

## **РУКОВОДСТВО**

### **ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ**

### **ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО КОМПЛЕКСА И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ФТОРХИНОЛОНАМ НА БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПАХ «ТБ-БИОЧИП-2»\***

Регистрационное удостоверение Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития РФ  
**№ ФСР 2010/08555 от 03.10.2010 г.**



\* Руководство составлено на основе Инструкции по применению набора реагентов для выявления микобактерий туберкулезного комплекса и определения их лекарственной чувствительности к фторхинолонам методом гибридизации с флуоресцентным изображением на биологическом микрочипе «ТБ-БИОЧИП-2» по ТУ 9398-003-02699501-2006, входящей в комплект регистрационной документации КРД № 27476 от 29.04.2010, утвержденной приказом Росздравнадзора от 03 августа 2010 г. № 7700-Пр/10

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА.

- 1.1. Набор реагентов ТБ-БИОЧИП-2 предназначен для выявления возбудителя туберкулеза в образцах мокроты человека и определения его лекарственной чувствительности к фторхинолонам методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей гибридизацией на биологическом микрочипе.
- 1.2. Фторхинолоны (ФХ) являются основными противотуберкулезными химиопрепаратами второго ряда. Устойчивость возбудителя туберкулеза к данному классу к фторхинолонам, обусловлена, в первую очередь, мутациями в гене *gyrA*. Набор ТБ-БИОЧИП-2 выявляет 10 мутаций в гене *gyrA* в течение 24 часов.
- 1.3. Набор рассчитан на проведение 100 анализов, включая положительные и отрицательные контрольные образцы (их количество зависит от количества анализируемых одновременно исследуемых образцов).

## 2. СТАДИИ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА.

- 2.1. Выявление микобактерий туберкулезного комплекса (МТБ) и определение их лекарственной чувствительности к ФХ 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) фрагмента гена *gyrA*, отвечающего 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 ФХ. Биологический микрочип представляет собой подложку с упорядоченно расположенными микроячейками полиакриламидного геля, содержащими ковалентно иммобилизованные олигонуклеотидные зонды, последовательности которых комплементарны как немутантным фрагментам гена *gyrA*, 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 отмывки 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 образовалось совершенных гибридизационных комплексов.

2.5. Анализ результатов гибридизации проводят на универсальном аппаратно-программном комплексе (УАПК) для анализа биочипов. Для возбуждения флуорофорных групп красителя, встроенного в процессе второй стадии ПЦР в исследуемый фрагмент генома и входящего в состав гибридизационного комплекса, используется монохроматический свет с длиной волны 650 нм. Флуоресцентные сигналы каждой ячейки регистрируются ПЗС-камерой и подвергаются 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 фторхинолонам.

### 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 (1,4 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-полимераза) – 1 пробирка (0,24 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 (1,5 мл);
- **ММ** (минеральное масло) – 1 флакон (10 мл);
- **MQ** (вода деионизованная со степенью очистки MQ для проведения ПЦР) – 1 флакон (10 мл).

**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 бромиды этидия) – 1 пробирка (0,02 мл);

- **ЭБ-1** (50-кратный буфер ТАЕ для проведения электрофореза) – 1 флакон (20 мл);
- **Агароза** (агароза для проведения электрофореза) – 10 пробирок (по 0,7 г);
- **ЭБ-2** (10-кратный буфер для нанесения образца) – 1 пробирка (0,24 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 микобактерий.
- 4.2. Метод позволяет обнаружить ДНК микобактерий туберкулезного комплекса в исследуемом образце (мокрота) и определить наличие/отсутствие устойчивости мутаций, приводящих к устойчивости к фторхинолонам, 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-2», 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 №64 от 21февраля 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. 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-2 приведен в Приложении 2.
- 5.5. По окончании работы использованные материалы и рабочее место должны быть соответствующим образом продезинфицированы.
- 5.6. При работе с включенным источником УФ-излучения следует пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской, не пропускающим УФ-лучи.
- 5.7. Запрещается снимать крышку с электрофорезной камеры при включенном источнике питания.
- 5.8. С агарозным гелем следует работать в перчатках и при использовании специально отведенной посуды. При его приготовлении используют бромид этидия, являющийся мутагеном. Необходимо помнить, что после проведения электрофореза бромид этидия содержится в электрофорезном буфере.
- 5.9. Обработка проб (деконтаминация и лизис), подготовка реакционной смеси для проведения ПЦР и электрофоретический анализ должны проводиться в разных (не менее 3-х) изолированных помещениях. Допускается проведение электрофореза и гибридизации в одном помещении.
- 5.10. 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.

- 5.11. 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.
- 5.12. Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводят ПЦР, должны обязательно до начала и после окончания работ облучаться ультрафиолетовым светом. Желательна также обработка поверхностей (и отработанных носиков) 0,1N р-ром соляной кислоты, в присутствии которой гидролиз ДНК происходит эффективнее.
- 5.13. Химическая посуда, пипетки, оборудование, которые используют 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 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.

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

### 7.3. Приготовление смеси для амплификации и проведение 1-й стадии ПЦР (комплект № 2).

- 7.3.1. Приготовить и маркировать необходимое количество (N) пробирок типа Эппендорф объемом 0,5 или 0,2 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	$19,5 \times (N+3)^1$ мкл
ПЦР-буф	$3,0 \times (N+3)$ мкл
дНТФ	$3,0 \times (N+3)$ мкл
ПР-1	$0,6 \times (N+3)$ мкл
Taq	$0,6 \times (N+3)$ мкл
UNG	$0,3 \times (N+3)$ мкл
Общий объем	$27 \times (N+3)$ мкл

- 7.3.3. Перемешать полученную реакционную смесь на вортексе и внести по 27 мкл в каждую приготовленную пробирку. Если используется 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 «К+» и «К-» 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. В процессе работы использовать только наконечники с фильтром.
- 7.3.5. Поместить пробирки в ДНК-амплификатор и провести амплификацию, используя приведенный ниже температурно-временной режим (Таблица 1).

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 pUC19/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 -20°C.

<sup>1</sup> (N+3) – N- число анализируемых проб; +3 обозначает увеличение объема с учетом двух контрольных пробирок «К+» и «К-» и погрешности при составлении смеси (на объем одной пробирки).



#### 7.4.1. Подготовка к проведению электрофореза.

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.

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

- Заполнить электрофорезную камеру буфером для проведения электрофореза (п. 7.3.1.1).
- Извлечь электрофорезный гель из формы (см п. 7.3.1.2.3) и поместить его в электрофорезную камеру.
- Нанести на гидрофобную поверхность по 1 мкл ЭБ-2 по количеству образцов.
- Из ПЦР-пробирки взять 8 мкл образца и добавить к ЭБ-2. Полученный раствор перемешать пипетированием и перенести 8 мкл в лунку электрофорезного геля. Провести операцию для всех исследуемых образцов и контролей.
- В крайнюю лунку внести ДНК маркер – 1 мкл Ladder.
- Провести электрофорез при 10 В/см в течение 20 мин.
- Выключить прибор для проведения электрофореза и извлечь из него электрофорезный гель.
- 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.

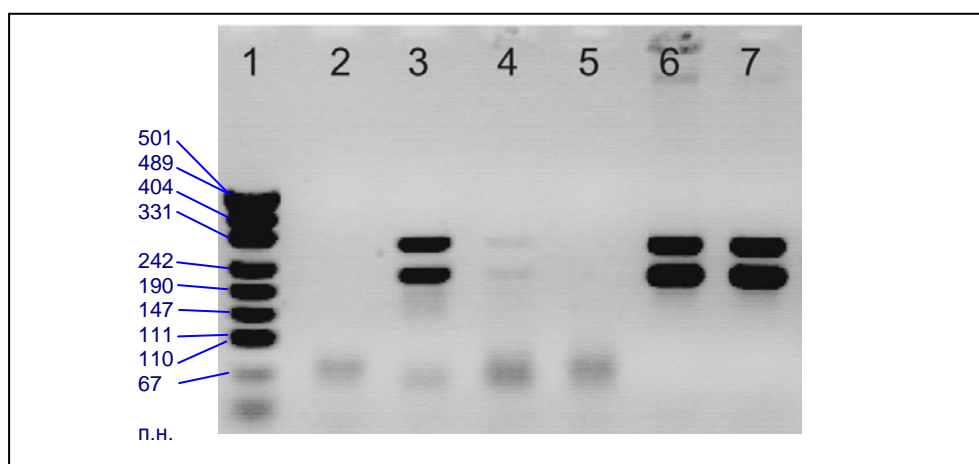


Рисунок 1. Результат проведения 1-й стадии ПЦР.

1- Молекулярный Маркер pUC19/MspI (Ladder из комплекта №3)

2- Отрицательный контроль 1-й стадии ПЦР ('К-')

3- ПЦР-продукт с положительным контрольным образцом ДНК в качестве

матрицы («К+»)

4-7 ПЦР-продукты с исследуемыми образцами ДНК в качестве матриц

#### 7.4.4. Учет результатов I этапа ПЦР (Рис. 1).

- Проверка отрицательного контроля.  
В дорожке, содержащей отрицательный контроль «К-» (колонка '2' 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.
- Проверка положительного контроля.  
В дорожке с положительным контролем «К+» (колонка '3' на Рис. 1) должен выявляться набор полос следующего размера: 309 п.н. (*IS6110*), 181 п.н. (*gyrA*). 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.
- 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*), 181 п.н. (*gyrA*). 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. дорожку '5' на Рис. 1), то считается, что в данном образце микобактерии туберкулеза отсутствуют, при этом II этап ПЦР и гибридизацию на чипе не проводят. Отсутствие ПЦР-продукта меньшего размера, соответствующего амплифицированному фрагменту гена *gyrA*, в образце, содержащем ДНК микобактерий туберкулеза, не является основанием для прекращения анализа (II этапа ПЦР и гибридизации на биочипе)
- Для определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза к фторхинолонам необходимо проведение II этапа ПЦР. Для проведения II этапа ПЦР используют лишь те образцы, в которых была выявлена ДНК микобактерий туберкулеза на I этапе ПЦР.

#### 7.5. Проведение II этапа ПЦР (комплект № 2).

- ##### 7.5.1.
- Приготовить и маркировать необходимое количество (N) пробирок типа Эппендорф объемом 0,5 или 0,2 мл для проведения II этапа ПЦР. Добавить дополнительные три пробирки для положительного и двух отрицательных контролей и маркировать их «К+», «К1-», «К2-». 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 «К1-» представляет отрицательный контроль, использующий «К-» I этапа ПЦР в качестве матрицы. Пробирка «К2-»

является отрицательным контролем II этапа где в качестве матрицы используется «К-» из комплекта №2 набора реагентов.

- 7.5.2. 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	$37 \times (N+4)^2$ мкл
ПЦР-буф	$5,0 \times (N+4)$ мкл
дНТФ	$5,0 \times (N+4)$ мкл
ПР-2	$1,0 \times (N+4)$ мкл
Taq	$1,0 \times (N+4)$ мкл
<b>Общий объем</b>	<b><math>49,0 \times (N+4)</math> мкл</b>

- 7.5.3. Перемешать смесь и внести по 49 мкл в пробирки, подготовленные для проведения ПЦР.
- 7.5.4. Если используется термоциклер без подогрева крышки, в каждую пробирку внести по 3 капли минерального масла MM для предохранения реакционной смеси от испарения при амплификации.
- 7.5.5. 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.
- 7.5.6. Поместить пробирки в термоциклер и провести ПЦР по следующей программе (таблица 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
	+63°С (отжиг праймеров)	30 с	
	+72°С (достройка праймеров)	30 с	
3	+72°С (завершающая инкубация)	5 мин	1

### 7.6. 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.

- 7.6.1. Учет результатов II этапа ПЦР (Рис. 2).

<sup>2</sup> (N+4) – N- число анализируемых проб; +4 обозначает увеличение объема с учетом трех контрольных пробирок «K+», «K<sub>1</sub>-», «K<sub>2</sub>-» и погрешности при составлении смеси (на объем одной пробирки).

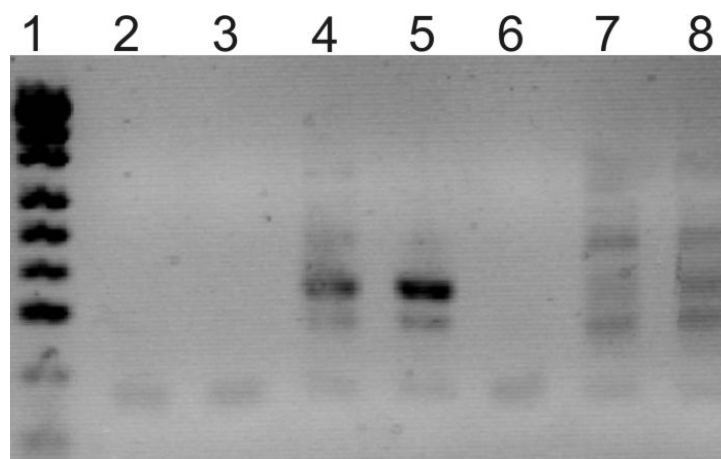


Рисунок 2. Результат проведения 2-й стадии ПЦР.

1- Молекулярный Маркер pUC19/MspI (Ladder из комплекта №3)

2- Отрицательный контроль «K1-»

3- Отрицательный контроль «K2-»

4- ПЦР-продукт с положительным контрольным образцом ДНК в качестве матрицы («K+»)

5-8- ПЦР-продукты с исследуемыми образцами в качестве матриц

- 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 '2' и '3') 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.
- Проверка положительного контроля.  
В дорожке с положительным контролем «K+» (колонка '4' на Рис. 2) должен наблюдаться набор полос с длинами в интервале от 90 до 140 н.п.
- 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 '5', '7', '8'). Результаты II этапа ПЦР не подлежат учету и последующей гибридизации на биологических микрочипах в случае отсутствия вышеуказанных специфичных полос (см. Дорожку '6').

### 7.7. Проведение гибридизации (комплекты №№ 4 и 5)

7.7.1. 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.

7.7.2. 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.

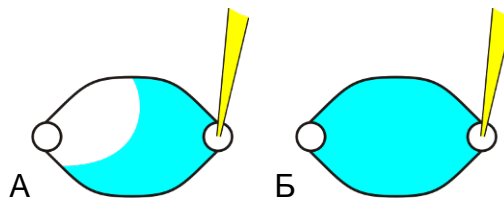


Рисунок 3. Проведение гибридизации.

А – внесение буфера ГБ,

Б – внесение реакционной смеси.

- 7.7.3. Закрыть крышку камеры.
- 7.7.4. Провести гибридизацию в закрытом суховоздушном термостате при +37°C в течение 6-18 ч.
- 7.7.5. 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.

- 7.7.5.1. Удалить реакционную смесь через любое из двух отверстий гибридизационной камеры. Замечание. Наконечник содержит раствор с непрогибризованными ПЦР-продуктами. Незамедлительно сбросить данный наконечник в спецрезервуар, содержащий раствор, вызывающий деградацию ДНК.
- 7.7.5.2. Внести в реакционную камеру биочипа 30 мкл дистиллированной воды, прогретой до 37°C. Подождать 1 минуту. Удалить воду. Повторить процедуру. Наконечники сбросить в спецрезервуар.
- 7.7.5.3. Аккуратно отсоединить гибридизационную камеру от подложки биочипа.
- 7.7.5.4. Промыть поверхность биочипа дистиллированной водой над емкостью для отходов, либо над раковиной. Для промывки чипа можно использовать банку-промывалку.
- 7.7.5.5. 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.

## 7.8. Учет результатов гибридизации.

- 7.8.1. Результаты гибридизации 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.
- 7.8.2. Произвести запуск программы «ImaGeWare»®, поставляющейся вместе с комплексом.
- 7.8.3. Программа содержит три вкладки в правой части окна: «Шаблон», «Снимок» и «Отчет».
- 7.8.4. 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 мутаций - «дикого типа».

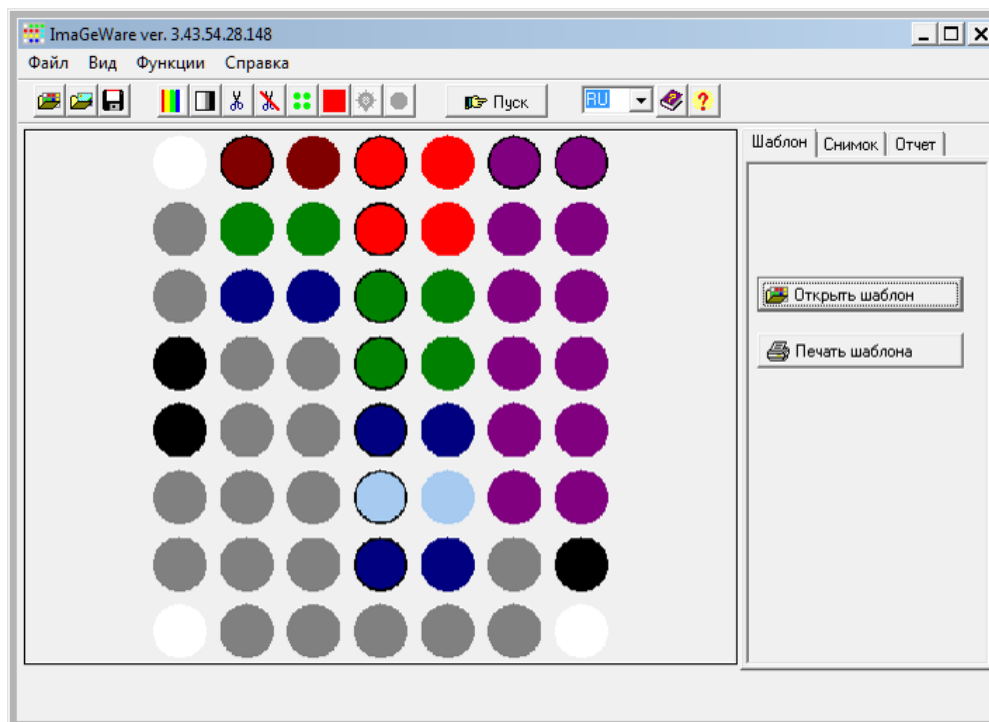


Рисунок 4. Диалоговое окно режима 'Шаблон'.

- 7.8.5. Биочип после проведения гибридизации, удаления гибридизационной камеры, ополаскивания и высушивания поместить в приемник Комплекса «лицевой» стороной (содержащей гелевые ячейки) кверху.
- 7.8.6. Работа программы предусматривает использование автоматического или ручного режимов.
- 7.8.7. 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 фторхинолонам. 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».

7.8.8. 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 осуществляют кнопкой «Позиции ячеек». Вычисление интенсивности свечения ячеек биочипа осуществляют 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.

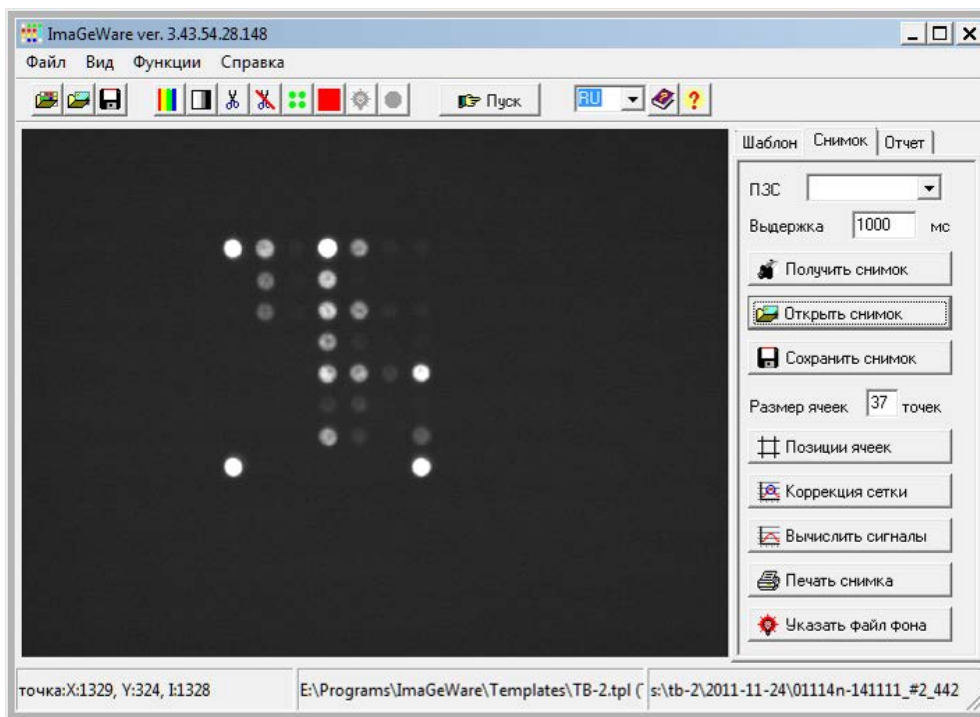


Рис. 5. Диалоговое окно режима 'Снимок'

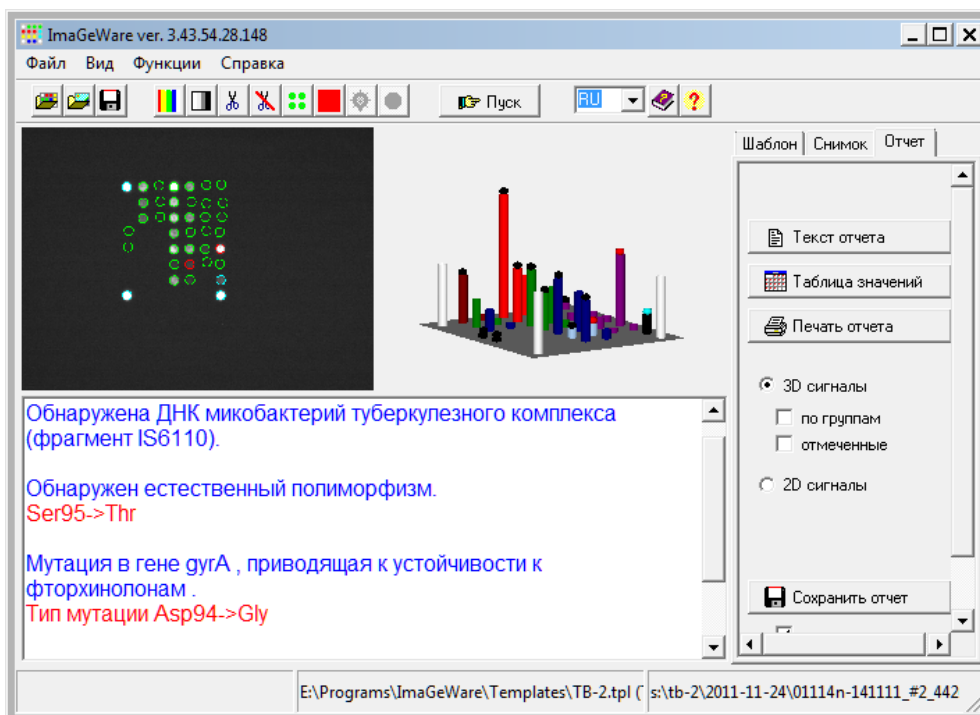


Рис. 6. Диалоговое окно режима 'Отчет'



## 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 '2' на Рис. 1) или второй (дорожки '2' и '3' на Рис. 2) стадий, присутствуют полосы, длины которых совпадают с длиной амплифицируемых специфических 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, раствором средства 'Пюржавель'). 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).

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-2, следует обращаться в ООО «БИОЧИП-ИМБ»:

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

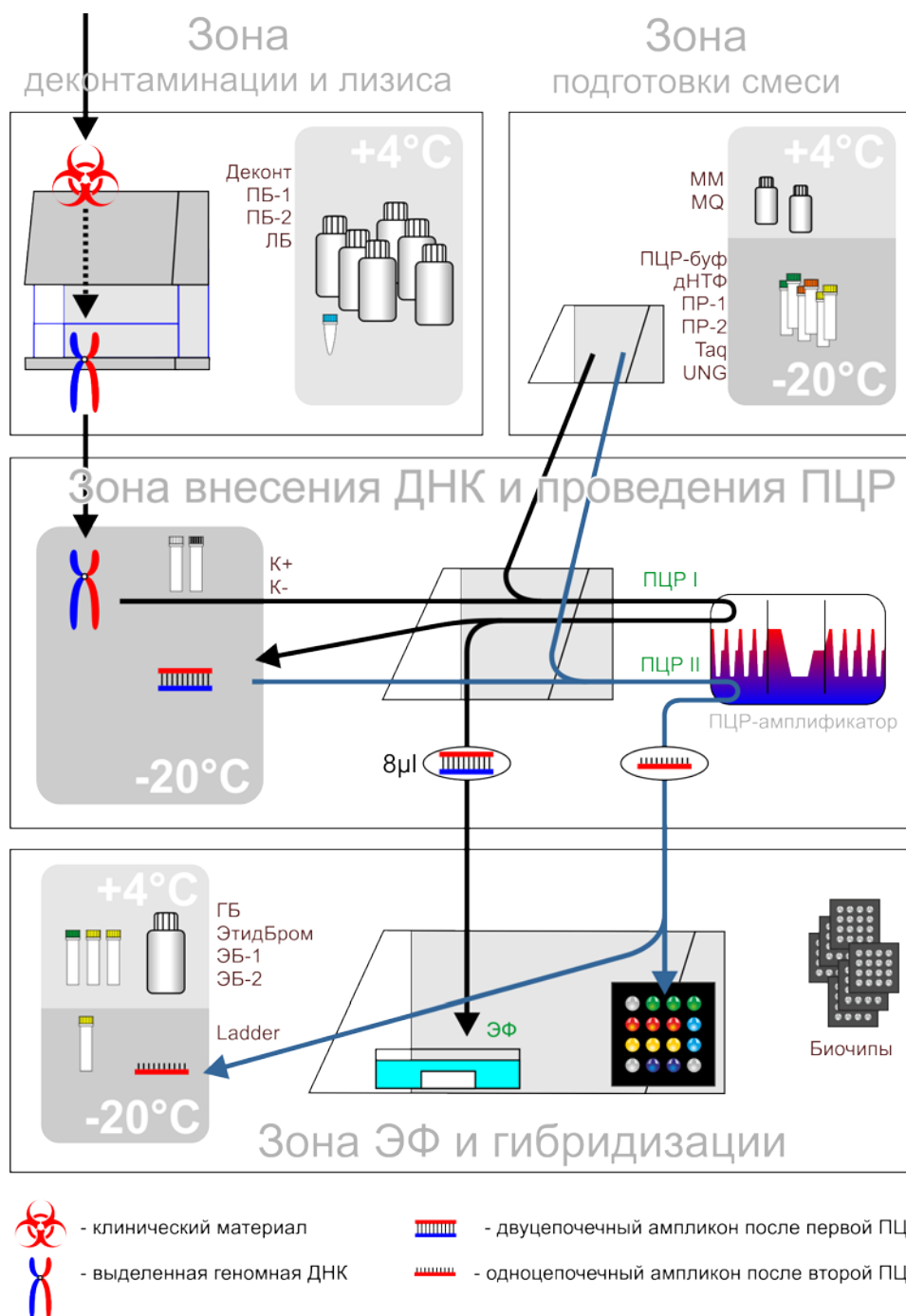
адрес для переписки: 117312, г.Москва, ул. Вавилова, д.17, пом.Б2

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.



## 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) <b>или</b> 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) <b>или</b> СМ-6М.01 (Elmi) - 2шт <b>или</b> LMC-4200R R-6 (BioSan) - 2шт	
3	Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф»	MiniSpin (Eppendorf)	1
4	Микроцентрифуга - вортекс	Микроспин FV-2400 (BioSan) <b>или</b> 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) <b>или</b> Лайт 100-1000мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
8	... 20-200мкл	Pipetman P200G (Gilson) <b>или</b> 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
<i>Расходные материалы (в расчете на 1 набор ТБ-Биочип)</i>			
17	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 1000 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-1000 (ULPlast) <b>или</b> SSI-4331-1FS (SSI)	5
18	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 200 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-200 (ULPlast) <b>или</b> SSI-4912-1FS (SSI)	5
19	... до 100 мкл ...	HT-F96S-100 (ULPlast) <b>или</b> 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) <b>или</b> БАВ-ПЦР «Ламинар-с» с УФ (Ламинарные системы)	1
2	Микроцентрифуга - вортекс	Микроспин FV-2400 (BioSan) <b>или</b> Комбиспин FVL-2400N (BioSan)	1
3	Холодильник -20°C /+4°C		1
4	Пипетка одноканальная автоматическая переменного объема: 200-1000мкл	Pipetman P1000G (Gilson) <b>или</b> Лайт 100-1000мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
5	... 20-200мкл	Pipetman P200G (Gilson) <b>или</b> Лайт 20-200 мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
6	... 10-100мкл	Pipetman Neo P100N (Gilson) <b>или</b> Лайт 10-100 мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
7	... 2-20мкл	Pipetman P20G (Gilson) <b>или</b> Лайт 2-20 мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
8	... 1-10мкл	Pipetman P10G (Gilson) <b>или</b> 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
<i>Расходные материалы (в расчете на 1 набор ТБ-Биочип)</i>			
15	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 1000 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-1000 (ULPlast) <b>или</b> SSI-4331-1FS (SSI)	1
16	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 200 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-200 (ULPlast) <b>или</b> SSI-4912-1FS (SSI)	1
17	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 100 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-100 (ULPlast) <b>или</b> SSI-4222-B1FS (SSI)	1

18	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 20 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-020 (ULPlast) <b>или</b> SSI-4222-A1FS (SSI)	1
19	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 10 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-010 (ULPlast) <b>или</b> 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) <b>или</b> БАВ-ПЦР «Ламинар-с» с УФ (Ламинарные системы)	1
2	Микроцентрифуга - вортекс	Микроспин FV-2400 (BioSan) <b>или</b> Комбиспин FVL-2400N (BioSan)	1
3	Многоканальный амплификатор ДНК	Mastercycler Personal (Eppendorf) <b>или</b> Терцик (ДНК-Технология)	1
4	Морозильник -20°C		1
5	Пипетка одноканальная автоматическая переменного объема: 1-10мкл	Pipetman P10G (Gilson) <b>или</b> 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
<i>Расходные материалы (в расчете на 1 набор ТБ-Биочип)</i>			
12	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 10 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-010 (ULPlast) <b>или</b> 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/Г-М-AR (BioSan) <b>или</b> 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) <b>или</b> Лайт 20-200 мкл (Thermo Fisher Scientific)	1
10	... 2-20мкл	Pipetman P20G (Gilson) <b>или</b> Лайт 2-20 мкл (Thermo Fisher Scientific)	2
11	... 1-10мкл	Pipetman P10G (Gilson) <b>или</b> 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		

<i>Расходные материалы (в расчете на 1 набор ТБ-Биочип)</i>			
22	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 200 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-200 (ULPlast) <b>или</b> SSI-4912-1FS (SSI)	1
23	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 20 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-020 (ULPlast) <b>или</b> SSI-4222-A1FS (SSI)	6
24	Наконечники с фильтром, стерильные, объемом до 10 мкл, 96 штук/штатив	HT-F96S-010 (ULPlast) <b>или</b> 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		