



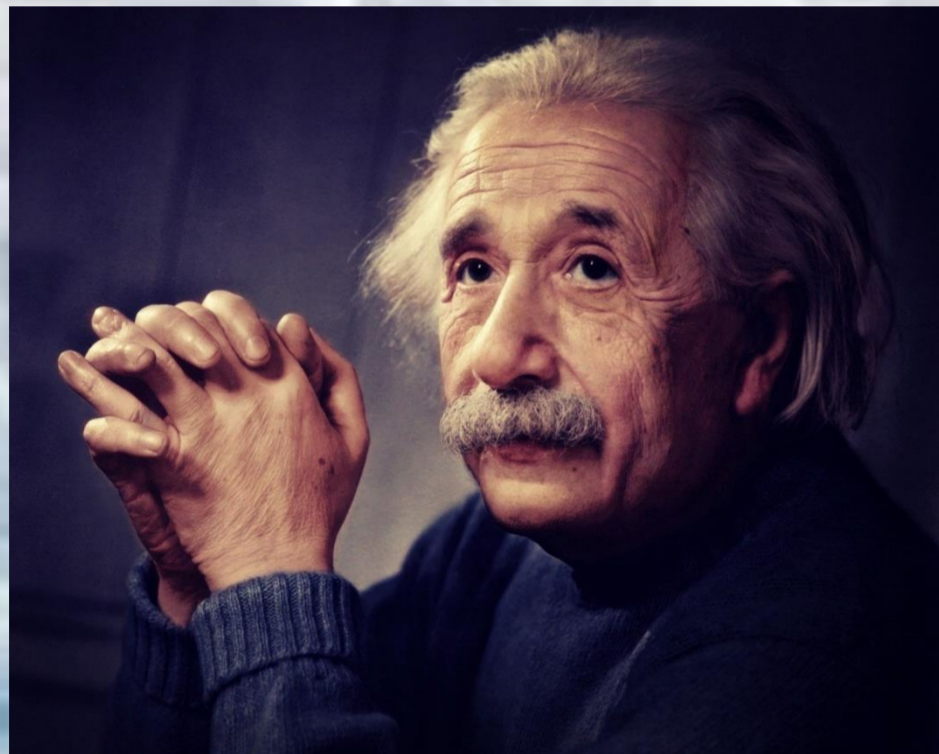
Подготовка к разработке ГСО характеристик высокомолекулярных веществ в сложных матрицах, применяемых для идентификации и количественного определения

II Всероссийская конференция участников ГССО
Москва, 14 апреля 2022 г.

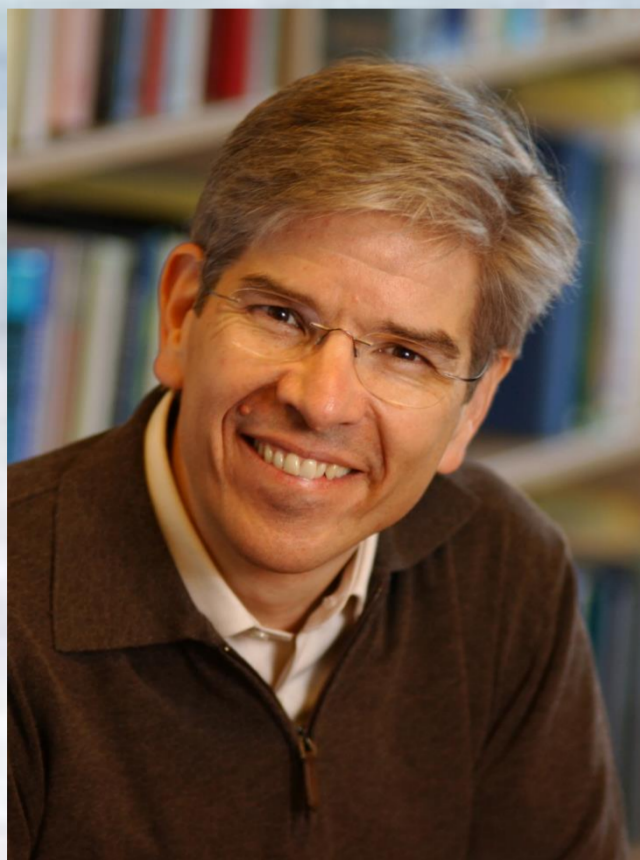
Е.В. Кулябина, Т.В. Кулябина, О.Н. Мелкова,
В.В. Морозова
ФГБУ «ВНИИМС»
kuliabina@vniims.ru
+7 (495) 781 44 13
+7 (916) 543 60 42



“Невозможное требует чуть больше времени” -
Дадли Хершбах, нобелевский лауреат по химии
1986 года [13 октября 2019 года, Москва, МГУ]



“Вы никогда не сумеете решить возникшую проблему,
если сохраните то же мышление и тот же подход, который
привел вас к этой проблеме” - Альберт Эйнштейн –
лауреат Нобелевской премии 1921 г. по физике



“Основной фактор экономического роста – рост
капиталовложений в исследования и разработки (НИОКР) и
инвестиции в человеческий капитал, и шансы обеспечить
быстрые темпы роста выше у экономики с развитой наукой и
человеческим капиталом” - Пол Ромер – лауреат
Нобелевской премии 2018 г. в области экономики



Содержание

1. ГСО ДНК, РНК, белков, пептидов, психоактивных, сильнодействующих веществ в сложных матрицах
2. Выбор востребованного объекта, ГСО которого актуально создавать
3. Классификация плазмид
4. Выбор подходящей плазмиды, выбор матрицы
5. Исследование возможности получения вещества для выделения ДНК
6. Определение характерного участка ДНК. Клонирование фрагментов ДНК в плазмидный вектор
7. Основные этапы создания таких ГСО
8. Дорожная карта метрологического сообщества по реагированию на пандемию инфекционных заболеваний
9. 10. 11. Номинальные свойства

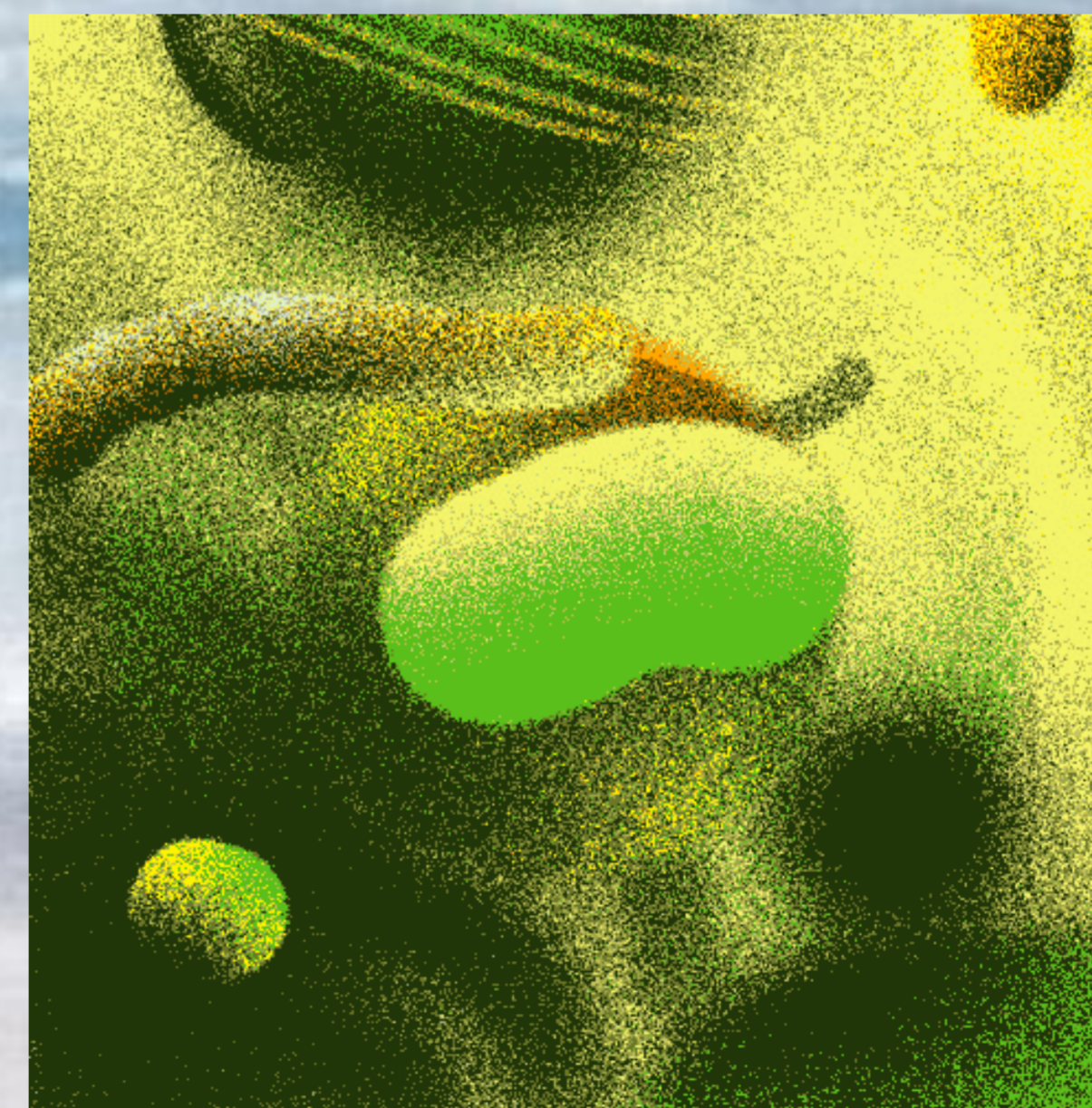
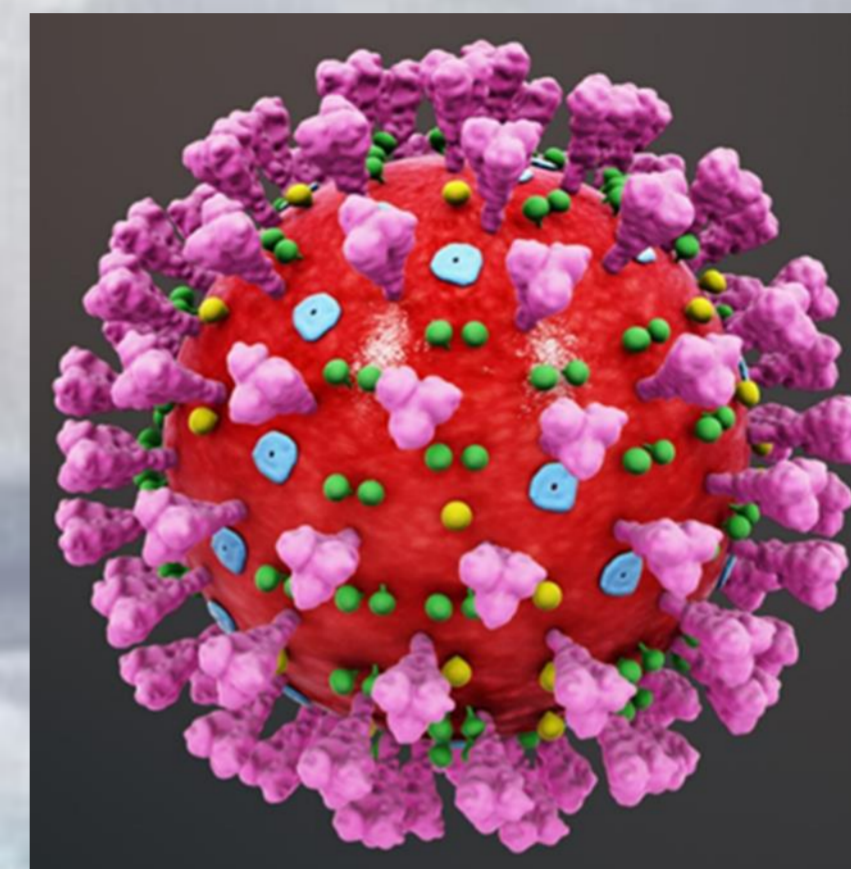
1. ГСО ДНК, РНК, белков, пептидов, психоактивных, сильнодействующих веществ в сложных матрицах

● ДНК — это своеобразный чертеж жизни, сложный код, в котором заключены данные о наследственной информации. Эта сложная макромолекула способна хранить и передавать наследственную генетическую информацию из поколения в поколение. ДНК определяет такие свойства любого живого организма как наследственность и изменчивость. ДНК содержит информацию о структуре различных видов РНК и белков в виде генетического кода, состоящего из последовательности нуклеотидов.

● Плазмида — это довольно короткая и обычно кольцевая молекула ДНК, которая плавает в цитоплазме бактериальной клетки. Плазмиды не связаны с бактериальной хромосомой, они могут реплицироваться независимо от нее.



2. Выбор востребованного объекта



3. Классификация плазмид

Плазмиды

Эписомы – могут встраиваться в бактериальные хромосомы или существовать в виде отдельных плазмид

По устойчивости к антибиотикам – R-плазмиды (resistance устойчивость) – определяют устойчивость к лекарственным препаратам

По продукции токсических соединений (антибиотики, колицины) – ColE1-плазмида (колицин)

По взаимодействию с эукариотами – Ti-плазмиды (tumor inducing)

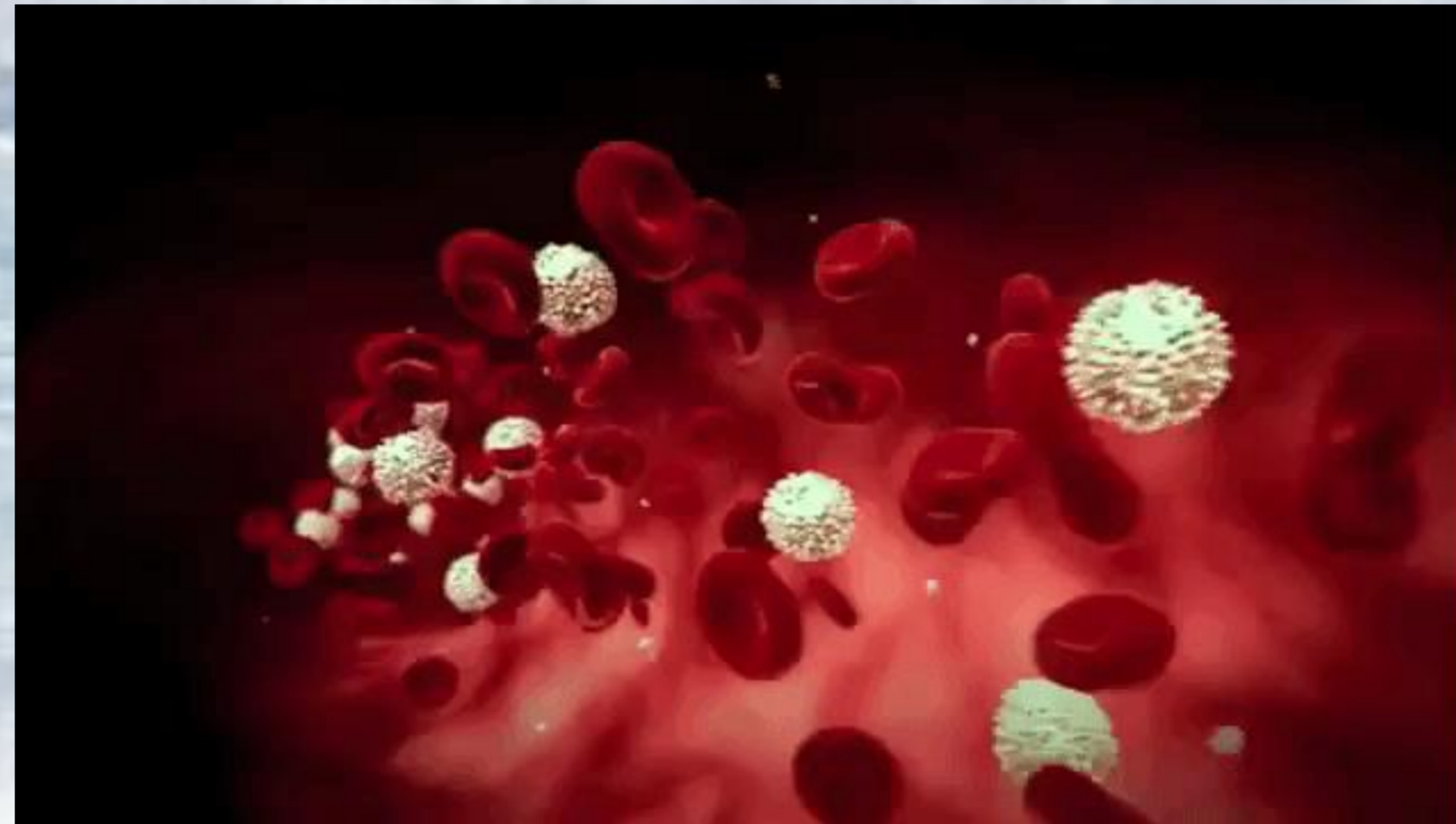
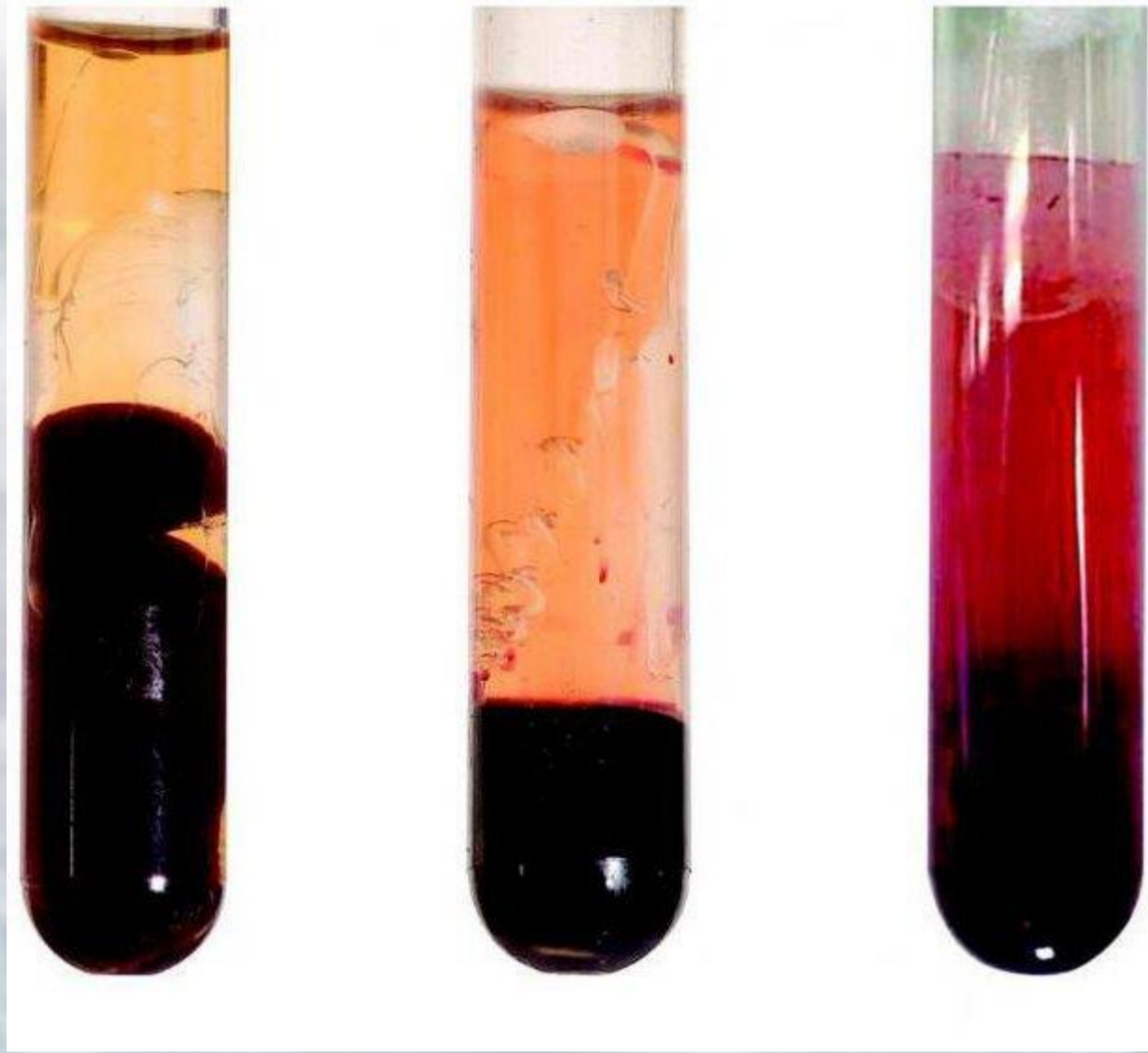
По устойчивости к UV, чувствительности к NaCl, ...

По возможности конъюгационного переноса – F-плазмиды (fertility – плодовитость) – инициируют деление бактерии

По деградации органических соединений – D-плазмиды (degradative)

Криптические плазмиды (фенотип неизвестен и плазмиды малого размера)

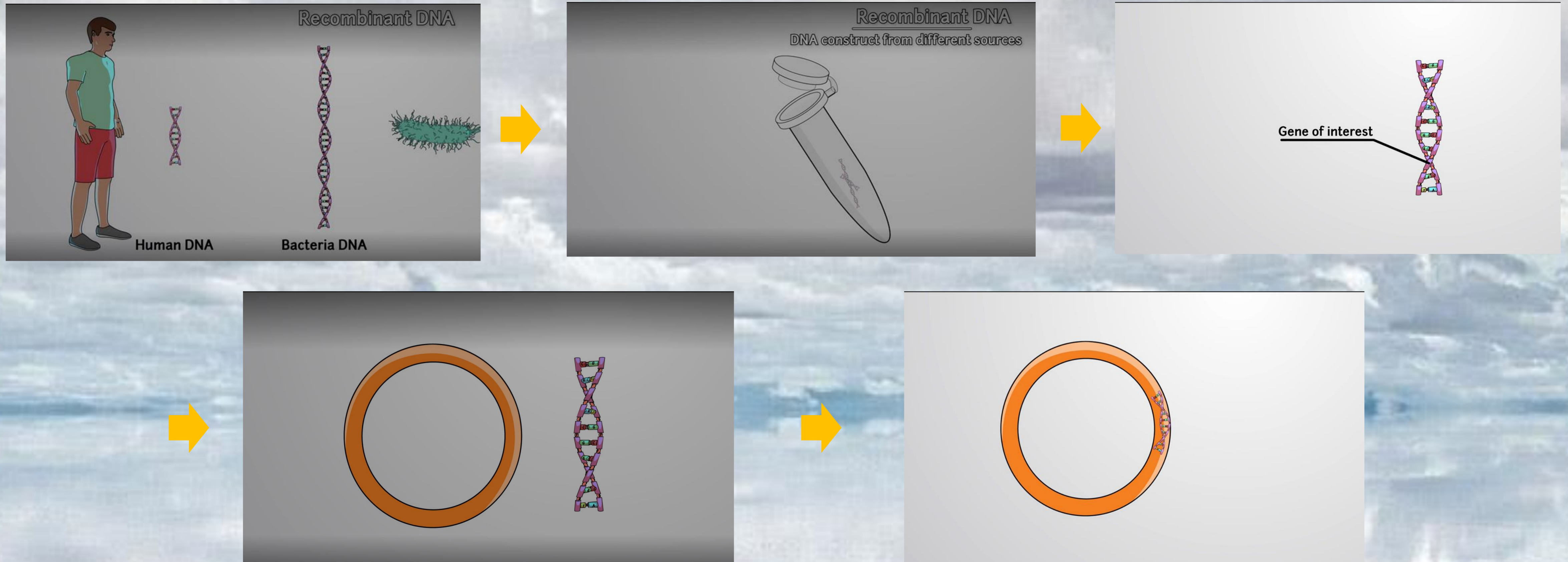
4. Выбор матрицы



5. Исследование возможности получения вещества для выделения ДНК

- Выделить ДНК можно из любой ткани живого или мертвого организма — вопрос только в том, сколько усилий придется затратить 😊
- Выделение ДНК — это первый этап молекулярно-биологического исследования. Генетический материал хранится в ядрах клеток, которые разрушают для извлечения ДНК в раствор с целью ее анализа. Из клеток животных часть ДНК высвобождают нагреванием, с клетками растений такой вариант не подходит, т.к. они защищены прочной клеточной мембраной из целлюлозы.
- Для успешного проведения измерений важно очистить ДНК от примесей, т.к. примеси ингибируют активность ферментов, необходимых для подготовки образца к анализу на **секвенаторе**. Ингибиторы в биологических тканях — это гемопротейны (компоненты эритроцитов, которые позволяют переносить кислород), коллаген в костях и других соединительных тканях, меланин в волосах и коже, ароматические соединения в растительных образцах, миоглобин в тканях мышц. В слюне анализу мешают остатки пищи и консерванты, которые используются для хранения и перевозки образцов.
- При криминалистических исследованиях для ДНК-идентификации достаточно луковицы волоса или кусочка кожи. Однако, для полногеномных исследований необходима неразрушенная ядерная и митохондриальная ДНК, поэтому необходимо использовать слюну и кровь.
- При невозможности работать напрямую с ДНК-содержащим материалом принимается решение о синтезе необходимого участка ДНК.

5.1 Синтез необходимого участка ДНК



● Рекомбинантная ДНК – молекула ДНК, полученная объединением *in vitro* разнородных, нигде в природе вместе не существующих фрагментов ДНК

6. Определение характерного участка ДНК. Клонирование фрагментов ДНК в плазмидный вектор

● Молекулярное клонирование – внесение в клетку чужеродного генетического материала.

Получение «вставки» – куска ДНК чужеродного гена, который вставляется в вектор

● Для выделения гена-вставки можно, например:

- - получить образец ткани организма, допустим человека,
- - извлечь из образца ДНК,
- - вычленив из ДНК интересующий ген,
- - провести анализ нуклеотидной последовательности гена (одним из подходящих методов секвенирования),
- - наработать его в больших количествах (методом ПЦР)

● Или можно синтезировать ген.

Получение «вектора» – молекулы ДНК, которая применяется для переноса генетического материала (вставки) внутрь клетки

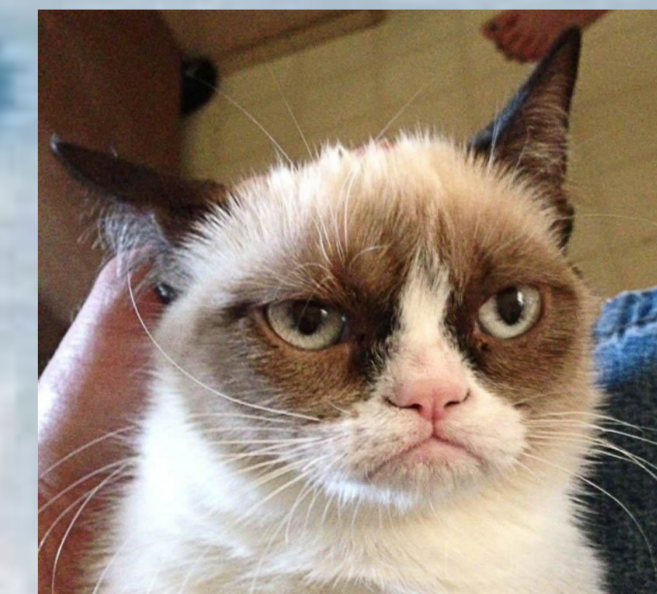
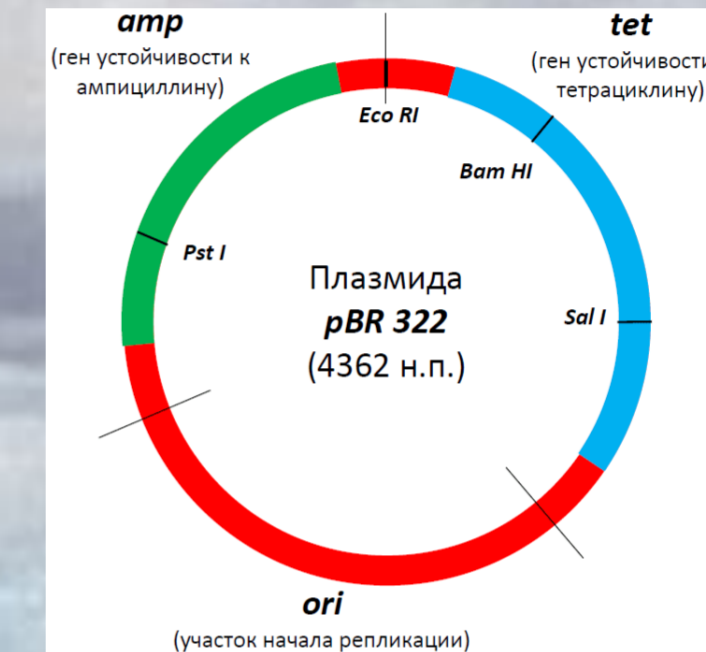
● В качестве вектора предлагается использовать кольцевую плазмиду, которая должна обладать следующими характеристиками:

● плазида должна в клетке реплицироваться, потому что иначе она быстро подвергнется деградациии, а вместе с ней исчезнет и ген-вставка

● в ДНК плазмиды должны быть участки, в которых ее можно будет разрезать, чтобы вшить туда вставку. В качестве «ножниц» используют рестриктазы, которые режут ДНК в строго определенных местах – сайтах рестрикции...

6. Определение характерного участка ДНК. Клонирование фрагментов ДНК в плазмидный вектор (продолжение)

- Выбор подходящего сайта, который будет находиться в том месте, куда планируется вшивать вставку, а затем обработка плазмиды соответствующей рестриктазой.
- После этого той же рестриктазой обрабатывают вставку, поскольку рестриктазы обычно оставляют выступающие концы на одной из нитей ДНК, и эти концы должны быть совместимы у вставки и плазмиды, чтобы они соединились.
- Соединение в одной пробирке плазмиды и вставки (предварительно очищенных от рестриктаз) и добавление к ним ДНК-лигазы, которая умеет сшивать воедино две молекулы ДНК.
- В результате получают не только желанный вектор, в котором плаزمида соединена со вставкой, но и множество побочных продуктов.
- Проводим селекцию – высееваем бактерии на среду с антибиотиком, который является первым селективным маркером
- Выбираем те бактериальные клоны, которые растут на среде с антибиотиком — они смогли съесть плазмиду со вставкой или хотя бы просто плазмиду (кота — с улыбкой или без)
- Проводим второй этап селекции. Например, переносим бактерии на среду с другим антибиотиком и выбираем те клоны, рост которых угнетается, — они ухитрились проглотить не просто плазмиду, а плазмиду, в которую была вшита вставка (кота с улыбкой);
- Выращиваем полученную культуру бактерий.
- Получена бактериальная культура, в которой живет созданный нами вектор.



7. Основные этапы создания таких ГСО

Выбор объекта ГСО и матрицы, выбор плазмиды



Выбор максимально чистых исходных веществ



Выделение или синтез ДНК



Клонирование фрагментов ДНК в плазмидный вектор



Добавление сложной матрицы, изучение и контроль влияния матрицы и ананта

8. Дорожная карта метрологического сообщества по реагированию на пандемию инфекционных заболеваний

Быстрые и точные диагностические тесты на SARS-CoV-2 были необходимы для выявления и лечения инфицированных людей, отслеживания контактов, эпидемиологической характеристики и принятия решений в области общественного здравоохранения на национальном и международном уровнях. Несмотря на то, что метрологическое сообщество проявляло активность в различных, в основном национальных, масштабах по всему миру, оно часто не было востребовано более широкими заинтересованными сторонами из-за общей неосведомленности о преимуществах, предлагаемых метрологическим сообществом, и отсутствия сплоченности на международном уровне.

Признавая аналогичные проблемы, с которыми метрологическое сообщество столкнется перед лицом будущей пандемии, если не принять промежуточных стратегических мер, в этом документе излагается путь будущей готовности сообщества к пандемии.

Видение дорожной карты

Разработать международную дорожную карту для метрологического сообщества, в которой определены приоритеты и намечены пути, необходимые для значительного ускорения сроков реагирования на пандемию и повышения осведомленности о ней среди более широких заинтересованных сторон.

8. Дорожная карта метрологического сообщества по реагированию на пандемию инфекционных заболеваний

Охарактеризованы технологические проблемы

A. Изучение вирусов и его штаммов

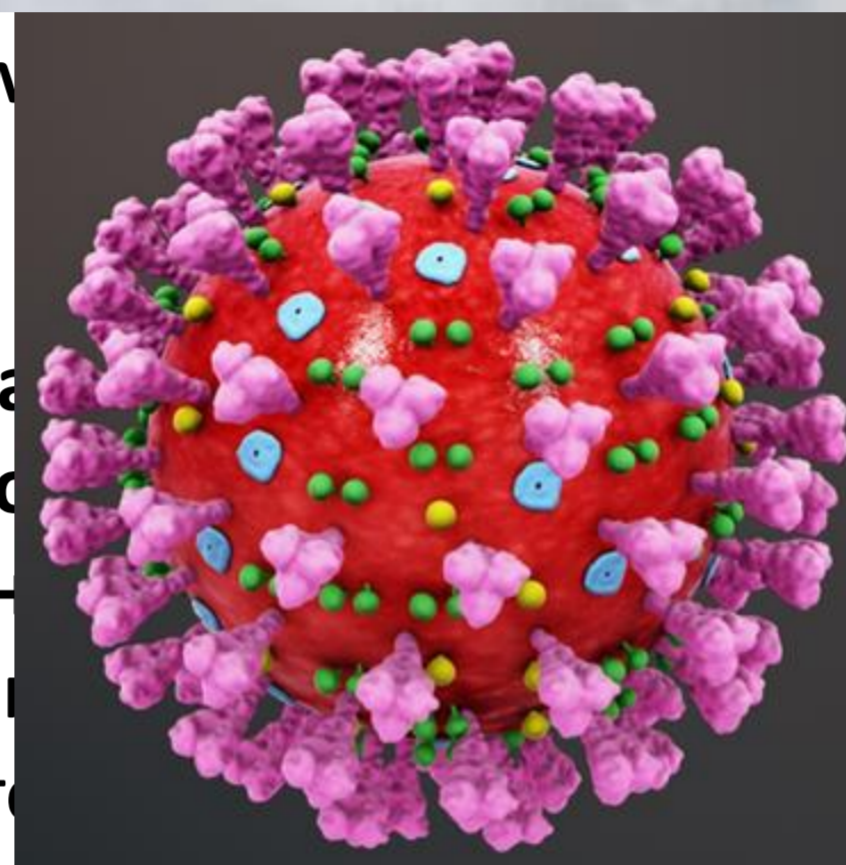
B. Исследование различных методов анализа, методов амплификации нуклеиновых кислот, иммунохимические методы

C. Исследование технологий обнаружения антител

Установлены краткосрочные и долгосрочные задачи

- Повысить точность и неопределенность методов
- Установить четко определенные единицы измерения
- Обеспечить местное производство
- Разработать стандартные образцы (в том числе матричные) и референтные методики измерений

Выработаны пути реализации Программы



иммунохимические методы, методы

реагирования, новых технологий

и:

высокой нагрузки



9. VIM 4 draft

Введение

...В то же время, что наиболее важно, несколько организаций-членов JCGM указали на растущую важность метрологически обоснованной обработки номинальных свойств и, следовательно, на необходимость большего количества записей в VIM о номинальных свойствах и процессе их проверки. Это привело РГ 2 к пересмотру некоторых ключевых концепций VIM, начиная с тех, которые связаны с самим различием между количественными и неколичественными свойствами.

Глава 6 «Номинальные свойства и экспертизы», посвященная номинальным свойствам и их экспертизе. В то время как VIM3 включал запись для «номинального свойства» (т. е. неколичественные, только классификационные свойства), в VIM4 был введен ряд связанных дополнительных записей, в основном взятых из словаря по номинальному свойству, экспертизе и связанным с ними понятиям для клинических лабораторных исследований (Рекомендации IFCC-IUPAC 2017; G.Nordin et al., Pure Appl. Chem. 90, 5, 2018) и адаптированы для приведения их в соответствие с VIM. Это потребовало пересмотра введенных в VIM3 записей об порядковых свойствах, для которых определяется порядок, а не единица измерения. Спорный вопрос заключается в том, достаточно ли порядка для того, чтобы сделать свойство количественным, и, следовательно, следует ли использовать термин «порядковое количество» для обозначения таких свойств. После тщательного анализа, также принимая во внимание, что научное сообщество заинтересованных сторон в порядковых свойствах, не было найдено, было решено для VIM4 минимизировать изменения в этом вопросе по отношению к VIM3 и сохранить предположение, что порядковые свойства являются (измеримыми) величинами.

Следствием более широкого рассмотрения номинальных свойств (и, в меньшей степени, порядковых величин) в VIM4 стало то, что определения «измерения» и «метрологии» рассматривались более тщательно. В частности, возник вопрос о том, должны ли определения того или иного определения быть расширены за пределы количественных показателей, чтобы включить в них рассмотрение номинальных свойств. Был проведен опрос среди организаций-членов JCGM, который иногда приводил к твердым мнениям по обеим сторонам вопроса. Поэтому было решено, что сейчас неподходящее время для внесения такого изменения, но к некоторым соответствующим записям были добавлены примечания, указывающие на то, что дебаты ведутся и могут повлиять на будущие версии VIM по этому вопросу.

9. VIM 4 draft

5 Measurement stan ^

- 5.1 [VIM3: 5.1; VII
- 5.2 [VIM3: 5.2; VII
- 5.3 [VIM3: 5.3; VII
- 5.4 [VIM3: 5.4; VII
- 5.5 [VIM3: 5.5; VII
- 5.6 [VIM3: 5.6; VII
- 5.7 [VIM3: 5.7; VII
- 5.8 [VIM3: 5.8; VII
- 5.9 [VIM3: 5.9; VII
- 5.10 [VIM3: 5.10]
- 5.11 [VIM3: 5.11;
[included in 5.7]
- 5.12 [VIM3: 5.13;
- 5.13 [VIM3: 5.14;
- 5.14 [new] certifi
- 5.15 [VIM3: 5.15]
- 5.16 [VIM3: 5.16]
- 5.17 [VIM3: 5.17]
- 5.18 [VIM3: 2.39;
- 5.19 [VIM3: 4.31]
- 5.20 [VIM3: 4.30]
- 5.21 [VIM3: 2.40]
- 5.22 [VIM3: 2.41;
- 5.23 [VIM3: 2.42;
- 5.24 [VIM3: 2.43]
- 5.25 [VIM3: 2.44]
- 5.26 [VIM3: 2.45]
- 5.27 [VIM3: 2.46]
- 5.28 [VIM3: 2.47]

6 Nominal propertie

- 6.1 [VIM3: 1.30] r
- 6.2 [VIM3: 1.30] r
- 6.3 [new] referen
- 6.4 [new] value o

JCGM-WG2-CD-02

International Vocabulary of Metrology 4th edition Committee Draft

VIM or VIM3 (note that elements of the entries are rearranged for highlighting analogies and differences with the new text)

6 Nominal properties and examinations

6.1 номинальное свойство – свойство явления, тела или вещества, где свойство не имеет размера.

ПРИМЕР 1 Пол человека.

ПРИМЕР 2 Цвет образца краски.

ПРИМЕР 3 Цвет прицельной пробы по химии.

ПРИМЕР 4 Двухбуквенный код страны ISO.

ПРИМЕР 5 Последовательность аминокислот в полипептиде.

NOTE 2 Any individual nominal property is an instance of a general nominal property, so that for example sodium ion in a given sample is an instance of chemical species. Individual nominal properties that are instances of the same general nominal property are comparable, and are said to be "nominal properties of the same kind".

EXAMPLE 1 Sex of a human being.
EXAMPLE 2 Colour of a paint sample.
EXAMPLE 3 Colour of a spot test in chemistry.
EXAMPLE 4 ISO two-letter country code.
EXAMPLE 5 Sequence of amino acids in a polypeptide.

9. VIM 4 draft

Закладки

- 4.33 [VIM3: 4.25; ^
- 5 Measurement stan
 - 5.1 [VIM3: 5.1; VII
 - 5.2 [VIM3: 5.2; VII
 - 5.3 [VIM3: 5.3; VII
 - 5.4 [VIM3: 5.4; VII
 - 5.5 [VIM3: 5.5; VII
 - 5.6 [VIM3: 5.6; VII
 - 5.7 [VIM3: 5.7; VII
 - 5.8 [VIM3: 5.8; VII
 - 5.9 [VIM3: 5.9; VII
 - 5.10 [VIM3: 5.10]
 - 5.11 [VIM3: 5.11; [included in 5.7]
 - 5.12 [VIM3: 5.13;
 - 5.13 [VIM3: 5.14;
 - 5.14 [new] certifi
 - 5.15 [VIM3: 5.15]
 - 5.16 [VIM3: 5.16]
 - 5.17 [VIM3: 5.17]
 - 5.18 [VIM3: 2.39;
 - 5.19 [VIM3: 4.31]
 - 5.20 [VIM3: 4.30]
 - 5.21 [VIM3: 2.40]
 - 5.22 [VIM3: 2.41;
 - 5.23 [VIM3: 2.42;
 - 5.24 [VIM3: 2.43]
 - 5.25 [VIM3: 2.44]
 - 5.26 [VIM3: 2.45]
 - 5.27 [VIM3: 2.46]
 - 5.28 [VIM3: 2.47]
- 6 Nominal propertie
 - 6.1 [VIM3: 1.30] r
 - 6.2 [VIM3: 1.30] r
 - 6.3 [new] referen
 - 6.4 [new] value o

6.4 [new]
value of a nominal property
value <nominal property>
individual nominal property identified in a reference set of nominal properties

VIN, 3.1
value of a nominal property

feature common to equivalent individual nominal properties

6.4 значение номинального свойства
индивидуальное номинальное свойство, идентифицированное в
эталонном наборе номинальных свойств

ПРИМЕР 3 Для вариации последовательности, соответствующей
замене G на A в положении 20210 ДНК в гене протромбина человека,
значением является G20210A.

EXAMPLE 4 For colour, as found in anthropological surveys to be in wide use across cultures, white is a value in the set {white, black, red, green, yellow, blue, brown, grey, orange, purple, and pink} (IEC 60050-845, *International Electrotechnical Vocabulary – Lighting*).

EXAMPLE 5 For blood group in the ABO system, A₁ is a value in the set {A₁, A₂, B, AB, O}.

EXAMPLE 6 For tumour type according to the WHO 2016 classification of tumours of the urinary system, urothelial type is a value.

NOTE 1 Values of nominal properties are not names/terms. In Example 1, where X = {sphere, prism, pyramid, other shape} is the set of possible values, a value of shape (in X) is sphere, which is a geometrical entity, not the term "sphere". Indeed the same value may be designated by the term "sphere" in English, "sphère" in French, and other terms in other languages.

NOTE 2 The term "value" in the phrase "value of a nominal property" is intended in analogy with its use in "value of a quantity". In this sense, the fact that the shape of a given object is spherical, and that the considered set of possible values of shape is X = {sphere, prism, pyramid, other shape}, can be written "shape(object) = sphere in X" in

system. The allele "1" is related to normal enzyme activity while the allele "3" is related to decreased enzyme activity.

EXAMPLE 1 'Yellow' is a nominal property value for a nominal property of the kind-of-nominal-property 'colour' of a given Urine as system. There is no separate component.

EXAMPLE 4 'Oval' is a nominal property value for a nominal property with of kind-of-nominal-property 'shape' of the component 'Leukocyte nucleus' in a given Blood as system. This shape is typical of immature forms of monocytes, such as promonocytes.

rights reserved

IM-WG2-CD-02

arty value for
component
es might be
be examined

f the kind-of-
en 'DNA' as

IUPAC Recommendations

Gunnar Nordin*, René Dybkaer, Urban Forsum, Xavier Fuentes-Arderiu
and Françoise Pontet†

Vocabulary on nominal property, examination, and related concepts for clinical laboratory sciences (IFCC-IUPAC Recommendations 2017)

<https://doi.org/10.1515/pac-2011-0613>

Received June 29, 2011; accepted September 6, 2017

Abstract: Scientists of disciplines in clinical laboratory sciences have long worked on a common language for efficient and safe request of investigations, report of results, and communication of experience and scientific achievements. Widening the scope, most scientific disciplines, not only clinical laboratory sciences, rely to some extent on various examinations in addition to measurements. The ‘International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms’ (VIM), is designed for metrology, the science of measurement. The aim of this vocabulary is to suggest definitions and explanations of concepts and a selection of terms related to nominal properties, *i.e.* properties that have no size.

Keywords: concept; examination; kind-of-nominal-property; nominal property; term; vocabulary.

2.1 номин
свойство я

ПРИМЕР 1
ПРИМЕР 2
ПРИМЕР 3
ПРИМЕР 4

Примечан
Понятие «
отсутствует
определен

Примечан
Термин «а
Примечан
Термин «к

часто подр
Примечан
«Номинал

2.1 nominal property

property of a phenomenon, body, or substance, where the property has no size

EXAMPLE 1 Colour at a specified lighting of a given leaf of a plant.

EXAMPLE 2 Sequence variation of nucleotides of a given gene.

EXAMPLE 3 *Taxon* (2.4) of a bacterium in a given sample of urine.

EXAMPLE 4 Shape of the nucleus of a given white blood cell.

Note 1 to entry: The concept 'nominal property' is defined as the opposite of 'quantity', *i.e.* the former concept lacks the essential characteristic of 'size' (or 'magnitude'). In such cases, ISO 704:2009-6.5.4 allows a 'negative definition' [9].

Brought to you by | Linköping University Library
Authenticated
Download Date | 5/23/18 11:27 AM

916 — G. Nordin et al.: Vocabulary on nominal property and examination

DE GRUYTER

Note 2 to entry: The term "attribute" has sometimes been used to designate 'nominal property', but not here.

Note 3 to entry: The term "qualitative property" is also used, but not here as it is ambiguous because 'ordinal quantity' is often included under that term.

Note 4 to entry: 'Nominal property' is sometimes termed "nameable property", but not here.

4
ЕГАТИВНОЕ

МИНОМ

3.1 значение номинального свойства

признак, общий для эквивалентных индивидуальных номинальных свойств (2.1)

ПРИМЕР 1

«Желтый» — это значение номинального свойства для номинального свойства вида (2.2) «цвет» данной мочи как системы. Отдельного компонента нет.

ПРИМЕР 2

«*1/*3» представляет собой значение номинального свойства для номинального свойства вида «изменение последовательности» гена CYP2D6 в данной «ДНК» как системе. Аллель «*1» связан с нормальной активностью фермента, тогда как аллель «*3» связан со сниженной активностью фермента.

.....

Примечание 1 к записи:

Значениями номинальных свойств могут быть слова, буквенно-цифровые коды, символы и т. д., но они не могут входить в алгебраические уравнения и не связаны с количественным измерением или единицей измерения.

Примечание 2 к записи:

Значение номинального свойства может состоять из набора.

Пример: Цвета национального флага Швейцарии — красный и белый.

Примечание 3 к записи:

Термин «значение номинального свойства» и его краткая форма «номинальное значение» используются, например, в VIM 4.6 для обозначения концепции, касающейся округленных или приблизительных значений количества. Термин «номинальный интервал индикации» используется в VIM 4.4 для обозначения концепции, касающейся округленных или приблизительных крайних индикаций.

[ИСТОЧНИК: первая часть примечания 1 к записи взята из VIM, 1.30, примечание 1.]

11. VIM 3

5.13 (6.13) стандартный образец СО

англ. reference material, RM
фр. matériau de référence, MR, m

материал, достаточно однородный и стабильный в отношении определенных свойств для того, чтобы использовать его при **измерении** или при оценивании **качественных свойств** в соответствии с предполагаемым назначением

ПРИМЕЧАНИЕ 1 Оценивание качественного свойства дает значение этого качественного свойства и соответствующую неопределенность. Эта неопределенность не является **неопределенностью измерений**.

ПРИМЕЧАНИЕ 2 Стандартные образцы с приписанными значениями **величины** или без них могут использоваться для контроля **прецизионности измерений**, тогда как для **калибровки** или контроля **правильности измерений** могут использоваться только стандартные образцы с приписанными значениями величины.

ПРИМЕЧАНИЕ 3 Понятие "**стандартный образец**" охватывает как образцы с **величинами**, так и образцы с **качественными свойствами**.

ПРИМЕР 1 Примеры стандартных образцов с величинами:

а) вода установленной степени чистоты, используемая для калибровки виско-

зиметра;

б) структура ДНК, содержащая определенную последовательность нуклеотидов;

с) моча, содержащая 19-андростендион.

ПРИМЕЧАНИЕ 4 Стандартный образец иногда включают в состав специально созданного устройства.

ПРИМЕР 1 Вещество с известной тройной точкой в ячейке тройной точки.

ПРИМЕР 2 Стекло с известной оптической плотностью в держателе светофильтра.

ПРИМЕР 3 Сферические частицы одного размера, размещенные на предметном стекле микроскопа.

ПРИМЕЧАНИЕ 5 Некоторые стандартные образцы имеют приписанные значения величины, которые являются метрологически прослеживаемыми к **внесистемной единице измерения**. К таким образцам относятся вакцины, которым Всемирной организацией здравоохранения приписываются Международные Единицы (МЕ).

ПРИМЕЧАНИЕ 6 В данном **измерении** данный стандартный образец может использоваться либо для калибровки, либо для обеспечения качества.

ПРИМЕЧАНИЕ 7 Спецификация стандартного образца должна включать прослеживаемость материала, которая показывает его происхождение и обработку (Accred. Qual. Assur.: 2006)^[45].



Елена Кулябина



Татьяна Кулябина



Ольга Мелкова



Валерия Морозова

Благодарю за внимание!

