

T/NAIA

团体标准

T/NAIA 000-2024

葡萄酒中布鲁塞尔德克酵母的检测 实时荧光 PCR 法

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

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。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏回族自治区食品检测研究院、宁夏计量质量检验检测研究院、银川海关技术中心。

本文件主要起草人：岳苑、吕毅、冯秀娟、何淑桢、苏洋、高俊峰、姚博伟，魏嘉雯、贺生芳。

葡萄酒中布鲁塞尔德克酵母的检测

实时荧光 PCR 法

1 范围

本标准规定了葡萄酒中布鲁塞尔德克酵母的实时荧光PCR检测方法。
本标准适用于葡萄酒中布鲁塞尔德克酵母的Taqman探针实时荧光PCR定性检测。

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 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测。

3 生物安全措施

为了保护实验室人员的安全，应由具备资格的工作人员检测布鲁塞尔德克酵母，所有培养物和废弃物应按照GB19489中的有关规定执行。

4 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

4.1 实时荧光 PCR real-time PCR

在PCR反应体系中加入荧光集团，通过荧光信号的积累实时监控整个PCR扩增过程。

4.2 Ct 值 cycle threshold

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

5 试剂

除另有规定外，试剂为分析纯或生化试剂。实验用水符合GB 6682的要求。所有试剂均用无DNA酶污染的容器分装。

5.1 引物与探针

引物：5'-GGATGGGTGCACCTGGTTTACAC-3'

5'-GAAGGGCCACATTCACGAACCCCG-3'

探针：FAM-ATATGGCTCCCAGAACCGATGCTGGCCCC-BHQ1

5.2 真菌基因组 DNA 提取试剂盒：提取步骤及使用注意事项参见附录 A。

5.3 荧光定量 PCR 反应预混液：使用方法及使用注意事项参见附录 B。

5.4 1.5mL 离心管，PCR 八联管

5.5 微量可调移液器配制吸头：10μL，100μL,1000μL。

6 仪器设备

- 6.1 培养箱：28℃±1℃
- 6.2 高压灭菌锅。
- 6.3 实时荧光定量 PCR 仪。
- 6.4 高速冷冻离心机（>12000r/min）。
- 6.5 核酸蛋白分析仪。
- 6.6 微量可调移液器：量程 0.5μL~10μL；量程 10μL~100μL；量程 100μL~1000μL。
- 6.7 恒温加热器。
- 6.8 分析天平（感量 0.1mg）。
- 6.9 无菌玻璃器皿。

7 操作方法

7.1 样本富集

在样本制备区进行。收集1mL酒样，12000 r/min离心2min，弃上清，重复上述操作至收集5mL酒样，弃上清。

7.2 模板 DNA 的制备

采用等效的真菌基因组DNA提取试剂盒进行DNA提取。操作过程按试剂盒要求进行。

8 实时荧光 PCR 检测

8.1 扩增试剂准备

为确保检测结果的准确性，在进行实际样品检测时，应设立空白对照、阴性对照和阳性对照实验。实时荧光PCR反应体系见表1。从荧光定量PCR反应预混液中取出相应的实时荧光PCR反应应用试剂，融化后，瞬时离心5s后再用。每个样品设置2个平行重复。

表1 实时荧光 PCR 反应体系

试剂成分	体积(μL)
2×预混液	12.5
引物混合液	1
探针	1
样品DNA	1
ddH ₂ O	至25
注1：空白对照实验时，用ddH ₂ O替代样品 DNA。 注2：阴性对照实验时，用非目标源性成分替代样品DNA。 注3：阳性对照实验时，用相应布鲁塞尔德克酵母的DNA替代样品DNA。	

8.2 实时荧光 PCR 反应程序

实时荧光PCR反应参数为：95℃ 30s；95℃ 5s、60℃ 30s，40个循环，在每次循环的退火时收集荧光。检测结束后，根据扩增曲线和Ct值判定结果。

9 结果判定与表述

9.1 质量控制

以下条件有一条不满足时，试验视为无效：

- a) 空白对照：无 FAM 荧光信号检出，Ct 值≥40.0；
- b) 阴性对照：无 FAM 荧光信号检出，Ct 值≥40.0；
- c) 阳性对照：有 FAM 荧光信号检出，且 FAM 通道出现典型的扩增曲线，Ct 值≤35.0；

9.2 结果判定

在符合9.1的情况下，检测结果如下判定：

- a) 如 C_t 值 ≤ 35.0 ，则判定为被检样品阳性；
- b) 如 C_t 值 ≥ 40.0 ，则判定为被检样品阴性；
- c) 如 $35.0 < C_t$ 值 < 40.0 ，则重复试验一次。如再次扩增后 C_t 值仍为 $35.0 < C_t$ 值 < 40.0 ，则判定被检样品阳性；若再次扩增后 C_t 值 ≥ 40.0 ，测判定被检样品阴性。

9.3 结果表述

9.3.1 结果为阳性者，表述为“检出布鲁塞尔德克酵母”。

9.3.2 结果为阴性者，表述为“未检出布鲁塞尔德克酵母”。

10 检测过程中防止交叉污染的措施

按照 GB/T 27403-2008 附录D执行。

11 废弃物处理

检测过程中的废弃物，收集后在焚烧炉中焚烧处理。

附录 A

(规范性)

真菌基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱型）的提取步骤和注意事项

A.1 真菌基因组 DNA 提取试剂盒

以某公司的植物基因组DNA提取试剂盒（离心柱型）为例。

A.2 提取步骤

A.2.1 富集5mL酒样的沉淀物于1.5mL离心管中，加入200 μ L溶液A，加入20 μ L RNase A，再加入100mg玻璃珠，在高速振荡器上振荡20min。

A.2.2 加入20 μ L蛋白酶K（10mg/mL），充分混匀，55℃消化30min，消化期间可颠倒离心管混匀数次。12000r/min离心2min，将上清转移到一个新的离心管中。

A.2.3 在上清中加入200 μ L溶液B，充分混匀。若出现白色沉淀，可55℃放置5min，沉淀即会消失。

A.2.4 加入200 μ L无水乙醇，充分混匀，此时可能会出现絮状沉淀。将溶液和絮状沉淀加入吸附柱中，放置2min。

A.2.5 12000r/min离心1min，弃废液。将吸附柱放入离心管中。

A.2.6 向吸附柱中加入600 μ L漂洗液（使用前先检查是否已加入无水乙醇），12000r/min离心1min，弃废液。将吸附柱放入离心管中。

A.2.7 重复步骤6。

A.2.8 12000r/min离心2min，将吸附柱置于室温或50℃温箱放置数分钟，以除去吸附柱中残余的漂洗液。

A.2.9 将吸附柱转入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加50 μ L~100 μ L 65℃预热的洗脱液，室温放置5min，12000r/min离心1min。

A.2.10 离心所得洗脱液再加入吸附柱中，室温放置2min，12000r/min离心2min，即得到高质量的真菌基因组DNA。

A.3 使用注意事项

A.3.1 进行样品处理时必须避免交叉污染。

A.3.2 操作时应带上无粉手套和口罩，避免DNA酶混入造成DNA分解。若污染皮肤、眼睛时，要立即用大量清水冲洗，必要时寻求医疗咨询。

附 录 B
(规范性)

荧光定量 PCR 反应预混液 Premix Ex Taq™ 的组成

B.1 荧光定量 PCR 反应预混液 Premix Ex Taq™

以某公司的荧光定量PCR反应预混液为例。

B.2 预混液试剂组成

预混液试剂组成见表B.1。

表B.1 预混液试剂组成

试剂组成	体 积
Premix Ex Taq™(Probe qPCR)(2×Conc.)*1	1mL
ROX Reference Dye (50×Conc.)*2	200μL
ROX Reference Dye II (50×Conc.)*2	200μL

B.3 使用注意事项

B.3.1 使用制品时，应轻轻上下颠倒混合均匀，避免起泡，并轻微离心后使用。 B.3.2 溶解后的试剂应于冰上放置。

B.3.2 本制品中不含有荧光探针等。

B.3.3 反应液的配制、分装应使用新的（无污染）枪头，Microtube等，尽量避免污染。