

ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

团 体 标 准

T/CVMA ×××××—××××

动物源奇异变形杆菌 bla_{NDM} 耐药基因定位 检测 Southern 印迹杂交法

Localization and Detection of bla_{NDM} Genes of *Proteus mirabilis* from Animals by
Southern blot

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中国兽医协会 发布

前言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：中国农业大学、青岛农业大学

本文件主要起草人：刘志海、赵莉、王莘莘、郝智慧、王帅玉、朱晓林、刘旭东、任海燕、郝红侠



动物源奇异变形杆菌 bla_{NDM} 耐药基因定位检测 Southern 印迹杂交法

1 范围

本文件规定了实验室动物源奇异变形杆菌 bla_{NDM} 耐药基因定位检测 Southern 印迹杂交法。

本文件适用于实验室动物源奇异变形杆菌 bla_{NDM} 耐药基因定位检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 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

SN/T 2552.8-2010 乳及乳制品卫生微生物学检验方法第 8 部分：普通变形杆菌和奇异变形杆菌检验

3 术语和定义、符号和缩略语

以下术语和定义适用于本文件。

3.1 SeaKem Gold Agarose

一种高凝胶强度，适用于脉冲场凝胶电泳法快速分辨 50Kb-10Mb DNA 和常规电泳方法分辨 1-50Kb DNA 与 PCR 产物。因其低电渗（EEO）特性，Seakem Gold Agarose 中的 DNA 电泳迁移速度显著高于常规琼脂糖凝胶。PFGE 跑胶时间依使用缓冲液和琼脂糖浓度的不同可减少至原电泳时间的 50%。

3.2 XbaI 酶

一种限制性内切酶，该限制性内切酶识别 5'-T|CTAGA-3'的酶切位点。

3.3 S1 核酸酶

一种高度单链特异的核酸内切酶，源于稻谷曲霉，在最适的酶催反应条件下，降解单链 DNA 或 RNA，产生带 5'-磷酸的单核苷酸或寡核苷酸。

4 原理

Southern 印迹杂交是利用 S1 核酸酶将环状质粒切开成为线性双链 DNA，利用 PFGE 脉冲电泳将染色体 DNA 与质粒线性双链 DNA 进行电泳分离。在 PFGE 电泳图上显示线性质粒 DNA 为清晰的条带，而降解的染色体 DNA 则显示为模糊的弥散带。由于线性质粒 DNA 的泳动速度与其片段大小成正比，通过与标准分子量 Marker 进行对比，便可以获得质粒 DNA 分子量大小。利用向上毛细管法吸引 DNA，将琼脂糖凝胶上的质粒 DNA 转移到尼龙膜上，通过与标记 DNA 探针杂交、显色，从而明确质粒上是否携带目的 DNA 片段及判断质粒大小。

5 试剂与耗材

- 5.1 1mol/L Tris-HCl, pH8.0 (按照附录 A.1 配制)
- 5.2 10mol/L NaOH (按照附录 A.2 配制)
- 5.3 0.5mol/L EDTA, pH8.0 (按照附录 A.3 配制)
- 5.4 10×TBE, pH8.3 (按照附录 A.4 配制)
- 5.5 溴化乙锭 (EB) 染色液 (按照附录配制 A.5)
- 5.6 20mg/ mL 蛋白 K 储存液 (按照附录 A.6 配制)
- 5.7 TE 缓冲液, pH8.0 (按照附录 A.7 配制)
- 5.8 CLB, pH8.0 (按照附录 A.8 配制)
- 5.9 S1 洗液, pH7.6 (按照附录 A.9 配制)
- 5.10 Ec Buffer 初始液, pH7.6 (按照附录 A.10 配制)
- 5.11 Ec Buffer 工作液 (按照附录 A.11 配制)
- 5.12 洗涤缓冲液 (按照附录 A.12 配制)
- 5.13 马来酸缓冲液 (按照附录 A.13 配制)
- 5.14 检测缓冲液 (按照附录 A.14 配制)
- 5.15 TE 缓冲液 (按照附录 A.15 配制)
- 5.16 20×SSC (按照附录 A.16 配制)
- 5.17 0.2M EDTA (按照附录 A.17 配制)
- 5.18 脱嘌呤液 (按照附录 A.18 配制)
- 5.19 变性液 (按照附录 A.19 配制)
- 5.20 中和缓冲液 (按照附录 A.20 配制)
- 5.21 10%SDS (按照附录 A.21 配制)
- 5.22 洗液 1 (按照附录 A.22 配制)
- 5.23 洗液 2 (按照附录 A.23 配制)
- 5.24 阻断液 (按照附录 A.24 配制)
- 5.25 抗体液 (按照附录 A.25 配制)
- 5.26 底物显色液 (按照附录 A.26 配制)
- 5.27 DIGEasy 杂交工作液 (按照附录 A.27 配制)
- 5.28 BHI 琼脂 Brain Heart Infusion Agar (按照附录 A.28 配制)
- 5.29 蛋白酶 K
- 5.30 溶菌酶
- 5.31 RNA 酶
- 5.32 XbaI 酶
- 5.33 S1 核酸内切酶
- 5.34 细菌基因组 DNA 提取试剂盒
- 5.35 离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒
- 5.36 2×Phanta Max Master Mix (Dye Plus)
- 5.37 Southern blot 杂交试剂盒(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I)
- 5.38 LONZA SeaKem Gold Agarose (SKG)
- 5.39 苯甲基磺酰氟 (PMSF)
- 5.40 尼龙膜 N+ (0.45μm)
- 5.41 3MM 滤纸
- 5.42 美罗培南 (纯度≥98%)
- 5.43 接种环 (10μL)
- 5.44 杂交管

6 仪器与设备

- 6.1 恒温培养箱
- 6.2 振荡培养箱
- 6.3 超净工作台
- 6.4 细菌浊度仪
- 6.5 水浴摇床
- 6.6 水浴锅
- 6.7 pH 酸度计
- 6.8 高压灭菌锅
- 6.9 微量可调移液器 (2.5 -1000 μ L)
- 6.10 脉冲场凝胶电泳仪
- 6.11 杂交炉
- 6.12 凝胶成像系统
- 6.13 PCR 扩增仪
- 6.14 电子天平 (精度 0.1 g)
- 6.15 涡旋振荡器
- 6.16 高速离心机
- 6.17 紫外交联仪

7 配制步骤

7.1 胶块制备

7.1.1 含 0.5 μ g/mL 或 1 μ g/mL 美罗培南 BHI 琼脂平板复苏目的奇异变形杆菌, 培养约 16-18 h, 用接种环取适量加入 1 mL TE 缓冲液中, 12,000 r/min 离心 8 min, 弃上清。

7.1.2 1 mL S1 洗液重悬细菌, 涡旋, 12,000 r/min 离心 8 min, 弃上清。

7.1.3 500 μ L Ec Buffer 工作液重悬菌体, 细菌浊度仪调节麦氏浊度 3.5-4.0, 吸取 200 μ L 至 1.5 mL EP 管。

7.1.4 Ec Buffer 工作液溶解 SKG (2%), 99 $^{\circ}$ C 水浴加热溶解至透亮放入 60 $^{\circ}$ C 水浴锅待用 (10 mL EP 管)。

7.1.5 200 μ L Ec Buffer 工作液重悬菌体中加入 RNA 酶 (终浓度达到 20 μ g/mL) 和溶菌酶 (终浓度达到 1mg/mL) 混匀, 加入等体积 SKG, 混匀后加入模具, 4 $^{\circ}$ C 冷凝 10 min。

7.1.6 冷凝胶块加入 1mL Ec Buffer 工作液, 加入 RNA 酶 (终浓度达到 20 μ g/mL) 和溶菌酶 (终浓度达到 1mg/mL), 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h。

7.1.7 胶块转移到 1mL CLB 裂解液中, 50 $^{\circ}$ C 水浴 2-3 h 或过夜。

7.1.8 待胶块透亮后, 取出胶块放置在 1mL TE 缓冲液含 1mMPMSF 溶液中, 37 $^{\circ}$ C, 150 r/min, 2 h 后倒出溶液重复一次。

7.1.9 胶块放入 1mL TE 缓冲液 37 $^{\circ}$ C 水浴, 1 h 后倒出液体重复一次。

7.1.10 倒出液体把胶块放入 2mL EP 管中, 加适量 TE 缓冲液 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

7.2 酶切

7.2.1 清洗胶块: 制备好的胶块用 1mL 10mM Tris 37 $^{\circ}$ C 处理, 15 min 后重复一次。

7.2.2 S1 酶处理酶切: 样品菌株采用 200 μ L 酶切体系, 37 $^{\circ}$ C 水浴 50 min, 随后弃去管内液体, 加 1 mL TE 缓冲液置于冰上 10 min, 终止酶切; 使用沙门氏菌标准菌株 H9812 作为

对照菌株，采用 200 μ L 酶切体系，首先 37 $^{\circ}$ C 水浴预酶切 10-15 min，随后弃去管内液体，在加 XbaI 的酶切体系中酶切 3.5 h，奇异变形杆菌和标准菌株 H9812 酶切体系配制分别见表 1 和表 2。

表 1 奇异变形杆菌酶切体系配制

体系成分	加入量
dd H ₂ O	160
10 \times S1 Buffer	20
S1 酶 (180U/ μ L)	20
总体积	200

表 2 标准菌株 H9812 酶切体系配制

试剂	预酶切	酶切
dd H ₂ O	160	156
10 \times M Buffer	20	20
BSA	20	20
XbaI	N	4
总体积	200	200

7.3 制备电泳胶块

7.3.1 清洗模具：蒸馏水清洗模具和梳子，再次用酒精清洗，晾干备用。

7.3.2 组装模具：将挡板及梳子放置正确，旋紧旋钮，计划小胶块放置顺序，胶块一分为二，对应放置相同小胶块，第一道、第八道和最后一道放置标准菌株 H9812。

7.3.3 放置小胶块于梳子：用挖耳勺或者小刀片轻轻取已制备好的小胶块的 1/2-1/3 大小，平整放至梳子齿上，用滤纸把胶块周围的液体吸干，调整位置水平，静置 10 min，垂直竖起梳子插入胶槽。

7.3.4 融合胶块：将熔化的 1% SKG 慢慢注入胶托内 (0.5 \times TBE 制备 110 mL，预留补胶孔用 SKG，60 $^{\circ}$ C 水浴备用)，枪头去除气泡，室温冷却凝固至胶块颜色变白 (30 min 左右)。

7.3.5 封闭胶孔：待胶块凝固后，慢慢去除梳子，用溶化的 1% SKG 封闭加样孔。

7.4 电泳液制备及机器参数设置

7.4.1 配液：制备 2.5L 0.5 \times TBE 缓冲液，10 \times TBE 稀释 20 倍，冰中冷却备用。

7.4.2 调水平：调整电泳槽旋钮。

7.4.3 开启仪器：开机顺序为主机-泵-冷凝机，倒入 2.0L 电泳液，调整循环泵流速 70，温度 14 $^{\circ}$ C，提前 30 min 开启。

7.4.4 电泳参数设置：起始电流一般在 120-145mA 间 (控制在 120-130 最佳)，若出现溢出范围，通过加入 TBE 或蒸馏水调整，终止电流一般不大于 160mA (控制在 140-150 最佳)。

7.4.5 电泳：1%琼脂糖凝胶，0.5 \times TBE 缓冲液，电泳温度 14 $^{\circ}$ C，电泳电压 6v/cm，脉冲转换时间 2.16-63.8s，脉冲角度 120 $^{\circ}$ ，电泳时间 16.5 h。

7.4.6 胶块放置：电泳仪运行稳定且符合条件后，暂停运行，缓慢放置胶块；清理干净碎胶块，以免堵塞机器；安放正确后开始运行，结束后 2L 蒸馏水清洗电泳槽 2 次，排空液体。

7.5 胶块染色与脱色

7.5.1 切胶：胶块一分为二，左边染色，右边转膜。

7.5.2 染色：取出胶，放在 300mL EB 溶液中静置染色 1 h（EB 溶液有害，全程佩戴橡胶手套）。

7.5.3 脱色：300 mL 蒸馏水中静置脱色 30 min。

7.5.4 照胶：凝胶成像系统获取图像并保存。

7.6 转膜

7.6.1 去嘌呤：凝胶右下角切一个缺口做标记，将凝胶背面朝上加入 50 mL 脱嘌呤液 50 r/min 振荡 15 min，弃去液体。

7.6.2 变性：加入 50 mL 变性液 50 r/min 振荡 30 min，弃去液体。

7.6.3 中和：加入 50 mL 中和缓冲液 50 r/min 振荡 15 min 后弃去重复一次，弃去液体。

7.6.4 转膜：裁剪带正电荷尼龙膜 1 张，面积稍微大于胶块，裁剪与尼龙膜相同大小 3MM 滤纸 2 张，使用 20×SSC 浸湿，搭建盐桥，保持重物平衡，及时更换吸水纸以加快转膜（17 h 以上）。除盐桥以外，其他部分不接触溶液，层与层之间无气泡（搭建盐桥使用 3MM 滤纸大小参考值为 36cm×14cm、正电荷尼龙膜大小参考值为 13.5cm×7.5cm）。

7.6.5 清洗：结束后尼龙膜正面朝上放入 6×SSC 中浸润 5 min（15 mL 20×SSC+35 mL 超纯水），去除胶碎片。

7.6.6 固定：风干或滤纸吸干表面水分，紫外交联(3J/3min)，若不马上转膜，置于密封袋中 4℃保存。

7.7 杂交

7.7.1 预杂交：杂交管预热 10mL DIGEasy 杂交工作液(10mL/100cm²)至杂交温度 43℃，将膜用镊子卷起放入杂交管中，有 DNA 面向内与杂交液直接接触，用另一个配平，预杂交 2 h。

7.7.2 变性探针：变性 DIG 探针，煮沸 10 min 至 DNA 变性，迅速冰浴 10 min，探针制备和标记见附录 B。

7.7.3 杂交：加入 5μL 变性探针到预热杂交液中（3.5 mL/100cm²）（68℃预热 15min），迅速混匀避免气泡产生，倒出预杂交液，加入杂交液，放入杂交炉，43℃杂交约 20h（杂交完后探针回收，倒回管内，可重复使用 3-4 次，每次使用前新鲜处理，68℃变性 10min）。

7.7.4 洗膜 1：洗液 1 室温震荡洗涤，5min 后弃去液体重复一次。

7.7.5 洗膜 2：洗液 2 杂交炉中预热 68℃振荡洗涤，15 min 后重复一次。

7.8 显色

7.8.1 25mL Washing Buffer 洗膜 min，弃去液体。

7.8.2 40mL 阻断液 100 r/min 诱导 30min，弃去液体。

7.8.3 25mL 抗体液 100 r/min 诱导 30min，弃去液体。

7.8.5 25mL Washing Buffer 洗膜 15min，弃去液体后重复一次。

7.8.6 25mL 检测缓冲液平衡 5min，弃去液体。

7.8.7 将膜放入 5mL 新鲜底物显色液容器中避光静置显色，30min 后观察结果，无条带过夜，清水脱色 5min。

附录 A
(规范性)
相关试剂的配制

A.1 1mol/L Tris-HCl, pH8.0

157.6g Tris-HCl 溶于 800 mL 超纯水中, 室温调 pH 至 8.0, 加水至终体积 1000 mL, 高压灭菌。

A.2 10mol/L NaOH

20g NaOH 小心溶于 40 mL 超纯水中, 冷却至室温, 加灭菌超纯水至终体积 50 mL。

A.3 0.5mol/L EDTA, pH8.0

37.22g Na₂EDTA·2H₂O 溶于 160 mL 超纯水中, 加 10 mL 10mol/L NaOH 调 pH 至 8.0, 加水至终体积 200 mL, 分成数份, 高压灭菌。

A.4 10×TBE, pH8.3

108g Tris-base(0.9mol/L), 55g 硼酸(0.9mol/L), 加入 40 mL 0.5mol/L pH8.0 EDTA 储存液(0.02mol/L), 溶于 1000 mL 灭菌的超纯水中, 高压灭菌。

A.5 溴化乙锭(EB)染色液

10mg/mL EB 储存液用超纯水 1:10,000 稀释, 即 100 mL 水中加 10 μ L 储存液或 500 mL 水中加 50 μ L EB 储存液, 稀释液在丢弃前可染 5-6 块胶。

A.6 20mg/mL 蛋白 K 储存液

100 mg Proteinase K 粉末溶于 5 mL 灭菌超纯水中, 混匀后分装在 1.5 mL 离心管中, 每管 500 μ L, -20°C 保存备用。

A.7 TE 缓冲液, pH8.0 (10mM Tris-HCl: 1mM EDTA)

10 mL 1mol/L Tris-HCl, pH8.0, 2 mL 0.5mol/L EDTA, pH8.0, 灭菌超纯水稀释至 1000 mL。

A.8 CLB, pH8.0 (含有 50mmol/L Tris-HCl, 50mmol/L EDTA, 1% 十二烷基肌氨酸钠, 用前加蛋白酶 K 至终浓度 0.1mg/mL)

25 mL 1mol/L Tris-HCl, pH8.0, 50 mL 0.5mol/L EDTA, pH8.0, 50 mL 10% 十二烷基肌氨酸钠, 灭菌超纯水稀释至 500 mL, 每 5 mL CLB 加 25 μ L 蛋白酶 K 储存液(20mg/mL), 使终浓度为 0.1mg/mL。

A.9 S1 洗液, pH7.6

1M NaCl(29.2g), 10mM Tris-HCl(0.79g), 室温调 pH 至 7.6, 加水至终体积 500 mL, 高压灭菌。

A.10 Ec Buffer 初始液, pH7.6

1M NaCl(29.22g), 100mM EDTA(18.61g), 6mM Tris-HCl(0.47g), 室温调 pH 至 7.6, 加水至终体积 500 mL, 高压灭菌。

A.11 Ec Buffer 工作液

Ec Buffer 初始液(100 mL), Brij58(0.5g), 十二烷基肌氨酸钠(0.5g), 去氧胆酸钠(0.2g)。

注: 可放置烘箱或 70°C 水浴加速溶解

A.12 洗涤缓冲液(500 mL)

0.1M 马来酸(5.804g), 0.15M NaCl(4.383g), pH7.5(加 10M NaOH 约 7 mL), 高压灭菌冷却后加 1.5 mL Tween20 (0.3%v/v)。

A.13 马来酸缓冲液(500 mL)

0.1M 马来酸(5.804g), 0.15M NaCl(4.383g), pH7.5(加 10M NaOH 约 7 mL), 高压灭菌。

A.14 检测缓冲液(500 mL)

0.1M Tris-HCl(7.882g), 0.1M NaCl(2.922g), pH 9.5, 高压灭菌。

A.15 TE 缓冲液(500 mL)

10mM Tris-HCl(0.7882g), 1mM EDTA(0.14612g), pH8.0, 高压灭菌。

A.16 20×SSC(500 mL)

3M NaCl(87.66 g), 0.3M 柠檬酸钠(44.115 g), pH7.0, (加 10M NaOH 约 100μL), 高压灭菌。

A.17 0.2M EDTA(10 mL)

Na₂EDTA·2 H₂O(0.58448 g), pH8.0, 高压灭菌。

A.18 脱嘌呤液(500 mL)

0.25M HCl(12.5 mL 浓 HCl), 先加适量水, 再将酸加入水中, 以防挥发, 无需高压灭菌。

A.19 变性液(500 mL)

1.5M NaCl(43.83 g)(NaCl 完全溶解后再加 NaOH), 0.5M NaOH(10 g), 高压灭菌。

A.20 中和缓冲液(500 mL)

1.5M NaCl(43.83 g), 1M Tris-HCl(78.82 g), pH7.4, 高压灭菌。

A.21 10%SDS

将 10 g SDS 小心加入装有 80 mL 灭菌超纯水的容器中, 35-45°C 轻轻混匀溶解, 定容至 100 mL, 灭菌滤器过滤至灭菌瓶中。

A.22 洗液 1

2×SSC+0.1%SDS, 临用前配制: 配 50 mL 时, 5 mL 20×SSC, 0.5 mL 10%SDS。

A.23 洗液 2

0.5×SSC+0.1%SDS, 临用前配制: 配 50 mL 时, 1.25 mL 20×SSC, 0.5 mL 10%SDS。

A.24 阻断液

马来酸缓冲液对 10×阻断液(瓶 6)进行 1:10 稀释, 临用时配制: 配 40 mL 时, 取 4 mL 10×阻断液, 用马来酸缓冲液补齐至 40 mL。

A.25 抗体液

每次使用抗 DIG-AP(管 4)前先 10,000 r/min 离心 5 min, 阻断液 1:5000(150μg/mL)稀释: 配 25 mL 时, 取 5μL DIG-AP 加入 25 mL 阻断液, 2-8°C 保存 12 h。

A.26 底物显色液

加 100μL NBT/BCIP(管 5)到 5 mL 检测缓冲液中, 临用前配制, 避光。

A.27 DIGEasy 杂交工作液

向 DIGEasy HybGraμLes(瓶 7)分两次加入 64 mL 灭菌双蒸水, 37°C 搅拌 5 min 溶解, 4°C 保存。

A.28 BHI 琼脂

准确称取牛脑浸粉 4.0g, 牛心浸粉 4.0g, 蛋白胨 5.0 g, 酪蛋白胨 16.0 g, 氯化钠 5.0 g, 葡萄糖 2.0 g, 磷酸氢二钠 2.5 g, 琼脂 13.5 g, 加热搅拌溶解于 1000 mL 蒸馏水中, 室温调 pH 至 7.4 ± 0.2, 121°C 高压灭菌 15min, 备用。

附录 B
(规范性)
探针制备及标记

B.1 探针制备

B.1.1 引物序列 (336bp):

6916-NDM-F CCGCCCAGATCCTCAACT

6916-NDM-R TCAGGCAGCCACAAAAG

B.1.2 任意 NDM 阳性试验菌株基因组精提取 (细菌基因组 DNA 提取试剂盒), 检测 DNA 浓度 ($>80\text{ng}/\mu\text{L}$) 和 ODA260/A280 (1.7-1.9) 在正常范围;

B.1.3 PCR 扩增: $200\mu\text{L}$ 体系, 分装 4 管, 每管 $50\mu\text{L}$ 进行 PCR (使用高保真 DNA 聚合酶、大胶孔梳齿、琼脂糖浓度 1.5%);

PCR 反应运行参数: $(94^\circ\text{C}, 5\text{ min}) + [(94^\circ\text{C}, 30\text{s}) + (55^\circ\text{C}, 30\text{s}) + (72^\circ\text{C}, 30\text{s})] \times 35 + (72^\circ\text{C}, 7\text{ min})$

B.1.4 切胶回收, 可合并 PCR 产物 (离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒), 检测 DNA 浓度和 ODA260/A280 在正常范围。

B.2 探针标记

B.2.1 取 500ng 模板 DNA, 无菌水补充到 $16\mu\text{L}$, 沸水浴 10 min , 获得变性 DNA, 变性后立即置于冰上 10 min ;

B.2.2 混匀 DIG-High Prime, 取 $4\mu\text{L}$ 加入变性 DNA 中混匀, 37°C 诱过夜 (20 h);

B.2.3 加入 $2\mu\text{L}$ 0.2MEDTA , 65°C 水浴 10 min , 终止反应。