
ОПИСАНИЕ ТИПА СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА

УТВЕРЖДЕННОГО ТИПА СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ ФРАГМЕНТА ПЛАЗМИДЫ pUC18 ДЛИНОЙ 271 НУКЛЕОТИД

ГСО 9931-2011

ДОКУМЕНТЫ, устанавливающие требования к метрологическим и техническим характеристикам и выпуску из производства: техническое задание на разработку стандартного образца фрагмента плазмиды pUC18 длиной 271 нуклеотид; программа испытаний стандартного образца фрагмента плазмиды pUC18 длиной 271 нуклеотид в целях утверждения типа.

Периодичность актуализации технической документации на тип стандартного образца – один раз в пять лет.

ФОРМА ВЫПУСКА: единичное производство.

НОМЕР ЭКЗЕМПЛЯРА (ПАРТИИ), ДАТА ВЫПУСКА: №001, дата выпуска 30 июня 2011 г.

НАЗНАЧЕНИЕ: поверка и калибровка автоматических секвенаторов, а также контроль метрологических характеристик при проведении их испытаний, в том числе с целью утверждения типа.

СФЕРА ПРИМЕНЕНИЯ:

– **сфера государственного регулирования:** осуществление деятельности в области здравоохранения, осуществление ветеринарной деятельности, осуществление деятельности в области охраны окружающей среды, выполнение работ по оценке соответствия промышленной продукции и продукции других видов, а также иных объектов установленным законодательством Российской Федерации обязательным требованиям, осуществлении мероприятий государственного контроля (надзора);

– **область применения:** здравоохранение, ветеринария, охрана окружающей среды, сельскохозяйственная и промышленная биотехнология, научно-исследовательская деятельность.

ДОКУМЕНТЫ, определяющие применение:

ОПИСАНИЕ: Стандартный образец представляет собой известную четко определенную последовательность ДНК. С химической точки зрения ДНК — это длинная полимерная молекула, состоящая из повторяющихся блоков — нуклеотидов («букв» генетического кода). Химически возможно четыре различных нуклеотида (аденин, тимин, гуанин и цитозин), обозначаемые соответственно буквами: А, Т, G и С. Получение стандартного образца основано на последовательности ферментативных химических реакций, модифицирующих («вырезающих» необходимый фрагмент) известную последовательность ДНК плазмиды pUC18. Основными метрологическими характеристиками стандартного образца являются:

- последовательность нуклеотидов (А, Т, G и С)

- количество нуклеотидов (длина последовательности стандартного образца).

Последовательность ДНК состоит из двух комплементарных цепочек. Комплементарность – одно из основных свойств цепочек ДНК (последовательности «букв»). Оно проявляется в том, что к каждому нуклеотиду прямой последовательности (А, Т, Г или С) присоединяется комплементарный нуклеотид обратной последовательности по закону (А↔Т, Г↔С). Данная комплементарная последовательность образует вторую (обратную) цепочку. При этом комплементарная цепочка записывается с противоположного конца из-за химического строения молекулы ДНК (например, к цепочке ААСТГТ комплементарная будет записана в виде АСАГТТ).

Стандартный образец представляет собой фрагмент плазмиды pUC18 (Yanisch-Perron, C., et al., Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors, Gene, 33, 103-119, 1985.), длина которой составляет 2686 нуклеотидов (как в прямой так и в комплементарной цепочках). Нуклеотидная последовательность (прямая и комплементарная) плазмиды pUC18 имеет следующий вид (Последовательность стандартного образца выделена серым цветом):

1	STATGCGGCA	TCAGAGCAGA	TTGTACTGAG	AGTGCACCAT	ATGCGGTGTG	AAATACCGCA
	GATACGCCGT	AGTCTCGTCT	AACATGACTC	TCACGTGGTA	TACGCCACAC	TTTATGGCGT
61	CAGATGCGTA	AGGAGAAAAT	ACCGCATCAG	GCGCCATTCT	CCATTCAGGC	TGCGCAACTG
	GTCTACGCAT	TCCTCTTTTA	TGGCGTAGTC	CGCGGTAAGC	GGTAAGTCCG	ACGCGTTGAC
121	TTGGGAAGGG	CGATCGGTGC	GGGCCTCTTC	GCTATTACGC	CAGCTGGCGA	AAGGGGGATG
	AACCCTTCCC	GCTAGCCACG	CCCGGAGAAG	CGATAATGCG	GTCGACCGCT	TTCCCCCTAC
181	TGCTGCAAGG	CGATTAAGTT	GGGTAACGCC	AGGGTTTTCC	CAGTCACGAC	GTTGTAAAC
	ACGACGTTCC	GCTAATTCAC	CCCATTGCGG	TCCCAAAAGG	GTCAGTGCTG	CAACATTTTG
241	GACGGCCAGT	GCCAAGCTTG	CATGCCCTGA	GGTCGACTCT	AGAGGATCCC	CGGGTACCGA
	CTGCCGGTCA	CGGTTCGAAC	GTACGGACGT	CCAGCTGAGA	TCTCCTAGGG	GCCCATGGCT
301	GCTCGAATTC	GTAATCATGG	TCATAGCTGT	TTCCTGTGTG	AAATTGTTAT	CCGCTCACAA
	CGAGCTTAAG	CATTAGTACC	AGTATCGACA	AAGGACACAC	TTTAACAATA	GGCGAGTGTT
361	TTCCACACAA	CATACGAGCC	GGAAGCATAA	AGTGTAAGC	CTGGGGTGCC	TAATGAGTGA
	AAGGTGTGTT	GTATGCTCGG	CCTTCGTATT	TCACATTTTC	GACCCACCG	ATTACTCACT
421	GCTAACTCAC	ATTAATTGCG	TTGCGCTCAC	TGCCCCGCTT	CCAGTCGGGA	AACCTGTCGT
	CGATTGAGTG	TAATTAACGC	AACGCGAGTG	ACGGGCGAAA	GGTCAGCCCT	TTGGACAGCA
481	GCCAGCTGCA	TTAATGAATC	GGCCAACGCG	CGGGGAGAGG	CGGTTTGCGT	ATTGGGCGCT
	CGGTGACAGT	AATTACTTAG	CCGGTTGCGC	GCCCCCTCTC	GCCAAACGCA	TAACCCGCGA
541	CTTCCGCTTC	CTCGCTCACT	GAATCGCTGC	GCTCGGTCGT	TCGGCTGCGG	CGAGCGGTAT
	GAAGGCGAAG	GAGCGAGTGA	CTGAGCGACG	CGAGCCAGCA	AGCCGACGCC	GCTCGCCATA
601	CAGCTCACTC	AAAGGCGGTA	ATACGGTTAT	CCACAGAATC	AGGGGATAAC	GCAGGAAAGA
	GTGAGGTGAG	TTTCCGCCAT	TATGCCAATA	GGTGTCTTAG	TCCCCTATTG	CGTCCTTTCT
661	ACATGTGAGC	AAAAGGCCAG	CAAAAGGCCA	GGAACCGTAA	AAAGGCCGCG	TTGCTGGCGT
	TGTACACTCG	TTTTCCGGTC	GTTTTCCGGT	CCTTGGCATT	TTTCCGGCGC	AACGACCGCA
721	TTTTCCATAG	GCTCCGCCCC	CCTGACGAGC	ATCACAAAAA	TCGACGCTCA	AGTCAGAGGT
	AAAAGGTATC	CGAGGCGGGG	GGACTGCTCG	TAGTGTTTTT	AGCTGCGAGT	TCAGTCTCCA
781	GGCGAAACCC	GACAGGACTA	TAAAGATACC	AGGCGTTTTCC	CCCTGGAAGC	TCCCTCGTGC
	CCGCTTTGGG	CTGTCTTGAT	ATTTCTATGG	TCCGCAAAGG	GGGACCTTCG	AGGGAGCACG
841	GCTCTCTGTG	TCCGACCCCT	CCGCTTACCG	GATACCTGTC	CGCCTTTCTC	CCTTCGGGAA
	CGAGAGGACA	AGGCTGGGAC	GGCGAATGGC	CTATGGACAG	GCGGAAAGAG	GGAAGCCCTT
901	GCGTGGCGCT	TTCTCATAGC	TCACGCTGTA	GGTATCTCAG	TTGCGGTGTG	GTCGTTTCGT
	CGCACCAGCG	AAGAGTATCG	AGTGCACAT	CCATAGAGTC	AAGCCACATC	CAGCAAGCGA
961	CCAAGCTGGG	CTGTGTGCAC	GAACCCCCCG	TTCAGCCCGA	CCGCTGCGCC	TTATCCGGTA

Приложение к свидетельству № 2219
об утверждении типа стандартного образца
(обязательное)

лист № 3
всего листов 5

	GGTTCGACCC	GACACACGTG	CTTGGGGGGC	AAGTCGGGCT	GGCGACGCGG	AATAGGCCAT
1021	АСТАТСТСТ	ТГАТСТТАС	СТСТТААСТ	АСТТТТТТ	СТСТТТТТ	СТСТТТТТ
1081	ГТААСТТТ	ТАСТТТТТ	АСТТТТТТ	СТТТТТТТ	АСТТТТТТ	АСТТТТТТ
1141	СТТААСТТ	СТТААСТТ	АСТТТТТТ	ТТТТТТТТ	СТТТТТТТ	АСТТТТТТ
1201	СТТТТТТТ	АСТТТТТТ	АСТТТТТТ	СТТТТТТТ	АСТТТТТТ	АСТТТТТТ
1261	ГТТТТТТТ	ТТТТТТТТ	СТТТТТТТ	СТТТТТТТ	АСТТТТТТ	АСТТТТТТ
1321	ТГАТТТТТ	ТАСТТТТТ	АСТТТТТТ	СТТТТТТТ	АСТТТТТТ	АСТТТТТТ
1381	ТАТГАТТТ	ТАТГАТТТ	ТАТГАТТТ	ТАТГАТТТ	ТАТГАТТТ	ТАТГАТТТ
1441	АТТААТТТ	АТТААТТТ	АТТААТТТ	АТТААТТТ	АТТААТТТ	АТТААТТТ
1501	АСТТТТТТ	АСТТТТТТ	АСТТТТТТ	АСТТТТТТ	АСТТТТТТ	АСТТТТТТ
1561	ТГАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ
1621	ГАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ
1681	АСТТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ
1741	АСТТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ
1801	ГАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ
1861	АСТТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ
1921	ГАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ
1981	АТААТТТТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ
2041	СТТААТТТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ
2101	СТТААТТТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ
2161	СТТААТТТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ
2221	СТТААТТТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ
2281	СТТААТТТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ	ТАТТААТ

```
2341  TACTCTTCCT TTTTCAATAT TATTGAAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC ATGAGCGGAT
      ATGAGAAGGA AAAAGTTATA ATAACCTTCGT AAATAGTCCC AATAACAGAG TACTCGCCTA

2401  ACATATTTGA ATGTATTTAG AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA TTTCCCCGAA
      TGTATAAACT TACATAAATC TTTTATTATTG TTTATCCCCA AGGCGCGTGT AAAGGGGCTT

2461  AAGTGCCACC TGACGTCTAA GAAACCATTA TTATCATGAC ATTAACCTAT AAAAATAGGC
      TTCACGGTGG ACTGCAGATT CTTTGGTAAT AATAGTACTG TAATTGGATA TTTTATCCG

2521  GTATCACGAG GCCCTTTCGT CTCGCGCGTT TCGGTGATGA CGGTGAAAAC CTCTGACACA
      CATAGTGCTC CGGGAAAGCA GAGCGCGCAA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT

2581  TGCAGCTCCC GGAGACGGTC ACAGCTTGTC TGTAAGCGGA TGCCGGGAGC AGACAAGCCC
      ACGTCGAGGG CCTCTGCCAG TGTCGAACAG ACATTCGCCT ACGGCCCTCG TCTGTTCCGG

2641  GTCAGGGCGC GTCAGCGGGT GTTGGCGGGT GTCGGGGCTG GCTTAA
      CAGTCCC GCGC CAGTCGCCCCA CAACCGCCCCA CAGCCCCGAC CGAATT
```

В качестве стандартного образца используется фрагмент длиной 271 нуклеотид, полученный в результате обработки плазмиды pUC18 ферментом рестрикции RsaI. Рестриктаза - бактериальный фермент, распознающий специфическую последовательность в двухцепочечной ДНК длиной 4 - 6 нуклеотидов и расщепляющий непрерывную двухцепочечную ДНК именно в этом участке. Карта, показывающая, где кольцевая цепочка ДНК расщепляется ферментом Rsa I, представлена на рис. 1. Стандартный образец представляет собой фрагмент, отмеченный на рис. 1 сплошным синим цветом. Его длина составляет 271 нуклеотид в каждой из двух комплементарных цепочек. Объем водного раствора стандартного образца составляет 200 мкл.

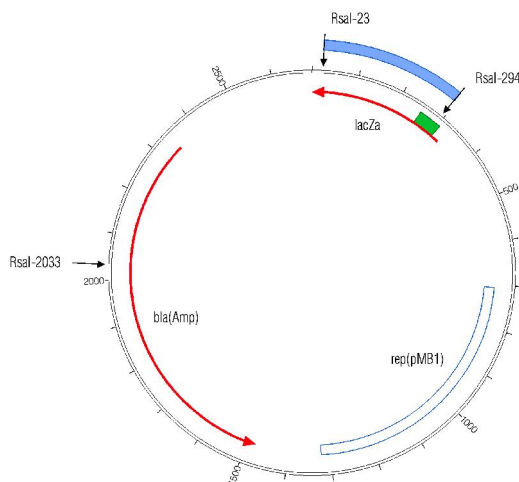


Рисунок 1. Рестрикционная карта фермента RsaI плазмиды pUC18.

НОРМИРОВАННЫЕ МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ:

Аттестуемые характеристики:

1. Концентрация ДНК в водном растворе
2. Последовательность нуклеотидов стандартного образца (прямая и комплементарная);
3. Количество нуклеотидов в последовательности стандартного образца

Нормированные метрологические характеристики:

1. Концентрация ДНК в водном растворе (Таблица 1)

Т а б л и ц а 1 – Нормированные метрологические характеристики

Индекс СО	Наименование аттестуемой характеристики	Аттестованное значение, нг/мкл	Границы относительной погрешности при $P=0,95$, %*
	Концентрация ДНК в водном растворе	49,1	10,7

2. Последовательность нуклеотидов стандартного образца (прямая последовательность выделена серым цветом, обратная последовательность – без выделений):

1 АСТGAGAGTG CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA TCGGTAAGGA GAAAATACCG
TGACTCTCAC GTGGTATACG CCACACTTTA TGGCGTGTCT ACGCATTCCT CTTTATGGC

61 CATCAGGCGC CATTCGCCAT TCAGGCTGCG CAACTGTTGG GAAGGGCGAT CGGTGCGGGC
GTAGTCCGCG GTAAGCGGTA AGTCCGACGC GTTGACAACC CTTCCCGCTA GCCACGCCCG

121 CTCTTCGCTA TTACGCCAGC TGGCGAAAGG GGGATGTGCT GCAAGGCGAT TAAGTTGGGT
GAGAAGCGAT AATGCGGTCTG ACCGCTTTCC CCCTACACGA CGTTCCGCTA ATTCAACCCA

181 AACGCCAGGG TTTTCCAGT CACGACGTTG TAAAACGACG GCCAGTGCCA AGCTTGCATG
TTGCGGTCCC AAAAGGGTCA GTGCTGCAAC ATTTTGCTGC CGGTCACGGT TCGAACGTAC

241 CCTGCAGGTC GACTCTAGAG GATCCCCGGG T
GGACGTCCAG CTGAGATCTC CTAGGGGCCC A

3. Последовательность пар нуклеотидов стандартного образца включает 271 единицу.

СРОК ГОДНОСТИ ЭКЗЕМПЛЯРА: 5 лет при -20°C

Место и способ нанесения знака утверждения типа на сопроводительные документы стандартного образца: печатным способом в правом верхнем углу первого листа паспорта и этикетки.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ:

РАЗРАБОТЧИК: - Учреждение Российской академии наук Центр «Биоинженерия» РАН
117312 Россия, Москва, пр-т 60-летия Октября д.7, корп.1.

ИЗГОТОВИТЕЛЬ: - Учреждение Российской академии наук Центр «Биоинженерия» РАН
117312 Россия, Москва, пр-т 60-летия Октября д.7, корп.1.

Заместитель

Руководителя Федерального агентства
по техническому регулированию
и метрологии

М.п. «__» _____ 2011 г.

Е.Р.Петросян

расшифровка подписи