

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微生物分子分型脉冲 场凝胶电泳 (PFGE)法

Molecular typing of animal-derived *Proteus mirabilis* microorganisms—Pulsed Field
Gel Electrophoresis (PFGE)

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、PAULA JEAN FEDORKA CRAY



动物源奇异变形杆菌微生物分子分型脉冲场凝胶电泳 (PFGE)法

1 范围

本文件规定了实验室动物源奇异变形杆菌分子分型 PFGE 检测的技术要求。

本文件适用于实验室动物源奇异变形杆菌的分子分型检测。

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、缩略语

3.1 术语和定义

以下术语和定义适用于本文件。

3.1.1 OD 值

光密度（Optical Density, OD），表示被检测物吸收的光密度，也可以称为吸光度。光通过被检测物，前后的能量差异即是被检测物吸收掉的能量。特定波长下，同一种被检测物的浓度与被吸收的能量成定量关系。

3.1.2 Seakem Gold Agarose (SKG)

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 电泳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 缩略语

以下缩略语适用于本文件。

BHI: 脑心浸液琼脂（Brain Heart Infusion Agar）

Tris-HCl: 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐（Tris(hydroxymethyl)aminomethane）

EDTA: 乙二胺四乙酸（Ethylene Diamine Tetraacetic Acid）

SDS: 十二烷基硫酸钠 (Sodium dodecyl sulfate)

TBE: Tris-硼酸-EDTA 缓冲液

EB: 溴化乙锭 (Ethidium bromide)

TE: Tris-EDTA 缓冲液

CLB: 细胞裂解液 (Cell Suspension Buffer)

CSB: 细胞悬浊液 (Cell Lysis Buffer)

4 原理

脉冲场凝胶电泳 (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) 通过选取合适的限制性内切酶对细菌基因组进行酶切, 经脉冲场凝胶电泳分离 DNA 片段, 通过比较染色体限制性内切酶图谱, 以确定各菌株之间的亲缘关系, 从而对细菌进行分型。PFGE 具有结果稳定、分辨率高和重复性好等优点, 不仅可利用限制性内切酶对细菌全基因组数据进行鉴别与分型, 还可直接或间接反映菌株基因组的变异情况, 广泛应用于研究细菌的分子流行病学特点, 被称为细菌分子分型研究的“金标准”。

5 试剂与耗材

- 5.1 BHI 琼脂 (按照附录 A.1 配制)
- 5.2 1 mol/L Tris-HCl, pH8.0 (按照附录 A.2 配制)
- 5.3 10 mol/L NaOH (按照附录 A.3 配制)
- 5.4 0.5 mol/L EDTA, pH8.0 (按照附录 A.4 配制)
- 5.5 10% SDS (按照附录 A.5 配制)
- 5.6 10×TBE, pH8.3 (按照附录 A.6 配制)
- 5.7 EB 染色液 (按照附录 A.7 配制)
- 5.8 20 mg/mL 蛋白 K 储存液 (按照附录 A.8 配制)
- 5.9 TE, pH8.0 (按照附录 A.9 配制)
- 5.10 CLB, pH8.0 (按照附录 A.10 配制)
- 5.11 CSB, pH8.0 (按照附录 A.11 配制)
- 5.12 SeaKem Gold agarose
- 5.13 Falcon 2054 管 (12 mm×75 mm)
- 5.14 接种环 (10 μ L)
- 5.15 枪头 (10 μ L、200 μ L 和 1000 μ L)
- 5.16 1.5mL 离心管
- 5.17 50mL screw-cap 管
- 5.18 Green screened-cap (1703711)
- 5.19 一次性模具 (1.5 mm×10 mm×5 mm)
- 5.20 手术刀片

5.21 标准胶槽（14×13cm 框和平板）

5.22 15 孔梳子（21cm×1.5mm）

5.23 无菌玻璃瓶（50mL-2000mL）

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：0.01 级

6.8 高压灭菌锅

6.9 微量可调移液器（2.5 μ L、10 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L）

6.10 脉冲场凝胶电泳仪

6.11 凝胶成像系统

6.12 PCR 扩增仪

6.13 电子天平：精度 0.1g、0.01g、0.001g

7 操作步骤

7.1 胶块制备

7.1.1 打开水浴摇床（54 $^{\circ}$ C）、水浴箱（56 $^{\circ}$ C），使用 TE 缓冲液制备 1% SeakemGold（含 1% SDS）：准确称取 0.25g SeaKem Gold agarose 放入 100 mL 玻璃瓶内，加入 22.5 mL TE 缓冲液轻柔摇荡使琼脂均匀散开。微松瓶盖，将玻璃瓶放于微波炉内加热 30 s 取出轻柔摇荡，再加热 15 s，重复操作直至琼脂彻底溶解（无颗粒物、悬浮物，透光均一，无明显异常折光，无气泡）。将溶解的 Seakem Gold agarose 放入 56 $^{\circ}$ C（55-60 $^{\circ}$ C均可）水浴箱内至少 15 min，再加入预热到 56 $^{\circ}$ C的 10% SDS 溶液 2.5 mL，置于 56 $^{\circ}$ C水浴箱备用。

7.1.2 在 Falcon 2054 管上标记样品菌株和对照菌株沙门氏菌 H9812 名称，分别加入约 2 mL CSB，用 CSB 湿润接种环，从培养皿上刮取适量奇异变形杆菌样品菌株（经过 SN/T 2552.8-2010 方法鉴定为奇异变形杆菌）和沙门氏菌 H9812 的菌落，均匀悬浊于 CSB 中。通过加入 CSB 稀释或增加菌液浓度，调整细胞悬液浓度至指定范围，使用细菌浊度仪调整浓度至 4.0-4.5 麦氏单位，（若用分光光度计测定其浓度，在 610 nm 波长吸光度应在 1.3-1.4）。

7.1.3 取 400 μ L 细菌悬浊液于相应的 1.5mL 无菌离心管中 37 $^{\circ}$ C水浴孵育 5min，取出后每管加 20 μ L 蛋白酶 K（储存液浓度 20 mg/mL），混匀，使其终浓度为 0.5 mg/mL，蛋白酶 K 置于冰上备用。

7.1.4 加入 400 μ L 1% Seakem Gold（含 1% SDS），用枪头轻轻混匀，避免产生气泡。注：

没有用完的 Seakem Gold agarose 可放于室温，并可重复使用 1-2 次。再次溶时加热时间缩短到每 10-15 s 一次，直至完全溶解。

7.1.5 迅速将混合物加入模具，避免气泡产生，在室温下凝固 10-15min，并记录模具内对应样品的名称。

7.2 细菌裂解

7.2.1 在 50mL screw-cap 管上做好样品和对照标记。

7.2.2 配制 CLB，向每 5mL 细胞裂解液加入 25 μ L 蛋白酶 K（储存液浓度 20mg/mL），混匀，使其终浓度为 0.1 mg/mL。

7.2.3 每个离心管加入 5mL 蛋白酶 K/CLB 混合液。

7.2.4 用刀片削去模具表面多余的部分，使胶块平齐。若使用可重复利用模具：打开模具，用小铲的宽头部分将胶块移入相应含上述裂解混合液的 screw-cap 管中；若使用一次性模具：撕掉模具下面的胶带，用小铲将胶块捅进相应含上述裂解混合液的 screw-cap 管中，将模具、胶带、小铲放入废弃物容器中。

7.2.5 将 screw-cap 管放在 54 $^{\circ}$ C 水浴摇床中孵育 2.5h，转速约 130r/min。

7.2.6 将超纯水和 TE 缓冲液放在 50 $^{\circ}$ C 水浴箱中预热。

7.3 胶块清洗

7.3.1 从水浴摇床中拿出装有胶块的 screw-cap 管，盖上绿色的 screened-cap。轻轻倒掉 CLB，在实验台上轻磕管底使胶块落在管底。注意把管倒置在吸水纸上，使管内液体尽量排除干净。

7.3.2 每管中加入 10mL 预热的超纯水，确保胶块在液面下而不在管壁或盖子上。

7.3.3 放回 50 $^{\circ}$ C 水浴摇床中，转速约 130r/min，摇 10min。

7.3.4 弃掉水再洗一次。

7.3.5 弃掉水加入 10mL 预热的 TE，在 50 $^{\circ}$ C 的水浴摇床中摇 15min。

7.3.6 弃掉 TE，用 TE 重复洗三次，每次 10-15min。

7.3.7 弃掉 TE，加入 10mL TE，放在 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

7.4 胶块内 DNA 酶切

7.4.1 在 1.5mL 离心管上标记对应样品及 H9812 对照名称。

7.4.2 预酶切体系配制：样品菌株奇异变形杆菌和对照菌株 H9812 均采用 200 μ L 预酶切体系，预酶切时不加限制酶，Buffer T 和 Buffer M 分别用于样品菌株奇异变形杆菌和对照菌株 H9812 预酶切，预酶切体系配制见表 1。

表 1 预酶切体系配制

试剂	μ L/胶块	μ L/10 胶块
ddH ₂ O	160	1600

Buffer T/M	20	200
BSA	20	200
总体积	200	2000

7.4.3 在每个 1.5mL 离心管中加入 200 μ L 预酶切混合液，小心取出样品菌株胶块和对照菌株 H9812 胶块放置在干净培养皿中，用刀片切下约 2-3mm 宽胶块放入 1.5mL 离心管中，确保胶块在液面以下，将剩余的胶块放回原来 TE 缓冲液中，离心管置于 37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 10-15min。

7.4.4 酶切体系配制：限制酶 SmaI 和 XbaI 分别用于样品菌株奇异变形杆菌和对照菌株 H9812 酶切，酶切体系配制见表 2。

表 2 酶切体系配制

试剂	μ L/胶块	μ L/10 胶块
ddH ₂ O	157	1570
Buffer T/M	20	200
BSA	20	200
SmaI/XbaI	3	30
总体积	200	2000

7.4.5 用枪头轻吸预酶切混合液，避免损伤胶块。在每个 1.5mL 离心管中加入 200 μ L 酶切混合液，37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 2.5h。

7.5 加样

7.5.1 水浴箱温度调至 55-60 $^{\circ}$ C，配制 2.2L 0.5 \times TBE 并用其配制 1% SKG 胶，微波加热溶解，放置 55-60 $^{\circ}$ C 水浴箱备用（至少平衡 30 min）。

7.5.2 调整梳子高度，使梳子齿与胶槽的底面相接触，用水平仪调整胶槽使其水平。

7.5.3 从 37 $^{\circ}$ C 水浴中取出胶块平衡至室温，用枪头吸出酶切混合液。每管加入 200 μ L 0.5 \times TBE，室温平衡 3min。

7.5.4 将梳子平放在胶槽上，把胶块加在梳子齿上，把标准菌株 H9812 上样在第 1、8、15 个齿上，吸水纸吸去胶块附近多余的液体，在室温下风干约 5min。

7.5.5 将梳子放入胶槽，确保所有胶块在一条线上且与胶槽的底面相触，从胶槽下部中央缓慢倒入 100 mL 熔化的在 55 $^{\circ}$ C-60 $^{\circ}$ C 平衡的 1% SKG，避免气泡产生，室温下凝固 30min。记录加样顺序。

7.6 电泳

7.6.1 调整电泳槽水平，加入 2-2.2L 0.5 \times TBE，关上盖子。

7.6.2 打开主机和泵开关，确保泵设在 70（此时缓冲液流速约 1 L/min）和缓冲液在管道中正常循环。

7.6.3 打开冷凝机，确保预设温度在 14 $^{\circ}$ C（缓冲液达到该温度通常需要 30min 左右）。

7.6.4 打开胶槽的旋钮，取出凝固好的胶，用吸水纸清除胶四周和底面多余的胶，小心把胶放入电泳槽，关上盖子。

7.6.5 设置电泳运行条件：温度 14°C；电压 6V/cm；转换角度 120°；切换时间 5-20 s；持续时间 19h，记录初始电流（通常为 120-145 mA）。

7.6.6 结束电泳：关机顺序为冷凝机—泵—主机，放掉电泳槽中 TBE，用 1-2L 超纯水清洗电泳槽并倒掉液体。

7.7 图像获取及数据分析

7.7.1 电泳结束后取出胶块放置于 400mL EB 溶液托盘内摇动染色 30min。

7.7.2 染色结束后取出胶块至 500mL 超纯水中脱色 3 次，每次 30min。

7.7.3 脱色完成后使用凝胶成像仪观察拍照，图像保存为 Tiff 格式，利用 BioNumerics 7.6 软件对 DNA 指纹图谱进行分析，构建系统发育树，根据 Tenover 等的准则对 PFGE 图进行分析解释。

附录 A
(规范性)
相关试剂的配制

A.1 BHI 琼脂

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

A.2 1 mol/L Tris-HCl, pH8.0

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

A.3 10mol/L NaOH

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

A.4 0.5mol/L EDTA, pH8.0

37.22 g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于 160mL 超纯水中, 加 10mL 10mol/L NaOH 调 pH 至 8.0, 加水至终体积 200mL, 分成数份, 高压灭菌。

A.5 10% SDS

10g SDS 小心加入装有 90 mL 灭菌超纯水的容器中, 在 $35\text{-}45^{\circ}\text{C}$ 下轻轻混匀溶解, 定容至 100mL。

A.6 $10\times$ TBE, pH8.3

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

A.7 溴化乙锭 (EB) 染色液

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

A.8 20 mg/mL 蛋白酶 K 储存液

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

A.9 TE, pH8.0 (10 mm Tris-HCl: 1 mm EDTA)

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

A.10 CLB, pH8.0 (含有 50 mmol/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)

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

A.11 CSB, pH8.0 (含有 100mmol/L Tris-HCl, 100mmol/L EDTA)

10mL 1mol/L Tris-HCl, pH8.0, 20mL 0.5mol/L EDTA, pH8.0, 灭菌超纯水稀释至 100mL。

中国兽医协会
CVMA

附录 B

(资料性)

PFGE 聚类分析

脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 通过脉冲电场的方向、时间、电流不断改变, 使包埋在琼脂糖凝胶中的 DNA 分子的泳动方向发生相应改变。由于小的 DNA 分子发生变化比大的 DNA 分子快, 所以小的 DNA 分子泳动的也快, 最终按分子大小在凝胶上呈现出电泳带型。通过比较任何两个分离株的指纹图谱, 可以研究它们是否属于同一克隆型菌株 (即两个分离株是同一克隆型) 或在遗传上不相关。使用 BioNumerics 7.6 对 PFGE 凝胶图谱进行聚类分析, 发现不同菌株条带之间的同源关系的结果。图 B.1 为部分奇异变形杆菌进行 PFGE 后得到聚类分析图。

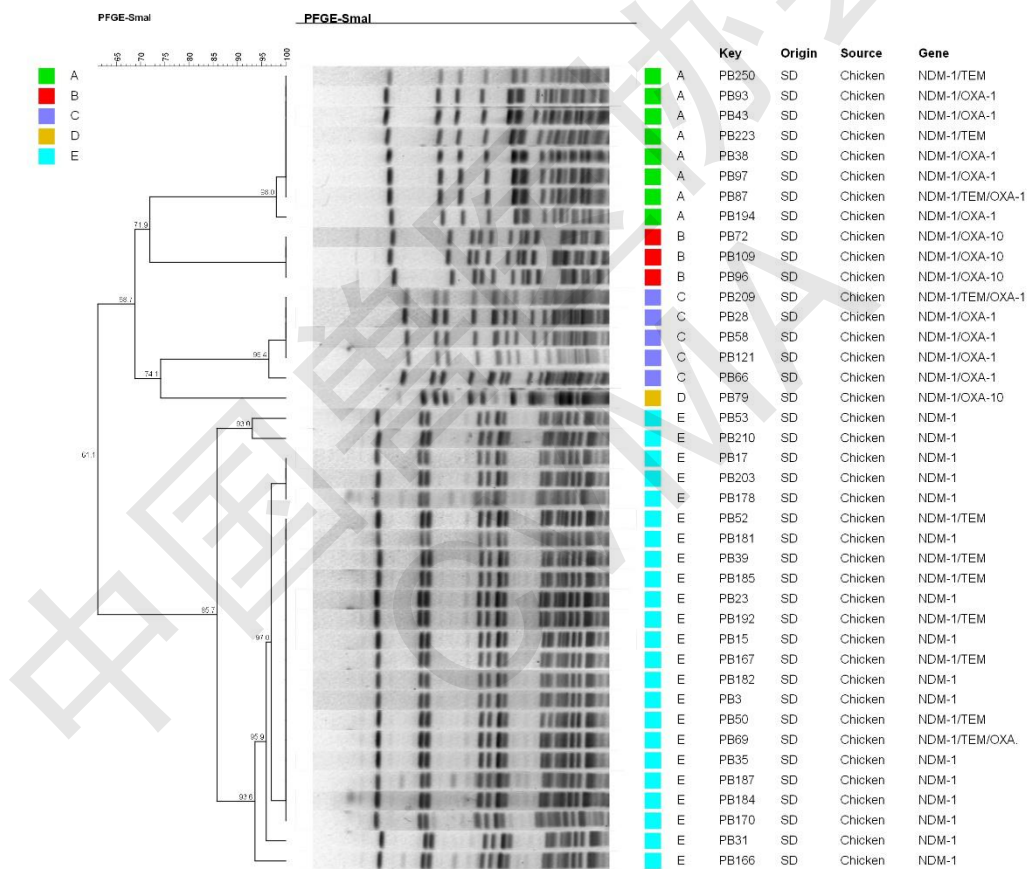


图 B.1 部分奇异变形杆菌聚类分析图