

# МЕЖДУНАРОДНЫЙ СТАНДАРТ

**ISO  
16578**

Первое издание  
2013-11-15

---

---

## Методы анализа молекулярного биомаркера. Общие определения и требования к микрочипам для обнаружения специфических последовательностей нуклеиновой кислоты

*Molecular biomarker analysis - General definitions and requirements for  
microarray detection of specific nucleic acid sequences*

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



Ссылочный номер  
ISO\_16578:2013(R)

© ISO 2013

**Отказ от ответственности при работе в PDF**

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или смотреть на экране, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на установку интегрированных шрифтов в компьютере, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe – торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованным для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General Info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 16578:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f78423b2-ccd7-4891-907a-c2cac6545ea4/iso-16578-2013>



**ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ**

© ISO 2013

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, которое должно быть получено после запроса о разрешении, направленного по адресу, приведенному ниже, или в комитет-член ISO в стране запрашивающей стороны.

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  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Опубликовано в Швейцарии

## Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в этой работе. ISO работает в тесном сотрудничестве с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Процедуры, используемые для разработки этого документа и тех, которые предназначены для его дальнейшего ведения, описаны в Директивах ISO/IEC, Часть 1. В частности, следует отметить различные критерии утверждения, необходимые для различных типов документов ISO. Этот документ был подготовлен в соответствии с редакционными правилами Директив ISO/IEC, Часть 2. [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives).

Следует иметь в виду, что некоторые элементы данного стандарта могут быть объектом патентных прав. ISO не несет ответственности за идентификацию какого-либо одного или всех таких патентных прав. Информация о любых патентных правах, выявленных в ходе разработки документа, будет представлена в разделе Введение и/или в перечне полученных патентных деклараций ISO. [www.iso.org/patents](http://www.iso.org/patents).

Любое торговое наименование, используемое в данном документе, дается для удобства пользователей и не является официальным мнением.

Данный документ разработан Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, SC 16, *Горизонтальные методы анализа молекулярного биомаркера*.

[ISO 16578:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f78423b2-ccd7-4891-907a-c2cac6545ea4/iso-16578-2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f78423b2-ccd7-4891-907a-c2cac6545ea4/iso-16578-2013>

## Введение

Основное внимание в настоящем стандарте уделяется методологиям на основе ДНК-микрочипов.

ДНК-микрочипы - это технология, используемая в молекулярной биологии и позволяющая одновременно обнаружить несколько последовательностей нуклеиновых кислот. Этот метод особенно подходит для определения последовательностей исследуемых нуклеиновых кислот, а также для измерения уровней экспрессии генов. Микрочип и его производные технологии были разработаны для применения в области анализа пищевых продуктов [для анализа генетически модифицированных организмов (ГМО), определения биомаркеров и др.]. Хотя стандартизированные параметры, необходимые для применения методов на основе ДНК-микрочипов, находятся в стадии рассмотрения, например, контроль качества микрочипов (MAQC) и минимальная информация об испытании микрочипов (MIAME), необходимо сформировать минимальные требования для интерпретации результатов.

Таким образом, целью настоящего стандарта является предоставление рекомендаций и требований для обнаружения последовательностей исследуемых нуклеиновых кислот с помощью микрочипов. Эта информация касается

- определения подходов к проверке достоверности методов на основе ДНК микрочипов, и
- определения общих принципов, используемых для осуществления этих лабораторных анализов.

Технология микрочипов развилась из блоттинга по Саузерну, основным принципом является гибридизация между двумя цепочками ДНК по свойству взаимодополняемости последовательностей нуклеиновых кислот. ДНК-микрочип представляет собой набор микроскопических точек ДНК, прикрепленных к твердой подложке или кодированным шарикам. Разработка анализа микрочипов обычно необходима для создания ДНК-зондов, установки ДНК-зонда на твердую подложку, маркировки последовательностей нуклеиновой кислоты-мишени, гибридизации мишеней с ДНК-зондом, и для разработки соответствующей системы обнаружения. Существует много видов анализов и множество способов для изготовления микрочипов. В соответствии с используемыми методами маркировки мишеней гибридизация может быть обнаружена с помощью электрических, колориметрических и/или флуоресцентных сигналов.

На момент публикации настоящего международного стандарта были разработаны лучшие практики и стандарты для представления данных и минимальной информации для сопоставления и воспроизводимости данных микрочипов. Тем не менее, лишь немногие опубликованные работы все еще сфокусированы на надежности и сопоставимости любых заданных платформ для микрочипов, и в этом случае, вероятно, недостаточно проверки достоверности в одной лаборатории. Скорее, должна быть принята межлабораторная проверка достоверности метода в соответствии с конкретными международными стандартами.

**ПРИМЕЧАНИЕ 1** Контроль качества микрочипов (MAQC) предоставляет отличный ресурс, чтобы определить лучшие практики на основе микрочипов, включая использование стандартных образцов, сбор данных и форматы.

См. <http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/MicroarrayQualityControlProject/default.htm>

**ПРИМЕЧАНИЕ 2** Минимальная информация об испытании микрочипов (MIAME) путем установления единых стандартов описания данных микрочипов, систем управления и передачи данных, а также общественных фондов для хранения и получения данных помогает в описании подробной информации, которую должны предоставить исследователи, чтобы объяснить процедуры и биологические цели данных с микрочипов.

См. <http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html>

Общие требования для обнаружения ДНК также изложены в следующих международных стандартах: ISO 21569, ISO 21570, ISO 21571, ISO 22174 и ISO 24276.

# Методы анализа молекулярного биомаркера. Общие определения и требования к микрочипам для обнаружения специфических последовательностей нуклеиновой кислоты

## 1 Область применения

Настоящий международный стандарт определяет условия для обнаружения последовательности исследуемой нуклеиновой кислоты с использованием ДНК-микрочипов для выявления нуклеиновой кислоты.

Настоящий международный стандарт распространяется на все методы, которые используют микрочипы для выявления нуклеиновых кислот.

Настоящий международный стандарт устанавливает методы проверки достоверности и параметры для молекулярного биологического анализа, в том числе для обнаружения и идентификации специфических последовательностей нуклеиновых кислот.

Настоящий международный стандарт представляет рекомендации и протокол для

- разработки и производства микрочипов,
- проверки специфичности гибридизации,
- межлабораторной проверки достоверности качественных методов,
- определения пределов обнаружения для микрочипов,
- определения диапазона надежных сигналов и
- определения критериев оценки технических характеристик платформы для микрочипов.

Стандарт не распространяется на следующие протоколы:

- процесс количественного измерения;
- требования к подготовке проб перед испытанием ДНК-микрочипов.

## 2 Нормативные ссылки

Следующие нормативные документы необходимы для применения настоящего международного стандарта. Для жестких ссылок применяется только то издание, на которое дается ссылка. Для плавающих ссылок применяется самое последнее издание нормативного ссылочного документа (включая любые изменения).

ISO 5725-1, *Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Общие принципы и определения*

ISO 5725-2, *Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения*

ISO 22174, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для обнаружения патогенных пищевых микроорганизмов. Общие требования и определения*

ISO 24276, *Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Общие требования и определения*

ISO/IEC 17025:2005, *Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий*

ISO/IEC Guide 99, *Международный словарь по метрологии. Основные и общие понятия и соответствующие термины (VIM)*

### 3 Термины и определения

Для целей настоящего документа используются термины и определения из ISO 5725 1, ISO 5725 2, ISO/IEC 17025, ISO/IEC Guide 99, ISO 22174 и ISO 24276 и последующие.

#### 3.1

**предел обнаружения платформы для микрочипов**  
**limit of detection for microarray platform**  
**LODP**

минимальная относительная величина внешнего стандарта измерения (или стандартного образца), которая может быть обнаружена экспериментально при уровне достоверности 95%, учитывая известное (установленное/оцененное) количество копий и/или концентрацию внешнего стандарта измерения (или стандартного образца)

#### 3.2

**диапазон надежного сигнала**  
**range of reliable signal**

способность (в пределах заданного диапазона) представить результаты, которые прямо пропорциональны концентрации и/или числу копий внешнего стандарта измерения (или стандартного образца)

#### 3.3

**ДНК-микрочип**  
**ДНК-чип**  
**DNA microarray**  
**DNA chip**

набор ДНК-зонда, сгруппированный в определенном порядке и закрепленный с большой плотностью на твердой подложке, прямо или косвенно, что позволяет оценить большое количество биологического материала с использованием высокоэффективных методов скрининга

#### 3.4

**ДНК-зонд**  
**probe DNA**

одноцепочечная нуклеиновая кислота, определяемая ее свойством спариваться с ДНК-мишенью на основе комплементарности, где жесткость закрепления связана с длиной и составом нуклеиновой кислоты зондов, наряду с параметрами реакции

#### 3.5

**платформа**  
**platform**

устройство, которое поддерживает технологию микрочипов (или ДНК-чипа)

#### 3.6

**обнаружение по флуоресцентному свечению**  
**fluorescence detection**

метод обнаружения гибридизации с использованием иммобилизованного ДНК-зонда путем измерения сигнала флуоресцентного свечения

**3.7****колориметрическое обнаружение  
colorimetric detection**

метод обнаружения гибридизации с использованием иммобилизованного ДНК-зонда путем измерения колориметрического сигнала

**3.8****электрохимическое обнаружение  
electrochemical detection**

метод обнаружения гибридизации путем измерения электрических токов электрода, на который иммобилизуют ДНК-зонд

**3.9****внешний стандарт измерения  
external measurement standard**

материал или субстрат, подготовленный для испытания совместимости методов анализа на основе микрочипов, значение свойств которого определяется как консенсус, основанный на совместной экспериментальной работе под эгидой научной или инженерной группы

**3.10****кросс-гибридизация  
cross-hybridization**

неспецифичность связывания ДНК-зонда с нуклеиновой кислотой, не рассматриваемой в качестве мишени

**4 Принцип****4.1 Анализ платформы для микрочипов**

Анализ платформы для микрочипов включает, например,

- денатурацию двойного или одноцепочечного анализатора ДНК или РНК,
- гибридизацию мишени(ней) с ДНК-зондом, закрепленным на твердом субстрате,
- обнаружение гибридизации с помощью электрических, колориметрических и/или флуоресцентных сигналов, и
- анализ данных.

Лаборатория должна использовать внешние стандарты измерения (или стандартные образцы) и проводить надлежащий контроль за стадией измерения микрочипов в процессе верификации. Эти требования, регулирующие верификацию методов на основе ДНК-микрочипов, также помогают в интерпретации результатов.

**4.2 Конструкция и изготовление микрочипов**

Для анализа микрочипов следует использовать следующие виды зондов, а их конструкция должна обеспечивать их верификацию.

Конструкция содержит ДНК-зонды для обнаружения

- внешних стандартов измерения (или стандартных образцов),
- положительного контроля,
- отрицательного контроля, и

— исследуемой последовательности нуклеиновой кислоты.

Иммобилизованный ДНК-зонд должен быть реплицирован, по крайней мере, в двух повторных местах. ДНК-зонд должен быть сконструирован с учетом значения  $T_m$ , соотношения GC, и специфичности к последовательности. Последовательность должна быть описана. Для того чтобы избежать путаницы между нуклеотидными основаниями, нижний регистр 'g' должен использоваться для четкого различия между 'G' и 'C' в описании (т.е. C, g, A и T должны использоваться для обозначения оснований). Качество ДНК-зондов должно быть обеспечено соответствующим методом (спектроскопическим анализом, масс-спектральным анализом и т.д.).

### 4.3 Валидация специфичности гибридизации

#### 4.3.1 Теоретическая оценка специфичности

Теоретическая оценка ДНК-зонда включает скрининг одной или нескольких главных баз данных последовательностей нуклеиновой кислоты (таких, как Refseq: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) с алгоритмом поиска гомологии последовательностей (BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, программа SSEARCH в пакете FASTA и др.). Следует выбирать специфические последовательности, которые не могут генерировать кросс-гибридизацию. Эти последовательности должны быть проверены экспериментальным путем.

#### 4.3.2 Экспериментальная оценка специфичности

Специфичность ДНК-зонда должна быть проверена экспериментально на пробах, имеющих последовательности нуклеиновых кислот, аналогичные последовательности-мишени, а также на организмах, выявленных в ходе теоретической оценки специфичности, как представляющей гомологию последовательностей, что, вероятно, может привести к кросс-гибридизации. Условия эксперимента должны быть такими же, какие использовались в рабочем порядке в лаборатории.

#### 4.3.3 Экспериментальная оценка кросс-гибридизации

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f78423b2-ccd7-4891-907a-c2cac6545ea4/iso-16578-2013>  
Процесс валидации должен продемонстрировать, что никакие кросс-гибридизации не происходят на ДНК-зонде, который способен обнаруживать экспериментально внешний стандарт измерения (или стандартный образец) в матрице. Результаты принимаются, если все ДНК-зонды для обнаружения внешних стандартов измерения (или стандартных образцов) являются положительными, а ДНК-зонды для обнаружения отрицательных контролей являются отрицательными.

### 4.4 Межлабораторная валидация количественных методов

#### 4.4.1 Общие положения

По своей природе качественные тесты приводят только к ответам да/нет. Однако определение диапазона использования метода всегда необходимо в процессе валидации. Метод может быть применен только в этом диапазоне.

#### 4.4.2 Предел обнаружения для платформы для микрочипов

В случае микрочипов нереально определить предел обнаружения (LOD) каждой исследуемой мишени. Если пределы обнаружения индивидуальных мишеней необходимы, то для экспериментального определения предела серии представительных мишеней на данной платформе можно использовать внешний стандарт измерения (или стандартный образец).

Экспериментальный предел обнаружения касается пробы для испытания, качества/количества аналита, и абсолютного предела обнаружения метода. Эти значения должны быть установлены путем совместных испытаний с использованием соответствующих эталонных и контрольных проб. Наименьший уровень внешнего стандарта измерения (или стандартного образца), полученный экспериментально, должен иметь ложно отрицательные значения меньше или равные 5 %.



#### 4.4.3 Диапазон надежного сигнала

Следует указать диапазон надежного сигнала, т.е. область применения метода, для известного (установленного/оцененного) числа копий и/или концентраций внешнего стандарта измерения (или стандартного образца) при 95%-м доверительном уровне. Значения должны быть получены в результате межлабораторных испытаний с использованием соответствующих сертифицированных справочных материалов или стандартных образцов. Информация может также быть получена на основе внутрилабораторных исследований как временная мера.

#### 4.4.4 Проба для испытания

Раствор или экстракт, содержащее молекулы ДНК/РНК, соответствующие области применения, приготовлены таким образом, что нет никакого подтвержденного ингибирования гибридизации или влияния на процесс электрического, колориметрического, и/или флуоресцентного обнаружения.

#### 4.4.5 Система измерения

Инструменты, включая термоциклер, гибридизационную печь или другую аппаратуру для гибридизации, сканер ДНК-микрочипов и приборы или оборудование для измерения целостности и концентрации ДНК/РНК должны быть откалиброваны в соответствии с ISO/IEC 17025. Это включает в себя критерии для выбора настроек прибора (например, установку фона, настройку нормализации).

Любые расчеты или модели, используемые для получения аналитических результатов, должны быть проверены.

#### 4.4.6 Оценка неопределенности измерений

На неопределенность измерений влияют многие источники, включая размер лабораторной пробы, пробы для анализа, отобранной из лабораторной пробы, измерение концентрации нуклеиновых кислот в экстрактах и отбор проб ДНК/РНК в реакциях, а также аналитические вариации.<sup>[1]</sup> Значения неопределенности измерений могут быть выведены на основе внутрилабораторных/межлабораторных исследований или на основе оценок компонентов, как описано в ISO/IEC 17025.

#### 4.4.7 Реагенты для микрочипов

Характеристики и качество реагентов [флуоресцентный краситель(и), ферменты для обратной транскрипции, буферы и т.д.], а также количество внешнего стандарта измерения (или стандартного образца), который добавляется к реакционной смеси, должны быть подтверждены.

### 5 Выражение результатов

#### 5.1 Общие положения

Результаты никогда не должны выражаться в формате символа + и – .

Отрицательный результат никогда не должен выражаться как “отсутствие последовательности ДНК-мишени”.

#### 5.2 Выражение отрицательного результата

В протоке испытания должны быть представлены следующие последовательности или их эквивалент.

Последовательность ДНК/РНК - мишени (указать) Y не обнаружена.

Предел обнаружения метода был X определен с ABC (опишите внешние стандартные образцы).

#### 5.3 Выражение положительного результата

В протоке испытания должны быть представлены следующие последовательности или их эквивалент.

Последовательность ДНК/РНК - мишени (указать) Y обнаружена.

Можно включить идентичность мишени, если известна.

Можно включить идентичность ГМО, если известна.

#### 5.4 Выражение неопределенного результата

Подтвержденный метод включает критерии, по которым наблюдаемый результат измерения может быть принят как действительный. Для анализа должны быть описаны критерии принять/отклонить.

Протокол испытания должен включать в себя информацию о среднеквадратическом отклонении повторяемости и воспроизводимости.

Если хотя бы одна проба для испытания даст неопределенные результаты, исследования должны быть повторены.

Если повторение анализа подтвердит неопределенный результат, то в протокол испытания должна быть внесена следующая информация:

- “неопределенный результат”;
- причина окончательного результата не могла быть выявлена (например, эффекты ингибирования, интерферирующие вещества, и т.д.).

iteh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

### 6 Протокол испытания

Отчетность должна проводиться так, как указано в соответствующих стандартах (например, в ISO/IEC 17025).

Протокол испытания должен включать следующую информацию:

- всю информацию, необходимую для идентификации пробы;
- дату получения;
- любую конкретную информацию, касающуюся лабораторных проб и любых возможных сопутствующих ограничений;
- всю информацию о пробе для анализа (тип, номер пробы);
- все условия, касающиеся транспортировки пробы, а также всего срока хранения, если это применимо;
- заявление о дате и типе применяемой процедуры отбора проб(ы), (если возможно);
- описание применяемого метода экстракции нуклеиновой кислоты;
- определение метода анализа и общее описание технологии микрочипов, который составляет основу аналитического метода (ов);
- положительные и отрицательные контроли;
- тип внешних стандартов измерения (или стандартных образцов);
- результаты экспериментальных пределов обнаружения и диапазон надежного сигнала для анализа обнаружения;
- любые расчеты или модели, используемые для получения аналитического результата;
- любые значимые события, наблюдаемые во время испытания.