

БИОНАГААХ УХААН**ШИГА ТОКСИН ЯЛГАРУУЛАГЧ ESCHERICHIA COLI-ИЙГ ЯЛГАН ДҮЙХ ПГУ
БОЛОН LAMP АРГАЧЛАЛЫГ ХАРЬЦУУЛСАН ДҮН**

Нямтуяа Н.¹, Сарантуяа Ж.¹, Амгаланзаяа Д.², Мөнхдэлгэр Я.¹

¹АШУУИС, БАС, Молекул биологи Удамзүйн тэнхим

²"Этүгэн" АУИС

Цахим шуудан: tuyatuyakana@gmail.com

Abstract**A COMPARISON OF PCR AND LAMP METHODS FOR DETECTING SHIGA
TOXIN PRODUCING ESCHERICHIA COLI**

Nyamtuya N.¹, Sarantuya J.¹ Amgalanzaya D.², Munkhdelger Ya.¹

¹MNUMS, School of Biomedicine, Department of Molecular biology and Genetics

²Etugen University,

E-mail: tuyatuyakana@gmail.com

Introduction

PCR to detect and amplify the virulence genes of STEC is specific and more sensitive, however, it takes five to six hours for whole test procedure and requires special lab instruments such as thermocycler. Loop-mediated isothermal amplification is a simple, rapid, specific and cost-effective nucleic acid amplification method by using four to six primers when compared to PCR, nucleic acid sequence-based amplification, self-sustained sequence replication and strand displacement amplification.

Goal

Detection and comparison of STEC by PCR and LAMP

Materials and Methods

In our study, we analyzed comparison of PCR and LAMP results on standard strain used quality control strain solution which diluted 1pg/ μ L DNA, 10 pg/ μ L DNA, 100 pg/ μ L DNA, 1 ng/ μ L DNA, 10 ng/ μ L DNA, and 100 ng/ μ L DNA concentration from LB agar cultures.

Research ethics

Permission to submit the survey was granted by the Ethics Review Committee of the MNUMS and the survey was conducted in accordance with the rules and regulations.

Result

Sensitivity of Stx1 and stx2 genes in PCR results are positive in 10 pg/ μ L DNA solution and negative in 1pg/ μ L DNA. In LAMP test results showed that positive for all concentration. It shows that LAMP method sensitivity is 10 times more than PCR.

Conclusion:

It shows that LAMP method sensitivity is 10 times more than PCR. All in all LAMP test is cost effective test with sensitive for detection STEC.

Keywords: gel electrophoresis, LAMP, PCR, STEC, stx1, stx2

Pp. 3-6 , Pictures 3, References 16

Үндэслэл

Дэлхий дахинд хоол хүнсээр дамжих бактерийн халдвар эрчимтэй нэмэгдсээр байна. Дэлхийн Эрүүл Мэндийн Байгууллага (ДЭМБ)-ын мэдээгээр хоол хүнсээр дамжих өвчинд 10 хүн тутмын 1 нь өртөж, эмгэгтөрөгч бактериар бохирлогдсон хоол хүнс хэрэглэсний улмаас жил бүр 420 сая хүн (230 сая нь 5 хүртэлх насны хүүхэд) суулгалтаар өвчилж байна [1]. АНУ-д жил бүр 76 сая хүн хоол хүнсээр дамжих халдвараар өвчилдөг бөгөөд тэдгээрийн 270000 орчим тохиолдол нь суулгалт үүсгэгч *Escherichia coli* (DEC)-ийн шалтгаантай байдаг [2]. *E.coli*-ийн шалтгаант хоолны хордлогын үед нарийн, бүдүүн гэдэсний үрэвсэл, цөсний замын халдвар, мухар олгойн үрэвсэл, элэгний буглаа зэрэг ходоод гэдэсний замын олон төрлийн эмгэг үүсдэг [3, 4]. STEC-ийн хоруу чанарын генийг олшруулан илрүүлэх ПГУ-ын арга нь өвөрмөц, мэдрэг чанар сайтай боловч оношлогоонд 5-6 цаг зарцуулахаас гадна заавал тусгай термоциклер, тоног төхөөрөмж шаарддаг [5]. LAMP олшруулалт нь *bst* полимеразыг ашиглан ПГУ-аас ялгаатай нь 4 юмуу 6 праймер ашиглан бай генийг олшруулдаг, тогтмол температурт явагддаг, нэг шаттай, их хэмжээний бүтээгдэхүүн үүсгэдэг илүү өвөрмөц, хурдан бөгөөд энгийн арга юм [6]. Дотор праймер (FIP, VIP) тус бүр нь бай генийн 2 өвөрмөц дараалалд хамжаа, үндсэн гогцоо үүсэхэд туслах дарааллыг агуулдаг. Гадна праймер нь зөвхөн циклийн бус үе шатанд гинжийг нийлэгжүүлэх үүрэг гүйцэтгэдэг бол бай генийн бүсүүдтэй хамжаа дараалал бүхий гогцоо праймер нэмэлтээр ашигласнаар олшруулах урвалыг илүү хурдасгадаг [7, 8]. Гельд гүйлгэсэний дараа гарсан үр дүнг этидиум бромид, SYBR green гэх мэт флюоресценц будагч бодис ашиглан хэт ягаан туяаны үүсгүүрт харах эсвэл өнгөний өөрчлөлтөөр нүдээр харж дүгнэх боломжтой. LAMP олшруулалтын аргачлал нь генетикийн шинжилгээ, халдварт өвчний оношлогоо, хоол хүнсний эрүүл ахуй, орчны шинжилгээ зэрэгт өргөн хүрээнд ашиглах бүрэн боломжтой [9].

Зорилго

STEC-ийг ПГУ болон LAMP-аргачлалаар илрүүлэн, харьцуулан үнэлэх

Судалгааны материал, арга зүй

Бид судалгаандаа Кагошимагийн Их Сургуулийн судалгааны лабораторид ялган дүйсэн *Stx1*, *Stx2* эерэг STEC-ийн лавлагаа омгийг ашиглалаа. Лавлагаа омгийг LB агарт өсгөвөрлөн [10] өсгөвөрөөс ДНХ ялгалаа [5]. ДНХ-ийн гарцыг

нанодропоор хэмжин 1пг/мкл ДНХ, 10пг/мкл ДНХ, 100пг/мкл ДНХ, 1нпг/мкл ДНХ, 10нпг/мкл ДНХ, 100нпг/мкл концентрацитай ДНХ уусмал бэлтгэлээ. Эдгээр ялгаатай концентрацитай ДНХ уусмалд ПГУ болон LAMP аргачлалаар STEC-ийг илрүүлэн илрүүлэх чадамжийг харьцуулан үнэлэв.

STEC-ийг ПГУ-аар илрүүлэх: STEC-ийн шига токсин кодлогч *stx1* (348 х.н), *stx2* (584 х.н) генүүдийг өвөрмөц праймер (*stx1* F:CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG, R:CACCAGACAATGTAACCGCTG, *stx2* F:ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG, R:GCGTCATCGTATACACAGGAGC) ашиглан ПГУ-аар олшруулж, илрүүлээ. [11] ПГУ-ыг эхлэлийн денатураци 94 хэмд 3 минут, Денатураци 94 хэмд 30 сек, Праймер холбогдох 62 хэмд 40 сек, Уртсах 72 хэмд 1 минутаар 31 цикл явагдсаны дараа 72 хэмд 7 минут байх нөхцлөөр явуулаа [12, 13]. Олширсон бүтээгдэхүүнийг 1.5%-ийн агарозын гелээр 100 вольтод 35 минут гүйлгэж этидиум бромидоор 20 минут будаж илрүүлэв [11].

Шига токсин ялгаруулагч *E.coli* (STEC)-ийг LAMP аргачлалаар илрүүлэх: LAMP урвалжийн холимгийг 5 M бетайн, 14ThermoPol буфер уусмал, 6 mM MgSO₄, 1.2 mM де олигонуклеозид трифосфат, 10 U/μL Bst DNA полимераз, F3/B3 праймер 0.1 μM, FIP/BIP праймер 1.8 μM, LF/LB праймер 1 μM, 2мкл ДНХ байхаар тооцож нийт 25 мкл холимог бэлтгэв. [5] Бэлтгэсэн холимгийг 65°C хэмд 1 цаг инкубацлан олшруулсаны дараа 80°C хэмд 5 минут байлгаж урвалыг зогсоон, олширсон бүтээгдэхүүнд Sybr green будагч нэмж нүдээр болон хэт ягаан туяаны үүсгэвэрт харж мөн гель электрофорезийн аргаар илрүүлээ [14].

Судалгааны ёс зүй

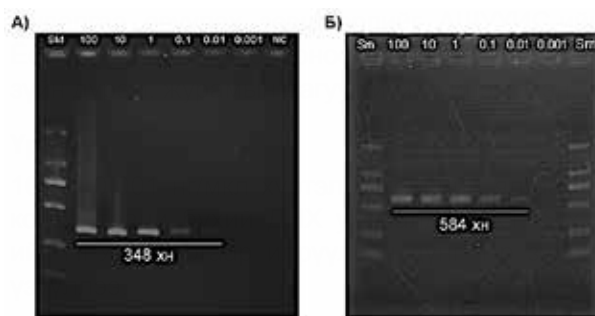


Figure 1. Mapping of PCR results of STEC toxin encoders *stx1* (A), *stx2* (B), genes detected in DNA solutions at different concentrations. Sm determinant, DNA in columns 2 - 7 at a concentration of 100 - 0.001 ng/μl

ПГУ-аар *stx1* генийн 348 х.н урттай бүтээгдэхүүн болон *stx2* генийн 584 х.н урттай бүтээгдэхүүн аль аль нь 100нг/мкл концентрацитайгаас 10пг/мкл болтол шингэрүүлсэн ДНХ уусмалд олширч илэрлээ. Харин 1 пг/мкл концентрацитай ДНХ уусмалд *stx1*, *stx2* генийн бүтээгдэхүүн илэрсэнгүй.

Ялгаатай концентрацитай ДНХ уусмалд *stx2* генийг LAMP аргачлалаар олшруулан хэт ягаан туяаныүүсгэвэртбайршуулан, өнгөнийялгарлаар дүгнэхэд 100нг/мкл концентрацитайгаас 1пг/мкл болтол шингэрүүлсэн ДНХ уусмалд эерэг тодорхойлогдлоо. Ялгаатай концентрацитай ДНХ уусмалаас олшруулсан LAMP урвалын бүтээгдэхүүнийг хэт ягаан туяаны үүсгэвэрт харж үнэлэхэд ДНХ-ийн гарц 100нг/мкл концентрацитай үед илүү тод ногоон өнгөөр ялгарч, ДНХ-ийн концентраци буурах тусам өнгөний ялгарал бага багаар буурч байсан ба 1пг/мкл болтол шингэрсэн ДНХ уусмалд ч

нүдэнд илт харагдахуйц өнгө өгч байлаа (Зураг 2).

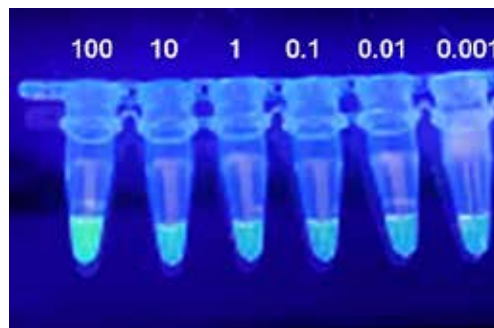


Figure 2. UV detection of the STEC *stx2* gene amplified by LAMP

LAMP аргачлалаар олшруулсан үр дүнг

баталгаажуулан агарозын гелд гүйлгэн, этидиум бромидоор будаж илрүүлсэн дүнг 3-р зурагт нэгтгэлээ.

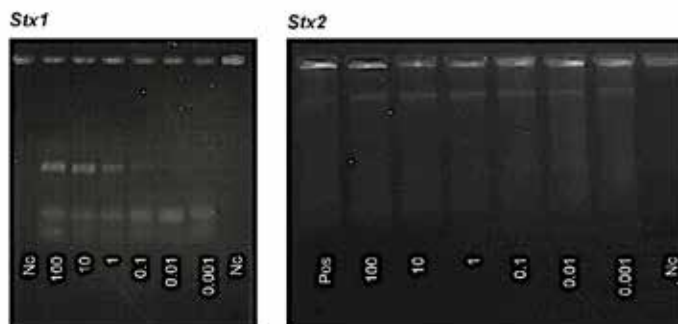


Figure 3. STEC-shiga toxin encoder *stx1* and *stx2* genes detected by LAMP DNA solution at different concentrations

Nc - negative control, pos - positive control, DNA in columns 2 - 7 with a concentration of 100 - 0.001 ng/μl

LAMP аргачлалаар 100нг/мкл концентрацитайгаас 1пг/мкл болтол шингэрүүлсэн бүх шингэрүүлэлтийн хувьд эерэг үр дүн өгч ПГУ-тай харьцуулахад 10 дахин мэдрэг байна.

Хэлцэмж

1998 онд Японы Eiken Chemical Co., Ltd хэмээх компани ПГУ-аас үүдэлтэй тодорхой бэрхшээлүүдийг арилгасан тогтмол хэмт гоцроо олшруулалт (LAMP) аргыг зохион бүтээжээ [16]. LAMP аргыг 2000 онд Японы судлаач Tsuginori Notomi нуклейн хүчлийг Bst ДНХ полимераза ферментийг ашиглан тогтмол температурт

явагддаг ДНХ-ийн гинжийг автоматаар солих урвалд суурилсан LAMP аргыг туршиж, нуклейн хүчлийг олшруулах аргачлалд суурилсан бүх шинжлэх ухааны салбар, ялангуяа генетикийн шинжилгээнд мутаци, нэг нуклеотидын полиморфизм илрүүлэх мөн халдварт өвчний оношлогоо, хоол хүнсний эрүүл ахуй, орчны шинжилгээ зэрэгт өвчин үүсгэгч вирус, бактери, шимэгчийг илрүүлэх өндөр ач холбогдолтой шинэлэг аргачлал болохыг судалгаагаараа нотолжээ [8]. 2020 онд Laura E. Lamb нар бхПГУ болон LAMP аргыг харьцуулан үнэлжээ. Судалгааны дүнгээр шинжилгээгээр эерэг сорьц 100%-д N = 6/6 LAMP эерэг, ПГУ-ын сорьцны 83%-д N = 5/6 бхПГУ эерэг байв. Судлаачид бохирдол, техник алдаа зэрэг хуурамч эерэг хариу гарсан байх боломжуудыг дахин шалгаж, хэд дахин туршиж үр дүнг баталгаажуулахад эерэг үр дүн хэвээр байжээ. Мөн ПГУ-аар сөрөг

гарсан дээжүүдийн нэг нь LAMP аргаар эерэг байлаа. Уг судалгаагаар LAMP аргыг ПГУ-аас илүү мэдрэг чанар өндөртэй байж магадгүй юм гэж дүгнэжээ [15].

Дүгнэлт: LAMP шинжилгээг STEC-ийг илрүүлэхэд ашиглах бүрэн боломжтой, илрүүлэх чадамж ПГУ-ын шинжилгээнээс 10 дахин өндөр байна.

Ном зүй

- Zhao C, Ge B, De Villena J, et al. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area. *Applied and environmental microbiology*. Dec 2001;67(12):5431-5436.
- Taylor EV, Nguyen TA, Machesky KD, et al. Multistate outbreak of *Escherichia coli* O145 infections associated with romaine lettuce consumption, 2010. *Journal of food protection*. Jun 2013;76(6):939-944.
- Дэшиймаа Л, Батхүү П, Гэлэгжамц Х. *Escherichia coli* (EcoH) -ийн халдвар 2006;
- МУУСХ. Хүнсний аюулгүй байдлын статистикийн үзүүлэлтүүд 2018. 2019.
- Wang F, Jiang L, Ge B. Loop-mediated isothermal amplification assays for detecting shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and human stools. *Journal of clinical microbiology*. Jan 2012;50(1):91-7. doi:10.1128/jcm.05612-11
- Yano A, Ishimaru R, Hujikata R. Rapid and sensitive detection of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes of enterotoxigenic *Escherichia coli* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Journal of microbiological methods*. Feb 2007;68(2):414-20. doi:10.1016/j.mimet.2006.09.024
- Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*. Jun 2002;16(3):223-9. doi:10.1006/mcpr.2002.0415
- Я.Мөнхдэлгэр ВХ. Тогтмол хэмт гогцоо олшруулалтын арга (LAMP) ба SARS-CoV-2 вирусийн оношлогоо. АШУУИС; 2021.
- Gould LH, Vopp C, Strockbine N, et al. Recommendations for diagnosis of shiga toxin--producing *Escherichia coli* infections by clinical laboratories. *MMWR Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports*. Oct 16 2009;58(Rr-12):1-14.
- Shakerian A, Rahimi E, Emad P. Vegetables and Restaurant Salads as a Reservoir for Shiga Toxigenic *Escherichia coli*: Distribution of Virulence Factors, O-Serogroups, and Antibiotic Resistance Properties. *Journal of food protection*. Jul 2016;79(7):1154-60. doi:10.4315/0362-028x.jfp-15-517
- George DF, Gbedema SY, Agyare C, et al. Antibiotic Resistance Patterns of *Escherichia coli* Isolates from Hospitals in Kumasi, Ghana. *ISRN microbiology*. 2012;2012:658470. doi:10.5402/2012/658470
- Vidal M, Kruger E, Duran C, et al. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *Journal of clinical microbiology*. Oct 2005;43(10):5362-5. doi:10.1128/jcm.43.10.5362-5365.2005
- Sarantuya J, Nishi J, Wakimoto N, et al. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. *Journal of clinical microbiology*. Jan 2004;42(1):133-9.
- Yan M, Xu L, Jiang H, Zhou Z, Zhou S, Zhang L. PMA-LAMP for rapid detection of *Escherichia coli* and shiga toxins from viable but non-culturable state. *Microbial pathogenesis*. Apr 2017;105:245-250. doi:10.1016/j.micpath.2017.02.001
- Lamb LE, Bartolone SN. Rapid detection of novel coronavirus/Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. 2020;15(6):e0234682. doi:10.1371/journal.pone.0234682.
- Soroka M, Wasowicz B. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR? Jul 29 2021;10(8).

*Танилцаж, нийтлэх санал өгсөн:
Анагаах ухааны доктор Д.Алтанцэцэг*