

Н.Л. Иванютина, С.И. Довбыш, Р.А. Волкова, А.А. Екимов, Н.Н. Савина, Е.С. Зайцева, А.С. Минеро, А.Ю. Бутырский, Е.Н. Морозова
 Оптимизация количественного определения гемагглютини́на вируса гриппа в первичном жидком стандартном образце методом электрофореза в полиакриламидном геле с последующей денситометрией

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-734-annex>

Онлайн-приложение / *Supplementary information*

Таблица S1. Этапы оптимизации методики определения гемагглютини́на методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия

Table S1. Stages of optimization of the method for quantification of hemagglutinin by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Этап Stage	Штаммы вирусов Virus strain	Гель / Gel		Буфер для образца (SB) Sample buffer (SB)	Дегликозилирование Deglycosylation	Осаждение белка Protein precipitation	Концентрация 2-МЭ на 50 мкг белка, мМ Concentration of 2- ME per 50 µg protein, mM
		Концентрация Concentration	Толщина, мм Thickness, mm				
1	№ 1, № 2, № 3, № 4 No. 1, No. 2, No. 3, No. 4	4–20% трис-глициновый гель (ручная заливка) 4–20% Tris-glycine gel (hand-cast)	0,75	4×SB + 8М мочеви́на 4×SB + 8M urea	+	3 раза по 3–5 мин 3 times for 3–5 min	0,006
	№ 5 No. 5	4–20% трис-глициновый гель (ручная заливка) 4–20% Tris-glycine gel (hand-cast)	0,75	4×SB + 8М мочеви́на 4×SB + 8M urea	+	30 мин 30 min	0,006
					–		0,072
		4–12% бис-трис гель 4–12% Bis-Tris gel	1	1×LDS SB	+/–	30 мин 30 min	0,006/0,072

		12% трис-глициновый гель (ручная заливка) <i>12% Tris-glycine gel</i> (hand-cast)	0,75	1×Laemmli SB	+/-	30 мин <i>30 min</i>	0,006/0,072
2	№ 5 <i>No. 5</i>	12% трис-глициновый гель (ручная заливка) <i>12% Tris-glycine gel</i> (hand-cast)	0,75	2×Laemmli SB	+	30 мин <i>30 min</i>	0,006/0,072
					–		0,006/0,072
				4×Laemmli SB	+		0,006/0,072
					–		0,006/0,072
3	№ 6 <i>No. 6</i>	12% трис-глициновый гель (ручная заливка) <i>12% Tris-glycine gel</i> (hand-cast)	0,75	2×Laemmli SB	+	30 мин; без осаждения <i>30 min; no precipitation</i>	0,072
		4–20% коммерческий гель <i>4–20% commercial gel</i>	1,5	2×Laemmli SB	+	30 мин; без осаждения <i>30 min; no precipitation</i>	0,072
		4–12% бис-трис гель <i>4–12% Bis-Tris gel</i>	1	2×LDS SB	+	30 мин; без осаждения <i>30 min; no precipitation</i>	0,072

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

Примечание. Штаммы вируса: № 1 – A/Victoria/2570/2019(H1N1); № 2 – A/Darwin/6/2021(H3N2) IVR-227; № 3 – B/Austria/1359417/2021; № 4 – B/Phuket/3073/20213; № 5 – A/Victoria/4897/2022 (H1N1) IVR-238; № 6 – A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2) NYMC-X-425A – 2025 вирусный концентрат; LDS SB – буфер для образцов с литий додецил сульфатом NuPAGE LDS 4× sample buffer; SB – буфер для образца; (+) – присутствует этап дегликозилирования; (–) – отсутствует этап дегликозилирования; 0,006/0,072 – испытания проводились в присутствии 0,006 и 0,072 мМ 2-меркаптоэтанола; 2-МЭ – 2-меркаптоэтанол.

Note. Virus strains: No. 1, A/Victoria/2570/2019(H1N1); No. 2, A/Darwin/6/2021(H3N2) IVR-227; No. 3, B/Austria/1359417/2021; No. 4, B/Phuket/3073/20213; No. 5, A/Victoria/4897/2022 (H1N1) IVR-238; No. 6, A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2) NYMC-X-425A: 2025 virus concentrate; LDS SB, sample buffer with lithium dodecyl sulfate NuPAGE LDS 4× sample buffer; SB, sample buffer; (+), deglycosylation step present; (–), deglycosylation step absent; 0.006/0.072, tests were carried out in the presence of 0.006 and 0.072 mM 2-mercaptoethanol; 2-ME, 2-mercaptoethanol.

Таблица S2. Содержание гемагглютининов вируса гриппа типа А и типа В по методике производителя
Table S2. Content of influenza virus type A and type B hemagglutinins according to the manufacturer's method

Показатель <i>Parameter</i>	Статистическая характеристика <i>Statistical measure</i>	Штаммы вирусов гриппа / <i>Influenza virus strains</i>							
		A/Victoria/2570/2019 (H1N1)		A/Darwin/6/2021 (H3N2) IVR-227		B/Austria/1359417/2021		B/Phuket/3073/2013	
		Лаб. № 1 <i>Lab. 1</i>	Лаб. № 2 <i>Lab. 2</i>	Лаб. № 1 <i>Lab. 1</i>	Лаб. № 2 <i>Lab. 2</i>	Лаб. № 1 <i>Lab. 1</i>	Лаб. № 2 <i>Lab. 2</i>	Лаб. № 1 <i>Lab. 1</i>	Лаб. № 2 <i>Lab. 2</i>
Общий белок по Лоури, мкг/мл <i>Total protein content (Lowry method), µg/mL</i>	$\bar{X} \pm SD$ CV, %	343,6±32,1 9,4	327,7±4,4 1,34	326,5±35,0 10,7	329,5±25,2 7,6	415±37,9 9,1	426,8±12,8 3,0	420±22,6 5,4	428,6±22,0 5,1
Содержание гемагглютинаина, % от общего белка <i>Hemagglutinin content, % of total protein</i>	$\bar{X} \pm SD$ CV, %	24,5±2,2 9,0	37,5±1,1 2,9	31,1±3,0 9,6	36,4±1,5 4,1	31,5±3,3 10,4	30,1±0,7 2,4	27,4±1,3 4,6	28,6±1,2 4,3
Концентрация гемагглютинаина, мкг/мл <i>Hemagglutinin concentration, µg/mL</i>	$\bar{X} \pm SD$ CV, %	83,3±7,0 8,4	122,9±3,6 2,9	101,5±9,7 9,5	119,9±4,9 4,1	130,6±13,5 10,4	128,3±3,0 2,4	115,0±5,4 4,7	122,6±5,3 4,3
Концентрация гемагглютинаина (ОРИД), мкг/мл <i>Hemagglutinin concentration (SRID), µg/mL</i>	$\bar{X} \pm SD$ CV, %	99,0±5,9 5,9	—	113,3±3,0 2,6	—	132,5±4,0 3,0	—	116,2±3,5 3,5	—

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

Примечание. Лаб. № 1 – лаборатория № 1 (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России); Лаб. № 2 – лаборатория № 2 (ФГУП СПбНИИВС ФМБА России); $\bar{X}$ – среднее арифметическое значение; SD – стандартное отклонение; CV, % – коэффициент вариации, %; (–) – испытания не проводились Лаб. № 2; ОРИД – одиночная радиальная иммунодиффузия.

Note. Lab. 1, laboratory 1 (Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products); Lab. 2, laboratory 2 (Saint Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Sera and Enterprise for the Production of Bacterial Preparations); $\bar{X}$, mean value; SD, standard deviation; CV, coefficient of variation; (–), not tested in Lab. 2; SRID, single radial immunodiffusion.

Таблица S3. Содержание гемагглютинаина, полученное при испытании образцов A/Victoria/4897/2022 (H1N1) IVR-238

Table S3. Hemagglutinin content obtained for A/Victoria/4897/2022 (H1N1) IVR-238 samples

Показатель <i>Parameter</i>	Статистическая характеристика <i>Statistical measure</i>	Варианты пробоподготовки / <i>Sample preparation variants</i>			
		2023 г., ДСН-ПААГ, центрифугирование в 1 этап (30 мин) <i>2023, SDS-PAGE, single-step centrifugation (30 min)</i>	2025 г., ДСН-ПААГ, восстанавливающие условия + PNGase F + 4×SB + 0,006 мМ 2-МЭ <i>2025, SDS-PAGE, reducing conditions + PNGase F+ 4×SB + 0.006 mM 2-ME</i>	2025 г., ДСН-ПААГ, восстанавливающие условия + PNGase F + 4×SB + 0,072 мМ 2-МЭ <i>2025, SDS-PAGE, reducing conditions + PNGase F+ 4×SB + 0.072 mM 2-ME</i>	2025 г., ДСН-ПААГ, восстанавливающие условия + PNGase F + 2×SB + 0,072 мМ 2-МЭ <i>2025, SDS-PAGE, reducing conditions+ PNGase F+ 2×SB + 0.072 mM 2-ME</i>
Концентрация общего белка по Лоури, мкг/мл <i>Total protein content (Lowry method), µg/mL</i>	$\bar{X} \pm SD$ CV, %	330,8±12,8 3,9	—	—	—
Содержание гемагглютинаина, % от общего белка <i>Hemagglutinin content, % of total protein</i>	$\bar{X} \pm SD$ CV, %	31,6±1,4 4,5	24,9±2,9 11,5	32,6±3,2 9,7	32,9±3,2 9,6
Концентрация гемагглютинаина, мкг/мл <i>Hemagglutinin concentration, µg/mL</i>	$\bar{X} \pm SD$ CV, %	104,6±4,7 4,5	82,4±9,6 11,5	107,8±10,6 9,7	108,8±10,6 9,6
Концентрация гемагглютинаина (ОРИД), мкг/мл <i>Hemagglutinin concentration (SRID), µg/mL</i>	$\bar{X} \pm SD$ CV, %	96,2±0,7 0,7	—	—	—

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

Примечание. Во всех вариантах пробоподготовки для электрофореза в ПААГ-ДСН использовали 12% трис-глициновый гель с дегликозилированием, расчет концентрации гемагглютинаина в 2025 г. проводился по результатам общего белка 2023 г. $\bar{X}$ – среднее арифметическое значение; SD – стандартное отклонение; CV, % – коэффициент вариации (%); (–) – испытания не проводились; ДСН-ПААГ – электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии натрия додецилсульфата; PNGase F – N-гликозидаза F; SB – буфер для образца; ОРИД – метод одиночной радиальной иммунодиффузии; 2-МЕ, 2-меркаптоэтанол.

Note. All sample preparation variants for SDS-PAGE used a 12% Tris-glycine gel with deglycosylation. The hemagglutinin concentration in 2025 was calculated based on the total protein results in 2023. $\bar{X}$, mean value; SD, standard deviation; CV, coefficient of variation; (–), not tested; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; PNGase F, N-glycosidase F; SB, sample buffer; SRID, single radial immunodiffusion method; 2-ME, 2-mercaptoethanol.

Таблица S4. Содержание и концентрация гемагглютинина вируса гриппа в вирусном концентрате A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2) NYMC-X-425A в различных условиях электрофореза

Table S4. Content and concentration of influenza virus hemagglutinin in virus concentrate of the A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2) NYMC-X-425A strain under different electrophoresis conditions

Параметр Parameter	4–12% бис-трис гель с осаждением 4–12% Bis-Tris gel with precipitation	4–12% бис-трис гель без осаждения 4–12% Bis-Tris gel without precipitation	4–20% трис- глициновый гель без осаждения 4–20% Tris- glycine gel without precipitation
<i>n</i>	14	14	14
Содержание гемагглютинина, % от общего белка <i>Hemagglutinin content, % of total protein</i>	$40,8 \pm 0,8^a$ $1,9^b$	$38,4 \pm 0,9^a$ $2,3^b$	$36,1 \pm 1,1^a$ 3^b
Концентрация гемагглютинина, мкг/мл <i>Hemagglutinin concentration, $\mu\text{g/mL}$</i>	$318,4 \pm 6,2^a$ $1,9^b$	$299,7 \pm 7,0^a$ $2,3^b$	$281,4 \pm 8,6^a$ 3^b

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

Примечание. *n* – количество испытаний; $\bar{X}$ – среднее арифметическое значение; SD – стандартное отклонение.

^a Данные представлены как $\bar{X} \pm \text{SD}$.

^b Коэффициент вариации (CV, %).

Note. *n*, number of tests; $\bar{X}$, mean value; SD, standard deviation.

^a Data are presented as $\bar{X} \pm \text{SD}$.

^b Coefficient of variation (CV, %).

Таблица S5. Содержание и концентрация гемагглютинаина вируса гриппа в разведенном вирусном концентрате A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2) NYMC-X-425A в различных условиях электрофореза

Table S5. Content and concentration of influenza virus hemagglutinin in diluted virus concentrate of the A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2) NYMC-X-425A strain under different electrophoresis conditions

Параметр <i>Parameter</i>	4–12% бис- трис гель с осаждением <i>4–12% Bis- Tris gel with precipitation</i>	4–12% бис- трис гель без осаждения <i>4–12% Bis- Tris gel without precipitation</i>	12% полиакриламидный гель с осаждением <i>12% polyacrylamide gel with precipitation</i>	12% полиакриламидный гель без осаждения <i>12% polyacrylamide gel without precipitation</i>	4–20% полиакриламидный гель с осаждением <i>4–20% polyacrylamide gel with precipitation</i>	4–20% полиакриламидный гель без осаждения <i>4–20% polyacrylamide gel without precipitation</i>	ОРИД <i>SRID</i>
<i>n</i>	20	6	14	13	6	19	18
Содержание гемагглютинаина, % <i>Hemagglutinin content, % of total protein</i>	37,7±1,4 ^a 3,7 ^b	23,8±1,8 ^a 7,6 ^b	42,0±2,5 ^a 5,9 ^b	36,9±2,7 ^a 7,4 ^b	43,0±2,0 ^a 4,7 ^b	42,0±3,4 ^a 8,2 ^b	—
Концентрация гемагглютинаина, мкг/мл <i>Hemagglutinin concentration, µg/mL</i>	135,8±5,0 ^a 3,7 ^b	85,9±6,5 ^a 7,6 ^b	151,2±8,9 ^a 5,9 ^b	133,0±9,8 ^a 7,4 ^b	152,5±6,6 ^a 4,7 ^b	151,4±12,2 ^a 8,2 ^b	123,6±11,3 ^a 9,2 ^b

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

Примечание. *n* – количество испытаний; $\bar{X}$ – среднее арифметическое значение; SD – стандартное отклонение; (–) – испытания не проводились; ОРИД – одиночная радиальная иммунодиффузия.

^a Данные представлены как $\bar{X} \pm SD$.

^b Значение коэффициента вариации (CV, %).

Note. *n*, number of tests; $\bar{X}$, mean value; SD, standard deviation; (–), not tested; SRID, single radial immunodiffusion.

^a Data are presented as $\bar{X} \pm SD$.

^b Coefficient of variation (CV, %).

Таблица S6. Значения факторов разрешения пиков компонентов Фармакопейного стандартного образца (ФСО.3.3.00472), полученные при оценке разрешающей способности хроматографической системы и нормы по паспорту

Table S6. Values of peak resolution factors between components of the pharmacopoeial reference standard (FSO.3.3.00472) obtained during assessment of chromatographic system suitability, and specification limits

Разрешение между пиками <i>Peak-to-peak resolution</i>	Нормы спецификации <i>Specification limits</i>	Полученные значения <i>Values obtained</i>
Сорбит/маннит <i>Sorbitol/mannitol</i>	1,8–2,4	2,4
Манит/трегалоза <i>Mannitol/trehalose</i>	2,1–2,9	2,8
Трегалоза/глюкоза <i>Trehalose/glucose</i>	$\geq 3,0$	6,8
Глюкоза/лактоза <i>Glucose/lactose</i>	$\geq 3,0$	11,3
Лактоза/сахароза <i>Lactose/sucrose</i>	$\geq 3,0$	4,7
Сахароза/мальтоза <i>Sucrose/maltose</i>	$\geq 3,0$	12,2

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

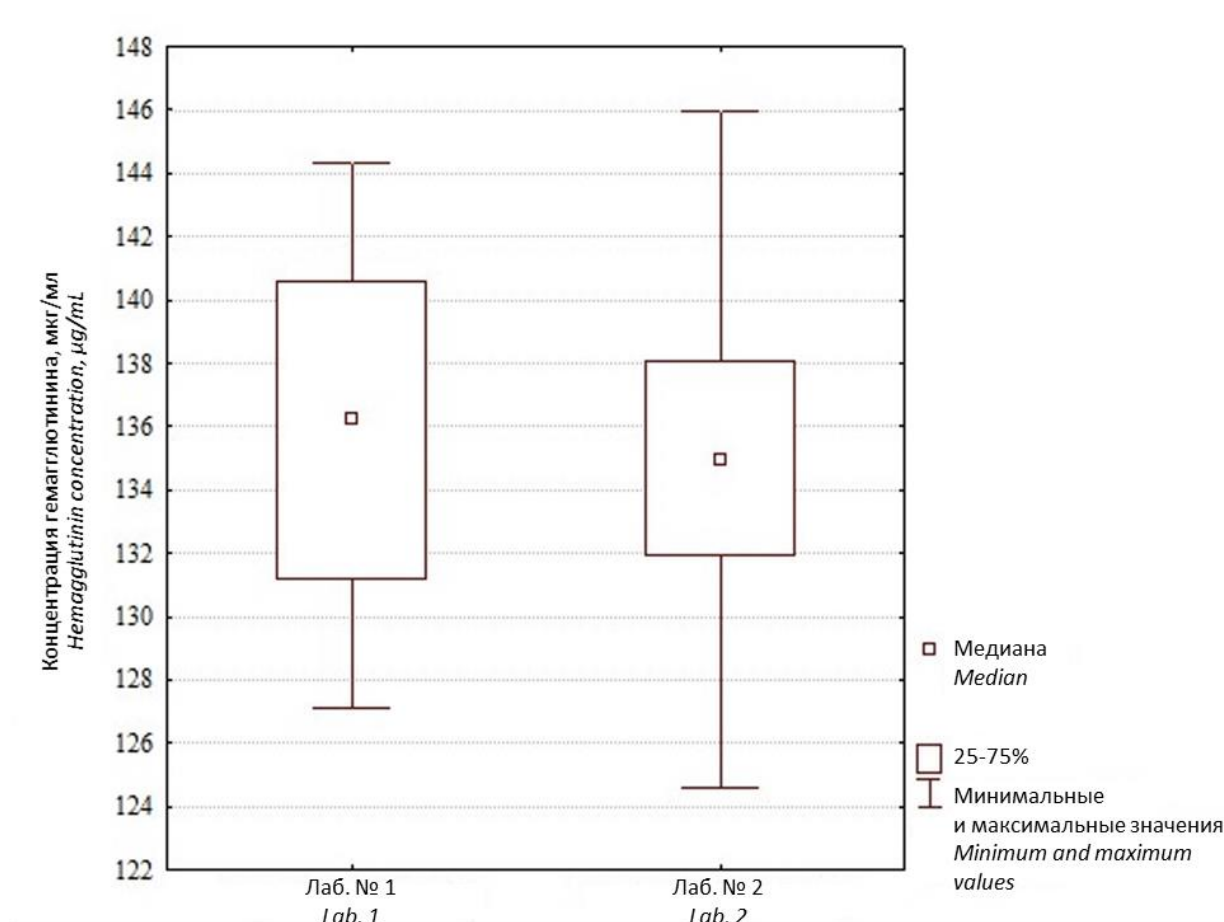


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. S1. Сравнение концентраций гемагглютина, определенных в лаборатории № 1 методом электрофореза ДСН-ПААГ с использованием коммерческих бис-трис гелей с градиентом концентрации 4–12% и в лаборатории № 2 с использованием трис-глициновых гелей ручной заливки с градиентом концентрации 4–20%. Лаб. № 1 – лаборатория № 1; Лаб. № 2 – лаборатория № 2.

Fig. S1. Comparison of hemagglutinin concentrations determined in Laboratory 1 by SDS-PAGE using commercial 4–12% Bis-Tris gradient gels and in Laboratory 2 using hand-cast 4–20% Tris-glycine gradient gels. Lab. 1, laboratory 1; Lab. 2, laboratory 2.