



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Ветбиохим»

А.В. Кривонос

«12» августа 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Тест-системы для индикации и дифференциации *M. bovis* и *M. tuberculosis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

(организация-производитель – ООО «Ветбиохим», г. Москва)

I ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Тест-система для индикации и дифференциации *M. bovis* и *M. tuberculosis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

1.2 Тест-система состоит из 3 наборов и рассчитана на выделение ДНК из 25 образцов и проведение 50 реакций ПЦР с двумя парами праймеров для двух видов микобактерий (таблица 1).

Таблица 1

№	Наименование	Количество	Упаковка
Набор I - для выделения ДНК			
1	Раствор – 1	6,0 мл	1 флакон
2	Раствор – 2	18,0 мл	1 флакон
3	Раствор – 3	6,0 мл	1 флакон
4	Раствор – 4	6,0 мл	1 флакон
5	Сорбент	2,0 мл	1 пробирка
6	Лизоцим	0,06 г	1 пробирка
7	Вода деионизованная	2,0 мл	1 пробирка
Набор II - для выявления ДНК микобактерий методом ПЦР			
Общие реагенты			
1	Буфер для ПЦР-1	0,9 мл	1 пробирка
2	Буфер для ПЦР-2	0,9 мл	1 пробирка
3	Тақ-полимераза	0,03 мл	1 пробирка
4	Минеральное масло	5,0 мл	1 флакон
Комплект реагентов для детекции ДНК <i>M. bovis</i> и <i>M. tuberculosis</i>			
5	Праймеры Т2-Т2А для ПЦР-1	0,135 мл	1 пробирка
6	Праймеры Т4-Т4А для ПЦР-2	0,135 мл	1 пробирка
7	Положительный контроль ДНК <i>M. bovis</i> BCG	0,200 мл	5 пробирок
Комплект реагентов для детекции ДНК <i>M. tuberculosis</i>			
8	Праймеры Т1-Т1А для ПЦР-1	0,135 мл	1 пробирка
9	Праймеры Т3-Т3А для ПЦР-2	0,135 мл	1 пробирка
10	Положительный контроль ДНК <i>M. tuberculosis</i>	0,025 мл	1 пробирка
Набор III – для электрофореза			
1	Агароза	5,0 г	1 пакет
2	Буфер для электрофореза	20 мл	1 флакон
3	Бромистый этидий	0,15 мл	1 пробирка

Тест-система предназначена для выявления и дифференциации ДНК *Mycobacterium bovis* и *Mycobacterium tuberculosis* в культурах микобактерий, а также материале от животных (кровь, фекалии, носовые и фарингеальные смывы, носовая и бронхиальная слизь, лимфоузлы, фрагменты паренхиматозных органов).

1.3 Упаковка и маркировка

Компоненты тест-систем расфасованы в полипропиленовые флаконы с завинчивающимися крышками вместимостью 30 мл, 13 мл и 20 мл, пластиковые пробирки с завинчивающимися

мися крышками вместимостью 0,5-2,0 мл. На пробирки и флаконы наклеена этикетка с указанием краткого названия компонента.

Наборы I, II и III отдельно упакованы в полиэтиленовые пакеты. На каждый пакет с компонентами наборов наклеена этикетка с указанием организации-производителя и разработчика и/или товарного знака, наименования набора, номера серии и контроля, даты изготовления, срока годности, условий хранения.

Наборы I и III, упакованные в полиэтиленовые пакеты, вложены в картонную или пластиковую коробку. На каждой коробке наклеена этикетка или нанесены типографским способом следующие обозначения: наименование предприятия-изготовителя, полное наименование тест-системы, количество анализов, номер серии и контроля, дата изготовления, срок годности, условия хранения, обозначение СТО, надпись «Для ветеринарного применения». В каждую упаковку вложена инструкция по применению тест-системы.

1.4. Условия хранения и транспортирования

Наборы I и III следует хранить при температуре от 2°C до 25°C, Набор II – при температуре от минус 18°C до минус 20°C.

Транспортирование Набора I и III проводить при температуре от 2°C до 25°C. Набор II транспортировать во льду в теплоизолирующей упаковке (термос, пенопластовая коробка). При получении тест-систему необходимо разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Срок годности тест-системы: 12 месяцев от даты изготовления.

Запрещается использовать тест-систему по истечении срока годности.

Флаконы и пробирки без этикеток, с нарушением целостности, изменением консистенции или цвета компонентов, при наличии плесени или других примесей и неиспользованные в течение срока годности подлежат выбраковке. Обеззараживание биоматериала и реагентов необходимо проводить, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, флаконы, наконечники) на 20-24 ч в специальный контейнер, содержащий 0,2% раствор ДП-2Т или аналогичные.

II ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

2.1 Тест-система включает два комплекта реагентов для выявления микобактерий: один из них является универсальным и позволяет обнаружить как *M. bovis*, так и *M. tuberculosis* (комплект реагентов для детекции ДНК *M. bovis* и *M. tuberculosis*), а другой предназначен только для выявления *M. tuberculosis* (комплект реагентов для детекции ДНК *M. tuberculosis*).

2.2 Идентификацию микобактерий проводят с помощью полимеразной цепной реакции. В основе метода лежит многократное циклическое повторение трех процессов: тепловой денатурации ДНК; гибридизации («отжига») исследуемой ДНК со специфическими олигонуклеотидными зондами (праймерами); синтеза комплементарных цепей ДНК с помощью термостабильной ДНК-полимеразы. В результате проведения n циклов амплификации концентрация синтезированного фрагмента в исследуемой пробе увеличивается в 2^n раз (например, в миллион раз после 20 циклов), что позволяет визуально учитывать результаты анализа с помощью электрофореза в агарозном геле.

2.3 Для детекции микобактерий применяется двухступенчатая, так называемая, «гнездовая» модификация метода ПЦР с использованием внутренних и внешних праймеров. Для индикации суммарной ДНК *M. tuberculosis* и *M. bovis* используются внешние праймеры Т2-Т2А в ПЦР-1 и внутренние Т4-Т4А в ПЦР-2. Для идентификации ДНК *M. tuberculosis* используются внешние праймеры Т1-Т1А в ПЦР-1 и внутренние Т3-Т3А в ПЦР-2.

III ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

3.1 Подготовка к работе

3.1.1 Необходимые условия успешного проведения анализа:

Строго соблюдать условия хранения и транспортировки компонентов тест-системы (см. п.1.4).

Однократно использовать пластиковую посуду. Ранее использованные и мытые наконечники и пробирки использовать нельзя.

На всех этапах анализа в первую очередь проводить манипуляции с отрицательным контролем, затем с исследуемыми образцами и в последнюю очередь с положительным контролем.

Посуда для отбора образцов биоматериала должна быть одноразовой или тщательно обработана хромовой смесью, отмыта, стерилизована.

Перед открыванием пробирок капли жидкости на крышках удалять центрифугированием; избегать случайного касания руками или инструментами внутренней поверхности крышек.

На всех стадиях обработки биоматериала удаление супернатанта производить одноразовыми пластиковыми наконечниками при помощи водоструйного насоса в колбу-ловушку с дезинфицирующим раствором (3% хлорамин или 5% перекись водорода и т. п.).

Бромистый этидий разлагается на свету и при нагревании. Содержащие его растворы хранить в темном месте. При длительном хранении или многократном нагревании в них перед употреблением следует внести свежую порцию бромистого этидия (5 мкл на 100 мл буфера).

3.1.2 Подготовка исследуемого материала

• **КРОВЬ:** пробы цельной крови должны быть обязательно консервированы 3-6%-ным раствором ЭДТА или 3,8%-ным раствором цитрата натрия. Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта. Пробирки с цельной кровью смешанной с антикоагулянтом хранить и транспортировать при температуре от 2°C до 8°C не более 24 часов. Не допускается замораживание образцов цельной крови. Для выделения ДНК использовать 200 мкл образца, помещенного в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

• **НОСОВЫЕ И ФАРИНГЕАЛЬНЫЕ СМЫВЫ:** 5-10 мл смывов центрифугировать при 5000 об/мин в течение 10 мин., надосадочную жидкость осторожно отобрать так, чтобы над осадком осталось примерно 200 мкл жидкости. Если осадка очень мало, то к пробе добавить еще 5-10 мл смыва и центрифугировать в том же режиме. Надосадочную жидкость отобрать, чтобы осталось примерно 200 мкл жидкости, осадок суспендировать в оставшемся объеме жидкости и перенести в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл для выделения ДНК.

• **БРОНХИАЛЬНАЯ СЛИЗЬ:** Для выделения ДНК использовать 200 мкл слизи, помещенной в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

• **ОРГАНЫ:** для исследования использовать цельные лимфоузлы, кусочки печени или селезенки, помещенные в пробирки с физиологическим раствором. Образцы хранить и транспортировать при температуре от 2°C до 8°C не более 3 суток, при температуре от минус 18°C до минус 20°C не более 10 суток. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Образец органа измельчить стерильными ножницами или растереть в физиологическом растворе или в фосфатном буфере (приготовить примерно 10% суспензию). Для выделения ДНК использовать 200 мкл готовой суспензии, помещенной в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

• **ФЕКАЛИИ:** для исследования использовать пробы фекалий массой (объемом) примерно 1-3 г (1-3 мл). Образцы хранить при температуре от 2°C до 8°C не более 3 суток. При исследовании фекалий без предварительного замораживания суспендировать их в фосфатном буфере или физиологическом растворе (приготовить 10-20%-ную суспензию), затем центрифугировать 5 мин при 9000 об/мин. Для выделения ДНК использовать 200 мкл супернатанта, помещенного в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

При необходимости длительного хранения к 10-20%-ной фекальной суспензии добавить глицерин до конечной концентрации 10-15%, гомогенизировать, экспонировать пробу 30-40 минут и заморозить при температуре от минус 18°C до минус 20°C. Хранить не более 7 суток. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

• **КУЛЬТУРЫ МИКОБАКТЕРИЙ:** для выделения ДНК использовать 200 мкл культуры, помещенной в полипропиленовую пробирку на 1,5-2,0 мл.

• **КОНТРОЛИ:** использовать положительные и отрицательные контроли на этапе выделения ДНК (п. 3.2). Положительным контролем этапа выделения является рекомбинантная ДНК *M. bovis* VCG. Пробирку с контролем размораживать непосредственно перед исполь-

зованием, повторной заморозке не подлежит. Для выделения использовать 200 мкл. Выделенную ДНК (5 мкл) использовать для проведения ПЦР. Положительным контролем этапа ПЦР (п.3.3) является рекомбинантная ДНК *M. tuberculosis*. Пробирку с контролем размораживать непосредственно перед использованием. В ПЦР использовать 5 мкл.

В качестве отрицательного контроля использовать 200 мкл деионизованной воды.

Положительные контроли хранить при температуре от минус 18°C до минус 20°C, размораживать непосредственно перед использованием.

3.2 Выделение ДНК

Выделение ДНК из исследуемого биологического материала проводить с помощью **Набора I - для выделения ДНК.**

3.2.1 Обработка проб раствором-1 и лизоцимом.

Внимание! На данном этапе положительный контроль не используется.

- Отобрать и маркировать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая отрицательный («К-») контроль выделения.

- **Подготовка рабочего раствора-1 с лизоцимом:** отобрать в отдельный флакон или пробирку необходимое количество раствора-1, исходя из расчета 200 мкл на 1 пробу, включая отрицательный контроль. К отобранному раствору-1 добавить лизоцим до конечной концентрации 10 мг/мл (например на 10 образцов понадобится 2 мл раствора-1 и 20 мг лизоцима). Данный раствор готовить непосредственно перед употреблением, допускается хранение не более 48 часов при температуре от 2°C до 6°C.

- Внести в каждую маркированную пробирку по 200 мкл рабочего раствора-1 с лизоцимом.

- В подготовленные пробирки с раствором-1 внести по 200 мкл образцов биологического материала и «К-» в следующей последовательности:

1. В пробирку, маркированную «К-», внести 200 мкл деионизованной воды;

2. В соответствующие пробирки внести по 200 мкл исследуемых проб;

- Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.
- Перемешать пробы на смесителе типа “Vortex”.
- Инкубировать пробы 10 минут при комнатной температуре (20±2°C), каждые 3 минуты перемешивая на смесителе типа “Vortex”.

- Поместить пробы в термостат (например, «Гном», ДНК-Технология), инкубировать при температуре 95°C в течение 15 минут. **Примечание:** чтобы избежать самопроизвольного открывания пробирок при нагревании, следует придавить их сверху грузом или использовать специальные пробирки с защелкой.

3.2.2 Выделение ДНК (на данном этапе используется положительный контроль ДНК *M.bovis* BCG).

- Отобрать и маркировать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл, включая положительный («К+») и отрицательный («К-») контроли выделения.

- В случае образования кристаллов в растворе-2 и растворе-3, инкубировать их при температуре от 60 до 65°C до полного растворения.

- Внести в каждую пробирку по 600 мкл раствора-2.

- Пробирку с сорбентом встряхнуть на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента. В каждую пробирку с раствором-2 внести по 40 мкл ресуспендированного сорбента.

- Инкубированные пробы с раствором-1 и лизоцимом центрифугировать в настольной центрифуге типа “Эппендорф” 2 минуты при максимальных оборотах. После центрифугирования надосадочную жидкость перенести в подготовленные пробирки с раствором-2 и сорбентом, а осадок отбросить. Вначале перенести «К-», затем исследуемые пробы. Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.

- В пробирку, маркированную «К+», внести 200 мкл положительного контроля ДНК *M. bovis*.

- Перемешать пробы на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента.

- Инкубировать 10 минут при комнатной температуре (20±2)°С, каждые 3 минуты перемешивая пробы на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента.

- Осадить сорбент центрифугированием на микроцентрифуге в течение 15 сек при максимальных оборотах. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, используя отдельный наконечник для каждой пробы.

- К осадку добавить 100 мкл раствора-3, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Перемешать пробы на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента. Осадить сорбент центрифугированием на микроцентрифуге в течение 15 сек при максимальных оборотах. Удалить надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Процедуру повторить еще раз.

- К осадку добавить 100 мкл раствора-4, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Перемешать на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования сорбента. Осадить сорбент центрифугированием на микроцентрифуге в течение 15 сек при максимальных оборотах. Удалить надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Процедуру повторить еще раз.

- Осадок сушить в течение 10 минут при 56°С, крышки у пробирок должны быть открыты.

- Добавить к осадку 30 мкл деионизованной воды, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Перемешать на смесителе типа “Vortex” до полного ресуспендирования осадка.

- Инкубировать пробы 10 минут при 56°С в закрытых пробирках, каждые 3 минуты перемешивая их на смесителе типа “Vortex”. Центрифугировать в течение 1 мин при максимальных оборотах. Надосадочная жидкость содержит выделенную ДНК и предназначена для проведения ПЦР (п. 3.3). Рекомендуется проводить ПЦР сразу после получения выделенных ДНК-проб. **Допускается хранение проб во льду или в холодильнике при температуре не выше 6°С не более 15 минут.**

- При необходимости длительного хранения, следует очень осторожно, не взмучивая сорбент, отобрать надосадочную жидкость в отдельные маркированные одноразовые пробирки. Если сорбент взмутился, осадить его центрифугированием. Вначале отобрать «К-», затем исследуемые пробы, затем «К+». Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером. Выделенные пробы заморозить при температуре от минус 18°С до минус 20°С и хранить не более 7 суток. Размораживать непосредственно перед использованием в ПЦР (п. 3.3), не допускается многократное размораживание проб.

3.3 Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Для выполнения ПЦР использовать **Набор П - для выявления ДНК микобактерий методом ПЦР.**

Для каждой исследуемой пробы параллельно поставить две реакции. Одна из них позволяет обнаружить ДНК *M. bovis* и ДНК *M. tuberculosis* с помощью универсальных праймеров Т2-Т2А в ПЦР-1 и Т4-Т4А в ПЦР-2. Другая предназначена для выявления только ДНК *M. tuberculosis* с помощью специфичных праймеров Т1-Т1А в ПЦР-1 и Т3-Т3А в ПЦР-2 (см. таблицу 2).

Таблица 2

Объект анализа	Праймеры ПЦР-1	Праймеры ПЦР-2
<i>M. bovis</i> и <i>M. tuberculosis</i>	Т2-Т2А	Т4-Т4А
<i>M. tuberculosis</i>	Т1-Т1А	Т3-Т3А

3.3.1 ПЦР-1.

Отобрать и маркировать необходимое количество пробирок с учетом положительных и отрицательных контрольных образцов.

Параллельно в отдельных пробирках приготовить две реакционные смеси на n+1 образцов, где n – количество проб с учетом положительных и отрицательных контролей.

Реактивы внести в количестве и последовательности, указанной в таблице 3 и таблице 4. Все реактивы, **кроме Таq-полимеразы**, должны быть прогреты при комнатной температуре до полного растворения кристаллов льда.

Перед открыванием пробирок рекомендуется осадить капли со стенок и крышек кратким центрифугированием (5-10 сек). Таq-полимеразу добавить в последнюю очередь, при составлении смеси следует держать ее во льду, нагревание не допускается.

Таблица 3. Реакционная смесь для детекции суммарной ДНК *M. bovis* и *M. tuberculosis*

Реактив	Кол-во на 1 пробу (мкл)	Кол-во на n+1 проб (мкл)
Буфер для ПЦР-1	15,25	15,25 x (n+1)
Праймеры T2-T2A для ПЦР-1	4,5	4,5 x (n+1)
Таq-полимераза	0,25	0,25 x (n+1)

Таблица 4. Реакционная смесь для детекции ДНК *M. tuberculosis*

Реактив	Кол-во на 1 пробу (мкл)	Кол-во на n+1 проб (мкл)
Буфер для ПЦР-1	15,25	15,25 x (n+1)
Праймеры T1-T1A для ПЦР-1	4,5	4,5 x (n+1)
Таq-полимераза	0,25	0,25 x (n+1)

Каждую смесь перемешать пипетированием, избегая образования пены, и немедленно внести по 20 мкл в маркированные пробирки. В каждую пробирку добавить по 2-3 капли минерального масла (примерно 40 мкл).

В подготовленные пробирки с реакционной смесью внести под слой масла по 5 мкл выделенных проб в следующей последовательности:

- В пробирки маркированные «К-» внести 5 мкл «К-»;
- В соответствующие пробирки внести по 5 мкл исследуемых проб;
- В пробирки для положительного контроля внести 5 мкл выделенной ДНК *M. bovis* BCG (если используется смесь для детекции ДНК *M. bovis* и *M. tuberculosis*) или 5 мкл ДНК *M. tuberculosis* (если используется смесь для детекции *M. tuberculosis*).

Для каждого образца использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.

Запустить на амплификаторе программу:

95°C – 5 мин – 1 цикл

95°C – 30 сек }
62°C - 30 сек } 25 циклов
72°C - 30 сек }

72°C - 5 мин – 1 цикл

Когда температура в ячейках достигнет 95°C (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Пробы, полученные после проведения ПЦР-1, можно хранить в течение 24 часов при комнатной температуре, в течение 72 часов при температуре от 2°C до 8°C и длительно при температуре от минус 18°C до минус 20°C.

3.3.2 ПЦР-2.

После проведения ПЦР-1 (амплификации) провести ПЦР-2 (реамплификацию) аналогично п. 3.3.1, используя смесь для ПЦР-2 (таблица 5 и таблица 6).

Таблица 5. Реакционная смесь для детекции суммарной ДНК *M. bovis* и *M. tuberculosis*

Реактив	Кол-во на 1 пробу (мкл)	Кол-во на n+1 проб (мкл)
Буфер для ПЦР-2	15,25	15,25 x (n+1)
Праймеры T4-T4A для ПЦР-2	4,5	4,5 x (n+1)
Таq-полимераза	0,25	0,25 x (n+1)

Таблица 6. Реакционная смесь для детекции **ДНК M. tuberculosis**

Реактив	Кол-во на 1 пробу (мкл)	Кол-во на n+1 проб (мкл)
Буфер для ПЦР-2	15,25	15,25 x (n+1)
Праймеры ТЗ-ТЗА для ПЦР-2	4,5	4,5 x (n+1)
Тaq-полимераза	0,25	0,25 x (n+1)

Каждую смесь перемешать, избегая образования пены, и немедленно внести по 20 мкл в подготовленные пробирки. В каждую пробирку добавить по 2-3 капли минерального масла (40 мкл).

В маркированные пробирки с реакционной смесью для ПЦР-2 внести под слой масла по 5 мкл образцов, полученных после проведения стадии ПЦР-1 (вначале внести отрицательный контроль, затем исследуемые образцы, затем соответствующий положительный контроль).

Для каждой пробы использовать отдельный наконечник с аэрозольным барьером.

Запустить на амплификаторе программу:

95°C – 5 мин – 1 цикл

95°C – 30 сек }
62°C - 30 сек } 25 циклов
72°C - 30 сек }

72°C - 5 мин – 1 цикл

Когда температура в ячейках достигнет 95°C (режим паузы), поставить пробирки в ячейки амплификатора и нажать кнопку продолжения программы.

Пробы, полученные после проведения ПЦР-2, можно хранить в течение 24 часов при комнатной температуре, в течение 72 часов при температуре от 2°C до 8°C и длительно при температуре от минус 18°C до минус 20°C.

IV УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Результаты исследования следует учитывать путем анализа продуктов амплификации исследуемых образцов методом электрофореза в агарозном геле, используя **Набор III - для проведения электрофореза.**

4.1 Приготовление 1 л рабочего буфера для электрофореза: к 980 мл дистиллированной воды добавить 20 мл буфера для электрофореза и 40 мкл бромистого этидия.

Буфер можно приготовить самостоятельно по следующей прописи: навеску 4,04 г Триса растворить в 200 мл дистиллированной воды, добавить 1,14 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл 0,5 М раствора ЭДТА рН 8,0 и довести объём буфера до 1000 мл дистиллированной водой. После растворения компонентов буфера добавить 40 мкл раствора бромистого этидия.

4.2 Приготовление агарозного геля

В колбу из термостойкого стекла насыпать 2 г агарозы и добавить 100 мл рабочего буфера для электрофореза (п.4.1), перемешать вращением колбы и поместить в микроволновую печь или на водяную баню, нагревать до полного расплавления агарозы. Расплавленную агарозу охлаждать до 45-55°C, осторожно вращая колбу. Охлажденную агарозу залить в специальную форму, установить гребенки, не касаясь дна формы. Расстояние между гребёнками должно быть не менее 4 см, толщина геля около 0,5 см. После полного застывания геля гребёнки аккуратно вынуть, подложку с готовым гелем перенести в аппарат для горизонтального электрофореза (например, ПГ-9 “Диа - М”, Россия), залить рабочим буфером для электрофореза, что бы он полностью покрывал всю поверхность геля. Гель должен располагаться лунками ближе к отрицательному электроду.

4.3 Электрофорез продуктов амплификации

Выставить в штатив пробирки с полученными продуктами второй амплификации (ПЦР-2, п. 3.3.2). Из каждой пробирки, из-под слоя масла, аккуратно отобрать 10 мкл амплификацион-

ной смеси и последовательно внести в лунки геля. Амплификационная смесь уже содержит краситель. Дополнительное смешивание амплификационной смеси с красителем не требуется. Каждой пробирке соответствует одна лунка геля. В каждом ряду лунок обязательно должен быть соответствующий положительный контроль.

Электрофорез проводят при напряжении 8 вольт/см длины геля. Краситель должен пройти не менее половины геля. **Направление движения образцов в геле от “-” к “+”!**

4.4 Учет результатов электрофореза

Результаты электрофореза следует учитывать, просматривая гель в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на приборе «Трансиллюминатор». Результаты реакции выявляются в виде светящихся красноватых полос.

Положительными следует считать пробы, полосы в которых располагаются в геле точно на таком же расстоянии от старта, что и полосы соответствующего положительного контроля.

Исследуемые пробы следует считать отрицательными, если в них не выявлено никаких полос или полосы не соответствуют по размеру фрагменту в контрольных пробах (т. е. располагаются на другом расстоянии от старта).

Т.к. после проведения электрофореза размеры фрагментов ДНК обеих микобактерий очень близки, дифференциацию *M.bovis* от *M. tuberculosis* проводят по праймерам для ПЦР-2 (таблица 7):

Таблица 7

Название образца	Размер фрагмента после проведения ПЦР-2 с используемыми праймерами		Интерпретация результатов
	T4-T4A	T3-T3A	
К-	-	-	В отрицательном контроле отсутствует ДНК <i>M. bovis</i> и ДНК <i>M.tuberculosis</i> .
Образец 1	352 п.н.	377 п.н.	В пробе присутствует ДНК <i>M. tuberculosis</i> либо суммарная ДНК <i>M. tuberculosis</i> и <i>M. bovis</i> . Результат положительный.
Образец 2	352 п.н.	-	В пробе присутствует ДНК <i>M. bovis</i> . Результат положительный.
Образец 3	-	-	В образце отсутствует ДНК <i>M. bovis</i> и ДНК <i>M.tuberculosis</i> . Результат отрицательный.
Положительный контроль ДНК <i>M.bovis</i> BCG	352 п.н.	-	В положительном контроле присутствует ДНК <i>M.bovis</i> BCG
Положительный контроль ДНК <i>M.tuberculosis</i>	-	377 п.н.	В положительном контроле присутствует ДНК <i>M.tuberculosis</i>

Исследование считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательных контролей, согласно таблице 7.

Присутствие в отрицательном контроле окрашенных фрагментов на уровне полос положительных контролей свидетельствует о перекрестной контаминации в процессе анализа. Результаты аннулируются. Анализ необходимо провести заново, начиная с этапа выделения ДНК, приняв меры для ликвидации контаминации.

V МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

5.1 Бромистый этидий является мутагеном, проникающим через кожу. При работе с ним использовать резиновые или латексные перчатки.

5.2 Ультрафиолет вызывает ожоги кожи и слизистой оболочки глаз. При просмотре гелей пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской.

5.3 Работу с химическими компонентами и биологическим материалом следует проводить с соблюдением правил техники безопасности. Работать необходимо в перчатках. При случай-

ном попадании компонентов на кожу или слизистые оболочки рекомендуется промыть это место большим количеством водопроводной воды.

Инструкция разработана ООО «Ветбиохим». Организация-производитель – ООО «Ветбиохим». Адрес производства: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д.16.