



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0033575

(51)^{2020.01} C12Q 1/68

(13) B

(21) 1-2020-03291

(22) 09/06/2020

(45) 25/10/2022 415

(43) 25/08/2020 389ASC

(73) 1. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội (VN)

334 Nguyễn Trãi, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội

2. Công ty cổ phần ANA BIO Research & Development (VN)

Số 7, liên kè 22, khu đô thị Văn Khê, La Khê, quận Hà Đông, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Vân Anh (VN); Chu Văn Sơn (VN); Nguyễn Thị Huyền (VN); Nguyễn Hòa Anh (VN); Nguyễn Đình Thắng (VN).

(54) QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH NHÓM VI KHUẨN BACILLUS SỐNG CÓ TRONG SẢN PHẨM LỢI KHUẨN VÀ HỖN HỢP CẤP MÔI VÀ ĐẦU DÒ ĐỂ XÁC ĐỊNH NHÓM VI KHUẨN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình xác định nhóm vi khuẩn *Bacillus* sống có trong sản phẩm lợi khuẩn, cụ thể là quy trình để định danh và định lượng đồng thời bốn loài vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus clausii* và *Bacillus coagulans* sống phổ biến trong các sản phẩm lợi khuẩn đa chủng bằng kỹ thuật PCR định lượng trực tiếp từ khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch nuôi cấy mẫu. Quy trình giúp hỗ trợ việc kiểm định và kiểm soát chất lượng sản phẩm lợi khuẩn đa chủng trong quá trình sản xuất, bảo quản và lưu thông sản phẩm. Sáng chế cũng đề cập đến hỗn hợp nhóm cấp môi và đầu dò để xác định nhóm vi khuẩn này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ vi sinh và công nghệ di truyền ứng dụng, cụ thể là sáng chế đề cập đến quy trình xác định nhóm vi khuẩn *Bacillus* sống có lợi bao gồm bốn loài *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis* sống có trong sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định bằng kỹ thuật real time PCR đa môi và hỗn hợp các cặp môi và đầu dò đặc hiệu dùng trong quy trình này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi sinh vật hữu ích đã và đang được chú ý bởi tính hiệu quả trong việc hỗ trợ tiêu hóa cũng như tăng cường khả năng hấp thụ thức ăn bởi người và động vật. Đã có nhiều sản phẩm vi sinh được ứng dụng rộng rãi, tuy nhiên, các chế phẩm vi sinh này thường ở dạng vi khuẩn sống nên bị ảnh hưởng nhiều bởi các yếu tố môi trường. Điều này bất lợi ngay cả với nhà sản xuất, người tiêu dùng và cũng là một thách thức không nhỏ đối với các nhà quản lý. Việc kiểm soát, kiểm định chất lượng của các chế phẩm vi sinh vật hữu ích này phụ thuộc vào nhiều yếu tố và là một thách thức không nhỏ về mặt kỹ thuật.

Đã có nhiều công cụ nhằm định lượng, định danh các chủng, loài vi sinh vật hữu ích như giải trình tự gen 16S rARN, phân tích đặc tính sinh hóa hoặc PCR. Trong đó, việc định danh các chủng vi khuẩn trong các sản phẩm lợi khuẩn bằng kỹ thuật PCR định lượng có nhiều ưu điểm so với giải trình tự gen 16S rARN, phân tích đặc tính sinh lý-sinh hoá. Kỹ thuật này có độ đặc hiệu và độ chính xác cao hơn các quy trình vi sinh cũng như hoá sinh và có độ đặc hiệu và chính xác tương đương với quy trình giải trình tự gen 16S rRNA đồng thời tiết kiệm thời gian và giảm thiểu thao tác thí nghiệm, giảm nguy cơ nhiễm chéo và giảm giá thành.

Hiện các sản phẩm lợi khuẩn được sản xuất ở dạng bào tử bền nhiệt chủ yếu chứa nhóm vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* mà chủ yếu là bốn loài bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis*. Các kỹ thuật định tính và định lượng lợi khuẩn có trong chế phẩm vi sinh thường tập trung chủ yếu vào định lượng bốn loài này. Tuy nhiên, do trong sản phẩm lợi khuẩn, tùy vào từng nhà sản xuất, thường có các loài vi khuẩn hỗ sinh đi kèm và thường được phối trộn với rất nhiều loài khác. Do

đó, việc định lượng nhóm vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* này thường bị ảnh hưởng bởi các loài khác.

Việc định danh và định lượng các loài *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus clausii* và *Bacillus coagulans* bằng kỹ thuật real time PCR sử dụng chất huỳnh quang SYBR Green đã phát triển trong một vài năm trở về đây. Tuy nhiên, các phương pháp này thường chỉ định danh từng loài mà không có khả năng định danh và định lượng đồng thời cả bốn loài *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus clausii* và *Bacillus coagulans* quan tâm trong một lần phân tích. Nghĩa là các phương pháp này không phát triển để có thể áp dụng cho kiểm định chất lượng các sản phẩm lợi khuẩn đa chủng, tức là dạng hỗn hợp của nhiều chủng thuộc các loài nói trên.

Trong khi đó, rất nhiều các sản phẩm thực phẩm chức năng và thức ăn bổ sung chăn nuôi là các lợi khuẩn đa chủng thuộc các loài này, ví dụ như: Livespo COLON (thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị đại tràng của công ty Livespo Global) bao gồm *Bacillus subtilis* và *Bacillus clausii*, Livespo Pregmom (thực phẩm chức năng cho bà mẹ và trẻ em của công ty Livespo Global) bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii* và *Bacillus coagulans*, Bioplus 2B (thức ăn bổ sung cho lợn và gà của công ty Chris Hansen) và Green Bio S1 (thức ăn bổ sung cho tôm của công ty Europhamra Vietnam).... Các sản phẩm này khi gửi đi kiểm nghiệm tại các đơn vị có chức năng thì chỉ kết luận được sự có mặt của các loài vi khuẩn này trong mẫu và chỉ định lượng được tổng số vi sinh vật có trong mẫu chứ không định lượng được mức độ hoạt động, khả năng sinh trưởng của từng loài trong mẫu. Lý do là các loài vi khuẩn này đều thuộc chi *Bacillus* nên có hình thái khuẩn lạc khá giống nhau và có tính chất sinh lý-sinh hoá gần gũi nhau nên chỉ có thể định danh chính xác bằng các kỹ thuật phân tích gen; trong khi đó nồng độ của chúng lại rất khác nhau trong hỗn hợp nên sau khi pha loãng mẫu và cấy trải mẫu trên đĩa thạch thì phải định danh tất cả (hàng chục tới cả trăm) khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch để từ đó tính được khả năng sinh trưởng (định lượng vi khuẩn sống) của từng loài có trong mẫu. Điều này không những tốn kém cho việc định danh và định lượng mà còn là một thách thức rất lớn đối với các nhà quản lý trong việc kiểm định sản phẩm để bảo vệ người tiêu dùng cũng như ngay bản thân các nhà sản xuất trong việc phân tích, kiểm soát chất lượng sản phẩm của mình.

Do đó, cần có một quy trình có khả năng đánh giá, định tính, định lượng được đồng thời nhóm vi khuẩn *Bacillus* sống có trong chế phẩm lợi khuẩn một cách đơn giản, hiệu

quả, có độ tin cậy và giảm được số lần phân tích để có thể hỗ trợ các nhà quản lý cũng như các nhà sản xuất trong việc kiểm soát, công bố chất lượng sản phẩm lợi khuẩn trên thị trường.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề đã nêu ở trên, theo đó sáng chế đề xuất quy trình xác định nhóm vi khuẩn *Bacillus* sống có trong sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định và hỗn hợp các cặp môi và đầu dò dùng trong quy trình này. Quy trình theo sáng chế để xác định đồng thời hoặc riêng rẽ bốn loài vi khuẩn *Bacillus* sống có lợi bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis* có trong sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định để phục vụ cho quá trình sản xuất cũng như kiểm soát chất lượng sản phẩm.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình xác định nhóm vi khuẩn *Bacillus* sống có trong sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) thu nhận khuẩn lạc của nhóm vi khuẩn *Bacillus* bằng cách hòa mẫu sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định với dung dịch NaCl 0,9% theo tỷ lệ 1/10 (w/v) rồi pha loãng mẫu theo loạt với tỷ lệ 1/10 (v/v) rồi cấy 100 µl từng mẫu đã được pha loãng này lên môi trường thạch Luria-Bertani và ủ trong 48 giờ, thu nhận các khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch có mức độ pha loãng đạt từ 10 đến 100 khuẩn lạc/100 µl;

b) thu ADN tổng số của vi khuẩn bằng cách chuyển các khuẩn lạc thu được vào 100 µl dung dịch NaCl 0,9%, trộn đều, gia nhiệt đến 96°C trong 10 phút nhằm phá vỡ tế bào để thu ADN tổng số của vi khuẩn;

c) xác định nhóm vi khuẩn *Bacillus* sống có lợi bằng cách tiến hành PCR định lượng đa môi với hỗn hợp thành phần phản ứng bao gồm từ 1 đến 5 µl ADN tổng số, từ 10 đến 50 mM tris-HCl pH từ 7,9 đến 9,0, từ 6 đến 30 mM KCl, từ 0,05 đến 0,15% Triton X-100, từ 200 đến 400 µM dNTP, từ 0,5 đến 5 đơn vị Taq polymeraza, từ 100 nM đến 1 µM cho mỗi môi xuôi và ngược, từ 25 đến 500 nM cho mỗi đầu dò và nước vừa đủ thể tích từ 20 đến 25 µl, trong đó:

- cặp môi để xác định *Bacillus subtilis* bao gồm môi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, môi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 và đầu dò bất kỳ được chọn từ nhóm oligonucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.9 đến SEQ ID NO.13 được gắn

huỳnh quang FAM ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ, BHQ hoặc TAMRA ở đầu 3';

- cặp môi để xác định *Bacillus clausii* bao gồm môi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3, môi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4 và đầu dò bất kỳ được chọn từ nhóm oligonucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.14 đến SEQ ID NO.18 được gắn huỳnh quang HEX, TET, VIC, JOE, hoặc Yellow555 ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ, BHQ hoặc TAMRA ở đầu 3';

- cặp môi để xác định *Bacillus coagulans* bao gồm môi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.5, môi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.6 và đầu dò bất kỳ được chọn từ nhóm oligonucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.19 đến SEQ ID NO.23 được gắn huỳnh quang ROX, Red610 hoặc Texas Red ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'; và

- cặp môi để xác định *Bacillus licheniformis* bao gồm môi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.7, môi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.8 và đầu dò bất kỳ được chọn từ nhóm oligonucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.24 đến SEQ ID NO.28 được gắn huỳnh quang Cy5 ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'; và

d) kết luận về sự có mặt và lượng vi khuẩn *Bacillus* sống bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis* có trong mẫu sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định theo biểu đồ huỳnh quang thu được từ phản ứng PCR định lượng các ADN tách từ các khuẩn lạc.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó quy trình này có thể xác định đồng thời hoặc riêng rẽ bốn loài vi khuẩn *Bacillus* sống có lợi bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis* có trong sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến hỗn hợp nhóm cặp môi và đầu dò để xác định nhóm vi khuẩn *Bacillus* sống có lợi trong sản phẩm lợi khuẩn bằng quy trình theo sáng chế, trong đó hỗn hợp này bao gồm:

- cặp môi để xác định *Bacillus subtilis* bao gồm môi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, môi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 và đầu dò bất kỳ được chọn từ nhóm oligonucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.9 đến SEQ ID NO.13 được gắn

huỳnh quang FAM ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ, BHQ hoặc TAMRA ở đầu 3';

- cặp mồi để xác định *Bacillus clausii* bao gồm mồi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3, mồi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4 và đầu dò bất kỳ được chọn từ nhóm oligonucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.14 đến SEQ ID NO.18 được gắn huỳnh quang HEX, TET, VIC, JOE, hoặc Yellow555 ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ, BHQ hoặc TAMRA ở đầu 3';

- cặp mồi để xác định *Bacillus coagulans* bao gồm mồi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.5, mồi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.6 và đầu dò bất kỳ được chọn từ nhóm oligonucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.19 đến SEQ ID NO.23 được gắn huỳnh quang ROX, Red610 hoặc Texas Red ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'; và

- cặp mồi để xác định *Bacillus licheniformis* bao gồm mồi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.7, mồi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.8 và đầu dò bất kỳ được chọn từ nhóm oligonucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.24 đến SEQ ID NO.28 được gắn huỳnh quang Cy5 ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó mỗi mồi xuôi và mồi ngược có nồng độ từ 100 nM đến 1 μ M, mỗi đầu dò có nồng độ từ 25 đến 500 nM.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến kit để xác định nhóm vi khuẩn *Bacillus* có trong sản phẩm lợi khuẩn, trong đó kit này chứa hỗn hợp hoá chất bao gồm nhóm cặp mồi và đầu dò nêu trên và hướng dẫn sử dụng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là kết quả PCR định lượng đa mồi đa đầu dò thể hiện đường cong khuếch đại tín hiệu FAM đặc hiệu cho *Bacillus subtilis* (PC-FAM), tín hiệu HEX đặc hiệu cho *Bacillus clausii* (PC-HEX) tín hiệu Texas Red đặc hiệu cho *Bacillus coagulans* (PC-Texas Red), tín hiệu Cy5 đặc hiệu cho *Bacillus licheniformis* (PC-Cy5) của mẫu KT01 gồm 4 chủng *Bacillus subtilis* VTCC 11010, *Bacillus clausii* VTCC 12283, *Bacillus coagulans* VTCC 11111, *Bacillus licheniformis* VTCC 10723; so sánh với mẫu KT02 gồm 4 chủng *Bacillus aquimaris* VTCC 11260, *Bacillus megaterium* VTCC 910088,

Bacillus acidophilus VTCC 12284, *Bacillus casei* VTCC 10411 chỉ có tín hiệu nền rất thấp (NC).

Hình 2 là kết quả PCR định lượng SYBR Green đơn môi phát hiện đơn loài vi khuẩn từ các khuẩn lạc của mẫu KT01 thể hiện qua các đường cong tín hiệu A1, B1, C1, D1 và đường A2, B2, C2, D2 xác định nhiệt độ nóng chảy T_m (melting curve) đặc hiệu tương ứng cho từng loài *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, và *Bacillus licheniformis*.

Hình 3 là kết quả PCR định lượng đa môi và đa đầu dò Taqman thể hiện đường cong khuếch đại tín hiệu FAM đặc hiệu cho *Bacillus subtilis* và tín hiệu HEX đặc hiệu cho *Bacillus clausii* của một số khuẩn lạc đại diện mọc trên môi trường thạch Luria-Bertani với mẫu lợi khuẩn thử nghiệm TM01 cần kiểm định.

Hình 4 là kết quả PCR định lượng đa môi và đa đầu dò Taqman thể hiện đường cong khuếch đại tín hiệu FAM (đặc hiệu cho *Bacillus subtilis*) và tín hiệu HEX (đặc hiệu cho *Bacillus clausii*), tín hiệu Texas Red (đặc hiệu cho *Bacillus coagulans*) của một số khuẩn lạc đại diện mọc trên môi trường thạch Luria-Bertani với mẫu lợi khuẩn thu được từ mẫu lợi khuẩn thử nghiệm TM02 cần kiểm định.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích mô tả chi tiết sáng chế chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Theo sáng chế, sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định chỉ các sản phẩm chứa vi sinh vật hữu ích có lợi cho hệ tiêu hóa của người hoặc động vật. Các loài vi sinh vật hữu ích này có thể gồm nhiều loài vi sinh vật khác nhau, nhưng chứa ít nhất một hoặc cả bốn loài *Bacillus* sống cần xác định sự có mặt và/hoặc lượng tế bào sống bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis*.

Các kỹ thuật PCR định lượng (real time PCR) và các thiết bị thực hiện là đã biết và có thể thực hiện được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật gắn đầu phát huỳnh quang bao gồm: FAM (Fluorescein amidite), HEX (6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein), TET (5'-Tetrachlorofluorescein), JOE (6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein, VIC (Victoria), Yellow555 (Yakima yellow phosphoramidite), ROX (6-carboxy-X-rhodamine), Texas Red

(sulforhodamine 101 acid chloride), Red610 (Fluor Red 610 Amidite), Cy5 (Cyanine-5) vào đầu 5' của các trình tự nucleotit làm đầu dò, và chất hấp thụ huỳnh quang bao gồm IBFQ (Iowa black fluorescence quencher) và BHQ1/2 (Black Hole Quencher 1 hoặc 2) vào đầu 3' của các trình tự nucleotit làm đầu dò, có thể thực hiện được theo hướng dẫn của nhà cung cấp.

Các đầu dò huỳnh quang được sử dụng theo sáng chế thiết kế dựa trên trình tự đặc hiệu của của sản phẩm PCR đích thu được. Ví dụ, đầu 5' của mẫu dò có gắn chất phát huỳnh quang FAM, HEX, Texas Red hoặc Cy5 với các bước sóng kích thích/phát xạ tương ứng là 495/520 nm; 540/570 nm; 580/604 nm; 650/670 nm, có thể phân biệt trên 4 kênh màu huỳnh quang của máy PCR định lượng; trong khi đó đầu 3' của các mẫu dò có gắn (Iowa black fluorescence quencher) là chất hấp thụ được cả 4 loại huỳnh quang này và không phát ra tín hiệu. Ngoài ra, để giảm tín hiệu nền, đầu dò còn được gắn thêm ZEN hoặc TAO ở nucleotit thứ 9 để hấp thụ toàn bộ tín hiệu huỳnh quang khi phản ứng chưa diễn ra. Khi phản ứng xảy ra, đầu dò sẽ bắt cặp với khuôn và bị enzym Taq ADN polymeraza cắt bỏ để kéo dài môi tổng hợp sợi bổ sung, do vậy chất chỉ thị sẽ được giải phóng, tách rời khỏi chất hấp thụ và phát huỳnh quang khi nhận nguồn sáng kích thích. Căn cứ vào cường độ huỳnh quang thu được sẽ xác định được lượng ADN có trong mẫu, từ đó có thể xác định được lượng vi khuẩn tương ứng có trong mẫu ban đầu.

Sáng chế đề xuất quy trình xác định nhóm vi khuẩn *Bacillus* có trong sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định và hỗn hợp các cặp môi và đầu dò dùng trong quy trình này. Quy trình theo sáng chế để xác định đồng thời hoặc riêng rẽ bốn loài vi khuẩn *Bacillus* có lợi bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis* có trong sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định để phục vụ cho quá trình sản xuất cũng như kiểm soát chất lượng sản phẩm.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến quy trình xác định nhóm vi khuẩn *Bacillus* có trong sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) thu nhận khuẩn lạc của nhóm vi khuẩn *Bacillus*; b) thu ADN tổng số của vi khuẩn; c) xác định nhóm vi khuẩn *Bacillus* sống có lợi; và d) kết luận về sự có mặt và lượng vi khuẩn *Bacillus* sống.

Mẫu sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định có thể là sản phẩm bất kỳ ở dạng bột, dạng lỏng, dạng hỗn hợp chứa một hoặc nhiều loài vi khuẩn có lợi sống hoặc có khả năng phát

triển trong điều kiện thuận lợi khi được sử dụng cho người và động vật hoặc cũng có thể là mẫu giống gốc *Bacillus* có lợi ở dạng bào tử. Các mẫu sản phẩm này có thể chứa một hoặc nhiều loài *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis* có trong sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định.

Trong bước thu nhận khuẩn lạc của nhóm vi khuẩn *Bacillus*, tiến hành pha loãng mẫu sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định với dung dịch NaCl 0,9% theo tỷ lệ 1/10 (w/v). Tiếp đó pha loãng mẫu theo loạt với tỷ lệ 1/10 (v/v). Mục đích của việc pha loãng này nhằm đảm bảo lượng vi khuẩn sống có trong mẫu có thể phát triển thành các khuẩn lạc và thu nhận được. Tùy với lượng vi khuẩn có trong mẫu mà nồng độ pha loãng có thể khác nhau, miễn có thể thu được từ 100 đến 1000 vi khuẩn/ml. Sau khi pha, các mẫu này được cấy 100 µl lên bề mặt môi trường thạch Luria-Bertani với dung tích từ 15 đến 20 ml được đổ trong đĩa petri có đường kính từ 90 đến 120 mm (gọi tắt là môi trường thạch Luria-Bertani) và ủ trong 48 giờ. Bước pha loãng mẫu này đảm bảo lượng vi khuẩn sau khi cấy sẽ cho những khuẩn lạc mọc riêng rẽ và đếm được trên môi trường thạch Luria-Bertani, từ đó có thể xác định được lượng tế bào vi khuẩn sống có trong sản phẩm men vi sinh. Mẫu này sau đó được cấy trải lên môi trường thạch Luria-Bertani tối ưu cho vi khuẩn *Bacillus* phát triển, tiếp đó ủ trong 48 giờ để vi khuẩn sinh trưởng. Quá trình này nhằm đảm bảo thu nhận được các chủng vi khuẩn sống, có khả năng phát triển. Sau khi ủ, thu nhận các khuẩn lạc.

Theo các phương án cụ thể, lượng khuẩn lạc trong mẫu pha loãng thu được tối ưu khi cấy trên mỗi đĩa môi trường thạch Luria-Bertani với lượng 100 µl nằm trong khoảng từ 25 đến 100 khuẩn lạc/đĩa thạch.

Trong bước thu ADN tổng số của vi khuẩn, các khuẩn lạc sau khi thu nhận được trên mỗi đĩa môi trường thạch Luria-Bertani, được chuyển vào 100 µl dung dịch NaCl 0,9%. Sau khi trộn đều, gia nhiệt đến 96°C trong 10 phút nhằm phá vỡ tế bào để thu ADN tổng số của vi khuẩn.

Cần lưu ý rằng, về lý thuyết hoàn toàn có thể xác định từng khuẩn lạc (định danh) dựa trên phương pháp theo sáng chế đối với một trong bốn loài vi khuẩn *Bacillus* quan tâm. Việc xác định từng khuẩn lạc là một phương án lựa chọn theo sáng chế.

Trong bước xác định nhóm vi khuẩn *Bacillus* sống có lợi, tiến hành PCR định lượng đa mồi. Thành phần phản ứng PCR đa mồi bao gồm từ 1 đến 5 µl ADN tổng số, từ 10

đến 50 mM tris-HCl pH từ 7,9 đến 9,0, từ 6 đến 30 mM KCl, từ 0,05 đến 0,15% Triton X-100, từ 200 đến 400 μ M dNTP, từ 0,5 đến 5 đơn vị Taq polymeraza, từ 100 nM đến 1 μ M cho mỗi mũi xuôi và ngược, từ 25 đến 500 nM cho mỗi đầu dò và nước vừa đủ thể tích từ 20 đến 25 μ l. Theo đó, việc thiết kế các cặp mồi đặc hiệu cho bốn loài vi khuẩn quan tâm được tối ưu theo điều kiện phản ứng PCR đa mồi. Các cặp mồi và đầu dò được thiết kế sao cho chúng không bắt cặp chéo, có cùng khoảng nhiệt độ khi thực hiện PCR đa mồi. Các cặp mồi và đầu dò đặc hiệu được thiết kế riêng để xác định đặc hiệu cho từng loài *Bacillus* quan tâm, cụ thể là bốn loài *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis* cần xác định.

Để xác định loài *Bacillus subtilis*, cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự gen *aprE* mã hoá cho tiền thân của subtilisin (subtilisin precursor) có độ bảo toàn cao ở loài *Bacillus subtilis* và sản phẩm PCR đặc hiệu cho loài *Bacillus subtilis* thu được có kích thước 159 bp. Cặp mồi để xác định *Bacillus subtilis* bao gồm mồi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và mồi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 sau:

CGTAGGTCCTGAGCTTGATGTA

SEQ ID NO.1

GCGTTTGTCCAAGTCGG

SEQ ID NO.2

Đầu dò đặc hiệu cho loài *Bacillus subtilis* được thiết kế dựa theo sản phẩm PCR được khuếch đại bởi cặp mồi nêu trên. Theo sáng chế, đầu dò đặc hiệu cho loài *Bacillus subtilis* là đoạn oligonucleotit bất kỳ được chọn từ nhóm nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.9 đến SEQ ID NO.13 bên dưới. Các đầu dò này được gắn huỳnh quang FAM ở đầu 5' và một trong các chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ, BHQ, hoặc TAMRA ở đầu 3' thuận lợi cho phát hiện bởi PCR định lượng ở kênh màu thứ 1 của máy.

TGGCTCCTGGTGTATCCATCCAA

SEQ ID NO.9

AAAGCACACTACCTGGAGGCACTT

SEQ ID NO.10

GCGCTTACAACGGAACGTCAA

SEQ ID NO.11

GGCGACTCCTCACGTTGC

SEQ ID NO.12

CGGAGCAGCAGCGTTAATTCT

SEQ ID NO.13

Để xác định loài *Bacillus clausii*, cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự gen *Erm34* mã hoá cho peptid dẫn đường và riboxom methylaza (putative leader peptide and ribosomal methylase) có độ bảo toàn cao ở loài *Bacillus clausii* và sản phẩm PCR đặc hiệu cho loài *Bacillus clausii* thu được có kích thước 132 bp. Cặp mồi để xác định

Bacillus clausii bao gồm mỗi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3 và mỗi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4 sau:

AATTTTACCGCCCCTCAAG

SEQ ID NO.3

ACTTTTGGAACATGCCGAAC

SEQ ID NO.4

Đầu dò đặc hiệu cho loài *Bacillus clausii* được thiết kế dựa theo sản phẩm PCR được khuếch đại bởi cặp mỗi nêu trên. Theo sáng chế, đầu dò đặc hiệu cho loài *Bacillus clausii* là đoạn nucleotit bất kỳ được chọn từ nhóm nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.14 đến SEQ ID NO.18 bên dưới. Các đầu dò này được gắn một trong 5 loại huỳnh quang HEX, TET, VIC, JOE, hoặc Yellow555 ở đầu 5' và một trong 3 chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ, BHQ, hoặc TAMRA ở đầu 3' thuận lợi cho phát hiện bởi PCR định lượng ở kênh màu thứ 2 của máy.

AAAAAAAGTGCGGCAGGCAATC

SEQ ID NO.14

GCGATGGTTTGTGACGCGAT

SEQ ID NO.15

AATCGGCGTCAAACCTGAGACACC

SEQ ID NO.16

GTGGCCATGCTTCATGCCAG

SEQ ID NO.17

GCAGTGGGCGATGGTTTGTG

SEQ ID NO.18

Để xác định loài *Bacillus coagulans*, cặp mỗi được thiết kế dựa trên trình tự gen mã hoá cho protein comK có độ bảo toàn cao ở loài *Bacillus coagulans* và sản phẩm PCR được hiệu cho loài *Bacillus coagulans* thu được có kích thước 106 bp. Cặp mỗi để xác định *Bacillus coagulans* bao gồm mỗi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.5 và mỗi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.6 sau:

GCAGGTTGCTTATGAAATCAAC

SEQ ID NO.5

CCAGGCTTAAATCCAATACAG

SEQ ID NO.6

Đầu dò đặc hiệu cho loài *Bacillus coagulans* được thiết kế dựa theo sản phẩm PCR được khuếch đại bởi cặp mỗi nêu trên. Theo sáng chế, đầu dò đặc hiệu cho loài *Bacillus coagulans* là đoạn nucleotit bất kỳ được chọn từ nhóm nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.19 đến SEQ ID NO.23 bên dưới. Các đầu dò này được gắn được gắn một trong 3 loại huỳnh quang ROX, Red610 hoặc Texas Red ở đầu 5' và một trong 2 chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3' thuận lợi cho phát hiện bởi PCR định lượng ở kênh màu thứ 3 của máy.

CGACGCTCCCGGATGC

SEQ ID NO.19

AACAGGGATACAGGGCGATGG	SEQ ID NO.20
ATCGCCCTGTATCCCTGTTGTTTC	SEQ ID NO.21
CCGCTCTCTTCCATCGCCC	SEQ ID NO.22
TGTTGTTTCAAGAATTGCATCCGGG	SEQ ID NO.23

Để xác định loài *Bacillus licheniformis* cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự gen mã hoá cho ADN ligaze phụ thuộc vào ATP (ATP-dependent DNA ligase) có độ bảo toàn cao ở loài *Bacillus licheniformis* và sản phẩm PCR đặc hiệu cho loài *Bacillus licheniformis* thu được có kích thước 216 bp. Cặp mồi để xác định *Bacillus licheniformis* bao gồm mồi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.7 và mồi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.8 sau

GTCAACGACACAATTTCCCCGT	SEQ ID NO.7
AGCTCCCTCAGGCGGCAATT	SEQ ID NO.8

Đầu dò đặc hiệu cho loài *Bacillus licheniformis* được thiết kế dựa theo sản phẩm PCR được khuếch đại bởi cặp mồi nêu trên. Theo sáng chế, đầu dò đặc hiệu cho loài *Bacillus licheniformis* là đoạn nucleotit bất kỳ được chọn từ nhóm nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.24 đến SEQ ID NO.28 bên dưới. Các đầu dò này được gắn huỳnh quang Cy5 ở đầu 5' và một trong 2 chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3 thuận lợi cho phát hiện bởi PCR định lượng ở kênh màu thứ 4 của máy.

ATCGTGATCGGCAAGTGTCTT	SEQ ID NO.24
TCCGAAATTTCCGGAATGTGTTTTCG	SEQ ID NO.25
TTCGCCGGTCGCAGCAATCTTTAA	SEQ ID NO.26
AGCGGCTGTGAGTTTCTGCT	SEQ ID NO.27
GACCCCGATACCCGTCATATTTG	SEQ ID NO.28

Theo đó, có thể thấy rằng, với phản ứng PCR định lượng đa mồi theo sáng chế, hoàn toàn có thể xác định đồng thời hoặc riêng rẽ bốn loài lợi khuẩn *Bacillus* sống bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis* có trong sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định.

Trong bước kết luận về sự có mặt và lượng của nhóm vi khuẩn *Bacillus* sống có lợi, các loài vi khuẩn sống có lợi quan tâm bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis* được xác định dựa trên biểu đồ huỳnh quang được xác định bởi tín hiệu huỳnh quang FAM, HEX/TET/VIC/JOE/Yellow555, ROX/Texas Red/Red 610 và Cy5 tương ứng. Căn cứ vào cường độ và giá trị chu kỳ

ngưỡng (C_t , threshold cycle) của biểu đồ huỳnh quang thu được từ phản ứng PCR định lượng, có thể kết luận về sự có mặt và hàm lượng của vi khuẩn *Bacillus* có lợi trong mẫu sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định.

Theo đó, quy trình theo sáng chế có thể xác định được đồng thời bốn loài vi khuẩn *Bacillus* có lợi bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis*.

Ngoài ra, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này khi căn cứ vào quy trình xác định nhóm vi khuẩn *Bacillus* có trong sản phẩm lợi khuẩn theo sáng chế được mô tả ở trên hoàn toàn có thể nhận thấy rằng quy trình theo sáng chế có thể xác định được *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* hoặc *Bacillus licheniformis* độc lập.

Do đó, theo một phương án ưu tiên, quy trình theo sáng chế xác định loài *Bacillus subtilis*, trong đó mỗi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, mỗi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 và đầu dò được chọn từ nhóm nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.9 đến SEQ ID NO.13

Theo một phương án ưu tiên khác, quy trình theo sáng chế có thể xác định loài *Bacillus clausii*, trong đó mỗi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3, mỗi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4 và đoạn được chọn từ nhóm nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.14 đến SEQ ID NO.18.

Theo một phương án ưu tiên khác, quy trình theo sáng chế có thể xác định loài *Bacillus coagulans*, trong đó mỗi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.5, mỗi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.6 sau và đầu dò được chọn từ nhóm nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.19 đến SEQ ID NO.23.

Theo một phương án ưu tiên khác, quy trình theo sáng chế có thể xác định loài *Bacillus licheniformis*, trong đó mỗi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.7, mỗi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.8 và đầu dò được chọn từ nhóm nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.24 đến SEQ ID NO.28.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến hỗn hợp nhóm cặp mỗi và đầu dò để xác định nhóm vi khuẩn *Bacillus* có trong sản phẩm lợi khuẩn bằng quy trình theo sáng chế, trong đó hỗn hợp này bao gồm:

- cặp mỗi để xác định *Bacillus subtilis* bao gồm mỗi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, mỗi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 và đầu dò bất kỳ được chọn từ

nhóm oligonucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.9 đến SEQ ID NO.13 được gắn huỳnh quang FAM ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ, BHQ hoặc TAMRA ở đầu 3';

- cặp mồi để xác định *Bacillus clausii* bao gồm mồi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3, mồi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4 và đầu dò bất kỳ được chọn từ nhóm oligonucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.14 đến SEQ ID NO.18 được gắn huỳnh quang HEX, TET, VIC, JOE, hoặc Yellow555 ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ, BHQ hoặc TAMRA ở đầu 3';

- cặp mồi để xác định *Bacillus coagulans* bao gồm mồi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.5, mồi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.6 và đầu dò bất kỳ được chọn từ nhóm oligonucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.19 đến SEQ ID NO.23 được gắn huỳnh quang ROX, Red610 hoặc Texas Red ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'; và

- cặp mồi để xác định *Bacillus licheniformis* bao gồm mồi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.7, mồi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.8 và đầu dò bất kỳ được chọn từ nhóm oligonucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.24 đến SEQ ID NO.28 được gắn huỳnh quang Cy5 ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'.

Hỗn hợp nhóm cặp mồi và đầu dò theo sáng chế này chứa các cặp mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.8, với mỗi mồi xuôi và ngược có nồng độ từ 100 nM đến 1 μ M và các đầu dò có trình tự nêu trong SEQ ID NO.9 đến SEQ ID NO.28 nồng độ từ 25 đến 500 nM.

Sáng chế còn đề cập đến kit để xác định nhóm vi khuẩn *Bacillus* có trong sản phẩm lợi khuẩn, trong đó kit này chứa hỗn hợp bao gồm nhóm cặp mồi và đầu dò nêu trên và hướng dẫn sử dụng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất hỗn hợp nhóm cặp mồi và đầu dò cho PCR định lượng đa mồi

Để thực hiện phản ứng PCR xác định nhóm vi khuẩn *Bacillus* sống có lợi bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis* có trong sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định, tiến hành sản xuất hỗn hợp nhóm cặp mồi và đầu dò dùng cho PCR định lượng đa mồi, trong đó các đoạn mồi và đầu dò được tổng hợp nhân

tạo và các thành phần dung dịch phản ứng được pha cho 100 phản ứng được chuẩn bị theo bảng sau:

STT	Thành phần và nồng độ hoá chất trong mỗi phản ứng	Định lượng và nồng độ dung dịch gốc
1	Dung dịch đệm 2X bao gồm 20 mM tris-HCl pH 8,8, 20 mM KCl, 0,2% Triton X-100, 400 μ M dNTP, 2 đơn vị Taq polymeraza, lượng 10 μ l	1 ml
2	Mồi xuôi: SEQ ID NO.1, nồng độ 250 nM	5 μ l nồng độ 100 μ M
3	Mồi ngược: SEQ ID NO.2, nồng độ 250 nM	5 μ l nồng độ 100 μ M
4	Đầu dò: SEQ ID NO.9 gắn huỳnh quang FAM ở đầu 5', hấp thụ ZEN ở nucleotit thứ 9 và hấp thụ IBFQ ở đầu 3', nồng độ 50 nM	5 μ l nồng độ 10 μ M
5	Mồi xuôi: SEQ ID NO.3, nồng độ 250 nM	5 μ l nồng độ 100 μ M
6	Mồi ngược: SEQ ID NO.4, nồng độ 250 nM	5 μ l nồng độ 100 μ M
7	Đầu dò: SEQ ID NO.14 gắn huỳnh quang HEX ở đầu 5', hấp thụ ZEN ở nucleotit thứ 9 và hấp thụ IBFQ ở đầu 3', nồng độ 50 nM	5 μ l nồng độ 10 μ M
8	Mồi xuôi: SEQ ID NO.5, nồng độ 100 nM	5 μ l nồng độ 50 μ M
9	Mồi ngược: SEQ ID NO.6, nồng độ 100 nM	5 μ l nồng độ 50 μ M
10	Đầu dò: SEQ ID NO.19 gắn huỳnh quang Texas Red ở đầu 5' và hấp thụ IBFQ ở đầu 3', nồng độ 25 nM	5 μ l nồng độ 5 μ M
11	Mồi xuôi: SEQ ID NO.7, nồng độ 250 nM	5 μ l nồng độ 100 μ M
12	Mồi ngược: SEQ ID NO.8, nồng độ 250 nM	5 μ l nồng độ 100 μ M
13	Đầu dò: SEQ ID NO.24 gắn huỳnh quang Cy5 đầu 5', hấp thụ TAO ở nucleotit thứ 9 và hấp thụ IBFQ ở đầu 3', nồng độ 50 nM	5 μ l nồng độ 10 μ M
14	Nước khử ion vừa đủ 20 μ l	940 μ l
	Tổng cộng	2 ml

Thành phần phản ứng PCR này có thể sử dụng được cho 100 phản ứng PCR.

Ví dụ 2. Xác định nhóm vi khuẩn Bacillus sống trong mẫu sản phẩm lợi khuẩn

Để xác định nhóm vi khuẩn Bacillus sống trong các mẫu sản phẩm lợi khuẩn, tiến hành thử nghiệm với 04 mẫu vi khuẩn lợi khuẩn bao gồm 02 mẫu sản phẩm lợi khuẩn kết hợp 4 chủng vi khuẩn Bacillus và 02 mẫu sản phẩm được bán trên thị trường ở dạng hỗn dịch trong nước, trong đó:

Mẫu KT 01: bao gồm 4 chủng chuẩn *Bacillus subtilis* VTCC 11010, *Bacillus clausii* VTCC 12283, *Bacillus coagulans* VTCC 11111, và *Bacillus licheniformis* VTCC 10723 được sử dụng làm mẫu đối chứng dương để kiểm định độ đặc hiệu của quy trình.

Mẫu KT 02: bao gồm 4 chủng chuẩn *Bacillus aquimaris* VTCC 11260, *Bacillus megaterium* VTCC 910088, *Bacillus acidophilus* VTCC 12284, *Bacillus casei* VTCC 10411 được sử dụng làm mẫu đối chứng âm để kiểm định độ đặc hiệu của quy trình.

Mẫu TM 01: mẫu sản phẩm thương mại, được nhà sản xuất công bố gồm 2 loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* và *Bacillus clausii* với nồng độ vi sinh vật tổng cộng $\geq 3 \times 10^9$ CFU/5 ml được sử dụng để kiểm định độ vi sinh vật sống trong sản phẩm.

Mẫu TM 02: mẫu sản phẩm thương mại, được nhà sản xuất công bố gồm 3 loài vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii* và *Bacillus coagulans* với nồng độ vi sinh vật tổng cộng $\geq 3 \times 10^9$ CFU/5 ml được sử dụng để kiểm định vi sinh vật sống trong sản phẩm.

Các mẫu nêu trên được thu nhận, lắc đều, sau đó hút 1 ml hỗn dịch, pha loãng với dung dịch NaCl 0,9% theo tỷ lệ 1/10 rồi pha loãng theo loạt tiếp bằng dung dịch NaCl 0,9% với nồng độ 1/10 đến tỷ lệ 10^{-6} rồi cấy 100 μ l lên môi trường thạch Luria-Bertani chứa 15g/l pepton, 5 g/l cao nấm men, 5 g/l NaCl và 16 g/l thạch. Sau khi cấy, đậy nắp và để yên 15 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó lật úp đĩa và nuôi cấy ở 37°C trong 48 giờ để thu nhận khuẩn lạc. Sau 48 giờ, khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy mỗi đĩa được đếm và lựa chọn đĩa thạch có nồng độ pha loãng môi trường thạch có khoảng từ 10 đến 100 khuẩn lạc. Các nồng độ pha loãng được chọn có độ pha loãng 10^{-6} .

Khuẩn lạc trên mỗi đĩa thạch có độ pha loãng 10^{-6} (khoảng 25-100 khuẩn) được thu nhận và chuyển vào 100 μ l dung dịch NaCl 0,9%, trộn đều, gia nhiệt đến 96°C trong 10 phút nhằm phá vỡ tế bào để thu ADN tổng số của vi khuẩn.

Nạp 5 μ l ADN tổng số thu được từ mỗi khuẩn lạc vào mỗi khay trên khay PCR-96 khay, trong đó mỗi khay đã được bổ sung 20 μ L dung dịch cho mỗi PCR định lượng được chuẩn bị theo Ví dụ 1 để đạt tổng lượng là 25 μ L. Tiến hành PCR định lượng trên hệ thống Light Cycler 96 (Roche Diagnostics) với chu trình nhiệt 1 chu kỳ (95°C trong 10 phút), 40 chu kỳ (95°C trong 15 giây, 60°C trong 60 giây).

Kết quả định lượng bằng kỹ thuật PCR định lượng đa môi và đa đầu dò của mẫu KT 01 và KT 02 được trình bày trên Hình 1 cho thấy đường tín hiệu huỳnh quang FAM, HEX, Texas Red, và Cy5 ở mẫu KT 01 (đối chứng dương, PC) được phát hiện với giá trị chu kỳ ngưỡng $C_t < 35$, trong khi đó mẫu KT 02 (đối chứng âm, NC) không có đường tín hiệu.

Kết quả kiểm tra lại các khuẩn lạc dương tính ở mẫu KT 01 bằng PCR SYBR Green đơn môi cho từng loài được trình bày ở Hình 2 cho thấy sự trùng khớp về mặt định danh loài: mẫu tín hiệu huỳnh quang FAM cũng cho tín hiệu huỳnh quang SYBR Green ở hỗn hợp môi đặc hiệu với *Bacillus subtilis*, mẫu tín hiệu huỳnh quang HEX cũng cho tín hiệu huỳnh quang SYBR Green ở hỗn hợp môi đặc hiệu với *Bacillus clausii*, mẫu tín hiệu huỳnh quang Texas Red cũng cho tín hiệu huỳnh quang SYBR Green ở hỗn hợp môi đặc hiệu với *Bacillus coagulans*, mẫu tín hiệu huỳnh quang Cy5 cũng cho tín hiệu huỳnh quang SYBR Green ở hỗn hợp môi đặc hiệu với *Bacillus licheniformis*. Với kết quả này, có thể kết luận quy trình mô tả theo sáng chế đặc hiệu cho 04 loài vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis*. Quy trình này có thể định lượng được 04 loài chỉ với một lần PCR duy nhất, giảm 4 lần chi phí các thành phần dNTPs, enzym Taq polymeraza, đệm pha hỗn hợp và dụng cụ tiêu hao, và đồng thời giảm 4 lần thời gian thao tác thí nghiệm so với kỹ thuật PCR SYBR Green đơn môi. Ví dụ, với quy trình mô tả trong sáng chế chỉ phải tiến hành 80 phản ứng cho 80 khuẩn lạc mọc trên đĩa, trong khi đó sẽ phải tiến hành tới 320 phản ứng khi áp dụng kỹ thuật PCR SYBR Green.

Kết quả PCR định lượng đối với mẫu TM 01 được trình bày ở Hình 3 cho thấy một số khuẩn lạc đại diện có đường tín hiệu FAM với giá trị $C_t < 35$ thuộc loài *Bacillus subtilis*; Khuẩn lạc có đường tín hiệu HEX với giá trị $C_t < 35$ thuộc loài *Bacillus clausii*. Căn cứ vào giá trị đường tín hiệu, tính tổng lượng vi sinh vật sử dụng công thức tính kết quả theo công thức sau:

$$N_{B. subtilis} = C_{FAM} / (V \times d) = 5,0 \times 10^8 \text{ CFU/ml} = 2,5 \times 10^9 \text{ CFU/5 ml}$$

$$N_{B. clausii} = C_{HEX} / (V \times d) = 3,6 \times 10^8 \text{ CFU/ml} = 1,8 \times 10^9 \text{ CFU/5 ml}$$

Trong đó:

$C_{FAM} = 50$ và $C_{HEX} = 36$ là tổng số khuẩn lạc đếm được trên đĩa mà khi chạy real time PCR có tín hiệu FAM và HEX; $V = 0,1$ và $d = 10^{-6}$.

Như vậy, tổng số vi khuẩn *Bacillus subtilis* và *Bacillus clausii* có trong mẫu thương mại 01 sử dụng để kiểm định là $4,3 \times 10^9$ CFU/5 ml, đạt yêu cầu theo công bố của nhà sản xuất.

Kết quả PCR định lượng của mẫu TM 02 được trình bày ở Hình 4 cho thấy một số khuẩn lạc đại diện có đường tín hiệu FAM với giá trị $C_t < 35$ thuộc loài *Bacillus subtilis*; Khuẩn lạc có đường tín hiệu HEX với giá trị $C_t < 35$ thuộc loài *Bacillus clausii*; Khuẩn lạc có đường tín hiệu Texas Red với giá trị $C_t < 35$ thuộc loài *Bacillus coagulans*. Căn cứ vào giá trị đường tín hiệu, tính tổng lượng vi sinh vật sử dụng công thức tính kết quả theo công thức sau:

$$N_{B. subtilis} = C_{FAM}/(V \times d) = 3,5 \times 10^8 \text{ CFU/ml} = 1,75 \times 10^9 \text{ CFU/5 ml}$$

$$N_{B. clausii} = C_{HEX}/(V \times d) = 3,2 \times 10^8 \text{ CFU/ml} = 1,60 \times 10^9 \text{ CFU/5 ml}$$

$$N_{B. coagulans} = C_{HEX}/(V \times d) = 1,1 \times 10^8 \text{ CFU/ml} = 5,5 \times 10^8 \text{ CFU/5 ml}$$

Trong đó:

$C_{FAM} = 35$, $C_{HEX} = 32$, $C_{HEX} = 11$ là tổng số khuẩn lạc đếm được trên đĩa mà khi chạy PCR định lượng có tín hiệu FAM, HEX, và Texas Red; $V = 0,1$ và $d = 10^{-6}$.

Như vậy, tổng số vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii* có trong mẫu TM 02 được kiểm định là $3,9 \times 10^9$ CFU/5 ml, đạt yêu cầu theo công bố của nhà sản xuất.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Quy trình xác định nhóm vi khuẩn *Bacillus* sống theo sáng chế là một công cụ cho phép xác định đặc hiệu nhóm lợi khuẩn *Bacillus* sống thường sử dụng trong các chế phẩm lợi khuẩn, cho phép đánh giá, xác định được lượng, thành phần loài vi khuẩn hữu ích có trong chế phẩm lợi khuẩn. Quy trình theo sáng chế cho phép các nhà quản lý, các nhà sản xuất có khả năng kiểm định cũng như kiểm soát được thành phần, chất lượng của sản phẩm vi sinh sống, cụ thể là các sản phẩm lợi khuẩn chứa vi khuẩn *Bacillus* sống bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis* một cách chính xác với độ tin cậy cao.

Quy trình theo sáng chế có khả năng định tính và định lượng đồng thời hoặc riêng rẽ bốn loài vi khuẩn lợi khuẩn sống thường có bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis* giúp các nhà quản lý phân lập và định tính, định lượng từng loài chỉ bằng một phản ứng duy nhất. Quy trình còn cho phép đánh giá

chất lượng cũng như thành phần sản phẩm vi sinh ở các giai đoạn khác nhau trong quá trình phân lập, sản xuất cũng như lưu thông sản phẩm.

Các đoạn mồi và đầu dò được tối ưu hóa cho phản ứng PCR giúp tăng hiệu quả cũng như chất lượng hình ảnh tín hiệu huỳnh quang thu được. Các đoạn mồi và đầu dò đặc hiệu cho phép nhận đặc hiệu đồng thời hoặc riêng rẽ ADN của *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis*, tăng độ nhạy và hiệu suất của quy trình theo sáng chế.

Quy trình theo sáng chế đơn giản và ưu việt hơn kỹ thuật PCR SYBR Green đơn mồi đã được công bố trên thế giới hiện nay ở khía cạnh vẫn đảm bảo được độ đặc hiệu tương đương, nhưng giúp tiết kiệm chi phí hoá chất, dụng cụ tiêu hao và thời gian kiểm định xuống 4 lần, giảm đáng kể nguy cơ nhầm lẫn trong quá trình nạp ADN khuôn vào hỗn hợp phản ứng, vì vậy có khả năng áp dụng rộng rãi giúp kiểm định cũng như kiểm soát và theo dõi được chất lượng của chế phẩm vi sinh hữu ích.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình xác định nhóm vi khuẩn *Bacillus* sống có trong sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) thu nhận khuẩn lạc của nhóm vi khuẩn *Bacillus* bằng cách hòa mẫu sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định với dung dịch NaCl 0,9% theo tỷ lệ 1/10 (w/v) rồi pha loãng mẫu theo loạt với tỷ lệ 1/10 (v/v) rồi cấy 100 μ l từng mẫu đã được pha loãng này lên môi trường thạch Luria-Bertani và ủ trong 48 giờ, thu nhận các khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch có mức độ pha loãng đạt từ 10 đến 100 khuẩn lạc/100 μ l;

b) thu ADN tổng số của vi khuẩn bằng cách chuyển các khuẩn lạc thu được vào 100 μ l dung dịch NaCl 0,9%, trộn đều, gia nhiệt đến 96°C trong 10 phút nhằm phá vỡ tế bào để thu ADN tổng số của vi khuẩn;

c) xác định nhóm vi khuẩn *Bacillus* sống có lợi bằng cách tiến hành PCR định lượng đa môi với hỗn hợp thành phần phản ứng bao gồm từ 1 đến 5 μ l ADN tổng số, từ 10 đến 50 mM tris-HCl pH từ 7,9 đến 9,0, từ 6 đến 30 mM KCl, từ 0,05 đến 0,15% Triton X-100, từ 200 đến 400 μ M dNTP, từ 0,5 đến 5 đơn vị Taq polymeraza, từ 100 nM đến 1 μ M cho mỗi môi xuôi và ngược, từ 25 đến 500 nM cho mỗi đầu dò và nước vừa đủ thể tích từ 20 đến 25 μ l., trong đó:

- cặp môi để xác định *Bacillus subtilis* bao gồm môi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, môi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 và đầu dò bất kỳ được chọn từ nhóm oligonucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.9 đến SEQ ID NO.13 được gắn huỳnh quang FAM ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ, BHQ hoặc TAMRA ở đầu 3';

- cặp môi để xác định *Bacillus clausii* bao gồm môi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3, môi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4 và đầu dò bất kỳ được chọn từ nhóm oligonucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.14 đến SEQ ID NO.18 được gắn huỳnh quang HEX, TET, VIC, JOE, hoặc Yellow555 ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ, BHQ hoặc TAMRA ở đầu 3';

- cặp môi để xác định *Bacillus coagulans* bao gồm môi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.5, môi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.6 và đầu dò bất kỳ được chọn từ nhóm oligonucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.19 đến SEQ ID NO.23 được

gắn huỳnh quang ROX, Red610 hoặc Texas Red ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'; và

- cặp mồi để xác định *Bacillus licheniformis* bao gồm mồi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.7, mồi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.8 và đầu dò bất kỳ được chọn từ nhóm oligonucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.24 đến SEQ ID NO.28 được gắn huỳnh quang Cy5 ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'; và

d) kết luận về sự có mặt và lượng vi khuẩn *Bacillus* sống bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis* có trong mẫu sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định theo biểu đồ huỳnh quang thu được từ phản ứng PCR định lượng các ADN tách từ các khuẩn lạc.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này có thể xác định đồng thời hoặc riêng rẽ bốn loài vi khuẩn *Bacillus* sống có lợi bao gồm *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* và *Bacillus licheniformis* có trong sản phẩm lợi khuẩn cần kiểm định.

3. Hỗn hợp nhóm cặp mồi và đầu dò để xác định nhóm vi khuẩn *Bacillus* sống có trong sản phẩm lợi khuẩn bằng quy trình theo điểm 1, trong đó hỗn hợp này bao gồm:

- cặp mồi để xác định *Bacillus subtilis* bao gồm mồi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, mồi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2 và đầu dò bất kỳ được chọn từ nhóm oligonucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.9 đến SEQ ID NO.13 được gắn huỳnh quang FAM ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ, BHQ hoặc TAMRA ở đầu 3';

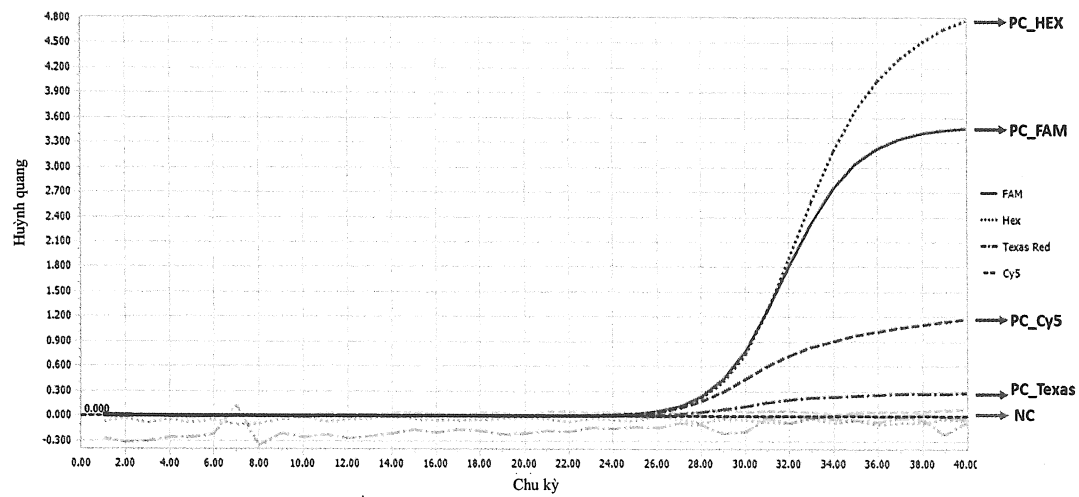
- cặp mồi để xác định *Bacillus clausii* bao gồm mồi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.3, mồi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.4 và đầu dò bất kỳ được chọn từ nhóm oligonucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.14 đến SEQ ID NO.18 được gắn huỳnh quang HEX, TET, VIC, JOE, hoặc Yellow555 ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ, BHQ hoặc TAMRA ở đầu 3';

- cặp mồi để xác định *Bacillus coagulans* bao gồm mồi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.5, mồi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.6 và đầu dò bất kỳ được chọn từ nhóm oligonucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.19 đến SEQ ID NO.23 được gắn huỳnh quang ROX, Red610 hoặc Texas Red ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'; và

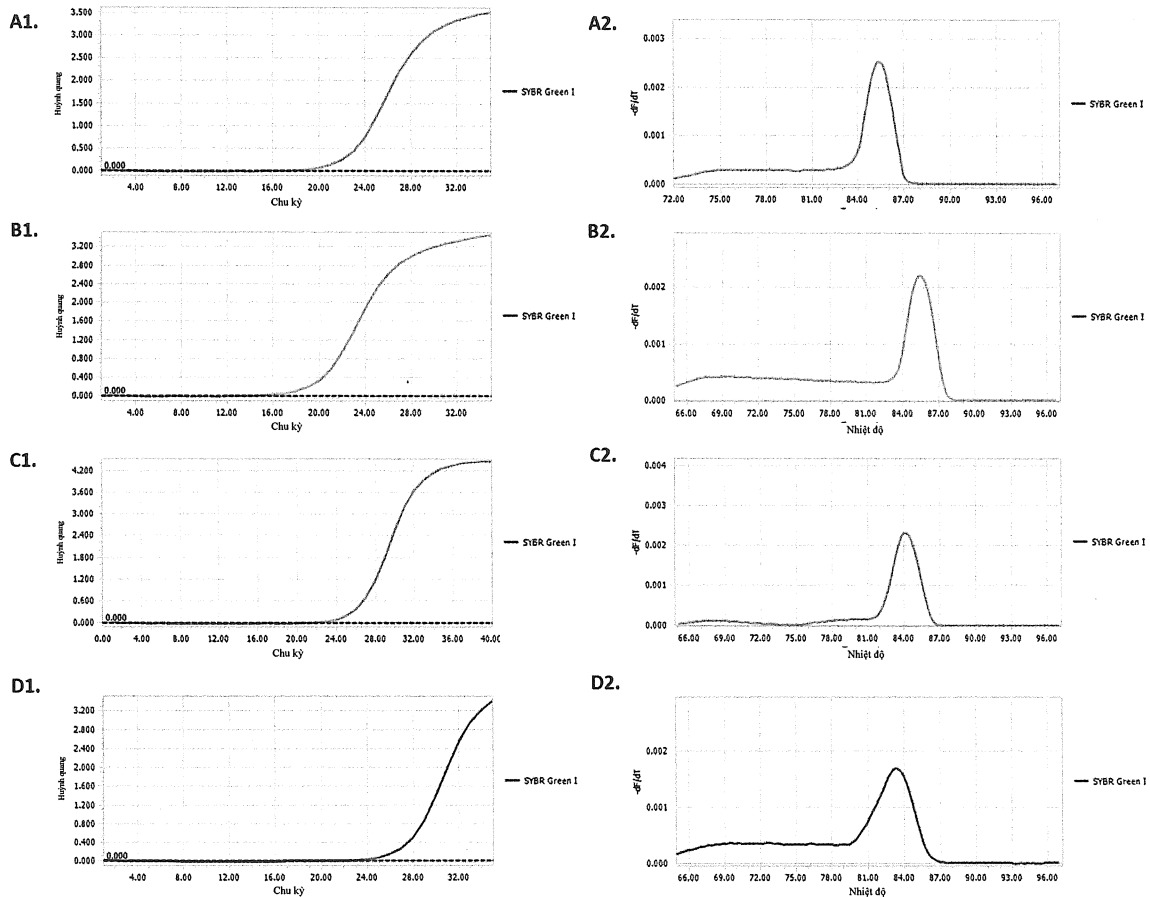
- cặp môi để xác định *Bacillus licheniformis* bao gồm môi xuôi có trình tự nêu trong SEQ ID NO.7, môi ngược có trình tự nêu trong SEQ ID NO.8 và đầu dò bất kỳ được chọn từ nhóm oligonucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.24 đến SEQ ID NO.28 được gắn huỳnh quang Cy5 ở đầu 5' và chất hấp thụ huỳnh quang IBFQ hoặc BHQ ở đầu 3'.

4. Hỗn hợp nhóm cặp môi và đầu dò theo điểm 3, trong đó mỗi môi xuôi và môi ngược có nồng độ từ 100 nM đến 1 μ M, mỗi đầu dò có nồng độ từ 25 đến 500 nM.

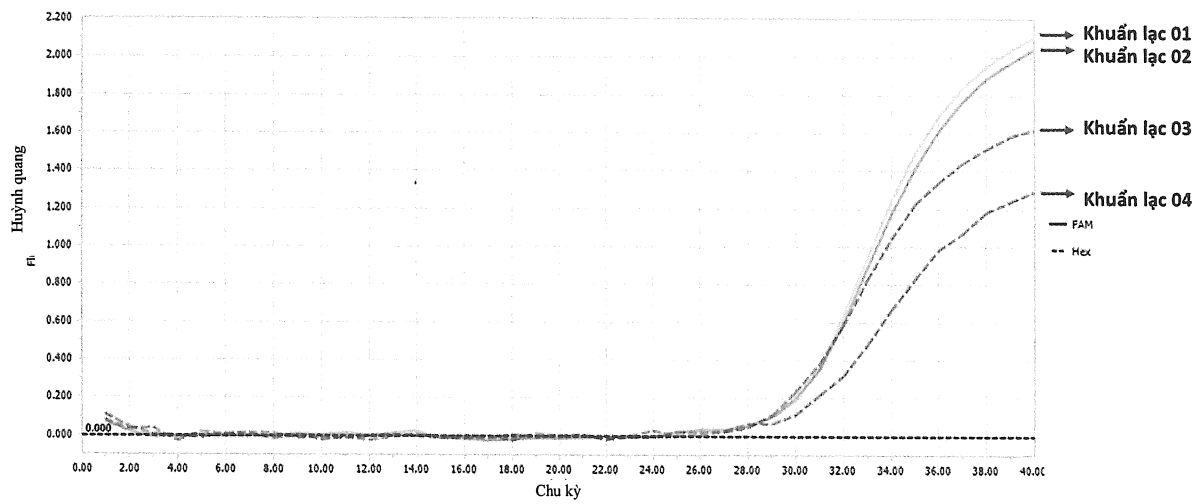
HÌNH 1



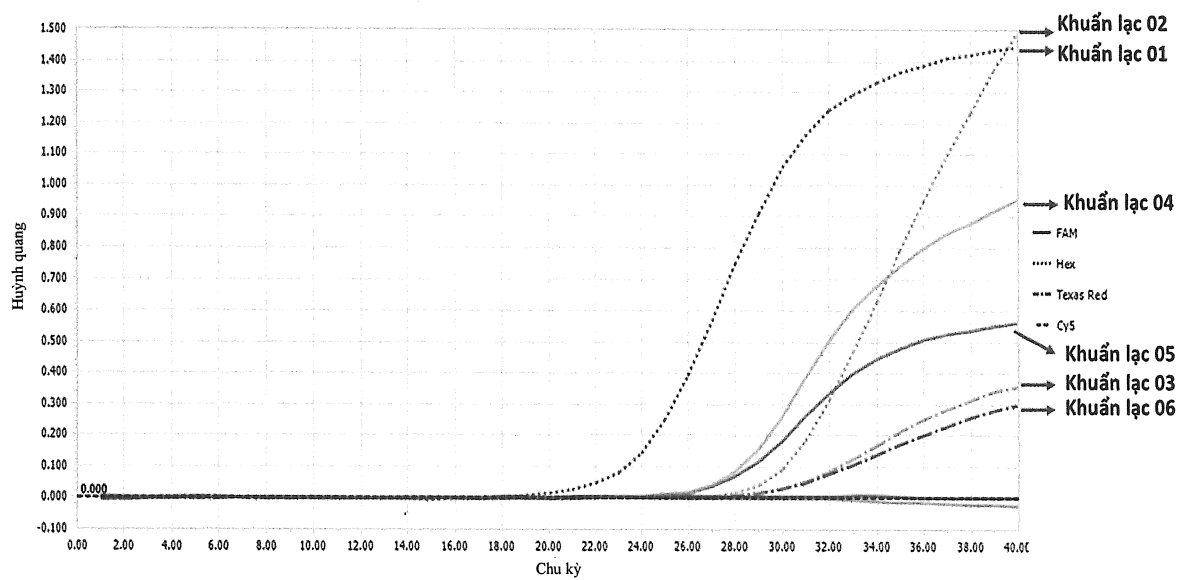
HÌNH 2



HÌNH 3



HÌNH 4



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội
 <120> Quy trình xác định nhóm vi khuẩn Bacillus sống có trong sản phẩm lợi khuẩn và hỗn hợp nhóm cặp mỗi và đầu dò để xác định nhóm vi khuẩn này

<130>

<160> 28

<170>

<210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<400> 1

CGTAGGTCCTGAGCTTGATGTA

<210> 2

<211> 17

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<400> 2

GCGTTTGTCCAAGTCGG

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<400> 3

AATTTTACCGCCCCTCAAG

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<220>

<400> 4

ACTTTTGGAAACATGCCGAAC

<210> 5
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 5
GCAGGTTGCTTATGAAATCAAC

<210> 6
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 6
CCAGGCTTAAATCCAATACAG

<210> 7
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 7
GTCAACGACACAATTTCCCCGT

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi

<220>
<400> 8
AGCTCCCTCAGGCGGCAATT

<210> 9
<211> 23
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đầu dò

<220>

<400> 9
TGGCTCCTGGTGTATCCATCCAA

<210> 10
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đầu dò

<220>
<400> 10
AAAGCACACTACCTGGAGGCACTT

<210> 11
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đầu dò

<220>
<400> 11
GCGCTTACAACGGAACGTCAA

<210> 12
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đầu dò

<220>
<400> 12
GGCGACTCCTCACGTTGC

<210> 13
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đầu dò

<220>
<400> 13
CGGAGCAGCAGCGTTAATTCT

<210> 14
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đầu dò

<220>
 <400> 14
 AAAAAAAGTGCGGCAGGCAATC

<210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<220>
 <400> 15
 GCGATGGTTTGTGACGCGAT

<210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<220>
 <400> 16
 AATCGGCGTCAAACCTGAGACACC

<210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<220>
 <400> 17
 GTGGCCATGCTTCATGCCAG

<210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<220>
 <400> 18
 GCAGTGGGCGATGGTTTGTG

<210> 19
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đầu dò

<220>

<400> 19

CGACGCTCCCGGATGC

<210> 20

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đầu dò

<220>

<400> 20

AACAGGGATACAGGGCGATGG

<210> 21

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đầu dò

<220>

<400> 21

ATCGCCCTGTATCCCTGTTGTTTC

<210> 22

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đầu dò

<220>

<400> 22

CCGCTCTCTTCCATCGCCC

<210> 23

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đầu dò

<220>

<400> 23

TGTTGTTTCAAGAATTGCATCCGGG

<210> 24

<211> 22

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<220>
 <400> 24
 ATCGTGATCGGCAAGTGTCTT

<210> 25
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<220>
 <400> 25
 TCCGAAATTTCCGAAATGTGTTTCG

<210> 26
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<220>
 <400> 26
 TTCGCCGGTCGCAGCAATCTTTAA

<210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<220>
 <400> 27
 AGCGGCTGTGAGTTTCTGCT

<210> 28
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đầu dò

<220>
 <400> 28
 GACCCCGATACCCGTCATATTTG