



ХАЛДВАРТ ӨВЧИН СУДЛАЛЫН
ҮНДЭСНИЙ ТӨВ



Томуу, SARS-CoV-2, RSV вирусийн ген илрүүлэх бх-ПГУ-ын шинжилгээний зарчим, аргачилал

АУ-ы магистр Н.Баясгалан



ПГУ гэж юу вэ?

- Амьд организм бүр дезоксирибонуклейн хүчил (ДНХ) болон рибонуклейн хүчил (РНХ) агуулдаг.
- Шинжлэгдэхүүнд байгаа ДНХ эсвэл РНХ-ийг өвөрмөц урвалж, ферментийн тусламжтайгаар олируулан илрүүлдэг молекул биологийн өндөр мэдрэг шинжилгээний аргыг **полимеразийн гинжин урвал (ПГУ)** буюу англиар **Polymerase Chain Reaction (PCR)** гэж нэрлэдэг.



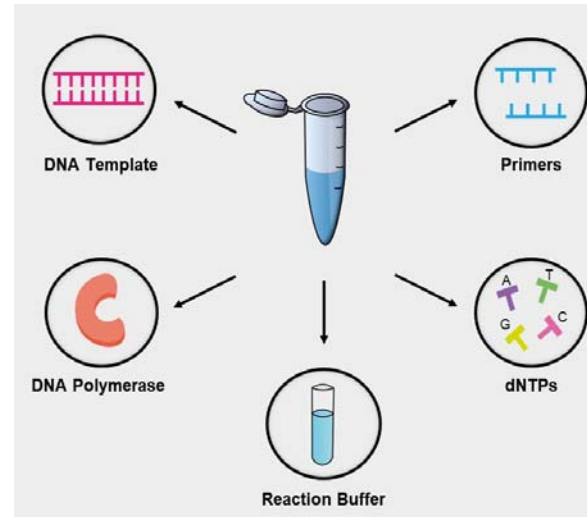
Kary Mullis
1993 онд
Нобел шагнал
хүртсэн



ПГУ-ын хэрэглэгдэхүүн Урвалж, оношлуурын найрлага



1. Олшируулах гэж байгаа ДНХ-гийн хэсэг./Нус, шүлс, цэр, цус, сийвэн, арьс, үс, ХЗА, эд, вирус, нян, мөөг, бичил биетэн/
2. Праймерууд 20-40 нуклеотидын урттай ДНХ-ын богино хэсгүүд 5' ба 3'
3. Таq-полимераза-г *Thermus aquaticus* нянгаас гаргаж авсан. Нийлэгжилтийг өдөөгч юм. 0.5-2.0 нэгж (1.25 нэгж)
4. Нийлэгжилтэнд шаардлагатай. dNTP's A, T, C, G 20-200µl (50µl)
5. Кофактор ба буфер: Магни(Mg²⁺)0,5-5,0мМ, Кали (K⁺) 35-100мМ, Tris/HCl pH-8.4
6. PHX –д Reverse Transcriptase



ПГУ-ын хэрэглэгдэхүүн • Урвалж, оншилуурын найрлага



Additive	Effect	Recommended Concentration
Betaine	Enhances stringency by reducing secondary structure. Recommended for GC rich (GC > 60%) DNA sequences.	1.0-1.7M
DTT (DTT)	Stabilizes enzymatic activity and enhances PCR efficiency.	1.5mM
DMSO	Denaturant. Enhances amplification of GC rich templates. Lowers T _m . Reduces secondary structure.	2-10%
BSA (A-420)	Counteracts phenolic compounds and polysaccharides to prevent polymerase inactivation.	0.1-0.8µg/µl
Formamide	Destabilizes the double-helix. Lowers T _m and increases primer annealing stringency. Enhances amplification of GC rich templates.	1.25-10%
1,2-Propanediol	Co-solvent that destabilizes DNA resulting in a lower T _m . Enhances amplification of GC rich templates.	0.8M
Tetramethylammonium chloride (TMAC)	Enhances hybridization specificity and increases T _m . Eliminates nonspecific priming and potential DNA-RNA mismatch.	15-100mM
7-deaza-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate (dC ⁺ GTP)	Destabilizes secondary structures enhancing amplification of GC rich templates.	3:1 dC ⁺ GTP:dGTP ratio
Glycerol	Enhances PCR efficiency at high temperatures by reducing secondary structures. Improves thermal stability of DNA polymerases. Recommended for GC rich templates.	1-10%
T4 gene 32 protein (T-416)	Enhances PCR yield and decreases inhibition.	20-150 µg/ml



ПГУ-ын хэрэглэгдэхүүн

• Праймер, проб хэрэглээ



	Standard PCR	Multiplex PCR	One-step RT-PCR
Хэмжээ С%	18–30nmol	21–30 nmol	18–30 nmol
GC харьцаа	40–60%	40–60%	40–60%
T_m мэдээлэл	T_m бодолтоос хамаарна.	T_m бодолтоос хамаарна. Хамгийн оновчтой нь (60–88°C) хооронд байрлах	T_m бодолтоос хамаарна. Хамгийн оновчтой нь (60–88°C) хооронд байрлах reverse transcription (50°C)-с бага байж болохгүй.

• T_m бодолт: $2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})$



ПГУ-ын хэрэглэгдэхүүн

• Праймер, проб хэрэглээ



ПГУ-ын праймерыг зохион бүтээхдээ дараахь зүйлийг анхаарч үзэх хэрэгтэй бөгөөд энэ нь бүх төрлийн ПГУ-д нийтлэг байдаг.

1. T_m бодолт: $2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C})$
2. Праймерын 3' төгсгөлд байрлах 2-3 аминхүчлийн холбогдлолыг баттай байлгах
3. Праймерын 3' төгсгөлд 3 ба түүнээс дээш С эсвэл G-ийг байлгахгүй.
4. Праймерын дараалал нь өвөрмөц эсэхийг шалгаарай.
5. Праймер бүр 0.1-1.0 мкм концентрацийг ашиглана.
6. Олон хэрэглээний хувьд праймерын концентраци 0.2 μM хангалттай байх болно

Хуурайшуулсан праймерыг бага хэмжээний нэрмэл ус эсвэл TE-д уусгаж, уусмалыг бэлтгэх хэрэгтэй. Дахин гэсгээх, хөлдөөхгүйн тулд **10 пмоль/мкл** агуулсан ажлын уусмалын жижиг хэсгүүдийг бэлтгэ. Бүх праймерын уусмалыг -20 хэмд хадгална.



ПГУ-ын хэрэглэгдэхүүн

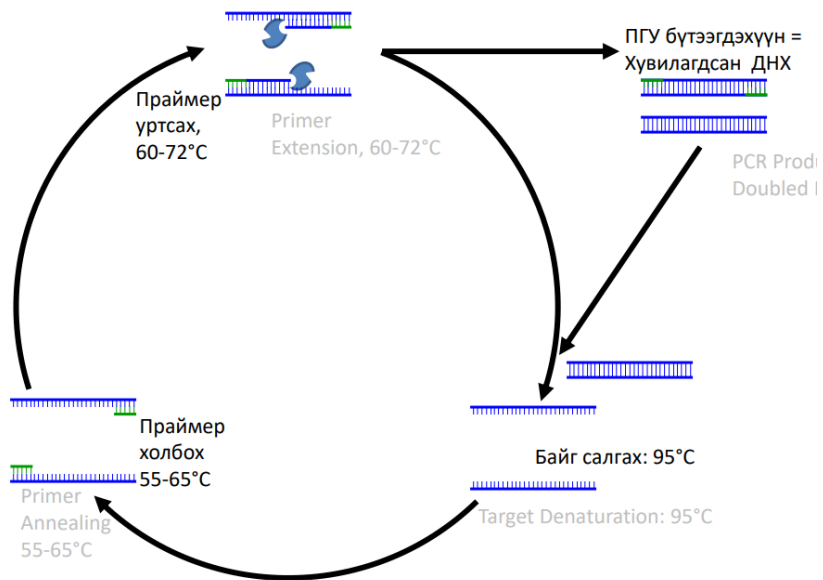


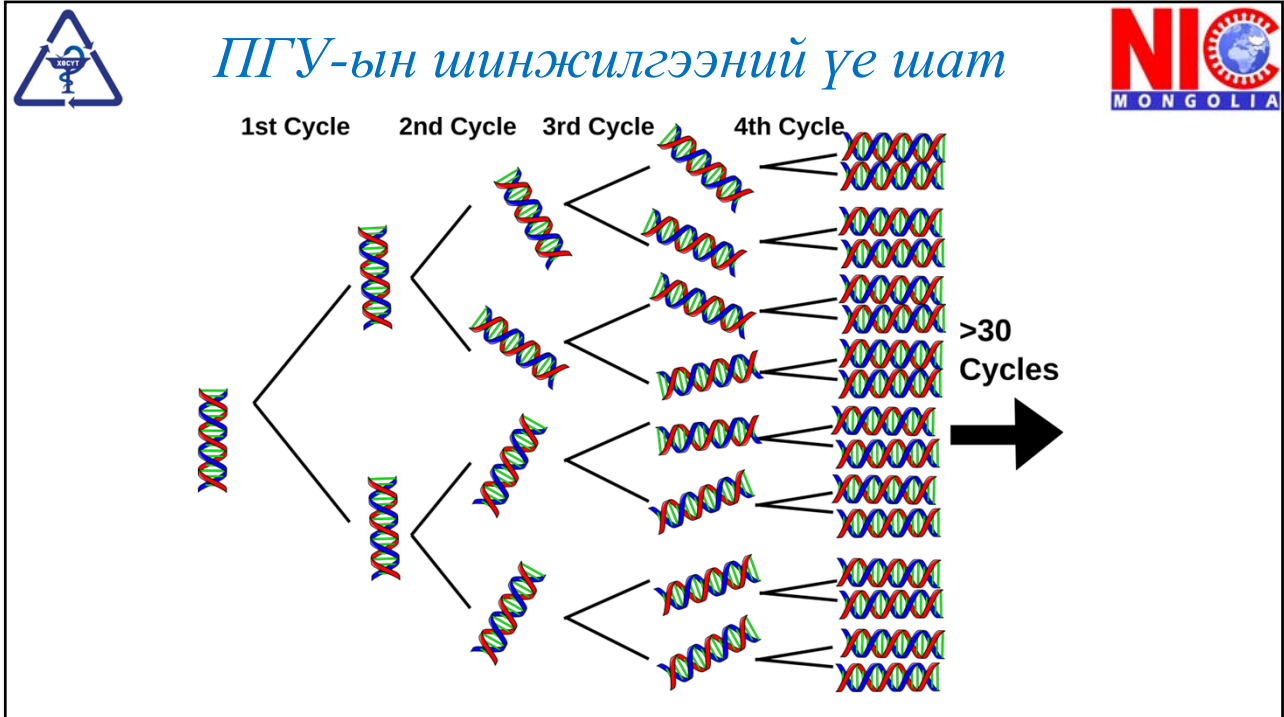
- Багаж, тоног төхөөрөмж

1.



ПГУ-ын шинжилгээний үе шат





ПГУ-ын хэрэглэгдэхүүн

- Багаж, тоног төхөөрөмж

2.

3.

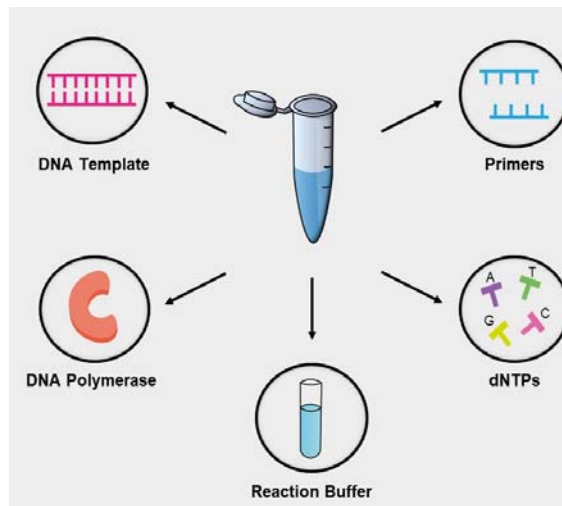
Length of DNA fragment (base pairs)	Marker	Sample A	Sample B	Sample C
1,000 bp	Band	Band	Band	Band
900 bp	Band	Band		
800 bp	Band		Band	
700 bp	Band	Band		
600 bp	Band			Band
500 bp	Band	Band		Band
400 bp	Band			
300 bp	Band		Band	
200 bp	Band			Band
100 bp	Band			



БХ-ПГУ-ын хэрэглэгдэхүүн



1. Олшируулах гэж байгаа ДНХ-гийн хэсэг./Нус, шүлс, цэр, цус, сийвэн, арьс, ус, ХЗА, эд, вирус, нян, мөөг, бичил биетэн/
2. Праймерууд 20-40 нуклеотидын урттай ДНХ-ын богино хэсгүүд 5' ба 3', Проб
3. Таq-полимераза-г *Thermus aquaticus* нянгаас гаргаж авсан. Нийлэгжилтийг өдөөгч юм. 0.5-2.0 нэгж (1.25 нэгж)
4. Нийлэгжилтэнд шаардлагатай. dNTP's A, T, C, G 20-200μl (50μl)
5. Кофактор ба буфер: Магни(Mg²⁺)0,5-5,0мМ, Кали (K⁺) 35-100мМ, Tris/HCl pH-8.4
6. PHX –д Reverse Transcriptase




БХ-ПГУ-ын хэрэглэгдэхүүн



- Багаж, тоног төхөөрөмж




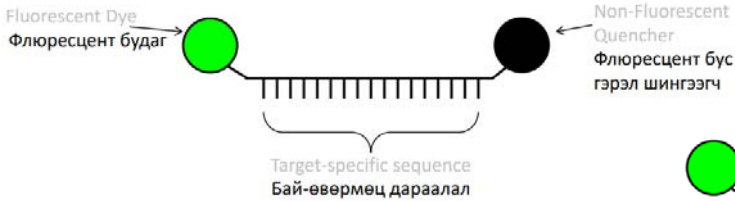


БХ-ПГУ-ын хэрэглэгдэхүүн

• Проб гэж юу вэ?

Real-Time Chemistries: TaqMan Probes






Fluorescent Dye
Флюоресцент будаг

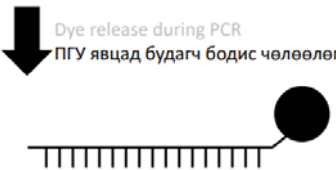
Non-Fluorescent Quencher
Флюоресцент бүс гэрэл шингээгч


Target-specific sequence
Бай-өөрмөц дараалал

If Dye + Quencher are on the same molecule:
No light detected by the machine.
Хэрэв будагч бодис + гэрэл шингээгч хэсэг 1 молекул дээр байгаа тохиолдолд
Машинд Гэрэл танигдахгүй.




↓ Dye release during PCR
ПГУ явцад будагч бодис чөлөөлөгдөнө.



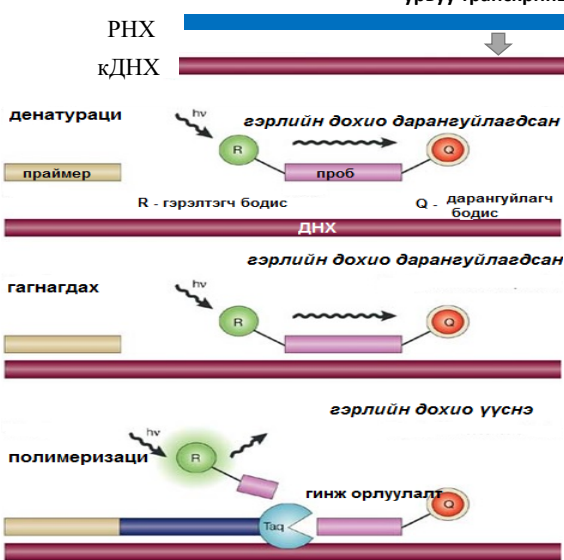


БхУТ-ПГУ-ын ерөнхий зарчим



урвуу транскрипц

РНХ
кДНХ



денатураци

гагнагдах

полимеризаци

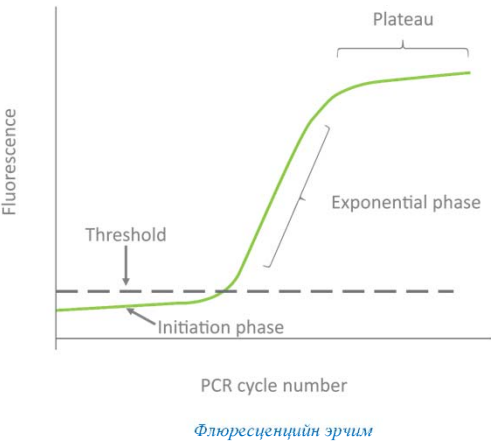
R - гэрэлтэгч бодис

Q - дарангуйлагч бодис

проб

гинж орлуулалт

Taq



Fluorescence

PCR cycle number

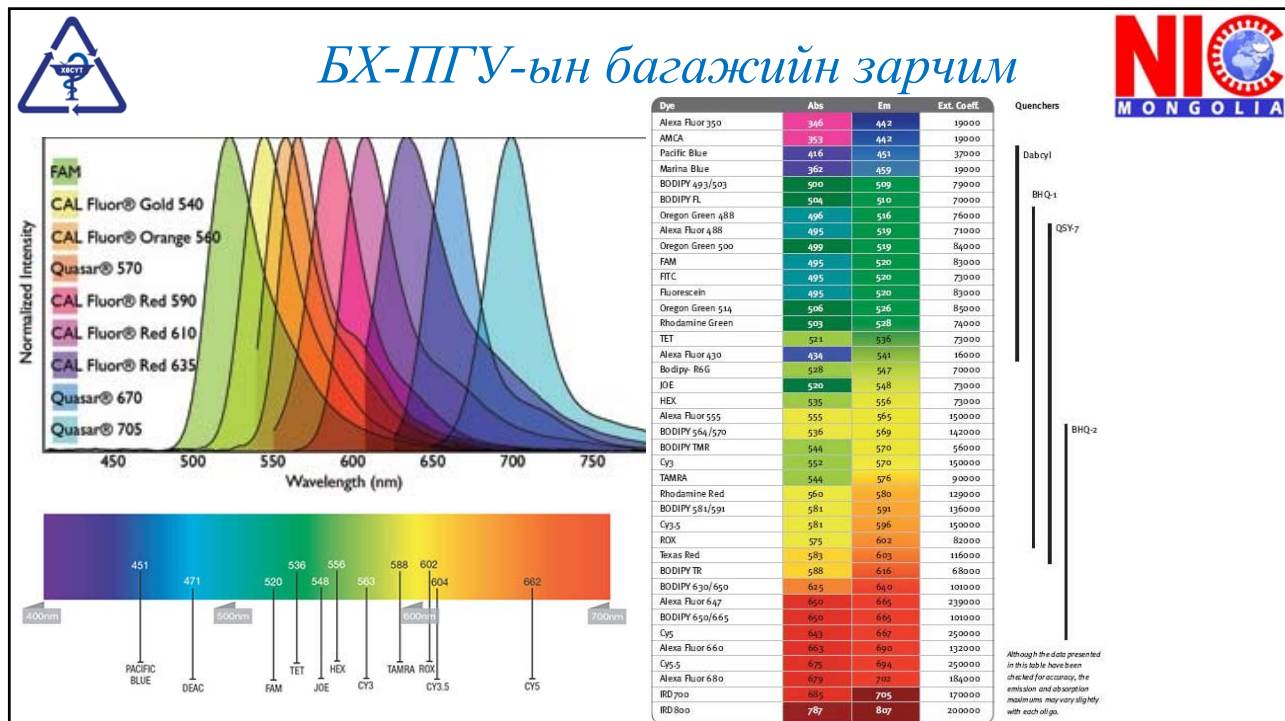
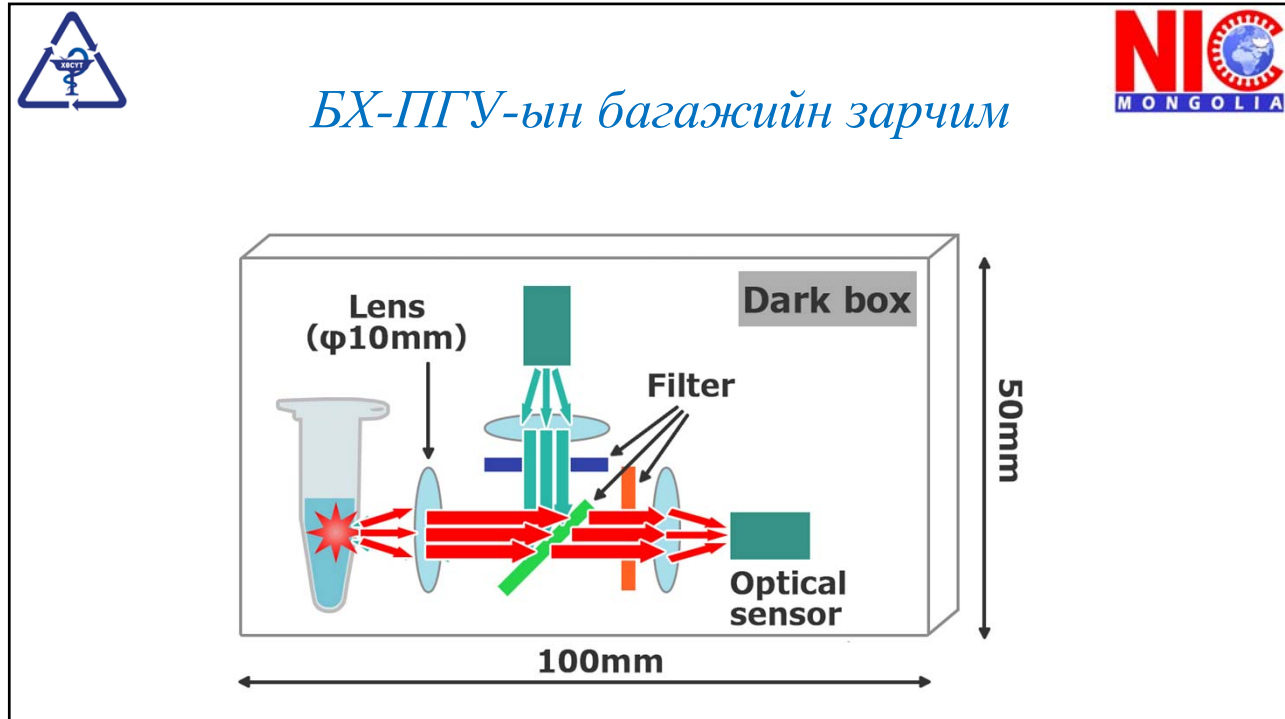
Флюоресценцийн эрчим


Threshold

Initiation phase


Exponential phase

Plateau











БХ-ПГУ-ын хэрэглэгдэхүүн




• Проб гэж юу вэ?


	Ногоон будагч бодис = Бай 1
	Цэнхэр будагч бодис = Бай 2
	Шар будагч бодис=Бай 3
	Улаан будагч бодис=Бай 4





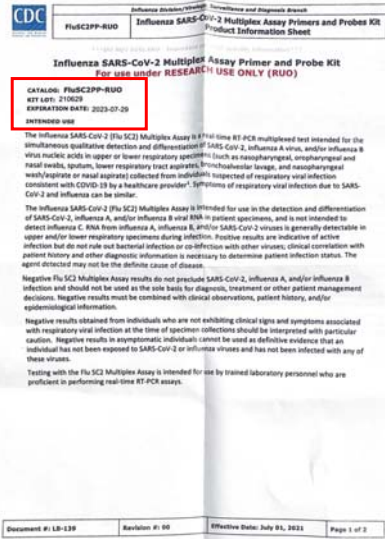
ӨХСТ-ийн Томуу ба SARS-CoV-2 илрүүлэх Мультиплекс цомог

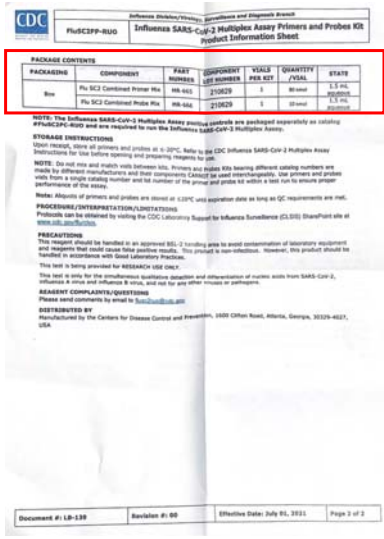


Томуугийн А ба В хүрээний вирус, SARS-CoV-2 илрүүлэх праймер, проб











Урвалжийг найруулах



Ag-Path One-Step RT-PCR Reagents
Sufficient for **1000 reactions** of 25 µL, contains:

- 14 mL 2X RT-PCR Buffer
- 1100 µL 25X RT-PCR Enzyme Mix
- 25 mL Nuclease-free Water.

Taq-Path 1-Step RT-qPCR Master Mix
Contains one **10-ml tube** of 4X RT-PCR master mix sufficient for 2000 20-µL reactions.

SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit

- 500 µl SuperScript™ III/Platinum™ Taq Mix
- 12.5 ml 2X Reaction Mix
- 2 × 1 ml Magnesium Sulfate (50 mM)
- 500 µl ROX Reference Dye (25 µM)

Урвалжийг хуваах -20°C Давтан гэсгээх













Урвалжийг найруулах



TaqPath

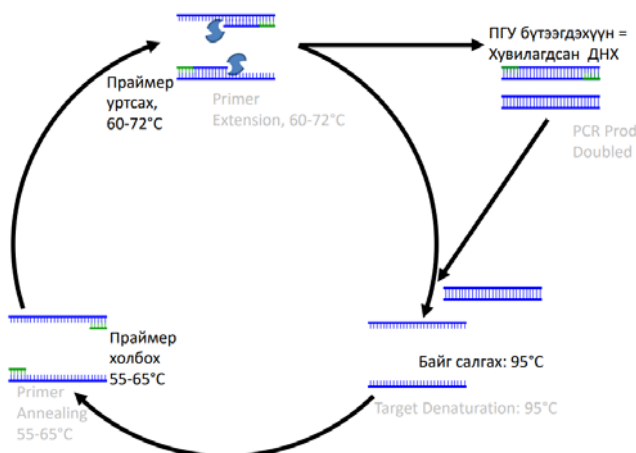
Урвалжууд	Шинжлэгдэхүүн бүрт орох урвалж тус бүрийн эзлэхүүн
Nuclease-free Water	N x 7,75 мкл
Томуу ба SARS-CoV-2 праймер	N x 3,0 мкл
Томуу ба SARS-CoV-2 проб	N x 3,0 мкл
TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix (No ROX) эсвэл Quantabio UltraPlex™ 1-Step ToughMix® (4X)	N x 6,25 мкл
Нийт эзлэхүүн	N x 20,0 мкл

*AqPath,
Invitrogen*


Урвалжууд	Шинжлэгдэхүүн бүрт орох урвалж тус бүрийн эзлэхүүн
Томуу ба SARS-CoV-2 праймер	N x 3,0 мкл
Томуу ба SARS-CoV-2 проб	N x 3,0 мкл
Ag-Path™ 1-Step RT-PCR Mix (No ROX) 2x buffer	N x 13,0 мкл
Ag-Path™ 1-Step RT-PCR Mix (No ROX) enzyme	N x 1,0 мкл
Нийт эзлэхүүн	N x 20,0 мкл




Урвалжийн нөхцөл



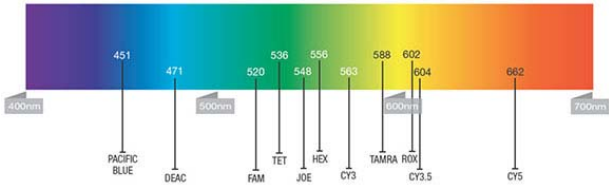
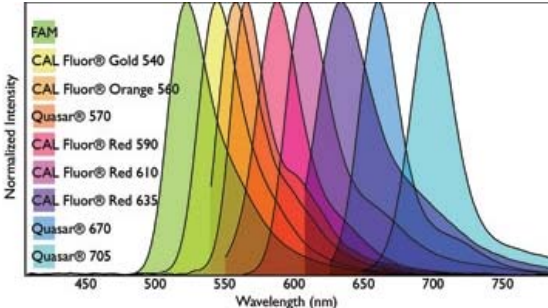
Урвуу транскриптазийн бэлтгэл шат	25°C хэм 2 мин
Урвуу транскриптазийн шат	50°C хэм 15 мин
Тaq полимераз энзим идэвхит шат	95°C хэм 2 мин
ПГУ-ын үндсэн цикл (45 удаа)	95°C хэм 15 сек 55°C хэм 30 сек




Багажгийн нөхцөл



Name	Reported Dye	Quencher Dye
FluA	FAM	(none)
FluB	Yakima Yellow/Vic/HEX	(none)
SARS-CoV-2	Texas Red X/ROX	(none)
RNP	CY5	(none)




СУДАЛЫН ҮНДСЭНИЙ ТӨВИЙН
ЕРӨНХИЙ ЗАХИРЛЫН
ТУШААЛ

2023 оны 10 сарын 30 өдөр

Дугаар 4193

Улаанбаатар хот




Эмнэлгийн хэрэгсэл хуваарилах тухай

Эрүүл мэндийн тухай хуулийн 20 дугаар зүйлийн 20.2.1, Негтлэн бодох бүртгэлийн тухай хуулийн 14 дүгээр зүйлийн 14.1, 14.2, 14.4.6 дахь заалт, Төсвийн тухай хуулийн 16 дугаар зүйлийн 16.5.2, 16.5.5 дахь заалт, Эрүүл мэндийн сайдын 373 дугаар тушаалын 4.6.7 дахь заалт, Халдварт Өвчин Судлалын Үндэсний Төвийн хөдөлмөрийн дотоод журмын 3 дугаар зүйлийн 3.2.5 дахь заалт, тушаалын төсөлийн Халдварт Өвчин Судлалын Үндэсний Төвийн дүрмийн 4 дүгээр зүйлийн 4.4 дахь хэсгийг тус тус үндэслэн ТУШААХ нь:

- Эмнэлгийн хэрэгсэл буюу томуу, томуу төст өвчин, КОВИД-19 халдварын вирус илрүүлэх ПГУ-ын оношлуурыг аймаг, дүүргийн вирус судлалын лабораториудад хуваарилах жагсаалтыг хавсралтаар баталгаажуулж, 2022/2023 онд хөрсөн шинэчлэгээний тоо
- Энэхүү тушаалын хавсралтаар батлагдсан хуваарийн дагуу томуу, томуу төст өвчин, КОВИД-19 халдварын вирус илрүүлэх ПГУ-ын оношлуурыг аймаг, дүүргийн эрүүл мэндийн байгууллагуудад олгож, холбогдох баримт бичгийг бүрдүүлж эхлэхийг Нэгдсэн лабораторийн албаны дарга (Б.Бумдэлгэр)-г тураг болгосугай.
- Томуу, томуу төст өвчин, КОВИД-19 халдварын вирус илрүүлэх ПГУ-ын оношлуурыг, эмнэлгийн хэрэгслийн данснаас шилжүүлж, санхүүгийн тайланд тусгаж ажиллахыг Санхүү бүртгэлийн алба (Г.Хунзаа)-д зөвшөөрсугэй.
- Тушаалын хэрэгжилтэд хяналт тавьж ажиллахыг Стратеги төлөвлөлт, гадаад харилцаа эрхэлсэн дэд захирал (Д.Баярсайхан)-д даалгасугай.

ЕРӨНХИЙ ЗАХИРЛЫН АЛБАН
ҮҮРГИЙГ ХАВСРАН ГҮЙЦЭТГЭГЧ



ОЖ БАЙГАЛМАА

ХӨСҮТ-ийн Ерөнхий захирлын
2023 оны 10 дугаар сарын 30-ны өдөр
4193 дугаар тушаалын хавсралт

ОНОШЛИГООНЫ ХЭРГЭСЭЛ ХУВААРИЛАХ JAГСААЛТ

Д/д	Аймаг, дүүрэг	2022/2023 онд ХӨСҮТ-д хөрсөн шигнэжээний тоо	2022/2023 онд хөрсөн шигнэжээний тоо	Хуваарь	Нэг бүрийн ураг	Нийт үнийн дүн
1	Архангай	5	0	700 х.т	27931	19551724
2	Баян-Өлгий	236	2290	700 х.т	27931	19551724
3	Баянхонгор	137	280	700 х.т	27931	19551724
4	Булган	5	0	700 х.т	27931	19551724
5	Говь-Алтай	139	380	700 х.т	27931	19551724
6	Говьсүмбэр	15	121	700 х.т	27931	19551724
7	Дархан-Уул	56	266	700 х.т	27931	19551724
8	Дорноговь	566	764	700 х.т	27931	19551724
9	Дорнод	245	275	700 х.т	27931	19551724
10	Дундговь	118	165	700 х.т	27931	19551724
11	Завхан	52	198	700 х.т	27931	19551724
12	Орхон	17	1266	700 х.т	27931	19551724
13	Өвөрхангай	44	354	700 х.т	27931	19551724
14	Өвөрсүмбэр	451	0	700 х.т	27931	19551724
15	Сүхбаатар	408	420	700 х.т	27931	19551724
16	Сэлэнгэ	143	194	700 х.т	27931	19551724
17	Төв	31	0	700 х.т	27931	19551724
18	Увс	128	0	700 х.т	27931	19551724
19	Ховд	172	252	700 х.т	27931	19551724
20	Хөвсгөл	164	234	700 х.т	27931	19551724
21	Хэнтий	70	221	700 х.т	27931	19551724
22	Баянгол	90	0	700 х.т	27931	19551724
23	Баянхонгор	220	0	700 х.т	27931	19551724
24	Сүхбаатар	135	0	700 х.т	27931	19551724
25	Хан-Уул	101	0	700 х.т	27931	19551724
26	Чигэсгэй	25	0	700 х.т	27931	19551724
27	Согномхалзан	459	0	700 х.т	27931	19551724
28	Баянхонгор	0	0	700 х.т	27931	19551724
29	Налайх	16	0	700 х.т	27931	19551724
	Нийт	4306	7670	21000 х.т	810000	567000000

Primer ID* (OFFICE USE)	Name	Sequence (5' to 3')	Base	Scale (OD)	Purification*	Modification (5') **	Modification (3') **
1	Type A MP-39-67For	CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTATC	29	100 (5*20)	PAGE		
2	Type A MP-183-153Rev	TGACAGRATYGGTCTGTCTTTAGCCAYTCCA	32	100 (5*20)	PAGE		
3	Type A MP-96-75ProbeAs	ATYTCGGCTTTGAGGGGGCCTG	22	100 (5*20)	HPLC	FAM	MGB
4	H1_49-77_For	GCAGACACAATATGTATAGGCTACCATGC	29	100 (5*20)	PAGE		
5	H1_115-140_Rev	ACAGAGTGTGCTACTGTACRTTCTT	26	100 (5*20)	PAGE		
6	H1_85-106_Fprobe	TCRACCGACACTGTTGACACAG	22	100 (5*20)	HPLC	FAM	MGB
7	H3_768-771-For	TGGACAATAGTRAAACCGGGRGAC	24	100 (5*20)	PAGE		
8	H3_898-921-Rev	GTCATTGGGRATGCTCCATTGG	24	100 (5*20)	PAGE		
9	H3_799-821-Probe	CTAATTGCTCTMGGGGTTACTT	23	100 (5*20)	HPLC	ROX	MGB
10	TypeB NS_87-103_Forv2	GGAGCAACCAATGCCAC	17	100 (5*20)	PAGE		
11	TypeB NS_172-191_Rev2	GTKTAGGCGGTCTTGACCAG	20	100 (5*20)	PAGE		
12	TypeB NS_105-124_Probe	ATAAACTTTGAAGCAGGAAT	20	100 (5*20)	HPLC	HEX	MGB
13	N_Sarbeco-F1	CACATTGGCACCCGCAATC	19	100 (5*20)	PAGE		
14	N_Sarbeco-R1	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	20	100 (5*20)	PAGE		
15	N_Sarbeco-P1	ACTTCTCAAGGAACAACATTGCCA	25	100 (5*20)	HPLC	FAM	MGB
16	NIID_2019-nCOV_N_F2	AAATTTGGGGACCAGGAAC	20	100 (5*20)	PAGE		
17	NIID_2019-nCOV_N_R2	TGGCAGCTGTGTAGGTCACAC	20	100 (5*20)	PAGE		
18	NIID_2019-nCOV_N_P2	ATGTGCGCATTTGGCATGGA	20	100 (5*20)	HPLC	ROX	MGB
19	RSV-A_Forward	ACTGCAATCAYACAAGATGCAACRA	25	100 (5*20)	PAGE		
20	RSV-A_Reverse	CAGATTGRAGAAGCTGATTCCA	22	100 (5*20)	PAGE		
21	RSV-A_Probe	CCAGATCAAGAACAACCCCARCATACT	30	100 (5*20)	HPLC	FAM	MGB
22	RSV-B_Forward	ACTTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAA	28	100 (5*20)	PAGE		
23	RSV-B_Reverse	TTGTRGCTGARTTTGTGTGGAT	22	100 (5*20)	PAGE		
24	RSV-B_Probe	TTAGCCCATCCMAACAAYCCACAACC	26	100 (5*20)	HPLC	ROX	MGB

