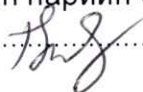


НИЙГМИЙН ЭРҮҮЛ МЭНДИЙН ҮНДЭСНИЙ ТӨВ

Нийгмийн Эрүүл Мэндийн Үндэсний Төвийн
Эрдмийн зөвлөлийн 2024 оны 7 дугаар сарын
4-ны өдрийн хурлаар хэлэлцэж батлав.

Протокол № 07/2024

Эрдэмтэн нарийн бичгийн дарга

.......... С.Цэгмэд

**“SARS-COV2 БА ХЕПАТИТЫН ДЕЛЬТА ВИРУСИЙН
ХАЛДВАРЫГ ИЛРҮҮЛЭХ ШИНЭ ҮЕИЙН СЕРОЛОГИЙН
ОНОШЛУУРУУДЫГ ЗОХИОН БҮТЭЭХ”
СУДАЛГААНЫ ТӨСЛИЙН ТАЙЛАН**

Улсын бүртгэлийн
дугаар

Нууцын зэрэглэл:

Аравтын бүрэн
ангилалын код

Төсөл хэрэгжүүлэх гэрээний
дугаар: 2021/10

**МОНГОЛ УЛСЫН ИХ СУРГУУЛЬ,
ЭЛЭГНИЙ ТӨВ**

**SARS-COV2 БА ХЕПАТИТЫН ДЕЛЬТА ВИРУСИЙН
ХАЛДВАРЫГ ИЛРҮҮЛЭХ ШИНЭ ҮЕИЙН СЕРОЛОГИЙН
ОНОШЛУУРУУДЫГ ЗОХИОН БҮТЭЭХ**

Инновацын төслийн тайлан

2021-2023

I Боть (1)

Төслийн хавсран гүйцэтгэгч:

Анагаахын шинжлэх ухааны үндэсний их
сургууль

Төслийн удирдагч:

О. Одгэрэл, доктор (PhD), дэд профессор
МУИС-ийн Генийн инженерчлэлийн
лабораторийн эрхлэгч

Санхүүжүүлэгч байгууллага:

Оном сан

Захиалагч байгууллага:

Элэгний эмч нарын нийгэмлэг, Оном сан

Тайлан өмчлөгч:

МУИС, УБХ, Их сургуулийн гудамж-1
Имэйл: odgerelo@num.edu.mn
Утас: 88479966

РЕФЕРАТ

Вируст хепатитийн 7 төрөл одоогоор бүртгэгдсэн байгаа бөгөөд үүнд: А, Б, Ц, Д, Е, аутоиммуни, нярайн хепатит багтана. Хепатитийн бусад хэлбэрүүдээс хамгийн хүндээр элгийг гэмтээж элэгний хатуурал, хорт хавдар үүсэх үйл явцыг хурдасгаж, нас баралтын гол шалтгаан болдог нь хепатитийн дельта вирус (ХДВ) юм. ХДВ-ийн халдварыг өвчлөл хүндрэхээс өмнө эрт илрүүлэх нь маш чухал билээ. Иймээс энэхүү шинэ үеийн серологийн оношлууруудыг хөгжүүлэх төслийн хүрээнд бид 1. Түргэвчилсэн оношлуур, 2. Гадаргуугийн плазмон резонансын биосенсор (ГПР) дээр үндэслэсэн оношлуур, 3. Фермент холбоот эсрэг биеийн урвалын (ФХЭБУ/ELISA) оношлууруудын прототип загваруудыг бүтээж, тэдгээрийн шинж чанарыг судлав.

Серологийн оношлуурт шаардагдах цөм бүрдэл хэсэг болох ХДВ-ийн гадаргуугийн жижиг антиген (small HDAg) уургийг рекомбинат технологиор нийлэгжүүлэн улмаар аффинити хроматографийн аргаар цэвэрлэж аван улмаар түүнийг энэ төслийн хүрээнд зохион бүтээсэн бүх оношлуурын платформд ашиглав.

Түргэвчилсэн оношлуурын прототип буюу туршилтын загварыг дотоод нөөц бололцоогоо ашиглан тусгай үйлдвэрлэлийн тоног төхөөрөмж ашиглалгүйгээр, гар аргаар угсран бэлдэв. Улмаар түргэвчилсэн оношлуурын прототип загварыг ашиглан ХДВ-ийн халдвартай хүний цусны дээж болон эрүүл хүний цусны дээжид ХДВ-ийн эсрэг бие илрүүлэх оношилгоог хийхэд өвчтэй болон эрүүл хүнийг ялган оношилж чадаж байгаа нь батлагдсан. Бидний судалгаагаар түргэвчилсэн оношлуурын бүтэц, хийцийн нэгэн жигд байдал нь үр дүн найдвартай, цэвэрхэн гарахад маш чухал нөлөөтэй нь тогтоогдлоо. Иймд түргэвчилсэн оношлуурыг зохион бүтээх судалгаанд цаашид үйлдвэрийн тоног төхөөрөмж ашиглаж бүтээсэн оношлуурыг ашиглах зайлшгүй шаардлагатай юм.

Төслийн дараагийн зорилтот ажил нь алтны nano хэмжээст ширхэг болон алтны nano хэмжээст нимгэн үе ашиглан плазмон резонансын үзэгдэл дээр тулгуурласан биосенсорыг бүтээж, түүнийг ХДВ-ийн оношилгоонд ашиглах боломжийг турших ажил байлаа. Энэ чиглэлийн оношлуурын хөгжүүлэлт нь биосенсор дээр үндэслэсэн цоо шинэ төрлийн оношлуур бөгөөд манай улсад урьд өмнө ямар нэг байдлаар хийгдэж байгаагүйгээрээ онцлог байлаа. МУИС-ын Генийн инженерчлэлийн лаборатори, болон Лазерийн лабораторын хамтарсан судалгааны баг биосенсорыг зохион бүтээж түүний шинж чанарыг тодорхойлов. Уг судалгаанд

нийт ХДВ-ийн халдвар бүхий 1 хүн, эрүүл 1 хүний цусны ийлдэсний дээжийг тус бүр 3 давталтаар оношилгоо хийж туршив. Ингэхэд эрүүл ба өвчтэй хүний дээжийг математик утгын хувьд хангалттай ялгаатай хэмжээнд ялган оношилж байлаа. Энэхүү плазмон резонансын үзэгдэл дээр үндэслэсэн биосенсорыг ашиглахад бүрэн автоматжуулсан туршилтын байгууламж ашиглах шаардлагатай болох нь тодорхой боллоо. Уг бүрэн автоматжуулсан туршилтын байгууламжийг ашигласнаар олон дээжид судалгаа хийх боломж бүрэлдэх ба ингэснээр статистик магадлал бүхий иж бүрэн үр дүн гарган авах боломжтой болно.

Төслийн дараагийн зорилтот ажил нь хепатитын делта вирусийн халдварыг илрүүлэх, фермент холбоот эсрэг биеийн урвал дээр үндэслэсэн, өндөр мэдрэг ELISA оношлуурыг зохион бүтээх, турших ажил байв. ELISA технологи нь харьцангуй бие гүйцэж төлөвшсөн, хамгийн өргөн хэрэглэгддэг технологи юм. Бид энэ төслийн хүрээнд ELISA оношлуурыг зохион бүтээхдээ хамгийн сүүлийн үеийн гэж тооцогдож болохуйц дараах технологиудыг ашиглав. Үүнд: 1. Хавтангийн полистерин гадаргууд линкер молекулыг ашиглан ковалент холболтоор эсрэг төрөгчийг хавтанд бэхлэх (covalent bonding). 2. Бэхлэгдсэн эсрэг төрөгчийн молекулуудын орон зайн байрлалын нэгэн жигд байдлыг хангах (mono orientation) 3. Орчин үеийн сайжруулсан 2-догч эсрэг бие болон субстратыг ашигласнаар өндөр мэдрэг чанарыг нөхцөлдүүлэх гэсэн үндсэн технологиудыг нэвтрүүлэхийг зорьж ажиллав. Гадаргууг функциональжуулах ковалентийн холболтын аргаар өндөр мэдрэг чанартай шууд бус ELISA оношлуурыг угсарсан. Биосенсорт уураг бэхлэх идэвхгүй холболт (физик адсорбци), идэвхтэй холболт (ковалент) гэсэн үндсэн хоёр технологи байдаг. Идэвхтэй холболт буюу ковалентийн аргыг ашиглах нь уургийн ориентаци жигд холбогдох ингэснээр мэдрэг чанар ихсэн давуу талтай. ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэх энэхүү аргийг ашигласан ELISA-ийн оношлуурын судалгаа дэлхий дахинд одоогоор хэвлэгдээгүй байгаа нь мөн энэ судалгааны нэг онцлог байлаа. Иймээс химийн холбогч бодисууд ашиглан ХДВ-ийн антигенийг полистирен 96 нүхт бичил хавтанд холбон оношлуурыг бэлтгэв. Оношлуурын баталгаажилтыг нийт 180 хүний дээжид (эрүүл 90, ХДВ-ийн халдвартай 90) шинжилгээ хийсэн. Үр дүнгээс статистик анализаар оношлуурын ажиллагааг баталгаажуулахад мэдрэг чанар 97.7%, өвөрмөц чанар 97.7% байв. Төслийн хүрээнд боловсруулсан ELISA оношлуур нь ийлдэс дэх ХДВ-ийн эсрэг биеийг илрүүлэхэд ашиглахад бүрэн боломжтой бөгөөд түүний мэдрэг чадвар нь худалдаанд байдаг Wantai компанийн ижил төстэй цомогтой харьцуулахад илүү сайн байна.


Энэхүү судалгаанд МУИС, Элэгний төв, АШУҮИС, НЭМҮТ-ийн нийт 10 шахам эрдэмтэн судлаачид оролцож хамтын ажиллагааг хөгжүүлэв. Судалгааны ажлын үр дүнг Европын элэг судлалын холбооны чуулган (EASL-2023), Залуу эрдэмтдийн холбооноос зохион байгуулсан “Хүрэл тогоот 2020”, “2022” хурал, АШУҮИС-аас зохион байгуулсан “Алхам урагш-2021” ба “Эрдмийн чуулган-63” хурлууд, МУИС-аас зохион байгуулсан “Хепатитын дельта вирусийн оношилгоо эмчилгээний орчин хандлага сэдэвт зөвлөгөөн” зэрэг хурлуудад илтгэж хэлэлцүүлэв. Мөн төслийн хүрээнд 2 магистр, 1 бакалаврын зэрэг амжилттай хамгааллаа.

Төслийн хүрээнд боловсруулсан 3-н төрлийн оношлуурын платформуудаас хамгийн сайн судалгаа хийгдсэн нь ELISA оношлуур байна. Түргэвчилсэн оношлуур болон плазмон резонансын оношлуурууд нь одоогоор бүтээгдэхүүн болж бүрэн туршигдах боломжгүй бөгөөд энэ нь уг оношлуурын бүтээхэд техник, технологийн нарийн түвшин шаардаж, энэхүү шаардлагыг одоогоор манай улсын ямар ч судалгааны баг хангах техникийн боломжгүй байгаатай холбоотой юм. Үйлдвэрлэлийн технологи, баталгаажуулалт, ашиглалтын хувьд бүрэн төлөвшиж, практикт нэвтрүүлэхэд илүү дөхөмтэй байгаа ELISA оношлуурыг цаашид зах зээлд нэвтрүүлэхэд бүрэн боломжтой бөгөөд ингэснээр Монгол улсын хэмжээнд хэрэгжиж буй Элэг бүтэн арга хэмжээний хэрэгжилтийг хангах, Монгол улсад вируст хепатитын өвчлөлийг бууруулахад энэ нь томоохон хувь нэмэр болох нь дамжиггүй юм.

ГҮЙЦЭТГЭГЧДИЙН НЭРИЙН ЖАГСААЛТ

<p>Ойдовсамбуугийн Одгэрэл БУ-ны доктор, Дэд профессор</p>		<p>Монгол улсын их сургууль</p>	<p>Гарын үсэг:</p>
<p>Жавийн Даваасамбуу ФУ-ны доктор, академич</p>		<p>Монгол улсын их сургууль</p>	<p>Гарын үсэг:</p>
<p>Ариунгэрэлийн Номин ИУ-ны магистр</p>		<p>Монгол улсын их сургууль</p>	<p>Гарын үсэг:</p>
<p>Энхжаргалын Саруул ИУ-ны магистр</p>		<p>Монгол улсын их сургууль</p>	<p>Гарын үсэг:</p>
<p>Эрдэнэбатын Номин-Эрдэнэ БУ-ны магистр</p>		<p>Монгол улсын их сургууль</p>	<p>Гарын үсэг:</p>
<p>Дашдоржийн Наранжаргал АУ-ны доктор</p>		<p>Элэгний төв</p>	<p>Гарын үсэг:</p>
<p>Бямбабаатарын Сумъяа АУ-ны магистр</p>		<p>Элэгний төв</p>	<p>Гарын үсэг:</p>

ГҮЙЦЭТГЭГЧДИЙН НЭРИЙН ЖАГСААЛТ

<p>Бат-Өлзийгийн Пүрэвжаргал АУ-ны магистр</p>		<p>Элэгний төв</p>	<p>Гарын үсэг:</p>
<p>Энхтайвны Санжаасүрэн ИУ-ны бакалавр</p>		<p>Элэгний төв</p>	<p>Гарын үсэг:</p>
<p>Лхагвасүрэнгийн Содномцогт АУ-ны доктор</p>		<p>Анагаахын шинжлэх ухааны үндэсний их сургууль</p>	<p>Гарын үсэг:</p>
<p>Мөнхжингийн Бадмаараг БУ-ны бакалавр</p>		<p>Анагаахын шинжлэх ухааны үндэсний их сургууль</p>	<p>Гарын үсэг:</p>

ГАРЧИГ

РЕФЕРАТ	II
ГҮЙЦЭТГЭГЧДИЙН НЭРИЙН ЖАГСААЛТ	V
ГАРЧИГ	VII
НЭР ТОМЬЁО, ТОВЧИЛСОН ҮГИЙН ТАЙЛБАР ЖАГСААЛТ	XII
ЗУРГИЙН ЖАГСААЛТ	XVI
ХҮСНЭГТИЙН ЖАГСААЛТ	XIX
УДИРТГАЛ	XXI
ЗОРИЛГО	XXII
1. ОНОЛЫН ХЭСЭГ	23
1.1. Түргэвчилсэн оношлуур	23
1.2. Гадаргуугийн плазмон резонансын сенсор.....	25
1.3. Фермент холбоот эсрэг биеийн урвал (ELISA) оношлуур	28
1.3.1.1. Иммуобилизаци.....	32
1.4. ЛАМП (LAMP-LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION) ПОЛИМЕРАЗЫН ГИНЖИН УРВАЛ	33
1.4.1. ЛАМП-ПГУ-ын үе шат	33
1.4.2. Колориметрик буюу өнгө үзүүлэгч ЛАМП полимеразын гинжин урвал	35
1.4.3. Флуоресценц ЛАМП полимеразын гинжин урвал	37
2. СУДАЛГААНЫ АЖЛЫН МАТЕРИАЛ	38
2.1. Бодис урвалж.....	38
2.2. Уусмал, буфер, тэжээлийн орчин.....	41
2.2.1. Агароз гель электрофез	41
2.2.2. SDS-PAGE	41
2.2.3. Компетент эс	42
2.2.4. Ni-NTA афинити баганан хроматограф	42
2.2.5. Вестерн блот	42
2.2.6. Бусад өргөн хэрэглэгддэг уусмал, буфер.....	43
2.2.7. Тэжээлийн орчин.....	43
2.3. Эс, плазмид, синтетик олигонуклеотид, эсрэг бие, энзим, цомог	44
2.3.1. Бактерийн омог	44

2.3.2.	Плазмид.....	44
2.3.3.	Синтетик олигонуклеотид.....	44
2.3.4.	Эсрэг бие.....	44
2.3.5.	Энзим.....	45
2.3.6.	Цомог.....	45
2.3.7.	Оношлуурын бүрдэл хэсгүүд.....	45
2.4.	Ашигласан программ хангамж.....	45
2.5.	Багаж, тоног төхөөрөмж.....	46
3.	СУДАЛГААНЫ АЖЛЫН АРГА ЗҮЙ.....	52
3.1.	ХДВ-ийн жижиг антиген уураг гарган авах.....	52
3.1.1.	Компетент эсэд трансформац хийх.....	52
3.1.2.	Полимеразын гинжин урвал явуулах.....	52
3.1.3.	Бактериас плазмид ялгах.....	53
3.1.4.	Агароз гель электрофорез.....	54
3.1.5.	Агарозын гелиэс ДНХ ялгах.....	54
3.1.6.	SDS полиакриламидын гель электрофорез.....	54
3.1.7.	Нуклеин хүчлийн дараалал тогтоох.....	55
3.1.8.	Рестриктаза энзим ашиглан ДНХ-г таслах.....	55
3.1.9.	Лигаци, ТА клонинг хийх.....	56
3.1.10.	Бактерид рекомбинант уураг нийлэгжүүлэх.....	56
3.1.11.	Бактерийн нийт уураг ялгах.....	56
3.1.12.	Вестерн блот хийх.....	57
3.1.13.	Ni-NTA афинити багана ашиглан нийлмэл уураг ялгах.....	57
3.2.	Түргэвчилсэн оношлуур угсарч, турших.....	58
3.3.	Алтны нано хэмжээст ширхэгдээр суурилсан гадаргуугийн плазмон резонансын оношлуур угсарч, турших.....	59
3.3.1.	Алтны нано хэмжээст ширхэгсинтезлэх.....	59
3.3.2.	Алтны нанопартиклыг MUA линкерээр бүрэх.....	60
3.3.3.	MUA линкерээр бүрхэгдсэн алтны нанопартиклыг антигентэй ковалент холбоогоор холбох.....	60
3.3.4.	Шилэн слайд цэвэрлэх.....	61
	Антигентэй холбосон алтны нанопартиклыг шилэн слайд дээр суулгах.....	61
3.4.	Алтны нимгэн үе дээр суурилсан гадаргуугийн плазмон резонансын оношлуур угсарч, турших.....	62
3.4.1.	ГПР оношлуурын баталгаажуулалтад ашиглагдах дээжийн хэмжээ ...	62
3.4.2.	Алтны нимгэн үе суулгах.....	62

3.4.3.	Алтны нимгэн үеийн гадаргууг идэвхжүүлж антигентэй холбох	62
3.4.4.	Алтны нимгэн үеийг антигентэй холбон ФХЭБУ оношлуур дээр анализ хийх	63
3.5.	ФХЭБУ оношлуур	64
3.5.1.	ФХЭБУ оношлуурын баталгаажуулалтад ашиглагдах дээжийн хэмжээ	64
3.5.2.	ФХЭБУ оношлуур угсрах	64
3.5.3.	ФХЭБУ оношлуурын тохиромжтой шингэрүүлэлтийг тодорхойлох	64
3.5.4.	ФХЭБУ оношлуур дээр шинжилгээ хийх	65
3.6.	Статистик анализ	65
3.7.	ЛАМП-ПГУ оношлуур	68
3.7.1.	ХДВ-ийн геномын дарааллын анализ	68
3.7.2.	ЛАМП-ПГУ-ын праймер боловсруулалт	68
3.7.3.	ХДВ-ийн нуклейн хүчил ялгах	68
3.7.4.	ХДВ-ийг илрүүлэх БХ-ПГУ	69
3.7.5.	ХДВ-ийг илрүүлэх ЛАМП-ПГУ-ын арга зүйг боловсруулах	70
4.	ҮР ДҮН	2
4.1.	Хепатитийн делта вирусийн жижиг антиген уураг гаргаж авсан үр дүн	2
4.1.1.	ХДВ-ийн нуклеокапсидын уураг нийлэгжүүлэгч конструкт зохион бүтээсэн үр дүн	2
4.1.2.	Полимеразын гинжин урвал явуулсан үр дүн	3
4.1.3.	НDAg-His генийг рGEM-T easy векторт клонинг хийсэн үр дүн	3
4.1.4.	DN5α эсээс рGEM-Teasy-HDAg-His плазмид ялган авсан үр дүн	4
4.1.5.	Нуклеин хүчлийн дарааллыг тогтоосон үр дүн	4
4.1.6.	рET41a векторт НDAg-His генийг клонинг хийсэн үр дүн	6
4.1.7.	DN5α эсээс рET41a-HDAg-His плазмид ялган авсан үр дүн	6
4.1.8.	Зохион бүтээсэн конструктыг ашиглан ХДВ-ийн нуклеокапсидын рекомбинант уургийг бактеридад нийлэгжүүлэн, цэвэрлэж авсан үр дүн	7
4.1.9.	Уургийн гель электрофорезийн үр дүн	8
4.1.10.	Вестерн блот хийсэн үр дүн	9
4.2.	ХДВ-ийн түргэвчилсэн оношлуурын туршилтын загварын үр дүн	10
4.3.	Алтны нанопартиклд суурилсан ГПР оношлуурын үр дүн	15
4.3.1.	Туркевичийн аргаар синтезлэсэн алтны нанопартиклын үр дүн	15
4.3.2.	Алтны нанопартиклыг MUA линкерээр бүрсэн үр дүн	20
4.3.3.	MUA линкерээр бүрхэгдсэн алтны нанопартиклыг антигентэй ковалент холбоогоор холбосон үр дүн	24

4.3.4. Алтны нанопартиклд суурилсан биосенсорын гадаргуугийн плазмон резонансыг хэмжсэн үр дүн.....	30
4.4. Гадаргуугийн плазмон резонансын оношлуурын үр дүн	32
4.4.1. Алтны нимгэн үе суулгасан үр дүн.....	32
4.4.2. ФХЭБУ оношлуур угсарч хэмжилт хийсэн үр дүн	36
4.4.3. Алтны нимгэн үед суурилсан биосенсорын гадаргуугийн плазмон резонансыг хэмжсэн үр дүн.....	39
4.5. ФХЭБУ оношлуурын үр дүн	41
4.5.1. Чекербоард (Checkerboard) арга зүйгээр оношлуурын оптимал нөхцөлийг тодорхойлох	41
4.5.2. Босго утга утга тодорхойлсон үр дүн.....	43
4.5.3. ФХЭБУ оношлуурын гүйцэтгэлийг тодорхойлсон үр дүн	46
4.5.4. Худалдааны цомогтой харьцуулан туршсан үр дүн	47
4.6. ЛАМП-ПГУ оношлуурын үр дүн	50
4.6.1. ХДВ-ийн геномын дарааллын анализ.....	50
4.6.2. ХДВ-ийг илрүүлэх ЛАМП-ПГУ-ын праймер загварчлалын үр дүн	51
4.6.3. Бодит хугацааны полимеразын гинжин урвалын үр дүн	53
4.6.4. Өнгө үзүүлэгч ЛАМП полимеразын гинжин урвалын үр дүн	58
4.6.5. Флуоресценц ЛАМП полимеразын гинжин урвалын үр дүн.....	60
4.7. 3.4. Агароз гель электрофорезын үр дүн.....	71
4.7.1. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг хөх туяаны гэрлээр шалгасан үр дүн	72
5. ГАДААД БОЛОН ДОТООДОД ҮР ДҮН ХЭВЛЭГДЭЖ, ХЭЛЭЛЦЭГДСЭН БАЙДАЛ.....	74
6. ТӨСЛИЙН ҮР ДҮНГЭЭР ЭРДМИЙН ЗЭРЭГ ХАМГААЛСАН БАЙДАЛ	75
7. ДҮГНЭЛТ	76
АШИГЛАСАН МАТЕРИАЛЫН ЖАСГААЛТ	78
ХАВСРАЛТ 1 Эрүүл мэндийн яам, анагаах ухааны ёс зүйн хорооны тогтоол	81
ХАВСРАЛТ 2 Плазмидын вектор	82
ХАВСРАЛТ 3 HDAg-His рекомбинант уургийн нуклеин хүчлийн дараалал “PASTA”.....	83
ХАВСРАЛТ 4 Гадаргуугийн плазмон резонансын багаж.....	84

ХАВСРАЛТ 5 Төслийн судалгааны хүрээнд эрдмийн зэрэг хамгаалсан оюутнуудын диплом	87
ХАВСРАЛТ 6 Төслийн үр дүн дотоодод хэлэлцэгдсэн хурал, өгүүллүүд	90
ХАВСРАЛТ 7 Төслийн үр дүн олон улсад хэлэлцэгдсэн хурал, өгүүллүүд ..	147
ХАВСРАЛТ 8 Төслийн судалгааны хүрээнд оюутнуудын оролцсон хурал, тэмцээний шагналууд	152

НЭР ТОМЬЁО, ТОВЧИЛСОН ҮГИЙН ТАЙЛБАР ЖАГСААЛТ

Товчилсон үг	Товчилсон үгийн тайлбар
°C	Celsius (Цельс)
Ab	Antibody (Эсрэг бие)
Ag	Antigen (Антиген)
APS	Ammonium Persulfate (Аммони персульфат)
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilane (3-аминопропилтриетоксисилан)
AUC	Area under curve (Муруй доорх талбай)
BSA	Bovine serum albumin (Үхрийн ийлдсийн албумин)
DAB substrate	3,3'-diaminobenzidine (3,3'-диаминобензин)
ddH ₂ O	Double distilled water (Давхар нэрсэн ус)
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates (Дизоксинуклейтид трифофат)
<i>E. coli</i>	Escherichia coli (Гэдэсний саванцар бактер)
EB	Elution buffer (Элюцийн буффер)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)carbodiimide (1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)кабодиимид)
GST	Glutathione S-transferases (Глутатион S-трасфераз)
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
H ₂ SO ₄	Sulfuric acid
HCl	Hydrochloric acid (Давсны хүчил)
HDAg-His	Hepatitis D virus-Antigen His*tag
HDV-Ab	Hepatitis D virus-Antibody
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	Horseradish peroxidase (Тунхууны пероксидаза)
IgG	Immunoglobulin G (иммуноглобулин G, эсрэг бие)
IPTG	Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside (Изопропил β-d-1-тигалактопиранозид)
LB	Luria Broth (Луриа шөл)
LFA	Lateral flow assay (Хөндлөнгийн урсгалын шинжилгээ)
MUA	11-Mercaptoundecanoic acid (11-Меркаптоандиканыхүчил)
NHS	N-Hydroxysuccinimide (Н-Гидроксисукцинимид)

Ni-NTA	Nickel Nitriлотриacetіc acid (Никель нитрилотриacetіc аcетийн хүчил)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Давс агуулсан фосфатынбуфер)
PBST	Phosphat buffersaline Tween 20 (Tween 20 агуулсан фосфатын буфер)
pH	Potential of hydrogen (Устөрөгчийн ионы хэмжээ)
PVDF	Polyvinylidene fluoride (Поливинил флуорид)
ROC	Receiver operating characteristic
SAM	Self-assembled monolayer (Өөрөө угсрагддаг моноүе)
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Додецилсульфат натритай полиакриламидын гель электрофорез)
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
TBE	Tris-borate-EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamine (Тетраметилэтилендиамид)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, (3,3',5,5'-Тетраметилбензидин)
WB	Wash buffer (Угаах буффер)
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
ГПР	Гадаргуугийн плазмон резонанс (Surface plasmon resonance)
ДНХ	Дезоксирибонуклейн хүчил (Deoxyribonucleic acid)
кДа	Килодалтон (kilo Dalton/kDa)
мл	Миллилитр (Milliliter/ml)
мкг	Микрограм (Microgramm/μg)
мкл	Микролитр (Microliter/μl)
мМ	Миллимоль (Millimole/mM)
нм	Нанометр (Nanometer/ nm)
ПГУ	Полимеразийн гинжин урвал (Polymerase chain reaction)
РН	Резонансын нэгж (Resonance unit)
ХБВ	Хепатитын В вирус (Hepatitis B virus)
ХДВ	Хепатитын Делта вирус (Hepatitis D virus)

Амин хүчлийн нэр, тэмдэглэгээ

A	Ala	Аланин
C	Cys	Цистеин
D	Asp	Аспаргины хүчил
E	Glu	Глутамины хүчил
F	Phe	Фенилаланин
G	Gly	Глицин
H	His	Гистидин
I	Ile	Изолейцин
K	Lys	Лизин
L	Leu	Лейцин
M	Met	Метионин
N	Asn	Аспарагин
P	Pro	Пролин
Q	Gln	Глутамин
R	Arg	Аргинин
S	Ser	Серин
T	Thr	Треонин
V	Val	Валин
W	Trp	Триптофан
Y	Tyr	Тирозин

Нуклейн хүчлийн нэр, тэмдэглэлээ

A	Аденин
C	Цитозин
G	Гуанин
T	Тимин
U	Урацил

ЗУРГИЙН ЖАГСААЛТ

Зураг 1. Түргэвчилсэн оношлуурын ерөнхий бүтэц.....	24
Зураг 2. ХДВ-ийн түргэвчилсэн оношлуурын загвар, ажиллах зарчим.....	25
Зураг 3. Гадаргуугийн плазмон резонансын үзэгдэл дээр үндэслэсэн биосенсорын ажиллах зарчим	26
Зураг 4. Гадаргуугийн плазмон резонансын үзэгдэл дээр үндэслэсэн биосенсорын сенсограм	27
Зураг 5. ХДВ-ийн ФХЭБУ-ын ажиллах зарчим	30
Зураг 6. ФХЭБУ-ийн төрлүүд	31
Зураг 7. ЛАМП полимеразын гинжин урвалын үе шат, механизм.....	35
Зураг 8. Өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ-ын схем	36
Зураг 9. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын схем.....	37
Зураг 10. Кодон оптимизаци хийн нийлэгжүүлсэн ХДВ-ийн генийн дараалал.....	2
Зураг 11. Полимеразын гинжин урвал явуулсан үр дүн.....	3
Зураг 12. HDAg-His генийг pGEM-T easy векторт клонинг хийж DH5α компетент эсэд оруулсан үр дүн	4
Зураг 13. DH5α эсээс pGEM-Teasy-HDAg-His.....	4
Зураг 14. Нуклеин хүчлийн дарааллыг тогтоосон үр дүн.....	5
Зураг 15. HDAg-His генийг pET41a векторт клонинг хийж DH5α компетент эсэд оруулсан үр дүн.	6
Зураг 16. DH5α эсээс pET41a-HDAg-His плазмид ялган авсан үр дүн.....	7
Зураг 17. BL21DE3 компетент эсэд pET41a-HDAg-His плазмидыг трансформаци хийсэн үр дүн	7
Зураг 18. ХДВ-ын нуклеокапсидын уургийг нийлэгжүүлэгч тогтвортой бактерийн омог гарган авсан үр дүн. 1: Ген шилжүүлэн суулгаагүй бактери, 2: Ген шилжүүлэн суулгасан бактери.....	8
Зураг 19. HDAg-His уургийг Ni-NTA афинити хроматографаар цэвэрлэсэн үр дүн. .	9
Зураг 20. Вестерн блотын үр дүн	10
Зураг 21. ХДВ-ийн түргэвчилсэн оношлуурын туршилтын 5-р загвар	11
Зураг 22. ХДВ-ийн түргэвчилсэн оношлуурын туршилтын 1-р загвар	11
Зураг 23. ХДВ-ийн түргэвчилсэн оношлуурын туршилтын 2-р загвар	12
Зураг 24. ХДВ-ийн түргэвчилсэн оношлуурын туршилтын 3-р загвар	13
Зураг 25. ХДВ-ийн түргэвчилсэн оношлуурын туршилтын 4-р загвар	13
Зураг 26. Цитратын ионоор тогтворжуулж үүсгэх алтны нанопартиклын.....	15

Зураг 27. Натрын цитратын агууламж бага байх үеийн алтны нанопартиклын	16
Зураг 28. Урвалын температур 950C үеийн фотон кросс корреляцын спектр	17
Зураг 29. Урвалын температур 800C үеийн фотон кросс корреляцын спектр	18
Зураг 30. Хоёр өөр аргаар синтезлэсэн алтны нанопартиклын хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр ба алтны нанопартиклын хэмжээнээс хамаарсан хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр	18
Зураг 31. Алтны нанопартиклын энергийн дисперсийн рентген спектр	19
Зураг 32. Синтезлэсэн алтны нано хэмжээст ширхэг болон MUA линкерээр бүрсэн алтны нанопартиклыг харьцуулсан хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр	21
Зураг 33. Алтны нанопартиклд MUA линкер суулгасан нил улаан туяаны спектр..	23
Зураг 34. EDC ба NHS ашиглаж карбоксил бүлэг -COOH ба амин бүлэг -NH ₂ ковалент холбоогоор холбож амидын холбоо үүсгэх урвалын механизм	25
Зураг 35. Алтны нанопартиклыг антигентэй ковалент холбоогоор холбох	26
Зураг 36. Алтны нанопартиклд EDC/NHS кроссхолбогчид суулгасан нил улаан туяаны спектр	27
Зураг 37. Алтны нанопартиклд функционал бүлгүүд суулгахаас антиген холбосон шат бүрийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр ба эрдэм шинжилгээний өгүүлэлд алтны нанопартиклыг модификаци хийсэн шат бүрийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр	29
Зураг 38. Алтны нанопартиклд суурилсан биосенсорын БГПР-ын хэмжилтийн үр дүн болон эрдэм шинжилгээний өгүүллийн БГПР-ын үр дүн	30
Зураг 39. Резонансын параметрийн ойлт, өнцгөөс хамаарсан тооцоолол	32
Зураг 40. Резонансын параметрийн фаз, өнцгөөс хамаарсан тооцоолол.....	32
Зураг 41. Найман өөр төрлийн хугацаанд суулгасан алтны нимгэн үеийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн нэвтрүүлэлтийн хувь	33
Зураг 42. 4 минутын турш суулгасан алтны нимгэн үеийн нэвтрүүлэлтийн хувь....	34
Зураг 43. Алтны нимгэн үеийн энергийн дисперсийн рентген спектр	35
Зураг 44. 50 нм орчим алтны нимгэн үе суулгасан шилэн слайдын ГПР-ын хэмжилт	36
Зураг 45. Угсарсан ФХЭБУ оношлуурын ажиллах зарчим	37
Зураг 46. Өнгө үзүүлэгч хромоген хийсний дараах ФХЭБУ оношлуурын үр дүн	37
Зураг 47. Урвал зогсоох уусмал хийж, хоосон бичил үүрлүү шилжүүлсний дараах ФХЭБУ оношлуурын үр дүн	38

Зураг 48. ФХЭБУ оношлуурын шингээлтийг 450 нм долгионы уртад хэмжсэн үр дүн	38
Зураг 49. Алтны нимгэн үе дээр суурилсан ГПР-ын биосенсорын холболт, угсралт явагдаж буй болон шинжлэхэд бэлэн болсон биосенсор	39
Зураг 50. Алтны нимгэн үед суурилсан биосенсорын ГПР-ын хэмжилтийн үр дүн	40
Зураг 51. Чекербоард арга зүйгээр сөрөг дээжийн 9 шингэрүүлэлтийг, хоёрдогч эсрэг биеийн 8 шингэрүүлэлтийг туршиж өнгөний өөрчлөлт үзүүлсэн хавтан	41
Зураг 52. Чекербоард арга зүйгээр эерэг дээжийн 9 шингэрүүлэлтийг, хоёрдогч эсрэг биеийн 8 шингэрүүлэлтийг туршиж өнгөний өөрчлөлт үзүүлсэн хавтан	42
Зураг 53. Чекербоард арга зүйгээр сөрөг дээжний 9 шингэрүүлэлтийн утгыг тодорхойлсон үр дүн.	42
Зураг 54. Чекербоард арга зүйгээр илрүүлэх хязгаар болон опимал шингэрүүлэлтийн утгыг тодорхойлсон үр дүн.....	43
Зураг 55. МУИС ФХЭБУ-ийн ROC муруй	44
Зураг 56. Эерэг болон сөрөг дээжийн шингээлтийн утгын нормал түгэлтийн график	45
Зураг 57. ФХЭБУ-аар анти-ХДВ тодорхойлсон 570 дээжийн тархалтын график	46
Зураг 58. Худалдааны ХДВ IgG тодорхойлох цомог болон МУИС цомгийг харьцуулсны шингээлтийн хувь	48
Зураг 59. ХДВ-ийн геномын дараалал	50
Зураг 60. ЛАМП-ПГУ-ын багц праймеруудын ХДВ-ийн геном дээрх байрлал.....	53
Зураг 61. ЛАМП-ПГУ-ын багц праймеруудын харьцуулалт	58
Зураг 62. Өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ-ын илрүүлэх доод хязгаар	59
Зураг 63. ХДВ-ийн халдварыг өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ-аар илрүүлсэн үр дүн	59
Зураг 64. Өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ-ыг эрүүл бүлэгт туршсан үр дүн	60
Зураг 65. ЛАМП-ПГУ-ын бүтээгдэхүүний агароз гель электрофорезын үр дүн.....	72
Зураг 66. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг UV гэрлээр шалгасан үр дүн	73

ХҮСНЭГТИЙН ЖАГСААЛТ

Хүснэгт 1. ФХЭБУ шинжилгээний давуу болон сул талууд	31
Хүснэгт 2. ПГУ-ын холимог	53
Хүснэгт 3. ПГУ явуулах нөхцөл.....	53
Хүснэгт 4. Акриламидын гелийн уураг салгах чадвар концентрацаас хамаарах нь	55
Хүснэгт 5. Уургийн электрофорезын гель бэлтгэх	55
Хүснэгт 6. Рестриктазын энзим ашиглан ДНХ-г таслах холимог.....	56
Хүснэгт 7. Лигацийн холимог	56
Хүснэгт 8. ROC муруйн доторх талбай (AUC) болон шинжилгээний нарийвчлал ..	66
Хүснэгт 9. 2x2 матриц хүснэгт.....	66
Хүснэгт 10. ХДВ-ийг илрүүлэх БХ-ПГУ-ын праймер болог пробын дараалал.....	69
Хүснэгт 11. ХДВ-ийг илрүүлэх БХ-ПГУ-ын мастер холимог.....	69
Хүснэгт 12. ХДВ-ийг илрүүлэх БХ-ПГУ-ын нөхцөл	70
Хүснэгт 13. ЛАМП-ПГУ-ын праймеруудын холимог	70
Хүснэгт 14. ХДВ-ийг илрүүлэх өнгө үзүүлэх ЛАМП-ПГУ-ын мастер холимог	71
Хүснэгт 15. ХДВ-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын мастер холимог.....	1
Хүснэгт 16. ХДВ-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын нөхцөл	1
Хүснэгт 17. Алтны нанопартиклын энерги дисперсийн рентгений спектрийн тайлал	20
Хүснэгт 18. Алтны нанопартиклд MUA линкер суулгасан нил улаан туяаны спектрийн пикийн тайлал	24
Хүснэгт 19. Алтны нанопартиклд EDC/NHS кросс холбогчид суулгасан нил улаан туяаны спектрийн пикийн тайлал	28
Хүснэгт 20. Тодорхой хугацааны турш суулгасан алтны нимгэн үеийн хамгийн өндөр нэвтрүүлэлт үзүүлж буй долгионы урт болон нэвтрүүлэлтийн хувь	34
Хүснэгт 21. Алтны нимгэн үеийн энергийн дисперсийн рентген спектрийн тайлал	35
Хүснэгт 22. Босго утгуудад суурилсан жинхэнэ эерэг, жинхэнэ сөрөг, хуурамч эерэг, хуурамч сөрөг утгууд	46
Хүснэгт 23. Босго утгуудад суурилсан оношлуурын чанарын баталгаажуулалт.....	47
Хүснэгт 24. Худалдааны ХДВ IgG тодорхойлох цомог болон МУИС цомгийг харьцуулсан шингээлтийн хувь, 450 нм	49
Хүснэгт 25. ХДВ-ийг илрүүлэх ЛАМП-ПГУ-ын багц праймеруудын дараалал.....	51
Хүснэгт 26. ХДВ-РНХ-ийн шингэрүүлэгийн БХ-ПГУ-аар илрүүлсэн үр дүн	54

Хүснэгт 27. ХДВ-РНХ-ийг тоон БХ-ПГУ-аар тоолсон үр дүн	55
Хүснэгт 28. ХДВ-ийн халдваргүй эрүүл дээжүүдийг БХ-ПГУ-аар баталсан үр дүн .	57
Хүснэгт 29. ХДВ-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын 65 °С дэх үр дүн.....	61
Хүснэгт 30. ХДВ-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын 68 °С дэх үр дүн.....	62
Хүснэгт 31. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын илрүүлэх доод хязгаар	64
Хүснэгт 32. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын ХДВ-ийн халдварыг илрүүлсэн үр дүн ...	65
Хүснэгт 33. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ыг эрүүл бүлэгт туршсан үр дүн	68
Хүснэгт 34. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын ХДВ-РНХ болон халдвартай ийлдэсний илрүүлгийн үр дүн.....	70

УДИРТГАЛ

Монгол улс хепатит вирусийн халдварын тархалт болон элэгний өвчлөлөөс шалтгаалсан нас баралтын тоогоороо дэлхийд нэгдүгээрт, элэгний өвчлөлөөрөө найм дугаарт эрэмбэлэгдэж байна. Элэгний өвчлөл их байгаагийн нэг том шалтгаан нь хепатит дельта вирусийн (ХДВ) халдвар юм. ХДВ-ийн халдвартай хүнд элэгний хатуурал, цаашлаад хавдар үүсэх процесс маш хурдан явагддаг ба энэ вирусийн тархалт дэлхийн бусад улс орнуудтай харьцуулахад Монгол улсад маш их байна. Бидний судалгааны ажлын зорилго нь ХДВ-ийн рекомбинант уураг гарган авч, ХДВ-ийг оношлох төрөл бүрийн оношлууруудыг зохион бүтээхэд оршино.

ХДВ-ийн рекомбинант уураг гарган авахын тулд ХДВ-ийн зэрлэг омгийн геномоос генийн дарааллыг авч, генд кодон оптимизац хийн рекомбинант генийн дарааллыг *in vitro* орчинд нийлэгжүүлсэн. Гарган авсан ХДВ-ийн генийг рекомбинант уураг нийлэгжүүлэх конструктад генийн инженерчлэлийн аргаар угсрав. Энэхүү конструктыг *E.coli* бактерид трансформац хийж оруулан ХДВ-ийн рекомбинант уургийг тогтвортой нийлэгжүүлэгч шилжмэл гентэй омог гарган авсан. Уг бактерийн омгийг ашиглан нийлэгжүүлсэн ХДВ-ын рекомбинант уургийг никель афинити хроматограф болон уургийн диализын аргаар цэвэрлэж уургийн гель электрофорезийн аргаар зорилтот уураг эсэхийг баталгаажуулсан. Мөн Вестерн блотын аргаар уургийн иммунологийн идэвхийг шалгасан.

Гарган авсан ХДВ-ын рекомбинант уургаар ХДВ-ийн түргэвчилсэн оношлуур, гадаргуугийн плазмон резонансын оношлуур, фермент холбоот эсрэг биеийн урвал (ELISA) оношлууруудын прототип загвар бүтээж оношлуурын ажиллагааг шалгасан. Эдгээр зохион бүтээсэн оношлууруудын загваруудыг ХДВ-ийн халдвартай болон халдваргүй хүмүүсийн эрүүл ийлдсийг ашиглан туршиж, оношлууруудын ажиллагааг баталгаажуулж, мэдрэг болон өвөрмөц чанарыг тодорхойлсон. Одоогоор дэлхий дахинд ХДВ-ийн түргэвчилсэн оношлуур, гадаргуугийн плазмон резонансын биосенсор (ГПР), өндөр мэдрэг фермент холбоот эсрэг биеийн урвалын (ФХЭБУ, ELISA) оношлуурыг бүтээсэн судалгаа, эрдэм шинжилгээний өгүүлэл байхгүй байгаа нь энэ судалгааны ажлыг хийх зайлшгүй шаардлагатайг харуулж байна.

ЗОРИЛГО

Хепатитийн дельта вирусийн гадаргуугийн жижиг антиген рекомбинант уураг (HDAg) гарган авч, хепатит дельта вирусийн халдварыг оношлох түргэвчилсэн, гадаргуугийн плазмон резонанс, фермент холбоот эсрэг биеийн урвал оношлууруудыг зохион бүтээх. Энэхүү зорилгын хүрээнд дараах зорилтуудыг тавин ажилласан.

Зорилтууд:

1. ХДВ-ийн нуклеокапсидын уургийг нийлэгжүүлэгч конструкт зохион бүтээх.
2. Зохион бүтээсэн конструктыг ашиглан ХДВ-ийн нуклеокапсидын рекомбинант уургийг бактерид нийлэгжүүлэн, цэвэрлэж авах.
3. Цэвэрлэж авсан ХДВ-ийн нуклеокапсидын уургийг ашиглан түргэвчилсэн оношлуур зохион бүтээх.
4. ХДВ-ийн гадаргуугийн уургийг алтны нанопартиклтай ковалент холбоогоор холбон, шилэн слайд дээр суулган биосенсор бэлтгэх.
5. Шилэн слайд дээр алтны нимгэн үе суулган, ХДВ-ийн гадаргуугийн уурагтай ковалент холбоогоор холбон биосенсор бэлтгэх.
6. Бэлтгэсэн хоёр төрлийн биосенсорыг ашиглан шинээр угсарсан ГПР-ын багаж дээр ХДВ-ийн халдварыг оношлох.
7. ФХЭБУ оношлуурыг угсран шинжилгээ хийх оптимал нөхцөлийг тодруулах.
8. ФХЭБУ оношлуурыг ашиглан эрүүл болон ХДВ-ийн халдвартай олон тооны дээж дээр шинжилгээ явуулж, өвөрмөц чанар, мэдрэг чанарыг тодорхойлох.

1. ОНОЛЫН ХЭСЭГ

1.1. Түргэвчилсэн оношлуур

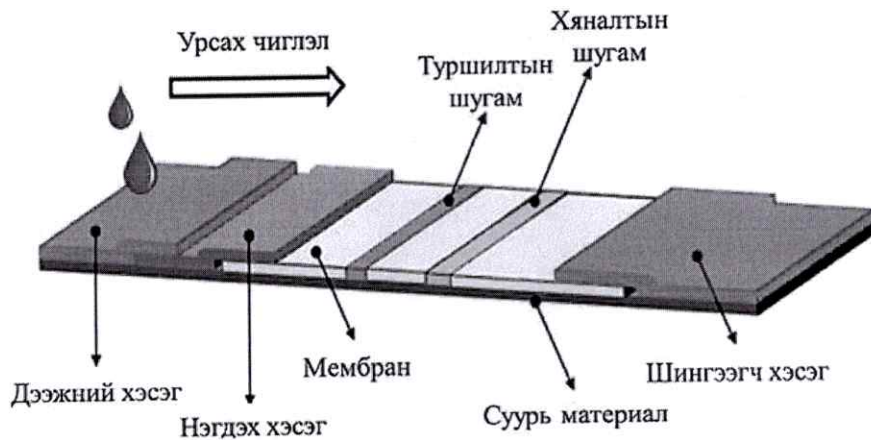
Түргэвчилсэн оношлуурын (lateral flow assay/LFA) санаа 1950-аад онд анх гарч цааш хэд хэдэн төрлөөр хөгжсөн байдаг. Гэхдээ хүний биеийн шингэнийг ашиглаж оношилдог арга нь маш эртнийх юм. Хэдэн мянган жилийн өмнөх эртний баримт бичигт шүлс болон шээсэнд тулгуурласан оношилгоо байсан нь нотлогдсон. Эртний Хятадууд шүлсэнд оношилгоо хийдэг байсан анхны улсуудын нэг юм. Мөн эртний Египетийн судар бичигт жирэмсэн эсэхийг шээснээс дээж авч оношилдог байсан тухай тэмдэглэгдсэн нь хамгийн эртнийхэд тооцогдог. Туршилтаар жирэмсэн байх магадлалтай эмэгтэйг хэд хоногийн турш улаан буудайн үр, арвайн үр дээр шээлгэдэг. Үр дүнд нь арвай ургавал эрэгтэй хүүхэд, улаан буудай ургавал эмэгтэй хүүхэд тээж байна гэж үздэг байжээ. Харин арвай, улаан буудай хоёулаа ургаагүй бол жирэмсэн болоогүйг илэрхийлдэг байж [1].

LFA нь уусмал холимгоос бай молекулыг илрүүлэх, тодорхойлоход зориулсан цаасан дээр суурилсан платформ оношлуур бөгөөд оношилгооны үр дүнг 5-30 минутын дотор гаргадаг. Мөн хөгжүүлэхэд бага өртөг зарцуулдаг мөн үйлдвэрлэхэд хялбар байдал нь түргэн оношилгоо хийх шаардлагатай олон салбарын хэрэглээнд нэвтрээд байна. LFA-д суурилсан шинжилгээг нэгдсэн эмнэлэг, өрхийн эмнэлэг, клиникийн лабораторид хүний шээс, шүлс, хөлс, ийлдэс, сийвэн, цус болон бусад шингэнийг ашиглан олон янзын биопсигоос өвөрмөц антиген ба эсрэг биеийг илрүүлэхэд өргөнөөр ашигладаг. Цаашлаад амьтны гаралтай өвчин, эмгэг төрүүлэгч (вирус, бактери), химийн бодис, хорт бодис, ус бохирдуулагчийг илрүүлэх зорилгоор мал эмнэлэг, чанарын хяналт, хүнсний бүтээгдэхүүний аюулгүй байдал, хүрээлэн буй орчны аюулгүй байдал зэрэг олон салбарт LFA-г өргөн ашиглаж байна [1] [2].

LFA нь полимер мембран дээгүүр бай молекулыг агуулсан шингэн (цус, ийлдэс, сийвэн) капиллярын үзэгдлээр урсгаж нитроцеллюлоз мембран дээр суулгасан баригч молекул (эсрэг бие)-тай сонгомлоор харилцан үйлчилж холбогддог. Хэрвээ шинжилгээ хийсэн шингэнд бай молекул байгаа тохиолдолд баригч молекултай холбогдож нитроцеллюлоз мембран дээр өнгөний өөрчлөлт харуулж шинжилгээний үр дүн эерэг гарна [2].

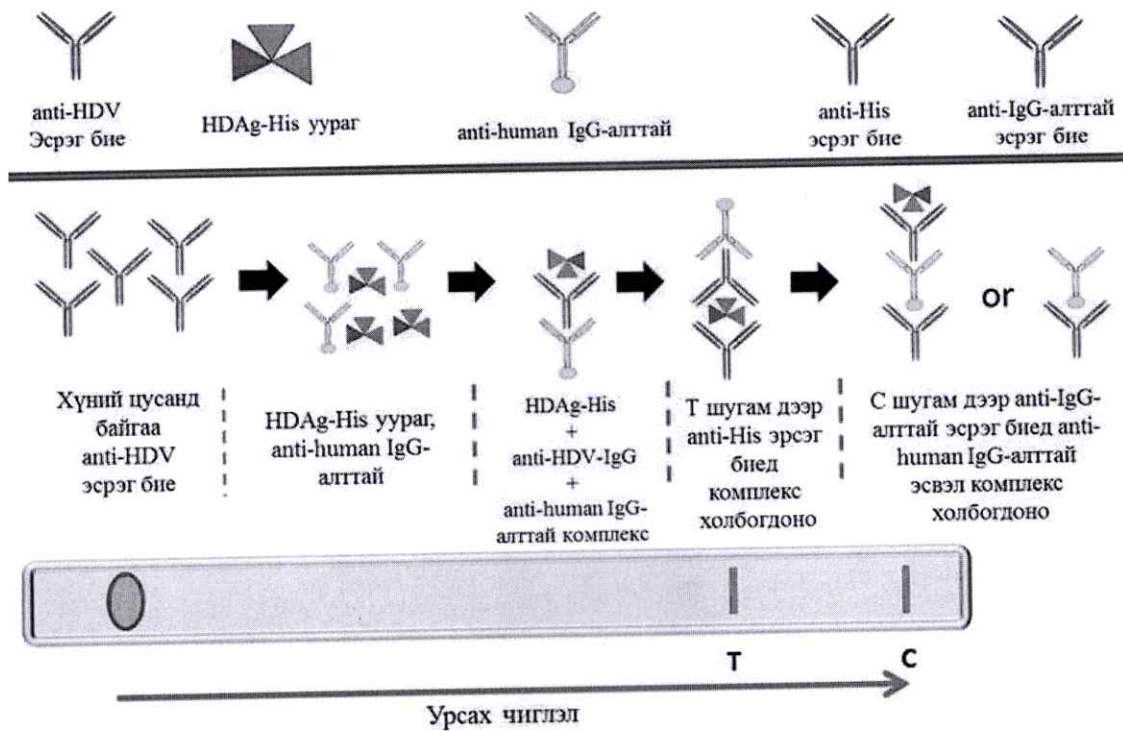
LFA-ийн бүтцэд бай молекул агуулсан шингэнийг дусааж уусгах “дээжийн хэсэг”, бай молекултай сонгомлоор холбогдог шошготой молекулууд (алтны

нанопартиклтай холбосон эсрэг бие/IgG-gold, антиген/Ag) агуулсан “нэгдэх хэсэг”, бай молекултай холбогдох чадвартай мембран дээр суулгаж өгсөн молекулын зурвас бүхий (эсрэг бие) “туршилтын шугам” болон “хяналтын шугам”, илүүдэл уусмалыг сорж авдаг “шингээгч хэсэг” болон эдгээрийг нэгтгэн тогтвортой барьж байдаг “суурь материалаас” бүрдэн [1] [2].



Зураг 1. Түргэвчилсэн оношлуурын ерөнхий бүтэц

ХДВ-ийн түргэвчилсэн оношилгоонд хүний ийлдсийг (anti-HDV эсрэг бие агуулсан) дээжийн хэсэгт дусааснаар урсаж эхэлнэ. Улмаар нэгдэх хэсэгт байгаа anti-human IgG-gold болон HDAg-His нар бай молекултай холбогдож HDAg-His + anti-HDV-IgG + IgG-gold бүхий комплекс бүтэц үүсгэн цааш урсана. Нитроцеллюоз мембран дээрх anti-His эсрэг бие бүхий туршилтын шугам дээр зөвхөн HDAg-His уураг холбогдоно. Иймд комплекс бүтцийн HDAg-His уураг anti-His эсрэг биетэй холбогдож (anti-His + HDAg-His + anti-HDV-IgG + anti-human IgG-gold) туршилтын шугам дээр улаан өнгө үүсгэнэ. Харин хяналтын шугам дээр anti-IgG-gold эсрэг бие байгаа тул мөн улаан өнгө үүсгэж тодорно. Хэрвээ хяналтын шугам дээр улаан өнгө үүсэхгүй бол туршилт буруу байгааг илтгэнэ.



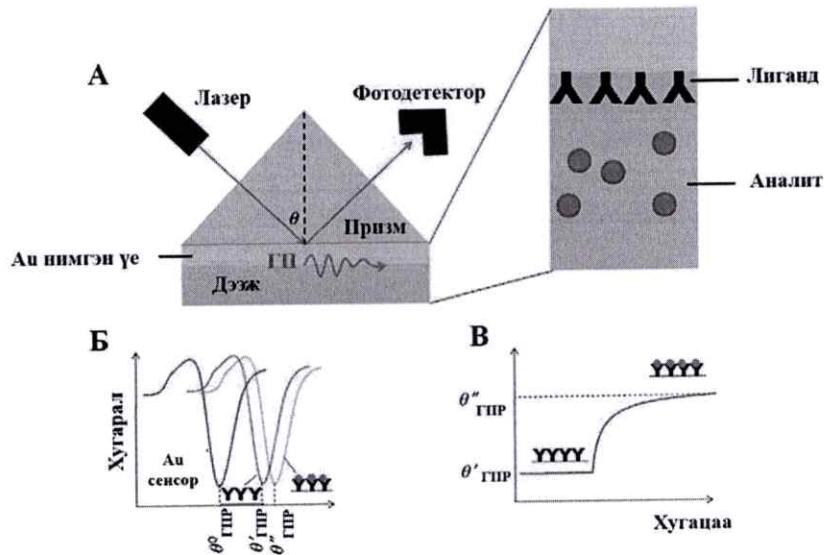
Зураг 2. ХДВ-ийн түргэвчилсэн оношлуурын загвар, ажиллах зарчим

1.2. Гадаргуугийн плазмон резонансын сенсор

Тодорхой өнцгөөр туссан лазер гэрэл металл үе (плазмон) дахь байршаагүй электронуудтай харилцан үйлчлэлцэж, улмаар ойсон гэрлийн эрчмийг бууруулдаг. Физик талаас нь авч үзвэл гадаргуугийн плазмонууд нь металл, диэлектрик интерфейстэй параллель чиглэлд тархдаг гадаргуугийн цахилгаан соронзон долгион юм. Долгион нь металл ба гадаад орчны зааг дээр тархах ба эдгээр осциляци нь металлын гадаргуу дээрх молекулуудын шингээлт гэх мэт аливаа өөрчлөлтөд маш мэдрэмтгий байдаг. Гадаргуугийн плазмонуудыг резонансад оруулан өдөөхийн тулд тодорхой долгионы урттай гэрлийн цацрагийг ашиглаж болно (үзэгдэх ба хэт улаан туяа ихэвчлэн ашигладаг). Ирж буй цацраг нь плазмонь импульстэй тохирох ёстой.

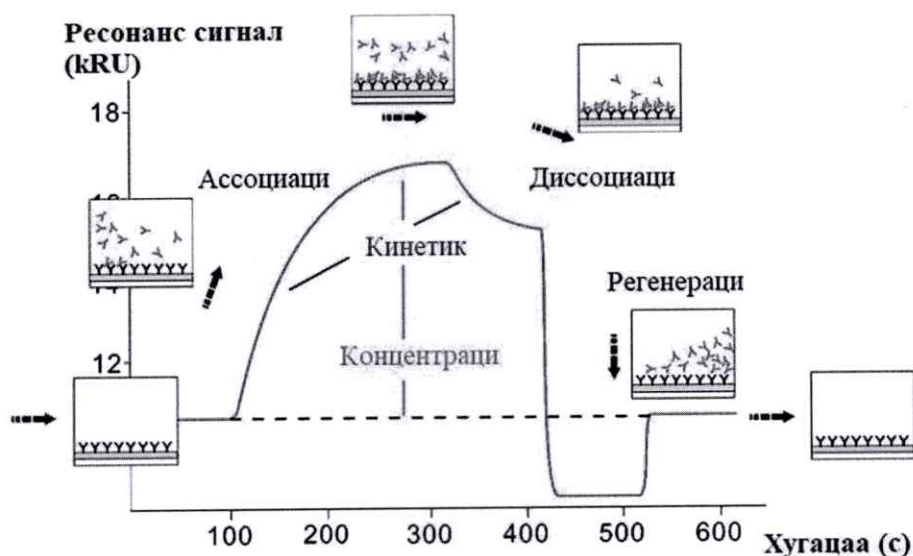
P-туйлширсан гэрлийн хувьд (туйлшрал нь тусах хавтгайд параллель явагдана) гэрлийг шилэн дээр ууршуулсан металл нимгэн үе дээр тусгаж, долгионы урт ба өнцгийг өөрчлөн резонансын нөхцөлийг бүрдүүлэх замаар хэмжилт хийдэг. S-туйлширсан гэрэл нь (туйлшрал нь тусах хавтгайд перпендикуляр явагддаг) гадаргуугийн электрон плазмонь өдөөж чадахгүй. Энэхүү туйлширсан гэрлийн тусах өнцгийг хэд хэдэн хүчин зүйлээр тодорхойлно.

ГПР-ын үзэгдлийг ашигласан олон төрлийн сенсор байдаг бөгөөд ажиллах зарчмын үндэс нь гадаргуу дээр холбогдсон бодисоос шалтгаалсан резонансын пикийн шилжилт юм. Биосенсорт холбогдсон лиганд тохирох аналиттай холбогдох үед резонансын пикийн шилжилт үзэгдэнэ. Хэрэв бидний судалж буй аналит байхгүй тохиолдолд резонансын пикийн шилжилт үзэгдэхгүй. Энэ шилжилтийг ашиглан дээжийг тодорхойлдог.



Зураг 3. Гадаргуугийн плазмон резонансын үзэгдэл дээр үндэслэсэн биосенсорын ажиллах зарчим

ГПР-ын үзэгдэл дээр суурилсан сенсоров хувьд металлын гадаргуу дээр лиганд холбосон байх ба гэрлийн үүсгүүрээс гарч буй гэрэл нь сенсоров гадаргуугаас дотоод бүрэн ойлтоор ойж детекторт очиж бүртгэгдэнэ. Гэрэл тусах өнцгийг өөрчилснөөр резонансын өнцгөөр тусах үед дотоод бүрэн ойлтоор ойхоо больж, ГПР-ын үзэгдлийн улмаас металлын гадаргуугаар долгион болон тархана. Энэ үед детекторт гэрлийн эрчим бүртгэгдэхээ болино. Гэрлийн тусаж буй өнцөг дахин өөрчлөгдөхөд гэрэл эргэн дотоод бүрэн ойлтоор ойж эхэлнэ. Хэрэв алтны гадаргуу дээр аналит суувал ГПР-ын үүсэж буй өнцөг нь өөрчлөгдөнө. Детекторт бүртгэгдсэн мэдээллийг ашиглан хугацаанаас хамаарсан сенсограм байгуулна.



Зураг 4. Гадаргуугийн плазмон резонансын үзэгдэл дээр үндэслэсэн биосенсорын сенсограм

Хугацааны эхний агшинд сенсор дээр ямар ч аналит холбогдоогүй байгаа учир резонансын сигнал байхгүй байна. Гаднаас дээж орж ирэн лигандтай холбогдож ассоциац явагдахад резонансын сигнал өсөж эхэлнэ. Резонансын сигналыг “Резонансын нэгж”-ээр илэрхийлэх ба 1 РН нь өнцгийн 10^{-4} градус шилжилтийг илэрхийлнэ. Хэмжилтийг явуулсны дараа буфер уусмал ашиглан сенсороо гэмтээхгүйгээр цэвэрлэж лигандтай холбогдсон бодисуудыг диссоциац явуулан салгахад резонансын сигнал буурна. Регенерацийн процессоор сенсограм дээжээс бүрэн цэвэрлэж, анхны төлөвт оруулна. Сенсограмын үр дүнд кинетик, бодисын концентрац, диффузийн хурд зэрэг хүчин зүйлүүд нөлөөлдөг. ГПР-ын сигналын өөрчлөлтийн хэмжээ нь тодорхой имобилизацилагдсан лиганд молекулуудтай холбогдож буй аналитын масстай шууд пропорционал хамааралтай байна [3].

1.3. Фермент холбоот эсрэг биеийн урвал (ELISA) оношлуур

ХДВ-ийг нээсний дараа ХДВ-ийн эсрэгбие илрүүлэх ийлдэсний шинжилгээг нэн даруй боловсруулж, худалдаанд гаргасан [4]. ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэх анхны скрининг шинжилгээнд HDAg-ийн эсрэгбиеийг фермент холбоот эсрэг биеийн урвал (ФХЭБУ)/(enzyme linked immunosorbent assay буюу, ELISA) шинжилгээгээр илрүүлдэг [5]. HDAg нь элэгний эсийн цөмд агуулагддаг бөгөөд иммуноассай аргаар илрүүлдэг. Ийлдэснээс HDAg-ийг илрүүлэх нь хязгаарлагдмал бөгөөд цочмог халдварын эхний хоёр долоо хоногт илрүүлж болно [5].

ФХЭБУ нь эсрэг биеийг түргэн хугацаанд шинжлэх, хэмжихэд ашиглах ба судлагдаж буй дээжид сонирхсон тодорхой уураг байгаа эсэх, хэрэв байвал хэр хэмжээтэй байгааг тодорхойлох явдал юм [6]. Өөрөөр хэлбэл, ФХЭБУ нь пептид (уураг, эсрэг бие) гормон гэх мэт бодисуудыг илрүүлэх болон тоо хэмжээг нь тодорхойлох зорилгоор ашиглагддаг. Энэхүү аргаар дээжид хэр хэмжээний эсрэг бие байгааг эсвэл хэчнээн хэмжээний эсрэг төрөгч буюу антиген байгааг илрүүлж болно. Учир нь ФХЭБУ бичил үүрт хавтангийн үүрүүдийн гадаргуу тодорхойлохыг хүссэн молекулын эсрэг биеэр бүрхэгдсэн байдаг [7].

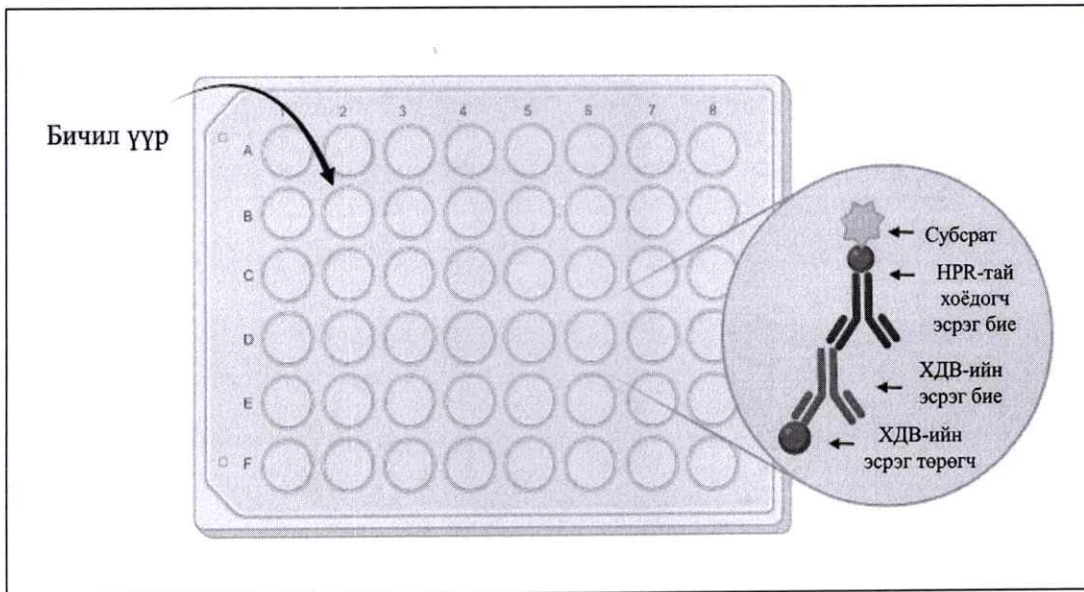
Биомолекулын холболтыг сайжруулахын тулд amino, эпокси эсвэл хлорын бүлгүүдийг агуулсан силан өөрөө угсрагддаг моноүе (self-assembled monolayer, SAMs) шаардлагатай. Эдгээр деривативууд нь биомолекулуудын холболтыг сайжруулахаас гадна наалдац, био нийцтэй байдал, цэнэг, гидрофил, гидрофобик зэрэг гадаргуугийн шинж чанарыг өөрчлөх боломжтой болгодог. Гадаргууг өөрчлөх зорилгоор өргөн судлагдсан силаны дериватив бол 3-аминопропилтриетоксисилан (APTES) юм [8]. Биоаналитик платформд түгээмэл хэрэглэгддэг цахиур, цахиурын дериватив, металл, полимер орно [9]. APTES нь биомолекулын тогтвортой байдлыг сайжруулах хөдөлгөөнгүй байлгах, био бохирдлыг багасгах зэрэг давуу талуудтай. Энэхүү холбогчийг биомаркер, эмгэг төрүүлэгч бичил биетүүд болон хүрээлэн буй орчны бохирдуулагчдыг илрүүлэх биосенсорыг хөгжүүлэхэд түгээмэл ашиглагддаг. APTES нь ФХЭБУ, ГПР дээр суурилсан биосенсор ба иммуносенсор, микроконтилвертер болон микрогравиметрийн шинжилгээ, гадаргуугийн акустик долгион дээр суурилсан шинжилгээ зэрэг янз бүрийн биосенсорт өргөн хэрэглэгддэг [10].

Бидний энэхүү төслийн хүрээнд бүтээх ФХЭБУ нь гадаргууг функционалжуулах арга зүй ашигласнаараа давуу талтай. Оношлуурыг угсрахад физик адсорбци, гадаргууг функционалжуулж химийн холбоо үүсгэх гэсэн хоёр үндсэн төрөл байдаг. Гадаргууг функционалжуулан АРТЕS ашиглан уургийг холбох нь бат бөх бөгөөд аливаа рН, хүчил шүлт, температур зэрэгт тэсвэртэй ба оношлуурыг хадгалах, угаах цэвэрлэхэд тогтвортой байдлыг хангаж өгнө. Зах зээлд худалдаалагддаг ФХЭБУ китны 96 бичил үүрт тавгийг антигентэй физик адсорбц эсвэл Ван-дер ваальсын сул хүчээр холбосон байдаг. Энэ нь оношилгооны явцад тавган дээрх антигены бүтцийн эвдрэл болох, угаалтын явцад антиген салах зэрэг сул талтай. Харин бид жирийн ФХЭБУ-аас мэдрэг чанар өндөртэй мөн химийн холбоо ашиглаж антигенийг бичил үүрэнд холбосон оношлуурыг угсарсан [11].

Үүнээс гадна ФХЭБУ нь доор дурдсан давуу талуудтай. Үүнд:

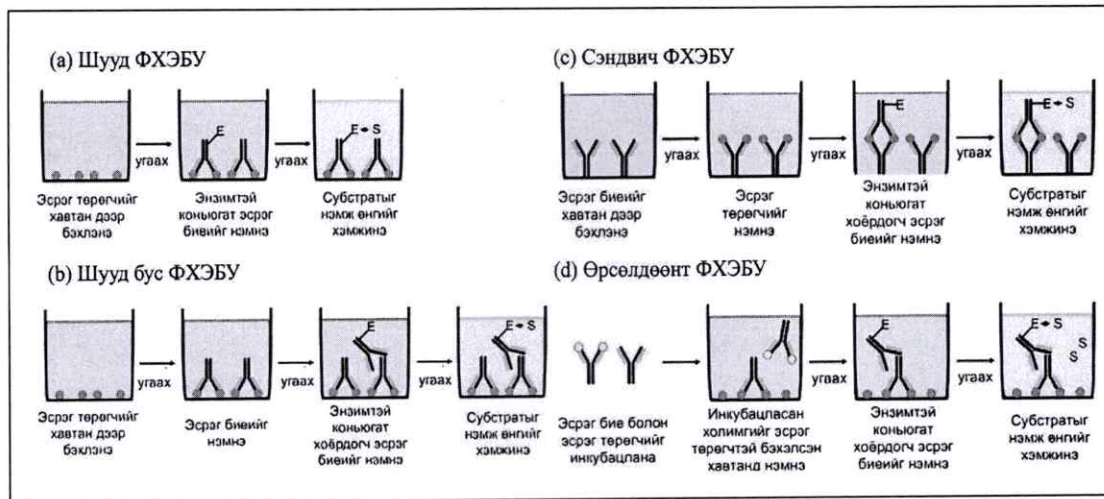
- Өвөрмөц болон мэдрэг чанар маш өндөр, пикограмм түвшинд эсрэг биеийг илрүүлэх боломжтой.
- Эсрэг бие эсвэл эсрэг төрөгч зэрэг нь хуванцар гадаргуу дээр идэвхгүйгээр адсорбцлогдох боломжтой. 96 (зарим тохиолдолд 384) үүртэй хавтангууд нэг дор олон дээжид туршилтыг гүйцэтгэх боломжтой, мөн багаж урвалжууд нь ашиглахад тохиромжтой
- ФХЭБУ сорилын урвалд орж буй бодисуудын нэг нь л хатуу гадаргууд бэхлэгдвэл бусад бэхлэгдээгүй бодисуудыг угаалтын процессын тусламжтайгаар хялбархан зайлуулах боломжтой
- Хэрэглэхэд хялбар, гараар ажиллахад бага цаг зарцуулдаг
- Дээж дэх антигений агууламжийг тодорхойлж чаддаг
- Төрөл бүрийн дээж дээр туршилт хийх боломжтой: ийлдэс, плазм, шээс, шүлс, эд эсийн ханд зэрэгт

ФХЭБУ-ийн суурь зарчим нь фермент ашиглан эсрэг бие-эсрэг төрөгчийн холбоог илрүүлэхэд орших ба фермент нь эсрэг биетэй холбогдож өнгөгүй хромоген бодисыг өнгөт бодис болгож, эсрэг бие, антигений холбоо илэрнэ [12].



Зураг 5. ХДВ-ийн ФХЭБУ-ын ажиллах зарчим

ХДВ-ийн ФХЭБУ оношлуур нь шууд бус системтэй. S-HDAg хатуу гадаргуу дээр хөдөлгөөнгүй бэхлэгдсэн байх ба түүн дээр эсрэгбиеүд буюу илрүүлэгч (анти-ХДВ) холбогдоно. Анти-ХДВ нь ямар нэг ферментгүй боловч фермент холбогдсон хоёрдогч эсрэгбиеүдийн бай нь болдог. ХДВ-ийн ФХЭБУ оношлуурын дээж нь хүний ийлдэс юм. Эхлээд бичил үүрт хавтангийн гадаргуу дээр хөдөлгөөгүй бэхлэгдсэн рекомбинант S-HDAg уураг дээр ийлдсийг буфер уусмалд шингэлж хийнэ. Энэ нь анти-ХДВ-ээс өөр бусад уургууд холбогдохоос сэргийлнэ. Үүнийг инкубацлаж, угаах үед холбогдоогүй илүүдэл анти-ХДВ, бусад уургууд хасагдана. Холбогдсон анти-ХДВ дээр буферт уусгасан тунхууны пероксидаза (HRP) ферменттэй хоёрдогч эсрэгбиеүдийг нэмж инкубацлан холбогдох нөхцөлийг бий болгоно. Инкубацласны дараа дахин угааж, өнгө үзүүлэгч субстратыг нэмж өнгөний өөрчлөлтийг үзүүлнэ (Зураг 5). Үүний дараа зогсоох уусмалаар өнгөний өөрчлөлтийн урвалыг зогсоодог. Хамгийн сүүлд спектрофотометрээр шингээлтийн утгуудыг хэмжиж авдаг.



Зураг 6. ФХЭБУ-ийн төрлүүд

Хүснэгт 1. ФХЭБУ шинжилгээний давуу болон сул талууд

Төрөл	Давуу тал	Сул тал
Шууд	Шинжилгээнд шаардагдах хугацаа богино Аргачлал, үйл ажиллагааны дараалал энгийн Хоёрдогч эсрэгбие шаардагдахгүй	Мэдрэг чанар багатай Эсрэгтөрөгчтэй зорилтот бус молекулууд холбогдох эрсдэлтэй
Шууд бус	Мэдрэг чанар өндөртэй Өртөг багатай	Аргачлал, үйл ажиллагааны дараалал их Төсөөтэй, зорилтот бус эсрэгбие харилцан үйлчлэх Эсрэгтөрөгчтэй зорилтот бус молекулууд холбогдох эрсдэлтэй
Сэндвич	Мэдрэг болон өвөрмөц чанар өндөртэй	Аргачлал, үйл ажиллагааны дараалал их Ашиглах анхдагч болон хоёрдогч эсрэгбиеүдийг сонгоход хугацаа шаардагдана Өртөг өндөртэй
Өрсөлдөөнт	Дээж дэх бага концентрацитай, жижиг аналитыг илрүүлэх боломжтой	Мэдрэг болон өвөрмөц чанар бага

1.3.1.1. Иммуобилизаци

Оношлуурын мэдрэг чанарт нөлөөлөх хүчин зүйлүүдийн нэг нь биомолекулыг бэхлэх буюу иммуобилизациас шалтгаална. Төрөл бүрийн биомолекулуудыг таних молекул болгон ашиглаж ирсэн бөгөөд үүнд уураг, олигонуклеотид, эсрэгтөрөгч болон бусад олон төрлийн биомолекулууд байдаг.

Иммуобилизаци нь биомолекулуудыг таних явцад тэдгээрийн харилцан үйлчлэлд саад учруулахгүй, нөлөөлөхгүйгээр тогтвортой үе үүсгэх юм [31], [32], [33]. Шууд бус ФХЭБУ оношлуурын хавтанд уургийн нэг төрөл болох эсрэгтөрөгчийг иммуобилизацладаг. Ихэвчлэн зөв нугаларсан уургийн бүтцэд гидрофобик амин хүчлүүд нь дотор талдаа байрлаж, гадна талдаа гидрофилик үлдэгдлүүд болох амин (-NH₂), карбоксил (-COOH), гидроксил (-OH) зэрэг бүлгүүд үлддэг ба эдгээр функциональ бүлгүүдийг ашиглан иммуобилизаци хийдэг.

Амин болон карбоксил бүлгүүд нь туйлтай шинж чанартай учраас эсрэгбиеийн гадаргуу дээр түгээмэл байдаг. Лизин, аспартат ба глутамат зэрэг амин хүчлийн функциональ бүлгийг ковалентын холбоог үүсгэхэд ашигладаг. Ихэвчлэн сукцинимидилийн эфиртэй (N-гидроксисукинимид, NHS) 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид (EDC)-ийг хамт ашиглан карбодиимидын химийн аргаар бий болгодог. Энэ аргыг EDC/NHS холболт гэдэг бөгөөд бат бөх амидын холбоо үүсгэдэг ба уургийн иммуобилизацид ашигладаг [34].

3-аминопропилтриетоксисилан (APTES) нь биомолекулуудыг гадаргуу дээр иммуобилизацладаг цахиур дээр суурилсан функциональ бүлгийг нэмэх процесст ашиглагддаг хамгийн түгээмэл органосилан молекул юм. APTES-ийн этокси бүлэг нь хавтангийн гадаргуу дээрх гидроксил бүлэгтэй харилцан үйлчилж (Si-OH) ковалентийн холбоог үүсгэнэ. Энэхүү хүчтэй ковалент холболтын улмаас биорецепторууд нь APTES-ийн бүтцийг алдагдуулахгүйгээр цэнэгийн харилцан үйлчлэл эсвэл хоёр функциональ бүлгүүдийн холбоогоор дамжуулан APTES-ийн давхаргад химийн аргаар холбогддог [35].

1.4. ЛАМП (LAMP-LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION) ПОЛИМЕРАЗЫН ГИНЖИН УРВАЛ

1980-аад онд полимеразын гинжин урвал үүсэж хөгжсөнөөс хойш энэхүү генийг олшруулах аргыг эмнэлзүйн хэрэглээнд, ялангуяа генетикийн шинжилгээнд өргөнөөр ашиглах зорилгоор боловсруулсан [13]. Энэхүү оношилгооны арга нь гепатитын халдвар, сүрьеэ, удамшлын өвчин, халдварт өвчин зэргийг илрүүлж, оношлоход тохиромжтой байсан [14]. Тус технологи нь маш өвөрмөц бөгөөд ПГУ-аар нэг сая хувь олшруулсан ДНХ-ийн хэмжээг нэг цагийн дотор тэрбум хувь хүртэл нэмэгдүүлдэг. Түүнчлэн уламжлалт ПГУ-тай харьцуулахад өндөр мэдрэмтгий, тусгай багаж болон мэргэжилтэн шаардахгүй, усан ванн эсвэл дулааны блокийн төхөөрөмж ашиглан хэрэглэж болохуйц, хурдан бөгөөд хялбар хэрэглээтэй технологи юм [15, 16].

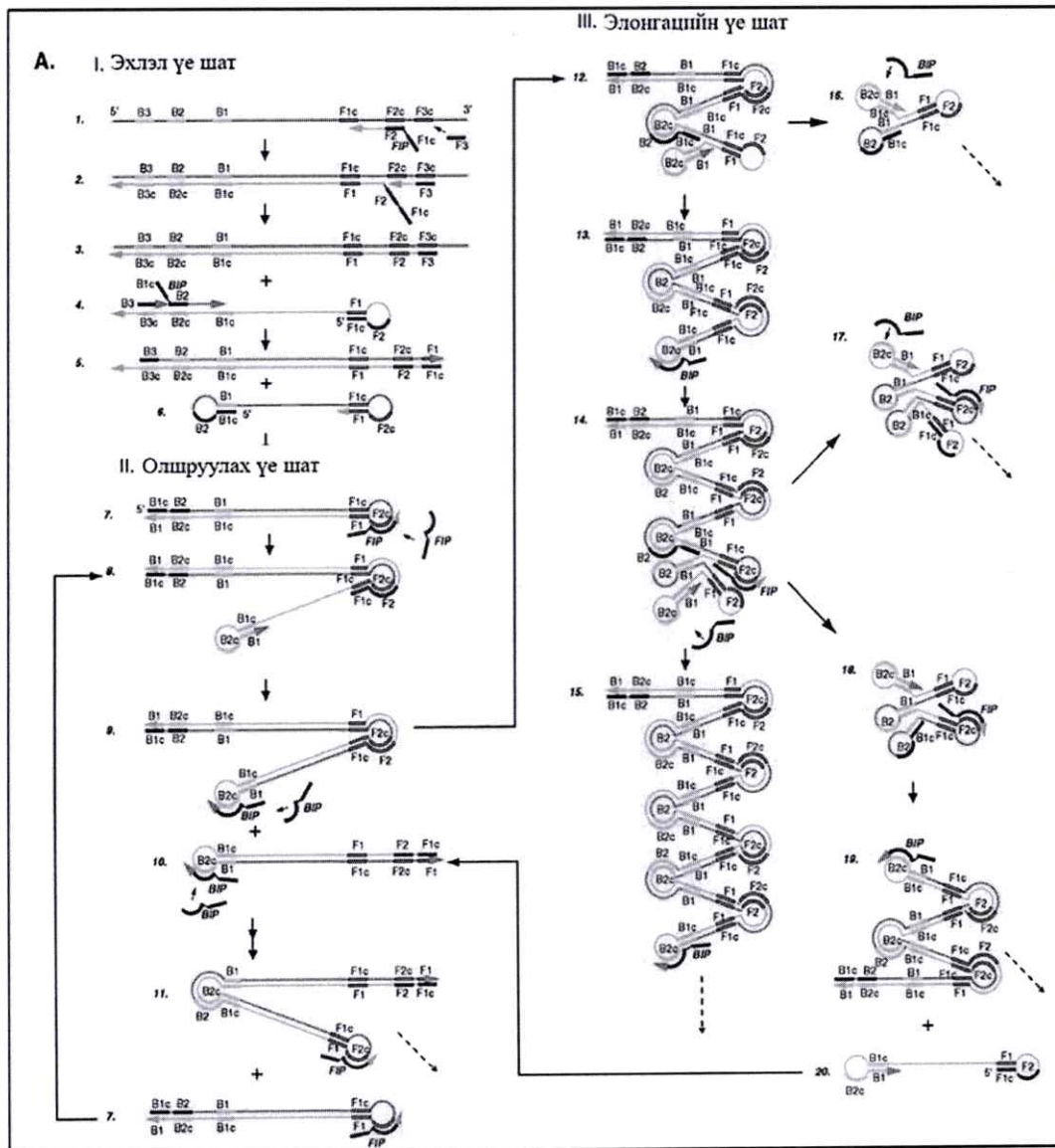
ЛАМП-ПГУ нь Bst ДНХ полимеразыг энзим болон геном дээрх 6-8 хүртэлх генийн дарааллыг тус тусад нь таних чадвартай 4-6 өөр өөр праймерыг ашиглан изотермийн нөхцөлд нуклейн хүчлийн олшруулалт явуулдаг шинэ технологи юм [15]. Bst ДНХ полимеразыг энзим нь *Bacillus stearothermophilus* ДНХ Полимераза I-ээс үүдэлтэй. Тус энзим нь 5'-3' ДНХ полимеразыг энзимийг агуулсан, хэлхээний хүчтэй шилжилт хөдөлгөөнтэй. Хэлхээний хүчтэй шилжилтийн идэвхжил нь Bst ДНХ полимеразыг тогтмол температурт ДНХ нийлэгжүүлэх боломжийг олгодог [14]. ЛАМП-ПГУ-ын урвалын явц болон үр дүнг шийдвэрлэх чухал элемент нь праймер загварчлал байдаг учир праймеруудыг зөв зохиох нь хамгийн нарийн чухал байдаг [14]. Праймеруудын хослолыг нуклеотидын байршил, хоорондын зай, концентраци гэх зэрэг зүйлсийн хүрээнд оновчтой болгох шаардлагатай [15]. ЛАМП-ПГУ-д FIP (шууд дотоод праймер), VIP (урвуу дотоод праймер), F3 (шууд праймер) болон B3 (урвуу праймер) гэсэн 4 үндсэн праймер болон нэмэлт LP, LB гэх хоёр гогцоот праймерыг хэрэглэдэг [17]. Нэмэлт праймеруудыг хийж өгснөөр урвалыг хурдасгах боломжтой болно [15]. FIP праймер нь геномын комплементар F1 болон F2 бүсийн нуклеотидаас бүрдэх бол VIP праймер нь комплементар B2 болон B1 бүсийн нуклеотидаас бүрддэг [14, 15]. Харин LF гогцоот праймер нь F1 болон F2 бүсийн дунд, LB гогцоот праймер нь B1 болон B2 бүсийн дунд байрлана [14, 15].

1.4.1. ЛАМП-ПГУ-ын үе шат

1-р шат. FIP праймер нь зорилтод ДНХ-ийн F2 бүс дээр сууснаар кДНХ синтезлэгдэж ПГУ эхэлнэ. Дараагаар нь F3 праймер ДНХ-ийн утаслаг дээр суух ба ДНХ полимеразыг энзим нь праймерыг уртасгадаг [14]. F3 праймер уртсах үедээ FIP

праймертай холбогдсон кДНХ утаслагыг шахан холдуулж 5' төгсгөлд FIP праймер өөр дээрээ сууж гогцоот бүтцийг (self-hybridizing loop structure) үүсгэдэг [15]. Энэ хэлхээ нь VIP праймер кДНХ синтезийг эхлүүлэх суурь болох ба VIP праймер 5' төгсгөл дээр үүссэн FIP праймерын гогцоог нээж уртасна. ВЗ праймер кДНХ-д сууж холбогдсоноор ДНХ-ийн 3' төгсгөл дээр нуклеотид нэмэгдэж ДНХ-ийн анхдагч дамббелл (dumbbell) гогцоот бүтэц үүснэ [14].

2-р шат. Анхдагч дамббелл бүтэц нь ПГУ-ын дараагийн шат буюу элонгацийн үеийг эхлүүлдэг [14]. Энэ шатанд FIP праймер дамббелл бүтцийн гогцоонд сууж, кДНХ синтезийг эхлүүлж улмаар F1 праймер уртсаж 3' төгсгөлд шинэ гогцоо үүсгэдэг. FIP праймераар ДНХ олшруулалт давтагдах тусам дамббелл бүтэц бий болсоор байдаг [15]. Эдгээр праймерын үе шатууд нь VIP праймерын хувьд ч ялгаагүй ижил юм. ЛАМП-ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг өвөрмөц бус бодис, булингар зэрэг шууд бус аргуудаар илрүүлж болдог [14]. ЛАМП-ПГУ-ыг энгийн ПГУ-тай харьцуулбал өндөр мэдрэмтгий, хялбар бөгөөд зардал багатай, тогтмол 60°C–65°C -д 1 цагийн дотор урвалыг явуулж дуусгадаг онцлог давуу талтай юм [14, 15, 18]. Гэвч праймер загварчлал болон урвалаар дамжих бохирдол нь санаа зовоосон асуудал хэвээр байна [15]. ПГУ-ын урвалын бүтээгдэхүүнийг төгсгөлөг цэг (end point), агароз гель электрофорез, кальцин, малахит ногоон болон гидроксинафтол хөх зэрэг янз бүрийн аргаар шалгаж болно. Кальцин гидроксинафтол хөх зэрэг бодисуудыг ПГУ-ын бүтээгдэхүүнд нэмж өгөх үед тюрбны тагийг нээх тул бохирдох эрсдэлтэй байдаг. ЛАМП-ПГУ-ын арга зүйгээр аюултай өвчин үүсгэгчид болох SARS-CoV (SARS-CoV), Чикунгунья, Денге вирусүүдийг илрүүлэх технологийн хөгжүүлэлт аль хэдийн хийгдчихсэн бол урвуу транскриптазын ЛАМП (RT-LAMP) шинжилгээгээр Шүлхийн вирус, Зика вирус, Томуугийн вирус, Цитомегаловирус (CMV), Хүний папилломавирус (HPV), Херпес (HSV)- ийн вирусүүдийг илрүүлээд байна [18].

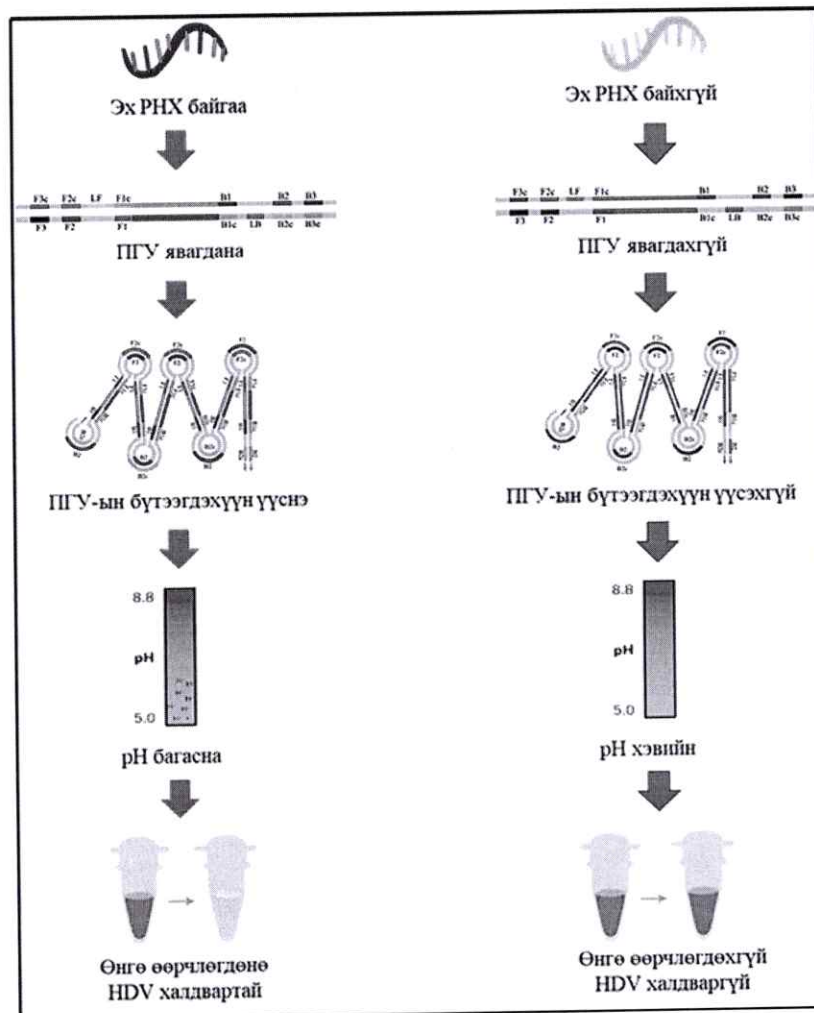


Зураг 7. ЛАМП полимеразын гинжин урвалын үе шат, механизм [19]

1.4.2. Колориметрик буюу өнгө үзүүлэгч ЛАМП полимеразын гинжин урвал

Өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ нь дээжид тодорхой хэмжээний ДНХ эсвэл РНХ-ийн дарааллыг хурдан бөгөөд мэдрэмтгий илрүүлэх боломжийг олгодог нуклейн хүчлийн олшруулах арга юм [20]. Богино хугацаанд их хэмжээний нуклейн хүчлийг үүсгэдэг бөгөөд үүссэн ДНХ-ийн бүтээгдэхүүнийг колориметрийн индикатор ашиглан хялбархан харж болно [20]. ЛАМП-ПГУ-ын үндсэн зарчим нь тогтмол температурт зорилтот нуклейн хүчлийн дарааллыг олшруулдаг тусгайлан боловсруулсан праймер ба ДНХ полимеразыг ашиглах явдал юм [20]. Өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ-д рН-мэдрэмтгий будаг фенол улаан эсвэл крезолын улаан гэх мэт

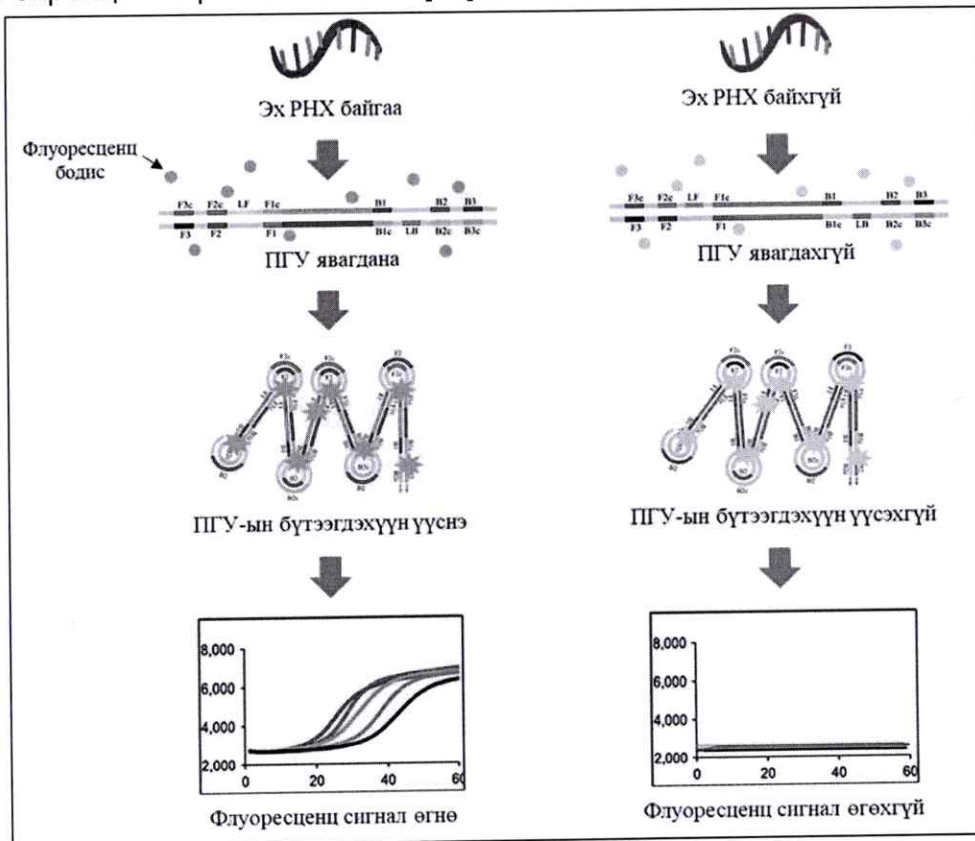
бодисууд урвалын холимогт ордог. Фенол улаан бодис нь агаарт тогтвортой, талс бүтэцтэй бөгөөд өнгө нь улаан (570 нм)-аас шар (443 нм)-руу аажмаар шилждэг [21]. Урвал явагдахад өнгө нь улаанаас шар болж өөрчлөгддөг нь нуклейн хүчил олширсныг илтгэнэ [21]. Өнгөний өөрчлөлтийг тусгай багаж төхөөрөмж ашиглахгүйгээр энгийн нүдээр ажиглаж болох бөгөөд энэ аргыг лабораторийн хязгаарлагдмал орчинд ашиглахад тохиромжтой [21]. Өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ нь халдварт өвчин, удамшлын эмгэг, хоол хүнсээр дамжих эмгэг төрүүлэгчдийг илрүүлэх зэрэг олон боломжит хэрэглээтэй.



Зураг 8. Өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ-ын схем

1.4.3. Флуоресценц ЛАМП полимеразын гинжин урвал

Флуоресценц ЛАМП-ПГУ нь дээжид байгаа тодорхой хэмжээний ДНХ эсвэл РНХ-ийг илрүүлэхийн тулд урвалын бүтээгдэхүүнтэй холбогддог флуоресценц будагч бодис ашиглан нуклейн хүчлийг олшруулдаг арга юм [17]. Энэ аргыг флуоресценц ЛАМП эсвэл бодит цагийн ЛАМП-ПГУ гэж нэрлэдэг [17]. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ нь зарчмын хувьд өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ-тай адил тусгайлан боловсруулсан праймер болон ДНХ полимераза энзимийг ашиглан нуклейн хүчлийг олшруулна [17]. Нуклейн хүчлийн олшруулах урвал явагдах үед флуоресцент будаг нь флуорометр гэх мэт тусгай тоног төхөөрөмж ашиглан бодит цагийн хугацаанд хэмжиж болох дохиог ялгаруулдаг [22]. Үүссэн флуоресценц гэрлийн хэмжээ нь дээжид агуулагдах олшруулсан нуклейн хүчлийн хэмжээтэй шууд пропорциональ бөгөөд зорилтот ДНХ болон РНХ-ийн дарааллын тоон шинжилгээг хийх боломжийг олгодог [18]. FAM (6-carboxyfluorescein) флуоресценц будгийг ЛАМП-ПГУ-д ашиглах ба өдөөх долгионы урт нь ойролцоогоор 494 нм, цацрагийн хамгийн их долгионы урт нь ойролцоогоор 521 нм байна [22].



Зураг 9. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын схем

2. СУДАЛГААНЫ АЖЛЫН МАТЕРИАЛ

2.1. Бодис урвалж

Бодис, урвалжийн нэр	Химийн томьёо	Үйлдвэрлэгч
Рекомбинат уураг гарган авах, түргэвчилсэн оношлуур		
Brilliant Blue R-250	$C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$	Sigma-Aldrich
DAB substrate,	$(C_6H_3(NH_2)_2)_2$	Thermo Fisher Scientific
DMSO	$(CH_3)_2SO$	Sigma-Aldrich
dNTPs(100mM)	-	Sigma-Aldrich
EDTA	$(CH_2N(CH_2CO_2H)_2)_2$	Biosesang
HEPES	$C_8H_{18}N_2O_4S$	HiMedia
IPTG	$C_9H_{18}O_5S$	Sigma-Aldrich
Luria Broth	-	HiMedia
Orange G	$C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$	Sigma-Aldrich
Protein assay dye reagent	-	Bio Rad
SDS	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	Xilong Scientific
SkimMilk	-	Becton
SOC тэжээлийн орчин	-	HiMedia
Stable peroxide substrate buffer	-	Thermo Fisher Scientific
TEMED	$C_6H_{16}N_2$	Thermo Fisher Scientific
Triton x100	$C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ (n=9-10)	HiMedia
Tween 20	$C_{58}H_{114}O_{26}$	HiMedia
X-Gal	$C_{14}H_{15}BrClNO_6$	Sigma-Aldrich
β -меркаптоэтанол	$HOCH_2CH_2SH$	Sigma-Aldrich
Агар	$C_{14}H_{24}O_9$	Sigma-Aldrich
Агароз	$C_{24}H_{38}O_{19}$	Lonza
Акриламид	C_3H_5NO	Sigma-Aldrich
Аммони персульфат (APS)	$(NH_4)_2S_2O_8$	Sigma-Aldrich
Ампициллин	$C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$	Sigma-Aldrich
Бис-акриламид	$C_7H_{10}N_2O_2$	Sigma-Aldrich

Борын хүчил	H_3BO_3	Sigma-Aldrich
Бромфенол хөх	$C_{19}H_{10}Br_4O_5$	Sigma-Aldrich
Глицерол	$C_3H_8O_3$	Sigma-Aldrich
Глицин	$C_2H_5NO_2$	Biosesang
Давсны хүчил	HCl	Sigma-Aldrich
ДНХ маркер	-	Invitrogen
Изопропанол	C_3H_8O	Duksan Pure Chemicals
Имидазол	$C_3H_4N_2$	Thermo Fisher Scientific
Калийн дигидрогенфосфат	KH_2PO_4	HiMedia
Калийн хлорид	KCl	Sigma-Aldrich
Кальцын хлорид	$CaCl_2$	Sigma-Aldrich
Канамицин	$C_{18}H_{36}N_4O_{11}$	Sigma-Aldrich
Манганы (II) хлорид	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	HiMedia
Метанол	CH_3OH	Xilong Scientific
Натрын карбонат	Na_2CO_3	HiMedia
Натрын фосфатын дигидрат	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	Sigma-Aldrich
Натрын хлорид	NaCl	HiMedia
Трис	$C_4H_{11}NO_3$	Sigma-Aldrich
Уургийн маркер	-	Invitrogen
Фосфат буфер салин (PBS)	-	HiMedia
Цууны хүчил	CH_3COOH	Xilong Scientific
Этидиум бромид	$C_{21}H_{20}BrN_3$	Sigma-Aldrich

ГПР-ийн оношлуур

Контаминон	ГИБ	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation
Экстран	ГИБ	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation
(3-аминопропил) триэтоксисилан APTES	$C_9H_{23}NO_3Si$	Sigma-aldrich
11-Меркаптоандеканы хүчил MUA	$HS(CH_2)_{10}CO_2H$	Cool chemistry

1-этил-3-(3- диметиламинопропил) карбодиимид (EDC)	$C_8H_{17}N_3$	Sigma-aldrich
N-гидроксисукцинимид (NHS)	$C_4H_5NO_3$	Sigma-aldrich
Tween 20	$C_{58}H_{114}O_{26}$	Himedia
Алт (балк)	-	
Алтны хлоридын хүчил	$HAuCl_4$	Sigma-aldrich
Ацетон	C_3H_6O	
Динатрын гидроген фосфат	$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	Xilong chemical
Натрын дигидроген фосфат	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	Xilong chemical
Натрын цитрат	$C_6H_5O_{72} \cdot H_2O$	Xilong chemical
Устөрөгчийн хэт исэл	H_2O_2	Xilong chemical
Үхрийн ийлдэсний албумин		Himedia
	-	
Фосфат буфер салин (PBS)	-	HiMedia
Хүхрийн хүчил	C_3H_6O	Xilong chemical
Этанол	C_2H_6O	Xilong chemical

ФХЭБУ оношлуур

(3-аминопропил) триэтоксисилан APTES	$C_9H_{23}NO_3Si$	Sigma-aldrich
1-Step Ultra TMB-ELISA	-	Thermo Fisher Scientific
Anti-human IgG (HRP)	-	Abcam
Tween 20	$C_{58}H_{114}O_{26}$	Himedia
Натрийн гидроксид		
Үхрийн ийлдэсний албумин		Himedia
	-	
Фосфат буфер салин (PBS)	-	HiMedia
Хүхрийн хүчил	H_2SO_4	-
Этанол	C_2H_6O	Xilong chemical

2.2. Уусмал, буфер, тэжээлийн орчин

2.2.1. Агароз гель электрофез

TBE буфер 10x	Трис-HCl (pH 7.5)	890 mM
	Борын хүчил	890 mM
	EDTA	20 mM
6x глицерол лоадинг буфер	Трис-HCl (pH 7.5)	10mM
	EDTA (pH 8)	10mM
	Глицерол	70%
	Orange G	0.025%

2.2.2. SDS-PAGE

40% акриламидын уусмал	Акриламид	29.2%
	Бис-акриламид	0.8%
Sample буфер 2x	Трис-HCl (pH 6.8)	126 mM
	Глицерол	20%
	β -меркаптоэтанол	10%
	SDS	4%
	Бромифенол хөх	0.02%
Running буфер	Трис-HCl (pH 8.3)	25 mM
	Глицин	192 mM
	SDS	0.1%
Салгагч гель буфер	Трис-HCl (pH 8.8)	1.5 M
Цуглуулагч гель буфер	Трис-HCl (pH 6.8)	1 M
Будагч уусмал	Brilliant Blue R-250	0.1%
	Метанол	50%
	Цууны хүчил	10%
	Нэрмэл ус	39.9%
Будаг арилгагч уусмал	Метанол	40%
	Цууны хүчил	10%
	Нэрмэл ус	50%

2.2.3. Компетент эс

ТВ буфер	HEPES	10 мМ
	CaCl ₂	15 мМ
	KCl (рН 6.7 1М КОН)	250 мМ
	MnCl ₂ 4H ₂ O	55 мМ
ТВ-DMSO	ТВ буфер	93%
	DMSO	7%

2.2.4. Ni-NTA афинити баганан хроматограф

Ni-NTA лизис буфер (рН 8.0)	Na ₂ HPO ₄	50 мМ
	NaCl	300 мМ
	Имидазол	10 мМ
Ni-NTA угаах буфер (рН 8.0)	Na ₂ HPO ₄	50 мМ
	NaCl	300 мМ
	Имидазол	20 мМ
Ni-NTA элюци буфер (рН 8.0)	Na ₂ HPO ₄	50 мМ
	NaCl	300 мМ
	Имидазол	250 мМ

2.2.5. Вестерн блот

Transfer буфер (рН 8.3)	Трис	25 мМ
	Глицин	150 мМ
	Метанол	15%
Blocking буфер	SkimMilk	4%
	Tween 20	0.1%
Washing буфер	SkimMilk	2%
	Tween 20	0.1%

2.2.6. Бусад өргөн хэрэглэгддэг уусмал, буфер

PBS	NaCl	137 мМ
	KCl	2.7 мМ
	Na ₂ HPO ₄	10 мМ
	KH ₂ PO ₄	2 мМ
PBST	NaCl	137 мМ
	KCl	2.7 мМ
	Na ₂ HPO ₄	10 мМ
	KH ₂ PO ₄	2 мМ
	Tween 20	0.05%
Диализын мембран буцалгах буффер	EDTA	50 мМ
	Na ₂ CO ₃	100 мМ
Диализын буффер	NaCO ₃	0.0875M
	NaHCO ₃	0.0125M

2.2.7. Тэжээлийн орчин

LB тэжээлийн орчин	Триптон	2%
	Мөөгөнцрийн ханд	0.5%
	NaCl	85.5 мМ
LB агар тэжээлийн орчин	Триптон	2%
	Мөөгөнцрийн ханд	0.5%
	NaCl	85.5 мМ
	Агар	1.5%
SOC тэжээлийн орчин	Триптон	2%
	Мөөгөнцрийн ханд	0.5%
	NaCl	10 мМ
	KCl	2.5 мМ
	MgCl ₂	10 мМ
	MgSO ₄	10 мМ
	Глюкоз	20 мМ

2.3. Эс, плазмид, синтетик олигонуклеотид, эсрэг бие, энзим, цомог

Антибиотик, IPTG, X-gal-ын уусмалыг бэлтгэн 0.22 мкм филтрээр шүүж -20°C-д хадгална. Хэрэглэх үед хийх гэж байгаа уусмалын температур 55°C-ээс доош байх шаардлагатай.

	Мастер уусмал	Уусгагч	Эцсийн концентрац
Ампициллин	50 мг/мл	ddH ₂ O	100 мкг/мл
Канамицин	50 мг/мл	ddH ₂ O	100 мкг/мл
IPTG	1 М	ddH ₂ O	1 мМ
X-gal	20 мг/мл	DMSO	40 мкг/мл

2.3.1. Бактерийн омог

<i>E. coli</i> BL21DE3	Novagen
<i>E. coli</i> DH5α	Invitrogen
<i>E. coli</i> Shuffle	Novagen

2.3.2. Плазмид

pCR2.1	Eurofins Genomics
pEGFP	Novagen
pGEM-T Easy	Promega
pET41a(+)	Novagen

2.3.3. Синтетик олигонуклеотид

Синтетик олигонуклеотидуудыг БНСУ-ын Genotech компанид захиалан авсан

HDV-Ag-NdeI	5'-GGGCATATGAGCCGTAGCGAATCTCG-3'
HDV-Ag-HindIII	5'-GGGAAGCTTCGGGAAACCCTGGTTACCAC-3'

2.3.4. Эсрэг бие

Anti-6x His tag	Abcam
Anti-Rabbit IgG	Sigma-Aldrich
Anti-Human IgG (HRP) Polyclonal	Sigma-Aldrich

Anti-Human IgG (HRP) Monoclonol	Abcam
Anti-Human IgG-Gold 40nm	BBI Solutions

2.3.5. Энзим

Рестриктазын энзим (дагалдах буфер)	NEB
BamH1 (G_GATCC)	NEB
Xho1 (C_TCGAG)	NEB
Nde1 (CA_TATG)	NEB
Hind3 (A_AGCTT)	NEB
T4 DNA ligase (дагалдах буфер)	Promega

2.3.6. Цомог

AccuPrep® PRC/Gel Purification kit	Bioneer
HotStart Taq DNA polymerase	Bioneer
Exprep™ Plasmid SV mini, 200p	GeneAll®
pGEMT®-T Easy Vector System I	Promega
T4 DNA Ligase	Promega
Anti HDV-IgG	Wantai

2.3.7. Оношлуурын бүрдэл хэсгүүд

Түргэвчилсэн тестийн суурь материал	Lonhmann
Нитроцеллюлоз мембран	GE Healthcare Life Science
БК7 шил	
96 well plate	Biofill

2.4. Ашигласан программ хангамж

Origin Pro
 Biorender
 Microsoft office

2.5. Багаж, тоног төхөөрөмж

Багаж, тоног төхөөрөмжийн нэр	Багаж, тоног, төхөөрөмжийн үйлдвэрлэгч	Багажийн зураг
Аналитик жин	Analytical balance, Adventurer, Ohaus Corp	
Соронзон хутгуур	Hotplate stirrer, Daihan scientific Co LTD	
Татах шүүгээ	Chemical Lab Ventilation Fume Hood, Monchilab	
Хутгуур	MaxQ™ 4000 Benchtop Orbital Shakers, Thermo fisher scientific	

Центрифуг (том)

Centrifuge Combi-514R,
hanil science industrial



Ультрасоник ванн

Ultrasonic bath, Yamato
250, Branson



Плазма спуттер

Plasma sputter, MCM-100,
Microtrac



UV/vis
спектрофотометр

UV-Visible recording
spectrophotometer, UV-
160, 1984, Shimadzu



FTIR

Shimadzu IR Prestige-21



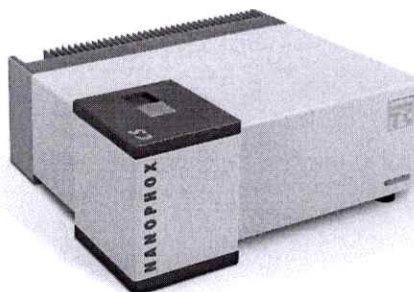
SEM/EDS

TM – 1000 Hitachi,
ШУТИС



Nanophox

PCCS, Sympatec

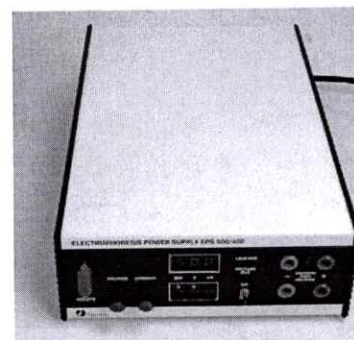


Агароз гел
электрофорез

Mupid-EX AC1000-240V,
Takara

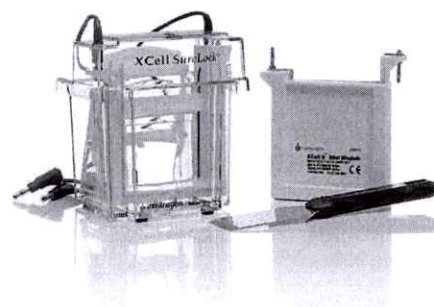


Цахилгааны тэжээл
(Power supply) EPS 500/400, Pharmacia
LKB



Уургийн гель
электрофорез

X cell surelock, Novex



Центрифуг (жижиг)

AccuSpin Micro 17R,
Fisher Scientific



Ультрасоникатор

Tort-400, Ultrasonicator



Инкубатор

Fuzzy control system,
Wisecube



Био-аюулгүйн
шүүгээ

BSC-1500IIA2-x, Biobase



ELISA reader

Microplate reader, Bio-tek
ELX 800 instruments

Microplate reader, Bio-tek
instruments



Спектрофотометр

SmartSpec 3000, Biorad



ПГУ-ын машин

T100 Thermalcycler,
Biorad

Сэгсрэлттэй
инкубатор (жижиг)

Thermoshaker, MSC-100,
Aosheng



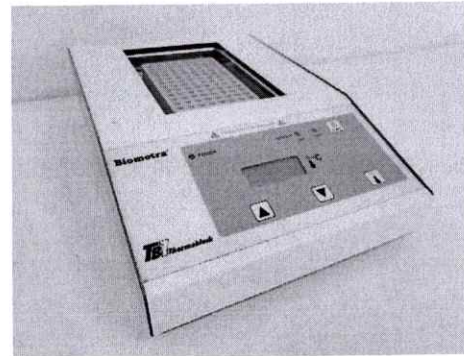
Гель документац

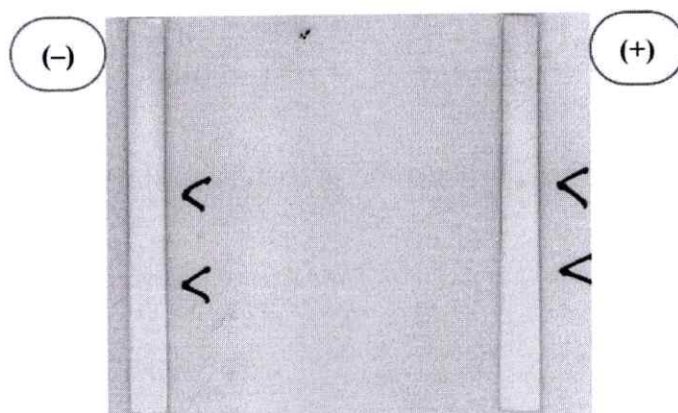
Maxidoc gel imaging
system, Daihan scientific



Термоблок

Thermoblock TB1,
Biometra

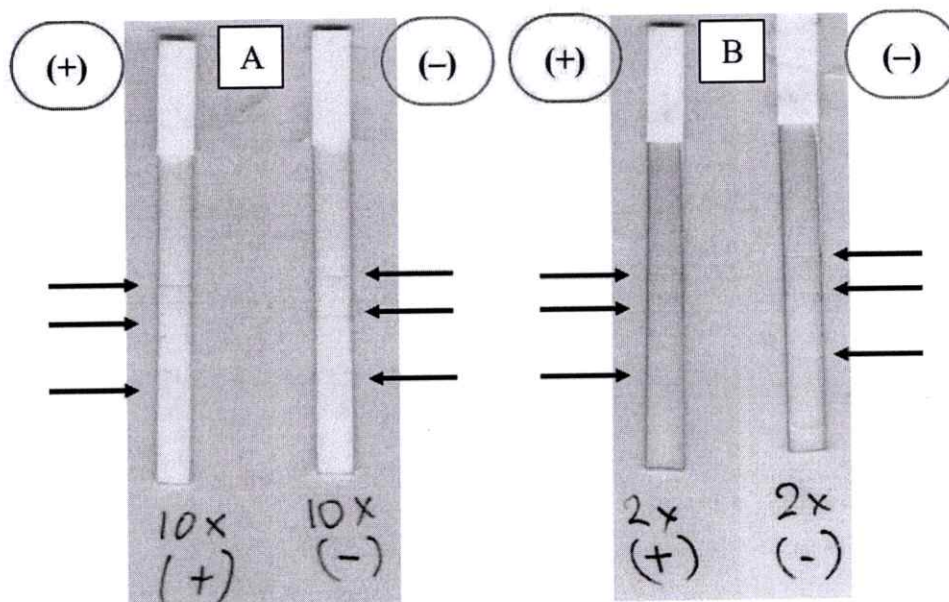




Зураг 21. ХДВ-ийн түргэвчилсэн оношлуурын туршилтын 5-р загвар

1-р загварт 2 мкл HDAg-His рекомбинант уургийг нитроцеллюлоз мембран дээр дусаасан. Мөн 5 мкл алттай холбогдсон anti-human IgG эсрэг бие, 45 мкл PBS-Triton x100 (0.5%), 50 мкл ХДВ эерэг/сөрөг хүний цусны дээжийн уусмал бэлдэн туршив.

Бусад туршилтын загваруудын үр дүн.

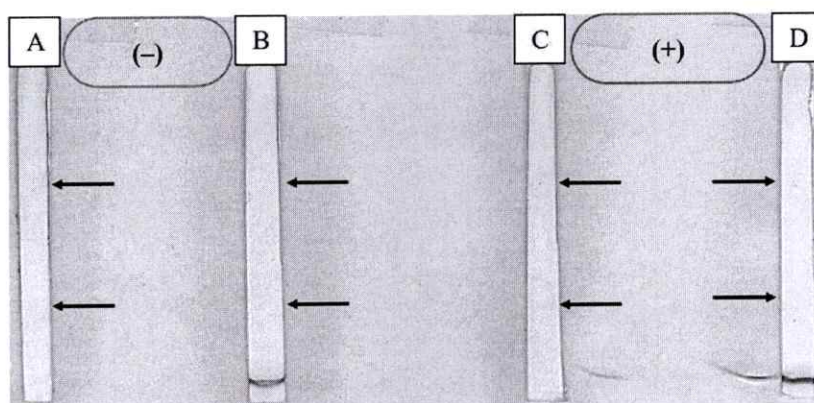


Зураг 22. ХДВ-ийн түргэвчилсэн оношлуурын туршилтын 1-р загвар

Энэ загварт алттай холбогдсон Anti-human IgG эсрэг биеийг хэчнээн хэмжээтэй хийх хэрэгтэйг мэдэх зорилгоор 10 дахин ба 2 дахин шингэлсэн уусмал бэлдэж туршсан. Мөн мембран дээр балны хошуу ашиглан HDAg-His рекомбинант уургийг

зурсан. 50 мкл алттай холбогдсон anti-human IgG эсрэг бие, 400 мкл PBS-Tween 20 (0.25%), 50 мкл ХДВ эерэг/сөрөг хүний цусны дээжийн уусмал бэлдэн туршсан.

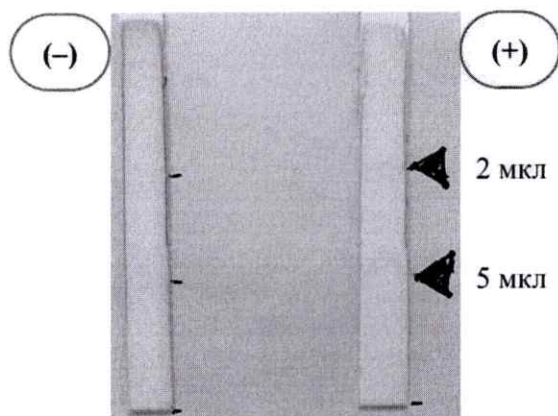
А: Алттай холбогдсон anti-human IgG эсрэг биеийг 10 дахин шингэлсэн. В: Алттай холбогдсон Anti-human IgG эсрэг биеийг 2 дахин шингэлсэн. Туршилтын дүнд балны хошуу ашиглахад мембраныг гэмтээхээс гадна уураг мембран дээр наалдаж чадсангүй. Мөн 2 дахин шингэлсэн алттай холбогдсон Anti-human IgG эсрэг биеийг ашиглахад мембраныг нэлэнхийд нь бүрхсэн тул 10 дахин шингэсэн нь тохиромжтой гэсэн дүгнэлтэд хүрлээ.



Зураг 23. ХДВ-ийн түргэвчилсэн оношлуурын туршилтын 2-р загвар

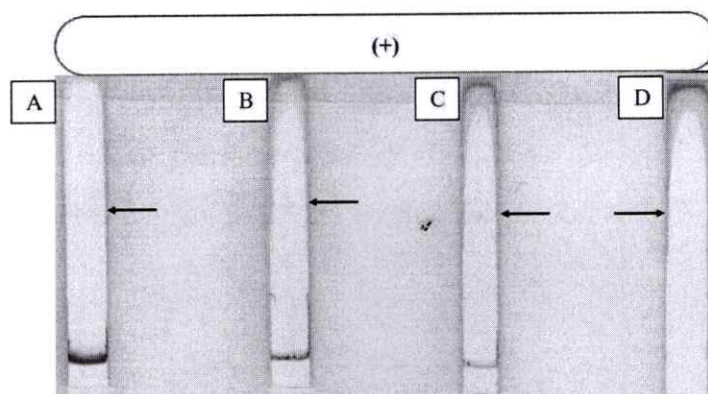
Энэ загварт дээжийн уусмалыг ус ба PBS-ийн алинд нь уусгавал тохиромжтой бэ гэдгийг туршсан. Мембран дээр 1 мкл HDAg-His рекомбинант уураг дусаасан. 5 мкл алттай холбогдсон anti-human IgG эсрэг бие, 45 мкл ус/PBS, 50 мкл ХДВ эерэг/сөрөг хүний цусны дээжийн уусмал бэлдсэн. А: PBS-д уусгасан ХДВ сөрөг, В: усанд уусгасан ХДВ сөрөг, С: PBS-д уусгасан ХДВ эерэг, D: усанд уусгасан ХДВ эерэг.

Эсрэг биеийн комплекс мембраны сүвээр дамжин урсахын тулд уусгагч агуулсан байх шаардлагатай. Туршилтын дүнд дээжийн PBS болон уусгагч (PBS, Tween-20, Triton x100) агуулсан уусмалд уусгах хэрэгтэй.



Зураг 24. ХДВ-ийн түргэвчилсэн оношлуурын туршилтын 3-р загвар

Туршилтын 2-р загвар амжилттай болсон тул мембран дээр 2, 5 мкл PBS Tween 20 (0.25%) уусгасан HDAg-His рекомбинант уураг дусаасан. 5 мкл алттай холбогдсон anti-human IgG эсрэг бие, 45 мкл PBS, 50 мкл ХДВ эерэг/сөрөг хүний цусны дээжийн уусмал бэлдсэн. Мембран дээрх улаан толбо 6 минутад тодорсон. Туршилтын дүнд мембран дээр дусаасан уураг цагариг үүсгэсэн байсан тул мембран дээр наалдаж чадалгүй дуслын зах луу урссан гэсэн дүгнэлтэд хүрлээ. Иймд мембран дээр наах гэж байгаа уургийг усанд уусгасан байх шаардлагатай гэсэн дүгнэлтэд хүрсэн.



Зураг 25. ХДВ-ийн түргэвчилсэн оношлуурын туршилтын 4-р загвар

Энэ загварт 2 мкл anti-His IgG эсрэг биеийг нитроцеллюлоз мембран дээр дусаасан. Мөн алттай холбогдсон anti-human IgG эсрэг бие, 10х PBS-Triton x100 (5%), ХДВ эерэг хүний цусны дээж, HDAg-His рекомбинант уургийн уусмалыг дөрвөн янзаар бэлдэн туршив.

A: 5 мкл алттай холбогдсон anti-human IgG эсрэг бие, 40 мкл HDAg-His рекомбинант уураг, 50 мкл ХДВ эерэг хүний цусны дээж, 10 мкл 10х PBS-Triton x100 (5%).

B: 5 мкл алттай холбогдсон anti-human IgG эсрэг бие, 20 мкл HDAg-His рекомбинант уураг, 50 мкл ХДВ эерэг хүний цусны дээж, 10 мкл 10x PBS-Triton x100 (5%), 20 мкл H₂O

C: 5 мкл алттай холбогдсон anti-human IgG эсрэг бие, 10 мкл HDAg-His рекомбинант уураг, 50 мкл ХДВ эерэг хүний цусны дээж, 10 мкл 10x PBS-Triton x100 (5%), 30 мкл H₂O

D: 5 мкл алттай холбогдсон anti-human IgG эсрэг бие, 5 мкл HDAg-His рекомбинант уураг, 50 мкл ХДВ эерэг хүний цусны дээж, 10 мкл 10x PBS-Triton x100 (5%), 35 мкл H₂O

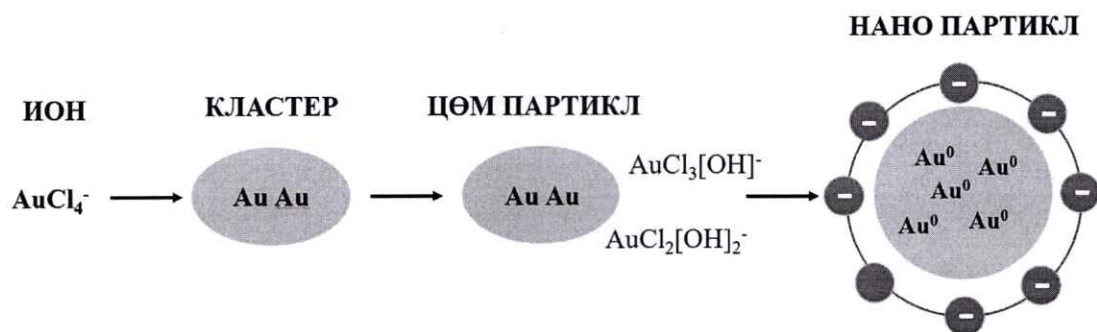
Туршилтын дүнд HDAg-His рекомбинант уураг болон бусад хольцын оптимал харьцааг тогтоох шаардлагатай гэж дүгнэсэн.

4.3. Алтны нанопартиклд суурилсан ГПР оношлуурын үр дүн

4.3.1. Туркевичийн аргаар синтезлэсэн алтны нанопартиклын үр дүн

Алтны нанопартиклыг гарган авах аргуудаас хамгийн алдартай нь 1951 онд Туркевичийн дэвшүүлсэн алтны хлоридын уусмалыг цитратаар ангижруулах арга юм. Энэ аргаар ойролцоогоор 20 нм орчим хэмжээтэй алтны нано хэмжээст ширхэггарган авч болох ба натрын цитрат-алтны харьцаанаас хамааран үүсэх партиклын хэмжээ өөрчлөгддөг.

Натрын цитрат нь ангижруулагчаас гадна тогтворжуулагч, рН тохируулагч гэх гурван үүргээр урвалд оролцдог. Уусмал дахь алтны хлоридын ион $AuCl_4^{-1}$ нь цитрат ионоор ангижирч алтны цөм үүсгэнэ. Цөм нь цөөн тооны алтны атомаас бүрдэх бөгөөд хамгийн гол онцлог нь цөм бүр ижил хэмжээтэй байдаг.

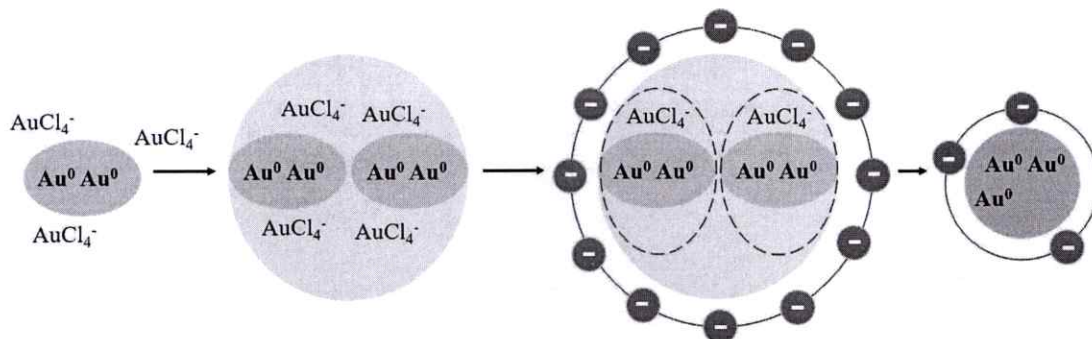


Зураг 26. Цитратын ионоор тогтворжуулж үүсгэх алтны нанопартиклын синтез

Цитратын концентрац их байх тусам Au^0 ангижрах урвалын хурд ихсэх тул нэгэн зэрэг алтны цөм үүснэ. Цитратын хэмжээ их байх тусам үүсэх цөмийн тоо их байна. Цөмийн тоо олон байна гэдэг нь нөгөөтээгүүр цөмийн хэмжээ жижиг гэсэн үг. Гидроксилжсэн алтны хлоридын ион цөмийн гадаргуу дээр сууж ургах процесс явдаг ба улмаар алтны нано хэмжээст ширхэг эцсийн бүтээгдэхүүн үүснэ. (Зураг 22).

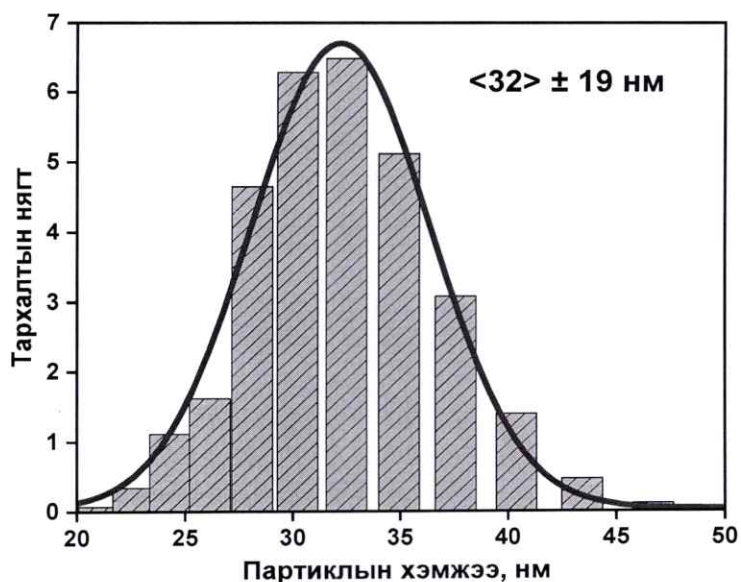
Туркевичийн аргаар жижиг нано хэмжээст ширхэг синтезлэх туршилтад натрын цитратын агууламж их байхад ($Rc/a=1.54$ Алтны хлоридын уусмал ба натрын цитратын молийн харьцаа) алтны ион ангижирч олон тооны цөм рүү хурдан хугацаанд хувирна. Хувирлыг өнгөөр таних боломжтой буюу алтны хлоридын шар өнгөөс тод улаан өнгийн алтны нанопартикл руу хувирсан. 515 нм урттай гэрлийг шингээж байгаа учир ойролцоогоор ~30 нм хэмжээтэй болохыг өмнөх судалгааны

үр дүнтэй жишиж тооцоолов. Иймд натрын цитратын агууламж их байхад жижиг хэмжээтэй тод улаан өнгө бүхий алтны nano хэмжээст ширхэг үүснэ.



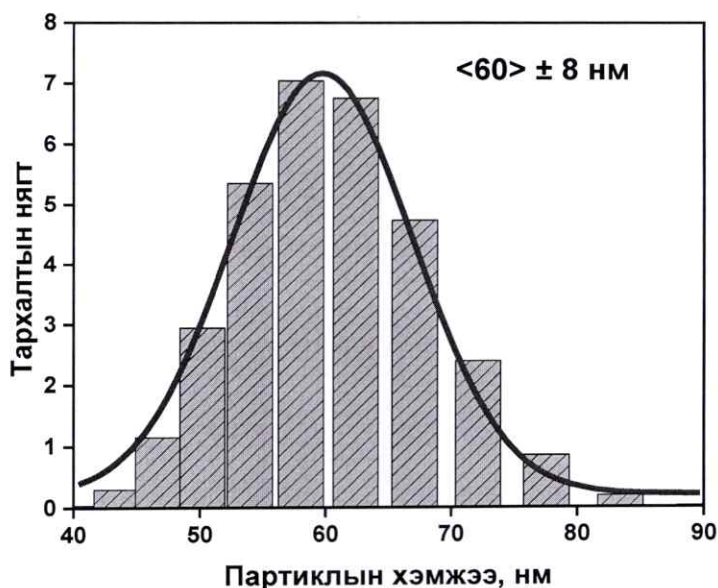
Зураг 27. Натрын цитратын агууламж бага байх үеийн алтны нанопартиклын синтез

Харин натрын цитрат бага хэмжээтэй ($Rc/a = 0.79$ Алтны хлорид ба натрын цитратын молийн харьцаа) авсан туршилтын явцад $AuCl_4^{-1}$ ионоос цөөн хэсэг нь цөм үүсгэх ба ихэнх үлдсэн ионууд үүссэн цөм дээр адсорбцлогдоно (Зураг 23). Гэвч $AuCl_4^{-1}$ ион нь хүчтэй электростатик түлхэлцэх хүчийг хангаж чадахгүй учраас агломерацид оруулж том партиклын саарал цэнхэр өнгийн хувирал үзүүлсэн. Энэ бол nano хэмжээст ширхэг үүсэхээс өмнө урвал явуулж эхэлсэн даруй үүсэх агрегация юм. Мөн үүнтэй зэрэгцээд эсрэгээрээ цитратын ион алтны гадаргуу дээр хүчтэй электростатик түлхэлцэх хүчийг үүсгэн бүрхсэнээр агрегацияжсан байдлыг багасгаж, алтны nano хэмжээст ширхэг эцсийн бүтээгдэхүүн үүсгэсэн. Иймд натрын цитратын агууламж бага байхад том хэмжээтэй, хөх ягаан туяатай алтны nano хэмжээст ширхэг үүссэн.

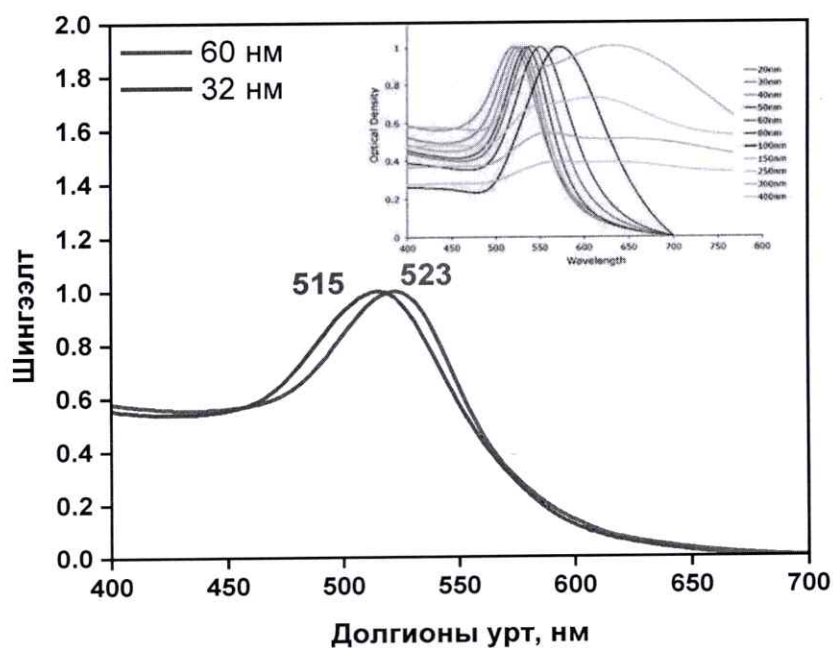


Зураг 28. Урвалын температур 950C үеийн фотон кросс корреляцын спектр

Зураг 28, Зураг 29-д фотон кросс корреляцын спектрометрийн үр дүнгээр алтны нанопартиклын хэмжээний тархалтыг харуулав. Урвалын температур буурахад нано хэмжээст ширхэг үүсгэдэг атомын зөөлт, хөдөлгөөн уусмалд удааширна. Уусмалд прекурсор үүсэж дуусаагүй байхад түрүүлж үүссэн алтны цөм дараагийн шатны ургах процессоо эхлүүлснээр том алтны нано хэмжээст ширхэг үүсдэг. Эсрэгээрээ температур их, урвал хурдан явагдах үед бүх прекурсор нь цөм үүсэх процессод нэгэн зэрэг ашиглагдаж дараагийн шатны ургах процессод цөөн хэдэн мономер л үлдсэн байдаг учраас бага хэмжээтэй алтны нано хэмжээст ширхэг үүсдэг. Иймд урвалын температур харьцангуй өндөр буюу 95⁰C байхад 32 ± 19 нм хэмжээтэй, 80⁰C байхад түүнээс том 60 ± 8 нм хэмжээтэй байгаа нь судалгааны үр дүнтэй давхцаж байна [23].



Зураг 29. Урвалын температур 800C үеийн фотон кросс корреляцын спектр



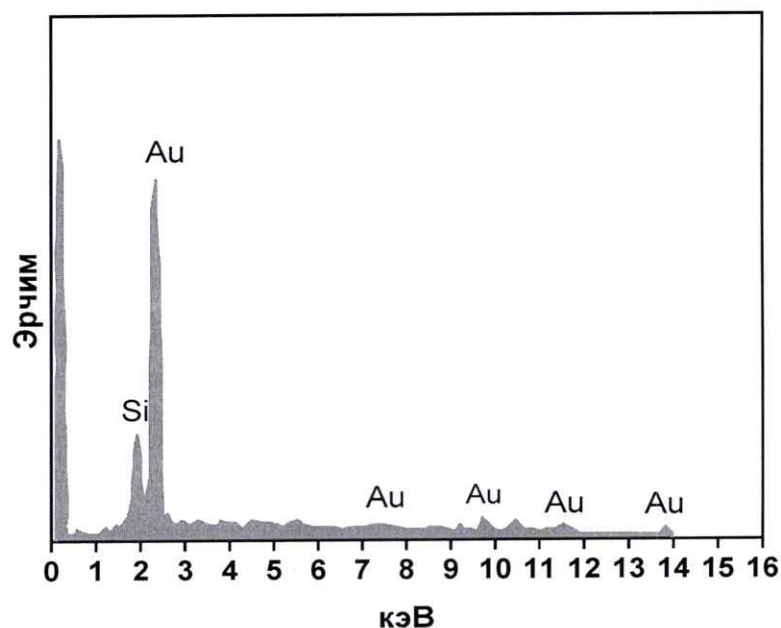
Зураг 30. Хоёр өөр аргаар синтезлэсэн алтны нанопартиклын хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр ба алтны нанопартиклын хэмжээнээс хамаарсан хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр [24]

Хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрээс харахад 60 нм алтны нано хэмжээст ширхэг нь 515 нм-т шингээлт өгсөн бол 32 нм хэмжээтэй нано хэмжээст ширхэг 523 нм-т шингээлтийн утга өгсөн байна. Үүнээс харахад партиклын хэмжээ томорч масс

нэмэгдэх тусам долгионы урт ихтэй муж руу пикийн шилжилт өгдөг ба **Зураг 30**-ын [24] утгатай тохирч байна.

Алтны нанопартиклыг ГПР-ын сенсорт ашиглахад 50 нм хэмжээ хамгийн тохиромжтой оптимал тул цаашдын судалгаанд 60 нм хэмжээтэй синтезлэсэн алтны нанопартиклыг хэрэглэв [25].

Үзэгдэх гэрлийн мужид спектр өгдөг бодисууд өнгөтэй байдаг ба синтезлэсэн алтны нано хэмжээст ширхэг хэмжээнээс хамааран улаанаас нил ягаан өнгөтэй байх ба 500 - 600 нм-ын долгионы уртад шингээлт өгдөг. Хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрофотометр нь шингээгдсэн гэрлийн эрчмийг хэмжих замаар уул бодисын концентрацийг тодорхойлдог. Шингээгдсэн гэрлийн эрчим нь туссан гэрлийн эрчмээс хамаарахгүй, гагцхүү уусмалын концентрац, үеийн зузаанаас хамаардаг [26]. Синтезлэсэн 60 нм алтны нанопартиклын уусмалыг 2, 10, 50 дахин шингэрүүлж, шингээлтийг хэмжсэн. Бугер Ламберт Бээрийн гэрэл шингээлтийн үндсэн хуулийн дагуу 2 дахин шингэрүүлсэн уусмал концентрац ихтэй тул өндөр шингээлтийн эрчимтэй пик үзүүлсэн ба уусмалын шингэрүүлэлтийг ихэсгэх тусам шингээлтийн эрчим багасаж байна. Энэ нь дараагийн туршилтын үе шатуудад шингэрүүлсэн алтны нанопартиклын уусмалыг хэрэглэж болохгүй ба пикийн шингээлт багасаж, анализ хийхэд хүндрэлтэй болох нь харагдаж байна.



Зураг 31. Алтны нанопартиклын энергийн дисперсийн рентген спектр

Хүснэгт 17. Алтны нанопартиклын энерги дисперсийн рентгений спектрийн тайлал

Д/д	Элемент	Эзлэхүүний хувь
1	Алт	95
2	Цахиур	5

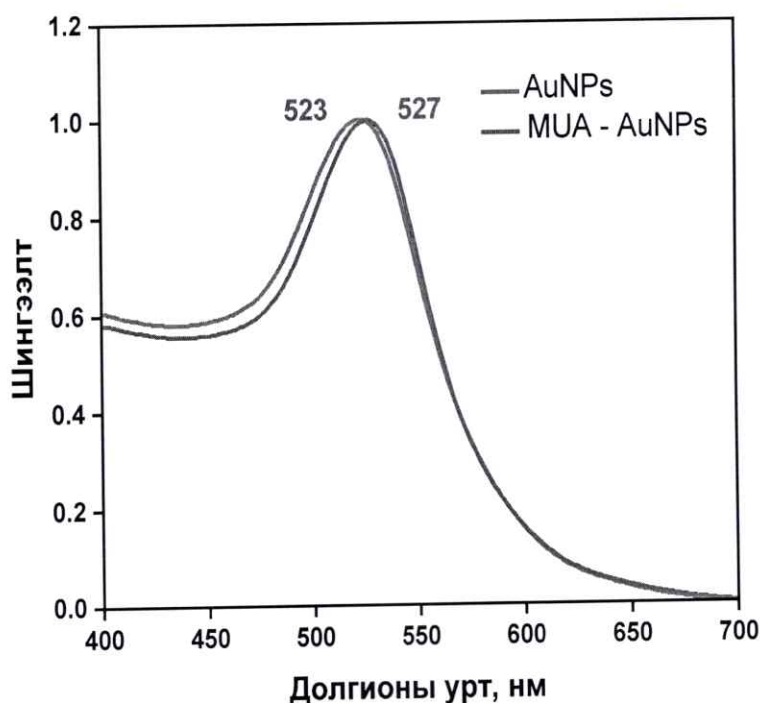
Хүснэгт 17-с харахад синтезлэсэн нанопартиклын элементийн анализ хийхэд алтны эзлэх хувь 95 %, цахиур 5 % байсан. Шилэн дээр суулгасан алтны нанопартиклын өөрөө угсрагдах моно-үе бэлтгэсэн дээжийг энергийн дисперсийн рентген спектроскопоор хэмжүүлсэн ба шилэн дэх цахиурын элемент илэрсэн гэж дүгнэж байна.

4.3.2. Алтны нанопартиклыг MUA линкерээр бүрсэн үр дүн

Алтны нанопартиклыг синтезлэсний дараа MUA линкерээр бүрсэн. MUA линкер нь нэгдүгээрт алтны нанопартиклын гадаргууг карбоксил бүлгээрээ функционалжуулах, хоёрдугаарт бүрэн бүрсний дараа агрегацад орохоос сэргийлэх тогтворжуулагчийн үүрэгтэй ба толгой бүлэг (тиол бүлэг, $-SH$), гинжин хэлхээ (10 нүүрстөрөгчийн алкан), сүүл хэсэг (карбоксил бүлэг, $-COOH$)-ээс тогтоно.

Толгойн тиол бүлэг нь алтны нанопартиклын гадаргуутай хүчтэй химийн холбоо үүсгэж адсорбцлогддог буюу өөрөө эрэмбэлэгдэн угсрах моно-үеийн процессыг удирдан чиглүүлдэг. Нүүрстөрөгчийн гинжин хэлхээ нь агрегацад орохгүй байх бүтцийн тогтвортой байдлыг Ван дер Ваальс ба гидрофоб харилцан үйлчлэлийн хүчээр хангадаг. Харин сүүл хэсэг нь алтны нанопартиклыг гадаргуугаас эгц дээш чиглэсэн карбоксил бүлэг байх ба энэ нь дараагийн шатанд антигений амин бүлэгтэй ковалент холбоо үүсгэх боломжийг олгодог. Алтны нанопартиклыг усан уусмал, 1 : 3 этанолон уусмалд MUA линкерээр бүрэх туршилтууд явуулсан боловч партиклууд хэсэг хугацааны дараа агрегацад орж нил ягаан өнгийн уусмал болон хувирч байсан. Тиймээс [27] эрдэм шинжилгээний өгүүллийн дагуу фосфат буфер-Tween 20 рН 6.8 (PBT) орчинд алтны нанопартиклыг линкертэй холбох туршилтыг явуулсан. Алтны нано хэмжээст ширхэг дээр алкантиол (MUA) химисорбцилогдож суухаас өмнө Tween 20 физисорбцилогдсоноор алтны нано хэмжээст ширхэгагрегацад орохоос сэргийлж тогтворжуулдаг. Учир нь түүний олиго (этиленгликол) бүрдэл нь стерик тогтворжилт (үл урвалдах, түлхэлцэх)-оор хангадаг ба энэ нь ионы бус сурфактант юм. Хоёр партиклын хоорондох зай партиклынхаа диаметртээс бага болохыг агрегац гэнэ. Агрегацад орж байгаа нанопартиклын

цөмүүд хоорондоо агрегацад орвол үүнийг үл буцах агрегац гэнэ. Харин Tween 20 орчинд үл буцах агрегац явагддаггүй. Учир нь MUA линкерийг алтны nano хэмжээт ширхэг дээр бүрэн сууж, моно-үе үүсгэж дуустал Tween 20 гадаргуу дээр оршсоор байдаг. Нэгэнтээ өөрөө эрэмбэлэгдэх моно-үе үүссэнээс хойш Tween 20 зайлуулагдах ба металлнано хэмжээт ширхэг линкерээр тогтворжиж агрегац явагдахгүй. Миегийн цацаргалтын онолоор “Диэлектрик орчинд дисперслэгдсэн партиклын хэмжээ гэрлийн долгионы уртаас бага байвал тодорхой ГПР өдөөгддөг. Иймд партиклын хэмжээ томорвол шингээлтийн спектр богино долгионы мужаас урт долгионы муж руу улаан шилжилт хийдэг.



Зураг 32. Синтезлэсэн алтны nano хэмжээт ширхэг болон MUA линкерээр бүрсэн алтны нанопартиклыг харьцуулсан хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр

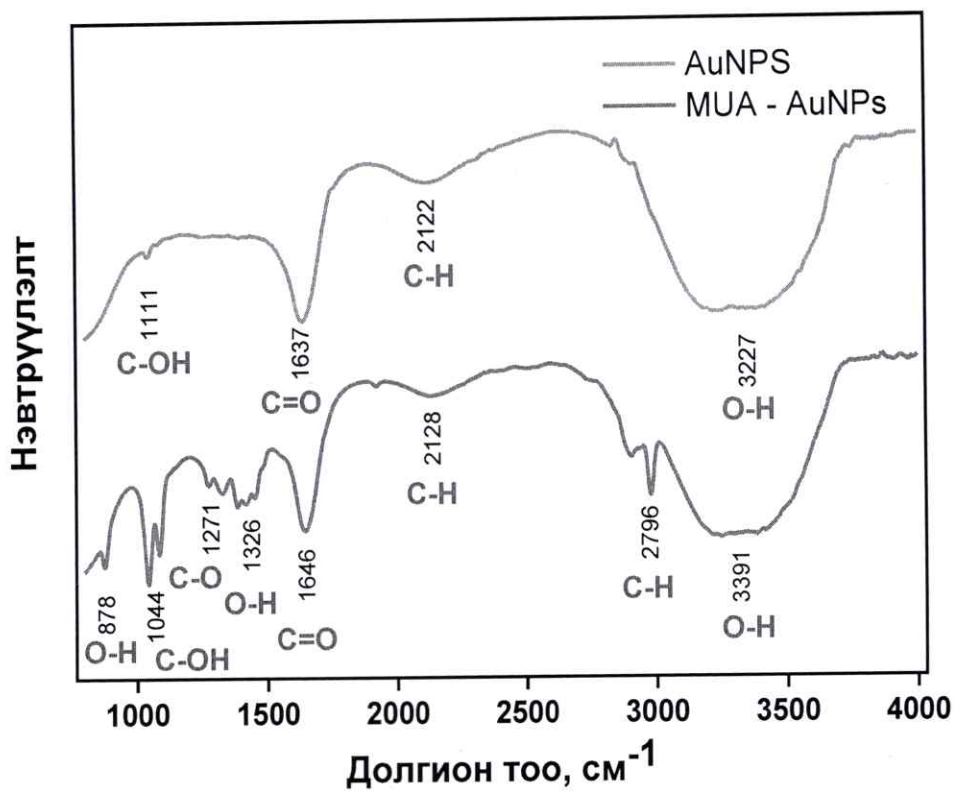
Шинжилж буй нэгдлийн функционал бүлэг болон зарим халагчийг солих, гинжин хэлхээг өөрчлөх, янз бүрийн уусгагчаар үйлчлэх мөн түүнчлэн гадаад хэлхээг өөрчлөх үед шингээлтийн спектрийн пик шилждэг [26].

Зураг 32-с харахад 60 нм алтны nano хэмжээт ширхэг дээр алкентиол MUA линкерийг химисорбцолсны дараа пикийн шингээлтийн долгионы урт 523 нм-ээс 527 нм-ын муж хүртэл шилжсэн, энэ нь металлнанопартиклын гадуур зузаан

давхарга үүссэнийг илтгэнэ. Харин шингээлтийн спектр өргөсөөгүй нь партикл агрегацад ороогүйг илтгэсэн.

Tween 20 концентрацаас шалтгаалахгүйгээр алтны nano хэмжээст ширхэг дээр ирж суух хурд ижил байдаг агаад энэ нь мицелийн критик концентрацаас илүү (сул чөлөөтэй сурфактантын тоо тогтмол үлдэж, зөвхөн мицел агрегацын тоо өөрчлөгдөх) ханасан үед үүсдэг. Алтны нанопартиклын гадаргуугийн 95 % бүрэхэд 20 минут шаардагдах ба энэ нь мицел биш сул чөлөөтэй сурфактантаар бүрхэгддэгийг өмнөх судалгаагаар шалгагдсан. Иймд 20 минутаас илүү хугацаагаар буюу 1 цагийн турш Tween 20 сурфактантаар бүрсэн ба бүрэн физисорбцлогдсоны дараа MUA линкер химисорбцлогдсон. Tween 20 сурфактантаас салгаж 2 удаа центрифуг ашиглан угаасны дараа $pH > 7.9$ үед үл буцах агрегацад огт ороогүй. MUA бүрхэгдсэн алтны нанопартиклыг центрифугдэх оптимал нөхцөл нь 8400 эрг/мин хурдаар 20 минут болохыг туршлагаар тогтоосон.

Tween 20 сурфактанттай орчны алтны nano хэмжээст ширхэгхөх ягаан туяа ороогүй, цэвэр улаан өнгөө хадгалсан хэвээр байсан. Эндээс дүгнэхэд этанолын орчинд алтны нанопартиклын тогтворжуулж байсан цитрат ион нь хэсэг линкер адсорбцлогдоход даруй зайлуулагдаж байсан. Энэ нь алтны nano хэмжээст ширхэг гадаргуугийн сөрөг цэнэгийн түлхэлцлээ алдаж агрегацад орж байсан бөгөөд линкер суух нөхцөлийг бүрдүүлээгүй. Харин фосфатын буфер орчинд алтны нанопартиклыг тогтворжуулж байсан Tween 20 сурфактант нь линкер бүрэн адсорбцлогдож дуустал гадаргуу дээр үлдэж тогтворжуулсаар байсан тул агрегацад ороогүй, линкер суух нөхцөлд саад хийгээгүй зэрэг давуу талтай байсан.



Зураг 33. Алтны нанопартиклд MUA линкер суулгасан нил улаан туяаны спектр

Хүснэгт 18. Алтны нанопартиклд MUA линкер суулгасан нил улаан туяаны спектрийн пикийн тайлал

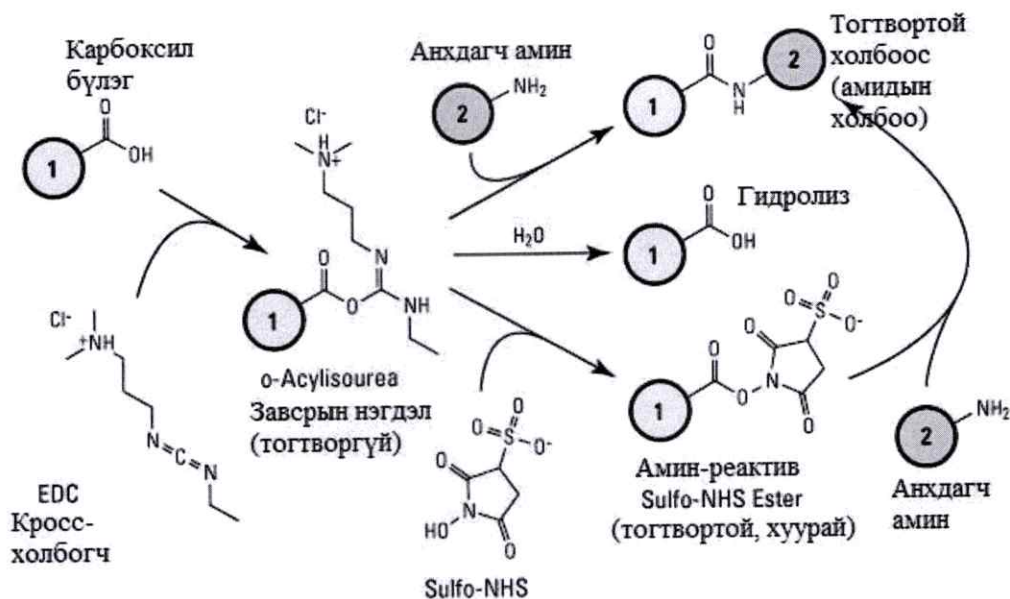
№	Пикийн долгионы тоо, см ⁻¹ Алтны нанопартикл	MUA линкерээр бүрсэн алтны нанопартикл	Харгалзах пикийн холбооны хэлбэлзэл
1	-	878	C-H
2	-	946	O-H
3	-	1044	C-OH
4	-	1085	C-OH
5	1111	-	C-OH
6	1249	1271	C-O
7	-	1326	O-H
8	1395	1385	O-H
9	-	1420	O-H
10	-	1451	C-H
11	1637	1646	C=O
12	2122	2128	C-H
13	-	2796	C-H
14	3227	3391	O-H

Хүснэгт 18-с MUA линкер суулгасан нил улаан туяаны спектрийн пикийн тайллыг харахад алтны нанопартиклаас ялгарах найман пикүүд ажиглагдаж байна. 878 см⁻¹, 946 см⁻¹, 1044 см⁻¹, 1085 см⁻¹, 1326 см⁻¹, 1420 см⁻¹, 1451 см⁻¹, 2796 см⁻¹ долгион тоон дээр пикүүд өгсөн бөгөөд эдгээр нь C-H деформац, O-H гидроксил, C-OH спирт болон эфир, O-H карбоксил бүлгийн гидроксил, C-H алкан, C-H алдегид бүлгүүдэд химийн холбооны хэлбэлзэлд харгалзаж байна.

Үүнээс харахад карбоксил бүлгийн гидроксил болон алдегид бүлгүүдийн долгион тоон дээр хүчтэй шингээлт өгсөн нь урвал амжилттай явагдаж MUA линкер алтны нанопартиклын гадаргуу дээр амжилттай холбогдсоныг харуулж байна. Мөн S-H тиол бүлгийн хэлбэлзэл 2500-2600 см⁻¹ долгион тоон дээр илрээгүй нь илүүдэл урвалд ороогүй MUA линкер центрифугдэн угаагдсаны улмаас бүрэн арилсан болох нь батлагдаж байна.

4.3.3. MUA линкерээр бүрхэгдсэн алтны нанопартиклыг антигентэй ковалент холбоогоор холбосон үр дүн

Карбоксил бүлэг -COOH нь амин бүлэгтэй -NH₂ бат бөх амидын холбоо үүсгэдэг. Иймд алтны нанопартиклын карбоксил бүлэг, антигений гадаргуугийн лизин дээрх амин бүлэгтэй ковалент холбоо үүсгэх ба энэ холбоог EDC/NHS кросс холбогчдын (crosslinkers) тусламжтай бий болгодог.



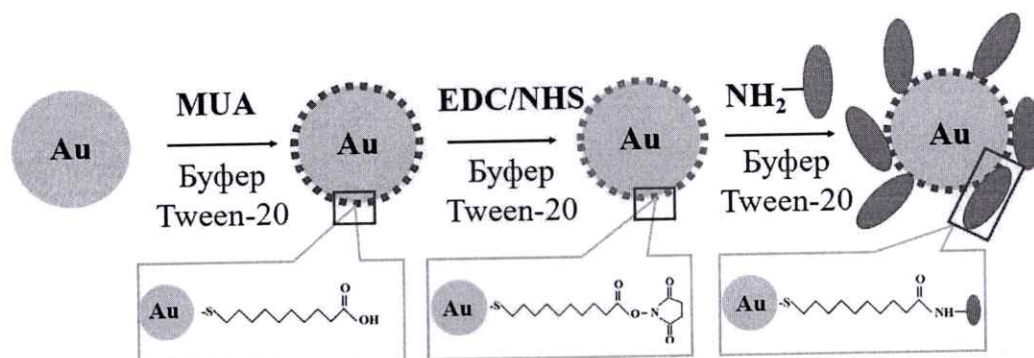
Зураг 34. EDC ба NHS ашиглаж карбоксил бүлэг -COOH ба амин бүлэг -NH₂ ковалент холбоогоор холбож амидын холбоо үүсгэх урвалын механизм

EDC ба NHS бол тэг урттай кросс холбогчид бөгөөд карбоксил бүлгийг амин бүлэгтэй холбосны дараа амидын холбоонд орж үлддэггүй. EDC алтны нанопартиклын гадаргуугийн -COOH бүлэгтэй урвалд орж O-acylisourea завсрын бүтээгдэхүүн үүсгэдэг. Уг завсрын бүтээгдэхүүн нь усан орчинд тогтвор муу гидролизод амархан орж, карбоксил бүлгийг ахин үүсгэх аюултай. EDC нь pH 4.5-7.2 орчинд 5 цагаас 40 минут хүртэл тогтвортой байдаг.

Алтны нанопартиклыг бүрсэн MUA линкерийн -COOH бүлгийн молийн тооноос EDC молийн тоог илүүдэл хэмжээгээр, EDC молийн тооноос NHS молийн тоог илүүдэл хэмжээгээр их авах шаардлагатай. Иймд хамгийн их EDC оптимал хэмжээг туршлагаар тогтоох шаардлага тулгардаг. Уг оптимал EDC хэмжээнээс бага тохиолдолд бүтээгдэхүүний гарц багасаж, их тохиолдолд алтны нанопартиклыг тогтворжилт алдагдаж агрегацад орно. Иймд 10 мг/мл концентрацтай усан уусмал дахь EDC-ээс 1 мкл болон 2 мкл нэмэхэд алтны нано хэмжээст ширхэгагрегацад орж байсан.

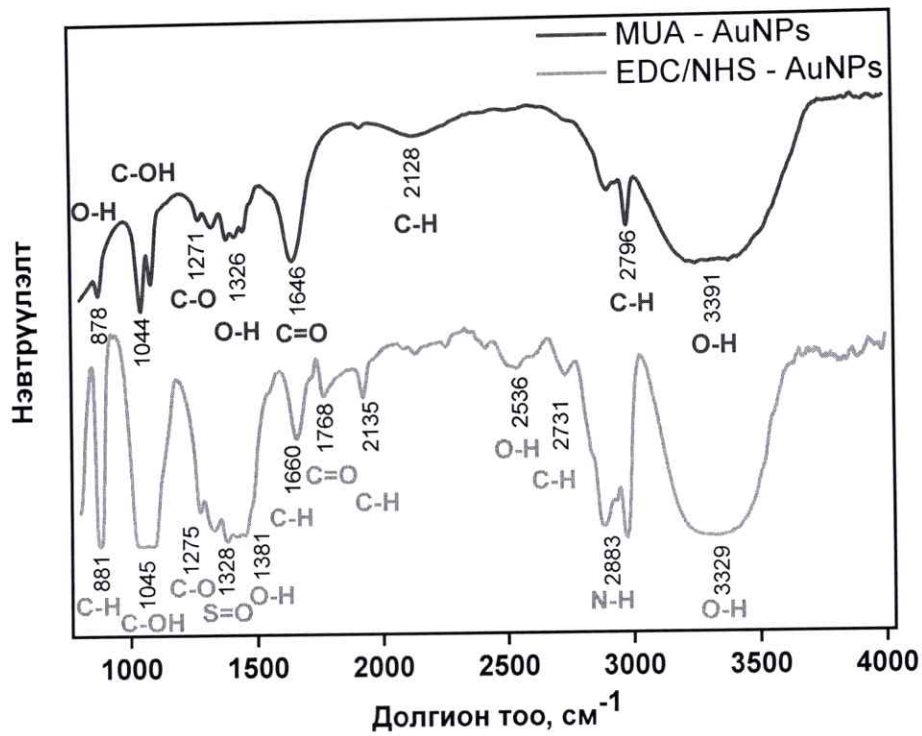
Усан орчинд уусгасан EDC нэмэхэд шууд агрегацад орж байгаа нь анх алтны нанопартиклыг pH 6.8 PBT 0.2 мг/мл орчинд MUA линкерээр бүрсэнтэй холбоотой. Иймд хоёр урвалжийн орчныг өөрчлөхгүйгээр pH 6.8 PBT 0.2 мг/мл ижил орчинд EDC уусгаж нэмэхэд алтны нано хэмжээст ширхэг агрегацад ороогүй хэвийн байсан. Улмаар 1 мл алтны нано хэмжээст ширхэг дээр нэмэх 10 мг/мл 1 мкл EDC

тохиромжит хэмжээ болохыг туршлагаар тогтоосон. Цаашид бүх туршилтын EDC, NHS-ийг pH 6.8 PBT 0.2 мг/мл орчинд уусгаж явуулсан.



Зураг 35. Алтны нанопартиклыг антигентэй ковалент холбоогоор холбох процессын схем

Үүний дараа NHS кроссхолбогч нь O-acylisourea-аас илүү тогтвортой завсрын бүтээгдэхүүн үүсгэдэг ба энэ нь антигений -NH₂ амин бүлгийг физиологийн pH 7.4 орчинд холбох боломжийг олгодог. NHS нь 4⁰C температурт pH 7.2–8.5 хүртэл харгалзан 4 цагаас 30 минут хүртэл гидролизод орохгүй тогтвортой байдаг учир био холболтын гарцыг нэмэгдүүлэхийн тулд EDC, NHS уусгаснаас 2 минутаас ихгүй хугацаанд алтны nano хэмжээст ширхэг дээр антиген нэмж урвалыг эхлүүлсэн. EDC эзлэхүүнээс хоёр дахин их NHS илүүдэл хэмжээгээр нэмэхэд агрегацад ороогүй уусмалын өнгө улаан хэвээр байв. Нэгэнтээ EDC, NHS-ийг илүүдлээр авсан учир центрифуг ашиглан угаах шаардлагатай ба туршлагаар 8400 эрг/мин хурдаар 15 минут тохиромжит нөхцөл болохыг тогтоосон. Функционал бүлгүүд суулгахаас өмнө алтны nano хэмжээст ширхэг 8400 эрг/мин хурдаар 15 минутаас бага нөхцөлд центрифугээр ялгахад тунадаггүй байсан ба антиген нэмж инкубацласны дараа 7500 эрг/мин 15 минутад хангалттай тунгалаг супернатант, агрегацилагдсан хар цэгэн тунадас буулгасан. Иймээс центрифугны хүч хэт ихдэж агрегац үүсэж байна гэж үзэн хурдыг багасгасан. Антигентэй холбосны дараах центрифугийн тохиромжит нөхцөл 6000 эрг/мин 15 минут болохыг тохируулсан. Эндээс алтны nano хэмжээст ширхэг антигентэй холбогдож молекул масс нэмэгдсэн байна гэж дүгнэж байна.



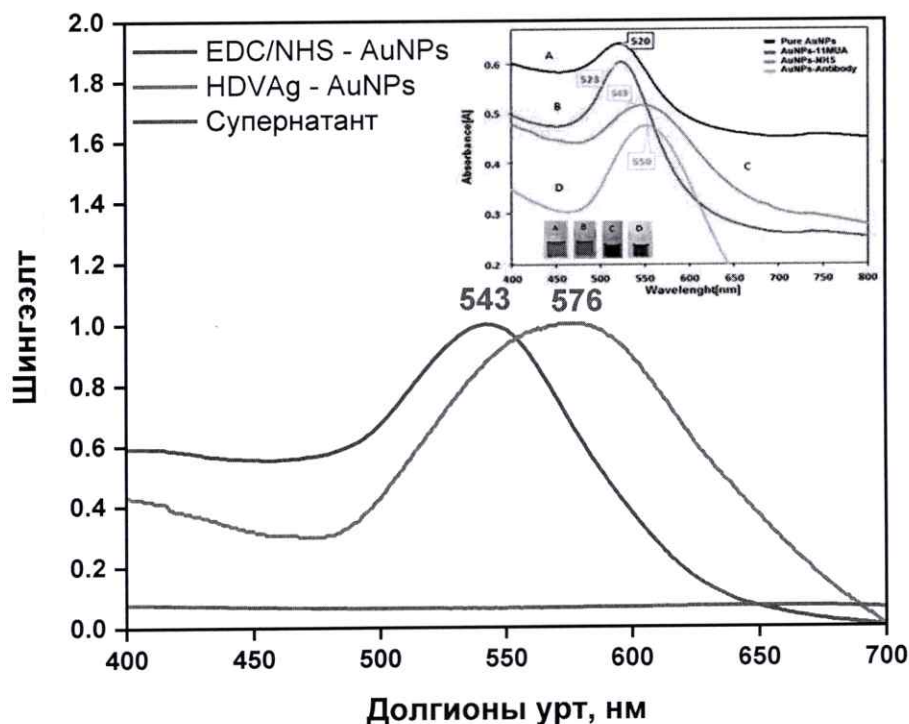
Зураг 36. Алтны нанопартиклд EDC/NHS кроссхолбогчид суулгасан нил улаан туйаны спектр

Хүснэгт 19. Алтны нанопартиклд EDC/NHS кросс холбогчид суулгасан нил улаан туяаны спектрийн пикийн тайлал

№	Пикийн долгионы тоо, см ⁻¹		Харгалзах пикийн холбооны хэлбэлзэл
	Алтны нанопартикл	MUA линкерээр бүрсэн алтны нанопартикл	
1	-	800	C-H
2	878	881	C-H
3	1044	1045	C-OH
4	1085	-	C-OH
5	1271	1275	C-O
	1326	-	O-H
6	-	1328	S=O
7	1385	1381	O-H
	1420	-	O-H
	1451	-	C-H
	1646	-	C=O
8	-	1660	C-H
9	-	1768	C=O
10	2128	2135	C-H
11	-	2536	O-H
12	2796	2731	C-H
13	-	2883	N-H
14	-	2973	N-H
15	3391	3329	O-H

Хүснэгт 19-с EDC/NHS кроссхолбогчид суулгасан нил улаан туяаны спектрийн пикийн тайллыг харахад MUA линкерээр бүрсэн алтны нанопартиклаас ялгарах долоон пикүүд ажиглагдаж байна. 800 см⁻¹, 1328 см⁻¹, 1660 см⁻¹, 1768 см⁻¹, 2536 см⁻¹, 2883 см⁻¹, 2973 см⁻¹ долгион тоон дээр пикүүд өгсөн бөгөөд эдгээр нь C- H деформац, S=O сульфонат, C-H алкан, C=O хүчлийн халид, O-H карбоксил бүлгийн гидроксил, N-H амин давсны бүлгүүдэд химийн холбооны хэлбэлзэлд харгалзаж байна.

Үүнээс харахад сульфонат болон амин бүлгүүдийн долгион тоон дээр хүчтэй шингээлт өгсөн нь урвал амжилттай явагдаж EDC халагдан NHS холбогдон алтны нанопартиклд карбоксил бүлэг амжилттай суусныг харуулж байна.



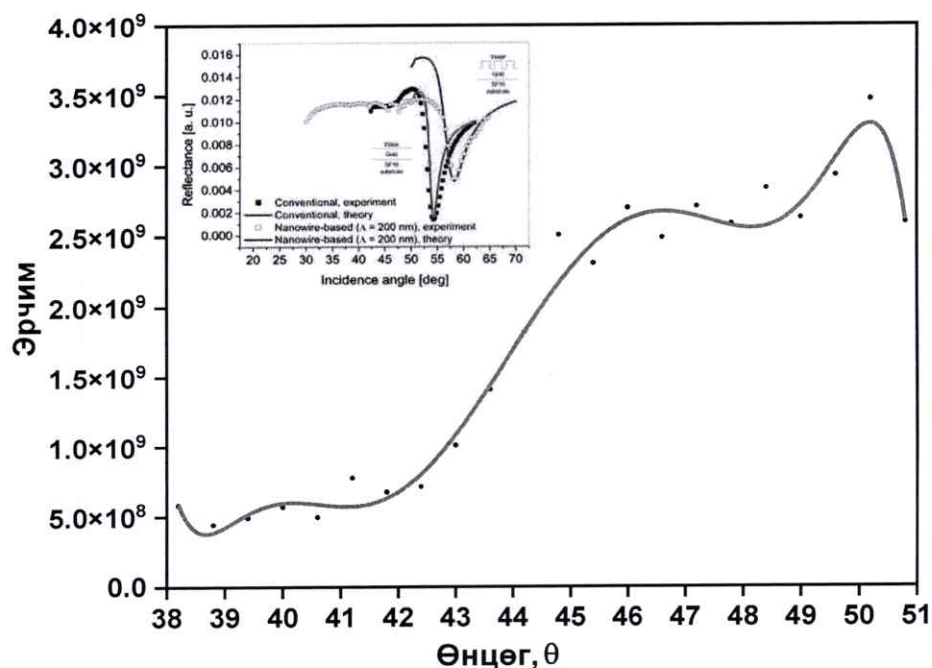
Зураг 37. Алтны нанопартиклд функционал бүлгүүд суулгахаас антиген холбосон шат бүрийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр ба эрдэм шинжилгээний өгүүлэлд алтны нанопартиклыг модификаци хийсэн шат бүрийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр [28]

Зураг 37-д алтны нанопартиклд функционал бүлгүүд суулгахаас антиген холбосон шат бүрийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрийн хэмжилтийг харуулсан. Шат бүрт пикийн хэмжээ өргөсөж, шингээж буй долгионы урт ихэссэн нь партиклын үе улам зузаарч функционал бүлгүүд нэмэгдэж, антиген сууснаар хэмжээ нь томорч буйг харуулж байна.

Эрдэм шинжилгээний өгүүлэлд [28] ижил PBT (фосфатын буфер 10мМ рН 7 0.2 мг/мл Tween 20) орчинд алтны нанопартиклыг антободитой ковалент холбоогоор холбох урвалыг явуулсан байна. Хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрийн үр дүнг харьцуулахад цэвэр алтны нано хэмжээст ширхэг 520 нм-т, MUA линкерээр бүрсэн үед 523 нм-т, EDC/NHS био холбогчид суулгасан үед 543 нм-т мөн антибоди холбосны дараа 550 нм-т шингээлтийн пик өгсөн байна. Үүнээс харахад модификацийн шат бүрд шингээлт өгч буй долгионы урт ихэссэн мөн харгалзах пикийн долгионы урт нь бидний судалгааны ажилтай тохирч байна.

4.3.4. Алтны нанопартиклд суурилсан биосенсорын гадаргуугийн плазмон резонансыг хэмжсэн үр дүн

Идэвхжүүлсэн шилэн слайд дээр антиген холбосон алтны нанопартиклыг суулгасан. Шилэн слайдыг пирана уусмал ($H_2SO_4:H_2O_2$, 3:1) ашиглан гидроксил бүлэг суулган дараа нь APTES-ын 5 % этанолон уусмалаар амин бүлэг суулгасан. Алтны нанопартиклын гадаргуу дээрх антигений карбоксил бүлэг шилэн слайдын амин бүлэгтэй бат бөх амидын холбоо үүсгэн, урвал дууссаны дүнд шилэн слайд нил ягаан өнгөтэй болсон.



Зураг 38. Алтны нанопартиклд суурилсан биосенсорын БГПР-ын хэмжилтийн үр дүн болон эрдэм шинжилгээний өгүүллийн БГПР-ын үр дүн [29]

Угсарсан биосенсорын БГПР-ын хэмжилтийг Лазерын судалгааны төвд шинээр угсарсан багаж дээр гүйцэтгэсэн боловч ГПР-ын үзэгдэл ажиглагдаагүй ба гэрлийн эрчим буурч резонансын үзэгдэл явагдалгүй эрчим улам ихэссэн (**Зураг 38**).

Эрдэм шинжилгээний өгүүлэл [29]-д БГПР-ын ойлт болон өнцгөөс хамаарсан графикийг цэнхэр өнгөөр дүрсэлсэн ба ойролцоогоор 57^0 -ын өнцгөөр лазер гэрэл тусгахад гадаргуугийн плазмон ажиглагдсан байна.

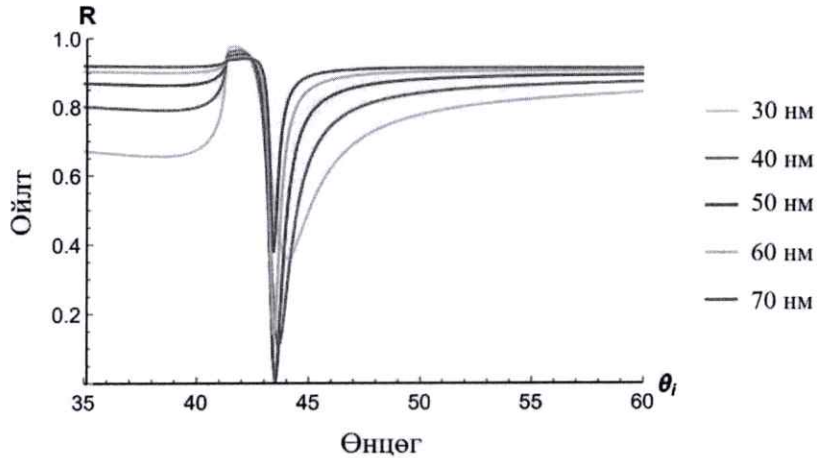
Дээжээс хамааран тохирох тодорхой нэг өнцгөөр лазер гэрэл тусгахад ойлтын эрчим буурч, детекторт лазер гэрэл бүртгэгдэхгүй болно. Энэ нь гадаргуугийн плазмон ашиглагдаж Х тэнхлэг дагуу плазмон резонанс үүсэж байгаа үзэгдэл юм. Харин бидний угсарсан биосенсор ойлтын эрчим буурах үзэгдэл явагдахгүй, улам ихсэж байгаа учир гадаргуугийн плазмон ажиглагдахгүй байна гэж дүгнэж байна.

Мөн дахин багажийн нөхцөл бололцоог сайжруулан лазерын ондоо эх үүсгэвэр ашиглах, долгионы урт болон шингээлтээс хамаарсан туршилт гүйцэтгэхийг төлөвлөж байна.

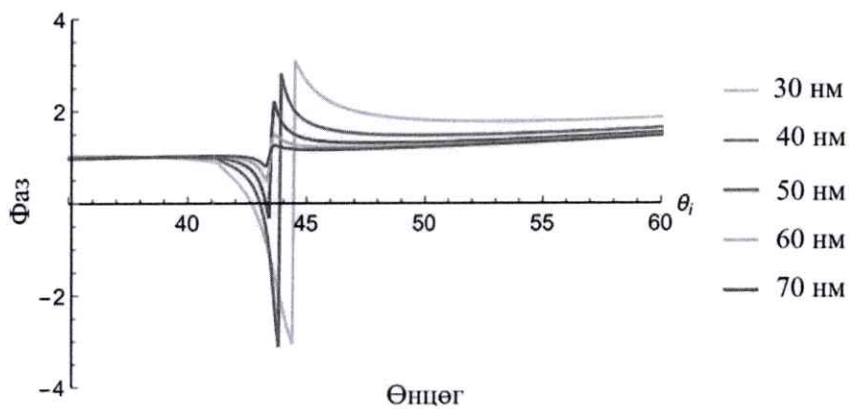
4.4. Гадаргуугийн плазмон резонансын оношлуурын үр дүн

4.4.1. Алтны нимгэн үе суулгасан үр дүн

ГПР-ын биосенсорын хэмжилтэд тохирох алтны нимгэн үеийн зузааныг тооцоолохын тулд Wolfram mathematica 10.0 программ ашиглан 30-70 нм зузаантай нимгэн үе дээр симуляцийн тооцоог Лазерийн судалгааны төв боловсруулсан.



Зураг 39. Резонансын параметрийн ойлт, өнцгөөс хамаарсан тооцоолол

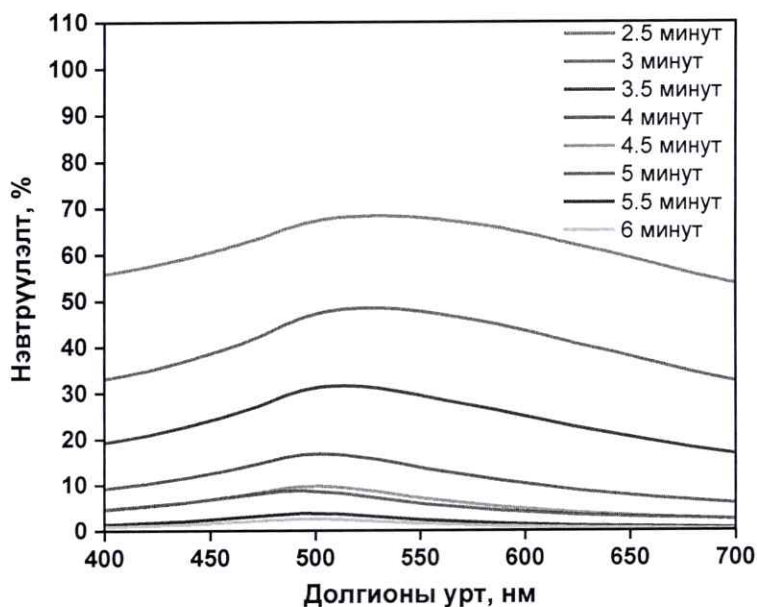


Зураг 40. Резонансын параметрийн фаз, өнцгөөс хамаарсан тооцоолол

Зураг 39 – дэх симуляцийн үр дүнгээс харахад 50 нм зузаантай алтны нимгэн үе дээр хамгийн сайн гадаргуугийн плазмон резонанс үүссэн мөн фазаас хамаарсан графикт (Зураг 40) фазын шилжилт үүссэн тул бидний угсрахыг зорьж буй биосенсорт тохиромжтой гэсэн тооцоолол гарсан тул цаашдын туршилтдаа 50 нм нимгэн үе бэлтгэхээр шийдсэн.

Алтны нимгэн үеийг МУИС-ийн ХБИТ-ийн Наноматериалын лабораторийн плазма спуттер Microtrac MCM-100 багаж ашиглан суулгасан ба сайтар цэвэрлэж толбогүй болсон ВК 7 шилэн слайдыг 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6 минутын турш байлган найман өөр дээж бэлтгэн туршсан. Бидний туршилтад алтны нимгэн үеийн зузааныг тодорхойлох чухал шаардлагатай ба нимгэн үеийн зузааныг хэмжихийн тулд эрдэм шинжилгээний өгүүллээс [30] иш татан, суулгасан шилэн слайдын нэвтрүүлэлтийн хувийг тооцоолсон.

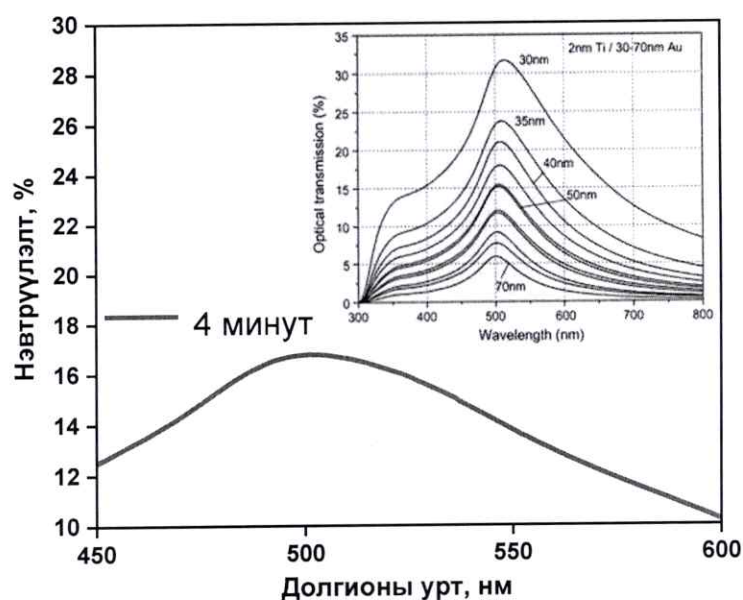
Тус бүр дээжийг бэлтгэсний дараа хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрофотометр ашиглан нэвтрүүлэлтийн хувийг тооцоолсон туршилтын графикийг **Зураг 41**-д харуулав. Энэхүү графикаас харахад хугацаа ихсэх тусам илүү зузаан алтны үе сууж, нэвтрүүлэлтийн хувь багасаж байгаа ба *Хүснэгт 10*-д найман өөр төрлийн хугацаанд суулгасан алтны нимгэн үеийн хамгийн өндөр нэвтрүүлэлт үзүүлж буй долгионы урт болон нэвтрүүлэлтийн хувийг харуулав.



Зураг 41. Найман өөр төрлийн хугацаанд суулгасан алтны нимгэн үеийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн нэвтрүүлэлтийн хувь

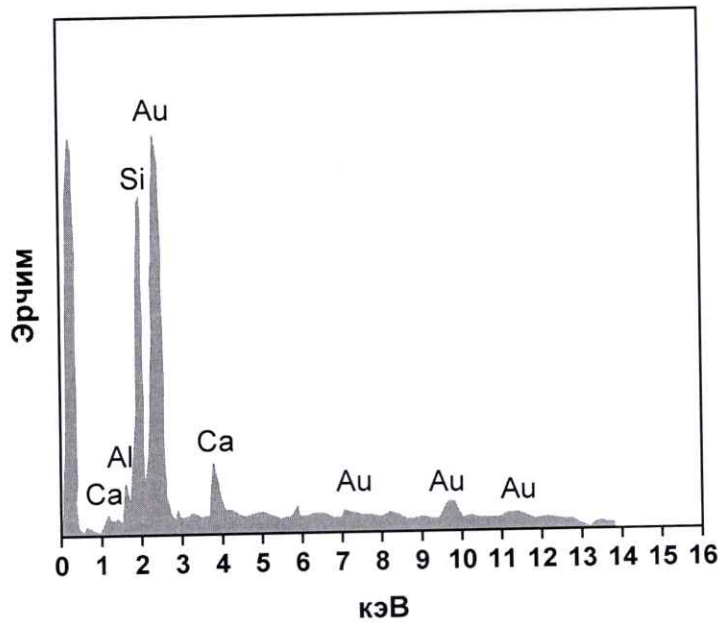
Хүснэгт 20. Тодорхой хугацааны турш суулгасан алтны нимгэн үеийн хамгийн өндөр нэвтрүүлэлт үзүүлж буй долгионы урт болон нэвтрүүлэлтийн хувь

Д/д	Хугацаа, минут	Долгионы урт, нм	Нэвтрүүлэлт, %
1	2.5	531	68.372
2	3	527	48.425
3	3.5	513	31.531
4	4	502	16.785
5	4.5	500	9.717
6	5	493	8.740
7	5.5	500	3.809
8	6	498	2.576



Зураг 42. 4 минутын турш суулгасан алтны нимгэн үеийн нэвтрүүлэлтийн хувь, [30]

Эрдэм шинжилгээний өгүүлэлтэй [30] харьцуулахад 50 нм зузаан алтны нимгэн үе 500 нм орчим долгионы уртад нэвтрүүлэлт нь 15.2 % байна. Бидний найман өөр хугацааны турш суулгасан алтны нимгэн үеүдээс 4 минутын хугацаанд суулгасан нимгэн үе нь 502 нм-т 16.7 %-ын нэвтрүүлэлтэй байгаа нь өгүүлэлтэй харьцуулахад хамгийн ойролцоо үр дүн болсон. Иймээс 4 минутын турш суулгасан алтны нимгэн үеийг 50 нм-тэй хамгийн ойролцоо гэж дүгнэсэн. Цаашдын ГПР-ын биосенсорын угсралт болон туршилтад алтны нимгэн үеийг 4 минут суулган ашиглахаар шийдсэн.



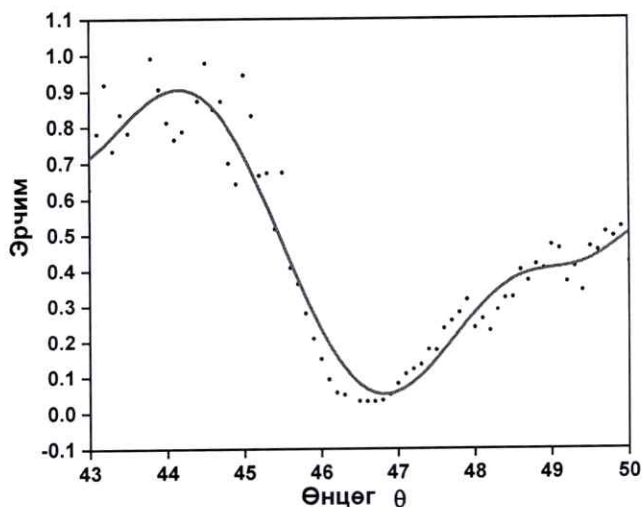
Зураг 43. Алтны нимгэн үеийн энергийн дисперсийн рентген спектр

Хүснэгт 21. Алтны нимгэн үеийн энергийн дисперсийн рентген спектрийн тайлал

Д/д	Элемент	Масс, %
1	Алт	75.8
2	Цахиур	17.4
3	Кальци	4.8
4	Хөнгөн цагаан	2

Энергийн дисперсийн рентген спектроскопоор шилэн слайд дээр суулгасан алтны нимгэн үед элементийн анализ хийсэн. **Хүснэгт 21**-с харахад алт 75.8 %, цахиур 17.4 % илэрсэн нь шилэн дэхь цахиур илэрсэн байж болзошгүй гэж дүгнэсэн ба кальци, хөнгөн цагааны элемент илэрсэн нь бохирдол байж болзошгүй гэж дүгнэсэн.

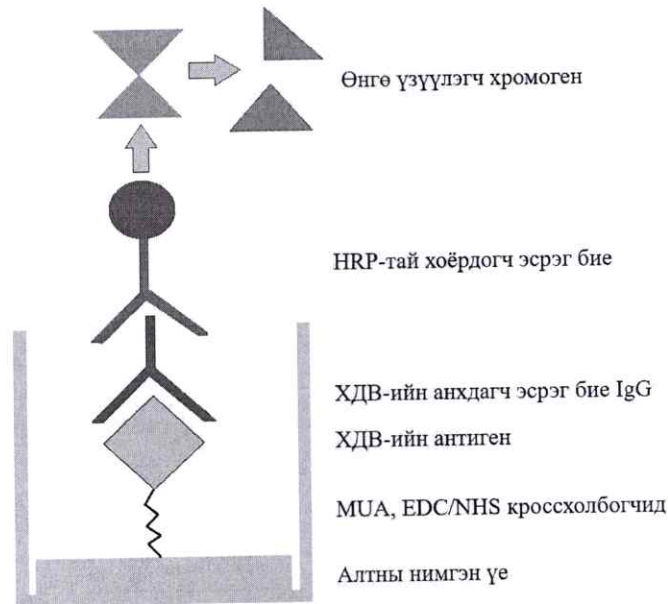
50 нм орчим алтны нимгэн үе суулгасан шилэн слайдыг гадаргуугийн плазмон үүсэж буй эсэхийг шалгах зорилгоор Лазерын судалгааны төвд угсарсан ГПР-ын багажийг ашиглан хэмжилт явуулсан бөгөөд **Зураг 44**-т харагдаж буй үр дүн гарсан. Энэхүү графикаас 47° өнцөгт гадаргуугийн плазмон үзэгдэл үүсэж байгааг тодорхойлсон.



Зураг 44. 50 нм орчим алтны нимгэн үе суулгасан шилэн слайдын ГПР-ын хэмжилт

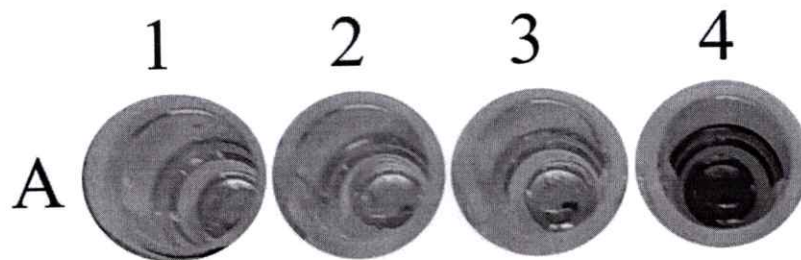
4.4.2. ФХЭБУ оношлуур угсарч хэмжилт хийсэн үр дүн

Фермент холбоот эсрэг биеийн урвал (enzyme linked immunosorbent assay буюу ELISA) нь эсрэг биеийг түргэн хугацаанд шинжлэх, хэмжихэд ашиглах ба судлагдаж буй дээжид сонирхсон тодорхой уураг байгаа эсэх, хэрэв байвал хэр хэмжээтэй байгааг тодорхойлох явдал юм [31]. Өөрөөр хэлбэл, ФХЭБУ нь пептид (уураг, эсрэг бие) гормон гэх мэт бодисуудыг илрүүлэх болон тоо хэмжээг нь тодорхойлох зорилгоор ашиглагддаг. Энэхүү аргаар дээжид хэр хэмжээний эсрэг бие байгааг эсвэл хэчнээн хэмжээний эсрэг төрөгч буюу антиген байгааг илрүүлж 8 болно. Учир нь ФХЭБУ бичил үүрт хавтангийн үүрүүдийн гадаргуу тодорхойлохыг хүссэн молекулын эсрэг биеэр бүрхэгдсэн байдаг [32].



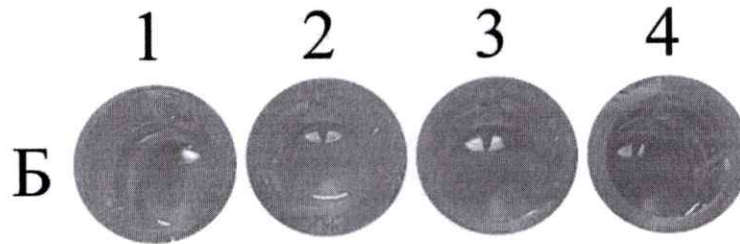
Зураг 45. Угсарсан ФХЭБУ оношлуурын ажиллах зарчим

Зураг 45-д өөрсдийн угсарсан ФХЭБУ оношлуурын бүтэц болон ажиллах зарчмыг дэлгэрэнгүй харуулав. ФХЭБУ-ын бичил үүрт орох дугуй хэмжээтэй шилэн слайд дээр 50 нм орчим алтны нимгэн үе суулган бичил үүрэнд гадаргууг дээш харуулан хийсэн. MUA линкер болон EDC/NHS кросс холбогчдыг ашиглан өмнөх ГПР-ын биосенсор угсрах аргатай ижил үйл явцаар алтны гадаргууд антигенийг холбосны дараагаар Wantai biotech HDV-IgG ФХЭБУ цомог ашиглан оношилгоо хийсэн. Оношилгоо хийж дуусмагц өнгөний хувирал явагдсан уусмалыг хоосон бичил үүр лүү шилжүүлэн 450 нм долгионы уртад гэрлийн шингээлтийг хэмжсэн.



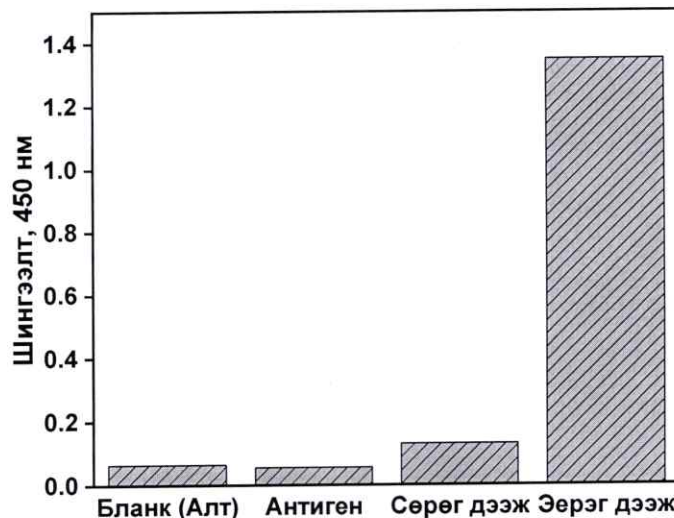
Зураг 46. Өнгө үзүүлэгч хромоген хийсний дараах ФХЭБУ оношлуурын үр дүн

- A1 – Бланк алтны нимгэн үеийн контрол
- A2 – Антиген суулган блокинг хийсэн контрол
- A3 – Халдваргүй, сөрөг контрол
- A4 – Халдвартай, зэрэг контрол



Зураг 47. Урвал зогсоох уусмал хийж, хоосон бичил үүрлүү шилжүүлсний дараах ФХЭБУ оношлуурын үр дүн

- Б1 – Бланк алтны нимгэн үеийн контрол
- Б2 – Антиген суулган блокинг хийсэн контрол
- Б3 – Халдваргүй, сөрөг контрол
- Б4 – Халдвартай, эерэг контрол



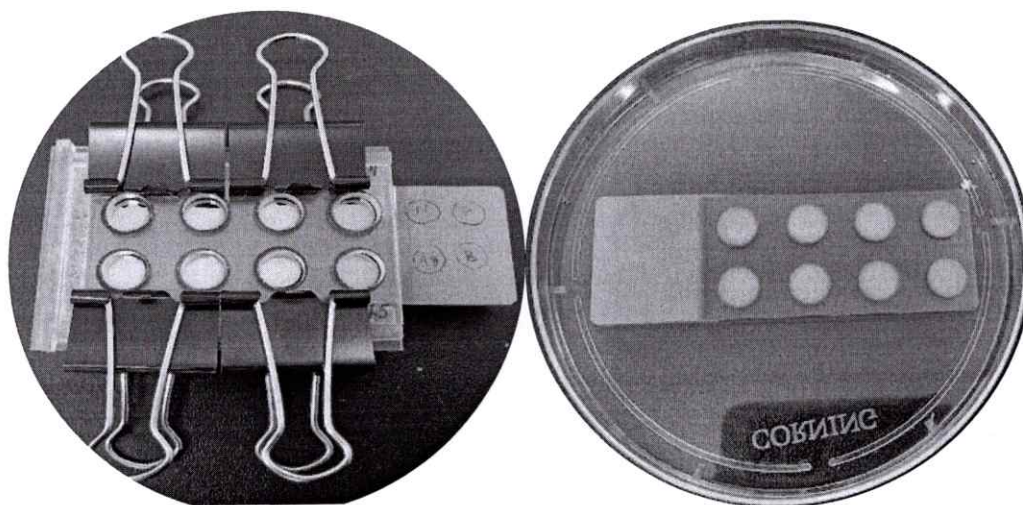
Зураг 48. ФХЭБУ оношлуурын шингээлтийг 450 нм долгионы уртад хэмжсэн үр дүн

Зураг 48-с харахад бланк алтны нимгэн үе нь антиген суулган блокинг хийсэн контролоос илүү өндөр шингээлт өгсөн нь алтны гадаргуу дээр HRP агуулсан антибоди бага хэмжээгээр холбогдсон болохыг харуулж байна.

Мөн халдваргүй сөрөг дээж антиген контролоос харьцангуй өндөр шингээлт өгсөн нь хүний цусанд агуулагдаж буй уураг, бусад антибоди нь сенсо­рыг гадаргуу дээр харилцан үйлчлэл үзүүлж сонгомол биш шинж чанараар холбогдсон байна гэж дүгнэсэн. Харин халдвартай цусны ийлдэс буюу эерэг дээжийн өнгө тодоор хувирч, 1.348 шингээлтийн өндөр утга өгсөн. Энэ нь алтны нимгэн үеийн гадаргуу дээр угсарч буй бидний биосенсор хүний цусан дахь хепатит дельта вирусийн

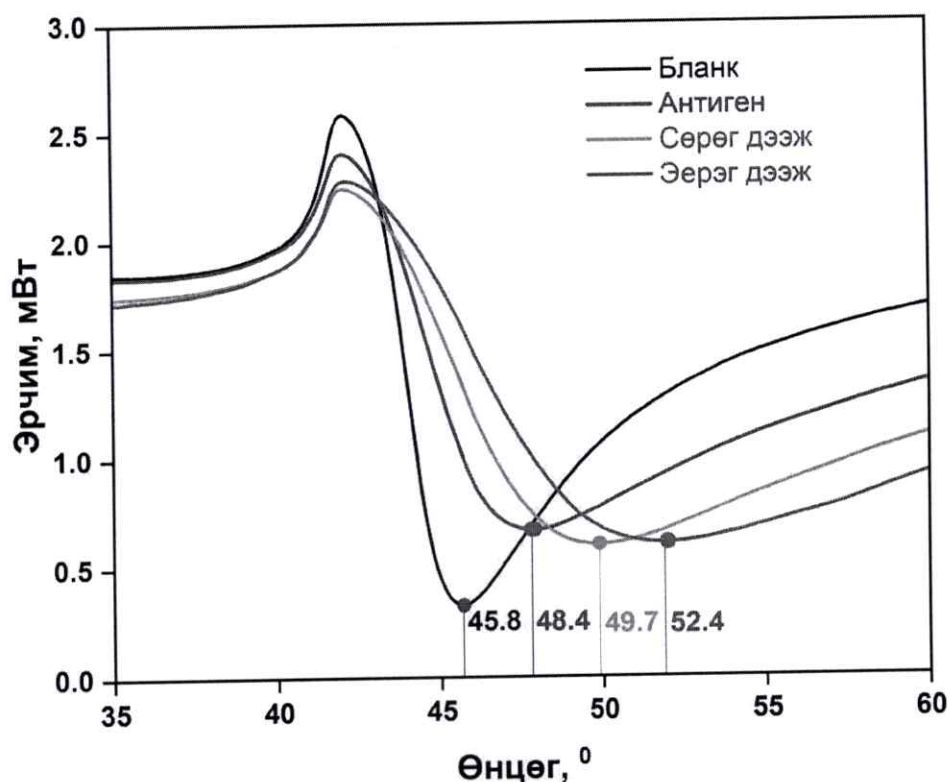
антибодийг сонгомлоор мэдрэг чанар сайтай танин холбогдож байгааг баталж байна.

4.4.3. Алтны нимгэн үед суурилсан биосенсорын гадаргуугийн плазмон резонансыг хэмжсэн үр дүн



Зураг 49. Алтны нимгэн үе дээр суурилсан ГПР-ын биосенсорын холболт, угсралт явагдаж буй болон шинжлэхэд бэлэн болсон биосенсор

Зураг 49–д алтны нимгэн үе суулгасны дараа маск тавьж бэхлэн, функционал бүлгүүдийг холбох угсралт явагдаж буй биосенсорыг харуулж байна. Харин баруун талд эрүүл болон ХДВ-ийн халдвартай хүний цуснаас ялгаж авсан ийлдсээр үйлчилсний дараа ГПР-ын багажаар хэмжихэд бэлэн болсон биосенсорыг харуулж байна.



Зураг 50. Алтны нимгэн үед суурилсан биосенсорын ГПР-ын хэмжилтийн үр дүн

Алтны нимгэн үед суурилсан биосенсорын ГПР-ын хэмжилтийг бланк буюу алтны нимгэн үе, антиген суулгасан буюу биосенсор, сөрөг буюу эрүүл хүний ийлдсээр үйлчилсэн, эерэг буюу халдвартай хүний ийлдсээр үйлчилсэн үед явуулсан.

ГПР-ийн биосенсорын үйл ажиллагааг шалгахад нийт 2 бүлгийн 31 хүний ийлдэсний дээжийг ашиглав. Үүнд:

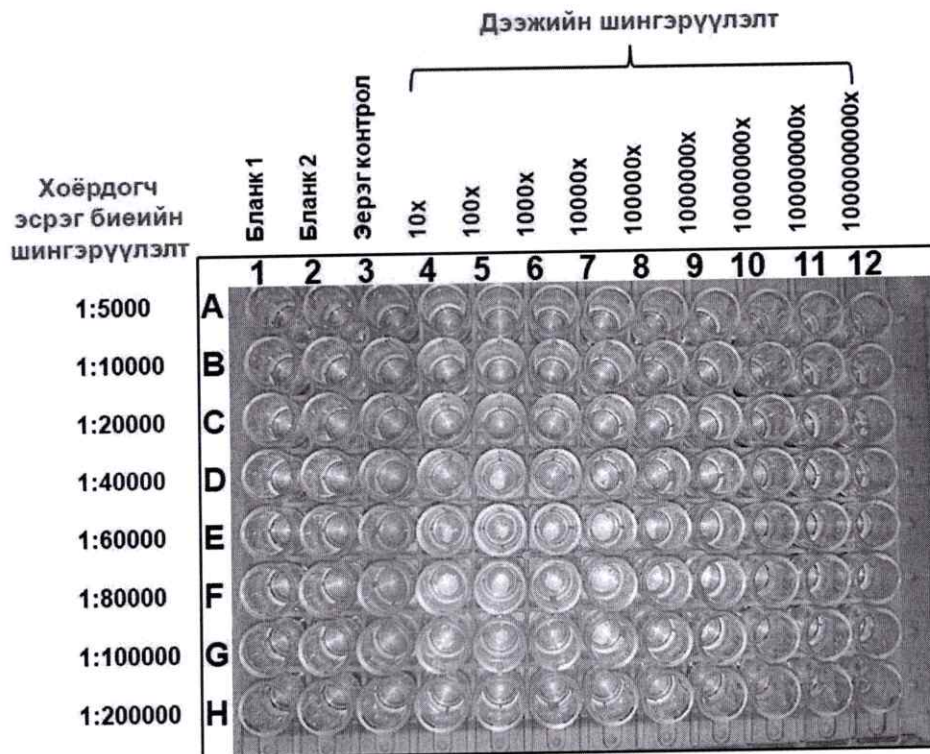
1. ХДВ-ийн халдвартай буюу эерэг бүлэг (HDV-RNA эерэг, HBsAg эерэг), n=15
2. Эрүүл буюу сөрөг бүлэг (Anti-HCV сөрөг, HBsAg сөрөг), n=16

Зураг 50-с харахад бланк 45.8° , антиген 48.4° , сөрөг дээж 49.7° , эерэг дээж 52.4° ГПР-ийн өнцгөөр шингээлтийн эрчим өгсөн байна. Эерэг болон сөрөг дээжүүд хоорондоо ялгаатай өнцгөөр шилжсэн. Иймд алтны нимгэн үед ковалентаар холбосон ХДВ-ийн антиген дээр дээж цусны ийлдэс дэх ХДВ-ийн антиген сонгомлоор холбогдож, бидний угсарсан биосенсор амжилттай ажиллаж энэхүү арга зүйгээр ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэх боломжтой хэмээн дүгнэж байна.

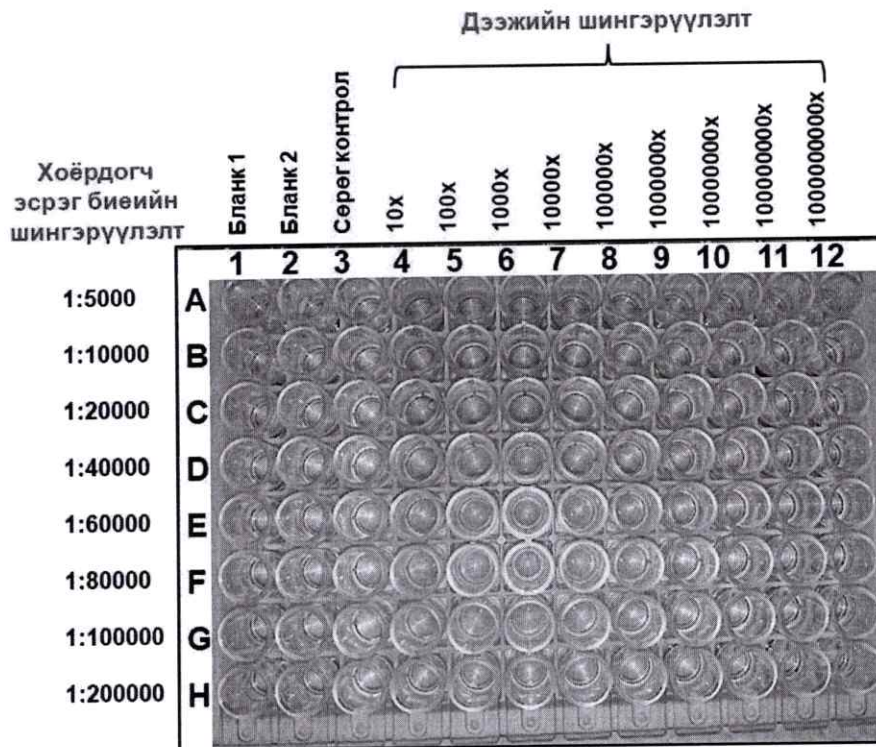
4.5. ФХЭБУ оношлуурын үр дүн

4.5.1. Чекербоард (Checkerboard) арга зүйгээр оношлуурын оптимал нөхцөлийг тодорхойлох

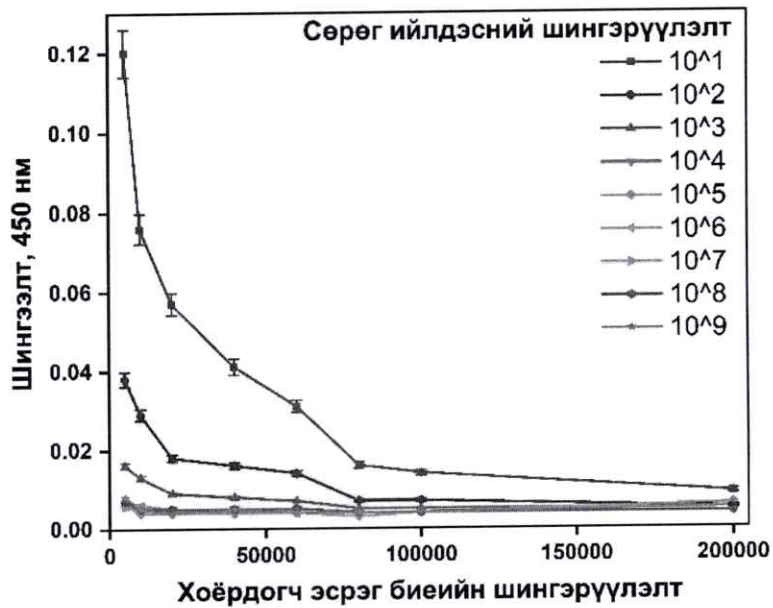
Нийлэгжүүлсэн рекомбинант S-HDAg уургийг ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэх ФХЭБУ оношлуурт ашиглах боломжтойг баталгаажуулсны дараа оношлуурыг ашиглах үедээ дээж буюу ийлдэс болон хоёрдогч эсрэгбие анти- Human IgG (HRP)-ийн тохиромжтой шингэрүүлэлтийг тодорхойлов. Ингэхдээ зэрэг, сөрөг дээжүүд, анти- Human IgG (HRP) тус бүрийн концентрацийг ихээс бага руу шингэлж, угсарсан оношлуур дээр шинжилгээ хийсэн. Шинжилгээний үр дүн буюу зэрэг болон сөрөг дээжүүдийн гэрлийн шингээлтийн утгуудыг хооронд нь хасаж зөрүү өндөртэй, анти- Human IgG (HRP)-г бага хэмжээтэй хэрэглэгдэх шинж чанараар тохиромжтой шингэрүүлэлтийг тодорхойлов.



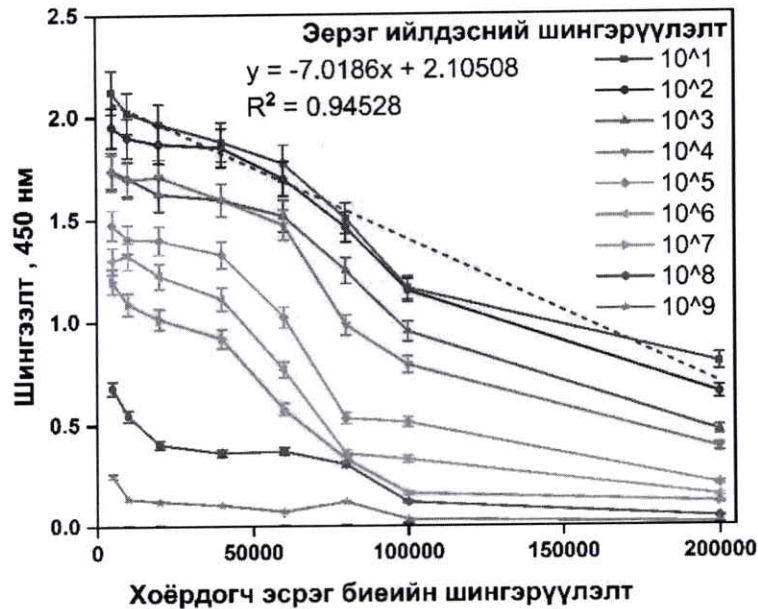
Зураг 51. Чекербоард арга зүйгээр сөрөг дээжийн 9 шингэрүүлэлтийг, хоёрдогч эсрэг биеийн 8 шингэрүүлэлтийг туршиж өнгөний өөрчлөлт үзүүлсэн хавтан



Зураг 52. Чекербоард арга зүйгээр эерэг дээжийн 9 шингэрүүлэлтийг, хоёрдогч эсрэг биеийн 8 шингэрүүлэлтийг туршиж өнгөний өөрчлөлт үзүүлсэн хавтан



Зураг 53. Чекербоард арга зүйгээр сөрөг дээжийн 9 шингэрүүлэлтийн утгыг тодорхойлсон үр дүн.



Зураг 54. Чекербоард арга зүйгээр илрүүлэх хязгаар болон опимал шингэрүүлэлтийн утгыг тодорхойлсон үр дүн. Ү тэнхлэгт 450 нм долгионы уртад хэмжсэн шингээлтийн утга, Х тэнхлэгт Anti-human IgG (HRP) хоёрдогч эсрэг биеийн 8 шингэрүүлэлтийн утгыг харуулав. Эерэг ийлдсийг 10 дахин шингэрүүлсэн шингээлтийн шугаман регрессийн утга $R^2=0.94528$, шугаман тэгшитгэл $y=-7.0186x+2.1058$ гарав.

ХДВ-ийн ФХЭБУ оношлуурын оптимал нөхцөлийг тодорхойлохдоо эерэг болон сөрөг ийлдсийг 10^1x , 10^2x , 10^3x , 10^4x , 10^5x , 10^6x , 10^7x , 10^8x , 10^9x дахин, Anti-human IgG (HRP) хоёрдогч эсрэг биеийг 1:5000, 1:10000, 1:20000, 1:40000, 1:60000, 1:80000, 1:100000, 1:200000 шингэрүүлэн шинжилсэн.

Зураг 49-с харахад сөрөг ийлдсийг 10 дахин шингүүлэхэд шингээлтийн утга өндөр байсан бол 100 дахин шингэрүүлэхэд шингээлт огцом багасаж хуурамч эерэг хариу гарах магадлал буурсан. Харин эерэг дээжийг 10 болон 100 дахин шингэрүүлэхэд шингээлтийн утгын зөрүү бага байсан ба мэрдэг чанарт ихээр нөлөөлөхгүй байв. Эерэг ийлдсийг 10^7 дахин шингэлэхэд оношлуур нь дээжээс ХДВ-ийн эсрэг биеийг илрүүлж чадсан нь Зураг 50-д харагдаж байна. Оношилгоонд хэрэгдэгдэх ийлдэс болон Anti-human IgG хамгийн оновчтой шингэрүүлдгийг 50 болон 1:60000 гэж тодорхойлов.

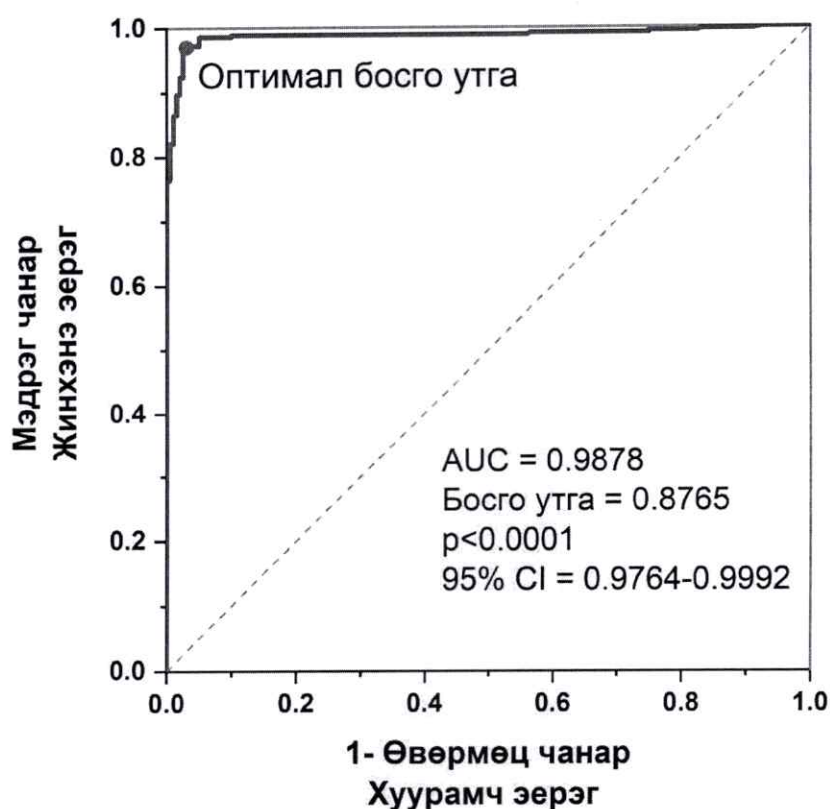
4.5.2. Босго утга утга тодорхойлсон үр дүн

Оношлуурын баталгаажуулалтыг хамгийн чухал үе шат нь босго утгыг хамгийн зөв аргаар нарийвчлан тодорхойлох юм. Босго утгыг зөв тогтоосноор оношлуурын мэдрэг, өвөрмөц чанар болон нарийвчлалыг тодорхойлох боломжтой болдог.

Энэхүү судалгаагаар ФХЭБУ оношлуурын босго утгыг ROC анализ, нормал түгэлтийн график, стандарт хазайлтад суурилсан томъёо гэх 3 аргаар бодож олсон.

4.5.2.1. ROC анализаар босго утга тодорхойлох

Туршилтын урвалж болон протоколыг оновчтой болгосны дараа оношлуурт статистик анализ хийсэн. Үүний 570 дээж (ХДВ-ийн халдвартай буюу эерэг бүлэг, $n=370$; эрүүл буюу сөрөг бүлэг, $n=200$) ашиглан босго утга утгыг тодорхойлон ROC муруйг байгуулсан.



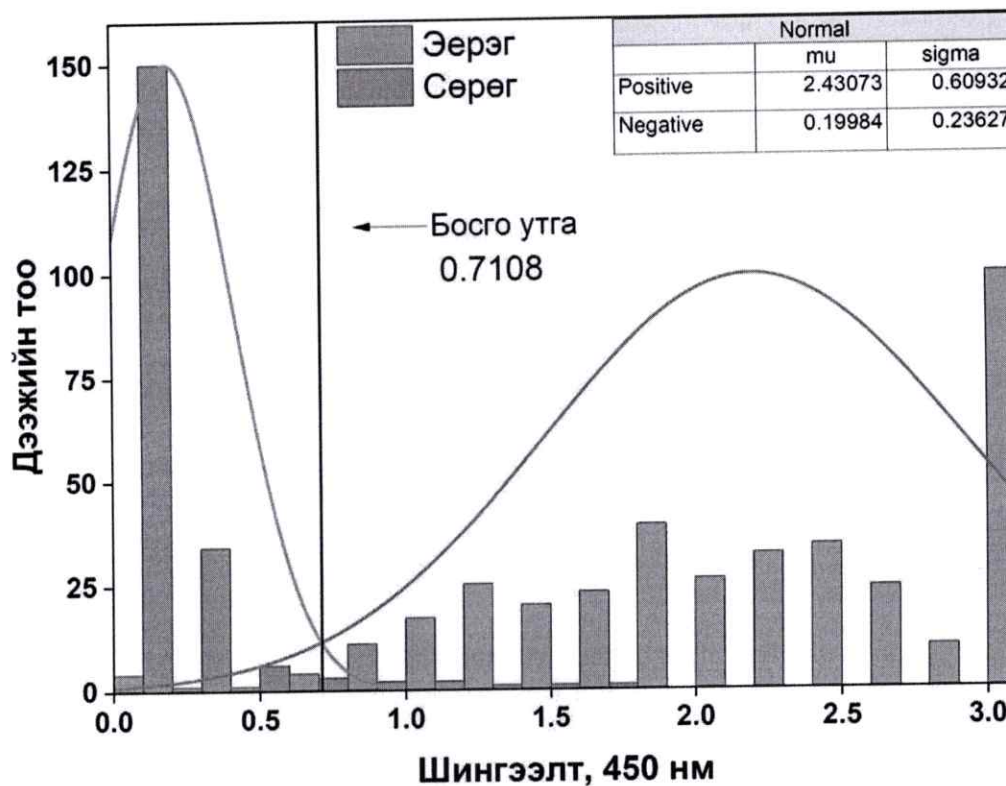
Зураг 55. МУИС ФХЭБУ-ийн ROC муруй. ROC муруйн доорх талбай (AUC) 0.997, босго утга 0.8765 байна. (Цэнхэр шугам нь туршилтын муруй ба тасархай саарал шугам нь тодорхойлох муруйг харуулж байна)

ROC муруйн доорх талбай (area under curve, AUC) 0.9878, 95%-ийн итгэлийн интервал (CI) нь 0.9764-0.992 байна. ROC анализын аргаар оптималь босго утгыг жинхэнэ эерэг болон хуурамч эерэг үзүүлэлтээр тодорхойлоход 0.8765 байв.

4.5.2.2. Нормал түгэлтийн графикаар босго утга тодорхойлох

Нормал түгэлтийн муруй дээр суурилсан босго утгыг тодорхойлохдоо босоо тэнхлэгт дээжийн тоо, хэвтээ тэнхлэгт эерэг болон сөрөг бүлгийн 450 нм-ийн шингээлтийн утгыг график дээр зурсан. Эерэг (дундаж=2.4307, $SD=0.6093$,

$p < 0.0001$) ба сөрөг бүлгүүдийн (дундаж=0.1998, $SD=0.2362$, $p < 0.0001$) графикийн давхцалын дундаж цэгээр босго утгыг тодорхойлсон ба босго утга 0.7108 байна.

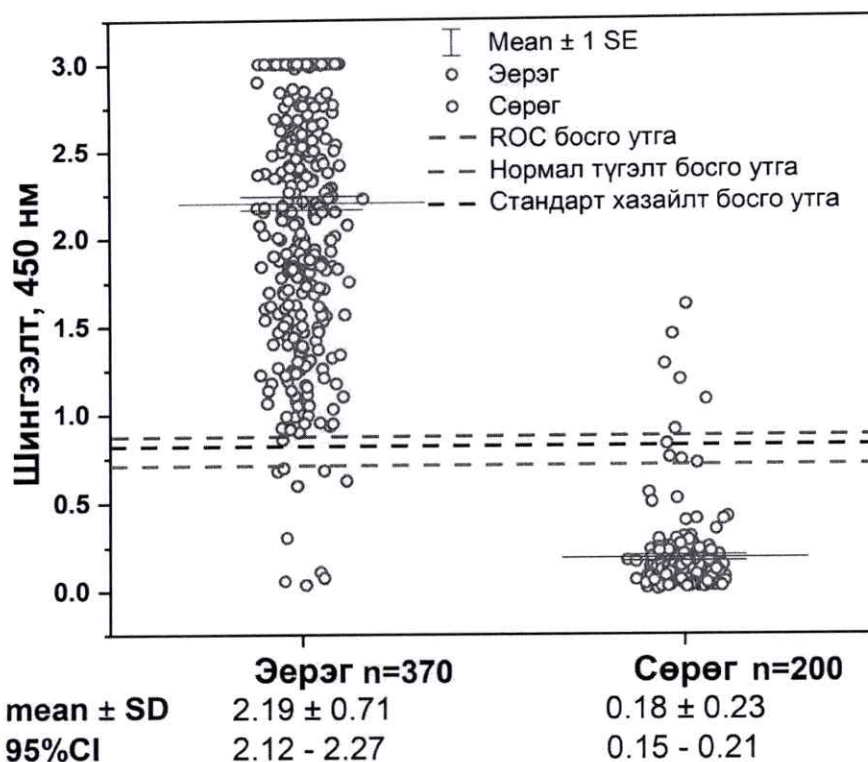


Зураг 56. Эерэг болон сөрөг дээжийн шингээлтийн утгын нормал түгэлтийн график

4.5.2.3. Стандарт хазайлтад суурилсан томъёо ашиглан босго утга тодорхойлох

Судалгаанд ашиглагдсан дээжүүд 450 нм-д 0.1275 дундаж шингээлтийг үзүүлсэн ба стандарт хазайлт 0.231 байсан. Үүнээс босго утга утгыг 0.8204 (дундаж + $3 \cdot SD$) гэж тогтоолоо.

4.5.3. ФХЭБУ оношлуурын гүйцэтгэлийг тодорхойлсон үр дүн



Зураг 57. ФХЭБУ-аар анти-ХДВ тодорхойлсон 570 дээжийн тархалтын график

Хүснэгт 22. Босго утгуудад суурилсан жинхэнэ эерэг, жинхэнэ сөрөг, хуурамч эерэг, хуурамч сөрөг утгууд

№	Ангилсан бүлэг	Босго утга 0.7108	Босго утга 0.8204	Босго утга 0.8764
1	Жинхэнэ эерэг	360	360	359
2	Жинхэнэ сөрөг	190	193	194
3	Хуурамч эерэг	10	7	6
4	Хуурамч сөрөг	10	10	11

Хүснэгт 23. Босго утгуудад суурилсан оношлуурын чанарын баталгаажуулалт

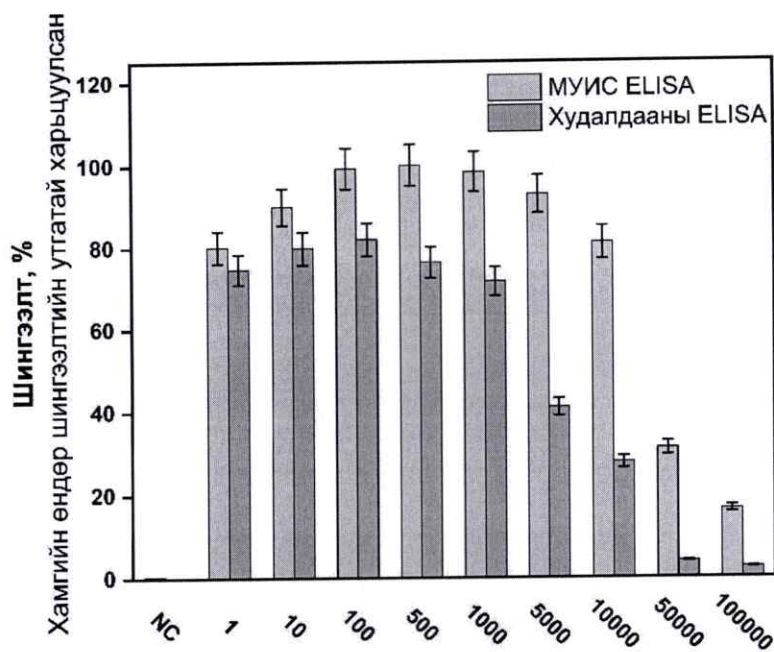
№	Шинж чанар	Босго утга 0.7108	Босго утга 0.8204	Босго утга 0.8765	Дундаж утга	Оптималь хэмжээ
1	Мэдрэг чанар	97.29%	97.29%	97.02%	97.2%	100%
2	Өвөрмөц чанар	95%	96.5%	97%	96.17%	100%
3	Эерэг байх магадлалын утга (PPV)	97.29%	98.09%	98.35%	97.91%	100%
4	Сөрөг байх магадлалын утга (NPV)	95%	95.07%	94.63%	94.9%	100%
5	Эерэг магадлалын харьцаа (LR+)	19.45	27.79	32.34	26.53	>10
6	Сөрөг магадлалын харьцаа (LR-)	0.028	0.028	0.03	0.28	<1
7	Youden-гийн индекс	0.92	0.94	0.94	0.93	1
8	Нарийвчлал	96.49%	97.01%	97.02%	96.84%	100%

ФХЭБУ-ын оношлуурын чанарын баталгаажуулалтыг 3 өөр босго утгыг ашигласан тодорхойлсон ба дундаж мэдрэг чанар 97.2%, дундаж өвөрмөц чанар 96.17%, дундаж нарийвчлал 96.84% байв.

4.5.4. Худалдааны цомогтой харьцуулан туршсан үр дүн

Өөрсдийн зохион бүтээсэн хавтангийн ажиллагааг худалдааны (Wantai HDV-IgG ФХЭБУ) цомогтой харьцуулан дүгнэхийн тулд ижил дээжүүд дээр адил арга зүйгээр туршилтыг явуулсан.

Хавтан дээрээ 1х, 10х, 100х, 500х, 1000х, 5000х, 10000х, 50000х, 100000х шингэрүүлэлттэй ХДВ-ийн халдвартай буюу эерэг ийлдсээр үйлчлэн, шингээлт утгыг 450 нм-т хэмжсэн.



Зураг 58. Худалдааны ХДВ IgG тодорхойлох цомог болон МУИС цомгийг харьцуулсны шингээлтийн хувь, 450 нм

Хүснэгт 24. Худалдааны ХДВ IgG тодорхойлох цомог болон МУИС цомгийг харьцуулсан шингээлтийн хувь, 450 нм

Нэр	Сөрөг	1х	10х	100х	500х	1000 х	5000 х	10000 х	50000 х	100000 х
МУИС цомог	0.38	80.11	89.9 1	99.1 7	100	98.2 9	92.82	81.01	31.03	16.45
Худалда аны цомог	0.05	74.61	79.7 5	81.8 8	76.2 7	71.5 2	40.97	27.77	3.99	2.43

Зураг 56 болон Хүснэгт 13-ийн үр дүнгээс харахад өөрсдийн угсарсан хавтан худалдааны цомогтой харьцуулахад шингэрүүлэлт ахих тусам шингээлтийн хувь өндөр байсан. МУИС буюу өөрсдийн угсарсан хавтан нь эерэг ийлдэсний 50000, 100000 шингэрүүлэлтийн утгад 31.03, 2.43%-ийн шингээлт өгсөн. Үүнээс харахад МУИС ФХЭБУ цомог нь худалдааны цомогтой харьцуулахад илүү өндөр мэрдэг байна гэж дүгнэлээ.

4.6. ЛАМП-ПГУ оношлуурын үр дүн

4.6.1. ХДВ-ийн геномын дарааллын анализ

ХДВ-ийн одоогоор мэдэгдэж буй нийт 8 генотипийн геномын дарааллыг хооронд нь харьцуулахад хамгийн бага ялгаатай EMBOSS_001 CHINAN M геномын дараалал байсан тул тус геномын дарааллыг сонгон авч ПГУ явуулах тохиромжтой хамгийн хадгалагдсан бүсийг тодорхойлов.

0001-ctcgggctcgggcgagtcagcagtcctctttacagaaaagagtaagagtactga-0060	
0061-ggactgccgctctagccgagatgagccggtccgagtcgaggaagaaccgcgaggaga-0120	
	M S R S E S R K N R G G R 13
0121-gaagagatcctcgagcagtggtggccggaagaagaagtttagaggaactcgagagagac-0180	
	E E I L E Q W V A G R K K L E E L E R D 33
0181-ctccggaagacaagaagaactcaagaagatagaggacgaaaatccctggctggggaac-0240	
	L R K T K K K L K K I E D E N P W L G N 53
0241-atcaaaggaattctcggaaagaaggataaggatggagagggggctccccggcgaagagg-0300	
	I K G I L G K K D K D G E G A P P A K R 73
0301- <u>gccccgaaccgaccagatggagggcagactccggacctgggaagaggcctctcaggggagga</u> -0360	
	A R T D Q M E A D S G P G K R P L R G G 93
0361- <u>ttcaccgacaaggagagggcaggatcaccgacgaaggaaggccctcgagaacaagaagaag</u> -0420	
	F T D K E R Q D H R R R K A L E N K K K 113
0421- <u>cagctatcggcgggaggcaagaacctcagcaaggaggaagaagaggaactcaggaggttg</u> -0480	
	Q L S A G G K N L S K E E E E L R R L 133
0481- <u>accgaggaagacgagagaagggaaagaagagtagccggcccggttgggggtgtgaac</u> -0540	
	T E E D E R R E R R V A G P P V G G V N 153
0541-cccctcgaaggtggatcgaggggagcggccggggcggtctcgtccccaatctgcagggga-0600	
	P L E G G S R G A P G G G F V P N L Q G 173
0601-gtcccggagtcctccttctcggaccggggaggggctggacatcaggggaaaccagggga-0660	
	V P E S P F S R T G E G L D I R G N Q G 193
0661-tttccataggatatactcttcccagccgatccgcccttttctcccagagttgtcgacc-0720	
	F P 195
0721-cagtgaataaagcgggtttccgctcacaggtttgctctcgcgtccttctttctcttcg-0780	
0781-ggtcggcatggcatctccacctctcgggtccgacctgggctccgaaggaggacgcac-0840	
0841-gtccactcggatggctaaggagagaccattttctcccgattccctatcggaatctagag-0900	
0901-agatttgggtcccattcggcattaccgaggggacgggtcccctcggaatgttggccagc-0960	
0961-cggcgcagcagaggaggtgggaccatgccggccatcaggttaagaaaggatggaacgcgg-1020	
1021-accctgcagagtggggtcccgccattcccgggcgacccttgggggggagtcggaatcga-1080	
1081-gcatcgggaagggcatcccattggctccactggtccccggtgttcccagcatcccctccgg-1140	
1141-tcactttcgaaggggtccgggggtcccgctagatggggacgataagtcgagttccccggg-1200	
1201-ataagcctcactcgtcccctctcggggggcggaacaccaccggctagccccgttgcctt-1260	
1261-ctttgggatacctcctcgtctcgggtctcccctactcctagcatcttctccaatcgctatg-1320	
1321-gtcttactcctaccgctcgaagcgcctcttgttcgctgaaggggtcctctggaggtggga-1380	
1381-tcactgctcatctccgagtgaaatccctcctctgagtgctactcaaccttcgggcccga-1440	
1441-gtgctctccagatctgggatcgggcccctcggatcgggagggcccggccctttttcttcca-1500	
1501-ccttctctttccccttccagagattctccggcgttggggatctcatccgcttctctaa-1560	
1561-gacctctctttgcttcttgggagtagtttctccgacgttccaatgctctttaccgtgaca-1620	
1621-tcccctctcgggagctgatacctcccccgctctcctcgtcggaaacttggctcagg -1677	

Зураг 59. ХДВ-ийн геномын дараалал. ЛАМП-ПГУ-ын праймер зохиосон бүсийг улаан өнгөөр тодосгов.

4.6.2. ХДВ-ийг илрүүлэх ЛАМП-ПГУ-ын праймер загварчлалын үр дүн

ХДВ-ийн геномын хамгийн хадгалагдсан бүсэд зориулалтын программ ашиглаж зохиосон ЛАМП-ПГУ-багц праймеруудын дарааллыг Хүснэгт 25-д, геном дээрх байрлалыг Зураг 59-д харуулав.

Хүснэгт 25. ХДВ-ийг илрүүлэх ЛАМП-ПГУ-ын багц праймеруудын дараалал

Праймер	Дараалал
ХДВ-Багц 1	
F3	5'-GGCCCTCGAGAACAAGAAGA-3'
B3	5'- CAGATTGGGGACGAAGCC-3'
FIP	5'-TCGGTCAACCTCCTGAGTTCCTCTATCGGCGGGAGGCAA-3'
BIP	5'-AGGAAAGAAGAGTAGCCGGCCCTCCCCTCGATCCACCTTC-3'
LB	5'-TTCTTCCTCCTTGCTGAGG-3'
LF	5'-CGGTTGGGGGTGTGAAC-5'
ХДВ-Багц 2	
F3	5'-TCCCCCTTCTCTCGGACC-3'
B3	5'-CCATGCCGACCCGAAGAG-3'
FIP	5'-GCGGATCGGCTGGGAAGAGTATGGGAGGGGCTGGACAT-3'
BIP	5'-TTCTCCCCAGAGTTGTGACCCGAAAGAAGGACGCGAGACG-3'
LB	5'-AATCCCTGGTTTCCCCTG-3'
LF	5'-CGGGTTTCCGCTCACA -3'
ХДВ-Багц 3	
F3	5'-CGATCCGCCCTTTTCTCC-3'
B3	5'-GCTCTCCCTTAGCCATCCG-5'
FIP	5'-ACGCGAGACGCAAACCTGTGCCAGAGTTGTGACCCCA-3'
BIP	5'-TCGGGTCGGCATGGCATCAGTGGACGTGCGTCCTC-3'
LB	5'-CGGAAACCCGCTTTATTCAC-3'
ХДВ-Багц 4	
F3	5'-GGGAAGAGGCCTCTCAGG-3'
B3	5'-TCACACCCCAACCGG-3'
FIP	5'-TCCC GCCGATAGCTGCTTCTTCCGACAAGGAGAGGCAGGAT-3'
BIP	5'-GCAAGAACCTCAGCAAGGAGGACCGGCTACTCTTCTTTCCCT-3'
LB	5'-GAGGGCCTTCCTTCGTC-3'
LF	5'-AGAAGAGGAACTCAGGAGGT-3'
ХДВ-Багц 5	
F3	5'-GAGGATTCACCGACAAGGAG-3'
B3	5'-TCACACCCCAACCGG-3'
FIP	5'-TCCC GCCGATAGCTGCTTCTAGGCAGGATCACCGACG-3'
BIP	5'-GCAAGAACCTCAGCAAGGAGGACCGGCTACTCTTCTTTCCCT-3'
LB	5'-TTCTCGAGGGCCTTCCT-3'
LF	5'-GGAACTCAGGAGGTTGACC-3'

A).
 301- gcccgaaacggaccagatggaggcagactccggacctggaagaggcctctcaggggagga
 A R T D Q M E A D S G P G K R P L R G G -93
 F3 →
 361- ttcaccgacaaggagaggcaggatcaccgacgaaggaagccctcgagaacaagaagaag
 F T D K E R Q D H R R R K A L E N K K K -113
 F2 → LFc ← F1c ←
 421- cagctatcggcgggaggcaagaacctcagcaaggaggaagaagaggaactcaggaggttg
 Q L S A G G K N L S K E E E E E L R R L -133
 B1 → LB →
 481- accgaggaagacgagagaagggaaagaagagtagccggcccggttggggggtggaac
 T E E D E R R E R R V A G P P V G G V N -153
 B2c ← B3c ←
 541- cccctcgaaggtggatcgaggggagcggccggggggcggcttcgtccccaatctgcagggg
 P L E G G S R G A P G G G F V P N L Q G -173

B).
 541- cccctcgaaggtggatcgaggggagcggccggggggcggcttcgtccccaatctgcagggg
 P L E G G S R G A P G G G F V P N L Q G -173
 F3 → F2 → LFc ←
 601- gtcccgaggtcccccttctctcggacggggaggggctggacatcaggggaaaccagggg
 V P E S P F S R T G E G L D I R G N Q G -193
 F1c ← B1 →
 661- tttccataggatatactcttcccagccgacccgcttttctcccagagttgtcgacc
 F P -195
 LB → B2c ←
 721- cagtgaataaagcgggtttccgctcacaggtttggtctcgcgtctcttcttctcttcg
 B3c ←
 781- ggtcggcatggcatctccacctctcgcggtccgacctgggctccgaaggaggacgcac

B).
 601- gtcccgaggtcccccttctctcggacggggaggggctggacatcaggggaaaccagggg
 V P E S P F S R T G E G L D I R G N Q G -193
 F3 → F2 →
 661- tttccataggatatactcttcccagccgacccgcttttctcccagagttgtcgacc
 F P -195
 LFc ← F1c ←
 721- cagtgaataaagcgggtttccgctcacaggtttggtctcgcgtctcttcttctcttcg
 B1 → B2c ←
 781- ggtcggcatggcatctccacctctcgcggtccgacctgggctccgaaggaggacgcac
 B3c ←
 841- gtccacctcggatgggctaaggagagccacttttctcccagattccctatcggaatctagag

Г).
 241- atcaaaggaattctcggaaagaaggataaggatggagagggggctccccggcgaagagg
 I K G I L G K K D K D G E G A P P A K R -73
 F3 →
 301- gcccgaaacggaccagatggaggcagactccggacctggaagaggcctctcaggggagga
 A R T D Q M E A D S G P G K R P L R G G -93
 F2 → LFc ←
 361- ttcaccgacaaggagaggcaggatcaccgacgaaggaagccctcgagaacaagaagaag
 F T D K E R Q D H R R R K A L E N K K K -113
 F1c ← B1 → LB →
 421- cagctatcggcgggaggcaagaacctcagcaaggaggaagaagaggaactcaggaggttg
 Q L S A G G K N L S K E E E E E L R R L -133
 B2c ← B3c ←
 481- accgaggaagacgagagaagggaaagaagagtagccggcccggttggggggtggaac
 T E E D E R R E R R V A G P P V G G V N -153

Д).



Зураг 60. ЛАМП-ПГУ-ын багц праймеруудын ХДВ-ийн геном дээрх байрлал.

А). 1-р праймер багц, Б). 2-р багц праймер, В). 3-р багц праймер Г). 4-р багц праймер, Д). 5-р багц праймер. F – шууд праймер, B – урвуу праймер, FIP – дотоод шууд праймер, BIP – дотоод урвуу праймер, LF – гогцоот шууд праймер, LB – гогцоот урвуу праймер

4.6.3. Бодит хугацааны полимеразын гинжин урвалын үр дүн

4.6.3.1. БХ-ПГУ-аар ХДВ-РНХ дараалсан шингэрүүлгийг бэлдсэн нь

Судалгаанд зориулан стандарт дээжүүд бэлдэх зорилгоор вирусийн РНХ-ийг 1х (575,000 IU/mL), 10х (57,500 IU/mL), 100х (5,750 IU/mL), 1000х (575 IU/mL) 10000х (57 IU/mL) дахин шингэлж бэлдэв. Улмаар бэлдсэн дээжүүдийн шингэрүүлгийг БХ-ПГУ-аар баталж (График 1) РНХ-ийн шингэрүүлэлт болон БХ-ПГУ-ын циклийн босго утгаар стандарт муруйг байгуулав. Стандарт муруйгаар РНХ-ийн дараалсан шингэрүүлэлт болон БХ-ПГУ-ын хоорондын хамаарал $R^2=0.9953$, регрессийн муруйн тэгшитгэл $y=3.826x+17.99$ гарав (График 2).

Хүснэгт 26. ХДВ-РНХ-ийн шингэрүүлэгийн БХ-ПГУ-аар илрүүлсэн үр дүн

Шингэрүүлэлт	Шингэрүүлэлтийн зэрэг	IU/mL	Босго утга (dR)	Циклийн босго утга (dR)
1-р шингэрүүлэлт	1х	$5 \cdot 10^5$	3159.53	22.18
2-р шингэрүүлэлт	10х	$5 \cdot 10^4$	3159.53	25.59
3-р шингэрүүлэлт	100х	$5 \cdot 10^3$	3159.53	28.79
4-р шингэрүүлэлт	1000х	$5 \cdot 10^2$	3159.53	33.35
5-р шингэрүүлэлт	10000х	$5 \cdot 10$	3159.53	37.43

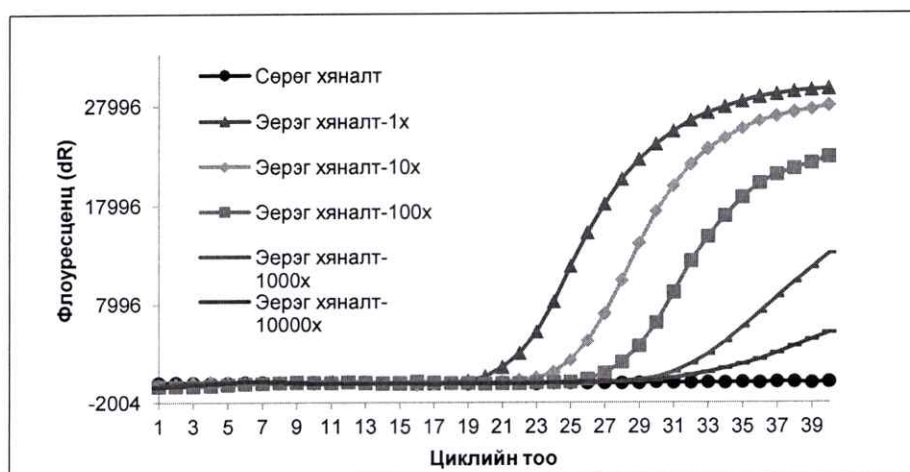


График 1. ХДВ-РНХ-ийн дараалсан шингэрүүлэгийн БХ-ПГУ-ын олшруулах муруй



График 2. ХДВ-РНХ-ийн дараалсан шингэрүүлэгийн БХ-ПГУ-ын стандарт муруй

4.6.3.2. ХДВ-ийн халдварыг тоон БХ-ПГУ-аар илрүүлэн баталж, тоолсон туршилтын үр дүн

Судалгаанд хамрагдагч ХДВ-ийн халдвартай буюу өвчтэй хүмүүсийн цуснаас вирүсийн РНХ-ийг ялгаж, ХДВ стандартуудыг ашиглан тоон БХ-ПГУ-аар тоолох туршилт, шинжилгээг хийв. Тус туршилтын үр дүнгээр вирүсийн халдвар хамгийн өндөр тоологдсон 747,100 IU/mL байсан бол хамгийн бага тоологдсон нь 219 IU/mL байв (Хүснэгт 16 болон График 3). БХ-ПГУ-аар батлагдсан ХДВ халдвартай эдгээр хүмүүсийн дээжийг цаашид ЛАМП-ПГУ-ын арга зүйгээр ХДВ-ийг илрүүлэхэд ашиглах болно.

Хүснэгт 27. ХДВ-РНХ-ийг тоон БХ-ПГУ-аар тоолсон үр дүн

Д/д	Дээжний нэр	Босго утга (dR)	Босго циклийн утга (dR)	Тоо хэмжээ, IU/mL (хуулбар)
1	Стандарт 1	4094.21	14.21	20000000
2	Стандарт 2	4094.21	21.38	200000
3	Стандарт 3	4094.21	29.68	2000
4	Стандарт 4	4094.21	32.31	200
5	Сөрөг хяналт	4094.21	No Ct	No Ct
6	ДЭМБ-стандарт 1	4094.21	24.30	37590
7	ДЭМБ-стандарт 2	4094.21	36.02	26
8	ХДВ өвчтөн 1	4094.21	21.23	253900
9	ХДВ өвчтөн 2	4094.21	32.47	236
10	ХДВ өвчтөн 3	4094.21	25.60	16820
11	ХДВ өвчтөн 4	4094.21	21.29	244500
12	ХДВ өвчтөн 5	4094.21	20.67	359500
13	ХДВ өвчтөн 6	4094.21	21.93	164000
14	ХДВ өвчтөн 7	4094.21	32.59	219
15	ХДВ өвчтөн 8	4094.21	19.49	747100

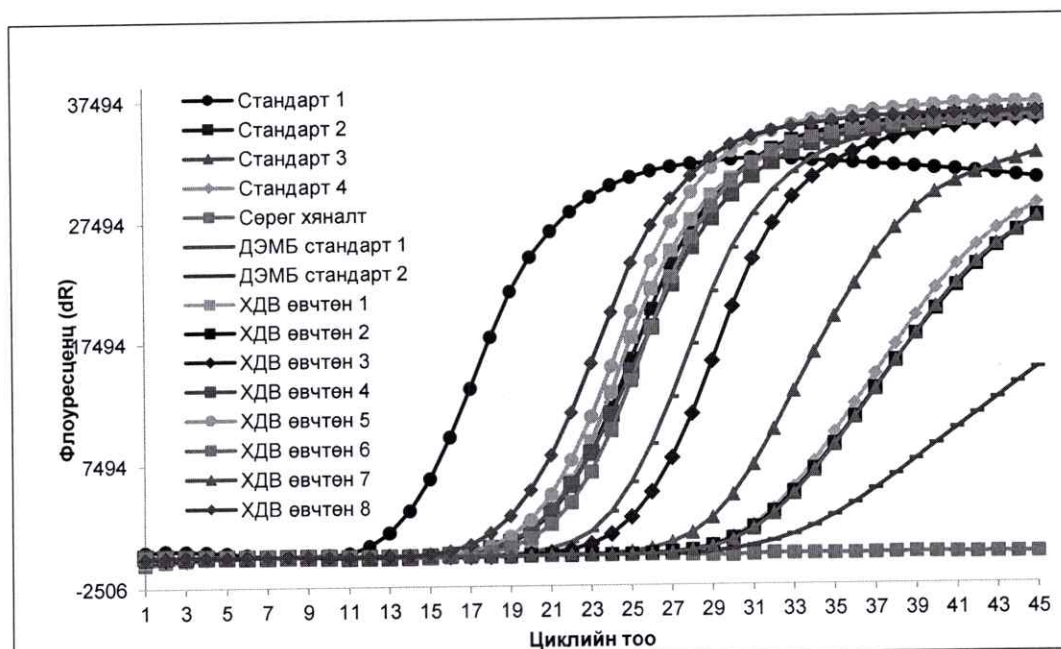


График 3. ХДВ-РНХ-ийг тоон БХ-ПГУ-ын олшруулах муруй

4.6.3.3. ХДВ-ийн халдваргүй буюу эрүүл хүмүүсийг БХ-ПГУ-ын туршилтаар баталсан үр дүн

Судалгаанд хамрагдагч 15 эрүүл хүмүүсийг ХДВ халдваргүйг БХ-ПГУ-аар баталж ЛАМП-ПГУ-д ашиглагдах ХДВ халдваргүй эрүүл дээжээр тодорхойлов (Хүснэгт 17 болон График 4).

**Хүснэгт 28. ХДВ-ийн халдваргүй эрүүл дээжүүдийг
БХ-ПГУ-аар баталсан үр дүн**

Д/д	Дээж	Босго утга (dR)	Циклийн босго утга(dR)
1	Эрүүл-1	668.705	No Ct
2	Эрүүл-2	668.705	No Ct
3	Эрүүл-3	668.705	No Ct
4	Эрүүл-4	668.705	No Ct
5	Эрүүл-5	668.705	No Ct
6	Эрүүл-6	668.705	No Ct
7	Эрүүл-7	668.705	No Ct
8	Эрүүл-8	668.705	No Ct
9	Эрүүл-9	668.705	No Ct
10	Эрүүл-10	668.705	No Ct
11	Эрүүл-11	668.705	No Ct
12	Эрүүл-12	668.705	No Ct
13	Эрүүл-13	668.705	No Ct
14	Эрүүл-14	668.705	No Ct
15	Эрүүл-15	668.705	No Ct
16	Сөрөг хяналт	668.705	No Ct
17	Эерэг хяналт	668.705	22.12

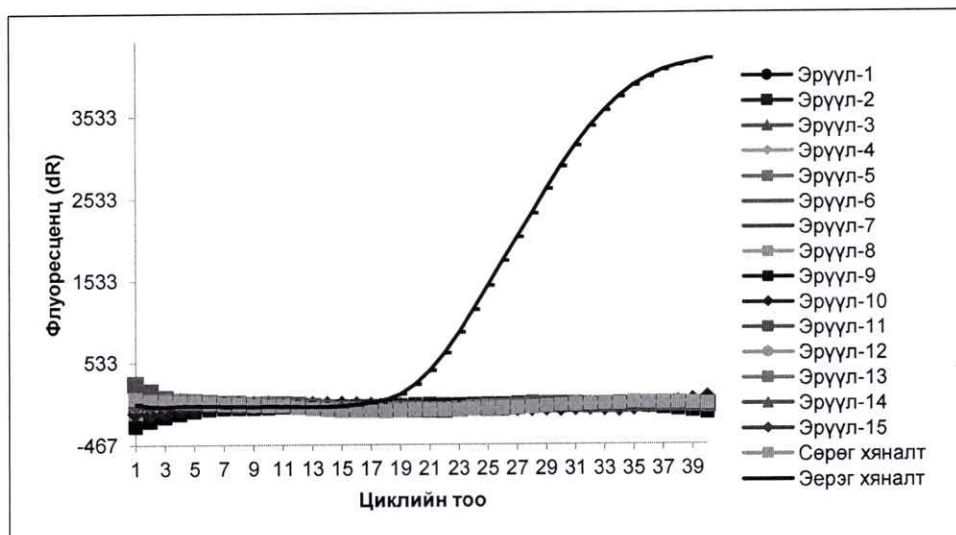
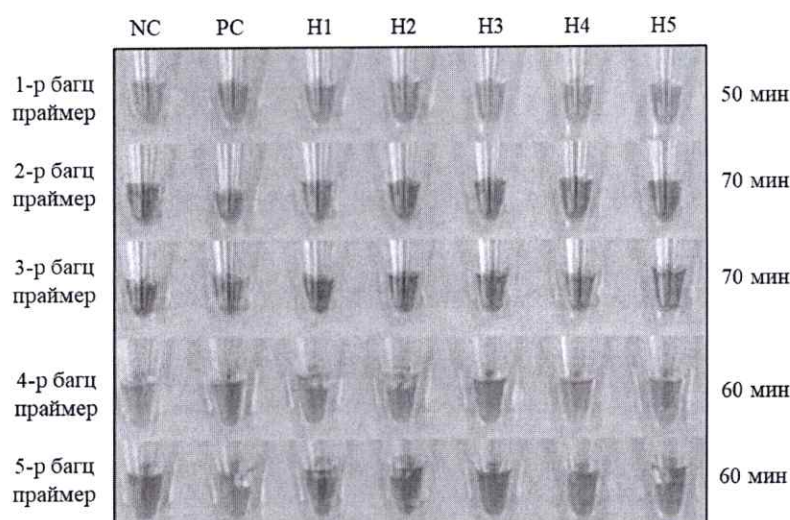


График 4. ХДВ-ийн халдваргүй эрүүл дээжүүдийг баталсан БХ-ПГУ-ын олшруулах муруй

4.6.4. Өнгө үзүүлэгч ЛАМП полимеразын гинжин урвалын үр дүн

4.6.4.1. ХДВ-ийг илрүүлэх ЛАМП-ПГУ-ын багц праймеруудын харьцуулсан үр дүн

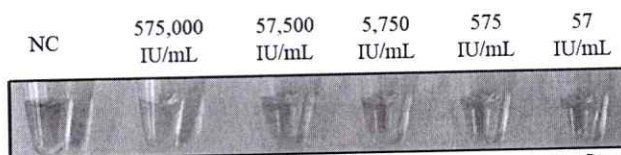
Вирүсийн геномын хамгийн хадгалагдсан бүсэд зохиосон ЛАМП-ПГУ-ын 5 багц праймеруудыг ХДВ-ийн халдваргүй сөрөг хяналтын дээжүүдэд харьцуулсан шинжилгээг хийж хамгийн сайн праймер багцыг сонгон авав. Туршилтаар 5-р багц праймер БХ-ПГУ-ын үр дүнтэй таарч байсан (Зураг 13) тул ХДВ-ийг илрүүлэх хамгийн сайн багц праймер хэмээн дүгнэсэн. Иймээс 5-р багц праймерыг сонгон авч цаашдын ЛАМП-ПГУ-ын судалгааны ажлыг гүйцэтгэв.



Зураг 61. ЛАМП-ПГУ-ын багц праймеруудын харьцуулалт. NC-Сөрөг хяналт, PC-Эерэг хяналт, H1-H5-Эрүүл буюу ХДВ халдваргүй дээжүүд

4.6.4.2. Өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ-ын илрүүлэх доод хязгаарыг тодорхойлсон үр дүн

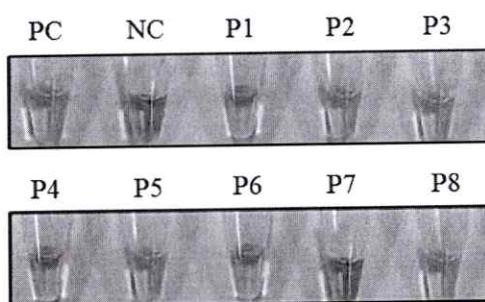
Өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ-ын илрүүлэх хязгаарыг ХДВ-РНХ-ийн дараалсан стандарт шингэрүүлгүүдээр тодорхойлов. Туршилтын үр дүнгээр бидний боловсруулсан арга зүйн ХДВ-ийг илрүүлэх хязгаар 57 IU/mL (**Зураг 14**) байсан бөгөөд энэ нь өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ хангалттай хэмжээний мэдрэг байгааг илтгэлээ.



Зураг 62. Өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ-ын илрүүлэх доод хязгаар. NC-Сөрөг хяналт

4.6.4.3. ХДВ-РНХ-ийг өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ-аар илрүүлсэн үр дүн

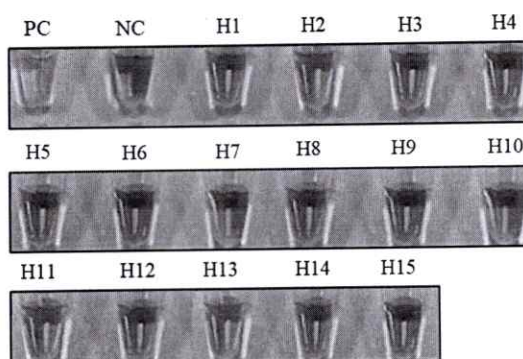
Тоон БХ-ПГУ-аар батлагдсан ХДВ-ийн халдвартай дээжүүдийг өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ-аар илрүүлэх туршилтыг хийсэн. Үр дүнгээр 1 хуурамч сөрөг (false negative) буюу ХДВ-ийн халдваргүй гарсан ба энэ нь тоон БХ-ПГУ-аар вирүс хамгийн бага тоологдсон дээж байв (**Зураг 15**). ЛАМП-ПГУ-ын праймерыг оновчтой зөв загварчлаагүй байх, зорилтод нуклейн хүчлийн концентраци бага байх, олшруулалтыг дарангуйлах ямар нэгэн бодис эсвэл хүний алдаа нь хуурамч сөрөг үр дүнд хүргэдэг.



Зураг 63. ХДВ-ийн халдварыг өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ-аар илрүүлсэн үр дүн. PC-Эерэг хяналт, NC-Сөрөг хяналт, P1-P8 нь ХДВ халдвартай дээжүүд

4.6.4.4. ХДВ-ийн халдваргүй эрүүл бүлэгт өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ-ыг туршсан үр дүн

БХ-ПГУ-аар ХДВ-ийн халдваргүй нь батлагдсан эрүүл дээжүүдийг өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ-ын арга зүйгээр туршиж, баталсан. Туршилтын үр дүнгээр вирусийн халдваргүй дээжүүд бүгд ягаан өнгөтэй, рН хэвийн буюу нуклейн хүчлийн олшруулалт явагдаагүй байгаа нь **Зураг 16**-өөс харагдаж байна. Мөн өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ-ын үр дүн БХ-ПГУ-ын үр дүнтэй таарав.



Зураг 64. Өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ-ыг эрүүл бүлэгт туршсан үр дүн. PC-Эерэг хяналт, NC-Сөрөг хяналт, H1-H15 ХДВ-ийн халдваргүй

4.6.5. Флуоресценц ЛАМП полимеразын гинжин урвалын үр дүн

4.6.5.1. ХДВ-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын тохиромжтой температурын нөхцөлийг тодорхойлсон үр дүн

ХДВ-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын тохиромжтой температурыг ХДВ-ийн өндөр халдвартай (5,000,000 IU/mL) дээжийн вирусийн РНХ-ийн 1х, 3х, 9х, 90х, 900х шингэрүүлгийг 65°C (Хүснэгт 18 болон График 5,6)-д болон 1х, 3х, 9х шингэрүүлгийг 68°C (Хүснэгт 19 болон График 7,8) болон 70°C (туршилтын үр дүнг оруулаагүй)- туршиж тодорхойлов. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын 65°C-ийн температурын нөхцөлд явуулсан туршилтын үр дүнгээр сөрөг хяналт бохирдолтой мөн диссоциацийн муруйнаас харахад ХДВ-ийн халдвартай 90х болон 900х дахин шингэрүүлсэн дээжийн флуоресценц бай бусад шингэрүүлгүүдээс ялгаатай өвөрмөц бус бүтээгдэхүүн үүссэн байв. Хэрэв ПГУ-аар өвөрмөц бус бүтээгдэхүүн үүсвэл праймер суух шатны температурыг 2-3°C нэмэгдүүлж болно гэсэн зарчмын үндэслэлд тулгуурлаж 65°C-ийг 68°C болгон нэмэгдүүлж урвалаар үүссэн өвөрмөц бус бүтээгдэхүүнийг арилгахыг зорьсон. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын 68°C дэх туршилтын үр дүнгийн диссоциацийн муруйгаас харахад судалгааны ажлын бай ХДВ-РНХ-ээс өөр флуоресценц сигнал илрээгүй мөн өвөрмөц бус бүтээгдэхүүн

үүсээгүй байгаа нь тус температурт өвөрмөц чанар сайн байгааг илтгэлээ. Диссоциацийн муруй зөвхөн 90.6°C-д илэрсэн. Харин температурыг 70°C болгон нэмэгдүүлэхэд ямар ч урвалын бүтээгдэхүүн үүсээгүй. Учир нь ЛАМП-ПГУ-д хэрэглэдэг Bst ДНХ полимераза энзим нь БХ-ПГУ-д ашигладаг Таq ДНХ полимераза энзим шиг өндөр температурт тэсвэртэй биш юм.

Хүснэгт 29. ХДВ-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын 65 °C дэх үр дүн

Шингэрүүлэлт	Шингэрүүлэлтийн зэрэг	IU/mL	Босго утга (dR)	Циклийн босго утга (dR)
1-р шингэрүүлэлт	1x	5,000,000	5260.608	28.39
2-р шингэрүүлэлт	3x	1,666,666	5260.608	23.00
3-р шингэрүүлэлт	9x	555,555	5260.608	22.44
4-р шингэрүүлэлт	90x	55,555	5260.608	30.30
5-р шингэрүүлэлт	900x	5,555	5260.608	30.87

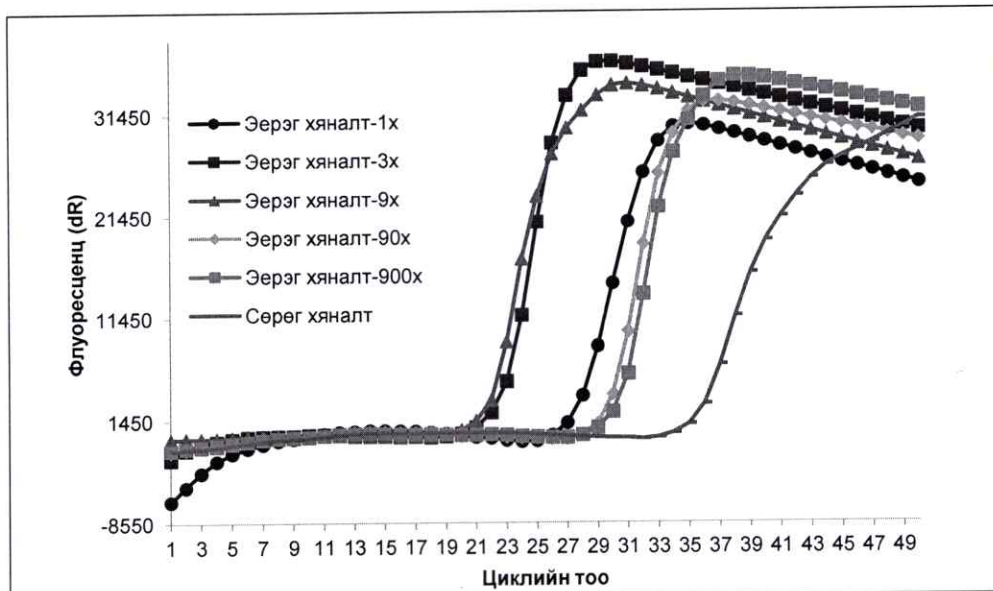


График 5. ХДВ-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын 65 °C дэх олишруулах муруй

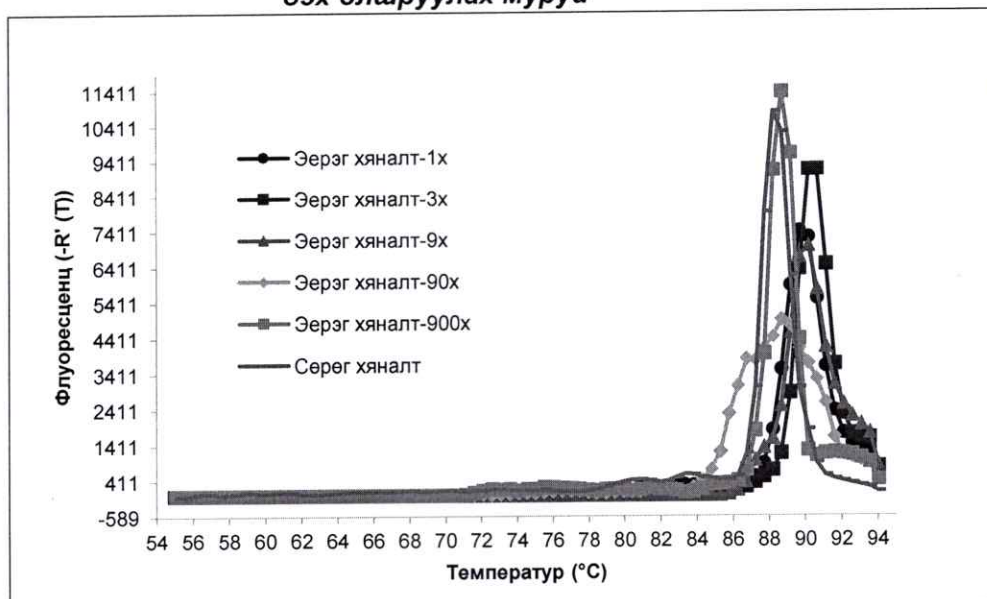


График 6. ХДВ-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын 65 °C дэх диссоциацийн муруй

Хүснэгт 30. ХДВ-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын 68 °C дэх үр дүн

Шингэрүүлэлт	Шингэрүүлэлтийн зэрэг	IU/mL	Босго утга (dR)	Циклийн босго утга (dR)
1-р шингэрүүлэлт	1х	5,000,000	6140.253	20.66
2-р шингэрүүлэлт	3х	1,666,666	6140.253	21.86
3-р шингэрүүлэлт	9х	555,555	6140.253	23.09

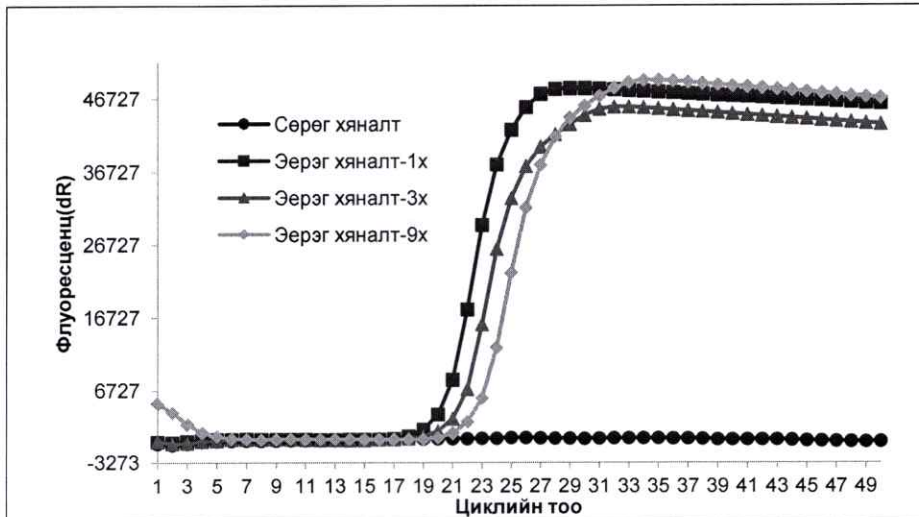


График 7. ХДВ-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын 68 °C дэх олишруулах муруй

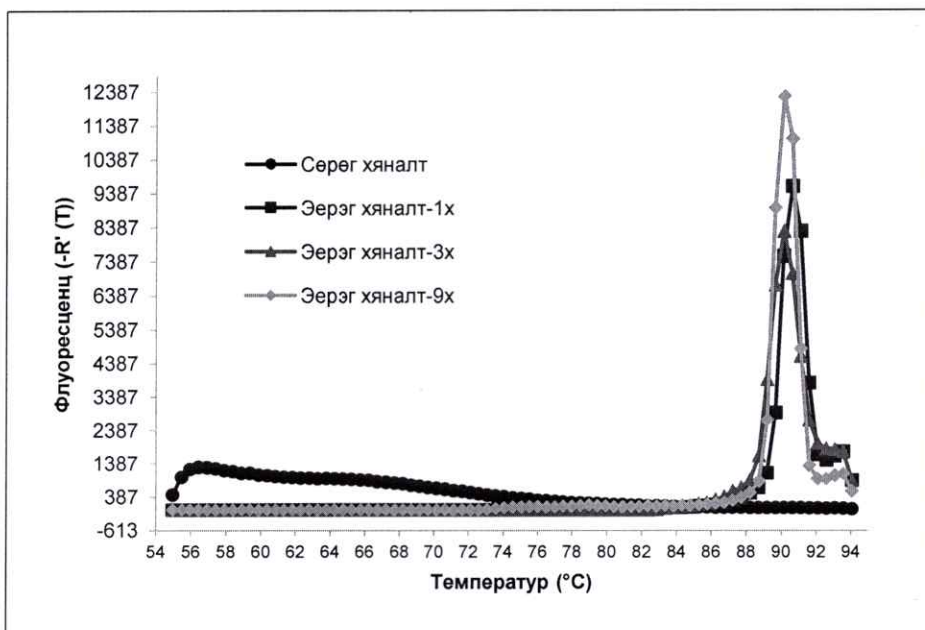


График 8. ХДВ-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын 68 °C дэх диссоциацийн муруй

4.6.5.2. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын илрүүлэх доод хязгаарыг тодорхойлсон үр дүн

Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын илрүүлэх хязгаарыг ХДВ-ийн стандарт шингэрүүлгүүдээр тодорхойлсон ба үр дүнгээр 10000х дахин шингэлсэн ХДВ-РНХ-ийг илрүүлж байгаа нь өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ-ын адил хангалттай хэмжээний мэдрэг чанартай байгааг харууллаа. Мөн диссоциацийн муруй 90.6°C- 90.8°C-д гарав (Хүснэгт 20 болон График 9, 10).

Хүснэгт 31. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын илрүүлэх доод хязгаар

Шингэрүүлэлт	Шингэрүүлэлтийн зэрэг	IU/mL	Босго утга (dR)	Циклийн босго утга (dR)
1-р шингэрүүлэлт	1х	$5 \cdot 10^5$	6277.536	14.12
2-р шингэрүүлэлт	10х	$5 \cdot 10^4$	6277.536	15.19
3-р шингэрүүлэлт	100х	$5 \cdot 10^3$	6277.536	16.26
4-р шингэрүүлэлт	1000х	$5 \cdot 10^2$	6277.536	17.39
5-р шингэрүүлэлт	10000х	$5 \cdot 10$	6277.536	19.07

График 9. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын илрүүлэх доод хязгаарын олшруулах муруй

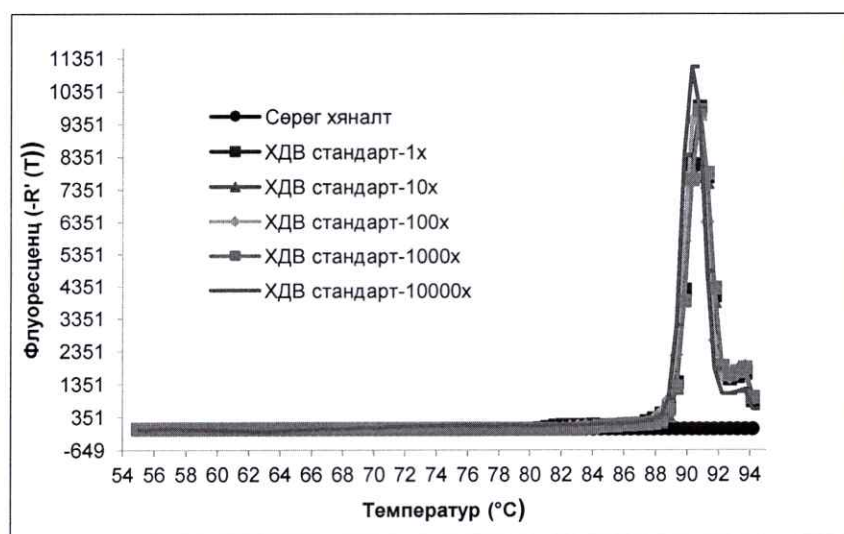
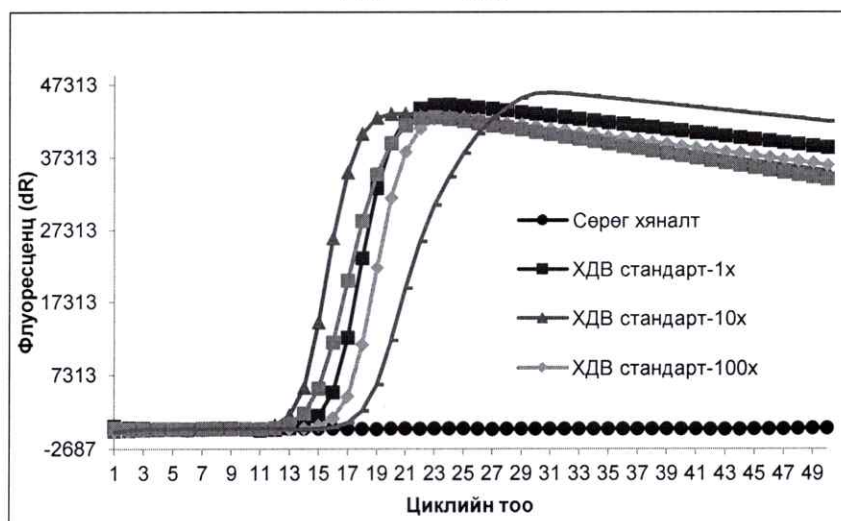


График 10. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын илрүүлэх доод хязгаарын диссоциацын муруй

4.6.5.3. ХДВ-РНХ-ийг флуоресценц ЛАМП-ПГУ-аар илрүүлсэн үр дүн

ХДВ халдвартай эерэг дээжүүдийг флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын арга зүйгээр мөн илрүүлэв. Энэ туршилтын үр дүнгээр флуоресценц ЛАМП-ПГУ нь ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэхэд БХ-ПГУ-аас илүү мэдрэг шинж чанартай байгаа нь циклийн босго утгаас харагдаж байна. Диссоциацийн муруйн үр дүнгээр ПГУ-аар өвөрмөц бус бүтээгдэхүүн үүсээгүй зөвхөн зорилтод ХДВ-РНХ дээр 90.7°C-д флуоресценц сигнал илэрсэн. Мөн өнгө үзүүлэгч ЛАМП-ПГУ-аар хуурамч сөрөг (false negative) гарсан ХДВ халдвартай дээж нь флуоресценц ЛАМП-ПГУ-аар вирүсийн халдвартай гарч БХ-ПГУ-ын үр дүнтэй таарав (Хүснэгт 21 болон График 11, 12).

Хүснэгт 32. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын ХДВ-ийн халдварыг илрүүлсэн үр дүн

Дээж	Босго утга (dR)	Циклийн босго утга (dR)
ХДВ өвчтөн 1	7182.334	15.42
ХДВ өвчтөн 2	7182.334	18.41
ХДВ өвчтөн 3	7182.334	15.54
ХДВ өвчтөн 4	7182.334	14.70
ХДВ өвчтөн 5	7182.334	15.46
ХДВ өвчтөн 6	7182.334	15.20
ХДВ өвчтөн 7	7182.334	17.72
ХДВ өвчтөн 8	7182.334	13.81
Сөрөг хяналт	7182.334	No Ct

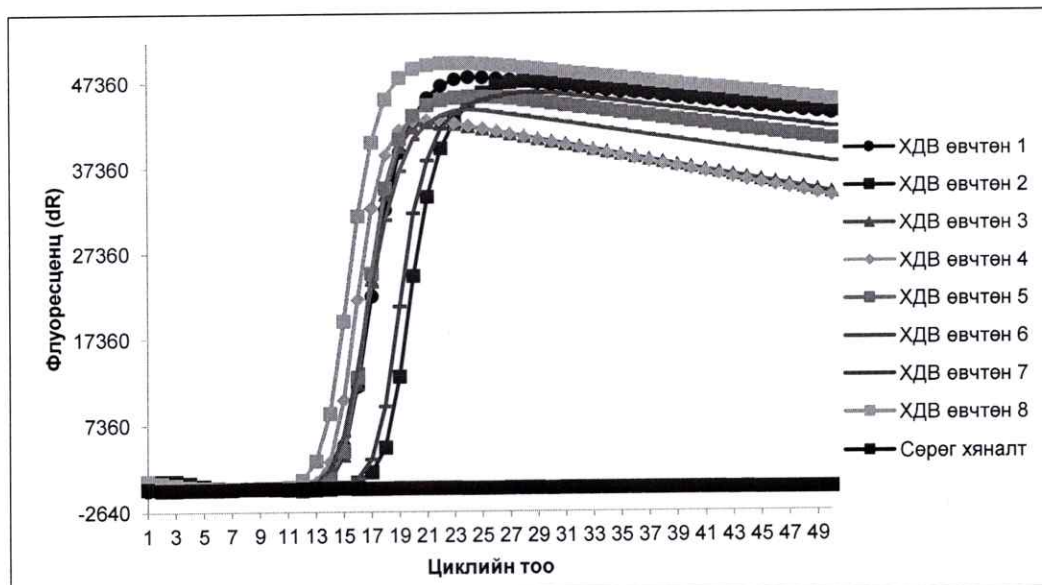


График 11. ХДВ-ийн халдварыг илрүүлсэн флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын олшруулах муруй

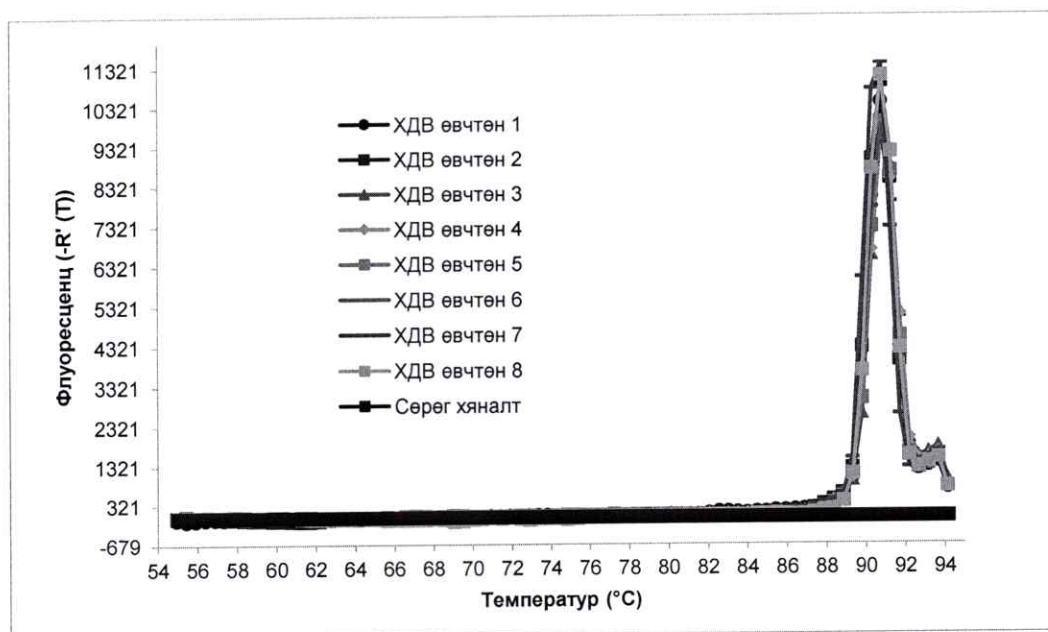


График 12. ХДВ-ийн халдварыг илрүүлсэн флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын диссоциацийн муруй

4.6.5.4. ХДВ-ийн халдваргүй эрүүл бүлэгт флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ыг туршсан үр дүн

БХ-ПГУ-аар батлагдсан ХДВ-ийн халдваргүй эрүүл дээжүүдийг флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын арга зүйгээр шалгахад бүгд халдваргүй гарч ямар нэгэн хуурамч эерэг (false positive) үр дүн байхгүй, өвөрмөц бус бүтээгдэхүүн үүсээгүй. Эерэг хяналтын диссоциацийн муруй зөвхөн 90.6°C-д гарсан (Хүснэгт 22 болон График 13, 14).

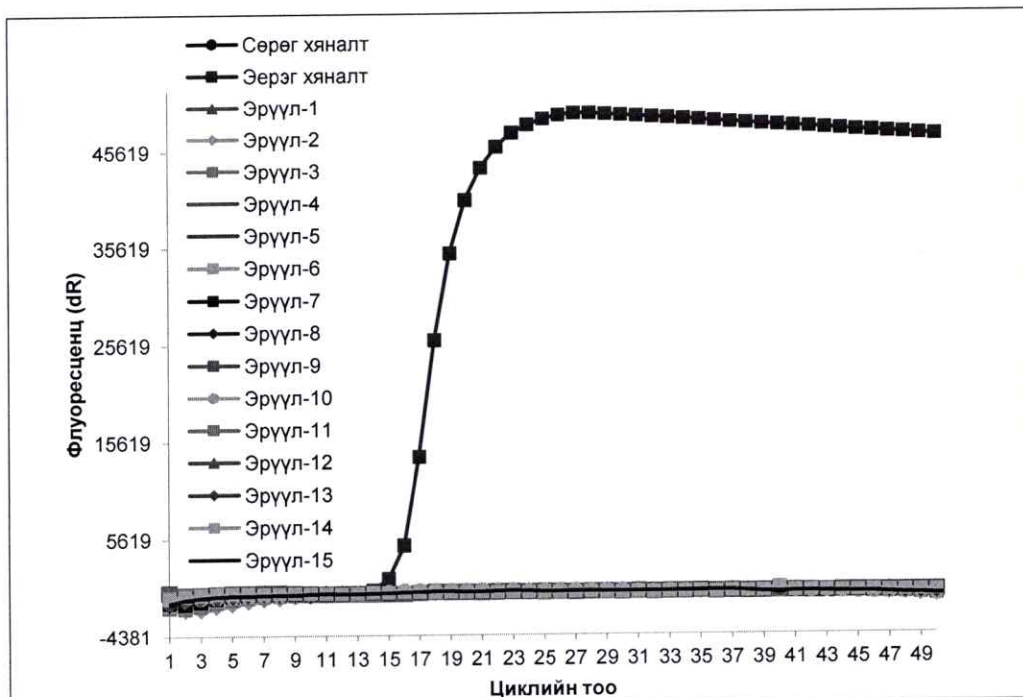


График 13. ХДВ-ийн халдваргүй эрүүл бүлэгт туршсан флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын олшруулах муруй

**Хүснэгт 33. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ыг эрүүл бүлэгт туршсан үр
дүн**

Дээж	Босго утга (dR)	Циклийн босго утга (dR)
Эрүүл-1	6538.908	No Ct
Эрүүл-2	6538.908	No Ct
Эрүүл-3	6538.908	No Ct
Эрүүл-4	6538.908	No Ct
Эрүүл-5	6538.908	No Ct
Эрүүл-6	6538.908	No Ct
Эрүүл-7	6538.908	No Ct
Эрүүл-8	6538.908	No Ct
Эрүүл-9	6538.908	No Ct
Эрүүл-10	6538.908	No Ct
Эрүүл-11	6538.908	No Ct
Эрүүл-12	6538.908	No Ct
Эрүүл-13	6538.908	No Ct
Эрүүл-14	6538.908	No Ct
Эрүүл-15	6538.908	No Ct
Эрүүл-16	6538.908	No Ct
Эерэг хяналт	6538.908	16.27
Сөрөг хяналт	6538.908	No Ct

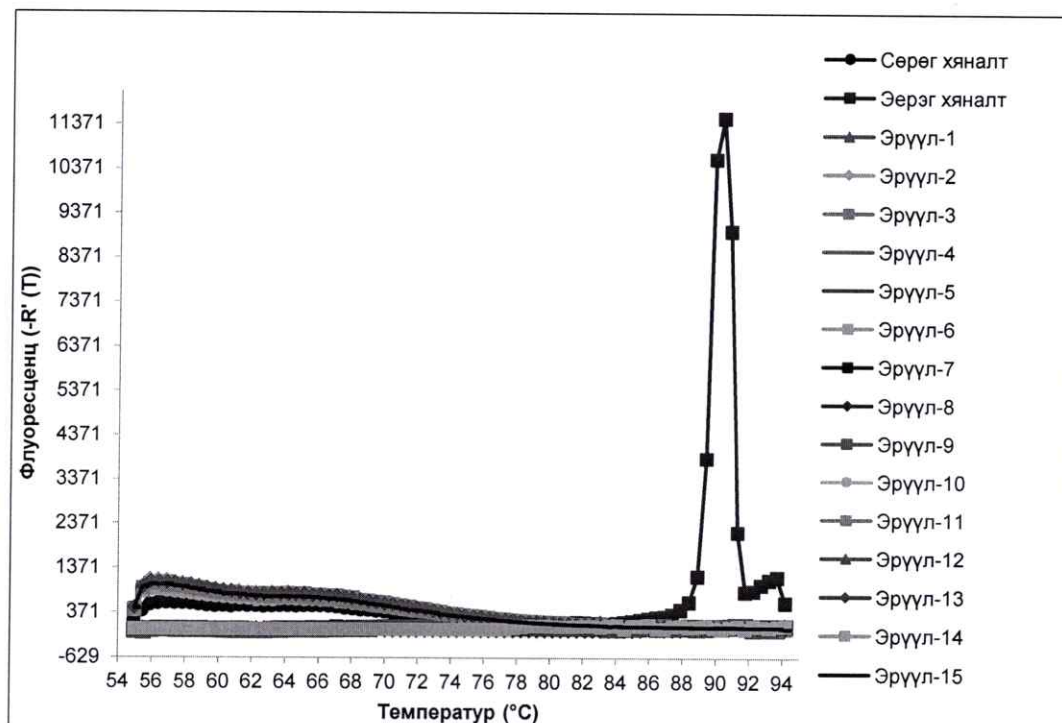


График 14. ХДВ-ийн халдваргүй эрүүл бүлэгт туршсан флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын диссоциацийн муруй

4.6.5.5. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын арга зүйгээр РНХ ялгалгүйгээр цусны ийлдэснээс ХДВ-ийг илрүүлсэн үр дүн

Молекул оношилгооны арга нь тухайн зорилтод бактери, вирусийн нуклейн хүчлийг олшруулж, илрүүлэх арга бөгөөд бичил организмын ДНХ болон РНХ-ийг биологийн дээжээс ялгахад багагүй цагийг зарцуулдаг. Иймээс нуклейн хүчил ялгалгүйгээр биологийн дээжээр ПГУ явуулахад вирус илрэх үү? аль эсвэл илрэхгүй юу? гэдгийг туршиж үзэхээр флуоресценц ЛАМП-ПГУ-аар 1)-ХДВ-ийн халдвартай дээжийн цусны ийлдэс, 2)-95°C-ийн өндөр температурт 15 мин инкубацилсан цусны ийлдэс, 3)-цусны ийлдэснээс ялгасан вирусийн РНХ зэргийг хооронд нь харьцуулав. Туршилтын үр дүнгээр флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын арга зүй нь ийлдэсээс ялгасан вирусийн РНХ-д нуклейн хүчил ялгаагүй ийлдэснээс илүү мэдрэг чанартай байгаа нь циклийн босго утгаас харагдаж байна (Хүснэгт 23). Диссоциацийн муруйгаар ХДВ халдвартай цусны өндөр температурт халаасан ийлдэс нь вирусийн РНХ-тэй адил флуоресценц сигналаар илэрсэн боловч олшруулах муруйнаас харахад ПГУ-ын экспонциалын өсөлтийг хамгийн оновчтой илэрхийлсэн нь ийлдэсээс ялгасан РНХ-ийн олшруулалт байсан (График 15, 16). Иймээс цуснаас нуклейн хүчил ялгах нь зөв юм гэдэг нь энэ туршилтын үр дүнгээр батлагдав.

Хүснэгт 34. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын ХДВ-РНХ болон халдвартай ийлдэсний илрүүлгийн үр дүн

Дээж	Босго утга (dR)	Циклийн босго утга (dR)
ХДВ-ийн РНХ	3646.462	13.85
ХДВ халдвартай цусны ийлдэс	3646.462	25.59
ХДВ халдвартай цусны өндөр температурт халаасан ийлдэс	3646.462	18.42

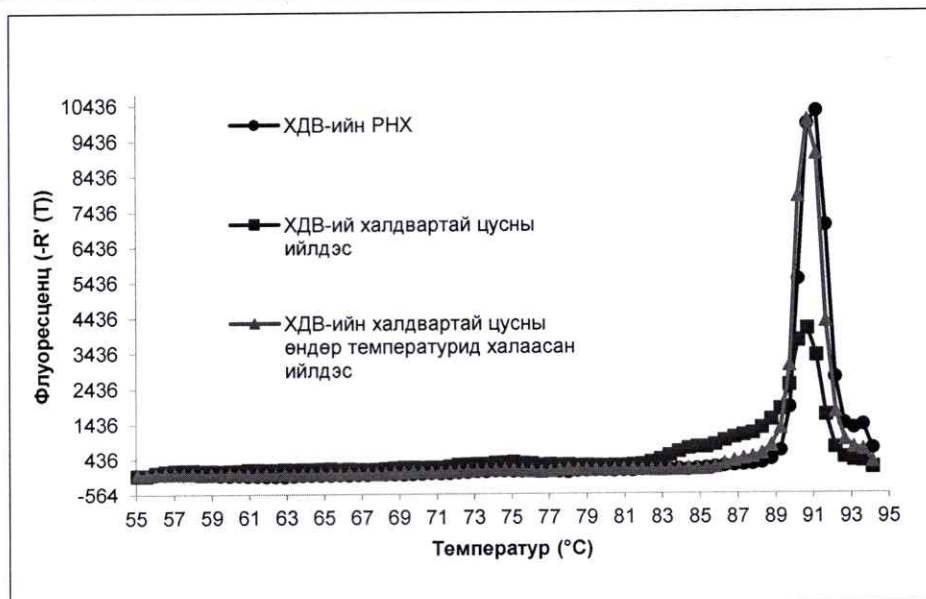


График 15. ХДВ-РНХ болон халдвартай ийлдэсний флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын диссоциацийн муруй

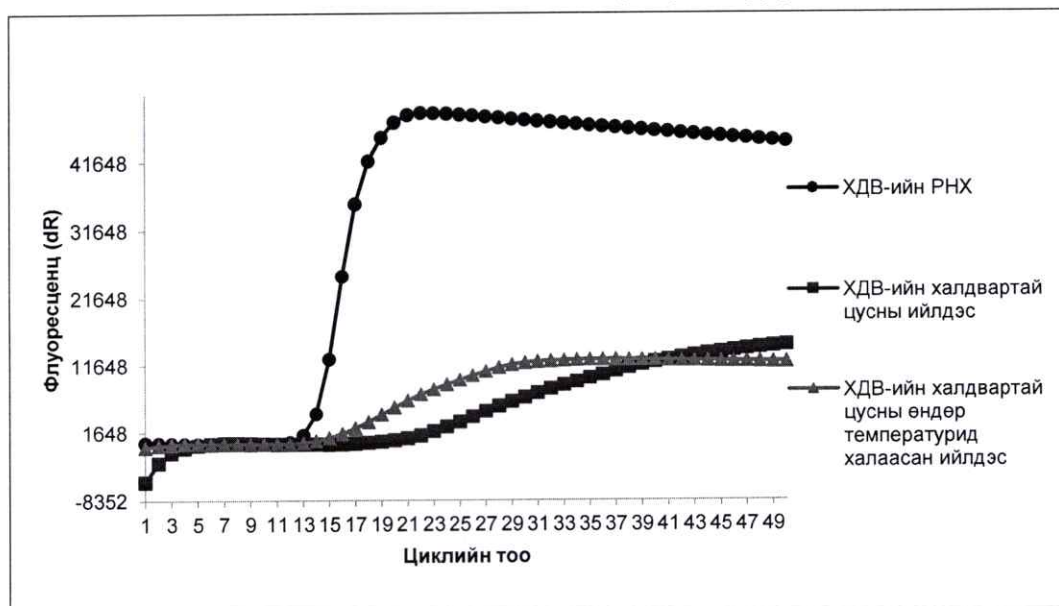
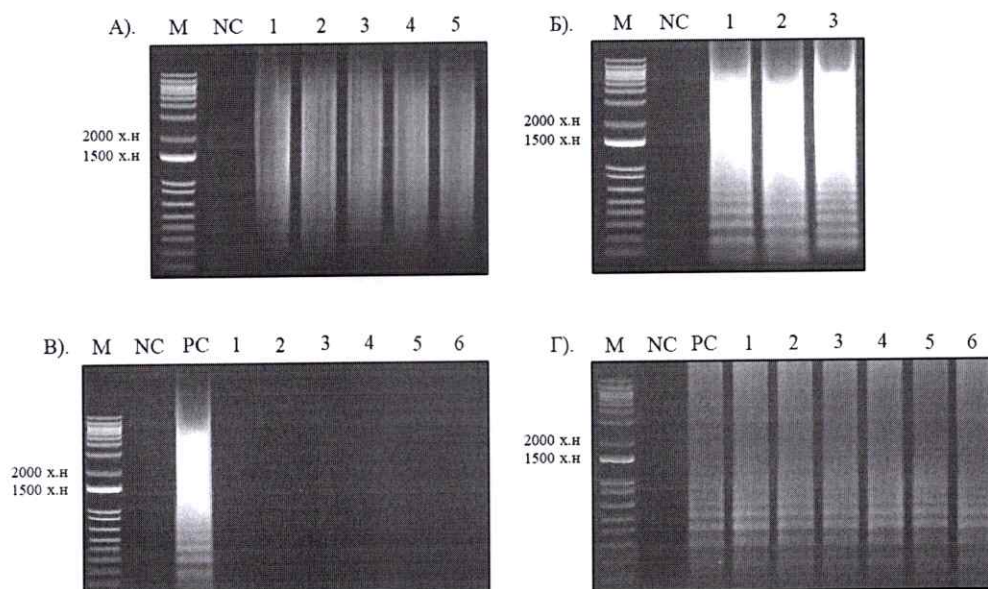


График 16. ХДВ-РНХ болон халдвартай ийлдэсний флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын олшруулах муруй

4.7. 3.4. Агароз гель электрофорезын үр дүн

ЛАМП-ПГУ-аар үүссэн ХДВ-ийн халдвартай болон халдваргүй бүтээгдэхүүнүүдийг уламжлалт молекулын арга болох агароз гель электрофорезын арга зүйгээр шалгав. Гельний үр дүнг ажвал нуклейн хүчлийн олшруулалт явагдсан ПГУ-ын бүтээгдэхүүн шатлал бүхий смир үүсгэсэн байгаа бол эсрэгээр вирүсийн РНХ байхгүй тохиолдолд ямар нэгэн смир, бэйнд үүсээгүй нь харагдаж байна. Мөн ХДВ-РНХ-ийг ЛАМП-ПГУ-ын арга зүйгээр илрүүлсэн нь агароз гельний үр дүнгээр

батлагдсан. **Зураг 20**-ийн Б-д ЛАМП-ПГУ-ын үр дүнд үүссэн ХДВ-ийн бүтээгдэхүүн болон өвөрмөц бус бүтээгдэхүүнийг агароз гелээр харьцуулахад смирийн шатлал ялгаатай байгаа нь 1 болон 2-р баганаас ажиглаж болно.

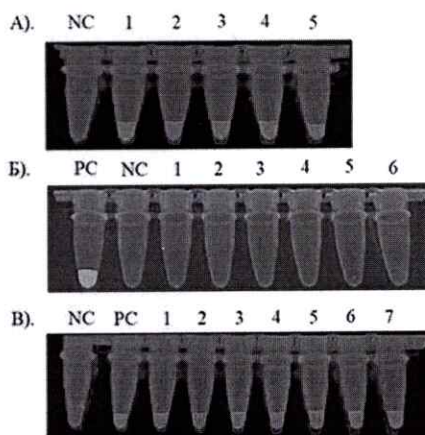


Зураг 65. ЛАМП-ПГУ-ын бүтээгдэхүүний агароз гель электрофорезын үр дүн.

А). ХДВ-ийн илрүүлэх хязгаарыг тодорхойлсон ЛАМП-ПГУ-ын бүтээгдэхүүн: NC-сөрөг хяналт, 1- ХДВ стандарт 1х, 2- ХДВ стандарт 10х, 3- ХДВ стандарт 100х, 4- ХДВ стандарт 1000х, 5- ХДВ стандарт 10000х Б). ЛАМП-ПГУ-аар үүссэн өвөрмөц бус бүтээгдэхүүн, РС-ээрэг хяналт, 1- ХДВ-РНХ, 2- ПГУ-аар үүссэн өвөрмөц бус бүтээгдэхүүн В). ХДВ халдваргүй эрүүл бүлэгт туршсан ЛАМП-ПГУ-ын бүтээгдэхүүн: Н1-Н8 ХДВ сөрөг (халдваргүй) Г). ХДВ-РНХ-ийг илрүүлсэн ЛАМП-ПГУ-ын бүтээгдэхүүн: Р1-Р8 ХДВ эерэг (халдвартай).

4.7.1. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг хөх туяаны гэрлээр шалгасан үр дүн

Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-аар үүссэн ХДВ-ийн халдвартай болон халдваргүй бүтээгдэхүүнүүдийг хэт ягаан туяаны гэрлийн хөх фильтр дээр шууд нүдээр үнэлж шалгахад ХДВ халдвартай дээж ногоон өнгөөр гэрэлтсэн бол халдваргүй дээж нь гэрэл цацаргаагүй юм (**Зураг 21**).



Зураг 66. Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг UV гэрлээр шалгасан үр дүн

А). Флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын илрүүлэх хязгаарыг үнэлсэн бүтээгдэхүүн хөх гэрэлд үзэгдэх байдал: NC-сөрөг хяналт, 1-ХДВ стандарт 1х, 2- ХДВ стандарт 10х, 3- ХДВ стандарт 100х, 4- ХДВ стандарт 1000х, 5- ХДВ стандарт 10000х Б). ХДВ халдваргүй эрүүл бүлэгт туршсан флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын бүтээгдэхүүн: PC-ээрэг хяналт, Н1-Н6 ХДВ сөрөг (халдваргүй) В). ХДВ-РНХ-ийг илрүүлсэн флуоресценц ЛАМП-ПГУ-ын бүтээгдэхүүн: P1-P8 ХДВ эерэг (халдвартай).

5. ГАДААД БОЛОН ДОТООДОД ҮР ДҮН ХЭВЛЭГДЭЖ, ХЭЛЭЛЦЭГДСЭН БАЙДАЛ

№	Үйл ажиллагаа	Зохиогдсон огноо	Нийтлэгдэж, хэлэлцэгдсэн хэлбэр	Нийтлэгдсэн сэдэв	Хавсралтын дугаар
1	EASL-2023 Европын элэг судлалын нийгэмлэгийн жилийн ээлжит чуулган	2023 оны 06 дугаар сарын 21-24	Ханын илтгэл	Development of ultra- sensitive enzyme linked immunosorbent assay for hepatitis delta virus antibody detection	Хавсралт 7
			Ханын илтгэл	Development of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of hepatitis delta virus	
			Ханын илтгэл	Development of one-step antigen immobilization based highly sensitive ELISA for HDV IgG detection	
			Ханын илтгэл	Successful development of LAMP-PCR assay for the detection of HDV RNA	
			Ханын илтгэл	Development of chemiluminescence based quantitative ELISA assay for detection of anti-HDV Ag	
2	“Delta-Cure-2023” олон улсын хурал	2023 оны 10 дугаар сарын 05-06	Ханын илтгэл		
3	“APASL-2024” Ази, Номхон далайн элэг судлалын нийгэмлэгийн жилийн ээлжит уулзалт	2024 оны 03 дугаар сарын 26-31	Ханын илтгэл		

6. ТӨСЛИЙН ҮР ДҮНГЭЭР ЭРДМИЙН ЗЭРЭГ ХАМГААЛСАН БАЙДАЛ

Эрдмийн зэрэг хамгаалсан хүн	Боловсролын байгууллага	Эрдмийн зэрэг	Хамгаалсан сэдэв	Хамгаалсан огноо	Хавсралтын дугаар
1 М.Бадмаараг	МУИС	Бакалавр	Хепатитын Дельта вирусийн халдварыг илрүүлэх түргэвчилсэн оношлуур зохион бүтээх	2020 он	Хавсралт 5
2 А.Номин	МУИС	Магистр	Хепатитын Дельта вирусийн халдварыг илрүүлэх гадаргуугийн плазмон резонанс дээр үндэслэсэн биосенсорыг зохион бүтээх	2021 он	
3 Э.Саруул	МУИС	Магистр	Хепатитын Дельта вирусийг илрүүлэх ЛАМП (Loop-Mediated Isothermal Amplification) полимеразын гинжин урвалын технологийн хөгжүүлэлт	2023 он	

7. ДҮГНЭЛТ

Хепатит дельта вирусийн нуклеокапсидын уургийг (HDAg) генийн инженерчлэлийн рекомбинат технологи ашиглан амжилттай гарган авлаа.

- HDAg уураг нийлэгжүүлэгч конструктыг ДНХ-ийн дараалал тогтоох аргаар шалгахад HDAg-ын генийн дараалал мөн болохыг баталсан.
- Уургийн гель электрофорез, вестерн блотын аргаар HDAg уургийн идэвхийг шалгаж оношлуурт хэрэглэх боломжтойг нотолсон.

Энэхүү HDAg рекомбинант уургаар ХДВ-ийн түргэвчилсэн оношлуурын прототип загварыг бүтээн угсарч, ХДВ-ийн халдвартай цуснаас HDV-Ab амжилттай илрүүлсэн.

- ХДВ-ийн халдвартай хүний цусны дээж болон эрүүл хүний цусны дээжинд зохион бүтээсэн ХДВ-ийн түргэвчилсэн оношлуурын ажиллагааг шалгахад өвчтэй хүний цуснаас халдварыг илрүүлж байгаа нь оношлуул зөв ажиллаж байгааг баталлаа.

Алтны нано хэмжээст ширхэгболон алтны нимгэн үе ашиглан хоёр төрлийн ГПР-ийн биосенсорыг ковалентын холболт ашиглан угсарсан.

- Алтны нано хэмжээст ширхэгсинтезлэн гадаргууд нь функционал бүлгүүдийг амжилттай суулгаж, HDAg ковалент холбоогоор холбосон болохыг баталсан.
- Алтны нанопартиклд тулгуурласан биосенсорыг амжилттай угсран, ГПР-ын багаж дээр анализ хийсэн боловч гадаргуугийн плазмоны үзэгдэл ажиглагдаагүй тул түүний учир шалтгааныг цаашид нарийвчлан тогтоох шаардлагатай байна.
- Алтны нимгэн үе дээр ХДВ-ийн гадаргуугийн антиген суулгах замаар гаргаж авсан биосенсорыг ашиглан ГПР-ын технологийн арга зүйгээр ХДВ-ийн халдварыг оношлох боломжтой болох нь харагдаж байна.

Гадаргууг функционалжуулах аргаар өндөр мэдрэг ФХЭБУ (ELISA) оношлуурын загваруудыг туршин оптимал нөхцөл тодорхойлон, серологийн шинжилгээ гүйцэтгэсэн.

- Өндөр мэдрэг ELISA нь ХДВ-ийн халдвартай хүний ийлдэсээс HDV-Ab илрүүлэн урвал явагдаж, өнгөний өөрчлөлт илэрсэн.

- ФХЭБУ оношлуурын чанарын баталгаажуулалтыг 180 хүний ийлдэс ашиглан хийсэн ба мэдрэг чанар 97.7%, өвөрмөц чанар 97.7% гэсэн үзүүлэлттэй байна.
- Энэхүү төслийн хүрээнд бүтээсэн ФХЭБУ оношлуурыг зах зээл дэх худалдааны цомогтой харьцуулан шинжлэхэд бусад ижил төрлийн бүтээгдэхүүнүүдтэй дүйцэхүйц чанартай болохыг илтгэж байна.

Түүнчлэн тус оношлуурууд нь хямд, хурдан технологи гэдэг нь энэхүү судалгааны ажлаар батлагдсан тул Монгол улсад цаашид нэвтрүүлэхэд нэн тохиромжтойн дээр иргэд хямд зардлаар серологийн оношлогоог хийлгэх бүрэн боломжтой гэдгийг харууллаа.

Энэхүү төслийн хүрээнд “Хепатит дельта вирусийн түргэвчилсэн оношлуур зохион бүтээх” сэдвээр Биоинженерчлэлийн Бакалаврын зэрэг 1 оюутан, “Хепатитийн дельта вирусийн халдварыг илрүүлэх гадаргуугийн плазмон резонанс дээр үндэслэсэн биосенсорыг зохион бүтээх” сэдвээр Магистрын зэрэг 1 оюутан тус тус хамгаалсан. “Хепатитийн дельта вирусийн халдварыг илрүүлэх өндөр мэдрэг ФХЭБУ (ELISA) оношлуурын хөгжүүлэлт” сэдвээр Биоинженерчлэлийн Докторын хөтөлбөрийн оюутан энэхүү судалгааг гүйцэтгэж байна.

АШИГЛАСАН МАТЕРИАЛЫН ЖАСГААЛТ

- [1] W. Raohael ба Т. Harley, Lateral Flow Immunoassay, Springer , 2009.
- [2] M. Katarzyna ба A. Gallotta, "Lateral flow assays," *Essays in biochemistry*, б. 60, pp. 111-120, 2016.
- [3] J. Homola, Surface plasmon resonance based sensors, Springer, 2006.
- [4] J. Vlachogiannakos ба G. V. Papatheodoridis, "New epidemiology of hepatitis delta," б. 40, pp. 48-53, 2020.
- [5] L.-Y. Chen, X.-Y. Pang, H. Goyal, R.-X. Yang ба H.-G. Xu, "Hepatitis D: challenges in the estimation of true prevalence and laboratory diagnosis," б. 13, %1-ийн д.д66, 2021.
- [6] R. M. Lequin, Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), 2005.
- [7] A. S, A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA., California,USA, 2015.
- [8] E. F. Vansant, P. Van Der Voort ба K. C. Vrancken, Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface, Elsevier, 1995.
- [9] S. K. Vashist, E. Lam ба S. Hrapovic, "Immobilization of Antibodies and Enzymes on 3-Aminopropyltriethoxysilane-Functionalized Bioanalytical Platforms for Biosensors and Diagnostics," *Chemical reviews*, 2014.
- [1 H. H. Weetall, "Preparation of immobilized proteins covalently coupled through silane
0] coupling agents to inorganic supports," *Applied biochemistry and biotechnology*, б. 41, %1-ийн д.д3, pp. 157-188, 1993.
- [1 V. S. Kumar, L. Edmond, H. Sbahudin, M. B. Keith ба L. John, "Immobilization of
1] antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics," *NRC Publications Archive*, б. 21, pp. 11083-11130, 2014.
- [1 Termo Scientific Microtiter Plate Guide.
2]
- [1 C. S. a. S. Roy-Chowdhuri, "Quantitative real-time PCR: Recent advances in
3] Methods in Molecular Biology," *Humana Press Inc*, %1-ийн д.дdoi:10.1007/978-1-4939-3360-0_15., p. 61–176, 2016.
- [1 Y. M. N. T. a. H. K. T. Notomi, "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP):
4] principle, features, and future prospects," *Journal of Microbiology*, Ботиуд. %2-ын

%153, no.1, Microbiological Society of Korea, %1-ийн д.дdoi:10.1007/s12275-015-4656-9, Jan. 17, 2015.

- [1 B. W. a. A. R. M. Soroka, "Loop-mediated isothermal amplification (Lamp): The better
5] sibling of pcr?," *Cells, MDPI*, Ботиуд. %2-ын %110, no. 8. , %1-ийн д.дdoi: 10.3390/cells10081931., Aug. 01, 2021.
- [1 S. D. a. S. Das, "Amplification chemistries in clinical virology," *Journal of Clinical
6] Virology, Elsevier B.V*, б. 115 , %1-ийн д.дdoi: 10.1016/j.jcv.2019.03.015., p. 18–31, Jun. 01, 2019.
- [1 "WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA).," NEB.
7] [Холбогдсон].
- [1 "Loop-Mediated isothermal amplification LAMP assay".
8]
- [1 T. N. e. al, "Loop-mediated isothermal amplification of DNA," 2000.
9]
- [2 S. S. P. K. D. P. V. L. R. a. K. M. M. M. Parida, "Loop mediated isothermal
0] amplification (LAMP): A new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases," *Reviews in Medical Virology*, Ботиуд. %2-ын %118, no. 6, %1-ийн д.дdoi: 10.1002/rmv.593., p. 407–421, Nov. 2008.
- [2 P. Held, "Using Phenol Red to Assess pH in Tissue Culture Media".
1]
- [2 [Холбогдсон]. Available: [https://en.wikipedia.org/wiki/6-Carboxyfluorescein#:~:text=6%2DCarboxyfluorescein%20\(6%2DFAM,emission%20wavelength%20of%20517%20nm](https://en.wikipedia.org/wiki/6-Carboxyfluorescein#:~:text=6%2DCarboxyfluorescein%20(6%2DFAM,emission%20wavelength%20of%20517%20nm).
2]
- [2 C. C. Huang ба Т. М. Liu, "Controlled Au-Polymer nanostructures for multiphoton
3] imaging, prodrug delivery and chemo-photothermal therapy platforms," *ACS Applied materials and interfaces*, б. 7, %1-ийн д.д45, pp. 25259-25269, 2015.
- [2 ". "https://www.cytodiagnosics.com/pages/introduction-to-gold-nanoparticle-
4] characterization.
- [2 V. Amendola, R. Pilot, M. Frasconi ба О. М. Marago, "Surface plasmon resonance in
5] gold nanoparticles: a review," *Journal of physics: Condensed matter*, б. 29, %1-ийн д.д20, 2017.
- [2 Г. Сүхдорж , "Шингээлтийн фотометрийн арга," %1-д *Анализын оптик аргууд* ,
6] 2007. pp. 7-23.
- [2 K. Aslan, C. C. Luhrs ба V. H. Perez-Luna, "Controlled and Reversible Aggregation
7] of Biotinylated Gold Nanoparticles with Streptavidin," *ACS Sustainable chemistry and engineering*, б. 4, %1-ийн д.д12, pp. 6435-6442, 2016.

- [2 J. A. Jonosh, F. Yazdian, R. Mansori ба М. Omid, "Localized surface plasmon
8] resonance biosensor for detection of serum prostate specific antigen in prostate
cancer patients," б. 13, %1-ийн д.д4, pp. 2273-2279, 2016.
- [2 S. J. Yoon ба D. Kim, "Target dependence of the sensitivity in periodic nanowire
9] based localized surface plasmon resonance biosensors," *Journal of the optical
society of America A*, б. 25, %1-ийн д.д3, pp. 725-735, 2008.
- [3 B. A. Sexton, B. N. Feltis ба Т. J. Davis, "Characterisation of gold surface plasmon
0] resonance sensor substrates," *Sensors and Actuators A*, б. 141, %1-ийн д.д2, pp.
471-475, 15 February 2008.
- [3 R. M. Lequin, "Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
1] (ELISA)," *Clinical chemistry*, б. 51, %1-ийн д.д12, pp. 2415-2418, 2005.
- [3 S. Aydin, "A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory
2] experience with peptide/protein analyses using ELISA," *Peptides*, б. 72, pp. 4-15,
October 2015.
- [3 Y. M. N. T. a. H. K. Tsugunori Notomi, "Loop-mediated isothermal amplification
3] (LAMP): principle, features, and future prospects," *Journal of Microbiology*, Ботгуд.
%2-ын %11-5, p. 53, 2015.
- [3 S. D. S. Dunbar, "Amplification chemistries in clinical virology," *Journal of Clinical
4] Virology*, б. 115, pp. 18-31, 2019.
- [3 K. Shirato, "Detecting amplicons of loop-mediated isothermal amplification,"
5] *Microbiology and Immunology, Wiley*, б. 63, pp. 407-412, 2019.
- [3 X. S. J. L. a. L. Z. C. Wang, "Development of a reverse transcription-loop-mediated
6] isothermal amplification (RT-LAMP) system for rapid detection of HDV genotype 1,"
Letters in Applied Microbiology, б. 56, pp. 229-235, 2012.
- [3 A. K. Akobeng, "Understanding diagnostic tests1: Sensitivity, specificity and
7] predictive values," *Acta paediatrica*, б. 96, pp. 338-341, 2006.

Эрүүл мэндийн яам, анагаах ухааны ёс зүйн хорооны тогтоол
ХАВСРАЛТ 1**Эрүүл мэндийн яам, анагаах ухааны ёс зүйн хорооны тогтоол****ЭРҮҮЛ МЭНДИЙН ЯАМ
АНАГААХ УХААНЫ ЁС ЗҮЙН ХЯНАЛТЫН ХОРООНЫ
ТОГТООЛ**

2021 оны 06 дугаар сарын 30-ны өдөр

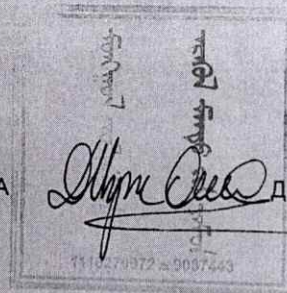
№243

210648 Улаанбаатар хот 6
Сүхбаатар дүүрэг,
Олимпийн гудамж-2,
Засгийн газрын VIII байр,
Эрүүл мэндийн яам
Утас: 261845, Факс:323541

Анагаах ухааны ёс зүйн хяналтын хорооны 2021 оны 06 дүгээр сарын 30-ны өдрийн 08 дугаар хурлын тэмдэглэлийг үндэслэн ТОГТООХ нь:

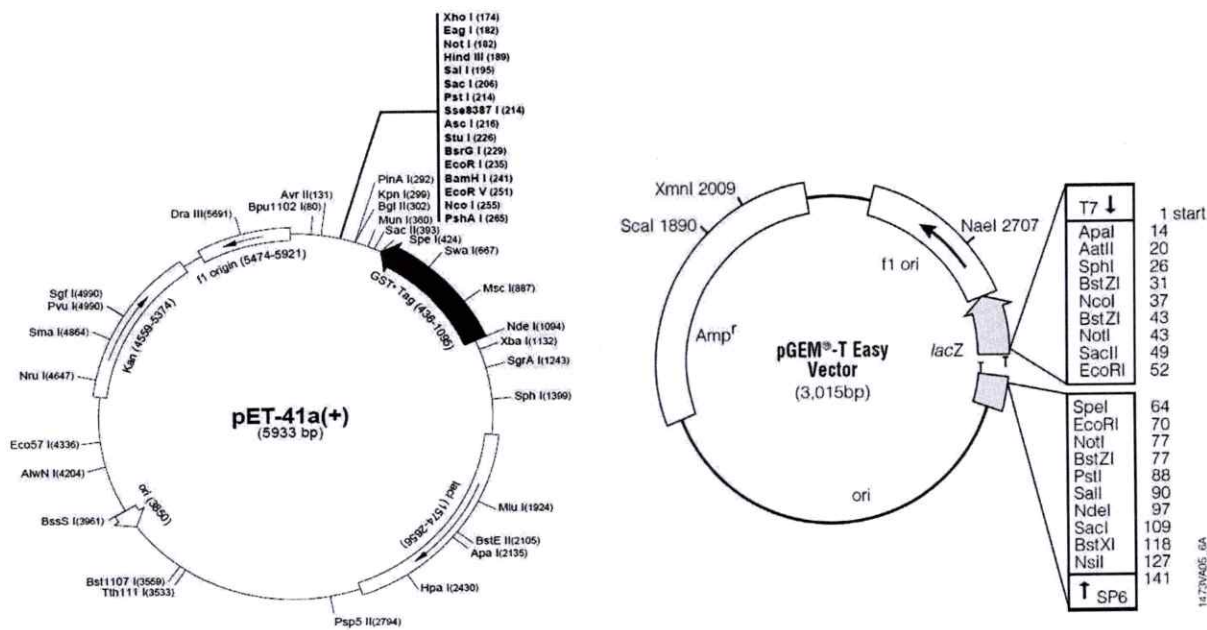
1. "Sars-CoV2 ба Хепатитийн дельта вирусийн халдварыг илрүүлэх шинэ үеийн серологийн оношлууруудыг зохион бүтээх" сэдэвт судалгааны ажлыг судалгааны ажлыг БУ-ны доктор О.Одгэрэлийн удирдлаган дор 2021-2022 онд багтаан хэрэгжүүлэхийг зөвшөөрсүгэй.
2. Судалгааны явцад тодорхой шалтгааны улмаас арга аргачлал өөрчлөгдөх, гадаад орон луу сорьц тээвэрлэх, Хельсинкийн тунхаглалд туссан ёс зүйн асуудал хөндөгдсөн тохиолдолд анагаах ухааны ёс зүйн хяналтын хороонд мэдэгдэж байхыг судалгааны багийнханд үүрэг болгосугай.
3. Судалгааны явцын болон төгсгөлийн тайланг судалгаа дууссан хугацаанаас хойш 2 сарын дотор багтаан анагаах ухааны ёс зүйн хяналтын хороонд ирүүлэхийг төслийн удирдагчид үүрэг болгосугай.

ДАРГА



Д.ЦЭРЭНДАГВА

ХАВСРАЛТ 2 Плазмидын вектор



T7 promoter lac operator XbaI rbs NdeI
 AATTAATACGACTCACATATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCTCCTAGAAATAATTTGTGTTAACTTAAGAAGGAGATACATATGTCCTCCT
 Met Ser Pro

GST-Tag SpeI His-Tag SacII
 ATACTAGGTTAT...627bp... GACCATCCTCCAAAATCGGATGGTTCACACTAGTGGTCTGGGTCATCACCATCACCATCACCCTCCGGGGTCTGGTGCCACCGCGGTAGT
 Ile Leu Gly Tyr ...209aa... Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly His His His His His Ser Ala Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser

MunI S-Tag S-Tag primer #69945-3 BglII KpnI PstI PshAI
 ACTGCAATTGGTATGAAGAACCCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCATGGACAGCCAGATCTGGGTACCGGTGGTGGCTCCGGTGATGACGACGACAAG
 Thr Ala Ile Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly Asp Asp Asp Asp Lys
 enterokinase

PstI EagI His-Tag
 NcoI EcoRV BamHI EcoRI BsrGI StuI AscI Sse8387I SacI Sall HindIII NotI XhoI
 AGTCCCATGGGATATCGGGGATCCGAATTCGTACAGCCCTTGGCGCCCTGCGAGGGGAGCTCCGTGACAAAGCTTGGCGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCACCACTAATTGATTAA
 Ser Pro Met Gly Tyr Arg Gly Ser Glu Phe Cys Thr Gly Leu Gly Ala Pro Ala Gly Glu Leu Arg Arg Gln Ala Cys Gly Arg Thr Arg Ala Pro Pro Pro Pro Pro Leu Ile AspEnd

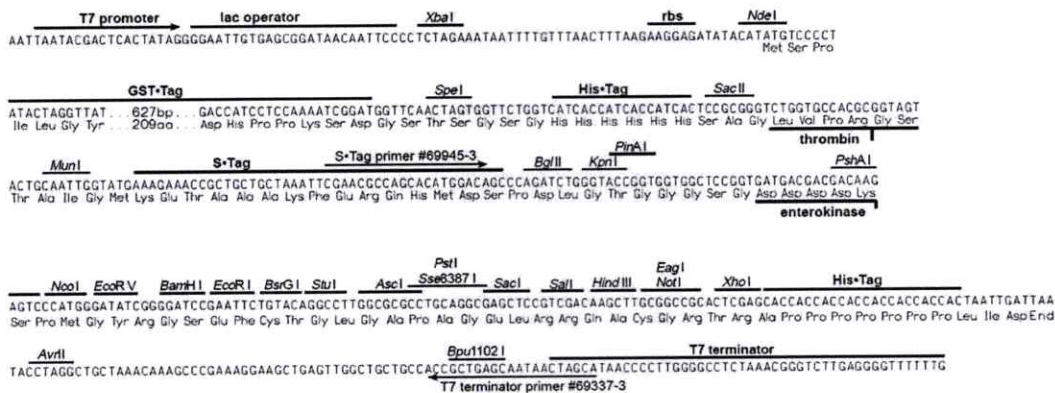
AvrII Bpu1102I T7 terminator
 TACCTAGGCTGCTAAACAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTGGGGCCCTAAACGGGCTTGGGGGTTTTTTTGT
 T7 terminator primer #69337-3

pET41a(+) векторын клонинг/экспрессийн бүс

ХАВСРАЛТ 3

HDAg-His рекомбинант уургийн нуклеин хүчлийн дараалал
"PASTA"

CATATGAGCCGTAGCGAATCTCGTAAAAACCGTGGTGGTCGTGAAGAAATTCTGGA
ACAGTGGGTGGCGGGTCGTAAAAAACTGGAAGAACTGGAACGTGATCTGCGTAAA
ACCAAAAAGAACTGAAAAAAATTGAAGATGAAAACCCGTGGCTGGGTAACATTA
AGGTATTCTGGGTAAAAAAGATAAAGATGGTGAAGGTGCGCCGCCGGCGAAACGT
GCGCGTACCGATCAGATGGAAGCGGATAGCGGTCCGGGTAAACGTCCGCTGCGT

***pET41a(+)* векторын клонинг/экспрессийн бүс**

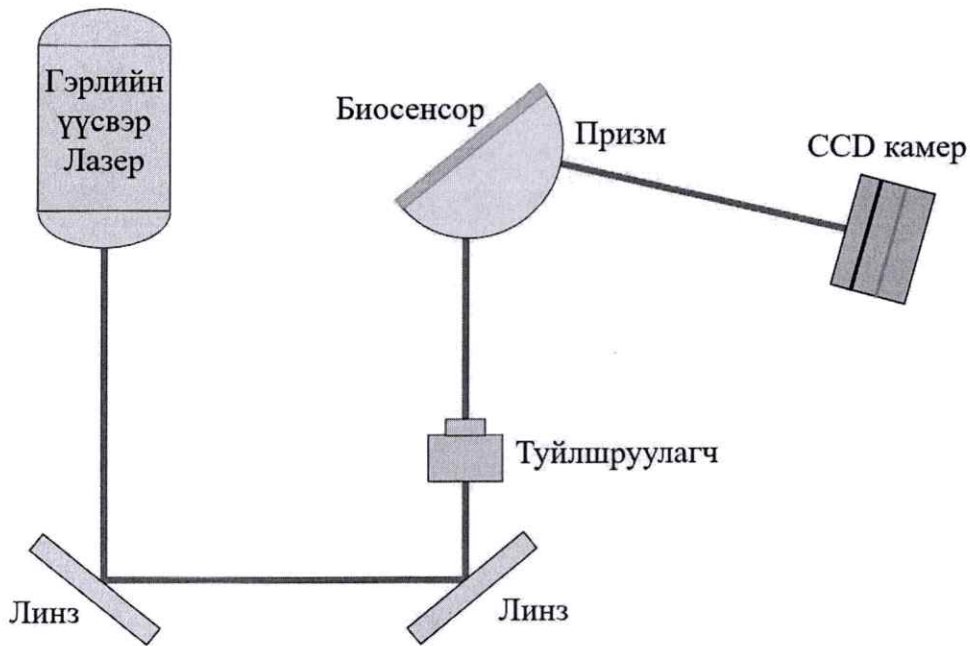
GGTGGTTTTACCGATAAAGAACGTCAGGATCATCGTCGTCGTAAAGCGCTGAAAA
ACAAAAAGAAACAGCTGAGCGCGGGTGGTAAAAACCTGAGCAAAGAAGAAGA
AGAACTGCGTCGTCTGACCGAAGAAGATGAACGTCGTGAACGTCGTGTGGCGGGT
CCGCCGGTGGGTGGTGTGAACCCGCTGGAAGGTGGTAGCCGTGGTGCGCCGGG
TGGTGGTTTTCGTGCCGAACCTGCAGGGTGTGCCGGAAAGCCCGTTACGCCGTAC
CGGTGAAGGTCTGGATATTCGTGGTAACCAGGGTTTCCCGAAGCTTGCGGCCGCA
CTCGAGCACCACCACCACCACCACCACTAA

HDAg-His рекомбинант уургийн амин хүчлийн дараалал

MSRSESRKNRGGREEILEQWVAGRKKLEELERDLRKTKKLKKIEDENPWLGNIGIL
GKKDKDGEAPPKRARTDQMEADSGPGKRPLRGGFTDKERQDHRRRKALENKKK
QLSAGGKNLSKEEEEEELRRLTEEDERRRERVAGPPVGGVNPLEGGSRGAPGGGFVP
NLQGVPEPFSRTGEGLDIRGNQGFPLAAALEHHHHHHHHH

ХАВСРАЛТ 4

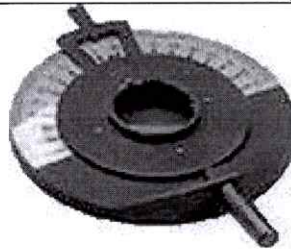
Гадаргуугийн плазмон резонансын багаж



Лазерын судалгааны төвд угсарсан ГПР-ын багажны схем

Д/д	Төхөөрөмж	Зураг	Тайлбар
1	Лазер		Thorlabs-ын HNL 150LB загварын 15мВ улаан (632.8 нм) HeNe (гели неон) шугаман (500:1 туйлшралын зэрэгтэй) лазер.
2	Призм		BK7 шилээр хийгдсэн хагас цилиндр призм.

3 Туйлшруулагч



Phywe компанийн
туйлшруулагч филтер.

4 Филтер



Thorlabs-ийн NDC-50S- 1M
алхам хувьсах, оптик нягт
0.04 – 0.1, ND филтер.

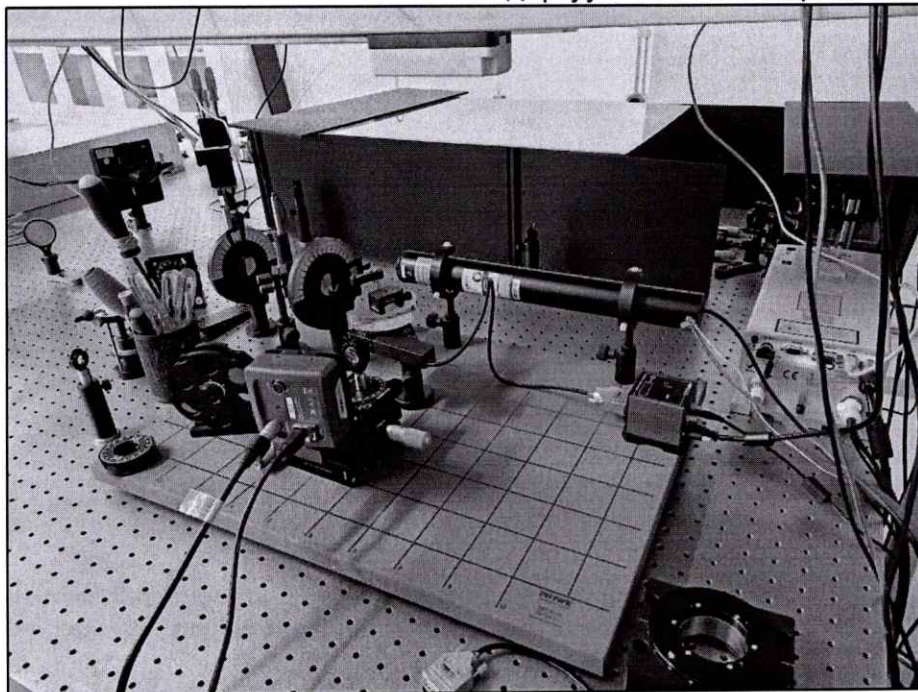
5 Моторт
эргэлтийн
тавцан

Thorlabs-ийн HDR50
загварын моторт эргэлтийн
тавцан. 50 кг хүртэлх ачаа
даах чадвартай, 50 мм-ийн
тунгалаг апертуртай

6 CCD камер




Thorlabs-ийн 4070C- USB-
TE загварын 4
мегапикселийн CCD камер.
40 МГц-ийн
секундэд 25.8 кадрыг
унших чадалтай сенсор
бөгөөд микроскоп болон
бусад шинжлэх ухааны
өндөр шаардлага бүхий
дүрслэх програмуудад
зориулагдсан .



Лазерийн судалгааны төвд шинээр угсарсан ГПУ багаж

ХАВСРАЛТ 5


Төслийн судалгааны хүрээнд эрдмийн зэрэг хамгаалсан оюутнуудын диплом




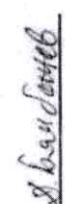
МОНГОЛ УЛС
МОНГОЛ УЛСЫН ИХ СУРГУУЛЬ
БАКАЛАВРЫН ДИПЛОМ

Дугаар D202017779

Монгол улсын ирэн Монхжийн БАНДМАРЛАГ нь
2020 онд Хэрэглээний технологийн ухаан, инженерийн сургуульд
БНЮ-УНЖСНЕРЧЛЭЛ
мэргэжл (D 078803)-ыг суралзан төгссөн туя төлсөлтийн комиссын
2020 оны 06 дугаар сарын 11-ний өдрийн шийдвэрийн үндсэн,
Зөвлөлийн 2020 оны 06 дугаар сарын 12-ны өдрийн А/144 тоот тушаалаар
УНЖСНЕРЧЛЭЛЭЙН УХААНЫ БАКАЛАВР-ийг зэрэг олоов.



Проф. Д. Д. Чирванчик
Холбоотой байгууллын дарга
1117144786
УХД0072 9104399



Проф. Д. Д. Чирванчик
Дэд зөвлөх, Д. Д. Чирванчик
Засаг
23А
УНЖСНЕРЧЛЭЛЭЙН УХААНЫ БАКАЛАВР



Д. Д. Чирванчик
Хэрэглээний технологийн ухаан,
инженерийн сургуулийн дарга

2020.08.12
Нийслэлийн Сурвалжын Засаг захиргаа
Холбоотой байгууллын Утга зохиолын үйлчилгээний төв
Урьдчилсан гэрээний дугаар 1000
Нотариал

Хэрэглээний дугаар 5968









МОНГОЛ УЛС
МОНГОЛ УЛСЫН ИХ СУРГУУЛЬ
МАГИСТРЫН ДИПЛОМ

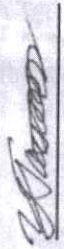
Дугаар E20214087


Монгол улсын ирэн Ардунсэрхийн ЮУМЭИ нь
2021 онд "Хөгжлийн далай бүрэлдэх хөдөлгөөний плазмон резонанс дээр
үндэслэн биосенсорын зохион бүтээх" сэдвээр дипломын ажил бийж хамгаалсан тус магистрын ажил
хамгаалуулах зөвлөлийн шийдвэрийн үндсэн дээр 2021 оны 06 дугаар сарын 10-ны өдрийн
А/133 тоот тушаалаар

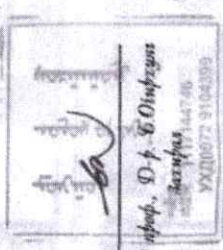
ИНЖЕНЕРЧДЭЛЭЙН ХААНЫ МАУИСИР-ийн
Зөргө олов.



Д.Н. С. Байарбаяр
Урьдчилж зөвлөлийн дарга


Проф. Д.Н. Байарбаяр
Эхлэсэн төрлийн сургуулийн захирал


Проф. Д.Н. Ч. Замсурс
Хөгжлийн зөвлөлийн дарга


Бүртгэлийн дугаар 09877


Дэд проф. Д.Н. Б. Ойролзон
Фактас 447/86
УХД1077 9104399





МОНГОЛ УЛС
МОНГОЛ УЛСЫН ИХ СУРГУУЛЬ
МАГИСТРЫН ДИПЛОМ

Дугаар E20235307

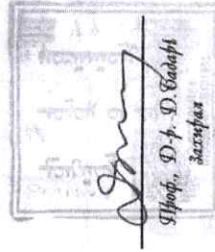
Монгол улсын иргэн Энхжаргалын САРУУЛ нь

2023 онд "Хөгжмийн Делата вирусийн илрүүлэх ААМЭ полимеразын тийжн урвалын технологийн хөгжүүлэлт" сэдвээр дипломын ажил бүтээж хамгаалсан тул магистрын ажлыг хамгаалуулах Зөвлөлийн шийдвэрийн үндсэн дээр 2023 оны 06 дугаар сарын 12-ны өдрийн А/239 тоот тушаалаар


ИНЖЕНЕРЧЛЭЛИЙН УХААНЫ МАГИСТР-ыг


зэрэг олгов.


М.Батсэрэн
Зочиход Зөвлөлийн дарга




Проф. Д.Д.Бадрах
Засрагч


Проф. Д.Н.Галамбаев
Ажлын түргэний сургуулийн Засрагч


Проф. Р.Чимэдрин
Хамгаалуулах Зөвлөлийн дарга



Бүртгэлийн дугаар 11102



ХАВСРАЛТ 6

Төслийн үр дүн дотоодод хэлэлцэгдсэн хурал, өгүүллүүд

Хүрэлтогоот, байгалийн ухааны салбар 2020

ᠬᠤᠷᠡᠯᠲᠣᠭᠣᠲᠤ, ᠪᠠᠶᠢᠭᠠᠯᠢᠶᠢᠨ ᠤᠬᠠᠨᠢ ᠰᠠᠯᠪᠠᠷ 2020



БОЛОВСРОЛ,
ШИНЖЛЭХ УХААНЫ ЯАМ



МОНГОЛЫН
ЗАЛУУ ЭРДЭМТДИЙН
ХОЛБОО



ШИНЖЛЭХ УХААН
ТЕХНОЛОГИЙН
САН



МОНГОЛ УЛСЫН
ШИНЖЛЭХ УХААНЫ
АКАДЕМИ



ГАРААНЫ
ТЕХНОЛОГИЙН
ИНКУБАТОР ХХК



БАЙГАЛИЙН УХААНЫ САЛБАРЫН
ЗАЛУУ ЭРДЭМТДИЙН ХОЛБОО

**ХҮРЭЛТОГООТ-2020
ЭРДЭМ ШИНЖИЛГЭЭНИЙ
ХУРЛЫН ЭМХЭТГЭЛ**



MEKEI
FOUNDATION



KhanLab
Khan Laboratory System



МОНХИМО



Synaps



ISBN 978-9919-20-815-8

УЛААНБААТАР ХОТ
2020 ОН

ХЕПАТИТ ДЕЛЬТА ВИРУСИЙН ТҮРГЭВЧИЛСЭН ОНОШЛУУРЫГ ПРОТОТИП БАЙДЛААР ЗОХИОН БҮТЭЭХ

М.Бадмаараг¹, Б.Заяа¹, Б.Хишигсүрэн¹, Н.Хулан¹ О.Одгэрэл^{1,2}

¹МУИС, Хэрэглээний шинжлэх ухаан, инженерчлэлийн сургууль, Хими биологийн инженерчлэлийн тэнхим, Генийн инженерчлэлийн лаборатори
²Элэгний төв

E-Mail: badaa0623@gmail.com, khunnustar@yahoo.co.uk

Abstract

In Mongolia, the main reason for liver disease and death caused by liver disorder is that hepatitis D virus infection is a high prevalence in the population. Nonetheless, the rapid test research of the hepatitis D virus is insufficient, which is the core validity of this research. We synthesized the gene of wild type nucleocapsid of hepatitis D virus that is optimized in genetic codon to cooperate with the E.Coli transcription system. Ni-NTA, affinity chromatography method, is used to separate the recombinant protein that will be dialyzed to gather pure products. Then, the protein is experimented to make a rapid test prototype. We did a comparative experiment between the blood of the control group and infected blood, in order to prove the rapid test function.

Key word: Hepatitis delta virus antigen (HDV-Ag), recombinant protein, antibody (anti-HDV IgG)

ОРШИЛ

Хепатит дельта вирус (HDV) нь элэгний өвчлөл үүсгэдэг шалтгаануудын нэг бөгөөд хепатит В вирусийн (HBV) гадаргуун антигенийг ашиглах замаар HBV-тэй давхар халдварлагддаг. HBV болон HDV-ийн давхар халдвартай хүнд элэгний дутагдал, элэгний хатуурал, элэгний хавдар (HCC) болох процесс HBV-ийн дан халдвартай байх үеэс илүү хурдацтай байдаг [1] [2] [3] [4].

HDV-ийн тархалт нь HBV-ийн халдвар тээгчдийн 13.02-14.57%-тай буюу 48-60 сая хүнийг хамарч байна [1] [2] [3]. Харин Монгол улсын хувьд нийт хүн амын 10.6% нь HBV-ийн халдвартай, үүний 67% нь HDV-ийн халдвартай байна (нийт хүн амын 7.2%). HD-Ab-ийн шинжилгээ эерэг хүмүүст HDV-PHX-ийн

шинжилгээ хийсэн үр дүнд Монгол улсын нийт хүн амын 4.5% нь архаг HDV-ийн халдвартай байна [4]. Монгол улс хепатит вирусийн халдварын тархалт болон элэгний өвчлөлөөс шалтгаалсан нас баралтаар дэлхийд нэгдүгээрт, элэгний өвчлөлөөрөө найм дугаарт байгаагийн гол шалтгааны нэг нь HDV-ийн халдварын тархалт их байгаатай холбоотой юм [4] [5].

Дэлхий дахинд одоогоор HDV-ийн оношлогоог фермент холбоот эсрэг биеийн урвалаар (ELISA) илрүүлдэг бөгөөд энэ арга нь лабораторийн нөхцөлд тусгай багаж ашиглан хийдэг, шинжилгээ 2-3 цаг үргэлжилхээс гадна нэг шинжилгээ хийхэд олон тооны дээж цуглуулах шаардлагатай болдог [6]. Харин түргэвчилсэн оношлуур ашиглан тус шинжилгээг хийвэл лабораторийн нөхцөл шаардахгүй, шинжилгээний

хариу 10 минутын дотор гарах ба оношлуурын өртөг багатай зэрэг олон давуу талтай. Гэвч одоогоор HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуур хийсэн судалгаа, эрдэм шинжилгээний өгүүлэл байхгүй байгаа нь энэ судалгааны ажлыг хийх зайлшгүй шаардлагатай харуулж байна. Тиймд бид судалгааны ажлын хүрээнд HDV-ийн рекомбинант уураг гарган авч, HDV-ийг оношлох түргэвчилсэн оношлуур зохион бүтээнэ. Энэхүү түргэвчилсэн оношлуур нь хэрэглэхэд хялбар, ямар ч нөхцөлд ашиглах боломжтой, үр дүн нь шууд гардаг нь одоо хэрэглээнд байгаа шинжилгээний аргуудтай харьцуулахад эдийн засаг, цаг хугацааны хувьд

хэмнэлтэй, эмчилгээг цаг алдалгүй эхлэх боломж бүрдэнэ. Мөн HDV-ийн халдварыг оношлож эрт илрүүлснээр элэгний хатуурал, элэгний дутагдал, элэгний хавдраар нас баралтыг бууруулах боломжтой юм.

1. Судалгааны МАТЕРИАЛ, АРГА ЗҮЙ

Судалгаанд ашигласан синтетик ген

HDV-ийн рекомбинант уураг гарган авахын тулд HDV-ийн зэрлэг омгийн геномоос генийн дарааллыг авч, генд кодон оптимизац хийн рекомбинант генийн дарааллыг (Зураг 1.1) *in vitro*

```

GTC G A G G C
A GA A G C
001-
CATATGGGATCCATGAGCCGTAGCGAATCTCGTAAAAACCGTGGTGGT
CGTGAAGAAATT-060
M S R S E S R K N R G
G R E E I
C G C A A A G G T A G C
GA A C C G G
061-
CTGGAACAGTGGGTGGCGGGTCTGTAAAAACTGGAAGAACTGGAACGT
GATCTGCGTAAA-120
L E Q W V A G R K K L E E L E
R D L R K
A G C G G A G C T C
G C A
121-
ACCAAAAAGAACTGAAAAAATTGAAGATGAAAACCCGTGGCTGGGT
AACATTAAGGT-180
T K K K L K K I E D E N P W L
G N I K G
C A G G G A G G T C
GA G C A G
181-
ATTCTGGGTAAAAAAGATAAAGATGGTGAAGGTGCGCCCGCGCGAAA
CGTGCGCGTACC-240
I L G K K D K D G E G A P P A
K R A R T
C G A CTC A T G GA G T CA
G A A C
241-
GATCAGATGGAAGCGGATAGCGGTCCGGGTAAACGTCCGCTGCGTGGT
GGTTTCACCGAT-300

```

1.1-р зураг. Кодон оптимизац хийн нийлээжүүлсэн HDV-Аг-ийн генийн нуклеин хүчил, амин хүчлийн дараалал. Улаанаар кодон оптимизац хийн сольсон нуклеин хүчил, цэнхрээр зэрлэг омгийн HDV-Аг генийн нуклеин хүчлийн тэмдэглэл

нийлэгжүүлж pCR2.1 векторт клонинг хийн pCR2.1-HDV-Ag векторыг гарган авсан.

Судалгаанд ашигласан E.coli Компетент эс

HDV-Ag ген агуулсан плазмидыг олшруулах зорилгоор DH5α компетент эсийг, HDV-Ag рекомбинант уургийг нийлэгжүүлэх зорилгоор BL21DE3 компетент эсийг тус бүр ашигласан.

Полимеразын гинжин урвал ашиглан праймерын өвөрмөц дараалал нэмэх

Синтетик HDV-Ag генийн зорилтод хэсэгт синтетик олигонуклеотидууд (HDV-Ag-Nde1: 5'-GGG CATATGAGCCGTAGCGAATCTCG-3', HDV-Ag-Hind3: 5'-GGGAAGCTTCGGGAAACCCTGGTTAC CA C-3') ашиглан ПГУ явуулж 5' болон 3' төгсгөл тус бүрд шинээр праймерын өвөрмөц дараалал нэмнэ.

SDS полиакриламидын гель электрофорез

Бидний нийлэгжүүлэн гарган авч байгаа HDV-Ag-ийн рекомбинант уураг 23.5 кДа молекул масстай. Иймд SDS полиакриламидын гель электрофорезийн гель бэлдэхэд уургийн молекул массаас нь хамаарч салгалт явуулах гелийн акриламидын концентрацыг 12%-аар тооцсон. Уургийн уртийг тодорхойлоход Invitrogen компанийн уургийн маркер ашигласан.

1.1-р хүснэгт. Акриламидын гелийн уураг салгах чадвар концентрацаас хамаарах

Акрила мид, %	Уургийн молекул масс, кДа
10	20-80 кДа
12	12-60 кДа
15	10-43 кДа

Лигази, ТА клонинг хийх

Рестрикийн энзимээр таслагдсан наалдамхай төгсгөлтэй ДНХ болон вектор хоёрыг нийлүүлэхийн тулд T4 DNA Ligase энзимийг ашигласан. Дараа нь бүтээгдэхүүнийг компетент эсэд трансформаци хийнэ.

Нуклеин хүчлийн дарааллыг тогтоох

HDV-Ag-ийн генийг ПГУ-ын аргаар олшруусны дараа нуклеин хүчлийн дарааллыг тодорхойлсон. Дээжийг савлаж бэлтгэн, БНХАУ дахь ZanaaSpex компанид илгээж, тодорхойлуулсан.

Бактерийн өсгөвөрлөлт, уураг нийлэгжүүлэх

Уураг нийлэгжүүлэхийн тулд үйлдвэрийн омгийн (BL21DE3 E.coli-д pET41a-HDV-Ag-His плазмид трансформаци хийсэн) глицерин стокоос эхлэлийн өсгөвөрийн клонийг авна. Түүнийгээ канамицин агуулсан ЛБ тэжээлийн орчинд тарьж 37°C-д 170 эрг/мин эргэлттэй, 20 цаг өсгөвөрлөнө. Дараа нь үндсэн өсгөвөрт эхлэлийн өсгөврөөс 1:1000 харьцаагаар авч тариад 37°C-д 170 эрг/мин эргэлттэй, 12-16 цаг өсгөвөрлөнө. Дараа нь IPTG-г үндсэн өсгөвөрт хийн 37°C-д, 170 эрг/мин эргэлттэй 4 цаг индукцилэн HDV-Ag-ийг экспресслэнэ.

Бактерийн эсээс нийт уураг ялгаж

Үйлдвэрийн омгийн (BL21DE3-pET41a-HDV-Ag-His) бактерийн өсгөврийг центрифугидэж тэжээлийн орчныг хаяна. Эсийн тунадсыг жинлэн Ni-NTA лизис буфер, лизоцим нэмж мөсөн дээр инкубацлана. Уусмалыг мөсөн дээр байрлуулан соникатор ашиглан эсийг задлаад центрифугидэн супернатантыг ялган авч 0.45 мкм фильтртээр шүүнэ.

Уургийн агууламж тодорхойлох

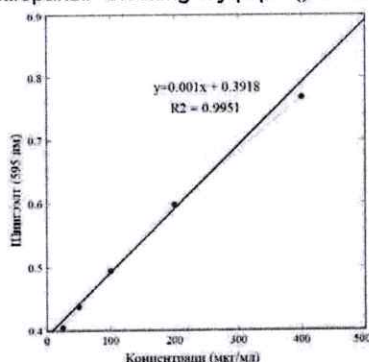
Уургийн агууламжийг Бредфордын аргаар тодорхойлно. 10 мкл уургийн дээж дээр 200 мкл Бредфордын урвалж нэмэн тасалгааны температурт инкубацлана. Дараа нь гэрлийн шингээлтийг 595 нм долгионы уртад хэмжинэ. Хяналтын уусмалаар Бредфордын урвалжийг дангаар нь хэрэглэнэ. Уургийн агуулгыг стандарт уургийн уусмал ашиглан байгуулсан жиших муруйнаас тодорхойлсон. Жиших муруй байгуулахдаа BSA-ийн

25, 50, 100, 200, 400 мкг/мл концентрацтай стандарт уусмалуудыг бэлтгэнэ.

Вестерн блот

Вестерн блот хийхдээ SDS полиакриламидын гель электрофорез явуулна. Вестерн блотд ашиглагдах PVDF мембран болон GB003 Whatman филтрэн цаасыг ашиглана.

Вестерн блотын дараа PVDF мембраныг blocking буферт () хийн 1



2.1-р зураг. Бредфордын аргаар уургийн агуулаа тодорхойлход ашигласан альбумины жиших муруй

цаг хөндлөн хутгагч дээр инкубацлана. Дараа нь washing буферээр 10 мин угаана. Улмаар нэгдүгээр эсрэг биеийг 1:5000 (ийлдэс бол 1:100) харьцаатайгаар washing буферээр шингэлэн хийн 2 цаг хөндлөн хутгагч дээр инкубацлана. Дахин гурван удаа 10 мин washing буферээр угаана. Дараа нь хоёрдугаар эсрэг биеийг 1:5000 харьцаатайгаар washing буферээр шингэлэн хийн 1 цаг хөндлөн хутгагч дээр инкубацлана. Эсрэг биеээр үйлчилж дуусаад гурван удаа 10 мин washing буферээр, хоёр удаа 5 мин PBS-ээр тус тус угаана. Дараа нь пероксидийн уусмалд (1:9 DAB Substrate + Stable peroxide substrate) мембранаа 2-3 мин хийн бандыг тодруулна.

Ni-NTA афинити багана ашиглан уураг ялгах

Бактерийн эсээс нийт уураг ялгах аргаар ялган авсан эсийн задрагийг

ашиглана. Ni-NTA-resin баганад хийж суулгана. Дараа нь баганыг тогтворжуулахын тулд Ni-NTA угаах буферээр угаана. Ni-NTA угаах буфер, уургийн лизат, Ni-NTA уусгах буфер гэсэн тавтамжтайгаар хийн уургаа ялган авна.

Уургийн диализ хийх

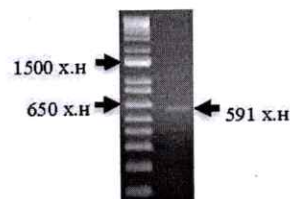
Энэхүү судалгаанд ашиглагдаж байгаа диализын мембран (Carlroth) 14 кДа-оос доош жинтэй молекулыг нэвтрүүлэх чадвартай.

Диализын мембранаа боловсруулж диализ хийхэд бэлдэнэ. Мембранд уургийн уусмалаа хийнэ. Давхар нэрсэн нэрмэл усанд диализийн түбэтэй уусмалаа хийн соронзон хутгуураар урсгал үүсгэнэ. Усны эсрэг диализ хийж уургийн буферийг сольж ус болгоно, мөн 14 кДа жингээс доошоо жинтэй бохирдлыг цэвэрлэнэ.

2. СУДАЛГААНЫ АЖЛЫН ҮР ДҮН

HDV-Ag-BamH-Xho генийг агароз гелиэс цэвэрлэж авсан үр дүн

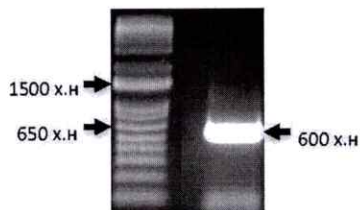
pCR2.1-HDV-Ag плазмидыг BamH1, Xho1 рестриктацийн энзим ашиглан тасалсан. Дараа нь бүх дээжийг агарозын гель электрофорезоор гүйлгэсэн. HDV-Ag генийг агарозын гелинээс ДНХ ялган авах аргаар (Biooneer, Gel purification kit ашигласан) ялгаж авсан. Ялгасан HDV-Ag генээс авч агарозын гель электрофорезоор гүйлгэж шалгасан үр дүнг 2.1-р зурагт харуулав. Рестрикцийн энзимээр таслахад 591 х.н хэмжээтэй наалдамхай төгсгөлтэй ДНХ-ийн хос утаслаг үүснэ.



2.1-р зураг. HDV-Ag-BamH-Xho генийг агарозын гелиэс цэвэрлэж

Полимеразын гинжин урвал явуулсан үр дүн

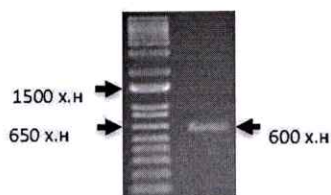
HDV-Ag генийг pET41a векторт клонинг хийх зорилгоор HDV-Ag-NdeI (5'-GGGCATATGAGCCGTA GCGAATCTCG-3'), HDV-Ag-HindIII (5'-GGGAAGC TTCGGGAAACCCTGGTTACCAC-3') синтетик олигонуклеотидуудыг ашиглан ПГУ хийсэн. ПГУ явуулснаар HDV-Ag генийн 5' төгсгөлд NdeI сайт, 3' төгсгөлд HindIII сайт нэмэгдэж 600 х.н урттай бүтээгдэхүүн үүсгэнэ. Нийт ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг агарозын гель электрофорезээр шалгасан үр дүнг 2.2-р зурагт харуулав.



2.2-р зураг. Полимеразын гинжин урвал явуулсан үр дүн

ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг гелиэс цэвэрлэж авсан үр дүн

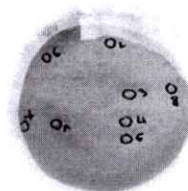
2.2-р зураг дээрх агарозын гелиэс ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг агарозын гелинээс ДНХ ялган авах аргаар ялгаж (Biooper, Gel purification kit ашигласан) авсан. Дараа нь ДНХ-ээс авч 1%-ийн агарозын гель электрофорезээр шалгаж үр дүнг 2.3-р зурагт харуулав. ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг цаашид HDV-Ag-His гэсэн нэр өгсөн.



2.3-р зураг. ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг гелиэс цэвэрлэж

HDV-Ag-His генийг pGEM-T easy векторт клонинг хийсэн үр дүн

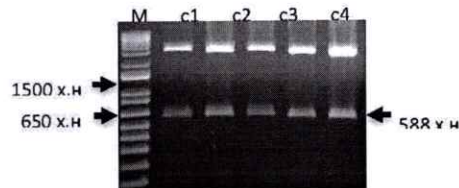
HDV-Ag-His генийг pGEM-T easy векторт лигази хийж бүтээгдэхүүнийг DH5α компетент эсэд трансформацийн аргаар оруулж цэнхэр-цагаан клоны селекцийн арга ашиглан трансформаци амжилттай явагдсан клонийг сонгон



2.4-р зураг. HDV-Ag-His генийн pGEM-T easy векторт ашигласан авна. Үр дүнд амжилттай трансформацилагдсан цагаан клонууд, трансформацилагдаагүй цэнхэр клонууд ургасан байгааг 2.4-р зурагт хуруулав. Клонинг явагдсан цагаан клоноос сонгон авч дараагийн шатанд ашигласан.

DH5α эсээс pGEM-Teasy-HDV-Ag-His плазмид ялган авсан үр дүн

2.4-р зураг дээрх DH5α-pGEM-T-easy HDV-Ag-His бактерийн тавагнаас санамсаргүйгээр 5ш клон (c1, c2, c3, c4, c5) сонгон авч ЛБ-амп тэжээлийн орчинд өсгөвөрлөсөн. Дараа нь бактерийн эсээс плазмид ялган авах аргаар pGEM-T-easy-HDV-Ag-His плазмидыг ялган авсан. Ялган авсан плазмидуудаас тус бүр авч NdeI ба HindIII энзимээр тасалсан. Дараа нь агароз гель электрофорезээр гүйлгэсэн үр дүнг 2.5-р зурагт харуулав. Үр дүнгээс хархад c5 клоноос ялгасан плазмидын гарц их байсан тул үүнийг

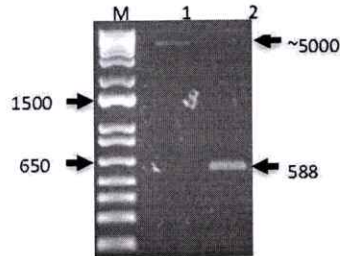


2.5-р зураг. DH5α эсээс pGEM-Teasy-HDV-Ag-His плазмид ялган авсан үр дүн

сонгон авч цаашдын судалгааны ажилд ашигласан.

рЕТ41а вектор, HDV-Ag-His генийг гелиэс цэвэрлэж авсан үр дүн

рGEM-T easy-HDV-Ag-His плазмид болон рЕТ41а векторыг рестрикцийн энзим *NdeI*, *HindIII* энзимүүдээр тасалж агарозын гелиэр шалгасан. Дараа нь агарозын гелиэс ДНХ ялгах аргаар



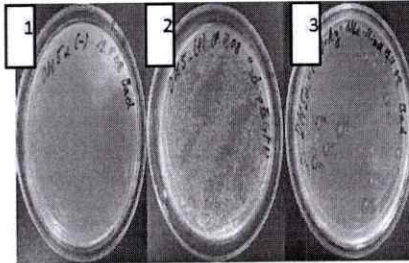
2.6-р зураг. рЕТ41а вектор, HDV-Ag-His генийг гелиэс цэвэрлэж авсан үр дүн
1: рЕТ41а векторыг *NdeI*-*HindIII* энзимээр тасалсан зурвас, 2: рGEM-T easy вектороос *NdeI*-*HindIII* энзимээр таслагдан гарсан HDV-Ag-His-ийн зурвас

ялган авч тус бүрийг агарозын гели электрофорезээр шалгаж үр дүнг 2.6-р

зурагт харуулав. Рестрикцийн энзимээр таслахад 588хн урттай HDV-Ag-His-ын ген рGEM-T easy плазмидеас тасарна.

рЕТ41а вектор HDV-Ag-His генийг клонинг хийсэн үр дүн

рЕТ41а вектор HDV-Ag-His генийг лигаци хийсэн. Лигацийн бүтээгдэхүүнийг DH5α компетент эсэд



2.7-р зураг. рЕТ41а вектор HDV-Ag-His генийг клонинг хийсэн үр дүн.

1: Трансформаци хийгээгүй сөрөг хяналт, 2: рEGFP вектор трансформаци хийсэн эерэг хяналт, 3: Амжилттай лигаци явагдсан рЕТ41а-HDV-Ag-His плазмидыг трансформаци хийсэн

061-
GAATTCAC TAGT GATTGGGCATATGAGCCGTAGCGAATCTCGTAAAAA
CCGTGGTGGTTCG-120

|||||
001-
ATGAGCCGTAGCGAATCTCGTAAAAAACCGTGGTGGTTCG-038

121-
TGAAGAAATCTGGAACAGTGGGTGGCGGGTTCGTAAAAAACTGGAAGA
ACTGGAACGTGA-180

|||||
039-
TGAAGAAATCTGGAACAGTGGGTGGCGGGTTCGTAAAAAACTGGAAGA
ACTGGAACGTGA-098

181-
TCTGCGTAAAACSAAAAAGAACTGAAAAAATTGAAGATGAAAACCC
GTGGCTGGGTAA-240

|||||
099-

2.8-р зураг. Нуклеин хүчлийн дарааллыг тогтоосон үр дүн.
Цэнхэр өнгөөр кодон оптимизац хийсэн генийн нуклеин хүчлийн

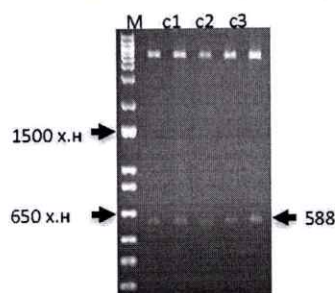
трансформаци хийсэн үр дүнг 2.7-р зурагт харуулав. Амжилттай лигаци явагдан рЕТ41а-HDV-Ag-His плазмид үүссэн. Мөн DH5α компетент эсэд уг плазмид амжилттай трансформаци хийгдсэн байна.

Нуклеин хүчлийн дарааллыг тогтоосон үр дүн

DH5α с5 клоноос ялган авсан рGEM-T easy-HDV-Ag-His плазмидуудыг БНХАУ дахь Zapasrex кампанид явуулан нуклеин хүчлийн дарааллыг тодорхойлуулсан үр дүнг 2.8-р зурагт харуулав. Нуклеин хүчлийн дарааллыг тодорхойлуулахад рGEM-T easy векторын T7 промотер, SP6 промотер дээр праймер зохион ашигласан. Нуклеин хүчлийн дарааллыг тодорхойлуулахад ямар нэг мутаци илэрсэнгүй.

DH5α эсээс рЕТ41а-HDV-Ag-His плазмид ялган авсан үр дүн

2.7-р зураг дээрх DH5α-рЕТ41а-HDV-Ag-His эсийн тавагнаас санамсаргүйгээр 5ш клон (с1, с2, с3, с4, с5) сонгон авч ЛБ-амп тэжээлийн орчинд өсгөвөрлөсөн. Дараа нь бактерийн эсээс плазмид ялган авах аргаар рЕТ41а-HDV-Ag-His плазмидыг ялган авсан. Ялган авсан плазмидаас тус бүр 2 мкл-ыг NdeI ба HindIII энзимээр таслаад агароз гель электрофорезоор гүйлгэсэн үр дүнг 2.9-р зурагт харуулав. Үр дүнгээс хархад с5 клоноос ялгасан плазмидын гарц их

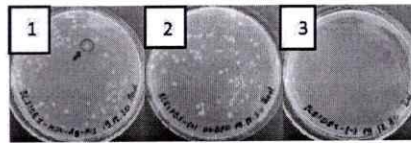


2.9-р зураг. DH5α эсээс рЕТ41а-HDV-Ag-His плазмид ялган авсан үр дүн

байсан тул үүнийг сонгон авч цаашдын судалгааны ажилд ашигласан.

BL21DE3 компетент эсэд рЕТ41а-HDV-Ag-His плазмидыг трансформаци хийсэн үр дүн

рЕТ41а-HDV-Ag-His плазмидыг уургийн экспрессийн BL21DE3 эсэд трансформаци хийсэн үр дүнг 2.10-р зурагт харуулав. Энэхүү бактерийн омгийг үйлдвэрийн омог гэж нэрсэн. рEGFP вектор, сөрөг хяналтаар Энэхүү бактерийн омгийг үйлдвэрийн омог гэж нэрсэн. плазмид хийгээгүй эсийг тарьсан.

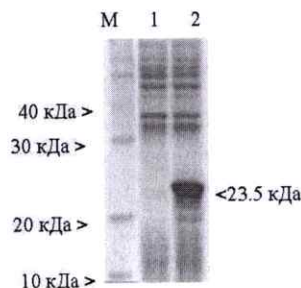


2.10-р зураг. BL21DE3 компетент эсэд рЕТ41а-HDV-Ag-His плазмидыг трансформаци хийсэн үр дүн
1: рЕТ41а-HDV-Ag-His плазмид трансформаци хийсэн, 2: рEGFP вектор трансформаци хийсэн гэрээ

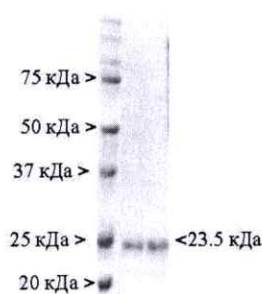
Уургийн гель электрофорезийн үр дүн

HDV-Ag-His рекомбинант уураг нийлэгжүүлэгч тогтвортой бактерийн омог гаргасан үр дүн

HDV-Ag-His уураг нийлэгжүүлэгч бактерийн омог болон трансформаци

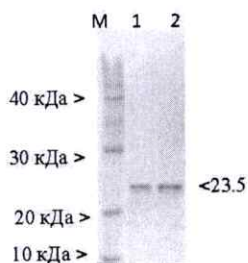


2.11-р зураг. HDV-ын нуклеокапсидын уургийг нийлэгжүүлэгч тогтвортой бактерийн омог гарган авсан үр дүн.



2.12-р зураг. HDV-Ag-His уургийг Ni-NTA афинити хроматографаар цэвэрлэсэн үр дүн

хийгээгүй бактерийн омгийн уургийн нийлэгжүүлэлтийн харьцуулалт хийсэн үр дүнг 2.11-р зурагт харуулав. Харьцуулалтын үр дүнгээр үйлдвэрийн омог HDV-Ag-His рекомбинант уургийг нийлэгжүүлж байгааг батлав.



2.13-р зураг. Уургийн диализ хийсэн үр дүн.

1: Диализ хийсэн уураг (усанд уусгасан), 2: Диализ хийхээс өмнөх уураг (Ni-NTA уусгах буферт уусгасан)

HDV-Ag-His рекомбинант уургийг бактерийн эсэд нийлэгжүүлэн Ni-NTA хроматографаар цэвэрлэн авсан үр дүн

Бактерийн эсэд уураг нийлэгжүүлэх аргаар бактерийн өсгөвөрөөс эсийн тунадас хураан авсан. Бактерийн эсээс нийт уургийн уусмалыг ялган авсан. Дараа нь нийт уургийн уусмалыг Ni-NTA баганаар урсган HDV-Ag-His нийлмэл уураг ялган авсан. Уг ялган авсан HDV-

Ag-His рекомбинант уургаас дээж бэлтгэн 12%-ийн уургийн гель электрофорезоор уургийн дээжийг гүйлгэсэн үр дүнг 2.12-р зурагт харуулав. Зорилтот HDV-Ag-His рекомбинант уураг 23.5 кДа молекул масстай бөгөөд уургийн гель дээр 25 кДа хэмжээтэй уургийн маркерын доор зурвас үүсгэн гарсан байна.

Уургийн диализ хийсэн үр дүн

Ni-NTA афинити хроматографаар ялган авсан HDV-Ag-His рекомбинант уургийн уусмалыг диализ хийсэн. Диализыг усны эсрэг хийж уураг ууссан байсан Ni-NTA уусгах буферийг усаар сольж усанд ууссан HDV-Ag-His рекомбинант уураг гарган авсан. Уураг усанд сайн уусаж өгөлгүй бага хэмжээний тундасжилттай байсан. Диализ хийхээс өмнөх болон дараах уургийн агууламж өөрчлөгдсөн шинж байхгүй байгааг Зураг 16-д харуулав.

Уургийн агууламж тодорхойлсон үр дүн

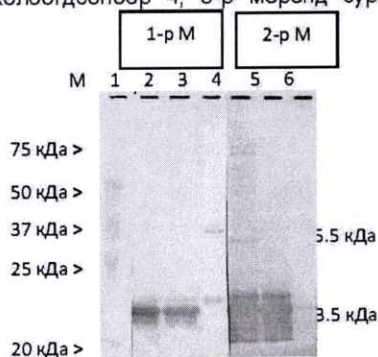
Уургийн агуулгыг тодорхойлоход 1.2-р зураг дээрх альбумины жиших муруй ашигласан. Уургийн диализ хийсний дараа HDV-Ag-His рекомбинант уураг 197 мкг/мл-ын агууламжтай байна.

Вестерн блот хийсэн үр дүн

HDV-Ag-His рекомбинант уургийг баталгаажуулалт болон HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурт ашиглах боломжтойг Вестерн блотын арга ашиглан тодорхойлсон. Үүнд anti-his эсрэгбие, HDV эерэг хүний цусны дээж ашигласан. Хоёрдогч эсрэг биеэр anti-rabbit HRP (Horseradish Peroxidase) IgG, anti-human HRP IgG-г ашигласан. Гурван дээжийг уургийн гель элетрофорезоор гүйлгэсний дараагаар Вестерн блот хийсэн. 1-р мембранд анхдагч эсрэгбие anti-6x His*tag IgG, хоёрдогч эсрэг бие anti-Rabbit-HRP-ээр, 2-р мембранд анхдагч эсрэг биеэр нь anti-HDV-Ag IgG (HDV эерэг хүний ийлдэс), хоёрдогч эсрэг бие anti-human HRP IgG хийсэн.

1-р мембранд анхдагч эсрэгбиеээр anti-his, хоёрдогч эсрэгбиеээр anti-rabbit HRP IgG хийснээр зөвхөн полихистидин агуулсан уураг дээр л холбогдоно. Иймд 1-р мембран дээр 1, 2, 3 дугаар мөрөн дээр зурвас үүссэн байгааг 2.14-р зурагт харуулав. Харин GST уураг нь 35.5 кДа хэмжээтэй, полихистидин агуулдаг тул мөн адил зурвас илэрнэ.

2-р мембранд анхдагч эсрэг биеэр HDV эерэг хүний цусны дээж, хоёрдогч эсрэг биеэр anti-human RHP IgG ашиглахад зөвхөн HDV-Ag-His рекомбинант уургийг таньж холбогдсоноор 4, 5-р мөрөнд зурвас



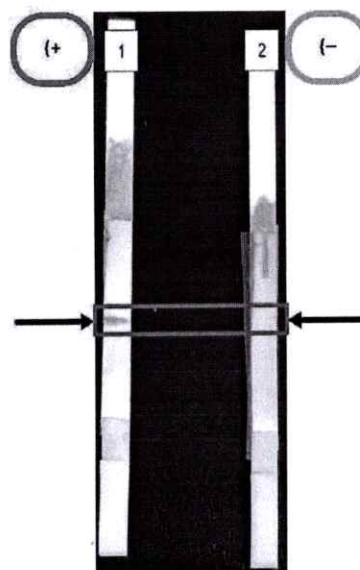
2.14-р зураг. Вестерн блотын үр дүн.
1: Хроматографиар ялгасан HDV-Ag-His рекомбинант уураг, 2: Диализ хийсэн HDV-Ag-His рекомбинант уураг, 3: Хроматографиар ялгасан GST уураг, 4: Хроматографиар ялгасан HDV-Ag-His рекомбинант уураг, 5: Диализ хийсэн HDV-Ag-His үүссэн байна. Харин GST уургийг хүний цусны ийлдсийн уураг таньж өвөрмөцөөр холбогдоогүй тул зурвал илэрсэнгүй. Энэхүү Вестерн блотын үр дүнгээс дүгнэхэд HDV-Ag-His рекомбинант уургийг HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурт ашиглах бүрэн боломжтойг нотлов.

HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурын прототип загвар турших

HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурын прототип загвар гарган авах туршилт хийсэн үр дүнг 2.15-р зурагт харуулав.

Бид прототип загварын олон хувилбар гарган туршсан. Туршилтийн үр дүнд HDV-ийн халдвартай хүний цусны дээжээс HDV-ийн халдварыг бидний зохион бүтээсэн түргэвчилсэн оношлуурын прототип загвар амжилттай илрүүлсэн.

Туршилтад: anti-his IgG эсрэг бие, HDV-Ag-His рекомбинант уураг (эсрэгтөрөгч), HDV эерэг хүний цусны дээж (anti-HDV IgG эсрэг бие), алттай холбогдсон anti-human IgG эсрэг бие ашиглагдсан.



2.15-р зураг. HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурын туршилтын загвар.

Хар сумаар HDV-Ag-His уургийг мембран дээр наасан хэсгийг тэмдэглэн харуулав.

1: HDV-ийн халдвартай хүний ийлдсэнд шинжилгээ хийхэд 1-р мембраныг ашигласан. Үр дүнд нь уураг наасан хэсэгт хүрэн улаан өнгийн банд үүссэн байна.

2: Эрүүл хүний ийлдсэнд шинжилгээ хийхэд 2-р мембраныг ашигласан.

Үр дүнд нь уураг наасан хэсэгт ямар нэг банд үүссээгүй байна.

Хэлэлцүүлэг, дүгнэлт

Бид HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурын прототип загвар бүтээж, хүний ийлдсэнд anti-HDV эсрэг биеийг илрүүлэх шинжилгээ хийсэн. Шинжилгээнд HDV-ийн халдвартай хүн, эрүүл хүний цуснаас ялгаж авсан ийлдсийг ашигласан. Мөн түргэвчилсэн оношлуурыг хэд хэдэн хувилбараар туршихад HDV-ийн халдвартай хүний ийлдэс ашигласан бүх туршилт HDV эерэг гэсэн хариу гарсан. Харин эрүүл хүний ийлдэс ашигласан бүх туршилт HDV сөрөг хариу гарсан нь HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурын прототип загвар амжилттай ажиллаж байгааг 2.15-р зурагт харуулж байна. Цаашид бид түргэвчилсэн оношлуурын оптимал хувилбарыг гарган үйлдвэрлэлд нэвтрүүлэхийг зорьж байна. Сүүлийн жилүүдэд серологийн шинжилгээнд түргэвчилсэн оношлуурын эзлэх хувь нэмэгдэж байгаад хэрэглэхэд хялбар, өртөг бага, лабораторийн хэрэглэл шаарддаггүй гэх мэт олон зүйл нөлөөлж байна^{[29][30]}. Хэдийгээр бусад төрлийн түргэвчилсэн оношлуур байдаг боловч яг HDV-ийг илрүүлэх түргэвчилсэн оношлуур одоогоор байхгүй. Монгол улсад HDV-ийн тархалт өндөр байгаагаас шалтгаалан бид HDV-ийг илрүүлэх түргэвчилсэн оношлуурыг бүтээх нь нийгмийн эрүүл мэндийг хамгаалахад томоохон хувь нэмэр болж чадна гэж үзэж байна.

Дүгнэлт

Бид хепатит дельта вирусийн нуклеокапсидын уургийг генийн инженерчлэлийн технологи ашиглан HDAg-His рекомбинант уураг болгон

Ном зүй

- [1] Chen, H. Y.; Shen, D. T.; Ji, D. Z.; Han, P. C.; Zhang, W. M.; Ma, J. F.; Chen, W. Sen; Goyal, H.; Pan, S.; Xu, H. G. Prevalence and Burden of Hepatitis D Virus Infection in the Global Population: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gut* **2019**, 68 (3), 512–521. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316601>.
- [2] Miao, Z.; Zhang, S.; Ou, X.; Li, S.; Ma, Z.; Wang, W.; Peppelenbosch, M. P.; Liu, J.; Pan, Q. Estimating the Global Prevalence, Disease Progression, and Clinical Outcome of Hepatitis Delta Virus Infection. **2020**, 221, 1677–1687. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz633>.
- [3] Vlachogiannakos, J.; Papatheodoridis, G. V. New Epidemiology of Hepatitis Delta.

амжилттай гарган авлаа. Энэхүү HDAg-His рекомбинант уургаар HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурын прототип загвар зохион бүтээж HDV халдвартай хүний цуснаас HDV-Ab-ыг амжилттай илрүүлсэн. Цаашид судалгааны үр дүнг улам бататгаж үйлдвэрлэлд нэвтрүүлэхийг зорьж байна. Судалгааны ажлын үр дүнгээс доорх дүгнэлтэд хүрсэн. Үүнд:

1. Бидний гарган авсан HDV-Ag уураг нийлэгжүүлэгч консруктыг ДНХ-ийн дараалал тогтоох аргаар шалгахад HDV-Ag -ын генийн дараалал мөн болох нь батлагдав.
2. Вестерн блотын аргаар HDAg-His рекомбинант уургийн идэвхийг шалгаж HDV түргэвчилсэн оношлуурт ашиглах боломжтойг нотолсон.
3. HDV-ийн халдвартай хүний цусны дээж болон эрүүл хүний цусны дээжинд зохион бүтээсэн HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурын прототип загварын ажиллагааг шалгахад өвчтэй хүний цуснаас халдварыг илрүүлж байгаа нь оношлуур зөв ажиллаж байгааг баталлаа.

ТАЛАРХАЛ

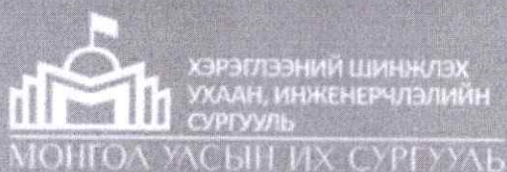
Энэхүү судалгааны турш түргэвчилсэн оношлуурын загварын ажиллагааг туршихад лабораторийн орчин, туршилтын дээжээр хангаж өгсөн Элэгний төвийн хамт олонд гүн талархал илэрхийлье.

Судалгааны ажлыг минь ойлгож үргэлж түшиж тулж байдаг гэр бүлдээ баярлалаа.

- 2020**, 40 (December 2019), 48–53. <https://doi.org/10.1111/liv.14357>.
- [4] Dashtseren, B.; Bungert, A.; Bat-Ulzii, P.; Enkhbat, M.; Lkhagva-Ochir, O.; Jargalsaikhan, G.; Enkhbat, A.; Oidovsambu, O.; Klemen, J. Endemic Prevalence of Hepatitis B and C in Mongolia: A Nationwide Survey among Mongolian Adults. *J. Viral Hepat.* **2017**, 24 (9), 759–767. <https://doi.org/10.1111/jvh.12697>.
- [5] Chen, X.; Oidovsambu, O.; Liu, P.; Grosely, R.; Elazar, M.; Winn, V. D.; Fram, B.; Boa, Z.; Dai, H.; Dashtseren, B.; Yagaanbuyant, D.; Genden, Z.; Bungert, A.; Dashdorj, N.; Glenn, J. S. A Novel Quantitative Microarray Antibody Capture (Q-MAC) Assay Identifies an Extremely High HDV Prevalence amongst HBV Infected Mongolians. *Hepatology* **2016**, 66 (6), 1739–1749. <https://doi.org/10.1002/hep.28957>.
- [6] Stephanie D. Gan, et al. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Investigative Dermatology*. 133, e12 (2013).
- [7] Lequin, R. M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **2005**, 2418, 2415–2418. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051532>.
- [8] Aydin, S. Peptides A Short History, Principles, and Types of ELISA, and Our Laboratory Experience with Peptide / Protein Analyses Using ELISA. *Peptides* **2015**, 72, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>.
- [9] WHO. Simple / Rapid tests https://www.who.int/diagnostics_laboratory/faq/simple_rapid_tests/en/?fbclid=IwAR3phuYKAqJMBfExmvyDKZf0_VtdsHVRhr7rkHXyL3dzMaBxVxQA1u_EQ2U.
- [10] Huang, C. R.; John Lo, S. Hepatitis D Virus Infection, Replication and Cross-Talk with the Hepatitis B Virus. *World J. Gastroenterol.* **2014**, 20 (40), 14589–14597. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i40.14589>.
- [11] Oyunsuren, T.; Kurbanov, F.; Tanaka, Y.; Elkady, A.; Sanduijav, R.; Khajidsuren, O.; Dagvadorj, B.; Mizokami, M. High Frequency of Hepatocellular Carcinoma in Mongolia; Association With Mono-, or Co-Infection With Hepatitis C, B, and Delta Viruses. **2006**, 1695 (August), 1688–1695. <https://doi.org/10.1002/jmv>.
- [12] World Health Organization. *Global Hepatitis Report, 2017*; 2017. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2012.11.010>.
- [13] Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, 68 (6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [14] Lempp, F. A.; Ni, Y.; Urban, S. Hepatitis Delta Virus: Insights into a Peculiar Pathogen and Novel Treatment Options. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, 13 (10), 580–589. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.126>.
- [15] Kumar, V.; Das, S.; Jameel, S. The Biology and Pathogenesis of Hepatitis Viruses. *Curr. Sci.* **2010**, 98.
- [16] Makino, S.; Chang, M. F.; Shieh, C. K.; Kamahora, T.; Vannier, D. M.; Govindarajan, S.; Lai, M. M. C. Molecular Cloning and Sequencing of a Human Hepatitis Delta (δ) Virus RNA. *Nature* **1987**, 329 (6137), 343. <https://doi.org/10.1038/329343a0>.
- [17] Rizzetto, M.; Canese, M. G.; Gerin, J. L.; London, W. T.; Sly, D. L.; Purcell, R. H. Transmission of the Hepatitis B Virus-Associated Delta Antigen to Chimpanzees. *J. Infect. Dis.* **1980**, 141 (5), 590–602. <https://doi.org/10.1093/infdis/141.5.590>.
- [18] Murphy, F. A.; Fauquet, C. M.; Bishop, D. H. L.; Ghabrial, S. A.; Jarvis, A.; Martelli, G. P.; Mayo, M. A.; Summers, M. D. *Virus Taxonomy*; Springer, 2002.
- [19] Rizzetto, M.; Hoyer, B.; Canese, M. G.; Shih, J. W.; Purcell, R. H.; Gerin, J. L. Delta Agent: Association of Delta Antigen with Hepatitis B Surface Antigen and RNA in Serum of Delta-Infected Chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, 77 (10), 6124–6128.
- [20] Bonino, F.; Heermann, K. H.; Rizzetto, M.; Gerlich, W. H. Hepatitis Delta Virus: Protein Composition of Delta Antigen and Its Hepatitis B Virus-Derived Envelope. *J.*

- Viol.* **1986**, 58 (3), 945–950.
- [21] Fattovich, G.; Boscaro, S.; Noventa, F.; Pornaro, E.; Stenico, D.; Alberti, A.; Ruol, A.; Realdi, G. Influence of Hepatitis Delta Virus Infection on Progression to Cirrhosis in Chronic Hepatitis Type B We Thank Antonella Trivellato for Manuscript Preparation. Please Address Requests for Reprints To. *J. Infect. Dis.* **1987**, 155 (5), 931–935. <https://doi.org/10.1093/infdis/155.5.931>.
- [22] Puigvehí, M.; Moctezuma-velázquez, C.; Villanueva, A.; Llovet, J. M.; Puigvehí, M.; Moctezuma-velázquez, C.; Villanueva, A. The Oncogenic Role of Hepatitis Delta Virus in Hepatocellular Carcinoma Authors The Oncogenic Role of Hepatitis Delta Virus in Hepatocellular Carcinoma. *JHEP Reports* **2019**, 1 (2), 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2019.05.001>.
- [23] Zuccola, H. J.; Rozzelle, J. E.; Lemon, S. M.; Erickson, B. W.; Hogle, J. M. Structural Basis of the Oligomerization of Hepatitis Delta Antigen. *Structure* **1998**, 6 (7), 821–830.
- [24] Polson, A. G.; Bass, B. L.; Casey, J. L. RNA Editing of Hepatitis Delta Virus Antigenome by DsRNA-Adenosine Deaminase. *Nature* **1996**, 380, 454–456.
- [25] Taylor, J. M. Hepatitis D Virus Replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2015**, 5 (11), 1–13. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021568>.
- [26] Botelho-souza, L. F.; Pinheiro, M.; Vasconcelos, A.; Oliveira, A. De; Miguel, J.; Salcedo, V.; Vieira, D. S. Hepatitis Delta : Virological and Clinical Aspects. **2017**, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0845-y>.
- [27] *Thermo Scientific Plate Guide*; 2011.
- [28] Freeman, W. M.; Walker, J.; Vrana, K. E. Review Quantitative RT-PCR : Pitfalls and Potential. **1999**, 26 (1).
- [29] Farrell, B. O.; Immunoassays, C. *Evolution in Lateral Flow – Based Immunoassay Systems*; 2009. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-240-3>.
- [30] Koczula, K. M.; Gallotta, A. Lateral Flow Assays. **2016**, No. June, 111–120. <https://doi.org/10.1042/EBC20150012>.
- [31] Lu, X. X.; Yi, Y.; Su, Q. D.; Bi, S. L. Delta Virus (HDV) Antigen for Use in a Diagnostic. *Biomed. Environ. Sci.* **2016**, 29 (6), 417–423. <https://doi.org/10.3967/bes2016.054>.
- [32] Ding, J.; Yi, Y.; Su, Q.; Qiu, F.; Jia, Z.; Bi, S. High Expression of Small Hepatitis D Antigen in Escherichia Coli and ELISA for Diagnosis of Hepatitis D Virus. *J. Virol. Methods* **2014**, 197, 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.10.006>.
- [33] Stockdale, A. J.; Kreuels, B.; Henrion, M. Y. R.; Giorgi, E.; Martel, C. De; Hutin, Y.; Geretti, A. M. The Global Prevalence of Hepatitis D Virus Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Hepatol.* **2020**. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.008>.

Төслийн үр дүн дотоодод хэлэлцэгдсэн хурал, өгүүллүүд
Монгол улсын их сургуулийн, Хэрэглээний шинжлэх ухаан инженерчлэлийн
сургуулийн эрдэм шинжилгээний хурлын эмхэтгэл 2020



2019-2020 ХИЧЭЭЛИЙН ЖИЛИЙН
ОЮУТНЫ ЭРДЭМ
ШИНЖИЛГЭЭНИЙ ХУРЛЫН
ЭМХЭТГЭЛ

2020 он

Хепатит дельта вирусийн түргэвчилсэн оношлуур зохион бүтээх

М.Бадмаарга¹, Б.Заяа¹, Б.Хишигсүрэн¹, О.Одгэрэл¹(улридагч багш)

МУИС, Хэрэглээний шинжлэх ухаан, инженерчлэлийн сургууль, Хими биологийн инженерчлэлийн тэнхим, Генийн инженерчлэлийн лаборатори

badma0623@gmail.com

Монгол улсад хепатит дельта вирусийн (HDV) тархалт өндөр байгаа нь элэгний өвчлөл, элэгний өвчлөлөөс шалтгаалсан нар баралтын гол шалтгааны нэг болдог. Гэвч одоогоор HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурын судалгаа байхгүй байгаа нь энэ судалгааны ажлыг хийх үндэслэл болсон. Бид зэрлэг омгийн HDV-ийн нуклеокапсидын уургийн геном колон оптимизаци хийн *E.coli* бактери нийлэгжүүлсэн. Мөн HDV-ийн рекомбинант уургийг Ni-NTA афинити хроматографаар ялгаж, уургийн диализ хийн цэвэрлэн авсан. Уг рекомбинант уургаар HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурын прототип загварт ашиглан туршиглан. Туршигтанд HDV-ийн халдвартай хүний цусны дээж ба эрүүл хүний цусны дээжид шинжилгээ хийж түргэвчилсэн оношлуурын ажиллагааг шалган баталсан.

Тухаар үгс: Хепатит дельта вирус (HDV), хепатит дельта вирүийн антиген (HDV-Ag), рекомбинант уураг, түргэвчилсэн оношлуур

I. ОРШИЛ

Хепатит дельта вирус (HDV) нь элэгний өвчлөл үүсгэдэг шалтгаануудын нэг бөгөөд хепатит В вирусийн (HBV) гадаргуун антигенийг ашиглах замаар HBV-тэй давхар халдварлагддаг. HBV болон HDV-ийн давхар халдвартай хүнд элэгний дутагдал, элэгний хатуурал, элэгний хялдар (НСС) болох процесс HBV-ийн дан халдвартай байх үеэс илүү хурдантай байдаг^{[1][2][3][4]}.

HDV-ийн тархалт нь HBV-ийн халдвар тээгчдийн 13.02-14.57%-тай буюу 48-60 сая хүнийг хамарч байна^{[1][2][3]}. Харин Монгол улсын хувьд нийт хүн амын 10.6% нь HBV-ийн халдвартай, үүний 67% нь HDV-ийн халдвартай байна (нийт хүн амын 7.2%). HD-Ab-ийн шинжилгээ эсрэг хүмүүст HDV-RNХ-ийн шинжилгээ хийсэн үр дүнд Монгол улсын нийт хүн амын 4.5% нь архаг HDV-ийн халдвартай байна^[4]. Монгол улс хепатит вирусийн халдварын тархалт болон элэгний өвчлөлөөс шалтгаалсан нас баралтаар дэлхийд нэгдүгээрт, элэгний өвчлөлөөрөө найм дугаарт байгаагийн гол шалтгааны нэг нь HDV-ийн халдварын тархалт их байгаагаар холбоотой юм^{[4][5]}.

Дэлхий дахинд одоогоор HDV-ийн оношлогоог фермент холбоот эсрэг биеийн урвалаар (ELISA) ширүүлдэг бөгөөд энэ арга нь лабораторийн нөхцөлд тусгай багаж ашиглан хийдэг, шинжилгээ 2-3 цаг үргэлжилжээс гадна нэг шинжилгээ хийхэд олон тооны дээж цуглуулах шаардлагатай болдог^[6]. Харин түргэвчилсэн оношлуур ашиглан тус шинжилгээг хийвэл лабораторийн нөхцөл шаардахгүй, шинжилгээний хариу 10 минутын дотор гарах ба оношлуурын өртөг багатай зэрэг олон давуу талтай. Гэвч одоогоор HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуур хийсэн судалгаа, эрдэм шинжилгээний өгүүлэл байхгүй байгаа нь энэ

судалгааны ажлыг хийх зайлшгүй шаардлагатайг харуулж байна. Тиймд бид судалгааны ажлын хүрээнд HDV-ийн рекомбинант уураг гарган авч, HDV-ийг оношлох түргэвчилсэн оношлуур зохион бүтээв. Энэхүү түргэвчилсэн оношлуур нь хэрэглэхэд хялбар, ямар ч нөхцөлд ашиглах боломжтой, үр дүн нь шууд гардаг нь одоо хэрэглээнд байгаа шинжилгээний аргуудтай харьцуулахад эдийн засаг, цаг хугацааны хувьд хэмнэлтэй, эмчилгээг цаг алдалгүй эхлэх боломж бүрдэнэ. Мөн HDV-ийн халдварыг оношлож эрт илрүүлснээр элэгний хагуурал, элэгний дутагдал, элэгний хялдраар нас баралтыг бууруулах боломжтой юм.

II. СУДАЛГААНЫ МАТЕРИАЛ, АРГА ЗҮЙ

Судалгаанд ашигласан синтетик ген

HDV-ийн рекомбинант уураг гарган авахын тулд HDV-ийн зэрлэг омгийн геномоос генийн дарааллыг авч, геном колон оптимизаци хийн рекомбинант генийн дарааллыг (Зураг 1) *in vitro* орчинд (Eurofins Genomics, АНУ) нийлэгжүүлж pCR2.1 векторт клонинг хийн pCR2.1-HDV-Ag векторыг гарган авсан.

E.coli Компетент эс бэлтгэх арга зүй

Компетент эс бэлтгэхдээ бактерийн өсгөврөөс бактериологийн гогцоогоор бага хэмжээгээр шүргүүлэн авч LB тэжээлийн орчинд тарьж 37°C-д 700 эрг/мин эргэлттэй шөножин өсгөвөрлөнө. Шөножин өсгөвөрлөсөн бактерийн өсгөврөөс LB тэжээлийн орчинд 1:100 харьцаагаар шингэн хийж 18°C-д 700 эрг/мин эргэлттэй шөножин өсгөвөрлөнө. Бэлэн болсон эсээ мөсөн дээр тавьж өсөлтийн зогсооно. Дараа нь бактерийн өсгөврийг 15 мин, 4°C, 2000хг хурдтайгаар центрифугднэ, супернатантыг хаяна. Тунасан эсийн пелет дээр 4 мл цэв хүйтэн ТВ буфер хийж эсээ уусган 10 мин мөсөн дээр инкубацлана. Дахин эсээ 15 мин, 4°C-д, 2000хг хурдтайгаар центрифугднэ. Супернатантыг нь хаяна. Эсийн пелет дээр 1 мл цэв хүйтэн ТВ-DMSO хийж уусган 10 мин мөсөн дээр инкубацлана. Бэлэн болсон эсээ 50 мкл-ээр 2-түбэд хуваан шингэн азотад хийн огцом хөлдөөж -80°C-д хадгална.

Компетент эсэд трансформаци хийх

Компетент эсийг мөсөн дээр гэсгээнэ. Компетент эсэд 0.5-5 плазмидыг хийн пештектний хошуугаараа зөөлөн хутгаад мөсөн дээр 30 мин инкубацлана. Дараа нь компетент эсийг 42°C-д 45 сек дулаанаар үйлчлээд дахин мөсөн дээр 15 мин инкубацлана. Компетент эсээ 1 мл SOC тэжээлийн орчинд тарин 37°C-д, эргэлттэй инкубаторт 1 ц инкубацлана. Дараа нь SOC тэжээлийн орчинтой бактерийн өсгөврөөс 100 мкл аван

SV баганад AW буфер 500 мкл хийн 1 мин, 17000×g хурдаар центрифугднэ, урсаж гарсан шингэнийг хаяна. Дахин SV баганад PW буфер 700 мкл хийж 1 мин, 17000×g хурдаар центрифугднэ. Мөн урсаж гарсан шингэнийг хаяж дахин нэг удаа баганыг хоосноор нь 1 мин, 17000×g хурдаар центрифугднэ. Дараа нь SV баганыг шинэ цуглуулагч түбэнд угсарч, түүний мембран дээр плазмидыг уусгагч EB буфер 50 мкл-ийг дусааж өрөөний температурт 3 минут инкубацлана. Үүний дараа баганыг 1 мин, 17000×g хурдаар өрөөний температурт центрифугдэхэд плазмид агуулсан уусмал цуглуулагч түбны ёроолд бууж хуримтлагдана.

Агарозын гелинээс ДНХ ялгах

Агарозын гелинээс ДНХ ялгахад "Abbot mSample Preparation System DNA" цомгийг өөрсдийн боловсруулсан протоколын дагуу ашигласан. Гелийг хэт ягаан туяаны тавиан дээр тавин зорилгот ДНХ-ийн тасархайг зүсэн авч жинлээд улмаар гелийн жингээс 3 дахин их хэмжээтэй лизис буфер хийж 60°C-д 10 минут инкубацлан гелийг бүрэн хайлуулна. Уусмалыг SV-баганад шилжүүлэн хийж 1 мин, 17000×g хурдаар центрифугдэж, урсаж гарсан шингэнийг хаяна. Дараа нь SV баганад WB 1 буфер 600 мкл хийж 1 мин, 17000×g хурдаар центрифугднэ. Урсаж гарсан шингэнийг хаяна. Улмаар SV баганад WB 2 буфер 600 мкл хийж 1 мин, 17000×g хурдаар центрифугднэ. Мөн урсаж гарсан шингэнийг хаяж дахин нэг удаа баганыг хоосноор нь 1 мин, 17000×g хурдаар центрифугднэ. Дараа нь SV баганыг шинэ цуглуулагч түбэнд угсарч, түүний мембран дээр ДНХ-ыг уусгагч EB буфер 50 мкл-ийг дусааж өрөөний температурт 3 минут инкубацлана. Үүний дараа баганыг 1 мин, 17000×g хурдаар өрөөний температурт центрифугдэхэд ДНХ агуулсан уусмал цуглуулагч түбны ёроолд бууж хуримтлагдана.

Агароз гель электрофорез

Агарозын гелийг 1% байхаар тохирох хэмжээний ибодонс агароз дээр 0.5x TBE буфер нэмж буцалгана. Уусмалаа 60°C хүртэл хөргөсний дараа этидиум бромидыг 0.5 мкг/мл нэмэн уусгана. Дараа нь уусмалаа хэвэнд цутгаж аймерта дээж хийх нүх гаргах самыг суурилуулж царцаана. Дээжид 6x глицерол лоадинг буфер нэмж гелийн нүхэнд ос гийг хийж 100В-д 30-45 минут гүйлгэнэ. ДНХ-ийн уртыг тодорхойлоход Invitrogen компанийн 1kb plus ДНХ маркер ашигласан.

SDS полиакриламидын гель электрофорез

Бидний нийлэгжүүлэн гарган авч байгаа HDV-Аг-ийн рекомбинант уураг 23.5 кДа молекул масстай. Иймд SDS полиакриламидын гель электрофорезийн гель бэлдэхэд уургийн молекул массаас нь хамаарч салгалт явуулах гелийн акриламидын концентрацыг 12%-аар тооцсон. Гелийн хэвийг угсарч 5%, 12%-ийн акриламидын натагны концентрацтай гелийг найруулж бэлтгэнэ. Салгагч гел эсийг гелийг хэвийн амсраас 1 см зайтай байхаар цутгана. Гелийг тэгшитэх үүднээс бага хэмжээний изопропанол 4-6 удаа хийнэ. Дараа нь цуглуулагч гелийг цутгаж дээж хийх нүх 17000× гаргах самыг суулган царцаана. 5-15 мкл дээж гелийн нүхэнд хийж 100В-д 1-2 цаг гүйлгэнэ. Дээж бэлтгэхдээ 2x Sample буфер хийж 10 мин буцалгана. Дараа нь мөсөн хурдаар дээр тавьж 10 мин инкубацлана. Уургийн уртыг Дараа нь

тодорхойлоход Invitrogen компанийн уургийн маркэр ашигласан.

Хүснэгт 1. Акриламидын гелийн уураг салгах чадвар концентрацаас хамаарах

Акриламид, %	Уургийн молекул масс, кДа
6	50-200 кДа
8	30-95 кДа
10	20-80 кДа
12	12-60 кДа
15	10-43 кДа

Лигаци, ТА клоинг хийх

Рестриктацийн энзимээр таслагдсан наалдамхай төгсгөлтэй ДНХ болон вектор хоёрыг нийлүүлэхийн тулд T4 DNA Ligase энзимийг ашигласан. Тасархай вектор 4 мкл, ДНХ 4 мкл, 10x буфер 1 мкл, T4 DNA ligase энзим 1 мкл тус тус хийн 16°C-д шөнжин инкубацлана. Дараа нь бүтээгдэхүүнийг компетент эсэд трансформаци хийнэ.

Нуклеин хүчлийн дарааллыг тогтоох

Рекомбинант уургийн генийг ПГУ хийсний дараа нуклеин хүчлийн дарааллыг тодорхойлсон. Дээжийг савлаж бэлтгэн, БНХАУ дахь ZanaaSpec компанид илгээж, тодорхойлуулсан.

Бактерийн өсгөвөрлөлт, уураг нийлэгжүүлэх

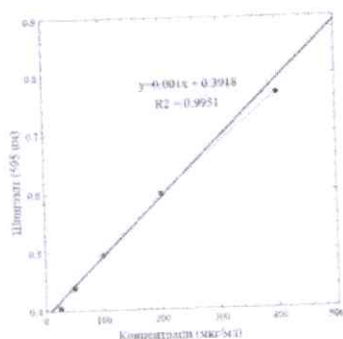
Эхлэлийн өсгөвөрийг үйлдвэрийн омгийн глицерин стокоос 1 мкл авна. Түүнийгээ 5 мл LB-кап тэжээлийн орчинд тарин 37°C-д 170 эрг/мин эргэлтэй, 20 цаг өсгөвөрлөнө. Дараа нь үндсэн өсгөвөрт эхлэлийн өсгөвөрөөс 1:1000 харьцаагаар аван тарьж 37°C-д 170 эрг/мин эргэлтэй, 12-16 цаг өсгөвөрлөнө. Дараа нь 0.5 mM IPTG-г үндсэн өсгөвөрт хийн 37°C-д, 170 эрг/мин эргэлтэй 4 цаг индукци явуулна.

Бактерийн эзэс нийт уураг ялгах

Бактерийн өсгөврийг 15 мин, 4°C-д, 3000×g хурдтайгаар центрифугднэ. Тэжээлийн орчныг хаяна. Эсийн пелетийг жинлэн 1 г-д 5 мл Ni-NTA лизис буфер хийн 15 мин мөсөн дээр инкубацлана. Дараа нь 1 мг/мл лизоцим байхаар тооцон хийн 30 мин мөсөн дээр инкубацлана. Уусмалыг мөсөн дээр тавин соникатор ашиглан эсийг задлаал 30 мин, 4°C-д, 21000×g хурдтайгаар центрифугднэ. Супернатант ялган авч 0.45 мкм филтрээр шүүнэ.

Уургийн агууламж тодорхойлох

Уургийн агууламжийг Бредфордын аргаар тодорхойлсон. 10 мкл дээж дээр 200 мкл Бредфордын урвалж нэмэн тасалгааны температурт 5-10 мин инкубацлана. Дараа нь гэрлийн шингээлтийг 595 нм-т хэмжинэ. Хяналтын уусмалаар Бредфордын урвалжийг дангаар нь хэрэглэнэ. Уургийн агуулгыг стандарт уургийн уусмал ашиглан байгуулсан жиших муруйнаас тодорхойлсон. Жиших муруй байгуулахдаа BSA-ийн 25, 50, 100, 200, 400 мкг/мл концентрацтай стандарт уусмалуудыг бэлтгэнэ.



Зураг 2. Бредфордын аргаар уургийн агуулга тодорхойлоход ашигласан альбумины жиших муруй

Вестерн блот хийх

Вестерн блот хийхдээ SDS полиакриламидын гель электрофорез явуулна. Вестерн блотд ашиглагдах PVDF мембран болон GB003 Whatman филтрэн цаасыг 6.5x8.5 см хэмжээтэй зүсэж бэлдэнэ. Эхлээд Вестерн блотын төхөөрөмж дээр бш филтрэн цаасыг transfer буферт норгож тавина. Дараа нь PVDF мембранаа метаноолоор норгож давхарлана. Мембран дээр SDS полиакриламидын гелийг болгоомжтой давхарлана. Сүүлд нь дахин филтрэн цаасыг transfer буферт норгож давхарлана. Вестерн блотын төхөөрөмжийг гүйцэтгэн угсраад гүйдэл 1 см²/мА байхаар тооцон 55 мА-аар 1 цаг вестерн блот хийсэн.

Вестерн блотын дараа PVDF мембраныг blocking буферт хийн 1 цаг хөндлөн хутгагч дээр инкубацлана. Дараа нь washing буферээр 10 мин угаана. Улмаар нэгдүгээр эсрэг биеийг 1:5000 (ийлцэс бол 1:100) харьцаатайгаар washing буферээр шингэлэн хийн 2 цаг хөндлөн хутгагч дээр инкубацлана. Дахин гурван удаа 10 мин washing буферээр угаана. Дараа нь хоёрдугаар эсрэг биеийг 1:5000 харьцаатайгаар washing буферээр шингэлэн хийн 1 цаг хөндлөн хутгагч дээр инкубацлана. Эсрэг биеээр үйлчилж дуусаад гурван удаа 10 мин washing буферээр, хоёр удаа 5 мин PBS-ээр тус тус угаана. Дараа нь пероксидийн уусмал (1:9 DAB Substrate + Stable peroxide substrate) мембранаа 2-3 мин хийн бандыг төдруулна.

Ni-NTA аффинити багана ашиглан нийлмэл уураг ялгах

Бактерийн эсээс нийт уураг ялгах аргаар ялган авсан уургийг лизатыг ашиглана. Ni-NTA аффинити баганыг суурилуулан баганад том амтай хошуугаар 2 мл Ni-NTA-resin хийн татах хүчний нөлөөгөөр аажмаар доош нь суулгана. Дараа нь баганыг тогтворжуулахын тулд Ni-NTA угаах буферээс баганын амсрыг дүүртэл хийн угаана. Ni-NTA угаах буфер урсаж дууссаны дараа уургийн лизатаас баганад 5 мл хийн урсган гаргана. Үргэлжлүүлэн 5 мл угаах буферээр угаана. Дараа нь 5 мл Ni-NTA уусгах буфер хийн уургаа уусган түбэнд цуглуулан авна.

Уургийн диализ хийх

Уургийн диализ хийхэд хагас нэвтрүүлэгч чанартай байгалийн болон синтетик мембраныг ашиглан зорилтот уургийн буфер солих, бусад хольц бага молекулт бохирдлоос нь салгадаг. Энэхүү судалгаанд ашиглагдаж

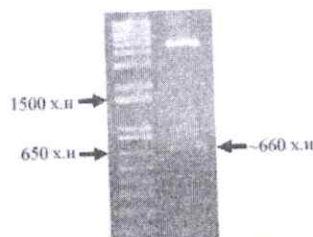
байгаа диализын мембран 14 кДа-оос доош жинтэй молекулыг нэвтрүүлэх чадвартай.

Диализын мембранаа буцааж байгаа диализын буфер хийн 10 мин буцалгана. Дараа нь мембранаа нэрмэл усанд 10 мин сойж диализ хийхэд бэлдэнэ. Мембранаа нэрмэл амсрыг нь битүүмжлэнэ. ddH₂O бэлдэж диализийн түбэтэй уусмалаа хийн соронзон хутгуураар урсгал үүсгэнэ. ddH₂O-г 4 цагийн зайтай гурван удаа солино. Усны эсрэг диализ хийж уургийн буферийг сольж ус болгоно, мөн 14 кДа жингээс доошоо жинтэй бохирдлыг цэвэрлэнэ.

III. СУДАЛГААНЫ АЖЛЫН ҮР ДҮН

DH5α эсээс pCR2.1-HDV-Ag плазмид ялган авсан үр дүн

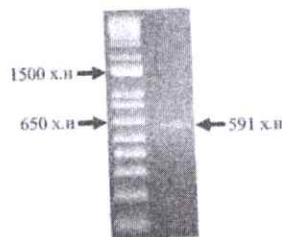
Кодон оптимизаци хийсэн гентэй pCR2.1-HDV-Ag плазмидыг DH5α компетент эсэд трансформаци хийсэн. Дараа нь бактерийн эсээс плазмид ялган авах аргаар ялгаж авсан. Уг плазмидыг рестриктацийн энзим EcoRI-ээр тасалсан. Дараа нь 2 мкл дээж аван агароз гели электрофорезоор гүйлгэж шалгасан үр дүнг Зураг 3-д харуулав. EcoRI рестриктацийн сайт нь pCR2.1 вектор дахь синтетик ген HDV-Ag-ийн хоёр талд байрладаг. Рестриктацийн энзимээр таслахад ~660 х.н хэмжээтэй ДНХ-ийн утаслаг үүснэ.



Зураг 3. DH5α эсээс pCR2.1-HDV-Ag плазмид ялган авсан нь

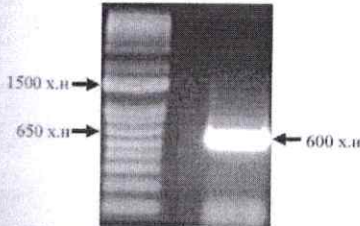
HDV-Ag-BamH1-Xho1 генийг гелиээс цэвэрлэж авсан үр дүн

pCR2.1-HDV-Ag плазмидыг рестриктацийн энзим BamH1, Xho1 ашиглан тасалсан. Дараа нь бүх дээжийг агарозын гели электрофорезоор гүйлгэсэн. Дараа нь HDV-Ag генийг агарозын гелинээс ДНХ ялган авах аргаар ялгаж авсан. Ялгасан HDV-Ag гентээс 2 мкл-ыг 1%-ийн агарозын гели электрофорезоор гүйлгэж шалгасан үр дүнг Зураг 4-д харуулав. Рестриктацийн энзимээр таслахад 591 х.н хэмжээтэй ДНХ-ийн утаслаг үүснэ.



Зураг 4. HDV-Ag-BamH1-Xho1 генийг гелиээс цэвэрлэж авсан үр дүн

Полимеразын гинжин урвал явуулсан үр дүн
 HDV-Ag генийг pET41a векторт клонинг хийх үр дүнд агарозын гелиор гүйлгэсэн үр дүнг Зургаг 5-д харуулав.



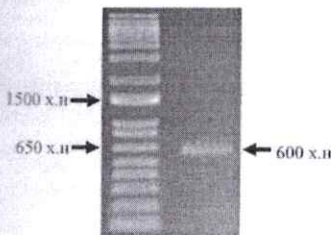
Зураг 5. Полимеразын гинжин урвал явуулсан үр дүн

сан үр

-HDV-Ag
 и хийсэн.
 их аргаар
 ам EcorI-

ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг гелиэс цэвэрлэж авсан үр дүн

Зураг 5 дээрх агарозын гелиэс ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг агарозын гелинээс ДНХ ялган авах аргаар ялгаж авсан. Дараа нь ДНХ-ээс 2 мкл-ыг 1%-ийн агарозын гели электрофорезоор гүйлгэсэн үр дүнг Зураг 6-д харуулав. ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг цаашид HDV-Ag-His гэсэн нэр өгсөн.

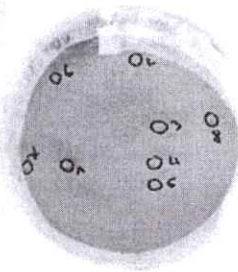


Зураг 6. ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг гелиэс цэвэрлэж авсан үр дүн

сан үр

HDV-Ag-His генийг pGEM-T easy векторт клонинг хийсэн үр дүн

Лигацийн бүтээгдэхүүнийг DH5a компетент эсэд трансформаци хийн цэнхэр-цагаан клоны селекцийн аргаар тусгаж авсан. Үр дүнд LB-amp (IPTG, X-gal) тэжээлийн тархинд тархуулав.

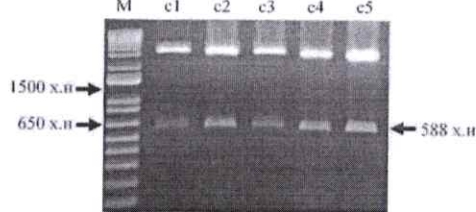


Зураг 7. HDV-Ag-His генийг pGEM-T easy векторт клонинг үр дүн

орчин дээр клонинг явагдсан цагаан клоонууд. Мөн клонинг явагдаагүй цэнхэр клоонууд ургасан байгааг Зураг 7-д хуруулав. Клонинг явагдсан цагаан клоноос сонгон авч дараагийн шатанд ашигласан.

DH5a эсээс pGEM-Teasy-HDV-Ag-His плазмид ялган авсан үр дүн

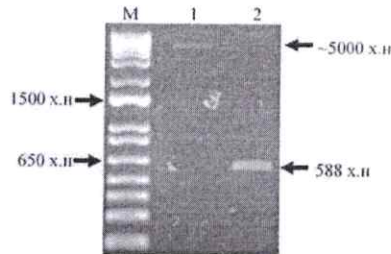
Зураг 7 дээрх DH5a-pGEM-T-easy HDV-Ag-His бактерийн тавагнаас санамсаргүйгээр 5ш клон (c1, c2, c3, c4, c5) сонгон авч LB-amp тэжээлийн орчинд өсгөвөрлөсөн. Дараа нь бактерийн эсээс плазмид ялган авах аргаар pGEM-T-easy HDV-Ag-His плазмидыг ялган авсан. Ялган авсан плазмидуудаас тус бүр 2 мкл-ыг аван NdeI ба Hind3 энзимаар тасалсан. Дараа нь агароз гели электрофорез хийсэн үр дүнг Зураг 8-д харуулав. Үр дүнгээс хархад c5 клоноос ялгасан плазмидын гарч их байсан тул үүнийг сонгон авч цаашдын судалгааны ажилд ашигласан.



Зураг 8. DH5a эсээс pGEM-Teasy-HDV-Ag-His плазмид ялган авсан үр дүн

pET41a вектор, HDV-Ag-His генийг гелиэс цэвэрлэж авсан үр дүн

pGEM-T easy-HDV-Ag-His плазмид болон pET41a векторыг рестрикташийн энзим NdeI, Hind3-аар тасалж агарозын гелиор гүйлгэсэн. Дараа нь агарозын гелиэс ДНХ ялгах аргаар ялган авсан. Ялгасан ДНХ-ээс тус бүр 2 мкл агарозын гели электрофорезоор гүйлгэсэн үр дүнг Зураг 9-д харуулав. Рестрикташийн энзимээр таслахад 588 х.н урттай HDV-Ag-His-ын ген pGEM-T easy плазмидаас тасарна.



Зураг 9. pET41a вектор, HDV-Ag-His генийг гелиэс цэвэрлэж авсан үр дүн

1: pET41a векторыг NdeI-Hind3 энзимээр тасалсан байдал,
 2: pGEM-T easy вектороос NdeI-Hind3 энзимээр таслагдан гарсан HDV-Ag-His

Нуклеин хүчлийн дарааллыг тогтоосон үр дүн

DH5a c5 клоноос ялган авсан pGEM-T easy-HDV-Ag-His плазмидуудыг БНХАУ дахь Zanaaprex кампанид явуулан нуклеин хүчлийн дарааллыг тодорхойлуулсан үр дүнг Зураг 10-д харуулав. Нуклеин хүчлийн дарааллыг тодорхойлуулахад pGEM-T easy векторын T7 промотер

Төслийн үр дүн дотоодод хэлэлцэгдсэн хурал, өгүүлүүд

```

061-GAATTCAGTGTGATGGGCATATGAGCCGTAGCGAATCTCGTAAAAACCGTGGTGGTCG-120
001-          |||
          ATGAGCCGTAGCGAATCTCGTAAAAACCGTGGTGGTCG-038
121-TGAAGAAATTCGGAACAGTGGGTGGCGGTGCTAAAAAACTGGAAGAACTGGAACGTGA-180
039-TGAAGAAATTCGGAACAGTGGGTGGCGGTGCTAAAAAACTGGAAGAACTGGAACGTGA-098
181-TCTGCGTAAAAACCAAAAGAACTGAAAAAAATGAAGATGAAAACCCGTGGCTGGGTAA-240
099-TCTGCGTAAAAACCAAAAGAACTGAAAAAAATGAAGATGAAAACCCGTGGCTGGGTAA-158
241-CATTAAGGTATTCTGGGTAAAAAGATAAAGATGGTGAAGGTGCGCCCGCGGAAACG-300
159-CATTAAGGTATTCTGGGTAAAAAGATAAAGATGGTGAAGGTGCGCCCGCGGAAACG-218
301-TGCGCGTACCGATCAGATGGAAGCGGATAGCGGTCCGGGTAACGTCGCTGGTGG-360
219-TGCGCGTACCGATCAGATGGAAGCGGATAGCGGTCCGGGTAACGTCGCTGGTGG-278
361-TTCCCGGATAAAGAACGTCAGGATCATCGTCTGTAAGCGCTGGAACAACAAAGAA-420
279-TTCCCGGATAAAGAACGTCAGGATCATCGTCTGTAAGCGCTGGAACAACAAAGAA-338
421-ACAGCTGAGCCCGGTGGTAAAAACCTGAGCAAGAAGAAGAAGAAGAACTGCGTCTCT-480
339-ACAGCTGAGCCCGGTGGTAAAAACCTGAGCAAGAAGAAGAAGAAGAACTGCGTCTCT-398
481-GACCGAAGAAGATGAACGTCGTAACGTCGTGTGGCGGGTCCGCGGTGGTGTGAA-540
399-GACCGAAGAAGATGAACGTCGTAACGTCGTGTGGCGGGTCCGCGGTGGTGTGAA-458
541-CCCGCTGGAAGGTGGTAGCCGTGGTGGCGCCGGTGGTGGTTCGTCGCCAACCTGCAGGG-600
459-CCCGCTGGAAGGTGGTAGCCGTGGTGGCGCCGGTGGTGGTTCGTCGCCAACCTGCAGGG-518
601-TGTGCCGGAAGCCCGTTCAGCCGTACCCTGGAAGGTCTGGATATTCGTGGTAACAGGG-660
519-TGTGCCGGAAGCCCGTTCAGCCGTACCCTGGAAGGTCTGGATATTCGTGGTAACAGGG-578
661-TTCCCGAAGCTTCCCAATCGAATTCCTCCGCGGCCCATGGCGCCGGGAGCATGCGACG-720
579-TTCCCGG
    
```

Зураг 10. Нуклеин хүчлийн дарааллыг тогтоосон үр дүн.

Цэнхэр өнгөөр кодон оптимизац хийсэн генийн нуклеин хүчлийн дараалал, хар өнгөөр нуклеин хүчлийн дараалал тодорхойлуулсан pGEM-T easy-HDV-Ag-His дарааллыг харуулав.

(AATACGACTCACTATAGGCGGAA), SP6 промотер (TTAGGT GACATATAGGAATCTC) дээр праймер зохион ашигласан. Нуклеин хүчлийн дарааллыг тодорхойлуулахад ямар нэг мутаци илэрсэнгүй.

pET41a векторт HDV-Ag-His генийг клонинг хийсэн үр дүн

pET41a векторт HDV-Ag-His генийг лигаци хийсэн. Дараа нь лигацийн бүтээгдэхүүнийг DH5α компетент эсэд трансформаци хийсэн үр дүнг Зураг 11-д харуулав. Амжилттай лигаци явагдан pET41a-HDV-Ag-His плазмид үүссэн. Мөн DH5α компетент эсэд уг плазмид амжилттай трансформаци хийгдсэн байна. Трансформаци



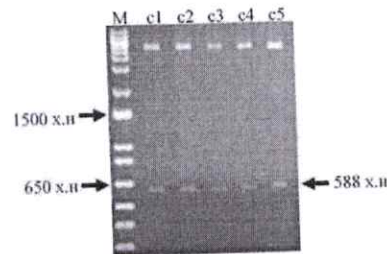
Зураг 12. pET41a векторт HDV-Ag-His генийг клонинг хийсэн үр дүн.

- 1: трансформаци хийгээгүй сөрөг хяналт,
- 2: pEGFP вектор трансформаци хийсэн сөрөг хяналт,
- 3: лигацийн бүтээгдэхүүнийг трансформаци хийсэн

хийхэд эерэг хяналтаар pEGFP вектор, сөрөг хяналтаар плазмид хийгээгүй эсийг тарьсан.

DH5α эсээс pET41a-HDV-Ag-His плазмид ялган авсан үр дүн

Зураг 10 дээрх DH5α-pET41a-HDV-Ag-His эсийг тавагнаас санамсаргүйгээр 5ш клон (c1, c2, c3, c4, c5) сонгон авч LB-амр тэжээлийн орчинд өсгөвөрлөсөн. Дараа нь бактерийн эсээс плазмид ялган авах аргаар pET41a-HDV-Ag-His плазмидыг ялган авсан. Ялган авсан плазмидаас тус бүр 2 мкл-ыг NdeI ба Hind



Зураг 11. DH5α эсээс pET41a-HDV-Ag-His плазмид ялган авсан үр дүн

Бөгөөд таслаад агароз гел электрофорезоор гүйлгэсэн үр дүнг зураг 12-д харуулав. Үр дүнгээс хархад c5 клонноос ялгасан плазмидын гарц их байсан тул үүнийг сонгож авч цаашдын судалгааны ажилд ашигласан.

BL21DE3 компетент эсэд pET41a-HDV-Ag-His плазмидыг трансформаци хийсэн үр дүн

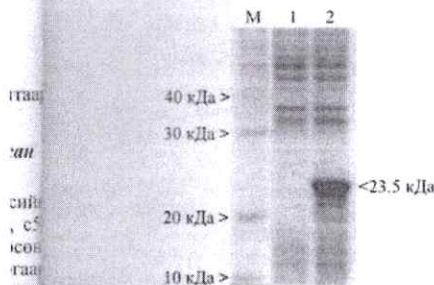
pET41a-HDV-Ag-His плазмидыг экспрессын эс BL21DE3-д трансформаци хийсэн үр дүнг Зураг 13-д харуулав. Трансформаци хийхэд эерэг хяналтаар pEGFP вектор, сөрөг хяналтаар плазмид хийгээгүй эсийг тусгасан. Энэхүү бактерийн омгийг үйлдвэрийн омог гэж нэрлэв.



Зураг 14. BL21DE3 компетент эсэд pET41a-HDV-Ag-His плазмидыг трансформаци хийсэн үр дүн:
1. pET41a-HDV-Ag-His плазмид трансформаци хийсэн,
2. pEGFP вектор трансформаци хийсэн эерэг хяналт,
3. трансформаци хийгээгүй сөрөг хяналт

Уургийн гел электрофорезийн үр дүн

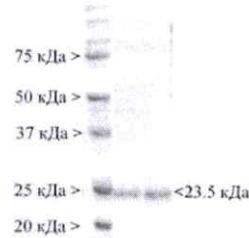
HDV-Ag-His рекомбинант уураг нийлэгжүүлэгч төгтвортой бактерийн омог гаргасан үр дүн: HDV-Ag-His уураг нийлэгжүүлэгч бактерийн омог болон трансформаци хийгээгүй бактерийн омгийн уургийн нийлэгжүүлэлтийн харьцуулалт хийсэн үр дүнг Зураг 14-д харуулав. Харьцуулалтын үр дүнгээр үйлдвэрийн омог HDV-Ag-His рекомбинант уургийг нийлэгжүүлж байгааг батлав.



Зураг 16. HDV-ын нуклеокапсидын уургийг нийлэгжүүлэгч төгтвортой бактерийн омог гарган авсан үр дүн:
1. Гел шилжүүлэн суулгаагүй эс,
2. Гел шилжүүлэн суулгасан эс

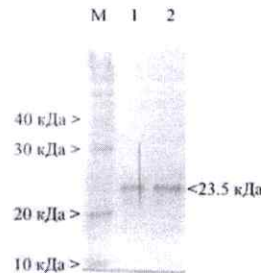
HDV-Ag-His рекомбинант уургийг бактерийн эсэд нийлэгжүүлэн Ni-NTA хроматографаар цэвэрлэн авсан үр дүн: Бактерийн эсэд уураг нийлэгжүүлэх аргаар 1 л бактерийн өсгөвөрөөс 2 г эсийн пелет хураан авсан. Бактерийн эсээс нийт уураг ялгах аргаар нийт уургийн уусмалыг ялган авсан. Дараа нь нийт уургаа Ni-NTA баганаар урсган HDV-Ag-His нийлмэл уураг ялган авсан. Уг ялган авсан HDV-Ag-His рекомбинант уургаас дээж бэлтгэн 12%-ийн уургийн гел электрофорезоор 15 мкл уургийн дээжийг гүйлгэсэн үр дүнг Зураг 15-д харуулав. Зорилтот HDV-Ag-His рекомбинант уураг 23.5 кДа

молекул масстай бөгөөд уургийн гел дээр 25 кДа хэмжээтэй уургийн маркерын доор банд үүсгэн гарсан байна. Бас өөр нэгэн баталгаа бол Ni-NTA баганаар ялгахад his*tag агуулсан уураг л зөвхөн ялгагдана.



Зураг 13. HDV-Ag-His уургийг Ni-NTA аффинити хроматографаар цэвэрлэсэн үр дүн.

Уургийн диализ хийсэн үр дүн: Ni-NTA аффинити хроматографаар ялган авсан HDV-Ag-His рекомбинант уургийн нийт 20 мл уусмалыг диализ хийсэн. Диализыг усны эсрэг хийж уураг ууссан байсан Ni-NTA уусгах буферийг усаар сольж нийт 25 мл усанд ууссан HDV-Ag-His рекомбинант уураг гарган авсан. Уураг усанд сайн уусах өгөлгүй бага хэмжээний тундасжилттай байсан. Диализ хийхээс өмнөх болон дараах уургийн агууламж оорчлогдсон шинж байхгүй байгааг Зураг 16-д харуулав.



Зураг 15. Уургийн диализ хийсэн үр дүн.

- 1: Диализ хийсэн уураг (усанд уусгасан)
- 2: Диализ хийхээс өмнөх уураг (Ni-NTA уусгах буферт уусгасан)

Уургийн агууламж тодорхойлсон үр дүн

Уургийн агуулгыг тодорхойлохдоо Зураг 2 дээрх альбумины жиших муруйг ашигласан. Уургийн диализ хийсний дараа HDV-Ag-His рекомбинант уураг 197 мкг/мл-ын агууламжтай байна.

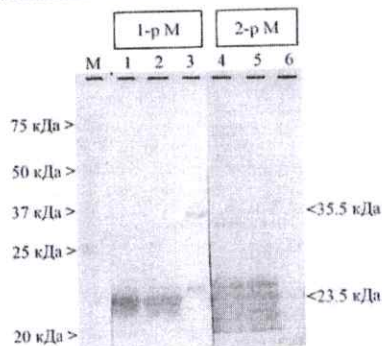
Вестерн блот хийсэн үр дүн

HDV-Ag-His рекомбинант уургийг баталгаажуулалт болон HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурт ашиглах боломжтойг Вестерн блотын арга ашиглан тодорхойлсон. Үүнд anti-his эсрэг бие, HDV эерэг хүний цусны дээж ашигласан. Хоёрдогч эсрэг биеэр anti-rabbit HRP IgG, anti-human HRP IgG-г ашигласан. Энэ туршилтад гурван дээж авсан үүнд: дээж №1 Ni-NTA баганаар хроматографаар ялгасан HDV-Ag-His рекомбинант уураг, дээж №2 уургийн диализ хийсэн HDV-Ag-His рекомбинант уураг, дээж №3 GST-bind

баганаан хроматографар ялгасан GST уураг. Гурван дээжийг уургийн гель электрофорезоор гүйлгэсэн. Дараа нь Вестерн блот хийсэн. PDVF мембранаа 1-р, 2-р мембран гэж хуваан эсрэгбиеээр үйлчилсэн. 1-р мембранд анхдагч эсрэгбие anti-his хоёрдогч эсрэг бие anti-rabbit-HRP-ээр, 2-р мембранд анхдагч эсрэг бие нь HDV эерэг хүний ийдэс хоёрдогч эсрэг бие anti-human HRP хийсэн.

1-р мембранд анхдагч эсрэгбиеээр anti-his, хоёрдогч эсрэгбиеээр anti-rabbit RHP IgG хийснээр зөвхөн полихистидин агуулсан уураг дээр л холбогдоно. Иймд 1-р мембран дээр 1, 2, 3 дугаар мөрөн дээр банд үүссэн байгааг Зураг 17-д хуруулав. Харин GST уураг нь 35.5 кДа хэмжээтэй, полихистидин агуулдаг тул мөн адил банд үүсгэнэ.

2-р мембранд анхдагч эсрэг биеэр HDV эерэг хүний цусны дээж, хоёрдогч эсрэг биеэр anti-human RHP IgG ашиглахад зөвхөн HDV-Ag-His рекомбинант уургийг таньж холбогдсоноор 4, 5-р мөрөн дээр банд үүсэн байна. Харин GST уурагт хүний цусны дээж дэх уураг таньж холбогдоогүй тул банд үүсгээгүй байна. Энэхүү Вестерн блотын үр дүнгээс дүгнэхэд HDV-Ag-His рекомбинант уургийг HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурт ашиглах бүрэн боломжтойг нотлов.



Зураг 18. Вестерн блотын үр дүн.

- 1: Хроматографар ялгасан HDV-Ag-His рекомбинант уураг
- 2: Диализ хийсэн HDV-Ag-His рекомбинант уураг
- 3: Хроматографар ялгасан GST уураг
- 4: Хроматографар ялгасан HDV-Ag-His рекомбинант уураг
- 5: Диализ хийсэн HDV-Ag-His рекомбинант уураг
- 6: Хроматографар ялгасан GST уураг

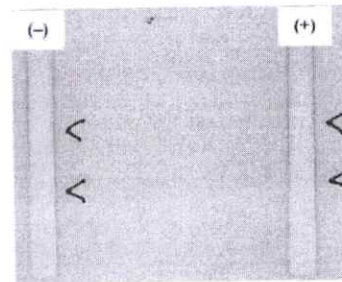
Дот блот хийсэн үр дүн

HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурын прототип загвар гарган туршилт хийсэн үр дүнг Зураг 18, 19-д харуулав. Бид прототип загварын олон хувилбар гарган туршсан. Туршилтийн үр дүнд HDV-ийн халдвартай хүний цусны дээжээс HDV-ийн халдварыг бидний зохион бүтээсэн HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурын прототип загвар амжилттай илрүүлсэн.

Туршилтад: anti-his IgG эсрэг бие, HDV-Ag-His рекомбинант уураг (эсрэгтөрөгч), HDV эерэг хүний цусны дээж (anti-HDV IgG эсрэг бие), алттай холбогдсон anti-human IgG эсрэг бие ашиглагдсан.

1-р загварт 2 мкл HDV-Ag-His рекомбинант уургийг нитроцеллюлоз мембран дээр дусаасан. Мөн 5 мкл алттай холбогдсон anti-human IgG эсрэгбие, 45 мкл PBS-

Triton x100 (0.5%), 50 мкл HDV эерэг/сөрөг хүний цус дээжийн уусмал бэлдэн туршсан.



Зураг 17. HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурын 1-р туршилтын загвар.

2-р загварт 20 мкл anti-his IgG эсрэг бие, нитроцеллюлоз мембран дээр дусаасан. Мөн 5 мкл алттай холбогдсон anti-human IgG эсрэг бие, 20 мкл HDV-Ag-His рекомбинант уураг, 50 мкл PBS-Tween 20 (0.25%), 20 мкл HDV эерэг/сөрөг хүний цусны дээжийн уусмал бэлдэн туршсан.



Зураг 19. HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурын 2-р туршилтын загвар.

IV. ХЭЛЭЛЦҮҮЛЭГ, ДҮГНЭЛТ

Бид гепатит дельта вирусийн нуклеокапсидыг уургийг генийн инженерчлэлийн технологи ашиглаж HDV-Ag-His рекомбинант уураг амжилттай гарган авлаа. Энэхүү HDV-Ag-His рекомбинант уургаар HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурын прототип загварууд зохион бүтээх туршилтыг амжилттай хийсэн. Цаашин судалгааны үр дүнг үйлдвэрлэлд нэвтрүүлэх боломжийг эрэлхийлэхийг зорьсон. Судалгааны ажлын үр дүнд доорх дүгнэлтүүдийг хийж, таамаг дэвшүүлж байна. Мөн шинжлэх ухааны үндэслэлийг нарийвчлан судлах шаардлагатай хэмээн үзэж байна.

- Вестерн блотын аргаар HDV-Ag-His рекомбинант уургийг HDV түргэвчилсэн оношлуурт ашиглах боломжтойг нотолсон.
- Бид HDV-ийн халдвартай хүний цусны дээж болон эрүүл хүний цусны дээжийг ашиглан HDV түргэвчилсэн оношлуурын ажиллагааг амжилттай шалгасан.
- Бид цаашин HDV-ийн түргэвчилсэн

хүний цус

өнөштүүрын туршилтын загваруудыг гаргаж
оптималь загварыг эрэлхийлнэ.

- HDV-Ag-His рекомбинант уургийг шинж
чанарын нарийвчилсан судалгаа хийн мэдрэг
чанарыг сайжруулна.

ТАЛАРХАЛ

Энэхүү судалгаанд оролцох боломж олгож
судалгааны явцад заавар зөвлөгөө өгсөн удирдагч багш
доктор О.Одгэрэл танд гүн талархал илэрхийлье. Мөн
өдийн ажлаарчлэлийн лабораторийн хамт олондоо
талархал илэрхийлье.

НОМ ЗҮЙ

1. Hai-Yan, C. *et al.* Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *J. Hepatology*. **0**, 1-10 (2018).
2. Zhijiang, M. *et al.* Estimating the Global Prevalence, Disease Progression, and Clinical Outcome of Hepatitis Delta Virus Infection. *J. Infections Diseases*. **221**, 1677-87 (2020).
3. Jiannis, V. *et al.* New epidemiology of hepatitis delta. *J. Liver International*. **40**, 48-53 (2020).
4. Dashtseren, B. *et al.* Endemic prevalence of hepatitis B and C in Mongolia: A nationwide survey among Mongolian adults. *J. Viral Hepat*. **24**, 759-767 (2017).
5. Chen, X. *et al.* A novel quantitative microarray antibody capture (Q-MAC) assay identifies an extremely high HDV prevalence amongst HBV infected Mongolians. *J. Hepatology*. **66**, 1739-1749 (2016).
6. Stephanie D. Gan, *et al.* Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Investigative Dermatology*. **133**, e12 (2013).
7. Ding, J. *et al.* High expression of small hepatitis D antigen in Escherichia coli and anELISA for diagnosis of hepatitis D virus. *J. Virological Methods*. **197**, 34-38 (2014).
8. Xue-Xin, L. *et al.* Expression and Purification of Recombinant Hepatitis Delta Virus (HDV) Antigen for Use in a Diagnostic ELISA for HDV Infection Using the High-Density Fermentation Strategy in Escherichia coli. *J. Biomed Environ Sci*. **6**, 417-423 (2016).
9. Vincent, P. *et al.* A critical analysis of codon optimization in human therapeutics. *J. Trends Mol Med*. **11**, 604-613 (2014).
10. Zuccola, H. *et al.* Structural basis of the oligomerization of hepatitis delta antigen. *J. Current Biology*. **6**, 821-830 (1998).
11. Florian, L. *et al.* Hepatitis delta virus: insights into a peculiar pathogen and novel treatment options. *J. Hepatology*. doi:10.1038/nrgastro.2016.126
12. Kumar, V. *et al.* The biology and pathogenesis of hepatitis viruses. *J. Current science*. **98**, 312-325 (2010).
13. Inoue, J. *et al.* High prevalence of hepatitis delta virus infection detectable by enzyme immunoassay among apparently healthy individuals in Mongolia. *J. Med Virol*. **76**, 333-40 (2005).

14. Zhou, Y. *et al.* High cell density cultivation of recombinant Escherichia coli for produg of recombinant human GLPs production. *J. Protein Expr Purif*. **85**, 38-43 (2012).
15. Ding, JY. *et al.* Gene optimization, protein expression, purification and characterization of the HDV antigen for diagnosis. *Chinese J Exp Clin Virol*. **26**, 87-9 (2012).
16. Zhang, Y. *et al.* The influences of lactose as an inducer on the expression of the recombinant proteins in Escherichia coli BL21 (DE3). *Chin J Biotech*. **16**, 464-8 (2000).

Хепатитын Дельта вирусийг илрүүлэх ЛАМП (Loop-Mediated Isothermal Amplification) полимеразын гинжин урвалын технологийн ХӨГЖҮҮЛЭЛТ

Энхжаргал Саруул
Хими, биологийн инженерчлэлийн
тэнхим
Монгол Улсын Их Сургууль
Монгол улс, Улаанбаатар хот
srl@onomfoundation.org

Ариунгэрэл Номин
Хими, биологийн инженерчлэлийн
тэнхим
Монгол Улсын Их Сургууль
Монгол улс, Улаанбаатар хот
a.nomin@onomfoundation.org

Ойдовсамбуу Одгэрэл
Хими, биологийн инженерчлэлийн
тэнхим
Монгол Улсын Их Сургууль
Монгол улс, Улаанбаатар хот
odgerel@seas.num.edu.mn

Хураангуй— Элэгний Хепатит Дельта вирусийн халдвар (HDV) нь элэгний өвчлөлтэй холбоотой нас баралтын тэргүүлэх хүчин зүйлсийн нэг юм. HDV-ийн халдварыг эрт илрүүлж, оношлох нь вирусийн тархалтыг бууруулахад чухал үүрэгтэй боловч ихэнхи хүмүүс элэгний өвчлөл нь аль хэдийн ноцтой үе шатанд хөгжсөн хожуу үедээ халдвараа мэддэг. Монгол улс нь HDV-ийн тархалт өндөртэй, элэгний өвчлөлөөс үүдсэн нас баралтаар дэлхийд тэргүүлэгч орон бөгөөд бид HDV-ийн халдварыг илрүүлэх шинэ үеийн ЛАМП (Loop-Mediated Isothermal Amplification) полимеразын гинжин урвал (ПГУ)-ын арга зүйг боловсруулж үнэлэх зорилгоор уг судалгааны ажлыг хийсэн. ЛАМП ПГУ нь үнэтэй Бодит хугацааны полимеразын гинжин урвал (БХ-ПГУ)-ын циклятор гэх мэт тусгай тоног төхөөрөмж шаардахгүй тул хөгжиж буй эдийн засаг буурай улс, оронд хэрэглэхэд тохиромжтой технологи юм. Бид HDV-ийг илрүүлэх ЛАМП ПГУ-ын арга зүйг боловсруулахын тулд HDV-ийн халдвартай болон халваргүй хүмүүсийг судалгаанд хамруулж, Эрүүл мэндийн яамны анагаахын ёсны зүй хяналтын хороогоор батлуулсан. Мөн одоогоор мэдэгдэж буй HDV-ийн бүх 8 генотипын геномын дараалалд дүн шинжилгээ хийж хамгийн хадгалагдсан геномын бүсэд 5 өөр хос праймер багцуудыг зохион бүтээж ПГУ-ыг явуулсан. Багц праймер хослолуудыг эрүүл хүмүүсийн дээжид туршилт хийж хуурамч эерэг (false positive) үр дүнд шүүж тодорхойлод 5-р багц праймер хамгийн сайн байсан. БХ-ПГУ-ыг хяналтын арга зүй болгож судалгаанд хамрагдагчдын HDV илрүүлэх шинжилгээг хийж баталсан. Улмаар БХ-ПГУ-аар HDV халдвартай болон халдваргүй батлагдсан дээжүүдийг ЛАМП ПГУ-ын арга зүйг боловсруулахад ашигласан ба ПГУ-ын бүтээгдэхүүнүүдийг агароз гель электрофорез болон диссоциацийн муруйгаар баталгаажуулсан. Өнгө үзүүлэгч болон флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын олшруулалт явагдах температур, хугацаа, мэдрэг болон өвөрмөц шинж чанарыг хэд хэдэн туршилтын үр дүнгээр тодорхойлсон. Өнгө үзүүлэгч ЛАМП ПГУ-ыг явуулахад 65 цельсийн градус, флуоресценц ЛАМП ПГУ-ыг явуулахад 68 цельсийн градусын температурт HDV-ийн РНХ-ийг олшруулахад тохиромжтой байсан ба хангалттай өвөрмөц болон мэдрэг чанартай байв. Бидний одоогоор боловсруулсан HDV ЛАМП шинжилгээ нь цусны дээжинд HDV-РНХ илрүүлэхэд хурдан, хэрэглэхэд хялбар, өндөр мэдрэмжтэй технологи юм хэмээн дүгнэсэн ба цаашид улам сайжруулж хэрэглээнд нэвтрүүлэхийг зорьж байна.

Түлхүүр үг—Хепатитын Дельта Вирус, HDV, ЛАМП ПГУ, БХ-ПГУ

I. УДИРТГАЛ

Хепатитын Дельта вирус (HDV) нь хепатитын В вирус (HBV)-ийн гадаргуугийн антигенийн тусламжтайгаар хүнд халдварладаг, дангаараа халдвар үүсгэх чадваргүй вирус юм[1]. HDV-ийн халдвар нь хепатит вирусүүдийн хамгийн хүнд хэлбэрийн өвчлөлийг үүсгэх ба маш хурдацтайгаар элэгийг хатууралд оруулж цаашлаад элэгний хорт хадварыг үүсгэдэг. Монгол улс 100,000 хүн амд ногдох элэгний хавдраар дэлхийд тэргүүлж байгаа нь дэлхийн дунджаас 8 дахин их үзүүлэлттэй байна [2].

Уг вирусийг эмчлэх үр дүнтэй эмчилгээ одоогоор байхгүй бөгөөд эрт илрүүлэх шинжилгээг хийж элэгний өвчлөлдүүдээс урьдчилан сэргийлэх боломжтой юм. Одоогоор дэлхийд HDV-ийг вирусийн эсрэгбие болон эсрэгтөрөгчийг илрүүлэх ийлдэс судлал буюу серологийн аргаар мөн вирусийн РНХ-д суурилсан молекулын оношилгоогоор илрүүлж байна [3]. Шинэ үеийн ЛАМП ПГУ нь молекул оношилгооны нэгэн төрөл бөгөөд уламжлалт ПГУ-тай харьцуулахад өндөр мэдрэмтгий, тусгай багаж болон мэргэжилтэн шаардахгүй, усан ванн эсвэл дулааны блокийн төхөөрөмж ашиглан хэрэглэж болохуйц, хурдан, хялбар хэрэглээтэй технологи юм [4, 5]. Тус технологи нь маш өвөрмөц бөгөөд ПГУ-аар нэг сая хувь олшруулсан ДНХ-ийн хэмжээг нэг цагийн дотор тэрбум хувь хүртэл нэмэгдүүлдэг [6]. ЛАМП ПГУ нь тодорхой праймер шаарддаг бөгөөд зорилтот дараалал бүрт урвалын нөхцлийг сайтар оновчтой болгох шаардлагатай, мөн олшруулалтын дараах салгах үе шат байхгүй тул бохирдолд илүү өртөмтгий байх магадлалтай [7].

Одоогоор HDV-ийн ЛАМП арга зүйг боловсруулсан “Wang et al, Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system for rapid detection of HDV genotype 1” нэг судалгааны өгүүлэл байна. Уг судалгааг өөрсдийн боловсруулсан HDV-ийг илрүүлэх ЛАМП ПГУ-ын арга зүйтэй харьцуулбаас зөвхөн HDV-ийн 1-р генотипийн дараалалд тулгуурлаж ПГУ-ийг явуулсан, агарозын гель электрофорез болон SYBR green бодисыг ПГУ-ын бүтээгдэхүүнд нэмж үр дүнг харсан, мэдрэг чанарыг нийт нуклейн хүчлийн массийн хэмжээ дээр үндэслэж тооцсон зэрэг хязгаарлагдмал талуудтай байсан. Харин бидний судалгааны ажлын ялгарах давуу талууд нь HDV-ийн одоогоор мэдэгдэж буй бүх 8 генотипийн хамгийн хадгалагдсан дараалал дээр ПГУ-ийг явуулж, орчин үеийн шууд нүдээр үнэлэх колориметрик болон БХ-ПГУ-

ын багаж ашиглан бодит хугацаанд вирусyг илрүүлэх флуоресценц арга зүй ашигласан. Түүнчлэн мэдрэг чанарыг шууд молекулын тоо дээр үндэслэсэн зэрэг юм. Бидний боловруулсан арга зүй, судалгаанаас өөр HDV-ийг илрүүлэх өнгө үзүүлэгч колориметрик болон бодит хугацаанд вирусийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын эрдэм шинжилгээний өгүүлэл, мэдээлэл одоогоор байхгүй байна.

II. МАТЕРИАЛ, АРГА ЗҮЙ

A. Судалгааны ёс зүйн зөвшөөрөл

Эрүүл мэндийн яам, анагаахын ёс зүйн хяналтын хорооны 2021 оны 6 дугаар сарын 30-ний өдрийн 243 дахь тогтоолоор баталгаажсан.

B. Судалгааны дээж

Судалгаанд ашиглах дээжийг “Элэгний төв” эмнэлгийн клиникийн лабораторид авсан ба Хепатитын Дельта вирусийг илрүүлэх БЦ-ПГУ шинжилгээгээр HDV халдвартай 35-40 насны 8 хүн (3 эмэгтэй, 5 эрэгтэй), халдваргүй буюу эрүүл 20-24 насны 15 (8 эмэгтэй, 7 эрэгтэй) хүний цусны серумыг ашиглаж нийт 23 хүний дээж дээр уг судалгааг хийсэн.

C. Хепатитын Дельта вирусийн геномын дарааллын анализ

HDV-ийн нуклейн хүчлийг илрүүлэх ЛАМП ПГУ-ын технологийн арга зүйг боловсруулахын тулд HDV-ийн генийн дараалал буюу геном дээр ЛАМП ПГУ-ын полимержуулах урвалыг явуулах боломжтой гомолог өндөр (conserved) дарааллын бүсийг тодорхойлно. Үүний тулд HDV-ийн одоогоор мэдэгдэж буй нийт 8 генотипийн геномын дарааллыг хооронд нь харьцуулсан.

D. ЛАМП ПГУ-ын праймер боловсруулалт

ЛАМП ПГУ-ын 5 багц праймерыг зориулалтын программ (NEB® LAMP Primer Design Tool) ашиглан зохиосон.

E. Хепатитын Дельта вирусийн нуклейн хүчил ялгах

“Bioactiva diagnostica GmbH” компанийн BioActGene® Virus Purification цомог ашиглан зааврын дагуу РНХ ялгаж 50 мкл RNase усанд уусгаж -80°C-д хадгалсан.

F. Хепатит Дельта вирусyг илрүүлэх бодит цагийн полимеразын гинжин урвал.

Хепатитын Дельта вирусийн халдварыг илрүүлэх ЛАМП ПГУ-ын арга зүйг боловсруулахын тулд, БЦ-ПГУ-тай харьцуулж, баталгаажуулна. HDV-ийг илрүүлэх БЦ-ПГУ-ыг “Bio-Rad” компанийн iTaq™ Universal Probes One-Step цомог болон Agilent Technologies Stratagene Mx3005p багажийг ашиглан БЦ-ПГУ-ын туршилтын ажлыг хийж гүйцэтгэсэн. HDV-ийн БЦ-ПГУ-ын шууд праймер 5'-GGCWCTCCCTTAGCCATCCG-3', урвуу праймер 5'-GGTCGGCATGGCATCTCC', проб 5'-6FAM-CTCCTWCGGATGCCAGGTCGGAC-BHQ1-3'. БЦ-ПГУ-ын мастер холимогт праймер болон проб тус бүр 10 мкмоль, iTaq 2x буфер 12,5 мкл, урвуу транскриптаза энзим 0,5 мкл, дээж РНХ 9 мкл, нийт эзэлхүүн 25 мкл байна. БЦ-ПГУ-ыг явуулах нөхцөл: урвуу транскриптаза

үе-50°C-д 20 мин, пре денатурацийн үе-95°C-д 3 мин, денатурацийн үе-15 сек, аннилинг ба экстенци үе 60°C-д 1 мин. Аннилинг ба экстенци үеийг 40 цикл давтана.

G. Хепатит Дельта вирусyг илрүүлэх ЛАМП ПГУ-ын арга зүйг боловсруулах

1) Колориметрик буюу өнгө үзүүлэгч ЛАМП ПГУ

“New England Biolabs” компанийн WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix цомог ашиглан HDV-ийг илрүүлэх өнгө үзүүлэгч ЛАМП ПГУ-ын туршилтын ажлыг гүйцэтгэв. HDV-ийг илрүүлэх ЛАМП праймеруудын холимог: ВР болон FIP 1,6 мкмоль, LB болон LF 0,4 мкмоль, В3 болон F3 0,2 мкмоль байхаар ажлын уусмалыг бэлдэнэ. Өнгө үзүүлэх ЛАМП ПГУ-ын мастер холимог 2x буфер 10 мкл, праймеруудын холимог 2 мкл, дээж РНХ 3 мкл, ус- 5 мкл, нийт эзэлхүүн 20 мкл байна. Урвалыг тогтмол 65°C-д 1 цагийн турш инкубацилна.

2) Флуоресценц ЛАМП ПГУ

“New England Biolabs” компанийн WarmStart® LAMP Kit болон Agilent Technologies Stratagene Mx3005p БХ-ПГУ-ын багажийг ашиглаж FAM болон SYBR® сувгаар HDV-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын туршилтыг гүйцэтгэсэн. Флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын мастер холимог: 2x буфер 10 мкл, ЛАМП праймерын холимог 2 мкл, Sybr green флуоресценц будаг 0,4 мкл, дээж РНХ 3 мкл, ус-4,6 мкл, нийт эзэлхүүн 20 мкл болно. Флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын нөхцөл: пре денатураци 68°C-д 20 мин, денатурац 68°C-д 30 сек, аннилинг ба экстенци 68°C-д 20 сек, энэ 3 ПГУ-ын шатлалыг нийлүүлээд 50 цикл давтаж явуулна. Халаалтын муруйн шат 95°C-д 1 мин, 55°C-д 30 сек, 95°C-д 30 сек 1 цикл байна.

H. Агароз гель электрофорез

Агарозын гелийг 1% байхаар тохирох хэмжээний агароз дээр 0.5x TBE буфер нэмж буцалгана. Уусмалаа 60°C хүртэл хөргөсний дараа этидиум бромидыг 0.5 мкг/мл концентрацтай байхаар тооцож нэмээд уусгана. Дараа нь уусмалаа хэвэнд цутгаж дээж хийх нүх гаргах самыг суурилуулан царцаана. Дээжинд 6x глишерол лоадинг буфер нэмж гелиний нүхэнд хийгээд 56 В-д 30-45 мин гүйлгэнэ. ДНХ-ийн уртыг тодорхойлоход Invitrogen компанийн 1kb plus ДНХ маркер ашигласан.

III. ҮР ДҮН

A. Хепатитын Дельта вирусийн геномын дарааллын анализын үр дүн

HDV-ийн одоогоор мэдэгдэж буй нийт 8 генотипийн геномын дарааллыг хооронд нь харьцуулахад хамгийн бага ялгаатай EMBOSS_001 CHINAN M (GenBank: NM046802.1) геномын дараалал байсан тул тус геномын дарааллыг сонгон авч ПГУ явуулах боломжтой тохиромжтой бүсийг тодорхойлсон (**Зураг 1**).

B. Хепатитын Дельта вирусийг илрүүлэх ЛАМП ПГУ-ын праймер загварчлалын үр дүн.

HDV-ийн геномын хамгийн хадгалагдсан бүсэд зохиогдсон ЛАМП ПГУ-ын праймеруудын дарааллыг **Хүснэгт 1**-д харуулав.

1-ctcgggctcgggcgagtcagcagtcctctttacagaaaagagtaagagtactga-60
 61-ggactgccgcctctagccgagatgagccggtccgagtcgaggaagaaccgaggaggaga-120
 M S R S E S R K N R G G R 13
 121-gaagagatcctcagcagtggtggccggaagaagaagttagaggaactcgagagagac-180
 E E I L E Q W V A G R K K L E E L E R D 33
 181-ctccggaagacaaagaagaactcaagaagatagaggacgaaaaatccctggctggggaac-240
 L R K T K K K L K K I E D E N P W L G N 53
 241-atcaaaggaattctcggaaagaaggataaggatggagagggggctccccggcgaagagg-300
 I K G I L G K K D K D G E G A P P A K R 73
 301-gccccgaacggaccagatggaggcagactccggacctgggaagaggcctctcaggggagga-360
 A R T D Q M E A D S G P G K R P L R G G 93
 361-ttcaccgacaaggagaggcaggatcaccgacgaaggaaggccctcgagaacaagaagaag-420
 F T D K E R Q D H R R R K A L E N K K K 113
 421-cagctatcggcgggaggcaagaacctcagcaaggaggaagaagaggaactcaggagggtg-480
 Q L S A G G K N L S K E E E E E L R R L 133
 481-accgaggaagacgagagaagggaaagaagagtagccggcccggtgggggtggaac-540
 T E E D E R R E R R V A G P P V G G V N 150
 541-cccctcgaaggtggatcgaggggagcgccggggggcggtcctcgtcccattctgcaggga-600
 P L E G G S R G A P G G G F V P N L Q G 173
 601-gtcccggagtcctcctctcggaccggggaggggtggacatcaggggaaaccaggga-660
 V P E S P F S R T G E G L D I R G N Q G 193
 661-tttccataggatatactcttccagccgatccgcctttctccccagagttgtcgaccc-720
 F P 195
 721-cagtgaataaagcgggtttccgctcacaggtttgctctcgcgtccttcttctctctcg-780
 781-ggtcggcatggcatctccacctcctcgcggtccgacctggcgctccgaaggaggacgcac-840
 841-gtccactcggatggctaaggagagccaattttctcccgatccctatcggaaactagag-900
 901-agatttgtgggtcccattcgccattaccgaggggacggtcccctcggaaatggtgccagc-960
 961-cggcgccagcagaggaggtgggaccatgcccggccatcaggaagaaggatggaacgcgg-1020
 1021-accctgcagagtggggtcccgccattcccgggcgacccttggggggggagtcggaatcga-1080
 1081-gcatcgggaagggcatcccatggctccactgggtcccgggtgttcccagcatcccctccgg-1140
 1141-tcactttcgaaggggtccgggtcccgctagatggggacgataagtcgagttccccggg-1200
 1201-ataagcctcactcgtcccctctcggggggggaacacccaccggctagccccgttgcctt-1260
 1261-ctttgggatcctcctcgtctcgggtctcccctactcctagcatcttctccaatcgctatg-1320
 1321-gtcttactcctaccgctcgaagcgctcttgttcgctgaaggggtcctctggaggtggga-1380
 1381-tcactgctcatctccgagtgattcctccctctgagtgctactcaacccttcgggcccga-1440
 1441-gtgcctcctcagatctgggatcgggcccctcggatcgggaggcccgccttttcttcca-1500
 1501-ccttctctttccccttcagagattctccggcgttggtgggatctcatccgcttctctaa-1560
 1561-gacctctctttgcttcttgggagtagttctccgacgttccaatgctctttaccgtgaca-1620
 1621-tcccctctcgggagctgatcctcccccgctctcctcgtcggaaacttggtcagg -1677

Зураг 1. HDV-ийн геномын дараалал. Улаан өнгөөр хадгалагдсан дарааллын бүсийг илэрхийлэв

Хүснэгт 1. HDV-ийг илрүүлэх ЛАМП ПГУ-ын праймерын дараалалууд	
Праймер	Дараалал
HDV-Set 1	
F3	5'-GGCCCTCGAGAACAAGAAGA-3'
B3	
FIP	5'-TCGGTCAACCTCCTGAGTTCCTCTATCGGCGGGAGGCAA-3'
BIP	5'-AGGGAAAGAAGAGTAGCCGGCCCTCCCTCGATCCACCTTC-3'
LB	5'-TTCTCCTCCTTGCTGAGG-3'
LF	5'-CGGTTGGGGTGTGAAC-5'
HDV-Set 2	
F3	5'-TCCCCCTTCTCTCGGACC-3'
B3	5'-CCATGCCGACCCGAAGAG-3'
FIP	5'-GCGGATCGGCTGGGAAGAGTATGGGAGGGGCTGGACAT-3'
BIP	5'-TTCTCCCCAGAGTTGTCGACCCGAAAGAAGACGCGAGACG-3'
LB	5'-AATCCCTGGTTCCCTG-3'
LF	5'-CGGGTTCCGCTCACA -3'
HDV-Set 3	
F3	5'-CGATCCGCCCTTTTCTCC-3'
B3	5'-GCTCTCCCTTAGCCATCCG-5'
FIP	5'-ACGCGAGACGCAAACCTGTGCCAGAGTTGTCGACCCCA-3'
BIP	5'-TCGGGTCGGCATGGCATCAGTGGACGTCGCTCCTC-3'
LB	5'-CGGAAACCCGCTTTATTCAC-3'
HDV-Set 4	
F3	5'-GGGAAGAGGCCTCTCAGG-3'
B3	5'-TCACACCCCAACCGG-3'
FIP	5'-TCCCGCGATAGCTGCTTCTCCGACAAGGAGAGGCAGGAT-3'
BIP	5'-GCAAGAACCTCAGCAAGGAGGACCGGCTACTTCTTTCCCT-3'
LB	5'-GAGGGCCTTCTTCGTC-3'
LF	5'-AGAAGAGGAACTCAGGAGGT-3'
HDV-Set 5	
F3	5'-GAGGATTCACGACAAGGAG-3'
B3	5'-TCACACCCCAACCGG-3'
FIP	5'-TCCCGCGATAGCTGCTTCTAGGACGATCACCGACG-3'
BIP	5'-GCAAGAACCTCAGCAAGGAGGACCGGCTACTTCTTTCCCT-3'
LB	5'-TTCTCGAGGGCCTTCT-3'
LF	5'-GGAACTCAGGAGTTGACC-3'

С. Бодит цагийн полимеразын гинжин урвалын үр дүн.

1) БЦ-ПГУ-аар HDV-ийн нуклейн хүчлийн дараалсан шингэрүүлгийг бэлдсэн нь.

Судалгаанд зориулан стандарт дээжүүд бэлдэх зорилгоор вирусийн РНХ-ийг 1х (575000 IU/mL), 10х (57500 IU/mL), 100х (5750 IU/mL), 1000х (575 IU/mL) 10000х (57 IU/mL) дахин шингэлж бэлдэв (Хүснэгт 2). Улмаар бэлдсэн дээжүүдийг БЦ-ПГУ-аар баталж хяналтын дээжээр сонгов (График 1). Хяналтын дээж бүхий HDV-ийн нуклейн хүчлийг аравтын шингэрүүлэг хийж БЦ-ПГУ явуулсан үр дүнгээр стандарт муруй байгуулахад $R^2=0.9953$ (детерминацын коэффициент), $y=3.826x+17.99$ (регрессийн муруйн тэгшитгэл) гарсан (График 2).



График 1. HDV-ийн дараалсан шингэрүүлгийн БЦ-ПГУ-ын үр дүн

2) БЦ тоон ПГУ-аар HDV-ийн халдварыг илрүүлж, баталсан үр дүн.

Судалгаанд хамрагдагч HDV-ийн халдвартай буюу өвчтэй хүмүүсийн цуснаас вирусийн РНХ-ийг ялгаж, БЦ тоон ПГУ-аар тоолох шинжилгээг хийсэн. Шинжилгээний үр дүнгээр вирусийн халдвар хамгийн өндөр тоологдсон 747100 IU/mL байсан бол хамгийн бага тоологдсон нь 219 IU/mL байв (Хүснэгт 3 болон График 3). БЦ-ПГУ-аар HDV халдвартай нь батлагдсан эдгээр хүмүүсийн дээжийг цаашид ЛАМП ПГУ-ын эерэг хяналтын дээж болгож ашигласан.

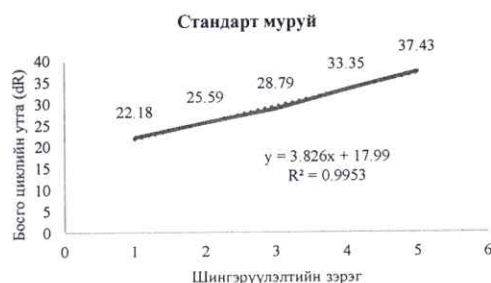


График 2. HDV-ийн нуклейн хүчлийн шингэрүүлэлтийн БЦ-ПГУ-ын стандарт муруй

Хүснэгт 2. HDV-ийн нуклейн хүчлийг шингэрүүлэлт хийж илрүүлсэн БЦ-ПГУ үр дүн

Шингэрүүлэлт	Шингэрүүлэлтийн зэрэг	IU/mL	Босго утга (dR)	Циклийн босго утга (dR)
1-р шингэрүүлэлт	1x	$5 \cdot 10^5$	3159.53	22.18
2-р шингэрүүлэлт	10x	$5 \cdot 10^4$	3159.53	25.59
3-р шингэрүүлэлт	100x	$5 \cdot 10^3$	3159.53	28.79
4-р шингэрүүлэлт	1000x	$5 \cdot 10^2$	3159.53	33.35
5-р шингэрүүлэлт	10000x	$5 \cdot 10$	3159.53	37.43

Хүснэгт 3. БЦ тоон ПГУ-ын HDV-ийн халдварыг илрүүлсэн үр дүн

Д/д	Дээжний нэр	Босго утга (dR)	Босго циклийн утга (dR)	Тоо хэмжээ, IU/mL (хуулбар)
1	Стандарт 1	4094.21	14.21	20000000
2	Стандарт 2	4094.21	21.38	200000
3	Стандарт 3	4094.21	29.68	2000
4	Стандарт 4	4094.21	32.31	200
5	Сөрөг контрол	4094.21	0	0
6	ДЭМБ-стандарт 1	4094.21	24.30	37590
7	ДЭМБ-стандарт 2	4094.21	36.02	26
8	HDV өвчтөн 1	4094.21	21.23	253900
9	HDV өвчтөн 2	4094.21	32.47	236
10	HDV өвчтөн 3	4094.21	25.60	16820
11	HDV өвчтөн 4	4094.21	21.29	244500
12	HDV өвчтөн 5	4094.21	20.67	359500
13	HDV өвчтөн 6	4094.21	21.93	164000
14	HDV өвчтөн 7	4094.21	32.59	219
15	HDV өвчтөн 8	4094.21	19.49	747100

Хүснэгт 4. БЦ-ПГУ-аар эрүүл хүмүүсийг баталсан үр дүн

Д/д	Дээж	Босго утга (dR)	Циклийн босго утга(dR)
1	Эрүүл-1	668.705	No Ct
2	Эрүүл-2	668.705	No Ct
3	Эрүүл-3	668.705	No Ct
4	Эрүүл-4	668.705	No Ct
5	Эрүүл-5	668.705	No Ct
6	Эрүүл-6	668.705	No Ct
7	Эрүүл-7	668.705	No Ct
8	Эрүүл-8	668.705	No Ct
9	Эрүүл-9	668.705	No Ct
10	Эрүүл-10	668.705	No Ct
11	Эрүүл-11	668.705	No Ct
12	Эрүүл-12	668.705	No Ct
13	Эрүүл-13	668.705	No Ct
14	Эрүүл-14	668.705	No Ct
15	Эрүүл-15	668.705	No Ct
16	Сөрөг контрол	668.705	No Ct
17	Эерэг контрол	668.705	22.12

3) HDV-ийн халдваргүй буюу эрүүл хүмүүсийг БЦ-ПГУ-ийн шинжилгээгээр баталсан үр дүн.

HDV-ийн халваргүй эрүүл хүмүүсийн цуснаас вирусийн РНХ-ийг шинжилж, БЦ-ПГУ-аар баталсан ба ЛАМП ПГУ-ын сөрөг хяналтын дээжээр тодорхойлсон (Хүснэгт 4 болон График 4).

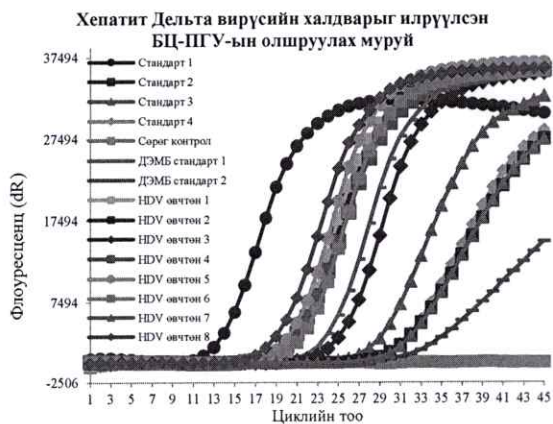


График 3. БЦ тоон ПГУ-аар HDV-ийн РНХ-ийг илрүүлсэн үр дүн

Эрүүл бүлэгт туршсан бодит хугацааны ПГУ-ын олшруулалтын муруй

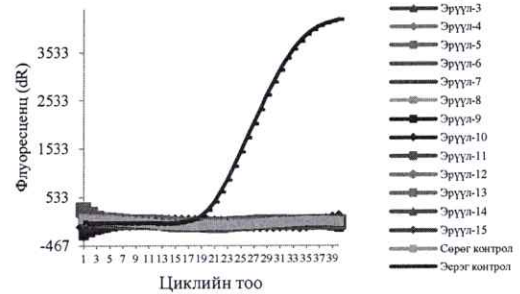


График 4. HDV-ийн халдваргүй эрүүл хүмүүсийг БЦ-ПГУ-аар шалгаж, баталсан үр дүн

D. Өнгө үзүүлэгч ЛАМП полимеразын гинжин урвал

1) *HDV-ийг илрүүлэх ЛАМП ПГУ-ын праймеруудын харьцуулсан үр дүн.*

Вирүсийн геномын хамгийн хадгалагдсан бүс дээр зохиосон ЛАМП ПГУ-ын 5 багц праймеруудыг БЦ-ПГУ-аар батлагдсан HDV-ийн халдаргүй 5 хүмүүсийн дээжүүд дээр харьцуулсан шинжилгээг хийв (Зураг 2). Туршилтын үр дүнгээр 5-р багц праймерын хослол ямар нэгэн хуурамч эерэг үр дүнг илтгэлгүйгээр БЦ-ПГУ-ын хариутай таарч байсан. Иймээс тус багц праймерыг сонгон авч цаашдын ЛАМП ПГУ-ын судалгааг үргэлжлүүлсэн.

2) *Өнгө үзүүлэгч ЛАМП ПГУ-ын мэдрэг чанарыг тодорхойлсон үр дүн.*

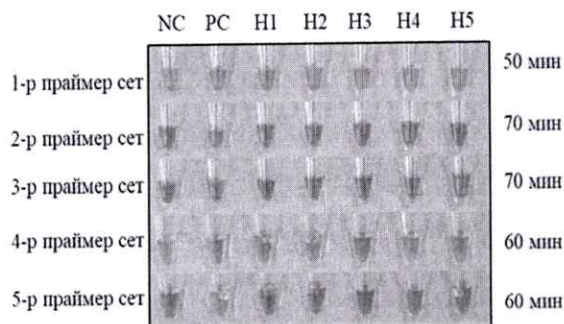
Өнгө үзүүлэгч ЛАМП ПГУ-ын мэдрэг чанарыг БЦ-ПГУ-аар батлагдсан HDV-ийн РНХ-ийн дараалсан шингэрүүлэгүүдээр тодорхойлсон ба бидний зохиож, сонгосон 5-р багц праймерын хослол 59 IU/mL хуртэлх HDV-ийн шингэрүүлгийг илрүүлсэн нь өнгө үзүүлэгч ЛАМП ПГУ-д хангалттай хэмжээний мэдрэг байгааг илтгэсэн.

3) *Өнгө үзүүлэгч ЛАМП ПГУ-аар HDV-ийн халдвартай хүмүүсийн цусны ийлдэснээс ялгасан нуклейн хүчлийг илрүүлсэн үр дүн.*

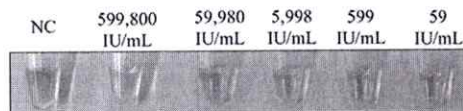
HDV-ийн халдвартай эерэг хяналтын дээжүүдийг өнгө үзүүлэгч ЛАМП ПГУ-аар илрүүлэх шинжилгээг хийхэд 1 хуурамч сөрөг (false negative) гарсан (Зураг 4).

4) *HDV-ийн халдваргүй эрүүл бүлэгт өнгө үзүүлэгч ЛАМП ПГУ-ыг туршсан үр дүн.*

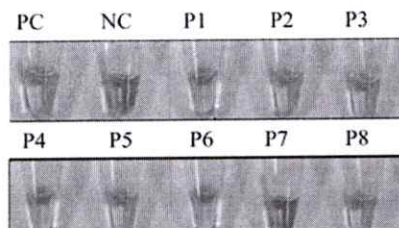
HDV-ийн халдваргүй сөрөг хяналтын дээжүүдийг өнгө үзүүлэгч ЛАМП ПГУ-аар шалгаж баталгаажуулсан үр дүнгээр бүгд ягаан өнгөтэй буюу вирүсийн РНХ-ийн олшруулалт явагдаагүй, халдваргүй байгааг илтгэсэн. Энэ нь БЦ-ПГУ-ын үр дүнтэй (Зураг 5) таарсан ба өнгө үзүүлэгч ЛАМП ПГУ үнэн зөв ажиллаж байгааг харуулж байна.



Зураг 2. ЛАМП ПГУ-ын праймер багцуудын харьцуулалт. NC-Сөрөг контрол буюу ус, PC-Эерэг контрол буюу HDV халдвартай, H1-H5-Эрүүл буюу HDV халдваргүй

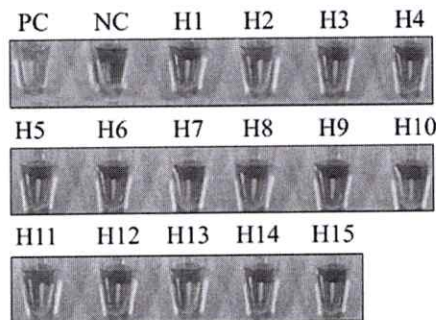


Зураг 3. Өнгө үзүүлэгч ЛАМП ПГУ-аар HDV-ийн стандарт дээжийн дараалсан шингэрүүлгүүдийг илрүүлсэн үр дүн. NC-Сөрөг контрол



Зураг 4. Өнгө үзүүлэгч ЛАМП ПГУ-аар HDV-ийн халдварыг илрүүлсэн үр дүн.

PC-Эерэг контрол, NC-Сөрөг контрол, P1-P8 нь HDV халдвартай хүмүүсийн дээжээс ялгасан вирүсийн нуклейн хүчил



Зураг 5. Өнгө үзүүлэгч ЛАМП ПГУ-ыг эрүүл бүлэгт туршсан үр дүн.

PC-Эерэг контрол, NC-Сөрөг контрол, H1-H15 нь эрүүл хүмүүсийн дээжээс ялгасан вирүсийн нуклейн хүчил

E. Флуоресценц ЛАМП полимеразын гинжин урвалын үр дүн.

1) *Хепатит Дельта вирүсийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын тохиромжтой температурын нөхцөлийг тодорхойлсон үр дүн.*

HDV-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын тохиромжтой температурыг тодорхойлохын тулд эерэг контрол буюу Дельта вирүсийн халдвартай дээжээс ялгасан нуклейн хүчлийн 1х, 3х, 9х, 90х, 900х шингэрүүлгүүдийг 65°C (Хүснэгт 5 болон График 5,6)-д мөн эерэг контролын 1х, 3х, 9х шингэрүүлгүүдийг 68°C (Хүснэгт 6 болон График 7,8)-д харьцуулсан туршилт хийв.

Хүснэгт 5. HDV-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын 65 °C дэх үр дүн

Шингэрүүлэлт	Шингэрүүлэлт ийн зэрэг	Босго утга (dR)	Циклийн босго утга (dR)
1-р шингэрүүлэлт	1x	5260.608	28.39
2-р шингэрүүлэлт	3x	5260.608	23.00
3-р шингэрүүлэлт	9x	5260.608	22.44
4-р шингэрүүлэлт	90x	5260.608	30.30
5-р шингэрүүлэлт	900x	5260.608	30.87

HDV-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын 65 °C -ийн температурын нөхцөлд явуулсан туршилтын үр дүнгээр сөрөг контрол бохирдолтой мөн диссоциацийн муруйнаас харахад эерэг контролын 90x болон 900x дахин шингэрүүлсэн дээжүүдийн флуоресценц бай бусад шингэрүүлгүүдээс ялгаатай өвөрмөц бус бүтээгдэхүүн үүссэн байсан. Хэрэв полимеразын гинжин урвалаар өвөрмөц бус бүтээгдэхүүн үүсвэл аннелингийн шатны температурыг 2-3°C нэмэгдүүлж болно гэсэн зарчмын үндэслэлд тулгуурлаж 65 °C -ийг 68 °C болгон нэмэгдүүлж өвөрмөц бус бүтээгдэхүүнийг арилгахыг зорив.

Флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын тохиромжит температурын нөхцөлийн олшруулах муруй

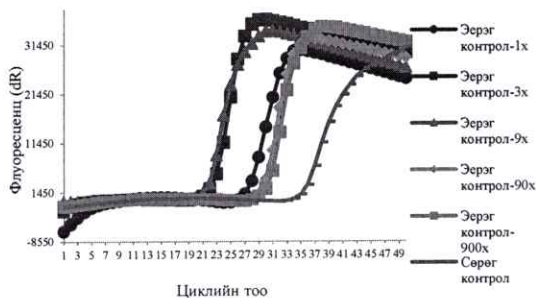


График 5. HDV-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын 65 °C дэх диссоциацийн муруй

Флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын тохиромжит температурын нөхцөлийн диссоциацийн муруй

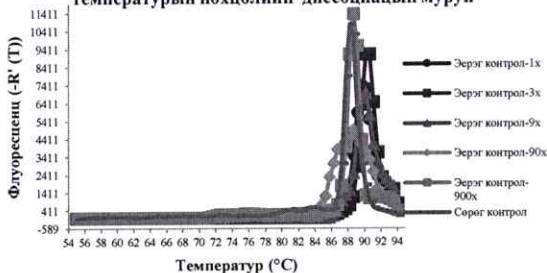


График 6. HDV-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын 65 °C дэх олшруулах муруй

HDV-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын 68°C дэх туршилтын үр дүнгийн диссоциацийн муруйгаас харахад судалгааны ажлын бай HDV-ийн

РНХ-ээс өөр флуоресценц сигнал илрээгүй мөн өвөрмөц бус бүтээгдэхүүн үүсээгүй байгаа нь тус температурт өвөрмөц чанар сайн байгааг илтгэсэн. Диссоциацийн муруй зөвхөн 90.6°C-д илрэв

Хүснэгт 6. HDV-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын 68 °C дэх үр дүн

Шингэрүүлэлт	Шингэрүүлэлт ийн зэрэг	Босго утга (dR)	Циклийн босго утга (dR)
1-р шингэрүүлэлт	1x	6140.253	20.66
2-р шингэрүүлэлт	3x	6140.253	21.86
3-р шингэрүүлэлт	9x	6140.253	23.09

Флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын тохиромжит температурын олшруулах муруй

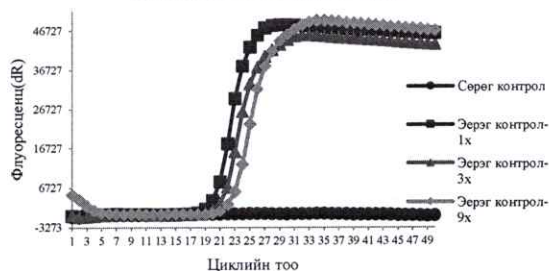


График 7. HDV-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын 68 °C дэх диссоциацийн муруй

Флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын тохиромжит температурын нөхцөлийн диссоциацийн муруй

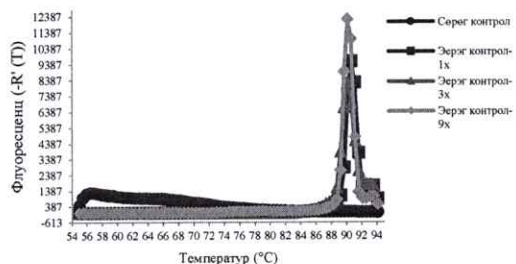


График 8. HDV-ийг илрүүлэх флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын 68 °C дэх олшруулах муруй

2) Флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын мэдрэг чанарыг тодорхойлсон үр дүн.

Флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын мэдрэг чанарыг БЦ-ПГУ-аар баглагдсан HDV-ийн РНХ-ийн дараалсан шингэрүүлгүүдээр тодорхойлоход бүгд эерэг гарсан нь өнгө үзүүлэгч ЛАМП ПГУ-ын адил хангалттай хэмжээний мэдрэг чанартай байгааг харуулсан ба диссоциацийн муруй 90.6°C-д гарсан (Хүснэгт 7 болон График 9, 10).

Хүснэгт 7. Флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын мэдрэг чанар

Шингэрүүлэлт	Шингэрүүлэлтийн зэрэг	Босго утга (dR)	Циклийн босго утга (dR)
1-р шингэрүүлэлт	1x	6277.536	14.12
2-р шингэрүүлэлт	10x	6277.536	15.19
3-р шингэрүүлэлт	100x	6277.536	16.26
4-р шингэрүүлэлт	1000x	6277.536	17.39
5-р шингэрүүлэлт	10000x	6277.536	19.07

Флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын мэдрэг чанарын олшруулах муруй

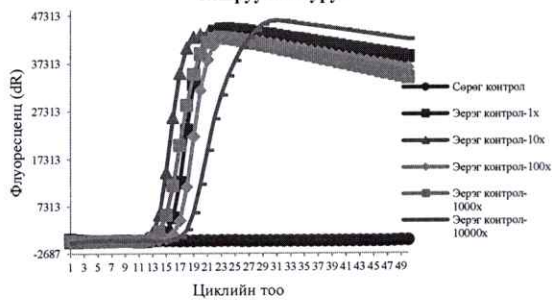


График 9. Флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын мэдрэг чанарын үр дүн

Флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын мэдрэг чанарын диссоциацийн муруй

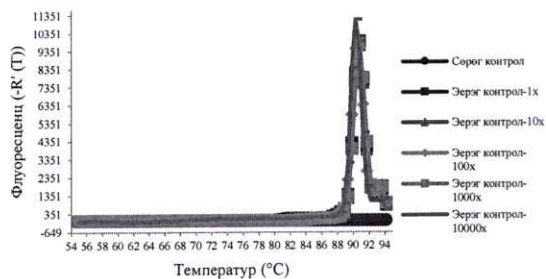


График 10. Флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын мэдрэг чанарын үр дүн

3) Флуоресценц ЛАМП ПГУ-аар HDV-ийн халдвартай хүмүүсийн цусны ийлдэснээс ялгасан вирусийн нуклейн хүчлийг илрүүлсэн үр дүн

HDV-ийн халдвартай судалгаанд хамрагдагч 8 хүний цуснаас ялгасан вирусийн РНХ-флуоресценц ЛАМП ПГУ-аар мөн илрүүлэв. Энэ туршилтын үр дүнгээр флуоресценц ЛАМП ПГУ нь HDV-ийн халдварыг илрүүлэхэд БЦ-ПГУ-аас илүү мэдрэг шинж чанартай байгаа нь циклийн босго утгаас харагдаж байна. Мөн диссоциацийн муруйн үр дүнгээр ПГУ-аар өвөрмөц бус бүтээгдэхүүн үүсээгүй зөвхөн зорилтод HDV-ийн РНХ дээр флуоресценц сигнал илэрч диссоциацийн муруй 90.7°C-д гарсан (Хүснэгт 8 болон График 11, 12).

Хүснэгт 8. Флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын HDV-ийн халдварыг илрүүлсэн үр дүн

Дээж	Босго утга (dR)	Циклийн босго утга (dR)
HDV өвчтөн 1	7182.334	15.42
HDV өвчтөн 2	7182.334	18.41
HDV өвчтөн 3	7182.334	15.54
HDV өвчтөн 4	7182.334	14.70
HDV өвчтөн 5	7182.334	15.46
HDV өвчтөн 6	7182.334	15.20
HDV өвчтөн 7	7182.334	17.72
HDV өвчтөн 8	7182.334	13.81
Сөрөг контрол	7182.334	No Ct

Хепатит Дельта вирусийн нуклейн хүчлийг илрүүлсэн флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын диссоциацийн муруй

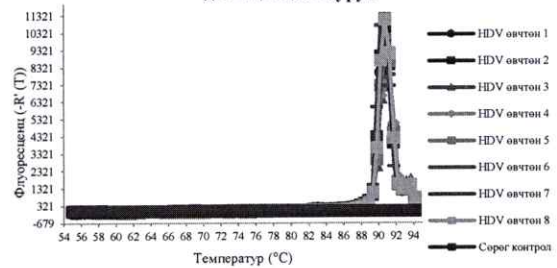


График 11. Флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын мэдрэг чанарын үр дүн

Хепатит Дельта вирусийн нуклейн хүчлийг илрүүлсэн флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын олшруулах муруй

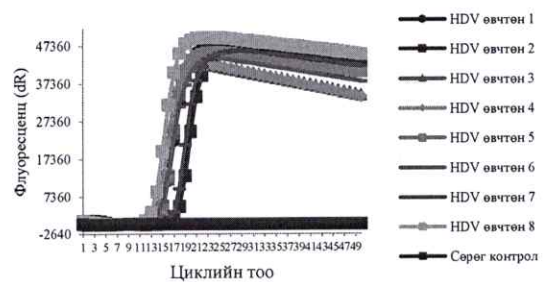


График 12. Флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын эрүүл хүмүүсийн дээж дээрх туршилтын үр дүн

4) HDV-ийн халдваргүй эрүүл бүлэгт флуоресценц ЛАМП ПГУ-ыг туршсан үр дүн.

БЦ-ПГУ-ын сөрөг хяналтын дээжүүдийг флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын арга зүйгээр шалгахад мөн бүгд халваргүй гарсан (Хүснэгт 9 болон График 13,14).

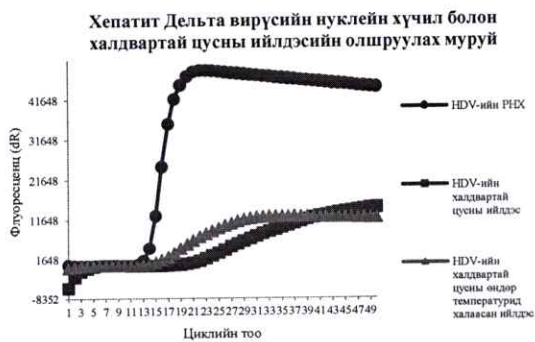
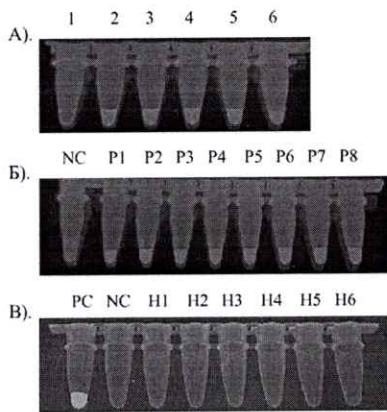


График 15. HDV-ийн халдвартай ийлдэс болон вирусийн нуклейн хүчлийн флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын үр



График 16. HDV-ийн халдвартай ийлдэс болон вирусийн нуклейн хүчлийн флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын үр

Г. Флуоресценц ЛАМП полимеразын гинжин урвалын бүтээгдэхүүнийг UV гэрлээр үнэлсэн үр дүн



Зураг 7. UV гэрлийн үр дүн

А). Флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын мэдрэг чанарыг үнэлсэн бүтээгдэхүүний хөх гэрэлд үзэгдэх гэрлийн үр дүн: NC-сөрөг контрол, 1- 1х дахин шингэлсэн эерэг контрол, 2-10х дахин шингэлсэн эерэг контрол, 3-100х дахин шингэлсэн эерэг контрол, 4-1000х дахин шингэлсэн эерэг контрол, 5-10000х дахин шингэлсэн эерэг контрол. Б). HDV халдвартай хүмүүсийг илрүүлсэн ЛАМП ПГУ-ын бүтээгдэхүүн: NC-сөрөг контрол, P1-P8 HDV халдвартай. В). HDV халдваргүй

эрүүл хүмүүсийн ЛАМП ПГУ-ын бүтээгдэхүүн: NC-сөрөг контрол, PC-эерэг контрол, H1-H6 эрүүл хүмүүс.

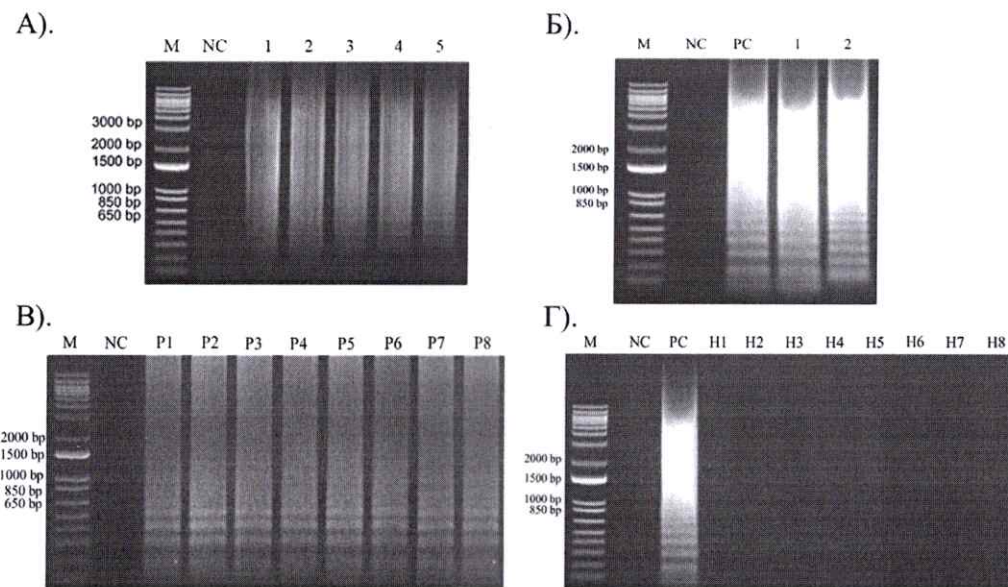
Н. Агароз гель электрофорезын үр дүн.

IV. ХЭЛЭЛЦҮҮЛЭГ

Одоогоор манай энэхүү судалгааны ажлаас өөр ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэх, өнгө үзүүлэх ба флуоресценц технологи технологи дээр тулгуурласан ЛАМП ПГУ-ийн мэдээлэл байхгүй байна. 2012 оны Ванг нарын ажил нь ЛАМП-ПГУ-ын бүтээгдэхүүнийг гел дээр гүйлгэж шалгасан нь цаг хугацаа, материал зардал их орох сул талтай. Бидний зохион бүтээсэн ЛАМП-ПГУ-ийн хамгийн том давуу тал нь үр дүнг шууд нүдээрээ харж үнэлэх эсвэл, БЦ-ПГУ-ын машинаар уншуулж тодорхойлох боломжтой байгаад оршино. Мөн манай ЛАМП-ПГУ-ын праймерын хоршлууд нь вирусийн геномын хамгийн хадгалагдсан дараалал дээр зохиогдсон тул онолын хувьд вирусийн бүх генотипийг илрүүлэх боломжтой. Гэхдээ үүнийг заавал туршилтаар батлах шаардлагатай. ЛАМП-ПГУ нь сүүлийн жилүүдэд, ялангуяа коронагийн жилүүдэд маш эрчимтэй судлагдаж практикт нэвтэрч байна. Гол хэрэглээ нь одоогийн байдлаар байгалийн голомтот халдварт өвчин, хүнсний бүтээгдэхүүний ариун цэврийн шинжилгээнд хэрэглэгдэж байна. Энэ нь ПГУ-ыг шууд тухайн газар дээр нь богино хугацаанд явуулж, үнэлэх шаардлагатай байдаг салбар юм. Манай орны хувьд өргөн уудам газар нутагтай, дэд бүтцийн хөгжил муу учраас төвлөрсөн хүчтэй лаборатори дутмаг байдаг. Иймд ЛАМП-ПГУ-ын технологийг төрөл бүрийн салбарт нэвтрүүлэх нь асуудлын нэг шийдэл байж болох юм.

V. ДҮГНЭЛТ

- (1). ЛАМП ПГУ-ын арга зүйг ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэхэд ашиглах бүрэн боломжтой
- (2). Өнгө үзүүлэх арга зүйг ашиглах нь хялбар, хэрэглээнд нэвтрүүлэхэд илүү тохиромжтой
- (3). Бидний зохиосон праймерын багц нь мэдрэг чанарын хувьд хангалттай өндөр байна
- (4). ЛАМП ПГУ-ын флуоресценц арга зүйг ашиглаж вирусын тоог тогтоох тоон шинжилгээг хийх боломжтой.



Зураг 6. Агароз гел электрофорезын үр дүн

А). Флуоресценц ЛАМП ПГУ-ын мэдрэг чанарыг үнэлсэн агароз гел электрофорезын үр дүн: NC-сөрөг контрол, 1- 1х дахин шингэлсэн эерэг контрол, 2-10х дахин шингэлсэн эерэг контрол, 3-100х дахин шингэлсэн эерэг контрол, 4-1000х дахин шингэлсэн эерэг контрол, 5-10000х дахин шингэлсэн эерэг контрол. Б). ЛАМП ПГУ-аар үүссэн өвөрмөц бус бүтээгдэхүүний агароз гел электрофорезын үр дүн: NC-сөрөг контрол, PC-ээрэг контрол, 1- HDV-ийн халдвартай, 2-ПГУ-аар үүссэн өвөрмөц бус бүтээгдэхүүн. В). HDV халдвартай хүмүүсийг илрүүлсэн ЛАМП ПГУ-ын бүтээгдэхүүн: NC-сөрөг контрол, P1-P8 HDV халдвартай. Г). HDV халдваргүй эрүүл хүмүүсийн ЛАМП ПГУ-ын бүтээгдэхүүн: NC-сөрөг контрол, PC-ээрэг контрол, H1-H8 эрүүл хүмүү.

НОМ ЗҮЙ

- [1] M. Rizzetto, "Hepatitis D (DELTA)," 2022.
- [2] O. Baatarkhuu, T. Gerelchimeg, D. Munkh-Orshikh, B. Batsukh, G. Sarangua, and J. Amarsanaa, "Epidemiology, Genotype Distribution, Prognosis, Control, and Management of Viral Hepatitis B, C, D, and Hepatocellular Carcinoma in Mongolia," *Euroasian Journal of Hepato-Gastroenterology*, vol. 8, no. 1, pp. 57–62, Jun. 2018, doi: 10.5005/jp-journals-10018-1260.
- [3] G. A. Niro, A. Ferro, F. Cicerchia, I. Brascugli, and M. Durazzo, "Hepatitis delta virus: From infection to new therapeutic strategies," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 27, no. 24, Baishideng Publishing Group Co, pp. 3530–3542, Jun. 28, 2021. doi: 10.3748/wjgv27.i24.3530.
- [4] M. Soroka, B. Wasowicz, and A. Rymaszewska, "Loop-mediated isothermal amplification (Lamp): The better sibling of pcr," *Cells*, vol. 10, no. 8, MDPI, Aug. 01, 2021. doi: 10.3390/cells10081931.
- [5] S. Dunbar and S. Das, "Amplification chemistries in clinical virology," *Journal of Clinical Virology*, vol. 115, Elsevier B.V., pp. 18–31, Jun. 01, 2019. doi: 10.1016/j.jcv.2019.03.015.

- [6] T. Notomi, Y. Mori, N. Tomita, and H. Kanda, "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects," *Journal of Microbiology*, vol. 53, no. 1, Microbiological Society of Korea, Jan. 17, 2015. doi: 10.1007/s12275-015-4656-9.
- [7] M. M. Parida, S. Sannarangaiah, P. K. Dash, P. V. L. Rao, and K. Morita, "Loop mediated isothermal amplification (LAMP): A new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases," *Reviews in Medical Virology*, vol. 18, no. 6, pp. 407–421, Nov. 2008. doi: 10.1002/rmv.593.



БАЙГАЛИЙН УХААНЫ САЛБАРЫН
ЗАЛУУ ЭРДЭМТДИЙН ХОЛБОО

**ХҮРЭЛТОГООТ-2022
ЭРДЭМ ШИНЖИЛГЭЭНИЙ
ХУРЛЫН ЭМХЭТГЭЛ**

УЛААНБААТАР ХОТ
2022 он

ᠬᠤᠷᠢᠯᠲᠣᠭᠣᠣᠲᠤ-ᠲᠣᠨᠨᠢ
ᠡᠷᠳᠡᠮ ᠰᠢᠨᠵᠢᠯᠢᠭᠡᠢ
ᠬᠤᠷᠯᠢ ᠡᠮᠬᠡᠲᠦᠭᠡᠯᠡ

ХЕПАТИТТИЙН ДЕЛЬТА ВИРУСИЙН ХАЛДВАРЫГ ИЛРҮҮЛЭХ ГАДАРГУУГИЙН ПЛАЗМОН РЕЗОНАНС ДЭЭР ҮНДЭСЛЭСЭН ОНОШЛУУРЫГ ЗОХИОН БҮТЭЭХ

А. Номин^{1*}, Э. Номин-Эрдэнэ², Ж. Даваасамбуу², Н. Эрдэнэ³, О. Олгэрэл^{1,4}

¹МУИС, ХШУИС, Хими Биологийн Инженерчлэлийн тэнхим, Генийн инженерчлэлийн лаборатори

²МУИС, ШУС, БУС, Физикийн тэнхим, Лазерын судалгааны төв

³МУИС, ХШУИС, Хими Биологийн Инженерчлэлийн тэнхим, Нанотехнологийн төв

⁴Элэгий төв

Цахим шуудан: nomin@onomfoundation.org

Хураангуй

Монгол улс гепатит вирусийн халдварын тархалт болон элэгний өвчлөлөөс шалтгаалсан нас баралтын тоогоороо дэлхийд нэгдүгээрт, элэгний өвчлөлөөрөө найм дугаарт эрэмбэлэгдэж байна. Элэгний өвчлөл их байгаагийн нэг том шалтгаан нь гепатит дельта вирусийн (ХДВ) халдвар юм. Гадаргуугийн плазмон резонансын (ГПР) оношлуурыг ашиглан ХДВ-ийг оноилол бодит хугацааны шинжилгээ явуулах ба мэдрэг чадвар нь түргэвчлэсэн болон энзим холбоот эсрэг биийн урвалын (ELISA) оношлуураас харьцангуй өндөр, нэмэлт молекулаар шингэхгүй зэрэг олон давуу талтай.

ГПР-ын оношлуурыг усрахдаа алтны нанопартикл болон бэлтгэл алт ашиглан хоёр төрлийн оношлуур бэлтгэн харьцуулан судалсан. Алтны нанопартиклыг синтезлэж, гадаргуу дээрх функционал бүлгийг урвалын идэвхтэй завсрын бүтээгдэхүүнүүрүү шилжүүлж ХДВ-ийн эсрэгторөгчтэй ковалент холбоосор холбосон. Ийнхүү амин бүлгээр идэвхжүүлсэн шилэн дээр ХДВ-ийн эсрэгторөгч бүхий алтны нанопартиклыг холбон элгий оношлуур бэлэн болсон. Бэлтгэл ашигласан оношлуурыг усрахдаа алтны нимгэн үе суулгаж, гадаргууг идэвхжүүлсэн ба биохалбогчийг ашиглан ХДВ-ийн эсрэгторөгчийг алтны нимгэн үеийг холбосон. Угсарсан оношлуурын ажллагааг ELISA арга зүйгээр баталгаажуулсан. ГПР-ын багажийг Лазерын судалгааны төвд шинээр усран, эсрэг болон сөрөг дээж дээр харьцуулан хэмжилт явуулахад шингээлтэй эрчим болон өнцгийн шинжлэлтийн ялгаатай үр дүн гарсан. Энэ нь оношлуур дээрх ХДВ-ийн эсрэгторөгчийг ХДВ-ийн эсрэгбие холбогдож оношлуур ажлалаж байгааг баталсан.

Бид судалгааны ажлаараа ГПР-ын технологид суурилсан оношлуурын хоёр төрлийн засварыг бүтээсэн ба ХДВ-ийн халдварыг оноилож эрт илрүүлснээр элэгний хатуурал, элэгний дутагдал, элэгний хавдраар нас баралтыг бууруулах боломжтой юм.

Түлхүүр үг: алтны нанопартикл, алтны нимгэн үе, эсрэгторөгч, эсрэг бие

Оршил

Хепатит дельта вирус (ХДВ) нь элэгний өвчлөл үүсгэдэг шалтгаануудын нэг бөгөөд гепатит Б вирусийн (ХБВ) гадаргуугийн эсрэгторөгчийг шингэх замаар ХБВ-тэй давхар халдварлагддаг [1, 2]. 2010-аас 2019 оны хооронд хийгдсэн судалгааны нэгтгэлээр дэлхийн хэмжээн дэх ХБВ-ийн гадаргуугийн эсрэгторөгч (HBsAg) эсрэг хүн амын 4.5 хувь нь ХДВ халдвартай байгаа нь тогтоогдсон бөгөөд дэлхийн нийт хүн амын 0.16 хувь буюу 12 сая хүн ХДВ-ийн халдвартай гэж тооцоологдсон [3]. Харин Монгол улсын хүн амын 8.03 (5.26-12.08) хувь нь ХДВ-ийн халдвартай буюу 239 (157-360) мянган хүн ХДВ-ийн халдвартай гэж тооцоологдсон байна [4-6]. Сүүлийн жилүүдэд ГПР дээр үндэслэсэн оношлуурын хөгжүүлэлт, судалгаа эрчимтэй явагдаж байна. Энэхүү оношлуурын хувьд металлын гадаргуу дээр лиганд холбосон байх ба лазер гэрлийн үүсгүүрээс гарч буй гэрэл нь сенсоорын гадаргуугаас дотоод бүрэн ойлгоор ойж

детекторт очиж бүртгэгдэнэ. Гэрэл тусах өнцгийг өөрчилснөөр резонансын өнцгөөр тусах үед дотоод бүрэн ойлгоор ойхоо больж, ГПР-ын үзэгдлийн улмаас металлын гадаргуугаар долгион болгон тархана. Энэ үед детекторт гэрлийн эрчим бүртгэгдэхээ болино. Гэрлийн тусаж буй өнцөг дахин өөрчлөгдөхөд гэрэл эргэн дотоод бүрэн ойлгоор ойж эхэлнэ. Хэрэв оношлуурын гадаргуу дээр зорилтот анализт ирж суувал ГПР үүсч буй өнцөг нь өөрчлөгддөг. Гадаргуугийн плазмоныг өдөөхөд хэрэглэгддэг сараалжит конфигураци, Оттогийн конфигурациуд байдаг ба хамгийн өргөн хэрэглэгддэг геометр бол Кречманы конфигураци юм [7]. Энэхүү судалгаанд бид Кречманы конфигураци дээр суурилсан ГПР-ын багаж утгалан хэмжилт явуулсан. ГПР-ын оношлуурыг ашиглан ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэн оношлох нь бодит хугацааны анализ хийн шинжилгээний хариу хурдан гарах, мэдрэг чадвар харьцангуй өндөр, нэмэлт молекулаар шингэхгүй, дахин хэрэглэж болох зэрэг олон давуу талтай [8].

Судалгааны материал арга зүй**Алтны нанопартикл синтезлэх**

Алтны хлоридын 0.25 мМ 50 мл уусмал болон 1% 5 мл натрийн цитратын уусмал бэлтгэнэ. Алтны хлоридын уусмалыг соронзон хутгуур дээр 80°C болон 95°C хүртэл халааж температур тогтворжих үед натрийн цитратын уусмалыг хийж хутгуурыг ажиглуулж уусмал өнгөгүйгээс хөх, нил ягаан, хэсэг хугацааны дараа улаан өнгөтэй болон хувирмагц нанопартикл үүссэн гэж үзэн уусмалыг огцом хөргөж урвалыг зогсооно [9].

Алтны нанопартиклыг меркантоандекааны хүчл (MUA) холбогчоор бүрэх

Синтезлэсэн алтны нанопартиклын 5 мл уусмал дээр ижил хэмжээний 10 мМ рН=6.8 фосфатын буфер-Tween 20 0.1% нэмж 20 минут зөөлөн хутгана. Нийт 10 мл Tween 20 физисорбицалсон алтны нанопартиклын уусмал дээр 5 мл 0.5 мМ MUA (этанол ус 1:3) уусмал нэмнэ. MUA-аар хэмисорбицож бүрэхийн тулд 11 цагийн турш тасралтгүй зөөлөн хутгана [10].

MUA-ээр бүрхэгдсэн алтны нанопартиклыг эсрэгтөрөгчтэй холбох

MUA холбогчоор бүрхэгдсэн алтны нанопартиклыг нэрмэл усаар 3 удаа угааж рН=6.8 фосфатын буфер-Tween 20 0.1%-д уусгана. Бүрхэгдсэн алтны нанопартикл дээр 10 мг/мл 1 мкл 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимид (EDC) нэмж, 15 минутын турш инкубацлана. 10мг/мл 2 мкл н-гидроксисукцинимид (NHS) нэмж 10 минут инкубацлана. 8400 эрг/мин хурдаар 15 минут центрифуг ашиглан рН=6.8 фосфатын буфер-Tween 20 0.1% уусмалаар илүүдэл EDC, NHS-ийг угаана. Гадаргуу нь идэвхижсэн алтны нанопартикл дээр 197.53 мг/мл концентрацтай 50 мкл эсрэгтөрөгч нэмж 2 цагийн турш инкубацлана. Улмаар алтны нанопартикл эсрэгтөрөгчтэй ковалент холбоо үүсгэнэ. 6000 эрг/мин хурдаар 15 минут центрифуг ашиглан алтны нанопартикл урвалд ороогүй илүүдэл эсрэгтөрөгч, бусад бодисыг фосфатын буфер-Tween 20 рН=6.8 ашиглан угаана. Илүүдэл урвалд ороогүй уургаас салгасны дараа тунаж үлдсэн эсрэгтөрөгчтэй холбогдсон алтны нанопартикл дээр 200 мкл рН=5.8 фосфатын буфер нэмж уусгана [11].

Шилэн слайд дээр эсрэгтөрөгчтэй холбогдсон алтны нанопартиклыг суулгах

Цэвэрлэж бэлтгэсэн шилэн дээр 100 мкл пирана уусмал дусааж 20 минут инкубацлана. Идэвхжүүлсэн шилний гадаргууг нэрмэл усаар 3 удаа цэвэрлэж илүүдэл урвалд ороогүй пиранаг цэвэрлэнэ. Идэвхжүүлсэн шилний гадаргууд 100 мкл бэлтгэсэн 5% (3-аминопропил) триэтоксилан (APTES) дусаан 90 минут чийгтэй орчинд 4°C-т инкубацлана. Энэ үед идэвхижсэн

гадаргуу дээр APTES-ийн молекулууд өөрөө эрэмбэлэгдэн сууна. APTES-ийн өөрөө эрэмбэлэгдэх үе суусан шилний этанолоор 3 удаа цэвэрлэн урвалд ороогүй илүүдэл бодисыг цэвэрлэнэ. APTES-ийн өөрөө эрэмбэлэгдэх шимгэн үе суулгасан шилэн дээрээ эсрэгтөрөгч буюу уурагтай холбогдсон алтны нанопартиклын уусмалаас 100 мкл хийж 60 минут инкубацлана. Бэлэн болсон шилнийг 3 удаа шүршин цэвэрлэж илүүдэл холбогдоогүй уургийг сайтар цэвэрлэнэ.

Алтны шимгэн үе суулгах

Алтны шимгэн үе суулгах ВК 7 шилний гадаргуугийн идэвхийг бодис болон органик уусгагчдаар сайтар цэвэрлэн, гүйцэд хатаана. Плазма шүтгэр багажид цэвэрлэсэн шилнийг голдуулан байрлуулна. Багажийг битүүмжлэн тагласны дараа асаан минутын заалтыг 2, 5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6 минутаар тус тус тохируулан найман өөр алтны шимгэн үеийн дээж бэлтгэнэ. Алтны шимгэн үе суулгасан шилнийг петрийн тавганд дээж харуулан хийж битүүмжилнэ.

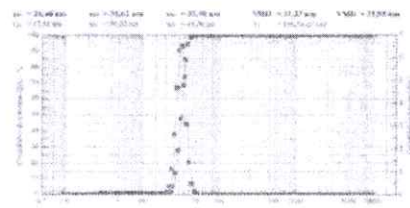
Алтны шимгэн үеийн гадаргууг идэвхжүүлж эсрэгтөрөгчтэй холбох

Шимгэн үе суулгасны дараа шилэн дээр маск тавьж зай гаргахгүй байхаар сайтар битүүмжилнэ. Цэвэрлэж бэлтгэсэн шилэн дээр 100 мкл пирана ($H_2SO_4:H_2O_2$; 2:1) 60°C хүртэл хөргөн хийж 1 минут идэвхжүүлнэ. Пиранагаар идэвхжүүлсэн шилэн дээр этанолд уусгасан 10 мМ MUA-аас тус бүр маскны нүхэнд 100 мкл хийж 24 цагийн турш 4°C-т чийгтэй орчинд сайтар битүүмжлэн инкубацлана. MUA-ийг шавхан цэвэрлэж, гадаргууг 5 удаа нэрмэл усаар угаана. Гадаргууг нь идэвхжүүлсэн алтны шимгэн үе дээр 75 мМ EDC, 15 мМ NHS-ын фосфатын давсны буфер (PBS)-д уусгаж бэлтгэн, нүх тус бүрт 100 мкл хийж 1 цаг инкубацлана. EDC/NHS бүхий уусмалыг шавхан гадаргууг PBS-р 5 удаа угааж хатаана [12]. Карбоксил бүлэг суулгасан алтны шимгэн үе дээр ХДВ-ийн гадаргуугийн уургаас (эсрэгтөрөгч) нүх тус бүрийг бүрхэж байхаар 120 мкл хийж 1 цаг инкубацлана. Уураг холбосон алтны сенсороо PBS-ээр 5 удаа угаана. 5% Skim milk PBS-д бэлтгэж нүх тус бүрт 100 мкл хийж 1 цаг блоклинг хийнэ. Блоклин хийсний дараа сенсороо 5 удаа PBST 0.1% ашиглан угаана [13].

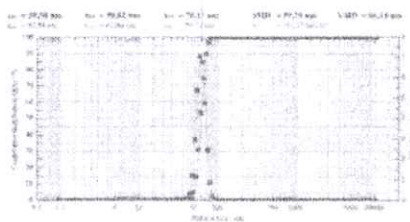
Үр дүн ба хэлэлцүүлэг**Туркевичийн аргаар синтезлэсэн алтны нанопартиклын үр дүн**

Алтны нанопартиклыг синтезлэхдээ урвалын температур их ба урвалын температур бага үед туршилт явуулсан. Зураг 1, 2-д фотон кросс корреляцийн спектрометрийн үр дүнгээр алтны нанопартиклын хэмжээний тархалтыг харуулав. Урвалын температур буурахад нанопартикл үүсгэдэг атомын зөөлт, хөдөлгөөн уусмалд

улаанвирна. Уусмалд прекурсор үүсч дуусаагүй байхад түрүүжж үүссэн алтны цөм дараагийн шатны ургах процессоо эхлүүлснээр том алтны нанопартикл үүсдэг. Эсрэгээрээ температур их, урвал хурдан явагдах үед бүх прекурсор нь цөм үүсэх процессод нэгэн зэрэг ашиглагдаж дараагийн шатны ургах процессод цөөн хэдэн мономер л үлдсэн байдаг учраас бага хэмжээтэй алтны нанопартикл үүсдэг. Иймд урвалын температур харьцангуй өндөр буюу 95°C байхад 32±19 нм хэмжээтэй, 80°C байхад түүнээс том 60±8 нм хэмжээтэй байгаа нь судалгааны үр дүнтэй давхиж байна [14].

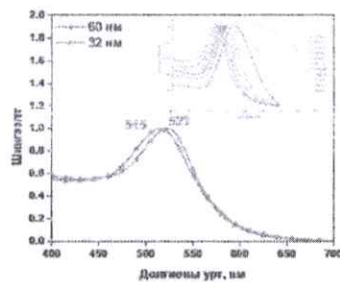


Зураг 1. Урвалын температур 95°C үеийн фотон кросс корреляцийн спектр



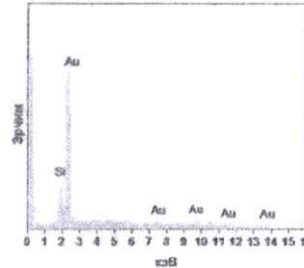
Зураг 2. Урвалын температур 80°C үеийн фотон кросс корреляцийн спектр

Үзэгдэх гэрлийн мужид спектр өгдөг бодисууд өнгөтэй байдаг ба синтезлэсэн алтны нанопартикл хэмжээнээс хамааран улаанаас нил ягаан өнгөтэй байх ба 500-600 нм-ын долгионы уртад шингээлт өгдөг.



Зураг 3. 60 нм болон 32 нм алтны нанопартиклын хэт ягаан үзэгдэх гэрлийн спектр [15]

Хэт ягаан үзэгдэх гэрлийн спектрээс харахад 60 нм алтны нанопартикл нь 515 нм-т шингээлт өссөн бол 32 нм хэмжээтэй нанопартикл 523 нм-т шингээлтийн утга өссөн байна. Үүнээс харахад нанопартиклын хэмжээ томрох тусам долгионы урт ихтэй мужруу пикийн шилжилт олддог. Зураг 3-ын [15] утгатай тохирч байна. Алтны нанопартиклыг ГПП-ын сенсорт ашиглахад 50 нм хэмжээ хамгийн тохиромжтой оптичнай тул цаашидын судалгаанд 60 нм хэмжээтэй синтезлэсэн алтны нанопартиклыг хэрэглэв [16].



Зураг 4. Алтны нанопартиклын энергийн дисперсийн рентген спектр

1-р хүснэгт

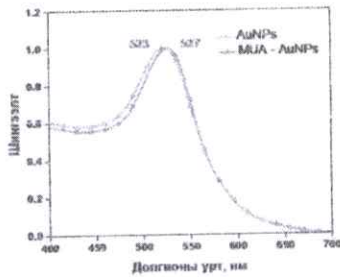
Алтны нанопартиклын энергийн дисперсийн рентген спектрийн тайлал

№	Элемент	Масс, %
1	Алт	95
2	Цахиур	5

Хүснэгт 1-с харахад синтезлэсэн нанопартиклын элементийн анализ хийхэд алтны эзлэх хувь 95%, цахиур 5% байсан. Шилэн дээр суулгасан алтны нанопартиклын өөрөө усрагдах моно үе бэлтгэсэн дээжийг энергийн дисперсийн рентген спектроскопвор хэмжүүрэн ба шилэн дэх цахиур ихэрсэн гэж дүгнэж байна.

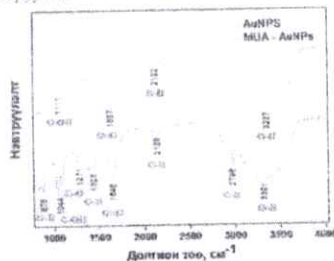
Алтны нанопартиклыг MUA холбогчоор бүрсэн үр дүн

Алтны нано партиклыг синтезлэсний дараа MUA холбогчоор бүрсэн. MUA лиганд нь нэгдүгээрт алтны нанопартиклыг гадаргууг карбоксил бүлгээрээ функционалжуулах, хоёрдугаарт бүрэн бүрсний дараа агрегацид орохоос сэргийлэх төгтворжуулагчийн үүрэгтэй ба талсон бүлэг (тиол бүлэг, -SH), гинжин хэлхээ (10 нүүрстөрөгчийн алкан), сүүз хэсэг (карбоксил бүлэг, -COOH)-ээс тогтоно. Шилжилж буй нэгдлийн функционал бүлэг болон зарим хавчгийг солих, гинжин хэлхээг өөрчлөх, янз бүрийн уусгагчаар үйчлэх мөн түүнчлэн гадаад хэлхээг өөрчлөх үед шингээлтийн спектрийн тик шилждэг [17].



Зураг 5. Синтезлэсэн алтны нанопартикл болон MUA холбогчоор бүрсэн алтны нанопартиклыг харьцуулсан хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр

Зураг 5-д 60 нм алтны нанопартикла болон MUA холбогч суулгасан алтны нанопартиклын хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрийг харьцуулан харуулав.

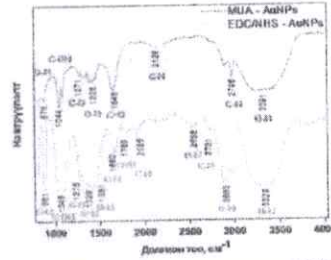


Зураг 6. Алтны нанопартиклд MUA линкер суулгасан нил улаан туганы спектр

Зураг 6-с MUA линкер суулгасан нил улаан туганы спектрийг харахад алтны нанопартиклаас ялгарах найман пикүүд ажиглагдаж байна. 878 cm^{-1} , 946 cm^{-1} , 1044 cm^{-1} , 1085 cm^{-1} , 1326 cm^{-1} , 1420 cm^{-1} , 1451 cm^{-1} , 2796 cm^{-1} долгион тоон дээр пикүүд өгсөн бөгөөд эдгээр нь C-H деформац, O-H гидроксил, C-OH спирт болон эфир, O-H карбоксил бүлгийн гидроксил, C-H алкан, C-H алдегид бүлгүүдэд химийн холбооны хэлбэлзэлд харгалзаж байна. Үүнгээс харахад карбоксил бүлгийн гидроксил болон алдегид бүлгүүдийн долгион тоон дээр хүчтэй шингээлт өгсөн нь урвал амжилттай явагдаж MUA линкер алтны нанопартиклын гадаргуу дээр амжилттай холбогдсоныг харуулж байна. Мөн S-H тиол бүлгийн хэлбэлзэл 2500-2600 cm^{-1} долгион тоон дээр ирээгүй нь шүүдэл урвалд ороогүй MUA линкер центрифугдэн усаагдсаны улмаас бүрэн арилсан болох нь батлагдаж байна.

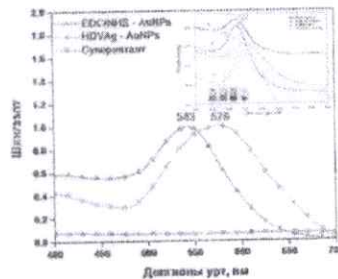
MUA холбогчоор бүрхэгдсэн алтны нанопартиклыг эсрэгтөрөгчтэй ковалент холбоогоор холбосон үр дүн Карбоксил бүлэг-COOH нь амин бүлэгтэй -NH₂ бат бах амидын холбоо үүсгэдэг. Иймд алтны нанопартиклын карбоксил бүлэг, эсрэгтөрөгчийн

гадаргуу дээрх амин бүлэгтэй ковалент холбоо үүсгэх ба энэ холбоог EDC/NHS биохолбогчдын тусламжтай бий болгодог.



Зураг 7. Алтны нанопартиклд EDC/NHS биохолбогчид суулгасан нил улаан туганы спектр

Зураг 7-с EDC/NHS биохолбогчид суулгасан нил улаан туганы спектрийг харахад MUA холбогчоор бүрсэн алтны нанопартиклаас ялгарах долоон пикүүд ажиглагдаж байна. 800 cm^{-1} , 1328 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} , 1768 cm^{-1} , 2536 cm^{-1} , 2883 cm^{-1} , 2973 cm^{-1} долгион тоон дээр пикүүд өгсөн бөгөөд эдгээр нь C-H деформац, S=O сульфонат, C-H алкан, C=O хүчлийн халид, O-H карбоксил бүлгийн гидроксил, N-H амин давсны бүлгүүдэд химийн холбооны хэлбэлзэлд харгалзаж байна. Үүнгээс харахад сульфонат болон амин бүлгүүдийн долгион тоон дээр хүчтэй шингээлт өгсөн нь урвал амжилттай явагдаж EDC халагдан NHS холбогдон алтны нанопартиклд карбоксил бүлэг амжилттай суусныг харуулж байна.



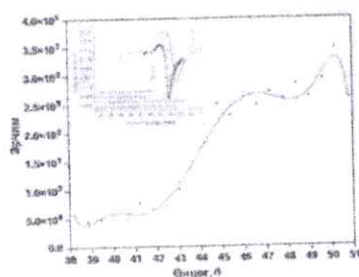
Зураг 8. Алтны нанопартиклд функциональ бүлэг суулгасан болон эсрэг төрөгч холбосон хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр [18]

Зураг 8-д алтны нанопартиклд функциональ бүлэг суулгасан болон эсрэгтөрөгч үеийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрийн хэмжээнийг харуулсан EDC/NHS холбогч суулгах болон эсрэгтөрөгч холбосон уусмалын ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрийн пик долгионы урт ихтэй мужруу шилжсэн. Мөн эрдэм шинжилгээний өгүүдэлтэй хявдуулахад [18] ижил PBST (pH=7 фосфатын буфер 10 mM 0.2 мг/мл Tween 20)

орчинд алтны нанопартиклыг эсрэгбиеэ квалент холбоогоор холбох урвалыг явуулсан байна. Хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрийн үр дүнг харьцуулахад цэвэр алтны нанопартикл 520 нм-т, MUA холбогчоор бүрсэн үед 523 нм-т, EDC/NHS биохолбогчийг суулгасан үед 543 нм-т мөн эсрэгбие холбосны дараа 550 нм-т шингээлтийн пик өгсөн байна. Үүнээс харахад модификацийн шат бүрт шингээлт өгч буй долгионы урт ихэссэн мөн харгалзах шийийн долгионы урт нь бидний судалгааны ажигтай тохирч байна.

Алтны нанопартиклд суурилсан оношлуурын гадаргуугийн плазмон резонансыг хэмжсэн үр дүн

Идэвхжүүлсэн шилэн дээр эсрэгтөрөгч холбосон алтны нанопартиклыг суулгасан. Шилыг нирала уусмал ($H_2SO_4:H_2O_2: 3:1$) ашиглан гидроксил бүлэг суулган дараа нь APTES-ын 5% этанолон уусмалаар амин бүлэг суулгасан. Алтны нанопартиклын гадаргуу дээрх эсрэгтөрөгчийн карбоксил бүлэг шилэн дээрх амин бүлэгтэй бат бөх амидын холбоо үүсгэн, урвал дууссаны дүнд шил нил ягаан өнгөтэй болсон.



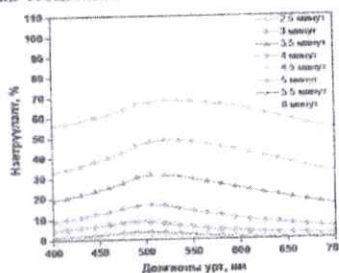
Зураг 9. Алтны нанопартиклд суурилсан оношлуурын ГПР-ын хэмжилтийн үр дүн [19]

Угсарсан оношлуурын ГПР-ын хэмжилтийг Лазерын судалгааны товд шингэр угсарсан багаж дээр гүйцэтгэсэн боловч ГПР-ын үзэгдэл ажиглагдаагүй ба гэрлийн эрчим буурч резонансын үзэгдэл явагдаагүй эрчим улам ихэссэн Зураг 9. Эрдэм шинжилгээний өгүүдэл [19]-д ГПР-ын ойлг болон өнцгөөс хамаарсан графикийг тэнхэр өнгөөр дүрсэлсэн ба ойролцоогоор 57°C-ын өнцгөөр лазер гэрэл тусгахад гадаргуугийн плазмон ажиглагдсан байна. Дээжээ хамааран тохирох тодорхой нэг өнцгөөр лазер гэрэл тусгахад ойтлын эрчим буурч, детекторт лазер гэрэл бүртгэгдэхгүй болно. Энэ нь гадаргуугийн плазмон ашиглагдаж Х тэнхлэг дагуу плазмон резонанс үүсэж байгаа үзэгдэл юм. Харин бидний угсарсан оношлуурт ойтлын эрчим буурах үзэгдэл явагдаагүй, улам ихэсж байгаа учир гадаргуугийн плазмон ажиглагдаагүй байна гэж дүгнэж байна. Мөн дахин багажны нөхцөл бололцоог сайжруулан лазерын ондоо эх үүсгэвэр

ашиглах, долгионы урт болон шингээлтээс хамаарсан туршилт гүйцэтгэхийг төлөвлөж байна.

Алтны нимгэн үе суулгасан үр дүн

Алтны нимгэн үеийн зузааныг тодорхойлох чухал шаардлагатай ба нимгэн үеийн зузааныг хэмжихийн тулд эрдэм шинжилгээний өгүүдлээс [20] иш татан суулгасан шилэн нэвтрүүлэлтийн хувийг тооцоолсон



Зураг 10. Найман өөр төрлийн хугацаанд суулгасан алтны нимгэн үеийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн нэвтрүүлэлтийн хувь

Тус бүр дэжнийг бэлтгэсний дараа хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрофотометр ашиглан нэвтрүүлэлтийн хувийг тооцоолсон туршилтын графикийг Зураг 10-т харуулав. Энэхүү графикаас харахад хугацаа ихсэх тусам илүү зузаан алтны үе сууж нэвтрүүлэлтийн хувь багасаж байгаа ба Хүснэгт 2-т найман өөр төрлийн хугацаанд суулгасан алтны нимгэн үеийн хамгийн өндөр нэвтрүүлэлт үзүүлж буй долгионы урт болон нэвтрүүлэлтийн хувийг харуулав.

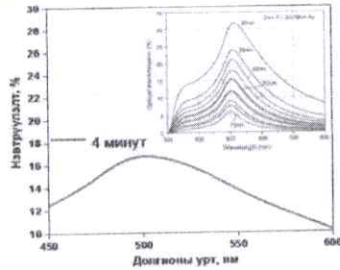
2-р хүснэгт

Тодорхой хугацааны турш суулгасан алтны нимгэн үеийн хамгийн өндөр нэвтрүүлэлт үзүүлж буй долгионы урт болон нэвтрүүлэлтийн хувь

№	Хугацаа, минут	Долгионы урт, нм	Нэвтрүүлэлт, %
1	2.5	531	68.4
2	3	527	48.4
3	3.5	513	31.5
4	4	502	16.8
5	4.5	500	9.7
6	5	493	8.7
7	5.5	500	3.8
8	6	498	2.6

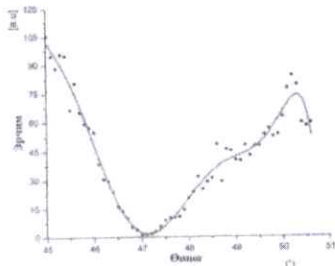
Эрдэм шинжилгээний өгүүдэлтэй [20] харьцуулахад 50 нм зузаан алтны нимгэн үе 500 нм орчим долгионы уртад нэвтрүүлэлт 15.2% байсан. Найман өөр хугацааны турш суулгасан алтны нимгэн үеэс 4 минут үргэлжилсэн нимгэн үе нь 502 нм-т 16.7% байгаа нь өмнөх өгүүдэлтэй харьцуулахад хамгийн ойролцоо үр дүн болсон. Иймээс 4 минутын турш суулгасан алтны нимгэн үеийг 50 нм-тэй хамгийн ойролцоо гэж дүгнэсэн.

Цаашдын оношлуурын угсралт болон туршилтад алтны нимгэн үеийг 4 минут суулган ашиглахаар шийдсэн.



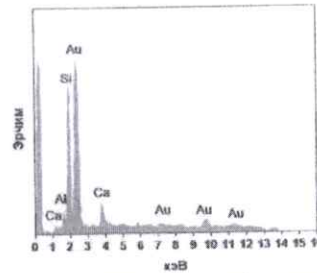
Зураг 11. 4 минутын турш суулгасан алтны нимгэн үеийн нэвтрүүлэлтийн хувь. Эрдэм шинжилгээний өгүүллийн алтны нимгэн үеийн нэвтрүүлэлтийн хувь [20]

50 нм алтны нимгэн үе суулгасан шилний гадаргуугийн плазмон үүсэж буй эсэхийг шалгах зорилгоор Лазерийн судалгааны товд угсарсан ГПР-ын багажийг ашиглан хэмжилт явуулсан бөгөөд Зураг 12-г харагдаж буй үр дүн гарсан. Энэхүү графикаас харахад гадаргуугийн плазмон үүсэж байгаа бөгөөд 47° орчим өнцгөөр дээжрүү лазер гэрэл тусгахад тохиромжтой гэж дүгнэсэн.



Зураг 12. 50 нм орчим алтны нимгэн үе суулгасан шилний ГПР-ын хэмжилт

Энергийн дисперсийн рентген спектроскопөөр шилэн дээр суулгасан алтны нимгэн үед элементийн анализ хийсэн. Хүснэгт 3-с харахад алт 75.8%, цахиур 17.4% илэрсэн нь шилэн дэх цахиур илэрсэн байж болзошгүй ба кальци, хөнгөн цагааны элемент илэрсэн нь бохирдол байж болзошгүй гэж дүгнэсэн.



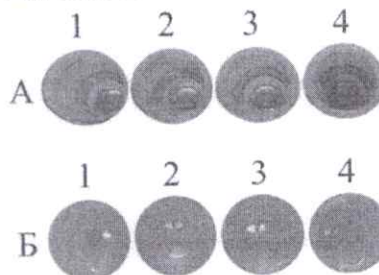
Зураг 13. Алтны нимгэн үеийн энергийн дисперсийн рентген спектр

3-р хүснэгт
Алтны нимгэн үеийн энергийн дисперсийн рентген спектрийн тайлал

№	Элемент	Масс, %
1	Алт	75.8
2	Цахиур	17.4
3	Кальци	4.8
4	Хөнгөнцагаан	2

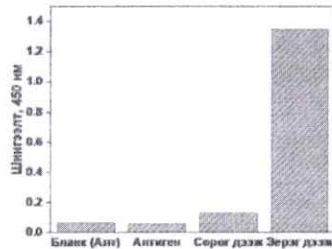
ELISA оношлуур угсарч, хэмжилт хийсэн үр дүн

Фермент холбоот эсрэг биеийн урвал буюу ELISA нь эсрэг биеийг түргэн хугацаанд шинжлэх, хэмжихэд ашиглах ба судлагдаж буй дээжил сонирхсон тодорхой уураг байгаа эсэх, хэрэн байвал хэр хэмжээтэй байгааг тодорхойлох явдал юм [21]. ELISA-ын бичил үүрт орох дугуй хэмжээтэй шилэн дээр 50 нм орчим алтны нимгэн үе суулган бичил үүрэд гадаргууг дээш харуулан хийсэн. MUA линкер болон EDC/NHS био-холбогчдыг ашиглан өмнөх ГПР-ын оношлуур угсрах аргатай ижил үйл явцаар алтны гадаргууд эсрэгтөрөгчийг холбосны дараагаар Wantai biotech HDV-IgG ELISA цөмөг ашиглан оношлогоо хийсэн. Оношлогоо хийж дуусмагц өнгөний хувирал явагдсан уусмалыг хоосон бичил үүрлүү шилжүүдэн 450 нм долгионы уртал гэрлийн шингээлтийг хэмжсэн.



Зураг 14. Алтны нимгэн үе ашиглан угсарсан ELISA оношлуурын үр дүн

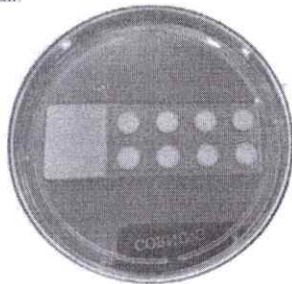
A1, B1 – Бланк алтны нимгэн үеийн контрол
A2, B2 – Эсрэгтөрөгч суулган блокинг хийсэн контрол
A3, B3 – Халдваргүй, сөрөг контрол
A4, B4 – Халдвартай, эерэг контрол



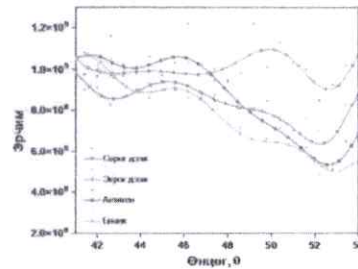
Зураг 15. ELISA оношлуурын шингээлтийг 450 nm долгионы уртад хэмжсэн үр дүн

Зураг 15-с харахад бланк алтны нимгэн үе нь эсрэгтөрөгч суулган блокинг хийсэн контролоос илүү өндөр шингээлт өгсөн нь алтны гадаргуу дээр horseradish peroxidase (HRP) агуулсан эсрэгбие бага хэмжээгээр холбогдсон байх боломжтой. Мөн халдваргүй сөрөг дээж эсрэгтөрөгч контролоос харьцангуй өндөр шингээлт өгсөний хүний цусанд агуулагдаж буй уураг, бусад эсрэгбие нь оношлуурын гадаргуу дээр харилцан үйлчлэл үзүүлж сонгомол биш шинж чанараар холбогдсон байна гэж дүгнэж байна. Харин халдвартай цусны нийлдэс буюу эерэг дээжийн өнгө тодоор хувирч 1.348 шингээлтийн өндөр утга өгсөн. Энэ нь алтны нимгэн үеийн гадаргуу дээр угсарч буй бидний оношлуур хүний цусан дахь хепатит дельта вирусийн эсрэгбиенийг сонгомолоор мэдрэг чанар сайтай танин холбогдож байгааг харуулж байна.

Алтны нимгэн үеэ оношлуур угсарсан үр дүн
Алтны нимгэн үе дээр суурилсан оношлуурын ГПП-ын хэмжилтийг балк буюу алтны нимгэн үе, эсрэгтөрөгч суулгасан буюу оношлуур, сөрөг буюу эрүүл хүний нийлдэсээр үйлчилсэн, эсрэг буюу халдвартай хүний нийлдэсээр үйлчилсэн үед явуулсан.



Зураг 16. Алтны нимгэн үе дээр суурилсан ГПП-ын оношлуурын зураг



Зураг 17. ХДВ-ийн халдвартай болон эрүүл хүний цусны нийлдэс дээр хэмжсэн ГПП-ын үр дүн

Зураг 17-с харахад бланк, эсрэгтөрөгч, сөрөг дээж бага эрчимтэй харин эерэг дээжийн шингээлтийн эрчим өндөр, эрс ялгаатай байна. Иймд алтны нимгэн үе дээр ковалентаар холбосон ХДВ-ийн эсрэгтөрөгч цусны нийлдэс дэх ХДВ-ийн эсрэгбиетэй сонгомолоор холбогдож, угсарсан оношлуур амжилттай ажиллаж энэхүү арга зүйгээр ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэх боломжтой хэмээн дүгнэж байна.

Хэлэлцүүлэг

ГПП-ын технологид үндэслэсэн оношлуур сүүлийн жилүүдэд эрчимтэй хөгжин, дэлхий дахинд олон төрлийн судалгаа хийгдэж байна. Гэвч ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэх ГПП-д тулгуурласан оношлуурын хөгжүүлтэг, судалгаа огт хийгдээгүй байна. Монгол улсад ХДВ-ийн тархалт өндөр байгаагаас шалтгаалан бид ХДВ-ийг илрүүлэх оношлуур бүтээх нь нийгмийн эрүүл мэндийг хамгаалахад томоохон хувь нэмэр болж чадна гэж үзэж байна. Энэхүү оношлуурыг угсрахад алтны нанопартикл болон балк алтны нимгэн үеийг ашигласан. Алтны нанопартиклыг Туркеничийн натрийн цитратыг ангижруулах аргаар хоёр өөр урвалын температурт сингээлсэн. Урвалын температур 95°C үед 32±19 нм, урвалын температур 80°C үед 60±8 нм орчим хэмжээтэй нанопартикл үүссэн Зураг 1, Зураг 2. 60 нм хэмжээтэй сингээлсэн алтны нанопартиклыг сонгон авч цаашдын судалгаанд ашигласан. Алтны нанопартиклыг MUA холбогчоор (тиол болон карбоксил бүлэгтэй) бүрсэн ба этанолон орчинд тогтворгүй агрегатад орж байсан тул Tween 20 болон фосфатын буфер орчинд урвалыг явуулсан. Карбоксил бүлэг суусан алтны нанопартиклыг ХДВ-ийн гадаргуугийн эсрэгтөрөгч уурагтай ковалент холбоогоор холбохын тулд EDC/NHS тэг урттай биохолбогчдыг ашигласан. Учир нь EDC

нанопартиклын гадаргуугийн карбоксид бүлэгтэй холбогдож O-acylisourea гэх тогтворгүй эфир үүсгэх ба дараа нь NHS холбогдон хагас тогтвортой амин бүлэгт идэвхтэй завсрын бүтээгдэхүүн үүсгэдэг. Карбонат-бикарбонатын буферт уусгасан ХДВ-ийн эсрэгтөрөгчийг уусмалд нэмснээр амин бүлэгт идэвхтэй NHS эфиртэй уургийн амин бүлэг холбогдон амидан холбоо үүсгэсэн. Алтны нанопартиклын гадаргууг модификацилаж функционал бүлгүүд суусныг Зураг 5, Зураг 6, Зураг 7 ба ХДВ-ийн эсрэгтөрөгчтэй амжилттай холбогдсоныг Зураг 8-д нил улаан туяаны спектроскоп, хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрометрээр баталгаажуулсан. Харин амин функционал бүлэг суулгасан шилэн дээр алтны нанопартиклтай холбогдсон эсрэгтөрөгчийг суулган сенсоорыг угсарч ГПР-ын багажаар хэмжилт явуулахад Зураг 9 дэх график гарсан ба гадаргуун плазмоны үзэгдэл ажиглагдаагүй учир бид багажны угсралтыг улам сайжруулан, лазер гэрлийн үүсгэврийг өөрчлөн дахин туршилт явуулан учир шалтгааныг нарийвчлан тодорхойлох хэрэгтэй байна. Балк алтны нимгэн үе шингэсэн оношлуурын хувьд нэвтрүүлэлтийн хувийг тооцоолох аргаар шилэн дээр 50 нм орчим алтны нимгэн үе суулгасан Зураг 10, Зураг 11. Пирана ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}; 2:1$) уусмалаар алтны нимгэн үеийн гадаргууг идэвхжүүлэн гидроксил бүлэг суулган дараа нь өмнөх арга зүйтэй ижил био-холбогчлоод шингэсэн ХДВ-ийн эсрэгтөрөгчийг ковалент холбоогоор холбосон. Угсарсан оношлуурын ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэх оношлогооны ажиглагаг давхар баталгаажуулахын тулд ELISA арга зүйгээр давхар судалгаа гүйцэтгэн баталсан Зураг 14, Зураг 15, Зураг 16. Бэлэн болсон оношлуурыг халдвартай болон эрүүл хүний цуснаас ялгаж авсан нийлдээр үйлчлэн ГПР-ын багажаар хэмжилт явуулахад эсрэг болон сөрөг дээж дээр ялгагдахуйц график үүсэж эрчмийн болон өнцгийн шилжилт ажиглагдаж байсан нь оношлуур болон ГПР-ын багаж амжилттай ажиллаж, ХДВ-ийн халдварыг оношлож байсан Зураг 18. Цаашид бид алтны нимгэн үедээр морфологи болон химийн холбоог тодорхойлох олон талт судалгаа явуулах, олон дээж дээр судалгаа хийж оношлуурын баталгаажуулалт хийх, мөн оношлуур болон түүнийг хэрэглэх арга зүйн нэгэнжигд байдлыг хангасан стандарт протокол боловсруулахыг зорьж байна.

Дүгнэлт

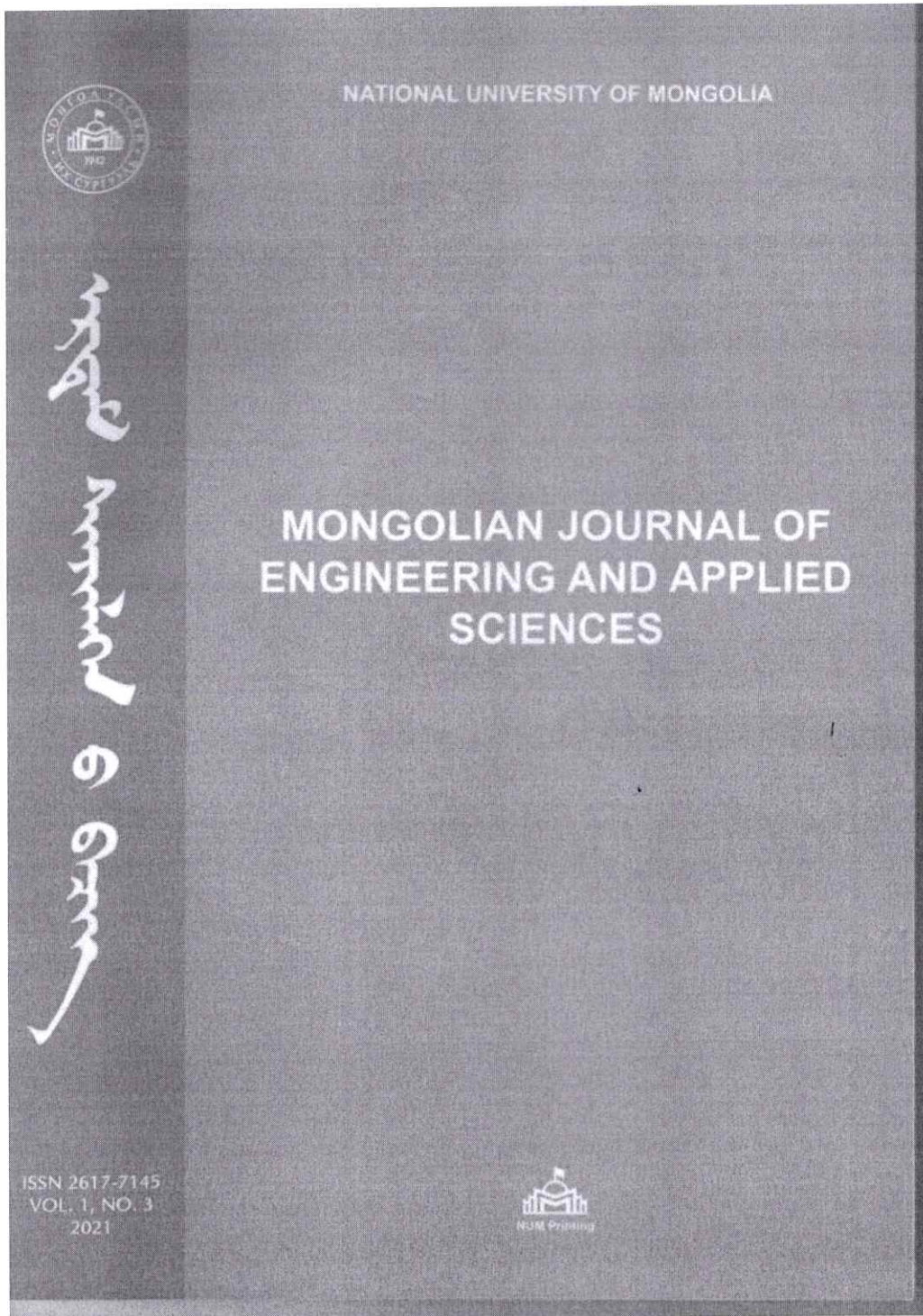
Бид энэхүү судалгаагаар балк бүтэцтэй алтболон алтны нанопартикл шингэсэн ковалент холбоогоор ХДВ-ийн эсрэгтөрөгчийг холбож амжилттай хоёр төрлийн ГПР-ын оношлуур угсарлаа. Энэхүү оношлуурын прототип загварыг зохион бүтээж ХДВ-ийн халдвартай хүний нийлдэснээс ХДВ эсрэгбөнийг амжилттай илрүүлсэн. Цаашид судалгааны ажлын үр дүнг улам бататгаж,

оношлуурын баталгаажуулалт хийх мөн оношлуур болон түүнийг хэрэглэх арга зүйн нэгэн жигд байдлыг хангахад чиглэсэн стандарт протокол боловсруулахад анхаарч ажиллах шаардлагатай байна. Судалгааны ажлын үр дүнгээс доорх дүгнэлтэд хүрсэн. Үүнд: Алтны нанопартиклыг синтезлэн гадаргууд нь амжилттай функционал бүлгүүд суулган эсрэгтөрөгчтэй холбосон болохыг баталсан. Алтны нанопартиклын оношлуурыг амжилттай угсран анализ хийсэн боловч шингэр угсарсан багаж дээр ГПР-ын үзэгдэл ажиглагдаагүй тул лазер гэрлийн эх үүсвэрийг өөрчлөх шаардлагатай гэж дүгнэсэн. Харин алтны нимгэн үе дээр ХДВ эсрэгтөрөгч суулгах замаар гаргаж авсан оношлуурыг шингэсэн ГПР-ын арга зүйгээр ХДВ-ийг оношлох боломжтой болох нь харгдаж байна.

Ашигласан ном хэвлэл

- [1] Vlachogiannakos J, Papatheodoridis GV. New epidemiology of hepatitis delta. *Liver international*. 2020;40:48–53.
- [2] Oyusuren T, Kurbanov YT, Elkady A. High frequency of hepatocellular carcinoma in Mongolia association with mono or co-infection with hepatitis C, B, and delta viruses. *Journal of medical virology*. 2006;78:1688–1694.
- [3] Stockdale AJ, Kreuels B, Henrion MY. The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis. *Journal of hepatology*. 2020;73:523–532.
- [4] Dashtseren B, Bungert A, Bat-Ulzii P. Endemic prevalence of hepatitis B and C in Mongolia: A nation wide survey amongst Mongolian adults. *Journal of viral hepatitis*. 2017;24:759–767.
- [5] Chen X, Oidovsambuu O, Liu P. A novel quantitative micro-array antibody capture assay identifies an extremely high hepatitis delta virus prevalence among hepatitis B virus-infected Mongolians. *Hepatology*. 2016;66:1739–1949.
- [6] Chen HY, Shen DT, Ji DZ. Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 2018;68:381–382.
- [7] Scashfoort RBM. Handbook of surface Plasmon resonance. Royal society of chemistry. 2017:27–103.
- [8] Homola J, Dostalek J, S Jiang JL. Surface Plasmon Resonance Based Sensors. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors. 2006:45–67.
- [9] Bastus NG, Comenge J, Puentes V. Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. *Langmuir*. 2011;27:11098–11105.
- [10] Li D, He Q, Cui Y. Immobilization of glucose oxidase onto gold nanoparticles with enhanced thermostability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;355:488–493.
- [11] Lelievre HY, Bukar N, McKeating KS. Plasmonic

Монгол улсын их сургуулийн, Хэрэглээний шинжлэх ухаан инженерчлэлийн
сургуулийн эрдэм шинжилгээний хурлын эмхэтгэл 2021



Mongolian Journal of Engineering and Applied Sciences, 2021, 3(1)

Био-инженерчлэл

ХЕПАТИТИЙН ДЕЛЬТА ВИРҮСИЙН ХАЛДВАРЫГ ИЛРҮҮЛЭХ ГАДАРГУУГИЙН ПЛАЗМОН РЕЗОНАНС ДЭЭР ҮНДЭСЛЭСЭН ОНОШЛУУРЫГ ЗОХИОН БҮТЭЭХ

А. Номин^{1*}, Э. Номин-Эрдэнэ², М. Бадмаараг¹, Н. Хулан¹, Н. Эрдэнэ³, О. Одгэрэл^{1,4}

¹МУИС, ХШУИС, Хими Биологийн Инженерчлэлийн тэнхим, Гешийн инженерчлэлийн лаборатори

²МУИС, ШУС, БУС, Физикийн тэнхим, Лазерын судалгааны төв

³МУИС, ХШУИС, Хими Биологийн Инженерчлэлийн тэнхим, Нанотехнологийн төв

⁴Элэгний төв

Received on 2021.04.14; Revised on 2021.06.24; Accepted on 2021.07.01

*Холбоо баригч зохиогч: anomin0110@gmail.com

Хураангуй

Монгол улс хепатит вирусийн халдварын тархалт болон элэгний өвчлөлөө шалтгаалсан нас баралтын тоогоороо дэлхийд нэгдүгээрт, элэгний өвчлөлөөрөө найм дугаарт эрэмбэлэгдэж байна. Элэгний өвчлөл их байгаагийн нэг том шалтгаан нь хепатит дельта вирусийн (ХДВ) халдвар юм. Гадаргуугийн плазмон резонансын (ГПР) оношлуурыг ашиглан ХДВ-ийг оношлох шинжилгээг хийвэл бодит хугацааны анализ явуулан шинжилгээний харну хурдан гарах ба мэдрэг чадвар харьцангуй өндөр, нэмэлт молекул ашиглахгүй, дахин хэрэглэж болох зэрэг олон давуу талтай. ГПР-ын оношлуурыг угсрахдаа алтны нано бөөм болон балк (bulk) бүтэцтэй алт ашиглан хоёр төрлийн оношлуур бэлтгэн тус тус харьцуулан судалсан. Алтны нано бөөмийг сонгодог Туркевичийн аргаар 32 ± 19 нм болон 60 ± 8 нм хэмжээтэй синтезлэн гаргаж, меркаптоацетаны хүчлийн (MUA) холбогчийг фосфатын буфер орчинд Tween 20 - ыг физисорб-шилж тогтворжуулан холбосон. Урвалын дараа алтны нано бөөмийн гадаргуу дээр карбоксил функционал бүлэг суусан. Гадаргуу дээрх функционал бүлгийг 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид, N-Гидроксисуқцинимид (EDC/NHS) биохолбогчдын тусламжтай урвалын идэвхтэй завсрын бүтээгдэхүүн рүү шилжүүлж ХДВ-ийн эсрэгтөрөгч уурагтай ковалент холбоогоор холбосон. Ийнхүү амин бүлэг суулган идэвхжүүлсэн шилэн дээр ХДВ-ийн эсрэгтөрөгч бүхий алтны нано бөөмийг холбон эхний оношлуур бэлэн болсон. Балк (bulk) бүтэцтэй алт ашигласан оношлуурыг угсрахдаа плазма спуттер багажаар 50 нм орчим зузаантай алтны нимгэн үе суулгасан ба пирана уусмалаар алтны гадаргууг идэвхжүүлж гидроксил бүлэг суулгасан. Үүний дараа MUA холбогчоор карбоксил функционал бүлэгтэй болгон өмнөх туршилтын адил EDC/NHS биохолбогчдыг ашиглан ХДВ-ийн эсрэгтөрөгч уургийг алтны нимгэн үетэй холбосон. оношлуурын холболтууд бүрэн явагдаж, угсралт амжилттай болсныг фотоны хөндлөн корреляцын спектроскоп, хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрофотометр, нил улаан туяаны спектрометр, энергийн дисперсийн рентген спектрийн багажит анализээр баталсан. Угсарсан оношлуурын ажиллагааг баталгаажуулахын тулд ELISA арга зүйг ашиглан өнгөний хувирал болон шингээлтийн эрчмийг хэмжин тодорхойлсон. ГПР-ын багажийг Лазерын судалгааны төвд шинээр угсран, зэрэг болон сөрөг дээж дээр харьцуулан хэмжилт явуулахад шингээлтийн эрчим болон өнцгийн шилжилтийн ялгаатай үр дүн гарсан. Энэ нь оношлуур дээр холбосон ХДВ-ийн эсрэгтөрөгчтэй дээж буюу ийлдэс дэх ХДВ-ийн эсрэгбие холбогдож бидний оношлуур ажиллаж байгааг баталсан. Бид судалгааны ажлаараа ХДВ-ийг оношлох ГПР-ын технологид суурилсан оношлуурын хоёр төрлийн загварыг бүтээсэн ба ХДВ-ийн халдварыг оношлож эрт илрүүлснээр элэгний хатуурал, элэгний дутагдал, элэгний халдвар нас баралтыг бууруулах боломжтой юм.

Түгэхүүр үг: алтны нано бөөм, алтны нимгэн үе, эсрэгтөрөгч, эсрэгбие

26 А.Номин ба бусад. Хепатитийн дельта вирусийн халдварыг илрүүлэх ППР дээр үндэслэсэн оношлуурыг зохион бүтээх

1 Удиртгал

Хепатит дельта вирус (ХДВ) нь элэгний өвчлөл үүсгэдэг шалтгаануудын нэг бөгөөд хепатит В вирусийн (ХВВ) гадаргуугийн эсрэгтөрөлтийг ашиглах замаар ХВВ-тэй давхар халдварлагддаг [1, 2]. 2010-аас 2019 оны хооронд хийгдсэн судалгааны нэгтгэлдээр дэлхийн хэмжээн дэх ХВВ-ийн гадаргуугийн эсрэгтөрөч (HBsAg) эерэг хүн амын 4.5 хувь нь ХДВ халдвартай байгаа нь тогтоогдсон бөгөөд дэлхийн нийт хүн амын 0.16 хувь буюу 12 сая хүн ХДВ-ийн халдвартай гэж тооцоологдсон [3]. Харин Монгол улсын хүн амын 8.03 (5.26- 12.08) хувь нь ХДВ-ийн халдвартай буюу 239 (157-360) мянган хүн ХДВ-ийн халдвартай гэж тооцоологдсон байна [4-6].

Сүүлийн жилүүдэд ППР дээр үндэслэсэн оношлуурын хөгжүүлэлт, судалгаа эрчимтэй явагдаж байна. Энэхүү оношлуурын хувьд металлын гадаргуу дээр лиганд холбосон байх ба лазер гэрлийн үүсгүүрээс гарч буй гэрэл нь сенсорын гадаргуугаас дотоод бүрэн ойлтоор ойж детекторт очиж бүртгэгдэнэ. Гэрэл тусгах өнцгийг өөрчилснөөр резонансын өнцгөөр тусгах үед дотоод бүрэн ойлтоор ойхоо болж, ППР-ын үзэгдлийн улмаас металлын гадаргуугаар долгион болгон тархана. Энэ үед детекторт гэрлийн эрчим бүртгэгдэхээ болино. Гэрлийн тусаж буй өнцөг дахин өөрчлөгдөхөд гэрэл эргэн дотоод бүрэн ойлтоор ойж эхэлнэ. Хэрэв оношлуурын гадаргуу дээр зорилтот анализт ирж суунал ППР үүсч буй өнцөг нь өөрчлөгддөг. Гадаргуугийн плазмоныг өдөөхөд хэрэгтэгддэг сарвалжигт конфигураци, Огтогын конфигурациуд байдаг ба хамгийн өргөн хэрэглэгддэг геометр бол Креманы конфигураци юм [7]. Энэхүү судалгаанд бид Креманы конфигураци дээр суурилсан ППР-ын багаж үгсэрн хэмжилт явуулсан.

ППР-ын оношлуурыг ашиглан ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэн оношлох нь бодит хугацааны анализ хийн шинжилгээний хариу хурдан гарах, мэдлэг чадвар харьцангуй өндөр, нэмэлт молекул ашиглахгүй, дахин хэрэглэж болох зэрэг олон давуу талтай [8].

2 Материал, арга зүй

2.1 Алтны нано бөөм синтезлэх

Алтны хлоридын 0.25 мМ 50 мл уусмал болон 1% 5 мл натрийн цитратын уусмал бэлтгэнэ. Алтны хлоридын уусмалаг соронзон хутгуур дээр 80°C болон 95°C хүргэл халдаж температур тогтворжих үед натрийн цитратын уусмалаг хийж хутгуурыг ажиглуулж уусмал өнгөгүйгээс хөх, шил ягаан, хэсэг хугацааны дараа улаан өнгөтэй болон хувирмагц нано бөөм үүссэн гэж үзэн урвалыг зогсооно [9].

2.2 Алтны нано бөөмийг MUA холбогчоор бүрэх

10 мМ pH=6.8 фосфатын буфер - Tween 20 уусмал бэлтгэж 5 мл синтезлэсэн алтны нано бөөм дээр 5 мл уусмалаг нэмж 20 минут зөөлөн хутгана. Нийт 10 мл Tween 20 физисорбцидсон алтны нано бөөмийн уусмал дээр 0.5 мМ MUA (этанолуус 1:3) уусмал нэмнэ. MUA-аар хилисоришлож бүрэхийн тулд 11 цагийн турш тасралтгүй зөөлөн хутгана [10].

2.3 MUA холбогчоор бүрхэгдсэн алтны нано бөөмийг эсрэгтөрөгчтэй ковалент холбоогоор холбох

MUA холбогчоор бүрхэгдсэн алтны нано бөөмийг 3 удаа угааж фосфатын буфер - Tween 20 pH=6.8-д уусгана. Бүрхэгдсэн алтны нано бөөм дээр 10 мг/мл 1 мкл EDC нэмж, 15 минутын турш идэвхжүүлнэ. 10 мг/мл 2 мкл NHS нэмж 10 минут идэвхжүүлнэ. 8400 эрг/мин хурдаар 15 минут центрифуг ашиглан фосфатын буфер - Tween 20 pH = 6.8 уусмалаар илүүдэл EDC, NHS-ийг угаана. Идэвхжсэн алтны нано бөөм дээр 197.53 мкг/мл концентрацитай 50 мкл эсрэгтөрөгч нэмж 2 цагийн турш инкубацлана. Улмаар алтны нано бөөм эсрэгтөрөгчтэй ковалент холбоо үүсгэнэ. 6000 эрг/мин хурдаар 15 минут центрифуг ашиглан алтны нано бөөмтэй урвалд ороогүй илүүдэл эсрэгтөрөгч, бусад бодисыг фосфатын буфер - Tween 20 pH = 6.8 ашиглан угаана. Илүүдэл урвалд ороогүй уургаас салгасны дараа тусаж үлдсэн эсрэгтөрөгчтэй холбогдсон алтны нано бөөм дээр 200 мкл фосфатын буфер pH = 5.8 нэмж уусгана [11].

2.4 Эсрэгтөрөгчтэй холбосон алтны нано бөөмийг шилэн дээр суулгах

Цэвэрлэж бэлтгэсэн шилэн дээр 100 мкл ширана уусмал дусгаж 20 минут инкубацлана. Идэвхжүүлсэн шилний гадаргууг нэрмэл усаар 3 удаа цэвэрлэж илүүдэл урвалд ороогүй шираныг цэвэрлэнэ. Идэвхжүүлсэн шилний гадаргууд 100 мкл бэлтгэсэн 5% APTES дусаан 90 минут чийгтэй орчинд 4°C-т инкубацлана. Энэ үед идэвхжсэн гадаргуу дээр APTES-ийн молекулууд өөрөө эрэмбэлэгдэн сууна. APTES-ийн өөрөө эрэмбэлэгдэх үе суусан шилнийг этанолоор 3 удаа цэвэрлэн урвалд ороогүй илүүдэл бодисыг цэвэрлэнэ. APTES-ийн өөрөө эрэмбэлэгдэх нимгэн үе суулгасан шилэн дээрээ эсрэгтөрөгч буюу уурагтай холбогдсон алтны нано бөөмийн уусмалаас 100 мкл хийж 60 минут инкубацлана. Бэлтгэн болсон шилнийг 3 удаа шүршин цэвэрлэж илүүдэл холбогдоогүй уургийг сайтар цэвэрлэнэ.

2.5 Алтны нимгэн үе суулгах

Алтны нимгэн үе суулгах ВК 7 шилнийг ГНБ болон органик уусгагчдаар сайтар цэвэрлэн, гүйцээж хатаана. Плазмиа сүүттер багьжид цэвэрлэсэн шилнийг голдуулан байрдуулна. Багьжийг битүүмжлэн

тагласны дараа асаан минутын заалтыг 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6 минутаар тус тус тохируулан найман өөр алтны нимгэн үеийн дээж бэлтгэнэ. Алтны нимгэн үе суулгасан шилдэг цетрийн тавгайд дээш харуулан хийж битүүмжилнэ.

2.6 Алтны нимгэн үеийн гадаргууг идэвхжүүлж эсрэгтөрөгчтэй холбох

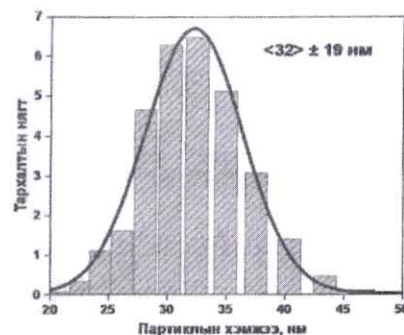
Нимгэн үе суулгасны дараа шилэн дээр маск тавьж зай гаргахгүй байхаар сайтар битүүмжилнэ. Цэвэрлэж бэлтгэсэн шилэн дээр 100 мкл пирана (H_2SO_4 : H_2O_2 ; 2:1) 60°C хүүртэл хөргөн хийж 1 минут идэвхжүүлнэ. Пиранагаар идэвхжүүлсэн шилэн дээр этанолд уусгасан 10 mM MUA –аас тус бүр маскны нүхэнд 100 мкл хийж 24 цагийн турш 4°C-т чийгтэй оршид сайтар битүүмжлэн инкубацлана. MUA-ийг шавхан цэвэрлэж, гадаргууг 5 удаа нэрмэл усаар угаана. Гадаргууг нь идэвхжүүлсэн алтны нимгэн үе дээр 75 mM EDC, 15 mM NHS-ын PBS-д уусгаж бэлтгэн, нүх тус бүрт 100 мкл хийж 1 цаг инкубацлана. EDC/NHS бүхий уусмалыг шавхан гадаргууг PBS-р 5 удаа угааж хатаана [12]. Карбоксил бүлэг суулгасан алтны нимгэн үе дээр ХДВ-ийн гадаргуугийн уургаас (эсрэгтөрөгч) нүх тус бүрийг бүрхэж байхаар 120 мкл хийж 1 цаг инкубацлана. Уураг холбосон алтны сенсороо PBS-ээр 5 удаа угаана. 5 % Skim milk PBS-д бэлтгэж нүх тус бүрт 100 мкл хийж 1 цаг блоклинг хийнэ. Блоклинг хийсний дараа сенсороо 5 удаа PBST 0.1 % ашиглан угаана [13].

3 Үр дүн

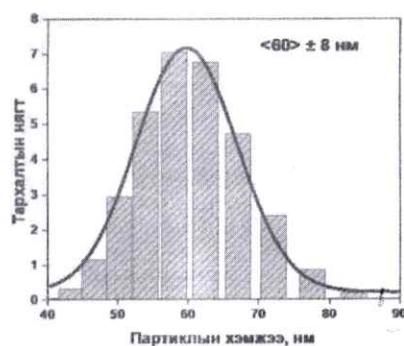
3.1 Туркевичийн аргаар синтезлэсэн алтны нано бөөмийн үр дүн

Алтны нано бөөмийг синтезлэхдээ урвалын температур их ба урвалын температур бага үед, харгалзан натрийн цитратын агууламж их ба бага үед туршилт явуулсан. Зураг 1, 2-д фотон кросс корреляцийн спектрометрийн үр дүнгээр алтны нано бөөмийн хэмжээний тархалтыг харуулав. Урвалын температур буурахад нано бөөм үүсгэдэг атомын зөөлт, хөдөлгөөн уусмалд удааширна. Уусмалд прекурсор үүсч дуусаагүй байхад түрүүлж үүссэн алтны цөм дараагийн шатны ургах процессоо эхлүүлснээр том алтны нано бөөм үүсдэг. Эсрэгээрээ температур их, урвал хурдан явагдах үед бүх прекурсор нь цөм үүсэх процессод нэгэн зэрэг ашиглагдаж дараагийн шатны ургах процессод цөөн хэдэн мономер л үлдсэн байдаг учраас бага хэмжээтэй алтны нано бөөм үүсдэг. Иймд урвалын температур харьцангуй өндөр буюу 95°C байхад 32 ± 19 нм хэмжээтэй, 80°C байхад түүнээс том 60 ± 8 нм хэмжээтэй байгаа нь судалгааны үр дүнтэй давхцаж байна. [14].

Үзэгдэх гэрлийн мужид спектр өгдөг бодисууд өнгөтэй байдаг ба синтезлэсэн алтны нано бөөм хэмжээнээс хамааран улаанаас нил ягаан өнгөтэй байх ба 500-600 нм-ын долгионы уртад шингээлт өгдөг.



Зураг 1: Урвалын температур 95°C үеийн фотон кросс корреляцийн спектр

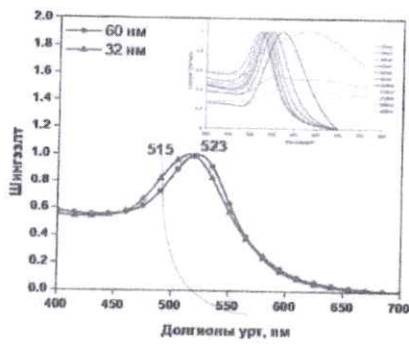


Зураг 2: Урвалын температур 80°C үеийн фотон кросс корреляцийн спектр

Хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрээс харахад 60 нм алтны нано бөөм нь 515 нм-т шингээлт өгсөн бол 32 нм хэмжээтэй нано бөөм 523 нм-т шингээлтийн утга өгсөн байна. Үүнээс харахад нано бөөмийн хэмжээ томрох тусам долгионы урт ихтэй мужруу шинжийг илджилт өгдөг. Зураг 3-ын [15] утгатай тохирч байна. Алтны нано бөөмийг ГПП-ын сенсорт ашиглахад 50 нм хэмжээ хамгийн тохиромжтой оптимал тул цаашид судалгаанд 60 нм хэмжээтэй синтезлэсэн алтны нано бөөмийг хэрэглэн [16].

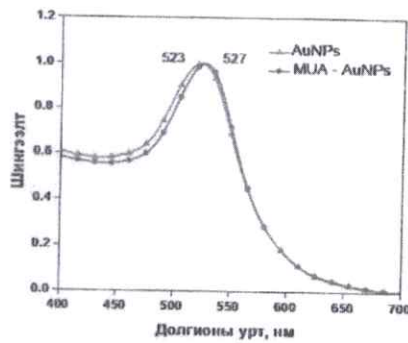
Хүснэгт 1-с харахад синтезлэсэн нано бөөмийн элементийн анализ хийхэд алтны эзлэх хувь 95 %, цахиур 5 % байсан. Шилэн дээр суулгасан алтны нано бөөмийн өөрөө утгагдах моноүе бэлтгэсэн дээжийг энергийн дисперсийн рентген спектроскопоор хэмжүүлсэн ба шилэн дэх цахиур илэрсэн гэж дүгнэж байна.

28 А.Номин ба бусад, Хепатитийн дельта вирусийн халдварыг илэрцлэх ГПР дээр үндэслэсэн оношилгуурыг зохион бүтээх

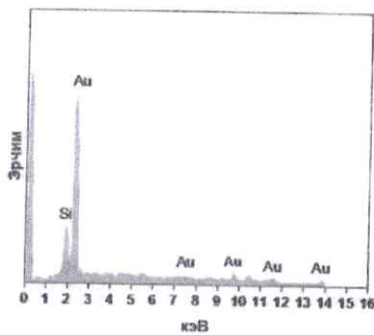


Зураг 3: Хоёр өөр аргаар синтезлэсэн алтны нано бөөмийн тэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр ба алтны нано бөөмийн тэмжлэгээрээ замварсан тэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр [15]

гой бүлэг (тиол бүлэг, -SH), гинжин хэлхээ (10 нүүрстөрөгчийн алкан), сүүд хэсэг (карбоксил бүлэг, -COOH)-ээс тогтоно.



Зураг 5: Синтезлэсэн алтны нано бөөм болон MUA холбогчоор бүрсэн алтны нано бөөмийг харьцуулсан тэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр



Зураг 4: Алтны нано бөөмийн энергийн дисперсийн рентген спектр

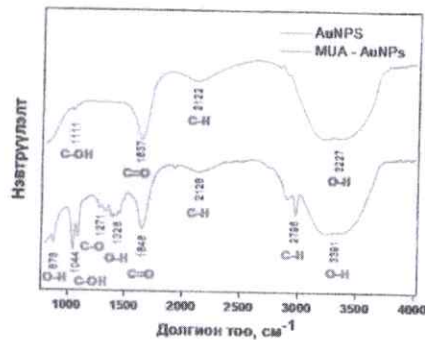
Хүснэгт 1: Алтны нано бөөмийн энергийн дисперсийн рентген спектрийн тайлал

№	Элемент	Масс, %
1	Алт	95
2	Пахнур	5

Шинжиж буй нэгдлийн функционал бүлэг болон зарим калагчийг солих, гинжин хэлхээг өөрчлөх, янз бүрийн уусгагчаар үйлчлэх мөн түүнчлэн гадаад хэлхээг өөрчлөх үед шингээлтийн спектрийн шилжилдэг [17]. Зураг 5-с харахад 60 нм алтны нано бөөм дээр алкентиол MUA линкерийг химисорбицолсны дараа шилжин шингээлтийн долгионы урт 523 нм-ээс 527 нм-ийн муж хүртэл шилжсэн, энэ нь металл нано бөөмийн гадуур зузаан давхарга үүссэнийг илтгэнэ. Харин шингээлтийн спектр өргөсөөгүй нь бөөм агрегатад ороогүйг илтгэсэн.

3.2 Алтны нано бөөмийг MUA холбогчоор бүрсэн үр дүн

Алтны нано бөөмийг синтезлэсний дараа MUA (меркаптоидеканы хүчил) холбогчоор бүрсэн. MUA линкер нь нэгдүгээрт алтны нано бөөмийн гадаргууг карбоксил бүлгээрээ функционалжуулах, хоёрдугаарт бүрэн бүрсний дараа агрегатад орохоос сэргийлэх тогтворжуулагчийн үүрэгтэй ба тол-



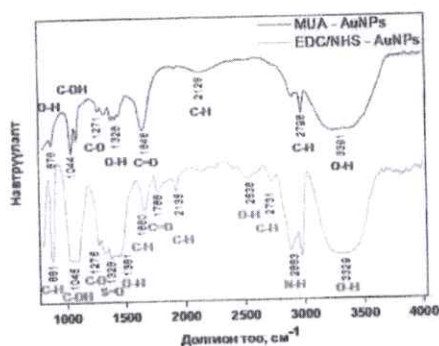
Зураг 6: Алтны нано бөөмд MUA линкер суулгасан нил улаан туяаны спектр

Зураг 6-с MUA линкер суулгасан нил улаан туяаны спектрийг харахад алтны нано бөөмөөс ялгарах найман пикүүд ажиглагдаж байна. 878 cm^{-1} , 946

см⁻¹, 1044 см⁻¹, 1085 см⁻¹, 1326 см⁻¹, 1420 см⁻¹, 1451 см⁻¹, 2796 см⁻¹ долгион тоон дээр шикүүд өгсөн бөгөөд эдгээр нь C-H деформаци, O-H гидроксил, C-OH спирт болон эфир, O-H карбоксил бүлгийн гидроксил, C-H алкан, C-H алдегид бүлгүүдэд химийн холбооны хэлбэлзэлд харгалзаж байна. Үүнээс харахад карбоксил бүлгийн гидроксил болон алдегид бүлгүүдийн долгион тоон дээр хүчтэй шингээлт өгсөн нь урвал амжилттай явагдаж MUA линкер алтны nano бөөмийн гадаргуу дээр амжилттай холбогдсоныг харуулж байна. Мөн S-H тиол бүлгийн хэлбэлзэл 2500-2600 см⁻¹ долгион тоон дээр илрээгүй нь илүүдэл урвалд ороогүй MUA линкер центрифугдэн угаасаны улмаас бүрэн арилсан болох нь батлагдаж байна.

3.3 MUA холбогчоор бүрхэгдсэн алтны nano бөөмийг эсрэгтөрөгчтэй ковалент холбоогоор холбосон үр дүн

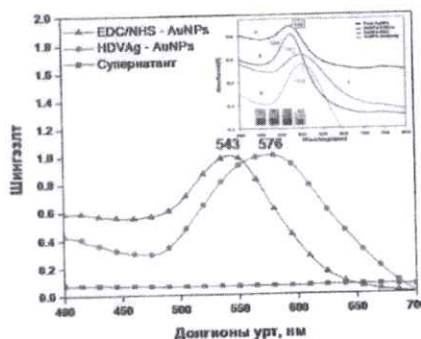
Карбоксил бүлэг -COOH нь амин бүлэгтэй -NH₂ баг бөх амидын холбоо үүсгэдэг. Иймд алтны nano бөөмийн карбоксил бүлэг, эсрэгтөрөгчийн гадаргуу дээрх амин бүлэгтэй ковалент холбоо үүсгэх ба энэ холбоог EDC/NHS биохолбогчидын тусламжтай бий болгодог.



Зураг 7- Алтны nano бөөмд EDC/NHS биохолбогчид суулгасан нил улаан туяаны спектр

Зураг 7-с EDC/NHS биохолбогчид суулгасан нил улаан туяаны спектрийг харахад MUA холбогчоор бүрэн алтны nano бөөмөөс ялгарах долоон шикүүд ажиглагдаж байна. 800 см⁻¹, 1328 см⁻¹, 1660 см⁻¹, 1768 см⁻¹, 2536 см⁻¹, 2883 см⁻¹, 2973 см⁻¹ долгион тоон дээр шикүүд өгсөн бөгөөд эдгээр нь C-H деформаци, S-O сульфонат, C-H алкан, C=O хүчлийн халид, O-H карбоксил бүлгийн гидроксил, N-H амин давсны бүлгүүдэд химийн холбооны хэлбэлзэлд харгалзаж байна. Үүнээс харахад сульфонат болон амин бүлгүүдийн долгион тоон дээр хүчтэй

шингээлт өгсөн нь урвал амжилттай явагдаж EDC халагдав NHS холбогдон алтны nano бөөмд карбоксил бүлэг амжилттай суусныг харуулж байна.



Зураг 8- Алтны nano бөөмд функционал бүлгүүд суулгахаас эсрэгтөрөгч холбосон шат бүрийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр ба эрдэм шинжилгээний өгүүлэлд алтны nano бөөмийг модификаци хийсэн шат бүрийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр [18]

Зураг 8-д алтны nano бөөмд функционал бүлгүүд суулгахаас эсрэгтөрөгч холбосон шат бүрийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрийн хэмжилтийг харуулсан. Шат бүрт шикийн хэмжээ өргөсөж, шингээж буй долгионы урт ихэссэн нь nano бөөмийн үе улам зузаарч функционал бүлгүүд нэмэгдэж, эсрэгтөрөгч сууснаар хэмжээ нь томорч буйг харуулж байна. Эрдэм шинжилгээний өгүүлэлд [18] ижил PBT (фосфатын буфер 10 mM pH 7.0, 2 мг/мл Tween 20) орчинд алтны nano бөөмийг антободитой ковалент холбоогоор холбох урвалыг явуулсан байна. Хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрийн үр дүнг харьцуулахад цэвэр алтны nano бөөм 520 нм-т, MUA холбогчоор бүрэн үед 523 нм-т, EDC/NHS биохолбогчид суулгасан үед 543 нм-т мөн эсрэгбие холбосны дараа 550 нм-т шингээлтийн пик өгсөн байна. Үүнээс харахад модификацийн шат бүрт шингээлт өгч буй долгионы урт ихэссэн мөн харгалзах шикийн долгионы урт нь бидний судалгааны ажлттай тохирч байна.

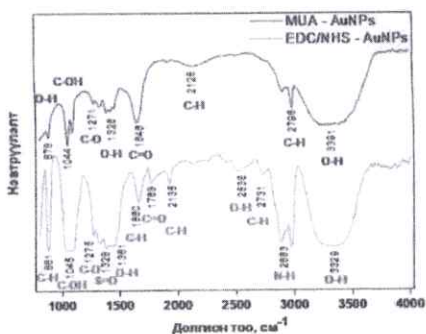
3.4 Алтны nano бөөмд суурилсан оношлуурын гадаргуугийн плазмон резонансыг хэмжсэн үр дүн

Идэвхжүүлсэн шилэн дээр эсрэгтөрөгч холбосон алтны nano бөөмийг суулгасан. Шилыг пирана уусмал (H₂SO₄ : H₂O₂; 3:1) ашиглан гидроксил бүлэг суулган дараа нь APTEС-ын 5 % этанолод уусмаалаар амин бүлэг суулгасан. Алтны nano бөөмийн гадаргуу дээрх эсрэгтөрөгчийн карбоксил бүлэг шилэн дээрх амин бүлэгтэй баг бөх амидын холбоо үүс

см⁻¹, 1044 см⁻¹, 1085 см⁻¹, 1326 см⁻¹, 1420 см⁻¹, 1451 см⁻¹, 2796 см⁻¹ долгион тоон дээр шикүүд өгсөн бөгөөд эдгээр нь C-H деформаци, O-H гидроксил, C-OH спирт болон эфир, O-H карбоксил бүлгийн гидроксил, C-H алкан, C-H алдегид бүлгүүдэд химийн холбооны хэлбэлцэлд харгалзаж байна. Үүнээс харахад карбоксил бүлгийн гидроксил болон алдегид бүлгүүдийн долгион тоон дээр хүчтэй шингээлт өгсөн нь урвал амжилттай явагдаж MUA лиганд алтны нано бөөмийн гадаргуу дээр амжилттай холбогдсоныг харуулж байна. Мөн S-H тиол бүлгийн хэлбэлцэл 2500-2600 см⁻¹ долгион тоон дээр илрээгүй нь илүүдэл урвалд ороогүй MUA лиганд центрифугдэн угаасаны улмаас бүрэн арилсан болох нь батлагдаж байна.

3.3 MUA холбогчоор бүрхэгдсэн алтны нано бөөмийг эсрэгтөрөгчтэй ковалент холбоогоор холбосон үр дүн

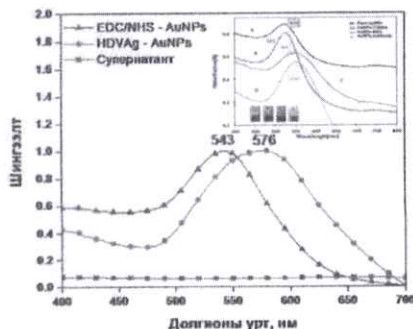
Карбоксил бүлэг -COOH нь амин бүлэгтэй -NH₂ баг бөх амидын холбоо үүсгэдэг. Иймд алтны нано бөөмийн карбоксил бүлэг, эсрэгтөрөгчийн гадаргуу дээрх амин бүлэгтэй ковалент холбоо үүсгэх ба энэ холбоог EDC/NHS биохолбогчдын тусламжтай бий болгодог.



Зураг 7: Алтны нано бөөмд EDC/NHS биохолбогчид суулгасан нил улаан туяаны спектр

Зураг 7-с EDC/NHS биохолбогчид суулгасан нил улаан туяаны спектрийг харахад MUA холбогчоор бүрэн алтны нано бөөмөөс ялгарах долоон шикүүд ажиглагдаж байна. 800 см⁻¹, 1328 см⁻¹, 1660 см⁻¹, 1768 см⁻¹, 2536 см⁻¹, 2883 см⁻¹, 2973 см⁻¹ долгион тоон дээр шикүүд өгсөн бөгөөд эдгээр нь C-H деформаци, S-O сульфонат, C-H алкан, C=O хүчлийн халид, O-H карбоксил бүлгийн гидроксил, N-H амин давсны бүлгүүдэд химийн холбооны хэлбэлцэлд харгалзаж байна. Үүнээс харахад сульфонат болон амин бүлгүүдийн долгион тоон дээр хүчтэй

шингээлт өгсөн нь урвал амжилттай явагдаж EDC халагдан NHS холбогдон алтны нано бөөмд карбоксил бүлэг амжилттай суусныг харуулж байна.



Зураг 8: Алтны нано бөөмд функционал бүлгүүд суулахаас эсрэгтөрөгч холбосон шат бүрийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр ба эрдэм шинжилгээний өгүүлд алтны нано бөөмийг модификаци хийсэн шат бүрийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектр [18]

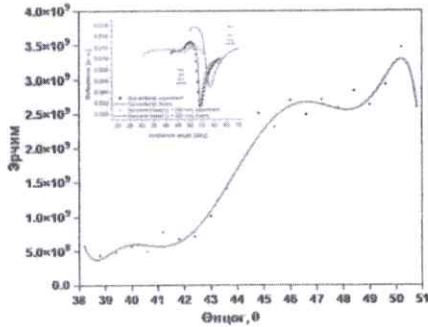
Зураг 8-д алтны нано бөөмд функционал бүлгүүд суулахаас эсрэгтөрөгч холбосон шат бүрийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрийн хэмжээг харуулсан. Шат бүрт шикийн хэмжээ өргөсөж, шингэж буй долгионы урт ихэссэн нь нано бөөмийн үе улам зузаарч функционал бүлгүүд нэмэгдэж, эсрэгтөрөгч сууснаар хэмжээ нь томорч буйг харуулж байна. Эрдэм шинжилгээний өгүүлд [18] ижил РВТ (фосфатын буфер 10 mM pH 7.0, 2 мг/мл Tween 20) орчинд алтны нано бөөмийг антободитой ковалент холбоогоор холбох урвалыг явуулсан байна. Хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрийн үр дүнг харуулахад ивэр алтны нано бөөм 520 нм-т, MUA холбогчоор бүрэн үед 523 нм-т, EDC/NHS биохолбогчид суулгасан үед 543 нм-т мөн эсрэгбие холбосны дараа 550 нм-т шингээлтийн пик өгсөн байна. Үүнээс харахад модификацийн шат бүрт шингээлт өгч буй долгионы урт ихэссэн мөн харгалзах шикийн долгионы урт нь бидний судалгааны ажилтай тохирч байна.

3.4 Алтны нано бөөмд суурилсан оношлуурын гадаргуугийн плазмон резонансыг хэмжсэн үр дүн

Идэвхжүүлсэн шилэн дээр эсрэгтөрөгч холбосон алтны нано бөөмийг суулгасан. Шилний пирано уусмал (H₂SO₄ : H₂O₂; 3:1) ашиглан гидроксил бүлэг суулган дараа нь APTES-ийн 5 % этанолон уусмалаар амин бүлэг суулгасан. Алтны нано бөөмийн гадаргуу дээрх эсрэгтөрөгчийн карбоксил бүлэг шилэн дээрх амин бүлэгтэй баг бөх амидын холбоо үүс-

30 А.Номин ба бусад. Хепатитийн delta вирусийн халдварыг илрүүлэх ГНР дээр үндэслэн оноилуурыг зохион бүтээх

гэн, урвал дууссаны дүнд шил нил ягаан өнгөтэй болсон.



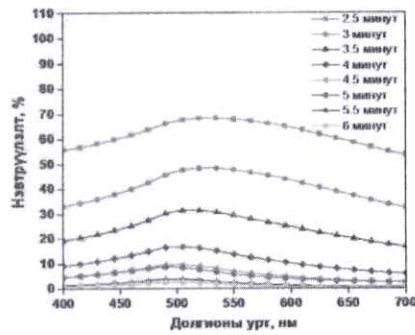
Зургаг 9: Алтны нано бөөмд суулгасан оноилуурын БГП-ын хэмжилтийн үр дүн болон эрдэм шинжилгээний өгүүллэийн БГП-ын үр дүн [19]

Угсарсан оноилуурын БГП-ын хэмжилтийг Лазерын судалгааны төвд шингээр угсарсан багаж дээр гүйцэтгэсэн боловч ГНР-ын үзэгдэл ажиглагдаагүй ба гэрлийн эрчим буурч резонансын үзэгдэл явагдаагүй эрчим улам ихэссэн. Зургаг 9. Эрдэм шинжилгээний өгүүллэл [19]-д БГП-ын ойлт болон өнцгөөс хамаарсан графикийг цэнхэр өнгөөр дүрсэлсэн ба ойролцоогоор 57°C-ын өнцгөөр лазер гэрэл тусгахад гадаргуугийн плазмон ажиглагдсан байна. Дээжээс хамаран тохирох тодорхой нэг өнцгөөр лазер гэрэл тусгахад ойлтын эрчим буурч, детекторт лазер гэрэл бүртгэгдэхгүй болно. Энэ нь гадаргуугийн плазмон шингилэгдэж Х тэнхлэг дагуу плазмон резонанс үүсэж байгаа үзэгдэл юм. Харин бидний угсарсан оноилуурт ойлтын эрчим буурах үзэгдэл явагдаагүй, улам ихэсэж байгаа учир гадаргуугийн плазмон ажиглагдаагүй байна гэж дүгнэж байна. Мөн дахин багажны нөхцөл бололцоог сайжруулан лазерын ондоо эх үүсвэр ашиглах, долгионы урт болон шингээлтээс хамаарсан туршилт гүйцэтгэхийг төлөвлөж байна.

3.5 Алтны нимгэн үе суулгасан үр дүн

Алтны нимгэн үеийн зузааныг тодорхойлох чухал шаардлагатай ба нимгэн үеийн зузааныг хэмжихийн тулд эрдэм шинжилгээний өгүүллээс [20] ш татаан суулгасан шилний нэвтрүүлэлтийн хувийг тооцоолсон.

Тус бүр дээжийг бэлтгэсний дараа хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрофотометр ашиглан нэвтрүүлэлтийн хувийг тооцоолсон туршилтын графикийг Зургаг 10-г харуулав. Энэхүү графикаас харахад хугацаа ихсэх тусам илүү зузаан алтны үе



Зургаг 10: Найман өөр төрлийн хугацаанд суулгасан алтны нимгэн үеийн хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн нэвтрүүлэлтийн турв

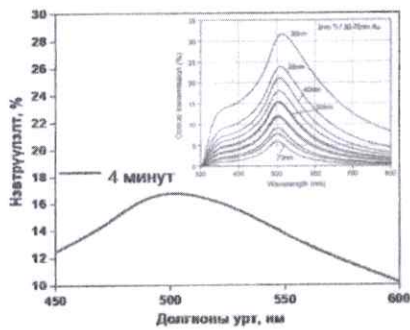
сууж нэвтрүүлэлтийн хувь багасаж байгаа ба Хүснэгт 2-т найман өөр төрлийн хугацаанд суулгасан алтны нимгэн үеийн хамгийн өндөр нэвтрүүлэлт үзүүлж буй долгионы урт болон нэвтрүүлэлтийн хувийг харуулав.

Хүснэгт 2: Тодорхой хугацааны турш суулгасан алтны нимгэн үеийн хамгийн өндөр нэвтрүүлэлт үзүүлж буй долгионы урт болон нэвтрүүлэлтийн турв

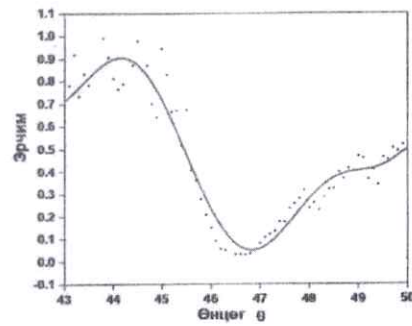
№	Хугацаа, минут	Долгионы урт, нм	Нэвтрүүлэлт, %
1	2.5	531	68.372
2	3	527	48.425
3	3.5	513	31.531
4	4	502	16.785
5	4.5	500	9.717
6	5	493	8.740
7	5.5	500	3.809
8	6	498	2.576

Эрдэм шинжилгээний өгүүллэлтэй [20] харьцуулахад 50 нм зузаан алтны нимгэн үе 500 нм орчим долгионы уртад нэвтрүүлэлт 15.2 % байсан. Найман өөр хугацааны турш суулгасан алтны нимгэн үеэс 4 минут үргэлжилсэн нимгэн үе нь 502 нм-т 16.7 % байгаа нь өмнөх өгүүллэлтэй харьцуулахад хамгийн ойролцоо үр дүн болсон. Иймээс 4 минутын турш суулгасан алтны нимгэн үеийг 50 нм-тэй хамгийн ойролцоо гэж дүгнэсэн. Цаашдын оноилуурын угсралт болон туршилтад алтны нимгэн үеийг 4 минут суулган ашиглахаар шийдсэн.

50 нм алтны нимгэн үе суулгасан шилний гадаргуугийн плазмон үүсэж буй эсэхийг шалгах зорилгоор Лазерын судалгааны төвд угсарсан ГНР-ын багажийг ашиглан хэмжилт явуулсан бөгөөд Зургаг 12-г харагдаж буй үр дүн гарсан. Энэхүү графикаас харахад гадаргуугийн плазмон үүсэж байгаа бөгөөд



Зураг 11: 4 минутын турш суулгасан алтны нимгэн үеийн нэвтрүүлэлтийн хувь Эрдэм шинжилгээний өгүүллийн тэмдэглэлийн хуудад элэгдлийн алтны нимгэн үеийн нэвтрүүлэлтийн хувь [20]



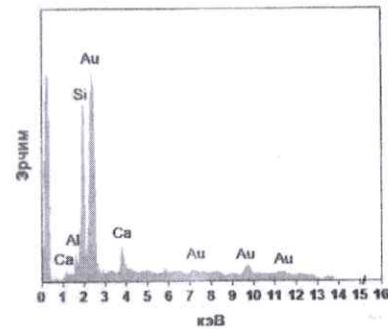
Зураг 12: 50 нм орчим алтны нимгэн үе суулгасан шилэн ГНР-ын хэмжээлт

47^o орчим өнцгөөр дээжрүү лазер гэрэл тусгахад тохиромжтой гэж дүгнэсэн.

Хүснэгт 3: Алтны нимгэн үеийн энергийн дисперсийн рентген спектрийн тайлал

№	Элемент	Масс, %
1	Алт	75.8
2	Цахиур	17.4
3	Кальци	4.8
4	Хөнгөнцагаан	2

Энергийн дисперсийн рентген спектроскопоор шилэн дээр суулгасан алтны нимгэн үед элементийн анализ хийсэн. Хүснэгт 3-с харахад алт 75.8 %, цахиур 17.4 % илэрсэн нь шилэн дэхь цахиур илэрсэн байж болзошгүй ба кальци, хөнгөн цагааны элемент илэрсэн нь бохирдол байж болзошгүй гэж дүгнэсэн.

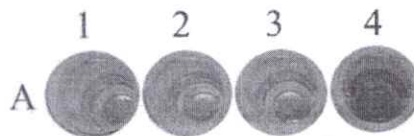


Зураг 13: Алтны нимгэн үеийн энергийн дисперсийн рентген спектр

3.6 ELISA оношлуур угсарч, хэмжилт хийсэн үр дүн

Фермент холбоот эсрэг биений урвал (enzyme linked immunosorbent assay буюу ELISA) нь эсрэг биенийг түргэн хугацаанд шинжлэх, хэмжихэд ашиглах ба судлагдаж буй дээжид сонирхсон тодорхой уураг байгаа эсэх, хэрэв байвал хэр хэмжээтэй байгааг тодорхойлох явдал юм [21]. ELISA-ын бичил үүрт орох дутуй хэмжээтэй шилэн дээр 50 нм орчим алтны нимгэн үе суулган бичил үүрэнд гадаргуут дээш харуулан хийсэн. MUA линкер болон EDC/NHS биохолбогчдыг ашиглан өмнөх ГНР-ын оношлуур угсрах аргатай ижил үйл явцаар алтны гадаргууд эсрэгтөрөгчийг холбосны дараагаар Wantai biotech HDV-IgG ELISA нэмэгдсэн оношлогоо хийсэн. Оношлогоо хийж дуусмагч өнгөний хувирал явагдсан уусмалыг хоосон бичил үүрлүү шилжүүлэн 450

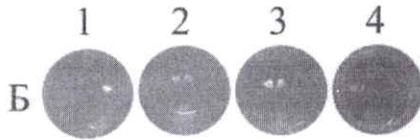
нм долгионы уртад гэрлийн шингээлтийг хэмжсэн.



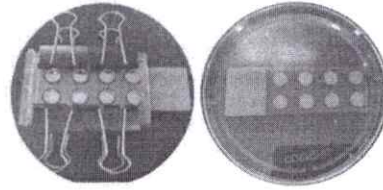
Зураг 14: Өнгө үзүүлэх аромосон хийсний дараах ELISA оношлуурын үр дүн

- A1, B1 – Бланк алтны нимгэн үеийн контрол
- A2, B2 – Эсрэгтөрөгч суулган блокинг хийсэн контрол
- A3, B3 – Халдваргүй, сөрөг контрол
- A4, B4 – Халдвартай, эерэг контрол

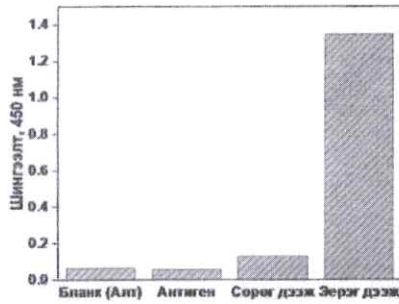
32 А.Номин ба бусад. Хепатитийн дельта вирусийн халдварыг илрүүлэх ГПР дээр үндэслэсэн оношлуурыг зохион бүтээх



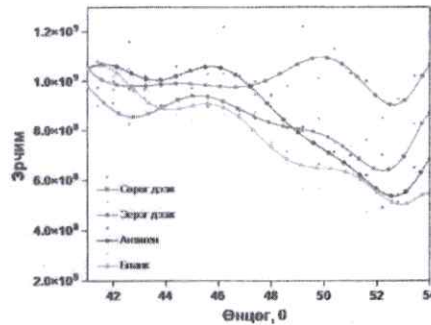
Зураг 15: Урвал зогсоот цусмал хийж, хоосон бичил үүрлүү шилжүүлсний дараах ELISA оношлуурын үр дүн



Зураг 17: Алтны нимгэн үе дээр суурилагд ГПР-ын оношлуурын холболт, угсралт явагдаж буй болон шинжлэхэд бэлэн болсон оношлуур



Зураг 16: ELISA оношлуурын шингээхэлтийг 450 нм долгионы уртанд хэмжээлн үр дүн



Зураг 18: ХДВ-ийн холбоортой болон эрүүл хүний цусны ийлдэс дээр хэмжээлн ГПР-ын үр дүн

Зураг 16-с харахад бланк алтны нимгэн үе нь эсрэгтөрөгч суулаган блокинг хийсэн контролоос илүү өндөр шингээлт өгсөн нь алтны гадаргуу дээр HRP агуулсан эсрэгбие бага хэмжээгэр холбогдсон байх боломжтой. Мөн халдваргүй сөрөг дээж эсрэгтөрөгч контролоос харьцангуй өндөр шингээлт өгсөн нь хүний цусанд агуулагдаж буй уураг, бусад эсрэгбие нь оношлуурын гадаргуу дээр харилцан үйлчлэл үзүүлж сонгомол биш шинж чанараар холбогдсон байна гэж дүгнэж байна. Харин халдвартай цусны ийлдэс буюу эсрэг дээжний өнгө тодоор хувирч 1.348 шингээлтийн өндөр утга өгсөн. Энэ нь алтны нимгэн үеийн гадаргуу дээр угсарч буй бидний оношлуур хүний цусанд дахь хепатит дельта вирусийн эсрэгбиеийг сонгомлоор мэдэрч чанар сайтай танин холбогдож байгааг харуулж байна.

3.7 Алтны нимгэн үет оношлуур угсарсан үр дүн

Алтны нимгэн үе дээр суурилагдсан оношлуурын ГПР-ын хэмжилтийг балк (bulk) буюу алтны нимгэн үе, эсрэгтөрөгч суулагсан буюу оношлуур, сөрөг буюу эрүүл хүний ийлдсээр үйлчилсэн, эсрэг буюу халдвартай хүний ийлдсээр үйлчилсэн үед явуулсан.

Зураг 18-с харахад бланк, эсрэгтөрөгч, сөрөг дээж бага эрчимтэй харин эерэг дээжний шингээл-

тийн эрчим өндөр, эрс ялгаатай байна. Иймд алтны нимгэн үе дээр ковалентаар холбоосон ХДВ-ийн эсрэгтөрөгч цусны ийлдэс дэх ХДВ-ийн эсрэгбие-тэй сонгомлоор холбогдож, угсарсан оношлуур амжилттай ажиллаж энэхүү арга зүйгээр ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэх боломжтой хэмээн дүгнэж байна.

4 Хэлэлцүүлэг

ГПР-ын технологид үндэслэсэн оношлуур сүүлийн жилүүдэд эрчимтэй хөгжин, дэлхий дахинд олон төрлийн судалгаа хийгдэж байна. Гэвч ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэх ГПР-д тулгуурласан оношлуурын хөгжүүлэлт, судалгаа огт хийгдээгүй байна. Мөнгөл улсад ХДВ-ийн тархалт өндөр байгаагаас шалтгаалан бид ХДВ-ийг илрүүлэх оношлуур бүтээх нь нийгмийн эрүүл мэндийг хамгаалахад томоохон хувь нэмэр болж чадна гэж үзэж байна. Энэхүү оношлуурыг угсрахад алтны нано бөөм болон балк (bulk) алтны нимгэн үеийг ашигласан. Алтны нано бөөмийг Туркевичийн натрийн цитратыг ангижруулах аргаар хоёр өөр урвалын температурт синтезлэсэн. Урвалын температур 95°C үед 32 ± 19

нм, урвалын температур 80°C үед 60 ± 8 нм орчим хэмжээтэй нано бөөм үүссэн *Зураг 1*, *Зураг 2*. 60 нм хэмжээтэй сингелдсэн алтны нано бөөмийг сонгон авч цаашид судалгаанд ашигласан. Алтны нано бөөмийг MUA холбогчоор (тиол болон карбоксил бүлэгтэй) бүрсэн ба этанолон орчинд тогтворгүй агрегатад орж байсан тул Tween 20 болон фосфатын буфер орчинд урвасныг явуулав. Карбоксил бүлэг суусан алтны нано бөөмийг ХДВ-ийн гадаргуугийн эсрэгтөрөгч уурагтай ковалент холбоогоор холбохын тулд EDC/NHS тэг урттай биохолбогчдыг ашигласан. Учир нь EDC нано бөөмийн гадаргуугийн карбоксил бүлэгтэй холбогдож O-acylisourea гэх тогтворгүй эфир үүсгэх ба дараа нь NHS холбогдон хагас тогтвортой амин бүлэгт идэвхтэй завсрын бүтээгдэхүүн үүсгэдэг. Карбонат-бикарбонатын буферт уусгасан ХДВ-ийн эсрэгтөрөгчийг уусмалд нэмснээр амин бүлэгт идэвхтэй NHS эфиртэй уургийн амин бүлэг холбогдон амидын холбоо үүсгэсэн. Алтны нано бөөмийн гадаргууг модификацлаж функционал бүлгүүд суусныг *Зураг 3*, *Зураг 6*, *Зураг 7* ба ХДВ-ийн эсрэгтөрөгчтэй амжилттай холбогдсонг *Зураг 8*-д шил улаан тузаны спектроскоп, хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрометрээр баталгаажуулав. Харин амин функционал бүлэг суулгасан шилэн дээр алтны нано бөөмтэй холбогдсон эсрэгтөрөгчийг суулган сенсоорыг угсарч ГПР-ын багажаар хэмжилт явуулахад *Зураг 9* дэх график гарсан ба гадаргуун плазманы үзэгдэл ажиглагдаагүй учир бид багажны угсралтыг улам сайжруулан, лазер гэрлийн үүсгэвэрийг өөрчлөн дахин туршилт явуулан учир шилтганыг нарийвчлан тодорхойлох хэрэгтэй байна. Балк (bulk) алтны нимгэн үе ашигласан оношлуурын хувьд нэвтрүүлэлтийн хувийг тооцоолох аргаар шилэн дээр 50 нм орчим алтны нимгэн үе суулгасан *Зураг 10*, *Зураг 11*. Цирана ($\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2 : 2:1$) уусмалаар алтны нимгэн үеийн гадаргууг идэвхжүүлэн гидроксил бүлэг суулган дараа нь өмнөх арга зүйтэй ижил биохолбогчуд ашиглан ХДВ-ийн эсрэгтөрөгчийг ковалент холбоогоор холбосон. Угсарсан оношлуурын ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэх онолгооны ажиглагч дэх баталгаажуулахын тулд ELISA арга зүйгээр давхар судалгаа гүйцэтгэн баталсан *Зураг 14*, *Зураг 15*, *Зураг 16*. Бэлэн болсон оношлуурыг халдвартай болон эрүүл хүний цуснаас ялгаж авсан ийлдсээр үйлчлэн ГПР-ын багажаар хэмжилт явуулахад зэрэг болон сөрөг дээж дээр ялгагдахуйц график үүсэж эрчмийн болон өнцгийн шилжилт ажиглагдаж байсан нь оношлуур болон ГПР-ын багаж амжилттай ажиллаж, ХДВ-ийн халдварыг оношлож байсан *Зураг 18*. Цаашид бид алтны нимгэн үе дээр морфологи болон химийн холбоо тодорхойлох олон талт судалгаа явуулах, олон дээж дээр судалгаа хийж оношлуурын баталгаажуулалт хийх, мөн оношлуур болон түүнийг хэрэглэх арга зүйн нэгэн жигд байдлыг хангасан стандарт протокол боловруулахыг зорьж байна.

5 Дүгнэлт

Бид энэхүү судалгаагаар балк (bulk) бүтэцтэй алт болон алтны нано бөөм ашиглан ковалент холбоогоор ХДВ-ийн эсрэгтөрөгчийг холбож амжилттай хоёр төрлийн ГПР-ын оношлуур угсарлаа. Энэхүү оношлуурын прототип загварыг зохион бүтээж ХДВ-ийн халдвартай хүний ийлдсэнээс ХДВ эсрэгбиеийг амжилттай илрүүлсэн. Цаашид судалгааны ажлын үр дүнг улам баталгааж, оношлуурын баталгаажуулалт хийх мөн оношлуур болон түүнийг хэрэглэх арга зүйн нэгэн жигд байдлыг хангахад чиглэсэн стандарт протокол боловсруулахад анхаарч ажиллах шаардлагатай байна. Судалгааны ажлын үр дүнгээс доорх дүгнэлтэд хүргэн. Үүнд:

- (1) Алтны нано бөөмийг сингелдэн гадаргууд нь амжилттай функционал бүлгүүд суулган эсрэгтөрөгчтэй холбосон болохыг баталсан.
- (2) Алтны нано бөөмийн оношлуурыг амжилттай угсран анализ хийсэн боловч шинээр угсарсан багаж дээр ГПР-ын үзэгдэл ажиглагдаагүй тул лазер гэрлийн эх үүсвэрийг өөрчлөх шаардлагатай гэж дүгнэсэн.
- (3) Харин алтны нимгэн үе дээр ХДВ эсрэгтөрөгч суудаг замаар гаргаж авсан оношлуурыг ашиглан ГПР-ын арга зүйгээр ХДВ-ийг оношлох боломжтой болох нь харгалдаж байна.

Ашиг сонирхлын зөрчилгүйн баталгаа

Зохиогчид ашиг сонирхлын зөрчилгүй гэдгээ баталж байна.

Талархал

Энэхүү судалгааны турш оношлуур бүтээхэд лабораторийн орчин, туршилтын дээжээр хангаж, онолын тооцоолол хийн шинээр багаж угсарсан Гешийн инженерчлэлийн лаборатори, Наноматериалын лаборатори, Элдэгийн төв, Лазерын судалгааны лабораторийн хамт олонд гүн талархал илэрхийлнэ. Судалгааны ажлыг минь ойлгож үргэлж түшиж тулж байдаг гэр бүлдээ байрлалаа.

Зохиогчийн оролцоо

А. Номин нь алтны нано бөөм, алтны нимгэн үе дээр суурилсан оношлуурын угсралт болон багажит анализын хэмжилт хийн, үр дүнг боловсруулсан. Э. Номин-Эрдэнэ нь ГПР-ын багаж угсран, онолын тооцоолол боловсруулан, оношлуурын хэмжилт хийсэн. М. Бадмаараг болон Н. Хулан нар нь ХДВ-ийн эсрэгтөрөгч уургийг гарган авч дэвэршүүлэн, ялгасан. Н. Эрдэнэ болон О. Одгэрэл нар нь судалгааны удирлагчид ба онол болон практикийн

34 А.Номин ба бусад. Хепатитийн дельта вирусийн халдварыг илрүүлэх ГТР дээр үндэслэсэн оношилгуурыг зохион бүтээх

олов талт туслалцаа, бодис урвалж лабораторийн орчноор хангаж энэхүү судалгааг гүйцэтгэсэн.

Санхүүжилт

Энэхүү судалгааны ажлыг санхүүжүүлж дэмжлэг үзүүлсэн Дөрвөн уул биотек ХХК-д гүн тазархал илэрхийлэе.

Ашиг сонирхолгүйн баталгаа

Ашиг сонирхолын зөрчилгүй болохыг үүгээр баталж байна.

Ашигласан ном

- [1] Vlachogiannakos J, Papatheodoridis GV. New epidemiology of hepatitis delta. *Liver international*. 2020;40:18–53.
- [2] Oyusuren T, F Kurbanov YT, Elkady A. High frequency of hepatocellular carcinoma in Mongolia: association with mono-, or co-infection with hepatitis C, B, and delta viruses. *Journal of medical virology*. 2006;78:1688–1694.
- [3] Stockdale AJ, Kreuels B, Henrion MY. The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis. *Journal of hepatology*. 2020;73:523–532.
- [4] Dashtseren B, Bungert A, Bat-Ulzii P, Enkhbat M, Oidovsambuu O. Endemic prevalence of hepatitis B and C in Mongolia: A nationwide survey amongst Mongolian adults. *Journal of viral hepatitis*. 2017;24:759–767.
- [5] Chen X, Oidovsambuu O, Liu P, Groseley R, Elazar M. A novel quantitative microarray antibody capture assay identifies an extremely high hepatitis delta virus prevalence among hepatitis B virus infected Mongolians. *Hepatology*. 2016;66:1739–1949.
- [6] Chen HY, Shen DT, Ji DZ, Han PC, Zhang WM, Ma JF. Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 2018;68:381–382.
- [7] Seashfoort RBM. Handbook of surface Plasmon resonance. Royal society of chemistry. 2017:27–103.
- [8] Homola J, Dostalek J, S Jiang JL, Lofas S. Surface Plasmon Resonance Based Sensors. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors. 2006:45–67.
- [9] Bastus NG, Comenge J, Puentes V. Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. *Langmuir*. 2011;27:11098–11105.
- [10] Li D, He Q, Cui Y, Duan L, Li J. Immobilization of glucose oxidase onto gold nanoparticles with enhanced thermostability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;355:488–493.
- [11] Lelievre HY, Bakar N, McKeating KS, Arnaud M, Cosin P. Plasmonic sensors for the competitive detection of testosterone. *Analyst*. 2015;140:5105–5111.
- [12] Jeong EJ, Jeong YS, Park K, Yi SY. Directed immobilization of DNA-binding proteins on a cognate DNA-modified chip surface. *Journal of Biotechnology*. 2008;135:16–21.
- [13] Vashist SK. Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Based Strategies to Crosslink Antibodies on Amine-Functionalized Platforms for Immunodiagnostic Applications. *Diagnostics*. 2012;2:23–33.
- [14] Huang CC, Liu TM. Controlled Au Polymer Nanostructures for Multiphoton Imaging, Prodrug Delivery, and Chemo-Photothermal Therapy Platforms. *ACS Applied materials and interfaces*. 2015;7:25259–25269.
- [15] <https://www.cytodiagnosics.com/pages/introduction-to-gold-nanoparticle-characterization>.
- [16] Amendola V, Pilot R, Frasconi M, Marago OM. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *Journal of physics: Condensed matter*. 2017;29.
- [17] Sukhdorj G. Optical methods of analysis. 2007:7–23.
- [18] Jonoush JA, Yazdian F, Mansori R, Omidi M. Localized Surface Plasmon Resonance Biosensor for Detection of Serum Prostate Specific Antigen in Prostate Cancer Patients. *Biosensing Biotechnology Research Asia*. 2016;13:2273–2279.
- [19] Yoon SJ, Kim D. Target dependence of the sensitivity in periodic nanowire-based localized surface plasmon resonance biosensors. *Journal of the Optical Society of America A*. 2008;25:725–735.
- [20] Sexton BA, Feltis BN, Davis TJ. Characterisation of gold surface plasmon resonance sensor substrates. *Sensors and Actuators A*. 2008;141:471–475.
- [21] Lequin RM. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical chemistry*. 2005;51:2415–2418.

Био-анагаахын сургууль, Алхам урагш 2021

БИО-АНАГААХЫН СУРГУУЛЬ
1982

АЛХАМ УРАГШ
2021

МУ-ЫН ГАВЬЯАТ БАГШ, ПРОФЕССОР
И.ПҮРЭВДОРЖИЙН НЭРЭМЖИТ

АЛХАМ УРАГШ 2021
МАГИСТРАНТ, ДОКТОРАНТ НАРТ ЗОРИУЛСАН
ЭРДЭМ ШИНЖИЛГЭЭНИЙ БАГА ХУРАЛ

Илтгэлийн хураангуй

2021 оны 12 сарын 20

Loading ...

8 дахь жилдээ

Ивээн тэтгэгч байгууллага

Ayuluunpharm

Гарамы **АНТИ-ГЕН ХХК**

Meeting ID: 418 470 3364
Passcode: 202109

Д-4

Хепатитийн дельта вирусийн халдварыг илрүүлэх гадаргуугийн плазмон резонанс дээр үндэслэсэн оношлуурыг зохион бүтээхА.Номин¹, Э.Номин-Эрдэнэ², Ж.Даваасамбуу², Н.Эрдэнэ³, О.Одгэрэл^{1,4}¹МУИС, ХШУИС, Хими Биологийн Инженерчлэлийн тэнхим, Генийн инженерчлэлийн лаборатори, ²МУИС, ШУС, БУС, Физикийн тэнхим, Лазерын судалгааны төв, ³МУИС, ХШУИС, Хими Биологийн Инженерчлэлийн тэнхим, Нанотехнологийн төв, ⁴Элэгний төв

E-mail: a.nomin@onomfoundation.org Утас: 91095535

Үндэслэл: Хепатит дельта вирус (ХДВ) нь элэгний өвчлөл үүсгэдэг шалтгаануудын нэг бөгөөд хепатит В вирусийн (ХБВ) гадаргуугийн эсрэгтөрөчийг ашиглах замаар ХБВ-тэй давхар халдварлагдаг. 2010-аас 2019 оны хооронд хийгдсэн судалгааны нэгтгэлээр дэлхийн хэмжээн дэх ХБВ-ийн гадаргуугийн эсрэгтөрөч (HBsAg) эерэг хүн амын 4.5 хувь нь ХДВ-ийн халдвартай байгаа нь тогтоогдсон бөгөөд дэлхийн нийт хүн амын 0.16 хувь буюу 12 сая хүн ХДВ-ийн халдвартай гэж тооцоологдсон. Харин Монгол улсын хүн амын 8.03 (5.26-12.08) хувь нь ХДВ-ийн халдвартай буюу 239 (157-360) мянган хүн ХДВ-ийн халдвартай гэж тооцоологдсон байна.

Сүүлийн жилүүдэд гадаргуугийн плазмон резонанс (ГПР) дээр үндэслэсэн оношлуурын хөгжүүлэлт, судалгаа эрчимтэй явагдаж байна. Энэхүү судалгаанд бид Кречманы конфигураци дээр суурилсан ГПР-ын багаж угсран хэмжилт явуулсан. ГПР-ын оношлуурыг ашиглан ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэн оношлох нь бодит хугацааны анализ хийн шинжилгээний хариу хурдан гарах, мэдрэг чадвар харьцангуй өндөр, нэмэлт молекул ашиглахгүй, дахин хэрэглэж болох зэрэг олон давуу талтай.

Зорилго: Хепатит дельта вирусийн халдварыг оношлох гадаргуугийн плазмон резонансын технологи дээр суурилсан оношлуур зохион бүтээх.

Материал, аргазүй: Алтны нанопартиклд үндэслэсэн биосенсор угсрах: Алтны нанопартиклыг туркевичийн аргаар 0.25 мМ алтны хлоридыг 1% натрийн цитратаар тогтворжуулан синтезлэж 0.5 мМ меркаптоандеканы хүчилтэй (MUA) холбоно. 10 мг/мл 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид/Н-Гидроксисукцинимид (EDC/NHS) биохолбогчуудыг ашиглан гадаргууг идэвхижүүлсэн алтны нанопартиклыг ХДВ-ийн гадаргуугийн антигентай холбож (3-аминопропил)триэтоксисилан (APTES)-аар идэвхижүүлсэн шилэн слайдтай ковалент холбоогоор холбох.

Алтны нимгэн үед үндэслэсэн биосенсор угсрах: Шилэн слайд дээр алтны нимгэн үе суулгаж пирана ($H_2SO_4:H_2O_2$; 2:1) уусмалаар гадаргууг идэвхижүүлнэ. Дараа нь 10 мМ MUA-ээр карбоксил функциональ бүлэг суулган 75 мМ EDC, 15 мМ NHS биохолбогчуудаар ХДВ-ийн гадаргуугийн антигенийг алтны нимгэн үетэй холбоно.

Үр дүн: Энэхүү оношлуурыг угсрахад алтны нанопартикл болон балк алтны нимгэн үеийг ашигласан. Алтны нанопартиклыг Туркевичийн натрийн цитратыг ангижруулах аргаар хоёр өөр урвалын температурт синтезлэсэн. Урвалын температур 95°C үед 32 ± 19 нм, урвалын температур 80°C үед 60 ± 8



АЛХАМ УРАГШ 2021

МУ-ЫН ГАВЬЯАТ БАГШ, ПРОФЕССОР И.ПҮРЭВДОРЖИЙН НЭРЭМЖИТ

нм орчим хэмжээтэй нанопартикл үүссэн. 60 нм хэмжээтэй синтезлэсэн алтны нанопартиклыг сонгон авч цаашдын судалгаанд ашигласан. Алтны нанопартиклыг МУА холбогчоор бүрсэн ба этанолон орчинд тогтворгүй агрегацад орж байсан тул Tween 20 болон фосфатын буфер орчинд урвалыг явуулсан. Карбоксил бүлэг суусан алтны нанопартиклыг ХДВ-ийн гадаргуугийн эсрэгтөрөгч уурагтай ковалент холбоогоор холбохын тулд EDC/NHS тэг урттай биохолбогчдыг ашигласан. Карбонат-бикарбонатын буферт уусгасан ХДВ-ийн эсрэгтөрөгчийг уусмалд нэмснээр амин бүлэгт идэвхтэй NHS эфиртэй уургийн амин бүлэг холбогдон амидын холбоо үүсгэсэн. Алтны нанопартиклын гадаргууг модификацилаж функционал бүлгүүд суусныг ба ХДВ-ийн эсрэгтөрөгчтэй амжилттай холбогдсоныг нил улаан туяаны спектроскоп, хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрометрээр баталгаажуулсан. Харин амин функционал бүлэг суулгасан шилэн дээр алтны нанопартиклтай холбогдсон эсрэгтөрөгчийг суулган сенсоорыг угсарч ГПР-ын багажаар хэмжилт явуулахад гадаргуун плазмоны үзэгдэл ажиглагдаагүй учир бид багажны угсралтыг улам сайжруулан, лазер гэрлийн үүсгэвэрийг өөрчлөн дахин туршилт явуулан учир шалтгааныг нарийвчлан тодорхойлох хэрэгтэй байна. Алтны нимгэн үе ашигласан оношлуурын хувьд нэвтрүүлэлтийн хувийг тооцоолох аргаар шилэн дээр 50 нм орчим алтны нимгэн үе суулгасан. Пирана уусмалаар алтны нимгэн үеийн гадаргууг идэвхжүүлэн гидроксил бүлэг суулган дараа нь өмнөх арга зүйтэй ижил био-холбогчүүд ашиглан ХДВ-ийн эсрэгтөрөгчийг ковалент холбоогоор холбосон. Угсарсан оношлуурын ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэх оношлогооны ажиллагааг давхар баталгаажуулахын тулд ELISA арга зүйгээр давхар судалгаа гүйцэтгэн баталсан. Бэлэн болсон оношлуурыг халдвартай болон эрүүл хүний цуснаас ялгаж авсан ийлдсээр үйлчлэн ГПР-ын багажаар хэмжилт явуулахад эерэг болон сөрөг дээж дээр ялгагдахуйц график үүсэж эрчмийн болон өнцгийн шилжилт ажиглагдаж байсан нь оношлуур болон ГПР-ын багаж амжилттай ажиллаж, ХДВ-ийн халдварыг оношлож байсан.

Дүгнэлт: Бид энэхүү судалгаагаар балк бүтэцтэй алт болон алтны нанопартикл ашиглан ХДВ-ийн гадаргуугийн уурагтай холбож хоёр төрлийн ГПР-ын оношлуур угсарлаа. Энэхүү оношлуурын прототип загварыг зохион бүтээж ХДВ-ийн халдвартай хүний ийлдэснээс ХДВ эсрэгбиеийг амжилттай илрүүлсэн ба доорх дүгнэлтэд хүрсэн.

Үүнд:

1. Алтны нанонанопартиклыг синтезлэн гадаргууд нь амжилттай функционал бүлгүүд суулган эсрэгтөрөгчтэй холбосон болохыг баталсан
2. Алтны нанопартиклын оношлуурыг амжилттай угсран анализ хийсэн боловч шинээр угсарсан багаж дээр ГПР-ын үзэгдэл ажиглагдаагүй тул лазер гэрлийн эх үүсвэрийг өөрчлөх шаардлагатай гэж дүгнэсэн
3. Харин алтны нимгэн үе дээр ХДВ эсрэгтөрөгч суулгах замаар гаргаж авсан оношлуурыг ашиглан ГПР-ын арга зүйгээр ХДВ-ийг оношлох боломжтой болох нь харагдаж байна.

Докторантын судалгааны ажлууд



Loading ...



АШУУИС

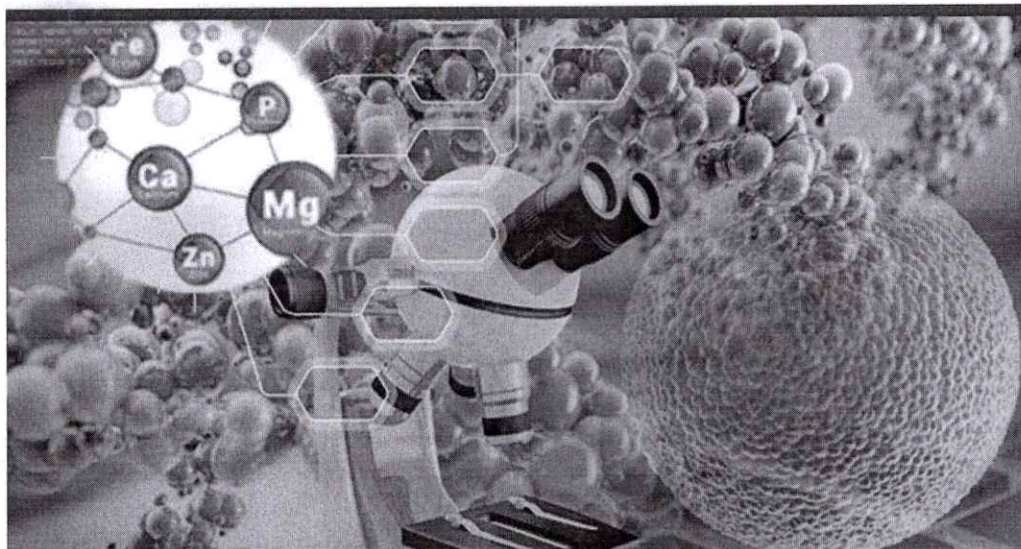
Английн Шинээлэ Улааны Төрийн Их Сургууль

БИОАНАГААХЫН
СУРГУУЛЬ

ЭРДМИЙН ЧУУЛГАН

Био-Анагаахын салбар хуралдаан

63



Улаанбаатар хот
2021 он

"Эрдэнийн чуулган-63" Био-Ашиглахын салбар хуралдаан

ОР-07 ХЕПАТИТ ДЕЛТА ВИРУСИЙН ХАЛДВАРЫГ ПЛАЗМОН РЕЗОНАНС ДЭЭР ҮНДЭСЛЭСЭН БИОСЕНСОРЫН АРГА ЗҮЙГ АШИГЛАН ОНОШЛОХ НЬ

А.Номин¹, Э.Номин-Эрдэнэ¹, М.Бадмаараг¹, Н.Эрдэнэ¹, О.Одгэрэл¹
¹МУИС, ХШУИС, Генийн инженерчлэлийн лаборатори
 anomin0110@gmail.com

Үндэслэл: Монгол улс гепатит вирусийн халдварын тархалт болон элэгний өвчлөлөөс шалтгаалсан нас баралтын тоогоороо дэлхийд нэгдүгээрт эрэмбэлэгдэж байна. Элэгний өвчлөл их байгаагийн нэг том шалтгаан нь гепатит дельта вирусийн (ХДВ) халдвар юм. Гадаргуугийн пласмон резонансын (ГПР) оношлуурыг ашиглан ХДВ-ийн шинжилвэл шинжилгээний хариу хурдан гарах, мэдрэг чанар өндөр, лабел ашиглахгүй ба дахин хэрэглэж болох зэрэг давуу талтай.

Зорилго, зорилт: ХДВ-ийн халдварыг оношлох ГПР дээр суурилсан оношлуур зохион бүтээх.

1. Алтны нано партикл (АНП) синтезлэн гадаргууд ХДВ антигенийг холбон, шилэн слайд дээр суулгах.
2. Алтны нимгэн үеийг (АНҮ) шилэн слайд дээр суулгаж, ХДВ антигентэй холбох.
3. Бэлтгэсэн оношлуурыг ашиглан ГПР багаж дээр ХДВ-ийг оношлох.

Материал, арга зүй: АНП-ыг синтезлэн MUA линкер, EDC/NHS биохолбогчид, ХДВ-ийн антигентэй холбож функционалжуулсан шилэн слайд дээр суулгана. Шилэн слайд дээр АНҮ суулган MUA линкер, EDC/NHS, ХДВ-ийн антигенийг холбож халдвартай болон эрүүл дээж дээр шинжилгээ хийх.

Үр дүн: АНП-ыг 31.93 нм болон 58.05

нм хэмжээтэй синтезлэсэн. АНП-т MUA линкерийг хими сорбцолсны дараа мужийн шилжилт үүссэн нь давхарга үүссэнийг, шингээлтийн спектр өсөөгүй нь партикл агрегацад ороогүйг илтгэсэн. Нил улаан туяаны (НУТ) спектрт карбоксил бүлгийн гидроксил, алдегид бүлгүүдэд шингээлт өгсөн нь линкертэй холбогдсоныг баталсан. Антигентэй холбосон НУТ-ны спектрт сульфонат, амин бүлгүүдийн шингээлт өгсөн нь NHS болон уураг суусныг харуулсан. Туршилтын шат бүрт шингээлтийн эрчим багасаж, пикийн хэмжээ өргөсөж, шингээж буй долгионы урт ихэссэн нь партиклын үе улам зузаарч буйг харуулсан. АНҮ-г суулгахад 8 өөр хугацааны туршилтаар нэвтрүүлэлтийн хувийг тооцоолоход 4 минут байлгасан шилэнд 50 нм АНҮ суусан. Оношлуураар ХДВ-ийн халдвартай болон эрүүл хүний ийлдэс дээр харьцуулан туршилт явуулахад эрчим болон өнцгийн шилжилт ялгаатай бүртгэгдэж байснаар бидний оношлуур ажиллаж антиген болон антибоди холбогдож байгааг баталсан.

Дүгнэлт: Энэхүү судалгаагаар АНҮ болон АНП ашиглан ковалент холбоогоор ХДВ-ийн антигенийг холбож хоёр төрлийн ГПР оношлуур угсарлаа. ГПР-ын оношлуурын прототип загварыг зохион бүтээж ХДВ халдвартай хүний ийлдэснээс ХДВ-ийг антибодийг амжилттай илрүүлсэн.

Түлхүүр үг: Алтны нанопартикл, алтны нимгэн үе, антиген, антибоди

Thickness optimization of a monometallic plasmonic structure for a surface-plasmon resonance biosensor

E.Nomin-Erdene^{1*}, Ts.Khos-Ochir¹, A.Nomin², B.Khishguren², B.Zaya², O.Oidovsambuu²,
N.Tuvjargal¹, G.Erdene-Ochir¹, G.Munkhbayar¹, J.Davaasambuu¹

¹Laser Research Center, National University of Mongolia

²Laboratory of Genetic Engineering, National University of Mongolia

Surface-plasmon resonance (SPR) effect in thin metal films is highly sensitive to the dielectric refractive index changes in the vicinity of metal interface and the conventional Kretschmann configuration has been widely used in the SPR measurement. In this work we have presented the thickness optimization for a monometallic plasmonic structure using the prism-based Kretschmann configuration in angular and spectral interrogation. He-Ne laser with wavelength of 632.8 nm as an optical source, a thin gold layer deposited onto the glass substrate and a BK7 glass prism were applied for this studies.

Based on the numerical analysis with variation of metallic layer thickness, angle of incidence and wavelength we will obtain the resonance parameters, such as reflectivity and phase. Experimentally, the SPR spectra of a pure gold sensing surface has been studied. With functionalizing with specific antigen molecules on the surface of the gold layer, this optimized settings can be further used as biosensing purpose for detection of certain analytes.

Keywords: Surface-plasmon resonance, Kretschmann configuration, biosensor.

I. INTRODUCTION

Surface plasmon resonance (SPR) is one of the widely used optical phenomena for the development of label-free, rapid and sensitive sensing devices [1]. The SPR is able to detect small variations of the index of refraction at the metal-coated interface caused by changes in a few monolayers above the surface [2].

Surface plasmons (SPs) are collective oscillations of conduction electrons at the surface of a thin metallic film adjacent to a dielectric layer. Exciting a surface plasmon wave (SPW) propagates along the interface between a metal and a dielectric medium. The well-known prism-based configuration which is proposed by Kretschmann [3] is frequently used for the SPs excitation. Small changes in optical properties of adjacent dielectric medium can be detected by this technique with a high precision. In this configuration of the attenuated total reflection (ATR) method p-polarized light (TM mode) beam is reflected at the interface between a prism and a very thin metal layer, being captured by a sensitive detector. Under the phase matching condition is satisfied, all the energy of the incident beam is totally transferred to the SPW, producing a reflectance dip in the reflected light intensity. This sharp dip in the SPR response curve indicates the minimum reflectivity based on the total internal

reflection at the metal-dielectric interface. The dielectric function of the noble metal have a negative real part at the chosen wavelength of the light [4]. Thus, the SPR occurs therefore in the visible region in so-called free electron-like metals such as silver and gold.

With a gold or a silver layer, resonance can be observed at any wavelength above 500 nm to the near IR, where the specific resonance angle corresponding to a particular wavelength will always be above the total internal reflection angle of the glass/dielectric interface. The thickness of the metallic layer is critical in this matter. If the metallic layer is too thick, the entire incident light is absorbed before reaching the upper surface of the metal; if it is too thin, not enough energy is absorbed by the free electrons and the SPR effect is negligible [5].

Outside the metal there exists an evanescent electric field, a field decays exponentially with distance from the metal surface with decay length of the order of 0.2 to 0.3 of the wavelengths of light [4]. This evanescent field interacts with the close vicinity of the metal. Changes in the optical properties of this region will therefore influence the resonance angle, which is the use of the SPR for biosensing purposes. Therefore, the shift in the

* Electronic address: nominerdene@num.edu.mn

incident angle or the optical wavelength indicates as the presence of analyte in the sample [6].

In this paper we will obtain the resonance parameters, such as reflectivity and phase based on the numerical analysis with variation of metallic layer thickness, angle of incidence and wavelength. The metallic thickness optimization is performed for the monometallic plasmonic structure using the prism-based Kretschmann configuration in angular and spectral interrogation. Experimentally, the SPR spectra of a pure gold sensing surface has been studied.

II. THEORETICAL PART

2.1 Numerical approach based on the ATR method

To excite the SPs, the wavevector of the incident light in the prism must phase match to the wavevector of the SPs at the metal-dielectric interface. The matching condition can be written as [7]

$$k_x^{prism} = k_x^{SP} \tag{1}$$

$$\sqrt{\epsilon_1} \frac{\omega}{c} \sin\theta_1 = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_2 \epsilon_3}{\epsilon_2 + \epsilon_3}} \tag{2}$$

where, ϵ_1 , ϵ_2 , and ϵ_3 are the dielectric permittivity of prism, metal film, and dielectric layer, respectively, and θ_1 is the incident angle of light in the prism. The refractive index of prism is estimated by using the Sellmeier's dispersion formula,

$$n^2(\lambda) = 1 + \frac{B_1 \lambda^2}{\lambda^2 - C_1} + \frac{B_2 \lambda^2}{\lambda^2 - C_2} + \frac{B_3 \lambda^2}{\lambda^2 - C_3} \tag{3}$$

where the coefficients B_1, B_2, B_3, C_1, C_2 , and C_3 numeric values are given in Table I, and λ is the wavelength in μm . With a help of the Drude model, the dielectric function (ϵ_m) of metal layer is expressed as

$$\epsilon_m(\lambda) = \epsilon_{mr} + i\epsilon_{mi} = 1 - \frac{\lambda^2 \lambda_c}{\lambda_p^2(\lambda_c + i\lambda)} \tag{4}$$

where, λ_p is the plasma wavelength and λ_c is the collision wavelength, respectively. As shown in Figure 1, the conventional Kretschmann configuration consists of a metallic film (Au film) coated on a BK7 glass prism and a sensing medium. In angular interrogation the wavelength was chosen at 632.8 nm (He-Ne laser source).

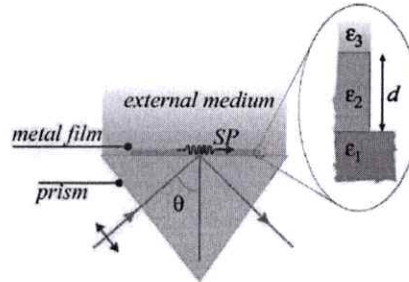


Figure.1 Schematic diagram of conventional Kretschmann configuration [8].

In this work the characteristic transfer matrix method (CTM) is applied to find reflectance of the multilayers structure is given by [9]

$$M_k = \begin{pmatrix} \cos\beta_k & -i\sin\beta_k/q_k \\ -iq_k \sin\beta_k & \cos\beta_k \end{pmatrix} \tag{5}$$

where q_k for transverse magnetic (TM) incident light are given by

$$q_k^{TM} = \sqrt{\frac{1}{\epsilon_k}} \cos\theta_k \tag{6}$$

The phase factor is

$$\beta_k = \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right) n_k \cos\theta_k (z_k - z_{k-1}) \tag{7}$$

where $(z_k - z_{k-1})$ is the thickness of the kth layer. The reflection coefficient for a multilayer structure is given by [10]

$$r = \frac{(M_{11} + M_{12}q_N)q_1 - (M_{21} + M_{22}q_N)}{(M_{11} + M_{12}q_N)q_1 + (M_{21} + M_{22}q_N)} \tag{8}$$

where

$$M_{ij} = \left(\prod_{k=2}^{N-1} M_k\right)_{ij}, i, j = 1, 2 \tag{9}$$

where i, j denote row and column indices and k is the layer index. q_1 and q_N are calculated for incident (prism) and the final medium (air or analyte). Now the reflectance of a multilayer system is given by

$$R = |r|^2 = rr^* \tag{10}$$

where *denotes the complex conjugate. The complex amplitude reflection coefficient is

$$r = R^{1/2} e^{i\varphi_r} \tag{11}$$

which can be written as

$$r = |r|(\lambda, \theta, n, d) e^{i\varphi_r(\lambda, \theta, n, d)} \tag{12}$$

where λ, θ, n , and d are the working wavelength, incident angle, refractive index, and thickness of the layers of the plasmonic structure, respectively, and φ_r is the phase shift of the reflected wave [10].

$$\varphi_r = \arg(r) = \tan^{-1} \left[\frac{Im(r)}{Re(r)} \right] \quad (13)$$

Table I. The constants of the dispersion and Drude model.

Materials	Constants [11]		
	B ₁	B ₂	B ₃
BK7 Glass	1.03961212	0.231792344	1.01046945
	C ₁	C ₂	C ₃
	0.00600069	0.020017914	103.560653
Parameters [12]			
Gold	λ_p in μm	λ_c in μm	
	0.16826	8.9342	

III. SIMULATION PART

The resonance parameters, reflectance and phase, are numerically computed using the three-layer Kretschmann configuration with variation of metallic layer thickness, angle of incidence and wavelength, respectively. In this work the dielectric medium was set to air.

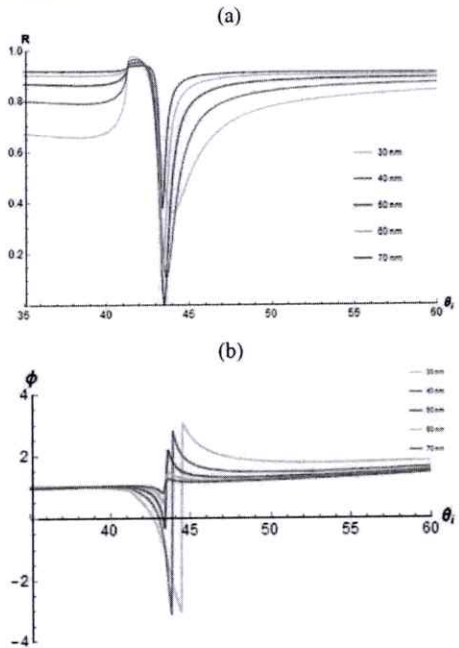


Figure 2. Resonance parameters a) reflectance and b) phase in angular interrogation.

As shown in Figure 2 and 3, the resonance curves have been plotted for different gold film thicknesses from 30 to 70 nm. From the shape of these resonance curves one can find the value of the gold thin layer thickness required for the optimum coupling of the incident energy in the prism to SPW.

For two resonance parameters the angle or wavelength at resonance remains almost unchanged due to the variation of the metal layer thickness for both spectral and angular interrogation.

From the reflectance curves of gold thin film, we can see the minimum values at the thickness of 50 nm with a Heaviside phase jump. In angular interrogation the wavelength is fixed at 632.8 nm for monometallic SPR configurations using gold thin film. But in spectral interrogation, the resonance angle is fixed at 43.47° for gold thin film.

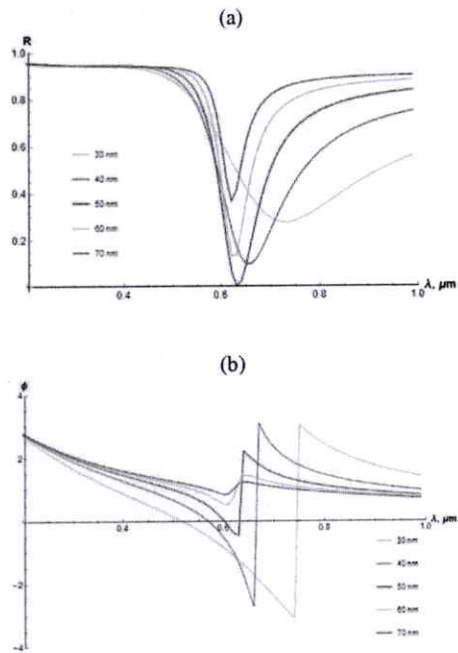


Figure 3. Resonance parameters a) reflectance and b) phase in spectral interrogation.

IV. EXPERIMENTAL PART

The experimental setup includes the light source, polarizer, half-cylindrical prism and detector. A schematic of our angular-interrogation-based Kretschmann-configuration SPR system is

4 E.Nomin-Erdene et al., Thickness optimization of a monometallic plasmonic structure for a surface-plasmon ...

presented in Figure 4. A monochromatic He-Ne laser (power 15mW) was used as the SPR excitation light source. The laser light, collimated and p-polarized, is reflected at the interface between the prism and the gold thin film, being captured by the CCD detector. To control the incidence angle, the prism is placed on the rotation stage. In this work the prism is used to enable plasmon resonance at the metal/air interface (light momentum increase). Note that light-plasmon coupling is only possible if the light momentum is first increased since plasmon excitation by light impinging directly on a metal-dielectric interface is not possible [13], [14].

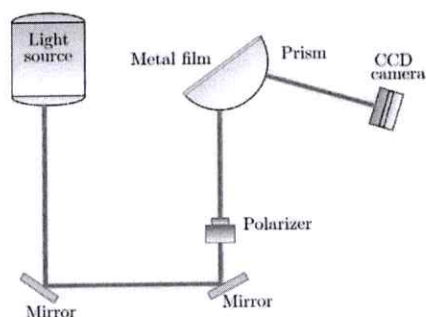


Figure 4. The scheme of the experimental setup for SPR measurement.

The gold thin layer was deposited on the BK7 glass slide with same index of refraction as the prism. An immersion oil is applied to minimize secondary reflections between the prism and glass slide.

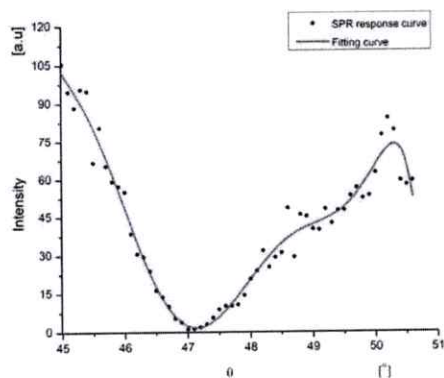


Figure 5. The normalized SPR response curve of a pure gold sensing surface.

In Figure 5 the normalized SPR response curve of a pure gold sensing surface has been plotted. To remove the noise signal in the dark condition, we subtracted the intensity of dark image from the reflected p-polarized beam intensity as well as s-polarized beam intensity. The final intensity is derived by dividing the subtracted p-polarized beam intensity by the subtracted s-polarized beam intensity [15]. With the fitting result of the gold thin film spectra the resonance angle was obtained at 47.18°.

V. CONCLUSION

In this paper, we estimated the resonance parameters, reflectivity and phase with different metallic thickness for monometallic plasmonic structure in angular and spectral interrogation. Furthermore, the resonance angle, laser wavelength and metallic thickness required for our angular-interrogation-based Kretschmann configuration SPR experimental system are introduced. Experimentally, the SPR response curve of gold thin film has been plotted. From this spectrum we observed the SPR effect at 47.18° resonance angle. Further, with functionalizing with specific antigen molecules on the surface of the gold layer, these optimized settings can be used as biosensing purpose for detection of certain analytes.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by NUM Fellowship Research Project Code Number: P2019-3738.

REFERENCES

- [1] V.P. Devanarayanan, V. Manjuladevi, R.K. Gupta, Surface plasmon resonance sensor based on a new opto-mechanical scanning mechanism, *Sensors & Actuators: B. Chemical* (2016), Vol. 227, Pages 643-648
- [2] Tuan Vo-Dinh (2015) *Biomedical Photonics Handbook*, Vol.2, Pages 9-11, New York, CRC press
- [3] Kretschmann E, Raether H (1968) Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light. *Z Naturforsch* 23A:2135-2136
- [4] Bo Liedberg, Claes Nylander, Ingemar Lundstrom, *Biosensing with surface plasmon*

- resonance-how it all started, *Biosensors & Bioelectronics* (1995), Vol.10, pages i-ix
- [5] Tuan Vo-Dinh (2015) *Biomedical Photonics Handbook*, Vol.2, Pages 201-203, New Yourk, CRC press
- [6] Verma R, Gupta BD. A novel approach for simultaneous sensing of urea and glucose by SPR based optical fiber multianalyte sensor. *Analyst*. 2014; 139: 1449. <https://doi.org/10.1039/c3an01983g>
- [7] Bera, M.; Ray, M. *J. Opt. (Kolkata, India)* 2009, 38, 232–248
- [8] Eduardo Fontana, et al, Thickness optimization of metal films for the development of surface-plasmon-based sensors for nonabsorbing media, *Applied Optics* (2006), Vol. 45, No. 29
- [9] Abeles, F. *Ann. Phys. (Paris)* 1950, 5, 596–640.
- [10] Mahua Bera, Jayeta Banerjee & Mina Ray (2014) Resonance parameters-based analysis for metallic thickness optimization of a bimetallic plasmonic structure, *Journal of Modern Optics*, 61:3, 182-196, DOI:10.1080/09500340.2013.878043
- [11] Melles Griot. *The Practical Application of Light*, Vol. (Catalog) X; Barloworld Scientific p.4.8. http://www.cvimellesgriot.com/products/Documents/Catalog/Dispersion_Equations.pdf
- [12] Homola, J.; Koudela, I.; Yee, S.S. *Sens. Actuators, B* 1999, 54, 16–24.
- [13] Valicenti-McDermott, M. et al., Age at diagnosis of autism spectrum disorders. *Journal of Pediatrics*, 2012. 161(3): 554–556.
- [14] Homola, J., *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors, ed. O.S. Wolfbeis, Springer, Berlin, Germany, 2006, p. 247.
- [15] Dongping Wang, Jacky Fong Chuen Loo, et al, *Recent Advances in Surface Plasmon Resonance Imaging Sensors* (2019), *Sensors*, 19, 1266; doi:10.3390/s19061266.

Төслийн үр дүн дотоодод хэлэлцэгдсэн хурал, өгүүллүүд
**Монгол улс дахь хепатитын дельта вирус халдварын оношлогоо
эмчилгээний шинэ хандлага**

The poster features a dark background with a large, faint circular graphic on the right side. At the top left, there are three logos: the Mongolian coat of arms, a circular logo with a cube-like shape, and another circular logo with a stylized 'S' or 'G' shape. The main text is centered and reads: "МОНГОЛ УЛС ДАХЬ ХЕПАТИТЫН ДЕЛЬТА ВИРУС ХАЛДВАРЫН ОНОШИЛГОО ЭМЧИЛГЭЭНИЙ ШИНЭ ХАНДЛАГА". Below this, there is a section with event details: a calendar icon followed by "2023 оны 6-р сарын 08-ны ПҮРЭВ ГАРИГТ 13:00 цагаас", a location pin icon followed by "МУИС Оюутны хөгжлийн төв /Лабрилыг урилын хайнаас хэрнэ уу/", and the word "УРИЛГА" in large, bold, white letters.

Эрхэм хүндэт ноён / хатагтай

Манай улсын хүн амын эрүүл мэндийн тулгамдсан асуудлуудын нэг болох гепатитын дельта вируст халдварын оношилгоо эмчилгээний шинэ хандлага сэдэвт зөвлөгөөн хуралд хүрэлцэн ирэхийг урьж байна.



ХӨТӨЛБӨР

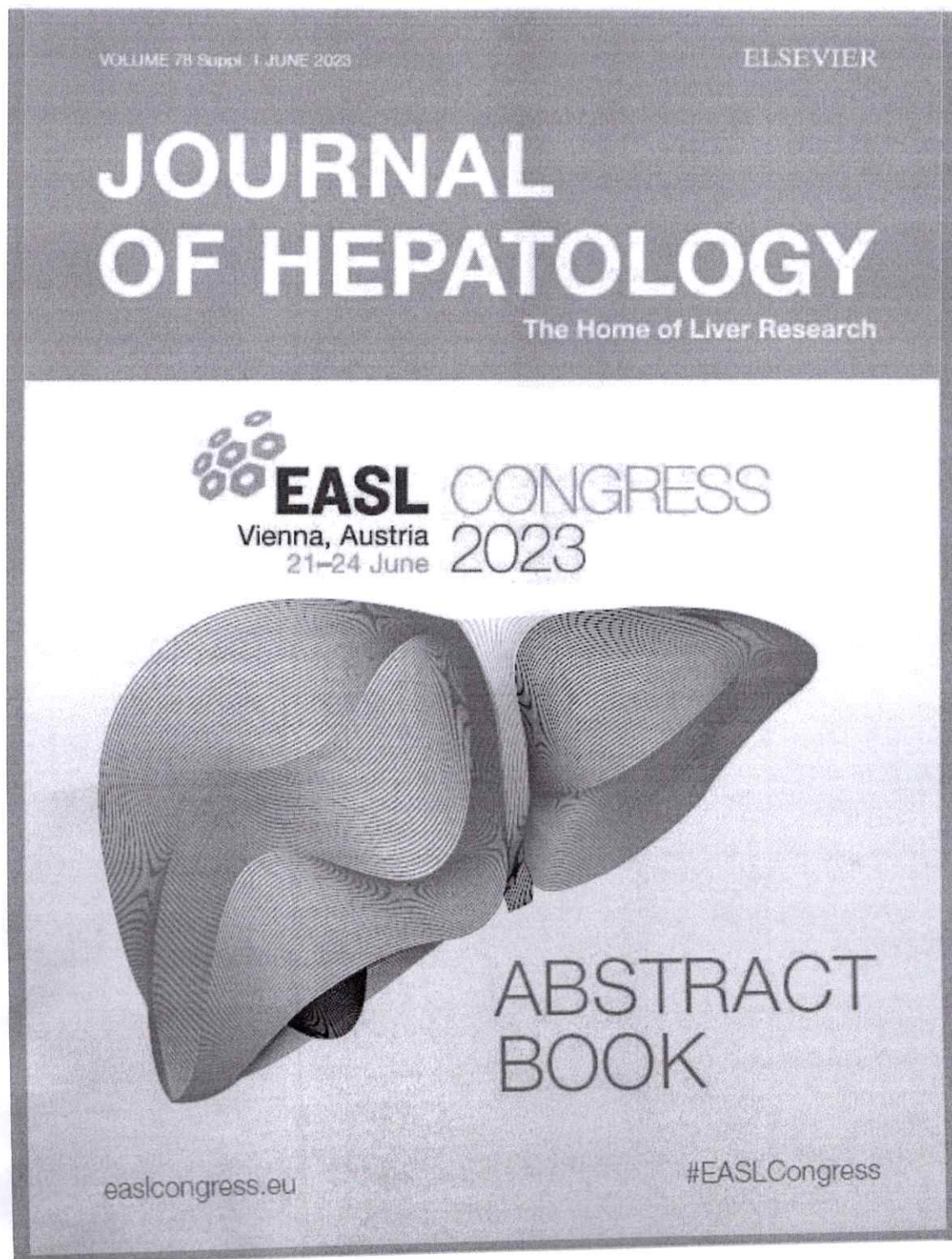
13:00-13:10	НЭЭЛТ	Я.Дагвадорж , Монголын элэгний эмч нарын нийгэмлэгийн Ерөнхийлөгч, Снүм сангийн Шинэжлэх ухааны зөвлөх, Элэгний төвийн Зөвлөх эмч, Монгол Улсын гавъяат эмч, Анагаах ухааны доктор, профессор
13:10 -13:30	Удиртгал	Д. Наранжаргал , Элэгний төвийн захирал, АУ-ы доктор
13:30 -13:50	Монгол дахь гепатитын дельта вирусийн тархалтын өнөөгийн байдал илтгэл	Д. Бэхболд , Элэгний төвийн эмч, АУ-ы докторант
13:50 -14:10	"Гепатитын дельта вирус бэлгийн замаар дамжих боломжийг молекул биологийн түвшинд тодорхойлсон нь" сэдэвт судалгааны илтгэл	Л. Оюунгэрэл , Элэгний төвийн эмч, АУ-ы магистрант
14:10 -14:30	"Гепатитын дельта вирусийн халдварыг илрүүлэх өндөр мэдрэг ELISA оношлуурыг зохион бүтээж, баталгаажуулсан дүн" сэдэвт судалгааны илтгэл	А. Номин , МУИС-ийн Хими, биологийн инженерчлэлийн тэнхим, БУ-ы докторант
14:30 -14:50	"Шинэ төрлийн LAMP-PCR, болон дижитал PCR-ийн арга зүй боловсруулж гепатитын дельта вирусийн оношлогоонд ашиглах нь" сэдэвт судалгааны илтгэл	Э. Саруул , МУИС-ийн Хими, биологийн инженерчлэлийн тэнхим, БУ-ы магистр
14:50-15:20	ХУРЛЫН ЗАВСАРЛАГА	
15:20 -15:50	"Гепатит дельта вирусийн эмчилгээний тулгамдсан асуудлууд, шинэ арга зүй, хэтийн төлөв" сэдэвт илтгэл	Э. Дэлгэрсайхан , Элэгний төвийн эмч, АУ-ы магистрант
15:50 -16:20	Оролцогчид санал өгөх, үг хэлэх	Хурлын дарга
16:20 -16:30	Хурлаас гарах зөвлөмжийн төслийг танилцуулах	Д. Наранжаргал , Элэгний төвийн захирал, АУ-ы доктор
16:30 -17:00	Зөвлөмжийг хэлэлцүүлэх, санал дүгнэлт	Д. Наранжаргал , Элэгний төвийн захирал, АУ-ы доктор
17:00 -17:15	ХУРЛЫН ЗАВСАРЛАГА	
17:15 -17:45	Зөвлөмжийг сонордуулж, батлах, хаалтын ажиллагаа	Д. Наранжаргал , Элэгний төвийн захирал, АУ-ы доктор

📅 2023 оны 6-р сарын 08-ны ПҮРЭВ ГАРИГТ
13:00 цагаас

📍 МУИС Оюутны хөгжлийн төв
/байршлыг урилын хойноос мэрнэ үү/

УРИЛГА

Төслийн үр дүн олон улсад хэлэлцэгдсэн хурал, өгүүллүүд
EASL congress 2023, Journal of hepatology



POSTER PRESENTATIONS

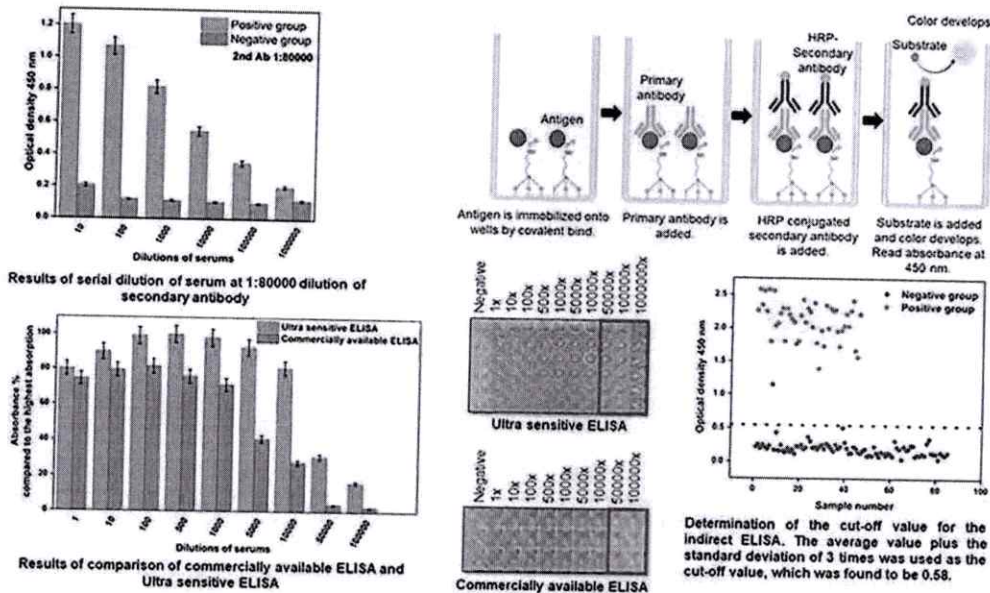


Figure: (abstract: SAT-497).

99.2% respectively. Ultra-sensitivity of the assay was confirmed by the detection of 1:1000000 times diluted serum while the commercially available kit was only able to detect up to 1:50 000 times diluted serum. The total testing process could be done in 30 min, which is 3 times shorter than the commercial testing kit. All these superior results indicate that the self-assembled monolayer method has principally advantageous in terms of design and method.

Conclusion: The ELISA assay developed by self-assembled monolayer method has very high sensitivity and this technology should be introduced to the HDV-diagnostic field.

SAT-498**Biomarkers of hepatocyte basement membrane turnover reflect disease activity in patients with early-stage non-alcoholic fatty liver disease**

Ida Lønsmann^{1,2}, Jane I. Grove^{3,4,5}, Asma Haider⁶, Philip Kaye⁶, Morten Karsdal², Diana Leeming², Guruprasad Aithal^{3,4,5}. ¹University of Southern Denmark, Department of Clinical Research, Odense, Denmark; ²Nordic Bioscience, Hepatic Research, Herlev, Denmark; ³University of Nottingham, MRC/EPSC Nottingham Molecular Pathology Node, Nottingham, United Kingdom; ⁴Nottingham University Hospitals NHS trust and University of Nottingham, NIHR Nottingham Biomedical Research Centre, Nottingham, United Kingdom; ⁵University of Nottingham, Nottingham Digestive Diseases Centre, Translational Medical Sciences, School of Medicine, Nottingham, United Kingdom; ⁶Nottingham University Hospitals NHS Trust, Department of Pathology, Nottingham, United Kingdom
Email: ilc@nordicbio.com

Background and aims: Halting progressive liver disease necessitate novel non-invasive methods to identify and monitor patients in need of early intervention. Investigating the pathophysiology of early liver injury might help to identify unique biomarkers. Early liver injury is characterized by reorganization of the hepatocyte basement membrane (BM) of the extracellular matrix. Thus, we quantified

biomarkers targeting two distinct neo-epitopes of the major BM collagen, type IV collagen (PRO-C4 and C4M), in patients spanning the non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) spectrum.

Method: We evaluated BM biomarkers in a cross-sectional study with 97 patients with NAFLD confirmed on histology. Serological levels of PRO-C4 and C4M were quantified using validated competitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). Using the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm, we stratified data into two groups: non-alcoholic fatty liver (NAFL) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Biomarker levels in the two groups were stratified by the NAFLD activity score (NAS). In both groups, biomarker measurements were analyzed in relation to histological scorings of steatosis, inflammation, ballooning, and fibrosis.

Results: The included patients had a body mass index (BMI) of 30.9 ± 5.6 kg/m², age of 53 ± 13 years and a NAS range of 1–8. Upon stratification by FLIP, the NASH patients had higher platelets, ALT, and AST levels than the NAFL group. Both PRO-C4 ($p = 0.0125$) and C4M ($p = 0.003$) increased with increasing NAS solely within the NAFL group. Furthermore, both markers were significantly associated with lobular inflammation ($p = 0.020$ and $p = 0.048$) and steatosis ($p = 0.004$ and $p = 0.015$) in patients with NAFL.

Conclusion: This study found that BM turnover is associated with liver injury in patients with NAFL but not those with NASH. These findings support BM turnover as a clinical feature in early disease development.



Development of ultra-sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay for hepatitis delta virus antibody detection

N. ARIUNGEREL^{1,2}, S. ENKHJARGAL^{1,2}, N. DASHDORJ^{1,2} and O. OIDOVSAMBUU¹
¹National University of Mongolia, Ulaanbaatar 14201, Mongolia
²Liver center, Ulaanbaatar 14230, Mongolia



Introduction

Hepatitis delta virus (HDV) is a defective minus-strand RNA virus that accelerates disease progression upon infection of hepatitis B carriers (1). In most countries, the infection rate is very low, but in some countries, especially Mongolia, it has a disproportionately high prevalence of HDV infection (2). Therefore, the introduction of sophisticated diagnostic assays for the detection of HDV infection is highly attractive for most countries, and diversity of commercially available kits are very limited. To enhance diagnostic sensitivity, surface functionalization, and chemical crosslinking agent have been implemented (3). This study describes a chemical immobilization-based indirect ELISA procedure for the development of rapid, low-cost and highly sensitive kits.

Aim

The aim of our study is to develop an ultra-sensitive ELISA utilizing the self-assembled monolayer (SAM) technique. This involves functionally attaching sHDag on the polystyrene plate surface. Then we will establish the optimal condition of the ELISA assay and determine sensitivity and specificity.

Method

Recombinant His-tagged sHDag protein (23 kDa) was produced in *E. coli* and purified by Ni-NTA* metal-affinity chromatography. sHDag antigen proteins were immobilized to ELISA plates by surface functionalization method using 1% 3-chloro-1-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (APTES) linker and blocking by 5% bovine serum albumin (BSA). To analyze sensitivity and specificity, 2 groups (positive and negative) of a total of 180 samples were used. The positive group consisted of samples from 90 patients, who were previously identified as HDV-RNA positive and HBSAg negative. The negative group consisted of samples from 90 people, who were previously identified as healthy by showing HBSAg negative and anti-HCV negative. The optimal conditions for the new ELISA tests were established using checkerboard dilutions of secondary antibody and serum. The main parameters of the optimal ELISA assay were found as follows: Serum dilution scale 1:100, Secondary Ab dilution scale 1:80000, incubation time 15 min at 37°C, color development time 3 min, and total test duration 30 min. For comparison analysis of sensitivity, the commercially available Wantai anti-HDV IgG kit was used.

Conclusions

High dilution of serum samples should be very important for quantitative detection of HDV Ab, which can be used for RNA positivity prediction and analysis of disease prognosis. The indirect ELISA assay developed by the SAM method has very high sensitivity and this technology should be introduced to the HDV-diagnostic field.

Acknowledgements

We would like to express my sincere gratitude to the Onom Foundation for their invaluable guidance and support throughout the project.

References

1. Antonia S et al. Hepatitis D virus. *Viral Hepatitis* 1999; 129-150
2. Alexander J-S et al. The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2010; 73(3): 523-532
3. Joward H-W. Preparation of Immobilized Proteins Covalently Coupled Through Silane Coupling Agents To Inorganic Supports 1996; 15:161-192

Contact information

N. Ariungerel
 Department of Chemical and Biological Engineering, School of Engineering and Applied Sciences, National University of Mongolia, Ulaanbaatar - 14201, Mongolia
 E-mail: a.normin@onomfoundation.org

Results

The result of the checkerboard assay, in-house ELISA can detect HDV antibodies, even when diluted to 10⁷, as evidenced by the results obtained. For the serum sample and anti-human IgG (HRP) secondary antibody, the optimal dilutions were found to be 50x and 1:60000, respectively.

According to the result of the analysis of 180 samples, the mean absorption of 0.079 at 450 nm, with a standard deviation (SD) of 0.063. Consequently, to determine the status of serum samples in relation to HDV virus antibody, a cut-off value of 0.27 (mean + 3*SD) was established. A comparison was made between the relative sensitivity and specificity of ultra-sensitive ELISA using a confusion matrix to evaluate its performance.

The overall specificity of the ultra-sensitive ELISA test was 97.7% with a sensitivity of 97.7% as shown in Table 1. The area under the ROC curve (AUC) was 0.997 (standard error, SE=0.017), with a 95% confidence interval (CI) of 0.9943 to 1.00126.

Ultra-sensitive ELISA was confirmed by detecting 1:100000 times diluted serum, while the commercially available kit could only detect up to 1:10000 times diluted serum. The total testing process could be done in 30 min, which is 3 times shorter than the commercial testing kit. All these superior results indicate that the self-assembled monolayer method has principally advantageous in terms of design and method.

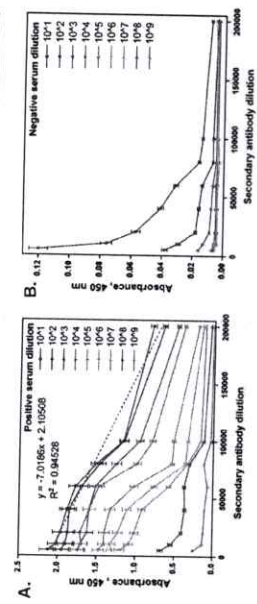


Figure 1. Checkerboard assay for determining detection range. The y-axis shows absorbance at 450 nm, the x-axis shows 8 serial diluted anti-human IgG (HRP) detecting 10-fold serial diluted positive (A) and negative (B) serum samples. The 10x diluted positive serum linear regression coefficient, $R^2=0.94528$ with a linear model equation, $y=-7.0186x+2.10568$.

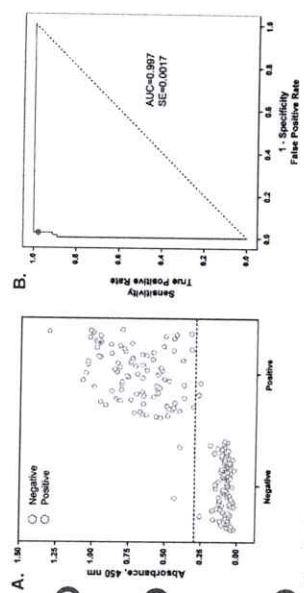


Figure 2. (A) Scatterplot analysis of 180 serum samples measured by ELISA IgG using S-HDag antigen. The dashed line indicates the cut-off point selected by confusion matrix (cut-off = 0.27). (B) Receiver operating characteristic (ROC) analysis of the HDV IgG ELISA shows an area under the curve (AUC) of 0.997 (blue line belongs to the test curve and dotted gray line shows a non-informative test curve).

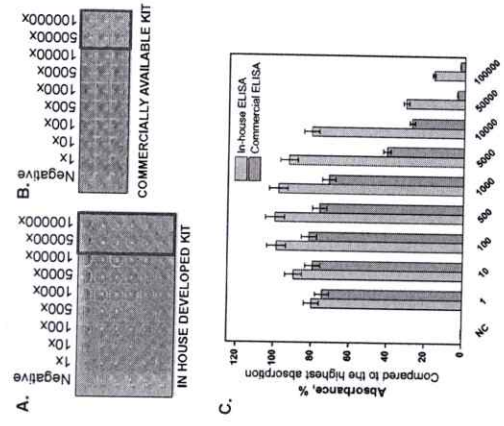


Figure 3. (A) ELISA plate picture after reaction of in-house developed kit. (B) ELISA plate picture after reaction of a commercial kit. (C) Absorbance percent result of comparison commercially available kit and in-house developed kit.

POSTER PRESENTATIONS

SAT-499

Development of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of hepatitis delta virus

Saruul Enkhjargal¹, Nomin Ariungerel¹, Naranjargal Dashdorj², Naranbaatar Dashdorj³, Odgerel Oidovsambu⁴. ¹National university of Mongolia, Department of Chemical and Biological Engineering, School of Engineering and Applied Sciences, Ulaanbaatar, Mongolia; ²Liver center, Ulaanbaatar, Mongolia; ³Onom foundation, Ulaanbaatar, Mongolia; ⁴National University of Mongolia, Department of Chemical and Biological Engineering, Ulaanbaatar, Mongolia
Email: srl@onomfoundation.org

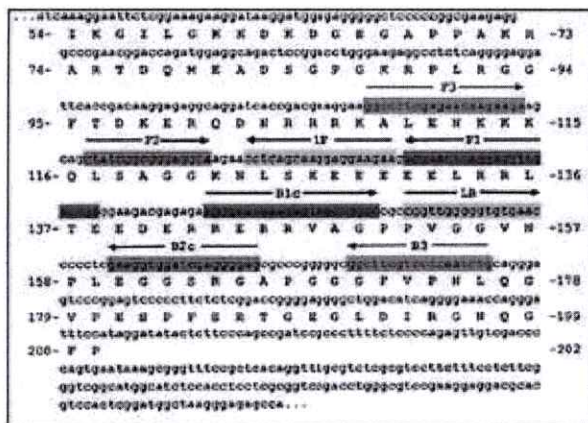
Background and aims: Infection of hepatitis delta virus (HDV) is one of the leading factors for liver disease-related mortality in some countries. For these countries, it is crucial to implement a suitable strategy to eliminate the endemicity of HDV using of sophisticated technologies. Correct diagnostic approaches and management, which enable early detection of HDV infection play a key role in effective elimination. However, HDV-infected people know their infection at a very late time when cirrhosis already developed to a serious stage. Therefore, some countries including Mongolia have initiated a mass screening campaign for the detection of hepatitis viral infection in the entire population, and currently, some apparent improvements were observed in the national viral hepatitis status. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) could be one of the possible options for the detection of active HDV infection in Mongolia, especially since this method might be very useful outside of big cities. LAMP-PCR does not require special equipment like an expensive real-time PCR cyclor, and its simple, fast-processing characteristic is very attractive.

The aim of this study was to develop and characterize a LAMP-PCR assay for the detection of HDV-RNA (HDV-LAMP assay).

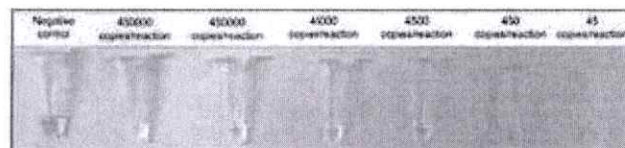
Method: Different primer sets were designed using NEB-online tools on a high homology region of HDV genomic sequence. In this study, commercially available WarmStart Colorimetric and Fluorescent LAMP 2X Master Mix (DNA and RNA) kits from NEB were used. For RNA extraction, Viral RNA isolation kit from Bioactiva Diagnostica was used. Serum samples from 13 HDV-infected patients and 15 healthy people (a total of 28 people) were used for this study. Serially diluted recombinant construct containing HDV genomic sequence were used for the analysis of the limit of detection (LOD). Both colorimetric and fluorescent assays were done for all 23 samples in different protocols to adjust the optimal condition. The amplified products were confirmed by gel electrophoresis and dissociation curve analysis. The overall HDV-LAMP assay was characterized by its sensitivity, specificity, optimal reaction temperature, and time-point of detection.

Results: We tested 5 different primer sets and the best primer set was identified by judging the rate of false positive results. The optimal reaction temperature for the best setting was found as 68°C. Our result indicated that LOD of HDV-LAMP assay is 4.5 copies/reaction, which can be considered a very sensitive assay. The optimal time-point of detection was 50–60 min for colorimetric and 40–50 min for fluorescent assays. Exceeded incubation time increases the probability of false positive results. Our pilot results showed that HDV-LAMP assay has a sensitivity of 100% and a specificity of 94.4%.

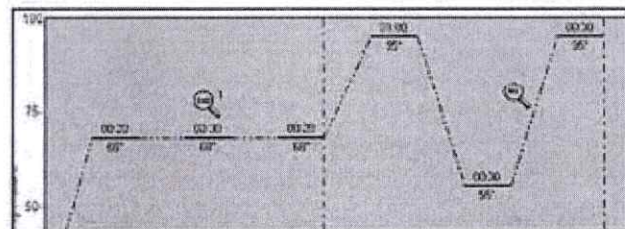
Conclusion: Our study concludes that the currently developed HDV-LAMP assay is a rapid, easy-to-use, and highly sensitive diagnostic assay for detecting HDV-RNA in blood samples. The assay can be



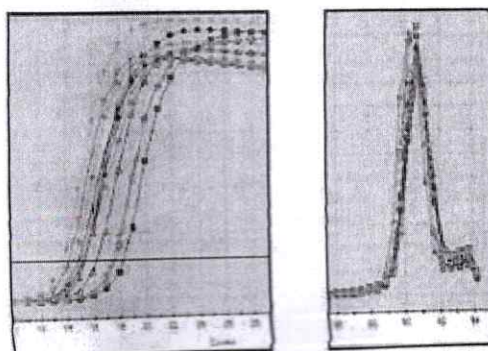
A. Best primer set shown on the high homology region of HDV genomic sequence



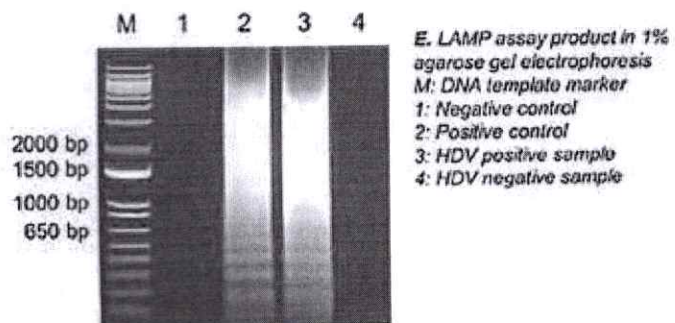
B. Colorimetric HDV-LAMP assay results of HDV standard serial dilution; pink indicates no infection, yellow indicates HDV infection



C. Suitable thermal settings of fluorescent HDV-LAMP assay



D. The amplification curve and dissociation curve of the fluorescent HDV-LAMP assay

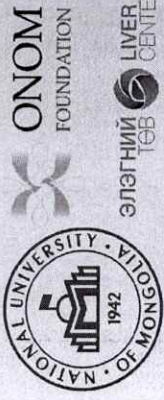


E. LAMP assay product in 1% agarose gel electrophoresis
M: DNA template marker
1: Negative control
2: Positive control
3: HDV positive sample
4: HDV negative sample

Figure: (abstract: SAT-499).



Development of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of hepatitis Delta virus



S.ENKHJARGAL¹, N.ARIUNGEREL¹, N.DASHDORJ², N.DASHDORJ³, and O.OIDOVSAMBUU¹

¹National University of Mongolia, Ulaanbaatar 14201, Mongolia

²Onom Foundation, Ulaanbaatar 17011, Mongolia

³Liver Center, Ulaanbaatar 14230, Mongolia

Introduction

Infection of hepatitis delta virus (HDV) is one of the leading factors for liver disease-related mortality in some countries (1). For these countries, it is crucial to implement a suitable strategy to eliminate the endemicity of HDV using of sophisticated technologies. Correct diagnostic approaches and management, which enable early detection of HDV infection play a key role in effective elimination. However, HDV-infected people know their infection at a very late time when cirrhosis already developed to a serious stage. Therefore, some countries including Mongolia have initiated a mass screening campaign for the detection of active hepatitis viral infection in the entire population, and currently, some apparent improvements were observed in the national viral hepatitis status. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) could be one of the possible options for the detection of active HDV infection in Mongolia, especially since this method might be very useful outside of big cities. LAMP-PCR does not require special equipment like an expensive real-time PCR cyclor, and its simple, fast-processing characteristic is very attractive (2).

Aim

This study is devoted to establish the detection method of HDV-RNA in serum by LAMP-PCR assay.

Method

The first and foremost, different primer sets were designed using NEB-online tools on a highly conserved homology region of HDV genomic sequence. In this study, commercially available WarmStart Colorimetric and Fluorescent LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) kits from NEB were used. For RNA extraction, Viral RNA isolation kit from Bioactive Diagnostics was used. In order to examine the compatibility of prepared primer sets, the serum obtained from 8 people infected with HDV and 15 non-infected people (a total of 23 people) from Liver Center were used in this study. The serial standard dilutions of HDV-RNA (10-100000IU/mL) were used to determine the limit of detection (LOD) of colorimetric and fluorescence LAMP. Different protocols were used to adjust the optimal condition in both colorimetric and fluorescent assays. The amplified products were confirmed by agarose gel electrophoresis and dissociation curve analysis.

Conclusions

In our findings, HDV-LAMP assay is deemed to be a rapid, easy-to-use, and highly sensitive diagnostic assay for detecting HDV-RNA. The assay can be broadly utilized in places without real-time PCR equipment and the testing cost will be cheaper. The primer set 5 showed the lowest limit of detection (57IU/mL). In addition, pilot result showed that HDV-LAMP assay using primer set 5 has a sensitivity of 100% and a specificity of 94.4%.

Acknowledgements

We are grateful to assistance of Onom foundation and our colleagues in Liver Center.

References

1. Global Hepatitis Report 2017. Geneva: World Health organization; 2017. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Tsugunori N et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology* 2015;53(7), 1-5

Contact information

Satul Enkhjargal,
School of Engineering and Applied Sciences, National University of Mongolia, Ulaanbaatar 14201
mail: srl@onomfoundation.org

Results

We tested 5 different primer sets and the best primer set was identified by judging the rate of false positive results. The colorimetric LAMP-PCR optimal reaction temperature for the best setting was found as 65°C, and fluorescence LAMP-PCR was 68°C. Our result indicated that LOD of HDV-LAMP assay is 57 IU/mL, which can be considered a very sensitive assay. The optimal time-point of detection was 50-60 min for colorimetric and 40-50 min for fluorescent assays. Exceeded incubation time increases the probability of false positive results.

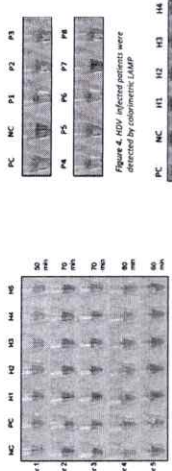


Figure 3. Comparison of 5 sets of primers for detection of HDV. Primer set 5 was the best when the sets of primers were tested on healthy human samples and filtered out the false positives.

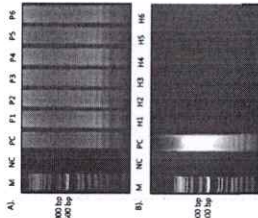


Figure 4. LAMP assay product in 24 separate gel electrophoresis. A1, HDV-infected; B, healthy.

Figure 5. Healthy samples were detected by colorimetric LAMP.



Figure 6. LAMP assay product in 24 separate gel electrophoresis.

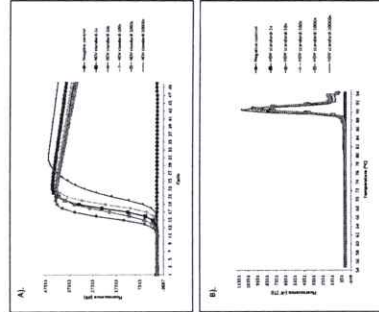


Figure 7. The limit of detection of fluorescence LAMP. A) Amplification curve of LOD; B) Dissociation curve of LOD.

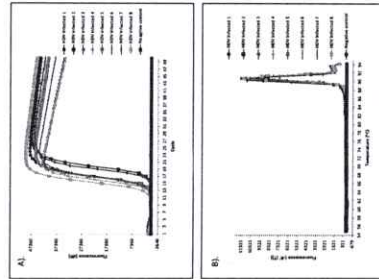


Figure 8. HDV-infected patients were detected by fluorescence LAMP. A) Amplification curve of LOD; B) Dissociation curve of LOD.

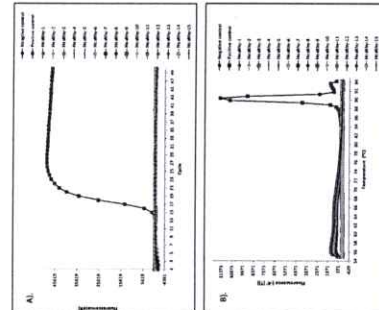
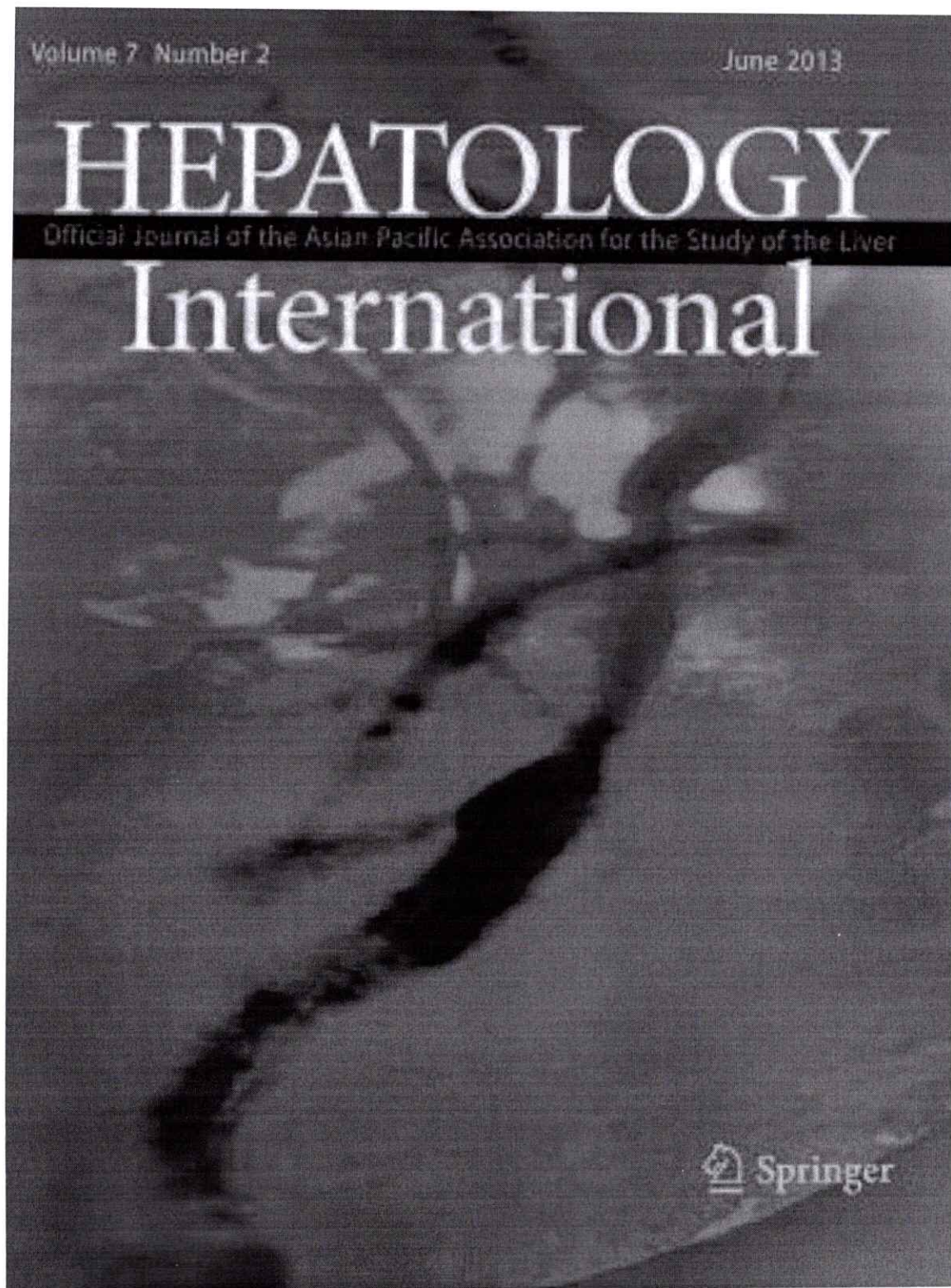


Figure 9. Healthy samples were detected by colorimetric LAMP. A) Amplification curve of LOD; B) Dissociation curve of LOD.



Successful development of a LAMP-PCR assay for the detection of HDV-RNA

SARUUL ENKHJARGAL¹, NOMIN ARIUNGEREL¹, NARANJARGAL DASHDORJ², NARANBAATAR DASHDORJ², AND ODGEREL OIDOVSAMBUU¹

¹National University of Mongolia, Ulaanbaatar 14201, Mongolia, ²Liver Center, Ulaanbaatar 14230, Mongolia, ³Onom Foundation, Ulaanbaatar 17011, Mongolia

Introduction

Infection of hepatitis delta virus (HDV) is one of the leading factors for liver disease-related mortality in some countries. Implementing of suitable strategy and sophisticated technologies is crucial to eliminate HDV endemicity. Early detection through reliable diagnostics and efficient management is crucial for successful treatment. Unfortunately, in many developing countries, HDV cases are often diagnosed late, after liver cirrhosis has advanced significantly. While RT-PCR is the global standard for active HDV infection detection, the LAMP-PCR method offers unique advantages, including simplicity, no need for specialized equipment, and visual detection. These attributes position LAMP-PCR as a potential diagnostic tool for early HDV detection in resource-limited settings.

Aim

This study aims to develop and characterize a LAMP-PCR assay for detecting HDV-RNA in blood serum.

Results

Figure 1. Among the five sets of primers evaluated for the detection of HDV.

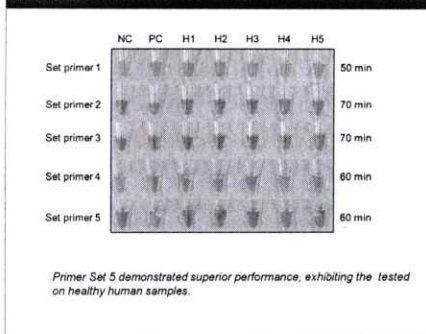


Figure 2. Among the five sets of primers evaluated for the detection of HDV.

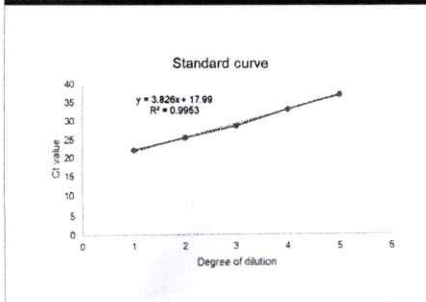


Figure 3. The limit of detection fluorescence LAMP-PCR was established using standard dilutions of HDV-RNA.

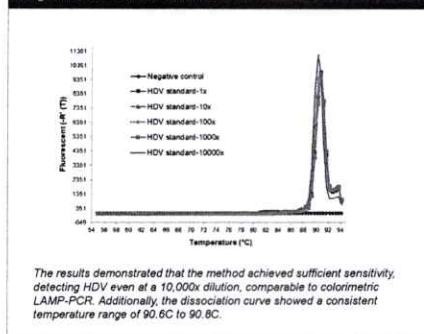


Figure 4. The limit of detection colorimetric LAMP-PCR.

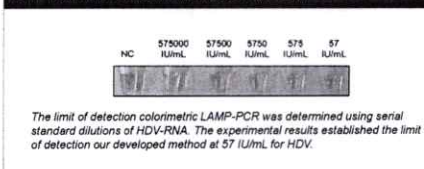


Figure 5. Results of colorimetric LAMP-PCR successfully detected healthy samples.

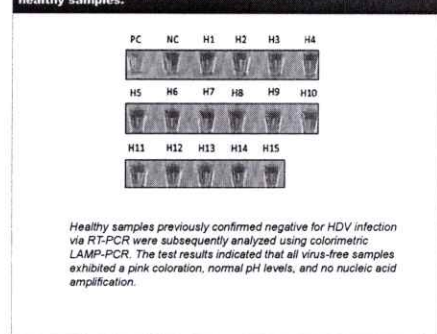
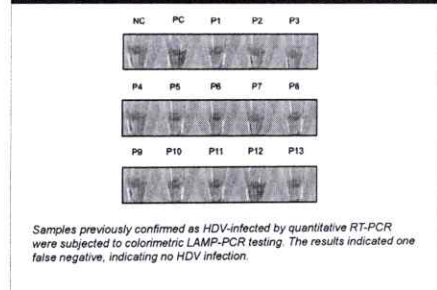


Figure 6. HDV-infected patients were detected using colorimetric LAMP-PCR.



Conclusion

- This study demonstrates that the developed HDV-LAMP assay is a rapid, user-friendly, and very sensitive diagnostic assay for detecting HDV-RNA in blood samples.
- It can be widely employed in the area without conventional RT-PCR laboratories, such as hospitals at the primary level, mobile labs, and point-of-care units.
- Through meticulous optimization and validation, this novel assay will have excellent potential as a reliable and accessible tool for HDV detection, contributing to early diagnosis and timely intervention, ultimately supporting the effective elimination of HDV infection.

Contact information

Saruul Enkhjargal,
School of Engineering and Applied Sciences, National University of
Mongolia, Ulaanbaatar 14201
mail: srl@onomfoundation.org

Reference

1. Global Hepatitis Report 2017. Geneva: World Health organization; 2017. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
2. Tsujinori N et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) principle, features, and future prospects. Journal of Microbiology 2015;53 (1)

Төслийн судалгааны хүрээнд оюутнуудын оролцсон хурал, тэмцээний шагналууд

ХАВСРАЛТ 8

**Төслийн судалгааны хүрээнд оюутнуудын оролцсон хурал,
тэмцээний шагналууд**



**БИО-АНАГААХЫН
СУРГУУЛЬ**
Алхам Урагш Шинжлэх Удирхайн Их Сургууль
1942

ӨРГӨМЖЛӨЛ



АЛХАМ УРАГШ

Эрхэм хүндэт *А. Номиш* танаа

Монгол Улсын гавьяат багш, УЗУ-ы доктор, профессор И.Пүрэвдоржийн нэрэмжит “АЛХАМ УРАГШ 2021” эрдэм шинжилгээний бага хуралд таны

*Алматын галыта бүрчлийн казбасыг шричлэх
позаргуулийн тэдээн резонанс дээр үндэслэсэн
оношчуурыг зөмөн бүтээх*

сэдэвт бүтээлээр шилдэг илтгэлээр шалгарч “ТЭРГҮҮН БАЙР” эзэлсэн тул өргөмжлөл, мөнгөн шагнал олгов.

Био-Анагаахын Сургуулийн

захирал

Дарамбазар

АУ-ы доктор / Дарамбазар

Монгол Улсын гавьяат багш,

профессор

И.Пүрэвдорж

И.Пүрэвдорж

Улаанбаатар хот

2021.12.20

БАТЛАМЖ

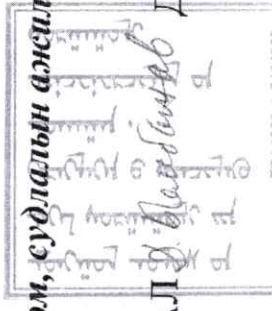
Эрхэм хүндэт **А.НОМИН** танаа

Монгол Улсын Их Сургууль, Хэрэглээний Шинжлэх Ухаан Инженерчлэлийн Сургуулиас зохион байгуулсан оюутны эрдэм шинжилгээний хуралд эрдэм мэдлэг ур чадвараа дайчлан оролцож инженер, технологийн салбар, магистрант болон докторант түвшинд "Хепатитийн дельта вирусийн халдварыг илрүүлэх гадаргуугын плазмон резонанс дээр үндэслэсэн биосенсорыг зохион бүтээх" судалгааны ажлаар **ТЭРГҮҮН** байр эзэлсэн тул багламж олгож, мөнгөн шагналаар урамшуулав.

Удирдагч багш: **Дэд Проф О.Одгэрэл, Дэд Проф Н.Эрдэнэ**

Таны цаашидын эрдэм, судлалын ажил дардан байх болтугай

ЗАХИРАЛ **Д.БЯМБАЖАВ**


Монгол Улсын Их Сургууль
Хэрэглээний Шинжлэх Ухаан Инженерчлэлийн Сургууль
2021 оны 4-р сарын 23



МОНГОЛ УЛСЫН ИХ СУРГУУЛЬ
ХЭРЭГЛЭЭНИЙ ШИНЖЛЭХ УХААН, ИНЖЕНЕРЧЛЭЛИЙН СУРГУУЛЬ

ӨРГӨМЖЛӨЛ

Хүндэт Э. Саруул танаа

Хэрэглээний Шинжлэх Ухаан, Инженерчлэлийн Сургуулийн оюутны эрдэм шинжилгээний хуралд “Магистрант, Докторант” түвшинд дараах илтгэлийг амжилттай илтгэж

“ТЭРГҮҮН”

байр эзэлсэн тул өргөмжлөл, мөнгөн шагналаар шагнав.

Илтгэлийн сэдэв:

“Хепатитын дельта вирусыг илрүүлэх ЛАМП (Loop-mediated isothermal amplification) полимеразын гинжин урвалын технологийн хөгжүүлэлт”

Удирдсан багш:

Дэд профессор О.Одгэрэл

Хэлэлцүүлсэн салбар:

Инженер

ХШУИС-ийн захирал

D. Bambaev

Д. Бямбажав

УЛААНБААТАР ХОТ

2023.04.28

БАТЛАВ.

Монголын элэгний эмч нарын
нийгэмлэгийн тэргүүн



Я. ДАГВАДОРЖ

БАТЛАВ.

ОНОМ сангийн гүйцэтгэх
захирал



Д. ОРХОНСЭЛЭНГЭ

БАТЛАВ.

Элэгний төвийн захирал



Д. НАРАНЖАРГАЛ

“САРС-КОВ-2 ВИРУС (SARS-COV-2) БА ХЕПАТИТИЙН ДЕЛЬТА ВИРУСИЙН (HDV)
ХАЛДВАРЫГ ИЛРҮҮЛЭХ ШИНЭ ҮЕИЙН СЕРОЛОГИЙН ОНОШЛУУРУУДЫГ
ЗОХИОН БҮТЭЭХ” СЭДЭВТ СУДАЛГААНЫ ТӨСӨЛ САНХҮҮЖҮҮЛЖ,
ХЭРЭГЖҮҮЛЭХ ГЭРЭЭ

2021 оны 06 сарын 16-ны өдөр

Дугаар № 20210616-1

Улаанбаатар хот

Захиалагч:

Улаанбаатар хот 14230, Баянзүрх дүүрэг, 1-р хороо, Юнескогийн гудамж-31 хаягт байрладаг
Монголын элэгний эмч нарын нийгэмлэг,

Санхүүжүүлэгч:

Улаанбаатар хот 17011, Хан Уул дүүрэг, 15-р хороо, Богд Жавзандамбын гудамж 3 хаягт байрладаг
Оном сан.

Гүйцэтгэгч:

Улаанбаатар хот 14230, Баянзүрх дүүрэг, 1-р хороо, Юнескогийн гудамж-31 хаягт байрладаг Элэгний
төв

Улаанбаатар хот 14201, Сүхбаатар дүүрэг, 6-р хороо, Их сургуулийн гудамж хаягт байрладаг МУИС-
ийн Генийн инженерчлэлийн лаборатори

нар харилцан тохиролцож, Иргэний хуулийн заалтуудыг үндэслэл болгон энэхүү гэрээг байгуулав.

1. НИЙТЛЭГ ҮНДЭСЛЭЛ

- 1.1. Судалгааны зорилго: Энэхүү судалгааны ажлын зорилго нь Сарс-Ков-2 вирус болон хепатитын
делта вирусийн (ХДВ) халдварыг илрүүлэх серологийн оношлууруудыг сүүлийн үеийн шинэ
технологиуд дээр үндэслэн зохион бүтээж, тэдгээрийн шинж чанарыг туршин тодорхойлоход
оршино.
- 1.2. Гэрээний хугацаа: Уг судалгааны хэрэгжих хугацаанд буюу 2021 оны 7-р сарын 1-ны өдрөөс
2023 оны 3-р сарын 30-ны өдөр хүртэл хугацаанд хүчин төгөлдөр мөрдөгдөнө.
- 1.3. Хамтын ажиллагааны нөхцөл:
 - 1.3.1. Төслийн хүрээнд судалгаа, хөгжүүлэлтийн ажлуудыг толгойлон гүйцэтгэгч байгууллага
нь Элэгний төв, МУИС байна.

- 1.3.2. Талуудын төлөөлөл бүхий төслийн багийг байгуулах бөгөөд төслийн баг нь хамтрагч байгууллагуудын үзэл баримтлал байр суурийг бүрэн төлөөлөх ба төслийн судалгаа хөгжүүлэлтийн ажилд хамтран ажиллана.
- 1.3.3. Гэрээт хугацаанд судалгааны хүрээнд эрдэм шинжилгээ, сургалт, судалгааны ажил зохион байгуулахтай холбоотой ажил үйлчилгээг талууд төлөвлөсөн хугацаа, хуваарийн дагуу хариуцлагатай, чанарын өндөр түвшинд хийж гүйцэтгэнэ.
- 1.3.4. Гүйцэтгэгч талын биелүүлэх үр дүнгийн даалгаврыг энэ гэрээний хавсралт хүснэгтэд зааж өгнө. Гүйцэтгэгч тал үр дүнгийн даалгаврыг биелүүлэх ажлын төлөвлөгөөг гаргаж, уг төлөвлөгөөний дагуу хийж гүйцэтгэнэ. Ажлын төлөвлөгөөнд хийх ажил, гүйцэтгэх хугацаа, хариуцах судлаач, судлаачийн цалин хөлс, ажилд шаардлагатай эд материалын хангамж зэргийг нарийвчлан тусгаж өгсөн байна.
- 1.3.5. Судалгаатай холбогдуулан олон улсын түвшинд гарах судалгааны богино өгүүлэл, судалгааны бүрэн хэмжээний өгүүлэл, ханын илтгэл, танилцуулга зэрэг бүхий л материалууд дээр талуудын судлаач нар тухайн судалгаанд оруулсан хувь нэмрийнхээ эрэмбийн дагуу зохиогчоор орно.

2. ТӨСЛИЙН САНХҮҮЖИЛТ

- 2.1. Төслийн нийт санхүүжилт 150 000 000 (зуун тавин сая төгрөг) байна.
- 2.2. Төслийн санхүүжүүлтийг гүйцэтгэгч байгууллага Элэгний төвийн албан ёсны дансанд санхүүжүүлэгч байгууллагаас энэхүү гэрээг байгуулснаас хойш 30 хоногийн дотор шилжүүлнэ.

3. ЗАХИАЛАГЧ, САНХҮҮЖҮҮЛЭГЧ ТАЛЫН ЭРХ ҮҮРЭГ:

- 3.1. Захиалагч, санхүүжүүлэгч тал судалгааны ажлыг ерөнхийд нь удирдаж, хамтран ажиллагч байгууллагуудыг судалгаа хийх материал, урвалжаар хангах үүрэгтэй. Үүний хүрээнд төслийн санхүүгийн бүх үйл ажиллагааг удирдан зохион байгуулна.
- 3.2. Төслийг хэрэгжүүлэх хамтарсан багийг бүрэлдүүлэхэд санал дэвшүүлэх, ажлын төлөвлөгөөг батлах, төлөвлөгөөний хэрэгжилтэд хяналт тавих эрхтэй.
- 3.3. Судалгааны явцын үр дүнг шаардаж авах, төслийн талаарх мэдээллийн арга хэмжээ зохион байгуулах эрхтэй.
- 3.4. Судалгаа хийхтэй холбоотой бүх мэргэжлийн судалгаа, мэдээлэл, аргазүй, агуулгад хамтрагч байгууллагад зөвөлгөө өгөх эрхтэй.
- 3.5. Судалгааны хүрээнд эрдэм шинжилгээ, сургалт, судалгаа хийхэд шаардлагатай боловсон хүчин, мэргэжилтэн, сургалтын агуулгаар өөрийн бололцооны хүрээнд дэмжлэг үзүүлэх үүрэгтэй.
- 3.6. Судалгааны бүх үе шатанд төслийн багт ажиллах судлаачдын цалин, хангамжийг бүрэн хариуцах үүрэгтэй.

4. ГҮЙЦЭТГЭГЧ ТАЛЫН ЭРХ, ҮҮРЭГ

- 4.1 Судалгааны хүрээнд үзлэг, эрдэм шинжилгээ, сургалт, судалгаа хийхэд шаардлагатай тоног төхөөрөмж, аппарат болон бусад багаж хэрэгслээр судалгааны багийг хангах үүрэгтэй.
- 4.2 Гэрээний хавсралт болон улмаар нарийвчилсан төлөвлөгөөнд заасан ажлуудаа хугацаанд нь чанартай гүйцэтгэнэ.
- 4.3 Судалгааны үр дүнг тухай бүр захиалагч, санхүүжүүлэгч талд тайлагнах.
- 4.4 Судалгааны хэрэгжилтийн дунд хугацааны болон эцсийн тайланг боловсруулж, олон улсын эрдэм шинжилгээний хуралд хэлэлцүүлэх.
- 4.5 Гэрээний хавсралтанд заасан үр дүнгийн даалгаварт буй ямар нэг ажлыг хийх боломжгүй тохиолдолд энэ талаар төслийн захиалагч болон санхүүжүүлэгч талд мэдэгдэж улмаар гэрээнд өөрчлөлт оруулах санал дэвшүүлэх эрхтэй.

5. ГЭРЭЭНИЙ ХАРИУЦЛАГА

- 5.1. Талууд гэрээгээр хүлээсэн үүргээ зохих ёсоор гүйцэтгээгүй тохиолдолд аль нэг тал гэрээг дангаар цуцлах эрхгүй. Талуудын аль нэг нь гэрээний хариуцлага алдсан тохиолдолд харилцан зөвшилцөж цаашид дахин хариуцлага алдахгүй байх талаар тохиролцоно.
- 5.2. Хамтын ажиллагааны хүрээнд талууд санаатай болон санамсаргүйгээр олж мэдсэн байгууллагын, хувь хүний нууцтай холбоотой мэдээллийг бусдад задруулахгүй байх үүрэгтэй.

6. ГЭРЭЭ ДУУСГАВАР БОЛОХ, ЦУЦЛАХ

- 6.1. Гэрээг аль нэг талын санаачилгаар цуцлах бол талууд бие биедээ бичгээр мэдэгднэ.
- 6.2. Гэрээний хугацаа дууссан тохиолдолд гэрээ дуусгавар болно.

7. МАРГААНЫГ ШИЙДВЭРЛЭХ

- 7.1. Талуудын хооронд энэхүү гэрээтэй холбогдуулан маргаан үүсэх тохиолдолд харилцан тохиролцож эвийн журмаар шийдвэрлэхийг эрмэлзэх бөгөөд эс чадваас Монгол Улсын хуулийн дагуу, Монгол Улсын шүүхээр шийдвэрлүүлнэ.

8. БУСАД ЗҮЙЛ

- 8.1. Гэрээнд нэмэлт өөрчлөлт оруулж болох ба аливаа өөрчлөлт оруулах саналыг нэг талдаа бичгээр мэдэгдэнэ. Мэдэгдэл хүргүүлснээс хойш ажлын 10 хоног дотор хариу өгөхгүй бол өгсөн саналыг зөвшөөрсөнд тооцно.
- 8.2. Гэрээнд талуудын эрх бүхий этгээдүүд гарын үсэг зурж, тамга дарснаар хүчин төгөлдөр болно.
- 8.3. Гэрээнд аливаа нэмэлт, өөрчлөлт оруулах тохиолдолд бичгээр үйлдэж эрх бүхий албан тушаалтан гарын үсэг зурж, тамга тэмдэг даран баталгаажуулснаар хүчин төгөлдөр болно,
- 8.4. Талууд энэхүү гэрээг Монгол хэл дээр 3 хувь үйлдэж, талууд тус бүр 1 хувийг хадгалсан нь хуулийн адил хүчинтэй байна,
- 8.5. Энэ гэрээгээр зохицуулагдаагүй бусад харилцааг Монгол Улсын холбогдох хууль тогтоомжид заасны дагуу зохицуулна.

ЭНЭХҮҮ ГЭРЭЭТЭЙ БҮРЭН ТАНИЛЦАЖ, ХҮЛЭЭН ЗӨВШӨӨРСӨН БӨГӨӨД ЯМАР
НЭГЭН МАРГААНГҮЙ БОЛОХЫГ БАТЛАВ.

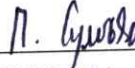
ГЭРЭЭ БАЙГУУЛСАН:

ТӨСЛИЙН УДИРДАГЧ, МУИС-ИЙН
ГЕНИЙН ИНЖЕНЕРЧЛЭЛИЙН
ЛАБОРАТОРИЙН ЭРХЛЭГЧ


О. ОДГЭРЭЛ



ЭЛЭГНИЙ ТӨВИЙН АХЛАХ СУДЛААЧ


П. СУМБЬЯА

МОНГОЛЫН ЭЛЭГНИЙ ЭМЧ НАРЫН
НИЙГЭМЛЭГИЙН НАРИЙН БИЧГИЙН
ДАРГА


Г. ЗУЛХҮҮ

ОНОМ САНГИЙН ГҮЙЦЭТГЭХ
ЗАХИРАЛ


Д. ОРХОНСЭЛЭНГЭ

Үр дүнгийн даалгаварууд

	Төслөөр бий болох үр дүн	Тоо хэмжээ	Үр дүнгийн үзүүлэлт	Үр дүнг хүлээлгэн өгөх хугацаа
1	Хепатит делта вирусийн түргэвчилсэн оношлуур зохион бүтээх	500 хүн	Загвар бүтээгдэхүүн бий болох	2023-оны 2-р сарын 28
2	Хепатит делта вирусийн ELISA оношлуур зохион бүтээх	500 хүн	Загвар бүтээгдэхүүн бий болох	2023-оны 2-р сарын 28
3	Плазмон резонансын үзэгдэл дээр суурилсан биосенсорын оношлуур зохион бүтээх	1	Олон улсын хуралд илтгэл хэлэлцүүлэх	2023-оны 2-р сарын 28
4	SARS-Cov-2 вирусийн түргэвчилсэн оношлуур зохион бүтээх	500 хүн	Загвар бүтээгдэхүүн бий болох	2023-оны 2-р сарын 28
5	Төслийн үр дүнг хэвлэн нийтлэх, олон улсын хуралд оролцох	2	Тайлан бичих, Олон улсын хуралд илтгэл хэлэлцүүлэх	2023-оны 2-р сарын 28

ТӨСЛИЙН УДИРДАГЧ, МУИС-ИЙН
ГЕНИЙН ИНЖЕНЕРЧЛЭЛИЙН
ЛАБОРАТОРИЙН ЭРХЛЭГЧ

О. ОДГЭРЭЛ



ЭЛЭГНИЙ ТӨВИЙН АХЛАХ СУДЛААЧ

П. Сумъяа

МОНГОЛЫН ЭЛЭГНИЙ ЭМЧ НАРЫН
НИЙГЭМЛЭГИЙН НАРИЙН БИЧГИЙН
ДАРГА

Г. ЗУЛХҮҮ

ОНОМ САНГИЙН ГҮЙЦЭТГЭХ
ЗАХИРАЛ

Д. ОРХОНСЭЛЭНГЭ

БАТЛАВ.


Монголын элэгний эмч нарын
нийгэмлэгийн тэргүүн

.....


Я. ДАГВАДОРЖ

БАТЛАВ.

ОНОМ сангийн гүйцэтгэх
захирал

.....


Д. ОРХОНСЭЛЭНГЭ

БАТЛАВ.

Элэгний төвийн захирал

.....


Д. НАРАНЖАРГАЛ

**“Сарс-Ков-2 вирус (SARS-Cov-2) ба Хепатитийн дельта вирусийн (HDV)
халдварыг илрүүлэх шинэ үеийн серологийн оношлууруудыг зохион бүтээх”
сэдэвт судалгааны төсөл санхүүжүүлж, хэрэгжүүлэх 20210616-1 тоот гэрээнд
оруулах нэмэлт өөрчлөлт**

2022 оны 12 сарын 25-ны өдөр, Улаанбаатар хот

1. Гэрээний талууд харилцан тохиролцсоны үндсэн дээр Хавсралт-1 -д заасан үрдүнгийн даалгавраас 4-р даалгавар “SARS-Cov-2 вирусийн түргэвчилсэн оношлуур зохион бүтээх” даалгаврыг хасав.
2. Энэхүү нэмэлт өөрчлөлт нь 20210616-1 тоот гэрээний нэг хэсэг болно.

НИЙГМИЙН ЭРҮҮЛ МЭНДИЙН ҮНДЭСНИЙ ТӨВИЙН ЭРДМИЙН ЗӨВЛӨЛИЙН ХУРЛЫН ТЭМДЭГЛЭЛ

2024 оны 07 дугаар сарын 1

Дугаар 07/2024

Улаанбаатар хот

Эрдмийн зөвлөлийн хурал 2024 оны 7 дугаар сарын 1-ний өдөр НЭМҮТ-ийн 2 давхрын сургалтын танхимд танхимаар явагдав. Хуралд Эрдмийн зөвлөлийн дарга, ХУ-ны доктор, дэд профессор С.Өнөрсайхан, Эрдмийн зөвлөлийн нарийн бичгийн дарга АУ-ны доктор С.Цэгмэд, БШУ-ны доктор Ж.Оюунбилэг, АУ-ны доктор Б.Өлзийбүрэн, АУ-ны доктор, профессор Р.Отгонбаяр, АУ-ны доктор, профессор Л.Ундрам, АУ-ны доктор Ц.Базаррагчаа, АУ-ны доктор Б.Цэцэгсайхан, АУ-ны доктор, дэд профессор И.Болормаа, ХЗУ-ны доктор Ж.Баясгалан, АУ-ны доктор Д.Дэлгэрмаа, ХУ-ны доктор И.Туяажаргал нар танхимаар оролцож, Эрдмийн зөвлөлийн гишүүн цахимаар саналаа ирүүлж, Эрдмийн зөвлөлийн гишүүн АУ-ны доктор Ж.Батжаргал, АУ-ны доктор Т.Өлзийсайхан, АУ-ны доктор Ш.Нансалмаа, АУ-ны доктор, дэд профессор Т.Хосбаяр, АУ-ны доктор Д.Ганзориг нар хүндэтгэх шалтгаантай тул хурлаас албан ёсны чөлөө авав. Хурал 80.0%-ийн ирцтэй байв.

Хурлыг Эрдмийн зөвлөлийн дарга, ХУ-ны доктор, дэд профессор С.Өнөрсайхан нээж, хурлын дэг, хөтөлбөрийг танилцуулав.

ХЭЛЭЛЦСЭН АСУУДАЛ: “SARS-CoV2 ба хепатитын дельта вирусийн халдварыг илрүүлэх шинэ үеийн серологийн оношлууруудыг зохион бүтээх” судалгааны төслийн тайлан хүлээлгэн өгөх.

Тус судалгааны ажилд шинжээчээр ажилласан Анагаах ухааны доктор, Хүний гавьяат эмч Ягаанбуянтын Дагвадорж болон Анагаах ухааны доктор, дэд профессор Алтангэрэлийн Баянмөнх нарын үнэлгээг Эрдмийн зөвлөлийн дарга, Химийн ухааны доктор, дэд профессор С.Өнөрсайхан уншиж, танилцуулав.

Судалгааны арга зүйг судалгааны удирдагч, биологийн ухааны доктор, Монгол Улсын Их Сургуулийн Генийн инженерчлэлийн лабораторийн эрхлэгч О.Одгэрэл танилцуулав.

АСУУЛТ, ХАРИУЛТ:

Асуулт: Эрдмийн зөвлөлийн гишүүн, АУ-ны доктор И.Болормаа:

1. Шинжлэх ухаан технологийн сангийн санхүүжилттэй биш хувийн хэвшлийн санхүүжилттэй төсөл үү?
2. Энэ төсөл нь ямар төрлийн төсөл вэ?
3. ШУТсан-тай адил хэлбэрээр санхүүжилт явагддаг уу?
4. Энэ оношлууруудын санхүүжилт нь хувийн хэвшил юм бол патентыг мөн хувийн хэвшлийн нэр дээр авах уу?
5. Хувь эмнэлгүүд болон хувь хүмүүс тус оношлууруудыг худалдаж авч болох уу?

Хариулт: Судалгааны удирдагч, БУ-ны доктор О.Одгэрэл:

1. ШУТсан-ийн санхүүжилттэй төсөл биш, хувийн байгууллагын санхүүжүүлэлттэй.
2. Инновацын төсөл гэсэн төрөлд багтах төсөл.

Асуулт: Эрдмийн зөвлөлийн гишүүн, БШУ-ны доктор Ж.Оюунбилэг:

1. Манай эрдмийн зөвлөлөөр ямар шийдвэр гаргуулахыг хүсэж байна вэ?
2. Дельта вирусийн эсрэгтөрөгчийг хэрхэн гаргаж авсан бэ?

Хариулт: Судалгааны удирдагч, БУ-ны доктор О.Одгэрэл:

1. Уг төсөл маань зорьсон зорилтдоо хүрчээ, төслийг хаахад боломжтой гэсэн шийдвэр гаргаж өгөхийг хүсэж байна. Энэ төслийн тайланг элэгний эмч нарын нийгэмлэг болон Оном санд хүлээлгэн өгөх болно.
2. Рекомбинант эсрэг төрөгчийн хувьд Дельта вирусийн жижиг антигенийг *e.coli* бактериуд нийлэгжүүлэн гаргаж авсан.

Асуулт: Эрдмийн зөвлөлийн гишүүн, АУ-ны доктор Ц.Базаррагчаа:

1. Энэ төслийн танилцуулга дээр 4 төрлийн оношлуур байна. Яагаад ЛАМП-ПГУ-ын үр дүнг хасаж танилцуулж байгаа вэ?
2. Эдгээр оношлууруудыг шинээр зохион бүтээгээгүй юм байна тийм үү?

Хариулт: Судалгааны удирдагч, БУ-ны доктор О.Одгэрэл:

1. Одоогоор дельта вирусийг илрүүлэх ЛАМП полимеразын гинжин урвалын технологи байхгүй. Үр дүнг нь оруулсан байж байгаад хассан. Бид ELISA, түргэвчилсэн, био сенсор гэсэн 3 төрлийн оношлуураар төслийн үр дүнг хүлээлгэн өгч байна. Танилцуулга дээр техникийн алдаа гарсан байгаад уучлал хүсье.
2. Ерөнхийдөө бүх оношлуурууд шинээр зохион бүтээгдсэн. Дельта вирусийг илрүүлэх түргэвчилсэн оношлуур дэлхий дээр нэг ч байхгүй, бидний зохиосон оношлуур бол хамгийн анхны түргэвчилсэн оношлуур болж байгаа. Харин ELISA оношлуур дээр химийн кросслинкинг ашигласаар шинэлэг болж байгаа юм. Дельта вирусийг илрүүлэх SPR буюу плазмон резонанс биосенсорын оношлуур мөн л дэлхийд байхгүй байгаа, иймээс бидний зохион бүтээсэн нь анхных ба шинэлэг болно. Цаашид ELISA болон түргэвчилсэн оношлуурыг баталгаажуулах нь чухал гэсэн дүгнэлтэд хүрсэн.

Асуулт: Эрдмийн зөвлөлийн гишүүн, ХУ-ны доктор И.Туяажаргал:

1. Жагсаасан 4 төрлийн оношлуурууд дундаас хасагдсан ЛАМП-ПГУ-ыг яагаад шинэ үеийн гэж нэрлэсэн юм бэ? Өмнөх технологийг хэрхэн сайжруулсан бэ?
2. ЛАМП-ПГУ-ын оношлуур нь RT-PCR-аас илүү мэдрэг шинж чанартай байх уу?

Хариулт: Судалгааны удирдагч, БУ-ны доктор О.Одгэрэл:

1. Одоо ашиглагдаж байгаа RT-PCR шиг үнэтэй багаж шаардахгүй, урвалыг зөвхөн өрөөний температурт явуулах боломжтой учир шинэ үеийн гэж байгаа. Халдвар авсан, аваагүйг шууд өнгөний өөрчлөлтөөр нь нүдээр үнэлэх боломжтой.
2. Мэдрэг чанарын хувьд RT-PCR-аас илүү өндөр.

Эрдмийн зөвлөлийн дарга, ХУ-ны доктор, дэд профессор С.Өнөрсайхан:
Өөр асуух асуулт байхгүй бол асуулт, хариултаа зогсоож, саналаа хэлэхийг гишүүд дэмжиж байна уу?

Эрдмийн зөвлөлийн гишүүд 100% саналтайгаар дэмжив.

хүрээнд тайлангаа оруулж байгаад баяртай байна. Өмнө орж ирсэн аргачлалыг бид хүлээн зөвшөөрөөгүйн учир нь та бүхэнд дараа нь эмнэлгийн тусгай зөвшөөрөл, химийн бодисын тусгай зөвшөөрөл гэх мэт маш олон асуудал гарч ирэх тул татгалзсан. Та бүхнийг манай эрдмийн зөвлөл дэмжиж байгаа, хувийн ямар нэгэн ашиг сонирхол байхгүй, та бүхний ажлыг хойш татах үндэслэл зөвлөлийн ямар ч гишүүнд байхгүй тул та бүхнийг дэмждэггүй гэсэн буруу ойлголтыг багийн гишүүддээ зөвөөр ойлгуулаарай гэдгийг протоколд тэмдэглүүлж үлдээхийг хүсэж байна.

ШИЙДВЭРЛЭСЭН НЬ:

“SARS-CoV2 ба хепатитын дельта вирусийн халдварыг илрүүлэх шинэ үеийн серологийн оношлууруудыг зохион бүтээх” судалгааны тайланг НЭМҮТ-ийн Эрдмийн зөвлөлийн гишүүдийн 87.5 %-ийн саналаар батлав.

Хянасан:

Эрдмийн зөвлөлийн нарийн бичгийн дарга



С.Цэгмэд

Хурлын тэмдэглэл хөтөлсөн:

МУИС, генийн инженерчлэлийн лабораторийн судлаач



Э.Саруул

ЭРҮҮЛ МЭНДИЙН ЯАМ
АНАГААХ УХААНЫ ЁС ЗҮЙН ХЯНАЛТЫН ХОРООНЫ
ТОГТООЛ

2021 оны 06 дугаар сарын 30-ны өдөр

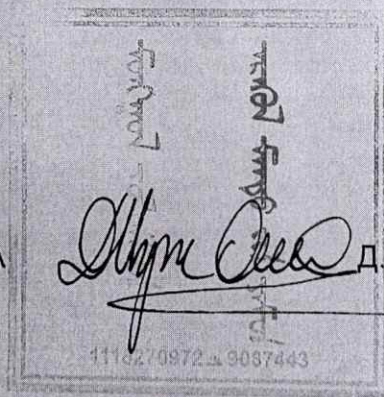
№243

210648 Улаанбаатар хот 6
Сүхбаатар дүүрэг,
Олимпийн гудамж-2,
Засгийн газрын VIII байр,
Эрүүл мэндийн яам
Утас: 261845, Факс: 323541

Анагаах ухааны ёс зүйн хяналтын хорооны 2021 оны 06 дүгээр сарын 30-ны өдрийн 08 дугаар хурлын тэмдэглэлийг үндэслэн ТОГТООХ нь:

1. "Sars-CoV2 ба Хепатитийн дельта вирусийн халдварыг илрүүлэх шинэ үеийн серологийн оношлууруудыг зохион бүтээх" сэдэвт судалгааны ажлыг судалгааны ажлыг БУ-ны доктор О.Одгэрэлийн удирдлаган дор 2021-2022 онд багтаан хэрэгжүүлэхийг зөвшөөрсүгэй.
2. Судалгааны явцад тодорхой шалтгааны улмаас арга аргачлал өөрчлөгдөх, гадаад орон луу сорьц тээвэрлэх, Хельсинкийн тунхаглалд туссан ёс зүйн асуудал хөндөгдсөн тохиолдолд анагаах ухааны ёс зүйн хяналтын хороонд мэдэгдэж байхыг судалгааны багийнханд үүрэг болгосугай.
3. Судалгааны явцын болон төгсгөлийн тайланг судалгаа дууссан хугацаанаас хойш 2 сарын дотор багтаан анагаах ухааны ёс зүйн хяналтын хороонд ирүүлэхийг төслийн удирдагчид үүрэг болгосугай.

ДАРГА



Д.ЦЭРЭНДАГВА

**“ЭРҮҮЛ МЭНДИЙН ЯАМНЫ АНАГААХ УХААНЫ ЁСЗҮЙН ХЯНАЛТЫН
ХОРООНД ХЭЛЭЛЦҮҮЛЭХ ТӨСЛИЙН АРГА ЗҮЙ (48 асуултаар)**

2021 оны ... сарын ... ны өдөр
Хэлэлцэх асуудлын дугаар

Хурал №

№	Үндсэн асуудлууд	Тайлбар
1	Судалгааны нэр	“Сарс-Ков-2 вирус (SARS-Cov-2) ба Хепатитийн дельта вирусийн (HDV) халдварыг илрүүлэх шинэ үеийн серологийн оношлууруудыг зохион бүтээх” инновацийн төсөл
2	Судлаачийн нэр/ Судалгааг явуулах байгууллага	Др. О. Одгэрэл, Элэгний төв, МУИС-ийн дэд профессор
3	Судалгаа явуулах хугацаа	2021-оны 7-р сарын 1-ээс 2024 оны 6-р сарын 30 хүртэл. Нийт 36 сар.
4	Судалгааны зорилго/асуултууд	<p>Зорилго:</p> <p>Энэхүү судалгааны ажлын зорилго нь Сарс-Ков-2 вирус болон хепатитын делта вирусийн (ХДВ) халдварыг (эсрэг бие) илрүүлэх түргэвчилсэн оношлууруудыг сүүлийн үеийн нэн шинэ технологи дээр үндэслэн зохион бүтээж, улмаар бүтээгдэхүүний чанарын баталгаажуулалтын судалгааг хийхэд оршно.</p> <p>Зорилтууд:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. HDV ба SARS-Cov-2 вирусийн түргэвчилсэн оношлуурыг уламжлалт хөндлөн урсгал (lateral flow) болон нэн шинэ үеийн нано технологийн арга зүйг ашиглан зохион бүтээх. 3. Боловсруулсан арга зүйн дагуу оношлууруудыг үйлдвэрлэж, физик, химийн үзүүлэлтүүдийг тодорхойлох. 4. Оношлууруудын мэдрэг болон өвөрмөц чанар, тоон чанар, найдвартай байдал, тогтвортой байдлын судалгаануудыг хийх. 5. Үр дүнг тайлагнах, судалгааны өгүүлэл хэвлүүлэх, үйлдвэрлэлд нэвтрүүлэхэд бэлэн болгох.
5	Судалгааны ажлын	150 000 000 төгрөг

№	Үндсэн асуудлууд	Тайлбар
	санхүүжилт	
6	Судалгааны аргачлал	(48 асуултын дагуу бэлдсэн дагалдах материалд бүрэн эхээрээ байгаа)
7	Хөндөгдөх ёс зүйн асуудлууд	Судалгаанд төрөл бүрийн бүлгийн хүмүүсийн цусны ийлдсийг ашиглах бөгөөд, үүнд олон улс, монгол улсын холбогдох стандарт, ёс зүйн зарчмыг чанд сахина.
8	Эрсдлийн түвшний үнэлгээ	НЭМҮТ-ийн Эрдмийн зөвлөлөөр хэлэлцэгдэж дэмжигдсэн.
9	Ёс зүйн хороонд ирүүлсэн материалууд	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ёс зүйн хяналтын хороонд хандсан байгууллагын албан бичиг 2. Судлаачийн хүсэлт (Холбоо барих утас, e-mail бичсэн байна) 3. Судалгааны ажлын хураангуй танилцуулга 4. Судалгааны ажлын бүрэн арга зүй, протокол (48 асуумжаар) 5. төсөл дээр хамтран ажиллах арга зүй, ёс зүйн асуудлуудын тухай гэрээ 6. Судалгааны ажлын арга зүйг хэлэлцүүлсэн эрдмийн зөвлөлийн хурлын протокол 7. Таниулсан зөвшөөрлийн хуудас 8. Судлаачдын намтар 9. Төлбөр төлсөн баримт

Эрүүл мэндийн яамны эмнэлгийн мэргэжилтний ёс зүйн хороонд

I. ЕРӨНХИЙ МЭДЭЭЛЭЛ

1. Судалгааны нэр:

“Сарс-Ков-2 вирус (SARS-Cov-2) ба Хепатитийн дельта вирусийн (HDV) халдварыг илрүүлэх шинэ үеийн серологийн оношлууруудыг зохион бүтээх” инновацийн төсөл

2. Дэвшүүлж буй судалгааны төслийн тухай мэргэжлийн (техникийн бус) хэллэгээр бичсэн товч хураангуй;

Зорилго:

Энэхүү судалгааны ажлын зорилго нь Сарс-Ков-2 вирус болон хепатитын дельта вирусийн (ХДВ) халдварыг (эсрэг бие) илрүүлэх түргэвчилсэн оношлууруудыг сүүлийн үеийн нэн шинэ технологи дээр үндэслэн зохион бүтээж, улмаар бүтээгдэхүүний чанарын баталгаажуулалтын судалгааг хийхэд оршно.

Зорилтууд:

1. HDV ба SARS-Cov-2 вирусийн түргэвчилсэн оношлуурыг уламжлалт хөндлөн урсгал (lateral flow) болон нэн шинэ үеийн нано технологийн арга зүйг ашиглан зохион бүтээх.
3. Боловсруулсан арга зүйн дагуу оношлууруудыг үйлдвэрлэж, физик, химийн үзүүлэлтүүдийг тодорхойлох.
4. Оношлууруудын мэдрэг болон өвөрмөц чанар, тоон чанар, найдвартай байдал, тогтвортой байдлын судалгаануудыг хийх.
5. Үр дүнг тайлагнах, судалгааны өгүүлэл хэвлүүлэх, үйлдвэрлэлд нэвтрүүлэхэд бэлэн болгох.

Хэрэгжүүлэх шаардлага, үндэслэл:

Монгол улс хепатит вирусүүдийн халдварын тархалт, элэгний өвчлөлөөс шалтгаалсан үхлийн рейтингээр дэлхийд тэргүүлж байна. Энэхүү харамсалтай дүр зураг бий болоход хепатитын дельта вирусийн халдвар томоохон нөлөө үзүүлж байгаа нь дамжиггүй юм. Хепатитын дельта вирус нь элэгний вирусүүдээс хамгийн аюултай нь бөгөөд дэлхийн бусад улсуудаас монгол улсад хамгийн өргөн тархалттай байдаг. Гэвч халдварын тархалт Монголоос бусад оронд бага байдагтай холбоотойгоор энэ өвчний оношлогоо, эмчилгээнд

чиглэсэн судалгаа, хөгжүүлэлтийн ажлууд дэлхийд тун ховор хийгддэг бөгөөд хамгийн их хохирол амсаж буй Монгол улс энэ чиглэлд өөрсдийн зүгээс санаачлагатай ажиллах нь зүйтэй. Энэхүү судалгааны ажил нь Монголд төдийгүй, дэлхийд анх удаа хепатитын Д вирусийн халдварыг илрүүлэх түргэвчилсэн оношлуурыг зохион бүтээж, түүний чанарын баталгаажуулалтыг хийж байгаагаараа онцлог юм. Манай судалгааны баг ямар нэгэн хүний материал ашиглахгүйгээр рекомбинант технологи дээр үндэслэн хепатитын Д вирусийн эсрэгтөрөгч уургийг гарган авч улмаар түргэвчилсэн оношлуурын прототип загварыг гарган аваад байна. Цаашид уг гарган авсан түргэвчилсэн оношлуурыг туршин тодорхойлох, улмаар анагаах ухааны практикт нэвтрүүлэх зайлшгүй шаардлагатай байна.

Коронавирусийн овогт багтах шинэ зүйлийн SARS-CoV-2 вирус, түүнээс шалтгаалсан амьсгалын замын Covid-19 өвчин 2019 оны 12 сард БНХАУ-д анх бүртгэгдэн, тархаж эхэлснээс хойш 1,5 жилийн хугацаанд уг вирусийн халдвар дэлхийн бүх улс оронд халдварлаж, нийт халдварын тоо 165 сая хүрчээ. Энэ хугацаанд Монгол улсад 50 мянга орчим хүн уг вирусийн халдварыг авч улс орны нийгэм, эдийн засагт томоохон хохирол учирлаа. Монгол улс Covid-19 өвчинтэй хөл хориог төрөл бүрийн түвшинд тогтоох, бүх нийтээр вакцинжуулах аргаар тэмцэж байна. SARS-CoV-2 вирусийн оношлогооны чиглэлд Монгол судлаачид идэвхтэй ажиллаж шүлсний дээжин дээр PCR хийх цомог, ийлдэс дээр эсрэг бие үзэх ELISA цомогнуудыг өөрсдөө зохион бүтээж, эхнээсээ хэрэглээнд нэвтэрч байна. Цаашид энэхүү цар тахал үүсгэгч вирусийн оношлогооны технологи улам бүр боловсронгуй болж байна. Үүнд E болон S уургийн эсрэг үүссэн эсрэг биеийг хамтад нь илрүүлдэг мультифлекс чадвар, өндөр мэдрэмтгий бийдал, хурдан найдвартай ажиллагаа, нанотехнологийг нэвтрүүлсэн байдал зэрэг шинж чанарыг улам бүр сайжруулах чиглэлд ажиллаж байна. Ялангуяа алтны нано хэмжээст нимгэн үеийн гадаргуу дээр эсрэг биеийг бэхлэж улмаар плазмон резонансийн үзэгдлийг ашиглан ямар нэг илрүүлэгч (probe) хэрэглэхгүйгээр биомолекулыг илрүүлэх арга зүйг ашигласан түргэвчилсэн оношлуурын технологи хурдацтай хөгжиж байна. Иймд хүний амьдралын чанар, эрүүл мэндийн технологийг тэргүүлэх чиглэл болгон заралсан манай улсын судлаачид энэ чиглэлд анхаарч, бодит бүтээгдэхүүн хийхэд чиглэсэн төслүүдийг эрчимжүүлэх нь зүйтэй юм.

Судалгааны ажлын загварчлал, арга зүй

HDV вирус болон SARS-Cov-2 вирусийн түргэвчилсэн оношлуурыг ямар нэгэн хүний дээж шаардахгүйгээр цэвэр рекомбинант технологи дээр үндэслэн боловсруулав. Улмаар боловсруулсан түргэвчилсэн оношлуурыг төрөл бүрийн өвчтөний бүлгээс ялгасан биологийн дээж дээр туршиж, түүний мэдрэг болон өвөрмөц чанар, ажиллагааны найдвартай байдлыг туршиж тодорхойлно.

HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурын судалгаанд 500 ширхэг HBV, HDV-ийн давхар халдвар бүхий өвчтөний дээж, 250 ширхэг HBV, HDV-ийн давхар

халдвар аваад HDV нь аяндаа эдгэсэн хүмүүс, 250 ширхэг HBV –ийн дан халдвартай өвчтөний дээж, 250 ширхэг халдвар аваагүй эрүүл хүмүүс гэсэн нийт 4-н бүлэг хүмүүсээс ялган авсан 1250 ширхэг цусны ийлдсийн дээжийг ашиглана.

SARS-Cov-2 вирүсийн түргэвчилсэн оношлуурын судалгаанд 250 ширхэг SARS-Cov-2 вирүсийн халдвар авсан өвчтөнгүүд, 250 ширхэг халдвар аваагүй эрүүл хүмүүс гэсэн 2 бүлэг хүмүүсээс ялгасан нийт 500 ширхэг цусны ийлдсийн дээжийг ашиглана.

Судалгааны ёс зүйн асуудлууд

Судалгааны арга, аргачлалыг тухайн салбараар мэргэжсэн эрдмийн зөвлөлөөр хэлэлцүүлж, улмаар судалгааг ЭМЯ-ны Ёс зүйн хорооны хурлаар хэлэлцүүлж зөвшөөрөл авсны үндсэн дээр эхлүүлнэ.

3. Судалгааны зөвтгөл, судалгаа явуулах газар, хүн амын хөгжил дэвшилд оруулах хувь нэмэр, тулгамдсан зорилтод нийцэж буй тухай маш тодорхой үндэслэл;

Судалгааны дээж авах, түүнийг боловсруулах ажлууд Элэгний төв дээр явагдна. Элэгний төв нь гепатологи, элэгний өвчлөлийн чиглэлээр судалгааны ажил явуулдаг үндэсний хэмжээний эрдэм шинжилгээний төв юм. Элэгний төвийн лабораторид 30 гаруй нэр төрлийн 100 орчим томоохон багаж тоног төхөөрөмжүүд ажиллаж байна. Жишээлбэл : флуоресценц инвертед микроскоп, микроманипуляторын иж бүрдэл, ердийн болон Real-Time PCR-ийн термоциклерүүд, гэрлийн шингээлт, флуоресценц, люминесценцийн микроплейт уншигч машинууд, флоу цитометр, спектрофотометр, ердийн ба CO2-ийн инкубаторууд, гүн хөлдөөгч хөргөгчнүүд, ламинар бокс, төрөл бүрийн нуклейн хүчлийн ба уургийн электрофорезийн аппаратууд зэрэг болно. Мөн тус лабораторийн биоматериалын санд нийт 15000 орчим хүний цусны ийлдэсний дээж, хепатитын В, С, Дельта вирүсийн дээжнүүд хадгалагдаж судалгаанд ашиглагдаж байна. Элэгний төв нь МУИС, АШУУИС, ШУА, ХӨСҮТ, ХСҮТ, Улсын нэгдсэн эмнэлгүүд, “Гялс” анагаах ухааны төв зэрэг дотоодын эрдэм шинжилгээний байгууллагууд, Станфордын их сургууль, Техасын анагаах ухааны их сургууль, Ханноверийн их сургууль, АНУ-ын Өвчнийг хянах, сэргийлэх төв (CDC), АНУ-ын Үндэсний эрүүл мэндийн хүрээлэн (NIH), Харвардын их сургууль, Жонс Хопкинсийн их сургууль, Сан Франциско дахь Калифорнийн их сургууль, Анкарагийн их сургууль зэрэг гадаадын эрдэм шинжилгээний байгууллагуудтай судалгааны хамтарсан төсөл хэрэгжүүлдэг.

Монгол улс хепатит вирүсийн халдварын тархалт, элэгний өвчлөлөөс шалтгаалсан үхлийн рейтингээр дэлхийд тэргүүлж байна. Энэхүү харамсалтай дүр зураг бий болоход ХДВ-ийн халдвар томоохон нөлөө үзүүлж байгаа нь дамжиггүй юм. ХДВ нь элэгний вирүсүүдээс хамгийн аюултай нь бөгөөд

дэлхийн бусад улсуудаас монгол улсад хамгийн өргөн тархалттай байна. Гэвч ХДВ -ийн халдварын тархалт Монголоос бусад оронд бага байдагтай холбоотойгоор гадаргуугийн пласмон резонансын (ГПР) технологи дээр суурилсан оношлуур, биосенсорын судалгаа огт хийгдээгүй байгаа юм.

Дэлхий дахинд одоогоор ХДВ-ийн оношлогоог фермент холбоот эсрэг биеийн урвал (ELISA)-аар илрүүлдэг бөгөөд энэ арга нь лабораторийн нөхцөлд ELISA уншигч багаж ашиглан хийдэг, шинжилгээ 2-3 цаг үргэлжлэхээс гадна нэг шинжилгээ хийхэд олон тооны дээж цуглуулах шаардлагатай болдог ELISA шинжилгээ нь хугацаа шаардагддаг, нэмэлт молекул (label) ашигладаг зэрэг сул талтай.

ГПР-ын оношлуурыг ашиглан ХДВ-ийг оношлох шинжилгээг хийвэл бодит хугацааны анализ явуулан шинжилгээний хариу хурдан гарах ба мэдрэг чадвар харьцангуй өндөр, нэмэлт молекул ашиглахгүй, дахин хэрэглэж болох зэрэг олон давуу талтай. Цаашид уг судалгааны ажлаар оношлуурын баталгаажуулалт хийснээр ХДВ-ийн халдварыг оношлож эрт илрүүлж эмчилснээр элэгний хатуурал, элэгний дутагдал, элэгний хавдраар нас баралтыг бууруулах боломжтой юм. Цаашлаад генийн инженерчлэл, нанотехнологийг ашиглан хүн амын дунд өргөн тархсан бусад төрлийн эмгэг үүсгэгч вирусийн оношлуур зохион бүтээж нийгмийн эрүүл мэндийг хамгаалах, урьдчилан сэргийлэх боломжийг олгож байна.

4. Өмнө хийгдсэн судалгааны тойм, судлаач, ивээн тэтгэгч нарт мэдэгдэж байгаа хэвлэгдсэн болон хэвлэгдээгүй судалгааны тойм, судалгааны мөн чанар, цар хүрээ, амьтан дээр хийсэн судалгаа, бусад эмнэл зүйн өмнөх ба эмнэл зүйн судалгаануудын товч хураангуй;

Одоогийн байдлаар дэлхий дахинд ГПР-ын шинэ технологийг ашигласан ХДВ-ийн халдварыг илрүүлэх биосенсорын судалгааны ажил харахан гараагүй байна.

Манай судалгааны баг алтны нанопартикл болон алтны нимгэн үе дээр суурилсан хоёр төрлийн биосенсорыг мөн ГПР-ын биосенсорын хэмжилт хийх тусгай багажийг угсарсан. ХДВ-ийн гадаргуун антигений рекомбинант уургийг нийлэгжүүлэн гарган авч, алтны нанопартикл болон алтны нимгэн үе дээр био-кроссхолбогчуудыг ашиглан ковалент холбоогоор холбосон. Ковалент холбоо нь хамгийн хүчтэй химийн холбоо бөгөөд биосенсорыг буфер орчин, рН-ын нөлөөнд илүү тэсвэртэй, олон дахин ашиглагдаж болох аргыг сонгосон. Биосенсорын химийн холбоо, угсралт амжилттай явагдсан эсэхийг хэт ягаан/үзэгдэх гэрлийн спектрофотометр, нил улаан туяаны спектрометр, нанофокс, энерги дисперсийн рентгений спектр, өөрсдийн угсарсан ГПР-ын багаж болон ELISA аргуудаар баталгаажуулсан.

5. Удирдамжийг хэрэгжүүлэх байдал;

Төслөөр гүйцэтгэх ажлыг календарчилсан төлөвлөгөөний дагуу гүйцэтгэж, ажлын үе шат болгон дээр "Биоанагаахын судалгаанд хүнийг

хамруулах ёс зүйн удирдамж”, “Тархвар зүйн судалгааны ёс зүйн хяналтын удирдамж” –уудыг чандлан баримтална.

Төсөлд ажиллах судлаачидтай “Судалгааны төсөл дээр судлаач ажиллуулах хөдөлмөрийн гэрээ” -г байгуулж уг гэрээнд дээрх удирдамжуудыг мөрдүүлэхэд чиглэсэн заалтуудыг оруулна.

6. Судалгаа хийгдэх газрын тархвар судлал, хүн ам зүйн мэдээлэл, судалгааг зохистой, аюулгүй явуулахад шаардлагатай нөхцөл, боломжийн талаарх товч тайлбар;

Судалгааны ажил гүйцэтгэхдээ халдвар хамгааллын дэглэмийг зохих дүрэм журмын дагуу чанд сахиж ажиллана.

7. Ивээн тэтгэгчийн нэр, хаяг;

Оном сан.

8. Албан газрын нэр хаяг, үндсэн болон бусад судлаачдын мэргэшил, туршлагын талаархи мэдээлэл;

Удирдагч: О. Одгэрэл, Ph.D, Дэд профессор,
Элэгний төвийн судлаач, МУИС-ийн дэд профессор
Биотехнологийн чиглэлээр 20 жил ажилласан туршлагатай

Судлаачид:

1. Э. Анир, PhD, Элэгний төвийн ЭША Генетикч. 20 жил ЭШ-ний байгууллагад ажилласан
2. Д. Наранжаргал, PhD, Элэгний төвийн ЭША. 16 жил Хүний эмч, анагаахын судлаач
3. Б. Сумъяа, MSc, Элэгний төвийн ЭША. Биоанагаах судлаач. 10 жил
4. Д. Пүрэвжаргал, MSc, Элэгний төвийн ЭША. Хүний эмч. Анагаахын судлаач 7 жил
5. А. Номин, MSc, МУИС-ийн Генийн инженерчлэлийн лаборатори, Биоинженер, 3 жил
6. Э. Номин-Эрдэнэ MSc, МУИС-ийн Физикийн тэнхим, Физикч, 5 жил,
7. Б. Ичинхорлоо, PhD, НЭМҮТ-ийн биотехнологийн албаны дарга, Хүний эмч, 30 жил
8. Л. Содномцогт, PhD, АШУҮИС-ийн Цөм лабораторийн эрхлэгч. Хүний эмч, 20 жил
9. М. Бадмаараг, BSc, АШУҮИС-ийн Цөм лабораторийн ЭША, Биоинженер, 2 жил

9. Судалгааны санхүүжилтын эх үүсвэр ба хэмжээ:

Судалгааны нийт төсөв 150 сая төгрөг.

Санхүүжилтийн эх үүсвэр: Оном сан, Элэгний төв

10. Судалгааг гүйцэтгэх хугацаа, ажлын төлөвлөгөө;

Нийт 36 сар

	Зорилтууд	Хугацаа	Үр дүн
1	Серологийн оношлууруудыг зохион бүтээх	2021-7 сараас 2022-6 сар хүртэл	Серологийн оношлуурын технологи бэлэн болох,
2	Прототип бүтээгдэхүүнүүдийг гаргах, чанарын баталгаажуулалтын судалгааг хийх.	2022-7 сараас 2023-6 сар хүртэл	Бэлэн болсон прототип бүтээгдэхүүн, чанарын баталгаажуулалтын судалгааны үр дүн
5	Үр дүнг боловсруулах, статистик анализ хийх	2023-6 сараас 2023-12 сар хүртэл	Эцсийн дүн гарч дүгнэлт өгсөн байна.
6	Судалгааны ажлын илтгэл бичих, үр дүн тайлагнах, эрдэм шинжилгээний өгүүлэл бичих	2024-1 сараас 2024-6 сар хүртэл	Эрдэм шинжилгээний өгүүлэл хэвлүүлсэн байх.

II. СУДАЛГААНЫ АРГА ЗҮЙН ТАЛААР

11. Судалгаа /туршилтын зорилго, зорилтууд, таамаглалууд, судалгааны тулгамдсан асуудлууд, түүний урьдчилан төсөөлөл, хувьсуурууд

Зорилго:

Энэхүү судалгааны ажлын зорилго нь Сарс-Ков-2 вирус болон гепатитын делта вирусийн (ХДВ) халдварыг (эсрэг бие) илрүүлэх түргэвчилсэн оношлууруудыг сүүлийн үеийн нэн шинэ технологи дээр үндэслэн зохион бүтээж, улмаар бүтээгдэхүүний чанарын баталгаажуулалтын судалгааг хийхэд оршно.

Зорилтууд:

1. HDV ба SARS-Cov-2 вирусийн түргэвчилсэн оношлуурыг уламжлалт хөндлөн урсгал (lateral flow) болон нэн шинэ үеийн нано технологийн арга зүйг ашиглан зохион бүтээх.
3. Боловсруулсан арга зүйн дагуу оношлууруудыг үйлдвэрлэж, физик, химийн үзүүлэлтүүдийг тодорхойлох.
4. Оношлууруудын мэдрэг болон өвөрмөц чанар, тоон чанар, найдвартай байдал, тогтвортой байдлын судалгаануудыг хийх.
5. Үр дүнг тайлагнах, судалгааны өгүүлэл хэвлүүлэх, үйлдвэрлэлд нэвтрүүлэхэд бэлэн болгох.

12. Судалгаа туршилтын арга зүйн нарийвчлалсан аргачлал (загвар). Хяналттай эмнэл зүйн туршилтын үед эмчилгээнд оруулах бүлгийг санамсаргүй сонгох эсэх (ямар агаар), судалгаанд сул далдлалт хэрэглэх эсэх, (дан сул, давхар сул), эсвэл нээлттэй явуулах эсэх

Судалгааны ажлын загварчлал

HDV вирус болон SARS-Cov-2 вирусийн түргэвчилсэн оношлуурыг ямар нэгэн хүний дээж шаардахгүйгээр цэвэр рекомбинант технологи дээр үндэслэн боловсруулна. Улмаар боловсруулсан түргэвчилсэн оношлуурыг төрөл бүрийн өвчтөний бүлгээс ялгасан биологийн дээж дээр туршиж, түүний мэдрэг болон өвөрмөц чанар, ажиллагааны найдвартай байдлыг туршиж тодорхойлно. HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурын судалгаанд 500 ширхэг HBV, HDV-ийн давхар халдвар бүхий өвчтөний дээж, 250 ширхэг HBV, HDV-ийн давхар халдвар аваад HDV нь аяндаа эдгэсэн хүмүүс, 250 ширхэг HBV –ийн дан халдвартай өвчтөний дээж, 250 ширхэг халдвар аваагүй эрүүл хүмүүс гэсэн нийт 4-н бүлэг хүмүүсээс ялган авсан 1250 ширхэг цусны ийлдсийн дээжийг ашиглана.

SARS-Cov-2 вирусийн түргэвчилсэн оношлуурын судалгаанд 250 ширхэг SARS-Cov-2 вирусийн халдвар авсан өвчтөнгүүд, 250 ширхэг халдвар аваагүй эрүүл хүмүүс гэсэн 2 бүлэг хүмүүсээс ялгасан нийт 500 ширхэг цусны ийлдсийн дээжийг ашиглана.



Туршилт судалгаанд бүлгийг санамсаргүй сонгох эсэх, судалгаанд сул далдлалт хэрэглэх (дан сул, давхар сул) зэрэг эмнэлзүйн туршилтын аргачлалыг ашиглахгүй.

Судалгааны баг, судалгаа явуулах газар

Судалгааны дээж авах ажлууд ХӨСҮТ, Элэгний төв дээр явагдана. Дээжнээс ийлдэс ялгах, ажлын гол үндсэн хэсгийг гүйцэтгэх лаборатори нь МУИС-ын генийн инженерчлэлийн лаборатори, Лазерийн судалгааны төв юм. Тус лаборатори нь 2014 оны 5-р сарын 1-ээс эхлэн албан ёсоор үүсгэн байгуулагдан улмаар НЭМҮТ, АШУҮИС, ХӨСҮТ, Элэгний төв, зэрэг байгууллагуудтай хамтран төрөл бүрийн үйл ажиллагааг явуулж байна. Судалгаанд оролцож буй лабораториуд нь дэлхийн стандартад нийцсэн, хамгийн сүүлийн үеийн, өндөр үр дүн, хүчин чадал бүхий лабораторийн техникүүдээр хангагдсан.

Арга зүйнүүд:

Сорьц авах, тээвэрлэхэд Эрүүл мэндийн технологи, Эмчилгээ оношлогооны түгээмэл үйлдлүүд Монгол улсын MNS4621:2008 стандарт, Эрүүл мэндийн сайдын 2016 оны 10-р сарын 21-ны өдрийн 93-р тушаалын хавсралтаар баталсан шинжилгээний сорьц тээвэрлэх журмыг баримтална.

Хураагуур судас хатгаж, цус авах.

Судалгаанд оролцогчдоос ийлдэс ялган авах материал нь цус байна.

Тохио, сарвууны хураагуур судсуудыг голчлон сонгож судсын хатгаж цус авна. Судас хатгах талбайг сонгож, хатгах судаснаас 2-4 см орчим дээр чангалуурыг зөвхөн хураагуур судасны урсгалыг хааж, тараагуур судасны лугшилт мэдрэгдэж байхаар бэхэлнэ. Цусны урсгалын дагуу арьсыг арчиж ариутгана.

Зүү тариураа арьстай 10-15 хэмийн налуугаар судсаа чиглүүлэн, арьсыг, дараа нь судсыг хатгана. Зүү судсанд орсон тохиолдолд хуруу шилээ тосч, 10-18 мл цус авна. Цус авч дууссаны дараа чангалуурыг сулла, хөвөн бөмбөлгөөр дарж зүүг сугалж авна.

Цуснаас ийлдэс ялгах

Цусаас ийлдэс ялгахдаа Эрүүл мэндийн сайдын 2017 оны 8-р сарын 28-ны өдрийн А/328-ын 3-р хавсралтын журмаар гүйцэтгэнэ. Цусыг 1 минутанд 1000 удаа эргэх хурдаар 10 минутын турш хурилдуулан ийлдсийг ялгаад ариун, таглаа бүхий эппендорфод хийж цельсийн -180 хэмд хадгална. Хэрэв ийлдсийг цус авсан даруйд ялган авах боломжгүй бол цусыг хөргүүрт бүлэн үүстэл нь байлгах ба ийлдсийг ариун нөхцөлд хоосон, ариун хуруу шилэнд ялган авч шинжилгээнд ашиглана.

Биосенсор үгсрах

Судалгаанд Eun-Ju Jeong et al., 2008, Nikin Patel et al., 1997 болон Hong-Yu Lin., 2007 өгүүлэлд нийтлүүлсэн арга зүйг ашигласан.

1. Алтны нимгэн үе суулгах SF 10 шилэн слайдыг ГИБ болон органик уусгагчдаар дээрх зааврын дагуу сайтар цэвэрлэн гүйцэд хатаана.
2. Плазма спуттер багажид цэвэрлэсэн шилэн слайдыг голлуулан байрлуулна.
3. Багажийг битүүмжлэн тагласны дараа асаан минутыг заалтыг 4 минутаар тохируулан алтны нимгэн үе бэлтгэнэ.
4. Алтны нимгэн үе суулгасан шилэн слайдыг хуванцар петрийн тавганд дээш харуулан хийн битүүмжилнэ.
5. Нимгэн үе суулгасны дараа слайд дээр маск тавьж зай гаргахгүй байхаар сайтар битүүмжлэнэ.
6. Алтны нимгэн үе суулгасан нүхэнд 100 мкл пирана (H_2SO_4/H_2O_2 ; 2:1) $60^{\circ}C$ хүртэл хөргөн хийж 1 минут идэвхжүүлж нэрмэл усаар 5 удаа угаана.
7. Пиранагаар идэвхжүүлсэн слайд дээр этанолд уусгасан 10мМ MUA –аас тус бүр маскны нүхэнд 100 мкл хийж 24 цагийн турш $4^{\circ}C$ -г чийгтэй орчинд сайтар битүүмжлэн инкубацлана. MUA-г шавхан цэвэрлэж, гадаргууг 5 удаа PBS-р угаана.
8. Гадаргууг нь идэвхжүүлсэн алтны нимгэн үе дээр 75 мМ EDC, 15 мМ NHS-ын PBS-д уусгаж бэлтгэн нүх тус бүрт 100 мкл хийж 1 цаг инкубацлана. EDC/NHS бүхий уусмалыг шавхан гадаргууг PBS-р 5 удаа угааж хатаана.
9. Карбоксил бүлэг суулгасан Алтны слайд дээрээ карбонат буферт уусгасан уургаас нүх тус бүрийг бүрхэж байхаар 120 мкл хийж 1 цаг инкубацлана. ХДВ-ийн антиген холбосон алтны сенсороо PBS-ээр 5 удаа угаана.

10.1 % BSA-ын PBST-д бэлтгэж нүх тус бүрт 100 мкл хийж 1 цаг блокинг хийнэ. Блокинг хийсний дараа сенсороо 5 удаа PBST 0.1 % ашиглан угаана.

Биосенсорыг ийлдсээр үйлчлэх

1. Антиген суулган угсарсан алтны нимгэн үеийн биосенсор дээр ХДВ эерэг болон ХДВ сөрөг ийлдсийг 10 дахин шингэрүүлж PBST 0.1 % -д бэлтгэн, велл тус бүрт 100 мкл хийн 30 минут инкубацлана.
2. Биосенсороо PBST 0.1 % - ээр 5 удаа маш сайн угаана.

13. Судалгаанд хамруулахаар зорьсон оролцогчдын тоо, тэдгээрийн статистик тооцооллыг хэрхэн хийсэн

HDV вирус болон SARS-Cov-2 вирусийн түргэвчилсэн оношлуурыг ямар нэгэн хүний дээж шаардахгүйгээр цэвэр рекомбинант технологи дээр үндэслэн боловсруулав. Улмаар боловсруулсан түргэвчилсэн оношлуурыг төрөл бүрийн өвчтөний бүлгээс ялгасан биологийн дээж дээр туршиж, түүний мэдрэг болон өвөрмөц чанар, ажиллагааны найдвартай байдлыг туршиж тодорхойлно.

HDV-ийн түргэвчилсэн оношлуурын судалгаанд 500 ширхэг HBV, HDV-ийн давхар халдвар бүхий өвчтөний дээж, 250 ширхэг HBV, HDV-ийн давхар халдвар аваад HDV нь аяндаа эдгэсэн хүмүүс, 250 ширхэг HBV –ийн дан халдвартай өвчтөний дээж, 250 ширхэг халдвар аваагүй эрүүл хүмүүс гэсэн нийт 4-н бүлэг хүмүүсээс ялган авсан нийт 1250 хүний цусны ийлдсийн дээжийг ашиглана.

SARS-Cov-2 вирусийн түргэвчилсэн оношлуурын судалгаанд 250 ширхэг SARS-Cov-2 вирусийн халдвар авсан өвчтөнгүүд, 250 ширхэг халдвар аваагүй эрүүл хүмүүс гэсэн 2 бүлэг хүмүүсээс ялгасан нийт 500 ширхэг цусны ийлдсийн дээжийг ашиглана.

Статистик тооцооллыг хийхдээ олон улсад хэвлэгдсэн ижил төстэй судалгааны өгүүллэгүүдийн арга зүй, үр дүнг баримтлан боловсруулав. Мөн 2020 онд хэвлэгдсэн төслийн удирдагчийн гепатитын В болон С вирусийн оношлуурын судалгааны үр дүнг баримтлав.

Өгүүллэг: Sensitivity and specificity of commercially available rapid diagnostic tests for viral hepatitis B and C screening in serum samples. 2020, Plos One
Ganbolor Jargalsaikhan, Miriam Eichner, Delgerbat Boldbaatar, Purevjargal Bat-Ulzii, Oyungerel, Lkhagva-Ochir, Odgerel, Oidovsambu, Bekhbold Dashtseren, Erdenebayar Namjil, Zulkhuu Genden,

14. Хамрагдагсдыг хасах болон оруулах шалгуурууд, хасах шалгуурын нас хүйс, нийгэм эдийн засгийн хүчин зүйл, мөн бусад шалтгааны үндэслэл

Судалгаанд хамрагдагсад нь HBV болон HDV-ийн давхар халдвартай хүмүүс, HBV-ийн дан халдвартай хүмүүс, ердийн эрүүл гэсэн эрх зүйн бүрэн чадамж бүхий насанд хүрсэн хүмүүс байна. Судалгаанд нийгэм эдийн засгийн хүчин зүйлс зэрэг бусад шалгуурыг авч үзэхгүй.

SARS-Cov-2 вирүсийн түргэвчилсэн оношлуурын судалгаанд 250 ширхэг SARS-Cov-2 вирүсийн халдвар авсан өвчтөнгүүд, 250 ширхэг халдвар аваагүй эрүүл хүмүүс гэсэн 2 бүлэг, нийт 500 хүний дээжийг хамруулна.

Судалгаанд хүүхэд болон эрх зүйн чадамжгүй хүмүүсийг оролцуулахгүй.

15. Судалгааны статистик боловсруулалтын аргачлал, явцын дүн шинжилгээ хийх төлөвлөгөө, шаардлагатай үед судалгааг урьдчилан зогсоох цэгнүүр

Судалгаанд статистик боловсруулалт хийхэд Origin, ерөнхий статистикийн MS-EXCEL програмуудыг ашиглана.

Судалгааны явцад судлаачдын баг улиралд 1 удаа явцын уулзалтыг зохион байгуулах бөгөөд энэ уулзалтаар судалгааны үр дүн, ёс зүйн асуудлуудыг авч хэлэлцнэ.

Судалгааны үр дүнг жил бүр ЭМЯ-ны Ёс зүйн хороонд тайлагнана.

16. Бүхий л ажилбарын тодорхойлолт тайлбар, (эмчилгээг хөтлөн явуулах арга зүй, тарилга хийх арга зам, тун, тун хоорондын зай, туршиж буй ба харьцуулж буй бүтээгдэхүүнийг хэрэглэх эмчилгээний үргэлжлэх хугацаа)

Судалгаанд эмнэлзүйн туршилт байхгүй.

17. Судалгаанд ашиглах стандарчилсан картын жишиг, эмчилгээний нөлөө өгөх арга зүй, мөшгих ажилбарууд, боломжтой бол эмчилгээний нийцэмжийн хүрээг тодорхойлох арга зүй

18. Судалгаанд эмнэлзүйн туршилт байхгүй.

III. ЁС ЗҮЙН АСУУДЛААР

19. Протоколд тусгагдсан лавлагааны жагсаалт:

1. Eun-Ju Jeonga, Yoo Seok Jeonga, Kyoungsook Parka, So Yeon Yi, Junhyoung Ahna, Sang J. Chunga, Moonil Kima, Bong Hyun Chunga, "Directed immobilization of DNA-binding proteins on a cognate DNA-modified chip surface", Journal of biotechnology, 2008.
2. Nikin Patel, Martyn C. Davies, Mark Hartshorne, Richard J. Heaton, Clive J. Roberts, Saul J. B. Tendler, Philip M. Williams, "Immobilization of Protein Molecules onto Homogeneous and Mixed Carboxylate-Terminated Self-Assembled Monolayers", Langmuir, 1997.
3. Hong-Yu Lin, Yu-Chia Tsao, Woo-Hu Tsai, Yi-Wen Yang, Tsong-Rong Yan, Bor-Chiou Sheu, "Development and application of side-polished fiber immunosensor based on surface plasmon resonance for the detection of Legionella pneumophila with halogens light and 850 nm-LED", Sensors and Actuators A, 2007.
4. Эрүүл мэндийн сайдын 2016 оны 10-р сарын 21-ны өдрийн н 93-р тушаалын хавсралтаар баталсан шинжилгээний сорьц тээвэрлэх журам.
5. Эрүүл мэндийн сайдын 2017 оны 8-р сарын 28-ны өдрийн А/328-р тушаалын хавсралтаар баталсан ийлдэс ялгах журам.
6. Эрүүл мэндийн технологи, Эмчилгээ оношлогооны түгээмэл үйлдлүүд Монгол улсын MNS4621:2008 стандарт

19. Ёс зүйн хяналтын хороонд өмнө нь оруулж байсан төсөл, түүний шийдвэр;

Ёс зүйн хяналтын хороонд өмнө нь энэ төслийг оруулж байгаагүй

20. Биоанагаахын судалгааны үед ивээн тэтгэгч манай орны шинжлэх ухаан, ёс зүйн хяналт, биоанагаахын судалгааны чадавхийг буй болгон хөгжүүлэхэд оруулах хувь нэмэр, чадавхийг сайжруулах зорилт нь судалгаанд хамрагдагсад, тэдний олон нийтийн эрх ашиг, хүсэл эрмэлзэлд нийцэж буйн баталгаа;

Монгол Улсын шинжлэх ухаан, технологийг 2007-2020 онд хөгжүүлэх мастер төлөвлөгөөний дагуу үндэсний инновацийн тогтолцоог хөгжүүлэх хөтөлбөрийг Монгол улсын засгийн газар 2007 онд баталсан. Хөтөлбөр нь дэд хөтөлбөртэй бөгөөд үүний нэг нь дэвшилт технологийг хөгжүүлэх дэд хөтөлбөр юм. Энэхүү дэд хөтөлбөрийн хүрээнд дэвшилт технологийн судалгаа, боловсруулалтыг улам боловсронгуй болгох, экологийн аюулгүй орчныг бүрдүүлэх, импортыг орлох ба экспортонд гаргах бүтээгдэхүүний нэр төрлийг олшруулах, монгол орон зөвхөн ашигт малтмалын нөөцөндөө

бус хүнийхээ чадавхид тулгуурлан хөгжиж, мэдлэгийн эдийн засгийг бүрдүүлэх нөхцөлийг бий болгох чухал холбогдолтой болж байгаа тул манай орны шинжлэх ухаан, ёс зүйн хяналт, биоанагаахын судалгааны чадавхийг сайжруулах болно. Энэ судалгаа нь манай улсын засгийн газраас инновацын тогтолцоог бүрдүүлэн хөгжүүлэх чиглэлийг дэмжих зорилгоор олгож буй санхүүжилтээр хийгдэх тул манай орны шинжлэх ухаан, ёс зүйн хяналт, биоанагаахын судалгааны чадавхийг сайжруулах болон судалгаанд хамрагдагсад, тэдний олон нийтийн эрх ашиг, хүсэл эрмэлзэлд бүрэн нийцэх болно.

21. Судалгаанд хөндөж буй ёс зүйн асуудлууд, анхаарах зүйлүүд, шийдвэрлэх арга замын талаархи судлаачийн тайлбар;

Судалгааны хүрээнд амьтан (туулай, усан гахай) дээр ямар нэгэн туршилт хийхгүй. Судалгаанд нийт 300 хүнийг хамруулах төлөвлөгөтэй. Судалгаанд хамрагдах хүн тус бүрд таниулах хуудас (хувь хүний таниулсан зөвшөөрлийн хуудас) өгөх бөгөөд, түүнийн уншиж танилцан, гарын үсэг зурж зөвшөөрөл өгсөн хүмүүсийг судалгаанд оролцуулна.

Үүнд Монгол улсын холбогдох хууль, тогтоол, журамууд, Үүнд: “Биоанагаахын судалгаанд хүнийг хамруулах ёс зүйн удирдамж”, “Тархвар зүйн судалгааны ёс зүйн хяналтын удирдамж”, олон улсын холбогдох эрх зүйн актууд, Үүнд: “НҮБ-ийн 1948 оны Хүний эрхийн түгээмэл тунхаглал”, “Дэлхийн анагаах ухааны нийгэмлэгийн 1964 оны Хелсинкийн тунхаглал”, “ДЭМБ-ийн 1982 оны хүнийг биоанагаах ухааны судалгаанд хамруулах тунхай олон улсын удирдамж” гэсэн баримт бичгүүдийг мөрдлөг болгоно.

22. Зөвшөөрөл өгөх чадвар хязгаарлагдмал, эсвэл нийгмийн эмзэг давхаргын хүмүүсийг хамруулсан судалгааны зөвтгөл тэдэнд учирч болох эрсдэл, тааламжгүй байдлыг багасгахад чиглэгдсэн тусгай арга хэмжээнүүдийн тайлбар;

Судалгаанд зөвшөөрөл өгөх чадвар хязгаарлагдмал хүмүүсийг (насанд хүрээгүй хүн, хөгжлийн бэрхшээлтэй иргэд, ялтан гэх мэт) оролцуулахгүй.

23. Шинээр хүн сонгох үйл ажиллагаа, жишээлбэл, зар сурталчилгаа ба уг үйл ажиллагааны явцад нууцлал, хувийн нууцыг хамгаалахад чиглэгдсэн арга хэмжээ;

Судалгааны нууцлалыг хадгалах, төслөөс гаднах аливаа этгээдэд төсөлтэй холбоотой мэдээллийг дамжуулахгүй байхад чиглэгдсэн заалтуудыг монгол улсын холбогдох хууль тогтоомжийн дагуу “Судалгааны төсөл дээр судлаач ажиллуулах хөдөлмөрийн гэрээ”-нд оруулж өгнө.

24. Судалгааны явцад өвчтөнд учирч болох аливаа эрсдлийн үед болон стандарт эмчилгээнээс хасах эсвэл татгалзах төлөвлөгөө болон зөвтгөл;

Судалгааны явцад хүнд учрах эрсдэл туйлын хязгаарлагдмал байна. Учир нь судалгаанд оролцогчоос зөвхөн 1 удаа, хүний биед ямар нэгэн гэмтэл, өвдөлт учруулахгүй биологийн дээж авах зам болох болох жавьжны арчдас авна. Биологийн дээж авах процессийг зориулалтын байранд, мэргэжлийн хүн явуулах бөгөөд үүнд холбогдох стандарт ажиллагааны зааврыг баримтална.

25. Судалгааны явцад хийж болох эсвэл хориглох эмчилгээний бусад аргууд;

Биологийн дээжийг зөвхөн хүний биед ямар нэгэн гэмтэл, өвдөлт учруулахгүй биологийн дээж авах зам болох жавьжны арчдас хэлбэрээр авах бөгөөд өөр ямар нэгэн дээж авахыг хориглоно.

Судалгаанд ямар нэг эмчилгээ байхгүй.

26. Хийгдвэл зохих эмнэл зүйн лабораторийн шинжилгээ болон бусад сорилууд;

Судалгаанд ямар нэг эмнэл зүйн лабораторийн шинжилгээ хийгдэхгүй.

27. Хамрагдагчийг судалгаа болон эмнэл зүйн туршилтаас хасах, (олон төвт судалгааны үед) оролцогч төвийн үйл ажиллагаа болон судалгааг нийтэд нь зогсоох журам, цэгнүүрүүд;

Хамрагдагч биологийн дээж өгсний дараагаар судалгаанаас сайн дураараа хасагдах хүсэлтээ бичгээр өгсөн тохиолдолд судалгаанаас хасч, уг хамрагдагчийн биологийн дээжийг нэн даруй устгана.

Судалгаанд эмнэлзүйн туршилт байхгүй.

Судалгаанд олон төв байхгүй.

Судалгааны багийн сар бүрийн зөвлөлдөх уулзалтаар судалгааны явц, цаашдын үйл ажиллагааны төлөвлөгөөг авч хэлэлцэнэ. Уг хурлаар судалгааг зогсоох саналыг багийн гишүүдээс тавьж улмаар олонхийн саналаар судалгааг зогсоох шийдвэр гаргасан тохиолдолд судалгааг бүхэлд нь зогсооно.

28. Гаж нөлөө болон урвалыг тэмдэглэх, мэдээлэх арга зүй, хүндрэлийн үед авах арга хэмжээ;

Судалгаанд хамрагдагчаас биологийн дээж авах үед тухайн үеийн биеийн ерөнхий байдлыг тодорхойлсон хуудас бөглүүлэх бөгөөд, дээж авсан журналыг зохих журмын дагуу хөтлүүлнэ. Дээж авснаас хойш судалгаанд хамрагдагч физик байдлаар оролцохгүй, хамааралгүй болно.

29. Яс үндэс, арьсны өнгөөр ялгаатай, мөн зарим нэг бүлэг хүн амын эрх ашигт хохирол учруулж болох тархвар зүй, нийгэм, удамзүйн судалгааны үр дүнг хэвлэн нийтлэхэд зохисгүй байх нөхцлүүд;

Судалгаанд өөрийгөө монгол үндэстэн гэж тодорхойлсон хүмүүсийг хамруулна. Судалгааны үр дүн Монгол хүн амын эрх ашигт ямар нэг хохирол учруулахгүй.

30. Аливаа баримт материалыг гуйвуулсан нь тогтоогдсон нөхцөлд ивээн тэтгэгчийн баримтлах зарчмын дагуу энэхүү зохисгүй үйлдлийн эсрэг зохих арга хэмжээ авах тухай баталгаа.

Манай судалгааны багийн гишүүд нь ёс зүйн хорооны сургалтанд хамрагдсан тул дээрх заалтад тусгагдсан зохисгүй үйлдлийг гаргахгүй байх болно. Хэрэв дээрх заалтад тусгагдсан зохисгүй үйлдлийг гаргавал тухайн судлаачийг Ёс зүйн хороонд мэдэгдэх бөгөөд ёс зүйн хорооны шийдвэрээр тухайн судлаачийн асуудлыг шийдвэрлэнэ.

Судалгааны багийн сар бүрийн зөвлөлдөх уулзалтаар судалгааны явц, цаашдийн үйл ажиллагааны төлөвлөгөөг авч хэлэлцэнэ. Уг хурлаар ёс зүйн асуудлаас үүдэн судалгааг зогсоох саналыг багийн гишүүдээс тавьж улмаар олонхийн саналаар судалгааг зогсоох шийдвэр гаргасан тохиолдолд судалгааг бүхэлд нь зогсооно.

31. Үйлдвэрлэлийн ивээн тэтгэгчтэй судалгааны үед уг судалгааны үр дүнг нийтлэх эрх эзэмшлийн нөхцлийн талаархи гэрээ, мөн үр дүнгийн тайлангийн эх ноорог бэлтгэх үед судлаачийн заавал биелүүлэх үүрэг;
Судалгаанд үйлдвэрлэлийн ивээн тэтгэгч байхгүй.

32. Сөрөг үр дүн гарсан тохиолдолд эмийн бүртгэлийн албанд тайлагнах эсвэл хэвлэн нийтлэх, аль тохиромжтой аргаар мэдээлэх;
Судалгаанд эмийн клиник туршилт байхгүй.

33. Судалгаа, туршилтын зорилгоор хэрэглэж буй эм, бэлдмэлийн аюулгүй байдлын байнгын хяналт болон бусад ажиллабарыг хянах төлөвлөгөө, шаардлагатай тохиолдолд түүнийг хэрэгжүүлэхэд чиглэгдсэн бие даасан мэдээлэл-хяналтын хороо томилох эсэх;

Судалгаанд хүн дээр ямар нэг эм, бэлдмэлийг хэрэглэхгүй.

Судалгаанд хэрэглэх урвалжыг Монгол улсад эм, эмнэлэгийн хэрэгсэл импортлох тусгай зөвшөөрөл бүхий аж ахуйн нэгжээр дамжуулан худалдан авч, үйлдвэрлэгчийн зааврийн дагуу ашиглана.

34. Судлаач болон бусад хүмүүсийн бодолд үл нийцсэн санхүүгийн ба ашиг сонирхлын зөрчлийг шийдвэрлэх арга зам: байгууллагын маргаан таслах хороонд мэдээлэх; зөрчлийн магадтай эсэх тухай хорооны дүгнэлтийг ёс зүйн хяналтын хороонд мэдээлэх; шаардлагатай гэж үзсэн мэдээллийг судлагаанд оролцогч талуудад энэ хороогоор дамжуулан хүргэх;

Судалгаанд оролцогч байгууллагууд төсөл дээр хамтран ажжиллах гэрээг хийж болно. Мөн судлаачид хувь судлаачийн журмаар төсөл дээх ажиллах нь нээлттэй байна. Энэ тохиолдолд заавал тухайн судлаачийн үндсэн харъяаллын байгууллагатай гэрээ хийхгүй. Санхүүгийн ба ашиг сонирхлын зөрчил гарвал Монгол улсын холбогдох хууль болон, гэрээний дагуу шийдвэрлэх бөгөөд, гэрээний дагуу шийдвэрлэж чадахгүй бол хуулийн байгууллагаар шийдвэрлүүлнэ.

IV. ЭРСДЭЛ БОЛОН ҮР АШИГ

- 35. Туршиж буй ажилбар болон эм, вакциныг дагалдаж гардаг эрсдлийг оролцуулаад мэдэгдэж байгаа болон учирч болох гаж нөлөөний эрсдэл;**
Судалгаанд ямар нэг эм, вакцин, биобэлдмэл, арга зүйг хүн болон амьтан дээр туршсан зүйл байхгүй.
- 36. Биед учирч болох гэмтлийн эрсдлийн доод хэмжээнээс давсан судалгааны үед даатгалд хамруулах, уг гэмтлийг эмчлэх, эмчилгээг санхүүжүүлэх судалгаатай холбоотой хөдөлмөрийн чадвар алдалт, нас баралтын үед нөхөн олговор олгох нарийвчилсан төлөвлөгөө;**
Судалгаанд хүний биед гэмтэл учруулах эрсдэл бүхий ямар нэг нэг үйл ажиллагаа байхгүй.
- 37. Судалгаа дууссаны дараа туршилтын эмчилгээг оролцогчид үргэлжлүүлэн хүртэх нөхцөл, хүртэх арга зам, төлбөрийг хариуцах хувь хүн байгууллага, үргэлжлэх хугацааг тогтоох;**
Судалгаа дууссаны дараа хамрагдагчтай холбоотой аливаа үйл ажиллагаа байхгүй.
- 38. Жирэмсэн эмэгтэйг хамруулсан судалгаанд шаардлагатай бол жирэмсний төгсгөл хүртэл, цаашилбал урт, богино хугацаанд эх, хүүхдийн эрүүл мэндэд байнгын ажиглалт хийх төлөвлөгөө;**
Судалгаанд жирэмсэн эхтэй холбоотой үйл ажиллагаа байхгүй.
- 39. Судалгаанд хамрагдагсад болон бусдад тусах үр ашиг;**
Хепатитын дельта вирус нь элэгний вирусүүдээс хамгийн аюултай нь бөгөөд дэлхийн бусад улсуудаас монгол улсад хамгийн өргөн тархалттай байна. Судалгаанд хамрагдагсад ямар нэг санхүүгийн ашиг тус хүртэхгүй. Энэ төслийн үр дүнд бий болох шинэ технологи, бүтээгдэхүүн нь цаашид HDV – ийн халдвар болон Ковид-19 өвчнөөр өвдсөн хүмүүсийн оношлогоо эмчилгээний чанарыг сайжруулахад томоохон дэвшил авчрах юм.
- 40. Судалгааны дүнд буй болсон шинэ мэдлэгийг оролцуулан судалгаанаас хүн амд ногдох хүлээгдэж буй үр ашиг;**

Монгол улс хепатит вирусийн халдварын тархалт, элэгний өвчлөлөөс шалтгаалсан үхлийн рейтингээр дэлхийд тэргүүлж байна. Энэхүү харамсалтай дүр зураг бий болоход хепатитын дельта вирусийн халдвар томоохон нөлөө үзүүлж байгаа нь дамжиггүй юм. Хепатитын дельта вирус нь элэгний вирусүүдээс хамгийн аюултай нь бөгөөд дэлхийн бусад улсуудаас монгол улсад хамгийн өргөн тархалттай байна.

Одоогоор ашиглагдаж байгаа ELISA оношлуур нь мэдрэг чанар харьцангуй сайн биш, бодис урвалж их шаардагддаг, 2-3 цагийн турш шинжилгээ хийгддэг гэх мэт сул талтай. Харин ГПР-ын технологи дээр суурилсан биосенсорыг ашигласнаар мэдрэг чанар өндөр, шууд хариу гарах боломжтой, бодис урвалж бага шаарддагддаг, олон дахин хэрэглэх зэрэг давуу тал ихтэй. Мэдрэг чанар өндөр оношлуур ашигласнаар ХДВ-ийн халдварыг эрт үед илрүүлж, эмчилгээг цаг алдалгүй хийх боломжтой болсноор нийгмийн эрүүл мэндэд үр ашигтай судалгаа болох юм.

V. ТАНИУЛСАН ЗӨВШӨӨРӨЛ

41. Хувь хүний таниулсан зөвшөөрөл авах арга зам, оролцогчид мэдээлэл өгөхөөр төлөвлөсөн ажиллабар, зөвшөөрөл өгч буй оролцогч, төлөөлөх хүний нэр, хаяг, албан тушаал зэрэг мэдээлэл авах аргачлал;

Таниулсан зөвшөөрөл авах дараалал:

- Судалгаанд хамрагдагчтай утсаар холбогдож судалгааны ерөнхий мэдээллийг өгөх бөгөөд биеэр хүрэлцэн ирж уулзахыг санал болгоно.
- Хамрагдагчтай төслийн судлаач уулзаж, судалгааны талаарх бүх мэдээллийг өгч, хүссэн асуултанд хариулна. Хувь хүний таниулсан зөвшөөрлийн хуудсийг тайлбарлана.
- Хамрагдагч судалгаанд хамрагдахыг хүсвэл хувь хүний таниулсан зөвшөөрлийн хуудас дээр гарын үсэг зуруулна.
- Судалгаанд зөвхөн хуулийн чадамж бүхий насанд хүрэгчийг оролцуулах бөгөөд хувь хүний таниулсан зөвшөөрлийн хуудас дээр хамрагдагч өөрөө гарын үсэг зурна.
- Судалгаанд хамрагдагч хувь хүний гарал үүсэл, нийгмийн байдал, албан ёсны бүртгэлийн тухай мэдээлэл бүхий анкетийг бөглөж өгнө.

42. Хамрагдагч таниулсан зөвшөөрөл өгөх боломжгүй үед түүнийг төлөөлөх эрх бүхий хүнээс, эсвэл хүүхэд таниулсан зөвшөөрлийн утга санааг ойлгож, зөвшөөрч байлаа ч хуулиар насанд хүрээгүй бол эцэг эх, хууль ёсны халамжлагч, бусад эрх мэдэл бүхий хүнээс таниулсан зөвшөөрөл авах

Судалгаанд таниулсан зөвшөөрөл өгөх боломжгүй хүнийг хамруулахгүй.

43. Үнэ төлбөргүй үзүүлэх болон нэмэлт үйлчилгээ, бэлэг, мөнгө зэрэг судалгаанд оролцох санаа төрүүлэх эдийн засгийн болон бусад аргууд, эмнэлгийн үйлчилгээний төлбөр гэх мэт оролцогчид зориулах санхүүгийн зардал;

Судалгаанд хамрагдсан хүмүүст ямар нэгэн мөнгөн болон эд материалын шагнал урамшуулал өгөхгүй.

44. Тухайн судалгаа болон адил төстэй өөр судалгаанаас гарах мэдээллийг (жишээ нь, хор нөлөө, үр ашиг) хамрагдагчдад танилцуулах төлөвлөгөө, хариуцах хүн;

Судалгааны явц, гарах үр дүнг тухайн хүний хүсэлтийг үндэслэн тухай бүрд нь өгнө.

45. Хамрагдагсдад судалгааны үр дүнгийн талаар танилцуулах төлөвлөгөө;

V. НУУЦЫГ ХАДГАЛАХ

46. Хүний хувийн мэдээллийн нууцыг хамгаалах, оролцогчийн эрхийг хүндэтгэх, зөвшөөрөлгүйгээр удамзүйн шинжилгээний дүнг гэр бүл, төрөл төрөгсдөд илчлэгдэхээс сэргийлэх нөхцлийг хангах;

Судалгааны нууцлалыг хадгалах, төслөөс гаднах аливаа этгээдэд төсөлтэй холбоотой мэдээллийг дамжуулахгүй байхад чиглэгдсэн заалтуудыг монгол улсын холбогдох хууль тогтоомжийн дагуу “Судалгааны төсөл дээр судлаач ажиллуулах хөдөлмөрийн гэрээ”-нд оруулж өгнө.

47. Судалгаанд хамрагдагсдын талаархи мэдээллийг хэрхэн дугаарлах, нууц дугаарыг хаана хадгалах, яаралтай тохиолдолд хэн, хэзээ, хэрхэн дэлгэх тухай мэдээлэл;

Судалгааны нууцлалыг хадгалах, төслөөс гаднах аливаа этгээдэд төсөлтэй холбоотой мэдээллийг дамжуулахгүй байхад чиглэгдсэн заалтуудыг монгол улсын холбогдох хууль тогтоомжийн дагуу “Судалгааны төсөл дээр судлаач ажиллуулах хөдөлмөрийн гэрээ”-нд оруулж өгнө.

Судалгаанд хамрагдсад, түүний харгалзах дээж 1-ээс эхэлж рационал тоогоор дугаарлагдана. Уг мэдээлэл “Судалгааны төсөл дээр судлаач ажиллуулах хөдөлмөрийн гэрээ” байгуулсан, төсөл дээр ажиллаж буй албан ёсны судлаачдад хадгалагдана.

Судалгааны үр дүнг тухайн хамрагдагсдад өгөхөөс бусад тохиолдолд үр дүнг хүний нэртэй холбосон ямар нэг тайлан, мэдээ материал үйлдэхгүй.

48. Хувийн мэдээлэл болон биологийн материалыг ирээдүйд ашиглах төлөвлөгөө

Судалгаанд хамрагдагсдын хувийн мэдээлэл, биологийн материалыг ирээдүйд ашиглахгүй бөгөөд, судалгаа дуусч, эрдэм шинжилгээний өгүүлэл хэвлэгдсэний дараа 1 сарын дотор устгана.

О.Одгэрэл

/төслийн удирдагч/

Утас: 88479966

email: odgerel@seas.num.edu.mn