

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4675.29—2016

### 出口葡萄酒中酒香酵母检验 实时荧光 PCR 法

Determination of *Brettanomyces bruxellensis* in wine for export—  
Real-time PCR method

2016-12-12 发布

2017-07-01 实施



中 华 人 民 共 和 国  
国家质量监督检验检疫总局 发布

## 前 言

SN/T 4675《出口葡萄酒质量安全分析方法》共分为 30 个部分：

- SN/T 4675.1: 出口葡萄酒中甘油的测定 酶法；
- SN/T 4675.2: 出口葡萄酒中 2,3-丁二醇的测定 气相色谱法；
- SN/T 4675.3: 出口葡萄酒中乙醇稳定碳同位素比值的测定；
- SN/T 4675.4: 出口葡萄酒中 乳酸的测定 酶法；
- SN/T 4675.5: 出口葡萄酒中有机酸的测定 离子色谱法；
- SN/T 4675.6: 出口葡萄酒中葡萄糖、果糖和蔗糖的测定；
- SN/T 4675.7: 出口葡萄酒中乙醛的测定 气相色谱-质谱法；
- SN/T 4675.8: 出口葡萄酒中 5-羟甲基糠醛的测定 液相色谱法；
- SN/T 4675.9: 出口葡萄酒中二甘醇的测定 气相色谱-质谱法；
- SN/T 4675.10: 出口葡萄酒中赭曲霉毒素 A 的测定 液相色谱-质谱/质谱法；
- SN/T 4675.11: 出口葡萄酒中 7 种花色苷的测定 超高效液相色谱法；
- SN/T 4675.12: 出口葡萄酒中溶菌酶的测定 液相色谱法；
- SN/T 4675.13: 出口葡萄酒中 2,4,6-三氯苯甲醚残留量的测定 气相色谱-质谱法；
- SN/T 4675.14: 出口葡萄酒中纳他霉素的测定 液相色谱-质谱/质谱法；
- SN/T 4675.15: 出口葡萄酒中水杨酸、脱氢乙酸和对氯苯甲酸的测定 液相色谱法；
- SN/T 4675.16: 出口葡萄酒中富马酸的测定 液相色谱-质谱/质谱法；
- SN/T 4675.17: 出口葡萄酒中丁基锡含量的测定 气相色谱-质谱/质谱法；
- SN/T 4675.18: 出口葡萄酒中二硫代氨基甲酸酯 残留量的测定 顶空气相色谱法；
- SN/T 4675.19: 出口葡萄酒中钠、镁、钾、钙、铬、锰、铁、铜、锌、砷、硒、银、镉、铅的测定；
- SN/T 4675.20: 出口葡萄酒中稀土元素的测定 电感耦合等离子体质谱法；
- SN/T 4675.21: 出口葡萄酒中可溶性无机盐的测定 离子色谱法；
- SN/T 4675.22: 出口葡萄酒中总二氧化硫的测定 比色法；
- SN/T 4675.23: 出口葡萄酒及葡萄汁中氨氮的测定 连续流动分析法；
- SN/T 4675.24: 出口葡萄酒福林-肖卡指数的测定 分光光度计法；
- SN/T 4675.25: 出口葡萄酒颜色的测定 CIE 1976(L\* a\* b\*)色空间法；
- SN/T 4675.26: 出口葡萄酒浊度的测定 散射光法；
- SN/T 4675.27: 出口葡萄酒碱性灰分的测定；
- SN/T 4675.28: 出口葡萄酒细菌、霉菌及酵母的计数；
- SN/T 4675.29: 出口葡萄酒中酒香酵母检验 实时荧光 PCR 法；
- SN/T 4675.30: 出口葡萄酒中拜氏接合酵母检验 实时荧光 PCR 法。

本部分为 SN/T 4675 的第 29 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：刘夏、李晓虹、王传现、钱云开、李志勇、宋青、刘青、凌莉、张旺。

## 出口葡萄酒中酒香酵母检验 实时荧光 PCR 法

### 1 范围

SN/T 4675 的本部分规定了葡萄酒中酒香酵母(*Brettanomyces bruxellensis*)的定性检测方法。  
本部分适用于各种葡萄酒中酒香酵母菌的检测。

### 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 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

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件

#### 3.1

**酒香酵母** *Brettanomyces bruxellensis*

酒香酵母是一种可以存活于葡萄酒中的酵母菌,可以产生 4-乙基苯酚和 4-乙基-2-甲氧基苯酚等酚类化合物,导致葡萄酒发出类似马汗的味道,如果浓度过高,会严重影响葡萄酒的品质。

### 4 生物安全措施和防污染措施

#### 4.1 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进行检测,所有培养物和废弃物应参照 GB 19489 中的有关规定执行。

#### 4.2 防污染措施

防止污染措施应符合 GB/T 27403 的规定。

### 5 仪器和设备

5.1 水浴锅或加热模板:95℃±5℃。

5.2 高速冷冻离心机:最高离心力不低于 12 000 g。

5.3 离心管:50 mL、2 mL。

5.4 移液器:量程 0.5 μL~10 μL;量程 10 μL~100 μL;量程 100 μL~1 000 μL 及无菌吸头。



- 5.5 无菌吸管,10.0 mL(具 0.1 mL 刻度)或移液器及吸头  
 5.6 计时器。  
 5.7 细胞破碎玻璃珠:直径 500  $\mu\text{m}$ 。  
 5.8 涡旋振荡器。  
 5.9 恒温干燥箱: $48\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。  
 5.10 冰箱: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。  
 5.11 荧光 PCR 仪。  
 5.12 无 Dnase PCR 反应板或反应管。

## 6 试剂和材料

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。

- 6.1 实验用水:应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。  
 6.2 Tris-HCl 缓冲液:10 mmol/L,pH 8.0,见 A.1。  
 6.3 交联聚乙烯吡咯烷酮:Crosslinking polyvinylpyrrolidone,缩略语为 PVPP,360 kDa。  
 6.4 TE 溶液:见 A.2。  
 6.5 溶液 I:见 A.3。  
 6.6 抽提液:见 A.4,4  $^{\circ}\text{C}$  保存。  
 6.7 醋酸铵溶液:4 mol/L。  
 6.8 Rnase A 溶液:1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,4  $^{\circ}\text{C}$  保存。  
 6.9 引物和探针:见表 1。

表 1 引物和探针序列

| 目标基因                | 引物序列                             | 探针序列   |
|---------------------|----------------------------------|--|
| 酒香酵母 RAD4<br>蛋白编码基因 | F 5'-GTTCACACAATCCCCTCGATCAAC-3' | 5'-FAM-ATGGCGAGGATGAAAG<br>TTTGGGATACA-BHQ1-3' |
|                     | R 5'-TGCCAACCTGCCGAATGTTCTC-3'   |  |

- 6.10 酒香酵母质控菌株:NBRC 0628,或等效菌株。  
 6.11 YM 培养基:见 A.5。  
 6.12 Taq DNA 聚合酶。  
 6.13 dNTP:dATP、dTTP、dCTP、dGTP。  
 6.14 10 $\times$ PCR 缓冲液。  
 6.15  $\text{MgCl}_2$  溶液:25 mmol/L。

## 7 操作步骤

### 7.1 样品处理

取 45 mL 待分析葡萄酒样品,置于具有无菌螺旋塞的 50 mL 试管中,在 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 5 min,离心力为 9 300 g,弃去上清液。然后加入 45 mL 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 洗涤残渣,涡旋振荡上述溶液,在 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 5 min,离心力为 9300 g,弃去上清液。轻微涡旋,使沉淀悬浮于残留液体中。

## 7.2 DNA 提取

### 7.2.1 细胞裂解

向收集的沉淀悬浮液中加入 0.3 g 玻璃珠,然后加入 PVPP,使其最终的质量/体积比为 1%。加入 200  $\mu\text{L}$  溶液 I 和 200  $\mu\text{L}$  抽提液。涡旋振荡上述溶液 80 s,然后置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷却 80 s;重复上述涡旋冷却步骤 3 次。

### 7.2.2 纯化 DNA

7.2.2.1 加入 200  $\mu\text{L}$  TE 溶液,12 000 g,离心 5 min。小心收集 400  $\mu\text{L}$  的上层水相至新的离心管中。如果水相和有机相分离不充分,重复上述离心步骤。

7.2.2.2 向离心管中加入 1 mL 无水乙醇,颠倒混匀 4 次~5 次。15 700 g,离心 5 min,弃上清。

7.2.2.3 加入 400  $\mu\text{L}$  TE 溶液和 30  $\mu\text{L}$  浓度为 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 RNaseA 溶液,重悬沉淀。37  $^{\circ}\text{C}$  温育 5 min。

7.2.2.4 加入 10  $\mu\text{L}$  浓度为 4 mol/L 的醋酸铵溶液和 1 mL 无水乙醇,颠倒混匀。

7.2.2.5 12 000 g,离心 5 min,弃上清。倒置于吸水纸上,吸干液体,不同样品应在吸水纸不同位置吸干。

7.2.2.6 沉淀干燥:打开离心管盖,48  $^{\circ}\text{C}$  恒温干燥 1 h。

7.2.2.7 向干燥后的离心管底部加入 25  $\mu\text{L}$  TE,涡旋震荡后于 4 $^{\circ}\text{C}$  放置 1 h~18 h(帮助 DNA 溶解)。室温下测定 DNA 含量。当 DNA 浓度为 0.34  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~340  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.7~1.9 之间时,适宜 PCR 扩增。

注:可使用等效商品化 DNA 提取试剂盒,按照操作说明书制备 DNA 模板。

## 7.3 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照:采用不含目标基因序列的菌株 DNA 为模板,每个反应板至少设置 1 个阴性对照。

阳性对照:接种酒香酵母到 10 mL YM 培养基中,30  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h,取 1 mL 菌液提取 DNA 模板,作为阳性对照,每个反应板至少设置 2 个阳性对照。

设两个空白对照:

——提取 DNA 时设置的提取空白对照(以水代替样品):

——RT-PCR 反应的空白对照(以 TE 溶液代替 DNA 模板)。

## 7.4 RT-PCR 反应体系

RT-PCR 反应体系见表 2。每个样品各做 2 个平行孔。加样时应使样品 DNA 溶液完全加入反应液中,不要粘附于管壁上。在反应体系配制完成后,密封反应板或联排管。密封后,可对反应板或联排管进行短时间离心以除掉其中的气泡。

表 2 实时荧光 PCR 反应体系

| 试剂名称                               | 试剂用量/ $\mu\text{L}$ |
|------------------------------------|---------------------|
| 10 $\times$ PCR 反应缓冲液              | 2.5                 |
| MgCl <sub>2</sub> 溶液(25 mmol/L)    | 3.0                 |
| dNTP(10 mmol/L)                    | 1.0                 |
| 上游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) | 1.0                 |
| 下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) | 1.0                 |



SN/T 4675.29—2016

表 2(续)

| 试剂名称                             | 试剂用量/ $\mu\text{L}$ |
|----------------------------------|---------------------|
| Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) | 0.5                 |
| 探针 Bret(10 $\mu\text{mol/L}$ )   | 0.5                 |
| DNA 模板                           | 5.0                 |
| 超纯水                              | 10.5                |
| 总体积                              | 25                  |

### 7.5 RT-PCR 反应参数

95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  退火延伸 20 s, 同时收集荧光信号, 72  $^{\circ}\text{C}$  20 s, 50 个循环; 4  $^{\circ}\text{C}$  保存反应产物。

反应体系与反应参数可以根据仪器型号或反应预混液类型的不同, 进行适当的调整。

## 8 质量控制

基本原则: 在对结果进行最终判读前, 应首先检查阴性和阳性对照结果。为保证试验有效, 阴性和阳性对照的结果应符合表 3 要求。任一种对照出现非下述正常结果, 应重做实验。

表 3 质量控制参考表

| 对照名称 | 结果                      |
|------|-------------------------|
| 阴性对照 | 无扩增曲线, $C_t \geq 40$    |
| 阳性对照 | 出现典型扩增曲线, $C_t \leq 30$ |
| 空白对照 | 无扩增曲线, $C_t \geq 40$    |

## 9 结果判断

9.1 如果检测样品的  $C_t$  值  $\leq 35$ , 并且出现典型扩增曲线, 可判断该样品检测结果为阳性。

9.2 如果检测样品的  $C_t$  值  $\geq 40$ , 并且无典型扩增曲线, 可判断该样品检测结果为阴性。

9.3 如果  $35 < C_t$  值  $< 40$ , 样品重新检测。如果  $C_t$  值仍在该范围内, 且曲线有明显的对数增长期, 可判定样品检测结果为阳性。否则判定检测结果为阴性。

## 10 结果表达

10.1 如果  $C_t$  值  $\geq 40$ , 检测结果为阴性, 表述为“该样品未检出酒香酵母”。

10.2 如果  $C_t$  值  $\leq 35$ , 检测结果为阳性, 表述为“该样品中酒香酵母荧光 PCR 检测阳性”。

10.3 如果  $35 < C_t$  值  $< 40$ , 样品重新检测。如果  $C_t$  值仍在该范围内, 且曲线有明显的对数增长期, 表述为“该样品中酒香酵母荧光 PCR 检测阳性”; 否则表述为“该样品未检出酒香酵母”。

附 录 A  
(规范性附录)  
培养基和试剂

A.1 Tris-HCl 缓冲液

称取 1.21 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris),用 800 mL 超纯水溶解。用 HCl 调节 pH 值为 8.0,加超纯水定容至 1 000 mL。121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2 TE 溶液

称取 1.21 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris),用 800 mL 超纯水溶解。用 HCl 调节 pH 值。然后添加 0.372 g EDTA,调节 pH 至 8.0 后,加超纯水定容至 1 000 mL。121 °C 高压灭菌 15 min。

A.3 溶液 I

制备 500 mL 2×TE 溶液,并添加 100 mL 浓度为 1 mol/L 的 NaCl 溶液和 100 mL 10%的 SDS 溶液(稍微加热以溶解 SDS)和 20 g Triton ×100,加超纯水定容至 1 000 mL。

A.4 苯酚、氯仿、异戊醇抽提液

添加 48 mL 氯仿和 2 mL 异戊醇到 50 mL 苯酚饱和的 pH 8.0 的 TE 溶液中,4 °C 储存备用。

A.5 YM 培养基

A.5.1 成分

|      |          |
|------|----------|
| 酵母浸粉 | 3 g      |
| 麦芽浸粉 | 3 g      |
| 蛋白胨  | 5 g      |
| 葡萄糖  | 10 g     |
| 蒸馏水  | 1 000 mL |

A.5.2 制备

将上述成分溶解于蒸馏水中,调节 pH 为 pH 6.8±0.2,121 °C 高压灭菌 15 min,备用。

中华人民共和国出入境检验检疫  
行 业 标 准  
出口葡萄酒中酒香酵母检验  
实时荧光 PCR 法

SN/T 4675.29—2016

\*

中国标准出版社出版  
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)  
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

\*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 14 千字  
2017 年 12 月第一版 2017 年 12 月第一次印刷  
印数 1—500

\*

书号: 155066 · 2-32299 定价 16.00 元



SN/T 4675.29-2016