

表 1 (续)

鉴定项目	枯草芽孢杆菌
木糖	+
L-阿拉伯糖	+
甘露醇	+
利用葡萄糖产气	—
利用柠檬酸盐	+
硝酸盐还原	+
50℃生长	+
pH5.7生长	—/+
7%氯化钠生长	+
淀粉水解	+
明胶液化	+
分解酪素	+

注：“+”为反应阳性；“—”为反应阴性；“+/-”或“-/+”为反应不定。

9 PCR 检测鉴定方法

9.1 细菌模板 DNA 的提取

9.1.1 蛋白酶水解提取法

取上述培养的增菌液 2 mL 加到 2 mL 无菌离心管中,10 000 r/min 离心 2 min,尽量弃净上清液,沉淀加入 TE100 μ L、10 mg/mL 溶菌酶 100 μ L,37℃温育 30 min,12 000 r/min 离心 2 min,弃上清液,沉淀加入 TE 缓冲液 600 μ L 重悬,再加入 15 mg/mL 蛋白酶 K25 μ L,55℃温育 1 h 后沸水浴 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液于-20℃保存以待检测。

9.1.2 酚/三氯甲烷抽提法

取上述培养的增菌液 2 mL 加到 2 mL 无菌离心管中,10 000 r/min 离心 2 min,尽量弃净上清液,沉淀加入 TE 缓冲液 570 μ L 重悬,然后加入 10 mg/mL 溶菌酶 100 μ L,37℃温育 30 min,再加入 10% SDS30 μ L,65℃温育 10 min,加入等体积的酚混匀,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液移入一新离心管中,重复一次,两次酚抽提后取上清加等体积的酚/三氯甲烷(1:1,体积比)混匀,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液再移入一新离心管中,加等体积的无水乙醇,1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠,轻缓颠倒混匀,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,沉淀用 500 μ L 75%乙醇洗两次,离心管开盖室温放置数分钟使乙醇挥发,加入 100 μ L 无菌水(预先加热至 65℃有利于 DNA 溶解),-20℃保存以待检测。

9.1.3 试剂盒提取法

使用商品化的细菌基因组 DNA 提取试剂盒,具体提取操作参照说明书进行。

9.2 PCR(聚合酶链式反应)检测鉴定

9.2.1 引物序列

上游引物:5'-GCGGAATCATCCGTATTGGGGCAGA-3'

下游引物:5'-AACCTCGCGGGCTTTCTCGCCAA-3'

9.2.2 空白对照、阴性对照和阳性对照设置

空白对照设为以水代替 DNA 模板。

阴性对照采用非目标菌的 DNA 作为 PCR 反应的模板。

阳性对照采用目标菌标准株的 DNA 作为 PCR 反应的模板。

9.2.3 PCR 反应体系

反应体系体积为 25 μL :10 \times PCR 缓冲液 2.5 μL 、引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL 、dNTP(2.5 mmol/L)2 μL 、UNG 酶(1 U/ μL)0.06 μL 、模板 DNA 2 μL 、灭菌去离子水补足 25 μL 。反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整,每个反应体系应设置两个平行反应。

9.2.4 PCR 反应参数

94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,进行 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存反应产物。

9.2.5 PCR 扩增产物的电泳检测

用电泳缓冲液(0.5 \times TBE)制备 2% 琼脂糖凝胶,5 μL PCR 扩增产物点样,核酸染料染色,DNA marker(100 bp DNA ladder)做参照。3 V/cm \sim 5 V/cm 恒压电泳,电泳 50 min \sim 60 min,电泳检测结果用凝胶成像分析系统记录并保存。

9.2.6 结果判定

在阴性对照未出现条带,阳性对照出现预期大小的扩增条带(产物 137 bp)条件下,如待测样品未出现相应大小的扩增条带,则可报告该样品检验结果为阴性;如待测样品出现相应大小扩增条带则可判定该样品 PCR 结果为阳性,需结合第 8 章的结果,作综合判定;如果阴性对照出现条带和(或)阳性对照未出现预期大小的扩增条带,本次待测样品的结果无效,应重新做实验,并排除污染因素。

9.3 荧光 PCR(荧光聚合酶链式反应)检测鉴定

9.3.1 方法提要

在 PCR 基础上,加入一条与模板 DNA 匹配的、两端有荧光基团标记的寡核苷酸探针。PCR 每进行一次循环,合成的新链数与释放的荧光基团数呈对应关系,即 PCR 产物的量与荧光信号的强度呈对应关系。当荧光信号超过所设定的阈值(Threshold-value)时,荧光信号可被检测出来,仪器检测荧光基团的增加量可以间接地体现目的片段的扩增量。

样品的模板 DNA 进行荧光 PCR 扩增,观察荧光增幅曲线,从而对样品进行快速鉴定。

9.3.2 引物和探针序列

上游引物:5'-GCGGAATCATCCGTATTGGGGCAGA-3'

下游引物:5'-AACCTCGCGGGCTTTCTCGCCAA-3'

探针:5'-AACTGAACTGACTGCCGAAGAACGCCT-3',5'端标记 FAM(6-羧基荧光素),3'端标记 TAMRA(6-羧基四甲基罗丹明)。

9.3.3 空白对照、阴性对照和阳性对照设置

空白对照设为以水代替 DNA 模板。