



ХҮНС, ХӨДӨӨ АЖ АХУЙ,
ХӨНГӨН ҮЙЛДВЭРИЙН ЯАМ



МАА-Н ЭДИЙН ЗАСГИЙН
ЭРГЭЛТИЙГ НЭМЭГДҮҮЛЭХ
ТӨСӨЛ



THE WORLD BANK
IBRD • IDA | WORLD BANK GROUP



“ГАРААНЫ ПРАЙМЕР ХХК”

“Нэг эрүүл мэндийн үйлчилгээ -
Түргэн тест ба PCR цомгийн туршилт”



Development diagnostic technology on the Food Safety



Гарааны Праймер ХХК

Хаяг: УБ, ХУД, Зайсан 17024,

Утас: 77118805, 99194028

Website: www.primer.mn

E mail: info@primer.mn

Facebook: Startup Primer



МАА-Н ЭДИЙН ЗАСГИЙН
ЭРГЭЛТИЙГ НЭМЭГДҮҮЛЭХ
ТӨСӨЛ



Хүнсний гаралтай эмгэг төрүүлэгчийг фуксинд суурилсан колориметрийн аргаар илрүүлэх LAMP-PCR бичил оношлуурын туршилтын тайлан

Issue 6, 2018

From the journal
Lab on a Chip

A foldable isothermal amplification microdevice for fuchsin-based colorimetric detection of multiple foodborne pathogens†

Thi Hyeon Dae Tahn* and Hae Won Lee**

Author affiliations

* Corresponding authors

† Department of BioNano Technology, Gachon University, 1342 Seongnam-daero, Sejong-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 13120, Korea

E-mail: tyhsa@gachon.ac.kr

Abstract

In this study, we have developed a foldable microdevice fully integrating DNA purification, amplification, and detection processes for detecting multiple foodborne pathogens. Specifically, the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique was combined with a fuchsin-based direct DNA colorimetric detection method. The microdevice was composed of three parts: a sample zone, reaction zone, and detection zone. A sealing film attached to the sample, reaction, and detection zones served as a bottom layer to make the microdevice foldable. The detection zone was made up of paper strips attached to the sticky side of the sealing film, and fuchsin-stained lines

МАА-Н ЭДИЙН ЗАСГИЙН
ЭРГЭЛТИЙГ НЭМЭГДҮҮЛЭХ
ТӨСӨЛ

PRIMER

ЛAMP (loop-mediated isothermal amplification) ДНХ
гогцоонд суурилсан изотермал олшруулалтын зарчим,
ач холбогдол

Мах, сүүнд эмгэг төрүүлэгч
E.coli, *S.aureus* илрүүлэх түргэн
тестийн туршилтын үйл явц

Үйл явц

1. Нян судлалын шинжилгээ

2. LAMP туршилтүүд

3. PCR баталгаажуулалт

Т. Ганцэцэг, MSc
С.Лхагвасүрэн PhD

Гарааны Праймер ХХК. Махны судалгаа хөгжүүлэлтийн лаборатори

1 | INTRODUCTION

- Хүнсээр дамжих өвчлөл дэлхий даяар нийгмийн эрүүл мэндийн тулгамдсан асуудал болж байна.
- Сүүлийн үеийн АНУ-ын CDC-ийн 2021-2023 оны мэдээллээр *Salmonella spp.*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* –ээс үүдэлтэй дэгдэлтүүд илүү мэдээлэгдсэн.
- Хүнсний гаралтай халдвар нь мал, түүхий махнаас биш хадгалагдсан бүтээгдэхүүн, түргэн хоолоос эх үүсвэртэй байна.
- Тандан шинжилгээнд ихэвчлэн ПГУ, ДНХ-ийн фрагмент анализын аргыг хэрэглэж байна.
- ДНХ-ийн гогцоонд суурилсан изотермийн олшруулалт (LAMP) нь генийг олшруулах энгийн бөгөөд хурдан арга юм. LAMP аргыг анх 2000 онд Японы эрдэмтэд өвөрмөц, өндөр бүтээмжтэй, хүссэн ДНХ-ийг хурдан өсгөх зорилгоор боловсруулсан. LAMP шинжилгээг хоол хүнс болон эмнэлзүйн лабораторид янз бүрийн эмгэг төрүүлэгчдийг илрүүлэхэд ашигладаг.
- LAMP нь бусад молекул биологи, ийлдэс судлалын туршилтууд шиг практик сул талгүй, зардал багатай бөгөөд хээрийн судалгаанд тохиромжтой арга гэж тооцогддог.

Contaminated Food	Germ	Year
Ice Cream	<i>Listeria monocytogenes</i>	2023
Ground Beef	<i>Salmonella</i> Saint Paul	2023
Raw Cookie Dough	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2023
Flout	<i>Salmonella</i> Infantis	2023
Frozen Strawberries	Hepatitis A	2023
Leafy Greens	<i>Listeria monocytogenes</i>	2023

Salmonella Outbreaks Associated with Not Ready-to-Eat Breaded, Stuffed Chicken Products — United States, 1998–2022

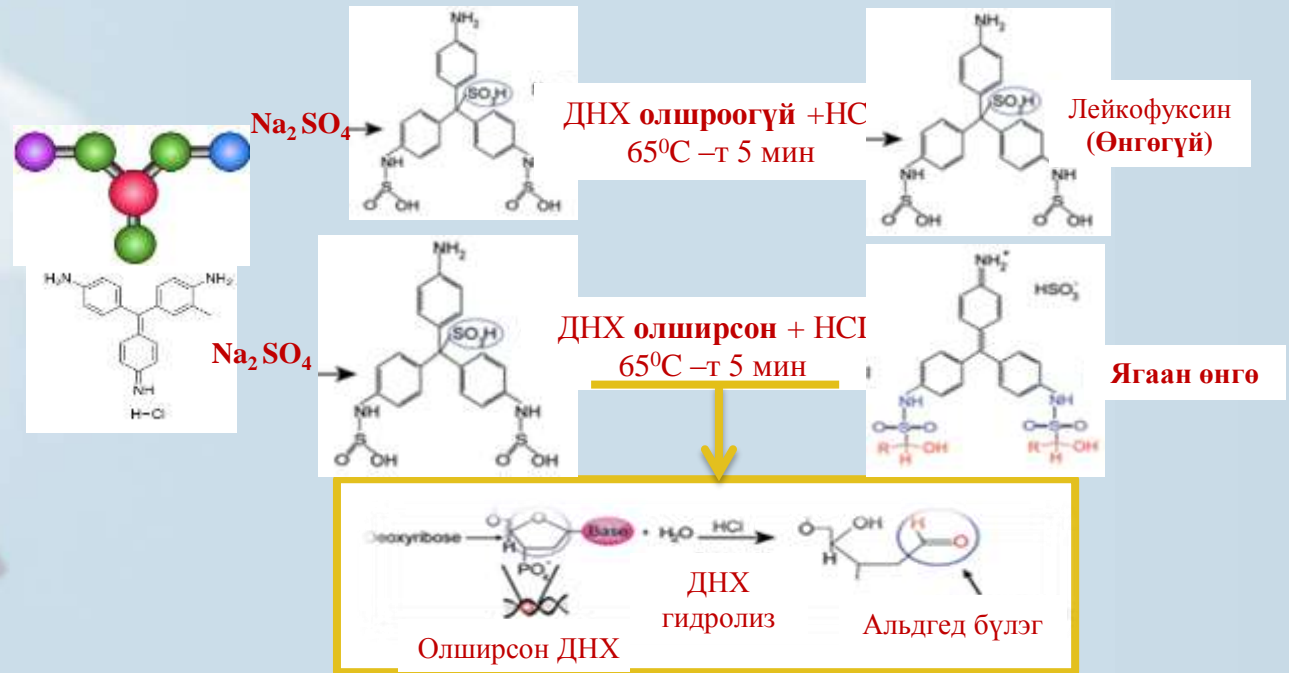
Laura Ford, PhD¹; Sean Beach, MPH²; Taylor Eisenstein, MPH³; Andrea Cox, DVM⁴; Zachary D. McCrossin, MPH⁵; Jelena Kraso-Calton, PhD⁶; Bonnie Klaidy, MPH⁷; Matthew Frazier⁸; Alida Sarason, MPH⁹; Matthew E. Wisc, PhD¹⁰; Kirk Smith, DVM, PhD¹¹; Carina Medan, PhD¹²; Patricia M. Griffin, MD¹³; Misha Babay, DVM¹⁴

Contaminated Food	Germ	Year
Fish	<i>Salmonella</i> Litchfield	2022
Frozen Falafel	<i>E. coli</i> O121	2022
Brie and Camembert Cheese	<i>Listeria monocytogenes</i>	2022
Ground Beef	<i>E. coli</i> O157:H7	2022
Unknown Food Source	<i>E. coli</i> O157:H7	2022
Ice Cream	<i>Listeria monocytogenes</i>	2022
Strawberries	Hepatitis A	2022
Peanut Butter	<i>Salmonella</i> Senftenberg	2022
Raw Oysters	Norovirus	2022
Power Greens Packaged Salads	<i>E. coli</i> O157:H7	2021

Contaminated Food	Germ	Year
Frozen Cooked Shrimp	<i>Salmonella</i> Weltevreden	2021
Raw Frozen Breaded Stuffed Chicken Products	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2021
Cashew Brie	<i>Salmonella</i> Duisburg	2021
Ground Turkey	<i>Salmonella</i> Hadar	2021
Queso Fresco	<i>Listeria monocytogenes</i>	2021
Unknown Food Source	<i>E. coli</i> O157:H7	2021
Unknown Source 3	<i>E. coli</i> O157:H7	2020
Leafy Greens	<i>E. coli</i> O157:H7	2020
Unknown Source 1	<i>E. coli</i> O157:H7	2020
Deli Meats	<i>Listeria monocytogenes</i>	2020

- Фуксинийг биологийн дээжийг будахад гол будагч бодис болдог.
- LAMP оршруулалтаар бий болсон бүтээгдэхүүнийг фуксинаар будаж, эерэг ДНХ-г илрүүлэхэд энэхүү арга үндэслэгдсэн.
- Нянгийн ДНХ-ийн өвөрмөц олшруулалт болоогүй тохиолдолд урвалын холимогт ямар ч өнгө үүсэхгүй.
- Хэрэв ДНХ олширсон тохиолдолд урвалын үр дүнд ягаан өнгө үүснэ.

Фуксинд суурилсан ДНХ илрүүлэх колориметрийн аргын механизм



- 3.1 | Materials
- 3.2 | Colorimetric fuchsin-based detection method
- 3.3 | Design and fabrication of the foldable microdevice
- 3.4 | Bacteria preparation and DNA extraction
- 3.5 | Operation of the microdevice for the LAMP reaction
- 3.6 | On-chip singleplex detection
- 3.7 | On-chip multiplex detection
- 3.8 | Sensitivity of the detection method
- 3.9 | Selective of the detection method

3.1 | Colorimetric fuchsin-based detection method

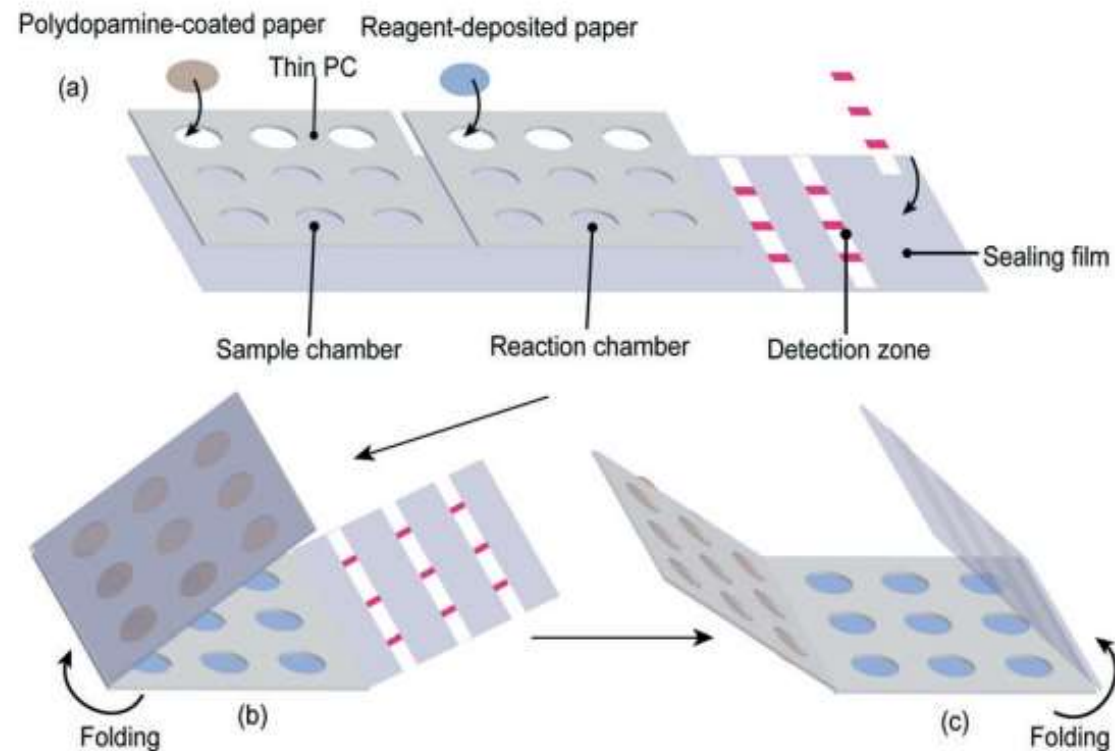
LAMP бүтээгдэхүүнийг илрүүлэхийн тулд фуксин (9 мкм) ба натрийн сульфит (51 мкм)-ийг хэрэглэсэн.

- ДНХ-г задлах зорилгоор 0.5 mM HCl-ээр 65 °C-т 5 минут боловсруулав.
- LAMP урвалж дээр натрийн сульфит+фуксин нэмж,
- Урвалын өнгөний өөрчлөлтийг ажиглаж, спектрофотометрээр шингээлтийг хэмжсэн.

Энэ аргыг цаасан дээр ашиглах туршилтын хийсэн.

- LAMP бүтээгдэхүүний давсний хүчлээр гидролизи хийж, дараа нь натрийн сульфит нэмсэн,
- LAMP бүтээгдэхүүнд фуксинаар будсан цаасан туузыг шингээсэн.
- Цаасны өнгөний өөрчлөлтийг нүдээр харж, зураг авч, ImageJ программ ашиглан дүн шинжилгээ хийсэн.

3.2 | Design and fabrication of the foldable microdevice



Зураг 2 Эвхэгддэг микро төхөөрөмжийн загвар ба заавар.

(a) Бичил төхөөрөмж нь гурван үндсэн хэсгээс бүрдэнэ.

- есөн дээжийн үүр бүхий **дээжийн бүс**,
- есөн урвалын үүр бүхий **урвалын бүс**,
- будаг шингээсэн гурван цаасан тууз бүхий **илрүүлэх бүс**;

(b) олируулахын тулд нугалах; ба (c) илрүүлэхийн тулд нугалах гэсэн 2 алхамаас бүрдэж байна.

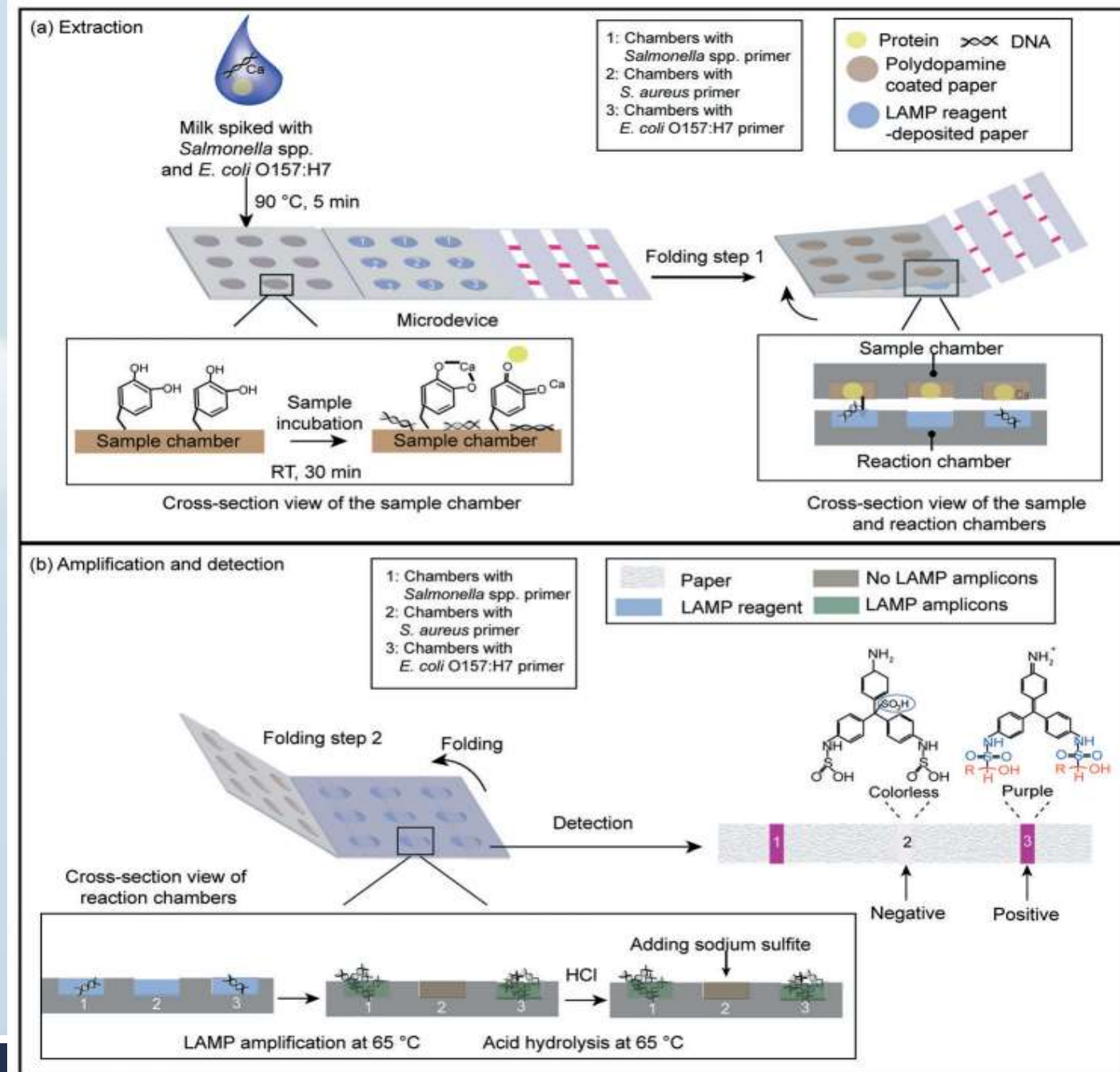
3.4 | Operation of the microdevice for the LAMP reaction

a) ДНХ ялгах

- Дээжээс 10 мкл-ийг дээжийн үүрд хийнэ (90 С-д 5 минут халаасан).
- Тасалгааны температурт 30 минут инкубаци хийнэ (дээж уурих, бохирдохоос сэргийлж дээжийн бүсийг наалдамхай хальсаар битүүмжилж).
- 30 минутын дараа хальсыг хуулна.

b) Олшруулалт

- Дээжийн бүсийг нугалж, урвалын бүстэй нийлүүлнэ.
- Олшруулалт 65 С-д 30 минут
- Давсны хүчил болон натрийн сульфитаар үйлчлэнэ.
- Илрүүлэх бүсийг нугалж урвалын бүстэй нийлүүлнэ.
- Үр дүнг үүссэн өнгөний эрчмээр илэрхийлнэ



4.1 | Colorimetric analysis of LAMP

- Колориметрийн шинжилгээнд альдегидийн бүлгүүдийг үүсгэхийн тулд ДНХ-г гидролизэд оруулна.
- Урвалын үр дүнг уншихын тулд фуксин ашиглана.

(a) Тيوبны урвал

(b) Спектрофотометрийн хэмжилт

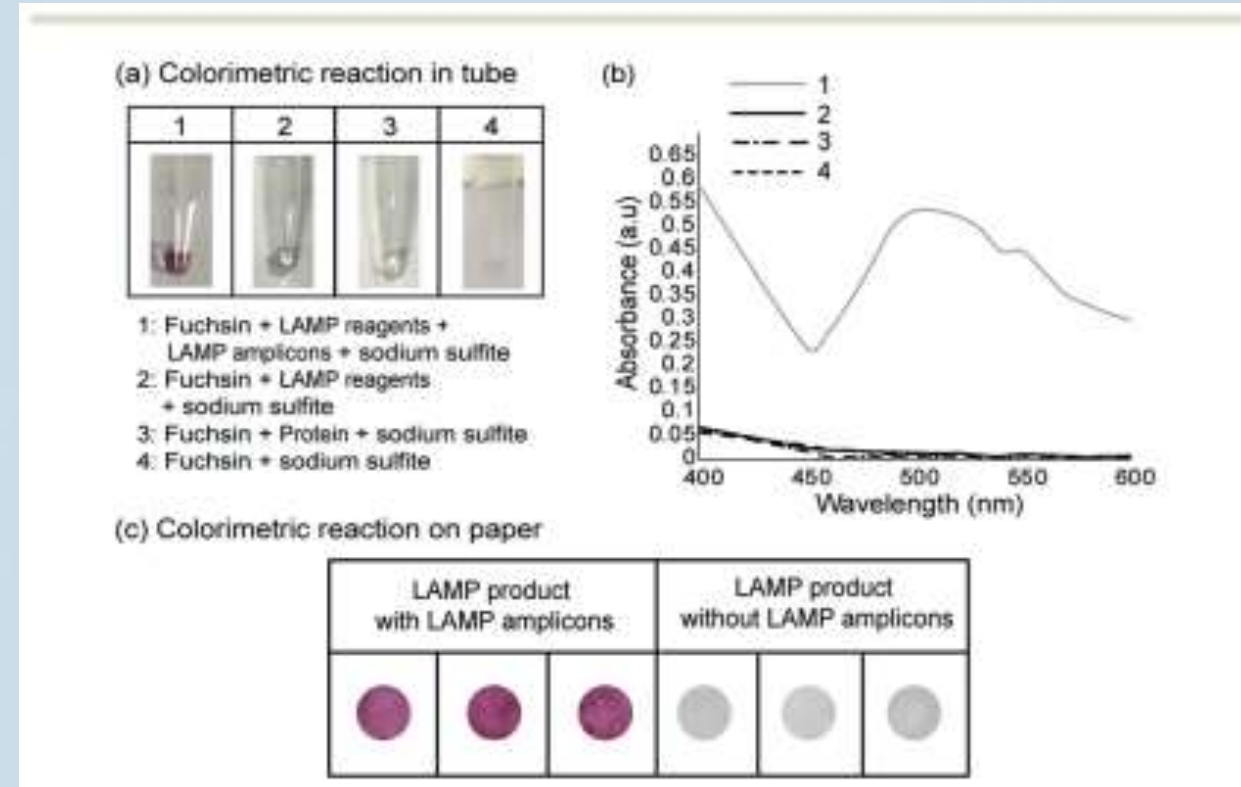
Зөвхөн ДНХ агуулсан урвалын өнгө эрчимтэй хэмжигдсэн ба

1 - ДНХ агуулсан урвалын өнгөний шингээлт 0.55-аас эхлэсэн

2, 3, 4 -ДНХ агуулаагүй урвалын өнгөний шингээлт 0.05-аас эхлэж байна.

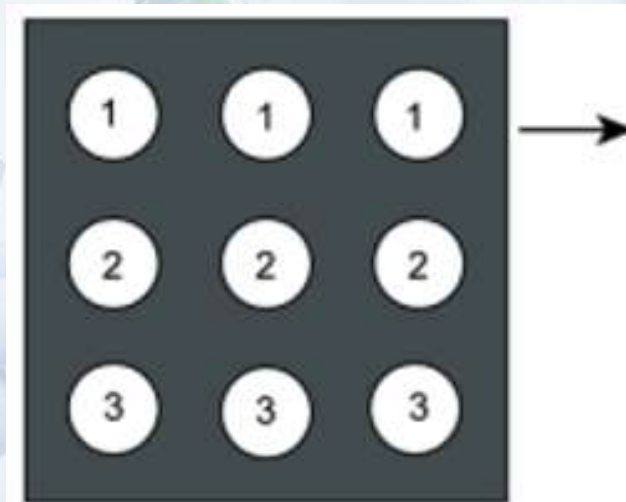
(c) Фуксиноор будсан цаасан дээр илрүүлэх арга

- LAMP бүтээгдэхүүн (бай ДНХ) агуулсан дээжний цаас нил ягаан өнгөтэй.
- Бай ДНХ агуулаагүй LAMP урвалын цаас өнгөгүй болно.



4.2 | Singleplex detection of foodborne pathogens using the foldable microdevice

1. Эерэг хяналт (*Salmonella* spp)
2. Сөрөг хяналт (ус)
3. Дээж (*Salmonella* агуулсан сүү)



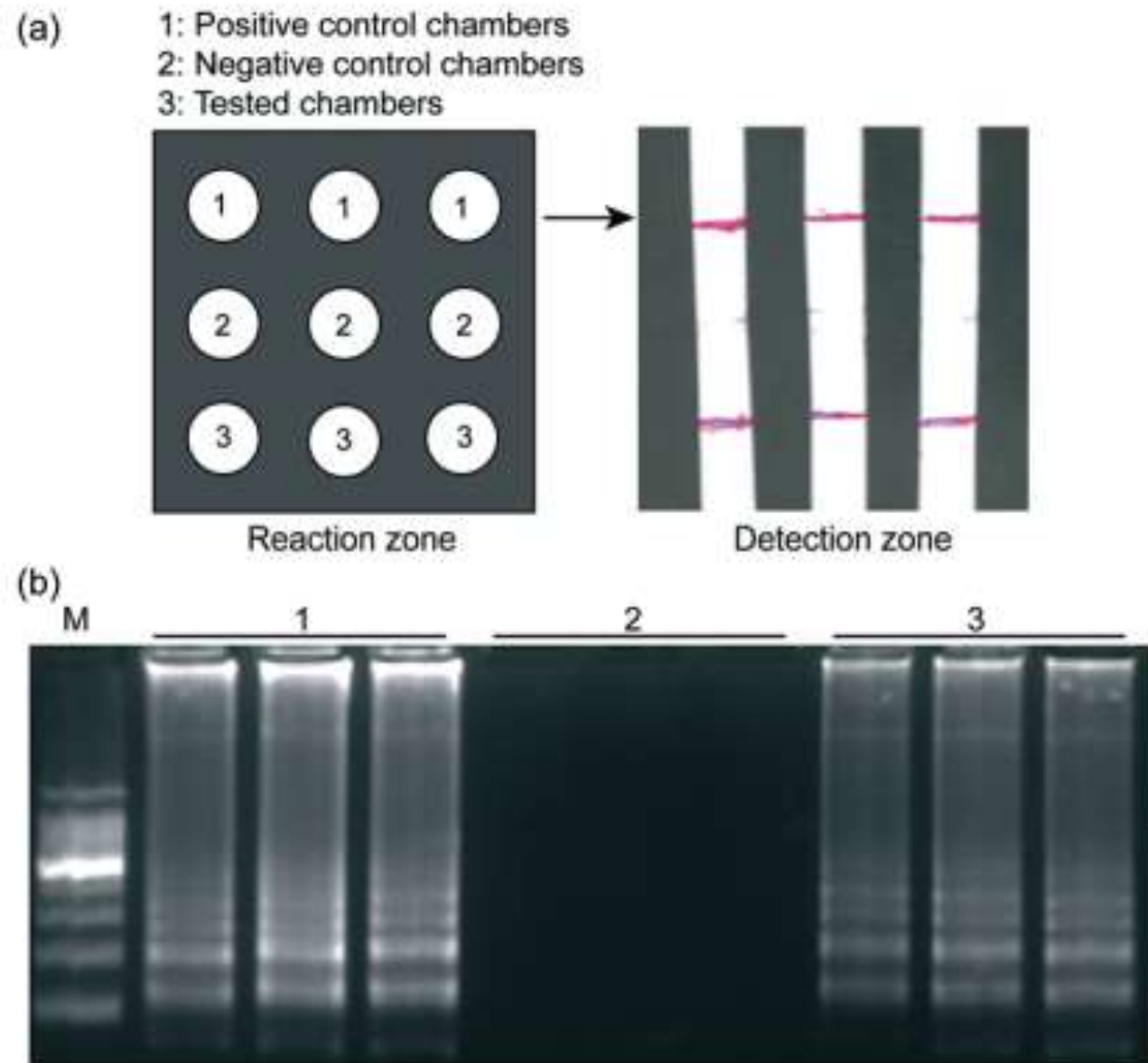
Дээжийн бүс

Эерэг хяналтын шугамууд нь микро төхөөрөмж болон бүх урвалууд зөв ажиллаж байгааг баталгаажуулсан.

Сөрөг хяналтын натрийн сульфит нь фуксиноор будсан шугамыг өнгөгүй болгож хувиргасан.

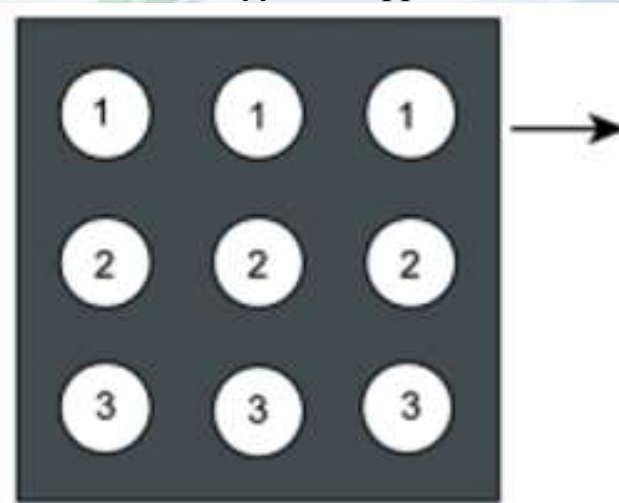
Энэ үр дүн нь бичил төхөөрөмжийг ашиглаг болохыг харуулж байна.

Агароз гель электрофорезийн үр дүнгээр шалгав.



4.3 | Multiplex detection of foodborne pathogens using the foldable microdevice

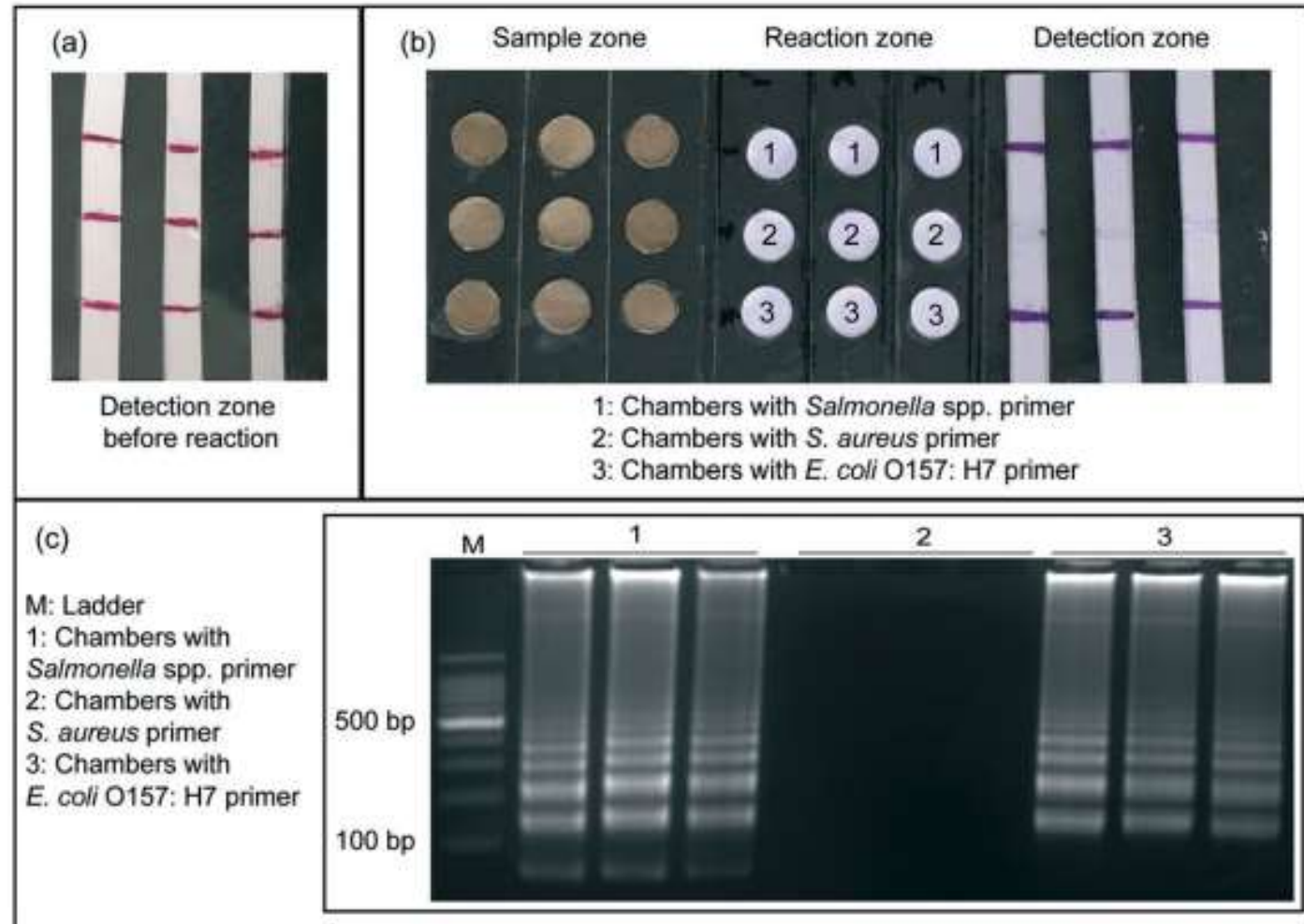
1. *Salmonella* агуулсан сүү
2. Нян агуулаагүй сүү
3. *E. coli* агуулсан сүү



дээжийн бүс

(b)-ээс харахад 1 ба 3 дугаарт будагдсан шугамын өнгө нь нил ягаан өнгөтэй байсан нь хоёр бактерийн зорилтот генийг LAMP урвалаар амжилттай илрүүлсэн байна.

(c)-д агароз гель электрофорезийн үр дүнг харуулав.



(a) урвалын өмнөх илрүүлэх бүсийн зураг,

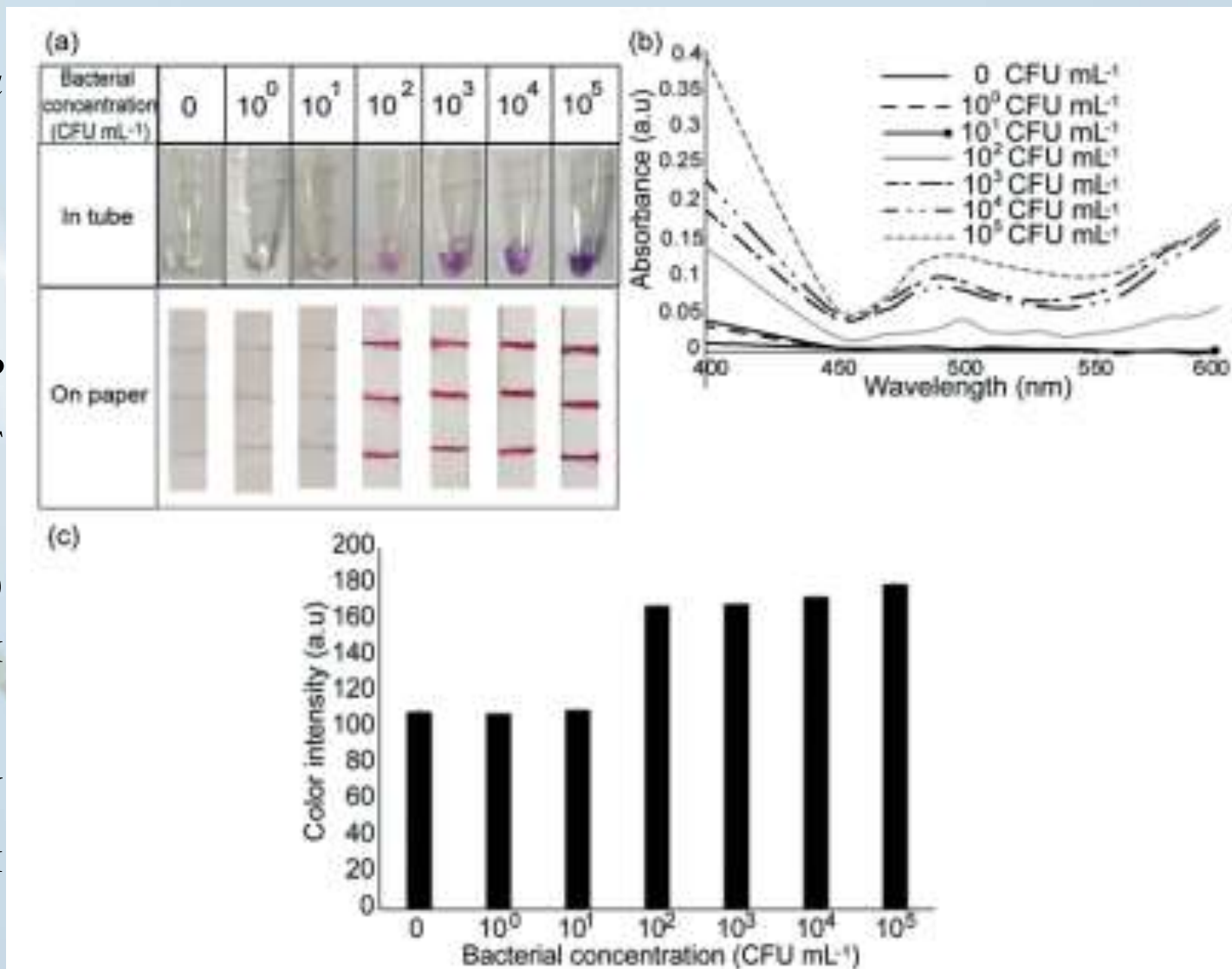
(b) урвалын дараах микро төхөөрөмжийн зураг,

(c) агароз гель электрофорезийн үр дүн.

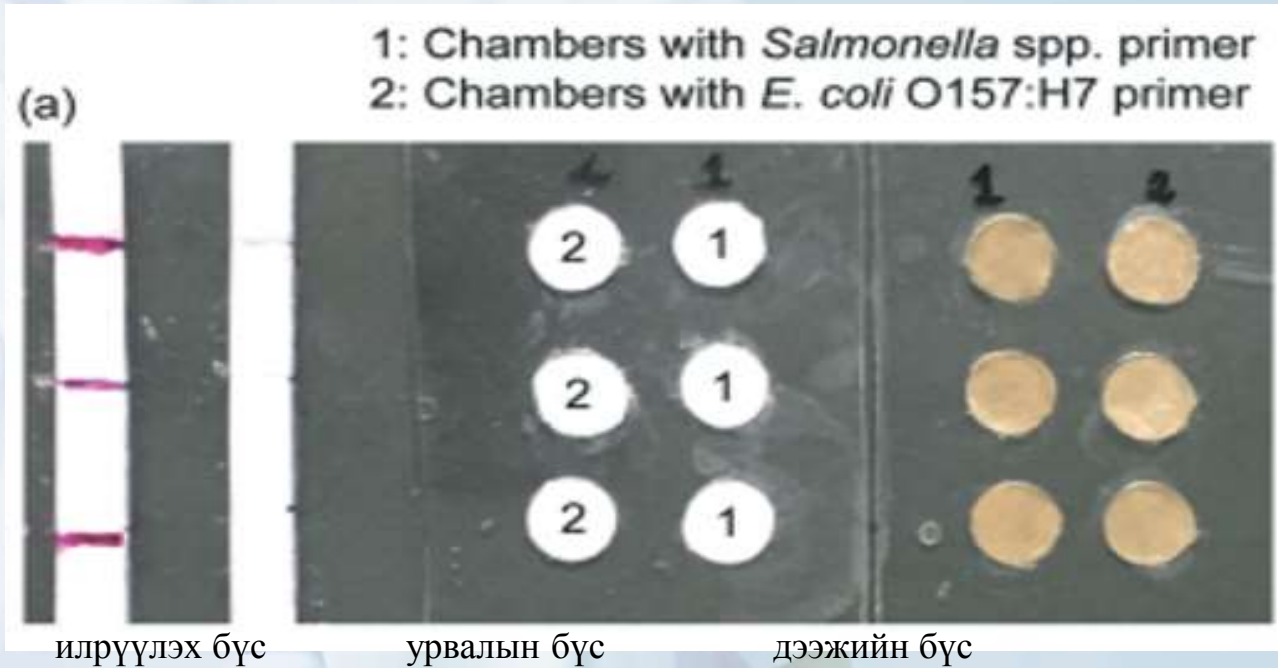
4.4 | Sensitivity of the fuchsin-based detection method

Аргын мэдрэмжийг шалгахдаа *Salmonella spp.*-ийг 10-ийн шингэрүүлэлтээр үнэлэв. Туршилтыг тюб болон цаасан дээр хийсэн

- 10^2 КҮН-ээс ээс их байх үед LAMP урвал амжилттай явагдаж байгааг харуулж байна.
- ага концентрацид (мл тутамд 10^2 CFU) колориметрийн дохио маш хүчтэй хэвээр байв.
- Бактерийн 1 мл тутамд 10^2 - 10^5 CFU хооронд өнгөний эрчим их ялгаагүй болохыг харуулсан.



4.5 | Selective of the foldable microdevice



Урвалын өвөрмөц байдлыг шалгах туршилтад *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 агуулсан сүүний дээжийг 1 мл-т 10^2 CFU концентрацитайгаар сонгон хийсэн.

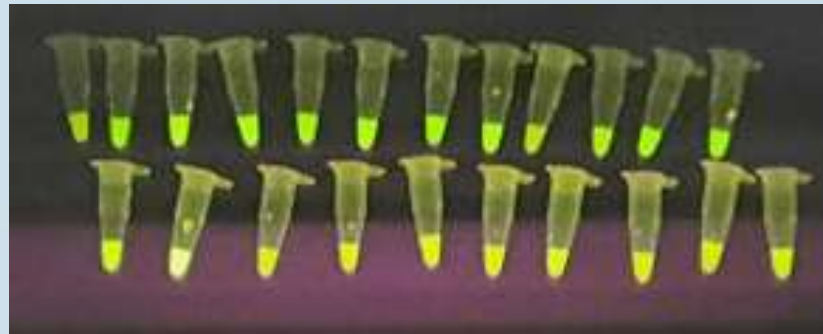
Дээжийн 1 ба 2 эгнээ үүрүүдэд *Salmonella* spp., халдварлуулсан сүү



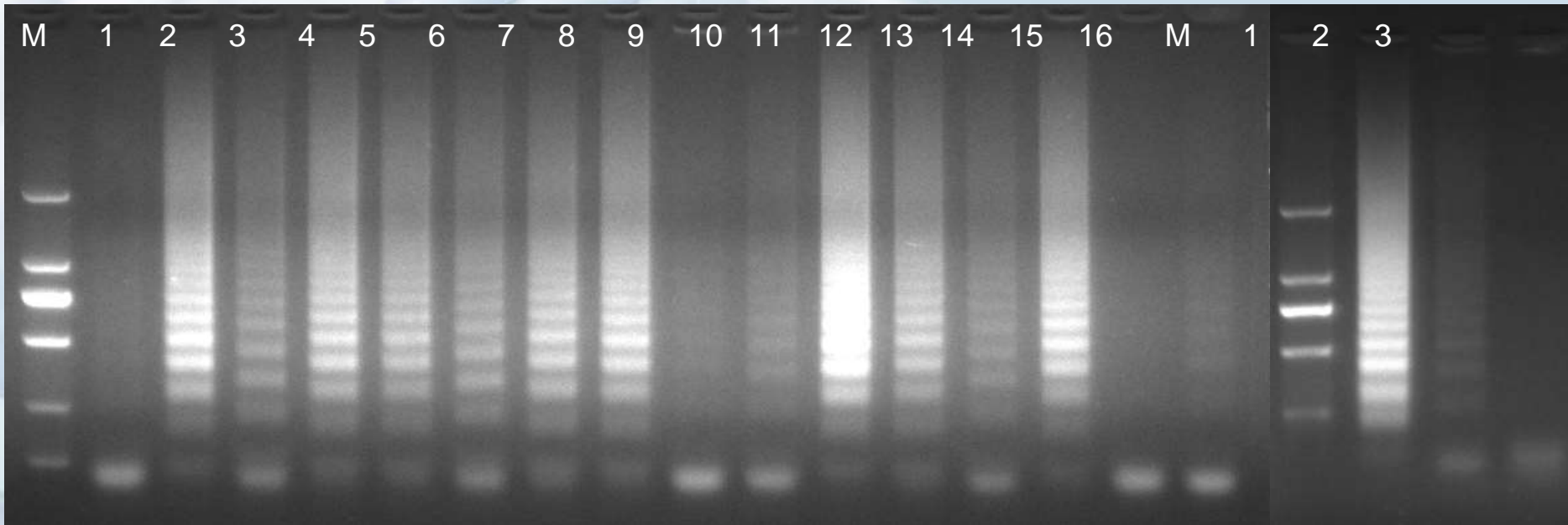
Дээжийн 1 ба 2 эгнээ үүрүүдэд *E. coli* O157 H7-оор халдварлуулсан сүү



LAMP бүтээгдэхүүнийг SYBR Green-ээр будсан байдал



SYBR Green-ээр будсан LAMP-ын бүтээгдэхүүн буюу үр дүнг флюроскоп болон UV лампын гэрэлд харагдах байдал



LAMP бүтээгдэхүүнийг агароз гельд гүйлгэн үр дүнг баталгаажуулсан байдал

- ДНХ-ийн толбыг илрүүлэхэд фуксин ашиглах нь зардал бага, түгээмэл, хэрэглэхэд хялбар, манай оронд нэвтрүүлж, хэрэглэх бүрэн боломжтой;
- Сүүнээс ДНХ ялгах, олшруулалт явуулах, илрүүлэх бичил төхөөрөмжийг туршсанаар уг аргыг мэдрэгтгий, өвөрмөц болохыг баталсан байна;
- ДНХ-ийн изотерм олшруулалт бүхий энэ арга нь хүнсний зах, мах боволсруулах үйлдвэр, сумын мал эмнэлгийн анхан шатны лабораториуд ашиглах боломжтой.