ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 20688-2— 2025

Биотехнология

СИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Часть 2

Требования к производству и контролю качества синтезированных фрагментов генов, генов и геномов

(ISO 20688-2:2024, IDT)

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2025

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Российский институт стандартизации» (ФГБУ «Институт стандартизации») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 326 «Биотехнологии»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 9 октября 2025 г. № 1181-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 20688-2:2024 «Биотехнология. Синтез нуклеиновых кислот. Часть 2. Требования к производству и контролю качества синтезированных фрагментов генов, генов и геномов» (ISO 20688-2:2024 «Biotechnology — Nucleic acid synthesis — Part 2: Requirements for the production and quality control of synthesized gene fragments, genes, and genomes», IDT).

Международный стандарт разработан Техническим комитетом ИСО/ТК 276 «Биотехнология» Международной организации по стандартизации (ИСО)

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 Некоторое элементы настоящего стандарта могут являться объектами патентных прав

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© ISO, 2024
© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2025

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 1
4 Требования к менеджменту качества 3
5 Требования к управлению ресурсами 4
6 Требования к биобезопасности и биозащите 6
7 Требования к контролю качества на производстве 7
8 Требования к качеству продукции 9
9 Спецификации поставляемых/синтезированных материалов 11
Приложение A (справочное) Примерный перечень оборудования и устройств и требования к их контролю 13
Приложение B (справочное) Примеры методов оценки качества 15
Приложение C (справочное) Электрофореграмма 17
Приложение D (справочное) Секвенирование по методу Сэнгера 21
Приложение E (справочное) Массивное параллельное секвенирование 22
Приложение F (справочное) Дополнительные возможности контроля качества фрагментов синтетических генов 24
Приложение G (справочное) Пример ранжирования рисков, связанных с продуктами ДНК 25
Библиография 26

Введение

Синтез фрагментов генов, генов и геномов — это получение синтетической двухцепочечной ДНК в виде неклонированных фрагментов (которые могут быть линейными) и клонированных генов в плазмидах (которые будут кольцевыми) с помощью соответствующих биохимических методов.

Синтезированные фрагменты генов, гены и геномы являются важными биотехнологическими продуктами и широко используются в биотехнологии, например в белковой инженерии, метаболической инженерии, разработке антител и вакцин, биоремедиации окружающей среды и исследовании натуральных продуктов.

Производство и контроль качества синтезированных фрагментов генов, генов и геномных продуктов необходимы для обеспечения качества и их последующего применения в биотехнологии. В настоящем стандарте приведены требования к производству и контролю качества синтетических фрагментов генов, генов и геномных продуктов, включая биобезопасность, чистоту, количество, размер, точность клонирования генов, целостность, последовательности, остаточные примеси и другие показатели качества. Настоящий стандарт представляет собой единое общее руководство по контролю качества синтеза фрагментов генов, генов и геномов. Он призван способствовать улучшению и обеспечению качества продукции и торговли на основе взаимной выгоды с использованием единого стандарта.

Настоящий стандарт предназначен для использования производителями синтетической ДНК в процессе производства для контроля качества с целью повышения качества своей продукции, академическими лабораториями для оценки качества ДНК, синтезированной на их оборудовании, и конечными пользователями для проверки качества синтезированных фрагментов генов, генов и геномов, предоставляемых производителями по мере необходимости.

В настоящем стандарте использованы следующие формулировки:

- «должен» обозначает требование;
- «следует» — рекомендацию;
- «может» — разрешение;
- «способен» — возможность или способность.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Биотехнология

СИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Часть 2

Требования к производству и контролю качества синтезированных фрагментов генов, генов и геномов

Biotechnology.
Nucleic acid synthesis.
Part 2. Requirements for the production and quality control of synthesized gene fragments, genes, and genomes

Дата введения — 2026—03—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает требования к производству и контролю качества синтезированной двухцепочечной ДНК. В нем приведены требования к менеджменту качества, управлению ресурсами, биобезопасности и биозащите, контролю качества производства, качеству продукции и спецификациям поставляемой продукции для синтезированных фрагментов генов, генов и геномов.

Настоящий стандарт применяют к синтетическим фрагментам генов, генам и геномам длиной менее 10 млн п. о. (пар оснований) в виде неклонированных фрагментов (линейных) и клонированных генов в плазмидах (кольцевых).

Настоящий стандарт не содержит специальных требований к материалам, используемым исключительно в диагностических целях.

Если синтезированные нуклеиновые кислоты приобретают и используют в диагностических целях, пользователь может учитывать ИСО 15189, ИСО 13485 и другие соответствующие клинические стандарты.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте нормативные ссылки отсутствуют.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями.

ИСО и МЭК поддерживают терминологические базы, используемые в целях стандартизации, по следующим адресам:

- платформа онлайн-просмотра ИСО: доступна по адресу gost.e-ecolog.ru ;
- Электропедия МЭК: доступна по адресу gost.e-ecolog.ru .

3.1 **биобезопасность** (biosafety): Методы и средства контроля, снижающие риск непреднамеренного воздействия или выброса биологических материалов.

Издание официальное

Примечание 1 — Биологические материалы — это любой материал, который состоит, содержит или может содержать биологические агенты и/или их вредные продукты, такие как токсины и аллергены (см. ИСО 35001:2019, 3.14).

Примечание 2 — Биологические агенты — это любые микробиологические объекты, клеточные или неклеточные, встречающиеся в природе или искусственно созданные, способные к репликации или передаче генетического материала, которые могут вызывать инфекцию, аллергию, токсичность или другие неблагоприятные воздействия у людей, животных или растений (см. ИСО 35001:2019, 3.13).

[ИСО 35001:2019, 3.22, с изменениями — добавлены примечания к терминологической статье]

3.2 **биозащита** (biosecurity): Практические методики и средства контроля, снижающие риск утери, кражи, неправильного использования, перенаправления или преднамеренного несанкционированного выброса биологических материалов.

[ИСО 35001:2019, 3.23, с изменениями — исключены примечания к терминологической статье]

3.3 **полимеразная цепная реакция колоний;** ПЦР колоний (colony polymerase chain reaction; colony PCR): Метод ПЦР, используемый для скрининга плазмид, содержащих нужную вставку, непосредственно из колоний микроорганизмов без выделения и очистки плазмид.

3.4 **сборка ДНК** (DNA assembly): Соединение олигонуклеотидов или меньших фрагментов генов через участки комплементарности с образованием более длинного двухцепочечного фрагмента ДНК последовательно *in vitro* или *in vivo*.

3.5 **секвенирование ДНК** (DNA sequencing): Определение порядка следования нуклеотидных оснований (аденина, гуанина, цитозина и тимина) в молекуле ДНК.

Примечание 1 — Последовательность, как правило, записывается с 5′-конца.

[ИСО 17822:2020, 3.19]

3.6 **клонирование генов** (gene cloning): Процесс введения определенного гена или последовательности ДНК с помощью методов генной инженерии в клетку-хозяина и ее репликация путем бесполого размножения во множество идентичных копий гена.

3.7 **массовое параллельное секвенирование;** MPS (massively parallel sequencing; MPS): Метод секвенирования, основанный на определении последовательности в процессе пошагового матричного синтеза множества независимых молекул ДНК одновременно.

Примечание 1 — Технология массового параллельного секвенирования может обеспечить миллионы или миллиарды коротких прочтений за один цикл или длинных прочтений на основе амплификации.

[ИСО 20397-2:2021, 3.30, с изменениями — отредактировано примечание к терминологической статье путем добавления слов «или длинных прочтений на основе амплификации»]

3.8 **плазмидный вектор** (plasmid vector): Внехромосомная молекула ДНК в клетках, физически отделенная от хромосомы и способная к автономной репликации, которая может быть использована в качестве носителя для переноса новых генов в клетки.

[ИСО 16577:2022, 3.4.37, с изменениями — к термину добавлено слово «вектор», а к определению добавлены слова «которая может быть использована в качестве носителя для переноса новых генов в клетки» (из ИСО 16577:2022, 3.4.58). Примечания к терминологической статье были исключены]

3.9 **оценка качества (показатель качества *Q*)** (quality score; *Q* score): Мера качества секвенирования данного нуклеотидного основания.

Примечание 1 — *Q* вычисляют по формуле

$$Q = -10 \log 10 (p),$$

где p — оцененная вероятность того, что основание определено неверно.

Примечание 2 — Оценка качества, равная 20, представляет собой вероятность ошибки 1 к 100, что соответствует точности определения 99 %.

Примечание 3 — Более высокие баллы качества указывают на меньшую вероятность ошибки. Более низкие показатели качества могут привести к тому, что значительная часть ридов окажется непригодной для использования. Низкие показатели качества могут также указывать на ложноположительное определение вариантов, что приводит к неточным выводам.

[ИСО 20397-2:2021, 3.32].

3.10 **выравнивание последовательности** (sequence alignment): Расположение последовательностей нуклеиновых кислот в соответствии с областями сходства.

Примечание 1 — Выравнивание последовательностей может не требовать референсного генома/референсной целевой области нуклеиновой кислоты, и создание сборки может не быть его целью.

[ИСО 20397-2:2021, 3.20]

3.11 **последовательность, вызывающая обеспокоенность;** SOC (sequence of concern; SOC): Последовательность длиной 50 п. о. или более, которая либо кодирует биологические функции, либо непосредственно наделяет или усиливает токсичность или патогенность.

3.12 **библиотека синтетической ДНК** (synthetic DNA library): Двухцепочечные фрагменты ДНК, синтезированные с заданным генетическим разнообразием, которые были вставлены в определенный(ые) клонирующий(ие) вектор(ы).

Примечание 1 — Под генетическим разнообразием понимают количество уникальных последовательностей в библиотеке ДНК. Разнообразные библиотеки позволяют осуществлять высокопроизводительную оценку генетических конструкций или функциональных вариантов.

3.13 **синтетический ген** (synthetic gene): Синтезированный, клонированный, двухцепочечный фрагмент ДНК, содержащий необходимые биологические части.

Примечание 1 — Линейная плазмида, полученная путем ферментативного расщепления рестриктазой, является разновидностью поставляемого продукта синтетического гена.

3.14 **синтетический фрагмент гена** (synthetic gene fragment): Синтезированные, не клонированные, двухцепочечные линейные фрагменты ДНК, собранные из синтетических олигонуклеотидов.

3.15 **синтетический геном** (synthetic genome): Искусственно созданный геном, содержащий всю необходимую генетическую информацию для живого организма, полученный путем сборки олигонуклеотидов или небольших фрагментов генов *in vitro* или *in vivo*.

4 Требования к менеджменту качества

4.1 Общие требования

Производитель как организация, синтезирующая двухцепочечную ДНК и распространяющая ее среди одного или нескольких заказчиков, должен создать и внедрить систему, в которой описаны и задокументированы следующие процессы:

a) процесс получения заказа;

b) процесс оценки рисков биобезопасности и биозащиты;

c) процесс синтеза генов;

d) процесс контроля качества конечного продукта.

В процессе получения заказа должны быть определены политика в области качества и цели в области качества. Требования к качеству различаются в зависимости от процесса производства, формы конечной синтетической двухцепочечной ДНК, метода контроля качества и предполагаемого дальнейшего применения. Для достижения запланированных результатов и качества следует предпринять необходимые действия в отношении процессов синтеза путем проведения анализа характеристик получаемых нуклеиновых кислот.

4.2 Контроль документации

У производителя синтетической двухцепочечной ДНК должна быть процедура, обеспечивающая контроль документированной информации, включающая следующие пункты:

a) информация о заказчике:
   1) имя контактного лица;
   2) организация;
   3) адрес;
   4) номер телефона;
   5) электронная почта;

b) информация о заказанной последовательности:
   1) заказанные последовательности нуклеотидов;
   2) используемый вектор;

c) протокол скрининга последовательностей;
d) отчет о скрининге последовательностей;
e) стандартная последовательность операций синтеза;
f) метод контроля качества;
g) форма продукта;
h) данные и отчет;
i) информация об отгрузке:
1) дата размещения и отгрузки;
2) адрес доставки;
3) наименование получателя;
4) условия хранения при транспортировании и т. д.

Производитель должен предотвращать непреднамеренное использование любого устаревшего документа. Производитель обязан обеспечить целостность и безопасность заказанного синтетического гена и информации о заказчике и предотвратить несанкционированный доступ к этим данным.

Если документированная информация, включая записи, хранится на электронных носителях, производитель должен обеспечить контроль этих электронных носителей. Необходимо внедрить адекватные меры кибербезопасности для защиты интеллектуальной собственности и личных данных заказчиков.

4.3 Система менеджмента качества

Производитель может утвердить и внедрить систему менеджмента качества для документирования необходимых процедур, обеспечения контроля производственных процессов, а также регулярного мониторинга и документирования производства и контроля качества синтетической двухцепочечной ДНК.

4.4 Менеджмент биорисков и контроль безопасности

Производитель может создать систему менеджмента биорисков (например, на основе применения ИСО 35001, [10] и [11]) для эффективного выявления, оценки, контроля и анализа рисков биобезопасности и биозащиты, присущих его деятельности.

Производитель может создать систему управления охраной труда (например, по ИСО 45001), чтобы снизить или устранить возможные риски, связанные с синтезированием двухцепочечной ДНК и контролем качества, как указано в настоящем стандарте.

Последовательность синтетической двухцепочечной ДНК должна быть проверена на соответствие списку патогенов и токсинов. Уровень риска биобезопасности и биозащиты синтетического гена должен быть оценен в соответствии с подходящим эталонным стандартом и документами по биобезопасности и биозащите. Пример ранжирования уровней риска приведен в приложении G.

У производителя должна быть в наличии процедура обеспечения легитимности заказчиков, основных пользователей и конечных пользователей синтетических генов, содержащих последовательности, вызывающие обеспокоенность (SOCs). Поставщики и поставщики-посредники синтетических генов должны:

a) знать, кому они продают продукт;

b) знать, содержит ли продукт, который они синтезируют и/или распространяют, SOC, частично или полностью;

c) уведомлять заказчиков и конечных пользователей, если их заказ содержит SOC.

5 Требования к управлению ресурсами

5.1 Система менеджмента качества

Оборудование, включая источники энергии, освещение и условия окружающей среды (температура, влажность, чистота и атмосферное давление), должно быть функциональным и надежным для синтеза и контроля качества двухцепочечной ДНК. Оборудование и условия окружающей среды не должны негативно влиять на синтез и контроль качества синтетической двухцепочечной ДНК. К факторам, которые могут негативно повлиять на качество продукта, относятся, в частности, контаминация другими нуклеиновыми кислотами, микробная контаминация, пыль, электромагнитные помехи, радиация, влажность, непостоянное электроснабжение, температура и вибрация.

Синтетические фрагменты генов, гены и геномы не должны быть контаминированы другими нуклеиновыми кислотами из производственной среды и не должны попадать во внешнюю среду без надлежащей обработки.

Производитель должен осуществлять мониторинг, контроль и регистрацию условий окружающей среды в соответствии с надлежащими спецификациями, методами или процедурами.

5.2 Оборудование и инструменты

Оборудование и инструменты, используемые для производства и контроля качества синтетических фрагментов генов, генов и геномов, должны надлежащим образом контролироваться, обслуживаться и калиброваться.

Записи о контроле, обслуживании и калибровке должны храниться в соответствии с документированной политикой хранения записей.

Оборудование и инструменты должны эксплуатироваться соответствующим образом обученным и квалифицированным персоналом.

Оборудование для производства и контроля качества может включать (но не ограничиваться ими) автоматизированные синтезаторы олигонуклеотидов на основе колонок, устройств, основанных на микрофлюидике и микроматрицах. Дополнительное необходимое оборудование может включать термоциклеры для полимеразной цепной реакции, аппараты для гель-электрофореза, микрочиповые анализаторы капиллярного электрофореза, ультрафиолетовые спектрофотометры, флуоресцентные спектрофотометры, секвенаторы ДНК, центрифуги, инкубаторы, холодильники, морозильники, системы получения чистой воды, pH-метры, весы, дозаторы, автоматические пипетирующие системы, сушилки, инкубаторы постоянной температуры, шейкеры с постоянной температурой и т. д.

Пример перечня оборудования и приборов и требований к их контролю для производства и контроля качества синтетических фрагментов генов, генов и геномов приведен в приложении А.

5.3 Сырье

Сырье включает в себя синтетические субстраты, вспомогательные материалы (такие как пробирки, наконечники для дозаторов и т. д.), вспомогательные реагенты (такие как олигонуклеотиды, ферменты, вектор, культуральная среда, буфер и т. д.) и чистую воду. Их качество влияет на качество синтетических фрагментов генов, генов и геномов, а также на последовательность и стабильность производственных процессов.

Производитель должен контролировать сырье, используемое в производстве и контроле качества синтетических фрагментов генов, генов и геномов.

Производитель должен оценивать поставщиков сырья, чтобы минимизировать влияние предоставленного сырья на требования к синтезу, такие как чистота синтезированных субстратов, активность ферментов и т. д.

Производитель должен установить процедуры закупки сырья и оценки поставщиков по заранее определенным критериям. Производитель обязан установить процесс квалификации партий реагентов, чтобы убедиться, что каждая партия реагентов соответствует требованиям производителя перед использованием в производстве.

Допускается использовать только химические вещества и материалы молекулярно-биологического класса.

5.4 Персонал

Производитель должен разработать программы обучения, направленные на обеспечение компетенции, необходимой для выполнения производственных функций. Производитель обязан обеспечить обучение всего персонала в соответствии с возложенными на него обязанностями. Программы обучения могут включать знания в области химии, молекулярной биологии и клеточной биологии без ограничений.

6 Требования к биобезопасности и биозащите

6.1 Общие положения

Разрабатывают и применяют подход к биобезопасности, основанный на оценке рисков и фактических данных, для обеспечения того, чтобы лабораторные помещения, оборудование для обеспечения безопасности, и методы работы соответствовали локальным условиям, были соразмерными и устойчивыми при сохранении надлежащего контроля биобезопасности.

Меры биобезопасности в лабораториях принимают на основе комплексной программы подотчетности биологических материалов, используемых для производства и контроля качества синтетических фрагментов генов, генов и геномов.

Для предотвращения преднамеренного или непреднамеренного использования технологий и продуктов синтеза ДНК производители используют механизм скрининга последовательности ДНК.

Для обеспечения биобезопасности допускается использовать ИСО 35001 и [10].

6.2 Механизм скрининга последовательности ДНК

Все производители ДНК должны использовать механизм скрининга последовательностей для оценки заказанных последовательностей. Такой механизм скрининга может быть разработан собственными силами или приобретен у третьей стороны. Системы скрининга могут опираться на признанную на международном уровне базу данных последовательностей ДНК, связанных с патогенами и токсинами, и алгоритмы для проверки заказанных последовательностей ДНК на основе этого набора последовательностей. Скрининг проводят для последовательностей длиной более 50 п. о. или в соответствии с национальным законодательством. Если система скрининга выдает совпадение для заказанной последовательности ДНК, производитель ДНК должен решить, проводить ли последующий скрининг или отклонить заказ. Если последующий скрининг не устраняет обеспокоенность по поводу заказа, производитель может отказаться от заказа или сообщить о нем надзорным органам в соответствии с конкретным случаем. Производители ДНК, решившие отказаться от синтеза ДНК, связанной с патогенами или токсинами, не должны продолжать синтез (см. [13]).

Если производитель ДНК решает синтезировать ДНК, связанную с патогенами или токсинами (т. е. последовательности, которые совпали с базой данных последовательностей ДНК, связанных с патогенами и токсинами, в соответствии с механизмом скрининга), он должен следовать рекомендациям, обеспечивающим выполнение требований законодательства, связанных с использованием. Доказательствами такого использования могут служить принадлежность к учреждению, подтверждение наличия исследовательской программы, соответствующей нормативным требованиям, история публикаций заказчиков или наличие коммерчески доступных продуктов (например, тест-системы).

Если производитель ДНК решает синтезировать ДНК, связанную с патогенами или токсинами, он должен обеспечить соответствующие условия и материальное оснащение для поддержания надлежащего контроля биобезопасности и биозащиты.

При заказе последовательности ДНК, связанной с патогеном или токсином, который подлежит особому контролю, заказчик должен предоставить производителю письменное описание предполагаемого использования синтетической ДНК.

По возможности производитель должен проверить, что полученная информация, включая предполагаемое использование, соответствует деятельности заказчика. Результат оценки должен быть задокументирован.

Производителям рекомендуется документировать и хранить в течение не менее восьми лет следующие сведения о заказах на последовательности ДНК, связанной с патогеном или токсином, который подлежит особому контролю:

a) информацию о заказчике (имя контактного лица, организация, адрес, электронная почта и номер телефона);

b) заказанной последовательности (заказанные последовательности нуклеотидов, используемый вектор);

c) заказе (дата размещения и отправки, адрес доставки, имя получателя);

d) предполагаемом использовании (описание от заказчика, результат оценки).

7 Требования к контролю качества на производстве

7.1 Общие положения

Производитель должен создать систему контроля качества при производстве синтетических фрагментов генов, генов и геномов для обеспечения надежности и воспроизводимости. Система контроля качества должна определять политику в области качества, цели в области качества и необходимые процедуры для обеспечения производства и контроля качества на основе установленных процедур.

7.2 Контроль качества при производстве синтетических фрагментов генов

7.2.1 Общие положения

Синтетические фрагменты генов обычно получают путем сборки синтетических олигонуклеотидов в двухцепочечные линейные фрагменты ДНК с использованием соответствующей стратегии сборки и дальнейшей очистки при необходимости.

Пример — Сборка полноразмерных генных конструкций для экспрессии и очистки белков, кассеты экспрессии «направляющей» РНК для редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, донорские конструкции для экспериментов по редактированию генов и матрица для транскрипции in vitro.

7.2.2 Дизайн последовательностей

Производитель должен оценить заказанные последовательности для подтверждения возможности их корректного синтеза. Критерии оценки могут включать содержание GC, вторичную структуру или повторы последовательностей. Если последовательности содержат мотивы, создающие производственный риск, может быть использована оптимизация кодонов для снижения производственного риска и/или для оптимизации экспрессии белка в желаемом хозяине.

7.2.3 Сборка

Для получения конечной заказанной последовательности, соответствующей заданным требованиям, при синтезе фрагментов генов может быть применена соответствующая стратегия сборки [включая, без ограничений, сборку с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), сборку с помощью лигазной цепной реакции (ЛЦР) или сборку на основе рекомбинации *in vitro*, *in vivo* и т. д.].

7.2.4 Очистка

Продукты сборки могут быть очищены соответствующим методом, включая наборы для очистки продуктов ПЦР, наборы для выделения ДНК из геля и т. д. Наборы следует выбирать с учетом требований к конечному очищению заказанной синтетической ДНК. Методы должны быть валидированы, если они разработаны собственными силами или модифицированы производителем. Эффективность методов очистки должна быть проверена перед использованием.

7.2.5 Консервация продуктов

Синтетические фрагменты генов поставляются в различной форме, включая лиофилизированный порошок или суспензию в жидком буфере.

Лиофилизированный порошок или продукт на определенном носителе, таком как фильтровальная бумага, следует хранить при температуре 4 °С или ниже, временно его допускается хранить при комнатной температуре.

Фрагменты генов, суспендированные в буфере, следует хранить при температуре ниже минус 20 °С. Следует избегать многократных циклов замораживания и оттаивания.

7.3 Контроль качества при производстве синтетических генов

7.3.1 Общие положения

В области фармацевтических разработок (например, вирусных геномов), метаболической инженерии, производства гуманизированных антител или синтетической биологии необходимы более длинные синтетические гены, полученные в виде очищенной плазмиды или глицеринового стока клонированных клеток, содержащих синтезированный ген в составе плазмиды.

Синтезированные олигонуклеотиды служат в качестве строительных блоков и собираются в последовательности длиной в ген. Две или более последовательностей генов могут быть собраны в более крупные конструкции. Готовые конструкции могут быть вставлены в плазмиды для клонирования. Следует учитывать факторы, которые могут повлиять на сборку и репликацию плазмиды, такие как токсичность генов, регулирующие элементы и фоновая экспрессия. Если возможно, последовательности всех конструкций или по крайней мере конечной конструкции плазмиды должны быть верифицированы. Для

синтетических конструкций с повторяющимися структурами или стабильными вторичными структурами, которые несовместимы с обычными технологиями проверки последовательности, следует использовать дополнительные подходы к проверке, такие как расщепление ферментом или специализированные методы секвенирования ДНК. Клоны, содержащие идеальную плазмидную ДНК (совпадающую с заказанной последовательностью со 100 %-ной точностью), могут поставляться заказчикам в виде глицериновых стоков или свежих посевов или могут быть в дальнейшем использованы для выделения плазмидной ДНК. Затем плазмидную ДНК, суспендированную в буфере или лиофилизированную, доставляют заказчику. Также может быть выполнена линеаризация путем расщепления ферментом, если заказчик предпочитает линеаризованную, клонированную ДНК.

7.3.2 Скрининг колоний

Для быстрого скрининга колоний допускается использовать один или несколько методов, включая ПЦР колоний и скрининг на устойчивость к антибиотикам для получения правильно трансформированных колоний.

7.3.3 Выделение ДНК из клетки-хозяина

Когда синтезированные гены реплицируются в конкретной клетке-хозяине, производитель должен выбрать соответствующие методы выделения и очистки синтезированной ДНК (варианты включают очистку с помощью мини-колонки, очистку с помощью магнитных частиц, осаждение этанолом, экстракцию фенол-хлороформом и т. д.) из клетки-хозяина.

7.3.4 Проверка последовательностей

Проверяют последовательность синтетических генов. Документируют результаты секвенирования. Технология, такая как секвенирование по Сэнгеру, MPS или другая эквивалентная технология секвенирования ДНК, должна быть выбрана в соответствии с характеристиками генов, производительностью синтеза и стоимостью.

7.3.5 Консервация продуктов

Синтетические гены могут поставляться в лиофилизированном виде, в виде суспензии в буферном растворе, в виде глицеринового стока или в виде свежего посева.

Лиофилизированный порошок или продукт на определенном носителе, таком как фильтровальная бумага, следует хранить при температуре 4 °С, а также допускается кратковременное хранение при комнатной температуре.

Для ДНК, суспендированной в буферном растворе, продукт следует хранить при температуре ниже минус 20 °С. Следует избегать многократных циклов замораживания и оттаивания.

Синтетические гены в глицериновом стоке трансформированных клеток, таких как *Escherichia coli*, следует хранить при температуре ниже минус 20 °С и предпочтительно при минус 80 °С.

Свежие посевы трансформированных клеток следует хранить при 4 °С.

7.4 Контроль качества при производстве синтетических геномов

7.4.1 Общие положения

Синтетический геном — это реконструкция, копирование и синтез всего генома или всех последовательностей ДНК определенного организма-мишени. Согласованность последовательностей продуктов синтетического генома является критически важной, и ее необходимо проверять.

Весь процесс создания синтетического генома должен проводиться в следующие этапы:

- анализ всей последовательности геномной ДНК организма-мишени;
- синтез отдельных фрагментов целого генома;
- сборка геномных фрагментов;
- трансплантация собранного синтетического генома в организм-мишень;
- запуск клетки для экспрессии геномного содержимого.

Технологию синтетического генома используют для создания некоторых экономически значимых микроорганизмов, например, производящих биотопливо или спирт, используемых для обеззараживания токсичных отходов или отслеживания опухолевых клеток.

7.4.2 Сборка

Необходимо выбрать соответствующую стратегию сборки в зависимости от длины генома. Для относительно коротких последовательностей допускается использовать методы сборки *in vitro* и *in vivo* на основе полимераз, лигаз или рекомбинации. Для эффективной сборки требуется фермент с высокой точностью (например, ДНК-полимераза или лигаза). Для сборки более крупных ДНК можно использовать бесшовные методы сборки, которые не оставляют следов в местах соединения сборки.

7.4.3 Проверка последовательностей

Из-за возможности ошибок на каждом этапе синтеза генов, включая олиго-синтез и сборку, в синтетических последовательностях ДНК неизбежны внутренние вставки и делеции, а также преждевременная терминация. Последовательности необходимо проверять перед использованием в сборке генома.

Последовательности, содержащие мутации, должны быть идентифицированы и удалены. В случае неизбежных мутаций информация о мутациях, подтвержденная секвенированием ДНК, должна быть предоставлена заказчику, и он должен подтвердить, влияют ли обнаруженные мутации на последующее использование или все еще отвечают требованиям заказчика.

Синтезированные последовательности клонируют в плазмидный вектор в *Escherichia coli* или дрожжах, а затем секвенируют по Сэнгеру или методом MPS.

8 Требования к качеству продукции

8.1 Фрагменты синтетических генов

8.1.1 Общие положения

Выход продукта, чистота и размер поставляемых продуктов синтетических линейных фрагментов генов являются важными показателями качества.

8.1.2 Выход продукта

Количество синтезированных линейных фрагментов генов может быть определено путем измерения концентрации ресуспендированных продуктов с помощью различных методов, таких как ультрафиолетовая спектрофотометрия с определением оптической плотности при 260 нм (OD_{260}) или количественное определение интенсивности флуоресценции с использованием ДНК-связывающих флуоресцентных красителей. Можно использовать количественную ПЦР (qPCR) в качестве дополнительного метода проверки, если заказчик оспаривает результаты. См. В.2.

При использовании метода спектрального анализа в ультрафиолетовом диапазоне следует обратить внимание на возможные помехи от невстроенных нуклеотидов и одноцепочечных нуклеиновых кислот.

8.1.3 Чистота

Примеси в синтетических линейных фрагментах генов могут включать белки, поступающие из полимеразы или лигазы, используемых для сборки. Для оценки контаминации белками можно использовать отношение оптической плотности при 260 нм к 280 нм. Значение оптической плотности (OD) в диапазоне от 1,8 до 2,0 указывает на незначительную контаминацию продукта белками. См. В.1.

8.1.4 Размер

Размер продуктов линейных фрагментов генов необходимо проверить с помощью электрофореза в агарозном геле или капиллярного электрофореза. Молекулярная масса измеренных полос при электрофорезе должна соответствовать длине заказанной последовательности.

8.1.5 Точность клонирования генов

Если у заказчика есть дополнительные требования к качеству продукта, например, точность клонирования генов, см. приложение F.

8.2 Синтетические гены

8.2.1 Общие положения

Контроль качества синтетических генов включает в себя определение выхода продукта, чистоты и последовательности.

8.2.2 Выход продукта

Количество синтезированных генов может быть определено путем измерения концентрации ресуспендированных продуктов с помощью различных методов, таких как ультрафиолетовая спектрофотометрия с определением оптической плотности при 260 нм (OD_{260}) или количественное определение интенсивности флуоресценции с использованием ДНК-связывающих флуоресцентных красителей. Допускается использовать количественную ПЦР (qPCR) в качестве дополнительного метода проверки, если заказчик не согласен с результатами. См. В.2.

При использовании метода спектрального анализа в ультрафиолетовом диапазоне следует обратить внимание на возможные помехи от невстроенных нуклеотидов и одноцепочечных нуклеиновых кислот.

8.2.3 Чистота

Примеси в синтетических генах могут включать белки, углеводы, гуанидин и т. д., поступающие из полимеразы или лигазы, используемых для сборки, или из клетки-хозяина.

Для оценки контаминации белками можно использовать отношение оптической плотности (OD) при 260 нм к 280 нм ($OD_{260/280}$). Значение $OD_{260/280}$ в диапазоне от 1,8 до 2,0 указывает на незначительную контаминацию продукта белками. См. В.1.

Отношение оптической плотности при 260 нм к 230 нм ($OD_{260/230}$) используется для оценки других примесей, таких как углеводы, гуанидин и т. д. Показатель $OD_{260/230}$ должен быть больше 2,0 для нормальной плазмиды и больше 1,8 для низкокопийного образца. См. В.1.

8.2.4 Последовательность

Последовательность синтетического генного продукта анализируют методом секвенирования ДНК, таким как метод Сэнгера или MPS, чтобы подтвердить, соответствует ли синтетический ген последовательности, указанной заказчиком. Каждому нуклеотиду должно быть присвоено числовое значение (так называемая «оценка качества основания»), которое соотносится с прогнозируемой точностью определения основания при секвенировании. См. В.4, приложение D и приложение Е.

Заказчику должна быть предоставлена следующая информация по каждой заказанной последовательности:

a) файл последовательности-мишени, созданный на основе заказанной последовательности;

b) отчет о выравнивании продукта синтетических генов;

c) последовательность с указанием заказанной (сконструированной) последовательности.

8.2.5 Целостность

Целостность отражает деградацию синтетической двухцепочечной ДНК. См. приложение С. После электрофореза в агарозном геле или капиллярного электрофореза молекулярная масса идентифицированных полос должна соответствовать ожидаемой.

Анализ ферментативного расщепления рестриктазой также позволяет подтвердить целостность синтетической двухцепочечной ДНК. Производитель должен выбрать соответствующую рестриктазу и методы расщепления для получения надежного расщепления и различаемого размера полос.

8.2.6 Анализ остаточных примесей

Остаточные примеси в продуктах синтетической двухцепочечной ДНК, такие как эндотоксин, геномная ДНК клетки-хозяина, белок клетки-хозяина и остаточная мРНК, должны быть определены с помощью соответствующих методов по запросу заказчика.

Если синтетическая двухцепочечная ДНК в плазмиде используется для трансфекции или если синтетическая двухцепочечная ДНК будет использоваться для производства лекарственных средств для человека или животных, эндотоксин в продукте должен быть определен количественно с помощью реактива, представляющего собой лизат клеток крови (амебоцитов) мечехвоста *Limulus polyphemus* (ЛАЛ-тест).

Уровень эндотоксина должен соответствовать требованиям заказчика и обычно может находиться в пределах (0,1—1,0) ЕЭ/мкг плазмидной ДНК — уровень, который, как правило, считается мало влияющим на последующее применение. ЕЭ (единица эндотоксина) — это единица, определяемая с помощью ЛАЛ-теста при испытании на эндотоксины.

Примечание 1 — По запросу остаточная геномная ДНК в продукте может быть оценена методами, включающими гибридизацию и количественную ПЦР в реальном времени.

Примечание 2 — Если плазмиды готовят для использования в качестве или при разработке фармацевтических субстанций/лекарственных средств, может быть проведено дополнительное испытание.

Анализ с помощью рестриктазы может быть проведен путем инкубации плазмидной ДНК с энзимами и последующим анализом при помощи электрофореза в агарозном геле или капиллярного электрофореза. Никаких других незначительных бэндов наблюдаться не должно, поэтому для надежной визуализации необходимо минимальное рекомендуемое количество.

8.2.7 Сверхскрученная плазмида

Для синтетической двухцепочечной ДНК в плазмиде процент сверхскрученной плазмиды в общей плазмиде, который может влиять на эффективность трансфекции и экспрессию белка, может быть определен при помощи электрофореза в агарозном геле или капиллярного электрофореза. Процентное содержание сверхскрученной плазмиды в общей плазмиде может быть определено при условиях, установленных заказчиком.

8.2.8 Бионагрузка

Жизнеспособные микроорганизмы, загрязняющие синтетический ДНК-продукт, могут быть обнаружены с помощью специального анализа на бионагрузку по запросу заказчика.

8.2.9 Специфические показатели качества библиотек синтетических ДНК

Производитель библиотеки синтетической ДНК должен предоставить заказчику доказательства синтеза библиотеки, продемонстрировав соответствие спецификациям заказчика.

Для библиотек синтетической ДНК должны быть определены следующие параметры с помощью секвенирования ДНК:

a) разнообразие библиотеки;

b) относительное изобилие каждого фрагмента ДНК;

c) точность вариантов каждого фрагмента двухцепочечной ДНК.

Библиотеки синтетической ДНК могут быть клонированы в определенный вектор для получения клонированных библиотек. Для проверки последовательности случайным образом отбирают заранее определенное количество клонов (со статистическим анализом) в зависимости от размера библиотеки.

Для отдельной библиотеки клонов последовательность клона в выбранном векторе должна быть проверена путем ферментативного расщепления рестриктазой и секвенирования ДНК. Секвенирование нового поколения (next generation sequencing, NGS) также может применяться для определения характеристик библиотеки синтетической ДНК в объединенных форматах.

Хотя последовательность, чистота и примеси являются важными базовыми показателями качества синтетической двухцепочечной ДНК, лучшим показателем качества является функциональность в интересующем последующем применении. Если заказчик обнаруживает проблему в применении, качество необходимо проверить.

8.3 Синтетический геном

8.3.1 Общие положения

Контроль качества синтетического генома включает в себя проверку последовательности. Проверку последовательности проводят, чтобы убедиться в правильности синтетического генома.

8.3.2 Последовательность

Для продуктов синтетического генома проверка последовательности должна проводиться с использованием соответствующей технологии секвенирования ДНК.

Для синтетического генома вариации продукта должны составлять менее 1 на 10 000 п. о. Если мутация расположена в кодирующей последовательности, она должна быть синонимичной.

9 Спецификации поставляемых/синтезированных материалов

9.1 Основная информация

Спецификации поставляемого/синтезированного материала для синтезированных фрагментов генов, генов или геномов должны включать, без ограничения, следующее:

a) количество синтезированного продукта;

b) информацию о секвенировании ДНК: выравнивание последовательностей или их статистическое обобщение;

c) информацию о чистоте;

d) информацию о целостности и рестрикционную карту, если она была получена;

e) информацию об остаточных примесях, если заказчик запросил этот анализ.

9.2 Прочая информация

Прочая информация, которая должна быть включена в окончательный отчет о поставленном/синтезированном материале, включает:

a) информацию о производителе.

Примечание 1 — Допускается включить соответствующий адрес, контактный телефон, оператора и время;

b) информацию о продукте.

Примечание 2 — Допускается включить название продукта, длину продукта, последовательность продукта;

c) информацию о векторе, если синтетические гены клонируются в векторе и полученная плазмида предоставляется заказчику.

Примечание 3 — Можно включить название вектора, кодируемую вектором устойчивость к антибиотикам, последовательность вектора и карту плазмиды;

d) информацию о клетке-хозяине, если синтезированные гены клонируются в векторе, реплицируются в клетке-хозяине и предоставляются заказчику в клетке-хозяине, содержащей плазмиду на основе вектора.

Примечание 4 — Можно указать тип клетки-хозяина, генотип и ауксотип клетки-хозяина, а также метод культивирования клетки-хозяина;

e) информацию о контроле качества продукта, включая результаты контроля качества, методы и использованные аналитические приборы.

Приложение А
(справочное)

Примерный перечень оборудования и устройств и требования к их контролю

Примерный перечень оборудования и устройств и требований к их контролю для производства и контроля качества синтетических фрагментов генов, генов и геномов приведен в таблице А.1.

Таблица А.1 — Перечень оборудования и устройств и требования к их контролю

Тип оборудования	Спецификации	Целевое использование	Требования	Периодичность проверки
Оборудование с контролем температуры (инкубатор, холодильник, морозильник и т. д.)	—	Хранение реагентов и образцов	Стабильность и однородность температуры	При установке, а затем периодически[a]
			Контроль температуры	В режиме реального времени
Система производства чистой воды	—	Производство/ контроль качества	Проверка электропроводимости	Периодически[a]
pH-метр	—	Приготовление реагентов	Настройка с использованием как минимум двух видов буферных растворов надлежащего качества	В месте использования
Весовое устройство	—	Приготовление реагентов	Подтверждение нулевой точки и проверка показаний с помощью стандарта массы	В месте использования
Пипетка или дозатор	—	Дозирование реагентов	Калибровка и проверка точности пипетирования	Периодически[a]
Центрифуга	—	Центрифугирование	Нормальная работа без посторонних шумов	В месте использования
Синтезатор олигонуклеотидов	Устройства для синтеза олигонуклеотидов	Синтез олигонуклеотидов	Проверка клапанов и расхода реагентов	Периодически[a]
Оборудование для электрофореза	Устройства, позволяющие проводить электрофорез в агарозном геле в нативных условиях, и детектирующие устройства, такие как ультрафиолетовая лампа	Подтверждение длины фрагментов ДНК	Возможность разделения и обнаружения маркеров соответствующей молекулярной массы	Периодически[a]

Окончание таблицы А.1

Тип оборудования	Спецификации	Целевое использование	Требования	Периодичность проверки
Система для капиллярного электрофореза	Устройства, способные разделять ДНК/РНК или белки по массе в нативных условиях и оснащенные детекторами и регистраторами, которые могут суммировать площади пиков	Подтверждение длины фрагментов ДНК	Возможность разделения и обнаружения маркеров соответствующей молекулярной массы	Периодически[a]
Автоматизированная система пипетирования	Обработка жидкостей и т. д.	Дозирование реагентов, синтез генов и т. д.	Проверка точности пипетирования	Периодически[a]
Сушилка	Устройства, которые можно использовать для сушки синтетических генов в растворе	Сушка синтетических генов	Проверка времени сушки	В месте использования
Ультрафиолетовый спектрофотометр	Однолучевые или двухлучевые спектрофотометры	Определение количества синтетических генов	Встроенная проверка показателей или калибровка с помощью оптического фильтра	Периодически[a]
Флуоресцентный спектрофотометр или флуоресцентный микропланшетный ридер	Однолучевые или двухлучевые спектрофотометры	Определение количества синтетических генов	Встроенная проверка показателей или калибровка с помощью оптического фильтра	Периодически[a]
Амплификатор	Устройства для проведения полимеразной цепной реакции	Синтез генов и определение количества	Стабильность и однородность температуры	Периодически[a]
Секвенатор ДНК	Устройства, способные определять последовательности нуклеотидов в синтетических генах и плазмидах	Определение последовательностей ДНК	Проверка показателей и калибровка основных компонентов (система аппарата, система подачи жидкости, оптическая система и т. д.)	Периодически[a]

[a] Частоту проверок определяют, чтобы обеспечить пригодность оборудования к использованию по назначению с учетом обычного метода использования и периодичности (см. ИСО 9001 или стандарты, относящиеся к системе качества организации).

Приложение В
(справочное)

Примеры методов оценки качества

В.1 Методы оценки чистоты синтетических нуклеиновых кислот

Отношение оптической плотности при 260 нм к 280 нм ($OD_{260/280}$) используют для оценки загрязнения белками, поступающими из полимеразы или лигазы, используемых для сборки, или из клеток-хозяев. Отношение оптической плотности при 260 нм к 230 нм ($OD_{260/230}$) используется для оценки других примесей, таких как углеводы, гуанидин и т. д. Оптическая плотность определяется с помощью обычного или ультрафиолетового спектрофотометра — для микрообъемов. Ультрафиолетовый спектрофотометр для микрообъемов позволяет быстро и легко провести определение.

Значение pH и концентрация ионов в растворе синтетического гена влияют на определение. Небольшие изменения в значении pH раствора приведут к изменению $OD_{260/280}$. Только при определенном значении pH и низкой концентрации ионов (например, pH 8,0, 10 мМ трис-HCl) результат будет точным. В то же время раствор пробы должен быть разбавлен до соответствующей концентрации, чтобы оптическая плотность находилась в диапазоне от 0,1 до 1,0.

$OD_{260/280}$ в диапазоне от 1,8 до 2 и $OD_{260/230}$ в диапазоне от 2 до 2,2 являются приемлемыми для определения чистоты ДНК. Если показатель чистоты значительно выше ожидаемого, лучше всего проанализировать спектральный профиль в качестве основного средства поиска дефектов.

В.2 Методы оценки количества синтетических нуклеиновых кислот

Количество фрагментов генов, генов или продуктов генома может быть измерено разными методами, включая метод ультрафиолетовой спектрофотометрии с определением оптической плотности при 260 нм (OD_{260}), флуоресцентное количественное определение с использованием флуоресцентных красителей, связывающих ДНК, и флуорометра, метод количественной ПЦР (qPCR).

Для метода ультрафиолетовой спектрофотометрии поглощение раствора синтетического гена при 260 нм определяется в соответствии с руководством ультрафиолетового спектрофотометра. Затем рассчитывают концентрацию нуклеиновой кислоты в образце по уравнению Беера-Ламберта и представляют в единицах масса/объем (т. е. нг/мм^3). Также устанавливают линейный диапазон оборудования, а раствор высокой концентрации необходимо разбавить, чтобы он вписался в линейный диапазон.

Для флуоресцентного метода добавляют водный раствор флуоресцентного красителя нуклеиновой кислоты для двухцепочечной ДНК (dsDNA) в кювету или микролитровый планшет, содержащий раствор синтетического гена, затем тщательно перемешивают и инкубируют в течение 2—5 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. После инкубации измеряют флуоресценцию образца с помощью спектрофлуорометра или флуоресцентного микропланшетного ридера при стандартных длинах волн флуоресцеина. Для того чтобы показания образцов оставались в диапазоне детектирования флуорометра, необходимо настроить усиление прибора таким образом, чтобы образец с наибольшей концентрацией ДНК давал интенсивность флуоресценции около максимума флуорометра. Чтобы свести к минимуму эффект фотообесцвечивания, поддерживают время измерения флуоресценции постоянным для всех образцов. Использование РНК-азы А/РНК-азы Т1 с нуклеазой S1 устранит все одноцепочечные нуклеиновые кислоты и гарантирует, что вся флуоресценция образца обусловлена двухцепочечной ДНК. Измеряют флуоресценцию образца, используя параметры прибора, соответствующие тем, которые использовались при построении стандартной кривой. Вычитают значение флуоресценции холостого образца из флуоресценции каждого из образцов. Определяют концентрацию ДНК в образце синтетического гена по стандартной кривой, построенной на основе стандартной кривой ДНК. Для стандартной кривой обычно используют ДНК бактериофага лямбда или тимуса теленка. Анализ можно повторить, используя другое разбавление образца, чтобы подтвердить результаты количественного определения.

В количественной ПЦР (qPCR) содержание целевых синтетических генов может быть определено с помощью специфических к соответствующим генам праймеров и калибровочной кривой. Калибровочная кривая может быть построена с использованием независимых стандартных образцов с заданной концентрацией (например, копий/мм^3), которые имеют ту же или схожую матрицу, что и исследуемые образцы. Предварительная обработка синтетических генов, а также количество, целостность и чистота образцов должны быть определены таким образом, чтобы обеспечить их достаточную чистоту, концентрацию и отсутствие компонентов, которые ингибируют или усиливают последующие реакции qPCR.

При использовании цифровой ПЦР (dPCR) количество целевых синтетических генов может быть определено без использования калибровочной кривой. Смесь для dPCR, содержащая испытуемый раствор, случайным образом разделяется на дискретные части номинально эквивалентного объема таким образом, что некоторые части не содержат целевого фрагмента нуклеиновой кислоты, а другие содержат одну или несколько копий фрагмента. Части термоциклируются до конечной точки, а затем считываются для определения доли частей с положительной реакцией. Для оценки числа копий целевых синтетических генов следует использовать статистику Пуассона.

В.3 Измерение целостности синтетической нуклеиновой кислоты

Для измерения целостности синтетической нуклеиновой кислоты можно использовать электрофорез в агарозном геле, включая электрофорез на чипах и капиллярный электрофорез.

Для электрофореза в агарозном геле рекомендуемые значения концентраций агарозы для идентификации ДНК приведены в таблицах В.1—В.2.

Таблица В.1 — Рекомендуемые концентрации агарозы для электрофореза ДНК различной длины

Длина ДНК, п. о.	Концентрация агарозы, %
250—1000	1,5—2
1000—5000	1,5
5000—10 000	1

Таблица В.2 — Рекомендуемые концентрации агарозы для пульс-электрофореза ДНК различной длины

Длина ДНК, млн п. о.	Концентрация агарозы, %
0,01—1	1,5
1—5	0,8—1
5—10	0,5—0,8

В.4 Секвенирование

Для проверки последовательности следует использовать секвенирование по Сэнгеру и MPS в зависимости от полноты рассмотрения производителями синтетической ДНК. Обычно секвенирование по Сэнгеру используют для коротких генов, а MPS — для длинных. Для сложных матриц, которые могут быть трудными для MPS, секвенирование по Сэнгеру лучше подходит для верификации идентичности последовательности.

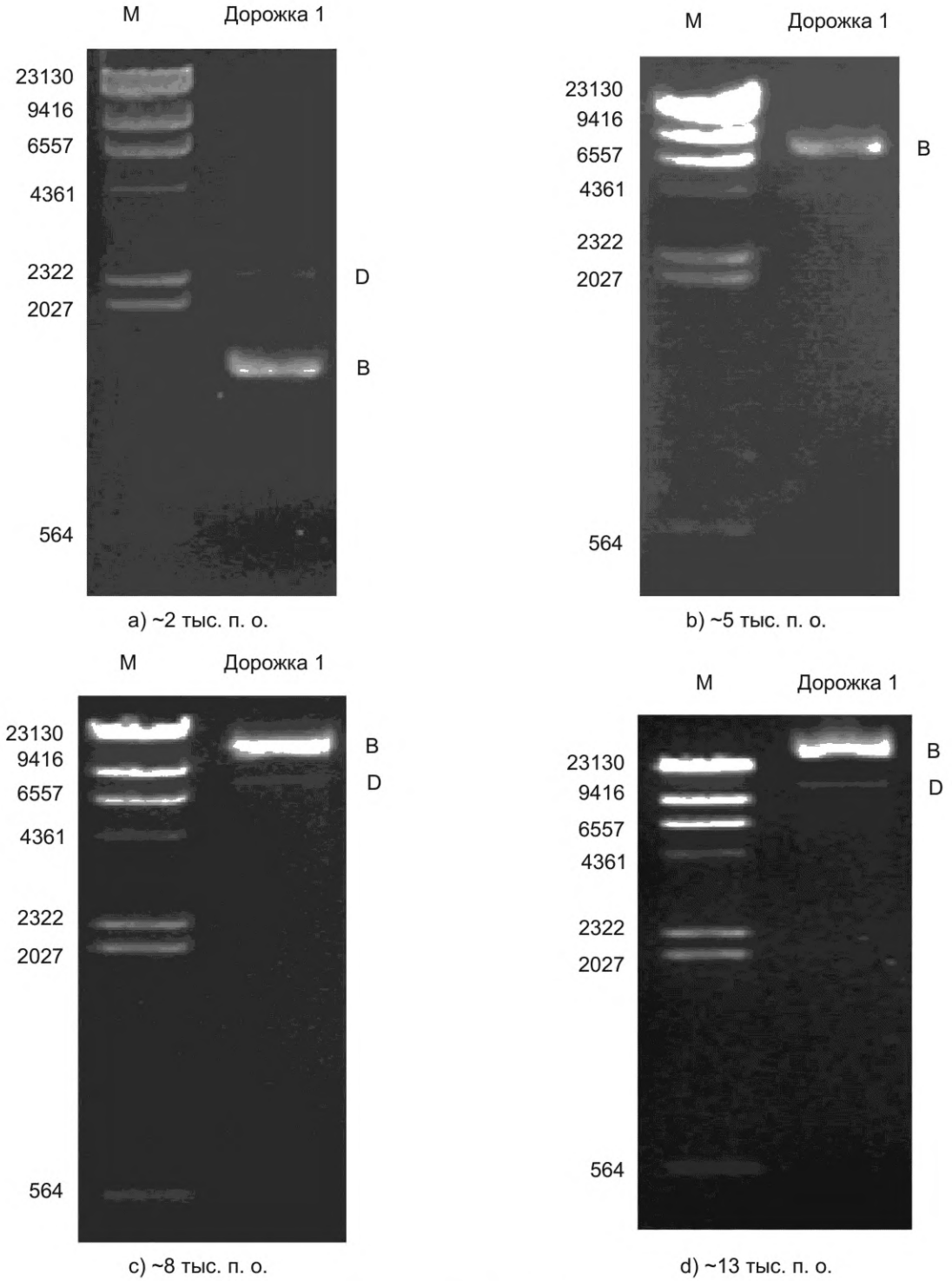
Приложение С
(справочное)

Электрофореграмма

Если фрагменты синтетических генов или гены клонированы в плазмидный вектор, для измерения их конфигурации и целостности можно использовать электрофорез в агарозном геле.

В процессе выделения плазмидная ДНК может быть повреждена в результате механического воздействия, pH, реагента и т. д. Выделенная плазмида обычно имеет различные конфигурации, включая сверхскрученную плазмидную ДНК, линейную плазмидную ДНК и плазмидную ДНК с однонитевым разрывом.

На рисунке С.1 приведена электрофореграмма в 1 %-ном агарозном геле плазмидной ДНК, в которую клонировали синтетические гены различной длины — примерно 2 тыс. п. о., 5 тыс. п. о., 8 тыс. п. о. и 13 тыс. п. о.

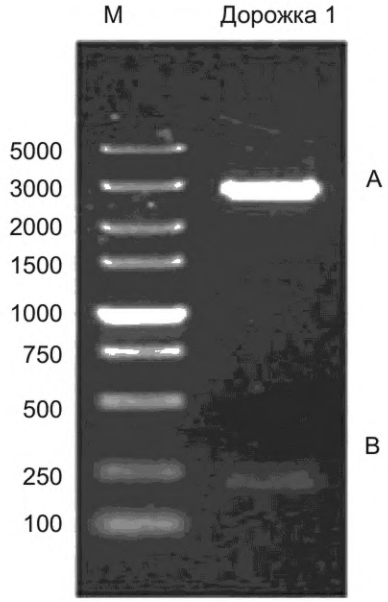


M — Маркер лямбда ДНК/Hind III

a) Более светлый бэнд (B) — сверхскрученная плазмидная ДНК, а более темный бэнд (D) — плазмидная ДНК с однонитевым разрывом.
b) Светлый бэнд (B) — плазмидная ДНК с однонитевым разрывом.
c) Более светлый бэнд (B) — плазмидная ДНК с однонитевым разрывом, а более темный бэнд (D) — линейная плазмидная ДНК.
d) Более светлый бэнд (B) — плазмидная ДНК с однонитевым разрывом, а более темный бэнд (D) — линейная плазмидная ДНК.

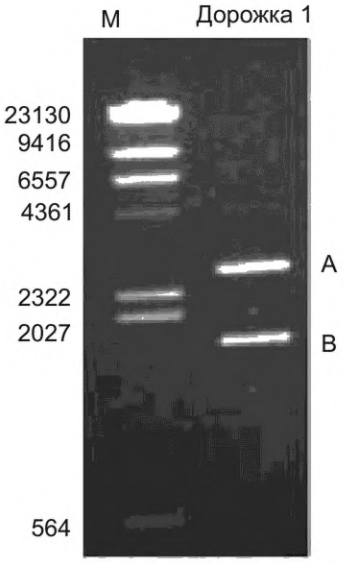
Рисунок С.1 — Электрофореграмма плазмидной ДНК (1 %-ный агарозный гель)

Электрофорез в агарозном геле также можно использовать для анализа длины фрагментов синтетических генов в плазмидном векторе после ферментативного расщепления рестриктазой, как показано на рисунках С.2—С.4, которые имеют разную длину фрагментов в векторах разного размера.



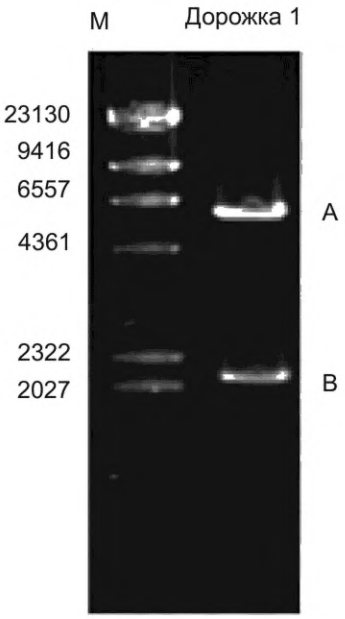
A — вектор ДНК; B — синтетический ген; M — Маркер лямбда ДНК/Hind III

Рисунок С.2 — Анализ ферментативного расщепления рестриктазой синтетического гена размером 246 п. о. в векторе 3,1 тыс. п. о. (1 %-ный агарозный гель)



A — вектор ДНК; B — синтетический ген; M — Маркер лямбда ДНК/Hind III

Рисунок С.3 — Анализ ферментативного расщепления рестриктазой синтетического гена размером 1,7 тыс. п. о. в векторе размером 2,7 тыс. п. о. (1 %-ный агарозный гель)



A — синтетический ген; B — вектор ДНК; M — Маркер лямбда ДНК/Hind III

Рисунок С.4 — Анализ ферментативного расщепления рестриктазой синтетического гена размером 6,1 тыс. п. о. в векторе размером 2,1 тыс. п. о. (1 %-ный агарозный гель)

Приложение D
(справочное)

Секвенирование по методу Сэнгера

Широко распространенным методом секвенирования ДНК для синтетических генов является секвенирование по методу Сэнгера.

Синтетический ген используется в качестве матрицы для получения набора одноцепочечных фрагментов ДНК, длина каждого из которых отличается на одно основание, посредством случайной терминации амплификации ДНК полимеразой путем включения дидезоксинуклеотидов.

В коммерческой системе, разработанной Applied Biosystems, каждый специфический дидезоксинуклеотид (ddATP, ddTTP, ddCTP и ddGTP) помечен одним типом флуоресцентного красителя, каждый фрагмент ДНК содержит на конце один из этих дидезоксинуклеотидов. Флуоресцентномеченые фрагменты ДНК разделяются с помощью капиллярного электрофореза (capillary array electrophoresis, CAE). Для считывания флуоресцентного сигнала используют детектор флуоресценции. Флуоресценция затем в каждом канале используется для получения базового значения результирующего считывания нуклеотидов.

На рисунке D.1 приведена проверка гена GFY с помощью секвенирования по методу Сэнгера. Каждый пик представляет собой нуклеотидный сигнал. Результат показывает, что последовательность синтезированного гена GFY верна на 100 %.

Последовательность

> GFY-Ген

CAGGATGAGAGACCGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTC
ATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGC
TCACTCATTAG

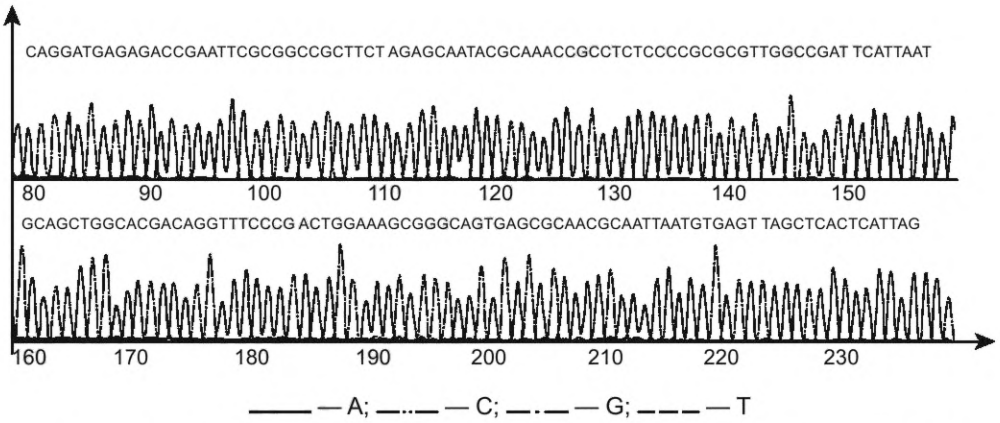


Рисунок D.1 — Проверка гена GFY с помощью секвенирования по методу Сэнгера

Приложение Е
(справочное)

Массивное параллельное секвенирование

Е.1 Общие положения

Метод MPS допускается использовать для быстрого получения высококачественной информации о последовательностях множества ДНК за один запуск и для составления отчета о точности последовательности по каждой последовательности с помощью биоинформатического анализа.

Были опубликованы серии стандартов, включающие ИСО 20397-1 и ИСО 20397-2. Данные по требованиям, связанным с массивно-параллельным секвенированием, приведены в серии ИСО 20397.

Е.2 Секвенирование ДНК

Е.2.1 Объединение образцов

Перед созданием библиотеки различные синтетические гены объединяют и проводят количественную оценку методом ультрафиолетовой спектрофотометрии (см. Е.2.2).

Е.2.2 Создание библиотеки

Е.2.2.1 Фрагментация и репарация концов

Для фрагментации проводится механическая или ферментативная фрагментация. Фрагменты ДНК нужного размера отбирают с помощью магнитных частиц. Предпочтительно, чтобы распределение вставок ДНК-мишеней было сосредоточено вокруг определенного размера (например, 300 п. о.). Липкие концы фрагментов ДНК восстанавливаются, а к 3′-концам фрагментов ДНК добавляется дополнительный хвост оснований «А».

Е.2.2.2 Амплификация и штрихкодирование

К вышеуказанным промежуточным продуктам добавляют универсальный адаптер. ПЦР с малым количеством циклов проводят с использованием комплементарного адаптерного праймера с ДНК штрихкодом. ПЦР-продукты индексированной библиотеки очищают и проводят количественную оценку методом ультрафиолетовой спектрофотометрии или флуоресцентной спектрометрии.

Е.2.2.3 Процедура перед секвенированием ДНК

Для конкретных платформ следует ознакомиться с инструкциями производителя.

Для некоторых платформ секвенирования ДНК:

- индексированные библиотеки объединяют в пул по равной массе и циркулируют с целью формирования библиотеки одноцепочечной ДНК (ssDNA), затем проводят количественную оценку флуоресцентным методом;
- ДНК-наношарики (DNBs) изготавливают с помощью амплификации по типу катящегося кольца (rolling cycle amplification, RCA);
- затем ДНК-наношарики загружают на ячейку секвенатора.

Для некоторых других платформ секвенирования ДНК:

- индексированные библиотеки объединяют в пул по равной массе и загружают на ячейку секвенатора;
- затем секвенатор проводит «мостиковую ПЦР» для амплификации молекул ДНК на ячейке.

Для других методов обработки образцов следуют соответствующему протоколу.

Е.2.3 Секвенирование ДНК на платформе MPS

Секвенирование ДНК на платформах MPS может быть проведено в соответствии с инструкциями производителя.

Е.3 Анализ данных

Е.3.1 Фильтрация необработанных данных

Для фильтрации прочтений используют соответствующее программное обеспечение. Прочтения, которые соответствуют приведенным ниже правилам, отбрасывают, а оставшиеся называют «чистыми данными»:

a) имеющие более чем 10 % оснований с качеством [выраженным как оценка качества (q-score)] менее 10;

b) с N основаниями;

c) последовательности, содержащие адаптеры (необязательно).

Е.3.2 Выравнивание

Используют программное обеспечение для выравнивания, чтобы сопоставить чистые данные с референсными последовательностями.

Е.3.3 Расчет глубины прочтения и покрытия

Используют программное обеспечение для расчета глубины прочтения и покрытия, чтобы определить глубину и покрытие картирования для каждой референсной последовательности.

Е.3.4 Выявление однонуклеотидного полиморфизма (SNV)/индел

Используют программное обеспечение для определения вариантов, чтобы определить однонуклеотидные полиморфизмы (SNV)/индел для каждого гена. SNV — это замены в последовательности ДНК, когда один нуклеотид, A, T, C или G, в геноме (или другой таргетной последовательности) различается между матрицами. Индел — это вставка и/или делеция нуклеотидов в последовательности ДНК.

Е.3.5 Оценка генов-кандидатов

Гены, соответствующие следующим правилам, считаются «идеальными» генами с корректными основаниями:

a) все основания референсной последовательности покрыты (т. е. покрытие составляет 100 %);

b) средняя глубина покрытия для референсной последовательности составляет более 30;

c) не обнаружено ни одного SNV/индела.

Пример — Проверка последовательности синтетических генов с помощью NGS.

Для партии из 563 синтезированных генов 8 клонов каждого гена объединяют в 8 отдельных библиотек, так что каждая библиотека содержит копию всех 563 генов. ДНК библиотеки создают и отправляют на NGS-секвенирование. После стандартной обработки выходных данных автоматически генерируется отчет о секвенировании (не все отображено), представленный на рисунке Е.1. Кандидаты из 522 генов со всеми корректными основаниями идентифицированы, считаются прошедшими секвенирование и могут быть отправлены заказчику. Оставшийся 41 ген считается не прошедшим секвенирование.

```
#########################################################################
#                                                                       #
#  Report:     Test NGS for Synthetic Genes                             #
#  Date:       2019-04-11                                               #
#  Operator:   Smart 0                                                  #
#                                                                       #
#  Gene Num:   563                                                      #
#  Reads Num:  3254168 Pairs                                            #
#  Q20 / Q30:  92.57% / 89.75%                                          #
#  Mapping Rate:  98.75%                                                #
#  Average Depth: 100x                                                  #
#                                                                       #
#########################################################################
        |          Library 1            |           Library 2            |
        | --------------------------    |   --------------------------   |
GeneID  | Coverage    Depth   Status    |   Coverage    Depth   Status   |
A1256   | 100.00%     97.3    Correct   |   100.00%     102.4   Correct  |
A1257   | 100.00%     97.9    Correct   |   100.00%      92.1   Correct  |
A1258   | 100.00%     95.1    Correct   |   100.00%      83.2   Correct  |
A1259   | 100.00%     97.3    Correct   |   100.00%      95.4   Correct  |
A1260   |  60.50%     56.1    Incorrect |   100.00%     111.5   Correct  |
A1261   | 100.00%     96.4    Correct   |   100.00%     120.4   Correct  |
A1262   | 100.00%     93.3    Correct   |   100.00%      97.2   Correct  |
A1263   | 100.00%     93.2    Correct   |   100.00%      90.4   Correct  |
A1264   | 100.00%     93.0    Correct   |   100.00%      89.4   Correct  |
A1265   | 100.00%     92.8    Correct   |     1.50%       2.3   Incorrect |
A1266   | 100.00%     91.4    Correct   |   100.00%     105.4   Correct  |
A1267   | 100.00%     97.5    Correct   |   100.00%     106.4   Correct  |
A1268   | 100.00%     93.8    Correct   |   100.00%      94.5   Correct  |
A1269   | 100.00%     94.6    Correct   |   100.00%     109.4   Correct  |
A1270   | 100.00%     95.4    Correct   |   100.00%     107.9   Correct  |
A1271   | 100.00%     99.7    Correct   |   100.00%     102.6   Correct  |
A1272   | 100.00%     90.7    Correct   |   100.00%     101.4   Correct  |
A1273   | 100.00%     91.6    Correct   |   100.00%     100.8   Correct  |
A1274   |  30.03%     12.1    Incorrect |   100.00%      87.0   Correct  |
A1275   | 100.00%     97.2    Correct   |   100.00%     105.4   Correct  |
A1276   | 100.00%     93.2    Correct   |     8.40%      31.4   Incorrect |
```

Рисунок Е.1 — Отчет о последовательности, созданный автоматически (отображено не полностью)

Приложение F
(справочное)

Дополнительные возможности контроля качества фрагментов синтетических генов

F.1 Точность клонирования

Проводят клонирование и скрининг для выявления правильного клона. Линейный фрагмент гена клонируют в соответствующий вектор. После лигирования и трансформации бактерии размножают и инкубируют в течение ночи. Отбирают определенное количество колоний и проводят ПЦР колоний для идентификации полноразмерных клонов.

Для проверки точности и эффективности клонирования можно также использовать RCA непосредственно из колоний бактерий с использованием фермента Phi29 без культивирования, с последующим непосредственным ферментативным расщеплением рестриктазой, секвенированием по Сэнгеру и MPS.

Средняя эффективность клонирования определяется как

$$E = C_f / C_t, \quad (1)$$

где E — средняя эффективность клонирования;

C_f — колонии с полноразмерной ДНК;

C_t — общее количество проанализированных колоний.

Процент рекомбинантных колоний при клонировании линейных фрагментов генов, содержащих нужную вставку, зависит от сложности конструкции.

F.2 Последовательность

Продукты линейных фрагментов генов представлены в виде пула фрагментов. Чтобы убедиться, что в пуле фрагментов присутствуют правильные фрагменты, линейные фрагменты генов должны быть секвенированы в большом количестве перед поставкой. Для идентификации правильного клона в 90 % случаев необходимо отобрать определенное количество полноразмерных клонов и провести их дальнейшее секвенирование для обеспечения 100 % достоверности последовательности. Рекомендуемое количество полноразмерных клонов приведено в таблице F.1. Количество клонов с правильной последовательностью определяется методами секвенирования ДНК, такими как метод по Сэнгеру или MPS, для подтверждения того, что синтетические фрагменты генов имеют идентичную последовательность с последовательностью в заказе. Для пулов повышенной сложности рекомендуется использовать метод MPS. См. B.4, приложение D и приложение E.

Таблица F.1 — Рекомендуемый скрининг линейных фрагментов генов

Размер линейных фрагментов генов	Рекомендуемое количество полноразмерных клонов для секвенирования ДНК
Линейные фрагменты генов размером до 1 тыс. п. о.	От 3 до 5 полноразмерных клонов
Линейные фрагменты генов размером 1—2 тыс. п. о.	От 5 до 8 полноразмерных клонов
Линейные фрагменты генов размером 2—3 тыс. п. о.	От 8 до 10 полноразмерных клонов

Заказчику может быть предоставлено следующее:

a) файл целевой последовательности, созданный на основе заказанной последовательности;

b) отчет о выравнивании [например, в формате синтеза качественных данных (synthesis of qualitative data, SQD)] продукта синтетических генных фрагментов;

c) последовательность с указанием заказанной последовательности;

d) необработанные данные и хроматограммы, полученные с помощью секвенатора.

Приложение G
(справочное)

Пример ранжирования рисков, связанных с продуктами ДНК

Риск для продуктов ДНК можно ранжировать следующим образом:

- уровень риска I: последовательности, полученные из геномов *Variola major* или *Variola minor*, если они не идентичны геномам *non-variola orthopox*. Последовательности, вызывающие наибольшую озабоченность, которые не должны производиться, если только заказчик не получил одобрение Консультативного комитета ВОЗ по исследованию вируса *Variola* (Advisory Committee on Variola Virus Research, ACVVR) в соответствии с рекомендациями, изложенными ВОЗ в 2016 году [11];
- уровень риска II: последовательности, вызывающие повышенное беспокойство, которые могут быть произведены при условии выполнения обязательств в соответствии с применимыми национальными нормами и правилами по особо опасным патогенам. Последовательности, кодирующие функциональные формы токсинов или их субъединиц (указанных в Сводном списке контролируемых агентов), значительные объемы (> 20 %) геномов вирусов или бактерий, включенных в список особо опасных патогенов первого уровня Федеральной программы особо опасных патогенов (Federal Select Agent Program, FSAP), или последовательности, способные передавать патогенный потенциал любого организма или вируса, включенного в Сводный список контролируемых агентов [14];
- уровень риска III: последовательности средней степени опасности, которые могут быть произведены уполномоченными поставщиками синтетических генов при условии выполнения обязательств в соответствии с применимыми национальными нормами и правилами по особо опасным патогенам. Последовательности, полученные из любого организма или вируса, контролируемого в соответствии с применимыми национальными нормами и правилами по особо опасным патогенам, которые не способны передавать патогенный потенциал любому другому организму, но обычно не рассматриваются как конститутивные гены или метаболические гены;
- уровень риска IV: последовательности, не представляющие особой опасности, которые могут быть произведены уполномоченными поставщиками синтетических генов. Последовательности, полученные от любого организма или вируса, включенного в Предупреждающий список или Ознакомительный раздел Общего контрольного списка Австралийской группы [15], которые не способны передавать патогенный потенциал любому другому организму, но обычно не рассматриваются как конститутивные гены или метаболические гены;
- уровень риска V: последовательности, не вызывающие опасений, которые могут быть произведены уполномоченными поставщиками синтетических генов. Последовательности, которые не получены из какого-либо организма или вируса, контролируемого в соответствии с применимыми национальными нормами и правилами по особо опасным патогенам, и не соответствуют другим критериям уровня риска. Последовательности, полученные из организмов или вирусов, контролируемых в соответствии с применимыми национальными нормами и правилами по особо опасным патогенам, обычно рассматриваемые как конститутивные гены или метаболические гены и не отвечающие другим критериям уровня риска.

Библиография

[1] ISO 9001 Quality management systems — Requirements

[2] ISO 13485 Medical devices — Quality management systems — Requirements for regulatory purposes

[3] ISO 45001 Occupational health and safety management systems — Requirements with guidance for use

[4] ISO 15189 Medical laboratories — Requirements for quality and competence

[5] ISO 16577:2022 Molecular biomarker analysis — Vocabulary for molecular biomarker analytical methods in agriculture and food production

[6] ISO 17822:2020 In vitro diagnostic test systems — Nucleic acid amplification-based examination procedures for detection and identification of microbial pathogens — Laboratory quality practice guide

[7] ISO 20397-2:2021 Biotechnology — Massively parallel sequencing — Part 2: Quality evaluation of sequencing data

[8] ISO 20397-1 Biotechnology — Massively parallel sequencing — Part 1: Nucleic acid and library preparation

[9] ISO 35001:2019 Biorisk management for laboratories and other related organisations

[10] World Health Organization (WHO), Laboratory biosafety manual. Fourth edition. WHO, 2020

[11] WHO, Global guidance framework for the responsible use of the life sciences: mitigating biorisks and governing dual-use research. WHO, 2022

[12] WHO WHO Recommendations concerning the distribution, handling and synthesis of variola virus DNA. WHO, 2016. Available from: gost.e-ecolog.ru

[13] International Gene Synthesis Consortium (IGSC), Harmonized Screening Protocol© v2.0, Gene Sequence & Customer Screening to Promote Biosecurity, IGSC, 2017

[14] U.S. Department of Health and Human Services (HHS) and U.S. Departments of Agriculture, (USDA). Select Agents and Toxins, HHS and USDA, 2023

[15] Australia Group, Australia Group Common Control List Handbooks, Volume II: Biological Weapons-Related Common Control Lists, Australia Group, 2021

УДК 615.07:006.354 ОКС 07.080

Ключевые слова: биотехнология, синтез нуклеиновых кислот, синтетические фрагменты генов, гены и геномы, MPS, секвенирование

Редактор *М.В. Митрофанова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *М.В. Малеевой*

Сдано в набор 13.10.2025. Подписано в печать 21.10.2025. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 3,72. Уч.-изд. л. 2,98.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru