

УТВЕРЖДЕНА
приказом Федерального агентства
по техническому регулированию
и метрологии
от «31» октября 2024 г. № 2614

**ГОСУДАРСТВЕННАЯ ПОВЕРОЧНАЯ СХЕМА
ДЛЯ СРЕДСТВ ИЗМЕРЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ
КОПИЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК**

1. Область применения

1.1. Настоящая государственная поверочная схема для средств измерений содержания копий последовательности ДНК (далее – ГПС) распространяется на средства измерений числа копий последовательности ДНК в диапазоне значений от 100 до 100000, концентрации копий последовательности ДНК¹ в диапазоне значений от 10 мм⁻³ до 10000 мм⁻³ и отношения числа копий последовательности ДНК² в диапазоне значений от 1:1000 до 1:1 (далее – содержания копий последовательности ДНК) и устанавливает порядок передачи³ единицы числа копий последовательности ДНК, единицы концентрации копий последовательности ДНК и единицы отношения числа копий последовательности ДНК от государственного первичного эталона этим средствам измерений при помощи вторичных эталонов и рабочих эталонов с указанием показателей точности и методов передачи единицы величины.

1.2. Графическая часть государственной поверочной схемы для средств измерений содержания копий последовательности ДНК представлена в приложении А к ГПС.

2. Сокращения

В ГПС применены следующие сокращения:

ВЭТ – вторичный эталон;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

НСП – неисключенная систематическая погрешность;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

СКО – среднеквадратичное отклонение;

Трис – трис(гидроксиметил)аминометан.

3. Государственный первичный эталон

3.1. Государственный первичный эталон единицы числа копий последовательности ДНК ГЭТ 220-2024 состоит из комплекса для воспроизведения и передачи единиц числа копий последовательности ДНК, концентрации копий последовательности ДНК, отношения числа копий последовательности ДНК, в состав которого входят:

установка на основе метода оптической (световой) микроскопии для измерений линейных размеров капель;

¹ Величина «концентрации копий последовательности ДНК» является связанной с величиной «число копий последовательности ДНК». Концентрацию копий последовательности ДНК T_{seq} рассчитывают как отношение числа копий последовательностей ДНК N_{seq} в образце к объему образца V_{DNA} : $T_{seq} = \frac{N_{seq}}{V_{DNA}}$.

² Величина «отношение числа копий последовательностей ДНК» является связанной с величиной «число копий последовательности ДНК». Отношение числа копий последовательностей ДНК $R_{seq1/seq2}$ представляет отношение числа копий одной последовательности ДНК N_{seq1} к числу копий другой последовательности ДНК N_{seq2} : $R_{seq1/seq2} = \frac{N_{seq1}}{N_{seq2}}$.

³ Воспроизведение и передачу единиц содержания копий последовательности ДНК выполняют с использованием ДНК в водных буферных растворах с низкой ионной силой (Буферы, используемые для хранения ДНК после выделения из матрицы биологического материала, такие как буферный раствор Трис/этилендиаминтетрауксусная кислота (буферный раствор ТЕ, 1× или 0,1×) с установленным значением pH 8,0 по ГОСТ ISO 21571-2018 или аналогичные).

установка на основе метода цифровой полимеразной цепной реакции (цифровой ПЦР) для измерений числа копий последовательности ДНК, концентрации копий последовательности ДНК и отношения числа копий последовательности ДНК;

установка на основе метода направленного секвенирования (по Сэнгеру) для определения последовательности нуклеотидов в составе ДНК с помощью капиллярного электрофореза в линейном полимере.

3.2. Диапазон значений, в котором воспроизводится единица величины, составляет:

для числа копий последовательности ДНК – от 100 до 100000;

для концентрации копий последовательности ДНК – от 10 мм^{-3} до 10000 мм^{-3} ;

для отношения числа копий последовательности ДНК – от 1:1000 до 1:1.

3.3. Государственный первичный эталон обеспечивает⁴:

3.3.1. Воспроизведение единицы величины числа копий последовательности ДНК с относительным средним квадратическим отклонением результата измерений, S_0 , при 5 (пяти) независимых измерениях:

от 13,0 % до 4,6 % в диапазоне от 100 до 1500;

от 4,6 % до 2,0 % в диапазоне свыше 1500 до 3000;

от 2,0 % до 1,8 % в диапазоне свыше 3000 до 100000.

Относительная неисключенная систематическая погрешность, θ_0 , не превышает:

2,1 % в диапазоне от 100 до 1500;

2,3 % в диапазоне свыше 1500 до 3000;

2,4 % в диапазоне свыше 3000 до 100000.

Относительная стандартная неопределенность, оцениваемая по типу A, u_{A0} , при 5 (пяти) независимых измерениях:

от 13,0 % до 4,6 % в диапазоне от 100 до 1500;

от 4,6 % до 2,0 % в диапазоне свыше 1500 до 3000;

от 2,0 % до 1,8 % в диапазоне свыше 3000 до 100000.

Относительная стандартная неопределенность, оцениваемая по типу B, u_{B0} , не превышает:

1,2 % в диапазоне от 100 до 1500;

1,3 % в диапазоне свыше 1500 до 3000;

1,4 % в диапазоне свыше 3000 до 100000.

3.3.2. Воспроизведение единицы величины концентрации копий последовательности ДНК с относительным средним квадратическим отклонением результата измерений, S_0 , при 5 (пяти) независимых измерениях:

от 13,0 % до 4,6 % в диапазоне от 10 до 150 мм^{-3} ;

от 4,6 % до 2,0 % в диапазоне свыше 150 до 300 мм^{-3} ;

⁴Воспроизведение единиц числа копий последовательности ДНК, концентрации копий последовательности ДНК и отношения числа копий последовательности ДНК с использованием государственного первичного эталона базируется на применении метода цифровой ПЦР; для обеспечения функционирования государственного первичного эталона используют единицы величин длины [метр (м)] и массы [килограмм (кг)], заимствованные у эталонов из других поверочных схем и получаемые в процессе поверки (калибровки) соответствующих средств измерений, входящих в состав эталона.

от 2,0 % до 1,8 % в диапазоне свыше 300 до 10000 мм⁻³.

Относительная неисключенная систематическая погрешность θ_0 не превышает:

2,7 % в диапазоне от 10 до 150 мм⁻³;

2,8 % в диапазоне свыше 150 до 300 мм⁻³;

3,0 % в диапазоне свыше 300 до 10000 мм⁻³.

Относительная стандартная неопределенность, оцениваемая по типу A, u_{A0} , при 5 (пяти) независимых измерениях:

от 13,0 % до 4,6 % в диапазоне от 10 до 150 мм⁻³;

от 4,6 % до 2,0 % в диапазоне свыше 150 до 300 мм⁻³;

от 2,0 % до 1,8 % в диапазоне свыше 300 до 10000 мм⁻³.

Относительная стандартная неопределенность, оцениваемая по типу B, u_{B0} , не превышает:

1,6 % в диапазоне от 10 до 150 мм⁻³;

1,6 % в диапазоне свыше 150 до 300 мм⁻³;

1,7 % в диапазоне свыше 300 до 10000 мм⁻³.

3.3.3. Воспроизведение единицы величины отношения числа копий последовательности ДНК с относительным средним квадратическим отклонением результата измерений, S_0 , при 5 (пяти) независимых измерениях:

от 13,1 % до 5,0 % в диапазоне от 1:1000 до 1:67 (от 0,001 до 0,015);

от 5,0 % до 2,8 % в диапазоне свыше 1:67 до 1:33 (свыше 0,015 до 0,030);

от 2,7 % до 2,5 % в диапазоне свыше 1:33 до 1:1 (свыше 0,030 до 1,000).

Относительная неисключенная систематическая погрешность θ_0 не превышает:

2,4 % в диапазоне от 1:1000 до 1:67 (от 0,001 до 0,015);

2,4 % в диапазоне свыше 1:67 до 1:33 (свыше 0,015 до 0,030);

2,1 % в диапазоне свыше 1:33 до 1:1 (свыше 0,030 до 1,000).

Относительная стандартная неопределенность, оцениваемая по типу A, u_{A0} , при 5 (пяти) независимых измерениях:

от 13,1 % до 5,0 % в диапазоне от 1:1000 до 1:67 (от 0,001 до 0,015);

от 5,0 % до 2,8 % в диапазоне свыше 1:67 до 1:33 (свыше 0,015 до 0,030);

от 2,7 % до 2,5 % в диапазоне свыше 1:33 до 1:1 (свыше 0,030 до 1,000).

Относительная стандартная неопределенность, оцениваемая по типу B, u_{B0} , не превышает:

1,4 % в диапазоне от 1:1000 до 1:67 (от 0,001 до 0,015);

1,4 % в диапазоне свыше 1:67 до 1:33 (свыше 0,015 до 0,030);

1,2 % в диапазоне свыше 1:33 до 1:1 (свыше 0,030 до 1,000).

3.4. Государственный первичный эталон применяют для передачи единиц величин вторичным и рабочим эталонам числа копий последовательности ДНК, концентрации копий последовательности ДНК и отношения числа копий последовательности ДНК⁵:

⁵ Государственный первичный эталон подлежит сличению с международными эталонами единиц величин Международного бюро мер и весов и национальными эталонами других государств – участников

3.4.1 методом сличений при помощи эталонов сравнения, изготовленных на комплексе установок государственного первичного эталона с метрологическими характеристиками, приведенными в таблице 1;

Таблица 1 – Требования к метрологическим характеристикам эталонов сравнения

Величина	Диапазон значений	Относительное СКО результата измерений, S_0 при $n=5$ независимых измерениях, %	Относительная НСП, θ , %, не более	Относительная стандартная неопределенность, оцениваемая по типу А, u_{A0} , при $n=5$ независимых измерениях, %	Относительная стандартная неопределенность, оцениваемая по типу В, u_{B0} , %, не более
Число копий последовательности ДНК	от 100 до 1500	от 13,0 до 4,6	2,1	от 13,0 до 4,6	1,2
	свыше 1500 до 3000	от 4,6 до 2,0	2,3	от 4,6 до 2,0	1,3
	свыше 3000 до 100000	от 2,0 до 1,8	2,4	от 2,0 до 1,8	1,4
Концентрация копий последовательности ДНК	от 10 до 150 мм ⁻³	от 13,0 до 4,6	2,7	от 13,0 до 4,6	1,6
	свыше 150 до 300 мм ⁻³	от 4,6 до 2,0	2,8	от 4,6 до 2,0	1,6
	свыше 300 до 10000 мм ⁻³	от 2,0 до 1,8	3,0	от 2,0 до 1,8	1,7
Отношение числа копий последовательностей ДНК	от 1:1000 до 1:67	от 13,1 до 5,0	2,4	от 13,1 до 5,0	1,4
	свыше 1:67 до 1:33	от 5,0 до 2,8	2,4	от 5,0 до 2,8	1,4
	свыше 1:33 до 1:1	от 2,7 до 2,5	2,1	от 2,7 до 2,5	1,2

3.4.2 методом прямых измерений с помощью комплекса установок государственного первичного эталона.

3.5. При передаче единиц содержания копий последовательности ДНК должно быть обеспечено соотношение показателей точности между государственным первичным эталоном, вторичными эталонами, рабочими эталонами и средствами измерений не более $\frac{1}{2}$.

4. Вторичные эталоны

4.1. В качестве вторичных эталонов применяют высокоточные измерительные установки и стандартные образцы концентрации копий последовательности ДНК и отношения числа копий последовательности ДНК.

4.2. Высокоточные измерительные установки, выполняющие функцию вторичных эталонов, предназначены для передачи единиц содержания копий последовательности ДНК рабочим эталонам методом прямых измерений в диапазонах измерений:

числа копий последовательности ДНК – от 100 до 100000;

концентрации копий последовательности ДНК – от 10 мм⁻³ до 10000 мм⁻³;

отношения числа копий последовательностей ДНК – от 1:1000 до 1:1.

Вторичные эталоны не предназначены для решения задачи идентификации неизвестных последовательностей ДНК и воспроизведения числа копий таких последовательностей.

4.3. Относительные средние квадратические отклонения суммарной погрешности $S_{\Sigma 0}$ (относительная суммарная стандартная неопределенность $u_{\Sigma 0}$) для ВЭТ – высокоточных измерительных установок при 5 (пяти) независимых измерениях, не должны превышать значения, указанные в таблице 2.

Таблица 2 – Требования к метрологическим характеристикам вторичных эталонов – высокоточных измерительных установок

Величина	Диапазон измерений	Относительное среднее квадратическое отклонение суммарной погрешности $S_{\Sigma 0}$ при $n=5$ независимых измерениях, %
Число копий последовательности ДНК	от 100 до 1500	26 – 9,5
	свыше 1500 до 3000	9,6 – 4,8
	свыше 3000 до 100000	4,9 – 4,6
Концентрация копий последовательности ДНК	от 10 до 150 мм ⁻³	26 – 9,7
	свыше 150 до 300 мм ⁻³	9,8 – 5,2
	свыше 300 до 10000 мм ⁻³	5,3 – 5,0
Отношение числа копий последовательностей ДНК	от 1:1000 до 1:67	26 – 10
	свыше 1:67 до 1:33	10 – 6,0
	свыше 1:33 до 1:1	5,9 – 5,6
Примечание: Корреляция между граничными значениями диапазонов измерений и диапазонов $S_{\Sigma 0}$ отсутствует.		

4.4. Высокоточные измерительные установки, выполняющие функцию вторичных эталонов, воспроизводят и передают единицы величин стандартным образцам, выполняющим функцию рабочих эталонов, методом прямых измерений.

4.5. Требования к метрологическим характеристикам стандартных образцов, выполняющим функцию вторичных эталонов, приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Требования к метрологическим характеристикам стандартных образцов, выполняющим функцию вторичных эталонов

Величина	Интервал аттестованных значений	Доверительные границы относительной погрешности при $P = 0,95$, δ_0 , %
Концентрация копий последовательности ДНК	от 10 до 150 мм ⁻³	52,4 – 19,4
	свыше 150 до 300 мм ⁻³	19,5 – 10,1
	свыше 300 до 10000 мм ⁻³	10,5 – 9,9
Отношение числа копий последовательностей ДНК	от 1:1000 до 1:67	52,8 – 20,8
	свыше 1:67 до 1:33	20,8 – 12,6
	свыше 1:33 до 1:1	11,8 – 11,3

4.6. Стандартные образцы, выполняющие функцию вторичных эталонов, применяют для передачи единиц величин концентрации копий последовательности ДНК и отношения числа копий последовательностей ДНК

средствам измерений методом прямых измерений и методом косвенных измерений⁶ с учетом требований пункта 3.6 ГПС.

5. Рабочие эталоны

5.1. В качестве рабочих эталонов применяют стандартные образцы состава ДНК, аттестованные по содержанию копий последовательности ДНК в диапазонах значений:

концентрации копий последовательности ДНК – от 150 мм⁻³ до 10000 мм⁻³;
отношения числа копий последовательностей ДНК – от 1:111 до 1:1.

5.2. Доверительные границы относительных погрешностей δ_0 , при доверительной вероятности 95 %, должны находиться в диапазонах значений, указанных в таблице 4.

Таблица 4 – Требования к метрологическим характеристикам стандартных образцов, выполняющим функцию рабочих эталонов

Величина	Интервал аттестованных значений	Доверительные границы относительной погрешности при $P = 0,95$, δ_0 , %
Концентрация копий последовательности ДНК	от 150 до 300 мм ⁻³	38 – 20
	свыше 300 до 10000 мм ⁻³	22 – 20
Отношение числа копий последовательностей ДНК	от 1:111 до 1:67	66 – 42
	свыше 1:67 до 1:33	42 – 26
	свыше 1:33 до 1:1	24 – 22

5.3. Стандартные образцы, выполняющие функцию рабочих эталонов, применяют для передачи единиц величин концентрации копий последовательности ДНК и отношения числа копий последовательностей ДНК средствам измерений методом прямых измерений и методом косвенных измерений с учетом требований пункта 3.6 ГПС.

5.4. Стандартные образцы, выполняющие функцию рабочих эталонов, применяют для поверки средств измерений содержания копий последовательности ДНК методом прямых измерений и методом косвенных измерений.

6. Средства измерений

6.1. В качестве средств измерений содержания копий последовательности ДНК⁷ применяют, в том числе, установки для цифровой ПЦР и установки для ПЦР в реальном времени.

⁶ Здесь и далее по тексту настоящей поверочной схемы методы прямых и косвенных измерений используются для передачи единиц величин от стандартных образцов измерительным установкам или от измерительных установок стандартным образцам, при этом метод прямых измерений подразумевает использование стандартных образцов и его аттестованного значения из паспорта как есть, без дополнительных процедур приготовления; метод косвенных измерений предполагает применение процедур разбавления стандартного образца и расчета аттестованного значения приготовленного раствора.

⁷ Средства измерений содержания копий последовательности ДНК применяют в клинической лабораторной диагностике, медико-генетических исследованиях, при установлении соответствия продукции санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям, фитосанитарном контроле, контроле безопасности пищевой продукции, кормов, агропромышленного сырья, ветеринарном контроле, контроле технологических процессов в биотехнологических производствах и т.д.

6.2. Средства измерений получают единицы величин от стандартных образцов, выполняющих функцию вторичных эталонов методом прямых измерений и методом косвенных измерений или от стандартных образцов, выполняющих функцию рабочих эталонов методом прямых измерений и методом косвенных измерений.

6.3. Доверительные границы относительных погрешностей δ_0 , при доверительной вероятности 95 % должны не превышать значений, указанных в таблице 5.

Таблица 5 – Метрологические характеристики средств измерений

Средства измерений		Диапазон измерений	Пределы допускаемой относительной погрешности (при $P = 0,95$), δ_0 , %
Средства измерений концентрации копий последовательности ДНК	Высокой точности	от 10 до 150 мм ⁻³	105 – 39
		свыше 150 до 300 мм ⁻³	39 – 21
		свыше 300 до 10000 мм ⁻³	22 – 20
	Низкой точности	от 150 до 300 мм ⁻³	78 – 42
		свыше 300 до 10000 мм ⁻³	44 – 40
Средства измерений отношения числа копий последовательностей ДНК	Высокой точности	1:1000 до 1:67	104 – 42
		свыше 1:67 до 1:33	42 – 26
		свыше 1:33 до 1:1	24 – 22
	Низкой точности	от 1:111 до 1:67	132 – 84
		свыше 1:67 до 1:33	84 – 52
		свыше 1:33 до 1:1	48 – 44