

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

УДК 577.112.854:535.34:535.372:543.51:547-386
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-43-54>

Поступило в редакцию 08.11.2021
Received 08.11.2021

Д. А. Семенов, О. С. Куприенко, И. И. Вашкевич, О. В. Свиридов

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

НЕКОТОРЫЕ МЕТАЛЛСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА ИЗ МОЛОКА ТРАНСГЕННЫХ КОЗ

(Представлено членом-корреспондентом С. А. Усановым)

Аннотация. Методами спектрофотометрии, флуоресцентной спектроскопии и масс-спектрометрии показано, что человеческий рекомбинантный лактоферрин (рчЛФ), выделенный из молока трансгенных коз, способен связывать ионы железа и европия. Получены апо-форма рчЛФ, а также комплексы этого белка с Fe^{3+} и Eu^{3+} , в которых степень насыщения рчЛФ металлом соответственно составила 76 и 22 %. Предложен способ регистрации общего или высвободившегося лантанида в системе, содержащей комплекс рчЛФ– Eu^{3+} , при кислом или нейтральном значении рН и высоких или низких концентрациях хелатирующих агентов по интенсивности времяразрешенной флуоресценции.

Ключевые слова: рекомбинантный лактоферрин человека, связывание ионов железа и европия

Для цитирования. Некоторые металлсвязывающие свойства рекомбинантного лактоферрина человека из молока трансгенных коз / Д. А. Семенов [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 43–54. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-43-54>

Dmitry A. Semenov, Olga S. Kuprienko, Irina I. Vashkevich, Oleg V. Sviridov

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

SOME METAL BINDING PROPERTIES OF RECOMBINANT HUMAN LACTOFERRIN FROM THE MILK OF TRANSGENIC GOATS

(Communicated by Corresponding Member Sergey A. Usanov)

Abstract. In this research, the ability of pure recombinant human lactoferrin (rhLF), originated from the milk of transgenic goats, to bind ferric and europium ions has been shown by the methods of spectrophotometry, fluorescent spectroscopy, and inductively coupled plasma mass spectrometry. The apo-form of rhLF and its complexes with Fe^{3+} or Eu^{3+} saturated in 76 or 22 %, respectively, were obtained. A method for detection of total or released (“free”) lanthanide at acidic or neutral pH and high or low concentrations of chelating agents by time-resolved fluorescence was proposed.

Keywords: recombinant human lactoferrin, ferric and europium ions binding

For citation. Semenov D. A., Kuprienko O. S., Vashkevich I. I., Sviridov O. V. Some metal binding properties of recombinant human lactoferrin from the milk of transgenic goats. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 1, pp. 43–54 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-43-54>

Введение. К настоящему времени, благодаря многочисленным ранним исследованиям и успехам современной металлопротеомики [1], установлены структуры, определены функции и дана стройная классификация удивительного многообразия металлсвязывающих белков в природе. Катионы металлов, связанные белками, играют одну из трех ролей – структурную, регуляторную или ферментативную – или совмещают две роли. Особую важность для развития большинства организмов имеют ионы железа, участвующие в процессах, от которых зависит жизнь – дыхание, синтез ДНК, фиксация азота и фотосинтез. Поэтому живые организмы выработали эффективные механизмы хранения, транспорта и использования этого металла, многие из которых основаны на образовании комплексов с белками, в частности с трансферрином и его аналогами, включая овотрансферрин, меланотрансферрин и лактоферрин (ЛФ) [2]. Как типичный представитель семейства трансферринов ЛФ способен с очень высоким сродством ($K_a \sim 10^{22} \text{ M}^{-1}$) связывать Fe^{3+} и взаимодействовать, хотя и с меньшей аффинностью, с катионами других «металлов жизни», а также с небιοгенными металлами, такими как Cr^{3+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , Cd^{2+} и трехзарядными катионами лантанидов [2; 3].

Поскольку в отличие от трансферрина ЛФ встречается в основном в секретируемых физиологических жидкостях, то активный транспорт железа для него не характерен, но он находится в первой линии защиты хозяина, предупреждая рост микроорганизмов и подавляя образование свободных радикалов путем регуляции уровня Fe^{3+} в этих средах, а также благодаря множеству других доказанных полезных функций [4].

Для природного человеческого ЛФ, имеющего молекулярную массу 82400 Да, известна последовательность 703 аминокислотных остатков в единственной полипептидной цепи [5], свернутой в две гомологичные доли, N- и C-концевую (остатки соответственно 1–338 и 339–703), каждая из которых состоит из двух доменов с металлсвязывающим центром в углублении между ними [3]. Кластер положительно заряженных аминокислот сконцентрирован на N-конце макромолекулы, а аспарагины в положениях 137, 478 (и потенциально 623) образуют N-гликозидные связи с олигосахаридами. Являясь щелочным белком (изоэлектрическая точка находится при pH 8,7), ЛФ способен взаимодействовать с анионными биополимерами, например, ДНК, гепарином, гликозаминогликанами, липополисахаридами, а также с биоструктурами клеточной поверхности [6].

Одна макромолекула ЛФ способна обратимо связывать два иона Fe^{3+} , по одному в C- и N-долях. Уникальной характеристикой металл-белкового комплексообразования с участием ЛФ и других трансферринов является синергизм связывания Fe^{3+} и CO_3^{2-} , причем анион связывается первым и затем за счет своих неподеленных электронных пар двух атомов кислорода занимает две позиции в координационной сфере центрального иона, а на остальных четырех располагаются электронодонорные группировки, включающие феноляты двух остатков тирозина, имидазол одного гистидила и карбоксильный кислород одного аспарагина белка. Эти остатки организованы в искаженный октаэдр. Сопровождаемое синергетическим эффектом включение аниона и катиона в активный центр индуцирует конформационные изменения ЛФ и переход белка в закрытую компактную конформацию, при этом взаимодействие фрагментов C- и N-долей третичной структуры ЛФ повышает устойчивость Fe^{3+} в связывающем центре к диссоциирующему действию ионов H^+ вплоть до pH 3 [3; 7]. Таким образом, третичные структуры апо- (свободный от металла) и холо-форм (насыщенный металлом) ЛФ различаются, но, скорее всего, не настолько, чтобы изменить такой параметр, как иммунореактивность белка.

Несложная методика выделения и очистки ЛФ традиционными хроматографическими приемами из молока человека и животных совершенствовалась благодаря целому ряду работ, и у исследователей не было проблем в получении сотен миллиграммов гомогенного белка для научных экспериментов. По мере обнаружения все новых функциональных свойств и физиологических эффектов ЛФ, необходимых или полезных для здоровья человека, росло потребление этого уникального белка пищевой промышленностью и фармацевтической индустрией, и очищенный ЛФ из коровьего молока и продукция на его основе стали производиться в крупнотоннажном масштабе. По понятным причинам выделение ЛФ из молока человека объективно не может выйти на индустриальный уровень, хотя такой продукт имеет более высокую терапевтическую эффективность и намного лучше совместим с организмом человека при его потреблении [4].

Важным для науки и перспективным для промышленности решением стало развитие усилиями ученых Беларуси и России методов и биотехнологий получения рекомбинантного человеческого лактоферрина (рчЛФ), идентичного природному ЛФ человека, в молоке трансгенных коз и выделения функционально активного белка в гомогенном виде [8; 9]. Эти достижения заложили основу для организации производства чистого рчЛФ и содержащих этот белок препаратов, а также для проведения их доклинических исследований и клинических испытаний. В нашей стране впервые разработаны иммуноаналитические системы для количественного определения биологически активного рчЛФ в сырье, пищевой продукции и фармацевтических препаратах [10] и освоен серийный выпуск соответствующего иммуноферментного набора реагентов.

Поскольку терапевтическая действенность ЛФ во многом зависит от способности белка связывать и высвобождать ионы железа и, возможно, других металлов, необходимо всесторонне изучить металлсвязывающие свойства конечного продукта опытно-промышленного процесса очистки рчЛФ в Беларуси. Поэтому мы поставили цель охарактеризовать металлсвязывающие

центры рчЛФ, выбрав для этого ионы Fe^{3+} и Eu^{3+} , проявляющие соответственно очень высокую и умеренную аффинности к белкам семейства трансферринов. Кроме того, комплекс рчЛФ с лантанид-ионом мог бы служить в качестве биоспецифически меченного белка, не поврежденного химической модификацией, для последующих исследований функциональной активности рчЛФ по связыванию с биополимерами и клетками.

Материалы и методы исследования. *Соединения, препараты, приборы.* Высокоочищенный (~98 %) рчЛФ выделен из молока трансгенных коз-продуцентов в Институте микробиологии НАН Беларуси. В нашей работе во всех экспериментах использовали деионизированную воду, полученную в модульной системе очистки воды Arium® pro VF фирмы Sartorius (Германия). Применяли Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , NaCl , NaHCO_3 , трилон Б, а также другие соли, кислоты и основания, доступные от поставщиков химреактивов в Республике Беларусь, тринатриевую соль нитрилотриуксусной кислоты (НТА), ксиленоловый оранжевый, о-фенантролин фирмы Alfa Aesar (США), гуанидин гидрохлорид (ГГХ), трис- HCl , лимонную кислоту и цитрат натрия компании Sigma-Aldrich (США). Использовали разборные 96-луночные микропланшеты, полученные от фирмы Хема (Россия). Колонка PD-10 (Сефадекс G-25) для обессоливания растворов биополимеров приобретена у фирмы GE Healthcare (США).

Концентрацию Eu^{3+} в растворе EuCl_3 определяли методом прямого комплексонометрического титрования с использованием трилона Б и ксиленолового оранжевого в качестве индикатора. Концентрацию Fe^{3+} в растворе FeCl_3 определяли фотометрически по интенсивности окрашивания комплекса двухвалентного железа с о-фенантролином.

Для регистрации спектров поглощения использовали прибор Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Швейцария), спектров флуоресценции – спектрофлуориметр СОЛАР СМ 2204 (Солар, Беларусь), интенсивности флуоресценции Eu^{3+} при 613 нм – планшетный флуориметр Delfia 1234 (Wallac Oy, Финляндия). Концентрацию Eu^{3+} в белковых растворах измеряли методом масс-спектрометрии с ионизацией в индуктивно-связанной плазме (ИСП-МС) с помощью масс-спектрометра Agilent 7500сх фирмы Agilent Technologies (США).

Получение апо-формы рчЛФ. Эксперимент проводили по методике, описанной в [11], с некоторыми изменениями. 160 мг рчЛФ растворяли в 3,5 мл 0,15 М NaCl и диализовали в течение 18 ч при 6 °С против 1 л 0,1 М цитратного буферного раствора, рН 3,5, в присутствии 2,5 мМ трилона Б для связывания высвободившихся ионов Fe^{3+} с регулярной сменой буфера каждые 6 ч. Потом диализовали раствор белка в течение 18 ч при 6 °С против деионизированной воды. После фильтрования получили бесцветный прозрачный раствор апо-рчЛФ.

Приготовление комплекса рчЛФ– Fe^{3+} . Следуя ранее описанной методике [11], в течение 18 ч при 6 °С проводили диализ 1,0 мл 35 мг/мл раствора апо-рчЛФ против 1 л 0,05 М трис- HCl буферного раствора, рН 7,4, содержащего FeCl_3 , НТА, 0,15 М NaCl , 0,005 М NaHCO_3 . Соблюдали мольное соотношение Fe^{3+} –белок–НТА 4 : 1 : 4. Затем проводили диализ в течение 18 ч при 6 °С против 1 л 0,05 М трис- HCl буферного раствора, рН 7,4, содержащего 0,15 М NaCl и НТА (соотношение белок–НТА 1 : 1) с двукратной сменой. Далее последовательно диализовали в течение 18 ч при 6 °С против деионизированной воды и 0,15 М NaCl . В результате центрифугирования получили прозрачный окрашенный в красный цвет раствор рчЛФ– Fe^{3+} .

Получение комплекса рчЛФ– Eu^{3+} . В течение 18 ч при 6 °С проводили диализ 1,0 мл 35 мг/мл раствора апо-рчЛФ против 1 л 0,05 М трис- HCl буферного раствора, рН 7,4, содержащего EuCl_3 , НТА, 0,15 М NaCl , 0,005 М NaHCO_3 . Соблюдали мольное соотношение Eu^{3+} –белок–НТА 4 : 1 : 1. Затем проводили диализ в течение 18 ч при 6 °С против 1 л 0,05 М трис- HCl буферного раствора, рН 7,4, содержащего 0,15 М NaCl и НТА (соотношение белок–НТА 1 : 1) с двукратной сменой. После этого последовательно диализовали в течение 18 ч при 6 °С против деионизированной воды и 0,15 М NaCl . В результате центрифугирования получили прозрачный бесцветный раствор рчЛФ– Eu^{3+} . Альтернативно, получение комплекса рчЛФ– Eu^{3+} проводили простым смешиванием всех реагентов в описанных выше условиях с последующей очисткой от низкомолекулярных примесей гелевой фильтрацией с помощью колонки PD-10, уравновешенной 0,05 М натрий-фосфатным буферным раствором (НФБ), рН 7,4, содержащим 0,15 М NaCl .

Измерения абсорбции. 100 мг рчЛФ растворили в 3,0 мл 0,05 М НФБ (рН 7,4). Далее разбавляли данный раствор белка в 10 раз НФБ, рН 7,4, или 6 М раствором ГГХ в воде. Спектры поглощения регистрировали в диапазоне длин волн 250–310 нм в кювете с длиной оптического пути 0,2 см, а в диапазоне 430–500 нм – в кювете 1,0 см. Концентрацию белка в разбавленном растворе определяли по закону Бугера–Ламберта–Бера, используя молярный коэффициент экстинкции, который рассчитали методом Эдельхока [12]

$$C (\text{рчЛФ}) = \frac{A_{280} (6 \text{ М ГГХ})}{\varepsilon_{280} (6 \text{ М ГГХ})l}, \quad (1)$$

где C (рчЛФ) – концентрация раствора рчЛФ, М; A_{280} (6 М ГГХ) – оптическая плотность раствора рчЛФ в 6 М ГГХ при 280 нм; l – длина оптического пути, см; ε_{280} (6 М ГГХ) – теоретически рассчитанный коэффициент экстинкции раствора рчЛФ в 6 М ГГХ при 280 нм, $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Расчет ε_{280} (6 М ГГХ) проводили по следующей формуле, исходя из поглощения света хромофорами белка при 280 нм [12]:

$$\varepsilon_{280} (6 \text{ М ГГХ}) = n_{\text{Трп}} \cdot 5690 + n_{\text{Тыр}} \cdot 1280 + n_{\text{Сис}} \cdot 120, \quad (2)$$

где $n_{\text{Трп}}$, $n_{\text{Тыр}}$ и $n_{\text{Сис}}$ – числа остатков триптофана, тирозина и цистеина в молекуле белка, найденные в открытой базе данных последовательностей белков UniProt; цифры соответствуют молярным коэффициентам экстинкции остатков аминокислот при 280 нм.

Согласно уравнению (2) коэффициент экстинкции рчЛФ при 280 нм в 6 М ГГХ равен

$$\varepsilon_{280} (6 \text{ М ГГХ}) = 10 \cdot 5690 + 21 \cdot 1280 + 16 \cdot 120 = 85700 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}.$$

Коэффициент экстинкции рчЛФ при 280 нм в НФБ рассчитывали на основании оптической плотности раствора в таком буфере по следующей формуле:

$$\varepsilon_{280} (\text{НФБ}) = \frac{A_{280} (\text{НФБ})}{C (\text{рчЛФ})l},$$

где ε_{280} (НФБ) – коэффициент экстинкции раствора рчЛФ в НФБ при 280 нм, $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; A_{280} (НФБ) – оптическая плотность раствора рчЛФ в НФБ при 280 нм; C (рчЛФ) – концентрация раствора белка, определенная по формуле (1), М.

По описанной выше методике были определены коэффициенты экстинкции для каждого препарата рчЛФ в диапазоне длин волн от 250 до 500 нм.

Дифференциальные спектры снимали для растворов рчЛФ с концентрацией 0,8 мг/мл с добавлением двух- и десятикратных молярных избытков Fe^{3+} и Eu^{3+} относительно раствора исходного препарата рчЛФ с такой же концентрацией.

Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой. 1 мг лиофилизированного препарата рчЛФ– Eu^{3+} растворяли в 10 мл концентрированной HNO_3 и минерализовали с применением системы микроволнового разложения при мощности 1000 Вт с выдержкой в течение 20 мин при 213–230 °С. Методика анализа основана на распылении полученного раствора в плазму индуктивно связанного разряда, где происходит процесс возбуждения и ионизации атомов, разделении ионов квадрупольным масс-анализатором по отношению массы к заряду и определении содержания элементов путем сравнения измеренных интенсивностей масс-спектров элементов пробы со значениями интенсивностей, полученными при построении калибровочного графика. Изотоп ^{153}Eu использовался для количественной оценки содержания европия в образце.

Флуоресцентная спектроскопия. Спектры флуоресценции 0,8 мг/мл раствора рчЛФ и его комплексов с двух- и десятикратными молярными избытками Fe^{3+} и Eu^{3+} регистрировали в кювете с длиной оптического пути 1 см при 22 °С. Возбуждали флуоресценцию светом с длиной волны 280 нм. Регистрацию излучения проводили в диапазоне 300–650 нм.

Содержание Eu^{3+} рассчитывали по интенсивности флуоресценции рчЛФ– Eu^{3+} в диссоциативно-усиливающем растворе, сравнивая полученные значения с флуоресценцией растворов с известной концентрацией Eu^{3+} .

По результатам 8 независимых определений с использованием концентраций рчЛФ–Eu³⁺ от 0,4 до 4,1 нМ в модифицированном усиливающем растворе с нейтральным значением рН определяли концентрацию иона лантанида, высвободившегося из активного центра белка, путем сравнения интенсивностей времяразрешенной флуоресценции растворов с исследуемыми и известными концентрациями Eu³⁺. По графику в координатах Скэтчарда определена константа диссоциации комплекса рчЛФ–Eu³⁺.

Результаты и их обсуждение. Важной, если не решающей, характеристикой чистого рчЛФ как конечного продукта опытно-промышленного процесса выделения и очистки из молока трансгенных коз-продуцентов является способность данного белка связывать и высвобождать ионы металлов, что лежит в основе функциональной активности природного ЛФ. Для характеристики обратимого связывания двух металлов высокого и среднего сродства к рчЛФ, Fe³⁺ и Eu³⁺, мы использовали несколько физико-химических методов – спектрофотометрию, ИСП-МС и два варианта флуоресцентной спектроскопии, определили содержание ионов металлов в различных препаратах рчЛФ, изучили спектральные эффекты комплексообразования и поведение комплекса рчЛФ–Eu³⁺ в хелатно-детергентном растворе. Далее переходим к представлению и обсуждению полученных результатов.

Абсорбционные эффекты комплексообразования. Исходный лиофилизированный препарат чистого рчЛФ после растворения давал типичный белковый спектр в ближней ультрафиолетовой области, а бледно-розовая окраска белкового порошка обусловлена слабым поглощением его раствора с максимумом при 465 нм (рис. 1). Известно, что для всех представителей семейства трансферринов, в том числе и для ЛФ, поглощение света при 280 и 465 нм существенно зависит от степени насыщения белка железом, причем эта зависимость имеет нелинейный характер [11]. Действительно, за счет потери связанного Fe³⁺ в 6 М ГГХ денатурированный рчЛФ поглощал при 280 нм менее интенсивно, чем интактный рчЛФ в 0,05 М НФБ (рН 7,4) при равных концентрациях белка в обоих растворах, а полоса в видимой области спектра исчезала. Измеренное спектральное соотношение $A_{280} / A_{465} = 129$ соответствовало степени насыщения рчЛФ железом, равной 11 %, рассчитанной по известной формуле [11]. Таким образом, взятый нами в исследование рчЛФ содержал меньше железа, чем изученные ранее подобные препараты с заполнением 50 % [8] или 90 % ($A_{280} / A_{465} = 25,8$) [13] активных центров, и в этом отношении он в большей степени соответствовал ЛФ из грудного молока человека с содержанием холо-формы в диапазоне 3–25 % [8; 13].

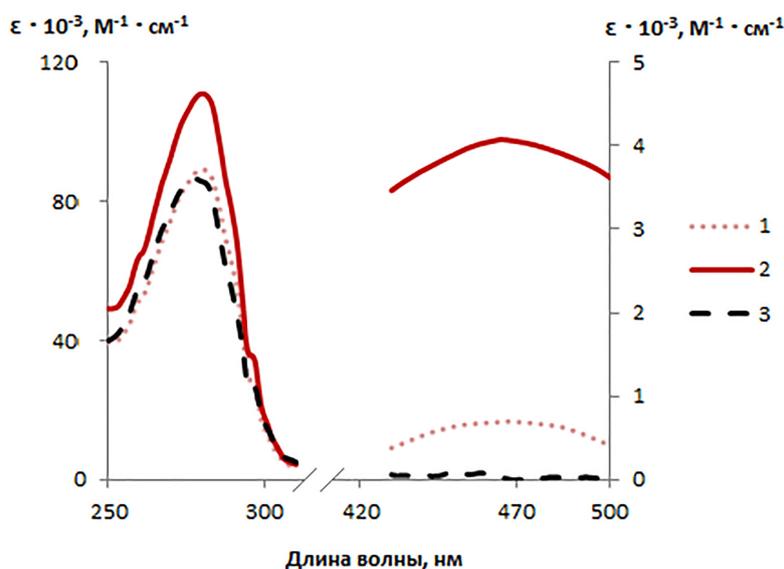


Рис. 1. Абсорбционные спектры рчЛФ: 1 – исходный препарат и 2 – холо-Fe³⁺-форма в 0,05 М НФБ (рН 7,4); 3 – исходный препарат в 6 М ГГХ

Fig. 1. Absorption spectra of rhLF: 1 – initial preparation and 2 – holo-Fe³⁺-form in 0.05 M phosphate buffered saline (рН 7.4); 3 – initial preparation in 6 M guanidine hydrochloride

Найденное экспериментально-расчетным путем значение молярного коэффициента экстинкции при pH 7,4 и длине волны 280 нм раствора исходного Fe^{3+} -содержащего препарата рчЛФ оказалось равным $89203 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, а «весовой» коэффициент абсорбции при этой длине волны составил $1,12 \text{ л/г} \cdot \text{см}^{-1}$. Установленный коэффициент экстинкции мы применяли для определения концентрации рчЛФ со степенью насыщения железом не выше 20–25 %, как указано в [11].

Визуальный и спектрофотометрический контроли применялись и при получении апо-формы белка диализом исходного рчЛФ сначала против цитратного буфера с pH 3,5, а затем против деионизированной воды, как рекомендуется в [11]. В этих условиях исследуемый белок оказался способным высвобождать металл из активных центров и давать бесцветный раствор с измеренным абсорбционным отношением $A_{280} / A_{465} \sim 580$ и остаточной степенью насыщения менее 2 %. В лиофилизированном виде апо-форма имела вид белого порошка.

В ходе приготовления комплекса рчЛФ– Fe^{3+} ионы железа поступали через полупроницаемую мембрану в раствор апо-рчЛФ в присутствии НСО_3^- и 4-кратных избытков ионов металла и НТА по отношению к белку, в результате чего наблюдалось появление и усиление интенсивности окраски в белковой части диализной системы. После последующего диализа против воды получен окрашенный в красный цвет раствор холо- Fe^{3+} –рчЛФ, имеющий $A_{280} / A_{465} = 27,2$ (рис. 1). В литературе сообщается, что $A_{280} / A_{465} = 22$ для ЛФ коровы соответствует степени насыщения железом 100 %, а абсорбционное отношение 27,2 должно указывать на степень насыщения около 76 % в холо- Fe^{3+} –рчЛФ [11]. В наших экспериментах применение хелатирующего агента в диализной системе, препятствующего неспецифическому связыванию железа и образованию его гидроксидов, а также выпадение белкового осадка, лишь частично растворявшегося затем в деионизированной воде в ходе диализа, могли обусловить получение «неполной» холо-формы рчЛФ.

Итак, в обсуждаемых экспериментах показано, что рчЛФ способен обратимо связывать Fe^{3+} по типичному для трансферринов механизму, который включает взаимодействие ферри-иона с фенолят-ионом остатка тирозина в активном центре, перенос заряда в образовавшемся комплексе и появление отдельной полосы поглощения в видимом спектре. Эта полоса исчезает вместе с разрушением комплекса рчЛФ– Fe^{3+} в денатурирующих белок условиях.

Думается, что 100 %-ная степень насыщения рчЛФ ионами Fe^{3+} может быть легко достигнута путем прямого смешивания компонентов и изменения их соотношения и содержания вспомогательных реагентов, что было бы полезным для практического применения препаратов на основе рчЛФ. Кстати, в таких экспериментах можно будет проверить, обладает ли рчЛФ не описанным для других трансферринов свойством природного ЛФ. Эта особенность состоит в способности образовывать в присутствии примерно 70-кратных мольных избытков Fe^{3+} и анионов НСО_3^- стабильную надмолекулярную структуру, которая состоит из 15–16 полипептидных цепей ЛФ, формирующих «поверхностные» комплексонаты Fe^{3+} с участием множества белковых карбоксильных и аминогрупп, а также бикарбонат-анионов. С определенной долей условности можно сказать, что связывание железа на поверхности раздела формирует четвертичную структуру ЛФ. Такой структурированный железом супрамолекулярный ассоциат в практическом плане может оказаться полезным антианемическим продуктом [14].

В наших первых экспериментах способность рчЛФ связывать ион редкоземельного металла, как и в случае комплексообразования белком ионов Fe^{3+} , проверялась диализом апо-формы против раствора с нейтральным pH, содержащего ионы Eu^{3+} и НСО_3^- , а также НТА. Альтернативный способ, использованный нами, состоял в простом смешивании растворов рчЛФ и Eu^{3+} в присутствии хелатирующего агента с последующей очисткой гель-хроматографией. В обоих случаях окрашивание раствора не происходило, и прямая спектрофотометрия не показывала изменений абсорбции, но факт комплексообразования в полученных смесях был установлен с помощью ИСП-МС, флуоресцентной спектроскопии и дифференциальной спектрофотометрии.

Метод дифференциальной спектрофотометрии достаточно часто применяется для характеристики белкового связывания ионов металлов, как описано в литературе для некоторых систем лантанид–трансферрин [15; 16]. Изменения конформации белка, в том числе индуцируемые лантанидами, могут менять окружение боковых цепей некоторых ароматических остатков, например, тирозинов, или вызывать более глубокие возмущения в электронных процессах из-за пря-

мого вовлечения таких остатков в комплексообразование, дающее характерные сигналы при 238 и 290 нм (рис. 2). В любом случае интенсивность возникающих сигналов невелика, и, как правило, они регистрируются только в дифференциальном режиме измерений абсорбции.

Масс-спектрометрический анализ комплекса рчЛФ–Eu³⁺. ИСП-МС является стандартизированным высокочувствительным и точным инструментальным методом определения содержания химических элементов в биосубстратах, препаратах и биологически активных добавках. Этот метод достаточно часто применяется в металлопротеомике, он оказался полезным при изучении механизма взаимодействия между Ag⁺ и ЛФ с образованием нанок комплексов, обладающих мощным антимикробным действием, а в комбинации с гель-фильтрационной хроматографией использовался для идентификации металлсвязывающих белков в грудном молоке человека [17].

Мы впервые применили ИСП-МС для изучения комплекса металла с рчЛФ. В выполненном эксперименте найдено 819,2 нг (5,4 нмоль) Eu в 1,0 мг (12,5 нмоль) взятого в анализ холо-*Eu³⁺*–рчЛФ. Это соотношение соответствует 22 % насыщения рчЛФ в расчете на 2 металлсвязывающих сайта в молекуле белка. В планируемых экспериментах по ИСП-МС предполагается найти зависимость степени насыщения рчЛФ металлом от величины нагрузки *Eu³⁺* и *Fe³⁺* на белок без посторонних хелатирующих агентов в среде.

Флуоресцентная спектроскопия процессов связывания ионов металлов с рчЛФ. Известно, что взаимодействие ионов металлов с белками семейства трансферринов приводит к тушению собственной флуоресценции белка за счет конформационных перестроек в полипептидной глобуле и изменения микроокружений остатков триптофана и тирозина [15; 16; 18]. Способные к люминесценции ионы лантанидов часто применяются для зондирования структуры металлсвязывающих белков в качестве «идеальных» меток [19], так как биоспецифически внедряясь в активный центр, они практически не изменяют природную структуру макромолекулы в отличие от химического конъюгирования.

В наших экспериментах добавление к исходному препарату рчЛФ двукратного молярного избытка *Fe³⁺* приводило к уменьшению на 14 % интенсивности флуоресценции с максимумом при 315 нм, возбуждаемой при 280 нм. В случае такого же молярного избытка *Eu³⁺* по отношению к рчЛФ наблюдалось тушение белковой флуоресценции на 6 %. А десятикратный молярный избыток *Eu³⁺* снижал интенсивность излучения ароматических флуорофоров на 22 % за счет образования металл-белкового комплекса и протекания процесса межмолекулярного переноса энергии от белкового триптофанила к связанному иону лантанида. При этом, как и в случае других описанных в литературе комплексов белков, в видимой области спектра не возникала индуцированная люминесценция лантанида, в энергетических уровнях которого выполненный пере-

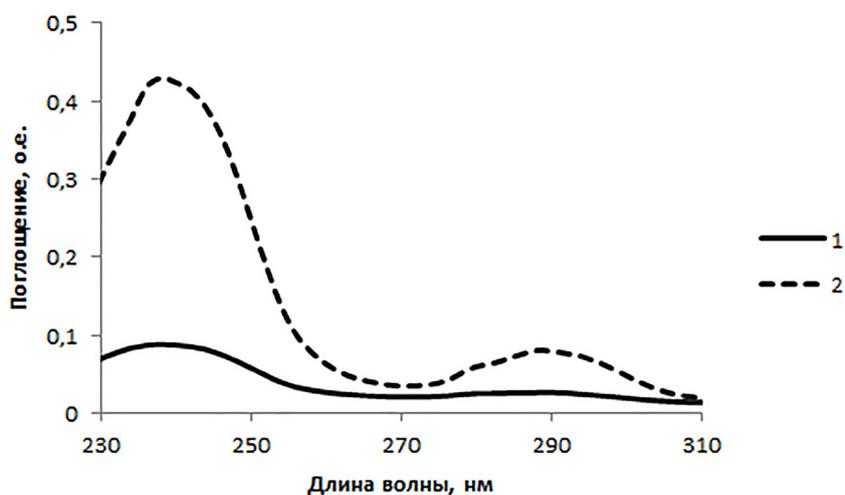


Рис. 2. Дифференциальные спектры поглощения растворов рчЛФ в присутствии 2-кратного (1) и 10-кратного (2) молярных избытков *Eu³⁺* при pH 7,4. Концентрация рчЛФ равна 10^{-5} М

Fig. 2. Difference absorption spectra after the addition of 2-fold (1) or 10-fold (2) molar excesses of *Eu³⁺* to an aqueous solution of rhLF at pH 7.4. rhLF concentration is 10^{-5} M

ход ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$ не сопровождался эмиссионным процессом ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ из-за безызлучательного рассеивания поглощенной энергии. Возможное объяснение этому различию состоит в том, что энергетический уровень донора намного ближе к энергетическому уровню Tb^{3+} , чем энергетическому уровню Eu^{3+} [15; 16; 19]. В связи с этим интересно будет проверить возможность эффекта индуцированной рчЛФ флуоресценции другого лантанида, Tb^{3+} , расположение электронных энергетических уровней которого благоприятствует выполнению излучательного перехода ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$.

Тем не менее, нам удалось найти способ использования Eu^{3+} в качестве способной к флуоресценции метки рчЛФ. Флуоресцентные свойства Eu^{3+} приобретал при помещении комплекса рчЛФ– Eu^{3+} в диссоциативно-усиливающий раствор, традиционно используемый в лантанидном иммунофлуориметрическом анализе для целей медицинской диагностики [20]. Приготовленный нами раствор содержал в высоких концентрациях хелатирующий агент 2-нафтоилтрифтороацетон (НФА), амфифильный хелатирующий реагент три-*n*-октилфосфин оксид (ТОФО), поверхностно-активное вещество тритон X-100 и имел pH 3,2. Мы нашли, что при этом значении pH в течение 10 мин Eu^{3+} полностью переходит из комплекса рчЛФ– Eu^{3+} в раствор и взаимодействует с его низкомолекулярными компонентами. НФА образует органический комплекс с Eu^{3+} , поглощающий свет при 340 нм, ТОФО, благодаря наличию атома кислорода и трех углеводородных цепочек, насыщает координационную сферу иона металла и защищает его от воздействия воды. Тритон X-100 участвует в образовании мицеллы и вытесняет из нее тушащие флуоресценцию молекулы воды. Интенсивность флуоресценции раствора с максимумом при 613 нм оставалась постоянной в течение часа. Этот параметр применяли как альтернативный метод определения степени насыщения рчЛФ ионами Eu^{3+} , используя построенный строго линейный график зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации Eu^{3+} в диссоциативно-усиливающем растворе при pH 3,2 (рис. 3). Рассчитаны количество иона лантанида в рчЛФ– Eu^{3+} и степень насыщения белка этим ионом, равная 24 %, что хорошо согласуется с данными ИСП-МС.

Кроме того, нами разработана система реагентов для прямой флуориметрической детекции Eu^{3+} , высвобождающегося из комплекса с рчЛФ, без разделения связанного с белком (*B*) и свободного (*U*) иона лантанида. В состав детектирующего раствора с нейтральным pH входят в подобранных концентрациях базовые компоненты диссоциативно-усиливающего раствора: НФА, ТОФО и тритон X-100 (рис. 4). При облучении белково-хелатной системы, связывающей Eu^{3+} , коротким импульсом света с длиной волны 340 нм комплекс рчЛФ– Eu^{3+} остается флуоресцентно инертным, тогда как Eu^{3+} , высвободившийся в результате естественной или индуцированной диссоциации комплекса и находящийся в составе мицеллы, переходит в возбужденное состояние и дает долгоживущую флуоресценцию с максимумом при 613 нм. Интенсивность флуоресценции, измеренная с задержкой во времени, пропорциональна концентрации иона лантанида

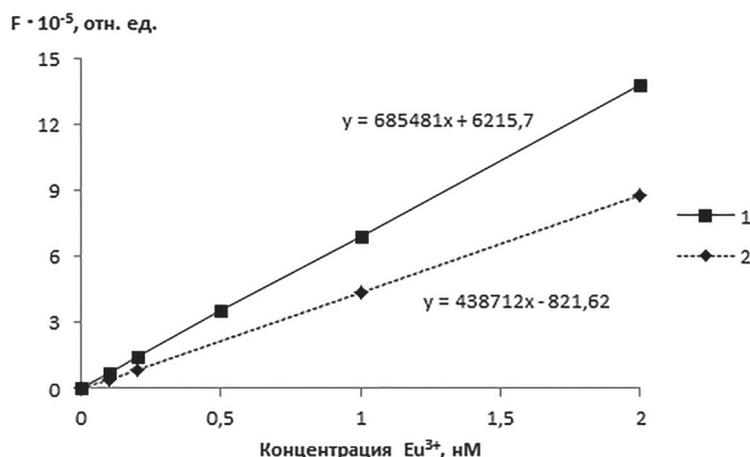


Рис. 3. Калибровочные графики флуоресценции Eu^{3+} в различных средах: 1 – стандартный диссоциативно-усиливающий раствор, pH 3,2; 2 – модифицированный усиливающий раствор, pH 7,2

Fig. 3. Calibration plots of Eu^{3+} fluorescence in different media: 1 – standard dissociation-enhancement solution, pH 3.2; 2 – modified enhancement solution, pH 7.2

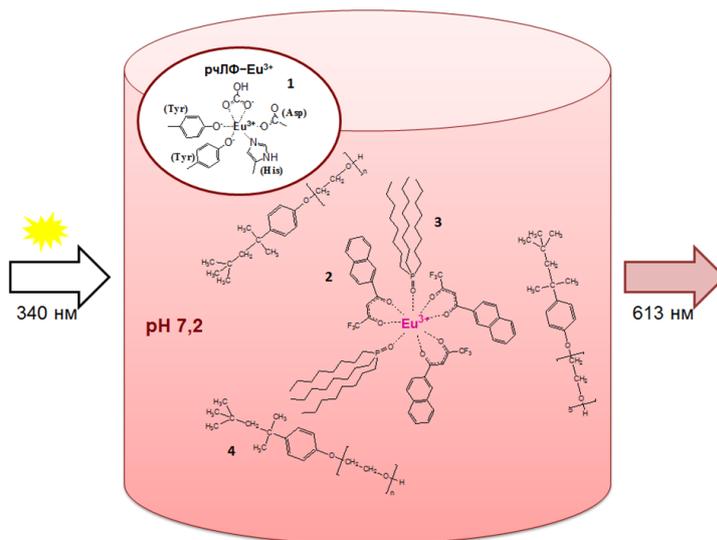


Рис. 4. Схематическое изображение Eu^{3+} -связывающей системы, включающей рчЛФ (показан активный центр, 1) и усиливающие флуоресценцию Eu^{3+} компоненты: 2 – НФА; 3 – ТОФО; 4 – тритон X-100

Fig. 4. Schematic representation of Eu^{3+} -binding system comprising rhLF (active center is depicted, 1) and Eu^{3+} fluorescence enhancement components: 2 – 2-naphthoyltrifluoroacetone; 3 – tri-n-octylphosphine oxide; 4 – triton X-100

и определяется по калибровочному графику (рис. 3), составляя примерно 60 % от интенсивности излучения такого же количества Eu^{3+} в стандартном диссоциативно-усиливающем растворе с высокими концентрациями ингредиентов и pH 3,2.

В эксперименте после внесения в систему рчЛФ, насыщенного Eu^{3+} на 22 %, в концентрации $4,1 \cdot 10^{-9}$ М (т. е. общий Eu^{3+} в системе – 1,80 нМ) и выдерживания при комнатной температуре в течение 1 ч флуориметрия показала содержание свободного от белка иона лантанида 0,56 нМ и соответственно концентрационное соотношение белковосвязанного и свободного (B / U) Eu^{3+} , равное 2,2. Таким образом, добавляя комплекс рчЛФ– Eu^{3+} в различных концентрациях (от $0,4 \cdot 10^{-9}$ М до $4,1 \cdot 10^{-9}$ М) в систему прямой флуориметрической детекции при фиксированной температуре и значении pH, можно определить степень диссоциации рчЛФ– Eu^{3+} от его концентрации и по графику Скэтчарда в координатах B / U от B рассчитать константу диссоциации комплекса в выбранных условиях, которая оказалась равной $(1,51 \pm 0,17) \cdot 10^{-9}$ М. Найденная величина достаточно близка к значению константы диссоциации $8,3 \cdot 10^{-10}$ М, определенной для комплекса овотрансферрина с Tb^{3+} [21]. Полученную таким способом константу K_d нельзя назвать истинно равновесной, так как низкомолекулярный хелатирующий агент в системе с определенным аффинитетом удерживает «свободный» Eu^{3+} . Однако и в других принятых методах определения константы связывания белок–металл, например, ультрафильтрации, диссоциация комплекса не является обратимой. Планируется апробировать разработанную систему в экспериментах по образованию и диссоциации комплексов рчЛФ с рядом физиологически важных металлов в различных условиях среды.

Закключение. Получаемый в Беларуси из молока трансгенных коз высокочистый биотехнологический продукт рчЛФ содержит 154 мкг железа на 1 г белка (220 ммоль Fe^{3+} на 1 моль белка, 11 % полного насыщения двух связывающих сайтов). При снижении pH раствора до 3,5 исходный рчЛФ обратимо теряет железо до степени насыщения менее 2 %, и образовавшийся апо-рчЛФ способен связывать Fe^{3+} или редкоземельный металл Eu^{3+} с мольными показателями насыщения соответственно 76 и 22 %. В результате взаимодействия рчЛФ с Fe^{3+} в спектре поглощения при 465 нм возникает полоса комплекса с переносом заряда между остатками тирозинов в активном центре и ионом металла, которая и служит индикатором содержания Fe^{3+} в белке. Мольная доля лантанида в холо- Eu^{3+} –рчЛФ определяется методом ИСП-МС или с хорошим соответствием данным масс-спектрометрии измеряется после высвобождения Eu^{3+} из белкового комплекса по его времяразрешенной флуоресценции в стандартном диссоциативно-усиливаю-

щем растворе при pH 3,2. Использование модифицированной хелатно-детергентной системы микеллирования иона лантанида с нейтральным значением pH 7,2, которая не вызывает диссоциацию комплекса рчЛФ–Eu³⁺, позволяет проводить прямое определение концентрации свободного Eu³⁺, находящегося в равновесии с комплексом. Это дает возможность рассчитывать K_d и может быть полезно при исследовании других металлсвязывающих свойств. Кроме того, рчЛФ, «биологически» меченный Eu³⁺ по активному центру, обладает структурой, не поврежденной химической модификацией, имеет высокий потенциал иммуноаналитического применения и может использоваться как белковый зонд с интенсивной долгоживущей флуоресценцией в исследованиях свойств ЛФ человека и при изучении его взаимодействий с биополимерами и клетками. Представленные первые результаты исследований связывания двух различных по свойствам металлов с рчЛФ позволяют обоснованно планировать дальнейшие эксперименты по установлению физико-химических и биологических свойств комплексов рчЛФ с различными металлами с использованием методов дифференциальной спектрофотометрии, времяразрешенной флуориметрии, ИСП-МС и иммуноанализа.

Список использованных источников

1. Proteomic analysis of contaminants in recombinant membrane hemeproteins expressed in *E. coli* and isolated by metal affinity chromatography / A. V. Yantsevich [et al.] // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2017. – Vol. 53, N 2. – P. 173–186. <https://doi.org/10.1134/s000368381702017x>
2. Пермяков, Е. А. Металлсвязывающие белки: структура, свойства, функции / Е. А. Пермяков. – М., 2012. – 544 с.
3. Baker, H. M. Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release / H. M. Baker, E. N. Baker // *BioMetals*. – 2004. – Vol. 17, N 3. – P. 209–216. <https://doi.org/10.1023/b:biom.0000027694.40260.70>
4. 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.
5. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins / M.-H. Metz-Boutigue [et al.] // *European Journal of Biochemistry*. – 1984. – Vol. 145, N 3. – P. 659–676. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08607.x>
6. Baker, E. N. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin / E. N. Baker, H. M. Baker // *Biochimie*. – 2009. – Vol. 91, N 1. – P. 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.05.006>
7. Ward, P. P. Cooperative interactions between the amino- and carboxyl-terminal lobes contribute to the unique iron-binding stability of lactoferrin / P. P. Ward, X. Zhou, O. M. Conneely // *Journal of Biological Chemistry. Protein Chemistry and Structure*. – 1996. – Vol. 271, N 22. – P. 12790–12794. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.22.12790>
8. Production of human lactoferrin in animal milk / I. L. Goldman [et al.] // *Biochemistry and Cell Biology*. – 2012. – Vol. 90, N 3. – P. 513–519. <https://doi.org/10.1139/o11-088>
9. Получение рекомбинантного лактоферрина человека из молока коз-производителей и его физиологические эффекты / В. С. Лукашевич [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси*. – 2016. – Т. 60, № 1. – С. 72–81.
10. 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>
11. 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>
12. Edelhoch, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins / H. Edelhoch // *Biochemistry*. – 1967. – Vol. 6, N 7. – P. 1948–1954. <https://doi.org/10.1021/bi00859a010>
13. Characterization of recombinant human lactoferrin secreted in milk of transgenic mice / J. H. Nuijens [et al.] // *Journal of Biological Chemistry. Protein Chemistry and Structure*. – 1997. – Vol. 272, N 13. – P. 8802–8807. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.13.8802>
14. Studies of the structure of multiferric ion-bound lactoferrin: a new antianemic edible material / F. Hu [et al.] // *International Dairy Journal*. – 2008. – Vol. 18, N 10–11. – P. 1051–1056. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.05.003>
15. Luk, C. K. Study of the nature of the metal-binding sites and estimate of the distance between the metal-binding sites in transferrin using trivalent lanthanide ions as fluorescent probes / C. K. Luk // *Biochemistry*. – 1971. – Vol. 10, N 15. – P. 2838–2843. <https://doi.org/10.1021/bi00791a006>
16. Abdollahi, S. Application of circularly polarized luminescence spectroscopy to Tb(III) and Eu(III) complexes of transferrins / S. Abdollahi, W. R. Harris, J. P. Riehl // *Journal of Physical Chemistry*. – 1996. – Vol. 100, N 5. – P. 1950–1956. <https://doi.org/10.1021/jp952044d>
17. Interactions of whey proteins with metal ions / A. Rodzik [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, N 6. – Art. 2156. <https://doi.org/10.3390/ijms21062156>
18. Lehrer, S. S. Fluorescence and absorption studies of the binding of copper and iron to transferrin / S. S. Lehrer // *Journal of Biological Chemistry*. – 1969. – Vol. 244, N 13. – P. 3613–3617. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)83413-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)83413-5)

19. Horrocks, W. D. Lanthanide ion luminescence probes of the structure of biological macromolecules / W. D. Horrocks, D. R. Sudnick // *Accounts of Chemical Research*. – 1981. – Vol. 14, N 12. – P. 384–392. <https://doi.org/10.1021/ar00072a004>
20. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays / I. Hemmilä [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 1984. – Vol. 137, N 2. – P. 335–343. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90095-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90095-2)
21. Yang, B. Binding constants for terbium (III) with chicken apoovotransferrin / B. Yang, Y. Li // *Chemical Research in Chinese Universities*. – 2001. – Vol. 17, N 1. – P. 6–13.

References

1. Yantsevich A. V., Dzichenka Ya. V., Ivanchik A. V., Shapiro M. A., Trawkina M., Shkel T. V., Gilep A. A., Sergeev G. V., Usanov S. A. Proteomic analysis of contaminants in recombinant membrane hemeproteins expressed in *E. coli* and isolated by metal affinity chromatography. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2017, vol. 53, no. 2, pp. 173–186. <https://doi.org/10.1134/s000368381702017x>
2. Permyakov E. A. *Metal binding proteins: structure, properties, functions*. Moscow, 2012. 544 p. (in Russian).
3. Baker H. M., Baker E. N. Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release. *BioMetals*, 2004, vol. 17, no. 3, pp. 209–216. <https://doi.org/10.1023/b:biom.0000027694.40260.70>
4. Borzenkova N. V., Balabushevich N. G., Larionova N. I. Lactoferrin: physical and chemical properties, biological functions, delivery systems, pharmaceutical and nutraceutical preparations (review). *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Biopharmaceutical Journal*, 2010, vol. 2, no. 3, pp. 3–19 (in Russian).
5. Metz-Boutigues M.-H., Jollès J., Mazurier J., Schoentgen F., Legrand D., Spik G., Montreuil J., Jollès P. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *European Journal of Biochemistry*, 1984, vol. 145, no. 3, pp. 659–676. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08607.x>
6. Baker E. N., Baker H. M. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. *Biochimie*, 2009, vol. 91, no. 1, pp. 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.05.006>
7. Ward P. P., Zhou X., Conneely O. M. Cooperative interactions between the amino- and carboxyl-terminal lobes contribute to the unique iron-binding stability of lactoferrin. *Journal of Biological Chemistry. Protein Chemistry and Structure*, 1996, vol. 271, no. 22, pp. 12790–12794. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.22.12790>
8. Goldman I. L., Georgieva S. G., Gurskiy Ya. G., Krasnov A. N., Deykin A. V., Popov A. N., Ermolkevich T. G., Budzevich A. I., Chernousov A. D., Sadchikova E. R. Production of human lactoferrin in animal milk. *Biochemistry and Cell Biology*, 2012, vol. 90, no. 3, pp. 513–519. <https://doi.org/10.1139/o11-088>
9. 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).
10. 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>
11. Majka G., Śpiewak 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>
12. 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>
13. Nuijens J. H., van Berkel P. H. C., Geerts M. E. J., Hartevelt P. P., de Boer H. A., van Veen H. A., Pieper F. R. Characterization of recombinant human lactoferrin secreted in milk of transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry. Protein Chemistry and Structure*, 1997, vol. 272, no. 13, pp. 8802–8807. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.13.8802>
14. Hu F., Pan F., Sawano Y., Makino T., Kakehi Y., Komiyama M., Kawakami H., Tanokura M. Studies of the structure of multiferric ion-bound lactoferrin: a new antianemic edible material. *International Dairy Journal*, 2008, vol. 18, no. 10–11, pp. 1051–1056. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.05.003>
15. Luk C. K. Study of the nature of the metal-binding sites and estimate of the distance between the metal-binding sites in transferrin using trivalent lanthanide ions as fluorescent probes. *Biochemistry*, 1971, vol. 10, no. 15, pp. 2838–2843. <https://doi.org/10.1021/bi00791a006>
16. Abdollahi S., Harris W. R., Riehl J. P. Application of circularly polarized luminescence spectroscopy to Tb(III) and Eu(III) complexes of transferrins. *Journal of Physical Chemistry*, 1996, vol. 100, no. 5, pp. 1950–1956. <https://doi.org/10.1021/jp952044d>
17. Rodzik A., Pomastowski P., Sagandykova G. N., Buszewski B. Interactions of whey proteins with metal ions. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, vol. 21, no. 6, art. 2156. <https://doi.org/10.3390/ijms21062156>
18. Lehrer S. S. Fluorescence and absorption studies of the binding of copper and iron to transferrin. *Journal of Biological Chemistry*, 1969, vol. 244, no. 13, pp. 3613–3617. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)83413-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)83413-5)
19. Horrocks W. D., Sudnick D. R. Lanthanide ion luminescence probes of the structure of biological macromolecules. *Accounts of Chemical Research*, 1981, vol. 14, no. 12, pp. 384–392. <https://doi.org/10.1021/ar00072a004>
20. Hemmilä I., Dakubu S., Mukkala V.-M., Siitari H., Lövgren T. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays. *Analytical Biochemistry*, 1984, vol. 137, no. 2, pp. 335–343. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90095-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90095-2)
21. Yang B., Li Y. Binding constants for terbium (III) with chicken apoovotransferrin. *Chemical Research in Chinese Universities*, 2001, vol. 17, no. 1, pp. 6–13.

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.

Куприенко Ольга Сергеевна – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kuprienko@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.

Kuprienko Olga S. – Ph. D. (Chemistry), Senior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kuprienko@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.