

# CAAPP

## 中国畜产品加工研究会团体标准

T/CAAPP 00011—2021

---

### 食品微生物学检验

### 食品用乳酸菌菌株鉴定方法

Methods of strain-specific identification of lactic acid bacteria used in food

2021 - 11 -18 发布

2021 - 11 -18 实施

---

中国畜产品加工研究会      发布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1 和 GB/T 20001.4 给出的规则起草。

本标准由扬州大学提出。

本标准由中国畜产品加工研究会归口。

本标准起草单位：扬州大学、光明乳业股份有限公司、新希望乳业股份有限公司、澳优乳业（中国）有限公司、瑞茵生物技术（北京）有限公司、上海昊岳食品科技有限公司。

本标准主要起草人员：顾瑞霞、张臣臣、黄玉军、陈大卫、刘振民、汪家琦、李启明、桑建、沈桂奇、陈霞、关成冉。

本标准为首次发布。

使用本标准应征得发布单位同意。

# 食品微生物学检验 食品用乳酸菌菌株鉴定方法

## 1 范围

本标准规定了中国允许应用于食品的乳酸菌（卫办监督发〔2010〕65号及后续补充公告）的菌株鉴定的操作方法和要求。

本标准适用于含活性乳酸菌的食品中乳酸菌的菌株水平的鉴定检验。

## 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。引用文件的最新版本（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 双歧杆菌检验。

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 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检验。

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

### 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*)、链球菌属(*Streptococcus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)和片球菌属(*Pediococcus*)的部分菌种。

### 3.2 菌株 Strain

表示同种微生物不同来源的纯种培养。本标准指达到“遗传型纯”的纯培养微生物谱系。

### 3.3 基因家族 Gene Family

是来源于同一个祖先，由一个基因通过基因重复而产生两个或更多的拷贝而构成的一组基因，它们在结构和功能上具有明显的相似性，编码相似的蛋白质产物。

## 4 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌设备外，其他设备和材料如下：

4.1 乳酸菌培养常规仪器：参照 GB4789.35。

4.2 PCR 仪。

4.3 琼脂糖凝胶电泳系统。

4.4 蓝光透射仪/琼脂糖凝胶成像系统。

## 5 培养基和试剂

5.1 MRS (Man Rogosa Sharpe)培养基：参照 GB4789.35。

5.2 双歧杆菌培养基：参照 GB4789.34。

5.3 M17 培养基：附录 A.1。

5.4 TAE (Tris base-Acetic acid-EDTA)溶液：附录 A.2。

5.5 细菌 DNA 提取试剂盒

5.6 DNA 聚合酶

## 6 鉴定检验程序

乳酸菌菌株鉴定检验程序见图 1。

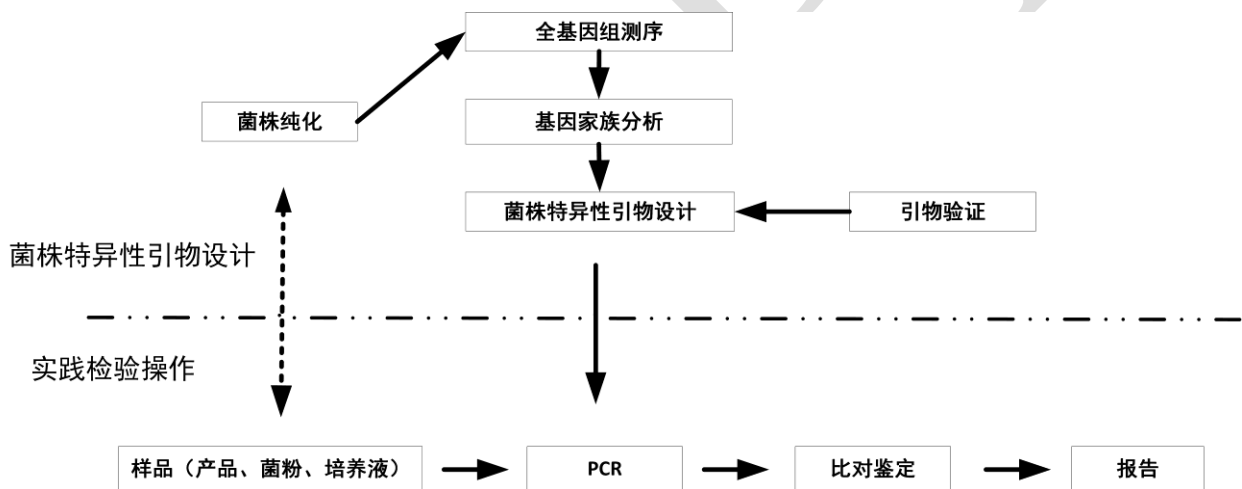


图 1 乳酸菌菌株鉴定检验程序

## 7 操作步骤

### 7.1 菌株特异性引物设计

#### 7.1.1 菌株纯培养

乳杆菌和双歧杆菌的纯培养分别参照GB4789.35和GB4789.34。

嗜热链球菌、乳酸乳球菌、肠膜明串珠菌和片球菌的纯培养需进行以下调整：嗜热链球菌采用M17培养基添加0.5%乳糖，培养温度为 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，培养时间为12-24 h；乳酸乳球菌采用M17培养基添加1%葡萄糖，培养温度为 $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，培养时间为12-24 h；肠膜明串珠菌采用MRS培养基，培养温度为 $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，培养时间为24-48 h；片球菌采用MRS培养基，培养温度为 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，培养时间为12-24 h。

菌株应进行至少3次划线纯化，直至菌落形态和革兰氏染色菌体形态达到均一。

### 7.1.2 DNA 提取

使用试剂盒，按操作说明书流程进行。

### 7.1.3 全基因组测序

7.1.3.1 进行全基因组测序，测序深度应达到 200×。

7.1.3.2 测序结果应进行开放阅读框预测。采用 Glimmer 3.0 软件对全基因组序列进行基因预测。基因预测模型选取自我训练基因预测模型，即提取拼装序列中最长的序列，以该序列作为基因预测模型训练的序列。然后以该序列构建的基因预测模型，对所有序列进行基因预测，设定开放阅读框（Open Reading Frame, ORF）的长度为不短于 110 bp，其余参数为 Glimmer 3.0 的默认设置。

### 7.1.4 菌种确定

基于全基因组数据，与现有测序乳酸菌（《可用于食品的菌种名单》中）构建系统发育树，预测最可能的菌种。具体流程为：采用 Mega 10 对所有序列进行比对，比对使用 ClustalW 1.6 进行序列比对并出去序列比对中的不可靠序列比对位点，接着将序列转换为 Mega 6 能识别的格式。采用 Mega 10 软件包中的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

### 7.1.5 基因家族分析

7.1.5.1 选择同菌种的已测序菌株（基因组数据可从NCBI (National Center for Biotechnology Information) 下载）作为参照（参照基因组不少于3个,已测序同种菌株不足3个可选同一菌种的不同亚种）。

7.1.5.2 首先，下载参考基因组的蛋白质序列，根据蛋白质序列长度进行筛选，去除序列长度低于 50 个氨基酸的序列。将所有待分析的蛋白质序列合并成一个文件，以该数据集为基础构建数据库，同时以该数据集作为查询，进行 all-VS-all blastp 分析，序列比对的阈值设置为1e-10。将序列比对的结果采用 orthomcl (version 2.0.8) 软件进行处理，其中序列比对的长度设置为 70%，采用 MCL 对基因家族进行聚类，聚类所采用的 I (Inflation) 设置为 1.5。最后，采用Perl 脚本对聚类得到的结果进行整理和统计。利用 Venn Painte (1.2.0) 绘制 Venn 图（附录B.1）。

### 7.1.6 引物设计及初检

7.1.6.1 基因家族选择。选取多个基因家族进行下一步引物设计，基因家族尽量分布于染色体DNA的不同位置；尽量选择单字母区域（附录B.1）的基因家族序列进行引物设计；如待测菌株无单字母区域，则应选择与不同参照菌株的双字母区域。

7.1.6.2 引物设计原则。（1）设计4个以上特异性引物对；（2）至少引物对的一条在特有基因家族序列内，另一条可在特有基因家族序列内，也可在其相邻区域；（3）预期扩增大小介于500-2000 bp之间；（4）引物长度介于18-25 bp之间；（5）引物 $T_m$ 介于54-60℃之间；（6）引物尽量以C或G结尾。

7.1.6.3 引物初检。以参照菌株的DNA作为对照，当引物对设计自单字母区域时，选取参照菌株作为对照，且所有引物均不能从对照DNA扩增到预期条带；当引物对设计自双字母区域时，所有参照菌株均应作为对照，除基因共有对照菌株外，引物均不能从对照DNA扩增到预期条带。如引物初检失败，则增设引物对。所有通过初检的引物对作为一个引物对组合，不应少于4个引物对。

### 7.1.7 引物特异性检测与公开

7.1.7.1 特异性检测。选取不少于10株同种野生菌株（应与待测菌株来自不同样品），提取DNA作为PCR模板，对引物对组合进行测试。通过标准为至少有1个引物对无法扩增到预期条带。

7.1.7.2 引物对公开。引物对组合和待测菌株扩增图谱应以论文、专利或科技报告的形式进行公开，以供生产企业、政府监管部门、社会团体和消费者参照检验。

## 7.2 实践检验操作

### 7.2.1 PCR 流程

7.2.1.1 模板样品获取。（1）菌株鉴定：样品制备参照GB4789.35进行，并按7.1.1的规范进行菌株活化和纯化，转接至新鲜培养基培养至稳定期，提取DNA。（2）菌株存在确定：对于高菌体浓度样品，直接吸取样品作为模板（PCR体系的1/25）；低菌体浓度样品可经相应培养基富集后，直接吸取样品作为模板（PCR体系的1/25）。

7.2.1.2 PCR程序。PCR程序按照DNA聚合酶说明书和GB/T 27403相关规范进行。

7.2.1.3 PCR应采用目标菌株做阳性对照，并选取同种不同菌株作为阴性对照。

### 7.2.2 琼脂糖凝胶电泳

7.2.2.1 凝胶要求。用TAE溶液配制1%琼脂糖凝胶；使用无毒DNA染料进行浸染。

7.2.2.2 电泳条件。电泳电压120 V，电流300 mA，时间约30 min。

7.2.2.3 鉴定。如电泳图谱与公开图谱（7.1.7.2）吻合，则鉴定为相应菌株。存疑菌株可对扩增条带进行测序比较，进一步提高辨析能力。

## 8 结果与报告

根据鉴定结果出具报告，报告结果为：

### 8.1 菌株鉴定检验

- （1）多个特异性引物对均能从所鉴定菌株扩增出与母株大小一致的条带，所鉴定菌株是目标菌株；
- （2）至少有一对特异性引物对未能从所鉴定菌株扩增出与母株大小一致的条带，所鉴定菌株不是目标菌株。

### 8.2 菌株存在检验

- （1）多个特异性引物对均能从所鉴定样品扩增出与母株大小一致的条带，所鉴定样品中存在目标菌株。
- （2）至少有一对特异性引物对未能从所鉴定样品扩增出与母株大小一致的条带，所鉴定样品中不存在目标菌株。

## 附录A 培养基和试剂

## A.1 M17 培养基

## 成分: g/L

酪蛋白胨	2.5
胰蛋白胨	2.5
大豆蛋白胨	5.0
牛肉浸粉	5.0
酵母浸粉	2.5
抗坏血酸	0.5
硫酸镁	0.25
$\beta$ -甘油磷酸钠五水合物	19.0
乳糖	5.0

## 配制方法:

将上述成分加入到1000 mL蒸馏水中，溶解，调节pH至 $7.1 \pm 0.2$ ；分装后115 ℃灭菌20-30 min。

## A.2 TAE 缓冲液

TAE缓冲液以50 $\times$ 配制，使用时进行稀释。

配制方法：称量Tris 242 g  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  37.2 g于1 L烧杯中；向烧杯中加入约800 mL去离子水，充分搅拌均匀；加入57.1 mL的冰乙酸，充分溶解；加去离子水定容至1 L后，室温保存。

使用时稀释50倍即1 $\times$ TAE 缓冲液。

附录B 例图

B.1 基因家族分析结果例图。

大写字母表明本区域基因家族由相应菌株共有，括号内为基因家族数量。单字母区域为该菌株特有基因家族。

