



中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXXX—202X

直接饲喂微生物饲料添加剂和发酵制品类 饲料添加剂生产菌株鉴定 第1部分：细菌菌种鉴定 分子生物学方法

Identification of direct-fed microorganisms feed additives and production strains of
feed additives for fermentation products

Part 1: Species identification of bacteria Molecular biological methods

(征求意见稿)

202X – XX – XX 发布

202X – XX – XX 实施

中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

NY/T XXXXX—202X《直接饲喂微生物饲料添加剂和发酵制品类饲料添加剂生产菌株鉴定》为系列标准，本部分为NY/T XXXXX—202X的第1部分。

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这些专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本文件起草单位：×××

本文件主要起草人：×××

直接饲喂微生物饲料添加剂和发酵制品类饲料添加剂生产菌株鉴定

第1部分：细菌菌种鉴定 分子生物学方法

1 范围

本文件描述了直接饲喂微生物饲料添加剂和发酵制品类饲料添加剂生产菌株中细菌菌种的分子生物学鉴定方法，即平均核苷酸一致性（ANI）鉴定法（第一法）和基因序列鉴定法（第二法）。

本文件第一法适用于已批准或拟申报的直接饲喂微生物饲料添加剂和发酵制品类饲料添加剂生产菌株中细菌菌种纯培养物的鉴定。第二法适用于附录A中细菌菌种纯培养物的鉴定。

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，标注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不标注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

GB/T 37874—2019 核酸提取纯化方法评价通则

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

直接饲喂微生物 **direct-fed microorganisms**

在饲料中添加或直接饲喂给动物的活的微生物饲料添加剂。

3.1.2

发酵制品类饲料添加剂 **feed additives for fermentation products**

微生物在受控制条件下，通过生命活动生产的特定代谢产物经分离、提取、纯化、精制和干燥等工艺制成的饲料添加剂，如氨基酸、维生素、酶制剂等。

3.1.3

鉴定 **identification**

通过分析菌株的分子特征，确定菌株分类地位的过程。

3.1.4

测序深度 **depth of sequencing**

菌株基因组中某个指定的核苷酸被检测的次数。

3.1.5

叠连群 **contig**

测序得到的DNA片段，根据相互间的重叠性，构成的一个长的无缺失的DNA片段。

[来源：GB/T 29859—2013，2.4.14]

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ANI: 平均核苷酸一致性 (Average Nucleotide Identity)

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)

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

gyrB: DNA旋转酶B亚基编码基因 (DNA gyrase subunit B encoding gene)

ICNP: 原核生物国际命名法规 (International Code of Nomenclature of Prokaryotes)

NCBI: 美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

pheS: 苯丙氨酸tRNA合成酶 α 亚基编码基因 (phenylalanyl-tRNA synthase alpha subunit encoding gene)

rRNA: 核糖体核糖核酸 (ribosome RNA)

4 仪器设备

试验设施和设备应符合 GB 19489 的规定，试验环境条件应参照 GB/T 27403 执行。

4.1 生物安全柜。

4.2 核酸定量仪。

4.3 高通量基因测序仪：MGISEQ-200 基因测序仪（二代）、GridION 基因测序仪（三代）。

注：也可用功能相当的其他型号的仪器代替。

4.4 恒温水浴锅：37 °C、55 °C。

4.5 离心机：最高转速 15 000 r/min。

4.6 PCR 仪。

4.7 核酸电泳仪。

4.8 凝胶电泳成像系统。

5 试剂或材料

- 5.1 细菌基因组 DNA 提取试剂盒。
- 5.2 文库制备试剂。
- 5.3 高通量测序试剂。
- 5.4 TE 缓冲液。
- 5.5 2×PCR 预混液：内含 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液。
- 5.6 引物：引物序列见 7.2.2.1 和 7.2.3.2。
- 5.7 无菌双蒸水。
- 5.8 琼脂糖。
- 5.9 1×TAE 缓冲液。
- 5.10 荧光核酸染料。
- 5.11 DNA 分子量标记物(100 bp~2000 bp)。
- 5.12 阳性对照菌株：枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* CICC 10498^T (=ACCC 10243^T)、嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* CICC 6096^T (=ACCC 19940^T)。

注：以上用于PCR反应及电泳试验的试剂、阳性对照菌株可用功能相当的其他产品代替。

6 第一法 平均核苷酸一致性（ANI）鉴定法

6.1 原理

采用高通量测序技术测定菌株基因组序列，并与模式菌株基因组序列进行比对，计算 ANI 值，实现菌株的鉴定。

6.2 操作步骤

6.2.1 待鉴定菌株基因组 DNA 提取

采用细菌基因组DNA提取试剂盒提取待鉴定菌株基因组DNA。DNA的纯度应符合GB/T 37874的要求，DNA的浓度和总量应符合文库构建的相关要求。提取的基因组DNA于-20℃保存，备用。

6.2.2 基因组测序和序列质控

6.2.2.1 采用第二代测序技术，或第二代和第三代测序技术相结合，测定待鉴定菌株基因组序列，获得基因组框架图或完成图。使用文库制备试剂对待鉴定菌株基因组 DNA 进行测序文库构建，利用高通量测序试剂在基因测序仪上进行序列测定。原始序列经分析软件比对和组装，获得待鉴定菌株的基因组序列。

6.2.2.2 基因组序列应同时满足以下条件，否则应重新进行测序。

——测序深度 $\geq 50\times$ ；

- 叠连群（contig）数量<500个；
- 基因组序列总长度与预期基因组大小的差异≤20%。

6.2.3 ANI 分析

6.2.3.1 从待鉴定菌株基因组序列中获得其 16S rRNA 基因序列并与核酸序列数据库（如 NCBI、EMBL、DDBJ 等）中近缘种模式菌株的 16S rRNA 基因序列进行比对，获得序列相似性数值。相似性数值修约按照 GB/T 8170 的规定执行。

6.2.3.2 从 NCBI 等公共数据库下载与待鉴定菌株 16S rRNA 基因序列相似性大于 98.65%的近缘种模式菌株基因组序列。利用 ANI 分析软件（如 Jspecies 软件、ANI Calculator 等），计算待鉴定菌株与近缘种模式菌株之间基因组序列的 ANI 值。

6.3 结果判定

第一法进行菌种鉴定的阈值为 ANI 值 95%~96%。

——当待鉴定菌株与近缘种模式菌株之间基因组序列的 ANI 值大于 96%时，判定待鉴定菌株与该参考菌种为同一种。

——当待鉴定菌株与近缘种模式菌株之间基因组序列的 ANI 值均小于 95%时，则待鉴定菌株无法判定至已知种。

——当待鉴定菌株与近缘种模式菌株之间基因组序列的 ANI 值在 95~96%时，应结合其他分子生物学方法（如数字 DNA—DNA 杂交）进行综合判定。

7 第二法 基因序列鉴定法

7.1 原理

细菌菌种首先通过PCR获得16S rRNA基因序列，与近缘种模式菌株基因序列进行比对，根据序列相似性及系统发育分析，对菌种进行鉴定。通过16S rRNA基因序列无法鉴定至种水平的菌种，应进一步进行*gyrB*或*pheS*基因序列分析，并结合16S rRNA和*gyrB*基因序列，或16S rRNA和*pheS*基因序列实现种水平鉴定。基因的选择见附录A。

7.2 操作步骤

7.2.1 待鉴定菌株基因组 DNA 提取

采用细菌基因组DNA提取试剂盒提取待鉴定菌株基因组DNA。也可采用手工提取的方法：取新鲜培养的菌液1 mL，10 000 r/min离心2 min。沉淀用TE缓冲液100 μL重悬，加入10 mg/mL溶菌酶100 μL，37 °C温育30 min，12 000 r/min离心2 min。沉淀用TE缓冲液600 μL重悬，加入15 mg/mL蛋白酶K 25 μL，55 °C温育1 h后，沸水浴10 min，12 000 r/min离心5 min，上清液用于PCR扩增。DNA质量应符合GB/T 37874—2019中5.3的要求。提取的基因组DNA于-20 °C保存，备用。

7.2.2 16S rRNA 基因序列鉴定

7.2.2.1 PCR 扩增引物

正向引物（27F）：5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'；

反向引物（1492R）：5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。

目的片段长度：全长约1500 bp。

7.2.2.2 反应体系

在生物安全柜中，按表1配置PCR扩增反应体系。

表 1 PCR 扩增反应体系

组分	体积/μL
2×PCR 预混液	25.0
10 μmol/L 正向引物	1.0
10 μmol/L 反向引物	1.0
待鉴定菌株基因组 DNA	2.0（约 50 ng~200 ng）
无菌双蒸水	21.0
总体积	50.0
注：也可使用等效的商业化 PCR 反应试剂并按其说明配制反应体系。反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。	

7.2.2.3 对照设置

分别设置阳性对照和阴性对照。

——阳性对照：PCR扩增反应体系中使用枯草芽胞杆菌*Bacillus subtilis* CICC 10498^T（=ACCC 10243^T）、嗜酸乳杆菌*Lactobacillus acidophilus* CICC 6096^T（=ACCC 19940^T）基因组DNA代替待鉴定菌株基因组DNA，其他同7.2.2.2。

——阴性对照：PCR扩增反应体系中使用无菌双蒸水代替待鉴定菌株基因组DNA，其他同7.2.2.2。

7.2.2.4 反应条件

94 ℃预变性5 min；94 ℃变性1 min，55 ℃退火1 min，72 ℃延伸1 min 30 s，30个循环；72 ℃延伸10 min；4 ℃保存。

7.2.2.5 PCR 扩增产物检测

用1×TAE缓冲液配置1%的琼脂糖凝胶（55 ℃~65 ℃时加入荧光核酸染料）。取5 μL的PCR扩增产物进行电泳检测，3 V/cm~5 V/cm恒压电泳20 min~40 min，用DNA分子量标记物（100 bp~2000 bp）作参照。使用凝胶电泳成像系统观察检测结果。

7.2.2.6 PCR 扩增质量控制

当待鉴定菌株和阳性对照菌株 PCR 扩增产物检测到目的条带，且阴性对照未检测到条带时，表明PCR扩增合格。否则应重新进行PCR扩增。

7.2.2.7 序列测定和比对

将待鉴定菌株PCR扩增产物进行序列测定，原始序列经DNA分析软件（如SeqMan）拼接、校对，获得待鉴定菌株16S rRNA基因序列。将待鉴定菌株与核酸序列数据库（如NCBI、EMBL、DDBJ等）中的模式菌株进行16S rRNA基因序列同源性比对，获得序列相似性。相似性数值修约按照GB/T 8170的规定执行。

7.2.2.8 系统发育树构建

选取与待鉴定菌株 16S rRNA 基因序列相似性最高的前 10 个种为近缘种。以近缘种的模式菌株为

内群，选取与待鉴定菌株同科不同属的 1 株模式菌株作为外群，采用系统发育分析软件（如 MEGA）和 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

7.2.2.9 结果判定

近缘种中仅有一个种的模式菌株与待鉴定菌株 16S rRNA 基因序列相似性大于 98.65%，且系统发育分析显示该种模式菌株与待鉴定菌株位于同一分支时，判定待鉴定菌株与该模式菌株为同一种。除此之外，待鉴定菌株鉴定至属或属以上水平。

7.2.3 *gyrB* 或 *pheS* 基因序列鉴定

7.2.3.1 基因的选择

通过 16S rRNA 基因无法鉴定至种水平的菌种，应进一步进行 *gyrB* 或 *pheS* 基因序列鉴定。

7.2.3.2 PCR 扩增引物

PCR 扩增引物，见表 2。

表 2 PCR 扩增引物

基因名称	引物	目的片段长度
<i>gyrB</i>	<i>gyrB</i> -F: 5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGGGNAARTTYGA-3' <i>gyrB</i> -R: 5'-AGCAGGATACGGATGTGCGAGCCRTCACRTTCNGCRTCNGTCAT-3'	全长约 1200 bp
<i>pheS</i>	<i>pheS</i> -F: 5'-CAYCCNGCHCGYAYATGC-3' <i>pheS</i> -R: 5'-GGRTGRACCATVCCNGCHCC-3'	全长约 450 bp

7.2.3.3 反应体系

同 7.2.2.2。

7.2.3.4 对照设置

gyrB 基因扩增时，阳性对照菌株使用枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* CICC 10498^T (=ACCC 10243^T)、嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus* CICC 6096^T (=ACCC 19940^T)。其他同 7.2.2.3。

7.2.3.5 反应条件

gyrB 基因扩增时，退火温度为 50 ℃。*pheS* 基因扩增时，退火温度为 48 ℃。其他同 7.2.2.4。

7.2.3.6 PCR 扩增产物检测

同 7.2.2.5。

7.2.3.7 PCR 扩增质量控制

同 7.2.2.6。

7.2.3.8 序列测定和比对

将待鉴定菌株PCR扩增产物进行序列测定，原始序列经DNA分析软件（如SeqMan）拼接、校对，获得待鉴定菌株*gyrB*或*pheS*基因序列。将待鉴定菌株与7.2.2.8中确定的近缘种的模式菌株进行*gyrB*或*pheS*基因序列同源性比对，获得序列相似性，相似性数值修约按照GB/T 8170的规定执行。

7.2.3.9 系统发育树构建

以近缘种的模式菌株为内群，选取与待测菌株同科不同属的一株模式菌株作为外群。采用系统发育分析软件（如MEGA）和Neighbor-Joining法构建菌株的*gyrB*或*pheS*基因序列系统发育树。

7.2.3.10 结果判定

近缘种中仅有一个种的模式菌株与待鉴定菌株的*gyrB*或*pheS*基因序列相似性大于97.0%，且系统发育分析显示待鉴定菌株与该模式菌株位于同一分支时，判定待鉴定菌株与该模式菌株为同一种。除此之外，则待鉴定菌株鉴定至属或属以上水平。

8 结果报告

8.1 第一法

根据结果判定，报告待鉴定菌株的鉴定结果，报告中至少应包括：

——待鉴定菌株的属名、种名（包括中文学名、拉丁学名等），分类学名称应符合原核生物国际命名法规（ICNP）要求；

——待鉴定菌株及其近缘种模式菌株的基因组序列（或序列登录号）；

——待鉴定菌株与近缘种模式菌株基因组序列的ANI值。

待鉴定菌株无法判定至已知种时，报告待鉴定菌株与其近缘种模式菌株基因组序列的ANI值。

8.2 第二法

根据结果判定，报告待鉴定菌株的鉴定结果，报告中至少应包括：

——待鉴定菌株的属名、种名（包括中文学名、拉丁学名等），分类学名称应符合原核生物国际命名法规（ICNP）要求；

——待鉴定菌株的基因序列、序列相似性和系统发育树。

待鉴定菌株无法判定至已知种时，报告待鉴定菌株与其近缘种模式菌株的基因序列相似性。

附录A

(资料性)

适用于第二法的细菌菌种

表A规定了适用于第二法的细菌菌种。

表A 适用于第二法的细菌菌种

类别	菌种名称
通过 16S rRNA 基因可鉴定至种水平的细菌菌种	凝结芽胞杆菌 <i>Bacillus coagulans</i> (分类学名称: <i>Weizmannia coagulans</i>)、迟缓芽胞杆菌 <i>Bacillus lentus</i> (分类学名称: <i>Lederbergia lenta</i>)、两歧双歧杆菌 <i>Bifidobacterium bifidum</i> 、长双歧杆菌 <i>Bifidobacterium longum</i> 、短双歧杆菌 <i>Bifidobacterium breve</i> 、动物双歧杆菌 <i>Bifidobacterium animalis</i> 、粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i> 、戊糖片球菌 <i>Pediococcus pentosaceus</i> 、嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i> 、发酵乳杆菌 <i>Lactobacillus fermentum</i> (分类学名称: 发酵粘液乳杆菌 <i>Limosilactobacillus fermentum</i>)、纤维二糖乳杆菌 <i>Lactobacillus cellobiosus</i> (分类学名称: 发酵粘液乳杆菌 <i>Limosilactobacillus fermentum</i>)、德氏乳杆菌 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> 、丁酸梭菌 <i>Clostridium butyricum</i>
通过 16S rRNA 基因和 <i>gyrB</i> 基因可鉴定至种水平的细菌菌种	枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> 、地衣芽胞杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i> 、解淀粉芽胞杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 、短小芽胞杆菌 <i>Bacillus pumilus</i> 、侧孢短芽胞杆菌 <i>Brevibacillus laterosporus</i> 、谷氨酸棒杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i> 、乳糖发酵短杆菌 <i>Brevibacterium lactofermentum</i> (分类学名称: 谷氨酸棒杆菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i>)
通过 16S rRNA 基因和 <i>pheS</i> 基因可鉴定至种水平的细菌菌种	乳酸片球菌 <i>Pediococcus acidilactici</i> 、干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus casei</i> (分类学名称: 干酪乳酪杆菌 <i>Lacticaseibacillus casei</i>)、植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantarum</i> (分类学名称: 植物乳植物杆菌 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>)、布氏乳杆菌 <i>Lactobacillus buchneri</i> (分类学名称: 布氏迟缓乳杆菌 <i>Lentilactobacillus buchneri</i>)、副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus paracasei</i> (分类学名称: 类干酪乳酪杆菌 <i>Lacticaseibacillus paracasei</i>)、约氏乳杆菌 <i>Lactobacillus johnsonii</i> 、嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i>
注: 第二法也适用于其它经过验证的细菌菌种的鉴定。	

参考文献

- [1] GB/T 29859—2013 生物信息学术语
- [2] European Food Safety Authority (EFSA). EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain. *EFSA Journal* 2021;19(7):6506. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6506>
-