

Lời nói đầu

TCVN 7607:2007 hoàn toàn tương đương với ISO 21572:2004 và bản
đính chính kỹ thuật 1:2005;

TCVN 7607:2007 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

Phương pháp phân tích để phát hiện các sinh vật biến đổi gen và sản phẩm có nguồn gốc biến đổi gen có thể được thực hiện để sàng lọc, nhận dạng hoặc định lượng sinh vật biến đổi gen và sản phẩm của chúng trong chất nền đã biết.

Để phát hiện các thành phần nguồn gốc biến đổi gen, nguyên tắc cơ bản của phương pháp dựa vào protein là để:

- lấy mẫu đại diện của chất nền;
- tách chiết protein;
- phát hiện và/hoặc định lượng protein đặc thù có nguồn gốc sinh vật biến đổi gen đang được nghiên cứu;

Khi các phương pháp mới được đánh giá có hiệu lực và được chấp nhận, thì chúng sẽ được đưa vào phụ lục của tiêu chuẩn này.

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 protein

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

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra các hướng dẫn chung và các tiêu chí thực hiện đối với các phương pháp phát hiện và/hoặc định lượng các protein đặc thù được chiết từ thực vật biến đổi gen có trong chất nền cụ thể.

Các hướng dẫn chung này đề cập đến các phương pháp dựa trên kháng thể hiện diện. Các phương pháp khác được mô tả trong Phụ lục A cũng có thể phát hiện được protein. Các tiêu chí tương tự được đưa ra trong tiêu chuẩn này thường được áp dụng.

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.

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

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

3.1 Các thuật ngữ chung

3.1.1

mẫu (sample)

một hoặc nhiều đơn vị mẫu được lấy từ một quần thể và được dùng để cung cấp thông tin về sản phẩm.

[ISO 3534-1:1993].

3.1.2

mẫu phòng thử nghiệm (laboratory sample)

mẫu được dùng để kiểm tra hoặc thử nghiệm trong phòng thử nghiệm.

3.1.3

mẫu thử (phần mẫu thử) (test sample) (test portion)

mẫu được chuẩn bị để thử nghiệm hoặc phân tích, toàn bộ khối lượng được sử dụng một lần để phân tích hoặc thử nghiệm.

[ISO 3534-1:1993].

3.1.4

chất nền (matrix)

tất cả các thành phần có chất phân tích ở trong mẫu. Mỗi chất nền có một tên riêng để có thể phân loại được.

3.1.5

biến tính của protein (denaturation of proteins)

việc xử lý bằng hoá chất (sinh học) và/hoặc bằng phương pháp vật lý để phá huỷ hoặc biến đổi cấu trúc của chất phân tích. Sự biến tính có thể làm biến đổi cấu trúc, chức năng, các đặc tính enzym hoặc kháng nguyên của protein.

3.2 Thuật ngữ liên quan đến kháng thể

3.2.1

kháng thể (antibody)

protein (globulin miễn dịch) được tế bào bạch huyết B (tế bào lympho) sinh ra hoặc tiết ra trong phản ứng với các phân tử được coi là ngoại lai (kháng nguyên). Mỗi kháng thể chỉ có khả năng liên kết với một kháng nguyên nhất định.

3.2.2

kháng nguyên (antigen)

chất đã được hệ thống miễn dịch coi là ngoại lai và tạo ra phản ứng miễn dịch.

3.2.3

dòng vô tính (clone)

quần thể các tế bào giống hệt nhau được chiết ra từ tế bào đơn dòng.

3.2.4

phản ứng chéo (cross-reactivity)

sự liên kết của kháng thể với các chất không phải là chất phân tích ban đầu cần quan tâm.

3.2.5

kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody)

kháng thể được tạo ra từ dòng vô tính lai đơn và đều kết hợp với một yếu tố quyết định kháng nguyên.

3.2.6

kháng thể đa dòng (polyclonal antibody)

kháng thể được tạo ra từ vài dòng vô tính của tế bào bạch huyết.

3.2.7

tính đặc hiệu của kháng thể (specificity of an antibody)

khả năng của một kháng thể để liên kết đặc hiệu với một yếu tố quyết định kháng nguyên và không liên kết với các cấu trúc tương tự khác hoặc các kháng nguyên khác.

3.3 Thuật ngữ liên quan đến kỹ thuật

3.3.1

chất cộng hợp (conjugate)

chất được tạo ra bằng việc gắn kết hai hoặc nhiều chất với nhau.

CHÚ THÍCH Các kháng thể cộng hợp với chất phát huỳnh quang (ví dụ, các hạt màu), các chất đã được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ, hoặc với các enzym thường sử dụng trong các phép thử miễn dịch.

3.3.2

lai protein (Western blotting)

chuyển một kháng nguyên (nghĩa là một protein có liên quan), sau khi đã tách bằng điện di, sang bề mặt liên kết. Kháng nguyên này có thể quan sát được bằng một kháng thể đã được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ đặc trưng hoặc bằng một kháng thể cộng hợp với enzym.

3.3.3

phản ứng hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA – enzyme linked immunosorbent assay)

phép thử trong ống nghiệm (vitro) dựa trên sự kết hợp của kháng thể có gắn enzym với một cơ chất để tạo ra sản phẩm có màu. Tùy thuộc vào sự áp dụng mà phép phân tích này có thể được sử dụng cho mục đích định tính hoặc định lượng.

3.3.4

bộ thử (test kit)

một bộ gồm các hoá chất, vật liệu và hướng dẫn sử dụng, được đóng gói chung và được dùng cho phép đo vitro để phát hiện chất cần phân tích đã định.

3.3.5

dạng que nhúng (dip stick format)

dùng để định tính nhanh, bao gồm các dải nằm ngang mà ở đó kháng thể hoặc chất phân tích được phủ lên bề mặt rắn.

3.4 Thuật ngữ liên quan đến kiểm soát

3.4.1

mẫu chuẩn (reference material)

vật liệu hoặc chất có một hay nhiều giá trị về tính chất của nó được xác định đủ đồng nhất và tốt để hiệu chuẩn thiết bị, đánh giá một phương pháp đo hoặc để ấn định các giá trị của vật liệu.

3.4.2

chuẩn (standard)

vật đo, phương tiện đo, mẫu chuẩn hoặc hệ thống đo để định nghĩa, thể hiện, duy trì hoặc tái tạo đơn vị hoặc một hay nhiều giá trị của đại lượng để dùng làm làm chuẩn hoặc để chuẩn bị các đặc tính đã biết.

3.5 Thuật ngữ liên quan đến xác nhận hiệu lực

3.5.1

độ chính xác (accuracy)

mức độ gần nhau giữa kết quả thử nghiệm và giá trị quy chiếu được chấp nhận

CHÚ THÍCH Khi áp dụng thuật ngữ độ chính xác cho một kết quả thử bao gồm sự kết hợp của thành phần ngẫu nhiên với sai số của hệ thống hoặc phần sai lệch.

[ISO 3534-1:1993].

3.5.2

độ chụm (precision)

mức độ gần nhau giữa các kết quả thử nghiệm độc lập nhận được trong điều kiện quy định.

CHÚ THÍCH 1 Độ chụm chỉ phụ thuộc vào phân bố của sai số ngẫu nhiên và không liên quan tới giá trị thực hoặc giá trị đã xác định.

CHÚ THÍCH 2 Thước đo độ chụm thường được thể hiện bằng độ phân tán và được tính toán như là độ lệch chuẩn của các kết quả thử nghiệm. Độ chụm càng thấp thì độ lệch chuẩn càng lớn.

CHÚ THÍCH 3 "Các kết quả thử nghiệm độc lập" có nghĩa là những kết quả nhận được theo cách không bị ảnh hưởng bởi bất cứ kết quả nào trước đó trên đối tượng thử như nhau hoặc tương tự như nhau. Thước đo định lượng của độ chụm phụ thuộc chủ yếu vào các điều kiện quy định. Điều kiện lặp lại và điều kiện tái lập là những tập hợp cụ thể của các điều kiện bắt buộc.

[ISO 3534-1:1993]

3.5.3

độ sai lệch (bias)

ước tính của sai lệch hệ thống (thích hợp), sai lệch của kết quả đo so với kết quả thực của mẫu xác định.

3.5.4

độ nhạy (sensitivity)

khả năng ghi được những thay đổi nhỏ về nồng độ của một chất trong vật liệu thử.

Trong trường hợp này, độ nhạy thường là lượng nhỏ nhất hoặc nồng độ của chất phân tích mà có thể nhận biết được từ mẫu.

3.5.5

tính đặc trưng (specificity)

đặc tính của phương pháp để phản ánh một cách duy nhất đặc điểm hay chất cần được phân tích được định nghĩa trong tiêu chuẩn Codex.

3.5.6

giới hạn phát hiện (LOD) (limit of detection) (LOD)

lượng tối thiểu hay nồng độ tối thiểu của chất phân tích trong mẫu thử có thể phát hiện được nhưng không cần thiết phải định lượng, như đã được chứng minh bằng thử nghiệm cộng tác hay xác nhận có hiệu lực thích hợp khác [1] [2].

3.5.7

giới hạn định lượng (LOQ) (limit of quantitation) (LOQ)

(Qui trình phân tích) nồng độ nhỏ nhất hay lượng chất phân tích nhỏ nhất trong mẫu thử mà có thể được định lượng được với mức chấp nhận về độ chụm và độ chính xác, như đã được chứng minh bằng thử nghiệm cộng tác hay xác nhận có hiệu lực thích hợp theo TCVN 6910 ISO 5725. [2], hoặc [3].

3.5.8

khoảng áp dụng (khoảng định lượng/tuyến tính/khoảng biến động) (applicability range (range of quantification/linearity/dynamic range)

giới hạn trên và giới hạn dưới của phép định lượng được biểu thị bằng vật liệu đối chứng (hoặc độ pha loãng).

3.5.9

giới hạn lặp lại [tái lập] [repeatability (reproducibility) limit]

giá trị mà độ lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm nhận được trong điều kiện lặp lại (hoặc tái lập) nhỏ hơn hoặc bằng giá trị đó với xác suất bằng 95 %.

CHÚ THÍCH - Ký hiệu là r [R].

Khi kiểm tra hai kết quả thử đơn lẻ thu được dưới các điều kiện lặp lại [tái lập] thì phép so sánh phải được thực hiện với giới hạn lặp lại [tái lập] $r [R] = 2,8 s_r [s_R]$.

3.5.10

độ tái lập (reproducibility)

độ chụm trong các điều kiện tái lập.

[ISO 3534-1:1993]

3.5.11

điều kiện tái lập (reproducibility conditions)

điều kiện mà trong đó các kết quả thử nghiệm nhận được bởi cùng một phương pháp, trên các mẫu thử giống hệt nhau trong các phòng thử nghiệm khác nhau, với những người thao tác khác nhau, sử dụng các thiết bị khác nhau.

[ISO 3534-1:1993]

3.5.12

độ lặp lại (repeatability)

độ chụm trong điều kiện lặp lại.

[ISO 3534-1:1993]

3.5.13

điều kiện lặp lại (repeatability conditions)

điều kiện mà tại đó các kết quả thử nghiệm độc lập nhận được với cùng một phương pháp, trên những mẫu thử giống hệt nhau, trong cùng một phòng thí nghiệm, bởi cùng người thao tác, sử dụng cùng một thiết bị, trong khoảng thời gian ngắn.

[ISO 3534-1:1993]

3.5.14

độ lệch chuẩn lặp lại [tái lập] [repeatability (reproducibility) standard deviation]

độ lệch chuẩn của các kết quả thử nghiệm nhận được trong điều kiện lặp lại [tái lập].

CHÚ THÍCH Đây là thước đo sự phân tán của phân bố các kết quả thử nghiệm trong điều kiện lặp lại [tái lập]. Tương tự, "phương sai lặp lại" và "hệ số biến thiên lặp lại [tái lập]" được xác định và được sử dụng làm các phép đo sự phân tán kết quả thử nghiệm trong các điều kiện lặp lại [tái lập].

3.5.15

độ thu hồi (recovery)

khả năng đo hoặc thu hồi lượng đã biết của chất phân tích từ các mẫu pha trộn trong một dải định lượng.

4 Nguyên tắc

Protein đích được chiết theo qui trình mô tả cho từng chất nền cụ thể và kháng thể đặc hiệu dùng để phát hiện hoặc đo nồng độ của protein trong mẫu.

5 Thuốc thử

Trong suốt quá trình phân tích chỉ sử dụng thuốc thử tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước đã khử ion hoặc nước tinh lọc hoặc có chất lượng tương đương, trừ khi có qui định khác.

Các loại thuốc thử khác, như các kháng thể, các chất cộng hợp, cơ chất, dung dịch hãm và các dung dịch đệm là những đặc trưng của phương pháp. Cần tham khảo phương pháp đối với các loại thuốc thử đặc trưng liên quan như các protein chuẩn hoặc mẫu chuẩn, các kháng thể được phủ lên bề mặt rắn hoặc ở dạng tự do, thuốc thử kiểm chứng và các mẫu thử.

6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ được qui định trong A.5.

7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu được qui định chi tiết trong ISO 21568.

8 Cách tiến hành

8.1 Khái quát

Các điều kiện bảo quản và hạn sử dụng của kháng thể, chất liên kết, mẫu, v.v...theo qui định của nhà sản xuất.

Để sử dụng tiêu chuẩn này, cần tuân thủ các yêu cầu chung về đảm bảo chất lượng đối với các phòng thử nghiệm (ví dụ: liên quan đến hiệu chuẩn thiết bị, xác định kép, phép thử trắng, sử dụng mẫu chuẩn, dụng cụ đường chuẩn v.v...). Cần làm sạch các dụng cụ tiếp xúc trực tiếp với mẫu để tránh nhiễm bẩn.

Sử dụng các dụng cụ phòng thử nghiệm thích hợp, có khả năng liên kết protein thấp (ví dụ: ống polypropylen) để ngăn ngừa hấp thụ protein trong suốt quá trình thử nghiệm.

8.2 Chuẩn bị dung dịch mẫu

Khi đã thu được mẫu đại diện, xem qui trình chuẩn bị mẫu cụ thể trong phụ lục A.

Nghiên mẫu theo qui định trước khi lấy các phần mẫu thử, nếu cần. Bột/bột mì có thể có các đặc tính tương nở và khi cần phải lấy gấp đôi thể tích dung dịch chiết.

Các mẫu phòng thử nghiệm chứa hàm lượng chất béo cao có thể khó đồng nhất và có thể cần phải chiết một lượng mẫu thử lớn. Nếu thích hợp, có thể xem hướng dẫn trong phụ lục A.

Cân một lượng thích hợp của mẫu phân tích đại diện để thiết lập phần mẫu thử. Cho dung dịch chiết vào và đồng hoá hoặc trộn.

8.3 Tách chiết

Sử dụng qui trình tách chiết thích hợp đối với chất nền. Các điều kiện thích hợp cho qui trình tách chiết/pha loãng phần mẫu thử, chất kiểm chứng và mẫu chuẩn được nêu trong phụ lục A.

Cẩn thận khi sử dụng các qui trình tách chiết thích hợp đối với chất nền và nếu cần, bổ sung chất cộng hợp hoặc dung dịch đệm đặc biệt để giúp cho quá trình tách chiết protein (ví dụ: bổ sung chất cộng hợp tanin khi phân tích sôcôla đen).

8.4 Chuẩn bị đường chuẩn

Để dựng đường chuẩn, khuyến cáo sử dụng mẫu chuẩn hoặc mẫu chuẩn đã được đánh giá phù hợp đối với chất nền.

8.5 Qui trình phân tích

Tùy theo qui trình được chọn ở Phụ lục A của tiêu chuẩn này, mà chọn số lượng hàng giếng/phép thử/v.v.. đối với một loạt dung dịch mẫu thử cần phân tích kể cả phép thử trắng, chất đối chứng, chất chuẩn, chất kiểm soát và bổ sung dung dịch mẫu thử, dung dịch chuẩn v.v...tối thiểu cần thực hiện hai lần song song, được pha loãng đúng cách để phân tích.

Tùy theo phương pháp được chọn, trộn nhẹ và để cho phản ứng xảy ra ở nhiệt độ và thời gian đã định. Nếu cần, kết thúc phản ứng theo phương pháp được mô tả trong Phụ lục.

Sự ổn định của các tín hiệu sau cùng có thể thay đổi. Đọc kết quả tại thời điểm được qui định trong phụ lục.

9 Diễn giải và biểu thị kết quả

9.1 Khái quát

Các thông số cần diễn giải dao động phụ thuộc vào phép thử là định tính, bán định lượng hoặc định lượng.

Đối với các phép thử định lượng, hệ số biến thiên của giá trị mật độ quang phát sinh từ các phép đo lặp lại của dung dịch mẫu thử, nhìn chung, không được vượt quá 15 %. Hệ số biến thiên của các nồng độ tính toán từ các phép đo lặp lại của dung dịch mẫu thử, nhìn chung, không được vượt quá 20 %.

Nếu giới hạn % hệ số biến thiên bị vượt quá, thì các phép phân tích cần được thực hiện lại trên dung dịch mẫu thử mới được chuẩn bị. Trong trường hợp này, để thiết lập hệ số biến thiên, cần tiến hành ít nhất ba phép xác định (ví dụ: các giá trị từ 3 giếng thử).

Không thể khẳng định rằng không có mặt các sinh vật biến đổi gen trong mẫu cần phân tích. Các kết quả âm tính sẽ được báo cáo là "không có ở giới hạn phát hiện", hoặc "nhỏ hơn giới hạn phát hiện".

Các kết quả dương tính thấp hơn giá trị giới hạn định lượng phải được báo cáo là dương tính trên giới hạn phát hiện nhưng dưới giới hạn định lượng.

9.2 Phân tích định lượng và bán định lượng

Các thông số sau đây đã được đánh giá: dữ liệu thô (các giá trị bằng số liên tục) của dung dịch mẫu thử, mẫu thử trắng, mẫu chuẩn hoặc chuẩn phân tích và của mẫu đối chứng âm, % hệ số biến thiên giữa các phép thử kép, % hệ số biến thiên của chất chuẩn và % hệ số biến thiên của mẫu kiểm chứng.

Tất cả các kết quả cuối cùng phải được báo cáo bao gồm cả độ không đảm bảo đo mà trước đó đã được thiết lập.

Các kết quả định lượng có thể không được báo cáo bằng phép ngoại suy trên mức cao nhất hoặc dưới mức thấp nhất của phép đo chuẩn hiệu chuẩn.

9.3 Phân tích định tính

Đối với các phép thử định tính, bao gồm tất cả các ứng dụng, các thông số tương ứng được mô tả trong phụ lục.

Các kết quả phải được báo cáo là phát hiện thấy hoặc không phát hiện thấy kể cả giới hạn phát hiện.

10 Các thông số đặc trưng có thể ảnh hưởng đến kết quả

10.1 Khái quát

Các chuẩn cứ thực hiện được liệt kê trong phương pháp ở phụ lục A là một loạt các yêu cầu cần thực hiện được thiết lập cho từng phương pháp trong quá trình xây dựng, đánh giá hiệu lực và sử dụng phương pháp. Các thông số này được xây dựng cho từng phương pháp và được dùng để đảm bảo rằng các số liệu của phương pháp là đáng tin cậy và có sự ổn định cao. Mỗi lần thực hiện phương pháp, đánh giá và so sánh các số liệu của phương pháp với chuẩn cứ tính năng của phương pháp đã thiết lập.

Khi giá trị (ví dụ, % hệ số biến thiên của các phép xác định lặp lại) không thống nhất với các yêu cầu của phép thử, điều đó nói lên rằng kết quả thu được là không điển hình và đánh giá chặt chẽ hơn các dữ liệu. Danh mục các yêu cầu phải đầy đủ, các thông số đặc trưng có thể trong các trường hợp nhất định không đáp ứng các yêu cầu, nhưng số liệu có thể vẫn có thể hoàn toàn chấp nhận được. Tuy nhiên, nếu bất kỳ một chuẩn cứ nào không đáp ứng, thì cần phải được ghi nhận lại và số liệu được đánh giá để xác định khi phân tích các kết quả cần phải điều chỉnh, hoặc khi phải lặp lại trên một mẫu cụ thể hoặc một loạt mẫu. Các quyết định này cần phải dựa trên việc điều chỉnh của nhà nghiên cứu giải thích toàn bộ các chuẩn cứ.

10.2 Các xem xét đặc biệt

10.2.1 Đặc trưng

Tính đặc trưng đầy đủ của phép thử đối với một chất phân tích cụ thể, cần được chỉ ra cho mỗi chất phân tích (protein) và trong từng chất nền cần phân tích. Nếu cần, khả năng phản ứng chéo cần được đánh giá về các chất tương tự (các protein có mặt với trình tự tương tự). Để kiểm tra sự vắng mặt của chất phân tích trong mẫu không chứa sinh vật biến đổi gen thì phân tích thành phần không chứa sinh vật biến đổi gen và thành phần chứa sinh vật biến đổi gen ở các độ pha loãng thích hợp và so sánh.

Điều này thường được thực hiện trong quá trình xây dựng và đánh giá phương pháp và không cần thực hiện trong quá trình phân tích mẫu thông thường mà trước đó đã được thực hiện để đánh giá hiệu lực phương pháp. Phương pháp trong phụ lục A liệt kê tất cả các chất cụ thể và các chất nền mà khả năng phản ứng chéo đã được xác định.

10.2.2 Hiệu quả tách chiết

Cần đánh giá cẩn thận ảnh hưởng của các thông số quá trình lên các mẫu phòng thử nghiệm.

Để tạo độ nhạy cao nhất cho một phép thử miễn dịch, hiệu quả tách chiết phải càng cao càng tốt. Hiệu quả phân tích phụ thuộc vào chất nền. Cần xác định hiệu quả tách chiết và ghi chép đối với từng chất nền.

Quy trình tách chiết phải cho thấy có khả năng tái lập và phương pháp hiệu chuẩn phải được tính đến cho trường hợp tách chiết không hoàn toàn.

10.2.3 Ảnh hưởng của chất nền

Phạm vi áp dụng định nghĩa rõ ràng và chính xác các chất nền có thể áp dụng cho một phép thử miễn dịch nhất định. Sử dụng mẫu chuẩn phù hợp với chất nền để so sánh trực tiếp giữa mẫu chuẩn và mẫu thử. Tuy nhiên, nếu mẫu cần phân tích so với mẫu chuẩn mà không cùng một chất nền thì phải đánh giá ảnh hưởng của chất nền.

Ví dụ, chuẩn bị một dịch chiết âm tính cho mỗi loại mẫu (chất nền) phân tích bằng phương pháp này và một dịch chiết đối chứng dương ở nồng độ đã biết. Chuẩn bị một dãy các độ pha loãng kiểm chứng dương tính trong dịch chiết âm tính và so sánh đường cong đáp ứng theo liều lượng tạo nên với đường chuẩn của phương pháp. Nếu hai đường này khác nhau tức là có ảnh hưởng chất nền. Sử dụng một chất nền mà biểu hiện gần nhất với các mẫu thực cần thử nghiệm. Đường cong pha loãng với kiểm chứng dương tính đã biết nồng độ cũng như một đường chuẩn. Hình dạng của đường chuẩn không được thay đổi do ảnh hưởng của chất nền.

10.2.4 Trạng thái song song/tuyến tính

Đối với các phép phân tích định lượng, biên độ tuyến tính dự kiến của một phép thử miễn dịch phải được thông báo rõ trong phần phạm vi áp dụng cho tất cả các loại chất nền được đề cập.

Số các điểm hiệu chuẩn được cung cấp phải phản ánh phần tuyến tính của đường cong (ví dụ, nếu đường chuẩn không tuyến tính thì phải tạo nhiều điểm chuẩn độ).

Nếu các đường hiệu chuẩn không "song song" hoặc không cùng độ dốc khi vẽ gần nhau thì số liệu cần phải được phân tích theo thống kê cho một phép thử với độ pha loãng so sánh.

10.2.5 Giới hạn phát hiện

Các kết quả không được thể hiện dưới mức giới hạn phát hiện. Trong trường hợp này, báo cáo kết quả phải nêu là bằng hoặc dưới giới hạn phát hiện.

10.2.6 Các giới hạn định lượng

Cần nêu rõ giới hạn định lượng cho từng phép hiệu chuẩn (hoặc độ pha loãng).

Nồng độ của các dung dịch mẫu thử chưa biết phải được nội suy chứ không được ngoại suy.

Kết quả không được thể hiện dưới giới hạn định lượng hoặc trên điểm hiệu chuẩn cao nhất hoặc dưới điểm hiệu chuẩn thấp nhất.

11 Phương pháp khẳng định

Để thiết lập độ tin cậy của phép thử, các phương pháp khác như lai protein, HPLC hoặc phân tích tính năng có thể được sử dụng để đo các phần của mẫu phân tích đã biết nồng độ. Các kết quả của cả hai phương pháp định tính/định lượng phải tương đương. Việc này rất quan trọng đối với các phép thử miễn dịch đo các kháng thể có thể phản ứng chéo với các chất phân tích khác có mặt trong chất nền.

12 Báo cáo thử nghiệm

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

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết mẫu thử;
- viện dẫn tiêu chuẩn này và phương pháp đã sử dụng và nêu rõ đây là phương pháp định tính, định lượng hay bán định lượng;
- giới hạn phát hiện;
- giới hạn định lượng trên và dưới;
- ngày tháng lấy mẫu và quy trình lấy mẫu đã sử dụng (nếu biết);
- ngày nhận mẫu;
- ngày bắt đầu phân tích và các tài liệu cần thiết khác;
- lượng mẫu sử dụng;
- lượng dung dịch mẫu thử;
- kết quả và đơn vị dùng để báo cáo kết quả;
- bất kỳ điểm đặc biệt nào trong khi thử nghiệm;
- bất kỳ thao tác nào không qui định trong phương pháp hoặc được coi là tùy ý mà có thể có ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A

(tham khảo)

Phát hiện đậu tương biến đổi gen (kháng Roundup Ready^{®1)})

A.1 Giới thiệu

Đậu tương (*Glycine max*) là nguồn thực phẩm và thức ăn chăn nuôi quan trọng²⁾. Gần đây, thông qua công nghệ sinh học hiện đại người ta đã đưa một loại gen là *cp4 epsps* vào một số giống đậu tương. Gen kháng glyphosat lấy từ loài vi khuẩn *Agrobacterium* dòng CP4. Protein CP4 EPSPS quy định tạo ra sức kháng thuốc diệt cỏ glyphosate (Roundup^{®1)}). Protein CP4 EPSPS được tạo ra có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các kháng thể đặc hiệu.

A.2 Phạm vi áp dụng

Phụ lục này quy định phương pháp ELISA để xác định protein CP4 EPSPS có trong đậu tương Roundup Ready^{®1)} GTS 40-3-2 và các thành phần có nguồn gốc từ nó.

Phương pháp này được áp dụng cho các mẫu ít xử lý hoặc chưa xử lý, hoặc qui trình đã được tiến hành mà protein CP4 EPSPS chưa bị phá hủy. Ví dụ, nhiệt độ dùng trong chế biến các thành phần đậu tương có thể ảnh hưởng đến khả năng phát hiện protein.

Trong trường hợp phải định lượng, thì phương pháp này chỉ có thể áp dụng cho các mẫu thực phẩm bao gồm đậu tương và các sản phẩm của nó mà có thể phát hiện được protein.

Phương pháp đã được kiểm định để phát hiện protein CP4 EPSPS trong đậu tương xay thành bột (mẫu chuẩn IRMM) và có thể dùng để xác định ngoài dải từ 0,5 % đến 2 % (w/w) khi sử dụng mẫu chuẩn³⁾. Bộ thử có bán sẵn trên thị trường⁴⁾ và dùng để phân tích các chất nền khác có chứa protein như đã

¹⁾ Roundup Ready[®] và Roundup[®] là nhãn hiệu thương mại đã đăng ký của công ty Monsanto. Thông tin này tạo thuận tiện cho người sử dụng, tổ chức CEN không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

²⁾ Các thành phần có nguồn gốc từ đậu tương thông thường giàu protein bao gồm: dạng bột, dịch cô đặc, sản phẩm tách và dạng sợi.

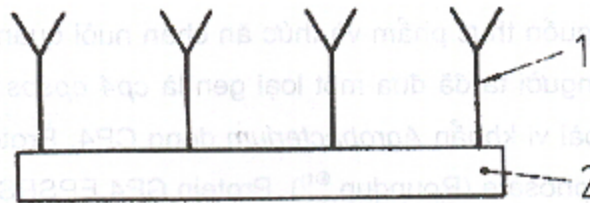
³⁾ Các mẫu chuẩn thích hợp có bán sẵn từ Trung tâm nghiên cứu phối hợp thuộc Ủy ban Châu Âu, Viện vật liệu và đo lường chuẩn (IRMM). Thông tin này tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

⁴⁾ Công ty Chẩn đoán chiến lược, Hampshire, Anh. Thông tin này tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

được nhận dạng của nhà sản xuất bộ thử. Tóm tắt của nghiên cứu cộng tác và Hướng dẫn sử dụng, xem [3], [4].

A.3 Nguyên tắc

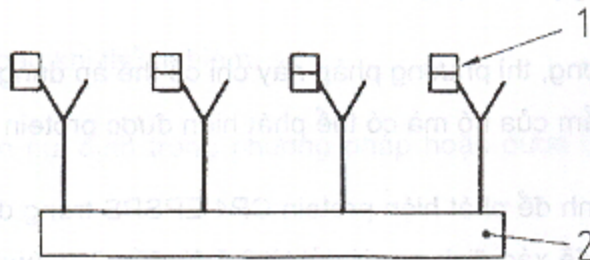
Phép thử miễn dịch hấp thụ liên kết enzyme kẹp đôi (ELISA) được sử dụng để phát hiện protein CP4 EPSPS như mô tả ở các hình A.1 đến A.4:



Chú giải

- 1 kháng thể đơn dòng
- 2 bề mặt phủ

Hình A.1 - Bề mặt của khay thử được phủ bởi một kháng thể đơn dòng đặc hiệu

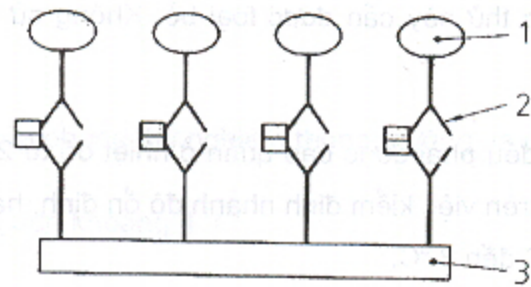


Chú giải

- 1 kháng nguyên
- 2 bề mặt phủ

Hình A.2 - Khi mẫu thử được thêm vào, kháng thể bám vào kháng nguyên. Các thành phần

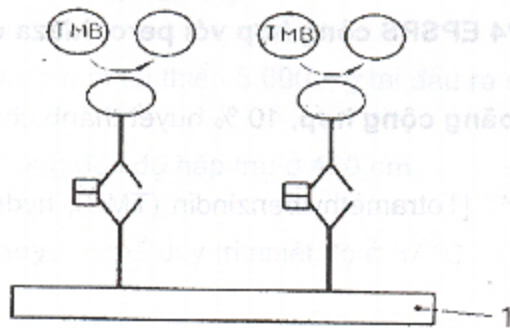
không kết bám của mẫu được rửa sạch



Chú giải

- 1 HRP
- 2 kháng thể phát hiện
- 3 bề mặt phủ

Hình A.3 – Sau khi rửa, kháng thể đa dòng đã liên kết với peroxidaza cải ngựa (horseradish peroxidas) (HRP) được thêm vào, kháng thể này liên kết đặc hiệu với vị trí kháng nguyên thứ hai trên protein CP4 EPSPS



Chú giải

- 1 bề mặt phủ

Hình A.4 – Sau khi rửa, cơ chất màu tetramethylbenzidin (TMB) đặc hiệu đối với HRP được thêm vào. HRP tạo ra tín hiệu màu tỷ lệ thuận với nồng độ kháng nguyên trong dải tuyến tính. Thêm dung dịch hãm để ngừng sự đổi màu. Cường độ màu tạo thành được đo ở bước sóng 450 nm

A.4 Thuốc thử

A.4.1 Khái quát

Trong suốt quá trình phân tích, chỉ sử dụng các loại thuốc thử phân tích, nước cất hoặc nước đã khử ion, trừ khi có quy định khác.

Mọi sai lệch so với chuẩn cứ thực hiện thì chúng tôi thuốc thử thiếu ổn định. Nếu các thành phần cơ chất đã đổi sang màu xanh thì thuốc thử này cần được loại bỏ. Không sử dụng các dung dịch đệm hoặc dung dịch cộng hợp bị vẩn đục.

Tất cả các bộ phận của bộ thử đều phải được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C. Hạn sử dụng của bộ thử được ghi trên nhãn. Dựa trên việc kiểm định nhanh độ ổn định, hạn sử dụng của bộ thử được xác định là 9 tháng ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

Dung dịch gốc kháng thể cộng hợp (A.6.6.1) và dung dịch làm việc kháng thể cộng hợp (A.6.6.2) phải được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C cho đến khi hết hạn sử dụng. Dung dịch đệm pha loãng để rửa phải được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C và không được lâu hơn thời hạn sử dụng của bộ thử.

A.4.2 Thuốc thử đi kèm bộ thử

A.4.2.1 Dung dịch đệm tách chiết đậu tương, đệm natri borat, pH 7,5.

A.4.2.2 Dung dịch đệm cho đậu tương, PBS, Tween 20, albumin huyết thanh bò, pH 7,4.

A.4.2.3 Hàng giếng đã phủ, 12 hàng, mỗi hàng 8 giếng được phủ kháng thể đơn dòng và một giá đỡ.

A.4.2.4 Protein tổ kháng CP4 EPSPS cộng hợp với peroxidaza cải ngựa (HRP), đông khô.

A.4.2.5 Dung dịch đệm pha loãng cộng hợp, 10 % huyết thanh chuột đã vô hoạt bằng nhiệt.

A.4.2.6 Cơ chất màu, Blue-K^{TM5)} [Tetramethylbenzidin (TMB), hydro peroxit, dimethylformamid 5 % làm dung môi].

A.4.2.7 Dung dịch hãm, 0,5 % axit sulfuric.

A.4.2.8 Dung dịch đệm rửa đậm đặc 10 lần, PBS, Tween 20, pH 7,1.

A.4.2.9 Các chuẩn đối chứng dương và đối chứng âm phù hợp với chất nền, ví dụ 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 % và 5 % w/w.

A.4.3 Các hoá chất không đi kèm bộ thử

A.4.3.1 Cồn, như metanol, nồng độ thể tích Φ 70 %, hoặc etanol Φ 95 %.

A.4.3.2 Chất tẩy rửa, dùng cho bể siêu âm, tùy chọn.

⁵⁾ Blue-K là tên thương mại của sản phẩm do Công ty Neogen, Lansing, Michigan, USA cung cấp. Thông tin này tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, tổ chức CEN không ấn định phải sử dụng sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho kết quả tương tự.

A.5 Thiết bị và dụng cụ

A.5.1 Khái quát

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể là:

A.5.2 Tủ lạnh, làm việc ở nhiệt độ khoảng 4 °C.

A.5.3 Ống ly tâm hình nón bằng polypropylen, có nắp đậy kín, ví dụ dung tích 15 ml.

A.5.4 Giấy bóng hoặc giấy nhôm.

A.5.5 Băng dính, để cố định khay giếng.

A.5.6 Chai rửa, ví dụ 500 ml.

A.5.7 Micropipet chính xác, chia độ, ví dụ 20 µl đến 500 µl.

A.5.8 Máy trộn, ví dụ Votex[®](6).

A.5.9 Cân, có thể cân được chính xác đến 0,01 g.

A.5.10 Máy ly tâm, có thể tạo lực ly tâm tối thiểu 5 000 x g tại đầu ra của ống ly tâm.

A.5.11 Máy đọc vi đĩa, có khả năng đọc độ hấp thụ ở 450 nm.

A.5.12 Tủ ấm hoặc nồi cách thủy, có thể duy trì nhiệt độ ở 37 °C.

A.5.13 Rây kích thước lỗ 450 µl, hoặc tương đương.

A.5.14 Rây kích thước lỗ 150 µl (100 mesh), hoặc tương đương.

A.5.15 Bộ pipet nhiều kênh, ví dụ từ 50 µl đến 300 µl (tùy chọn)

A.5.16 Dụng cụ đựng thuốc thử cho bộ pipet nhiều kênh (tùy chọn)

A.5.17 Máy rửa vi đĩa tự động (tùy chọn)

A.5.18 Giá đựng ống nghiệm dùng cho ống ly tâm 15 ml (tùy chọn)

A.5.19 Bể siêu âm (tùy chọn)

⁶⁾ Votex là một sản phẩm thích hợp có bán sẵn trên thị trường. Thông tin này tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, tổ chức CEN không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

A.6 Tiến hành

A.6.1 Cảnh báo và phòng ngừa

Phải cẩn thận khi dùng các dung dịch axit và dung dịch có chứa TMB.

Thông gió tự nhiên là vừa đủ.

A.6.2 Hạn chế của qui trình

Phản ứng ELISA này bị giới hạn cho các mẫu có số lượng protein CP4 EPSPS có thể tương quan tuyến tính với hàm lượng nguyên liệu biến đổi gen có trong mẫu chuẩn được sử dụng. Đối với các mẫu thực phẩm đã qua xử lý nhiệt và các mẫu thực phẩm ở dạng hỗn hợp thì mối tương quan này có thể không áp dụng được.

Bộ thử ELISA được thiết kế để có hiệu suất tối ưu ở nhiệt độ môi trường từ 15 °C đến 30 °C. Độ hấp thụ của mẫu chuẩn cao nhất phải lớn hơn 0,8 mật độ quang (OD) và không được nằm ngoài dải tuyến tính của máy đo quang phổ (giới hạn trên thay đổi khác nhau tùy vào từng loại máy quang phổ). Ở nhiệt độ cao hơn 30 °C, thì giá trị OD sẽ tăng nhanh hơn, nên có thể giảm thời gian ủ ấm enzym với cơ chất. Ở nhiệt độ thấp (nhỏ hơn 15 °C) thì thời gian ủ ấm cơ chất cần phải tăng lên.

A.6.3 Lấy mẫu

Lấy mẫu theo ISO 21568.

A.6.4 Chuẩn bị mẫu

Lấy mẫu thử đồng nhất từ mẫu phòng thử nghiệm, mẫu kép, xem ISO 21568.

Đối với đậu tương nguyên liệu, nên lấy 2 000 g, trộn lẫn rồi nghiền nhỏ cho tới khi lọt qua rây. Để phân tích định lượng thì kích cỡ của hạt nghiền phải nhỏ hơn 150 µm và phân tích định tính phải nhỏ hơn 450 µm. Khi rây bột phải cẩn thận tránh nhiễm bẩn. Ngoài ra, cần chú ý không làm mẫu bị nóng quá. Hoạt động của máy trộn bao gồm việc trộn và nghiền mẫu. Từ mẫu đã nghiền, lấy khoảng 100 g và lọc qua rây có cỡ lỗ 450 µm (A.5.13). Lượng mẫu này phải lọt qua rây ít nhất 90 %. Để phân tích định tính thì có thể dùng trực tiếp mẫu này, để phân tích định lượng thì phải rây tiếp qua rây cỡ lỗ 150 µm (A.5.14). Mẫu đã lọt qua rây 450 µm thì được coi là đồng nhất. Vì vậy, chỉ cần rây đủ lượng mẫu lọt qua rây 150 µm để dùng cho phép phân tích.

Các dạng mẫu khác phải được xử lý tương tự mặc dù có thể chỉ cần lượng mẫu nhỏ hơn.

A.6.5 Các biện pháp tránh nhiễm bẩn khi chuẩn bị mẫu

A.6.5.1 Khái quát

Hệ thống thử bằng ELISA là một kỹ thuật rất nhạy có thể phát hiện một lượng rất nhỏ protein CP4 EPSPS. Vì lý do đó, theo kinh nghiệm thì tất cả các thiết bị dùng để xử lý mẫu đậu tương phải được làm sạch sau mỗi mẻ mẫu. Các quy trình sau đây bao gồm bước đầu tiên là làm sạch các thành phần khác biệt. Bước thứ hai, rửa bằng cồn, để vô hiệu và tẩy sạch bất kỳ protein nào còn sót lại trên thiết bị.

A.6.5.2 Làm sạch máy nghiền hoặc máy trộn

Làm sạch bằng bàn chải mềm.

Tráng bằng cồn (cồn có thể được chứa và phun từ máy phun hoặc thiết bị phun bằng tay). Nên tráng hoặc phun bằng cồn 2 lần. Sau đó tráng kỹ bằng nước.

Nếu cần dùng lại ngay- thì để khô tự nhiên hoặc dùng máy sấy tốc.

Rửa bàn chải định kỳ và ngâm vào dung dịch cồn (A.4.3.1). Làm khô bàn chải trước mỗi lần sử dụng. Lau bàn chải bằng vải mềm hoặc khăn phòng thử nghiệm.

A.6.5.3 Làm sạch rây

Rây dễ bị bết lại do bột đậu tương. Đập nhẹ rây lên mặt bàn tay cho bong các phần dính.

Chải rây bằng bàn chải sạch và mềm. Ngâm rây vào cồn ít nhất 5 phút rồi tráng kỹ bằng nước. Nếu cần dùng lại ngay thì để khô tự nhiên hoặc dùng máy sấy tốc.

Phương pháp làm khô khác là dùng bể siêu âm làm khô bằng không khí.

Rửa bàn chải định kỳ và ngâm trong cồn (A.4.3.1) ít nhất trong 1 phút. Làm khô trước khi mỗi lần sử dụng. Lau bàn chải bằng vải mềm.

A.6.5.4 Làm sạch nơi làm việc

Không để bụi đậu tương làm nhiễm bẩn nơi làm việc. Không để bụi đậu tương của quá trình xử lý làm nhiễm bẩn thiết bị dùng cho quá trình xử lý tiếp theo. Để đạt hiệu quả tối ưu, nên tiến hành phân tích ở một phòng riêng cách biệt với nơi nghiền và chuẩn bị mẫu để tránh bị ô nhiễm bụi.

A.6.6 Chuẩn bị dung dịch kháng thể cộng hợp

A.6.6.1 Dung dịch gốc kháng thể cộng hợp

Làm tan chất kháng thể cộng hợp đông khô (A.4.2.4) bằng dung dịch đệm cộng hợp (A.4.2.5) theo hướng dẫn sử dụng.

Bảo quản dung dịch gốc kháng thể cộng hợp ở 2 °C đến 8 °C không lâu hơn hạn sử dụng của bộ thử.

A.6.6.2 Dung dịch làm việc kháng thể cộng hợp

Thêm 240 µl dung dịch gốc cộng hợp (A.6.6.1) vào 21 ml dung dịch đệm pha loãng cộng hợp (A.4.2.5)

Bảo quản dung dịch làm việc kháng thể cộng hợp ở 2 °C đến 8 °C không lâu hơn hạn sử dụng của bộ thử.

A.6.7 Chuẩn bị dung dịch đệm rửa

Pha loãng 10 lần dung dịch đệm rửa đậm đặc (A.4.2.8) bằng nước với tỷ lệ 1:10 (1+9).

A.6.8 Tiến hành thử

Để tất cả các thuốc thử đạt tới nhiệt độ phòng.

Lấy các hàng giếng đã phủ (A.4.2.3) và giá đỡ ra khỏi bao gói. Sau mỗi lần lấy một số lượng cần thiết ra cần đóng kín bao gói. Mười giếng là đủ đối với các mẫu chuẩn đối chứng và mẫu thử trắng. Mỗi khay phải có các chuẩn và các chất kiểm chứng của nó. Nếu rửa thử công thì phải dính bằng băng dính tất cả mép các khay (A.5.5) vào giá đỡ cho một lần chạy, để tránh các hàng giếng bị rơi khỏi giá đỡ trong quá trình rửa.

Quy trình được tóm tắt trong A.7

A.6.9 Tiến hành thử nghiệm

A.6.9.1 Tách chiết phần mẫu thử và chuẩn đối chứng

Các phần mẫu thử và các mẫu chuẩn âm tính và dương tính ⁷⁾ được tách chiết hai lần trong cùng các điều kiện mô tả dưới đây:

Cân khoảng 0,5 g ± 0,01 g từng loại mẫu chuẩn và phần mẫu thử cho vào các ống ly tâm polypropylen 15 ml riêng biệt. Tiến hành cân từng mẫu chuẩn theo nồng độ tăng dần. Sau đó cân phần mẫu thử. Để tránh nhiễm bẩn, phải lau đĩa cân bằng vải thấm cồn (A.4.3.1) rồi để khô hoặc sử dụng đĩa cân dùng một lần cho mỗi lần cân.

Thêm 4,5 ml dung dịch đệm tách chiết (A.4.2.1) vào mỗi ống ly tâm.

Trộn phần mẫu thử hoặc mẫu chuẩn với dung dịch đệm chiết bằng cách lắc mạnh và trộn (vortex) cho đến khi đồng nhất.

⁷⁾ Các nguyên liệu đối chứng hiện có bán sẵn trên thị trường đã được Viện Vật liệu và Đo lường, JRC, Geel, Đức chứng nhận. Thông tin này tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, tổ chức CEN không ấn định phải sử dụng sản phẩm này.

CHÚ THÍCH Bột đã tách chất béo và protein cần thời gian trộn lâu hơn, đôi khi phải nhiều hơn 15 phút. Bột nguyên chất béo dễ đông hóa hơn (không đến 5 phút).

Ly tâm hỗn hợp ở khoảng 5 000 g trong 15 phút, tốt nhất là ở 4 °C.

Cẩn thận loại bỏ khoảng 1 ml phần nổi phía trên của mỗi dung dịch và dịch chiết của chuẩn đối chứng và cho từng loại vào các ống ly tâm polypropylen sạch.

Các dung dịch mẫu có thể bảo quản ở nhiệt độ 2 °C đến 8 °C, nhưng không quá một ngày làm việc.

Trước khi tiến hành phân tích, pha loãng các dung dịch mẫu và dung dịch chuẩn đối chứng bằng dung dịch đệm cho đậu tương (A.4.2.2) theo bảng A.1.

Bảng A.1 – Độ pha loãng tùy theo chất nền

Chất nền	Độ pha loãng
Đậu tương	1 : 300
Bột đậu tương	1 : 300
Bột đậu tương đã tách chất béo ^a	1 : 300
Mẫu protein ^a	1 : 10

^a Các chất nền này chưa được đánh giá thử nghiệm cộng tác. Độ pha loãng được dựa trên kinh nghiệm của nhà sản xuất.

Tóm tắt các bước tách chiết được nêu trong Bảng A.2

A.6.9.2 Quy trình phản ứng miễn dịch ELISA

A.6.9.2.1 Khái quát

Bộ thử ELISA có thể thực hiện theo nhiều dạng khác nhau sử dụng bất kỳ số hàng nào trong các hàng 8 giếng. Nên theo cách nạp giếng ngẫu nhiên, nghĩa là các mẫu thử và mẫu kiểm chứng không phải khi nào cũng cần phải nạp vào một vị trí cố định để tránh các ảnh hưởng vị trí trên khay có thể xảy ra, nếu có.

Tất cả các phản ứng phải được chạy tối thiểu hai lần song song và tính giá trị hấp thụ trung bình. Mỗi lần chạy bao gồm: phép thử trắng, mẫu trắng và dung dịch chuẩn đối chứng dương.

Khi đã bắt đầu phân tích thì tất cả các bước phải được hoàn tất mà không bị gián đoạn.

Tóm tắt quy trình ELISA được đưa ra trong bảng A.3.

A.6.9.2.2 Ủ ấm

Dùng micropipet lấy 100 μ l dung dịch mẫu pha loãng và dung dịch mẫu chuẩn cho vào các giếng thích hợp và tiến hành phép thử trắng. Sử dụng các tip riêng cho mỗi lần hút pipet để tránh nhiễm bẩn sang các lần tiếp theo. Bọc khay bằng giấy bóng kính hoặc giấy nhôm (A.5.4) để tránh nhiễm bẩn và bay hơi. Trước khi ủ ấm, nên lắc nhẹ khay vi đĩa bằng cách dùng ngón tay trở và ngón cái cầm mép ngắn của khay và đưa nhẹ sang hai phía.

Ủ ấm khay vi đĩa ở 37 °C trong 1 giờ.

A.6.9.2.3 Rửa

Rửa 3 lần bằng 300 μ l dung dịch đệm rửa (A.6.7) bằng cách dùng máy trộn (A.5.8).

Rửa thủ công: Đổ hết lượng chứa trong các giếng bằng cách lật úp xuống các chậu rửa hoặc thùng rác. Dùng chai rửa loại 500 ml chứa dung dịch rửa, làm đầy các giếng, để khoảng 60 giây, sau đó lại đổ hết như trên. Lặp lại các bước rửa đó ít nhất 3 lần. Loại bỏ dịch lỏng và bọt khí còn sót lại bằng cách lật úp xuống lớp giấy lau.

Để tránh các hàng giếng bị rơi khỏi giá đỡ, nên dùng băng dính dán lại.

Rửa tự động: Sau khi ủ, dùng máy rửa vi đĩa hút hết lượng chứa trong các giếng, sau đó đổ đầy các giếng bằng dung dịch đệm rửa làm việc. Lặp lại thao tác hút rửa giếng ít nhất 3 lần. Cuối cùng, dùng máy hút khô các giếng rồi vỗ các khay lật úp lên tập giấy lau để loại hết chất lỏng và bọt khí.

CHÚ THÍCH 1 Không được để các giếng khô hẳn, vì có thể ảnh hưởng đến việc phân tích.

CHÚ THÍCH 2 Rửa không kỹ sẽ làm sai lệch kết quả. Dù rửa thủ công hay rửa bằng máy, cũng phải chắc chắn rằng mỗi giếng đều được rửa như nhau với các thể tích bằng nhau.

A.6.9.2.4 Bổ sung dung dịch kháng thể cộng hợp

Dùng micropipet cho 100 μ l dung dịch kháng thể cộng hợp làm việc (A.6.6.2) vào mỗi giếng. Bọc khay lại để tránh nhiễm bẩn và bay hơi.

Trước khi ủ, lắc nhẹ các khay vi đĩa bằng cách dùng ngón tay trở và ngón cái cầm mép ngắn của khay và đưa nhẹ sang hai phía.

Ủ các khay vi đĩa ở nhiệt độ 37 °C trong 1 giờ.

A.6.9.2.5 Rửa

Sau giai đoạn ủ, lặp lại các bước rửa như mô tả ở trên (A.6.9.2.3)

A.6.9.2.6 Bổ sung cơ chất

Dùng micropipet lấy 100 μ l cơ chất màu (A.4.2.6) cho vào mỗi giếng. Lắc nhẹ khay và ủ trong 10 phút ở nhiệt độ phòng.

Việc bổ sung cơ chất màu phải thực hiện liên tục, không gián đoạn. Duy trì trình tự và khoảng cách thời gian như nhau trong quá trình bổ sung dung dịch.

A.6.9.2.7 Bổ sung dung dịch hãm

Sau khi ủ, dùng pipet lấy 100 μ l dung dịch hãm (A.4.2.7) cho vào mỗi giếng, việc bổ sung dung dịch hãm phải theo đúng trình tự như đối với thuốc thử màu. Lắc nhẹ khay trong 10 giây để ngừng sự hiện màu và phân bố đều dung dịch hãm.

Việc bổ sung dung dịch hãm phải được thực hiện liên tục, không được gián đoạn. Cần bảo vệ các khay tránh ánh nắng mặt trời, nếu không cường độ màu có thể bị ảnh hưởng.

A.6.9.2.8 Đọc độ hấp thụ

Dùng máy đọc vi đĩa, có gắn bộ lọc phù hợp để đọc ở bước sóng 450 nm, đo độ hấp thụ trong từng giếng. Việc đọc phải thực hiện trong 30 phút sau khi bổ sung dung dịch hãm.

Ghi lại kết quả thu được và tính giá trị hấp thụ trung bình hoặc dùng chương trình máy tính.

A.7 Sơ đồ

Bảng A.2 – Quy trình tách chiết

Quy trình	Mô tả
Cân 0,5 g	Cân mẫu phân tích, mẫu trắng, mẫu chuẩn đối chứng
Thêm 4,5 ml	Thêm dung dịch đệm tách chiết (A.4.2.1)
Trộn	Trộn phần mẫu thử với dung dịch đệm chiết cho đến đồng nhất, đối với bột chưa tách chất béo thì thời gian trên sẽ nhỏ hơn 5 phút, còn đối với bột tách chất béo, mẫu protein thì nhiều hơn 15 phút.
Ly tâm ở 5 000 x g	Ly tâm mẫu ở 5 000 x g trong 15 phút, ở 4 °C. Loại bỏ phần nổi phía trên và cho vào một ống sạch.
Độ pha loãng: 1:300 hoặc 1:10 tùy theo loại nguyên liệu được nghiên cứu	Pha loãng dung dịch mẫu thử tạo thành, phân tích trắng và các chuẩn đối chứng.

Bảng A.3 – Quy trình ELISA

Quy trình	Thể tích	Mô tả
Bổ sung	100 μ l	Dùng pipet lấy các dung dịch pha loãng, dung dịch mẫu thử, mẫu trắng và chuẩn đối chứng cho vào các giếng phân tích thích hợp và trộn.
Ủ		Ủ trong 1 giờ ở 37 °C
Rửa		Rửa 3 lần bằng dung dịch đệm rửa (A.6.7)
Bổ sung	100 μ l	Phân phối chất kháng thể cộng hợp (A.4.2.4) vào từng giếng phân tích và trộn.
Ủ		Ủ trong 1 giờ ở 37 °C
Rửa		Rửa 3 lần bằng dung dịch đệm rửa (A.6.7)
Bổ sung	100 μ l	Phân phối cơ chất màu (A.4.2.6) vào từng giếng và trộn.
Ủ		Ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng.
Bổ sung	100 μ l	Phân phối dung dịch hãm (A.4.2.7) vào từng giếng và trộn.
Đo độ hấp thụ		Đo độ hấp thụ của từng giếng phân tích trong máy đọc đĩa ở 450 nm.

A.8 Đánh giá

Số liệu phải được ghi lại.

Dùng các giá trị chuẩn để xây dựng đường chuẩn. Các giá trị từ phân tích trắng phải được trừ khỏi tất cả các giá trị của các dung dịch mẫu thử pha loãng và chuẩn đối chứng. Trung bình của các giá trị đã chỉnh từ mỗi điểm chuẩn được thực hiện hai lần song song phải được dùng để xây dựng đường chuẩn. Giá trị trung bình thu được từ mỗi dung dịch mẫu thử được thực hiện hai lần song song được dùng để suy ra nồng độ từ đường đó.

A.9 Tiêu chí chấp nhận/loại bỏ

Mỗi vận hành phải đáp ứng được các tiêu chí chấp nhận/loại bỏ trong quy trình để có giá trị như liệt kê trong Bảng A.4. Một vận hành gồm: phân tích trắng, mẫu đối chứng dương, mẫu đối chứng âm và mẫu chưa biết. Tất cả các dung dịch mẫu thử, dung dịch mẫu chuẩn và phân tích trắng phải được chạy hai lần song song. Nếu vận hành không đạt các tiêu chí chấp nhận thì phải lặp lại toàn bộ quy trình. Các dung dịch mẫu thử không đạt được các tiêu chí chấp nhận trong bất kỳ lần vận hành nào thì phải tiến hành lần hai.

Bảng A.4 – Tiêu chí chấp nhận hoặc loại bỏ kết quả

Phân tích trắng dung dịch đậm	A 450 nm < 0,30
0 % chuẩn sinh vật biến đổi gen	A 450 nm < 0,30
2,5 % chuẩn đối chứng	A 450 nm \geq 0,8
Tất cả các chuẩn đối chứng dương, OD	CV (OD) của các bản sao \leq 15 %
Dung dịch mẫu không biết	CV (OD) của các bản sao \leq 20 %

A.10 Tình trạng

Phương pháp này đã được thử nghiệm trong một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm trên mẫu chuẩn CRM 410 theo TCVN 6910 (ISO 5725) do Trung tâm Nghiên cứu Phối hợp của Ủy ban châu Âu tại Ispra, Italia thực hiện, xem [3].

Phương pháp được sử dụng đối với phép thử liên phòng khác với mô tả dưới đây liên quan đến các khía cạnh sau:

- không rây,
- không nói rõ sử dụng của các thuốc thử,
- không nói rõ việc chuẩn bị mẫu,
- phương pháp chỉ áp dụng trên mẫu chuẩn chứa 0,1 %, 0,5 % và 2 % CRM 410,
- các chuẩn đối chứng không được phân tích hai lần song song,
- lượng mẫu không đủ để lặp lại phân tích và để áp dụng các tiêu chí chấp nhận/loại bỏ.

Các kết quả thử liên phòng thử nghiệm được liệt kê trong Bảng A.5

Bảng A.5 - Dữ liệu về độ chụm

Phần trăm mẫu sinh vật biến đổi gen trong bột đậu tương	0,5 %	1 %	2 %
Năm thử liên phòng thử nghiệm	1999	1999	1999
Số lượng phòng thử nghiệm	37	37	37
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	37	33	35
Số ngoại lệ (phòng thử nghiệm)	0	4	2
Số kết quả được chấp nhận	37	33	35
Giá trị trung bình \bar{X} , % sinh vật biến đổi gen	0,440	0,952	1,902
% của giá trị thực	88,1	95,2	95,1
Độ lệch chuẩn lặp lại s_r ^a	0,062	0,092	0,146
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại RSD_r , % ^b	12,4	9,2	7,3
Giới hạn lặp lại r [$r = 2,8 \cdot s_r$] ^a	0,176	0,260	0,414
Độ lệch chuẩn tái lập s_R ^a	0,083	0,123	0,186
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập RSD_R , % ^b	16,6	12,3	9,3
Giới hạn tái lập R [$R = 2,8 \cdot s_R$] ^a	0,238	0,349	0,527

^a s_r , s_R , r , và R được biểu thị bằng đơn vị % sinh vật biến đổi gen.

^b RSD_r và RSD_R được biểu thị như phần trăm của giá trị thực.

Thư mục tài liệu tham khảo

ISO 5725 (all Parts), Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results.

ISO Guide 30, Terms and definitions used in connection with reference materials.

[1] Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling: In House method validation. In House validated methods and their role in methods of analysis for codex purposes. Codex Alimentarius Commission. (CX/MAS 98/8), 1998, Budapest, Hungary, 23-27 November 1998

[2] Horwitz W.: Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. *Pure and Applied Chemistry*, 1995, **67**: 331-343.

[3] Lipp, M., Anklam, E., and Stave, J., 2000. Validation of an Immunoassay for Detection and Quantitation of a Genetically Modified Soybean in Food and Food Fractions Using Reference Materials: Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International*. Vol 83, No.4, pp.919 -927.

[4] GMO Food Ingredient Testing, Soya kit User's Guide, (1999) Strategic Diagnostics Inc., Rev. 052099, Vers.1.8.