

TCVN 7606 : 2007

ISO 21571 : 2005

Xuất bản lần 1

**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**

*Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified
organisms and derived products – Nucleic acid extraction*

HÀ NỘI – 2007

Mục lục

| | |
|--|----|
| Lời giới thiệu | 5 |
| 1 Phạm vi áp dụng | 7 |
| 2 Tài liệu viện dẫn | 7 |
| 3 Nguyên tắc..... | 8 |
| 3.1 Khái quát | 8 |
| 3.2 Tách chiết ADN | 8 |
| 3.3 Định lượng ADN | 8 |
| 4 Yêu cầu chung đối với phòng thử nghiệm..... | 9 |
| 5 Cách tiến hành | 9 |
| 5.1 Chuẩn bị phần mẫu thử | 9 |
| 5.2 Tách chiết/tinh sạch ADN | 11 |
| 5.3 Định lượng ADN tách chiết được | 12 |
| 5.4 Tính ổn định của ADN tách chiết được | 13 |
| 6 Diễn giải..... | 13 |
| 7 Báo cáo thử nghiệm..... | 14 |
| Phụ lục A Phương pháp tách chiết ADN | 15 |
| Phụ lục B Phương pháp định lượng ADN đã tách chiết được..... | 48 |
| Thư mục tài liệu tham khảo | 56 |

TCVN 7606 : 2007

Lời nói đầu

TCVN 7606 : 2007 hoàn toàn tương đương với ISO 21571 : 2005;

TCVN 7606 : 2007 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Việc nghiên cứu các thành phần của gốc biến đổi gen được thực hiện bằng các phương pháp với các bước liên tục tiếp theo (hoặc đồng thời). Sau khi thu thập mẫu, axit nucleic hoặc protein được chiết ra khỏi phần mẫu thử. Các mẫu phân tích đã chiết được có thể phải làm sạch tiếp, đồng thời với việc chiết hoặc sau khi chiết. Sau đó, các axit nucleic được định lượng (nếu cần), được pha loãng (nếu cần) và được phân tích (theo PCR). Các bước này được mô tả chi tiết trong tiêu chuẩn này và trong các tiêu chuẩn Thực phẩm – Phương pháp phân tích để phát hiện sinh vật biến đổi gen và sản phẩm có nguồn gốc biến đổi gen:

ISO 21568, *Foodstuffs – Method of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Sampling* (Thực phẩm – Phương pháp phân tích để phát hiện sinh vật biến đổi gen và sản phẩm có nguồn gốc biến đổi gen – Lấy mẫu).

TCVN 7605 : 2007 (ISO 21569 : 2005), Thực phẩm – Phương pháp phân tích phát hiện sinh vật biến đổi gen và sản phẩm có nguồn gốc biến đổi gen – Phương pháp dựa trên định tính axit nucleic.

ISO 21570 : 2005, *Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Quantitative nucleic acid based methods* (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).

Thông tin về yêu cầu chung và định nghĩa kể cả các bước nói trên được nêu trong:

TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006) Thực phẩm – Phương pháp phân tích để phát hiện sinh vật biến đổi gen và các sản phẩm có nguồn gốc biến đổi gen dựa vào axit nucleic – Yêu cầu chung và định nghĩa.

Tổ chức ISO lưu ý rằng, việc sử dụng tiêu chuẩn này có thể kèm theo việc sử dụng bằng sáng chế liên quan đến phương pháp tách chiết dựa trên silica (No.EP 0389063/USP 5,234,809) được nêu trong A.4.

ISO không liên quan đến bằng chứng, tính hiệu lực và phạm vi bản quyền sáng chế này.

Người giữ bản quyền đã cam đoan với ISO rằng họ mong muốn thương lượng giấy phép một cách hợp lý, không phân biệt đối xử và các điều kiện với những người sử dụng trên khắp thế giới. Về khía cạnh này, bản tuyên bố của những người giữ bản quyền này được đăng ký với ISO. Thông tin có thể có được từ:

Jean Deleforge,

BioMérieux

Chemin de l'Orme,

69280 Marcy-l'Etoile, France.

TCVN 7606 : 2007

Chú ý về khả năng là một số cơ sở của tài liệu này có thể phải chịu bản quyền khác với các điều đã nói ở trên. ISO không có trách nhiệm về việc nhận biết bất kỳ hoặc tất cả các bản quyền.

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

Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra các yêu cầu chung và các phương pháp đặc trưng để tách chiết/tinh sạch và định lượng ADN. Các phương pháp này được mô tả trong Phụ lục A và Phụ lục B.

Tiêu chuẩn này được thiết lập nhằm dùng cho các loại chất nền thực phẩm, cũng có thể áp dụng cho các loại chất nền khác như các loại hạt và thức ăn chăn nuôi.

Tiêu chuẩn này là một phần của các phương pháp phân tích dựa vào axit nucleic, cụ thể là TCVN 7605 : 2007 (ISO 21569 : 2005) phương pháp phân tích định tính và ISO 21570 phương pháp phân tích định lượng.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006)¹⁾ 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.

ISO 21568, *Foodstuffs – Method of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Sampling* (Thực phẩm – Phương pháp phân tích để phát hiện sinh vật biến đổi gen và các sản phẩm có nguồn gốc biến đổi gen – Lấy mẫu).

¹⁾ Tại thời điểm ban hành ISO 21569 : 2005 này, tiêu chuẩn ISO 24276 chưa được ban hành. Đến nay tiêu chuẩn ISO 24276 đã được ban hành.

3 Nguyên tắc

3.1 Khái quát

Mục đích của phương pháp tách chiết axit nucleic là thu được các axit nucleic thích hợp để dùng cho các phân tích tiếp theo [xem TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006)].

CHÚ THÍCH: “Chất lượng” của ADN phụ thuộc vào độ dài trung bình của các đoạn ADN tách chiết được, độ tinh khiết về mặt hóa học và tình trạng nguyên vẹn của trình tự ADN cũng như chuỗi xoắn kép (ví dụ: liên kết giữa các sợi, liên kết nội sợi giữa các base của ADN, khoảng trống của sợi đơn, liên kết chéo với các polyol, haemin...). Tuy nhiên, các biến đổi như thế thường là chuỗi đặc thù và do đó không được phân bố ngẫu nhiên trên toàn hệ gen (xem [1], [2], [3] và [4]).

Người sử dụng tiêu chuẩn này cần chú ý rằng một số phương pháp có thể được bảo hộ bản quyền, (ví dụ: tất cả các phương pháp dựa trên silica).

3.2 Tách chiết ADN

Nguyên tắc cơ bản của việc tách chiết ADN bao gồm việc giải phóng ADN có mặt trong chất nền và tiếp theo hoặc sau đó là tinh sạch ADN ra khỏi các chất ức chế phản ứng (PCR).

Các phương pháp tách chiết/tinh sạch được mô tả trong Phụ lục A. Việc chọn phương pháp là sự lựa chọn theo kinh nghiệm của người sử dụng, trên cơ sở xem xét đến mục tiêu và các loại chất nền dùng ở mỗi phương pháp.

Các quy trình khác cũng có thể thích hợp với điều kiện là phương pháp đã được chứng minh có hiệu lực trên chất nền đã được nghiên cứu.

3.3 Định lượng ADN

Việc định lượng các ADN tách chiết được có thể giúp ích cho việc phân tích PCR tiếp theo.

Việc định lượng có thể thực hiện bằng: phương pháp vật lý (ví dụ: đo độ hấp thụ tại bước sóng cụ thể), phương pháp lý-hóa (ví dụ: sử dụng các thuốc thử xen giữa hoặc kết hợp để có thể phát xạ huỳnh quang), phương pháp emzym (ví dụ: phát hiện sự phát quang sinh học), hoặc phương pháp PCR định lượng. Phương pháp PCR định lượng này đặc biệt thích hợp đối với các mẫu có hàm lượng ADN thấp hoặc có ADN bị phân hủy.

Có một vài phương pháp thích hợp để định lượng ADN có mặt trong dung dịch, như mô tả trong Phụ lục B. Điều này giúp cho người sử dụng lựa chọn một phương pháp thích hợp nhất để áp dụng, tùy thuộc vào lượng và chất lượng ADN cần phân tích và đồng thời phụ thuộc vào loại mẫu mà từ đó ADN tách chiết được.

Các quy trình khác có thể cũng thích hợp với điều kiện là phương pháp đã được chứng minh có hiệu lực trên các chất nền được nghiên cứu.

4 Yêu cầu chung đối với phòng thử nghiệm

Bụi và sự phân tán sol khí có thể nhiễm bẩn ngẫu nhiên vào ADN. Vì thế, tổ chức khu vực làm việc của phòng thử nghiệm phải được:

- phân khu một cách có hệ thống các bước phương pháp có liên quan trong việc tạo ra kết quả và
- thực hiện nguyên tắc “dòng chảy xuôi” để xử lý mẫu.

Nguyên tắc này đảm bảo cho ADN cần phân tích và ADN đã khuếch đại bằng PCR được tách rời tự nhiên.

Chi tiết hơn, xem TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

5 Cách tiến hành

5.1 Chuẩn bị phần mẫu thử

5.1.1 Khái quát

Các biến động của mẫu thử (ví dụ như độ ẩm...) và quá trình chế biến có thể ảnh hưởng đến số lượng và chất lượng của ADN tách chiết được. Do đó, các thao tác của phương pháp tách chiết ADN được nêu phụ thuộc vào chất nền.

Cần có các biện pháp thích hợp để đảm bảo rằng phần mẫu thử là đại diện cho mẫu phòng thử nghiệm.

Phần mẫu thử phải có đủ cỡ mẫu và phải có đủ số lượng mẫu nhỏ để đại diện cho mẫu phòng thử nghiệm (ví dụ: 3 000 mẫu nhỏ tại LOD 0,1 %) để cho phép đưa ra kết luận có cơ sở thống kê (xem ISO 21568).

Vì các lý do thực tế/kỹ thuật, khuyến cáo không nên sử dụng cỡ mẫu quá 2 g.

Mọi hạn chế phát sinh từ độ lớn của mẫu thử làm chúng không có tính đại diện phải được ghi lại và được cân nhắc trong phần giải thích kết quả. Các phương pháp tách chiết ADN trong Phụ lục A mô tả các phần mẫu thử từ 200 mg đến 500 mg, thường là đủ đối với các nguyên liệu thô giàu ADN (ví dụ: bột hoặc các hạt ngũ cốc nghiền nhỏ, bột). Tuy nhiên, đối với loại chất nền cụ thể có chứa một lượng rất nhỏ ADN hoặc ADN đã bị phân hủy thì lượng ADN chiết được có thể không đủ để phân tích. Trong trường hợp như vậy cần tăng lượng mẫu thử.

Tiến hành tách chiết ADN ít nhất trên hai phần mẫu thử.

Bảo quản các chất chuẩn, mẫu và phần mẫu thử theo TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006) và phải bố trí sao cho bảo vệ được các thông số sinh hoá cần phân tích [về chi tiết, xem TCVN ISO/IEC 17025:2001 (ISO/IEC 17025 : 1999)].

TCVN 7606 : 2007

5.1.2 Mẫu

Tất cả các thao tác chuẩn bị mẫu thử (ví dụ: nghiền, đồng hoá, chia, sấy khô) phải được thực hiện phù hợp với các quy trình mô tả trong TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006), tránh nhiễm bẩn mẫu hoặc thay đổi thành phần của mẫu.

Mẫu phòng thử nghiệm phải được đồng nhất trước khi giảm cỡ mẫu và lấy phần mẫu thử.

Lắc kỹ bình chứa mẫu dạng lỏng để đồng hoá sản phẩm. Trong trường hợp sản phẩm không đồng nhất như dầu thô, thì kiểm tra và loại bỏ hết lượng cặn ra khỏi bình chứa mẫu.

Đối với các loại chất nền dạng rắn mà khó có thể hoà tan thì có thể nghiền để giảm cỡ hạt và/hoặc thuận tiện cho việc tách chiết ADN. Trong trường hợp này, cần chú ý đến cỡ hạt. Phần mẫu thử cần tách chiết phải có một lượng hạt tối thiểu như quy định trong ISO 21568. Các thiết bị xay/nghiền phải được tinh sạch kỹ và được chọn để thu được số lượng hạt và sự phân bố cỡ hạt trong phần mẫu thử như mong muốn theo quy định trong ISO 21568.

Nếu các thành phần của mẫu phòng thử nghiệm đã được loại bỏ trước khi tách chiết, thì quy trình đó phải được ghi lại.

Các loại thực phẩm ở dạng rắn hoặc nhão và có chứa hàm lượng lipit cao thường khó có thể nghiền đến cỡ hạt mong muốn ngay trong một lần. Do đó, có thể cần bổ sung một vài quy trình, như dùng hexan để loại bỏ lipit ngay sau khi nghiền, làm đông lạnh hoặc đông khô trước khi nghiền.

Để thuận tiện cho việc xay nghiền các sản phẩm dạng nhão hoặc sánh, có thể sử dụng một trong các phương pháp xử lý sau đây đối với các loại mẫu cụ thể:

- làm nóng đến nhiệt độ tối đa là 40 °C;
- hoà tan trong dung dịch lỏng thích hợp như nước;
- làm đông lạnh ở nhiệt độ thấp hơn hoặc bằng -20 °C.

Đồng hoá toàn bộ mẫu phòng thử nghiệm. Lấy hai phần mẫu thử, có tính đến khả năng pha loãng hoặc các nồng độ của chúng.

Trong suốt quá trình xay/nghiền, tránh làm nóng mẫu vì nhiệt độ tăng có thể ảnh hưởng xấu đến chất lượng của ADN tách chiết được.

Các kỹ thuật xay/nghiền có nguy cơ nhiễm bẩn chéo cao nên cần tránh được càng nhiều càng tốt (như sử dụng kết hợp nitor lỏng và cối xay). Theo quy tắc của thực hành tốt, thì trong quá trình phân tích phải tránh bất kỳ bước nào có sinh bụi.

Nếu trong mẫu có chứa các muối, gia vị, đường bột và/hoặc các chất khác mà có khả năng cản trở việc tách chiết hoặc cản trở việc phân tích, thì cần xem xét các bước tinh sạch thích hợp theo phương pháp được chọn (xem Phụ lục A).

Ví dụ: trong các mẫu từ các chất nền phức hợp, thì chất nền đích (ví dụ, lớp bột phủ của cá tẩm bột) cần được tách riêng để tách chiết ADN.

5.2 Tách chiết/tinh sạch ADN

5.2.1 Khái quát

Cần xem xét các vấn đề sau đây để thiết kế các phương pháp tách chiết.

Chất lượng và số lượng axit nucleic của chất nền tách chiết được bằng phương pháp nhất định cần có khả năng lặp lại và khả năng tái lập khi phân tích, với điều kiện là có đủ lượng axit nucleic trong chất nền để có thể tách chiết được.

Để thu được ADN chất lượng tốt, tốt nhất là loại bỏ các chất sau đây, khi thích hợp:

- polysacarit (pectin, xenlulo, hemi-xenlulo, tinh bột, chất làm dày...) sử dụng các enzym thích hợp để xử lý (ví dụ, pectinaza, xenlulaza, hemi-xenlulaza, α -amylaza) hoặc chiết xuất hữu cơ (ví dụ, CTAB/clorofom);
- RNA và/hoặc protein sử dụng phương pháp xử lý thích hợp, như xử lý bằng enzym RNaza và proteinaza, tương ứng;
- các cấu phần lipit sử dụng, ví dụ như các phương pháp xử lý bằng enzym, hoặc các dung môi (ví dụ, *n*-hexan);
- các muối (ví dụ, từ các dung dịch chiết xuất/dung dịch đệm phân giải, từ bước kết tủa) có thể gây cản trở bước phân tích tiếp theo.

Đặc biệt là đối với các mẫu ở dạng rắn hoặc khô, thì thể tích dung dịch đệm chiết/phân giải cần phải phù hợp để đảm bảo ADN được hoà tan.

CHÚ THÍCH 1: Việc tinh sạch ADN có thể được tiến hành bằng nhiều cách như kết tủa phân đoạn, sử dụng các dung môi như phenol, clorofom, etanol, isopropanol, và/hoặc bằng cách hấp thụ lên chất nền dạng rắn (resin trao đổi ion, silica gel hoặc gel thủy tinh, diatomat, màng...). Một vài nguyên tắc tinh sạch ADN có thể được dùng kết hợp. Nếu thích hợp, việc tách chiết và tinh sạch có thể được thực hiện trong cùng một bước.

Cần sử dụng các chất cộng kết ADN như glycogen, PEG hoặc t-RNA để tăng độ thu hồi ADN trong suốt các giai đoạn kết tủa, nó không được chứa hoạt tính nucleaza hoặc chất ức chế/cạnh tranh PCR ở mức bất kỳ có thể phát hiện được, cũng không được chứa bất kỳ chuỗi đồng dạng nào với PCR đang nghiên cứu. Đối với các thực vật biến đổi gen, chất mang ADN có thể được sử dụng (ví dụ, ADN của tinh dịch cá hồi hoặc cá trích).

Khi sử dụng thiết bị sấy đông khô bằng chân không để sấy khô các viên ADN thu được sau giai đoạn kết tủa, cần chú ý tránh nguy cơ nhiễm bẩn chéo.

Hoà lại ADN trong nước hoặc trong dung dịch đệm sao cho tránh làm giảm chất lượng ADN.

TCVN 7606 : 2007

Khi thiết lập một cách chiết ADN mới, hoặc khi áp dụng một trong các phương pháp mô tả trong Phụ lục A cho một loại chất nền mới, thì cần tính đến chất lượng và tính nguyên vẹn của ADN tách chiết sử dụng phương thức đã chọn bằng phương pháp sau đây. Một lượng đã biết ADN đánh dấu được bổ sung vào dung dịch đệm phân giải cộng với mẫu được dùng để chiết ADN. Khi ADN đánh dấu được chọn là một lượng ADN định trước hoặc đại diện cho một số lượng đã định của các phiên bản của chuỗi ADN cụ thể được trộn vào chất nền khi bắt đầu chiết ADN, đảm bảo việc không có mặt của trình tự ADN tương đồng giữa ADN đánh dấu và ADN cần phân tích.

CHÚ THÍCH 2: Việc sử dụng ADN đánh dấu là sự đánh giá gần đúng vị trí thực của ADN trong chất nền, trong trường hợp ADN kết hợp với các thành phần khác (ví dụ, các protein). Phương pháp này cũng có thể được sử dụng để đánh giá sự có mặt của chất ức chế PCR tác động trans và hoà tan có trong ADN tách chiết được [xem TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006), TCVN 7605 : 2007 (ISO 21569 : 2005) và ISO 21570].

Tuy nhiên, ADN đánh dấu có thể gây hiểu nhầm về độ thu hồi, vì ADN đánh dấu có thể dễ dàng tách ra khỏi chất nền hơn so với ADN đích.

5.2.2 Các phép kiểm chứng

Các phép kiểm chứng được đưa ra trong Bảng 1 của TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006). Các phép kiểm chứng này là những yêu cầu tối thiểu, bao gồm kiểm chứng trắng về quy trình tách chiết và kiểm chứng tách chiết dương tính, cũng có thể bao gồm cả kiểm chứng môi trường.

5.2.3 Kiểm chứng độ sạch của ADN: kiểm chứng nội PCR

Khi thiết lập một kiểu tách chiết mới, thì sự có mặt các chất ức chế phản ứng PCR trong ADN chiết được có thể được ước tính sử dụng các mẫu đã biết trước ADN (DNA spikes) [xem TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006), TCVN 7605 : 2007 (ISO 21569 : 2005) và ISO 21570]. Lượng ADN được bổ sung vào không được vượt quá mức tối đa mà PCR cung cấp và phải chứa một lượng xác định các phiên bản chuỗi cần xác định. Số lượng này cần được xác định riêng rẽ đối với từng chuỗi cần xác định và được chỉ rõ là bội số của giới hạn phát hiện dưới. Tốt nhất, nồng độ đích của PCR kiểm chứng dương tính phải tương ứng với độ nhạy cần thiết của phép phân tích. Cần thận trọng khi sử dụng ADN đích nhân bản có nồng độ cao. Khi có thể, các phép kiểm chứng dương tính phải tuân thủ các điều kiện của mẫu thử chứa axit nucleic.

5.3 Định lượng ADN tách chiết được

5.3.1 Khái quát

Chất lượng, số lượng và tính nguyên vẹn của mẫu axit nucleic có ảnh hưởng đến tính năng của phương pháp phân tích, do đó ảnh hưởng đến kết quả thu được. Giới hạn phát hiện của phương pháp cụ thể có thể phụ thuộc vào lượng axit nucleic được sử dụng.

Việc định lượng ADN giúp cho việc

- so sánh hiệu quả của các quy trình tách chiết ADN khác nhau đối với một loại chất nền đã định (tính lặp lại), và
- đo nồng độ của các axit nucleic trước khi phân tích.

5.3.2 Phạm vi áp dụng

Mỗi phương pháp định lượng phải được áp dụng trong khoảng động học, đồng thời cũng xem xét đến độ chụm của nó.

5.3.3 Chuẩn định lượng

Độ chính xác của các phương pháp định lượng phụ thuộc vào các chuẩn axit nucleic được dùng để hiệu chuẩn phương pháp.

Nếu sử dụng phương pháp nhạy với cỡ và/hoặc chất lượng của các phân đoạn axit nucleic, thì cần sử dụng các chuẩn axit nucleic phù hợp với cỡ và/hoặc chất lượng của axit nucleic cần phân tích đó.

Mẫu chuẩn được sử dụng cần đảm bảo về khả năng truy nguyên đối với các chất chuẩn đã định, thông thường là các chất chuẩn quốc tế hoặc chuẩn quốc gia thông qua chuỗi so sánh liên tục [xem ISO guide 30].

Khi một phương pháp có dùng các chất xen kẽ, ADN chuẩn có khối lượng phân tử cao cần được sử dụng khi định lượng ADN khối lượng phân tử cao. ADN có khối lượng phân tử thấp cần được sử dụng khi định lượng ADN khối lượng phân tử thấp. Axit nucleic có khối lượng phân tử cao thường chứa một lượng nhất định các đoạn khối lượng phân tử thấp. Điều này có nghĩa rằng nhiều phương pháp định lượng ADN có một độ không chính xác nhất định cần được tính đến.

CHÚ THÍCH: Ngoài ra, tùy thuộc vào loại chất nền và phương pháp tách chiết, mà một phần nhất định của ADN tách chiết được có thể tồn tại ở dạng sợi đơn ADN (có khả năng xen kẽ kém hơn), dẫn đến việc đánh giá dưới mức hàm lượng ADN tổng số. Trái lại, ADN sợi đơn cũng được phát hiện tương tự bằng các phương pháp vật lý.

Có ít nhất ba điểm (tốt nhất là được lặp lại) được yêu cầu để dựng đường chuẩn tốt. Lượng ADN chuẩn được sử dụng cho mỗi điểm hiệu chuẩn phụ thuộc vào độ nhạy và khoảng động học của phương pháp.

5.4 Tính ổn định của ADN tách chiết được

Bảo quản ADN tách chiết được trong các điều kiện đảm bảo được tính ổn định để thực hiện các phép phân tích tiếp theo.

Tránh lặp lại việc cấp đông và rã đông các dung dịch ADN.

6 Diễn giải

Phương pháp tách chiết ADN được áp dụng phải thích hợp để thu được chất lượng và số lượng axit nucleic theo yêu cầu để phân tích tiếp theo.

TCVN 7606 : 2007

Chất lượng của axit nucleic tách chiết được cần được đánh giá bằng phương pháp phân tích chịu ảnh hưởng bởi các thông số chất lượng tương tự như phép phân tích được tiến hành trên axit nucleic chiết được (ví dụ, phép phân tích được thực hiện là PCR, thì các bước tiếp theo PCR cần được thực hiện để đánh giá chất lượng của ADN tách chiết được).

Các thông số tiếp theo về tính tương thích của phương pháp, có thể xem TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006), TCVN 7605 : 2007 (ISO 21569 : 2005) và ISO 21570.

7 Báo cáo thử nghiệm

Khi đưa ra báo cáo thử nghiệm cuối cùng theo TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006), cần bao gồm các thông tin bổ sung sau đây vào tài liệu về hoạt động của phòng thử nghiệm:

- báo cáo mô tả sai lệch của các phần mẫu thử và bất kỳ xử lý nào của mẫu trước khi tách chiết axit nucleic;
- cỡ mẫu thử được sử dụng để tách chiết axit nucleic;
- phương pháp tách chiết axit nucleic đã sử dụng;
- bất kỳ quan sát đặc biệt nào trong suốt quá trình thử nghiệm;
- bất kỳ thao tác nào không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được coi là tùy ý mà có ảnh hưởng đến kết quả;
- diễn giải các kết quả;
- tên người làm thực nghiệm.

Xử lý và bảo quản các số liệu được đưa ra trong TCVN ISO/IEC 17025 : 2001 (ISO/IEC 17025 : 1999) và sơ đồ đảm bảo chất lượng có liên quan. Cần đảm bảo tính nhất quán.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Phương pháp tách chiết ADN

A.1 Chuẩn bị ADN đạt chất lượng dùng cho phản ứng PCR bằng phương pháp tách chiết ADN có sử dụng phenol/clorofom

A.1.1 Phương pháp dựa trên phenol/clorofom

A.1.1.1 Khái quát

Phương pháp thông dụng này (xem [5]) thích hợp để chiết ADN ra khỏi nhiều loại chất nền khác nhau (xem A.1.1.8).

Phenol thường rất thích hợp đối với việc phá huỷ các nucleaza và làm biến tính protein.

Khi nghiên cứu các loại thảo mộc hoặc lá (ví dụ, các lá rau diếp, cỏ linh lăng khô), thì nhiều chất ức chế phản ứng PCR có thể cũng đồng thời kết tủa với ADN. Do đó, khả năng thu nhận ADN khuếch đại bằng PCR có thể gặp khó khăn.

Do tính độc hại ăn mòn của phenol mà cần sử dụng các phương pháp tách chiết ADN dựa trên CTAB và/hoặc PVP và/hoặc sự hấp thụ silica.

A.1.1.2 Tình trạng hiệu lực

Phương pháp này đã được áp dụng rộng rãi trong tất cả các lĩnh vực sinh học, nông học và y tế trong suốt 40 năm qua, nhưng chưa bao giờ được đánh giá trong các nghiên cứu liên phòng thử nghiệm để phát hiện sinh vật biến đổi gen trong thực phẩm.

A.1.1.3 Nguyên tắc

Phương pháp này bao gồm các bước phân huỷ (phân huỷ nhiệt trong sự có mặt của natri dodecyl sunfat và hàm lượng EDTA cao) tiếp theo bằng cách loại bỏ các tạp chất (như các phân tử ưa mỡ, các chất polysacarit và protein) và các nucleaza từ pha lỏng chứa ADN sử dụng phenol và clorofom. Kết tủa ADN cuối cùng bằng etanol, làm cô đặc ADN và loại trừ các muối và clorofom còn dư. Bước quyết định của phương pháp là bước phân giải [5].

A.1.1.4 Các yêu cầu về an toàn

Cần có tủ hút để xử lý các chất hữu cơ.

TCVN 7606 : 2007

A.1.1.5 Thuốc thử

A.1.1.5.1 Etanol, $\phi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 96\%$ phần thể tích

Bảo quản và sử dụng dung dịch này ở $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

A.1.1.5.2 Axit axetic băng (CH_3COOH).

A.1.1.5.3 Kali axetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{K}$).

A.1.1.5.4 Axit clohydric, $\phi(\text{HCl}) = 37\%$.

A.1.1.5.5 Isoamyl ancol [$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$].

A.1.1.5.6 Phenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$).

A.1.1.5.7 Clorofom (CHCl_3).

A.1.1.5.8 Tris(hydroxymetyl)-aminometan (Tris)($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$).

A.1.1.5.9 Muối dikali axit etylendiamintetraaxetic (K_2EDTA) ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{K}_2$).

A.1.1.5.10 Kali hydroxit (KOH).

A.1.1.5.11 Kali clorua (KCl).

A.1.1.5.12 Natri dodexyl sunfat (SDS) ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{SNa}$).

A.1.1.5.13 Proteinaza-K, khoảng 20 đơn vị/mg lyophilisat.

A.1.1.5.14 RNaza-A, không chứa DNaza từ tuyến tụy của bò, khoảng 50 đơn vị/mg lyophilisat.

A.1.1.5.15 Phenol cân bằng, $\text{pH} > 7,8$.

Sử dụng phenol cân bằng dựa vào dung dịch đệm chiết (A.1.1.5.18) không có SDS, hoặc được chuẩn bị theo [5], hoặc theo các khuyến cáo của nhà sản xuất.

A.1.1.5.16 Clorofom-isoamyl ancol

Trộn 24 phần thể tích clorofom (A.1.1.5.7) với 1 phần thể tích isoamyl ancol (A.1.1.5.5).

A.1.1.5.17 Phenol-clorofom-isoamyl ancol

Trộn 1 phần thể tích phenol đã cân bằng (A.1.1.5.15) với 1 phần thể tích dung dịch clorofom-isoamyl ancol (A.1.1.5.16).

A.1.1.5.18 Dung dịch đệm chiết/phân giải, nồng độ chất $c(\text{Tris}) = 0,050 \text{ mol/l}$, $c(\text{K}_2\text{EDTA}) = 0,050 \text{ mol/l}$, nồng độ khối lượng $\rho(\text{SDS}) = 30 \text{ g/l}$.

Dùng HCl hoặc KOH để chỉnh pH đến 8,0.

A.1.1.5.19 Dung dịch đệm TE, $c(\text{Tris}) = 0,010 \text{ mol/l}$, $c(\text{K}_2\text{EDTA}) = 0,001 \text{ mol/l}$.

Dùng HCl hoặc KOH để chỉnh pH đến 8,0.

A.1.1.5.20 Dung dịch proteinaza, $\rho = 20 \text{ mg/ml}$, hoà tan được trong nước vô trùng.

Không hấp áp lực. Bảo quản ở $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, tránh lặp lại việc cấp đông và rã đông.

A.1.1.5.21 Dung dịch RNaza-A, $\rho = 10 \text{ mg/ml}$ lyophilisat.

Bảo quản ở $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, tránh lặp lại việc cấp đông và rã đông.

A.1.1.5.22 Dung dịch etanol, $\phi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 70 \%$.

Bảo quản ở $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

A.1.1.5.23 Dung dịch kali axetat, $c(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{K}) = 3 \text{ mol/l}$.

Dùng axit axetic băng để chỉnh pH đến 5,2. Không hấp áp lực. Lọc qua bộ lọc cỡ lỗ $0,22 \text{ } \mu\text{m}$, nếu cần.

A.1.1.6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ phòng thử nghiệm thông thường và các loại sau:

A.1.1.6.1 Máy ly tâm, có thể đạt được lực ly tâm tối thiểu $10\,000 \text{ g}$.

Trong một số giai đoạn cần đến ly tâm lạnh.

A.1.1.6.2 Nồi cách thủy hoặc tủ ấm, làm việc trong dải nhiệt độ từ $60 \text{ }^\circ\text{C}$ đến $70 \text{ }^\circ\text{C}$.

A.1.1.6.3 Máy sấy chân không, tùy chọn.

A.1.1.6.4 Máy sấy đông khô, tùy chọn.

A.1.1.6.5 Máy trộn, ví dụ như Vortex^{®2)}.

A.1.1.6.6 Bình phản ứng, bền với việc cấp đông trong nitơ lỏng.

²⁾ Máy Vortex là một ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và tổ chức ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Các sản phẩm tương tự có thể được sử dụng nếu cho kết quả tương tự.

TCVN 7606 : 2007

A.1.1.7 Cách tiến hành

A.1.1.7.1 Khái quát

Khi phần mẫu thử đã được chuẩn bị thì tiến hành quy trình tách chiết/tinh sạch ADN. Cần điều chỉnh cho thích hợp giữa khối lượng và thể tích dung dịch đệm tùy theo cỡ mẫu đã chọn.

A.1.1.7.2 Quy trình tách chiết

Cân 0,25 g mẫu thử cho vào một ống nghiệm nhỏ.

Cho thêm 1,6 ml dung dịch đệm chiết (A.1.1.5.18) và khi cần cho thêm (ví dụ như trong các loại chất nền giàu protein), 50 μ l dung dịch K proteinaza (A.1.1.5.20). Ủ ở 60 °C đến 70 °C, thông thường trong vòng 30 min đến 2 h (cũng có thể ủ ấm qua đêm). Bổ sung RNaza A (A.1.1.5.21) đạt nồng độ cuối cùng là 0,1 μ g/ml. Ly tâm ở 5 000 g trong 30 min và lấy phần nổi phía trên cho vào ống nghiệm mới. Cho một thể tích phenol đã cân bằng (A.1.1.5.15) vào phần nổi phía trên và trộn kỹ một cách nhẹ nhàng. Cho ly tâm ở 5 000 g trong 15 min và thu lấy phần nổi phía trên cho vào ống nghiệm mới. Thêm một thể tích phenol-clorofom-isoamyl ancol (A.1.1.5.17) vào phần nổi phía trên và trộn kỹ một cách nhẹ nhàng. Cho ly tâm tiếp ở 5 000 g trong 15 min và thu lấy pha lỏng vào một ống nghiệm mới. Lặp lại bước này một hoặc nhiều lần (tùy thuộc vào loại chất nền) cho đến khi có lớp ngăn cách rõ ràng giữa các pha.

Cho một thể tích clorofom/isoamyl ancol (A.1.1.5.16) vào phần nổi phía trên và trộn kỹ một cách nhẹ nhàng. Cho ly tâm tiếp ở 5 000 g trong 10 min và thu lấy pha lỏng vào một ống nghiệm mới. Lặp lại bước này, nếu cần, cho đến khi có lớp ngăn cách rõ ràng giữa các pha. Trộn kỹ phần nổi phía trên với 0,1 thể tích dung dịch kali axetat (A.1.1.5.23) và 2,5 thể tích etanol 96 % (A.1.1.5.1), trộn kỹ bằng cách lật lên lật xuống ống nghiệm. Ủ ít nhất 5 phút trong niro lỏng, hoặc 1 h ở - 80 °C, hoặc để qua đêm ở -20 °C. Ly tâm ở 10 000 g (hoặc đến 13 000 g) ở 4 °C ít nhất 15 min, cẩn thận loại bỏ phần nổi phía trên.

Rửa cẩn thận các kết tủa ADN bằng 2 thể tích dung dịch etanol 70 % (A.1.1.5.22). Ly tâm ở 10 000 g đến 13 000 g ở 4 °C trong 15 min

, sau đó cẩn thận loại bỏ phần nổi phía trên. Bước này là cần thiết để loại bỏ các muối kết tủa mà có thể làm cản trở bước phân tích tiếp theo (ví dụ: PCR).

Sấy khô kết tủa này và hoà tan lại trong 100 μ l nước hoặc dung dịch đệm thích hợp, ví dụ, dung dịch đệm TE (A.1.1.5.19). Đây là dung dịch gốc chính ADN. Thêm RNaza-A (A.1.1.5.21) đến nồng độ cuối cùng là 0,1 μ g/ml.

A.1.1.8 Danh mục các ví dụ

Phương pháp này đã áp dụng thành công để chiết ADN³⁾ ra khỏi các loại chất nền sau:

Hạt đậu tương đã axit hoá³⁾, cỏ linh lăng khô, bánh dùng cho trẻ nhỏ³⁾, sữa dành cho trẻ nhỏ³⁾, vi khuẩn và bào tử của nó, hạt lúa mạch, pate thịt bò/thịt lợn³⁾, thịt bò³⁾, phomat xanh, bánh socola hạnh nhân³⁾, ngô đóng hộp, hạt carot, ngũ cốc đóng thành thỏi³⁾, phomat, gà, lá rau diếp, củ cải, bánh socola³⁾, socola nhão³⁾, bánh quế, mít quả, bánh ngô³⁾, gạo xay, váng sữa³⁾, hạt đậu Hà lan khô, bánh qui ngô³⁾, bánh khô dầu ngô, bột ngô, thức ăn gluten ngô, ngô hạt, các hạt bột sắn dùng làm thức ăn chăn nuôi, bột sắn hạt, thịt tươi và đã nấu chín³⁾ (bò, lợn, gà, và gà tây), thịt quả dưa, hạt dưa, thịt xay, các thành phần của món điểm tâm³⁾, món điểm tâm³⁾, giá đỗ³⁾, hạt yến mạch, củ khoai tây, bánh khô của hạt cải dầu, glupacolza, hạt cải dầu, xúc xích (lát mỏng³⁾ và cocktail³⁾(xem A.1.2 về phương pháp chiết cải tiến), món còtlet bê, sovie hoi sin³⁾, viên xúp, protein đậu tương trong chế biến thịt³⁾, lexitin đậu tương (nâu thô và vàng xác định³⁾), giá đậu tương³⁾, đồ uống từ đậu tương, hạt đậu tương, váng dữa đậu tương, bánh khô dầu đậu tương, đậu phụ từ đậu tương, nước sốt spaghetti³⁾, hạt lúa mì spenta, củ cải đường (phần thịt sấy khô), củ cải đường (củ tươi), hạt củ cải đường, hạt hoa hướng dương, đậu phụ, quả cà chua tươi, cà chua nghiền³⁾, hạt quả cà chua, hamburger thực vật, bánh kem xốp (có³⁾ và không có socola³⁾), cám lúa mì, bột mì, thức ăn gluten lúa mì, hạt lúa mì, semolina lúa mì, sữa chua³⁾ (xem A.1.3 về phương pháp chiết cải tiến).

A.1.2 Phương pháp phenol/clorofom: Quy trình cấy khởi động xúc xích lên men

A.1.2.1 Khái quát

Phương pháp này được dùng để tách ADN tổng số, bao gồm ADN hệ gen vi khuẩn từ xúc xích. Khả năng áp dụng của phương pháp này là để thu được ADN có chất lượng cao thích hợp cho việc phát hiện ADN tái tổ hợp bằng PCR đã được chứng minh cho xúc xích lên men [6] giống như đối với xúc xích lên men xử lý nhiệt, còn được gọi là xúc xích mùa hè [7]. Ngoài ra, phương pháp tách chiết còn thích hợp để tách ADN tổng số ra khỏi váng sữa để phát hiện *Staphylococcus aureus* đặc thù trong chất nền thực phẩm này [8]. (Phương pháp này thích hợp đối với các loại chất nền nêu trong A.1.2.8).

A.1.2.2 Tình trạng hiệu lực

Một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm trên phần mẫu thử 0,4 g đã được thực hiện để đánh giá hiệu lực đối với phương pháp này (xem A.1.2.9).

³⁾ Độ lặp lại có thể phụ thuộc vào mẻ mẫu và/hoặc công nghệ sản xuất chúng. Trong một số trường hợp, ADN có thể không tìm thấy hoặc bị biến chất làm cho các kết quả PCR ở mức dưới giới hạn phát hiện của phương pháp, bất kể mỗi/quy trình PCR đã được sử dụng. Điều này có thể là nguyên nhân của độ tái lập thấp giữa các phòng thử nghiệm.

TCVN 7606 : 2007

A.1.2.3 Nguyên tắc

Phương pháp này gồm việc thu hồi lại các tế bào vi khuẩn từ chất nền thực phẩm bằng cách đông hoá các mẫu xúc xích, sau đó cho ly tâm. Phần lắng chứa không chỉ các tế bào vi khuẩn mà còn các hạt thịt. Để phân huỷ riêng các tế bào vi khuẩn, thì cần phá vỡ các thành tế bào bằng cách bổ sung lysozym. Để tăng độ phân huỷ các thành tế bào lactobacili thịt, có thể bổ sung mutanolysin. Việc phân huỷ hoàn toàn các tế bào được thực hiện bằng cách bổ sung chất làm sạch SDS (natri dodexyl sunfat) và proteinaza-K, tiếp theo bằng cách chiết vài lần pha lỏng bằng phenol và/hoặc clorofom. Bước chiết bằng phenol và/hoặc clorofom là rất cần thiết để loại bỏ mọi hoạt tính nucleaza và các chất ức chế phản ứng PCR kể cả các chất này được phát sinh ra từ chất nền thực phẩm (ví dụ, haematin). Cuối cùng thực hiện kết tủa ADN bằng etanol.

A.1.2.4 Yêu cầu về an toàn

Cần có tủ hút để xử lý các chất hữu cơ.

A.1.2.5 Thuốc thử

A.1.2.5.1 Isopropanol [$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$].

A.1.2.5.2 Etanol, ϕ ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) = 96 %.

Bảo quản và sử dụng ở $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

A.1.2.5.3 Axit axetic băng, (CH_3COOH).

A.1.2.5.4 Axit clohydric, ϕ (HCl) = 37 %.

A.1.2.5.5 Natri hydroxit (NaOH).

A.1.2.5.6 Isoamyl ancol [$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$].

A.1.2.5.7 Phenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$).

A.1.2.5.8 Clorofom (CHCl_3).

A.1.2.5.9 Tris(hydroxymetyl)-aminometan (Tris)($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$).

A.1.2.5.10 Muối dinatri axit etylendiamintetraaxetic (Na_2EDTA)($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2$).

A.1.2.5.11 Natri dodexyl sunfat (SDS)($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{SNa}$).

A.1.2.5.12 Lysozym

50 000 U/mg protein (1 U sẽ tạo ra một ΔA_{450} của 0,001/phút ở pH 6,24 và 25 °C, sử dụng huyền phù *Micrococcus lysodeikticus* làm cơ chất, trong 2,6 ml hỗn hợp phản ứng sử dụng 1 cm đường quang).

A.1.2.5.13 Sacaroza ($C_{12}H_{22}O_{11}$).**A.1.2.5.14 Proteinaza-K**, khoảng 20 đơn vị/mg lyophilisat.**A.1.2.5.15 Natri axetat** ($C_2H_3O_2Na$).

A.1.2.5.16 Phenol đã cân bằng, được bão hoà với dung dịch đệm Tris/HCl (pH>7,8), hoặc được chuẩn bị theo [5], hoặc theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

A.1.2.5.17 Clorofom-isoamyl ancol

Trộn 24 phần thể tích clorofom (A.1.2.5.8) với một phần thể tích isoamyl ancol (A.1.2.5.6).

A.1.2.5.18 Phenol-clorofom-isoamyl ancol

Chuẩn bị bằng cách trộn 25 phần thể tích phenol đã cân bằng (A.1.2.5.16) với 24 phần thể tích clorofom (A.1.2.5.8) và 1 phần thể tích isoamyl ancol (A.1.2.5.6).

A.1.2.5.19 Dung dịch mutanolysin, chứa 500 U/ml hoặc 5 000 U/ml mutanolysin, được hoà tan trong nước vô trùng.

Không hấp áp lực. Bảo quản ở $-20\text{ }^\circ\text{C}$, tránh lặp lại việc cấp đông và rã đông.

A.1.2.5.20 Dung dịch lysozym, chứa 10 mg/ml, được hoà tan trong nước vô trùng.

Không hấp áp lực. Bảo quản ở $-20\text{ }^\circ\text{C}$, tránh lặp lại việc cấp đông và rã đông.

A.1.2.5.21 Dung dịch sacaroza, $\rho(C_{12}H_{22}O_{11}) = 400\text{ g/l}$.

A.1.2.5.22 Dung dịch đệm A, $c(\text{Tris}) = 0,020\text{ mol/l}$, $c(\text{Na}_2\text{EDTA}) = 0,020\text{ mol/l}$, $c(\text{NaCl}) = 0,1\text{ mol/l}$.

Dùng HCl hoặc NaOH để chỉnh pH đến 8,0.

A.1.2.5.23 Dung dịch đệm tách chiết/phân giải, chứa một phần thể tích dung dịch đệm A (A.1.2.5.22) và một phần dung dịch sacaroza (A.1.2.5.21).

A.1.2.5.24 Dung dịch SDS, $\rho(\text{SDS}) = 250\text{ g/l}$.

A.1.2.5.25 Dung dịch proteinaza-K, chứa khoảng 20 mg/ml, được bảo quản ở $-20\text{ }^\circ\text{C}$, được hoà tan trong nước vô trùng.

Không hấp áp lực. Bảo quản ở $-20\text{ }^\circ\text{C}$, tránh lặp lại việc cấp đông và rã đông.

TCVN 7606 : 2007

A.1.2.5.26 Dung dịch etanol, ϕ (C₂H₅OH) = 70 %.

Bảo quản và sử dụng ở -20 °C.

A.1.2.5.27 Natri axetat, c (C₂H₃O₂Na) = 3 mol/l.

Dùng axit axetic bằng để chỉnh pH đến 5,2.

A.1.2.5.28 Dung dịch đệm TE, c (Tris) = 0,010 mol/l, c (Na₂EDTA) = 0,001 mol/l.

Dùng HCl hoặc NaOH để chỉnh pH đến 8,0.

A.1.2.6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và các loại sau:

A.1.2.6.1 Dụng cụ và/hoặc vật liệu để làm nhỏ các mô (ví dụ, dao thái).

A.1.2.6.2 Máy ly tâm, có thể được lực ly tâm ở 12 000 g.

Trong một số giai đoạn cần đến ly tâm lạnh.

A.1.2.6.3 Nồi cách thủy hoặc tủ ẩm.

A.1.2.6.4 Máy sấy chân không (tùy chọn).

A.1.2.6.5 Máy trộn, ví dụ: Vortex^{®2}.

A.1.2.7 Cách tiến hành

A.1.2.7.1 Khái quát

Khi phần mẫu thử đã được chuẩn bị thì tiến hành quy trình tách chiết/tinh sạch ADN. Cần điều chỉnh cho thích hợp giữa khối lượng và thể tích dung dịch đệm tùy theo cỡ mẫu đã chọn.

A.1.2.7.2 Chuẩn bị mẫu

Cắt nhỏ xúc xích thật, đông hoá và cho từ 200 mg đến 500 mg vào 3 thể tích nước (đến 1,5 ml). Giữ ở nhiệt độ phòng khoảng 10 phút.

A.1.2.7.3 Quy trình tách chiết

Cẩn thận chuyển 500 μ l pha lỏng (huyền phù) vào bình phản ứng mới. Cho ly tâm 10 phút ở 12 000 g.

Gạn phần nổi phía trên và hoà lại các chất kết tủa trong 500 μ l dung dịch đệm chiết/phân gải (A.1.2.5.23).

Cho 50 µl dung dịch lysozym (A.1.2.5.20). Ủ ở 37 °C trong 1 giờ. Nếu các kết quả chưa đạt yêu cầu thì có thể kết hợp lysozym với 10 U mutanolysin (A.1.2.5.19), nhưng ảnh hưởng của loại chất nền cụ thể này cần được thử nghiệm trước khi sử dụng.

Thêm 25 µl dung dịch SDS (A.1.2.5.24) và 25 µl dung dịch proteinaza-K (A.1.2.5.25), sau đó để 10 phút ở 60 °C.

Cho thêm 1 thể tích phenol/clorofom/isoamyl ancol (A.1.2.5.18) và trộn.

Cho ly tâm hỗn hợp trong 3 min ở 12 000 g. Chuyển phần nổi phía trên sang bình phản ứng mới.

Cho 0,1 thể tích dung dịch natri axetat (A.1.2.5.27) và 1 thể tích isopropanol (A.1.2.5.1). Trộn nhẹ nhàng bằng cách đảo chiều vài lần.

Giữ ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 min. Ly tâm 15 min ở khoảng 12 000 g. Gạn bỏ phần nổi phía trên.

Rửa các kết tủa này cẩn thận bằng ít nhất 500 µl dung dịch etanol (A.1.2.5.26), lắc nhẹ. Ly tâm hỗn hợp 10 min ở khoảng 12 000 g. Bước này là cơ bản để loại bỏ các muối kết tủa mà có thể gây cản trở cho bước phân tích tiếp theo (ví dụ, PCR).

Loại bỏ phần nổi phía trên.

Làm khô các kết tủa này và hoà lại vào 100 µl nước hoặc dung dịch đệm thích hợp, ví dụ: dung dịch đệm TE (A.1.2.5.28). Đây là dung dịch ADN gốc.

A.1.2.8 Danh mục các ví dụ

Xem Bảng A.1.

Bảng A.1 – Danh mục các loại chất nền đã áp dụng thành công phương pháp

| Các loại chất nền đã được phân tích thành công | Vi sinh vật | Tài liệu tham khảo |
|--|-------------------------------|--------------------|
| Xúc xích lên men | <i>Lactobacillus curvatus</i> | [6] |
| Xúc xích mùa hè (được xử lý nhiệt) | <i>Lactobacillus curvatus</i> | [7] |
| Váng sữa | <i>Staphylococcus aureus</i> | [8] |

A.1.2.9 Tính hiệu lực

Các số liệu xác nhận hiệu lực ở Bảng A.2 đã được xây dựng trong nghiên cứu cộng tác của nhóm công tác “Xây dựng các phương pháp để nhận biết thực phẩm được chế biến bằng kỹ thuật công nghệ gen” của Ủy ban German Federal Health Board về ứng dụng các phương pháp theo Điều khoản 35 của Luật Thực phẩm của Đức [6].

TCVN 7606 : 2007

Trong nghiên cứu cộng tác này, có hai mẫu dương tính giả, có khả năng do bao gói sai. Trong nghiên cứu này không sử dụng mutanolysin.

Bảng A.2 – Số liệu có hiệu lực

| Số lượng phòng thử nghiệm tham gia | Số lượng mẫu xúc xích/một phòng thử nghiệm | Số lượng mẫu tổng số | Số lượng mẫu được nhận dạng đúng |
|------------------------------------|--|----------------------|--|
| 15 | 10 | 150 | 148 (các mẫu kiểm chứng và mẫu biến đổi gen) |

A.1.3 Phương pháp chiết bằng phenol/clorofom: Quy trình đối với việc cấy khởi động sữa chua

A.1.3.1 Khái quát

Phương pháp này mô tả quy trình chiết ADN từ nuôi cấy khởi động được dùng để lên men sản phẩm sữa chua. Quy trình này thực hiện thành công với sữa chua thường, sữa chua có chứa các thành phần khác nhau như thịt quả, các chất phụ gia và các chất ổn định và các sản phẩm khác có hàm lượng chất béo khác nhau (xem A.1.3.8 và [9], [10], [11]). ADN có chất lượng dùng cho phản ứng PCR cũng được chiết ra khỏi sữa chua đã được xử lý nhiệt^[12].

A.1.3.2 Tình trạng hiệu lực

Phương pháp này đã được đánh giá hiệu lực qua một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm, xem A.1.3.9.

A.1.3.3 Nguyên tắc

Phương pháp này dựa trên quy trình tách chiết phenol/clorofom và được điều chỉnh cho phù hợp với các chất nền thực phẩm cụ thể. Các gốc Gram dương của sữa chua thu được sau khi hoà tan casein đông tụ ở pH kiềm. Các tế bào thu được được hoà lại vào trong dung dịch đệm và được xử lý bằng lysozym (và mutanolysin) để phá vỡ thành tế bào. Việc phân huỷ tế bào được thực hiện bằng cách bổ sung chất tẩy rửa như natri dodexyl sunfat (SDS). Protein được loại ra bằng cách xử lý proteinaza-K và các bước tiếp theo là xử lý bằng phenol/clorofom và clorofom. ADN cuối cùng được kết tủa với ancol.

A.1.3.4 Yêu cầu về an toàn

Cần có tủ hút để xử lý các chất hữu cơ.

A.1.3.5 Thuốc thử

A.1.3.5.1 Isopropanol [CH₃CH(OH)CH₃].

A.1.3.5.2 Etanol, ϕ (C₂H₅OH) = 96 %.

Bảo quản và sử dụng ở - 20 °C.

A.1.3.5.3 Axit axetic băng, (CH_3COOH).

A.1.3.5.4 Natri clorua (NaCl).

A.1.3.5.5 Natri xitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$).

A.1.3.5.6 Axit clohydric, ϕ (HCl) = 37 %.

A.1.3.5.7 Natri hydroxit (NaOH).

A.1.3.5.8 Isoamyl ancol [$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$].

A.1.3.5.9 Phenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$).

A.1.3.5.10 Clorofom (CHCl_3).

A.1.3.5.11 Tris(hydroxymetyl)-aminometan (Tris)($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$).

A.1.3.5.12 Muối dinatri axit etylendiamintetraaxetic (Na_2EDTA)($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2$).

A.1.3.5.13 Natri dodexyl sunfat (SDS)($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{SNa}$).

A.1.3.5.14 Lysozym, 50 000 U/mg protein (1 U sẽ tạo ra một ΔA_{450} của 0,001/min ở pH 6,24 và 25 °C, sử dụng huyền phù *Micrococcus lysodeikticus* làm chất nền, trong 2,6 ml hỗn hợp phản ứng sử dụng 1 cm đường quang).

A.1.3.5.15 Sacaroza ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$).

A.1.3.5.16 Proteinaza-K, khoảng 20 đơn vị/mg lyophilisat.

A.1.3.5.17 Natri axetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$).

A.1.3.5.18 Dung dịch natri xitrat, $\rho(\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7) = 400$ g/l.

A.1.3.5.19 Dung dịch natri hydroxit ρ (NaOH) = 0,4 mol/l.

Hoà tan trong nước vô trùng, nhưng không hấp áp lực. Chuẩn bị mới ngay trước khi sử dụng.

A.1.3.5.20 Dung dịch natri clorua/natri xytrat (SSC, nồng độ 5 x), $c(\text{NaCl}) = 0,75$ mol/l, $c(\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7) = 0,075$ mol/l.

Nên chuẩn bị dung dịch SSC làm dung dịch gốc đậm đặc (ví dụ, SSC 20x), vì các dung dịch có nồng độ muối cao thường ổn định hơn. Pha loãng trước khi sử dụng.

A.1.3.5.21 Phenol đã cân bằng, được chỉnh đến pH bằng 8, đã bão hoà với dung dịch đệm Tris/HCl (pH>7,8), hoặc được chuẩn bị theo [5], hoặc theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

TCVN 7606 : 2007

A.1.3.5.22 Clorofom-isoamyl ancol

Trộn 24 phần thể tích clorofom (A.1.3.5.10) với 1 phần thể tích isoamyl ancol (A.1.3.5.8).

A.1.3.5.23 Phenol-clorofom-isoamyl ancol

Chuẩn bị bằng cách trộn 25 phần thể tích phenol đã cân bằng (A.1.3.5.21) với 24 phần thể tích clorofom (A.1.3.5.10) và 1 phần thể tích isoamyl ancol (A.1.3.5.8).

A.1.3.5.24 Dung dịch mutanolysin, chứa 500 U/ml hoặc 5 000 U/ml mutanolysin, được hoà tan trong nước vô trùng.

Không hấp áp lực. Bảo quản ở $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, tránh lặp lại việc cấp đông và rã đông.

A.1.3.5.25 Dung dịch lysozym, chứa 10 mg/ml, được hoà tan trong nước vô trùng.

Không hấp áp lực. Bảo quản ở $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, tránh cấp đông và rã đông.

A.1.3.5.26 Dung dịch sacaroza, $\rho(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}) = 400\text{ g/l}$.

A.1.3.5.27 Dung dịch đệm A, $c(\text{Tris}) = 0,020\text{ mol/l}$, $c(\text{Na}_2\text{EDTA}) = 0,020\text{ mol/l}$, $c(\text{NaCl}) = 0,100\text{ mol/l}$.

Dùng HCl hoặc NaOH để chỉnh pH đến 8,0.

A.1.3.5.28 Dung dịch đệm chiết/phân huỷ, chứa một phần thể tích dung dịch đệm A (A.1.3.5.27) và một phần dung dịch sacaroza (A.1.3.5.26).

A.1.3.5.29 Dung dịch SDS, $\rho(\text{SDS}) = 250\text{ g/l}$.

A.1.3.5.30 Dung dịch proteinaza-K, chứa khoảng 20 mg/ml, được hoà tan trong nước vô trùng.

Không hấp áp lực. Bảo quản ở $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, tránh lặp lại việc cấp đông và rã đông.

A.1.3.5.31 Dung dịch etanol, $\phi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 70\text{ \%}$.

Bảo quản và sử dụng ở $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A.1.3.5.32 Dung dịch natri axetat, $c(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}) = 3\text{ mol/l}$.

Dùng axit axetic băng để chỉnh pH đến 5,2.

A.1.3.5.33 Dung dịch đệm TE, $c(\text{Tris}) = 0,010\text{ mol/l}$, $c(\text{Na}_2\text{EDTA}) = 0,001\text{ mol/l}$.

Dùng HCl hoặc NaOH để chỉnh pH đến 8,0.

A.1.3.6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và các loại sau:

A.1.3.6.1 Máy ly tâm, có thể tạo được lực ly tâm ở 12 000 g. Trong một số giai đoạn cần đến ly tâm lạnh.

A.1.3.6.2 Nội cách thủy hoặc tủ ẩm.

A.1.3.6.3 Máy sấy chân không (tùy chọn).

A.1.3.6.4 Máy trộn, ví dụ: Vortex^{®2}.

A.1.3.7 Cách tiến hành

A.1.3.7.1 Khái quát

Khi phân mẫu thử đã được chuẩn bị thì tiến hành quy trình tách chiết/tinh sạch ADN. Cần điều chỉnh cho thích hợp giữa khối lượng và thể tích dung dịch đệm tùy theo cỡ mẫu đã chọn.

A.1.3.7.2 Chuẩn bị mẫu

Lắc kỹ sữa chua. Chuyển 250 µl sữa chua vào bình phản ứng 2 ml. Thêm 80 µl dung dịch natri xitrat (A.1.3.5.18). Thêm 150 µl dung dịch NaOH (A.1.3.5.19) và trộn kỹ. Ly tâm 2 min ở 12 000 g.

Đường kính của khối kết tủa không được lớn hơn 0,7 cm và khoảng 100 µl thể tích. Nếu không, cần lặp lại các bước này (cho thêm 80 µl dung dịch natri xitrat và 150 µl NaOH).

Loại bỏ lớp chất béo phía trên và phần dịch lỏng phía trên rồi hoà lại khối kết tủa này trong khoảng 500 µl dung dịch SSC 20x (A.1.3.5.20). Ly tâm ít nhất 2 min ở 12 000 g và loại bỏ phần nổi phía trên. Hoà lại khối kết tủa này trong 500 µl dung dịch SSC 5x. Ly tâm tiếp 2 phút ở 12 000 g và loại bỏ phần nổi phía trên.

Hoà lại chất kết tủa này trong 500 µl dung dịch đệm tách chiết/phân giải (A.1.3.5.28). Bổ sung 50 µl dung dịch lysozym (A.1.3.5.25). Ủ ở 37 °C trong 1 h. Nếu kết quả thu được không đạt yêu cầu thì có thể kết hợp lysozym với mutanolysin 10 U (A.1.3.5.24), nhưng ảnh hưởng của chất nền này cần được thử nghiệm trước khi sử dụng.

Cho thêm 25 µl dung dịch SDS (A.1.3.5.29) và 25 µl dung dịch proteinaza-K (A.1.3.5.30). Ủ trong 10 min ở 60 °C. Thêm 500 µl phenol-clorofom-isoamyl ancol (A.1.3.5.23) và trộn. Ly tâm 3 min ở khoảng 12 000 g. Chuyển phần nổi phía trên sang bình phản ứng mới. Thêm 1 thể tích clorofom/isoamyl ancol (A.1.3.5.22) và trộn. Ly tâm 3 phút ở khoảng 12 000 g

Chuyển pha nổi phía trên sang bình phản ứng mới. Thêm 0,1 thể tích dung dịch natri axetat (A.1.3.5.32) và 1 phần thể tích isopropanol (A.1.3.5.1). Giữ ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 min. Ly tâm 15 min ở khoảng 12 000 g. Loại bỏ phần nổi phía trên. Rửa các chất kết tủa cẩn thận bằng ít nhất 500 µl dung dịch etanol (A.1.3.5.31). Ly tâm trong 10 min ở khoảng 12 000 g. Bước này là cơ bản để loại bỏ các muối kết tủa có thể gây cản trở cho bước phân tích tiếp theo (ví dụ, PCR). Gạn bỏ phần nổi phía trên.

TCVN 7606 : 2007

Làm khô các chất kết tủa này và hoà tan lại vào 100 µl nước hoặc dung dịch đệm thích hợp, ví dụ: dung dịch đệm TE (A.1.3.5.33). Đây là “ADN gốc chính”.

A.1.3.8 Danh mục các ví dụ

Xem Bảng A.3.

Bảng A.3 – Danh mục các loại chất nền đã áp dụng thành công phương pháp

| Các chất đã được phân tích thành công | Hàm lượng, chất phụ gia... | Vi sinh vật | Tài liệu tham khảo |
|---------------------------------------|---|-----------------------------------|--------------------|
| Sữa chua thường | 0,3 % chất béo, 3,5 % chất béo | <i>Streptococcus thermophilus</i> | [9], [11] |
| Sữa chua hoa quả | 1,5 % chất béo, tinh bột biến tính, quả phỉ, gelatin 1,5 % chất béo, 3,8 % protein, aspartam, axesulfam, dứa 3,5 % chất béo, hương liệu, gelatin, đào, dứa 10 % chất béo, tinh bột biến tính, chanh, hương liệu, quả hạnh, pectin, carotin, riboflavin | <i>Streptococcus thermophilus</i> | [9] |
| Sữa chua thường đã xử lý nhiệt | 3,5 % chất béo | <i>Streptococcus thermophilus</i> | [12] |

A.1.3.9 Tính hiệu lực

Các số liệu xác nhận hiệu lực ở Bảng A.4 đã được xây dựng trong nghiên cứu cộng tác của nhóm công tác “Xây dựng các phương pháp để nhận biết thực phẩm được chế biến bằng kỹ thuật công nghệ gen” của Ủy ban German Federal Health Board về ứng dụng các phương pháp theo Điều khoản 35 của Luật Thực phẩm của Đức [6].

Trong nghiên cứu cộng tác này, có hai phòng thử nghiệm không tiến hành thẩm tra bằng phép lai. Trong nghiên cứu này không sử dụng *mutanolysin*.

Bảng A.4 – Số liệu có hiệu lực

| Số lượng phòng thử nghiệm tham gia | Số lượng mẫu sữa chua/một phòng thử nghiệm | Số lượng mẫu tổng số | Số lượng mẫu được nhận dạng đúng |
|------------------------------------|--|----------------------|--|
| 20 | 10 | 200 | 200 (99 mẫu kiểm soát và 101 mẫu biến đổi gen) |

A.1.4 Phương pháp chiết bằng phenol/clorofom: Quy trình đối với nấm men và/hoặc nấm sợi thu được từ thực phẩm

A.1.4.1 Khái quát

Phương pháp này mô tả quy trình chiết và tinh sạch ADN đạt chất lượng dùng cho phản ứng PCR một bước từ nấm men hoặc nấm sợi [13], hoặc các quần thể vi khuẩn được phân lập. Phương pháp này cũng thích hợp đối với việc truy nguyên ADN từ các sinh vật biến đổi gen trong các loại chất nền phức hợp cao [14], [15]. Phương pháp này được sử dụng để chiết ADN tổng số từ chất nền [14], [15], hoặc ra khỏi phần vi khuẩn hoặc trực tiếp được tách từ chất nền hoặc thu được từ môi trường khởi động (khuẩn lạc trong môi trường lỏng hoặc thạch).

CHÚ THÍCH: Việc tách phần vi khuẩn ra khỏi phần mẫu thử cho các kết quả đáng tin cậy nhất, nếu điều này được thực hiện trước khi chiết ADN.

ADN tổng số từ chất nền có thể được chiết theo quy trình trong Phụ lục A. Tuy nhiên, các quy trình này không đảm bảo rằng ADN từ tất cả các vi sinh vật (đặc biệt từ nấm khó phân huỷ, hoặc vi khuẩn Gram âm) có thể được phân lập ngẫu nhiên với lượng đáng tin cậy. Mặc dù quy trình hiện hành có thể được sử dụng để chiết ADN tổng số có trong các loại chất nền như sữa chua, sữa hoặc phomat. Hiệu quả của việc tách chiết cho thấy đáng tin cậy chỉ đối với các loại chất nền dạng rắn đã nghiền hoặc đã xay nhỏ và luôn phải kiểm tra trên chất nền chính.

A.1.4.2 Tình trạng hiệu lực

Phương pháp tách chiết ADN này đã được áp dụng và đánh giá có hiệu lực [13] cho 325 loài đại diện cho 25 chi nấm (bao gồm nấm men dùng cho việc sản xuất bánh hoặc sản xuất rượu, và *Penicilla* spp. [16] được sử dụng cho phô mát xanh). Dưới dạng sợi nấm hoặc bào tử (trong số đó nhiều nhất là các loài không liên kết sợi hoặc khó phân huỷ như *Aspergillus fumigatus* và *Cryptococcus neoformans*. Phương pháp đã được thiết kế để tránh nhiễm giữa các mẫu kiểm tra và phòng thử nghiệm làm cho nó thích hợp cho việc tách chiết ADN thường xuyên với lượng lớn và áp dụng PCR. Không quan sát thấy có sự biến động về chất lượng làm khuôn trong PCR định tính, sau thời gian bảo quản dài đến 5 năm ở – 20 °C, và giữa các lần chuẩn bị ADN khác nhau từ cùng một vi sinh vật. Mặc dù chất lượng ADN là thích hợp cho PCR định tính, nhưng nó có thể không thích hợp cho một số enzym giới hạn. Đối với các mục đích như dùng cho PCR định lượng, thì ADN thu được bằng phương pháp hiện hành phải được tinh sạch tiếp bằng cách sử dụng các nguyên tắc sinh hoá khác như được mô tả trong A.4.

Phương pháp này được áp dụng cho các khối vi khuẩn hoặc sợi nấm đã được gửi đến để đánh giá bằng liên phòng thử nghiệm [17].

A.1.4.3 Nguyên tắc

Về cơ bản, các vi khuẩn, nấm men hoặc nấm sợi bị phá vỡ và ADN được tách chiết đồng thời bằng cách nghiền trong hỗn hợp Tris-phenol-clorofom-EDTA-SDS với tốc độ cao trong sự có mặt của các hạt thủy tinh, tiếp theo được kết tủa với etanol.

TCVN 7606 : 2007

A.1.4.4 Yêu cầu về an toàn

Cần có tủ hút để xử lý các chất hữu cơ.

A.1.4.5 Thuốc thử

A.1.4.5.1 Etanol, ϕ (C₂H₅OH) = 96 %.

Bảo quản và sử dụng ở -20 °C.

A.1.4.5.2 Axit axetic băng, (CH₃COOH).

A.1.4.5.3 Axit sunfuric, ϕ (H₂SO₄) > 90 %.

A.1.4.5.4 Kali bicacbonat (KHCO₃).

A.1.4.5.5 Kali axetat (C₂H₃O₂K).

A.1.4.5.6 Axit clohydric, ϕ (HCl) = 37 %.

A.1.4.5.7 Isoamyl ancol [(CH₃)₂CHCH₂CH₂OH].

A.1.4.5.8 Phenol (C₆H₅OH).

A.1.4.5.9 Clorofom (CHCl₃).

A.1.4.5.10 Tris(hydroxymetyl)-aminometan (Tris)(C₄H₁₁NO₃).

A.1.4.5.11 Muối dikali axit etylendiamintetraaxetic (K₂EDTA)(C₁₀H₁₄N₂O₈K₂).

A.1.4.5.12 Kali hydroxit (KOH).

A.1.4.5.13 Natri dodexyl sunfat (SDS)(C₁₂H₂₅O₄SNa).

A.1.4.5.14 RNaza-A, không chứa ADNaza từ tuyến tụy của bò, khoảng 50 đơn vị/mg lyophilisat.

A.1.4.5.15 Phenol cân bằng, chỉnh đến pH > 7,8.

Phenol (A.1.4.5.8) được chuẩn bị, ví dụ: xem [5] và (tùy chọn) cuối cùng được cân bằng dựa vào dung dịch đệm tách chiết (A.1.4.5.18) không có SDS, hoặc theo các khuyến cáo của nhà sản xuất.

A.1.4.5.16 Clorofom-isoamyl ancol

Trộn 24 phần thể tích clorofom (A.1.4.5.9) với 1 phần thể tích isoamyl ancol (A.1.4.5.7).

A.1.4.5.17 Phenol-clorofom-isoamyl ancol

Trộn 1 phần thể tích phenol đã cân bằng (A.1.4.5.15) với 1 phần thể tích dung dịch phenol-clorofom-isoamyl (A.1.4.5.16).

A.1.4.5.18 Dung dịch đệm tách chiết/phân giải, $c(\text{Tris}) = 0,050 \text{ mol/l}$, $c(\text{K}_2\text{EDTA}) = 0,050 \text{ mol/l}$, $\rho(\text{SDS}) = 30 \text{ g/l}$.

Dùng HCl hoặc KOH để chỉnh pH đến 8,0.

A.1.4.5.19 Dung dịch đệm TE, $c(\text{Tris}) = 0,010 \text{ mol/l}$, $c(\text{K}_2\text{EDTA}) = 0,001 \text{ mol/l}$.

Dùng HCl hoặc KOH để chỉnh pH đến 8,0.

A.1.4.5.20 Dung dịch RNaza-A, $\rho(\text{RNaza-A}) = 10 \text{ mg/ml lyophilisat}$.

Bảo quản ở $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

A.1.4.5.21 Dung dịch etanol, $\phi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 70 \%$.

Bảo quản và sử dụng ở $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

A.1.4.5.22 Dung dịch kali axetat, $c(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{K}) = 3 \text{ mol/l}$.

Dùng axit axetic băng để chỉnh pH đến 5,2. Không hấp áp lực. Lọc qua bộ lọc cỡ lỗ $0,22 \mu\text{m}$, nếu cần.

A.1.4.5.23 Hạt thủy tinh đã ổn định

Ủ các hạt thủy tinh có đường kính từ 0,2 mm đến 0,5 mm qua đêm trong H_2SO_4 đậm đặc (A.1.4.5.3). Rửa sạch bằng nước đã tiệt trùng, đun sôi trong dung dịch KHCO_3 (A.1.4.5.24), rửa lại bằng nước tiệt trùng, sấy khô bằng chân không ở $80 \text{ }^\circ\text{C}$ [13], [14].

A.1.4.5.24 Dung dịch kali bicacbonat, $\rho(\text{KHCO}_3) = 50 \text{ g/l}$.

Chuẩn bị mới trước khi sử dụng.

A.1.4.6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và các loại sau:

A.1.4.6.1 Dụng cụ khuấy trộn tế bào, đối với ống nghiệm micro polyetylen có nắp vặn dung tích 2 ml, có tần số khuấy trộn ít nhất 100 lần khuấy/phút [ví dụ, Mini-Beater^{TM 4}].

A.1.4.6.2 Ống nghiệm micro, 2 ml bằng polyetylen, được xiết chặt vào vòng O, có nắp vặn.

A.1.4.6.3 Dụng cụ lọc, đường kính 25 mm, bằng sợi thủy tinh.

TCVN 7606 : 2007

A.1.4.6.4 Máy ly tâm, có thể giữ được ống nghiệm micro 2 ml ở lực ly tâm tối thiểu 10 000 g. Trong một số giai đoạn cần đến ly tâm lạnh.

A.1.4.6.5 Nồi cách thủy hoặc tủ ẩm.

A.1.4.6.6 Máy sấy chân không (tùy chọn). Được khuyến cáo dùng cho A.1.4.5.23.

A.1.4.6.7 Máy trộn, ví dụ: Vortex^{®2)}.

A.1.4.7 Cách tiến hành

A.1.4.7.1 Chuẩn bị mẫu thử và vi khuẩn

Các quy trình phân lập vi khuẩn, đôi khi được gắn liền với giai đoạn tăng sinh trên thạch hoặc trong môi trường lỏng để kiểm soát chất lượng vi sinh vật trong thực phẩm, có thể được sử dụng để chiết ADN ra khỏi quần thể vi sinh.

Bắt đầu từ 1 ml đến 2 ml mẫu phòng thử nghiệm là phần chuẩn, quần thể vi sinh được phân lập một cách thích hợp (xem A.1.3). Cách khác, nấm men hoặc nấm sợi được phân lập từ mẫu thử có thể sinh trưởng như một mẫu khởi động. Trong cả hai trường hợp, các vi sinh vật thu được và được xử lý tiếp theo A.1.4.7.2 hoặc được bảo quản ở -20 °C cho đến khi tiến hành thử nghiệm.

A.1.4.7.2 Tách chiết ADN

A.1.4.7.2.1 Đối với các sợi nấm thu được trên bộ lọc sợi thủy tinh, rửa các sợi nấm hai lần bằng dung dịch đệm phân giải (A.1.4.5.18) không chứa SDS. Lấy các sợi nấm ra khỏi bộ lọc và cho vào ống nghiệm micro có nắp vặn 2 ml (A.1.4.6.2) có chứa các hạt thủy tinh đã làm ổn định (A.1.4.5.23) (một nửa ống), 600 µl dung dịch đệm phân huỷ (A.1.4.5.18) và 600 µl phenol-clorofom-isoamyl ancol (A.1.4.5.17). Bước tiếp theo được mô tả trong A.1.4.7.2.3.

A.1.4.7.2.2 Đối với các khối tổng thể quần thể vi sinh, vi khuẩn, sợi nấm, nấm men hoặc các vi sinh vật giống nấm men, thì rửa các tế bào một lần bằng 1 ml dung dịch đệm phân huỷ (A.1.4.5.18) không chứa SDS, ly tâm ở 10 000 g đến 13 000 g trong 10 phút, lặp lại ít nhất một lần rồi hoà lại vào 600 µl dung dịch đệm phân huỷ (A.1.4.5.18) và chuyển sang ống nghiệm micro có chứa các hạt thủy tinh và phenol-clorofom như trong A.1.4.7.2.1.

A.1.4.7.2.3 Sau bước A.1.4.7.2.1 hoặc A.1.4.7.2.2, khuấy trộn ống nghiệm micro ít nhất 100 lần/phút trên bộ khuấy tế bào (A.1.4.6.1) từ 1 min đến 2 min, rồi ủ ngay ở 65 °C từ 30 min đến 120 min. Ly tâm ở 10 000 g đến 13 000 g trong 10 min. Chuyển phần nổi phía trên sang ống nghiệm micro mới.

Tuỳ chọn đối với các phản ứng PCR định lượng tiếp theo, ủ 30 min rồi ly tâm ở 10 000 g đến 13 000 g trong 15 min. Chuyển phần nổi phía trên sang ống nghiệm micro, bổ sung RNaza-A (A.1.4.5.20) ở nồng độ cuối cùng là 0,001 mg/ml và ủ tiếp 30 min đến 90 min ở 65 °C.

Cho dung dịch kali axetat (A.1.4.5.22) ở nồng độ cuối cùng 0,3 mol/l. Trộn, bổ sung 1,2 ml etanol (A.1.4.5.1) và ủ ở -20 °C qua đêm hoặc ủ trong 1 h ở -80 °C. Ly tâm kết tủa ADN ở 10 000 g đến 13 000 g trong 15 min ở 4 °C.

Rửa kỹ kết tủa ADN bằng dung dịch etanol (A.1.4.5.21). Làm ráo nước ống nghiệm úp trên giấy và làm khô ống nghiệm bằng hút chân không. Hoà tan kết tủa ADN trong 50 µl đến 100 µl nước. Cho phép bảo quản lâu dài (đến 5 năm) ở nhiệt độ -20 °C. Việc sử dụng nước cất thay cho dung dịch đệm TE (A.1.4.5.19) đã được xác nhận có hiệu quả [13]. Đây là dung dịch ADN gốc chính.

A.1.4.8 Danh mục các ví dụ

Số lượng các loài/chủng đã nghiên cứu được chỉ ra trong dấu ngoặc đơn:

Absidia corymbifera (1), *Acremonium* spp. (2), *Aspergillus* spp. (119), *Cladosporium* spp. (2), *Cryptococcus* spp. (6), *Epidermophyton floccosum* (1), *Fusarium* (1), *Fusarium solani* (1), *malbranchea pulchella* (1), *Geotrichum* spp. (2), *Microsporium canis* (1), *paecilomyces* spp. (2), *Penicillium* spp. (20), *Pityrosporum ovale* (1), *Rhizopus* spp. (2), *Saccharomyces cerevisiae* (1), *Schizosaccharomyces pombe* (1), *Scopulariopsis brevicaulis* (1), *Trichoderma* spp. (124), *Trichosporon* spp. (2), *Ulocladium botrytis* (1), *Verticillium tenerum* (1).

A.1.4.9 Xác nhận tính hiệu lực

Tính hiệu lực của phương pháp đã được đánh giá xác nhận trong trường hợp đối với nấm [13]. Việc phân tích định lượng về hiệu quả chiết đã cho thấy rằng việc sử dụng các viên bi thuỷ tinh khi nghiền là có hiệu quả nhất [18].

A.2 Chuẩn bị ADN đạt chất lượng dùng cho phản ứng PCR sử dụng các phương pháp tách chiết ADN dựa trên polyvinyl-pyrrolidon (PVP)

A.2.1 Phương pháp dựa trên PVP

A.2.1.1 Khái quát

Phương pháp này đơn giản, nhanh và rẻ [19] thích hợp đối với nhiều loại chất nền, đặc biệt là có chứa các hợp chất polyphenol với hàm lượng cao.

TCVN 7606 : 2007

A.2.1.2 Tình trạng hiệu lực

Phương pháp này đã được đánh giá có hiệu lực trong nhóm và được sử dụng để chuẩn bị ADN thông thường trong nhiều phòng thử nghiệm, cho dù nó chưa được đánh giá trong các nghiên cứu liên phòng thử nghiệm chính thức.

A.2.1.3 Nguyên tắc

Phương pháp này bao gồm bước phân giải (phân giải bằng nhiệt với sự có mặt của natri dodexyl sunfat và EDTA hàm lượng cao), tiếp theo là bước loại bỏ các tạp chất như các phân tử polyphenol, polysacarit, các chất trao đổi và các protein hoà tan ra khỏi pha lỏng chứa ADN bằng việc kết hợp với PVP và amoni axetat. Bước kết tủa bằng ancol cuối cùng để thu lấy ADN và loại bỏ các muối xem [19], [20], [21], [22] và [23].

A.2.1.4 Các yêu cầu về an toàn

Cần có tủ hút để xử lý các chất hữu cơ.

A.2.1.5 Thuốc thử

A.2.1.5.1 Etanol, ϕ (C₂H₅OH) = 96 %.

Bảo quản và sử dụng ở -20 °C.

A.2.1.5.2 Isopropanol [CH₃CH(OH)CH₃].

A.2.1.5.3 Polyvinylpyrrolidon (PVP), khối lượng phân tử $M = 360\ 000$ D, độ nhớt bản chất (giá trị K) = 80 đến 100⁵⁾.

A.2.1.5.4 Axit axetic băng, (CH₃COOH).

A.2.1.5.5 Axit clohydric, ϕ (HCl) = 37 %.

A.2.1.5.6 Natri clorua (NaCl).

A.2.1.5.7 Tris(hydroxymetyl)-aminometan (Tris)(C₄H₁₁NO₃).

A.2.1.5.8 Muối dinatri axit etylendiamintetraaxetic (Na₂EDTA).

A.2.1.5.9 Natri dodexyl sunfat (SDS)(C₁₂H₂₅O₄SNa).

⁵⁾ SIGMA P-5288 là một ví dụ thích hợp về sản phẩm có bán sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và tổ chức ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Các sản phẩm tương tự có thể được sử dụng nếu chúng cho kết quả tương tự.

A.2.1.5.10 Amoni axetat ($C_2H_3O_2NH_4$).

A.2.1.5.11 Dung dịch etanol, ϕ (C_2H_5OH) = 70 %.

Bảo quản và sử dụng ở $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

A.2.1.5.12 Dung dịch đệm chiết, pH 8,0, $c(\text{Tris}) = 0,2\text{ mol/l}$, $c(\text{NaCl}) = 0,250\text{ mol/l}$, $c(\text{Na}_2\text{EDTA}) = 0,025\text{ mol/l}$, $\rho(\text{SDS}) = 50\text{ g/l}$.

Dùng HCl hoặc KOH để chỉnh pH đến 8,0.

A.2.1.5.13 Dung dịch amoni axetat, $c(\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2) = 7,5\text{ mol/l}$.

Hoà tan trong nước vô trùng và khử trùng bằng lọc qua bộ lọc cỡ lỗ $0,22\text{ }\mu\text{m}$.

A.2.1.5.14 Dung dịch đệm TE, $c(\text{Tris}) = 0,010\text{ mol/l}$, $c(\text{Na}_2\text{EDTA}) = 0,001\text{ mol/l}$.

Dùng HCl hoặc NaOH để chỉnh pH đến 8,0.

A.2.1.6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và các loại sau:

A.1.2.6.1 Máy ly tâm, có khả năng tạo được lực ly tâm ở $10\ 000\text{ g}$.

Trong một số giai đoạn cần đến ly tâm lạnh.

A.2.1.6.2 Nội cách thủy hoặc tủ ẩm.

A.2.1.6.3 Máy sấy chân không (tùy chọn).

A.2.1.6.4 Máy sấy đông khô, tùy chọn.

A.2.1.6.5 Máy trộn, ví dụ như Vortex^{®2}.

A.2.1.7 Cách tiến hành

A.2.1.7.1 Khái quát

Khi phân mẫu thử đã được chuẩn bị thì tiến hành quy trình tách chiết/tinh sạch ADN. Cần điều chỉnh cho thích hợp giữa khối lượng và thể tích dung dịch đệm tùy theo cỡ mẫu đã chọn.

A.2.1.7.2 Quy trình chiết

Cân $0,25\text{ mg}$ mẫu đã xay, nghiền thô hoặc mẫu dạng lỏng cho vào lọ. Thêm 1 ml dung dịch đệm chiết (A.2.1.5.12). Khuấy huyền phù 1 h ở $65\text{ }^\circ\text{C}$, làm nguội đến nhiệt độ phòng. Trộn huyền phù tiếp với 60 mg bột PVP (A.2.1.5.3) và $0,5$ thể tích dung dịch amoni axetat (A.2.1.5.13). Để trên nước đá 30 min .

TCVN 7606 : 2007

Ly tâm ở 10 000 g trong 10 phút và chuyển phần nổi phía trên sang ống nghiệm mới. Trộn với 1 thể tích isopropanol (A.2.1.5.2) và để 30 min ở -20°C . Ly tâm ở 10 000 g và trong 10 min ở 4°C và cẩn thận gạn phần nổi phía trên.

Rửa kỹ các kết tủa ADN bằng 2 thể tích dung dịch etanol (A.2.1.5.11). Bước này là cần thiết để loại bỏ các loại muối bất kỳ nào mà có thể gây cản trở phép phân tích tiếp theo (ví dụ, PCR). Loại bỏ cẩn thận phần nổi phía trên (trong trường hợp các kết tủa phân tán thì ly tâm 10 min ở 10 000 g và ở 4°C). Làm khô kết tủa này và hoà lại vào 100 μl nước hoặc dung dịch đệm thích hợp, ví dụ, dung dịch đệm TE (A.2.1.5.14). Đây là ADN gốc chính.

A.2.1.8 Danh mục các ví dụ

Phương pháp đã áp dụng thành công để chiết ADN từ các loại chất nền sau đây:

Bánh dùng cho trẻ nhỏ⁶⁾, sữa dành cho trẻ nhỏ⁶⁾, patê của Bỉ, bột xay từ bánh mì (lúa mì hoặc ngô) để tẩm cá thối, bánh socola hạnh nhân⁶⁾, ngô đóng hộp, ngũ cốc đóng thành thỏi⁶⁾, khoai phomat, gà rán bọc bột, thịt gà, bánh socola⁶⁾, socola nhão⁶⁾, bánh ngô⁶⁾, bánh giòn, kem phủ bánh⁶⁾, thức ăn dành cho trẻ nhỏ, bánh qui ngô⁶⁾, bột ngô, thịt tươi và thịt đã nấu chín (bò, lợn, gà, và gà tây), thịt xay, món điểm tâm⁶⁾, bỏng ngô, sữa bột, xúc xích (thái lát⁶⁾ và cocktail⁶⁾, bánh cốt-lết, giá đậu tương⁶⁾, viên xúp, protein đậu tương trong chế biến thịt⁶⁾, lexitin đậu tương⁶⁾, đồ uống từ đậu tương⁶⁾, váng sữa đậu tương, nước sốt spaghetti⁶⁾, bánh speculoos, đậu phụ, hambơg thực vật, bánh xếp sôcôla⁶⁾, bánh quế, sữa chua⁶⁾.

A.3 Chuẩn bị ADN đạt chất lượng dùng cho phản ứng PCR sử dụng các phương pháp chiết ADN dựa trên CTAB

A.3.1 Phương pháp dựa trên CTAB

A.3.1.1 Khái quát

Phương pháp này có thể dùng để chiết ADN từ thực vật và các loại chất nền có nguồn gốc từ thực vật, đặc biệt do có khả năng loại bỏ các hợp chất polysacarit và polyphenol vốn có ảnh hưởng đến chất lượng ADN. Phương pháp này cũng có thể dùng cho các loại chất nền khác (A.3.1.8).

A.3.1.2 Tình trạng hiệu lực

Phương pháp này đã được thử nghiệm vòng (xem A.3.1.9).

Phương pháp này là thông dụng trong việc chuẩn bị ADN ở nhiều phòng thử nghiệm.

A.3.1.3 Nguyên tắc

⁶⁾ Độ lặp lại phụ thuộc vào các mẻ mẫu và/hoặc công nghệ sản xuất chúng. Trong một số trường hợp, ADN có thể không tìm thấy hoặc bị biến chất làm cho các kết quả PCR ở mức dưới giới hạn phát hiện của phương pháp, bất kể quy trình/ái lực PCR đã được sử dụng. Điều này có thể là nguyên nhân của độ tái lập thấp giữa các phòng thử nghiệm.

Phương pháp này bao gồm bước phân giải (phân giải bằng nhiệt với sự có mặt của CTAB), tiếp theo là các bước loại bỏ các tạp chất như các polysacarit và các protein [24].

Đối với một vài loại chất nền, cần tiến hành một số bước có sự tham gia của enzym khác nhau như trong A.3.1.7. Alpha-amylaza được cho vào dung dịch đệm phân giải để thủy phân các tinh bột khi các chất nền chứa nhiều tinh bột. Việc xử lý mẫu bằng proteinaza-K là cần thiết đối với nhiều loại chất nền khác nhau để loại trừ protein. Việc xử lý bằng RNaza cũng được khuyến cáo đối với các loại chất nền khi việc kết tủa đồng thời ARN có thể làm nhiễu phép phân tích tiếp theo.

Nồng độ muối trong suốt quá trình tách chiết là rất quan trọng trong việc loại bỏ các tạp chất, vì sự kết tủa của axit CTAB-nucleic sẽ xảy ra nếu nồng độ muối hạ xuống thấp khoảng 0,5 mol/l ở nhiệt độ phòng và/hoặc nếu nhiệt độ giảm xuống dưới 16 °C. Bằng cách tăng nồng độ muối (ví dụ, bổ sung natri clorua) việc loại bỏ các protein đã biến tính và polysacarit được tạo phức với CTAB sẽ được thực hiện, lúc đó các axit nucleic sẽ được hoà tan. Clorofom được dùng để tách tiếp các axit nucleic ra khỏi CTAB và các hợp chất polysacarit/protein.

Cuối cùng, các axit nucleic được tinh sạch bằng kết tủa bởi isopropanol và rửa bằng etanol.

A.3.1.4 Các yêu cầu về an toàn

Xử lý các chất hữu cơ trong tủ hút.

A.3.1.5 Thuốc thử

A.3.1.5.1 α -Amylaza (tùy chọn), kiểu loại IIa từ các loài thuộc *Bacillus*, từ 1 500 đơn vị/mg protein đến 3 000 đơn vị/mg protein.

A.3.1.5.2 Clorofom (CHCl₃).

A.3.1.5.3 Etanol, ϕ (C₂H₅OH) = 96 %.

A.3.1.5.4 Muối dinatri axit etylendiamintetraaxetic (Na₂EDTA)(C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂).

A.3.1.5.5 Hexadexyl-trimetyl-amoni-bromua (CTAB)(C₁₉H₄₂BrN).

A.3.1.5.6 Axit clohydric, ϕ (HCl) = 37 %.

A.3.1.5.7 Isopropanol [CH₃CH(OH)CH₃].

A.3.1.5.8 Proteinaza-K (tùy chọn), khoảng 20 đơn vị/mg lyophilisat.

A.3.1.5.9 RNaza-A, không chứa DNaza từ tuyến tụy của bò, khoảng 50 đơn vị/mg lyophilisat.

A.3.1.5.10 Natri clorua (NaCl).

TCVN 7606 : 2007

A.3.1.5.11 Natri hydroxit (NaOH).

A.3.1.5.12 Tris(hydroxymetyl)-aminometan (Tris)(C₄H₁₁NO₃).

A.3.1.5.13 Dung dịch α -Amylaza (tùy chọn), $c(\alpha\text{-Amylaza}) = 10 \text{ mg/ml}$.

Không hấp áp lực. Bảo quản ở $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, tránh lặp lại việc cấp đông và rã đông.

A.3.1.5.14 Dung dịch đệm chiết CTAB, $\rho(\text{CTAB}) = 20 \text{ g/l}$, $c(\text{NaCl}) = 1,4 \text{ mol/l}$, $c(\text{Tris}) = 0,1 \text{ mol/l}$, $c(\text{Na}_2\text{EDTA}) = 0,02 \text{ mol/l}$.

Dùng HCl hoặc NaOH để chỉnh pH đến 8,0.

A.3.1.5.15 Dung dịch đệm kết tủa CTAB, $\rho(\text{CTAB}) = 5 \text{ g/l}$, $c(\text{NaCl}) = 0,04 \text{ mol/l}$.

A.3.1.5.16 Dung dịch natri clorua, $c(\text{NaCl}) = 1,2 \text{ mol/l}$.

A.3.1.5.17 Dung dịch etanol, $\phi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 70 \%$.

A.3.1.5.18 Dung dịch proteinaza-K (tùy chọn), $\rho = 20 \text{ mg/ml}$, hoà tan được trong nước vô trùng.

Không hấp áp lực. Bảo quản ở $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, tránh lặp lại việc cấp đông và rã đông.

A.3.1.5.19 Dung dịch RNaza-A (tùy chọn), $\rho(\text{RNaza-A}) = 10 \text{ mg/ml}$.

Bảo quản trong dung dịch lỏng ở $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

A.3.1.5.20 Dung dịch đệm TE, $c(\text{Tris}) = 0,01 \text{ mol/l}$, $c(\text{Na}_2\text{EDTA}) = 0,001 \text{ mol/l}$.

Dùng HCl hoặc NaOH để chỉnh pH đến 8,0.

A.3.1.6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và các loại sau:

A.3.1.6.1 Tủ sấy hoặc tủ ẩm, tốt nhất là có máy lắc.

A.3.1.6.2 Máy ly tâm, có khả năng tạo được lực ly tâm ở $12\,000 \text{ g}$.

Trong một số giai đoạn cần đến ly tâm lạnh.

A.3.1.6.3 Máy trộn, ví dụ như Vortex^{®2}.

A.3.1.6.4 Máy sấy chân không (tùy chọn).

A.3.1.7 Cách tiến hành

A.3.1.7.1 Khái quát

Khi phần mẫu thử đã được chuẩn bị thì tiến hành quy trình tách chiết/tinh sạch ADN. Cần điều chỉnh cho thích hợp giữa khối lượng và thể tích dung dịch đệm tùy theo cỡ mẫu đã chọn.

A.3.1.7.2 Chiết mẫu

Cân từ 200 mg đến 300 mg mẫu thử cho vào ống nghiệm.

Thêm 1,5 ml dung dịch đệm chiết CTAB (A.3.1.5.14) đã được ủ trước ở (65 °C) và trộn. (Trong một số trường hợp có thể cần một lượng dung dịch đệm lớn hơn để hoà tan chất nền). Thêm 10 µl dung dịch α-amylaza (A.3.1.5.13, tùy chọn), 10 µl dung dịch RNaza-A (A.3.1.5.19, tùy chọn) và trộn nhẹ nhàng. Ủ 30 min ở nhiệt độ 65 °C, trong khi vẫn lắc trộn. Thêm 10 µl dung dịch proteinaza-K (A.3.1.5.18, tùy chọn), lắc trộn nhẹ nhàng ống nghiệm và để 30 min ở 65 °C, trong khi vẫn lắc trộn (tùy chọn). Ly tâm 10 min ở khoảng 12 000 g. Chuyển phần nổi phía trên sang một ống nghiệm mới, thêm 0,7 thể tích đến 1 thể tích clorofom (A.3.1.5.2) và trộn kỹ.

Ly tâm 15 phút ở khoảng 12 000 g. Chuyển pha phía trên (pha lỏng) sang một ống nghiệm mới.

A.3.1.7.3 Kết tủa CTAB

Cho thêm 2 thể tích dung dịch đệm kết tủa (A.3.1.5.15). Để yên 60 phút ở nhiệt độ phòng. Ly tâm 15 min ở khoảng 12 000 g. Gạn bỏ phần phía trên. Hoà tan ADN kết tủa bằng cách thêm 350 µl dung dịch NaCl (A.3.1.5.16). Thêm 350 µl dung dịch clorofom (A.3.1.5.2) và trộn kỹ. Ly tâm 10 phút ở khoảng 12 000 g. Chuyển pha lỏng sang một ống nghiệm mới.

CHÚ THÍCH: Việc kết tủa CTAB là không cần thiết đối với tất cả các loại chất nền, chỉ dùng đối với các loại chất nền giàu protein và giàu polysacarit. Việc tinh sạch pha rắn ADN (ví dụ, bằng cách sử dụng các cột quay) cũng có khả năng cho các kết quả tương đương.

A.3.1.7.4 Kết tủa ADN

Cho thêm 0,6 thể tích isopropanol (A.3.1.5.7), trộn kỹ bằng cách đảo chiều ống nghiệm và giữ trong 20 min ở nhiệt độ phòng. Ly tâm 15 min ở 12 000 g. Gạn bỏ phần nổi phía trên. Cho thêm 500 µl dung dịch etanol (A.3.1.5.17) vào ống nghiệm và đảo chiều ống nghiệm vài lần. Đây là bước quyết định để đảm bảo loại bỏ hết CTAB. Ly tâm 10 min ở khoảng 12 000 g. Gạn bỏ phần nổi phía trên. Làm khô các kết tủa ADN và hoà tan lại vào 100 µl nước hoặc dung dịch đệm thích hợp, ví dụ, dung dịch đệm TE (A.3.1.5.20). Đây là ADN gốc chính.

A.3.1.8 Danh mục các ví dụ

Phương pháp này đã được áp dụng thành công để tách chiết ADN⁷⁾ từ các chất nền sau:

Thức ăn dành cho trẻ nhỏ (dạng bột), thức ăn cho trẻ nhỏ, hỗn hợp làm bánh, bánh qui, viên canh thịt⁷⁾, kẹo ngọt và kẹo chanh, ngô hộp, váng sữa caramel⁷⁾, thức ăn cho gia súc, hạt ngũ cốc (gạo, lúa mì, yến mạch, lúa mạch đen, kiều mạch, kê), socola thanh⁷⁾, kem socola⁷⁾, bánh qui socola⁷⁾, bánh qui, bia ngô⁷⁾, bánh bột ngô, váng kem làm món tráng miệng, dextrosa⁷⁾, chất độn của kẹo hạt dẻ, bánh ngọt pastries, cá⁷⁾, thối cá⁷⁾, bánh từ đậu tương, cá rán kiểu Pháp, nước thịt⁷⁾, giăm bông nấu chín, mật ong⁷⁾, đồ ăn liền, râu ngô, bột ngô, phôi ngô, thức ăn từ gluten ngô, bánh ngô, lá ngô, tinh bột ngô⁷⁾, dầu ngô (nguyên chất)⁷⁾, protein ngô⁷⁾, hạt ngô/ngũ cốc, lõi hạt ngô, margarin⁷⁾, thịt tươi, sữa bột, sữa, thức ăn chăn nuôi hỗn hợp, món điểm tâm⁷⁾, hạt đậu, lá cây mù tạc, bông ngô, khoai tây chiên, tinh bột khoai tây (nguyên chất), củ khoai tây, lá cây cải dầu, bánh từ cải dầu, dầu cải dầu (thô/ nguyên chất)⁷⁾, hạt cải dầu, lecithin đậu tương thô⁷⁾, món ăn nhanh, salami (hàm lượng chất béo cao), snack mặn (ngô), xúc xích, chất điều vị⁷⁾, tinh bột biến tính (một số loại)⁷⁾, váng sữa chua với hành⁷⁾, bột đậu tương, phôi đỗ tương (đã được bảo quản, đông lạnh), protein đỗ tương⁷⁾, đồ uống từ đậu tương⁷⁾, hạt đậu tương/ngũ cốc, đậu phụ từ đậu tương, hạt đậu tương (đã axit hoá)⁷⁾, lá củ cải đường, hạt củ cải đường, hạt hướng dương, surimi đậu tương⁷⁾, ngô ngọt, món taco shells, món tarama (trứng cá nhão), thuốc lá, tương cà chua⁷⁾, cà chua cô đặc⁷⁾, cà chua (quả), bánh ngô chiên⁷⁾, hamburger thực vật, bánh quế⁷⁾, tinh bột mỳ (nguyên chất), sữa chua⁷⁾.

A.3.1.9 Xác nhận tính hợp lệ

Các số liệu có hiệu lực trong Bảng A.5 đã được xây dựng trong nghiên cứu cộng tác của nhóm công tác “Xây dựng các phương pháp để nhận biết thực phẩm được chế biến bằng kỹ thuật công nghệ gen” của Ủy ban German Federal Health Board về ứng dụng các phương pháp theo Điều khoản 35 của Luật Thực phẩm của Đức (xem [25], [26], [27]). Các loại chất nền đã được thử nghiệm là khoai tây, đậu tương và cà chua. Các nghiên cứu liên phòng thử nghiệm này đã thực hiện trên mẫu thử 100 mg. Bước kết tủa CTAB là cần thiết để phân tích hạt đậu tương và bột đậu tương. Trong các nghiên cứu này không thực hiện các bước có sự tham gia của enzym.

Đối với nghiên cứu cộng tác trên hạt đậu tương, thì hai phòng thử nghiệm tham gia đã sử dụng các quy trình được cải biến nhiều và mỗi phòng thử nghiệm đã thử nghiệm năm mẫu không liên tục. Như vậy 22 trong số 25 phòng thử nghiệm tham gia đã nhận dạng đúng tất cả 110 mẫu.

Đối với mỗi nghiên cứu cộng tác trên khoai tây, thì ba mẫu đã được nhận dạng âm tính giả và một mẫu dương tính giả. Ba mẫu này không được đánh giá vì các kết quả không rõ ràng giữa hai lần lặp lại.

⁷⁾ Độ lặp lại phụ thuộc vào các mẻ mẫu và/hoặc công nghệ sản xuất chúng. Trong một số trường hợp, ADN có thể không tìm thấy hoặc bị biến chất làm cho các kết quả PCR ở mức dưới giới hạn phát hiện của phương pháp, bất kể mỗi/quá trình PCR đã được sử dụng. Điều này có thể là nguyên nhân của độ tái lặp thấp giữa các phòng thử nghiệm.

Bảng A.5 – Số liệu có hiệu lực

| Chất nền | Số lượng phòng thử nghiệm tham gia | Số lượng mẫu/một phòng thử nghiệm | Số lượng mẫu tổng số | Số lượng mẫu được nhận dạng đúng |
|--------------------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------|----------------------------------|
| Hạt đậu tương [25] | 25 | 5 | 125 | 110 |
| Khoai tây [26] | 18 | 10 | 180 | 173 |
| Cà chua [27] | 18 | 5 | 90 | 90 |

A.4 Chuẩn bị ADN đạt chất lượng dùng cho phản ứng PCR sử dụng các phương pháp tách chiết ADN dựa trên silica

A.4.1 Phương pháp tách chiết dựa trên silica

A.4.1.1 Khái quát

Phương pháp này thích hợp để chiết ADN từ các loại chất nền có phạm vi rộng (xem các ví dụ trong A.4.1.8). Phương pháp này cũng có thể được dùng như một bước tinh sạch ADN thu được sau khi ADN được tách chiết bằng các phương pháp khác.

Phương pháp này đã được điều chỉnh cho thích hợp từ quy trình đã công bố [28]. Phương pháp này có một số ưu điểm đối với các loại chất nền mà nó thích hợp, đặc biệt là để tránh các thuốc thử có độc tính cao. Ngoài ra, quy trình này có thể thích hợp đối với các phép phân tích bằng tay cũng như phân tích tự động khi lượng mẫu đưa vào nhiều, đặc biệt do không có các lớp phân cách không bền (như nước-clorofom) và do đó cần ly tâm với tốc độ thấp.

Thông thường không nên dùng phương pháp này để chiết ADN ra khỏi các loại chất nền giàu chất béo.

A.4.1.2 Tình trạng hiệu lực

Phương pháp này đã được đánh giá xác nhận trong phòng thử nghiệm nội bộ và được sử dụng để chuẩn bị ADN thông thường trong nhiều phòng thử nghiệm, cho dù nó chưa được đánh giá trong các nghiên cứu liên phòng thử nghiệm chính thức. Nguyên tắc của phương pháp này được ứng dụng trong các loại kit khác nhau, đã được thử nghiệm thành công (xem [29], [30] và [31]).

A.4.1.3 Nguyên tắc

Phương pháp này bao gồm bước phân giải (phân giải bằng nhiệt với sự có mặt của natri dodecyl sunfat trong dung dịch đệm), tiếp theo là bước làm sạch bằng resin silica trong sự có mặt của thuốc thử guanidin hydroclorua. Nguyên tắc của phương pháp là việc liên kết các axit nucleic với silica trong điều kiện hoạt độ nước thấp do hiệu ứng entropi [32]. Các tạp chất được rửa khỏi resin bằng isopropanol, trong khi ADN vẫn được giữ lại. Bước phân giải cuối cùng bằng dung dịch đệm muối thấp cho phép thu hồi ADN.

TCVN 7606 : 2007

Người sử dụng tiêu chuẩn này cần biết rằng các phương pháp dựa trên silica có thể chịu luật bản quyền ^[33].

A.4.1.4 Yêu cầu về an toàn

Cần có tủ hút để xử lý các chất hữu cơ.

A.4.1.5 Thuốc thử

A.4.1.5.1 Natri clorua (NaCl).

A.4.1.5.2 Tris(hydroxymetyl)-aminometan (Tris)(C₄H₁₁NO₃).

A.4.1.5.3 Muối dinatri axit etylenđiamintetraaxetic (Na₂EDTA)(C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂).

A.4.1.5.4 Axit clohydric, ϕ (HCl) = 37 %.

A.4.1.5.5 Natri hydroxit (NaOH).

A.4.1.5.6 Natri dodecyl sunfat (SDS)(C₁₂H₂₅O₄SNa).

A.4.1.5.7 Proteinaza-K, khoảng 20 đơn vị/mg lyophilisat.

A.4.1.5.8 Guanidin hydroclorua (CH₅N₃-HCl).

A.4.1.5.9 Kali clorua (KCl).

A.4.1.5.10 Dinatri hydro phosphat (Na₂HPO₄).

A.4.1.5.11 Kali dihydro phosphat (KH₂PO₄).

A.4.1.5.12 Isopropanol [CH₃CH(OH)CH₃].

A.4.1.5.13 Silica (SiO₂), silicon dioxit có sự phân bố cỡ hạt từ 0,5 μ m đến 10 μ m (80 % từ 1 μ m đến 5 μ m) ⁸⁾.

A.4.1.5.14 RNaza-A, không chứa DNaza, khoảng 100 đơn vị/mg lyophilisat.

A.4.1.5.15 Dung dịch proteinaza-K, ρ = 20 mg/ml.

Hoà tan enzym trong nước vô trùng hoặc dung dịch đệm thích hợp như mô tả trong [34]. Không hấp áp lực dung dịch này. Bảo quản ở - 20 °C, tránh lặp lại việc cấp đông và rã đông.

A.4.1.5.16 Dung dịch guanidin hydroclorua I, c (CH₅N₃-HCl) = 5 mol/l.

Hấp áp lực tối đa 15 min ở 121 °C.

⁸⁾ SIGMA S-5631 là một ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và tổ chức ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Các sản phẩm tương tự có thể được sử dụng nếu cho kết quả tương tự.

A.4.1.5.17 Dung dịch guanidin hydroclorua II, $c(\text{CH}_5\text{N}_3\text{-HCl}) = 6 \text{ mol/l}$.

Hấp áp lực tối đa 15 min ở $121 \text{ }^\circ\text{C}$.

A.4.1.5.18 Dung dịch đệm PBS, $c(\text{NaCl}) = 0,157 \text{ mol/l}$, $c(\text{KCl}) = 0,0027 \text{ mol/l}$, $c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,010 \text{ mol/l}$, $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 0,0018 \text{ mol/l}$.

Chỉnh pH đến 7,5 bằng HCl.

A.4.1.5.19 Huyền phù silica

Cân 5 g silica (A.4.1.5.13) cho vào ống nghiệm 50 ml và thêm 50 ml dung dịch đệm PBS (A.4.1.5.18). Trộn kỹ và để yên trong 2 giờ. Loại bỏ phần nổi phía trên bằng cách dùng pipet để hút. Thêm tiếp 50 ml dung dịch đệm PBS, trộn kỹ và để yên trong 2 h. Hút để loại bỏ phần nổi phía trên. Ly tâm 2 phút ở 2 000 g. Loại bỏ phần nổi phía trên còn lại. Hoà lại các cặn này trong dung dịch guanidin-HCl II (A.4.1.5.17) đến 50 ml. Sử dụng dung dịch này trong vòng từ 2 tháng đến 5 tháng. Lắc kỹ trước khi sử dụng.

A.4.1.5.20 Dung dịch đệm chiết TNE-SDS, $c(\text{NaCl}) = 0,150 \text{ mol/l}$, $c(\text{Tris}) = 0,002 \text{ mol/l}$, $c(\text{Na}_2\text{EDTA}) = 0,002 \text{ mol/l}$, $\rho(\text{SDS}) = 10 \text{ g/l}$.

Dùng HCl hoặc NaOH để chỉnh pH đến 8,0 và hấp áp lực trước khi bổ sung SDS.

A.4.1.5.21 Isopropanol $\phi[\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3] = 80 \%$.

A.4.1.5.22 Dung dịch đệm TE, $c(\text{Tris}) = 0,010 \text{ mol/l}$ và $c(\text{Na}_2\text{EDTA}) = 0,001 \text{ mol/l}$.

Dùng HCl hoặc NaOH để chỉnh pH đến 8,0.

A.4.1.5.23 Dung dịch RNaza-A, $\rho(\text{RNaza}) = 10 \text{ mg/ml}$.

Bảo quản trong dung dịch lỏng ở $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, tránh lặp lại việc cấp đông và rã đông.

A.4.1.6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và các loại sau:

A.4.1.6.1 Máy ly tâm, có thể tạo được lực ly tâm nhỏ nhất là 2 000 g.

Trong một số giai đoạn cần đến ly tâm lạnh.

A.4.1.6.2 Tủ sấy hoặc tủ ấm, có nhiệt độ làm việc ở $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

A.4.1.6.3 Máy lắc, được đặt vào trong tủ sấy/tủ ấm.

A.4.1.6.4 Máy trộn, ví dụ: Vortex^{®2}.

A.4.1.6.5 Lọ ly tâm, 50 ml để chuẩn bị huyền phù silica.

A.4.1.7 Cách tiến hành

A.4.1.7.1 Khái quát

Khi phần mẫu thử đã được chuẩn bị thì tiến hành quy trình tách chiết/tinh sạch ADN. Cần điều chỉnh cho thích hợp giữa khối lượng và thể tích dung dịch đệm tùy theo cỡ mẫu đã chọn.

A.4.1.7.2 Quy trình chiết

Cân từ 200 mg đến 500 mg mẫu đã nghiền hoặc đã xay nhỏ cho vào lọ. Thêm 2 ml dung dịch đệm chiết (A.4.1.5.20) và 20 µl dung dịch proteinaza-K (A.4.1.5.15). Để 1 h đến 5 h trong tủ sấy ở 60 °C. Trong suốt thời gian ủ, mẫu được lắc mạnh (khoảng 250 lần/min). Ly tâm 15 min ở 2 000 g. Chuyển 550 µl phần nổi phía trên vào ống nghiệm mới.

Xử lý phần vừa được chuyển sang ống nghiệm bằng 2 µl dung dịch RNaza (A.4.1.5.23) 5 min ở 37 °C (bước thuỷ phân ARN này nên được thực hiện trước khi liên kết silica, mặt khác ARN đã phân giải và các nucleotit tạo thành có thể gây cản trở các phép đo phổ UV tiếp theo). Bổ sung thêm 55 µl dung dịch guanidin-HCl I (A.4.1.5.16) và 100 µl huyền phù silica (A.4.1.5.19). Trộn thật kỹ vài lần. Để yên các ống trên bàn khoảng 1 min.

Ly tâm ống 2 phút ở khoảng 800 g. Gạn bỏ phần nổi phía trên và thêm 500 µl dung dịch isopropanol (A.4.1.5.21). Đậy nắp ống và trộn, có thể dùng máy lắc (A.4.1.6.4), để hoà đều hoàn toàn các cặn.

Ly tâm ống 2 min ở khoảng 1 500 g. Gạn bỏ phần nổi phía trên và làm khô các kết tủa. Thêm 100 µl dung dịch đệm TE (A.4.1.5.22). Trộn thật cẩn thận để hoà tan kết tủa. Ủ mẫu ở 60 °C trong 5 min. Ly tâm 5 min ở 2 000 g. Chuyển 80 % phần nổi phía trên sang ống nghiệm mới. Chú ý không chuyển bất kỳ một hạt silica nào bởi vì chúng sẽ gây ức chế hoạt tính của enzym (ví dụ, ADN polymeraza, các enzym endonucleaza).

Xử lý phần vừa được chuyển sang ống nghiệm bằng 2 µl dung dịch RNaza (A.4.1.5.23) 1 h ở 37 °C, hoặc để qua đêm ở nhiệt độ phòng. Đây là dung dịch ADN gốc chính.

A.4.1.8 Danh mục các ví dụ

Phương pháp này đã được áp dụng thành công để tách chiết ADN⁹⁾ từ các loại chất nền sau:

Phôi ngô⁹⁾, bột ngô, thức ăn gluten ngô⁹⁾, lá ngô, tinh bột ngô biến tính⁹⁾, tinh bột ngô nguyên chất⁹⁾, hạt ngô, lõi ngô, protein từ hạt đậu tương⁹⁾, hạt đậu tương, lá đậu tương, củ cải đường (củ tươi) củ cải đường (phần ruột đông lạnh), lá củ cải đường.

⁹⁾ Độ lặp lại phụ thuộc vào các mẻ mẫu và/hoặc công nghệ sản xuất chúng. Trong một số trường hợp, ADN có thể không tìm thấy hoặc bị biến chất mà như thế các kết quả PCR sẽ thấp hơn giới hạn phát hiện của phương pháp, bất kể quy trình/ái lực PCR đã được sử dụng. Điều này có thể là nguyên nhân của độ tái lập thấp giữa các phòng thử nghiệm.

A.5 Chuẩn bị ADN đạt chất lượng dùng cho PCR sử dụng các phương pháp tách chiết ADN dựa trên guanidi-clorofom

A.5.1 Phương pháp dựa trên guanidi-clorofom

A.5.1.1 Khái quát

Phương pháp này thích hợp để tách chiết ADN ra khỏi nhiều loại chất nền thực phẩm và thức ăn chăn nuôi khác nhau (xem A.5.1.8). Có thể cần đến bước tinh sạch tiếp theo phụ thuộc vào mẫu.

A.5.1.2 Tình trạng hiệu lực

Phương pháp này đã được đánh giá xác nhận trong phòng thử nghiệm.

A.5.1.3 Nguyên tắc

Phương pháp này bao gồm các bước phân giải bằng nhiệt và phân giải bằng enzym với sự có mặt của natri dodecyl sunfat trong dung dịch đệm guanidi gây biến tính, đôi khi được thực hiện tiếp bước tinh sạch, điều này phụ thuộc vào loại chất nền.

Các tạp chất như lipit và protein được loại trừ bằng cách chiết trong clorofom sau khi phân huỷ, ADN được kết tủa bằng isopropanol trước khi tinh sạch.

A.5.1.4 Các yêu cầu về an toàn

Cần có tủ hút để xử lý các chất hữu cơ.

A.5.1.5 Thuốc thử

A.5.1.5.1 α -Amylaza (tùy chọn), kiểu loại IIa từ các loài *Bacillus*, từ 1 500 đơn vị/mg lyophilisat đến 5 000 đơn vị/mg lyophilisat.

A.5.1.5.2 Axit axetic băng (CH_3COOH).

A.5.1.5.3 Clorofom (CHCl_3).

A.5.1.5.4 Etanol, $\phi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 96\%$.

A.5.1.5.5 Muối dinatri axit etylendiamintetraaxetic (Na_2EDTA) ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2$).

A.5.1.5.6 Guanidin hydroclorua ($\text{CH}_5\text{N}_3\text{-HCl}$).

A.5.1.5.7 Axit clohydric, $\phi(\text{HCl}) = 37\%$.

A.5.1.5.8 Isopropanol [$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$].

A.5.1.5.9 Proteinaza-K, khoảng 20 đơn vị/mg lyophilisat.

A.5.1.5.10 RNaza-A, không chứa DNaza từ tuyến tụy của bò, khoảng 50 đơn vị/mg lyophilisat.

TCVN 7606 : 2007

A.5.1.5.11 Natri clorua (NaCl).

A.5.1.5.12 Natri dodexyl sunfat (SDS) (C₁₂H₂₅O₄SNa).

A.5.1.5.13 Natri hydroxit, (NaOH).

A.5.1.5.14 Tris(hydroxymetyl)-aminometan (Tris)(C₄H₁₁NO₃).

A.5.1.5.15 Dung dịch α -Amylaza, $\rho = 10$ mg/ml, được hoà tan trong nước vô trùng.

Không hấp áp lực. Bảo quản ở -20 °C, tránh lặp lại việc cấp đông và rã đông.

A.5.1.5.16 Dung dịch etanol, ϕ (C₂H₅OH) = 70 %.

A.5.1.5.17 Dung dịch đậm chiết, $c(\text{Tris}) = 0,1$ mol/l, $c(\text{NaCl}) = 0,15$ mol/l, $c(\text{Na}_2\text{EDTA}) = 0,05$ mol/l, $\rho(\text{SDS}) = 10$ g/l.

Dùng HCl hoặc KOH để chỉnh pH đến 8,0.

A.5.1.5.18 Dung dịch guanidin hydroclorua, $c(\text{CH}_5\text{N}_3\text{-HCl}) = 5$ mol/l.

Hấp áp lực sau khi đã chuẩn bị (tối đa 15 min ở 121 °C).

A.5.1.5.19 Dung dịch proteinaza-K, $\rho = 20$ mg/ml, được hoà tan trong nước vô trùng.

Không dùng nồi hấp. Bảo quản ở -20 °C, tránh lặp lại việc cấp đông và rã đông.

A.5.1.5.20 Dung dịch RNaza-A, $\rho = 10$ mg/ml.

Bảo quản ở -20 °C.

A.5.1.5.21 Dung dịch đậm TE, $c(\text{Tris}) = 0,01$ mol/l, $c(\text{Na}_2\text{EDTA}) = 0,001$ mol/l.

Dùng HCl hoặc NaOH để chỉnh pH đến 8,0.

A.5.1.6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ phòng thử nghiệm thông thường và các loại sau:

A.5.1.6.1 Máy ly tâm, có thể tạo được lực ly tâm ở 8 000 g. Trong một số giai đoạn cần đến ly tâm lạnh.

A.5.1.6.2 Tủ sấy hoặc tủ ẩm, tốt nhất là có trang bị một máy lắc.

A.5.1.6.3 Máy trộn, ví dụ như Vortex^{®2}.

A.5.1.7 Cách tiến hành

A.5.1.7.1 Khái quát

Khi phần mẫu thử đã được chuẩn bị thì tiến hành quy trình tách chiết/tinh sạch ADN. Cần điều chỉnh cho thích hợp giữa khối lượng và thể tích dung dịch đệm tùy theo cỡ mẫu đã chọn.

A.5.1.7.2 Quy trình tách chiết

Cân từ 200 mg đến 500 mg mẫu đã nghiền hoặc đã xay nhỏ cho vào ống nghiệm micro. Thêm 1,6 ml dung dịch đệm chiết (A.5.1.5.17) đã được ủ trước (60 °C).

Thêm 10 µl dung dịch RNaza-A (A.5.1.5.20) và 10 µl dung dịch α-amylaza (A.5.1.5.15), trộn nhẹ bằng cách lật đảo chiều ống nghiệm. Để 50 min ở 60 °C trong khi vẫn lắc nhẹ. Thêm 1/10 thể tích dung dịch guanidin-HCl (A.5.1.5.18) và trộn bằng máy trộn (A.5.1.6.3).

Thêm 20 µl dung dịch proteinaza-K (A.5.1.5.19), trộn kỹ bằng cách đảo chiều ống nghiệm và ủ ít nhất 2 h ở 60 °C trong khi ủ vẫn lắc trộn nhẹ. Để ống nghiệm trên giá đỡ 15 min rồi ly tâm 15 min ở lực ly tâm tối thiểu là 8 000 g.

Chuyển phần nổi phía trên vào ống nghiệm mới. Thêm 1 thể tích clorofom (A.5.1.5.3) và trộn bằng máy trộn (A.5.1.6.3). Ly tâm 15 min ở tối thiểu là 8 000 g. Chuyển phần nổi phía trên vào ống nghiệm mới. Thêm 0,6 thể tích isopropanol (A.5.1.5.8), đảo chiều ống để trộn và cắm các ống nghiệm này vào nước đá trong 50 min.

Ly tâm 20 min ở tối thiểu là 8 000 g. Rửa các chất kết tủa bằng ít nhất là 2 ml dung dịch etanol (A.5.1.5.16) và ly tâm 10 min ở tối thiểu là 8 000 g. Bước này là cần thiết để loại bỏ hết các muối vốn có thể gây cản trở cho việc phân tích tiếp theo (ví dụ, PCR). Gạn bỏ phần nổi phía trên. Làm khô các kết tủa này và hoà lại vào 100 µl nước hoặc dung dịch đệm thích hợp, ví dụ: dung dịch đệm TE (A.5.1.5.21). Đây là dung dịch ADN gốc chính. Nếu cần phải có bước tinh sạch tiếp theo thì phải được tiến hành trên ADN gốc này.

A.5.1.8 Danh mục các ví dụ

Phương pháp này đã được áp dụng thành công để chiết ADN¹⁰⁾ ra khỏi các các loại chất nền sau:

Đậu tương đã axit hoá, ngô hộp, thức ăn cho gia súc, thanh sôcôla¹⁰⁾, sôcôla thanh¹⁰⁾, váng sữa làm món điểm tâm¹⁰⁾, bánh từ đậu tương, râu ngô, bột ngô, phôi ngô¹⁰⁾, thức ăn từ gluten của ngô¹⁰⁾, hạt ngô, tinh bột ngô biến tính¹⁰⁾, protein ngô¹⁰⁾, hạt ngô, lõi ngô, tinh bột ngô nguyên chất¹⁰⁾, hạt cải dầu, xúc xích¹⁰⁾, bột đậu tương, đậu phụ từ đậu tương, lexitin đậu tương (màu nâu thô¹⁰⁾ và màu vàng xác định¹⁰⁾, protein đậu tương, hạt đậu tương, tonyu đậu tương, bánh chip ngô¹⁰⁾.

Phương pháp đã không áp dụng thành công trên cỡ mẫu thử 1 g của dầu, maltodextrin, D-glucoza, maltitol, mannitol hoặc xylitol.

¹⁰⁾ Độ lặp lại phụ thuộc vào các mẻ mẫu và/hoặc công nghệ sản xuất chúng. Trong một số trường hợp, ADN có thể không tìm thấy hoặc bị biến chất làm cho các kết quả PCR ở mức dưới giới hạn phát hiện của phương pháp, bất kể mỗi/quy trình PCR đã được sử dụng. Điều này có thể là nguyên nhân của độ tái lập thấp giữa các phòng thử nghiệm.

Phụ lục B

(Tham khảo)

Phương pháp định lượng ADN đã tách chiết được

B.1 Phương pháp đo quang trong vùng cực tím

B.1.1 Khái quát

Phụ lục này mô tả phương pháp thông dụng để xác định nồng độ ADN trong các dung dịch.

B.1.2 Tình trạng hiệu lực

Phương pháp này đã được thử nghiệm một cách rộng rãi và các kết quả đã được công bố [35]. Ví dụ như phương pháp này đã được áp dụng thành công trong liên phòng thử nghiệm về việc phát hiện sinh vật biến đổi gen, do Federal Office of Public Health, Bern và Cantonal Laboratories of Basel and Zurich, Switzerland tổ chức.

B.1.3 Nguyên tắc

Các axit nucleic trong dung dịch sẽ hấp thụ ánh sáng tia cực tím (UV) trong dải từ 210 nm đến 300 nm với độ hấp thụ cực đại ở 260 nm. Vì các ADN, ARN và các nucleotit cùng có độ hấp thụ cực đại ở 260 nm, nên ADN không thể xác định được bằng máy đo quang trong vùng cực tím (UV) khi dung dịch bị nhiễm ARN và nucleotit. Với lý do này, nên ARN cần được loại ra bằng phương pháp enzym trong quá trình chiết ADN trước khi xác định ADN. Cũng tương tự, các oligonucleotit và các nucleotit thu được từ thủy phân ARN cần được loại bỏ (ví dụ, xử lý bằng silica, như trong A.4.1.7.2). Các oligonucleotit và các nucleotit sinh ra khi xử lý bằng RNaza, nếu không được loại bỏ (ví dụ như xử lý bằng silica) thì có thể dẫn đến việc đánh giá thừa hàm lượng ADN của mẫu thử. Ngoài ra, ADN xoắn kép hấp thụ ánh sáng UV ít hơn so với ADN xoắn đơn. Vì tỷ lệ ADN xoắn đơn có trong dung dịch là chưa biết, nên để tránh đánh giá thừa hàm lượng ADN, thì tất cả các ADN có trong mẫu thử cần được chuyển về dạng xoắn đơn bằng cách sử dụng natri hydroxit. Do các axit nucleic không hấp thụ ở bước sóng 320 nm, nên việc đọc ở 320 nm là thông tin để xác định việc hấp thụ mẫu do phân tán ánh sáng và các hợp chất hoạt hoá UV.

Không cần thiết phải xây dựng đường chuẩn, khi hệ số tắt phân tử được chọn như một hàm số của loại axit nucleic đang được nghiên cứu và/hoặc tình trạng nguyên vẹn của chúng.

Tuy nhiên, việc hiệu chuẩn quang phổ kế cần được kiểm tra định kỳ bằng cách đo nồng độ của các dung dịch ADN đối chứng.

B.1.4 Phạm vi áp dụng

Phương pháp này có thể áp dụng cho ADN với các nồng độ từ 2 µg/ml đến 50 µg/ml. Trước khi định lượng, cần pha loãng các dung dịch ADN chiết được, để đảm bảo nằm trong dải tuyến tính của phép đo quang phổ (mật độ quang từ 0,05 đến 1).

CHÚ THÍCH: Đôi khi các hợp chất còn dư (ví dụ, CTAB từ quy trình chiết ADN) có thể gây cản trở cho việc phát hiện sắc phổ UV ở 260 nm, vì chúng hấp thụ ở bước sóng này.

B.1.5 Thuốc thử

B.1.5.1 Tris(hydroxymetyl)-aminometan (Tris)(C₄H₁₁NO₃).

B.1.5.2 Natri hydroxit (NaOH).

B.1.5.3 Axit clohydric, ϕ (HCl) = 37 %.

B.1.5.4 Chất mang ADN, ví dụ, Herring Sperm ADN ¹¹⁾ hoặc Calf Thymus ADN ¹¹⁾.

B.1.5.5 Dung dịch chuẩn ADN

Chuẩn bị 10 mg/ml dung dịch gốc ADN bằng cách hoà tan 100 mg chất mang ADN (B.1.5.4) trong 10 ml dung dịch đệm (B.1.5.7). ADN hoà tan ở nồng độ này rất chậm và tạo thành dung dịch rất sánh. Sau đó pha loãng dung dịch ADN chuẩn gốc này với dung dịch đệm đến nồng độ mong muốn (ví dụ: 25 µg/ml).

B.1.5.6 Dung dịch natri hydroxit, $c(\text{NaOH}) = 2 \text{ mol/l}$.

B.1.5.7 Dung dịch đệm, $c(\text{Tris}) = 0,01 \text{ mol/l}$.

Dùng HCl để chỉnh pH đến 9,0.

B.1.6 Thiết bị, dụng cụ

B.1.6.1 Máy đo phổ UV, chùy đơn, hai chùy tia hoặc mảng photo diot là thích hợp.

B.1.6.2 Máy trộn/máy lắc, ví dụ Vortex^{®2)}.

B.1.6.3 Bình đo, ví dụ: các cuvet/ngăn nhỏ bằng thạch anh hoặc bằng chất dẻo thích hợp cho việc phát hiện UV ở bước sóng 260 nm.

¹¹⁾ Các sản phẩm này có sẵn từ hãng Sigma tương ứng là D-7290 và D-1501. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và tổ chức ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Các sản phẩm tương tự có thể được sử dụng nếu cho kết quả tương tự.

TCVN 7606 : 2007

Cỡ của bình đo được dùng xác định thể tích đo: các half-micro cuvet (1 000 μ l), micro cuvet (400 μ l), ultra-micro cuvet (100 μ l) và các ống mao dẫn (3 μ l đến 5 μ l). Đường quang của cuvet chuẩn thường là 1 cm.

B.1.7 Cách tiến hành

B.1.7.1 Đo các dung dịch chuẩn ADN

Việc hiệu chuẩn chính xác của máy quang phổ có thể được kiểm chứng bằng cách sử dụng dung dịch ADN đối chứng, như sau:

- để đo mẫu trắng, chỉ sử dụng dung dịch đệm (B.1.5.7) để đổ đầy bình đo;
- bình đo được đổ đầy bằng dung dịch chuẩn ADN (B.1.5.5).

Đo độ hấp thụ đối với dung dịch mẫu trắng và cả dung dịch chuẩn ADN ở bước sóng 260 nm và bước sóng 320 nm.

B.1.7.2 Đo dung dịch ADN thử nghiệm có nồng độ chưa biết

Đối với dung dịch mẫu trắng, trộn dung dịch đệm (B.1.5.7) và dung dịch natri hydroxit (B.5.1.1.5.13), sao cho nồng độ chất của NaOH cuối cùng là 0,2 mol/l. Hỗn hợp này được sử dụng để đổ đầy bình đo.

Trộn dung dịch ADN thử nghiệm với dung dịch natri hydroxit và nếu cần thì trộn với dung dịch đệm để thu được nồng độ chất của NaOH cuối cùng là 0,2 mol/l. Hỗn hợp này được sử dụng để đổ đầy bình đo.

Đo độ hấp thụ đối với dung dịch mẫu trắng và cả dung dịch chuẩn ADN gốc ở bước sóng 260 nm và bước sóng 320 nm sau khi ủ 1 phút. Đọc kết quả ổn định sau ít nhất 1 h.

VÍ DỤ 1: Đối với dung dịch mẫu trắng, trộn 90 μ l dung dịch đệm và 10 μ l dung dịch natri hydroxit và chuyển sang bình đo 100 μ l.

VÍ DỤ 2: Đối với dung dịch ADN thử nghiệm, trộn 80 μ l dung dịch đệm hoặc nước, 10 μ l dung dịch natri hydroxit và 10 μ l dung dịch ADN chưa biết nồng độ rồi chuyển sang bình đo 100 μ l.

B.1.8 Đánh giá

Độ hấp thụ đã được hiệu chỉnh ở 260 nm thu được bằng cách lấy độ hấp thụ ở 260 nm trừ đi độ hấp thụ (OD) ở 320 nm (nền).

Nếu độ hấp thụ đã chỉnh ở 260 nm bằng 1, thì nồng độ ADN được ước tính tương ứng là 50 μ g/ml đối với ADN xoắn kép hoặc 37 μ g/ml đối với ADN xoắn đơn (tức là bị biến tính bởi natri hydroxit).

Các phép đo tin cậy đòi hỏi các giá trị hấp thụ ở bước sóng 260 nm phải lớn hơn 0,05.

Cuối cùng, tính nồng độ khối lượng, ρ , của dung dịch ADN xoắn kép thử nghiệm, có tính đến sự biến tính và hệ số pha loãng được áp dụng theo công thức (1):

$$\rho_{ADN} = F \times (OD_{260} - OD_{320}) \times 37 \quad (1)$$

trong đó:

F là hệ số pha loãng;

OD_{260} là độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm;

OD_{320} là độ hấp thụ ở bước sóng 320 nm;

37 là hệ số chuyển đổi, tính bằng miligam trên mililit.

VÍ DỤ: Đối với hệ số pha loãng là 10 và độ hấp thụ OD_{260} là 0,658 và OD_{320} là 0,040:

$$\rho_{ADN} = 10 \times (0,658 - 0,040) \times 37 \mu\text{g/ml} = 229 \mu\text{g/ml}.$$

B.2 Phương pháp nhuộm ethidi bromua và điện di gel agarosa

B.2.1 Khái quát

Phụ lục này mô tả phương pháp thông dụng để xác định nồng độ ADN trong các dung dịch. Điện di gel agarosa của ADN và nhuộm màu ethidi bromua (EtBr) đưa ra cách ước tính số lượng ADN và phân tích tại cùng một thời điểm trạng thái tự nhiên của chúng (ví dụ: độ phân huỷ, sự có mặt của ARN còn dư và một số tạp chất). Phương pháp này cũng có thể áp dụng nếu lượng ADN sẵn có không đủ để phát hiện bằng đo phổ, hoặc ADN chưa đủ sạch và có thể còn chứa các chất hấp thụ tia UV ^[36]. Điện di gel thường không được khuyến cáo để định lượng ADN nếu nó đã bị biến tính. Trong trường hợp này, có thể áp dụng các phương pháp khác.

B.2.2 Tình trạng hiệu lực

Phương pháp này đã được áp dụng rộng rãi trong nhiều năm qua, nhưng chưa bao giờ được đánh giá trong các nghiên cứu liên phòng thử nghiệm để phát hiện sinh vật biến đổi gen trong thực phẩm.

B.2.3 Nguyên tắc

ADN tách bằng điện di, trên cơ sở điện tích và phân tử lượng của nó, khi nạp lên rây phân tử (gel agarosa) và chịu tác động của điện trường trong sự có mặt của dung dịch đệm ^[37].

EtBr đan xen vào ADN và khi được kích thích bằng ánh sáng UV sẽ phát huỳnh quang da cam. Do lượng huỳnh quang tỷ lệ với khối lượng ADN tổng số, nên số lượng ADN có trong mẫu có thể được ước tính bằng cách so sánh huỳnh quang được tạo ra bởi mẫu chưa biết với một dãy định lượng chuẩn. Khối lượng phân tử của các chất chuẩn cần phải giống với khối lượng phân tử của ADN cần định lượng, vì EtBr cũng nhuộm màu ADN xoắn đơn và ARN. Để định lượng chính xác hơn về hàm lượng ADN, thì ARN phải được loại bỏ bằng phương pháp enzym.

TCVN 7606 : 2007

B.2.4 Dải áp dụng

Phương pháp này có thể áp dụng cho các nồng độ ADN trong khoảng từ 5 ng đến 500 ng khi sử dụng các hệ thống thu nhận ảnh. Các hệ thống sử dụng CCD để ghi hình có thể nhạy hơn.

B.2.5 Các yêu cầu về an toàn

EtBr là một chất gây đột biến mạnh và là chất gây ung thư và phải được xử lý hết sức thận trọng. Sử dụng găng tay là bắt buộc. Tất cả các dung dịch và các gel chứa EtBr phải được khử nhiễm trước khi loại bỏ, xem [36].

Ánh sáng UV (UV-C) rất nguy hiểm, đặc biệt là đối với võng mạc mắt. Luôn luôn phải đeo dụng cụ bảo vệ UV (mặt nạ) khi sử dụng.

B.2.6 Thuốc thử

Điện di gel agarosa có thể được thực hiện theo dung dịch đệm điện di TAE hoặc theo dung dịch đệm điện di TBE.

Thông thường, ở mức sinh học phân tử thì không cần các loại thuốc thử mô tả trong phương pháp này. Các dung dịch mô tả trong phương pháp này không phải lúc nào cũng cần phải khử trùng bằng hấp áp lực.

B.2.6.1 Agarosa, thích hợp cho việc điện di ADN và cho việc tách cỡ phân tử ADN.

B.2.6.2 Axit boric (H_3BO_3), chỉ dùng cho hệ thống dung dịch đệm TBE.

B.2.6.3 Xanh bromophenol ($C_{19}H_9Br_4O_5SNa$) và/hoặc xylene cyanol FF ($C_{25}H_{27}N_2O_6S_2Na$).

B.2.6.4 Chất chuẩn định lượng ADN, có phân tử lượng thích hợp (ví dụ, linearized Lambda Phage ADN đối với ADN phân tử lượng cao và Lambda Phage ADN phân giải giới hạn đối với ADN phân tử lượng thấp).

B.2.6.5 Axit axetic băng (CH_3COOH), chỉ dùng cho hệ thống dung dịch đệm TAE.

B.2.6.7 Muối dinatri axit etylenđiamintetraaxetic (Na_2 -EDTA) ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$).

B.2.6.8 Ethidi bromua (EtBr) ($C_{21}H_{20}N_3Br$).

B.2.6.9 Glyxerol ($C_3H_8O_3$).

B.2.6.10 Natri axetat ($C_2H_3O_2Na$), chỉ dùng cho hệ thống dung dịch đệm TAE.

B.2.6.11 Axit clohydric, ϕ (HCl) = 37 %.

B.2.6.12 Natri hydroxit (NaOH).

B.2.6.13 Tris(hydroxymetyl)-aminometan (Tris) ($C_4H_{11}NO_3$).

B.2.6.14 Dung dịch đệm TAE (1x), $c(\text{Tris}) = 0,050 \text{ mol/l}$, $c(C_2H_3O_2Na) = 20 \text{ mmol/l}$, $c(Na_2EDTA) = 0,001 \text{ mol/l}$.

Dùng NaOH hoặc axit axetic bằng để chỉnh pH đến 8,0. Tốt nhất là chuẩn bị dung dịch đệm TAE theo dung dịch gốc đậm đặc (đậm đặc tối đa gấp 50 lần). Nếu thấy có kết tủa thì loại bỏ. Ngay trước khi sử dụng, có thể pha loãng dung dịch đệm điện di đậm đặc bằng nước đã khử ion hoặc nước chưng cất một lần, chưa khử trùng.

B.2.6.15 Dung dịch đệm Tris/borat (TBE) (0,5x), $c(\text{Tris}) = 0,055 \text{ mol/l}$, $c(\text{axit boric}) = 0,055 \text{ mol/l}$, $c(Na_2EDTA) = 0,001 \text{ mol/l}$,

Dùng NaOH hoặc HCl để chỉnh pH đến 8,0. Tốt nhất là chuẩn bị dung dịch đệm TBE theo dung dịch gốc đậm đặc (đậm đặc tối đa gấp 10 lần). Nếu thấy có kết tủa thì loại bỏ. Ngay trước khi sử dụng, có thể pha loãng dung dịch đệm điện di đậm đặc bằng nước đã khử ion hoặc nước chưng cất một lần, chưa khử trùng.

B.2.6.16 Dung dịch đệm nạp mẫu (5x), $\phi(\text{glyxerol}) = 50 \%$, $\rho(\text{xanh bromophenol}) = 2,5 \text{ g/l}$ và/hoặc $\rho(\text{xylen xyanol}) = 2,5 \text{ g/l}$, hoà tan trong dung dịch đệm điện di (B.2.6.14 hoặc B.2.6.15).

B.2.6.17 Dung dịch ethidi bromua, $c(\text{EtBr}) = 0,5 \text{ mg/l}$.

Tốt nhất là bảo quản dung dịch ethidi bromua ở dạng đậm đặc (ví dụ, 10 mg/ml) ở 5 °C nơi tối (EtBr rất nhạy với ánh sáng). Cũng không nên cân EtBr. Dung dịch gốc cần được chuẩn bị bằng cách hoà một lượng nước thích hợp vào bình đã chứa sẵn bột EtBr, hoặc chứa một số viên EtBr đã được cân trước. Khi hoà tan EtBr cần phải tránh ánh sáng, trong khi vẫn khuấy, ở nhiệt độ phòng. Chuẩn bị dung dịch này thường mất khoảng 1 h.

B.2.7 Thiết bị, dụng cụ

B.2.7.1 Lò vi sóng hoặc nồi cách thủy

B.2.7.2 Dụng cụ để điện di gel agarosa, kèm theo phụ tùng và nguồn năng lượng.

B.2.7.3 Đèn chiếu UV, thích hợp với bước sóng 312 nm.

Cách khác, có thể sử dụng thiết bị sắc ký cột axit nucleic và tùy theo hệ thống phát hiện hoặc các hệ thống thích hợp tương tự.

B.2.7.4 Dụng cụ đọc, ví dụ: hệ thống chụp ảnh có các phim 3 000 ASA và bộ lọc UV đủ cho huỳnh quang được phát ra bởi EtBr.

Cách khác, có thể sử dụng hệ thống máy quay video có camera CCD, có bộ lọc UV và (tùy chọn) phần mềm phân tích định lượng.

B.2.8 Cách tiến hành

B.2.8.1 Khái quát

Điện di gel agarosa có thể được thực hiện theo dung dịch đệm điện di TAE hoặc theo dung dịch đệm điện di TBE. Sử dụng cùng một loại dung dịch đệm để hoà tan agarosa và để đổ vào bể điện di.

B.2.8.2 Chuẩn bị gel agarosa

Gel không được dày quá 1 cm.

Nồng độ và chất lượng của agarosa xác định khả năng phân giải của gel. Để định lượng ADN phân tử lượng cao, thì sử dụng các nồng độ agarosa từ 8 g/l đến 10 g/l. Để định lượng ADN phân tử lượng thấp (ví dụ, đã bị phân giải hoặc cắt bởi enzym giới hạn), thì sử dụng các nồng độ agarosa cao hơn (đến 40 g/l) [38].

Cân một lượng agarosa thích hợp (B.2.6.1) cho vào dung dịch đệm điện di (B.2.6.14 hoặc B.2.6.15). Đun sôi trong lò vi sóng hoặc trên nồi cách thuỷ (B.2.7.1), cho đến khi agarosa hoà tan hoàn toàn. Bù vào lượng thất thoát do bay hơi bằng một lượng nước tương đương, trộn bằng cách khuấy (không để lẫn bọt khí), làm nguội dung dịch đến 60 °C và giữ ở nhiệt độ này cho đến khi sử dụng. Chuẩn bị khay đổ gel (đĩa gel) với “lược mẫu” thích hợp được đặt đúng vị trí. Rót dung dịch agarosa lên khay gel và để cho đông đặc lại ở nhiệt độ phòng (nên để 1 h).

B.2.8.3 Chuẩn bị mẫu ADN

Trộn các dung dịch mẫu ADN (ví dụ, 5 µl đến 10 µl) với khoảng 20 % (đối với thể tích mẫu cuối cùng) của dung dịch đệm (B.2.6.16) (ví dụ, cho 2,5 µl dung dịch đệm vào 10 µl mẫu ADN), trộn và dùng micro pipet đưa hỗn hợp vào giếng. Nếu nghi ngờ rằng các mẫu quá đậm đặc, thì cũng nên cho thêm một số dung dịch mẫu pha loãng vào gel điện di.

Để xác định kích thước của các đoạn ADN đã chiết được, thì cho dung dịch đệm mẫu (B.2.6.16) theo tỷ lệ (20 % thể tích mẫu) vào một lượng thích hợp của chất chuẩn khối lượng phân tử ADN (B.2.6.5) và tiến hành điện di song song.

Để ước tính nồng độ của mẫu chưa biết, cho chạy song song với các mẫu chuẩn ADN. Các mẫu như thế có chứa các lượng đã biết của ADN chuẩn (B.2.6.4) (nằm trong dải áp dụng của phương pháp: từ 5 ng đến 500 ng) được hoà tan trong nước hoặc dung dịch đệm điện di (B.2.6.14 hoặc B.2.6.15). Khuyến cáo sử dụng các chất chuẩn định lượng chứa ít nhất 5 điểm hiệu chuẩn (nghĩa là các lượng ADN khác nhau).

B.2.8.4 Điện di mẫu

Cẩn thận lấy “lược” ra khỏi gel. Chuyển gel (cùng với đĩa gel) vào bể điện di, sao cho các giếng nằm gần với cực âm. Đổ dung dịch đệm điện di (B.2.6.14 hoặc B.2.6.15) vào đầy bể. Phủ một lớp dày khoảng 2 mm cùng loại dung dịch đệm lên lớp gel và dùng micro pipet để nạp mẫu vào giếng.

Tiến hành điện di ở nhiệt độ phòng ở điện áp và cường độ thích hợp (thông thường nên dùng điện áp ổn định tối đa 5 V/cm đối với khoảng cách giữa các điện cực). Dưới các điều kiện được mô tả, thì ADN tích điện âm sẽ di chuyển từ cực âm sang cực dương. Thời gian điện di phụ thuộc vào khoảng cách di chuyển cần thiết, dòng điện cung cấp, dung dịch đệm được sử dụng, thẩm thấu điện và nồng độ của agarosa trong gel.

B.2.8.5 Nhuộm

Sau khi kết thúc điện di, nhuộm gel từ 15 min đến 50 min trong dung dịch ethidi bromua (B.2.6.17) ở nhiệt độ phòng, nên để nơi tối (và/hoặc để trong bể bằng thép không gỉ có nắp đậy kín) và lắc nhẹ.

Nếu cần, giảm bớt việc nhuộm màu nền bằng cách khử màu gel trong nước từ 10 min đến 30 min.

Cách khác, để nhuộm màu sau điện di, có thể bổ sung EtBr vào gel trước khi rót. Trong trường hợp này, EtBr được bổ sung vào gel đến nồng độ cuối cùng của gel đã được làm nguội đến 60 °C là 0,01 mg/ml.

Nếu gel được đúc với ethidi bromua, thì nạp mẫu chưa biết và chất chuẩn ADN (B.2.6.4) vào các giếng riêng biệt được tạo ra bởi cùng một “lược” trên cùng loại gel. Mặt khác, lượng ethidi bromua khác nhau, sinh ra các kết quả định lượng sai. Để giảm thiểu các vấn đề di chuyển EtBr trong gel, có thể bổ sung một số EtBr vào dung dịch đệm điện di (bể điện di). Sau khi điện di, thường phải rửa gel.

B.2.8.6 Ghi lại gel

Chuyển gel lên bề mặt đèn UV và ghi lại huỳnh quang ADN bằng chụp ảnh hoặc quay video.

B.2.9 Đánh giá/diễn giải

Hàm lượng ADN của mẫu được ước tính bằng cách so sánh các mẫu chưa biết với các mẫu chuẩn ADN đưa vào điện di song song. Việc đánh giá này có thể được thực hiện bằng trực giác hoặc tốt nhất là có sự hỗ trợ của phần mềm định lượng để có thể dựng đường chuẩn.

B.3 Phương pháp PCR tức thời (real time PCR) hoặc định lượng ADN

Khi các chất nền chiết được ít ADN, thì không phải khi nào cũng có thể định lượng ADN bằng phương pháp vật lý (ví dụ, các phương pháp mô tả trong Phụ lục này), vì độ nhạy của chúng không đủ. Trong trường hợp này khi cần định lượng nên sử dụng phương pháp PCR tức thời (real time PCR). Phương pháp này cũng cung cấp thông tin về sự khuếch đại PCR các phân tử ADN đã tách mà các phép đo nồng độ ADN bằng vật lý không thể cung cấp được. Về chi tiết, xem ISO 21570.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K.: *CuTent Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons (1988) (ISBN 0-471-50338-X)
- [2] SAMBROOK, J., RUSSEL D "Molecular Cloning, a Laboratory Manual" 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (2001) (ISBN 0-87969-576-5)
- [3] SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1987) ISBN 0-87969-309-6
- [4] PROKISCH, J. ZELENY, R., TRAPMANN, S., LE GUERN, L., SCHIMMEL, H., KRAMER, G.N, PAUWELS, J. Estimation of the minimum uncertainty of DNA concentration in a genetically modified maize sample candidate certified reference material. *Fresenius J. Analy. Chem.* (2001) 370(7) pp. 935-9
- [5] SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F and MANIATIS, T. In: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. Vol. 3, Appendix E.3, Purification of nucleic acids. (1987) (ISBN 0-87969-309-6)
- [6] Detection of a genetic modification of *Lactobacillus curvatus* in uncooked-meat sausage by amplification of the modified DNA sequence using the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe. L 08.00-44 In: *Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods*. Federal Health Office, September 1998, revised version: state OS/2001; Berlin, Köln, Beuth Verlag GmbH
- [7] STRAUB, J. A., HERTEL, C. and HAMMES, W.P. The fate of recombinant DNA in thermally treated fermented sausages. *Eur. Food Res. Technol.* (1999) **210**, pp. 62-67
- [8] STRAUB, J. A., HERTEL, C. and HAMMES, W. P. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *J. Food Protect.* (1999) 62, pp. 1150-1156
- [9] LICK, S., KELLER, M., BOCKELMANN, W., HELLER, K.J. Optimized DNA extraction method for starter cultures from yoghurt. *Milk Sci. Int.* (1998) 51, pp. 183-186
- [10] LICK, S., HELLER, K.J. Quantitation by PCR of yoghurt starters in a model yoghurt produced with a genetically modified *Streptococcus thermophilus*. *Milk Sci. Int.* (1998) 53, pp. 671-675
- [11] Detection of a genetic modification of *Streptococcus thermophilus* in yoghurt by amplification of the modified DNA sequence by means of the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe. L 02.02-4 In: *Collection of official methods under article 35 of the German Federal Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics*

and commodity goods. Federal Health Office, September 1998, revised version: state OS/2001; Berlin, Koln, Beuth Verlag GmbH

- [12] LICK, S., KELLER, M., KRUSCH, U., HELLER, K.J. Identification of starter cultures in thermally treated plain yoghurt using geneprobcs and PCR. *J. Dairy Res.* (1998) 63, pp. 607-613
- [13] VAN VAERENBERGH, B., GROOTAERT, B., MOENS, W. Validation of a method for the preparation of fungal genomic DNA for Polymerase chain reaction (PCR) and Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD). *J. Mycol. Med.* (1995) 5, pp. 133-139
- [14] HAYNES, K.A., WESTERNENG, T.J., FELL J.W., MOENS, W. Rapid detection and identification of pathogenic fungi by polymerase chain amplification of large subunit ribosomal DNA. *J. Med.& Vet. Mycology* (1995) 33, pp. 319-325
- [15] GUILLAUME, G.: VERBRUGGE, D., CHASSEUR-LIBONe, M-L., MOENS, W., COLLARD, J-M.: PCR typing of tetracycline determinants (Tet A-E) in *Salmonella enterica* Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. In: *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 32, pp. 77-85
- [16] PEDERSEN, LH., SKOUBOE, P., BOYSEN, M., SOULE, J., ROSSEN, L: Detection of *Penicillium* species in complex food samples using the polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol*, 1997, 35(2), pp.169-77
- [17] MOENS, W., Methodology for the fast design of fungal DNA probes and PCR primers. In: A.Vassaroti and U. Kircheim (Ed.) *Biotechnology Research for Innovation, Development and Growth in Europe*, ECSC-EC-EAEC Brussels, 1992, pp. 421-426
- [18] HAUGLAND, R.A., HECKMAN, J.L., WYMER, L.J. Evaluation of different methods for the extraction of fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis. In: *J.Microbiol. Methods*, 1999, 37(2), pp. 165-176
- [19] KIM, C.S., LEE, C. H., SHIN, J.S., CHUNG, Y.S., and HYUNG, N.I. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**, No.5, pp. 1085-1086
- [20] BERTHELET, M., WHYTE, L.G., and GREER, C. W.: Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpolypyrrolidone spin columns. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, 138, pp. 17-22
- [21] PETIT, F., CRAQUELIN, S., GUESPIN-MICHEL, J., and BUFFET-JANVRESSE, C. Nucleic acid extraction from polluted estuarine water for detection of viruses and bacteria by PCR and RT -PCR analysis. *Res. Microbiol.*, 1999, **150**, pp. 143-151
- [22] WATSON, R.J., and BLACKWELL, B.: Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. *Can J. Microbiol.*, 2000, 46, pp. 633-642

- [23] GRIFFITHS, R. J., WHITELEY, A.S., O'DONNELL, A.G., and BAILEY, M.J.: Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, No. 12, pp. 5488-5491
- [24] ROGERS, S.O. and BENDICH, A.J.. Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual A6* (1988) pp. 1-10
- [25] Analysis of foodstuffs: Detection of a genetic modification of soya beans by amplification of the modified DNA sequence using the polymerase chain reaction (PCR) and hybridisation of the PCR product with a DNA probe. L 23.01.22-1, March 1998. In: *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG; Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen* BgVV (In: Official Collection of methods under article 35 of the German Federal Food Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/BgVV). March 1998 Bd. 1 1999-03 Vol. 1) Berlin, K61n: Beuth Verlag GmbH
- [26] Analysis of foodstuffs: Detection of a genetic modification of potatoes by amplification of the modified DNA sequence using the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a DNA probe. L 24.01-01, February 1996, revised in January 1997. In: *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG; Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen* BgVV (In: Official Collection of methods under article 35 of the German Federal Food Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/BgW). Jan 1997 Bd. 1 (1997-01 Vol. 1) Berlin, K61n: Beuth Verlag GmbH
- [27] Analysis of foodstuffs: Detection of a genetic modification of tomatoes bean by amplification of the modified DNA sequence by means of the polymerase chain reaction (PCR) and hybridisation of the PCR product with a DNA probe. L 25.03.01-1, November 1999. In: *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG; Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen* BgVV (In: Official Collection of methods under article 35 of the German Federal Food Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/BgW). Nov 1999 Bd. 1 (1999-11 Vol. 1) Berlin, Koln: Beuth Verlag GmbH
- [28] BOYLE, J.S., and LEW, A.M. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification, *Trends in Genetics*, Vol. 11(1), p. 8, 1995
- [29] BRODMANN, P., EUGSTER, A., HUBNER, Ph., MEYER, R., PAULI, U., V6GELI, U. and LUTHY, J. Nachweis gentechnisch veränderter Roundup Ready™ Sojabohnen mittels der Polymerase - Kettenreaktion (PCR). Methodenvorprüfung im Rahmen der Subkommission 29a des Schweizerischen Lebensmittelbuches. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 1997,88, pp. 722-731

- [30] HUBNER, P., STUDER, E., and LUTHY, J. Quantitative Competitive PCR for the Detection of Genetically Modified in Food. *Food Control*, 1999,10, pp. 353-358
- [31] HUBNER, P., STUDER, E., and LuTHY, J. Quantitation of genetically modified organisms in food. *Nat Biotechnol.* 1999,17, pp. 1137-1138
- [32] MELZAK, K.A., SHERWOOD, C.S., TURNER, R.F.B. and HAYNES, C.A. Driving Forces for DNA Adsorption to Silica in Perchlorate Solutions. *J. Colloid and Interface Science*, 1996, **181**, pp. 635-644
- [33] Patents: EP 0389063, USP5,234,809
- [34] SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F, and MANIATIS, T. In: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed, Vol. 5, Appendix B 16,1989 Proteinase-K. (ISBN 0-87969-509-6)
- [35] *Swiss Food Manual*, Chapter 52B, Section 1 to 5.(2000) Eidgenossische Drucksachen und Materialzentrale, CH-5005 Bern, available on CD.
- [36] SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F and MANIATIS, T. In: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed., Vol. 5, Appendix 5, (1989) Quantitation of DNA and RNA (ISBN 0-88989-509-8)
- [37] SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F and MANIATIS, T. In: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* 2nd ed., Vol. 1, Chapter 6, (1989) Gel electrophoresis of DNA (ISBN 0-88989-509-8,)
- [38] SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F and MANIATIS, T. In: "*Molecular Cloning: a Laboratory Manuaf*" 2nd ed., Vol. 1, Section 6.5, table 8.1 (1989) (ISBN 0-88989-509-8)
- [39] ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- [40] ISO 21569, Foodstuffs -Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products -Qualitative nucleic acid based methods
- [41] ISO 21570, Foodstuffs -Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products -Quantitative nucleic acid based methods
- [42] ISO Guide 30, Terms and definitions used in connection with reference materials.
-