

TCVN 13841:2023

ISO 20813:2019

Xuất bản lần 1

**PHÂN TÍCH DẤU ẤN SINH HỌC PHÂN TỬ –
PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN VÀ XÁC ĐỊNH NGUYÊN LIỆU
CÓ NGUỒN GỐC TỪ ĐỘNG VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ
SẢN PHẨM THỰC PHẨM (DỰA TRÊN AXIT NUCLEIC) –
YÊU CẦU CHUNG VÀ ĐỊNH NGHĨA**

Molecular biomarker analysis –

*Methods of analysis for the detection and identification of animal species
in foods and food products (nucleic acid-based methods) –*

General requirements and definitions

HÀ NỘI – 2023

Lời nói đầu

TCVN 13841:2023 hoàn toàn tương đương với ISO 20813:2019;

TCVN 13841:2023 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Viện Tiêu chuẩn Chất lượng Việt Nam đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Phân tích dấu ấn sinh học phân tử – Phương pháp phát hiện và xác định nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật trong thực phẩm và sản phẩm thực phẩm (dựa trên axit nucleic) – Yêu cầu chung và định nghĩa

Molecular biomarker analysis – Methods of analysis for the detection and identification of animal species in foods and food products (nucleic acid-based methods) – General requirements and definitions

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định các yêu cầu tối thiểu về đặc tính hiệu năng của phương pháp phân tử để phát hiện trình tự axit nucleic (ADN), như: phản ứng chuỗi polymerase (PCR), bao gồm các phương pháp phát hiện sau PCR khác nhau, real-time PCR, các kỹ thuật phát hiện dựa trên một và/hoặc nhiều đoạn dò cũng như sự kết hợp của các phương pháp đó.

Tiêu chuẩn này có thể áp dụng để phát hiện, xác định và định lượng ADN của các loài động vật thuộc các nhóm phân loại sinh học trên loài và dưới loài trong thực phẩm và xác nhận giá trị sử dụng của các phương pháp áp dụng.

Tiêu chuẩn này áp dụng cho động vật có vú, chim, bò sát, động vật lưỡng cư, cá, động vật thân mềm, động vật giáp xác và côn trùng. Các ví dụ điển hình cho từng loài được nêu trong Phụ lục A.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 7608 (ISO 24276), *Thực phẩm – Phương pháp phân tích để phát hiện sinh vật biến đổi gen và sản phẩm có nguồn gốc biến đổi gen – Yêu cầu chung và định nghĩa*

TCVN 11933 (ISO 16577), *Phân tích dấu ấn sinh học phân tử – Thuật ngữ và định nghĩa*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa nêu trong TCVN 11933 (ISO 16577), TCVN 7608 (ISO 24276) cùng với các thuật ngữ và định nghĩa sau:

3.1

Công cụ tìm kiếm trình tự tương đồng (basic local alignment search tool)

BLAST

Thuật toán so sánh trình tự được tối ưu hóa cho tốc độ được sử dụng để tìm kiếm cơ sở dữ liệu về trình tự đối với các trình tự tương đồng tối ưu với trình tự truy vấn.

CHÚ THÍCH 1: Thuật toán này ước tính trực tiếp các trình tự tương đồng để tối ưu phép đo mức độ tương đồng, điểm tương đồng của cặp tín hiệu lớn nhất (MST) hoặc điểm tương đồng của cặp phân đoạn có điểm số cao (HSP).

CHÚ THÍCH 2: Xem Tài liệu tham khảo [2].

CHÚ THÍCH 3: BLASTn có thể áp dụng để so sánh trình tự nucleotid.

3.2

Phản ứng chuỗi polymerase truyền thống (conventional polymerase chain reaction)

PCR truyền thống (conventional PCR)

Phương pháp PCR yêu cầu bước sau PCR như điện di trên gel để phát hiện hoặc hiển thị các sản phẩm khuếch đại cho kết quả định tính.

4 Đặc tính hiệu năng của các phương pháp

4.1 Yêu cầu chung

Các phương pháp được sử dụng để phân tích nguyên liệu có nguồn gốc từ các loài động vật phải đáp ứng các đặc tính hiệu năng phù hợp với tiêu chuẩn này. Cần mô tả các kết quả của tất cả các phép xác nhận liên phòng và/hoặc đơn phòng thử nghiệm và các đặc tính hiệu năng.

CHÚ THÍCH: Có sẵn một số hướng dẫn để thực hiện các phương pháp, xem Tài liệu tham khảo [10].

4.2 Phạm vi áp dụng của phương pháp

Thông tin về mục đích sử dụng và những hạn chế của các phương pháp cần được đưa ra. Đặc biệt, thông tin phải chỉ ra các tiêu chí nêu trong tiêu chuẩn này đã được đáp ứng.

4.3 Cơ sở khoa học

Tổng quan về các nguyên tắc và tài liệu khoa học đã công bố có liên quan cần được cung cấp đầy đủ.

4.4 Đơn vị đo

Các phép phân tích định tính cho thấy có hoặc không có (không phát hiện được) một đích nhất định.

Trong phân tích định lượng, giá trị đo được tính theo tỷ lệ số bản sao ADN (c/c). Việc sử dụng tỷ lệ này cần được kiểm tra về các ảnh hưởng có thể xảy ra, bao gồm số bản sao ADN liên quan đến đích trong bộ gen. Có thể sử dụng các đơn vị khác (ví dụ: tỷ lệ khối lượng). Các nguyên tắc tính toán tỷ lệ phải được báo cáo.

Nếu sử dụng phương pháp định lượng để đánh giá tỷ lệ khối lượng của các thành phần nguyên liệu có nguồn gốc từ các loài động vật khác nhau trong mẫu, thì cần nêu rõ các giá trị đo được đối với tỷ lệ số bản sao ADN không thể phản ánh tỷ lệ khối lượng của các thành phần nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật trong mẫu trong mọi trường hợp.

4.5 Khả năng áp dụng

Khi đánh giá một phương pháp phù hợp với mục đích áp dụng, cần xem xét các khía cạnh về bản chất của đích như sau:

- vị trí của đích (nhân hoặc ty thể);
- số bản sao trên mỗi tế bào;
- chiều dài trình tự đích.

Đối với các phương pháp định lượng đặc hiệu của loài, sử dụng một gen nhân, không bao gồm ADN ty thể làm đích. Trình tự đích phải được biểu hiện dưới dạng một bản sao trên mỗi bộ gen đơn bội hoặc số bản sao phải được biết trước.

Khi đánh giá một phương pháp phù hợp với mục đích áp dụng, cần xem xét các khía cạnh về nền mẫu như sau:

- bản chất của nền mẫu tiềm ẩn;
- mức độ xử lý các thành phần mẫu;
- các loài và loại mô động vật khác nhau có liên quan;
- việc chuẩn bị nền mẫu.

Khả năng áp dụng của phương pháp phải được kiểm tra bằng cách chiết ADN từ các mẫu thử phản ánh nền mẫu và phạm vi phân tích.

ADN phải được chiết từ tối thiểu ba nền mẫu phù hợp nhất, bao gồm cả các loại phản ánh phạm vi áp dụng của phương pháp, có chứa hàm lượng khối lượng đã biết của nguyên liệu có nguồn gốc từ các loài động vật đích (phân bố đều trên dải động của phương pháp tính bằng phần trăm) và các mô động vật có liên quan để áp dụng.

CHÚ THÍCH 1: Không sử dụng các ty thể đích PCR để định lượng đúng tỷ lệ số lượng bản sao bộ gen đơn bội của các loài khác nhau, vì số lượng ty thể đích khác nhau tùy theo loại mô.

CHÚ THÍCH 2: Các loại mô động vật khác nhau có thể có hàm lượng ADN thay đổi trên mỗi khối lượng tương đương.

TCVN 13841:2023

CHÚ THÍCH 3: Giới hạn phát hiện (LOD) thực tế [xem TCVN 7605 (ISO 21569)] có thể chênh lệch đáng kể đối với các nền mẫu khác nhau. Ngoài ra, các mức xử lý các thành phần động vật khác nhau trong cùng một sản phẩm sẽ làm tăng sự phân hủy ADN và khả năng phân bố ADN không đối xứng giữa các thành phần nguyên liệu. Ví dụ: một sản phẩm có thể được cấu tạo từ các loại mô động vật khác nhau chứa các lượng ADN khác nhau. Sự mất cân bằng này có thể tăng nếu một số thành phần nguyên liệu được xử lý trước, như nấu chín hoặc xử lý bằng axit, làm giảm chất lượng ADN, trong khi các thành phần nguyên liệu khác được thêm vào là nguyên liệu thô hoặc nguyên liệu đã xử lý khác.

4.6 Độ đặc hiệu

4.6.1 Yêu cầu chung

Cần đánh giá độ đặc hiệu theo quy trình hai bước: đánh giá bằng lý thuyết và đánh giá bằng thực nghiệm độ chọn lọc mục tiêu và độ chọn lọc loại trừ.

Thực hiện thử nghiệm *in silico* về độ đặc hiệu của mỗi và đoạn dò bằng các công cụ tin sinh học có sẵn.

CHÚ THÍCH 1: Các ví dụ thử nghiệm sự hình thành hiện tượng mỗi bắt cặp với nhau (primer-dimer) cùng với các nghiên cứu về chương trình sử dụng mã nguồn mở primer3^[1] và BLAST^[2] trong cơ sở dữ liệu trình tự axit nucleic.

Nếu sử dụng dữ liệu trình tự để kiểm tra xác nhận kết quả phân loại động vật thì các dữ liệu này phải dựa trên cơ sở dữ liệu thích hợp có xem xét đến thời điểm nhập các dữ liệu riêng lẻ và mọi thay đổi sau đó trong việc phân loại hoặc định danh.

CHÚ THÍCH 2: Trong trường hợp thu được kết quả ngoài dự kiến, có thể tiến hành nghiên cứu thêm bằng các kỹ thuật thích hợp, chẳng hạn như kỹ thuật xác định trình tự, điện di trên gel hoặc kỹ thuật lai để khẳng định tính đồng nhất của mẫu chuẩn.

4.6.2 Yêu cầu đối với thử nghiệm độ chọn lọc mục tiêu

Cần đưa ra các kết quả thực nghiệm từ thử nghiệm phương pháp với các loài động vật đích. Thử nghiệm này phải bao gồm các giống của loài động vật có liên quan đến phạm vi áp dụng của phương pháp (xem 4.2).

Nguyên liệu để thử nghiệm độ chọn lọc mục tiêu thực nghiệm cần chứa khoảng 100 bản sao ADN đích^[6]. Mỗi nguyên liệu mẫu phải được thử nghiệm ít nhất hai lần lặp lại. Cần xác định các thay đổi trình tự của các loài động vật đích với hiệu suất khuếch đại có thể so sánh được, nếu có.

CHÚ THÍCH: Các loài động vật đích để thử nghiệm độ chọn lọc mục tiêu thường có nhiều hơn năm giống.

4.6.3 Yêu cầu đối với thử nghiệm độ chọn lọc loại trừ

Cần đưa ra các kết quả thực nghiệm từ thử nghiệm phương pháp với các loài động vật không phải đích. Thử nghiệm này cần bao gồm cả các loài động vật gần giống về mặt phân loại và không có quan hệ họ hàng gần. Cần thử nghiệm các loài động vật hoặc các nhóm phân loại có liên quan đến phạm vi áp dụng của phương pháp, ví dụ: các loài thường được dùng trong thực phẩm nói chung và đặc biệt

trong các nền mẫu được xem xét trong phạm vi áp dụng của phương pháp. Phương pháp này cần phân biệt rõ các loài động vật đích và động vật không phải đích.

Cần sử dụng đủ ADN để thử nghiệm độ chọn lọc loại trừ thực nghiệm. Số lượng 2 500 bản sao đích^[6] đảm bảo có thể xác định được phản ứng chéo.

Chọn tối thiểu 10 loài có thể gây nhiễu cho các loài động vật đích có mặt trong nguyên liệu thử nghiệm của thực phẩm. Ví dụ về các vi sinh vật thích hợp được nêu trong Phụ lục A.

Cần bao gồm cả các loài khác nếu có liên quan, ví dụ: nếu có sự tương đồng về trình tự của các oligonucleotid với các trình tự của axit nucleic.

Phản ứng chéo của nền mẫu cần được mô tả.

Sự phù hợp của ADN được sử dụng để khuếch đại phải được khẳng định bằng phép kiểm soát khuếch đại, ví dụ: bằng hệ thống PCR bảo thủ sử dụng ADN (nhiễm sắc thể) đơn lẻ (ví dụ: myostatin hoặc actin).

4.7 Độ nhạy

4.7.1 Yêu cầu chung

Cần có sẵn các kết quả thực nghiệm từ thử nghiệm phương pháp ở các nồng độ khác nhau để kiểm tra phạm vi sử dụng của phương pháp. Các kết quả này cần được nêu trong báo cáo xác nhận giá trị sử dụng.

Nếu cần, cung cấp thông tin chi tiết về cách thiết lập giá trị giới hạn và cách sử dụng trong phòng thử nghiệm.

Các loài động vật cần thử nghiệm định tính phải được phát hiện ở mức độ liên quan đến đối tượng được quan tâm, ví dụ: người tiêu dùng.

4.7.2 Giới hạn phát hiện (LOD)

4.7.2.1 Giới hạn phát hiện tuyệt đối

Giới hạn phát hiện tuyệt đối (LOD_{abs}) phải được biểu thị bằng số bản sao của trình tự đích cho mỗi phản ứng với độ tin cậy quy định (thường là 95 %).

CHÚ THÍCH 1: Có thể sử dụng 20 bản sao hoặc ít hơn đối với các gen đơn lẻ và một số bộ gen đơn bội thích hợp tương đương với các gen có số bản sao cao.

CHÚ THÍCH 2: Nếu không có sẵn một ADN với số bản sao đã biết của trình tự đích để xác định giới hạn phát hiện (LOD) thì có thể sử dụng ADN plasmid.

Xác định LOD_{abs} thực nghiệm của phương pháp bằng cách chuẩn bị một dãy các dung dịch pha loãng của nguyên liệu đích với các độ pha loãng nằm trong dải giới hạn phát hiện dự kiến/mức tiêu. Hướng dẫn đánh giá LOD_{abs} được nêu trong Tài liệu tham khảo [6].

4.7.2.2 Giới hạn phát hiện tương đối

Giới hạn phát hiện tương đối (LOD_{rel}) phải được xác định trên cơ sở ADN của loài động vật không phải đích có liên quan. Tùy thuộc vào yêu cầu thử nghiệm, LOD_{rel} được chỉnh đến giá trị này. LOD_{rel} biểu thị bằng % tỷ lệ số bản sao tương đối của ADN các loài động vật đích trong ADN các loài động vật khác được phát hiện với độ tin cậy 95 %.

Cần xác định LOD_{rel} thực nghiệm bằng cách chuẩn bị một hoặc nhiều mẫu đối chứng xác định có phần trăm hàm lượng ADN đích xác định trong dải giới hạn phát hiện. Mỗi mẫu đối chứng được phân tích ít nhất 10 lần lặp lại. Phần trăm của mẫu đối chứng trong đó ít nhất 95 % số lần lặp lại cho kết quả dương tính thì được coi là LOD_{rel} .

4.7.2.3 Giới hạn phát hiện không đối xứng (chỉ dùng cho các phương pháp đa môi)

Trong các phương pháp đa môi, việc phát hiện các đích khác nhau bị hạn chế bởi các tác động cạnh tranh, do đó với các phương pháp real time-PCR đa môi, cần xác nhận giá trị sử dụng của LOD đối với các đích đơn lẻ trong trường hợp đích không đối xứng được biểu thị bằng tỷ lệ đích. Trộn các trình tự đích có hàm lượng khác nhau của động vật cụ thể để thu được tỷ lệ bản sao xác định (ở đây tỷ lệ là 1:1 000 và 1 000:1; 1:100 và 100:1). Tỷ lệ mỗi động vật đích được phát hiện với độ tin cậy 95 % xác định bằng thực nghiệm có số lần lặp lại thích hợp đối với mẫu đối chứng xác định.

4.8 Yêu cầu cụ thể đối với các phương pháp định lượng**4.8.1 Yêu cầu chung**

Cần xác định giới hạn trên và giới hạn dưới dải tuyến tính của phương pháp. Việc đánh giá các giới hạn và dải tuyến tính này phải được thực hiện trên các mẫu chứa ADN của động vật không phải đích liên quan đến thực phẩm.

4.8.2 Giới hạn định lượng (LOQ)

Giới hạn định lượng tuyệt đối (LOQ_{abs}) phải được biểu thị bằng số bản sao của trình tự đích. Giới hạn này phải bằng giá trị nhỏ nhất nằm trong dải động.

Giới hạn định lượng tương đối (LOQ_{rel}) phải được xác định bằng ADN của loài động vật liên quan khác. Tùy thuộc vào các yêu cầu thử nghiệm, LOQ_{rel} cần được chỉnh theo giá trị này. LOQ_{rel} biểu thị tỷ lệ giữa số bản sao ADN của các loài động vật đích với các bản sao ADN của loài động vật khác hoặc với các bản sao của gen tham chiếu đại diện cho toàn bộ thứ hạng phân loại. LOQ_{rel} phải bằng nồng độ nhỏ nhất nằm trong dải động.

Nếu không có sẵn một ADN với số bản sao đã biết của trình tự đích để xác định LOQ thì cần sử dụng ADN plasmid. Plasmid này cũng có thể dùng làm chất hiệu chuẩn.

Thử nghiệm ít nhất 15 lần lặp lại với nồng độ đích của giới hạn định lượng dự kiến. Các kết quả phải đáp ứng các tiêu chí về độ chụm và độ đúng.

CHÚ THÍCH: Các giá trị LOQ được báo cáo từ dữ liệu nghiên cứu cộng tác thường đề cập đến mức thấp nhất của chất phân tích được quan sát có độ lệch chuẩn tái lập tương đối nhỏ hơn hoặc bằng 25 %.

4.8.3 Dải động

Dải động cần bao gồm các giá trị phần trăm cũng như số bản sao theo mục đích sử dụng và phạm vi áp dụng của phương pháp.

Để xác định số bản sao tối thiểu liên quan, cần xác định dải động dự kiến bằng phần trăm bản sao đích. Cần xem xét kích thước bộ gen của các loài trong nguyên liệu mẫu dự kiến sẽ hạn chế số bản sao tối đa có thể được sử dụng để phân tích (ví dụ: từ 100 ng đến 200 ng, tùy thuộc vào phương pháp).

CHÚ THÍCH 1: Ví dụ, đối với bò, giả định kích thước bộ gen là 4 pg thì thu được số bản sao tối đa là 25 000 trong 100 ng nguyên liệu ADN mẫu. Xem Bảng B.2^[18] ^[22].

Số bản sao của dải động đối với cả đích và trình tự tham chiếu được xác định như sau:

- đối với trình tự tham chiếu, số bản sao tối đa được tính dựa trên kích thước bộ gen và lượng ADN mẫu sử dụng để phân tích như mô tả ở trên;
- đối với đích, số bản sao thấp nhất phải là LOQ tuyệt đối; điều kiện tiên quyết là cần xem xét giá trị thấp nhất có thể được coi là tỷ lệ so sánh của tổng số bản sao tối đa/ADN tham chiếu;
- số bản sao tối thiểu của trình tự tham chiếu và số bản sao tối đa đối với đích được tính tương ứng theo tỷ lệ tối thiểu và tối đa, tính bằng phần trăm.

CHÚ THÍCH 2: Dải động được thiết lập trên cơ sở đường chuẩn với tối thiểu bốn mức nồng độ được phân bố đều ở ít nhất hai lần lặp lại.

CHÚ THÍCH 3: Để giới hạn trên dự kiến của phần trăm dải động là 100 %, số bản sao tối thiểu của trình tự tham chiếu có thể bằng giới hạn dưới đây số bản sao của trình tự đích và để LOQ tuyệt đối của 30 bản sao là 0,1 % thì giới hạn trên của đích tham chiếu là 30 000 bản sao.

4.8.4 Xác định độ chụm và độ đúng của các phương pháp định lượng

Xác định độ chụm và biểu thị độ chụm theo độ lệch chuẩn lặp lại tương đối (S_r).

Cần phân tích đủ các lần lặp lại (ít nhất 15 lần) đối với ít nhất ba nguyên liệu ADN có các tỷ lệ phần trăm đích khác nhau bao trùm toàn bộ dải động.

CHÚ THÍCH: Không sử dụng ADN ty thể làm đối tượng mục tiêu cho phương pháp định lượng.

TCVN 13841:2023

S_r sử dụng cho tất cả các lần lặp lại phải $\leq 25\%$ trên toàn bộ dải động của phương pháp.

Độ đúng của phương pháp phải nằm trong khoảng 25% giá trị chuẩn được chấp nhận đối với tất cả các lần lặp lại trên toàn bộ dải động của phương pháp.

4.9 Độ vững

4.9.1 Yêu cầu chung

Cần đưa ra các kết quả thu được từ thử nghiệm thực nghiệm của phương pháp dựa vào các thay đổi nhỏ nhưng có chủ định các thông số của phương pháp (ví dụ: sự thay đổi nồng độ của thành phần kit, sự thay đổi thiết bị), nếu có.

4.9.2 Xác định độ vững bằng nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

Nghiên cứu liên phòng thử nghiệm đưa ra sự thay đổi có chủ định trong phòng thử nghiệm thực hiện phương pháp và đáp ứng các tiêu chí để đánh giá độ vững (robustness). Theo kinh nghiệm, cần lựa chọn phương pháp đáng tin cậy bằng cách xem xét các kết quả không thay đổi đáng kể thu được từ các phòng thử nghiệm khác nhau.

4.9.3 Xác định độ vững bằng thiết kế phép thử kết hợp đồng thời nhiều yếu tố

Phép thử được thực hiện theo cách tiếp cận nhiều yếu tố trong đó có đánh giá một số thay đổi, bao gồm, nhưng không giới hạn về nồng độ mastermix, thể tích phản ứng, nồng độ mẫu và đoạn dò, nhiệt độ gắn mẫu, hệ thống phân tích chu kỳ nhiệt.

CHÚ THÍCH 1: Quy trình chi tiết được nêu trong Tài liệu tham khảo [6].

Đối với các phương pháp định tính, cần thử nghiệm ít nhất ba lần lặp lại. Số bản sao của các loài động vật đích được sử dụng trong phép thử cần ở nồng độ gấp ba lần LOD_{abs} của phương pháp (độ tin cậy 95%).

Đối với các phương pháp định lượng, cần thử nghiệm ba nồng độ đích xác định trong toàn bộ dải động của phương pháp, mỗi nồng độ thử nghiệm ba lần lặp lại.

CHÚ THÍCH 2: Phương pháp được coi là đảm bảo độ vững nếu tất cả các phản ứng đều cho các kết quả dự kiến.

5 Xác nhận giá trị sử dụng trong phòng thử nghiệm đơn lẻ

Phương pháp phân tích cần được thử nghiệm đầy đủ trong phòng thử nghiệm, để đưa ra các yêu cầu kỹ thuật trước khi nghiên cứu liên phòng thử nghiệm, xem TCVN 10990 (ISO 13495).

Các mẫu chuẩn (RM) hoặc mẫu chuẩn được chứng nhận (CRM) cần được xem xét để sử dụng trong xác nhận giá trị sử dụng của các phương pháp phát hiện và định lượng axit nucleic.

6 Nghiên cứu liên phòng thử nghiệm (nghiên cứu cộng tác)

6.1 Yêu cầu chung

Thông tin về nghiên cứu cộng tác (đơn vị tổ chức, quy trình, số lượng phòng thử nghiệm tham gia, v.v....) và dữ liệu hiệu năng thu được từ nghiên cứu phải được báo cáo cùng với các viện dẫn thích hợp đến các tài liệu có liên quan. Có thể thực hiện các nghiên cứu cộng tác về xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp PCR để phát hiện, xác định và định lượng các trình tự ADN đặc hiệu theo các tài liệu liên quan khác (ví dụ: CAC/GL 74-2010^[7]).

CHÚ THÍCH: Có thể thực hiện một nghiên cứu cộng tác quy mô nhỏ (nghiên cứu trước khi xác nhận giá trị sử dụng, ví dụ: từ hai đến bốn phòng thử nghiệm) để kiểm tra khả năng chuyển đổi của phương pháp trước khi tổ chức nghiên cứu quy mô lớn.

Đối với việc xác nhận độ chụm của các phương pháp phát hiện và xác định, dữ liệu phải được thu thập từ nhiều phòng thử nghiệm có cơ sở vật chất và năng lực thử nghiệm cấp sinh học phân tử. Trong TCVN 10990 (ISO 13495), số phòng thử nghiệm yêu cầu lần lượt là tám phòng thử nghiệm tham gia xác nhận ở cấp quốc tế và bốn phòng thử nghiệm tham gia xác nhận ở cấp quốc gia. Theo tài liệu AOAC (2002)^[23], số phòng thử nghiệm yêu cầu là tám phòng thử nghiệm. Phân tích thống kê được tính theo 6.3 của TCVN 6910-1 (ISO 5725-1).

6.2 Phương pháp định tính

Nghiên cứu cộng tác xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp PCR định tính cần được thiết kế bằng cách xem xét xác suất phát hiện (POD) (xem ISO/TS 16393) trong phạm vi áp dụng của phương pháp.

CHÚ THÍCH: Phi tham số truyền thống có tỷ lệ dương tính giả 5 % và âm tính giả 5 % tương ứng với POD 5 % và POD 95 %.

6.3 Phương pháp định lượng

Độ lệch chuẩn tái lập tương đối (S_R) cần ≤ 25 % trên toàn bộ dải động của phương pháp.

CHÚ THÍCH: Ở mức 0,1 % (tỷ lệ số bản sao), S_R bằng 50 % có thể chấp nhận được.

7 Yêu cầu chung đối với phòng thử nghiệm và yêu cầu về cách tiến hành

7.1 Yêu cầu chung

Cách tiến hành được lập thành văn bản bao gồm các bước sau:

- lấy mẫu đại diện;
- chuẩn bị mẫu thử (tùy chọn: nếu mẫu thử không phải toàn bộ mẫu phòng thử nghiệm thì đồng hóa mẫu phòng thử nghiệm và lấy mẫu thử theo các tiêu chuẩn liên quan);

TCVN 13841:2023

- nghiền và đồng hóa mẫu thử;
- chuẩn bị các phần mẫu thử;
- chiết ADN;
- thử nghiệm, diễn giải và báo cáo kết quả.

Áp dụng các khuyến cáo về an toàn của nhà sản xuất.

7.2 Cơ sở vật chất, nguyên liệu và thiết bị

Khu vực làm việc trong phòng thử nghiệm cần được thiết kế để ngăn ngừa ô nhiễm ADN ngẫu nhiên, ví dụ: có nguồn gốc từ bụi, nguyên liệu từ con người và các loại khí phát tán, bao gồm cả việc xem xét:

- phân khu có hệ thống trong các bước của phương pháp có liên quan đến việc tính kết quả;
- nguyên tắc dòng chảy xuôi chiều để xử lý mẫu.

Đối với các phương pháp dựa trên ADN, cần tách riêng công việc (theo thời gian và/hoặc vật lý) để ngăn ngừa ô nhiễm. Nên thiết kế các khu vực làm việc chuyên dụng/riêng biệt với thiết bị như sau:

- a) khu vực nghiền và đồng hóa mẫu;
- b) khu vực chiết axit nucleic từ nguyên liệu thử nghiệm;
- c) khu vực riêng để cài đặt phản ứng PCR/khuếch đại;
- d) khu vực riêng cho quá trình xử lý tiếp theo, bao gồm phân tích và xác định đặc tính của trình tự ADN đã được khuếch đại, nếu có.

Nếu ADN của người được phát hiện bằng phương pháp này thì cần thực hiện các biện pháp ngăn ngừa ô nhiễm thích hợp (ví dụ: sử dụng khẩu trang, găng tay và áo khoác dùng một lần) để ngăn kết quả dương tính giả do nhiễm ADN của người thực hiện phép thử hoặc người khác trong quá trình phân tích.

Việc phân chia vật lý thông qua việc sử dụng các phòng khác nhau là cách hiệu quả và thích hợp nhất để đảm bảo tách riêng các khu vực làm việc, nhưng có thể sử dụng các phương pháp khác để tránh ô nhiễm, miễn là đạt được hiệu quả tương tự. Cài đặt hệ thống dòng khí và điều hướng sao cho ngăn bụi/amplicon xâm nhập từ các khu vực làm việc có nguy cơ ô nhiễm cao hơn đến các khu vực làm việc có nguy cơ ô nhiễm thấp hơn.

Đối với phép phân tích, chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích thích hợp dùng cho sinh học phân tử, không chứa ADN và DNase, trừ khi có quy định khác. Thuốc thử và dung dịch cần được bảo quản ở nhiệt độ phòng, trừ khi có quy định khác. Thuốc thử PCR cần được bảo quản trong các lọ nhỏ để giảm thiểu nguy cơ ô nhiễm. Nước được sử dụng phải là nước cất hai lần, đã khử ion hoặc nước có

chất lượng tương đương. Các dung dịch được chuẩn bị bằng cách hòa tan thuốc thử thích hợp trong nước và hấp tiệt trùng, trừ khi có quy định khác. Có thể sử dụng các thiết bị lọc vô trùng (cỡ lỗ có thể là 0,22 μm) khi không thể hấp áp lực.

Để tránh ô nhiễm, cần áp dụng kỹ thuật vô trùng trong khu vực cài đặt PCR, ví dụ: cần sử dụng găng tay không phủ bột, dụng cụ bằng chất dẻo đã tiệt trùng, thuốc thử đã hấp áp lực, dụng cụ bằng chất dẻo dùng một lần và được bảo vệ bằng sol khí, cần sử dụng các đầu tip pipet có lọc không chứa ADN/ARN và DNase/RNase.

Nguyên liệu, tất cả các vật chứa và dụng cụ dùng một lần có chứa thuốc thử phải được bảo quản tránh khỏi mọi tác nhân gây ô nhiễm (ví dụ: bụi bẩn).

Cần tuân thủ các khuyến cáo của nhà sản xuất về việc sử dụng thuốc thử. Có thể sử dụng các kiểm chứng thích hợp để đánh giá tính nguyên vẹn của thuốc thử và sự không có mặt của DNase.

Không được có các enzym không mong muốn (ví dụ: exonuclease) có thể gây nhiễu PCR trong quá trình chuẩn bị. Dung dịch đệm phản ứng phải thích hợp cho polymerase được sử dụng.

7.3 Chuẩn bị mẫu và chiết ADN

Cần thử nghiệm mẫu đại diện. Đảm bảo rằng các mẫu thử được sử dụng để chiết ADN đại diện cho mẫu phòng thử nghiệm, chẳng hạn bằng cách đồng hóa mẫu hoặc các phần mẫu thử thích hợp. Lấy ít nhất hai dung dịch mẫu từ mẫu phòng thử nghiệm đã đồng nhất làm các phần mẫu thử để chiết ADN và phân tích tiếp theo.

Nếu có thể, không lấy nguyên liệu mẫu từ bề mặt của mẫu phòng thử nghiệm để giảm thiểu nguy cơ khuếch tán các chất ô nhiễm bám dính.

Nếu phương pháp phân tích được sử dụng cho mẫu phát hiện ADN của người thì cần thực hiện các biện pháp ngăn ngừa ô nhiễm đặc biệt.

Chuẩn bị ADN từ phần mẫu thử, cần tuân thủ các hướng dẫn và biện pháp chung được mô tả trong TCVN 7606 (ISO 21571). Cần xem xét một trong các phương pháp chiết ADN được mô tả trong Phụ lục A, TCVN 7606 (ISO 21571). Ngoài ra, có thể sử dụng các bộ kit thương mại để chiết và tinh sạch ADN.

7.4 Sử dụng kiểm chứng

Thực hiện các kiểm chứng theo Bảng 1 [xem thêm TCVN 7608 (ISO 24276)].

Chuẩn bị kiểm chứng âm ADN đích từ ADN chiết được từ các loài không phải đích phổ biến trong mẫu (ví dụ: đối với phân tích ADN của ngựa trong thịt bò, loài không phải đích là bò).

Bảng 1 – Lưu đồ biểu thị các bước tiến hành đối với các kiểm chứng

Bước kiểm chứng	Kiểm chứng môi trường ^b	Kiểm chứng chiết mẫu trắng ^c	Kiểm chứng chiết dương ^d	Kiểm chứng dương ADN đích ^e	Kiểm chứng âm ADN đích ^f	Kiểm chứng thuốc thử phản ứng PCR ^g	Kiểm chứng chất ức chế PCR ^h
Đồng hóa	Khuyến cáo	—	—	—	—	—	—
Chiết axit nucleic	↓ ^a	Một trên một dây	Bắt buộc ở những khoảng thời gian đều đặn	—	—	—	—
Đánh giá chất lượng axit nucleic	↓	↓	↓	—	—	—	—
Khuếch đại axit nucleic	↓	↓	↓	Bắt buộc	Khuyến cáo	Bắt buộc	Khuyến cáo nhưng bắt buộc trong một số trường hợp cụ thể
Đánh giá kết quả khuếch đại axit nucleic	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Diễn giải	—	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Báo cáo thử nghiệm	—	↓	↓	↓	↓	↓	↓

^a Các mũi tên chỉ ra rằng kiểm chứng này cần được áp dụng trong các bước phân tích tiếp theo.

^b Việc sử dụng các kiểm chứng môi trường giúp phòng thử nghiệm xác định các nguồn gây ô nhiễm ở giai đoạn ban đầu và có thể được sử dụng để xác định khu vực làm việc có ô nhiễm. Điều này có thể được chứng minh bằng nhiều cách khác nhau, ví dụ: nếu các mẫu âm tính trong dây mẫu đồng nhất cho kết quả âm tính thì bắt đầu từ bước đầu tiên của quy trình (ví dụ: bước nghiền nếu liên quan).

^c Ít nhất phải bao gồm một kiểm chứng chiết mẫu trắng cho mỗi lần chiết ADN từ một hoặc nhiều mẫu. Ống kiểm chứng phải luôn là ống cuối cùng trong mỗi dây ống. Có thể thích hợp để đặt một ống chiết mẫu trắng, ví dụ: trên một giá tám ống nghiệm hoặc một đĩa micro gồm 96 giếng để chiết tự động.

^d Phải luôn luôn bao gồm một kiểm chứng chiết dương. Kiểm chứng này cho biết nếu thuốc thử hoặc hiệu năng của quy trình chiết có vấn đề.

^e Kiểm chứng dương ADN đích chứng minh khả năng của quy trình khuếch đại axit nucleic trong việc phát hiện trình tự ADN đích ở số bản sao thấp để khẳng định LOD.

^f Kiểm chứng âm ADN đích chứng minh khả năng của quy trình khuếch đại axit nucleic để tránh khuếch đại dương tính giả trong trường hợp không có trình tự ADN đích.

^g Kiểm chứng thuốc thử phản ứng PCR chứng minh không có mặt axit nucleic nhiễm bẩn trong các lô thuốc thử phản ứng PCR được sử dụng. Có thể bỏ qua kiểm chứng thuốc thử phản ứng PCR khi sử dụng kiểm chứng chiết mẫu trắng.

^h Có thể sử dụng kiểm chứng chất ức chế PCR để chứng minh sự không có mặt của chất ức chế hòa tan. Điều này cũng có thể được chứng minh bằng dây các dung dịch pha loãng axit nucleic mẫu. Tuy nhiên, phải thực hiện một số loại đánh giá ảnh hưởng của các chất ức chế hòa tan đến kết quả phân tích mẫu.

ⁱ Kiểm chứng chất ức chế PCR là bắt buộc, nếu tất cả các phép thử PCR trên mẫu thử đều cho kết quả âm tính.

7.5 Phân tích dữ liệu

7.5.1 Kiểm chứng

Mỗi kiểm chứng phải có một giá trị hợp lệ và nếu kết quả quan sát được đối với mọi kiểm chứng bất kỳ khác với giá trị hợp lệ thì cần lập lại phép phân tích. Các kiểm chứng môi trường có kết quả dương tính phải luôn bắt đầu bằng các biện pháp loại bỏ và ngăn ngừa ô nhiễm môi trường phòng thử nghiệm. Nếu thu được nhiều lần kết quả không hợp lệ đối với mọi biện pháp kiểm soát bất kỳ khác thì cần thực hiện các biện pháp xác định vị trí và loại bỏ/thay thế các nguồn gây lỗi và tiến hành lập lại phân tích. Các kết quả phân tích chỉ được báo cáo khi tất cả các kiểm chứng cho các giá trị hợp lệ và các giá trị hợp lệ đối với các kiểm chứng là như sau:

- kiểm chứng chiết mẫu trắng phải luôn âm tính;
- kiểm chứng chiết dương phải luôn dương tính;
- các kết quả âm tính phải luôn âm tính (kết quả mẫu âm tính là hợp lệ, ngay cả khi kiểm chứng ADN đích âm tính là không hợp lệ, nếu tất cả các kiểm chứng khác đều hợp lệ).
- kiểm chứng dương ADN đích phải luôn dương tính;
- kiểm chứng âm ADN đích phải luôn âm tính;
- kiểm chứng thuốc thử phản ứng PCR phải luôn âm tính;
- kiểm chứng chất ức chế PCR phải không cho thấy ảnh hưởng ức chế đáng kể trong trường hợp các mẫu có kết quả định tính âm tính và đối với các mẫu có kết quả định lượng.

Các kiểm chứng trên phải được sử dụng để diễn giải /báo cáo kết quả mẫu thử.

7.5.2 Phản ứng PCR truyền thống

Các amplicon được tạo ra bằng phản ứng PCR truyền thống phải có độ dài dự kiến (ví dụ: biểu hiện trên gel). Để tránh các kết quả dương tính giả, có thể thực hiện việc kiểm tra xác nhận amplicon thu được bằng cách lai, giải trình tự, phân tích enzym giới hạn hoặc thực hiện phương pháp đặc hiệu kiểm tra xác nhận trình tự thích hợp khác ngoài phép khẳng định độ dài.

CHÚ THÍCH: Phép phân tích nhiệt độ nóng chảy đôi khi được sử dụng để kiểm tra xác nhận amplicon nhưng không đặc hiệu đối với trình tự.

7.5.3 Đường khuếch đại real-time PCR

Các đường khuếch đại real-time PCR cần được kiểm tra trực quan về hình dạng chữ S để loại trừ các hình dạng ảo/kết quả dương tính giả.

CHÚ THÍCH: Phép phân tích nhiệt độ nóng chảy đôi khi được sử dụng để kiểm tra xác nhận amplicon nhưng không đặc hiệu đối với trình tự.

7.6 Biểu thị kết quả

7.6.1 Biểu thị các kết quả dương tính

Các kết quả được mô tả để cho thấy phát hiện ADN có nguồn gốc từ đích.

VÍ DỤ: Đối với chất phân tích đích X, phát hiện sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ (trình tự đích đặc hiệu và nhóm các loài hoặc nhóm phân loại động vật).

CHÚ THÍCH: Phạm vi của phép phân tích này chỉ cho thấy sự có mặt/không có mặt ADN của các loài động vật được định danh, không cho thấy sự có mặt hay không có mặt của mô các loài động vật đó (ví dụ: ADN có nguồn gốc từ trứng, gelatin).

Các kết quả đối với tất cả các phần mẫu thử của một mẫu trong một lần phân tích phải nhất quán. Khi ít nhất một phần mẫu thử cho kết quả dương tính và ít nhất một phần mẫu thử cho kết quả âm tính thì phải lặp lại phép phân tích PCR.

Nếu các kết quả PCR của lần phân tích thứ hai đối với tất cả các phần mẫu thử không giống nhau thì cần lặp lại quá trình chiết ADN và phân tích PCR.

Nếu ít nhất hai lần lặp lại quy trình (bắt đầu từ quá trình chiết ADN) cho kết quả không rõ ràng là kết quả dương tính và âm tính, thì báo cáo phải nêu rõ mẫu thử là âm tính ở giới hạn phát hiện.

Kết quả phải đưa ra độ đặc hiệu (nhóm các loài hoặc nhóm hoặc các nhóm phân loại) và đích (nhân, ty thể hoặc loại khác) của phương pháp cho phép diễn giải rõ ràng và có thể so sánh được các kết quả.

7.6.2 Biểu thị các kết quả âm tính

Các kết quả âm tính được mô tả cho thấy không phát hiện được ADN có nguồn gốc từ đích.

VÍ DỤ: Đối với chất phân tích đích X, không phát hiện được ADN có nguồn gốc từ loài động vật cụ thể.

7.6.3 Biểu thị các kết quả định lượng

Kết quả của các phương pháp định lượng phải có đơn vị đo.

Xem ví dụ trong Phụ lục B.

Kết quả phải đưa ra độ không đảm bảo đo cũng như các cách hiệu chuẩn và phương pháp tính được sử dụng, nếu thích hợp.

Giải thích khả năng áp dụng của kết quả đo liên quan đến phần trăm khối lượng của các loài đích trong mẫu.

8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm tham khảo TCVN ISO/IEC 17025 (ISO/IEC 17025) và ít nhất bao gồm các nội dung sau:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết mẫu thử;
- viện dẫn đến tiêu chuẩn này và các phụ lục tương ứng kèm theo;
- ngày và loại quy trình lấy mẫu được sử dụng (nếu biết);
- ngày nhận mẫu;
- ngày bắt đầu/kết thúc phân tích, nếu có;
- tổ chức chịu trách nhiệm phân tích;
- đơn vị đo và phương pháp đo, nếu có;
- phần mẫu thử được sử dụng để phân tích;
- kết quả theo yêu cầu của phương pháp đặc hiệu và theo quy định trong Điều 6;
- các phương pháp và hệ thống được sử dụng;
- LOD của phương pháp phân tích như LOD_{rel} và/hoặc LOD_{abs} đối với các kết quả định tính;
- LOQ thực tế đối với các kết quả định lượng;
- bất kỳ sự quan sát bất thường nào trong thử nghiệm;
- bất kỳ sự sai lệch nào, thêm vào hoặc bớt đi so với quy định thử nghiệm.

Thông tin phải được đưa ra cùng với đơn vị đo.

Theo yêu cầu, độ không đảm bảo đo và mức độ tin cậy của phép đo tính bằng cùng đơn vị đo phải được cung cấp cho người sử dụng kết quả (ví dụ %).

Phụ lục A
(Tham khảo)

Danh sách các loài điển hình được sử dụng để thử nghiệm độ chọn lọc mục tiêu
và độ chọn lọc loại trừ

Các loài điển hình được sử dụng để thử nghiệm độ chọn lọc mục tiêu và độ chọn lọc loại trừ được liệt kê trong Bảng A.1 đến Bảng A.8.

Bảng A.1 – Ví dụ về các loài động vật có vú liên quan

Số thứ tự	Tên tiếng Việt	Tên Latinh
1	Linh dương nhày	<i>Antidorcas marsupialis</i>
2	Cá voi Minke	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>
3	Cá voi Minke Nam cực	<i>Balaenoptera bonaerensis</i>
4	Cá voi Sei	<i>Balaenoptera borealis</i>
5	Cá voi Bryde	<i>Balaenoptera edeni</i>
6	Cá voi vây (cá voi lưng xám)	<i>Balaenoptera physalus</i>
7	Cá voi mõm khoằm Arnoux	<i>Barardius arnuxii</i>
8	Cá voi mõm khoằm Baird	<i>Barardius bairdii</i>
9	Bò bison	<i>Bison bison</i>
10	Bò hoang Tây Tạng	<i>Bos mutus</i>
11	Bò nhà	<i>Bos taurus</i>
12	Trâu	<i>Bubalus bubalis</i>
13	Lạc đà hai bướu	<i>Camelus bactrianus</i>
14	Lạc đà một bướu	<i>Camelus dromedarius</i>
15	Chó nhà	<i>Canis lupus familiaris</i>
16	Dê	<i>Capra hircus</i>
17	Hoẵng châu Âu	<i>Capreolus capreolus</i>
18	Hươu đỏ	<i>Cervus elaphus</i>
19	Hươu sao	<i>Cervus nippon</i>
20	Linh dương đầu bò	<i>Connochaetes spp.</i>
21	Hươu hoang	<i>Dama dama</i>
22	Lừa	<i>Equus asinus</i>
23	Ngựa	<i>Equus caballus</i>
24	Mèo	<i>Felis catus</i>
25	Cá voi hoa tiêu vây ngắn	<i>Globicephala macrorhynchus</i>
26	Người	<i>Homo sapiens</i>
27	Chuột lang nước	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>
28	Thỏ rừng châu Âu	<i>Lepus europaeus</i>
29	Chuột túi đỏ	<i>Macropus rufus</i>

Bảng A.1 (kết thúc)

Số thứ tự	Tên tiếng Việt	Tên Latinh
30	Thỏ châu Âu	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
31	Linh dương Gemsbok	<i>Oryx gazelle</i>
32	Cừu	<i>Ovis aries</i>
33	Cá nhà táng	<i>Physeter catodon</i>
34	Cá heo Dall	<i>Phocoenoides dalli</i>
35	Chuột nâu	<i>Rattus norvegicus</i>
36	Sơn dương Chamois	<i>Rupicapra rupicapra</i>
37	Cá heo sọc	<i>Stenella coeruleoalba</i>
38	Lợn nhà	<i>Sus scrofa domesticus</i>
39	Lợn rừng	<i>Sus scrofa scrofa</i>
40	Linh dương Kudu lớn	<i>Tragelaphus strepsiceros</i>
41	Cá heo mũi chai	<i>Tursiops truncatus</i>

Bảng A.2 – Ví dụ về các loài chim có liên quan

Số thứ tự	Tên tiếng Việt	Tên Latinh
1	Vịt cổ xanh	<i>Anas platyrhynchos</i>
2	Ngỗng xám	<i>Anser anser</i>
3	Ngan bướu mũi	<i>Cairina moschata</i>
4	Bò câu núi	<i>Columba livia</i>
5	Chim cút thường	<i>Coturnix coturnix</i>
6	Gà rừng lông đỏ	<i>Gallus gallus</i>
7	Gà tây	<i>Meleagris gallopavo</i>
8	Gà sao	<i>Numida meleagris</i>
9	Đà điểu châu Phi	<i>Struthio camelus</i>

Bảng A.3 – Ví dụ về các loài bò sát có liên quan

Số thứ tự	Tên tiếng Việt	Tên Latinh
1	Cá sấu sông Nile	<i>Crocodylus niloticus</i>
2	Cá sấu hoa cà (cá sấu nước mặn)	<i>Crocodylus porosus</i>

Bảng A.4 – Ví dụ về các loài lưỡng cư có liên quan

Số thứ tự	Tên tiếng Việt	Tên Latinh
1	Cóc bò	<i>Leptodactylus pentadactylus</i>
2	Ếch ương beo	<i>Rana catesbeiana</i>
3	Ếch xanh	<i>Pelophylax esculentus</i>
4	Ếch Ấn Độ	<i>Hoplobatrachus tigerinus</i>

Bảng A.5 – Ví dụ về các loài cá có liên quan

Số thứ tự	Tên tiếng Việt	Tên Latinh
1	Cá chình châu Âu	<i>Anguilla anguilla</i>
2	Cá chình Nhật Bản	<i>Anguilla japonica</i>
3	Cá hồng	<i>Beryx splendens</i>
4	Cá trích Đại Tây Dương	<i>Clupea harengus</i>
5	Cá trích Thái Bình Dương	<i>Clupea pallasii</i>
6	Cá thu đao	<i>Cololabis saira</i>
7	Cá cơm Argentina	<i>Engraulis anchoita</i>
8	Cá cơm châu Âu	<i>Engraulis encrasicolus</i>
9	Cá cơm Nhật Bản	<i>Engraulis japonicus</i>
10	Cá cơm California	<i>Engraulis mordax</i>
11	Cá cơm Peru	<i>Engraulis ringens</i>
12	Cá minh thái Alaska	<i>Gadus chalcogrammus</i>
13	Cá tuyết Thái Bình Dương	<i>Gadus macrocephalus</i>
14	Cá tuyết Đại Tây Dương	<i>Gadus morhua</i>
15	Cá tuyết Greenland	<i>Gadus ogac</i>
16	Cá bơn lưỡi ngựa Đại Tây Dương	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>
17	Cá bơn lưỡi ngựa Thái Bình Dương	<i>Hippoglossus stenolepis</i>
18	Cá cờ sọc	<i>Kajikia audax</i>
19	Cá ngừ vằn	<i>Katsuwonus pelamis</i>
20	Cá vược Nhật Bản	<i>Lateolabrex japonicus</i>
21	Cá chày vàng	<i>Lophius litulon</i>
22	Cá hồi lưng gù (cá hồi hồng)	<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>
23	Cá hồi Coho (cá hồi bạc)	<i>Oncorhynchus kisutch</i>
24	Cá hồi Chinook (cá hồi vua)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>
25	Cá hồi Chum (cá hồi chó)	<i>Oncorhynchus keta</i>
26	Cá hồi Masu	<i>Oncorhynchus masou masou</i>
27	Cá hồi vân	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
28	Cá hồi đỏ	<i>Oncorhynchus nerka</i>
29	Cá tráp đỏ Nhật Bản	<i>Pagrus major</i>
30	Cá bơn olive (cá bơn vôi)	<i>Paralichthys olivaceus</i>
31	Cá bơn vàng	<i>Pseudopleuronectes herzensteini</i>
32	Cá bơn lưỡi ngựa Greenland	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>
33	Cá hồi Đại Tây Dương	<i>Salmo salar</i>
34	Cá mòi Nhật Bản	<i>Sardinops melanostictus</i>
35	Cá mòi Thái Bình Dương	<i>Sardinops sagax</i>
36	Cá thu lam (cá nục hoa)	<i>Scomber australasicus</i>
37	Cá sa ba	<i>Scomber japonicus</i>
38	Cá thu Đại Tây Dương	<i>Scomber scombrus</i>
39	Cá hồ	<i>Sebastiscus marmoratus</i>

Bảng A.5 (kết thúc)

Số thứ tự	Tên tiếng Việt	Tên Latinh
40	Cá cam sọc	<i>Seriola dumerili</i>
41	Cá cam sọc vàng	<i>Seriola lalandi</i>
42	Cá cam Nhật Bản	<i>Seriola quinqueradiata</i>
43	Cá trứng Nhật Bản	<i>Spirinchus lanceolatus</i>
44	Cá nóc hổ	<i>Takifugu rubripes</i>
45	Cá ngừ vây dài	<i>Thunnus alalunga</i>
46	Cá ngừ vây vàng	<i>Thunnus albacares</i>
47	Cá ngừ vây xanh phương Nam	<i>Thunnus maccoyii</i>
48	Cá ngừ mắt to	<i>Thunnus obesus</i>
49	Cá ngừ vây xanh Thái Bình Dương	<i>Thunnus orientalis</i>
50	Cá ngừ Đại Tây Dương	<i>Thunnus thymus</i>
51	Cá sông Nhật Bản	<i>Trachurus japonicus</i>
52	Cá sông Đại Tây Dương	<i>Trachurus trachurus</i>
53	Cá tuyết lưng nâu	<i>Trisopterus luscus</i>
54	Cá kiếm	<i>Xiphias gladius</i>

Bảng A.6 – Ví dụ về động vật thân mềm có liên quan

Số thứ tự	Tên tiếng Việt	Tên Latinh
1	–	<i>Amphioctopus fangsiao</i>
2	Bạch tuộc khổng lồ Thái Bình Dương	<i>Enteroctopus dofleini</i>
3	Mực ống	<i>Heterololigo bleekeri</i>
4	Bạch tuộc thông thường	<i>Octopus vulgaris</i>
5	Mực lá	<i>Sepioteuthis lessoniana</i>
6	Mực ống Nhật bản	<i>Todarodes pacificus</i>
7	Mực đom đóm	<i>Watasenia scintillans</i>

Bảng A.7 – Ví dụ về các loài giáp xác có liên quan

Số thứ tự	Tên tiếng Việt	Tên Latinh
1	Cua Tanner	<i>Chionoecetes bairdi</i>
2	Cua tuyết đỏ	<i>Chionoecetes japonicus</i>
3	Cua tuyết	<i>Chionoecetes opilio</i>
4	Tôm Shiba	<i>Metapenaeus joyneri</i>
5	Tôm chì Alaska	<i>Pandalus eous</i>
6	Tôm rồng Nhật Bản	<i>Pamlirus japonicus</i>
7	Cua Alaska	<i>Paralithodes camtschatica</i>
8	Cua hoàng đế xanh	<i>Paralithodes platypus</i>
9	Tôm sú	<i>Penaeus mondon</i>

Bảng A.8 – Ví dụ về côn trùng có liên quan

Số thứ tự	Tên tiếng Việt	Tên Latinh
1	Họ Rệp bướt thông	<i>Adelgidae</i>
2	Họ Rệp muội	<i>Aphididae</i>
3	Họ Ngải đèn	<i>Arctiidae</i>
4	Họ Gián	<i>Blattellinae</i>
5	Họ Gián thường	<i>Blattidae</i>
6	Họ Ruồi xanh (họ Nhặng)	<i>Calliphoridae</i>
7	Họ Chân chạy	<i>Carabidae</i>
8	Họ Dĩn	<i>Ceratopogonidae</i>
9	Họ Muỗi chỉ hồng	<i>Chironomidae</i>
10	Họ Ánh kim (họ Cánh cứng ăn lá)	<i>Chrysomelidae</i>
11	Họ Bộ cánh gân	<i>Chrysopidae</i>
12	Họ Ve sầu	<i>Cicadidae</i>
13	Họ Bộ cánh cứng phẳng	<i>Cucujidae</i>
14	Họ Muỗi	<i>Culicidae</i>
15	Họ Bộ vòi voi	<i>Curculionidae</i>
16	–	<i>Dermestidae</i>
17	Họ Ruồi giấm	<i>Drosophilidae</i>
18	Họ Bò cũi	<i>Elateridae</i>
19	Họ Cánh da đuôi kim	<i>Forficulidae</i>
20	Họ Kiến	<i>Formicidae</i>
21	Họ Dế mèn	<i>Gryllidae</i>
22	–	<i>Latridiidae</i>
23	Họ Chuồn chuồn ngô	<i>Libellulidae</i>
24	–	<i>Monotomidae</i>
25	Họ Ruồi nhà	<i>Muscidae</i>
26	Họ Ruồi ăn nấm	<i>Mycetophilidae</i>
27	Họ Bộ có đuôi	<i>Nitidulidae</i>
28	Họ Ngải đêm (họ Bướm cú đêm)	<i>Noctuidae</i>
29	Họ Ngải thiên xã	<i>Notodontidae</i>
30	Họ Bộ xít năm đốt râu	<i>Pentatomidae</i>
31	Họ Ruồi lưng gù	<i>Phoridae</i>
32	Họ Rệp bướt nhỏ	<i>Phylloxeridae</i>
33	Họ Ruồi nhỏ	<i>Piophilidae</i>
34	Bộ Rệp sáp (bộ Mọt)	<i>Psocoptera</i>
35	Họ Ruồi cống (họ Ruồi cánh bướm)	<i>Psychodidae</i>
36	Họ Ngải sáng	<i>Pyalidae</i>
37	Họ Ruồi xám	<i>Sarcophagidae</i>
38	Họ Ruồi đen	<i>Stratiomyidae</i>
39	Họ Ruồi ăn rệp	<i>Syrphidae</i>
40	Họ Chân bò	<i>Tenebrionidae</i>
41	Họ Ruồi đục quả	<i>Tephritidae</i>
42	Họ Ruồi sếu mùa đông	<i>Trichoceridae</i>
43	Họ Ong	<i>Vespinae</i>
44	Họ Ngải sủi	<i>Zygaenidae</i>

Phụ lục B

(Tham khảo)

Ví dụ về các phương pháp chuyển đổi đơn vị từ số bản sao ADN sang tỷ lệ khối lượng

B.1 Yêu cầu chung

Phụ lục này đưa ra các ví dụ về các phương pháp chuyển đổi đơn vị từ số bản sao ADN sang tỷ lệ khối lượng.

Các ví dụ sau được coi là các phương pháp đã chuẩn hóa, tuy nhiên, việc ước lượng có nhiều khả năng chứa độ không đảm bảo do hàm lượng ADN khác nhau trên mỗi khối lượng tương đương trong các mô và mức độ xử lý khác nhau.

B.2 Ví dụ về việc chuyển đổi kết quả đo được biểu thị bằng tỷ lệ số bản sao ADN sang tỷ lệ khối lượng sử dụng mẫu chuẩn

Xem Tài liệu tham khảo [6].

Tỷ lệ số bản sao ADN thu được trong thử nghiệm định lượng có thể được chuyển đổi sang tỷ lệ khối lượng bằng cách sử dụng các mẫu chuẩn (RM).

Khi xác định được từng giá trị cụ thể của các hệ số chuyển đổi đối với từng RM có sẵn và các lô mẫu chuẩn, thì kết quả chuyển đổi được biểu thị bằng tỷ lệ khối lượng còn lại có thể truy xuất được và có thể so sánh với kết quả được biểu thị bằng tỷ lệ số bản sao.

Có thể sử dụng RM không có số bản sao ADN hoặc giá trị khối lượng ADN đối với thịt được quy định làm nền mẫu.

Tính phần khối lượng của hệ số chuyển đổi (CF) bằng Công thức (B.1):

$$F_c = \frac{C_n}{M_n} \quad (B.1)$$

Trong đó:

F_c là giá trị của hệ số chuyển đổi;

C_n là số bản sao của các loài động vật đích hoặc nhóm phân loại trong mẫu chuẩn;

M_n là khối lượng mẫu chuẩn của các loài động vật đích hoặc nhóm phân loại.

TCVN 13841:2023

Vì cơ sở để đo số bản sao đích trong cùng một nền mẫu được sử dụng để tính CF, do đó, ví dụ về công thức tính % đích (phần khối lượng) nêu trong Công thức B.2:

$$T = \frac{C_s}{M_s} \times \frac{1}{F_c} \times 100 \quad (\text{B.2})$$

Trong đó:

T là phần trăm khối lượng của các loài đích trong nền mẫu;

C_s là số bản sao của các loài động vật đích được đo theo các yêu cầu, bao gồm các loài được mô tả trong 4.8;

M_s là khối lượng của toàn bộ mẫu để phân tích.

Độ không đảm bảo của hệ số chuyển đổi được sử dụng kết hợp với độ không đảm bảo đo. Số lượng ADN thay đổi tùy thuộc vào loại thịt và các phần thịt, điều quan trọng là phải ước tính độ không đảm bảo bằng cách xem xét.

B.3 Ví dụ về phép định lượng tương đối hàm lượng nguyên liệu có nguồn gốc từ các loài động vật trong các sản phẩm thịt

B.3.1 Kết quả phân tích được báo cáo theo phần khối lượng

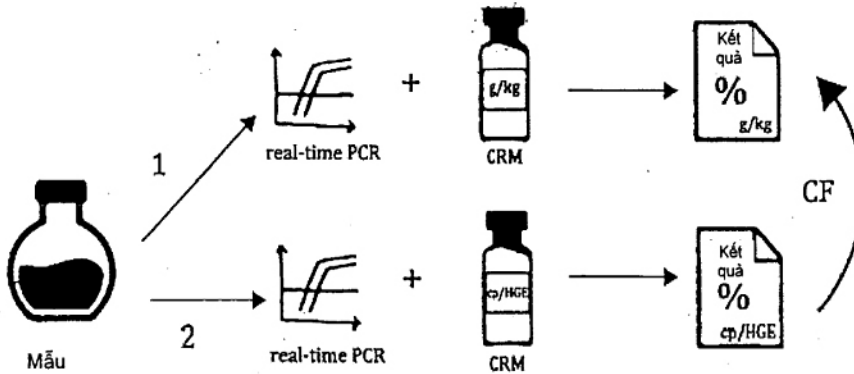
Việc biểu thị kết quả phân tích định lượng theo phần khối lượng là một cách tiếp cận phổ biến trong nhiều lĩnh vực (GMO, các chất gây dị ứng, v.v...) sử dụng công nghệ dựa trên ADN, nếu không kết quả không được hầu hết các nhà chuyên môn/chuyên gia đánh giá/cơ quan quản lý thực phẩm chấp nhận/sử dụng. Thực tế, không có mối quan hệ định lượng nhất quán giữa số bản sao ADN và hàm lượng thịt của một mẫu, do đó, ví dụ về việc chuyển đổi được nêu trong EUR 28536 EN^[11]. Tiêu chuẩn này tóm tắt các nội dung chính về cách so sánh và thiết lập các kết quả có thể truy nguyên trong hệ thống đo lường từ các phép đo phản ứng chuỗi polymerase thời gian thực (real-time PCR), nếu dữ liệu được gắn với giá trị đã được chứng nhận của mẫu chuẩn.

Do thiếu CRM để thử nghiệm các loài động vật, thường áp dụng kế hoạch thay thế trong các phòng thử nghiệm kiểm soát chính thức, sử dụng các nguyên liệu đã được hiệu chuẩn khối lượng [ví dụ: mẫu chuẩn hỗn hợp thịt được chuẩn bị theo TCVN ISO 17034 (ISO 17034), hoặc thực phẩm mô phỏng được tạo thành trong các điều kiện xác định/được kiểm soát, xem thêm tùy chọn 1 trong Hình B.1). Các loại nguyên liệu khác nhau có thể được sử dụng để thu được các đường chuẩn đối với real-time PCR. Các nguyên liệu phổ biến nhất là các dung dịch ADN của bộ gen (gADN) hoặc ADN plasmid (pADN). Tuy nhiên, người phân tích có thể quyết định chiết gADN từ các nguyên liệu được tạo thành từ các hỗn hợp nguyên liệu động vật khác nhau đã được chỉnh về hàm lượng khối lượng yêu cầu.

B.3.2 Chuyển đổi kết quả đo được biểu thị bằng số bản sao trên mỗi bộ gen đơn bội tương đương (cp/HGE) sang phần khối lượng

B.3.2.1 Yêu cầu chung

Cần chuyển đổi kết quả đo thu được bằng real-time PCR sử dụng chất hiệu chuẩn, được biểu thị bằng số bản sao trên mỗi bộ gen đơn bội tương đương (cp/HGE) sang phần khối lượng. Tổng quan về các khả năng thay đổi để đo hàm lượng động vật có trong mẫu được thể hiện trong Hình B.1.



CHÚ THÍCH 1: Trong tùy chọn 1, hàm lượng động vật được xác định bằng real-time PCR sử dụng CRM hoặc nguyên liệu tương đương (ví dụ: mẫu mô phỏng) được chỉnh theo phần khối lượng dùng làm chất hiệu chuẩn. Các kết quả được biểu thị bằng phần khối lượng (g/kg) hoặc % khối lượng.

CHÚ THÍCH 2: Trong tùy chọn 2, hàm lượng động vật được xác định bằng real-time PCR sử dụng nguyên liệu hiệu chuẩn để xác định số bản sao. Các kết quả thu được (tính bằng cp/HGE) được chuyển đổi thành phần khối lượng (g/kg), sử dụng CF.

CHÚ THÍCH 3: Được điều chỉnh theo Tài liệu tham khảo [11] có sửa đổi.

Hình B.1 – Tổng quan về các khả năng thay đổi để đo hàm lượng nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật có trong một mẫu

Sử dụng phương pháp định lượng tương đối, phân tích ADN phân lập bằng ít nhất hai hệ thống real-time PCR đối với các gen đích đơn lẻ: phân tích real-time PCR đặc hiệu đối với các loài để xác định hàm lượng ADN của động vật cần phân tích và phân tích real-time PCR chuẩn để xác định lượng ADN động vật tổng số (ví dụ: gen myostatin, sự kết hợp của các hệ thống đơn mồi để tổng hợp lượng ADN tổng số của động vật có vú và gia cầm). Cả hai phép phân tích real-time PCR đều được hiệu chuẩn. Các đường cong hiệu chuẩn thu được bằng cách dựng đồ thị logarit của nồng độ ADN so với giá trị chu kỳ định lượng (C_q) tương ứng. Sau khi thiết lập các đường chuẩn cho cả hai phép phân tích PCR, sử dụng đường hồi quy tuyến tính, lượng ADN tổng số của động vật có vú và gia cầm trong mẫu được xác định và tính tỷ lệ phần trăm của động vật cụ thể.

ADN của tất cả các loài động vật, động vật có vú và gia cầm có thể được chiết với hiệu quả xấp xỉ như nhau.

Để đánh giá khả năng áp dụng của phương pháp định lượng, cần phân tích và tính độ thu hồi của các kiểm chứng định lượng dương tính với thành phần đã biết. Nền mẫu và thành phần của các kiểm chứng định lượng dương tính được xem xét tương tự như mẫu.

VÍ DỤ: Pha loãng ADN trong phân tích PCR gen tham chiếu đích (ví dụ: myostatin) trong dung dịch đệm hoặc nước không chứa nuclease (ví dụ: các dung dịch pha loãng có nồng độ từ 150 ng ADN/PCR đến 1 ng ADN/PCR được sử dụng để dựng đường chuẩn cho gen tham chiếu). Để dựng đường chuẩn cho ADN đích của động vật, sử dụng 150 ng ADN/PCR chiết được từ nguyên liệu mô phỏng có chứa lượng giảm dần của động vật đích (ví dụ: sử dụng từ 50 g/kg đến 1 g/kg). Lượng ADN đích trong phép phân tích được chiết từ nguyên liệu mô phỏng có chứa 50 g/kg động vật đích (tương ứng với phần khối lượng là 5 %) cũng được coi là 5 % số bản sao ADN đích (nghĩa là 7,5 ng ADN đích trên mỗi phản ứng PCR tốt cho phản ứng chứa 150 ng ADN). Tỷ lệ gần đúng tương tự cũng thu được đối với mẫu chuẩn khác có chứa phần khối lượng nhỏ hơn của gen đích động vật hoặc gen tham chiếu. Lượng (hoặc nồng độ tính bằng %) ADN đích của động vật và ADN gen tham chiếu trong dung dịch ADN chiết được từ mẫu chưa xác định sau đó được tính bằng cách chuyển đổi các giá trị C_q đo được thành các giá trị khối lượng sử dụng hai đường chuẩn và phân chia chúng. Phần khối lượng động vật (động vật đích so với gen tham chiếu đích) cuối cùng được nhân với 100 để biểu thị kết quả dưới dạng phần trăm.

Các phương pháp đã được công bố để định lượng tương đối hàm lượng các loài động vật trong các sản phẩm thịt được nêu trong Bảng B.1.

Bảng B.1 – Phương án định lượng dựa trên real-time PCR

Phương án định lượng dựa trên real-time PCR	Hiệu chuẩn		Biểu thị kết quả bằng	Tài liệu	
	Chất hiệu chuẩn	Đơn vị			
Phương pháp đường chuẩn sử dụng gen tham chiếu	Hỗn hợp ADN (tính số bản sao)	cp/μl	% ADN (tỷ lệ số bản sao)	Laube et al. (2007) ^[22] Iwobi et al. (2015) ^[18]	Kaltenbrunner et al. (2018) ^[19] Kaltenbrunner et al. (2018) ^[20]
	Hỗn hợp ADN	ng/μl	% ADN (phần khối lượng)	Druml et al. (2015) ^[15]	
	Chất chiết thịt (hỗn hợp lysate)	ng/μl	% ADN (phần khối lượng)		
	Hỗn hợp thịt	ng/μl	% ADN (phần khối lượng)	Druml et al. (2016) ^[16]	
	Nền mẫu mô phỏng	ng/μl	% ADN (phần khối lượng)		
Phương pháp đường chuẩn sử dụng phương pháp đã chuẩn hóa	Hỗn hợp ADN	ng/μl	% ADN (phần khối lượng)	Köppel et al. (2012) ^[21] BVL L 08.00-61 ^[13] BVL L 08.00-62 ^[14]	
	Nền mẫu mô phỏng	ng/μl	% ADN (phần khối lượng)	Eugster et al. (2009) ^[17]	

B.3.2.2 Ví dụ: Định lượng tương đối dựa trên gen tham chiếu (phương pháp đường chuẩn)

B.3.2.2.1 Khuếch đại PCR đơn mỗi các trình tự đích đặc hiệu của loài và trình tự đích nội sinh của động vật phổ cập (gen tham chiếu) dựa trên các phép tính số bản sao.

Cách tiến hành:

- ADN của bộ gen được chiết từ các mẫu mô cơ của các loài (mẫu đối chứng) và đo nồng độ ADN (tính bằng ng/μl) (bằng máy Nanodrop, PicoGreen, v.v...) hoặc sử dụng ADN plasmid làm chuẩn hiệu chuẩn;
- chạy PCR đơn mỗi đối với các loài đích và động vật đích phổ cập cùng các ADN hiệu chuẩn (ít nhất bốn chuẩn với các dung dịch pha loãng ADN và bộ gen tương đương cho mỗi phản ứng với số lượng xác định, ví dụ: 156 250, 31 250, 6 250, 1 250, 250, 50) và ADN mẫu;
- sử dụng giá trị C_q của các chuẩn cho đường chuẩn, giá trị C_q của mẫu để tính nồng độ đặc hiệu của loài (số bản sao/μl);
- số bản sao được tạo thành đối với mỗi loài được ngoại suy dựa vào số bản sao tính được đối với gen tham chiếu của động vật phổ cập, để đưa ra tỷ lệ loài x hoặc loài y, v.v...

Công thức (cho từng loài đích PCR):

$$P_x = \frac{C_{sx} \times 100}{C_r}$$

$$P_y = \frac{C_{sy} \times 100}{C_r}$$

Trong đó:

P_x là phần trăm của loài đích X;

P_y là phần trăm của loài đích Y;

C_{sx} là số bản sao của loài đích X, tính bằng (cp/μl);

C_{sy} là số bản sao của loài đích Y, tính bằng (cp/μl);

C_r là số bản sao của gen tham chiếu phổ cập (cp/μl).

Ví dụ về kích thước bộ gen của một số loài được liệt kê trong Bảng B.2.

Bảng B.2 – Kích thước bộ gen để tính số bản sao bộ gen

Loài	Cặp base	Kích thước bộ gen (pg)
Bò	$3,65 \times 10^9$	4,00
Lợn	$3,11 \times 10^9$	3,41
Cừu	$3,25 \times 10^9$	3,56
Dê	$3,20 \times 10^9$	3,51
Gà	$1,25 \times 10^9$	1,37
Gà tây	$1,68 \times 10^9$	1,84
Vịt	$1,54 \times 10^9$	1,69

Để biết thêm thông tin, xem Tài liệu tham khảo [18] và [22].

B.3.2.2.2 Khuếch đại PCR đa mồi hoặc đơn mồi trình tự đích đặc hiệu của loài và trình tự đích nội sinh của loài động vật phổ cập (gen tham chiếu, trong PCR đơn mồi) dựa vào ADN được khuếch đại (ng/μl).

Cách tiến hành:

- hiệu chuẩn:
 - hỗn hợp ADN: chiết ADN của bộ gen từ các mẫu mô cơ của loài (mẫu đối chứng) và đo nồng độ ADN (tính bằng ng/μl) (bằng máy Nanodrop, PicoGreen, v.v...) hoặc sử dụng ADN plasmid với các đích đặc hiệu đối với các loài khác nhau; ADN bộ gen hoặc ADN plasmid được pha loãng đến cùng nồng độ và được trộn theo tỷ lệ thích hợp;
 - hỗn hợp lysis (hiệu chuẩn chất chuẩn đáp ứng với mẫu);
 - phân giải (đệm CTAB + proteinase K) của các mẫu mô cơ (mẫu thịt chuẩn nguyên chất, ví dụ 1 g);
 - sau khi phân giải, lysis được trộn theo tỷ lệ thích hợp (phần thể tích), chiết ADN (quy trình chiết nguyên liệu hiệu chuẩn và mẫu là giống nhau); bằng cách mô phỏng thành phần của mẫu đã thử nghiệm loại bỏ các ảnh hưởng của PCR đặc hiệu của loài;
 - đo nồng độ ADN (tính bằng ng/μl) (ví dụ: máy Nanodrop, PicoGreen);
- hỗn hợp thịt: thịt được cân và trộn theo các tỷ lệ thích hợp (phần khối lượng) trước khi phân giải và chiết ADN; đo nồng độ của ADN thu được (ng/μl);
- hỗn hợp hiệu chuẩn được pha loãng thành từng dãy trong nước (ít nhất bốn chuẩn với dãy dung dịch pha loãng ADN và nồng độ ADN xác định được tính bằng ng/μl, ví dụ: bắt đầu với 20 ng/μl và phân tích với tỷ lệ 1:4, 1:16, 1:64, 1: 256, 1:1 024 và 1:4 096) và được sử dụng để hiệu chuẩn cả hai hệ thống PCR, phân tích PCR đặc hiệu của loài và phân tích PCR chuẩn;

- mẫu: ADN của nguyên liệu mẫu được chiết theo quy trình tương tự như hỗn hợp hiệu chuẩn, nồng độ ADN (tính bằng ng/μl) được xác định (bằng Nanodrop, PicoGreen, v.v.); mẫu được phân tích bằng cả hai hệ thống PCR, phân tích PCR đặc hiệu của loài và phân tích PCR chuẩn;
- dựng đồ thị các giá trị C_q thu được trong hệ thống PCR đặc hiệu của loài và hệ thống PCR chuẩn dựa trên logarit của nồng độ ADN; các đường chuẩn đối với phép phân tích PCR đặc hiệu của loài và phép phân tích PCR chuẩn thu được bằng phương pháp hồi quy tuyến tính;
- sử dụng các giá trị C_q thu được trong phân tích PCR đối với các loài cụ thể và phân tích PCR chuẩn cho một mẫu để tính nồng độ ADN đặc hiệu của loài (ng/μl) và nồng độ ADN tổng số (ng/μl); tính phần trăm của động vật cần phân tích.

Công thức:

$$C_{DS} = 10^{\frac{C_{q_{spec}} - d_{spec}}{S_{spec}}}$$

$$C_{DT} = 10^{\frac{C_{q_{ref}} - d_{ref}}{S_{ref}}}$$

$$C = \frac{C_{DS}}{C_{DT}} \times 100$$

Trong đó:

C_{DS} là nồng độ của ADN đặc hiệu, tính bằng nanogam trên microlit (ng/μl);

C_{DT} là nồng độ của ADN tổng số, tính bằng nanogam trên microlit (ng/μl);

$C_{q_{spec}}$ là giá trị C_q nhận được sử dụng đặc hiệu của loài;

$C_{q_{ref}}$ là giá trị C_q nhận được sử dụng phép phân tích;

d_{spec} là điểm giao nhau các đường chuẩn của phép phân tích PCR đặc hiệu của loài;

d_{ref} là điểm giao nhau các đường chuẩn của phép phân tích real-time PCR chuẩn;

S_{spec} là độ dốc các đường chuẩn của phân tích phép PCR đặc hiệu của loài;

S_{ref} là độ dốc các đường chuẩn của phân tích real-time PCR chuẩn;

C là phần trăm hàm lượng của các loài đặc hiệu.

Để biết thêm thông tin, xem Tài liệu tham khảo [15], [16], [19] và [20].

B.3.2.3 Ví dụ: Định lượng tương đối % ADN được khuếch đại (ng/μl) sử dụng phương pháp chuẩn hóa

Khuếch đại PCR song song (PCR đa môi) trình tự đích đặc hiệu của loài và định lượng tương đối được mô tả như sau.

Cách tiến hành:

- chiết ADN từ các mẫu mô cơ của các loài (mẫu đối chứng) và đo nồng độ ADN (tính bằng ng/μl) (bằng máy Nanodrop, PicoGreen, v.v...);
- chuẩn bị các hỗn hợp ADN (ng/μl) với khối lượng ADN tương đối khác nhau để sử dụng làm các chuẩn hiệu chuẩn;
- chạy PCR đa môi với các ADN hiệu chuẩn (ít nhất bốn chuẩn, mỗi chuẩn của các loài có nồng độ nằm trong khoảng từ 20 ng/μl đến 0,02 ng/μl) và ADN mẫu;
- các giá trị C_q của các chuẩn dùng cho đường chuẩn, một giá trị dùng cho mỗi loài động vật có trong hỗn hợp ADN hiệu chuẩn;
- các giá trị C_q của mẫu được sử dụng để tính nồng độ ADN đặc hiệu của loài (ng/μl); tổng ADN của tất cả các loài được xác định bằng cách tính tổng lượng thu được đối với mỗi loài đích bằng phân tích PCR đa môi;
- tính phần trăm của động vật cần phân tích.

Công thức (cho từng loài đích PCR):

$$P = \frac{M_s \times 100}{M_t}$$

Trong đó:

P là tỷ số giữa ADN của các loài đích và tổng ADN của tất cả các loài, tính bằng phần trăm (%);

M_s là khối lượng ADN của các loài đích, tính bằng nanogram trên microlit (ng/μl);

M_t là tổng số ADN của tất cả các loài, tính bằng nanogram trên microlit (ng/μl).

Ví dụ về việc chuẩn bị các chuẩn hiệu chuẩn được nêu trong Bảng B.3.

Bảng B.3 – Chuẩn bị các chuẩn hiệu chuẩn

Số		Bò	Lợn	Ngựa	Cừu	Tổng số các loài động vật	ADN tinh trùng cá trích
Mẫu 1	Thể tích (μl)	1	32	3,2	32	68,2	31,8
	Nồng độ của dung dịch gốc (ng/μl)	2	2	2	20	712,4	20
	ng ADN	2	64	6,4	640	7,124	638
	Nồng độ cuối cùng (ng/μl)	0,02	0,64	0,064	6,4		6,38
	% các loài động vật	0,28	8,98	0,90	89,84		
Mẫu 2	Thể tích (μl)	32	10	1	10	53	47
	Nồng độ của dung dịch gốc (ng/μl)	20	2	2	20	862	20
	ng ADN	640	20	2	200	8,62	940
	Nồng độ cuối cùng (ng/μl)	6,4	0,2	0,02	2		9,4
	% các loài động vật	74,25	2,32	0,23	23,2		
Mẫu 3	Thể tích (μl)	10	3,2	32	3,2	48,4	51,6
	Nồng độ của dung dịch gốc (ng/μl)	20	2	20	20	910,4	20
	ng ADN	200	6,4	640	64	910,4	1032
	Nồng độ cuối cùng (ng/μl)	2	0,064	6,4	0,64		10,32
	% các loài động vật	21,97	0,7	70,3	7,03		
Mẫu 4	Thể tích (μl)	32	1	10	10	53	47
	Nồng độ của dung dịch gốc (ng/μl)	2	2	20	2	286	20
	ng ADN	64	2	200	20	2,86	940
	Nồng độ cuối cùng (ng/μl)	0,64	0,02	2	0,2		9,4
	% các loài động vật	22,38	0,70	69,93	6,99		
Mẫu 5	Thể tích (μl)	10	32	3,2	3,2	48,4	51,6
	Nồng độ của dung dịch gốc (ng/μl)	2	20	20	2	730,4	20
	ng ADN	20	640	64	6,4	7,034	1 032
	Nồng độ cuối cùng (ng/μl)	0,2	6,4	0,64	0,064		10,32
	% các loài động vật	2,74	87,62	8,67	0,88		
Mẫu 6	Thể tích (μl)	3,2	10	10	1	24,2	75,8
	Nồng độ của dung dịch gốc (ng/μl)	2	20	2	2	228,4	20
	ng ADN	6,4	200	20	2	2,284	1 516
	Nồng độ cuối cùng (ng/μl)	0,064	2	0,2	0,02		15,16
	% các loài động vật	2,8	87,57	8,76	0,88		

Để biết thêm thông tin, xem Tài liệu tham khảo [13], [14] và [21].

B.4 Ví dụ về phép tính số bản sao của gen đơn lẻ

Có thể tính tỷ lệ khối lượng cùng với tỷ lệ số bản sao của các gen trong loài đích và trong nền mẫu, khi một gen nội sinh đơn lẻ hoặc gen chuyển đổi đơn lẻ được quy định và trình tự nucleotid của các gen này là phổ biến giữa các loài động vật dự kiến có trong nền mẫu.

CHÚ THÍCH: Gen chuyển đổi đơn lẻ là gen có số lượng bản sao trong bộ gen đã biết và nhất quán về số lượng giữa các loài động vật.

Ví dụ về công thức tính:

$$P = M_s \times C_{st} / C_{sc}$$

Trong đó:

P là tỷ lệ khối lượng của các loài đích, tính bằng phần trăm (%);

M_s là khối lượng của toàn bộ mẫu để phân tích;

C_{st} là số bản sao của gen nội sinh đơn lẻ hoặc gen chuyển đổi đơn lẻ đặc hiệu của động vật đích;

C_{sc} là số bản sao của gen nội sinh đơn lẻ hoặc gen chuyển đổi đơn lẻ phổ biến trong nền mẫu.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] UNTERGASSER A., CUTCUTACHE I., KORESSAAR T., YE J., FAIRCLOTH B.C., REMM M., ROZEN S.G., Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012, 40(15), e115
- [2] ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER W., MYERS E.W., LIPMAN D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990, 215(3), pp. 403–410
- [3] TCVN 6910-1:2001 (ISO 5725-1:1994), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung*
- [4] TCVN 10990:2015 (ISO 13495:2013), *Thực phẩm – Nguyên tắc lựa chọn và tiêu chí đánh giá xác nhận các phương pháp nhận biết giống sử dụng axit nucleic đặc thù*
- [5] THOMPSON M., ELLISON S.L.R., WOOD R. Harmonized Guidelines for Single-laboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure Appl. Chem.* 2002, 74(5), pp. 835–855
- [6] European Network of GMO Laboratories (ENGL). *Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing* European Network of GMO Laboratories. European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, Ispra, 2015
- [7] Codex Alimentarius Commission. CAC/GL 74-2010, *Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in foods*, 2010
- [8] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). *Guidelines for the validation of qualitative real-time PCR methods by means of a collaborative study*. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Bundesallee 50, 38116 Braunschweig, 2016
- [9] TCVN ISO/IEC 17025 (ISO/IEC 17025), *Yêu cầu chung về năng lực của phòng thử nghiệm và hiệu chuẩn*
- [10] BUSTIN et al. The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines for PCR. *Clin. Chem.* 2009, 55(4), pp. 611–622
- [11] CORBISIER P., BARBANTE A., BERBEN G., BROOthaerts W., DE LOOSE M., EMONS H., GEORGIEVA TZ, LIEVENS A., MAZZARA M., PAPAZOVA N., PERRI E., SOWA S., STEBIH D., TERZI V., TRAPMANN S. *Recommendation for the unit of measurement and the measuring system to report traceable and comparable results expressing GM content in accordance with EU legislation*. EUR28536 EN. doi 10.2760/177516
- [12] TCVN 7606:2007 (ISO 21571:2005), *Thực phẩm – Phương pháp phân tích để phát hiện sinh vật biến đổi gen và sản phẩm có nguồn gốc biến đổi gen – Tách chiết axit nucleic*

- [13] BVL L 08.00-61 (2016), *Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis der Tierarten Rind, Schwein, Pute und Huhn in Wurstwaren durch Multiplex-real-time PCR*
- [14] BVL L 08.00-62:2016-03 (2016), *Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis der Tierarten Rind, Schwein, Schaf und Equiden in Wurstwaren durch Multiplex-real-time PCR*
- [15] DRUML et al. Development and validation of a TaqMan real-time PCR assay for the identification and quantification of roe deer (*Capreolus capreolus*) in food to detect food adulteration. *Food Chemistry*. 2015, 178, pp. 319–326
- [16] DRUML et al. A novel reference real-time PCR assay for the relative quantification of (game) meat species in raw and heat-processed food. *Food Control*. 2016, 70, pp. 392–400
- [17] EUGSTER et al. Quantification of beef, pork, chicken and turkey proportions in sausages: use of matrix-adapted standards and comparison of single versus multiplex PCR in an interlaboratory trial. *Eur Food Res Technol*. 2009, 230 pp. 55–61
- [18] IWOBI et al. A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat. *Food Chem*. 2015, 169, pp. 305–313
- [19] KALTENBRUNNER et al. Development and validation of a fallow deer (*Dama dama*)-specific TaqMan real-time PCR assay for the detection of food adulteration. *Food Chemistry*. 2018, 243, pp. 82–90, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.09.087
- [20] KALTENBRUNNER et al. Red deer (*Cervus elaphus*)-specific real-time PCR assay for the detection of food adulteration. *Food Control*. 2018, doi: 10.1016/j.foodcont.2018.01.021
- [21] KÖPPEL et al. Quantification of Meat Proportions by Measuring DNA Contents in Raw and Boiled Sausages Using Matrix-Adapted Calibrators and Multiplex Real-Time PCR. *J AOAC*. 2012, 95, pp. 494–499
- [22] LAUBE et al. Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR. *Int J Food Sci Technol*. 2007, 42, pp. 336–341
- [23] AOAC International. Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis. *AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS*, 2002
- [24] ISO/TS 16393, *Molecular biomarker analysis – Determination of the performance characteristics of qualitative measurement methods and validation of methods*
- [25] TCVN ISO 17034 (ISO 17034), *Yêu cầu chung về năng lực của nhà sản xuất mẫu đối chứng*
- [26] TCVN 7605 (ISO 21569), *Thực phẩm – Phương pháp phân tích để phát hiện sinh vật biến đổi gen và sản phẩm có nguồn gốc biến đổi gen – Phương pháp dựa trên định tính axit nucleic*