

hiệt thích hợp. Tiến hành phản ứng theo chu trình nhiệt
Bước 1: Ủ ở 95 °C trong 7 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 mỗi đặc hiệu cho chủng *Lacticaseibacillus casei* Lc-11 bằng cặp mỗi đặc hiệu chung cho loài *Lacticaseibacillus casei* thì có thể chạy riêng mẫu chứng dương với chu trình nhiệt phù hợp với cặp mỗi được chọn. Chu trình nhiệt trong nhân bản DNA có thể được thực hiện theo quy trình của master mix hoặc theo yêu cầu của enzym sử dụng.

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 % trong dung dịch đệm TAE 1X (TT). Nhuộm gel bằng dung dịch ethidium bromid (TT) 0,5 mg/mL và tiếp tục rửa gel bằng nước.

Có thể sử dụng thuốc nhuộm gel phù hợp khác.

Thận trọng: Ethidium bromid (TT) là một chất độc hại và có khả năng gây đột biến nên ở bước rửa gel bằng nước thì nước sau khi rửa phải được thu hồi và xử lý theo hướng dẫn xử lý hóa chất độc hại.

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 các băng điện di DNA được 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.

Kết quả phản ứng PCR mẫu chứng dương phải có sản phẩm khuếch đại với số cặp base đặc hiệu như ở mục Tiêu chuẩn chấp nhận nếu sử dụng khuôn DNA của chủng chuẩn. Nếu sử dụng cặp mỗi đặc hiệu chung cho loài, kết quả phản ứng PCR phải có sản phẩm khuếch đại tương ứng với cặp mỗi theo 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 không như mong đợi, tiến hành lại phản ứng PCR với các mẫu thử, mẫu chứng âm, mẫu chứng dương.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Mẫu thử phải có sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 176 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 *Lacticaseibacillus casei*.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Số lượng vi khuẩn *Lacticaseibacillus casei* Lc-11 không được 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 được quá 10^2 CFU/g (Phụ lục 13.6).

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

Vi sinh vật gây bệnh

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

Salmonella sp.: 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 đồ đựng 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 CFU/liều hoặc tương đương trên nhãn sản phẩm.

Ghi chú

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

LACTICASEIBACILLUS PARACASEI

Lacticaseibacillus paracasei

Định nghĩa

Lacticaseibacillus paracasei (trước đây gọi là *Lactobacillus paracasei*) là vi khuẩn sinh acid lactic, Gram dương, hình que, không sinh bào tử, vi khuẩn hiếu khí, kỵ khí tùy ý, lên men đồng hình. Có thể thêm các chất bảo vệ lạnh phù hợp vào sinh khối thu được sau quá trình 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 có số lượng vi khuẩn sống *Lacticaseibacillus paracasei* không được ít hơn 100 % so với lượng ghi trên nhãn.

Chủng LPC-37: *Lacticaseibacillus paracasei* LPC-37 (ATCC SD5275) là chủng *Lacticaseibacillus paracasei* đặc hiệu, thuần chủng, không sinh D-lactat.

Lưu ý: Chuyên luận này chỉ áp dụng cho chủng *Lacticaseibacillus paracasei* LPC-37.

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.

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.

Cặp mỗi:

Mỗi xuôi (5' - 3') GTTTGTGGCGGCGTAACCTTC và mỗi ngược (5' - 3') GGTGATCCTGAACGCGGTT. Pha loãng mỗi bằng dung dịch đệm đến nồng độ 100 µM, tiếp

tục pha loãng bằng dung dịch đệm đến nồng độ 25 μ M, bảo quản ở -20 °C.

Mẫu thử: Chuẩn bị dung dịch chứa 10 μ L PCR master mix¹, 1 μ L dung dịch mỗi xuôi (25 μ M), 1 μ L dung dịch mỗi ngược (25 μ M) và 12 μ L nước vô khuẩn, 1 μ L mẫu thử hoặc pha theo khuyến cáo của master mix thương mại khác được sử dụng.

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

Mẫu chứng dương: Tương tự như thành phần của mẫu thử, thay mẫu thử bằng 1 μ L khuôn DNA của chủng chuẩn *Lactocaseibacillus paracasei* LPC-37 hoặc thay thế cặp mỗi đặc hiệu cho chủng chuẩn *Lactocaseibacillus paracasei* LPC-37 bằng cặp mỗi đặc trưng cho loài *Lactocaseibacillus paracasei*.

Tiến hành: Tiến hành phản ứng PCR trên mẫu thử, mẫu chứng âm và mẫu chứng dương với cùng máy tạo chu trình nhiệt thích hợp. Tiến hành phản ứng theo chu trình nhiệt Bước 1: Ủ ở 95 °C trong 7 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 30 s. 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 mỗi đặc hiệu cho chủng *Lactocaseibacillus paracasei* LPC-37 bằng cặp mỗi đặc hiệu chung cho loài *Lactocaseibacillus paracasei* thì có thể chạy riêng mẫu chứng dương với chu trình nhiệt phù hợp với cặp mỗi được chọn. Chu trình nhiệt trong nhân bản DNA có thể được thực hiện theo quy trình của master mix hoặc theo yêu cầu của enzym sử dụng.

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 % trong dung dịch đệm TAE 1X (TT). Nhuộm gel bằng dung dịch ethidium bromid (TT) 0,5 mg/mL và tiếp tục rửa gel bằng nước.

Có thể sử dụng thuốc nhuộm gel phù hợp khác.

Thận trọng: *Ethidium bromid* (TT) là một chất độc hại và có khả năng gây đột biến nên ở bước rửa gel bằng nước thì nước sau khi rửa phải được thu hồi và xử lý theo hướng dẫn xử lý hóa chất độc hại.

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.

Kết quả phản ứng PCR mẫu chứng dương phải có sản phẩm khuếch đại với cặp base đặc hiệu như ở mục Tiêu chuẩn chấp nhận nếu sử dụng khuôn DNA của chủng chuẩn. Nếu sử dụng cặp mỗi đặc hiệu chung cho loài, kết quả phản ứng PCR phải có sản phẩm khuếch đại tương ứng với cặp mỗi theo 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 không như mong đợi, tiến hành lại phản ứng PCR với các mẫu thử, mẫu chứng âm, mẫu chứng dương.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Mẫu thử phải có sản phẩm khuếch đại gen có kích thước khoảng 273 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*.

Tiêu chuẩn chấp nhận: Số lượng vi khuẩn sống *Lactocaseibacillus paracasei* 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 được quá 10² CFU/g (Phụ lục 13.6).

Tổng số vi khuẩn không sinh acid lactic: Không được quá 5 × 10³ CFU/g (Phụ lục 1.26).

Vi sinh vật gây bệnh

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

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

Staphylococcus aureus: Không được có trong 1 g (Phụ lục 13.6).

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

Enterococci: Không được quá 10² CFU/g (Phụ lục 1.26).

Coliforms: Không được quá 10 CFU/g (Phụ lục 1.26).

Bảo quản

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

Ghi nhãn

Phải ghi tên chi, loài và chủng và số lượng vi khuẩn dưới dạng CFU/g hoặc CFU/liều hoặc đơn vị tương đương.

Ghi chú

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

LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS

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 độn 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