



Бифункциональные гибридные белки Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 на основе Z-домена белка A *Staphylococcus aureus* для иммунофлуоресцентного анализа иммуноглобулинов G в сыворотке крови

А.М. Елисейкин , И.В. Маргатский , В.Е. Артемов, А.В. Марущак ,
И.С. Понкратенко, А.Н. Глушков , А.Е. Студенников 

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения
Российской академии наук», Институт экологии человека, пр. Ленинградский, д. 10,
Кемерово, 650065, Российская Федерация

✉ Студенников Артем Евгеньевич; studennikovav@fscuh.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Традиционные методы обнаружения иммуноглобулинов G (IgG) в сыворотке крови основаны на применении антител, химически конъюгированных с ферментными или флуоресцентными метками. Эффективность таких методов ограничивается стерическими помехами, возникающими в процессе химической конъюгации. В качестве альтернативы для иммунофлуоресцентного анализа IgG предложены бифункциональные гибридные белки Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 на основе Z-домена белка A *Staphylococcus aureus* и ярких флуоресцентных белков mHoneydew и CyOFP1, которые сочетают способность связываться с IgG и интенсивную флуоресценцию, а их получение исключает этап химической конъюгации.

ЦЕЛЬ. Получение гибридных белков на основе Z-домена белка A для создания универсальных флуоресцентных реагентов для обнаружения IgG в сыворотке крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Генетические конструкции *pCCO-Z-mHoneydew* и *pCCO-Z-CyOFP1* получали методами молекулярного клонирования в вектор pCCO. Экспрессию белков Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 (~35 кДа) проводили в *Escherichia coli* штамм M15. Белки очищали аффинной хроматографией на Ni²⁺-NTA агарозе. Свойства белков изучали с использованием спектрофлуориметрии, иммуноферментного анализа (ИФА) и иммунофлуоресцентного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Генетические конструкции *pCCO-Z-mHoneydew* и *pCCO-Z-CyOFP1* под контролем промотора T5 кодируют гибридные белки со следующей структурой: Z-домен белка A – гибкий линкер (Ser-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Ser-Gly) – флуоресцентный белок mHoneydew или CyOFP1 – гексагистидиновая метка. При экспрессии выход растворимых белков составил ~37 мг/л (Z-mHoneydew) и ~6 мг/л (Z-CyOFP1) с чистотой ≥90%. Максимумы возбуждения и эмиссии Z-mHoneydew зарегистрированы при длинах волн 480 и 536 нм соответственно со сдвигом эмиссии в синюю область на 26 нм относительно нативного mHoneydew (562 нм). Максимум возбуждения Z-CyOFP1 зарегистрирован при 515 нм со сдвигом в красную область на 18 нм относительно нативного CyOFP1 (497 нм) при сохранении максимума эмиссии. Методом ИФА показано дозозависимое связывание IgG с гибридными белками. Для Z-mHoneydew линейная зависимость наблюдалась в диапазоне концентраций от 30 до 235 нг/мкл ($R^2=0,96$), а для Z-CyOFP1 – от 15 до 250 нг/мкл ($R^2=0,97$), что подтверждает способность гибридных белков связываться с IgG. Данные иммунофлуоресцентного анализа указали на возможность обнаружения IgG, специфических к конъюгату бензо[а]пирена с бычьим сывороточным альбумином, в сыворотке крови кролика с использованием гибридных белков. Линейная зависимость для Z-mHoneydew наблюдалась в диапазоне разведений сыворотки 1:10–1:160 ($R^2=0,92$), а для Z-CyOFP1 –

1:10–1:80 ($R^2=0,98$), что свидетельствует о пригодности данных белков для обнаружения специфических антител в сыворотке крови.

ВЫВОДЫ. Гибридные белки Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 сохраняют флуоресцентные свойства и способность связываться с IgG, в том числе с IgG сыворотки крови, что перспективно с точки зрения разработки прототипов универсальных иммунофлуоресцентных тест-систем.






Ключевые слова: иммуноглобулин G; иммунофлуоресценция; иммуноанализ; ИФА; Z-домен белка A; *Staphylococcus aureus*; mHoneydew; CyOFP1; гибридные белки

Для цитирования: Елисейкин А.М., Маргатский И.В., Артемов В.Е., Марущак А.В., Понкратенко И.С., Глушков А.Н., Студенников А.Е. Бифункциональные гибридные белки Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 на основе Z-домена белка A *Staphylococcus aureus* для иммунофлуоресцентного анализа иммуноглобулинов G в сыворотке крови. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(2):196–207. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-746>

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИР по теме государственного задания федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», Институт экологии человека, «Иммуно-гормональные взаимодействия при фиброзно-кистозной болезни молочной железы» (номер государственной регистрации 1023032300035-4-3.1.3).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Bifunctional hybrid proteins Z-mHoneydew and Z-CyOFP1 based on the Z-domain of *Staphylococcus aureus* protein A for immunofluorescence assay of immunoglobulins G in blood serum

Alexey M. Eliseykin , Ivan V. Margatskiy , Vladislav E. Artemov, Anna V. Marushchak , Igor S. Ponkratenko, Andrey N. Glushkov , Artem E. Studennikov 

Federal State Scientific Institute, Federal Research Centre for Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Institute of Human Ecology, 10 Leningradsky Ave., Kemerovo 650065, Russian Federation

✉ Artem E. Studennikov; studennikovav@fscuh.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Traditional methods for detecting serum IgG rely on antibodies chemically conjugated to enzymatic or fluorescent tags. The efficiency of such methods may be limited by steric hindrance during chemical cross-linking. As an alternative, bifunctional hybrid proteins Z-mHoneydew and Z-CyOFP1, based on the Z-domain of *Staphylococcus aureus* protein A and bright fluorescent proteins mHoneydew and CyOFP1, combining the binding to IgG and intense fluorescence, have been proposed for IgG immunofluorescence analysis; their production excludes the stage of chemical conjugation.

AIM. This study aimed to produce hybrid proteins based on the Z-domain of protein A for the creation of universal fluorescent reagents for the detection of IgG in blood serum.

MATERIALS AND METHODS. The *pCCO-Z-mHoneydew* and *pCCO-Z-CyOFP1* genetic constructs were created by molecular cloning in the pCCO vector. Z-mHoneydew and Z-CyOFP1 proteins (~35 kDa) were expressed in *Escherichia coli* strain M15. Protein purification was performed by affinity chromatography on Ni²⁺-NTA agarose. The protein properties were studied using spectrofluorimetry, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and immunofluorescence assay.

RESULTS. Genetic constructs *pCCO-Z-mHoneydew* and *pCCO-Z-CyOFP1* under the control of the T5 promoter encode chimeric proteins with the following structure: Z-domain of protein A –

flexible linker (Ser-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Ser-Gly) – fluorescent protein mHoneydew or CyOFP1 – 6×His tag. Soluble proteins were obtained with a yield of ~37 mg/L (Z-mHoneydew) and ~6 mg/L (Z-CyOFP1) with a purity ≥90%. For the Z-mHoneydew protein, excitation and emission maxima were observed at 480 and 536 nm, respectively; a 26 nm blue shift in emission was observed relative to native mHoneydew (562 nm). For Z-CyOFP1, the excitation maximum was recorded at 515 nm; an 18 nm red shift in excitation was observed relative to native CyOFP1 (497 nm), while maintaining the emission maximum. Dose-dependent binding of IgG to the hybrid proteins was demonstrated using ELISA. A linear dependence was observed for Z-mHoneydew in the concentration range of 30–235 ng/μL ($R^2=0.96$) and 15–250 ng/μL ($R^2=0.97$) for Z-CyOFP1, confirming the capacity of the hybrid proteins to bind IgG. Immunofluorescence assay showed the feasibility of detecting IgG, specific to conjugate benzo[a]pyrene-bovine serum albumin, in rabbit serum using hybrid proteins. A linear relationship was observed for Z-mHoneydew in the serum dilution range of 1:10–1:160 ($R^2=0.92$) and 1:10–1:80 ($R^2=0.98$) for Z-CyOFP1, evidencing the suitability of hybrid proteins for detection of specific antibodies in blood serum.

CONCLUSIONS. Hybrid proteins Z-mHoneydew and Z-CyOFP1 retain fluorescent properties and the capacity to bind to IgG, including serum IgG, which is promising from the point of view of developing prototypes of universal immunofluorescent test systems.

Keywords: immunoglobulin G; immunofluorescence; immunoassay; ELISA; Z-domain; protein A; *Staphylococcus aureus*; mHoneydew; CyOFP1; hybrid proteins

For citation: Eliseykin A.M., Margatskiy I.V., Artemov V.E., Marushchak A.V., Ponkратенко I.S., Glushkov A.N., Studennikov A.E. Bifunctional hybrid proteins Z-mHoneydew and Z-CyOFP1 based on the Z-domain of *Staphylococcus aureus* protein A for immunofluorescence assay of immunoglobulins G in blood serum. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(2):196–207. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-746>

Funding. This study was conducted by the Federal State Scientific Institute, Federal Research Centre for Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Institute of Human Ecology as part of the research and development work under State Assignment No. 1023032300035-4-3.1.3.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из направлений совершенствования иммуноаналитических методов является разработка реагентов для селективного определения антител различных классов с использованием антиизотипических моноклональных или поликлональных антител, получаемых из гипериммунных сывороток крови животных или гибридных клеточных линий [1]. Получение таких антител – трудоемкая и дорогостоящая процедура, поэтому возникает потребность в применении альтернативных реагентов с аналогичными функциями и более высокой стабильностью при меньших производственных затратах.

За последние два десятилетия внимание исследователей привлекают иммуноглобулин-связывающие белки патогенных микроорганизмов, такие как белки А, М и L [2], которые обладают природной способностью специфично связываться с определенными участками антител различных классов. Белок А, выделенный из *Staphylococcus aureus*, взаимодействует с Fc-фрагментом иммуноглобулина G (IgG) [3]; белок М – с Fc-фрагментом IgM; белок L – с κ-цепями Fab-фрагмента. Основные преимущества данных белков заключаются в универсальности,

высокой специфичности и простоте получения рекомбинантных вариантов в непатогенных организмах-продуцентах.

Наибольшее распространение в иммуноаналитических методах исследования, таких как вестерн-блоттинг и иммуноферментный анализ [4–6], получил белок А и его рекомбинантные варианты, в частности Z-домен, созданный на основе В-домена белка А *S. aureus* [7]. Z-домен состоит из 58 аминокислотных остатков, образует три антипараллельные α-спирали [8] и обладает аффинностью к Fc-участкам IgG [9]. Z-домен устойчив к протеазам и может быть экспрессирован в клетках *Escherichia coli*. Используя методы генной инженерии, можно создавать функциональные гибридные белки с Z-доменом [10, 11].

Применение Z-домена в качестве универсального реагента в иммуноанализе [12, 13] подразумевает его конъюгацию с ферментными метками, такими как щелочная фосфатаза или пероксидаза хрена (HRP). Данные ферменты усиливают аналитический сигнал при использовании соответствующих субстратов. Однако ферментные метки имеют следующие недостатки: необходимость применения специфических субстратов, что усложняет и удорожает анализ;

потеря активности при неправильном хранении; снижение эффективности связывания и чувствительности анализа из-за крупных размеров ферментов. Также исследователи часто обращаются к альтернативным системам обнаружения, основанным на флуоресцентных метках [14]. Использование химических флуорофоров позволяет напрямую детектировать флуоресцентный сигнал меченого белка без применения субстратов; кроме того, они стабильны и пригодны для мультиплексных форматов анализа. Тем не менее традиционные методы химической конъюгации таких меток имеют недостатки вследствие того, что требуются дополнительные реагенты и большое количество белка, а также существует риск нарушения функций белка из-за неспецифического присоединения меток [15].

Одним из возможных путей устранения указанных недостатков является создание рекомбинантных гибридных белков для иммуноанализа [16]. Гибридные белки могут объединять несколько функциональных доменов при сохранении их свойств [17]. Особый интерес представляют генетические конструкции, кодирующие гибридные белки, содержащие естественные флуорофоры, например GFP-подобные белки [18]. Комбинирование естественных флуорофоров в качестве меток с белком-носителем без потери его функциональности делает такие конструкции перспективными для биомедицинских исследований и иммуноанализа [19]. В качестве еще одного преимущества стоит отметить стабильность флуоресцентного сигнала. Это позволяет проводить иммунофлуоресцентный анализ с получением воспроизводимых результатов. Разнообразие флуоресцентных белков дает возможность создавать мультиплексные системы [20]. Несмотря на потенциальные преимущества Z-домена для создания рекомбинантных флуоресцентных конструкций, аспекты разработки стабильных диагностических тест-систем на их основе для обнаружения сывороточных антител остаются малоизученными.

В литературе недостаточно данных о применении подобных рекомбинантных белков для количественного определения сывороточных IgG. Так, были найдены два исследования, посвященные использованию Z-домена, меченого флуоресцентными белками, преимущественно в микроскопии [21, 22]; данные о разработках мультиплексных систем с использованием меченого флуоресцентными белками Z-домена не обнаружены.

В свою очередь, использование различных флуоресцентных белков с уникальными спектральными характеристиками в качестве меток

дает возможность одновременно применять флуоресцентно-меченный Z-домен в одной пробе с другими мечеными конъюгатами. Создание универсального в применении флуоресцентного реагента для обнаружения целевых IgG в сыворотке крови значительно упростит и удешевит иммуноанализ, позволит повысить его воспроизводимость и откроет возможности для разработки прототипов тест-систем.

Цель работы – получение гибридных белков на основе Z-домена белка А для создания универсальных флуоресцентных реагентов для обнаружения IgG в сыворотке крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы сыворотки крови

Гипериммунные сыворотки крови кроликов, которых иммунизировали отдельными конъюгатами полициклических ароматических углеводов с бычьим сывороточным альбумином (ПАУ-БСА), получены ранее в нашей лаборатории в соответствии с протоколом, описанным в работе [23]. Сыворотки, содержащие поликлональные антитела к конъюгатам ПАУ-БСА, хранили при 4 °С с добавлением натрия азида до финальной концентрации 0,02%. В экспериментах использовали образец сыворотки крови кролика, иммунизированного конъюгатом бензо[а]пирена с БСА (БП-БСА) [24].

Сборка плазмидных конструкций для экспрессии Z-mHoneydew и Z-CyOFP1

Гены, кодирующие mHoneydew и CyOFP1, были амплифицированы методом ПЦР с использованием ДНК-полимеразы PfuSe (НПО «СибЭнзим», Россия). В качестве матриц использовали коммерчески доступные плазмидные ДНК pNCS-mHoneydew и pKK-TEV-CyOFP1 (Addgene, США).

Для амплификации генов mHoneydew (696 п.н.) и CyOFP1 (702 п.н.), кодирующих белки с молекулярными массами 26,2 и 26,3 кДа соответственно, использовали праймеры F-mHondew g-s и R-mHondw6his (табл. 1). ПЦР-продукты mHoneydew и CyOFP1 обрабатывали эндонуклеазами BamHI и HindIII (НПО «СибЭнзим») в соответствии с протоколом производителя. Ген Z (171 п.н.), кодирующий Z-домен белка А массой 6,5 кДа, амплифицировали с использованием праймеров F-Za и R-Za (табл. 1). В качестве матрицы использовали плазмиду pEZZ18 (Amersham, США). ПЦР-продукт гена Z обрабатывали эндонуклеазами Bsp19I и BamHI.

Плазмиду pCCO линеаризовали рестриктазами Bsp19I и HindIII. Продукты рестрикции – гены Z, mHoneydew и CyOFP1 – лигировали с вектором pCCO в присутствии T4-лигазы (НПО «СибЭнзим»)

Таблица 1. Праймеры для ПЦР амплификации генов и генетических конструкций
Table 1. Primer sequences for PCR amplification of genes and genetic constructs

Праймеры <i>Primers</i>	Последовательности праймеров <i>Primer sequences</i>	Рестриктазы <i>Restrictases</i>
F-mHondew g-s	5'-GAATT <u>TCGGGATCC</u> AGTAGTGGAGTGAGCAAGGGCGAG-3'	<i>Bam</i> HI
R-mHondw6his	5'-AATAAAGCTTAGTGGTGGTGATGATGATGTGACTTGTACAGCTCGTCC-3'	<i>Hind</i> III
F-Za	5'-CACGATGAAGCCATGGACAACAATTCACAAAG-3'	<i>Bsp</i> 19I
R-Za	5'-CGGGATCCCGAGCTCGAATTCGCG-3'	<i>Bam</i> HI
CBD-F	5'-CACGAGGCCCTTTCGTCTTACC-3'	Нет / <i>No</i>
R-T0term	5'-GCAACCGAGCGTTCTGAACAAATCCAG-3'	Нет / <i>No</i>

Таблица составлена авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Примечание. Праймеры F-mHondew g-s и R-mHondw6his: сайты рестрикции *Bam*HI и *Hind*III выделены подчеркиванием, участки линкера (Ser 3 Gly)₂, а также последовательность 6×His-метки отмечены серым цветом. Праймеры F-Za и R-Za: сайты рестрикции *Bsp*19I и *Bam*HI выделены подчеркиванием, участок (Ser 3 Gly)₂ линкера отмечен серым цветом.

Note. Primers F-mHondew g-s and R-mHondw6his: *Bam*HI and *Hind*III restriction sites are underlined with bold lines, the linker regions (Ser 3 Gly)₂, and the 6×His-tag sequence are highlighted in gray. Primers F-Za and R-Za: *Bsp*19I and *Bam*HI restriction sites are underlined with bold lines, the (Ser 3 Gly)₂ linker region are highlighted in gray.

в соотношениях 1:1,5:1,5 для *pCCO:Z:mHoneydew* и 1:1,5:1,5 – *pCCO:Z:CyOFP1*. Полученные плазмидные конструкции *pCCO-Z:mHoneydew* и *pCCO-Z:CyOFP1* проверяли ПЦР (праймеры CBD-F и R-mHondw6his). Дополнительно проводили секвенирование с использованием набора BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, США) и праймеров CBD-F и R-T0term (табл. 1).

Трансформацию плазмидных конструкций в *E. coli* штамм M15 осуществляли методом электропорации (Gene Pulser Xcell, Bio-Rad) при следующих условиях: кювета с зазором между электродами – 0,1 см; напряжение – 1800 В; емкость – 25 мкФ; сопротивление – 200 Ом; время продолжительности импульса – от 5 до 5,2 мс.

Экспрессия и очистка Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 из *E. coli*

Бактериальные штаммы *E. coli* M15, экспрессирующие Z-mHoneydew и Z-CyOFP1, высевали на агаризованную среду LB, содержащую 150 и 50 мкг/мл ампициллина и канамицина соответственно, и культивировали в течение 16 ч при 37 °С. Отобранными колониями инокулировали 5 мл бульона LB с добавлением тех же антибиотиков и выращивали в течение 16 ч при 37 °С и перемешивании при скорости 125 об/мин. Суспензионную культуру переносили в 1,5 л среды LB, содержащую антибиотики, инкубировали при 37 °С и скорости 125 об/мин до достижения значения оптической плотности суспензии 0,5 при длине волны 600 нм. Экспрессию белков Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 индуцировали

добавлением изопропил β-D-тиогаляктозида (ООО «Компания Хеликон», Россия) до конечной концентрации 1 мМ. После индукции культивирование продолжали в тех же условиях в течение 16 ч.

Клеточную биомассу собирали центрифугированием при 2000 *g* в течение 20 мин при 4 °С и промывали охлажденным фосфатно-солевым буферным раствором, ФСБР (pH 7,5). Осадок ресуспендировали в 10 мл лизирующего буферного раствора, содержащего 30 мМ Na₂HPO₄ (pH 8,0), 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазола, и разрушали ультразвуком (Sonic Vibracell, США) на льду. Растворимую фракцию выделяли путем центрифугирования при 14000 об/мин (ротор 45 Ti, центрифуга Optima L-90K, Beckman Coulter, США) в течение 20 мин при 4 °С. Супернатант наносили на колонку, содержащую 2 мл Ni²⁺-NTA агарозы (Serva, США), предварительно уравновешенную лизирующим буферным раствором. Смола промывали 10 мл буферного раствора, содержащего 50 мМ Na₂HPO₄ (pH 6,0), 300 мМ NaCl, 40 мМ имидазол и 10% глицерин. Белки Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 элюировали буферным раствором, содержащим 50 мМ Na₂HPO₄ (pH 6,0), 300 мМ NaCl, 150 мМ имидазола и 10% глицерин. Полученные фракции диализовали против ФСБР и анализировали методом электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ)¹.

Количественное определение белка в очищенных препаратах проводили с использованием набора Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США).

¹ Студенников АЕ. Антитела к полициклическим ароматическим углеводородам и антиидиотипические антитела к ним: получение, характеристика, применение: дис. ... канд. биол. наук. Кемерово; 2022.

Флуоресцентные свойства гибридных белков исследовали с использованием мультимодального микропланшетного ридера ClarioStar Plus (BMG Labtech, Германия). Рабочие растворы белков готовили путем 1000-кратного разведения очищенных препаратов в ФСБР до финальной концентрации 1 нг/мкл. Методом последовательных двукратных разведений тем же буфером получали пять тестовых образцов с концентрациями 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 и 1 нг/мкл. Далее аликвоты полученных растворов объемом 200 мкл вносили в лунки черного 96-луночного планшета (Greiner Bio-One, Германия). Измерения проводили в режиме сканирования с регистрацией спектров возбуждения и эмиссии в диапазоне от 340 до 740 нм. Для каждого белка определяли спектры возбуждения при фиксированной длине волны эмиссии, спектры эмиссии при фиксированной длине волны возбуждения и оптимальные пары длин волн возбуждения/эмиссии. Все измерения выполняли при 25 °С в ФСБР ($n=3$). В качестве фонового контроля использовали лунки с ФСБР.

Связывание Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 с иммуноглобулинами G

Связывающую способность гибридных белков с IgG изучали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием очищенных козьих антикроличьих IgG, конъюгированных с HRP (Abcam, США). В лунки 96-луночного иммунологического планшета вносили по 100 мкл растворов белков Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 в начальных концентрациях 470 и 250 нг/мкл соответственно с последующим серийным разведением в ФСБР, после чего инкубировали в течение 1 ч и 500 об/мин при 37 °С.

Для предотвращения неспецифического связывания поверхность лунок обрабатывали 250 мкл «блокирующим раствором» ФСБР, содержащим 1% БСА (Amresco, США) и 0,05% Tween-20 (ООО «Компания Хеликон»), в течение 1 ч при 37 °С. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора очищенных HRP-меченных козьих антикроличьих IgG (разведение 1:2500 в блокирующем растворе) и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С при перемешивании. После инкубации лунки планшета 4 раза промывали 300 мкл ФСБР, содержащим 0,05% Tween-20 с использованием автоматической промывочной станции Bio-Plex Pro Wash Station (Bio-Rad, США). Далее в лунки вносили по 50 мкл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (Sigma-Aldrich, США) и через 10 мин реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2 М HCl.

Оптическую плотность растворов измеряли при длине волны 450 нм с использованием планшетного ридера iMark (Bio-Rad). В качестве контроля неспецифического связывания использовали лунки без сорбированных гибридных белков.

Связывание Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 с иммуноглобулинами G сыворотки крови

Способность Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 связываться с IgG оценивали методом иммунофлуоресцентного анализа. В качестве антигена использовали БП-БСА. В лунки черного 96-луночного планшета вносили по 200 мкл раствора конъюгата в ФСБР (5 нг/мкл). Планшет инкубировали в течение 16 ч при 25 °С в месте, полностью защищенном от света. После удаления раствора БП-БСА вносили блокирующий раствор в объеме 250 мкл и инкубировали в течение 1 ч и 500 об/мин при 37 °С. Затем в лунки вносили 200 мкл серийных разведений иммунной сыворотки кролика. В эксперименте использовали один аликвотный образец сыворотки крови кролика, иммунизированного конъюгатом БП-БСА. Цельную сыворотку крови последовательно разводили ФСБР с шагом в два раза, начиная с разведения 1:10 и заканчивая разведением 1:320. Инкубацию с сывороткой проводили в течение 1 ч и 500 об/мин при 37 °С. После этого лунки 4 раза промывали 300 мкл ФСБР, содержащим 0,05% Tween-20, с использованием автоматической промывочной станции Bio-Plex Pro Wash Station. Для оценки фонового сигнала использовали контрольные лунки двух типов: с иммобилизованным антигеном (без сыворотки) и без антигена и сыворотки (только блокирующий раствор). Для выявления связавшихся антител в лунки добавляли 200 мкл раствора белка Z-mHoneydew или Z-CyOFP1 в концентрации 100 нг/мкл каждый и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С при перемешивании. После завершения инкубации лунки 4 раза промывали 200 мкл ФСБР, содержащим 0,05% Tween-20. Флуоресцентный сигнал белков регистрировали на мультимодальном микропланшетном ридере ClarioStar Plus (BMG Labtech, Германия) при 25 °С: Z-mHoneydew – длина волны возбуждения 481 нм и эмиссии 538 нм; Z-CyOFP1 – длина волны возбуждения 514 нм и эмиссии 590 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сборка генетических конструкций Z-mHoneydew и Z-CyOFP1

Ген Z-домена белка А и гены флуоресцентных белков mHoneydew [25] и CyOFP1 [26] амплифицировали методом ПЦР. После очистки ПЦР-продукты были клонированы в плазмидный

вектор pCCO [27] под контролем промотора T5. Плазмидные конструкции содержали гены, кодирующие Z-домен и флуоресцентные белки, соединенные линкером, который кодирует пептид Ser-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Ser-Gly, обозначенный как (Ser3Gly)₂ (рис. 1A). Корректность сборки генетических конструкций pCCO-Z-mHoneydew и pCCO-Z-CyOFFP1 подтверждали секвенированием генов плазмидных конструкций и ПЦР-анализом плазмидных конструкций с последующим электрофоретическим разделением ПЦР-продуктов – генетических вставок. Размеры генетических вставок Z-mHoneydew и Z-CyOFFP1 находились в диапазоне от 1000 до 1500 п.н. (рис. 1B), что согласуется с теоретически предсказанными значениями 1077 и 1071 п.н. для Z-mHoneydew и Z-CyOFFP1 соответственно. Окончательную проверку сборки плазмидных конструкций провели путем секвенирования целевых генов. Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей с расчетными подтвердило корректность сборки конструкций, а именно: вставки имели правильную ориентацию, не содержали делеций и инсерций, рамка считывания сохранялась.

Экспрессия и очистка белков Z-mHoneydew и Z-CyOFFP1

Из культуры объемом 1 л среды LB получено ~37 мг белка Z-mHoneydew с чистотой ~90% по данным денситометрического анализа ДСН-ПААГ и ~6 мг Z-CyOFFP1 с чистотой ≥90%. Гибридные белки имели молекулярную массу около 35 кДа (рис. 2), что соответствует теоретически предсказанным значениям 34,7 и 34,9 кДа для Z-mHoneydew и Z-CyOFFP1 соответственно.

Изучение флуоресцентных свойств Z-mHoneydew и Z-CyOFFP1

Изучение флуоресцентных свойств гибридных белков включало следующие этапы: измерение интенсивности флуоресценции при различных концентрациях белка (серийные разведения) и сканирующей спектрофлуориметрии в диапазоне от 340 до 740 нм для определения оптимальных длин волн возбуждения и эмиссии. Измерения для каждого разведения проводили в трех повторах. Полученные при сканировании гибридного белка Z-mHoneydew данные (рис. 3A) сравнивали с известными данными сканирования нативного белка mHoneydew, спектральные

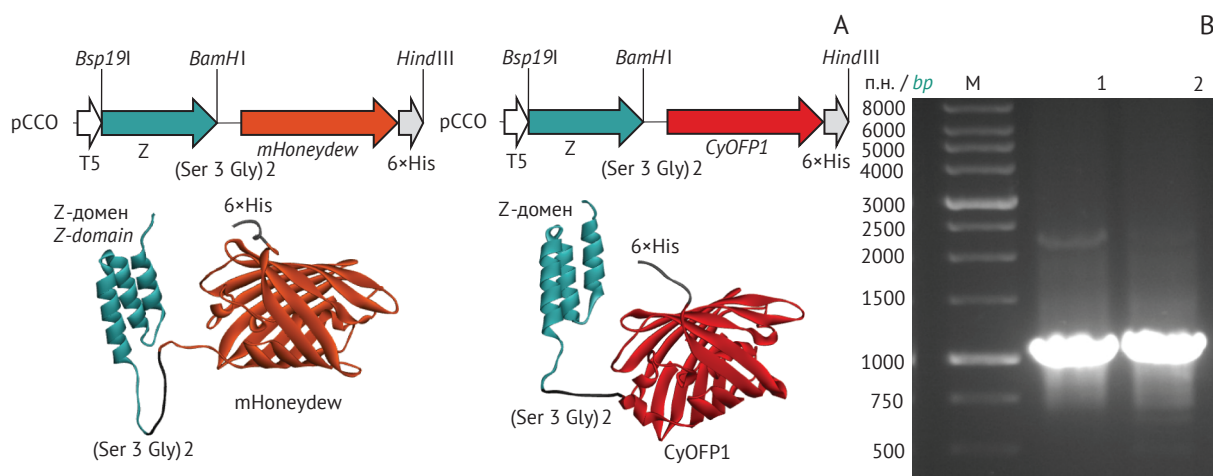


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 1. А – схема плазмидных конструкций pCCO-Z-mHoneydew и pCCO-Z-CyOFFP1: T5 – промотор; ген Z кодирует домен белка A, который связывает иммуноглобулин G; mHoneydew – ген кодирует оранжевый флуоресцентный белок; 6xHis – гексигистидиновая метка на С-конце белка; (Ser 3 Gly)₂ – гибкий линкер; CyOFFP1 – ген кодирует красный флуоресцентный белок. На 3D-моделях, предсказанных AlphaFold², Z-домен представлен тремя альфа-спиралями и соединен посредством гибкого линкера с глобулой белка CyOFFP1 или mHoneydew. В – электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов в 1% агарозном геле: М – маркер размера фрагментов ДНК; 1 – ПЦР-продукт гена Z-CyOFFP1, 1071 п.н.; 2 – ПЦР-продукт гена Z-mHoneydew, 1077 п.н.; п.н. – пар нуклеотидов.

Fig. 1. A, a scheme of pCCO-Z-mHoneydew and pCCO-Z-CyOFFP1 plasmid constructs: T5, promoter; Z, a gene encodes the synthetic IgG-binding Z-domain of protein A; mHoneydew, a gene encodes an orange fluorescent protein; 6xHis, C-terminal hexahistidine tag; (Ser 3 Gly)₂, flexible linker; CyOFFP1, a gene encodes a red fluorescent protein. In the 3D-models, predicted by AlphaFold², Z-domain is represented by three alpha-helices and is connected via a flexible linker to the CyOFFP1 or mHoneydew globule. B, electrophoretic separation of PCR-products in a 1% agarose gel: M, molecular weight size marker; 1, PCR-product of the Z-CyOFFP1 gene, 1071 bp; 2, PCR-product of the Z-mHoneydew gene, 1077 bp.; bp, base pairs.

² <https://alphafoldserver.com>

³ Там же.

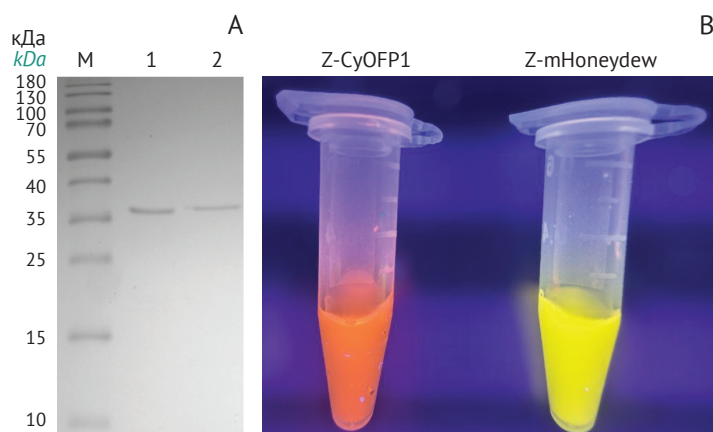


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Идентификация очищенных гибридных белков: А – электрофоретический анализ Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 в 12,5% полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия: М – маркер молекулярных масс; 1 – Z-CyOFP1; 2 – Z-mHoneydew; В – флуоресценция очищенных белковых препаратов Z-CyOFP1 и Z-mHoneydew в ультрафиолетовом свете при длине волны 365 нм.

Fig. 2. Identification of purified hybrid proteins. A, electrophoretic analysis of Z-mHoneydew and Z-CyOFP1 in a 12.5% polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate: M, molecular weight marker; 1, Z-CyOFP1; 2, Z-mHoneydew. B, fluorescence of the purified protein preparations of Z-CyOFP1 and Z-mHoneydew under ultraviolet light exposure at a wavelength of 365 nm.

характеристики которого взяты из открытой базы данных Fluorescent protein database⁴: максимумы возбуждения и эмиссии mHoneydew наблюдаются при длинах волн 480 и 562 нм соответственно. На *рисунке 3А* показано, что Z-mHoneydew при pH 7,5 имеет совпадающий максимум возбуждения при 480 нм, однако наблюдается сдвиг максимума эмиссии от 562 к 536 нм по сравнению с нативным mHoneydew. Сдвиг наблюдается и при более низких концентрациях белка Z-mHoneydew. При использовании Z-mHoneydew в качестве флуоресцентной метки в иммуноанализе детекцию сигнала можно проводить при длине волны 536 нм.

На *рисунке 3В* показано сравнение спектральных характеристик гибридного белка Z-CyOFP1 при pH 7,5 с данными спектральных характеристик нативного CyOFP1, взятых из Fluorescent protein database: максимумы возбуждения и эмиссии наблюдаются при 497 и 588 нм соответственно. Из рисунка видно, что максимум возбуждения Z-CyOFP1 смещается в длинноволновую область от 497 к 515 нм. Подобный сдвиг имеет место и при более низких концентрациях белка, но максимум эмиссии Z-CyOFP1 и CyOFP1 остается при длине волны 588 нм. Наблюдаемые сдвиги спектров возбуждения и эмиссии гибридных белков предположительно обусловлены влиянием относительно небольшого Z-домена на конформацию β -бочонка флуоресцентного белка, формирующего

микроокружение хромофора. Выбор длины волны 515 нм возбуждения является оптимальным для иммунофлуоресцентного анализа с использованием Z-CyOFP1.

Изучение связывания Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 с IgG методом иммуноферментного анализа

Поскольку Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 содержат Z-домен белка А в дополнение к флуоресцентным белкам, необходимо проверить их способность связываться с IgG. Взаимодействие изучали методом прямого ИФА в трех независимых повторях. В лунки иммунологического планшета вносили серийные разведения гибридных белков, после чего добавляли очищенные HRP-меченные козы антикроличьи IgG. Меченые антитела дозозависимо связывались с обоими белками (*рис. 4*). Линейная зависимость связывания наблюдается для Z-mHoneydew в диапазоне от 30 до 235 нг/мкл, для Z-CyOFP1 – от 15 до 250 нг/мкл. Высокие значения коэффициентов детерминации 0,97 (Z-mHoneydew) и 0,96 (Z-CyOFP1) указывают на хорошее качество аппроксимации и демонстрируют зависимость сигнала ИФА от концентрации гибридных белков.

Изучение связывания Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 с IgG сыворотки крови методом непрямого иммунофлуоресцентного анализа

Для обнаружения IgG с использованием флуоресцентно-меченных гибридных белков

⁴ <https://www.fpbse.org>

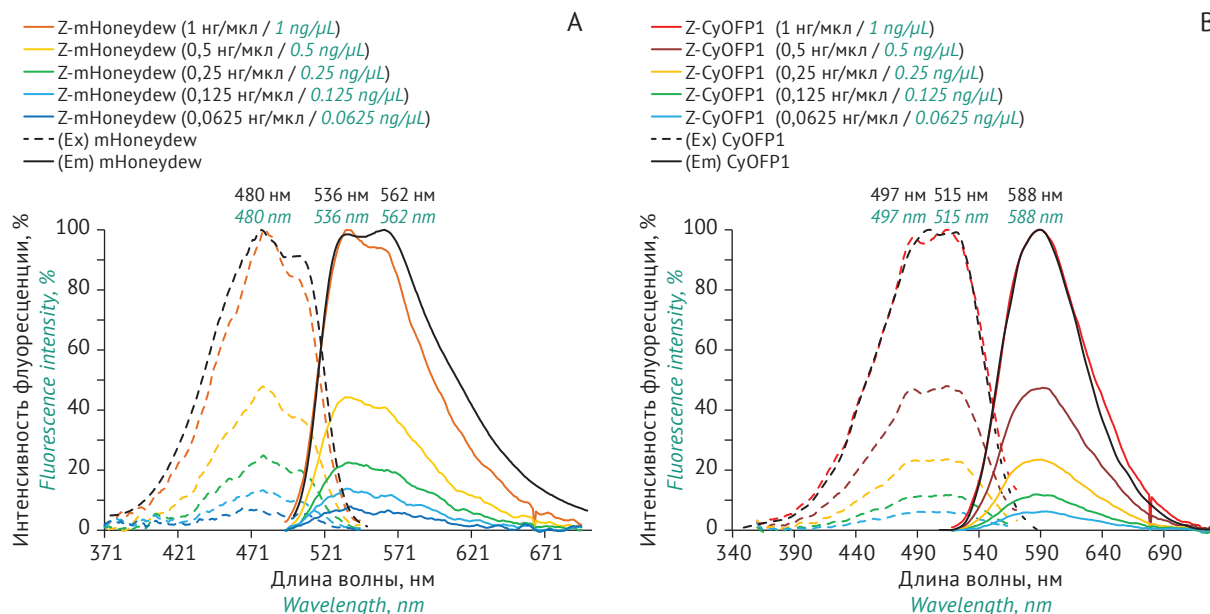


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Спектральные характеристики гибридных белков: А – Z-mHoneydew в диапазоне концентраций от 0,0625 до 1 нг/мкл, максимумы возбуждения и эмиссии при длинах волн 480 и 536 нм соответственно; В – Z-CyOFP1 в диапазоне концентраций от 0,0625 до 1 нг/мкл, максимумы возбуждения и эмиссии при длинах волн 515 и 588 нм соответственно. Черными линиями показаны референсные спектры нативных белков mHoneydew или CyOFP1. Данные представлены как среднеарифметические значения; все измерения проводили в трех повторностях.

Fig. 3. Spectral characteristics of hybrid proteins. A, Z-mHoneydew in the concentration range from 0.0625 to 1 ng/μL, excitation and emission maxima at wavelengths of 480 and 536 nm, respectively. B, Z-CyOFP1 in the concentration range from 0.0625 to 1 ng/μL, excitation and emission maxima at wavelengths of 515 and 588 nm, respectively. The black lines show the reference spectra of native CyOFP1 or mHoneydew. Data are presented as mean values; all measurements were performed in triplicate.

в лунки с сорбированным конъюгатом БП-БСА вносили образцы сыворотки крови иммунизированных кроликов в разных разведениях. После инкубации добавляли Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 и измеряли сигналы флуоресценции в трех независимых наблюдениях. Изменение интенсивности флуоресценции коррелировало с разведением сыворотки, что отражало наличие IgG, специфических к БП-БСА (рис. 5). В контрольных лунках планшета, блокированных БСА и содержащих сорбированный антиген, но без добавления сыворотки, флуоресцентный сигнал соответствовал фоновым значениям. Фоновый сигнал составил 2316 относительных единиц (отн. ед.) флуоресценции при длинах волн 480 нм (возбуждение) и 536 нм (эмиссия) для Z-mHoneydew. Фоновый сигнал составил 2568 отн. ед. флуоресценции при длинах волн 515 нм (возбуждение) и 588 нм (эмиссия) для Z-CyOFP1.

Представленные на рисунке 5 величины были скорректированы путем вычитания значений фонового сигнала контрольных лунок. Для проверки неспецифического взаимодействия гибридных белков с БСА получены значения фонового сигнала блокированных БСА лунок

планшета, не содержащих сорбированный антиген и сыворотку: для Z-mHoneydew флуоресцентный сигнал составил 2730 отн. ед. флуоресценции при длинах волн возбуждения 480 нм и эмиссии 536 нм; для Z-CyOFP1 – 2601 отн. ед. флуоресценции при длинах волн возбуждения 515 нм и эмиссии 588 нм. Наблюдалась четкая зависимость интенсивности флуоресценции от разведения сыворотки (рис. 5), отражающая содержание IgG, специфических к БП-БСА. Данные иммунофлуоресцентного анализа подтвердили возможность обнаружения IgG в модельной системе с использованием гибридных белков. Аппроксимация данных позволила выявить участок линейной зависимости в диапазоне разведений сыворотки 1:10–1:160 (Z-mHoneydew) и 1:10–1:80 (Z-CyOFP1). Данные указывают на свойство белков к обнаружению специфических IgG в сыворотке крови.

Таким образом, слияние с Z-доменом не приводит к потере флуоресцентных характеристик mHoneydew и CyOFP1. Свойство изученных гибридных белков связывать IgG позволяет рассматривать их в качестве перспективных детектирующих реагентов в флуоресцентном иммуноанализе.

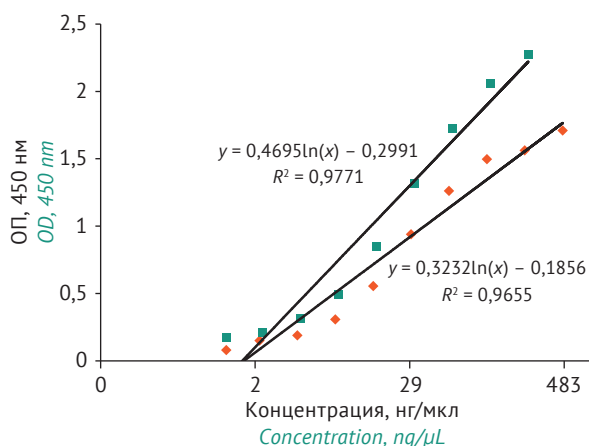


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Кривые связывания иммобилизованных белков Z-mHoneydew (ромбы) и Z-CyOFP1 (квадраты) с козьими иммуноглобулинами G, мечеными пероксидазой хрена, по данным иммуноферментного анализа. ОП – оптическая плотность. Ось X – концентрации белков Z-mHoneydew или Z-CyOFP1. Эксперименты выполнены в трех независимых повторях; данные на графике представлены в виде среднеарифметических значений. Каждая экспериментальная точка скорректирована на величину фонового сигнала в контрольных лунках ($OD_{450}=0,042$).

Fig. 4. Binding curves of immobilized proteins Z-mHoneydew (diamonds) and Z-CyOFP1 (squares) with goat immunoglobulin G labeled with horseradish peroxidase, as determined by enzyme-linked immunosorbent assay. OD, optical density. X-axis, concentration of Z-mHoneydew or Z-CyOFP1. Experiments were performed in three independent replicates; data on the graph are presented as mean values. Each experimental point was corrected for the background signal in control wells ($OD_{450}=0.042$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Создание гибридных белков, которые выполняют связывающие и детектирующие функции, является перспективным направлением в молекулярной иммунологии. Наша работа показывает, что Z-домен белка A *S. aureus* может быть успешно использован в качестве основы для создания флуоресцентных реагентов при обнаружении IgG. Экспериментально подтверждена способность гибридных белков Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 специфически взаимодействовать с очищенными HRP-мечеными IgG и поликлональными IgG сыворотки крови. Белки сохраняют флуоресцентные свойства, демонстрируя лишь незначительные спектральные сдвиги относительно исходных флуоресцентных белков. Результаты дополнительных экспериментов указывают на отсутствие нарушений в пространственной структуре обоих доменов в составе сконструированных белков. Полученные гибридные белки сочетают неизменную специфичность Z-домена к IgG с флуоресцентными свойствами. Подобные белки упомянуты в ограниченном числе публикаций, например в контексте создания люциферазных гибридных белков на основе Z-домена [28]. Следует отметить, что и рекомбинантные флуоресцентные конструкции, аналогичные разрабатываемым, были ранее описаны в литературе [29]. Несмотря на имеющиеся аналоги, меченые EGFP (enhanced green fluorescent protein), ключевым отличием нашей работы является целенаправленное конструирование рекомбинантных реагентов, отличающихся универсальностью

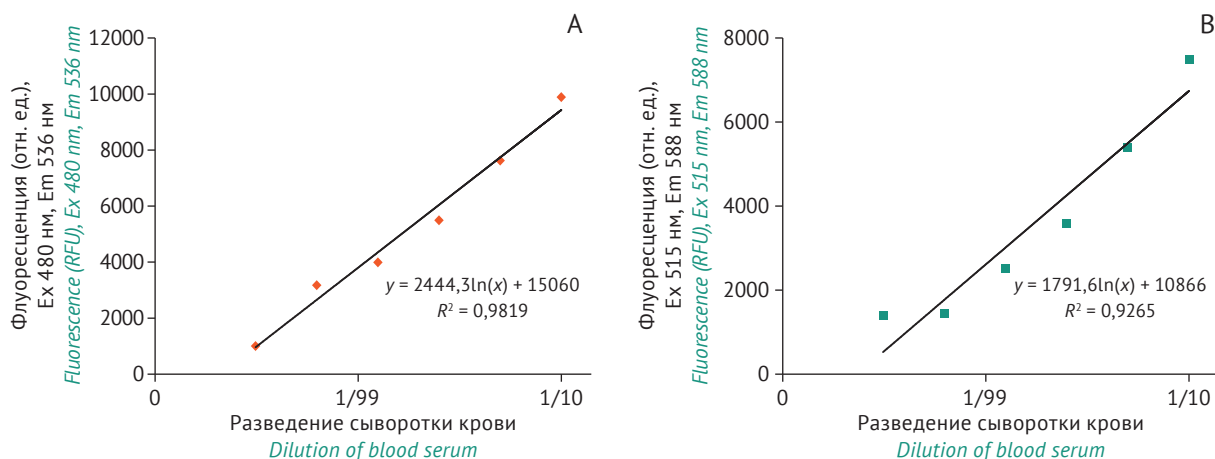


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Кривые связывания гибридных белков с сывороточными IgG, специфичными к конъюгату бензо[а]пирена с бычьим сывороточным альбумином по данным иммунофлуоресцентного анализа: А – Z-mHoneydew (ромбы) и В – Z-CyOFP1 (квадраты). Ex и Em – длина волны возбуждения и эмиссии соответственно. Данные представлены как средние арифметические значения ($n=3$), скорректированные на фоновый сигнал.

Fig. 5. Binding curves of fusion proteins with serum IgG specific for benzo[a]pyrene-bovine serum albumin conjugate according to immunofluorescence assay. A, Z-mHoneydew (diamonds) and B, Z-CyOFP1 (squares). Abbreviations: RFU, relative fluorescence units. Data are presented as the arithmetic mean values ($n=3$), corrected for background signal.

и адаптивностью, для определения сывороточных IgG иммунофлуоресцентным методом.

Помимо детекции IgG, специфичных к различным антигенам, созданные иммунореагенты позволяют регистрировать сигнал иммунных комплексов. В частности, ключевым преимуществом гибридного белка Z-mHoneydew является широкий спектральный диапазон 481–507 нм (возбуждение) и 536–562 нм (эмиссия). Использование mHoneydew в качестве метки открывает возможности для детекции антител по флуоресцентному сигналу на оборудовании с разными оптическими конфигурациями за счет широких диапазонов возбуждения/эмиссии флуоресцентного белка. Параллельно создан рекомбинантный белок Z-CyOFP1, который в перспективе может быть использован в FRET-анализе (Förster resonance energy transfer). Флуоресцентный белок CyOFP1 в составе рекомбинантного гибридного белка Z-CyOFP1 может служить эффективным флуорофором-акцептором, что в комбинации с подходящим флуорофором-донором позволит изучать динамику формирования иммунных комплексов [30, 31].

Исследование имеет ряд ограничений. Основным подтверждением функциональности Z-домена белка A в составе гибридных белков Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 послужили данные о взаимодействии с очищенными HRP-мечеными IgG и поликлональными IgG в сыворотке крови кроликов, иммунизированных антигеном БП-БСА. Однако остается не охарактеризованной аффинность взаимодействий (равновесные константы диссоциации) комплексов созданных гибридных белков с IgG, что затрудняет постановку количественного

иммунофлуоресцентного анализа. Кроме того, не изучена стабильность белков при различных условиях хранения (температура, pH, циклы замораживания-оттаивания) и структурная целостность белков в динамике, что напрямую определяет воспроизводимость и надежность анализа. Еще одно ограничение заключается в том, что гибридные белки не апробированы на сыворотках крови человека; это не позволяет оценить их реальную диагностическую ценность.

В перспективе авторы планируют провести анализ диагностической эффективности на клинических образцах сывороток в условиях реальной диагностической задачи.

Выводы

1. Получены два гибридных белка на основе Z-домена белка A для создания универсальных флуоресцентных реагентов при обнаружении IgG.
2. Изучены спектры возбуждения и эмиссии гибридных белков Z-mHoneydew и Z-CyOFP1.
3. Белки Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 взаимодействуют с очищенными HRP-мечеными IgG и поликлональными IgG, специфичными к конъюгату бензо[а]пирена с бычьим сывороточным альбумином в сыворотке крови иммунизированных кроликов. Гибридные белки сохраняют флуоресцентные свойства относительно исходных флуоресцентных белков в иммуноанализе. Сочетание таких характеристик позволит в дальнейшем использовать Z-mHoneydew и Z-CyOFP1 в количественном иммунофлуоресцентном анализе, открывая новые возможности для создания прототипов универсальных и высокочувствительных диагностических тест-систем.

Литература/References

1. Ghagane S, Puranik S, Gan S, et al. Frontiers of monoclonal antibodies: Applications in medical practices. *Hum Antibodies*. 2017;26(3):135–42. <https://doi.org/10.3233/HAB-170331>
2. Sidorin E, Solov'eva T. IgG-binding proteins of bacteria. *Biochemistry (Mosc)*. 2011;76(3):295–308. <https://doi.org/10.1134/s0006297911030023>
3. Cruz A, Boer M, Strasser J, et al. Staphylococcal protein A inhibits complement activation by interfering with IgG hexamer formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2021;118(7):e2016772118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2016772118>
4. Goding J. Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *J Immunol Methods*. 1978;(20):241–53. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(78\)90259-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(78)90259-4)
5. Bao L, Yang A, Liu Z, et al. Development of a mammalian cell-based ZZ display system for IgG quantification. *BMC Biotechnol*. 2023;23(1):1–10. <https://doi.org/10.1186/s12896-023-00798-2>
6. Девдариани ЗЛ, Терешкина НЕ, Тараненко ТМ и др. Результаты модельных экспериментов по конструированию тест-системы иммуноферментной для выявления антител к Ф1 чумного микроба (ИФА-АТ-Ф1 *Yersinia pestis*). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013;(1):74–7. Devdariani ZL, Tereshkina NE, Taranenko TM, et al. Results of modeling experiments in designing immune-enzyme test-system for the detection of antibodies to *Yersinia pestis* F1 (ELISA-Ab-F1 *Yersinia pestis*). *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2013;(1):74–7 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2013-1-74-77>
7. Mazigi O, Schofield P, Langley D, Christ D. Protein A superantigen: structure, engineering and molecular basis of antibody recognition. *Protein Eng Des Sel*. 2019;32(8):359–66. <https://doi.org/10.1093/protein/gzz026>
8. Braisted A, Wells J. Minimizing a binding domain from protein A. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(12):5688–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.5688>
9. Tashiro M, Tejero R, Zimmerman D, et al. High-resolution solution NMR structure of the Z domain of staphylococcal protein A. *J Mol Biol*. 1997;272(4):573–90. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1265>
10. Le Brun A, Shah D, Athey D, et al. Self-assembly of protein monolayers engineered for improved monoclonal immunoglobulin G binding. *Int J Mol Sci*. 2011;12(8):5157–67. <https://doi.org/10.3390/ijms12085157>
11. Viviani V, Silva J, Ho P. A novel brighter bioluminescent fusion protein based on ZZ domain and *Amydetes vivianii* firefly luciferase for immunoassays. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:755045. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.755045>
12. Park J, Kim M, Jose J, Park M. Covalently immobilized regenerable immunoaffinity layer with orientation-controlled antibodies based on Z-domain autodisplay. *Int J Mol Sci*. 2021;23(1):459. <https://doi.org/10.3390/ijms23010459>
13. Jeon D, Pyun J, Jose J, Park M. A regenerative immunoaffinity layer based on the outer membrane of Z-domains autodisplaying *E. coli* for immunoassays and immunosensors. *Sensors (Basel)*. 2018;18(11):4030. <https://doi.org/10.3390/s18114030>

- Hajdu T, Rebenku I, Serrano Cano T, et al. Fluorescence labeling-induced structural rearrangement of a monoclonal IgG revealed by biophysical experiments and simulations. *Int J Biol Macromol*. 2025;321(Pt 2):146209. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.146209>
- Witting E, Hober S, Kanje S. Affinity-based methods for site-specific conjugation of antibodies. *Bioconjug Chem*. 2021;32(8):1515–24. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00313>
- Ji P, Wang K, Zhang L, et al. A new nanobody-enzyme fusion protein-linked immunoassay for detecting antibodies against influenza A virus in different species. *J Biol Chem*. 2022;298(12):102709. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102709>
- Yu K, Liu C, Kim B, Lee D. Synthetic fusion protein design and applications. *Biotechnol Adv*. 2015;33(1):155–64. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.11.005>
- Nienhaus K, Nienhaus G. Genetically encodable fluorescent protein markers in advanced optical imaging. *Methods Appl Fluoresc*. 2022;10(4):042002. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ac7d3f>
- Liu M, Wang B, Wang F, et al. Soluble expression of single-chain variable fragment (scFv) in *Escherichia coli* using superfolder green fluorescent protein as fusion partner. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103(15):6071–9. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09925-6>
- Liu Q, Li X, Zhao J, et al. Nanobody-horseradish peroxidase and -EGFP fusions as reagents to detect porcine parvovirus in the immunoassays. *J Nanobiotechnology*. 2020;18(1):7. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0568-x>
- Ilgen P, Grotjohann T, Jans DC, et al. RESOLFT nanoscopy of fixed cells using a Z-domain based fusion protein for labelling. *PLoS One*. 2015;10(9):e0136233. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136233>
- Yu XT, Fu XY, Gao XY, et al. Fc-specific and covalent conjugation of a fluorescent protein to a native antibody through a photoconjugation strategy for fabrication of a novel photostable fluorescent antibody. *Anal Bioanal Chem*. 2021;413(3):945–53. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03051-3>
- Глушков АН, Костянко МВ, Аносова ТП и др. Модель исследования иммунологических образов химических канцерогенов. *Российский иммунологический журнал*. 2007;1(3–4):246–50. Glushkov AN, Kostyanko MV, Anosova TP, et al. The model for research of immunological images of chemical carcinogens. *Russian Journal of Immunology*. 2007;1(3–4):246–50 (In Russ.). EDN: SWMMFP
- Костянко МВ, Глушков АН. Способ получения конъюгата гаптен-белок. Патент Российской Федерации № 2141114; 1998. Kostyanko MV, Glushkov AN. Method of conjugate hapten-protein preparing. Patent of the Russian Federation No. 2141114; 1998 (In Russ.). EDN: JPYAJM
- Shaner N, Campbell R, Steinbach P, et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. 2004;22(12):1567–72. <https://doi.org/10.1038/nbt1057>
- Chu J, Oh Y, Sens A, et al. A bright cyan-excitable orange fluorescent protein facilitates dual-emission microscopy and enhances bioluminescence imaging *in vivo*. *Nat Biotechnol*. 2016;34(7):760–7. <https://doi.org/10.1038/nbt.3550>
- Гинцбург АЛ, Карягина-Жулина АС, Кормилицына МИ и др. Рекombинантная плазмидная ДНК, кодирующая синтез рекombинантного белка TUL4spCBD, штамм *Escherichia coli* M15 [pREP4, pTUL4spCBD] – продуцент рекombинантного белка TUL4spCBD, рекombинантный белок TUL4spCBD и способ его получения, способ получения специфических антител к белку TUL4spCBD. Патент Российской Федерации № 2270249; 2006. Gintsburg AL, Karjagina-Zhulina AS, Kormilitsyna MI, et al. Recombinant plasmid DNA encoding TUL4spCBD recombinant protein synthesis, m15[pREP4, pTUL4spCBD] *Escherichia coli* strain as producer of tul4spcbd recombinant protein, TUL4spCBD recombinant protein, method for production thereof, and method for production of specific antibody against TUL4spCBD protein. Patent of the Russian Federation No. 2270249; 2006 (In Russ.). EDN: VETEJD
- Nandy S, Crum M, Wasden K, et al. Protein A-Nanoluciferase fusion protein for generalized, sensitive detection of immunoglobulin G. *Anal Biochem*. 2023;660:114929. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114929>
- Huang QL, Chen C, Chen YZ, et al. Application to immunoassays of the fusion protein between protein ZZ and enhanced green fluorescent protein. *J Immunol Methods*. 2006;309(1–2):130–8. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.11.009>
- Chu J, Oh Y, Sens A, et al. A bright cyan-excitable orange fluorescent protein facilitates dual-emission microscopy and enhances bioluminescence imaging *in vivo*. *Nat Biotechnol*. 2016;34(7):760–7. <https://doi.org/10.1038/nbt.3550>
- Bajar BT, Wang ES, Zhang S, et al. A guide to fluorescent protein FRET pairs. *Sensors (Basel)*. 2016;16(9):1488. <https://doi.org/10.3390/s16091488>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.М. Елисейкин, А.Е. Студенников, А.Н. Глушков** – формирование концепции работы; **А.М. Елисейкин** – написание текста рукописи, формулирование выводов; **А.М. Елисейкин, И.В. Маргатский, В.Е. Артемов, А.В. Марущак, И.С. Понкратенко** – дизайн и выполнение экспериментов; **А.Н. Глушков** – формулирование выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Благодарности. Коллектив авторов благодарит В.А. Устинова и И.С. Гребенщикова за ценные консультации при обсуждении результатов проведенного исследования.

Author contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.M. Eliseykin, A.E. Studennikov, A.N. Glushkov** conceptualised the study. **A.M. Eliseykin** drafted the manuscript and formulated the conclusions. **A.M. Eliseykin, I.V. Margatskiy, V.E. Artemov, A.V. Marushchak, I.S. Ponkratenko** developed the design and conducted the experiments. **A.N. Glushkov** formulated the conclusions and approved the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements. The authors express their gratitude to V.A. Ustinov and I.S. Grebenshchikov for valuable advice when discussing the study results.

Об авторах / Authors

Елисейкин Алексей Михайлович / Alexey M. Eliseykin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9134-5586>

Маргатский Иван Владимирович / Ivan V. Margatskiy

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-7602-0230>

Артемов Владислав Евгеньевич / Vladislav E. Artemov

Марущак Анна Владимировна / Anna V. Marushchak

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9560-7563>

Понкратенко Игорь Сергеевич / Igor S. Ponkratenko

Глушков Андрей Николаевич, д-р мед. наук / Andrey N. Glushkov, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8560-6719>

Студенников Артем Евгеньевич, канд. биол. наук / Artem E. Studennikov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6623-8818>

Поступила 20.10.2025

После доработки 11.02.2026

Принята к публикации 13.03.2026

Online first 20.05.2026

Received October 20, 2025

Revised February 11, 2026

Accepted March 13, 2026

Online first May 20, 2026