

УДК 68.39.13

## БУАЗДЫҚҚА БАЙЛАНЫСТЫ ГЛИКОПРОТЕИНДЕРГЕ ТӘН МОНОКЛОНДЫ АНТИДЕНЕЛЕРДІ АЛУ

*Сарина Н.И., Искакова И.Т., Рыскельдина А.Ж.*  
*ҚР БҒМ ҒК «Биотехнология Ұлттық орталығы» РМК,*  
*Нұр-Сұлтан қ. Қазақстан*  
*E-mail: indiraabenova@mail.ru*

### Түйін

Тышқандардың имундық спленоциттерді және миеломды жасушаларын гибридтеудің нәтижесінде, PAG1 рекомбинатты антигеннің эпитопына телімді моноклоналды антиденелердің продуцент-штамдары алынды. Және де, ары қарай зерттеулер жүргізу үшін, авторлық атауы 3D9D9 гибридті жасушаның штамы мен өсінді сұйықтығындағы антиденелер ИФТ-да 1:3200 ден 1:6400-ге титрді көрсеткен субклондар талдап алынды. In vivo жағдайында моноклоналды антиденелердің препараттық мөлшері жинап алынып, олардың басты имунды химиялық қасиеттері зерттелді. Тазартылған асцит сұйықтығындағы антиденелердің титрі 1:12800-ге тең болғаны анықталып, олардың каппа типіндегі L тізбегінде, G класының G1 тармағының имуноглобулиндеріне жататыны анықталды. Иммуноблоттинг нәтижесінде МКА молекулалық салмағы 57 кД, рекомбинантты PAG1 антигендік детерминантасына жататындығы айқындалды. Осылай, алынған моноклоналды антиденелердің PAG1 рекомбинантты антигендерге телімділігі дәлелденді, және ол буаздықты анықтауға арналған тестті әзірлеу кезінде қолданылауы мүмкін.

**Кілт сөздер:** буаздықты диагностикалау, буаздыққа байланысты гликопротеиндер, PAG1 рекомбинантты антигені, имундау, гибридтеу, клондау, моноклонды антиденелер.

### Кіріспе

Буаздықты ерте және дәл диагностикалау малдың көбеюін жақсы басқарудың, төлдеу аралықтарын қысқартудың, ұрықтанбаған малдарды анықтаудың, ұрықтандыруды бақылаудың, емдеудің немесе жоюдың маңызды критерийі болып табылады. Қазіргі уақытта ветеринарлардың арсеналында буаздықты анықтаудың тікелей және жанама әдістері бар. Тікелей әдістерге трансректалды пальпация және ультрадыбыстық зерттеу кіреді. Техникалық сараптама деңгейі, ветеринардың біліктілігі және зерттеу жүргізілетін ұрықтандырудан кейінгі кезең талдаудың ерекшелігі мен сезімталдығына айтарлықтай әсер етуі мүмкін [1].

Буаздыққа байланысты гликопротеиндер (pregnancy associated glycoproteins, PAG) сияқты арнайы антигендерді анықтауға негізделген зертханалық әдістер буаздықты диагностикалауға балама ретінде жиі қолданылуда. Буаздықпен байланысты гликопротеиндер аспарагикалық протеиназалар тұқымының мүшелері болып табылады. Гликопротеиндердің бұл тобы трофобластың

өзгерген эндометрияға соңғы бекітілгеннен кейін көрінеді және олардың концентрациясы жүктілік кезеңіне, ұрық санына байланысты және ұрықтың өміршеңдігінің көрсеткіші болып табылады.

Молекулалық-генетикалық әдістермен жүргізілген зерттеулер күйіс қайыратын жануарлардың геномында PAG кодтайтын 100-ден астам гендер бар екенін көрсетті, олардың көпшілігі плацентаның беткі қабаттарында экспрессияланады. Сондай-ақ жануарларда буаздықтың әртүрлі кезеңдерінде PAG гендерінің экспрессиялану мүмкіндігін орнату мүмкін болды [2]. Ірі қара малда кем дегенде 22 PAG түрі анықталған, олар аминқышқылдық құрамы мен филогенетикалық систематикасы бойынша үш топқа топтастырылған [3,4]. Ірі қара ұрықтың котиледондарынан бөлінген бірінші PAG түрі boPAG1 деп аталды. Гликопротеидтердің бұл түрі буаздықтың ерте кезеңдерінде (ірі қара малында ұрықтанудың 19-шы күнінен бастап) бөлініп шығады, анасының қанына түседі және буаздықтың

бүкіл кезеңінде ерекше маркер қызметін атқара алады. PAG1 гликопротеиндері өміршеңдігін бағалаудағы және ұрықтың ерте өлімін анықтаудағы маңыздылығына байланысты таңдаулы буаздық маркері болып саналады. Осы себепті, зерттеу объектісі ретінде PAG1 гликопротеині алынды. Дүниежүзілік тәжірибеде жануарлардың буаздығын

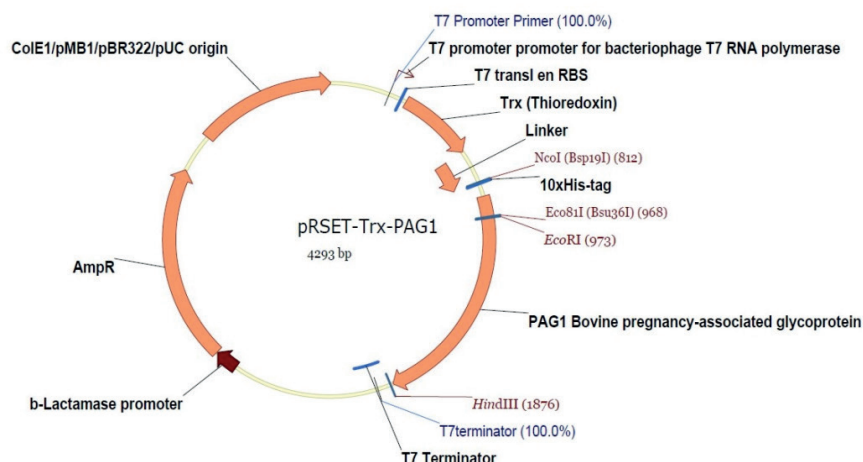
серологиялық диагностикалау буаздыққа байланысты гликопротеидтерді анықтауға негізделген, сондықтан сынаманың телімділігі мен сезімталдығының негізгі нүктесі антиденелерді анықтау болып табылады. Осыған байланысты, бұл жұмыстың мақсаты - рекомбинантты PAG1 эпитоптарына тән моноклоналды антиденелерді алу болды.

### Материалдар және зерттеу әдістері

Зерттеу жұмыстары Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігінің «Ұлттық биотехнология орталығы» РМК Қолданбалы генетика зертханасының базасында жүргізілді.

pRSET-Trx-PAG1 плазмидасымен экспрессияланған рекомбинантты PAG1 антигені иммуноген ретінде пайдаланылды (1-сурет).

Пайдаланылған құрылымда мақсатты ақуыз қайта қатпарлану және тазарту процесін жеңілдету үшін теоредоксинмен байланыстырылады. Тазартылған ерігіш ақуыз Balb/c тышқандарын иммундау үшін пайдаланылды.



1-сурет - pRSET векторы негізінде жасалған PAG1 антигенінің бактериялық экспрессиясына арналған экспрессиялық плазида

Тәжірибелік жануарлар ретінде Balb/c тышқандарының екі тобы таңдалды (жасы, салмағы, физиологиялық жағдайы бірдей), әрқайсысы үшеуден. Әр топ бөлек торда ұсталды, азықтандыру және тұру жағдайлары да бірдей болды. Бірінші топтағы жануарларға үш апта бойы антиген енгізілді, екінші топ - бақылау тобы болды. Иммундеу схемасы келесідей болды: бірінші күні эксперименталды жануарларға 0,1 мл Фрейдтің толық адьюванты қосылған 50 мкг рекомбинантты антиген құрсақ қуысына енгізілді. 7 және 14-ші күндері 0,1 мл Фрейдтің толық емес адьюванты қосылған 50 мкг рекомбинантты антиген құрсақ қуысына енгізілді.

Иммунизацияның 21-ші күні жануарларға PBS (рН 7,2-7,4) араластырылған 50 мкг антиген енгізілді. Телімді антиденелердің деңгейін сынау соңғы иммунизациядан кейін 4-ші күні иммунды ферменттік талдаудың (ИФТ) жанама қойылымымен жүргізілді.

Телімді моноклоналды антиденелерді (МКА) өндіретін гибридомалар иммунзацияланған Balb/c тышқандарынан алынған NS0/SP2 миелома жасушалары мен иммундық спленоциттерді будандастыру арқылы алынды. Декантация агенті ретінде PEG1500 (Sigma, 10783641001) пайдаланылды. Жасушалары бар пластиналар 2% Aminopterin (SigmaA5159) және 10% FetalBovineSerum

(Sigma, F2442) бар Opti-MEM™ қоректік ортада (Gibco™ 22600134) 5% CO<sub>2</sub> бар 37°C температурада инкубацияланды. 14 күннен кейін жасуша өсінділерін инверттелген микроскоппен қарау арқылы гибридті жасушалардың өсуі бақыланды. Гибридті жасушалардың өсінді сұйықтығын телімді антиденелерге сынау үшін иммунжы ферменттік талдаудың жанама қойылымы қолданылды.

Гибридті жасушаларды клондау лимитті сұйылту әдісімен орындалды [5].

Моноклоналды антиденелердің изотиптерін анықтау Pro-Detect™ Rapid Antibody Isotyping Assay Kit - Mouse (Thermo Scientific, A38550) көмегімен ИФТ әдісімен жүргізілді.

МКА препараттық мөлшерлерін алу үшін гибридті жасушалар BALB/c тышқандарының құрсақ қуысында өсірілді, оларға алдын ала толық емес Фрейнд адьюванты (Сигма,

### Зерттеу нәтижелері

Иммунделген тышқандардың қан сарысуын сынау нәтижесінде пайдаланылған рекомбинантты PAG1 антигендік дәрежесі жеткілікті, жануарлардың иммундық жүйесін ынталандырады, бұл қажетті антиденелерді өндіретін В-лимфоциттердің клондарының белсенді индукцияландыратындығы айқындалды және қан сарысуының құрамындағы телімді антиденелердің титрлері 1:6400-1:12800 болды. Ең жоғары антидене титрлерін көрсеткен тышқандар таңдалып алынып, олардың көк бауырларынан алынған иммундық спленоциттер миелома жасушаларымен будандастыру үшін пайдаланылды. Миелома жасушаларының саны -  $9 \times 10^6$ , иммундық спленоциттер -  $60 \times 10^6$ , қатынасы 1: 7 болды. Гибридома штаммдарының қалыптасуы екі апта ішінде орын алды. Жасуша өсінділерін бақылау инверттелген микроскоппен қарау арқылы орындалды. Жасушаларды өсіруге арналған планшеттің 384 шұңқыршасының 175-інен гибридті жасушалардың өсуі байқалғаны анықталды, гибридті жасушалардың пайда болу пайызы 45,5% құрады. Клондардың өсінді сұйықтығын ИФТ әдісімен телімді антиденелердің болуына сынау қоректік ортаның аздап сарғаюы байқалған және гибридті жасушалар шұңқырша беткейінің 30%-дан астамын алып жатқан сәттен басталды. Бастапқы тестілеу өсінді сұйықтығында рекомбинантты PAG1-ге тән антиденелерді өндіретін гибридомалар 29 шұңқыршадан

АҚШ) 0,5 мл дозада енгізілді. Алынған асцит сұйықтығы стерильді жағдайда құрсақ қуысынан жинап алынды және центрифугалау арқылы гибридті жасушалардан ажыратылды. Асцит сұйықтығынан иммуноглобулиндерді тазарту жұмыстары NAb™ ProteinA / GSpinColumns, 1 мл (Thermo Scientific, 89958) көмегімен орындалды.

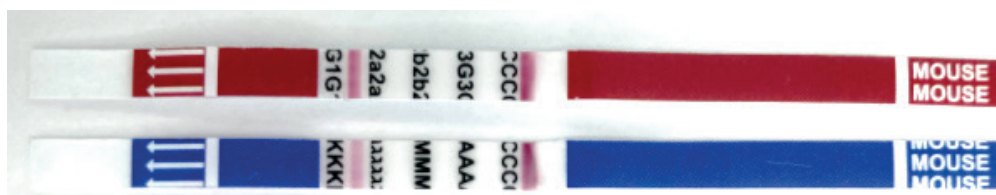
SDS-PAGE электрофорезі U. Laemmli [6] әдісі бойынша 10% полиакриламидті геледе (PAAG) орындалды.

Иммуноблоттинг (Westernblotting) Towbin P. et al. әдісі бойынша орындалды [7].

ҚР БҒМ ҒК "Ұлттық биотехнология орталығы" РМК жергілікті этикалық комиссиясының отырысында жануарлардың қатысуымен жүргізілетін зерттеулер хаттамасы қарастырылып, мақұлданды.

анықталды. Белсенді гибридомалардың жасушалары мұздату арқылы сақталды. Әрі қарай жұмыс жүргізу үшін ең белсенді гибридоманың 3D9 штаммы таңдалды. Әрі қарай құрылымы мен қасиеттері бойынша біртекті моноклоналды антиденелерді алу үшін 3D9 гибридомасы лимитті сұйылту әдісімен клондалды. Гибридомалардың белсенділігін анықтау үшін микроскопияда бір жасушалы шоғыры бар гибридті жасушалар таңдалды. Клондау нәтижелері таңдалған қосалқы клондардың біртектілігін көрсетті, өйткені олардың 78% дейін телімді иммуноглобулиндерді синтездейтіндігін сақтады. Әрі қарай жұмыс жүргізу үшін ИФТ-да ең жоғары оптикалық тығыздыққа ие болған 3D9D9 субклоны таңдалды. ИФТ-да иммуноглобулиндердің антигендермен байланысуы тіркелген субклондардың өсінді сұйықтығының құрамындағы антиденелердің титрі 1:3200-ден 1:6400-ге дейінгі аралықта ауытқыды.

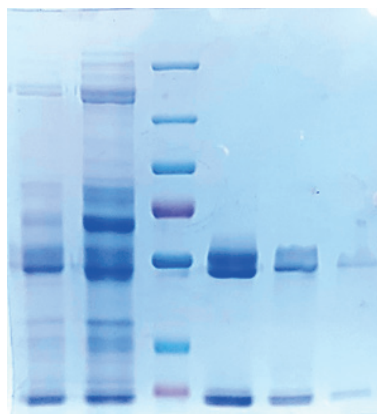
Моноклоналды антиденелердің класы мен класс тармағын анықтау иммуноглобулиндерді тазартудың оңтайлы әдісін таңдау кезінде қажет. Осы мақсатта Pro-Detect™ Rapid Antibody Isotyping Assay Kit - Mouse (Thermo Scientific, A38550) иммунохроматографиялық сынақтар жинағы пайдаланылды. Сынақ үшін 3D9D9 штаммының өсінді сұйықтығы алынып, 1:10 қатынасында сұйылтылып, зерттеу жүргізілді. Нәтижелері 2-суретте берілген.



2-сурет – МКА тобы мен қосалқы топты анықтаудың нәтижесі

1-суретте көрсетілгендей, 3D9D9 штаммының МКА G иммуноглобулиндер тобына, G1 класс тармағына жатады және каппа типті L тізбегі бар. Әдебиеттерден белгілі болғандай, тышқан IgG1 рН 8-9 кезінде А ақуызымен жақсы байланысады. Бұл аффинитті тазарту кезінде иммуноглобулиндердің жақсы байланысуы үшін буферлерді дайындау кезінде ескерілді.

МКА препараттық мөлшерін алу үшін *in vivo* әдісі қолданылды, нәтижесінде олар асцит сұйықтығы түрінде алынды. NAb™ ProteinA / GSpinColumns ұқсастық бағандары арқылы асцит сұйықтығын тазарту процесінде тазалығы жоғары антиденелердің 3 фракциясы алынды (3-сурет). ИФТ-да асцит сұйықтығынан тазартылған антиденелердің титрі 1: 12800 болды.



3-сурет - 10% PAAG ішіндегі SDS-PAGE

1 - асцит сұйықтығы (1/10), 2 - серпіліс, М - ақуыз PageRulerPlus маркерлері (молекулалық салмақтары 10-250 кДа), 4 - №1 фракция, 5 - №2 фракция, 6 - №3 фракция.

Алынған МКА-дің тиоредоксинге ықтимал ерекшелігін болдырмау үшін тестілеу гетерологиялық рекомбинантты ақуыздарды қолдану арқылы жүргізілді (1-кесте).

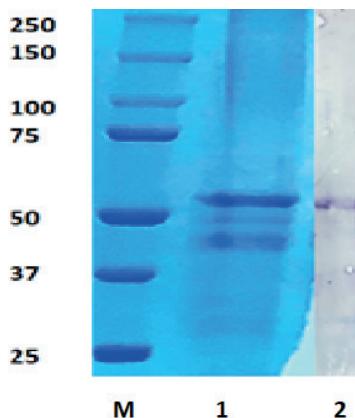
1-кесте – Алынған МКА штаммының 3D9D9 тиоредоксинге телімділігін анықтау

Сұйылту	450 нм кезіндегі оптикалық тығыздықтың көрсеткіші			
	3А аусыл Вирусының рекомбинантты құрылымсыз ақуызы	3В аусыл вирусының рекомбинантты құрылымсыз ақуызы	NP 3 Құтыру вирусының рекомбинантты нуклеопротеині	Рекомбинантты PAG1
1:100	0,144	0,093	0,090	0,626
1:200	0,072	0,052	0,065	0,501
1:400	0,040	0,022	0,032	0,447
1:800	0,021	0,018	0,018	0,402
1:1600	0,013	0,011	0,012	0,334
1:3200	0,008	0,008	0,009	0,232
1:6400	0,008	0,009	0,011	0,168
1:12800	0,008	0,007	0,012	0,167

1-кестеден көрсетілгендей, ферментке байланысты иммунды ферменттік талдаудағы 3D9D9 штаммының МКА гетерологиялық рекомбинантты ақуыздармен әрекеттеспейді.

Иммуноблоттинг нәтижесінде алынған

МКА-дің рекомбинантты PAG1 антигендік детерминанттарына телімділігі анықталды, антиденелердің өзара әрекеттесуі және молекулалық массасы 57 кД антигеннің белоктық фракциясы анықталды (4-сурет).



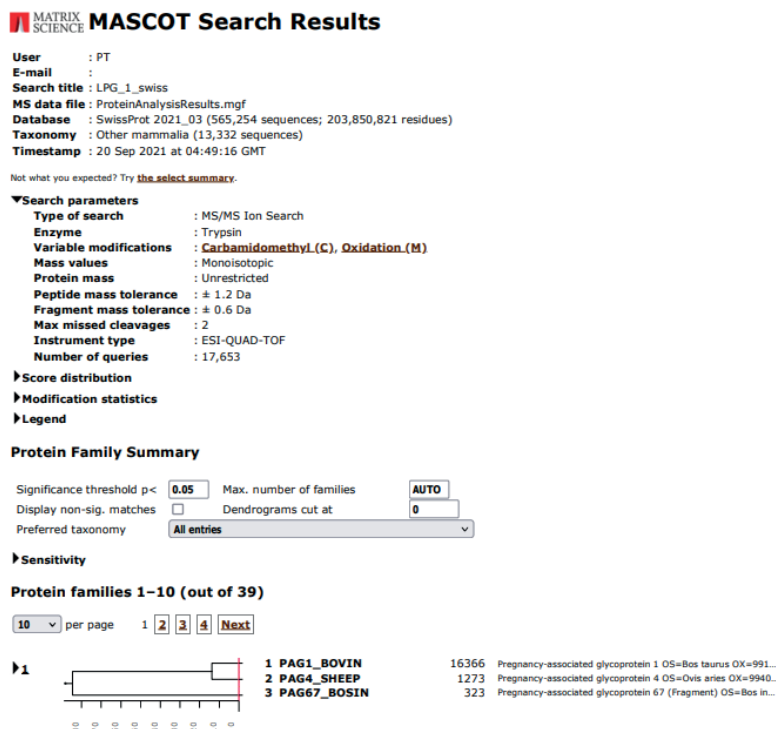
4-сурет - 3D9D9 штаммының иммуноблоттау МКА нәтижелері

M - PageRulerPlus ақуыздарының молекулалық массасының маркерлері (10-250 кДа),

1 - рекомбинантты PAG1 (SDS-PAGE 10% PAAG),

2 - МКА штаммының 3D9D9 иммуноблоттауы

Рекомбинантты PAG1 үлгісінде масс-спектрометриялық талдауға жіберілген полиакриламидті гельден 57 кД молекулалық массаға сәйкес жолақ кесілді (5-сурет).



5-сурет - Иммунореактивті ақуыздардың масс-спектрометриялық талдауының нәтижелері

5-суретте көрсетілгендей, масс-спектрометриялық талдау нәтижесінде иммунореактивті ақуыз «Буаздыққа байланысты гликопротеин 1 OS = Bos taurus» (PAG1\_BOVIN) ретінде анықталды. Бұрын айтылғандай, гликопротеиндердің бұл

түрі буаздықтың ерте бөлінуі (ірі қара мал ұрықтанудың 19-шы күнінен бастап), анасының қанына енеді және буаздықтың бүкіл кезеңінде спецификалық маркер қызметін атқара алады [8].

### Зерттеу нәтижелерін талқылау және қорытынды

Бүгінгі таңда буаздықты диагностикалаудың көптеген әдістері ұсынылған: тік ішекті пальпациялау, ультрадыбыстық зерттеу және иммунохимиялық әдістер иммунды ферменттік талдауға негізделген. Сиырлардың буаздығын диагностикалаудағы ең перспективті әдістің бірі болып сезімталдығы жоғары ИФТ табылады. Бастапқыда оны қолдану ұрықтандырудан кейін аналық бездер өндіретін гормондарды анықтау мүмкіндігіне байланысты болды. Дегенмен, аналық бездердегі патологиялық процестердің дамуы кезінде гормондардың әртүрлі деңгейлерін өндіруге байланысты ИФТ әдісі кең қолдануды таба алмады.

Ғалымдар плацента арқылы экспрессияланатын және жануарлардың қанында айналатын PAG гликопротеидтер тобын ашқаннан кейін [8], қан сарысуында осы маркерлерді анықтауға негізделген буаздықты диагностикалау әдістері әзірленді. Бұл бағыттағы жұмыстардың келешегі ұрықтанғаннан кейін 19-шы күннен бастап сиырлардың қанында осы антигендердің болуына және буаздықтың бүкіл кезеңінде қан айналымына байланысты. Сонымен қатар, олардың сүтте табылу мүмкіндігі туралы деректер бар, бұл әсіресе құнды, өйткені бұл әдіс жануарларға стресссіз буаздықты орнатуға мүмкіндік береді [9]. Мы-

салы, R.V. Oliveira Filho және басқалары ірі қара малдың буаздығын диагностикалау үшін айналымдағы PAG гликопротеиндерін пайдалану мүмкіндігін зерттеді. Буаз сиырлардағы бұл ақуыздардың концентрациясы 24-ші күні жоғарылағаны анықталды, бұл сиырлардағы буаздықты ерте анықтау үшін пайдалы маркер және эмбриональды жоғалуды болжау үшін әлеуетті маркер болуы мүмкін [10]. Ғалымдар тобы (Ahmed O. Gatea және т.б.), коммерциялық сынақтармен салыстырғанда, қан құрамындағы PAG ақуыздарының концентрациясын анықтау үшін, иммунды ферменттік талдауда моноклоналды және поликлоналды антиденелерді қолданған. Зерттеу нәтижесінде ең дәл нәтижелер (95%) моноклоналды антиденелердің комбинациясын қолдану арқылы алынды [11].

Осылайша, 3D9D9 гибридті жасуша өсіндісі штаммының моноклоналды антиденелерінің иммунды химиялық сипаттамаларының алдын ала нәтижелері олардың PAG1 буаздыққа байланысты рекомбинантты гликопротеинге телімділік көрсетеді, бұл оларды сиырлардың буаздығын ерте анықтау үшін отандық серологиялық тесттердің құрамдас бөлігі ретінде пайдалану мүмкіндігін болжайды.

### Әдебиеттер тізімі

1. Cowie TA. Pregnancy diagnosis tests: a review // Commonwealth agricultural bureaux joint publication. – 1948. – No. 13. – P. 11–7.
2. J. Coding Antibody production by hybridoma. // J. Immunol. Meth. – 1980. – V. 39. – Iss.1. – P.285-308.
3. Sousa, N. M., Ayad, A., Beckers, J. F., & Gajewski, Z. Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) as pregnancy markers in the ruminants // J PhysiolPharmacol. – 2006. – No. 57. – P.153-171.
4. Green JA, Xie S, Quan X, Bao B, Gan X, Mathialagan N, et al. Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy // BiolReprod. – 2000. – No.62. – P.24–31.
5. J. Coding Antibody production by hybridoma. // J. Immunol. Meth. – 1980.– Volume 39. – № 1, – P. 285-308.
6. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // Nature. – 1970. – Volume 227. P. 680-685.
7. Towbin P.K., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels tonitrocellulose sheets. // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1979. Volume 76. – № 9, – P. 4350-4354.
8. Sousa, N. M., Ayad, A., Beckers, J. F., & Gajewski, Z. Pregnancy-associated glycoproteins (PAG) as pregnancy markers in the ruminants. // J PhysiolPharmacol. – 2006. Volume 57. № 8, – P.153-171.
9. Green JA, Xie S, Quan X, Bao B, Gan X, Mathialagan N, et al. Pregnancy-associated bovine and

ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy // BiolReprod. – 2000. No.62. – P.24–31.

10. R V Oliveira Filho , G A Franco , S T Reese , F G Dantas , P L P Fontes, R F Cooke, J D Rhinehart, K W Thompson, K G Pohler. Using pregnancy associated glycoproteins (PAG) for pregnancy detection at day 24 of gestation in beefcattle // Theriogenology. – 2020. No.1. – P.128 – 133.

11. Ahmed O Gatea, Michael F Smith, Ky G Pohler, Tina Egen, Marcos H C Pereira, José L M Vasconcelos , John C Lawrence, Jonathan A Green. The ability to predict pregnancy loss in cattle with ELISAs that detect pregnancy associated glycoproteins is antibody dependent // Theriogenology. – 2018. No.1. – P.269-276.

#### **Қаржыландыру көзі**

Зерттеулер "2020-2022 жылдарға арналған ғылыми және ғылыми-техникалық жобалар бойынша ажалымдарды гранттық қаржыландыру", ЖТН АР08052441 шеңберінде жүргізілді.

### **ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ СПЕЦИФИЧНЫХ К ГЛИКОПРОТЕИНАМ СВЯЗАННЫХ СО СТЕЛЬНОСТЬЮ**

*Сарина Н.И., Искакова И.Т., Рыскельдина А.Ж.*

*РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК,*

*г. Нур-Султан, Казахстан*

*E-mail: indiraabenova@mail.ru*

#### **Аннотация**

В результате гибридизации иммунных спленоцитов и клеток миеломной линии мышей, получены штаммы-продуценты моноклональных антител к эпитопам рекомбинантного антигена PAG1. Для дальнейших исследований отобран штамм гибридных клеток с авторским названием 3D9D9, титры антител культуральной жидкости данного субклона ИФА составили от 1:3200 до 1:6400. Нарботано препаративное количество моноклональных антител методом *in vivo* изучены их основные иммунохимические свойства. Титр очищенных антител из асцитной жидкости оказался равен 1:12800, они относятся к иммуноглобулинам класса G подкласса G1 и имеют L цепь типа каппа. В результате иммуноблотинга определена эпитопная направленность МКАк антигенным детерминантам рекомбинантного PAG1 с молекулярной массой 57кД. Таким образом доказано, что полученные моноклональные антитела имеют специфичность к антигенам рекомбинантного PAG1 и могут быть использованы при конструировании теста для определения стельности.

**Ключевые слова:** диагностика стельности, гликопротеины, связанные со стельностью, рекомбинантный антиген PAG1, иммунизация, гибридизация, клонирование, моноклональные антитела

### **OBTAINING MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO GLYCO-PROTEINS ASSOCIATED WITH PREGNANCY**

*Sarina N.I., Iskakova I.T., Ryskeldina A.Zh.*

*RSE «National Center for Biotechnology» CS MES RK,*

*Nur-Sultan, Kazakhstan*

*E-mail: indiraabenova@mail.ru*

#### **Abstract**

As a result of hybridization of immune splenocytes and cells of the myeloma line of mice, strains producing monoclonal antibodies to the epitopes of the recombinant PAG1 antigen were obtained. For further studies, a strain of hybrid cells with the author's name 3D9D9 was selected, the antibody titers of

the culture fluid of this subclone of ELISA comprised from 1:3200 to 1:6400. A preparative amount of monoclonal antibodies was obtained by the in vivo method and their main immunochemical properties were studied. The titer of purified antibodies from ascites fluid was 1: 12800, they belong to class G immunoglobulins, subclass G1 and have an L chain of the kappa type. As a result of immunoblotting, the epitope orientation of MCA to antigenic determinants of recombinant PAG1 with a molecular weight of 57 kD was determined. Thus, it was proved that the obtained monoclonal antibodies have specificity for the antigens of the recombinant PAG1 and can be used in the design of a test for determining pregnancy.

**Keywords:** pregnancy diagnostics, glycoproteins associated with pregnancy, recombinant antigen PAG1, immunization, hybridization, cloning, monoclonal anti-bodies.