



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4525.1—2016

## 出口食品中致病菌的分子分型 MLST 方法 第 1 部分:沙门氏菌

Multilocus sequence typing detection method for pathogens in export food—  
Part 1: *Salmonella*

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 1 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：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。

本部分主要起草人：林燕奎、刘慧玲、袁芳、吕敬章、马淑棉、黄欣迪、葛丽雅、黄李华、赵芳、匡燕云、蒋原、薛峰。

# 出口食品中致病菌的分子分型 MLST 方法 第 1 部分:沙门氏菌

## 1 范围

SN/T 4525 的本部分规定了出口食品中沙门氏菌分子分型 MLST 检测方法。  
本部分适用于出口食品中沙门氏菌的分子分型检测。

## 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 4789.4 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验

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 术语和定义、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或生化试剂;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 提取试剂:细菌基因组 DNA 提取试剂盒。

5.2 *Taq* DNA 酶。

5.3 dNTP:dATP、dTTP、dCTP、dGTP。

5.4 引物:扩增引物和测序引物序列见表 A.2。

5.5 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。

5.6 琼脂糖凝胶。

5.7 Gelred 核酸染色剂。

5.8 6×溴酚蓝上样缓冲液。

5.9 分子量标记:100 bp DNA marker。

5.10 5×TBE 电泳缓冲液:445 mmol/L Tris,445 mmol/L 硼酸,10 mmol/L EDTA(pH 8.0)。使用时稀释为 0.5×TBE 电泳缓冲液。

5.11 质控菌株:肠炎沙门氏菌 ATCC 13076 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 检测程序

根据沙门氏菌的 7 个管家基因,设计 PCR 引物和测序引物序列(见附录 A),通过管家基因片段的 PCR 扩增,再进行 PCR 产物的纯化和 DNA 序列双向测定,将所得到的沙门氏菌 7 个管家基因测序结果的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://mist.warwick.ac.uk/mlst/>)进行在线数据分析,得到的结果与 MLST 数据库进行比对,获得菌株所对应的等位基因图谱,确定沙门氏菌分离株的序列型。在确定 ST 基础上应用 eBURST 程序对菌株进行分析,构建系统遗传进化树(参见附录 B)。

MLST 的操作程序见图 1。

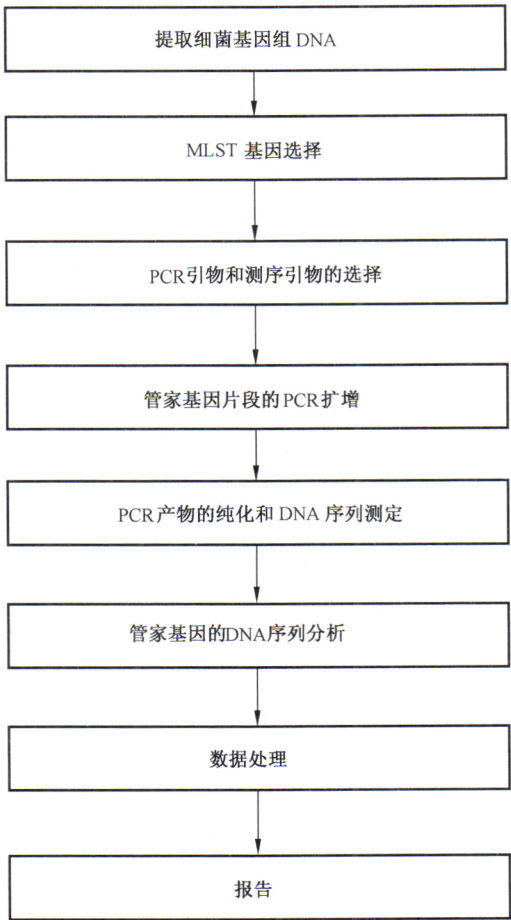


图 1 MLST 操作程序

8 检测步骤

8.1 细菌基因组 DNA 提取

将经过 GB 4789.4 的方法鉴定为沙门氏菌的菌株提取基因组 DNA。

8.2 MLST 基因选择

按表 A.1 所示,选择沙门氏菌的 7 个管家基因进行 MLST 分析。

8.3 PCR 扩增引物和测序引物的选择

按表 A.2 中的序列,合成沙门氏菌 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  $\mu\text{mol/L}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

8.4 管家基因片段的 PCR 扩增

反应体系体积为 50  $\mu\text{L}$ : 10 $\times$ PCR 缓冲液 5  $\mu\text{L}$ 、dNTP(2.5 mmol/L) 4  $\mu\text{L}$ 、引物对(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ 、*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ 、模版 DNA 2  $\mu\text{L}$ 、水 34.6  $\mu\text{L}$ 。

*aroC*、*hemD*、*hisD*、*sucA*、*thrA* 基因的反应条件为:预变性 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min;变性 94  $^{\circ}\text{C}$  45 s,退火 60  $^{\circ}\text{C}$

45 s,延伸 72 °C 1 min,进行 35 个循环;72 °C再延伸 7 min。

dnaN、purE 基因的反应条件为:预变性 94 °C 5 min;变性 94 °C 45 s,退火 58 °C 45 s,延伸 72 °C 1 min,进行 35 个循环;72 °C再延伸 7 min。

将 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,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。

## 8.5 DNA 序列测定

将 PCR 产物纯化后,采用附录 A 中表 A.2 的测序引物对管家基因的 DNA 序列进行双向测序。

## 8.6 结果报告

将所得到的沙门氏菌 7 个管家基因测序结果与 GenBank 中的已有的相关基因进行比对,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://mlst.warwick.ac.uk/mlst/>)进行在线数据分析,得到的结果与 MLST 数据库进行比对。

## 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沙门氏菌,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)

沙门氏菌多位点序列分型的管家基因及引物序列

表 A.1 沙门氏菌管家基因

基因名称	片段大小 bp	管家基因名称
aroC	826	分支酸变位酶基因(chorismate synthase)
dnaN	833	DNA 聚合酶合成酶Ⅲβ亚单位基因(DNA polymerase Ⅲ beta subunit)
hemD	666	尿卟啉原Ⅲ同和酶基因(uroporphyrinogen Ⅲ cosynthase)
hisD	894	组氨酸脱氢酶基因(histidinol dehydrogenase)
purE	510	氨基咪唑甲酸核苷酸羧酶基因(phosphoribosylaminoimidazole carboxylase)
sucA	643	α-酮戊二酸脱氢酶基因(alpha ketoglutarate dehydrogenase)
thrA	852	天冬氨酸激酶/高丝氨酸脱氢酶基因(aspartokinase+homoserine dehydrogenase)

表 A.2 沙门氏菌管家基因的扩增引物序列和测序引物序列

引物名称	基因名称	引物序列(5'→3')
扩增引物	aroC (Forward)	CCTGGCACCTCGCGCTATAC
	aroC (Reverse)	CCACACACGGATCGTGGCG
	dnaN (Forward)	ATGAAATTTACCGTTGAACGTGA
	dnaN (Reverse)	AATTTCTCATTCGAGAGGATTGC
	hemD (Forward)	GAAGCGTTAGTGAGCCGCTCGCG
	hemD (Reverse)	ATCAGCGACCTTAATATCTTGCCA
	hisD (Forward)	GAAACGTTCCATTCCGCGCAGAC
	hisD (Reverse)	CTGAACGGTCATCCGTTTCTG
	purE (Forward)	ATGTCTTCCCGCAATAATCC
	purE (Reverse)	TCATAGCGTCCCCGCGGATC
	sucA (Forward)	AGCACCGAAGAGAAACGCTG
	sucA (Reverse)	GGTTGTTGATAACGATACGTAC
	thrA (Forward)	GTCACGGTGATCGATCCGGT
	thrA (Reverse)	CACGATATTGATATTAGCCCCG
测序引物	aroC (Forward)	GGCACCAGTATTGGCCTGCT
	aroC (Reverse)	CATATGCGCCACAATGTGTTG
	dnaN (Forward)	CCGATTCTCGGTAACCTGCT
	dnaN (Reverse)	CCATCCACCAGCTTCGAGGT
	hemD (Forward)	GTGGCCTGGAGTTTTCCTACT
	hemD (Reverse)	GACCAATAGCCGACAGCGTAG
	hisD (Forward)	GTCGGTCTGTATATTCCTCGG
	hisD (Reverse)	GGTAATCGCATCCACCAAATC
	purE (Forward)	CGCATTATTCCGGCGCGTGT
	purE (Reverse)	CGCGGATCGGGATTTTCAG
	sucA (Forward)	AGCACCGAAGAGAAACGCTG
	sucA (Reverse)	GGTTGTTGATAACGATACGTAC
	thrA (Forward)	ATCCCGGCCGATCACATGAT
	thrA (Reverse)	CTCCAGCAGGGGCTCTTTTCAG

附 录 B  
(资料性附录)  
系统遗传进化树的构建

将所得到的沙门氏菌 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,确定沙门氏菌分离株的序列型(ST)。在确定 ST 的基础上应用 eBURST 程序将菌株分为各个谱系组(clonal complex),构建系统遗传进化树。图 B.1 为部分沙门氏菌进行 MLST 分析后,绘制的系统遗传进化树图。

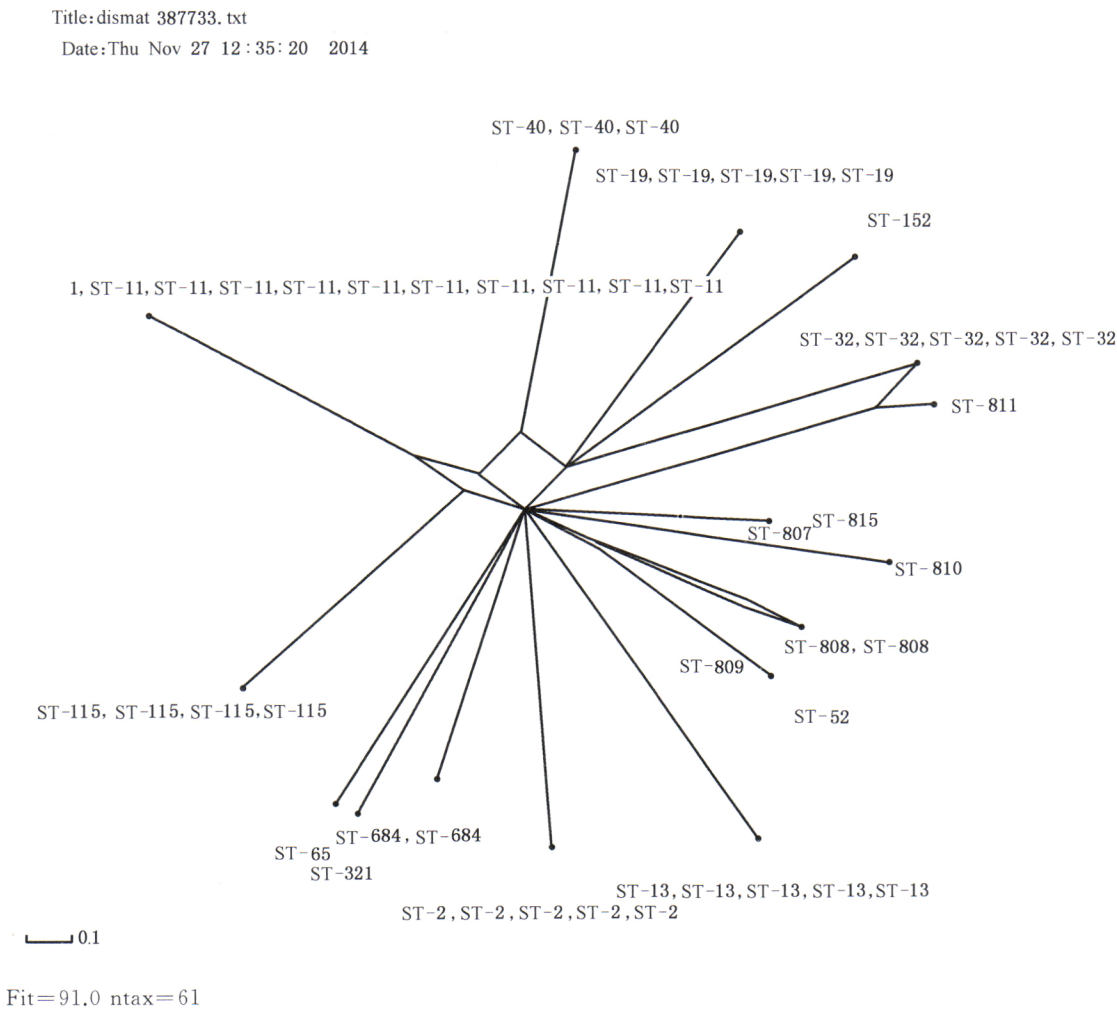


图 B.1 部分沙门氏菌系统遗传进化树图