

LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS

Định nghĩa

Lactobacillus acidophilus là vi khuẩn sinh acid lactic, không di động, không sinh bào tử, lên men đồng hình, trực khuẩn Gram dương hình que, đôi khi xếp thành chuỗi ngắn. Có thể thêm các chất bảo vệ lạnh phù hợp vào sinh khối thu được sau khi lên men trước khi đông lạnh rồi đông khô. Các chất đệm hay chất pha loãng phù hợp có thể được thêm vào công thức sản phẩm. Sản phẩm tạo thành phải chứa số lượng vi khuẩn sống *Lactobacillus acidophilus* không ít hơn 100 % so với lượng ghi trên nhãn. Chủng La-14: *Lactobacillus acidophilus* La-14 (mã hóa chủng theo ATCC là SD5212) là chủng vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* đặc trưng, thuần chủng, sản phẩm lên men có 60 % L-lactat và 40 % D-lactat.

Chủng NCFM: *Lactobacillus acidophilus* NCFM (mã hóa chủng theo ATCC là SD5221) là chủng vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* đặc trưng, thuần chủng, sản phẩm lên men có 66% L-lactat và 34 % D-lactat.

Lưu ý: Chuyên luận này chỉ áp dụng cho chủng *Lactobacillus acidophilus* La-14 và *Lactobacillus acidophilus* NCFM.

Định tính

A. Định tính bằng kính hiển vi

Tiến hành như chỉ dẫn trong mục Định lượng và nhuộm soi dưới kính hiển vi.

Tiêu chuẩn chấp nhận:

Chủng La-14: Trực khuẩn hình que

Chủng La NCFM: Trực khuẩn hình que, xếp thành chuỗi ngắn.

B. Định tính bằng phương pháp phân tích dựa trên chuỗi acid nucleic

Các hóa chất, dung môi sử dụng trong kỹ thuật PCR phải đạt chất lượng quy định trong Phụ lục 1.26.

Hỗn dịch mẫu: Chuẩn bị hỗn dịch mẫu probiotic trong *dung dịch đệm TE 1X (TT)* có nồng độ 100 mg/ml.

Mỗi đặc hiệu: xem *Bảng 1*

Bảng 1: Mỗi đặc hiệu và tiêu chuẩn chấp nhận tương ứng

Chủng	Mỗi đặc hiệu	Trình tự mỗi	Tiêu chuẩn chấp nhận ^a
La-14	1	Mỗi xuôi (5'-3'): AAACTGCAATTTAAGATTAT GAGTTTC Mỗi ngược (5'-3'): GGTACCGTCTTGATTATTAGTGTA Nhiệt độ biến tính mỗi: 51,0 °C	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước 184 cặp base. Không được có sản phẩm khuếch đại gen có kích thước 600 cặp base.
NCFM	1	Mỗi xuôi (5'-3'): TCGGCAAACCTTAGTTGCAGAAGG Mỗi ngược (5'-3') GGTGCTAAGCTAGGTATGGAAC. Nhiệt độ biến tính mỗi: 57,0 °C	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước 365 cặp base với 2 đa hình đơn nucleotid (SNP: Single-nucleotid polymorphisim). Vị trí SNP đầu tiên được gạch chân trong đoạn polynucleotid có 15 cặp base có trình tự như sau GAGTAAATTCATCA, vị trí của SNP này là cặp base thứ 50 tính từ đầu 5' của mỗi xuôi. Vị trí SNP thứ hai được gạch chân trong

			đoạn polynucleotid có 15 cặp base có trình tự như sau: TTCAATTGA <u>A</u> GTTTG, vị trí của SNP này là cặp base thứ 242 tính từ đầu 5' của mỗi xuôi. Trình tự của sản phẩm khuếch đại gen nên được xác định bằng các kỹ thuật giải trình tự đã được thẩm định, ví dụ như phương pháp Sanger.
	2	Mỗi xuôi (5'-3'): GCTGACGGAGATTATTCAAGCCA Mỗi ngược (5'-3'): GCAGAACACATACGCTACCAGA. Nhiệt độ biến tính mỗi: 57,0 °C	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước 433 cặp base với hai SNP. Vị trí SNP đầu tiên được gạch chân trong đoạn polynucleotid có 15 cặp base có trình tự như sau: AAGCATT <u>C</u> AATACAC và vị trí SNP này là cặp base thứ 72 tính từ đầu 5' của mỗi xuôi. Vị trí SNP thứ hai được gạch chân trong đoạn polynucleotid có 15 cặp base có trình tự như sau ATATGG <u>T</u> CTT ACCT và vị trí SNP này là cặp base thứ 215 tính từ đầu 5' của mỗi xuôi. Trình tự của sản phẩm khuếch đại gen nên được xác định bằng các kỹ thuật giải trình tự đã được thẩm định, ví dụ như phương pháp Sanger.
	3	Mỗi xuôi (5'-3'): AAACTGCAATTTAAGATTATGAGTTTC Mỗi ngược (5'-3'): GGTACCGTCTTGATTATTAGTGT Nhiệt độ biến tính mỗi: 51,0 °C	Sản phẩm khuếch đại gen có kích thước 600 cặp base. Không được có sản phẩm khuếch đại gen có kích thước 184 cặp base

^a: Phải đáp ứng tiêu chuẩn chấp nhận đối với mỗi cặp mỗi để đạt yêu cầu định tính đến mức chủng (strain).

Pha dung dịch mỗi gốc có nồng độ 100 µM bằng dung dịch đệm, tiếp tục pha loãng đến nồng độ 25 µM bằng dung dịch đệm, bảo quản ở -20 °C.

Mẫu thử: Chuẩn bị dung dịch chứa 10 µL PCR master mix¹, 1 µL dung dịch mỗi xuôi (25 µM), 1 µL dung dịch mỗi ngược (25 µM), 12 µL nước vô khuẩn và 1 µL hỗn dịch mẫu.

Mẫu chứng âm: tương tự như thành phần của mẫu thử, thay mẫu thử bằng 1 µL nước vô khuẩn.

Mẫu chứng dương: tương tự như thành phần của mẫu thử, thay mẫu thử bằng 1 µL khuôn DNA của chủng chuẩn *Lactobacillus acidophilus* La-14/NCFM hoặc thay cặp mỗi đặc hiệu cho chủng chuẩn bằng cặp mỗi đặc hiệu chung cho loài *Lactobacillus acidophilus*.

Tiến hành: Đối với mỗi cặp mồi, tiến hành phản ứng PCR trên mẫu thử, mẫu chứng âm và mẫu chứng dương trên cùng máy tạo chu trình nhiệt thích hợp ở bảng 2. Trong trường hợp mẫu chứng dương là mẫu thử được thay cặp mồi đặc hiệu cho chủng *Lactobacillus acidophilus* La-14/NCFM bằng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài *Lactobacillus acidophilus* thì phải chạy riêng mẫu chứng dương với chu trình nhiệt phù hợp với cặp mồi được chọn.

Bảng 2: Chu trình nhiệt

Chủng	Cặp mồi	Chu trình khuếch đại PCR
La-14	1	Bước 1: ủ 95 °C trong 7 min. Bước 2: ủ 95 °C trong 30 s. Bước 3: ủ ở 51,0 °C trong 30 s. Bước 4: ủ ở 72 °C trong 60 s. Lặp lại các bước 2 – 4 trong 34 chu kỳ, sau đó ủ tiếp ở 72 °C trong 5 min và giữ ở 4 °C.
NCFM	1	Bước 1: ủ 95 °C trong 7 min. Bước 2: ủ 95 °C trong 30 s. Bước 3: ủ ở 57,0 °C trong 30 s. Bước 4: ủ ở 72 °C trong 30 s. Lặp lại các bước 2 – 4 trong 34 chu kỳ, sau đó ủ tiếp ở 72°C trong 5 min và giữ ở 4 °C.
	2	Bước 1: ủ 95 °C trong 7 min. Bước 2: ủ 95 °C trong 30 s. Bước 3: ủ ở 57,0 °C trong 30 s. Bước 4: ủ ở 72 °C trong 30 s. Lặp lại các bước 2 – 4 trong 34 chu kỳ, sau đó ủ tiếp ở 72 °C trong 5 min và giữ ở 4 °C.
	3	Bước 1: ủ 95 °C trong 7 min. Bước 2: ủ 95 °C trong 30 s. Bước 3: ủ 51,0 °C trong 30 s. Bước 4: ủ 72 °C trong 1 min. Lặp lại các bước 2 – 4 trong 34 chu kỳ, sau đó ủ tiếp ở 72°C trong 5 min và giữ ở 4 °C.

Phân tích sản phẩm phản ứng PCR của mẫu thử, mẫu chứng dương, mẫu chứng âm bằng hệ thống điện di tự động kèm bộ kit DNA (automated on – chip electrophoresis system). Tiến hành điện di theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ngoài ra, có thể tiến hành phương pháp điện di gel. Sử dụng gel agarose (TT) 2 % (kl/tt) trong dung dịch đệm TAE 1X (TT). Nhuộm gel bằng dung dịch Ethidium bromid (TT) 0,5 mg/mL hoặc thuốc nhuộm gel phù hợp khác và rửa gel bằng nước.

{Thận trọng: Ethidium bromid (TT) là một chất độc hại và có khả năng gây đột biến. Sử dụng thiết bị bảo hộ cá nhân thích hợp (đeo găng tay nitril) khi tiếp xúc thuốc thử này}

Sử dụng thang chuẩn DNA phù hợp để xác định kích thước của sản phẩm khuếch đại thu được. Để thuận lợi cho việc so sánh kích thước của các sản phẩm khuếch đại, nên đặt thang chuẩn ở làn đầu tiên và làn cuối cùng trên gel.

Nếu sử dụng DNA của chủng đối chiếu làm mẫu chứng dương, kết quả phản ứng PCR mẫu chứng dương phải có sản phẩm khuếch đại với số cặp base đặc hiệu như được quy định ở mục Tiêu chuẩn chấp nhận (Bảng 1). Nếu sử dụng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài *Lactobacillus acidophilus* làm

chứng dương, kết quả phản ứng PCR mẫu chứng dương phải có sản phẩm khuếch đại với số cặp base đặc hiệu như trong các tài liệu đã công bố.

Kết quả phản ứng PCR mẫu chứng âm phải không có bất kỳ sản phẩm khuếch đại nào. Nếu kết quả phản ứng PCR mẫu chứng âm và/hoặc mẫu chứng dương không như mong muốn, tiến hành lại phản ứng PCR với mẫu thử, mẫu chứng âm và mẫu chứng dương.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Xem Bảng 1.

Định lượng

Tiến hành theo chỉ dẫn trong Phụ lục 1.26, mục Định lượng các loài vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Số lượng vi khuẩn sống *Lactobacillus acidophilus* không ít hơn 100 % so với lượng ghi trên nhãn. Số lượng vi khuẩn được ghi theo đơn vị CFU/g.

Giới hạn nhiễm vi sinh vật

Tổng số nấm: Không quá 10^2 CFU/g (Phụ lục 13.6).

Tổng số vi khuẩn không sinh acid lactic: Không quá 5×10^3 CFU/g (Phụ lục 1.26).

Escherichia coli (phụ lục 13.6): Không được có trong 10 g (Phụ lục 13.6).

Salmonella (phụ lục 13.6): Không được có trong 40 g (Phụ lục 13.6).

Listeria: Không được có trong 25 g (Phụ lục 1.26).

Bảo quản

Bảo quản trong bao bì có chất liệu phù hợp, kín, bền chắc, không quá 4 °C.

Ghi nhãn

Phải ghi tên chi, loài, chủng và số lượng vi khuẩn theo đơn vị CFU/g hoặc đơn vị tương đương trên nhãn.

¹ AmpliTaq Gold 360 Master Mix của ThermoFisher Scientific (www.thermofisher.com) hoặc tương đương.