



中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXXX—202X

直接饲喂微生物和发酵制品类饲料 添加剂生产菌株 酵母菌菌种鉴定 分子生物学方法

Identification of direct-fed microorganisms and production strains of fermented
products for feed additives—Yeast species identification—
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

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：XXX

本文件主要起草人：XXX。

直接饲喂微生物和发酵制品类饲料添加剂生产菌株 酵母菌菌种鉴定 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菌株和发酵制品类饲料添加剂生产菌株中酵母菌菌种的分子生物学鉴定方法，包括26S rDNA序列、ITS rDNA序列和*TEF1*基因序列鉴定法。

本文件适用于已批准或拟申报的直接饲喂微生物饲料添加剂菌株和发酵制品类饲料添加剂生产菌株中酵母菌菌种的鉴定。

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，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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

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

直接饲喂微生物饲料添加剂 **direct-fed microorganisms feed additives**

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 **fermentation products feed additives**

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

菌种鉴定 **microbial species identification**

通过分析菌株的遗传物质特征，确定菌株分类学地位的过程。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp: 碱基对 (base pair)

CTAB: 十六烷基三甲基溴化铵 (cetyltrimethylammonium bromide)

DNA: 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)

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

ITS: 内转录间隔区 (internal transcribed spacer)

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

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

TEF1: 翻译延伸因子基因 (translation elongation factor 1- α gene)

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

4 试剂或材料

实验用水应符合 GB/T 6682规定的一级水。

- 4.1 PCR 扩增试剂盒。
- 4.2 2×PCR 预混液。
- 4.3 引物: 引物序列见 7.2.1 和 7.3.1。
- 4.4 无菌双蒸水。
- 4.5 琼脂糖。
- 4.6 1×TAE 缓冲液。
- 4.7 荧光核酸染料。
- 4.8 DNA 分子量标准 (涵盖目标条带长度)。
- 4.9 Tris-HCl 缓冲液: pH 8.0。
- 4.10 EDTA 溶液: pH 8.0。
- 4.11 NaCl。
- 4.12 β -巯基乙醇。
- 4.13 CTAB 提取缓冲液: 称取 20 g CTAB, 100 mL 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 40 mL 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 以及 81.82 g NaCl, 用水定容至 1 L, 使用前加入 4 mL β -巯基乙醇。
- 4.14 苯酚。
- 4.15 氯仿。
- 4.16 异戊醇。
- 4.17 异丙醇。
- 4.18 75%乙醇。
- 4.19 无菌离心管。
- 4.20 阳性对照菌株: 产朊假丝酵母 *Candida utilis* CICC 33699^T (=JCM 3617^T)、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* CICC 1964^T (=ACCC 20317^T)、红法夫酵母 *Phaffia rhodozyma* CICC 33700^T (=CGMCC 2.3074^T)、马克斯克鲁维酵母 *Kluyveromyces marxianus* CICC 33697^T (=CBS 712^T)、解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica* CICC 33698^T (=JCM 2320^T) 或等效菌株。
- 4.21 阴性对照菌株: 短双歧杆菌 *Bifidobacterium breve* CICC 6079^T 或等效菌株。

5 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。

- 5.1 生物安全柜。
- 5.2 冰箱：2℃～8℃、-20℃～-30℃。
- 5.3 电子天平：感量为 0.1 mg。
- 5.4 核酸定量仪。
- 5.5 恒温水浴锅。
- 5.6 涡旋振荡仪。
- 5.7 离心机：离心力>10000×g。
- 5.8 PCR 仪。
- 5.9 电泳仪。
- 5.10 凝胶电泳成像系统。

6 原理

提取待鉴定酵母菌的基因组DNA，采用PCR技术扩增26S rDNA D1/D2区序列，与国内外权威核酸序列数据库中模式菌株进行同源性比对，根据序列一致性和系统发育分析，对菌种进行鉴定。通过26S rDNA序列无法鉴定至种水平的菌种，应开展ITS rDNA序列分析。通过上述方法均无法鉴定至种水平的菌种，应进一步开展TEFI基因序列分析进行菌种鉴定。

7 试验步骤

7.1 待鉴定菌株基因组 DNA 提取

采用酵母菌基因组 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：称取 100 mg 菌株纯培养物至 1.5 mL 离心管中，加入 600 μL CTAB 提取缓冲液，65℃ 孵育 1 h 后，10000 g 离心 10 min。吸取上清液至新的离心管中，加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇（25:24:1），上下颠倒混匀，10000 g 离心 10 min。吸取上清液至新的离心管中，加入等体积氯仿/异戊醇（24:1），上下颠倒混匀，10000 g 离心 10 min。吸取上清液至新的离心管中，加入等体积的异丙醇，-20℃ 沉淀 30 min 后，10000 g 离心 20 min，弃上清。向沉淀中加入预冷的 75%乙醇，洗涤 2 次后，保持开盖状态，待沉淀于室温下干燥，加入 100 μL 纯水溶解 DNA。提取的基因组 DNA 置于 2℃～8℃ 供当天使用，否则应于-20℃ 以下保存，并于 1 周内使用。

7.2 26S rDNA 序列鉴定

7.2.1 PCR 扩增及测序引物

26S rDNA序列PCR扩增及测序引物见表1。

表 1 26S rDNA 序列 PCR 扩增及测序引物

基因名称	扩增引物序列	测序引物序列
26S rDNA (D1/D2 区)	正向引物 (NL1) : 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' 反向引物 (NL4) : 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'	同扩增引物

7.2.2 反应体系

PCR扩增反应体系按表2配制，或采用等效的PCR扩增试剂盒。

表 2 PCR 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 (DNA 总量约 50 ng~200 ng)
无菌双蒸水	21.0
总体积	50.0
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进行适当调整。	

7.2.3 对照设置

分别设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

——阳性对照：PCR扩增反应体系中使用产朊假丝酵母*Candida utilis* CICC 33699^T (=JCM 3617^T)、酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae* CICC 1964^T (=ACCC 20317^T)、红法夫酵母*Phaffia rhodozyma* CICC 33700^T (=CGMCC 2.3074^T)、马克斯克鲁维酵母*Kluyveromyces marxianus* CICC 33697^T (=CBS 712^T)、解脂耶氏酵母*Yarrowia lipolytica* CICC 33698^T (=JCM 2320^T)或等效菌株基因组DNA代替待鉴定菌株基因组DNA，其他同7.2.2。

——阴性对照：PCR 扩增反应体系中使用短双歧杆菌 *Bifidobacterium breve* CICC 6079^T 或等效菌株基因组 DNA 代替待鉴定菌株基因组 DNA，其他同 7.2.2。

——空白对照：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。

7.2.4 反应条件

94℃预变性5 min；循环参数94℃/50 s，52℃/50 s，72℃/50 s，35个循环；72℃延伸8 min。PCR扩增产物于4℃保存。

7.2.5 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 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分子量标准（涵盖目标条带长度）作参照。

7.2.6 凝胶成像分析

26S rDNA引物PCR扩增产物条带通常位于500 bp~750 bp区间（不同酵母菌种的扩增片段长度存在差异），采用凝胶电泳成像系统观察并记录电泳检测结果。

7.2.7 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，且阴性对照和空白对照未检测到条

带时，表明 PCR 扩增合格。否则应重新进行 PCR 扩增。

7.2.8 序列测定和比对

将待鉴定菌株PCR扩增产物进行正反向序列测定，原始序列经DNA分析软件拼接、校对，获得待鉴定菌株26S rDNA序列。将待鉴定菌株与国内外权威核酸序列数据库中的模式菌株进行26S rDNA序列同源性比对，获得序列一致性。数值修约按照GB/T 8170执行。

7.2.9 系统发育树构建

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，通过邻接法构建 26S rDNA 序列系统发育树，自举值不低于 1000 次。

7.2.10 结果判定

近缘种中仅有一个种的模式菌株与待鉴定菌株 26S rDNA 序列一致性大于 99.0%，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。

7.3 ITS rDNA 或 *TEF1* 基因序列鉴定

7.3.1 PCR 扩增及测序引物

ITS rDNA、*TEF1*基因序列PCR扩增及测序引物见表3。

表 3 ITS rDNA、*TEF1* 基因序列 PCR 扩增及测序引物

基因名称	扩增引物序列	测序引物序列
ITS rDNA	正向引物（ITS5）：5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' 反向引物（ITS4）：5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	同扩增引物
<i>TEF1</i>	正向引物（983-F）：5'-GC(C/T)CC(C/T)GG(A/T/C)CA(C/T)CGTGA(C/T)TT(C/T)AT-3' 反向引物（2212-R）：5'-CC(A/G)AC(A/G)GC(A/G)AC(A/G)GT(C/T)(C/T)GTCTCAT-3'	同扩增引物

7.3.2 反应体系

同7.2.2。

7.3.3 对照设置

同7.2.3。

7.3.4 反应条件

94℃预变性5 min；循环参数94℃/50 s，55℃/50 s，72℃/50 s，35个循环；72℃延伸8 min。PCR扩增产物于4℃保存。

7.3.5 PCR 扩增产物检测

同7.2.5。

7.3.6 凝胶成像分析

ITS rDNA引物PCR扩增产物条带通常位于500 bp~750 bp区间, *TEFI*基因引物PCR扩增产物条带通常位于1000 bp位置(不同酵母菌种的扩增片段长度存在差异), 采用凝胶电泳成像系统观察并记录电泳检测结果。

7.3.7 PCR 扩增质量控制

同7.2.7。

7.3.8 序列测定和比对

将待鉴定菌株PCR扩增产物进行正反向序列测定, 原始序列经DNA分析软件拼接、校对, 获得待鉴定菌株ITS rDNA或*TEFI*基因序列。将待鉴定菌株与7.2.9中选取的近缘种的模式菌株进行ITS rDNA或*TEFI*基因序列同源性比对, 获得序列一致性。数值按照GB/T 8170的修约值比较法执行。

7.3.9 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1株模式菌株作为外群。采用系统发育分析软件, 通过邻接法构建ITS rDNA或*TEFI*基因序列系统发育树, 自举值不低于1000次。

7.3.10 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ITS rDNA或*TEFI*基因序列一致性大于99.0%, 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。

8 结果报告

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:

- a) 待鉴定菌株的属名、种名(包括中文学名、拉丁学名等), 分类学名称应符合国际藻类、真菌和植物命名法规要求;
- b) 待鉴定菌株的基因序列、序列一致性和系统发育树。
- c) 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一致性。

附 录 A

(资料性)

适用于本文件的酵母菌菌种

表A.1 给出了采用本文件可鉴定至种水平的酵母菌菌种。

表A. 1 适用于本文件的酵母菌菌种

类别	菌种名称
通过 26S rDNA 可鉴定至种水平的酵母菌菌种	产朊假丝酵母 (<i>Candida utilis</i> , 当前分类学名称: 杰丁塞伯林德纳氏酵母 <i>Cyberlindnera jadinii</i>)、解脂耶氏酵母 (<i>Yarrowia lipolytica</i> , 另有中文译名: 解脂亚罗酵母)
通过 26S rDNA 和 ITS rDNA 可鉴定至种水平的酵母菌菌种	马克斯克鲁维酵母 (<i>Kluyveromyces marxianus</i>)
通过 26S rDNA 和 <i>TEF1</i> 基因可鉴定至种水平的酵母菌菌种	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)、红法夫酵母 (<i>Phaffia rhodozyma</i>)
注:对于其他酵母菌菌种的鉴定,应首先进行 26S rDNA D1/D2 区序列分析,若无法鉴定至种水平,则需依次开展 ITS rDNA 和 <i>TEF1</i> 基因序列分析。	