

团 体 标 准

T / CIFST 020—2024

食品用菌种检验 鼠李糖乳酪杆菌检验 PMA-qPCR法

Examination of microbial food culture—Detection of *Lacticaseibacillus rhamnosus*
PMA-qPCR method

2024-04-01 发布

2024-04-01 实施

中国食品科学技术学会 发布

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》的规则起草。

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。

本文件由中国食品科学技术学会提出并归口。

本文件起草单位：中国食品发酵工业研究院有限公司、国家食品安全风险评估中心、汤臣倍健股份有限公司、山西大学、发酵行业生产力促进中心、丹尼斯克(中国)有限公司、内蒙古伊利实业集团股份有限公司、内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司、光明乳业股份有限公司、北京科拓恒通生物技术股份有限公司、微康益生菌(苏州)股份有限公司。

本文件主要起草人：姚粟、郭立峥、徐进、赵溪、连晓雷、张国华、刘艺茹、冯会粉、葛媛媛、郭茸凯、路春霞、马霞、王玉琼、张旭光、毛跃建、张锋华、马杰、方曙光、夏九学。

食品用菌种检验 鼠李糖乳酪杆菌检验 PMA-qPCR 法

1 范围

本文件规定了食品中鼠李糖乳酪杆菌(*Lactocaseibacillus rhamnosus*)的 PMA-qPCR 检验方法。
本文件适用于食品原料和固体饮料中鼠李糖乳酪杆菌的活菌定量检验。

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—2023 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
GB/T 27403—2008 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

实时荧光定量 PCR quantitative real-time polymerase chain reaction

在聚合酶链式反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,对未知模板 DNA 进行定量分析的方法。

3.1.2

Ct 值 cycle threshold value

实时荧光定量 PCR 反应中每个反应管内的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CFU:菌落形成单位(colony forming units)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

LED:发光二极管(light emitting diode)

OD:光密度(optical density)

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

PMA:叠氮溴化丙锭(propidium monoazide)

qPCR:实时荧光定量 PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction)

ROX:一种荧光染料(carboxy-X-rhodmine)

4 原理

PMA 是一种能与 DNA 结合的光反应染料,可透过受损细胞膜与菌体 DNA 发生共价交联,从而抑制受损菌体 DNA 的 qPCR 扩增。样品经 PMA 染料处理、DNA 提取后,采用鼠李糖乳酪杆菌特异性引物进行 qPCR 扩增。细胞膜结构完整的活菌菌体 DNA 在 qPCR 扩增反应中能够产生荧光信号。当扩增产物的荧光信号达到设定阈值时,可被实时检测并生成 Ct 值,将 Ct 值代入标准曲线方程中,计算获得样品中鼠李糖乳酪杆菌的活菌数量。

5 仪器设备

- 5.1 实时荧光定量 PCR 仪。
- 5.2 高速台式冷冻离心机:0~20 000 r/min。
- 5.3 酶标仪。
- 5.4 恒温培养箱:36 °C ± 1 °C。
- 5.5 生物安全柜或超净工作台。
- 5.6 冰箱:2 °C ~ 5 °C、-30 °C ~ -20 °C。
- 5.7 涡旋振荡仪。
- 5.8 LED 光解仪:最大功率 60 W,频率 50 Hz~60 Hz,LED 输出波长 465 nm~475 nm。
- 5.9 珠式样品研磨器:速度 0.8 m/s~8 m/s。
- 5.10 拍打式均质器。
- 5.11 高压灭菌锅。
- 5.12 天平:精度 0.01 g。
- 5.13 微量可调移液器及配套吸头:0.5 μL~10 μL、10 μL~100 μL、100 μL~1000 μL。

6 试剂或材料

除特别说明外,仅使用分析纯或生化试剂,实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水。

- 6.1 无菌均质袋。
- 6.2 无菌离心管:1.5 mL。
- 6.3 无菌玻璃珠:粒径 0.1 mm。
- 6.4 无菌研磨管:2 mL。
- 6.5 荧光定量 PCR 8 连排管或 96 孔板。
- 6.6 96 孔细胞培养板。
- 6.7 MRS(Man Rogosa Sharpe)琼脂培养基:见 GB 4789.35—2023 附录 A 中 A.2。
- 6.8 PMA 溶液:浓度 20 mmol/L。
- 6.9 无菌超纯水或无菌双蒸水。
- 6.10 0.85% 无菌生理盐水:见 GB 4789.35—2023 附录 A 中 A.8。
- 6.11 实时荧光定量 PCR 混合试剂。
- 6.12 ROX 参比染料(50×)。
- 6.13 阳性对照:鼠李糖乳酪杆菌 CICC 6224^T(= ATCC 7469^T)菌株 DNA 或扩增片段的阳性克隆分子 DNA。

7 检测步骤

7.1 样品制备及前处理

7.1.1 按照 GB 4789.35—2023 中 6.1 规定的方法将待检测样品制备成 1:10 的样品匀液。

7.1.2 采用微量移液器,以无菌操作吸取 7.1.1 制备的 1:10 样品匀液 200 μL 注入 96 孔细胞培养板中,利用酶标仪测定样品 OD_{620} 值。将 1:10 样品匀液稀释至 OD_{620} 值为 0.3~0.5 时,总菌体数量约为 10^8 CFU/mL。

7.1.3 吸取 10^8 CFU/mL 样品匀液 500 μL ,注于 1.5 mL 无菌离心管中。

7.2 样品 PMA 处理

7.2.1 在避光条件下,以无菌操作吸取 PMA 溶液 1.25 μL ,注于 7.1.3 的离心管中,颠倒混匀至少 10 次,制成 PMA 终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的样品溶液。

7.2.2 将样品溶液置于暗处,室温孵育 5 min,每隔 1 min 颠倒混匀一次。

7.2.3 将样品溶液置于 LED 光解仪内,曝光照射 15 min,曝光结束后于室温下 12 000 r/min 离心 15 min,弃上清液。

7.3 样品 DNA 提取

7.3.1 吸取无菌超纯水 200 μL ,注于 7.2.3 的离心管中,反复吹吸使之混匀。

7.3.2 吸取 7.3.1 中的全部菌液,注于装有 0.25 g 无菌玻璃珠的 2 mL 无菌研磨管中。

7.3.3 将无菌研磨管置于珠式样品研磨器中,以 6 m/s 破碎速度破碎 12 s。于室温下 12 000 r/min 离心 15 min,获得 DNA 粗提液。取 50 μL 上清液,注于 1.5 mL 无菌离心管中贮存备用。或采用具有相同效果的基因组 DNA 提取方法进行 DNA 提取。

7.4 实时荧光定量 PCR 扩增

7.4.1 实时荧光定量 PCR 反应体系

实时荧光定量 PCR 反应体系总体积为 25 μL ,其中含:实时荧光定量 PCR 混合试剂($2\times$)12.5 μL 、上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL 、ROX 参比染料 0.5 μL 、DNA 模板 5 μL 、无菌超纯水 5 μL 。每个反应体系应设置至少 3 个平行反应。实时荧光定量 PCR 检测特异性引物序列分别为:上游引物 Lrh-F:5'-TGCTTGCATCTTGATTTAATTTTG-3',下游引物 Lrh-R:5'-GGTTCTTGATYATGCG-GTATTAG-3',目标基因产物约为 122 bp。

注:反应体系中各试剂的量根据具体情况或不同的反应总体积作适当调整。

7.4.2 实时荧光定量 PCR 反应程序

实时荧光定量 PCR 反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}/30$ s;95 $^{\circ}\text{C}/10$ s,55 $^{\circ}\text{C}/32$ s(收集荧光信号),72 $^{\circ}\text{C}/25$ s,进行 40 个循环。

注:反应程序根据不同型号实时荧光 PCR 仪和所选 PCR 扩增体系不同作适当调整。

7.4.3 实验对照

实验设立以下对照。

阳性对照:鼠李糖乳酪杆菌 CICC 6224^T(=ATCC 7469^T)菌株 DNA 或扩增片段的阳性克隆分子 DNA。

阴性对照:非鼠李糖乳酪杆菌 DNA。

空白对照:无菌超纯水。

7.5 标准曲线

7.5.1 通用要求

制备标准曲线时需设置至少 5 个浓度点,且设置的最低浓度点宜尽量接近该扩增目标的定量下限。标准曲线上的每个浓度应设置至少 3 个平行反应。

7.5.2 标准曲线的制备

7.5.2.1 将鼠李糖乳酪杆菌 CICC 6224^T(=ATCC 7469^T)或从待测样品中分离出的目标鼠李糖乳酪杆菌接种于 MRS 琼脂培养基中,于 36 °C±1 °C 培养 48 h±2 h,获得纯培养物。

7.5.2.2 用无菌接种环挑取适量菌体于无菌生理盐水中,充分振荡混匀。

7.5.2.3 参考 7.1.2,用无菌生理盐水将 7.5.2.2 中菌液稀释至菌体浓度为 10⁸ CFU/mL。根据 GB 4789.35—2023 中乳杆菌的培养方法,检测活菌总数(CFU/mL)。

7.5.2.4 按 7.2 处理 7.5.2.3 制备的样品,按 7.3 提取样品基因组 DNA,并对 DNA 溶液进行 10 倍梯度稀释。

7.5.2.5 利用建立的 qPCR 反应体系和扩增程序,测定每个稀释度 DNA 对应的 Ct 值,根据样品活菌总数对数值(lg CFU/mL)和扩增 Ct 值的线性关系绘制标准曲线。标准曲线即以活菌总数的对数值为横坐标,以 Ct 值为纵坐标作图,获得标准曲线方程。

8 结果分析与计算

8.1 质量控制

下述指标有一项不符合者,需重新进行实时荧光定量 PCR 扩增。

空白对照:Ct 值>30;

阴性对照:Ct 值>30;

阳性对照:Ct 值<30。

被检测样品 Ct 值应在标准曲线测定范围内,如不在标准曲线测定范围内,则需对样品 DNA 浓度进行适当调整后重新进行检测。

8.2 结果计算

当样品 Ct 值在标准曲线的线性范围内,按式(1)计算。

$$N = \frac{\sum_{i=1}^n 10^{\frac{X_i - B}{A}}}{n} \times d \dots\dots\dots (1)$$

式中:

N ——样品中鼠李糖乳酪杆菌的活菌总数;

n ——重复次数;

X_i ——样品单次重复的 Ct 值;

B ——标准曲线截距;

A ——标准曲线斜率;

d ——稀释倍数。

9 结果表述

检测结果表述为:检出鼠李糖乳酪杆菌活菌量为“×× CFU/g(mL)”。

10 注意事项

检测过程防止交叉污染应注意的事项按照 GB/T 27403—2008 中附录 D 的规定执行。
