

ОПЫТ ПОЛУЧЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К СТЕРОИДНОМУ ГОРМОНУ

Турмаганбетова Г.К. - магистрант, Костанайский государственный университет им. А.Байтурсынова

Кравченко А.В. – докторант, Костанайский государственный университет им. А.Байтурсынова

Умаров А.Б. -магистрант, Костанайский государственный университет им. А.Байтурсынова

Рыщанова Р.М.- к.в.н., доцент, Костанайский государственный университет им. А.Байтурсынова

Куйбагаров М.А.- к.в.н., директор ТОО «НИИ сельскохозяйственной биотехнологии», г. Астана

В статье приведены результаты получения специфических моноклональных антител. Опыты были проведены с использованием гибридомных технологий. Моноклональные антитела получали к антигенным детерминантам стероидного гормона. Получены моноклональные антитела (Mabs), которые специфически связывают эстрадиол 17 β (ЭСТ). Проведена иммунизация мышей линии Balb/c с использованием различных схем, с целью получения иммунных компетентных клеток В-лимфоцитов специфических к эстрадиолу. Принятая схема иммунизации мышей обеспечивала высокий специфический иммунный ответ у животных. Схема иммунизации основана на оптимальной комбинации специфических препаратов конъюгата эстрадиола с иммуностимулятором адьювантом Фрейнда.

В качестве антигена для иммунизации линейных мышей был использован синтезированный конъюгат ЭСТ с носителем - бычьим сывороточным альбумином. Для тестирования иммунной сыворотки крови и моноклональных антител методом ИФА были использованы конъюгаты ЭСТ с бычьим сывороточным альбумином и овальбумином. Полученные линии гибридных клеток продуцировали моноклональные антитела класса IgG.

Ключевые слова: мыши линии Balb/c, конъюгат, гаптен, гормон эстрадиол 17 β , эпитоп, миеломные клетки, гибридизация, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ, изотип.

СТЕРОИДТІК ГОРМОНҒА ЕРЕКШЕЛІ МОНОКЛОНАЛЬДІ АНТИДЕНЕЛЕРДІ АЛУДЫҢ ТӘЖІРИБЕСІ

Турмаганбетова Г.К. - магистрант, А. Байтурсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университеті

Кравченко А.В. – докторант, А. Байтурсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университеті

Умаров А.Б. -магистрант, А. Байтурсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университеті

Рыщанова Р.М.- в.ғ.к., доцент, А. Байтурсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университеті

Куйбагаров М.А.- в.ғ.к., ЖШС «Ауылшаруашылық биотехнология ғылыми-зерттеу институты», Астана қ.

Мақалада ерекше моноклональді антиденелерді алудың нәтижелері келтірген. Тәжірибелер гибридомдық технологияларды қолдануымен өткізілген. Моноклональді антиденелер стероидтік гормонның антигендік детерминанттарына қарсы алынды. Эстрадиол 17 β байланыстыруға арналған моноклональды антиденелер алынған. Әр түрлі схемаларды қолдануымен эстрадиолға ерекшелі В-лимфоциттердің иммуна құзырлы торшаларды алу үшін Balb/c желісі тышқандардың иммундеуі өткізілген. Тышқандарды иммундеуге қабылданған схемасы малдарда биік ерекше иммуна жауап қамтамасыз етті. Иммундеу схемасы эстрадиол конъюгатымен Фрейнд адьювант иммуностимулятор ерекше препараттардың ұтымды комбинацияда негізделген.

Сызықтық тышқандар иммундеу үшін керек антиген ретінде эстрадиол мен бука сарысулы альбумин конъюгаты пайдаланылды. Иммундық іркіт және моноклоналды антиденелерді тексеру үшін бука сарысулы альбумин және овальбумин конъюгаттары пайдаланылды. Нәтижесінде алынған гибриді ұялы желілер IgG классты моноклоналды антиденелерді шығарған еді.

BALB / c желісі тышқандар, конъюгат, гаптен, эстрадиол 17 β гормоны, эпитоп, миелома жасушалары, будандастыру, моноклоналды антиденелер, иммуноферменттік талдау, изотип.

THE EXPERIENCE OF OBTAINING SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES TO STEROID HORMONE

Turmaganbetova G.K. - undergraduate, *Kostanay State University named after A.Baitursynov*

Kravchenko A.V. - PhD student, *Kostanay State University named after A.Baitursynov*

Umarov A.B. - undergraduate, *Kostanay State University named after A.Baitursynov*

RysChanova R.M. - candidate of veterinary sciences, *Kostanay State University named after*

A.Baitursynov

Kuibagarov M.A. - candidate of veterinary sciences, *Research Institute of Agricultural Biotechnology, Astana city*

The article presents the results of specific monoclonal antibodies. Experiments were conducted using hybrid technology. Monoclonal antibodies were obtained for antigenic determinants of steroid hormone. The obtained monoclonal antibodies (Mabs) that specifically bind estradiol 17-β (ECT).

Conducted immunization of mice of the line Balb/c using various schemes, for the purpose of obtaining immune competent cells of b-lymphocytes specific for estradiol. The approved scheme of immunization, the mice were provided a high specific immune response in animals. The immunization scheme based on the optimal combination of specific drugs conjugate of estradiol with the immune adjuvant of Freinda. As antigen for immunization of linear mice was used the synthesized conjugate ECT with bovine serum albumin. For the test of immune serum and monoclonal antibodies with method ELISA were used the conjugates ECT with bovine serum albumin and ovalbumin. Received hybrid cell lines secreting monoclonal antibodies of the IgG class.

Key words: mice of the line Balb/c, conjugate, hapten, hormone estradiol 17β, epitope, myeloma cells, hybridization, monoclonal antibodies, ELISA, isotype.

Оценка современного состояния решаемой научной проблемы в современном промышленном животноводстве и птицеводстве для увеличения производства продукции нередко используются гормональные стимуляторы роста: прогестерон, тестостерон, эстрадиол-17В и их синтетические производные и аналоги, которые по анаболическому действию эффективнее природных гормонов в 100 раз и более. Интенсивное применение гормонов животным и птицам может приводить к их избыточному накоплению в мясе и мясопродуктах. Это представляет серьезную опасность для здоровья человека, поскольку данные соединения нарушают обменные процессы и гормональный статус организма, влияют на сердечную деятельность, обладают канцерогенным эффектом. В связи с этим во многих странах мира ужесточаются требования по контролю за содержанием гормональных препаратов в продуктах животного происхождения, что предусмотрено соответствующими Директивами Евросоюза 89/662/ЕЕС, 90/425/ЕЕС, 96/23/ЕС, 2003/74/ЕС.[1, с.12] В нашей стране с одной стороны, существуют законодательные акты, регулирующие содержание гормональных препаратов в продуктах питания, а с другой отсутствуют механизмы мониторинга за соблюдением установленных нормативов, отсутствуют наборы реагентов и методики обнаружения остаточных количеств гормонов в продуктах питания [2,3, с 210].

К основным методам, широко применяемым в мировой практике для обнаружения остаточных количеств гормональных препаратов в продуктах животноводства относится иммуноферментный анализ (ИФА) [1]. Важным преимуществом ИФА является высокая чувствительность, специфичность, применение стандартных препаратов [4,5, с.87]. Однако, ИФА как диагностический тест будет иметь ценность лишь в том случае, когда в нем будут использованы специфические иммуноглобулины, направленные против уникальных эпитопов гормонов, характеризующиеся постоянными свойствами, т. е. имеющие моноклональное происхождение, и доступные в неограниченном количестве [6, с.37]. В этом случае, чувствительность и специфичность ИФА несопоставимо выше, так как позволяет выявлять остаточные количества гормонов в диапазоне не всегда достаточном для воздействия их на тест-культуры.

Исходя из вышеизложенного, целью наших исследований явилось получение специфических моноклональных антител (МКА) против стероидного гормона эстрадиола 17β.

Материалы и методы исследований:

1. Приготовление иммуногенов и конъюгатов

Конъюгат E2-BSA для иммунизации готовили по методике описанной [7,8, с.869].

2. Синтез E2-6-carboxymethylloxime-activcited ester

К 0,5 мл раствора диметилсульфоксида, содержащего 10 мг E2-6-carboxyinethylloxime (Sigma, США) добавить 7,7 мг EDC и 4,6 мг N-Гидрохусцинимиде при перемешивании, раствор перемешивать в течение 3 ч при комнатной температуре добавить 150 мл этилацетата. Раствор промывают 3 x 50 мл насыщенного раствора NaCl и сушат с помощью Na₂SO₄ После испарения растворителя, продукт растворяли в 1,0 мл ДМСО.

3. Синтез E2-BSA конъюгата

К 10 мл 0,05 М карбонатного буфера (pH 9,6), содержащего 30 мг BSA (Sigma, США) добавить по капле 0,25 мл раствора E2-6 в DMSO при перемешивании. Перемешивать 20 ч при комнатной

температуре свободный E2-6 отделяют от E2-BSA конъюгата на колонке с Sephadex G-50 с использованием в качестве элюента 0.05 М NH₄HCO₃ буфера, pH 8.0 Раствор диализуют 3 раза по 24 часа против 1 л дист. воды. Хранят при -20С до использования. Для использования, в иммуноанализе конъюгат разбавляют в 67 раз с 0,1 М карбонатного буфера, pH 9.6. Конъюгат E2 с *ovalbumin* (*Albumin from chicken egg white, Sigma*) - E2-OVA готовили аналогично.

4. Иммунизация мышей.

Иммунизацию мышей линии Balb/c 8-недельного возраста проводили конъюгатами E2-BSA внутрибрюшинно в концентрации 50 мкг/мл 4кратно с интервалом 7 суток. Сыворотку крови иммунизированных мышей через 3 дня после последней иммунизации исследовали в непрямом варианте ИФА.

5. Непрямой ИФА

В ячейки 96-луночного планшета для иммунологических реакций вносили конъюгат E2-OVA на фосфатно-солевом растворе (PBS) pH 7,2 в объеме 0,1 мл в концентрации 1 мкг/мл. Планшеты инкубировали при 4°C в течение ночи. Для удаления несвязавшихся реагентов планшет отмывали 3 раза фосфатно-солевым буфером с содержанием 0,05% твина-20 (PBS-TW). После этого вносили антителосодержащую жидкость, инкубировали при 37°C в течение 60 минут. Повторяли процедуру отмывки, в лунки вносили по 0,1 мл раствора субстрата фермента (однокомпонентный раствор тетраметилбензидина – ТМБ) и инкубировали планшет 10-15 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением в лунки планшет раствора 0,5М серной кислоты. Результаты ИФА учитывали с помощью спектрофотометра с вертикальным потоком света при длине волны 450 нм.

6. Получение моноклональных антител

Для получения моноклональных антител к эстрадиолу 17β использовали гибридную технологию. Гибридизацию клеток миеломы X₆₃Ag 8.653 и иммунных спленоцитов проводили по методу [9, с.351]. В процессе слияния использовали спленоциты иммунизированных мышей. Клетки миеломной линии X₆₃Ag8.653 и спленоциты смешивали и центрифугировали в течение 7-10 минут при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, осадок осторожно встряхивали и добавляли к нему в течение 1 минуты 1 мл теплого (37°C) 50%-ного раствора ПЭГ 4000 (Fluka). Медленно приливали 9 мл неполной ростовой среды RPMI-1640 (Sigma) и перемешивали. Смесь выдерживали 10 мин при температуре 37 °С и центрифугировали 7-10 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, осадок суспензировали в 40 мл полной ростовой среды и высевали в ячейки 96–луночного планшета (Nunc, Дания) с «питающим слоем» перитонеальных клеток. Планшеты с клетками инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Через 24 часа после посева гибридизированных клеток в каждую ячейку планшета добавляли равное количество среды, содержащей гипоксантин, аминоптерин, тимидин (HAT) (Sigma) в двукратной концентрации. По истечении 14 суток проводили контроль роста слившихся клеток путем просмотра культур на инвертированном микроскопе.

Для тестирования культуральной жидкости гибридных клеток использовали непрямой вариант твердофазного иммуноферментного анализа.

Клонирование гибридных клеток проводили методом лимитирующих разведений [10, с.285]. Определение изотипов моноклональных антител проводили в ИФА с использованием набора специфических антисывороток к различным классам мышинных иммуноглобулинов ISO2 (Sigma).

Результаты исследований

В результате тестирования сывороток крови иммунных мышей было определено, что использованный конъюгат E2-BSA обладает достаточной степенью антигенности, активно стимулируют иммунную систему животных, титры специфических антител при этом составили 1:6400-1:12800, что указывает на активную индукцию клонов В-лимфоцитов, продуцирующих антитела заданной специфичности. Отбирали мышей с наиболее высокими титрами антител, селезенки которых были использованы в качестве источника иммунных спленоцитов для гибридизации с миеломными клетками линии X₆₃/Ag 8.653. В качестве сливающего агента использовали 50% раствор полиэтиленгликоля с молекулярной массой 4000. Для культивирования клеточных культур использовали среду RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка, 0,05 мг/мл пирувата натрия, 0,003 мл/л 2-меркаптоэтанол. Количество миеломных клеток – 3×10⁶, иммунных спленоцитов – 20×10⁶, соотношение 1:9.

Формирование штаммов гибридом происходило в течение двух недель. Контроль роста проводили путем просмотра культур под инвертированным микроскопом. Было выявлено, что из 384 лунок, использованных для посева (четыре 96-ти луночных планшета для проведения культуральных работ), рост гибридных клеток наблюдался в 75 лунках, процент слившихся клеток составил – 19,5%. Тестирование культуральной жидкости клонов методом ИФА на наличие специфических антител начинали проводить с момента, когда наблюдалось незначительное пожелтение ростовой среды и гибридные клетки занимали более 30 % поверхности лунок.

Тестирование культуральной жидкости клонов проводили в непрямом варианте ИФА. В качестве антигена для сенсibilизации лунок планшета были использованы как конъюгат E2-OVA так

и чистые препараты носителей БСА и ОВА. Первичное тестирование показало наличие в культуральной жидкости 2-х гибридом 3В4 и 4F4 антител специфичных эстрадиолу (таблица 1).

Как следует из результатов таблицы 1, только один штамм 4F4 сохранил активность с течением времени. Далее, для получения гомогенных по структуре и свойствам моноклональных антител было проведено клонирование гибридомы 4F4 методом лимитирующих разведений. В результате клонирования было получено 3 гомогенных штамма, сохранивших свои свойства и продуцирующих моноклональные антитела, специфичные к антигенным детерминантам эстрадиола.

Таблица 1 - Результаты скрининга гибридных культивируемых клеток

| Наименование гибридного клона | Оптическая плотность | | |
|-------------------------------|----------------------|-----------|-----------|
| | 15-й день | 20-й день | 25-й день |
| 3В4 | 0,652 | 0,514 | 0,111 |
| 4F4 | 0,803 | 0,993 | 1,015 |

Антительную активность клеток - субклонов определяли с помощью ИФА через 10–14 суток после клонирования. Для определения активности гибридом выбирали ячейки, содержащие одиночные колонии клеток, различимые микроскопически. Позитивные клоны подвергали реклонированию по описанному методу. Результаты клонирования показали однородность отобранных субклонов, так как до 84 % из них сохранили синтез специфических иммуноглобулинов. Для дальнейшей работы были отобраны 3 субклона (4F4A7, 4F4G8, 4F4D9) с наибольшей оптической плотностью в ИФА. Титр антител культуральной жидкости субклонов, при которых достоверно фиксировалось связывание иммуноглобулинов в ИФА, был в диапазоне от 1:3200 до 1:6400.

Для получения препаративного количества моноклональных антител *in vitro* было проведено культивирование штаммов на 24-луночных планшетах и затем в вентилируемых флаконах (матрацах) объемом 50 мл. Далее, суспензию клеток в логарифмической фазе роста переносили в стерильные стеклянные бутылки с 300 мл полной среды RPMI-1640, неплотно закрывали крышками и культивировали в CO₂-инкубаторе на лабораторном шейкере (37°C, 5% CO₂) в течение 3 суток. Суспензию клеток центрифугировали при 800 g – 10 мин, супернатант с МКА отбирали для дальнейшей работы. Часть гибридом была подвергнута криоконсервации в жидком азоте при -196°C для длительного хранения.

Моноклональные антитела из культуральной жидкости осаждали с помощью сульфата аммония по способу [11, с.223].

Культуральную жидкость центрифугировали 5 мин при 1000 g для осаждения клеток. Иммуноглобулины осаждали, добавляя в охлажденную до 4° С культуральную жидкость сухой сульфат аммония до концентрации 50% от насыщающей. рН смеси доводили до 7,4, используя 1 М NaOH, и оставляли на ночь. Осадок, отделенный центрифугированием при 10 000 g (20 мин), растворяли в PBS в объеме 1/10 от исходного и проводили повторное осаждение, добавляя раствор сульфата аммония, рН 7,4, до концентрации 40% от насыщающей при 4° С. После перемешивания в течение 2 часов осадок отделяли центрифугированием при 10 000g (20 мин) и растворяли в минимальном объеме стартового буфера (0,015 М фосфатный буфер, рН 6,5). Полученный раствор диализовали против четырех смен стартового буфера при 4°C и центрифугировали при 20 000g (15 мин) для удаления образовавшегося осадка.

МКА разделяли на аликвоты по 200 мкл и хранили при -20С.

Проведены исследования по изучению некоторых иммунохимических свойств полученных моноклональных антител (МКА). Константа связывания, которую определяли по методу составила $2,3 \times 10^{-8}$ М [12, с.173]. Определение изотипа антител методом ИФА с помощью набора ISO2 (Sigma), показало что моноклональные антитела штамма 4F4 относятся к иммуноглобулинам класса G подкласса G3 [6, с.39].

В результате выполнения данного этапа исследований методом гибридомной технологии было получено 3 штамма гибридом продуцирующих моноклональные антитела специфичные антигенным детерминантам эстрадиола. Проведена наработка препаративного количества моноклональных антител и изучены их основные иммунохимические свойства [10, с.290]

Таким образом, исходя из полученных результатов, можно говорить о специфичности полученных моноклональных антител и перспективности их использования в разработке иммунологических способов определения эстрадиола в продуктах питания [7, с.872].

Литература:

1. Попов М.М., Циганенко А.Я., Минухин В.В. Основы иммунологии: Учебник.-Харьков: Вид-во "Основа", 2005.- 276с
2. Директивы Европейского союза 89/662/ЕЕС, 90/425/ЕЕС, 96/23/ЕС, 2003/74/ЕС
3. Куфлина С.А., Павлова Т.Н. Эвтаназия экспериментальных животных // Методические рекомендации по выведению животных для экспериментов // – М., 1985. – 9 с.
4. Ефременко, Д.В. Способ проведения иммуноферментного анализа (ИФА) / Д.В.Ефременко, И.В.Жарникова, А.А.Ефременко, И.В. Гаркуша, Е.В.Жданова, И.В.Юркина, Е.В.Алиева, Е.Е.Афанасьева. //Патент РФ на изобретение № 2290641, опубл. 27.12.2006. Бюл. #36. - 5 с.
5. Фримель Х. В кн.: Иммунологические методы. Ред. Фримель Г. //Москва: Медицина, 1987. - с. 89-97.
6. C. Kamps-holtzapple, Larry H. Stanker, John R Deloach. Monoclonal antibodies to hygromycin B and the method of making the same. United States Patent 620890.
7. Majima K, Fukui T, Yuan J, Wang G, Matsumoto. Quantitative measurement of 17 beta-estradiol and estriol in river water by time-resolved fluoroimmunoassay. K.Anal Sci. 2002 Aug;18(8):869-74
8. Greg T. Hermanson. Bioconjugate techniques. 1995
9. Oi V., Herzenberg L. Immunoglobulin – producing hybrid cell lines //Selected methods in cellular immunology // Ed. By. Mishell B and Shiigi. – San Francisco, 1980. - P. 351-352.
10. Goding J. Antibody production by hybridoma //J. Immunol. Meth. – 1980. - Vol. 39, № 1. - P. 285-308.
11. Плечко Т.Н.; Кириллов А.В.; Амбросова С.М.; Борисова О.В.; Одинец А.Г. Использование моноклональных антител в диагностике фитовирусов. Биооргани. химия, 1991; Т. 17. N 2. - с. 223-231
12. Beatty J., Beatty P., Vlahos W. Measurement of monoclonal antibody affinity by non – competitive immunoassay // J. Immunol. Meth. – 1987. - Vol. 100, №3. - P. 173-179.

References:

1. Popov M. M., Tsyganenko A. J., Minukhin V. V. Osnovy immunology: Uchebnik.-Kharkiv: Vid-vo "Osnova", 2005.- S
2. Directivae Europaea 89/662/EEC, 90/425/EEC, 96/23/EC, 2003/74/EC
3. Cufline S. A., Pavlova T. N. Euthanasia experimentalnyh zhivothyh // Methodica rekomendacii po vyvedeniuy zhivotnyh dlya experimentov // – M., 1985. – 9 S.
4. Efremenko, D. V. Sposob provedeniya immunofermentnogo analiza (ELISA) / D. V. Efremenko, I. V. Zharnikova, A. Efremenko, V. I. Garkusha, E. V. Zhdanova, I. V. Yurkin, E. V. Alieva, E. E. Afanaseva. //RF patente RF na isobretenie № 2290641, publ. 27.12.2006. Bul. #36. - 5 S.
5. Phrimal H. V kn.: Immunologicheskie metody. Red. Phrimal G. //Moscow: Medicina, 1987. - p. 89-97.
6. C. Kamps-holtzapple, Larry H. Stanker, John R Deloach. Monoclonal antibodies to hygromycin B and the method of making the same. United States Patent 620890
7. Majima K, Fukui T, Yuan J, Wang G, Matsumoto. Quantitative measurement of 17 beta-estradiol and estriol in river water by time-resolved fluoroimmunoassay. K.Anal Sci. 2002 Aug;18(8):869-74
8. Greg T. Hermanson. Bioconjugate techniques. 1995
9. Oi V., Herzenberg L. Immunoglobulin – producing hybrid cell lines //Selected methods in cellular immunology // Ed. By. Mishell B and Shiigi. – San Francisco, 1980. - P. 351-352.
10. Goding J. Antibody production by hybridoma //J. Immunol. Meth. – 1980. - Vol. 39, № 1. - P. 285-308.
11. Plechko T. N.; Kirillov V. A.; Ambrosov S. M.; Borisov, O. V.; Odinetz A., Ispolzovanie monoclonalnyh v diagnostike phitovirusov. Bioorgan. chemiae, 1991; V. 17. N 2. - p. 223-231
12. Beatty J., Beatty P., Vlahos W. Measurement of monoclonal antibody affinity by non – competitive immunoassay // J. Immunol. Meth. – 1987. - Vol. 100, №3. - P. 173-179.

Сведения об авторах

Турмаганбетова Г.К. -магистрант, Костанайский государственный университет им. А.Байтурсынова, e-mail: Gulsuma_1991@mail.ru

Кравченко А.В. – докторант, Костанайский государственный университет им. А.Байтурсынова, Костанайская область, п.Затобольск, мкрн.Строитель д.21 кв.4, тел.87754118867, e-mail: anzhelika.kravchenko.90@mail.ru

Умаров А.Б. -магистрант, Костанайский государственный университет им. А.Байтурсынова

Рыщанова Р.М.- к.в.н., доцент, Костанайский государственный университет им. А.Байтурсынова, тел. 787059895938, e-mail: raushan5888@mail.ru

Куйбагаров М.А.- к.в.н., директор ТОО «НИИ сельскохозяйственной биотехнологии», г. Астана

Turmaganbetova G.K.- undergraduate, Kostanay State University named after A.Baitursynov, e-mail: Gulsuma_1991@mail.ru

Kravchenko A.V.- PhD student, Kostanay State University named after A.Baitursynov, Kostanay obl, Zabol'sk village, mkrn.Stroitel 21-4, phone:87754118867, e-mail: anzhelika.kravchenko.90@mail.ru

Umarov A.B.- undergraduate, Kostanay State University named after A.Baitursynov

Ryschanova R.M.- candidate of veterinary sciences, Kostanay State University named after A.Baitursynov, phone:87059895938, e-mail: raushan5888@mail.ru

Kuibagarov M.A. - candidate of veterinary sciences, Research Institute of Agricultural Biotechnology, Astana city

Турмаганбетова Г.К. -магистрант, А. Байтурсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университеті, e-mail: Gulsuma_1991@mail.ru

Кравченко А.В. – докторант, А. Байтурсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университеті, Қостанай облысы, Затобол п., мкрн.Құрылысшы д. 21 кв. 4, тел.87754118867, e-mail: anzhelika.kravchenko.90@mail.ru

Умаров А.Б. -магистрант, А. Байтурсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университеті

Рыщанова Р.М.- в.ғ.к., доцент, А. Байтурсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университеті, тел. 87059895938, e-mail: raushan5888@mail.ru

Куйбагаров М.А.- в.ғ.к., ЖШС «Ауылшаруашылық биотехнология ғылыми-зерттеу институты», Астана қ.)