



Монгол хонинд дархлааны генийн өвөрмөц шинэ аллелийг илрүүлсэн дүнгээс

Л.Цэрэннадмид, Н.Даваасүрэн, Б.Нямгарав, М.Золзаяа, Г.Отгонтуяа, Г.Нямдаваа,
Ч.Тунгалаг, Ц.Эрдэнэ-Очир, Ш.Түмэнжаргал*

Мал Эмнэлгийн Сургууль, ХААИС

*Холбоо барих хаяг: tumee@muls.edu.mn

Л.Цэрэннадмид, Н.Даваасүрэн нар тэгш эрхтэйгээр эхний зохиогчоор оролцов

ХУРААНГУЙ

Гадны өвчин үүсгэгч (антиген) эс дотор ороогүй үед эсрэгбием үйлчлэх бөгөөд харин үүсгэгч эс дотор орсон үед Т лимфоцитийн дархлааны хариу урвал үйлчилдэг байна. Хонины ЭТИБ-ийн II ангийн DRB1 генийн уураг кодлогч эксон 2 нь туслагч Т эс антигенийг танихад оролцдог тул олон хувилбар (аллель)-тай болох нь Генбанк болон гадаадын бусад судалгаагаар нотлогдсон байна. Бид зарим нутгийн Монгол хонины захын цусанд (Халх, Баяд) уг генийг ПГУ-аар илрүүлэн, генийн хувилбаруудыг RsaI таслагч энзимээр тогтоож, урьд өмнө Генбанкинд бүртгэгдээгүй өвөрмөц шинэ аллелийг тодорхойлов. Генийн дарааллыг тогтоосон найман дээжнээс Генбанкинд бүртгэлтэй нэг, бүртгэлгүй зургаан аллель илэрсэн нь Монгол хонины дархлааны DRB1 ген нь өвөрмөц бас олон янз (полиморф) байх магадлалтайг харуулав. Энэ нь цаашид Монгол малын ЭТИБ болон халдварын болон вакцины дараах Т эсийн хариу урвалын судалгааны суурь болж байна.

ТҮЛХҮҮР ҮГ: Т эсийн дархлааны хариу урвал, Эдийн Тохирооны Иж Бүрдэл (ЭТИБ), дархлааны DRB1 ген, ПГУ-клонинг, таслагч энзим.

ОРШИЛ

Эзэн биеийн эс дотор орсон өвчин үүсгэгч антиген нь протеосомийн (уураг задлагч ферментүүдийн нэгдэл) нөлөөгөөр жижиг пептид болон задарсны дараа ЭТИБ-тэй цуг холбогдон зөөгч молекулын тусламжтайгаар эсийн (Антигенийг Илчлэгч Эс, АИЭ) гадаргуу дээр гарч Т эсэд илчлэгддэг. Устгагч CD8+ Т лимфоцит нь 8 –аас 9 амин хүчлийн урттай пептид антигенийг АИЭ -ийн гадаргуу дээр ЭТИБ-ийн I ангитай цуг таньснаар идэвхжин вирусээр халдварласан эсийг хөнөөдөг. Туслагч Т эс нь 15 орчим амин хүчлийн урттай пептид антигенийг ЭТИБ-ийн II ангитай цуг өөрийн өвөрмөц авуураар таньж идэвхжсэнээр шингэн хэлбэрийн мэдээлэгч уургууд болох цитокинийг нийлэгжүүлэн ялгаруулж В эсийн эсрэгбием нийлэгжилтийг дэмжих, макрофаг болон бусад залгиур эсийн үйл ажиллагаанд жинхэнэ туслагч нь болдог [7,10]. Удаан явцтай вирусун ужиг халдвар (ДОХ, герпесвирус, ретровирус г.м.) болон эс дотор удаан хугацаагаар шимэгчлэн эзэн бие махбодийн дархлаанаас нуугдан амьдардаг нян (сүрьеэ, ям, бруцеллез г.м.)-ийн халдварын

үед ЭТИБ болон Т эсийн хариу урвалыг судалгаанд хамруулах нь оношлогоо, эмчилгээ, дархлаажуулалт болон вакцинжуулалтанд нэн шаардлагатай. Монгол орны хүн эмнэлэг болон мал эмнэлгийн судалгаанд Т лимфоцитийн дархлааны хариу урвал, уг урвалд оролцдог эдийн тохирооны иж бүрдэл (ЭТИБ)-ийн талаар судалгаа шинжилгээ хийгдээгүй байна. ЭТИБ -ийн II ангийн DRB1 генийн эксон 2 нь туслагч Т эс антигеныг танихад оролцдог тул олон хувилбар аллельтай болох нь Генбанк болон бусад хэвлэлийн эх сурвалжаар нотлогдсон [3,4]. Энэ хэсэг нь 280 х.с орчим урт бөгөөд ЭТИБ-ийн пептид антигентай холбогддог *бета 1* хэсгийг кодлодог учир олон хувилбартай байдаг, одоогоор 160 гаруй хувилбар тогтоогдоод байна[1,5,10]. Бид энэхүү эхний судалгаагаар нутгийн Монгол хонинд ЭТИБ-ийн II ангийн DRB1 генийн эксон 2-ийг ПГУ-аар илрүүлэх, үр дүнг секвенсингээр баталгаажуулах, генийн боломжит хувилбаруудыг таслагч энзимийн үйлчлэлээр илрүүлэхийг зорилоо. Энэ нь цаашид Монгол малын ЭТИБ, халдварын болон вакцины

дараах Т эсийн хариу урвалыг судлах боломж нээх юм.

Энэ судалгааны ажлын гол зорилго нь халдварт өвчний эсрэг дархлааны Т эсийн хариу урвалд оролцдог ЭТИБ-ийн DRB1 генийг Монгол

хонинд илрүүлэн тодорхойлох явдал юм. Үүнд дараах судалгаа туршилтыг арга зүйд заасны дагуу хийж гүйцэтгэлээ.

1. Хонины дархлааны DRB1 генийн Генбанкинд бүртгэгдээгүй шинж аллель хувилбарыг ПГУ, таслагч энзимийн тусламжтайгаар олж тогтоох

2. Уг генийг ПГУ-клонинг (ДНХ-ийн векторт оруулан угсарч компотент эсэд трансформацийн аргаар шилжүүлэх) хийсний дараа нуклеотидын дарааллыг секвенсингээр тогтоох, Генбанк дахь бусад аллельтай харьцуулах.

СУДАЛГААНЫ ХЭРЭГЛЭГДЭХҮҮН, АЖЛЫН АРГА ЗҮЙ

Дээж авах, геномын ДНХ ялгах, ПГУ: Хонины захын цуснаас (INVITROGEN, PureLink genomic DNA mini kit) цомгийн зааврын дагуу ажиллаж геномын ДНХ-г ялгасан. Ялгасан геномын ДНХ-ээс Ex-Taq DNA-Polymerase (TAKARA, Clontech) цомог болон дараах өвөрмөц олигонуклеотидийг ашиглан шаталсан ПГУ -аар хонины дархлааны DRB1 эксон 2 генийн 279 х.с урттай хэсгийг олшруулав. 5'CCGGAATTCCCGTCTCTGCAGCACATTTCTT-3', 5'-TTT AAA TTC GCG CTC ACC TCG CCG CT-3' өвөрмөц хос праймер ашиглан ПГУ-ын эхний шатыг 94 хэмд 5 минут, 94 хэмд 30 секунд, 50 хэмд 30 секунд, 72 хэмд 1 минут, 72 хэмд 10 минутаар нийт 15 мөчлөгтэйгээр явуулав. ПГУ-ын хоёрдогч шатыг 5'-CCGGAATTCCCGTCTCTGCAGCACATTTCTT-3', 5'-AGCTCGAGCGCTGCA CAGTGAAACTC-3' хос праймерууд ашиглан 94 хэмд 5 минут, 94 хэмд 30 секунд, 50 хэмд 30 секунд, 72 хэмд 1 минут, 72 хэмд 10 минутаар нийт 35 мөчлөгтэйгээр явуулав. 1,5%-ийн агарозын гельд гүйлгэж, хэт ягаан туяаны аппаратанд үр дүнг уншуулж гэрэл зургаар баталгаажуулав.

СУДАЛГААНЫ АЖЛЫН ҮР ДҮН

Монгол хонинд дархлааны DRB1 генийн хэсгийг 279 х.с урттай ДНХ судлыг дээрх аргазүйн дагуу

Таслагч энзимээр хэрчих:

10мкл ПГУ -ын толбыг таслагч энзим (*RsaI*, NEB) -аар үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу үйлчилсний дараа полиакриламид гельд гүйлгэн этидиум бромид болон мөнгөний нитратаар будсан. Маркер puc-19, 501/489х.с, 404х.с, 331х.с, 242х.с, 190х.с, 147х.с, 111/110х.с, 67х.с, 34х.с, 26х.с хэмжээтэйг ашигласан (Roth).

Клонинг, нуклеотидийн дараалал тогтоох, үр дүнгийн боловсруулалт:

ПГУ-ын толбыг агарозын гельнээс зүсэн Gel Extraction kit (NEB)-ээр зааврын дагуу цэвэрлэн усанд уусган *pGEM-T Easy* (Promega) векторт угсран *NEB-10 beta E. coli* компетент эсэд дулааны шокын трансформацийн аргаар шилжүүлсэн. Ампицилинтэй петрийн тавганд ургасан клонуудыг клонийн ПГУ-аар баталгаажуулсны дараа Nutrient broth-ийн тэжээлт орчинд өсгөвөрлөн плазмидын ДНХ-ийг бэлэн цомгоор (Thermo Scientific, Gene Jet Plasmid miniprep kit) ялгаж Зенгерийн секвенсингийн аргаар нуклеотидийн дарааллыг тогтоолгосон (Macrogen). Үр дүнг Bioedit, MEGA 7.0, Geneious R10 зэрэг программ ашиглан Генбанктай харьцуулалт хийн удам зүйн зураглал гаргав.

ПГУ -аар олшруулахад шинжилсэн 42 дээж бүгд эерэг дүн үзүүлэв (Зураг 1).



Зураг 1 . Полимеразын гинжин урвалын үр дүн. М-100 алхамт ДНХ Маркер (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 х.с.), дээж-1-15, сөрөг хяналт-NC

Халх болон Баяд үүлдрийн 42 хонины дээжинд дархлааны 279 х.с урт DRB1 эксон 2 генийг таслагч энзим (*RsaI*, NEB) -ээр хэрчигдэх байдлыг полиакриламид гельд гүйлгэн шинжлэхэд арав гаруй хувилбарууд гарсан. Уг генийн Генбанкинд бүртгэгдээгүй шинэ аллель хувилбарыг илтгэж болох найман дээжийг сонгон авч арга зүйд заасны дагуу ПГУ клонинг хийн нуклеотидийн дараалалыг Зенгерийн секвенсингийн аргаар тогтооход Генбанкинд бүртгэлтэй хоёр ижил дараалал (*khalkha18R*, *khalkha26-#FN543117*) бүртгэлгүй зургаан өөр дараалал (51, 47R, 41, 36R, 35R, *khalkha62R*) тогтоогдов (Зураг 2). Халх (*khalkha18R*, *khalkha26*, *khalkha62R*, 51) болон Баяд (35R, 36R, 41, 47R) хонины генийн нуклеотидийн дараалалтай хамгийн илүү төстэй гадаад хонины генийн дарааллуудыг FN543117, FN543118, FM209041 (Шотланд); KC733431

(Хятад); JX236661, LN613183 (Грек) сонгон авч харьцуулсан болно (Зураг 2). Эксон 2-ийн өмнө байрлах интрон 1-ийн дарааллыг сөрөг тоогоор үзүүлэв. *Khalkha* 18, 26, 62 дараалалууд 278 х.с, 41, 47, 51, 35, 36 дарааллууд 292-294 х.с урттай бөгөөд зурагт харьцуулан үзүүлсэн 14 генийн дараалалууд нийтдээ 54 байрлал дээр хувьсамтгай полиморф байна. Эксон 2-ийн эхлэл хэсэгт бүх дараалал тогтмол ижилхарин төгсгөл хэсэгт Монгол хонинд хувьсамтгай байна. Монгол хониноос илэрсэн DRB1 эксон 2-ийн Генбанкинд бүртгэгдээгүй дээрх шинэ аллелуудыг MN755643-MN755648 дугаартайгаар бүртгүүлсэн болно. Бидний шинжилсэн цөөн тооны дээжинд Генбанкинд бүртгэлтэй болон бүртгэлгүй аллель хувилбарууд илэрсэн нь Монгол хонины дархлааны DRB1 ген нь өвөрмөц бас олон янз (полиморф) байх хандлагатайг харуулж байна.

харьцангуй олон янзаар хэрчигдэх байдал нь уг энзимийг шинэ аллель хувилбарыг тодорхойлоход ашиглахад нэн дөхөмтэй болох нь бусад судалгаанаас харагдсан [3,4,6]. Цаашид бид бог малын зарим үүлдэр омгийн генийн аллель

хувилбарын давтамжыг тодорхойлох, зонхилох аллелийг тогтоох, статистик боловсруулалтыг хийжбайна. Энэ нь цаашид Монгол малын ЭТИБ, халдварын болон вакцины дараах Т эсийн хариу урвалыг судлах боломж нээх юм.

ДҮГНЭЛТ

Хонины дархлааны DRB1 генийн эксон 2 генийн зургаан хувилбар (аллель)-ыг таслагч энзим, ПГУ-клонингийн тусламжтайгаар Монгол хонинд анх тутам шинээр илрүүлэн нуклеотидийн дараалалыг тогтоон Генбанкинд MN755643-MN755648 дугаартайгаар бүртгүүлэв. Энэ нь

Монгол хонины дархлааны DRB1 ген олон янз (полиморф), бас өвөрмөц болохыг илтгэхээс гадна цаашид халдварын болон вакцины дараах Т эсийн хариу урвалыг тодорхойлох судалгааны судалгааны эхлэл болов.

ТАЛАРХАЛ

Энэхүү судалгааны ажил нь Шинжлэх Ухаан Технологийн Сан (ШУТСан) -аас санхүүжигдсэн болно.

АШИГЛАСАН БҮТЭЭЛИЙН ЖАГСААЛТ

1. Amaia Larruskain and Begoña M. Jugo. 2013. Retroviral Infections in Sheep and Goats: Small Ruminant Lentiviruses and Host Interaction. *Viruses*. Aug; 5(8): 2043–2061.
2. Dukkipati V.S., Blair H.T., Garrick D.J., Murray A., 2006. Ovar-MhcOvine major histocompatibility complex: structure and gene polymorphisms, *Genetics and Molecular Research* 5 (4): 581-608
3. van Eijk Mj., Stewart –Haynes JA., Lewin HA., 1992. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Anim Genet.*, 23 483-496
4. Konnai S., Nagaoka S., Takesima M., Onuma M., Aida Y., 2003. Technical Note: DNA Typing for Ovine MHC DRB1 Using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP), *Journal of Dairy Science*. Volume 86, Issue 10, 3362-3365
5. NCBI GenBank
6. Nikbakht Brujeni Gh., Emam M., Mahmoudzadeh H., Hamedmonfared E., Talebnia Jahromi., Rezaei H., 2009. Typing of OVAR –DRB1 second with PCR- RFLP technique in Iranian Shaul Sheep, *J.Vet.Res.Nov.03*, № 28, 250-254.
7. Roitt., *Immunology* 2012
8. Tumenjargal Sh., Gellrich S., Linnemann T., Muche JM., Lukowsky A., Audring H., Wiesmuller KH., Sterry W., Walden P.. 2003. Anti-tumor immune responses and tumor regression induced with mimotopes of a tumor-associated T cell epitope. *Eur J Immunol* 33: 3175-3185.
9. Tumenjargal Sh., Wiesmueller KH., Walden P., 2007. Mitotope vaccines for cancer immunotherapy. *Eur J Vaccine*, 3032-3037.
10. Tizard, *Veterinary Immunology*, 2011

Determination of novel alleles for immune gene in mongolian sheep

**Tserennadmid L., Davaasuren N., Nyamgarav B., Zolzaya M., Otgontuya G.,
NyamdavaaG., Tungalag Ch., Erdene-OchirTs., and Tumenjargal Sh.***

School of Veterinary Medicine, Mongolian University of Life Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia

*Corresponding author: tumee@mul.s.edu.mn

ABSTRACT

Antibodies recognize antigens outside of the cell but if an antigen enters the host cell the antibodies are no more effective. T cell responses are the main effector cells for the antigens inside of the host cell. Exon 2 of the ovine DRB1 gene loci (Major Histocompatibility Complex-MHC class II) is recognized by T helper lymphocytes together with antigens. Therefore, many alleles existing for this gene according to the GenBank Data and other publications. We determined six novel alleles for ovineDRB1 exon 2 using polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease *RsaI* digestion in Mongolian sheep breed Bayad and Khalkha. One allele identified in Mongolian sheep Breed Khalkha was identical with known alleles in GenBank. These initial data represent the diversity and exotic feature of the ovine DRB1 exon 2 genes in certain Mongolian sheep breeds and the pioneer study for further research in MHC/T cell responses by infections/vaccinations livestock of Mongolia.

KEY WORDS: T cell response, Major Histocompatibility Complex-MHC, ovine DRB1 gene, PCR-cloning, restriction endonuclease