

T/SSFS

上海市食品学会团体标准

T/SSFS XXXX—2024

食品中马克斯克鲁维酵母的定性检验 PCR 法

Qualitative determination of —*Kluyveromyces marxianus*
PCR method for food

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

上海市食品学会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 仪器和设备	1
5 试剂和材料	2
6 检验原则及程序	3
7 操作步骤	3
8 结果判断与表述	4
9 检出限	4
附录 A（资料性） 马克斯克鲁维酵母 PCR 检测方法所用试剂配制	5
附录 B（资料性） 马克斯克鲁维酵母 PCR 检测方法参照表	6
附录 C（资料性） 马克斯克鲁维酵母的 PCR 图	7

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由上海市食品学会提出并归口。

本文件由上海市食品学会发布。

本文件起草单位：光明乳业股份有限公司。

本文件主要起草人：

本文件首批承诺执行单位：。

食品中马克斯克鲁维酵母的定性检验 PCR 法

1 范围

本文件规定了食品中马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) 的定性检验方法 (PCR法)。本文件适用于含马克斯克鲁维酵母的发酵乳、饮料、干酪、乳粉及发酵剂等产品中马克斯克鲁维酵母的定性检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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 4789.35 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验
GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

马克斯克鲁维酵母 *Kluyveromyces marxianus*

属于子囊菌门、酵母菌亚门、酵母纲、酵母目、酵母科、克鲁维属。菌体呈椭圆形、卵形或结肠形,好氧或兼性厌氧的异养型单细胞真核生物。

3.2

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction, PCR

模板DNA先经高温变性成为单链,在DNA聚合酶作用和适宜的反应条件下,根据模板序列设计的两条引物分别与模板DNA两条链上相应的一段互补序列发生退火而相互结合,接着在DNA聚合酶的作用下以四种脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)为底物,使退火引物得以延伸,然后不断重复变性、退火和延伸这一循环,使位于两段已知序列之间的DNA片段呈几何倍数。

3.3

缩略词

DNA: 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)。

PCR: 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction)。

Taq酶: 从水生栖热菌 *Thermus Aquaticus*中分离出的具有热稳定性的DNA聚合酶。

dNTP: 脱氧核糖核苷三磷酸 (deoxy-ribonucleoside triphosphate)。

bp: 碱基对 (base pair)。

ITS: 内部转录间隔区 (internal transcribed spacer)。

4 仪器和设备

除微生物实验常规灭菌及培养设备外,其他设备和材料如下:

- 4.1 电子天平：感量：0.001 g。
- 4.2 PCR 扩增仪。
- 4.3 高速台式冷冻离心机：0~20 000 r/min。
- 4.4 紫外凝胶成像仪。
- 4.5 电泳装置：包括电泳槽及电泳仪。
- 4.6 微量可调移液器及相应可调吸头。
- 4.7 恒温水浴锅：37℃ ± 2℃和70℃ ± 2℃。
- 4.8 微波炉。
- 4.9 超净工作台。
- 4.10 高压灭菌锅。
- 4.11 涡旋振荡仪。
- 4.12 冰箱：2℃~8℃、-30℃~-20℃。

5 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯或符合生化试剂，实验用水为GB/T 6682规定的一级水，试剂如不做特别说明的均为常温保存。

- 5.1 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液：见附录 A.1.1。
- 5.2 1.2 mol/L 山梨醇缓冲液：见附录 A.1.2。
- 5.3 20%柠檬酸三钠溶液：见附录 A.1.3。
- 5.4 1 mol/L 氢氧化钠溶液：见附录 A.1.4。
- 5.5 1×TAE 缓冲液：见附录 A.1.5。
- 5.6 无菌超纯水或无菌双蒸水。
- 5.7 PCR 混合试剂：包括 ExTaq DNA 聚合酶、dNTPs 混合液、10×PCR 缓冲液（含 Mg²⁺）、引物，于-20℃保存。
- 5.8 DNA 分子量标记物（Marker DL2000），于4℃保存。
- 5.9 电泳上样缓冲液，于4℃保存。
- 5.10 商品化的酶法破壁酵母基因组 DNA 提取试剂盒（内含缓冲液 GA 及 GB，蛋白酶 K，漂洗液 GD 及 PW，洗脱液 TE）。
- 5.11 溶壁酶（10 U/μL），于-20℃保存。
- 5.12 无水乙醇。
- 5.13 1%琼脂糖凝胶：见附录 A.1.6。
- 5.14 4S Green 染料，于4℃保存。
- 5.15 无菌离心管：包括 1.5 mL、2.0 mL、15.0 mL。
- 5.16 无菌 PCR 反应管。
- 5.17 乳酸克鲁维酵母 CICC 32402^T 菌株或其他等效参考菌株。
- 5.18 马克斯克鲁维酵母 CGMCC 10060 菌株或其他等效参考菌株。

6 检验原则及程序

采用马克斯克鲁维酵母的特异性引物对不同样品DNA进行PCR扩增，从而从种水平定性检验马克斯克鲁维酵母。

对不同样品进行前处理后，提取待检测样本的基因组DNA，并对ITS目标序列进行扩增，将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。对马克斯克鲁维酵母检验程序见图1。

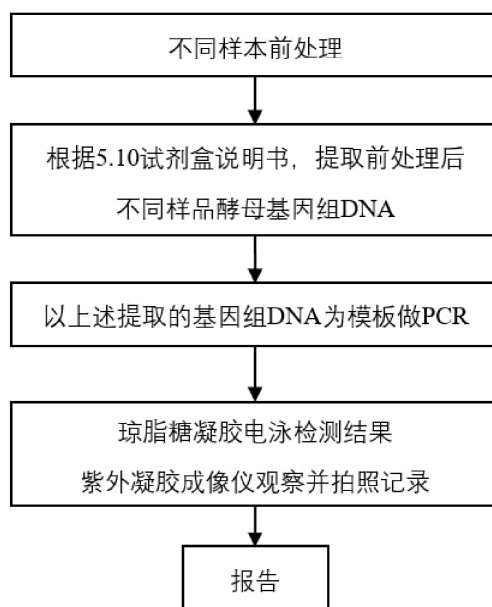


图1 不同样品中马克斯克鲁维酵母检验程序

7 操作步骤

7.1 样品前处理

按照GB 4789.35中6.1规定的方法将待测样品制备成1: 10的样品匀液。

7.1.1 发酵乳及饮料前处理

采用移液器以无菌操作吸取发酵乳及饮料匀液5 mL至无菌离心管中，加入1 mL 20%的柠檬酸三钠及50 μ L 1 mol/L 的氢氧化钠。充分振荡反复吹打保证混合均匀，静置10 min。4 $^{\circ}$ C、9000 r/min离心10 min，将上清吸除干净后留取沉淀物备用。

7.1.2 发酵剂及乳粉前处理

采用移液器以无菌操作吸取发酵剂及乳粉匀液 500 μ L 至离心管中，添加 100 μ L 20%的柠檬酸三钠及 50 μ L 1 mol/L 的氢氧化钠。充分振荡反复吹打混合混匀，静置 10 min。4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 10 min，将上清吸除干净后留取沉淀物备用。

7.1.3 干酪前处理

采用移液器以无菌操作吸取干酪匀液 1 mL 至离心管中，添加 200 μ L 20%的柠檬酸三钠及 100 μ L 1 mol/L 的氢氧化钠。充分振荡反复吹打混合混匀，静置 10 min。4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 离心 10 min，将上清吸除干净后沉淀留取备用。

7.2 酵母基因组 DNA 提取

7.2.1 在上述沉淀中加入 600 μ L 由 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液配置的山梨醇 buffer，约 100 U 溶壁酶，充分混匀。30 $^{\circ}$ C 处理 1 h。4000 r/min 离心 10 min，弃上清收集沉淀。

7.2.2 加入 200 μL 缓冲液 GA 重悬沉淀，加入 20 μL Proteinase K 溶液充分混匀，加入 220 μL 缓冲液 GB，充分颠倒混匀，70 $^{\circ}\text{C}$ 放置 20 min。

7.2.3 加 220 μL 无水乙醇，充分颠倒混匀。转移至吸附柱中，12 000 r/min 离心 30 s。加入漂洗液洗涤两次。

7.2.4 选取 50 μL 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热后的洗脱液洗脱两次。或采用具有相同效果的酶法破壁基因组 DNA 提取方法进行 DNA 提取。

7.3 PCR 反应

7.3.1 PCR 反应体系：采用针对马克斯克鲁维酵母设计的特异性引物(附录 B 中表 B.1)进行 PCR 扩增。

7.3.2 PCR 反应程序：PCR 反应体系和参数见附录 B 中表 B.2 和 B.3。反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同反应总体积进行适当调整。

7.3.3 PCR 质量控制

每个 PCR 反应均应设置三个平行试验，同时应设置空白对照、阳性对照及阴性对照：

阳性对照：马克斯克鲁维酵母 CGMCC 10060 菌株或等效参考菌株 DNA 为模板。

阴性对照：乳酸克鲁维酵母 CICC 32402T 菌株或等效参考菌株 DNA 为模板。

空白对照：无菌双蒸水为模板。

阳性对照及阴性对照菌株选用生长至对数期的菌株，DNA 提取流程同 7.2。

7.4 PCR 结果验证

7.4.1 使用 1 \times TAE 缓冲液配置 2% 琼脂糖凝胶并添加 1% 4S Green 染料。放于电泳槽中。

7.4.2 将 1 \times TAE 缓冲液倒入电泳槽中完全没过胶。

7.4.3 吸取 5 μL PCR 扩增产物与 1 μL 电泳上样缓冲液，混匀后在凝胶孔中点样。

7.4.4 在点样孔中加入 5 μL DL2000 Marker。

7.4.5 恒压 120V 电泳 20 min~30 min。

8 结果判断与表述

8.1 结果判断

PCR 结果需同时满足下述条件才可被视为有效：

(1) 三份平行结果一致（均出现或未出现预期大小的扩增条带）；

(2) 空白及阴性对照未扩增到条带；

(3) 阳性对照出现目的片段。

若上述条件有一项不符合者，结果无效。

8.2 结果表述

根据上述片段琼脂糖凝胶电泳的有效结果，若三份平行样本均可扩增得到与阳性对照位置一致的片段，则认为在该样品中可检出马克斯克鲁维酵母菌；若三份平行样本未扩增得到与阳性对照位置一致的片段，则认为在该检样单位中未检出马克斯克鲁维酵母。

检测结果表述为：检样单位中检出或未检出马克斯克鲁维酵母。

9 检出限

本文件适用的检出限为：发酵乳及饮料： 2×10^2 CFU/g；发酵剂及乳粉： 2×10^3 CFU/g；干酪： 1×10^3 CFU/g。

附录 A

(资料性)

马克斯克鲁维酵母 PCR 检测方法所用试剂配制

A.1 培养基及试剂

A.1.1 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液

A.1.1.1 成分

0.1 mol/L 磷酸氢二钠溶液 14.2 g/L

0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液 15.6 g/L

A.1.1.2 制法

77.4 mL 0.1 mol/L 磷酸氢二钠加入 22.6 mL 0.1 mol/L 磷酸二氢钠，混匀备用。

A.1.2 1.2 mol/L 山梨醇缓冲液

称取山梨醇 218.60 g，溶解于 1000 mL 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液（pH 7.4），混匀备用。

A.1.3 20% 柠檬酸三钠

20% 柠檬酸三钠溶液：称取柠檬酸三钠 20.0 g，溶解于 100 mL 蒸馏水，混匀备用。

A.1.4 1 mol/L 氢氧化钠溶液

称取氢氧化钠 4 g，溶解于 100 mL 蒸馏水，混匀备用。

A.1.5 1×TAE 缓冲液

取 50×TAE 缓冲液 20 mL，加入 980 mL 蒸馏水，混匀备用。

A.1.6 1% 琼脂糖凝胶

称取琼脂糖 0.5 g 于 50 mL 1×TAE 缓冲液中，用微波炉加热至琼脂糖完全溶解。带溶液冷却至 60℃ 左右时，加入 1% 4S Green 核酸染料，轻轻摇匀后倒入制胶模具，备用。

附录 B

(资料性)

马克斯克鲁维酵母 PCR 检测方法参照表

B.1 马克斯克鲁维酵母 PCR 检测方法的各参照表信息参见表 B.1、B.2、B.3。

表B.1 马克斯克鲁维酵母 PCR 检测的引物信息

引物名称	引物序列	扩增长度/bp
正向引物 KM-F	5' -CTG GGG GAA TCG TCT GAA CAA G-3'	545
反向引物 KM-R	5' -CTA TGA GTC TCT ATG ACC CAA GC-3'	

表B.2 马克斯克鲁维酵母 PCR 检测的反应体系

试剂	终浓度	加入体积/ μL
10 \times PCR 缓冲液 (含 Mg^{2+})	1 \times	5
2.5 mmol/L dNTPs	0.2 mmol/L	4
Ex Taq DNA 聚合酶	0.05 U/ μL	0.5
10 $\mu\text{mol/L}$ 正向引物	0.4 $\mu\text{mol/L}$	2
10 $\mu\text{mol/L}$ 反向引物	0.4 $\mu\text{mol/L}$	2
DNA 模板	-	4.0~8.0
ddH ₂ O	-	28.5~32.5
总体积	-	50

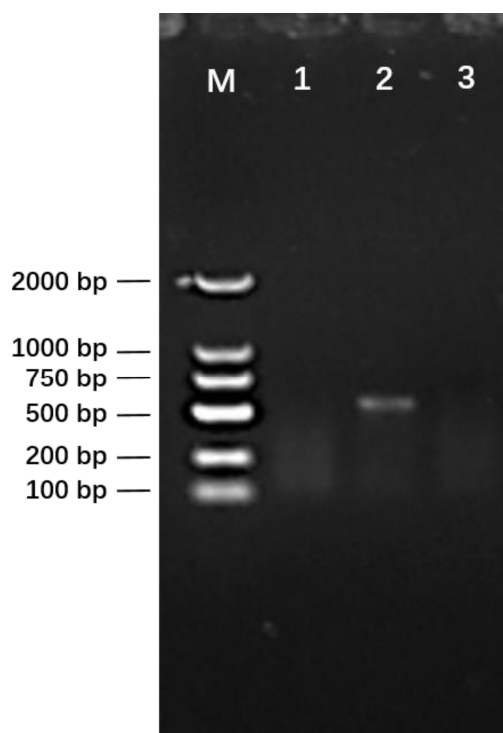
注：反应体系中各试剂的量可根据反应的总体积进行适当调整。

表B.3 马克斯克鲁维酵母 PCR 检测的反应参数

预变形	扩增	循环数	后延伸
95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min	95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 45 s	40	72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min

注：PCR 反应参数可根据 PCR 扩增仪型号进行适当调整。

附录 C
(资料性)
马克斯克鲁维酵母的 PCR 图



^a 注：M—DL2000 Marker；1—空白对照；2—阳性对照（545 bp）；3—阴性对照。

图C.1 马克斯克鲁维酵母的 PCR 图