

BIFIDOBACTERIUM LONGUM SUBSP.LONGUM

Định nghĩa

Bifidobacterium longum subsp. *longum* là vi khuẩn kỵ khí, Gram dương, không sinh bào tử, sinh acid lactic, lên men dị hình hexose tùy ý. Chúng có hình dạng khác nhau như trực khuẩn hình que, đầu tròn, ngắn; trực khuẩn hình chùy; trực khuẩn hình que, chia nhánh hình chữ Y. Có thể thêm các chất bảo vệ lạnh phù hợp vào sinh khối thu được sau quá trình lên men trước khi tiến hành 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 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* không ít hơn 100 % so với lượng ghi trên nhãn.

Chủng BI-05: là chủng vi khuẩn đặc trưng, thuần chủng thuộc loài *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*.

Ghi chú: Chuyên luận này chỉ áp dụng với chủng *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* Bi-05.

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: trực khuẩn hình que, đầu tròn, ngắn; trực khuẩn hình chùy và trực khuẩn hình que, chia nhánh hình chữ Y.

B. Phương pháp phân tích dựa trên chuỗi acid nucleic

Nước vô khuẩn, dung dịch đệm TE 1X, dung dịch đệm TAE 1X: Xem phụ lục 1.26, mục “Hóa chất, thuốc thử sử dụng trong nghiên cứu sinh học phân tử”.

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

Cặp mồi: Mồi xuôi (5'-3') ATCACCGCAATCGTTGGAATAGC và mồi ngược (5'-3') TTGCAACCACCACTAGAATCTGC. Pha dung dịch mồi gốc có nồng độ 100 μ M bằng *dung dịch đệm TE 1X (TT)*, tiếp tục pha loãng đến nồng độ 25 μ M bằng *dung dịch đệm TE 1X (TT)*, bảo quản ở -20°C.

Mẫu thử: Chuẩn bị dịch chứa 12,5 μ L PCR master mix¹, 1 μ L dung dịch mồi xuôi (25 μ M), 1 μ L dung dịch mồi ngược (25 μ M), 9 μ L *nước vô khuẩn* và 1 μ L hỗn dịch mẫu.

Mẫu chứng âm: tương tự như thành phần của mẫu thử, thay 1 μ L hỗn dịch mẫu bằng 1 μ L *nước vô khuẩn*.

Mẫu chứng dương: tương tự như thành phần của mẫu thử, thay 1 μ L hỗn dịch mẫu bằng 1 μ L dung dịch DNA của chủng đối chiếu *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* Bi-05 hoặc thay thế cặp mồi đặc hiệu cho chủng đối chiếu bằng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*.

Tiến hành: tiến hành phản ứng PCR trên mẫu thử, mẫu chứng âm và mẫu chứng dương bằng máy tạo chu trình nhiệt thích hợp. Tiến hành phản ứng theo chu trình nhiệt như sau: Bước 1: Ủ ở 95 °C trong 5 min; Bước 2: ủ ở 95 °C trong 30 s; Bước 3: ủ ở 57 °C trong 30 s; Bước 4: ủ ở 72 °C trong 1 min. Lặp lại các bước 2 – 4 trong 34 chu kỳ. Ủ tiếp ở 72 °C trong 5 min và giữ ở 4 °C. **Trong trường hợp mẫu chứng dương là mẫu thử được thay cặp mồi đặc hiệu cho chủng *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* Bi-05 bằng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* thì phải chạy riêng mẫu chứng dương với chu trình nhiệt phù hợp với cặp mồi được chọn.**

Phân tích sản phẩm phản ứng PCR của mẫu thử, mẫu chứng dương, mẫu chứng âm bằng hệ thống điện di tự động kèm 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 2 % (kl/tt) trong *dung dịch đệm TAE 1X (TT)*. Nhuộm gel bằng dung dịch *ethidium bromid (TT)* 0,5 mg/mL và rửa gel bằng *nước*. Có thể sử dụng thuốc nhuộm phù hợp khác.

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. Để thuận lợi cho việc so sánh kích thước các sản phẩm khuếch đại gen, nên đặt thang chuẩn ở làn đầu tiên và làn cuối cùng trên bản 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 qui định ở mục Tiêu chuẩn chấp nhận. Trong trường hợp mẫu chứng dương sử dụng cặp mồi đặc hiệu chung cho loài, 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 gen nào. Nếu kết quả phản ứng PCR mẫu chứng âm và/hoặc mẫu chứng dương không như mong muốn, cần tiến hành lại phản ứng PCR với mẫu thử, mẫu chứng dương và mẫu chứng âm.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Mẫu thử phải có sản phẩm khuếch đại gen có kích thước 164 cặp base.

Định lượng

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

Môi trường thạch MRS Lactobacilli: Chuẩn bị môi trường có công thức chỉ dẫn trong Phụ lục 1.26 và thêm 1 ml dung dịch vô khuẩn *cystein hydroclorid (TT)* 5% (kl/tt) vào 100 ml môi trường ngay trước khi sử dụng.

Giới hạn chấp nhận: Số lượng vi khuẩn sống *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* không ít hơn 100 % so với lượng ghi trên nhãn.

Giới hạn nhiễm vi sinh vật

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

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

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

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

Tổng số vi khuẩn không sinh acid lactic: Không quá 5×10^3 CFU/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 đầy đủ tên chi, loài và chủng kèm theo số lượng vi khuẩn theo đơn vị CFU/g hoặc đơn vị tương đương.

Chú thích

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