



УДК 577.18+577.112.4

ПРЯМОЕ КОНЬЮГИРОВАНИЕ ПЕНИЦИЛЛИНОВ И ЦЕФАЛОСПОРИНОВ С БЕЛКАМИ ДЛЯ РЕЦЕПТОРНОГО АНАЛИЗА БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ

© 2022 г. Т. С. Серченя*, #, И. В. Горбачева*, О. В. Свиридов*

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Беларусь, 220141 Минск, ул. Акад. Купревича, 5/2

Поступила в редакцию 26.04.2021 г.

После доработки 04.05.2021 г.

Принята к публикации 21.05.2021 г.

Пятнадцать белковых конъюгатов пенициллинов и цефалоспоринов, содержащих амино- и/или карбоксильные группы в исходных структурах, синтезированы в реакциях с сывороточным альбумином человека или овальбумином с использованием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид гидрохлорида (EDC) или комбинации EDC/*N*-гидроксисульфосукцинимид (sNHS) при различных соотношениях базовых реагентов. Проведено сравнительное исследование состава и свойств конъюгатов методами УФ-спектроскопии, масс-спектрометрии и лиганд-рецепторного анализа. Показано, что содержание остатков антибиотика в полученных макромолекулах варьируется от 1 до 22, бета-лактамный цикл остается интактным, и это обеспечивает специфическое взаимодействие конъюгатов с пенициллин-связывающим белком. В двух разработанных моделях рецепторных биоаналитических систем конъюгат ампициллина на твердой фазе взаимодействует с пенициллин-связывающим белком в составе его комплекса с моноклональным антителом, которое детектировали с использованием иммуноферментной метки в микропланшетах или наночастиц золота на тест-полосках. Связывание конъюгированного ампициллина с рецептором конкурентно ингибировалось антибиотиками, добавленными в жидкую фазу, и показатели аналитической чувствительности в отношении пенициллина G для микропланшетной и рецепторно-хроматографической тест-систем составили 0.05 и 1 нг/мл соответственно.

Ключевые слова: гаптен-белковые конъюгаты, бета-лактамы, рецепторный анализ, антибиотики

DOI: 10.31857/S0132342322010122

ВВЕДЕНИЕ

Бета-лактамные антибиотики составляют один из наиболее широко используемых в медицине и ветеринарной химиотерапии классов противомикробных препаратов [1, 2]. Поэтому точные, простые и быстрые методы их определения востребованы и актуальны для контроля биобезопасности продуктов питания животного происхождения [3–6], оценки уровня бета-лактамов в крови в целях назначения адекватной дозы паци-

ентам при неотложных состояниях [6–9], а также для мониторинга содержания в объектах окружающей среды [10, 11]. Эффективным методом скринингового контроля различных антибиотиков признан иммуноанализ, основанный на реакции антиген–антитело [3, 12–15]. Однако в случае бета-лактамных антибиотиков уникальную возможность для разработки методов биоанализа представляет лиганд-рецепторное взаимодействие с участием специфического пенициллин-связывающего белка (ПСБ), узнающего обязательный структурный элемент этих лекарственных субстанций – бета-лактамное кольцо. ПСБ в мембране бактерий играет ключевую роль в механизме антибактериального действия бета-лактамов, образуя с ними комплекс с последующей химической модификацией остатка серина в активном центре и обусловленной этим утратой ПСБ функции транспептидазы в биосинтезе пептидов клеточной стенки бактерии, что приводит к гибели микроорганизма [16–18]. Преимущество использования рецептора в биоанализе, в отличие от большинства антител, заключается в

Сокращения: К.В. – коэффициент вариации; МАТ – моноклональное антитело; ПСБ – пенициллин-связывающий белок; ЧСА – сывороточный альбумин человека; V_0 – оптическая плотность в анализе в отсутствие конкурирующего бета-лактама в жидкой фазе; BSA – бычий сывороточный альбумин; EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид гидрохлорид; IC_{50} – концентрация антибиотика в растворе, вызывающая 50%-ное ингибирование связывания рецептора с твердофазным лигандом; MES – 2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота; PBS – натрий-фосфатный буфер; sNHS – *N*-гидроксисульфосукцинимид.

Автор для связи: (тел.: +375 (17) 300-57-07; эл. почта: serchenya@iboch.by).

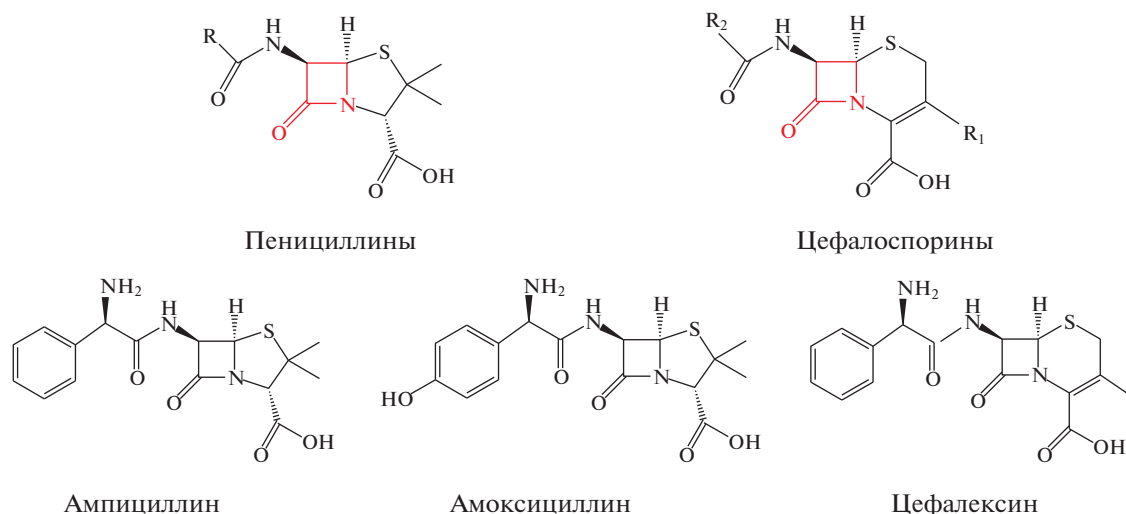


Рис. 1. Структурные формулы исследуемых бета-лактамовых антибиотиков.

способности узнавать и связывать целую группу бета-лактамов, при этом взаимодействие происходит только с активными формами этих антибиотиков, имеющими цельное бета-лактамовое кольцо. Тест-системы рецепторного анализа – новый и перспективный инструмент, в сравнении с иммуноанализом они характеризуется повышенной аналитической чувствительностью и гораздо более широкой групповой специфичностью.

Химически модифицированные белки и производные низкомолекулярных органических биомолекул (гаптен) представляют собой главные реагенты для создания иммуно- и рецепторно-аналитических систем. При этом высокоэффективная стратегия модификации соединений должна обеспечивать получение биологически активных и стабильных гаптен-белковых конъюгатов, отличаться простотой и воспроизводимостью. В нашей работе для получения белковых конъюгатов бета-лактамовых антибиотиков были выбраны подходы к биоконъюгированию, учитывающие наличие реакционноспособных групп в исходных соединениях и необходимость сохранения структуры бета-лактамового кольца – основного сайта узнавания антибиотика рецепторным белком. При этом задействовались как аминогруппы, так и карбоксильные группы пенициллинов и цефалоспоринов – наиболее важных в практическом плане подклассов бета-лактамов.

В основе молекул аминопенициллинов лежит структура 6-аминопенициллановой кислоты, включающая конденсированные тиазолидиновый и бета-лактамовый циклы (рис. 1). Аминированные цефалоспорины – производные 7-аминоцефалоспориновой и 7-аминодезацетоксицефалоспориновой кислот, содержащие конденсированные бета-лактамовое и дигидротиазинового кольца (рис. 1). Для проявления биологической активности боль-

шое значение имеют целостность и, соответственно, реакционная способность бета-лактамового цикла, который очень неустойчив в кислой и щелочной средах, а также может разрушаться в ходе химической модификации.

Из литературы неясно, как химическая природа сайта конъюгирования в молекуле бета-лактама и способ его ковалентного присоединения к белку могут влиять на поведение конъюгата антибиотика на твердой фазе и на взаимодействие с рецепторным белком в биоаналитической системе. Описаны белковые конъюгаты бета-лактамовых антибиотиков, применяемые в качестве иммуногенов для получения антител, и конъюгаты с пероксидазой из корней хрена для иммуноаналитических тест-систем [13–15, 19, 20]. Эти конъюгаты синтезировали с использованием различных линкеров или безлинкерным карбодимидным методом. Однако в литературе отсутствуют количественные характеристики присоединения антибиотиков к белку в терминах содержания гаптена в описанных конъюгатах и сведения о зависимости этого показателя от мольного соотношения реагентов, а также данные о влиянии сайта модификации молекулы антибиотика на стехиометрию конъюгирования. Не изучена в полной мере связь между аналитическими параметрами тест-систем рецепторного анализа и свойствами твердофазных белковых конъюгатов бета-лактамов.

Цель данной работы – провести комплексное сравнительное исследование способов прямого (“безлинкерного”) конъюгирования пенициллинов и цефалоспоринов с инертными белками и изучить зависимость характеристик связывания конъюгатов с пенициллин-связывающим белком от их общей структуры. Такие знания и полученные реагенты полезны в разработках высокочув-

ствительных систем микропланшетного и хроматографического рецепторного анализа с широкой групповой специфичностью в отношении бета-лактамовых антибиотиков в пищевых продуктах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез белковых конъюгатов бета-лактамовых антибиотиков. Для получения белковых конъюгатов бета-лактамов были выбраны методы биоконъюгирования с учетом реакционноспособных групп, присутствующих в исходных антибиотиках. При этом также учитывали, что в процессе синтеза конъюгатов не должно разрушаться бета-лактамовое кольцо, выступающее основным сайтом узнавания антибиотика рецепторным белком. Целостность бета-лактамового кольца подтверждали спектрофотометрически по отсутствию пиков поглощения при 320–330 нм [21]. Наличие в исходных молекулах доступных карбокси- и аминогрупп определило выбор методик с использованием водорастворимого карбодиимида и получения активированных сложных эфиров. Эти синтетические подходы позволяют проводить реакцию образования прочной амидной связи между компонентами конъюгата в водных средах (иногда с добавлением органического растворителя), в которых многие малые биомолекулы достаточно хорошо растворимы, а белки могут сохранять свою нативную структуру. Карбодиимид (EDC), хорошо себя зарекомендовавший в безлинкерном синтезе биоконъюгатов, образует с карбоксильной группой неустойчивый в водных растворах промежуточный продукт, поэтому этот реагент часто используют в комбинации с *N*-гидроксисукцинимидом или его сульфопроизводным (sNHS) и получают эффективный в реакции *N*-ацилирования сложный эфир.

Поскольку практически все белки содержат аминогруппы, их модификация особенно часто проводится посредством активированных эфиров малых органических молекул. Все бета-лактамы характеризуются наличием карбоксильной группы, которая, однако, расположена вблизи бета-лактамового кольца. Поэтому мы выбрали такие пенициллины и цефалоспорины (ампициллин, амоксициллин и цефалексин), которые содержат также и аминогруппу в боковой цепи, что позволяет в конъюгате пространственно разделить функционально важный бета-лактамовый цикл и амидную связь антибиотика с белком. Кроме того, в отличие от природного пенициллина G, синтетические аминопенициллины достаточно стабильны в водных растворах при нейтральных pH, что позволяет избежать расщепления бета-лактамового кольца в реакции конъюгирования. Из цефалоспоринов был взят цефалексин, по структуре очень близкий к аминопенициллинам, но отличающийся строением цикла, конденсированного с бета-лактамовым кольцом (рис. 1).

В нашей работе белковые конъюгаты аминопенициллинов и цефалоспоринов синтезированы путем ковалентного присоединения к молекулам сывороточного альбумина человека (ЧСА) и овальбумина исследуемых бета-лактамов путем карбодиимидной конденсации с EDC и в реакции активированных эфиров с использованием комбинации EDC/sNHS. В первом случае происходит конъюгирование преимущественно по аминогруппам антибиотика, хотя возможны и реакции с участием его карбоксильных групп, а поперечная сшивка молекул белка, скорее всего, тормозится из-за конкуренции со стороны аминопроизводных бета-лактамов, имеющих более высокую подвижность в растворе. В вариантах синтеза с EDC/sNHS за счет изменения порядка добавления реагентов проводили активацию карбоксильной группы антибиотика или белка и далее ацилировали полученными активированными эфирами NH₂-группы другого компонента реакции конъюгирования. При этом мольные соотношения белок/антибиотик варьировались в диапазоне от 1 : 10 до 1 : 150.

По данным MALDI-TOF-масс-спектрометрии, количество остатков присоединенного к белкам (ЧСА и овальбумин) антибиотика изменялось от 1 до 22. Показано, что при одинаковом мольном соотношении реагентов количество присоединенных остатков бета-лактамов к ЧСА зависит от выбранной методики конъюгирования (табл. 1). При одностадийном конъюгировании с EDC наблюдалось присоединение 7, 20 и 22 остатков ампициллина к одной белковой молекуле при, соответственно, 10-, 50- и 150-кратном мольном избытке этого антибиотика. В то же время в реакции активированных эфиров при тех же соотношениях реагентов были получены другие количества присоединенного гаптена: при ацилировании аминогрупп белковой молекулы – 1, 5 и 6, а при конъюгировании по аминогруппам ампициллина – 5, 12 и 19. Видно, что при карбодиимидной конденсации в сравнении с использованием двух реагентов EDC/sNHS максимальное присоединение происходит уже при 50-кратном избытке антибиотика. При активации карбоксильных групп бета-лактама наблюдается присоединение не более 5–6 остатков гаптена даже при его большом мольном избытке, а в случае 10-кратного избытка ампициллина мы получаем конъюгат лишь с эквимольным соотношением белок–гаптен. В табл. 1 не включены конъюгаты ЧСА с цефтиофуrom (K13, синтезирован по методике с EDC/sNHS), цефапирином и цефоперазоном (K14 и K15, получены с использованием EDC), которые содержали, соответственно, 5, 12 и 2 остатка антибиотика на молекулу белка.

Отметим, что при конъюгировании по аминогруппам гаптена в случае реакции активированных эфиров наблюдается последовательное и наиболее контролируемое увеличение количе-

Таблица 1. Синтезированные белковые конъюгаты бета-лактамов, использованные методы конъюгирования и содержание остатков антибиотиков в конъюгатах

Шифр конъюгата	Бета-лактамы	Метод и сайт(ы) конъюгирования в антибиотике	Избыток антибиотика в реакции, моль/моль белка	Содержание остатков антибиотика в конъюгате, моль/моль белка
K1	Ампициллин	EDC (H ₂ N-Амп-СООН)	10	7
K2	Ампициллин	EDC (H ₂ N-Амп-СООН)	150	22
K3	Ампициллин	EDC/sNHS (Амп-СООН)	10	1
K4	Ампициллин	EDC/sNHS (Амп-СООН)	150	6
K5	Ампициллин	EDC/sNHS (Амп-NH ₂)	10	5
K6	Ампициллин	EDC/sNHS (Амп-NH ₂)	50	12
K7	Ампициллин	EDC/sNHS (Амп-NH ₂)	150	19
K8	Цефалексин	EDC/sNHS (Цеф-СООН)	10	1
K9	Цефалексин	EDC/sNHS (Цеф-СООН)	10	2
K10	Цефалексин	EDC (H ₂ N-Цеф-СООН)	50	7
K11	Цефалексин	EDC/sNHS (Цеф-NH ₂)	150	18
K12	Амоксициллин	EDC/sNHS (Амокс-NH ₂)	150	12

Примечание: все конъюгаты бета-лактамов синтезированы с использованием ЧСА, кроме K8, который получен при конъюгировании с овальбумином.

ства присоединенных остатков ампициллина согласно возрастанию его мольной нагрузки в реакционной смеси.

Спектральные характеристики конъюгатов.

Спектральные характеристики некоторых синте-

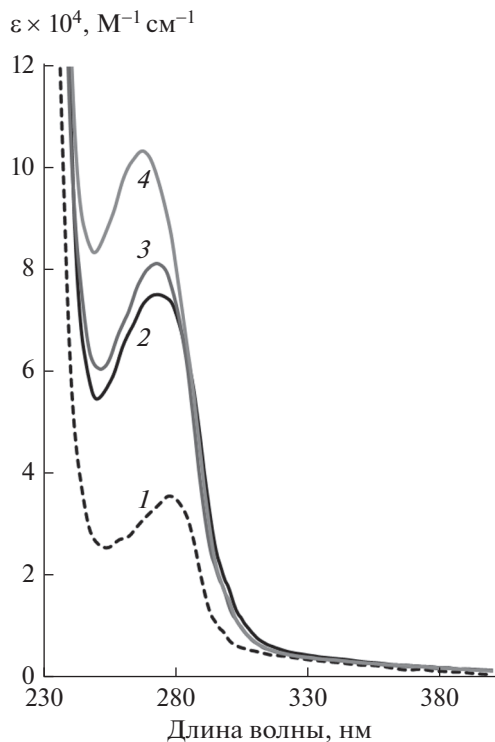


Рис. 2. Спектры поглощения синтезированных конъюгатов бета-лактамов с ЧСА: 1 – ЧСА, 2 – конъюгат ампициллина K6, 3 – конъюгат амоксициллина K12, 4 – конъюгат цефалексина K11.

зированных конъюгатов (K6, K11 и K12) представлены на рис. 2. Интактный ЧСА характеризуется максимумом спектра поглощения при 278 нм, а овальбумин – при 279 нм. Значение коэффициента молярной экстинкции в максимуме поглощения для ЧСА составило $3.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, а для овальбумина – $3.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Форма спектров поглощения конъюгатов, синтезированных с использованием различных методик (данные не представлены), была та же, что и у спектра исходного белка, но наблюдался сдвиг максимума абсорбции и гиперхромный эффект, зависящие от количества присоединенного гаптена. Так, спектры поглощения эквимольных конъюгатов имели характеристики, практически идентичные абсорбционным спектрам немодифицированных белков. В случаях присоединения более 1–2 остатков ампициллина, цефалексина или амоксициллина к белковым молекулам происходит сдвиг максимума спектра поглощения в коротковолновую область на 4–6 нм для конъюгатов с ампициллином и амоксициллином и на 6–8 нм для конъюгатов с цефалексином. В то же время дополнительные пики и плечи в полосах спектров конъюгатов отсутствуют, что указывает на сохранение интактного бета-лактамого кольца антибиотиков в составе конъюгатов. Таким образом, абсорбционная спектроскопия оказалась эффективным инструментом количественного и качественного контроля структуры белковых конъюгатов бета-лактамов, предназначенных для систем биоанализа.

Рецепторный анализ, связывание с рецепторным белком бета-лактамов и биоаналитические свойства конъюгатов. Исследовано влияние белкового конъюгирования на связывающую активность бета-лактамов по отношению к ПСБ, установлен-

ны биоаналитические свойства полученных конъюгатов и разработаны конструкции модельных систем рецепторного анализа в микропланшетном варианте и на хроматографических тест-платках.

За модель мы принимаем исследовательскую биоаналитическую систему в качестве промежуточного объекта на общепринятом этапе создания валидированной практической системы для тестирования не только стандартных, но и неизвестных проб, приготовленных из образцов пищевой продукции [22]. По сравнению с иммуноанализом, рецепторный анализ в скрининговых лабораторных исследованиях содержания бета-лактамов в различных пищевых матрицах обладает следующими преимуществами: более высокой чувствительностью, широкой групповой специфичностью, способностью выявлять реакционноспособные формы антибиотиков.

В микропланшетном варианте рецепторного анализа на твердой фазе иммобилизовали синтезированные конъюгаты бета-лактамов антибиотиков, а главным компонентом жидкой фазы был ПСБ в составе специфического комплекса с моноклональным антителом (МАт) к нему, которое выполняло только функцию биологической метки и не влияло на активность лиганд-связывающего центра рецепторного белка. В гетерофазной системе происходило распределение ПСБ между антибиотиком на твердой фазе и его конкурентом в растворе в составе "стандартов" с возрастающими концентрациями бета-лактама. Выявление связавшегося ПСБ осуществляли с помощью антивидовых антител (иммуноглобулины козы против иммуноглобулинов мыши), конъюгированных с пероксидазой из корней хрена.

Сравнение конъюгированных бета-лактамов проводили по параметрам рецепторного связывания, показателям калибровочного графика и аналитическим характеристикам тест-системы (табл. 2). При этом оценивали связывающую активность конъюгатов в отсутствие конкурирующего бета-лактама в растворе (V_0 , о.е.) и параметры конкурентного ингибирования взаимодействия ПСБ с твердофазным антибиотиком возрастающими концентрациями (0.03–900 нг/мл) пенициллина G, ампициллина и цефалексина. Кроме того, определяли разницу сигнал–фон (ΔV), соотношения значений оптической плотности V_i/V_0 для стандартов, содержащих пенициллин G (0.05 нг/мл), ампициллин (0.05 нг/мл) и цефалексин (3 нг/мл), чувствительность анализа (IC_{50} , нг/мл) и повторяемость (К.В., %). Результаты исследования представлены в табл. 2.

Согласно полученным данным, эквимольные конъюгаты слабее других конъюгатов связывались с рецепторным белком, и для конъюгата с ампициллином V_0 составило лишь 0.52 о.е. В конъюгатах с ампициллином и амоксициллином

при мольных соотношениях белок/гаптен, равных 1 : (5–7) (К1, К4, К5), значение V_0 составило 1.17–1.28 о.е., а при содержании 1 : 12 (К6, К12) соответствующий колориметрический сигнал был уже 1.50 о.е. При максимальных количествах конъюгированных ампициллина (К2, К7) и цефалексина (К11) с белком параметр связывания V_0 составил, соответственно, 1.97–2.12 и 1.15 о.е. Как видно из результатов, цефалексин, конъюгированный с ЧСА или овальбумином, характеризуется намного более низкими показателями связывания с рецептором по сравнению с ампициллином при одинаковых мольных долях этих бета-лактамов в конъюгатах (К2 и К11; К1, К4, К5 и К10). Это свидетельствует о меньшем сродстве данного цефалоспоринона к ПСБ, что также подтверждается значениями ингибиторной активности IC_{50} при использовании цефалексина в качестве стандарта (табл. 2).

Итак, в лиганд-рецепторной системе, включающей белковый конъюгат бета-лактама и ПСБ, с ферментно-колориметрической детекцией взаимодействия оптический ответ в существенной мере зависит от природы и количества присоединенных остатков антибиотика в конъюгате. При выборе твердофазного лиганда для разработки рецепторной тест-системы для определения бета-лактамов следует учитывать тот установленный нами факт, что наибольшее связывание с ПСБ имеют конъюгаты, содержащие 12–22 остатков ампициллина или амоксициллина.

При сравнении характеристик конъюгатов с идентичным содержанием бета-лактамов (К1, К4, К5, К10; К6, К12; К2, К7, К11), но синтезированных различными способами прямого конъюгирования, мы показали, что в терминах параметров V_0 , ΔV и IC_{50} они имеют схожие характеристики взаимодействия с рецептором и близкие биоаналитические свойства. Это говорит о том, что сайт в молекуле бета-лактама, через который он напрямую присоединяется к белку-носителю, не критичен для последующего взаимодействия конъюгированного антибиотика с рецепторным белком. Таким образом, бета-лактамовое кольцо остается доступным для лиганд-связывающего центра ПСБ при модификации как аминогруппы на периферии молекулы, так и карбоксильной группы вблизи бета-лактамовой группировки.

При сравнении биоаналитических свойств конъюгатов видно, что для всех твердофазных конъюгированных антибиотиков в рецепторной тест-системе графически рассчитанная чувствительность анализа (IC_{50}) находится в пределах 0.34–0.38 нг/мл для растворов пенициллина G в стандартах, 0.39–0.45 нг/мл для ампициллина и 50–55 нг/мл для цефалексина (табл. 2). Эти данные свидетельствуют о том, что увеличение содержания остатков антибиотика в составе конъюгата с белком незначительно влияет на положение

Таблица 2. Биоаналитические характеристики синтезированных конъюгатов бета-лактамов

№	V ₀ , о.е.	Стандарт									К.В., %
		пенициллин G			ампициллин			цефалексин			
		ΔB	IC ₅₀ , нг/мл	V _{0.05} /V ₀ , %	ΔB	IC ₅₀ , нг/мл	V _{0.05} /V ₀ , %	ΔB	IC ₅₀ , нг/мл	V ₃ /V ₀ , %	
K1	1.28	1.12	0.38	81	1.12	0.40	90	1.10	53.0	90	3.2
K2	1.97	1.81	0.38	91	1.82	0.45	94	1.78	55.0	93	3.3
K3	0.52	0.40	0.34	79	0.41	0.39	86	0.38	52.0	85	4.1
K4	1.21	1.06	0.35	80	1.07	0.39	87	1.02	52.0	86	4.3
K5	1.17	1.01	0.35	80	1.02	0.39	87	0.98	52.0	86	2.5
K6	1.51	1.38	0.35	88	1.37	0.38	92	1.34	53.0	92	3.4
K7	2.12	1.97	0.35	89	1.98	0.42	92	1.94	55.0	94	4.3
K8	0.32	0.23	—	80	0.23	—	84	0.22	—	84	2.8
K9	0.33	0.23	—	80	0.23	—	87	0.22	—	84	3.2
K10	0.47	0.35	0.34	84	0.35	0.39	88	0.32	50.0	85	3.1
K11	1.15	1.01	0.35	85	1.01	0.41	90	0.98	51.0	93	3.1
K12	1.50	1.38	0.36	89	1.40	0.41	92	1.34	52.0	93	3.2

Примечание: прочерк — параметр IC₅₀ не рассчитывали при V₀ < 0.4 о.е.

ние калибровочного графика относительно оси концентраций. Это свойство отличает рецепторный анализ от работы большинства иммунохимических тест-систем с использованием моно- или поликлональных антител. Так что выбрать оптимальный конъюгат для рецепторного анализа, обеспечивающий наибольший колориметрический сигнал V₀, можно не в ущерб чувствительности анализа IC₅₀. Конъюгаты K13–K15 на основе цефтиофура, цефапирина и цефоперазона проявляли активность в отношении ПСБ, и характеристики их связывания укладывались в структурно-функциональные зависимости, описанные выше.

Из синтезированных продуктов подходящими для иммуноанализа (данные не приведены) оказались белковые конъюгаты ампициллина (K3) и цефалексина (K8, K9), что будет предметом последующих публикаций.

Для оценки групповой специфичности анализа бета-лактамов в модельных рецепторно-ферментных тест-системах микропланшетной конструкции использовали конъюгаты ампициллина (K7), цефалексина (K11) и калибраторы — растворы с точными концентрациями индивидуальных антибиотиков группы бета-лактамов, наиболее часто применяемых в клинической практике и ветеринарии. Результаты исследования представлены в табл. 3. Установлено, что связывающая активность бета-лактамовых лигандов по отношению к рецепторному белку уменьшается в следующем ряду: пенициллин G > ампициллин > амоксициллин > цефоперазон > цефапирин > цефтиофур > цефалексин. Показано также, что специфичность анализа не зависит от природы (пенициллин или цефалоспорин) твердофазного лиганда. Калибровочные графики, полученные для исследуемых

бета-лактамов, характеризовались IC₅₀ в диапазоне 0.35–0.46 нг/мл для пенициллинов и 0.72–55 нг/мл для цефалоспоринов, а перекрестная реактивность относительно пенициллина G составила 82.6–86.4% для пенициллинов и 0.7–48.6% для цефалоспоринов. Индивидуальные рабочие диапазоны достоверно определяемых концентраций различных бета-лактамов находились в широких пределах: 0.05–8.0 нг/мл для пенициллинов и 0.05–600 нг/мл для цефалоспоринов.

Сравнивая работу в рецепторно-ферментных системах конъюгатов K2 и K7 с практически одинаковым высоким содержанием ампициллина, присоединенного через его аминогруппу, мы обнаружили, что в случае двухэтапной методики синтеза (K7) конъюгат имеет несколько лучшие биоаналитические характеристики (V₀ и IC₅₀). Поэтому конъюгат K7 признан оптимальным лигандом для микропланшетной твердой фазы, и в последующей работе его использовали для иммобилизации на нитроцеллюлозной мембране хроматографических тест-полосок.

Расширяя сделанную нами ранее формулировку, отметим, что аналитические характеристики системы гетерофазного рецепторно-ферментного анализа, включающей белковый конъюгат бета-лактама на твердой фазе, в значительной степени определяются содержанием и природой антибиотика в конъюгате и в меньшей мере зависят от сайта присоединения в гаптене, а также способа прямого конъюгирования.

В результате экспериментов по оптимизации условий лиганд-рецепторного взаимодействия в микропланшетной системе (концентрации конъюгата K7 на твердой фазе, ПСБ и ампициллина в растворе, pH и ионная сила среды, температура)

Таблица 3. Характеристики специфичности и диапазоны определяемых концентраций бета-лактамов в рецепторно-ферментном анализе с использованием твердофазных конъюгатов ампициллина и цефалексина

Твердофазный конъюгат	Стандарт	IC ₅₀ , нг/мл	Перекрестная реактивность, %	К.В., %	Диапазон концентраций, нг/мл
Ампициллин–альбумин (К7)	Пенициллин G	0.38	100.0	3.6	0.05–4.0
	Ампициллин	0.44	86.4	3.7	0.05–8.0
	Амоксициллин	0.46	82.6	3.8	0.05–8.0
	Цефалексин	55.0	0.7	5.1	3.0–600.0
	Цефоперазон	0.80	47.5	4.2	0.05–8.0
	Цефтиофур	4.0	9.5	4.0	0.3–100.0
Цефалексин–альбумин (К11)	Пенициллин G	0.35	100	3.8	0.05–4.0
	Ампициллин	0.41	85.4	3.7	0.05–8.0
	Амоксициллин	0.42	83.3	3.7	0.05–8.0
	Цефалексин	51.0	0.7	5.2	3.0–600.0
	Цефоперазон	0.72	48.6	4.3	0.05–8.0
	Цефтиофур	3.5	10.0	4.1	0.3–100.0
	Цефапирин	0.80	43.7	3.8	0.05–30.0

получены аналитические характеристики, которые выражаются калибровочной кривой, представленной на рис. 3. Рабочий диапазон анализа составляет 0.05–8.0 нг/мл при IC₅₀ = 0.42 ± 0.05 нг/мл (n = 5) и аналитической чувствительности 0.05 нг/мл в отношении ампициллина, что превышает показатели, представленные в литературе [13, 14, 19]. Так, иммуносенсор для флуоресцентного анализа бета-лактамовых антибиотиков в работе Venito-Peña et al. [13] характе-

ризовался следующими параметрами: IC₅₀ = 30 нг/мл и предел детекции 2.4 нг/мл при динамическом диапазоне анализа 6–191 нг/мл. Предел детекции ампициллина в буферном растворе в биосенсоре с использованием МАТ, представленном в работе Cliquet et al. [14], не превышал 46 нг/мл. Разработанная Zeng et al. [19] тест-система для определения бета-лактамов с использованием ПСБ (рекомбинантного аналога природного рецептора РВР 2х из *Streptococcus pneumoniae* R6) позволяет определять ампициллин и пенициллин G в диапазоне 1–16 нг/мл и характеризуется пределом детекции для этих бета-лактамов 0.75 и 1.22 нг/мл соответственно.

Разработанная в данной работе конструкция тест-системы с высокими показателями чувствительности может стать прототипом набора реагентов для рецепторно-ферментного анализа бета-лактамов в пищевой продукции животного происхождения.

Рецепторно-хроматографический анализ. В настоящее время широкое применение получили экспресс-методы детекции малых биомолекул и белковых маркеров на хроматографических тест-полосках благодаря скорости и простоте выполнения, высокой производительности и возможности проведения анализа вне лаборатории без сложного оборудования. Такой анализ – эффективный инструмент качественного и количественного определения антибиотиков в продуктах [4, 23].

Нами исследовано взаимодействие синтезированного белкового конъюгата ампициллина, свободных бета-лактамов и ПСБ в разработанной рецепторно-хроматографической системе на тест-

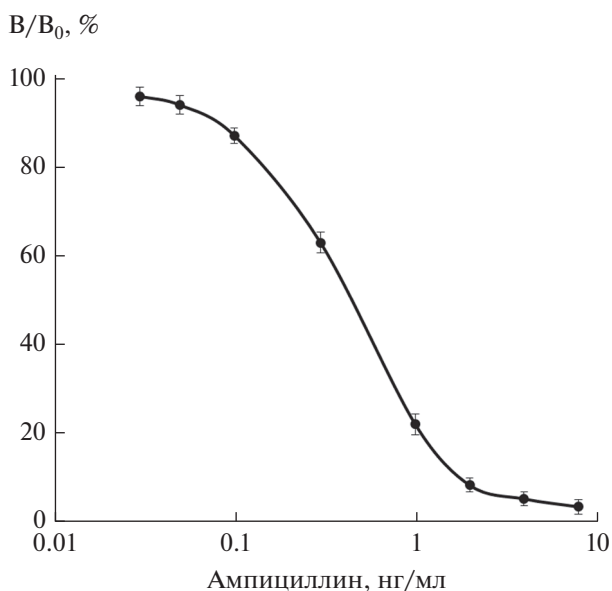


Рис. 3. Зависимость связывания ПСБ с твердофазным конъюгатом ампициллина K7 от концентрации свободного ампициллина в жидкой фазе модельной системы рецепторно-ферментного анализа.

Таблица 4. Пределы обнаружения бета-лактамов на тест-полосках модельного рецепторно-хроматографического анализа

Антибиотик	Максимально допустимый уровень, нг/мл		Предел обнаружения, нг/мл
	молоко	мясо	
Пенициллин G	4	50	1
Ампициллин	4	50	2
Амоксициллин	4	50	2
Цефоперазон	50	—	4
Цефалексин	100	200	200

полоске, которая представляет собой мультимембранный композит. На рабочей нитроцеллюлозной мембране в аналитической зоне иммобилизовали конъюгат ампициллина K7, показавший наилучшие результаты в микропланшетной системе, а контрольную зону формировали адсорбцией антивидовых антител (иммуноглобулины козы против иммуноглобулинов мыши). В подвижной фазе детектирующим реагентом был ПСБ, иммунохимически иммобилизованный через МАт мыши к ПСБ, адсорбированное на золотых наночастицах, которые, в свою очередь, служили колориметрической меткой. В ходе анализа тест-полоску мембраной для образца погружали в раствор, содержащий детектирующий комплекс и исследуемые стандартные пробы с возрастающими кон-

центрациями бета-лактамов (пенициллин G, ампициллин, амоксициллин или цефалексин). При движении раствора вдоль полоски к впитывающей верхней мембране происходило взаимодействие твердофазного конъюгата K7 с меченым ПСБ в аналитической зоне, а затем протекало связывание в контрольной зоне адсорбированных антивидовых антител с МАт в составе детектирующего комплекса. Аналитический процесс состоит из одной стадии и занимает 10 мин. Оценка результатов заключается в визуальном контроле наличия или отсутствия окрашивания в аналитической и контрольной зонах тест-полоски (рис. 4).

Различные бета-лактамы антибиотики в качестве конкурентных ингибиторов связывания

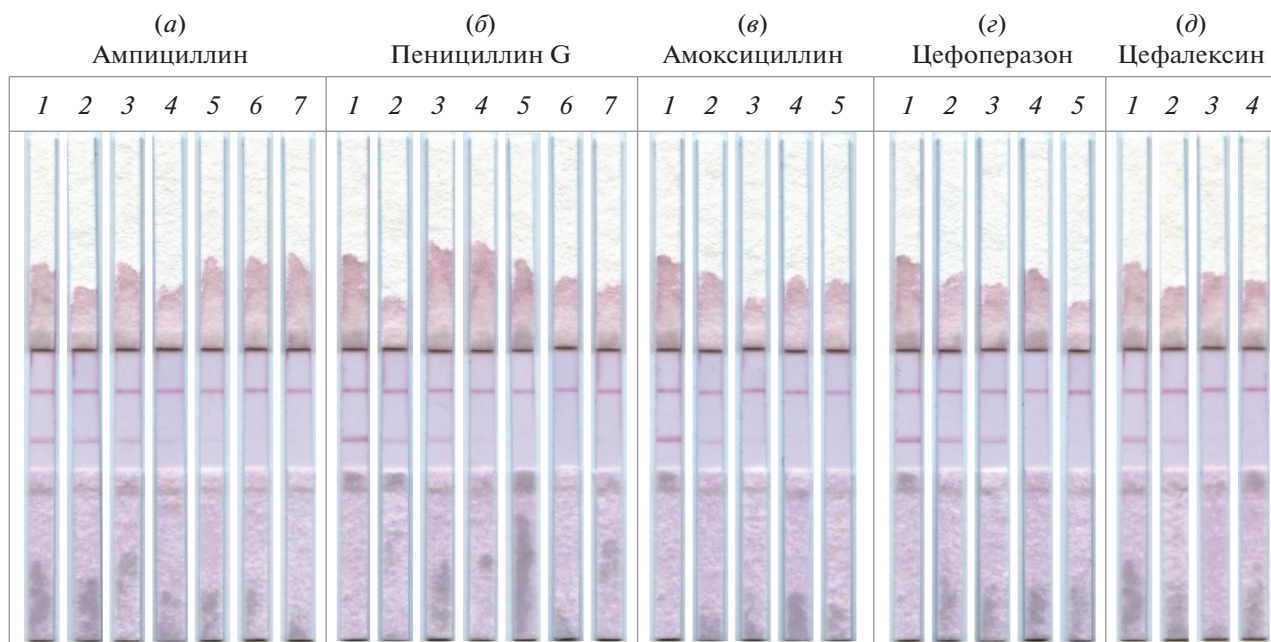


Рис. 4. Взаимодействия меченого золотыми наночастицами комплекса МАт–ПСБ с конъюгатом ампициллина K7 в аналитической зоне и антивидовыми антителами в контрольной зоне тест-полоски при возрастающих концентрациях бета-лактамов в подвижной фазе модельной системы рецепторно-хроматографического анализа: (а) — ампициллин в концентрации 0 (1), 0.25 (2), 0.5 (3), 1.0 (4), 2.0 (5), 3.0 (6) и 5.0 нг/мл (7); (б) — пенициллин G в концентрации 0 (1), 0.25 (2), 0.5 (3), 1.0 (4), 2.0 (5), 3.0 (6) и 5.0 нг/мл (7); (в) — амоксициллин в концентрации 0 (1), 0.5 (2), 1.0 (3), 2.0 (4) и 5.0 нг/мл (5); (г) — цефоперазон в концентрации 0 (1), 1.0 (2), 2.0 (3), 4.0 (4) и 8.0 нг/мл (5); (д) — цефалексин в концентрации 0 (1), 100 (2), 200 (3) и 400 нг/мл (4).

К7 с меченым ПСБ в стандартных растворах с концентрациями 0.25–5.0 нг/мл для пенициллинов и 1–400 нг/мл для цефалоспоринов снижали интенсивность окраски аналитической полосы, что позволило оценить пределы их обнаружения (табл. 4). Показано, что порог визуальной детекции ампициллина, пенициллина G и амоксициллина составляет 1–2 нг/мл, если не рассматривать на данном этапе влияние пищевого матрикса на результаты определений. Так, разработанная рецепторно-хроматографическая система позволяет выявлять перечисленные бета-лактамы в концентрациях даже ниже значений максимально допустимого уровня (МДУ) этих ветеринарных субстанций в продуктах питания [24, 25].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и материалы. В экспериментальной работе использовали 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид (EDC), *N*-гидроксисульфосукцинимид (sNHS), 2-(*N*-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES), бычий сывороточный альбумин (BSA), 30%-ный водный раствор H_2O_2 , 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), тимеросаль (Sigma-Aldrich, США); колонки Zeba для хроматографии под действием гравитационных сил для обессоливания (Thermo Fisher Scientific, США); диметилсульфоксид (Applichem, Германия); хлорид натрия, Tween-20, кислоту лимонную моногидрат (Merck, Германия); сахарозу (Riedel-de-Haën, Германия); колонки с Sephadex G-25 (GE Healthcare, США). Реактивы отечественных и российских производителей: натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный, натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный, гидроокись натрия, соляная кислота, серная кислота, глицерин – имели классификацию не ниже ч.д.а. ЧСА (5%-ный раствор) предоставлен РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Беларусь), антитела козы против иммуноглобулинов мыши получены от УП “ХОП ИБОХ” НАН Беларуси (Беларусь). Конъюгат этих антител с высокоочищенной ($R_z \geq 3.0$) пероксидазой из корней хрена (Диаэм, Россия) синтезировали путем окисления углеводных цепей фермента периодатом натрия, присоединения иммуноглобулина с образованием основания Шиффа и стабилизацией конъюгата восстановлением двойной связи борогидридом натрия. Сухие порошки высокоочищенных антибиотиков: пенициллин G, ампициллин, амоксициллин, цефалексин, цефоперазон, цефтифури, цефепимид – куплены у Sigma-Aldrich, США. ПСБ (рекомбинантный аналог природного рецептора RPR 2x из *Streptococcus pneumoniae* R6) и моноклональные антитела к нему приобретены у Glory Sciences Co., Ltd, КНР (www.glorybios.com).

Для приготовления всех растворов использовали деионизированную воду с удельным электрическим сопротивлением 17–18 МОм см, полу-

ченную в модульной системе очистки воды Agium® pro VF (Sartorius, Германия).

При проведении рецепторно-ферментного анализа в качестве твердофазных носителей использовали разборные полистирольные 96-луночные микропланшеты (ООО “Хема-медика”, Россия). Системы хроматографического анализа на тест-полосках конструировали с применением комплекта мембран из набора MDI Easyrack (Advanced Microdevices, Индия).

Получение белковых конъюгатов бета-лактамов. В трех описанных ниже методиках конъюгаты бета-лактамов с белками синтезировали в присутствии EDC в одну стадию или с использованием EDC/sNHS в две стадии в вариантах первоначальной активации карбоксиллов антибиотика или белка и, соответственно, присоединения бета-лактама через карбоксильную или аминогруппу. В качестве белка-носителя применяли ЧСА в случаях ампициллина и амоксициллина или же ЧСА и овальбумин в случае цефалексина.

Реакция карбодиимидной конденсации в присутствии EDC. Препарат ЧСА растворяли в 0.01 М MES (pH 6.0) с 0.15 М NaCl. К растворам, содержащим 15 мг (225 нмоль), 3 мг (45 нмоль) или 1 мг (15 нмоль) ЧСА, добавляли 0.7 мг (3.7 мкмоль) EDC и 0.8 мг (2.3 мкмоль) ампициллина в 0.01 М MES (pH 6.0), что соответствовало 10-, 50- или 150-кратному мольному избытку антибиотика по отношению к белку. Реакцию конъюгирования проводили в течение 18 ч при 4°C.

Биоконъюгация путем активирования карбоксильных групп антибиотика с использованием EDC/sNHS. Препарат ЧСА растворяли в 0.1 М натрий-фосфатном буфере (PBS), pH 7.4, с 0.15 М NaCl. Препараты антибиотиков растворяли в 0.01 М MES (pH 6.0) с 0.15 М NaCl. К трем растворам антибиотика, содержащим по 0.8 мг (2.3 мкмоль) ампициллина, добавляли 0.8 мг (3.7 мкмоль) sNHS и 0.7 мг (3.7 мкмоль) EDC, инкубировали 15–20 мин при 25°C. Далее вносили растворы белка, содержащие 15 мг (225 нмоль), 3 мг (45 нмоль) или 1 мг (15 нмоль) ЧСА, что соответствовало 10-, 50- или 150-кратному мольному избытку антибиотика в реакционной смеси. Реакцию конъюгирования проводили в течение 18 ч при 4°C.

Конъюгирование за счет карбоксильных групп белка, активированных EDC/sNHS. Препарат ЧСА растворяли в 0.01 М MES (pH 6.0) с 0.15 М NaCl. К растворам, содержащим 15 мг (225 нмоль), 3 мг (45 нмоль) или 1 мг (15 нмоль) ЧСА, добавляли 0.8 мг (3.7 мкмоль) sNHS и 0.7 мг (3.7 мкмоль) EDC, инкубировали 15–20 мин при 25°C. Далее к растворам белка добавляли 0.8 мг (2.3 мкмоль) ампициллина в 0.1 М PBS (pH 7.0) с 0.15 М NaCl,

что соответствовало 10-, 50- или 150-кратному мольному избытку антибиотика по отношению к белку. Реакцию конъюгирования проводили в течение 18 ч при 4°C.

С применением аналогичных подходов были приготовлены конъюгаты цефалексина с ЧСА и овальбумином (10-, 50-, 150-кратный мольный избыток антибиотика в реакциях). Конъюгат амоксициллина с ЧСА синтезировали через NH₂-группу антибиотика с использованием его 150-кратного мольного избытка.

Очистку всех полученных конъюгатов проводили хроматографией под действием гравитационных сил с использованием колонок Zeba, уравновешенных 0.02 М PBS (pH 7.2), содержащим 0.15 М NaCl. Очищенные конъюгаты разбавляли в 2 раза глицерином и хранили при -20°C.

Спектральные измерения. Спектры поглощения растворов антибиотиков и синтезированных конъюгатов измеряли в кювете с длиной оптического пути 1 см с использованием спектрофотометра Tecan Infiniti M200 (Австрия).

Масс-спектры. Масс-спектры MALDI-TOF регистрировали на приборе Microflex LRF (Bruker, Германия). Изменение молекулярной массы (М) белков при конъюгировании ΔМ, выраженное в Да, определяли как разницу в молекулярных массах конъюгата и немодифицированного белка. Степень конъюгирования (1 моль антибиотика на 1 моль белка) рассчитывали как ΔМ/М (антибиотика).

Биоспецифическое связывание и конкурентное ингибирование взаимодействий в рецепторно-ферментных системах. В лунках микропланшета иммобилизовали белковые конъюгаты антибиотиков из 100 мкл раствора с концентрацией 0.1 мкг/мл путем инкубации при 4–8°C в течение 18 ч. Стабилизацию проводили путем внесения во все лунки по 150 мкл 0.05 М PBS (pH 7.4), содержащего 0.15 М NaCl, 0.05% Tween-20, 1 мг/мл BSA, 2% сахарозы, 0.01% эуксил К-100, и выдерживания планшета при 4–8°C в течение 18 ч. Исходные растворы исследуемых антибиотиков в концентрации 4 мг/мл готовили в 0.01 М PBS (pH 7.2), 0.15 М NaCl. Стандарты (калибровочные растворы) готовили в том же буфере в концентрации 0, 0.03–8.0 нг/мл для пенициллина G, амоксициллина, ампициллина, цефоперазона; 0, 0.05–100.0 нг/мл для цефтиофура и цефепима; 1–900 нг/мл для цефалексина.

При проведении анализа в лунки вносили по 50 мкл калибровочных растворов с антибиотиком в возрастающих концентрациях и по 50 мкл предварительно приготовленной смеси, содержащей ПСБ и МАт к нему в концентрациях 0.05 и 0.1 мкг/мл соответственно. Инкубацию системы в планшете проводили при 25°C в течение 30 мин. Далее удаляли непрореагировавшие компоненты и промывали планшет с использованием промы-

вочного раствора (0.01 М PBS, pH 7.2, 0.15 М NaCl, 0.05% Tween-20). На второй стадии вносили в лунки по 100 мкл раствора конъюгата антивидовых антител (иммуноглобулины козы против иммуноглобулинов мыши) с пероксидазой хрена в титре 1 : 25000. После инкубации при 25°C в течение 15 мин содержимое лунок удаляли и промывали планшет, как описано выше. В лунки вносили по 100 мкл хромоген-субстратного раствора, содержащего ТМБ и перекись 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 (ОП₄₅₀) в планшетном спектрофотометре Tecan Infinity M200 (Австрия) и рассчитывали соотношение V_i/V₀ (%), где V₀ – оптическая плотность в отсутствие бета-лактама в растворе, V_i – оптическая плотность в присутствии возрастающих концентраций антибиотика в растворе. Калибровочные графики зависимости конкурентного связывания от концентраций бета-лактама в калибровочных пробах строили в координатах: V_i/V₀ (%), ось ординат – линейная) и концентрация (нг/мл, ось абсцисс – логарифмическая).

Общую чувствительность метода оценивали по графически определенной величине IC₅₀, что соответствует концентрации антибиотика в растворе, вызывающей 50%-ное ингибирование связывания рецептора с твердофазным лигандом (уменьшение V₀ вдвое). Аналитическую чувствительность (предел обнаружения, минимальную достоверно измеряемую концентрацию) получали из калибровочного графика как абсциссу точки V₀ – 2 SD, где SD – среднее квадратичное отклонение. Перекрестную реактивность (ПР) рассчитывали по формуле: ПР (%) = IC₅₀ (пенициллин G)/IC₅₀ (другой антибиотик) × 100.

Рецепторно-хроматографический анализ на тест-полосках. Нанесение реагентов на нитроцеллюлозную мембрану проводили с помощью автоматического диспенсера IsoFlow (Imagene Technology, США). Аналитическую зону тест-полоски формировали путем нанесения конъюгата ампициллина К7 из раствора с концентрацией 0.5 мг/мл, а в контрольной зоне иммобилизовали антивидовые антитела (иммуноглобулины козы против иммуноглобулинов мыши) из раствора с концентрацией 0.25 мг/мл. Функционализированные мембраны высушивали на воздухе при 20–22°C не менее 20 ч и вместе с подложкой для исследуемой пробы и впитывающей мембраной собирали в мультимембранный композит. Тест-полоски нарезали шириной 3.5 мм с помощью автоматического гильотинного нарезчика Index-Cutter 1 (A-Point Technologies, США).

Наночастицы золота получали восстановлением золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия по методу Френса, как описано в работе *Byzova et al.* [26]. Полученные наночастицы в выбранной на основании фотометрических данных концентрации 10 мкг/мл адсорбционно конъюгировали с МАт к ПСБ. Для проведения модельного рецепторно-хроматографического анализа бета-лактамов в лунки инертного пластмассового микропланшета вносили меченный наночастицами золота комплекс МАт–ПСБ и добавляли бета-лактамы (ампициллин, пенициллин G, амоксициллин, цефоперазон или цефалексин) в возрастающих концентрациях в диапазоне 0.25–400 нг/мл. Далее реагенты выдерживали в течение 3–5 мин и в лунку помещали подготовленные тест-полоски. Хроматографию проводили в течение 10 мин и визуально регистрировали окрашивание в аналитической и контрольной зонах.

Все эксперименты по лиганд-рецепторному связыванию проводили не менее чем в трех повторях. Обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel. На калибровочном графике (рис. 3) планки погрешностей обозначают среднеквадратичное отклонение SD.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненного исследования охарактеризованы методики прямого конъюгирования пенициллинов и цефалоспоринов с белковыми макромолекулами (ЧСА и овальбумина) для технологий рецепторного анализа. Установлено влияние модификаций пенициллинов и цефалоспоринов в области бета-лактамного кольца и в боковой цепи на связывание с белком-рецептором, определены спектральные характеристики синтезированных белковых конъюгатов бета-лактамов. Предложены оптимальные условия биоконъюгирования белков с этими субстанциями без предварительного введения линкерных (спейсерных) групп в структуры антибиотиков. Установлено оптимальное мольное соотношение антибиотика и белка-носителя в синтезированном конъюгате для его эффективного взаимодействия с ПСБ. В модельных системах лиганд-рецепторного связывания исследованы биоаналитические свойства полученных конъюгатов. Разработаны конструкции тест-систем для рецепторного анализа бета-лактамов антибиотиков в микропланшетном варианте и в виде хроматографических тест-полосок, характеризующиеся широкой групповой специфичностью и высокой аналитической чувствительностью в отношении пенициллинов и цефалоспоринов.

В ближайшей перспективе описанная в данной работе модельная рецепторно-хроматографическая тест-система для выявления бета-лак-

тамов может стать практическим аналитическим средством экспресс-контроля биобезопасности продуктов питания.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено по теме задания 2.3.1 государственной программы научных исследований “Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия”, финансируемого Национальной академией наук Беларуси.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sachi S., Ferdous J., Sikder M.H., Azizul Karim Husani S.M.* // *J. Adv. Vet. Anim. Res.* 2019. V. 6. P. 315–332.
<https://doi.org/10.5455/javar.2019.f350>
2. *Landers T.F., Cohen B., Wittum T.E., Larson E.L.* // *Public Health Rep.* 2012. V. 127. P. 4–22.
<https://doi.org/10.1177/003335491212700103>
3. *Kantiani L., Farre M., Barcelo D.* // *Trends Anal. Chem.* 2009. V. 28. P. 729–744.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.04.005>
4. *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>
5. *Zhang J., Wang Z., Wen K., Liang X., Shen J.* // *Anal. Biochem.* 2013. V. 442. P. 158–165.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.07.042>
6. *Merola G., Martini E., Tomassetti M., Campanella L.* // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014. V. 106. P. 186–196.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.005>
7. *Abdulla A., Bahmany S., Wijma R.A., van der Nagel B.C.H., Koch B.C.P.* // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2017. V. 1060. P. 138–143.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.06.014>
8. *Briscoe S.E., McWhinney B.C., Lipman J., Roberts J.A., Ungerer J.P.J.* // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2012. V. 907. P. 178–184.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.09.016>
9. *Rawson T.M., Sharma S., Georgiou P., Holmes A., Cass A., O'Hare D.* // *Electrochem. Commun.* 2016. V. 82. P. 1–5.
<https://doi.org/10.1016/j.elecom.2017.07.011>
10. *Merola G., Martini E., Tomassetti M., Campanella L.* // *Sens. Actuators B Chem.* 2014. V. 199. P. 301–313.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.03.083>
11. *Hrioua A., Loudiki A., Farahi A., Bakasse M., Lahrich S., Saqrane S., Mhammedi M.A.El.* // *Bioelectrochemistry.*

2021. V. 137. P. 107687.
<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107687>
12. *Бызова Н.А., Зверева Е.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. С. 685–693. [*Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2011. V. 47. P. 627–634.]
<https://doi.org/10.1134/S0003683811060032>
 13. *Benito-Peña E., Moreno-Bondi M.C., Orellana G., Maquieira Á., van Amerongen A.* // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. P. 6635–6642.
<https://doi.org/10.1021/jf0511502>
 14. *Cliquet P., Goddeeris B.M., Bonroy K., Cox E.* // Food Agric. Immunol. 2005. V. 16. P. 101–115.
<https://doi.org/10.1080/09540100500139239>
 15. *Cliquet P., Cox E., Van Dorpe C., Schacht E., Goddeeris B.M.* // J. Agric. Food Chem. 2001. V. 49. P. 3349–3355.
<https://doi.org/10.1021/jf001428k>
 16. *Macheboeuf P., Contreras-Martel C., Job V., Dideberg O., Dessen A.* // FEMS Microbiol. Rev. 2006. V. 30. P. 673–691.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00024.x>
 17. *Sauvage E., Kerff F., Terrak M., Ayala J.A., Charlier P.* // FEMS Microbiol. Rev. 2008. V. 32. P. 234–258.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x>
 18. *Mbah A.N., Isokpehi R.D.* // Chemother. Res. Pract. 2013. V. 2013. Article ID 614670.
<https://doi.org/10.1155/2013/614670>
 19. *Zeng K., Zhang J., Wang Y., Wang Z.H., Zhang S.X., Chong Ming W.U.* // Biomed. Environ. Sci. 2013. V. 26. P. 100–109.
<https://doi.org/10.3967/0895-3988.2013.02.004>
 20. *Peng J., Cheng G., Huang L., Wang Y., Hao H., Peng D.* // Anal. Bioanal. Chem. 2013. V. 405. P. 8925–8933.
<https://doi.org/10.1007/s00216-013-7311-5>
 21. *Kotova N.S., Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* // Orient. J. Chem. 2020. V. 36. P. 21–25.
<https://doi.org/10.13005/ojcs/360103>
 22. *Вашкевич И.И., Ястребова А.А., Курпиенко О.С., Серченя Т.С., Иванько М.В., Шкиндерова В.О., Пыжик И.П., Смоляк Т.М., Мелещя А.В., Свиридов О.В.* // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. 2020. Т. 56. № 3. С. 318–332.
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-3-318-332>
 23. *Chen W., Huang Z., Hu S., Peng J., Liu D., Xiong Y., Xu H., Wei H., Weihua L.* // J. Dairy Sci. 2019. V. 102. P. 1887–1900.
<https://doi.org/10.3168/jds.2018-15462>
 24. Перечень ветеринарных лекарственных средств (фармакологически активных веществ), максимально допустимые уровни остатков которых могут содержаться в переработанной пищевой продукции животного происхождения, в том числе в сырье, и методик их определения // Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 13.02.2018 г. № 28. <http://pravo.by/document/?guid=3871&p0=F91800044>
 25. 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 15/1. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf
 26. *Byzova N.A., Smirnova N.I., Zherdev A.V., Eremin S.A., Shanin I.A., Lei H.T., Sun Y., Dzantiev B.B.* // Talanta. 2013. V. 119. P. 125–132.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.10.054>

Direct Conjugation of Penicillins and Cephalosporins with Proteins for Receptor Assays of Beta-Lactam Antibiotics

T. S. Serchenya*, #, I. V. Harbachova*, and O. V. Sviridov*

*Phone: +375 (17) 300-57-07; e-mail: serchenya@iboch.by

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, ul. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus

Fifteen protein conjugates of penicillins and cephalosporins containing amino- and/or carboxylic groups in the initial structures have been synthesized in the reactions with human serum albumin or ovalbumin using 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC) or a combination of EDC and *N*-hydroxysulfosuccinimide at various relationships of the basic reagents. A comparative study of conjugates composition and properties have been carried out by UV spectroscopy, mass-spectrometry and a ligand-receptor assay. It was shown that the antibiotic residues content of the obtained macromolecules varied from 1 to 22, the beta-lactam cycle remained intact assuring specific interactions of the conjugates with a penicillin-binding protein. In two developed models of receptor bioanalytic systems, an ampicillin conjugate onto a solid phase binds to penicillin-binding protein complexed with a monoclonal antibody which was detected by an immunoenzyme label in microplate wells or gold nanoparticles on test strips. Conjugated ampicillin binding to the receptor was competitively inhibited by beta-lactam antibiotics added to the liquid phase, and analytical sensitivities relative to penicillin G were 0.05 and 1 ng/mL for microplate and receptor chromatographic systems, respectively.

Keywords: haptен-protein conjugates, beta-lactams, receptor assay, antibiotics