

THIẾT LẬP PHƯƠNG PHÁP LẤY MẪU LÚA THEO TIÊU CHUẨN ISO/IEC 17025: 2017 PHỤC VỤ THỬ NGHIỆM XÁC ĐỊNH LOCUS GEN

Chu Đức Hà¹, Nguyễn Thị Minh Nguyệt¹, Nguyễn Thị Nhài¹,
Nguyễn Bá Ngọc¹, Khuất Thị Mai Lương¹, Phạm Thị Lý Thu¹, Lê Hùng Lĩnh¹

TÓM TẮT

Tiêu chuẩn ISO/IEC 17025 (International Organization for Standardization/ International Electrotechnical Commission) là một trong những thước đo quan trọng chứng nhận cho phòng thí nghiệm đạt tiêu chuẩn quốc tế. Trong nghiên cứu này, các phương pháp lấy mẫu lúa phục vụ thử nghiệm xác định locus gen mục tiêu đã được thiết lập. Cụ thể, hai phương pháp lấy mẫu thử nghiệm ngoài đồng ruộng và trong phòng thí nghiệm đã được xây dựng thành công. Trong đó, các bước thu, bảo quản mẫu lá lúa trên đồng ruộng và tiếp nhận, bảo quản, chuẩn bị mẫu thử nghiệm từ lô mẫu hạt giống nhận tại phòng thử nghiệm cũng đã được chú ý. Kết quả của nghiên cứu này có ý nghĩa trong đưa ra quy trình lấy mẫu theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025: 2017, từ đó thành lập và vận hành phòng sinh học phân tử giám định gen thực vật đạt chuẩn ISO/IEC 17025:2017.

Từ khóa: ISO, lúa, thử nghiệm, quy trình, lấy mẫu

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

ISO/IEC 17025 (International Organization for Standardization/ International Electrotechnical Commission) là tiêu chuẩn về hệ thống quản lý chất lượng, được áp dụng đặc thù cho các lĩnh vực thử nghiệm và hiệu chuẩn do Tổ chức Quốc tế về Tiêu chuẩn hóa thiết lập và ban hành (Honsa and McIntyre, 2003). Được thiết kế nhằm hợp nhất với tiêu chuẩn về hệ thống quản lý chất lượng ISO 9001, tiêu chuẩn ISO/IEC 17025 đưa ra một cách

nghiêm ngặt các quy định để đảm bảo năng lực kỹ thuật, mang lại kết quả đo lường/thử nghiệm đạt độ tin cậy cao và được quốc tế thừa nhận (Yamamoto *et al.*, 2010). Vì vậy, đạt chuẩn ISO/IEC 17025 được xem là một tiêu chuẩn “cứng” để đánh giá khả năng hoạt động của phòng thử nghiệm và hiệu chuẩn kiểu mẫu.

Hiện nay, nhu cầu xác định sự có mặt của một số locus gen mục tiêu trong các giống lúa (*Oryza sativa*) được xem là quan tâm hàng đầu trong các

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp, VAAS

chương trình chọn tạo giống nhằm nâng cao tính chống chịu điều kiện bất lợi. Nhiều locus gen kháng với bất lợi sinh học, như bệnh đạo ôn, bạc lá và rầy nâu, và bất lợi phi sinh học, như ngập úng, mặn có thể phát hiện một cách chính xác bằng kỹ thuật sinh học phân tử dựa trên các chỉ thị liên kết chặt với gen kháng. Do vậy, thiết lập quy trình xác định chính xác sự có mặt của gen kháng mục tiêu trong các giống lúa được xem là rất cần thiết. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có ghi nhận về phòng thử nghiệm đạt chuẩn ISO/IEC 17025: 2017 đảm nhận chức năng xác định sự có mặt của các locus gen mục tiêu trên các giống lúa ở Việt Nam.

Trong nghiên cứu này, phương pháp lấy mẫu thử nghiệm đã được thiết lập làm cơ sở quan trọng cho ban hành Quy trình lấy mẫu và quản lý mẫu thử theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025: 2017. Mục đích của nghiên cứu này nhằm triển khai một phương pháp lấy mẫu tiêu chuẩn đảm bảo tính đại diện của mẫu, đồng thời giảm thiểu tối đa lỗi trong quá trình xác định gen mục tiêu.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu giống lúa cần thử nghiệm sự có mặt/ vắng mặt của locus gen mục tiêu, gồm lá lúa thu thập trên đồng ruộng hoặc hạt giống lúa do khách hàng cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị trang thiết bị và dụng cụ

Túi ziplock, kéo cắt mẫu, găng tay y tế, panh kẹp, thùng lạnh bảo quản mẫu và một số đồ dùng cần thiết khác.

2.2.2. Phương pháp tiếp nhận mẫu

Mẫu giống có thể được thu thập trên đồng ruộng hoặc được khách hàng mang đến phòng thí nghiệm. Đối với mẫu giống trên đồng ruộng, tiến hành đánh số cây theo thứ tự hàng 1 - 10 - 20 - 30 - 40 - 50 - 60 - 70 - 80 - 90 - 100. Nếu trong hàng có khóm bị thiếu thì đeo thẻ tag đánh dấu và đếm số tiếp tục từ khóm tiếp theo. Đối với lô hạt giống giao nhận tại phòng thử nghiệm, tiến hành kiểm tra tem nhãn và phiếu giao nhận mẫu giống trước khi lấy mẫu.

2.2.3. Phương pháp thu mẫu và chuẩn bị mẫu

Đối với mẫu lá thu trực tiếp trên đồng ruộng: Thu 100 mẫu lá đại diện cho 100 cây của giống lúa cần thử nghiệm. Cây được đánh số và ghi nhãn theo thứ tự. Mẫu lá non, sạch bệnh được cắt bằng kéo và cắt

trong túi ziplock, ghi nhãn và bảo quản trong thùng lạnh. Mẫu được vận chuyển về phòng thí nghiệm và bảo quản ở 4°C.

Đối với lô hạt giống tại phòng thí nghiệm: Phương pháp thu mẫu được bên giao thực hiện theo hướng dẫn của Tiêu chuẩn Việt Nam về Hạt giống lúa nước - Phương pháp thử TCVN 1700:1976 (Bộ Khoa học và Công nghệ, 1986). Mẫu giống được kiểm tra tem nhãn, phiếu giao nhận trước khi bảo quản trong tủ mát 4°C. Hạt giống đảm bảo chất lượng được ngâm ủ nảy mầm trên đĩa petri trong điều kiện ẩm, nhiệt độ 37°C (Bộ Khoa học và Công nghệ, 1986).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

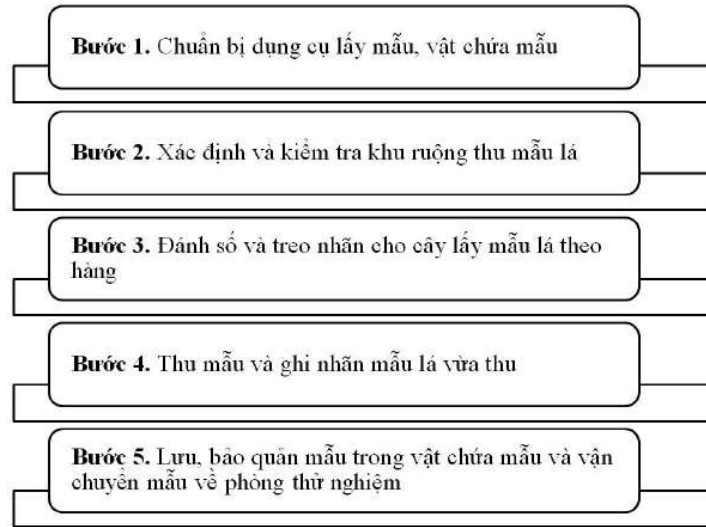
3.1. Xây dựng phương pháp thu và bảo quản mẫu lá lúa trên đồng ruộng

Phòng Sinh học phân tử Giám định gen thực vật được xây dựng nhằm thử nghiệm các chỉ tiêu đăng ký công nhận theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025: 2017. Các chỉ tiêu thử nghiệm là các locus gen mục tiêu (kháng sâu bệnh, chống chịu với các điều kiện bất lợi của ngoại cảnh, các gen năng suất, chất lượng... trong các giống lúa). Để đạt được mục tiêu trên, việc xây dựng và ban hành phương pháp tiêu chuẩn đối với việc thu mẫu và bảo quản mẫu là cần thiết nhằm xây dựng được Quy trình Lấy mẫu và quản lý mẫu thử của phòng thử nghiệm.

Để cung cấp mẫu đại diện cho các phân tích thử nghiệm và giảm tối đa lỗi xảy ra trong quá trình xác định, quy trình lấy mẫu phải phụ thuộc vào kế hoạch lấy mẫu của phòng thử nghiệm. Mặc dù các bước lấy mẫu lá trên đồng ruộng khá đơn giản, tuy nhiên quy trình thu mẫu cần phải trở thành một tài liệu tiêu chuẩn, từ đó có thể sử dụng cho phòng thử nghiệm một cách chính quy (Bùi Hữu Điền, 2018).

Cụ thể, phương pháp thu và bảo quản mẫu lá lúa trên đồng ruộng phục vụ cho Phòng Sinh học phân tử giám định gen thực vật theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025 được xây dựng gồm năm bước chính (Hình 1).

- Bước 1. Chuẩn bị dụng cụ lấy mẫu, vật chứa mẫu: Các dụng cụ lấy mẫu, chia mẫu, chứa mẫu được chuẩn bị theo nguyên tắc chung: phải sạch trung tính và không làm nhiễm bản, nhiễm chéo cho mẫu lấy, đồng thời hình dáng, vật liệu chế tạo và kích thước của dụng cụ lấy mẫu và chứa mẫu phải dựa vào các tiêu chuẩn phù hợp cho mẫu lá lúa (Bùi Hữu Điền, 2018). Trong nghiên cứu này, dụng cụ được chuẩn bị bao gồm: kéo y tế, túi ziplock, bút viết kính, găng tay y tế, thùng lạnh bảo quản mẫu.



Hình 1. Các bước tiến hành khi thu mẫu lúa trên đồng ruộng phục vụ cho phòng thí nghiệm giám định gen thực vật chuẩn ISO/IEC 17025

- Bước 2. Xác định và kiểm tra khu ruộng thu mẫu lá: Trước khi lấy mẫu giống lúa thử nghiệm, cần xác định và kiểm tra khu ruộng thu mẫu lá lúa do khách hàng yêu cầu. Ruộng thu mẫu lá là ruộng cây theo hàng, lúa được cấy 1 dảnh, đảm bảo sạch bệnh, tiện lợi cho việc ghi sơ đồ và đánh dấu khu thu mẫu.

- Bước 3. Đánh số và treo nhãn cho cây lấy mẫu lá theo hàng: Đối với mỗi mẫu giống cần thử nghiệm sẽ tiến hành thu mẫu lá trên 100 cây, do đó hàng thu mẫu phải được ghi sơ đồ và đánh số số cây theo thứ tự hàng 1 - 10 - 20 - 30 - 40 - 50 - 60 - 70 - 80 - 90, trong đó đánh dấu lại những khóm lúa trong hàng không đạt tiêu chuẩn, như biểu hiện nhiễm bệnh, hình thái không đồng đều để tránh sai sót trong quá trình thu mẫu.

- Bước 4. Thu mẫu và ghi nhãn mẫu lá vừa thu: Mỗi mẫu giống lúa cần thử nghiệm sẽ được thu 100 cá thể, tương ứng với 100 cây lúa. Mỗi cây lúa được thu 2 mẫu lá non, không nhiễm bệnh, đảm bảo đủ khối lượng mẫu cho phân tích thử nghiệm và lưu mẫu. Sau mỗi lần cắt cần phải vệ sinh kéo cắt mẫu bằng cồn 70° để tránh nhiễm bản, nhiễm chéo mẫu trong quá trình lấy mẫu, chia mẫu. Các mẫu lá được lưu giữ trong túi ziplock đã ghi nhãn và bảo quản trong thùng bảo quản lạnh đảm bảo mẫu lá tươi cho bước tách chiết ADN.

- Bước 5. Lưu, bảo quản mẫu trong vật chứa mẫu và vận chuyển mẫu về phòng thử nghiệm: Để tránh việc xảy ra mâu thuẫn về tính đại diện của mẫu được thu (Bùi Hữu Điền, 2018). Trong nghiên cứu này, 100 cây của mỗi mẫu giống lúa cần thử nghiệm được thu mẫu lá, mỗi cây thu hai lá (một lá cho phân tích

thử nghiệm, một lá để lưu mẫu). Trong đó, người lấy mẫu cần đảm bảo các điều kiện bảo quản ngoài đồng ruộng để tránh các tác nhân như nhiệt độ, ánh sáng, độ ẩm có thể ảnh hưởng đến độ tươi của lá (Semagn, 2014). Cuối cùng, mẫu lá được bảo quản trong thùng bảo quản lạnh và được vận chuyển về phòng thử nghiệm để chuẩn bị cho các bước tiếp theo của quy trình thử nghiệm.

Đối với phương pháp thu mẫu lá từ ruộng thí nghiệm, thời gian phù hợp nhất để tiến hành là sáng sớm để đảm bảo mẫu lá tươi được vận chuyển về phòng thử nghiệm và tách chiết ADN ngay trong ngày. Mẫu lưu được bảo quản trong tủ lạnh sâu -20°C trong thời hạn 1 tháng kể từ ngày thu mẫu. Như vậy, với năm bước chính và các điểm cần chú ý nêu trên, phương pháp thu mẫu lá lúa trên đồng ruộng đã đảm bảo những tiêu chuẩn cần thiết cho Phòng Sinh học phân tử giám định gen thực vật thiết lập Quy trình Lấy mẫu và Quản lý mẫu thử phù hợp với tiêu chuẩn ISO/IEC 17025:2017.

3.2. Xây dựng phương pháp thu nhận, bảo quản và chuẩn bị mẫu từ lô hạt giống

Quy trình nhận lô mẫu hạt giống và xử lý mẫu do khách hàng cung cấp phục vụ cho Phòng Sinh học phân tử giám định gen thực vật được triển khai tùy thuộc vào tình trạng lô mẫu giống. Cán bộ tiếp nhận sẽ kiểm tra sơ bộ tính đồng nhất của lô mẫu đối chiếu với giấy tờ kèm theo, mô tả và xác định hình dạng, sự nguyên vẹn, độ sạch và mức độ nhiễm tạp của bao gói. Các lô mẫu giống không đạt yêu cầu về sự đồng nhất, bị lẫn hạt mốc, mối mọt sẽ không được tiếp nhận. Lô mẫu hạt giống đạt yêu cầu sẽ

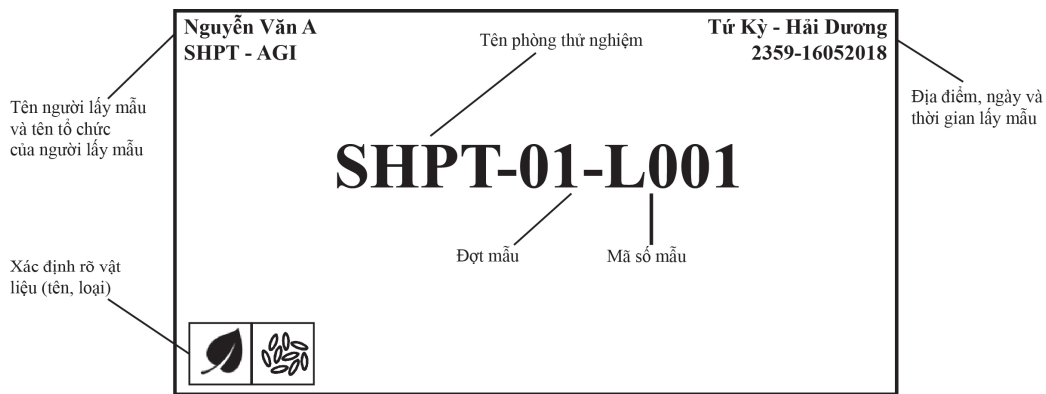
được cán bộ của phòng thử nghiệm tiếp nhận và hai bên cùng ký nhận vào phiếu giao nhận mẫu giống. Phiếu giao nhận sẽ được photo gửi khách hàng 1 bản, bản gốc được lưu trong hồ sơ của phòng thử nghiệm. Mẫu hạt giống đạt yêu cầu sẽ được lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử nghiệm như sau: Đối với mỗi lô mẫu cần thử nghiệm, 20 hạt được lấy ngẫu nhiên tại mỗi 10 vị trí khác nhau trong lô. Tổng số 200 hạt lúa sẽ được ngâm ủ và cho nảy mầm.

Hạt mẫu được xử lý ngâm ủ theo hướng dẫn trong TCVN 1700:1976 (Bộ Khoa học và Công nghệ, 1986). Trong đó, hạt được nảy mầm trên đĩa petri có giấy ẩm, đặt ở điều kiện nhiệt độ ẩm $37 \div 40^\circ\text{C}$ trong $2 \div 3$ ngày. Cần chú ý phải luôn duy trì độ ẩm cho đĩa petri bằng cách bổ sung nước vào giấy. Mẫu lá mầm của từng hạt giống được cắt ở giai đoạn $7 \div 10$ ngày sau khi ngâm ủ, chiều dài mẫu cắt $2,0 \div 2,5$ cm, chuyển vào các ống eppendorf 2 ml đã khử trùng và

giữ lạnh để tiến hành bước tách chiết ADN tiếp theo. Như vậy, với các bước và các điểm cần chú ý nêu trên, phương pháp thu nhận, bảo quản và chuẩn bị mẫu thử nghiệm từ lô mẫu hạt giống nhận tại phòng thử nghiệm đã đảm bảo những tiêu chuẩn cần thiết cho Phòng Sinh học phân tử giám định gen thực vật thiết lập Quy trình Lấy mẫu và Quản lý mẫu thử phù hợp với tiêu chuẩn ISO/IEC 17025:2017.

3.3. Hoàn thiện quy trình quản lý lô hàng và bảo quản mẫu

Việc kiểm soát quá trình bảo quản sau lấy mẫu và thông tin về mẫu giống thử nghiệm rất quan trọng, mẫu sau khi lấy phải bao gói bằng các bao bì thích hợp và phải được ghi nhãn với đầy đủ các thông tin để truy xuất nguồn gốc nếu cần. Để thống nhất theo quy chuẩn chung, nhãn mác thông tin về mẫu thử nghiệm đã được thiết kế với mục đích cung cấp đầy đủ thông tin về lô mẫu giống (Hình 2).



Hình 2. Mẫu nhãn mác lưu trữ và bảo quản mẫu thử nghiệm của Phòng Sinh học phân tử giám định gen thực vật theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025: 2017

Cụ thể, nhãn mác lưu trữ và bảo quản mẫu thử nghiệm của Phòng Sinh học phân tử giám định gen thực vật có đầy đủ các thông tin về tên phòng thử nghiệm, số thứ tự đợt lấy mẫu trong năm, đối tượng thu mẫu (lúa hoặc loại cây trồng khác), mã số mẫu thử nghiệm. Nhãn mác cũng cung cấp thông tin về người có trách nhiệm lấy mẫu, thời gian và địa điểm lấy mẫu và loại mẫu (lá, hạt...). Các thông tin trên nhãn mác cần được thống nhất với biên bản tiếp nhận lô mẫu giống và khách hàng để tránh sai sót cũng như xác thực tính đại diện của phép thử nghiệm.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Đã thiết lập được phương pháp lấy mẫu thử nghiệm phục vụ xác định locus gen mục tiêu. Phương pháp lấy mẫu thử nghiệm được chia thành

phương pháp áp dụng cho việc thu, bảo quản mẫu lá lúa trên đồng ruộng và phương pháp áp dụng cho việc thu nhận, bảo quản, chuẩn bị mẫu thử nghiệm từ lô mẫu hạt giống nhận tại phòng thử nghiệm.

Việc xây dựng phương pháp tiêu chuẩn cho việc lấy mẫu thử nghiệm được xem là những bước đi đầu tiên cho việc ban hành Quy trình lấy mẫu và quản lý mẫu thử theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17025: 2017, làm cơ sở cho việc xây dựng và vận hành Phòng Sinh học phân tử giám định gen thực vật đạt chuẩn ISO/IEC 17025:2017.

4.2. Đề nghị

Nghiên cứu sẽ được tiếp tục nhằm thiết lập quy trình đánh giá 10 gen chỉ tiêu ở lúa, từ đó đưa vào áp dụng cho Phòng Sinh học phân tử giám định gen thực vật đạt chuẩn ISO/IEC 17025:2017.

LỜI CẢM ƠN

Công trình nghiên cứu nằm trong hoạt động xây dựng Phòng Sinh học phân tử giám định gen thực vật đạt chuẩn ISO/IEC 17025:2017, thuộc Tiểu dự án FIRST-AGI “Nâng cao năng lực nghiên cứu, làm chủ công nghệ genom học (Genomics-assisted breeding - GAB) và công nghệ chọn giống ứng dụng chỉ thị phân tử (Marker-assisted backcrossing - MABC) để chọn tạo các giống lúa kháng đa yếu tố ứng phó với biến đổi khí hậu”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bộ Khoa học và Công nghệ, 1986. Tiêu chuẩn Việt Nam về Hạt giống lúa nước - Phương pháp thử: TCVN 1700:1976.

Bùi Hữu Điền, 2018. Lấy mẫu cho phân tích thử nghiệm. *Tạp chí Thử nghiệm Ngày nay*, 12: 52-54.

Helliwell, E. E., Yang, Y., 2013. Molecular strategies to improve rice disease resistance. *Methods Mol Biol*, 956: 285-309.

Honsa, J. D., McIntyre, D. A., 2003. ISO 17025: Practical benefits of implementing a quality system. *JAOAC Int*, 86(5): 1038-1044.

Semagn, K., 2014. Leaf tissue sampling and DNA extraction protocols. In: *Besse P (ed) Molecular plant taxonomy: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ: 53-67.

Yamamoto, S., Asakura, H., Machii, K., Igimi, S., 2010. Approval of ISO/IEC 17025 and quality control of laboratory testing. *Kokuritsu Jyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku*, 128: 78-80.

Establishment of rice sampling protocols with the ISO/IEC 17025: 2017 standard for the identification of locus for target genes

Chu Duc Ha, Nguyen Thi Minh Nguyet, Nguyen Thi Nhai, Nguyen Ba Ngoc, Khuat Thi Mai Luong, Pham Thi Ly Thu, Le Hung Linh

Abstract

ISO/IEC 17025 Standard (International Organization for Standardization/ International Electrotechnical Commission) is considered as one of the most critical criteria for the international laboratory certification. In this study, the rice sampling protocols have been successfully established for the testing of the identification of target genes. Particularly, two methods in the field and laboratory have been classified. Among them, the steps of sample collecting and storage in the field were highly recommended as much care as the process of sample receiving, storage and preparation from the seed package in the laboratory. Our results could provide the rice sampling protocols according to the ISO/IEC 17025: 2017 standard, therefore, contribute to the establishment and operation of ISO/IEC 17025: 2017 certified laboratory of the molecular biology for the plant gene(s) detection.

Keywords: ISO, rice, test, protocol, sampling

Ngày nhận bài: 24/10/2018

Ngày phản biện: 29/10/2018

Người phản biện: TS. Huỳnh Văn Nghiệp

Ngày duyệt đăng: 15/11/2018