

УДК 579.6

ФАГОВЫЕ АНТИТЕЛА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАНАМИЦИНА

© 2023 г. О. И. Гулий^{1, *}, С. С. Евстигнеева¹, С. А. Староверов^{1, 2}, А. С. Фомин¹, О. А. Караваева¹

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ
“Саратовский научный центр РАН” (ИБФРМ РАН), Саратов, 410049 Россия

² Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии
им. Н.И. Вавилова, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: guliy_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 07.04.2023 г.

После доработки 21.04.2023 г.

Принята к публикации 28.04.2023 г.

Получены рекомбинантные антитела, специфичные к канамицину, с использованием овечьей дисплейной библиотеки фрагментов scFv (Griffin.1) и показана возможность их применения для определения канамицина методом дот-иммуноанализа. Минимальная определяемая концентрация канамицина составляет 1 мкг/мл (различимое связывание метки, отличное от фонового уровня). Показано, что антиканамициновые фаговые антитела обладали специфичностью в отношении канамицина и не взаимодействовали с другими антибиотиками (неомицином, тетрациклином, ампициллином, гентамицином). Антиканамициновые фаговые антитела являются перспективной альтернативой моноклональным антителам для использования при определении канамицина.

Ключевые слова: фаговый дисплей антител, канамицин, определение, дот-иммуноанализ

DOI: 10.31857/S0555109923050070, **EDN:** NPHVMM

Фаговый дисплей — технология, разработанная американским химиком Джорджем П. Смитом, в основе которой лежит экспонирование чужеродных пептидов или белков на поверхности фаговых частиц в составе одного из химерных белков оболочки [1–3]. Эта технология основана на возможности экспрессии чужеродного белка на поверхности нитчатого бактериофага M13, проведении встройки гена, кодирующего фрагмент эндонуклеазы рестрикции EcoRI, в единую рамку трансляции с минорным белком оболочки рIII нитчатого бактериофага [4]. Метод представления пептида на поверхности бактериофага M13 был изобретен в 1985 г. В 1989 г. были клонированы гены иммуноглобулинов, что позволило обойтись без гибридной технологии для получения антител. Первоначально в бактериях синтезировали Fab или scFv фрагменты антител, создавая библиотеки клонов, и проводили ручную отбор наиболее аффинных клонов с помощью радиоактивно-меченного антигена, что было весьма трудоемко и неэффективно. В 1990 г. впервые использовали дисплейную технологию представления фрагментов антител на поверхности фагов, а в 1991 создали первую библиотеку вариабельных фрагментов. Метод фагового дисплея был использован для экспонирования антигенсвязывающих фрагментов иммуноглобулинов на поверхности бактериофага fd [5]. В результате появился

новый комбинаторный подход к разработке рекомбинантных антител, являющийся альтернативным традиционной гибридной технологии. Технология фагового дисплея основана на простых процедурах манипулирования с ДНК и бактериями [4–6], что значительно сокращает время получения и стоимость стабильных клонов [7, 8]. Общая схема получения комбинаторной фаговой библиотеки включает следующие этапы.

1. Из донорских иммунных или интактных В-лимфоцитов человека, мыши, кролика, цыпленка, свиньи, собаки, обезьяны, овцы, коровы и др. выделяют мРНК и клонируют гены scFv, Fab-фрагментов или др.

2. Данные гены встраивают в фагмиду в единую рамку трансляции с геном, кодирующим белок капсида (обычно р3).

Полученными фагидами заражают клетки *Escherichia coli*, в которых происходит экспрессия фагмидных генов и сборка вирионов, которые в составе капсидных белков будут экспонировать и чужеродный фрагмент антитела. В зависимости от выбранной векторной системы этот этап проходит с использованием хелперных фагов или без них. Таким образом, получают популяцию бактериофагов, каждый из которых экспонирует на своей поверхности определенный антигенсвязывающий домен [9, 10]. Схема конструирования фрагмен-

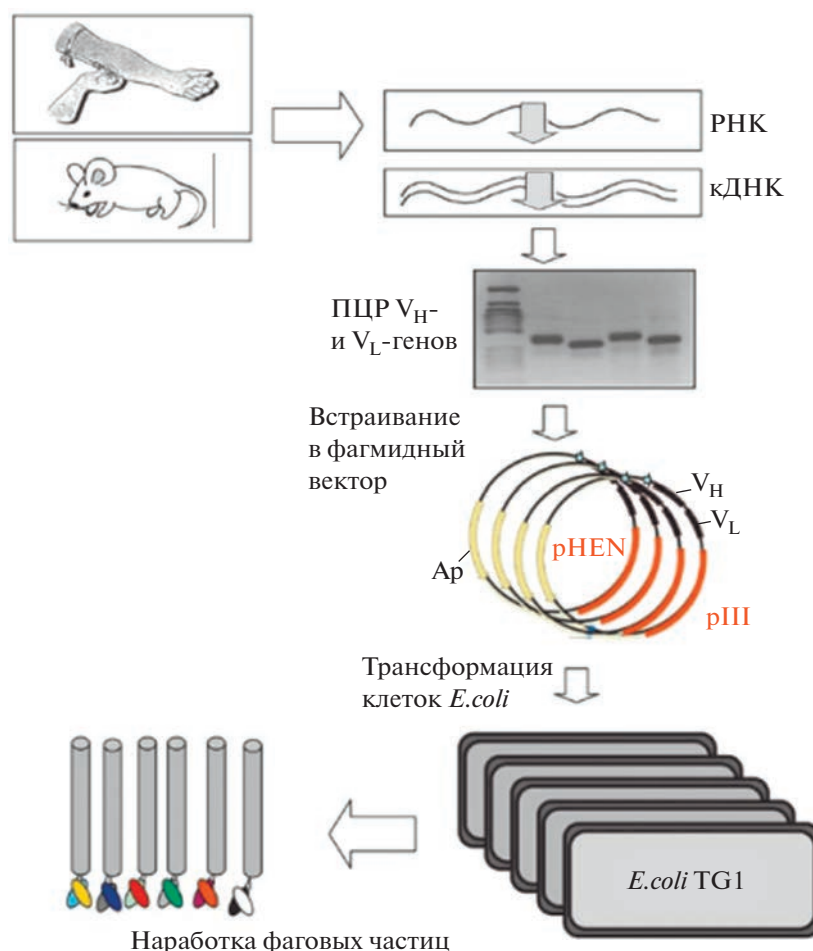


Рис. 1. Схема конструирования фрагментов антител фаговой библиотеки [11].

тов антител фаговой библиотеки представлена на рис. 1 [11].

Фаговый дисплей антител, позволяющий получать антитела к низкомолекулярным антигенам (гаптенам), является перспективной методикой для определения антибактериальных препаратов. С момента получения первых антител на поверхности фагов интерес к применению фагового дисплея неуклонно растет. За последние пять лет количество публикаций, посвященных применению рекомбинантных фаговых антител возросло более чем в два раза: от 70 статей в 2018 г. до 142 статей в 2022 г. [12–16]. Так, например, с применением технологии фагового дисплея получены и апробированы в различных методах иммуноанализа фаговые антитела к ивермектину [17], диминазину [18], ферритину [19], силимарину [20], ампициллину [21]. Одним из антибиотиков, который применяется не только для лечения, но и в качестве стимулятора роста животных и в кормовых добавках для профилактики заболеваний, является канамицин [22]. Неконтролируемое применение

канамицина приводит не только к повышению устойчивости бактерий к нему, но и вызывает накопление остатков канамицина в воде. Канамицин угрожает здоровью человека, поскольку он может накапливаться в организме и характеризуется потенциальной ототоксичностью и нефротоксичностью [23, 24]. Особенную опасность представляет канамицин при попадании в воду, поскольку для его гидролиза необходима температура не ниже 100°C [25], поэтому контроль содержания канамицина в воде и развитие методов для его определения представляет особый интерес.

Наиболее распространенным вариантом получения антител, обладающих специфичностью к конкретному антигену, является иммунизация животных. Возможность использования антиканамициновых антител нефагового происхождения для определения антибиотика описана в работах [26–30]. Альтернативным методом получения специфичных антител, не требующим иммунизации животных, является технология фагового дис-

плея. Поэтому важным моментом при развитии методов определения канамицина является подбор специфичного антитела, в том числе с помощью технологии фагового дисплея.

Цель работы — совершенствование технологии фагового дисплея для получения антиканамициновых антител и оценка возможности их применения для определения канамицина.

МЕТОДИКА

Бактериальная культура и питательные среды. Использованы бактерии *Escherichia coli* штамма TG1, полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (Россия, <http://collection.ibppm.ru>). Культуры выращивали на жидкой питательной среде 2хТУ 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, неомицин (“Sigma”, США).

Аффинная селекция миниантител из фаговой библиотеки. В работе использовали фаговую библиотеку антител (Ат) овцы, любезно предоставленную профессором Университета г. Абердин (Великобритания) У. Харрисом [9]. В работе использовали хелперный бактериофаг M13K07 (“Stratagene”, Швеция).

Синтез белковых конъюгатов канамицина проводили по методике, описанной в работе [30].

Для селекции фагов, несущих антитела к конъюгатам канамицина с бычьим сывороточным альбумином (БСА), в качестве твердой фазы для закрепления антигена использовали мембрану “Wester S”, как описано в [21, 32]. Блокировку незанятого антигеном пространства на стенках планшета проводили 2% раствором сухого обезжиренного молока (“Scharlau”, Испания) в течение 1 ч. Элюцию фаговых частиц проводили триэтиламином. Элюированные фаговые частицы использовали для инфицирования клеток *E. coli* штамма TG1. Методика получения фаговых антител подробно описана в работе [21].

Отбор фаговых частиц библиотеки или аффинная селекция проводилась следующим образом: клоны библиотеки инкубировали с иммобилизованным антигеном (канамицином); удаляли при помощи отмывки фаговые частицы, не связанные с антибиотиком; элюировали связанные фаговые частицы; заражали отобранными клонами клетки *E. coli* и проводили амплификацию с последующим выделением аффинных клонов, как описано [21].

Концентрацию фаговых частиц определяли спектрофотометрически, как описано в работе

[33] 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.

Полученный препарат фаговых частиц использовали для проведения последующих раундов селекции, осуществляемых в аналогичных условиях. Специфичность полученных препаратов фаговых антител определяли методом дот-иммуноанализа. Титр сыворотки определяли с помощью метода твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) по общепринятой методике [34]. Титр фаговых антител составил 1 : 2000.

Наночастицы золота. Наночастицы золота со средним диаметром частиц (15 нм) получали, используя реакцию восстановления золотохлористоводородной кислоты (“Aldrich”, США) цитратом натрия (“Fluka”, Швейцария) по методу, описанному в работе [35]. Наночастицы контролировали по фотометрической калибровке, с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и регистрации динамического рассеяния света, как описано [36] в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии “Симбиоз” ИБФРМ РАН.

Дот-иммуноанализ. Для дот-иммуноанализа использовали мембрану “Western S” (“Sigma-Aldrich”, США), которую предварительно погружали в раствор метанола на 30 с. Методика проведения подробно описана в работе [21]. Канамицин наносили на мембрану “Western S” в концентрациях 0.5; 1; 2; 4, 6, 12, 25, 50 и 100 мкг/мл. Блокировку мембраны проводили в течение 1 ч 2%-ным сухим молоком, разведенным в фосфатном буферном растворе (pH 7.0). Мембрану погружали в раствор специфичных фагмид, разведенных до концентрации 1×10^{13} в 1 мл 10 мМ фосфатного буфера, и проводили инкубацию в течение ночи при 4°C. Затем мембрану отмывали от неспецифически связанных фаговых антител в фосфатном буфере и погружали в конъюгат коллоидного золота с кроличьими антифаговыми антителами ($A_{520} = 0.5$) при 25°C на ночь. После окрашивания мембрану промывали в фосфатном буфере и высушивали.

Метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Для ИФА использовали 96-луночные полистироловые планшеты. Ампициллин, канамицин и тетрациклин растворяли в 10 мМ фосфатном буфере (pH 7.0). Антибиотики титровали (исходная концентрация 1 мг/мл) с помощью двойных последовательных разведений и иммобилизовали в планшетах методом простой адсорбции при комнатной температуре на протяжении ночи. В качестве первичных антител вносили фаговые антиканамициновые антитела (разведе-

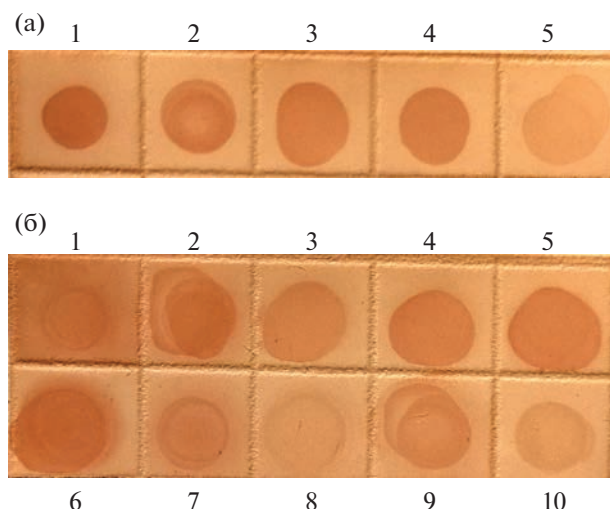


Рис. 2. Дот-иммуноанализ фаговых антител, специфичных к канамицину, полученных с использованием фаговой библиотеки после третьего (а) и четвертого (б) раундов селекции: 1 – 100; 2 – 50; 3 – 25; 4 – 12.5; 5 – 6; 6 – 5; 7 – 4; 8 – 3; 9 – 2; 10 – 1 (мкг/мл).

ние 1 : 10), которые затем взаимодействовали со вторичными кроличьими антифаговыми антителами (разведение 1 : 2). Для ферментативного мечения взаимодействия антиген-антитело была использована пероксидаза хрена, конъюгированная с козьими антикроличьими антителами. В качестве субстрата для пероксидазы использовали *о*-фенилендиамин в присутствии перекиси водорода. Оптическую плотность образцов после проведения ферментативной реакции измеряли с помощью мультипланшетного фотометра Multiskan Ascent (“ThermoLabsystems”, Финляндия) при длине волны 492 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При отработке технологии фагового дисплея для получения антиканамициновых антител, были проведены с первого по четвертый раунды селекции фаговых антител, специфичных к канамицину. Проверку специфичности антиканамициновых фаговых антител после каждого раунда селекции проводили методом дот-иммуноанализа, который заключается в качественном и полуквантитативном тестировании антител. Суть метода заключается в визуализации специфического взаимодействия адсорбированного на мембране антигена и меченых (коллоидными или молекулярными метками) антител. В работе использовали стратегию вторичного мечения, которая успешно была ранее апробирована в работе [19]: сначала проводили биоспецифическую реакцию канамицин/фаговые антитела, а затем визуально оценивали реакцию с помощью меченых наночастицами поликлональных кроличьих антифаговых антител.

На рис. 2 представлены данные дот-иммуноанализа для антиканамициновых фаговых антител после 3 и 4 раундов селекции, поскольку специфичность антиканамициновых фаговых антител в отношении канамицина увеличилась после этих раундов селекции. При проведении исследований по определению минимальной концентрации антигена, визуально детектируемого с помощью антиканамициновых фаговых антител методом дот-иммуноанализа показано, что данные антитела позволяют определять канамицин. Так, из результатов, представленных на рис. 2б видно, что фаговые антитела, специфичные к канамицину, позволяли определять канамицин в водных растворах методом дот-иммуноанализа с нижним пределом детекции 1 мкг/мл.

Дополнительно для оценки специфичности антиканамициновых антител проводили ИФА после первого (рис. 3а), второго (рис. 3б), третьего (рис. 3в) и четвертого (рис. 3г) раундов селекции антител. В качестве дополнительного контроля специфичности антиканамициновых фаговых антител, использовали ампициллин и тетрациклин. Данные, полученные методом ИФА (рис. 3), показывают, что фаговые антиканамициновые антитела выявляли канамицин, но не обнаруживали другие антибиотики.

На основании проведенных исследований сделан вывод, что для повышения чувствительности фаговых антител рекомендовано проводить не менее четырех раундов селекции.

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

тетрациклин — представитель тетрациклинов, занимает 1 место по объему продаж среди всех антибиотиков; ампициллин — представитель бета-лактамов вместе с пенициллинами (сведения по бета-лактамам антибиотикам приводятся совместно с пенициллинами) занимают 2 место по объему продаж среди всех антибиотиков [37].

При разработке специфичного рецептора для определения антигена одним из важных моментов является оценка неспецифического взаимодействия с другими аналитами. Поэтому дополнительно проводили анализ возможности неспецифического взаимодействия антиканамициновых антител с другими представителями аминогликозидных антибиотиков. В работе использовали гентамицин и неомидин. Структурные формулы используемых в работе аминогликозидных антибиотиков представлены на рис. 4. Условия проведения анализа для всех антибиотиков были аналогичны тем, которые были и при использовании канамицина. Как видно из данных, представленных на рис. 5, фаговые антиканамициновые антитела взаимодействуют только с канамицином, но не связыва-

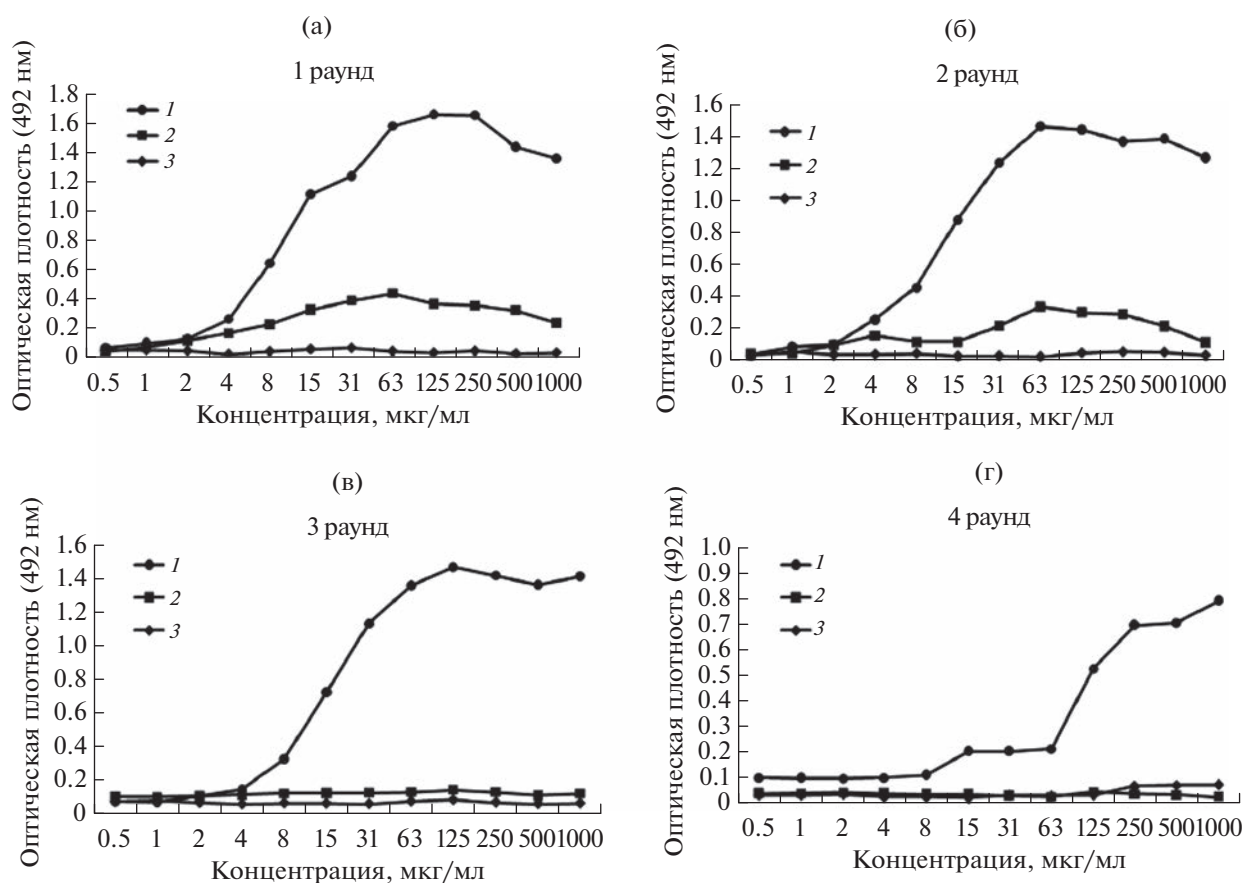


Рис. 3. ИФА фаговых антител, специфичных к канамицину после первого (а), второго (б), третьего (в) и четвертого (г) раундов селекции: 1 — канамицин, 2 — ампициллин, 3 — тетрациклин.

ются с ампициллином, гентамицином, тетрациклином и неомицином.

Таким образом, отработана технология получения антиканамициновых антител с помощью фагового дисплея. Методом дот-иммуноанализа при биоспецифичном взаимодействии отобранных фаговых антиканамициновых антител проведено определение канамицина в водных растворах, при минимальной определяемой концентрации 1 мкг/мл (различное связывание метки, отличное от фонового уровня). Показано, что полученные антиканамициновые антитела специфичны в отношении канамицина и не взаимодействуют с представителями других антибактериальных препаратов: ампициллином, тетрациклином, гентамицином и неомицином.

Перспективность получения и применения моноклональных и поликлональных антител для определения канамицина показаны с помощью конкурентного прямого ИФА и иммунохроматографического анализа [38], метода поляризационного флуоресцентного иммуноанализа [39], а

также с помощью иммуносенсорных технологий [40–43]. В данной работе показана альтернативная возможность получения антител, специфичных к канамицину, с применением технологии фагового дисплея. Технология фагового дисплея обеспечивает быструю и экономичную наработку антител с использованием нитевидного фага. Производство рекомбинантных антител включает несколько этапов, но все они проводятся *in vitro* и отсутствует необходимость проведения экспериментов с привлечением животных. Это основное и важное преимущество данной технологии по сравнению с традиционными методами получения антител. Еще одним преимуществом фагового дисплея является меньшее время, необходимое для продукции антител. Это делает фаговый дисплей эффективным в долгосрочной перспективе. Однако, следует признать, что фаговые антитела имеют низкую аффинность по сравнению с обычными иммуноглобулинами.

Таким образом, рекомбинантные антитела, полученные с помощью фагового дисплея, созда-

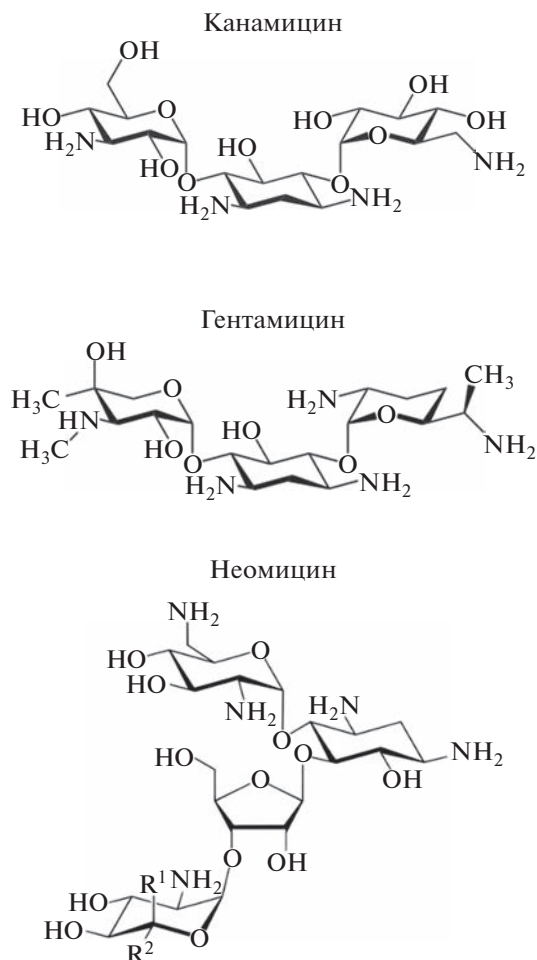


Рис. 4. Структурные формулы канамицина, гентамицина и неомицина.

ют перспективную платформу для определения антибиотиков и могут быть использованы для их анализа.

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного Фонда проект № 22-24-00417.

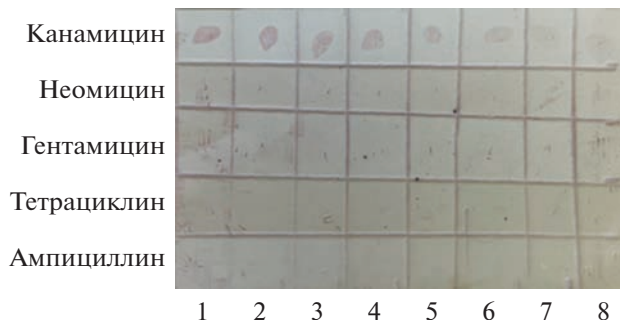


Рис. 5. Анализ взаимодействия фаговых антител, специфичных к канамицину, полученных с использованием фаговой библиотеки после 4 раунда селекции, в отношении канамицина, неомицина, гентамицина, тетрациклина и ампициллина методом дот-иммунанализа: 1 – 128; 2 – 64; 3 – 32; 4 – 16; 5 – 8.0; 6 – 4.0; 7 – 2; 8 – 1.0 мкг/мл.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Willats W.G.T. // Plant Mol. Biol. 2002. V. 50. P. 837–854.
<https://doi.org/10.1023/A:1021215516430>
2. Wang L.-F., Yu M. // Curr. Drug Targets. 2004. V. 5. P. 1–15.
<https://doi.org/10.2174/1389450043490668>
3. Кузьмичева Г.А., Белявская В.А. // Биомедицинская химия. 2016. Т. 62. № 5. С. 481–495. Kuzmicheva G.A., Belyavskaya V.A. // Biochem. Moscow Suppl. Ser. B. 2017. V. 11. P. 1–15.
<https://doi.org/10.18097/PBMC20166205481>
4. Smith G.P. // Science. 1985. V. 228. P. 1315–1317.
<https://doi.org/10.1126/science.4001944>
5. McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J. // Nature. 1990. V. 348. P. 552–554.
<https://doi.org/10.1038/348552a0>
6. Smith G.P., Petrenko V.A. // Chem. Rev. 1997. V. 97. P. 391–410.
<https://doi.org/10.1021/cr960065d>
7. Chassagne S., Laffly E., Drouet E., Hérodin F., Lefranc M.-P., Thullier P. // Mol. Immunol. 2004. V. 41. P. 539–546.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.03.040>
8. Jacobsson K., Rosander A., Bjerketorp J., Frykberg L. // Biol. Proced. Online. 2003. V. 5. P. 123–135.
<https://doi.org/10.1251/bpo54>
9. 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>
10. Bashir S., Paeshuyse J. // Antibodies. 2020. V. 9. P. 21.
<https://doi.org/10.3390/antib9020021>
11. Тукунова Н.В., Морозова В.В. // Acta Nat. 2009. Т. 1. С. 22–31. doi.org/ Tikunova N.V., Morozova V.V. // Acta Nat. 2009. V. 1. P. 20–28.
<https://doi.org/10.32607/20758251-2009-1-3-20-28>
12. Zhao H., Nie D., Hu Y., Chen Z., Hou Z., Li M., Xue X. // Molecules. 2023. V. 28. P. 2621.
<https://doi.org/10.3390/molecules28062621>

13. 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>
14. Tang H., Gao Y., Han J. // Int J Mol Sci. 2023. V. 24 (4). P. 4176. <https://doi.org/10.3390/ijms24044176>
15. Mahdavi S.Z.B., Oroojalian F., Eyvazi S., Hejazi M., Baradaran B., Pouladi N. et al. // Int J Biol Macromol. 2022. V. 208. P. 421–442. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.113>
16. Li L., Wu S., Si Y., Li H., Yin X., Peng D. // Compr Rev Food Sci Food Saf. 2022. V. 21. P. 4354–4377. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13018>
17. Пристенский Д.В., Староверов С.А., Ермилов Д.Н., Щеголев С.Ю., Дыкман Л.А. // Биомедицинская химия. 2007. Т. 53. С. 57–64. Pristensky D.V., Staroverov S.A., Ermilov D.N., Shchyogolev S.Y., Dykman L.A. // Biochem. Moscow Suppl. Ser. B. 2007. V. 1. P. 249–253. <https://doi.org/10.1134/S1990750807030146>
18. Staroverov S.A., Sidorkin V.A., Fomin A.S., Shchyogolev S.Y., Dykman L.A. // J. Vet. Sci. 2011. V. 12. P. 303–307. <https://doi.org/10.4142/jvs.2011.12.4.303>
19. Staroverov S.A., Volkov A.A., Fomin A.S., Laskavuy V.N., Mezhenyuy P.V., Kozlov S.V. et al. // J. Immunoassay Immunochem. 2015. V. 36. P. 100–110. <https://doi.org/10.1080/15321819.2014.899257>
20. Staroverov S.A., Kozlov S.V., Fomin A.S., Gabalov K.P., Khanadeev V.A., Soldatov D.A. et al. // ADMET DMPK. 2021. V. 9. P. 255–266. <https://doi.org/10.5599/admet.1023>
21. Гулий О.И., Алсоевэиди А.К.М., Фомин А.С., Габалов К.П., Староверов С.А., Караваева О.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. № 5. С. 513–519. Guliy O.I., Alsowaidi A.K., Fomin A.S., Gabalov K.P., Staroverov S.S., Karavaeva O.A. // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. № 5. P. 646–651. <https://doi.org/10.1134/S0003683822050088> <https://doi.org/10.31857/S0555109922050087>
22. Durante-Mangoni E., Grammatikos A., Utili R., Falagas M.E. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2009. V. 33. P. 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.09.001>
23. Jiang M., Karasawa T., Steyger P.S. // Front. Cell Neurosci. 2017. V. 11. P. 308. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00308>
24. Shavit M., Pokrovskaya V., Belakhov V., Baasov T. // Bioorg. Med. Chem. 2017. V. 25. P. 2917–2925. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.068>
25. Tang M., Li F., Yang M., Zhang Y. // J. Environ. Sci. (China). 2020. V. 97. P. 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.04.032>
26. Jin Y., Jang J.W., Han C.H., Lee M.H. // J Vet Sci. 2006. V. 7(2). P. 111–117. <https://doi.org/10.4142/jvs.2006.7.2.111>
27. Pietschmann J., Dittmann D., Spiegel H., Krause H.J., Schröper F. // Foods. 2020. V. 9. P. 1773. <https://doi.org/10.3390/foods9121773>
28. Li C., Zhang Y., Eremin S.A., Yakup O., Yao G., Zhang X. // Food Chem. 2017. V. 227. P. 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.058>
29. DeCastro A.F., Place J.D., Lam C.T., Patel C. // Antimicrob Agents Chemother. 1986. V. 29. № 6. P. 961–964. <https://doi.org/10.1128/AAC.29.6.961>
30. 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>
31. Самсонова Ж.В., Щелокова О.С., Иванова Н.Л., Рубцова М.Ю., Егоров А.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 6. С. 668–675. Samsonova Z.V., Shchelokova O.S., Ivanova N.L., Rubtsova M.Y., Egorov A.M. // Appl. Biochem. Microbiol. 2005. V. 41. № 6. P. 589–595. <https://doi.org/10.1007/s10438-005-0107-4>
32. Charlton K.A., Moyle S., Porter A.J., Harris W.J. // J. Immunol. 2000. V. 164. P. 6221–6229. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6221>
33. 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)
34. Shah K., Maghsoudlou P. // Br. J. Hosp. Med. 2016. V. 77. P. 98–101.
35. Frens G. // Nat. Phys. Sci. 1973. V. 241. P. 20–22. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
36. Guliy O.I., Zaitsev B.D., Burygin G.L., Karavaeva O.A., Fomin A.S., Staroverov S.A., Borodina I.A. // Ultrasound Med. Biol. 2020. V. 46. P. 1727–1737. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2020.03.014>
37. European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2021. “Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 31 European Countries in 2019 and 2020”. (EMA/58183/2021).
38. Jin Y., Jang J.-W., Han C.-H., Lee M.-H. // J. Vet. Sci. 2006. V. 7(2). P. 111–117.
39. Воронежцева О.В., Еремин С.А., Ермолаева Т.Н. // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. 2009. № 2. С. 11–17.
40. Zhao Y., Wei Q., Xu C., Li H., Wu D., Cai Y., Mao K., Cui Z., Du B. // Sens. Actuators B Chem. 2011. V. 155. № 2. P. 618–625. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.01.019>
41. Shinko, E.I., Farafonova, O.V., Ermolaeva, T.N. // Zavodskaya Laboratoriya. Diagnostika Materialov. 2021. V. 87. № 12. P. 11–16. <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2021-87-12-12-17>
42. Shinko E.I., Farafonova O.V., Shanin I.A., Eremin S.A., Ermolaeva T.N. // Anal. Lett. 2022. V. 55. № 7. P. 1164–1177. <https://doi.org/10.1080/00032719.2021.1991364>
43. Bizina E.V., Farafonova O.V., Zolotareva N.I., Grazhulene S.S., Ermolaeva T.N. // J. Anal. Chem. 2022. V. 77. № 4. P. 458–465. <https://doi.org/10.1134/S1061934822040049>

Phage Antibodies for Kanamycin Detection

O. I. Guliy^{a, *}, S. S. Evstigneeva^a, S. A. Staroverov^{a, b}, A. S. Fomin^a, and O. A. Karavaeva^a

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

^b *Saratov State Vavilov Agrarian University, Saratov 410049 Russia*

^{*}*e-mail: guliy_olga@mail.ru*

Recombinant antibodies specific to kanamycin were obtained using a sheep display library of scFv fragments (Griffin.1) and the possibility of their use for the determination of kanamycin by dot-immunoassay was demonstrated. The minimum detectable concentration of kanamycin is 1 µg/mL (distinguishable label binding other than background). It has been shown that anti-kanamycin phage antibodies are specific for kanamycin and do not interact with other antibiotics (neomycin, tetracycline, ampicillin, gentamicin). Anti-kanamycin phage antibodies are a promising alternative to monoclonal antibodies for use in the determination of kanamycin.

Keywords: phage display antibodies, kanamycin, detection, dot-immunoassay