

TCVN 7605 : 2007

ISO 21569 : 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 – PHƯƠNG PHÁP DỰA TRÊN
ĐỊNH TÍNH AXIT NUCLEIC**

Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative nucleic acid based methods

HÀ NỘI – 2007

Mục lục

Lời giới thiệu	5
1 Phạm vi áp dụng	7
2 Tài liệu viện dẫn	7
3 Thuật ngữ và định nghĩa	8
4 Nguyên tắc	8
5 Thuốc thử	9
6 Thiết bị, dụng cụ	9
7 Cách tiến hành	9
8 Diễn giải kết quả	13
9 Biểu thị kết quả và đảm bảo chất lượng	14
10 Báo cáo thử nghiệm	15
Phụ lục A Phương pháp đặc hiệu/taxon đích	16
Phụ lục B Phương pháp sàng lọc	35
Phụ lục C Phương pháp xác định cấu trúc đặc thù	54
Phụ lục D Phương pháp phân tích dòng đặc hiệu	79
Thư mục tài liệu tham khảo	85

TCVN 7605 : 2007

Lời nói đầu

TCVN 7605 : 2007 hoàn toàn tương đương với ISO 21569 : 2005;

TCVN 7605 : 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:

- Lấy mẫu (ISO 21568);
- Phương pháp dựa trên định lượng axit nucleic (ISO 21570:2005);
- Tách chiết axit nucleic (ISO 21571).

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

Việc phát hiện định tính trình tự ADN đích được thực hiện để trả lời câu hỏi có hay không khi phát hiện có trình tự đích cụ thể hoặc không liên quan đến các phép kiểm chứng thích hợp và nằm trong giới hạn phát hiện của phương pháp đã sử dụng và phần mẫu được phân tích.

Tính đặc trưng của các phương pháp được mô tả trong các Phụ lục từ A đến D, từ các phương pháp sàng lọc để phát hiện trình tự ADN đặc trưng của sinh vật biến đổi gen, đến phát hiện cấu trúc gen đặc hiệu hoặc dòng đặc thù.

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 công nghệ PCR.

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

Tổ chức ISO đã được thông báo rằng Applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Inc. and F.Hoffman La Roche Ltd. giữ bản quyền liên quan đến công nghệ PCR. Các công ty 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:

Cơ quan cấp phép

Applied Biosystems,
850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404
USA

TCVN 7605 : 2007

và

Roche Molecular Systems, Inc.

Licensing Department

1145 Atlantic Avenue

Alameda, CA 94501

USA

Chú ý 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 – Phương pháp dựa trên định tính axit nucleic

Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative nucleic acid based methods

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này mô tả quy trình phát hiện các sinh vật bị biến đổi gen và các sản phẩm có nguồn gốc biến đổi gen bằng phương pháp phân tích axit nucleic được tách từ mẫu nghiên cứu. Phương pháp sử dụng chủ yếu là khuếch đại gen bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR).

Tiêu chuẩn này cũng đưa ra những yêu cầu chung để phát hiện và nhận dạng chính xác các trình tự axit nucleic (ADN) đã được khuếch đại.

Các hướng dẫn, yêu cầu tối thiểu và tiêu chí thực hiện được quy định trong tiêu chuẩn này là để đảm bảo các kết quả tái lập, chính xác và có thể so sánh thu được trong các phòng thử nghiệm khác nhau.

Tiêu chuẩn này được áp dụng cho chất nền thực phẩm nhưng cũng có thể được áp dụng cho các loại chất nền khác (ví dụ, thức ăn chăn nuôi và các mẫu thực vật được lấy ngoài môi trường).

Các ví dụ cụ thể của các phương pháp được đưa ra trong Phụ lục A đến Phụ lục D.

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 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005), Thực phẩm – Phương pháp phân tích để phát hiện sinh vật biến đổi gen và các sản phẩm có nguồn gốc biến đổi gen – Tách chiết axit nucleic.

TCVN 7605 : 2007

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

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng các thuật ngữ và định nghĩa trong TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

4 Nguyên tắc

4.1 Khái quát

Phân tích định tính bao gồm phát hiện đặc hiệu các trình tự axit nucleic đích trong mẫu thử. Mỗi phương pháp quy định một trình tự đích nhất định.

Kết quả định tính phải nêu rõ sự có mặt hay không có mặt yếu tố gen đang nghiên cứu, liên quan đến các phép kiểm chứng thích hợp và nằm trong giới hạn phát hiện của phương pháp được sử dụng và phần mẫu cần phân tích.

4.2 Khuếch đại gen bằng PCR

Việc khuếch đại một trình tự axit nucleic trong ống nghiệm thông qua phản ứng xúc tác bởi men ADN polymeraza với sự có mặt của cặp mồi và các deoxyribonucleosit triphosphat trong dung dịch đệm phản ứng như đã được mô tả [1], [2]. Điều kiện tiên quyết để quyết định thành công của phản ứng khuếch đại một trình tự axit nucleic là hỗn hợp phản ứng không chứa các chất ức chế polymeraza. Khuếch đại các đoạn ADN này tiến hành theo chu kỳ, mỗi chu kỳ bao gồm các bước sau:

- làm biến tính sợi ADN đôi thành sợi axit nucleic đơn bằng nhiệt;
- mồi kết cặp với trình tự gen cần khuếch đại ở nhiệt độ thích hợp;
- phản ứng kéo dài các mồi đã bám với sợi axit nucleic đơn được xúc tác bởi ADN polymeraza cũng ở một nhiệt độ thích hợp.

4.3 Phát hiện và khẳng định các sản phẩm PCR

Các sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di trên gel agarosa hoặc bằng một phương pháp thích hợp, sau khi phân lập bằng một quy trình chiết tách thích hợp, nếu cần.

Việc nhận dạng bất kỳ trình tự nào đã phát hiện được có thể được xác nhận bằng kỹ thuật thích hợp (ví dụ bằng cách phân tích trình tự của enzym giới hạn, bằng cách lai hoặc phân tích trình tự ADN).

Trong trường hợp phân tích bằng phương pháp PCR tức thời (real-time PCR), thì việc khuếch đại và phát hiện diễn ra đồng thời.

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.

5 Thuốc thử

Nhìn chung nên bảo quản các dung dịch phản ứng ở nhiệt độ xấp xỉ -20°C , trừ khi có quy định khác.

Có thể ước lượng các dung dịch cho mỗi phản ứng và chia vào từng ống riêng để tránh lặp lại việc rã đông và cấp đông, và/hoặc để giảm khả năng nhiễm bẩn chéo.

5.1 ADN đích/kiểm chứng

5.2 Nước

5.3 Dung dịch deoxyribonucleosit triphosphat (dNTP) chứa dATP, dCTP, dGTP và dTTP hoặc dUTP.

CHÚ THÍCH: Sử dụng dUTP có thể làm cản trở việc phân tích sản phẩm PCR bằng enzym giới hạn.

5.4 Dung dịch đệm cho PCR

Dung dịch đệm thường được cung cấp kèm theo ADN polymeraza. Dung dịch đệm này có hoặc không có MgCl_2 với một nồng độ nhất định do nhà sản xuất quy định. Nồng độ cuối cùng của MgCl_2 ảnh hưởng đến tính đặc hiệu của phương pháp nên nồng độ này đã được liệt kê trong từng phụ lục. Các chất phản ứng đã được chuẩn bị có bán sẵn trên thị trường. Cần theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

5.5 ADN polymeraza chịu nhiệt

5.6 Môi xuôi

5.7 Môi ngược

6 Thiết bị và dụng cụ

Về chi tiết, xem TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006) và phần Phụ lục từ A đến D.

7 Cách tiến hành

7.1 Chất lượng, tính toàn vẹn và khả năng khuếch đại của axit nucleic đã tách chiết

Dung dịch chứa axit nucleic phải đủ tinh khiết cho việc phân tích tiếp theo [3]. Chất lượng và hàm lượng axit nucleic đã được tách chiết bằng một phương pháp nhất định trên một chất nền đã cho phải có khả năng lặp lại và tái lập.

CHÚ THÍCH: Chất lượng, tính nguyên vẹn và hàm lượng của ADN khuôn ảnh hưởng đến kết quả của PCR vì thế ảnh hưởng đến kết quả phân tích. Do đó, giới hạn phát hiện của phương pháp phụ thuộc vào vật liệu cần phân tích là đã chế biến hay tinh chế và phụ thuộc vào độ phân hủy của ADN trong đó.

TCVN 7605 : 2007

Axit nucleic sử dụng trong PCR không được chứa các chất ức chế phản ứng PCR [4]. Các phép kiểm chứng ức chế được mô tả trong TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

7.2 Tiêu chí thực hiện

Các tiêu chí thực hiện được mô tả trong TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

Các đặc trưng thực hiện của mỗi phương pháp được nêu trong Phụ lục A đến Phụ lục D và cần tính đến kích thước hệ gen, xem [5].

Các điều kiện phản ứng, đặc biệt là nồng độ $MgCl_2$ và chu trình nhiệt phải được tối ưu hóa cho mỗi cặp môi và/hoặc cho mỗi hệ thống. Đối với bất kỳ cặp môi khi sử dụng lần đầu, cần phải biết về chu trình nhiệt được chọn cho một chất nền cụ thể cần nghiên cứu, tránh các sản phẩm cạnh tranh không mong muốn làm giảm độ nhạy của việc phát hiện.

Trong một phản ứng tối ưu, để khuếch đại được ≥ 10 trình tự đích thì cần dưới 40 chu trình nhiệt là đã có thể nhận được sản phẩm PCR với lượng có thể phát hiện được bằng phương pháp chuẩn. Khi số chu trình nhiệt tăng lên thì có thể gia tăng các sản phẩm không đặc hiệu. Một phản ứng PCR tối ưu, thì chỉ khoảng 40 chu trình nhiệt là có thể khuếch đại trình tự axit nucleic từ mẫu chuẩn tinh khiết chứa khoảng 100 bản sao của sợi ADN khuôn thành đủ lượng sản phẩm PCR có thể phát hiện được. Chương trình về chu trình nhiệt/thời gian cho mỗi cặp môi và hỗn hợp phản ứng thích hợp cho từng loại thiết bị được sử dụng và số chu trình phải được tuân thủ nghiêm ngặt.

Nhìn chung, tính đặc hiệu của phản ứng càng tăng nhiều càng tốt (ví dụ bằng cách sử dụng PCR bắt đầu với nhiệt độ cao: hot-start PCR). Hot-start PCR được khuyến khích sử dụng để làm giảm các phản ứng phụ như việc khuếch đại các trình tự không mong muốn trong ADN nền (hiện tượng bắt cặp sai của môi) và hiện tượng oligo hoá môi (từ đó làm tăng tính đặc hiệu).

Các giá trị thu được từ nghiên cứu xác nhận phương pháp có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và các chất nền khác với các giá trị nêu trong các phụ lục tương ứng.

7.3 Thiết kế cho PCR

7.3.1 Khái quát

Vì tính năng của mỗi PCR đặc hiệu này phải phù hợp với các phản ứng PCR đặc hiệu khác nên các khía cạnh của thiết kế PCR sau đây phải được lưu ý.

7.3.2 Kích thước của sản phẩm PCR

Kích thước của trình tự đích phải được chọn phù hợp với dải khối lượng phân tử có sẵn trong dịch chiết axit nucleic cần phân tích.

VÍ DỤ: Đối với các ADN bị phân huỷ nhiều từ các mẫu thực phẩm đã qua chế biến, thì kích thước sản phẩm PCR nên nằm trong khoảng 60 đến 150 cặp bazơ (bp). Đối với các nguyên liệu thô, thì kích thước của sản phẩm PCR rộng hơn, ví dụ có thể lên đến 250 bp cũng có thể áp dụng được.

Tuy nhiên, khi đã có các nghiên cứu thực nghiệm trước để xác định tính hiệu lực của các bộ cặp mồi tạo ra các sản phẩm PCR có kích thước khác nhau thì chúng có thể được sử dụng trên các chất nền mà chúng đã được đánh giá hiệu lực.

7.3.3 Mồi

7.3.3.1 Khái quát

Thông tin về trình tự mồi được nêu trong các Phụ lục từ A đến D.

7.3.3.2 Thiết kế mồi

Trình tự mồi tốt nhất nên có những đặc điểm sau đây khi có thể:

- chiều dài của từng mồi: 18 nucleotit đến 30 nucleotit;
- nhiệt độ kết cặp tối ưu xấp xỉ 60 °C (cần được xác định bằng thực nghiệm), nghĩa là nhiệt độ nóng chảy của mồi nhỏ hơn hoặc bằng 65 °C;
- tỷ lệ GC:AT = 50:50 nếu có thể, nếu không thì càng gần tỷ lệ đó càng tốt;
- tính ổn định ở bên trong mồi cao (tránh tập trung nhiều các G và C vào một đoạn ngắn của mồi);
- đầu 3' của mồi tránh hiện tượng kết cặp bổ sung để tạo các cặp đôi (dimer) giữa hai mồi;
- hạn chế cấu trúc bậc hai;
- hạn chế sự tạo thành cặp đôi với mẫu dò lai (probe) đặc hiệu dùng cho PCR.

Hiện nay có các phần mềm có sẵn phục vụ cho thiết kế mồi.

7.3.3.3 Kiểm tra mồi

7.3.3.3.1 Khái quát

Khả năng phát hiện trình tự đích của mồi phải được đánh giá xác nhận.

Việc đánh giá xác nhận mồi phải được tiến hành theo hai bước: đầu tiên đánh giá lý thuyết, sau đó là đánh giá bằng thực nghiệm.

7.3.3.3.2 Đánh giá tính đặc hiệu bằng lý thuyết

TCVN 7605 : 2007

Việc đánh giá bằng lý thuyết tối thiểu phải được tiến hành bằng việc nghiên cứu trình tự tương tự (ví dụ, tìm bằng công cụ trong FastA, Blast²⁾) với một trong số các trình tự trong ngân hàng trình tự axit nucleic (ví dụ, trong EMBL, GenBank²⁾). Các trình tự gen tương đồng từ ngân hàng dữ liệu có thể được lấy ra và so sánh để ước đoán khả năng tìm thấy các trình tự giống với trình tự trong taxon đích hoặc trong các sinh vật khác.

7.3.3.3 Đánh giá tính đặc hiệu bằng thực nghiệm

Không phụ thuộc vào các tiêu chí thiết kế đã áp dụng, tính đặc hiệu của mỗi luôn phải được kiểm tra bằng thực nghiệm để xác định khả năng của mỗi phân biệt được trình tự đích với các trình tự khác gần giống với trình tự không phải là đích.

Vì mỗi được thiết kế để phát hiện đặc hiệu đoạn trình tự trong một đơn vị phân loại nên để chắc chắn được tính đặc hiệu của mỗi thì cần phải đưa vào những kết quả khi sử dụng mỗi để khuếch đại trình tự đó ở một số cá thể khác nhau trong cùng đơn vị phân loại đó.

7.4 Mô tả PCR đích

Để phát hiện và nhận dạng các sinh vật biến đổi gen có thể tiến hành nhiều thử nghiệm PCR, phụ thuộc vào các loại chất nền cần nghiên cứu và/hoặc các yêu cầu phân tích. Các phép phân tích này có thể nhằm vào trình tự đặc hiệu đối với taxa đích, cấu trúc gen và dòng biến đổi, cũng như các yếu tố thích hợp cho mục đích sàng lọc.

7.5 Các phép kiểm chứng

Vì có những nguy cơ có kết quả dương tính giả và/hoặc âm tính giả nên khi tiến hành PCR phải cần đến các phép kiểm chứng thích hợp đối với mỗi thử nghiệm bằng phương pháp này [xem TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006)].

Cần sử dụng các mẫu chuẩn đã được xác nhận làm đối chứng âm và đối chứng dương, nếu sẵn có và thích hợp.

7.6 Chuẩn bị PCR, phát hiện và khẳng định các sản phẩm PCR

Trong các Phụ lục A đến D nêu chi tiết đối với các bước tiến hành PCR .

CHÚ THÍCH: Trong trường hợp phát hiện sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarosa, thì kích thước sản phẩm PCR có thể ước lượng được bằng ADN đánh dấu đã biết kích thước được điện di song song cùng với sản phẩm PCR.

²⁾ Blast và Genbank là những ví dụ về sản phẩm thích hợp có sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra để tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng sản phẩm khác nếu chúng cho các kết quả tương tự.

Trong một số trường hợp, có thể cần phải khẳng định kết quả âm tính hoặc dương tính về việc biến đổi gen. Trong trường hợp này, có thể sử dụng cặp môi thay thế trình tự đích; cách này đặc biệt thích hợp để khẳng định kết quả của phương pháp thử nghiệm sàng lọc.

Việc nhận dạng trình tự ADN đích đặc thù có thể được thực hiện bằng một phương pháp thích hợp khác với phương pháp xác định kích thước sản phẩm PCR, ví dụ:

- bằng phương pháp lai sản phẩm PCR với mẫu dò lai đặc hiệu, hoặc
- tiến hành phân tích trình tự trên sản phẩm PCR bằng enzym giới hạn, chiều dài của các đoạn tạo ra phải tương ứng với chiều dài dự tính của trình tự ADN đích sau giới hạn, hoặc
- giải trình tự sản phẩm PCR, hoặc
- khẳng định bằng các kỹ thuật tương đương khác.

Nếu mỗi được thiết kế để phát hiện các trình tự từ sinh vật nhiễm (sinh vật không biến đổi gen trong tự nhiên như virus, vi khuẩn) thì phải kiểm tra xem đoạn ADN vừa phát hiện có phải từ sinh vật biến đổi gen hay không. Thực hiện bằng cách kiểm tra sự không có mặt ADN khác có nguồn gốc từ sinh vật gây nhiễm này.

VÍ DỤ: Promoter 35S có nguồn gốc từ virus khảm súp lơ (CaMV) và có thể tìm thấy đoạn ADN của promoter này ở sinh vật biến đổi gen hoặc/và ở CaMV⁽⁶⁾. Bằng cách kiểm tra sự có mặt của các ADN khác từ CaMV, điều này có thể khẳng định được nguồn gốc biến đổi gen của promoter 35S-CaMV, nếu không tìm thấy đoạn ADN nào khác có nguồn gốc từ CaMV.

8 Diễn giải kết quả

8.1 Khái quát

Kết quả PCR sẽ là một trong hai trường hợp sau:

- a) dương tính nếu chỉ thấy một sản phẩm PCR đặc hiệu được phát hiện còn tất cả các phép kiểm chứng đều có kết quả như trong Bảng 2 của TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006), hoặc
- b) âm tính nếu không thấy sản phẩm PCR đặc hiệu và tất cả các phép kiểm chứng đều có kết quả như trong Bảng 2 của TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

CHÚ THÍCH: Đôi khi vẫn có khả năng các trình tự đích dòng đặc thù này có mặt cùng với các trình tự dòng đặc thù khác trong cùng một sinh vật biến đổi gen đơn (ví dụ do các gen xếp chồng nhau [7]).

Nếu kết quả không rõ ràng, phải tiến hành lặp lại, xem TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

8.2 Thẩm tra

Thẩm tra các kết quả âm tính hoặc dương tính đối với trình tự đích như đã mô tả trong 7.6.

9 Biểu thị kết quả và đảm bảo chất lượng

9.1 Khái quát

Các kết quả nên được diễn giải một cách rõ ràng, nghĩa là không ghi "±".

Kết quả âm tính không được diễn giải là "không có mặt sinh vật biến đổi gen".

Tốt nhất, giới hạn phát hiện (LOD) phải được đưa ra để tham khảo đối với mẫu thử. Tuy nhiên, việc này đòi hỏi những nguyên liệu đặc biệt, ADN có chất lượng cao và/hoặc thiết bị thử nghiệm phức tạp mà không phải phòng thử nghiệm nào cũng có được. Do đó việc phân tích trở nên mất công, phức tạp và tốn kém không áp dụng thường xuyên được.

Tối thiểu, LOD phải được cung cấp cùng với mẫu chuẩn và một giá trị tương đối dựa vào một chất nền cụ thể (tốt nhất là một lượng đã biết của dung dịch ADN hệ gen, ví dụ 100 ng của 0,01 % GTS 40-3-2 ADN).

9.2 Biểu thị kết quả âm tính

Báo cáo thử nghiệm như sau:

"Đối với mẫu X, trình tự Y không phát hiện được".

Giá trị LOD của phương pháp là x % được xác định bởi ABC (nêu rõ mẫu chuẩn đã sử dụng).

Nếu không thể chỉ ra lượng ADN đích trong PCR bao nhiêu là đủ để phát hiện thì phải thêm câu sau:

"Tuy nhiên, đối với mẫu này hàm lượng ADN đích tách chiết được từ loài X có thể chưa đủ để phát hiện đối với mẫu này".

CHÚ THÍCH: LOD của mẫu được xác định bằng lượng ADN của loài nằm trong phản ứng phân tích (số lượng bản sao) và tỷ lệ có liên quan đến LOD tuyệt đối của trình tự đích biến đổi gen (số bản sao) [7].

9.3 Biểu thị kết quả dương tính

Báo cáo thử nghiệm như sau:

"Đối với mẫu X, trình tự Y đã được tìm thấy".

Có thể bao gồm cả việc nhận dạng sinh vật biến đổi gen, nếu có sẵn.

9.4 Yêu cầu đảm bảo chất lượng

Các kết quả thu được từ hai phần mẫu thử cần phải nhất quán. Nếu một phần cho kết quả dương tính còn một phần lại cho kết quả âm tính thì phải lặp lại phép phân tích [xem TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006)], nếu có thể thì tăng lượng axit nucleic khuôn trong phản ứng để nhận được các kết quả phù hợp cho hai phần mẫu thử. Ngoài ra, tối thiểu phải kiểm tra mức độ tinh khiết của ADN khuôn bằng phép kiểm chứng ức chế PCR. Các phép kiểm chứng khác để kiểm tra chiều dài và tính nguyên vẹn của axit nucleic khuôn cũng có thể sử dụng.

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải được ghi phù hợp với TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006) và phải bao gồm ít nhất thông tin sau:

- giới hạn phát hiện và chất nền được sử dụng để nhận biết giới hạn phát hiện;
- mô tả tính đặc hiệu của phương pháp phân tích;
- kết quả được diễn giải theo điều 9.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Phương pháp đặc hiệu taxon-dịch

A.1 Phương pháp đặc hiệu taxon-dịch để phát hiện các thành phần từ đậu tương

A.1.1 Khái quát

Đây là phương pháp thông thường để phát hiện một gen đơn đặc hiệu trong đậu tương (*Glycine max*).

Phương pháp này có thể sử dụng để đánh giá khả năng khuếch đại đoạn ADN từ các sản phẩm có nguồn gốc từ đậu tương.

A.1.2 Thẩm tra thực trạng và tiêu chí thực hiện

A.1.2.1 Nghiên cứu cộng tác

Phương pháp đã được đánh giá hiệu lực bởi các nghiên cứu cộng tác [8], [9] được tổ chức bởi nhóm nghiên cứu thuộc Viện nghiên cứu bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng và Viện Thú Y Liên bang Đức với đề tài “Xây dựng phương pháp nhận dạng thực phẩm được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền” theo Điều 35 của luật thực phẩm của Liên bang Đức. Phương pháp CTAB được sử dụng để tách chiết ADN được đưa ra trong TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005), A.3 (nhưng phần mẫu thử là 100 mg).

Dữ liệu từ các nghiên cứu cộng tác được liệt kê trong Bảng A.1.

Bảng A.1 - Kết quả từ các nghiên cứu cộng tác

Năm nghiên cứu cộng tác	1997 ^[8]	1998/1999 ^[9]
Số phòng thử nghiệm tham gia	25	27
Số phòng thử nghiệm có kết quả gửi đến	22	20
Số mẫu của mỗi phòng thử nghiệm	10	3
Số kết quả được chấp nhận	220	60
Số mẫu chứa đậu tương	220	50
Kết quả dương tính giả	0	1 (2 %)
Kết quả âm tính giả	0	1 (2%)

A.1.2.2 Đặc hiệu phân tử

A.1.2.2.1 Khái quát

Phụ lục này trình bày chi tiết những yêu cầu được nêu trong điều 7.

Phương pháp được thiết kế cho trình tự đích được mô tả trong GenBank^{®3)}, có số hiệu đăng ký No. K00821 = M30884.

A.1.2.2.2 Lý thuyết

Gene lectin *Le1* đậu tương [10] thu được từ các ngân hàng dữ liệu gen được sử dụng làm trình tự đích.

Trình tự cấu trúc ADN được đưa vào không có sự tương đồng với bất kỳ trình tự ADN nào của các cây trồng khác nhau (các cây họ đậu, ngũ cốc, rau...) (NCBI BlastN^{® 2)}) không biến đổi gen được tìm thấy trong ngân hàng dữ liệu của Phòng thử nghiệm Sinh học phân tử Châu Âu (EMBL), ngày 28 tháng 9 năm 2001). Tuy nhiên, GM03 tương đồng 100% với trình tự có số hiệu đăng ký trong cơ sở dữ liệu: AX033509, (trình tự 17 từ bản quyền DE19906169), AX033507 (trình tự 15 từ bản quyền DE19906196) và AX033501 (trình tự 9 từ bản quyền DE19906169), trong khi GM04 chỉ tương đồng với mã ký hiệu AX033509 (trình tự 17 từ bản quyền DE19906169). Chú ý rằng mã ký hiệu No.M30884 giống với K00821, trong GenBank được đăng ký năm 1993.

Số bản sao trình tự đích không xác định được, nhưng được coi là một gen phiên bản đơn.

A.1.2.2.3 Thực nghiệm

Không có gen nào được khuếch đại quan sát được khi sử dụng ADN từ cây trồng khác (đậu đỗ, ngũ cốc, các loại rau) hoặc từ thịt bò, thịt lợn. PCR đặc hiệu cao đối với ADN từ đậu tương [10], [11].

A.1.2.3 Giới hạn phát hiện (LOD)

Giới hạn tuyệt đối chưa xác định được, nhưng phương pháp đã được chứng minh có thể phát hiện đối với ADN của đậu tương có hàm lượng 0,1 ng, được xác định bằng huỳnh quang.

A.1.3 Điều chỉnh

Chưa có quy định cụ thể.

A.1.4 Nguyên tắc

Đoạn có chiều dài 118 bp từ gen lectin của hạt đậu tương được khuếch đại bằng PCR và được xác định bằng điện di trên gel agarosa.

³⁾ Blast và Genbank là những ví dụ về sản phẩm thích hợp có sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra để tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu chúng cho kết quả tương tự.

TCVN 7605 : 2007

A.1.5 Thuốc thử

Chất lượng thuốc thử được sử dụng, xem TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

A.1.5.1 Nước

A.1.5.2 Dung dịch đệm PCR (không chứa MgCl₂), 10 x ⁴⁾

A.1.5.3 Dung dịch MgCl₂, c(MgCl₂) = 25 mmol/l

A.1.5.4 Dung dịch dNTP, c(dNTP) = 2,5 mmol/l (cho mỗi loại)

A.1.5.5 Oligonucleotit

A.1.5.5.1 Môi xuôi

Gen lectin của Đậu tương (mã ký hiệu trong GenBank[®] No.K00821).

Mỗi GM03: 5'-gCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C-3'.

A.1.5.5.2 Môi ngược

Gen lectin của đậu tương (mã ký hiệu trong GenBank[®] No.K00821).

Mỗi GM04: 5'-gCC CAT CTg CAA gCC TTT TTg Tg-3'.

A.1.5.6 ADN polymeraza chịu nhiệt (dùng cho hot-start PCR), 5 IU/μl.

A.1.5.7 Mẫu dò lai (GM)

5'-ggT AgC gTT gCC AgC TTC g-3'.

A.1.5.8 Dung dịch đệm muối natri xitrat (SSC) 5x, pH 7,0.

Dung dịch đệm SSC 5x là dung dịch chứa 0,75 mol/l NaCl và 0,075 mol/l natri xitrat.

A.1.5.9 Dung dịch lai sơ bộ

Bao gồm dung dịch đệm SSC 5x, 0,1 % (nồng độ khối) *N*-lauroylsarcosin, 0,02 % (nồng độ khối) natri dodecyl sulfat (SDS) và 1 % chất hãm ⁵⁾ hoặc 5 % (nồng độ khối) bột sữa không chứa chất béo [12].

⁴⁾ 10 x có nghĩa là 10 lần; hay nói cách khác dung dịch đệm PCR chứa 1,5 mol/l Tris-HCl. pH 8,3.

⁵⁾ Chất hãm (Blocking reagent) là sản phẩm có sẵn trên thị trường được sản xuất bởi Boehringer, Mannheim. Thông tin này đưa ra để tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu chúng cho các kết quả tương tự.

A.1.5.10 Dung dịch lai

Chứa 10 pmol mẫu dò lai trong 2,5 ml dung dịch đệm trước khi lai (A.1.5.9). Nhiệt độ lai là 50 °C. Thông tin chi tiết hơn về điều kiện lai xem [12].

A.1.6 Thiết bị**A.1.6.1 Máy chu trình nhiệt (máy PCR)****A.1.6.2 Buồng điện di, với nguồn điện.****A.1.7 Cách tiến hành****A.1.7.1 Chuẩn bị PCR**

Phương pháp này định rõ tổng thể tích PCR là 25 µl cho một phản ứng với các thành phần như liệt kê trong Bảng A.2. PCR cũng có thể tiến hành với thể tích lớn hơn nếu các dung dịch được điều chỉnh phù hợp. Nồng độ cuối cùng của các thuốc thử đưa ra trong Bảng A.2 được chứng minh là phù hợp.

Bảng A.2 – Thành phần thuốc thử

Thuốc thử	Nồng độ cuối cùng	Thể tích trên mẫu (µl)
Mẫu ADN khuôn	10 ng đến 50 ng	1
Nước		15,9
Đệm PCR 10 x (không chứa MgCl ₂)	1 x	2,5
Dung dịch MgCl ₂ ^a , 25 mmol/l	1,5 mmol/l	1,5
Dung dịch dNTP, 10 mmol/l	0,8 mmol/l	2
Môi GM03, 5 µmol/l	0,2 µmol/l	1
Môi GM04, 5 µmol/l	0,2 µmol/l	1
Taq ADN polymeraza, 5 IU/µl	0,5 IU	0,1
^a Nếu dung dịch đệm PCR có chứa MgCl ₂ , thì nồng độ cuối cùng của MgCl ₂ trong hỗn hợp phản ứng là 1,5 mmol/l.		

A.1.7.2 Kiểm chứng PCR

Về kiểm chứng dương tính, mẫu chuẩn GTS 40-3-2 do Viện Vật liệu và Đo lường chuẩn (IRMM) Geel, Bỉ (IRMM-410) cung cấp, có thể được sử dụng.

Các kiểm chứng thích hợp khác cần tiến hành theo TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

A.1.7.3 Chương trình thời gian-nhiệt độ

Chương trình thời gian-nhiệt độ nêu trong Bảng A.3 được sử dụng cho nghiên cứu thẩm tra phương pháp, sử dụng máy chu trình nhiệt GeneAmp[®] 2400 hoặc GeneAmp[®] 9600 và AmpliTaq Gold[®] ADN

TCVN 7605 : 2007

polymeraza⁶⁾. Khi sử dụng máy khác thì phải chỉnh cho phù hợp. Thời gian hoạt hoá/biến tính ban đầu phụ thuộc vào polymeraza được sử dụng. Nếu sử dụng hot-start polymeraza, thì phải tuân theo khuyến cáo của nhà sản xuất, trừ khi có quy định khác.

Bảng A.3 - Chương trình thời gian-nhiệt độ

Hoạt hoá, biến tính ban đầu	10 min /95 °C
Khuếch đại gen	30 s /95 °C
	30 s /60 °C
	60 s /72°C
Số chu trình	35
Kéo dài sợi trước khi kết thúc	3 min/72 °C

A.1.8 Nhận dạng

Vì phương pháp này chỉ để đánh giá như phương pháp kiểm chứng để xác định chất lượng của ADN tách chiết được, nên việc nhận dạng chỉ dựa vào kích thước của sản phẩm PCR.

Nếu sử dụng phương pháp này cho mục đích khác thì việc nhận dạng sản phẩm khuếch đại có thể được xác định bằng lai Southern sử dụng đầu dò lai đã được đánh dấu bằng digoxigenin (từ A.1.5.7 đến A.1.5.10) hoặc đọc trình tự sản phẩm PCR và so sánh trình tự đó với các gen từ GenBank trong Bảng A.1.5.5.

A.1.9 Đảm bảo chất lượng và diễn giải kết quả

Trình tự đích được coi là đã phát hiện nếu kích thước của sản phẩm PCR tương ứng với kích thước của trình tự ADN đích dự kiến, được xác định bằng cách so sánh với các sản phẩm thu được từ mẫu chuẩn GTS[®] 40-3-2 đã được công nhận (ví dụ các dây IRMM-410 của IRMM, Geel, Bỉ).

Về nhận dạng, xem A.1.8.

Sản phẩm PCR có kích thước 118 bp chứng tỏ rằng dung dịch ADN mẫu có chứa ADN gốc đậu tương có thể khuếch đại nằm trong giới hạn đặc hiệu được mô tả trong A.1.2.2.

Chi tiết về điện di, xem B.2 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005).

A.2 Phương pháp đặc hiệu taxon-đích để phát hiện các trình tự ADN nhiều bản sao có mặt trong diệp lục thực vật

⁶⁾ GeneAmp[®] 2400, 9600 và AmpliTaq Gold[®] polymeraza là các ví dụ thích hợp về các sản phẩm có sẵn trên thị trường của Applied Biosystems, trước kia là Perkin Elmer/Applied Biosystems. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

A.2.1 Khái quát

Phương pháp này dùng để phát hiện các trình tự ADN nhiều bản sao có mặt trong diệp lục thực vật (đoạn intron trnL của diệp lục).

Phương pháp này thích hợp để kiểm tra xem việc tách chiết ADN từ mẫu thực phẩm có thành công hay không và để kiểm tra xem mẫu có chứa ADN của thực vật với hàm lượng có thể phát hiện bằng cách khuếch đại gen hay không. Đối với nguyên liệu đã qua chế biến, khả năng ứng dụng phương pháp này phụ thuộc vào mức độ ADN bị phân hủy.

Thông thường tế bào thực vật chứa nhiều bản sao của trình tự ADN này và kích thước của trình tự đích được khuếch đại về căn bản lớn hơn các trình tự được sử dụng để phát hiện sự biến đổi đặc thù về gen. Vì thế, phương pháp không được sử dụng làm kiểm chứng để định lượng ADN.

Số bản sao trên mỗi tế bào có thể khác nhau giữa các loài và các mô thực vật.

A.2.2 Tình trạng hiệu lực và tiêu chí thực hiện

A.2.2.1 Nghiên cứu cộng tác

Phương pháp đã được đánh giá hiệu lực bởi các nghiên cứu cộng tác [13] được tổ chức bởi nhóm nghiên cứu thuộc Viện nghiên cứu bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng và Viện Thú Y Liên bang Đức với đề tài “Xây dựng phương pháp nhận dạng thực phẩm được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền” theo Điều 35 của luật thực phẩm của Liên bang Đức. Phương pháp CTAB được sử dụng để tách chiết ADN được đưa ra trong TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005), A.3 (nhưng phần mẫu thử là 100 mg).

Dữ liệu từ các nghiên cứu cộng tác được liệt kê trong Bảng A.4.

Bảng A.4 - Kết quả từ nghiên cứu cộng tác

Năm	1995
Số phòng thử nghiệm tham gia	18
Số phòng thử nghiệm gửi kết quả	18
Số mẫu của mỗi phòng thử nghiệm	10
Tổng số mẫu	180
Số kết quả được chấp nhận	180
Số mẫu khoai tây chứa B33-INV	71
Số mẫu không chứa khoai tây biến đổi gen	109
Kết quả dương tính giả	0 (0 %)
Kết quả âm tính giả	0 (0 %)

TCVN 7605 : 2007

A.2.2.2 Đặc hiệu phân tử

A.2.2.2.1 Khái quát

Phụ lục này trình bày chi tiết những yêu cầu nêu trong điều 7.

Phương pháp được thiết kế cho trình tự đích được mô tả trong [14], ví dụ: GenBank[®], có số hiệu đăng ký No. Z00044, S54304, X15901.

A.2.2.2.2 Lý thuyết

Trình tự cấu trúc ADN được đưa vào không có sự tương đồng với bất kỳ trình tự ADN nào từ các sinh vật không phải là thực vật được tìm thấy trong ngân hàng dữ liệu (NCBI BlastN[®], dữ liệu EMBL, 28 tháng 9 năm 2001).

Mỗi được thiết kế để khuếch đại một trình tự duy nhất của ADN diệp lục (đoạn intron chèn vào gen *trmL*) cho thấy không có tương đồng với trình tự khác đích.

A.2.2.2.3 Thực nghiệm

Không có đoạn ADN nào được khuếch đại khi sử dụng ADN của động vật, nấm và vi khuẩn [14].

Trình tự ADN đích đã được khuếch đại khi sử dụng ADN khuôn có nguồn gốc từ tảo, cyanobacteria, bryophytes, dương xỉ, cây hạt trần và cây hạt kín [14].

Số bản sao của trình tự đích phụ thuộc vào loài và kiểu mô thực vật.

A.2.2.3 Giới hạn phát hiện (LOD)

Giới hạn tuyệt đối không xác định được nhưng phương pháp được chứng minh là có thể phát hiện với nồng độ ADN đầu tương nhỏ hơn 0,1 ng. Nồng độ này đo được bằng máy huỳnh quang.

A.2.3 Điều chỉnh

Chưa có quy định cụ thể.

A.2.4 Nguyên tắc

Một đoạn ADN kích thước từ 500 bp đến 600 bp có trong gen mã hoá tRNA của diệp lục [14], được khuếch đại bằng PCR và được tách bằng điện di trên gel agarosa.

A.2.5 Thuốc thử

Chất lượng thuốc thử sử dụng, xem TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

A.2.5.1 Nước

A.2.5.2 Dung dịch đệm PCR (không có MgCl₂), 10 x

A.2.5.3 Dung dịch $MgCl_2$, $c(MgCl_2) = 25 \text{ mmol/l}$

A.2.5.4 Dung dịch dNTP, $c(dNTP) = 2,5 \text{ mmol/l}$ (cho mỗi loại)

A.2.5.5 Oligonucleotit

A.2.5.5.1 Mỗi xuôi

Gen tRNA của diệp lục (GenBank® số hiệu đăng ký No. Z00044, X15901).

Mỗi c [14]: 5'-CgA AAT Cgg TAg ACg CTA Cg-3'.

A.2.5.5.2 Mỗi ngược

Gen tRNA của diệp lục (GenBank® số hiệu đăng ký No. Z00044, X15901).

Mỗi d [14]: 5'-ggg gAT AgA ggg ACT TgA AC-3'.

A.2.5.6 ADN polymeraza chịu nhiệt, 5 IU/ μl .

A.2.6 Thiết bị, dụng cụ

Theo quy định trong A.1.6.

A.2.7 Cách tiến hành

A.2.7.1 Chuẩn bị PCR

Phương pháp này định rõ tổng thể tích PCR là 25 μl cho một phản ứng với các thành phần như liệt kê trong Bảng A.5. PCR cũng có thể tiến hành với thể tích lớn hơn nếu các dung dịch được điều chỉnh phù hợp. Nồng độ cuối cùng của các thuốc thử đưa ra trong Bảng A.5 được chứng minh là phù hợp.

Bảng A.5 - Thành phần thuốc thử

Thuốc thử	Nồng độ cuối cùng	Thể tích trên mẫu (μl)
Mẫu ADN	10 ng tới 50 ng	1
Nước		13,9
10 x dung dịch đệm PCR (không có $MgCl_2$)	1 x	2,5
dung dịch ^a $MgCl_2$, 25 $\mu\text{mol/l}$	1,5 mmol/l	1,5
dung dịch dNTP, 10 $\mu\text{mol/l}$	0,8 mmol/l	2
Mỗi c, 10 $\mu\text{mol/l}$	0,8 $\mu\text{mol/l}$	2
Mỗi d, 10 $\mu\text{mol/l}$	0,8 $\mu\text{mol/l}$	2
Taq ADN polymeraza, 5 IU/ μl	0,5 IU	0,1

^a Nếu dung dịch đệm PCR có sẵn $MgCl_2$ thì nồng độ cuối cùng của $MgCl_2$ trong mỗi hỗn hợp phản ứng nên điều chỉnh đến 1,5 mmol/l.

TCVN 7605 : 2007

A.2.7.2 Kiểm chứng PCR

Về kiểm chứng dương tính, mẫu chuẩn GTS 40-3-2 do Viện Vật liệu và Đo lường chuẩn (IRMM) Geel, Bỉ (IRMM-410) cung cấp có thể được sử dụng.

Một số kiểm chứng thích hợp khác nên tiến hành theo TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

A.2.7.3 Chương trình thời gian-nhiệt độ

Chương trình thời gian-nhiệt độ nêu trong Bảng A.6 được sử dụng cho nghiên cứu thẩm tra phương pháp, sử dụng máy chu trình nhiệt GeneAmp[®] 2400 hoặc GeneAmp[®] 9600 và AmpliTaq Gold[®] ADN polymeraza⁷⁾. Khi sử dụng máy khác thì phải chỉnh cho phù hợp. Thời gian hoạt hoá/biến tính ban đầu phụ thuộc vào polymeraza được sử dụng. Nếu sử dụng hot-start polymeraza, thì phải tuân theo khuyến cáo của nhà sản xuất, trừ khi có quy định khác.

Bảng A.6 - Chương trình thời gian-nhiệt độ

Hoạt hoá, biến tính ban đầu	4 min/94°C
Khuếch đại	30 s/95 °C 30 s/55 °C 120 s/72 °C
Số chu trình	35
Kéo dài sợi trước khi kết thúc	5 min/72 °C

A.2.8 Nhận dạng

Vì phương pháp này chỉ được đánh giá như là phương pháp đối chứng để xác định chất lượng của ADN được tách chiết nên không biết chính xác kích thước của sản phẩm PCR. Do đó, việc nhận dạng chỉ dựa vào kích thước sản phẩm PCR dự đoán trong khoảng từ 500 bp đến 600 bp.

A.2.9 Đảm bảo chất lượng và diễn giải kết quả

Trình tự đích được coi là đã phát hiện nếu kích thước của sản phẩm PCR tương ứng với kích thước của trình tự ADN đích dự kiến.

Về nhận dạng, xem A.2.8.

Sản phẩm PCR có kích thước từ 500 bp đến 600 bp chứng tỏ rằng dung dịch ADN có chứa ADN của thực vật với nồng độ nằm trong giới hạn phát hiện đặc hiệu có thể khuếch đại để phát hiện được bằng PCR như nêu trong A.2.2.2.

⁷⁾ GeneAmp[®] 2400, 9600 và AmpliTaq Gold[®] polymeraza là các ví dụ thích hợp về các sản phẩm có sẵn trên thị trường của Applied Biosystems, trước kia là Perkin Elmer/Applied Biosystems. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

Chi tiết về điện di, xem B.2 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005).

A.3 Phương pháp đặc hiệu taxon-đích và sàng lọc sinh vật biến đổi gen để phát hiện ADN từ cà chua và/hoặc cà chua biến đổi gen Zeneca®.

A.3.1 Khái quát

Đây là qui trình thông thường để phát hiện trình tự ADN có số bản sao đơn đặc hiệu của cà chua (*Lycopersicon esculentum* Mill).

Phương pháp này có thể được sử dụng như phương pháp sàng lọc để phát hiện cà chua biến đổi gen làm chậm quá trình chín (Zeneca; *Lycopersicon esculentum* Mill giống Ailsa Craig dòng Nema 282F).

Không có công cụ nào thẩm tra việc nhận dạng của sản phẩm PCR. Vì thế, phương pháp này không được coi là phương pháp nhận dạng. Phương pháp này có thể sử dụng để đánh giá khả năng khuếch đại ADN của cà chua.

A.3.2 Tình trạng hiệu lực và tiêu chí thực hiện

A.3.2.1 Nghiên cứu cộng tác

Phương pháp đã được đánh giá hiệu lực bởi các nghiên cứu cộng tác [15] được tổ chức bởi nhóm nghiên cứu thuộc Viện nghiên cứu bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng và Viện Thú Y Liên bang Đức với đề tài “Xây dựng phương pháp nhận dạng thực phẩm được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền” theo Điều 35 của luật thực phẩm của Liên bang Đức. Phương pháp CTAB được sử dụng để tách chiết ADN được đưa ra trong A.3 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005).

Dữ liệu về nghiên cứu cộng tác được liệt kê trong Bảng A.7.

Bảng A.7 - Kết quả từ nghiên cứu cộng tác lần đầu

Năm	1998
Số phòng thử nghiệm tham gia	19
Số phòng thử nghiệm gửi kết quả	18
Số mẫu của mỗi phòng thử nghiệm	5
Số kết quả được chấp nhận	90
Số mẫu chứa <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill giống Ailsa Craig dòng Nema 282F (Zeneca)	43
Số mẫu chứa <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill giống Ailsa Craig dòng Nema 282C (không biến đổi gen)	47
Kết quả dương tính giả	0 (0 %)
Kết quả âm tính giả	0 (0 %)

TCVN 7605 : 2007

Một nghiên cứu cộng tác khác được tiến hành bởi Viện Nghiên cứu Bảo vệ sức khoẻ người tiêu dùng và Thú y, Cộng hoà Liên bang Đức (BGVV) trong khuôn khổ Dự án Châu Âu mã SMT4-CT96-2072 theo các tiêu chí trong TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). Phương pháp CTAB được sử dụng để tách chiết ADN được đưa ra trong TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005), A.3 (nhưng phần mẫu thử là 100 mg).

Bảng A.8 - Kết quả từ nghiên cứu cộng tác thứ hai

Năm	1998
Số phòng thử nghiệm tham gia	21
Số phòng thử nghiệm gửi kết quả	19
Số mẫu của mỗi phòng	10
Số kết quả được chấp nhận	190
Số mẫu chứa <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill giống Ailsa Craig dòng Nema 282F (Zeneca)	88
Số mẫu chứa <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill giống Ailsa Craig dòng Nema 282C (không biến đổi gen)	102
Kết quả dương tính giả	0 (0 %)
Kết quả âm tính giả	0 (0 %)

A.3.2.2 Đặc hiệu phân tử

A.3.2.2.1 Khái quát

Phụ lục này đáp ứng những yêu cầu nêu trong điều 7.

Đây là phương pháp sử dụng để nhận dạng các trình tự đích đã được mô tả, ví dụ trong GenBank® mã hiệu No. X04583.

A.3.2.2.2 Lý thuyết

Trình tự cấu trúc ADN được đưa vào không có sự tương đồng với bất kỳ trình tự ADN nào từ các sinh vật không phải là thực vật được tìm thấy trong ngân hàng dữ liệu (NCBI BlastN®, dữ liệu EMBL, 28 tháng 9 năm 2001). Cả hai mỗi đều trùng 100 % với trình tự sau có trong ngân hàng gen mã: X14074 (Gen mã hoá polygalactonaza của cà chua phân cắt thành tế bào), X05656 (mRNA phiên mã cho polygalacturonaza của cà chua), M37304 (gen mã hoá polygalacturonaza (PG) cà chua), X04583 (mRNA phiên mã cho polygalacturonaza-2a cà chua), A24194 (polygalacturonaza của *L. esculentum*), A15981 (mRNA phiên mã cho polygalacturonaza-2a của *L. esculentum*), 101809 (trình tự nucleotit số 1 từ bản quyền US4801540), và AX062336 (trình tự nucleotit số 1 từ bản quyền WO0078982).

A.3.2.2.3 Thực nghiệm

Không có trình tự nào được khuếch đại từ ADN của các cây trồng khác [16].

Số bản sao trình tự đích chưa xác định được, nhưng người ta cho rằng đó là một gen đơn bản.

A.3.2.3 Giới hạn phát hiện (LOD)

LOD tuyệt đối chưa xác định được nhưng phương pháp đã thực hiện để khuếch đại đoạn ADN từ nồng độ 0,1 ng (xác định được bằng huỳnh quang) được tách chiết từ cà chua tươi.

A.3.3 Điều chỉnh

Sử dụng mẫu qua chế biến kỹ có thể cho kết quả âm tính do không còn đoạn trình tự đích có kích thước lớn hơn 383 bp.

Việc phát hiện các sản phẩm PCR có kích thước 383 bp chứng tỏ dung dịch ADN mẫu có chứa ADN của cà chua nguyên gốc, còn sản phẩm PCR có kích thước 180 bp chứng tỏ dung dịch ADN mẫu chứa gen từ cà chua biến đổi gen (Zeneca; *Lycopersicon esculentum* Mill giống Ailsa Craig dòng Nema 282F).

A.3.4 Nguyên tắc

Gen polygalacturonaza (gen PG) mã hoá cho enzym PG liên quan đến quá trình chín của quả. Phương pháp này có khả năng khuếch đại đoạn trong gen PG [17] có kích thước 383 bp. ở cà chua biến đổi gen Zeneca, đoạn gen 180 bp sẽ được khuếch đại do gen PG của cây này đã bị cắt bỏ một đoạn trình tự ADN dùng để chuyển gen [18], [19].

A.3.5 Thuốc thử

Chất lượng của thuốc thử, xem TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

A.3.5.1 Nước

A.3.5.2 Dung dịch đệm PCR (không có MgCl₂), 10 x

A.3.5.3 Dung dịch MgCl₂, c(MgCl₂) = 25 mmol/l

A.3.5.4 Dung dịch dNTP, c(dNTP) = 2,5 mmol/l (cho mỗi loại)

A.3.5.5 Oligonucleotit

A.3.5.5.1 Môi xuôi

Gen PG (GenBank® số hiệu No. X04583).

Môi PG34L: 5'-ggA TCC TTA gAA gCA TCT AgT-3'.

A.3.5.5.2 Môi ngược

Gen PG (GenBank® số hiệu No. X04583).

TCVN 7605 : 2007

Môi PG34R: 5'-CgT Tgg TgC ATC CCT gCA Tgg-3'.

A.3.5.6 ADN polymeraza chịu nhiệt (dùng cho hot-start PCR), 5 IU/ μ l.

A.3.6 Thiết bị, dụng cụ

Như quy định trong A.1.6.

A.3.7 Cách tiến hành

A.3.7.1 Chuẩn bị PCR

Phương pháp này định rõ tổng thể tích PCR là 25 μ l cho một phản ứng với các thành phần như liệt kê trong Bảng A.9. PCR cũng có thể tiến hành với thể tích lớn hơn nếu các dung dịch được điều chỉnh phù hợp. Nồng độ cuối cùng của các thuốc thử đưa ra trong Bảng A.9 được chứng minh là phù hợp.

Bảng A.9 - Thành phần thuốc thử

Thuốc thử	Nồng độ cuối cùng	Thể tích trên mẫu (μ l)
Mẫu ADN	10 ng - 50 ng	1
Nước		16,8
Dung dịch đệm PCR 10 x (không có MgCl ₂)	1 x	2,5
Dung dịch MgCl ₂ ^a , 25 mmol/l	1,5 mmol/l	1,5
Dung dịch dNTP, 10mmol/l	0,4 mmol/l	1
Môi PG34L 10 μ mol/l	0,4 μ mol/l	1
Môi PG34R 10 μ mol/l	0,4 μ mol/l	1
Taq ADN polymeraza, 5 IU/ μ l	1 IU	0,2

^a Nếu dung dịch đệm cho PCR có sẵn MgCl₂ thì nồng độ cuối cùng của MgCl₂ hỗn hợp phản ứng phải được điều chỉnh đến 1,5 mmol/l.

A.3.7.2 Kiểm chứng PCR

Vì phương pháp cần kiểm chứng dương tính đối với việc sử dụng taxon-đích đặc thù, nên có thể sử dụng ADN từ cà chua tươi. Tuy nhiên, không có đối chứng dương tính cho gen đã bị cắt bỏ một phần, có mặt trong cà chua biến đổi gen có trên thị trường⁸⁾.

Các phép kiểm chứng thích hợp khác cần tiến hành theo TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

⁸⁾ Về các loại mẫu chuẩn thích hợp, liên hệ với Cơ quan chuẩn Quốc gia.

A.3.7.3 Chương trình thời gian-nhiệt độ

Chương trình thời gian-nhiệt độ nêu trong Bảng A.10 được sử dụng cho nghiên cứu thẩm tra phương pháp, sử dụng máy chu trình nhiệt GeneAmp® 2400 hoặc GeneAmp® 9600 và AmpliTaq Gold® ADN polymeraza⁹⁾. Khi sử dụng máy khác thì phải chỉnh cho phù hợp. Thời gian hoạt hoá/biến tính ban đầu phụ thuộc vào polymeraza được sử dụng. Nếu sử dụng hot-start polymeraza, thì phải tuân theo khuyến cáo của nhà sản xuất, trừ khi có quy định khác.

Bảng A.10 - Chương trình thời gian-nhiệt độ

Hoạt hoá, biến tính ban đầu	10 min/95 °C
Khuếch đại	30 s/94 °C 60 s/60 °C 60 s/72 °C
Số chu trình	35
Kéo dài sợi trước khi kết thúc	6 min/72 °C

A.3.8 Nhận dạng

Như đã trình bày, việc nhận dạng cơ bản chỉ dựa vào kích thước sản phẩm PCR.

A.3.9 Đảm bảo chất lượng và diễn giải kết quả

Trình tự đích được coi là đã phát hiện nếu kích thước của sản phẩm PCR tương ứng với kích thước của trình tự ADN đích dự kiến, được xác định bằng cách so sánh với sản phẩm được tạo ra từ mẫu chuẩn từ cà chua.

Nhận dạng sản phẩm PCR, xem A.3.8.

Sản phẩm PCR có kích thước 383 bp và 180 bp cho thấy dung dịch mẫu ADN có chứa ADN của cà chua và của cà chua biến đổi gen Zeneca tương ứng, với nồng độ AND nằm trong giới hạn phát hiện đặc hiệu nêu trong A.3.2.2.

Chi tiết về các bước điện di, xem B.2 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005).

A.4 Phương pháp đặc hiệu taxon-đích để phát hiện các thành phần có nguồn gốc từ ngô

⁹⁾ GeneAmp® 2400, 9600 và AmpliTaq Gold® polymeraza là các ví dụ thích hợp về các sản phẩm có sẵn trên thị trường của Applied Biosystems, trước kia là Perkin Elmer/Applied Biosystems. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự

TCVN 7605 : 2007

A.4.1 Khái quát

Đây là qui trình thông thường để phát hiện trình tự gen invertaza có số bản sao đơn đặc hiệu của ngô (*Zea mays*).

Không có công cụ nào thẩm tra việc nhận dạng của sản phẩm PCR. Vì thế, phương pháp này không được coi là phương pháp nhận dạng. Phương pháp này có thể sử dụng để đánh giá khả năng khuếch đại ADN của ngô.

A.4.2 Tình trạng hiệu lực và tiêu chí thực hiện

A.4.2.1 Nghiên cứu cộng tác

Phương pháp đã được đánh giá hiệu lực bởi các nghiên cứu cộng tác, được tổ chức bởi nhóm nghiên cứu thuộc Viện nghiên cứu bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng và Viện Thú Y Liên bang Đức với đề tài “Xây dựng phương pháp nhận dạng thực phẩm được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền” theo Điều 35 của luật thực phẩm của Liên bang Đức. Phương pháp CTAB được sử dụng để tách chiết ADN được đưa ra trong A.3 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005) và một nửa số phòng thử nghiệm tham gia đã sử dụng Wizard® ADN-Clean-Up-System¹⁰.

Dữ liệu từ nghiên cứu cộng tác được liệt kê trong Bảng A.11.

Bảng A.11 - Kết quả từ nghiên cứu cộng tác [20]

Năm	1999
Số phòng thử nghiệm tham gia	18
Số phòng thử nghiệm gửi kết quả	16
Số mẫu của mỗi phòng thử nghiệm	6
Số kết quả được chấp nhận	96
Số mẫu có Bt-176	32
Số mẫu có Bt-11	32
Số mẫu không chứa ngô biến đổi gen	32
Kết quả dương tính giả	0 (0 %)
Kết quả âm tính giả	0 (0 %)

A.4.2.2 Đặc hiệu phân tử

A.4.2.2.1 Khái quát

Phụ lục này đáp ứng những yêu cầu nêu trong điều 7.

Phương pháp được thiết kế để phát hiện trình tự như mã số No. U16123 trong ngân hàng gen.

A.4.2.2.2 Lý thuyết

Gen mã hoá invertaza của ngô thu được từ cơ sở dữ liệu trình tự ADN được chọn làm trình tự đích.

Một số trình tự tương đồng với một số trình tự ADN của cây trồng khác (cây đậu, cây ngũ cốc, rau) và của người, côn trùng được tìm thấy trong ngân hàng dữ liệu (NCBI BlastN[®] search, EMBL database, ngày 28 tháng 9 năm 2001).

Mỗi IVR1-F được lấy từ:

- invertaza IVR1 axit, tan của cây ngô No. AF171874 (100 % phù hợp);
- trình tự 25 có số hiệu đăng ký AX033517 từ bản quyền DE19906169 (21 nucleotit liên tiếp giống nhau).
- trình tự 22 có số hiệu đăng ký AX033514 từ bản quyền DE19906169 (21 nucleotit liên tiếp giống nhau).

Mỗi IVR1-R được lấy từ:

- invertaza IVR1 axit, tan của cây ngô No. AF171874 (100 % giống nhau);
- trình tự 30 có số hiệu đăng ký AX150234 từ bản quyền WO0132919 (100 % giống nhau);
- mRNA phiên mã cho beta-fructosidaza của *Triticum aestivum* số hiệu đăng ký AJ224681 (20 nucleotit liên tiếp giống nhau);
- invertaza axit tan của *Saccharum officinarum* số hiệu đăng ký AF062735 (19 nucleotit liên tiếp giống nhau);
- invertaza axit tan của *Saccharum robustum* số hiệu đăng ký AF062734 (19 nucleotit liên tiếp giống nhau).

Số bản sao của trình tự đích chưa được xác định nhưng được cho là một gen đơn bản.

A.4.2.2.3 Thực nghiệm

Thử nghiệm khuếch đại ADN từ ngô bằng PCR cho kết quả đặc hiệu cao [21].

A.4.2.3 Giới hạn phát hiện (LOD)

¹⁰⁾ Wizard[®] ADN-Clean-Up-System là ví dụ thích hợp về sản phẩm có sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra để tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu chúng cho các kết quả tương tự.

TCVN 7605 : 2007

LOD tuyệt đối chưa được xác định, nhưng người ta đã xác định được là phương pháp có thể khuếch đại với nồng độ ADN $\leq 0,1$ ng được tách chiết từ hạt ngô (xác định được bằng quang phổ) [20].

A.4.3 Điều chỉnh

Chưa có quy định cụ thể.

A.4.4 Nguyên tắc

Gen mã hoá cho invertaza của ngô mã hoá cho enzym tham gia trong quá trình trao đổi carbonhydrat.

Một đoạn ADN 226 bp của gen mã hoá invertaza của ngô được khuếch đại bằng PCR và được tách bằng điện di trên gel agarosa.

A.4.5 Thuốc thử

Chất lượng thuốc thử sử dụng, xem TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

A.4.5.1 Nước

A.4.5.2 Dung dịch đệm PCR (không có $MgCl_2$), 10 x.

A.4.5.3 Dung dịch $MgCl_2$, $c(MgCl_2) = 25$ mmol/l.

A.4.5.4 Dung dịch dNTP, $c(dNTP) = 2,5$ mmol/l.

A.4.5.5 Oligonucleotit

A.4.5.5.1 Môi xuôi

Gen invertaza của ngô (số hiệu đăng ký trên ngân hàng gen No. U16123).

Môi IVR1-F: 5'-CCg CTg TAT CAC AAg ggC Tgg TAC C-3'.

A.4.5.5.2 Môi ngược

Gen invertaza của ngô (số hiệu đăng ký trên ngân hàng gen No. U16123).

Môi IVR1-R: 5'-ggA gCC CgT gTA gAg CAT gAC gAT C-3'.

A.4.5.6 ADN polymeraza chịu nhiệt (dùng cho hot-start PCR), 5 IU/ μ l.

A.4.6 Thiết bị, dụng cụ

Như quy định trong A.1.6.

A.4.7 Cách tiến hành

A.4.7.1 Chuẩn bị PCR

Phương pháp này định rõ tổng thể tích PCR là 25 µl cho một phản ứng với các thành phần như liệt kê trong Bảng A.12. PCR cũng có thể tiến hành với thể tích lớn hơn nếu các dung dịch được điều chỉnh phù hợp. Nồng độ cuối cùng của các thuốc thử đưa ra trong Bảng A.12 được chứng minh là phù hợp.

Bảng A.12 - Thành phần thuốc thử

Thuốc thử	Nồng độ cuối cùng	Thể tích trên mẫu (µl)
ADN Mẫu	10 ng đến 50 ng	2
Nước		15,3
Đệm chạy PCR 10x (không có MgCl ₂)	1 x	2,5
Dung dịch MgCl ₂ ^a , 25 mmol/l	1,5 mmol/l	1,5
Dung dịch dNTP, 10 mmol/l	0,4 mmol/l	1
Mồi IVR1-F, 10 µmol/l	0,5 µmol/l	1,25
Mồi IVR1-R, 10 µmol/l	0,5 µmol/l	1,25
Taq ADN polymeraza, 5 IU/µl	1 IU	0,2
^a Nếu dung dịch đệm cho PCR đã có sẵn MgCl ₂ thì nồng độ MgCl ₂ trong hỗn hợp phản ứng được điều chỉnh đến 1,5 mmol/l.		

A.4.7.2 Kiểm chứng PCR

Về kiểm chứng dương tính, có thể sử dụng mẫu chuẩn đã được công nhận, ví dụ ngô Bt 11 (IRMM-412) hoặc ngô dòng (Event) 176 (Bt 176) (IRMM-411).

Các phép kiểm chứng thích hợp khác tiến hành theo TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

A.4.7.3 Chương trình thời gian-nhiệt độ

Chương trình thời gian-nhiệt độ nêu trong Bảng A.13 được sử dụng cho nghiên cứu thẩm tra phương pháp, sử dụng máy chu trình nhiệt GeneAmp[®] 2400 hoặc GeneAmp[®] 9600 và AmpliTaq Gold[®] ADN polymeraza¹¹⁾. Khi sử dụng máy khác thì phải chỉnh cho phù hợp. Thời gian hoạt hoá/biến tính ban đầu phụ thuộc vào polymeraza được sử dụng. Nếu sử dụng hot-start polymeraza, thì phải tuân theo khuyến cáo của nhà sản xuất, trừ khi có quy định khác.

Bảng A.13 - Chương trình thời gian – nhiệt độ

Hoạt hoá/biến tính ban đầu	12min/95°C
Khuếch đại	30 s/95 °C
	30 s/64 °C
	60 s/72 °C
Số chu trình	35
Kéo dài sợi trước khi kết thúc	10 min/72 °C

A.4.8 Nhận dạng

Việc nhận dạng chỉ dựa vào kích thước sản phẩm PCR.

A.4.9 Đảm bảo chất lượng và diễn giải kết quả

Trình tự đích được coi là đã phát hiện nếu kích thước của sản phẩm PCR tương ứng với kích thước của trình tự ADN đích dự kiến, được xác định bằng cách so sánh với sản phẩm được tạo ra từ mẫu ngô chuẩn (ví dụ, IRMM-412 [Bt11 ngô] hoặc IRMM-411 [Ngô dòng 176] do IRMM, Geel, Bỉ cung cấp).

Nhận dạng sản phẩm PCR, xem A.4.8.

Sản phẩm PCR có kích thước 226 bp cho thấy dung dịch mẫu ADN có chứa ADN của ngô gốc, với nồng độ AND nằm trong giới hạn phát hiện đặc hiệu nêu trong A.4.2.2.

Chi tiết về các bước điện di xem B.2 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005).

¹¹⁾ GeneAmp[®] 2400, 9600 và AmpliTaq Gold[®] polymeraza là các ví dụ thích hợp về các sản phẩm có sẵn trên thị trường của Applied Biosystems, trước kia là Perkin Elmer/Applied Biosystems. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

Phụ lục B

(tham khảo)

Phương pháp sàng lọc

B.1 Phương pháp sàng lọc để phát hiện ADN của thực vật biến đổi gen (promoter 35S-CaMV)

B.1.1 Khái quát

Phương pháp này để phát hiện trình tự ADN có nguồn gốc từ đoạn khởi động (promoter) 35S của virus khảm súp lơ (CaMV) có số bản sao khác nhau. Do promoter 35S-CaMV có mặt trong một số thực vật biến đổi gen, nên phương pháp này có thể được sử dụng để sàng lọc sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ thực vật biến đổi gen [22], [23].

B.1.2 Tình trạng hiệu lực và tiêu chí thực hiện

B.1.2.1 Nghiên cứu cộng tác

Phương pháp này được đánh giá hiệu lực bởi nhiều nghiên cứu cộng tác tiến hành trên các chất nền thực phẩm qua chế biến [24], [25].

Phương pháp đã được đánh giá hiệu lực bởi nghiên cứu cộng tác [24] được tổ chức bởi nhóm nghiên cứu thuộc Viện nghiên cứu bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng và Viện Thú Y Liên bang Đức với đề tài “Xây dựng phương pháp nhận dạng thực phẩm được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền”. Số phòng thử nghiệm tham gia cũng như số mẫu được nêu trong TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). Phương pháp CTAB được sử dụng để tách chiết ADN được đưa ra trong A.3 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005) (nhưng phần mẫu thử là 100 mg).

Dữ liệu nghiên cứu cộng tác được liệt kê trong bảng B.1

Bảng B.1 - Kết quả nghiên cứu cộng tác

Năm	1999
Số phòng thử nghiệm tham gia	27
Số phòng thử nghiệm gửi kết quả	23
Số mẫu nghiên cứu của mỗi phòng	5
Số kết quả được chấp nhận	115
Số mẫu chứa GTS 40-3-2	59
Số mẫu chứa đậu tương không biến đổi gen	56
Kết quả dương tính giả	0 (0 %)
Kết quả âm tính giả	0 (0 %)

TCVN 7605 : 2007

B.1.2.2 Đặc hiệu phân tử

B.1.2.2.1 Khái quát

Phụ lục này trình bày chi tiết những yêu cầu được ghi trong điều 7.

Phương pháp được thiết kế cho trình tự đích được mô tả trong GenBank®, có số hiệu đăng ký No.V00141.

Danh mục thực vật biến đổi gen có chứa Promoter 35S-CaMV được liệt kê trong phần phụ lục của [24].

Kết quả dương tính giả có thể xảy ra vì trình tự được khuếch đại có nguồn gốc từ virus khảm súp lơ gây bệnh cho súp lơ và các thành viên khác thuộc họ *Brassicaceae* (*Cruciferae*) cũng như họ *Resedaceae* và *Solanaceae* [26], [27].

Vì thế, kết quả dương tính từ các mẫu *Brassicaceae*, *Resedaceae* và *Solanaceae* cần được xử lý cẩn thận. Kết quả dương tính có thể chỉ ra sự có mặt của các sản phẩm có nguồn gốc từ thực vật biến đổi gen nhưng không nên kết luận khi chưa có thêm bằng chứng xác đáng.

Để phân biệt giữa nhiễm virus và vật liệu biến đổi gen, phương pháp phát hiện virus gây nhiễm súp lơ có thể được sử dụng [6].

B.1.2.2.2 Lý thuyết

Trình tự cấu trúc ADN được đưa vào không có sự tương đồng với bất kỳ trình tự ADN nào từ cây trồng không biến đổi gen được tìm thấy trong ngân hàng dữ liệu (NCBI BlastN®, EMBL database, 28 tháng 9 năm 2001) được tìm thấy. Tuy nhiên, cả hai mỗi đều trùng hợp với trình tự mà không thể xác định được đó là trình tự virus khảm súp lơ hay trình tự trong vector tái tổ hợp hay bản quyền mã: S70105 cp (protein vỏ) [virus khảm dưa chuột]. Mỗi cũng trùng hợp với hơn 100 trình tự của virus khảm súp lơ, vector tái tổ hợp, các bản quyền.

B.1.2.2.3 Thực nghiệm

Sản phẩm PCR được khuếch đại không có ở ADN của cây trồng không biến đổi gen và không bị nhiễm virus [22], [24], [25], [28].

Sản phẩm PCR được khuếch và được phát hiện khi sử dụng ADN từ một số cây trồng biến đổi gen ví dụ GTS 40-3-2 (Đậu tương Roundup Ready®), ngô dòng (Event) 176 (Bt 176), Bt 11, MON 810, MON 809, và cà chua bị làm chậm quá trình chín (Zeneca) [22], [24], [25], [28].

Số bản sao của trình tự ADN là khác nhau.

B.1.2.3 Giới hạn phát hiện (LOD)

Giới hạn tuyệt đối chưa xác định được. LOD tương đối đã được chứng minh với nồng độ bột đậu tương biến đổi gen chiếm 0,1 % (khối lượng) bột đậu tương IRMM-410 và hàm lượng ngô biến đổi gen dòng (Event) 176 (Bt 176) IRMM-411 chiếm 0,1 % (khối lượng) trong bột ngô (mẫu chuẩn đã được công nhận CRMs) [25].

B.1.3 Điều chỉnh

Chưa có quy định cụ thể.

B.1.4 Nguyên tắc

Đoạn ADN 195 bp trong promoter 35S-CaMV được khuếch đại bằng PCR và được phát hiện bằng điện di trên gel agarosa sau khi tách. Để nhận dạng chính xác sản phẩm PCR, phải tiến hành các bước thẩm tra tiếp theo.

Promoter là vùng được nhận dạng bởi ARN-polymeraza (RNA-polymeraza), chịu trách nhiệm cho việc biểu hiện gen. Ví thể, promoter 35S-CaMV cấu thành thường được sử dụng trong thực vật biến đổi gen [24].

B.1.5 Thuốc thử

Chất lượng thuốc thử được sử dụng, xem TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

B.1.5.1 Nước**B.1.5.2 Dung dịch đệm PCR (không chứa $MgCl_2$), 10 x****B.1.5.3 Dung dịch $MgCl_2$, $c(MgCl_2) = 25 \text{ mmol/l}$** **B.1.5.4 Dung dịch dNTP, $c(dNTP) = 2,5 \text{ mmol/l}$ (cho mỗi loại)****B.1.5.5 Oligonucleotit****B.1.5.5.1 Mỗi xuôi**

Promoter 35S-CaMV, 35s-1: ^{(2),(28)}5'- gCT OCT ACA AAT gCC ATC A -3'.

Mỗi xuôi cùng với mỗi ngược được thiết kế để khuếch đại trình tự mã No. V00141.

B.1.5.5.2 Mỗi ngược

Promoter 35S-CaMV, 35s-2: ^{[24],[28]} 5'- gAT AgT ggg ATT gTg CgT CA -3'.

Mỗi ngược cùng với mỗi xuôi được thiết kế để khuếch đại trình tự mã No. V00141.

B.1.5.6 ADN polymeraza chịu nhiệt (dùng cho hot-start PCR), 5 IU/ μ l.**B.1.5.7 Enzym giới hạn: *Xmn* I (= *Asp* 700).**

TCVN 7605 : 2007

B.1.6 Thiết bị, dụng cụ

B.1.6.1 Máy chu trình nhiệt

B.1.6.2 Bộ điện di, có nguồn cung cấp.

B.1.7 Cách tiến hành (Chuẩn bị PCR)

B.1.7.1 Khái quát

Phương pháp này định rõ tổng thể tích PCR là 25 µl cho một phản ứng với các thành phần như liệt kê trong Bảng B.2. PCR cũng có thể tiến hành với thể tích lớn hơn nếu các dung dịch được điều chỉnh phù hợp. Nồng độ cuối cùng của các thuốc thử đưa ra trong Bảng B.2 được chứng minh là phù hợp.

Bảng B.2 - Thành phần thuốc thử

Thuốc thử	Nồng độ cuối cùng	Thể tích trên mẫu (µl)
Mẫu ADN	10 ng - 50 ng	1
Nước		15,9
Dung dịch đệm PCR 10 x (không chứa MgCl ₂)	1 x	2,5
Dung dịch MgCl ₂ ^a , 25 mmol/l	1,5 mmol/l	1,5
Dung dịch dNTP, 10 mmol/l	0,8 mmol/l	2
Môi 35s-1,5 µmol/l	0,2 µmol/l	1
Môi 35S-2,5 µmol/l	0,2 µmol/l	1
Taq ADN polymeraza, 5 IU/µl	0,5 IU	0,1
^a Nếu dung dịch đệm PCR có sẵn MgCl ₂ , thì nồng độ cuối cùng của MgCl ₂ được điều chỉnh đến 1.5 mmol/l.		

B.1.7.2 Kiểm chứng PCR

Về kiểm chứng dương tính, mẫu chuẩn GTS 40-3-2 (chứa 0,1 % thành phần thực vật biến đổi gen) do Viện Vật liệu và Đo lường chuẩn (IRMM) Geel, Bỉ (IRMM-410) cung cấp có thể được sử dụng.

Các kiểm chứng thích hợp khác cần tiến hành theo TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

B.1.7.3 Chương trình thời gian-nhiệt độ

Chương trình thời gian-nhiệt độ nêu trong Bảng A.3 được sử dụng cho nghiên cứu thẩm tra phương pháp, sử dụng máy chu trình nhiệt GeneAmp[®] 2400 hoặc GeneAmp[®] 9600 và AmpliTaq Gold[®] ADN

polymeraza¹²⁾. Khi sử dụng máy khác thì phải chỉnh cho phù hợp. Thời gian hoạt hoá/biến tính ban đầu phụ thuộc vào polymeraza được sử dụng. Nếu sử dụng hot-start polymeraza, thì phải tuân theo khuyến cáo của nhà sản xuất, trừ khi có quy định khác.

Bảng B.3 - Chương trình thời gian-nhiệt độ

Hoạt hoá, biến tính ban đầu	10 phút/95°C
Quá trình khuếch đại	20 s/94°C 40 s/54°C 60 s/72°C
Số chu trình	40
Kéo dài sợi trước khi kết thúc	3 min/72°C

B.1.8 Nhận dạng

Việc nhận dạng sản phẩm PCR có thể phải được kiểm tra bằng enzym giới hạn *Xmn* I. Enzym này cắt sản phẩm PCR thành 2 đoạn (có kích thước 115 bp và 80 bp) [22], [24].

B.1.9 Đảm bảo chất lượng và diễn giải kết quả

Trình tự đích được coi là đã phát hiện nếu kích thước của sản phẩm PCR tương ứng với kích thước của trình tự ADN đích dự kiến, được xác định bằng cách so sánh với các sản phẩm thu được từ mẫu chuẩn (ví dụ [GTS[®] 40-3-2] các dây IRMM-410 của IRMM, Geel, Bỉ).

Về nhận dạng, xem B.1.8.

Sản phẩm PCR có kích thước 195 bp chứng tỏ dung dịch mẫu ADN có chứa ADN của CaMV hoặc có nguồn gốc biến đổi gen có khả năng khuếch đại với nồng độ nằm trong giới hạn phát hiện đặc hiệu đã được nêu trong B.1.2.2.

Chi tiết về điện di, xem B.2 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005).

B.2 Phương pháp sàng lọc thay thế để phát hiện ADN của thực vật biến đổi gen (promoter 35S-CaMV)

B.2.1 Khái quát

Phương pháp này dùng để phát hiện trình tự ADN promoter 35S từ virus khảm súp lơ (CaMV) có số bản sao khác nhau trong các chất nền thực phẩm đã qua chế biến. Do promoter 35S-CaMV có mặt ở nhiều

¹²⁾ GeneAmp[®] 2400, 9600 và AmpliTaq Gold[®] polymeraza là các ví dụ thích hợp về các sản phẩm có sẵn trên thị trường của Applied Biosystems, trước kia là Perkin Elmer/Applied Biosystems. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

TCVN 7605 : 2007

thực vật biến đổi gen nên phương pháp này có thể sử dụng để sàng lọc ADN có nguồn gốc từ thực vật biến đổi gen [22], [23], [29].

Không có biện pháp nào để kiểm chứng việc nhận dạng các sản phẩm PCR. Do đó, phương pháp này không được coi là phương pháp nhận dạng. Phương pháp này chỉ có thể sử dụng để đánh giá khả năng khuếch đại của đoạn trình tự đích.

B.2.2 Tình trạng hiệu lực và tiêu chí thực hiện

B.2.2.1 Nghiên cứu cộng tác

Phương pháp đã được đánh giá hiệu lực theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). Nghiên cứu cộng tác giữa 23 phòng thử nghiệm của châu Âu và được điều phối bởi EC JRC [29], [30]. Phương pháp được đánh giá cho việc phát hiện các sinh vật biến đổi gen trong nhiều chất nền thực phẩm đã qua chế biến (hạt ngô luộc, sữa dành cho trẻ nhỏ, bánh bích quy, thức ăn chứa đậu tương đã bị axit hoá) chứa 0 %, 2 %, và 100 % (10 % thay cho 100 % đối với bánh bích quy) của GTS 40-3-2 hoặc dòng (Event) 176. Mỗi phòng thử nghiệm tham gia nhận 4 mẫu đối chứng và 30 mẫu kép độc lập chưa biết trong đó có 10 mẫu chứa 0 % sinh vật biến đổi gen và 20 mẫu chứa các phần trăm khác nhau của mẫu biến đổi gen. Tất cả các phòng đều nhận được bản mô tả phương pháp chi tiết để tách ADN bằng CTAB hoặc bằng bộ kit có sẵn trên thị trường. Tuy nhiên, các phòng thử nghiệm đã tự do sử dụng các phương pháp của họ để tách ADN trong khi các điều kiện cho PCR phải được tối ưu hóa đối với các thiết bị tại chỗ của họ để có kết quả đặc hiệu. Các phòng phải phân tích mỗi mẫu một lần và xem xét chính xác mẫu dương tính hay âm tính với sinh vật biến đổi gen. Vì hầu hết các phòng thử nghiệm đều có kết quả đúng (14 phòng có số tỷ lệ đúng 90 % đến 100 %; và 3 phòng có tỷ lệ đúng 80 % đến 90 %) và không có tỷ lệ đúng trong khoảng 70 % đến 80 %, nên giới hạn kết quả đúng được chọn là 80 %. Do đó, 5 phòng thử nghiệm không được đưa vào phân tích thống kê tiếp theo. Trung bình 96,1 % kết quả đúng đối với mẫu chứa thực vật không biến đổi gen (3,9 % kết quả dương tính giả) và trung bình 98,1 % kết quả đúng đối với mẫu có chứa sinh vật biến đổi gen (1,9 % kết quả âm tính giả) [30]. Kết quả được nêu trong Bảng B.4.

Bảng B.4 - Kết quả của nghiên cứu cộng tác

Năm	1999
Số phòng thử nghiệm tham gia	30
Số phòng thử nghiệm gửi kết quả	18
Số mẫu của mỗi phòng thử nghiệm	12
Tổng số mẫu	360
Số kết quả được chấp nhận	540
Kết quả dương tính giả	3,9 %
Kết quả âm tính giả	1,9 %

B.2.2.2 Đặc hiệu phân tử

B.2.2.2.1 Khái quát

Phụ lục này trình bày chi tiết những yêu cầu nêu trong điều 7.

Phương pháp được thiết kế cho trình tự đích được mô tả, ví dụ trong GenBank®, có số hiệu đăng ký No. V00141. Danh mục các thực vật biến đổi gen chứa promoter 35S-CaMV, xem [23] và [24].

Kết quả dương tính giả có thể xảy ra vì trình tự được khuếch đại có thể có nguồn gốc từ promoter của virus khảm súp lơ và các loài khác thuộc họ *Brassicaceae* (*Cruciferae*) cũng như *Resedaceae* và *Solanaceae* [26], [27].

Kết quả dương tính từ các mẫu *Brassicaceae*, *Resedaceae* và *Solanaceae* phải được xử lý cẩn thận. Kết quả dương tính có thể chỉ ra sự có mặt của sản phẩm có nguồn gốc từ sinh vật biến đổi gen nhưng để chắc chắn thì phải kiểm tra và có bằng chứng.

Để phân biệt giữa sự nhiễm virus và nguyên liệu biến đổi gen, phương pháp phát hiện virus khảm súp lơ có thể được sử dụng [6].

B.2.2.2.2 Lý thuyết

Trình tự cấu trúc ADN được đưa vào không có sự tương đồng với bất kỳ trình tự ADN nào từ các sinh vật không phải là thực vật được tìm thấy trong ngân hàng dữ liệu (NCBI BlastN®, dữ liệu EMBL, 28 tháng 9 năm 2001). Mỗi bắt cặp được với hàng loạt gen trong ngân hàng gen, và bắt cặp tốt nhất với gen của virus khảm súp lơ, vector tái tổ hợp và các bằng phát minh.

B.2.2.2.3 Thực nghiệm

Không có trình tự nào được khuếch đại khi sử dụng ADN của đậu tương không biến đổi gen cho thử nghiệm trước khi tiến hành nghiên cứu cộng tác [29].

TCVN 7605 : 2007

B.2.2.3 Giới hạn phát hiện (LOD)

Giới hạn tuyệt đối cho phương pháp này chưa xác định được, nhưng nó đã được thử nghiệm để phát hiện ít nhất 50 bản sao ADN của GTS 40-3-2 [29].

LOD tương đối được xác định nhưng nghiên cứu cộng tác [8] đã chỉ ra rằng có thể phát hiện được trong bánh bích qui, sữa dành cho trẻ em và đậu tương axit hoá có chứa sinh vật biến đổi gen [GTS 40-3-2 (đậu tương Roundup Ready[®]) và/ hoặc ngô dòng (Event) 176 (Bt 176)] chiếm 2 %, kết quả chính xác 100 % [30].

B.2.3 Điều chỉnh

Chưa có quy định cụ thể.

B.2.4 Nguyên tắc

Đoạn ADN có kích thước 123 bp từ promoter 35S-CaMV được khuếch đại bằng PCR và phát hiện được bằng điện di trên gel agarosa. Việc nhận dạng sản phẩm PCR có thể được kiểm tra xác nhận, ví dụ bằng cách giải trình tự. Tuy nhiên chưa có qui trình thẩm tra nào được xác nhận có hiệu lực.

Promoter là trình tự được RNA polymeraza nhận dạng và gắn vào, chúng chịu trách nhiệm cho việc biểu hiện gen. Vì thế promoter 35S-CaMV thường được sử dụng trong thực vật biến đổi gen [22].

B.2.5 Thuốc thử

Chất lượng của thuốc thử, xem TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

B.2.5.1 Nước

B.2.5.2 Dung dịch đệm PCR, $c(\text{MgCl}_2) = 15 \text{ mmol/l}$, 10 x

B.2.5.3 dNTP dung dịch, $c(\text{dNTP}) = 4 \text{ mmol/l}$ (cho mỗi loại)

B.2.5.4 Oligonucleotit

B.2.5.4.1 Môi xuôi

Promoter 35S-CaMV, 35s-cf3: 5'- CCA CgT CTT CAA AgC AAg Tgg-3'.

Môi xuôi được thiết kế để khuếch đại promoter 35S-CaMV ví dụ gen với mã hiệu No. V00141.

B.2.5.4.2 Môi ngược

Promoter 35S-CaMV, 35s-cr4: 5'-TCC TCT CCA AAT gAA ATg AAC TTC C-3'.

Được thiết kế để khuếch đại promoter 35S-CaMV, ví dụ gen với mã hiệu No. V00141.

B.2.5.5 ADN polymeraza chịu nhiệt (dùng cho hot-start PCR), 5 IU/ μ l.

B.2.6 Thiết bị, dụng cụ

Được quy định trong B.1.6.

B.2.7 Cách tiến hành

B.2.7.1 Chuẩn bị PCR

Phương pháp này định rõ tổng thể tích PCR là 25 μ l cho một phản ứng với các thành phần như liệt kê trong Bảng B.5. PCR cũng có thể tiến hành với thể tích lớn hơn nếu các dung dịch được điều chỉnh phù hợp. Nồng độ cuối cùng của các thuốc thử đưa ra trong Bảng B.5 được chứng minh là phù hợp.

Bảng B.5 - Thành phần thuốc thử

Thuốc thử	Nồng độ cuối cùng	Thể tích trên mẫu (μ l)
Mẫu ADN		5
Nước		14,84
Đệm PCR 10 x (có MgCl ₂ 15 mmol/l) ^a	1 x	2,5
Dung dịch dNTP, 16 mmol/l	0,64 mmol/l	1
Môi 35s-cf3, 20 μ mol/l	0,6 μ mol/l	0,75
Môi 35S-cr4, 20 μ mol/l	0,6 μ mol/l	0,75
Taq ADN polymeraza, 5 IU/ μ l	0,8 IU	0,16
^a Nếu sử dụng đệm PCR không chứa MgCl ₂ , thể tích và nồng độ của mỗi thuốc thử nên điều chỉnh lại cho hợp lý.		

B.2.7.2 Kiểm chứng PCR

Về kiểm chứng dương tính có thể sử dụng mẫu chuẩn GTS 40-3-2 đã được công nhận (chứa 0,1 % thành phần thực vật biến đổi gen), do Viện Vật liệu và Đo lường chuẩn (IRMM), Geel, Bỉ (IRMM-410) cung cấp.

Các kiểm chứng thích hợp khác nên tiến hành theo TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

B.2.7.3 Chương trình thời gian-nhiệt độ

Chương trình thời gian-nhiệt độ nêu trong Bảng A.6 được sử dụng cho nghiên cứu thẩm tra phương pháp, sử dụng máy chu trình nhiệt của Perkin Elmer 2400/9600/9700 và AmpliTaq Gold[®] ADN polymeraza¹³⁾.

¹³⁾ GeneAmp[®] 2400, 9600 và AmpliTaq Gold[®] polymeraza là các ví dụ thích hợp về các sản phẩm có sẵn trên thị trường của Applied Biosystems, trước kia là Perkin Elmer/Applied Biosystems. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

TCVN 7605 : 2007

Khi sử dụng máy khác thì phải chỉnh cho phù hợp. Thời gian để hoạt hoá/biến tính ban đầu phụ thuộc vào polymeraza được sử dụng. Nếu sử dụng hot-start polymeraza, thì phải tuân theo khuyến cáo của nhà sản xuất, trừ khi có quy định khác.

Bảng B.6 - Chương trình thời gian-nhiệt độ

Hoạt hoá, biến tính ban đầu	10 min/95 °C
Khuếch đại	25 s/95 °C
	30 s/62 °C
	45 s/72 °C
Số chu trình	50
Kéo dài sợi trước khi kết thúc	7 min/72 °C

B.2.8 Nhận dạng

Nên thẩm tra sản phẩm PCR được khuếch đại từ mẫu không biết, ví dụ bằng enzym giới hạn, đọc trình tự ADN hoặc lai ADN.

B.2.9 Đảm bảo chất lượng và diễn giải kết quả

Trình tự đích được coi là đã phát hiện nếu kích thước của sản phẩm PCR tương ứng với kích thước của trình tự ADN đích dự kiến, được xác định bằng cách so sánh với sản phẩm PCR khuếch đại từ mẫu chuẩn có trình tự ADN đích đã được chứng nhận (ví dụ mẫu IRMM-410 từ IRMM, Geel, Bỉ).

Về nhận dạng, xem B.2.8.

Sản phẩm PCR có kích thước 123 bp chứng tỏ mẫu ADN có chứa ADN promoter 35S-CaMV có nồng độ nằm trong giới hạn phát hiện trong B.2.2.2.

Chi tiết về điện di, xem B.2 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005).

B.3 Phương pháp sàng lọc để phát hiện ADN thực vật biến đổi gen (NOS-terminator của *Agrobacterium tumefaciens*)

B.3.1 Khái quát

Phương pháp này dùng để phát hiện trình tự kết thúc (terminator) trên gen nopaline synthase (NOS) có số lượng bản sao khác nhau có nguồn gốc từ *Agrobacterium tumefaciens*. Do nhiều thực vật biến đổi gen có chứa trình tự NOS-terminator nên phương pháp này có thể được sử dụng để sàng lọc sự có mặt của thành phần từ thực vật biến đổi gen [22], [23] [29], [30].

Không có công cụ nào thẩm tra việc nhận dạng của sản phẩm PCR. Vì thế, phương pháp này không được coi là phương pháp nhận dạng. Phương pháp này có thể sử dụng để đánh giá khả năng khuếch đại ADN chứa trình tự đích.

B.3.2 Tình trạng hiệu lực và tiêu chí thực hiện

B.3.2.1 Nghiên cứu cộng tác

Phương pháp đã được đánh giá hiệu lực theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). Nghiên cứu cộng tác giữa 23 phòng thử nghiệm của châu Âu và được điều phối bởi EC JRC [29], [30]. Phương pháp được đánh giá để phát hiện các sinh vật biến đổi gen trong nhiều chất nền thực phẩm đã qua chế biến (hạt ngô luộc, sữa cho trẻ, bánh bích quy, thức ăn chứa đậu tương đã bị axit hoá) chứa 0 %, 2 %, và 100 % (10 % thay cho 100 % đối với bánh bích quy) của GTS 40-3-2 hoặc dòng (Event) 176. Vì ngô dòng (Event) 176 không có trình tự NOS-terminator, nên mẫu chứa dòng (Event) 176 không được đánh giá bằng phương pháp này. Tuy nhiên, vì nghiên cứu cộng tác được tổ chức có liên quan đến phương pháp phát hiện promoter 35S nên tất cả mẫu được đưa vào đều được sử dụng để đánh giá. Kết quả PCR từ hạt ngô luộc đã không được đưa vào trong phân tích thống kê tiến hành ở giai đoạn sau.

Mỗi phòng thử nghiệm nhận 4 mẫu đối chứng và 30 mẫu kép độc lập chưa biết trong đó có 10 mẫu chứa 0% sinh vật biến đổi gen và 20 mẫu chứa các phần trăm khác nhau của mẫu biến đổi gen. Tất cả các phòng đều nhận được bản mô tả phương pháp chi tiết để tách ADN bằng CTAB hoặc bằng bộ kit có sẵn trên thị trường. Tuy nhiên các phòng thử nghiệm được tự do sử dụng các phương pháp của họ để tách ADN trong khi các điều kiện cho PCR phải được tối ưu hóa đối với các thiết bị tại chỗ của họ để có kết quả đặc hiệu. Các phòng phải phân tích mỗi mẫu một lần và xem xét chính xác mẫu dương tính hay âm tính với sinh vật biến đổi gen. Vì hầu hết các phòng thử nghiệm đều có kết quả đúng (14 phòng có số tỷ lệ đúng 90 % đến 100 %; và 3 phòng có tỷ lệ đúng 80 % đến 90 %) và không có tỷ lệ đúng trong khoảng 70 % đến 80 %, nên giới hạn kết quả đúng được chọn là 80 %. Do đó, kết quả của 5 phòng thử nghiệm không được đưa vào phân tích thống kê. Vì dòng (Event) 176 không có trình tự NOS-terminator, nên tất cả các kết quả phân tích từ hạt ngô luộc nên là âm tính. Kết quả từ hạt ngô luộc này đã cho kết quả đúng 100 % và cũng không đưa vào phân tích thống kê. Trung bình 98,2 % kết quả đúng đối với mẫu không biến đổi gen (1,8 % kết quả dương tính giả) và trung bình 97,9 % kết quả đúng đối với mẫu có chứa sinh vật biến đổi gen (2,1 % kết quả âm tính giả) [30]. Kết quả được nêu trong Bảng B.7.

Bảng B.7 – Kết quả từ nghiên cứu cộng tác

Năm	1999
Số phòng thử nghiệm tham gia	30
Số phòng thử nghiệm gửi kết quả	18
Số mẫu của mỗi phòng thử nghiệm	12
Tổng số mẫu	360
Số kết quả được chấp nhận	540
Kết quả dương tính giả	1,8%
Kết quả âm tính giả	2,1%

B.3.2.2 Đặc hiệu phân tử

B.3.2.2.1 Khái quát

Phụ lục này đưa ra toàn bộ những yêu cầu như đã nêu trong điều 7.

Phương pháp được thiết kế để xác định sự có mặt của trình tự kết thúc mã hoá nopalín synthaza của *Agrobacterium tumefaciens* mô tả trong ngân hàng gen với số hiệu No.V00087.

Kết quả dương tính giả có thể xuất hiện vì trình tự được khuếch đại là của *Agrobacterium*, một vi sinh vật đất có trong tự nhiên. Các kết quả dương tính này có thể nói lên sự có mặt của sản phẩm từ cây trồng biến đổi gen nhưng không nên nói chắc chắn điều đó nếu không có thêm xác nhận. Nên xem xét khả năng nguyên liệu sử dụng bị nhiễm *Agrobacterium* hoặc vi khuẩn có liên quan.

B.3.2.2.2 Lý thuyết

Trình tự cấu trúc ADN được đưa vào không có sự tương đồng với bất kỳ trình tự ADN nào từ các thực vật không biến đổi gen được tìm thấy trong ngân hàng dữ liệu (tìm trong NCBI BlastN®, ngân hàng dữ liệu EMBL, ngày 28 tháng 9 năm 2001). Chú ý mỗi ngược giống 100 % với gen mã hoá polymeraza của virus ức chế sinh trưởng ở lúa số hiệu AF015682. Cả hai mỗi để có khả năng phù hợp với nhiều trình tự đã được đăng ký và phù hợp nhất với các vector tách dòng, gen trong bản quyền cũng như với gen mã hoá nopalín synthaza.

B.3.2.2.3 Thực nghiệm

Không có trình tự nào được khuếch đại từ cây trồng và các chất nền thực phẩm chế biến từ cây trồng không biến đổi gen. Kết quả này tiến hành trước nghiên cứu cộng tác giữa các phòng thử nghiệm [30].

B.3.2.3 Giới hạn phát hiện (LOD)

Giới hạn phát hiện tuyệt đối không xác định được, nhưng phương pháp này đã có thể phát hiện 50 bản sao ADN của GST 40-3-2.

Trong nghiên cứu cộng tác, phương pháp này có thể phát hiện được khi hàm lượng GTS 40-3-2 (đậu tương Roundup Ready[®]) chiếm 2 % trong bánh bích quy, sữa bột dành cho trẻ em, sữa chua đậu tương với độ chính xác tối thiểu là 96,4 % [29].

B.3.3 Điều chỉnh

Chưa có quy định cụ thể.

B.3.4 Nguyên tắc

Đoạn ADN có kích thước 118 bp nằm trong trình tự kết thúc (terminator) của NOS được khuếch đại bằng PCR và được phát hiện bằng điện di trên gel agarosa. Việc nhận dạng sản phẩm phải được thẩm tra ví dụ bằng giải trình tự ADN. Tuy nhiên chưa có quy trình thẩm tra nào được xác nhận hiệu lực.

B.3.5 Thuốc thử

Chất lượng của các thuốc thử xem trong TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

B.3.5.1 Nước**B.3.5.2 Dung dịch đệm PCR, $c(\text{MgCl}_2) = 15 \text{ mmol/l}$, 10 x****B.3.5.3 Dung dịch dNTP, $c(\text{dNPT}) = 4 \text{ mmol/l}$ (cho mỗi loại)****B.3.5.4 Oligonucleotit****B.3.5.4.1 Môi xuôi**

NOS-terminator của *Agrobacterium tumefaciens*, HA-nos118f: 5'-gCA TgA CgT TAT TTA TgA gATggg-3'.

Môi được thiết kế để khuếch đại trình tự có số hiệu đăng ký No. V00087.

B.3.5.4.2 Môi ngược

NOS-terminator của *Agrobacterium tumefaciens*, HA-nos118r: 5'-gAC ACC gCg CgC AgT AAT TTA TCC-3'.

Môi được thiết kế để khuếch đại trình tự có số hiệu đăng ký No. V00087.

B.3.5.5 ADN polymeraza chịu nhiệt (dùng cho hot-start PCR), 5 IU/ μl .

TCVN 7605 : 2007

B.3.6 Thiết bị, dụng cụ

Theo quy định trong B.1.6

B.3.7 Cách tiến hành (Chuẩn bị PCR)

B.3.7.1 Khái quát

Phương pháp này định rõ tổng thể tích PCR là 25 µl cho một phản ứng với các thành phần như liệt kê trong Bảng B.8. PCR cũng có thể tiến hành với thể tích lớn hơn nếu các dung dịch được điều chỉnh phù hợp. Nồng độ cuối cùng của các thuốc thử đưa ra trong Bảng B.8 được chứng minh là phù hợp.

Bảng B.8 – Thành phần thuốc thử

Thuốc thử	Nồng độ cuối cùng	Thể tích trên mẫu (µl)
Mẫu ADN		5
Nước		14,84
Đệm PCR 10x (có 15 mmol/l MgCl ₂) ^a	1x	2,5
dNTP, 16 mmol/l	0,64 mmol/l	1
Mồi HA-nos118f, 20 µmol/l	0,6 µmol/l	0,75
Mồi HA-nos118r, 20 µmol/l	0,6 µmol/l	0,75
Taq ADN polymeraza, 5 IU/µl	0,8 IU	0,16
^a Nếu dung dịch đệm PCR không có MgCl ₂ , nồng độ và thể tích cần được điều chỉnh cho phù hợp		

B.3.7.2 Kiểm chứng PCR

Kiểm chứng dương tính có thể sử dụng mẫu chuẩn GST 40-3-2 (chứa 0,1 % thành phần thực vật biến đổi gen) do Viện Vật liệu và Đo lường chuẩn [Institute for Reference Materials AND Measurements (IRMM)] Geel, Bỉ (IRMM-410) cung cấp.

Các kiểm chứng thích hợp khác nên tiến hành theo TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

B.3.7.3 Chương trình thời gian-nhiệt độ

Chương trình thời gian-nhiệt độ nêu trong Bảng B.9 đã được sử dụng cho nghiên cứu thẩm tra phương pháp, sử dụng máy PCR của Perkin Elmer 2400/9600/9700 và AmpliTaq Gold[®] ADN polymeraza¹⁴⁾. Nếu sử dụng máy khác thì cần điều chỉnh thích hợp. Thời gian cho hoạt hoá, biến tính ban đầu phụ

¹⁴⁾ GeneAmp[®] 2400, 9600 và AmpliTaq Gold[®] polymeraza là các ví dụ thích hợp về các sản phẩm có sẵn trên thị trường của Applied Biosystems, trước kia là Perkin Elmer/Applied Biosystems. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

thuộc vào polymeraza sử dụng. Nếu dùng hot-start polymeraza, nhà sản xuất khuyên nên giữ nguyên chương trình trừ khi quy trình có quy định khác.

Bảng B.9 - Chương trình thời gian-nhiệt độ

Hoạt hoá, biến tính ban đầu	10 min/95 °C
Khuếch đại	25 s/95 °C 30 s/62 °C 45 s/72 °C
Số chu trình	50
Kéo dài sợi trước khi kết thúc	7 min/72 °C

B.3.8 Nhận dạng

Nên kiểm tra sản phẩm PCR được khuếch đại từ mẫu chưa biết bằng các phương pháp, ví dụ như enzym giới hạn, đọc trình tự ADN hoặc lai ADN.

B.3.9 Đảm bảo chất lượng và diễn giải kết quả

Trình tự đích xem là đã được phát hiện nếu kích thước của sản phẩm PCR tương đồng với chiều dài của trình tự ADN đích, được xác định bằng cách so sánh với sản phẩm PCR khuếch đại từ mẫu chuẩn có trình tự ADN đích đã được chứng nhận (ví dụ IRMM-410 từ IRMM, Geel, Bỉ).

Về nhận dạng sản phẩm PCR xem B.3.8.

Sản phẩm PCR được nhận dạng có kích thước 118 bp chứng tỏ mẫu ADN có chứa ADN từ NOS-terminator với nồng độ nằm trong giới hạn phát hiện trong B.3.2.2.

Chi tiết về điện di, xem TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005), B.2.

B.4 Phương pháp sàng lọc để phát hiện ADN từ thực vật biến đổi gen (gen *npt II*)

B.4.1 Khái quát

Phương pháp này dùng để phát hiện gen mã hoá cho neomycin phosphotransferaza (*npt II*). Vì gen này được sử dụng để thiết kế các vector chuyển gen có khả năng tích hợp vào cây trồng để tạo cây biến đổi gen nên gen có thể được dùng để sàng lọc các thể sinh vật biến đổi gen.

B.4.2 Tình trạng hiệu lực và tiêu chí thực hiện

B.4.2.1 Nghiên cứu cộng tác

Phương pháp đã được đánh giá hiệu lực bởi các nghiên cứu cộng tác, được tổ chức bởi nhóm nghiên cứu thuộc Viện nghiên cứu bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng và Viện Thú Y Liên bang Đức với đề tài “Xây dựng phương pháp nhận dạng thực phẩm được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền”. Số phòng thử nghiệm tham gia và số mẫu được chọn theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2).

Phương pháp CTAB được sử dụng để tách chiết ADN được đưa ra trong A.3 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005) (nhưng với phần mẫu thử là 100 mg).

Dữ liệu từ nghiên cứu thực nghiệm được nêu trong Bảng B.10.

Bảng B.10 - Kết quả nghiên cứu cộng tác

Mẫu	Cà chua Zeneca
Môi	APH2 ngấn/APH2 ngược
Năm	1998
Số phòng thử nghiệm tham gia	10
Số phòng thử nghiệm gửi kết quả	9
Số mẫu của mỗi phòng thử nghiệm	5
Số kết quả được chấp nhận	45
Số mẫu chứa gen neomycin phosphotransferaza của cà chua Zeneca	22
Kết quả dương tính giả	0 (0 %)
Kết quả âm tính giả	0 (0 %)

B.4.2.2 Đặc hiệu phân tử**B.4.2.2.1 Khái quát**

Phụ lục này đáp ứng những yêu cầu nêu trong điều 7.

Phương pháp được thiết kế để khuếch đại trình tự đích có số hiệu đăng ký No.AF269238 trong GenBank®.

Neomycin phosphotransferaza có nguồn gốc từ *E. coli* K12 và có mặt trong nhiều sinh vật biến đổi gen.

Gen *npt II* có nguồn gốc từ *E. coli* K12 và có mặt trong nhiều sinh vật biến đổi gen.

Kết quả dương tính giả có thể xảy ra vì gen đích có trong *E. coli* K12. Kết quả dương tính không được coi là bằng chứng xác định sự có mặt của sản phẩm có nguồn gốc thực vật biến đổi gen

B.4.2.2.2 Lý thuyết

Trình tự cấu trúc ADN được đưa vào không có sự tương đồng với bất kỳ trình tự ADN nào từ các thực vật không biến đổi gen được tìm thấy trong ngân hàng dữ liệu (NCBI BlastN[®], EMBL database, 28 tháng 9 năm 2001). Chỉ thử các môi transposon Tn5 và trình tự được tổng hợp đã công bố bản quyền.

B.4.2.2.3 Thực nghiệm

Không có trình tự nào được khuếch đại khi sử dụng ADN của cây trồng hoặc các thực phẩm có nguồn gốc từ cây trồng không bị biến đổi gen.

B.4.2.3 Giới hạn phát hiện (LOD)

Việc đánh giá xác nhận được đã tiến hành với nguyên liệu chứa 0 % và 100 % thành phần biến đổi gen.

B.4.3 Điều chỉnh

Chưa có quy định cụ thể.

B.4.4 Nguyên tắc

Đoạn ADN có kích thước 215 bp trong gen neomycin phosphotransferaza được khuếch đại bằng PCR và được phát hiện bằng điện di trên gel agarosa. Để nhận dạng sản phẩm PCR, có thể phải kiểm tra bằng enzym giới hạn.

Neomycin phosphotransferaza giúp cho vi khuẩn kháng lại kháng sinh neomycin/kanamycin và gen đã được đưa vào chỉ làm gen chỉ thị.

B.4.5 Thuốc thử

Chất lượng của thuốc thử, xem TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

B.4.5.1 Nước

B.4.5.2 Dung dịch đệm cho PCR, $c(\text{MgCl}_2) = 15 \text{ mmol/l}$, 10 x

B.4.5.3 Dung dịch dNTP, $c(\text{dNTP}) = 2,5 \text{ mmol/l}$ (cho mỗi loại)

B.4.5.4 Oligonucleotit

B.4.5.4.1 Môi xuôi

APH2 short: 5'-CTC ACC TTg CTC CTg CCg AgA-3"

TCVN 7605 : 2007

B.4.5.4.2 Môi ngược

APH2 ngược: 5'-CgC CTT gAg CCT ggC gAA CAg -3'

B.4.5.5 ADN polymeraza chịu nhiệt (dùng cho hot-start PCR), 5 IU/μl

B.4.5.6 Enzym giới hạn: *Rsa* I

B.4.6 Thiết bị, dụng cụ

Theo quy định trong B.1.6.

B.4.7 Cách tiến hành (Chuẩn bị PCR)

B.4.7.1 Khái quát

Phương pháp này định rõ tổng thể tích PCR là 25 μl cho một phản ứng với các thành phần như liệt kê trong Bảng B.11. PCR cũng có thể tiến hành với thể tích lớn hơn nếu các dung dịch được điều chỉnh phù hợp. Nồng độ cuối cùng của các thuốc thử đưa ra trong Bảng B.11 được chứng minh là phù hợp.

Bảng B.11 - Thành phần thuốc thử

Thuốc thử	Nồng độ cuối cùng	Thể tích trên mẫu (μl)
Mẫu ADN		5
Nước		14,6
Đệm PCR 10x (có MgCl ₂ 15 mmol/l)	1 x	2,5
Dung dịch dNTP, 10 mmol/l	0,2 mmol/l	0,5
Môi APH2 short, 10 μmol/l	0,4 μmol/l	1
Môi APH2 ngược, 10 μmol/l	0,4 μmol/l	1
Taq ADN polymeraza, 5 IU/μl	2 IU	0,4

B.4.7.2 Kiểm chứng PCR

Không có sẵn mẫu chuẩn trên thị trường¹⁵⁾.

B.4.7.3 Chương trình thời gian-nhiệt độ

Chương trình thời gian-nhiệt độ nêu trong Bảng B.12 đã được sử dụng để nghiên cứu thẩm tra phương pháp, sử dụng máy chu trình nhiệt GeneAmp® 2400 hoặc GeneAmp® 9600 và AmpliTaq Gold® ADN

¹⁵⁾ Để có các mẫu kiểm chứng, liên hệ với cơ quan chuẩn Quốc gia.

polymeraza¹⁶⁾. Nếu sử dụng máy khác thì cần điều chỉnh thích hợp. Thời gian hoạt hoá, biến tính ban đầu phụ thuộc vào polymeraza được sử dụng. Nếu sử dụng hot-start PCR, nhà sản xuất khuyên giữ nguyên chương trình trừ khi thực hiện với quy trình khác.

Bảng B.12 - Chương trình thời gian-nhiệt độ

Hoạt hoá, biến tính ban đầu	10 min/95°C
Khuếch đại	25 s/95 °C
	30 s/60 °C
	45 s/72 °C
Số chu trình	35
Kéo dài sợi trước khi kết thúc	7 min/72 °C

B.4.8 Nhận dạng

Nên thẩm tra sản phẩm PCR có nguồn gốc từ mẫu ADN chưa biết bằng, ví dụ, enzym giới hạn, đọc trình tự ADN hoặc lai ADN. Sản phẩm PCR khi cắt bằng *Rsa* sẽ tạo ra hai đoạn gen (có kích thước 122 bp và 93 bp tương ứng) [24].

B.4.9 Đảm bảo chất lượng và diễn giải kết quả

Trình tự đích coi là đã được phát hiện nếu kích thước sản phẩm PCR tương ứng với kích thước của trình tự đích như dự tính, được xác định bằng cách so sánh với sản phẩm PCR khuếch đại từ mẫu chuẩn thích hợp (ví dụ plasmit có chứa trình tự đích có bán sẵn trên thị trường).

Về nhận dạng sản phẩm PCR, xem B.4.8.

Sản phẩm PCR được nhận dạng có kích thước 215 bp chứng tỏ mẫu ADN có chứa ADN gen *npt II* với nồng độ nằm trong giới hạn phát hiện trong B.4.2.2.

Chi tiết về điện di, xem B.2 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005).

B.5 Phương pháp sàng lọc để phát hiện ADN có nguồn gốc từ cà chua biến đổi gen (Zeneca® F282)

Phương pháp này được mô tả chi tiết trong A.3.

¹⁶⁾ GeneAmp® 2400, 9600 và AmpliTaq Gold® polymeraza là các ví dụ thích hợp về các sản phẩm có sẵn trên thị trường của Applied Biosystems, trước kia là Perkin Elmer/Applied Biosystems. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

Phụ lục C

(Tham khảo)

Phương pháp xác định cấu trúc đặc thù

C.1 Phương pháp xác định cấu trúc đặc thù để phát hiện các trình tự ADN bị biến đổi từ GTS 40-3-2 biến đổi gen (Đậu tương Roundup Ready®)

C.1.1 Khái quát

Phương pháp này dùng để phát hiện đậu tương GTS 40-3-2 (Roundup Ready®¹⁷) biến đổi gen kháng glyphosat có trong các nguyên liệu thô hoặc đã qua chế biến [8], [11] bằng cách khuếch đại trình tự có một bản sao, kích thước 172 bp đặc trưng cho vùng nối giữa promoter 35S-CaMV và trình tự tín hiệu lục lạp dẫn protein nằm trước trình tự gen EPSPS của *Agrobacterium*.

Cách cấu trúc gen như vậy đã được sử dụng trong nhiều sinh vật biến đổi gen khác.

Không thể sử dụng phương pháp này để phân biệt giữa GTS 40 3-2 và các cây trồng khác được tạo ra từ việc lai GTS 40 3-2 và các cây đậu tương khác, trừ khi phân tích được thực hiện trên một hạt hoặc cây có chứa/hoặc không chứa các trình tự gen có nguồn gốc từ dòng khác và có thể được kiểm tra lại.

C.1.2 Tình trạng hiệu lực và tiêu chí thực hiện

C. 1.2.1 Nghiên cứu cộng tác

Phương pháp đã được đánh giá hiệu lực bởi các nghiên cứu cộng tác [8] được tổ chức bởi nhóm nghiên cứu thuộc Viện nghiên cứu bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng và Viện Thú Y Liên bang Đức với đề tài “Xây dựng phương pháp nhận dạng thực phẩm được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền” theo Điều 35 của luật thực phẩm của Liên bang Đức. Phương pháp CTAB được sử dụng để tách chiết ADN được đưa ra trong TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005), A.3 (nhưng phần mẫu thử là 100 mg).

Dữ liệu từ nghiên cứu cộng tác được nêu trong Bảng C.1.

¹⁷ Roundup Ready là tên thương mại của Monsanto. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

Bảng C.1 - Kết quả của nghiên cứu cộng tác

Năm	1998
Số phòng thử nghiệm tham gia	25
Số phòng thử nghiệm gửi kết quả	24
Số mẫu của mỗi phòng thử nghiệm	5
Số kết quả được chấp nhận	105
Số mẫu chứa GTS 40-3-2	56
Số mẫu chứa đậu tương không biến đổi gen	49
Kết quả dương tính giả	0 (0 %)
Kết quả âm tính giả	0 (0 %)

C.1.2.2 Đặc hiệu phân tử

C.1.2.2.1 Khái quát

Phụ lục này đáp ứng những yêu cầu nêu trong điều 7.

Phương pháp được mô tả trong [8]. Thông tin về việc thiết kế gen để đưa vào hệ gen đậu tương đã được nêu trong [31].

C.1.2.2.2 Lý thuyết

Trình tự cấu trúc ADN được đưa vào không có sự tương đồng với bất kỳ trình tự ADN nào của đậu tương và cây trồng khác không biến đổi gen được tìm thấy trong ngân hàng dữ liệu (GenBank® database; BlastN® 2.2.1, 1 tháng 7 năm 2001). Ngoài ra, cặp môi được thiết kế để khuếch đại trình tự đặc hiệu cho vùng nối nhân tạo, trình tự này không có trong tự nhiên.

C.1.2.2.3 Thực nghiệm

Không có sản phẩm PCR nào được khuếch đại khi sử dụng ADN từ đậu tương, khoai tây, cà chua, ngô và củ cải đường không bị biến đổi gen hoặc từ ngô dòng (Event) 176 (Bt 176), Bt 11, T 25, MON 810 bị biến đổi gen.

C.1.2.3 Giới hạn phát hiện (LOD)

Dựa vào giả định rằng chỉ có một bản sao của trình tự gen được thiết kế trong hệ gen đơn bội (AGBIOS database: <http://www.aqbios.com/>) và kích thước hệ gen đơn bội của đậu tương là $1,13 \times 10^9$ bp (xem [5]), thì LOD tuyệt đối là 50 ng ADN đậu tương trong đó có 0,1 % khối lượng là sinh vật biến đổi gen trong hạt nghiền, tương đương với 40 bản sao của hệ gen đơn bội [32].

TCVN 7605 : 2007

LOD tương đối đã được xác định là tốt hơn hoặc tương đương với nồng độ đậu tương 0,1 % trong bột đậu tương (mẫu chuẩn IRMM-410R đã được công nhận, do IRMM, Geel, Bỉ cung cấp) [9]. Bằng cách này, bột đậu tương chứa 0,45 % GTS 40-3-2 cũng đã được phát hiện sau khi làm bánh [33].

C.1.3 Điều chỉnh

Chưa có quy định cụ thể.

C.1.4 Nguyên tắc

Đậu tương GTS 40-3-2 kháng glyphosat là do có chứa trình tự gen được thiết kế mã hoá cho enolpyruvylshikimi-3-phosphat synthaza (EPSPS) có nguồn gốc từ *Agrobacterium* chủng CP4 được nối với trình tự của peptit chuyển hoá diệp lục (CTP) có nguồn gốc từ *Petunia hybrida* (trình tự tín hiệu cho phép protein đi qua màng, CTP để chuyển EPSPS đi vào lục lạp). Glyphosat ức chế EPSPS ở thực vật. Đoạn ADN có kích thước 172 bp nối giữa promoter 35S-CaMV và CTP được khuếch đại bằng PCR và được nhận dạng trên gel agarosa. Để xác định chính xác sản phẩm PCR có thể dùng mẫu dò lai.

C.1.5 Thuốc thử

Thuốc thử được chỉ dẫn trong TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

C.1.5.1 Nước

C.1.5.2 Dung dịch đệm PCR (không chứa $MgCl_2$), 10 x

C.1.5.3 Dung dịch $MgCl_2$, $c(MgCl_2) = 25 \text{ mmol/l}$

C.1.5.4 Dung dịch dNTP, $c(dNTP) = 2,5 \text{ mmol/l}$ (cho mỗi loại)

C. 1.5.5 Oligonucleotit

C.1.5.5.1 Môi xuôi

35s-f2: 5'- TgA TgT gAT ATC TCC ACT gAC g -3'.

Số hiệu đăng ký No.(GenBank®): V00141, J02048.

C.1.5.5.2 Môi ngược

petu-r1: 5'- TgT ATC CCT TgA gCC ATg TTg T -3'.

Số hiệu đăng ký No.(GenBank®): M21084, J03227.

C.1.5.6 ADN polymeraza chịu nhiệt (dùng cho hot-start PCR), 5 IU/ μ l.

C.1.5.7 Mẫu dò lai

H-35s-ar1: 5'- ggg TCT TgC gAA ggA TAg Tg-3'.

C.1.5.8 Dung dịch lai sơ bộ, bao gồm dung dịch đệm SSC 5x, 0,1 % N-lauroylsarcosin (nồng độ khối), 0,02 % SDS (nồng độ khối), 1 % chất hãm [8].

C. 1.5.9 Dung dịch lai, bao gồm 10 pmol mẫu dò ADN trong 2,5 ml dung dịch lai sơ bộ (C.1.5.8). Lai ở nhiệt độ 50 °C. Ngoài ra, các thông tin về điều kiện lai đã được đưa ra trong [12].

C.1.6 Thiết bị, dụng cụ

C.1.6.1 Máy chu trình nhiệt

C.1.6.2 Bộ điện di, có nguồn cung cấp.

C.1.6.3 Thiết bị lai

C.1.7 Cách tiến hành

C.1.7.1 Chuẩn bị PCR

Phương pháp này định rõ tổng thể tích PCR là 25 µl cho một phản ứng với các thành phần như liệt kê trong Bảng C.2. PCR cũng có thể tiến hành với thể tích lớn hơn nếu các dung dịch được điều chỉnh phù hợp. Nồng độ cuối cùng của các thuốc thử đưa ra trong Bảng C.2 được chứng minh là phù hợp.

Bảng C.2 - Thành phần thuốc thử

Thuốc thử	Nồng độ cuối cùng	Thể tích trên mẫu (µl)
Mẫu ADN	10 ng tới 50 ng	1
Nước		15,9
Đệm PCR 10x (không chứa MgCl ₂)	1 x	2,5
Dung dịch MgCl ₂ , 25 mmol/l	1,5 mmol/l	1,5
Dung dịch dNTP, 10 mmol/l	0,8 mmol/l	2
Môi 35s-f 2,5 µmol/l	0,2 µmol/l	1
Môi petu-r1, 5 µmol/l	0,2 µmol/l	1
Taq ADN polymeraza, 5 IU/µl	0,5 IU	0,1
^a Nếu trong dung dịch đệm PCR đã chứa MgCl ₂ thì nồng độ cuối cùng của MgCl ₂ trong hỗn hợp phản ứng là 1,5 mmol/l.		

C.1.7.2 Kiểm chứng PCR

Kiểm chứng dương tính sử dụng mẫu chuẩn GTS 40-3-2 đã được chứng nhận (chứa 0,1 % thành phần thực vật biến đổi gen), do Viện Vật liệu và Đo lường chuẩn (IRMM), Geel, Bỉ (IRMM-410) cung cấp.

Một số đối chứng thích hợp khác nên tiến hành theo TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

C.1.7.3 Chương trình thời gian-nhiệt độ

Chương trình thời gian-nhiệt độ nêu trong Bảng C.3 đã được sử dụng để nghiên cứu thẩm tra phương pháp, sử dụng máy chu trình nhiệt GeneAmp® 2400 hoặc GeneAmp® 9600 và AmpliTaq Gold® ADN polymeraza¹⁸⁾. Nếu sử dụng máy khác thì cần điều chỉnh chương trình. Thời gian hoạt hoá, biến tính ban đầu phụ thuộc vào polymeraza được sử dụng.

Bảng C.3 - Chương trình thời gian-nhiệt độ

Hoạt hoá và biến tính ban đầu	10 min ở 95 °C
Khuếch đại	30 s/95 °C
	30 s/60 °C
	25 s/72 °C
Số chu trình	35 đến 40
Kéo dài sợi trước khi kết thúc	3 min/72 °C

C.1.8 Nhận dạng

Mức độ đặc hiệu của sản phẩm PCR được xác định dựa vào lai Southern, sử dụng mẫu dò oligonucleotit H35s-ar1 (C.1.5.7 to C.1.5.9) được đánh dấu huỳnh quang. Các mẫu không bị biến đổi gen nên sử dụng làm đối chứng âm trong thử nghiệm lai [8].

C.1.9 Đảm bảo chất lượng và diễn giải kết quả

Trình tự đích coi như đã được phát hiện nếu kích thước của sản phẩm PCR tương đương với kích thước của trình tự đích theo lý thuyết. Kích thước này được xác định bằng cách so sánh với sản phẩm PCR được khuếch đại từ mẫu chuẩn đã được chứng nhận GTS 40-3-2 (ví dụ IRMM-410 từ IRMM, Geel, Bỉ).

Về nhận dạng sản phẩm PCR, xem C.1.8.

Sản phẩm PCR là đoạn gen có kích thước 172 bp chứng tỏ mẫu ADN có chứa ADN có nguồn gốc từ GTS 40-3-2 với nồng độ nằm trong giới hạn phát hiện đặc hiệu nêu trong C.1.2.2. Chi tiết về điện di, xem B.2 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005).

C.2 Phương pháp cấu trúc đặc thù để phát hiện trình tự ADN biến đổi từ cà chua biến đổi gen (Zeneca®F282)

¹⁸⁾ GeneAmp® 2400, 9600 và AmpliTaq Gold® polymeraza là các máy PCR thích hợp có sẵn trên thị trường được cung cấp bởi Applied Biosystems, trước kia là Perkin Elmer/Applied Biosystems. Các thông tin này được giới thiệu để tiện sử dụng Tiêu chuẩn Quốc tế này chứ ISO không bắt buộc. Các máy khác có thể được sử dụng nếu chúng có thể cho ra kết quả tương tự.

C.2.1 Khái quát

Phương pháp này để phát hiện cà chua biến đổi gen làm chậm quá trình chín của quả (Zeneca) trong các nguyên liệu thô bằng cách khuếch đại PCR đoạn ADN nối giữa đoạn có bản sao đơn có nguồn gốc từ NOS-terminator của *Agrobacterium tumefaciens* và gen polygalacturonaza (PG) từ *Lycopersicon esculentum* Mill, hai đoạn ADN này được nối với nhau bằng cách tái tổ hợp trong ống nghiệm.

Trong tương lai, phương pháp cấu trúc đặc thù này có thể được sử dụng trong các sinh vật biến đổi gen khác.

Không sử dụng phương pháp này để phân biệt cà chua Zeneca 282F và các giống cà chua khác có nguồn gốc từ quá trình lai cà chua Zeneca 282F với cà chua khác mà chỉ sử dụng để nhận dạng hạt hoặc cây đơn được tạo ra bằng cách khác có hoặc không có trình tự đích.

C.2.2.1 Nghiên cứu cộng tác

Phương pháp đã được đánh giá hiệu lực bởi các nghiên cứu cộng tác [15] được tổ chức bởi nhóm nghiên cứu thuộc Viện nghiên cứu bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng và Viện Thú Y Liên bang Đức với đề tài “Xây dựng phương pháp nhận dạng thực phẩm được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền”. Số phòng thử nghiệm tham gia cũng như số mẫu được thực hiện theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). Phương pháp CTAB được sử dụng để tách chiết ADN được đưa ra trong A.3 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005), (nhưng phần mẫu thử là 100 mg).

Dữ liệu từ nghiên cứu cộng tác được nêu trong Bảng C.4.

Bảng C.4 - Kết quả nghiên cứu và cộng tác

Năm	1999
Số phòng thử nghiệm tham gia	18
Số phòng thử nghiệm gửi kết quả	18
Số mẫu của mỗi phòng thử nghiệm	5
Số kết quả được chấp nhận	90
Số mẫu cà chua biến đổi gen (Zeneca 282F)	43
Số mẫu cà chua không biến đổi gen (Zeneca 282C)	47
Kết quả dương tính giả	0 (0 %)
Kết quả âm tính giả	0 (0 %)

C.2.2.2 Đặc hiệu phân tử

C.2.2.2.1 Khái quát

Phụ lục này đáp ứng những yêu cầu nêu trong điều 7.

Phương pháp được mô tả trong [15] và [16]. Thông tin về thiết kế gen để đưa vào hệ gen của cà chua được nêu trong [18].

TCVN 7605 : 2007

C.2.2.2.2 Lý thuyết

Trình tự cấu trúc ADN được đưa vào không có sự tương đồng với bất kỳ trình tự ADN nào của cà chua, hoặc các cây trồng khác không biến đổi gen được tìm thấy trong ngân hàng dữ liệu (GenBank® database; BlastN® 2.2.1, 1 tháng 7 năm 2001). Hơn nữa, bộ mã được thiết kế chỉ để khuếch đại đặc hiệu trình tự nối nhân tạo chứ không có trong tự nhiên.

C.2.2.2.3 Thực nghiệm

Không có sản phẩm PCR nào được khuếch đại khi sử dụng ADN từ cà chua có các tính trạng tương tự như *Long-Life-tomatoes* của SelfestaFI, SeduroFI, Lioba F1 and Harzglut F1 (hạt được tạo bởi Quedlinburg, Đức) [15].

C.2.2.3 Giới hạn phát hiện (LOD)

Dựa vào giả định rằng chỉ có một bản sao của trình tự gen được thiết kế trong hệ gen đơn bội (AGBIOS database: <http://www.aqbios.com/>) và kích thước hệ gen đơn bội của cà chua là $1,0 \times 10^9$ bp (xem [5], thì LOD tuyệt đối là 10 ng ADN cà chua trong đó 100 % là sinh vật biến đổi gen tương đương với 10 bản sao của hệ gen đơn bội [19].

C.2.3 Điều chỉnh

Để nhận dạng sự biến đổi gen trong bột cà chua, nên tách chiết axit nucleic với lượng nhiều hơn 5 lần theo quy định trong TCVN 7606:2007 (ISO 21571:2005). Sau khi đã trộn lẫn các axit nucleic đã được tách chiết, bước tinh sạch bằng bộ thử QIAquick PCR Purification¹⁹⁾ để có được lượng ADN đủ và thích hợp cho PCR.

C.2.4 Nguyên tắc

Tính trạng của cà chua biến đổi gen (*Lycopersicon esculentum* Mill.) được tạo ra từ Zeneca làm chậm quá trình chín của quả. Tính trạng này có được là do khả năng ức chế sự tạo thành polygalacturonaza (PG).

Sự biến đổi gen trong hệ gen của cà chua tạo ra bằng cách đưa đoạn gen polygalacturonaza (PG) không hoàn thiện dưới dạng cADN (cDNA) vào trong hệ gen cà chua. Sự có mặt của gen này làm giảm mạnh sự tạo thành enzym PG. Enzym này chịu trách nhiệm làm mềm cà chua [17].

Phương pháp này khuếch đại đoạn trình tự kích thước 350 bp nhân tạo, nối giữa đoạn cADN (cDNA) của gen PG và đoạn NOS-terminator bên cạnh. Trình tự này chỉ có mặt trong cà chua biến đổi gen. Để xác định chính xác sản phẩm PCR, phương pháp lai đặc hiệu bằng mẫu dò lai như đã mô tả có thể được sử dụng.

¹⁹⁾ QIAquick PCR Purification Kit là tên thương mại của sản phẩm của hãng QIAGEN, Hilden, Đức. Thông tin này đưa ra để tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

C.2.5 Thuốc thử

Chất lượng các thuốc thử, xem TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

C.2.5.1 Nước**C.2.5.2 Dung dịch đệm PCR (không chứa MgCl₂), 10 x****C.2.5.3 Dung dịch MgCl₂, c(MgCl₂) = 25 mmol/l****C.2.5.4 Dung dịch dNTP, c(dNTP) = 2,5 mmol/l (cho mỗi loại)****C.2.5.5 Oligonucleotit****C.2.5.5.1 Môi xuôi**

PG34L: 5'- ggA TCC TTA gAA gCA TCT AgT-3'.

Số hiệu đăng ký X04583.

C.2.5.5.2 Môi ngược

t-NOS: 5'- CAT CgC AAg ACC ggC AAC Ag-3'

Số hiệu đăng ký NC002147.

C.2.5.6 ADN polymeraza chịu nhiệt (dùng cho hot-start PCR), 5 IU/μl.**C.2.5.7 Mẫu dò lai Tomato-2**

ADN mẫu dò lai đã được đánh dấu bằng digoxigenin (Dig) (Tomato-2) có trình tự sau:

5'-Dig-CCT CTA gAg Tcg ACC TgC Agg TCg-3'.

C.2.5.8 Dung dịch lai sơ bộ, bao gồm dung dịch đệm SSC 5x, 0,1 % W-lauroyl-sarcosin (theo nồng độ khối), 0,02 % SDS (theo nồng độ khối) và 1 % chất hãm [15].**C.2.5.9 Dung dịch lai, bao gồm 10 pmol mẫu dò lai trong 2,5 ml dung dịch lai sơ bộ (C.2.5.8).**

Nhiệt độ lai 60 °C. Ngoài ra, các thông tin cho điều kiện lai đã được đưa ra trong [12].

C.2.5.10 Enzym giới hạn: *Eae* I hoặc *Mwo* I.**C.2.6 Thiết bị, dụng cụ**

Theo quy định trong C.1.6.

C.2.7 Cách tiến hành

C.2.7.1 Chuẩn bị PCR

Phương pháp này định rõ tổng thể tích PCR là 25 µl cho một phản ứng với các thành phần như liệt kê trong Bảng C.5. PCR cũng có thể tiến hành với thể tích lớn hơn nếu các dung dịch được điều chỉnh phù hợp. Nồng độ cuối cùng của các thuốc thử đưa ra trong Bảng C.5 được chứng minh là phù hợp.

Bảng C.5 - Thành phần thuốc thử

Thuốc thử	Nồng độ cuối cùng	Thể tích trên mẫu (µl)
Mẫu ADN	10 ng tới 50 ng	0,5
Nước		17,3
10 x Đệm PCR (không chứa MgCl ₂)	1 x	2,5
Dung dịch MgCl ₂ ^a , 25 mmol/l	1,5 mmol/l	1,5
Dung dịch dNTP, 10 mmol/l eac	0,4 mmol/l	1,0
Môi PG34L, 10 µmol/l	0,4 µmol/l	1,0
Môi t-NOS, 10 µmol/l	0,4 µmol/l	1,0
Taq ADN polymeraza, 5 IU/µl	1 IU	0,2
^a Nếu trong dung dịch đệm PCR đã chứa MgCl ₂ thì nồng độ cuối cùng của MgCl ₂ trong hỗn hợp phản ứng là 1,5 mmol/l.		

C.2.7.2 Chuẩn bị PCR

Trên thị trường không có sẵn mẫu chuẩn để sử dụng làm đối chứng dương²⁰⁾.

Một số đối chứng khác nên tiến hành theo TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

C.2.7.3 Chương trình thời gian-nhiệt độ

Chương trình thời gian-nhiệt độ nêu trong Bảng C.6 đã được sử dụng để nghiên cứu thẩm tra phương pháp, sử dụng máy chu trình nhiệt (PCR) GeneAmp[®] 2400 hoặc GeneAmp[®] 9600 và AmpliTaq Gold[®] ADN polymeraza²¹⁾. Nếu sử dụng máy khác thì cần điều chỉnh chương trình. Thời gian hoạt hoá, biến tính ban đầu phụ thuộc vào polymeraza được sử dụng.

²⁰⁾ Để có các mẫu chuẩn thích hợp để làm đối chứng, liên hệ với Cơ quan chuẩn Quốc gia.

²¹⁾ GeneAmp[®] 2400, 9600 và AmpliTaq Gold[®] polymeraza là các ví dụ thích hợp về các sản phẩm có sẵn trên thị trường của Applied Biosystems, trước kia là Perkin Elmer/Applied Biosystems. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

Bảng C.6 - Chương trình thời gian-nhiệt độ

Hoạt hoá, biến tính ban đầu	10 min/95 °C
Khuếch đại	30 s/94 °C 60 s/60 °C
Số chu trình	35
Kéo dài sợi trước khi kết thúc	6 min/72 °C

C.2.8 Nhận dạng

Tính đặc hiệu của sản phẩm PCR được khuếch đại có thể được kiểm tra bằng lai Southern, sử dụng mẫu dò lai oligonucleotit Tomate-2 có đánh dấu digoxigenin (từ C.2.5.7 đến C.2.5.9). Mẫu không bị biến đổi gen được sử dụng làm đối chứng âm cho thử nghiệm lai này [15].

Để xác định sản phẩm PCR được khuếch đại có thể sử dụng các enzym giới hạn *Eae* I hoặc *Mwo* I. Khi bị cắt bởi *Eae* I, sản phẩm PCR sẽ tạo ra 2 đoạn tương ứng có kích thước 126 bp và 224 bp. Khi bị cắt bởi *Mwo* I, sản phẩm PCR sẽ tạo ra 3 đoạn có kích thước tương ứng là 8 bp, 164 bp và 178 bp.

C.2.9 Đảm bảo chất lượng và diễn giải kết quả

Trình tự đích coi như đã được phát hiện nếu kích thước của sản phẩm PCR tương đương với kích thước của trình tự đích theo lý thuyết. Kích thước này được xác định bằng cách so sánh với sản phẩm PCR được khuếch đại từ mẫu chuẩn thích hợp.

Về nhận dạng sản phẩm PCR, xem C.2.8.

Sản phẩm PCR là đoạn gen có kích thước 350 bp chứng tỏ mẫu ADN có chứa ADN có nguồn gốc từ cà chua Zeneca bị biến đổi gen với nồng độ nằm trong giới hạn phát hiện đặc hiệu nêu trong C.2.2.2. Chi tiết về điện di, xem B.2 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005).

C.3 Phương pháp cấu trúc đặc thù để phát hiện trình tự ADN biến đổi từ ngô Bt 11 biến đổi gen**C.3.1 Khái quát**

Phương pháp này dùng để phát hiện ngô Bt 11 biến đổi gen tạo ra độc đối của *Bacillus thuringiensis* (Syngenta, trước kia là Novartis) trong nguyên liệu thô bằng cách khuếch đại vùng nối của trình tự bản sao đơn có nguồn gốc từ 1S-Intron 2 adh (IVS2) của ngô và gen *pat* của *Streptomyces viridochromogenes*.

Trong tương lai, phương pháp này có thể được sử dụng trong nhiều sinh vật biến đổi gen khác.

TCVN 7605 : 2007

Không thể sử dụng phương pháp này để phân biệt giữa ngô Bt 11 và các cây trồng khác được tạo ra từ việc lai ngô Bt 11 và các cây ngô khác, trừ khi trong hạt hoặc cây đơn được tạo ra bằng cách khác có thể kiểm soát được có chứa/hoặc không chứa các trình tự gen đó.

C.3.2 Tình trạng hiệu lực và tiêu chí thực hiện

C.3.2.1 Nghiên cứu cộng tác

Phương pháp đã được đánh giá hiệu lực bởi các nghiên cứu cộng tác [20] được tổ chức bởi nhóm nghiên cứu thuộc Viện nghiên cứu bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng và Viện Thú Y Liên bang Đức với đề tài “Xây dựng phương pháp nhận dạng thực phẩm được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền”. Số phòng thử nghiệm tham gia cũng như số mẫu được thực hiện theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). Một nửa số phòng thử nghiệm tham gia sử dụng CTAB để tách ADN theo A.3 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005), còn một nửa số phòng còn lại sử dụng Wizard® ADN-Clean-Up-System²²⁾.

Dữ liệu từ nghiên cứu cộng tác được nêu trong Bảng C.7.

Bảng C.7 – Kết quả nghiên cứu và cộng tác

Năm	2000
Số phòng thử nghiệm tham gia	18
Số phòng thử nghiệm gửi kết quả	16
Số mẫu của mỗi phòng thử nghiệm	6
Số kết quả được chấp nhận	96
Số mẫu có chứa ngô dòng (Event) 176	32
Số mẫu chứa ngô Bt 11	32
Số mẫu có chứa ngô không biến gen	32
Kết quả dương tính giả	3 (5 %)
Kết quả âm tính giả	3 (10%)

Ngoài ra, 14 phòng thử nghiệm đã nhận các mẫu ADN tách chiết từ ngô biến đổi gen dòng Bt 11 với nồng độ ADN là 0,05 ng, 0,5 ng, 5 ng và 50 ng. Kết quả trong Bảng C.8 [20].

²²⁾ Wizard® ADN-Clean-Up-System là bộ Kit thích hợp, có sẵn trên thị trường. Thông tin này được đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

Bảng C.8 – Kết quả từ nghiên cứu và cộng tác

Lượng ADN	Kết quả		Chú thích
	Chính xác	Lỗi	
50 ng	14	—	
5 ng	14	—	
0,5 ng	12	1	Âm tính giả
		1	Không rõ ràng
0,05 ng	7	5	Âm tính giả
		2	Không rõ ràng

C.3.2.2 Đặc hiệu phân tử

C.3.2.2.1 Khái quát

Phụ lục này đáp ứng những yêu cầu nêu trong điều 7.

Phương pháp đã được mô tả trong [20].

Thông tin về việc cấu trúc ADN để đưa vào hệ gen ngô được nêu trong [34]. ADN đã được thiết kế có trong EMBL/GenBank® số hiệu đăng ký No. AR110602 (đã được cấp bằng sáng chế). Đoạn ADN này chứa tất cả các phần tử theo thứ tự đã được báo cáo đối với chủng Bt 11.

C.3.2.2.2 Lý thuyết

Trình tự cấu trúc ADN được đưa vào không có sự tương đồng với bất kỳ trình tự ADN nào của ngô và các cây trồng khác không biến đổi gen được tìm thấy trong ngân hàng dữ liệu (GenBank® database; BlastN® 2.2.1, 1 tháng 7 năm 2001). Hơn nữa, bộ môi được thiết kế chỉ để khuếch đại đặc hiệu trình tự nổi nhân tạo chứ không có trong tự nhiên.

C.3.2.2.3 Thực nghiệm

Không có đoạn ADN nào được khuếch đại khi sử dụng ADN từ ngô không biến đổi gen hoặc GTS 40-3-2 biến đổi gen (đậu tương Roundup Ready®) hoặc các ngô dòng (Event) 176 (Bt 176), T25 và MON 810.

Số lượng các trình tự đích là 1.

C.3.2.3 Giới hạn phát hiện (LOD)

Dựa vào giả định rằng chỉ có một bản sao của trình tự gen được thiết kế trong hệ gen (AGBIOS database: <http://www.aqbios.com/>) và kích thước hệ gen đơn bội của ngô là $2,65 \times 10^9$ bp (xem [5]), thì LOD tuyệt đối là 50 ng ADN ngô có chứa 0,1 % sinh vật biến đổi gen trong hạt nghiền thì tương đương

TCVN 7605 : 2007

với 20 bản sao của hệ gen [34]. LOD tương đối được tính khi sinh vật biến đổi gen có nồng độ cao hơn hoặc tương đương 0,1 % trong bột ngô nghiên [34].

C.3.3 Điều chỉnh

Chưa có quy định cụ thể.

C.3.4 Nguyên tắc

Gen Bt có nguồn gốc từ vi khuẩn đất *Bacillus thuringiensis*. Protein mã hoá từ gen này được tạo ra từ mô thực vật và có khả năng bảo vệ chống lại ấu trùng đục thân ngô ở Châu Âu. Protein Bt trở thành dạng hoạt động trong ruột côn trùng tạo thành lỗ trên màng tế bào và làm mất cân bằng thẩm thấu dẫn đến ly giải tế bào.

Gen *pat* có nguồn gốc từ vi khuẩn đất *Streptomyces viridochromogenes* mã hoá cho enzym phosphinothricin-*A*-acetyltransferaza giúp cho cây trồng kháng lại thuốc diệt cỏ amoni glufosinat. Amoni glufosinat làm mất quá trình tổng hợp glutamin ở thực vật. Đoạn ADN có kích thước 189 bp là vùng liên kết giữa intron IVS2 gen *adh* và gen *pat* được khuếch đại bằng PCR và được phát hiện bằng điện di trên gel agarosa. Để xác định chính xác sản phẩm PCR, phương pháp lai bằng mẫu dò lai có thể được sử dụng.

C.3.5 Thuốc thử

Chất lượng các thuốc thử, xem TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

C.3.5.1 Nước

C.3.5.2 Dung dịch đệm PCR (không chứa $MgCl_2$), 10 x

C.3.5.3 Dung dịch $MgCl_2$, $c(MgCl_2) = 25 \text{ mmol/l}$

C.3.5.4 Dung dịch dNTP, $c(dNTP) = 2,5 \text{ mmol/l}$ (cho mỗi loại)

C.3.5.5 Oligonucleotit

C.3.5.5.1 Môi xuôi

Intron IVS2-2: 5'-CTg ggA ggC CAA ggT ATC TAA T-3'

Số hiệu đăng ký No. AR110602

C.3.5.5.2 Môi ngược

Vùng mã hoá cho protein PAT, PAT-B: 5'-gCT gCT gTA gCT ggC CTA ATC T-3'

Số hiệu đăng ký No. AR110602

C.3.5.6 ADN polymeraza chịu nhiệt (dùng cho hot-start PCR), 5 IU/ μ l

C.3.5.7 Mẫu dò lai được đánh dấu đầu 5' (ví dụ như được đánh dấu bằng digoxigenin) mẫu dò Bt: 5'-TAT CTg TCT CAg ggg CAg ACT C-3'; $c = 20$ mmol/l.

C.3.5.8 Dung dịch lai sơ bộ, bao gồm dung dịch đệm SSC 5x, 0,1 % W-lauroyl-sarcosin, (theo nồng độ khối), 0,02 % SDS (nồng độ khối) và 1 % chất hãm.

C.3.5.9 Dung dịch lai, bao gồm 10 pmol mẫu dò trong 2,5 ml dung dịch lai sơ bộ (C.3.5.7). Tiến hành lai ở nhiệt độ 60 °C. Ngoài ra, các thông tin và điều kiện lai đã được trình bày trong [12].

C.3.5.10 Enzym giới hạn

Hinf I.

C.3.6 Thiết bị, dụng cụ

Theo quy định trong C.1.6.

C.3.7 Cách tiến hành

C.3.7.1 Chuẩn bị PCR

Phương pháp này định rõ tổng thể tích PCR là 25 μ l cho một phản ứng với các thành phần như liệt kê trong Bảng C.9. PCR cũng có thể tiến hành với thể tích lớn hơn nếu các dung dịch được điều chỉnh phù hợp. Nồng độ cuối cùng của các thuốc thử đưa ra trong Bảng C.9 được chứng minh là phù hợp.

Bảng C.9 - Thành phần thuốc thử

Thuốc thử	Nồng độ cuối cùng	Thể tích trên mẫu (μ l)
Mẫu ADN	10 ng tới 50 ng	1
Nước		15,8
10 x Đệm PCR (không chứa $MgCl_2$)	1 x	2,5
Dung dịch $MgCl_2^a$, 25 mmol/l	2 mmol/l	2,0
Dung dịch dNTP, 10 mmol/l	0,4 mmol/l	1,0
Môi IVS2-2, 10 mmol/l	0,5 mmol/l	1,25
Môi PAT-B, 10 mmol/l	0,5 mmol/l	1,25
Taq ADN polymeraza, 5 IU/ml	1 IU	0,2
^a Nếu trong dung dịch đệm PCR đã chứa $MgCl_2$ thì nồng độ cuối cùng của $MgCl_2$ trong hỗn hợp phản ứng được điều chỉnh là 2 mmol/l.		

C.3.7.2 Kiểm chứng PCR

Kiểm chứng dương tính sử dụng mẫu chuẩn đã được công nhận, ví dụ chứa 0,1 % thành phần ngô Bt 11 biến đổi gen, do Viện Vật liệu và Đo lường chuẩn (IRMM), Geel, Bỉ (IRMM-410) cung cấp.

Một số phương pháp kiểm chứng thích hợp khác nên tiến hành theo TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

C.3.7.3 Chương trình thời gian-nhiệt độ

Chương trình thời gian-nhiệt độ nêu trong Bảng C.10 đã được sử dụng để nghiên cứu thẩm tra phương pháp, sử dụng máy chu trình nhiệt GeneAmp[®] 2400 hoặc GeneAmp[®] 9600 và AmpliTaq Gold[®] ADN polymeraza²³⁾. Nếu sử dụng máy khác thì cần điều chỉnh chương trình. Thời gian hoạt hoá, biến tính ban đầu phụ thuộc vào polymeraza được sử dụng.

Bảng C.10 - Chương trình thời gian-nhiệt độ

Hoạt hoá, biến tính ban đầu	12 min/95 °C
Khuếch đại	30 s/95 °C
	30 s/64 °C
	30 s/72 °C
Số chu trình	38
Kéo dài sợi trước khi kết thúc	10 min/72 °C

C.3.8 Nhận dạng

Sản phẩm PCR được khuếch đại có thể được kiểm tra bằng lai Southern, sử dụng mẫu dò oligonucleotit Bt có đánh dấu digoxigenin (từ C.3.5.7 đến C.3.5.9). Mẫu không bị biến đổi gen được sử dụng làm đối chứng âm cho thử nghiệm lai này [20].

Việc nhận dạng sản phẩm PCR có thể được tiến hành bằng các enzym giới hạn. Khi sử dụng *Hinf* I cắt sản phẩm PCR sẽ tạo hai đoạn gen có kích thước 116 bp và 73 bp tương ứng [20].

C.3.9 Đảm bảo chất lượng và diễn giải kết quả

Trình tự đích coi như đã được phát hiện nếu kích thước của sản phẩm PCR tương đương với kích thước của trình tự đích theo lý thuyết. Kích thước này được xác định bằng cách so sánh với sản phẩm PCR được khuếch đại từ mẫu chuẩn Bt11 đã được công nhận (ví dụ dòng IRMM-412 từ IRMM, Geel, Bỉ).

²³⁾ GeneAmp[®] 2400, 9600 và AmpliTaq Gold[®] polymeraza là các ví dụ thích hợp về các sản phẩm có sẵn trên thị trường của Applied Biosystems, trước kia là Perkin Elmer/Applied Biosystems. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

Về nhận dạng sản phẩm PCR, xem C.3.8.

Sản phẩm PCR là đoạn gen có kích thước 189 bp chứng tỏ mẫu ADN có chứa ADN có nguồn gốc từ ngô Bt 11 bị biến đổi gen với nồng độ nằm trong giới hạn phát hiện đặc hiệu nêu trong C.3.2.2.

Chi tiết về điện di, xem B.2 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005).

C.4 Phương pháp cấu trúc đặc thù để phát hiện trình tự ADN biến đổi từ ngô dòng 176 biến đổi gen

C.4.1 Khái quát

Phương pháp này dùng để phát hiện ngô dòng (Event) 176 (Syngenta) trong các nguyên liệu thô hoặc đã qua chế biến bằng cách khuếch đại vùng nối nhân tạo giữa hai bản sao của một cấu trúc gen dùng để tích hợp vào hệ gen thực vật. Ngô bị biến đổi có khả năng tạo độc tố Bt (loại cryIA(b)) có nguồn gốc từ *Bacillus thuringiensis*, bằng cách gắn gen Bt vào promoter CDPK của ngô (*Zea mays*).

Trong tương lai, phương pháp cấu trúc tương tự sẽ được sử dụng trong các sinh vật biến đổi gen khác.

Phương pháp này không thể phân biệt các cây trồng tạo ra bằng tổ hợp gen mà chỉ phân biệt được hạt hoặc cây đơn có mang đoạn gen này hay không.

C.4.2 Tình trạng hiệu lực và tiêu chí thực hiện

C.4.2.1 Nghiên cứu cộng tác

Phương pháp đã được đánh giá hiệu lực bởi các nghiên cứu cộng tác [20] được tổ chức bởi nhóm nghiên cứu thuộc Viện nghiên cứu bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng và Viện Thú Y Liên bang Đức với đề tài “Xây dựng phương pháp nhận dạng thực phẩm được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền”. Số phòng thử nghiệm tham gia cũng như số mẫu được thực hiện theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). Một nửa số phòng thử nghiệm tham gia sử dụng CTAB để tách ADN theo A.3 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005), còn một nửa số phòng còn lại sử dụng Wizard® ADN-Clean-Up-System²⁴).

Dữ liệu từ nghiên cứu cộng tác được nêu trong Bảng C.11.

²⁴) Wizard® ADN-Clean-Up-System là bộ Kit thích hợp có sẵn trên thị trường. Thông tin này được đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng sản phẩm khác nếu cho các kết quả tương tự.

Bảng C.11 - Kết quả từ nghiên cứu cộng tác

Năm	2000
Số phòng thử nghiệm tham gia	18
Số phòng thử nghiệm gửi kết quả	16
Số mẫu của mỗi phòng thử nghiệm	6
Số kết quả được chấp nhận	96
Số mẫu chứa ngô dòng (Event) 176	32
Số mẫu chứa ngô Bt 11	32
Số mẫu chứa ngô không biến đổi gen	32
Kết quả dương tính giả	0 (0 %)
Kết quả âm tính giả	0 (0 %)

Ngoài ra, 13 phòng thử nghiệm đã nhận được mẫu ADN của ngô có nguồn gốc từ bột ngô khô chứa 0,1 % khối lượng thuộc dòng (Event) 176 (ngô Bt 176) biến đổi gen (mẫu chuẩn đã được công nhận, do IRMM, Geel, Bỉ cung cấp). Mười hai phòng thử nghiệm xác định mẫu dương tính với ngô dòng (Event) 176 (Bt 176) và một phòng có kết quả không rõ ràng.

C.4.2.2 Đặc hiệu phân tử

C.4.2.2.1 Khái quát

Phụ lục này đáp ứng những yêu cầu nêu trong điều 7.

Phương pháp đã được mô tả trong [20] và trong [35].

Thông tin về thiết kế gen để đưa vào hệ gen của ngô được mô tả trong [35].

C.4.2.2.2 Lý thuyết

Trình tự cấu trúc ADN được đưa vào không có sự tương đồng với bất kỳ trình tự ADN nào của ngô và các cây trồng khác không biến đổi gen được tìm thấy trong ngân hàng dữ liệu (GenBank® database; BlastN® 2.2.1, 1 tháng 7 năm 2001). Hơn nữa, bộ môi được thiết kế chỉ để khuếch đại đặc hiệu trình tự nối nhân tạo chứ không có trong tự nhiên.

C.4.2.2.3 Thực nghiệm

Không có đoạn ADN nào được khuếch đại khi sử dụng ADN từ đậu tương (GTS 40-3-2) và ngô dòng Bt 11, T25 và MON810 [11] biến đổi gen hoặc từ ngô không bị biến đổi gen [11], [20].

Số bản sao của trình tự là 2.

C.4.2.3 Giới hạn phát hiện (LOD)

Dựa vào giả định rằng có hai bản sao của trình tự gen được thiết kế trên một hệ gen (AGBIOS database: <http://www.aqbios.com/>) và kích thước hệ gen đơn bội của ngô là $2,65 \times 10^9$ bp (xem [5]), thì LOD tuyệt đối là 50 ng ADN ngô có chứa 0,1 % sinh vật biến đổi gen trong hạt nghiền, tương đương với 20 bản sao của hệ gen^[34]. LOD tương đối được tính khi sinh vật biến đổi gen có nồng độ cao hơn hoặc tương đương 0,1 % trong bột ngô nghiền^[34].

C.4.3 Điều chỉnh

Chưa có quy định cụ thể.

C.4.4 Nguyên tắc

Độc tố Bt từ *Bacillus thuringiensis* là chất diệt côn trùng có nguồn gốc từ vi khuẩn. Thực vật biến đổi gen chứa gen Bt tạo ra protein kháng sâu bệnh. Ngô dòng (Event) 176 (ngô Bt 176) chứa gen Bt tổng hợp loại CryIA(b) được điều khiển bởi promoter CDPK6. Đoạn gen kích thước 211 bp ở vùng nối giữa promoter CDPK6 và gen Bt được khuếch đại bằng PCR và sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di trên gel agarosa. Để xác định chính xác sản phẩm PCR, phương pháp lai với mẫu dò lai được mô tả và có thể được sử dụng.

C.4.5 Thuốc thử

Chất lượng các thuốc thử, xem TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

C.4.5.1 Nước

C.4.5.2 Dung dịch đệm PCR (không chứa $MgCl_2$), 10 x

C.4.5.3 $MgCl_2$ dung dịch, $c(MgCl_2) = 25$ mmol/l

C.4.5.4 dNTP dung dịch, $c(dNTP) = 2,5$ mmol/l (cho mỗi loại)

C.4.5.5 Oligonucleotit

C.4.5.5.1 Mỗi xuôi

Cry03: 5-CTC TCg CCg TTC ATg TCC gT-3'

Chưa đăng ký số hiệu. Mỗi nằm trong vùng điều khiển CDPK6. Trình tự mỗi 100 % giống với dòng ngô CDPK, số hiệu đăng ký. L27484.1.

C.4.5.5.2 Mỗi ngược

Cry04: 5'-ggT CAg gCT Cag gCT gAT gT-3'

TCVN 7605 : 2007

Số hiệu đăng ký là 41419 (xem [36]). Mỗi năm trong vùng gen tổng hợp CryIA(b).

C.4.5.6 ADN polymeraza chịu nhiệt (dùng cho hot-start PCR), 5 IU/ μ l.

C.4.5.7 Trình tự mẫu dò (Cry01)

5'-ATg gAC AAC AAC CCC AAC ATC-3.'

C.4.5.8 Dung dịch lai sơ bộ, chứa SSC 5 x, 0,1 % *N*-lauroyl-sarcosin (theo nồng độ khối), 0,02 % SDS (nồng độ khối) và 1 % thuốc hãm.

C.4.5.9 Dung dịch lai, chứa 10 pmol mẫu dò lai trong 2,5 ml dung dịch trước khi lai (C.4.5.8).

Quá trình lai diễn ra ở nhiệt độ 50 °C. Ngoài ra, các thông tin về điều kiện lai được nêu trong [12].

C.4.6 Thiết bị, dụng cụ

Như quy định trong C.1.6.

C.4.7 Cách tiến hành

C.4.7.1 Chuẩn bị PCR

Phương pháp này định rõ tổng thể tích PCR là 25 μ l cho một phản ứng với các thành phần như liệt kê trong Bảng C.12. PCR cũng có thể tiến hành với thể tích lớn hơn nếu các dung dịch được điều chỉnh phù hợp. Nồng độ cuối cùng của các thuốc thử đưa ra trong Bảng C.12 được chứng minh là phù hợp.

Bảng C.12 – Thành phần thuốc thử

Thuốc thử	Nồng độ cuối cùng	Thể tích trên mẫu (μ l)
Mẫu ADN	10 ng tới 50 ng	2
Nước		15,4
Đệm PCR 10 x (không chứa MgCl ₂)	1	2,5
Dung dịch đệm MgCl ₂ ^a , 25 mmol/l	1,5 mmol/l	1,5
Dung dịch dNTP, 10 mmol/l	0,4 mmol/l	1.0
Mồi Cry03, 5 μ mol/l	0,25 μ mol/l	1,25
Mồi Cry04, 5 μ mol/l	0,25 μ mol/l	1,25
Taq ADN polymeraza, 5 IU/ μ l	0,5 IU	0,1

^a Nếu trong dung dịch đệm PCR đã chứa MgCl₂ thì nồng độ cuối cùng của MgCl₂ trong hỗn hợp phản ứng được điều chỉnh là 1,5 mmol/l.

C.4.7.2 Kiểm chứng PCR

Để kiểm chứng dương tính, sử dụng mẫu chuẩn đã được công nhận [ví dụ, chứa 0,1 % thành phần ngò dòng (Event) 176 (Bt 176) biến đổi gen, do Viện Vật liệu và Đo lường chuẩn (IRMM), Geel, Bỉ (IRMM-410, MZ-0,1) cung cấp.

Một số đối chứng thích hợp khác nên tiến hành theo TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

C.4.7.3 Chương trình thời gian-nhiệt độ

Chương trình thời gian-nhiệt độ nêu trong Bảng C.13 đã được sử dụng để nghiên cứu thẩm tra phương pháp, sử dụng máy chu trình nhiệt GeneAmp® 2400 hoặc GeneAmp® 9600 và AmpliTaq Gold® ADN polymeraza²⁵). Nếu sử dụng máy khác thì cần điều chỉnh chương trình. Thời gian hoạt hoá, biến tính ban đầu phụ thuộc vào polymeraza được sử dụng. Nếu sử dụng hot-start polymeraza, nhà sản xuất khuyến cũng nên sử dụng chương trình đó trừ khi thực hiện với qui trình có quy định khác.

Bảng C.13 - Chương trình thời gian-nhiệt độ

Hoạt hoá, biến tính ban đầu	12phút/95 °C
Khuếch đại	30 giây/95 °C 30 giây/63 °C 30 giây/72 °C
Số chu trình	38
Kéo dài sợi trước khi kết thúc	6 phút/72 °C

C.4.8 Nhận dạng

Kiểm chứng sản phẩm PCR bằng phương pháp lai Southern sử dụng mẫu dò oligonucleotit CryOI đánh dấu digoxigenin (C.4.5.7 đến C.4.5.9). Mẫu không biến đổi gen nên được dùng làm đối chứng âm trong thử nghiệm lai này [20].

Việc kiểm chứng sản phẩm được khuếch đại có thể sử dụng enzym giới hạn *Hae* III, *Taq* I hoặc *Dde* I. Sản phẩm PCR khi bị cắt bằng *Hae* III sẽ cho 2 đoạn có kích thước 162 bp và 49 bp, tương ứng. Sản phẩm PCR khi bị cắt bằng *Taq* I sẽ cho 3 đoạn có kích thước 168, 22 và 21 bp tương ứng. Còn khi cắt bằng *Dde* I, sản phẩm PCR sẽ tạo 3 đoạn ADN có kích thước 128, 72 và 11 bp, tương ứng [20].

C.4.9 Đảm bảo chất lượng và diễn giải kết quả

Trình tự đích coi như đã được phát hiện nếu kích thước của sản phẩm PCR tương đương với kích thước của trình tự đích theo lý thuyết. Kích thước này được xác định bằng cách so sánh với sản phẩm PCR

²⁵) GeneAmp® 2400, 9600 và AmpliTaq Gold® polymeraza là các ví dụ thích hợp về các sản phẩm có sẵn trên thị trường của Applied Biosystems, trước kia là Perkin Elmer/Applied Biosystems. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

TCVN 7605 : 2007

được khuếch đại từ mẫu chuẩn của ngô dòng (Event) 176 (Bt 176) đã được công nhận (ví dụ: dòng IRMM-411 từ IRMM, Geel, Bỉ).

Để nhận dạng sản phẩm PCR, xem C.4.8.

Sản phẩm PCR là đoạn gen có kích thước 211 bp chứng tỏ mẫu ADN có chứa ADN có nguồn gốc từ ngô dòng (Event) 176 (Bt 176) biến đổi gen với nồng độ nằm trong giới hạn phát hiện đặc hiệu trong C.4.2.2.

Chi tiết về điện di, xem B.2 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005).

C.5 Phương pháp cấu trúc đặc thù để phát hiện trình tự ADN biến đổi từ ngô T 25 biến đổi gen

C.5.1 Khái quát

Phương pháp này dùng để phát hiện ngô T25/"LibertyLink" kháng lại thuốc diệt cỏ nhờ biến đổi gen trong các nguyên liệu thô bằng cách khuếch đại vùng nối giữa trình tự ADN có nguồn gốc từ promoter 35S-CaMV và gen *pat*, hai đoạn gen này được nối với nhau nhờ tái tổ hợp trong ống nghiệm.

Trong tương lai, cấu trúc tương tự có thể được sử dụng trong nhiều sinh vật biến đổi gen khác.

Phương pháp không phân biệt được các giống ngô mà chỉ phát hiện được sự có mặt hay không có mặt của đoạn gen trong các hạt và cây đơn.

C.5.2 Tình trạng hiệu lực và tiêu chí thực hiện

C.5.2.1 Nghiên cứu cộng tác

Phương pháp đã được đánh giá hiệu lực bởi các nghiên cứu cộng tác [20] được tổ chức bởi nhóm nghiên cứu thuộc Viện nghiên cứu bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng và Viện Thú Y Liên bang Đức với đề tài "Xây dựng phương pháp nhận dạng thực phẩm được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền". Số phòng thử nghiệm tham gia cũng như số mẫu được thực hiện theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). ADN được tách chiết bằng phương pháp CTAB theo A.3 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005).

Mẫu từ bột hạt nghiền chứa T25 (0,1 %, 1 %), MON 810 (0,1 %, 1 %) và ngô không biến đổi gen đã sử dụng trong nghiên cứu cộng tác.

Dữ liệu từ nghiên cứu cộng tác được nêu trong Bảng C.14 và 15.

Bảng C.14 - Các kết quả từ nghiên cứu và cộng tác

Năm	2001
Số phòng thử nghiệm tham gia	16
Số phòng thử nghiệm gửi kết quả	16
Số mẫu của mỗi phòng thử nghiệm	5
Số kết quả được chấp nhận	75
Số mẫu chứa T25	33
Số mẫu chứa MON 810	31
Số mẫu chứa ngô không biến đổi gen	11
Kết quả dương tính giả	0 (0 %)
Kết quả âm tính giả	4 (12%)

Bảng C.15 - Kết quả từ các nghiên cứu cộng tác

Các dạng mẫu	Số lượng mẫu	Dương tính	Âm tính
<u>Các mẫu âm tính T25:</u>			
0 % sinh vật biến đổi gen	11	11	0
0,1 % MON810	13	13	0
1 % MON810	18	18	0
<u>Các mẫu dương tính T25:</u>			
0,1 % T25	18	15	3 (âm tính) ^a
1 % T25	15	14	1 (âm tính)
^a Mọi kết quả âm tính giả nhận được từ một phòng thử nghiệm.			

C.5.2.2 Đặc hiệu phân tử**C.5.2.2.1 Khái quát**

Phụ lục này đáp ứng những yêu cầu nêu trong điều 7.

Phương pháp này đã được mô tả trong [20].

CHÚ THÍCH: Thông tin về việc xây dựng phương pháp này do Bayer Crop Science cung cấp (trước kia là Aventis CropScience).

Thông tin về thiết kế gen để đưa vào hệ gen ngô có trong [37].

TCVN 7605 : 2007

C.5.2.2.2 Lý thuyết

Trình tự cấu trúc ADN được đưa vào không có sự tương đồng với bất kỳ trình tự ADN nào của ngô và các cây trồng khác không biến đổi gen được tìm thấy trong ngân hàng dữ liệu (GenBank® database; BlastN® 2.2.1, 1 tháng 7 năm 2001). Hơn nữa, bộ môi được thiết kế chỉ để khuếch đại đặc hiệu trình tự nổi nhân tạo chứ không có trong tự nhiên.

C.5.2.2.3 Thực nghiệm

Không có đoạn ADN nào được khuếch đại khi sử dụng ADN từ ngô không biến đổi gen, đậu tương GTS 40-3-2 (Roundup Ready®) biến đổi gen hoặc các dòng ngô biến đổi gen Bt dòng (Event) 176 (Bt 176), Bt 11 và MON 810.

Số bản sao của trình tự là 1.

C.5.2.3 Giới hạn phát hiện (LOD)

Dựa vào giả định rằng có hai bản sao của trình tự gen được thiết kế trên một hệ gen (AGBIOS database: <http://www.aqbios.com/>) và kích thước hệ gen đơn bội của ngô là $2,65 \times 10^9$ bp (xem [5]), thì LOD tuyệt đối là 50 ng ADN ngô có chứa 0,1 % sinh vật biến đổi gen trong hạt nghiền, tương đương với 20 bản sao của hệ gen [34]. LOD tương đối được tính khi sinh vật biến đổi gen có nồng độ cao hơn hoặc tương đương 0,1 % trong bột ngô nghiền [34].

C.5.3 Điều chỉnh

Chưa có quy định cụ thể.

C.5.4 Nguyên tắc

Gen *pat* có nguồn gốc từ vi sinh vật đất *Streptomyces viridochromogenes* mã hoá enzym phosphinothricin-W-acetyltransferaza giúp cho cây trồng kháng lại thuốc diệt cỏ amoni glufosinat. Amoni glufosinat phá vỡ quá trình tổng hợp glutamin ở thực vật.

Đoạn gen có kích thước 209 bp nằm trong vùng nối giữa promoter 35S-CaMV và gen *pat* được khuếch đại bằng PCR và được phát hiện bằng điện di trên gel agarosa. Để nhận dạng chính xác sản phẩm PCR có thể sử dụng enzym giới hạn như đã mô tả.

C.5.5 Thuốc thử

Chất lượng các thuốc thử, xem TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

C.5.5.1 Nước

C.5.5.2 Dung dịch đệm PCR (không chứa $MgCl_2$), 10 x

C.5.5.3 Dung dịch $MgCl_2$, $c(MgCl_2) = 25$ mmol/l

C.5.5.4 Dung dịch dNTP, $c(\text{dNTP}) = 2,5 \text{ mmol/l}$ (cho mỗi loại)

C. 5.5.5 Oligonucleotit

C.5.5.5.1 Mỗi xuôi

T25-F7: 5'-ATg gTg gAT ggC ATg ATg TTg-3'

Số hiệu đăng ký (GenBank®) là NC001497. Mỗi nằm trong promoter 35S-CaMV

C.5.5.5.2 Mỗi ngược

T25-R3: 5'- TgA gCg AAA CCC TAT AAg AAC CC -3'

Chưa được đăng ký số hiệu trên ngân hàng. Mỗi nằm trong vùng gen mã hoá protein PAT

C.5.5.6 ADN polymeraza chịu nhiệt (dùng cho hot-start PCR), 5 IU/ μl

C.5.5.7 Enzym giới hạn: *Hinf* I and *Mwo* I

C.5.6 Thiết bị, dụng cụ

Theo quy định trong C.1.6.1 và C.1.6.2.

C.5.7 Cách tiến hành

C.5.7.1 Chuẩn bị PCR

Phương pháp này định rõ tổng thể tích PCR là 25 μl cho một phản ứng với các thành phần như liệt kê trong Bảng C.16. PCR cũng có thể tiến hành với thể tích lớn hơn nếu các dung dịch được điều chỉnh phù hợp. Nồng độ cuối cùng của các thuốc thử đưa ra trong Bảng C.16 được chứng minh là phù hợp.

Bảng C.16 - Thành phần thuốc thử

Thuốc thử	Nồng độ cuối cùng	Thể tích trên mẫu (μl)
Mẫu ADN	10 ng tới 50 ng	2
Nước		14,8
Đệm PCR (không chứa MgCl_2) 10x	1 x	2,5
Dung dịch ^a MgCl_2 , 25 mmol/l	2 mmol/l	2,0
Dung dịch dNTP, 10 mmol/l	0,4 mmol/l	1,0
Mỗi T25-F7, 10 $\mu\text{mol/l}$	0,5 $\mu\text{mol/l}$	1,25
Mỗi T25-R3, 10 $\mu\text{mol/l}$	0,5 $\mu\text{mol/l}$	1,25
Taq ADN polymeraza, 5 IU/ μl	1 IU	0.2

^a Nếu trong dung dịch đệm PCR đã chứa MgCl_2 thì nồng độ cuối cùng của MgCl_2 trong hỗn hợp phản ứng được điều chỉnh là 2 mmol/l.

TCVN 7605 : 2007

C.5.7.2 Kiểm chứng PCR

Mẫu chuẩn không có sẵn trên thị trường²⁶⁾.

Một số đối chứng thích hợp khác nên tiến hành theo TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

C.5.7.3 Chương trình thời gian-nhiệt độ

Chương trình thời gian-nhiệt độ nêu trong Bảng C.17 đã được sử dụng để nghiên cứu thẩm tra phương pháp, sử dụng máy chu trình nhiệt GeneAmp[®] 2400 hoặc GeneAmp[®] 9600 và AmpliTaq Gold[®] ADN polymeraza²⁷⁾. Nếu sử dụng máy khác thì cần điều chỉnh chương trình. Thời gian hoạt hoá, biến tính ban đầu phụ thuộc vào polymera được sử dụng. Nếu sử dụng hot-start polymeraza, nhà sản xuất khuyên cũng nên sử dụng chương trình đở trừ khi qui trình quy định khác.

Bảng C.17 - Chương trình thời gian-nhiệt độ

Hoạt hoá/Biến tính ban đầu	12 min/95 °C
Khuếch đại	30 s/95 °C 30 s/64 °C 30 s/72 °C
Số chu trình	40
Kéo dài sợi trước khi kết thúc	10 min/72°C

C.5.8 Nhận dạng

Sản phẩm PCR có thể được thẩm tra bằng các enzym giới hạn như *Hinf* I hoặc *Mwo* I. Sản phẩm PCR cắt bằng *Hinf* I tạo ra hai đoạn có kích thước 121 và 88 bp, tương ứng. Khi cắt bằng *Mwo* I sản phẩm PCR sẽ cho hai đoạn gen có kích thước 141 và 68 bp, tương ứng [20].

C.5.9 Đảm bảo chất lượng và diễn giải kết quả

Trình tự đích coi như đã được phát hiện nếu kích thước của sản phẩm PCR tương đương với kích thước của trình tự đích theo lý thuyết. Kích thước này được xác định bằng cách so sánh với sản phẩm PCR được khuếch đại từ mẫu chuẩn có nguồn gốc từ ngô T25.

Về nhận dạng sản phẩm PCR, xem C.5.8.

Sản phẩm PCR là đoạn gen có kích thước 209 bp chứng tỏ mẫu ADN có chứa ADN có nguồn gốc từ ngô T25 bị biến đổi gen với nồng độ nằm trong giới hạn phát hiện đặc hiệu nêu trong C.5.2.2.

Chi tiết về điện di, xem B.2 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005).

²⁶⁾ Để có các mẫu chuẩn để làm đối chứng, liên hệ với cơ quan chuẩn Quốc gia.

²⁷⁾ GeneAmp[®] 2400, 9600 và AmpliTaq Gold[®] polymeraza là các ví dụ thích hợp về các sản phẩm có sẵn trên thị trường của Applied Biosystems, trước kia là Perkin Elmer/Applied Biosystems. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

Phụ lục D

(Tham khảo)

Phương pháp phân tích dòng đặc hiệu

D.1 Phương pháp phân tích dòng đặc hiệu dùng để phát hiện các trình tự ADN bị biến đổi từ ngô MON 810 biến đổi gen

D.1.1 Khái quát

Phương pháp này dùng phát hiện ngô MON 810/"YieldGuard" biến đổi gen để chống côn trùng trong các nguyên liệu thô bằng cách khuếch đại vùng gen nối giữa hệ gen của ngô có bản sao đơn và trình tự tích hợp được gắn vào có nguồn gốc từ promoter 35S-CaMV bằng tái tổ hợp gen trong ống nghiệm.

Cây trồng tạo ra bằng phương pháp lai không thể phân biệt được bằng cách này mà phương pháp này chỉ phân biệt được hạt đơn hoặc cây đơn có hay không có trình tự gen này mà thôi.

D.1.2 Tình trạng hiệu lực và tiêu chí thực hiện

D. 1.2.1 Nghiên cứu cộng tác

Phương pháp đã được đánh giá hiệu lực bởi các nghiên cứu cộng tác [20] được tổ chức bởi nhóm nghiên cứu thuộc Viện nghiên cứu bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng và Viện Thú Y Liên bang Đức với đề tài "Xây dựng phương pháp nhận dạng thực phẩm được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền". Số phòng thử nghiệm tham gia cũng như số mẫu được thực hiện theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). ADN được tách chiết bằng phương pháp CTAB theo A.3 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005).

Mẫu từ bột hạt nghiền chứa "MON 810 DK 513/59179" (0,1 %, 1 %), T25 (0,1 %, 1 %) và ngô không biến đổi gen đã được sử dụng trong nghiên cứu cộng tác. Dữ liệu từ nghiên cứu cộng tác được nêu trong Bảng D.1 và D.2.

Bảng D.1 – Các kết quả nghiên cứu và cộng tác

Năm	2001
Số phòng thử nghiệm tham gia	16
Số phòng thử nghiệm gửi kết quả	16
Số mẫu của mỗi phòng thử nghiệm	5
Số kết quả được chấp nhận	75
Số mẫu chứa MON 810	31
Số mẫu chứa T25	33
Số mẫu chứa ngô không biến đổi gen	11
Kết quả dương tính giả	0 (0 %)
Kết quả âm tính giả	0 (0 %)

Bảng D.2 - Kết quả từ nghiên cứu cộng tác

Mẫu	Số mẫu	Đúng tính	Sai
<u>MON 810 mẫu âm tính:</u>			
0 % sinh vật biến đổi gen	11	11	0
0,1 % T25	18	18	0
1 % T25	15	15	0
<u>MON 810 Các mẫu dương tính:</u>			
0,1 % MON 810	13	13	0
1 % MON 810	18	18	0

D.1.2.2 Đặc hiệu phân tử**D.1.2.2.1 Khái quát**

Phụ lục này đáp ứng những yêu cầu nêu trong điều 7.

Phương pháp này đã được mô tả trong [20].

CHÚ THÍCH: Thông tin về quá trình xây dựng phương pháp này do Monsanto cung cấp.

Thông tin về thiết kế gen để đưa vào hệ gen ngô có sẵn trong [38].

D.1.2.2.2 Lý thuyết

Trình tự cấu trúc ADN được đưa vào không có sự tương đồng với bất kỳ trình tự ADN nào của ngô và cây trồng khác không biến đổi gen được tìm thấy trong ngân hàng dữ liệu (GenBank® database; BlastN® 2.2.1, 1 tháng 7 năm 2001). Ngoài ra, mỗi được thiết kế chỉ để khuếch đại trình tự đặc hiệu nối nhân tạo (vùng nối nhân tạo) vốn không có trong tự nhiên.

D.1.2.2.3 Thực nghiệm

Không có đoạn ADN nào được khuếch đại khi sử dụng ADN từ ngô không biến đổi gen, đậu tương GTS 40-3-2 (Roundup Ready®) hoặc các dòng (Event) 176 (Bt 176), Bt 11 và T25 biến đổi gen.

Số bản sao của trình tự là 1.

D.1.2.3 Giới hạn phát hiện (LOD)

Dựa vào giả định rằng chỉ có một bản sao của trình tự gen được thiết kế trên một hệ gen (AGBIOS database: <http://www.aqbios.com/>) và kích thước hệ gen đơn bội của ngô là $2,65 \times 10^9$ bp (xem [5], thì LOD tuyệt đối là 50 ng ADN ngô có chứa 0,1 % sinh vật biến đổi gen trong hạt nghiền, tương đương với 20 bản sao của hệ gen [34]. LOD tương đối được tính khi sinh vật biến đổi gen có nồng độ cao hơn hoặc tương đương 0,1 % trong bột ngô nghiền [34].

D.1.3 Điều chỉnh

Chưa có quy định cụ thể.

D.1.4 Nguyên tắc

Gen Bt có nguồn gốc từ vi sinh vật đất *Bacillus thuringiensis* loài phụ *kurstaki*. Protein này được tạo ra trong mô cây trồng giúp cây trồng chống lại sự tấn công của sâu đục thân. Protein hoạt động trong ruột của côn trùng và tạo thành lỗ trên màng tế bào dẫn đến phá huỷ cân bằng thẩm thấu của màng tế bào, kết quả là tế bào bị phân giải.

Đoạn ADN có kích thước 170 trong vùng nối giữa hệ gen với đoạn ADN có nguồn gốc từ promoter 35S-CaMV được tích hợp được khuếch đại bằng PCR và được phát hiện bằng điện di trên gel agarosa. Để nhận dạng sản phẩm PCR có thể sử dụng enzym giới hạn như đã mô tả (xem D.1.8).

D.1.5 Thuốc thử

Sử dụng thuốc thử có chất lượng như trong TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

D.1.5.1 Nước**D.1.5.2 Dung dịch đệm PCR (không chứa $MgCl_2$), 10 x****D.1.5.3 Dung dịch $MgCl_2$, $c(MgCl_2) = 25$ mmol/l**

TCVN 7605 : 2007

D.1.5.4 Dung dịch dNTP, $c(\text{dNTP}) = 2,5 \text{ mmol/l}$ (cho mỗi loại)

D.1.5.5 Oligonucleotit

Vùng tích hợp hệ gen đã được ấn bản [38] với số đăng ký AF434709

D.1.5.5.1 Môi xuôi

VW01: 5'-TCg AAg gAC gAA ggA CTC TAA Cg-3'

Số hiệu đăng ký là AF434709. Mỗi nằm trong hệ gen của ngô.

D.1.5.5.2 Môi ngược

VW03: 5'-TCC ATC TTT ggg ACC ACT gTC g-3'.

Số hiệu đăng ký (GenBank[®]) là V00141, J02048. Mỗi nằm trong promoter CaMV-35S.

D.1.5.6 ADN polymeraza chịu nhiệt (dùng cho hot-start PCR), 5 IU/ μl .

D.1.5.7 Enzym giới hạn: *Mwo* I và *Hae* III.

D.1.6 Thiết bị, dụng cụ

D.1.6.1 Máy chu trình nhiệt

D.1.6.2 Bộ điện di, có nguồn cung cấp.

D.1.7 Cách tiến hành

D.1.7.1 Chuẩn bị PCR

Phương pháp này định rõ tổng thể tích PCR là 25 μl cho một phản ứng với các thành phần như liệt kê trong Bảng D.3. PCR cũng có thể tiến hành với thể tích lớn hơn nếu các dung dịch được điều chỉnh phù hợp. Nồng độ cuối cùng của các thuốc thử đưa ra trong Bảng D.3 được chứng minh là phù hợp.

Bảng D.3 - Thành phần thuốc thử

Thuốc thử	Nồng độ cuối cùng	Thể tích trên mẫu (µl)
Mẫu ADN	10 ng tới 50 ng	2
Nước		14,8
10 x Đệm PCR (không chứa MgCl ₂)	1 x	2,5
Dung dịch ^a MgCl ₂ , 25 mmol/l	2 mmol/l	2,0
Dung dịch dNTP, 10 mmol/l	0,4 mmol/l	1,0
Môi VW01, 10 µmol/l	0,5 µmol/l	1,25
Môi VW03, 10 µmol/l	0,5 µmol/l	1,25
Taq ADN polymeraza, 5 IU/µl	1 IU	0,2
^a Nếu trong dung dịch đệm PCR đã chứa MgCl ₂ thì nồng độ cuối cùng của MgCl ₂ trong hỗn hợp phản ứng được điều chỉnh là 2 mmol/l.		

D.1.7.2 Kiểm chứng PCR

Để kiểm chứng dương tính có thể sử dụng mẫu chuẩn IRMM-413 đã được IRMM công nhận.

Một số đối chứng thích hợp khác nên tiến hành theo TCVN 7608 : 2007 (ISO 24276 : 2006).

D.1.7.3 Chương trình thời gian-nhiệt độ

Chương trình thời gian-nhiệt độ nêu trong Bảng D.4 đã được sử dụng để nghiên cứu thẩm tra phương pháp, sử dụng máy chu trình nhiệt GeneAmp[®] 2400 hoặc GeneAmp[®] 9600 và AmpliTaq Gold[®] ADN polymeraza²⁸⁾. Nếu sử dụng máy khác thì cần điều chỉnh chương trình. Thời gian hoạt hoá, biến tính ban đầu phụ thuộc vào polymeraza được sử dụng. Nếu sử dụng hot-start polymeraza, nhà sản xuất khuyên cũng nên sử dụng chương trình đó trừ khi có quy định khác.

Bảng D.4 - Chương trình thời gian-nhiệt độ

Hoạt hoá, biến tính ban đầu	12 min/95 °C
Khuếch đại	30 s/95 °C
	30 s/64 °C
	30 s/72 °C
Số chu trình	40
Kéo dài sợi trước khi kết thúc	10 min/72 °C

²⁸⁾ GeneAmp[®] 2400, 9600 và AmpliTaq Gold[®] polymeraza là các ví dụ thích hợp về các sản phẩm có sẵn trên thị trường của Applied Biosystems, trước kia là Perkin Elmer/Applied Biosystems. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

TCVN 7605 : 2007

D.1.8 Nhận dạng

Sản phẩm PCR được khuếch đại có thể được thẩm tra bằng enzym giới hạn *Hae* III hoặc *Mwo* I. Sản phẩm PCR được cắt bằng *Hae* III tạo hai đoạn gen có kích thước 126 và 44 bp tương ứng. Khi cắt bằng *Mwo* I, sẽ tạo ra hai đoạn có kích thước 109 bp và 61 bp tương ứng.

D.1.9 Đảm bảo chất lượng và diễn giải kết quả

Trình tự đích coi như đã được phát hiện nếu kích thước của sản phẩm PCR tương đương với kích thước của trình tự đích theo lý thuyết. Kích thước này được xác định bằng cách so sánh với sản phẩm PCR được khuếch đại từ mẫu chuẩn có nguồn gốc từ ngô MON 810 (ví dụ, IRMM-413 từ IRMM, Geel, Bỉ).

Về nhận dạng sản phẩm PCR, xem D.1.8.

Sản phẩm PCR là đoạn gen có kích thước 170 bp chứng tỏ mẫu ADN chứa ADN có nguồn gốc từ ngô MON 810 biến đổi gen với nồng độ nằm trong giới hạn phát hiện đặc hiệu nêu trong D.1.2.2.

Chi tiết về điện di, xem B.2 của TCVN 7606 : 2007 (ISO 21571 : 2005).

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., and ARNHEIM, N.: Enzymatic amplification of R-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, **230**, pp 1350-1354
- [2] MULLIS, K.B. and FALOONA, F.A.: Specific synthesis of ADN in vitro via a polymeraza-catalyzed reaction. *Methods Enzymol.*, 1987, **155**, pp 335-350
- [3] HEATON, P.A.: Quantification of total ADN by spectroscopy. In *Analytical Molecular Biology: Quality and Validation*, ed. Saunders, G.S and Parkes, H.C. *RSC publications*, 1999, U.K
- [4] BICKLEY and HOPKINS: Inhibitors and enhancers of PCR in *Analytical Molecular Biology: Quality and Validation*, ed. Saunders, G.S and Parkes, H.C. *RSC publications*, 1999, U.K
- [5] ARUMUGANATHAN, K. and EARLE, E.D.: Nuclear content of some important plant species, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9(3), 1991, pp 208-218
- [6] WOLF, C, SCHERZINGER, M., WURZ, A., PAULI, U., HOBNER, P., and LUTHY, J.: Detection of cauliflower mosaic virus by the polymeraza chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results. *Eur. Food Res. Technol.*, 2000, **210**, pp 367-372
- [7] HOLST-JENSEN, A., RONNING, S.B., LOVSETH, A. and BERDAL, K.G.: PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, 375, pp 985-993
- [8] Detection of a genetic modification of soybeans by amplification of the modified ADN sequence by means of the polymeraza chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a ADN probe, No. L 23.01.22-1. *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*, Loose leaf edition as of March 1998, Berlin, Koln, Beuth Verlag GmbH
- [9] Report of the EU tender No. XXIV/98/A3/001. Development of qualitative as well as quantitative detection methods to identify a genetic modification in soybean and maize. http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/biotech/biotech02_en.html, 2000
- [10] MEYER, R., CHARDONNENS, F., HOBNER, P., and LUTHY, J.: Polymeraza chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of Soya in processed meat products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1996, **203**, pp 339-344
- [II] BROLL, H., WAGNER, U., SPIEGELBERG, A, ZAGON, J., and SCHAUZU, M.: Anwendung von Methoden zum Nachweis von gentechnisch veränderten Sojabohnen und gentechnisch verändertem Mais in im Handel befindlichen Lebensmitteln, *Bundesgesundhblatt*, 1998, **12**, pp 560-562.
- [12] SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W.: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

TCVN 7605 : 2007

- [13] Detection of a genetic modification of potatoes by amplification of the modified ADN sequence using the polymeraza chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a ADN probe, No. L 24.01 -1: *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*, Loose leaf edition as of January 1997, Berlin, Koln, Beuth Verlag GmbH.
- [14] TABERLET, P., GIELLY, L., PAUTOU, G., and BOUVET, J.: Universal Mòis for amplification of three noncoding regions of chloroplast ADN. *Plant Mol. Biol.*, 1991,17, pp 1105-1109.
- [15] Detection of a genetic modification of tomatoes by amplification of the modified ADN sequence by means of the polymeraza chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a ADN probe or restriction analysis of the PCR product, No. L 25.03.01. *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*, Loose leaf edition as of November 1999, Berlin, Koln, Beuth Verlag GmbH.
- [16] BUSCH, U., MUHLBAUER, B., SCHULZE, M., and ZAGON, J.: Screening- und spezifische Nachweismethode filr transgene Tomaten (Zeneca) mit der Polymerazakettenreaktion. *Deutsche Lebensmittelrundschau*, 1999, Heft 2, 52-56.
- [17] GIERSON, E., TUCKER, G.A., KEEN, J., RAY, J., BIRD, C.R., and SCHUCH, W.: Sequencing and identiffication of a cADN clone for tomato polygalacturonase. *Nucleic Acid Research*, 1986, 14, pp 8595-8603.
- [18] SMITH, C.J.S., WATSON, C.F., BIRD, C.R., RAY, J., SCHUCH, W., and GIERSON, D.: Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet*, 1990, **224**, pp 477-481.
- [19] BROLL, H., JANSEN, B., SPIEGEL BERG, A., LEFFKE, A., ZAGON, J., and SCHAUZU, M.: ADN-analytische Nachweismethoden fur gentechnisch veranderte Tomaten in Tomatenprodukten. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 1999, 95, 48-51.
- [20] Detection of a genetic modification of maize (*Zea mays* L.) by amplification of the modified ADN sequence by means of the polymeraza chain reaction (PCR) and hybridization of the PCR product with a ADN probe or restriction analysis of the PCR product, No. L 15.05-1. *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*, Loose leaf edition as of May 2002, Berlin, Koln, Beuth Verlag GmbH.
- [21] EHLERS, B., STRAUCH, E., GOLTZ, M., KUBSCH, D., WAGNER, H., MAIDHOF, H., BENDIEK, J., APPEL, B. and BUHK, H.-J.: Nachweis gentechnischer VerSnderungen in Mais mittels PCR. *Bundesgesundhbl.*, 1997, 4, pp 118-121.
- [22] PIETSCH, K., WAIBLINGER, H.U., BRODMANN, P. and WURZ. A: Screening method for the detection of genetically modified plants, *Dtsch Lebensm. Rundsch.* 1997, 93, pp 35-38.

- [23] HEMMER, W.: *Foods Derived from Genetically Modified Organisms and Detection Methods*. In: BATS- report (Agency for Biosafety research and assessment of technology Impacts of the Swiss priority Programme Biotechnology of the Swiss National Science Foundation, Basel, Switzerland), 1997,2/97, pp 40-44.
- [24] Screening procedurre for the detection of genetically modified ADN sequences in foods by identification of PCR of ADN sequences that frequently occur in genetically modified organisms. No L 00.00-31. *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*, Loose leaf edition as of September 1998, revised version: state 05/2001; Berlin, Koln, Beuth Verlag GmbH.
- [25] LIPP, M., BRODMANN, P., PIETSCH, K., PAUWELS, J., and ANKLAM, E.: IUPAC Collaborative trial of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder, *J. AOAC Int.*, 1999, 82, pp 923-928.
- [26] BRUNT, A., CRABTREE, K., DALLWITZ, M., GIBBS, A., WATSON, L: *Virutes of Plants: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. 1996, 1484 pp. C.A.B. International, U.K.
- [27] Qiu, S.G., WINTERMANTEL, W.M., SHA, Y. and SCHOELZ, J.E.: Light-Dependent Systemic Infection of Solanaceous Species by Cauliflower Mosaic Virut Can Be Conditioned by a Viral Gene Encoding an Aphid Transmission Factor. *Virology*, 1997, **227**, pp 180-188.
- [28] *Schweizerisches Lebensmittelhandbuch* Kapitel 52B, Eidgenossische Drucksachen- und Materialienzentrale, Bern, 1998.
- [29] van den EEDE, G., LIPP, M., EYQUEM, F. and ANKLAM, E.: *Validation of an analytical method for the detection of GMO-derived ADN in processed foodstuffs*. EUR 19677 EN, Report issued by the IHCP ISPRA, 2000.
- [30] LIPP, M., BLUTH, A., EYQUEM, F., KRUSE, L., SCHIMMEL, H., van den EEDE, G. and Anklam, E. Validation of a method based on polymeraza chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *Eur. FoodRes.Technol.*, 2001, 212, pp 497-504.
- [31] PADGETTE, S.R., KOLACZ, K.H., DELANNY, X., RE, D.B., LAVELLEE, B.J., TINIUS, C.N., RHODES, W.K., OTERO, Y.I., BARY, G.F., EICHHOLTZ, DA, PESCHKE, V.M., NIDA, D.L, TAYLOR, N.B., KISHORE, G.M.: Development, identiffication of PCR and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.*, 35,1995, pp 1451-1461.
- [32] WURZ, A., WILLMUND, R.: identiffication of PCR of transgenic glyphosate-resistant soybeans. In: G.A. Schreiber, K.W. Bogl (Eds.). *Foods produced by means of genetic engineering — 2nd status report. BgVV-Heft 1/1997* (BgW, Berlin), pp. 115-117.
- [33] STRAUB, J.A., HERTEL, C. and HAMMES, W.P.: Limits of a PCR-based detection method for genetically modified soya beans in wheat bread production. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 208, 1999, pp. 77-82.

TCVN 7605 : 2007

- [34] ZIMMERMANN, A., LUTHY, J., PAULI, U.: Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site. *Lebensm.-Wiss. U. Technol.*, 33, 2000, pp. 210-216.
- [35] HUPFER, C, HOTZEL, H., SACHSE, K., ENGEL, K.-H.: Detection of the genetic modification in heat treated products of Bt maize by polymeraza chain reaction. *Lm. Unters. Forsch.*, 206 (Band A), 1998, pp. 203-207.
- [36] VAITILINGOM, M., PIJNENBURG, H., GENDRE, F. and BRIGNON, P.: Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and RoundupReady soybean in some representative foods. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1999, pp. 5261-5266.
- [37] MATSUOKA, T., KAWASHIMA, Y., AKIYAMA, H., MIURA, H., GODA, Y., KUSAKABE, Y., ISSHIKI, K. & TOYODA, M., HINO, A.: A method of detecting recombinant ADNs from four lines of genetically modified maize. *Journal of Food Hygienic Society of Japan*, 41, 2000, pp. 137-143.
- [38] HOLCK, A., VAITILINGOM, M., DIDIERJEAN, L. & RUDI, K.: 5'-Nuclease PCR for quantitative Event specific detection of the genetically modified Mon810 MaisGard maize. *Eur Food Res Technol*, 214, 2002, pp. 449-454.
- [39] ISO 5725-2, *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.*
- [40] ISO 21568, *Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Sampling.*
- [41] ISO 21570, *Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Quantitative nucleic acid based methods.*
-