

Қазақстан Республикасы Тәуелсіздігінің 30 жылдығына арналған «Сейфуллин оқулары – 17: «Қазіргі аграрлық ғылым: цифрлық трансформация» атты халықаралық ғылыми – тәжірибелік конференцияға материалдар = Материалы международной научно – теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 17: «Современная аграрная наука: цифровая трансформация», посвященной 30 – летию Независимости Республики Казахстан.- 2021.- Т.1, Ч.1 - С.331-333

ИММУНИЗАЦИЯ МЫШЕЙ РЕКОМБИНАНТНЫМ ГЛИКОПРОТЕНОМ PAG 1

*Абенова И.Т.,
Боровиков С. Н.*

Ранняя диагностика стельности у коров широко применяется в странах с развитым животноводством и является рекомендуемой процедурой при воспроизводстве стада. Своевременная диагностика стельности позволяет контролировать воспроизводство стада и снижать экономические издержки фермерам. В частности, осенняя проверка коров на стельность позволяет выбраковывать яловых животных и таким образом сокращать затраты на зимнее содержание. А перевод стельных коров на сбалансированное кормление благоприятно влияет на будущее потомство [1].

В настоящее время используют следующие методы выявления стельности у коров:

- ректальное исследование репродуктивной системы;
- ультразвуковое исследование и химико-иммунологические тесты для обнаружения биохимических маркёров стельности (в настоящее время в РК может быть использован только один биохимический маркёр - прогестерон).

Ректальное исследование - трудоемкий процесс, требующий опыта работы и при ректальном исследовании достоверные результаты можно получить только с 40 дня, а в ряде случаев характерные морфологические изменения пальпируются только на 2 -3 месяц стельности. Затруднительно применения ректальной диагностики для скота мясных пород. Ультразвуковое исследование позволяют точно выявлять стельных коров уже на 28-е сутки после осеменения с достоверностью получаемых результатов 99,5%, но требует приобретения дорогостоящего оборудования и услуг высокоспециализированного специалиста [2]. Оценивая реальное положение дел в животноводческих хозяйствах Казахстана, становится очевидным, что далеко не все хозяйства могут себе позволить покупку специализированного аппарата УЗИ и подготовку специалиста. Кроме того, ректальный метод и ультразвуковое исследование трудоемкая процедура, в то время как при интенсификации животноводства требуется недорогие, но высокоспецифичные тесты.

В настоящее время самыми быстрыми и достоверными способами выявления стельности коров являются методы лабораторной диагностики с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Тесты ИФА позволяют

определять биохимические маркеры стельности: гормон прогестерон или гликопротеины, ассоциированные с беременностью (pregnancy associated glycoproteins, PAG) в молоке и/или сыворотке крови уже на 28-е сутки после осеменения [3].

Связанные со стельностью гликопротеины (PAG) являются продуктами двуядерных клеток плаценты и членами семейства аспарагиновых протеиназ, но многие из них, как предполагается, являются ферментативно неактивными [4,5]. Гликопротеин, связанный со стельностью крупного рогатого скота 1 (bPAG-1) был первым, который был выделен из плаценты крупного рогатого скота, и методы его обнаружения были подтверждены в дальнейших исследованиях [6].

Более поздние исследования идентифицировали его генную последовательность, структуру белка и подтвердили его локализацию в двуядерных клетках. На сегодняшний день идентифицированы 21 ген PAG крупного рогатого скота, 9 PAG овец и 11 PAG коз [7]. Недавние исследования выявили, что различные bPAGs экспрессируются в ранние сроки стельности, а те, которые преимущественно локализованы в двуядерных клетках, экспрессируются на более поздних стадиях стельности. Хотя оба гликопротеина локализованы в двуядерных клетках, bPAG-1 экспрессируется одним из первых [8].

Учитывая данный факт, первым этапом нашей работы являлось проведение иммунизации мышей линии *Balb/c* рекомбинантным белком PAG 1 (антиген любезно предоставлен сотрудниками НЦБ МОН РК) с целью получения моноклональных антител к эпитопам данного антигена.

В качестве опытных животных были отобраны две группы линейных мышей по методу аналогов (одинаковый возраст, вес, физиологическое состояние), по три головы в группе. Каждая группа содержалась в отдельной клетке, условия кормления и содержания были идентичными. Животным первой группы инъецировали антиген в течение четырех недель, вторая группа была контрольной. Схема иммунизации приведена в таблице 1.

Таблица 1- Схема иммунизации линейных мышей рекомбинантным антигеном PAG 1

Дни иммунизации	Дата	Адьюванты	Доза антигена, мкл	Способ иммунизации
-1	21.12.20	Отбор преиммунной сыворотки		
0	21.12.20	Полный адьювант Фрейнда	100	Подкожно
14	04.01.21	Неполный адьювант Фрейнда	100	Подкожно
28	18.01.21	Неполный адьювант Фрейнда	100	Подкожно
32	22.01.21	Отбор крови и тестирование		
42	24.01.21	Boost – без	100	Внутрибрюшинно

		адьюванта		
--	--	-----------	--	--

Из таблицы 1 видно, что первые 3 иммунизации проводили подкожно с полным и неполным адьювантами, а последняя иммунизация была проведена внутривенно без адьюванта.

На 32-й день после начала иммунизации лабораторных животных проводили отбор крови для первичного тестирования. Отбор крови проводили из хвостовой вены с соблюдением всех правил асептики. Тестирование сыворотки крови иммунизированных животных проводили в иммуноферментном анализе. Исходя из результатов тестирования были получены следующие данные (таблица 2).

Таблица 2 – Динамика выработки антител в организме иммунизированных животных

№ тести- рования	1-я группа			Контрольная группа		
	Титры антител					
	I мышь	II мышь	III мышь	I мышь	II мышь	III мышь
I	1:12 800	1:51 200	1:51 200	-	-	-

Как видно из таблицы 2, выбранная схема иммунизации позволила получить высокие титры специфических антител к эпитопам использованного рекомбинантного антигена у всех иммунизированных в опыте животных. Полученные титры иммуноглобулинов вполне отвечают поставленной цели и могут быть использованы для выделения иммунных В-лимфоцитов и получения гибридных клеток, продуцирующих моноклональные антитела.

Таким образом, в результате проведенных исследований, отработана схема иммунизации лабораторных животных, позволяющая стимулировать иммунную систему мышей синтезировать специфические антитела к исходному антигену в высоких титрах.

Список литературы

1. Youngquist, R.S., Pregnancy diagnosis. Current Therapy in Large Animal Theriogenology. WB Saunders Co. Philadelphia, PA. pp, 1997: p. 295-303.
2. Posthuma-Trumple, G.A., et al., Perspectives for on-site monitoring of progesterone. Trends in biotechnology, 2009. 27(11): p. 652-660.
3. Samsonova, J.V., A.P. Osipov, and S.E. Kondakov, Strip-dried whole milk sampling technique for progesterone detection in cows by ELISA. Talanta, 2017. 175: p. 143-149.
4. Green JA, Xie S, Quan X, Bao B, Gan X, Mathialagan N, Beckers J, Roberts RM. Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. Bio Reprod.- 2000.62:1624 -1631

5. Zoli AP, Beckers JF, Wouters-Ballman P, Closset J, Falmagne P, Ectors F. 1991. Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein. *Biol Reprod* 45:1–10
6. Zoli AP, Guilbault LA, Delabaut P, Ortiz WB, Beckers JF. 1992a. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: Its application for pregnancy diagnosis. *Biol Reprod* 46:83–92.
7. Xie S, Green J, Beckers JF, Roberts RM. The gene encoding bovine pregnancy-associated glycoprotein-1, an inactive member of the aspartic proteinases family. *Gene* 1995.159:193–197
8. Osman V. Patel, Osamu Yamada, Keiichiro Kizaki. Quantitative Analysis Throughout Pregnancy of Placentomal and Interplacentomal Expression of Pregnancy-Associated Glycoproteins-1 and -9 in the Cow. *Molecular Reproduction and Development.*- 2004,467:257–263.