



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4525.7—2016

出口食品中致病菌的分子分型 MLST 方法 第 7 部分:空肠弯曲菌

Multilocus sequence typing detection method for pathogens in export food—
Part 7: *Campylobacter jejuni*

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 7 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、中国检验检疫科学研究院、中国食品安全风险评估中心、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、上海交通大学。

本部分主要起草人：蒋原、薛峰、陈颖、袁芳、郭云昌、王娉、曾德新、蒋鲁岩、封振、吕敬章、施春雷、史贤明。

出口食品中致病菌的分子分型 MLST 方法 第 7 部分:空肠弯曲菌

1 范围

SN/T 4525 的本部分规定了出口食品中空肠弯曲菌分子分型 MLST 检测方法。
本部分适用于出口食品中空肠弯曲菌的分子分型检测。

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 4789.9 食品安全国家标准 食品微生物学检验 空肠弯曲菌检验

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:空肠弯曲菌 *Campylobacter jejuni* subsp.*jejuni* NCTC 11168 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

根据空肠弯曲菌的 7 个管家基因,设计 PCR 引物和测序引物序列(见附录 A),通过目的基因片段的 PCR 扩增,再进行 PCR 产物的纯化和 DNA 序列测定,将所得到的空肠弯曲菌 7 个管家基因测序结果与 GenBank 中的已有的相关基因进行 BLAST,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。获得菌株所对应的等位基因图谱,确定空肠弯曲菌分离株的序列型(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 BURST 程序将菌株分为各个谱系组(clonal complex),构建系统遗传进化树(参见

附录 B)。

MLST 分子分型操作程序见图 1。

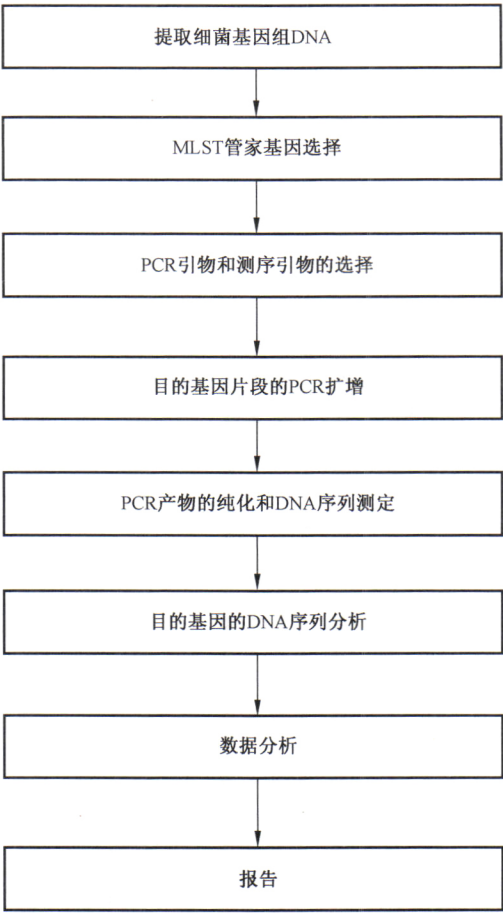


图 1 多位点序列分型(MLST)操作步骤

8 操作步骤

8.1 细菌基因组 DNA 提取

将经过 GB 4789.9 的方法进行鉴定为空肠弯曲菌的菌株提取基因组 DNA。

8.2 MLST 基因选择

按表 A.1 所示,选择空肠弯曲菌的 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,合成空肠弯曲菌 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 μmol/L, -20 °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。gltA、aspA、pgm 和 uncA 基因的反应条件为:94 °C 4 min;94 °C 1 min,50 °C 1 min,72 °C 1 min,30 个循环;72 °C 10 min。

glnA 和 glyA 基因的反应条件为:94 ℃ 4 min;94 ℃ 1 min,52 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃ 10 min。

tkf 基因的反应条件为:94 ℃ 4 min;94 ℃ 1 min,58 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃ 10 min。

将 PCR 产物进行 1%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。

8.5 DNA 序列测定

采用表 A.2 中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

将所得到的空肠弯曲菌 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。

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空肠弯曲菌,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)

空肠弯曲菌多位点序列分型的管家基因及引物序列

表 A.1 空肠弯曲菌管家基因

基因	片段	MLST 基因位置	管家基因名称
aspA	477	96692-97168	aspartase
glnA	477	658085-657609	glutamine synthetase
gltA	402	1604930-1604529	citrate synthase
glyA	507	367573-368052	serine hydroxymethyl transferase
pgm	498	327773-328252	phospho glucomutase
tkf	459	1569415-1569873	transketolase
uncA	489	112163-112651	ATP synthase alpha subunit

表 A.2 空肠弯曲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')
aspA A9 (Forward)	AGTACTAATGATGCTTATCC
aspA A10 (Reverse)	ATTTTCATCAATTTGTTCTTTGC
glnA A1 (Forward)	TAGGAAGCTGGCATCATATTACC
glnA A2 (Reverse)	TTGGACGAGCTTCTACTGGC
gltA A1 (Forward)	GGGCTTGACTTCTACAGCTACTTG
gltA A2 (Reverse)	CCAAATAAAGTTGTCTTGGACGG
glyA A1 (Forward)	GAGTTAGAGCGTCAATGTGAAGG
glyA A2 (Reverse)	AAACCTCTGGCAGTAAGGGC
tkf A3 (Forward)	GCAAAGCTCAGGACACCCAGG
tkf A6 (Reverse)	AAAGCATTGTTAATGGCTGC
pgm A7 (Forward)	TACTAATAATATCTTAGTAGG
pgm A8 (Reverse)	CACAACATTTTTTCATTTCTTTTTC
uncA A7 (Forward)	ATGGACTTAAGAATATTATGGC
uncA A8 (Reverse)	ATAAATTCATCTTCAAATTCC
aspA S3 (Forward)	CCAACTGCAAGATGCTGTACC
aspA S6 (Reverse)	TTCATTTGCGGTAATACCATC
glnA S3 (Forward)	CATGCAATCAATGAAGAAAC
glnA S6 (Reverse)	TTCCATAAGCTCATATGAAC
gltA S3 (Forward)	CTTATATTGATGGAGAAAATGG

表 A.2 (续)

引物名称		序列(5'→3')
测序引物	gltA S6 (Reverse)	CCAAAGCGCACCAATACCTG
	glyA S5 (Forward)	GCTAATCAAGGTGTTTATAT
	glyA S4 (Reverse)	AGGTGATTATCCGTTCCATCGC
	tkt S5 (Forward)	GGTTTTAGATGTGGCTCATG
	tkt S2 (Reverse)	TCCAGAATAGCGAAATAAGG
	pgm S5 (Forward)	GCTTAGCAGATATTTTAAGTG
	pgm S6 (Reverse)	AAGCCTGCTTGTTCTTTGGC
	uncA S3 (Forward)	AAAGTACAGTGGCACAAGTGG
	uncA S4 (Reverse)	TGCCTCATCTAAATCACTAGC

附录 B
(资料性附录)
系统遗传进化树的构建

将所得到的空肠弯曲菌 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,确定空肠弯曲菌分离株的序列型(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 程序将菌株分为各个谱系组(clonal complex),构建系统遗传进化树,见图 B.1。

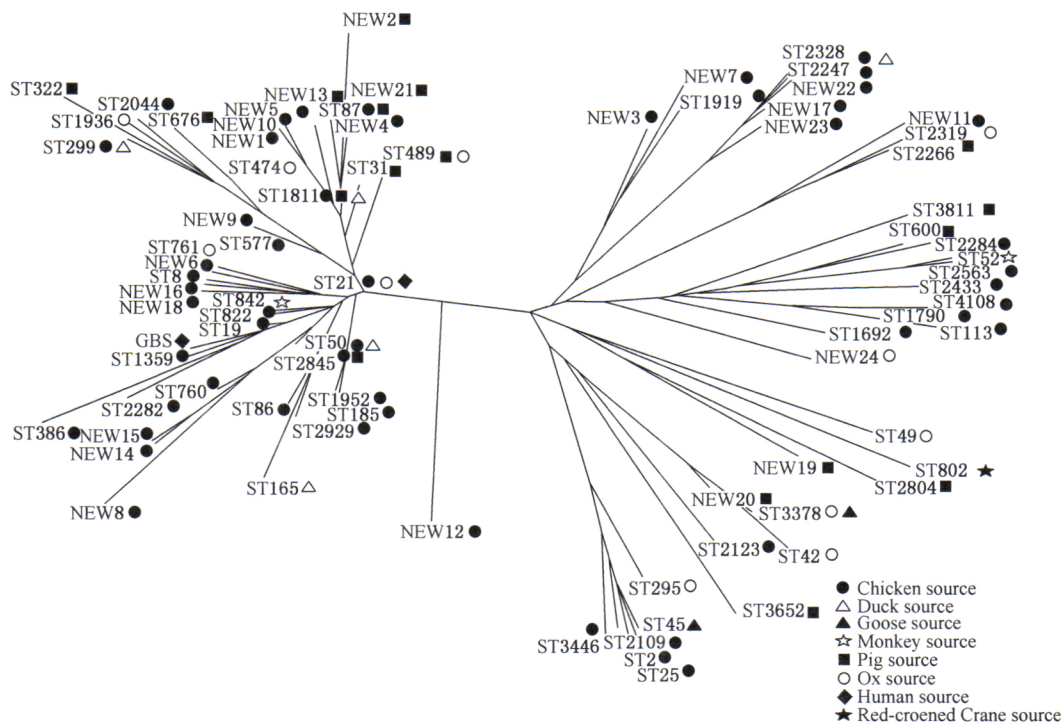


图 B.1 部分空肠弯曲菌系统遗传进化树图