

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4780—2017

出口食品腐败酵母菌 实时荧光 PCR 检测方法

Detection of spoilage yeasts in food for export—Real-time PCR method

2017-05-12 发布

2017-12-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国北京出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：付溥博、郭铮蕾、韩玥、徐姗、饶红、王传现、刘夏、李晓虹。

出口食品腐败酵母菌 实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了出口食品中鲁氏结合酵母菌(*Zygosaccharomyces rouxii*)、酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)和酒香酵母菌(*Brettanomyces spp.*)的实时荧光 PCR 检测方法。

本标准适用于出口食品中鲁氏结合酵母菌、酿酒酵母菌和酒香酵母菌的实时荧光 PCR 检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 4789.15 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

腐败酵母菌 Spoilage yeasts

腐败酵母菌是指在食品中生长而引起食品腐败变质的一类酵母菌。腐败酵母菌会分解食品的糖、胶质、淀粉和脂肪,产生二氧化碳、硫化物,或引起食物酸化,从而导致食品腐败。鲁氏结合酵母菌、酿酒酵母菌和酒香酵母菌均为重要的导致食品腐败的酵母菌。

3.2

鲁氏结合酵母菌 *Zygosaccharomyces rouxii*

鲁氏结合酵母菌(*Zygosaccharomyces rouxii*)属于掷孢酵母科,鲁氏结合酵母属。鲁氏结合酵母菌在麦芽汁琼脂上菌落呈奶油色,稍有光泽,质地软而平滑,卵形或球形。

注:鲁氏结合酵母菌是最常见的嗜高渗透压酵母菌。既是主要传统发酵食品的生产菌,又是引起某些低水分活度食品及原料的腐败菌。如:鲁氏结合酵母菌是生产酱油、日本味噌和泰国发酵鱼制品等发酵制品的重要菌种。在果汁、果酱、软饮料、沙拉酱和调味番茄酱等中则是腐败菌。

3.3

酿酒酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae*

酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)属于酵母菌科,酿酒酵母菌属。单细胞,卵圆形或球形,具细胞壁、细胞质膜、细胞核、液泡、线粒体。细胞大小为 $2.5\ \mu\text{m}\sim 10\ \mu\text{m}\times 4.5\ \mu\text{m}\sim 21\ \mu\text{m}$ 。酿酒酵母菌在孟加拉红培养基上光滑、湿润,呈红色、粉红或白色蜡样菌落,常带黏性。酿酒酵母菌又称面包酵母或者出芽酵母,常常存在于蔬果汁饮料中,从而引起饮料的腐败。

3.4

酒香酵母菌 *Brettanomyces spp.*

酒香酵母菌(*Brettanomyces spp.*)属于隐球酵母菌科,酒香酵母菌属。酒香酵母菌的菌落特征为乳白色、圆形、中央凸起、边缘扁平、表面湿润光泽、粘稠易挑起,有轻微的酱香味,主要以出芽方式繁殖。

注:酒香酵母菌属中的布鲁塞尔酒香酵母菌(*Brettanomyces bruxellensis*)会引葡萄酒风味劣变。在酿造葡萄酒过程中,酒香酵母菌在酒体中产生的4-乙基苯酚(4-Ethylphenol, 4-EP)和4-乙基愈创木酚(4-Ethylguaiacol, 4-EG),能产生一种典型的“马厩味”不良风味。在低浓度时,这些物质可以对葡萄酒的香气产生有利的影响,增加许多特别的风味,但浓度一旦变高,就会产生不愉快的气味,降低葡萄酒的香气和口感,影响葡萄酒的经济价值。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PCR:聚合酶链式反应(polymerase chainreaction)

Ct 值:循环阈值(Cycle threshold)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

FAM:6-羧基荧光素(6-carboxy-fluorescein)

TAMRA:6-羧基四甲基罗丹明(Tetramethylrhodamin)

BHQ:黑洞淬灭基团(Black Hole Quencher)

MGB:小沟结合物探针(Minor Groove Binder)

5 生物安全要求及防污染措施

5.1 检测工作中的个人防护按照 GB 19489。

5.2 使用过的实验用品应遵照 GB 19489 对废弃物的处理要求进行无害化处理。

5.3 检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 27403 执行。

6 仪器和设备

6.1 荧光定量 PCR 仪。

6.2 高速台式离心机:最高离心力不低于 $15\ 000\times g$ 。

6.3 生物安全柜或超净工作台。

6.4 冰箱(冷藏室 $4\ ^\circ\text{C}$ 、冷冻室 $-20\ ^\circ\text{C}$ 和超低温冰箱 $-70\ ^\circ\text{C}$)。

6.5 恒温培养箱。

6.6 涡旋振荡器。

6.7 紫外灭菌灯。

6.8 高压灭菌锅。

6.9 接种环。

6.10 移液器及对应吸头: $10\ \mu\text{L}$ 、 $100\ \mu\text{L}$ 、 $200\ \mu\text{L}$ 、 $1\ 000\ \mu\text{L}$ 。

6.11 PCR 反应管。

7 试剂

除另有规定外,试剂为分析纯或生化试剂。实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。所有试

剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

7.1 麦芽浸膏琼脂(MEA):参见附录 A 中 A.1。

7.2 山梨醇缓冲液:参见 A.2。

7.3 破细胞壁酶:溶细胞酶(Lyticase)。

7.4 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB):参见 A.3。

7.5 Tris 饱和酚。

7.6 三氯甲烷。

7.7 异戊醇。

7.8 抽提液:Tris 饱和酚:三氯甲烷:异戊醇比例为 25:24:1。

7.9 乙酸钠。

7.10 异丙醇。

7.11 70% 乙醇。

7.12 酵母基因组提取试剂盒。

7.13 实时荧光 PCR 反应预混液。

7.14 灭菌双蒸水。

7.15 引物探针:实时荧光 PCR 扩增引物及探针信息见表 1。其相应的目的基因片段参见附录 B。

7.16 阳性对照菌株:鲁氏结合酵母菌 ATCC 34890、酿酒酵母菌 ATCC 9763 和酒香酵母菌 ATCC 34447,或相应等效菌株。

7.17 阴性对照菌:非目标菌的其他酵母菌标准菌株。

表 1 实时荧光 PCR 扩增引物及探针序列

酵母菌名称	引物或探针名称	序列(5'-3')
鲁氏结合酵母菌	ZRF1	CCA CGA TAG TCG TAT TAG G
	ZRR1	TGA GGT CAA ACT TTG AGA A
	ZRP1	FAM-CCA GAC GCT GCC TGC TTC TA-TAMERA
酿酒酵母	SCF1	GGA CTC TGG ACA TGC AAG AT
	SCR1	ATA CCC TTC TTA ACA CCT GGC
	SCP1	FAM-CCC TTC AGA GCG TTT TCT CTA AAT TGA TAC-BHQ1
酒香酵母	BBF1	TGT CAG AGA CAT CAA GGA GAA GCT
	BBR1	CGT CTG CAT TTC CTG GTC AA
	BBP1	FAM-TGT TAC GTT GCT TTG GAC-MGB

8 检测步骤

8.1 DNA 的提取

8.1.1 待检测菌悬液的制备

取按 GB 4789.15 方法得到的待检测酵母菌单菌落,置于 50 μ L 无菌水中,制成 1.0~2.0 麦式浊度(MCF)的菌悬液。

8.1.2 CTAB 法提取

8.1.2.1 酵母细胞破壁:收集的菌体沉淀中加入 600 μ L 山梨醇缓冲液,加入 50 U 溶细胞酶(Lyticase),

涡旋振荡器上震荡充分混匀,30℃处理30 min。4 000 ×g 离心10 min,弃上清,保留沉淀。

8.1.2.2 破壁后细胞沉淀加700 μL 20 g/L CTAB 裂解液,涡旋振荡器上震荡充分混匀,置于65℃水浴中0.5 h~2 h。

8.1.2.3 抽提液抽提:冷却至室温后,加入400 μL 抽提液,颠倒混匀,12 000 ×g 离心8 min,转移上清至新离心管中,弃沉淀。如果水相和有机相之间有白色沉淀物,则重新抽提有机相,合并水相,将上清至新离心管中。

8.1.2.4 乙酸钠调节:向上清液中加入1/10 体积的3 mol/L pH 5.2 的乙酸钠,用手指轻弹管壁,混匀。

8.1.2.5 异丙醇沉淀:加入等体积的异丙醇轻轻颠倒混匀,置于-20℃冰箱中,放置40 min。

8.1.2.6 70%乙醇洗涤:12 000 ×g 离心8 min,弃上清,保留沉淀。加入600 μL 70% 乙醇轻轻颠倒几次后离心1 min,弃上清,用干净的吸水纸吸干净残留液。

8.1.2.7 干燥:将离心管静置至干燥。

8.1.2.8 定容与含量测定:干燥后的离心管底部加入50 μL TE,置于65℃水浴中40 min,室温下测定DNA 含量。纯化后的DNA 溶液稀释成30 ng/μL~100 ng/μL,作为PCR 工作液浓度,4℃保存。

8.1.3 商品化试剂盒提取

根据不同提取原理的基因组提取试剂盒,按照操作说明书进行操作。

8.2 实时荧光 PCR 扩增

配制20 μL 实时荧光 PCR 反应体系,组成如下:含10 μL 2×TaqMan Universal Master Mix,目标菌上下游引物(10 μmol/L)各0.8 μL,探针(10 μmol/L)0.8 μL,模板(3.0 ng/μL)2 μL,灭菌双蒸水5.6 μL。

实时荧光 PCR 反应参数为:

鲁氏结合酵母菌的参数设置:50℃,2 min;95℃,10 min;94℃,15 s,60℃,60 s,40 个循环。

酿酒酵母菌和酒香酵母菌的参数设置:50℃,2 min;95℃,10 min;95℃,15 s,60℃,60 s,40 个循环。

9 反应体系中对照的设置与基线调整

检测过程中要设阳性对照、阴性对照和空白对照。目标酵母菌 DNA 模板作为阳性对照,非目标酵母菌作为阴性对照,用配制反应体系的超纯水设置空白对照。

基线调整取6个~15个循环的荧光信号,阈值设定原则以阈值线刚好超过阴性对照的检测荧光曲线的最高点,也可根据仪器噪声情况调整,以超过3个~15个循环左右的荧光信号值标准偏差10倍为参考。

10 结果判定

10.1 质量控制

基本原则:在对结果进行最终判读前,应首先检查阴性和阳性对照结果。为保证试验有效,结果应符合以下要求,有一项不符合者,应重新做实时荧光 PCR 扩增。

空白对照:无扩增曲线或者 Ct 值大于或等于40。

阴性对照:无扩增曲线或者 Ct 值大于或等于40。

阳性对照:出现典型扩增曲线且 Ct 值小于或等于35。

10.2 结果判断

待检样品检测 Ct 值小于或等于 35.0,对照结果正常,则可判定为该样品目标酵母菌检出。

待检样品检测 Ct 值在 35.0 和 40.0 之间时,重复一次,如果 Ct 值仍小于 40.0,且扩增曲线有明显的指数增长特性,对照结果正常,可报告该样品目标酵母菌检出。否则报告该样品目标酵母菌未检出。

待检样品检测不到 Ct 值,对照结果正常者报告该样品目标酵母菌未检出。

附 录 B

(资料性附录)

目标酵母菌实时荧光 PCR 扩增的 DNA 序列

B.1 鲁氏结合酵母菌实时荧光 PCR 扩增 5.8SrDNA—ITS 基因序列(accession No. KJ507666)

CCACGATAGTCGTATTAGGTTTTACCGACTCGGCGAAAGTGAAGAGGTTTGCTTTTT
AAAAGAAGCAGGCAGCGTCTGGCTTGACAAAATTCTCAAAGTTTGACCTCA

B.2 酿酒酵母菌实时荧光 PCR 扩增 第 16 条染色体基因序列(accession No. CP008251)

ATACCTTCTTAACACCTGGCAAATTACCTTCAGAGCGTTTTCTCTAAATTGATACC
TACACAACCTAAAATCACTTAGAACAAATCTTGCATGTCCAGAGTCC

B.3 酒香酵母菌实时荧光 PCR 扩增 Actin 基因序列(accession No. AJ508461)

TGTCAGAGACATCAAGGAGAAGCTTTGTTACGTTGCTTTGGACTTTGACCAGGAAAT
GCAGACG
