

РУКОВОДСТВО

ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

**ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО КОМПЛЕКСА
И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
К РИФАМПИЦИНУ И ИЗОНИАЗИДУ
НА БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПАХ «ТБ-БИОЧИП-1»***

Регистрационное удостоверение Федеральной службы по надзору в
сфере здравоохранения и социального развития РФ
№ ФСР 2011/10088 от 03.02.2011 г.



* Руководство составлено на основе Инструкции по применению набора реагентов для выявления микобактерий туберкулезного комплекса и определения их лекарственной чувствительности к рифампицину и изониазиду на биологических микрочипах «ТБ-Биочип-1» по ТУ 9398-001-02699501-2010, входящей в комплект регистрационной документации КРД № 76347 от 22.12.2010, утвержденной приказом Росздравнадзора от 03 февраля 2011 г. № 436-Пр/11

1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА.

- 1.1. Набор реагентов ТБ-БИОЧИП-1 предназначен для выявления возбудителя туберкулеза в образцах мокроты человека и определения его лекарственной чувствительности к рифампицину и изониазиду методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей гибридизацией на биологическом микрочипе.
- 1.2. Рифампицин (RIF) и изониазид (INH) являются основными бактерицидными противотуберкулезными препаратами первого ряда. Устойчивость возбудителя туберкулеза к этим препаратам может быть определена на генетическом уровне по молекулярно-генетическим маркерам резистентности. Такими маркерами являются определенные мутации в бактериальных генах *rpoB*, *katG*, *inhA* и в регуляторном регионе между генами *ahpC* и *oxyR*. Основным преимуществом определения устойчивости на генетическом уровне является идентификация большого количества мутаций, вызывающих резистентность:
 - 27 мутаций в гене *rpoB*, приводящих к устойчивости к рифампицину;
 - 11 мутаций в гене *katG*, 5 мутаций в гене *inhA*, 5 мутаций в гене *ahpC*, приводящих к устойчивости к изониазиду.
- 1.3. Набор реагентов «ТБ-БИОЧИП-1» (в дальнейшем - «набор») рассчитан на проведение 100 анализов, включая положительные и отрицательные контрольные образцы.

2. СТАДИИ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.

- 2.1. Выявление микобактерий туберкулезного комплекса (МТБ) и определение их лекарственной чувствительности к RIF и INH при использовании набора достигается проведением ряда последовательных этапов, включающих деконтаминацию клинического образца, лизис микроорганизмов, две последовательные стадии мультиплексной ПЦР, гибридизацию полученных ПЦР-продуктов (ампликонов) на биологическом микрочипе, регистрацию и интерпретацию полученных результатов.
- 2.2. Первая стадия ПЦР служит для амплификации а) специфичной для МТБ нуклеотидной последовательности *IS6110*-элемента и б) фрагментов генома микроорганизма, отвечающих за возникновение резистентности, из материала клинического образца (мокроты).
- 2.3. Вторая стадия ПЦР, проводимая по асимметричному типу, служит для получения преимущественно одноцепочечных флуоресцентно-меченных ПЦР-продуктов. В качестве ДНК-матрицы используют ПЦР-продукты, полученные на первой стадии.
- 2.4. Гибридизацию на биологическом микрочипе проводят с продуктом второй стадии ПЦР с целью идентификации мутаций, приводящих к устойчивости МТБ к RIF и INH. Биологический микрочип представляет собой подложку с упорядоченно расположенными микроячейками полиакриламидного геля, содержащими ковалентно иммобилизованные олигонуклеотидные зонды, последовательности которых комплементарны как немутантным фрагментам генов, перечисленных в п. 1.2. (т.е. дикому типу), так и фрагментам, содержащим мутации. При гибридизации одноцепочечный флуоресцентно-меченый фрагмент ДНК, полученный в ходе двухэтапной ПЦР, образует высокостабильный гибридизационный комплекс только с полностью комплементарным иммобилизованным зондом (т.е. каждый нуклеотид изучаемой мишени образует совершенный гибридизационный дуплекс с соответствующим нуклеотидом в составе зонда). При наличии даже одного

неспаренного основания эффективность гибридизации молекулы-мишени с иммобилизованным зондом снижается, флуоресцентный сигнал в соответствующей ячейке падает, а после процедуры отмычки снижается до уровня фонового шума. Таким образом, ячейки, содержащие полностью комплементарные к молекуле-мишени олигонуклеотиды, имеют сигнал флуоресценции, по меньшей мере, в несколько раз превосходящий сигналы ячеек, в которых не образовались совершенных гибридизационных комплексов.

- 2.5. Анализ результатов гибридизации проводят с помощью Комплекса универсального аппаратно-программного (УАПК) для анализа биологических микрочипов (ТУ 9443-004-02699501-2006). Для возбуждения флуорофорных групп красителя, встроенного в процессе второй стадии ПЦР в исследуемый фрагмент генома и входящего в состав гибридизационного комплекса, используют монохроматический свет с длиной волны 655 нм. Флуоресцентные сигналы каждой ячейки регистрируют ПЗС-камерой и подвергают оцифровке. Специальное программное обеспечение позволяет сравнить флуоресцентные сигналы в ячейках, определить, в каких ячейках образовались совершенные комплексы, используя заданный алгоритм сравнения и, таким образом, выдать отчет об отсутствии/наличии мутаций в исследуемой ДНК микобактерий и, соответственно, о чувствительности/устойчивости исследуемого штамма к рифампицину и/или изониазиду.

3. СОСТАВ НАБОРА.

В состав набора реагентов входят следующие компоненты:

Комплект №1 для деконтаминации клинического образца и выделения ДНК микобактерий*(см. Примечание) включает:

- **Деконт-А** (реагент А для деконтаминации образцов) – 10 пробирок (по 0,25 г)
- **Деконт-Б** (реагент Б для деконтаминации образцов) – 10 флаконов (по 50 мл)
- **ПБ-1** (промывочный буфер №1) – 5 флаконов (по 25 мл)
- **ПБ-2** (промывочный буфер №2) – 1 флакон (20 мл)
- **ЛБ** (лизирующий буфер) – 1 флакон (10 мл)

Комплект № 2 для проведения двух стадий ПЦР включает:

- **ПЦР-буф** (10-кратный буфер для ПЦР) – 1 пробирка (1,5 мл);
- **дНТФ** (водный раствор дезоксинуклеозидтрифосфатов) – 1 пробирка (1,5 мл);
- **ПР-1** (водный раствор праймеров для проведения первой стадии ПЦР) – 1 пробирка (0,12 мл);
- **ПР-2** (водный раствор праймеров для проведения второй стадии ПЦР) – 1 пробирка (0,12 мл);
- **Тaq** (Тaq ДНК-полимераза) – 1 пробирка (0,25 мл);
- **UNG** (урацил-N-гликозилаза) – 1 пробирка (0,06 мл)
- **К+** (положительный контрольный образец ДНК – 10000 геном-эквивалентов/мкл) – 1 пробирка (0,1 мл);
- **К-** (отрицательный контрольный образец – вода деионизованная степени очистки MQ) – 1 пробирка (0,5 мл);
- **ММ** (минеральное масло) – 1 флакон (10 мл);
- **MQ** (вода деионизованная со степенью очистки MQ для проведения ПЦР) – 1 флакон (10 мл).

При получении набора **К+** отделить от набора и поместить на хранение в зону внесения ДНК в амплификационную смесь. Комплект №2 хранить при -20°C за исключением ММ и МQ (+4°C).

Комплект № 4 для проведения гибридизации на микрочипе включает:

- **ГБ** (буфер для гибридизации) – 2 пробирки (по 2,0 мл).

Комплект № 5 включает биологические микрочипы, каждый из которых рассчитан на проведение одного анализа (гибридизации) – 100 штук.

Комплект №3 для проведения электрофореза НЕ ВХОДИТ В НАБОР И ПОСТАВЛЯЕТСЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНО ПО ЗАПРОСУ.

Комплект включает:

- **ЭтидБром** (раствор бромида этидия) – 1 пробирка (0,03 мл);
- **ЭБ-1** (50-кратный буфер ТАЕ для проведения электрофореза) – 2 флакона (20 мл и 10 мл);
- **Агароза** (агароза для проведения электрофореза) – 10 пробирок (по 0,7 г);
- **ЭБ-2** (10-кратный буфер для нанесения образца) – 1 пробирка (0,4 мл);
- **Ladder** (молекулярный ДНК-маркер) – 1 пробирка (0,02 мл).

* **Примечание.** Для обработки клинических образцов и изолятов и выделения микобактериальной ДНК вместо Комплекта № 1 допускается применение других коммерческих наборов и автоматических роботизированных станций, разрешенных к применению в практике клинико-диагностических лабораторий.

4. ТРЕБОВАНИЯ К ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ.

- 4.1. Метод позволяет обнаружить не менее 500 геном-эквивалентов микобактериальной ДНК.
- 4.2. Метод позволяет обнаружить ДНК микобактерий туберкулезного комплекса в исследуемом образце (мокрота) и определить наличие/отсутствие мутаций, приводящих к устойчивости к рифампицину и изониазиду, со специфичностью 95%.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

- 5.1. Все реагенты, входящие в состав набора, используют только для применения *in vitro* и по их прямому назначению.
- 5.2. Персонал, ответственный за проведение анализа с использованием набора реагентов «ТБ-БИОЧИП-1», должен состоять как минимум из двух сотрудников.
- 5.3. При работе необходимо соблюдать требования ГОСТ 12.2.003-91 (Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности), Приказа МЗ РФ N64 от 21 февраля 2000 г. «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований», СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III — IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений», Р 3.5.1904-04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях», СП 2.2.4.548-96 «Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы

- лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».
- 5.4. При работе с клиническим материалом необходимо придерживаться правил соответствующей Инструкции о порядке работы с инфекционным материалом и микроорганизмами II и III групп патогенности. Работу с клиническим материалом проводят в ламинарном шкафу класса 2 (с защитой исследователя) с использованием соответствующих средств индивидуальной защиты (маска, перчатки и т.п.).
 - 5.5. Подготовку смеси для проведения ПЦР следует проводить в ПЦР-боксе, снабженном электрическими розетками, лампами дневного и ультрафиолетового света. Закрытый бокс должен обеспечивать создание локальной чистой зоны, необходимой для подготовки ПЦР-смеси.
 - 5.6. По окончании работы использованные материалы и рабочее место должны быть соответствующим образом продезинфицированы.
 - 5.7. При работе с включенным источником УФ-излучения следует пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской, не пропускающим УФ-лучи.
 - 5.8. Запрещается снимать крышку с электрофорезной камеры при включенном источнике питания.
 - 5.9. С агарозным гелем следует работать в перчатках и при использовании специально отведенной посуды. При его приготовлении используется этидия бромид, являющийся мутагеном. Необходимо помнить, что после проведения электрофореза этидия бромид содержится в электрофорезном буфере.
 - 5.10. Обработка проб (деконтаминация и лизис) и выделение ДНК, подготовка реакционной смеси для проведения ПЦР, внесение ДНК-матриц и проведение ПЦР, электрофоретический анализ и гибридизация на биочипах должны проводиться в разных (не менее 3-х) изолированных помещениях. Допускается проведение электрофореза и гибридизации в одном помещении. Рекомендуемая схема организации зон для проведения биочип-анализа, движения биологического материала и размещения компонентов набора приведена в Приложении 1. Перечень оборудования расходных материалов для анализа образцов с использованием тест-системы ТБ-БИОЧИП-1 приведен в Приложении 2.
 - 5.11. Запрещается перемещать из одного лабораторного помещения в другое любое лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторную посуду, рабочие растворы и др. Для переноса пробирок используют специально выделенные для этой цели (только для транспортировки) штативы.
 - 5.12. Помещение, в котором осуществляются процедуры электрофореза, гибридизации и отмывки на биочипах, должно содержать отдельный комплект одноразовых халатов, головных уборов и перчаток, который по окончании работ необходимо сменить.
 - 5.13. Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводится ПЦР, должны обязательно до начала и после окончания работ облучаться ультрафиолетовым светом. Желательна также обработка поверхностей (и отработанных носиков) 0,1N раствором соляной кислоты, в присутствии которой гидролиз ДНК происходит эффективнее.
 - 5.14. Химическая посуда, пипетки, оборудование, которые используются в работе с набором, должны иметь соответствующую маркировку и храниться отдельно.

6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РАСТВОРОВ ДЛЯ ДЕКОНТАМИНАЦИИ ОБРАЗЦОВ МОКРОТЫ.

- 6.1. Приготовление рабочего раствора для обработки мокроты.
К содержимому флакона **Деконт-Б** добавить содержимое пробирки **Деконт-А**. Тщательно перемешать до полного растворения. Раствор готовят непосредственно перед употреблением, срок хранения приготовленного раствора - 8 ч.
- 6.2. Приготовление промывочного буфера **ПБ-1**.
Перенести количественно содержимое флакона **ПБ-1** в колбу объемом 1000 мл, довести объем дистиллированной водой до 1000 мл и тщательно перемешать. Приготовленный раствор хранить при температуре +2-8°C не более 1 мес.

7. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.

7.1. Обработка образцов мокроты (с использованием Комплекта № 1).*

- 7.1.1. К 2-5 мл мокроты добавить равный объем (2-5 мл) **свежеприготовленного** рабочего раствора для обработки мокроты (см п. 6.1.). Перемешать на вортексе в течение 15-20 с.
- 7.1.2. Смесь инкубировать в течение 30 мин при комнатной температуре (+18-25°C), периодически перемешивая на вортексе.
- 7.1.3. После окончания инкубации добавить к смеси 5 объемов **ПБ-1** (20-50 мл) и перемешать на вортексе в течение 15-20 с.
- 7.1.4. Центрифугировать в течение 30 мин при 3000 об/мин при комнатной температуре, надосадочную жидкость удалить.
- 7.1.5. Осадок клеток (200-500 мкл) перенести пипеткой в пластиковую центрифужную пробирку объемом 1,5 мл (далее пробирка типа Эппендорф).
- 7.1.6. Добавить к суспензии клеток равный объем промывочного буфера **ПБ-1** и перемешать на вортексе в течение 10 с.
- 7.1.7. Центрифугировать в течение 10 мин при 12000 об/мин при комнатной температуре (+18-25°C), надосадочную жидкость удалить: **аккуратно слить в банку с дезинфектантом**.
- 7.1.8. Добавить к осадку 100 мкл буфера **ПБ-2** и перемешать на вортексе в течение 10 с.
- 7.1.9. Центрифугировать смесь в течение 10 мин при 12000 об/мин при комнатной температуре, надосадочную жидкость удалить.
- 7.1.10. Повторить пункты 7.1.8-7.1.9. В процессе работы использовать только наконечники с фильтром.

7.2. Выделение ДНК(с использованием Комплекта № 1).

- 7.2.1. Добавить к осадку 30 мкл лизирующего буфера **ЛБ**. Перемешать на вортексе в течение 10 с.
- 7.2.2. Прогреть пробирку в термостате в течение 30 мин при температуре +95°C, после чего охладить пробирку, поместив на лед на 5-10 мин.
- 7.2.3. Центрифугировать в течение 10 мин при 12000 об/мин при комнатной температуре.
- 7.2.4. Перенести надосадочную жидкость в отдельную маркированную пробирку, плотно закрыть крышку. В процессе работы использовать только наконечники с фильтром.

* Методики выделения ДНК микобактерий из других препаратов приведены в Приложениях 4-6.

Получен деконтаминированный препарат, содержащий ДНК. Для проведения ПЦР используют аликвоту из надосадочной жидкости.

Примечание.

Методика выделения ДНК из биоптатов легких, костей, операционного материала (туберкулом, каверн и проч) приведена в Приложении 5.

Методика выделения ДНК из крови приведена в Приложении 6.

Методики выделения ДНК из культур клеток, полученных с жидкой и плотной питательных сред приведены в Приложении 7.

7.3. Приготовление смеси для амплификации и проведение 1-го этапа ПЦР (комплект № 2).

7.3.1. Приготовить и маркировать необходимое количество (N) пробирок типа Эппендорф объемом 0,5 мл для проведения 1-й стадии ПЦР. Добавить дополнительные две пробирки для положительного и отрицательного контролей и маркировать их.

7.3.2. Приготовить реакционную смесь для проведения ПЦР (Комплект № 2). В стерильную пробирку типа Эппендорф объемом 1,5 мл внести следующие компоненты набора в указанных ниже последовательности и количестве:

• Вода деионизованная MQ	19,5	×	(N+3)* мкл
• ПЦР-буф	3	×	(N+3) мкл
• дНТФ	3	×	(N+3) мкл
• ПР-1	0,6	×	(N+3) мкл
• Таq	0,6	×	(N+3) мкл
• UNG	0,3	×	(N+3) мкл
Общий объем	27	×	(N+3) мкл

(N+3) – N- число анализируемых проб; +3 обозначает увеличение объема с учетом двух контрольных пробирок «K+» и «K-» и погрешности при составлении смеси (на объем одной пробирки).

Подробную таблицу для разного количества образцов см. в Приложении 3.

7.3.3. Перемешать полученную реакционную смесь на вортексе и внести по 27 мкл в каждую приготовленную пробирку. Если используют амплификатор без подогрева крышки, в каждую пробирку дополнительно вносят по 2 капли минерального масла ММ (сверху на реакционную смесь).

7.3.4. Внести в контрольные пробирки с реакционной смесью по 3 мкл «K+» и «K-» и закрыть их. Внести в остальные пробирки по 3 мкл анализируемых образцов (см п. 7.1) и закрыть их. Собрать капли центрифугированием в течение 10 с при 1000 g .

7.3.5. Поместить пробирки в ДНК-амплификатор и провести амплификацию, используя приведенный ниже температурно-временной режим (см. Табл. 1).

7.3.6. Перенести по 8мкл реакционной смеси после амплификации в чистые подписанные пробирки, и переместить их в зону электрофореза. Пробирки с остатком (~20мкл) – поместить на -20°С. В процессе работы использовать только наконечники с фильтром.

* (N+3) – N- число анализируемых проб; +3 обозначает увеличение объема с учетом двух контрольных пробирок «K+» и «K-» и погрешности при составлении смеси (на объем одной пробирки).

Таблица 1. Температурно-временной режим I-го этапа ПЦР.

Шаг программы	Температура	Время инкубации	Количество циклов
1	+95°C (предварительная денатурация ДНК)	4 мин	1
2	+95°C (денатурация ДНК)	30 с	36
	+67°C (отжиг праймеров)	30 с	
	+72°C (достройка праймеров)	30 с	
3	+72°C (завершающая инкубация)	5 мин	1

7.4. Проведение электрофореза после I этапа ПЦР. (комплект № 3).

Для проведения электрофореза используют 8 мкл содержимого каждого образца. В отдельную лунку вносят 0,5 мкг молекулярного маркера рUC19/MspI (Ladder из комплекта №3). Агарозный гель-электрофорез продуктов первой стадии ПЦР рекомендуется проводить в 2% геле при 10 В/см в течение 20 мин (160 В 20 минут).

Оставшийся после проведения электрофореза объем образца допускается хранить не более одного месяца при температуре -20С.

7.4.1. Подготовка к проведению электрофореза.

7.4.1.1. Приготовление буфера для проведения электрофореза.

В колбу объемом 1000 мл перенести содержимое флакона ЭБ-1 20мл, довести объем до 1000 мл дистиллированной водой и тщательно перемешать. Для **ЭБ-1** 10 мл конечный объем – 500 мл.

7.4.2. Приготовление электрофорезного геля.

7.4.2.1. Перенести содержимое пробирки «**Агароза**» в термостойкий стакан (колбу) и довести объем до 50 мл буфером, приготовленным по п. 7.3.1.1. Полученную взвесь кипятить до полного расплавления агарозы, периодически помешивая. Для компенсации испарения перед кипячением можно добавить ~5мл дистиллированной воды.

7.4.2.2. Охладить раствор до температуры +45-55°C и добавить 2,5 мкл раствора **ЭтидБром**.

7.4.2.3. Тщательно перемешать и залить в форму для электрофорезного геля с гребенкой для формирования лунок. Дальнейшие операции с гелем проводить только после его полного застывания при комнатной температуре (+18-25°C).

7.4.3. Проведение электрофореза.

7.4.3.1. Заполнить электрофорезную камеру буфером для проведения электрофореза (п. 7.3.1.1).

7.4.3.2. Извлечь электрофорезный гель из формы (см п. 7.3.1.2.3) и поместить его в электрофорезную камеру.

7.4.3.3. Внести в пробирки с образцами после первого этапа ПЦР, перенесенные из зоны внесения и амплификации (8мкл), по 2 мкл **ЭБ-2**.

7.4.3.4. Перемешать пипетированием и перенести 10 мкл в лунку электрофорезного геля. Провести операцию для всех исследуемых образцов и контролей.

7.4.3.5. В крайнюю лунку внести ДНК маркер – 1 мкл **Ladder**. В процессе работы использовать только наконечники с фильтром.

7.4.3.6. Провести электрофорез при 10 В/см в течение 20 мин.

7.4.3.7. Выключить прибор для проведения электрофореза и извлечь из него электрофорезный гель.

7.4.3.8. Просмотреть гель в проходящем ультрафиолетовом свете на источнике УФ-излучения (трансиллюминаторе). При необходимости полученные результаты можно документировать с помощью пленочного или цифрового фотоаппарата

с оранжевым светофильтром, либо используя специализированную систему гель-документации.

7.5. Учет результатов I этапа ПЦР (Рис. 1).

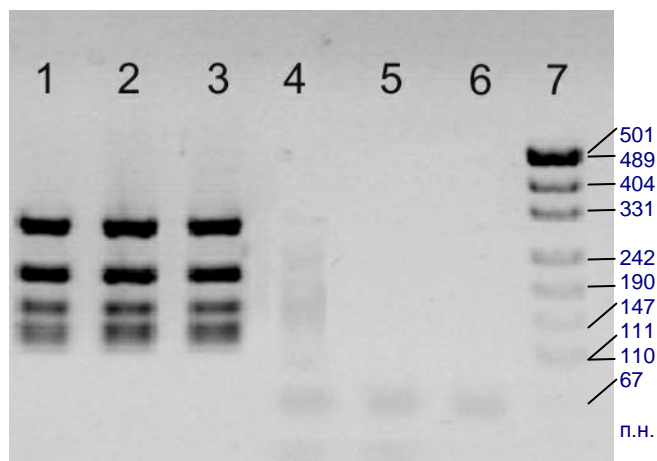


Рис. 1. Результат проведения 1-й стадии ПЦР.

- 1 - ПЦР-продукт с положительным контрольным образцом ДНК в качестве матрицы («К+»)
- 2-5 - ПЦР-продукты с исследуемыми образцами ДНК в качестве матрицы
- 6 - Отрицательный контроль 1-й стадии ПЦР («К-»)
- 7 - Молекулярный Маркер *pUC19/MspI* (**Ladder** из **Комплекта №3**)

7.5.1. Проверка отрицательного контроля.

В дорожке, содержащей отрицательный контроль «К-» (колонокка 'б' на Рис. 1), светящиеся полосы должны отсутствовать (за исключением слабо светящейся размытой полосы, содержащей праймеры). Появление одной или нескольких специфичных полос указывает на контаминацию реактивов или проб. В этом случае результаты анализа считают недействительными. Требуется предпринять меры по выявлению источника контаминации (см. раздел «Возможные проблемы и способы их устранения») и повторить анализ образцов.

7.5.2. Проверка положительного контроля.

В дорожке с положительным контролем «К+» (колонокка '1' на Рис. 1) должен выявляться набор полос следующего размера: 309 п.н. (*IS6110*), 212 п.н. (*rpoB*), 166 п.н. (*katG*), 133 п.н. (*inhA*), 126 п.н. (*ahpC*). Если в положительном контроле отсутствуют светящиеся полосы, то такой результат свидетельствует о том, что реакция не прошла. Это может быть вызвано потерей активности фермента, либо тем, что не добавлен один из компонентов реакции, либо произошел сбой в работе амплификатора (неисправность прибора, неверно задана программа, произошло кратковременное отключение питания прибора и т.п.), либо частичной деградацией при хранении ДНК положительного контроля. При отсутствии вышеуказанных полос в положительном контроле результаты ПЦР признаются недействительными.

7.5.3. Учет результатов анализа образцов.

В дорожках с исследуемыми образцами ДНК Микобактерий туберкулеза должен выявляться тот же набор полос, который характерен для положительного контроля (как в дорожках '2' и '3' на Рис. 1) следующего размера: 309 п.н. (*IS6110*), 212 п.н. (*rpoB*), 166 п.н. (*katG*), 133 п.н. (*inhA*), 126 п.н. (*ahpC*). Наличие амплифицированного фрагмента ДНК в виде светящейся

полосы в дорожке с исследуемым образцом мокроты, соответствующей 309 п.н., свидетельствует о присутствии в образце ДНК Микобактерий туберкулеза. Если данная полоса не выявляется (см. колонки '4' и '5' на Рис. 1), то считается, что в данном образце микобактерии туберкулеза отсутствуют, при этом II этап ПЦР и гибридизацию на чипе не проводят.

- 7.5.4. Для определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза к рифампицину и изониазиду необходимо проведение II этапа ПЦР. Для проведения II этапа ПЦР используются лишь те образцы, наличие ДНК микобактерий туберкулеза в которых было подтверждено ПЦР-продуктом размером 309 п.н на I этапе ПЦР. Отсутствие каких-либо ПЦР-продуктов меньшего размера, соответствующих амплифицированным фрагментам генов *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, в образце, содержащем ДНК микобактерий туберкулеза, не является основанием для прекращения анализа (II этапа ПЦР и гибридизации на биочипе).

7.6. Проведение II этапа ПЦР (комплект № 2).

- 7.6.1. Приготовить и маркировать необходимое количество (N) пробирок типа Эппендорф объемом 0,5 мл для проведения II этапа ПЦР. Добавить дополнительные три пробирки для положительного и двух отрицательных контролей и маркировать их «K+», «K1-», «K2-». Реакционную смесь, содержащую ПЦР-продукты, полученные на I этапе амплификации, используют в качестве матрицы на II этапе реакции амплификации с праймерами для проведения второй стадии ПЦР. Пробирка «K1-» представляет отрицательный контроль, использующий «K-» I этапа ПЦР в качестве матрицы. Пробирка «K2-» является отрицательным контролем II этапа где в качестве матрицы используется «K-» из комплекта №2 набора реагентов.
- 7.6.2. Приготовить реакционную смесь для проведения ПЦР (комплект № 2). В стерильную пробирку типа Эппендорф объемом 1,5 мл внести следующие компоненты набора в указанных ниже последовательности и количестве:

• Вода деионизованная MQ	37	×	(N+4)* мкл
• ПЦР-буф	5	×	(N+4) мкл
• дНТФ	5	×	(N+4) мкл
• ПР-2	1	×	(N+4) мкл
• Таq	1	×	(N+4) мкл
Общий объем	49	×	(N+4) мкл

(N+4) – N- число анализируемых проб; +4 обозначает увеличение объема с учетом трех контрольных пробирок «K+», «K1-», «K2-» и погрешности при составлении смеси (на объем одной пробирки).

Подробную таблицу для разного количества образцов см. в Приложении 4.

- 7.6.3. Перемешать смесь и внести по 49 мкл в пробирки, подготовленные для проведения ПЦР.
- 7.6.4. Если используется амплификатор без подогрева крышки, в каждую пробирку внести по 3 капли минерального масла ММ для предохранения реакционной смеси от испарения при амплификации.

* (N+4) – N- число анализируемых проб; +4 обозначает увеличение объема с учетом трех контрольных пробирок «K+», «K1-», «K2-» и погрешности при составлении смеси (на объем одной пробирки)

- 7.6.5. Отобрать по 1 мкл амплификационной смеси из каждой пробирки после I этапа ПЦР и внести в пробирки со смесью для проведения II этапа ПЦР. В пробирку «K1-» внести в качестве матрицы отрицательный контроль «К-» I этапа ПЦР. Пробирка «K2-» является отрицательным контролем II этапа, где в качестве матрицы используется «К-» из **Комплекта №2** набора реагентов. В процессе работы использовать только наконечники с фильтром. Собрать со стенок пробирок капли смеси центрифугированием при комнатной температуре (+18-25 °С) в течение 10 с при 1000 g.
- 7.6.6. Поместить пробирки в амплификатор и провести ПЦР по следующей программе (см Табл. 2).

Таблица 2. Температурно-временной режим II-го этапа ПЦР.

Шаг программы	Температура	Время инкубации	Количество циклов
1	+95°С (предварительная денатурация ДНК)	5 мин	1
2	+95°С (денатурация ДНК)	20 с	37
	+61°С (отжиг праймеров)	30 с	
	+72°С (достройка праймеров)	30 с	
3	+72°С (завершающая инкубация)	5 мин	1

7.7. Проведение электрофореза после II этапа ПЦР (Комплект № 3).

Проводят, как описано в п. 7.3.

Оставшийся после проведения электрофореза объем образца допускается хранить не более одного месяца при температуре -20°С.

Проведение электрофореза после II этапа ПЦР и учет результатов по п.7.7 является необязательной процедурой и рекомендуется при возникновении подозрений на контаминацию (загрязнение) реактивов ПЦР-продуктами.

7.8. Учет результатов II этапа ПЦР (Рис. 2).

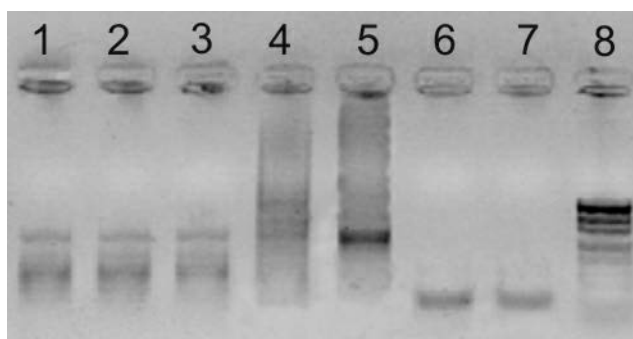


Рис. 2. Результат проведения II-го этапа ПЦР.

- 1 - ПЦР-продукт с положительным контрольным образцом ДНК в качестве матрицы ('K+')
- 2-5 - ПЦР-продукты с исследуемыми образцами в качестве матриц
- 6 - Отрицательный контроль «K1-»
- 7 - Отрицательный контроль «K2-»
- 8 - Молекулярный Маркер pUC19/MspI (**Ladder** из **Комплекта №3**)

7.8.1. Проверка отрицательного контроля.

В дорожках с отрицательными контролями «K1-», «K2-» светящиеся полосы должны отсутствовать, за исключением слабо светящейся размытой полосы, соответствующей по размеру праймерам (см. Рис. 2 дорожки '6' и '7') При

наличии полос, аналогичных положительному контролю или по размерам превышающих примерные длины праймеров, результаты ПЦР признаются недействительными из-за контаминации продуктами ПЦР, и последующую процедуру гибридизации не проводят.

- 7.8.2. Проверка положительного контроля.
В дорожке с положительным контролем «К+» (колонка '1' на Рис. 2) должен наблюдаться набор полос с длинами в интервале от 90 до 140 н.п.
- 7.8.3. Учет результатов анализа образцов.
В дорожке с исследуемым образцом должен наблюдаться набор полос с длинами в интервале от 90 до 140 н.п (как показано на Рис. 2 в дорожках '2' и '3'). Результаты II этапа ПЦР не подлежат учету и последующей гибридизации на биологических микрочипах в случае отсутствия вышеуказанных специфичных полос либо наличия неспецифичного размытого «шмера» (Рис. 2 колонка '4') и/или неспецифичной полосы размером около 250 п.н (Рис. 2 колонка '5'). Вероятные причины появления неспецифичных полос или шмеров на II этапе ПЦР и предложения по решению данных проблем изложены в разделе «Возможные проблемы и способы их устранения».

7.9. Проведение гибридизации (комплекты №№ 4 и 5)

- 7.9.1. Внести 20 мкл раствора ГБ сразу на чип через одно из двух отверстий, как указано на Рис. 3А. При анализе нескольких образцов внесение ГБ во все биочипы можно делать одним сменным носиком.
- 7.9.2. Внести 10 мкл реакционной смеси после второй стадии ПЦР в то же отверстие, куда был внесен раствор ГБ. При заполнении камеры следует избегать образования воздушных пузырей (правильное заполнение приведено на Рис. 3Б). Если при амплификации использовали минеральное масло (ММ), следует избегать его попадания в наконечник пипетки.

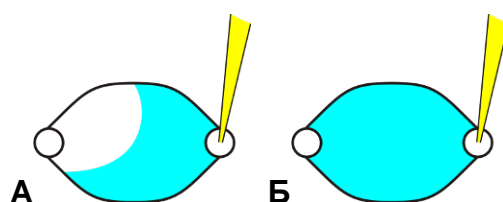


Рис. 3. Проведение гибридизации.

А – внесение буфера ГБ,

Б – внесение реакционной смеси.

- 7.9.3. Закрыть крышку камеры.
- 7.9.4. Провести гибридизацию в закрытом суховоздушном термостате при +37°C в течение 6-18 ч.
- 7.9.5. Отмывка биочипов по окончании гибридизации.

Предупреждение. Отмывку биочипов рекомендуется проводить в помещении, оснащенном УФ-лампой с целью предотвращения контаминации ПЦР-продуктами, либо в ПЦР-боксе, также оснащенном УФ-лампой.

Для сброса наконечников дозаторов, использующихся при отмывке, рекомендуется использовать отдельную емкость с крышкой (спецрезервуар), содержащую раствор, вызывающий деградацию ДНК (0,1N раствор соляной кислоты, 3% раствор хлорамина или аналоги). Все наконечники, используемые на данной стадии, должны быть сброшены в данный резервуар.

- 7.9.5.1. Удалить реакционную смесь через любое из двух отверстий гибридационной камеры. Замечание. Наконечник содержит раствор с непрогибридизованными ПЦР-продуктами. Незамедлительно сбросить данный наконечник в спецрезервуар, содержащий раствор, вызывающий деградацию ДНК.
- 7.9.5.2. Внести в реакционную камеру биочипа 30 мкл дистиллированной воды, прогретой до 37°C. Подождать 1 минуту. Удалить воду. Повторить процедуру. Наконечники сбросить в спецрезервуар.
- 7.9.5.3. Аккуратно отсоединить гибридационную камеру от подложки биочипа.
- 7.9.5.4. Промыть поверхность биочипа дистиллированной водой над емкостью для отходов, либо над раковиной. Для промывки чипа можно использовать банку-промывалку.
- 7.9.5.5. Высушить биочип в струе воздуха до полного исчезновения капель на поверхности подложки, для просушки можно использовать пустую промывалку или медицинскую грушу. Высушенные биочипы хранить в сухом темном месте при комнатной температуре.
Примечание: высушенные биочипы хранить в сухом темном месте при комнатной температуре.

7.10. Учет результатов гибридазации.

- 7.10.1. Результаты гибридазации регистрируют с помощью Комплекса универсального аппаратно-программного (УАПК) для анализа биологических микрочипов (ТУ 9443-004-02699501-2006). Инсталляция и эксплуатация комплекса осуществляется в соответствии с Руководством по эксплуатации Комплекса.
- 7.10.2. Произвести запуск программы «ImaGeWare»[®], поставляющейся вместе с комплексом.
- 7.10.3. Программа содержит три вкладки в правой части окна: «Шаблон», «Снимок» и «Отчет».
- 7.10.4. При первом запуске программы выбрать шаблон биочипа путем нажатия кнопки «Открыть шаблон» и выбора необходимого из списка файлов с расширением «.tpl». При повторных запусках программа автоматически загружает последний загруженный шаблон и отображает его как показано на Рис.4. При наведении указателя мыши на ячейку выводится информация с обозначением находящегося в ней зонда. Названия зондов соответствуют детектируемым мутациям. Обведенные ячейки соответствуют последовательностям, не содержащим мутации – «дикого типа».

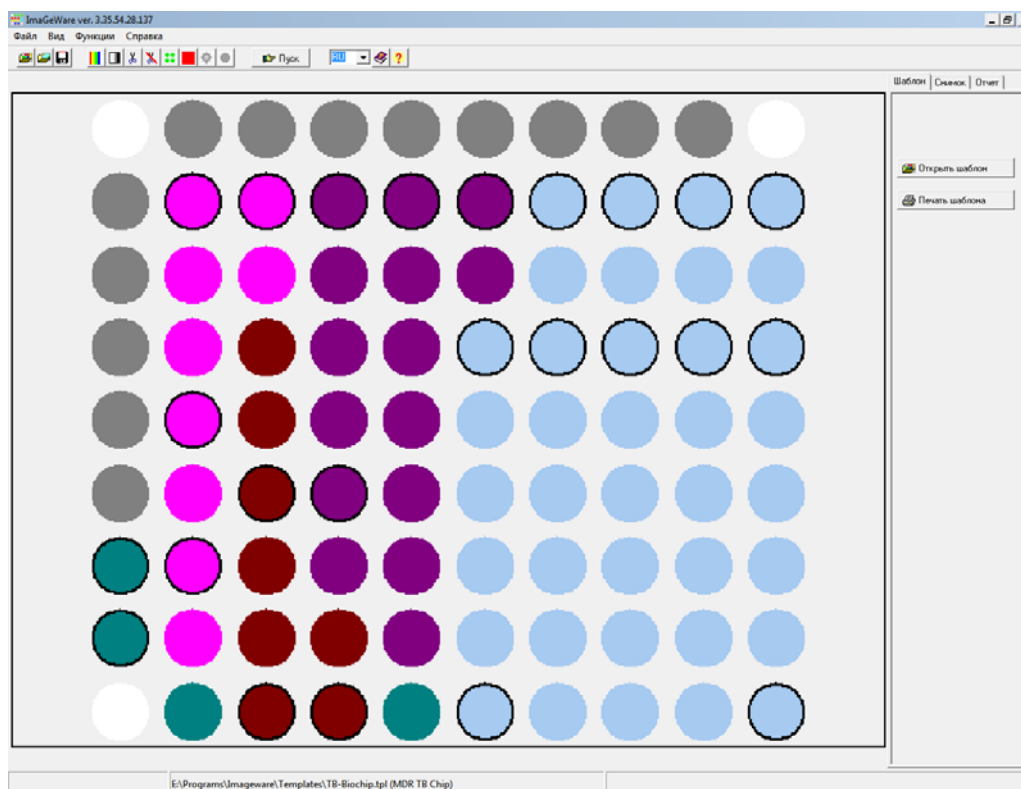


Рис. 4. Диалоговое окно режима 'Шаблон'.

- 7.10.5. Биочип после проведения гибридизации, удаления гибридизационной камеры, ополаскивания и высушивания поместить в приемник Комплекса «лицевой» стороной (содержащей гелевые ячейки) кверху.
- 7.10.6. Работа программы предусматривает использование автоматического или ручного режимов.
- 7.10.7. При работе в автоматическом режиме следует нажать пиктограмму с надписью «Пуск» в верхней части диалогового окна «Снимок» (Рис. 4). При этом происходит возбуждение флуоресценции ячеек биочипа лазерами с длиной волны 655 нм, получение флуоресцентного изображения (Рис. 5), автоматическое наложение сетки на ячейки биочипа, обсчет сигналов и выдача отчета (Рис. 6) о наличии ДНК микобактерий туберкулезного комплекса, отсутствии/наличии мутаций в исследуемой ДНК и, соответственно, о чувствительности/устойчивости исследуемого штамма к рифампицину и/или изониазиду.
- Сохранение результатов осуществляется путем нажатия кнопки «Сохранить снимок» в диалоговом окне «Отчет» (Рис. 6). При этом пользователю предлагается выбор форматов сохранения результатов:
- текстовый (файл имеет расширение .txt, в котором прописывается отчет, а также таблица нормированных значений интенсивности сигналов ячеек биочипа);
 - снимок (файл имеет расширение .spe, при этом сохраняется необработанная флуоресцентная картина гибридизации на биочипе. Такой формат необходим для дальнейшей обработки гибридизационной картины, вычисления интенсивностей сигналов, получения отчета);
 - графический (файл имеет расширение .jpg, при этом сохраняется флуоресцентное изображение биочипа с наложенной сеткой в формате Jpeg. Этот формат удобен для быстрого создания презентаций с использованием

полученных данных, однако, он не позволяет проводить обработку флуоресцентного изображения).

Рекомендуемые форматы сохранения при рутинном анализе – «текстовый» и «снимок».

- 7.10.8. В случае необходимости оператор может воспользоваться ручным режимом получения и обработки флуоресцентной картины гибридизации на биочипе. Для этого следует переключиться на закладку «Снимок», после чего установить экспозицию в миллисекундах (мс) в диалоговом окне в правой части экрана программы (выбрать в пределах 10–10000 мс). Рекомендуемое начальное значение выдержки – 200 мс. Нажать кнопку «Получить снимок», либо, если изображение было сохранено ранее в формате «снимок» (файл с расширением .spe), кнопку «Открыть снимок».

Автоматическое определение координат ячеек и наложение сетки осуществляется кнопкой «Позиции ячеек». Вычисление интенсивности свечения ячеек биочипа осуществляется кнопкой «Вычислить сигналы», после чего при наведении курсора мышки на ячейку возникает подсказка – название ячейки, величина интенсивности ее флуоресценции.

Для получения отчета об анализе флуоресцентной картины биочипа необходимо выбрать режим «Отчет» (рис. 6). Анализ флуоресцентной картины и отображение текстового отчета происходит при наличии изображения чипа и наложенной сетки.

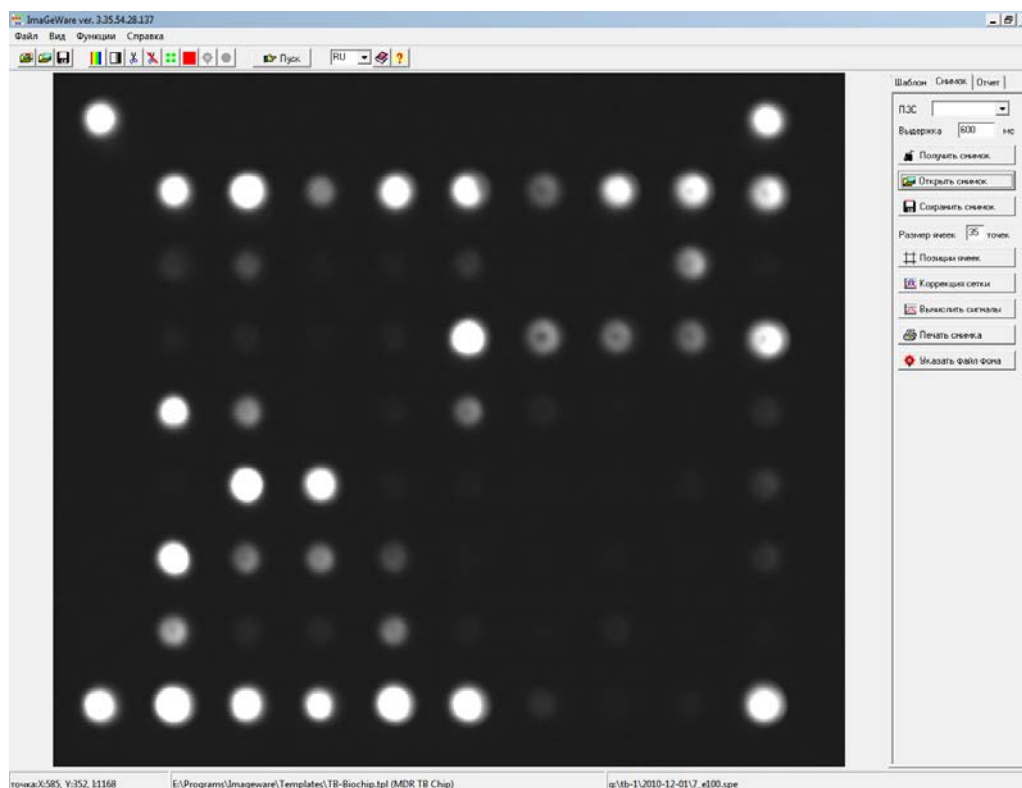


Рис. 5. Диалоговое окно режима 'Снимок'

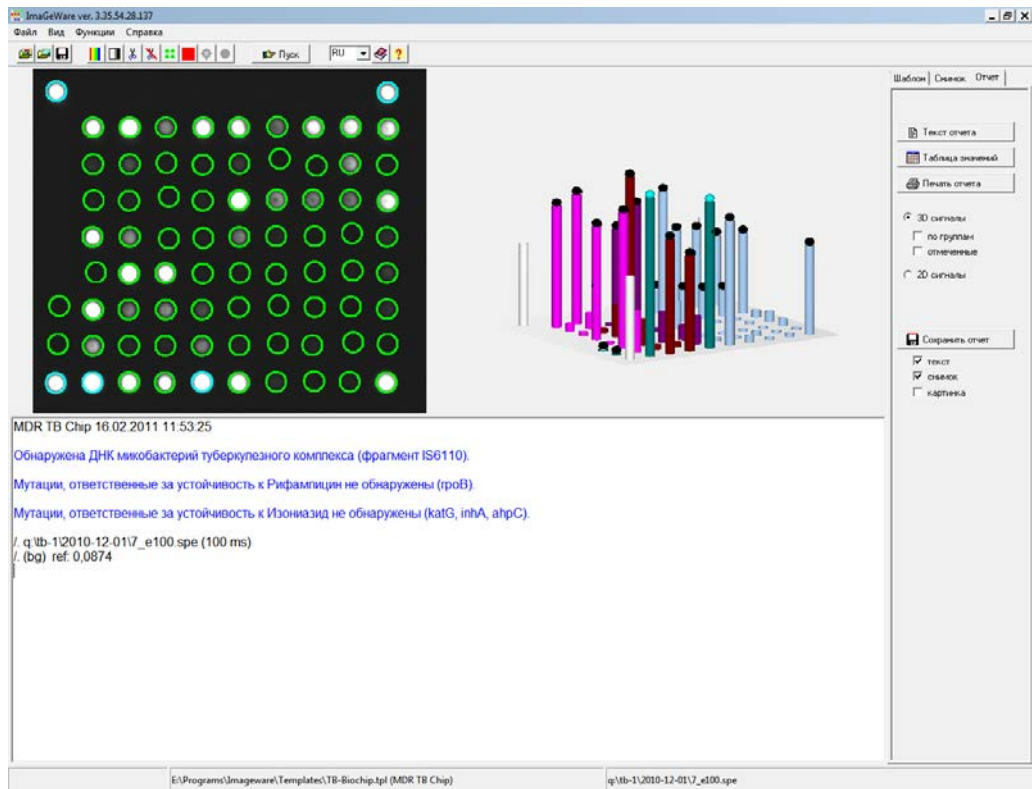


Рис. 6. Диалоговое окно режима 'Отчет'

8. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

- 8.1. Отсутствие полос в дорожке соответствующей положительному контролю «К+» на I стадии ПЦР (п. 7.4.2).

Возможная причина: потеря активности фермента, не добавлен один из компонентов реакции, сбой в работе амплификатора (неисправность прибора, неверно задана программа, произошло кратковременное отключение питания прибора и т.п.), частичная деградация при хранении ДНК положительного контроля.

Решение: убедиться в исправности используемого оборудования, в правильных условиях хранения комплектов набора. Повторить эксперимент. При отсутствии положительного результата использовать новые аликвоты реагентов комплекта № 2 (согласно рекомендациям).

- 8.2. В дорожках, соответствующих отрицательным контролям первой (колонка 'б' на Рис. 1) или второй (дорожки 'б' и '7' на Рис. 2) стадий, присутствуют полосы, длины которых совпадают с длиной амплифицируемых специфичных фрагментов. (п. 7.4.1)

Возможная причина: контаминация используемых реактивов и/или расходных материалов (наконечников, пробирок) продуктами ПЦР.

Решение: Провести облучение рабочих поверхностей, оборудования и материалов ультрафиолетом с максимумом излучения 260 нм. Облучение необходимо проводить в течение 1-2 часов до начала работы и после окончания работы. Использованные наконечники для автоматических пипеток, пробирки и другие материалы, загрязненные ДНК, обработать реагентами, вызывающими деградацию ДНК (0,1н HCl, 10% гипохлоритом натрия или 10% хлорной известью). Аналогичным образом обработать ПЦР-бокс для подготовки реакционной смеси. В процессе работы использовать только наконечники с фильтром. Приготовить новые аликвоты реагентов комплекта № 2 (согласно рекомендациям).

- 8.3. Наличие неспецифичного размытого «шмера» (Рис. 2 колонка '4') и/или неспецифичной полосы размером около 250 п.н (Рис. 2 колонка '5') при анализе результатов электрофореза продуктов II стадии ПЦР (п. 7.7.3).

Возможная причина: неполный лизис микобактериальных клеток на стадии выделения ДНК (окончание срока годности комплектов набора, неисправность термостата для пробирок, в котором проводится лизис, несоблюдение временных параметров процедуры лизиса).

Решение: Убедиться в исправности используемого оборудования, годности комплектов набора и соблюдении пунктов инструкции. Провести повторный лизис культур клеток или клинического образца. В случае отсутствия клинического материала считать результат анализа недействительным.

Замечание: При возникновении описанных проблем и неисправностей настоятельно рекомендуется контактировать с представителями предприятия-разработчика (присылать по электронной почте подробное описание проблемы с приложением картин электрофореза и/или гибридизационных изображений).

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ.

- 9.1. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при следующих условиях:
Комплекты №№ 1 и 3 – при температуре +2-8°C.
Комплект № 2 – при температуре -20°C.
Комплекты №№ 4 и 5 – при комнатной температуре (+18-25°C).
- 9.2. Срок годности набора – 6 мес.
- 9.3. Все реагенты после вскрытия флаконов и пробирок могут храниться не более 1 месяца при условиях, указанных в п. 9.1.

По вопросам, касающимся качества набора ТБ-БИОЧИП-1, следует обращаться в ООО «БИОЧИП-ИМБ»:

тел. 8(499)135-9826; факс: 8(499)135-9761; e-mail: info@biochip.ru

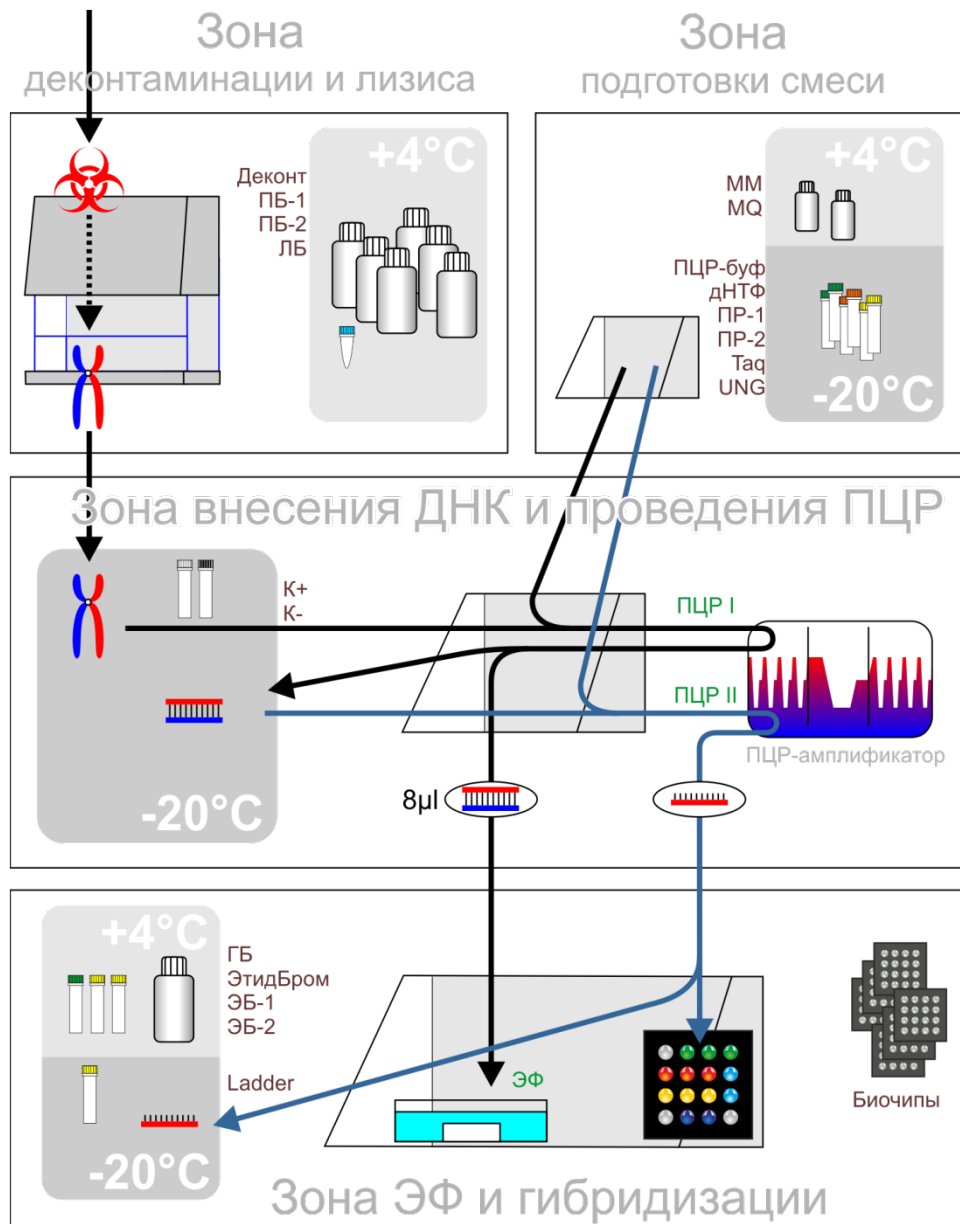
адрес для переписки: 117312, г.Москва, ул. Вавилова, д.17, пом.Б2

фактический адрес: 119991, г.Москва, ул. Вавилова, д.32

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

Схема организации зон для проведения биочип-анализа, движения биологического материала и размещения компонентов набора

Для создания лаборатории необходима подготовка по меньшей мере четырех изолированных помещений (зон) и оснащение их оборудованием, список которого приведен ниже.



- клинический материал

- выделенная геномная ДНК



- двуцепочечный ампликон после первой ПЦР



- одноцепочечный ампликон после второй ПЦР

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Список оборудования и материалов: - зона деkontаминации и лизиса микобактерий

№	Наименование оборудования	Варианты комплектации	Кол-во
1	Ламинарный шкаф 2-го класса биологической защиты	СЛШ-1,8 АМ (Миасский завод медицинского оборудования) или БАВп-01–«Ламинар-С» 1,8 (220.180) (Ламинарные системы)	1
2	Центрифуга низкоскоростная 3000 об/мин с ротором на пробирки объемом 50 мл	5810 / А-4-81 (Eppendorf) или СМ-6М.01 (Elmi) - 2шт или LMC-4200R R-6 (BioSan) - 2шт	
3	Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф»	MiniSpin (Eppendorf)	1
4	Микроцентрифуга - вортекс	Микроспин FV-2400 (BioSan) или Комбиспин FVL-2400N (BioSan)	1
5	Холодильник (+4°C)		1
6	Термостат твердотельный для пробирок типа «Эппендорф»	Гном (ДНК-Технология)	1
7	Пипетка одноканальная автоматическая переменного объема: 200-1000мкл	Pipetman P1000G (Gilson) или Лайт 100-1000мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
8	... 20-200мкл	Pipetman P200G (Gilson) или Лайт 20-200 мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
9	Штатив для пипеток	LS-2 (Хеликон)	1
10	Штатив для хранения пробирок 1,5 мл, с крышкой	SSI-5312 (SSI)	2
11	Штатив настольный для пробирок 1,5-2 мл	RA-7215 (Хеликон)	1
12	Штатив настольный для пробирок 50 мл	SSI-5580 (Хеликон)	2
13	Стакан градуированный, 1000 мл		1
14	Банка с герметичной крышкой 1000мл		1
15	Маркеры для пробирок		2
16	Пинцет медицинский		1
Расходные материалы (в расчете на 1 набор ТБ-Биочип)			
17	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 1000 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-1000 (ULPlast) или SSI-4331-1FS (SSI)	5
18	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 200 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-200 (ULPlast) или SSI-4912-1FS (SSI)	5
19	... до 100 мкл ...	HT-F96S-100 (ULPlast) или SSI-4222-B1FS (SSI)	3
20	Пробирки Falcon 50,0 мл с резьбовой крышкой, по 20 шт в	GR-227261 (Greiner)	11

	упаковке, упаковок		
21	Пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл, по 500 шт в упаковке, упаковок	SSI-1260 (SSI)	1
22	Перчатки латексные, неопудренные		
23	Халаты одноразовые		

- зона подготовки реакционной смеси

№	Наименование оборудования	Варианты комплектации	Кол-во
1	ПЦР-бокс	UVC/T-M-AR (BioSan) или БАВ-ПЦР «Ламинар-с» с УФ (Ламинарные системы)	1
2	Микроцентрифуга - вортекс	Микроспин FV-2400 (BioSan) или Комбиспин FVL-2400N (BioSan)	1
3	Холодильник -20°C /+4°C		1
4	Пипетка одноканальная автоматическая переменного объема: 200-1000мкл	Pipetman P1000G (Gilson) или Лайт 100-1000мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
5	... 20-200мкл	Pipetman P200G (Gilson) или Лайт 20-200 мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
6	... 10-100мкл	Pipetman Neo P100N (Gilson) или Лайт 10-100 мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
7	... 2-20мкл	Pipetman P20G (Gilson) или Лайт 2-20 мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
8	... 1-10мкл	Pipetman P10G (Gilson) или Лайт МИКРО 1-10 мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
9	Штатив для пипеток	LS-2 (Хеликон)	1
10	Штатив для хранения пробирок 1,5 мл, с крышкой	SSI-5312 (SSI)	2
11	Штатив настольный для пробирок 1,5-2 мл	RA-7215 (Хеликон)	2
12	Штатив настольный для пробирок 0,5 мл	RA-10005 (Хеликон)	2
13	Маркеры для пробирок		2
14	Пинцет медицинский		1
Расходные материалы (в расчете на 1 набор ТБ-Биочип)			
15	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 1000 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-1000 (ULPlast) или SSI-4331-1FS (SSI)	1
16	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 200 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-200 (ULPlast) или SSI-4912-1FS (SSI)	1
17	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 100 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-100 (ULPlast) или SSI-4222-B1FS (SSI)	1

18	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 20 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-020 (ULPlast) или SSI-4222-A1FS (SSI)	1
19	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 10 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-010 (ULPlast) или SSI-4112-1FS (SSI)	1
20	Пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл, по 500 шт в упаковке, упаковок	SSI-1260 (SSI)	1
21	Тонкостенные микропробирки 0,5 мл по 500 шт в упаковке, упаковок	SSI #3320-00 (SSI)	1
22	Перчатки латексные, неопудренные		
23	Халаты одноразовые		

- зона внесения ДНК и проведения ПЦР

№	Наименование оборудования	Варианты комплектации	Кол-во
1	ПЦР-бокс	UVC/T-M-AR (BioSan) или БАВ-ПЦР «Ламинар-с» с УФ (Ламинарные системы)	1
2	Микроцентрифуга - вортекс	Микроспин FV-2400 (BioSan) или Комбиспин FVL-2400N (BioSan)	1
3	Многоканальный амплификатор ДНК	Mastercycler Personal (Eppendorf) или Терцик (ДНК-Технология)	1
4	Морозильник -20°C		1
5	Пипетка одноканальная автоматическая переменного объема: 1-10мкл	Pipetman P10G (Gilson) или Лайт МИКРО 1-10 мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
6	Штатив для пипеток	LS-2 (Хеликон)	1
7	Штатив настольный для пробирок 0,5 мл	RA-10005 (Хеликон)	1
8	Штатив для хранения пробирок 0,5 мл, с крышкой	SSI-5312 (SSI)	2
9	Штатив для хранения пробирок 1,5 мл, с крышкой	SSI-5312 (SSI)	2
10	Маркеры для пробирок		2
11	Пинцет медицинский		1
Расходные материалы (в расчете на 1 набор ТБ-Биочип)			
12	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 10 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-010 (ULPlast) или SSI-4112-1FS (SSI)	5
13	Тонкостенные микропробирки 0,5 мл по 500 шт в упаковке, упаковок	SSI #3320-00 (SSI)	1
14	Перчатки латексные, неопудренные		
15	Халаты одноразовые		

- зона электрофореза и проведения гибридизации на биочипах

№	Наименование оборудования	Варианты комплектации	Кол-во
1	ПЦР-бокс	UVC/T-M-AR (BioSan) или БАВ-ПЦР «Ламинар-с» с УФ (Ламинарные системы)	1
2	Блок питания для электрофореза	Эльф 4 (ДНК-Технология)	1
3	Мини-камера для электрофореза, размер геля 7,6х 12,5 см	SE-1 (Хеликон)	1
4	Система регистрации результатов электрофореза	Gel Imager-2 (Хеликон)	1
5	Трансиллюминатор	ECX-F15.C (Vilber Lourmat)	1
6	Термостат суховоздушный, +37°C	ТС-1/20 СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ»)	1
7	Микроволновая печь либо электрическая плитка поддерживающая температуру +150°C		1
8	Комплекс универсальный программно-аппаратный УАПК, ООО «Биочип-ИМБ»		1
9	Пипетка одноканальная автоматическая переменного объема:20-200мкл	Pipetman P200G (Gilson) или Лайт 20-200 мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
10	... 2-20мкл	Pipetman P20G (Gilson) или Лайт 2-20 мкл (Thermo Fisher Scientific)	2
11	... 1-10мкл	Pipetman P10G (Gilson) или Лайт МИКРО 1-10 мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
12	Штатив для пипеток	LS-2 (Хеликон)	1
13	Штатив для хранения пробирок 1,5 мл, с крышкой	SSI-5312 (SSI)	
14	Штатив для хранения пробирок 0,5 мл, с крышкой	SSI-5312 (SSI)	
15	Штатив настольный для пробирок 1,5-2 мл	RA-7215 (Хеликон)	
16	Штатив настольный для пробирок 0,5 мл	RA-10005 (Хеликон)	
17	Банка с герметичной крышкой 1000мл		
18	Стакан градуированный, 1000 мл		
19	Колба из термостойкого стекла 100мл		
20	Маркеры для пробирок		
21	Интернет-канал пропускной способностью от 33,6 Kbit		
Расходные материалы (в расчете на 1 набор ТБ-Биочип)			
22	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 200 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-200 (ULPlast) или SSI-4912-1FS (SSI)	1

23	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 20 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-020 (ULPlast) или SSI-4222-A1FS (SSI)	6
24	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 10 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-010 (ULPlast) или SSI-4112-1FS (SSI)	1
25	Пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл, по 500 шт в упаковке, упаковок	SSI-1260 (SSI)	1
26	Перчатки латексные, неопудренные		
27	Халаты одноразовые		

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Количество реактивов для постановки I-го этапа ПЦР.

кол	MQ	ПЦР-буфф	дНТФ	ПР-1	Taq	UNG	Смесь	Образец
1	19,5	3	3	0,6	0,6	0,3	В каждую пробирку раскатать по 27 мкл приготовленной реакционной смеси для проведения ПЦР. Внести 3 мкл отрицательного контроля ПЦР-1. Внести по 2 капли минерального масла в каждую пробирку	
2	39	6	6	1,2	1,2	0,6		
3	58,5	9	9	1,8	1,8	0,9		
4	78	12	12	2,4	2,4	1,2		
5	97,5	15	15	3	3	1,5		
6	117	18	18	3,6	3,6	1,8		
7	136,5	21	21	4,2	4,2	2,1		
8	156	24	24	4,8	4,8	2,4		
9	175,5	27	27	5,4	5,4	2,7		
10	195	30	30	6	6	3		
11	214,5	33	33	6,6	6,6	3,3		
12	234	36	36	7,2	7,2	3,6		
13	253,5	39	39	7,8	7,8	3,9		
14	273	42	42	8,4	8,4	4,2		
15	292,5	45	45	9	9	4,5		
16	312	48	48	9,6	9,6	4,8		
17	331,5	51	51	10,2	10,2	5,1		
18	351	54	54	10,8	10,8	5,4		
19	370,5	57	57	11,4	11,4	5,7		
20	390	60	60	12	12	6		
21	409,5	63	63	12,6	12,6	6,3		
22	429	66	66	13,2	13,2	6,6		
23	448,5	69	69	13,8	13,8	6,9		
24	468	72	72	14,4	14,4	7,2		
25	487,5	75	75	15	15	7,5		
26	507	78	78	15,6	15,6	7,8		
27	526,5	81	81	16,2	16,2	8,1		
28	546	84	84	16,8	16,8	8,4		
29	565,5	87	87	17,4	17,4	8,7		
30	585	90	90	18	18	9		
31	604,5	93	93	18,6	18,6	9,3		
32	624	96	96	19,2	19,2	9,6		
33	643,5	99	99	19,8	19,8	9,9		
34	663	102	102	20,4	20,4	10,2		
35	682,5	105	105	21	21	10,5		
36	702	108	108	21,6	21,6	10,8		
37	721,5	111	111	22,2	22,2	11,1		
38	741	114	114	22,8	22,8	11,4		
39	760,5	117	117	23,4	23,4	11,7		
40	780	120	120	24	24	12		

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Количество реактивов для постановки II-го этапа ПЦР.

кол	MQ	ПЦР-буф	дНТФ	ПР-2	Taq	Смесь	Образец
1	37	5	5	1	1	В каждую пробирку раскатать по 49 мкл приготовленной реакционной смеси для проведения ПЦР2, внести 1 мкл отрицательного контроля ПЦР-1 Внести по 2 капли минерального масла в каждую пробирку	В каждую пробирку внести по 1 мкл образца, положительный контроль ПЦР-2 вносить в зоне внесения образца
2	74	10	10	2	2		
3	111	15	15	3	3		
4	148	20	20	4	4		
5	185	25	25	5	5		
6	222	30	30	6	6		
7	259	35	35	7	7		
8	296	40	40	8	8		
9	333	45	45	9	9		
10	370	50	50	10	10		
11	407	55	55	11	11		
12	444	60	60	12	12		
13	481	65	65	13	13		
14	518	70	70	14	14		
15	555	75	75	15	15		
16	592	80	80	16	16		
17	629	85	85	17	17		
18	666	90	90	18	18		
19	703	95	95	19	19		
20	740	100	100	20	20		
21	777	105	105	21	21		
22	814	110	110	22	22		
23	851	115	115	23	23		
24	888	120	120	24	24		
25	925	125	125	25	25		
26	962	130	130	26	26		
27	999	135	135	27	27		
28	1036	140	140	28	28		
29	1073	145	145	29	29		
30	1110	150	150	30	30		
31	1147	155	155	31	31		
32	1184	160	160	32	32		
33	1221	165	165	33	33		
34	1258	170	170	34	34		
35	1295	175	175	35	35		
36	1332	180	180	36	36		
37	1369	185	185	37	37		
38	1406	190	190	38	38		
39	1443	195	195	39	39		
40	1480	200	200	40	40		

ПРИЛОЖЕНИЕ 5.

АЛГОРИТМ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК из биоптатов легких, костей, операционного материала (туберкулом, каверн и проч)

1. Материал перенести в стерильную ступку со стерильным песком, тщательно измельчить стерильными ножницами, добавить 0,5-1,0 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия и энергично растереть до получения гомогенной массы, постепенно доведя объем добавляемого изотонического раствора до 4-5 мл. Через 1-2 минуты надосадочную жидкость в количестве 400 мкл перенести в пробирку 1,5 мл эпандорф, добавить изотонический раствор до 1,5 мл, тщательно перемешать на вортексе в течение 10 с.
2. Центрифугировать в течение 10 мин при 12000 об/мин при комнатной температуре (+18-25°C), надосадочную жидкость удалить.
3. Отмывку 500 мкл изотонического раствором хлорида натрия повторить при тех же параметрах.
4. Надосадочную жидкость удалить.
5. Добавить к осадку 30 мкл лизирующего буфера **ЛБ**. Перемешать на вортексе.
6. Прогреть пробирку в термостате в течение 30 мин при температуре +95°C, после чего охладить пробирку, поместив на лед на 5-10 мин.
7. Центрифугировать в течение 10 мин при 12000 об/мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость использовать для проведения ПЦР.
8. Хранить образцы ДНК при -20°C не более 1 мес

ПРИЛОЖЕНИЕ 6.

АЛГОРИТМ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК из крови

1. Кровь из вены или менструационная кровь берется из расчета 1объем консерванта+10объемов крови. В качестве консерванта берётся 0,2М раствор ЭДТА. Годятся так же пробирки от vacutaner или другие официальные с консервантом EDTA. В пробирку типа эппендорф наливается 150 мкл 0,2М раствора ЭДТА
2. Пробирку с кровью центрифугировать в течение 10 мин при 1000об/мин при комнатной температуре (+18-25°C), надосадочную жидкость удалить.
3. К осадку клеток добавить 1мл дистиллированной воды, перемешать на вортексе, центрифугировать 10 минут при 12000 об/мин
4. Повторить пункт 3 два-три раза. Критерий хорошей отмывки - прозрачный цвет надосадочной жидкости после центрифугирования.
5. Осадок отмыть в 1мл физиологического раствора при тех же режимах, надосадочную жидкость слить.
6. Добавить к осадку 30 мкл лизирующего буфера **ЛБ**. Перемешать на вортексе в течение 10 с.
7. Прогреть пробирку в термостате в течение 30 мин при температуре +95 °С, после чего охладить пробирку, поместив на лед на 5-10 мин.
8. Центрифугировать в течение 10 мин при 12000 об/мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость использовать для проведения ПЦР.
9. Хранить образцы ДНК при -20°C не более 1 мес

ПРИЛОЖЕНИЕ 7.

АЛГОРИТМ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК из культуры с жидкой питательной среды

1. 500-1000мкл жидкой среды перенести в пробирку 1,5 мл типа эппендорф.
2. Центрифугировать в течение 10 мин при 12000 об/мин при комнатной температуре (+18-25°C), супернатант удалить
3. К осадку добавить 30мкл лизирующего буфера ЛБ перемешать на вортексе в течение 10 с.
4. Прогреть пробирку в термостате в течение 30 мин при температуре +95°C, после чего охладить пробирку, поместив на лед на 5-10 мин.
5. Центрифугировать в течение 10 мин при 12000 об/мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость использовать для проведения ПЦР.
6. Хранить образцы ДНК при -20°C не более 1 мес

АЛГОРИТМ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК из культуры с плотной питательной среды

1. Петлёй или лопаточкой 1-2 колонии диаметром 1-2мм с плотной питательной среды перенести в пробирку 1,5мл типа эппендорф с 1000мкл физиологического раствора. Перемешать на вортексе в течение 10 с.
2. Центрифугировать в течение 10 мин при 12000 об/мин при комнатной температуре (+18-25°C), надосадочную жидкость удалить.
3. К осадку добавить 30мкл лизирующего буфера ЛБ, перемешать на вортексе в течение 10 с.
4. Прогреть пробирку в термостате в течение 30 мин при температуре +95°C (при недостаточной гомогенизации раствора через каждые 7-8 минут инкубации аккуратно встряхивать на вортексе) после чего охладить пробирку, поместив на лед на 5-10 мин.
5. Центрифугировать в течение 10 мин при 12000 об/мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость использовать для проведения ПЦР.
6. Хранить образцы ДНК при -20°C не более 1 мес.