

BACILLUS ANTHRACIS–ИЙН РЕКОМБИНАНТ РА УУРАГ АШИГЛАН МАЛЫН ЦУСНЫ ИЙЛДСЭНД ӨВӨРМӨЦ ЭСРЭГБИЕМ ИЛРҮҮЛСЭН ДҮН

**З. Түвшинзаяа^{1*}, О. Хурцбаатар¹, Н. Энхцэцэг¹, Ц. Батболд¹, Б.Лхам¹, Н. Жавхлан²,
Э.Тамир², Ж. Энхтуяа^{1*}**

1-Мал Эмнэлгийн Хүрээлэн
2- Хөдөө Аж Ахуйн Их Сургууль

*Email: tuvshinzaya129@gmail.com

ХУРААНГУЙ

*Манай оронд хүн, малын боомын тохиолдол жил бүр бүртгэгдэж, өвчний гаралт буурахгүй байгаагаас уг өвчнөөр тайван бус боомын голомт бүхий нутгийн хүн, малд уг өвчин үүсгэгчийн эсрэгбиемийн “хэвийн таньц”-ыг тогтоон голомтын идэвхжлийг тогтоох зорилгоор *B. anthracis*-ийн хоруу чанарыг нөхцөлдүүлэгч гол уураг болох хамгаалах эсрэгтөрөгч буюу РА-ийн рекомбинант хувилбарыг гарган авч, боомын голомт бүхий нутгийн 1648 малын цусны ийлдсийг шууд бус ФХЭБУ-аар шинжилсэн юм. Сөрөг хяналтаар боомын тохиолдол бүртгэгдэж байгаагүй 1612 малын цусны ийлдсийг мөн шинжилж үзэхэд боомын голомт бүхий нутгийн малын цусны ийлдэсний 7.6%-д *B.anthraxis*-ийн өвөрмөц эсрэгбием илэрч, сөрөг хяналтанд авсан цусны ийлдсэнд уг эсрэгбием илрээгүй байгаа нь энэхүү рекомбинант уургийг ашиглан *B. anthracis*-ийн байгалийн эсрэгбиемийг илрүүлэх боломжтойг харуулж байна.*

ТҮЛХҮҮР ҮГ: Боом, *Bacillus anthracis*, хамгаалах эсрэгтөрөгч (РА)

ОРШИЛ

Боомын үүсгэгч малаас хүнд халдварлаж, цочмог халдварт зооноз өвчин үүсгэнэ [2]. Уг өвчин үүсгэгч гадаад орчинд туйлын тэсвэртэй спор хэлбэрээр хөрсөнд он удаан жил орших чадвартай учир хөрсөнд голомтлон өвчин үүсгэх эрсдэл бий болгодог юм [3]. Монгол оронд боомын гаралтын тоо жил ирэх тутам нэмэгдэж байгаа учраас өвчин гарсан үед хорио цээр тогтоох, тухайн орон нутгийн мал, амьтныг вакцинжуулах, эмчлэх болон урьдчилан сэргийлэх арга хэмжээ, ариутгал, халдваргүйжүүлэлт зэрэгт нэлээдгүй их хэмжээний зардал гарсаар байна [1]. Вакцинжуулалт нь боом өвчнөөс сэргийлэх

үндсэн арга зам бөгөөд энэ нь эцсийн дүндээ хүний өвчлөлийг бууруулахад оршиж байдаг. Дэлхий нийтэд 1937 оноос өнөөг хүртэл мал амьтдыг вакцинжуулахад *B. anthracis*-ын Stern (34F2) омгийн спорын вакцин хэрэглэж байгаа бөгөөд түүний хамгаалах идэвх нь сайн болохыг олон талын судалгаагаар нотолсон байдаг. Манай оронд уг вакциныг 1970-аад оны эхэн үеэс Сонгины Биокомбинатад үйлдвэрлэн ашиглаж ирсэн бөгөөд үр дүнтэй сайн вакцин гэсэн үнэлгээтэй байдаг. Хэдий тийм боловч зах зээлд шилжсэн 1990-ээд оноос хойш боомын голомтот нутаг дэвсгэрийн мал сүргийг бүхэлд нь хамарсан

вакцинжуулалт зогссон, мал эмнэлэг хувьд шилжин мал вакцинжуулалтын үйл ажиллагааг хянах боломжгүйгээс уг өвчний гаралт нэлээдгүй ихсэж байна. Тиймээс вакцинжуулалтыг оновчтой зөв хэрэгжүүлэхийн тулд голомтын нарийвчилсан зураглал гаргах, байгалийн голомтын идэвхжлийг тогтоох, вакцин тарьсны дараах дархлааны хөдлөл зүйг хянах, чанарыг үнэлэх тогтолцоо манай улсад зайлшгүй шаардлагатай байгааг харгалзан үзэж бид олон улсын судлаачдын

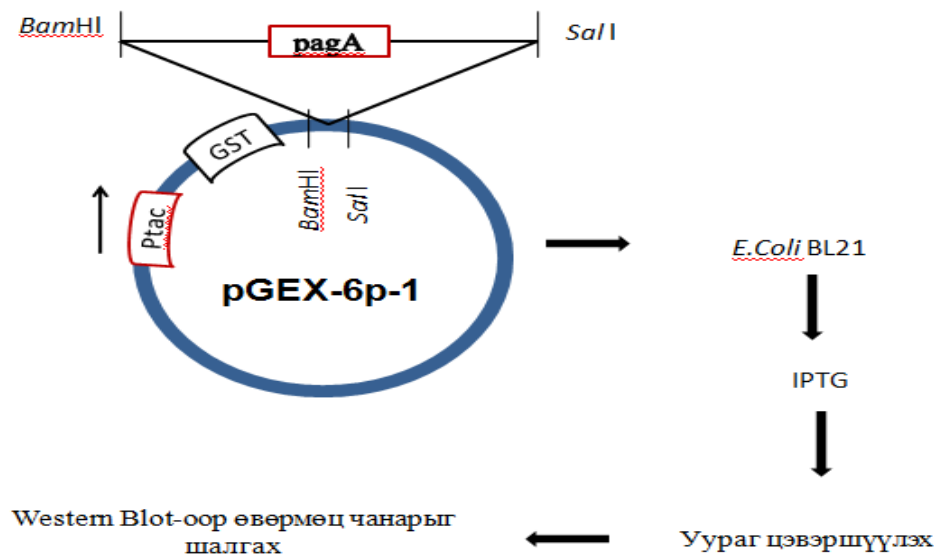
судалгаагаар тогтоогдсон *B.anthraxis*-ийн дархлаа төрүүлэх өндөр идэвхтэй РА уургийг рекомбинантаар цэвэршүүлэн авч *B.anthraxis*-ийн эсрэгбиом илрүүлэх ФХЭБУ-ийн цомог гаргах судалгаа хийж байгаа юм. Энэхүү өгүүлэлд судалгааны ажлын эхний үр дүн болох рекомбинант РА уургийг ашиглан *B. anthracis*-ийн байгалийн эсрэгбиом илрүүлсэн үр дүнг үзүүлж байна.

СУДАЛГААНЫ ХЭРЭГЛЭГДЭХҮҮН, АРГА ЗҮЙ

Рекомбинант уураг гарган авсан аргачлал

Энэ нь *Bacillus anthracis*-ийн РА-ыг кодлогч генийг GST рекомбинант уургийн нийлэгжлийн системд хэрэглэгддэг pGEX-6p-1 плазмидад суулган, *E.coli* BL21 бактерийн эсэд нийлэгжүүлж, GST уургаас таслан цэвэршүүлсэн

өвөрмөц идэвхтэй эсрэгтөрөгч юм. pGEX-6p-1 вектор молекул дээр тас промотор, GST уураг кодлогч генийн дараалал, *lacI* репрессор уураг кодлогч ген, рестрикцийн энзимийн сайтууд болоод ампициллин (Амп)-д тэсвэртэй генүүд оршдог [5].



Бүдүүвч 1. Рекомбинант РА-ийг гарган авсан бүдүүвч

Компетент эс бэлтгэсэн нь

E.coli BL21 бактерийн эсийг ЛБ (Луриа Биртани) шингэн тэжээлт орчинд суулгаж, 37°C-д 16 цаг өсгөвөрлөсний дараа өсгөврөөс 500 мкл-ийг авч 50 мл ЛБ-д хийн шингэлээд оптик нягтыг $OD_{600}=0.5$ болтол 37°C-д 200 эрг/мин эгсэрэлттэй дулаан тогтоогуурт өсгөвөрлөв. Үүний дараа өсгөврийг 4000 эрг/мин хурдаар 4°C-д 10 минут хурилдуурдаж тундасыг 30 мл 80 mM $MgCl_2$, 20 mM $CaCl_2$ ийн холимогт цийдүүлээд дахин хурилдуурдсан. Тунадас дээр 100 mM $CaCl_2$, 80% глицерол агуулсан холимогос 2 мл-ийг нэмж цийдүүлэв.

Трансформаци хийсэн нь

100 мкл *E.coli* BL21 компетент эс дээр РА-ийг кодлогч *pagA* генийг оруулсан 4мкл (46.6 нг/мкл) pGEX-6p-1 плазмидыг хийж мөсөн дээр 45 минут, 42°C-д 2 минут байлгаад ЛБ шингэн тэжээлт орчинд 250 эрг/мин эгсэрэлттэй 1 цаг өсгөвөрлөв. Трансформаци явуулсан болон трансформаци хийгээгүй бактерийн эсээс 100 мкл-ийг авч Амп (50 мкл/мл) ЛБ хатуу тэжээлт орчинд суулгаж, 37°C-ийн дулаан тогтоогуурт 16 цаг өсгөвөрлөв.

Плазмидын ДНХ ялгасан нь

E.coli BL21 бактерийн өсгөврөөс плазмидын ДНХ-г QIAprep® Spin Miniprep(50) цомгоор үйлдвэрлэгчийн зааврын дагуу ялгаж

Полимеразын гинжин урвал

ПГУ-ыг Maxime PCR PreMix цомог ашиглан явуулсан.

Шууд праймер -5' ATT GGA TCC GAA GTT AAA CAG GAG AAC CGG 3'

Урвуу праймер -5' AGA GTC GAC TTA TCC TAT CTC ATA GCC TTT 3'

ПГУ-ын нөхцөл:

концентрацийг NanoDrop™ спектрофотометрээр (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, USA) тодорхойлов.

Анхдагч денатураци	94°C	2мин	
Денатураци	95°C	30сек	
Аннеалин	51°C	30сек	35 цикл
Элонгаци	72°C	30сек	
Сүүлийн элонгаци	72°C	7мин	

Рекомбинант РА уураг цэвэршүүлэх

E.coli BL21-ийн колоноос 2.5 мл 2хҮТ (16 г триптон, 10 г дрожын ханд, 5 г NaCl, 900 мл H₂O, рН 7.0) шингэн тэжээлт орчинд суулгалт хийн 16 цаг өсгөвөрлөсний дараа өсгөврийг 250 мл Amp (100 мкл/мл)-тай 2хҮТ тэжээлт орчин уруу шилжүүлж 37°C-д 250 эрг/мин сэгсрэлттэйгээр бактерийн гэрлийн шингээлтэйг OD₆₀₀-д 0.9 болтол өсгөвөрлөв. 100 мМ IPTG-ээр уургийн нийлэгжлийг өдөөж 37°C-д 250 эрг/мин хурдаар 5 цаг өсгөвөрлөсөн. Үүний дараа өсгөврийг 4°C-д 8000 эрг/мин хурдаар 10 минут хурилдуурдаж, 12.5 мл холбогдох буфер (140 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1.8 мМ KH₂PO₄, рН 7.3)-т уусгав. Бактерийн эсийг лизоцим болон хэт авиагаар үйлчлэн задлаад дээр нь, 1% Тритон Х-100 нэмж 4°C-д 10 минут эргүүлэгчээр хольж, дараа нь 13000 эрг/мин хурдаар 30 минут

Полиакриламидын гель электрофорез,**иммуноблот**

Рекомбинант РА уургийг 12% -ийн SDS полиакриламидын гель дээр 550 вольт хүчдэлд 30 мА тогтмол гүйдлээр гүйлгэн салгаад 0.1% Кумассын бриллант хөх (10% цууны хүчил, 40% метанол, 50% H₂O) будгаар будаж РА уургийн толбо илрүүлсэн. SDS гель электрофорезыг дээрх аргачлалаар дахин явуулаад, гелд үүссэн уургийн толбуудыг нитроцеллюлозын мембран уруу иммуноблотын аппарат ашиглан шилжүүлж,

Шууд бус ФХЭБУ

Цэвэршүүлэн авсан эсрэгтөрөгчийг урвалын хавтангийн нийт үүрэнд 5 мкг/мл концентранцитай байхаар тооцон 0.1М-ийн карбонат-бикарбонат буфер (Na₂CO₃, NaHCO₃, ddH₂O, рН 9.6)-ээр шингэлэн 50 мкл-ээр савлаж 4°C-д 16 цаг тавин урвалын хавтанд суулгав. Хугацаа дуусмагц урвалын хавтангийн үүр тус бүрийг 200 мкл угаагч буфер (0.05% Твин-20, 140 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1.8 мМ KH₂PO₄, рН 7.2)-ээр 3 удаа угаасны дараа

хурилдуурдаж, тундасыг авч задлагч буфер 1 (2 М Уреа, 5 мМ Дитиотритол (ДТТ) агуулсан 10 мл холбогч буфер)-т уусгаад мөн хэт авиагаар үйлчлүүлж дахин 13000 эрг/мин хурдаар 30 минут хурилдуурдсан. Тунадас дээр задлагч буфер 2 (8 М Уреа, 5 мМ ДТТ, 130 мМ NaCl, 20 мМ Трис-НCl рН 7.4 агуулсан 10 мл холбогч буфер)- ийг нэмж уусгаад дахин 13000 эрг/мин хурдаар хурилдуурдаж шингэн хэсгийг авч 150 мл холбогч буферээр шингэлэв. GSTrap^{FF} уураг цэвэршүүлэх багана дундуур дээжийг гүйлгэж 10 мл холбогч буфер болон 10 мл таслагч буфер (50 мМ Трис-НCl, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ рН 7.5)-ээр тус тус угаан GST-тэй холбогдсон рекомбинант РА уургийг протеазе энзимээр (GE Healthcare, PrescissionTM protease, UK) таслан цэвэршүүлэв.

мембраныг РА-ийн эсрэг гарган авсан үхрийн 1:400 дахин шингэлсэн эерэг ийлдэс болон 1:10000 дахин шингэлэлттэй үхрийн IgG (Sigma anti-bovine serum HRPO conjugated)-ээр үйлчлүүлэн, диаминобензидин (ДАБ), 0.005% H₂O₂-ийг агуулсан субстратын уусмалаар өвөрмөц уургийн толбо илрүүлэх замаар цэвэршүүлсэн рекомбинант РА уургийн өвөрмөц идэвхийг шалгав.

тосгүйжүүлсэн 3%-ийн сүүтэй фосфатын буферийг хавтангийн үүр тус бүрд 100 мкл-ээр нэмж 37°C-д 1 цаг тавив. Хавтанг дээрхийн адил гурван удаа давтан угаасны дараа тосгүйжүүлсэн, 0.3% ийн сүүтэй фосфатын буферээр шингэлсэн (1:1600) шинжлэх ийлдсийг 100 мкл-ийг хавтангийн үүрэнд хийж 37°C-д 1 цаг тавив. Хавтанг 3 удаа угаагаад, коньюганттай холбосон үхрийн эсрэг өвөрмөц дархлаат глобулиныг 1:20000 гэсэн харьцаагаар шингэлэгч буферээр

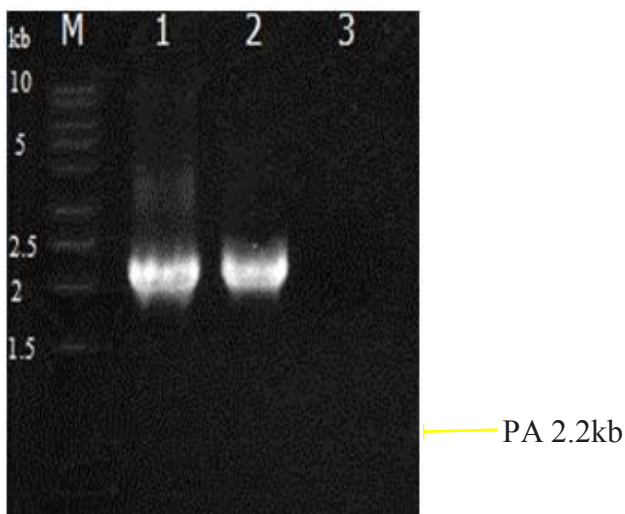
шингэлэн хавтангийн үүр тус бүрт 100 мкл-ийг нэмээд 37°C-д 1 цаг тавьсан. Үүний дараа өнгө олгогч ТМБ субстратаас 50мкл-ыг хавтангийн үүр тус бүрт нэмж тасалгаанд 30 минут болгоод

1М-ийн хүхрийн хүчлийг хавтангийн нэг үүрэнд 50 мкл байхаар хийж, бичил хавтан уншигчийн 450 нм ийн долгионы уртад гэрлийн шингээлтийг хэмжиж, үр дүнг тооцоолсон болно.

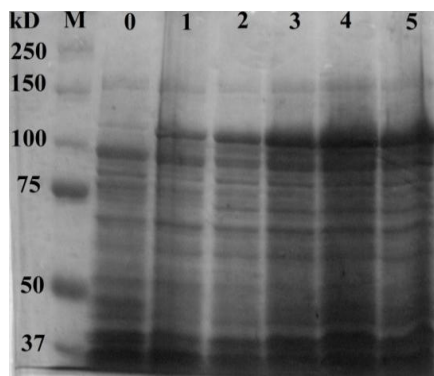
СУДАЛГААНЫ ҮР ДҮН

Рекомбинант уураг цэвэршүүлэн авсан үр дүн
E.coli BL21 бактерийн эсрүү PA генийг суулгасан рGEX-6p-1плазмидыг трансформаци хийн оруулсан ба трансформацийн идэвх 7.6×10^5 байв. (Зураг 1). *E.coli* BL21-ийн 2.5 мл өсгөврийг 250 мл ампициллинтай (100 мкл/мл) 2хҮТ шингэн тэжээлт орчинд гэрлийн шингээлт нь OD600-д 0.9 болтол сэгсрэлттэй ургуулаад 100 мМ IPTG нэмж үргэлжлүүлэн 5 цаг өсгөвөрлөсөн ба цаг тутам дээж авч бэлтгэсэн бөгөөд уургий нийлэгжил өссөн болох нь полиакриламидын гельнээс ажиглагдсан (Зураг 2). GSTrap багана ашиглан рекомбинант PA уургийг GST-ээс таслан цэвэршүүлж уургийн болох концентрацийг Pierce® BCA protein assay kit (Thermo scientific, USA)-ээр тодорхойлоход 0.35 мг/мл байв.

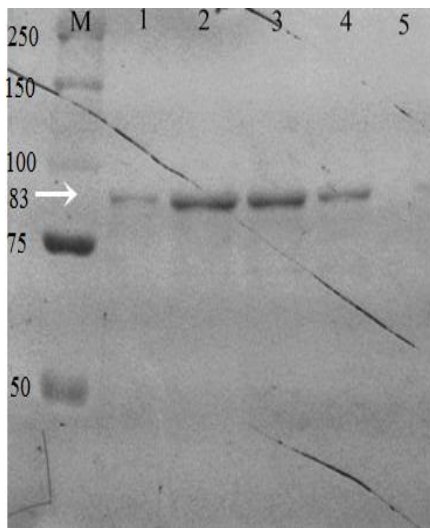
Цэвэршүүлсэн рекомбинант PA уургийг дээжний буфертэй (50 мМ Трис HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% глицерол, 1% β-меркаптоэтанол, 12.5 мМ ЭДТА, 0.02% бромфенолын хөх) 1:1 харьцаатай хольж, 12% ийн SDS гелд 550 В, 30 мА тогтмол гүйдлээр гүйлгэж гелийг Кумассын бриллант хөхөөр будахад 83кДа жинтэй PA уургийн толбо илэрлээ (Зураг 3). Цэвэршүүлэн авсан Рекомбинант уургийн өвөрмөц чанарыг Western blot-ын урвалаар шалгасан. Рекомбинант уургийг эсрэгтөрөгч болгон ашиглаж байгалийн халдвартай үхрээс эсрэгбие илрүүлэн өвөрмөц чанарыг шалгахад уг эсрэгтөрөгч зөвхөн *B.anthraxis*-ийн халдвар авсан үхрийн ийлдэст өвөрмөц урвал өгч байв (Зураг 4).



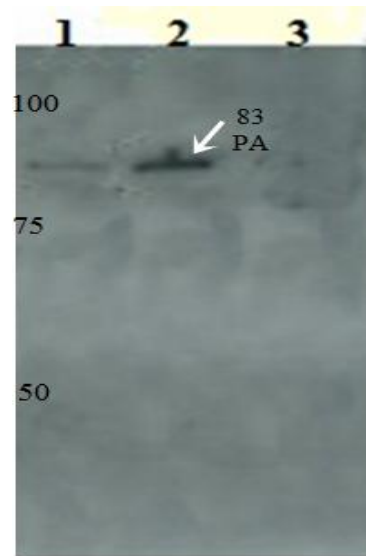
1-р зураг М- жишиг ДНХ (1000 хос суурь), 1-Эерэг 1-р зураг М- жишиг ДНХ (1000 хос суурь) 1-Эерэг хяналт 2-Дээж, 3-Сөрөг хяналт



2-р зураг. М–жишиг уураг, 0-1мМ IPTG тэжээлт орчинд нэмхээс өмнө, 1-IPTG-ээр өдөөснөөс хойш 1 цаг, 2цаг, 3цаг, 4цаг, 5цаг



3-р зураг. SDS полиакриламидын гель электрофорез, М-уургийн жишиг уураг, 1-5 дээж



4-р зураг. Иммуноблот 1-ээрэг хяналт, 2-дээж, 3-сөрөг хяналт

Шууд бус ФХЭБУ-ын үр дүн

Боомын тохиолдол урьд нь гарч байгаагүй Өмнөговь аймгийн нийт 1612 малын цусны ийлдсэнд рекомбинант РА уургийн эсрэг өвөрмөц эсрэгбием илэрсэнгүй. Харин Хэнтий аймгаас тус

судалгаанд хамрагдсан 1648 малын 126 буюу 7.6%-д РА-ийн өвөрмөц эсрэгбием илэрсэн байна. Малын төрөл тус бүрээр харуулсан шинжилгээний дүнг Хүснэгт 1-д үзүүлэв.

Хүснэгт 1

Аймаг	Сум	хонь	ямаа	үхэр	адуу	тэмээ
Хэнтий	Баянхутаг	4/70	1/64	2/56	3/43	
	Дэлгэрхаан	7/44	4/23	6/79	-	
	Жаргалтхаан	1/42	1/69	2/99	-	
	Өмнөдэлгэр	3/65	3/57	2/49	3/34	0/4
	Батширээт	10/88	15/48	20/59	-	
	Биндэр	4/79	5/24	3/47	2/46	
	Баян-Адарга	1/78	0/54	0/93	5/45	
	Дадал	2/90	3/56	4/43	-	
	Нийт дүн		32/556	32/395	49/525	13/168
Өмнөговь	Даланзадгад	0/80	0/90	0/30	0/10	0/100
	Баян-Овоо	0/100	0/100	0/10	0/50	0/100
	Ханбогд	0/99	0/80	0/11	0/50	0/100
	Манлай	0/93	0/80	0/9	0/20	0/100
	Цогтцэций	0/100	0/70	0/10	0/30	0/100
	Нийт дүн		0/472	0/420	0/70	0/150

ШҮҮН ХЭЛЭЛЦЭХҮЙ

Хамгийн анх 1946 онд хамгаалах эсрэгтөрөгчийг *in vitro* нөхцөлд ялган авсан байдаг ба цаашид молекул биологи, генийн инженерчлэлийн салбар хөгжсөнөөр хамгаалах эсрэгтөрөгчийг янз бүрийн рекомбинант уураг нийлэгжүүлэх систем ашиглан өндөр цэвэршилттэй гарган авах болсон [4]. Загвар амьтанд хийсэн туршилтаар амьд бие махбодь *B.anthraxis*-ийн PA-ийн эсрэг хамгийн өндөр дархлааны хариу урвал үзүүлж байжээ [6]. Тиймээс хүний цусны ийлдэсдэх PA-ийг сөрж үүссэн иммуноглобулин G нь тухайн газар орон дахь боомын гаралт дэгдэлтийн илтгэгч болж

чадна хэмээн судлаачид үздэг [7]. Олон улсад ФХЭБУ-аар цусны ийлдэсд *Bacillus anthracis*-ийн PA-ийн эсрэг үүссэн эсрэгбием илрүүлэх судалгаа хүний популяцийн дунд цөөнгүй хийгдсэн байдаг [8]. Бидний хувьд GST рекомбинант уургийн нийлэгжлийн системээр цэвэршүүлэн авсан PA уураг нь цэвэршилт, өвөрмөц мэдрэг чанараар бусад улсын судлаачдын гарган авсан рекомбинант хувилбартай дүйж бүх талаар шаардлагад нийцэж байсан тул малын цус шинжлэх шууд бус ФХЭБУ-ын эсрэгтөрөгч болгон ашигласан.

АШИГЛАСАН ХЭВЛЭЛ

1. Ш.Цэрэндорж, А.Ёндондорж, Д.Ганболд, Д.Буяндэлгэр, С.Цэрэндагва, Л.Батчимэг Боомын үүсгэгчээр зориудын халдвар хийсэн хонины бие махбодид үүсэх эмгэг бүтцийн өөрчлөлт. УМЭАЦТЛ-ын 60 жил –2007 он 92-93 хуудас
2. Ш.Цэрэндорж, А.Ёндондорж, С.Эрдэнэцэцэг, М.Түвшинзаяа, С.Эрдэнэчимэг, Б.Долгорсүрэн Боомын гаралтыг зогсооход вакцинжуулалтын ач холбогдол. Оношлох эрдэм–дэвшилтэт арга сэтгүүл УБ хот 2007 он
3. Ш.Цэрэндорж, А.Ёндондорж, С.Эрдэнэцэцэг, С.Сугар, Ш.Энхээ Монгол малаас ялган авсан *B.anthraxis*-ийн хэлбэр зүй, өсгөвөржилт, биохимийн болон молекул биологийн онцлог, антибиотик халдваргүйжүүлэх бодист тэсвэрлэх байдал. Оношлох эрдэм–дэвшилтэт арга сэтгүүл УБ хот 2007 он
4. Acha, Pedro and Szyfres, Boris. Zoonosis and communicable diseases common to man and animals. 3rd edition. 2003, Renouf Publishing Co. Ltd, Ogdensburg, NY 13669
5. Bourgogne A, Drysdale M, Hilsenbeck SG, Peterson SN, and Koehler TM. Global effects of virulence gene regulators in a *Bacillus anthracis* strain with both virulence plasmids. *Infect. Immun.* 2003 :71(5) :2736-2743
6. Bradaric N, Punda-Polic V. Cutaneous anthrax due to penicillin-resistant *Bacillus anthracis* transmitted by an insect bite. *Lancet.* 1992 Aug 1;340(8814) :306-307.
7. Welkos S, Little S, Friendlander A, Fritz D, Fellows P. The role of antibodies to *Bacillus anthracis* and anthrax toxin components in inhibiting the early stages of infection by anthrax spores. *Microbiology.* 2001 Jun ; 147(6) :1677-1685
8. Ghosh.N, Goel.A.K. Anti-protective antigen IgG enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of cutaneous anthrax in India.*Clinical and vaccine immunology.* 2012 Aug; 1238-1242

THE RESULTS OF DETECTION OF A SPECIFIC ANTIBODY TO b.ANTHRACIS RECOMBINANT PA ANTIGENE IN ANIMAL SERUM

In Mongolia, human and animal anthrax cases are informed every year and outbreak number doesn't depleted, therefore we aimed to describe the naturally acquired specific antibodies against *Bacillus anthracis*'s Protective antigen (PA) which is highly pathogenic protein. We purified the PA by recombinant and total of 1648 bovine serum samples collected from anthrax foci site were tested by an indirect ELISA. The non-anthrax foci area's 1612 bovine sera were also screened, using a negative control. As a result, 7.6 % serum samples were positive in the anthrax foci site, and serum samples from non-anthrax foci site, showed a negative result by an indirect ELISA. The result shows that the assay, using recombinant PA, capable to determine naturally acquired antibodies against *B.anthraxis* and useful tool for vaccine monitoring.