

ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

QB

中华人民共和国轻工行业标准

XX/T XXXXX—XXXX

食品用乳酸菌鉴定技术指南

Guide for identification of Lactic acid bacteria in food

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

征求意见稿

(本稿完成日期:)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中华人民共和国工业和信息化部

发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009的规则起草。

本标准由中国轻工业联合会提出。

本标准由全国食品发酵标准化中心归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

引 言

乳酸菌是一类可发酵糖主要产生大量乳酸的细菌的通称，是益生菌中最具代表性的菌属，益生乳酸菌能够促进机体内菌群平衡或者预防生态失调、缓解乳糖不耐症等作用。

联合国粮农组织（Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO）和世界卫生组织（World Health Organization, WHO）2002年发布了《食品中益生菌评价指南》（Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food），指南中认为确定益生菌的种和属很有必要，菌种鉴定对确定菌种特定的健康功能和流行病学监测与研究具有重要意义，DNA-DNA杂交是确定菌株种属的参考方法，但该方法需要保藏大量参考菌株，许多实验室不具备这样的条件，因此建议用DNA序列编码16s rRNA的方法代替杂交试验，并建议综合运用基因分型试验和表型试验。

国际乳品协会（International Dairy Federation, IDF）2012年发布455号公告《发酵食品中微生物菌种安全性论证》（Safty Demonstration of Microbial Food Culture (MFC) in Fermented Food Products），公布了食品用微生物菌种，其中包括细菌195种，在确定细菌分类学地位时，建议采用多相鉴定的方法，即当菌株和模式菌种在表型和/或基因型具有高度的相似性时，被归为同一种。

2010年原卫生部办公厅印发了可用于食品的菌种名单，包括双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）、乳杆菌属（*Lactobacillus*）和链球菌属（*Streptococcus*）等三个属，本指南根据国际相关组织公布的技术文件中乳酸菌鉴定的指导原则，建立可用于食品的双歧杆菌属、乳杆菌属和链球菌属等乳酸菌菌种鉴定一般原则和程序。

食品用乳酸菌鉴定技术指南

1 范围

本标准规定了可用于食品的双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 和嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 等乳酸菌鉴定程序的一般要求。

本标准适用于可用于食品的双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 和嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 等乳酸菌的种水平鉴定。

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，仅所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 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则

GB 4789.34 食品安全国家标准 食品微生物学检验 双歧杆菌的鉴定

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 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

GB/T 19495.3 转基因产品检测 核酸提取纯化方法

SN/T 1941.3 进出口食品中乳酸菌检验方法 第3部分：乳酸杆菌的PCR法

3 术语和定义

SN/T 1941.3 规定的及以下术语和定义适用本文件。

3.1

乳酸菌 lactic acid bacteria

一类可发酵糖主要产生大量乳酸的细菌的通称。本标准中乳酸菌主要为乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 和嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

4.1 PCR: polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应。

4.2 DNA: deoxyribonucleic acid, 脱氧核糖核酸。

4.3 dNTP: deoxy-ribonucleoside triphosphate, 脱氧核糖核苷三磷酸。

4.4 dATP: deoxy-adenosine triphosphate, 脱氧腺苷三磷酸。

- 4.5 dCTP: deoxy-cytidine triphosphate, 脱氧胞苷三磷酸。
- 4.6 dTTP: deoxy-thymidine triphosphate, 脱氧胸苷三磷酸。
- 4.7 dGTP: deoxy-guanosine triphosphate, 脱氧鸟苷三磷酸。
- 4.8 dUTP: deoxy-uridine triphosphate, 脱氧尿苷三磷酸。
- 4.9 bp: base pair, 碱基对。
- 4.10 Taq: thermus aquaticu, 水生栖热菌。
- 4.11 Tris: tris(hydroxymethyl) aminomethane, 三(羟甲基)氨基甲烷。
- 4.12 EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid, 乙二胺四乙酸。
- 4.13 TE: Tris-HCl、EDTA 缓冲液。
- 4.14 16s rRNA: 16S ribosomal ribonucleic acid, 16s 核糖体核糖核酸。
- 4.15 Genbank: 基因银行。
- 4.16 EMBL: The European Molecular Biology Laboratory, 欧洲分子生物学实验室。
- 4.17 DDBJ: DNA Data Bank of Japan, 日本 DNA 数据银行。

5 实验室基本要求和生物安全与质量控制

应符合GB 4789.1的规定

6 方法提要

获得乳酸菌菌种纯培养后,采用表型试验和聚合酶链式反应相结合的方式鉴定,首先通过提取乳酸菌基因组DNA,利用通用引物扩增16s rRNA,将所得的PCR产物进行测序,并将DNA序列与国际已有核酸序列数据库(如Genbank、EMBL、DDBJ等)中已知参考序列进行同源性搜索比对,根据鉴定菌种的种/属信息,利用乳酸菌不同属特异性引物或其他用于种或属水平鉴定的基因引物扩增目标DNA片段,将所得的PCR产物测序后进行序列比对,并根据形态和生理生化验证和确定。生理生化鉴定方法和PCR鉴定方法也可同时进行。

6.1 鉴定程序

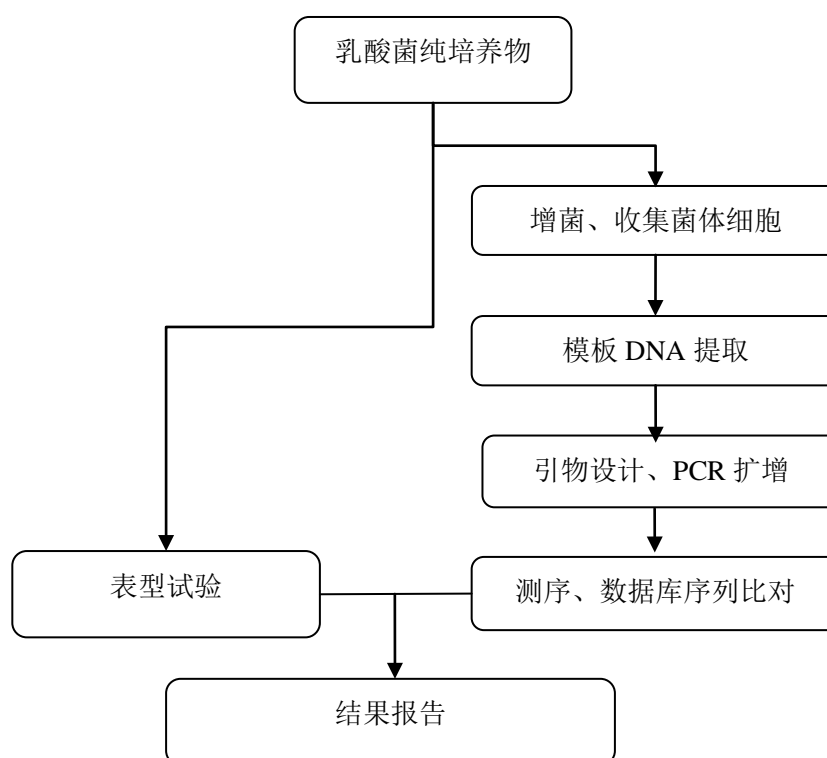


图1 食品用乳酸菌鉴定程序

6.2 表型试验（形态观察及生理生化方法）

双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 鉴定按照GB 4789.34规定的方法执行，乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 和链球菌属 (*Streptococcus*) 鉴定按照GB 4789.35 规定的方法执行。

6.3 PCR 方法

6.3.1 PCR 反应一般要求

6.3.1.1 实验室操作人员应具备良好的分子生物学专业技能，操作熟练。

6.3.1.2 有毒、有害、废弃物质的处理及安全防护应符合 GB/T 19495.2 的要求。

6.3.2 PCR 反应质量控制

每个PCR反应均应设置2个平行实验，应设置空白对照、阳性对照和阴性对照，空白对照的PCR反应体系中使用无菌双蒸水代替DNA模板，阳性对照使用与目标菌种同种的模式菌种或参比菌株的DNA为模板，阴性对照采用不含目标序列的DNA为模板。

6.3.3 引物设计要求

6.3.3.1 用于属、种水平鉴别基因有 16s rRNA 等。

6.3.3.2 用于种、亚种水平的鉴别基因有 16s~23s rRNA 转录间区序列、苯丙氨酰-tRNA 合成酶 α 亚基 (phenylalanyl-tRNA synthase alpha subunit, *pheS*)、RNA 聚合酶 α 亚基 (RNA polymerase alpha subunit, *rpoA*)、翻译延伸因子 Tu (translational elongation factor, *tuf*) 等。

6.3.3.3 设计的引物应和核酸序列数据库（如 Genbank、EMBL、DDBJ 等）中的模式菌株 DNA 序列进行同源性比较分析，评价其是否与近缘菌种具有同源序列。根据鉴定对象和需要，可选择两对以上的引物，并进行同源性比对。

6.3.3.4 设计合理的引物序列，应对其鉴定能力和适用范围进行评价实验，确定其适用性。

6.3.4 模板 DNA 提取

6.3.4.1 DNA 提取方法参见附录 A。

6.3.4.2 DNA 浓度测定按照 GB/T 19495.3 规定的方法执行。

6.3.5 PCR 扩增反应

优化PCR反应条件，特别是热循环条件。

6.3.6 PCR 结果判断

当出现下列情况之一，则PCR鉴定结果无效，应重新进行实验。

- 两份平行测试样品的结果不一致；
- 空白对照或阴性对照出现条带；
- 阳性对照未出现目的片段。

7 结果报告

根据菌株的核酸序列、形态特征观察（镜检）和生理生化实验结果，对照通用的鉴定系统，确定待鉴定菌株的分类地位。菌种名称采用国际命名规则，使用属名和种加词的拉丁词，并附中文译名，有异名时应同时标注。

附录 A
(资料性附录)

双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 和嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)
等乳酸菌的 PCR 鉴定方法

A.1 试剂和材料

除另有规定外,试剂均为分析纯或生化试剂,实验用水为灭菌双蒸水或蒸馏水。

A.1.1 Taq DNA聚合酶。

A.1.2 dNTP: dATP、dTTP、dCTP、dGTP。

A.1.3 质控菌株

大肠杆菌ATCC25922、目标菌种的模式菌株或参考菌株。

A.1.4 琼脂糖。

A.1.5 溴化乙锭或其他可替代的生物染料。

A.1.6 DNA分子量标记(依据目的片段大小选择)。

A.1.7 细菌基因组DNA提取试剂盒。

A.1.8 TE缓冲液: 10mmol/L Tris-HCl(pH=8.0)、1mmol/L EDTA(pH=8.0)。

A.1.9 50×TAE缓冲液: Tris碱242g、冰乙酸57.1mL、0.5mmol/L EDTA(pH=8.0) 100mL,用蒸馏水定容至1000mL,室温保存,使用时稀释至1×。

A.1.10 琼脂糖凝胶(2%, w/v): 称取2.0g琼脂糖于三角瓶中,加入98.0mL 1×TAE缓冲液,加热溶解。

A.1.11 10×PCR缓冲液。

A.1.12 6×loading buffer(上样液)。

A.1.13 无菌PCR反应管。

A.1.14 无菌离心管: 1.5mL、2mL。

A.2 仪器和设备

A.2.1 电子天平: 感量0.001g。

A.2.2 PCR仪。

A.2.3 离心机。

A.2.4 紫外凝胶成像仪。

A.2.5 电泳仪。

A.2.6 微量移液器: 10μL、100μL、200μL、1000μL。

A. 2. 7 恒温水浴锅。

A. 2. 8 超净工作台。

A. 3 操作步骤

A. 3. 1 增菌

双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 按照GB 4789.34规定的方法执行, 获得对数生长期液体培养物, 乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 和链球菌属 (*Streptococcus*) 按照GB 4789.35 规定的方法执行, 获得对数生长期液体培养物。

A. 3. 2 模板DNA提取

无菌条件下, 移取处于对数生长期的含菌液体培养物1.5mL, 8000g 离心2~5min, 小心去除上清液。按照细菌基因组DNA提取试剂盒说明书提取DNA模板, 所提取的模板DNA溶于50 μ L TE缓冲液或无菌双蒸水中, -20 $^{\circ}$ C保存, 备用。

A. 3. 3 引物、PCR反应体系及扩增程序

从表A. 1中选择相应的引物和PCR反应条件, 如果有必要, 可重新筛选新的引物。

表A. 1 引物、PCR 反应体系及扩增程序

目标菌种	靶基因名称	引物序列	扩增片段	PCR反应体系	PCR反应程序
乳杆菌属 双歧杆菌属 链球菌属	16s rRNA	5' -aga gtt tga tcc tgg ctc ag-3' 5' -acg gct acc ttg tta cga ctt-3'	1500bp	10 \times PCR 缓冲液 (Mg ²⁺ Plus) 5 μ L, 模板1 μ L, 引物各0.4 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶1.5 units, dNTPs 0.2mmol/L, 无菌双蒸水补充至50 μ L。	95 $^{\circ}$ C预处理5min、95 $^{\circ}$ C变性1min、55 $^{\circ}$ C退火1min、72 $^{\circ}$ C延伸1min30s, 30个循环后, 72 $^{\circ}$ C延伸10min, 最后冷却到4 $^{\circ}$ C保存。
乳杆菌属	16s rRNA	5'-gga aac ag(a/g) tgc taa tac cg-3' 5'-cac cgc tac aca tgg ag-3'	500bp	10 \times PCR 缓冲液 (Mg ²⁺ Plus) 5 μ L, 模板1 μ L, 引物各0.4 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶1.5 units, dNTPs 0.2mmol/L, 无菌双蒸水补充至50 μ L。	95 $^{\circ}$ C预处理5min、94 $^{\circ}$ C变性1min、51 $^{\circ}$ C~61 $^{\circ}$ C退火1min (每个循环后降低0.5 $^{\circ}$ C, 20个循环); 94 $^{\circ}$ C变性1min、58 $^{\circ}$ C退火1min、72 $^{\circ}$ C延伸2min, 23个循环后, 72 $^{\circ}$ C延伸4min, 最后冷却到4 $^{\circ}$ C保存。
	<i>pheS</i>	5'-cay ccn gch cgy gay atg c-3' 5'-ggr tgr acc atv ccn gch cc-3'	450bp	10 \times PCR 缓冲液 (Mg ²⁺ Plus) 5 μ L, 模板1 μ L, 引物各0.4 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶1.25 units, dNTPs 0.2mmol/L, 无菌双蒸水补充至50 μ L。	95 $^{\circ}$ C预处理5min、95 $^{\circ}$ C变性2min、46 $^{\circ}$ C退火1min45s、72 $^{\circ}$ C延伸1min15s, 执行3个循环后, 95 $^{\circ}$ C变性35s、46 $^{\circ}$ C退火1min45s、72 $^{\circ}$ C延伸1min15s, 30个循环后,

					72℃延伸7min, 最后冷却到4℃保存。
双歧杆菌属	16s rRNA	5'-ataatgcccgcacggcggtgtgtrc -3' 5'-taatagcggccgcagcmgcccggtaatwc -3'	900bp	10×PCR缓冲液(Mg ²⁺ Plus) 5μL, 模板1μL, 引物各0.4μmol/L, Taq DNA聚合酶1.5 units, dNTPs 0.2mmol/L, 无菌双蒸水补充至50μL。	94℃预处理4min、94℃变性1min、45℃退火1min、72℃延伸1min, 执行30个循环后, 72℃延伸4min, 最后冷却到4℃保存。
链球菌属	16s rRNA	5'-ctg gtc tgt aac tga cgc tga g-3' 5'-cca act gaa tga tgg caa cta a-3'	405bp	10×PCR缓冲液 (Mg ²⁺ Plus) 2.5μL, 模板1μL, 引物各0.2μmol/L, Taq DNA聚合酶0.75 units, dNTPs 0.2mmol/L, 无菌双蒸水补充至25μL。	94℃预处理2min、94℃变性30s、61℃退火1min、72℃延伸1min, 执行30个循环后, 72℃延伸10min, 最后冷却到4℃保存。

A. 3.4 PCR扩增产物电泳检验

使用1×TAE缓冲液配制2%琼脂糖凝胶, 加热至沸腾溶解后, 采取电泳前染色法, 当凝胶温度在55℃~60℃时, 微量移液器加入溴化乙锭或其他可替代的生物染料, 使其终浓度达到1μg/mL或工作浓度为1×, 趁热将琼脂糖溶液均匀倒入制胶器, 室温冷却至凝固。在电泳槽中加入1×TAE缓冲液, 使溶液没过胶面, 移取5μL DNA扩增产物与1μL 6×loading buffer(上样液)混合均匀后, 点样, 同时根据目的片段大小, 在点样孔中加入 DNA分子量标记, 5~10v/cm, 恒压, 电泳20~30min。在紫外凝胶成像仪下观察电泳结果, 拍照并记录结果。

A. 3.5 序列测定及比对

将所得PCR产物进行测序, 返回序列后, 将所得序列输入核酸序列数据库, 按照使用说明, 与已知模式菌株或参考菌株序列进行同源性比对, 报告菌种属或种名。