

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4525.6—2016

出口食品中致病菌的分子分型
MLST 方法
第 6 部分：化脓链球菌

Multilocus sequence typing detection method for pathogens in export food—
Part 6: *Streptococcus pyogenes*

2016-06-28 发布

2017-02-01 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 4525《出口食品中致病菌的分子分型 MLST 方法》共分 10 个部分：

- 第 1 部分：沙门氏菌；
- 第 2 部分：金黄色葡萄球菌；
- 第 3 部分：副溶血性弧菌；
- 第 4 部分：霍乱弧菌；
- 第 5 部分：克罗诺杆菌；
- 第 6 部分：化脓链球菌；
- 第 7 部分：空肠弯曲菌；
- 第 8 部分：致泻性大肠埃希氏菌；
- 第 9 部分：单核细胞增生李斯特氏菌；
- 第 10 部分：小肠结肠炎耶尔森氏菌。

本部分为 SN/T 4525 的第 6 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：中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：蒋鲁岩、王毅谦、袁芳、封振、薛峰、肖震、倪鹏、邵景东、曾德新。

出口食品中致病菌的分子分型 MLST 方法 第 6 部分:化脓链球菌

1 范围

SN/T 4525 的本部分规定了检测出口食品中化脓链球菌的分子分型 MLST 法。
本部分适用于出口食品中化脓链球菌的分子分型检测。

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 4789.11 食品安全国家标准 食品微生物学检验 β 型溶血性链球菌检验

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 定义、术语和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

管家基因 house-keeping genes

所有细胞中均要表达的一类基因,其产物是对维持细胞基本生命活动所必需的,其基因序列高度保守并且在大多数情况下持续表达。又称看家基因,持家基因。

3.1.2

Taq DNA 酶 *Thermus aquaticus* DNA polymerase

从 *Thermus aquaticus* 细菌中提取的耐热 DNA 聚合酶。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

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

EDTA:乙二胺四乙酸(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)

MLST:多位点序列分型(multilocus sequence typing)

ST:序列型(Sequence Type)

Tris:三(羟甲基)氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane]

4 原理

MLST 是通过测定多个管家基因中长度约为 470 bp 核心片段的核苷酸序列,对其组合进行索引编号,不同的菌株对应不同的序列型,从而揭示菌株间等位基因的多样性。MLST 分型中多个管家基因的序列分析比较在实验过程的操作性与结果的可靠性之间取得了平衡,且结果准确,所得数据在不同的实验室间具有良好的可比性。

5 试剂和材料

除有特殊说明外,所有实验用试剂均为分析纯;实验用水符合 GB/T 6682 中一级水的要求。所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

5.1 DNA 提取液:50 mmol/L Tris-HCl(pH8.0),100 mmol/L EDTA(pH 8.0),100 mmol/L NaCl,1%SDS。

5.2 酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1)。

5.3 异丙醇。

5.4 75%乙醇。

5.5 TE 溶液(pH8.0):10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0),1 mmol/L EDTA(pH8.0),高压灭菌。

5.6 *Taq* DNA 酶。

5.7 dNTP:dATP、dTTP、dCTP、dGTP。

5.8 引物:扩增引物和测序引物序列见表 A.2。

5.9 10×PCR 缓冲液:200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.4),200 mmol/L 氯化钾,15 mmol/L 氯化镁。

5.10 2%琼脂糖凝胶。

5.11 EB 核酸染色剂。

5.12 分子量标记:100 bp~2 000 bp DNA marker。

5.13 5×TBE 电泳缓冲液:445 mmol/L Tris,445 mmol/L 硼酸,10 mmol/L EDTA(pH8.0)。使用时稀释为 0.5×TBE 电泳缓冲液。

5.14 质控菌株:化脓链球菌 *Streptococcus pyogenes* M1 GAS 或等效菌株。

6 仪器和设备

6.1 离心机。

6.2 天平:量程 2 kg,感量 0.1 g。

6.3 pH 计。

6.4 涡旋振荡器。

6.5 PCR 仪。

6.6 电泳仪。

6.7 凝胶成像仪。

6.8 基因测序仪。

6.9 超净工作台。

6.10 移液器:0.1 μL~2.5 μL、2 μL~20 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL。

7 操作流程

多位点序列分子分型操作流程见图 1。

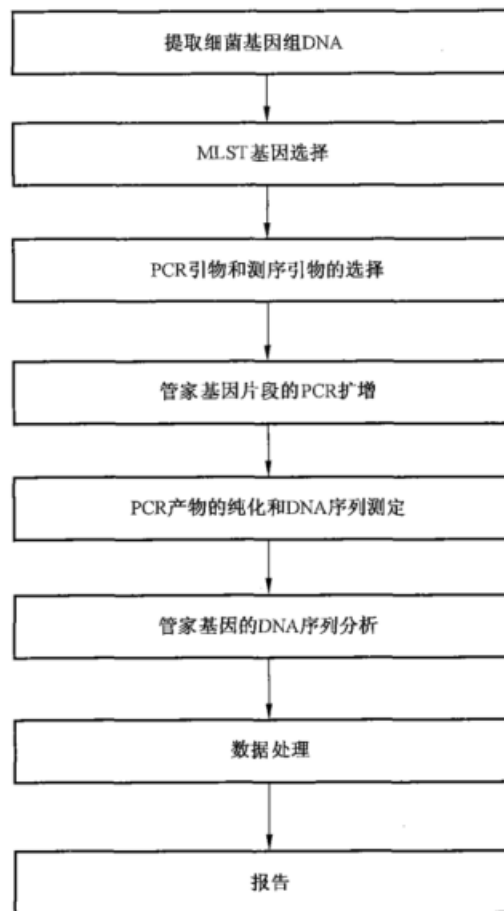


图 1 多位点序列分型(MLST)操作步骤

8 操作步骤

8.1 细菌基因组 DNA 提取

将经过 GB 4789.11 的方法进行鉴定为化脓链球菌的菌株提取基因组 DNA。取待测样本 1 mL, 加到 1.5 mL 离心管中, 8 000 r/min 离心 3 min, 弃去上清。加入 750 μ L DNA 提取液, 65 $^{\circ}$ C 温浴 30 min, 加酚: 三氯甲烷: 异戊醇(25: 24: 1)500 μ L, 振荡混匀, 13 000 r/min 离心 5 min, 吸取 500 μ L 上清液与 400 μ L 的异丙醇充分混合, 13 000 r/min 离心 5 min, 75% 乙醇冲洗沉淀一次, 13 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 沉淀干燥后溶于 30 μ L TE 溶液中, 立即用于检测或短期保存于 -20 $^{\circ}$ C。

注: 也可使用其他经验证的 DNA 提取方法或等效的商品化细菌 DNA 提取试剂盒, 按照其使用说明操作。

8.2 DNA 浓度和纯度的测定

取 5 μ L DNA 溶液加双蒸水稀释至 1 mL, 使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计分别检测 260 nm 和 280 nm 处的吸光值 A_{260} 和 A_{280} 。DNA 的浓度按式(1)计算:

$$c = A \times N \times 50 / 1\,000 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

c —— DNA 浓度, 单位为微克每微升(μ g/ μ L);

A —— 260 nm 处的吸光值;

N ——核酸稀释倍数。

当 A_{260}/A_{280} 比值在 1.7~1.9 之间时,适宜于 PCR 扩增。

8.3 MLST 基因选择

按表 A.1 所示,选择化脓链球菌的 7 个管家基因进行 MLST 分析。

8.4 PCR 扩增引物和测序引物的选择

按表 A.2 中的序列,合成化脓链球菌 7 个管家基因对应的 7 对 PCR 扩增引物和 7 对测序引物。引物在使用前按照相应分子量进行稀释到 10 $\mu\text{mol/L}$, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

8.5 目的基因片段的 PCR 扩增

反应体系体积为 50 μL : 10 \times PCR 缓冲液 5 μL 、dNTP(10 mmol/L) 2 μL 、引物对(10 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL 、Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL) 0.4 μL 、模板 DNA 5 μL 、水 33.6 μL 。

反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。

将 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后紫外光下成像观察,条带单一且明亮的样品进行 PCR 产物纯化与 DNA 序列测定。

8.6 DNA 序列测定

采用表 A.2 中的测序引物用基因测序仪对管家基因的 DNA 序列进行双向测序。也可请有同等能力的检测公司测序。

8.7 结果报告

将所得到的化脓链球菌 7 个管家基因测序结果与 GenBank 中的已有的相关基因进行 BLAST,然后使用 Lasergene7.1 对序列进行 Clustal V 分析,将上下游序列整合后得到完整序列,为减小误差首尾的几个碱基不计算入序列测定结果。最后将测序结果上传至 MLST 网站(<http://www.mlst.net>)进行在线数据分析,得到的结果与 MLST 数据库进行比对。在确定序列型的基础上应用 e-BURST 或其他软件将菌株分为各个谱系组,构建系统遗传进化树(参见附录 B)。

9 生物安全措施和防污染措施

9.1 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检测化脓链球菌,所有培养物和废弃物应按照 GB 19489 中的有关规定执行。

9.2 防污染措施

防止污染措施应符合 GB/T 27403 的规定。

附录 A
(规范性附录)

化脓链球菌多位点序列分型的管家基因及引物序列

表 A.1 化脓链球菌管家基因

基因	片段	MLST 基因位置 ^a	管家基因名称
gki	498	1258289-1258786	葡糖激酶(Glucose kinase)
gtr	450	1236746-1237195	谷氨酰胺转运蛋白(Glutamine transporter protein)
murI	438	312730-313167	谷氨酸消旋酶(Glutamate racemase)
mutS	405	1787594-1787998	DNA 错配修复蛋白(DNA mismatch repair protein)
recP	459	1391380-1391838	转酮醇酶(Transketolase)
xpt	450	930970-931419	黄嘌呤磷酸核糖转移酶(Xanthine phosphoribosyl transferase)
yqiL	434	129469-129902	乙酰辅酶 A 乙酰转移酶(Acetyl-CoA acetyltransferase)

^a 该位置是基于化脓性链球菌 M1 GAS 全基因组序列而定,该菌株基因组全长 1 852 433 bp。

表 A.2 化脓链球菌管家基因的扩增引物序列和测序引物序列

引物名称	序列(5'→3')
gki-up	GGCATTGGAATGGGATCACC
gki-dn	TCTCCTGCTGCTGACAC
gtr-up	GAGGTGTGGTGATTATTGG
gtr-dn	GCAAAGCCCATTTCATGAGTC
murI-up	TGCTGACTCAAAATGTTAAAATGATTG
murI-dn	GATGATAATTCACCGTTAATGTCAAAATAG
murS-up	GAAGAGTCATCTAGTTTAGAATACGAT
murS-dn	AGAGAGTTGTCACTTGCGCGTTTGATTGCT
recP-up	GCAAATCTGGACACCCAGG
recP-dn	CTTTCACAAGGATATGTTGCC
xpt-up	TTACTTGAAGAACGCATCTTA
xpt-dn	ATGAGGTCACTTCAATGCCC
yqiL-up	TGCAACAGTATGGACTGACCAGAGAACAAGATGC
yqiL-dn	CAAGGTCTCGTGAAACCGCTAAAGCCTGAG

附录 B
(资料性附录)
系统遗传进化树的构建

将所得到的化脓链球菌 7 个管家基因核酸扩增片段 DNA 序列进行 MLST 分析,获得菌株所对应的等位基因图谱,确定化脓链球菌分离株的序列型(Sequence Type,ST),并与 PubMLST 数据库中国际菌株的资料进行比较。在确定 STs 的基础上应用 e-BURST 程序或其他软件将菌株分为各个谱系组(clonal complex),构建系统遗传进化树。图 B.1 为部分化脓链球菌进行 MLST 分析后,绘制的系统遗传进化树图。

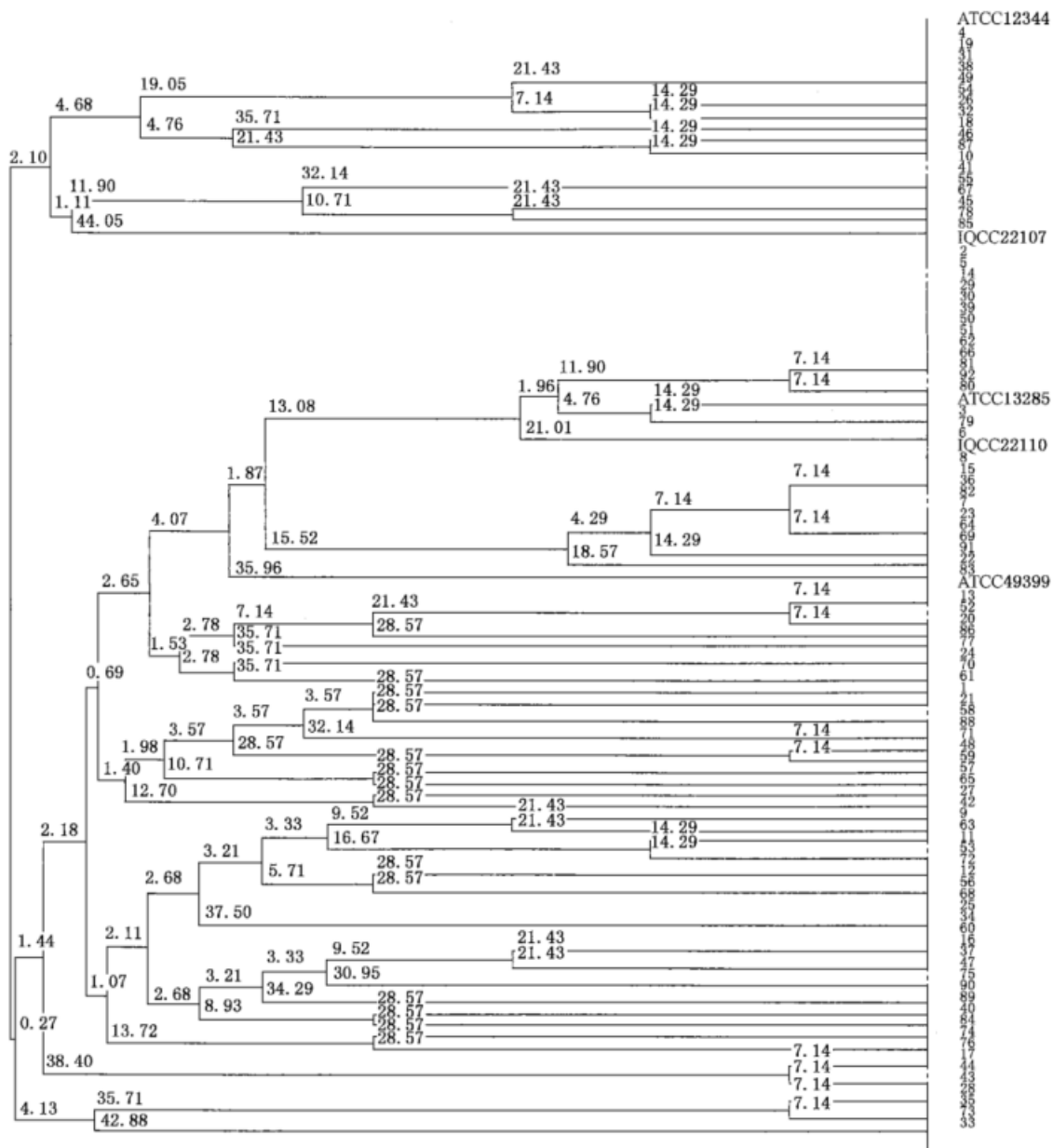


图 B.1 部分化脓链球菌系统遗传进化树图