

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 11934:2017

ISO 16578:2013

Xuất bản lần 1

**PHÂN TÍCH DẤU ÁN SINH HỌC PHÂN TỬ - ĐỊNH NGHĨA
VÀ CÁC YÊU CẦU CHUNG ĐỐI VỚI VIỆC PHÁT HIỆN CÁC
TRÌNH TỰ AXIT NUCLEIC ĐẶC HIỆU BẰNG MICROARRAY**

*Molecular biomarker analysis - General definitions and requirements for microarray detection of
specific nucleic acid sequences*

HÀ NỘI - 2017

Lời nói đầu

TCVN 11934:2017 hoàn toàn tương đương ISO 16578:2013;

TCVN 11934:2017 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13
Phương pháp phân tích và lấy mẫu biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn
Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Trọng tâm chính của tiêu chuẩn này là các phương pháp luận dựa trên ADN chip.

ADN chip là kỹ thuật sinh học phân tử có khả năng phát hiện đồng thời nhiều trình tự axit nucleic và đặc biệt thích hợp để xác định các trình tự axit nucleic cần quan tâm và để đo mức độ biểu hiện gen. Kỹ thuật microarray đã được phát triển để sử dụng trong lĩnh vực phân tích thực phẩm [phân tích sinh vật biến đổi gen (GMO), nhận biết dấu ấn sinh học...]. Mặc dù các tham số chuẩn hóa yêu cầu cho phương pháp dựa trên ADN chip đang được nghiên cứu (như MAQC và MIAME), nhưng cần phải có các yêu cầu tối thiểu để giải thích kết quả.

Do đó, mục đích của tiêu chuẩn này là cung cấp hướng dẫn và các yêu cầu cho phép phát hiện các trình tự axit nucleic quan tâm bằng kỹ thuật microarray. Thông tin này liên quan đến:

- việc thiết lập biện pháp xác nhận đối với các phương pháp dựa trên ADN chip, và
- xác định các nguyên tắc chung được sử dụng khi thực hiện các phép phân tích trong phòng thử nghiệm.

Kỹ thuật microarray được phát triển từ phương pháp "Southern blot"; nguyên tắc chính là lai tạo giữa hai dải ADN, bằng cách kết hợp chính xác các trình tự axit nucleic. ADN chip là một tập hợp của các điểm ADN siêu nhỏ gắn vào cơ chất rắn hoặc các hạt đã mã hóa. Nói chung sự phát triển của phép thử microarray cần để thiết kế các đoạn dò ADN, sắp xếp các đoạn dò ADN vào cơ chất, đánh dấu các trình tự axit nucleic đích, lai các đích với các đoạn dò ADN và xây dựng một hệ thống phát hiện phù hợp. Hiện có nhiều kiểu array và có rất nhiều cách để tạo ra microarray. Tùy thuộc vào các kỹ thuật đánh dấu đích được sử dụng, việc lai có thể phát hiện được bằng tín hiệu điện, hiện màu và/hoặc huỳnh quang.

Vào thời điểm công bố ISO 16578, thực hành tốt và các tiêu chuẩn thể hiện dữ liệu và thông tin tối thiểu đã được xây dựng để so sánh và khả năng lặp lại dữ liệu microarray. Tuy nhiên, chỉ có một vài tài liệu được xuất bản nhưng vẫn tập trung vào độ tin cậy và khả năng so sánh của các phương pháp microarray đã nêu và trong trường hợp này việc đánh giá xác nhận của một phòng thử nghiệm đơn lẻ chắc chắn sẽ không đủ. Thay vào đó, cần có đánh giá xác nhận phương pháp liên phòng thử nghiệm, theo các hướng dẫn quốc tế cụ thể.

CHÚ THÍCH 1 Cơ quan kiểm soát Chất lượng Microarray (MAQC) cung cấp nguồn để xác định các thực hành tốt microarray, bao gồm việc sử dụng mẫu chuẩn, bộ dữ liệu và các định dạng.

Xem <http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/MicroarrayQualityControlProject/default.htm>

CHÚ THÍCH 2 Thông tin tối thiểu về thực nghiệm Microarray (MIAME), bằng cách thiết lập các tiêu chuẩn thông dụng để mô tả dữ liệu microarray, hệ thống quản lý dữ liệu, truyền dữ liệu, công khai nơi cất giữ bảo quản và khai thác dữ liệu, hỗ trợ thông tin chi tiết mà các nhà nghiên cứu cần có để giải thích quy trình và mục đích sinh học với dữ liệu microarray.

Xem <http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html>

Các yêu cầu chung đối với việc phát hiện ADN cũng có trong các tiêu chuẩn sau đây: TCVN 7605 (ISO 21569), ISO 21570, TCVN 7606 (ISO 21571), TCVN 11134 (ISO 22174) và TCVN 7608 (ISO 24276).

Phân tích dấu ấn sinh học phân tử - Định nghĩa và các yêu cầu chung đối với việc phát hiện các trình tự axit nucleic đặc hiệu bằng microarray

Molecular biomarker analysis - General definitions and requirements for microarray detection of specific nucleic acid sequences

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra các thuật ngữ về việc phát hiện trình tự axit nucleic cần tìm sử dụng các ADN chip để phát hiện axit nucleic.

Tiêu chuẩn này áp dụng cho tất cả các phương pháp sử dụng microarray để phát hiện các axit nucleic.

Tiêu chuẩn này quy định các quy trình xác nhận và các tham số của phép phân tích sinh học phân tử, bao gồm phát hiện và nhận biết các trình tự axit nucleic đặc thù.

Tiêu chuẩn này được xây dựng để cung cấp các khuyến nghị và quy tắc đối với:

- thiết kế và sản xuất microarray,
- đánh giá xác nhận lại đặc hiệu,
- đánh giá xác nhận liên phòng thử nghiệm đối với các phương pháp định tính,
- xác định các giới hạn phát hiện của microarray,
- xác định các dải tin hiệu tin cậy, và
- các tiêu chí đánh giá hiệu năng kỹ thuật của microarray platform.

Tiêu chuẩn này không bao gồm:

- quá trình đo định lượng;
- các yêu cầu chuẩn bị mẫu trước khi thực nghiệm ADN chip.

2 Tài liệu viện dẫn

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

TCVN 6165 (ISO/IEC Guide 99) *Từ vựng quốc tế về đo lường học – Khái niệm, thuật ngữ chung và cơ bản*

TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung*

TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn*

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

TCVN 11134 (ISO 22174) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để phát hiện vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm – Định nghĩa và yêu cầu chung*

TCVN ISO/IEC 17025:2007 (ISO/IEC 17025:2005) *Yêu cầu chung về năng lực của phòng thử nghiệm và hiệu chuẩn*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa trong TCVN 6910-1 (ISO 5725-1), TCVN 6910-2 (ISO 5725-2), TCVN/ISO/IEC 17025 (ISO/IEC 17025), TCVN 7608 (ISO 24276) cùng với các thuật ngữ và định nghĩa sau:

3.1

Giới hạn phát hiện đối với microarray platform (limit of detection for microarray platform)

LODP

Lượng tương đối thấp nhất của chất ngoại chuẩn (hoặc mẫu chuẩn) có thể phát hiện được bằng thực nghiệm với mức tin cậy 95 %, cho số bản sao và/hoặc nồng độ chất ngoại chuẩn (hoặc mẫu chuẩn) xác định (xác định/ước lượng được).

3.2

Dài tín hiệu tin cậy (range of reliable signal)

Khả năng (trong dài nhất định) cung cấp các kết quả tỉ lệ thuận với nồng độ và/hoặc số bản sao của chất ngoại chuẩn (hoặc mẫu chuẩn).

3.3

ADN Chip (DNA microarray/DNA chip)

Cơ chất rắn, nơi tập hợp các đoạn dò ADN được sắp xếp theo thiết kế cụ thể được gắn với mật độ cao, trực tiếp hoặc gián tiếp, để phân tích một lượng lớn vật liệu sinh học bằng cách sử dụng phương pháp sàng lọc với số lượng lớn.

3.4

Đoạn dò ADN (probe DNA)

Sợi đơn axit nucleic có trình tự xác định dùng để nhận diện các đoạn axit nucleic khác có trình tự bổ sung với nó.

3.5

Platform (platform)

Thiết bị hỗ trợ công nghệ microarray (hoặc DNA chip).

3.6

Phát hiện huỳnh quang (fluorescence detection)

Phương pháp phát hiện lai sử dụng đoạn dò ADN cố định bằng đo tín hiệu huỳnh quang.

3.7

Phát hiện màu (colorimetric detection)

Phương pháp phát hiện lai sử dụng đoạn dò ADN cố định bằng đo tín hiệu màu.

3.8

Phát hiện điện hóa (electrochemical detection)

Phương pháp phát hiện lai bằng cách đo dòng điện của một điện cực mà trên đó đoạn dò ADN được cố định.

3.9

Chất ngoại chuẩn (external measurement standard)

Vật liệu hoặc cơ chất được chuẩn bị để kiểm tra tính tương thích của phương pháp phân tích dựa trên microarray, có giá trị đặc tính nhận được là giá trị đồng thuận dựa trên phép thử nghiệm cộng tác dưới sự bảo trợ của một nhóm khoa học hoặc kỹ thuật.

3.10

Lai chéo (cross-hybridization)

Sự gắn kết không đặc hiệu của đoạn dò ADN vào axit nucleic không phải đích.

4 Nguyên tắc

4.1 Phép thử microarray platform

Ví dụ về phép thử microarray platform gồm:

- biến tính ADN sợi đơn hoặc sợi đôi hoặc ARN cần phân tích,
- lai đích với đoạn dò ADN đã được gắn vào cơ chất rắn,
- phát hiện lai bằng các tín hiệu điện, hiện màu và/hoặc huỳnh quang, và
- phân tích dữ liệu.

Phòng thử nghiệm phải sử dụng các chất ngoại chuẩn (hoặc mẫu chuẩn) và thực hiện các phép kiểm chứng phù hợp với bước đo microarray trong quá trình kiểm tra xác nhận. Những yêu cầu này bao gồm kiểm tra xác nhận các phương pháp dựa trên phương pháp ADN chip cũng giúp làm rõ việc giải thích các kết quả.

4.2 Thiết kế và chế tạo microarray

Phân tích microarray cần sử dụng các kiểu đoạn dò ADN và cần được thiết kế sao cho có thể kiểm tra xác nhận được.

Thiết kế có các đoạn dò ADN để phát hiện

- các chất ngoại chuẩn (hoặc mẫu chuẩn),
- kiểm chứng dương,
- kiểm chứng âm, và
- trình tự axit nucleic quan tâm.

Đoạn dò ADN cố định phải được sao chép ít nhất ở các vị trí hai lần lặp lại. Các đoạn dò ADN được thiết kế phải tính đến giá trị T_m , tỷ lệ GC và tính đặc hiệu của trình tự. Trình tự cần được mô tả. Để tránh sự nhầm lẫn giữa các nucleotid base, chữ 'g' sẽ được sử dụng để phân biệt rõ giữa 'G' và 'C' trong mô tả (nghĩa là C, g, A và T phải được sử dụng để chỉ ra các base). Chất lượng của đoạn dò ADN phải được đảm bảo bằng một phương pháp thích hợp (phân tích quang phổ, phân tích khối phổ, v.v.).

4.4.3 Dài tín hiệu tin cậy

Dài tín hiệu tin cậy là dài áp dụng của phương pháp cần biết trước về số bản sao và/hoặc nồng độ (đã xác định/đã ước lượng được) của chất ngoại chuẩn (hoặc mẫu chuẩn) ở mức tin cậy 95 %. Các giá trị này cần được thiết lập thông qua phép thử liên phòng sử dụng các mẫu chuẩn hoặc mẫu chuẩn được chứng nhận phù hợp. Thông tin cũng có thể được lấy từ các nghiên cứu nội phòng thử nghiệm như là một biện pháp tạm thời.

4.4.4 Mẫu thử

Dung dịch hoặc chất chiết có chứa các phân tử ADN/ARN thích hợp với lĩnh vực áp dụng được chuẩn bị sao cho không có ức chế việc lai hoặc gây nhiễu với detector điện, hiện màu và/hoặc huỳnh quang.

4.4.5 Hệ thống đo

Các dụng cụ bao gồm máy chu trình nhiệt, tủ lai hoặc các thiết bị lai khác, máy quét ADN chip và thiết bị hoặc dụng cụ để đo tình trạng nguyên vẹn và nồng độ ADN/ARN phải được hiệu chuẩn theo TCVN/ISO/IEC 17025. Điều này bao gồm các tiêu chí lựa chọn cài đặt dụng cụ, thiết bị (ví dụ như cài đặt nền, cài đặt chuẩn hóa).

Mọi phép tính hoặc mô hình được sử dụng để lấy kết quả phân tích cần được đánh giá xác nhận.

4.4.6 Ước tính độ không đảm bảo đo

Độ không đảm bảo đo phát sinh từ nhiều nguồn, bao gồm cơ mẫu phòng thử nghiệm, việc lấy mẫu thử từ mẫu phòng thử nghiệm, đo nồng độ axit nucleic trong các phần chiết và lấy mẫu ADN/ARN trong các phản ứng, cũng như độ biến thiên phép phân tích ^[1]. Ước tính độ không đảm bảo của phép đo có thể được lấy từ nghiên cứu nội phòng/liên phòng thử nghiệm hoặc từ các ước tính của các thành phần, như trong TCVN/ISO/IEC 17025.

4.4.7 Thuốc thử microarray

Các đặc tính và chất lượng của thuốc thử [thuốc nhuộm huỳnh quang, enzym phiên mã ngược, dung dịch đệm v.v...] và lượng chất ngoại chuẩn (hoặc mẫu chuẩn) được thêm vào hỗn hợp phản ứng phải được đánh giá xác nhận.

5 Biểu thị kết quả

5.1 Yêu cầu chung

Không biểu thị kết quả dạng ký hiệu + và -.

Không biểu thị kết quả âm tính dưới dạng “không có trình tự đích”.

4.3 Đánh giá hiệu lực lai đặc hiệu

4.3.1 Đánh giá lý thuyết về tính đặc hiệu

Đánh giá lý thuyết về đoạn dò ADN bao gồm sàng lọc một hoặc nhiều cơ sở dữ liệu trình tự axit nucleic chính (xem Refseq: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) bằng tìm kiếm trình tự tương đồng (BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, chương trình SSEARCH bộ chương trình FASTA, v.v..). Cần lựa chọn các trình tự đặc hiệu mà không tạo lai chéo. Những trình tự này cần được kiểm tra bằng thực nghiệm.

4.3.2 Đánh giá thực nghiệm tính đặc hiệu

Tính đặc hiệu của đoạn dò ADN cần được đánh giá xác nhận bằng thực nghiệm trên các mẫu có các trình tự axit nucleic tương tự như trình tự đích, cũng như trên các sinh vật đã được xác định qua việc đánh giá lý thuyết về tính đặc hiệu như tính đẳng dòng trình tự có mặt có khả năng gây ra các lai chéo. Các điều kiện thử nghiệm phải giống như những điều kiện thường áp dụng trong phòng thử nghiệm.

4.3.3 Đánh giá thực nghiệm về lai chéo

Quá trình đánh giá xác nhận phải chứng minh là không có sự lai chéo xảy ra trên đoạn dò ADN có khả năng phát hiện được bằng thực nghiệm bằng chất ngoại chuẩn (hoặc mẫu chuẩn) trong nền mẫu. Các kết quả được chấp nhận nếu các đoạn dò ADN để phát hiện chất ngoại chuẩn (hoặc mẫu chuẩn) là dương tính và các đoạn dò ADN để phát hiện các kiểm chứng âm là âm tính.

4.4 Đánh giá xác nhận liên phòng thử nghiệm về các phương pháp định tính

4.4.1 Yêu cầu chung

Về bản chất, các kết quả phép thử định tính chỉ có câu trả lời có/không. Tuy nhiên, việc xác định dải áp dụng của phương pháp là cần thiết trong nghiên cứu đánh giá xác nhận. Phương pháp này chỉ áp dụng được trong dải đó.

4.4.2 Giới hạn phát hiện đối với microarray platform (LODP)

Trong trường hợp sử dụng microarray, không thực hiện xác định giới hạn phát hiện (LOD) của từng đích cần thăm dò. Nếu yêu cầu LOD của các đích riêng rẽ, ngoại chuẩn (hoặc chuẩn đối chứng) thì có thể được sử dụng để xác định giới hạn của một dãy đích đại diện trên nền mẫu cụ thể.

LODP thực nghiệm có liên quan đến phần mẫu thử, chất lượng/số lượng của chất phân tích và LODP tuyệt đối của phương pháp. Các giá trị này phải được thiết lập thông qua thử nghiệm liên phòng sử dụng các mẫu đối chứng và mẫu kiểm chứng phù hợp và mức thấp nhất của chất ngoại chuẩn (hoặc mẫu chuẩn) thu được từ thực nghiệm phải có tỷ lệ âm tính giả nhỏ hơn hoặc bằng 5 %.

5.2 Biểu thị kết quả âm

Các câu sau đây hoặc tương ứng phải được thể hiện trong báo cáo thử nghiệm.

Trình tự đích Y ADN/ARN (đặc hiệu) không phát hiện được.

LODP của phương pháp là X được xác định bằng ABC (mô tả chất ngoại chuẩn).

5.3 Biểu thị kết quả dương

Các câu sau đây hoặc tương ứng phải được thể hiện trong báo cáo thử nghiệm.

Trình tự đích Y ADN/ARN (đặc hiệu) đã phát hiện được.

Có thể bao gồm cả việc nhận dạng đích, nếu biết.

Có thể gồm cả nhận dạng GMO, nếu biết.

5.4 Biểu thị kết quả không xác định

Phương pháp đã được đánh giá xác nhận bao gồm các tiêu chí mà từ đó kết quả đo quan sát được có thể được chấp nhận là có giá trị. Các tiêu chí chấp nhận/không chấp nhận đối với phép phân tích phải được mô tả.

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm thông tin về độ lệch chuẩn lặp lại và độ lệch chuẩn tái lập.

Khi ít nhất một phần thử nghiệm cho kết quả không xác định, thì lặp lại phép phân tích.

Nếu việc lặp lại của phép phân tích xác nhận kết quả không xác định, thì báo cáo thử nghiệm phải gồm các thông tin sau:

- "Kết quả không xác định";
- lý do không thể thu được kết quả cuối cùng (ví dụ: ảnh hưởng chất ức chế, các chất gây nhiễu v.v...).

6 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo phải được thực hiện như được quy định trong các tiêu chuẩn áp dụng (ví dụ TCVN ISO/IEC 17025).

Báo cáo thử nghiệm phải ít nhất bao gồm các thông tin sau:

- mọi thông tin cần thiết cho việc nhận biết đầy đủ về mẫu;
- ngày nhận mẫu;

TCVN 11934:2017

- mọi thông tin cụ thể liên quan đến mẫu phòng thử nghiệm và bất kỳ hạn chế kèm theo có thể áp dụng;
- mọi thông tin liên quan đến mẫu thử nghiệm (loại, số lượng mẫu);
- các điều kiện liên quan đến vận chuyển mẫu, cũng như bảo quản, nếu có;
- ngày và quy trình lấy mẫu được sử dụng, nếu có;
- mô tả phương pháp chiết axit nucleic đã sử dụng;
- nhận biết phương pháp phân tích và mô tả chung về quy trình microarray là cơ sở của phương pháp phân tích;
- kiểm chứng dương và kiểm chứng âm;
- loại chất ngoại chuẩn (hoặc mẫu chuẩn);
- kết quả LODP thực nghiệm và dải tín hiệu tin cậy đối với phép phân tích phát hiện;
- cách tính toán và mô hình sử dụng để thu được kết quả phân tích;
- các điểm quan sát được trong quá trình thử nghiệm.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 9595-3 (ISO/IEC GUIDE 98-3) *Độ không đảm bảo đo – Phần 3: Hướng dẫn trình bày độ không đảm bảo đo (GUM:1995)*
-