



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4525.10—2016

出口食品中致病菌的分子分型 MLST 方法 第 10 部分：小肠结肠炎耶尔森氏菌

Multilocus sequence typing detection method for pathogens in export food—
Part 10: *Yersinia enterocolitica*

2016-06-28 发布

2017-02-01 实施



中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

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 10 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：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国南京出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：陈颖、王娉、赵晓燕、蒋原、薛峰、赵晓美。

出口食品中致病菌的分子分型

MLST 方法

第 10 部分:小肠结肠炎耶尔森氏菌

1 范围

SN/T 4525 的本部分规定了出口食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌的分子分型 MLST 检测方法。
本部分适用于出口食品中小肠结肠炎耶尔森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/T 4789.8—2008 食品卫生微生物学检验 小肠结肠炎耶尔森氏菌检验

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 *Ex Taq* DNA 聚合酶。

5.2 dNTP:dATP、dTTP、dCTP、dGTP。

5.3 DNA 提取试剂:DNA 提取试剂盒。

5.4 10× *Ex Taq* Buffer(20 mmol/L MgCl₂)。

5.5 琼脂糖。

5.6 TAE 缓冲液:2 mol/L Tris-HCl(pH8.4),1 mol/L 乙酸,100 mol/L EDTA。

5.7 参考菌株:小肠结肠炎耶尔森氏菌 *Y.enterocolitica* 8081(NCTC 13174)。

6 仪器和设备

6.1 PCR 扩增仪。

6.2 离心机。

6.3 核酸蛋白分析仪。

6.4 电泳仪。

6.5 分子凝胶成像仪。

6.6 微量移液器和灭菌吸头:10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL。

6.7 恒温培养箱。

6.8 恒温水浴锅。

6.9 天平。

6.10 灭菌三角烧瓶:500 mL、250 mL。

6.11 灭菌平皿:90 mm×15 mm。

6.12 灭菌试管:内径 3 mm,长 5 cm。

7 检测程序

对小肠结肠炎耶尔森氏菌 7 对管家基因分别设计引物,并进行 PCR 扩增(引物序列见表 A.2),对扩增结果阳性的样品进行克隆测序,将所得到的小肠结肠炎耶尔森氏菌 7 对管家基因测序结果上下游序列整合后得到完整序列,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,获得菌株所对应的等位基因图谱,确定小肠结肠炎耶尔森氏菌分离株的序列型(Sequence Type,ST),并与 PubMLST 数据库中菌株的资料进行比较。在确定 STs 的基础上应用 MEGA 程序对菌株进行聚类分析(参见附录 B)。

MLST 的操作程序见图 1。

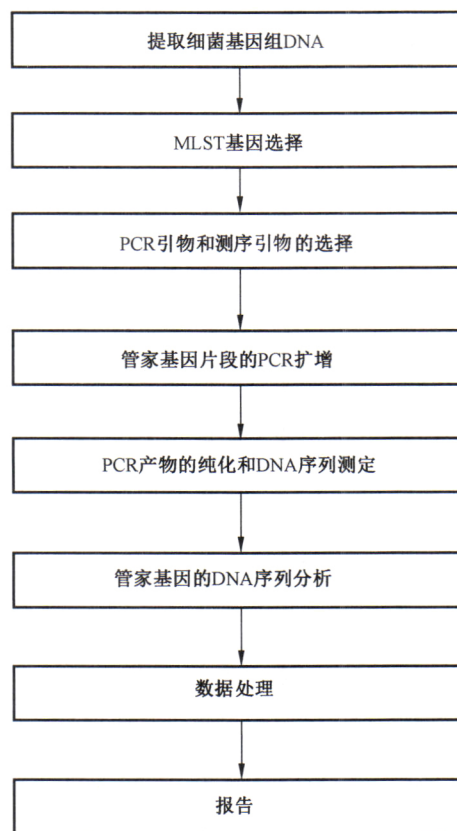


图 1 MLST 操作程序

8 检测步骤

8.1 提取细菌基因组 DNA

将经过 GB/T 4789.8—2008 的方法鉴定为小肠结肠炎耶尔森氏菌的菌株提取基因组 DNA。

8.2 MLST 基因选择

选择耶尔森氏菌属的 7 个管家基因作为目的基因进行 MLST 分析,如表 A.1 所示,它们分别是蛋白 UbiB 合成酶基因(putative ubiquinone biosynthesis protein UbiB, aarF)、双官能磷酸泛酰半胱氨酸脱羧酶/磷酸泛酸合成酶基因(bifunctional phosphopantothenoylcysteine decarboxylase/phosphopantothenate synthase, dfp)、DNA 结合的转录调节基因(DNA-binding transcriptional regulator, galR)、谷氨酰-tRNA 合成酶基因(glutamyl-tRNA synthetase, glnS)、谷氨酰-tRNA 还原酶基因(glutamyl-tRNA reductase, hemA)、双官能庚糖-7-磷酸激酶/庚糖-1-磷酸腺苷酰转移酶基因(bifunctional heptose 7-phosphate kinase/heptose 1-phosphate adenylyltransferase, rfaE)、精氨酸脱羧酶基因(arginine decarboxylase, speA)。

8.3 PCR 引物和测序引物的选择

针对表 A.1 中小肠结肠炎耶尔森氏菌 7 个目的基因,合成 7 对相应的 PCR 引物序列(表 A.2)。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 目的基因片段的 PCR 扩增

采用 50 μL PCR 反应体系:10 \times PCR buffer 5 μL ,dNTP Mixture 4 μL ,上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL ,*Taq* 聚合酶(5 U/ μL)0.5 μL ,DNA 模板 2 μL ,去离子水补齐至 50 μL 。

扩增程序为:

galR、*glnS* 和 *hemA* 基因的反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

dfp 和 *rfaE* * 基因的反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

speA 基因的反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,53 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

aarF 基因的反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

rfaE 基因的反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 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 PCR 产物进行 DNA 序列测定。

8.5 DNA 序列测定

PCR 产物的纯化后对目的基因的 DNA 序列进行双向测序,对于所有基因序列对上下游进行 2 次双向序列测定。

8.6 结果报告

将所得到的小肠结肠炎耶尔森氏菌 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 Lasergene 7.1 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小肠结肠炎耶尔森氏菌,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)

小肠结肠炎耶尔森氏菌多位点序列分型的管家基因及引物序列

表 A.1 小肠结肠炎耶尔森氏菌管家基因

基因名称	基因表达产物
aarF	putative ubiquinone biosynthesis protein UbiB
dfp	Bifunctional phosphopantothenoylcysteine decarboxylase/phosphopantothenate synthase
galR	DNA-binding transcriptional regulator
glnS	glutaminyl-tRNA synthetase
hemA	glutamyl-tRNA reductase
speA	arginine decarboxylase
rfaE	bifunctional heptose7-phosphate kinase/heptose 1-phosphate adenylyltransferase

表 A.2 小肠结肠炎耶尔森氏菌管家基因的扩增引物序列和测序引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	PCR 产物长度 bp
aarF	TTCCATGCAGATATGCATCC CCACTGACTAATAGTGTAGC	650
dfp	CATAACGGCTGACAATCTCG GATCCAGTGCGCTTTATCAG	547
galR	ATTGGAACCGTTACCATG GTTGGGCTGAACATATTGGT	648
glnS	GCACAGAAATAACCTTCAC GAATCCTGTATCCGTGATG	557
hemA	CGGTTAGCAATAATCATATG ATGACTCTGCTTGCATTAGG	602
speA	CAGATAAACCTTATGGCCC ATGTCTGATGATAACTTGATT	550
rfaE	ATCGCTGCCTTTGGGATC ATGAAAGTCACGCTGCCTGA	509
Alternate rfaE primers specific for <i>Y. enterocolitica</i> serotype O:3		
rfaE*	GGATAGATTTGGTGTTCAGTAGC ATGAAAGTCACGCTGCCTGA	550

附 录 B
(资料性附录)

系统遗传进化树的构建

将所得到的小肠结肠炎耶尔森氏菌 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,确定小肠结肠炎耶尔森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 为部分小肠结肠炎耶尔森氏菌进行 MLST 分析后绘制的系统遗传进化树图。

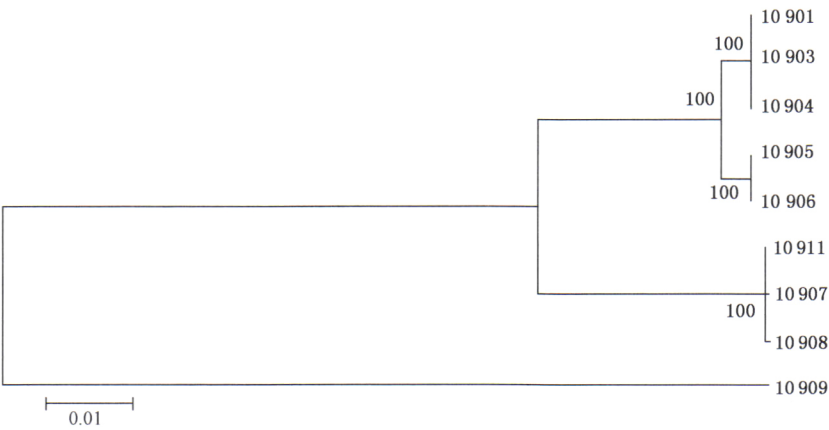


图 B.1 部分小肠结肠炎耶尔森氏菌系统遗传进化树图