

**УТВЕРЖДЕНА**  
Приказом Росздравнадзора

**«УТВЕРЖДАЮ»**  
Генеральный директор  
ООО «Биочип-ИМБ»

от \_\_\_\_\_ 201\_ г. № \_\_\_\_\_



И.О. Ермолинская

10 декабря 2011 г.

**ИНСТРУКЦИЯ**  
**ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ СПОЛИГОТИПИРОВАНИЯ**  
**МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО И БЫЧЬЕГО ТИПОВ**  
**МЕТОДОМ ГИБРИДИЗАЦИИ**  
**НА БИОЛОГИЧЕСКОМ МИКРОЧИПЕ**  
**(СПОЛИГО-БИОЧИП)**

**1. НАЗНАЧЕНИЕ.**

1.1. Набор реагентов СПОЛИГО-БИОЧИП предназначен для сполиготипирования микобактерий туберкулёзного комплекса с флуоресцентным изображением на биологическом микрочипе. Набор позволяет не только выявлять наличие микобактерий туберкулёза человеческого или бычьего типов, но и проводить внутривидовое типирование, тем самым позволяя получить эпидемиологические данные о том или ином обнаруженном штамме.

1.2. Сполиготипирование представляет метод генотипирования микобактерий туберкулёзного комплекса (МБТ), основанный на полиморфизме локуса прямых повторов ДНК МБТ.

1.3. Набор рассчитан на проведение 100 анализов, включая положительные и отрицательные контрольные образцы (их количество зависит от количества анализируемых одновременно исследуемых образцов).

**2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.**

**2.1. Принцип действия.**

2.1.1. Набор реагентов СПОЛИГО-БИОЧИП основан на ПЦР с использованием специфических флуоресцентно-меченных праймеров и последующей гибридизации полученного ПЦР-продукта на биологическом микрочипе. ПЦР с использованием флуоресцентно меченых праймеров применяется для получения ПЦР-продукта, содержащего флуоресцентную метку – для последующей визуализации результатов гибридизации.

2.1.2. Гибридизация на биологическом микрочипе осуществляется для выявления 43 спейсеров локуса прямых повторов микобактерий туберкулёзного комплекса.

2.1.3. Биологический микрочип представляет собой подложку с иммобилизованными зондами, специфичными 43 спейсерам локуса прямых повторов ДНК микобактерий туберкулёза человеческого и бычьего типов. Интерпретация результатов осуществляется программно (полуавтоматически) в зависимости от того, с какими из иммобилизованных зондов прошла реакция амплификации. На основании картины гибридизации делается вывод о принадлежности штамма к микобактериям туберкулёза человеческого или бычьего типов, а также проводится внутривидовое типирование.

## 2.2. Состав набора.

В состав набора реагентов входят следующие компоненты:

а) комплект № 1 для выделения ДНК Микобактерий туберкулезного комплекса из биологического материала, включающий:

- 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);

б) комплект № 2 для проведения ПЦР, включающий:

- ПЦР-буф (10-кратный буфер для ПЦР с хлоридом магния) - 1 пробирка (1,5 мл);
- дНТФ (водный раствор дезоксинуклеозидтрифосфатов для проведения реакции ПЦР) - 1 пробирка (1,4 мл);
- ПР-1 (водный раствор праймеров для проведения ПЦР) – 1 пробирка (0,1 мл);
- ПР-2 (водный раствор флуоресцентно-меченных праймеров для специфической метки продукта реакции ПЦР) – 1 пробирка (0,5 мл);
- Таq (Таq-полимеразу) – 1 пробирка (0,2 мл);
- У (водный раствор флуоресцентно меченных урацил нуклеозид трифосфатов) – 1 пробирка (0,05 мл);
- УДГ (Урацил-ДНК-гликозилаза) - 1 пробирка (0,2 мл);
- БСА (водный раствор бычьего сывороточного альбумина) - 1 пробирка (0,6 мл);
- К+ (положительный контрольный образец ДНК *M. tuberculosis*) – 1 пробирка (0,1 мл);
- К – (отрицательный контрольный образец) – 1 пробирка (1,5 мл);
- ММ (масло минеральное) – 1 флакон (10 мл);
- MQ (вода деионизованная для проведения ПЦР) – 1 флакон (10 мл).

в) комплект № 3 для проведения гибридизации на биочипе, включающий:

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

г) комплект № 4, включающий биочипы – 100 штук.

## 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

3.1. Специфичность. Набор специфично определяет участки локуса прямых повторов ДНК Микобактерий туберкулезного комплекса в исследуемом образце.

3.2. Чувствительность. Набор способен выявлять 43 участка локуса прямых повторов ДНК Микобактерий туберкулезного комплекса не более 400 геном-эквивалентов в 2 мкл образца ДНК после обработки комплектом №1.

## 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором необходимо соблюдать требования "Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР" (Москва, 1981 г).

4.4. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.5. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с набором.

4.6. Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда и др., а также рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

4.7. Все работы с выделенными нуклеиновыми кислотами и реагентами для проведения ПЦР должны выполняться только с использованием одноразовых наконечников (с аэрозольным фильтром и маркировкой “DNase, RNase FREE”) для полуавтоматических пипеток.

4.8. Перемещение персонала из помещения в помещение должно проходить под строгим контролем. Смена верхней одежды, головных уборов, обуви и перчаток является обязательным условием при переходе из помещения для электрофореза.

4.9. Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, должны обязательно до начала и после окончания работ облучаться ультрафиолетовым светом.

## 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Комплекс универсальный аппаратно-программный (УАПК);
- ДНК-амплификатор автоматический;
- центрифуга для микропробирок, позволяющая развивать ускорение 10000 g;
- холодильник бытовой;
- встряхиватель вихревой для микропробирок (вортекс);
- термостат суховоздушный закрытый, поддерживающий температуру +37 °С;
- термостат суховоздушный для микроцентрифужных пробирок вместимостью 500 и 1500 мкл, поддерживающий температуру до +95 °С;
- плитка электрическая, поддерживающая температуру +150 °С, или СВЧ-печь;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие забирать объемы жидкости 2, 10, 20, 100, 200 и 1000 мкл;
- колбы мерные вместимостью 50 и 1000 мл;
- колба коническая плоскодонная термостойкая вместимостью 200 мл;
- пробирки пластиковые стерильные вместимостью 200 или 500 мкл в зависимости от типа столика амплификатора и 1500 мкл с крышками;
- перчатки резиновые или пластиковые без талька (неопудренные);
- вода дистиллированная.

## 6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

Для анализа используется мокрота или заранее подготовленные культуры микобактерий.

## 7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

### 7.1. Подготовка реагентов для анализа.

#### 7.1.1. Приготовление смеси для обработки мокроты (комплект № 1).

Содержимое одной пробирки Деконт-А количественно перенести во флакон с раствором Деконт-Б и тщательно перемешать до полного растворения. Полученной смеси достаточно для обработки 10 образцов.

Приготовленная смесь должна быть использована в течение времени не более 8 ч.

#### 7.1.2. Приготовление промывающего раствора ПБ-1.

Содержимое флакона ПБ-1 количественно перенести в мерную колбу вместимостью 1000 мл, довести объем дистиллированной водой до метки и тщательно перемешать.

Допускается стерилизация раствора автоклавированием при 1 атм. в течение 40 мин.

Приготовленный раствор можно хранить при температуре +2-8°С не более 1 мес.

### 7.2. Процедура анализа.

#### 7.2.1. Обработка мокроты и выделение ДНК (комплект № 1).

7.2.1.1. К 2-5 мл анализируемого образца мокроты добавить равный объем (2-5 мл) смеси для обработки мокроты (см п. 7.1).

7.2.1.2. Смесь инкубировать в течение 20 мин при комнатной температуре (+18-25°C), периодически помешивая.

7.2.1.3. После окончания инкубации добавить к смеси 1 объем промывающего раствора ПБ-1 (см п. 7.2) и перемешать на вортексе.

7.2.1.4. Центрифугировать в течение 20 мин при 3000 g при комнатной температуре, надосадочную жидкость удалить.

7.2.1.5. Оставшуюся суспензию клеток (200-400 мкл) перенести в пластиковую центрифужную пробирку вместимостью 1500 мкл. Для этого использовать отдельную полуавтоматическую пипетку, рассчитанную на объем до 1000 мкл, и одноразовый наконечник с фильтром.

7.2.1.6. Добавить к суспензии клеток 1 объем промывающего раствора ПБ-1 и перемешать смесь на вортексе.

7.2.1.7. Центрифугировать в течение 10 мин при 10000 g при комнатной температуре.

7.2.1.8. Добавить 100 мкл промывочного буфера ПБ-2 и перемешать на вортексе.

7.2.1.9. Центрифугировать смесь в течение 10 мин при 10000 g при комнатной температуре.

7.2.1.10. Повторить пункты 7.2.1.8-7.2.1.9.

7.2.2. Приготовление смеси для амплификации и постановка ПЦР (комплект № 2).

7.2.2.1. Приготовить пробирки вместимостью 500 мкл для проведения ПЦР, пронумеровать их в соответствии с количеством исследуемых образцов и расположить в штативе соответствующим образом.

7.2.2.2. Приготовить реакционную смесь для проведения ПЦР (комплект № 2). В стерильную пробирку для приготовления реакционной смеси вместимостью 500-1500 мкл в зависимости от числа анализируемых образцов N внести следующие компоненты набора в указанных ниже последовательности и количестве:

|                          |                  |
|--------------------------|------------------|
| Вода деионизованная (MQ) | 14,5 x (N+1) мкл |
| ПЦР-буфер                | 3,0 x (N+1) мкл  |
| ДНТФ                     | 3,0 x (N+1) мкл  |
| ПР-1                     | 0,8 x (N+1) мкл  |
| ПР-2                     | 5,0 x (N+1) мкл  |
| Taq                      | 0,6 x (N+1) мкл  |
| У                        | 0,3(N+1) мкл     |
| УДГ                      | 0,3 x (N+1) мкл  |
| БСА                      | 0,5(N+1) мкл     |
| Общий объем              | 28 x (N+1) мкл   |

7.2.2.3. Внести смесь по 28 мкл в пробирки, подготовленные для проведения ПЦР.

7.2.2.4. Внести аликвоту (2 мкл) анализируемых образцов (см п. 7.2.1.10), а также контроли ПЦР К+ и К- в пробирки с реакционной смесью. При использовании амплификатора без подогрева крышки в каждую пробирку добавить по 30 мкл масла минерального вазелинового ММ.

7.2.2.5. Поместить пробирки в автоматический ДНК-амплификатор и провести амплификацию по следующей программе (см таблицу 1).

Таблица 1. Температурно-временной профиль ПЦР.

| Шаг программы | Температура, °C | Время инкубации | Количество циклов |
|---------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| 1             | +95             | 300 с           | 1                 |
| 2             | +95             | 40 с            | 52                |
|               | +63             | 40 с            |                   |
|               | +72             | 40 с            |                   |
| 3             | +72             | 420 с           | 1                 |

### 7.2.3 Проведение гибридизации (комплекты №№ 4 и 5)

7.2.3.1. Перенести по 12 мкл реакционной смеси после ПЦР в пробирки вместимостью 500 мкл.

7.2.3.2. Добавить в каждую пробирку по 24 мкл раствора ГБ и перемешать на вортексе в течение 5 с.

7.2.3.3. Нанести на биочип 32 мкл полученной смеси.

7.2.3.4. Провести гибридизацию в закрытом суховоздушном термостате при температуре +37°C в течение времени 10-16 ч

7.2.3.5. После гибридизации снять защитную пленку с камеры биочипа, отсосать жидкость из камеры полуавтоматической пипеткой и дважды промыть дистиллированной водой, предварительно подогретой до температуры +37 °C. Высушить биочип в струе воздуха до полного исчезновения капель на поверхности подложки.

## 8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

8.1. Результаты гибридизации регистрируют с помощью Комплекса универсального аппаратно-программного (УАПК) для анализа биочипов. Установка и эксплуатация Комплекса осуществляются в соответствии с Инструкцией по пользованию комплексом УАПК.

8.2. Оператор может визуально проконтролировать флуоресцентное изображение на биологическом микрочипе. Для этого после завершения процедуры автоматической интерпретации результатов (см п. 8.1) следует переключиться на закладку «Снимок» в правой части экрана и визуально проконтролировать автоматическое наложение сетки на изображения ячеек микрочипа (Рис. 2). В случае некорректного наложения сетки следует «протащить» мышкой левую и правую нижние элементы сетки до соответствующих ячеек микрочипа. При этом сетка должна полностью наложиться на изображение микрочипа. После этого следует переключиться на закладку «Отчет» и снова проверить выдаваемые программой результаты (Рис. 3).

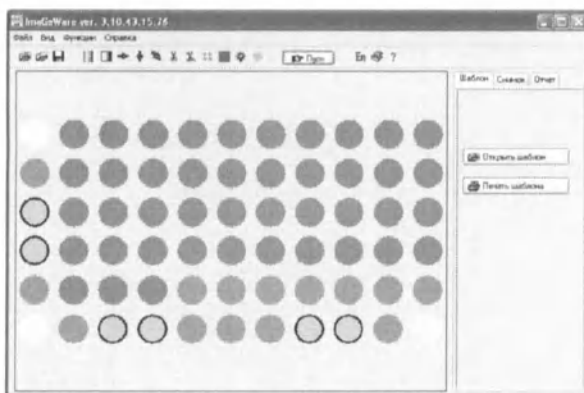


Рис. 1. Диалоговое окно режима 'Шаблон'.

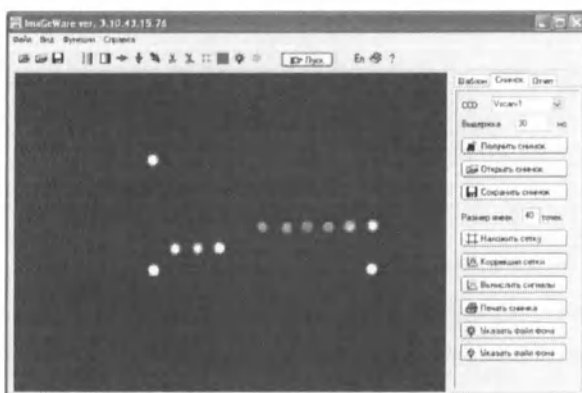


Рис. 2. Диалоговое окно режима 'Просмотр'.



Рис. 3. Диалоговое окно режима 'Отчет'.

## 9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Полученные результаты необходимо сохранять в виде электронных отчетов, выдаваемых специализированной программой, входящей в состав Комплекса универсального аппаратно-программного (УАПК) для анализа биочипов (см. п. 8.)

## 10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Хранение наборов в упаковке предприятия-изготовителя должно производиться при следующих условиях:

комплекты №№ 1, 3 и 4 - при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности набора; допускается хранение комплектов №№ 1, 3 и 4 при температуре до 25 °С не более 3 сут;

комплект № 2 - при температуре минус 20 °С в течение всего срока годности набора; допускается хранение комплекта № 2 при температуре не выше 0 °С не более 1 сут.

10.2. Срок годности набора - 6 мес.

10.3. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора СПОЛИГО-БИОЧИП, следует обращаться в Общество с ограниченной ответственностью «Биочип-ИМБ» по адресу: 117312, г. Москва, ул. Вавилова, д. 17, помещ. Б2, тел./факс (499) 135-97-61.

Зам. директора по производству

Паньков С.В.

И.О. Зав. Отдела Микробиологии  
ГУ ЦНИИТ РАМН,  
д.м.н., проф.

Л.Н. Черноусова

Пронумеровано, прошнуровано  
и скреплено 6 листа (-ов)

Ген. Директор ООО «Биочип-ИМБ»  
И.О. Ермолинская

