

УДК 57.089.23: 57.083.3: 577.112.853

© Коллектив авторов

## РАЗРАБОТКА ДВУХСАЙТНОГО ИММУНОАНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ЛАКТОФЕРРИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

П. П. ЛАКТИОНОВ, Н. А. ШЕВЧУК, В. А. НАУМОВ\*,  
Н. Г. ЖЕВАЧЕВСКИЙ\*, Е. Ю. РЫКОВА, В. В. ВЛАСОВ

Институт биоорганической химии Сибирского отделения РАН, 630090,  
Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8. Факс: (3832)33-36-77, электронная  
почта: viv108@niboch.nsc.ru

\*333 Окружной военный клинический госпиталь, 630017, Новосибирск, ул.  
Воинская, 34. Факс: (3832)66-80-47

Разработан метод двухсайтного иммуноферментного анализа на лактоферрин с использованием поликлональных антител к неперекрывающимся эпитопам молекулы антигена. Чувствительность анализа, определённая как минимальная детектируемая с вероятностью не менее 95% концентрация лактоферрина, составляет 0,5 нг/мл. Точность анализа характеризуется коэффициентом вариации, составляющим 7% в клинически важном диапазоне концентраций. На результаты анализа практически не влияет присутствие человеческих белков (альбумина, гемоглобина и трансферрина) в концентрациях до 5 мг/мл.

Разработанный метод применён для исследования сывороток здоровых доноров и больных вирусным гепатитом. Содержание лактоферрина в 44 исследованных сыворотках здоровых людей составляло  $130 \pm 40$  нг/мл (среднее  $\pm$  среднеквадратическое отклонение). Исследование образцов сывороток 95 пациентов с вирусными гепатитами А, В и С показало, что сывороточная концентрация лактоферрина при этих заболеваниях значительно повышается и составляет соответственно  $850 \pm 420$  нг/мл,  $780 \pm 580$  нг/мл и  $680 \pm 500$  нг/мл.

Показано, что двухсайтная иммуноаналитическая система обладает удовлетворительными характеристиками и может быть использована для мониторинга уровня лактоферрина в сыворотках пациентов.

**Ключевые слова:** лактоферрин, двухсайтный иммуноанализ, сыворотка крови, вирусный гепатит.

**ВВЕДЕНИЕ.** Лактоферрин (ЛФ) — гликопротеин с мол. массой около 78 кДа, выявлен в ткани и секретах большинства желез экзокринового типа, а также во вторичных гранулах нейтрофилов. ЛФ выполняет ряд важных функций: участвует в неспецифической иммунной защите, является фактором созревания и активатором клеток лимфоидного ряда [1], а также является внеклеточным транскрипционным фактором [2]. К механизмам функциональной активности ЛФ относят его способность обратимо связывать ионы Fe, и тем самым подавлять рост микроорганизмов и опухолей, а также его способность регулировать выделение ФНО- $\alpha$ , интерлейкинов 1 и 6 и усиливать фагоцитоз [1]. Обнаружена рибонуклеазная активность одной из изоформ ЛФ, а также способность ЛФ ослаблять повреждающее действие свободных радикалов [1]. Доказана иммунологическая идентичность препаратов ЛФ, полученных из секретов и полиморфноядерных лейкоцитов человека [3].

Средняя концентрация ЛФ в сыворотке крови здоровых людей составляет от 120 до 300 нг/мл [4,5] и зависит от пола и возраста [6]. При ВИЧ-1 [7] и локальных инфекциях и дефиците железа, содержание ЛФ в сыворотке значительно снижается [6]. При ревматоидном артрите [8,9], кистозной болезни [10], лейкоцитозе, а также при раке лёгкого, желудочно-кишечного тракта и молочных желез [11] отмечено достоверное увеличение сывороточной концентрации антигена, что, вероятно, обусловлено избыточным образованием ЛФ либо опухолевыми клетками, либо нейтрофилами. При некоторых аутоиммунных расстройствах определение уровня ЛФ может быть использовано для мониторинга состояния больных [8]. Таким образом, изменение уровня ЛФ в сыворотке пациентов при наличии точных методов его определения может являться перспективным прогностическим критерием вышеперечисленных заболеваний [11,12], а также пневмонии, туберкулёза [1,13] и лепры [14].

Малоисследованным в настоящее время остаётся вопрос о сывороточном уровне и роли ЛФ при различных видах гепатита. Ряд авторов [6,15] указывают на повышение уровня ЛФ при метастатическом раке печени и вирусных гепатитах, другие авторы [16] отмечают снижение уровня ЛФ при гепатитах, в то время как третьи [17] - говорят о лишь незначительном изменении концентрации ЛФ при вирусных гепатитах, но указывают на неблагоприятный прогноз для больных с повышенным уровнем ЛФ. Эти противоречия, скорее всего, вызваны несовершенством методов измерения, в частности, низкой специфичностью антител, используемых в иммунохимических методах анализа. В настоящей работе мы предлагаем двухсайтный иммуноферментный анализ для определения содержания ЛФ в сыворотке крови человека, основанный на использовании поликлональных антител к неперекрывающимся эпитопам молекулы лиганда.

Двухсайтные иммунометрические системы анализа благодаря высокой специфичности и чувствительности оптимально подходят для быстрого измерения концентрации антигенов в биологических жидкостях. Как правило, такие иммуноаналитические системы основаны на использовании моноклональных антител. Несмотря на очевидные преимущества использования моноклональных антител, получение стабильных продуцентов является длительной, дорогой и трудоемкой процедурой, а требуемые селективность и чувствительность иммуноаналитической системы, могут быть также получены при использовании поликлональных антител.

**МЕТОДИКА.** Образцы сыворотки крови доноров и пациентов были получены по стандартным методикам и хранились до их использования при - 20°.

Гомогенный препарат ЛФ, полученный из донорского молока по модифицированному методу [18], использовали для иммунизации кроликов породы шиншилла. Кроликам вводили 0,5 мл раствора ЛФ в концентрации 0,5 мг/мл в 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда (Sigma, США). На 14-й, 21-й, 28-й, 35-й и 42-й дни проводили инъекции в неполном адьюванте Фрейнда. Кровь у животных брали на 27-й, 34-й, 41-й и 48-й дни. Для аффинной очистки антител использовали иммуноглобулиновую фракцию, полученную фракционированием антисыворотки 40% сульфатом аммония с последующим диализом против 0,15 М NaCl. Для изготовления аффинного сорбента Сефарозу CL-4В (Pharmacia, Швеция) активировали BгCN [19]. Активированную смолу инкубировали с очищенным ЛФ из расчёта 5 мг ЛФ на 5 мл осушенной смолы. Связывание белка со смолой оценивали спектрофотометрически. Для удаления антител, перекрёстно реагирующих с сывороточными белками, использовали аффинный сорбент, приготовленный из активированной BгCN Сефарозы CL-4В и диализованной человеческой сыворотки.

Для выделения антител к неперекрывающимся эпитопам молекулы ЛФ был изготовлен аффинный сорбент, содержащий фрагмент молекулы ЛФ с мол. массой 38 кДа. ЛФ в концентрации 0,5 мг/мл в 0,1 М натрий-ацетатном буфере рН 4,5

инкубировали с пепсином (Merck, Германия) при 37° и массовом соотношении фермент: субстрат 1:50 в течение 24 часов. Реакцию останавливали добавлением 1 М NaOH до pH 7,5, и после лиофильного высушивания и растворения разделяли на колонке (1x50см) с Сефадексом G-75 (fine) (Pharmacia, Швеция), уравновешенной 0,05 М натрий-фосфатным буфером pH 7,5 с 0,15 М NaCl и 0,02% NaN<sub>3</sub> (Sigma, США). Гидролизат элюировали со скоростью 3,2 мл/ч и собирали фракции, соответствующие объёму удержания от 20 до 24,8 мл. Содержимое фракций объединяли, лиофильно высушивали и после растворения, хроматографировали в тех же условиях. Из очищенного фрагмента ЛФ и активированной бромцианом Сефарозы CL-4В изготавливали аффинный сорбент как описано выше.

Для того, чтобы разделить аффинно очищенные антитела против ЛФ на антитела, не связывающие фрагмент 38 кДа (далее - антитела 1) и связывающие этот фрагмент (далее - антитела 2), было определено максимальное количество антител, способных связаться с аффинным сорбентом, и относительное содержание антител 1 и 2 в препарате аффинно очищенных антител против цельной молекулы ЛФ. На аффинный сорбент с 38 кДа фрагментом молекулы лактоферрина, наносили шестикратный мольный избыток очищенных аффинно антител против ЛФ. Колонку отмывали 0,025 М натрий-фосфатным буфером pH 7,5 с 0,5 М NaCl и 0,05% твин-20 до исчезновения белка в элюате, затем 0,05 М трис-HCl pH 7,5 с 0,15 М NaCl, элюировали специфические антитела 0,1 М глицин-HCl pH 2,5 с 0,5 М NaCl и определяли их количество спектрофотометрически. Для определения соотношения антител 1 и 2 в препарате аффинно очищенных антилактоферриновых антител, аффинную очистку на смоле с фрагментом 38 кДа повторяли, нанося на колонку аффинно очищенные антитела против всей молекулы ЛФ в количестве 90% от антител, связывающихся со смолой в условиях насыщения. В дальнейшей работе для получения антител 1 и 2, антитела против всей молекулы ЛФ наносили на аффинный сорбент с 38 кДа фрагментом в количестве 70% от максимальной ёмкости сорбента и собирали не связывающуюся со смолой (антитела 1) и связанную (антитела 2) фракции. Аффинно очищенные антитела 2 конъюгировали с пероксидазой хрена согласно описанному методу [20] и хранили в растворе 40% сульфата аммония при 4°.

Пепсиновый гидролизат ЛФ разделяли при помощи градиентного электрофореза в 10-20% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия и переносили пептиды на нитроцеллюлозный фильтр. Фильтр разрезали на полоски, одни полоски окрашивали неспецифически коллоидным серебром [21], а другие - инкубировали со специфическими антителами, затем с конъюгатом антикроличьих антител с пероксидазой хрена и визуализировали иммунные комплексы антител с ЛФ и его фрагментами при помощи субстратной смеси, состоящей из 0,018% раствора 4-хлоро-1-нафтаола в 0,01 М трис-HCl pH 7,5 с 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

В качестве рабочего буфера использовали 0,01 М трис-HCl, pH 7,5, 0,15 М NaCl, 0,02% Твин-20 с 10% бычьей сыворотки. Стандартные растворы ЛФ (6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400 нг/мл в конечном разведении) готовили из исходного раствора (0,1 мг/мл) на рабочем буфере. Концентрацию исходного раствора определяли, исходя из молярного коэффициента поглощения ЛФ при 280 нм [22]. Антитела 1 сорбировали из раствора (100 мкл на лунку) с концентрацией 20 мкг/мл в 0,01 М трис-HCl pH 7,5, 0,15 М NaCl, 0,02% NaN<sub>3</sub> при 4° в течение 12 ч на стенках 96-луночных полистирольных планшетов Titertek (Flow Laboratories, Англия). Остаточные центры сорбции блокировали буфером 0,01 М трис-HCl pH 7,5, 0,15 М NaCl, содержащим 10% бычьей сыворотки, в течение 30 мин на шейкере «Elpan» 358S (Польша). Все инкубации проводили при комнатной температуре. После блокировки центров неспецифической сорбции лунки промывали рабочим буфером, вносили по 50 мкл стандартных растворов ЛФ или образцов, по 50 мкл раствора конъюгата с концентрацией 260 нг/мл в рабочем буфере и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После инкубации промывали лунки тремя сменами по 100

мкл рабочего буфера с промежуточной инкубацией в течение 1 мин, с последующим ополаскиванием тремя сменами по 100 мкл 0,1 М цитрат-фосфатного буфера pH 5,0. В лунки вносили по 100 мкл окрашивающего раствора 0,1 М цитрат-фосфат pH 5,0, 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,4 мг/мл о-фенилендиамин, инкубировали 10 мин без перемешивания, останавливали реакцию добавлением 100 мкл 0,9 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и измеряли поглощение при 490 нм на многоканальном спектрофотометре «Bio-Rad» 2550 (США). Концентрацию ЛФ в исследуемых образцах определяли по калибровочной кривой, которую строили для каждого планшета.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** В результате выделения был получен гомогенный препарат лактоферрина человека (рис.1), который в дальнейшем использовали для иммунизации, фрагментации и изготовления аффинных сорбентов. Для получения антител к неперекрывающимся эпитопам молекулы лактоферрина, белок фрагментировали и, при помощи аффинной хроматографии, разделяли суммарные антитела на две субпопуляции, реагирующие с различными

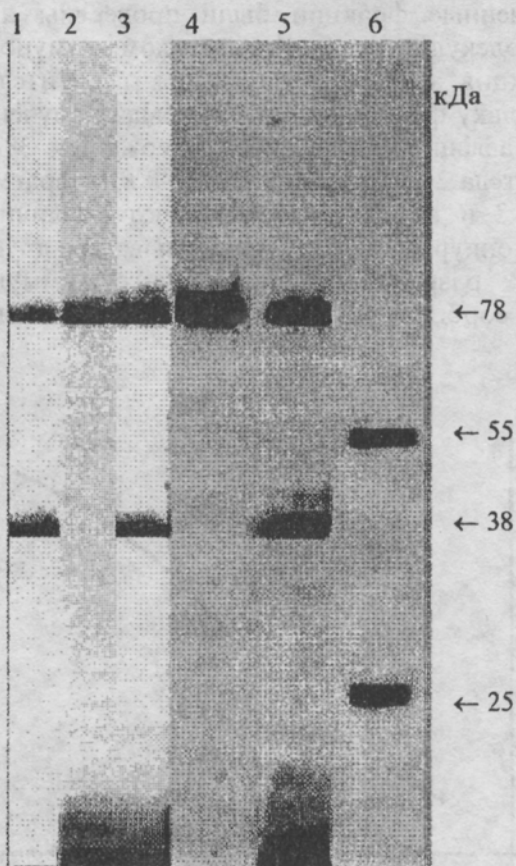


Рисунок 1.

Исследование специфичности антител, полученных аффинной хроматографией на сорбентах, изготовленных из лактоферрина и 38 кДа фрагмента лактоферрина. Пепсиновый гидролизат лактоферрина разделяли при помощи градиентного электрофореза в 10-20% ПААГ в присутствии додецилсульфата Na, переносили белки на нитроцеллюлозный фильтр, инкубировали полоски фильтра со специфическими антителами и визуализовали иммунные комплексы антител с лактоферрином и его фрагментами при помощи конъюгата антикроличьих антител с пероксидазой хрена. 1 — антитела против 38 кДа фрагмента лактоферрина (антитела 2); 2 — антитела против лактоферрина, не связывающиеся с 38 кДа фрагментом (антитела 1); 3 — антитела против всей молекулы лактоферрина; дорожки 4, 5, 6 — неспецифическое окрашивание коллоидным серебром: 4 — интактный лактоферрин; 5 — пепсиновый гидролизат лактоферрина; 6 — маркерный иммуноглобулин G.

антигенными детерминантами молекулы лактоферрина. Для фрагментации был выбран метод гидролиза ЛФ пепсином, в результате которого, как известно из литературных данных, образуется С-концевой [23] фрагмент молекулы ЛФ с мол. массой 38 кДа и набор низкомолекулярных пептидов (рис. 1). Были оптимизированы условия гидролиза белка и показано, что при обработке пепсином при рН 4,5 и соотношении фермент: субстрат 1:50 образуется фрагмент 38 кДа с выходом не менее 50%. При помощи гель-фильтрации на Сефадексе G-75 (fine) был выделен 38 кДа фрагмент молекулы ЛФ, не содержащий примеси исходного ЛФ, который использовали для приготовления аффинного сорбента (рис 1).

Для выделения антител к неперекрывающимся эпитопам молекулы ЛФ были использованы две хроматографии: на аффинном сорбенте, содержащем интактный ЛФ, и на сорбенте, содержащем фрагмент ЛФ с мол. массой 38 кДа. Аффинно очищенные антитела против всей молекулы ЛФ наносили на аффинный сорбент с 38 кДа фрагментом в количестве 70% от максимальной ёмкости сорбента и собирали не связывающие 38 кДа фрагмент (антитела 1) и связывающие этот фрагмент (антитела 2) фракции. Полученные фракции были проверены на способность связывать молекулы ЛФ и молекулы фрагмента методом иммуноблоттинга (рис. 1). Было показано, что фракция антител 1 не содержит антител, реагирующих с 38 кДа фрагментом. Поскольку фракция антител 2 была получена при помощи аффинной хроматографии на аффинном сорбенте, содержащем 38 кДа фрагмент молекулы лактоферрина, антитела 2 связывают только 38 кДа фрагмент лактоферрина. Таким образом, антитела 2 и антитела 1 связывают различные фрагменты молекулы лактоферрина, не конкурируя за сайты связывания друг с другом и могут быть использованы для разработки двухсайтного иммуноанализа. Антитела 1 использовали для сорбции, а антитела 2 - для изготовления конъюгата с пероксидазой хрена.

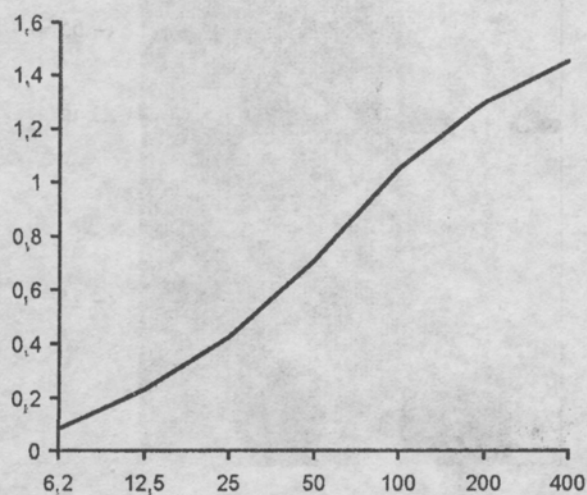


Рисунок 2.

Калибровочная кривая двухсайтного иммуноферментного анализа при времени инкубации 1 час. По оси абсцисс — концентрация лактоферрина в образце (нг/мл), по оси ординат — поглощение при 490 нм (опт. ед.).

С целью достижения максимальной ёмкости твёрдой фазы, для сорбции использовали раствор очищенных антител 1 с концентрацией 20 мкг/мл. При общем объёме реакционной смеси 100 мкл и концентрации ЛФ в исследуемом образце 100 нг/мл оптимальная концентрация конъюгата антител 2 с пероксидазой хрена составляет 130 нг/мл. Калибровочная кривая, полученная в результате инкубации реакционной смеси в течение 1 часа (рис. 2), имела удовлетворительные

характеристики в рабочем диапазоне концентраций (6-300 нг/мл) при конечном разведении образца сыворотки в реакционной смеси 1:10. Чувствительность метода, определённая как минимальная концентрация антигена, обнаруживаемая с вероятностью не менее 95% составляла 0,5 нг/мл. Точность анализа характеризовалась коэффициентом вариации, который составлял 44% для  $m=1$  нг/мл, 7% для  $m=10$  нг/мл и 6% для  $m=100$  нг/мл при определении в одной постановке образца сыворотки в нескольких повторах ( $n=14$ ). По данным теста на перекрёстные реакции с сывороточными белками, специфичность анализа была высокой. На результаты анализа практически не влияло присутствие человеческих белков (альбумина, гемоглобина и трансферрина) в концентрациях до 5 мг/мл (данные не приведены). Таким образом, было показано, что разработанный двухсайтный иммуноанализ может быть использован для определения концентрации лактоферрина в сыворотке крови человека.

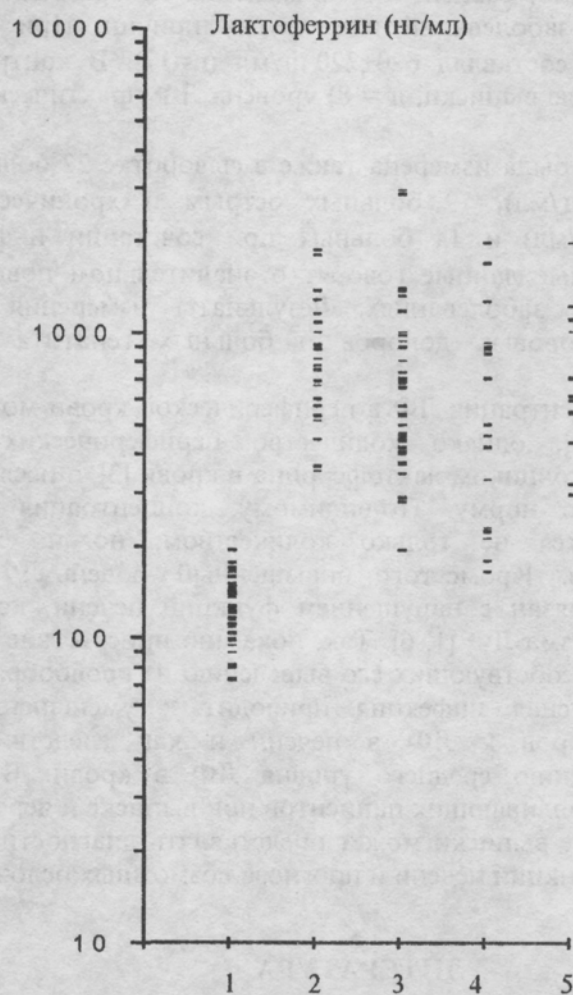


Рисунок 3.

Распределение концентраций лактоферрина в сыворотках 44 здоровых доноров и 95 больных вирусными гепатитами, полученное при помощи метода двухсайтного иммуноферментного анализа на лактоферрин. В каждом образце сыворотки измерения проводили дважды, вычисляя среднюю величину. 1 - здоровые доноры, 2 - больные гепатитом А, 3 - больные гепатитом В, 4 - больные гепатитом С, 5 - больные с сочетанием инфекций В и С.

При помощи метода двухсайтного анализа были исследованы сыворотки здоровых доноров и сыворотки больных вирусными гепатитами. Концентрация ЛФ

в 44 сыворотках здоровых доноров мужского пола составляла  $130 \pm 40$  нг/мл (среднее  $\pm$  среднеквадратическое отклонение), что согласуется с литературными данными [6].

Для выяснения возможной роли ЛФ при вирусных гепатитах, исследовали сыворотки крови группы больных гепатитами А, В и С на различных стадиях заболевания. Определение концентрации ЛФ в сыворотках крови 40 больных вирусным гепатитом В средней и тяжёлой степени показало, что уровень ЛФ при этих заболеваниях значительно повышается и составляет  $780 \pm 580$  нг/мл (в преджелтушный период заболевания). Исследование образцов сывороток пациентов, инфицированных гепатитом В, в динамике заболевания при поступлении на стационарное лечение, через две недели и при выписке показало, что содержание ЛФ может значительно изменяться и составлять от 290 до 1900 нг/мл. Такой широкий диапазон принимаемых значений, вероятно, объясняется тем, что содержание ЛФ в сыворотке крови, возможно, зависит от применения лекарственных препаратов, наличия сопутствующих заболеваний или других причин. При выздоровлении уровень ЛФ снижался и составлял  $620 \pm 220$  нг/мл ( $n=17$ ). В контрольной группе пациентов (2-3 месяца после выписки,  $n = 8$ ) уровень ЛФ практически не отличался от нормы —  $160 \pm 50$  нг/мл.

Концентрация ЛФ была измерена также в сыворотке 22 больных вирусным гепатитом А ( $850 \pm 420$  нг/мл), 19 больных острым и хроническим вирусным гепатитом С ( $680 \pm 500$  нг/мл) и 14 больных при сочетании инфекций В и С ( $740 \pm 450$  нг/мл). Полученные данные говорят о значительном повышении уровня ЛФ в крови при этих заболеваниях. Результаты измерения сывороточной концентрации ЛФ у здоровых доноров и больных гепатитами А, В и С представлены на рис. 3.

Известно, что концентрация ЛФ в периферической крови может зависеть от уровня лейкоцитов [5, 9], однако количество периферических нейтрофилов, являющихся основным источником лактоферрина в крови [3], в исследуемой группе пациентов не превышало норму. По-видимому, концентрация сывороточного лактоферрина определяется не только количеством, но и функциональной активностью нейтрофилов. Кроме того, повышенный уровень ЛФ при вирусных гепатитах может быть связан с нарушением функций печени, которая является главным местом метаболизма ЛФ [1, 6]. Так, показано присутствие на гепатоцитах рецепторов к ЛФ [24], способствующих его выведению из кровообращения. Можно предположить, что вирусная инфекция приводит к уменьшению количества функциональных рецепторов к ЛФ в печени и как следствие приводит к нерегулируемому повышению среднего уровня ЛФ в крови. В связи с этим определение ЛФ у выздоравливающих пациентов при выписке и через определённые промежутки времени после выписки может представлять диагностический тест для оценки восстановления функций печени и прогноза возможных осложнений.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Adamik B., Wlaszczyk A., (1996) Postepy Hig. Med. Dosw., 50, 33-41.
2. He J., Furmanski P., (1995) Nature, 373, 721-724.
3. Estevenon J.P., Figarella C., (1983) Clin. Chim. Acta., 129, 311-318.
4. Немцова Е. Р., Иванова Л. М., Якубовская Р. И., Писаревский К. И., (1995) Вопр. мед. химии., 41 (5), 58-61.
5. Hetherington S. V., Spitznagel J. K., Quie P. G., (1983) J. Immunol. Methods., 65, 183-190.
6. Rosenmund A., Friedli J., Bebie H., Straub P. W., (1988) Acta Haematol., 80 (1), 40-48.

7. *Defer M.C., Dugas B., Picard O., Damais C., (1995) Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand), 41, 417-421.*
8. *Борейкина И. П., Матулис А. А., Шевченко О. П., Веналис А. И., (1989) Ревматология, 4, 41-45.*
9. *Baynes R., Bezwoda W., Bothwell T., Khan Q., Mansoor N., (1986) Scand. J. Clin. Lab. Invest., 46, 695-704.*
10. *Barthe C., Galdbert C., Guy-Crotte O., Figarella C., (1989) Clin. Chim. Acta, 181, 183-188.*
11. *Сухарев А. Е., Николаев А. А., Васильев М. Ю., (1990) Лаб. дело, 8, 33-35.*
12. *Nemet K., Simonovits R., (1985) Haematologia (Budap), 18, 3-12.*
13. *Braun J., Dalhoff K., Lipp R., Eckmann C., Marre R., Wood W. G., Wiessmann K. J., (1992) Pneumologie, 46, 141-147.*
14. *Parkash O. M., Girdhar B. K., Sengupta U., (1993) Lepr. Rev., 64, 295-301.*
15. *Сухарев А. Е., Ермолаева Т. Н., Николаев А. А., Беда А. Н., Воронков М. И., Гринберг Б. А., (1996) Клин. лаб. диагн., 3, 29-30.*
16. *Baynes R., Bezwoda W., Khan Q., Mansoor N., (1986) Scand. J. Haemat., 36, 79-84.*
17. *Яковлев А. М., Туркин В. В., Толмазова Т. В., (1988) Ж. микробиол. эпидемиол. иммунобиол., 10, 75-79.*
18. *Van Munster P. J. I., Stoeling G. B. A., Poels-Zanders S., (1971) Immunochemistry, 8, 471-477.*
19. *Kohn J., Wilchek M., (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun., 107, 878-884.*
20. *Wilson M. B., Nakane P. K., (1978) Immunofluorescence and related staining techniques. London, pp. 215-224.*
21. *Moermans M., Daneels G., DeMey J., (1985) Anal. Biochem., 145, 315-321.*
22. *Monnard C., Varnet M., (1988) Path. Biol. (Paris), 36, 933-935.*
23. *Qian Z. Y., Jolles P., Migliore-Samour D., Fiat A. M., (1995) Biochim. Biophys. Acta, 243, 25-32.*
24. *Bennatt D. J., McAbee D. D., (1997) Biochemistry, 36, 8359-8366.*

Поступила 10. 10. 97 г.

#### DEVELOPMENT OF A TWO-SITE IMMUNOASSAY USING POLYCLONAL ANTIBODIES FOR LACTOFERRIN MEASUREMENT IN HUMAN SERA

P. P. LAKTIONOV, N. A. SHEVCHUK, V. A. NAUMOV, N. G. ZHEVACHEVSKY, E. YU. RYKOVA, V. V. VLASSOV

Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Pr. Lavrentjeva 8. Novosibirsk 630090, fax: (3832)33-36-77, e-mail: viv108@niboch.nsc.ru  
Military Clinical Hospital, Voinskaya St., 34. Novosibirsk, 630017; fax: (3832)66-80-47

The two-site enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for lactoferrin using polyclonal antibodies to spatially distant epitopes has been developed. The assay sensitivity defined as minimal detectable lactoferrin concentration for  $p = 0.05$  is 0,5 ng/ml. Accuracy of the assay (variance coefficient) is 7% within the clinical range of antigen concentrations. Human albumin, hemoglobin, and transferrin in concentrations up to 5 mg/ml practically do not interfere with the measurement.

Sera of healthy donors and viral hepatitis patients were investigated using the two-site ELISA. The lactoferrin content in 44 donors' sera was  $130 \pm 40$  ng/ml (medium  $\pm$  standard deviation). A study of the serum specimens of 95 patients with hepatitis A, B, and C showed significant increase in serum lactoferrin concentration:  $850 \pm 420$ ,  $780 \pm 580$ , and  $680 \pm 500$  ng/ml respectively.

The assay showed good characteristics and may be recommended for lactoferrin measurement in patients' sera.

**Key Words:** lactoferrin, two-site immunoassay, blood serum, viral hepatitis