

XÂY DỰNG BỘ KIT MULTIPLEX PCR PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI BA VI KHUẨN *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* VÀ *Bacillus subtilis* CHO CÁC CHẾ PHẨM PROBIOTICS

Nguyễn Thành Luân*, Nguyễn Thị Ngọc, Nguyễn Hồ Thiên Thảo,
Trần Lê Như Quỳnh, Nguyễn Hương Giang, Nguyễn Thị Ngọc Châm
Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

*Email: luannt@huit.edu.vn

Ngày nhận bài: 27/5/2025; Ngày nhận bài sửa: 25/6/2025; Ngày chấp nhận đăng: 28/6/2025

TÓM TẮT

Vi sinh vật nhóm probiotic đang được ứng dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp y dược và thực phẩm vì những lợi ích sức khỏe của chúng. Nghiên cứu này xây dựng và tối ưu một bộ kit multiplex PCR nhằm phát hiện đồng thời ba chủng lợi khuẩn phổ biến: *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* và *Bacillus subtilis*. Ba cặp mồi đặc hiệu cho các gen *slpA*, *lacS* và *sboA* được thiết kế và tích hợp vào một phản ứng duy nhất. Bộ kit cho kết quả khuếch đại rõ ràng, không xuất hiện phản ứng chéo hoặc sản phẩm không đặc hiệu. Điều kiện phản ứng tối ưu gồm 75 μ M $MgCl_2$, 300 μ M dNTPs và nhiệt độ gắn mồi 61 $^{\circ}C$. Khi áp dụng trên 10 chế phẩm probiotic thương mại, giới hạn phát hiện (LOD) của bộ kit multiplex PCR với độ nhạy cao đạt 10/10 mẫu trong các thử nghiệm thực tế. Bộ kit cho thấy độ đặc hiệu, độ nhạy và tính ứng dụng cao. Đây cũng là công cụ hiệu quả cho kiểm định probiotic và xác minh thành phần vi sinh vật trong sản phẩm thương mại.

Từ khóa: Probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus subtilis*, bộ kit multiplex PCR.

1. MỞ ĐẦU

Probiotic là các vi sinh vật có lợi, khi được đưa vào cơ thể với liều lượng phù hợp, có khả năng cải thiện sức khỏe của vật chủ. Chúng tác động thông qua nhiều cơ chế như điều hòa miễn dịch, tăng cường tổng hợp kháng thể IgA tại niêm mạc và ức chế các vi sinh vật gây bệnh nhờ tiết ra hợp chất kháng khuẩn, cạnh tranh vị trí bám, cũng như tạo môi trường acid hóa bất lợi cho tác nhân gây hại [1]. Ngoài ra, probiotic còn có thể tồn tại trong điều kiện acid dạ dày và dịch mật, từ đó hỗ trợ tiêu hóa lactose và phòng ngừa các rối loạn đường tiêu hóa. Các dòng probiotics phổ biến hiện nay được phân thành ba nhóm chính: (i) vi khuẩn acid lactic (LAB) như *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*; (ii) vi khuẩn sinh bào tử như *Bacillus subtilis*, *B. coagulans*, *B. clausii* và (iii) một số vi khuẩn Gram âm chọn lọc như *Escherichia coli*. Trong số đó, *Lactobacillus acidophilus* (LA), *Streptococcus thermophilus* (ST) và *Bacillus subtilis* (BS) là ba chủng được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm và y sinh học nhờ khả năng tạo acid hữu cơ, tiết enzyme tiêu hóa và sản sinh các hợp chất kháng khuẩn [2].

Lactobacillus acidophilus, *Streptococcus thermophilus* và *Bacillus subtilis* đóng vai trò quan trọng trong việc cân bằng hệ vi khuẩn đường ruột. Thông qua quá trình lên men carbohydrate, sản xuất acid lactic, từ đó làm giảm pH, ức chế vi sinh vật có hại và tạo điều kiện thuận lợi cho lợi khuẩn phát triển. Cụ thể, *B. subtilis* tiết enzyme tiêu hóa amylase, protease, lipase và peptide kháng khuẩn bacitracin, subtilisin; *S. thermophilus* tổng hợp bacteriocin như nisin, lacticin, có khả năng ức chế *Listeria monocytogenes* và *Clostridium botulinum*; trong khi *L. acidophilus* giúp ổn định pH và tăng cường hàng rào bảo vệ niêm mạc [2]. Khi kết hợp, ba chủng này tạo hiệu ứng cộng hưởng sinh học, thúc đẩy tổng hợp enzyme và exopolysaccharide, từ đó hỗ trợ tiêu hóa và tăng cường miễn dịch.

Tuy nhiên, một trong số các vấn đề tồn tại thực trạng vẫn còn thiếu các công cụ phát hiện nhanh, chính xác và đồng thời nhiều chủng probiotic trong một mẫu thực phẩm hay chế phẩm sinh học, nhất là trong bối cảnh số lượng sản phẩm probiotics thương mại ngày càng đa dạng. Các phương pháp truyền

thống như nuôi cấy, phân lập tốn thời gian và không phân biệt được các chủng có đặc tính sinh học gần nhau. Các phản ứng PCR đơn lẻ khi thực hiện song song nhiều mục tiêu gây tăng chi phí và sai lệch kết quả. Do đó, cần phát triển phương pháp phân tích hiện đại, đa mục tiêu, độ nhạy cao, tính đặc hiệu tốt và khả năng lặp lại ổn định [3].

Trong nghiên cứu này, một phản ứng multiplex PCR được xây dựng để phát hiện được đồng thời ba chủng *L. acidophilus*, *S. thermophilus* và *B. subtilis*. Ba cặp mồi đặc hiệu được thiết kế nhắm vào các vùng gen bảo tồn: *slpA* (mã hóa protein bề mặt – S-layer), *lacS* (lactose permease) và *sboA* (mã hóa tiền peptide của subtilisin A). Đây là các gen không chỉ giúp định danh chính xác mà còn có liên quan đến chức năng sinh học đặc trưng của từng loài. Các đoạn mồi được chọn từ vùng mã hóa bảo tồn cao, nhằm đảm bảo độ đặc hiệu loài và tránh phản ứng chéo. Đồng thời, việc chọn lọc điều kiện tốt nhất cho các yếu tố phản ứng của mồi ở nồng độ 10, 20 và 30 pmol/μL, nồng độ dNTPs, ion Mg²⁺ và số chu kỳ PCR trong phản ứng được nghiên cứu [4].

Nghiên cứu này xây dựng bộ kit multiplex PCR với tính đổi mới cao khi lần đầu tiên tích hợp đồng thời ba chủng lợi khuẩn phổ biến là *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* và *Bacillus subtilis* vào một phản ứng duy nhất. Khác với các công trình trước chủ yếu chỉ tập trung vào một hoặc hai chủng, hệ thống này cho phép phát hiện đồng thời ba mục tiêu với độ đặc hiệu và độ nhạy cao. Việc lựa chọn các gen đích *slpA*, *lacS* và *sboA* không chỉ đảm bảo khả năng định danh chính xác mà còn phản ánh các chức năng sinh học đặc trưng của từng loài, như vận chuyển lactose, tổng hợp protein bề mặt và sản xuất peptide kháng khuẩn. Bộ kit multiplex PCR giúp rút ngắn thời gian phân tích, giảm thiểu chi phí và sai sót thao tác so với thực hiện PCR đơn lẻ cho từng chủng [3].

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Nghiên cứu để ứng dụng ba chủng vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* VCIM 5905 (MLA), *Bacillus subtilis* VCIM 5902 (MBS) được cung cấp từ Trung tâm Vi sinh vật và *Streptococcus thermophilus* VTCC 19258 (MST) thu nhận tại Viện Công nghiệp Thực phẩm (FIRI). Mẫu được hoà tan 0,1 g trong 100 mL nước cất vô trùng. Sau đó, dịch huyền phù được hút 10 mL cấy vào môi trường Luria-Bertani broth (LB) và nuôi cấy hiếu khí trong 28 giờ ở 37 °C để thúc đẩy sự phát triển của vi khuẩn. Sau khi ủ, dịch nuôi cấy được cấy trải trên môi trường MRS agar ủ ở 37 °C trong 72 giờ. Hình thái khuẩn lạc được quan sát dưới kính hiển vi quang học, đánh giá dựa trên kích thước, hình dạng và sắc tố. Các khuẩn lạc điển hình được cấy truyền lại để đảm bảo độ thuần chủng. Các chủng vi khuẩn được bảo quản trong dung dịch glycerol 40% ở nhiệt độ –80 °C nhằm duy trì khả năng sống và tính ổn định di truyền cho các bước phân tích tiếp theo. Toàn bộ quy trình được thực hiện trong điều kiện vô trùng và lặp lại ba lần để đảm bảo độ tin cậy và khả năng tái lập của dữ liệu thu được.

2.2. Phương pháp tách chiết DNA

Trong nghiên cứu này, hai phương pháp tách chiết DNA được sử dụng để khảo sát khả năng trích ly DNA, bao gồm: phương pháp Cetyltrimethylammonium bromide – Sodium Dodecyl Sulfate (CTAB – SDS) tham khảo từ nghiên cứu của Pinzauti và cộng sự [6] và phương pháp nhiệt lysis được điều chỉnh dựa trên mô tả từ nghiên cứu của Marques và cộng sự [7].

2.2.1. Phương pháp CTAB–SDS

Quy trình tách chiết DNA được tiến hành theo phương pháp CTAB – SDS, với các điều chỉnh theo điều kiện thực nghiệm tại phòng thí nghiệm, đồng thời tham khảo nguyên lý từ *Current Protocols in Molecular Biology* và phương pháp ly giải bằng proteinase K được tối ưu hóa như mô tả bởi Wilson và cộng sự [8]. Sau 28 giờ nuôi cấy, 1,5 mL dịch LB chứa sinh khối vi khuẩn được thu nhận bằng ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút, rồi hòa tan trong 500 μL SDS 10%. Tiếp theo, 10 μL proteinase K được bổ sung và hỗn hợp được ủ ở 65 °C trong 40 phút nhằm phá vỡ cấu trúc tế bào và phân giải protein. Mẫu sau đó được ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 15 phút để loại bỏ cặn. Phần dịch trong được trộn đều hỗn hợp phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) với tỉ lệ bằng nhau, sau đó ly tâm để tách lớp. Thu dịch nổi và bổ sung 0,6 mL isopropanol lạnh tỉ lệ (1:1) ủ ở –20 °C trong 30 phút nhằm kết tủa acid nucleic. DNA được thu lại bằng ly tâm, rửa với ethanol 70%, làm khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng và hòa tan trong 100 μL dung dịch đệm TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). Sản phẩm thu được được lưu trữ ở –20 °C để phục vụ các bước phân tích tiếp theo [6].

2.2.2. Phương pháp nhiệt lysis

DNA được tách chiết dựa trên phương pháp nhiệt lysis kết hợp proteinase K, được điều chỉnh dựa trên mô tả của Marques và cộng sự [7], mẫu dịch vi khuẩn được tăng sinh trong môi trường LB lỏng sau 28 giờ (1,5 mL) sẽ được mang đi ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút. Lượng sinh khối vi sinh được trộn đều với 200 μ L lysis buffer, ủ ở nhiệt độ 95 °C trong 10 phút rồi làm lạnh nhanh ở 4 °C, bổ sung thêm vào hỗn hợp 20 μ L proteinase K ở nhiệt độ 55 °C trong 30 phút. Phần dịch nổi chứa DNA của vi khuẩn sẽ được thu sau khi ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút. Sản phẩm sẽ được bảo quản ở nhiệt độ -20 °C cho đến khi sử dụng [4].

2.3. Thiết kế môi đặc hiệu

Các cặp môi được thiết kế thủ công theo quy trình 6 bước: (1) xác định vùng gen bảo tồn có độ dài thích hợp (200 – 500 bp) từ cơ sở dữ liệu NCBI, (2) chọn trình tự chuẩn đại diện của loài và so sánh trên BioEdit để khoanh vùng bảo tồn, (3) thiết kế môi bằng công cụ BioEdit và IDT, (4) kiểm tra các đặc tính sinh hóa (T_m , %GC, dimer, hairpin) bằng cơ sở dữ liệu trên IDT và Primer3Plus, (5) đánh giá khả năng kết hợp trong multiplex PCR để tránh cạnh tranh giữa các môi, (6) xác minh độ đặc hiệu loài bằng BLAST (NCBI), đảm bảo độ tương đồng $\geq 99\%$ với loài mục tiêu và không khuếch đại nhầm loài ngoài đích. Các cặp môi được thiết kế với chiều dài 20 ± 2 bp, T_m đồng đều từ 58 đến 62 °C không hình thành cấu trúc thứ cấp và đạt độ đặc hiệu cao.

Ba cặp môi đặc hiệu được thiết kế để khuếch đại các vùng gen đặc trưng của ba chủng vi khuẩn: *slpA* của *Lactobacillus acidophilus*, *lacS* của *Streptococcus thermophilus* và *sboA* của *Bacillus subtilis*. Trình tự môi và kích thước sản phẩm PCR tương ứng cụ thể với *slpA* – 5'-ACTGCCGTTAAACCTGCTGA-3', 5'-TTGCTTACGCTGGCTACAGT-3' (273 bp); *lacS* – 5'-GATAAACGCTTTGCTTCAGG-3', 5'-TAACTTCAGACAAAGCTTCTAC-3' (351 bp); *sboA* – 5'-CTCGATCACAGACTTCACATG-3', 5'-GCAAGTAGTCGATTCTAACAC-3' (425 bp). Tất cả các cặp môi được xác thực *in silico* để đảm bảo tính đặc hiệu với loài mục tiêu và loại trừ hiện tượng khuếch đại không đặc hiệu, đồng thời được tổng hợp thương mại và kiểm nghiệm khả năng tương thích trong phản ứng multiplex PCR.

Phản ứng PCR được thực hiện trong tổng thể tích 25 μ L, bao gồm: 1 μ L DNA mẫu, 1 μ L mỗi cặp môi với nồng độ 10 - 30 pmol/ μ L, 12,5 μ L Master Mix 2X, 0,5 μ L RNase, 0,5 μ L dNTPs và nước khử ion bổ sung thể tích đến 25 μ L. Đối chứng dương được thiết lập bằng cách sử dụng DNA tinh sạch của từng chủng vi khuẩn đích. Đối chứng âm sử dụng nước không có DNA (nước cất vô trùng) để đảm bảo không có phản ứng khuếch đại không đặc hiệu. Các điều kiện chu kỳ gồm: khởi động 95 °C trong 5 phút; 35 chu kỳ gồm biến tính 95 °C trong 30 giây, gắn môi 61 °C trong 30 giây, kéo dài 72 °C trong 45 giây; kết thúc với 72 °C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên agarose gel 2%, bằng thuốc nhuộm GelRed loading buffer with tricolor 6X và quan sát hình ảnh điện di dưới tia UV để kiểm tra các vạch DNA được khuếch đại [5].

2.4. Khảo sát xây dựng phản ứng Multiplex PCR để phát hiện đồng thời ba chủng lợi khuẩn

Sau khi khảo sát riêng lẻ từng cặp môi trong phản ứng đơn (singleplex PCR), ba cặp môi chọn lọc được kết hợp trong phản ứng Multiplex PCR với thể tích 25 μ L. Thành phần phản ứng gồm 1 μ L DNA khuôn, 1 μ L hỗn hợp môi, 12,5 μ L Master Mix 2X, 0,5 μ L RNase, 0,5 μ L dNTPs và 4,5 μ L nước vô trùng, với các điều kiện khảo sát tối ưu về nồng độ Mg^{2+} từ 25 μ M, 50 μ M và 75 μ M, dNTPs 100 μ M, 200 μ M và 300 μ M, nhiệt độ gắn môi từ 58 °C kéo dài đến 61 °C. Chu trình nhiệt gồm: 95 °C (5 phút), 30 chu kỳ ở nhiệt độ 95 °C trong 30 giây - nhiệt độ gắn môi từ 58 °C đến 62 °C trong 30 giây, nhiệt độ kéo dài 72 °C trong 30 giây và kéo dài cuối pha kết thúc chu kỳ ở nhiệt độ 72 °C trong thời gian 5 phút. Phản ứng Multiplex PCR được tối ưu này cho phép phát hiện nhanh, chính xác ba chủng lợi khuẩn trong một lần khuếch đại duy nhất, phục vụ hiệu quả cho kiểm nghiệm vi sinh thực phẩm và phát triển bộ kit chẩn đoán phân tử.

2.5. Xây dựng bộ KIT multiplex PCR

Hệ thống phản ứng được tối ưu về nồng độ các thành phần và điều kiện chu trình nhiệt để đảm bảo độ đặc hiệu cao, độ nhạy tốt và khả năng lặp lại ổn định. Phản ứng được thực hiện trong thể tích 25 μ L, bao gồm: 12,5 μ L Master Mix 2X (gồm *Taq* DNA polymerase 0,5 U/ μ L, buffer và $MgCl_2$ 25 nM), dNTPs nồng độ 300 μ M, 3,0 μ L hỗn hợp môi đa môi (gồm ba cặp môi đặc hiệu cho các gen *slpA*, *lacS*, *sboA*, mỗi cặp gồm 0,5 μ L môi xuôi và môi ngược ở nồng độ 10 pmol/ μ L), 0,5 μ L RNase để loại bỏ RNA tạp,

2,0 μ L DNA khuôn (10 – 50 ng) và nước tinh khiết bổ sung đủ thể tích. Chu trình nhiệt tối ưu bao gồm: khởi động ở 95 °C trong 5 phút; 30 chu kỳ khuếch đại với các bước 95 °C trong 30 giây, 61 °C trong 30 giây, 72 °C trong 30 giây; và kéo dài cuối ở 72 °C trong 5 phút. Phản ứng đối chứng âm không chứa DNA khuôn được thiết lập nhằm kiểm soát nhiễm chéo và loại trừ khuếch đại không đặc hiệu.

Bộ kit được đóng gói theo định dạng tiêu chuẩn bao gồm: ống phản ứng chứa Master Mix tiêu chuẩn 8 ống/strip, ống primer mix dạng lỏng có nồng độ 10 μ M chứa hỗn hợp 3 cặp mồi, ống DNA đối chứng dương cho ba chủng (10⁵ CFU/mL), tài liệu hướng dẫn sử dụng bản in khổ A4 và thang chuẩn DNA 100 bp cung cấp bởi ABT. Tất cả các thành phần được bảo quản lạnh ở 2 – 8 °C ở dạng dung dịch, đảm bảo độ ổn định và tiện lợi khi sử dụng trong phòng thí nghiệm. Phản ứng multiplex PCR được kiểm tra bằng mẫu chứng âm không chứa DNA khuôn để xác nhận không có nhiễm chéo.

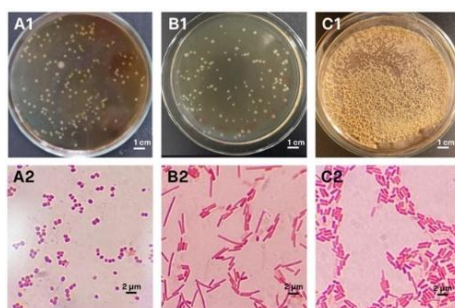
2.6. Ứng dụng bộ kit multiplex PCR trên các chế phẩm probiotic thương mại

Nhằm đánh giá tính khả thi và hiệu quả ứng dụng thực tế của bộ kit multiplex PCR đã phát triển, bộ kit multiplex PCR đã được đánh giá trên 10 mẫu probiotic thương mại được chọn đại diện kiểm tra nguồn gốc và thành phần khác nhau đang lưu hành trên thị trường Việt Nam nhằm kiểm tra tính đặc hiệu và khả năng phát hiện ba chủng vi sinh mục tiêu: *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* và *Bacillus subtilis*, các mẫu chế phẩm probiotics thương mại thuộc các dạng bào chế khác nhau như dạng bột, viên nén và dung dịch được lựa chọn ngẫu nhiên từ thị trường Việt Nam để làm đối tượng khảo sát. Mẫu được cân/đong 1 g hoặc 1 mL và hòa tan trong 9 mL dung dịch NaCl 0,85% vô trùng, lắc đồng nhất 30 phút và ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 10 phút nhằm thu gom sinh khối vi khuẩn. Sinh khối sau đó được rửa một lần bằng dung dịch NaCl nhằm loại bỏ tạp chất còn sót lại trước khi tiến hành bước tách bằng phương pháp CTAB. Phản ứng multiplex PCR tiếp theo được thiết lập trong thể tích tổng cộng 25 μ L gồm 12,5 μ L Master Mix 2X, hỗn hợp mồi sử dụng 0,5 μ L mỗi xuôi và 0,5 μ L mỗi ngược ở nồng độ 10 pmol/ μ L, 0,5 μ L RNase nhằm loại bỏ RNA tạp, 5,0 μ L DNA khuôn với nồng độ tương đương 10 – 50 ng và nước tinh khiết bổ sung. Chu trình nhiệt được tối ưu gồm: khởi động ở 95 °C trong 5 phút; 30 chu kỳ khuếch đại với các bước biến tính ở 95 °C trong 30 giây, gắn mồi ở 61 °C trong 30 giây, kéo dài ở 72 °C trong 30 giây; kết thúc bằng giai đoạn kéo dài cuối ở 72 °C trong 5 phút. Phản ứng PCR không chứa DNA khuôn được thiết lập đồng thời để làm đối chứng âm.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả hoạt hóa và xác định ba chủng vi khuẩn

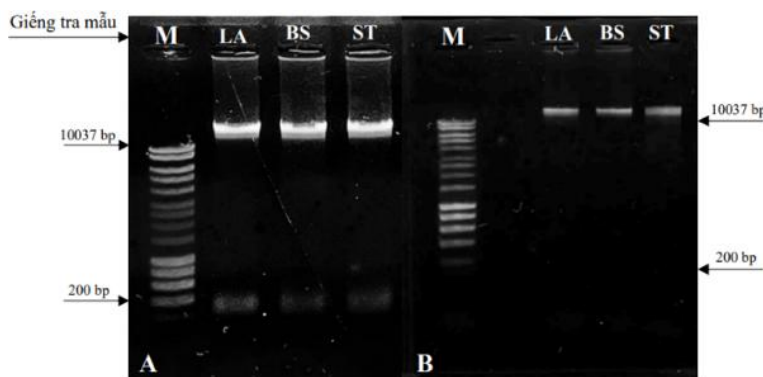
Sau thời gian ủ 72 giờ ở nhiệt độ 37 °C, ba chủng vi khuẩn được hoạt hóa trên các môi trường chọn lọc thích hợp gồm môi trường MRS agar cho vi khuẩn nhóm *Lactobacillus*, M17 agar cho vi khuẩn *Streptococcus* và NA cho vi khuẩn *Bacillus*. Quan sát hình thái khuẩn lạc kết hợp nhuộm Gram, sự khác biệt giữa các chủng, cả về kích thước, hình dạng lẫn đặc điểm hình thái tế bào đại thể và vi thể thể hiện khác biệt (Hình 1). Chủng nghi ngờ là *Lactobacillus acidophilus* hình thành khuẩn lạc tròn, lồi, kích thước trung bình 1,2 $\pm$ 0,1 mm, không sắc tố và bề mặt nhẵn. Kết quả nhuộm Gram cho thấy tế bào dạng que ngắn 0,7 $\times$ 2,0 μ m, Gram dương. Đối với chủng nghi ngờ *Streptococcus thermophilus*, khuẩn lạc có đường kính nhỏ hơn 0,9 $\pm$ 0,05 mm, đục, mép đều, dưới kính hiển vi hình dạng cầu khuẩn Gram dương, xếp thành chuỗi ngắn với đường kính trung bình 0,8 μ m. Ngược lại, chủng nghi ngờ *Bacillus subtilis* hình thành khuẩn lạc lớn 4,3 $\pm$ 0,2 mm, khô, bề mặt nhẵn, mép xù xì; tế bào dạng que lớn 1,0 $\times$ 4,0 μ m, Gram dương và có khả năng sinh bào tử nội bào.



Hình 1. Hình thái đại thể (A1, B1, C1) và vi thể (A2, B2, C2) của ba mẫu vi khuẩn hoạt hóa sau 72 giờ nuôi cấy trên môi trường MRS agar, quan sát dưới kính hiển vi quang học (100 $\times$): A – MST; B – MLA; C – MBS.

3.2. Kết quả khảo sát phương pháp tách chiết DNA

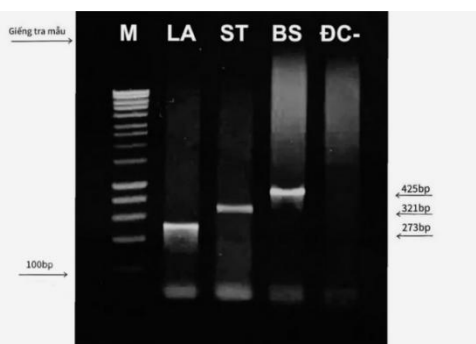
Kết quả DNA tổng số từ ba chủng vi khuẩn từ mẫu MLA, mẫu MST và mẫu MBS được tách chiết bằng hai phương pháp: CTAB – SDS và nhiệt lysis. Kết quả điện di gel agarose cho thấy phương pháp CTAB – SDS tạo ra băng DNA rõ nét, sáng và không bị nhòe, phản ánh DNA có khối lượng phân tử lớn, nguyên vẹn và đạt độ tinh sạch cao. Ngược lại, phương pháp phân giải nhiệt lysis cho băng vạch mờ, khuếch tán và có độ tạp cao hơn, cho thấy DNA bị phân hủy và hiệu suất thu hồi thấp, đặc biệt rõ ở mẫu *S. thermophilus* VTCC 19258. Mặc dù đơn giản, nhanh và không cần nhiều hóa chất, nhưng phương pháp nhiệt lysis không đáp ứng yêu cầu về độ tinh sạch và toàn vẹn DNA trong các ứng dụng như multiplex PCR hay giải trình tự. Như vậy, trong khi CTAB–SDS vẫn là phương pháp tiêu chuẩn cho mục tiêu thu nhận DNA chất lượng cao, phân giải nhiệt nếu được tối ưu hóa có thể trở thành giải pháp hiệu quả, tiết kiệm và phù hợp cho các ứng dụng chẩn đoán nhanh hoặc xét nghiệm nhanh.



Hình 2. Kết quả điện di DNA tổng số của ba chủng vi khuẩn chuẩn được tách chiết bằng phương pháp CTAB–SDS (A) và lysis nhiệt (B). M: thang DNA 1 kb; LA: *Lactobacillus acidophilus* VCIM 5905; BS: *Bacillus subtilis* VCIM 5902; ST: *Streptococcus thermophilus* VTCC 19258.

3.3. Kết quả phản ứng PCR nhận diện gen đặc hiệu của ba chủng lợi khuẩn

Kết quả điện di sản phẩm PCR đơn cho thấy cả ba cặp mồi *slpA*, *lacS* và *sboA* đều khuếch đại thành công các đoạn gen đích với kích thước tương ứng lần lượt ở vạch 273 bp, 351 bp và 425 bp (Hình 3). Các vạch DNA hiện rõ, sắc nét, không có hiện tượng tạo băng vạch phụ, dimer mồi hay khuếch đại không đặc hiệu, chứng tỏ từng cặp mồi có độ đặc hiệu nội loài cao và tương thích tốt với điều kiện phản ứng chuẩn. Đặc biệt, hiện tượng khuếch đại chéo giữa các loài vi khuẩn không mục tiêu không ghi nhận, điều này cho thấy vùng gắn mồi đã được lựa chọn chính xác, loại trừ được các trình tự tương đồng với loài khác. Bên cạnh đó, kích thước sản phẩm chênh lệch đủ lớn, đảm bảo phân tách rõ ràng trong điều kiện multiplex PCR, củng cố tiềm năng ứng dụng của hệ mồi trong phản ứng đa mồi sau này. Tuy nhiên, ở một số mẫu, kết quả vạch sản phẩm PCR xuất hiện vệt nhòe mờ có khả năng do tồn dư các tạp chất như protein hoặc muối trong DNA khuôn. Điều này chưa ảnh hưởng đến kết quả khuếch đại nhưng có thể làm suy giảm độ sắc nét và tính tái lập trong các bước phát triển sau, đặc biệt khi mở rộng sang multiplex PCR có độ nhạy cao.



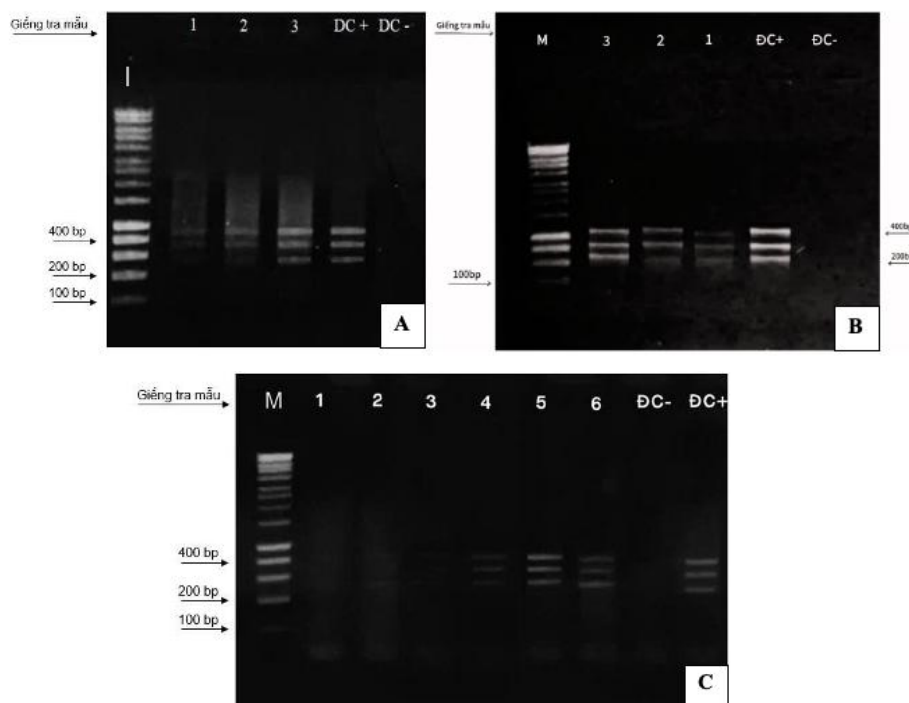
Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR của ba chủng vi khuẩn chuẩn trên gel agarose. M: thang DNA 100 bp; LA: *Lactobacillus acidophilus* VCIM 5905; BS: *Bacillus subtilis* VCIM 5902; ST: *Streptococcus thermophilus* VTCC 19258; ĐC-: đối chứng âm không chứa DNA khuôn.

Sau khi khuếch đại thành công ba đoạn gen mục tiêu bằng phản ứng PCR, sản phẩm được tinh sạch và giải trình tự để xác minh độ đặc hiệu của các cặp mồi. Trình tự thu được được phân tích đối chiếu bằng công cụ BLAST trên cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI). Kết quả cho thấy trình tự gen *slpA* có độ tương đồng 100% với *Lactobacillus acidophilus* chủng ATCC 4356 (mã truy cập NR_104927.1), gen *lacS* trùng khớp 100% với *Streptococcus thermophilus* chủng CNRZ1066 (mã truy cập CP000023.1) và gen *sboA* tương đồng hoàn toàn với *Bacillus subtilis* chủng 168 (mã truy cập AL009126.3). Trình tự so sánh không phát hiện trùng khớp đáng kể với các loài ngoài mục tiêu trong cùng chi trên 100 trình tự BLAST, khẳng định các đoạn khuếch đại có tính đặc hiệu nội loài cao. Kết quả này chứng minh rằng các cặp mồi được thiết kế có độ chính xác và độ đặc hiệu cao, đáp ứng yêu cầu định danh vi sinh vật đến cấp độ loài trong phản ứng multiplex PCR.

3.4. Kết quả khảo sát xây dựng quy trình phát hiện nhanh và đồng thời ba chủng lợi khuẩn bằng phản ứng multiplex PCR

Nồng độ Mg^{2+} đóng vai trò then chốt trong hoạt tính của DNA polymerase trong phản ứng multiplex PCR. Ở nồng độ 25 μM $MgCl_2$, kết quả không có sản phẩm khuếch đại đặc hiệu trên gel agarose cho thấy thiếu hụt cofactor cần thiết cho hoạt động của enzyme *Taq* polymerase. Khi tăng nồng độ $MgCl_2$ lên 75 μM , ba amplicon mục tiêu được khuếch đại rõ ràng, sắc nét, không xuất hiện băng phụ. Tuy nhiên, ở nồng độ 50 μM hiệu quả khuếch đại không được cải thiện thêm; một số mẫu cho thấy hiện tượng băng mờ, không ổn định, khi nồng độ Mg^{2+} quá thấp có thể làm giảm đặc hiệu phản ứng do ổn định các bắt cặp mồi không đặc hiệu (Hình 4A).

Nồng độ dNTPs cũng ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất và sự cân bằng khuếch đại giữa các mục tiêu. Ở mức nồng độ dNTPs 100 μM , chỉ số cường độ băng vạch DNA trung bình giảm khoảng 80% so với điều kiện tối ưu và một hoặc nhiều amplicon không được tạo thành. Khi tăng nồng độ dNTPs lên đến 200 μM , phản ứng diễn ra nhưng không đồng đều với tín hiệu yếu rõ rệt từ gen *lacS*. Ở mức 300 μM , ba đoạn DNA sau khuếch đại đặc hiệu xuất hiện rõ ràng, không có vạch phụ. Điều này cho thấy sự cân bằng tối ưu giữa nguồn nucleotide và hoạt tính enzyme. Mức nồng độ 300 μM này cao hơn so với giá trị thường dùng trong PCR đơn (200 – 250 μM) (Hình 4B).



Hình 4. Kết quả khảo sát tối ưu phản ứng multiplex PCR ở các điều kiện phản ứng khác nhau. Trong đó A: nồng độ $MgCl_2$ (1: 25 μM ; 2: 50 μM ; 3: 75 μM); B: nồng độ dNTPs (1: 100 μM ; 2: 200 μM ; 3: 300 μM); C: nhiệt độ gắn mồi (1: 57 °C; 2: 58 °C; 3: 59 °C; 4: 60 °C; 5: 61 °C; 6: 62 °C); M: thang DNA 100 bp; ĐC-: đối chứng âm; ĐC+: đối chứng dương.

Nhiệt độ gần môi có ảnh hưởng trực tiếp đến độ đặc hiệu của phản ứng. Ở mức dưới từ 58 -60 °C, xuất hiện nhiều băng phụ, cho thấy hiện tượng bất cặp môi không đặc hiệu. Tại 62 °C, hiệu quả khuếch đại, đặc biệt là của gen *slpA*, suy giảm đáng kể, có khả năng do vượt quá nhiệt độ nóng chảy (T_m) của một trong các cặp môi. Nhiệt độ 61 °C được xác định là kết quả tốt nhất cho 3 sản phẩm bất cặp multiplex PCR, cho phép cả ba cặp môi hoạt động đồng thời với độ đặc hiệu và hiệu quả cao, tránh hiện tượng cạnh tranh môi thường gặp trong multiplex PCR (Hình 4C).

3.5. Kết quả đánh giá bộ KIT với một số mẫu chế phẩm probiotics thương mại

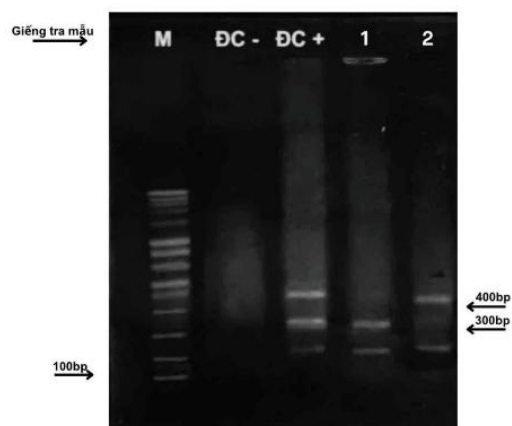
Bảng 1. Kết quả đánh giá bộ KIT multiplex PCR trên một số chế phẩm probiotics thương mại

Tên sản phẩm	Thành phần vi sinh vật công bố trên nhãn	<i>L. acidophilus</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>B. subtilis</i>	Nhóm probiotic khác
Mẫu 1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	+	+	-	-
Mẫu 2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i>	+	-	+	-
Mẫu 3	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus clausii</i>	-	-	+	-
Mẫu 4	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i>	+	-	-	-
Mẫu 5	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	+	-	-	-
Mẫu 6	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bifidobacterium breve</i>	-	-	+	-
Mẫu 7	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bacillus clausii</i>	-	+	-	-
Mẫu 8	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>	+	-	-	-
Mẫu 9	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	+	-	+	-
Mẫu 10	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>	+	+	-	-
Ký tự biểu thị (-) mẫu âm tính; (+) mẫu dương tính.					

Kết quả khuếch đại PCR được thể hiện qua ảnh điện di trên gel agarose cho thấy *L. acidophilus* được phát hiện ở các mẫu 1, 2, 4, 5, 8, 9 và 10; *S. thermophilus* được phát hiện ở các mẫu 1, 7 và 10; *B. subtilis* được phát hiện ở các mẫu 2, 3, 6 và 9. Không có mẫu nào dương tính đồng thời với cả ba gen mục tiêu (*slpA*, *lacS*, *sboA*). Kết quả thu được phù hợp với thành phần vi sinh vật công bố trên nhãn của các mẫu khảo sát khi không có sản phẩm chứa cả ba chủng khảo sát trong cùng một bộ sản phẩm lợi khuẩn thương mại với 10/10 mẫu có phản ứng (Bảng 1). Việc lựa chọn mẫu được thực hiện ngẫu nhiên, dựa trên tiêu chí đa dạng về chủng vi sinh và nguồn gốc thương hiệu và dạng bào chế nhằm đảm bảo tính đại diện tương đối cho các sản phẩm probiotics phổ biến trên thị trường Việt Nam. Hơn thế nữa, bộ kit multiplex PCR được thiết kế hướng đến khả năng ứng dụng thực tế trong kiểm định chất lượng các sản phẩm probiotics thương mại bao gồm các thành phần như enzyme *Taq* polymerase, dNTPs, buffer và các môi đặc hiệu giúp sàng lọc chủng vi sinh vật đầu vào và hỗ trợ nghiên cứu phát triển chế phẩm đa chủng [9]. Với độ đặc hiệu, độ nhạy cao và tính linh hoạt, bộ kit góp phần chuẩn hóa quy trình định danh sơ bộ nhanh vi sinh vật tại các cơ sở sản xuất và phòng kiểm nghiệm [6]. Trong bối cảnh thị trường probiotics tại Việt Nam tăng trưởng hơn 20% mỗi năm, việc ứng dụng công nghệ này có thể giúp cải thiện đáng kể chất lượng giám sát và đảm bảo quyền lợi người tiêu dùng [10].

Mặc dù vậy, để nâng cao độ tin cậy và tính khái quát của kết quả, các nghiên cứu tiếp theo nên mở rộng quy mô khảo sát với số lượng mẫu lớn hơn, bao phủ nhiều phân khúc sản phẩm, bao gồm cả hàng nội địa và nhập khẩu. Đồng thời, cần thiết tiến hành đối chiếu hiệu suất bộ kit với các phương

pháp kiểm định tiêu chuẩn hiện hành nhằm xác lập giá trị ứng dụng thực tiễn một cách khách quan và đầy đủ hơn.



Hình 5. Kết quả phản ứng multiplex PCR trên một số chế phẩm probiotic thương mại. M: thang DNA 100 bp; ĐC-: đối chứng âm; ĐC+: đối chứng dương; 1: mẫu 1; 2: mẫu 2.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng và tối ưu thành công một bộ kit multiplex PCR cho phép phát hiện đồng thời ba chủng lợi khuẩn có giá trị ứng dụng cao gồm *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* và *Bacillus subtilis*. Ba cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa trên các gen đặc trưng (*slpA*, *lacS*, *sboA*) cho sản phẩm khuếch đại rõ ràng với độ đặc hiệu cao, không xuất hiện băng không đặc hiệu hay phản ứng chéo. Các điều kiện phản ứng PCR với 75 μ M $MgCl_2$, 300 μ M dNTPs và nhiệt độ gần môi 61 $^{\circ}C$ được tối ưu nhằm đạt hiệu suất khuếch đại đồng thời tối ưu trong một phản ứng duy nhất, nghiên cứu có ý nghĩa ứng dụng cao trong các lĩnh vực thực phẩm và y sinh. Khi áp dụng trên 10 chế phẩm probiotic thương mại, giới hạn phát hiện (LOD) của bộ kit multiplex PCR với độ nhạy cao đạt 10/10 mẫu phản ứng trong các thử nghiệm thực tế. Bên cạnh đó, các gen mục tiêu được lựa chọn không chỉ có vai trò định danh di truyền mà còn liên quan đến chức năng sinh học đặc trưng của từng chủng, qua đó tăng cường giá trị ứng dụng thực tế của kết quả khuếch đại [11]. Ngoài ra, để nâng cao hiệu quả toàn bộ quy trình, nghiên cứu đề xuất cải tiến phương pháp tách chiết DNA dựa trên nguyên lý nhiệt lysis bằng cách bổ sung RNase nhằm loại bỏ RNA tạp, phương pháp CTAB- SDS tăng hiệu quả phá vỡ màng tế bào và áp dụng bước trung hòa với potassium acetate giảm nhiễu protein và các mảnh tế bào, từ đó giúp thu nhận DNA có độ tinh sạch tốt hơn cho phản ứng PCR, góp phần quan trọng vào độ ổn định và độ tin cậy bộ kit multiplex PCR [12]. Bộ kit multiplex PCR có tiềm năng ứng dụng trong kiểm nghiệm sản phẩm probiotics, đánh giá chủng vi khuẩn đầu vào và nghiên cứu chế phẩm đa chủng, góp phần nâng cao chất lượng trong sản xuất và nghiên cứu vi sinh ứng dụng.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này do Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh bảo trợ và cấp kinh phí theo Hợp đồng số 39/HĐ-DCT ngày 17 tháng 01 năm 2025.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T. L. A. Bùi *et al.*, “Đánh giá độc tính cấp và độc tính bán trường diễn của viên nang cứng probiotic EntVN 500 mg trên động vật thực nghiệm,” *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nhiệt đới*, no. 34, pp. 92–102, 2024, doi: <https://doi.org/10.58334/vrtc.jtst.n34.08>
- [2] C. Hill *et al.*, “The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term ‘probiotic’,” *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, vol. 11, pp. 506–514, 2014, doi: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- [3] K. Kadri, “Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications,” in *Synthetic Biology – New Interdisciplinary Science. IntechOpen*, 2019, doi: <https://doi.org/10.5772/intechopen.86491>

- [4] D. E. Kiousi *et al.*, “Development of a multiplex PCR assay for efficient detection of two potential probiotic strains using whole genome-based primers,” *Microorganisms*, vol. 11, no. 10, Art. no. 2553, 2023, doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102553>
- [5] T. L. Nguyễn *et al.*, “Nghiên cứu và ứng dụng kỹ thuật multiplex PCR trong phát hiện vi khuẩn *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* gây ngộ độc thực phẩm,” *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, vol. 18, no. 1, pp. 23–35, 2019.
- [6] D. Pinzauti *et al.*, “DNA isolation methods for Nanopore sequencing of the *Streptococcus mitis* genome,” *Microbial Genomics*, vol. 8, no. 2, Art. no. 000764, 2022, doi: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000764>
- [7] M. A. de M. Marques *et al.*, “Evaluation of six commercial DNA extraction kits for recovery of *Burkholderia pseudomallei* DNA,” *Journal of Microbiological Methods*, vol. 91, no. 3, pp. 487–489, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.09.019>
- [8] K. Wilson, “Preparation of genomic DNA from bacteria,” *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 56, no. 1, unit 2.4, 2001, doi: <http://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56>
- [9] Q. K. Hoàng and T. L. T. Phạm, “Phân lập, định danh và xác định các chủng *Lactobacillus* có tiềm năng probiotic từ con người,” *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, vol. 14, no. K6, pp. 62–76, 2011, doi: <https://doi.org/10.15625/0866-7160/V36N1SE.4361>
- [10] T. B. T. Võ *et al.*, “Thiết kế và tối ưu hóa phản ứng multiplex PCR để phát hiện và định danh kiểu gen virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi ở Việt Nam,” *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 228, no. 09, pp. 3–10, 2023, doi: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7456>
- [11] T. M. T. Trần, “Đặc điểm chủng vi khuẩn lactic dùng trong chế phẩm probiotic phòng và trị bệnh đường ruột cho heo,” *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Trà Vinh*, no. 40, pp. 189–197, 2020, doi: <https://doi.org/10.35382/18594816.1.40.2020.631>
- [12] I. You and E. B. Kim, “Genome-based species-specific primers for rapid identification of six species of *Lactobacillus acidophilus* group using multiplex PCR,” *PLoS ONE*, vol. 15, no. 3, Art. no. e0230550, 2020, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230550>

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX PCR KIT FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF THREE BACTERIA *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* AND *Bacillus subtilis* FOR PROBIOTIC PRODUCTS

Nguyễn Thanh Luân*, Nguyễn Thị Ngọc, Nguyễn Hồ Thiên Thảo,
Trần Lê Như Quỳnh, Nguyễn Hoàng Giang, Nguyễn Thị Ngọc Cham
Ho Chi Minh City University of Industry and Trade

*Email: luannt@huit.edu.vn

Probiotic microorganisms have been increasingly applied in the medical and food industries due to their health benefits. This study aimed to construct and optimize a multiplex PCR kit for identifying simultaneously three probiotic strains *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* and *Bacillus subtilis*. By using three specific primers *slpA*, *lacS* and *sboA* respectively, the multiplex PCR had been designed and integrated for the single reaction. Based on these findings, a multiplex PCR kit was amplified DNA products respectively the three bacteria strains without cross-reactivity. The optimal PCR condition including 75 μ M MgCl₂, 300 μ M dNTPs and priming temperature in 61 °C was explored and designed. This multiplex PCR kit had been applied in 10 commercial probiotic products with limit of detection (LOD) in demonstrating high sensitivity at 10/10 samples of practical test. This method indicated a high sensitivity, specificity and applicability. It also offered an effective tool for quality control and verification of probiotic components in commercial products.

Keywords: Probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus subtilis*, multiplex PCR KIT.