XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG NHANH VI KHUẨN *Bifidobacterium bifidum* TRONG MEN VI SINH VÀ SỮA BỘT BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR

Phạm Như Trọng[1], Lê Thành Long, Nguyễn Thành Trung, Tạ Thị Yến, Phạm Thị Loan, Nguyễn Thị Xuân Hường

Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia

(Ngày đến tòa soạn: 8/2/2018; Ngày sửa bài sau phản biện: 22/3/2018; Ngày chấp nhận đăng: 30/3/2018)

Tóm tắt

Bifidobacterium có tác dụng hỗ trợ tiêu hóa được sử dụng rộng rãi như thực phẩm chức năng, sản phẩm sữa và thuốc. Trong đó Bifidobacterium bifidum (B. bifidum) thường được bổ sung vào nhiều dạng sản phẩm khác nhau. Tuy nhiên đối với sản phẩm chứa nhiều chủng vi khuẩn có lợi thì việc định lượng gặp nhiều khó khăn. Hiện nay Việt Nam chưa có phương pháp tiêu chuẩn để định lượng B. bifidum. Để đáp ứng các yêu cầu của thực tế và kỹ thuật trên, chúng tôi xây dựng phương pháp định lượng B. bifidum bằng real-time PCR dựa trên trình tự đoạn gen groEL. Giới hạn định lượng của phương pháp là 10^5CFU/g/mL, phù hợp cho đánh giá chất lượng các sản phẩm men vi sinh với công bố chất lượng lớn hơn 10^6CFU/g/mL. Độ đặc hiệu của phương pháp là 100% khi so sánh với các chủng không đặc hiệu và độ lặp lại S_R < 0,25 phù hợp với yêu cầu của ISO 16140: 2005 và AOAC: 2016 phụ lục F đối với thẩm định phương pháp phân tích vi sinh.

Từ khóa: *Bifidobacterium bifidum, real-time PCR, probiotics, men vi sinh*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo Tổ chức nông lương thế giới (FAO), probiotic là những vi sinh vật khi vào cơ thể với hàm lượng đủ sẽ mang lại lợi ích cho sức khỏe. Trong các vi sinh vật lợi khuẩn thì vi khuẩn *Bifidobacterium bifidum (B. bifidum)* thường được bổ sung vào các sản phẩm khác nhau như men vi sinh, thực phẩm bổ sung, các sản phẩm lên men tự nhiên như sữa chua và sữa chua uống. *B. bifidium* đã được chứng minh lâm sàng có khả năng tăng cường miễn dịch, tăng cường chức năng tiêu hóa, tăng cường hấp thu các vi chất dinh dưỡng [3].

Các sản phẩm chứa *B. bifidum* rất đa dạng về chủng loại. Quá trình tiến hành phân tích thực nghiệm mẫu do khách hàng gửi đến và mẫu từ các cơ quan quản lý cho thấy nhiều mẫu không đảm bảo số lượng vi khuẩn như công bố. Sự khác biệt này có thể do sự sử dụng các công nghệ sản xuất hoặc phối trộn khác nhau, quá trình bảo quản chủng giống và sản phẩm, hoặc có thể xuất phát từ vấn đề gian lận thương mại mà các sản phẩm tạo ra không chứa đủ lượng vi khuẩn có lợi như đã yêu cầu.

Mặc dù trên thế giới đã có rất nhiều công trình nghiên cứu để định tính và định lượng *B. bifidum* trong các chế phẩm đa thành phần, tuy nhiên ở Việt Nam việc kiểm soát chất lượng của các chế phẩm probiotic còn đang bỏ ngỏ. Việt Nam chưa có phương pháp tiêu chuẩn định lượng *B. bifidum* trong mẫu với nền chứa nhiều chủng vi khuẩn có lợi. Việc xây dựng một phương pháp có độ chính xác cao, thời gian tiến hành ngắn, có thể phân tích trên các nền mẫu chứa nhiều loại vi khuẩn có lợi khác nhau là rất cần thiết.

Gen *groEL* quy định cấu trúc của protein chống chịu sốc nhiệt cho *Bifidobacterium*, chứa một trình tự duy nhất trong hệ gen, đã được công bố trên ngân hàng gen quốc tế và mức độ đa dạng cho phép chúng đặc trưng ở cấp độ loài. Đây là những yếu tố để trình tự gen *groEL* phù hợp cho phản ứng real-time định lượng [6].

Do đó chúng tôi đã xây dựng phương pháp định lượng nhanh *B. bifidum* trong men vi sinh bằng

[1] *Điện thoại: 01656492768 Email: phamnhutrong@yahoo.com*

kỹ thuật real-time PCR dựa trên trình tự đoạn gen *groEL*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Chủng chuẩn: Bao gồm *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356, Streptococcus thermophilus ATCC 8317, E.coli ATCC 25922, Bacillus cereus ATCC 10876, Bacillus subtilis ATCC 6633, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium bifidum ATCC 15700*
- Mẫu: 07 mẫu men vi sinh.

2.2. Thiết bị và hóa chất

2.2.1. Thiết bị

Các thiết bị được sử dụng bao gồm các thiết bị cho nuôi cấy vi sinh và các thiết bị dùng trong sinh học phân tử: Tủ nuôi cấy kị khí Bactron EZ300, máy real-time PCR Biorad CFX C1000, máy điện di ADN, máy đo nồng độ ADN Nanodrop và các thiết bị phụ trợ khác.

2.2.2. Hóa chất

Hóa chất dùng cho real-time PCR định lượng: qPCR master mix của hãng Thermo Fisher Scientific, code: K0991, cặp mồi của gen groEL mồi xuôi: 5'-CAAGGACGTGGAGACCAAG 3', mồi ngược: 5'-CTTGTTCAGGATGAGGGTCG-3' [5]. Bộ kít tách chiết ADN Gene JET genomic ADN pufirication của hãng Thermo Fisher Scientific, code: K0722.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Đồng nhất mẫu

Chủng chuẩn nuôi cấy và mẫu men vi sinh được xử lý và pha loãng theo thập phân phương pháp TCVN 6507: 2005 [2].

2.3.2. Tách chiết ADN

ADN được tách chiết theo kít Gene JET. Mỗi 1 ml của các nồng độ chủng chuẩn và mẫu men vi sinh được ly giải bằng lysozyme và protease, ADN tiếp tục được hấp thụ trên cột tinh sạch sau đó được hòa lại trong đệm, nồng độ ADN thu được nằm trong khoảng 4 đến 16 ng/µl.

2.3.3. Real-time PCR

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng cặp mồi được thiết kế trong báo cáo của Jana Junick và Michael Blaut [5], dùng để định lượng *B. bifidum*. mồi xuôi: 5'-CAAGGACGTGGAGACCAAG-3', mồi ngược: 5'-CTTGTTCAGGATGAGGGTCG-3'. Tiến hành thẩm định cặp mồi này trên nền mẫu men vi sinh và chủng chuẩn [3],[4],[5],[6], [7].

Thành phần một phản ứng: real-time PCR 25 µl như sau: Master mix 2x: 12,5 µl; Mồi xuôi: 1 µl; Mồi ngược: 1 µl; Khuôn ADN: 1 µl; H_2O: 9,5 µl

Chu kỳ nhiệt: 94°C, 3 Phút; 30 lần (94°C, 30 s; 65°C, 30 s; 72°C, 30 s); 72°C, 10 phút.

2.3.4. Nuôi cấy để xác định nồng độ cho đường chuẩn real-time PCR

Để xác định số lượng vi khuẩn cho đường chuẩn phản ứng real-time PCR, tiến hành song song real-time PCR và nuôi cấy theo TCVN 9635:2013 [1]. Mẫu thử được đồng nhất trong dung dịch đệm, pha loãng thập phân, đường chuẩn real-time và nuôi cấy được tiến hành song song trên cùng 1 dẫy pha loãng đó.

2.3.5. Thẩm định phương pháp

Thông số thẩm định bao gồm: giới hạn định lượng, độ đặc hiệu và độ lặp lại theo ISO 16140 và AOAC 2016 phụ lục F về thẩm định phương pháp vi sinh và hóa học.

Giới hạn định lượng: Giới hạn định lượng của phương pháp được xác định dựa trên liên hệ giữa giá trị Ct của phản ứng real-time PCR và nồng độ CFU/mL phương pháp nuôi cấy tính trên cùng dãy nồng độ pha loãng. Từ đó suy ra giới hạn định lượng CFU/mL của phương pháp real-time PCR.

Xác định độ đặc hiệu: Độ đặc hiệu của phương pháp được xác nhận trên kết quả phân tích chủng đích *B. bifidium* so với kết quả phân tích mẫu có chứa các chủng cùng chi *Bifidobacterium* như *B. longum*, và các chủng *probiotic* thuộc chi khác như *Lactobacillus acidophilus, Streptococcus thermophilus, Bacillus subtilis* và các chủng vi sinh vật không mong muốn, có thể gây hại cho sức

khỏe như *Escherichia coli* và *Bacillus cereus*. Cách thức thiết lập được thể hiện trong bảng 1.

Công thức tính độ đặc hiệu:

Độ đặc hiệu = số trường hợp âm tính thật/(số trường hợp âm tính thật + số trường hợp dương tính giả) = d/(d+b)*100.

Trong đó:

a: số kết quả dương tính giả;

b: số kết quả âm tính giả;

c: số kết quả dương tính giả, d: số kết quả âm tính.

Bảng 1. *Thiết lập thông số tính độ đặc hiệu*

Phép thử		*Chủng thử nghiệm*		*Tổng*
		Dương tính	**Âm tính**	
Kết quả real-time PCR	Dương tính	a	c	a+c
	Âm tính	b	d	b+d
Tổng		a+b	c+d	6

Xác định độ lặp lại: Độ lặp lại xác định theo ISO 16140, lặp lại 7 lần giá trị độ lệch chuẩn S_r yêu cầu phải nhỏ hơn 0,25. Độ lệch chuẩn được tính theo công thức: S_R

$$S_R = \sqrt{\frac{\Sigma (xi - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Trong đó:

x_i: *Kết quả của mỗi lần lặp lại*

$\bar{x}$ *: kết quả trung bình của các lần lặp lại; n: số lần lặp lại (n = 7).*

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

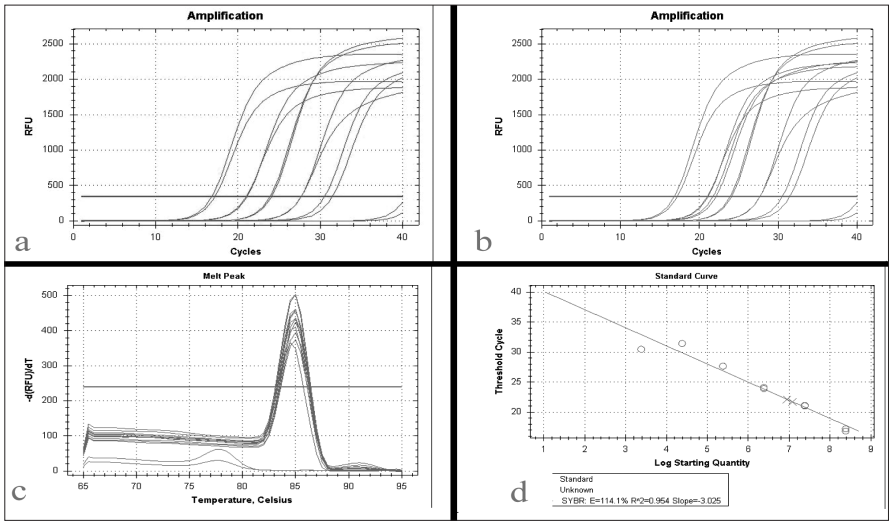
3.1. Kết quả

3.1.1. Tách chiết ADN

Chủng chuẩn và mẫu vi sinh được tách chiết bằng bộ kít tách chiết ADN Gene JET, sản phẩm ADN được kiểm tra nồng độ trên máy Nanodrop, hàm lượng từ 4 đến 16 ng/l, độ tinh sạch nằm trong khoảng 1,8 đến 2,1; hàm lượng và độ tinh sạch đảm bảo làm khuôn mẫu của phản ứng real-time PCR.

3.1.2. Xây dựng đường chuẩn và định lượng

Đường chuẩn được tiến hành trên các mẫu thử được pha loãng thập phân từ nồng độ 10^4 đến 10^9 CFU/mL kết quả được thể hiện trên hình 1.



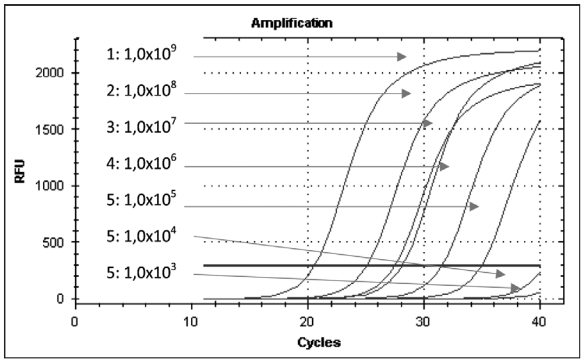
Hình 1. *Kết quả định lượng B. bifidum trong mẫu men vi sinh.*
(a) Đường cong khuếch đại của chuẩn.
(b) Đường cong khuếch đại chuẩn và mẫu.
(c) Phân tích độ đặc hiệu của sản phẩm khuếch đại bằng đỉnh nóng chảy.
(d) Phương trình đường chuẩn.

Trong hình 1a các nồng độ pha loãng kép có đường cong khuếch đại tuyến tính với nhau, trong hình 1c phân tích đỉnh nóng chảy cho thấy các sản phẩm đều nằm trên 85°C chứng tỏ tính đặc hiệu cao của sản phẩm khuếch đại, hình 1b và 1c đường chuẩn có giá trị R = 9,95 phù hợp để tính toán kết quả định lượng, mẫu thử nằm trong khoảng nồng độ 10^6 - 10^8 CFU/ml.

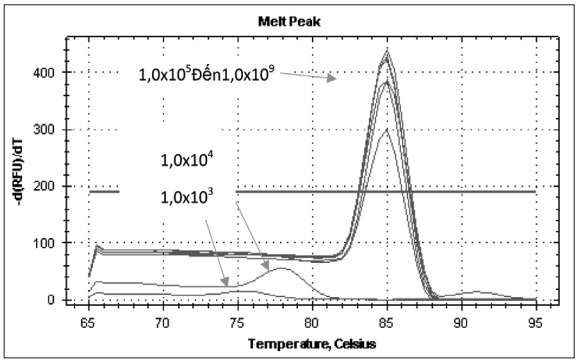
3.1.3. Giới hạn định lượng

Giới hạn định lượng của phương pháp được xác định dựa trên sự liên hệ tuyến tính giữa nồng độ của phương pháp nuôi cấy và giá trị Ct khi hai phương pháp tiến hành trên cùng một dãy nồng

độ pha loãng (Hình 2), giới hạn định lượng là 10^5 CFU/mL.



Hình 2a. *Xác định giới hạn định lượng*

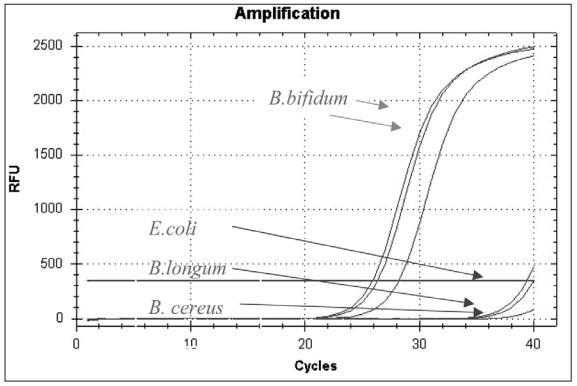


Hình 2b. *Phân tích đỉnh nóng chảy của sản phẩm khuếch đại*

Theo hình 2a ở nồng độ 1,0x10^5 CFU/mL là giới hạn định lượng của phương pháp, để khẳng định lại tiến hành phân tích giá trị đỉnh nóng chảy của sản phẩm khuếch đại, trên hình 2b cho thấy nồng độ từ 1,0x10^5 đến 1,0 x 10^9 giá trị đỉnh nóng chảy ở là 85°C, còn ở nồng độ 1,0 x 10^4 và 1,0 x 10^3 đỉnh nóng chảy dưới 76°C, đây là sản phẩm khuếch đại không đặc hiệu.

3.1.4. Độ đặc hiệu

Độ đặc hiệu xác định theo mục 2.3.5 tiến hành phản ứng real-time *B. bifidum* cùng với các chủng không đặc hiệu trên hình 3 là phản ứng tiến hành với *E. coli, B. longum và B. cereus* cho thấy kết quả dương tính với *B. bifidum* và âm tính với các chủng còn lại.



Hình 3: *Kiểm tra độ đặc hiệu của phản ứng real-time*

Tiến hành với tất cả các chủng còn lại thu được kết quả trong bảng 2

Bảng 2. *Độ đặc hiệu của phương pháp*

Số TT	Tên chủng	Nguồn gốc, mã số chủng	Kết quả real-time PCR
1	*Lactobacillus acidophilus*	MicroBiologics	Âm tính
2	*Streptococcus thermophilus*	ATCC 8317	Âm tính
3	*E. coli*	ATCC 25922	Âm tính
4	*Bacillus cereus*	ATCC 10876	Âm tính
5	*Bacillus subtilis*	ATCC 6633	Âm tính
6	*Bifidobacterium longum*	Biolife	Âm tính
7	*Bifidobacterium bifidum*	Biolife	Dương tính

Bảng 3. *Độ lặp lại trên nền men vi sinh*

STT mẫu	Khối lượng cân (g)	Hàm lượng (CFU/g)	S_r	RSD (%)
1	10,04	2.4x10^6	0,006	5,0
2	10,06	2.1x10^6		
3	10,07	2.7x10^6		
4	10,02	2.4x10^6		
5	10,10	2.0x10^6		
6	10,02	2.5x10^6		
7	10,01	2.2x10^6		

Áp dụng công thức xác định độ đặc hiệu trong mục 2.3.5 và số liệu bảng 2 ta có: d/(d+b)*100 = 6/6 = 100%, độ đặc hiệu của phương pháp là 100%.

3.1.5. Độ lặp lại

Độ lặp lại của phương pháp được tiến hành lặp lại 7 lần trên nền mẫu men vi sinh kết quả trong bảng 3.

Áp dụng công thức tính độ lặp lại trong mục 2.3.5 và tiêu chuẩn ISO 16140 cho thấy trên nền mẫu đều có độ lặp lại phù hợp S_R < 0,25, RSD = 5,0, đạt yêu cầu về độ lặp lại.

3.2. Bàn luận

Giới hạn định lượng của phương pháp là 10^5 CFU/mL đối với các sản phẩm đa lượng bổ sung *B. bifidum*, yêu cầu về chất lượng thường phải lớn hơn 10^6 CFU/g/mL, do đó phương pháp hoàn toàn

phù hợp. Theo nghiên cứu của S.R.Herbel và cộng sự trên nền mẫu sữa chua với các chủng *Lactobacillus*, giới hạn định lượng của phương pháp real-time PCR định lượng từ 10^5 đến 10^6 CFU/mL.

Về giá thành phương pháp real-time PCR chỉ bằng một nửa so với phương pháp nuôi cấy kỵ khí và thử nghiệm hóa sinh, hơn nữa với thời gian phân tích chỉ từ 4 giờ đến 6 giờ so với thời gian của phương pháp nuôi cấy ít nhất từ 3 đến 5 ngày, phương pháp có thể đáp ứng nhu cầu cần phân tích nhanh của xã hội.

4. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được phương pháp real-time PCR định lượng cho *B. bifidum* trong nền mẫu men vi sinh. Với độ đặc hiệu 100%, độ lặp lại $S_R < 0,25$ và giới hạn định lượng của phương pháp ở 10^5 CFU/g/mL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. TCVN 9635: 2013. "Sản phẩm sữa - Định lượng vi khuẩn bifidus giả định - kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 37^{0}C"
2. TCVN 6507:2005 (ISO 6887: 1999). "Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật"
3. Danfeng Song, Salam Ibrahim and Saeed Hayek, 2015, "Recent Application of Probiotics in Food and Agriculture Science". Immunology and Microbiology, *edited by Everlon Cid Rigobelo. ISBN 978-953-51-0776-7*
4. Ishibashi N, Yaeshima T and Hayasawa H, 1997," Bifidobacteria: their significance in human intestinal health"Mal J Nutr 3: page 149-159
5. Jana Junick and Michael Blaut, 2012, "Quantification of Human Fecal Bifidobacterium Species by Use of Quantitative Real-Time PCR Analysis Targeting the *groEL* Gene", *Applied and Environmental Microbiology*, p.2613–2622
6. Mikael Kubista, et al., 2006, "The real-time polymerase chain reaction", *Molecular Aspects of Medicine*, 27 p. 95–12
7. S.R. Herbel, et al.(2013), "Species-specific quantification of probiotic lactobacilli inyoghurt by quantitative real-time PCR, Journal of Applied Microbiology. ISSN 1364-5072

Summary

DEVELOPMENT OF QUALITATIVE METHODS OF Bifidobacterium bifidum IN PROBIOTIC WITH REAL-TIME PCR METHOD

Pham Nhu Trong, Le Thanh Long, Nguyen Thanh Trung, Ta Thi Yen, Pham Thi Loan, Nguyen Thi Xuan Huong

National Institute for Food Control

Bifidobacterium strains with probiotic effects have been widely used in dairy products, food additives and pharmaceuticals. Especially, Bifidobacterium bifidum (B. bifidum) is usually presented into food products such as functional food. However, it is difficult to detect, and quantify B. bifidum in a sample with a combination of different probiotics. In Vietnam, there is no official standard method to identify and quantify B. bifidum in the sample with the mix of probiotic species. To fulfil the requirements of a robust quality management, we have developed a quantitative real-time PCR assay based on groEL gene for accurate identification and quantification of Bifidobacterium bifidum. The developed assay allows an unambiguous species-specific detection. We built the real-time PCR method to detect and identify B. bifidum in functional and supplemented food with specific up to 100% and reproducibility (SR< 0.25) suitable with Annex F AOAC: 2016. This real-time PCR method is rapidly and effectively than conventional method. It takes only 24 hours to detect and identify B. bifidum in compare with at least a period of 3-5 days for conventional methods. The low quantitative limit is 10^5 CFU/g/mL, which is consistent with probiotic and powdered milk products with a declared quality of more than 10^6 CFU/g/mL.

Keywords: *Bifidobacterium bifidum, real-time PCR, probiotics*