



中华人民共和国国家标准

GB/T 41219—2021

酿酒酵母和乳酸克鲁维酵母的 鉴定方法

Method for identification of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*

2021-12-31 发布

2022-07-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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。

本文件由全国食品工业标准化技术委员会(SAC/TC 64)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、广东省食品工业研究所有限公司、乐斯福(明光)有限公司、安琪酵母股份有限公司、山东圣琪生物有限公司。

本文件主要起草人：孟镇、周世伟、周芳梅、刘明、郑国斌、易勇、武竹英、吴李娣、孙雅芳、张继祥、郭新光、钟肖琼、朱永兵、孟庆祥、赵学文、张媛媛。



酿酒酵母和乳酸克鲁维酵母的 鉴定方法

1 范围

本文件规定了酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)的鉴定原理、鉴定方法和鉴定结果表述。

本文件适用于酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)的种水平鉴定。

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 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则

GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 19495.3 转基因产品检测 核酸提取纯化方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp:碱基对(base pair)

DDBJ:日本 DNA 数据库(DNA Data Bank of Japan)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dATP:脱氧腺苷三磷酸(deoxy-adenosine triphosphate)

dCTP:脱氧胞苷三磷酸(deoxy-cytidine triphosphate)

dGTP:脱氧鸟苷三磷酸(deoxy-guanosine triphosphate)

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

dTTP:脱氧胸苷三磷酸(deoxy-thymidine triphosphate)

dUTP:脱氧尿苷三磷酸(deoxy-uridine triphosphate)

EB:溴化乙锭(Ethidium bromide)

EDTA:乙二胺四乙酸 ethylene(diamine tetraacetic acid)

EMBL:欧洲分子生物学实验室(The European Molecular Biology Laboratory)

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

Taq:水生栖热菌(thermus aquaticu)

Tris:三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl) aminomethane]

YM:酵母麦芽(Yeast Malt)

YPD:酵母浸出粉胨葡萄糖(Yeast Extract Peptone Dextrose)

26S rDNA:26S 核糖体脱氧核糖核酸(26S ribosomal deoxyribonucleic acid)

5 鉴定原理

获得酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)菌种纯培养物后,采用表型试验和聚合酶链式反应(PCR)方法相结合的方式鉴定。

6 鉴定方法

6.1 表型试验

根据酵母菌株的培养形态、生理生化特征等,与分类系统对照,得到菌株的分类信息,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)表型试验按照附录 A 的方法鉴定,也可按照自动微生物鉴定系统等方法进行鉴定。

6.2 PCR 方法

获得待鉴定菌种纯培养后,提取待鉴定菌种的基因组 DNA,并对目标序列进行扩增(26S rDNA D1/D2 区序列),将扩增产物纯化后进行测序,并将测序得到的 DNA 序列与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,得到菌株的分类信息,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*) 26S rDNA D1/D2 序列分析(PCR 方法)按照附录 B 的方法鉴定,也可使用其他目标序列进行鉴定。

7 鉴定结果表述

根据菌株的核酸序列、形态特征观察和生理生化特征,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

(规范性)

酿酒酵母和乳酸克鲁维酵母的表型试验方法

A.1 设备和材料

除另有规定外,实验用水应符合 GB/T 6682—2008 中三级水的要求。

- A.1.1 超净工作台。
- A.1.2 恒温培养箱。
- A.1.3 恒温水浴培养箱。
- A.1.4 光学显微镜:放大倍数 400 以上。
- A.1.5 高压灭菌锅。
- A.1.6 电子天平:感量 0.01 g。
- A.1.7 pH 计或 pH 比色试管或精密 pH 试纸。
- A.1.8 巴林糖度计。
- A.1.9 无菌培养皿:直径 90 mm。
- A.1.10 无菌锥形瓶:250 mL、500 mL。
- A.1.11 试管:15 mm×150 mm。
- A.1.12 无菌盖玻片:75%乙醇浸泡的清洁盖玻片。
- A.1.13 无菌载玻片:75%乙醇浸泡的清洁载玻片。

A.2 培养基和溶液

- A.2.1 麦芽汁液体培养基:麦芽汁加水稀释至 10 °Bx~15 °Bx(巴林糖度计),分装于试管,每管约 3 mL,在高压灭菌锅中 121 °C 灭菌 15 min。
- A.2.2 麦芽汁琼脂培养基:麦芽汁加水稀释至 10 °Bx~15 °Bx(巴林糖度计),加 2%琼脂粉,在高压灭菌锅中 121 °C 灭菌 15 min。临用时加热融化琼脂,冷却至 50 °C 时使用。
- A.2.3 玉米粉琼脂培养基:称取 12.5 g 黄玉米粉加入到 300 mL 水中混匀,置恒温水浴培养箱中以 60 °C 热水浴保温 1 h,用滤纸过滤,滤液加水至 300 mL,加入 3.8 g 琼脂,加热溶解,分装至锥形瓶中,在高压灭菌锅中 115 °C 灭菌 15 min。
- A.2.4 McCLary 琼脂斜面培养基:分别称取葡萄糖 1.0 g、氯化钾 1.8 g、酵母膏 2.5 g、醋酸钠 8.2 g、琼脂 20 g,加入到 1 000 mL 水中,加热溶解,调节 pH 至 6.4±0.2,分装至试管中,在高压灭菌锅中 115 °C 灭菌 15 min 后,经自然冷却,待气压降至零时,将试管从高压灭菌锅中取出,趁热直接摆成斜面,待凝固后备用。
- A.2.5 YPD 液体培养基:分别称取酵母粉 5.0 g、蛋白胨 10.0 g、葡萄糖 20.0 g,加入到 1 000 mL 水中,加热溶解,分装至试管中,在高压灭菌锅中 116 °C 灭菌 15 min。
- A.2.6 YM 琼脂培养基:分别称取酵母浸膏 3.0 g、麦芽粉 3.0 g、蛋白胨 5.0 g、琼脂 20.0 g,加入到 1 000 mL 水中,加热溶解,分装至锥形瓶中,在高压灭菌锅中 121 °C 灭菌 15 min。
- A.2.7 无菌生理盐水:将 8.5 g 氯化钠加入到 1 000 mL 水中,搅拌至完全溶解,分装后,在高压灭菌锅中 121 °C 灭菌 15 min。
- A.2.8 染色液
 - A.2.8.1 孔雀绿染液:将 5.0 g 孔雀绿加入少许水中充分混匀,待完全溶解后,加水定容至 100 mL,混匀备用。

A.2.8.2 番红水溶液:将 0.5 g 番红加入少许水中充分混匀,待完全溶解后,加水定容至 100 mL,混匀备用。

A.3 试验步骤

A.3.1 无菌要求

全部操作过程均应遵循无菌操作程序。

A.3.2 菌株活化

A.3.2.1 样品处理:半固体或液体菌株直接活化。固体菌株或真空冷冻干燥菌株,可先加适量无菌生理盐水或其他适宜稀释液,溶解菌粉后再活化。

A.3.2.2 活化:用接种环挑取一环至两环处理好的样品(见 A.3.2.1)接种在麦芽汁液体培养基中,25 ℃ ±1 ℃ 培养 48 h~72 h,进行活化,获得培养物。

A.3.3 酿酒酵母的鉴定

A.3.3.1 接种和培养

A.3.3.1.1 取一环至两环活化的培养物(见 A.3.2.2)接种在麦芽汁液体培养基中,在 25 ℃ ±1 ℃ 恒温培养箱中培养 3 d。观察是否形成菌醭、菌环或岛,并用无菌水制作水浸片在显微镜下观察,记录酵母细胞的形状、大小及增殖方式。

A.3.3.1.2 取活化后的培养物(见 A.3.2.2)以划线法接种在麦芽汁琼脂平板培养基中,在 25 ℃ ±1 ℃ 恒温培养箱中培养 3 d,观察其菌落形态。

A.3.3.1.3 在无菌培养皿中倒入 15 mL~20 mL 融化的玉米粉琼脂培养基,待凝固后,在培养基表面用活化的培养物(见 A.3.2.2),以划线法接种两条或三条,每条线上盖以无菌盖玻片,盖上培养皿盖,在 28 ℃ ±1 ℃ 恒温培养箱中培养 4 d~5 d 后打开培养皿盖,取下盖玻片,放到无菌载玻片上,在显微镜下观察是否有菌丝生长及菌丝类型,或打开培养皿盖,在显微镜下直接观察。

A.3.3.1.4 将活化好的培养物(见 A.3.2.2)接种于麦芽汁琼脂斜面培养基中,在 25 ℃ ±1 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h,连续转接培养两次或三次后,用接种环取转接后的培养物,接种到 McClary 琼脂斜面培养基中,在 25 ℃ ±1 ℃ 恒温培养箱中培养 7 d,涂片后在酒精灯火焰上固定,用染色液进行染色(在涂片上滴加孔雀绿染色液,染 1 min~1.5 min,水洗;加 95% 乙醇脱色 30 s,水洗;最后用番红染色液复染 30 s~1 min,水洗、干燥),显微镜下观察是否形成子囊孢子、孢子的形状和特点、每个子囊内的孢子数等。未见子囊孢子的,在 17 ℃ ±1 ℃ 恒温培养箱中培养,每周检查一次,至少检测六周。

A.3.3.2 菌种鉴定

A.3.3.2.1 菌落及培养特征

25 ℃ ±1 ℃ 静止培养 3 d 后,在麦芽汁液体培养基底部有沉淀产生,不形成浮膜;在麦芽汁琼脂平板培养基中形成乳白色、有光泽、不透明、扁平状、偶尔隆起或折叠、边缘整齐的菌落。

A.3.3.2.2 涂片镜检

酿酒酵母细胞呈球状、卵球形或长形(3 μm~8 μm)×(5 μm~10 μm),单个或成簇状,多边芽殖;子囊孢子呈球形、卵形,表面光滑,每个子囊含有 1 个~4 个子囊孢子;在玉米粉琼脂培养基上不生长假菌丝或有不典型的假菌丝形成。

A.3.3.2.3 生理生化特征

挑取麦芽汁琼脂培养基中典型菌落进行生理生化反应检测。酿酒酵母生理生化特征见表 A.1。

表 A.1 酿酒酵母生理生化特征

类型	鉴定项目	酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
发酵	葡萄糖	+
	半乳糖	v
	蔗糖	+
	麦芽糖	+
	乳糖	—
	棉子糖	+
	海藻糖	—
	蜜糖	—
同化	葡萄糖	+
	菊糖	—
	蔗糖	+
	棉子糖	+
	蜜二塘	—
	半乳糖	v
	乳糖	—
	海藻糖	+
	麦芽糖	+
	松三糖	v
	甲基- α -D-葡萄糖苷	—
	可溶性淀粉	—
	纤维二糖	—
	水杨苷	—
	L-山梨糖	—
	L-鼠李糖	—
	D-木糖	—
	L-阿拉伯糖	—
	D-阿拉伯糖	—
	D-核糖	—
	甲醇	—
	乙醇	+
	甘油	v
	赤藓糖醇	—
	核糖醇	—

表 A.1 酿酒酵母生理生化特征 (续)

类型	鉴定项目	酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
同化	半乳糖醇	—
	D-甘露醇	—
	D-葡萄糖醇	—
	Myo-肌醇	—
	DL-乳酸	v
	琥珀酸	—
	柠檬酸	—
	D-葡萄糖酸	v
	D-氨基葡萄糖	—
	N-乙酰-D-葡糖胺	—
	十六烷	—
	硝酸盐	—
	无维生素	—
其他	木糖醇	—
	2-酮基-葡萄糖酸钠	—
	5-酮基-葡萄糖酸钠	—
	D-葡萄糖醛酸	—
	尸胺	—
	乙胺	—
	10%氯化钠/5%葡萄糖	—
	50% D-葡萄糖培养基	+
	淀粉形成	—
	DBB	—
	明胶液化	—
	吐温 80 水解	—
	于 25 °C 生长	+
	于 30 °C 生长	+
	于 37 °C 生长	v
	于 40 °C 生长	v

注：+表示阳性；—表示阴性；v表示可变反应；s表示缓慢的阳性反应。

A.3.4 乳酸克鲁维酵母的鉴定

A.3.4.1 接种和培养

A.3.4.1.1 取1环~2环活化的培养物(见A.3.2.2)接种在YPD液体培养基中,在25℃±1℃恒温培养箱中培养3d。观察是否形成菌醭、菌环或岛,并用无菌水制作水浸片在显微镜下观察,记录酵母细胞的形状、大小及增殖方式。

A.3.4.1.2 取活化后的培养物(见A.3.2.2)以划线法接种在YM琼脂培养基中,在25℃±1℃恒温培养箱中培养3d,观察其菌落形态。

A.3.4.1.3 在无菌培养皿中倒入15mL~20mL融化的玉米粉琼脂培养基,待凝固后,在培养基表面用活化的培养物(见A.3.2.2),以划线法接种两条或三条,每条线上盖以无菌盖玻片,盖上培养皿盖,在28℃±1℃恒温培养箱中培养4d~5d后打开培养皿盖,取下盖玻片,放到洁净载玻片上,在显微镜下观察是否有菌丝生长及菌丝类型,或打开培养皿盖,在显微镜下直接观察。

A.3.4.1.4 将活化好的培养物(见A.3.2.2)接种于麦芽汁琼脂斜面培养基中,在25℃±1℃恒温培养箱中培养24h,连续转接培养两次或三次后,用接种环取转接后的培养物,接种到McClary琼脂斜面培养基中,在25℃±1℃恒温培养箱中培养7d,涂片后在酒精灯火焰上固定,用染色液进行染色(在涂片上滴加孔雀绿染色液,染1min~1.5min,水洗;加95%乙醇脱色30s,水洗;最后用番红染色液复染30s~1min,水洗、干燥),显微镜下观察是否形成子囊孢子、孢子的形状和特点、每个子囊内的孢子数等。未见到子囊孢子的,在17℃±1℃恒温培养箱中培养,每周检查一次,至少检测六周。

A.3.4.2 菌种鉴定

A.3.4.2.1 菌落及培养特征

25℃±1℃静止培养3d后,在YPD液体培养基中可形成薄的浮膜;在YM琼脂培养基上形成生长旺盛、有光泽、呈奶油色或粉红色的菌落。

A.3.4.2.2 涂片镜检

乳酸克鲁维酵母细胞呈椭圆形(2μm~6μm)×(2μm~8μm),单独、成对或以短链形式出现;子囊孢子呈圆形、椭圆形或肾形,每个子囊含有1个~4个子囊孢子;在加盖玻片的玉米粉琼脂培养基上通常形成发育不良的假菌丝。

A.3.4.2.3 生理生化特征

挑取YM琼脂平板培养基中典型菌落进行生理生化反应检测。乳酸克鲁维酵母生理生化特征见表A.2。

表 A.2 乳酸克鲁维酵母生理生化特征

类型	鉴定项目	乳酸克鲁维酵母 <i>Kluyveromyces lactis</i>
发酵	葡萄糖	+
	半乳糖	s
	蔗糖	v
	麦芽糖	s
	乳糖	+

表 A.2 乳酸克鲁维酵母生理生化特征 (续)

类型	鉴定项目	乳酸克鲁维酵母 <i>Kluyveromyces lactis</i>
发酵	棉子糖	v
	海藻糖	v
	菊粉	—
同化	葡萄糖	+
	菊糖	v
	蔗糖	+
	棉子糖	v
	蜜二糖	—
	半乳糖	+ ^a
	乳糖	+ ^a
	海藻糖	+ ^a
	麦芽糖	v
	松三糖	+ ^a
	α -甲基-D-葡萄糖苷	v
	可溶性淀粉	—
	纤维二糖	+ ^a
	水杨苷	+ ^a
	L-山梨糖	v
	L-鼠李糖	—
	D-木糖	v
	L-阿拉伯糖	— ^a
	D-阿拉伯糖	—
	D-核糖	—
	甲醇	—
	乙醇	+
	甘油	v
	赤藓糖醇	—
	核糖醇	v
	半乳糖醇	—
	D-甘露醇	+ ^a
	D-山梨醇	+
	肌醇	—
	DL-乳酸	v

表 A.2 乳酸克鲁维酵母生理生化特征 (续)

类型	鉴定项目	乳酸克鲁维酵母 <i>Kluyveromyces lactis</i>
同化	琥珀酸	+
	柠檬酸	— ^a
	D-氨基葡萄糖	—
	D-葡萄糖酸	—
	N-乙酰-D-葡萄糖胺	—
	十六烷	—
	硝酸盐	—
	无维生素	—
其他	木糖醇	v
	2-酮基-葡萄糖酸钠	—
	D-葡萄糖醛酸	—
	葡萄糖酸- δ -内酯	v
	无氨基酸	+
	亚硝酸盐	— ^b
	乙胺	+ ^b
	赖氨酸	+
	产生淀粉	—
	DBB	—
	明胶	—
	0.01% 放线菌酮	+
	30 °C 生长	+
	尸胺	+ ^b
	10% 氯化钠	—
50% 葡萄糖	v	

注 1: +表示阳性;—表示阴性;v表示可变反应;s表示缓慢的阳性反应。

注 2: 在发酵和同化等特性的反应中,上标“^a”表示在乳酸克鲁维酵母和乳酸克鲁维酵母变种中可能具有不同的特征。上标“^b”表示 CBS 4693 菌株具有不同的特征。

附录 B

(规范性)

酿酒酵母和乳酸克鲁维酵母的 26S rDNA D1/D2 序列分析方法(PCR 方法)

B.1 试剂和材料

警示——溴化乙锭有致癌作用,配制和使用时应戴一次性手套操作并妥善处理废弃物。
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。

B.1.1 质控菌株

大肠杆菌 ATCC25922、酿酒酵母 ATCC 18824 T = JCM 7255 T = CGMCC 2.1882T、乳酸克鲁维酵母 ATCC8585T,或目标菌种的其他已确定分类地位的参考菌株。

B.1.2 麦芽汁液体培养基:麦芽汁加水稀释至 10 °Bx~15 °Bx(巴林糖度计),分装于试管,每管约 3 mL,在高压灭菌锅中 121 °C 灭菌 15 min。

B.1.3 Taq DNA 聚合酶。

B.1.4 dNTPs 混合溶液:将浓度为 10 mmol/L 的 dATP、dTTP、dCTP、dGTP4 种脱氧核糖核苷酸溶液等体积混合。

B.1.5 琼脂糖。

B.1.6 10 g/L 溴化乙锭(EB)溶液:称取 1.0 g 溴化乙锭,溶解于 100 mL 水中,避光保存。

注:根据需要可选择其他效果相当的核酸染料代替溴化乙锭作为核酸电泳的染色剂。

B.1.7 DNA 分子量标记物(DNA Marker)。

B.1.8 酵母基因组 DNA 提取试剂盒。

B.1.9 10 mol/L 氢氧化钠(NaOH)溶液:在 160 mL 水中加入 80.0 g 氢氧化钠,溶解后,冷却至室温,再加水定容至 200 mL,混匀备用。

B.1.10 500 mmol/L EDTA 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)溶液(pH=8.0):称取 18.6 g 乙二胺四乙酸二钠,加入 70 mL 水中,缓慢滴加氢氧化钠溶液(B.1.9)直至 EDTA-Na₂ 完全溶解,用氢氧化钠溶液(B.1.9)调节 pH 至 8.0,加水定容至 100 mL,混匀,在高压灭菌锅中 115 °C 灭菌 15 min 室温保存备用。

B.1.11 50×TAE 缓冲液:称取 242.2 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris),加 57.1 mL 冰乙酸,100 mL 乙二胺四乙酸二钠溶液(B.1.10),溶于水中,然后加水定容至 1 000 mL,混匀,在高压灭菌锅中 115 °C 灭菌 15 min 室温保存。使用时用水稀释成 1×TAE。

B.1.12 2%琼脂糖凝胶:称取 2.0 g 琼脂糖,于 100 mL 1×TAE 缓冲液中,用微波炉加热溶解琼脂糖,冷却至 55 °C~60 °C,加入 10 g/L 溴化乙锭溶液约 5 μL EB 溶液或适量的其他核酸染料,至终浓度为 0.5 μg/mL 左右,轻轻摇匀后,缓慢倒在制胶模具上。

B.1.13 10×PCR 缓冲液。

B.1.14 6×上样缓冲液(6×loading buffer)。

B.1.15 无菌 PCR 反应管。

B.1.16 无菌离心管:1.5 mL、2 mL。

B.2 仪器和设备

B.2.1 电子天平:感量 0.01 g。

B.2.2 PCR 扩增仪。

B.2.3 离心机。

- B.2.4 紫外凝胶成像仪。
- B.2.5 电泳槽、电泳仪等电泳装置。
- B.2.6 微量移液器:10 μL 、100 μL 、200 μL 、1000 μL 。
- B.2.7 恒温水浴锅。
- B.2.8 高压灭菌锅。
- B.2.9 微波炉。
- B.2.10 巴林糖度计。
- B.2.11 超净工作台。

B.3 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。

B.4 试验步骤

B.4.1 菌株活化

B.4.1.1 样品处理:半固体或液体菌株直接活化。固体菌株或真空冷冻干燥菌株,可先加适量无菌生理盐水或其他适宜稀释液,溶解菌粉后再活化。

B.4.1.2 活化:用接种环挑取 1 环~2 环处理好的样品(见 B.4.1.1)接种在麦芽汁液体培养基中,25 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h~72 h,进行活化,获得培养物。

B.4.2 DNA 模板制备

B.4.2.1 DNA 模板提取

无菌条件下,移取处于对数生长期的 1.5 mL 酵母液体培养物,10 000 r/min 离心 2 min~5 min,小心去除上清液。按照酵母基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA 模板,所提取的模板 DNA 溶于 50 μL 无菌双蒸水中,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。

B.4.2.2 DNA 模板浓度测定

按照 GB/T 19495.3 规定的方法执行。

B.4.3 引物、PCR 反应体系及反应条件

B.4.3.1 引物选择

以酵母 26S rDNA D1/D2 区域序列为目的片段,长度 550 bp~600 bp,上游引物序列:5' - GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3',下游引物序列:5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'。

B.4.3.2 反应体系

10 \times PCR 缓冲液(含 Mg^{2+}) 5 μL ,模板 3 μL ~5 μL ,引物各 0.4 $\mu\text{mol/L}$,*Taq* DNA 聚合酶 1.5 U, dNTPs 0.2 mmol/L,无菌双蒸水补充至 50 μL ,同时设置阴性对照、阳性对照和空白对照。

B.4.3.3 反应条件

95 $^{\circ}\text{C}$ 预处理 5 min、95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min、52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 30 s,36 个循环后,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存反应产物。

B.4.4 PCR 质量控制

每个 PCR 反应均应设置两个平行试验,同时应设置空白对照、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或同属的质控菌株的 DNA 为模板,阴性对照采用不含目标序列的 DNA 为模板。

B.4.5 PCR 扩增产物的电泳检验

将 2% 琼脂糖凝胶放置在电泳槽中,在电泳槽中加入 $1 \times$ TAE 缓冲液,使溶液没过胶面,吸取 $5 \mu\text{L}$ PCR 扩增产物与 $1 \mu\text{L}$ $6 \times$ 上样缓冲液混合均匀后,在凝胶点样孔中点样,同时根据目的片段大小,在点样孔中加入 DNA 分子量标记物,接通电源在 $8 \text{ V/cm} \sim 12 \text{ V/cm}$,恒压,电泳 $20 \text{ min} \sim 30 \text{ min}$ 。在紫外凝胶成像仪下观察电泳结果,拍照并记录结果。

B.4.6 PCR 结果判断

当出现下列情况之一,则 PCR 方法鉴定结果无效,应重新进行试验。

- 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。

B.4.7 序列测定及比对

将所得 PCR 产物进行测序,获得序列后,将所得序列输入核酸序列数据库,按照操作说明,进行同源性搜索比对,并构建系统发育树,报告菌种种属信息。

参 考 文 献

- [1] Kurtzman, C. P, Fell, Jack W. The yeasts: a taxonomic study[M]. Kluwer Academic Publishers, 2013.
-

