

УДК 579.6

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФАГОВЫХ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ГЕНТАМИЦИНУ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗЕ

© 2025 г. О. И. Гулий^{1,*}, Д. С. Чумаков¹, В. С. Гринёв^{1,2}, О. А. Каравеева¹

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, Федеральный исследовательский центр
“Саратовский научный центр РАН”, Саратов, 410049 Россия

²Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского,
Саратов, 410012 Россия

*e-mail: gulyi_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 16.01.2025 г.

После доработки 01.03.2025 г.

Принята к публикации 03.03.2025 г.

Показана перспективность применения технологии фагового дисплея для получения антигентамициновых антител. Антигентамициновые рекомбинантные антитела впервые получены с использованием овечьей фаговой библиотеки (Griffin.1, UK). Контроль взаимодействия полученных фаговых антител с гентамицином проводили с помощью спектроскопии кругового дихроизма (КД). Показано, что взаимодействие антигентамициновых фаговых антител с соответствующим антибиотиком сопровождалось появлением в спектрах КД характеристичного экситонного дублета: положительного пика при ~233 нм и более интенсивного отрицательного пика с максимумом ~240 нм. Впервые показана возможность индикации гентамицина с помощью тест-системы на основе метода дот-иммуноанализа и антигентамициновых рекомбинантных антител в водных растворах. Нижний предел детекции антибиотика составлял – 0.5 мкг/мл. Методом дот-иммуноанализа установлено, что антигентамициновые фаговые антитела не взаимодействовали с ампициллином и тетрациклином, но взаимодействовали с канамицином (нижний предел детекции – 1 мкг/мл). Результаты являются перспективными для дальнейшего развития методов определения гентамицина с помощью рекомбинантных фаговых антител.

Ключевые слова: гентамицин, дот-иммуноанализ, фаговый дисплей антител

DOI: 10.7868/S3034574X25040105

Антибактериальные препараты существенно улучшили показатели продолжительности жизни и здоровья людей, борясь с широким спектром инфекционных заболеваний [1]. Антибиотики активно применяются не только в медицине, но и для терапии в ветеринарии, а также в качестве стимуляторов роста животных и в кормовых добавках для профилактики развития заболеваний. Нерациональное применение антибиотиков не только в медицине, но и ветеринарии и сельском хозяйстве привело к загрязнению остатками антибактериальных препаратов и их метаболитами поверхностных и грунтовых вод, питьевой воды, городских сточных вод, почвы, ила. Большая часть антибиотиков накапливается в иле, который

впоследствии может быть распространен на сельскохозяйственных угодьях [2]. Попадание в водные ресурсы и дальнейшая циркуляция антибиотиков и продуктов их деградации создает глобальные экологические проблемы для человечества. Отсутствие антибиотиков является одним из важнейших показателей качества питьевой воды [3]. Остатки антибиотиков, обнаруживаемые в питьевой воде, могут не только приводить к неблагоприятному воздействию на здоровье человека, но и способствовать формированию устойчивости к противомикробным препаратам. Особую опасность представляют аминогликозидные антибиотики, суммарный объем продаж которых составляет 6.5% от общего объема реализации антибиотиков

(по данным, собранным для 31 европейской страны на 2022 г.) [4]. Гентамицин, как представитель аминогликозидных антибиотиков, достигает антибактериального эффекта, вмешиваясь в синтез бактериальных белков, проникает через клеточную мембрану бактерий, необратимо связывается с А-сайтом 30S субъединиц бактериальных рибосом (сайт связывания тРНК), угнетая синтез белка возбудителя. Гентамицин широко используется при лечении бактериальных инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, кроме того, проявляет активность в отношении аэробных грамположительных кокков, в том числе устойчивых к пеницилинам и другим антибиотикам [5–6]. В животноводстве и сельскохозяйственном производстве гентамицин применяется для лечения инфекций крупного рогатого скота, свиней и птицы, также его добавляют в корм животных. Остатки гентамицина с питьевой водой, молоком, яйцами, мясом попадают в организм человека [7]. Чрезмерные концентрации гентамицина могут приводить к негативным последствиям для здоровья человека, что проявляется в потере слуха, нефротоксичности и аллергических реакциях на лекарственные препараты [8, 9]. О высокой токсичности гентамицина свидетельствует тот факт, что Европейская комиссия установила максимальный предел остаточных количеств для гентамицина в молоке на уровне 100 мкг/кг (173.7 нМ), что ниже, чем у других аминогликозидных антибиотиков [10]. Нижние пределы количественного определения антибиотиков в питьевой воде должны быть < 1 нг/л. Концентрации антибактериальных средств в загрязненной водопроводной воде варьируются от 0.3 до 5 нг/л, при средней концентрации 2 нг/л [11], поэтому исследования, направленные на развитие ускоренных и простых методов индикации гентамицина в воде, являются приоритетными и представляют большой интерес для специалистов во всем мире.

Среди часто применяемых методов для анализа гентамицина можно выделить методы на основе хроматографии, в том числе высокоэффективная жидкостная хроматография, жидкостная хроматография с масс-спектрометрией, капиллярный электрофорез, иммуноферментный анализ и спектрофлуориметрия образцов, хемилюминесцентный иммуноферментный анализ и др. [3, 10, 12–14]. Весьма успешными для анализа антибиотиков, в том числе гентамицина, являются разнообразные сенсорные системы [10, 15–20].

В качестве узнающего компонента аналитических систем могут выступать антитела, полученные с помощью технологии фагового дисплея. Фаговый дисплей антител зарекомендовал себя как надежный и эффективный молекулярный метод для создания обширных библиотек, содержащих миллионы или даже миллиарды различных пептидов или белков. Он включает в себя пакет-

ное клонирование ДНК, кодирующей миллионы вариантов определенных лигандов (например, пептидов и белков или их фрагментов) в геном фага как часть одного из белков оболочки фага (р III, р VI или р VIII). Экспозиция белков или полипептидов на поверхности фага достигается путем слияния кодирующей последовательности одного из белков оболочки с интересующим геном, что помогает изолировать специфические связывающие лиганды с помощью серии рекурсивных циклов отбора на антигене или лиганде, каждый цикл которого включает связывание, промывку, элюцию и амплификацию [21]. Успешность применения фаговых антител показана при определении бактерий [22–27], вирусов [24, 25, 28–30], диагностически важных антигенов и биомаркеров [25, 31–34], а так же некоторых антибиотиков: ампициллина [35] и канамицина [36]. В известных литературных источниках отсутствуют данные о наработке антител, специфичных к гентамицину, с использованием технологии фагового дисплея. Успех применения антител, полученных с использованием технологии фагового дисплея, в качестве распознающего компонента аналитических систем зависит от отработки методики их получения.

Цель работы – получение антигентамициновых фаговых антител и демонстрация возможности их применения для определения гентамицина с помощью метода дот-иммуноанализа.

МЕТОДИКА

Бактериальная культура и питательные среды. Использованы бактерии *Escherichia coli* XL-1 Blue (IBPPM 632), полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (Россия, <http://collection.ibppm.ru>). Культуры выращивали на жидкой питательной среде 2×TY следующего состава (г/100 мл воды): NaCl – 0.5; триптон (“Becton, Dickinson and Company”, Франция) – 1.6; дрожжевой экстракт – 1.0, при 37°C с перемешиванием при 160 об./мин.

В работе использовали антибиотики: канамицин, ампициллин, тетрациклин, гентамицин (“Sigma Aldrich”, США).

Аффинная селекция антител. Аффинная селекция антител из фаговой библиотеки проводилась с помощью фаговой библиотеки антител овцы, которая была предоставлена в ИБФРМ РАН У. Харрисом (Университет г. Абердин, Великобритания) [37]. В работе использовали хелперный бактериофаг M13K07 (“Stratagene”, Швеция).

Синтез белковых конъюгатов гентамицина проводили по методике, описанной в работе [38].

Для селекции фагов, несущих антитела к конъюгатам гентамицина с бычьим сывороточным альбумином (БСА), в качестве твердой фазы для закрепления антигена использовали мембрану “Western S”,

как описано ранее [36, 37]. Блокировку незанятого антигеном пространства на стенках планшета проводили 2%-ным раствором, приготовленным из сухого обезжиренного молока ("Scharlau", Испания), в течение 1 ч. Элюцию фаговых частиц проводили триэтиламиноом. Элюированные фаговые частицы использовали для инфицирования клеток *E. coli* штамма XL-1. Методика получения фаговых антител подробно описана в работе [36].

Отбор фаговых частиц библиотеки или аффинная селекция включала этапы:

- инкубирование клонов библиотеки с иммобилизованным антигеном (гентамицином);
- удаление методом отмывки фаговых частиц, которые не связались с антибиотиком;
- элюирование связавшихся с гентамицином фаговых частиц;
- заражение отобранными клонами клеток *E. coli* и проведение амплификации с последующим выделением аффинных клонов, как описано ранее [36, 39].

Концентрацию фаговых частиц определяли на спектрофотометре UV-VIS Specord BS 250 ("Analytik Jena AG", Германия) в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии "Симбиоз" ИБФРМ РАН, используя для расчетов следующую формулу:

$$(A_{269} - A_{320}) \times 10^{14}/15, \quad (1)$$

где A_{320} – оптическая плотность суспензии фагов при длине волны электромагнитного излучения 320 нм; A_{269} – оптическая плотность суспензии фагов при длине волны электромагнитного излучения 269 нм.

С учетом соотношения, при котором 2×10^{14} фаговых частиц/мл соответствуют 30 оптическим единицам, как описано в работе [40].

Полученный препарат фаговых частиц использовали для проведения последующих раундов селекции, осуществляемых в аналогичных условиях. Титр сыворотки определяли с помощью ИФА по методике [41]. Титр (предельное разведение сыворотки, при котором могут быть обнаружены антигентамициновых фаговых антител составил 1 : 2400.

Наночастицы золота (НЧЗ). НЧЗ со средним диаметром частиц (15 нм) получали, используя реакцию восстановления золотохлористоводородной кислоты ("Sigma Aldrich", США) цитратом натрия ("Fluka", Швейцария) по методу, описанному в работе [42]. К кипящему 0.01%-ному раствору золотохлористоводородной кислоты добавляли 7.75 мл 1%-ного водного раствора цитрата натрия. После смешивания реагентов продолжали кипячение еще в течение 20 мин. Отмечалось формирование золя,

имеющего красный цвет. Размер полученных наночастиц контролировали спектрофотометрически, а также с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и регистрации динамического рассеяния света (ДРС), как описано в работе [43].

Получение конъюгатов наночастиц золота и протеина А. Смешивали 150 мкл 1 мг/мл протеина А и 25 мл раствора НЧЗ с $A_{518} = 1$, перемешивали 10 мин и затем вносили в реакционную смесь 500 мкл 1%-ного ПЭГ-20000. Перемешивали еще 5 мин и центрифугировали при 12000 *g* в течение 40 мин. Супернатант удаляли, осадок перерастворяли в 10 мМ фосфатном буферном растворе (ФБР), содержащем 0.02 М NaN_3 , 0.02%-ный ПЭГ-20000, 30%-ный глицерин, таким образом, чтобы уменьшить объем в 5 раз по сравнению с исходным образцом конъюгата. Оптическая плотность при $\lambda = 519$ нм исходного образца составляла 1.0. Сконцентрированные образцы конъюгатов хранили при -20°C .

Дот-иммуноанализ. Для дот-иммуноанализа использовали мембрану "Western S" ("Sigma-Aldrich", США), которую предварительно погружали в раствор метанола на 30 с. Методика проведения описана в работе [36]. Гентамицин наносили на мембрану "Western S" в концентрациях от 0.5 до 24 мкг/мл в виде точек. После высушивания проводили блокирование мембраны с нанесенным на нее антигеном (антибиотиком) 2%-ным сухим молоком, разведенным в 10 мМ в ФБР (рН 7.2) в течение часа. Затем мембрану погружали в раствор специфических фагмид (разведение 1×10^{13} фагмид в 1 мл 10 мМ фосфатного буфера) и инкубировали в течение ночи при $+4^\circ\text{C}$. Затем мембрану отмывали от неспецифически связавшихся фаговых антител в ФБР и погружали в кроличьи антифаговые антитела ($A_{520} = 0.5$) при $+25^\circ\text{C}$ на 1 ч, затем отмывали в ФБР и погружали в раствор конъюгата наночастиц золота с протеином А для визуализации специфического взаимодействия. При наличии биоспецифического взаимодействия антитела связывались с антигеном, адсорбированным на мембране, что можно было визуально наблюдать в виде серии красных пятен.

Измерение спектров кругового дихроизма (КД) проводили на спектрометре Chirascan ("Applied Photophysics", Великобритания), снабженном системой постоянной продувки азотом особой чистоты (99.996%, объемная доля кислорода не более 0.001%). Для регистрации спектров использовалась свободная от внутренних напряжений стекла и предназначенная для поляризационных измерений кварцевая кювета 101-QS P ("Hellma Analytics", Германия) с длиной оптического пути 1 мм. Диапазон измерений 180–280 нм с шагом в 1 нм, скорость сканирования 4 нм/с, результаты измеренной эллиптичности представлены в миллиградусах (mdeg). В качестве раствора сравнения

регистрировался спектр соответствующего растворителя в аналогичных условиях. Измерения проводились при комнатной температуре в ЦКП “Симбиоз” при ИБФРМ РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены характеристики наночастиц: электронно-микроскопическое изображение НЧЗ (рис. 1а), диаграмма распределения наночастиц по размерам (рис. 1б) и их спектр поглощения (рис. 1в). Полученные наночастицы характеризовались высокой степенью монодисперсности. Средний размер НЧЗ, по данным обсчета 100 частиц на ПЭМ-изображении, составил 15.4 ± 1.2 нм. Согласно ДРС, в растворе наночастицы имели узкий диапазон распределения по размеру, средневзвешенный гидродинамический диаметр согласовывался с данными ПЭМ (рис. 1б). Для НЧЗ был характерен максимум поглощения в зеленой спектральной области $\lambda = 519$ нм. Данное положение максимума типично для НЧЗ, имеющих размер 15 нм [44]. Полученные НЧЗ использовали для конъюгации с протеином А и визуализации специфического взаимодействия фаговых антител с соответствующим антибиотиком методом дот-иммуноанализа.

Для получения антигентамициновых антител были проведены с первого по четвертый раунды селекции фаговых антител, специфичность которых в отношении гентамицина проверяли после каждого раунда селекции с помощью метода дот-иммуноанализа. Поскольку специфичность антител в отношении гентамицина увеличилась после 2 раунда селекции антител, результаты дот-иммуноанализа по оценке взаимодействия антигентамициновых фаговых антител с гентамицином представлены на рис. 2 после 2 (рис. 2а) и 3 (рис. 2б) раундов селекции. Установлено, что конъюгат связывался с комплексом гентамицин (антиген) – специфичные антигентамициновые фаговые антитела, что можно визуально наблюдать в виде серии розовых пятен.

После 4 раунда селекции антигентамициновых антител визуально регистрируемый результат их взаимодействия с соответствующим антибиотиком методом дот-иммуноанализа является более показательным, можно наблюдать хорошо различимое связывание метки, отличное от фонового уровня. На следующем этапе проводили исследования по определению гентамицина с помощью тест-системы на основе метода дот-иммуноанализа и антигентамициновых рекомбинантных антител после 4 раунда селекции. Полученные результаты представлены на рис. 2в, в данном случае был увеличен диапазон определяемых концентраций. Как видно из данных, представленных на рис. 2, минимальная визуально детектируемая концентрация гентамицина, определяемая с помощью метода дот-иммуноанализа и полученных антигентамициновых фаговых антител, составляла 0.5 мкг/мл.

Для контроля взаимодействия антигентамициновых фаговых антител с соответствующим антибиотиком проведены исследования с помощью измерения спектров кругового дихроизма. Круговой дихроизм (циркулярный дихроизм) – один из эффектов оптической анизотропии, проявляющийся в различии коэффициентов поглощения левого и правого циркулярно-поляризованного света. Преимуществом спектроскопии кругового дихроизма является возможность детекции процесса специфического связывания при низкой концентрации анализируемых компонентов в биологической пробе (до 20 мкг/мл). Кроме того, метод не требует значительных материальных и технических затрат и позволяет использовать различные биологические агенты для исследования [45].

Спектры кругового дихроизма до (линия 1) и после (линия 2) взаимодействия антигентамициновых антител с соответствующим антибиотиком характеризуются наличием экситонного дублета: положительного пика при ~ 233 нм и более интенсивного отрицательного пика с максимумом ~ 240 нм (отмечено пунктирными стрелками, рис. 3). Изменения сигнала КД в этой части спек-

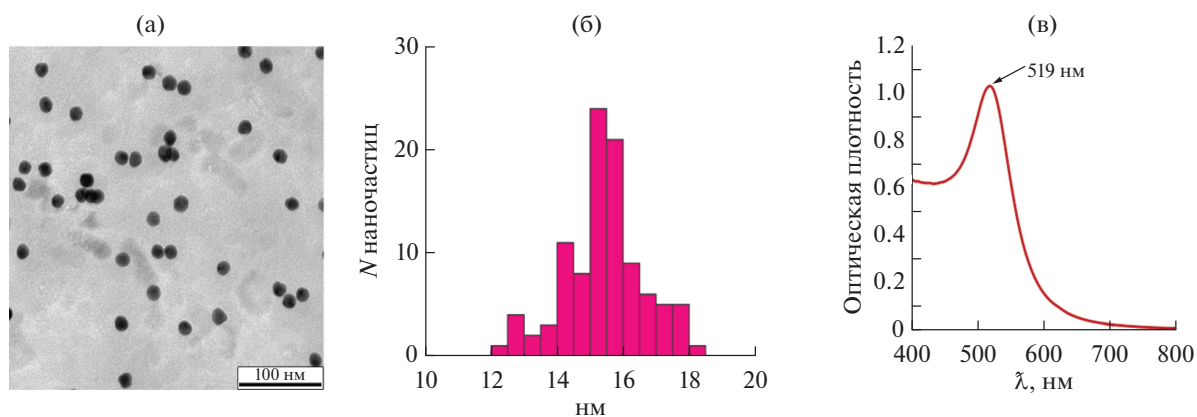


Рис. 1. Электронно-микроскопическое изображение НЧЗ (а), диаграмма распределения наночастиц по размерам (б), спектр оптической плотности НЧЗ (в).

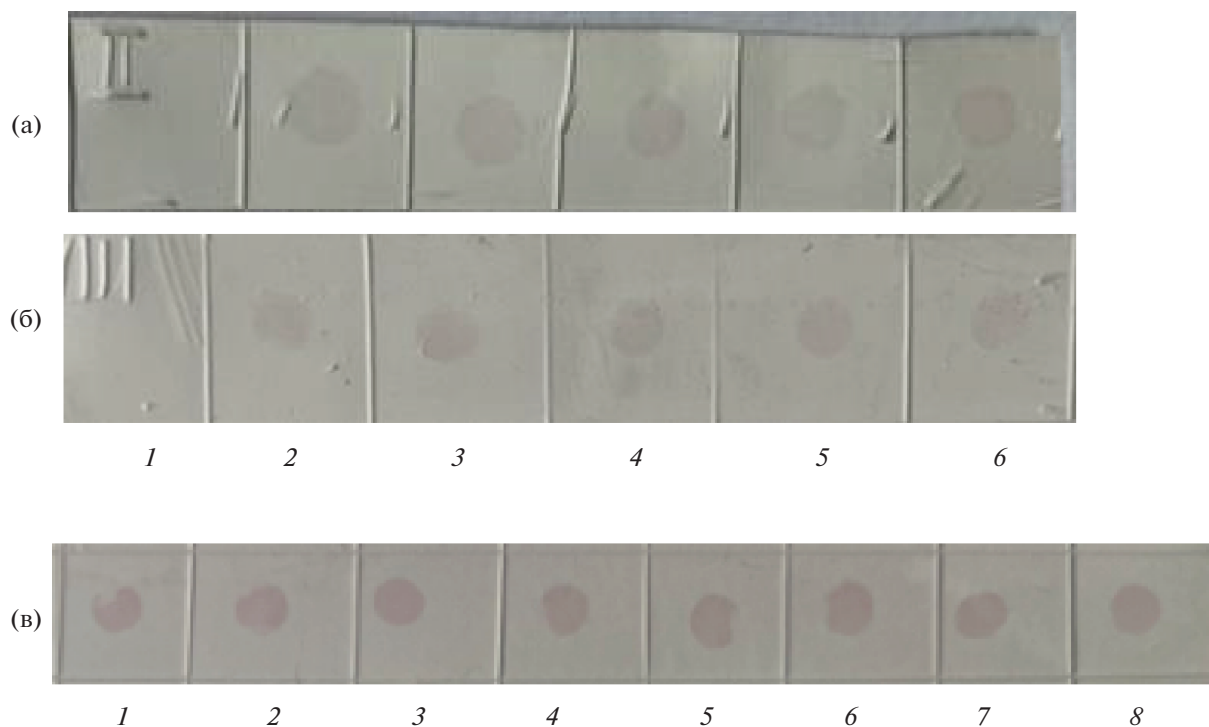


Рис. 2. Дот-иммуноанализ фаговых антител, специфичных к гентамицину, полученных после 2 (а) и 3 (б) раундов селекции, при определении гентамицина в концентрации: 1 – контроль (без антибиотика); 2 – 0.5; 3 – 1.0; 4 – 4.0; 5 – 6.0; 6 – 12 мкг/мл; после 4-го раунда (в) селекции, при определении гентамицина в концентрации (мкг/мл): 1 – 0.5; 2 – 1.0; 3 – 2.0; 4 – 4.0; 5 – 6; 6 – 8; 7 – 12; 8 – 24.

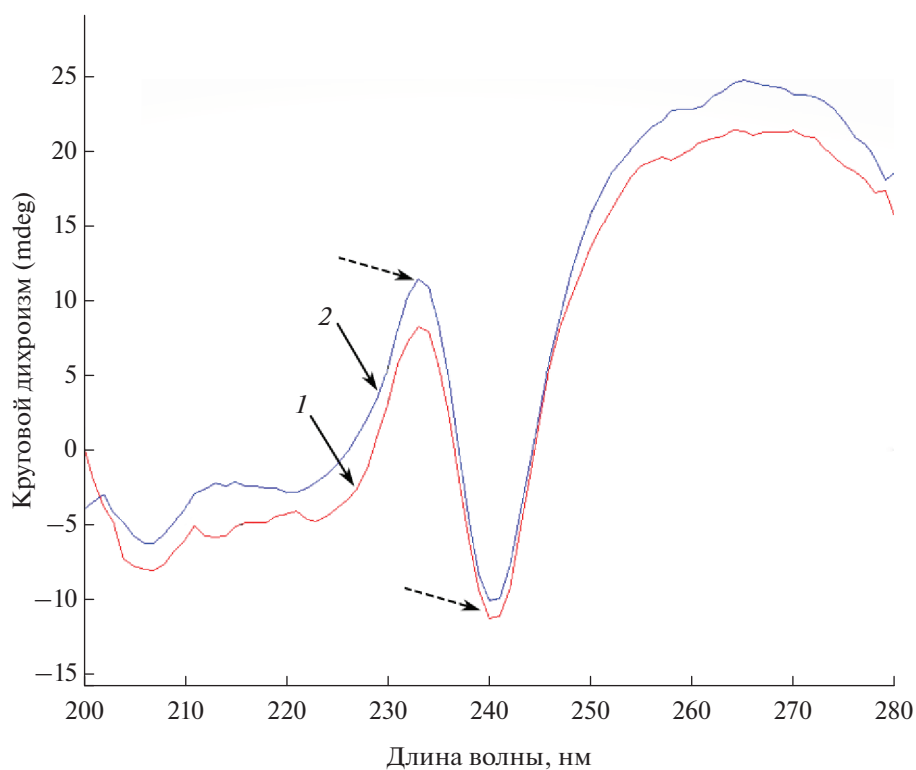


Рис. 3. Спектры кругового дихроизма до (1) и после (2) взаимодействия антигентамициновых фаговых антител с гентамицином (1 мкг/мл).

тра отражают конформационные перестройки в вариабельной области фаговых антител и зависят от степени связывания антител с антигеном, что согласуется с данными, представленными в работе [46]. Изменения интенсивности пиков указывали на то, что один или оба хромофора, вовлеченные в экситонную пару отсутствуют и/или их конформация, либо пространственное расположение неблагоприятны, по сравнению с нативным состоянием. Связывание антибиотика со специфичными фаговыми антителами, вероятно, приводит к образованию агрегирующих ассоциатов, что сопровождается изменением эллиптичности и, соответственно, изменению спектрального профиля КД.

На основании данных дот-иммуноанализа и результатов измерения спектров кругового дихроизма можно заключить, что фаговые антитела, специфичные к гентамицину, взаимодействуют с сайтами связывания антибиотика и могут быть использованы в качестве узнающего компонента при его определении.

Немаловажным моментом является сохранение активности фаговых антител в процессе хранения. Для этого полученные фаговые антитела хранили при температуре -4°C и проверяли сохранение их активности в отношении гентамицина методом дот-иммуноанализа один раз в месяц. Установлено, что антигентамициновые фаговые антитела сохраняли свою активность в отношении гентамицина в процессе хранения в течение 4 месяцев (на момент написания публикации), с сохранением предела детекции.

Для экспериментов по оценке специфичности фаговых антител, специфичных к гентамицину, использовали антибиотики, которые относятся к разным классам:

– ампициллин – представитель бета-лактамов антибиотиков (сведения по бета-лактамам антибиотикам приводятся совместно с пенициллинами, занимают 1 место по объему продаж среди всех антибиотиков);

– тетрациклин – представитель тетрациклинов (занимает 2 место по объему продаж среди всех антибиотиков) [4].

Условия проведения анализа для всех антибиотиков были аналогичны тем, которые были и при использовании гентамицина. При тестировании антигентамициновых антител в отношении тетрациклина и ампициллина методом дот-иммуноанализа после 2, 3 и 4 раундов селекции антител не зафиксировано связывание антител с антибиотиками. Из данных, представленных на рис. 4 видно, что антигентамициновые антитела после 4 раунда селекции антител не взаимодействовали с тетрациклином (рис. 4а) и ампициллином (рис. 4б).

При разработке специфичного рецептора для определения антигена одним из важных моментов является анализ возможности неспецифичного взаимодействия с другими анализитами близкими по химической структуре. Поэтому был проведен анализ возможности неспецифичного взаимодействия антигентамициновых фаговых антител с другими представителями аминогликозидных антибиотиков. В работе использовали канамицин. Из результатов, представленных на рис. 4в видно, что конъюгат связывался с комплексом антиген-антитело, что можно было визуально наблюдать в виде серии красных пятен. Связывание наблюдалось при концентрации канамицина 1 мкг/мл (различимое связывание метки, отличное от фонового уровня). Следовательно, полученные в работе антигентамициновые фаговые антитела способны детектировать не только гентамицин, но и канамицин. Специфичность антигентамициновых антител в отношении гентамицина и канамицина

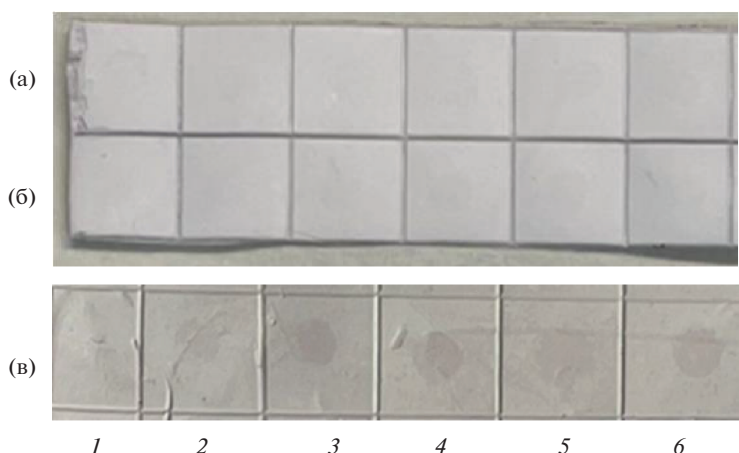


Рис. 4. Дот-иммуноанализ фаговых антител, специфичных к гентамицину, при определении ампициллина (а), тетрациклина (б) и канамицина (в) в концентрации: 1 – контроль (без антибиотика); 2 – 0.5; 3 – 1.0; 4 – 4.0; 5 – 6.0; 6 – 12 мкг/мл.

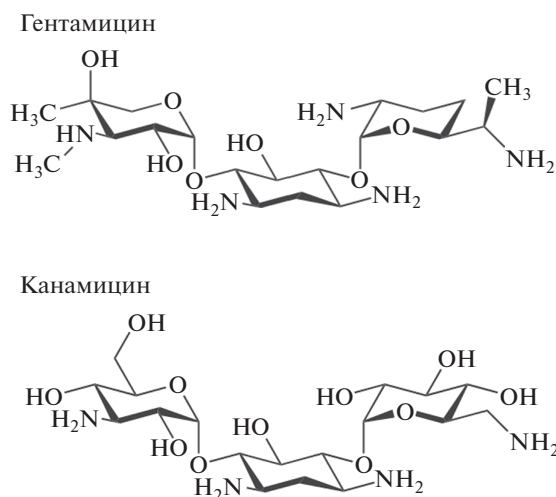


Рис. 5. Структурные формулы гентамицина и канамицина.

может быть обусловлена тем, что оба антибиотика принадлежат к группе аминогликозидов и обладают близкими структурными формулами, которые представлены на рис. 5.

Таким образом, данное исследование включает демонстрацию возможности применения технологии фагового дисплея для получения антигентамициновых антител. Методом дот-иммуноанализа при биоспецифичном взаимодействии отобранных антигентамициновых фаговых антител проведено определение гентамицина и канамицина в водных растворах, при минимальной определяемой концентрации 0.5 и 1 мкг/мл соответственно (различимое связывание метки, отличное от фонового уровня). Показано, что антигентамициновые фаговые антитела не взаимодействовали с ампициллином и тетрациклином.

Полученные результаты имеют большой потенциал для развития методов определения антибиотиков с использованием фаговых антител. Представленный дизайн исследований по получению антител и их применению для индикации гентамицина может быть адаптирован для других антибактериальных препаратов.

Исследования проводились с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Симбиоз” (ЦКП “Симбиоз”) ИБФРМ РАН (г. Саратов, Россия).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного Фонда проект № 24-24-00309.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dawadi S., Thapa R., Modi B., Bhandari S., Timilsina A.P.; Yadav R.P. et al. // *Processes* 2021. V. 9. № 9. P. 1500. <https://doi.org/10.3390/pr9091500>
2. Larsson D.G. // *Ups. J. Med. Sci.* 2014. V. 119. № 2. P. 108–112. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.896438>
3. Sadrolhosseini A.R., Hamidi S.M., Mazhdi Y. // *Measurement*. 2025. V. 239. 115412. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2024.115412>
4. Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 31 European Countries in 2022' (EMA/299538/2023). Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2023. <https://doi.org/10.2809/895656>
5. Riviere J.E., Spoo J.W. In: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, / Ed. H.R. Adams. Iowa State University Press, 2001. P. 841–867.
6. Robert F.W.M., Melanie S.J. // *Aust. Prescr.* 2010. V. 33. P. 134–135. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2010.062>
7. Gehring R., Haskell S.R., Payne M.A., Craigmill A.L., Webb A.I., Riviere J.E. // *J. Am. Vet. Med. A.* 2005. V. 227. P. 63–66. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.63>
8. Hayward R.S., Harding J., Molloy R., Land L., Longcroft-Neal K., Moore D., Ross J.D.C. // *Br. Clin. Pharmacol.* 2018. V. 84. № 2. P. 223–238. <https://doi.org/10.1111/bcp.13439>
9. LeBrun M., Grenier L., Gourde P., Bergeron M.G., Labrecque G. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. V. 43. № 5. P. 1020–1026. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.5.1020>
10. Zhang S., Geng Y., Ye N., Xiang Y. // *Microchem. J.* 2020. V. 158. 105190. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105190>
11. Segura P.A., François M., Gagnon C., Sauvé S. // *Environ. Health Perspect.* 2009. V. 117. № 5. P. 675–684. <https://doi.org/10.1289/ehp.11776>
12. Deng W., Wang D., Dai P., Hong Y., Xiong J., Duan L. et al. // *Microchem. J.* 2024. V. 197. 109706. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109706>
13. Dai P., Zhang Y., Hong Y., Xiong J., Du H., Duan L. et al. // *Food Chem.* 2023. V. 400. 134067. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134067>
14. Jin Y., Jang J.W., Han C.H., Lee M.H. // *J. Agric. Food Chem.* 2005. V. 53. № 20. P. 7639–7643. <https://doi.org/10.1021/jf050484o>
15. Ramalingam S., Collier C.M., Singh A. // *Biosensors* 2021. V. 11. 29. <https://doi.org/10.3390/bios1102029>

16. *Burç M., Duran S.T., Güngör Ö., Köytepe S.* // *Electroanalysis* 2022. V. 34. № 7. P. 1212–1226.
<https://doi.org/10.1002/elan.202100630>
17. *Guo X., Guo Y., Chen X.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. V. 25. № 4. 2143.
<https://doi.org/10.3390/ijms25042143>
18. *Li K.W., Yen Y.K.* // *Biosens Bioelectron.* 2019. V. 130. P. 420–426.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.014>
19. *Guliy O.I., Zaitsev B.D., Borodina I.A.* In: *Nanobio-analytical Approaches to Medical Diagnostics.* / Eds: P.K. Maurya, P. Chandra Elsevier Ltd. Woodhead Publishing, 2022. Chapter 5. P. 143–177. ISBN 978-0-323-85147-3.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85147-3.00004-9>
20. *Guliy O.I., Zaitsev B.D., Borodina I.A.* // *Sensors.* 2023. V. 23. 6292.
<https://doi.org/10.3390/s23146292>
21. *Bashir S., Paeshuyse J.* // *Antibodies.* 2020. V. 9. 21.
<https://doi.org/10.3390/antib9020021>
22. *Guliy O.I., Evstigneeva S.S., Dykman L.A.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2022. V. 58. Suppl. 1. P. S32–S46.
<https://doi.org/10.1134/S0003683822100076>
23. *Moreira G.M.S.G., Gronow S., Dübel S., Mendonça M., Moreira Â.N., Conceição F.R. et al.* // *Front. Public Health.* 2022. V. 10. 712657.
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.712657>
24. *Huang J.X., Bishop-Hurley S.L., Cooper M.A.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. V. 56. № 9. P. 4569–4582.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00567-12>
25. *Roth K.D.R., Wenzel E.V., Ruschig M., Steinke S., Langreder N., Heine P.A. et al.* // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021. V. 11. 697876.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.697876>
26. *Kulkarni A., Mochnáčová E., Majerova P., Čurlík J., Bhide K., Mertinková P. et al.* // *Front. Mol. Biosci.* 2020. V. 7. 573281.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.573281>
27. *Nian S., Wu T., Ye Y., Wang X., Xu W., Yuan Q.* // *BMC Immunol.* 2016. V. 17. P. 8.
<https://doi.org/10.1186/s12865-016-0146-z>
28. *Salem R., El-Kholy A.A., Ibrahim M.* // *Virology* 2019. V. 533. P. 145–154.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.05.012>
29. *Guliy O.I., Evstigneeva S.S., Khanadeev V.A., Dykman, L.A.* // *Biosensors* 2023. V. 13. 640.
<https://doi.org/10.3390/bios13060640>
30. *Petrenko V.A., Gillespie J.W., De Plano L.M., Shokhen M.A.* // *Viruses.* 2022. V. 14. 384.
<https://doi.org/10.3390/v14020384>
31. *Sadraeian M., Maleki R., Moraghebi M., Bahrami A.* // *Molecules.* 2024. V. 29. 3002.
<https://doi.org/10.3390/molecules29133002>
32. *Guliy O.I., Evstigneeva S.S., Dykman L.A.* // *Biosens. Bioelectron.* 2023. V. 222. P. 114909.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114909>
33. *Staroverov S.A., Volkov A.A., Fomin A.S., Laskavuy V.N., Mezheny P.V., Kozlov S.V. et al.* // *J. Immunoassay Immunochem.* 2015. V. 36. P. 100–110.
<https://doi.org/10.1080/15321819.2014.899257>
34. *Petrenko V.A.* // *Viruses* 2024. V. 16. 968.
<https://doi.org/10.3390/v16060968>
35. *Guliy O.I., Alsowaidi A.K.M., Fomin A.S., Gaba-lov K.P., Staroverov S.A., Karavaeva O.A.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2022. V. 58. № 5. P. 646–651.
<https://doi.org/10.1134/S0003683822050088>
36. *Guliy O.I., Evstigneeva S.S., Staroverov S.A., Fomin A.S., Karavaeva O. A.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2023. V. 59. № 5. P. 716–722.
<https://doi.org/10.1134/S0003683823050071>
37. *Charlton, K.A., Moyle, S., Porter, A.J.R., Harris, W.J.* // *J. Immunol.* 2000 V. 164. P.6221–6229.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6221>
38. *Wei Q., Zhao Y., Du B., Wu D., Li H., Yang M.* // *Food Chem.* 2012. V. 134. № 3. P. 1601–1606.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.126>
39. *Aripov V.S., Volkova N.V., Ilyichev A.A., Shcherba-|kov D.N.* // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2024. V. 28. № 2. P. 249–257.
<https://doi.org/10.18699/vjgb-24-29>
40. *Smith G.P., Scott J.K.* // *Methods Enzymol.* 1993. V. 217. P. 228–257.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)17065-D](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)17065-D)
41. *Shah K., Maghsoudlou P.* // *Br. J. Hosp. Med.* 2016. V. 77. P. 98–101.
<https://doi.org/10.12968/hmed.2016.77.7.C98>
42. *Frens G.* // *Nat. Phys. Sci.* 1973. V. 241. P. 20–22.
<https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
43. *Guliy O.I., Zaitsev B.D., Burygin G.L., Karavaeva O.A., Fomin A.S., Staroverov S.A.* // *Ultrasound Med. Biol.* 2020. V. 46. P. 1727–1737.
<https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2020.03.014>
44. *Khlebtsov N.G., Dykman L.A., Khlebtsov B.N.* // *Russ. Chem. Rev.* 2022. V. 91. P. 1–29.
<https://doi.org/10.57634/RCR5058>
45. *Chang Y.-M., Chen Cammy K.-M., Hou M.-H.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. V. 13. P. 3394–3413.
<https://doi.org/10.3390/ijms13033394>
46. *Bruque M.G., Rodger A., Hoffmann S.V., Jones N.C., Aucamp J., Dafforn T.R. et al.* // *Anal. Chem.* 2024. V. 96. P. 15151–15159.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c01882>

Production of Recombinant Phage Antibodies Specific to Gentamicin and Their Use in Dot Immunoassay

O. I. Guliy^{a, *}, D. S. Chumakov^a, V. S. Grinev^{a, b}, O. A. Karavaeva^a

^a*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – Subdivision Research Institution Saratov Federal Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS), Saratov, 410049 Russia*

^b*Institute of Chemistry, N. G. Chernyshevsky Saratov National Research State University, Saratov, 410012 Russia*

*e-mail: guliy_olga@mail.ru

The potential of using phage display technology to obtain antigentamicin antibodies has been demonstrated. Antigentamicin recombinant antibodies were obtained for the first time using a sheep phage library (Griffin.1, UK). The interaction between obtained phage antibodies and gentamicin was monitored using a circular dichroism spectroscopy. It was shown that the interaction between antigentamicin phage antibodies and corresponding antibiotic is characterized by the presence of a characteristic exciton doublet: a positive peak at ~233 nm and a more intense negative peak with a maximum at ~240 nm. The possibility of gentamicin indication using a test system based on the dot immunoassay method and antigentamicin recombinant antibodies in aqueous solutions has been demonstrated for the first time; the lower limit of antibiotic detection is 0.5 µg/ml. Using the dot immunoassay method, it was found that antigentamicin phage antibodies did not exhibit activity towards ampicillin and tetracycline, but showed activity towards kanamycin (lower limit of detection – 1 µg/ml). The results are promising for further development of methods for gentamicin detection using recombinant phage antibodies.

Keywords: gentamicin, dot immunoassay, phage antibody display