

УДК 577.112:577.322.5:57.083.3

МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОГО РЕЦЕПТОРА БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ BlaR-CTD ДЛЯ БИОАНАЛИТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

© 2023 г. Т. С. Серченя¹ *, П. А. Семижон², Е. П. Счесленок²,
И. В. Горбачева¹, И. И. Вашкевич¹, О. В. Свиридов¹

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, 220141 Беларусь

²Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, 220114 Беларусь

*e-mail: serchenya@iboch.by

Поступила в редакцию 03.08.2022 г.

После доработки 29.08.2022 г.

Принята к публикации 02.09.2022 г.

Разработана биоаналитическая сэндвич-система для количественного определения рекомбинантного рецептора бета-лактамов BlaR-CTD, обладающего лигандсвязывающей активностью и иммунореактивностью. В этой тест-системе BlaR-CTD из биологической жидкости или калибровочной пробы связывается за счет рецепторного сайта с иммобилизованным в лунке микропланшета ампициллином, а через эпитопы периферической структуры взаимодействует со специфическими поликлональными антителами. Аналитическая чувствительность метода оказалась равной 2 нг/мл, рабочий диапазон составил 5–215 нг/мл. Проведен мониторинг биологической активности и дана оценка стабильности BlaR-CTD в процессах его гетерологической экспрессии, выделения и приготовления реagentных форм. Получен высокоочищенный рекомбинантный рецептор бета-лактамов BlaR-CTD. Показано, что этот белок обладал достаточно высокой устойчивостью к денатурации хаотропными агентами (мочевина и гуанидингидрохлорид) и стабилен в широком диапазоне pH среды. Кроме того, предложены конструкции и методики применения конкурентных систем для биоанализа бета-лактамовых антибиотиков, основанные на рецепторных и антигенных свойствах BlaR-CTD, в микропланшетах (аналитическая чувствительность 0.02 нг/мл, $IC_{50} = 0.28$ нг/мл) и на хроматографических тест-полосках (предел обнаружения 1–2 нг/мл).

Ключевые слова: бета-лактамы антибиотиков, рецепторы бета-лактамов, белок BlaR-CTD, иммуноанализ, рецепторный анализ бета-лактамов

DOI: 10.31857/S0555109923010105, **EDN:** CVMIEW

Антибиотики широко применяются в ветеринарной медицине в качестве профилактических средств для предотвращения заболеваний у здоровых животных и терапевтических препаратов для лечения заболевших особей. Из-за избыточного и неправильного использования эти лекарства загрязняют продукты питания человека и порождают проблему накопления, распространения и эволюции устойчивых к антибиотикам бактерий. Остаточные количества антибиотиков в продукции животного происхождения законодательно регламентируются в мировом масштабе [1]. Для контроля применяют биоаналитические способы скрининга, преимущественно иммуноанализ, и инструментальные методы подтверждения — главным образом высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрической детекцией [2–4].

Все это относится и к бета-лактамам — пенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам и монобактамам, которые являются одними из наиболее используемых антибиотиков в мире. Родоначальником пенициллинового ряда выступает природное соединение бензилпенициллин (пенициллин G), известный с сороковых годов прошлого столетия. Кроме него максимально допустимые уровни (в мкг/кг) в разных видах продовольствия установлены для полусинтетических субстанций, включающих амоксициллин, ампициллин (по 4–50 мкг/кг), оксациллин, флоксациллин, диклоксациллин, нафциллин (по 30–300) и клавулановую кислоту (по 100–400), а также для еще одного природного антибиотика феноксиметилпенициллина или пенициллина V (25–250). Из цефалоспоринов контролируются цефепим (10–50), цефтриаксон, цефалотриаксон (по 20–100), цефопера-

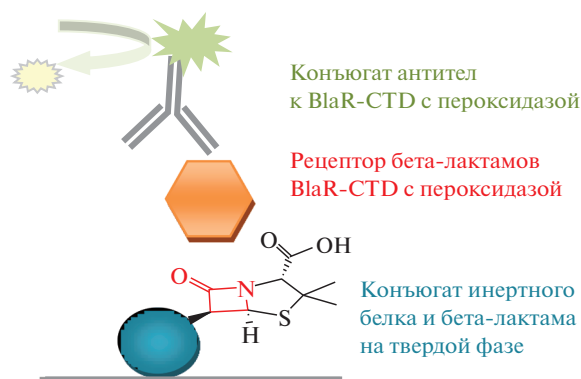


Рис. 1. Схема конструкции гетерофазной рецепторно-иммунной системы сэндвич-ИФА-BlaR-CTD.

зон, цефазолин (по 50), цефтиофур, цефалексин (по 100) и цефакетрил (125) [5, 6].

Уже на протяжении многих лет целям обнаружения и количественного определения бета-лактамовых антибиотиков в различных пищевых матриксах служит иммуноанализ, основанный на реакции антиген-антитело в системах различных конструкций. Известны способы синтеза иммуногенных конъюгатов пенициллинов и цефалоспоринов с инертными белками и получения поликлональных или моноклональных антител, способных узнавать в конкурентной реакции связывания несколько близких структурных аналогов каждого ряда и среди них антиген с детектируемой меткой в растворе или иммобилизованный на твердой фазе. Отметим, что лишь в единичных случаях удается получить высокоаффинные антитела и достичь требуемой чувствительности анализа [7–11]. Не описаны антитела, взаимодействующие со всеми или многими пенициллинами или цефалоспориновыми, не говоря уже об их групповой специфичности в отношении полного перечня контролируемых бета-лактамов. К тому же каждый из препаратов антител имеет свой уникальный набор свойств, что создает трудности в стандартизации иммуноаналитических методик и тест-систем.

Следует подчеркнуть, что молекулярным элементом, определяющим химическое поведение и антибактериальную активность всех обсуждаемых соединений, является четырехчленное бета-лактамовое кольцо. Этот фрагмент на примере пенициллинов представлен на рис. 1. Из-за структурного напряжения в кольце бета-лактамы активны в химических реакциях, в частности, они легко подвергаются гидролизу в водных растворах. Распад важнейшего структурного фрагмента бета-лактамовых антибиотиков протекает также под действием β -лактамаз в бактериальных клетках, что приводит к полной инактивации лекарственной субстанции. Способность этих ферментов связы-

вать бета-лактамы была использована для разработки биоанализа антибиотиков, в котором бета-лактамы из исследуемой или градуировочной пробы блокирует в активном центре β -лактамазы эпитопы связывания специфического моноклонального антитела [12]. В ветеринарной химиотерапии для ингибирования бактериальных β -лактамаз в состав препаратов вводят уже упоминавшуюся выше клавулановую кислоту, имеющую бета-лактамовое кольцо в своей структуре.

Однако открытие, исследование и применение *in vitro* совсем других бактериальных белков, проявляющих сродство к бета-лактамам, обеспечило значительное развитие биоанализа данного класса антибиотиков. Речь идет о мембранных рецепторах бета-лактамов в бактериальных клетках, например в *Streptococcus pneumoniae*, получивших название пенициллинсвязывающие белки (PBP) [13–17]. Природная функция PBP ферментная, так как они участвуют в биосинтезе пептидогликанов клеточной стенки бактерии в качестве DD-трансспептидаз. Бета-лактамовый цикл антибиотика имитирует дипептидную структуру D-Ala–D-Ala в пептидогликанах и за счет этого рецептор-фермент связывает данные лиганды, создавая условия для ключевой стадии их антимикробного действия. В бактериальной клетке при лечении инфицированного животного белок-рецептор выступает в качестве мишени введенного бета-лактамового антибиотика. После связывания лекарственной субстанции его напряженное бета-лактамовое кольцо раскрывается и происходит ацилирование остатка серина в активном центре белка, что ингибирует ферментативный процесс формирования клеточной стенки микроорганизма. Образование нековалентного комплекса между PBP и бета-лактамом происходит и в биоаналитической системе, но оно не приводит к химической модификации активного центра рецептора из-за крайне малых концентраций реагентов. Результаты такого лиганд-белкового связывания разные: в системе *in vitro* происходит высокочувствительная детекция бета-лактама, а *in vivo* прекращается функционирование рецептора, что вызывает гибель болезнетворной бактерии. Научные исследования механизмов возникновения лекарственной устойчивости к бета-лактамам, обусловленной мутациями в активном центре рецептора и снижением сродства к этим антибиотикам, стимулировали развитие генетической инженерии PBP и появление целого ряда рекомбинантных вариантов, различающихся по аффинитету и специфичности в отношении пенициллинов и цефалоспоринов [18]. Общность механизмов лекарственного действия бета-лактамов и их распознавания в рецепторной системе *in vitro* позволяет утверждать, что все фармацевтически активные субстанции этого класса антибиотиков должны с той или иной степенью чувствительности детектироваться рецептором.

И, наоборот, биоаналитически негативные в этой системе детекции новые бета-лактамы препараты не должны обладать антибактериальной активностью. То есть в принципе рецепторная система может положительно проявлять себя и в скрининге новых бета-лактамов на биологическую (антибактериальную) активность.

К суперсемейству PBP, представители которого специфически связывают и гидролизуют бета-лактамы антибиотики с участием остатка серина в активных центрах, относится и трансмембранный белок BlaR — рецептор бета-лактамов антибиотиков и трансдуктор сигнала в индуцируемом бета-лактамами синтезе бета-лактамазы *Bacillus licheniformis* [19]. Этот белок состоит из N-концевой внутриклеточной части (**BlaR-NTD**, остатки 1–345) и C-концевого домена (**BlaR-CTD**, остатки 346–601), экспонированного вне клетки. Цельный белок включает четыре трансмембранных сегмента и три петли, две из которых расположены в цитоплазме. Сенсорный домен BlaR-CTD выполняет рецепторную функцию и специфически связывает бета-лактамы, который затем ацилирует остаток серина в активном центре. Структурные изменения формируют сигнал, передающийся через трансмембранную область в большую петлю BlaR-NTD и вызывающий ее гидролитическое действие, в результате которого инактивируется белок-репрессор, включается транскрипция гена и осуществляется синтез бета-лактамазы.

BlaR-CTD был гетерологически экспрессирован в *E. coli* в форме водорастворимого пенициллинсвязывающего белка с молекулярной массой 26 кДа [20]. Более продуктивный штамм *E. coli* и трехстадийная методика высокой очистки (99%) рекомбинантного BlaR-CTD в препаративных количествах описаны в работах [21, 22]. Анализ кристаллической структуры BlaR-CTD [22] показал, что его полипептидная цепь свернута в 2 домена с полостью лигандсвязывающего центра между ними. Интересно, что BlaR-CTD и β -лактамаза класса D имеют близкие характеристики фолдинга и схожие топологии лигандсвязывающих сайтов. Однако на основании кинетических параметров реакции активного центра BlaR-CTD с бета-лактамами антибиотиками [21, 22] сделано заключение о том, что эта сенсорная часть BlaR является высокочувствительным PBP, но не β -лактамазой. Интересно, что в экспрессированном и очищенном сенсорном домене BlaR из *Staphylococcus aureus* химическая модификация бета-лактамом остатка серина в лигандсвязывающем центре активировалась необычным карбоксилсвязывающим лизилом, обнаруженным в этом белке [23]. Существенные конформационные изменения, которые развивались в полипептиде от образования комплекса с антибиотиком до завершения реакции ацилирования, считают главным

структурным процессом феномена передачи сигнала внутрь клетки [23].

В последнее десятилетие появились публикации об эффективном применении рекомбинантного BlaR-CTD из *B. licheniformis* дикого и мутантного типов в рецепторноаналитических системах различных форматов, предназначенных для количественного определения широкого спектра бета-лактамов антибиотиков в пищевых продуктах [24–27]. По мере совершенствования методик гетерологической экспрессии этого рецептора и конструкций тест-систем с его применением [24, 26, 27], а также повышения стабильности и аффинитета путем направленного мутагенеза [25, 26] увеличивалась чувствительность детекции бета-лактамов, а групповая специфичность определения расширилась от 15 [24] до 21 [26], а затем до 33 [27] антибиотиков этого класса. В новой по конструкции тест-системе мембранной хроматографии конъюгат бета-лактама иммобилизован на тест-полоске, а в подвижной фазе мутантный BlaR-CTD-M (I188K/S19C/G24C) иммунохимически связан с золотыми наночастицами через адсорбированное на них моноклональное антитело [27].

Таким образом, важными для конструирования биоаналитических систем оказываются не только взаимодействия рецептора с лигандами, но и его реакции как антигена, например, в ходе биоспецифической иммобилизации на твердофазных антителах [11]. BlaR-CTD и другие рекомбинантные рецепторные белки могут частично или полностью терять лигандсвязывающую активность и/или иммунореактивность в процессах экспрессии, очистки, транспортирования, хранения и обработок перед применением.

Цель настоящего исследования — разработка метода количественного определения в культуральных жидкостях, биологических средах и растворах BlaR-CTD, эффективного в качестве базового реагента биоаналитических систем, основанных на рецепции бета-лактамов антибиотиков и взаимодействия рецептора со специфическими антителами.

Примененный в работе методический подход может быть полезным для мониторинга процессов получения, выделения, хранения и применения также и других важных для практики рекомбинантных рецепторов, например, микробного белка, связывающего тетрациклины [28].

МЕТОДИКА

Реагенты и материалы. В экспериментальной работе использовали: трис, хлорид кальция, бычий сывороточный альбумин, пероксидазу из корней хрена, 30%-ный водный раствор H_2O_2 , 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), гуанидингидрохлорид, изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

(ИПТГ), каприловую кислоту, додецилсульфат натрия (ДДС), акриламид, бисакриламид, β -меркаптоэтанол, кумасси синий R 250, консерванты тимеросаль, проклин 300 и 5-бromo-5-нитроо-1,3-диоксан (BND, “Sigma-Aldrich”, США), глицерин, стандарты для электрофореза, колонки Zeba для обессоливания, ферменты XhoI, SmaI, T4 ДНК-лигаза (“Thermo Fisher Scientific”, США), SmArtTaq-полимеразы (“АртБиоТех”, Беларусь), диметилсульфоксид, мочевию, лактозу (“Applis-chem”, Германия), хлорид натрия, имидазол, хлорид магния, твин-20, кислоту лимонную моногидрат (“Merck”, Германия), сахарозу (“Riedel-de Haën”, Германия), колонки с Sephadex G-25 (“GE Healthcare”, США). Применявшиеся реактивы отечественных и российских производителей – натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный, натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный, NaHCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, гидроокись натрия, соляная кислота, серная кислота, глицерин – имели классификацию не ниже “ч. д. а.”. Антитела козы против иммуноглобулинов мыши были получены на Опытном производстве Института биоорганической химии НАН Беларуси. Сухие порошки высокоочищенных антибиотиков пенициллина G и ампициллина приобретены у “Sigma-Aldrich” (США).

Для приготовления растворов использовали деионизированную воду с удельным электрическим сопротивлением 17–18 МОм · см, полученную в модульной системе очистки воды Arium® pro VF фирмы “Sartorius” (Германия).

При проведении рецепторно-ферментного анализа в качестве твердофазных носителей использовали разборные полистирольные микропланшеты с 96 лунками от фирмы “Хема-медика” (Россия). Системы хроматографического анализа на тест-полосках конструировали с применением комплекта мембран из набора MDI Easypack (“Advanced Microdevices”, Индия), использовали нитроцеллюлозную мембрану CNPF с размером пор 10 мкм, мембрану для образца GFB-R7L и верхнюю впитывающую мембрану AP045.

Рекомбинантный мутантный белок BlaR-STD-M был любезно предоставлен проф. Chuanlai Xu (Цзяннаньский университет, КНР).

Спектральные измерения. Спектры поглощения препаратов рецепторного белка и очищенных антител снимали в кювете с длиной оптического пути 1 см на приборе Tecan Infinite 200 (Австрия).

Масс-спектры. Масс-спектры MALDI-TOF регистрировали на приборе Microflex LRF “Bruker” (Германия).

Электрофоретический анализ. Электрофорез продуктов амплификации бактериальной ДНК и продуктов рестрикции плазмидной ДНК проводили в 2 и 0.8%-ных гелях агарозы и визуализировали окрашиванием геля бромистым этидием.

При оценке уровня экспрессии рекомбинантного белка, анализе хроматографических фракций и конечного препарата рекомбинантного полипептида, а также препарата очищенных антител электрофоретический анализ проводили в 12 и 15% ПААГ в присутствии ДДС по Лэммли. Для окрашивания белков использовали Кумасси R 250.

Бактериальные штаммы и клеточные линии. Бактериальный штамм *Bacillus licheniformis* B-80541 был получен из Национального биоресурсного центра Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ “Курчатовский институт” (аналог штамма ATCC 14580) и использован как источник ДНК. Для проведения генно-инженерных работ и накопления гибридной плазмидной ДНК использовали штамм *E. coli* DH5 α (“Promega”, США). Для получения рекомбинантного полипептида после индукции ИПТГ применяли штамм *E. coli* BL21 (DE3).

Выделение ДНК, получение праймеров и проведение ПЦР. Выделение ДНК проводили с помощью набора реагентов “НК-экстра” (Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии эпидемиологии и микробиологии, Беларусь).

Анализ нуклеотидных последовательностей для выбора и последующего синтеза олигонуклеотидных затравок (праймеров), а также для определения оптимальных условий проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) выполняли с использованием программ “Gene Runner 3.00” и “Vector NTI Advance 9.1”.

Праймеры для амплификации фрагмента ДНК, кодирующего карбокситерминальный пенициллинсвязывающий рецептор, имели следующую нуклеотидную последовательность 5' $\rightarrow$ 3' – GCCTCGAGTATGCAAAGAGATACGCACTTTT (BlaR-F) и CGCCCGGGTTATCGGGAAGCGGATGG (BlaR-R) и содержали сайты узнавания рестриктазами, которые необходимы для последующего клонирования фрагментов в экспрессирующий вектор. Олигонуклеотидные последовательности выбранного состава были синтезированы и очищены по заказу в “АртБиоТех” (Беларусь). Постановку ПЦР осуществляли с использованием фермента SmArtTaq-полимеразы в присутствии хлорида магния. Продукты амплификации анализировали электрофоретически.

Конструирование экспрессирующего вектора. В качестве экспрессирующего вектора использовали плазмиду pJC40, обеспечивающую транскрипцию клонированных генов в бактериальных клетках под контролем T7-промотора [29]. Особенностью этой плазмиды является наличие дополнительного фрагмента, кодирующего десять остатков гистидина, которые при трансляции локализуются в N-концевой части рекомбинантного полипепти-

да, что позволяет выполнить его очистку металлоаффинной хроматографией.

Рестрикцию вектора и амплифицированных фрагментов проводили с использованием ферментов эндонуклеаз XhoI и SmaI. Для лигирования фрагмента ДНК в исходный вектор pJC40 применяли фермент T4 ДНК-лигаза. Амплифицированные фрагменты ДНК и продукты рестрикции гибридных плазмид анализировали электрофоретически.

Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамм DH5 α . Трансформацию клеток выполняли в присутствии хлорида кальция. Далее клетки-трансформанты высевали на селективную среду. Селекцию гибридных клонов осуществляли, после посева рассеянных штрихом одиночных колоний клеток-трансформантов (от 5 до 12 клонов) на твердой питательной среде с последующим выделением плазмидной ДНК и ее рестрикционным анализом. Выделение плазмидной ДНК осуществляли с использованием коммерческих наборов QIAprep Miniprep Kit ("Qiagen", Нидерланды), GeneJET Plasmid Miniprep Kit ("Thermo Fisher Scientific", США), Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit ("Jena Bioscience", Германия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Индукция синтеза рекомбинантного белка. Индукцию бактериальной культуры *E. coli* штамм BL21(DE3) проводили с использованием ИПТГ. Единичные колонии клеток *E. coli*, штамм BL21(DE3), трансформированные соответствующей гибридной плазмидой, выращивали при 37°C в питательной среде LB при постоянном перемешивании на шейкере до достижения культурой логарифмической фазы роста ($D_{600} = 0.3$). Затем вносили в среду ИПТГ в конечной концентрации 0.4 мМ и инкубировали в течение 3 ч. Клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 0.02 М трис-HCl, pH 7.5, с 0.5 М NaCl. Анализировали бактериальный лизат электрофоретически в 15%-ном ПААГ.

Очистка целевого белка. Очистку рекомбинантного белка проводили методом металлохелатной аффинной хроматографии с использованием сорбента с иммобилизованными катионами Ni²⁺ ("Sigma-Aldrich", США) в условиях без применения денатурирующих агентов. Связывание с данным сорбентом происходит за счет 10 остатков гистидина, имеющих на N-конце полученного рекомбинантного белка.

Для приготовления лизата клетки *E. coli* осаждали центрифугированием при 2500 g в течение 10 мин. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 0.02 М трис-HCl, pH 7.5, содержащем 5 мМ имидазол и 0.5 М NaCl. Далее клеточную суспензию обрабатывали с помощью 5 циклов со-никации при 20 кГц в течение 30 с на льду. После

обработки ультразвуком клеточные лизаты *E. coli* центрифугировали при 4000 g в течение 30 мин при +4°C. Супернатант, содержащий растворимые белки, собирали и наносили на колонку со скоростью 15–20 мл/ч. Затем колонку промывали 10 объемами связывающего буфера, содержащего 0.02 М трис-HCl, pH 7.5, содержащий 5 мМ имидазол и 0.5 М NaCl, и далее 10 объемами промывочного буфера, содержащего 0.02 М трис-HCl, pH 7.5, 20 мМ имидазол, 0.5 М NaCl. Элюцию связавшегося рекомбинантного белка проводили буферным раствором, содержащим 0.02 М трис-HCl, pH 7.5, 500 мМ имидазол, 0.5 М NaCl. Дополнительную очистку белка проводили с использованием колонки с гидроксипатитом ("Bio-Rad", США).

Полученные в процессе его очистки фракции белка, включая лизат клеток до и после обработки ультразвуком, осадок после УЗ-обработки клеточной суспензии, растворенный в мочеvine (конечная концентрация 6 М), хроматографические фракции до и после нанесения на колонку, а также препарат очищенного белка анализировали электрофоретически в 15%-ном ПААГ. Концентрацию целевого активного белка во всех перечисленных фракциях определяли разработанным биоаналитическим методом. Содержание очищенного белка контролировали также спектрофотометрически и по методу Бредфорда.

Получение поликлональных антител к BlaR-CTD и мечение их пероксидазой. Рекомбинантным белком BlaR-CTD из одной и той же охарактеризованной партии иммунизировали мышей линии BALB/c путем многократного подкожного введения с полным адъювантом Фрейнда по 50 мкг BlaR-CTD на одну инъекцию с интервалом в 14 сут. Через 7 дней после каждой повторной инъекции у животных отбирали сыворотку крови и анализировали динамику продукции антител путем детекции поликлональных антител к BlaR-CTD с помощью ИФА. Далее внутрибрюшинно прививали мышам последовательно 0.2 мл пристана, 50 мкг BlaR-CTD и 10⁵–10⁶ клеток карциномы Эрлиха с интервалом в 3–5 сут. Выделение поликлональных антител из полученной асцитической жидкости осуществляли последовательным осаждением альбумина каприловой кислотой и иммуноглобулинов сульфатом аммония. Концентрацию антител определяли спектрофотометрически при 280 нм, используя коэффициент экстинкции 1.35 г⁻¹ · л · см⁻¹.

Конъюгат полученных антител с высокоочищенной ($R_z \geq 3.0$) пероксидазой из корней хрена ("Диаэм", Россия) синтезировали путем окисления углеводов цепей фермента перйодатом натрия, присоединения иммуноглобулина с образованием основания Шиффа и стабилизацией аддукта вос-

становлением двойной связи борогидридом натрия.

Рецепторно-иммунная система сэндвич-ИФА—BlaR-CTD. В лунках микропланшета иммобилизовали конъюгат ампициллина с альбумином, полученным и охарактеризованным, как описано ранее [17], внесением во все лунки по 100 мкл раствора с концентрацией 0.5 мкг/мл и инкубации при 4–8°C в течение 18 ч. При выборе условий анализа использовали также растворы с концентрацией конъюгата 0.15 и 1.0 мкг/мл. Стабилизацию проводили внесением во все лунки по 150 мкл 0.05 М натрий-фосфатного буфера (НФБ), pH 7.0, содержащего 0.15 М NaCl, 0.05% Твин 20, 1 мг/мл БСА, 2% сахарозы, 0.01% эуксил К-100, и выдерживанием планшета при 4–8°C в течение 18 ч. Стандарты (калибровочные растворы) активного и охарактеризованного BlaR-CTD, готовили в 0.05 М НФБ, pH 7.0, содержащем 0.15 М NaCl, 0.05% Твин 20, 1 мг/мл БСА, 0.01% эуксил К-100 в диапазоне концентраций 0.5–215 нг/мл. При проведении анализа в лунки вносили по 100 мкл калибровочных растворов с возрастающими концентрациями рецепторного белка или по 100 мкл исследуемых проб, предварительно разведенных тем же буферным раствором, и проводили инкубацию в течение 30 мин при температуре 25°C в термостате. Далее удаляли непрореагировавшие компоненты и промывали планшет с использованием промывочного раствора (0.01 М НФБ, pH 7.0, 0.15 М NaCl, 0.05% Твин 20). На второй стадии вносили в лунки по 100 мкл раствора конъюгата поликлональных антител к BlaR-CTD с пероксидазой с титром 1 : 5000. После инкубации при 25°C в течение 30 мин содержимое лунок удаляли и промывали планшет, как описано выше. В лунки вносили по 100 мкл хромоген-субстратного раствора, содержащего ТМБ и пероксид водорода (0.1 М натрий-цитратный буфер, pH 4.2, 3 мМ H₂O₂ и 1 мМ ТМБ) и инкубировали 15 мин при 20–25°C. Ферментативную реакцию останавливали добавлением в лунки по 100 мкл 5%-ной H₂SO₄. Измеряли оптическую плотность при 450 нм (D₄₅₀) с помощью планшетного спектрофотометра Infinity M 200 Тесан (Австрия). Концентрацию активного BlaR-CTD в пробах определяли по калибровочной кривой, построенной в координатах D₄₅₀ (ось ординат, линейная) и концентрация BlaR-CTD в стандартах (ось абсцисс, логарифмическая), используя аппроксимацию $y = \lg(x) + b$.

Аналитическую чувствительность (предел обнаружения, минимальную достоверно измеряемую концентрацию) получали из калибровочного графика как абсциссу точки ($B_0 + 2 SD$).

Все эксперименты по исследованию лиганд-рецепторного связывания проводили не менее чем в трех повторах. Обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel. На калибро-

вочных графиках и в таблицах планки погрешностей обозначают среднеквадратичное отклонение (SD).

Исследование стабильности связывающих свойств BlaR-CTD при хранении. Для установления условий сохранения активности BlaR-CTD при его применении в биоаналитических системах готовили пробы рецепторного белка в стабилизирующих буферных растворах, которые содержали либо только консервирующие добавки против бактериального роста, либо дополнительно включали стабилизирующие белковые и небелковые наполнители. Пробы белка разводили в 0.05 М НФБ, pH 7.0, содержащем консерванты — 0.03% проклин 300 и 0.015% BND (буфер № 2), или в 0.05 М НФБ, pH 7.0, содержащем 0.15 М NaCl, 0.05 М твин-20, 1%-ный БСА, 1%-ный декстран 70, 10%-ный глицерин, 0.03%-ный проклин 300, 0.015%-ный BND (буфер № 1), или 0.05 М НФБ, pH 7.0, содержащем 0.1%-ный БСА, 1%-ную лактозу, 0.03%-ный проклин 300, 0.015%-ный BND (буфер № 3) и выполняли анализ.

Белок в указанных буферных растворах № 1 и № 2 выдерживали при температурах 4°C, –20°C или –70°C в течение 1–12 мес. и проводили контроль в периоды 0, 1, 3, 6, 12 мес. Также в качестве контроля применяли препарат лиофилизованного рецепторного белка в буфере № 3. Исследуемые пробы, хранившиеся при –20 и –70°C, готовили в аликвотах и анализировали после однократного размораживания. Количественное определение BlaR-CTD проводили методом сэндвич-ИФА—BlaR-CTD и рассчитывали концентрацию в пробах по калибровочной кривой. Остаточную активность рецепторного белка после хранения определяли как отношение концентраций этого белка в хранившихся и исходных пробах.

Частичная денатурация BlaR-CTD и связывание с лигандом и антителами. Для определения структурно-функциональной стабильности рецептора бета-лактамов проводили анализ его связывания с лигандом и антителами в системе сэндвич-ИФА—BlaR-CTD после воздействия на рецепторный белок факторов, способных нарушать вторичную и третичную структуры. Пробы BlaR-CTD выдерживали в течение 1 ч при температуре 25°C в средах, содержащих мочевины в диапазоне концентраций 1–10 М, гуанидингидрохлорид (1–6 М), ДДС (1–4%), а также в 0.1 М НФБ с pH 6.0 (контроль), 7.0, 8.0 и pH 12.0 или в 0.1 М фосфатно-цитратном буфере с pH 3.0 и 5.0, или в 0.1 М карбонатном буфере с pH 10.0. Кроме того, проводили инкубации в течение 1 ч при температурах 25, 37, 55 и 100°C. Затем разводили пробы в 100 раз инкубационным раствором для нивелирования действия денатурантов и агрессивных сред на связывание рецептора с иммобилизованным ампициллином и растворенными антителами в

тест-системе сэндвич-ИФА—BlaR-CTD и выполняли анализ. Для оценки остаточной активности BlaR-CTD (%) средние значения концентрации рецептора в подвергнутых денатурирующим воздействиям пробах относили к среднему значению его концентрации в контрольной пробе.

Рецепторная система для определения бета-лактамов в микропланшетах. В лунках микропланшета иммобилизовали конъюгат ампициллина с альбумином, как описано выше. Калибровочные пробы, содержащие ампициллин, готовили в 0.05 М НФБ, pH 7.0, содержащем 0.15 М NaCl, 0.05% Твин 20, 1 мг/мл БСА, 0.01%-ный экусил К-100 в диапазоне концентраций 0, 0.025–4 нг/мл. При проведении анализа в лунки вносили по 50 мкл калибровочных растворов или исследуемых проб и по 50 мкл раствора BlaR-CTD и проводили инкубацию в течение 30 мин при 25°C. Далее удаляли непрореагировавшие компоненты и промывали планшеты. На второй стадии вносили в лунки по 100 мкл раствора конъюгата поликлональных антител к BlaR-CTD с пероксидазой. Планшет инкубировали 30 мин при 25°C, затем содержимое лунок удаляли и промывали планшет. Далее проводили ферментативное окрашивание и измерение D_{450} , как описано выше. Рассчитывали соотношение V_i/V_0 в %, где V_0 — оптическая плотность в отсутствие антибиотика в растворе, V_i — оптическая плотность в присутствии возрастающих концентраций антибиотика в растворе. Калибровочные графики зависимости конкурентного связывания от концентраций пенициллина в калибровочных пробах строили в координатах: V_i/V_0 в % (ось ординат, линейная) и концентрация в нг/мл (ось абсцисс, логарифмическая). Значение минимальной достоверно измеряемой концентрации получали из калибровочного графика как абсциссу точки ($V_0 - 2SD$).

Рецепторная система для определения бета-лактамов на тест-полосках. На нитроцеллюлозную мембрану наносили реагенты с помощью автоматического диспенсера IsoFlow ("ImageTechnology", США). Аналитическую зону тест-полоски формировали путем нанесения конъюгата ампициллина из раствора с концентрацией 0.5 мг/мл, а в контрольной зоне иммобилизовали антивидовые антитела (иммуноглобулины козы против иммуноглобулинов мыши) из раствора с концентрацией 0.2 мг/мл. Далее мембраны сушили на воздухе при температуре 20–25°C не менее 20 ч. Затем собирали их в мультимембранный композит вместе с подложкой для исследуемой пробы и впитывающей мембраной. Тест-полоски нарезают шириной 3.5 мм с помощью автоматического гильотинного резчика IndexCutter 1 ("A Point Technologies", США).

Наночастицы золота получали восстановлением золотохлористоводородной кислоты цитратом

натрия по методу Френса, как описано [30]. Функционализацию наночастиц осуществляли путем адсорбции на них поликлональных антител к BlaR-CTD в концентрации 12 мкг/мл, выбранной по фотометрическим данным. Для проведения анализа в лунки инертного пластмассового микропланшета вносили иммобилизованный через антитела на золотых наночастицах BlaR-CTD и добавляли ампициллин в возрастающих концентрациях в диапазоне 0, 0.5–4.0 нг/мл. Далее реагенты выдерживали в течение 3 мин и в лунку помещали подготовленные тест-полоски. Хромотографию проводили в течение 10 мин и визуальное регистрировали окрашивание.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе представлен новый методический подход для мониторинга одновременно лиганд-связывающей активности и иммунореактивности рецептора бета-лактамов антибиотиков в процессах его гетерологической экспрессии, выделения и технологической обработки для применения в аналитических системах. Разработана система рецепторно-иммунного связывания для количественного определения BlaR-CTD с неповрежденными структурами связывающего центра и периферии макромолекулы. Метод исследован в ходе контроля выходов биологически активного белка на стадиях биопродуцирования и очистки, а также при оценке стабильности этого рецептора в различных условиях технологической обработки и хранения как базового реагента тест-систем на бета-лактамы антибиотиков.

Принцип метода и характеристика рецепторно-иммунной системы сэндвич-ИФА—BlaR-CTD. Данная система позволяет в одном тесте количественно оценить две независимые биоспецифические реакции BlaR-CTD, включающие его взаимодействие за счет рецепторного сайта и иммунореактивных эпитопов. В ходе анализа рецепторный белок сначала связывается посредством своего активного центра с бета-лактамом антибиотиком, иммобилизованным в составе конъюгата с инертным белком на внутренней поверхности лунки полистирольного микропланшета. Затем экспонированный в раствор иммунореактивный фрагмент структуры связанного рецептора в роли антигена взаимодействует с очищенными поликлональными антителами к BlaR-CTD, конъюгированными с пероксидазой из корней хрена (рис. 1). Альтернативно для детекции BlaR-CTD в его комплексе с твердофазным бета-лактамом могут применяться немеченные первичные антитела с последующим прибавлением пероксидазного конъюгата антивидового иммуноглобулина. По калибровочной кривой, основанной на использовании интактного BlaR-CTD, рассчитывается концентрация ак-

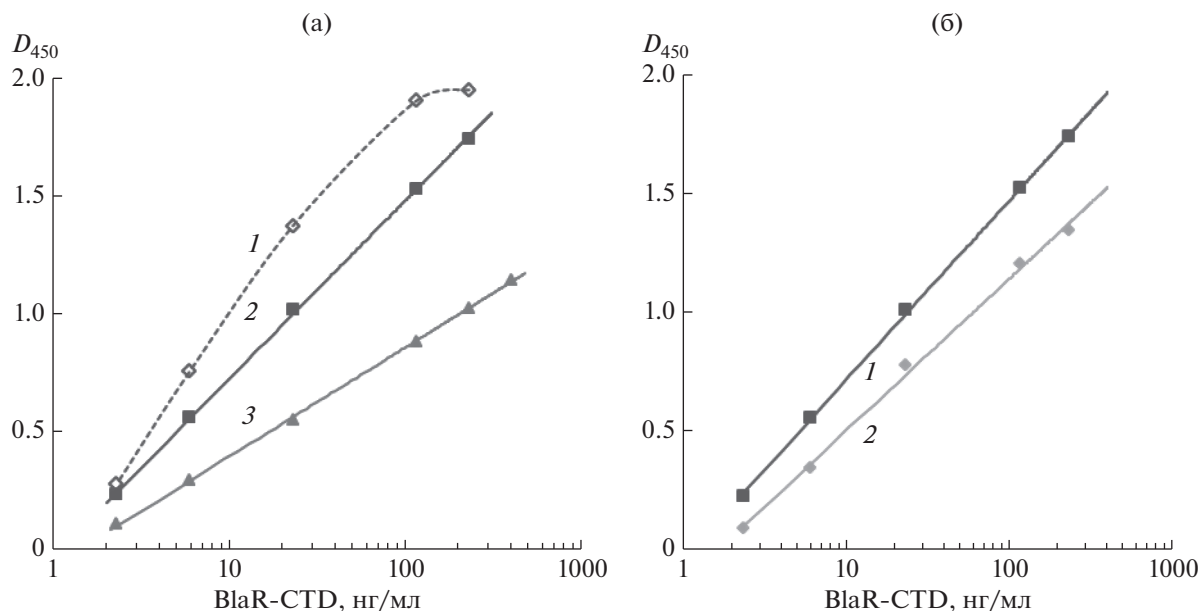


Рис. 2. Калибровочные графики гетерофазной рецепторно-иммунной системы сэндвич-ИФА—BlaR-CTD при различных концентрациях специфических реагентов. а Твердофазный конъюгат иммобилизован из раствора в концентрациях 1.0 (1), 0.5 (2) и 0.15 мкг/мл (3). б Концентрация антител к BlaR-CTD в анализе — 0.5 (1) и 0.25 (2) мкг/мл.

тивного рецептора в исследуемых пробах. Анализ занимает 1 ч 15 мин.

В работе получены все специфические компоненты и разработана конструкция сэндвич-ИФА—BlaR-CTD. Выбраны оптимальные концентрации реагентов для иммобилизации в лунках микропланшета и для взаимодействия в растворе с целью обеспечения наилучших показателей связывания и чувствительности анализа. Показано, что 0.5 мкг/мл является оптимальной концентрацией конъюгата в растворе для иммобилизации на твердой фазе (рис. 2а). Видно, что при увеличении содержания конъюгата на твердой фазе (раствор 1.0 мкг/мл) калибровочный график быстрее выходит на плато и таким образом сужается диапазон определяемых концентраций, соответствующий прямолинейному участку. При уменьшении плотности покрытия лунок конъюгатом ампициллина (раствор 0.15 мкг/мл) наблюдаются низкие значения связывания в единицах оптической плотности. Выбрана также оптимальная концентрация антител к BlaR-CTD на второй стадии анализа (рис. 2б). При увеличении содержания антител наблюдается постепенное увеличение связывания и соотношения значений сигнал/фон для калибровочного графика.

Диапазон достоверно определяемых концентраций активного BlaR-CTD составляет 5–215 нг/мл. Аналитическая чувствительность полностью соответствует назначению системы и составляет 2 нг/мл. Коэффициент вариации результатов определений не превышает 7%. Для обеспечения

практического применения разработанной системы экспериментально установлены способы долговременной стабилизации всех ее компонентов. Далее проведена апробация системы сэндвич-ИФА—BlaR-CTD в процессах экспрессии и очистки BlaR-CTD. С ее помощью исследовано влияние температуры и продолжительности хранения, а также различных физико-химических факторов на лигандсвязывающую и антигенную активность рецепторного белка.

Получение рекомбинантного белка BlaR-CTD.

Для биосинтеза рекомбинантного карбокситерминального фрагмента пенициллинсвязывающего рецептора использовали экспрессирующий вектор pJC 40 и бактериальный штамм *E. coli* BL21 (DE3). Плазмидный вектор pJC 40 широко используется для эффективной и специфической суперэкспрессии клонированных генов под контролем T7-промотора (рис. 3а). Количество экспрессируемого продукта может составлять до 10% от общего клеточного белка. Вектор содержит гистициновый участок, который становится частью N-конца экспрессируемого полипептида. Наличие последовательности, кодирующей 10 остатков гистидина, позволяет осуществлять очистку рекомбинантного белка BlaR-CTD аффинной металлохеллатной хроматографией.

Для синтеза фрагмента ДНК, кодирующего карбокситерминальный пенициллинсвязывающий рецептор, была подобрана и искусственно синтезирована пара олигонуклеотидов BlaR-F и BlaR-R, ограничивающая фрагмент генома *Bacil-*

lus licheniformis (GenBank, CP034569) с 1036 по 1800 н.о. В структуру праймеров были дополнительно включены сайты для узнавания специфическими рестриктурирующими эндонуклеазами XhoI и SmaI и для дальнейшего встраивания синтезированного фрагмента в клонирующий вектор pJC40.

Предварительно осуществляли накопление бактериальной культуры *Bacillus licheniformis* В-80541, выделение бактериальной ДНК и постановку ПЦР на полученной ДНК-матрице. В результате был получен специфический фрагмент размером 782 п.о. (рис. 3б, дорожка 8) — полный ампликон, включающий сайты для клонирования. Далее данный фрагмент использовали для клонирования в экспрессирующий вектор pJC40. На рис. 3а представлены схематическая карта экспрессирующего вектора и электрофореграмма рестрикционного анализа плазмидной ДНК pJC40/ BlaR-CTD. Показано, что обработка рестриктазами XhoI и SmaI делит полученную плазмидную ДНК на 2 фрагмента, один из которых аналогичен исходному вектору (2402 п.н.), а второй фрагмент (782 п.н.) содержит специфическую вставку, кодирующую рецептор BlaR-CTD (рис. 3б, дорожки 1–7). Таким образом, в результате генно-инженерных манипуляций получена рекомбинантная плазмидная ДНК pJC40/ BlaR-CTD.

Для экспрессии BlaR-CTD полученной плазмидой трансформировали бактериальную культуру пермиссивных клеток *E. coli*, штамм BL21 (DE3). Оптимизация процесса получения рекомбинантного рецептора по таким параметрам, как условия подготовки “компетентных” клеток *E. coli*, количество индуктора в среде и время индукции, температура культивирования, позволила достигнуть высокой продукции белка.

Эффективность экспрессии оценивали по интенсивности соответствующих зон при электрофоретическом анализе (рис. 4). Так, в лизате продуцента (клетки, содержащие соответствующую рекомбинантную плазмиду) наблюдалась экспрессия полипептида и присутствие мажорного белкового продукта с молекулярной массой в области 25 кДа (рис. 4, дорожки 1, 2) в отличие от контрольного лизата клеток *E. coli*, штамм BL21 (DE3) без плазмиды, где эта полоса отсутствовала (рис. 4, дорожка 5).

Для получения рекомбинантного рецепторного белка, максимально очищенного от клеточных белков, были использованы металл-хелатная хроматография и последующая хроматография на гидроксиапатите. Обе хроматографии проводили в нативных условиях для сохранения структурно-функциональных свойств BlaR-CTD. Для дезинтеграции целевого белка клеточную суспензию обрабатывали 5 циклами соникации. Электрофоретический анализ фракций (рис. 4) рекомбинант-

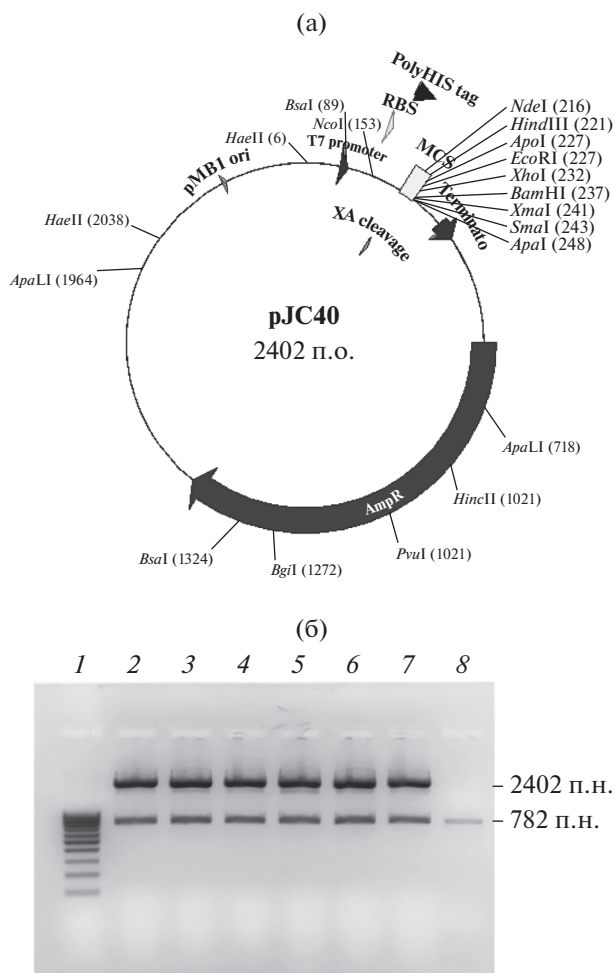


Рис. 3. Схематическая карта плазмидного вектора pJC40 (а) и электрофореграмма продуктов рестрикции рекомбинантной плазмиды pJC40/ BlaR-CTD (б): 1 — маркер молекулярных масс; 2–7 — продукты рестрикции плазмидной ДНК по сайтам XhoI и SmaI, выделенной из гибридных клонов клеток DH5α/pJC40/ BlaR-CTD; 8 — ампликат, полученный с парой праймеров, ограничивающих область BlaR-CTD.

ного полипептида показал, что фракция элюции (дорожка 9) содержит белок, соответствующий молекулярной массе 25 кДа, и при этом отсутствуют фоновые клеточные белки. Полученный белок характеризовался повышенной электрофоретической подвижностью, так как теоретически рассчитанная молекулярная масса продуцируемого BlaR-CTD составляет 32.22 кДа. Это подтвердили результаты MALDI-TOF, согласно которым полученный BlaR-CTD имел молекулярную массу 32.32 ± 0.06 кДа (рис. 5а). Дополнительная очистка хроматографией на гидроксиапатите позволила сконцентрировать белок, перевести его в буферный раствор без имидазола и достичь чистоты продукта не менее 95% (рис. 5б).

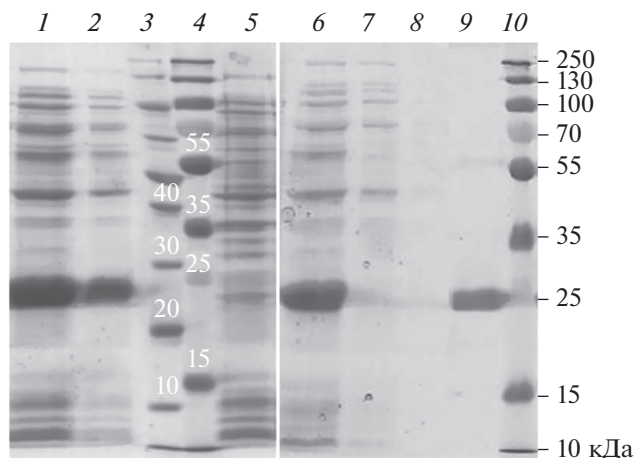


Рис. 4. Электрофоретический анализ фракций биосинтеза и выделения рекомбинантного рецептора BlaR-CTD. 1, 2 – исходный лизат клеток, экспрессирующих рецептор BlaR-CTD; 3, 4, 10 – маркеры молекулярных масс в кДа; 5 – лизат клеток *E. coli*, штамм BL21, не содержащих экспрессирующий вектор; 6, 7 – бактериальный лизат до и после проведения металлохелатной хроматографии, соответственно; 8 – фракция, полученные при промывке металлоаффинной колонки после связывания целевого белка; 9 – фракция элюции.

Этот препарат был охарактеризован далее как основной реагент биоаналитических систем для определения бета-лактамовых антибиотиков. Перед этим его использовали для иммунизации лабораторных мышей с целью быстрого получения

специфических поликлональных антител против BlaR-CTD.

Определение содержания BlaR-CTD во фракциях при его гетерологической экспрессии и хроматографической очистки. Применение разработанной тест-системы сэндвич-ИФА–BlaR-CTD позволило провести специальное исследование содержания BlaR-CTD во фракциях при его получении в чистом виде.

Во всех исследованных пробах специфическим методом измерялся именно целевой белок (табл. 1). В анализе использовали следующие фракции: супернатант LB среды, исходный лизат клеточной суспензии, лизат клеток после УЗ (супернатант и осадок), элюат металлохелатной хроматографии, фракции с колонки после нанесения образца и после промывки колонки.

Известно, что некоторые рекомбинантные белки при экспрессии в гетерологичных системах способны к неспецифической агрегации и формированию “телец включения”. Поэтому мы определяли содержание рецептора в растворимой и нерастворимой фракциях после сонации клеток. При этом для получения растворимого белкового препарата использовали раствор мочевины.

Установлено, что основная фракция наработанного белка находится в клетках (88%), и часть белка присутствует в тельцах включения (12%). При работе с клетками нарабатывается около 2 мг рецепторного белка на 200 мл среды. Измерения

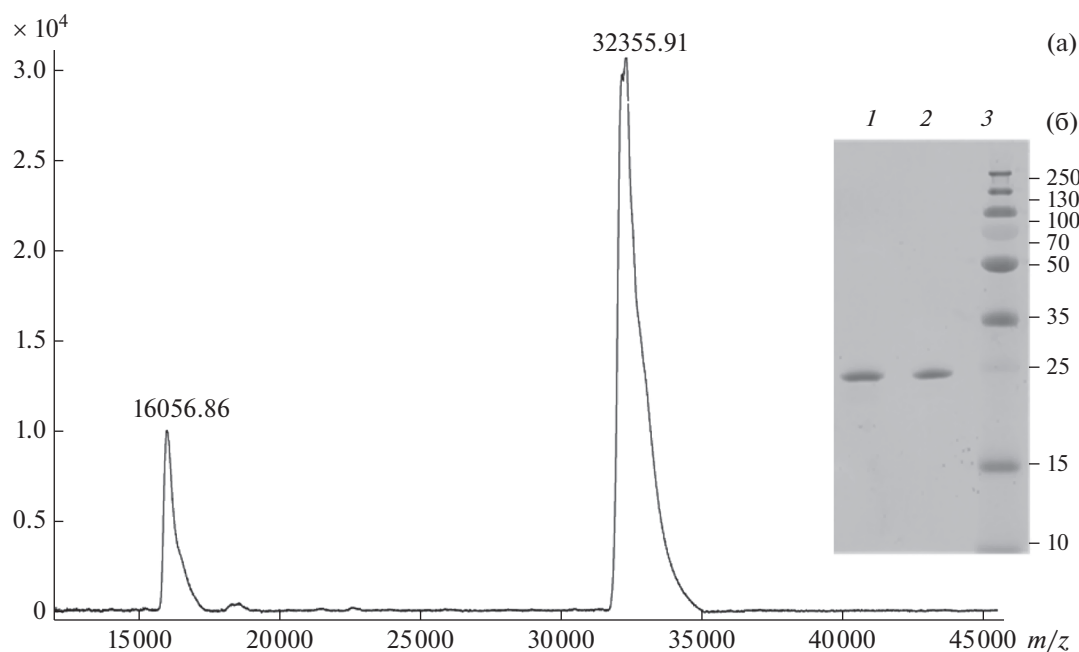


Рис. 5. Спектр MALDI-TOF (а) и электрофореграмма (б) очищенного рецепторного белка BlaR-CTD. 1–2 – препарат очищенного BlaR-CTD, 3 – маркер молекулярных масс в кДа.

Таблица 1. Характеристика стадий получения рекомбинантного BLaR-CTD

№ п/п	Фракции, получаемые при выделении и очистке	Содержание BLaR-CTD*, мкг	Степень чистоты, %	Выход BLaR-CTD, %
1	Супернатант LB среды	5 ± 1	—	—
2	Лизат клеточной суспензии	2400 ± 50	29 ± 1	—
3	Лизат клеток после УЗ-обработки, супернатант	2750 ± 50	33 ± 2	100.0
4	Лизат клеток после УЗ-обработки; осадок, растворенный в 6М мочеvine	300 ± 20	—	—
5	Неадсорбированная фракция металл-хелатной хроматографии	25 ± 5	—	—
6	Промывка металлохелатной колонки	30 ± 5	—	—
7	Элюат имидазолом в металл-хелатной хроматографии	1950 ± 50	95 ± 1	70.9

* Измерения содержания BLaR-CTD в различных фракциях с использованием системы сэндвич-ИФА—BLaR-CTD представлены в расчете на 200 мл среды. “—” — обозначены фракции, в которых характеристики BLaR-CTD не определяли и/или не рассчитывали.

BLaR-CTD в различных фракциях с использованием сэндвич-ИФА—BLaR-CTD представлены из расчета на 200 мл среды. В самой LB среде целевой белок практически отсутствовал (табл. 1). В исходном лизате присутствовало 2.4 ± 0.05 мг белка, а после обработки УЗ его содержание составило 2.75 ± 0.05 мг. Выход BLaR-CTD после аффинной хроматографии составлял около 70%. Показано, что во фракциях, собранных после нанесения образца на металл-хелатную колонку, и фракциях, полученных после промывки этой колонки, целевой белок также практически отсутствовал. Таким образом, согласно данным рецепторно-иммунного анализа разработана эффективная схема получения рекомбинантного BLaR-CTD.

Характеристика поликлональных антител к BLaR-CTD. В работе получены антитела к BLaR-CTD и исследованы их иммунохимические свойства в отношении интактного BLaR-CTD и его мутантной формы BLaR-CTD-M (I188K/S19C/G24C), переданной нам из лаборатории, в которой мутантный белок был ранее получен и всесторонне охарактеризован [26, 27]. Установлена способность поликлональных антител идентично выявлять обе формы рецептора бета-лактамов в составе их твердофазных комплексов с ампициллином. Калибровочные графики сэндвич-ИФА—BLaR-CTD с применением в качестве стандартов рецепторных белков дикого и мутантного типов представлены на рис. 6.

Мониторинг активности BLaR-CTD при различных температурно-временных условиях хранения. Для биоаналитического применения полученного рецептора как базового реагента тест-систем контроля содержания остаточных количеств бета-лактамов антибиотиков в пищевой продукции изучена его стабильность при хранении в течение 1–12 мес. при температурах -70 , -20°C или 4°C , в различных буферных средах, в том числе со

стабилизирующими наполнителями (табл. 2). Показано, что наиболее полно связывающие свойства BLaR-CTD сохраняются при его сублимационной сушке и выдерживании в виде лиофилизованного препарата. Активность BLaR-CTD оставалась прежней или лишь незначительно падала при его хранении в буферных растворах, содержащих белковые наполнители и глицерин, в температурном диапазоне от -70 до 4°C . В случае выдерживания этого белка в буферном растворе без наполнителей оптимальным является замораживание при -70°C , при этом допускается двукратное оттаивание/замораживание. В таких

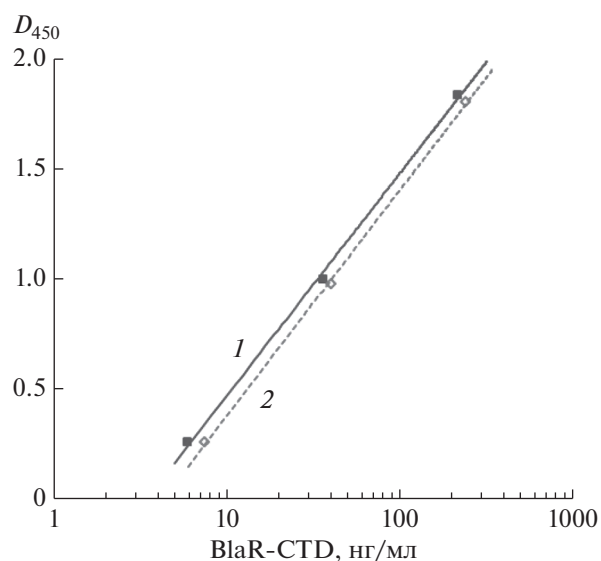


Рис. 6. Взаимодействие BLaR-CTD (1) и его мутантной формы BLaR-CTD-M (2) с твердофазным бета-лактамом и меченными пероксидазой поликлональными антителами к BLaR-CTD в системе сэндвич-ИФА—BLaR-CTD.

Таблица 2. Активность BLaR-CTD при различных условиях и продолжительности хранения

№	Условия хранения		Активность, %			
	Среда	t , °C	1 мес	3 мес	6 мес	12 мес
1	Буфер 1	4	97 ± 1	93 ± 2	89 ± 2	88 ± 2
2		–18	100 ± 1	99 ± 2	99 ± 2	96 ± 2
3		–70	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1
4	Буфер 2	+4	84 ± 2	81 ± 2	80 ± 2	81 ± 2
5		–18	86 ± 3	70 ± 3	55 ± 3	50 ± 3
6		–70	91 ± 2	89 ± 2	88 ± 2	88 ± 2
7	Буфер 3	Лиофилизация	100 ± 1	100 ± 2	100 ± 1	100 ± 1

условиях активность BLaR-CTD составляла 95–100%.

Стабильность BLaR-CTD при денатурирующих воздействиях. Лигандсвязывающие свойства и иммунореактивность BLaR-CTD могут меняться в агрессивных средах, моделирующих условия технологических обработок в процессах приготовления его реагентных форм. Поэтому перед применением в рецепторно-иммунных тест-системах на антибиотики необходимо оценивать запас структурно-функциональной прочности данного белка. Для этого BLaR-CTD инкубировали в растворах с различными концентрациями денатурирующих агентов или при повышенных температурах. Затем пробы разводили буферным раствором для нивелирования действия денатурантов и при комнатной температуре измеряли в них концентрации биологически активного белка тест-системой сэндвич-ИФА–BLaR-CTD.

Установлена достаточно высокая устойчивость BLaR-CTD к денатурации. При воздействии хаотропных агентов происходило постепенное, но незначительное снижение связывающих свойств рецепторного белка (рис. 7а, 7б). Так, даже в условиях 6 М мочевины или 4 М гуанидингидрохлорида белок сохранял 72–75% своей лигандсвязывающей активности и иммунореактивности. Даже в присутствии 10 М мочевины не происходило полной денатурации, и остаточная активность белка составила 45%. В то же время после воздействия 6 М гуанидингидрохлорида определялось лишь 12% активного BLaR-CTD. В растворах ДДС с концентрациями 1–4% происходила инактивация 90% присутствующего в пробах рецепторного белка.

Найдено, что в растворах с pH 5–7 максимально сохранялись способности BLaR-CTD взаимодействовать с твердофазным бета-лактамом и растворимыми антителами (рис. 7в). Однако при выдерживании в среде с pH 3 наблюдалось подавление связывающих свойств белка, и подвергнутый такой обработке BLaR-CTD характеризовался остаточной активностью 37%. Увеличение pH

среды с 7 до 12 приводило к постепенному уменьшению биоактивности BLaR-CTD до значения 58%.

Анализ стабильности при тепловой обработке в диапазоне 25–100°C показал, что выдерживание при температуре 37°C уже приводило к изменению активности рецепторного белка, а в результате инкубации при 55°C в течение 1 ч его остаточная активность составила только 14% (рис. 7г). Исходя из полученных данных, можно было сделать выводы об оптимальных условиях функционирования BLaR-CTD *in vitro*. Для сохранения биоактивности рецептора предпочтительным является его применение и хранение в буферных растворах с pH в диапазоне 5–7. При выполнении биоанализа следует проводить инкубации при температуре около 25°C. В процессах выделения, очистки и приготовления реагентных форм BLaR-CTD можно использовать растворы мочевины или гуанидингидрохлорида в соответствующих концентрациях до 6 и 4 М включительно.

Рецепторная тест-система для определения бета-лактамов. Используя BLaR-CTD в качестве основного биореагента, мы разработали систему непосредственного рецепторно-иммуноферментного анализа бета-лактамов антибиотиков. Принцип анализа заключается в конкурентном взаимодействии рецептора с бета-лактамом, адсорбированным в лунках микропланшета в составе конъюгата с инертным белком, и свободными бета-лактамами в жидкой фазе. Выявление иммобилизованного комплекса лиганд–рецептор осуществляли посредством специфических антител к BLaR-CTD, меченных пероксидазой. В результате экспериментов по оптимизации условий лиганд–рецепторного взаимодействия (содержание бета-лактамов на твердой и в жидкой фазах, концентрация BLaR-CTD в растворе, pH и ионная сила среды, температура) получены аналитические характеристики системы, которые отражены в калибровочной кривой, представленной на рис. 8а. В калибровочных пробах находился ампициллин в возрастающих концентрациях. Рабочий диапазон

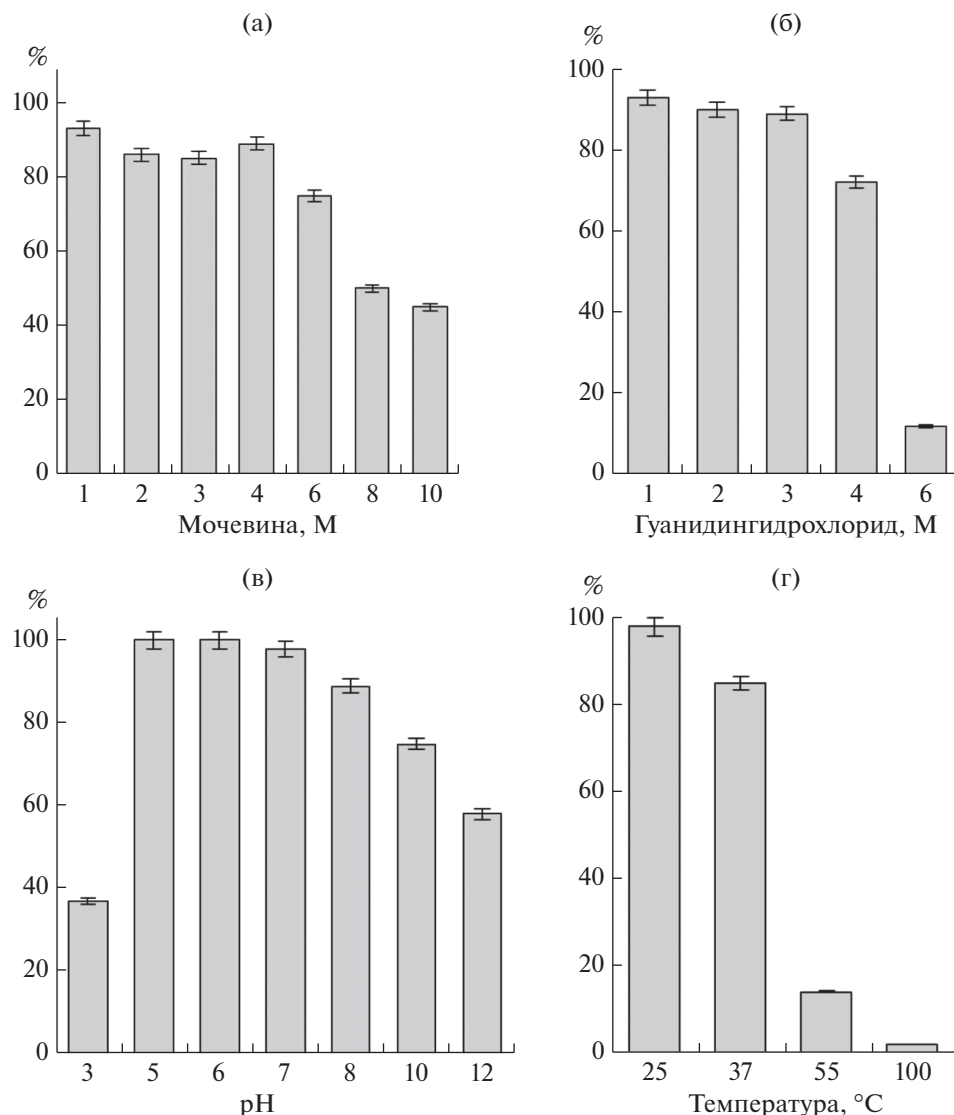


Рис. 7. Активность BLAR-CTD после воздействия на белок некоторых химических и физических факторов.

анализа составлял 0.05–4.0 нг/мл при $IC_{50} = 0.28 \pm \pm 0.01$ нг/мл ($n = 3$). Аналитическая чувствительность 0.02 нг/мл в отношении ампициллина превышала показатели, представленные в литературе [8, 15]. Разработанная конструкция может стать прототипом набора реагентов для рецепторно-иммуноферментного анализа бета-лактамов в пищевой продукции животного происхождения.

BLAR-CTD в рецепторнохроматографическом анализе бета-лактамов. Тест-системы экспрессного анализа на тест-полосках широко востребованы, благодаря скорости и простоте выполнения, высокой производительности и возможности проведения анализа вне лаборатории без сложного оборудования. В работе были исследованы лигандсвязывающие свойства и иммунореактивность полученного рецепторного белка BLAR-CTD в конструкции рецепторно-хроматографической тест-системы. В хо-

де анализа тест-полоска помещалась в коллоидный раствор, содержащий иммобилизованный рецептор и стандартные пробы антибиотика. При движении раствора вдоль полоски к впитывающей верхней мембране происходило взаимодействие твердофазного конъюгата ампициллина с меченным золотом BLAR-CTD в аналитической зоне и связывание в контрольной зоне адсорбированных на мембране антивидовых антител с антителами к BLAR-CTD в составе детектирующего комплекса на золотых наночастицах. Аналитический процесс состоял из одной стадии. Оценка результатов заключалась в визуальном контроле наличия или отсутствия окрашивания в аналитической и контрольной зонах тест-полоски (рис. 8б). Установлено, что порог визуальной детекции ампициллина составлял 1–2 нг/мл, что указывало на пригодность тест-системы для анализа этой вете-

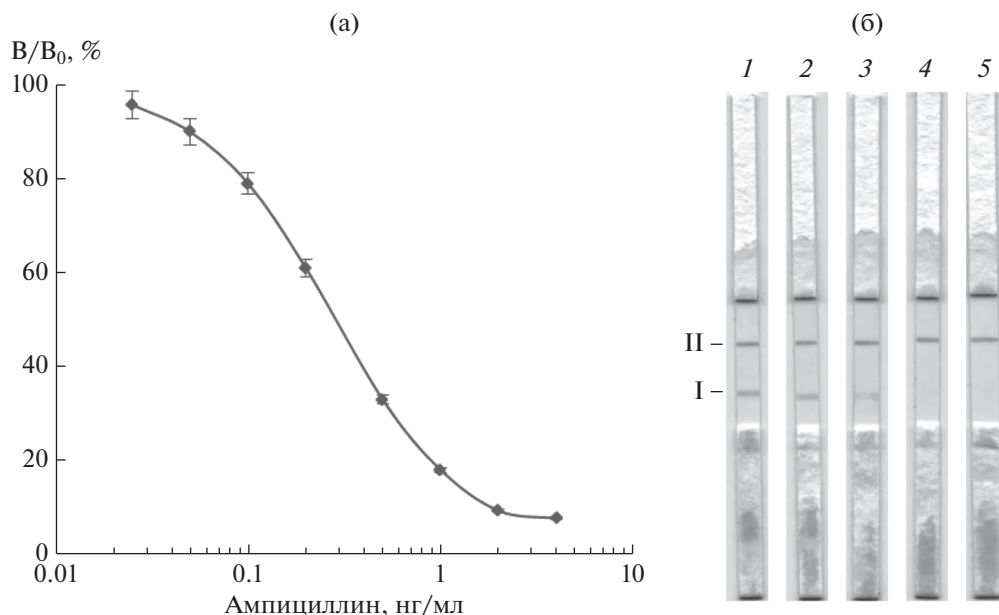


Рис. 8. Взаимодействия BLaR-CTD с конъюгатом ампициллина, иммобилизованным в лунках микропланшета (а) или в аналитической зоне тест-полоски (б), при возрастающих концентрациях свободного ампициллина в жидкой фазе в модельных системах рецепторного анализа. (б) Ампициллин в концентрациях 0 (1), 0.5 (2), 1 (3), 2 (4), 4 (5) нг/мл. I и II – аналитическая и контрольная зоны тест-полоски.

ринарной субстанции в продуктах питания и позволяло выявлять ампициллин в концентрациях даже ниже значений его максимально допустимого уровня в продуктах питания [5, 6]. Отметим, что найденное значение предела обнаружения лежало также ниже аналогичных значений, представленных в литературе для тест-систем на основе антител и других пенициллинсвязывающих белков [7, 8, 15, 26, 31].

Описанная модельная система рецепторно-хроматографического анализа на бета-лактамы при проведении дальнейших исследований с использованием широкого круга антибиотиков этого класса и различных пищевых матриц может стать практическим аналитическим средством экспрессного контроля биобезопасности продуктов питания.

Таким образом, в результате работы получен в чистом виде рекомбинатный микробный белок BlaR-CTD, связывающий бета-лактамы антибиотиков и взаимодействующий со специфическими антителами в двух форматах тест-систем на бета-лактамы. С помощью разработанной системы рецепторно-иммунного анализа исследована устойчивость его активности к лигандам и антителам в процессах экспрессии, очистки и биоаналитического применения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сазыкин И.С., Хмелевцова Л.Е., Селиверстова Е.Ю., Сазыкина М.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 1. С. 24–35. <https://doi.org/10.31857/S0555109921010335>
2. Kantiani L., Farre M., Barcelo D. // Trends Anal. Chem. 2009. V. 28. № 6. P. 729–744. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.04.005P>
3. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V. // Trends Anal. Chem. 2014. V. 55. P. 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.11.007>
4. Ahmed S., Ning J., Peng D., Chen T., Ahmad I., Ali A., Lei Z., Shabbir M.A., Cheng G., Yuan Z. // Food Agric. Immunol. 2020. V. 31. № 1. P. 268–290. <https://doi.org/10.1080/09540105.2019.1707171>
5. Decision of the EEC Board of February 13, 2018 N 28. https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01217013/clcd_15022018_28.
6. European Commission. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on Pharmacologically Active Substances and their Classification Regarding Maximum Residue Limits in Foodstuffs of Animal Origin. // Official Journal of the European Union. 2010. L 15/10. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/-files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf.
7. Strasser A., Usleber E., Schneider E., Dietrich R., Bürk C., Märklbauer E. // Food Agric. Immunol. 2003. V. 15. № 2. P. 135–143. <https://doi.org/10.1080/09540100400003493>
8. Cliquet P., Goddeeris B.M., Okerman L., Cox E. // Food Agric. Immunol. 2007. V. 18. № 3–4. P. 237–252. <https://doi.org/10.1080/09540100701802908>
9. Bremus A., Dietrich R., Dettmar L., Usleber E., Märklbauer E. // Anal. Bioanal. Chem. 2012. V. 403. № 2. P. 503–515. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5750-z>
10. Jiao S.N., Wang P., Zhao G.X., Zhang H.C., Liu J., Wang J.P. // J. Environ. Sci. Health. B. 2013. V. 48. № 6. P. 486–494. <https://doi.org/10.1080/03601234.2013.761908>

11. Kuprienko O.S., Serchenya T.S., Vashkevich I.I., Harbachova I.V., Zilberman A.I., Sviridov O.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2022. V. 48. № 1. P. 105–114. <https://doi.org/10.1134/S106816202201006X>
12. Chambers S.J., Wyatt G.M., Morgan M.R. // Anal Biochem. 2001. V. 288. № 2. P. 149–155. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4883>
13. Macheboeuf P., Contreras-Martel C., Job V., Dideberg O., Dessen A. // FEMS Microbiol. Rev. 2006. V. 30. № 5. P. 673–691. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00024.x>
14. Sauvage E., Kerff F., Terrak M., Ayala J.A., Charlier P. // FEMS Microbiol. Rev. 2008. V. 32. № 3. P. 234–258. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x>
15. Zeng K., Zhang J., Wang Y., Wang Z.H., Zhang S.X., Wu C.M., Shen J.Z. // Biomed. Environ. Sci. 2013. V. 26. № 2. P. 100–109. <https://doi.org/10.3967/0895-3988.2013.02.004>
16. Chen Y., Wang Y., Liu L., Wu X., Xu L., Kuang H., Li A., Xu C. // Nanoscale. 2015. V. 7. № 39. P. 16381–16388. <https://doi.org/10.1039/c5nr04987c>
17. Serchenya T.S., Harbachova I.V., Sviridov O.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2022. V. 48. № 1. P. 85–95. <https://doi.org/10.1134/S1068162022010125>
18. Moon T.M., D'Andréa E.D., Lee C.W., Soares A., Jakoncic J., Desbonnet C. et al. // J. Biol. Chem. 2018. V. 293. № 48. P. 18574–18584. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006052>
19. Zhu Y.F., Curran I.H., Joris B., Ghuyssen J.M., Lampen J.O. // J. Bacteriol. 1990. V. 172. № 2. P. 1137–1141. <https://doi.org/10.1128/jb.172.2.1137-1141.1990>
20. Joris B., Ledent P., Kobayashi T., Lampen J.O., Ghuyssen J.M. // FEMS Microbiology Letters. 1990. V. 70. № 1. P. 107–113. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90111-3](https://doi.org/10.1016/0378-1097(90)90111-3)
21. Duval V., Swinnen M., Lepage S., Brans A., Granier B., Franssen C., Frère J.-M., Joris B. // Mol. Microbiol. 2003. V. 48. № 6. P. 1553–1564. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03520.x>
22. Kerff F., Charlier P., Colombo M.-L., Sauvage E., Brans A., Frère J.-M., Joris B., Fonze E. // Biochemistry. 2003. V. 42. № 44. P. 12835–12843. <https://doi.org/10.1021/bi034976a>
23. Golemi-Kotra D., Cha J.Y., Meroueh S.O., Vakulenko S.B., Mobashery S. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 20. P. 18419–18425. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300611200>
24. Peng J., Cheng G., Huang L., Wang Y., Hao H., Peng D., Liu Z., Yuan Z. // Anal. Bioanal. Chem. 2013. V. 405. № 27. P. 8925–8933. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7311-5>
25. Ning J., Ahmed S., Cheng G., Chen T., Wang Y., Peng D., Yuan Z. // J. Biological Engineering. 2019. V. 13. № 1. P. 27–43. <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0157-4>
26. Lia Y., Xua X., Liua L., Kuanga H., Xua L., Xu C. // Analyst. 2020. V. 145. № 9. P. 3257–3265. <https://doi.org/10.1039/d0an00421a>
27. Li Y., Liu L., Xu C., Kuang H., Sun L. // Sci. China Mater. 2021. V. 64. № 8. P. 2056–2066. <https://doi.org/10.1007/s40843-020-1578-0>
28. Wang G., Zhang H.C., Liu J., Wang J.P. // Anal. Biochem. 2019. V. 564–565. P. 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.10.017>
29. Clos J., Brandau S. // Protein Expr. Purif. 1994. V. 5. № 2. P. 133–137. <https://doi.org/10.1006/prep.1994.1020>
30. Frens G. // Nature Physical Science. 1973. V. 241. № 105. P. 20–22. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
31. Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // Appl. Biochem. Microbiol. 2011. V. 47. № 6. P. 627–634. <https://doi.org/10.1134/S0003683811060032>

A Method for the Quantitative Determination of the Active Receptor of Beta-lactam Antibiotics BlaR-CTD for Bioanalytical Applications

T. S. Serchenya^{a, *}, P. A. Semizhon^b, E. P. Schaslionak^b, I. V. Harbachova^a,
I. I. Vashkevich^a, and O. V. Sviridov^a

^a Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220141 Belarus

^b Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, 220114 Belarus

*e-mail: serchenya@tut.by

A sandwich bioassay for the quantitative determination of the recombinant beta-lactam receptor BlaR-CTD possessing ligand binding activity and immunoreactivity has been developed. In the bioassay system, BlaR-CTD present in a biological liquid or standard sample binds via its receptor site to ampicillin immobilized in a microplate well and interacts through the epitopes of its peripheral structure with specific polyclonal antibodies. The analytical sensitivity of the method proved to be 2 ng/mL, and its concentration range was 5–215 ng/mL. In the processes of heterologous expression, isolation and reagent forms preparation, the biological activity of BlaR-CTD was monitored and its stability was evaluated. High purity recombinant beta-lactam receptor BlaR-CTD was obtained. The protein was shown to have a sufficiently high resistance to denaturation by chaotropic agents (urea and guanidine hydrochloride), and it was stable over a wide pH range. Also, we proposed the constructions and procedures of competitive bioassays for beta-lactam antibiotics using microplates (analytical sensitivity – 0.02 ng/mL, IC₅₀ = 0.28 ng/mL) or chromatographic test-strips (detection limit 1–2 ng/mL), which are based on the receptor and antigenic properties of BlaR-CTD.

Keywords: beta-lactam antibiotics receptor, BlaR-CTD, beta-lactam, immunoassay, receptor assay