

УДК 578.224

DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ108599>

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА НУКЛЕОКАПСИДА SARS-CoV-2 РАЗЛИЧНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ

А.Я. Рак, С.А. Дони́на, И.Н. Исакова-Сивак, Л.Г. Руденко

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Для цитирования: Рак А.Я., Дони́на С.А., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г. Оптимизация условий получения и исследование антигенных свойств рекомбинантного белка нуклеокапсида SARS-CoV-2 различных генетических линий // Медицинский академический журнал. 2022. Т. 22. № 2. С. 235–241. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ108599>

Рукопись получена: 24.05.2022

Рукопись одобрена: 07.06.2022

Опубликована: 30.06.2022

Обоснование. В условиях постоянного появления новых штаммов SARS-CoV-2 и необходимости определения иммуногенности новых вариантов противовирусных вакцин требуется создание диагностических тест-систем на основе консервативных вирусных белков. Белок нуклеокапсида (N) SARS-CoV-2B может рассматриваться как кандидатный антиген, в то же время релевантность существующих тест-систем на его основе для определения титра антител, выработанных в ответ на инфекцию вирусами других генетических линий, неизвестна.

Цель работы — оптимизация условий получения рекомбинантных N-белков различных линий SARS-CoV-2 и анализ возможности создания на их основе иммуноферментных тест-систем.

Материалы и методы. Бактериальные штаммы-продуценты N-белков получали путем амплификации соответствующих генов и их лигирования в экспрессионный вектор pETDuet-1. Проводили индукцию экспрессии при 20 или 37 °C в течение 1, 2, 4 или 20 ч, используя концентрации индуктора изопропилтиогалактозида 0,1 или 0,5 mM в присутствии или без добавления 3 % этанола. Белки очищали из биомассы методом металл-аффинной хроматографии и использовали в качестве антигенов для выявления противовирусных антител иммуноферментным методом.

Результаты. Установлено, что достаточная для экспрессии рекомбинантных белков концентрация индуктора составляет 0,1 mM, время индукции — 1 ч, а необходимая температура 37 °C. Влияния присутствия этанола как стимулирующего экспрессию реагента выявлено не было. При определении титров противовирусных антител с помощью полученных белков была установлена кросс-реактивность сывороток переболевших COVID-19 людей по отношению к антигенам различных линий SARS-CoV-2.

Заключение. Возможность эффективной индукции синтеза белков при минимальной концентрации индуктора и времени культивирования свидетельствует об экономичности их получения, а распознавание этих белков противовирусными антителами — об их нативной структуре. Перекрестная реактивность сывороток крови реконвалесцентов указывает на медленный характер эволюции антигенных свойств N-белка SARS-CoV-2. Таким образом, полученные белки могут быть использованы для создания на их основе диагностических тест-систем.

Ключевые слова: антиген; экспрессия белка; белок нуклеокапсида; рекомбинантный белок; SARS-CoV-2; реконвалесценты COVID-19; тест-система; иммуноферментный анализ; кросс-реактивность.

OPTIMIZATION OF PURIFICATION CONDITIONS AND STUDY OF ANTIGENIC PROPERTIES OF RECOMBINANT NUCLEOCAPSID PROTEIN OF DIFFERENT SARS-CoV-2 STRAINS

Alexandra Ya. Rak, Svetlana A. Donina, Irina N. Isakova-Sivak, Larisa G. Rudenko

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

For citation: Rak AY, Donina SA, Isakova-Sivak IN, Rudenko LG. Optimization of purification conditions and study of antigenic properties of recombinant nucleocapsid protein of different SARS-CoV-2 strains. *Medical Academic Journal*. 2022;22(2):235–241. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ108599>

Received: 24.05.2022

Accepted: 07.06.2022

Published: 30.06.2022

BACKGROUND: In the context of the constant manifestation of new SARS-CoV-2 strains and the need to determine the immunogenicity of new variants of antiviral vaccines, it is necessary to create diagnostic test systems based on conservative viral proteins. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein can be considered as a candidate antigen. However, the relevance of existing test systems based on it for determining the titer of antibodies produced in response to infection by recently emerging strains is unknown.

AIM: The goal is to optimize the conditions for obtaining recombinant N proteins of various SARS-CoV-2 strains and to analyze the possibility of creating ELISA test systems based on them.

Список сокращений

ИПТГ — изопропилтиогалактозид; ПЦР — полимеразная цепная реакция.

MATERIALS AND METHODS: Bacterial strains producing N proteins were obtained by amplifying the corresponding genes and ligating them into the pETDuet-1 expression vector. Expression was induced at 20 or 37 °C for 1, 2, 4, or 20 h using inducer (IPTG) concentrations of 0.1 mM or 0.5 mM with or without the addition of 3% ethanol. Proteins were purified from biomass by metal affinity chromatography and used as antigens for the detection of antiviral antibodies by ELISA.

RESULTS: It was found that the concentration of the inducer sufficient for the expression of recombinant proteins is 0.1 mM, the induction time is 1 h, and the required temperature is 37 °C. The influence of the presence of ethanol as an expression-stimulating reagent was not revealed. When determining the titers of antiviral antibodies using the obtained proteins, cross-reactivity of sera of COVID-19 convalescents was established regarding to antigens of various SARS-CoV-2 strains.

CONCLUSIONS: The possibility of effective induction of protein synthesis at a minimum concentration of the inducer and cultivation time indicates the economy of its production, and antigen recognition by antiviral antibodies indicates a native structure. Cross-reactivity of the blood sera of convalescents indicates the slow character of the evolution of the antigenic properties of the SARS-CoV-2 N protein. Thus, the purified proteins can be used as a basis for development of diagnostic test systems.

Keywords: antigen; protein expression; recombinant protein; COVID-19 convalescents; nucleocapsid protein; SARS-CoV-2; test system; cross-reactivity.

Обоснование

Пандемия COVID-19, начавшаяся в конце 2019 г., стала причиной глобального социально-экономического кризиса, последствия которого проявляются до сих пор [1]. На сегодняшний день зарегистрировано более 500 млн случаев заражения SARS-CoV-2, и с появлением новых штаммов вируса это число продолжает расти [2]. Эффективный контроль распространения инфекции может быть обеспечен при своевременном выявлении и детальном анализе каждого отдельного случая.

Традиционно лабораторный анализ на COVID-19 выполняется в двух вариантах: прямая детекция вирусной РНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (РТ-ПЦР) в носоглоточных мазках или определение титра противовирусных антител серологическими методами (иммуноферментный анализ, реакция микронейтрализации или автоматизированный хемилюминесцентный анализ) [3]. Несмотря на то что серологическое тестирование не подходит для диагностики острой фазы инфекции, с его помощью можно оценить не только интенсивность гуморального иммунного ответа у отдельных лиц, но и темпы распространения инфекции, и степень формирования коллективного иммунитета [3].

Большинство современных иммуноферментных тест-систем для детекции антител против SARS-CoV-2 разработано на основе поверхностного шипового белка этого вируса, поскольку посредством его вирус проникает в клетки-мишени [4]. Однако определить с их помощью, что стало причиной появления противовирусных антител, вакцинация или инфекция, не представляется возможным. В этой связи целесообразна разработка аналитических тест-систем на основе других белков SARS-CoV-2, в частности консервативного и высокоиммуногенного белка нуклеокапсида (N), в больших количествах синтезируемого

в зараженных клетках [5]. Дополнительный скрининг донорского материала с помощью таких тест-систем при определении иммуногенности новых вакцин против SARS-CoV-2 позволит избежать завышения данных из-за ошибочного включения в контрольную группу лиц, переболевших COVID-19 в период вакцинации [6].

Релевантность иммуноферментных тест-систем, разработанных на основе N-белка SARS-CoV-2, выделенного в начале пандемии и принадлежащего линии В.1 (Wuhan) [7–9], в случае скрининга материала лиц, переболевших вирусами других генетических линий, остается неизвестной. Таким образом, цель настоящего исследования — оптимизация условий получения рекомбинантных N-белков SARS-CoV-2 различных генетических линий и анализ возможности создания на их основе иммуноферментных тест-систем.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 13 реконвалесцентов COVID-19 и 17 наивных доноров 21–77 лет. Образцы венозной крови были отобраны после получения информированного согласия от доноров спустя ≥22 дня после заболевания. Данное исследование — часть проекта «Изучение формирования иммунного ответа после перенесенной коронавирусной инфекции», одобренного локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 2/20 от 7 апреля 2020 г.). Сыворотки отделяли центрифугированием при 1000 g в течение 10 мин и хранили при –20 °C.

В работе использовали пять штаммов SARS-CoV-2, полученных из коллекции вирусов гриппа и ОРВИ ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава РФ:

- hCoV-19/Russia/StPetersburg-3524/2020 (линия В.1, Wuhan);

- hCoV-19/Russia/SPE-RII-27029S/2021 (линия B.1.351, Beta);
- hCoV-19/Japan/TY7-503/2021 (линия P.1, Gamma);
- hCoV-19/Russia/SPE-RII-32759S/2021 (линия B.1.617.2, Delta);

- hCoV-19/Russia/SPE-RII-6243V1/2021 (линия B.1.1.529, Omicron).

Очистку тотальной РНК из вирусосодержащей жидкости осуществляли набором Biolabmix RNA Isolation Kit. Гены, кодирующие N-белки различных вирусов, амплифицировали набором

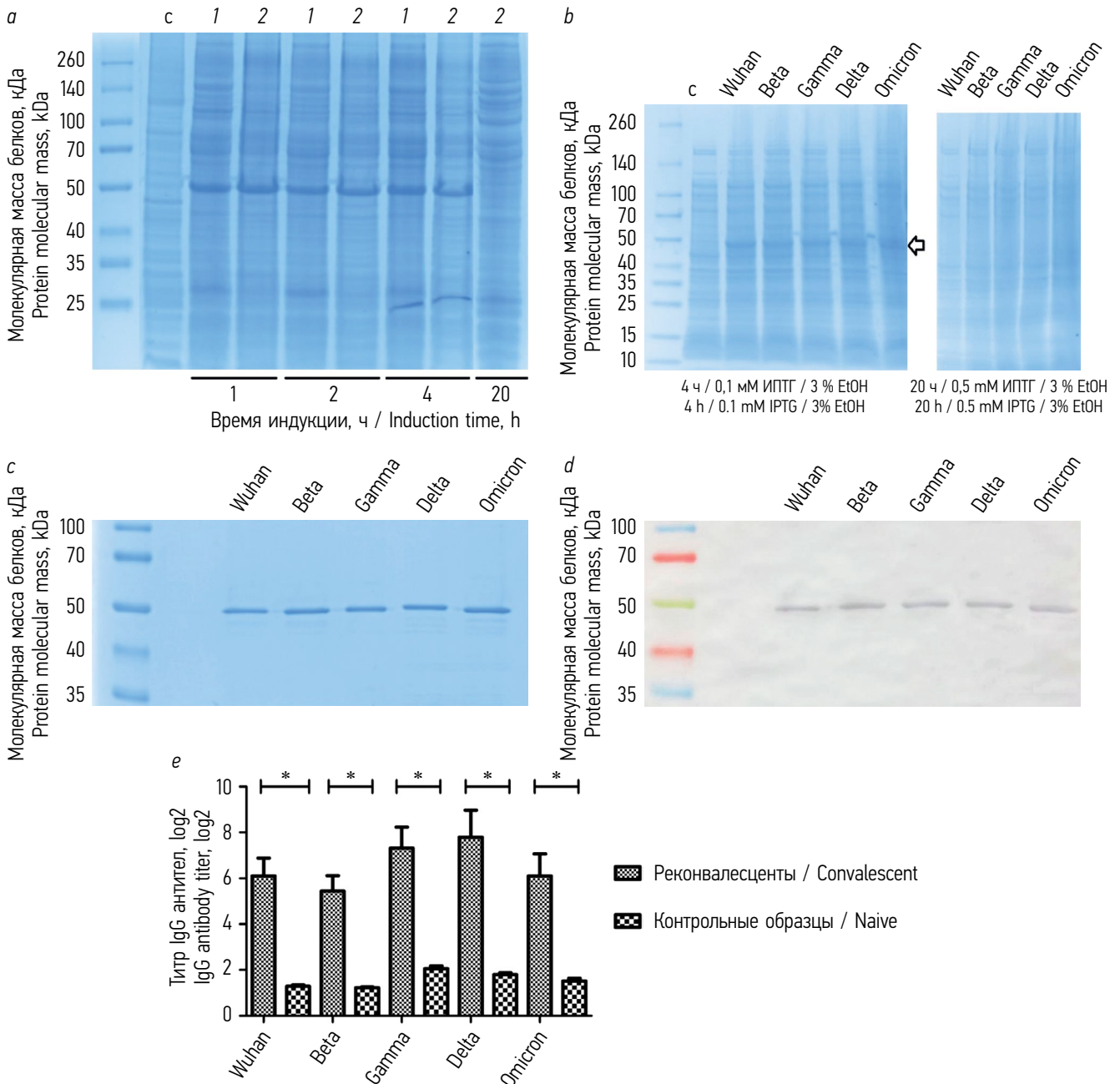


Рисунок. Электрофоретический анализ влияния: *a* — концентрации индуктора и времени индукции на интенсивность экспрессии N-белка SARS-CoV-2 линии Wuhan, дорожка 1 — 0,1 мМ ИПТГ; дорожка 2 — 0,5 мМ ИПТГ; *b* — добавления этанола на индукцию экспрессии N-белков; *c* — очищенных N-белков; *d* — вестерн-блот анализ очищенных N-белков; *e* — титры противовирусных антител класса IgG, определенные с использованием тест-системы, созданной на основе рекомбинантных N-белков. Приведены средние значения ± стандартные ошибки среднего. ИПТГ — изопропилтиогалактозид; *c* — контрольные образцы без индукции. **p* < 0,001

Figure. SDS-PAGE analysis: *a* — of inductor concentration and induction time effects on the intensity of N protein expression of the Wuhan strain (lane 1 — 0.1 mM IPTG, lane 2 — 0.5 mM IPTG); *b* — of ethanol addition effects on the induction of expression of N proteins; *c* — of purified N proteins; *d* — SARS-CoV-2 virus-specific IgG antibody titers measured in ELISA based on recombinant N proteins. The data are given as mean values ± standard error means showed by error bars. IPTG — isopropylthiogalactoside; *c* — control samples without induction. **p* < 0.001

BioMaster RT-PCR Premium Kit и клонировали в экспрессионный вектор pETDuet-1 по рестрикционным сайтам *Bam*HI и *Not*I, добавляя к N-концевой части экспрессируемых белков полигистидиновый таг. Трансформированные плазмидами клетки *Escherichia coli* штамма BL21 (DE3) культивировали в среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 0,1 мМ изопрропилтиогалактозида (ИПТГ). Полученную биомассу ресуспендировали в буфере, содержащем 100 мкг/мл лизоцима, и лизировали ультразвуком. Осветленный при 16 000 g лизат наносили на колонку с заряженным ионами Co^{2+} сорбентом His-Bind (Novagen, США), уравновешенную ресуспендирующим буфером с добавлением 5 мМ имидазола. Очистку белков проводили при скорости потока 0,5 мл/мин, для элюции использовали ресуспендирующий буфер, содержащий 200 мМ имидазола.

Электрофоретический анализ полученных фракций и лизатов проводили в невозстанавливающих условиях, используя 12,5 % разрешающий акриламидный гель. Результаты визуализировали стандартным окрашиванием Кумасси G-250 либо методом иммуноблоттинга, осуществляя влажный перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0,45 мкм. После обработки 5 % сухим обезжиренным молоком в течение 1 ч при 37 °С мембрану выдерживали в растворе антиполигистидиновой пробы (1 : 10000, Thermo Fischer, США) и далее после трехкратной отмывки проявляли 0,05 % раствором диаминобензидина (Sigma, США), содержащим 1 % перекиси водорода.

Для исследования возможности использования очищенных белков как основы для создания иммуноферментных тест-систем проводили их сорбцию при концентрации 1,5 мкг/мл в течение 16–18 ч при 4 °С. Затем, после трехкратной отмывки фосфатным буфером, содержащим 0,05 % Твин-20, в лунки вносили 5 % раствор обезжиренного сухого молока. Инкубацию проводили в течение 1 ч при 37 °С, после чего вносили по 50 мкл растворов исследуемых сывороток и также проводили часовую инкубацию. После трехкратной отмывки в лунки вносили по 50 мкл антител козы против IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена (1 : 3000). Спустя 1 ч проводили финальную отмывку и регистрировали иммуноферментную реакцию с использованием тетраметилбензидина и ридера для микропланшета при длине волны 450 нм. За конечный титр принимали последнее разведение сыворотки, где оптическая плотность вдвое превышала средний уровень фоновых лунок.

Статистическую обработку данных выполняли в программе GraphPad Prism 6.0. Для проверки нормальности распределения использовали тест

Шапиро – Уилка. Значимость различий между группами оценивали однофакторным дисперсионным анализом по Краскелу – Уоллису с апостериорным критерием Данна. Достоверность различий признавали при $p < 0.05$.

Результаты

Исследование влияния различных концентраций индуктора синтеза рекомбинантных белков и времени культивирования на интенсивность синтеза N-белка коронавируса линии Wuhan (см. рисунок, а) показало, что индукция происходит при добавлении минимального количества ИПТГ (0,1 мМ). Аналогичные результаты получены при анализе влияния временного фактора на индукцию экспрессии N-белков штаммов остальных линий при добавлении 0,1 мМ ИПТГ. Добавление этанола в культуру клеток-продуцентов N-белка различных штаммов SARS-CoV-2 до конечной концентрации 3 % не повлияло на интенсивность синтеза как в течение 4 ч при добавлении 0,1 мМ ИПТГ, так и в течение 20 ч при добавлении 0,5 мМ индуктора (см. рисунок, б). Электрофоретический анализ очищенных белков пяти исследованных штаммов представлен на рисунке, в. Его результаты хорошо согласуются с данными иммуноблоттинга (см. рисунок, д).

Вирусспецифические антитела против N белков SARS-CoV-2 различных генетических линий обнаружены во всех экспериментальных группах (см. рисунок, е). Однако титры противовирусных антител у реконвалесцентов оказались в несколько раз выше по сравнению с таковыми у доноров из контрольной экспериментальной группы ($p < 0,001$).

Обсуждение

В настоящее время использование серологических методов в диагностике COVID-19 — распространенный общепринятый подход, поскольку он дает возможность оценить интенсивность генерации противовирусных антител и, следовательно, степень активации гуморального противовирусного иммунитета при минимальных затратах времени и средств [10]. Этот показатель коррелирует с индивидуальной и социальной защищенностью в случае будущего заражения, поэтому может быть использован как для оценки рисков у отдельных лиц, так и для анализа выработки коллективного иммунитета [11].

С появлением новых штаммов SARS-CoV-2 требуется разработка тест-систем, пригодных для детекции антител к белкам эволюционирующих вирусов. Поскольку шиповый белок коронавируса крайне мутабельный [12], хорошей альтернативой представляется разработка

диагностических инструментов на основе более консервативного антигена.

Качество и выход антигена во многом обуславливает экономичность, специфичность и чувствительность разработанных на его основе тест-систем. В этой связи после получения продуцентов N-белков мы провели анализ влияния различных факторов (температуры, концентрации индуктора, продолжительности индукции, присутствия этанола) на интенсивность синтеза антигенов. Эффективная индукция была достигнута при использовании 0,1 мМ ИПТГ уже через 1 ч культивирования при 37 °С (см. рисунок, *a*). Значительного влияния присутствия 3% этанола (что способствует увеличению выхода некоторых рекомбинантных белков [13]) при различных концентрациях индуктора при 20 или 37 °С на интенсивность экспрессии выявлено не было (см. рисунок, *b*). Используя 100 мл бактериальных культур, выращенных в присутствии 0,1 мМ ИПТГ в течение 2 ч при 37 °С, мы получили 1 мг высокоочищенных N-белков (см. рисунок, *c*), идентифицированных методом иммуноблоттинга (см. рисунок, *d*). Эти данные отражают экономичность получения антигенов, распознавание которых противовирусными антителами свидетельствует о корректности фолдинга белков и о возможности создания на их основе релевантных иммуноферментных тест-систем (см. рисунок, *e*).

Анализ сывороток доноров позволил выявить не только кросс-реактивность противовирусных антител по отношению к антигенам SARS-CoV-2 различных генетических линий, но и наличие низкого титра у добровольцев контрольной группы, не имевших COVID-19 в анамнезе и у которых не выявлялись антитела к шиповому белку коронавируса. Эти явления объяснимы с учетом консервативности структуры и последовательности бетакоронавирусных N-белков [5], контакт с которыми в последнем случае мог произойти в результате сезонной инфекции. Для детальной характеристики предложенных тест-систем будут проведены дополнительные исследования с расширенными экспериментальными группами.

Выводы

1. Оптимизированы условия получения рекомбинантных N белков SARS-CoV-2 различных генетических линий.
2. Показана возможность создания на основе очищенных рекомбинантных N белков иммуноферментных тест-систем.
3. Обнаружена кросс-реактивность противовирусных антител по отношению к антигенам различных генетических линий нового коронавируса.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 21-75-30003.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с подготовкой и публикации статьи.

Соблюдение этических норм. Выполнение исследования одобрено этическим комитетом Института экспериментальной медицины (протокол № 2/20 от 07.04.2020).

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Наибольший вклад распределен следующим образом: *А.Я. Рак, С.А. Донина* — проведение экспериментальных исследований, обработка и анализ результатов; *И.Н. Исакова-Сивак* — анализ полученных результатов; *Л.Г. Руденко* — общая координация исследований.

Additional information

Funding. The study was performed with the financial support of the Russian Science Foundation (Project No. 21-75-30003).

Competing interests. The authors have no interest conflict related to this article publication to declare.

Compliance with ethical standards. The study was approved of the Ethics Committee of the Institute of Experimental Medicine (Protocol No. 2/20 by April 7, 2020).

Authors' contribution. All authors made a significant contribution to the development of the concept and preparation of the article, read and approved the final version before publication. The largest contribution is distributed as follows: *A.Ya. Rak, S.A. Donina* — experimental work, processing and analysis of the results; *I.N. Isakova-Sivak* — analysis of the results; *L.G. Rudenko* — general coordination of research.

Список литературы

1. Wang C., Horby P.W., Hayden F.G., Gao G.F. A novel coronavirus outbreak of global health concern // *Lancet*. 2020. Vol. 395, No. 10223. P. 470–473. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30185-9
2. Worldometer of COVID-19 Coronavirus Pandemic [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.worldometers.info/coronavirus>. Дата обращения: 10.05.2022.
3. Amanat F., Stadlbauer D., Strohmaier S. et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans // *Nat. Med.* 2020. Vol. 26, No. 7. P. 1033–1036. DOI: 10.1038/s41591-020-0913-5
4. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin // *Nature*. 2020. Vol. 579, No. 7798. P. 270–273. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7

5. Bessa L.M., Guseva S., Camacho-Zarco A.R. et al. The intrinsically disordered SARS-CoV-2 nucleoprotein in dynamic complex with its viral partner nsp3a // *Sci. Adv.* 2022. Vol. 8, No. 3. P. eabm4034. DOI: 10.1126/sciadv.abm4034
6. Gonzalez Lopez Ledesma M.M., Sanchez L., Ojeda D.S. et al. Longitudinal study after Sputnik V vaccination shows durable SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and reduced viral variant escape to neutralization over time // *mBio.* 2022. Vol. 13, No. 1. P. e0344221. DOI: 10.1128/mbio.03442-21
7. Korobova Z.R., Zueva E.V., Arsentieva N.A. et al. Changes in Anti-SARS-CoV-2 IgG subclasses over time and in association with disease severity // *Viruses.* 2022. Vol. 14, No. 5. P. 941. DOI: 10.3390/v14050941
8. Meschi S., Colavita F., Bordi L. et al. Performance evaluation of Abbott ARCHITECT SARS-CoV-2 IgG immunoassay in comparison with indirect immunofluorescence and virus microneutralization test // *J. Clin. Virol.* 2020. Vol. 129. P. 104539. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104539
9. Bořecká K., Jamriková V., Sojka P. et al. Measurement of anti-SARS-CoV-2 antibodies nucleocapsid versus spike, ECLIA versus ELISA // *Klin. Biochem. Metab.* 2021. Vol. 29, No. 1. P. 19–24.
10. Zhao J., Yuan Q., Wang H. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019 // *Clin. Infect. Dis.* 2020. Vol. 17, No. 16. P. 2027–2034. DOI: 10.1093/cid/ciaa344
11. Meyer B., Drosten C., Müller M.A. Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls // *Virus Res.* 2014. Vol. 194. P. 175–183. DOI: 10.1016/j.virusres.2014.03.018
12. Magazine N., Zhang T., Wu Y. et al. Mutations and evolution of the SARS-CoV-2 spike protein // *Viruses.* 2022. Vol. 14, No. 3. P. 640. DOI: 10.3390/v14030640
13. Chhetri G., Kalita P., Tripathi T. An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli* // *MethodsX.* 2015. Vol. 2. P. 385–391. DOI: 10.1016/j.mex.2015.09.005
2. Worldometer of COVID-19 Coronavirus Pandemic [Internet]. Available from: <https://www.worldometers.info/coronavirus>. Accessed: May 10, 2022.
3. Amanat F., Stadlbauer D., Strohmaier S., et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat Med.* 2020;26(7):1033–1036. DOI: 10.1038/s41591-020-0913-5
4. Zhou P., Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270–273. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7
5. Bessa LM, Guseva S, Camacho-Zarco AR, et al. The intrinsically disordered SARS-CoV-2 nucleoprotein in dynamic complex with its viral partner nsp3a. *Sci Adv.* 2022;8(3):eabm4034. DOI: 10.1126/sciadv.abm4034
6. Gonzalez Lopez Ledesma MM, Sanchez L, Ojeda DS, et al. Longitudinal study after Sputnik V vaccination shows durable SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and reduced viral variant escape to neutralization over time. *mBio.* 2022;13(1):e0344221. DOI: 10.1128/mbio.03442-21
7. Korobova ZR, Zueva EV, Arsentieva NA, et al. Changes in Anti-SARS-CoV-2 IgG subclasses over time and in association with disease severity. *Viruses.* 2022;14(5):941. DOI: 10.3390/v14050941
8. Meschi S, Colavita F, Bordi L, et al. Performance evaluation of Abbott ARCHITECT SARS-CoV-2 IgG immunoassay in comparison with indirect immunofluorescence and virus microneutralization test. *J Clin Virol.* 2020;129:104539. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104539
9. Bořecká K, Jamriková V, Sojka P, et al. Measurement of anti-SARS-CoV-2 antibodies nucleocapsid versus spike, ECLIA versus ELISA. *Klin Biochem Metab.* 2021;29(1):19–24.
10. Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2020;17(16):2027–2034. DOI: 10.1093/cid/ciaa344
11. Meyer B, Drosten C, Müller MA. Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls. *Virus Res.* 2014;194:175–183. DOI: 10.1016/j.virusres.2014.03.018
12. Magazine N, Zhang T, Wu Y, et al. Mutations and evolution of the SARS-CoV-2 spike protein. *Viruses.* 2022;14(3):640. DOI: 10.3390/v14030640
13. Chhetri G, Kalita P, Tripathi T. An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*. *MethodsX.* 2015;2:385–391. DOI: 10.1016/j.mex.2015.09.005

References

Информация об авторах / Information about the authors

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Александра Яковлевна Рак — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородиной. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5552-9874>; e-mail: rak.ay@iemspb.ru

Светлана Александровна Донина — канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородиной. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6502-8341>; Scopus Author ID: 6602276916; e-mail: sveta.donina@gmail.com

Alexandra Ya. Rak — Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Associate of Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections of Department of Virology. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5552-9874>; e-mail: rak.ay@iemspb.ru

Svetlana A. Donina — MD, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Associate of Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections of Department of Virology. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6502-8341>; Scopus Author ID: 6602276916; e-mail: sveta.donina@gmail.com

Ирина Николаевна Исакова-Сивак — д-р биол. наук, заведующая лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2801-1508>;
Scopus Author ID: 23973026600;
eLibrary SPIN: 3469-3600;
e-mail: isakova.sivak@iemspb.ru

Irina N. Isakova-Sivak — Dr. Sci. (Biol.), Head of Laboratory of Immunology and Prevention of Viral Infections, A.A. Smorodintsev Department of Virology.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2801-1508>;
Scopus Author ID: 23973026600;
eLibrary SPIN: 3469-3600;
e-mail: isakova.sivak@iemspb.ru

Лариса Георгиевна Руденко — д-р мед. наук, профессор, заведующая отделом вирусологии им. А.А. Смородинцева.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0107-9959>;
Scopus Author ID: 7005033248;
eLibrary SPIN: 4181-1372; e-mail: vaccine@mail.ru

Larisa G. Rudenko — MD, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the A.A. Smorodintsev Department of Virology.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0107-9959>;
Scopus Author ID: 7005033248;
eLibrary SPIN: 4181-1372; e-mail: vaccine@mail.ru

✉ **Контактное лицо / Corresponding author**

Александра Яковлевна Рак / Alexandra Ya. Rak
Адрес: Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12
Address: 12 Academician Pavlov St., Saint Petersburg, 197022, Russia
E-mail: rak.ay@iemspb.ru