

PHÂN BIỆT THỊT TRÂU VÀ THỊT BÒ BẰNG KỸ THUẬT PCR

Đoàn Thị Tuyết Lê⁽¹⁾ Nguyễn Ngọc Tuấn⁽²⁾,

(1) Khoa Công nghệ sinh học và Môi trường, trường đại học Lạc Hồng (tỉnh Đồng Nai)

(2) Khoa Chăn nuôi Thú y, trường đại học Nông Lâm TP HCM

Email: tuyetledt@yahoo.com; nnttttd@gmail.com

Xác định loài của thịt bằng phương pháp sinh học phân tử trở nên phổ biến trong gần 20 năm qua. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật PCR được ứng dụng để phân biệt thịt bò và thịt trâu với mục tiêu xây dựng hai quy trình PCR-bò và PCR-trâu. Mỗi xuôi (F2) được thiết kế chung cho hai quy trình dựa vào vùng tương đồng trên gen cytochrome b của bò và trâu để giảm chi phí. Còn mỗi ngược RC2 (PCR-bò) và RBU2 (PCR-trâu) được thiết kế dựa vào vùng không tương đồng trên gen cytochrome b của bò và trâu. Kết quả thu được PCR-bò, PCR-trâu khuếch đại sản phẩm có kích thước 839bp và 763bp. Trong đó, quy trình PCR-trâu phát hiện được thịt trâu trong các hỗn hợp thịt xử lý từ 80°C đến 180°C trong 15 phút nhưng không phát hiện được thịt trâu dưới 10% trong hỗn hợp thịt xử lý 120°C hoặc 130°C trong 30'. PCR-bò phát hiện được thịt bò trong các hỗn hợp thịt xử lý ở 80°C đến 180°C trong 15' nhưng không phát hiện được thịt bò ở tỷ lệ thấp hơn 10% trong hỗn hợp thịt xử lý 120°C hoặc 130°C từ 15- 30 phút. Nồng độ DNA trâu, DNA bò thấp nhất mà PCR-trâu, PCR-bò phát hiện được là 0,001 ng/ μ l.

Từ khóa: phân biệt, thịt, bò, trâu, PCR.

GIỚI THIỆU

Vấn đề gian lận thương mại trong mua bán sản phẩm chế biến từ thịt cũng như việc kiêng sử dụng một vài loài thịt nào đó vì lý do sức khỏe như dị ứng hay vì lý do tôn giáo (đạo Hindu không ăn thịt bò) luôn đặt ra cho nhà quản lý chất lượng và kiểm soát thị trường. Vì thế, việc phát triển và ứng dụng các phương pháp phát hiện nhanh và chính xác các loại thịt trong sản phẩm chế biến từ thịt gia súc, gia cầm là cần thiết.

Có nhiều phương pháp để xác định nguồn gốc thịt như phương pháp phát hiện dựa vào protein và DNA (López-Calleja và cs, 2005; Teletchea và cs, 2005). Các phương pháp dựa vào protein bao gồm điện di (Vallejo và cs, 2005), miễn dịch (Giovannacci và cs, 2004), sắc ký (Toorop và cs, 1997) cho kết quả chậm và không chính xác đối với các sản phẩm thịt đã xử lý nhiệt (Reale và cs, 2008). Trong vài thập niên gần đây, nhờ sự phát triển của sinh học phân tử nên các phương pháp phát hiện

loài của thịt dựa và DNA cho kết quả chính xác hơn và rút ngắn thời gian hơn các phương pháp dựa vào protein (Russell và cs, 2000). Trong các phương pháp dựa vào DNA thì phương pháp PCR dễ thực hiện, cho kết quả chính xác với độ nhạy cao trong thời gian ngắn nên được sử dụng rộng rãi trong việc phân biệt loài của thịt gia súc và gia cầm (Fajardo và cs, 2007; Kesmen và cs, 2007; Martin và cs, 2007).

Matsunaga và cs (1999) đã phát hiện 6 loại thịt (bò, heo, cừu, dê, ngựa, gà) từ thịt tươi và thịt chế biến bằng kỹ thuật multiplex PCR. Năm 2007, Jain và cs đã sử dụng cặp mồi FSIM & RC (bò) để phát hiện thịt trâu. Theo Đoàn Thị Tuyết Lê và Nguyễn Ngọc Tuấn (2010), các cặp mồi của Matsunaga và cs (1999) không phân biệt được thịt trâu và bò trong hỗn hợp có cả thịt trâu lẫn bò. Vì lẽ đó, mục tiêu của bài báo là thiết kế mồi và thiết lập quy trình để phân biệt thịt bò và trâu, góp phần giảm vấn nạn gian lận thương mại đối với sản phẩm thịt chế biến cho con người và bột thịt làm nguyên liệu trong chế biến thức ăn gia súc.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

VẬT LIỆU

Nguồn mẫu tách chiết DNA

Mẫu cơ vân các loại thịt heo, gà, trâu, bò, dê, cừu được lấy tại lò mổ ở TP HCM.

Mẫu bột xương thịt là nguyên liệu chế biến thức ăn gia súc của các hãng sản xuất thức ăn gia súc.

Hóa chất: Tris HCl, NaCl, SDS, EDTA, protein K, sodium acetate, isoamyl alcohol, phenol, chloroform, ethanol, TE 1X, *Taq* DNA polymerase 5UI/ μ l (Promega), dung dịch đệm 10X, dNTP 25mM, MgCl₂ 25 mM (Promega), các mồi (IDT), nước cất 2 lần; agarose, TBE 0,5 X (Tris borate EDTA, pH 8,3), loading dye 6X, ladder 100bp, 200bp, ethidium bromide.

Thiết bị và dụng cụ: Tủ sấy (Jencons – PLS), water bath (Memmert), autoclave (Tommy), máy cất nước (khử ion) (Branstead), máy ly tâm (Mikro Z2K/Sigma 3K30C), tủ trữ mẫu và hóa chất (Reetech, Brandt, Sanyo), máy nghiền mẫu (Model A11, IKA-Đức), máy chụp gel (Biorad), máy luân nhiệt, bộ điện di (Biorad), máy đo OD (Hewlett Packard), micropipet, đầu tip, eppendorf, kéo, chày, kẹp...

PHƯƠNG PHÁP

Phối trộn và xử lý các hỗn hợp thịt

Mỗi loại thịt được lấy khoảng 300g, nghiền nhuyễn bằng máy nghiền mẫu. Sau đó cân và trộn các loại thịt với 7 tỷ lệ thịt heo:gà:trâu:bò:dê:cừ. Tỷ lệ phối trộn 1 là 30:30:10:10:10:10, tỷ lệ phối trộn 2 (40:40:5:5:5:5), phối trộn 3 (48:48:1:1:1:1), phối trộn 4 (49:49:0,5:0,5:0,5:0,5), phối trộn 5 (49,8:49,8:0,1:0,1:0,1:0,1), phối trộn 6 (49,9:49,9:0,05:0,05:0,05:0,05), phối trộn 7 (49,94:49,94:0,03:0,03:0,03:0,03). Mỗi hỗn hợp được chia thành 7 phần (1 phần không xử lý nhiệt (kí hiệu N1 đến N7), 6 phần để xử lý nhiệt (kí hiệu M2.1 đến M7.7) được cho vào các túi nilon chịu nhiệt, dán nhãn ghi rõ thành phần tỷ lệ thịt, nhiệt độ và thời gian xử lý nhiệt. Với 6 nhóm xử lý nhiệt, 5 nhóm hỗn hợp thịt xử lý bằng nồi hấp autoclave ở các nhiệt độ và thời gian: 80°C/15' (kí hiệu M2.1 đến M2.7); 120°C/15' (kí hiệu M3.1 đến M3.7); 120°C/30' (kí hiệu M4.1 đến M4.7); 130°C/15' (kí hiệu M5.1 đến M5.7); 130°C/30' (kí hiệu M6.1 đến M6.7); và một nhóm hỗn hợp thịt được xử lý thịt ở 180°C/15' bằng tủ sấy (kí hiệu M7.1 đến M7.7). Làm nguội và trữ ở -70°C cho đến khi sử dụng.

Tách chiết DNA: Sau khi rã đông mẫu ở nhiệt độ phòng, tách chiết DNA được thực hiện theo dẫn liệu của Lương Quý Phương (2006).

Mồi (primer): Các cặp mồi được thiết kế dựa vào vùng giống và khác nhau của gen cytochrome b. Mồi xuôi (F) được thiết kế chung cho cả trâu và bò dựa vào vùng tương đồng cao của trâu và bò. Còn các mồi ngược riêng biệt cho từng loài (RB: trâu; RC: bò) dựa vào vùng không tương đồng của trâu, bò và các loài khác.

PCR-trâu, PCR-bò

Thực hiện phản ứng PCR theo từng cặp F & RB (trâu); F & RC (bò) với từng loại DNA mẫu thịt khác nhau của heo, gà, trâu, bò, dê, cừ; hỗn hợp DNA mẫu thịt trâu và bò; hỗn hợp mẫu DNA gồm DNA thịt heo, gà, trâu, bò, dê, cừ.

Thành phần hóa chất phản ứng PCR kiểm tra độ đặc hiệu mồi như sau: Dung dịch đệm PCR 1X, MgCl₂ 2 mM, mỗi mồi 10 pmol, dNTP200 μM/mỗi loại, *Taq*1 UI, DNA mỗi loại 100 ng/1 phản ứng, H₂O cất vừa đủ 30μl. Chu trình nhiệt sẽ phụ thuộc vào nhiệt độ nóng chảy (T_m) của các mồi được thiết kế và kích thước của sản phẩm cần khuếch đại.

Ứng dụng PCR-trâu, PCR-bò để phát hiện thịt trâu, thịt bò

Các quy trình PCR-trâu, PCR-bò vừa xây dựng được dùng để phát hiện thịt trâu và bò trong các loại mẫu thử nghiệm khác nhau gồm hỗn hợp DNA và xác định giới hạn phát hiện; hỗn hợp thịt xử lý nhiệt và không xử lý nhiệt; mẫu bột thịt.

KẾT QUẢ THẢO LUẬN

Kết quả thiết kế và tổng hợp môi phát hiện thịt trâu, thịt bò

Trình tự các môi được thiết kế và được tổng hợp bởi công ty IDT (Mỹ) gồm 2 môi xuôi chung (F1, F2), 2 môi ngược cho thịt trâu (RBU1, RBU2), 2 môi ngược cho thịt bò (RC1, RC2) như bảng 1.

Bảng 1. Các môi đã được thiết kế

TT	Tên	Trình tự (5' -> 3')	Chiều dài	Vị trí
1	F1	AGCCACAGCATTATAGGATACGT	24	372 - 395
2	F2	CTACACATCCGACACAACAACAGC	24	162 -185
3	RBU1	GCGTATGCGAATAGGAAGTACCATTCA	27	810 - 836
4	RBU2	ATGTAGCAGGGGCATGAGAA	20	905 - 924
5	RC1	CTCAGATTCATTCTGACTAAATTTGTGCCG	29	468 - 496
6	RC2	TCAGTAGGTCTGCTACTAGGGC	22	979 - 1000

Kết quả kiểm tra lý thuyết độ đặc hiệu các cặp môi F&RB, F&RC

Kết quả kiểm tra bằng FASTPCR cho thấy tất cả các môi được thiết kế đều có $Q > 80$. Nhiệt nóng chảy (T_m) của các môi xuôi và ngược chênh lệch không quá 3°C . Kiểm tra bằng phần mềm Clustal W cho thấy trình tự môi cho cytochrome b ở thịt trâu và bò tương đồng 100%. Còn các trình tự môi này tương đồng dưới 91,67 % ở thịt heo, gà, dê, cừu. Kiểm tra bằng phần mềm BLAST cho thấy trình tự các môi tương đồng cho thịt trâu và bò rất cao (100%), không có sự tương đồng với các loài thực vật khác thường sử dụng trong thức ăn gia súc như lúa, ngô, đậu nành, mì...

Kết quả kiểm tra thực nghiệm độ đặc hiệu các cặp môi F&RB, F&RC

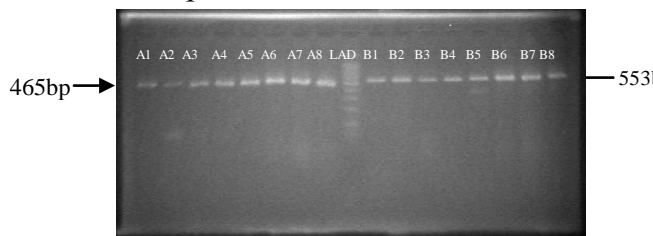
Bảng 1 cho ta 8 tổ hợp môi để phát hiện thịt trâu, bò. Sản phẩm khuếch đại lần lượt của các tổ hợp A (F1 & RBU1) là 465 bp, tổ hợp B (F1& RBU2) 553 bp, tổ hợp C (F1 & RC1) 125 bp, tổ hợp D (F1 & RC2) 629 bp, tổ hợp E (F2 & RBU1) 675 bp, tổ hợp F (F2 & RBU2) 763bp, tổ hợp G (F2 & RC1) 335 bp và tổ hợp H (F2 & RC2) là 839 bp.

Các cặp môi ở bảng 1 được kiểm tra độ đặc hiệu của phản ứng PCR. Thành phần phản ứng và quy trình nhiệt giống nhau, chỉ khác nhau ở DNA khuôn mẫu. Dựa vào T_m của các môi, nhiệt độ bắt cặp (T_a) được chọn để kiểm tra độ đặc hiệu môi là 54°C . Thành phần phản ứng đã được trình bày ở phần phương pháp. Quy trình nhiệt gồm

tiền biến tính $94^{\circ}\text{C}/4'$, 35 chu kỳ (biến tính ở $94^{\circ}\text{C}/1'$, bắt cặp ở $54^{\circ}\text{C}/45''$, kéo dài ở $72^{\circ}\text{C}/1'$) và kéo dài ở $72^{\circ}\text{C}/5'$.

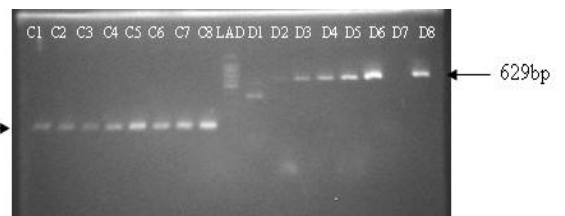
Theo Sambrook & Russell (2000), thời gian kéo dài 1 phút cho DNA mục tiêu dưới 1000bp. Trong nghiên cứu này, đoạn DNA mục tiêu của trâu dài tối đa 763 bp, còn của bò dài tối đa 839 bp. Do đó, chọn thời gian kéo dài 1 phút là tương đối phù hợp. Kết quả ở hình 1, hình 2 cho thấy tổ hợp A, B, C, D bị loại. Kết quả ở hình 3 cho thấy tổ hợp E không đặc hiệu vì có thể bắt cặp với DNA của bò, gà, dê, cừu. Còn tổ hợp F (F2&RBU2) có thể phát hiện cả thịt bò và trâu ở $T_a = 54^{\circ}\text{C}$ nhưng band bò mờ hơn band trâu. Tuy nhiên, khi tăng T_a lên 56°C thì tổ hợp môi này trở nên đặc hiệu hơn, chỉ phát hiện thịt trâu (Hình 5). Nhiệt độ bắt cặp ảnh hưởng đến tính đặc hiệu của môi vì tăng nhiệt độ bắt cặp làm giảm sự kéo dài sai của những nucleotit ở đầu 3' của môi (Michael và David, 1990). Vậy tổ hợp môi F được chọn cho PCR-trâu ở $T_a = 56^{\circ}\text{C}$.

Tương tự, kết quả ở hình 4 cho thấy tổ hợp G có thể phát hiện cả thịt dê và cừu nên không đặc hiệu. Còn tổ hợp H (F2&RC2) chỉ phát hiện thịt bò nên đặc hiệu. Vì thế, tổ hợp H được chọn cho PCR-bò ở $T_a = 54^{\circ}\text{C}$.



Hình 1. Kết quả kiểm tra tổ hợp môi A (F1-RBU1) và B (F1-RBU2)

A1- bò, A2- heo, A3- gà, A4- dê, A5- cừu, A6- trâu+bò, A7- 6 con, A8- trâu, B1- bò, B2- heo, B3- gà, B4- dê, B5- cừu, B6- trâu+bò, B7- 6 con, B8- trâu



Hình 2. Kết quả kiểm tra tổ hợp môi C (F1-RC1) và D (F1-RC2)

C1- trâu, C2- heo, C3- gà, C4- dê, C5- cừu, C6- trâu+bò, C7- 6 con, C8- bò, D1- trâu, D2- heo, D3- gà, D4- dê, D5- cừu, D6- trâu+bò, D7- 6 con, D8- bò



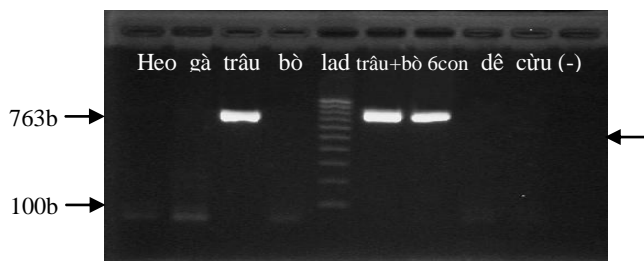
Hình 3. Kết quả kiểm tra tổ hợp môi E (F2-RBU1) và F (F2-RBU2)

E1- bò, E2- heo, E3- gà, E4- dê, E5- cừu, E6- trâu+bò, E7- 6 con, E8- bò, F1- bò, F2- heo, F3- gà, F4- dê, F5- cừu, F6- trâu+bò, F7- 6 con, F8- trâu



Hình 4. Kết quả kiểm tra tổ hợp môi G (F2-RC1) và H (F2-RC2)

G1- trâu, G2- heo, G3- gà, G4- dê, G5- cừu, G6- trâu+bò, G7- 6 con, G8- bò, H1- trâu, H2- heo, H3- gà, H4- dê, H5- cừu, H6- trâu+bò, H7- 6 con, H8- bò



Hình 5. Kiểm tra độ đặc hiệu môi F2 & RBU2

($T_a=56^{\circ}\text{C}$)

Kiểm tra độ đặc hiệu môi F2&RBU2 và F2&RC2 với các DNA template của lúa, đậu phộng, đậu nành, mè, cà chua

Cặp môi F2&RBU2; F2 &RC2 được kiểm tra lại với các DNA khác nhau của các loài có thể có trong thức ăn như lúa, bắp, đậu nành, cà chua, mè. Kết quả cho thấy âm tính. Vậy cặp môi F2&RBU2, F2&RC2 đặc hiệu để phát hiện thịt trâu, thịt bò trong thực phẩm chứa bột gạo, bắp, đậu nành và mè.

Sản phẩm PCR-trâu, PCR-bò được giải trình tự và đăng ký mã số trên NCBI lần lượt là GQ154521, GQ358783.

Xác định điều kiện tối ưu cho PCR-trâu, PCR-bò

Từ kết quả kiểm tra độ đặc hiệu tổ hợp môi F (F2&RBU2); H (F2 & RC2) ở trên, quy trình PCR-trâu, PCR-bò được tóm tắt như sau:

- Thành phần hóa chất như đã đề cập ở phần phương pháp.
- Quy trình nhiệt PCR-trâu: tiền biến tính $94^{\circ}\text{C}/4'$, 35 chu kỳ: biến tính ở $94^{\circ}\text{C}/1'$, bắt cặp ở $56^{\circ}\text{C}/45''$, kéo dài ở $72^{\circ}\text{C}/1'$, kéo dài cuối cùng ở $72^{\circ}\text{C}/5'$. Quy trình nhiệt PCR-bò gồm tiền biến tính $94^{\circ}\text{C}/4'$, 35 chu kỳ (biến tính ở $94^{\circ}\text{C}/1'$, bắt cặp ở $54^{\circ}\text{C}/45''$, kéo dài ở $72^{\circ}\text{C}/1'$) và kéo dài cuối cùng ở $72^{\circ}\text{C}/5'$.

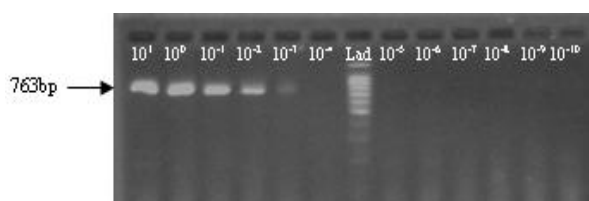
Ứng dụng PCR-trâu

Giới hạn nồng độ DNA trâu

Thực hiện PCR-trâu với 12 nồng độ DNA ly trích từ thịt trâu (bắt đầu là $10\text{ ng}/\mu\text{l}$ và giảm 10 lần so với trước, từ $10^1\text{ ng}/\mu\text{l}$ xuống $10^{-10}\text{ ng}/\mu\text{l}$). Kết quả ở hình 6 cho thấy nồng độ thấp nhất của DNA trâu mà PCR trâu có thể phát hiện được là $0,001\text{ ng}/\mu\text{l}$.

PCR-trâu đối với hỗn hợp DNA có nồng độ giảm dần của trâu, bò, dê, cừu

Kết quả ở hình 7 cho thấy PCR trâu có thể phát hiện trâu ở hỗn hợp M1, M2, M3, M4, M5. PCR- trâu không phát hiện được trâu trong hỗn hợp M6, M7. Điều này có nghĩa là đối với các hỗn hợp DNA có nồng độ giảm dần của trâu, bò, dê, cừu thì PCR-trâu có thể phát hiện được thịt trâu ở tỷ lệ 0,1 % (M5).

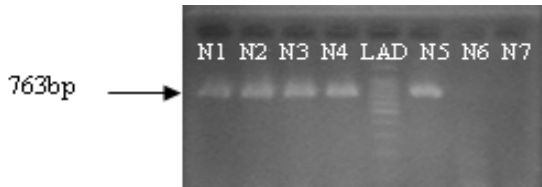


Hình 6. Giới hạn nồng độ DNA trâu có thể phát hiện được của PCR-trâu



Hình 7. PCR-trâu đối với các hỗn hợp DNA có nồng độ giảm dần của trâu, bò, dê, cừu

PCR-trâu phát hiện thịt trâu trong các hỗn hợp thịt không xử lý nhiệt



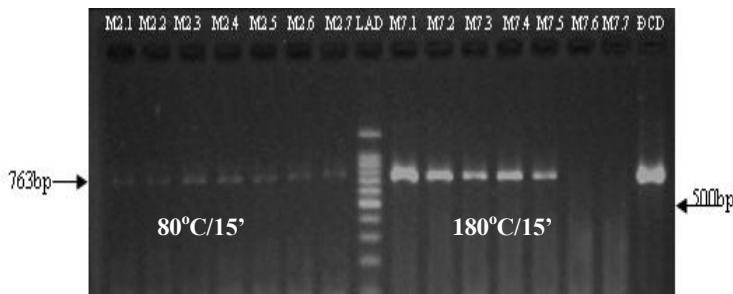
Hình 8. PCR-trâu phát hiện thịt trâu trong các hỗn hợp thịt không xử lý nhiệt

Hình 8 cho thấy hỗn hợp thịt không xử lý nhiệt, tỷ lệ thịt trâu thấp nhất mà PCR-trâu có thể phát hiện là 0,1% (N5).

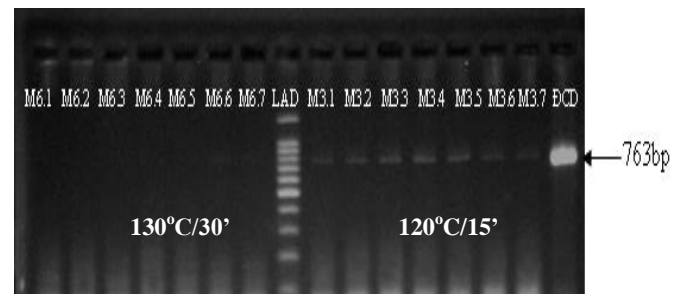
PCR-trâu phát hiện thịt trâu trong các hỗn hợp thịt xử lý nhiệt

Từ kết quả ở hình 9, hình 10, hình 11 cho thấy với 6 nhóm nhiệt độ và thời gian xử lý là 80°C/15'; 120°C/15'; 120°C/30'; 130°C/15'; 130°C/30', 180°C/15', PCR-trâu phát hiện được thịt trâu trong các hỗn hợp thịt xử lý nhiệt ở 80°C/15'; 120°C/15'. Đối với các hỗn hợp thịt được xử lý ở 130°C/15' và 180°C/15' thì PCR-trâu chỉ phát hiện đến tỷ lệ thấp nhất là 0,1% (M5.5 và M7.5), tương ứng với 0,001 ng/μl DNA.

PCR-trâu không có khả năng phát hiện thịt trâu trong các hỗn hợp thịt xử lý ở 120°C/30' và 130°C/30'.



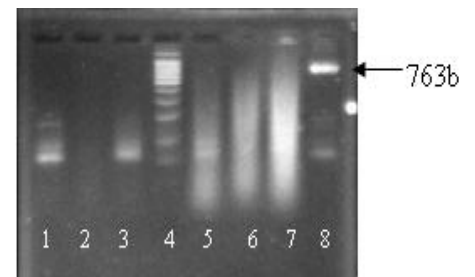
Hình 9. PCR-trâu phát hiện thịt trâu trong các hỗn hợp thịt xử lý nhiệt ở 80°C/15' (M2.1-M2.7) và 180°C/15' (M7.1-M7.7)



Hình 10. PCR-trâu phát hiện thịt trâu trong các hỗn hợp thịt xử lý nhiệt ở 130°C/30' (M6.1-M6.7) và 120°C/15' (M3.1-M3.7)



Hình 11. PCR-trâu phát hiện thịt trong các hỗn hợp thịt xử lý nhiệt ở 130°C/15' (M5.1-M5.7) và 120°C/30' (M4.1-M4.7)



Hình 12. PCR-trâu với bột thịt 1, 2, 3, 5, 6, 7-mẫu bột thịt; 4-ladder; 8-ĐC dương (thịt trâu)

PCR-trâu với bột thịt trên thị trường

Kết quả ở hình 12 cho thấy không phát hiện thịt trâu trong 6 mẫu bột thịt.

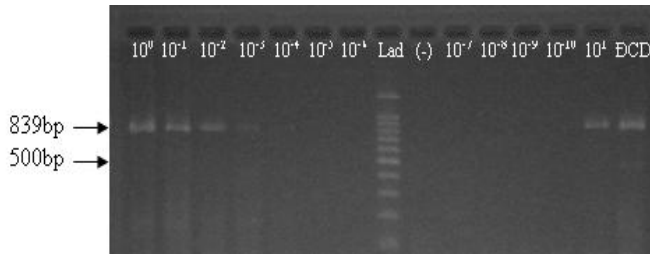
Ứng dụng PCR-bò

Giới hạn nồng độ DNA bò

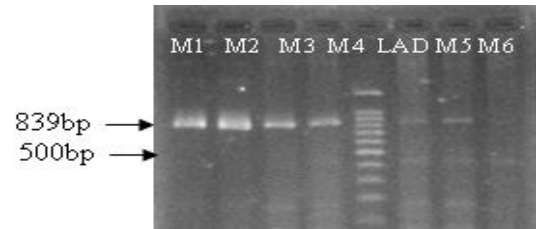
Kết quả ở hình 13 cho thấy nồng độ thấp nhất của DNA bò mà PCR-bò có thể phát hiện là 0,001 ng/μl.

PCR-bò đối với các hỗn hợp DNA có nồng độ giảm dần của trâu, bò, dê, cừu

Kết quả ở hình 14 cho thấy tỷ lệ DNA bò thấp nhất mà PCR-bò có thể phát hiện là 0,05% (M6) trong hỗn hợp DNA của các loại thịt.



Hình 13. Giới hạn nồng độ DNA bò có thể phát hiện được của PCR-bò

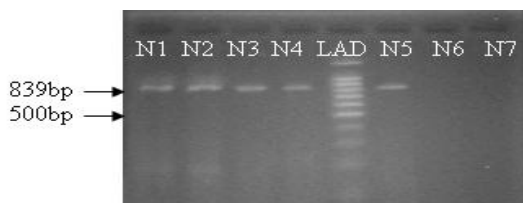


Hình 14. PCR-bò đối với các hỗn hợp DNA có nồng độ giảm dần của trâu, bò, dê, cừu

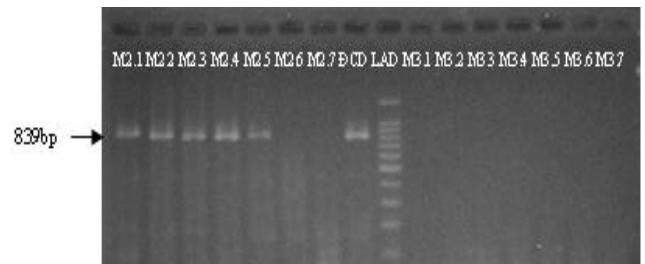
nhiệt...) nên DNA ít bị bẻ gãy. Vì thế PCR-bò có khả năng phát hiện DNA bò ở tỷ lệ thấp (0,05%) mặc dù là đoạn DNA mục tiêu dài 839 bp. Haunshi và cs (2009) cũng phát hiện được thịt heo với kích thước sản phẩm khuếch đại dài 835 bp.

PCR-bò phát hiện thịt bò trong các hỗn hợp thịt không xử lý nhiệt

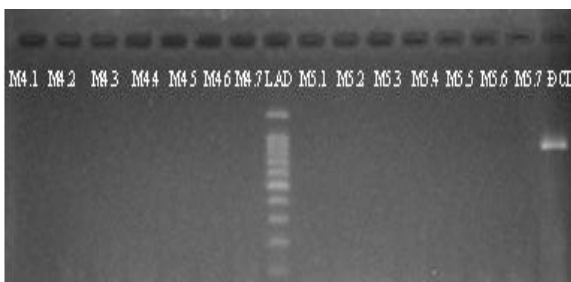
Kết quả ở hình 16 cho thấy hỗn hợp thịt không xử lý nhiệt, tỷ lệ thịt bò thấp nhất mà PCR-bò có thể phát hiện là 0,1% (N5). M-PCR cũng phát hiện bò&trâu ở tỷ lệ là 0,1% đối hỗn hợp thịt không xử lý nhiệt.



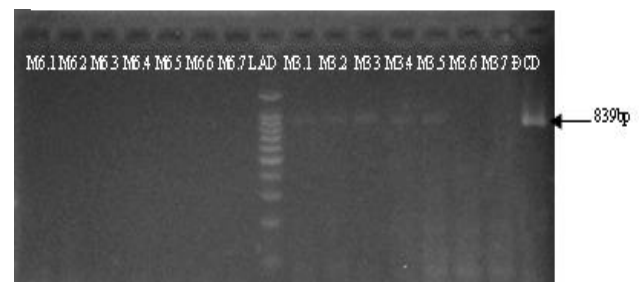
Hình 15. PCR-bò phát hiện thịt bò trong các hỗn hợp thịt không xử lý nhiệt



Hình 16. PCR-bò phát hiện thịt bò trong các hỗn hợp thịt xử lý nhiệt ở 80°C/15' (M2.1-M2.7) và 120°C/15' (M3.1-M3.7)



Hình 17. PCR-bò phát hiện thịt bò trong các hỗn hợp thịt xử lý nhiệt ở 120°C/30' (M4.1-M4.7) và 130°C/15' (M5.1-M5.7)



Hình 18. PCR-bò phát hiện thịt bò trong các hỗn hợp thịt xử lý nhiệt ở 130°C/30' (M6.1-M6.7) và 180°C/15' (M7.1-M7.7)

PCR-bò phát hiện thịt bò trong các hỗn hợp thịt xử lý nhiệt

PCR-bò được thực hiện với các hỗn hợp DNA được ly trích từ các hỗn hợp thịt. Kết quả ở hình 16, hình 17, và hình 18 cho thấy PCR-bò chỉ phát hiện được thịt bò ở các nhóm hỗn hợp thịt xử lý ở 80°C/15' và 180°C/15'. Các nhóm còn lại, PCR-bò không phát hiện được thịt bò.

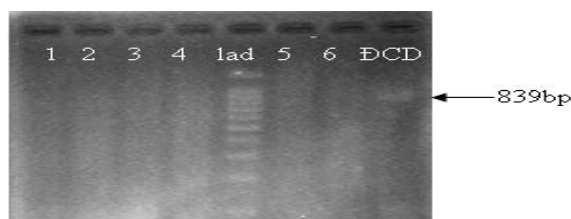
Như vậy, với cùng tỷ lệ phối trộn, PCR-bò có thể phát hiện DNA bò trong hỗn hợp DNA có trâu, bò, dê, cừu giảm dần (0,1%), phát hiện thịt bò trong các hỗn hợp thịt chế biến không xử lý nhiệt (0,1%) còn các hỗn hợp thịt chế biến có xử lý nhiệt thì PCR-bò không phát hiện được hết đối với các nhóm xử lý nhiệt. Vì sản phẩm của PCR-bò dài 839bp nên có thể dễ bị gãy trong quá trình chế biến. Điều này một lần nữa cho thấy nhiệt độ và áp suất (cụ thể là autoclave) có ảnh hưởng đến sự biến tính của DNA. Đặc biệt, đoạn DNA càng lớn thì khả năng bị gãy càng cao.

Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy kích thước của sản phẩm PCR là thông số quan trọng liên quan đến việc phát hiện DNA ở nhiệt độ cao. Hird và cs (2006) đã nhận định rằng thật khó để phát hiện những đoạn DNA có kích thước lớn trong những mẫu thịt đã được luộc hoặc nướng ở 180°C.

Kết quả trên một lần nữa khẳng định rằng phân biệt loài của thịt trong sản phẩm thịt chế biến bằng phương pháp PCR ảnh hưởng bởi thời gian, nhiệt độ, và kích thước của đoạn DNA mục tiêu.

PCR-bò với bột thịt trên thị trường

Thực hiện PCR-bò với 6 mẫu bột thịt trên thị trường. Kết quả ở hình 19 cho thấy không phát hiện thịt bò trong 6 mẫu bột thịt khảo sát.



Hình 19. PCR-bò với bột thịt trên thị trường

KẾT LUẬN

Quy trình PCR-trâu và PCR-bò đã được xây dựng để phát hiện thịt trâu và thịt bò với các môi tự thiết kế. Trong đó môi xuôi được thiết kế chung và môi ngược được thiết kế riêng cho mỗi quy trình dựa vào các vùng tương đồng và không tương đồng của gen cytochrome b của trâu và bò. Nghiên cứu cũng cho thấy rằng phân biệt loài của thịt trâu

và thịt bò trong sản phẩm thịt chế biến bằng phương pháp PCR bị ảnh hưởng bởi thời gian, nhiệt độ và kích thước của đoạn DNA mục tiêu. Nồng độ DNA trâu, bò thấp nhất mà PCR-trâu, PCR-bò phát hiện được là 0,001 ng/μl.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đoàn Thị Tuyết Lê và Nguyễn Ngọc Tuấn, 2010. Phân biệt thịt dê, gà, cừu, heo, bò, trâu bằng kỹ thuật multiplex PCR. *Tạp chí Chăn nuôi*, số 11 trang 29-35.
2. Lương Quý Phương, 2006. *Sản xuất bộ kit tách chiết DNA và bộ kit PCR phát hiện gen halothan trên heo*. Khóa luận tốt nghiệp kỹ sư công nghệ sinh học. Trường Đại học Nông Lâm TP HCM.
3. Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Rojas, M., García, T., et al., 2007. PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region. *Meat Science* 76: 644–652.
4. Giovannacci, I., Guizard, C., Carlier, M., Duval, V., Martin, J. L., & Demeulemester, C., 2004. Species identification of meat products by ELISA. *International Journal of Food Science and Technology* 39: 863–867.
5. Haushi S., Basumatary R., Girish P. S., Doley S., Bardoloi R. K., Kumar A., 2009. Identification of chicken, duck, pigeon and pig meat by species-specific markers of mitochondrial origin. *Meat science. Meat Science* 83 (3): 454-459.
6. Hird H., J., Chisholm A., Sanchez M., Hernandez R., Goodier K., Schneede C., Boltz and Popping B., 2006. Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. *Food Additives and Contaminants*. 23:645–650.
7. Jain S., Brahmabhai M. N., Rank D. N., Joshi C. G. and Solank J. V., 2007. Use of cytochrome b gene variability in detecting meat species by multiplex PCR assay. *Indian Journal of Animal Sciences* 77 (9): 880-881.
8. Kesmen, Z., Sahin, F., & Yetim, H., 2007. PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. *Meat Science* 77: 649–653.
9. López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., et al., 2005. Application of polymerase chain reaction to detect adulteration of sheep's milk with goats' milk. *Journal of Dairy Science* 88: 3115–3120.
10. Martín, I., García, T., Fajardo, V., López-Calleja, I., Rojas, M., Hernández, P. E., et al., 2007. Mitochondrial markers for the detection of four duck species and the specific identification of Muscovy duck in meat mixtures using the polymerase chain reaction. *Meat Science* 76: 721–729.
11. Matsunaga T., Chikuni K., Tanabe R., Muroya S., Shibata K., Yamada J. and Shinmura Y., 1999. A quick and simple method for the identification of meat species and meat product by PCR assay. *Meat Science* 51 (2): 143-148.

12. Michael A. I., David H. G., 1990. PCR protocol: A guide to methods and application. *Academic Press*, San Diego, CA. p 3-12.
13. Reale, S., Campanella, A., Merigioli, A., & Pilla, F., 2008. A novel method for species identification in milk and milk-based products. *Journal of Dairy Research* 75: 107–112.
14. Russell, V. J., Hold, G. L., Pryde, S. E., Rehbein, H., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M., et al., 2000. Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2184–2188.
15. Sambrook J., Russell W. D., 2001. *Molecular cloning (A laboratory manual)*. Cold Spring Harbor laboratory press, New York, USA.
16. Teletchea, F., Maudet, C., & Hänni, C., 2005. Food and forensic molecular identification: Update and challenges. *Trends in Biotechnology* 23: 359–366.
17. Toorop, R. M., Murch, S. J., & Ball, R. O., 1997. Methodology and development of prediction equations for the determination of pork substitution in veal. *Food Research International* 30: 629–636.
18. Vallejo, B., González, A. F., Mazorra, M. A., & Rodríguez, R., 2005. Capillary electrophoresis for the analysis of meat authenticity. *Journal of Separation Science* 28: 826–836.

SUMMARY

THE IDENTIFICATION OF CATTLE AND BUFFALO MEAT BY PCR

Đoàn Thị Tuyết Lê⁽¹⁾ Nguyễn Ngọc Tuấn⁽²⁾,

(3) Khoa Công nghệ sinh học và Môi trường, trường đại học Lạc Hồng (tỉnh Đồng Nai)

(4) Khoa Chăn nuôi Thú y, trường đại học Nông Lâm TP HCM

Email: tuyetledt@yahoo.com; nntttd@gmail.com

Molecular species detection in food has become common in the last 20 years. In this study, PCR technique was applied to differentiate buffalo and cattle meat by PCR-buffalo and PCR-cattle. Common forward primer (F2) was designed base on homology region of cytochrome b gen of buffalo and cattle to reduce expenses. Reverse primer RBU2 (PCR-buffalo) and RC2 (PCR-cattle) were designed base on inhomology region of cytochrome b gen of buffalo and cattle. Mitochondrial DNA fragments of 763 bp, 839 bp for buffalo and cattle, respectively, were amplified. The PCR-buffalo was detected meat buffalo in the treat mixtures at 80°C to 180°C/15 min but it was not detected buffalo meat percentage less 10% in the treated mixtures at 120°C or 130°C in 30 min. PCR-cattle was detected cattle meat in the treat mixtures at 80°C to 180°C/15 min but it was not detected cattle meat percentage less 10% in the

treated mixtures at 120°C or 130°C from 15 min to 30 min. The minimum DNA concentration was detected by PCR-buffalo and PCR-cattle was 0.001 ng/μl.

Keywords: *identification, meat, cattle, buffalo, polymerase chain reaction.*