

## SO SÁNH VÀ ĐÁNH GIÁ CÁC PHƯƠNG PHÁP LY TRÍCH DNA TRONG CÁC SẢN PHẨM CÓ NGUỒN GỐC TỪ HẠT CA CAO

Lâm Thị Việt Hà<sup>1\*</sup>, Trương Trọng Ngôn<sup>2</sup>, Trần Nhân Dũng<sup>2</sup> và Hà Thanh Toàn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Nông Nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu và phát triển CNSH, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Lâm Thị Việt Hà (email: [ltvha@ctu.edu.vn](mailto:ltvha@ctu.edu.vn))

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 22/04/2019

Ngày nhận bài sửa: 24/06/2019

Ngày duyệt đăng: 31/10/2019

### Title:

Comparative evaluation of four extraction methods for DNA Quantification and PCR detection in cocoa-derived products

### Từ khóa:

Ca cao, PCR, phương pháp trích ly DNA

### Keywords:

Cocoa, cocoa-derived product, DNA extraction, polymerase chain reaction

### ABSTRACT

Four methods for extracting DNA in cocoa-derived products (cocoa powder, cocoa butter, cocoa mass, and dark chocolate) are described. These DNA extraction methods included four commercial kits DNeasy Plant kit, DNeasy Plant kit with polyvinyl polypyrrolidone (PVPP), QIAamp DNA Stool kit, Wizard Genomic DNA Purification kit. The DNA yield, purity, and quality for four different cocoa matrices are discussed. The yield and purity were determined through spectrophotometry: DNA concentration, DNA purity and PCR positive amplification. Three different conventional PCR reactions were used to assess the quality of the DNA extracted. The Wizard Genomic DNA Purification kit was found to be the best for DNA quality and PCR detection in cocoa powder and dark chocolate ([DNA] = 44.83 (ng/μL); A260/A280 = 1.4-1.7, PCR positive amplification) and ([DNA] = 29.34 (ng/μL) and A260/A280 = 1.4-1.7, PCR positive result, respectively). The cocoa butter matrix gave the lowest DNA yield, and negative amplification results for three the examined extraction methods DNeasy Plant kit with PVPP, DNeasy Plant kit without PVPP, and QIAamp DNA Stool kit [DNA] <10 (ng/μL, PCR negative products). The QIAamp DNA Stool kit method showed the best result for PCR detection of cocoa mass (A260/A280 = 1.7-2.0, [DNA] = 28.12 (ng/μL), PCR negative amplification).

### TÓM TẮT

Bốn phương pháp trích ly DNA nhanh (kit) được dùng trong nghiên cứu đánh giá và so sánh nhằm chọn phương pháp trích ly DNA tối ưu nhất cho từng nguyên liệu có nguồn gốc từ sản phẩm ca cao (bốn nguyên liệu sử dụng trong thí nghiệm: bột ca cao, bơ ca cao, ca cao lỏng và sô cô la). Các phương pháp trích ly bao gồm: DNeasy Plant kit, DNeasy Plant kit with polyvinyl polypyrrolidone (PVPP), QIAamp DNA Stool kit, và Wizard Genomic DNA Purification kit. DNA ly trích được so sánh nồng độ DNA; độ tinh sạch và so sánh chất lượng sản phẩm tạo thành (sản phẩm PCR dương tính); Wizard Genomic DNA Purification kit cho kết quả tốt nhất đối với bột ca cao và sô cô la [DNA] = 44,83 (ng/μL); A260/A280 = 1,4-1,7, PCR dương tính; và [DNA] = 29,34 (ng/μL) và A260/A280 = 1,4-1,7, PCR dương tính; sản phẩm bơ ca cao không cho kết quả tốt đối với 3 phương pháp ly trích DNeasy Plant kit with PVPP, DNeasy Plant kit without PVPP, và QIAamp DNA Stool kit ([DNA] <10 (ng/μL PCR âm tính); QIAamp DNA Stool kit cho kết quả tối ưu để ly trích DNA từ ca cao lỏng (A260/A280 = 1,7-2,0, [DNA] = 28,12 (ng/μL), PCR dương tính).

Trích dẫn: Lâm Thị Việt Hà, Trương Trọng Ngôn, Trần Nhân Dũng và Hà Thanh Toàn, 2019. So sánh và đánh giá các phương pháp ly trích DNA trong các sản phẩm có nguồn gốc từ hạt ca cao. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(5B): 9-15.

## 1 GIỚI THIỆU

Cacao (*Theobroma cacao* L.) là loài cây công nghiệp quan trọng trên toàn cầu, sản lượng cao là nguồn thu nhập chính của một số nước đang phát triển trên thế giới như: Ghana, Bờ Biển Ngà (Afoakwa *et al.*, 2016; ICCO, 2016). Hiện nay, hạt cao ngày càng phát huy giá trị kinh tế và giá trị dinh dưỡng (Wood and Lass, 2001; Efombagn *et al.*, 2009; Ha *et al.*, 2016). Cây cao có 3 giống gồm Forastero, Criollo và giống lai Trinitario (giống Trinitario là con lai của Criollo và Forastero). Giống Forastero (trái xanh khi còn non, chín có màu vàng) cho năng suất cao, chống chịu sâu bệnh tốt, trái và hạt có kích cỡ to; nhưng chất lượng của hạt không thơm ngon (Afoakwa *et al.*, 2014; ICCO, 2017; Wood and Lass, 2001). Giống Criollo ngược lại cung cấp hạt với chất lượng thơm ngon nhưng dễ bị sâu bệnh và năng suất thu hoạch kém. Giống lai Trinitario được lai tạo mang các đặc tính tốt của hai giống bố mẹ; vì vậy đa số các quốc gia trồng cao hiện nay trên thế giới chỉ trồng giống lai Trinitario (Phước, 2009; Afoakwa *et al.*, 2014; ICCO, 2017).

Thực phẩm có nguồn gốc từ hạt cao (thực phẩm được sản xuất từ nguyên liệu hạt cao) đã được tiêu thụ từ hơn 2.600 năm trước (Wood and Lass, 2001; Lecumberri *et al.*, 2007; Afoakwa *et al.*, 2016). Có 3 giống cao hạt cao (hạt Criollo, hạt Forastero và hạt lai Trinitario); sự định danh nguồn gốc xuất xứ hạt rất quan trọng cho các nhà sản xuất và người tiêu dùng các sản phẩm này. Định danh nguồn gốc hạt cao (Forastero, Criollo, và Trinitario) giúp ích quá trình phân loại đúng hạt cao chất lượng, nhằm tiêu chuẩn hóa nhãn hiệu sản phẩm và nguồn gốc xuất xứ các sản phẩm chế biến từ hạt cao. Đặc biệt với sự phát triển vượt bậc của ngành Sinh học Phân tử hiện đại, với sự hiện diện một lượng rất nhỏ DNA trong nguyên liệu, các nhà khoa học có thể nhận biết nhiều thông tin của nguyên liệu đang nghiên cứu (cấu trúc bộ gen, chức năng gen...).

Hạt cao tươi sau khi lên men từ 5-7 ngày, sấy khô từ 4-6 ngày, và sau mỗi quy trình sản xuất khác nhau sẽ tạo ra các sản phẩm khác nhau bao gồm cao lỏng, cao bột, bơ cao và cuối cùng là sản phẩm sô cô la. Vì vậy, khảo sát phương pháp ly trích DNA tối ưu cho từng sản phẩm có nguồn gốc từ hạt cao là vấn đề cấp thiết nhằm truy xuất nguồn gốc sản phẩm, tiêu chuẩn hóa và đánh giá chất lượng sản phẩm khi có nhu cầu của nhà sản xuất và người tiêu dùng.

Phản ứng PCR (Polymerase Chain Reaction) đã được áp dụng để xác thực nguồn gốc của thực phẩm

ở các nước phát triển (Reid *et al.*, 2006; Mafra *et al.*, 2008; Smulders *et al.*, 2008). Hơn nữa, số lượng và chất lượng DNA sau ly trích là yêu cầu được đặt lên hàng đầu (Spaniolas *et al.*, 2008). Kỹ thuật PCR là phương pháp tối ưu và tin cậy dùng để phát hiện số lượng rất nhỏ DNA trong các sản phẩm thực phẩm (Tombelli *et al.*, 2000; Holst-Jensen *et al.*, 2003). Phản ứng PCR thành công phụ thuộc vào hiệu quả của phương pháp ly trích DNA, ly trích lượng DNA tinh sạch và chất lượng (Mafra *et al.*, 2008).

Các công bố khoa học cho thấy hiệu quả của việc sử dụng các phương pháp trong ly trích DNA từ lá cao: tác giả Perry chứng minh phương pháp “CTAB” hiệu quả khi ly trích DNA từ lá cao (Perry *et al.*, 1998); Haymes đã thí nghiệm thành công bộ kit “DNeasy Plant kit with PVPP (Polyvinyl Polypyrrolidone)” khi ly trích DNA từ lá cao (Haymes *et al.*, 2004); tác giả Saunders chứng minh bộ kit “DNeasy Plant kit with PVPP” là phương pháp tối ưu cho ly trích DNA từ lá cao dùng cho DNA printing (Saunders *et al.*, 2004); phương pháp CTAB cải tiến được tác giả Bhattacharjee thực thi trên mẫu lá cao dùng cho phân tích đánh dấu phân tử (Bhattacharjee *et al.*, 2004). Tuy nhiên, phương pháp ly trích DNA tối ưu (nhanh và đạt DNA chất lượng) từ các sản phẩm có nguồn gốc hạt cao chưa từng được khảo sát và công bố.

Thực phẩm sản xuất từ hạt cao chứa một lượng rất lớn polyphenol, là nguyên nhân làm giảm chất lượng DNA ly trích; hợp chất polyphenol gây ức chế các phản ứng trong quá trình ly trích DNA (Perry, 1998; Petiard and Cruzillat, 2004; Saunder, 2004; Gryson *et al.*, 2007). Hơn nữa, polyphenol là chất ức chế làm giảm hiệu quả phản ứng của phản ứng PCR (Pinto *et al.*, 2007; Smith and Maxwell, 2007). Nghiên cứu phương pháp tối ưu ly trích DNA chất lượng cao là mục tiêu của đề tài nhằm thu được lượng DNA không chứa các hợp chất ức chế.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm thử nghiệm 4 bộ kit thương mại ly trích DNA các sản phẩm nguồn gốc từ cao: cao lỏng, bột cao, bơ cao và sô cô la. Bốn bộ kit được dùng trong thí nghiệm bao gồm: DNeasy Plant kit with PVPP, DNeasy Plant kit without PVPP; QIAampDNA Stool kit; và Wizard Genomic DNA Purification kit.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Nguyên liệu

Bốn loại nguyên liệu cao lỏng, bột cao, bơ cao và sô cô la được thu thập tại Công ty sản xuất sô cô la Kimmy (Châu Thành – Tiền Giang). Mẫu thí nghiệm bảo quản từ -18°C dùng cho phân tích.

**2.2 Phương pháp ly trích DNA:**

Các kit ly trích DNA được mua từ các công ty hóa chất, quy trình ly trích thực hiện chính xác theo hướng dẫn protocol công ty.

- DNeasy Plant kit with PVPP and DNeasy Plant kit without PVPP: Công ty Qiagen, GmbH, Đức.

- QIAamp DNA Stool kit: Công ty Qiagen, Leusden, Hà Lan.

- Wizard Genomic DNA Purification kit: Promega, Madison, WI, Mỹ.

**2.3 Phương pháp đo nồng độ và độ tinh sạch DNA sau ly trích**

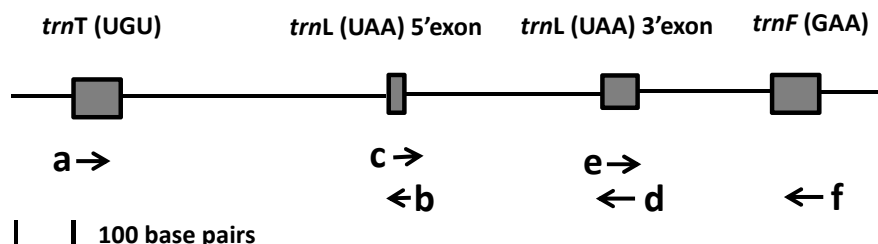
- Nồng độ DNA được đo bằng máy Spectrophotometer (Eppendorf, Milan, Ý) với bước sóng A260 nm.

- Độ tinh sạch DNA xác định bằng tỉ lệ hấp phụ 2 bước sóng A260 nm và A280 nm (A260/280).

**2.4 Đoạn môi oligonucleotide**

Các cặp môi oligonucleotide được tổng hợp và cung cấp: Công ty Integrated DNA technologies (Leuven, Bỉ). Môi được pha loãng bằng Milli-Q nước cất 2 lần đến nồng độ 50 μM. Sản phẩm DNA ly trích được thực hiện phản ứng PCR bằng các đoạn môi oligonucleotide, các cặp môi này hiện trong gen thực vật; phản ứng PCR dương tính với các cặp môi chứng minh DNA hiện diện với độ tinh sạch cao trong nguyên liệu.

Cặp môi Plant C/Plant D: Plant C (5'-CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG-3') và plant D (5'-GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC-3') được dùng khuếch đại đoạn gen 500bp – 600bp (Taberlet *et al.*, 1991). Đoạn môi non-coding của chloroplast DNA được dùng trong nghiên cứu mối quan hệ di truyền của các loài thực vật.



**Hình 1: Cấu trúc đoạn môi UAA 5' (Plant C) và UAA 3' (Plant D)**

- Cặp môi 5S I/5S II: 5S I (5'-TTT AGT GCT GGT ATG ATC GC-3') và 5S II (5'-TGG GAA GTC CTC GTG TTG CA-3'); đoạn môi 5S phát hiện đoạn 160 bp-1.000 bp của hạt (Petiard and Crouzillat, 2004).

- Cặp môi SSP III/SSP IV: SSP III (5'-GGC AAT TTA CTT CGT GAC AAA CG-3') và SSP IV (5'-CTC ATA TTT GCC AGG AGA ATT AC-3'); đoạn môi SSP phát hiện đoạn gen seed storage protein. Đoạn SSP thể hiện đoạn gen copy (3-5 copy) trong gen haploid T. cacao (Petiard and Crouzillat, 2004), vì vậy đoạn môi này xuất hiện từ lá đến các sản phẩm được sản xuất từ hạt ca cao (từ lá đến sô cô la).

**2.5 Phương pháp PCR**

- Hỗn hợp 50 μL chứa 2 μL DNA sản phẩm và 48 μL thể tích master mix chứa 31,75 μL nước cất 2 lần, 10 μL thể tích 5xgoTaq PCR buffer (Promega), 2 μL mỗi môi (10 μM), 2 μL dNTPs (5 mM) và 0,25 μL goTaq DNA polymerase (5 U). Mẫu âm tính chứa 2 μL nước cất 2 lần. Mẫu dương tính chứa 2 μL DNA đậu nành (DNA đậu nành cho phản ứng PCR dương tính với hầu hết các đoạn môi non-coding, intron và exon; DNA đậu nành cũng chứa nhiều chất

ức chế cho quá trình ly trích DNA và phản ứng PCR).

**- Phản ứng PCR :**

Cặp môi plant C/D: Khởi đầu bằng giai đoạn biến tính DNA ở nhiệt độ 95°C trong 3 phút, theo sau là 35 chu kỳ gia nhiệt với các giai đoạn: biến tính DNA ở 95°C trong 20 giây, gắn môi ở 54°C trong 40 giây, tổng hợp DNA ở 72°C trong 30 giây và kết thúc phản ứng PCR bằng giai đoạn ổn định sản phẩm ở 3 phút 72°C; lưu trữ ở 4°C.

5S I/II và SSP III/IV: Khởi đầu bằng giai đoạn biến tính DNA ở nhiệt độ 94°C trong 3 phút, theo sau là 30 chu kỳ gia nhiệt với các giai đoạn: biến tính DNA ở 95°C trong 1 phút, gắn môi ở 55°C trong 1 phút, tổng hợp DNA ở 72°C trong 1 phút và kết thúc phản ứng PCR bằng giai đoạn ổn định sản phẩm ở 72°C trong 7 phút; lưu trữ ở 4°C.

Chương trình gia nhiệt cho phản ứng PCR bằng máy Gene Amp PCR System 9700.

**- Phân tích sản phẩm PCR:**

Sản phẩm PCR được điện di bằng bộ điện di Bio-RAD kèm PC, sử dụng gel agarose 1,5% 1xTAE

buffer. Sản phẩm nhuộm với 1 ng/μL ethidium bromide, chụp hình gel dưới tia UV bằng máy Bio-RAD Gel Doc. Hình ảnh băng được phân tích bằng phần mềm Quantity One Software. Thang chuẩn Lamda Hind III và GeneRulerTM100 bp DNA ladder plus được dùng để ước lượng kích thước của đoạn DNA.

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Phân tích nồng độ, độ tinh sạch DNA và kết quả PCR

Theo các công bố, độ tinh sạch DNA sau ly trích đạt kết quả tốt ở mức 1,7–2,0 (Strauss, 2001; Puchooa and Khoyratty, 2004; Varma *et al.*, 2007). Khi kết quả này lớn hơn 2,0 biểu hiện có nhiều RNA hoặc protein trong sản phẩm DNA (Varma *et al.*, 2007). Kết quả A260/A280 đo được trong thí nghiệm đạt từ 1,4–2,0. Nồng độ DNA thu được trong nguyên liệu bột và bơ ca cao lớn hơn 40 ng/μL và nhỏ hơn 40 ng/μL (Bảng 1).

#### Bột ca cao và ca cao lỏng

Sản phẩm bột ca cao thể hiện kết quả nồng độ DNA cao nhất khi sử dụng DNeasy Plant kit (87,23 ng/μL). Phản ứng PCR đều cho kết quả âm tính, ngoại trừ kết quả dương tính đối với Wizard Genomic DNA Purification kit. Khi sử dụng QIAamp DNA Stool kit, 2 sản phẩm này đều cho nồng độ thấp nhất (<30 ng/μL) nhưng độ tinh sạch lại đạt kết quả tốt nhất (1/7–2,0). Ca cao lỏng cho kết quả dương tính với các kit thí nghiệm, ngoại trừ sản phẩm PCR khi dùng cặp mỗi 5S I/II.

#### Bơ ca cao và sô cô la

Wizard Genomic DNA Purification kit thể hiện kết quả tối ưu khi dùng ly trích DNA trong sản phẩm bơ ca cao và sô cô la (>25 ng/μL). Bơ ca cao đều cho kết quả PCR âm tính. Sô cô la cho kết quả PCR âm tính đối với 3 kit DNeasy Plant kit, DNeasy Plant kit with PVPP và QIAamp DNA Stool kit; nhưng cho kết quả dương tính khi ly trích bằng Wizard Genomic DNA Purification kit.

Nhìn chung, nồng độ DNA ly trích trong sô cô la cho kết quả thấp hơn so với ca cao lỏng và bột ca cao. Nồng độ DNA ly trích trong bơ ca cao đạt kết quả thấp nhất so với 3 sản phẩm trong nghiên cứu. Kết quả nồng độ DNA khác nhau ở các phương pháp trích ly có thể do trong nghiên cứu đã sử dụng số lượng nguyên liệu khác nhau ở mỗi phương pháp, mỗi quy trình ly trích DNA (kit) qui định số lượng mẫu khác nhau. Các bước tuân theo quy trình trích ly trong khi thực hiện thí nghiệm. Trong các thí nghiệm sau, đề xuất sử dụng một lượng nguyên liệu cố định giống nhau mới có thể so sánh hàm lượng DNA ly trích được.

Hai tác giả Surzycki and Belknap (2000) đã chứng minh Wizard Genomic DNA Purification kit có khả năng đáp ứng với sự không tinh sạch của DNA trong phản ứng PCR, điều này lý giải kết quả sử dụng bộ kit này cho PCR dương tính hầu hết các mẫu thí nghiệm, ngoại trừ sản phẩm bơ ca cao cho kết quả âm tính.

Sản phẩm bơ ca cao cho kết quả PCR âm tính đối với 3 cặp mỗi sử dụng, điều này có thể lý giải do bơ ca cao sau quá trình chế biến tạo ra bơ, bơ có thể không còn chứa nước; như vậy DNA không tồn tại trong bơ. Nghiên cứu được thực hiện trong tất cả các giai đoạn tạo thành sản phẩm từ hạt đến sô cô la là sản phẩm cuối cùng; bơ ca cao cũng là một sản phẩm trong công đoạn chế biến nên cũng được sử dụng thí nghiệm và báo cáo kết quả nghiên cứu được. Hạt ca cao tươi sau khi thu hoạch từ trái ca cao, trải qua quá trình lên men (5–7 ngày); tiếp đến là sấy khô (4–6 ngày); quá trình rang và tách vỏ hạt ca cao sấy khô tạo sản phẩm ca cao nips; ca cao nips sẽ được nghiền thành ca cao lỏng; ca cao lỏng được ép tạo thành 2 sản phẩm: sản phẩm một là ca cao lỏng không chứa bơ ca cao và sản phẩm thứ hai là bơ ca cao. Bơ ca cao tuyệt đối không chứa nước. Quá trình tách phân đoạn này phải qua các thiết bị chuyên ngành sử dụng trong chế biến sô cô la. Quá trình tạo ca cao bột là sự tách nước của sản phẩm thứ nhất không chứa bơ ca cao; và sản phẩm sô cô la là sản phẩm cuối cùng khi bổ sung nguyên liệu tùy thuộc vào mục đích của nhà sản xuất (chất bổ sung : lecithin, đường, bơ, mùi, vị...).

Trong 4 phương pháp ly trích thí nghiệm, kết quả PCR tối ưu đối với ca cao lỏng do trong suốt quy trình chế biến ca cao, sản phẩm ca cao lỏng là sản phẩm hình thành đầu tiên; sự phá vỡ DNA trong vách tế bào không nhiều, nên DNA có thể hiện diện nguyên cấu trúc mà không bị phá vỡ trình tự. Hơn nữa bột ca cao, bơ ca cao và sô cô la phải trải qua các quá trình xử lý nhiệt độ nên đây cũng là một nguyên nhân làm giảm số lượng và chất lượng DNA ly trích (Pinto *et al.*, 2006; Reid *et al.*, 2007; Smulders *et al.*, 2008).

Sự ảnh hưởng của PVPP trong ly trích DNA rất quan trọng, chính PVPP làm giảm các chất ức chế sinh ra trong quá trình ly trích (Haymes *et al.*, 2004). Trong ca cao, có rất nhiều hợp chất phenolic, chính PVPP là tác nhân làm giảm các chất phenolic này sinh ra khi xử lý tế bào và thu nhận DNA. Hợp chất PVPP hình thành khung hydrogen và phenolic, hợp chất PVPP-phenolic sẽ kết tủa và loại trừ sau quá trình ly tâm (Young *et al.*, 1993). Sản phẩm có nguồn gốc ca cao chứa một lượng lớn chất ức chế phenolic (Bekele *et al.*, 1994; Haymes *et al.*, 2004; Demeke and Jenkins, 2010), nên hợp chất này rất khó loại trừ trong quá trình ly trích DNA.

**Bảng 1 : Nồng độ, chất lượng và sự hiện diện băng của sản phẩm bột ca cao, bơ ca cao, ca cao lỏng và sô cô la**

Mẫu	Phương pháp	Nồng độ DNA concentration (ng/μL)			Tỷ số A260/280	Băng PCR		
		Lần 1	Lần 2	Trung bình		Plant c/d	5S I/II	SSP III/IV
		Bột	DNeasy Plant kit	94,01	80,45	87,23	1,4-1,7	-
	DNeasy Plant kit with PVPP	47,40	34,99	41,20	1,4-1,7	-	-	-
Cacao	QIAamp DNA Stool kit	23,81	28,69	26,25	1,7-2,0	+/-	+/-	-
	Wizard Genomic DNA Purification kit	44,86	44,80	44,83	1,4-1,7	+	+	-
Bơ ca cao	DNeasy Plant kit	9,94	0,00	9,94	1,4-1,7	-	-	-
	DNeasy Plant kit with PVPP	19,75	8,00	13,88	1,4-1,7	-	-	-
	QIAamp DNA Stool kit	2,00	12,00	7,00	1,4-1,7	-	-	-
	Wizard Genomic DNA Purification kit	27,99	26,67	27,33	1,4-1,7	-	-	-

+: có băng

-. không hiện băng

+/-: vết mờ

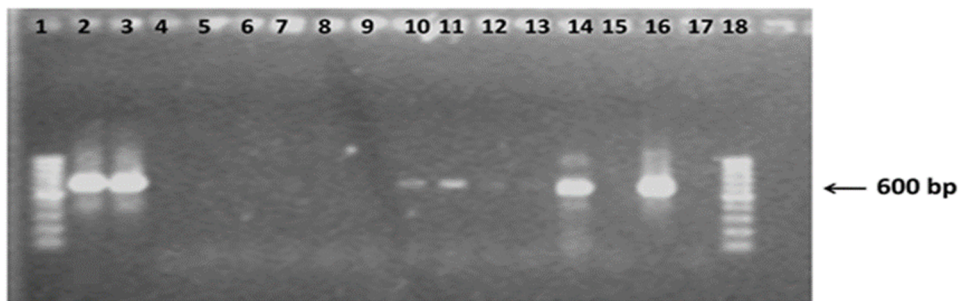
**Bảng 2 : Nồng độ, chất lượng và sự hiện diện băng của sản phẩm bột ca cao, bơ ca cao, ca cao lỏng và sô cô la**

Mẫu	Phương pháp	Nồng độ DNA concentration (ng/μL)			Tỷ số A260/280	Băng PCR		
		Lần 1	Lần 2	Trung bình		Plant c/d	5S I/II	SSP III/IV
		Ca cao lỏng	DNeasy Plant kit	46,40	53,62	50,01	1,4-1,7	+
DNeasy Plant kit with PVPP	38,12		39,16	38,64	1,4-1,7	+	-	-
QIAamp DNA Stool kit	29,31		26,93	28,12	1,7-2,0	-	-	-
Wizard Genomic DNA Purification kit	37,91		36,01	36,96	1,4-1,7	+	+	-
Sô cô la	DNeasy Plant kit	18,95	17,87	18,41	1,4-1,7	-	-	-
	DNeasy Plant kit with PVPP	10,60	7,29	9,00	1,4-1,7	-	-	-
	QIAamp DNA Stool kit	16,72	16,50	16,61	1,4-1,7	+/-	+/-	-
	Wizard Genomic DNA Purification kit	31,47	27,21	29,34	1,4-1,7	+	+	-

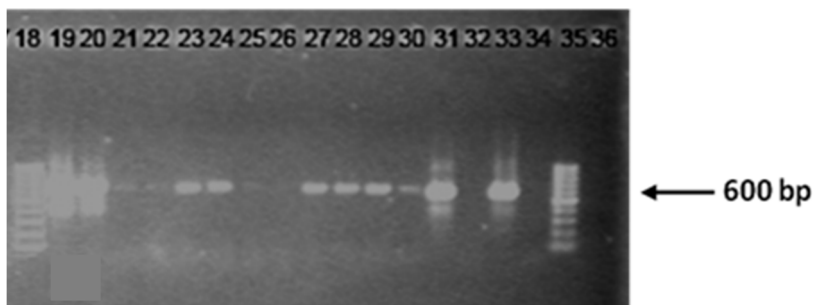
+: có hiện băng

-. không hiện băng

+/-: vết mờ



**Hình 2: Sản phẩm PCR sử dụng QIAamp DNA Stool kit, mỗi plant C/D (Band 1, 18: thang chuẩn 100 bp; band 2-3: lá ca cao; band 4-5: hạt ca cao band 6-7: bột ca cao, band 8-9: bơ ca cao, band 10-11: ca cao lỏng ; band 12-13: sô cô la ; band 14,16 : DNA đậu nành ; band 15-17 : nước cất mQ)**



**Hình 3: Sản phẩm PCR sử dụng Wizard Genomic DNA Purification kit, primer plant C/D (Band 18, 35: thang chuẩn 100 bp; band 23-24: bột ca cao, band 25-26: bơ ca cao, band 27-28: ca cao lỏng ; band 29-30: sô cô la ; band 31,33 : DNA đậu nành ; band 32-34: nước cất mQ. Band 19-20: lá ca cao; band 21-22: hạt ca cao)**

## 4 KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### 4.1 Kết luận

Cặp môi SSP III/IV chứng minh sự không thành công khi sử dụng trong phản ứng PCR đối với 4 phương pháp ly của trích thí nghiệm trên 4 loại sản phẩm. Bộ Wizard Genomic DNA purification kit cho kết quả nồng độ DNA ly trích tốt nhất. QIAamp DNA Stool kit cho kết quả độ tinh sạch DNA ly trích tốt nhất ( $A_{260}/A_{280} = 1.7-2.0$ ). Phương pháp ly trích DNA tối ưu đối với sản phẩm ca cao lỏng là QIAamp DNA Stool kit, phương pháp này cho kết quả  $A_{260}/A_{280}$  tối ưu (1.7-2.0). Wizard Genomic DNA purification kit là phương pháp ly trích DNA tối ưu đối với bột ca cao và sô cô la. Bơ ca cao không cho kết quả ly trích DNA tốt, không tạo sản phẩm PCR đối với 4 phương pháp thử nghiệm. Bên cạnh đó, độ tinh sạch DNA vẫn không đạt tối ưu 1,7-2,0 đối với một số phương pháp trong nghiên cứu thử nghiệm.

### 4.2 Kiến nghị

Khảo sát thêm các kit thương mại tiên tiến hiện nay dùng ly trích các sản phẩm có hàm lượng polyphenol cao.

### LỜI CẢM ƠN

Các tác giả cảm ơn Phòng thí nghiệm Agrifing (Đại học Ghent, Bỉ) đã hỗ trợ hóa chất và thiết bị thí nghiệm cho nghiên cứu này.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Afoakwa, E.O., 2016. Chocolate science and technology, Wiley Blackwell (2nd edition),1-13.
- Afoakwa, E.O., 2014. Cocoa production and processing technology. CRC Press, 9-17
- Bekele, F., Kennedy, A., Mc David, C., et al., 1994. Numerical taxonomic studies on cacao (*Theobroma cacao* L.) in Trinidad. *Euphytica*, 75, 231-240.
- Bhattacharjee, R., Kolesnikova-Allen, M., Aikpokpodion, P., et al., 2004. An improved

semiautomated rapid method of extracting genomic DNA for molecular marker analysis in cocoa, *Theobroma cacao* L. *PlantMol. Biol. Rep.* 22:435-436.

- Demeke, T., Jenkins R., 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analyt. Bioanaly. Chem.* 396: 1977-1990.
- Efombagn, I.B.M., Sounigo, O., Nyasse, S., et al., 2009a. Phenotypic variation of cacao (*Theobroma cacao* L.) on farms and in the gene bank in Cameroon. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 1, 258-264.
- Gryson, N., Messens, K., Dewettinck, K., 2007. Influence of cocoa components on the PCR detection of soy lecithin DNA. *European Food Research and Technology*, 226, 247-254.
- Ha, L.T.V., Hang, P.T.N., Everaert H., et al., 2016a. Morphology characteristics of leaf, flower and pod of cocoa varieties in southern Vietnam. *Pakistan Journal of Botany*, 48(6), 2375-2383.
- Haymes, K.M., Mischke, S., Scott, D.L., et al., 2004. Rapid isolation of DNA from chocolate and date palm tree crops. *J. Agric.Food Chem.* 52:5456-5462.
- Holst-Jensen, A., R  nning, S.B., L  vseth, A., et al., 2003. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analyt.Bioanaly.Chem.*, 375, 985-993.
- ICCO, 2017. Quarterly bulletin of cocoa statistic . Available: <https://www.icco.org/about-us/icco-news/337-february-2017-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics.html>. Accessed 28th February 2017
- ICCO, 2016. Quarterly bulletin of cocoa statistic. Available: <https://www.icco.org/about-us/icco-news/333-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics-november-2016.html>. Accessed Nov 2016
- Lecumberri, E., Mateos, R., Izquierdo-Pulido, M., et al., 2007. Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, 104, 948-954.

- Mafra, I., Silva, S.A., Moreira, E.J.M.O., Silva, C.S.F., Beatriz, M., Oliveira, P.P., 2008. Food Control. 19:1183-1190.
- Perry, M.D., Davey, M.R., Power, J.B., Lowe, K.C., Bligh, H.F.J., Roach, P.S., Jones, C., 1998. DNA isolation and AFLPTM genetic fingerprinting of shape *Theobroma cacao* (L). Plant Mol. Biol. Rep. 16: 49-59.
- Petiard, V., Cruzillat, D., 2004. Method of determining the genetic material of cocoa in fermented or roasted beans and chocolate. US Patent, No.20,161.
- Pinto, A.D., Forte, V., Guastadisegni, M.C., Martino, C., Schena, F.P., Tantillo, G., 2007. A comparison of DNA extraction methods for food analysis. Food Control. 18:76-80.
- P.H.D.Phuoc, 2009. Kỹ Thuật Trồng Cacao ở Việt Nam. NXB Nông Nghiệp, 1-46
- Puchooa, D., Khoyratty, S. S., 2004. Genomic DNA extraction from *Victoria amazonica*. Plant Mol. Biol. Rep., 22: 195a–195j
- Reid, L.M., O'Donnell, C.P., Downey, G., 2006. Recent technological advances for the determination of food authenticity. Trends Food Sci. Techn. 17:344-353.
- Saunders, J.A., Mischke, S., Leamy, E.A., et al., 2004. Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of *Theobroma cacao*. Theor. Appl. Genet. 110:41-47.
- Smith, D.S. and Maxwell, P.W., 2007. Use of quantitative PCR to evaluate several methods for extracting DNA from corn flour and cornstarch. Food Control, 18, 242236-242242.
- Smulders, M.J.M., Esselink, D., Amores, F., et al., 2010. Identification of cocoa (*Theobroma cacao* L.) varieties with different quality attributes and parentage analysis of their beans. Ingenic Newsl. 12: 1-13.
- Spaniolas, S., Tsachaki, M., Bennett. M.J., et al., 2008. Evaluation of DNA extraction methods from green and roasted coffee beans. Food Control. 19:257-262.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., 1991. Universal primers for amplification of 3 noncoding regions of chloroplast DNA. Plant Mol. Biol. 17:1105-1109.
- Young, C.C., Burghoff, R.L., Keim, L.G., et al., 1993. Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soils. Appl.Envir.Microbio. 59:1972-1974.
- Strauss, W.M., 2001. Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. Current protocols in molecular biology, 2-2.
- Surzycki, S.A., Belknap, W.R., 2000. Repetitive-DNA elements are similarly distributed on *Caenorhabditis elegans* autosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences. 97: 245-249.
- Tombelli, S., Mascini, M., Sacco, C., et al., 2000. A DNA piezoelectric biosensor assay coupled with a polymerase chain reaction for bacterial toxicity determination in environmental sample. Anal. Chim. Acta., 418, 1-9.
- Varma, A., Padh, H. and Shrivastava, N., 2007. Plant genomic DNA isolation: an art or a science. Biotechnology Journal, 2(3): p.386.
- Wood, G.A.R. and Lass, R., 2008. Cocoa. John Wiley & Sons. p. 232-250