

УДК 577.2

## (СТРЕПТ)АВИДИН ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С ГЛИКОКОНЬЮГАТАМИ

© 2024 Н.В. Шилова<sup>1,2\*</sup>, С.М. Полякова<sup>1</sup>, А.Ю. Нокель<sup>1,2</sup>, А.Д. Липатников<sup>1</sup>,  
Е.А. Гордеева<sup>1</sup>, М.В. Лаврентьева<sup>3</sup>, Н.В. Бовин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Государственный научный центр Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия; e-mail: rimatnv@gmail.com

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения РФ, 117997 Москва, Россия

<sup>3</sup> МИРЭА – Российский технологический университет, кафедра биотехнологии, 119571 Москва, Россия

Поступила в редакцию 08.04.2024

После доработки 11.10.2024

Принята к публикации 15.10.2024

Флуоресцентно меченный и конъюгированный (стрепт)авидин широко используется для визуализации биотинилированных молекул в иммунологических анализах и гистохимии. В представленной работе показано, что кроме биотина, эти белки связывают ряд гликанов, в том числе фрагменты гликопротеиновых и гликолипидных цепей млекопитающих, в частности, антигены системы крови АВО, олиголактозамины, 6-О-сульфатированные олигосахариды. Это взаимодействие дозозависимо ингибируется гликанами в полимерной (но не в мономерной) конъюгированной форме на уровне микромолярной концентрации, т.е. требует поливалентности. С учётом кластерной организации гликанов клетки (гликопротеинов и гликолипидов), при исследовании объектов, содержащих углеводы, это свойство является потенциальным источником ошибки, которую можно предотвратить, избегая большого избытка (стрепт)авидина в аналитической системе.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** стрептавидин, авидин, гликоконъюгаты, гликаны, гликановый эррей, микрочип.

DOI: 10.31857/S0320972524110143 EDN: IKGDSV

### ВВЕДЕНИЕ

(Стрепт)авидин широко используется в огромном количестве тест-систем благодаря уникальному высокой ( $10^{-14}$  М) константе связывания с биотином [1]. Однако биотин является не единственным его лигандом; ранее было описано низкоаффинное взаимодействие с нуклеозидами [2] и пептидами [3], а моносахарид манноза ингибировал на миллимолярном уровне взаимодействие как стрептавидина, так и авидина с биотинилированным кальтерикулином при изучении гликан-связывающих свойств последнего с помощью планшетного твердофазного метода анализа и блот-анализа [4]; аналогичная активность была продемонстрирована для сахарозы [5], мальтозы [6] и глюкозы [7]. Несмотря на наличие

литературных данных, подавляющее большинство специалистов в области биоаналитической химии не учитывает риск побочного взаимодействия (стрепт)авидина с гликанами. Лишь обнаружив такое неожиданное взаимодействие, авторы настоящей работы провели литературный поиск и нашли цитированные выше статьи. Последующее целенаправленное исследование, проведённое с помощью таких вариантов твердофазного анализа, как представительный гликановый эррей (в формате микрочипа) и планшетный анализ, показало, что (стрепт)авидин взаимодействует со многими гликанами, в том числе характерными для тканей и клеток млекопитающих.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Соли и другие неорганические реагенты были производства компании «Sigma-Aldrich» (Сент-Луис, Миссури, США).

Принятые сокращения: ПХ – пероксидаза хрена; ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

\* Адресат для корреспонденции.

**Гликановый эррей.** Гликановый эррей, содержащий 174 аминоспецифированных гликана и соответствующие им полиакриламидные гликоконьюгаты, Glyc-PAA, где Glyc – остаток гликана, а PAA – полиакриламид молекулярной массы ~20 кДа («GlycoNZ», Окланд, Новая Зеландия), печатали в формате микрочипа (далее термины «гликановый эррей», «микрочип» и «чип» будут использованы как эквивалентные) методом роботизированного нанесения бесконтактным принтером sciFLEXARRAYER S5 («Scienion», Берлин, Германия) 0,9 нл растворов гликанов или PAA-коньюгатов в буфере для печати (300 мМ фосфатный буфер, pH 8,5, содержащий 0,001%-ный Tween-20) на стёкла размером 25 × 75 мм, активированные N-гидроксисукцинилмидом (Slide H, «Schott Nexterion», Йена, Германия). Концентрация гликанов в буфере для печати составляла 50 мКМ. Все лигандаe были напечатаны в шести повторах. Размер наносимых пятен ~80 мкм. После печати чипы инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и 75%-ной влажности. Затем, согласно протоколу производителя активированных слайдов, оставшиеся N-гидроксисукцинилмидные группы блокировали погружением чипов в блокировочный буфер (25 мМ этаноламин в 100 мМ боратном буфере, содержащий 0,2%-ный Tween-20, pH 8,5) на 1,5 ч. Контроль иммобилизации лигандов осуществляли с помощью поликлональных антител сыворотки крови человека, а также с использованием наборов растительных лектинов и моноклональных антител (как описано, например, в работе Obukhova et al. [8]).

**Взаимодействие стрептавидина с гликанами чипа.** 1 мл раствора стрептавидина, меченого красителем Alexa 555 («Invitrogen», Карлсбад, Калифорния, США), в концентрации 1 мКг/мл (18 нМ) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, «Эко-Сервис», Санкт-Петербург, Россия), содержащем 0,1%-ный (v/v) Tween-20 («Sigma-Aldrich») (ФСБ-0,1%), наносили на чип (предварительно смоченный в ФСБ-0,1% в течение 10 мин при комнатной температуре) и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C и 75%-ной влажности. Затем чип дважды промывали ФСБ, содержащим 0,05%-ный Tween-20, и, на заключительном этапе, бидистиллированной водой, после чего высушивали центрифугированием и сканировали (разрешение 10 мкм) с помощью флуоресцентного сканера InnoScan 1100 AL («Innopsys», Карбон, Франция). Изображения преобразовывали в таблицу Excel с помощью программного обеспечения ScanArray Express 4.0 с использованием метода фиксированных колец («PerkinElmer», Шелтон, Коннектикут, США) и GAL-файла. Результаты представляли в виде медианы относительных единиц флуоресценции (ОЕФ). Сигналы величины, в 10 раз превышающей

ОЕФ фона (сигналы от пятен, не содержащих гликанов), считали значимыми.

**Взаимодействие рицинового агглютинина (RCA 120) с гликанами чипа.** 1 мл раствора биотинилированного RCA 120 («Vector Laboratories», Ньюарк, Калифорния, США) в концентрации 10 мКг/мл в ФСБ-0,1% наносили на микрочип и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C и 75%-ной влажности с последующей промывкой ФСБ-0,05%. Затем наносили 1 мл раствора стрептавидина, меченого Alexa 555 («Invitrogen»), в концентрации 1 мКг/мл (18 нМ) или 0,1 мКг/мл (1,8 нМ) в ФСБ-0,1% и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C и 75%-ной влажности. Затем были выполнены последующие этапы, как описано в разделе «Взаимодействие стрептавидина с гликанами чипа».

**96-Луночный твердофазный анализ. Взаимодействие стрептавидина и авидина с гликоконьюгатами. Прямое связывание.** В лунки планшетов (NUNC Maxisorp, «Thermo Fisher Scientific», Уолтем, Массачусетс, США) вносили по 100 мкл растворов коньюгатов Glyc-PAA («GlycoNZ») в двух повторах, в двукратном разведении, начиная с 20 мКг/мл, в 0,05 М Na-карбонатном буфере, pH 9,6, и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C, после чего вносили 120 мкл 1%-ного бычьего сывороточного альбумина, БСА («Sigma-Aldrich»), в ФСБ и выдерживали в течение 1 ч при 37 °C. Затем лунки трижды промывали ФСБ-0,05%, после чего прибавляли 100 мкл раствора стрептавидина, меченого пероксидазой хрена (ПХ), стрептавидина-ПХ («Southern Biotech», Бирмингем, Алабама, США), или авидина-ПХ («BioLegend», Сан-Диего, Калифорния, США) в концентрации 0,1 мКг/мл (1,8 нМ) в ФСБ, содержащем 0,3% БСА (ФСБ-0,3% БСА), и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C. После промывки, как описано выше, проводили оценку ферментативной активности пероксидазы путём 30-минутной инкубации с буфером, состоящим из 0,1 М фосфата натрия/0,1 М лимонной кислоты, содержащим 0,04%-ный о-фенилендиамин и 0,03%-ную H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 мкл/лунка), что сопровождалось изменением цветности субстратного раствора. Реакцию останавливали добавлением в лунки планшета 50 мкл 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Оптическую плотность (ОП) регистрировали при длине волны 492 нм с помощью многофункционального планшетного анализатора Wallac Victor2 1420 («PerkinElmer», Шелтон, Коннектикут, США). Все эксперименты проводили дважды, разброс между значениями не превышал 10%.

**Ингибирование взаимодействия стрептавидина с гликоконьюгатами.** В лунки планшетов вносили по 100 мкл раствора коньюгата GlcNAc-PAA в концентрации 10 мКг/мл в 0,05 М Na-карбонатном буфере, pH 9,6, после чего лунки блокировали и промывали, как указано в разделе

«Взаимодействие стрептавидина и авидина с гликоконъюгатами. Прямое связывание». Последовательные двукратные разведения ингибиторов – гликанов в спейсерированной или в PAA-форме (50 мкл/лунка, начальная концентрация 0,5 мМ по Glyc в ФСБ-0,3% БСА) – добавляли одновременно со стрептавидином-ПХ (0,2 мкг/мл, 50 мкл/лунка) в ФСБ-0,3% БСА, и планшет инкубировали в течение 1 ч при 37 °C, трижды промывали промывочным буфером, затем проводили измерение ферментативной активности пероксидазы, как указано в разделе «Взаимодействие стрептавидина и авидина с гликоконъюгатами. Прямое связывание».

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

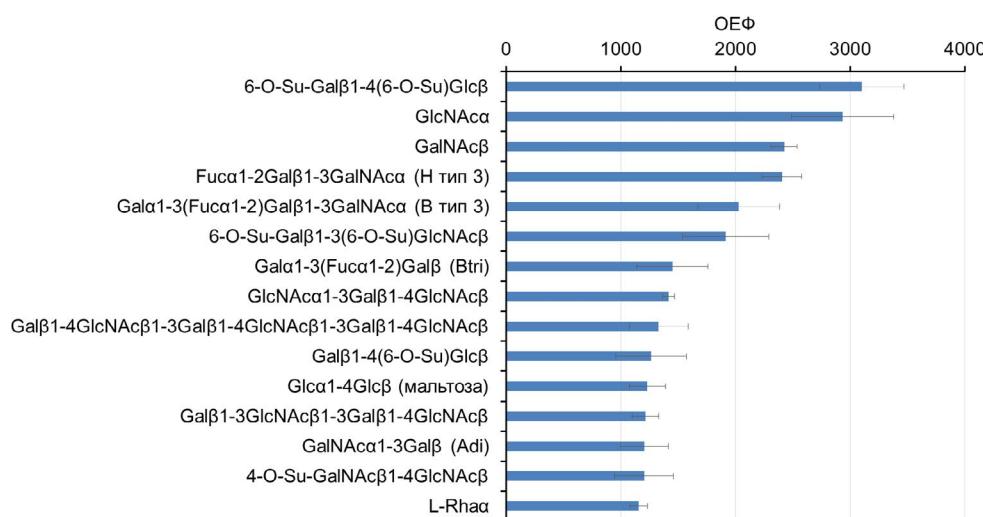
С помощью микрочипа обнаружено, что флуоресцентно меченный стрептавидин взаимодействует с несколькими десятками моно- и олигосахаридов, иммобилизованных на чипе (около 50 из 174). На рис. 1 показаны 15 наиболее активных (топовых) гликанов, включая мальтозу, связывание которой со стрептавидином наблюдалось ранее [6], более подробно эти данные приведены в Приложении 1. Интенсивность сигналов была сравнима с интенсивностью «канонических» углеводсвязывающих белков – лектинов (что показано, например, в работах Ahmad et al. и Shilova et al. [9, 10]).

Среди связывающих гликанов отметим антигены группы крови АВО – олигосахарида В и Н, олиголактозамины, а также 6-O-сульфатированные олигосахариды, то есть те, которые типичны для гликопротеинов и гликолипидов человека.

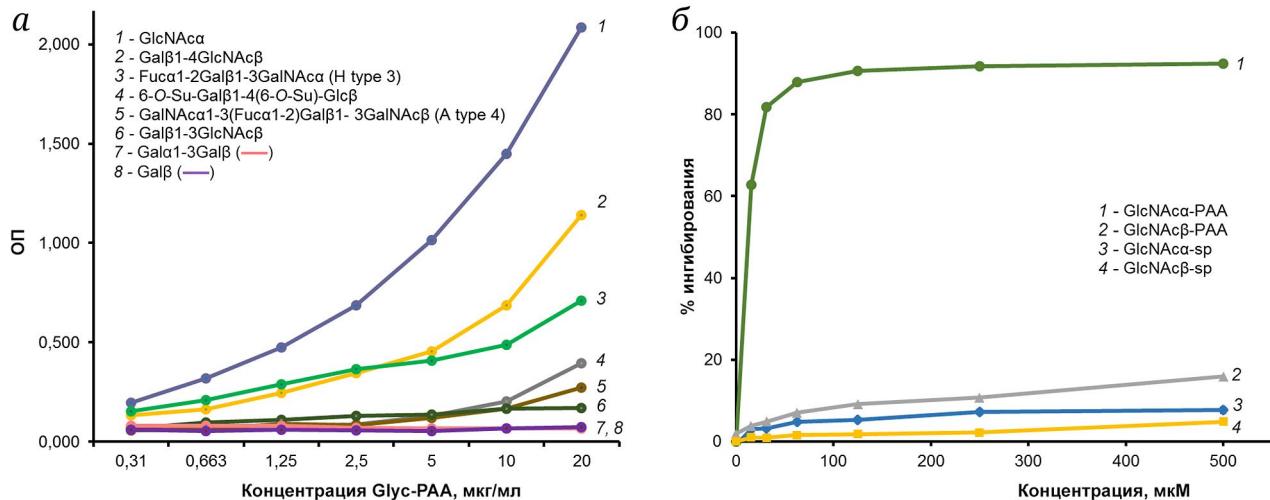
С помощью 96-луночного твердофазного анализа, который включал семь гликанов, проявивших активность в составе чипа, была показана концентрационная зависимость взаимодействия (рис. 2, а).

Взаимодействие с гликанами было воспроизведимым при использовании стрептавидина разных производителей («Invitrogen», «SouthernBiotech» и «Sigma-Aldrich») с разными метками (ПХ и Alexa 555). Подобно стрептавидину, авидин взаимодействовал с GlcNAca, трисахаридом Н типа 3 и сульфатированными гликанами (данные не показаны).

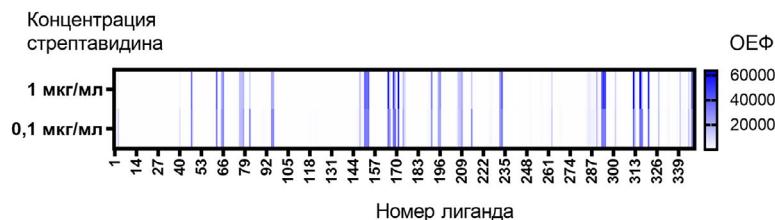
Согласно проведённому ингибиторному анализу, взаимодействие стрептавидина с углеводами дозозависимо ингибируется конъюгатами Glyc-PAA в диапазоне концентраций (по гликану) от 15 до 500 мКМ, как показано на примере GlcNAca-PAA – гликоконъюгата, проявившего максимальную активность как на микрочипе, так и в планшетном твердофазном анализе. Отметим, что GlcNAc $\beta$ -PAA такого действия не оказывал (рис. 2, б). Мономерные (неконъюгированные) гликаны не оказывали ингибирующего действия в этом диапазоне концентраций, т.е. взаимодействие требует поливалентности, которая, по-видимому, реализуется всеми свободными (т.е. не занятymi меткой или ПХ) субъединицами стрептавидина, с одной стороны, и множеством копий остатка Glyc, присоединённого к полимерной цепи, – с другой. Сайт связывания белка с гликаном не совпадает с сайтом связывания биотина, в противном случае биотин вытеснил бы значительно менее аффинный гликан в используемой тест-системе, чего не происходило.



**Рис. 1.** Гликаны, показавшие наилучшее взаимодействие со стрептавидином, меченым Alexa 555 (в концентрации 1 мкг/мл). Гликановый эррея состоял из 174 гликанов, иммобилизованных в виде поликарбамидных конъюгатов, Glyc-PAA [11]. Максимально возможное значение флуоресценции (OEФ) в этой аналитической системе составляет около 65 000; сигналы от пятен, не содержащих лигандов, то есть фон, не превышают 100 OEФ. Все моносахариды, за исключением рамнозы, являются D-пиранозами. Тривиальные названия олигосахаридов приведены в круглых скобках. См. подробнее в Приложении 1



**Рис. 2.** Взаимодействие стрептавидина, меченного ПХ (в концентрации 0,1 мкг/мл), с конъюгатами Glyc-PAA: а – концентрационная зависимость взаимодействия с гликоконъюгатами, иммобилизованными в лунках 96-луночного планшета; б – дозозависимое ингибирование взаимодействия меченого стрептавидина с иммобилизованным GlcNAcα-PAA и GlcNAcβ-PAA, а также неконъюгированными GlcNAcα-sp и GlcNAcβ-sp (sp – спейсер). ОП – оптическая плотность



**Рис. 3.** Снижение концентрации стрептавидина при визуализации связывания RCA120 с его лигандами не повлияло ни на общую интенсивность сигнала, ни на профиль взаимодействия. Коэффициент корреляции Пирсона равен 0,92. См. подробнее в Приложении 2

Следует отметить, что диапазон микромолярных концентраций типичен для углеводных ингибиторов антигликановых антител и лектинов и соответствует микромолярному диапазону констант аффинности [9, 10, 12], которые достаточно высоки, чтобы от нежелательного связывания стрептавидина с углеводом можно было бы освободиться с помощью интенсификации стадии промывки комплекса при проведении анализа.

Высокая аффинность биотина по отношению к стрептавидину создаёт предпосылку уменьшения концентрации стрептавидиновых реагентов в аналитических системах, чтобы тем самым без потери аналитического сигнала понизить нежелательное связывание с гликанами. Чтобы проверить такую возможность, биотинилированный лектин RCA120 был проявлен с помощью флуоресцентно меченного стрептавидина в двух концентрациях – 1 мкг/мл (используется обычно) и 0,1 мкг/мл. На рис. 3 показано, что десятикратное снижение концентрации в целом не влияло ни на интенсивность наблюдаемого сигнала, ни на профиль взаимодействия RCA120 с гликанами.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Система (стрепт)авидин-биотин имеет многолетнюю историю использования в качестве инструмента для детекции в различных аналитических системах. Наряду с многочисленными публикациями о её успешном использовании существуют работы, свидетельствующие о получении ложноположительных результатов при выявлении антигенов человека и животных [13–15]. Среди прочих причин в цитируемых работах обнаруженные факты объясняли присутствием биотиноподобных молекул в тканях и/или влиянием эндогенных гликанов [15]. Авторы [16] отмечали, что использование стрептавидина в сэндвич-формате твердофазного анализа следует проводить с осторожностью из-за возможного влияния углеводов, содержащихся в образцах. При изучении супрамолекулярных конструктов на основе авидина были выдвинуты аналогичные объяснения [6].

Наши исследования показали, что стрептавидин и авидин способны связываться с широким кругом гликанов, в том числе типичных для клеток млекопитающих. Несмотря на то, что

выявленные углеводные лиганды относятся к структурно разным классам, эти взаимодействия не являются неспецифическими, а скорее полиреактивными, что характерно для ряда лектинов. Очевидно, что в действительности круг (стрепт)-авидин-позитивных гликанов ещё шире, поэтому необходимо проявлять осторожность при оценке результатов экспериментов, проводимых с использованием этих белков в биоаналитических тест-системах. Отметим также, что взаимодействие (стрепт)авидина с гликанами в конкретной тест-системе будет зависеть от степени гликозилирования изучаемого объекта, присутствия детергентов и блокирующих агентов и множества других факторов.

Общим решением этой проблемы является уменьшение количества конъюгированного (стрепт)авидина, который обычно берут в неоправданном избытке (как показано в данном исследовании), или применением конъюгата с полипероксидазой, в котором содержание стрептавидина снижено. Следует также отметить, что использование пары (стрепт)авидин-биотин не ограничивается фундаментальными исследованиями и диагностикой *in vitro*, (стрепт)авидиновая система апробируется для доставки лекарств [17, 18],

где обнаруженная полиреактивность этих белков становится потенциальным источником побочных эффектов.

**Благодарности.** Эта работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-63-47110.

**Вклад авторов.** Надежда В. Шилова и Николай В. Бовин – концептуализация, планирование экспериментов, написание рукописи, рецензирование и редактирование; Алексей Ю. Нокель – печать эрреев, анализ данных; Светлана М. Полякова, Александр Д. Липатников, Елена А. Гордеева и Марина В. Лаврентьевна – проведение экспериментов с гликановыми эрреями и твердофазным анализом, анализ данных и подготовка рисунков.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо другой сфере.

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

**Дополнительные материалы.** Приложения к статье опубликованы на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Green, M. N. (1990) Avidin and streptavidin, *Methods Enzymol.*, **184**, 51-67, [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)84259-J](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)84259-J).
2. Bing, T., Chang, T., Qi, C., Zhang, N., Liu, X., and Shangguan, D. (2012) Specific interactions between adenosine and streptavidin/avidin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**, 7052-7055, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.09.088>.
3. Caparon, M. H., De Ciechi, P. A., Devine, C. S., Olins, P. O., and Lee, S. C. (1996) Analysis of novel streptavidin-binding peptides, identified using a phage display library, shows that amino acids external to a perfectly conserved consensus sequence and to the presented peptides contribute to binding, *Mol. Divers.*, **1**, 241-246, <https://doi.org/10.1007/BF01715528>.
4. Houen, G., and Hansen, K. (1997) Interference of sugars with the binding of biotin to streptavidin and avidin, *J. Immunol. Methods*, **210**, 115-123, [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(97\)00166-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(97)00166-X).
5. Smith, J. A., Xu, G., Feng, R., Janetka, J. W., and Moeller, K. D. (2016) C-glycosides, array-based addressable libraries, and the versatility of constant current electrochemistry, *Electroanalysis*, **28**, 2808-2817, <https://doi.org/10.1002/elan.201600200>.
6. Ennen, F., Boye, S., Lederer, A., Cernescu, M., Komber, H., Brutschy, B., Voit, B., and Appelhans, D. (2014) Biohybrid structures consisting of biotinylated glycopolymers and proteins: influence of the biotin ligand's number and chemical nature on the biotin-avidin conjugation, *Polym. Chem.*, **5**, 1323-1339, <https://doi.org/10.1039/C3PY01152F>.
7. Beber, A., Alqabandi, M., Prévost, C., Viars, F., Lévy, D., Bassereau, P., Bertin, A., and Mangenot, S. (2019) Septin-based readout of PI(4,5)P<sub>2</sub> incorporation into membranes of giant unilamellar vesicles, *Cytoskeleton*, **76**, 92-103, <https://doi.org/10.1002/cm.21480>.
8. Obukhova, P., Tsygankova, S., Chinarev, A., Shilova, N., Nokel, A., Kosma, P., and Bovin, N. (2020) Are there specific antibodies against Neu5Gc epitopes in the blood of healthy individuals? *Glycobiology*, **30**, 395-406, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz107>.
9. Ahmad, N., Gabius, H.-J., Kaltner, H., André, S., Kuwabara, I., Liu, F.-T., Oscarson, S., Norberg, T., and Brewer, C. F. (2002) Thermodynamic binding studies of cell surface carbohydrate epitopes to galectins-1, -3, and -7: evidence for differential binding specificities, *Canad. J. Chem.*, **80**, 1096-1104, <https://doi.org/10.1139/v02-162>.
10. Shilova, N., Bovin, N., Maltseva, D., Polyakova, S., Sablina, M., Niwa, H., Zakharova, G., Raygorodetskaya, M., Bufeeva, L., Belyi, Y., Hushpulian, D., and Tonevitsky, A. (2022) Specificity of viscumin revised. As probed with a printed glycan array, *Biochimie*, **202**, 94-102, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.08.009>.

11. Tuzikov, A., Chinarev, A., Shilova, N., Gordeeva, E., Galanina, O., Ovchinnikova, T., Schaefer, M., and Bovin, N. (2021) 40 years of glyco-polyacrylamide in glycobiology, *Glycoconj. J.*, **38**, 89-100, <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09965-5>.
12. Obukhova, P., Rieben, R., and Bovin, N. (2007) Normal human serum contains high levels of anti-Gal $\alpha$ 1-4GlcNAc antibodies, *Xenotransplantation*, **14**, 627-635, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2007.00436.x>.
13. Duhamel, R. C., and Whitehead, J. S. (1990) Prevention of nonspecific binding of avidin, 201-207, [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)84275-L](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)84275-L).
14. Nyhlin, N., El-Salhy, M., Sandström, O., and Suhr, O. (1997) Evaluation of immunohistochemical staining of human duodenal endocrine cells after microwave antigen retrieval, *Histochem. J.*, **29**, 177-181, <https://doi.org/10.1023/a:1026441623791>.
15. Kim, S. H., Jung, K. C., Shin, Y. K., Lee, K. M., Park, Y. S., Choi, Y. L., Oh, K. I., Kim, M. K., Chung, D. H., Son, H. G., and Park, S. H. (2002) The enhanced reactivity of endogenous biotin-like molecules by antigen retrieval procedures and signal amplification with tyramine, *Histochem. J.*, **34**, 97-103, <https://doi.org/10.1023/a:1020954611464>.
16. Shone, C., Ferreira, J., Boyer, A., Cirino, N., Egan, C., Evans, E., Kools, J., and Sharma, S. (2006) The 5th international conference on basic and therapeutic aspects of Botulinum and tetanus neurotoxins. Workshop review: assays and detection, *Neurotox. Res.*, **9**, 205-216, <https://doi.org/10.1007/BF03033940>.
17. Dundas, C. M., Demonte, D., and Park, S. (2013) Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 9343-9353, <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5232-z>.
18. Jain, A., and Cheng, K. (2017) The principles and applications of avidin-based nanoparticles in drug delivery and diagnosis, *J. Control. Rel.*, **245**, 27-40, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.016>.

## (STREPT)AVIDIN BINDS GLYCOCOCONJUGATES

**N. V. Shilova<sup>1,2\*</sup>, S. M. Polyakova<sup>1</sup>, A. Yu. Nokel<sup>1,2</sup>, A. D. Lipatnikov<sup>1</sup>,  
E. A. Gordeeva<sup>1</sup>, M. V. Lavrenteva<sup>3</sup>, and N. V. Bovin<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
117997 Moscow, Russia; e-mail: pumatnv@gmail.com

<sup>2</sup> National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology  
named after Academician V. I. Kulakov of the Ministry of Health of Russian Federation,  
117997 Moscow, Russia

<sup>3</sup> MIREA, Russian Technological University, Biotechnology department, 119571 Moscow, Russia

Fluorescently labeled and conjugated (strept)avidin is widely used for imaging of biotinylated molecules in immunological assays and histochemistry. The presented article shows that in addition to biotin, these proteins bind a number of glycans, including fragments of glycoprotein and glycolipid chains of mammals, in particular, antigens of the ABO blood system, oligolactosamines, 6-O-sulfated oligosaccharides. This interaction is inhibited in a dose-dependent manner by glycans in a form of polymeric (but not monomeric) conjugates at the micromolar concentration level, i.e. requires polyvalence. Taking into account the cluster organization of cell glycans (glycoproteins and glycolipids), when analyzing objects containing carbohydrates, this property is a potential source of error, that can be prevented by avoiding a large excess of (strept)avidin in the analytical system.

**Keywords:** streptavidin, avidin, glycoconjugates, glycans, printed glycan array, microarray