

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 7605-2:2017
ISO/TS 21569-2:2012**

Xuất bản lần 1

**PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH DẤU ẤN SINH HỌC PHÂN TỬ
- PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH ĐỂ PHÁT HIỆN SINH VẬT
BIẾN ĐỔI GEN VÀ SẢN PHẨM CÓ NGUỒN GỐC BIẾN ĐỔI
GEN - PHẦN 2: PHƯƠNG PHÁP REAL-TIME PCR ĐẶC
HIỆU CẤU TRÚC ĐỂ PHÁT HIỆN SỰ KIỆN FP967 CỦA
DÒNG HẠT LẠNH VÀ SẢN PHẨM TỪ HẠT LẠNH**

Horizontal methods for molecular biomarker analysis - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products -- Part 2: Construct-specific real-time PCR method for detection of event FP967 in linseed and linseed products

HÀ NỘI - 2017

Lời nói đầu

TCVN 7605-2:2017 hoàn toàn tương đương với ISO/TS 21569-2:2012;

TCVN 7605-2:2017 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.

TCVN 7605 (ISO 21569) *Phương pháp phân tích dấu ấn sinh học phân tử – Phương pháp phân tích để phát hiện sinh vật biến đổi gen và sản phẩm có nguồn gốc biến đổi gen* gồm có các tiêu chuẩn sau:

- TCVN 7605:2007 (ISO 21569:2005)⁷⁾ *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*
- TCVN 7605-2:2017 (ISO 21569-2:2012) *Phương pháp phân tích dấu ấn sinh học phân tử – Phương pháp phân tích để phát hiện sinh vật biến đổi gen và sản phẩm có nguồn gốc biến đổi gen*
- Phần 2: *Phương pháp real-time PCR đặc hiệu cấu trúc để phát hiện sự kiện FP967 của dòng hạt lạnh và sản phẩm từ hạt lạnh.*
- TCVN 7605-3:2017 (ISO 21569-3:2015) *Phương pháp phân tích dấu ấn sinh học phân tử Phương pháp phân tích để phát hiện sinh vật biến đổi gen và sản phẩm có nguồn gốc biến đổi gen*
- Phần 3: *Phương pháp real-time PCR đặc hiệu cấu trúc để phát hiện trình tự P35S-Pat trong sàng lọc sinh vật biến đổi gen*

Bộ tiêu chuẩn ISO 21569 *Horizontal methods for molecular biomarker analysis – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products* còn có các tiêu chuẩn sau:

- ISO/TS 21569-4:2016 *Horizontal methods for molecular biomarker analysis – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Part 4: Real-time PCR based screening methods for the detection of the P-nos and P-nos-nptII DNA sequences*
- ISO/TS 21569-5:2016 *Horizontal methods for molecular biomarker analysis – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Part 5: Real-time PCR based screening method for the detection of the FMV promoter (P-FMV) DNA sequence*
- ISO/TS 21569-6:2016 *Horizontal methods for molecular biomarker analysis – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Part 6: Real-time PCR based screening methods for the detection of cry1Ab/Ac and Pubi-cry DNA sequences*

⁷⁾ ISO 21569:2005 đang được soát xét để trở thành ISO 21569-1

**Phương pháp phân tích dấu ấn sinh học phân tử -
Phương pháp phân tích để phát hiện sinh vật biến đổi gen
và sản phẩm có nguồn gốc biến đổi gen -
Phần 2: Phương pháp real-time PCR đặc hiệu cấu trúc để phát
hiện sự kiện FP967 của dòng hạt lanh và sản phẩm từ hạt lanh**

Horizontal methods for molecular biomarker analysis –

Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products –

Part 2: Construct-specific real-time PCR method for detection of event FP967

in linseed and linseed products

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định quy trình phát hiện trình tự ADN của dòng hạt lanh (*Linum usitatissimum*) biến đổi gen (sự kiện FP967, còn được gọi là "CDC Triffid"). Với mục đích này, ADN đã chiết được sử dụng trong real-time PCR và sự biến đổi gen (GM) được phát hiện bằng khuếch đại trình tự ADN 105 bp thể hiện sự chuyển đổi giữa đoạn gen kết thúc của nopalín synthase (*Tnos*) từ *Agrobacterium tumefaciens* và gen khử dihydrofolat (*dfrA1*) từ integron nhóm 1 của *Escherichia coli*.

Phương pháp này có thể áp dụng để phân tích ADN được chiết từ thực phẩm, cũng có thể thích hợp để phân tích ADN chiết từ các sản phẩm khác như thức ăn chăn nuôi và các loại hạt. Để áp dụng được phương pháp này yêu cầu phải chiết một lượng ADN vừa đủ để có thể khuếch đại từ nền mẫu thích hợp cho mục đích phân tích.

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 7605 (ISO 21569) *Thực phẩm – Phương pháp phân tích để phát hiện sinh vật biến đổi gen và sản phẩm có nguồn gốc biến đổi gen – Phương pháp dựa trên định tính axit nucleic*

TCVN 7605-2:2017

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

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

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa trong TCVN 7608 (ISO 24276).

4 Nguyên tắc

ADN được chiết ra khỏi mẫu thử bằng phương pháp thích hợp. Phân tích ADN gồm hai phần:

- a) Đánh giá xác nhận số lượng, chất lượng và khả năng khuếch đại của ADN chiết được, ví dụ bằng real-time PCR đặc hiệu taxon đích với mỗi khuếch đại đoạn 68 bp từ gen 2 desaturase protein mang stearoyl-acyl (SAD) đặc hiệu của hạt lanh (*Linum usitatissimum*) (Tài liệu tham khảo [1]).
- b) Phát hiện cấu trúc *Tnos-dfr* trong real-time PCR (Tài liệu tham khảo [1]).

5 Thuốc thử và vật liệu thử

Sử dụng hóa chất loại phân tích đã được công nhận, phù hợp với sinh học phân tử như theo quy định. Nước sử dụng phải được cất hai lần hoặc có chất lượng phù hợp. Trừ khi có quy định khác, các dung dịch cần được chuẩn bị bằng cách hòa tan thuốc thử tương ứng trong nước và khử trùng bằng hấp áp lực. Tất cả các thao tác có sử dụng gang, thì cần đảm bảo rằng gang tay không có bột. Việc sử dụng đầu typ pipet bảo vệ sol khí là để tránh lây nhiễm chéo.

5.1 Thuốc thử PCR

5.2.1 ADN polymerase chịu nhiệt (dùng cho hot-start PCR).

5.2.2 Dung dịch đệm PCR (chứa magie clorua và deoxyribonucleoside triphosphate dATP, dCTP, dGTP và dUTP).

Có thể sử dụng các hỗn hợp thuốc thử đã pha sẵn hoặc các thành phần riêng lẻ. Có thể sử dụng các thuốc thử và polymerase cho kết quả tương tự hoặc tốt hơn.

5.2.3 Oligonucleotid (xem Bảng 1).

Bảng 1 – Các oligonucleotid

Tên	Trình tự ADN của các oligonucleotid	Nồng độ cuối trong PCR
Cấu trúc <i>Tnos-dfr</i> làm trình tự đích (Tài liệu tham khảo [1]):		
NOST-Spec FW	5'-AgC gCg CAA ACT Agg ATA AA-3'	800 nmol/l
NOST-Spec RV	5'-ACC TTC Cgg CTC gAT gTC TA-3'	800 nmol/l
Đoạn dò NOST-Spec	5'-(FAM)-CgC gCg Cgg TgT CAT CTA Tg-(BHQ)-3' ^a	100 nmol/l
^a FAM: 6-Carboxyfluorescein, BHQ: Black hole quencher.		

CHÚ THÍCH Thuốc nhuộm reporter và/hoặc thuốc nhuộm quencher tương đương có thể được sử dụng cho đoạn dò nếu chúng cho kết quả tương tự hoặc tốt hơn.

5.2.4 ADN chuẩn để hiệu chuẩn

Dung dịch ADN chuẩn có nồng độ đã biết (ng/μl) được sử dụng để tính số lượng bản sao của trình tự đích *Tnos-dfr*.

Khi sử dụng ADN hệ gen của hạt lạnh làm ADN chuẩn, thì số đương lượng gen đơn bội trên microlit, n_{hgEq} , phải được tính dựa vào khối lượng phân tử của gen đơn bội hạt lạnh xấp xỉ 0,7 pg (Tài liệu tham khảo [2]) và sử dụng Công thức (1):

$$n_{hgEq} = \frac{[ADN] \times 1000}{m_{hg}} \quad (1)$$

Trong đó:

[ADN] là nồng độ ADN tính bằng nanogram trên microlit, (ng/μl);

m_{hg} là khối lượng gen đơn bội, tính bằng picogram (pg).

Trong phép thử nghiệm cộng tác, plasmid đã được sử dụng làm ADN chuẩn, có chứa một bản sao của đoạn *Tnos-dfr* 105 bp và đoạn gen SAD lớn 68 bp, tương ứng. Do chưa biết số tích hợp chính xác của cấu trúc *Tnos-dfr* trong sự kiện FP967 hạt lạnh tại thời điểm xây dựng tiêu chuẩn này, nên hàm lượng biến đổi gen đã tính chỉ là ước tính dựa trên giả định rằng trình tự đích hiện có là bản sao duy nhất cho mỗi gen đơn bội.

6 Thiết bị, dụng cụ

Đối với thiết bị, dụng cụ và vật liệu thử, xem TCVN 7605 (ISO 21569). Ngoài các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường cần có các thiết bị sau:

6.1 Thiết bị PCR

Thiết bị real-time PCR thích hợp cho việc kích thích các phân tử huỳnh quang và phát hiện các tín hiệu huỳnh quang tạo ra trong quá trình chạy PCR.

7 Lấy mẫu

Tất cả các mẫu phải được xác định rõ ràng.

8 Cách tiến hành

8.1 Chuẩn bị mẫu thử

Cần đảm bảo rằng mẫu thử được sử dụng để chiết ADN là mẫu đại diện của phòng thử nghiệm, ví dụ bằng cách nghiền hoặc đồng hóa mẫu. Xem trình tự đo và thực hiện theo quy định trong TCVN 7606 (ISO 21571) và TCVN 7608 (ISO 24276).

8.2 Chuẩn bị chất chiết ADN

Liên quan đến việc chuẩn bị ADN từ mẫu thử, cần tuân theo các hướng dẫn chung và các phép đo được mô tả trong TCVN 7606 (ISO 21571). Nên chọn phương pháp chiết ADN được mô tả trong Phụ lục A, TCVN 7606:2007 (ISO 21571:2005).

8.3 Chiết ADN

Nên thực hiện việc chiết ADN bằng phương pháp CTAB với 1 g phần mẫu thử đồng nhất [xem A.3.1, TCVN 7606:2007 (ISO 21571:2005)].

Vi yêu cầu về độ tinh khiết nên cần thực hiện thêm bước tinh sạch (lọc gel, ví dụ dùng cột micro spin).

Có thể sử dụng các phương pháp chiết và tinh sạch khác (ví dụ: hệ thống bộ kit thử), sử dụng các phần mẫu thử nhỏ hơn, nếu cần (Tài liệu tham khảo [1]).

8.4 Cài đặt PCR

Phương pháp này quy định tổng thể tích là 25 µl trên mỗi phản ứng PCR. Sử dụng thuốc thử nêu trong Bảng 2.

Thuốc thử đã rã đông hoàn toàn ở nhiệt độ phòng và cần được ly tâm nhanh trước khi sử dụng. Mỗi thuốc thử phải được trộn cẩn thận ngay trước khi lấy bằng pipet. Hỗn hợp thuốc thử được chuẩn bị có chứa tất cả các thành phần trừ mẫu ADN. Lượng hỗn hợp thuốc thử PCR phụ thuộc vào số phản ứng cần thực hiện, nên lấy thêm ít nhất một lượng cho phản ứng bổ sung bằng pipet để dự phòng. Sử dụng thể tích mẫu ADN là 5 µl.

Bảng 2 – Bổ sung thuốc thử

Tổng thể tích phản ứng	25 µl
Mẫu ADN (đến 200 ng) hoặc mẫu kiểm chứng	5 µl
Dung dịch đệm PCR ^a (bao gồm MgCl ₂ , dNTP và hot-start ADN polymerase)	12,5 µl
Mỗi	Xem Bảng 1
Đoạn dò	Xem Bảng 1
Nước	Thêm để thu được 25 µl
^a Trong nghiên cứu cộng tác, TaqMan Universal Mastermix (Applied Biosystems) được sử dụng làm dung dịch đệm PCR. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng chúng. Các sản phẩm tương tự từ các nhà sản xuất khác có thể được sử dụng nếu chúng cho kết quả tương đương hoặc tốt hơn. Nếu cần, đối chứng với lượng chất thử và chương trình nhiệt độ-thời gian.	

Trộn hỗn hợp thuốc thử bằng ly tâm nhanh và dùng pipet cho 20 µl vào mỗi bình phản ứng. Để kiểm soát thuốc thử PCR, thêm 5 µl nước vào bình phản ứng tương ứng. Dùng pipet lấy 5 µl mẫu ADN hoặc 5 µl dung dịch kiểm chứng (kiểm soát chiết mẫu trắng, kiểm soát ADN đích dương tính). Nếu cần, chuẩn bị kiểm soát ức chế PCR như trong TCVN 7608 (ISO 24276).

Chuyển các ống phản ứng vào máy chu trình nhiệt và khởi động chương trình nhiệt độ-thời gian.

8.5 Chương trình nhiệt độ-thời gian

Chương trình nhiệt độ-thời gian nêu trong Bảng 3, đã được sử dụng trong nghiên cứu đánh giá xác nhận và được sử dụng kết hợp với TaqMan Universal Mastermix. Việc sử dụng các điều kiện phản ứng và các máy chu trình real-time PCR khác nếu cần phải tối ưu hóa. Thời gian biến tính ban đầu phụ thuộc vào hỗn hợp ban đầu được sử dụng.

Bảng 3 – Chương trình nhiệt độ-thời gian

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

9 Tiêu chí chấp nhận/từ chối

Chương trình phân tích dữ liệu thiết bị đặc hiệu real-time PCR tương ứng được sử dụng để nhận biết các sản phẩm PCR. Các kết quả khuếch đại có thể được đưa ra theo cách khác, tùy thuộc vào thiết bị được sử dụng. Trong trường hợp không có sản phẩm PCR được phát hiện (kết quả âm tính), ví dụ "chưa xác định", "không khuếch đại được" hoặc số chu trình tối đa được đưa ra trong báo cáo. Nếu việc khuếch đại trình tự đích ADN xảy ra trong mẫu (kết quả dương tính), thì có thể quan sát được đường

khuếch đại hình chữ S và số lượng chu trình được tính mà tại đó giá trị huỳnh quang xác định trước bị vượt quá ngưỡng (giá trị C_1 hoặc giá trị C_p).

Nếu số liệu tín hiệu đo lường huỳnh quang không điển hình, thì việc giải thích tự động không mang lại kết quả có nghĩa, cần có thể phải thiết lập thủ công đường nền và ngưỡng trước khi giải thích dữ liệu. Trong trường hợp này, áp dụng các hướng dẫn cho thiết bị cụ thể nêu trong sổ tay dùng phần mềm giải thích.

9.1 Nhận biết

Trình tự đích coi như phát hiện được, nếu:

- khi sử dụng các môi đặc hiệu *Tnos-dfr* NOST-Spec FW và NOST-Spec RV và đoạn dò NOST-Spec, thì có thể quan sát thấy đường khuếch đại hình chữ S và giá trị huỳnh quang xác định trước đã bị vượt quá ngưỡng.
- khi sử dụng real-time PCR đặc hiệu của hạt lạnh (Tài liệu tham khảo [1]), thì có thể quan sát thấy đường khuếch đại hình chữ S và giá trị huỳnh quang xác định trước đã bị vượt quá ngưỡng.
- việc thiết lập kiểm soát PCR không bổ sung ADN (kiểm soát thuốc thử PCR, kiểm soát chiết âm tính), thì không quan sát thấy đường khuếch đại hình chữ S và giá trị huỳnh quang xác định trước không bị vượt quá ngưỡng và
- việc thiết lập kiểm soát khuếch đại (kiểm soát ADN đích dương tính, kiểm soát ức chế PCR) thì thu được các giá trị C_1 dự kiến (hoặc giá trị C_p).

10 Thực trạng đánh giá xác nhận và tiêu chí hiệu năng

10.1 Độ chắc chắn của phương pháp

Độ chắc chắn của phương pháp chưa được kiểm tra qua những thay đổi nhỏ các yếu tố như nồng độ thuốc thử (ví dụ đoạn môi, đoạn dò) hoặc các điều kiện phản ứng (ví dụ: nhiệt độ gắn môi).

CHÚ THÍCH Trong phép thử cộng tác, độ chắc chắn của phương pháp đã được kiểm tra bằng các máy real-time PCR khác nhau (ABI 7500, ABI 7700, ABI 7900, RotorGene 3000, RotorGene 6000, LightCycler 480)¹⁾. Máy real-time PCR không ảnh hưởng đến hiệu năng của phương pháp.

10.2 Phép thử nội phòng thử nghiệm

Các thử nghiệm với ADN được chiết từ hạt FP967 đã được thực hiện bởi Phòng thử nghiệm chuẩn của Liên minh Châu Âu về Thực phẩm và Thức ăn chăn nuôi biến đổi gen (EURL-GMFF) để đánh giá xác nhận tính đặc hiệu và độ nhạy của phương pháp xác định cấu trúc đặc hiệu (Tài liệu tham khảo [1]). Việc thực nghiệm kiểm tra tính đặc hiệu cho thấy rằng phép thử PCR xác định cấu trúc đặc hiệu của

¹⁾ Ví dụ về sản phẩm có bán sẵn. thông tin này đưa ra tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng chúng.

Tnos-dfr không phát hiện được các sự kiện biến đổi gen khác trong các điều kiện được thực nghiệm. Giới hạn của phương pháp phát hiện được thiết lập trong 60 PCR lặp lại ở từng 50, 25, 10, 5, 1 và 0,1 bản sao của trình tự đích (theo lý thuyết) cho thấy 60 phản ứng dương tính với 5 bản sao và 58 phản ứng dương tính với 1 bản sao.

10.3 Phép thử cộng tác

Phương pháp này được đánh giá xác nhận trong nghiên cứu cộng tác (Tài liệu tham khảo [3]) do tổ chức Bảo vệ Người tiêu dùng và An toàn Thực phẩm Liên bang Đức (BVL) phối hợp theo chương trình IUPAC (Tài liệu tham khảo [4]) với tổng 11 phòng thử nghiệm tham gia. Các phòng thử nghiệm tham gia đã nhận được 14 mẫu ADN để phân tích. Các mẫu có nồng độ trình tự đích *Tnos-dfr* khác nhau. Tất cả các mẫu được đánh dấu bằng mã số ngẫu nhiên.

Để chuẩn bị các mẫu, ADN được tách từ hạt lạnh biến đổi gen sự kiện FP967 (mẫu chuẩn CDC-FLOOI-2 của Đại học California, Riverside/USA¹⁾), từ sản phẩm hạt lạnh biến đổi gen dương tính (mẫu trên thị trường từ CVUA, Freiburg¹⁾ cũng như sản phẩm từ hạt cải dầu không biến đổi gen (hạt cải dầu vụ đông, KWS¹⁾), hạt lạnh không biến đổi gen (LGL, Oberschleisheim¹⁾) hoặc bột khoai tây không biến đổi gen (ERM-BF421a từ IRMM, Geel¹⁾) và được sử dụng làm dung dịch ADN ban đầu. Nồng độ ADN được xác định bằng phương pháp quang phổ. Số bản sao được tính theo giả định kích cỡ gen là tích phân một bản sao trình tự đích trên mỗi gen đơn bội. Nồng độ ADN (pg/ μ l) được chia cho giá trị 1C trung bình được công bố đối với hạt lạnh (0,7 pg, Tài liệu tham khảo [2]), cải dầu (1,23 pg, Tài liệu tham khảo [5]) và khoai tây (1,8 pg, Tài liệu tham khảo [5]), tương ứng. ADN hạt cải dầu không biến đổi gen đã được điều chỉnh đến khoảng $4,8 \times 10^4$ bản sao trên 5 μ l; ADN hạt lạnh và khoai tây không biến đổi gen được điều chỉnh đến khoảng $5,0 \times 10^4$ bản sao hệ gen trên 5 μ l. Các dung dịch ADN khác nhau cuối cùng được chia cho 14 mẫu ADN đã mã hóa (cặp mẫu mù) cho từng phòng thử nghiệm tham gia trong phép thử cộng tác. Mỗi phòng thử nghiệm tham gia nhận được 2 lọ (cặp mẫu mù) chứa dung dịch ADN như sau:

- 100 % ADN FP967 (đã chỉnh đến nồng độ tính được của 10 bản sao trên 5 μ l dung dịch ADN)
- 100 % ADN FP967 (đã chỉnh đến nồng độ tính được của 50 bản sao trên 5 μ l dung dịch ADN)
- ADN hạt lạnh biến đổi gen dương tính từ mẫu trên thị trường (đã chỉnh đến $C_t = 30$ với 5 μ l dung dịch ADN)
- mẫu hạt lạnh biến đổi gen dương tính từ mẫu trên thị trường (đã chỉnh đến $C_t = 32$ với 5 μ l dung dịch ADN)
- ADN hạt cải dầu không biến đổi gen (đã chỉnh đến nồng độ tính được của 48 660 bản sao trên 5 μ l dung dịch ADN)
- ADN khoai tây không biến đổi gen (đã chỉnh nồng độ tính được của 50 000 bản sao trên 5 μ l dung dịch ADN)

– ADN hạt lạnh không biến đổi gen (được chỉnh đến tính nồng độ của 50 000 bản sao trên 5 µl dung dịch ADN).

Ngoài ra, tất cả các phòng thử nghiệm tham gia đã nhận được dung dịch ADN với ADN plasmid (plasmid Triffid FP967/CDC) (Genetic ID AG, Augsburg, Germany¹⁾) để tính số bản sao của cấu trúc *Tnos-dfr* trong các mẫu (nồng độ ADN plasmid tính được đầu tiên của 500 bản sao trên mỗi µl sau khi hoàn nguyên lycophilisate trong 100 µl nước không có nuclease). Trên cơ sở dung dịch ADN chuẩn, một dãy pha loãng 0,2 x TE được chuẩn bị bởi những bên tham gia để thu được các dung dịch ADN cho 5 điểm hiệu chuẩn (2 500, 500, 150, 50 và 10 bản sao của trình tự đích) cũng như dung dịch ADN để sử dụng để kiểm soát độ nhạy với 5 bản sao. Mỗi một mẫu đã được các phòng thử nghiệm tham gia trong phép xác định riêng rẽ với 5 µl của các dung dịch ADN bằng phương pháp real-time PCR *Tnos-dfr* trong các điều kiện quy định trong các Bảng 1 đến Bảng 3. Các dung dịch ADN để hiệu chuẩn cũng như dung dịch ADN plasmid với 5 bản sao đã được đo bằng PCR lặp lại hai lần. Việc đo được thực hiện bằng các máy real-time PCR khác nhau (xem 10.1). Các kết quả của nghiên cứu thử nghiệm cộng tác được liệt kê trong Bảng 4 và Bảng 5.

Bảng 4 – Kết quả phép thử cộng tác

Năm thực hiện phép thử cộng tác	2009
Số lượng phòng thử nghiệm	11
Số lượng phòng thử nghiệm đưa ra kết quả	11
Số lượng mẫu cho mỗi phòng thử nghiệm	14
Số lượng kết quả chấp nhận được	137 ^a
Số lượng mẫu chấp nhận được chứa trình tự đích <i>Tnos-dfr</i>	71
Số lượng mẫu chấp nhận được mà không chứa trình tự đích <i>Tnos-dfr</i>	66
Kết quả dương tính giả	0 (0 %)
Kết quả âm tính giả	1 (1,4 %)
^a Một phòng thử nghiệm báo cáo thể tích một mẫu không đủ; hai phòng thử nghiệm có kết quả của mẫu chứa trình tự đích <i>Tnos-dfr</i> đã được loại ra như là ngoại lệ.	

Để tính số bản sao tương ứng từ các giá trị C_t xác định được từ các mẫu, 5 dung dịch hiệu chuẩn ADN cùng với các mẫu được đo trong cùng lần phân tích PCR. Đường chuẩn được tạo ra bằng cách vẽ đồ thị giá trị C_t theo lôgarit của số bản sao trình tự đích được cung cấp cho các dung dịch hiệu chuẩn. Số lượng bản sao tương ứng với các mẫu, cũng như dung dịch ADN Plasmid với 5 bản sao, được tính bằng nội suy từ đường chuẩn (Tài liệu tham khảo [6]). Trong Bảng 5, đưa ra tóm tắt các kết quả. Trước khi tính số bản sao trung bình và dữ liệu độ chụm (Tài liệu tham khảo [6]), các phép kiểm tra thống kê khác nhau đã được sử dụng để xác định ngoại lệ. Dữ liệu của hai phòng thử nghiệm có số lượng bản sao cao nằm ngoài các giới hạn chấp nhận (Tài liệu tham khảo [3]). Do đó, việc tính số bản sao trung bình và hệ số biến thiên trong điều kiện tái lập, $C_{V,R}$, được tính bằng dữ liệu từ chín phòng thử nghiệm.

Bảng 5 – Các kết quả định lượng thu được trong phép thử cộng tác

Mẫu ADN	Số kết quả dương tính/kết quả tổng số	Số bản sao trung bình phát hiện ^a	$C_{V,R}^b$ (%)
100 % ADN FP967 (10 bản sao)	22/22	11	47
100 % ADN FP967 (50 bản sao)	21/22	40	24
ADN chiết được từ mẫu trên thị trường ($C_t = 30$)	22/22	314	19
ADN chiết được từ mẫu trên thị trường ($C_t = 32$)	22/22	66	29
ADN hạt cải dầu không biến đổi gen	0/22	0	—
ADN khoai tây không biến đổi gen	0/22	0	—
ADN hạt lanh không biến đổi gen	0/22	0	—

^a Số bản sao trung bình tính được từ các kết quả (sau khi đã loại trừ ngoại lệ)

^b Hệ số biến thiên trong các điều kiện tái lập (sau khi đã loại trừ ngoại lệ)

10.4 Độ nhạy

Trong Bảng 5, các kết quả phép thử cộng tác với các mẫu ADN cho thấy số bản sao trình tự đích *Tnos-dfr* thấp. ADN plasmid ở nồng độ của 5 bản sao/5 μ l tạo thành trong khuếch đại (trung bình $C_t = 35,6 \pm 1,9$) ở tất cả các phòng thử nghiệm. Trong một phòng thử nghiệm, việc khuếch đại chỉ phát hiện được trong một phép xác định. Ở 10 bản sao của trình tự đích, tín hiệu khuếch đại thu được trong tất cả các phòng thử nghiệm (trung bình $C_t = 34,2 \pm 1,4$).

Việc đánh giá xác nhận thực nghiệm đối với phương pháp xác định cấu trúc đặc hiệu *Tnos-dfr* của GMR-EURL cho thấy rằng giới hạn phát hiện là từ 1 đến 5 bản sao (Tài liệu tham khảo [1]).

10.5 Tính đặc hiệu

Tính đặc hiệu của đoạn mồi và đoạn dò đã được đánh giá xác nhận *in silico* sử dụng các liên kết trình tự của tìm kiếm dữ liệu trong ngân hàng gen GenBank/EMBL/DDBJ (ngày tìm kiếm: 2011-06-16). Với mục đích này, bằng cách sử dụng chương trình BLASTN và trình tự của sản phẩm PCR từ sự kiện FP967 (Tài liệu tham khảo [2]), để so sánh với các trình tự nucleotide trong GenBank (cơ sở dữ liệu "non-redundant" với tất cả GenBank, RefSeq, EMBL, DDBJ và PDB) và cơ sở dữ liệu về các trình tự nucleotid đã có bản quyền được cấp bằng sáng chế. Kết quả tìm kiếm cho thấy không hoàn toàn giống với các trình tự khác trong cơ sở dữ liệu ngoại trừ các oligonucleotid đích. Việc nhận biết trình tự amplicon chỉ tìm thấy với một đoạn xấp xỉ 60 bp là một phần của số lớn các vectơ chứa vùng kết thúc của gen tổng hợp nopaline. Tuy nhiên, trình tự của đoạn này chứa vị trí không liên kết đối với đoạn mồi ngược NOST-Spec RV. Việc tìm kiếm cơ sở dữ liệu với trình tự của đoạn mồi này liên quan đến việc nhận biết hoàn toàn với trình tự đưa vào gen *dfrA1* từ intergron nhóm 1 của *Escherichia coli*, nhưng không phù hợp với gen kháng spectinomycin/streptomycin (Tài liệu tham khảo [2]).

TCVN 7605-2:2017

Trong phép xác định thực nghiệm tính đặc hiệu sử dụng 50 ng đến 200 ng ADN trên mỗi phản ứng, không khuếch đại được ADN từ các thực vật biến đổi gen khác dưới đây, trừ ADN từ hạt lạnh sự kiện FP967 (Tài liệu tham khảo [1][3]):

- **Hạt cải biến đổi gen:** Rf1 (ACS-BN001-4), Rf2 (ACS-BN002-5), Rf3 (ACS-BN003-6), MSI (ACS-BN004-7), MS8 (ACS-BN005-8), GT73 (MON-00073-3), Oxy235 (ACS-BN011-5), T45 (HCN92) (ACS-BN008-2), Laurate 23-198 (CGN-89465-2)
- **Ngô biến đổi gen:** MIR162 (SYN-IR162-4), Bt (SYN-BT011-1), GA21 (MON- 00021-9), MIR604 (SYN-IR604-5), MON863 (MON- 00863-5), NK603 (MON- 00603-6), MON87460 (MON-87460-4), 3272 (SYN-E3272-5), MON89034 (MON-89034-3), MON88017 (MON-88017-3), DBT418 (DKB-89614-9), B16 (DLL25) (DKB-89790-5), CBH351 (ACS-ZM004-3), T14 (ACS-ZM002-1), MON810 (MON-00810-6), TC1507 (DAS-01507-1), DAS-59122-7 (DAS-59122-7)
- **Đậu tương biến đổi gen:** MON40-3-2 (MON- 04032-6), MON89788 (MON-89788-1)
- **Khoai tây biến đổi gen:** EH92-527-1 (BPS-25271-9), RBMT21-129 (NMK-89684-1)
- **Bông biến đổi gen:** MON1445 (MON- 01445-2), MON531 (MON- 00531-6), MON15985 (MON-15985-7)
- **Cỏ linh lăng biến đổi gen:** J101 (MON- 00101-8), J163 (MON- 00163-7)
- **Bí ngòi biến đổi gen:** ZW20 (SEM-0ZW20-7)

CHÚ THÍCH Tính đặc hiệu của phương pháp real-time PCR đối với gen SAD chuẩn đặc hiệu hạt lạnh cũng đã được kiểm tra thực nghiệm để xây dựng phương pháp đối với 6 loài thực vật thường gặp trong thực phẩm (lúa mì, lúa mạch, gạo, cải dầu, ngô, đậu tương) sử dụng 200 ng ADN tương ứng (Tài liệu tham khảo [1]). Ngoại trừ ADN hạt lạnh, phát hiện khuếch đại yếu trong ADN từ đậu tương và ngô (tín hiệu tương ứng để tính 0,5 pg ADN hạt lạnh). Tuy nhiên, báo cáo xác nhận của EURL-GMFF đã chỉ ra rằng giữa trình tự đoạn dò SAD và trình tự xác định được trong hạt lạnh, có hai sự khác biệt trong các vị trí nucleotide 8 và 11 có trong "đoạn dò SAD" (Tài liệu tham khảo [1]).

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải được thực hiện theo TCVN 7068 (ISO 24276) và các tiêu chuẩn thích hợp khác (ví dụ TCVN ISO/IEC 17025^[7]).

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] C. Delobel, N. Foti, C. Savini, A. Patak, M. Van den Bulcke, M. Ermolli *Report on the verification of the performance of a construct-specific assay for the detection of flax CDC Triffid event FP967 using real-time PCR – Validation Report and Protocol*. 2009, ISBN: 978-92-79-14875-0
- [2] M.D. Bennett, I.J. Leitch Plant DNA C-values Database (release 5.0, December 2010); <http://data.kew.org/cvalues/> (11.05.2012)
- [3] L. Grohmann, U. Busch, S. Pecoraro, N. Hess, K. Pietsch, J. Mankertz Collaborative trial validation of a construct-specific real-time PCR method for detection of genetically modified linseed event "CDC Triffid" FP967. *Eur. Food Res. Technol.* 2011, 232 pp. 557–561
- [4] W. Horwitz Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. *Pure Appl. Chem.* 1995, 67 pp. 331–343
- [5] K. Arumuganathan, E.D. Earle Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1991, 9 (3) pp. 208–218
- [6] H.-U. Waiblinger, N. Graf, H. Broll, L. Grohmann, K. Pietsch Evaluation of real-time PCR results at the limit of detection. *J. Verbr. Lebensm.* 2011, 6 pp. 411–417
- [7] TCVN ISO/IEC 17025 (ISO/IEC 17025), *Yêu cầu chung về năng lực của phòng thử nghiệm và hiệu chuẩn*
-