

TCVN 13842-5:2023

ISO/TS 20224-5:2020

Xuất bản lần 1

**PHÂN TÍCH DẤU ẤN SINH HỌC PHÂN TỬ – PHÁT HIỆN
NGUYÊN LIỆU CÓ NGUỒN GỐC TỪ ĐỘNG VẬT TRONG THỰC
PHẨM VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI BẰNG REAL-TIME PCR –
PHẦN 5: PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN ADN CỦA DÊ**

*Molecular biomarker analysis – Detection of
animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR –
Part 5: Goat DNA detection method*

HÀ NỘI – 2023

Lời nói đầu

TCVN 13842-5:2023 hoàn toàn tương đương với ISO/TS 20224-5:2020;

TCVN 13842-5:2023 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.

Bộ TCVN 13842 (ISO/TS 20224) *Phân tích dấu ấn sinh học phân tử – Phát hiện nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi bằng real-time PCR* gồm các tiêu chuẩn sau:

- TCVN 13842-1:2023 (ISO/TS 20224-1:2020), *Phần 1: Phương pháp phát hiện ADN của bò*;
- TCVN 13842-2:2023 (ISO/TS 20224-2:2020), *Phần 2: Phương pháp phát hiện ADN của cừu*;
- TCVN 13842-3:2023 (ISO/TS 20224-3:2020), *Phần 3: Phương pháp phát hiện ADN của lợn*;
- TCVN 13842-4:2023 (ISO/TS 20224-4:2020), *Phần 4: Phương pháp phát hiện ADN của gà*;
- TCVN 13842-5:2023 (ISO/TS 20224-5:2020), *Phần 5: Phương pháp phát hiện ADN của dê*.

Bộ ISO/TS 20224 *Molecular biomarker analysis – Detection of animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR* còn có các tiêu chuẩn sau:

- ISO/TS 20224-6:2020, *Part 6: Horse DNA detection method*;
- ISO/TS 20224-7:2020, *Part 7: Donkey DNA detection method*;
- ISO/TS 20224-8:2022, *Part 8: Turkey DNA detection method*;
- ISO/TS 20224-9:2022, *Part 9: Goose DNA detection method*.

Lời giới thiệu

Trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi, việc pha trộn gian lận thịt đe dọa đến thương mại và an toàn của cộng đồng. Việc pha trộn có thể ảnh hưởng đến sự tuân thủ các quy tắc về chế độ ăn hàng ngày, sự phát triển kinh tế và ổn định xã hội. Tiêu chuẩn này đưa ra phương pháp phân tích phản ứng chuỗi polymerase thời gian thực (real-time PCR) để xác định thịt của các loài động vật từ axit nucleic có trong thành phần của thực phẩm và thức ăn chăn nuôi.

Nguyên liệu sinh học có nguồn gốc từ động vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi được phát hiện và xác định trong phòng thử nghiệm bằng các bước liên tiếp (hoặc đồng thời) sau: chuẩn bị phần mẫu thử/mẫu thử, chiết và tinh sạch axit nucleic, khuếch đại PCR và diễn giải kết quả. Tiêu chuẩn này đưa ra hướng dẫn về việc khuếch đại PCR và diễn giải kết quả, cụ thể để phát hiện ADN của dê.

Bộ TCVN 13842 (ISO 20224) bao gồm các yêu cầu kỹ thuật mô tả các ứng dụng cụ thể. Các phương pháp phát hiện ADN của các loài khác được thiết lập trong tương lai sẽ được thêm vào như các phần độc lập.

Phân tích dấu ấn sinh học phân tử

Phát hiện nguyên liệu có nguồn gốc từ động vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi bằng real-time PCR –

Phần 5: Phương pháp phát hiện ADN của dê

Molecular biomarker analysis – Detection of animal-derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR –
Part 5: Goat DNA detection method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phản ứng chuỗi polymerase thời gian thực (real-time PCR) để phát hiện định tính ADN đặc hiệu của dê trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi. Phương pháp này yêu cầu chiết một lượng thích hợp ADN có thể khuếch đại bằng PCR từ nền mẫu liên quan và có thể được áp dụng để phát hiện nguyên liệu có nguồn gốc từ dê (*Capra hircus*).

Trình tự đích là một phần đoạn trình tự ADN nhiễm sắc thể 9 của dê (nghĩa là mã số truy cập trong Ngân hàng gen là NC_030816.1)^[1], biểu hiện dưới dạng một bản sao trên một bộ gen đơn bội. Phép phân tích PCR được dùng cho đích này có giới hạn phát hiện tuyệt đối là năm bản sao cho mỗi phản ứng, với độ lặp lại $\geq 95\%$ ở nồng độ này ($LOD_{95\%}$).

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 7606 (ISO 21571), *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 axít nucleic*

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*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa nêu trong TCVN 11933 (ISO 16577).

4 Cơ sở khoa học

ADN được chiết ra khỏi phần mẫu thử bằng phương pháp thích hợp [xem Phụ lục A.1, TCVN 7606 (ISO 21571)]. Phép phân tích ADN gồm hai phần:

- kiểm tra xác nhận chất lượng và khả năng khuếch đại của ADN chiết được sử dụng phép phân tích PCR đặc hiệu đối với sinh vật nhân thực (ví dụ: gen 18S rARN) hoặc động vật có vú và gia cầm (ví dụ: gen myostatin);
- phát hiện trình tự ADN đặc hiệu của trình tự ADN nhiễm sắc thể 9 đơn lẻ của dê (ví dụ: mã số truy cập trong Ngân hàng gen là NC_030816.1) bằng real-time PCR.

CHÚ THÍCH: Số bản sao gen 18S ribosome ARN (18S rARN) của sinh vật nhân thực trong một tế bào thay đổi từ vài trăm đến vài nghìn, trong khi gen trình tự đích đặc hiệu ở bộ gen của dê, gen myostatin ở bộ gen của động vật có vú và của gia cầm là gen đơn lẻ. Số bản sao của trình tự đích đặc hiệu ở bộ gen của dê đã được khẳng định bằng phân tích tin sinh học ở toàn bộ gen (xem Phụ lục A) và sử dụng PCR kỹ thuật số để định lượng tuyệt đối.

5 Thuốc thử và vật liệu thử

5.1 Yêu cầu chung

Trong tiêu chuẩn này, chỉ sử dụng các hóa chất và nước loại tinh khiết phân tích đã được công nhận, thích hợp dùng cho sinh học phân tử. Trừ khi có quy định khác, các dung dịch phải được chuẩn bị bằng cách hòa tan các thuốc thử tương ứng trong nước, sau đó tiệt trùng bằng nồi hấp áp lực. Đối với tất cả các thao tác sử dụng gắng tay không có bột. Nên sử dụng các đầu pipet được bảo vệ bằng sol khí (tránh ô nhiễm chéo).

5.2 Thuốc thử PCR

5.2.1 PCR master mix

PCR master mix chứa ADN polymerase bền nhiệt, đệm pH, KCl, MgCl₂, uracil-ADN glycosylase (UDG) và bốn dNTP (dATP, dGTP, dUTP, dCTP] ở dạng cô đặc có thể pha loãng, sẵn có để sử dụng.

5.2.2 Oligonucleotid

Chất lượng của các oligonucleotid phải đủ để sử dụng làm mồi và đoạn dò. Xem Bảng 1.

Bảng 1 – Oligonucleotid

Tên	Trình tự ADN của oligonucleotid	Nồng độ cuối cùng trong PCR
Trình tự ADN đặc hiệu trong ADN nhiễm sắc thể 9 của dê là trình tự đích (mã số truy cập trong Ngân hàng gen là NC_030816.1) ^a		
Goat-87bp-F	5-GGAAGGAAAGAGAATGGGGATATGG-3'	400 nmol/L
Goat-87bp-R	5'-TCTCCACACACAGCCAAAACC-3'	400 nmol/L
Goat-87bp-P	5'-[FAM]-ATCCATCTCTCCCTCCACTCCCTGCCTAA-[TAMRA] ^b -3'	200 nmol/L
^a Sản phẩm PCR = 33 829 251 - GGAAGGAAAG AGAATGGGGA TATGGAGGAA AATTAGGCA GGGAGTGGAG GGAGAGATGG ATGTATGGTT TTGGCTGTGT GTGGAGA - 33 829 337 - NC_030816.1.		
^b FAM: 6-carboxyfluorescein, TAMRA: 6-carboxytetramethylrhodamin.		

Goat-87bp-F gồm các cặp base 33 829 251-33 829 275, Goat-87bp-R gồm các cặp base 33 829 317-33 829 337 và Goat-87bp-P gồm các cặp base 33 829 284-33 829 312 của trình tự ADN nhiễm sắc thể 9 của dê, có mã số truy cập trong Ngân hàng gen là NC_030816.1. Có thể sử dụng thuốc nhuộm reporter và/hoặc thuốc nhuộm quencher tương tự nếu cho các kết quả tương đương hoặc tốt hơn.

6 Thiết bị, dụng cụ

Các yêu cầu liên quan đến thiết bị, dụng cụ và vật liệu phải tuân theo TCVN 13841 (ISO 20813). Ngoài các thiết bị thông thường của phòng thử nghiệm, cần có các thiết bị sau.

6.1 Máy chu trình nhiệt real-time

Thiết bị khuếch đại ADN *in vitro* và thực hiện các chu trình nhiệt độ-thời gian cần thiết cho PCR. Ngoài ra, thiết bị phải có khả năng kích thích các phân tử huỳnh quang ở các bước sóng quy định và phát hiện đủ ánh sáng huỳnh quang phát xạ của chất đánh dấu huỳnh quang được dùng để thực hiện các phân tích định dạng TaqMan.

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị phần mẫu thử/mẫu thử

Mẫu thử được sử dụng để chiết ADN phải đại diện cho mẫu phòng thử nghiệm và đồng nhất, ví dụ bằng cách nghiền hoặc đồng hóa mẫu phòng thử nghiệm thành hỗn hợp mịn. Chuẩn bị phần mẫu thử/mẫu thử cần tuân theo các yêu cầu chung và phương pháp cụ thể được nêu trong TCVN 7606 (ISO 21571) và TCVN 13841 (ISO 20813).

7.2 Chuẩn bị chất chiết ADN

Việc chiết/tinh sạch và định lượng ADN từ phần mẫu thử cần tuân theo các yêu cầu chung và phương pháp nêu trong TCVN 7606 (ISO 21571). Nên sử dụng các phương pháp chiết ADN được mô tả trong Phụ lục A, TCVN 7606 (ISO 21571).

7.3 Thiết lập PCR

7.3.1 Hỗn hợp phản ứng

Phương pháp này sử dụng tổng thể tích hỗn hợp phản ứng là 25 µL cho mỗi phản ứng PCR. Thiết lập thành phần phản ứng như trong Bảng 2. Thuốc thử phải được rửa đông hoàn toàn ở nhiệt độ phòng. Mỗi loại thuốc thử phải được trộn cẩn thận và ly tâm trong thời gian ngắn ngay trước khi lấy bằng pipet. Hỗn hợp thuốc thử PCR được chuẩn bị có chứa tất cả các thành phần trừ ADN mẫu thử. Tổng lượng hỗn hợp thuốc thử PCR cần được chuẩn bị phụ thuộc vào số phản ứng cần thực hiện, bao gồm ít nhất một lượng được lấy bằng pipet để dự phòng cho phản ứng bổ sung. Số lượng mẫu thử và các kiểm chứng lặp lại theo TCVN 13841 (ISO 20813). Thiết lập các phép thử PCR như sau:

- a) trộn hỗn hợp thuốc thử PCR, ly tâm trong thời gian ngắn và dùng pipet lấy 20 µL cho vào mỗi lọ phản ứng;
- b) thêm 5 µL từng ADN mẫu thử (từ 20 ng/µL đến 200 ng/µL) hoặc kiểm chứng dương ADN đích hoặc kiểm chứng chiết mẫu trắng hoặc nước vào các lọ phản ứng tương ứng;
- c) trộn và ly tâm trong thời gian ngắn.

Bảng 2 – Thành phần phản ứng khuếch đại

Tổng thể tích phản ứng	25 µL
ADN mẫu thử (từ 20 ng/µL đến 200 ng/µL) hoặc các kiểm chứng	5 µL
2 × PCR master mix ^a	12,5 µL
Mỗi Goat-87bp-F, c = 10 µmol/L và Goat-87bp-R, c = 10 µmol/L	1,0 µL cho từng mỗi
Đoạn dò Goat-87bp-P, c = 10 µmol/L	0,5 µL
Nước	Đến 25 µL
^a Trong thử nghiệm cộng tác, sử dụng 2 × PCR master mix đã được tối ưu hóa có sẵn để dùng có chứa tất cả các thành phần, không bao gồm khuôn mẫu và mỗi. 2 × PCR master mix chứa ADN polymerase bền nhiệt, hỗn hợp của các dNTP với dUTP và uracil-UDG để giảm thiểu ô nhiễm chéo PCR và chất chuẩn nội thụ động dựa trên thuốc nhuộm ROX. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương hoặc tốt hơn. Nếu cần, có thể điều chỉnh lượng thuốc thử và chương trình nhiệt độ-thời gian.	

7.3.2 Các kiểm chứng PCR

7.3.2.1 Yêu cầu chung

Các kiểm chứng PCR được nêu trong TCVN 7608 (ISO 24276) và TCVN 13841 (ISO 20813).

7.3.2.2 Kiểm chứng chất ức chế (phân tích gen tham chiếu)

Phải thực hiện phép phân tích PCR gen kiểm chứng tham chiếu (ví dụ: gen 18S rARN đối với sinh vật nhân thực, gen myostatin đối với động vật có vú và gia cầm) sử dụng các ADN mẫu thử để kiểm tra khả năng khuếch đại axit nucleic và đưa ra kiểm chứng để loại các kết quả âm tính giả.

7.3.3 Cài đặt máy chu trình nhiệt real-time PCR

Chuyển các lọ phản ứng đã chuẩn bị vào máy chu trình nhiệt. Các lọ phải được sắp xếp để tránh mọi thay đổi nhiệt độ có thể xảy ra ở thành lọ liên quan đến máy chu trình nhiệt real-time cụ thể. Bật chương trình nhiệt độ-thời gian.

7.4 Chương trình nhiệt-độ thời gian

Chương trình nhiệt độ-thời gian nêu trong Bảng 3 đã được sử dụng trong nghiên cứu xác nhận giá trị sử dụng. Việc sử dụng các điều kiện phản ứng và chu trình real-time PCR khác nhau cần được kiểm tra xác nhận. Thời gian biến tính ban đầu phụ thuộc vào master mix được sử dụng.

Bảng 3 – Chương trình nhiệt độ-thời gian

Bước	Thông số		Nhiệt độ	Thời gian	Đo huỳnh quang	Số chu trình
1	Biến tính ban đầu		95 °C	10 min	Không	1
2	Khuếch đại	Biến tính	95 °C	15 s	Không	45
		Gắn mồi và kéo dài	60 °C	60 s	Có	

8 Tiêu chí chấp nhận/từ chối

8.1 Yêu cầu chung

Cần sử dụng chương trình phân tích dữ liệu cụ thể đối với thiết bị real-time PCR tương ứng để xác định các sản phẩm PCR. Các kết quả khuếch đại có thể được biểu thị khác nhau, tùy thuộc vào thiết bị được sử dụng. Trong trường hợp không có sản phẩm PCR có thể phát hiện được (ví dụ: các kiểm chứng âm), kết quả phải được biểu thị là “không xác định”, “không khuếch đại” hoặc số chu kỳ phản ứng tối đa được thực hiện. Nếu xảy ra sự khuếch đại của trình tự đích ADN trong một mẫu thử (ví dụ: các kiểm chứng dương) thì có thể quan sát thấy đường cong khuếch đại hình chữ S (sigmoid-shaped).

Số chu kỳ được tính tại điểm giao nhau của đường cong khuếch đại và ngưỡng huỳnh quang [chu kỳ ngưỡng (C_t) hoặc chu kỳ định lượng (C_q)].

Nếu dữ liệu đo huỳnh quang không điển hình thì việc diễn giải tự động không cho kết quả có nghĩa, có thể cần thiết lập thủ công đường nền và ngưỡng trước khi diễn giải dữ liệu. Trong trường hợp này, áp dụng các hướng dẫn cho thiết bị cụ thể được cung cấp cùng với phần mềm diễn giải.

8.2 Xác định

Trình tự đích được xem là phát hiện được nếu:

- các môi đặc hiệu của dẻ Goat-87bp-F, Goat-87bp-R và đoạn dò Goat-87bp-P tạo thành đường cong khuếch đại hình chữ S và có thể tính được giá trị C_t hoặc giá trị C_q ;
- các phản ứng kiểm chứng PCR không bổ sung ADN (kiểm chứng thuốc thử PCR, kiểm chứng chiết mẫu trắng) không tạo ra sự khuếch đại;
- các kiểm chứng khuếch đại (kiểm chứng dương ADN đích, kiểm chứng chất ức chế PCR) tạo ra sự khuếch đại và giá trị C_t (hoặc giá trị C_q) dự kiến.

Các phát hiện vết được xác định bằng PCR có giá trị C_t trễ hơn giá trị C_t xác định được tại LOD_{95 %} đích. Trong trường hợp phát hiện vết hoặc thu được các kết quả dương tính/âm tính trái ngược nhau từ các chất chiết khác nhau của cùng một mẫu thử, mẫu đó phải được thử lại. Cần chuẩn bị ít nhất hai chất chiết mới từ mẫu phòng thử nghiệm đã được đồng nhất. Tiến hành phân tích PCR ít nhất 20 lần lặp lại trên các chất chiết mới (ví dụ: phân tích PCR mười lần lặp lại đối với hai ADN chiết được, phân tích PCR bảy lần lặp lại đối với ba ADN chiết được). Trình tự đích được xem là “phát hiện được” nếu $\geq 95 \%$ các kết quả PCR của chất chiết mới cho thấy phát hiện dương tính. Trình tự đích được xem là “không phát hiện được” nếu $< 95 \%$ các kết quả PCR của chất chiết mới cho thấy phát hiện dương tính.

9 Tình trạng xác nhận giá trị sử dụng và tiêu chí hiệu năng

9.1 Yêu cầu chung

Xác nhận giá trị sử dụng theo một quy trình gồm hai phần:

- a) xác nhận giá trị sử dụng nội bộ;
- b) xác nhận giá trị sử dụng bằng thử nghiệm cộng tác.

9.2 Độ vững

Độ vững (robustness) của phương pháp đã được khẳng định trong thử nghiệm cộng tác bằng cách thay đổi các điều kiện phản ứng đối với các yếu tố sau:

- a) thiết bị real-time PCR (ví dụ: ABI 7500, BioRad CFX96, ABI 7900 HT Fast, Eppendorf Realplex 4¹⁾);
- b) thể tích phản ứng: 19 μ L hoặc 21 μ L hỗn hợp thuốc thử PCR cộng với 5 μ L ADN mẫu thử (nồng độ từ 20 ng/ μ L đến 200 ng/ μ L);
- c) nhiệt độ gắn mồi: 59 °C và 61 °C;
- d) nồng độ mồi hoặc đoạn dò: đều giảm 30 %.

Đối với mỗi yếu tố được thử nghiệm, các phản ứng PCR được phân tích ba lần, mỗi lần 20 bản sao của trình tự đích và 100 bản sao của trình tự không phải đích là các kiểm chứng âm. Hiệu năng của phương pháp vẫn đạt yêu cầu đối với cả các mẫu thử và các kiểm chứng âm trong các điều kiện thay đổi đối với từng yếu tố thay đổi.

9.3 Độ tái lập

Độ tái lập của phương pháp được kiểm tra xác nhận trong thử nghiệm cộng tác có 12 phòng thử nghiệm tham gia, do Trung tâm Kỹ thuật Kiểm dịch Động vật, Thực vật và Thực phẩm, Hải quan Thượng Hải^[2] tổ chức, phù hợp với nguyên tắc IUPAC^[3] và các hướng dẫn BVL^[4]. Các phòng thử nghiệm tham gia nhận được 12 mẫu ADN để đánh giá tỷ lệ dương tính giả và âm tính giả. Tất cả các mẫu được dán nhãn với số mã hóa ngẫu nhiên và bao gồm sáu mẫu lặp lại. 12 mẫu ADN là:

- sáu lọ dung dịch ADN của dê, 10 bản sao/ μ L;
- sáu lọ dung dịch ADN của bò, 20 bản sao/ μ L.

Sử dụng phương pháp real-time PCR nêu trong tiêu chuẩn này và dãy các dịch pha loãng plasmid ADN có chứa trình tự đích để xác định số bản sao. Nồng độ của plasmid-ADN (bản sao/ μ L) được đo bằng máy PCR kỹ thuật số.

Các phòng thử nghiệm tham gia nhận được PCR master mix và các oligonucleotid (các mồi và đoạn dò) từ đơn vị tổ chức thử nghiệm cộng tác để tiến hành các thử nghiệm PCR.

ADN bộ gen của dê và bò được chiết lần lượt từ thịt dê và thịt bò, sau đó được chỉnh bằng đệm 0,2 $\times$ TE đến nồng độ danh nghĩa tương ứng là 10 bản sao/ μ L đối với ADN của dê và 20 bản sao/ μ L đối với ADN của bò.

Thử nghiệm cộng tác được thiết kế để xác định tỷ lệ dương tính giả và âm tính giả. Mỗi mẫu ADN được thử bởi các phòng thử nghiệm tham gia trong một thử nghiệm PCR duy nhất với 5 μ L dung dịch ADN tương ứng, sử dụng quy trình và các điều kiện nêu trong Bảng 2 và Bảng 3. Kết quả của thử nghiệm cộng tác được liệt kê trong Bảng 4.

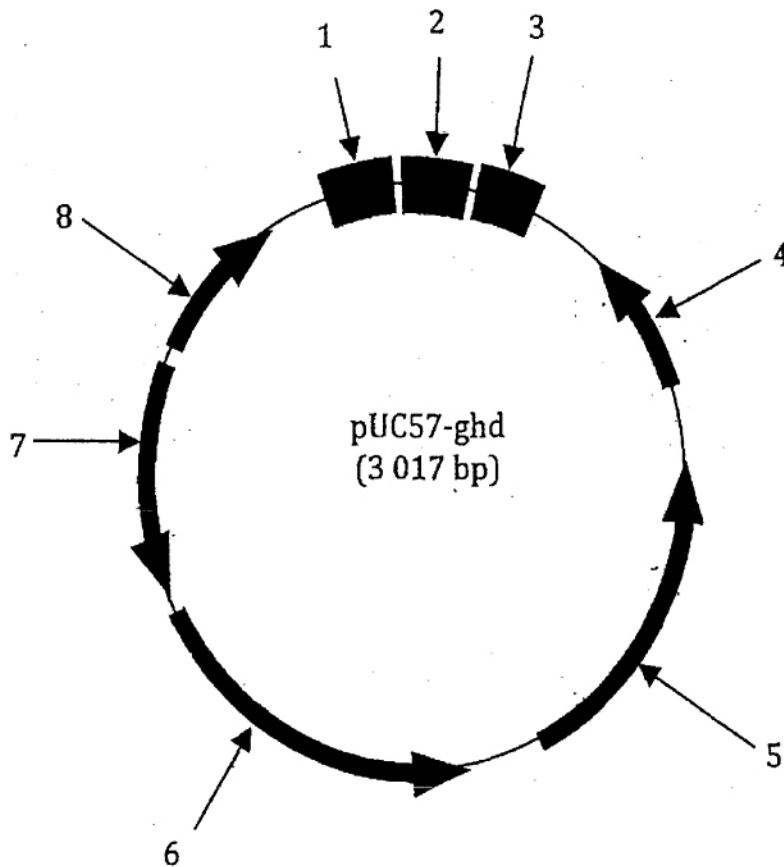
¹⁾ Đây là các ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

Bảng 4 – Kết quả phép thử cộng tác

Số phòng thử nghiệm tham gia	12
Số phòng thử nghiệm đưa ra kết quả	12
Số mẫu thử cho mỗi phòng thử nghiệm	12
Số kết quả được chấp nhận	144
Số mẫu thử được chấp nhận có chứa nguyên liệu từ dê	72
Số mẫu thử được chấp nhận không chứa nguyên liệu từ dê	72
Kết quả dương tính giả	0
Kết quả dương tính giả (tính bằng %)	0
Kết quả âm tính giả	0
Kết quả âm tính giả (tính bằng %)	0

9.4 Độ nhạy

Giới hạn phát hiện tuyệt đối (LOD₉₅ %) đối với phương pháp này là năm bản sao ADN. Thử nghiệm cộng tác phương pháp phát hiện ADN của dê được thực hiện đồng thời với các thử nghiệm cộng tác phương pháp phát hiện ADN của ngựa và lừa. Trình tự ADN đích của dê, ngựa và lừa được tổng hợp và tạo dòng trong vector pUC57 [chiều dài 2 710 bp, mã số truy cập trong Ngân hàng gen/Cơ sở dữ liệu của châu Âu về trình tự nucleotid (EMBL) là Y14837]. Plasmid PUC57-ghd đã tạo thành này (chiều dài 3 127 bp) được giải trình tự để đảm bảo rằng chỉ một bản sao của trình tự ADN đích của dê, ngựa và lừa được chèn vào (xem Hình 1). Không thấy có đột biến bị xóa hoặc chèn trong các trình tự được chèn (xem Hình 2). Trình tự đích của các phương pháp PCR tương ứng được đưa ra.



Chú dẫn:

- 1 nt 1~87 = amplicon dê (87 bp)
- 2 nt 88~182 = amplicon lừa (95 bp)
- 3 nt 183~307 = amplicon ngựa (125 bp)
- 4 Promotor ngược M13
- 5 Vị trí khởi đầu sao chép ColE1
- 6 Gen β -lactamase (gen kháng ampicillin)
- 7 Gen promotor kháng ampicillin
- 8 Promoter xuôi M13

Hình 1 – Sơ đồ plasmid ADN đa đích

1 GGAAGGAAAGAGAATGGGGA TATGGAGGAA AATTTAGGCA GGGAGTGGAG
51 GGAGAGATGG ATGTATGGTT TTGGCTGTGT GTGGAGATGA GTCAGGTGCT
101 CCTTGAACAG CCGCTTCCCG TCAGTTGTGT CCTTAGTTGG CAACACGGTT
151 GAGAAGGATC TCAAGAGAGA CGAGTGCCTC AGACTCATCA AACGCCGCTC
201 TCGAGATCCG TGCACATCGT TCAATGGAAACTTCATTTTAAAAAGAGAA
251 AAAGGCGATTGG AAGCACCGAGCCCTGGGT AGCGTGTGCCAACGGGGTCT
301 TCACAGC

Chú dẫn:

- Đường một gạch liền đậm nt 1~87 = amplicon dê (87 bp)
- Đường hai gạch liền nt 88~182 = amplicon lừa (95 bp)
- Đường gạch ngang nt 183~307 = amplicon ngựa (125 bp)

Hình 2 – Trình tự hoàn chỉnh của các nucleotide (nt) và chú giải của đoạn chèn trong plasmid pUC57

Mỗi phòng thử nghiệm tham gia vào thử nghiệm cộng tác nhận được một dung dịch chứa ADN plasmid pUC57 được chỉnh đến 1 000 bản sao/ μ L của trình tự đích (xem Hình 1 và Hình 2) trong ADN tinh trùng cá hồi nồng độ 20 ng/ μ L được phá vỡ tế bào bằng sóng siêu âm. Nồng độ được đo trước khi phân phối bằng thiết bị PCR kỹ thuật số (Hệ thống PCR Digital Droplet QX100²⁾). Dãy các dung dịch pha loãng thu được từ 12 phòng thử nghiệm nằm trong dải từ 0,02 bản sao/ μ L đến 4 bản sao/ μ L sử dụng đệm 0,2 $\times$ TE có chứa ADN tinh trùng cá hồi nồng độ 20 ng/ μ L được phá vỡ tế bào bằng sóng siêu âm. Mỗi phòng thử nghiệm tham gia đo sáu lần lặp lại cho mỗi mức nồng độ. Kết quả dương tính đạt được đối với 5 bản sao trên mỗi PCR bằng 78 trong số 78 lần thử nghiệm (xem Bảng 5).

Xác suất phát hiện (POD) mô tả xác suất mà quá trình khuếch đại PCR sẽ diễn ra tại một số bản sao đã cho của trình tự đích. Dữ liệu định tính thu được từ tất cả các phòng thử nghiệm và các mức pha loãng (xem Bảng 5) sử dụng để xác định POD = 0,95 của phương pháp phát hiện (xem Bảng 6) được nêu trong Tài liệu tham khảo [3]. Độ lệch chuẩn xác định được là 0,30 và LOD_{95 %} là 3,2 bản sao; cả hai thông số đều thấp hơn mức tối đa yêu cầu lần lượt là 1 bản sao và 20 bản sao^[4].

²⁾ Đây là ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Các sản phẩm tương tự có thể được sử dụng nếu cho kết quả tương đương.

Bảng 5 – Kết quả thử nghiệm cộng tác đối với giới hạn phát hiện ($LOD_{95\%}$)

Số bản sao trình tự ADN đặc hiệu trong nhiễm sắc thể 9 của dê trên mỗi phản ứng PCR (danh nghĩa)	Số kết quả dương tính ($C_t < 45$) trong 72 kết quả
20	72
10	72
5	72
2	64
1	51
0,5	33
0,1	8

Bảng 6 – Kết quả thử nghiệm cộng tác đối với xác suất phát hiện (POD)

Thông số		Trình tự ADN đặc hiệu trong nhiễm sắc thể 9 của dê
Số phòng thử nghiệm tham gia		12
Số lần lặp lại phân tích PCR trên mỗi mức pha loãng		6
Đường cong POD	Xác suất phát hiện trung bình giữa các phòng thử nghiệm (LPOD)	0,82
	Độ dốc b so với đường cong POD lý tưởng ($b = 1$)	1,16
	Độ lệch chuẩn phòng thử nghiệm, σ_L	0,30
$LOD_{95\%}$ (tính bằng các bản sao)	Trung vị của phòng thử nghiệm theo lý thuyết	3,2

9.5 Độ đặc hiệu

Trình tự đại diện từ trình tự ADN nhiễm sắc thể 9 của dê (mã số truy cập của trình tự trong Ngân hàng gen là NC_030816.1) được chọn làm đích PCR^[1]. Mồi và đoạn dò được thiết kế và tối ưu hóa bằng cách sử dụng phần mềm tối ưu hóa và lựa chọn đoạn dò-mồi.

Độ đặc hiệu loại trừ lý thuyết của mồi và đoạn dò gen trình tự ADN nhiễm sắc thể 9 của dê được phân tích để xác định tính tương đồng với các loài khác sử dụng chương trình BLASTN^[5]. Sử dụng trình tự 87-bp làm trình tự truy vấn là một phần của trình tự có mã số truy cập trong NCBI là NC_030816.1 (vị trí các nucleotid: 33829251-33829337). Các kết quả nghiên cứu về sự tương đồng được nêu trong Phụ lục A. Không có sự tương đồng với các gen và các loài khác.

Các phép phân tích quy định trong Bảng 7 được thiết lập với ADN từ các loài khác nhau (khoảng 200 ng/PCR). Dữ liệu dự kiến lý thuyết được thiết lập bằng các trình tự truy vấn trong cơ sở dữ liệu NCBI công khai^[5].

Độ đặc hiệu mục tiêu được thử nghiệm với 10 giống dê *Capra hircus* bao gồm dê Boer (nguồn gốc Nam Phi, lấy thịt), dê Angora (Thỏ Nhĩ Kỳ, lấy len), dê Saanen (Thụy Sĩ, lấy sữa), dê Toggenburg (Thụy Sĩ, lấy sữa), dê Nubia (Ai Cập, lấy thịt), dê Laoshan (Trung Quốc, lấy sữa), dê vàng châu Á (Trung Quốc, lấy thịt), dê Yimeng (Trung Quốc, lấy thịt), dê Liêu Ninh (Trung Quốc, lấy thịt) và dê Vân Nam (Trung Quốc, lấy thịt). Với khoảng 100 bản sao của ADN đích, tất cả các mẫu giống dê đều được phát hiện với các tín hiệu dương tính và đường cong khuếch đại dự kiến. Độ chọn lọc mục tiêu của trình tự đích 87 base cũng được đánh giá bằng chương trình BLASTN dựa trên dữ liệu toàn bộ gen động vật của Ngân hàng gen. Các kết quả cho thấy trình tự đích 87 base là duy nhất đối với dê được nêu trong Phụ lục A.

Bảng 7 – Độ đặc hiệu của phương pháp phát hiện trình tự ADN nhiễm sắc thể 9 của dê

Loài động vật thử nghiệm		Dự kiến về mặt lý thuyết	Khẳng định bằng thử nghiệm
Động vật	Bò bison (<i>Bison bison</i>)	N	N
	Lạc đà hai bướu (<i>Camelus bactrianus</i>)	N	N
	Cá chép (<i>Cyprinus carpio</i>)	N	N
	Mèo (<i>Felis catus</i>)	N	N
	Bò nhà (<i>Bos taurus</i>)	N	N
	Gà rừng lông đỏ (<i>Gallus gallus</i>)	N	N
	Chó nhà (<i>Canis familiaris</i>)	N	N
	Lừa (<i>Equus asinus</i>)	N	N
	Vịt cổ xanh (<i>Anas platyrhynchos</i>)	N	N
	Nai sừng xám (<i>Cervus canadensis</i>)	N	N
	Dê (<i>Capra hircus</i>)	Pos	Pos
	Cá vàng (<i>Carassius auratus</i>)	N	N
	Ngỗng xám (<i>Anser anser</i>)	N	N
	Ngựa (<i>Equus caballus</i>)	N	N
	Bò Zebu (<i>Bos indicus</i>)	N	N
	Chuột nhắt (<i>Mus musculus</i>)	N	N
	Đà điểu châu Phi (<i>Struthio camelus</i>)	N	N

Bảng 7 (kết thúc)

Loài động vật thử nghiệm		Dự kiến về mặt lý thuyết	Khẳng định bằng thử nghiệm
Động vật	Chim trĩ đỏ (<i>Phasianus colchicus</i>)	N	N
	Lợn nhà (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	N	N
	Bồ câu núi (<i>Columba livia</i>)	N	N
	Chim cút thường (<i>Coturnix coturnix</i>)	N	N
	Thỏ châu Âu (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	N	N
	Chuột cống (<i>Rattus norvegicus</i>)	N	N
	Khỉ vàng (<i>Macaca mulatta</i>)	N	N
	Cừu (<i>Ovis aries</i>)	N	N
	Cá hồi vân (<i>Onchorhynchus mykiss</i>)	N	N
	Gà tây (<i>Meleagris gallopavo</i>)	N	N
	Trâu (<i>Bubalus bubalis</i>)	N	N
	Bò hoang Tây Tạng (<i>Bos mutus</i>)	N	N
Người	Người (<i>Homo sapiens</i>)	N	N
Thực vật	Cỏ linh lăng (<i>Medicago sativa</i>)	N	N
	Ngô (<i>Zea mays</i>)	N	N
	Cải dầu (<i>Brassica rapa</i>)	N	N
	Lúa (<i>Oryza sativa</i>)	N	N
	Cao lương (<i>Sorghum bicolor</i>)	N	N
	Đậu tương (<i>Glycine max</i>)	N	N
	Lúa mì (<i>Triticum aestivum</i>)	N	N
Chú dẫn Pos: dương tính; N: âm tính			

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải được lập theo quy định trong TCVN 13841 (ISO 20813) và các tiêu chuẩn có thể áp dụng khác [ví dụ: TCVN 7608 (ISO 24276)].

Phụ lục A

(Tham khảo)

Kết quả BlastN 2.9.0 đối với trình tự truy vấn của bộ gen tham chiếu trong Ngân hàng gen
(441 cơ sở dữ liệu)

A.1 Trình tự truy vấn

A.1.1 ID trình tự truy vấn: NC_030816.1 (bp 33829251-3382337).

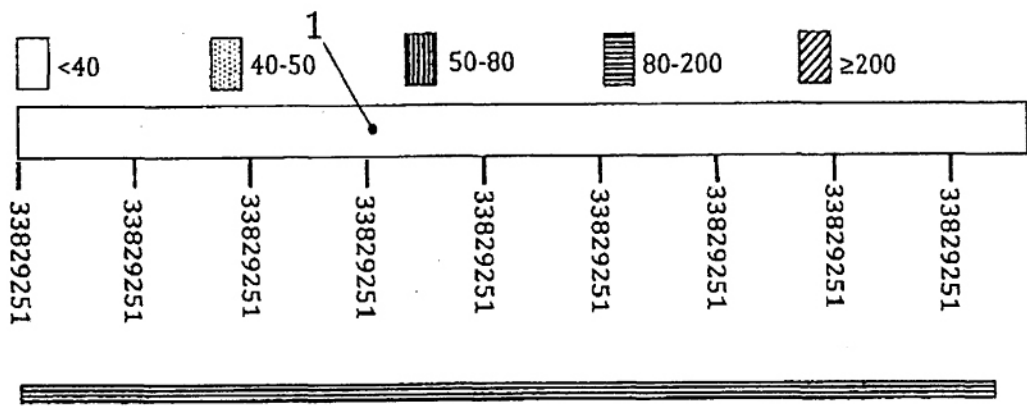
A.1.2 Mô tả: Nhiễm sắc thể 9 của giống dê San Clemente loài dê (*Capra hircus*), ASM170441v1, trình tự ngẫu nhiên (shotgun) của toàn bộ bộ gen.

A.1.3 Loại phân tử: axit nucleic.

A.1.4 Chiều dài trình tự truy vấn: 87.

A.2 Sự phân phối 1 Blast hit trên 1 trình tự tham chiếu trong cơ sở dữ liệu của Ngân hàng gen

Xem Hình A.1.



Chú dẫn:

1 Trình tự truy vấn

Hình A.1 – Chú dẫn đối với các điểm bắt cặp

A.3 Mô tả

Bảng A.1 – Mô tả

Mô tả	Điểm tối đa	Điểm tổng số	Tỷ lệ bao phủ %	Giá trị E	Độ tương đồng %	Mã số truy cập
Nhiễm sắc thể 9 của giống dê San Clemente loài dê (<i>Capra hircus</i>) ASM170441v1, trình tự ngẫu nhiên (shotgun) của toàn bộ bộ gen	161	161	100	6e-36	100	NC_030816.1

A.4 Bắt cặp

Nhiễm sắc thể 9 của giống dê San Clemente loài dê (*Capra hircus*), ASM170441v1, trình tự ngẫu nhiên (shotgun) của toàn bộ bộ gen, ID trình tự: NC_030816.1

Chiều dài: 91568626 Số điểm khớp: 1 Dải 1: từ 33829251 đến 33829337

<u>Điểm</u>	<u>Kỳ vọng</u>	<u>Độ tương đồng</u>	<u>Khoảng trống</u>	<u>Mach</u>
161 bit (87)	6e-36()	87/87 (100 %)	0/87 (0 %)	Dương/Dương

Trình tự truy vấn	33829251	GGAAGGAAAAGAGAATGGGGATATGGAGGAAAATTTAGGCAGGGAGTGGAGGGAGAGATGG	33829310
Trình tự tham chiếu	33829251	GGAAGGAAAAGAGAATGGGGATATGGAGGAAAATTTAGGCAGGGAGTGGAGGGAGAGATGG	33829310
Trình tự truy vấn	33829311	ATGTATGGTTTTGGCTGTGTGGAGA	33829337
Trình tự tham chiếu	33829311	ATGTATGGTTTTGGCTGTGTGGAGA	33829337

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] LOWE T. M., EDDY S.R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* 1997, **25**(5), pp. 955-964
 - [2] HORWITZ W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. *Pure and Appl. Chem.* 1995, **67**, pp. 331-343
 - [3] *Guidelines for the validation of qualitative real-time PCR methods by means of a collaborative study.* Federal Office of Consumer Protection and Food Safety. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)
 - [4] UHLIG S., FROST K., COLSON B., SIMON K., MADE D., REITING R., GOWIK P., GROHMANN L. Validation of qualitative PCR methods on the basis of mathematical-statistical modelling of the probability of detection. *Accred Qual Assur.* 2015, **20**, pp. 75-83
 - [5] National Center for Biotechnology Information (NCBI), Available at (accessed 2019-07-28): https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
-