

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ОБЩЕГО БЕЛКА SARS-COV-2 ВИРУСА COVID-19

Ж.С. Абсатова*^{ID}, К.А. Шораева^{ID}, Э.Ж. Калимолда^{ID}, Ж.С. Абай^{ID},
К.К. Джекебеков^{ID}, С.У Молдагулова^{ID}, Г.Ж. Наханова^{ID}, Е.А. Шаяхметов^{ID},
Т.И. Байсеит^{ID}, С.О. Садикалива^{ID}, А.А. Керимбаев^{ID}

«Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» МЗ РК,
пгт. Гвардейский, Казахстан
*zharkinay_a_s@mail.ru

Аннотация. Одним из главных требований к создаваемым новым вакцинам является их безопасность в применении, в том числе содержание общего белка, являющиеся одним из основных показателей качества и безопасности вакцин. В данной статье представлены результаты работ по сравнительному анализу методов определения общего белка в составе активной фармацевтической субстанции (АФС) и также балк-продукта вакцины «QazCovid-in[®]». Определение концентрации общего белка проводилось с помощью сравнения методов Лоури, Бредфорда, коммерческих наборов Клини Тест-БЛ и *BSA Gold Protein*. В результате определения общего белка в составе АФС классическим методом Лоури и коммерческим набором КлиниТест-БЛ были получены наивысшие показатели в среднем 616,67 и 589 мкл/мл, а в балк-продукте 51,11 и 47,38 мкл/мл, соответственно. Самый минимальный показатель содержания общего белка $38,39 \pm 0,000059$ показывает метод с использованием коммерческого набора *BSA Gold Protein*. Средние значения содержания общего белка показали результаты, полученные методом Бредфорда и определение общего белка коммерческим набором Клини Тест-БЛ. Полученные данные позволяют рекомендовать использование набора Клини Тест-БЛ для использования в контроле качества, так как данный набор отличается легкостью и быстротой метода определения, которая не уступает классическому методу Лоури. При определении содержания общего белка в балк-продукте, используемого для приготовления вакцины QazVac против COVID-19 метод классической Лоури показал наилучший результат с высокой степенью чувствительности.

Ключевые слова: концентрация; общий белок; спектрофотометрия; метод Лоури; метод Бредфорд; АФС и балк-продукт.

Введение

В начале декабря 2019 г. первые случаи пневмонии неизвестного происхождения были выявлены в городе Ухань, провинция Хубэй, Китай. Высокопроизводительное секвенирование выявило новый бета-коронавирус, который в настоящее время называется новым коронавирусом 2019 года (*SARS-CoV-2*).

Коронавирусы относятся к отряду *Nidovirales*, семейству *Coronaviridae* и подсемейству *Orthocoronavirinae*. Коронавирусы содержат одноцепочечную положительно заряженную РНК и обладают одним из самых больших геномов среди всех РНК вирусов. Две трети генома коронавируса на 5'-конце кодирует вирусные белки, участвующие в транскрипции вирусной РНК и репликации, а одна треть на 3'-конце кодирует структурные и группоспецифические вспомогательные белки. Основными структурными белками коронавирусов являются: *S* (*spike*), *E* (*envelope*), *M* (*membrane*) и *N* (*nucleocapsid*). Эти биомаркеры играют центральную роль не только в диагностике заболевания, но и в понимании его патогенности [1].

S белок состоит из 1300 а.к. и имеет размер 180–200 кДа, в структуре *S* белка выделяют внеклеточный *N*-терминальный домен (*NTD*), трансмембранный домен (*TMD*), закрепленный на вирусной мембране, и короткий внутриклеточный *C*-терминальный домен (*CMD*) [2]. До слияния с мембраной клетки *S* белок обычно существует в метастабильной конформации; как

только вирус взаимодействует с клеткой-хозяином, происходит обширная структурная перестройка *S* белка, позволяющая вирусу сливаться с мембраной клетки-хозяина. *S* белок покрыт молекулами полисахарида, чтобы избежать иммунного ответа организма хозяина во время проникновения в клетку [3].

E белок – это небольшой гидрофобный белок, состоящий из 74–109 а.к. молекулярной массой 8,4– 109 кДа. Он состоит из трех частей: *NTD*, *TMD* и *CTD* [4]. В структуре *E* белка выделяют три сайта цистеина, которые специфичны к пальмитолитическому белку [5, 6]. Хотя точная функция пальмитолитического белка все еще вызывает споры, исследования роли этого белка в развитии коронавирусной инфекции продолжаются. *E* белок образует в клетке ионный канал, повышает активность виropорина, участвует в сборке вируса, а также опосредует экзоцитоз вирусных частиц [7]. *PDZ*-связывающий мотив (*PBM*) является важным белковым мотивом в *CT* области, также он играет решающую роль в патогенности, разобщая передачу сигналов в клетке [8, 9].

M белок – трансмембранный гликопротеин, является важным структурным белком коронавирусов [10]. Это самый распространенный протеин на поверхности вируса, который придает ему форму.

N белок имеет молекулярную массу 43–50 кДа. Этот структурный белок спирального нуклеокапсида имеет сродство к РНК и несколькими аминокислотами (лизин и аргинин) [11]. В структуре *N* белка выделяют: *NTD*, *CTD*, а также множество неупорядоченных фрагментов (богатых серином и аргинином). *N* белок выполняет функцию присоединения и сборки генома вирусной РНК к длинной спиральной структуре нуклеокапсида или матрице рибонуклеопротеида [12]; однако он очень чувствителен к протеазам [13]. Этот белок фосфорилируется в нескольких специфических положениях в различных коронавирусах, что приводит к изменению его функций, таких как специфичность к вирусной РНК, нарушения связывания моноклональных антител с поверхностью вируса, а также созревание и сборка вируса [14-16].

В производстве биопрепаратов оценка содержания вирусных белков отвечающие за иммуногенность и безопасность в составе вакцин является актуальной задачей, таким образом, определение содержания белка в иммунобиологических препаратах имеет важное значение. Белки являются основой структурного материала всех клеточных мембран, так как образуют основу протоплазмы любой живой клетки, поэтому для точного количественного определение белка был разработан широкий спектр различных методов для количественного определения как сложных смесей белков, так и одного типа белка [17-18]. Методы количественного определения общего белка включают традиционные методы, такие как измерение поглощения УФ-излучения при 280 нм, анализы Бицинхониновой кислоты (*BSA Gold Protein*) и Бредфорда, а также альтернативные методы, такие как анализы Лоури. Отдельные методы количественного определения белка включают, иммуноферментный анализ (*ELISA*), вестерн-блоттинг и в последнее время масс-спектрометрию.

Точная количественная оценка общей концентрации белка является ключевым этапом в большинстве экспериментов и рабочих процессов, связанных с выделением, разделением и анализом белков биохимическими методами. Выбор среди доступных анализов белка обычно основывается на нескольких факторах, включая его химическую совместимость с буферными компонентами анализируемых образцов [19].

Согласно корейским правилам, Фармакопее США [20] и Европейской фармакопее [21], метод Лоури считается наиболее точным методом определения концентрации белка в лицензированных вакцинах.

Однако, существуют и другие методы, такие как: метод Бредфорда, метод с бицинхониновой кислотой альтернативный методу Лоури, но отличающийся более высокой стабильностью реагента, чем реактив Фолина, и меньшей зависимостью от природы белка и сопутствующих соединений.

В производстве биопрепаратов оценка количества вирусных белков, отвечающие за иммуногенность и безопасность в составе вакцин является актуальной задачей.

В исследовательских работах НИИПББ имеются опыт работы с разными методами определения общего белка в составе иммунобиологических препаратов, такие как метод Лоури, метод Бредфорда, определение методом Клини Тест-БЛ и *BSA Gold Protein*.

Целью настоящей работой является проведение сравнительного анализа методов по определению концентрации общего белка в составе АФС и балк-продукта вакцины «*QazCovid-in®*».

Материалы и методы

Для проведения исследования использовали активную фармацевтическую субстанцию (АФС), который является инактивированным очищенным вирусом *SARS-CoV-2*, также балк-продукт вакцины «*QazCovid-in®*».

Определение общий белок методом Лоури.

Метод основан на реакции белков с солями меди (II) в щелочном растворе и восстановлении фосфорномолибдено-вольфрамового реактива (реактив Фолина) с образованием окрашенных продуктов, интенсивность окраски которых определяют по оптической плотности при длине волны 750 нм [22].

Определение методом Бредфорд.

Определение количество общего белка проводилась согласно протоколу производителя [23].

Определение методом Клини Тест-БЛ.

Определение количество общего белка с помощью набора «*Клини Тест-БЛ*» проводилась согласно протоколу производителя [24].

BSA Gold Protein (производитель ThermoFisher scientific)

Определение количество общего белка проводилась согласно протоколу производителя [25].

Результаты

Был проведен сравнительный анализ методов определения содержания общего белка такие как: метод Лоури, метод Бредфорда, коммерческие наборы Клини Тест-БЛ и *BSA Gold Protein*, в результате которого наибольший выход общего белка получено с помощью классического метода Лоури (Рис.1 и 2). Это может быть связано с осаждением белков, с использованием дезоксихолата натрия (ДОХ) и трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Смесь ТХУ и ДОХ усиливает осаждение даже не значительного количества белков, поскольку ДОХ связывается с гидрофобными частями белков. Добавление ТХУ повышает гидрофобность дезоксихолатно-белкового комплекса, что способствует осаждению белков. Однако комбинация ТХУ с ДОХ приводит к образованию осадка образца, который не подходит для прямого анализа.

Анализ, проведенный методом *BSA Gold Protein*, как правило, устойчив к ионогенным и неионогенным детергентам, таким как *NP-40*, *Triton X-100*, и денатурирующим агентам, также мочевины и хлорид гуанидиния, которые имеют тенденцию мешать другим колориметрическим анализам белков (Рис.1 и 2). Однако некоторые реагенты, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), восстанавливающие сахара и липиды, могут мешать анализу *BSA Gold Protein*. Одним из недостатков использования *BSA Gold Protein* является то, что он проявляет сильную реакцию красителя и может привести к недооценке концентрации белка в образцах.

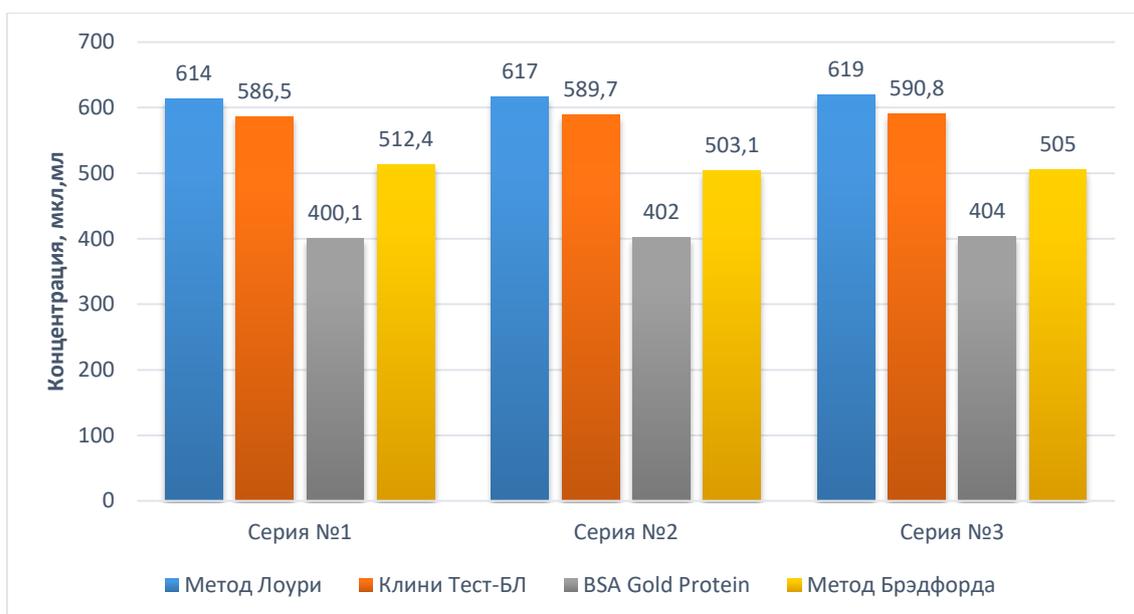


Рисунок 1. Результаты определения общего белка активной фармацевтической субстанции (АФС)

Из рисунка 1 видно, что определение максимального содержания белка $619 \pm 0,00005$ мкл/мл выявляется классическим методом Лоури, тогда как самый минимальный показатель содержания общего белка $400,1 \pm 0,00005$ показывает метод с использованием коммерческого набора *BSA Gold Protein*. Среднее значения содержания общего белка показали определение методом Брэдфорда и набором «Клини Тест-БЛ».

Далее, в работе определяли содержания общего белка в составе балк-продукта, используемый для приготовления вакцины *QazVac* против *COVID-19*.

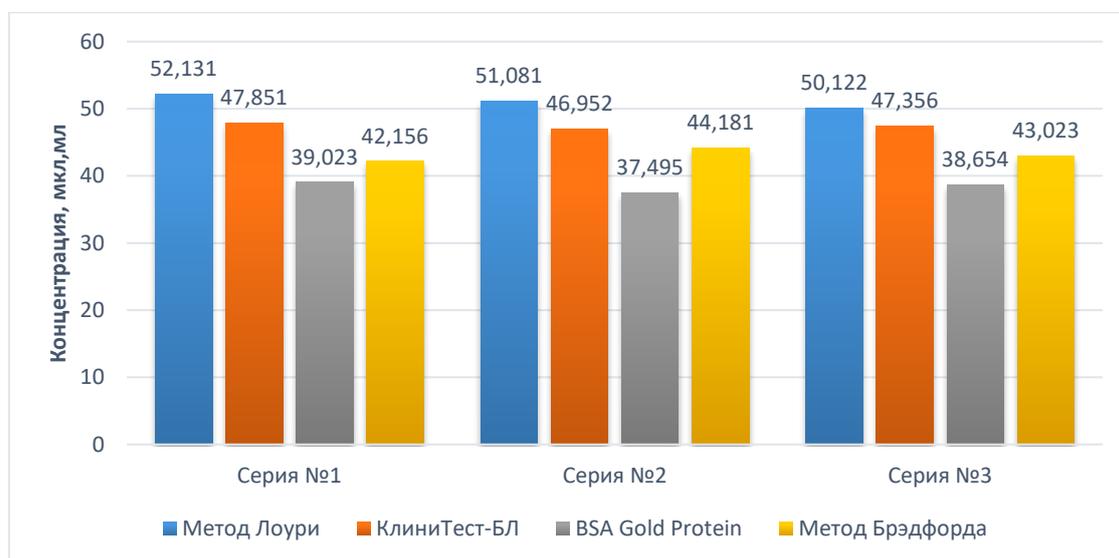


Рисунок 2. Результаты определения общего белка в балк-продуктах

Из рисунка 2 видно, что определение максимального содержания общего белка $51,11 \pm 0,00005$ мкл/мл выявлено классическим методом Лоури, тогда как самый минимальный показатель содержания общего белка $38,39 \pm 0,000059$ показывает метод с использованием коммерческого набора *BSA Gold Protein*. Средние значения содержания общего белка показали результаты, полученные методом Брэдфорда и определение общего белка коммерческим набором Клини Тест-БЛ.

Обсуждение

Определение общего белка является одним из основных показателей качества и безопасности применяемых вакцин.

В данной работе для определения общего белка были использованы четыре основных метода спектрофотометрического анализа для быстрого определения концентрации общего белка, были протестированы на АФС и балк-продукте, и далее методы были сравнены между ними.

Какой бы метод ни применялся, результаты во многом зависят от того, насколько точно стандартный белок соответствует измеряемому белку. Тем не менее, бычий сывороточный альбумин (*BSA Gold Protein*) является наиболее часто используемым стандартным белком. При определении количества белка в растворе использовали две калориметрических методов по Лоури, в котором осуществлена реакция белка с ионами Cu^{2+} в присутствии фосфорно-молибденовой кислоты (реактив Фолина) [26], и окраски белка красителем *Coomassie G-250*, предложенный Мерионом Бредфордом [27], также метод *BSA Gold Protein*.

Полученные результаты работы показывают, что использование набора КлиниТест-БЛ для использования в контроле качества отличается быстротой процесса определения, однако по выходу белка незначительно уступает классическому методу Лоури.

Метод *BSA Gold Protein* показал наименьшее содержание общего белков в исследуемых АФС ($400,1 \pm 0,000051$ мкл/мл) и балк-продукте ($38,39 \pm 0,000051$ мкл/мл), что вероятно, было связано с сравнительно низкой чувствительностью этого метода. Использование реагента Фолина-Чокалтеу для определения восстановленной меди делает анализ Лоури на несколько раз более чувствительным. Наши результаты показывают высокую концентрацию белков с использованием метода Лоури ($616,67 \pm 0,00005$ мкл/мл для АФС и $51,11 \pm 0,00005$ мкл/мл для балк-продукта, аналогичные результаты были получены также и у других исследователей [28-29]).

Тем не менее метод Бредфорд является доминирующим, поскольку менее «капризен». Но у него есть минусы, один из которых заключается в том, что краситель Кумасси *G-250* связывается только с теми белками, которые имеют в своем составе аргинин и в гораздо меньшей степени лизин, триптофан, тирозин, фенилаланин и гистидин [30], что требует для анализа использование материалов с высокой концентрацией белков [31].

Также, предложено ввести стадию отделения от гидроксида алюминия для гармонизации в случае вакцин, содержащих алюминий, для получения точных и воспроизводимых результатов. Модификация метода, в том числе такие, как обработка ДОХ, осаждение ТХУ или термообработка были исследованы для удаления мешающих веществ [32]. Эти модификации включены в метод, называемый «традиционным методом Лоури. Усиляет метод тем, что осаждаются все белки, и таким образом эти методы не эффективны для устранения влияния гидроксида алюминия ($Al(OH)_3$).

Из четырех анализов имеют различные сильные и слабые стороны с точки зрения интерференции веществ и размера белка, однако определения содержания белка методом Лоури дал самые высокие значения, за ним следуют методы Бредфорда и *BSA Gold Protein*, также было выявлено, что метод Лоури является наиболее подходящим методом для вакцины «*QazCovid-in®*», поскольку на него не влияет характер выборки материала.

Заключение

Результаты исследования, по сравнительной оценке четырех методов определения концентрации общего белка продемонстрировали эффективность классического метода Лоури и определение с помощью коммерческого набора Клини Тест-БЛ. Полученные данные позволяют рекомендовать использование набора Клини Тест-БЛ для использования при контроле качества общего белка, так как данный набор отличается легкостью и быстротой метода определения, которая по чувствительности и выходам общего белка не уступает классическому методу Лоури.

Литература

1. Gorbalenya, A.E. et al. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2 // *Nat. Microbiol.* – 2020;5(4):536–544.
2. Bosch, B.J. et al. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex // *J. Virol.* – 2003;77(16):8801–8811.
3. Watanabe, Y. et al. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike // *Science.* – 2020;369(6501):330–333.
4. Nieto-Torres, J.L. et al. Subcellular location and topology of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein // *Virology.* – 2011;415(2):69–82.
5. Liao, Y. et al. Biochemical and functional characterization of the membrane association and membrane permeabilizing activity of the severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein // *Virology.* – 2006;349(2):264–275.
6. Tseng, Y.T. et al. SARS-CoV envelope protein palmitoylation or nucleocapsid association is not required for promoting virus-like particle production // *J. Biomed. Sci.* – 2014;21(34):21–34.
7. Schoeman, D. Coronavirus envelope protein: current knowledge // *Virol. J.* – 2019;16(1):69.
8. Hung, A.Y., Sheng M. PDZ domains: structural modules for protein complex assembly // *J. Biol. Chem.* – 2002;277(8):5699–5702.
9. Javier, R.T., Rice, A.P. Emerging theme: cellular PDZ proteins as common targets of pathogenic viruses // *J. Virol.* – 2011;85(22):11544–11556.
10. Ariel, L.A., Blake, J.L., Brenda, G.H. A conserved domain in the coronavirus membrane protein tail is important for virus assembly // *J. Virol.* – 2010;84(21):1418–11428.
11. Chang, C.K. et al. Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein // *J. Biomed. Sci.* – 2006;13(1):59–72.
12. Kumar, A. et al. Characterization of nucleocapsid (N) protein from novel coronavirus SARS-CoV-2 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2020;527(3):618–623.
13. Macnaughton, M. et al. Ribonucleo protein-like structures from coronavirus particles // *J. Gen. Virol.* – 1978;39(3):545–549.
14. Kuo, L., Koetzner, C.A., Masters, P.S., A key role for the carboxy-terminal tail of the murine coronavirus nucleocapsid protein in coordination of genome packaging // *Virology.* – 2016;494:100–107.
15. Grunewald, M.E. et al. The coronavirus nucleocapsid protein is ADP-ribosylated // *Virology.* – 2018;517:62–68.
16. Chen, Y. et al. The phosphorylation of the N protein could affect PRRSV virulence in vivo // *Vet. Microbiol.* – 2019;231:226–231.
17. Perutz, M.F., Rossmann, M.G., Cullis, A.F., Muirhead, H., Will, G., North, A.C. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis (англ.) // *Nature.* – 1960;185(4711):416–422. PMID 18990801.
18. Белки // *Химическая энциклопедия.* – Москва: Советская энциклопедия. – 1988. Архивная копия от 3 февраля 2012 на Wayback Machine.
19. Якубке Х., Ешкайте Х. Аминокислоты, пептиды, белки. // *М. Мир.* – 1985.
20. Фармакопея США, Национальный формуляр (USP 37, NF 32). 1057 Статья, полученная из биотехнологии: анализ общего белка.
21. Европейская фармакопея 8.0, 2.5.33: Общий белок.
22. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.Z., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951;193:265–275.
23. Браун Р., Джарвис К., Хайленд К. Измерение белка с использованием бицинониновой кислоты: устранение мешающих веществ. *Анальная биохимия.* 1989;180:136–9 опубликовано
24. Redinbaugh M, Turley R. Адаптация анализа белка бицинониновой кислоты для использования с микротитровальными планшетами и фракциями градиента сахарозы. *Анальная биохимия.* 1986;153:267–71 опубликовано

25. Noble, J.E., Bailey, M.J.A. Quantitation of proteins // *Methods in enzymology*. 2009;463:73-95.
26. Malim, T., Ridzuan, P.D. Principle in Biochemistry. [http://www.slideshare.net / UmiBiee](http://www.slideshare.net/UmiBiee), 2010.
27. Anggun M. Determining the concentration of protein on egg albumin through Lowry method. <http://www.scribd.com>, 2013.
28. Бенсадун А., Вайнштейн Д. Анализ белков в присутствии мешающих материалов // *Anal Biochem*, 70 (1976), – С. 241-250.
29. Batav1 C., Gothwal R., Tembhre M. Efficacy of the established methods for determination of protein in fish visceral extract. 462024, India.
30. Полачек И., Кабиб Э. Простая методика определения белка по методу Лоури в разбавленных растворах и в присутствии мешающих веществ // *Anal Biochem*, 117 (1982). – С. 311-314.
31. Родригес-Вико Ф., Мартинес-Кайуэла М., Гарсиа-Перегрин Э., Рамирес Х. Методика устранения помех в методе Лоури для определения белка // *Anal Biochem*, 183 (1989), – С. 275-278.
32. Танялчин Т., Кутай Ф.З., Аслан Д. / Исследование интерференции следует проводить для каждого используемого метода измерения белка // *Accredit Qual Assur*, 6 (2001), – С. 427-430.
33. Кусуноки Х., Окума К., Хамагути И. / Оценка влияния лактозы на вакцины и предложение методологической корректировки определения общего белка по методу Лоури // *Jpn J Infect Dis*, 65 (2012), – С. 489-494.

References

1. Gorbalenya, A.E. et al. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2 // *Nat. Microbiol.* – 2020;5(4):536–544.
2. Bosch, B.J. et al. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex // *J. Virol.* – 2003;77(16):8801–8811.
3. Watanabe, Y. et al. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike // *Science.* – 2020;369(6501):330–333.
4. Nieto-Torres, J.L. et al. Subcellular location and topology of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein // *Virology.* – 2011;415(2):69–82.
5. Liao, Y. et al. Biochemical and functional characterization of the membrane association and membrane permeabilizing activity of the severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein // *Virology.* – 2006;349(2):264–275.
6. Tseng, Y.T. et al. SARS-CoV envelope protein palmitoylation or nucleocapsid association is not required for promoting virus-like particle production // *J. Biomed. Sci.* – 2014;21(34):21–34.
7. Schoeman, D. Coronavirus envelope protein: current knowledge // *Virol. J.* – 2019;16(1):69.
8. Hung, A.Y., Sheng M. PDZ domains: structural modules for protein complex assembly // *J. Biol. Chem.* – 2002;277(8):5699–5702.
9. Javier, R.T., Rice, A.P. Emerging theme: cellular PDZ proteins as common targets of pathogenic viruses // *J. Virol.* – 2011;85(22):11544–11556.
10. Ariel, L.A., Blake, J.L., Brenda, G.H. A conserved domain in the coronavirus membrane protein tail is important for virus assembly // *J. Virol.* – 2010;84(21):1418–11428.
11. Chang, C.K. et al. Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein // *J. Biomed. Sci.* – 2006;13(1):59–72.
12. Kumar, A. et al. Characterization of nucleocapsid (N) protein from novel coronavirus SARS-CoV-2 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2020;527(3):618–623.
13. Macnaughton, M. et al. Ribonucleo protein-like structures from coronavirus particles // *J. Gen. Virol.* – 1978;39(3):545–549.

14. Kuo, L., Koetzner, C.A., Masters, P.S., A key role for the carboxy-terminal tail of the murine coronavirus nucleocapsid protein in coordination of genome packaging // *Virology*. – 2016;494:100–107.
15. Grunewald, M.E. et al. The coronavirus nucleocapsid protein is ADP-ribosylated // *Virology*. – 2018;517:62–68.
16. Chen, Y. et al. The phosphorylation of the N protein could affect PRRSV virulence in vivo // *Vet. Microbiol.* – 2019;231:226–231.
17. Perutz, M.F., Rossmann, M.G., Cullis, A.F., Muirhead, H., Will, G., North, A.C. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis (англ.) // *Nature*. – 1960;185(4711):416-422. PMID 18990801.
18. Белки // *Химическая энциклопедия*. – Москва: Советская энциклопедия. – 1988. Архивная копия от 3 февраля 2012 на Wayback Machine.
19. Якубке Х., Ешкайте Х. *Аминокислоты, пептиды, белки*. // М. Мир. – 1985.
20. Фармакопея США, Национальный формуляр (USP 37, NF 32). 1057 Статья, полученная из биотехнологии: анализ общего белка.
21. Европейская фармакопея 8.0, 2.5.33: Общий белок.
22. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.Z., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951;193:265-275.
23. Браун Р., Джарвис К., Хайленд К. Измерение белка с использованием бицинониновой кислоты: устранение мешающих веществ. *Анальная биохимия*. 1989;180:136-9 опубликовано
24. Redinbaugh M, Turley R. Адаптация анализа белка бицинониновой кислоты для использования с микротитровальными планшетами и фракциями градиента сахарозы. *Анальная биохимия*. 1986;153:267-71 опубликовано
25. Noble, J.E., Bailey, M.J.A. Quantitation of proteins // *Methods in enzymology*. 2009;463:73-95.
26. Malim, T., Ridzuan, P.D. Principle in Biochemistry. [http://www.slideshare.net / UmiBiee](http://www.slideshare.net/UmiBiee), 2010.
27. Anggun M. Determining the concentration of protein on egg albumin through Lowry method. <http://www.scribd.com>, 2013.
28. Бенсадун А., Вайнштейн Д. Анализ белков в присутствии мешающих материалов // *Anal Biochem*, 70 (1976), – С. 241-250.
29. Batavi S., Gothwal R., Tembhe M. Efficacy of the established methods for determination of protein in fish visceral extract. 462024, India.
30. Полачек И., Кабиб Э. Простая методика определения белка по методу Лоури в разбавленных растворах и в присутствии мешающих веществ // *Anal Biochem*, 117 (1982). – С. 311-314.
31. Родригес-Вико Ф., Мартинес-Кайуэла М., Гарсиа-Перегрин Э., Рамирес Х. Методика устранения помех в методе Лоури для определения белка // *Anal Biochem*, 183 (1989), – С. 275-278.
32. Танялчин Т., Кутай Ф.З., Аслан Д. / Исследование интерференции следует проводить для каждого используемого метода измерения белка // *Accredit Qual Assur*, 6 (2001), – С. 427-430.
33. Кусуноки Х., Окума К., Хамагути И. / Оценка влияния лактозы на вакцины и предложение методологической корректировки определения общего белка по методу Лоури // *Jpn J Infect Dis*, 65 (2012), – С. 489-494.

COVID-19 ВИРУСЫНЫҢ SARS-COV-2 ЖАЛПЫ АҚУЫЗЫНЫҢ ҚҰРАМЫН АНЫҚТАУ ӘДІСТЕРІН САЛЫСТЫРМАЛЫ ТАЛДАУ

Ж.С. Абсатова*^{ID}, К.А. Шораева^{ID}, Э.Ж. Калимолда^{ID}, Ж.С. Абай^{ID},
К.К. Джекебеков^{ID}, С.У. Молдагулова^{ID}, Г.Ж. Наханова^{ID}, Е.А. Шаяхметов,
Т.И. Байсеит^{ID}, С.О. Садиқалива^{ID}, А.А. Керимбаев^{ID}

ҚР ДСМ «Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты»,
Гвардейский қтк, Қазақстан
*zharkinay_a_s@mail.ru

Аннотация. Жасалып жатқан жаңа вакциналарға қойылатын негізгі талаптардың бірі олардың қолдану қауіпсіздігі, соның ішінде вакциналардың сапасы мен қауіпсіздігінің негізгі көрсеткіштерінің бірі болып табылатын жалпы ақуыз мөлшері болып табылады. Бұл мақалада белсенді фармацевтикалық субстанция (БФС) құрамындағы жалпы ақуызды және "QazCovid-in ®" вакцинасының балк-өнімін анықтау әдістерін салыстырмалы талдау бойынша жұмыстардың нәтижелері келтірілген. Анықтау жалпы ақуыз концентрациясы Лоури, Бредфорд әдістерін, коммерциялық Clini Test-bl жиынтықтарын және BSA Gold Protein салыстыру арқылы жүргізілді. Классикалық Лоури әдісімен және Clinitest-BL коммерциялық жиынтығымен АФС құрамындағы жалпы ақуызды анықтау нәтижесінде орташа есеппен 616,67 және 589 мкл/мл, ал балк өнімінде сәйкесінше 51,11 және 47,38 мкл/мл ең жоғары көрсеткіштер алынды. Жалпы ақуыздың ең аз мөлшері $38,39 \pm 0,000059$ BSA Gold Protein коммерциялық жиынтығын қолдану әдісін көрсетеді. Жалпы ақуыздың орташа мәндері Бредфорд әдісімен алынған нәтижелерді және коммерциялық Clini Test-bl жиынтығымен жалпы ақуызды анықтауды көрсетті. Нәтижелер сапаны бақылауда пайдалану үшін сынау сынағы жинағын пайдалануды ұсынуға мүмкіндік береді, өйткені бұл жинақ классикалық Лоури әдісінен кем түспейтін анықтау әдісінің жеңілдігі мен жылдамдығымен ерекшеленеді. Qazvac COVID-19 вакцинасын жасау үшін қолданылатын балк өніміндегі жалпы ақуыздың құрамын анықтау кезінде классикалық Лоури әдісі жоғары сезімталдықпен ең жақсы нәтиже көрсетті.

Түйін сөздер: концентрация; жалпы ақуыз; спектрофотометрия; Лоури әдісі; Бредфорд әдісі; АФС және сәуле өнімі.

COMPARATIVE ANALYSIS OF METHODS FOR DETERMINING THE CONTENT OF THE TOTAL PROTEIN SARS-COV-2 OF THE COVID-19 VIRUS

Zh.S. Absatova*^{ID}, K.A. Shorayeva^{ID}, E.Zh. Kalimolda^{ID}, Zh.S. Abai^{ID},
K.K. Jekebekov^{ID}, S.U. Moldagulova^{ID}, G.Zh. Nakhanova^{ID}, E.A. Shayakhmetov^{ID},
T.I. Bayseit^{ID}, S.O. Sadikalieva^{ID}, A.A. Kerimbayev^{ID}

«Research Institute of Biological Safety Problems» Ministry of Health of the Republic of
Kazakhstan, Guardeysky, Kazakhstan
*zharkinay_a_s@mail.ru

Abstract. One of the main requirements for the new vaccines being created is their safety in use, including the total protein content, which are one of the main indicators of the quality and safety of vaccines. This article presents the results of work on the comparative analysis of methods for determining the total protein in the active pharmaceutical substance (AFS) and also the bulk product of the vaccine "QazCovid-in ®". Determination of the total protein concentration was carried out by

comparing the methods of Lowry, Bradford, commercial sets of Clini Test-BL and BSA Gold Protein. As a result of the determination of the total protein in the composition of the AFS by the classical Lowry method and the commercial CliniTest-BL kit, the highest values were obtained on average 616.67 and 589 $\mu\text{l/ml}$, and in the bulk product 51.11 and 47.38 $\mu\text{l/ml}$, respectively. The most minimal indicator of the total protein content of 38.39 ± 0.000059 is shown by the method using the commercial BSA Gold Protein kit. The average values of total protein content showed the results obtained by the Bradford method and the determination of total protein by a commercial set of Clini Test-BL. The data obtained allow us to recommend the use of a set of Clini Test-BL for use in quality control, since this set is characterized by the ease and speed of the determination method, which is not inferior to the classical Lowry method. When determining the total protein content in the bulk product used to prepare the QazVac vaccine against COVID-19, the classical Lowry method showed the best result with a high degree of sensitivity.

Keywords: concentration; total protein; spectrophotometry; Lowry method; Bradford method; AFS and bulk product.