



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4453—2016

出口食品中金黄色葡萄球菌的分子分型 SPA 基因分型方法

Molecular typing method of *Staphylococcus aureus* in export food—
SPA typing method

2016-03-09 发布

2016-10-01 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

本标准按照 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。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：深圳市检验检疫科学研究院、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：赵芳、洪小柳、刘慧玲、黄李华、吕敬章、葛丽雅、张恒、马淑棉、黄欣迪、蒋原、薛峰、闫笑梅、张欢。

出口食品中金黄色葡萄球菌的分子分型 SPA 基因分型方法

1 范围

本标准规定了金黄色葡萄球菌的 SPA 基因分型方法。

本标准适用于金黄色葡萄球菌的 SPA 基因分型。

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 4789.10 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验

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 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CTAB 十六烷基三甲基溴化铵(Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide)

DNA 脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid)

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

EDTA 乙二胺四乙酸(ethylene diaminetetraacetic acid)

PCR 聚合酶链反应(polymerase chain reaction)

SDS 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate)

SPA 葡萄球菌 A 蛋白(*Staphylococcus* proteinA)

Taq 酶 DNA 聚合酶

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

4 原理

SPA 是葡萄球菌细胞壁的一种表面蛋白,绝大多数金黄色葡萄球菌均含有 SPA。编码 SPA 基因的 X 区包含有 2 个~15 个长 21 bp~27 bp 的重复序列,该区由于重复序列数目、重复序列特征及重复序列的排列顺序不同而具有高度的多态性。SPA 基因的 X 区具有良好的重复性和体内、体外稳定性,适合用来基因分型。根据 SPA 基因序列设计引物对 X 区进行扩增,将扩增产物的测序结果进行比对分析,从而达到分型的目的。

5 试剂和材料

除另有规定外,所有试剂为分析纯或生化试剂。实验用水符合 GB/T 6682 的要求。所有试剂均用

SN/T 4453—2016

无 DNA 酶污染的容器分装。

5.1 DNA 提取试剂:称取 0.1 g chelex 100 粉末,加入 100 mL 灭菌蒸馏水,摇匀即可。

5.2 RNase(核糖核酸酶)溶液(20 mg/mL)。

5.3 葡萄球菌溶菌酶溶液(1 mg/mL)。

5.4 TE 缓冲液:10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),1 mmol/L EDTA(pH 8.0)。

5.5 蛋白酶 k 溶液(25 mg/mL)。

5.6 NaCl(氯化钠)溶液(5 mol/L)。

5.7 三氯甲烷(氯仿)。

5.8 酚。

5.9 异戊醇。

5.10 异丙醇。

5.11 10×PCR 缓冲液:200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),200 mmol/L 氯化钾。

5.12 琼脂糖。

5.13 DNA 分子量标记物(100 bp~1 000 bp)。

5.14 血琼脂平板:见 A.3。

5.15 CTAB-NaCl 溶液:见 A.1。

5.16 无菌生理盐水:见 A.2。

6 仪器和设备

6.1 PCR 仪。

6.2 DNA 测序仪。

6.3 电泳装置。

6.4 凝胶成像系统。

6.5 电热仪。

6.6 离心机:离心力不小于 12 000g。

6.7 恒温培养箱:36 °C±2 °C。

6.8 移液器:2 μL~10 μL、10 μL~100 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL。

7 检测步骤

7.1 样品制备、增菌培养和分离

样品的制备、增菌培养和分离步骤参照 GB 4789.10 方法进行。

7.2 模版 DNA 的制备

7.2.1 直接提取法

金黄色葡萄球菌经培养后,取增菌液 1 mL,加到 1.5 mL 无菌离心管中,13 000 r/min 离心 5 min,吸弃上清;加入 50 μL DNA 提取液,混匀后沸水浴 5 min,13 000 r/min 离心 5 min,取上清保存于 -20 °C 备用以待检测。对分离到的菌落,可直接挑取加入 50 μL DNA 提取液,再按照上述步骤制备模版 DNA 以待检测。

7.2.2 CTAB 法

金黄色葡萄球菌在血平板上 36 °C 过夜培养后,挑取菌落用无菌生理盐水比浊到 0.5 麦氏单位;

13 000 r/min离心 5 min,吸弃上清;加入 280 μ L TE 缓冲液、2.5 μ L RNase 和 50 μ L 的葡萄球菌溶菌酶,36 $^{\circ}$ C 温育 1 h;加入 30 μ L 10%SDS、2.5 μ L RNase 和 4 μ L 蛋白酶 k,36 $^{\circ}$ C 温育 1 h;加入 100 μ L NaCl 溶液和 80 μ L CTAB-NaCl 溶液,65 $^{\circ}$ C 温育 10 min;加入等体积的氯仿混匀,13 000 r/min 离心 5 min;将上层液转移到新的管中,等体积的酚:氯仿:异戊醇(体积比为:25:24:1)抽提两次,随后等体积氯仿:异戊醇(体积比为:24:1)抽提一次;吸取上层液到新管中,加入 500 μ L 异丙醇沉淀 DNA,室温放置 20 min,13 000 r/min 离心 10 min,吸弃上清液;加入 1 mL 70%乙醇溶液,13 000 r/min 离心 5 min,吸弃上清,加入 50 μ L TE 缓冲液溶解 DNA,立即使用或保存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

也可使用等效的商业化的 DNA 提取试剂盒并按其说明制备模版 DNA。

7.3 PCR 扩增

7.3.1 PCR 扩增和测序引物序列

正向引物:5'-TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC-3';
反向引物:5'-CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT-3'。

7.3.2 PCR 反应体系

见表 1。

表 1 PCR 反应体系

试剂	贮备液浓度	加样体积/ μ L	终浓度
双蒸水	—	补至 50	—
10 \times PCR 缓冲液	—	5	—
Mg ²⁺	25 mmol/L	3	1.5 mmol/L
dNTP	2.5 mmol/L	4	0.18 mmol/L
上游引物	10 μ mol/L	0.5	0.04 μ mol/L
下游引物	10 μ mol/L	0.5	0.04 μ mol/L
Taq 酶	5 U/ μ L	0.5	0.05 U/ μ L
模板 DNA	—	2	—
注 1: 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。 注 2: 每个反应体系应设置两个平行反应。			

7.3.3 反应条件

94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;4 $^{\circ}$ C 保存反应产物。

注: PCR 反应参数也可根据基因扩增仪型号的不同进行适当的调整。

7.4 电泳及 DNA 测序

制备 1.5%~2%的琼脂糖凝胶,取 5 μ L~15 μ L PCR 扩增产物,分别和 2 μ L 上样缓冲液混合,进行点样,用 DNA 分子量标记物做参照,100 V 恒压电泳,电泳 20 min~40 min,使用凝胶成像系统观察结果。观察到单一条带的 PCR 扩增产物,用相应测序引物进行双向测序。

SN/T 4453—2016

7.5 SPA 基因型的确定

对测序结果进行比对分析,截取 SPA 基因重复序列区域,通过 SPA 基因分型数据库得到重复单元的编号和 SPA 基因型,见附录 B。

8 防止污染及生物安全的措施

参照 GB/T 27403 和 GB 19489 中的有关规定执行。

9 结果与报告

通过对测序结果进行比对分析,并根据 SPA 基因分型数据库(<http://www.ridom.de/spaserver/>)的分型结果,报告金黄色葡萄球菌的 SPA 基因型。

附 录 A
(规范性附录)
相 关 试 剂

A.1 CTAB-NaCl 溶液

A.1.1 成分

CTAB	4.0 g
氯化钠	16.4 g
1 mol/L Tris-HCl(pH8.0)	20.0 mL
0.5 mol/L EDTA	8.0 mL

A.1.2 制法

先用 70 mL 蒸馏水溶解,再定容至 200 mL,121 ℃灭菌 15 min。冷却后加入 0.2%~1% 2-巯基乙醇(400 μL),摇匀。

A.2 无菌生理盐水

A.2.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.2.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中,121 ℃高压灭菌 15 min。

A.3 血琼脂平板

A.3.1 成分

豆粉琼脂(pH7.4~7.6)	100.0 mL
脱纤维羊血(或兔血)	5.0 mL~100 mL

A.3.2 制法

加热融化琼脂,冷却至 50 ℃,以无菌操作加入脱纤维羊血,摇匀,倾注平板。

附 录 B
(规范性附录)

DNA 序列分析和 SPA 基因分型步骤

B.1 SPA 基因重复序列区域 5'端的标志序列为 RCAMCAAAA(与重复序列的 5'端起始相距 0 bp), 3'端的标志序列为 TAYATGTCGT(与重复序列的 3'端末尾相距 19 bp 或 18 bp)。按上述规则截取 SPA 基因重复序列区域,并按照 24 bp 分割成不同的重复单元。

B.2 登陆官方网站 <http://www.ridom.de/spaserver/>,将每个重复单元的序列粘贴到页面下方“Search for a spa-type or repeat;”后的文本框中,点击 search,即得到该重复单元的编号。按 5'→3'的顺序依次确定每一个重复单元的编号。

B.3 上述步骤完成后,将所有重复单元的编号(5'→3'的顺序)依次输入文本框中,点击 search,得到该菌株的 SPA 基因型。

注意:输入时去掉每个重复单元编号前的“r”。

B.4 如果在搜索重复单元的编号或是 SPA 基因型别时发现是新型,可向官方网站数据库进行提交序列及峰图进行确认,获取新的 SPA 基因型别编号。
