

沙門氏菌快速脈衝式電泳標準操作程序

(註:目前 PulseNet Taiwan 偵測的沙門氏菌只有 *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* 兩種)

一、菌體培養

沙門氏菌以 TSA 瓊脂培養基置於 37℃ 隔夜培養

二、菌體包埋及菌體溶解

首先開啟水浴槽，設定溫度在 56℃，並配製菌體包埋用瓊脂[1% agarose in TE buffer] 置於 56℃ 水浴槽備用。

1. 將每個純化培養好的菌株及 USA CDC PulseNet PFGE 分析用標準 marker 菌株 H9812 以無菌棉棒刮取菌落至裝有 2ml **Cell Suspension Buffer (CSB)**之 13 ×100mm KIMBLE culture tube 中，混合均勻後以濁度計調整濁度值至 0.4 - 0.6。
2. 標示好 1.5ml 無菌微量離心管，先加入 20μl 之 20 mg/ml Proteinase K 溶液至每一微量離心管中，再取出測好濁度之菌液 400μl 放入微量離心管中緩慢混合均勻後準備包埋。
3. 將上述裝有 400μl 菌液之 1.5ml 微量離心管，再加入 400μl 包埋用瓊脂混合均勻後，快速注滿鑄膠模具(plug mold)，待其冷卻固化形成膠塊(Plug)。
4. 在等待膠塊形成的同時，於 50ml 離心試管中配製 **Proteinase K/Cell Lysis Buffer** (每支試管含 20mg/ml Proteinase K 25μl + Cell Lysis Buffer 5ml)。
5. 將固化之膠塊，推入分裝有 Cell Lysis Buffer 之 50ml 離心試管中，鎖緊管蓋後置於 56℃ 恆溫震盪水浴槽中 shaking wash 1.5 ~ 2 小時

三、膠塊清洗

在菌體溶解處理同時時間內，先將清洗用之滅菌好的二次水(D.D.W.)及 TE buffer，預先放置在 56℃ 水浴槽加熱保溫。

1. 將離心試管蓋取下，換上有孔篩子(Screened Plug Caps)或是用扁平微量藥匙擋住膠塊，以方便倒掉 Cell Lysis Buffer，小心留下膠塊。
2. 加入 15 ml 預熱 56℃ 之滅菌二次水(D.D.W.)至離心試管中，將試管放回 56℃ 恆溫震盪水浴槽中 shaking 10~15 分鐘之後倒掉，再加入新的二次水重覆清洗一次(共二次)。
3. 二次水(D.D.W.) 清洗結束倒乾後，加入 15ml TE Buffer，在 56℃ 水浴槽中 shaking wash 15 分鐘之後倒掉，再加入新的 TE Buffer 重覆清洗三次以上(共四次)。
4. TE Buffer 清洗結束倒乾後，取出膠塊放入裝有 3 ml TE Buffer 之長型血清瓶中，置於 4℃ 冰箱保存直到使用為止。

四、限制酵素消化切割(Restriction Digestion)

1. 以 70%酒精消毒單側刃之刀片及膠體切割台後，取出清洗好的膠塊(包括 PFGE 分析用標準 marker 菌株 H9812 的 Plug 在內)切出一寬 2mm × 長 10mm 之細長狀膠條(slices)，放入裝有一倍 200µl 限制酵素 XbaI 專用緩衝溶液的 1.5ml 微量離心管中，置在室溫下 5~10 分鐘。
2. 移除上述緩衝溶液，再加入一倍 200µl 已含有酵素 XbaI (10Units) 的限制酵素專用緩衝溶液，放置 37℃ 乾浴器或水浴槽 1.5 ~ 2 小時
3. 作用時間結束後，取出酵素專用緩衝溶液，置換成 200µl 的 0.5 x TBE 緩衝液。
4. 此步驟作法如簡表，劑量為每一 plug slice

Reagent	ddH ₂ O	BSA(10μg/ μl)	10X Buffer	XbaI(10U/ μl)	Total volume
Predigest	178 μl	2 μl	20 μl	0	200 μl
Digest	177 μl	2 μl	20 μl	1μl	200 μl

五、電泳操作流程

1. 配製 2400ml 的 0.5X Tris-Borate EDTA(TBE) 緩衝液[10X TBE 溶液 120ml + 2280ml 二次水(D.D.W.)]；取其中 150ml 與 1.5g SKG agarose 加熱溶製成 1% 電泳用膠，置於 56 水浴槽備用。
2. 將剩餘 2250ml 的 0.5X TBE 緩衝液倒入電泳槽中，開啟脈衝式電泳裝置(Bio-Rad CHEF Mapper XA system)電源、幫浦(流速 70)及冷卻裝置，使緩衝液溫度降至 14
3. 組裝好電泳膠鑄膠台(gel casting stand)並以水平桌調整水平；齒梳(Comb) 緊密接觸鑄膠台底部的撐膠板(gel platform)。
4. 將已被酵素消化之細長狀膠條(slices)取出，用吸水紙盡量吸乾附著於其上之緩衝液，再將細長狀膠條依序平貼於齒梳(Comb)：將 PFGE 分析用標準 marker 菌株放置在第 1、5、10、15 孔，其餘孔位放置樣品菌株。
5. 之後將齒梳直立放置在鑄膠台(gel casting stand)上，倒入融化回溫至 56 的 1%電泳用膠，放置室溫 20~30 分鐘或 4 15 分鐘待冷卻凝固後即可進行電泳。

6. 電泳條件設定如下：

	沙門氏菌
Initial switch time	2.16 seconds
Final switch time	63.8 seconds
Run time	19 hours
Angle	120 degrees
voltage Gradient	6.0 volts/cm
Temperature	14 °C
Ramping factor	Linear

六、染色與照相

1. 電泳結束，關閉電泳裝置取出膠片，置於 1 μ g / ml 溴化乙苯非啶溶液(ethidium bromide)染色 20~30 分鐘,並以二次水(D.D.W.)褪染 40~60 分鐘。
2. 膠片最後放置在 UV 平台上觀察，並以數位影像處理系統擷取 DNA 圖譜影像儲存成數位檔案(*.tif 檔)，以供後續 Bionumics 電腦軟體進行圖譜分析比對。

配製藥品

Cell suspension Buffer

(100 mM Tris-HCl : 100 mM EDTA, pH 8.0)

Preparation:

10 ml of 1M Tris-HCl, pH 8.0

20 ml of 0.5 M EDTA, pH 8.0

Dilute to 100 ml with sterile **de-ionized** water

Store at room temperature

TE Buffer

(10 mM Tris-HCl : 1 mM EDTA, pH 8.0)

Preparation:

10 ml of 1 M Tris-HCl, pH 8.0

2 ml of 0.5M EDTA, pH 8.0

Dilute to 1000 ml with sterile **de-ionized** water

Store at room temperature

Cell Lysis Buffer

(50 mM Tris-HCl : 50 mM EDTA, pH 8.0

+ 1% N- Lauroyl- Sarcosine, Sodium salt (Sarcosyl))

Preparation:

25 ml of 1 M Tris-HCl, pH 8.0

50 ml of 0.5 M EDTA, pH 8.0

50 ml of 10% Sarcosyl

OR

5 g of Sarcosyl powder (N-Lauroyl-Sarcosine, Sodium salt)

Dilute to 500 ml with sterile **de-ionized** water

10X TBE Buffer

(1M Tris; 0.9 mM Boric acid; 0.01 M EDTA , pH 8.0)

Preparation:

121.14 g Tris base

55 g Boric acid

20 ml of 0.5M EDTA, pH 8.0

Dilute to 1000 ml with sterile **de-ionized** water

Sterilize by autoclaving

0.5X TBE (Tris Borate EDTA)

Preparation:

100 ml of 10x TBE

Dilute to 2000 ml with distilled water

Ethidium Bromide (10 mg/ml) stock solution. CARCINOGENIC.

Preparation:

250 mg Ethidium Bromide

Dilute to 25 ml with distilled water

Store at 4 °C in a lightproof container

不同菌種之 PFGE 操作狀況比較表

菌種 步驟		Shigella	Salmonella	Neisseria
培養	Media	TSA	TSA	5% sheep blood agar
	incubation	37 °C	37 °C	37 °C, 5% CO2
包埋	Turbidity ^a	0.48-0.52	0.68-0.72	0.68-0.72
膠片製作	RE ^b (sample)	Not I	Xba I	Nhe I
	Marker	H9812	H9812	M413
	RE ^b (marker)	Xba I	Xba I	Nhe I
電泳條件	Initial switch time	2.16 s	2.16 s	2.2 s
	Final switch time	54.17 s	63.8 s	35 s
	Run time	19 hs	19hs	18 hs
	Angle	120 degrees	120 degrees	120 degrees
	voltage Gradient	6.0 volts/cm	6.0 volts/cm	6.0 volts/cm
	Temperature	14 °C	14 °C	14 °C
	Ramping factor	Linear	Linear	Linear

- a. 為菌液濃度指標, 於 13 mm x 100 mm KIMBLE tube 中之量測值
- b. restriction enzyme 之濃度均為 10 U/ slice