

Отечественный белок G для диагностики *in vitro*

Е.А.Панфёрцев, О.Н.Перовская, А.Г.Шевяков, Т.В.Решетняк, А.Г.Королёва-Ушакова, В.А.Яковлева, В.В.Мочалов, А.А.Горбатов, П.В.Соловьёв, Е.В.Баранова, С.Ф.Бикетов

ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболensk, Московская область, Российская Федерация

Белок G широко используется в таких областях, как биохимия (изучение механизмов клеточного ответа на внешние стимулы, включая гормоны, нейромедиаторы и абиотические факторы), фармацевтика (разработка лекарств, модулирующих активность G-белков, для лечения сердечной недостаточности, воспалений и лейкоза), биотехнологии (выделение и очистка иммуноглобулинов из образцов, иммобилизация антител на поверхности). Наличие производства отечественного белка G актуально для развития в стране *in vitro* диагностики.

Ключевые слова: белок G, иммунохроматографический серотест, золотоконъюгат

Для цитирования: Панфёрцев Е.А., Перовская О.Н., Шевяков А.Г., Решетняк Т.В., Королёва-Ушакова А.Г., Яковлева В.А., Мочалов В.В., Горбатов А.А., Соловьёв П.В., Баранова Е.В., Бикетов С.Ф. Отечественный белок G для диагностики *in vitro*. Бактериология. 2025; 10(4): 152–154. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-4-152-154

Domestic protein G for *in vitro* diagnostics

E.A.Panfertsev, O.N.Perovskaya, A.G.Shevyakov, T.V.Reshetnyak, A.G.Koroleva-Ushakova, V.A.Yakovleva, V.V.Mochalov, A.A.Gorbatov, P.V.Solovyov, E.V.Baranova, S.F.Biketov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow region, Russia

The G protein is widely used in fields such as biochemistry (studying the mechanisms of cellular response to external stimuli, including hormones, neurotransmitters, and abiotic factors), pharmaceuticals (developing drugs that modulate G protein activity for the treatment of heart failure, inflammation, and leukemia), and biotechnology (isolating and purifying immunoglobulins from samples, immobilizing antibodies on surfaces). Domestic production of the G protein is essential for the development of *in vitro* diagnostics in the country.

Key words: protein G, immunochromatographic serotest, gold conjugate

For citation: Panfertsev E.A., Perovskaya O.N., Shevyakov A.G., Reshetnyak T.V., Koroleva-Ushakova A.G., Yakovleva V.A., Mochalov V.V., Gorbatov A.A., Solovyov P.V., Baranova E.V., Biketov S.F. Domestic protein G for *in vitro* diagnostics. Bacteriology. 2025; 10(4): 152–154. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-4-152-154

Стрептококки подвида G продуцируют поверхностный белок (SpG), который прочно связывается с Fc-областью иммуноглобулина G (IgG). Было описано, что SpG связывает широкий спектр IgG млекопитающих или три IgG-связывающих домена. Высокая способность SpG связывать IgG обычно используется для обнаружения и количественного определения антигенов путем связывания SpG с репортерным ферментом, например, в вестерн-блоттинге или иммуноферментном анализе (ELISA). Конъюгаты IgG-связывающего домена SpG с коллоидным золотом исполь-

зуются при разработке иммунохроматографических (ИХ) тестов. Для эффективного синтеза конъюгата на основе коллоидного золота аминокислотная последовательность протеина G должна содержать аминокислоту цистеин, которая отсутствует в нативном IgG-связывающем домене.

Получение белка G. Для получения стабильного источника SpG-Cys-белка нами был создан штамм-продуцент *Escherichia coli*. Фрагмент ДНК *Streptococcus G*, кодирующий синтез трех IgG-связывающих доменов (615 п.о.), был получен при помощи ПЦР-амплификации и клонирован в составе

Для корреспонденции:

Панфёрцев Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболensk, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0147
ORCID: 0000-0001-6778-934X

Статья поступила 10.10.2025, принята к печати 25.12.2025

For correspondence:

Evgeny A. Panfertsev, MD, PhD, Senior Researcher of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147
ORCID: 0000-0001-6778-934X

The article was received 10.10.2025, accepted for publication 25.12.2025

экспрессирующего вектора pET40b (Novagen, США). В состав обратного ПЦП-праймаера был включен кодон АСА, кодирующий биосинтез цистеина. Рекombинантный штамм-производитель *E. coli* Bl21RP/pETGcysNH был получен путем трансформации штамма-хозяина рекомбинантной плазмидной ДНК. Для выделения рекомбинантного SpG-Cys-белка клетки *E. coli* Bl21RP/pETGcysNH штамма-производителя выращивали при температуре 37°C в жидкой аэрируемой среде LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) и глюкозы (0,4%) в лабораторном ферментере New Brunswick Scientific с рабочим объемом 5 л до оптической плотности A600-0,6-0,8. Затем добавляли IPTG до 1 мМ и растили еще 4 ч. Клеточную суспензию центрифугировали при 7000 g в течение 10 мин при температуре 4°C.

Хроматографическая очистка рекомбинантного белка G. Хроматографическую очистку рекомбинантного SpG-Cys-белка проводили на HisTrap™ HP колонке фирмы GE (США) по методике фирмы-производителя. Целевой белок элюировали буфером, содержащим 300 мМ имидазола, с последующим обессоливанием на колонке HiPrep™26/10 Desalting фирмы GE (USA), уравновешенной фосфатно-солевым буфером. Очищенный белок SpG-Cys анализировали электрофорезом в редуцирующих и нередуцирующих условиях.

Получение конъюгата белка G с наночастицами коллоидного золота. В круглодонную колбу с обратным холодильником вносили 95 мл деионизованной воды и добавляли 1 мл 1%-го раствора золотохлористоводородной кислоты. Доводили смесь до кипения при перемешивании и вносили 4 мл свежеприготовленного 1%-го раствора цитрата натрия. Кипятили смесь еще 15 мин и охлаждали ее до комнатной температуры. Полученный препарат коллоидного золота (КЗ) хранили при температуре 4°C в темноте.

Определение количества белка G, необходимого для конъюгации. Раствор КЗ защелачивали добавлением 0,1 М раствора карбоната калия до pH 8,5. В микропробирки вносили по 100 мкл растворов SpG с концентрациями 5–250 мкг/мл в 10 мМ трис-хлориде pH 8 и добавляли по 1 мл раствора КЗ, перемешивали и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Затем в каждую пробу вносили 0,1 мл 10%-го раствора NaCl и перемешивали. Через 5 мин измеряли оптическую плотность раствора при $\lambda = 580$ нм. За фоновый сигнал принимали оптическую плотность исходного КЗ. В качестве оптимальных для получения иммунохроматографически эффективных препаратов принимали концентрацию SpG, на 10% превосходящую точку выхода на плато.

Иммобилизация белка G на частицах золота. К 10 мл КЗ добавляли свежеприготовленный 0,1М K₂CO₃ до pH 8,5–9,0. Затем вносили раствор SpG в 10 мМ трис-хлориде pH 8, содержащий экспериментально установленное оптимальное количество белка. Смесь инкубировали 60 мин при комнатной температуре и перемешивании, после чего вносили 0,1 мл 10%-го раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА). Частицы с иммобилизованным белком отделяли центрифугированием при 9000 g в течение 30 мин. После отбора супернатанта осадок ресуспендировали в буфере для КЗ (10 мМ трис-хлорид pH 7,4, 1% сахароза, 1% БСА, 0,05% Tween-20, 0,002% азид натрия). Полученный конъюгат хранили при температуре 4°C в темном месте.

Конструирование ИХ-серотестов на основе собственных компонентов

Для изготовления ИХ-серотестов на выявление маркеров таких заболеваний, как боррелиоз, туляремия, лепра, в касетном формате были отобраны следующие материалы производства Advanced Microdevices (Индия): ламинированные нитроцеллюлозные мембраны на твердой основе с пористостью 12 мкм (CNPC-SS12-L3-P25, 25 мм NC, 27 AP-080, 60 × 300 мм); подушечки для впитывания образца (GFB-R4 (0.6), 25 × 300 мм); стекловолоконные фильтры для золотоконъюгата (TYPE-PT-R5, 6 × 300 мм).

Нанесение золотоконъюгата проводили диспенсером IsoFlow (Imagene Technology, США) в объеме 0,48 мл на стекловолоконные фильтры длиной 30 см и шириной 0,6 см, со скоростью нанесения 8 мм/с и в объеме 1,6 мкл/мм. Распыление реагента, его непрерывность и равномерность контролировали визуально. По окончании распыления реагента фильтры укладывали на поддон для сушки. Формирование аналитической и контрольной зон проводили диспенсером IsoFlow (Imagene Technology, США). Для аналитической зоны использовали растворы различных антигенов, в зависимости от специфических мишеней. Для серотестов на туляремию на нитроцеллюлозную мембрану наносили липополисахарид; на лепру – растворы синтетических (на основе фенольного гликолипида и липоарабиноманнана) и рекомбинантных антигенов (ML 0050 и ML 0576); на боррелиоз – рекомбинантные антигены производства ФБУН ГНЦ ПМБ (раствор смеси высокоочищенных рекомбинантных декорин-связывающих белков боррелий – *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii* – DBPAG). Для контрольной зоны использовали раствор козьих антител против иммуноглобулинов мыши (Arista) в фосфатно-солевом буфере. Данные растворы наносили на ламинированные нитроцеллюлозные мембраны CNPC-SS12-L3-P25, 25 мм NC, 27 AP-080, 75 × 300 мм в концентрации 0,5 мг/мл, со скоростью нанесения 4 мм/с и объемом 0,2 мкл/мм. В качестве стабилизирующих добавок в этом же растворе использовали 5% глицерин, 1% БСА, 0,01% азид натрия. Сушку мембран и фильтров с нанесенными реагентами проводили в климатической камере (Memmert, Германия) при температуре 25 ± 2°C и влажности 20%. Сборку полуфабриката производили следующим образом: с самоклеящейся поверхности нитроцеллюлозной мембраны удалили защитную ленту, фильтр с золотоконъюгатом уложили на клеящую поверхность внахлест (0,1–0,2 см) на нитроцеллюлозную мембрану. Фильтр для нанесения пробы GFB-R4 (0.6), 25 × 300 мм уложили на клеящую поверхность мембраны внахлест (0,2–0,3 см) на фильтр с золотоконъюгатом. Поверх фильтра для нанесения пробы, отступив 0,5 см от нижнего края и внахлест (0,1–0,2 см), на нитроцеллюлозную мембрану наклеили мембрану ламинирующую (Type MT1, 25 × 300 мм). Далее произвели нарезку полосок из полуфабриката по 3 мм при помощи автоматического программируемого гильотинного нарезчика ИХ-тестов ZQ3502 (Kinbio, Китай).

Пригодность полученных ИХ-тестов исследовали с помощью панели сывороток крови пациентов. Ранее в качестве основного визуализирующего компонента ИХ-тестов мы использовали коллоидное золото, конъюгированное с белком G производства США (Arista). Однако на сегодняшний

день нами установлено и подтверждено многочисленными исследованиями, что полученный во ФБУН ГНЦ ПМБ белок G по способности конъюгироваться с коллоидным золотом и показателям чувствительности не уступает импортному препарату. В связи с этим данный биопрепарат может использоваться при производстве ИХ-серотестов.

Информация о финансировании

Данное исследование выполнено в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was supported by the Sectoral Scientific Program of the Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Информация о соавторах:

Перовская Ольга Николаевна, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Шевяков Антон Георгиевич, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-0504-7073

Решетняк Татьяна Викторовна, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Королёва-Ушакова Анжела Григорьевна, младший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Яковлева Вера Александровна, младший сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Мочалов Владимир Вячеславович, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Горбатов Алексей Александрович, кандидат медицинских наук, заместитель директора ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-0799-893X

Соловьёв Павел Владимирович, кандидат биологических наук, заместитель директора по научной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Баранова Евгения Владимировна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-6455-5756

Бикетов Сергей Фёдорович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-1179-6895

Information about co-authors:

Olga N. Perovskaya, Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Anton G. Shevyakov, Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор
ORCID: 0000-0002-0504-7073

Tatyana V. Reshetnyak, Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Angela G. Koroleva-Ushakova, Junior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Vera A. Yakovleva, Junior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Vladimir V. Mochalov, Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Alexey A. Gorbatov, PhD, MD, Deputy Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор
ORCID: 0000-0002-0799-893X

Pavel V. Solovyov, PhD in Biological Sciences, Deputy Director for Research, of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Evgenia V. Baranova, MD, PhD, Senior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор
ORCID: 0000-0002-6455-5756

Sergey F. Biketov, PhD in Biological Sciences, leading researcher Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор
ORCID: 0000-0003-1179-6895

НОВОСТИ НАУКИ

Вакцина от опоясывающего лишая снижает риски легкого когнитивного расстройства и смерти от деменции

Представлены новые данные наблюдения так называемой уэльской когорты – сравнения пожилых жителей Уэльса, получивших и не получивших по возрасту доступ к вакцине Zostavax против вируса варицелла-зостер. Ранее было показано, что вакцинация на 20% снижает риск развития деменции. В новой работе также продемонстрировано, что вакцинация снижает частоту развития легкого когнитивного расстройства и смертей, связанных с деменцией. Таким образом, защитное действие вакцины против нейротропного вируса проявляется на всех этапах прогрессирования когнитивных нарушений.

Xie M, Eytting M, Bommer C, Ahmed H, Geldsetzer P.

The effect of shingles vaccination at different stages of the dementia disease course.

Cell. 2025 Dec 2:S0092-8674(25)01256-5. DOI: 10.1016/j.cell.2025.11.007

