



УДК 612.398.145.3+535.372

ПРИМЕНЕНИЕ ОДНОДОМЕННЫХ НАНОТЕЛ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ТРАНСФЕРРИНА МЕТОДОМ ПОЛЯРИЗАЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

© 2025 г. Л. И. Мухаметова*, #, С. А. Еремин*, И. В. Михура**, О. С. Горяйнова***,
А. М. Сачко***, Т. И. Иванова***, С. В. Тиллиб***, #

* Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/3

** ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*** ФГБУН “Институт биологии гена” РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 34/5

Поступила в редакцию 05.09.2024 г.

После доработки 18.09.2024 г.

Принята к публикации 19.09.2024 г.

Трансферрин (Tf) в плазме крови существует в двух формах: железосодержащей holo-Tf и железонесодержащей apo-Tf формах. Количественное соотношение этих форм в плазме крови человека – важный биохимический маркер заболеваний, связанных с дефицитом или избытком железа. Применение метода поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (FPIA) и использование рекомбинантных нанотел верблюда в качестве распознающего реагента для экспрессного определения holo-Tf и apo-Tf позволит разработать быстрые метод определения двух конформаций трансферрина. Синтезированы и охарактеризованы конъюгаты нанотел верблюда аTf1 и аTf2 к holo- и apo-формам Tf человека с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC). Подобраны концентрации конъюгатов FITC-аTf1 и FITC-аTf2 (2.5–5 нМ) с оптимальным соотношением сигнал/шум и исследована кинетика связывания FITC-аTf1 и FITC-аTf2 с holo- и apo-Tf методом поляризации флуоресценции. Показано, что полное связывание конъюгатов FITC-аTf1 и FITC-аTf2 с holo- и apo-Tf наблюдается через 15 и 5 мин инкубации соответственно. Определены равновесные константы диссоциации комплексов FITC-аTf1*holo-Tf и FITC-аTf2*apo-Tf, которые составили 30.7 ± 0.3 и 15.3 ± 0.2 нМ, соответственно. Продемонстрировано, что инкубация конъюгатов FITC-аTf1 и FITC-аTf2 с другими белками человека – лактоферрином, сывороточным альбумином и лизоцимом – не приводит к изменению сигнала поляризации флуоресценции, что свидетельствует о высокой специфичности анализа. Показано, что пары реагентов FITC-аTf1/apo-Tf и FITC-аTf2/holo-Tf не демонстрировали связывания между собой, что подтверждает аффинность конъюгатов FITC-аTf1 и FITC-аTf2 к holo- и apo-Tf, соответственно. В данной работе показана возможность определения двух форм трансферрина в физиологических жидкостях человека методом FPIA, которое может иметь диагностическое значение, а применение портативного флуоресцентного анализатора позволит проводить данный анализ вне стен специализированных лабораторий.

Ключевые слова: однодоменное антитело, нанотело, holo-трансферрин, apo-трансферрин, поляризационный флуоресцентный иммуноанализ

DOI: 10.31857/S0132342325020063, **EDN:** LCGAIP

Сокращения: FITC – флуоресцеинизотиоцианат, изомер 1; FP – поляризация флуоресценции; FPIA – поляризационный флуоресцентный иммуноанализ; LF – лактоферрин; mP – поляризация флуоресценции; Nb – нанотело; Tf – трансферрин; holo-Tf – железосодержащий трансферрин; apo-Tf – железонесодержащий трансферрин; TfR – рецептор трансферрина; TIBC – общая железосвязывающая способность; TSAT – процент насыщения трансферрина.

Автор для связи: (эл. почта: liliya106@mail.ru; tillib@genebiology.ru).

ВВЕДЕНИЕ

Метаболизм железа – один из самых сложных процессов в организме млекопитающих, в котором участвуют многие органы и ткани, такие как кишечник, костный мозг, селезенка, печень и др. [1, 2]. Трансферрин (Tf) плазмы крови играет центральную роль в метаболизме железа, осуществляя его транспорт между тканями организма в растворимой и нетоксичной форме и играя защитную роль в связывании свободного железа [3, 4].

Трансферрин представляет собой гликопротеин (~680 а.о.) с массой 80 кДа. Tf состоит из двух гомологичных *N*- и *C*-долей, каждая из которых связывает по одному иону Fe^{3+} [5]. *N*-концевая доля состоит из остатков 1–330, *C*-концевая – из остатков 340–680, и эти две доли соединены небольшой пептидной последовательностью (остатки 330–340) [5].

К трансферринам принадлежит собственно белок под названием трансферрин, а также сывороточный трансферрин, овотрансферрин, лактоферрин, меланотрансферрин и некоторые другие. Гепатоциты вырабатывают сывороточный трансферрин, находящийся в сыворотке, спинномозговой жидкости и т.д. Клетки эпителия слизистых оболочек вырабатывают лактоферрин (LF), который обнаруживается в молоке [6], слезе, слюне, а также в клетках крови, таких как нейтрофилы и лейкоциты [7]. Овотрансферрин обнаруживается в белке птичьего яйца.

Трансферрины образуют важнейшую систему регуляции железа, доставляя его из кишечника или мест разрушения гема в пролиферирующие клетки. Таким образом, трансферрин играет жизненно важную роль как в гомеостазе железа, так и при заболеваниях, связанных с недостатком железа в организме, например, при анемии, функциональном железодефиците у онкологических больных, патологии печени и почек и др. [8–13].

При связывании с ионами железа трансферрин претерпевает конформационные изменения. Без связанных ионов железа молекула Tf демонстрирует открытую конформацию (апоформу, apo-Tf), тогда как связывание ионов железа приводит к образованию компактной структуры белка (закрытая конформация, holo-Tf) [14, 15]. Наличие (отсутствие) полостей при

высвобождении (связывании) ионов железа оказывается наиболее характерным структурным изменением белка. Конформационное изменение, связанное с переходом между формами holo- и apo-трансферрина, влияет на относительную ориентацию *N*- и *C*-долей внутри молекул Tf, соединительная область между ними перестраивается [8]. Структурные изменения трансферринов были хорошо изучены как экспериментально, так и с помощью компьютерного моделирования [14]. Наиболее подходящим диагностическим тестом на дефицит или избыток железа служит определение железосодержащей и железонесодержащей форм трансферрина [16–18]. Таким образом, выявление соотношения holo- и apo-форм трансферрина может быть достаточно информативным источником содержания железа в организме.

Состояния как дефицита, так и избытка железа вредны для здоровья человека [10]. Важным биохимическим маркером содержания железа в организме служит индекс насыщения трансферрина (TSAT), который отражает долю связанного с трансферрином железа от общего количества связующих сайтов этого белка. Определение TSAT получило широкое распространение в связи с доступностью таких методов измерения, как колориметрия [19], турбидиметрия, нефелометрия и иммунохимия [9].

Отношение количества трехвалентного железа, связанного с Tf, и максимального количества железа, которое Tf может связать (общая железосвязывающая способность, TIBC), определяется как процент насыщения трансферрина (TSAT). Этот клинический параметр отражает содержание железа в организме, поэтому для диагностики как дефицита, так и избытка железа его используют в сочетании с другими биомаркерами сыворотки крови, такими как ферритин, сывороточный растворимый рецептор Tf (TfR) и/или гепсидин [9, 11, 20, 21]. Более того, высокий уровень TSAT был предложен в качестве биомаркера риска различных болезней, таких как сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет и рак [9, 11]. Результаты нескольких клинических и доклинических исследований показали, что повреждение головного мозга, вызванное ишемией, увеличивается в результате предшествующей системной перегрузки организма железом [9, 11, 20]. TSAT обычно рассчитывается по отношению сывороточного железа к TIBC [9]:

$$TSAT = \frac{\text{сывороточное Fe}^{3+}}{\text{TIBC}} \times 100\%. \quad (1)$$

Оба параметра измеряются в клинических лабораториях колориметрическими методами [9]. Содержание сывороточного железа определяется напрямую с использованием хромофоров, таких как феррозин или батоферантролин [9, 22]. Измерение TIBC можно проводить как прямыми, так и непрямыми методами [23, 24], однако они ненадежны, поскольку предполагают, что все сывороточное железо связано с Tf [9, 25], но различия в значении TSAT могут доходить до 35% среди некоторых коммерческих методов. Известен метод прямого определения TSAT с помощью электрофореза с таким реагентом, как мочевина, позволяющий отдельно определять apo- и holo-Tf. Этот метод оказался более точным и надежным, чем вышеупомянутые методы [26–29]. Однако он требует достаточно много времени для анализа, его невозможно автоматизировать и миниатюризировать, что затрудняет использование данного метода в клинической практике.

Поэтому крайне необходима разработка новых биоаналитических подходов, которые позволят не только точно определять концентрацию трансферрина, но также дифференцировать его железосвязанную (holo-Tf) и железонесвязанную форму (apo-Tf). Большой интерес вызывают методы, предполагающие использование на месте оказания медицинской помощи (РОСТ). В настоящее время РОСТ оказывается главным приоритетом Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [30]. Недорогие РОСТ-системы определения TSAT значительно ускорят и облегчат диагностику железодефицитной анемии и/или позволят принять быстрое решение при оценке распространения инсульта [29]. Для определения TSAT предложена РОСТ-технология, использующая сочетание анализов на основе смартфона и бумажного носителя, поскольку смартфон обеспечивает простое колориметрическое обнаружение и мобильность, а бумага является чрезвычайно недорогим расходным материалом [31, 32].

В данной работе мы предлагаем новый подход к измерению концентраций различных форм трансферрина, основанный на определении количеств apo- и holo-Tf методом поляризации флуоресценции (FP) с применением миниатюрных однодоменных антител – так называемых нанотел (Nb). Рекомбинантные Nb имеют небольшой

размер (13–20 кДа) и могут демонстрировать константы равновесной диссоциации комплексов с антигенами вnano- и пикомолярном диапазоне, сравнимые с другими моноклональными антителами, т.е. небольшой размер Nb не оказывает отрицательного влияния на их аффинность [33–35]. Nb демонстрируют высокую стабильность при воздействии высоких температур в течение длительного времени и способны повторно принимать исходную конфигурацию после денатурации [36, 37]. Большим преимуществом Nb служит легкость их производства и относительная дешевизна по сравнению со стандартными моноклональными антителами, поскольку они хорошо экспрессируются в бактериальных системах. Особая структура нанотел имеет ряд преимуществ относительно традиционных моноклональных антител. Паратопы нанотел могут связываться с вогнутыми частями молекул антигенов, часто недоступными для более крупных традиционных моноклональных антител [38, 39]. Данная особенность нанотел позволяет изучать конформационные изменения в белках. Все эти характеристики в совокупности делают Nb идеальными функциональными кандидатами для высокочувствительных методов определения различных антигенов. В настоящее время проводится множество исследований и разработок по применению нанотел в диагностике рака [39], инфекционных болезней (COVID-19 и СПИД и т.д.) [39, 40], для быстрой и масштабируемой очистки белковых комплексов [41].

Недавно были получены и охарактеризованы высокоспецифические однодоменные антитела (нанотела), узнающие преимущественно holo-Tf(aTf1) или apo-Tf(aTf2) [42]. Было показано, что параллельное использование иммуносорбентов, создаваемых на основе этих нанотел, позволяет выявлять изменения в относительной представленности apo- и holo-Tf в биологических жидкостях человека. Увеличение относительной доли apo-Tf в биологических жидкостях выявлено при ряде онкологических заболеваний человека [12, 43].

Метод поляризации флуоресценции перспективен для определения белков, их взаимодействий, вычисления кинетических параметров и т.д. [35]. Нанотела, ввиду своего небольшого размера, могут быть помечены флуоресцентной меткой и использованы в качестве распознающих реагентов в неконкурентном FP-анализе. Преимуществом FP-

анализа служит маркировка только лиганда, тогда как методы с переносом флуоресценции требуют маркировки как мишени, так и лиганда.

Более прямым и экономичным методом количественного определения и контроля концентрации Tf в моче с помощью специфических нанотел может стать неконкурентный формат поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (FPIA), не требующий длительной пробо подготовки образцов. Ранее мы показали принципиальную возможность применения этого метода для определения высокомолекулярных белков (на модели лактоферрина человека) в разбавленном молоке при использовании в качестве распознающего реагента флуоресцентно-меченых однодоменных антител существенно меньшего размера, чем детектируемый белок [35].

Трансферрин человека, как уже упоминалось выше, при связывании с железом претерпевает конформационные изменения, и аро-форма Tf трансформируется в железосодержащую *holo*-форму. В данной работе рассмотрена возможность применения в методе FPIA в качестве распознающих реагентов полученных ранее рекомбинантных однодоменных миниатюрных нанотел верблюда для определения аро- и *holo*-форм трансферрина в физиологических жидкостях организма человека (плазма крови, моча).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе были получены и охарактеризованы FITC-меченные производные нанотел к *holo*-Tf (FITC-aTf1) и apo-Tf (FITC-aTf2). Соотношение белок/краситель aTf1(2)/FITC определяли по спектрам поглощения меченых антител в 10 мМ PBS (pH 7.4) по уравнению (2):

$$\frac{aTf}{FITC} = \frac{A_{492} \times \epsilon_{aTf}}{(A_{280} - C \times A_{492})\epsilon_{FITC}}, \quad (2)$$

где A_{492} – оптическая плотность раствора FITC-aTf1(2) на длине волны максимума поглощения FITC (492 нм), A_{280} – оптическая плотность образца на длине волны максимума поглощения антител (280 нм), ϵ_{aTf} – молярный коэффициент экстинкции нанотел aTf1 и aTf2 на длине волны 280 нм, ϵ_{FITC} – молярный коэффициент экстинкции FITC на длине волны максимума поглощения ($73\,000\,M^{-1}\,cm^{-1}$), С – фактор коррекции для FITC на длине волны 280 нм ($c = 0.35$).

Соотношение aTf1(2)/FITC составило $\sim 1:2$; оно оказалось оптимальным, поскольку дальнейшее увеличение соотношения белок/краситель не приводит к увеличению флуоресцентного сигнала.

Необходимым условием для разработки эффективных диагностических систем служит полная характеристика специфичности и аффинности применяемых антител [35, 44]. Для аналитического метода на основе FPIA важно определить константы связывания антигена с антителом в растворе, которые могут существенно отличаться от констант связывания с антителами, иммобилизованными на поверхности.

Для разработки протокола FPIA были выбраны концентрации FITC-aTf1 и FITC-aTf2, дающие оптимальный сигнал интенсивности флуоресценции и стабильное значение поляризации флуоресценции. При концентрациях в интервале 2.5–5 нМ соотношение сигнал/шум оказалось оптимальным [35]. Флуоресцентно-меченные антитела FITC-aTf1 и FITC-aTf2 демонстрировали значение поляризации флуоресценции 173 ± 1 и 180 ± 1 (mP) соответственно. При добавлении *holo*- и аро-Tf к рабочим растворам FITC-aTf1 и FITC-aTf2 значение FP увеличивалось, что свидетельствовало о связывании белок/aTf1 и белок/aTf2. Изучение кинетики связывания FITC-aTf1 с *holo*-Tf и FITC-aTf2 с аро-Tf показало, что при $25^\circ C$ полное связывание наблюдается через 5 и 15 мин инкубации соответственно (рис. 1). Величина FP была стабильна в течение часа.

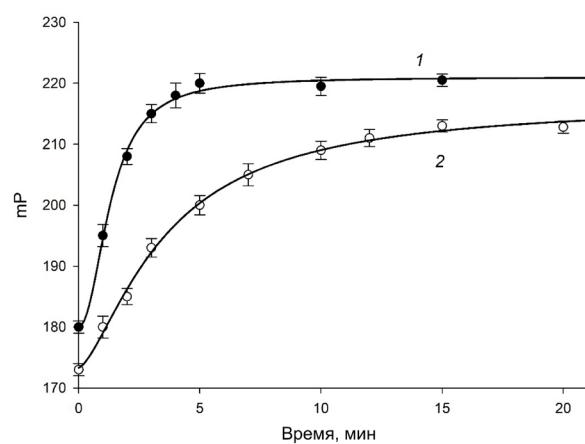


Рис. 1. Кинетика связывания конъюгатов FITC-aTf2 (1) и FITC-aTf1 (2) 2 нМ с аро- и *holo*-Tf соответственно. Конечные концентрации аро- и *holo*-Tf – 3 мкг/мл; pH 7.4, $25^\circ C$.

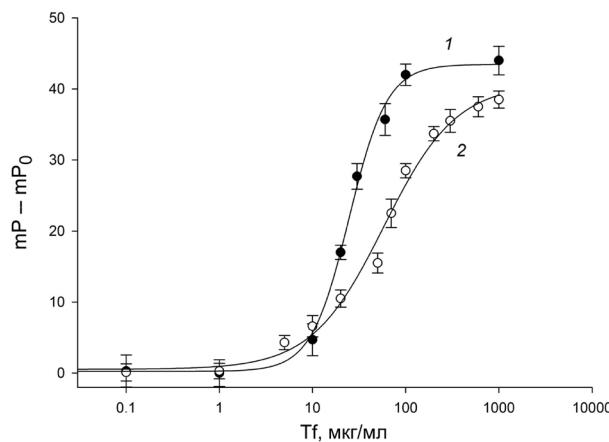
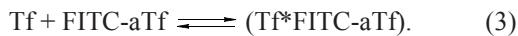


Рис. 2. Изменение сигнала FP в зависимости от концентрации апо-Tf (1) и holo-Tf (2) в присутствии 2.5 нМ FITC-aTf2 (1) и FITC-aTf1 (2); pH 7.4, 25°C.

На рис. 2 представлено изменение сигнала FP при связывании FITC-aTf1 и FITC-aTf2 с различными концентрациями holo- и апо-Tf соответственно. Можно видеть, что с ростом концентрации holo- и апо-Tf величина FP при взаимодействии с рабочими растворами FITC-aTf1 и FITC-aTf2 увеличивается. Изменение поляризации флуоресценции (ΔmP) составило ~40 ед. Данная величина была получена благодаря применению однодоменных нанотел, имеющих небольшие молекулярные веса (~20 кДа). Константы диссоциации (K_d) комплексов FITC-aTf1*holo-Tf и FITC-aTf2*апо-Tf оценивались, как описано ранее [35].

Известно, что метод FPIA удобен для характеристики взаимодействий белок/лиганд [35]. Уравнение (3) описывает реакцию связывания коньюгатов FITC-aTf1 и FITC-aTf2 с двумя формами белка, holo-Tf и апо-Tf:



K_d для комплекса Tf*FITC-aTf выражается следующим образом:

$$K_d = \frac{[Tf][FITC-aTf]}{[Tf^*FITC-aTf]}. \quad (4)$$

При условии, что исходная концентрация Tf и флуоресцентно-меченного нанотела близки, текущие концентрации Tf и FITC-aTf равны:

$$[Tf] = [Tf]_0 - [Tf^* FITC - aTf]$$

$$[FITC - aTf] = [FITC - aTf]_0 - [Tf^* FITC - aTf]. \quad (5)$$

При этом уравнение (4) принимает вид:

$$K_d = \frac{([Tf]_0 - [Tf^* FITC - aTf])([FITC - aTf]_0 - [Tf^* FITC - aTf])}{[Tf^* FITC - aTf]}. \quad (6)$$

Если обозначить варьируемую концентрацию $[Tf^* FITC - aTf]$ символом C_x , то

$$K_d = \frac{([Tf]_0 - C_x)([FITC - aTf]_0 - C_x)}{C_x}. \quad (7)$$

Доля связанного трансферрина с нанотелом F_b (отношение концентрации связанного с антителом трейсера C_x к исходной концентрации трейсера $[FITC - aTf]_0$) определяется так:

$$F_b = \frac{C_x}{C_0} = \frac{mP - mP_0}{(mP_{max} - mP)Q + (mP - mP_0)}, \quad (8)$$

где mP – наблюдаемая степень поляризации образца; mP_0 – степень поляризации свободного флуоресцентно-меченного коньюгата FITC-aTf1 или FITC-aTf2; mP_{max} – степень поляризации комплексов holo-Tf*FITC-aTf1 или апо-Tf*FITC-aTf2 при полном связывании; Q – отношение интенсивностей флуоресценции связанной формы к свободной. При измерении сигнала поляризации флуоресценции образцов интенсивность флуоресценции комплексов holo-Tf*FITC-aTf1 или апо-Tf*FITC-aTf2 не изменялась при связывании с антителами, поэтому $Q = 1$.

Выражение (7) преобразуется в квадратное уравнение, а C_x вычисляется как один из его корней. После подстановки решения уравнения (7) в выражение (8) получаем следующее уравнение:

$$F_b = \frac{mP - mP_0}{mP_{max} - mP_0} = \frac{a - \sqrt{a^2 - 4 [FITC - aTf]_0 [Tf]_0}}{2 [FITC - aTf]_0}, \quad (9)$$

где $a = K_d + [FITC - aTf]_0 + [Tf]_0$.

K_d для пар FITC-aTf2/апо-Tf и FITC-aTf1/ holo-Tf определяли с использованием постоянных концентраций коньюгатов нанотел с FITC, FITC-aTf2 и FITC-aTf1, она составила 2.0 нМ. При данных концентрациях флуоресцентно-меченных нанотел детектировались устойчивые значения сигнала FP и интенсивности флуоресценции, оптимальное соотношение сигнал/шум. Концентрации FITC-aTf1 и FITC-aTf2 были ниже ожидаемой величины K_d и увеличивающихся концентраций holo- и апо-Tf, превосходящих ожидаемую величину K_d . Концентрации holo- и апо-Tf варьировали от 0 до 0.5 мкМ. Величины FP (mP) были аппроксимированы по уравнению (9) (рис. 3) и вычислены K_d . Равновесные K_d комплексов FITC-aTf2*апо-Tf и FITC-aTf1*holo-Tf составили 15.3 ± 0.2 и 30.7 ± 0.3 нМ соответ-

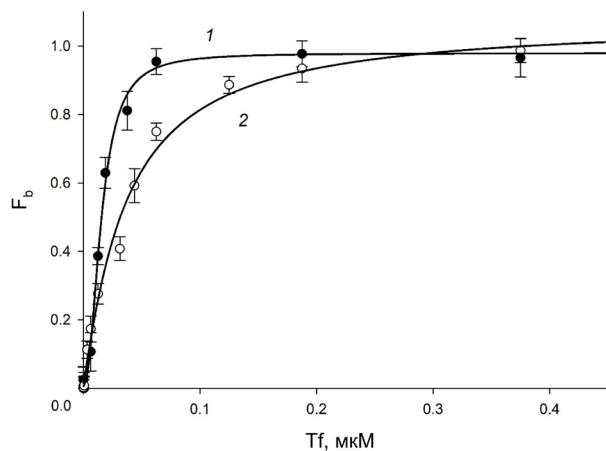


Рис. 3. Зависимость соотношения концентрации связанных с антителом тройсера C_x от исходной концентрации тройсера FITC-aTf₀ (Fb) от концентрации аро-Tf (1) и holo-Tf (2) при постоянных концентрациях флуоресцентно-меченные нанотел FITC-aTf2 (1) и FITC-aTf1 (2) 2 нМ; pH 7.4, 25°C.

ственno. Как видно, оба антитела имеют достаточно низкие K_d , что свидетельствует о высокояффинном связывании с соответствующими формами трансферрина.

Специфичность полученных нанотел FITC-aTf1 и FITC-aTf2 была изучена дополнительно. Белки, входящие в состав матрицы физиологических жидкостей, как и белки, которые часто используются в приготовлении буферов или структурно подобные трансферрину, потенциально могут влиять на значение сигнала FP и на точность анализа. Мы исследовали специфичность связывания нанотел FITC-aTf1 и FITC-aTf2 с рядом других белков – лактоферрином человека (HLF), сывороточным альбумином быка (BSA) и человека (HSA), лизоцимом человека (HLYZ) – в неконкурентном FPIA. К рабочим растворам нанотел FITC-aTf1 и FITC-aTf2 добавляли вышеуказанные белки в концентрации 1 мг/мл и измеряли сигнал поляризации флуоресценции через 15 и 5 мин инкубации. При данных концентрациях потенциальных кросс-реагентов изменения сигнала FP практически не наблюдалось, что свидетельствует о высокой аффинности используемых нанотел FITC-aTf1 и FITC-aTf2 к holo-Tf и apo-Tf соответственно (рис. 4).

Для определения концентрации аро-Tf и holo-Tf были построены калибровочные зависимости изменения сигнала FP от концентрации соответствующих белков (рис. 5). Точность эксперимента была продемонстрирована методом “введенено/найдено”. Были приготовлены два образца в

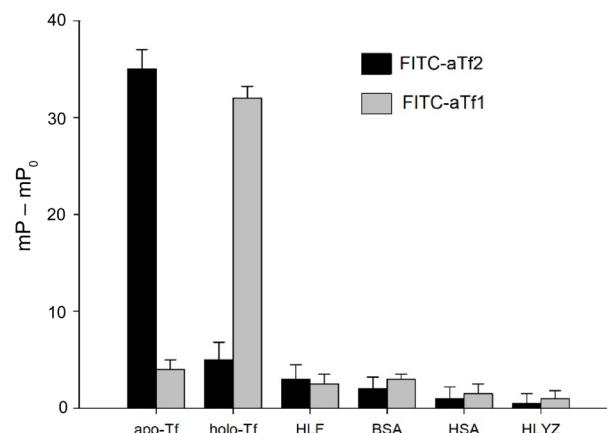


Рис. 4. Специфичность нанотел FITC-aTf1 и FITC-aTf2 при взаимодействии с различными белками; pH 7.4, 25°C.

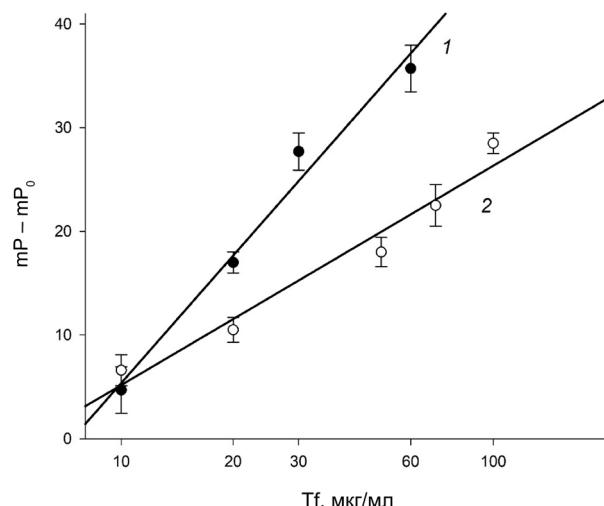


Рис. 5. Линейный диапазон калибровочных зависимостей для определения аро-Tf (1) и holo-Tf (2); pH 7.4, 25°C.

буфере “искусственная моча” с известными концентрациями аро- и holo-Tf при их различном соотношении. В этих образцах были определены концентрации аро- и holo-Tf с использованием нанотел FITC-aTf2 и FITC-aTf1 соответственно, результаты представлены в табл. 1.

Как видно из данных табл. 1, процент открытия аро- и holo-Tf составляет 93–112%, что свидетельствует о возможности определения двух форм белка в реальных образцах. Из этих экспериментов видно, что в тесте “введенено/найдено” концентрации аро-формы белка несколько выше, чем holo-формы. Это может быть вызвано тем, что в буфере holo-форма может незначительно терять железо, и концентрация железосвязанной формы снижается, а свободной формы – увеличивается.

Таблица 1. Результаты теста “введено/найдено”

Образец	Форма Tf	Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	Открытие, %
1	apo-Tf	40	45.0 ± 1.5	112
	holo-Tf	60	56.5 ± 1.0	93
2	apo-Tf	30	32.2 ± 1.3	106
	holo-Tf	50	47.5 ± 1.1	94

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. FITC (флуоресцеинизотиоцианат, изомер 1, Sigma-Aldrich, США), верблюжьи нанотела против holo- и apo-трансферрина человека – aTf1 (20.1 кДа) и aTf2 (20.0 кДа) соответственно, были наработаны как описано ранее [44], лактоферрин человека (HLF), holo- и apo-трансферрины человека (holo-Tf и apo-Tf), бычий сывороточный альбумин (BSA), сывороточный альбумин человека (HSA), лизоцим человека (HLYZ) (Sigma-Aldrich, США).

Получение флуоресцентно-меченных нанотел к holo-Tf(aTf1) и apo-Tf(aTf2). Полученные нанотела aTf1 и aTf2 конъюгировали с FITC, как описано ранее [35], с некоторыми модификациями. К 100 мкл нанотел с концентрацией 1 мг/мл (50 мкМ) aTf1 и aTf2 в 0.05 М PBS (рН 7.4) добавляли 10 мкл FITC в 0.1 М карбонатном буфере (рН 9) до конечной концентрации 250 мкМ. Выдерживали растворы 2 ч при комнатной температуре. Непрореагировавший FITC удаляли ультрафильтрацией реакционных смесей (9000 об/мин, 10 мин) через фильтры Amicon® Ultra (Merck Millipore, Германия), 0.5 мл, с низкой сорбцией белка и фильтром 3 кДа. Операцию повторяли несколько раз до снижения оптической плотности раствора при λ_{492} до фоновых значений буфера. Полученные конъюгаты FITC-aTf1 и FITC-aTf2 характеризовали спектрофотометрически как по содержанию белка, так и по степени модификации аминогрупп [35]. Концентрации антител определяли с использованием расчетных коэффициентов экстинкции $\epsilon_{280} = 16\,000$ и $26\,150\text{ M}^{-1}\text{ см}^{-1}$ для aTf1 и aTf2 соответственно [42]. Молярный коэффициент экстинкции FITC = $73\,000\text{ M}^{-1}\text{ см}^{-1}$. Соотношения FITC/aTf1 и FITC/aTf2 в очищенных конъюгатах составили $\sim 2 : 1$. Флуоресцентно-меченные конъюгаты FITC-aTf1 и FITC-aTf2 были получены нами в трех незави-

симых экспериментах, вариация сигнала FP для них не превышала 10%.

Неконкурентный FPIA был выполнен на портативном флуориметре Sentry-200 (Ellie, США) $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 495/530$ нм, как описано ранее [35]. Готовили растворы флуоресцентно-меченных нанотел FITC-aTf1 и FITC-aTf2 (TWS) так, чтобы интенсивность флуоресценции раствора составляла ~ 200 тыс. ед. В пробирку из боросиликатного стекла (10 × 75 мм) помещали 950 мкл раствора антител, добавляли 50 мкл стандартного раствора apo-Tf или holo-Tf различных концентраций (0–1000 мкг/мл) и измеряли изменение сигнала поляризации флуоресценции (mP) и интенсивность исследуемого раствора после 5 или 15 мин инкубации при 25°C. Строили калибровочную зависимость изменения сигнала FP от концентрации трансферрина, по которым определяли неизвестную концентрацию белка в образцах.

Специфичность конъюгатов FITC-aTf1 и FITC-aTf2. Перекрестные реакции FITC-aTf1 и FITC-aTf2 с другими белками определяли, измеряя изменение сигнала FP при добавлении к 950 мкл рабочего раствора флуоресцентно-меченных нанотел FITC-aTf1 и FITC-aTf2 50 мкл стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина (BSA), сывороточного альбумина человека (HSA), holo- или apo-форм трансферрина человека, лактоферрина человека (HLF) и лизоцима человека (HLYZ). Концентрации стандартных растворов реагентов составляли 1 мг/мл. Каждый эксперимент был выполнен в двух повторах и трех аппаратных измерениях.

Тест “введено/найдено”. К 1 мл раствора буфера “искусственная моча” добавляли известные концентрации apo- и holo-Tf, образцы инкубировали в течение 15 мин, разбавляли в 2 раза и добавляли 50 мкл исследуемого раствора к 950 мкл TWS FITC-aTf1 и FITC-aTf2, затем измеряли изменение сигнала FP через 5 мин на

портативном флуориметре Sentry-200 (Ellie, США). По калибровочным зависимостям изменения FP сигнала от концентрации аро- и holo-Tf определяли концентрации белков и вычисляли процент открытия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированы и охарактеризованы флуоресцентно-меченные производные нанотел aTf1 и aTf2, полученные к holo- и аро-формам трансферрина человека, имеющих закрытую и открытую конформации. Методом поляризации флуоресценции изучена кинетика связывания FITC-aTf1 и FITC-aTf2 с holo-Tf и аро-Tf соответственно, рассчитаны K_d комплексов FITC-aTf1*holo-Tf и FITC-aTf2*аро-Tf. Полученные данные демонстрируют высокую аффинность нанотел FITC-aTf1 и FITC-aTf2 к holo-Tf и аро-Tf соответственно. Важно отметить, что нанотело FITC-aTf1 не связывается с аро-формой Tf, а FITC-aTf2 – с holo-формой, что позволяет различать трансферрин в различных конформациях. Показано, что полученные нанотела высокоспецифичны только к целевым белкам и не связываются с другими белками человека. Подобран формат и оптимизирован анализ двух форм трансферрина методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа. Показана возможность точного определения концентраций holo-Tf и аро-Tf с использованием рекомбинантных однодоменных миниатюрных нанотел верблюда к двум формам трансферрина методом FPIA в физиологических жидкостях организма человека на примере буфера “искусственная моча”.

Точное определение концентраций и соотношения holo- и аро-форм трансферрина может быть полезным и важным критерием содержания железа в организме человека при диагностике различных заболеваний.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

С.А. Еремин, С.В. Тиллиб – концепция и руководство работой; О.С. Горяйнова, А.М. Сачко, Т.И. Иванова – наработка однодоменных антител; Л.И. Мухаметова, И.В. Михура – эксперименты по мечению нанотел и измерению поляризационной флуоресценции; Л.И. Мухаметова – написание статьи; С.В. Тиллиб, С.А. Еремин – редактирование и внесение дополнений в статью.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tatsumi Y., Yano M., Wakusawa S., Miyajima H., Ishikawa T., Imashuku S., Takano A., Nihei W., Kato A., Kato K., Hayashi H., Yoshioka K., Hayashi K. // J. Clin. Transl. Hepatol. 2024. V. 12. P. 346–356.
<https://doi.org/10.14218/JCTH.2023.00290>
2. Sarkar J., Potdar A.A., Saidel G.M. // PLoS Comput. Biol. 2018. V. 14. e1006060.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006060>
3. Schreiner O.D., Schreiner T.G. // Front. Aging. 2023. V. 4. P. 1234958.
<https://doi.org/10.3389/fragi.2023.1234958>
4. Tandara L., Salamunic I. // Biochem. Med. (Zagreb). 2012. V. 22. P. 311–328.
<https://doi.org/10.11613/bm.2012.034>
5. Wally J., Halbrooks P.J., Vonrhein C., Rould M.A., Everse S.J., Mason A.B., Buchanan S.K. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 24934–24944.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M604592200>
6. Baker E.N., Lindley P.F. // J. Inorg. Biochem. 1992. V. 47. P. 147–160.
[https://doi.org/10.1016/0162-0134\(92\)84061-q](https://doi.org/10.1016/0162-0134(92)84061-q)
7. Ponzini E., Scotti L., Grandori R., Tavazzi S., Zambon A. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2020. V. 61. P. 9.
<https://doi.org/10.1167/iovs.61.12.9>
8. Withold W., Neumayer C., Beyrau R., Heins M.,

Schauseil S., Rick W. // Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1994. V. 32. P. 19–25.
<https://doi.org/10.1515/cclm.1994.32.1.19>

9. *Elsayed M.E., Sharif M.U., Stack A.G.* // Adv. Clin. Chem. 2016. V. 75. P. 71–97.
<https://doi.org/10.1016/bs.acc.2016.03.002>

10. *Muñoz M., García-Erce J.A., Remacha Á.F.* // J. Clin. Pathol. 2011. V. 64. P. 287–296.
<https://doi.org/10.1136/jcp.2010.086991>

11. *Szöke D., Panteghini M.* // Clin. Chim. Acta. 2012. V. 413. P. 1184–1189.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.04.021>

12. *Ivanova T.I., Klabukov I.D., Krikunova L.I., Poluektova M.V., Sychenkova N.I., Khorokhorina V.A., Vorobyev N.V., Gaas M.Y., Baranovskii D.S., Goryainova O.S., Sachko A.M., Shegay P.V., Kaprin A.D., Tillib S.V.* // J. Clin. Med. 2022. V. 11. P. 7377.
<https://doi.org/10.3390/jcm11247377>

13. *Baringer S.L., Neely E.B., Palsa K., Simpson I.A., Connor J.R.* // Fluids Barriers CNS. 2022. V. 19. P. 49.
<https://doi.org/10.1186/s12987-022-00345-9>

14. *Yang N., Zhang H., Wang M., Hao Q., Sun H.* // Sci. Rep. 2012. V. 2. P. 999.
<https://doi.org/10.1038/srep00999>

15. *Baringer S.L., Palsa K., Spiegelman V.S., Simpson I.A., Connor J.R.* // J. Biomed. Sci. 2023. V. 30. P. 36.
<https://doi.org/10.1186/s12929-023-00934-2>

16. *Bassett M.L., Halliday J.W., Ferris R.A., Powell L.W.* // Gastroenterology. 1984. V. 87. P. 628–633.

17. *MacPhail A.P., Mandishona E.M., Bloom P.D., Patterson A.C., Rouault T.A., Gordeuk V.R.* // S. Afr. Med. J. 1999. V. 89. P. 966–972.

18. *Yamanishi H., Iyama S., Yamaguchi Y., Kanakura Y., Iwatani Y.* // Clin. Chem. 2003. V. 49. P. 175–178.
<https://doi.org/10.1373/49.1.175>

19. *Huebers H.A., Eng M.J., Josephson B.M., Ekpoom N., Rettmer R.L., Labbé R.F., Pootrakul P., Finch C.A.* // Clin. Chem. 1987. V. 33. P. 273–277.

20. *Lopez A., Cacoub P., Macdougall I.C., Peyrin-Biroulet L.* // Lancet. 2016. V. 387. P. 907–916.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60865-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60865-0)

21. *Camaschella C.* // Blood Rev. 2017. V. 31. P. 225–233.
<https://doi.org/10.1016/j.blre.2017.02.004>

22. *Yamanishi H., Kimura S., Iyama S., Yamaguchi Y., Yanagihara T.* // Clin. Chem. 1997. V. 43. P. 2413–2417.
<https://doi.org/10.1093/clinchem/43.12.2413>

23. *Gambino R., Desvarieux E., Orth M., Matan H., Ackattupathil T., Lijoi E., Wimmer C., Bower J., Gunter E.* // Clin. Chem. 1997. V. 43. P. 2408–2412.
<https://doi.org/10.1093/clinchem/43.12.2408>

24. *Strzelak K., Rybkowska N., Wiśniewska A., Koncki R.* // Anal. Chim. Acta. 2017. V. 995. P. 43–51.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.10.015>

25. *Eleftheriadis T., Liakopoulos V., Antoniadi G., Stefanidis I.* // Ren. Fail. 2010. V. 32. P. 1022–1023.
<https://doi.org/10.3109/0886022X.2010.502609>

26. *Kitsati N., Liakos D., Ermeidi E., Mantzaris M.D., Vasakos S., Kyratzopoulou E., Eliadis P., Andrikos E., Kokkolou E., Sferopoulos G., Mamalaki A., Siamopoulos K., Galaris D.* // Haematologica. 2015. V. 100. P. e80–e83.
<https://doi.org/10.3324/haematol.2014.116806>

27. *Angoro B., Motshakeri M., Hemmaway C., Svirskis D., Sharma M.* // Clin. Chim. Acta. 2022. V. 531. P. 157–167.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.04.004>

28. *Agarwal R.* // Kidney Int. 2004. V. 66. P. 1139–1144.
<https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00864.x>

29. *DeGregorio-Rocasolano N., Martí-Sistac O., Ponce J., Castelló-Ruiz M., Millán M., Guirao V., García-Yébenes I., Salom J.B., Ramos-Cabrera P., Alborch E., Lizasoain I., Castillo J., Dávalos A., Gasull T.* // Redox Biol. 2018. V. 15. P. 143–158.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.11.026>

30. *Drain P.K., Hyle E.P., Noubary F., Freedberg K.A., Wilson D., Bishai W.R., Rodriguez W., Bassett I.V.* // Lancet Infect. Dis. 2014. V. 14. P. 239–249.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70250-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70250-0)

31. *Karim K., Lamaoui A., Amine A.* // J. Pharm. Biomed. Anal. 2023. V. 225. P. 115207.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115207>

32. *Arbabi Ghahroudi M., Desmyter A., Wyns L.*

Hamers R., Muyldermans S. // FEBS Lett. 1997. V. 414. P. 521–526.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01062-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01062-4)

33. *Muyldermans S.* // Annu. Rev. Biochem. 2013. V. 82. P. 775–797.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>

34. *Sockolosky J.T., Dougan M., Ingram J.R., Ho C.C., Kauke M.J., Almo S.C., Ploegh H.L., Garcia K.C.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. P. E2646–E2654.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1604268113>

35. *Mukhametova L.I., Eremin S.A., Arutyunyan D.A., Goryainova O.S., Ivanova T.I., Tillib S.V.* // Biochemistry (Moscow). 2022. V. 87. P. 1679–1688.
<https://doi.org/10.1134/s0006297922120227>

36. *Dumoulin M., Conrath K., Van Meirhaeghe A., Meersman F., Heremans K., Frenken L.G., Muyldermans S., Wyns L., Matagne A.* // Protein Sci. Publ. Protein Soc. 2002. V. 11. P. 500–515.
<https://doi.org/10.1110/ps.34602>

37. *Xu L., Song X., Jia L.* // Biotechnol. Appl. Biochem. 2017. V. 64. P. 895–901.
<https://doi.org/10.1002/bab.1544>

38. *Jovčevska I., Muyldermans S.* // BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther. 2020. V. 34. P. 11–26.
<https://doi.org/10.1007/s40259-019-00392-z>

39. *Khodabakhsh F., Behdani M., Rami A., Kazemi-Lomedasht F.* // Int. Rev. Immunol. 2018. V. 37. P. 316–322.
<https://doi.org/10.1080/08830185.2018.1526932>

40. *Mei Y., Chen Y., Sivaccumar J.P., An Z., Xia N., Luo W.* // Front. Pharmacol. 2022. V. 13. P. 963978.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.963978>

41. *Bao G., Tang M., Zhao J., Zhu X.* // EJNMMI Res. 2021. V. 11. P. 6.
<https://doi.org/10.1186/s13550-021-00750-5>

42. *Тиллиб С.В., Горяйнова О.С., Сачко А.М., Иванова Т.И.* // Acta Naturae. 2022. Т. 14. С. 98–102.
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.11663>

43. *Сачко А.М., Горяйнова О.С., Иванова Т.И., Николаева И.Ю., Тарнопольская М.Е., Бычков А.Ю., Гаас М.Я., Воробьев Н.В., Каприн А.Д., Шегай П.В., Тиллиб С.В.* // Биохимия. 2023. Т. 88. С. 1352–1365.
<https://doi.org/10.31857/S0320972523080055>

44. *Yu L., Zhong M., Wei Y.* // Anal. Chem. 2010. V. 82. P. 7044–7048.
<https://doi.org/10.1021/ac100543e>

Single-Domain Nanobodies for Determination of Conformational Changes in Transferrin and Their Use in Fluorescent Polarization Immunoassay

L. I. Mukhametova*, S. A. Eremin*, I. V. Mikhura, O. S. Goryainova***, A. M. Sachko***, T. I. Ivanova***, and S. V. Tillib***, #**

#*E-mail: liliya106@mail.ru; tillib@genebiology.ru*

**Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University,
Leninskie gory 1/3, Moscow, 119234 Russia*

***Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*

****Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 34/5, Moscow, 119334 Russia*

A method for the synthesis of aTf1 and aTf2 nanobodies conjugates, previously obtained for human holo- and apo-transferrin (Tf) with fluorescein isothiocyanate (FITC), is proposed. The conjugates were used as tracers for the fluorescence polarization immunoassay (FPIA) method with nanobodies. Optimal concentrations of FITC-aTf1 and FITC-aTf2 conjugates (2.5–5 nM) were selected. Binding kinetics of FITC-aTf1 and FITC-aTf2 with holo- and apo-Tf was studied. A complete binding of FITC-aTf1 and FITC-aTf2 conjugates with holo- and apo-Tf was observed after 15 and 5 min of incubation, respectively. The equilibrium dissociation constants of FITC-aTf1*holo-Tf and FITC-aTf2*apo-Tf complexes were determined, which amounted to 30.7 ± 0.3 and 15.3 ± 0.2 nM. A high specificity of analysis was verified by the incubation of FITC-aTf1 and FITC-aTf2 conjugates with other human proteins, lactoferrin, serum albumin, lysozyme. A high affinity of the conjugates FITC-aTf1 and FITC-aTf2 to holo- and apo-Tf was also shown. The synthesized FITC-aTf1 and FITC-aTf2 conjugates have potential for determining transferrin various conformations in human physiological fluids. Thus, this work demonstrates the possibility of determining two forms of transferrin in human physiological fluids using the FPIA method, which may have diagnostic value, and the use of a portable fluorescence analyzer will allow this analysis to be carried out outside the walls of specialized laboratories.

Keywords: *single-domain antibody, nanobodies, holo-transferrin, apo-transferrin, fluorescence polarization immunoassay*