

BƯỚC ĐẦU XÂY DỰNG QUY TRÌNH PCR NHẪM PHÁT HIỆN THÀNH PHẦN ĐỘNG VẬT TRONG THỰC PHẨM CHAY DỰA TRÊN VÙNG 16S rDNA TY THỂ

Ngày nhận bài: 10/04/2014

Ngày nhận lại: 10/06/2014

Ngày duyệt đăng: 07/07/2014

*Lao Đức Thuận, Nguyễn Thị Thanh Nhân,
Nguyễn Thị Thiên Hương, Trần Kiến Đức,
Võ Phi Phi Nguyễn, Phan Thị Trâm¹
Lê Huyền Ái Thủy²*

TÓM TẮT

Hiện nay nhu cầu sử dụng thực phẩm chay ngày càng tăng cao với sự chú trọng đến “tính thuần chay”, nghĩa là không lẫn bất kì thành phần nào có nguồn gốc từ động vật. Đây là một đặc tính quan trọng trong chế biến và sản xuất thực phẩm chay. Với mục đích kiểm tra có hoặc không sự hiện diện của thành phần động vật trong thực phẩm chay, chúng tôi tiến hành xây dựng quy trình phát hiện sự hiện diện của thành phần động vật dựa trên kỹ thuật PCR khuếch đại vùng 16S rDNA ty thể bằng cặp mồi TP1 và TP2 có tính phổ quát và đặc hiệu với 16S rDNA ở hầu hết các loài động vật. Kết quả cho thấy, bước đầu xây dựng thành công quy trình phát hiện DNA động vật lẫn trong thực phẩm chay. Quy trình được hình thành sơ bộ này đã được thử nghiệm trên 11 mẫu được dán nhãn là thực phẩm chay thu nhận từ chợ và một số công ty chế biến thực phẩm chay trên thị trường; Kết quả ghi nhận 4/11 mẫu thực phẩm chay nhiễm thành phần có nguồn gốc động vật (chiếm 36,36%). Qua đó, quy trình này có thể khẳng định đủ cơ sở khoa học để triển khai trên một số lượng mẫu lớn hơn trong thực tế.

Từ khóa: 16S rDNA ty thể, thực phẩm chay, PCR, động vật, thực vật.

ABSTRACT

The demand for using vegetarian foods more and more increase nowadays with focusing to the veganism that mean don't contain any ingredients have origin from animals that is an important feature in the processing and production of vegetarian foods. For this purpose, we check whether have or not presence of animal ingredients in vegetarian food. PCR assay that are specific to detect the presence of ingredients animal were designed basing on 16S rDNA gene of the mitochondrial DNA genome by primer TP1 and TP2. Oligonucleotide primers that are universal and specific for 16S rDNA gene in most of animals. As the results, assay was initially successfully established for detecting animal- origin components in vegetarian foods. We experimentally tested and detected animal ingredients in 11 samples vegetarian food from the market and vegetarian food companies, as the results, 4/11 samples (counting for 36.36%) contain the animal ingredients. In addition, we conducted sequencing and indentified successfully this ingredient originating from *Sus scrofa* and *Gallus gallus*. According to this sequencing result that are completely accordant, we affirm primer-specific amplification in this study can be apply to experiment on the large number of samples in the reality.

Keywords: mitochondrial 16S rDNA, vegetarian food, PCR, animal, plant.

¹ Trường Đại học Mở TP.HCM.

² PGS.TS, Trường Đại học Mở TP.HCM. Email: lhathuy@gmail.com

1. Giới thiệu

Thực phẩm chay được hiểu là thực phẩm không chứa các thành phần có nguồn gốc từ động vật^[1]. Thuật ngữ “ăn chay” được biết đến nhiều ở đạo Phật và nhiều tôn giáo khác dưới nhiều hình thức “ăn chay” khác nhau^[1]. Về xu hướng ăn chay hiện nay ngày càng gia tăng ở nhiều quốc gia trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Lý do của sự gia tăng này là do ăn chay là một phương thức trong việc phòng chống các bệnh tật nguy hiểm liên quan đến tim mạch, cao huyết áp, ung thư,...^{[2][3][4]}. Nấm bắt được xu thế phát triển, thị trường ngày càng xuất hiện nhiều sản phẩm chay với mẫu mã đa dạng, phong phú như: thịt gà chay, heo chay, bò viên chay,... Tuy nhiên, “tính thuần chay” lại không được đảm bảo, đặc biệt là chưa có một cơ quan thẩm quyền nào đảm bảo trong thực phẩm chay không lẫn bất kỳ một thành phần có nguồn gốc động vật. Do đó, một số công ty thực phẩm chay với mục đích để đảm bảo “thương hiệu” phải gửi mẫu thực phẩm (sản phẩm và/hoặc nguyên liệu sản xuất) sang nước ngoài để kiểm định. Xuất phát từ nhu cầu thực tế trên, việc nghiên cứu và phát triển một quy trình nhằm kiểm định sự hiện diện có thành phần có nguồn gốc từ động vật trong thực phẩm chay là cần thiết.

Trên thế giới, phương pháp PCR (polymerase chain reaction) là phương pháp thông dụng được nhiều tác giả sử dụng để khuếch đại trình DNA đích của các thành phần có nguồn gốc từ động vật. Một số các trình tự đích được sử dụng như gen *Cytochrome b* của bộ gen ty thể^{[5][6]}, *12S rDNA* của ty thể^{[7][8]}, *16S rDNA* ty thể^{[9][10]}... Trong nghiên cứu này, *16S rDNA* ty thể được chọn làm trình tự DNA đích cho phản ứng PCR, lý do cho sự lựa chọn này (1) *16S rDNA* có tính phổ quát, tính bảo tồn cao trong cùng một loài, chúng thay đổi chậm theo thời gian^{[11][12]}; (2) Số lượng nhiều bản sao *16S rDNA* trong tế bào^[11]... Do đó, mục đích của nghiên cứu này bao gồm xây dựng quy trình phát hiện thành phần có nguồn gốc từ động vật trong thực phẩm chay và bước đầu quy trình này được kiểm tra tính thuần chay trên các mẫu thực phẩm chay thu nhận trên thực tế.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Mẫu chứng dương bao gồm mẫu động vật là thịt gà và thịt heo. Mẫu chứng âm là mẫu thực vật. Mẫu thực tế là các mẫu thực phẩm chay thu mua ngẫu nhiên từ các công ty sản xuất thực phẩm chay từ công ty Âu Lạc, từ chợ Thủ Dầu Một và siêu thị.

Thiết kế môi

Trình tự môi xuôi và môi ngược được thiết kế dựa trên *16S rDNA* ty thể trên Ngân hàng Genbank (NCBI: <http://ncbi.nlm.nih.gov/>) của các loài động vật bao gồm gà (KF908854, AB489247,...), heo (JN714132, KC208030, KF799977,...), bò (KF799979,...) bằng các phần mềm trực tuyến như Primer3(v.0.4.0) (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Môi sau khi thiết kế được đánh giá các thông số vật lý như độ dài, nhiệt độ nóng chảy, phần trăm GC, năng lượng hình thành các cấu trúc bậc hai... bằng phần mềm trực tuyến IDT (<http://sg.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Đồng thời tính đặc hiệu được kiểm tra bằng chương trình BLAST (NCBI: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) v.v.

Tách chiết DNA

DNA được tách chiết theo phương pháp Phenol-Chloroform^{[13][14]}. Tất cả các mẫu dùng để tách DNA đều được lần lượt rửa sạch bằng nước, cồn 70° và dung dịch PBS (Phosphate buffer saline). Sau khi rửa sạch, các mẫu được cắt và giã nhuyễn thành một mẫu đồng nhất. 2,0 g mẫu dịch này huyền phù với 4 ml dung dịch đồng nhất mẫu (NaCl 5M, Tris-HCl 1M, EDTA 0.5M, ddH₂O). Sau khi đồng nhất, hút 750 µl dịch chuyển vào ống eppendorf mới, bổ sung 20 µl SDS 10% và 20 µl proteinase K (1 mg/ml), ủ qua đêm ở nhiệt độ 65°C. Sau đó, 250 µl NaCl bão hòa được bổ sung, ủ mẫu ở 4°C trong 30 phút, ly tâm 10.000 vòng/phút trong 15 phút. Chuyển 500 µl dịch vào ống eppendorf khác và bổ sung với 500 µl hỗn hợp Phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:41:1) đảo nhẹ ống, ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút (lặp lại 2-3 lần), thêm 500 µl Chloroform, đảo nhẹ ống và ly tâm 13.000 vòng/phút trong

10 phút. Quá trình rửa được thực hiện với NH_4OAc và Isopropanol ở nhiệt độ -20°C trong vòng 2 giờ. Sau đó, tiến hành ly tâm thu rửa và lưu giữ DNA trong dung dịch TE cho những thí nghiệm sau này. Nồng độ DNA được xác định thông qua phương pháp đo OD và kiểm tra độ tinh sạch thông qua trị số A_{260}/A_{280} .

Phản ứng PCR

Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt sau: 1 chu kỳ với nhiệt độ 95°C trong 5 phút; 35 chu kỳ với nhiệt độ 95°C trong 30 giây, 67°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút; 1 chu kỳ 72°C trong 5 phút. Thành phần phản ứng PCR được thể hiện ở Bảng 1. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% và giải trình tự tại công ty Nam Khoa.

Bảng 1. Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Lượng
Master mix (2X)	7,5 μl
Mỗi xuôi (10 μM)	0,5 μl
Mỗi ngược (10 μM)	0,5 μl
DNA mạch khuôn	1,0 μl
ddH ₂ O	5,5 μl
Tổng thể tích	15,0 μl

3. Kết quả và thảo luận

Môi, đánh giá các đặc tính của môi

Trình tự môi để khuếch đại 16S rRNA ty thể có trình tự: môi xuôi (TP1) 5'-CCYAGGGATAACAGCGCAATC-3' và môi

ngược (TP2) 5'-TCCGGTCTGAACTCAGATCAC-3' (Trong đó, Y thay thế cho C và T). Các đặc tính vật lý môi được đánh giá bằng phần mềm IDT thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Các đặc tính vật lý của môi TP1 và TP2

Môi	Chiều dài (bp)	%GC	T_m ($^\circ\text{C}$)	(1)	(2)	(3)
TP1	21	54,7	56,9	0,81	-11,53	-4,64
TP2	21	52,4	56,2	-2,00	-9,75	

Ghi chú: T_m : nhiệt độ nóng chảy; (1) ΔG của cấu trúc kẹp tóc (hairpin-loop) (kcal.mole^{-1}); (2) ΔG của cấu trúc self-dimer (kcal.mole^{-1}); (3) ΔG của cấu trúc hetero-dimer (kcal.mole^{-1}).

Dựa trên kết quả Bảng 2, các giá trị vật lý về chiều dài, %GC, nhiệt độ nóng chảy và sự chênh lệch nhiệt độ nóng chảy đều thỏa mãn các yêu cầu trong thiết kế môi^[15]. Về ΔG phần lớn đều thỏa mãn lớn hơn -9 kcal.mol^{-1} , ngoại trừ năng lượng hình thành cấu trúc tự bắt cặp của TP1, TP2. Tuy nhiên, khi tiến hành

kiểm tra bằng phần mềm trực tuyến, cấu trúc tự bắt cặp xảy ra ở đầu 5' và giá trị này không chênh lệch quá nhiều so với yêu cầu. Do đó, cặp môi này vẫn được sử dụng và kiểm tra tính đặc hiệu. Tính đặc hiệu được tiến hành kiểm tra bằng chương trình BLAST và Annhyb đều cho thấy khả năng bắt cặp đặc hiệu trên 16S rDNA ở các loài động vật với mức độ tương

đồng đạt 100% (Hình 1) và không bắt cặp trên các trình tự *16S rDNA* thực vật như bắp cải, ngò, rau dền, đậu hủ... (Dữ liệu không trình bày). Đồng thời khi kiểm tra bằng phần mềm ClustalX, kết quả cho thấy cặp mỗi bắt cặp

chuyên biệt đối với các trình tự *16S rDNA* từ động vật (Dữ liệu không trình bày). Dựa trên những kết quả thu nhận được, mỗi TP1 và TP2 vẫn được chọn để sử dụng cho các thực nghiệm sau này.

Hình 1. (a) Sự bắt cặp của TP1 và TP2 lên trình tự 16S rRNA của *Gallus Gallus* (Mã số truy cập trên Genbank: AP003321). Vị trí Y trong cặp mỗi TP1 tương thích với C trong trình tự bắt cặp; Kết quả BLAST (b) cặp mỗi TP1 và (c) TP2 thể hiện tính đặc hiệu

Name	init	end	comments
forward	1308	1328	found oligo score: 90.95 sense: ...
reverse	1440	1460	found oligo score: 100 sense: ...

1101	TTTAAATCA	CGACCACCTT	ACAACCTTAC	ACAGCCCCAC	TGGGTCCACC
1151	CACACATAAA	CCCCTGGTCG	ACATTTTTCG	GTGGGGCGA	CCTTGGAGAA
1201	AAAAAATCC	TCCAAACCCA	CAGACCACAA	CTCTTCACTA	AGACCAACTC
1251	CTCAAAGTAC	CAACAGTAAC	CAGACCCAAT	ATAATTGAGC	AATGGACCAA
1301	GCTACCCAG	GGATAACAGC	GCAATCTCCT	CCAAGAGCCC	ATATCGACAA
1351	GGAGGTTTAC	GACCTCGATG	TTGGATCAGG	ACAACCTAAT	GGTGCAACCG
1401	CTATTAAGGG	TTGTTTGT	CAACGATTAA	CAGTCCTAC	TGATCTGAGT
1451	TCAGACCGG	GCAATCCAGG	TCGGTTTCTA	TCTATGAACA	CACTCCTCCT
1501	AGTACGAAAG	GACCGGAGAA	GTGGGGTCAA	TACCACTGAG	CACACCCCAA

(a)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Canis lupus haplotype HV1 Cov13 mitochondrion, partial genome	39.4	39.4	100%	0.23	95%	JF342907.3
☐ Sus veruocusus mitochondrion, complete genome	39.4	39.4	100%	0.23	95%	KF926379.1
☐ Canis lupus familiaris mitochondrion, complete genome	39.4	39.4	100%	0.23	95%	KF926378.1
☐ Bos taurus mitochondrion, complete genome	39.4	39.4	100%	0.23	95%	KF926377.1
☐ Columba livia mitochondrion, complete genome	39.4	39.4	100%	0.23	95%	KF926376.1
☐ Sperata seenghala mitochondrial DNA, complete genome	39.4	39.4	100%	0.23	95%	AB907556.1
☐ Megalobrama amblycephala x Parabramis pekinensis mitochondrion, complete genome	39.4	39.4	100%	0.23	95%	KF927167.1

(b)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Paraneetroplus synsphilus mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.023	100%	KF879808.1
☐ Dasvatis benettii mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.023	100%	KC633222.1
☐ Rhincodon typus mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.023	100%	KC633221.1
☐ Alepes kleinii mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.023	100%	KF728081.1
☐ Acipenser schrenckii mitochondrion, complete genome	42.1	42.1	100%	0.023	100%	KC820796.1
☐ Anas platyrhynchos clone S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, mitochondrial	42.1	42.1	100%	0.023	100%	KF908859.1

(c)

Xây dựng quy trình thực nghiệm tách chiết DNA và khuếch đại trình tự đích

Tổng số mẫu thực nghiệm là 5 mẫu bao gồm 2 mẫu gà (ký hiệu 1, 2), 2 mẫu heo (ký hiệu 3, 4) và mẫu thực vật (ký hiệu 5), các mẫu

này được tách theo phương pháp Phenol/chloroform. Kết quả tách chiết được kiểm tra bằng giá trị OD và tỷ số A_{260}/A_{280} (Bảng 3).

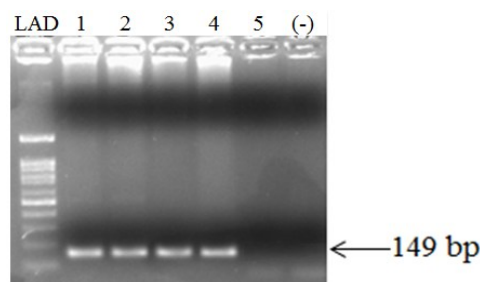
Bảng 3. Giá trị OD và trị số A_{260}/A_{280} của các mẫu tách chiết

Mẫu	OD ₂₆₀	A_{260}/A_{280}	C _{DNA} (µg/ml)
1	0,013	1,66	33,55
2	0,063	1,88	158,8
3	0,047	2,00	117,0
4	0,018	1,51	44,0
5	0,028	1,57	70,5

Giá trị A_{260}/A_{280} của các mẫu tách đều có giá trị nằm trong khoảng 1,8 đến 2,0 (các mẫu 1, 2, 3), một số mẫu (mẫu 4, 5) có giá trị bé hơn 1,8, điều này nghĩa là sản phẩm tách

chiết DNA ở các mẫu này nhiễm protein. Tuy nhiên, các mẫu này vẫn thực hiện PCR khuếch đại trình tự đích. Kết quả điện di sản phẩm PCR được thể hiện Hình 2.

Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR của các mẫu nhằm khảo sát khả năng bắt cặp của môi

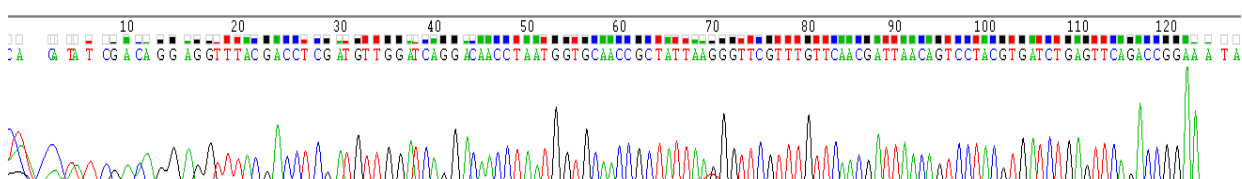


Ghi chú: LAD: thang DNA 100 bp; (-): giếng đối chứng âm (không chứa DNA).

Kết quả sản phẩm PCR cho thấy ở các mẫu động vật: mẫu 1, 2, 3, 4 đều có một băng sáng rõ với kích thước là 149 bp. Điều này cho thấy môi TP1, TP2 đã khuếch đại được sản phẩm mục tiêu *16S rDNA*. Trong khi đó, ở mẫu thực vật (bắp cải) và ở giếng đối chứng âm (-) không thấy xuất hiện băng nào. Điều

này cho thấy cặp môi TP1 và TP2 đặc hiệu với trình tự đích *16S rDNA* và không khuếch đại được trình tự đích ở các mẫu thực vật trên cả lý thuyết và thực nghiệm. Để khẳng định tính đặc hiệu này, một mẫu sản phẩm PCR được tiến hành giải trình tự tại công ty Nam Khoa (mẫu 1) (Hình 3).

Hình 3. Kết quả giải trình tự mạch xuôi (môi TP1) của sản phẩm PCR mẫu 1



Dựa trên kết quả giải trình tự Hình 3, kết quả cho thấy các peak của sản phẩm đều rất rõ ràng chỉ trừ một đoạn số nucleotide phần đầu. Điều này có thể giải thích, tại vị trí đoạn mỗi bắt cặp, khi giải trình tự tín hiệu vùng này không rõ ràng. Tuy nhiên, phần đọc được (đoạn giữa trình tự) rất rõ ràng và hoàn toàn đặc hiệu khi được tiến hành kiểm tra bằng chương trình BLAST. Kết quả BLAST cho thấy, đoạn trình tự này tương đồng rất cao với trình tự *16S rDNA* ty thể của loài *Gallus gallus*

(Mã số truy cập: KF981434) với độ tương đồng đạt 98%, giá trị E-value gần bằng 0 (Ident=98%, E-value=4e-46). Ngoài ra, chúng tôi tiến hành kiểm tra sự tương đồng với các trình tự *16S rDNA* của gà thu nhận từ Ngân hàng Genbank đều cho thấy độ tương đồng rất cao (Hình 4.). Do đó, kết quả trình tự *16S rDNA* này tương đồng với loài gà (*Gallus gallus*) hay nói cách khác DNA tách và khuếch đại đúng với mẫu thịt gà.

Hình 4. Kết quả sắp giống cột trình tự sản phẩm PCR-TP1 với các trình tự *16S rDNA* của gà (*Gallus gallus*)

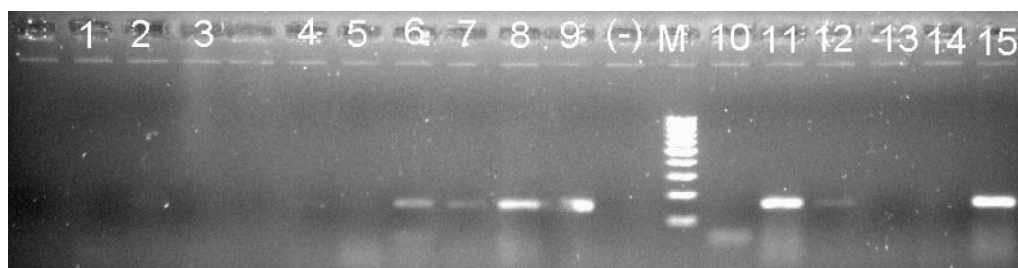
AB489247.1	CCCATATCGACAAGGAGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACAACCTAATGGTGCACCGCTATTAAAGGGTTCGTTTGTTCACAGATTAAACAGTCCTACGTGATCTGAGTTCCAGACCGGA
KF908854.1	CCCATATCGACAAGGAGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACAACCTAATGGTGCACCGCTATTAAAGGGTTCGTTTGTTCACAGATTAAACAGTCCTACGTGATCTGAGTTCCAGACCGGA
AB489247.1	CCCATATCGACAAGGAGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACAACCTAATGGTGCACCGCTATTAAAGGGTTCGTTTGTTCACAGATTAAACAGTCCTACGTGATCTGAGTTCCAGACCGGA
AY236430.1	CCCATATCGACAAGGAGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACAACCTAATGGTGCACCGCTATTAAAGGGTTCGTTTGTTCACAGATTAAACAGTCCTACGTGATCTGAGTTCCAGACCGGA
Sanpham_TP1	-CCCATATCGACAAGGAGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACAACCTAATGGTGCACCGCTATTAAAGGGTTCGTTTGTTCACAGATTAAACAGTCCTACGTGATCTGAGTTCCAGACCGGA

Như vậy, dựa trên các kết quả đánh giá lý thuyết và kết quả thực nghiệm, chúng tôi nhận thấy đã bước đầu thành công trong việc xây dựng quy trình thực nghiệm khuếch đại đoạn trình tự đích *16S rDNA* nhằm phát hiện thành phần động vật hiện diện trong thực phẩm chay.

Kết quả thực nghiệm trên các mẫu thực tế

Sau khi xây dựng được quy trình thực nghiệm, bước đầu tiến hành thử nghiệm trên 11 mẫu thu mua ở chợ, công ty sản xuất thực phẩm chay và siêu thị trên địa bàn Thủ Dầu Một. Kết quả kiểm tra được thể hiện trên bảng điện di Hình 5.

Hình 5. Kết quả kiểm tra sự hiện diện thành phần động vật trên các mẫu thực nghiệm



Ghi chú: (1) (2) (3) (4) (5) là các mẫu thu nhận từ cửa hàng sản xuất thực phẩm chay Âu Lạc lần lượt là đùi gà xá chay, thịt nạc kho chay, sườn ram chay, bò kho chay, pate gan ngỗng chay; (6) (7) (8) là các mẫu thu mua tại chợ lần lượt là heo chiên chay, chả trứng vịt chay, chả cá chay; (12) (13) (14) là các mẫu thu mua tại siêu thị lần lượt là gà cục chay, bột xù và thịt gà xé chay; (9) (11) (15) là chứng dương lần lượt là thịt heo, thịt gà, hỗn hợp trộn thịt gà và thịt heo; (10) là đối chứng âm, cải bắp; (-) giếng chứng âm không chứa DNA.

Dựa trên kết quả Hình 5, các mẫu thực phẩm chay ở chợ đều xuất hiện một băng ở kích thước 149 bp (3/3 mẫu nhiễm); ở các mẫu thu nhận từ siêu thị, có duy nhất 1 mẫu (mẫu số 12) (1/3 mẫu nhiễm) xuất hiện một băng 149 bp với độ sáng tương đối mờ; ở các mẫu thu nhận từ công ty sản xuất thực phẩm chay Âu Lạc không thấy xuất hiện băng nào cả (0/5 mẫu nhiễm). Độ sáng không đồng đều ở các mẫu bị nhiễm được giải thích là do hàm lượng protein động vật nhiễm trong các mẫu khác nhau, nồng độ DNA tách được không giống nhau, dẫn đến sự khuếch đại các băng có độ sáng khác nhau. Đối với mẫu chứng dương đều hoàn toàn xuất hiện băng với kích thước 149 bp sáng, mẫu chứng âm không xuất hiện. Như vậy, tỷ lệ số mẫu nhiễm protein động vật đạt 4/11 mẫu chiếm 36,36%, trong đó các mẫu ở chợ tỷ lệ nhiễm 100%, siêu thị nhiễm 33,33% và công ty sản xuất nhiễm 0%. Để khẳng định hơn về kết quả, một mẫu đại diện được tiến hành giải trình tự có xuất hiện băng (mẫu số 7). Kết quả giải trình tự được kiểm tra bằng chương trình BLAST. Kết quả kiểm tra

BLAST cho thấy, mẫu sản phẩm tương đồng với *16S DNA* của *Sus scrofa* với giá trị tương đồng cao đạt 98% và giá trị E-value gần bằng 0 (Ident=98%, E-value=4e-51) và độ tương đồng cao với các trình tự *16S DNA* của heo khi kiểm tra bằng chương trình ClustalX (Dữ liệu không trình bày).

4. Kết luận

Quy trình phát hiện thành phần có nguồn gốc từ động vật dựa trên kỹ thuật sinh học phân tử PCR trên gen mục tiêu *16S DNA* đã bước đầu xây dựng thành công với độ đặc hiệu cao. Đồng thời, quy trình được áp dụng để kiểm tra thử nghiệm trên các mẫu thực tế thu nhận trên địa bàn Thủ Dầu Một, Bình Dương. Kết quả bước đầu cho thấy tỷ lệ nhiễm đạt 36,36% (4/11 mẫu nhiễm). Để ứng dụng quy trình này rộng rãi trong thực tế, trong các nghiên cứu sắp tới, chúng tôi sẽ tiếp tục tối ưu hóa quy trình tách chiết đối với nhiều loại mẫu (thực phẩm khác nhau) cũng như thiết kế chứng nội nhằm khẳng định tính tin cậy của quy trình.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anderson J., Prior S 2012, *Vegetarian diets*, Food science and human nutrition, the Colorado State University.
2. Booton GC., Carmichael JR., Visvesvara GS., Byers TJ., Fuerst PA 2003, 'Identification of *Balamuthia mandrillaris* by PCR Assay Using the Mitochondrial *16S rRNA* Gene as a Target', *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), p.453-455.
3. Chomczynski P., Sacchi N 2006, 'The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on', *Nature Protocols*, 1(2), p.581-585.
4. Chomczynski P., Sacchi N 1987, 'Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction', *Anal Biochem*, 162, p.156-159.
5. Claude C., Hermann S., Eilber U., Steindorf K 2005, 'Lifestyle determinants and mortality in German vegetarians and health-conscious persons: Results of a 21-year follow-up', *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14, p.963-968.
6. Girish PS., Anjaneyulu ASR., Viswas KN., Anand M., Rajkumar N., Shivakumar BM., Bhaskar S 2004, 'Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species', *Meat Science*, 66, p.551-556.
7. Heulin., Surget-Groba Y., Guiller A., Guillaume CP., Deunff J 1999, 'Comparisons of mitochondrial DNA (mtDNA) sequences (*16S rRNA* gene) between oviparous and viviparous strains of *Lacerta vivipara*: a preliminary study', *Molecular Ecology*, 8, p.1627-1631.

8. Hsieh HM., Tsai CC., Tsai LC., Chiang HL 2005, 'Species identification of meat products using the cytochrome b gene', *Forensic Science Journal*, 4, p.29-36.
9. Ishizaki S., Sakai Y., Yano T., Nakano S., Yamada T., Nagashima Y., Shiomi K., Nakao Y., Akiyama H 2012, 'Specific detection by the polymerase chain reaction of potentially allergenic salmonid fish residues in processed foods', *Biosci Biotechnol Biochem*, 76(5), p.980-985.
10. Karabudak E., Kiziltan G., Cigerim N 2008, 'A comparison of some of the cardiovascular risk factors in vegetarian and omnivorous Turkish females', *J Hum Nutr Diet*, 21, p.13-22.
11. Key TJ., Appleby PN., Rosell MS 2006, 'Health effects of vegetarian and vegan diets', *Proc Nutr Soc*, 65, p.35-41.
12. Melton T., Holland C 2007, 'Routine Forensic Use of the Mitochondrial 12S Ribosomal RNA Gene for Species Identification', *J Forensic Sci*, 62, p.250-257.
13. Misener S., Krawetz SA 1999, 'Methods in Molecular Biology', © *Humana Press*, 132, p. 365-386.
14. Mitani T., Akane A 2009, 'Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S rRNA gene', *International Symposium Advances in legal Medicine*, 11(1), p.449-450.
15. Tomoaki M., Atsushi A 2009, 'Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S rRNA gene', *International Symposium Advances in legal Medicine*, 11(1), p.449-450.