

---

---

**Стандартные образцы. Примеры  
стандартных образцов качественных  
свойств**

*Reference materials — Examples of reference materials for qualitative  
properties*

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO/TR 79:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5d4b21f8-a67e-4b46-a371-59d8e12ad443/iso-tr-79-2015>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R  
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава ISO

---

---



Ссылочный номер  
ISO/TR 79:2015(R)

# iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO/TR 79:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5d4b21f8-a67e-4b46-a371-59d8e12ad443/iso-tr-79-2015>



## **ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ**

© ISO 2015

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO по соответствующему адресу, указанному ниже, или комитета-члена ISO в стране заявителя.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Опубликовано в Швейцарии

## Содержание

Страница

Предисловие .....	v
Введение .....	vi
<b>1 Область применения .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Стандартные образцы, сертифицированные на последовательность ДНК.....</b>	<b>1</b>
2.1 Общие сведения .....	1
2.2 Некоторые примеры сертифицированных стандартных образцов .....	1
2.3 Подходы, применяемые к сертификации .....	2
2.3.1 Обработка материалов .....	2
2.3.2 Оценка чистоты .....	3
2.3.3 ССО геномной ДНК .....	4
2.3.4 Характеризация (ведущая к сертифицированному значению).....	4
2.3.5 Дополнительная характеризация (ведущая к несертифицированному значению).....	5
2.3.6 Исследование пригодности .....	5
2.3.7 Исследование однородности .....	5
2.3.8 Минимальный размер пробы .....	6
2.3.9 Кратковременная и долговременная стабильность .....	6
2.3.10 Вероятность идентификации .....	6
2.3.11 Документальная и метрологическая прослеживаемость .....	7
<b>3 Органические стандартные образцы для качественного анализа.....</b>	<b>7</b>
3.1 Общие сведения .....	7
3.2 Проверка идентификации маркера стероидного злоупотребления.....	8
3.3 Дополнительное значение знания процедуры синтеза .....	10
<b>4 Биообразцы человеческого происхождения, сертифицированные на качественные свойства .....</b>	<b>11</b>
4.1 Общие сведения .....	11
4.2 Отобранные человеческие биообразцы – примеры стандартных образцов .....	11
4.3 Подходы, применяемые к сертификации .....	12
4.3.1 Общие сведения.....	12
4.3.2 Обработка материалов.....	12
4.3.3 Оценка чистоты .....	13
4.3.4 Характеризация.....	13
4.3.5 Исследования пригодности .....	17
4.3.6 Исследование однородности .....	17
4.3.7 Исследование стабильности.....	18
4.4 Выводы по биообразцам как стандартным образцам, сертифицированным на качественные свойства .....	18
4.4.1 Общие сведения.....	18
4.4.2 Документальная и метрологическая прослеживаемость .....	19
<b>5 Стандартный образец для идентификации семени плевела .....</b>	<b>19</b>
5.1 Общие сведения .....	19
5.2 Приготовление стандартных образцов .....	19
5.3 Назначение .....	20
5.4 Характеризация.....	20
5.4.1 Характеризуемые качественные свойства .....	20
5.4.2 Основной принцип характеризации.....	20
5.4.3 Характеризация стандартного образца для идентификации семян плевела .....	26
5.5 Исследования однородности и стабильности .....	30
5.6 Неопределенность .....	30
5.7 Выражение качественного свойства стандартного образца.....	30
5.8 Прослеживаемость .....	30
<b>6 Цвет пресноводного выращенного жемчуга.....</b>	<b>31</b>
6.1 Общие сведения .....	31

6.2	Исследование однородности .....	31
<b>7</b>	<b>Стандартные образцы Европейской фармакопеи для качественного анализа .....</b>	<b>34</b>
7.1	Общие сведения.....	34
7.2	Примеры.....	34
7.2.1	Стандартные образцы Европейской фармакопеи для подтверждения идентичности вещества для фармакологического применения методом инфракрасной спектrophотометрии .....	34
7.2.2	Стандартные образцы Европейской фармакопеи для идентификации методом спектрометрии ядерного магнитного резонанса .....	35
7.2.3	Стандартные образцы Европейской фармакопеи для идентификации примесей методом жидкостной хроматографии .....	36
7.2.4	Разработка и производство стандартных образцов Европейской фармакопеи для качественного использования.....	37
	<b>Библиография .....</b>	<b>38</b>

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO/TR 79:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5d4b21f8-a67e-4b46-a371-59d8e12ad443/iso-tr-79-2015>

## Предисловие

ISO (Международная организация по стандартизации) является всемирной федерацией национальных учреждений по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка Международных стандартов обычно проводится техническими комитетами ISO. Каждый член ISO, имеющий интерес к тематической области, для которой установлен технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Сотрудничающие с ISO международные организации, как правительственные, так и неправительственные, также принимают участие в работе ISO. ISO тесно сотрудничает с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Процедуры, используемые для разработки и дальнейшего поддержания настоящего документа, установлены в Директивах ISO/IEC, Часть 1. В частности, следует отметить различные критерии утверждения различных типов документов ISO. Этот документ был разработан в соответствии с редакционными правилами Директив ISO/IEC, Часть 2. (см. [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives)).

Следует обратить внимание на то, что некоторые элементы настоящего документа могут быть предметом патентных прав. ISO не несёт ответственности за обнаружение каких-либо или всех таких патентных прав. Сведения о каких-либо патентных правах, обнаруженных во время разработки документа, будут указаны во Введении и/или в Перечне ISO полученных патентных деклараций (см. [www.iso.org/patents](http://www.iso.org/patents)).

Любое торговое название, использованное в этом документе, является информацией, представленной для удобства потребителей, и не означает одобрение.

Для разъяснения значения специальных терминов и выражений ISO, относящихся к оценке соответствия, а также для информации о соблюдении ISO принципов ВТО в отношении к Техническим барьерам в торговле (ТБТ) см. следующий URL: Foreword – Supplementary information.

Комитетом, ответственным за этот документ, является ISO/REMCO, *Комитет по стандартным образцам*.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5d4b21f8-a67e-4b46-a371-59d8e12ad443/iso-tr-79-2015>

## Введение

В 2007 г. ISO/REMCO создал Специальную группу (AGH) для исследования необходимости руководства по созданию Стандартного образца (RM = CO), сертифицированного на качественное свойство. AGH 01 провела анализ неиспользованных резервов, обратившись к 12 организациям и предприятиям, использующим качественные стандартные образцы и рассмотрела 13 документов, относящихся к качественным CO. По результатам этого анализа ISO/REMCO решил в 2008 г. создать рабочую группу (WG = РГ) и поручить ей разработку документа ISO.

В связи с ограниченным объёмом информации, представленной РГ 13 в последующие годы, разработка руководства, гармонизированного на международном уровне, оказалась невозможной. Вместо этого, было принято решение начать разработку Технического отчёта ISO (TR = TO), обобщающего состояние работ по производству качественных CO. В настоящем ТО приведены примеры CO, которые либо сертифицированы на качественное свойство, либо могут рассматриваться как CO предприятий, охарактеризованные на качественное свойство. Поэтому многие из перечисленных здесь примеров CO основаны на принципах, установленных в Руководстве ISO 35<sup>[1]</sup> и в Руководстве ISO 80<sup>[2]</sup>. Эти примеры представляют опыт, накопленный различными организациями и предприятиями и их интерпретацию качественных свойств, но не отражают процесс достижения общего мнения в этой области.

В настоящем отчёте представлены шесть следующих образцов:

- a) сертификация CO на их последовательности ДНК изготовителем стандартных образцов (RMP), аккредитованным на соответствие Руководству ISO 34<sup>[3]</sup> (Раздел 2);
- b) характеристика лабораторией органических химикатов в качестве CO для целей идентификации в рамках предприятия (Раздел 3);
- c) идентификация CO биопробы банком тканей, аккредитованным на соответствие ISO/IEC 17020<sup>[4]</sup> (Раздел 4);
- d) разработка стандартного образца для идентификации семян плевела (Раздел 5);
- e) классификация и исследование однородности между пробами пресноводного искусственно выращенного жемчуга (Раздел 6);
- f) Стандартные образцы Европейской фармакопеи для качественного анализа (Раздел 7).

Недостаточность международной стандартизации в области качественных свойств была признана несколькими группами. В их число входит РГ 2 Объединённого комитета по руководствам в метрологии (JCGM), официально ответственная за Международный словарь по метрологии (VIM)<sup>[5]</sup>, занимающаяся актуализацией и расширением VIM для включения в него также качественных свойств. Поскольку, эти обсуждения продолжаются, терминология, используемая в различных примерах, представленных в этом ТО, может быть разной, например, некоторые группы называют качественные свойства номинальными свойствами. Аналогично, на международном уровне ещё не достигнуто соглашение в тех случаях, когда термин «измерение» ограничен количественными свойствами, но может также использоваться для качественных свойств. Для удобства чтения этого ТО, термину *качественное свойство* отдаётся предпочтение, и термин *измерение* ограничен использованием вместе с количественными свойствами в соответствии с рекомендациями, высказанными большинством делегатов во время ежегодного 37-го заседания ISO/REMCO в 2014 г.

В связи с отсутствием общего руководства в области производства CO качественных свойств, подходы и понимание терминов, определения которым даны для количественных свойств (например, однородность и прослеживаемость) по-разному интерпретируются и применяются для качественных свойств различными организациями и предприятиями, представившими свои примеры в эту подборку примеров. Также по-разному интерпретируется граница между количественными и качественными свойствами. Порядковые свойства воспринимаются некоторыми группами как ограниченные количественными свойствами, в то время как другие группы предлагают разграничить количественный и качественный порядок.

Поскольку ключевой целью настоящего ТО является развитие проходящего по этому вопросу обсуждения, эти расхождения были намеренно сохранены.

В ходе подготовки ISO/TR 79, РГ 13 ISO/REMCO определила ряд вопросов для обсуждения, на которые пока невозможно дать согласованные ответы, но которые считаются решающими, если будут проводиться дальнейшие работы по переводу этого ТО в Руководство.

- Обсуждалось выражение доверия к идентификации, и в большинстве случаев не проводилась оценка неопределённости, хотя эксперты соглашались, что вероятность неправильной идентификации также формирует часть результата. Идентификация объекта не имеет неопределённости; однако оценка идентификации объекта связана с возможностью неправильной классификации. Способы оценки неопределённости результатов качественного анализа предлагались преимущественно в области последовательности ДНК<sup>[6]</sup>. В то же время в некоторых областях требуется оценка неопределённости, равной нулю, например, при классификации группы крови.<sup>[7]</sup>
- Прямая/обратная последовательность ДНК рассматривается многими экспертами как ортогональный метод, свободный от параметров, влияющих на результат. В то же время задаётся вопрос, о том, что делает последовательность ДНК специфичной.
- Неоднородность материалов, используемых в качестве СО для идентификации качественного свойства, необязательно неблагоприятно влияет на его назначение. Необходимы методы определения степени, до которой, например, может быть принята неоднородность.
- Рабочая группа в AOAC International разработала гармонизированное на международном уровне руководство по валидации качественных двоичных химических методов<sup>[7]</sup>. В Руководстве по валидации качественных двоичных химических методов рассмотрен вопрос с позиции метода. Вопрос о необходимости сертификации СО, используемого при проведении испытания/без испытания, на количественное или качественное свойство в этой рабочей группе до настоящего времени не обсуждался.

ISO/TR 79:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5d4b21f8-a67e-4b46-a371-59d8e12ad443/iso-tr-79-2015>





# Стандартные образцы. Примеры стандартных образцов качественных свойств

## 1 Область применения

Настоящий Технический отчет обобщает современное состояние производства и сертификации или характеристики стандартных образцов (СО) качественных свойств.

Потребность в руководстве по производству СО, сертифицированных на качественные свойства, была признана многими экспертами. В то же время, имеющаяся информация была признана недостаточной для создания руководства, принятого на международном уровне. Кроме того, отсутствие международного словаря в части терминов и определений для качественных свойств затрудняло взаимодействие специалистов из различных областей испытания друг с другом.

ISO/TR 79 обобщает накопленный опыт. Его цель состоит в том, чтобы способствовать проходящему в настоящее время обсуждению номинальных свойств и производству подобных СО. Исследование номинальных свойств варьируются в различных специализированных областях (исследование, классификация, идентификация, испытание, наблюдение, и т.д.). ISO/TR 79 — это попытка способствовать будущей разработке международного согласованного руководства.

## 2 Стандартные образцы, сертифицированные на последовательность ДНК

### 2.1 Общие сведения

Нижеследующее — это компиляция подходов к сертификации, применительно к трем стандартным образцам, которые были сертифицированы на последовательность ДНК, Объединенным исследовательским центром Европейской комиссии, Институтом стандартных образцов (IRMM, Гиль, Бельгия).

### 2.2 Некоторые примеры сертифицированных стандартных образцов

CRM ERM-AD427<sup>[9]</sup> состоит из плазмидной ДНК, сертифицированной на содержание некоторых фрагментов ДНК. Он применяется для определения количества Генетически модифицированных организмов (ГМО) и калибровки в целях реализации определенного количественного метода Полимеразной цепной реакции (ПЦР). Сертифицированный стандартный образец (ССО) содержит плазмиду, несущую два определенных фрагмента 2'- дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Калибрانت плазмиды сертифицирован путем определения последовательности ДНК на содержание двух специфичных ДНК-мишеней на плазмиду. Числовое соотношение между двумя мишенями равно 1, что позволяет использование СО в качестве калибранта для относительных измерений ПЦР в режиме реального времени. Идентичность последовательности ДНК подтверждается циклическим секвенированием красящего терминатора с вероятностью ничтожно малой погрешности для идентификации последовательности.

CRM IRMM-448<sup>[10]</sup> состоит из геномной ДНК, полученной от микроорганизма и сертифицированной на идентичность его ДНК (с исследуемой областью ПЦР путем определения последовательности ДНК). IRMM-448 используется в качестве позитивного контроля в определенном качественном методе ПЦР для тестирования продуктов питания. ССО (CRM) состоит из очищенной сублимированной геномной ДНК (гДНК) *Кампилобактера еюни* (NCTC11351). Идентичность гДНК была подтверждена анализом последовательности ДНК гена *seuE*, в поддержку гармонизации и валидации методов ПЦР путем их использования в качестве таксономического контроля в реакциях ПЦР. Приведено ориентировочное значение массы сублимированной геномной гДНК.

CRM IRMM/IFCC-490<sup>[11]</sup> состоит из плазмиды ДНК, сертифицированной на последовательность его ДНК (целая последовательность). IRMM/IFCC-490 предназначен для использования в качестве позитивного контроля в количественном методе ПЦР в области генетического тестирования. ССО состоит из очищенной плазмиды ДНК (пДНК) рUC18, содержащей специфический фрагмент последовательности человеческого гена Фактора II (протромбин). ССО применяется для поддержки валидации и гармонизации методов, основанных на ПЦР, для выявления мутации в человеческом гене протромбин. В любом случае ПЦР-амплификация следует либо за рестриктивным ферментом пищеварения, либо за протоколами гибридизации, анализом одноцепочечного конформационного полиморфизма, анализом кривой плавления, анализом или определением последовательности денатурирующего градиентного геля.

## 2.3 Подходы, применяемые к сертификации

### 2.3.1 Обработка материалов

**2.3.1.1** Обработка может осуществляться в соответствии с требованиями Руководства ISO 34<sup>[3]</sup>. Доскональное знание и понимание отдельных этапов обработки имеют исключительно важное значение для создания качественных СО, так как знания об использованном исходном материале — это единственный способ обеспечить идентичность. Также важны средства контроля процесса обработки.

Примером может служить использование полученной геномной ДНК для приготовления СО. Геномную ДНК от необходимого штамма микроорганизма можно получить от центров собрания культур вместе с сертификатом анализа, подтверждающим идентичность материала. Выдача сертификата на геномную ДНК отдельного штамма микроорганизма обычно основывается на биохимической, морфологической и микробиологической информации. Аналогичным образом данный подход контролируемого происхождения может применяться для фрагментов ДНК, выбранных для клонирования.

**2.3.1.2** Проверка желаемой последовательности фрагментов ДНК включает следующие техники:

- a) очищение фрагмента ДНК перед лигированием продукта амплификации, например, с набором очищения фрагмента ПЦР.
- b) контроль правильной длины ампликонов ДНК методом электрофореза в агарозном геле путем сравнения с лэддером молекулярной массы ДНК.
- c) исследование температуры плавления продуктов кПЦР, полученных с помощью праймеров и зондов для дальнейшего подтверждения идентичности последовательности ДНК.
- d) оценка идентичности последовательности ДНК путем анализа последовательности ДНК фрагмента, вставленного в вектор.

**2.3.1.3** Условия клонирования должны быть выбраны таким образом, чтобы клонирование других фрагментов, отличных от желаемого, было запрещено. Необходимо учитывать следующее:

- a) синтетические векторы, используемые для клонирования, должны быть многократными векторами от той же самой группы несовместимости. Таким образом, трансформируемые бактериальные клоны могут только переносить одну отдельную плазмиду, а не смесь различных плазмид.
- b) при повторном выращивании необходимо удостовериться, что культивируется только одна колония.

**2.3.1.4** Результат клонирования можно проверить следующими методами:

- a) рестрикционный анализ эндонуклеаза для контроля правильного клонирования и проверки ориентации вставки ДНК.
- b) испытание полученной плазмиды с использованием качественной ПЦР на присутствие вставки.

- c) оценка идентичности последовательности ДНК путем анализа последовательности ДНК других целых последовательностей ДНК или интересующего фрагмента ДНК.

**2.3.1.5** В случае, если в плазмиду вставляются различные фрагменты ДНК в желаемом соотношении, необходимо использовать следующие методы для проверки соотношения:

- a) цифровые эксперименты ПЦР могут подтверждать ожидаемое соотношение между двумя последовательностями мишеней.
- b) можно применять метод ПЦР в режиме реального времени, помечающий один фрагмент и использующий второй фрагмент в качестве нормализатора при условии, что эффективности амплификации эквивалентны.

**2.3.1.6** Идентичность последовательности ДНК нуждается в подтверждении. Данное подтверждение может касаться как целой последовательности ДНК (например, как в случае с плазмидой), так и одной или нескольких частей ДНК (например, область ПЦР-мишени в геномной ДНК от микроорганизмов, используемых для идентификации штамма или различных фрагментов ДНК, вставленных в плазмиду в нужном соотношении).

Часть подтверждения идентичности проводится в процессе обработки (2.3.1 *Обработка материалов*). В зависимости от этапов обработки, необходимо рассматривать возможность повторного применения метода подтверждения (например, определение последовательности ДНК на различных критических этапах обработки и, по возможности, в заключительной подготовке).

Чтобы убедиться, что данные последовательности ДНК имеют низкую вероятность неправильного прочтения, необходимо применять прямое и обратное определение последовательности (определение последовательности по Сангеру). Вероятность неправильного прочтения может быть оценена в соответствии с Ссылочным документом [6].

**2.3.1.7** В любом случае, в отношении поиска гомологии найденной последовательности ДНК необходимо принимать во внимание следующее:

- a) если опубликованные данные последовательности ДНК оцениваются как достоверные, необходимо применять метод поиска гомологии найденной последовательности ДНК (как для целой последовательности ДНК, так и соответствующего фрагмента ДНК).
- b) сравнение найденной последовательности ДНК, например, с данными, представленными центром коллекции культур.

## **2.3.2 Оценка чистоты**

### **2.3.2.1 Первый этап**

На первом этапе исследования чистоты ДНК составляется список загрязнений ДНК. Оценивается их влияние на дальнейшее использование ССО и разрабатываются методы проверки влияния загрязнений ДНК:

#### **2.3.2.2 ССО, основанные на плазмиде**

**2.3.2.2.1** Оставшиеся следы геномной ДНК от бактериальной клетки хозяина или следы молекул РНК:

необходимо проверить, будут ли подобные следы влиять на идентичность плазмиды или ее пригодность для измерений ПЦР в режиме реального времени, например, если задается высокая гомология. Если идентичность последовательности геномной ДНК бактерий и интересующих фрагментов ДНК низкая, разумно предположить, что они не будут оказывать влияния. Однако, в связи с тем, что оставшиеся следы могут вызывать смещение в количественном анализе ДНК, основанном на УФ-поглощении раствора плазмиды, пользователь должен знать, что это может привести к ошибочной оценке абсолютного числа копий плазмиды.

**2.3.2.2.2** Наличие других плазмид, отличных от плазмид, содержащих исследуемый (ые) фрагмент(ы) ДНК:

- a) для предотвращения присутствия других плазмид, вместо той, которая содержит исследуемый(ые) фрагмент(ы) ДНК, синтетические векторы, применяемые для клонирования должны быть многократными векторами от одной и той же группы несовместимости. В результате, трансформируемые бактериальные клоны смогут нести только одну отдельную плазмиду. Из этого можно сделать вывод, что каждая отдельная бактерия, выделенная из одной колонии, содержит только один тип плазмиды.
- b) присутствие других плазмид в избыточном количестве можно выявить при помощи энзимного ограничения при условии полного расщепления. Однако, следует иметь в виду, что очень трудно доказать, что все плазмиды были на самом деле полностью расщеплены, так как следы нерасщепленных плазмид будут не видны после электрофореза в геле и окрашивания бромистым этидием.
- c) в качестве дополнительного доказательства чистоты, последовательность плазмидной ДНК может быть определена полностью для того, что бы убедиться, что желаемая последовательность правильно клонирована. Для подтверждения чистоты, результаты не должны обнаруживать присутствие смешанных популяций плазмид. Необходимо с особой тщательностью выбирать технику определения последовательности в зависимости от поставленных вопросов. Сегодня можно применять анализ определения Последовательности нового поколения (NGS), при условии, что настройки заданы таким образом, что мешающие примеси выявляются.
- d) Для дальнейшего исследования чистоты можно использовать метод ПЦР по конечной точке перед электрофорезом в агарозном геле. Качественная ПЦР должна быть отмечена в последовательность(и) ДНК, которая(ые) рассматриваются как проблема для дальнейшего использования ССО и/или в последовательности ДНК, которая предполагается как загрязнитель. Однако, возможности данного метода по определению чистоты материала ограничены и часто только чистота в 90% может быть доказана. Аналогично можно использовать цифровой метод ПЦР в конечной точке для проверки загрязнения.

**2.3.3 ССО геномной ДНК**

Чистота гДНК одноклеточных культур:

- a) для того, чтобы убедиться в требуемой чистоте гДНК, необходимо, насколько это возможно, проверить и документировать происхождение материала. Геномная ДНК от желаемого штамма микроорганизма должна быть получена от центров коллекции культур с сертификатом анализа, подтверждающим идентичность материала. Выдача сертификата на геномную ДНК конкретных штаммов микроорганизмов обычно основывается на биохимической, морфологической и микробиологической информации.
- b) в качестве дополнительного доказательства чистоты, может быть определена последовательность гДНК. Это можно сделать на целом геноме (если возможно) или для ограниченной части исследуемой последовательности (например, заданный диапазон ПЦР).

**2.3.4 Характеризация (ведущая к сертифицированному значению)**

Характеризация и приписывание значений качественным ССО ДНК опирается во многом на надлежащий контроль обработки материала и результат оценки чистоты. В некоторых случаях характеризация может быть классифицирована как подтверждение обработки исследуемого материала.

Ниже рассмотрены два возможных метода подтверждения:

- a) контроль рестрикционной структуры проб плазмидной ДНК путем электрофореза в геле. Электрофорез в геле можно использовать на гДНК или ампликонах ПЦР, полученных после проведения конкретной ПЦР.
- b) предпочтительнее определение последовательности целой ДНК двумя независимыми лабораториями/инструментами или протоколами с использованием прямого и обратного определения последовательности (определение последовательности по Сангеру). Определять последовательность двухцепочной ДНК необходимо на обеих цепочках для того чтобы обеспечить точное определение двойного покрытия полученных последовательностей, а также полную характеристику молекулярного состава двухцепочной ДНК.

В случае, если определение целой последовательности невозможно или не представляет интереса, определение последовательности, например, может быть ограничено ампликонами, полученными после проведения конкретной ПЦР. Ампликоны необходимо очищать и клонировать в плазмиде, у которой после очищения можно определить последовательность.

Неопределенность, связанная с определением последовательности по методу Сангера, часто может рассматриваться как ничтожная, так что вероятность представления ошибочного основания (вероятность погрешностей) очень мала. Для дальнейшего руководства см. Ссылочный документ <sup>[6]</sup>.

### 2.3.5 Дополнительная характеристика (ведущая к несертифицированному значению)

В различных случаях количество ДНК является полезной дополнительной информацией о материале. Количественное определение можно выполнить флуориметрическим методом. Однако при отсутствии стандартных образцов, сертифицированных на количество ДНК, результирующим значением является оценка величины ДНК.

### 2.3.6 Исследование пригодности

Исследование пригодности проводят для того чтобы убедиться, что материал соответствует заданным целям и может использоваться по назначению. По существу, исследование пригодности должно проводиться для возможности обнаружения проблем коммутативности.

В связи с тем, что примеры, использованные в настоящем документе, относятся к ССО сертифицированным на их последовательность и предназначенным для применения в области измерений ПЦР, планируемого назначения ПЦР разработано здесь.

Необходимо проверять правильное поведение качественного ССО относительно его назначения (т.е. как калибрующее вещество ПЦР или позитивный контроль в ПЦР). Идеально, действие ССО может быть проверено лабораториями — потенциальными (позднее) пользователями этого ССО.

Если тип ДНК отличается от проанализированных образцов и калибрующих веществ (т.е. гДНК и плазмиды), необходимо проанализировать проблемы коммутативности. Калибрующее вещество должно вести себя точно так же, как и исследуемый материал.

Пригодность ССО может зависеть не только от сертифицированных параметров (последовательность ДНК), но также от несертифицированных параметров (т.е. количества ДНК). Необходимо принимать во внимание данный факт при исследовании пригодности и однородности.

Положительный результат исследования пригодности свидетельствует о том, что материал соответствует своему назначению.

### 2.3.7 Исследование однородности

ССО, сертифицированный на его последовательность ДНК, сертифицирован на идентичность. Идентичность последовательности определяет структуру. Однородность материала, следовательно, определяется чистотой материала.