

SỬ DỤNG PHƯƠNG PHÁP PCR PHÁT HIỆN MỘT SỐ LOẠI THỊT VẬT NUÔI

Nguyễn Thương Thương, Trần Bích Phương,
Nguyễn Thái Anh, Đỗ Đức Lực, Nguyễn Hoàng Thịnh*

Khoa Chăn nuôi, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: nhthinh@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 08.12.2022

Ngày chấp nhận đăng: 03.04.2023

TÓM TẮT

Phương pháp xét nghiệm PCR được sử dụng rộng rãi để nhận các đoạn DNA đặc hiệu, phương pháp này cũng được xác nhận là nhạy và ít tốn kém so với các phương pháp như real-time PCR, giải trình tự đoạn DNA, có thể sử dụng phổ biến trong phòng thí nghiệm thông thường, không yêu cầu cơ sở vật chất đặc biệt. Nghiên cứu này sử dụng phương pháp PCR để xây dựng và phát triển quy trình nhận diện chính xác ba loại thịt (bò, lợn và gà) ở dạng sống và xử lý nhiệt (tổng 30 mẫu). Bộ mồi được thiết kế mồi xuôi dùng chung cho ba loài và mồi ngược chuyên biệt cho từng loài. Kết quả cho thấy DNA đã được nhận đoạn thành công với các băng có kích thước 274, 398 và 227bp (tương ứng đặc trưng cho loài bò, lợn, gà), đồng thời nghiên cứu này có thể nhận diện được đoạn DNA đặc trưng của từng loài ở mẫu riêng lẻ và mẫu trộn hai và ba loại thịt đại diện cho hai và ba loài khác nhau có thể phát hiện ở nồng độ DNA là 0,16 ng/μl.

Từ khóa: Thịt bò, thịt lợn, thịt gà, PCR.

Use of PCR Method for Identification of Meat of some Livestock Species

ABSTRACT

The PCR test method is widely used in the multiplication of specific DNA fragments since it is sensitive and inexpensive, and can be used universally in the routine laboratory. This study used PCR to develop a procedure to accurately identify three types of meat (beef, pork, and chicken) in raw and heat-treated forms (30 samples total). The primer set was designed with forward primer for all three species and specific reverse primer for each species. The results show that DNA fragments were successfully amplified with specific size band of 274, 398 and 227 bp (specific for cows, pigs and chickens, respectively). This study indicates that genes in individual and mixed samples of two and three meats representing two and three different species can be identified with the limit of detection down to 0.16 ng/μl.

Keywords: Cattle meat, pork, chicken meat, PCR.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Khi kinh tế ngày càng phát triển, nhiều người tiêu dùng có xu hướng quan tâm đến chất lượng và vệ sinh an toàn thực phẩm. Việc phân biệt chính xác loại thịt trong thực phẩm là mối quan tâm của toàn xã hội nhằm bảo vệ người tiêu dùng, đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm. Theo Ayaz & cs. (2006), khoảng 22% mẫu thịt, salami, xúc xích và thịt viên ở Thổ Nhĩ Kỳ chứa

loại thịt không được ghi trên nhãn; năm 2013, Châu Âu vướng vào vụ bê bối về sự hiện diện của thịt ngựa không được khai báo trong thực phẩm có chứa thịt bò (Di Giuseppe & cs., 2015). Tại Việt Nam, Trần Minh Tấn & Nguyễn Ngọc Tuấn (2019) phát hiện được 50% (6/12) mẫu thịt bò tươi không phải thịt bò mà là thịt lợn và thịt trâu, 66,67% (8/12) mẫu xúc xích bò chứa thịt trâu trong sản phẩm, tất cả 12 mẫu bò viên được kiểm tra đều phát hiện có chứa DNA bò,

nhưng 66,67% mẫu lẫn thịt trâu và 16,67% mẫu lẫn thịt heo. Các vụ khủng hoảng trên đây lên lo ngại phải có những quy định kiểm soát chặt chẽ hơn về thực phẩm bán cho người tiêu dùng. Sản phẩm thịt bị tạp nhiễm dù vô tình hay cố ý đều là hành vi gian lận thương mại và là nguy cơ tiềm ẩn đối với sức khỏe cộng đồng.

Vì thế, việc phát triển và ứng dụng các phương pháp phát hiện chính xác và nhanh chóng các loại thịt trong những sản phẩm chế biến từ thịt gia súc, gia cầm khác nhau là nhu cầu cần thiết của thị trường và xã hội. Có nhiều phương pháp để xác định nguồn gốc thịt như phương pháp phát hiện dựa vào protein (điện di, miễn dịch, sắc ký). Tuy vậy protein có khả năng bị giảm chất lượng hoặc biến tính trong các sản phẩm thịt chế biến (Ebbehoj & Thomsen, 1991). Do đó, các phương pháp PCR để nhận diện DNA đặc trưng cho loài thường được sử dụng hơn. Phương pháp PCR đã được Matsunaga & cs. (1999) sử dụng để phát hiện sáu loại thịt làm nguyên liệu thực phẩm (bò, lợn, gà, cừu, dê và ngựa), giới hạn phát hiện là 0,25 ng/ μ l nồng độ DNA đối với tất cả các loại. Gần hơn, Tauma & Abdul-Hassan (2014) cũng sử dụng phương pháp này để phát hiện 7 loại thịt nhờ khuếch đại một phần của gen cytochrom b ty thể thông qua PCR.

Ở Việt Nam, năm 2018, Hồ Viết Thế & cs. (2018) đã sử dụng sự cặp mỗi đặc hiệu trong nhân đoạn DNA của bò và lợn để xây dựng được phương pháp phân biệt hai loại thịt này trong thực phẩm, nghiên cứu đã nhận diện ADN thành công với kích thước băng vạch đặc trưng 294bp đối với thịt heo và 106bp đối với thịt bò.

Tuy nhiên, các nghiên cứu về phát hiện loại thịt tại Việt Nam còn khá ít; do đó, nghiên cứu này nhằm xây dựng và tối ưu hóa các điều kiện phản ứng PCR để nhận diện DNA đặc hiệu, từ đó có thể phát hiện ba loại thịt phổ biến tại các chợ và siêu thị hiện nay (bò, lợn, gà), góp phần giúp người tiêu dùng và cơ quan quản lý thị trường phát hiện chính xác nguồn gốc sản phẩm, làm tiền đề để có thể nhận diện sự lẫn tạp thịt trong sản phẩm chế biến cho hướng nghiên cứu sau này.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Mẫu thịt sử dụng trong nghiên cứu này là 30 mẫu thịt tươi (10 mẫu thịt bò (*Bos Taurus*), 10 mẫu thịt lợn (*Sus scrofa domesticus*), 10 mẫu thịt gà (*Gallus gallus*) được thu thập từ các chợ dân sinh trên địa bàn huyện Gia Lâm, Hà Nội, vận chuyển về phòng thí nghiệm bằng thùng xốp có đá lạnh. Mỗi loại thịt thu mẫu 200g, chia thành các mẫu kích thước 1cm \times 1cm, trong đó 100g để sống và 100g luộc sôi (100°C trong 20 phút). Các mẫu thịt sống và chín được cho vào từng túi nilon sạch, dán nhãn và bảo quản ở -20°C đến khi sử dụng để hạn chế sự phân rã của DNA.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Tách và tinh sạch DNA: Tiến hành tách chiết DNA theo phương pháp tách chiết phenol:chloroform của Sambrook (2003).

- Kiểm tra độ tinh sạch và chất lượng DNA: Độ tinh sạch của DNA được đo bằng máy quang phổ đa năng Thermo Scientific™ NanoDrop™ One và tỷ lệ hấp thụ ở bước sóng 260 và 280nm (tỷ lệ A260/280) và bước sóng 260 và 230nm (A260/A230). Chất lượng và độ toàn vẹn của DNA tổng số được kiểm tra bằng phương pháp chạy điện di trên gel agarose 1%.

- Phản ứng PCR nhận các đoạn gen

Các cặp mồi thiết kế dựa trên nguyên tắc trình tự mỗi xuôi dùng chung cho các loài và trình tự mỗi ngược chuyên biệt cho từng loài (Matsunaga & cs., 1999). Trình tự cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu được lấy từ trình tự gen cytochrom b từ các loài khác nhau và được tham khảo từ Matsunaga & cs. (1999) như sau:

Mồi xuôi: SIM (5'-GACCTCCCAGCTCC ATCAAACATCTCATCTTGATGAAA-3') và mồi ngược [mồi gà (5'-AAGATACAGATGAAGAAGAA TGAGGCG- 3'), mồi lợn (5'-GCTGATAGTAG ATTTGTGATGACCGTA-3') và mồi bò (5'-CTA GAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG-3')]

Độ nhạy của xét nghiệm PCR được xác nhận bằng cách pha loãng nối tiếp các mẫu DNA, bắt đầu với 10 ng/ μ l và giảm dần xuống 2 ng/ μ l. Năm nồng độ DNA (10, 7, 5, 2 và

1 ng/ μ l) của các mẫu đã được sử dụng để khuếch đại PCR nhằm xác định nồng độ tối thiểu phát hiện được sự có mặt của DNA trong mẫu thử.

Ban đầu, các phản ứng PCR được thực hiện đơn lẻ với các cặp primer chuyên biệt cho từng loại thịt. Phản ứng PCR được thực hiện trong tổng thể tích 25 μ l bao gồm 2 μ l DNA (5 nồng độ); 10pm mỗi môi, 0,2mm mỗi dNTP, 1U Taq polymerase, nước khử ion và dung dịch đệm vừa đủ. Phản ứng khuếch đại DNA được tiến hành trong máy PCR Thermal Cycler Gene Atlas G (Nhật Bản) theo quy trình sau: 94 $^{\circ}$ C trong 4 phút. 35 chu kỳ gồm: 94 $^{\circ}$ C trong 45 giây, 50 $^{\circ}$ C trong 45 giây, 72 $^{\circ}$ C trong 2 phút. Cuối cùng 72 $^{\circ}$ C trong 10 phút và giữ ở 4 $^{\circ}$ C cho đến khi phân tích. Như vậy năm nồng độ DNA (10, 7, 5, 2, 1 ng/ μ l) tương ứng với năm nồng độ DNA trong phản ứng PCR là 0,8; 0,56; 0,4; 0,16 và 0,08 ng/ μ l.

Tiếp theo, đối với mẫu trộn 2-3 loại DNA tương ứng với 2-3 loại thịt, chúng tôi sử dụng bộ môi hỗn hợp (chung môi xuôi và 2-3 loại môi ngược tương ứng với loài). Chúng tôi sử dụng hàm lượng DNA mỗi loại thịt tương đương nhau sao cho tổng thể tích phản ứng PCR vẫn là 25 μ l với quy trình như trên. Hỗn hợp trộn như sau: đối với phản ứng PCR sử dụng hai môi: bò - lợn, bò - gà, lợn - gà; phản ứng PCR sử dụng ba môi: bò - lợn - gà. Các sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose 3% (30 phút, 100V), quan sát và chụp hình ảnh điện di bằng máy Syngene™ Ingenius 3 với thang chuẩn 100bp.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách chiết DNA

Kết quả cho thấy DNA tách chiết phù hợp cho quá trình khuếch đại PCR. Độ tinh khiết của dịch chiết thu được từ tất cả các mẫu thịt đều cao, do tỷ lệ A260/A280 nằm trong khoảng từ 1,7 đến 2,0. Ngoài ra, sản lượng DNA nằm trong khoảng từ 100-200 ng/ μ l. Như vậy DNA được coi là tinh sạch để sẵn sàng cho các phản ứng tiếp theo.

3.2. Xác định nồng độ tối thiểu phát hiện DNA từ mẫu đơn

Phản ứng PCR là cách đơn giản để khuếch đại trình tự DNA mục tiêu đến một lượng mà

mắt người có thể nhìn thấy nhờ các thiết bị hỗ trợ (Fairchild & cs., 2006).

Sau khi tiến hành phản ứng PCR với các cặp môi đặc trưng cho từng loài, ta thấy các băng có kích thước đặc trưng cho từng loài xuất hiện trên điện di. Kết quả ở hình 1 cho thấy các cặp môi dành riêng cho bò, lợn và gà rất đặc hiệu, đã khuếch đại chính xác vị trí mục tiêu, nhận diện được mẫu thịt bò với kích thước 274bp, thịt lợn với kích thước 398bp và thịt gà 227bp. Xử lý vật lý và nhiệt đối với các mẫu thịt luộc không ảnh hưởng đến quá trình khuếch đại DNA. Tuy nhiên, hình 1B (mẫu thịt luộc) cho kết quả là các băng mờ hơn so với hình 1A (mẫu thịt sống), nguyên nhân là do DNA trong thịt luộc đã bị phân rã một phần bởi nhiệt độ cao (Ebbehøj & Thomsen, 1991), vì vậy số lượng DNA được nhân lên ít hơn so với thịt sống. Dù thịt sống hay đã qua xử lý nhiệt, phương pháp PCR vẫn phát hiện được sự có mặt của thịt ở nồng độ thấp nhất trong hỗn hợp là 0,16 ng/ μ l ở cả 30 mẫu thịt.

Matsunaga & cs. (1999) cũng thành công trong việc phát hiện 6 loại thịt (cừu, gà, bò, dê, lợn và ngựa) bằng kỹ thuật PCR này, nồng độ thấp nhất phát hiện được có thịt trong mẫu sản phẩm là 0,25 ng/ μ l. Năm 2004, phương pháp PCR được Rodríguez & cs. (2004) sử dụng để phân biệt thịt bò, dê, cừu và lợn ở dạng sống và xử lý nhiệt. Gần hơn, Cahyadi & cs. (2020) cũng sử dụng gen môi 12S rRNA đã khuếch đại thành công DNA của từng loài bò, chó, lợn và chuột được ký hiệu lần lượt là 155, 244, 357 và 491bp của các dải DNA. Thịt bị xử lý nhiệt bằng cách luộc như Cai & cs. (2022) cũng không ảnh hưởng đến kết quả của phản ứng, Cai & cs. (2022) đã dùng phương pháp phản ứng chuỗi polymerase hexaplex hai ống xác định được 12 loài thịt, trong đó có thịt luộc, thực hiện kết hợp 6 loại thịt trong một phản ứng có giới hạn phát hiện là 0,05-0,1ng.

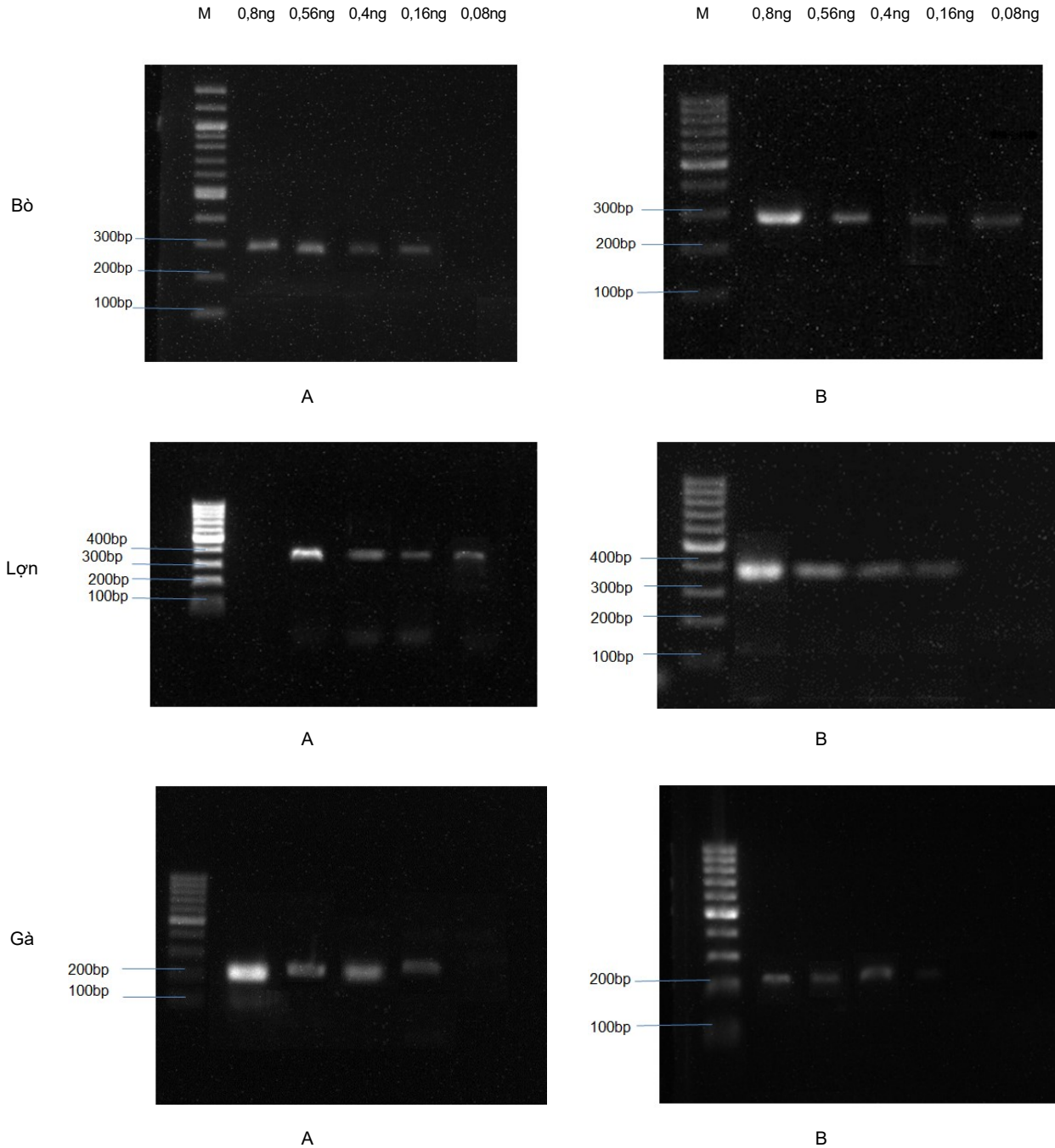
3.3. Khuếch đại gen mục tiêu bằng phản ứng PCR đa môi

Phản ứng PCR đa môi được thực hiện nhằm phát hiện đồng thời nhiều loại thịt trong một hỗn hợp. Trong phản ứng này chúng tôi sử dụng

Sử dụng phương pháp PCR phát hiện một số loại thịt vật nuôi

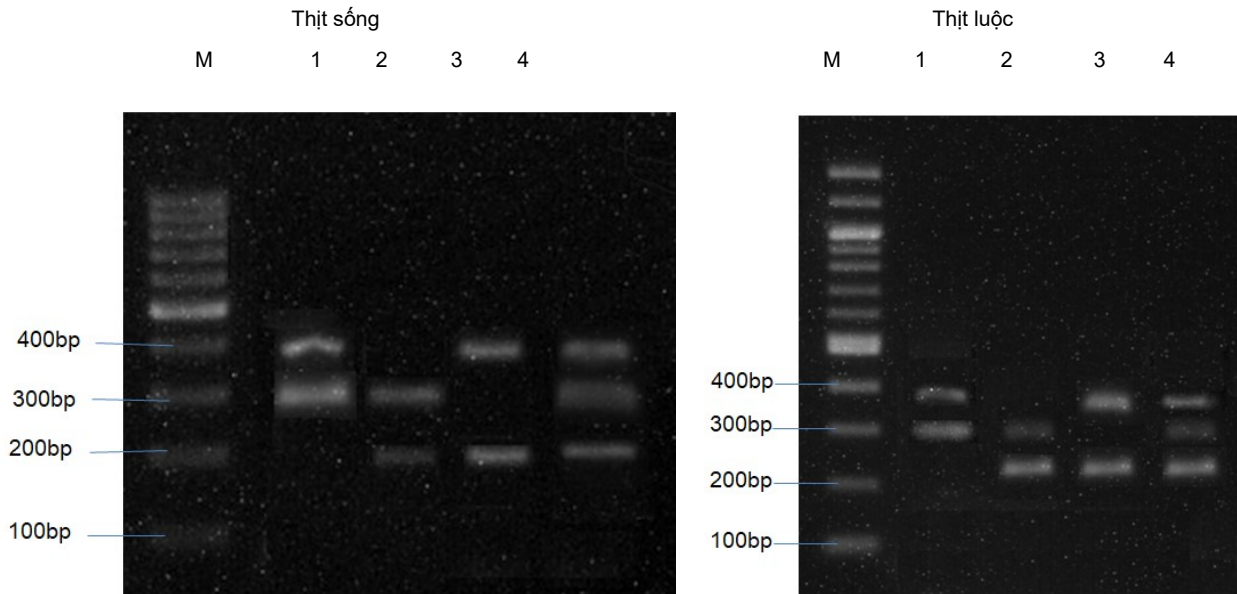
DNA pha loãng tới nồng độ 0,16 ng/μl. Kết quả được trình bày tại hình 2, kết quả cho thấy mẫu gộp giữa thịt bò và thịt lợn được phát hiện bởi hai băng có kích thước là 274 và 398bp ở vị trí giếng 1. Giếng 2 nhận diện được thịt bò và thịt gà bởi hai băng có kích thước 274 và 227bp.

Giếng 3 nhận diện hai băng: 398bp (lợn) và 227bp (gà). Giếng 4 nhận diện ba băng: 398bp (lợn), 274bp (bò) và 227bp (gà). Kết quả này cho thấy tiềm năng ứng dụng trong việc phát hiện các thành phần thịt trong sản phẩm thịt chế biến sẵn.



Ghi chú: A: Thịt sống, B: Thịt luộc, M: thang DNA 100bp (hãng Thermo Scientific).

Hình 1. Hình ảnh gel của sản phẩm thịt thông qua khuếch đại PCR bằng cách sử dụng mỗi đặc trưng cho từng loài bò, lợn và gà với các nồng độ pha loãng khác nhau



Ghi chú: M: Thang DNA 100bp (hãng Thermo Scientific); Giếng 1: Mẫu trộn giữa lợn - bò; Giếng 2: Mẫu trộn giữa bò - gà; Giếng 3: Mẫu trộn giữa lợn - gà; Giếng 4: Mẫu trộn giữa bò - lợn - gà.

Hình 2. Hình ảnh gel của sản phẩm thịt thông qua khuếch đại PCR bằng cách sử dụng 2 hoặc 3 môi

Trước đó, Partis & cs. (2000) cũng sử dụng phương pháp PCR hai môi để phát hiện thành công sự trộn lẫn thịt lợn với thịt bò.

Xét nghiệm hexaplex PCR được Safdar & Junejo (2016) thực hiện cho cả thịt động vật và protein thực vật (bò, lợn, gia cầm, ngựa, cừu và đậu tương), phát hiện được 3/27 sản phẩm thương mại có gian lận trong thành phần thực phẩm so với nhãn mác.

Balakrishna & cs. (2019) cũng sử dụng phương pháp PCR bốn ống đơn với độ nhạy cao, xuống tới 16pg DNA để nhận diện bốn loại thịt (bò, lợn, gà và cừu), phân tích 68 sản phẩm thịt thương mại và kết quả là 9 mẫu bị tạp nhiễm (chứa các thành phần thịt không được khai báo).

Cai & cs. (2021) đã nhận diện đồng thời 7 loại thịt (bò, lợn, gà, gà tây, ngỗng, cừu và vịt) bằng PCR dựa vào gen trên ty thể. Đặc biệt, một phương pháp multiplex PCR đã phát triển bởi Yang & cs. (2022) có thể xác thực đồng thời 8 loài thịt bao gồm đà điểu, mèo, ngỗng, vịt, gà, ngựa, chó và cừu; hàm lượng DNA có thể phát hiện được đối với mỗi loài mục tiêu thấp tới 0,01ng trong cả thịt sống và thịt được xử lý nhiệt.

4. KẾT LUẬN

Kỹ thuật PCR có thể nhận diện được gen ở mẫu riêng lẻ và mẫu trộn lẫn DNA từ 2 đến 3 loại mẫu thịt đại diện cho 2-3 loài khác nhau ở nồng độ thấp nhất là 0,16 ng/μl, là nồng độ thấp hơn các nghiên cứu trước đây. Cần mở rộng đối tượng nghiên cứu là gia súc, gia cầm, cá và protein thực vật để ứng dụng được nhiều hơn trong việc xác định sự tạp nhiễm trong sản phẩm thịt chế biến

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu sử dụng kinh phí của đề tài khoa học công nghệ cấp Học viện “Sử dụng phương pháp PCR đánh giá chất lượng thịt của một số loài vật nuôi”, mã số T2022-02-07.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ayaz Y., Ayaz N.D. & Erol I. (2006). Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Muscle Foods*. 17(2): 214-220.
- Balakrishna K., Sreerohini S. & Parida M. (2019). Ready-to-use single tube quadruplex PCR for

- differential identification of mutton, chicken, pork and beef in processed meat samples. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 36(10): 1435-1444.
- Cahyadi M., Wibowo T., Pramono A. & Abdurrahman Z.H. (2020). A Novel Multiplex-PCR Assay to Detect Three Non-Halal Meats Contained in Meatball using Mitochondrial 12S rRNA Gene. *Food Science of Animal Resources*. 40(4): 628-635.
- Cai Z., Zhong G., Liu Q., Yang X., Zhang X., Zhou S., Zeng X., Wu Z. & Pan D. (2022). Molecular authentication of twelve meat species through a promising two-tube hexaplex polymerase chain reaction technique. *Frontiers in Nutrition*. 9: 813962.
- Cai Z., Zhou S., Liu Q., Ma H., Yuan X., Gao J., Cao J. & Pan D. (2021). A simple and reliable single tube septuple pcr assay for simultaneous identification of seven meat species. *Foods*. 10(5): 1083.
- Di Giuseppe A. M. A., Giarretta N., Lippert M., Severino V. & Di Maro A. (2015). An improved UPLC method for the detection of undeclared horse meat addition by using myoglobin as molecular marker. *Food Chemistry*. 169: 241-245.
- Ebbehøj K.F. & Thomsen P.D. (1991). Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization. *Meat Science*. 30(3): 221-234.
- Fairchild A., Lee M.D. & Maurer J. J. (2006). PCR basics. In *PCR methods in foods*. pp. 1-25.
- Hồ Viết Thế, Hồ Lê Quỳnh Trinh, Phạm Thị Tuyết Trinh, Nguyễn Hiếu Thuỳên & Ngô Thị Kim Anh (2018). Xây dựng phương pháp phát hiện thịt heo và thịt bò trong thực phẩm bằng kỹ thuật multiplex-PCR. tr. 87-94.
- Matsunaga T., Chikuni K., Tanabe R., Muroya S., Shibata K., Yamada J. & Shinmura Y. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Science*. 51(2): 143-148.
- Partis L., Croan D., Guo Z., Clark R., Coldham T. & Murby J. (2000). Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Science*. 54(4): 369-376.
- Rodríguez M. A., García T., González I., Asensio L., Hernández P. E. & Martín R. (2004). PCR identification of beef, sheep, goat, and pork in raw and heat-treated meat mixtures. *Journal of Food Protection*. 67(1): 172-177.
- Safdar M. & Junejo Y. (2016). The development of a hexaplex-conventional PCR for identification of six animal and plant species in foodstuffs. *Food Chemistry*. 192: 745-749.
- Sambrook S. & Russell D.W. (2003). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York
- Tauma J.A. & Abdul-Hassan I.A. (2014). Identification of some meat species using PCR and multiplex PCR of mitochondrial cytochrome b gene. *Iraqi Poultry Sci. J.* 8 (1): 1-9.
- Trần Minh Tấn & Nguyễn Ngọc Tuấn (2019). Phân biệt thịt bò, trâu, heo bằng kỹ thuật multiplex real-time PCR. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. 18(1).
- Yang C., Zhong G., Zhou S., Guo Y., Pan D., Wang S., Liu Q., Xia Q. & Cai Z. (2022). Detection and characterization of meat adulteration in various types of meat products by using a high-efficiency multiplex polymerase chain reaction technique. *Frontiers in Nutrition*. 9: 979977.