

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN THỊT HEO VÀ THỊT BÒ TRONG THỰC PHẨM BẰNG KỸ THUẬT MULTIPLEX-PCR

**Hồ Viết Thế*, Hồ Lê Quỳnh Trinh, Phạm Thị Tuyết Trinh,
Nguyễn Hiếu Thuýên, Ngô Thị Kim Anh**

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: *thehv@cntp.edu.vn*

Ngày nhận bài: 29/3/2018; Ngày chấp nhận đăng: 05/6/2018

TÓM TẮT

Hiện tượng pha trộn các thành phần trong thực phẩm đang là vấn đề được người tiêu dùng quan tâm. Hiện nay, việc xác định sự lẫn tạp này bằng các phương pháp truyền thống như cảm quan và sinh hóa không thật sự đạt hiệu quả cao. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật multiplex PCR được hoàn thiện để phân biệt thịt heo và thịt bò tươi từ đó áp dụng vào việc xác định sự hiện diện của hai loại thịt này trong thực phẩm. Phương pháp được tiến hành dựa trên sự phát hiện đặc hiệu của hai đoạn gene ty thể *COI* ở thịt heo và *ND5* ở thịt bò. Kết quả xác định được chu trình phản ứng multiplex PCR tối ưu với các thông số của phản ứng như sau: nồng độ DNA là 50 ng/ μ L, nồng độ primer heo, bò lần lượt là 10 μ M và 10 μ M, nhiệt độ bắt cặp ở 57 °C. Sản phẩm PCR chuyên biệt có kích thước khuếch đại ở 294 bp đối với thịt heo và 106 bp đối với thịt bò. Sau đó, quy trình này đã được ứng dụng thành công ngoài thực tiễn để phát hiện chính xác thịt heo và thịt bò có trong các sản phẩm chế biến từ thịt.

Từ khóa: Thịt heo, thịt bò, multiplex PCR, phân biệt thịt, pha trộn thịt.

1. MỞ ĐẦU

Cùng với sự phát triển về kinh tế, nhu cầu sử dụng thực phẩm chất lượng cao cũng tăng theo, đặc biệt là thịt bò [1]. Tuy nhiên, hiện nay nhiều trường hợp người buôn bán vì lợi nhuận đã dùng hóa chất để làm giả thịt bò từ các loại thịt khác [2]. Điều này gây ảnh hưởng đến việc kinh doanh, sản xuất cũng như sức khỏe người tiêu dùng. Vì vậy, việc tìm ra phương pháp phân biệt thịt heo và thịt bò một cách nhanh chóng, chính xác phục vụ người tiêu dùng cùng các nhân viên kiểm tra thực phẩm là hết sức cần thiết. Những phương pháp phân biệt thịt heo, thịt bò hiện nay chủ yếu dựa trên màu sắc, mùi vị, độ dai của thịt bò nhưng đối với những loại thịt bò tẩm hóa chất hay các sản phẩm đã qua chế biến thì phương pháp trên cho độ chính xác thấp hoặc không thể thực hiện [2]. Trong những thập niên gần đây, nhờ sự phát triển của sinh học phân tử nên các phương pháp phân biệt thịt dựa vào DNA cho kết quả chính xác hơn. Trong đó, phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction) dễ thực hiện, cho kết quả chính xác với độ nhạy cao trong thời gian ngắn [3]. Từ năm 1999, nhóm nghiên cứu của Matsunaga đã phát hiện 6 loại thịt (bò, heo, cừu, dê, ngựa, gà) từ thịt tươi và thịt chế biến bằng kỹ thuật PCR [4]. Gần hơn nữa, vào năm 2014, Kitpipit *et al.* thực hiện PCR trực tiếp mà không cần tách chiết DNA trước với primer được thiết kế từ cytochrome ty thể, *cytochrome oxidase I (COI)*, và 12s rRNA [5]. Một bước cải tiến mới của phương pháp PCR là multiplex PCR. Phương pháp này cùng một lúc sử dụng nhiều cặp primer chuyên biệt cho các gen mục tiêu khác nhau, như vậy có thể giúp xác định nhanh

được nhiều loại thịt trong một phản ứng. Nhờ những ưu điểm đó mà multiplex PCR ngày càng được sử dụng rộng rãi. Ở Malaysia, kỹ thuật này đã được dùng để phát hiện các loại thịt bị cấm sử dụng trong thức ăn của người theo đạo Hồi [6]. Kỹ thuật này cũng đã được sử dụng ở Hàn Quốc để phân biệt các loại thịt tươi và thịt đã qua sơ chế [7]. Trong nghiên cứu này, quy trình multiplex PCR được hoàn thiện để xác định được sự lẫn tạp hai loại thịt heo và bò ở các sản phẩm từ thịt có trên thị trường. Kết quả này có thể cung cấp phương tiện cho các nhà chuyên môn trong việc quản lý sự gian lận thương mại đối với sản phẩm thịt tươi cũng như các sản phẩm chế biến từ thịt.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các mẫu thịt tươi và sản phẩm từ thịt được thu thập từ siêu thị và các chợ ở trên địa bàn quận Tân Phú, thành phố Hồ Chí Minh. Mỗi loại thịt thu mẫu 500 g, chia thành các mẫu kích thước 1 cm x 1 cm cho vào từng túi nilon sạch, dán nhãn và bảo quản ở -20 °C đến khi sử dụng.

2.2. Phương pháp

Mẫu thịt tươi và sản phẩm từ thịt được rã đông ở nhiệt độ phòng, tiến hành tách chiết DNA theo phương pháp được Lương Quý Phương phát triển năm 2006 [8]. Tuy nhiên, nhóm tác giả thay đổi thời gian ly giải thịt từ 30 phút lên 1 giờ và kết tủa DNA bằng isopropanol thay vì sử dụng ethanol tuyệt đối. DNA sau khi tách chiết được định tính bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,5% ở 110 V trong 20 phút và định lượng bằng phương pháp đo quang phổ (Optima SP-3000, Nhật Bản). Sau đó, DNA được bảo quản ở nhiệt độ -20 °C cho đến khi sử dụng.

Phản ứng PCR được thực hiện với các cặp primer được thiết kế dựa trên gene *COI* đối với heo và gene *ND5* đối với bò [9, 10]. Trình tự các primer được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Trình tự các primer xuôi và ngược

Trình tự (5' – 3')	Gene mục tiêu	Loại thịt	Kích thước (bp)
GGAGCAGTGTTCGCCATTAT TTCTCGTTTTGATGCGAATG	<i>COI</i>	Heo	294
GGTTTCATTTTAGCAATAGCATGG GTCCAATCAAGGGTATGTTTGAG	<i>ND5</i>	Bò	106

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 20 µL bao gồm 1 µL DNA; 1 µL primer xuôi, 1 µL primer ngược; 10 µL MyTaq TM HS Mix White; 7 µL nước PCR (Bioline, Anh). Nồng độ DNA tối ưu cho phản ứng PCR được khảo sát ở 3 mức nồng độ gồm 50 ng/µL, 100 ng/µL, 150 ng/µL và nồng độ primer được khảo sát ở 3 mức nồng độ bao gồm 5 µM, 10 µM, 15 µM. Phản ứng khuếch đại DNA được tiến hành trong máy PCR Agilent Cycler 8800 (Agilent, Mỹ) theo quy trình sau: biến tính ban đầu ở 94 °C trong 1 phút; 35 chu kỳ tiếp theo: biến tính ở 94 °C trong 1 phút, bắt cặp ở 54 °C trong 45 giây, kéo dài ở 72 °C trong 1 phút; hoàn thiện phản ứng ở 72 °C trong 5 phút, và giữ ở 4 °C cho đến khi phân tích.

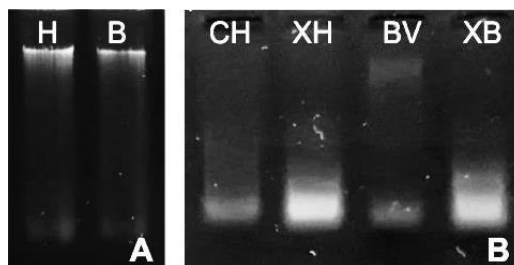
Sau khi có được thông số tối ưu về nồng độ DNA và nồng độ primer, nhiệt độ bắt cặp phù hợp cho cả hai cặp primer trong phản ứng multiplex PCR được khảo sát ở sáu mức nhiệt độ bao gồm 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C và 57 °C. Các sản phẩm PCR được điện di với gel agarose 1,5% trong thời gian 60 phút, điện thế 110 V trên máy điện di Muid-one (Takara-Advance, Nhật Bản). Gel được quan sát và chụp hình ảnh tại máy chụp gel (Quantum ST4-3000, Nhật Bản).

Sau khi hoàn thiện quy trình phát hiện đối với các thịt tươi, quy trình multiplex PCR sử dụng để phát hiện thịt heo và thịt bò ở một số sản phẩm xúc xích và chả ở trên thị trường với thành phần phản ứng có nồng độ như sau: 50 ng/μL DNA khuôn mẫu; 5 μM primer phát hiện thịt heo, 10 μM primer phát hiện thịt bò; 1X MyTaq TM HS Mix White; tổng thể tích phản ứng 20 μL. Quy trình nhiệt tương tự như đã mô tả ở trên với nhiệt độ bắt cặp ở 57 °C.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tách chiết DNA

Trong nghiên cứu này, việc ly trích DNA ở mẫu thịt tươi được tiến hành khá thuận lợi và kết quả cho thấy DNA có độ tinh sạch cao (Hình 1A) tương tự như kết quả trước đó của Lương Quý Phương [8], trong khi đó việc ly trích DNA từ thịt đã qua chế biến gặp nhiều khó khăn, không phát hiện rõ được vạch DNA (Hình 1B). Nguyên nhân có thể là do trong các sản phẩm này chứa nhiều bột, các chất phụ gia, ít thịt và đã qua chế biến nên gây cản trở cho việc tách chiết. Đây là vấn đề thường gặp phải khi ly trích DNA từ các sản phẩm đã qua chế biến.

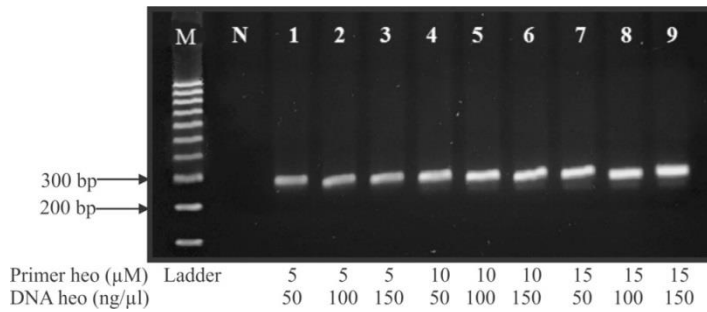


Hình 1. Kết quả ly trích DNA từ thịt tươi (A) và các sản phẩm từ thịt (B).
(H: thịt heo; B: thịt bò; CH: chả heo; XH: xúc xích heo; BV: bò viên; XB: xúc xích bò)

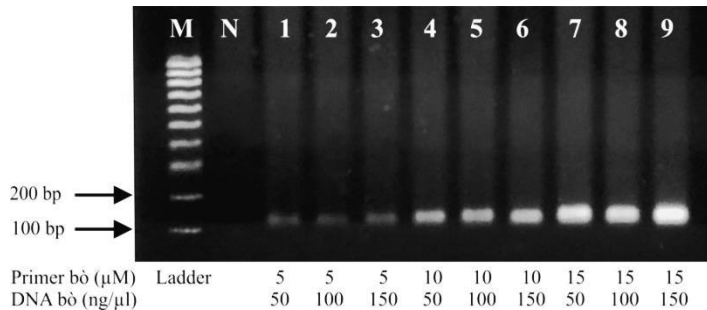
Sau khi đo quang phổ, nồng độ DNA thu được thấp, tuy nhiên nhiều nghiên cứu trước đây cũng đã thành công trong việc khuếch đại DNA mục tiêu từ các sản phẩm đã qua chế biến [11, 12] do đó các DNA này tiếp tục được sử dụng cho các nghiên cứu sau.

3.2. Kết quả tối ưu hóa nồng độ primer và nồng độ DNA ở các phản ứng PCR đơn gen

Nồng độ DNA và nồng độ primer có ảnh hưởng quan trọng đến tính chính xác, độ nhạy của phản ứng PCR, vì vậy khi bắt đầu triển khai các nghiên cứu về sinh học phân tử nhiều nhóm nghiên cứu đã tiến hành tối ưu hóa nồng độ primer để thu được kết quả PCR tốt nhất [13, 14]. Đối với các phản ứng PCR từ động vật, nồng độ DNA trong khoảng 50-250 ng/μL thường cho kết quả ổn định nhất [15]. Kết quả này được sử dụng để tiến hành khảo sát các nồng độ primer và nồng độ DNA cho phản ứng PCR phát hiện DNA thịt heo và thịt bò. Kết quả về khảo sát nồng độ primer và nồng độ DNA ở thịt heo tươi và thịt bò tươi được trình bày lần lượt ở Hình 2 và Hình 3.



Hình 2. Kết quả tối ưu hóa nồng độ DNA và nồng độ primer cho phản ứng PCR phát hiện DNA heo (M: thang chuẩn DNA 100 bp; N: đối chứng âm).



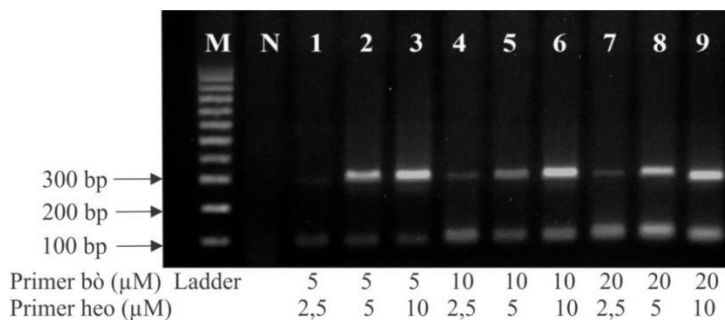
Hình 3. Kết quả tối ưu hóa nồng độ DNA và nồng độ primer cho phản ứng PCR phát hiện DNA bò (M: thang chuẩn DNA 100 bp; N: đối chứng âm).

Kết quả ở Hình 2 và Hình 3 cho thấy tất cả các tỷ lệ phối hợp giữa các nồng độ DNA và nồng độ primer đều đối với các sản phẩm khuếch đại chuyên biệt ở heo và bò có kích thước tương đồng với các nghiên cứu trước đó [9,10]. Ở các giếng 1, 2, 3 (Hình 2), tuy nồng độ DNA khác nhau nhưng cho các sản phẩm khuếch đại có độ sáng tương đương, trong khi đó các mẫu ở giếng 1, 4, 7 ở cùng nồng độ DNA nhưng cho các sản phẩm khuếch đại có độ sáng tăng dần theo nồng độ primer. Như vậy, trong 2 yếu tố khảo sát ở thí nghiệm này, nồng độ primer có ảnh hưởng lớn hơn đến hiệu suất khuếch đại của phản ứng PCR. Ở phản ứng PCR khuếch đại DNA của bò (Hình 3), hiệu suất của phản ứng PCR phụ thuộc nhiều hơn vào nồng độ primer. Kết quả cho thấy, các giếng 1, 2, 3 với nồng độ primer ở mức 5 μM có nồng độ sản phẩm thấp, trong khi đó từ nồng độ primer 10 μM trở lên, phản ứng có hiệu suất cao, bất kể các thay đổi về nồng độ DNA.

Từ kết quả trên, nồng độ DNA tối ưu cho cả hai loại thịt là 50 ng/μL. Trong khi đó nồng độ primer phù hợp cho phản ứng PCR phát hiện thịt heo và thịt bò lần lượt là 5 μM và 10 μM. Các thông số này được sử dụng để thực hiện các phản ứng multiplex PCR cho thịt heo và thịt bò ở thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Kết quả tối ưu hóa nồng độ primer và nhiệt độ bắt cặp cho phản ứng multiplex PCR

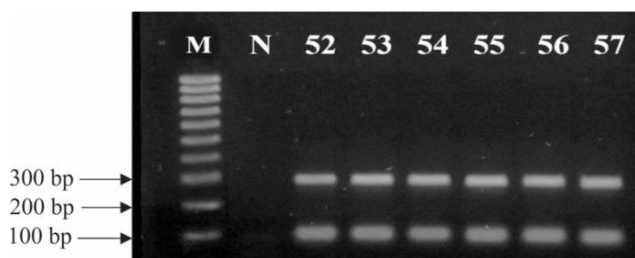
Trong phản ứng multiplex PCR, khi kết hợp nhiều primer với nồng độ không phù hợp có thể xảy ra sự khuếch đại không đồng đều giữa các locus, một số sản phẩm khuếch đại có thể khó quan sát được sau phản ứng [16]. Trước đó, các nhóm nghiên cứu của Martin và Markoulatos cũng đã khảo sát các nồng độ primer khác nhau trong một phản ứng multiplex PCR để xác định được tỷ lệ phù hợp nhất [14, 17]. Vì vậy, nồng độ primer của hai cặp primer của phản ứng multiplex PCR được khảo sát với việc sử dụng kết hợp của DNA từ lý trích từ thịt heo và thịt bò tươi theo nồng độ đã được tối ưu ở thí nghiệm trên (50 ng/μL). Kết quả được trình bày ở Hình 4.



Hình 4. Kết quả tối ưu hóa nồng độ primer cho phản ứng multiplex PCR phát hiện DNA heo và DNA bò (M: thang chuẩn DNA 100 bp, N: đối chứng âm)

Quan sát Hình 4, có thể nhận thấy có sự khác biệt về hiệu suất khuếch đại của phản ứng multiplex PCR khi kết hợp các nồng độ primer khác nhau trong một phản ứng. Kết quả này cho thấy cần có nồng độ primer tương ứng khi kết hợp các primer trong một phản ứng multiplex PCR. Ở giếng 1, nồng độ của hai primer thấp nhất dẫn tới lượng sản phẩm được tạo thành ít. Các mẫu ở giếng số 5, 6, 8, 9 cho hai sản phẩm khuếch đại heo và bò đều sáng rõ và dễ quan sát. Vì vậy, nồng độ primer heo là 10 μM , nồng độ primer bò là 10 μM (giếng 6) được chọn làm nồng độ thích hợp để thực hiện phản ứng multiplex PCR heo, bò.

Bên cạnh đó, nhiệt độ bắt cặp cũng là một yếu tố quan trọng trong multiplex PCR vì mỗi cặp primer có nhiệt độ bắt cặp khác nhau nên khi kết hợp trong một phản ứng cần tìm được một nhiệt độ phù hợp để kết quả của phản ứng là tốt nhất [16]. Kết quả khảo sát nhiệt độ bắt cặp của các cặp primer được trình bày ở Hình 5.

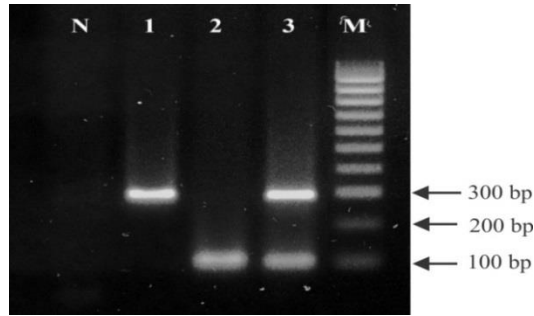


Hình 5. Tối ưu hóa nhiệt độ bắt cặp cho phản ứng multiplex PCR heo, bò.
(Thứ tự các giếng: M: thang chuẩn DNA 100 bp;
N: đối chứng âm, 52 °C, 53 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C, 57 °C)

Tại Hình 5, kết quả thu được ở tất cả các nhiệt độ bắt cặp khảo sát đều cho sản phẩm khuếch đại rõ, sáng đều như nhau vì vậy ở các nhiệt độ đã khảo sát không gây ra sự thay đổi cho sản phẩm multiplex PCR heo và bò. Do đó, nhiệt độ bắt cặp là 57 °C được chọn làm nhiệt độ thích hợp nhất cho phản ứng multiplex PCR heo và bò.

3.4. Kết quả thử nghiệm tính chuyên biệt các cặp môi trong phản ứng multiplex PCR

Trong phản ứng multiplex PCR, việc kết hợp nhiều primer và nhiều DNA sẽ dễ dẫn đến trường hợp nhiễm chéo hay còn gây ra hiện tượng dương tính giả nên việc tìm ra được cặp primer chuyên biệt cho mỗi loại DNA là rất quan trọng [20, 21]. Chính vì vậy, thí nghiệm chuyên biệt trong phản ứng multiplex PCR được tiến hành nhằm xác định tính chuyên biệt của hai cặp primer đã chọn. Kết quả được trình bày ở Hình 6.

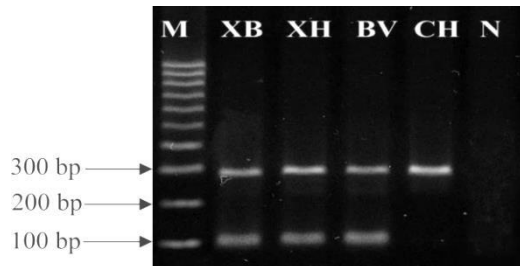


Hình 6. Kết quả đánh giá mức độ chuyên biệt của các cặp primer trong phản ứng multiplex PCR (M: thang chuẩn DNA 100 bp; N: đối chứng âm; 1: primer phát hiện gen *COI* (ở heo) + primer phát hiện gen *ND5* (ở bò) + DNA heo; 2: primer phát hiện gen *COI* (ở heo) + primer phát hiện gen *ND5* (ở bò) + DNA bò; 3: primer phát hiện gen *COI* (ở heo) + primer phát hiện gen *ND5* (ở bò) + DNA heo + DNA bò)

Kết quả cho thấy rằng các primer được sử dụng hoàn toàn chuyên biệt đối với từng loại thịt mục tiêu. Các primer không bắt chéo từ heo sang bò và ngược lại, không tạo các sản phẩm phụ và các band sản phẩm chính khuếch đại rõ ràng, đúng kích thước tương ứng với các nghiên cứu trước đó [9, 10]. Điều này khẳng định các cặp primer có tính chuyên biệt cao có thể đáp ứng cho các phản ứng multiplex PCR phân biệt thịt heo và thịt bò.

3.5. Thử nghiệm trên một số sản phẩm thực phẩm

Tiến hành thử nghiệm với các mẫu thực phẩm được lấy từ các khu chợ và siêu thị khu vực quận Tân Phú, thành phố Hồ Chí Minh. Các mẫu được thử: xúc xích heo, chả quế, xúc xích bò, bò viên. Kết quả multiplex PCR được thể hiện ở Hình 7.



Hình 7. Kết quả multiplex PCR của DNA từ mẫu thực phẩm (M: thang chuẩn DNA 100 bp; N: đối chứng âm; XB: xúc xích bò, BV: bò viên, XH: xúc xích heo, CH: chả heo)

Quan sát các sản phẩm khuếch đại ở Hình 7 có thể thấy đa phần các loại thực phẩm chế biến từ thịt có mặt trên thị trường có sự pha trộn giữa thịt heo và thịt bò. Thông thường để giảm giá thành sản xuất, các sản phẩm làm từ nguyên liệu thịt bò như xúc xích bò, bò viên sẽ được trộn thêm thịt heo để tăng lợi nhuận. Đây là vấn đề được báo chí nêu nhiều trong thời gian vừa qua [2, 18, 19], và thực tế trong nghiên cứu này tuy lượng mẫu sử dụng hạn chế cũng đã phát hiện các mẫu xúc xích bò và bò viên bị nhiễm DNA heo chứng tỏ có sự pha trộn thịt heo trong các sản phẩm này. Trong khi đó, đối với hai mẫu thực phẩm có nguồn gốc từ heo bao gồm xúc xích heo và chả heo, chỉ có mẫu xúc xích heo được xác định có sự hiện diện của DNA bò, đây có thể là sự lẫn tạp chéo trong quá trình chế biến vì một cơ sở sản xuất có thể có nhiều sản phẩm khác nhau dẫn tới sự lẫn tạp trên. Đây cũng là vấn đề cần lưu ý khi xuất khẩu các mặt hàng thực phẩm sang các nước không tiêu thụ một trong các loại thịt bò trên vì lý do vệ sinh hoặc tôn giáo.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, quy trình multiplex PCR để phát hiện chuyên biệt DNA từ heo, bò đã được xây dựng và tối ưu. Từ đó đã có thể phát hiện được sự có mặt của thịt heo, thịt bò trong một số sản phẩm thực phẩm đã qua chế biến. Kết quả của nghiên cứu này có thể được ứng dụng ở các cơ quan quản lý về an toàn thực phẩm hoặc ở các bộ phận kiểm soát chất lượng của các nhà máy chế biến thực phẩm. Ngoài ra, trong tương lai có thể phát triển thành các bộ KIT để phát hiện sự pha trộn của các loại thịt này ngay tại nơi bán hoặc nơi sản xuất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phòng Thương mại và Công nghiệp Việt Nam. - Ngành thịt Việt Nam - cơ hội và thách thức, 2016. Truy cập tại: <http://vcci-hcm.org.vn/diem-nhan-thi-truong/nganh-thit-viet-nam-%E2%80%93co-hoi-va-thach-thuc-tt6357.html>
2. Tiến Long, Hoàng Lộc. - Phù phép thịt heo nái thành thịt bò, tẩm hóa chất Metabisulfite, Báo Tuổi trẻ, 2016. Truy cập tại: <http://tuoitre.vn/tin/kinh-te/thi-truong/20160203/phu-phep-thit-heo-nai-thanh-thit-bo-tam-hoa-chat-metabisulfite/1048924.html>.
3. Martín I., García T., Fajardo V., López-Calleja I., Rojas M., Pavón M.A., Hernández P.E., González I. and Martín R. - Technical note: detection of chicken, turkey, duck, and goose tissues in feedstuffs using species-specific polymerase chain reaction, *Journal of Animal Science* **85** (2) (2007) 452–458.
4. Matsunaga T., Chikuni K., Tanabe R., Muroya S., Shibata K., Yamada J., Shinmura Y. - A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay, *Meat Science* **51** (2) (1999) 143–148.
5. Kitpipit T., Sittichan K. and Thanakiatkrai P. - Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products, *Food Chemistry* **163** (2014) 77–82.
6. Ali Md.E., Razzak Md.A., Hamid S.B.A., Rahman Md. M., Amin Md. A., Rashid N.R.A. and Asing. - Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods, *Food Chemistry* **177** (2015) 214–224.
7. Qin P., Hong Y. and Kim H. Y. - Multiplex-PCR assay for simultaneous identification of lamb, beef and duck in raw and heat-treated meat mixtures, *Journal of Food Safety* **36** (3) (2016) 367–374.
8. Lương Quý Phương. - Sản xuất bộ kit tách chiết DNA và bộ kit PCR phát hiện gene halothan trên heo, Luận văn Kỹ sư Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, 2006.
9. Szychaj A., Szalata M., Słomski R. and Pospiech E. - Identification of bovine, pig and duck meat species in mixtures and in meat products on the basis of the mtDNA cytochrome oxidase subunit I (*COI*) gene sequence, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **66** (1) (2016) 31–36.
10. Hossain M. A. M., Ali M. E., Sultana S., Asing, Bonny S. Q., Kader M. A. and Rahman M. A. - Quantitative tetraplex real-time polymerase chain reaction assay with Taqman probes discriminates cattle, buffalo, and porcine materials in food chain, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65** (19) (2017) 3975–3985.
11. Arslan A., Ilhak O.I. and Calicioglu M. - Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique, *Meat Science* **72** (2) (2006) 326–330.

12. Şakalar E., Abasiyanik M.F., Bektik E., and Tayyrov A. - Effect of heat processing on DNA quantification of meat species, *Journal of Food Science* **77** (9) (2012) N40-N44. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02853.x.
13. Hồ Huỳnh Thùy Dương. - Sinh học phân tử: khái niệm-phương pháp-ứng dụng, Tái bản lần 2, NXB Giáo Dục TP. Hồ Chí Minh, 1997, 299tr.
14. Marín A., Fujimoto T., and Arai K. - Rapid species identification of fresh and processed scallops by multiplex PCR, *Food Control* **32** (2) 2013 472–476.
15. Jonker K.M., Tilburg J.J, Hagele G.H., de Boer E. - Species identification in meat products using real-time PCR, *Food Additives & Contaminants: Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* **25** (5) (2008) 527–533.
16. Henegariu O., Heerema N.A., Dlouhy S.R., Vance G.H., Vogt P.H. - Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol, *Biotechniques* **23** (3) (1997) 504–511.
17. Markoulatos P., Siafakas N., Moncany M. - Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach, *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **16** (1) (2002) 47–51.
18. Lan Anh. - Nhiều loại thịt, chả, xúc xích bò là giả, *Báo Tuổi trẻ*, 2016. Truy cập tại <https://tuoitre.vn/nhieu-loai-thit-cha-xuc-xich-bo-la-gia-1080769.htm>
19. Hồng Hải. - Phát hiện hàng loạt giò, xúc xích bò “lên đời” từ thịt lợn, *Báo Dân trí*. Truy cập tại <http://dantri.com.vn/suc-khoe/phat-hien-hang-loat-gio-xuc-xich-bo-len-doi-tu-thit-lon-20160408033403477.htm>
20. Apte A., Daniel S. - PCR primer design, In: *PCR Primer: A laboratory manual*, 2nd edn. (Dieffenbach C.W., Dveksler G.S. eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003, 61–74.
21. Sint D., Raso L., Traugott M. - Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success, *Methods in Ecology and Evolution* **3** (5) (2012) 898–905.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX PCR FOR PORK AND BEEF IDENTIFICATION IN FOOD PRODUCTS

Ho Viet The*, Ho Le Quynh Trinh, Pham Thi Tuyet Trinh,
Nguyen Hieu Thuyen, Ngo Thi Kim Anh
Ho Chi Minh City University of Food Industry
*Email: thehv@cntp.edu.vn

Currently, meat products on the market are not strictly monitored. Several products are adulterated or mixed with cheaper ingredients to increase illegal profits. This problem is hardly solved due to the unprecise authentication when using traditional methods. In the present study, multiplex PCR assay was developed and applied to distinguish between pork and beef and processed products. The method based on the gene detection of *COI* for pork and *ND5* for beef. After optimization, the suitable parameters for multiplex PCR reactions are follows: DNA concentration at 50 ng/μL, primer concentration at 10 μM and annealing temperature at 57 °C. Specific PCR amplifications for pork and beef are 294 bp and 106 bp, respectively. The established multiplex PCR were also applied successfully to confirm the adulteration of meat products on markets.

Keywords: Beef, pork, multiplex PCR, meat authentication, mixed meat.