

ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА В МОЛОКЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ

© 2022 Л.И. Мухаметова^{1*}, С.А. Еремин¹, Д.А. Арутюнян¹, О.С. Горяйнова²,
Т.И. Иванова², С.В. Тиллиб^{2*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: liliya106@mail.ru

² Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, Россия; электронная почта: tillib@genebiology.ru

Поступила в редакцию 24.06.2022

После доработки 27.10.2022

Принята к публикации 27.10.2022

Благодаря уникальной структуре и свойствам лактоферрин в молоке человека (hLF) обладает множеством необходимых для младенцев питательных и укрепляющих здоровье функций, например, обеспечивает защиту от бактериальных инфекций и воспаления. Недостаток лактоферрина в женском молоке или в молочных смесях может приводить к нежелательному ослаблению иммунитета детей. Определение уровня hLF необходимо для контроля качества молока с целью возможной терапевтической коррекции. Перспективным методом количественного определения и контроля концентрации hLF в молоке и молочных продуктах может стать неконкурентный формат поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (FPIA), не требующий обязательного разделения связанных и свободных форм белков и длительной пробоподготовки образцов. Применение в качестве распознающих реагентов флуоресцентно меченных однодоменных антител верблюда («нанотел») позволяет количественно определять молекулы (антигены) относительно большего размера, в частности лактоферрин человека, методом FPIA. В данной работе использованы конъюгаты с флуоресцеин изотиоцианнатом (FITC) двух ранее полученных однодоменных антител anti-hLF5 и anti-hLF16, специфически узнающих различные эпитопы лактоферрина человека, но не узнающих лактоферрин козы. Изучена кинетика взаимодействия FITC-меченных нанотел с hLF. Определены в растворе константы диссоциации (K_D) для антител FITC-anti-Lf5 и FITC-anti-Lf16 с hLF, которые составили $3,2 \pm 0,3$ нМ и $4,9 \pm 0,4$ нМ соответственно, что свидетельствует об их высокоаффинном связывании с лактоферрином человека. Разработан протокол FPIA, подобраны концентрации FITC-anti-hLF5 и FITC-anti-hLF16, которые дают оптимальный флуоресцентный сигнал и стабильное значение поляризации. Получена зависимость поляризации флуоресценции от концентрации hLF для неконкурентного FPIA с антителами FITC-anti-hLF5 и определены аналитические характеристики: предел обнаружения $2,1 \pm 0,2$ мкг/мл и линейный диапазон для определения концентраций – 3–10 мкг/мл. Метод FPIA обычно применяется для определения низкомолекулярных веществ. Однако в данной работе продемонстрирована принципиальная возможность распространения этого метода и для определения высокомолекулярных белков (лактоферрина человека) в биологической жидкости (молоке), если использовать в качестве распознающего реагента флуоресцентно меченные малые однодоменные антитела.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: однодоменное антитело, нанотело, лактоферрин, поляризация флуоресценции, иммуноанализ.

DOI: 10.31857/S0320972522120211, **EDN:** NIWPGN

ВВЕДЕНИЕ

Лактоферрин (LF) – гликопротеин массой примерно 80 кДа, содержащий 690 а.о., является членом семейства трансферринов и имеет

60% идентичности аминокислотной последовательности с трансферрином сыворотки крови [1, 2]. Впервые LF был выделен из коровьего молока в 1939 г. Соренсенем, а в 1960 г. Йохансоном был выделен лактоферрин из молока

Принятые сокращения: anti-hLf – нанотела против лактоферрина человека; FITC – флуоресцеин-5-изотиоцианнат изомер 1; FP – поляризация флуоресценции; FPIA – поляризационный флуоресцентный иммуноанализ; hLF – лактоферрин человека; LF – белок лактоферрин.

* Адресат для корреспонденции.

человека (hLF) [1]. В настоящее время известно, что LF присутствует не только в молоке млекопитающих, но также является компонентом многих физиологических жидкостей, таких как слюна, слезы, сперма и секреты слизистых оболочек, а также является важным компонентом нейтрофильных гранул лейкоцитов [1, 3]. В организме человека hLF участвует во многих биологических процессах, таких как защита организма, ингибирование роста опухоли, он обладает антимикробной, антибактериальной, противовирусной и противопаразитарной активностями и регулирует ферментативную активность рибонуклеазы А, клеточную пролиферацию и дифференцировку [4–6]. LF эффективно связывает ионы Fe^{3+} (с K_D около 10^{-20} М) [7] и играет важную роль в регулировании уровня свободного железа в жидкостях организма [8].

Концентрация лактоферрина в грудном молоке человека выше, чем в коровьем молоке [9]. Кроме того, концентрация LF в молоке сильно варьируется в зависимости от стадий лактации и у разных видов. Человеческое молоко содержит более 5 г/литр hLF по сравнению с 2–3 г/литр в зрелом грудном молоке. Содержание LF в коровьем молозиве составляет приблизительно 0,8 г/литр, тогда как в коровьем молоке содержится всего 0,03–0,49 г/литр. Более высокое количество hLF в молозиве обеспечивает защиту младенцев, находящихся на грудном вскармливании, от бактериальной инфекции и воспаления. В тех случаях, когда содержание лактоферрина в молоке матери оказывается чрезвычайно низким, считается целесообразным добавлять его к рациону детей, особенно недоношенных. Это также важно для детей, которые находятся на искусственном вскармливании, в случае вынужденного прекращения грудного вскармливания при болезни матери или приеме препаратов, которые могут оказать негативное действие на здоровье грудного ребенка [10]. Пастеризация грудного молока для кормления недоношенных и больных детей, процессы переработки молока и молочных продуктов могут нарушать структуру и, как следствие, функцию LF, что может повлиять на стабильность его свойств [5]. В связи с вышесказанным очевидна востребованность разработки быстрых, эффективных и экономичных методов количественного определения hLF в молоке и молочных продуктах.

К настоящему времени продемонстрировано множество различных подходов для определения LF (в основном на моделях LF из молока коровы): иммуноферментный анализ (ELISA) [11], поверхностный плазмонный

резонанс на основе иммуносенсоров [12], капиллярный электрофорез [13], ультра-высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (UHPLC-MS/MS) [14], высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой (RP-HPLC) [15, 16]. Показана возможность определения лактоферрина человека гомогенным иммунохимическим методом с использованием переноса возбуждения и флуориметрии с фазовым разрешением [17]. Для определения лактоферрина человека сегодня чаще всего используют иммуноферментный анализ (ELISA), и на рынке присутствуют коммерческие наборы, например, <https://www.hycultbiotech.com/hk329-02>. Указанный набор, базирующийся на «sandwich-ELISA», позволяет примерно за 3,5 ч. определить концентрацию hLF в разных биологических жидкостях человека (после соответствующих разведений до нужного диапазона) с высокой чувствительностью (0,4–100 нг/мл). Метод UHPLC-MS/MS, обладающий особенно высокой чувствительностью, может быть использован для определения LF в переработанном молоке и молочных продуктах. Однако количественная оценка LF была разработана с применением в качестве стандартов пептидов, полученных из гидролизатов бычьего лактоферрина, а это означает, что UHPLC-MS/MS не может отличить нативный лактоферрин от денатурированного. RP-HPLC можно использовать для определения нативного лактоферрина, однако показано, что результаты, полученные данным методом, не сочетались с методом HPLC. Таким образом, RP-HPLC может быть недостаточно чувствительным для определения лактоферрина в коммерческом молоке и молочных продуктах с низким содержанием лактоферрина. Разработаны и апробированы колонки с NITRAP™ Heparin HP [18] или аптамером [19] для обогащения лактоферрином с последующим количественным определением на HPLC. Однако к недостаткам данных методов можно отнести длительную пробоподготовку, использование дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала.

На основе проведенного анализа литературных данных и нашего предшествующего опыта мы предположили, что для определения нативного лактоферрина в женском молоке весьма перспективным может оказаться использование метода поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (FPIA), в котором флуоресцентно меченные однодоменные антитела («нанотела») используются в качестве распознающих реагентов. FPIA не требует сложных

операций, например, таких как разделение связанных и свободных форм белков, длительной пробоподготовки образцов и трудоемких процедур, которые обычно используют в анализе пищевых продуктов, клинических и биомедицинских анализах [20]. Важно отметить, что длительность анализа составляет не более 5 мин и калибровочная зависимость стабильна и не требует повторения при каждом анализе. Методика FPIA для определения лактоферрина в женском молоке позволила бы быстро и точно определять данный белок. Большинство методик FPIA являются конкурентными анализами, в которых анализируемый и меченый флуоресцентной меткой аналит (трейсер) конкурентно связываются с антителом. Первоначально данный метод был разработан для определения низкомолекулярных аналитов (антибиотиков, микотоксинов, пестицидов) [20, 21]. Величина сигнала поляризации флуоресценции (FP) теоретически может изменяться от 0 до 0,5; в расчетах обычно используют величину миллиполяризации флуоресценции (mP). FP зависит от гидродинамического радиуса (относительного размера) флуоресцирующего соединения, и при связывании низкомолекулярного трейсера (с молекулярной массой меньше 5 кДа) с белками или антителами существенно большего размера гидродинамический радиус заметно увеличивается и наблюдается большее изменение степени поляризации (ΔmP). В случае же крупного анализируемого вещества, такого, например, как белок среднего размера (примерно 60 кДа), ΔmP будет небольшим и применение FPIA затруднительно, поскольку разница в гидродинамическом радиусе между свободным аналитом и аналитом, связанным с белком близкого размера или антителом, в этом случае крайне невелика.

Применение неконкурентного формата FPIA позволяет разработать методы анализа для определения крупных молекул. С помощью флуоресцентно меченых Fab-фрагментов антител был разработан неконкурентный FPIA для количественного определения С-реактивного белка [22]. Метод FPIA был продемонстрирован для обнаружения вирусных частиц [23–25]. Однако применение таких вариантов неконкурентного FPIA ограничено высоким фоном или низкой чувствительностью. Кроме проблемы малого изменения сигнала поляризации флуоресценции при взаимодействии молекул с высокой молекулярной массой часто возникает неспецифическая адсорбция, которая также может быть серьезной проблемой в FPIA. Таким образом, выбор антигенсвязывающих молекул с более низкой молекулярной массой является перспективным для развития метода FPIA.

Использование миниатюрных верблюжьих однодоменных антител («нанотел») размером 12–15 кДа (2×4 нм) может быть перспективным для разработки FPIA-определения белков. Нанотело (наноантитело, VHH) представляет собой рекомбинантный белок, соответствующий вариабельному антигенсвязывающему домену особых антител, состоящих из гомодимера укороченной тяжелой цепи при отсутствии легких цепей. Такие антитела были обнаружены у представителей семейства Верблюдовые и у хрящевых рыб [26, 27]. Нанотела очень стабильны в широком диапазоне температур и pH, способны быстро ренатурировать с полным восстановлением активности, они способны узнавать особые эпитопы антигенов (активные центры ферментов, небольшие углубления), которые не узнаются классическими антителами. В лаборатории соавторов этой статьи уже на протяжении 20 лет ведется работа по получению и использованию нанотел для широкого спектра приложений [28–31], в том числе при их участии были получены высокоспецифические нанотела против лактоферрина человека [29]. Нанотела все активнее используются в последние годы для многих иммунобиотехнологических исследований, и их можно рассматривать как перспективный дополнительный инструмент наряду с традиционными антителами и их производными. Благодаря своей небольшой молекулярной массе флуоресцентно меченое нанотело может быть перспективным в качестве распознающего реагента для целевого белка-мишени, имеющего существенно больший размер, чем нанотело в методе неконкурентного FPIA.

Цель настоящей работы – демонстрация принципиальной возможности использования однодоменных антител для разработки методов определения в биологической жидкости целевого антигена на основе неконкурентного FPIA. Полученные нами ранее нанотела против лактоферрина человека были использованы в качестве распознающего реагента для определения лактоферрина человека в молоке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

FITC (флуоресцеин-5-изотиоцианат изомер 1, «Sigma» США), клоны-продуценты нанотел верблюда против лактоферрина человека anti-hLf5 (20,1 кДа) и anti-hLf16 (20 кДа) [29], лактоферрин человека (hLF, 80 кДа) и четыре образца женского молока (№№ 1–4) были любезно предоставлены Садчиковой Е.Р. (Институт биологии гена РАН, Москва). Так же в

работе использовали смесь апо- и холо-трансферринов человека (hTF), бычий сывороточный альбумин (BSA), сывороточный альбумин человека (HSA), лизоцим человека (LYZ) и казеин (Cas) фирмы «Sigma-Aldrich» США.

Получение FITC-меченных нанотел против hLF. Используя ранее полученные бактериальные клоны-продуценты [29], нанотела LF5 и LF16, специфически узнающие лактоферрин человека (анти-hLf), но не узнающие лактоферрин козы, были наработаны в периплазме бактерий, выделены из периплазматического экстракта с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии, охарактеризованы с помощью хроматографического, электрофоретического и иммуноферментного анализа, как описано ранее [29]. Полученные нанотела конъюгировали с FITC и очищали, как описано ранее [32], и характеризовали как по содержанию белка, так и по степени модификации аминокрупп белка спектрофотометрически. Концентрации антител были определены, используя расчетные коэффициенты экстинкции $\epsilon_{280} = 29780 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (anti-hLf-5 0,68 мг/мл) и $\epsilon_{280} = 28260 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (anti-hLf-16 0,71 мг/мл) [33]. Молярный коэффициент экстинкции FITC – $73,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Имуноферментный метод определения (ELISA) лактоферрина человека был проведен, используя набор LF ELISA («ХЕМА», Россия), согласно инструкции производителя. Поглощение для LF ELISA было измерено при длине волны 450 нм, используя микропланшетный фотометр Bio-Rad 680 («Bio-Rad Laboratories Inc.», США).

Неконкурентный FPIA был выполнен на портативном флуориметре Sentry-200 («Ellie», США), при $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 495/530 \text{ nm}$. Готовили рабочий раствор (TWS) FITC-anti-hLf, чтобы интенсивность флуоресценции раствора составляла около 200 000. Готовили стандартные растворы hLF, проверяя в нескольких разведениях концентрацию спектрофотометрически, используя $\epsilon_{280} = 8,85 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [34]. Затем к 950 мкл TWS добавляли 50 мкл стандартного раствора hLF различных концентраций (0, 0,01; 0,1; 1; 3; 10; 20; 40; 100 и 1000 мкг/мл) и измеряли изменение сигнала поляризации флуоресценции (mP) и интенсивность исследуемого раствора после 5 мин инкубации при комнатной температуре. Каждый эксперимент был выполнен в двух повторах и трех аппаратных измерениях. Перекрестные реакции данных нанотел были изучены, измеряя изменение поляризации флуоресценции при добавлении к 950 мкл рабочему раствору трейсера (FITC-anti-hLf) 50 мкл стандартных растворов казеина, бычьего сывороточного аль-

бумина, сывороточного альбумина человека, трансферрина человека и др. Концентрации стандартных растворов реагентов составляли (0, 1, 10, 100 и 1000 мкг/мл).

Анализ образцов молока. Для оценки определения лактоферрина человека в натуральное козье молоко был добавлен стандартный раствор hLF до конечных концентраций 0,5 и 1 мг/мл. Молоко центрифугировали 15 мин (4000 g) для удаления жира, разбавляли в 20, 40 и 80 раз 10 мМ фосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 150 мМ NaCl, и использовали для неконкурентного FPIA. Для валидации метода FPIA все образцы молока были проанализированы методом иммуноферментного анализа с использованием набора hLF ELISA («ХЕМА»), который в настоящее время проходит регистрацию и выпускается как опытная партия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе были использованы однодоменные нанотела верблюда, anti-hLf5 и anti-hLf16, ранее полученные к различным эпитомам лактоферрина человека [29]. Было показано, что каждое нанотело связывает практически весь hLF в молоке [29], из чего можно предположить, что узнаваемые этими нанотелами эпитопы hLF остаются доступными для связывания как в случае мономерных, так и в случае олигомерных форм hLF. По предварительным данным относительно связывания нанотелами пептидов, полученных при частичном переваре hLF пепсином, при использовании нанотела anti-hLf5 связывания не наблюдали, тогда как нанотело anti-hLf16 сохраняло способность связывать в переваре наибольший пептид размером 35 кДа. Таким образом, можно предполагать, что по крайней мере одно (anti-hLf16) из двух используемых в работе нанотел способно связывать не только целый белок, но и отдельный пептид этого белка (или денатурированный белок, содержащий этот пептид). Мы не наблюдали заметных различий в результатах при использовании по отдельности каждого из этих двух нанотел в качестве трейсеров. Можно предполагать, что эффекты возможной частичной денатурации hLF не являются существенными при детекции hLF с помощью используемых нанотел. Данные антитела высокоспецифичны к hLF и не связываются с лактоферрином козы [29].

В данной работе использовали адаптированные нанотела, содержащие на C-конце длинную линкерную последовательность (из 28 а.о. длинного варианта шарнирного участ-

ка неканонического верблюжьего антитела), после которой расположены два пептидных фрагмента: фрагмент из 9 а.о. YPYDVPDYA (HA-tag) и последовательность из 6 остатков гистидина (His-tag). Линкерный линейный участок содержит 4 удобно расположенные и хорошо доступные а.о. лизина, по которым удобно проводить конъюгирование с другими молекулами.

В работе были получены и охарактеризованы FITC-меченные производные данных антител: FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 соответственно.

Соотношение anti-hLf/FITC определяли по спектрам поглощения меченных антител в 10 mM PBS (pH 7,4) по уравнению (1):

$$\frac{\text{FITC}}{\text{anti-hLf}} = \frac{A_{492} * \epsilon_{\text{anti-hLf}}}{(A_{280} - C * A_{492}) * \epsilon_{\text{FITC}}}, \quad (1)$$

где A_{492} – поглощение конъюгата на длине волны максимума поглощения FITC (492 нм), A_{280} – поглощение образца на длине волны максимума поглощения антител (280 нм), $\epsilon_{\text{anti-hLf}}$ – молярный коэффициент экстинкции антитела на длине волны 280 нм, ϵ_{FITC} – мольный коэффициент экстинкции FITC на длине волны максимума поглощения ($73\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), C – фактор коррекции для FITC на длине волны 280 нм ($C = 0,35$). Соотношение FITC/anti-hLf составило приблизительно 1 : 1, данное соотношение является оптимальным, поскольку дальнейшее увеличение соотношения белок/краситель не приводит к увеличению флуоресцентного сигнала.

Необходимым условием для разработки эффективных диагностических систем является полная характеристика специфичности и аффинности применяемых антител [35]. Для аналитического метода на основе FPIA важным является определение константы связывания антигена с антителом в растворе, которая может существенно отличаться от константы связывания с антителами, иммобилизованными на поверхности. Мы определили аффинности антител FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 в отношении hLF и оценили возможность их использования для количественного определения лактоферрина в молоке методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа.

Для разработки протокола FPIA были выбраны рабочие растворы FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 с концентрациями, которые дают оптимальный флуоресцентный сигнал и, следовательно, стабильное значение поляризации. При концентрациях в интервале 2,5–5 нМ соотношение сигнал/шум было оптимальным. Флуоресцентно меченные ан-

титела FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 демонстрировали значение поляризации флуоресценции 125 ± 1 мР.

Изучение кинетики связывания нанотел FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 с лактоферрином человека изучали в широком диапазоне концентраций белка. Были приготовлены стандартные растворы hLF (0,125 нМ – 12 мкМ) в 10 mM фосфатном буфере pH 7,4, содержащем 150 mM NaCl (PBS). Для измерения сигнала FP в пробирке смешивали 50 мкл стандартного раствора hLF с 950 мкл рабочих растворов антител FITC-anti-hLf5 или FITC-anti-hLf16. Пробирку помещали в портативный флуориметр Sentry-200 и изучали кинетику связывания лактоферрина (конечные концентрации hLF составили 6 пМ – 625 нМ с рабочими растворами FITC-anti-hLf5 или FITC-anti-hLf16 в течении 1 ч). На рис. 1 в качестве примера представлена зависимость сигнала FP от времени при конечной концентрации hLF 10 нМ. Быстрое увеличение сигнала и достижение равновесия за 1–2 мин при комнатной температуре свидетельствовало о высокоаффинном связывании белок/нанотело (рис. 1). В дальнейшем при изучении связывания флуоресцентно меченных нанотел с лактоферрином сигнал FP мы измеряли после 5 мин инкубации. В настоящее время известно, что лактоферрин способен образовывать ассоциаты, а уровень олигомеризации зависит от концентраций hLF, KCl, NaCl, а также от продолжительности хранения белка в растворе [36]. Для того, чтобы исключить влияние олигомеризации hLF мы изучили стабильность сигнала FP в широком диапазоне концентраций hLF (6 пМ – 625 нМ). Нами показано, что для всего изученного диапазона концентраций сигнал FP после достижения максимального значения в течение 2 мин инкубации сохранялся в течение часа. Эти данные могут свидетельствовать о том, что за время инкубации не происходит агрегации лактоферрина в исследуемом растворе, которая приводила бы к увеличению сигнала FP. Кроме того, кинетика связывания лактоферрина с нанотелами FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 была также изучена при различном времени прединкубации стандартных растворов лактоферрина (125 пМ – 12 мкМ) перед измерением FP. Однако даже при прединкубации стандартных растворов при комнатной температуре в течение 8 ч перед проведением анализа сигнал FP оставался на том же уровне (данные не приведены), что свидетельствует об отсутствии влияния возможной олигомеризации hLF на анализ.

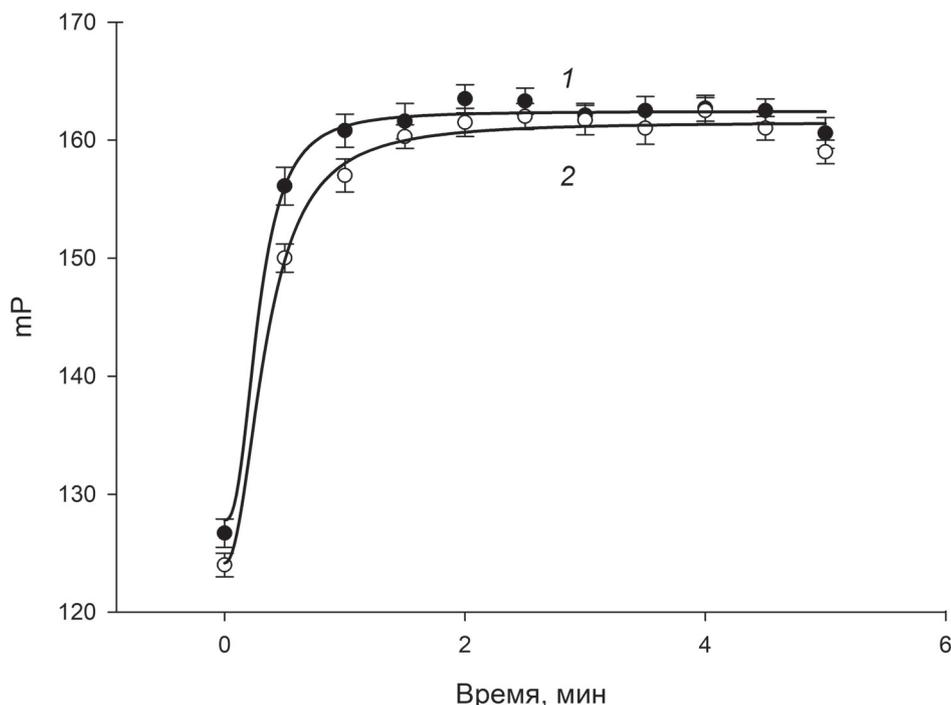
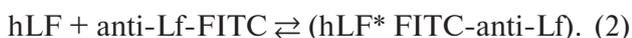


Рис. 1. Кинетика связывания FITC-anti-hLf5 (1) и FITC-anti-hLf16 (2) (оба в концентрации 5 нМ) с hLf (10 нМ) в 10 мМ PBS (рН 7,4) при 25 °С. Измерения проводили трижды, результаты представлены как среднее значение \pm SD

Известно, что метод FPIA удобен для характеристики взаимодействий белок/лиганд [34, 36]. Уравнение (2) описывает реакцию связывания между трейсером (FITC-anti-Lf) и белком hLF:



Если концентрация [FITC-anti-Lf] много меньше концентрации [hLF], поляризация флуоресценции может быть выражена уравнением (3) [37]:

$$mP = (mP_{\max} - mP_{\min}) \cdot \frac{[hLF]}{K_D + [hLF]} + mP_{\min}, \quad (3)$$

где mP_{\min} — это поляризация флуоресценции свободного флуорофора FITC-anti-Lf5, mP_{\max} — FP для комплекса hLF*FITC-anti-Lf5; [hLF] — концентрация лактоферрина, а K_D — константа диссоциации комплекса hLF*FITC-anti-Lf.

На рис. 2 представлена кривая связывания трейсеров FITC-anti-Lf5 и FITC-anti-Lf16 (2,5 нМ) и различных концентраций hLF. Как видно, с увеличением концентрации белка hLF величина FP увеличивается и достигает максимальных значений при полном связывании трейсера с антителом. Как видно из представленного рисунка, изменение поляризации флуоресценции (ΔmP) составило 30–35 ед. Данная величина была достигнута благодаря применению однодоменных нанотел, которые имеют низкий молекулярный вес (около 20 кДа).

Флуоресцентно меченные нанотела FITC-anti-Lf5 и FITC-anti-Lf16 были получены нами в трех независимых экспериментах, и вариация сигнала FP в данном эксперименте не превышала 10%.

Константу диссоциации (K_D) для пар FITC-anti-Lf5 и hLF определяли с использованием постоянной концентрации трейсера 2,5 нМ, при которой получались устойчивые значения FP, оптимальное соотношение сигнал/шум и, кроме того, они были ниже ожидаемой величины K_D и увеличивающихся концентраций hLF, превосходящих ожидаемую величину K_D . Концентрации hLF варьировали от 0 до 50 нМ. Величины сигнала поляризации флуоресценции (mP) были аппроксимированы по уравнению (2) и вычислены K_D . Равновесные константы диссоциации для антител FITC-anti-Lf5- и FITC-anti-Lf16- составили $3,2 \pm 0,3$ нМ и $4,9 \pm 0,4$ нМ соответственно. Как видно, оба антитела имеют достаточно низкие константы диссоциации, что свидетельствует о высокоаффинном связывании с лактоферрином.

Белки, входящие в состав матрицы физиологических жидкостей, как и белки, которые часто используются в приготовлении буферов или структурно подобные лактоферрину, потенциально могут влиять на значение сигнала FP и на точность анализа. Мы исследовали на этот предмет ряд нецелевых белков (сывороточный альбумин быка и человека, казеин,

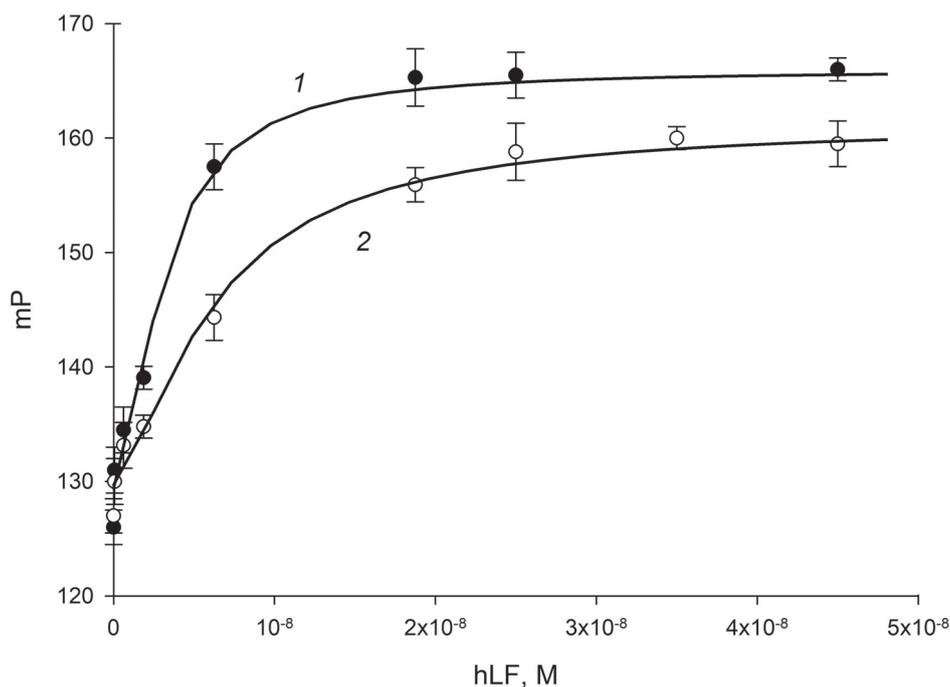


Рис. 2. Изменение сигнала FP в зависимости от концентрации hLF в присутствии 2,5 нМ FITC-anti-Lf5 (1) и FITC-anti-Lf16 (2) (pH 7,4) при 25 °С. Измерения проводили трижды, результаты представлены как среднее значение ± SD

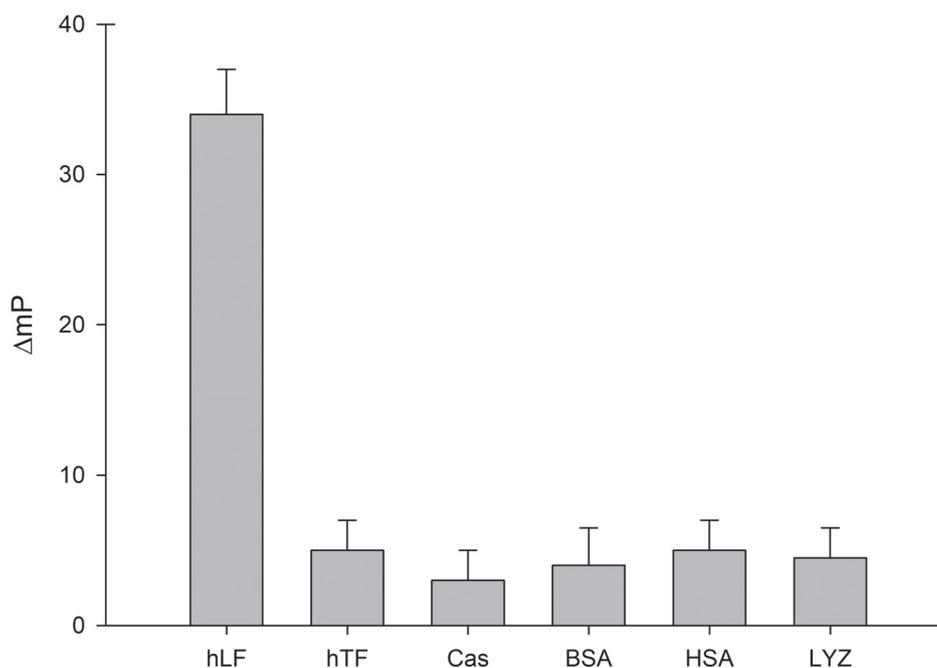


Рис. 3. Специфичность основных белков на связывание с FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 (pH (7,4) при 25 °С). Концентрация стандартного раствора hLF составила 40 мкг/мл, других реагентов – 1000 мкг/мл. Измерения проводили трижды, результаты представлены как среднее значение ± SD

лизоцим, трансферрин человека) в неконкурентном FPIA, используя FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 (рис. 3). К рабочему раствору антител добавляли различные концентрации вышеперечисленных белков (1–1000 мкг/мл) и измеряли сигнал поляризации флуоресценции через 5 мин инкубации. При данных концентрациях потенциальных кросс-реагентов изменение сигнала FP практически не наблю-

далось, что свидетельствует о высокой аффинности используемых антител только к hLF. На рис. 3 представлено изменение сигнала FP при высоких концентрациях этих белков, и, как видно из данного рисунка, они не вызывали изменения сигнала, что свидетельствует о высокоспецифичном связывании FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 с лактоферрином человека.

Для определения лактоферрина человека в молоке был использован метод введено/найденно. Антитела anti-hLf5 и anti-hLf16 не связываются с лактоферрином козы, поэтому в экспериментах использовали натуральное козье молоко, в которое добавляли точное количество hLF.

Известно, что молоко является довольно сложной матрицей для проведения анализа, поскольку в молоке присутствует большое количество компонентов, которые могут влиять на аналитический сигнал. Наиболее распространенным способом уменьшения матричного эффекта в молоке является его разбавление для снижения концентрации веществ, которые могут мешать анализу. Молоко первоначально центрифугировали для обезжиривания и готовили образцы с последовательным двукратным разбавлением 10 мМ фосфатным буфером (рН 7,4), содержащим 150 мМ NaCl. После чего определяли оптимальный коэффициент разбавления молока для проведения анализа следующим образом: к рабочим растворам FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 добавляли 50 мкл молока в различных разведениях и через 5 мин инкубации измеряли сигнал ФР. Было обнаружено, что уже при предварительном разведении в 8–10 раз (конечное разведение в анализируемом растворе составило 160–200 раз) образцы показали значение ФР, аналогичное сигналу рабочих растворов FITC-anti-hLf5 и FITC-anti-hLf16 с 50 мкл буфера (данные не представлены). Таким образом, даже при разведении молока в анализируемом растворе в 160 раз полностью удалось снять влияние матричного эффекта, однако высокое содержание лактоферрина в молоке (0,5–1 мг/мл) позволяет нам

определять содержания данного белка при разведении более чем в 200 раз методом FPIA.

Так как FITC-anti-hLf5 связывалось с hLF с большим сродством, то в качестве распознающего реагента было выбрано данное нанотело. На рис. 4, а представлена стандартная зависимость поляризации флуоресценции от концентрации hLF, полученная при неконкурентном анализе FPIA с антителами FITC-anti-hLf5, и ее линейный участок (б). Предел обнаружения определен как $(mP_0 + 3 SD)$, который составил $2,1 \pm 0,2$ мкг/мл и линейный диапазон для определения концентраций составил 3–50 мкг/мл.

Для проверки воспроизводимости метода получения флуоресцентно меченный конъюгат FITC-anti-hLf5 был синтезирован и очищен, как описано в работе [32], в трех независимых экспериментах и обнаружено, что калибровочные зависимости и их аналитические характеристики во всех трех случаях различались между собой не более чем на 10%.

Поскольку нанотело anti-hLf5 высокоспецифично к лактоферрину человека и не связывается с лактоферрином козы [29], натуральное козье молоко с добавленным hLF было использовано для подтверждения возможности определения данного белка в молоке. В образцы козьего молока был добавлен лактоферрин человека до конечных концентраций 0,5 и 1 мг/мл. Затем образцы молока разбавили в 20, 40 и 80 раз; как уже упоминалось выше, при разведении образцов в 10 раз полностью устраняется матричный эффект. При каждом разведении измеряли значение ФР и определяли содержание лактоферрина в образце, результаты представлены в табл. 1.

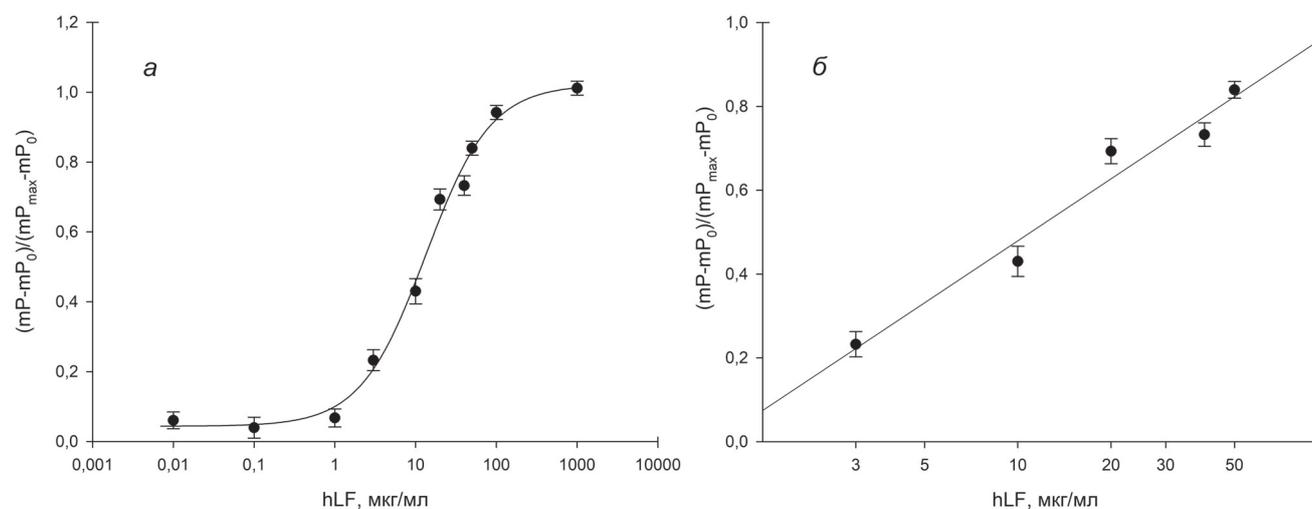


Рис. 4. Нормированная кривая зависимости поляризации флуоресценции от концентрации hLF (а) и ее линейный участок (б), полученные при неконкурентном анализе FPIA с антителом FITC-anti-hLf5 (рН 7,4 и 25 °С). Измерения проводили трижды, результаты представлены как среднее значение \pm SD

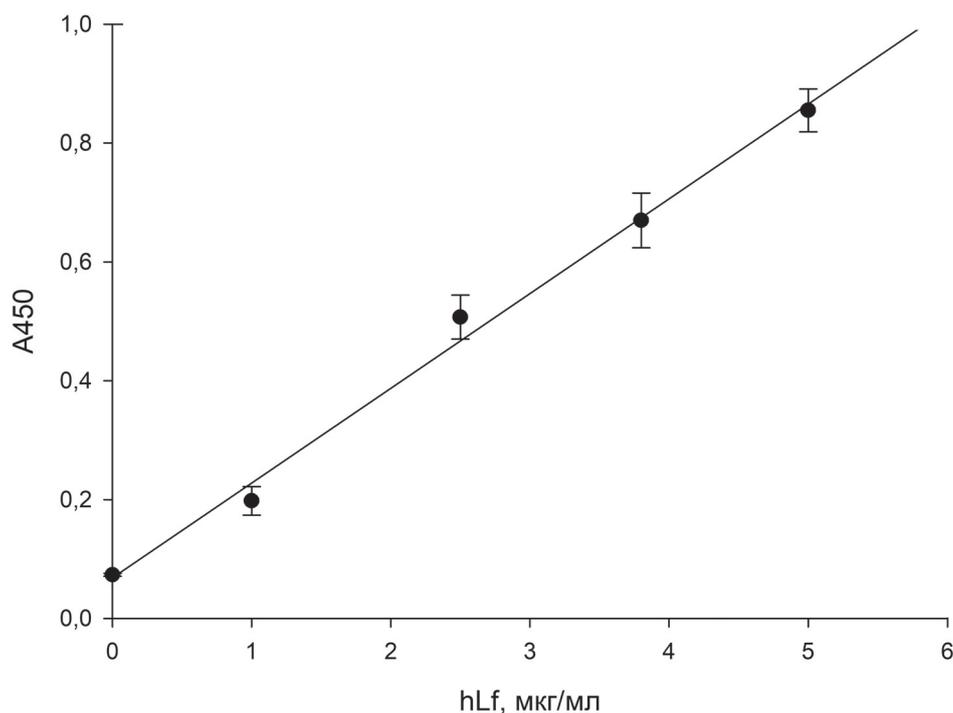


Рис. 5. Калибровочная зависимость определения hLF методом иммуноферментного анализа. Измерения дублировали, результаты представлены как среднее значение \pm SD

Таблица 1. Результаты обнаружения hLF в молоке методом введено/найдено с помощью FPIA и LF ELISA

Введено, мг/мл	FPIA				hLF ELISA			
	разведение образца	мкг/мл	найдено, мг/мл	% открытия	разведение образца	мкг/мл	найдено, мг/мл	% открытия
0,5	1 : 20	24,0 \pm 0,5	0,52 \pm 0,02	104	1 : 200	2,55 \pm 0,02	0,54 \pm 0,02	108
	1 : 40	13,2 \pm 0,3			1 : 400	1,35 \pm 0,04		
	1 : 80	7,0 \pm 0,2			1 : 800	0,70 \pm 0,05		
1	1 : 20	53,5 \pm 0,3	1,12 \pm 0,03	111	1 : 200	5,10 \pm 0,05	1,10 \pm 0,05	110
	1 : 40	26,4 \pm 0,2			1 : 400	2,72 \pm 0,06		
	1 : 80	15,5 \pm 0,4			1 : 800	1,51 \pm 0,4		

Примечание. % – Соответствие (в процентах) полученного результата с ожидаемым, исходя из предварительных данных.

В тех же образцах было определено содержание лактоферрина методом иммуноферментного анализа на лактоферрин hLF ELISA. На рис. 5 представлена калибровочная зависимость поглощения (A) от концентрации стандартных растворов hLF. Образцы молока предварительно разбавляли в 200, 400 и 800 раз. Результаты представлены в табл. 1. В образце козьего молока без добавления лактоферрина методами FPIA и ELISA не было обнаружено увеличение аналитического сигнала, что свидетельствует о высокоспецифичном связывании антител с лактоферрином человека.

Как видно из рис. 4, б и рис. 5, предел обнаружения для иммуноферментного метода

определения ниже предела обнаружения для FPIA 0,3 и 2,1 мкг/мл соответственно. Однако содержание лактоферрина в молоке составляет 1 мг/мл или больше и разбавление испытуемых образцов до определяемых концентраций позволяет полностью избавиться от матричного эффекта, влияющего на точность анализа. Но метод FPIA благодаря своим преимуществам позволяет избежать длительного и трудоемкого иммуноферментного анализа, существенно снизив время его проведения с 3,5 до 5 мин. Кроме того, калибровочная зависимость для полученных нами иммунореагентов была стабильна и не было необходимости при тестировании образцов ее повторять.

Таблица 2. Сравнение результатов обнаружения hLF в реальных образцах женского молока при их различном разведении с помощью FPIA и hLF ELISA

Образец молока	FPIA			hLF ELISA		
	разведение образца	содержание hLF в разведенных образцах, мкг/мл	содержание hLF в образцах, мг/мл	разведение образца	содержание hLF в разведенных образцах, мкг/мл	содержание hLF в образцах, мг/мл
№ 1	1 : 100	24,0 ± 0,5	2,19 ± 0,02	1 : 1500	1,56 ± 0,08	2,34 ± 0,12
	1 : 150	13,2 ± 0,3		1 : 2000	1,17 ± 0,15	
№ 2	1 : 100	25,2 ± 0,3	2,26 ± 0,14	1 : 1500	1,69 ± 0,11	2,24 ± 0,11
	1 : 150	13,5 ± 0,2		1 : 2000	0,98 ± 0,10	
№ 3	1 : 100	20,0 ± 0,4	1,95 ± 0,05	1 : 1500	1,41 ± 0,12	1,95 ± 0,12
	1 : 150	12,8 ± 0,2		1 : 2000	0,90 ± 0,12	
№ 4	1 : 100	18,1 ± 0,2	1,85 ± 0,05	1 : 1500	1,13 ± 0,20	1,79 ± 0,18
	1 : 150	12,1 ± 0,3		1 : 2000	0,95 ± 0,15	

Для проверки адекватности разработанного метода FPIA на образцах женского молока мы воспользовались четырьмя образцами женского молока (№№ 1–4). В этих образцах мы параллельно определяли содержание лактоферрина с помощью традиционного метода иммуноферментного анализа (с помощью набора фирмы «ХЕМА»).

Как видно из представленной табл. 2, при разбавлении образца молока в 100 и 150 раз удается определить близкое к ожидаемому содержание лактоферрина методом FPIA.

При проверке этих же образцов женского молока методом иммуноферментного анализа показано, что для получения достоверных результатов необходимо было разбавить образцы молока более, чем в 1000 раз, поскольку метод hLF ELISA имеет более низкий предел обнаружения; однако он является более длительным и трудоемким.

Как видно из приведенных в табл. 2 результатов, количество лактоферрина в образцах женского молока, определенное методом FPIA, находится в хорошей корреляции с данными, полученными с помощью более традиционного метода ELISA.

Для верификации метода в данной статье мы смогли получить и использовать только четыре образца женского молока, которые были ранее в работе у наших коллег и хранились уже в серии разведений в замороженном виде. В статье мы показали, что переход к реальным биологическим образцам молока не вызывает возникновения новых проблем с определением лактоферрина, требующих радикально менять используемую нами методику.

Таким образом, в данной работе продемонстрирована принципиальная возможность использования однодоменных антител в качестве распознающего реагента для определения в биологической жидкости (молоке) целевого антигена (лактоферрина) методом неконкурентного FPIA. По сравнению с традиционным иммуноферментным анализом FPIA занимает всего 5 мин, связывание антиген/антитело происходит в гомогенной среде и не требует сложных операций. Данный метод показал высокую чувствительность и специфичность для определения лактоферрина человека в молоке, как в образцах козьего молока с добавленным hLF, так и в реальных образцах женского молока, и показал хорошую корреляцию с традиционным методом hLF ELISA. Флуоресцентно меченные однодоменные антитела anti-LF5 и anti-LF16 являются перспективными для создания тест-системы определения лактоферрина человека в молоке и физиологических жидкостях методом FPIA.

Вклад авторов. Еремин С.А., Тиллиб С.В., Мухаметова Л.И. – концепция и руководство работой; Мухаметова Л.И., Арутюнян Д.А. – проведение FPIA-экспериментов; Горяйнова О.С., Иванова Т.И., Тиллиб С.В. – наработка и мечение нанотел; Еремин С.А., Тиллиб С.В., Мухаметова Л.И. – обсуждение результатов исследования; Мухаметова Л.И. – написание текста; Еремин С.А., Тиллиб С.В. – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00305).

Благодарности. Мы выражаем благодарность Садчиковой Е.Р. (Институт биологии гена РАН, Москва) за предоставление для данной работы очищенного лактоферрина человека и образцов женского молока.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- González-Chávez, S. A., Arévalo-Gallegos, S., and Rascón-Cruz, Q. (2009) Lactoferrin: Structure, function and applications, *Int J. Antimicrob. Agents*, **33**, 301.e1-301.e8, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020.
- Karav, S., German, J. B., Rouquié, C., Le Parc, A., and Barile, D. (2017) Studying lactoferrin N-glycosylation, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 870, doi: 10.3390/ijms18040870.
- Rosa, L., Cutone, A., Lepanto, M. S., Paesano, R., and Valenti, P. (2017) Lactoferrin: a natural glycoprotein involved in iron and inflammatory homeostasis, *J. Mol. Sci.*, **18**, 1985, doi: 10.3390/ijms18091985.
- Adlerova, L., Bartoskova, A., and Faldyna, M. (2008) Lactoferrin: a review, *Vet. Med.*, **53**, 457-468, doi: 10.17221/1978-VETMED.
- Murphy, M. E., Kariwa, H., Mizutani, T., Tanabe, H., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., and Takashima, I. (2001) Characterization of in vitro and in vivo antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus, *J. Vet. Med. Sci.*, **63**, 637-645, doi: 10.1292/jvms.63.637.
- Legrand, D., and Mazurier, J. (2010) A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity, *Biometals*, **23**, 365-376, doi: 10.1007/s10534-010-9297-1.
- Baker, E. N. (2004) Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release, *BioMetals*, **17**, 209-216, doi: 10.1023/B:BIOM.0000027694.
- Nagasako, Y., Saito, H., Tamura, Y., Shimamura, S., and Tomita, M. (1993) Iron-binding properties of bovine lactoferrin in iron-rich solution, *J. Dairy Sci.*, **76**, 1876-1881, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(93)77520-7.
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P., and O'Mahony, J. (2015) Biologically Active Compounds in Milk, in: *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Springer. Cham, doi: 10.1007/978-3-319-14892-2_11.
- Садчиков П. Е., Гольдман И. Л., Намазова-Баранова Л. С., Яцык Г. В., Боровик Т. Э., Черноусов А. Д., Романченко А. И., Садчикова Е. Р., Лукоянова О. Л., Звонкова Н. Г., Беляева И. А. (2016) Лактоферрин в проблеме противoinфекционной защиты детей первого года жизни, *Педиатрическая фармакология*, **13**, 607-613, doi: 10.15690/pf.v13i6.1677.
- Chen, P.-W., and Mao, F.C. (2004) Detection of lactoferrin in bovine and goat milk by enzyme-linked immunosorbent assay, *J. Food Drug Anal.*, **12**, doi: 10.38212/2224-6614.2653.
- Tomassetti, M., Martini, E., Campanella, L., Favero, G., Sanzò, G., and Mazzei, F. (2013) Lactoferrin determination using flow or batch immunosensor surface plasmon resonance: Comparison with amperometric and screen-printed immunosensor methods, *Sens. Actuat. B Chem.*, **179**, 215-225, doi: 10.1016/j.snb.2012.09.096.
- Chen, H., Wang, Z., Fan, F., Shi, P., Xu, X., Du, M., and Wang, C. (2021) Analysis method of lactoferrin based on uncoated capillary electrophoresis, *eFood*, **2**, 147-153, doi: 10.2991/efood.k.210720.001.
- Zhang, J., Lai, S., Cai, Z., Chen, Q., Huang, B., and Ren, Y. (2014) Determination of bovine lactoferrin in dairy products by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on tryptic signature peptides employing an isotope-labeled winged peptide as internal standard, *Anal. Chim. Acta*, **829**, 33-39, doi: 10.1016/j.aca.2014.04.025.
- Palmano, K. P., and Elgar, D. F. (2002) Detection and quantitation of lactoferrin in bovine whey samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene, *J. Chromatogr. A*, **947**, 307-311, doi: 10.1016/s0021-9673(01)01563-1.
- Tsakali, E., Chatzilazarou, A., Houhoula, D., Koulouris, S., Tsaknis, J., and Van Impe, J. (2019) A rapid HPLC method for the determination of lactoferrin in milk of various species, *J. Dairy Res.*, **86**, 238-241, doi: 10.1017/s0022029919000189.
- Nithipatikom, K., and McGown, L. B. (1987) Homogeneous immunochemical technique for determination of human lactoferrin using excitation transfer and phase-resolved fluorometry, *Anal. Chem.*, **59**, 423-427, doi: 10.1021/ac00130a010.
- Chen, M. X., Wen, F., Zhang, Y. D., Li, P., Zheng, N., and Wang, J. Q. (2019) Determination of native lactoferrin in milk by HPLC on HiTrap Heparin HP column, *Food Anal. Method.*, **12**, 2518-2526, doi: 10.1007/s12161-019-01572-x.
- Wang, N., Jiang, X., Xu, X., Liu, Y., Liu, L., Lu, A., Lu, J., and Luan, Y. (2021) An aptamer affinity column for purification and enrichment of lactoferrin in milk, *J. Chromatography B*, **1178**, 122724, doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122724.
- Hendrickson, O. D., Taranova, N. A., Zherdev, A.V., Dzantiev, B. B., and Eremin, S. A. (2020) Fluorescence polarization-based bioassays: new horizons, *Sensors*, **20**, 7132, doi: 10.3390/s20247132.
- Zhang, H., Yang, S., De Ruyck, K., Beloglazova, N., Eremin, S. A., De Saeger, S., Zhang, S., Shen, Ji., and Wang, Z. (2019) Fluorescence polarization assays for chemical contaminants in food and environmental

- analyses, *Trends Anal. Chem.*, **114**, 293-313, doi: 10.1016/j.trac.2019.03.013.
22. Nishiyama, K., Fukuyama, M., Maeki, M., Ishida, A., Tani, H., Hibara, A., Tokeshi, M. (2021) One-step non-competitive fluorescence polarization immunoassay based on a Fab fragment for C-reactive protein quantification, *Sensors Actuators B Chem.*, **326**, 128160, doi: 10.1016/j.snb.2020.128982.
 23. Nishiyama, K., Takeda, Y., Takahashi, K., Fukuyama, M., Maeki, M., Ishida, A., Tani, H., Shigemura, K., Hibara, A., Ogawa, H., and Tokeshi, M. (2021) Non-competitive fluorescence polarization immunoassay for detection of H5 avian influenza virus using a portable analyzer, *Anal. Bioanal. Chem.*, **413**, 4619-4623, doi: 10.1007/s00216-021-03193-y.
 24. Nishiyama, K., Takahashi, K., Fukuyama, M., Kasuya, M., Imai, A., Usukura, T., Maishi, N., Maeki, M., Ishida, A., Tani, H., Hida, K., Shigemura, K., Hibara, A., and Tokeshi, M. (2021) Facile and rapid detection of SARS-CoV-2 antibody based on a noncompetitive fluorescence polarization immunoassay in human serum samples, *Biosens. Bioelectron.*, **190**, 113414, doi: 10.1016/j.bios.2021.113414.
 25. Takeda, Y., Yonezawa, Y., Asake, S., Ogawa, H., and Imai, K. (2020) A fluorescence polarization immunoassay for the rapid detection of antibody against influenza A virus in chicken and goat sera, *J. Vet. Diagn. Invest.*, **32**, 887-891, doi: 10.1177/1040638720960046.
 26. Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., and Hamers, R. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains, *Nature*, **363**, 446-448, doi: 10.1038/363446a0.
 27. Flajnik, M. F., and Kasahara, M. (2010) Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures, *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 47-59, doi: 10.1038/nrg2703.
 28. Тиллиб, С. В., Иванова, Т. И., Васильев Л. А. (2010) Фингерпринтный анализ селекции наноантител методом фагового дисплея с использованием двух вариантов фагов-помощников, *Acta Naturae*, **2**, 100-108.
 29. Tillib, S. V., Privezentseva, M. E., Ivanova, T. I., Vasilev L. F., Efimov, G. A., Gurskiy, Ya. G., Georgiev, G. P., Goldman, I. L., and Sadchikova, E. R. (2014) Single-domain antibody-based ligands for immunoaffinity separation of recombinant human lactoferrin from the goat lactoferrin of transgenic goat milk, *J. Chromatogr. B*, **949-950**, 48-57, doi: 10.1016/j.jchromb.2013.12.034.
 30. Горяйнова О. С., Иванова Т. И., Рутовская М. В., Тиллиб С. В. (2017) Метод параллельного и последовательного генерирования однодоменных антител для протеомного анализа плазмы крови человека, *Мол. биол.*, **51**, 985-996.
 31. Тиллиб С. В. (2020) Перспективы использования однодоменных антител в биомедицине, *Мол. биол.*, **54**, 362-373, doi: 10.31857/S0026898420030167.
 32. Schreiber, A. B., and Yfimovich, J. (1983) Quantitative fluorometric assay for detection and characterization of Fc receptors, *Meth. Enzymol.*, **93**, 147-155, doi: 10.1016/s0076-6879(83)93039-2.
 33. Pace, C. N, Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Sci.*, **11**, 2411-23, doi: 10.1002/pro.5560041120.
 34. Chung, T., and Raymond, K. (1993) Lactoferrin: the role of conformational changes in its iron binding and release, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6765-6768, doi: 10.1021/ja00068a037
 35. Мухаметова Л. И., Крылов В. Б., Соловьев А. С., Яшунский Д. В., Матвеев А. Л., Тикунова Н. В., Еремин С. А., Нифантьев Н. Э. (2021) Характеристика аффинности анти-β-(1→3)-d-глюканового моноклонального антитела 3G11 методом поляризационно-флуоресцентного иммуноанализа, *Известия Академии наук. Сер. хим.*, **5**, 975-980.
 36. Nevinskii, A. G., Soboleva, S. E., Tuzikov, F. V., Buneva, V. N., and Nevinsky, G. A. (2009) DNA, oligosaccharides, and mononucleotides stimulate oligomerization of human lactoferrin, *J. Mol. Recognit.*, **22**, 330-342, doi: 10.1002/jmr.952.
 37. Zhang, S., Chen, L., Kumar, S., Wu, L., Lawrence, D. S., and Zhang, Z.-Y. (2007) An affinity-based fluorescence polarization assay for protein tyrosine phosphatases, *Methods*, **42**, 261-267, doi: 10.1016/j.ymeth.2007.02.008.

FLUORESCENCE POLARIZATION IMMUNOASSAY OF HUMAN LACTOFERRIN IN MILK USING SMALL SINGLE-DOMAIN ANTIBODIES

L. I. Mukhametova^{1*}, S. A. Eremin¹, D. A. Arutyunyan¹, O. S. Goryainova²,
T. I. Ivanova², and S. V. Tillib^{2*}

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 119234 Moscow, Russia; email: liliya106@mail.ru

² Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia; email: tillib@genebiology.ru

Due to its unique structure and properties, lactoferrin in human milk (hLF) has many nutritional and health-promoting functions for infants, such as protection against bacterial infections and inflammation. A lack of lactoferrin in human milk or formula milk can lead to an undesirable weakening of the infant's immune system. A promising method for the quantitative determination and control of the concentration of hLF in milk and dairy products can be a non-competitive format of polarization fluorescence immunoassay (FPIA), which does not require mandatory separation of bound and free forms of proteins and long-term sample preparation. The use of fluorescently labeled single-domain camel antibodies ("nanobodies") as recognition reagents makes it possible to quantify relatively larger molecules (antigens), in particular, human lactoferrin by FPIA. In this work, conjugates with fluorescein isothiocyanate (FITC) of two previously obtained anti-hLf5 and anti-hLf16 nanobodies, which specifically recognize various human lactoferrin epitopes, but do not recognize goat lactoferrins, were used. The kinetics of the interaction of FITC labeled nanobodies with hLF was studied. The dissociation constants (K_D) for antibodies anti-Lf5-FITC and anti-Lf16-FITC with hLF were determined to be 3.2 ± 0.3 nM and 4.9 ± 0.4 nM, respectively, indicating their high affinity binding to human lactoferrin. The FPIA protocol was developed, and the concentrations of FITC-anti-hLf5 and FITC-anti-hLf16 were selected, which give the optimal fluorescent signal and a stable polarization value. The dependence of fluorescence polarization on hLF concentration for non-competitive FPIA with FITC-anti-hLf5 antibodies was obtained and analytical characteristics were determined: detection limit 2.1 ± 0.2 $\mu\text{g/ml}$ and linear range for determining concentrations 3-10 $\mu\text{g/ml}$. The FPIA method is usually used to determine low molecular weight substances, but high molecular weight proteins can be determined using fluorescein-labeled small nanobodies; in particular, this work shows the possibility of quantitative determination of human lactoferrin in milk by the FPIA method using fluorescently labeled nanobodies as a recognition reagent.

Keywords: single-domain antibody, nanobody, lactoferrin, fluorescence polarization, immunoassay