

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ
КАНАМИЦИНА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Мартыненко Анжелики Викторовны

Научный руководитель:

канд. биол. наук



М.В. Каневский

дата, подпись 07.06.24

Научный консультант:

вед. н. с. ИБФРМ РАН, д.б.н.,

профессор



О.И. Гулий

07.6.24

дата, подпись

Зав. кафедрой:

док. биол. наук, проф.



С.А. Коннова

дата, подпись

07.06.2024

Саратов 2024

Введение. По данным ВОЗ на 2019 год загрязнение окружающей среды антибиотиками является одной из 10 глобальных проблем человечества. Лекарственные препараты попадают в сточные воды из медицинских и ветеринарных учреждений, вместе с отходами сельского хозяйства, производственных предприятий и др. Попадание антибиотиков и их метаболитов в объекты окружающей среды приводит к негативным экологическим последствиям, что в дальнейшем оказывает негативное влияние на здоровье людей. В связи с этим неуклонно растёт потребность в развитии методов анализа антибактериальных препаратов, в том числе, на основе биосенсорных систем. Среди ускоренных методов определения остаточных количеств антибактериальных веществ лидирующее положение занимают иммуноферментные с применением антител.

Одним из перспективных методов считается получение фаговых антител в ходе методики фагового дисплея. Их преимуществами является удешевление процесса, за счёт отсутствия необходимости иммунизации и содержания животных – это также ускоряет процесс получения антител. Полученные антитела обладают высокой стабильностью, улучшенной растворимостью и совместимостью с растворителями.

Успех в применении фаговых антител в качестве распознающего элемента при проведении иммуноанализа в значительной степени зависит от предварительной адаптации метода получения антител, их наработки и тестирования. Поэтому разработка методики получения антител, специфичных к антибиотикам, с использованием технологии фагового дисплея и оценка возможности их применения для определения антибиотиков являются актуальными в современной биологии.

Целью исследования была адаптация технологии фагового дисплея для получения антител, специфичных к канамицину.

Для достижения цели были поставлены и решались следующие задачи:

1. оптимизация методики получения в препаративных количествах антиканамициновых фаговых антител;

2. оценка специфичности и селективности антиканамициновых фаговых антител в отношении антибактериальных препаратов, относящихся к разным классам: ампициллина и тетрациклина;
3. анализ неспецифического взаимодействия антиканамициновых фаговых антител с другими представителями аминогликозидных антибиотиков (неомицином и гентамицином).

Исследование проводилось с использованием методов, адекватных поставленным задачам. В ходе исследования было проведено 4 раунда селекции антител, после каждого раунда проводился дот-иммуноанализ с целью оценки специфичности полученных антител. Также было проведено спектрофотометрическое определение концентрации фаговых антител и иммуноферментный анализ для апробации полученных антител и проверки специфичности.

Структура бакалаврской работы. Работа состоит из списка использованных сокращений, введения, основной части, заключения, выводов, списка использованных источников. Литературный обзор составлен на основе анализа 55 источников и включает в себя следующие вопросы: объемы использования антибиотиков в мире (история появления, продажи, проблематика чрезмерного употребления), классификация антибиотиков, методы детекции антимикробных препаратов.

Основное содержание работы. С целью визуализации проблемы роста антибиотикорезистентных микроорганизмов были применены методы машинного обучения. Для обработки данных использовался сайт Google Colaboratory (<https://colab.research.google.com/?hl=ru>), программа Microsoft Excel 2019 для просмотра данных, набор данных «Antimicrobial resistance in Europe» с сайта kaggle (<https://www.kaggle.com/>), которые загружены из базы данных EARS (Election agents records system).

База включает в себя столбцы с наименованием: распределение, единица измерения, год, код региона, название региона, категория (возрастные рамки), значение, бактерия, антибиотик.

Всего база данных имеет 64386 строк с указанием различных антибиотиков, пропуски в данных отсутствуют. В ходе работы использовали строки, в которых в столбце «Антибиотик» (Antibiotic) имеется значение «Аминогликозиды» (Aminoglycosides), всего таких данных 8090.

Был построен график плотности распределения доли бактерий, резистентных к аминогликозидным антибиотикам, с 2000 по 2018 гг., который представлен на рисунке 1.

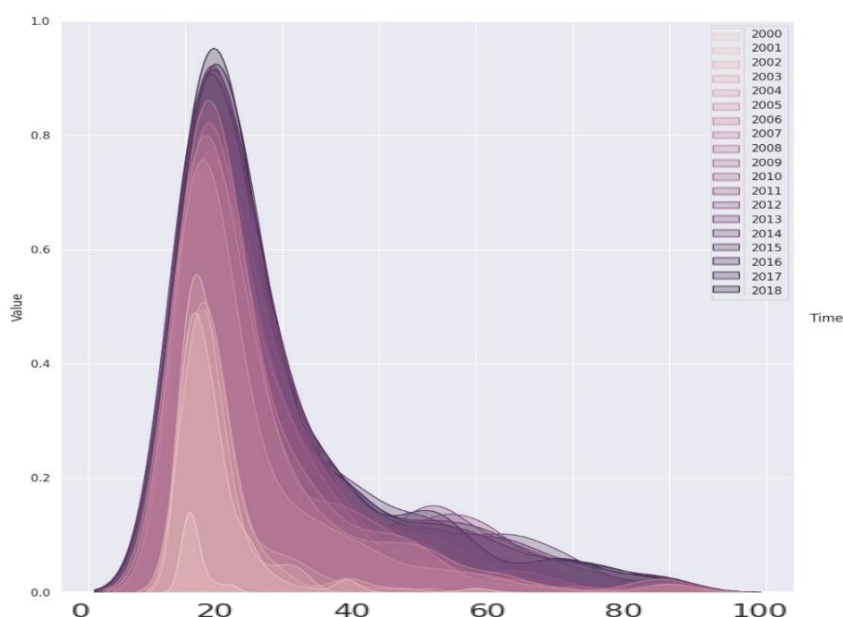


Рисунок 1 – Изменение доли микроорганизмов, резистентных к аминогликозидным антибиотикам, с 2000 по 2018 гг, по оси y – частота встречаемости устойчивых бактерий, по x – процент их резистентности.

Из представленных данных видно, что доля бактерий, резистентных к аминогликозидным антибиотикам, увеличивается.

Используемые микроорганизмы. В работе были использованы бактерии *Escherichiacoli* штамма TG-1, предоставленные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (Россия) (<http://collection.ibppm.ru>).

В ходе исследования применялись фагмиды бактериофага M13, которые экспрессируют Fab-фрагменты антител, полученные из фаговой библиотеки

овцы. Библиотека была любезно предоставлена профессором университета г. Абердин (Великобритания) Уильямом Харрисом. Данные кольцевые ДНК содержат ген устойчивости к ампициллину.

В работе использовали хелперный бактериофаг M13K07 (Stratagene, Швеция), несущий ген устойчивости к канамицину.

Селекция фагов. Посев единичной колонии проводилина жидкую 2хТҮ среду(состав на 100 мл: триптон 1,6 г, дрожжевой экстракт 1,0 г, NaCl0,5 г) и инкубировали при интенсивности перемешивания 160 об/мин при 37 °С 24ч, затем 1/5 часть культуры пересевали на свежую среду 2хТҮ среду и инкубировали при интенсивной аэрации (160 об/мин) и температуре 37 °С в течение 4ч. Далее для формирования *F*-пилей культуру термостатировали при 37°С в течение 30-40 мин и потом добавили элюированные фаговые частицы библиотеки, для заражения культуру с бактериями и фагами оставляли в условиях термостатирования при 28°С на 30 мин. После чего суспензию центрифугировали в течении 20мин при 3000 об., затем осадок переносили в свежую 2хТҮ среду с добавлением 600 мкл 20% р-ра глюкозы и канамицина и инкубировали при интенсивной аэрации при 37°С в течение 24ч. Затем 1/5 часть выросшей культуры переносили на свежую среду 2хТҮ с канамицином и инкубировали при интенсивной аэрации при 37°С в течение 4ч. По истечении указанного времени культуру перемещали в термостат (при температуре 28°С) на 30 мин для формирования *F*-пилей. Затем в колбу вносили хелперный бактериофаг в соотношении 1:20 и выдерживали еще 30 мин при 37°С для заражения культуры (без покачивания и встряхивания). Далее суспензию центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об., осадок переносили в свежую 2хҮТ среду с добавлением канамицина и р-ра IPTG и оставляли при 37°С на 24ч. (при аэрации). Затем суспензию центрифугировали 20 мин при 6000 об., собирали надосадок и к осадку добавили PEG/NaCl (1/5 объема). Оставляли в холодильнике на 24ч. Далее суспензию фаговых антител центрифугировали при 14000 оборотах 4°С в течении 15 мин и осадок ресуспензировали в 0,01 М фосфатном буфере (рН 7.0) и полученную фаговую суспензию очищали путем

проведения диализа против 0,01 М фосфатного буфера (рН 7.0) в мерном цилиндре в течение 48 ч. Затем осадок собирали и хранили в морозилке. Полученный препарат фаговых частиц использовали для проведения последующих раундов селекции. Условия получения фаговых частиц не изменялись при проведении разных раундов селекции. Схема проведения методики представлена на Рисунке 2.

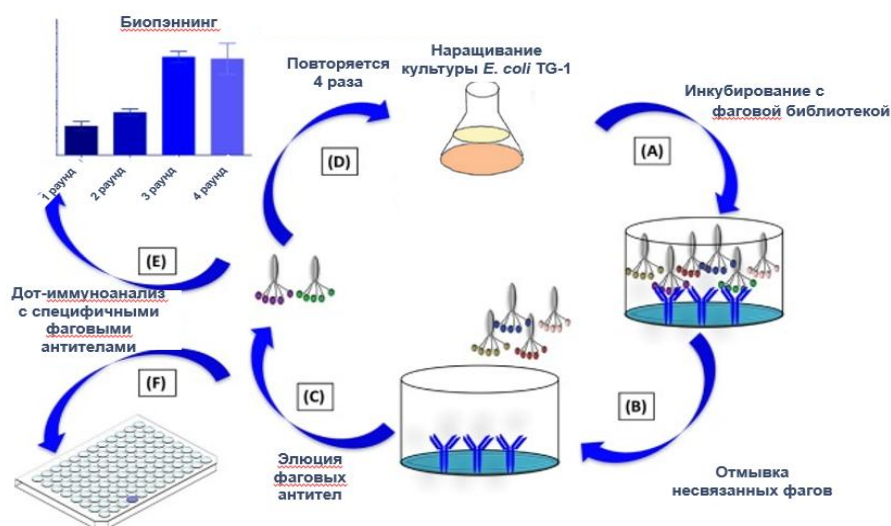


Рисунок 2 – Методика проведения технологии фагового дисплея с последующим дот-иммуноанализом.

Определение концентрации фаговых частиц. Проводили на спектрофотометре UV-VIS Specord BS 250.

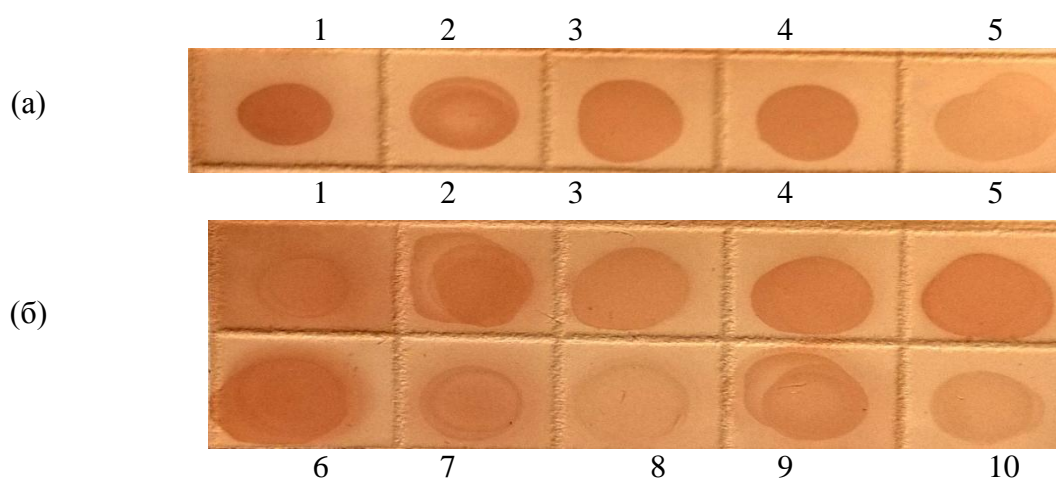
Определение специфичности фаговых антител. Проводили методом твердофазного дот-иммуноанализа, для этого использовали поливинилиденфторидную мембрану «Western S», которую предварительно погружали в раствор метанола на 30 с. конъюгаты наночастиц золота с кроличьими антифаговыми антителами, а также антибиотики канамицин, ампициллин, тетрациклин, гентамицин, неомицин.

В качестве образцов на мембрану в виде серии точек наносили антибиотик (канамицин) в различных концентрациях (0.5; 1; 2.0; 4.0, 6.0, 12, 25, 50 и 100 мкг/мл.). Затем проводили блокирование мембраны с нанесенным на нее

антигеном в течение 1 ч 2% сухим молоком. Мембрану погружали в раствор специфических фагмид, разведенных до концентрации $1 \cdot 10^{13}$ в 1 мл 10 мМ фосфатного буфера, и проводили инкубацию в течение ночи при 40°C. Затем мембрану отмывали от неспецифически связавшихся 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.

В результате биоспецифического взаимодействия фаговые антитела связывались с канамицином, адсорбированным на мембране. Наблюдали связывание комплекса антигена (канамицин) с фаговыми антителами (в виде серии окрашенных пятен). Цвет пятен соответствует максимуму экстинкции наночастиц или молекул-меток.

На рис. 3а представлены данные дот-иммуноанализа для антиканамициновых фаговых антител после 3 и 4 раундов селекции. Данные после 1 и 2 раундов селекции не приводятся, поскольку специфичность антиканамициновых фаговых антител в отношении канамицина увеличилась после 3-го и 4-го раундов селекции. Из результатов, представленных на рис. 3б, видно, что антиканамициновые фаговые антитела позволяют определять канамицин методом дот-иммуноанализа с нижним пределом детекции 1 мкг/мл.



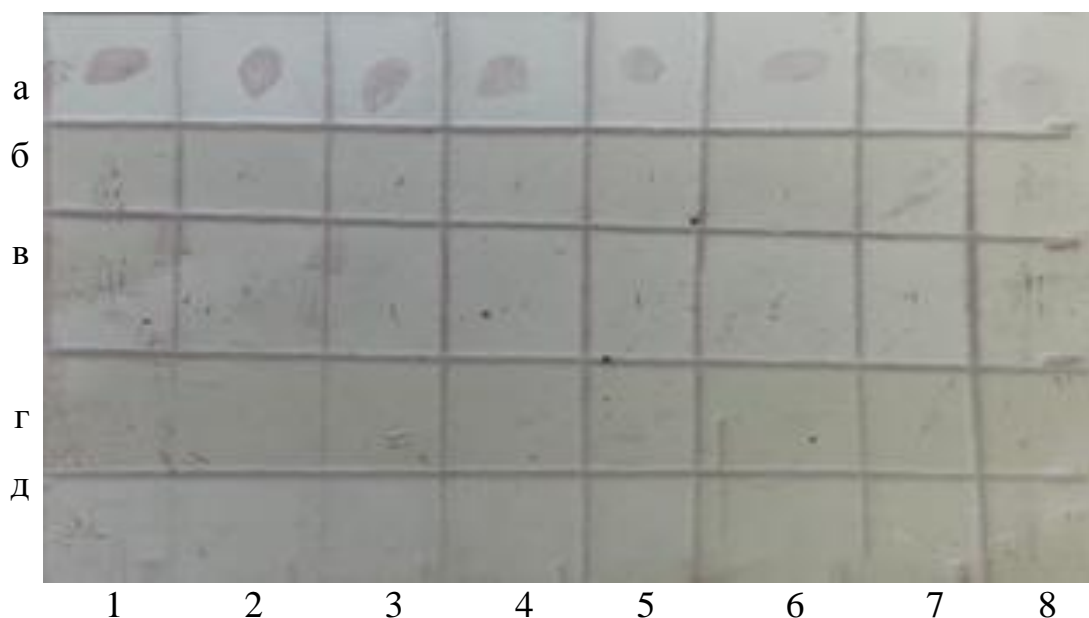
1 – 100; 2 – 50; 3 – 25; 4 – 12.5; 5 – 6; 6 – 5; 7 – 4; 8 – 3; 9 – 2; 10 – 1 (мкг/мл)

Рисунок 3 – Дот-иммуноанализа фаговых антител, специфичных к канамицину, полученных с использованием фаговой библиотеки после третьего (а) и четвертого (б) раундов селекции.

Специфичность взаимодействия антиканамициновых фаговых антител с представителями других антибактериальных препаратов показана на рис. 4. Для данного эксперимента использовали антибиотики, которые относятся к разным классам:

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

Дополнительно проводили анализ возможности неспецифичного взаимодействия антиканамициновых антител с другими представителями аминогликозидных антибиотиков: гентамицином и неомицином.



1- 128; 2 - 64; 3 - 32; 4 - 16; 5 – 8.0; 6 –4.0; 7 – 2; 8 – 1.0 мкг/мл,

а – канамицин, б – неомицин, в – гентамицин, г – тетрациклин, д – ампициллин.

Рисунок 4 – Анализ взаимодействия фаговых антител, специфичных к канамицину, полученных с использованием фаговой библиотеки после 4 раунда селекции в отношении канамицина, неомицина, тетрациклина, гентамицина и ампициллина методом дот-иммуноанализа.

Как видно из данных, представленных на рис. 3, антиканамициновые фаговые антитела взаимодействуют только с канамицином и не связываются с ампициллином, гентамицином, тетрациклином и неомицином.

Метод иммуноферментного анализа

Проводили с использованием 96-луночных полистироловых планшетов. Ампициллин, канамицин и тетрациклин растворяли в 10 мМ фосфатном буфере (рН 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 (разведение 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 *o*-фенилендиамин в присутствии перекиси водорода. Оптическую плотность образцов после проведения ферментативной реакции измеряли с помощью мультипланшетного фотометра MultiskanAscent при длине волны 490 нм.

Для оценки специфичности антиканамициновых антител проводили ИФА после 1-го (рис. 5а), 2-го (рис. 5б), 3-го (рис. 5в) и 4-го (рис. 5г) раундов селекции антител. В качестве контроля специфичности антиканамициновых фаговых антител, использовали ампициллин и тетрациклин. Из представленных данных видно, что

фаговые антиканамициновые антитела выявляли канамицин, но не определяли другие антибиотики.

На основании проведенных исследований сделан вывод, что для повышения чувствительности фаговых антител рекомендовано проводить не менее 4х раундов селекции.

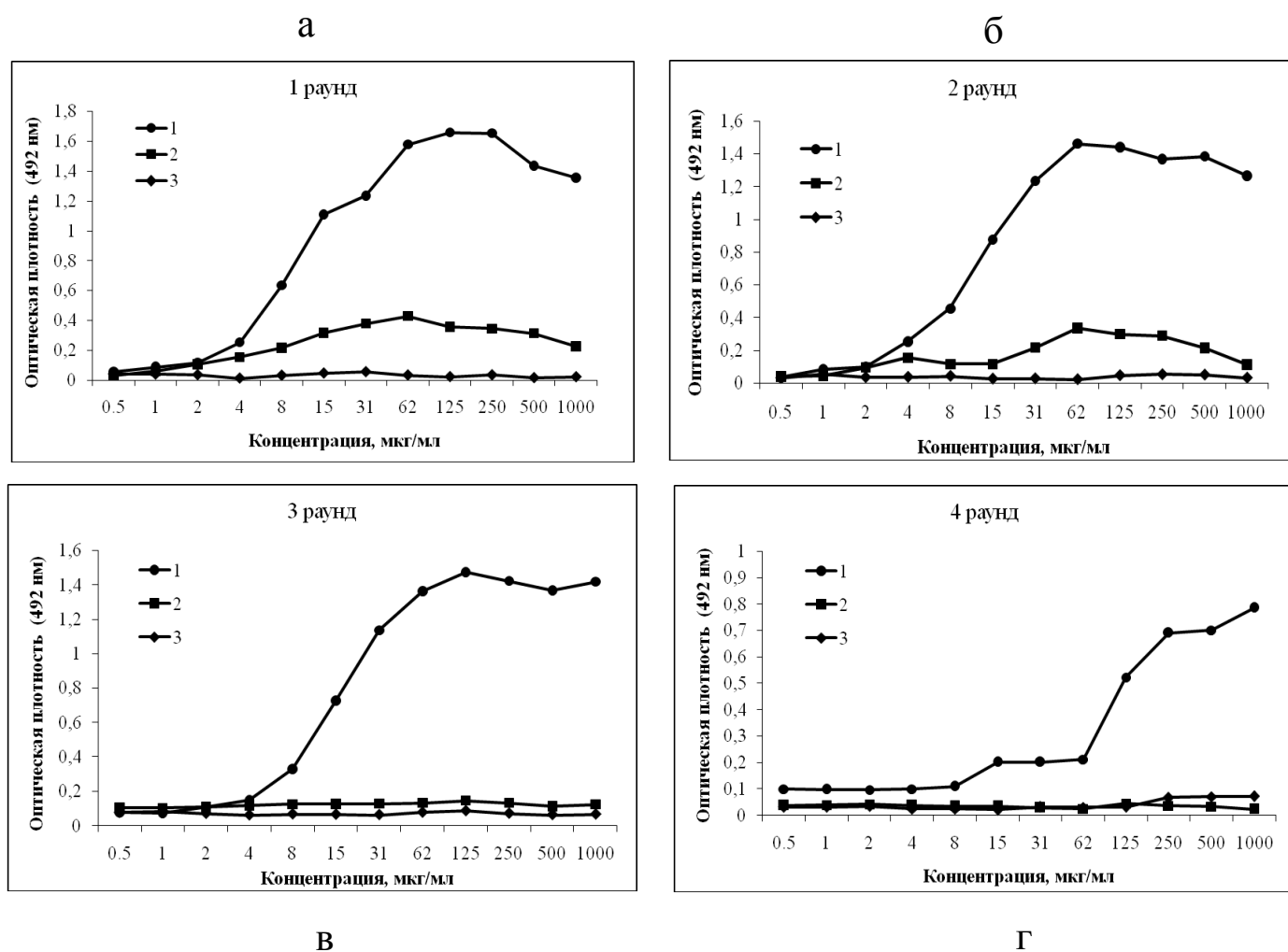


Рисунок 5 – ИФА фаговых антител, специфичных к канамицину после первого (а), второго (б), третьего (в) и четвертого (г) раундов селекции: 1 – канамицин, 2 – ампициллин, 3 – тетрациклин.

Одним из перспективных методов обнаружения антибиотиков являются рекомбинантные антитела, полученные методом фагового дисплея.

В результате проведенных исследований апробирована технология получения рекомбинантных антиканамициновых антител. Методом дот-иммуноанализа показана перспективность применения антиканамициновых фаговых антител для определения канамицина в водных растворах с минимальной определяемой концентрацией 1 мкг/мл (различимое связывание метки, отличное от фонового уровня). Антиканамициновые антитела специфичны в отношении канамицина и не взаимодействуют с представителями других антибактериальных препаратов: ампициллином, тетрациклином, гентамицином и неомицином. Полученные в работе рекомбинантные фаговые антитела потенциально могут быть использованы в качестве чувствительного (распознающего) компонента при определении канамицина в водных растворах. Отработанная технология получения антител может служить основой для наработки антител, специфичных к другим группам антибиотиков.

Выводы.

1. Применение технологии фагового дисплея позволило получить антитела, специфичные к канамицину.
2. Рекомбинантные антитела выявляют канамицин методом дот-иммуноанализа, нижний предел определения канамицина составил 1 мкг/мл.
3. Антиканамициновые фаговые антитела специфичны в отношении канамицина и не взаимодействуют с тетрациклином, ампициллином, гентамицином и неомицином.

Я.В.М. - 07.06.24