

БИОАНАЛИТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОЦЕНКИ ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩЕЙ И ИММУНОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЕЙ РЕКОМБИНАТНОГО РЕЦЕПТОРА БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ BlaR-CTD

Серченя Т.С.¹, Горбачева И.В.¹, Семижон П.А.², Счесленок Е.П.², Вашкевич И.И.¹, Свиридов О.В.¹

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

²РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Аналитические системы на основе лиганд-рецепторного взаимодействия являются перспективным и новым биотехнологическим направлением создания тест-систем для выявления антибиотиков в продуктах питания. В таких системах применяют бактериальные белки, которые *in vivo* выполняют функции рецепторов антибиотиков в клеточных системах лекарственной устойчивости. Трансмембранный рецепторный белок BlaR связывает бета-лактамы антибиотики, главным образом пенициллины и цефалоспорины, и играет роль сенсора-трансдуктора синтеза бета-лактамаз. BlaR-CTD представляет собой внеклеточный С-концевой домен мультимодульного белка и содержит рецепторный сайт. Процесс получения такого белка в активной форме характеризуется рядом сложных стадий продуцирования и очистки.

Мы разработали рецепторно-ферментную аналитическую систему для установления активности рекомбинатного BlaR-CTD, необходимую при контроле выходов активного белка на стадиях продуцирования и очистки, установлении факторов, влияющих на его структурно-функциональные свойства, и при оценке стабильности этого рецептора в различных условиях технологической обработки и хранения. Особенностью этой тест-системы является оценка двух независимых биоспецифических реакций BlaR-CTD, включающих его взаимодействия за счет рецепторного сайта и при участии иммунореактивных эпитопов. В ходе анализа рецепторный белок сначала связывается посредством своего активного центра с бета-лактамым антибиотиком в составе конъюгата с инертным белком, иммобилизованным 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. Концентрация активного рецептора в исследуемых пробах определяется по градуировочной кривой, построенной по калибровочным пробам с возрастающим содержанием интактного BlaR-CTD в диапазоне 5-200 нг/мл. Анализ занимает не более 1,5 ч. Аналитическая чувствительность полностью соответствует назначению системы и составляет 2 нг/мл, коэффициент вариации результатов определений находится в пределах 5-7%.

Применение тест-системы позволило провести специальное исследование и найти количественные показатели содержания BlaR-CTD во фракциях его гетерологической экспрессии и хроматографической очистки последовательно на металлохелатной колонке и гидроксипатите. Измерено содержание активного белка на каждой из стадий выделения и установлено, что общий выход очищенного BlaR-CTD составляет до 21%. Для биоаналитического применения полученного рецептора как базового реагента тест-систем контроля содержания остаточных количеств бета-лактамы антибиотиков в пищевой продукции изучена его стабильность при хранении в течение 1 и 6 месяцев при температурах -70°C , -20°C или $+4^{\circ}\text{C}$, в различных буферных средах, в том числе со стабилизирующими наполнителями. Показано, что наиболее полно рецепторные 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°C до $+4^{\circ}\text{C}$. В случае выдерживания этого белка в буферном растворе без наполнителей оптимальным является замораживание при -70°C , при этом допускается двукратное размораживание/замораживание. В таких условиях активность BlaR-CTD составляла 95-100%. Исследована структурно-функциональная стабильность BlaR-CTD при действии ряда хаотропных агентов, таких как мочевины и гуанидингидрохлорид. Найден оптимальный диапазон pH среды (5-8) для лиганд-рецепторного взаимодействия. Таким образом, в результате работы получен рекомбинатный микробный рецептор бета-лактамы антибиотиков BlaR-CTD и разработана новая эффективная система для установления его активности и стабильности в процессах экспрессии, очистки и биоаналитического применения.