ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 20397-1— 2025

Биотехнология

МАССОВОЕ ПАРАЛЛЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ

Часть 1

Подготовка нуклеиновой кислоты и библиотеки

(ISO 20397-1:2022, 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 16 октября 2025 г. № 1229-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 20397-1:2022 «Биотехнология. Массовое параллельное секвенирование. Часть 1. Подготовка нуклеиновой кислоты и библиотеки» (ISO 20397-1:2022 «Biotechnology — Massively parallel sequencing — Part 1: Nucleic acid and library preparation», IDT).

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

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочного международного стандарта соответствующий ему национальный стандарт, сведения о котором приведены в дополнительном приложении ДА

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, 2022
© 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 Оценка качества образцов нуклеиновых кислот 2
5 Подготовка библиотеки нуклеиновых кислот 3
6 Валидация 6
7 Стандартные образцы или контроли 7
8 Контаминация 8
Приложение А (справочное) Контрольный перечень вопросов для оценки качества образцов перед созданием библиотеки 10
Приложение В (справочное) Примеры критериев качества для выбранных платформ MPS и приложений 11
Приложение С (справочное) Перечень стандартных образцов 13
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочного международного стандарта национальному стандарту 14
Библиография 15

Введение

Массовое параллельное секвенирование (massively parallel sequencing, MPS) — это высокопроизводительный аналитический подход к секвенированию нуклеиновых кислот. Методы MPS позволяют обрабатывать от тысяч до миллиардов ридов (прочтений) нуклеотидных последовательностей одновременно за один цикл, что позволяет анализировать целые геномы, транскриптомы и специфические мишени из нуклеиновых кислот различных организмов за относительно короткое время.

MPS используют во многих областях биологии, позволяя определять и осуществлять высокопроизводительный анализ миллионов нуклеотидных оснований. Биологическая изменчивость полимеров дезоксирибонуклеиновой и рибонуклеиновой кислот живых организмов создает трудности в точном определении их последовательностей. Качество определения последовательности с помощью MPS зависит от многих факторов, в том числе качества образца, подготовки библиотеки и качества данных секвенирования.

Качество нуклеиновых кислот и библиотек, подготовленных для MPS, имеет решающее значение для получения высококачественных данных о последовательностях. Контроль этапов предварительной подготовки для MPS и оценка образцов нуклеиновых кислот и библиотек на пригодность для секвенирования значительно улучшают результаты MPS, последующий анализ и, в конечном счете, результаты, зависящие от данных MPS.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Биотехнология

МАССОВОЕ ПАРАЛЛЕЛЬНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ

Часть 1

Подготовка нуклеиновой кислоты и библиотеки

Biotechnology. Massively parallel sequencing.
Part 1. Nucleic acid and library preparation

Дата введения — 2026—03—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает общие требования и рекомендации по оценке качества образцов нуклеиновых кислот. Настоящий стандарт устанавливает общие рекомендации по подготовке и оценке качества библиотек перед секвенированием и генерацией данных.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использована нормативная ссылка на следующий стандарт [для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных — последнее издание (включая все изменения)]:

ISO 20395:2019, Biotechnology — Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences — qPCR and dPCR (Биотехнология. Требования к оценке эффективности методов количественного определения последовательностей нуклеиновых кислот-мишеней. Количественная ПЦР и цифровая ПЦР)

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями.

ИСО и МЭК поддерживают терминологические базы данных, 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 **адаптер** (adapter): Олигонуклеотиды известной последовательности, которые добавлены ферментативным путем (например, лигазная или полимеразная цепная реакция) к концу(ам) фрагмента ДНК/кДНК.

3.2 **штрихкод (индекс)** (barcode; index): Короткая последовательность, обычно состоящая из шести или более нуклеотидов, которая служит средством идентификации или маркировки отдельных образцов, когда их секвенируют параллельно на одной дорожке и/или чипе секвенирования.

Примечание 1 — Штрихкоды обычно располагают в пределах *адаптеров* (3.1) секвенирования.

3.3 **штрихкодирование (индексирование)** (barcoding; indexing): Уникальный метод идентификации последовательности ДНК, позволяющий объединить несколько образцов для секвенирования.

Издание официальное

Примечание 1 — Каждый образец определяют по уникальному *штрихкоду* (3.2), позволяющему идентифицировать результаты во время параллельного анализа.

3.4 **гуанин-цитозиновый состав;** GC-состав (GC content; GC): Процентное содержание гуанина и цитозина в одной или более последовательности(ях) нуклеиновой кислоты.

Примечание 1 — Количество гуанина и цитозина в полинуклеотиде, как правило, выражают в долях (или процентах) от общего количества азотистых оснований. Общее количество азотистых оснований включает в себя общее количество ридов нуклеотидных оснований, полученных в результате одного или нескольких циклов MPS.

[ИСО 20397-2:2021, 3.15]

3.5 **библиотека (библиотека для секвенирования)** (library; sequencing library): ДНК, кДНК или РНК, подготовленная для массового параллельного секвенирования в определенном диапазоне размеров и, как правило, содержащая *адаптеры* (3.1) и/или идентификаторы, распознаваемые при праймировании конкретной последовательности, захвате последовательности и/или идентификации конкретных выбранных фрагментов.

Примечание 1 — Существуют ДНК- и кДНК-библиотеки. Для секвенирования РНК на большинстве секвенаторов подготавливают кДНК-библиотеки. Некоторые приборы могут непосредственно секвенировать РНК.

3.6 **подготовка библиотеки (подготовка библиотеки для секвенирования)** (library preparation; sequencing library preparation): Совокупность процедур, выполняемых для подготовки ДНК- или РНК-фрагментов, содержащих метки и участки связывания праймеров для секвенирования, для массового параллельного секвенирования (MPS).

3.7 **«spike-in» контроль («spike-in» контроль процесса)** (spike-in control; spike-in process control): Целевая последовательность, часто идентифицированная и имеющая определенную концентрацию, которая вводится в образец на различных этапах протокола массового параллельного секвенирования.

Примечание 1 — Контроль процесса может быть использован для оценки любого этапа протокола, но обычно его применяют в качестве контроля нуклеиновых кислот перед *подготовкой библиотеки* (3.6).

3.8 **оценка качества (показатель качества Q)** (Q score): Мера качества секвенирования данного нуклеотидного основания.

[ИСО 20397-2:2021, 3.32, с изменениями — исключены примечания]

4 Оценка качества образцов нуклеиновых кислот

4.1 Общие положения

Лаборатория должна разработать, документировать и внедрить рабочий процесс для количественного определения нуклеиновых кислот, обеспечивающий точные и воспроизводимые результаты. Требования к качеству и количеству нуклеиновых кислот в образце могут быть различными в зависимости от метода MPS. Методы очистки нуклеиновых кислот также могут оказать влияние на качество нуклеиновых кислот, используемых для подготовки библиотеки.

Необходимо разработать процедуру контроля качества, позволяющую четко определить качество нуклеиновых кислот и состав библиотеки. Эта процедура должна быть проверена, внедрена и задокументирована и обеспечивать точное определение минимального количества нуклеиновой кислоты, необходимого для проведения MPS. Необходимо указать значения неопределенности измерения и чувствительности метода, используемого для этой процедуры. Количественный анализ позволяет соответствующим образом скорректировать концентрацию нуклеиновой кислоты, вводимой в секвенатор MPS.

В приложении А приведен контрольный перечень вопросов для оценки качества образца перед созданием библиотеки. Количество, чистота и целостность являются основными показателями качества подготавливаемых образцов. Прочие общие рекомендации по обеспечению качества образцов, касающиеся проведения мультиплексных молекулярных тестов, включая секвенирование нового поколения (next generation sequencing, NGS), приведены в ИСО 21474-1:2020.

4.2 Количественное определение образцов

Ряд методов количественного определения нуклеиновых кислот приведен в ИСО 20395:2019, 5.2. Допускается использовать другие методы (например, электрофорез).

В таблице В.2 приведены оптимальные количества и концентрации образцов в зависимости от метода проведения MPS.

4.3 Чистота образца

Определение чистоты образца нуклеиновой кислоты проводят при помощи методов, установленных в ИСО 20395:2019, 5.4.

4.4 Целостность образца

4.4.1 Общие положения

Ряд методов оценки целостности образцов приведен в ИСО 20395:2019, приложение В.

Для оценки целостности образцов нуклеиновых кислот допускается проводить электрофорез с использованием геля и микрофлюидной аналитической системы.

4.4.2 Электрофорез в агарозном геле

Электрофорез в агарозном геле может быть использован как метод разделения и выделения молекул нуклеиновых кислот разного размера. Его также можно использовать для определения целостности нуклеиновых кислот. Например, в лучшем случае образцы геномной ДНК (гДНК) имеют одну выраженную основную полосу с высокой молекулярной массой (размером более 20 тыс. п. о.[1)]) и минимальной дисперсией полос.

4.4.3 Капиллярный гель-электрофорез

Для оценки целостности нуклеиновых кислот может быть также использован капиллярный гель-электрофорез.

4.4.4 Микрофлюидная аналитическая система

Микрофлюидная аналитическая система может быть использована для оценки целостности геномной ДНК или РНК, выделенной из различных материалов.

Примечание 1 — Индекс целостности ДНК или РНК обычно используют в качестве числового критерия оценки качества. Чем выше его значение, тем лучше качество.

Примечание 2 — В зависимости от типа прибора устанавливают подходящее пороговое значение.

4.4.5 ПЦР-метод

Также для оценки целостности может быть использован ПЦР-метод. Образцы высокого качества могут генерировать более информативные для оценки данные, чем данные, которые могут быть получены из образцов низкого качества.

Примечание — Парафинизированные образцы, фиксированные в формалине (FFPE-образцы), могут затруднить использование некоторых методов анализа ДНК. Дополнительные рекомендации приведены в стандартах серии ИСО 20166.

5 Подготовка библиотеки нуклеиновых кислот

5.1 Общие положения

Лаборатория должна разработать, документировать и внедрить все процедуры, выполняемые в рамках подготовки библиотеки нуклеиновых кислот, которые обеспечивают точные и воспроизводимые результаты.

Качество библиотеки MPS обычно определяется следующими процедурами, (но не ограничивается ими):

a) фрагментацией;
b) добавлением универсальных последовательностей;
c) выбором размера;
d) амплификацией;
e) очисткой;
f) количественным определением библиотеки;
g) контролем качества библиотеки.

[1)] тыс. п. о. = тыс. пар оснований.

5.2 Фрагментация

5.2.1 Общие положения

Для некоторых методов секвенирования (например, секвенирование коротких ридов) на первом этапе необходимо фрагментировать ДНК, кДНК или РНК перед подготовкой библиотеки.

Фрагментация может быть выполнена механическим или ферментативным способом для получения ДНК или РНК определенного размера, необходимого для конкретного метода и платформы секвенирования. Для длинных фрагментов РНК обычно применяют химическую фрагментацию.

При выборе метода фрагментации следует учитывать влияние конкретного подхода на равномерность охвата в конечных библиотеках, например, для того, чтобы избежать сдвига GC-состава.

Следует также учитывать количество доступного исходного материала и вероятность потери образцов в результате применения каждого подхода.

5.2.2 Механическая фрагментация

Механическая фрагментация может быть выполнена с помощью сфокусированной акустики. Размер получаемых фрагментов (от 150 до 5000 п. о.[2)]) можно регулировать, изменяя интенсивность и длительность ультразвуковых акустических волн.

Для получения более крупных фрагментов (обычно от 1 до 75 тыс. п. о.) может быть использована гидродинамическая фрагментация, которая, однако, требует большого количества вводимой ДНК (>1 мкг) и имеет низкую производительность.

Другой альтернативой является небулизация, при которой сжатый воздух проталкивает ДНК или РНК через небольшое отверстие. Несмотря на то, что размер фрагмента можно в определенной степени контролировать, требуется большое количество вводимой ДНК (в микрограммах), и этот метод подходит только для небольшого количества образцов.

5.2.3 Ферментативная фрагментация

Ферментативные методы фрагментации (например, с использованием фрагментазы, транспозазы или эндонуклеазы) имеют преимущество за счет более высокой производительности по сравнению с механическими методами и обычно приводят к меньшим потерям образца.

Недостаток ферментативных методов заключается в потенциальном искажении последовательности, поскольку многие ферменты обладают определенными последовательностями распознания или избирательностью по отношению к последовательностям.

5.2.4 Химическая фрагментация

Химическую фрагментацию обычно используют для расщепления длинных фрагментов РНК. Химическая фрагментация осуществляется путем нагревания РНК с катионом двухвалентного металла (магния или цинка). Длина получаемых продуктов колеблется от 115 до 350 нуклеиновых оснований и может быть скорректирована путем увеличения или уменьшения времени инкубации.

5.2.5 Количество образца фрагментированной нуклеиновой кислоты

Некоторые протоколы подготовки библиотек требуют количественного определения фрагментированной ДНК или РНК (поскольку в процессе может быть потеряно некоторое количество материала). Это можно сделать любым из методов, описанных в 4.2, но чаще всего это делают с помощью спектрофотометрии или интеркалирующих флуоресцентных красителей.

5.2.6 Чистота образца фрагментированной нуклеиновой кислоты

Если существует риск того, что примеси, образующиеся в процессе фрагментации (например, компоненты ферментативных реакций фрагментации), могут быть перенесены в очищенные продукты, чистоту образца можно оценить с помощью методов, описанных в 4.3.

5.2.7 Распределение фрагментированных нуклеиновых кислот по размерам

Необходимо определить достигла ли фрагментированная нуклеиновая кислота соответствующего диапазона размеров. Это можно сделать, используя методы, описанные для контроля целостности образца в 4.4.

5.2.8 Очистка фрагментированных нуклеиновых кислот с помощью гель-электрофореза

Очистка фрагментированных нуклеиновых кислот может быть осуществлена путем отделения нуклеиновых кислот определенного размера от нуклеиновых кислот других размеров перед последующими этапами подготовки библиотеки и секвенирования. Чистота может быть достигнута с помощью капиллярного электрофореза, других методов электрофореза или с применением магнитных частиц. Можно проводить количественный анализ очищенных нуклеиновых кислот, как описано в 4.2.

[2)] п. о. = пары оснований.

5.3 Добавление универсальных последовательностей

5.3.1 Репарация

Поскольку фрагментация может привести к повреждению, образец нуклеиновой кислоты должен быть репарирован после проведения данной процедуры, чтобы повысить эффективность последующих этапов подготовки.

Примечание — Процедура репарации может потребоваться при наличии: апуриновых/апиримидиновых сайтов, одноцепочечных разрывов, димеров тимина, заблокированных 3'-концов, окисленного гуанина или пиримидина, дезаминированного цитозина.

Конец фрагмента должен быть специально подготовлен (т. е. добавлены 5'-PO_4 или 3'-OH группы), чтобы сделать его пригодным для лигирования.

5.3.2 Лигирование адаптера

Оценка последовательности адаптера может включать (но не ограничивается этим):

a) оценку длины,

b) структуры адаптера,

c) соотношения размеров адаптера и ДНК.

Соотношение размеров адаптера имеет решающее значение и требует оптимизации.

5.3.3 Штрихкодирование/индексация

Библиотеки могут иметь одинарную или двойную индексацию. На платформах MPS, использующих шаблонные проточные ячейки, допустимо использование уникальной двойной индексации, чтобы смягчить последствия присвоения библиотекам неправильного индекса вместо предполагаемого.

Последовательность штрихкодов должна быть как можно более уникальной и разнородной.

Нуклеотидные последовательности, выбранные в качестве штрихкодов/индексов, должны быть различаемыми в рамках проекта секвенирования.

Длина штрихкода должна быть как можно короче. Примеры длин штрихкодов приведены в таблице В.1.

Штрихкод должен быть разработан таким образом, чтобы свести к минимуму артефакты из-за образования димеров адаптеров и димеров праймеров.

Последовательность штрихкода/индекса обычно составляет от 6 до 12 п. о. Каждый штрихкод/индекс в библиотеке для секвенирования ДНК должен иметь уникальную последовательность, которую легко отличить от всех других штрихкодов/индексов в этой библиотеке.

Штрихкоды обычно располагают рядом с адаптерами.

Набор последовательностей штрихкодов может быть оценен с помощью следующих параметров:

a) разнообразие последовательностей штрихкодов (актуально для некоторых платформ MPS);

b) расстояние Хэмминга (количество различающихся оснований между парой индексов).

Если для оценки используют параметр b), то расстояние Хэмминга должно составлять >3 п. о.

5.4 Выбор размера

Оптимальная длина нуклеотидов в библиотеке должна определяться в соответствии с предполагаемым применением. Обычно это достигается с помощью следующих методов, включая (но не ограничиваясь ими):

a) методы с применением магнитных частиц;

b) электрофорез.

5.5 Амплификация

Использование полимеразы может привести к неравномерной амплификации и, в конечном счете, к неудаче на данном этапе.

Полимераза может вносить ошибки; это можно минимизировать путем увеличения покрытия последовательности или увеличения числа технических повторов.

Примечание 1 — Чрезмерная амплификация приводит к появлению ПЦР-дубликатов.

Примечание 2 — Для снижения количества ошибок можно использовать высокоточный фермент для амплификации.

5.6 Процедуры очистки

Перед проведением MPS необходимо очистить полученные с помощью ПЦР-амплификации фрагменты или нефрагментированные нуклеиновые кислоты для удаления избытка адаптеров или других загрязнений. Методы могут включать (но не ограничиваться ими):

a) очистку при помощи магнитных частиц;
b) спин-колонки;
c) ферментную очистку;
d) очистку с помощью гель-электрофореза.

5.7 Количественное определение библиотеки

5.7.1 Методы количественного определения библиотеки

Методы количественного определения библиотек включают (но не ограничены ими):

a) флуоресцентные красители нуклеиновых кислот или спектрофотометрические анализы;
b) электрофорез;
c) количественные ПЦР-тесты в режиме реального времени;
d) цифровые ПЦР-тесты;
e) методы для высокомолекулярной нуклеиновой кислоты.

5.7.2 Выбор метода количественного определения

Выбор метода количественного определения зависит от нескольких факторов, включая (но не ограничиваясь ими):

a) распределение библиотек по размерам (например, обычно выбирают среди флуорометрических методов, но данные методы не подходят для библиотек с широким распределением размеров фрагментов);

b) тип используемого метода подготовки библиотеки (например, при использовании методов количественной ПЦР (кПЦР) обычно применяют праймеры, которые связываются с адаптерами библиотеки, таким образом они будут наиболее точны при использовании методов получения библиотеки, в которых может содержаться большое количество ДНК, не содержащей адаптера для секвенирования).

5.8 Контроль качества библиотеки

5.8.1 Общие положения

Необходимо проводить контроль качества библиотеки для выявления потенциальных проблем, таких как высокий процент коротких фрагментов ДНК или димеров адаптеров, и определить, имеют ли они подходящую длину (с учетом дополнительной длины адаптеров для секвенирования).

Лаборатория должна использовать валидированные протоколы для определения размеров фрагментов в определенном диапазоне молекулярных масс при подготовке библиотеки.

Следует принимать особые меры для минимизации количества димеров праймеров, димеров адаптеров и более широких полос с более высокой молекулярной массой. Количество димеров праймеров обычно минимизируют с помощью магнитных частиц, в результате димеры, как правило, не представляют серьезной проблемы, если только они не доминируют в реакции.

5.8.2 Методы

Для оценки общего диапазона размеров фрагментов ДНК, составляющих библиотеку, обычно используют методы электрофореза.

6 Валидация

Перед сбором валидационных данных необходимо разработать, внедрить и задокументировать протокол валидации для всего рабочего процесса.

Валидационные исследования следует проводить с использованием образцов, которые предназначены для такого типа исследований, чтобы результаты теста были репрезентативными для большей совокупности образцов. Однако MPS множества генов не могут быть валидированы так, как если бы это был тест для одного анализируемого вещества. Существует высокий уровень вариабельности в типах образцов, типах вариаций, аллельной нагрузке и целевых экзонах или областях. Процесс валидации должен систематически выявлять потенциальные ошибки на протяжении всей подготовки библиотеки. Ошибки на каждом этапе и их источник могут быть устранены и оценены на различных уровнях, например методика проведения анализа, валидация метода и/или контроль качества.

Требования к эффективности метода могут быть проверены в ходе процедуры валидации, а для мониторинга эффективности анализа каждого образца должны использоваться одни и те же спецификации. При определении требований к эффективности должна приниматься во внимание оценка соответствия всей системы измерений целевому назначению.

Учитывая существенные различия между платформами, конкретными приложениями и применяемыми инструментами информатики, конкретные рекомендации по диапазонам и пороговым значениям не могут быть предложены для всех случаев, и каждая лаборатория должна определить критерии и средства мониторинга всех показателей качества для обеспечения оптимальных аналитических характеристик на основе инструкций производителя анализатора. Показатели качества для валидации на основе примеров платформ MPS приведены в таблице В.1.

7 Стандартные образцы или контроли

7.1 Общие положения

Для быстрого выявления источников ошибок можно использовать контрольные образцы. Контрольные образцы следует использовать для мониторинга этапов методики, для которых валидационные и верификационные данные показали потенциальную изменчивость или ошибку. Клеточные линии, фрагменты ДНК/генома, микроорганизмы и т. д. можно использовать в качестве эталонных материалов для целей контроля качества.

Использование контрольных образцов должно быть определено в диапазоне минимальных и максимальных уровней обнаружения нуклеиновых кислот. Каждая партия подготовленных контрольных образцов должна быть проверена перед использованием в качестве контроля, а результаты проверки задокументированы.

7.2 Контрольные образцы

Существуют различные стандартные образцы, которые могут быть использованы в тестах для оценки качества и/или валидационных испытаниях. Их следует использовать, если они доступны. Перечень стандартных образцов и примеры их поставщиков приведены в приложении С.

Контрольные образцы обычно делятся на три категории:

a) подробно изученные клеточные линии.

Примечание 1 — Наиболее широко используют клеточные линии «НарМар» или проекта «Personal Genome Project»;

b) подробно изученные фрагменты ДНК/генома.

Примечание 2 — Обладают особыми преимуществами, поскольку могут быть построены таким образом, чтобы включать определенные вариации последовательности в известных положениях;

c) микробиологические стандартные образцы, которые охватывают широкий диапазон GC-состава, в процентах, обычно используют для оценки GC-сдвига.

7.3 Положительный контроль

В качестве положительного контроля для мониторинга качества секвенирования для разных циклов и выявления проблем с химическим процессом секвенирования следует использовать ДНК или РНК подробно изученного вида или известного происхождения.

Одну и ту же выделенную ДНК или РНК следует последовательно использовать для аналогичных источников или применений.

Положительный контроль должен содержать фрагменты в диапазоне, соответствующем используемой технологии, а результаты секвенирования должны быть согласованными между циклами.

Частота использования положительного контроля для мониторинга качества с течением времени должна быть установлена, внедрена и задокументирована.

7.4 Отрицательный контроль

Во время подготовки образца допускается использовать отрицательный контроль. В некоторых случаях, таких как таргетное секвенирование/обогащение генов, для оценки можно использовать отрицательные контроли с определенными ДНК или РНК-матрицами.

Примечание — Отрицательный контроль используют для оценки перекрестной контаминации, возникающей при подготовке библиотеки, и общей специфичности процедуры.

Отрицательный контроль не должен иметь заметных пиков и минимальных значений последовательности, связанных с отрицательным контролем.

Отрицательный контроль не требуется для каждого цикла. Частота использования отрицательного контроля для мониторинга качества с течением времени должна быть установлена, внедрена и задокументирована.

7.5 Безматричный контроль

Безматричные контроли должны выполняться во время подготовки библиотеки, чтобы отслеживать контаминацию/неспецифическую амплификацию на этапах ПЦР, они также могут быть секвенированы с использованием определенных протоколов для подтверждения идентичности таких продуктов.

7.6 «Spike-in» контроль

«Spike-in» контроль может быть использован для проверки таргетного секвенировния и функционирования прибора.

Этот контроль используют на протяжении всего процесса и проводят те же этапы обработки, что и для исследуемого образца, от первоначального количественного определения до последующей конечной обработки. Если в стандартном контроле наблюдается ошибка последовательности, то, вероятно, такая же ошибка произошла и в основном образце.

«Spike-in» контроль можно использовать только в библиотечной конструкции.

Контролируемая библиотека должна быть включена в каждый цикл.

В некоторых платформах для секвенирования коротких ридов можно использовать «Spike-in» контроль высокой концентрации (>1 %), чтобы расширить разнообразие последовательностей в библиотеках с низким уровнем разнообразия.

Стандартным образцом могут быть любые используемые стабильные образцы (такие как клеточные линии) или обеспечиваться третьими сторонами (например, национальными органами по стандартизации). Перечень примеров стандартных образцов и поставщиков приведен в приложении С.

7.7 Стандартные образцы

Имеющиеся в продаже материалы могут быть использованы для конкретных применений.

8 Контаминация

8.1 Общие положения

Особое внимание следует уделять перекрестной контаминации в процессе обработки, особенно на этапах, предшествующих ПЦР, включая этап предварительного анализа образца (например, обработка исходного образца, фрагментация ДНК и создание библиотеки нуклеиновых кислот). Контаминацию можно контролировать с помощью соответствующих средств контроля (например, безматричные контроли на этапах ПЦР).

8.2 Оценка первичных образцов

Первичный образец необходимо исследовать на отсутствие контаминации экзогенной ДНК, белком, РНК или другими потенциальными примесями. Этого можно достичь с помощью методов, описанных в 4.4. При необходимости чистоту образца можно повысить с помощью таких методов очистки, как наборы с колонками или магнитные частицы.

8.3 Протокол и операционные процедуры

Через соответствующие интервалы времени следует оценивать техническую компетентность оператора в отношении установленной процедуры и требований, чтобы обеспечить надлежащую эффек-

тивность метода и избежать перекрестной контаминации между различными образцами или библиотеками нуклеиновых кислот. Эффективность цикла может быть оценена путем анализа показателей контроля качества, таких как частота появления ошибок, количество ридов и показатель качества Q.

Примечание — Проведение одновременного детектирования различных библиотек, использующих один эксперимент с гель-электрофорезом, может привести к недостоверным результатам.

Для выделения целевого фрагмента ДНК из геля должны быть использованы соответствующие методы и оборудование.

Приложение А
(справочное)

Контрольный перечень вопросов для оценки качества образцов перед созданием библиотеки

Основные вопросы при оценке качества образцов:

a) Откуда получен образец (источник образца) нуклеиновой кислоты (бактерии, ткани, кровь и т. д.)?

Примечание 1 — Получение данной информации может иметь решающее значение на начальных этапах контроля качества.

Пример — Если образец взят из растений (которые, как известно, содержат большое количество полисахаридов), вместе с нуклеиновыми кислотами могут быть извлечены и полисахариды и для их удаления из образца может потребоваться процедура очистки.

b) Какие методы использовались для выделения ДНК? Подходит ли выбранный метод для удаления солей или детергентов при выделении?

c) Основан ли проведенный количественный анализ образцов на флюорометрии?

d) Достаточно ли было ДНК для подготовки библиотеки?

e) Использовались ли гели при оценке качества гДНК?

Примечание 2 — Важно знать, с чем проводят работу: с РНК, с ДНК или с деградированной ДНК.

f) Выполнялись ли необходимые методы очистки перед фрагментацией?

g) Соответствует ли образец предполагаемому назначению? Соответствует(ют) ли используемый(ые) первичный образец/условия преаналитической подготовки образца предполагаемому назначению?

Приложение В
(справочное)

Примеры критериев качества для выбранных платформ MPS и приложений

В таблице В.1 приведена информация о критериях показателей качества, относящихся к известным глобальным платформам MPS по состоянию на 1 августа 2020 г. В таблице В.2 приведены оптимальные количества и концентрации образцов, подходящие для различных выбранных применений MPS.

Таблица В.1 — Примеры критериев качества для выбранных платформ MPS[a,b]

Наименование платформы	Количество образца	Концентрация образца	Диапазон размеров фрагментов	Диапазон длин штрихкодирования	Длина адаптера	Контроль
illumina®[1] NextSeq & NovoSeq	10 мкг	200 нг/мкл	От 100 до 500 п. о.	От 6 до 10 п. о.	От 10 до 15 п. о.	—
Thermo Fisher Ion S5™[,2]	10 мкг	200 нг/мкл	От 100 до 500 п. о.	От 6 до 10 п. о.	От 10 до 15 п. о.	—
MGI[3] DNASEQ-G400	10 мкг	200 нг/мкл	От 100 до 500 п. о.	От 6 до 10 п. о.	От 10 до 15 п. о.	—
Oxford Nanopore[4] PromethION®[5]	1 мкг	200 нг/мкл	От 1 тыс. до 2 М п. о.	От 6 до 10 п. о.	—	—
PacBio® Sequel II[6,7]	3 мкг	200 нг/мкл	От 5 до 30 тыс. п. о.	От 6 до 10 п. о.	—	—

[a] Приведенные критерии взяты из нескольких международных лабораторий. Количество и концентрация образца являются избыточными. Пользователь может обратиться в лаборатории или компании, занимающиеся секвенированием, чтобы получить последние точные значения.

[b] Диапазон размеров фрагментов зависит от используемых платформ.

[1] illumina® является торговой маркой биотехнологической компании illumina, Inc. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не указывает на предпочтение со стороны ИСО в отношении данного продукта.

[2] Thermo Fisher Ion S5™ является торговой маркой биотехнологической компании Thermo Fisher Scientific. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не указывает на предпочтение со стороны ИСО в отношении данного продукта.

[3] MGI является торговой маркой MGI Tech Co., Ltd. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не указывает на предпочтение со стороны ИСО в отношении данного продукта.

[4] Oxford Nanopore производит нанопоровое секвенирование.

[5] Oxford Nanopore PromethION® является торговой маркой Oxford Nanopore Technologies Limited. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не указывает на предпочтение со стороны ИСО в отношении данного продукта.

[6] PacBio Sequel II® является торговой маркой биотехнологической компании Pacific Biosciences. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не указывает на предпочтение со стороны ИСО в отношении данного продукта.

[7] Pacific Biosciences производит измерения на волноводах нулевого режима (ZMW).

Таблица В.2 — Примеры критериев качества для выбранных платформ MPS[a,b]

Тип MPS	Применения	Количество образца	Концентрация образца
Полногеномное секвенирование	Гомозиготные однонуклеотидные полиморфизмы (SNV) — однонуклеотидные замены, когда аллели гена идентичны	От 1 до 10 мкг	От 20 до 200 нг/мкл
	Гетерозиготные SNV — однонуклеотидные замены, когда аллели гена отличаются друг от друга		
	Инсерции и делеции (инделы) — мутации в геноме, при которых нуклеотиды вставляются или удаляются		

Окончание таблицы В.2

Тип MPS	Применения	Количество образца	Концентрация образца
	Вариация числа копий (CNV) — разница в количестве копий гена у разных особей		
	Большая структурная перестройка (SV)		
Полноэкзомное секвенирование	Гомозиготные SNV	От 3 до 10 мкг	От 60 до 200 нг/мкл
	Гетерозиготные SNV		
	Инделы		
Таргетное секвенирование	SNV/SV на таргетных участках		
Секвенирование РНК — секвенирование транскриптома	Количественный анализ дифференциальной экспрессии — количественное измерение экспрессии множества генов для изучения различных уровней экспрессии в образце	От 1 до 10 мкг	От 20 до 200 нг/мкл
	Альтернативный сплайсинг — идентификация различных вариаций сплайсинга по транскриптам мРНК		
	Аллель-специфическая экспрессия — экспрессия транскрипта определенного аллеля гена		
Секвенирование РНК — секвенирование малой РНК (микроРНК)	Дифференциальная экспрессия — количественное измерение экспрессии микроРНК для изучения различных уровней экспрессии в образце	От 3 до 10 мкг	От 500 до 1000 нг/мкл
	Открытие новых микроРНК		
Секвенирование метилирования	Метилирование	От 5 до 20 мкг	От 1 до 5 нг/мкл
Секвенирование микробиома или метагенома	Анализ микробиома или метагенома в образцах	От 1 до 10 мкг	От 20 до 200 нг/мкл
Секвенирование одиночных клеток	Анализ одиночных клеток	От 3 до 10 мкг	
Секвенирование образца FFPE	Анализ образца FFPE	От 5 до 10 мкг	

[a] Объемы и концентрации образцов представлены несколькими международными лабораториями. Пользователь может обратиться в лаборатории или компании, занимающиеся секвенированием, чтобы получить актуальные значения.

[b] Для теста Q129/41 можно взять 250 нг. Однако потребуется больше времени для консервации, а качество секвенирования ухудшится.

Приложение С
(справочное)

Перечень стандартных образцов

Перечень стандартных образцов приведен в таблице С.1. Этот перечень не охватывает все стандартные образцы. Лаборатории/установки для секвенирования могут обладать собственными (внутренними) стандартными образцами для оценки рабочих характеристик.

Таблица С.1 — Стандартные образцы для оценки эффективности методов секвенирования

Назначение	Стандартный(е) образец(цы)
Стандартный образец (СО) ДНК человека, охарактеризованный в масштабе генома	- NIST[a] RM 8391 — ДНК человека для оценки вариаций всего генома (мужчина восточноевропейского еврейского ашкеназского происхождения) (HG-002) - NIST[a] RM 8392 — ДНК человека для оценки вариаций всего генома (семейство из трех человек восточноевропейских ашкеназских евреев по происхождению) (HG-002, HG-003, HG-004) - NIST[a] RM 8393 — ДНК человека для оценки вариаций всего генома (мужчина китайского происхождения) (HG-005) - NIST[a] RM 8398 — ДНК человека для оценки вариаций всего генома (женщина из Юты/Европейского происхождения) (HG-001) - NIFDC[b] YJ-360007[c]
Сертифицированный стандартный образец (ССО)/СО ДНК человека для конкретных вариаций числа копий генов	- NIST[a] SRM 2373 — Стандарты геномной ДНК для измерений HER2 - NIST[a] RM 8366 — EGFR и MET Стандарты числа копий генов для онкологических измерений
ДНК «spike-in» контроля для РНК	- NIST[a] SRM 2374 — Библиотека последовательностей ДНК для внешних контролей РНК
СО РНК для количественных определений	- NMIJ[d] CRM-6204 — Растворы рибонуклеиновой кислоты (РНК) для количественного анализа
Микробиологический СО ДНК, охарактеризованный в масштабе генома	- NIST[a] RM 8375 — Стандарты микробной геномной ДНК для оценки эффективности секвенирования (MG-001, MG-002, MG-003, MG-004) - NIST[a] RM 8376 — Стандарты ДНК микробных патогенов для обнаружения и идентификации
Неинвазивный пренатальный тест (NIPT), T21, T18 и T13[e]	- NIFDC[b] YJ-360008[c]
Предимплантационный генетический тест на анеуплоидию (PGT-A)	- NIFDC[b] YJ-360010[c]

[a] NIST: National Institute of Standards and Technology, USA (Национальный институт стандартов и технологий, США).
[b] NIFDC: National Institutes for Food and Drug Control, China (Национальные институты по контролю за пищевыми продуктами и лекарствами, Китай).
[c] Chinese national reference material (Национальный стандартный образец Китая).
[d] NMIJ: National Metrology Institute of Japan (Национальный институт метрологии, Япония).
[e] T21, T18 и T13: трисомия по хромосоме 21, трисомия по хромосоме 18 и трисомия по хромосоме 13.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочного международного стандарта национальному стандарту

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ISO 20395:2019	IDT	ГОСТ Р ИСО 20395—2023 «Биотехнология. Требования к оценке эффективности методов количественного определения последовательностей нуклеиновых кислот-мишеней. Количественная ПЦР и цифровая ПЦР»

Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандарта:

- IDT — идентичный стандарт.

Библиография

[1] ISO 20397-2:2021, Biotechnology — Massively parallel sequencing — Part 2: Quality evaluation of sequencing data (Биотехнология. Массовое параллельное секвенирование. Часть 2. Оценка качества данных секвенирования)

[2] ISO 21474-1:2020, In vitro diagnostic medical devices — Multiplex molecular testing for nucleic acids — Part 1: Terminology and general requirements for nucleic acid quality evaluation (Медицинские изделия для диагностики in vitro. Мультиплексные молекулярные методы для определения содержания нуклеиновых кислот. Часть 1. Терминология и общие требования к оценке качества нуклеиновых кислот)

[3] ISO 20166 (all parts), Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue [Молекулярные диагностические исследования in vitro. Требования к процессам преданалитического этапа исследования зафиксированных формалином тканей в парафиновых блоках (FFPE)]

УДК 615.07:006.354 ОКС 07.080

Ключевые слова: биотехнология, массовое параллельное секвенирование, подготовка, нуклеиновая кислота, библиотека, ДНК, РНК

Редактор *М.В. Митрофанова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Р.А. Ментова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 20.10.2025. Подписано в печать 28.10.2025. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 2,12.

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