАТ к рчЛФ, как и было показано в данной работе.

На основании совокупности полученных нами данных и сведений из литературы [3; 17] можно предположить, что даже в результате весьма жестких физико-химических воздействий

не происходят глубокие изменения пространственной структуры главных детерминант иммунореактивности (эпитопов) и доменов, формирующих активные металлсвязывающие центры рчЛФ. Вопрос о пространственном разделении эпитопов и активных центров или об их локализации в одних и тех же доменах рчЛФ пока остается открытым.

Поскольку полученные анти-рчЛФ ПАт в составе антисыворотки к рчЛФ оказались устойчивыми в достаточно агрессивных условиях среды, то встал вопрос об их очистке и последующей химической модификации для применения в иммуноаналитических системах повышенного технического уровня. Наиболее подходящим методом выделения чистых антител в одну стадию является антиген-аффинная хроматография. Мы иммобилизовали рчЛФ на Сефарозе CL-4В, активированной бромцианом, затем использовали аффинный сорбент в хроматографии по разработанной схеме и получили очищенные анти-рчЛФ ПАт, практически не содержащие примесных белков по данным электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия без и после восстановления 2-меркаптоэтанолом. Выделенный иммуноглобулин также идентифицирован как чистый белок с молекулярной массой около 145 кДа методом MALDI-TOF.

Системы ЛИФМА. Существуют два подхода к конструированию систем конкурентного иммуноанализа, которые отличаются стадиями детекции комплекса антиген–антитело. В варианте прямого анализа метку (например, фермент или флуорофор) присоединяют непосредственно к антителу или к антигену, а в системе непрямого иммуноанализа детекция проводится на дополнительном этапе методики, чаще всего вторичным (антивидовым) антителом, несущим конъюгированную метку. Наличие чистых антител к рчЛФ позволило нам создать конструкции прямых ЛИФМА и ИФА.

Проверка активности и стандартизация чистых антител по параметру сродства к рчЛФ выполнены путем введения в полипептидную цепь иммуноглобулина комплексогена европия в качестве низкомолекулярной флуоресцентной метки [11] и измерения константы связывания (K_a) меченых анти-рчЛФ ПАт из раствора иммобилизованным рчЛФ. Расчеты сделаны по графику в координатах Скэтчарда, показанному на рис. 1.

По результатам 6 независимых определений с использованием максимально низких концентраций вносимого в систему (общего) анти-рчЛФ ПАт–ДТТА/ Eu^{3+} значение K_a для доминантного клона анти-рчЛФ ПАт оказалось равным $(1,49 \pm 0,13) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$. Полученная величина характеризует исследованные анти-рчЛФ ПАт как среднеаффинный связывающий агент, удовлетворяющий требованиям иммуноанализа объектов, содержащих рчЛФ в практически важном диапазоне концентраций.

В литературе есть отдельные сведения о применении лантанидов только в неиммунных биоаналитических системах на основе природного ЛФ человека.

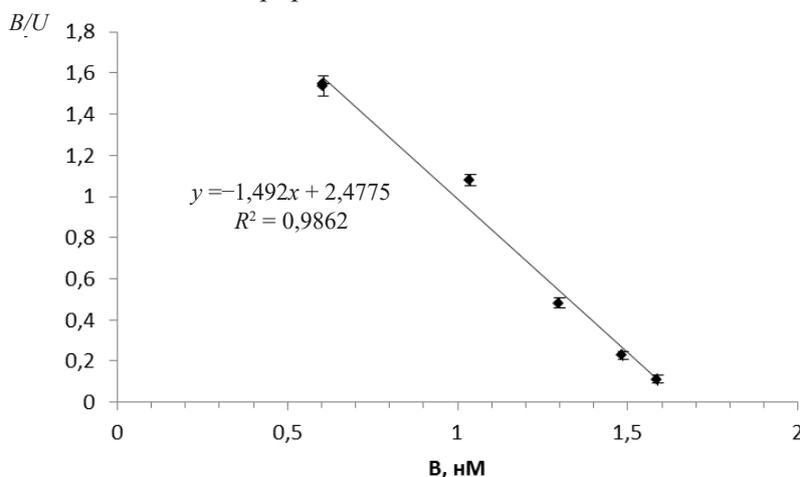


Рис. 1. Типичный график зависимости между концентрациями Eu^{3+} -меченого анти-рчЛФ иммуноглобулина, связанного с рчЛФ на твердой фазе (B) и свободного в растворе (U) в состоянии равновесия в гетерофазной системе

Fig. 1. Typical plot representing the relationship between concentrations of Eu^{3+} -labeled anti-rhLF immunoglobulin bound to rhLF on the solid phase (B) and unbound in solution (U) at equilibrium in the heterophase system

Конструкция конкурентного ЛИФМА, которую мы впервые применили в исследованиях рчЛФ как альтернативу системам с колориметрической детекцией, включала покрытый адсорбированным рчЛФ микропланшет, а также конкурирующий антиген и чистые анти-рчЛФ ПАт, химически модифицированные хелатом ионов Eu^{3+} . Градуировочный график, отражающий зависимость разрешенной во времени флуоресценции твердофазного иммунного комплекса в диссоциативно-усиливающем растворе от концентрации рчЛФ в жидкой фазе, представлен на рис. 2.

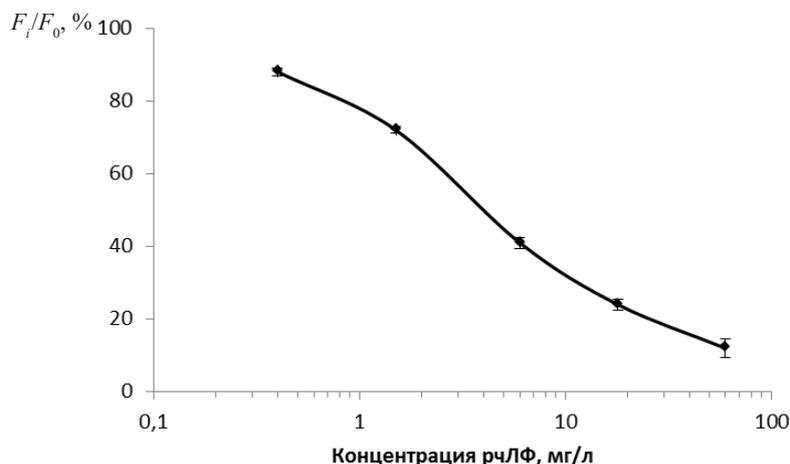


Рис. 2. Градуировочный график прямого конкурентного ЛИФМА рчЛФ

Fig. 2. Calibration curve of direct competitive lanthanide immunofluorescence assay (LIFMA) of rhLF

В созданной нами принципиально новой конструкции модельной системы ЛИФМА анти-рчЛФ ПАт, иммунохимически иммобилизованные в лунках планшета, конкурентно связывали комплекс рчЛФ– Eu^{3+} и немеченый рчЛФ из жидкой фазы, а на следующей стадии ион европия высвобождался из белкового комплекса в добавленный диссоциативно-усиливающий раствор с образованием хелатно-мицеллярной структуры, интенсивность времяразрешенной флуоресценции которой находилась в обратной зависимости от искомой концентрации немеченого рчЛФ в системе. Новая схема ЛИФМА и соответствующий градуировочный график показаны на рис. 3.

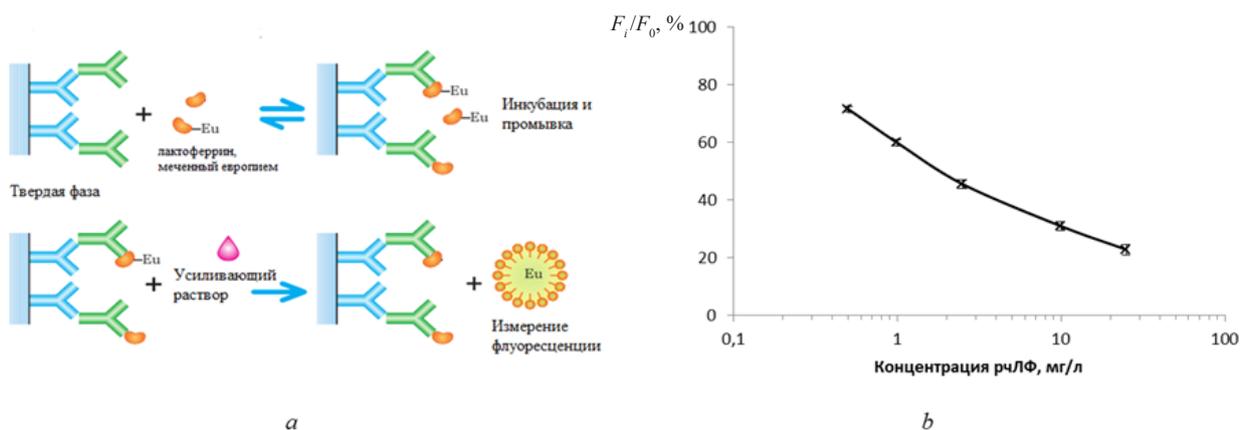


Рис. 3. Система ЛИФМА, включающая анти-рчЛФ ПАт на твердой фазе, комплекс рчЛФ– Eu^{3+} и рчЛФ в жидкой фазе, в которой измеряется времяразрешенная флуоресценция Eu^{3+} в добавляемом диссоциативно-усиливающем растворе (а); типичный градуировочный график зависимости относительной флуоресценции от концентрации немеченого рчЛФ (b)

Fig. 3. New LIFMA system comprising rhLF labeled with Eu^{3+} at the metal-binding site and unlabeled rhLF in the liquid phase, and anti-rhLF polyclonal antibodies on the solid phase, in which time-resolved fluorescence of Eu^{3+} in the added dissociation-enhancement solution is measured (a); typical calibration curve of relative fluorescence versus unlabeled rhLF concentration (b)

Ион европия выбран в качестве комплексообразователя потому, что в специальных условиях он имеет более высокую интенсивность флуоресценции, чем другие редкоземельные элементы. Способ получения комплекса состоял в смешивании растворов рчЛФ и EuCl_3 в присутствии соли нитрилотриуксусной кислоты для предотвращения неспецифической адсорбции Eu^{3+} на белке с последующей очисткой гель-хроматографией. Степень насыщения белка редкоземельным металлом составила 20–25 %. Найдено, что ионы Eu^{3+} полностью высвобождаются из комплекса с рчЛФ при pH 3,2 в течение 10 мин как в случае нахождения белка в растворе, так и при его адсорбции на твердой фазе. Концентрация рчЛФ, вызывающая 50 %-ное ингибирование связывания метки, оказалась равной 2 мг/л, линейаризованный диапазон определения рчЛФ составил 0,5–25,0 мг/л.

Таким образом, найденные условия комплексообразования и диссоциации комплекса позволяют легко получать рчЛФ, биологически меченный ионами Eu^{3+} , и применять его, в частности, в прямом конкурентном ЛИФМА.

Система прямого ИФА. Эта конструкция ИФА использовалась для исследования взаимодействий чистых анти-рчЛФ ПАт, меченных ПХ, с адсорбированным на твердой фазе рчЛФ, а также служила лабораторным прототипом набора реагентов для количественного определения рчЛФ в молоке коз-продуцентов, пищевых продуктах и фармацевтических препаратах и обозначалась как ИФА–рчЛФ.

В данной иммунохимической системе иммобилизованный рчЛФ и растворимый рчЛФ, внесенный в лунки в составе исследуемых, контрольных или градуировочных проб, конкурируют за связывание с конъюгатом анти-рчЛФ ПАт–ПХ в ходе первой инкубации. Не вступившие в иммунохимическую реакцию реагенты удаляются промывкой лунок специальным промывочным раствором в ИФА. Фермент, иммобилизовавшийся в составе конъюгата на поверхности лунок, катализирует реакцию перекисного окисления хромогена, которая сопровождается развитием окраски при второй инкубации. Стоп-реагент инактивирует ПХ, меняет цвет и фиксирует интенсивность окрашивания раствора в лунке. Каскаду реакций в тест-системе соответствует последовательность зависимостей их результатов, а итогом является меньшая оптическая плотность конечного раствора при большей концентрации рчЛФ в пробе, что и отражается в градуировочной кривой (рис. 4), имеющей концентрационный диапазон 0,4–32,4 мг/л рчЛФ.

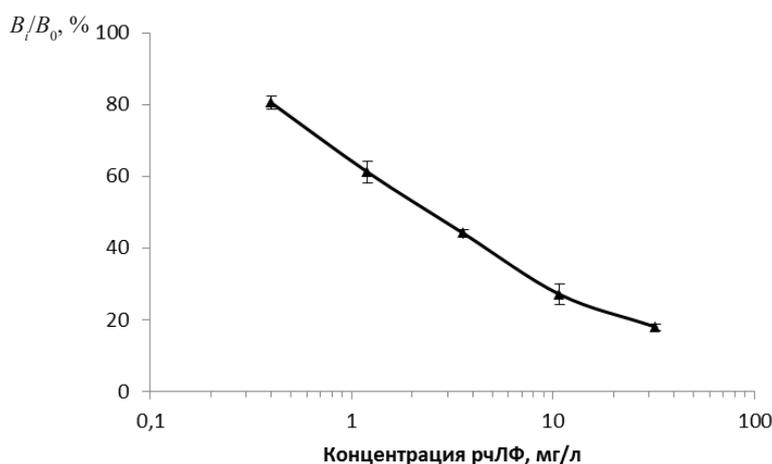


Рис. 4. Типичный градуировочный график прямого конкурентного ИФА рчЛФ

Fig. 4. Typical calibration curve of direct competitive ELISA of rhLF

Заключение. рчЛФ – это рекомбинантный железосвязывающий гликопротеин, по структуре, свойствам и физиологической активности идентичный природному ЛФ человека. Для количественного определения биологически активного рчЛФ в сырье, пищевой продукции и фармацевтических препаратах необходимо создание специальных иммуноаналитических систем, что и явилось целью нашей работы. Поликлональные антитела, способные специфически распознавать рчЛФ в сложных по составу пищевых и фармацевтических матриксах, получены в составе

кроличьей антисыворотки, очищены антиген-аффинной хроматографией и химически модифицированы пероксидазой из корней хрена или органическим комплексом иона европия. Результаты исследования нековалентных взаимодействий анти-рчЛФ ПАТ с рчЛФ на твердой фазе и в растворе показали возможность их эффективного применения в различных системах конкурентного иммуноанализа. В качестве иммунохимических партнеров анти-рчЛФ ПАТ в этих системах служили иммобилизованный и растворимый рчЛФ, а также рчЛФ, биологически меченный Eu^{3+} по металлсвязывающему центру. Установленные аналитические характеристики систем иммуноферментного и лантанидного иммунофлуориметрического анализов позволяют применять их в исследованиях продуктов, содержащих рчЛФ, а также в научных экспериментах по изучению данного белка. Одна из этих лабораторных систем, ИФА-рчЛФ, охарактеризована общепринятыми методами как прототип производственной продукции – иммуноферментного набора реагентов. Авторы имеют все основания полагать, что в самое ближайшее время такой набор станет эффективным и надежным инструментом тестирования животных-продуцентов и биоаналитического контроля промежуточной и конечной продукции в технологической цепочке получения и практического использования рчЛФ.

Список использованных источников

1. Isolation of an iron-containing red protein from human milk / B. Johanson [et al.] // *Acta Chemica Scandinavica*. – 1960. – Vol. 14, N 2. – P. 510–512. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.14-0510>
2. Thermal denaturation of human lactoferrin and its effect on the ability to bind iron / L. Mata [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 1998. – Vol. 46, N 10. – P. 3964–3970. <https://doi.org/10.1021/jf980266d>
3. 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. Ларионова // *Биофармацевт. журн.* – 2010. – Т. 2, № 3. – С. 3–19.
4. Будевич, А. Перспективы рекомбинантного лактоферрина человека, получаемого из молока коз-продуцентов / А. Будевич // *Наука и инновации*. – 2016. – № 6. – С. 29–32.
5. Мировая практика получения рекомбинантного человеческого лактоферрина (обзор) / И. С. Агиевич [и др.] // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты*. – 2017. – Т. 9. – С. 9–30.
6. Использование трансгенных животных в биотехнологии: перспективы и проблемы / О. Г. Максименко [и др.] // *Acta Naturae*. – 2013. – Т. 5, № 1. – С. 33–47. <https://doi.org/10.32607/20758251-2013-5-1-33-46>
7. Получение рекомбинантного лактоферрина человека из молока коз-продуцентов и его физиологические эффекты / В. С. Лукашевич [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси*. – 2016. – Т. 60, № 1. – С. 72–81.
8. Vashist, S. K. *Handbook of immunoassay technologies: approaches, performances, and applications* / S. K. Vashist, J. H. T. Luong. – Academic Press, 2018. – 496 p.
9. Антимикробные и антиоксидантные свойства апо-формы рекомбинантного человеческого лактоферрина, выделенного из молока коз-продуцентов / Р. Н. Бирюков [и др.] // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты*. – 2017. – Т. 9. – С. 305–317.
10. Faraji, N. Optimization of lactoperoxidase and lactoferrin separation on an ion-exchange chromatography step / N. Faraji, Y. Zhang, A. K. Ray // *Separations*. – 2017. – Vol. 4, N 2. – Art. 10. <https://doi.org/10.3390/separations4020010>
11. Гарбуз, О. С. Новый реагент для мечения белков ионами редкоземельных металлов / О. С. Гарбуз, Л. В. Дубовская, О. В. Свиридов // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси*. – 2014. – Т. 58, № 1. – С. 68–74.
12. Hermanson, G. T. *Bioconjugate techniques* / G. T. Hermanson. – 3d ed. – Academic Press, 2013. – P. 203–205. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-64240-9>
13. A high-throughput method for the quantification of iron saturation in lactoferrin preparations / G. Majka [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2013. – Vol. 405, N 15. – P. 5191–5200. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6943-9>
14. Edelhoich, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins / H. Edelhoich // *Biochemistry*. – 1967. – Vol. 6, N 7. – P. 1948–1954. <https://doi.org/10.1021/bi00859a010>
15. Baldwin, R. L. How Hofmeister ion interactions affect protein stability / R. L. Baldwin // *Biophysical Journal*. – 1996. – Vol. 71, N 2. – P. 2056–2063. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(96\)79404-3](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(96)79404-3)
16. Melander, W. Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series / W. Melander, C. Horváth // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1977. – Vol. 183, N 1. – P. 200–215. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(77\)90434-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90434-9)
17. Single-domain antibody-based ligands for immunoaffinity separation of recombinant human lactoferrin from the goat lactoferrin of transgenic goat milk / S. V. Tillib [et al.] // *Journal of Chromatography B*. – 2014. – Vol. 949–950. – P. 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.12.034>

References

1. Johanson B., Virtanen A. I., Tweit R. C., Dodson R. M. Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta Chemica Scandinavica*, 1960, vol. 14, no. 2, pp. 510–512. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.14-0510>

2. Mata L., Sánchez L., Headon D. R., Calvo M. Thermal denaturation of human lactoferrin and its effect on the ability to bind iron. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, vol. 46, no. 10, pp. 3964–3970. <https://doi.org/10.1021/jf980266d>
3. Borzenkova N. V., Balabushevich N. G., Larionova N. I. Lactoferrin: physical and chemical properties, biological functions, delivery systems, pharmaceutical and nutraceutical preparations (review). *Biofarmatsevticheskii zhurnal = Biopharmaceutical journal*, 2010, vol. 2, no. 3, pp. 3–19 (in Russian).
4. Budzevich A. Prospects for the production and use of recombinant human lactoferrin obtained from milk-producing goats. *Nauka i innovatsii = Science and innovations*, 2016, no. 6, pp. 29–32 (in Russian).
5. Agievitch I. S., Kastsiyanovich 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).
6. 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>
7. 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).
8. Vashist S. K., Luong J. H. T. *Handbook of immunoassay technologies: approaches, performances, and applications*. Academic Press, 2018. 496 p.
9. Birukou R. N., Kastsiyanovich A. A., Kapustin M. A., Falkouskaya U. V., Chubarova H. S., Hubchyk K. A. Antimicrobial and antioxidant properties of apoform of recombinant human lactoferrin isolated from goat milk. *Mikrobynye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty = Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects*, 2017, vol. 9, pp. 305–317 (in Russian).
10. Faraji N., Zhang Y., Ray A. K. Optimization of lactoperoxidase and lactoferrin separation on an ion-exchange chromatography step. *Separations*, 2017, vol. 4, no. 2, art. 10. <https://doi.org/10.3390/separations4020010>
11. Garbuz O. S., Dubovskaya L. V., Sviridov O. V. New reagent for labeling proteins with rare earth metal ions. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2014, vol. 58, no. 1, pp. 68–74 (in Russian).
12. Hermanson G. T. *Bioconjugate techniques, Third Edition*. Academic Press, 2013, pp. 203–205. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-64240-9>
13. Majka G., Śpięwak K., Kurpiewska K., Heczko P., Stochel G., Strus M., Brindell M. A high-throughput method for the quantification of iron saturation in lactoferrin preparations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, vol. 405, no. 15, pp. 5191–5200. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6943-9>
14. Edelhoch H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, 1967, vol. 6, no. 7, pp. 1948–1954. <https://doi.org/10.1021/bi00859a010>
15. Baldwin R. L. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophysical Journal*, 1996, vol. 71, no. 4, pp. 2056–2063. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(96\)79404-3](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(96)79404-3)
16. Melander W., Horváth C. Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1977, vol. 183, no. 1, pp. 200–215. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(77\)90434-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90434-9)
17. Tillib S. V., Privezentseva M. E., Ivanova T. I., Vasilev L. F., Efimov G. A., Gursky Y. G., Georgiev G. P., Goldman I. L., Sadchikova E. R. Single-domain antibody-based ligands for immunoaffinity separation of recombinant human lactoferrin from the goat lactoferrin of transgenic goat milk. *Journal of Chromatography B*, 2014, vol. 949–950, pp. 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.12.034>

Информация об авторах

Семенов Дмитрий Александрович – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: dsemenov@iboch.by.

Вашкевич Ирина Игнатьевна – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vashkevich@iboch.by.

Свиридов Олег Васильевич – д-р хим. наук, заведующий лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, 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., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dsemenov@iboch.by.

Vashkevich Irina I. – Ph. D. (Chemistry), Leading researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vashkevich@iboch.by.

Sviridov Oleg V. – D. Sc. (Chemistry), Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sviridov@iboch.by.