

DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.153

BƯỚC ĐẦU XÂY DỰNG BỘ KIT PHÁT HIỆN SỰ LẤN TẠP DNA MỘT SỐ LOẠI THỊT TRONG THỰC PHẨM CHAY

Vũ Thị Thanh Trâm, Phạm Minh Hạc, Phạm Thị Thu Sang, Nguyễn Thị Hương, Lê Thị Hồng Ngân, Ngô Thị Kim Anh và Hồ Việt Thế*

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm bài viết: Hồ Việt Thế (email: thehv@hufi.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 22/07/2020

Ngày nhận bài sửa: 27/08/2020

Ngày duyệt đăng: 28/12/2020

Title:

Initial development of KIT to detect the contamination of meat DNA in vegetarian foods

Từ khóa:

DNA động vật, KIT, multiplex PCR, thực phẩm chay

Keywords:

Animal DNA, KIT, meat, multiplex PCR, vegetarian food

ABSTRACT

Vegetarian food is being favored not only for religious purposes but also for health care. However, there have been many cases where the presence of meats in vegetarian foods has been detected due to the failure of during process vegetarian food or due to mixing to enhance the flavor of products. The use of DNA markers to identify ingredient composition has been successfully used in many cases. In this study, the KIT detects DNA from some common meats based on the multiplex PCR technique was developed and tested. The KIT can determine the presence of DNA of pork, beef, and chicken in vegetarian foods at a concentration of DNA 50 ng/reaction. This result could be potential to develop and apply PCR kit to check the presence of meats in food samples in general and vegetarian foods in particular.

TÓM TẮT

Thực phẩm chay đang được người tiêu dùng ưa chuộng không chỉ vì mục đích tín ngưỡng mà còn để bảo vệ sức khỏe. Tuy nhiên, đã có nhiều trường hợp phát hiện sự hiện diện của các loại thịt trong thực phẩm chay do không đảm bảo an toàn thực phẩm trong quá trình sản xuất. Việc sử dụng DNA để nhận diện thành phần nguyên liệu đã được sử dụng thành công ở nhiều đối tượng. Trong nghiên cứu này, bộ KIT phát hiện DNA từ một số loại thịt phổ biến dựa vào kỹ thuật PCR đa môi (Multiplex PCR) được xây dựng và hoàn thiện. Kết quả bộ KIT bước đầu có thể xác định được sự hiện diện của DNA trong các loại thịt heo, bò, và gà trong thực phẩm chay ở nồng độ DNA 50 ng/phản ứng. Kết quả này là tiền đề để phát triển và đưa vào ứng dụng bộ KIT PCR để kiểm tra sự hiện diện của các loại thịt ở các mẫu thực phẩm nói chung và thực phẩm chay nói riêng trong thực tế.

Trích dẫn: Vũ Thị Thanh Trâm, Phạm Minh Hạc, Phạm Thị Thu Sang, Nguyễn Thị Hương, Lê Thị Hồng Ngân, Ngô Thị Kim Anh và Hồ Việt Thế, 2020. Bước đầu xây dựng bộ KIT phát hiện sự lẫn tạp DNA một số loại thịt trong thực phẩm chay. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(6B): 146-152.

1 MỞ ĐẦU

Do nhiều lý do khác nhau như quan niệm về giá trị đạo đức, lý do sức khỏe, số lượng người có nhu cầu thực phẩm chay ngày càng cao và lượng thực phẩm chay cung cấp cho thị trường cũng tăng tương ứng. Từ đó kéo theo thị trường thực phẩm chay ngày

càng lớn mạnh với vô vàn dòng sản phẩm thực phẩm mới khác nhau đang nổi lên. Do sự cạnh tranh của thị trường, nhiều nhà sản xuất thực phẩm chay đã trộn thêm thành phần có nguồn gốc từ động vật để tăng cường kết cấu cũng như hương vị sản phẩm (Cheng *et al.*, 2012) hoặc có thể giảm giá thành sản

phẩm (Mi *et al.*, 2015), điều này tác động tiêu cực đến niềm tin của người tiêu dùng vào sản phẩm thực phẩm chay. Vì vậy, tìm kiếm được một công cụ xác định thành phần trong thực phẩm có độ chính xác cao là cần thiết cho việc đảm bảo an toàn thực phẩm. Hiện nay, việc xác định sự lẫn tạp các loại thịt trong thực phẩm bằng các phương pháp truyền thống như cảm quan và sinh hóa không thật sự đạt hiệu quả cao. Các phương pháp liên quan đến xác định thành phần thực phẩm dựa trên phân tích ở cấp độ phân tử DNA thường được sử dụng hơn vì DNA có tính ổn định vượt trội và khả năng truy tìm nguồn gốc phổ quát trong tất cả các tế bào sinh vật. Ứng dụng DNA trong thực phẩm không chỉ dừng ở việc xác định có sự hiện diện của thực phẩm biến đổi gene (GMO) mà đã được ứng dụng để đo lường mức độ an toàn của các nhiều loại thực phẩm khác nhau như xác định sự pha trộn các loại nguyên liệu hoặc sự hiện diện của các vi sinh vật nguy hại (Kasiviswanathan *et al.*, 2017). Một số nghiên cứu đã được sử dụng để phát hiện sự hiện diện DNA của động vật trong thực phẩm chay. Năm 2014, nhóm nghiên cứu tại Italia đã sử dụng phương pháp PCR khuếch đại các đoạn DNA đặc trưng của động vật, kết quả đã phát hiện 41/72 mẫu sản phẩm từ thịt có thành phần không đúng như công bố (Pinto *et al.*, 2015). Nhiều nghiên cứu áp dụng kỹ thuật PCR trong kiểm soát thực phẩm chay cũng đã được công bố. Năm 2012, Cheng *và ctv.* sử dụng phương pháp Real-time PCR để phát hiện sự hiện diện DNA của cá trong thực phẩm chay (Cheng *et al.*, 2012), trong khi đó Mi *và ctv.* đã phát hiện sự hiện diện của DNA bò, heo, gà và vịt trong thực phẩm chay (Mi *et al.*, 2015). Ở nước ta, một nghiên cứu thực hiện năm 2014 với việc kiểm tra 11 thực phẩm chay, nhóm tác giả từ thành phố Hồ Chí Minh đã phát hiện 4 mẫu thực phẩm chay dương tính với DNA của động vật (Lao Đức Thuận, 2014). Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cũng chỉ ra rằng kỹ thuật PCR đa mồi (multiplex PCR) có tiềm năng cao hơn kỹ thuật PCR truyền thống, vì có khả năng phát hiện đồng thời nhiều vùng DNA mục tiêu trong một phản ứng. Kỹ thuật này đã được áp

dụng thành công trong phát hiện các loại virus gây bệnh trên tôm sú (Đặng Thị Hoàng Oanh *và ctv.*, 2010), các vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy cấp ở lợn (Nguyễn Tuấn Anh *và ctv.*, 2014), các gene mục tiêu của vi khuẩn *Chlamydia trachomatis* gây bệnh đường sinh dục (Nguyễn Nam Thắng *và ctv.*, 2016), các DNA của các loại thịt gà tây, đà điểu, gà và vịt (Li *et al.*, 2015). Trong nghiên cứu này, bộ KIT dựa trên kỹ thuật multiplex PCR được phát triển có khả năng phát hiện sự hiện diện DNA của heo, bò và gà và đã ứng dụng thành công trong tầm soát một số loại thực phẩm chay trên thị trường. Kết quả này có thể hỗ trợ cho việc xác thực sự hiện diện của thịt heo, thịt bò và thịt gà trong các loại thực phẩm và nguyên liệu được tiến hành nhanh chóng, chính xác và hiệu quả.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Các mẫu thịt tươi của heo, bò, gà và các loại thực phẩm chay được thu thập từ siêu thị, chợ, quán chay trên địa bàn các quận, huyện phía Tây Nam thành phố Hồ Chí Minh sau đó cho vào các túi zip và bảo quản ở từ -20°C đến khi sử dụng. Ngoài ra đậu nành cũng được sử dụng để làm đối chứng vì đây là thành phần nguyên liệu phổ biến trong sản xuất thực phẩm chay.

2.2 Phương pháp

DNA từ các mẫu thịt heo, bò, gà và đậu nành được tiến hành tách chiết theo quy trình của Schiebelhut *và ctv.* (2016), quy trình này cũng được sử dụng trong tách chiết các thực phẩm chay dùng trong nghiên cứu. DNA sau khi tách chiết được định tính bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,2 % ở 100 V trong 20 phút và định lượng bằng phương pháp quang phổ (Optima SP-3000, Nhật Bản). Sau đó DNA được pha loãng tới nồng độ 100 ng/μL và bảo quản ở nhiệt độ -20°C đến khi sử dụng. Mồi sử dụng cho phản ứng PCR để khuếch đại các gene mục tiêu được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1: Trình tự các mồi sử dụng trong nghiên cứu

Trình tự mồi (5'-3')	Gene mục tiêu	Đối tượng	Kích thước (bp)	Tài liệu tham khảo
GAAAAATCATCGTTGTACTTCAACTACA GGTCAATGAATGCGTTGTTGAT	<i>Cyt b</i>	Heo	100	López-Andreo <i>et al.</i> , 2005
CATCAACTTCATTACAACAATTATCAACATAAAG CCGAATGGTTCYTTTITTYCCYGAGTAGTA	<i>COI</i>	Bò	311	Kitpipit <i>et al.</i> , 2014
CAACAACACTCACTAATCGACCT GGGAGGAGGAAGTGTAAGC	<i>Cyt b</i>	Gà	516	Li <i>et al.</i> , 2015
GGCAAACACTCAGCGGAAACTGT TTAGATGGCCTCATGCAACAC	<i>Lectin</i>	Đậu nành	772	Xia <i>et al.</i> , 2019

Bảng 2: Thành phần phản ứng multiplex PCR

Thành phần	Nồng độ phản ứng
Môi cho DNA heo	0,5 mM
Môi cho DNA bò	0,5 mM
Môi cho DNA gà	0,5 mM
Môi cho DNA đậu nành	0,5 mM
Taqmix	1X
DNA thịt heo	50 ng/phản ứng
DNA thịt bò	50 ng/ phản ứng
DNA thịt gà	50 ng/ phản ứng
DNA đậu nành	50 ng/ phản ứng
Nước khử ion vô trùng	-
Tổng thể tích	20 μ L

Ban đầu, các phản ứng PCR được thực hiện riêng lẻ với các cặp môi chuyên biệt cho từng loại DNA. Phản ứng PCR được thực hiện trong tổng thể tích 6 μ L bao gồm 1,5 μ L nước khử ion vô trùng (Sigma-Aldrich, Mỹ); 0,5 μ L môi xuôi; 0,5 μ L môi ngược (IDT, Mỹ); 3 μ L *MyTaqTMHS Mix* White (Bioline, Anh). Phản ứng khuếch đại DNA được tiến hành trong máy PCR Agilent SureCycler 8800 (Agilent, Mỹ) theo quy trình: biến tính ban đầu ở 94°C trong 5 phút; 35 chu kỳ tiếp theo: biến tính ở 94°C trong 30 giây, bắt cặp ở 61°C trong 30 giây; kéo dài ở 72°C trong 45 giây; hoàn thiện phản ứng ở 72°C trong 5 phút, và giữ ở 4°C cho đến khi phân tích. Ở thí nghiệm đầu tiên, lượng DNA trong phản ứng được cố định 50 ng và khảo sát nhiệt độ bắt cặp của môi ở các mức 58°C, 60°C, 61°C và 62°C. Sau khi xác định được nhiệt độ bắt cặp của các môi, thí nghiệm tiếp theo được thực hiện để xác định lượng DNA phù hợp cho phản ứng PCR bao gồm mức 5 ng, 10 ng, 25 ng, 50 ng. Sau đó các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,2 % trong thời gian 40 phút, điện thế 100 V trên máy điện di Mupid-one

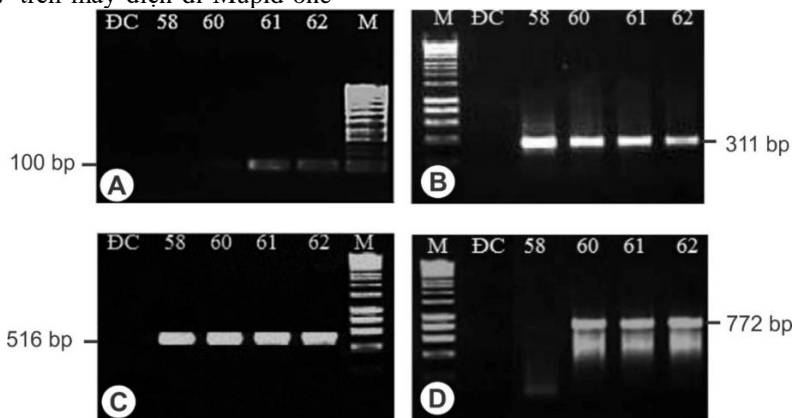
(Advance, Nhật Bản). Gel được quan sát và chụp hình ảnh tại máy chụp gel (Quantum ST4-3000, Nhật Bản), kích thước được so sánh với thang chuẩn 100 bp và 1000 bp (Bioline, Anh). Sau khi hoàn thiện quy trình PCR đơn để phát hiện DNA các loại thịt, quy trình multiplex PCR đa mục tiêu sử dụng để phát hiện cùng lúc DNA từ heo, bò, gà và đậu nành được thể hiện ở Bảng 2.

Sau khi hoàn thiện quy trình phản ứng PCR đa mục tiêu, các hóa chất được trộn lại với nhau để tạo thành bộ KIT như ở Hình 5. Bộ KIT sau đó được sử dụng để phát hiện sự hiện diện của các loại DNA mục tiêu từ tám mẫu thực phẩm chay được bán trên thị trường.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tối ưu điều kiện phản ứng PCR đơn

Nhiệt độ bắt cặp của môi với DNA mục tiêu là một yếu tố quan trọng quyết định sự chính xác của phản ứng PCR vì vậy thông số này cần được khảo sát kỹ lưỡng. Trong nghiên cứu này, nhiệt độ bắt cặp của các cặp môi được khảo sát ở các mức nhiệt độ 58°C, 60°C, 61°C, và 62°C. Kết quả khảo sát nhiệt độ gắn môi được thể hiện như Hình 1. Kết quả cho thấy, đối với cặp môi phát hiện DNA của bò (Hình 1B), DNA của gà (Hình 1C), sản phẩm PCR tất cả các mức nhiệt độ khảo sát đều cho kết quả rõ ràng, chứng tỏ sự bắt cặp của hai cặp môi này hoạt động tốt trong khoảng nhiệt độ này. Trong khi đó cặp môi chuyên biệt cho DNA heo chỉ hoạt động tốt ở mức nhiệt độ từ 61-62°C và tốt nhất ở 61°C (Hình 1A), và cặp môi chuyên biệt cho gene *lectin* ở đậu nành hoạt động tốt trong khoảng từ 60-62°C. Từ kết quả này, nhiệt độ bắt cặp chung cho các cặp môi là 61°C được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

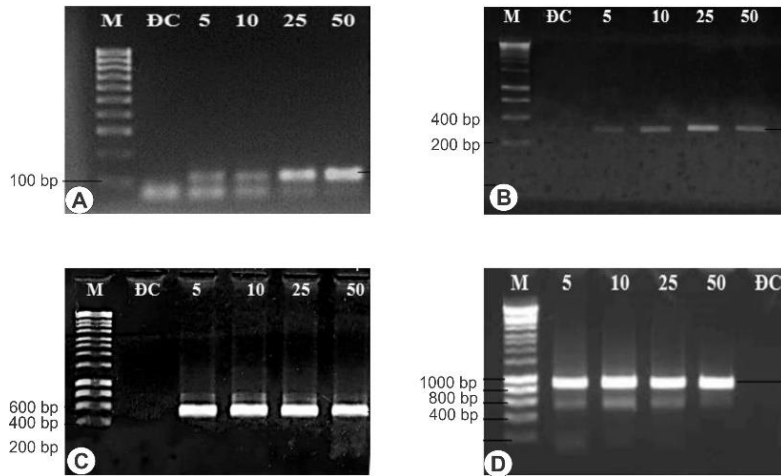


Hình 1: Kết quả khảo sát nhiệt độ gắn môi

(Hình A, B, C, D: DNA lần lượt từ thịt heo, bò, gà, và đậu nành, M: Thang chuẩn 100 bp (A), thang chuẩn 1000 bp (B, C, D) (Bioline, Anh); ĐC: đối chứng âm không DNA)

Sau khi xác định được nhiệt độ bắt cặp phù hợp của các môi ở 61°C, phản ứng PCR tiếp tục được khảo sát với các nồng độ DNA khác nhau, kết quả thu được như ở Hình 2. Kết quả cho thấy phản ứng PCR các nồng độ đều hiện bằng vạch sáng rõ, khuếch đại đúng kích thước sản phẩm như các nghiên cứu trước đó. Nhìn chung cho thấy ở nồng độ 50 ng/phản ứng cho kết quả tốt nhất đối với cả bốn loại môi. Như vậy nồng độ DNA tối thiểu cho

phản ứng PCR hoạt động tốt ở nghiên cứu này thấp hơn các nghiên cứu đã công bố trước đây. Trong nghiên cứu phát hiện DNA động vật từ thực phẩm chay, nghiên cứu của Lao và Le (2020) đã sử dụng tới 250 ng DNA cho một phản ứng PCR. Ở một nghiên cứu khác tại Trung Quốc, Mi và *ctv.* (2015) sử dụng DNA mạch khuôn tới nồng độ 50 ng/ μ L cho thể thích phản ứng 25 μ L. Vì vậy nồng độ 50 ng/phản ứng được sử dụng để thực hiện cho phản ứng multiplex PCR ở các thí nghiệm tiếp theo.

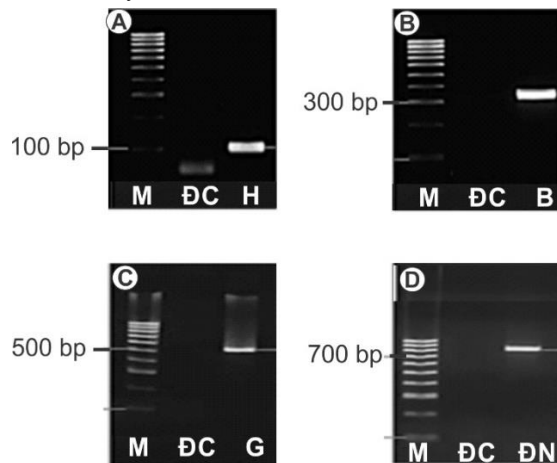


Hình 2: Kết quả ảnh hưởng của nồng độ DNA tới phản ứng PCR

(M: Thang chuẩn 100 bp (A), thang chuẩn 1000 bp (B, C, D) (Bioline, Anh); ĐC: đối chứng âm; 5, 10, 25, 50: nồng độ DNA (ng/phản ứng))

Sau khi xác định được nhiệt độ bắt cặp tối ưu của các môi và nồng độ DNA phù hợp, hai thông số này được dùng để thực hiện các phản ứng PCR riêng biệt cho từng loại DNA. Kết quả thu được ở Hình 3 cho thấy môi được sử dụng hoàn toàn chuyên biệt đối

với từng loại DNA mục tiêu. Sản phẩm PCR được khuếch đại rõ ràng, đúng kích thước khuếch đại so với các nghiên cứu trước đó. Điều này khẳng định các cặp môi có tính chuyên biệt cao có thể phù hợp để thực hiện phản ứng multiplex PCR.

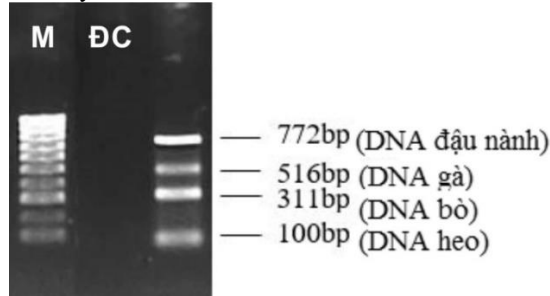


Hình 3: Kết quả PCR chuyên biệt thịt heo, thịt bò, thịt gà và đậu nành

(M: thang chuẩn 100 bp (Bioline, Anh); ĐC: đối chứng âm không DNA, Hình A, B, C, D: DNA lần lượt từ thịt heo (H), bò (B), gà (G), và đậu nành (ĐN))

3.2 Kết quả phản ứng multiplex PCR

Trong phản ứng multiplex PCR, việc kết hợp nhiều cặp mồi và nhiều DNA sẽ dẫn đến trường hợp nhiễu chéo hay còn gây ra hiện tượng dương tính giả nên việc tìm ra được cặp mồi chuyên biệt cho



Hình 4: Kết quả multiplex PCR sử dụng mồi chuyên biệt cho bốn loại DNA

(M : Thang chuẩn 100 bp (Bioline, Anh); DC: Mẫu đối chứng âm không DNA)

Multiplex PCR ngày càng được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu sinh học và y học vì chúng cho phép khuếch đại đồng thời một số đoạn DNA trong một phản ứng. Điều này giúp giảm số lượng phản ứng cần thiết để kiểm tra một mẫu cho các mục tiêu khác nhau giúp tiết kiệm thời gian và tiền bạc và làm cho kỹ thuật trở nên hữu ích, đặc biệt khi phải kiểm tra số lượng mẫu lớn. Tuy nhiên, đối với phản ứng multiplex PCR, thông thường kết quả các sản phẩm sẽ không đều nhau, và một vài sản phẩm sẽ chiếm ưu thế so với các sản phẩm còn lại, dẫn tới kết quả khó quan sát hơn kết quả của PCR đơn (Nguyễn Tuấn Anh và *ctv.*, 2014). Ở kết quả nghiên cứu này thu được như ở Hình 4 cho thấy tất cả các băng sản phẩm khuếch đại rõ ràng, dễ quan sát, không tạo ra sản phẩm phụ, kích thước tương ứng với các nghiên cứu trước đó: băng sản phẩm khuếch đại của thịt heo có độ lớn 100 bp, thịt bò 311 bp, thịt gà 516 bp và đậu nành 772 bp. Như vậy ở trong thí nghiệm này, các thông số phù hợp cho phản ứng multiplex PCR đã được xác định cụ thể. Điều này có ý nghĩa trong việc áp dụng phương pháp vào công việc thực tế vì trong phản ứng multiplex PCR có sử dụng đồng thời nhiều mồi trong một phản ứng điều này có thể gây ra một số bất lợi cho phản ứng như sự khác nhau về nhiệt độ nóng chảy/bắt cặp của mồi hoặc việc tạo thành các cấu trúc bậc hai giữa các mồi có thể làm giảm hiệu quả của phản ứng (Sint *et al.*, 2012).

3.3 Hoàn thiện và thử nghiệm bộ KIT

Dựa theo thành phần hóa chất thực hiện phản ứng multiplex PCR đã tối ưu hóa ở các thí nghiệm trên, thành phần hóa chất cho phản ứng PCR được chia thành ba ống: ống A gồm Taqmix 2X, hỗn hợp 4 loại mồi chuyên biệt cho DNA heo, bò, gà và đậu

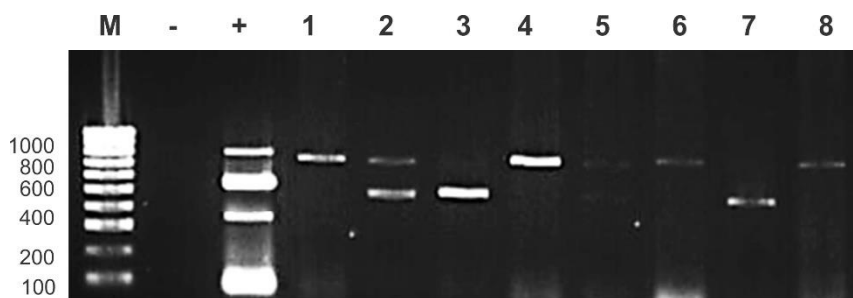
mỗi loại DNA là rất quan trọng. Vì vậy, thí nghiệm kiểm tra độ đặc hiệu của mồi trong phản ứng multiplex PCR được tiến hành nhằm xác định tính chuyên biệt của bốn cặp mồi đã chọn. Kết quả kiểm tra độ đặc hiệu của mồi được trình bày như Hình 4.

nành (10 mM), ống B là nước khử ion, và ống C chứa các DNA của heo, bò, gà và đậu nành (50 ng/ μ L) được sử dụng để làm đối chứng dương (Hình 5).



Hình 5: Hình bộ KIT phát hiện sự hiện diện của DNA từ heo, bò, và gà

Các mẫu thực phẩm chay được lấy từ các chợ và quán ăn trên địa bàn quận Tân Phú và Bình Tân, Tp.HCM và được tiến hành ly trích DNA. Các phản ứng multiplex PCR sử dụng KIT phát triển được với các thành phần như sau: 10 μ L từ ống A, DNA mẫu hoặc 1 μ L từ ống C (cho mẫu đối chứng dương) và thêm nước từ ống B cho đủ tổng thể tích phản ứng 20 μ L. Phản ứng được khuếch đại theo quy trình đã hoàn thiện ở thí nghiệm trên, kết quả sản phẩm sau điện di được thể hiện trong Hình 6.



Hình 6: Kiểm tra khả năng phát hiện thịt trên mẫu thực phẩm chay

(M: Thang 1 kb (Bioline, Anh); 1: M: thang 100 bp; -: đối chứng âm không DNA; +: đối chứng dương; 1: bắp chiên chay; 2: lòng xào chay; 3: mì căn; 4: chả lụa chay; 5: tàu hũ ki kho; 6: bì chay; 7: chạo ram chay; 8: chả hấp chay)

Hình 6 cho thấy hầu hết mẫu thực phẩm chay đều có sản phẩm PCR có kích thước 772 bp tương ứng với DNA của đậu nành. Đặc biệt trong đó có ba mẫu xuất hiện sản phẩm PCR có kích thước là 516 bp của DNA gà bao gồm chạo ram chay, mì căn và lòng xào chay. Từ đó, có thể thấy đã có sự pha trộn thịt gà hay trong quá trình chế biến đã gây lẫn thịt gà vào số loại thực phẩm chay trên. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trước đây ở nước ta (Lao Đức Thuận và *ctv.*, 2014). Đây là vấn đề không chỉ của nước ta mà cả ở những nước khác, năm 2018 sự hiện diện của thịt heo và thịt gà tây cũng đã được phát hiện trong các loại thực phẩm chay ở Anh (Morley *et al.*, 2018).

4 KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, bước đầu bộ KIT dựa trên kỹ thuật multiplex PCR được hoàn thiện và có thể phát hiện sự hiện diện của DNA từ heo, bò và gà ở một số loại thực phẩm chay. Kết quả ban đầu cho thấy đã phát hiện được sự có mặt của DNA gà trong một số sản phẩm thực phẩm chay có bán trên địa bàn khu vực phía Tây Nam thành phố Hồ Chí Minh bao gồm lòng xào chay, mì căn và chạo ram chay. Tuy nhiên, kết quả này mới dừng lại ở xác định định tính sự có mặt của DNA các loại thịt mục tiêu, vì vậy cần thực hiện các nghiên cứu để đánh giá ngưỡng phát hiện của phương pháp thông qua sử dụng kỹ thuật PCR định lượng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Cheng, C.Y., Shi, Y.C., Lin, S.R., Chou, C.C., Huang CC., 2012. Use of real-time PCR to detect surimi adulteration in vegetarian foods. *Journal of Marine Science and Technology*. 20(5): 570-574.

Đặng Thị Hoàng Oanh, Trần Nguyễn Diễm Tú và Trần Việt Tiên, 2010. Quy trình mPCR phát hiện đồng thời vi-rút gây bệnh đốm trắng, vi-rút parvo gây bệnh gan tụy trên tôm sú (*Penaeus monodon*). *Tạp chí Khoa học đại học Cần Thơ*. 13: 144-150.

Kasiviswanathan, D., Sadasivam, N., Madheslu, M., 2017. DNA as a Biomaterial in Diagnosis of Food Adulteration and Food Safety Assurance. *Research & Development in Material Science* 2(3). RDMS.000538. DOI: 10.31031/RDMS.2017.02.000538.

Kitpitpit, T., Sittichan, K., Thanakiatkrai, P., 2014. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. *Food Chemistry*. 163: 77-82.

Lao, T.D., Le, T.A.H., 2020. Exploring the multiplex PCR for detection of animal-derived ingredients in vegetarian foods. *Pharmacophore*. 11(3): 69-74.

Lao Đức Thuận, Nguyễn Thị Thanh Nhân, Nguyễn Thị Thiên Hương và *ctv.* 2014. Bước đầu xây dựng quy trình PCR nhằm phát hiện thành phần động vật trong thực phẩm chay dựa trên vùng 16S rDNA ti thể. *Tạp chí khoa học trường đại học Mở Tp. Hồ Chí Minh*. 4(37): 3-10.

Li, J., Hong, Y., Kim, J.H., Quin, P., Kim, M.J., Kim, H.Y., 2015. Multiplex PCR for simultaneous identification of turkey, ostrich, chicken, and duck. *Journal of Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 58: 887-893.

Lopez-Andreo, M., Lugo, L., Garrido-Pertierra, A., Prieto, M.I., Puyet, A., 2005. Identification and quantitation of species in complex DNA mixture by real-time polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry*. 339(1): 73-82.

Mi, X., Yang, J., Cao, L. *et al.*, 2015. Potential DNA markers as a rapid tracing tool for animal adulterants in vegetarian food. *Food research International* <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.007>

Morley, K., Heighton, L., Newell, C., 2018. Supermarker scandal: pork and turkey found in vegan and "meat free" meals, accessed on 8 June 2018. Available from <https://www.telegraph.co.uk/news/2018/06/08/supermarket-scandal-pork-turkey-found-vegan-meat-free-meals/>

- Nguyễn Nam Thắng, Bùi Đức Độ, Nguyễn Thị Hoa và *ctv.*, 2016. Phát triển kỹ thuật multiplex PCR phát hiện đồng thời hai gen đích của *Chlamydia trachomatis*. Tạp chí Sinh học. 39(1): 108-114.
- Nguyễn Tuấn Anh, Nguyễn Thị Minh Tâm, Trịnh Thị Thanh Huyền, Ngô Quang Hùng, Phí Thị Thu Hiền và Nguyễn Thị Hoàng, 2014. Xây dựng quy trình Multiplex PCR phát hiện một số vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy cấp ở lợn. Tạp chí Sinh học. 36(1se): 8-14.
- Pinto, A.D., Bottaro, M., Bonerba, E. *et al.* 2015. Occurrence of mislabelling in meet products using DNA-based assay. Journal Food Science and Technology. 52(4): 2479-2484.
- Schiebelhut, L.M., Abboud, S.S., Daglio, L.E.G., Swift, H.F., Dawson, M.N., 2016. A comparison of DNA extraction methods for high-throughput DNA analyses. Molecular Ecology Resources. 17(4): 721-729.
- Sint, D., Raso, L., Traugott, M., 2012. Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. Methods in Ecology and Evolution. 3(5): 897-905.
- Xia, Y., Chen, F., Du, Y. *et al.*, 2019. A modified SDS-based DNA extraction method from raw soybean. Bioscience reports. 39(2) BSR20182271