

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4624.10—2016

### 入境环保用微生物菌剂检测方法 第 10 部分：淡紫拟青霉

Methods for examination of import microbial blends in the environmental  
protection—Part 10: *Paecilomyces lilacinus*

2016-08-23 发布

2017-03-01 实施



中 华 人 民 共 和 国  
国家质量监督检验检疫总局 发 布

中华人民共和国出入境检验检疫  
行 业 标 准  
入境环保用微生物菌剂检测方法  
第 10 部分:淡紫拟青霉

SN/T 4624.10—2016

\*

中国标准出版社出版  
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)  
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)  
总编室:(010)68533533

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

\*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 18 千字  
2017 年 11 月第一版 2017 年 11 月第一次印刷  
印数 1—500

\*

书号: 155066 · 2-32294 定价 16.00 元

## 前 言

SN/T 4624《入境环保用微生物菌剂检测方法》共分为 17 部分：

- 第 1 部分：地衣芽孢杆菌；
- 第 2 部分：短小芽孢杆菌；
- 第 3 部分：巨大芽孢杆菌；
- 第 4 部分：嗜酸氧化亚铁硫杆菌；
- 第 5 部分： $\beta$  型溶血性链球菌；
- 第 6 部分：金黄色葡萄球菌；
- 第 7 部分：沙门氏菌；
- 第 8 部分：志贺氏菌；
- 第 9 部分：致泻大肠埃希氏菌；
- 第 10 部分：淡紫拟青霉；
- 第 11 部分：雅致小克银汉霉；
- 第 12 部分：哈茨木霉；
- 第 13 部分：黄孢原毛平革菌；
- 第 14 部分：焦曲霉；
- 第 15 部分：解淀粉芽孢杆菌；
- 第 16 部分：类产碱假单胞菌；
- 第 17 部分：恶臭假单胞菌。

本部分为 SN/T 4624 的第 10 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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：中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、辽宁省农业科学院。

本部分主要起草人：张莹、赵颖、张明、李靓、李瑶、陈芳、王芳。

## 入境环保用微生物菌剂检测方法

### 第 10 部分:淡紫拟青霉

#### 1 范围

SN/T 4624 的本部分规定了入境环保用微生物菌剂符合性检验淡紫拟青霉的形态学鉴定、实时荧光 PCR 检测方法。

本部分适用于入境环保用微生物菌剂符合性检验淡紫拟青霉检测和鉴定。

#### 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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

#### 3 主要试剂和培养基

3.1 实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

3.2 查氏琼脂:见附录 A 中 A.1。

3.3 查氏液体培养基:见 A.2。

3.4 CTAB 缓冲液:见 A.3。

3.5 蛋白酶 K。

3.6 Tris 饱和酚。

3.7 三氯甲烷。

3.8 异戊醇。

3.9 异丙醇。

3.10 TE 缓冲液(pH 8.0):见 A.4。

3.11 70%乙醇。

3.12 溴化乙锭。

3.13 DNA 分子量标记:1 000 bp DNA ladder。

3.14 琼脂糖。

3.15 50×TAE 缓冲液(pH8.5):见 A.5。

3.16 Real Master Mix(2.5×,含 ROX 内参染料)。

3.17 20×Probe Enhancer Solution。

3.18 液氮。

#### 4 主要设备和材料

4.1 电子天平(感量 0.01 g)。

SN/T 4624.10—2016

- 4.2 恒温培养箱:  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.3 恒温振荡箱:  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.4 恒温水浴锅。
- 4.5 台式冷冻离心机(最高转速 15 000 r/min)。
- 4.6 PCR 超净工作台。
- 4.7 实时荧光 PCR 仪。
- 4.8 微量移液器和灭菌吸头: 10  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、1 000  $\mu\text{L}$ 。
- 4.9 高压灭菌锅。
- 4.10 电泳仪装置。
- 4.11 核酸/蛋白分析仪。
- 4.12 凝胶成像系统。
- 4.13 陶瓷研钵。
- 4.14 无菌培养皿: 直径 90 mm。
- 4.15 灭菌三角烧瓶: 500 mL、250 mL。
- 4.16 接种棒、镍铬丝。
- 4.17 Eppendorf 管和 PCR 反应管。
- 4.18 显微镜: 物镜  $10\times \sim 100\times$ 。

## 5 样品制备

- 5.1 以无菌操作取 1 g(mL)样品加入到 100 mL 无菌水中混匀,移取 1 环菌液连续划线接种 5 个查氏琼脂平板,  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下培养 5 d~10 d,观察琼脂平板上的菌落特征。取样过程中,在样品旁边放置 1 个查氏琼脂平板作为空白对照。
- 5.2 挑取单菌落划线接种在查氏琼脂平板上,  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下培养 5 d~10 d,得到纯化的菌株,进行形态学鉴定。
- 5.3 挑取符合形态学特征单菌落转接查氏液体培养基中,  $25\text{ }^{\circ}\text{C} + 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下 180 r/min 振荡培养 5 d~10 d,获得菌丝体。

## 6 形态学鉴定

### 6.1 培养性状

淡紫拟青霉在查氏琼脂平板上菌落平铺,质地絮状,白色,  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下培养 14 d 的菌落直径为 5 cm~5.5 cm;粉絮状的淡紫色菌落,背面浅褐色,无水溶色素。

### 6.2 形态特征

菌丝无色光滑,宽  $2.0\text{ }\mu\text{m} \sim 3.5\text{ }\mu\text{m}$ ;分生孢子梗特化不明显,粗糙,  $(200\text{ }\mu\text{m} \sim 500\text{ }\mu\text{m}) \times (2.0\text{ }\mu\text{m} \sim 2.5\text{ }\mu\text{m})$ ;产孢瓶梗单生或簇生于分生孢子梗或其分枝上,在分生孢子梗上可着生 1 个~3 个轮瓶梗簇,瓶梗烧瓶状,多数  $5\text{ }\mu\text{m} \sim 12\text{ }\mu\text{m}$  长,近基部膨大,宽  $1.6\text{ }\mu\text{m} \sim 2.5\text{ }\mu\text{m}$ ,颈部细长。分生孢子近球形或宽梭形,无色,壁光滑,  $(2.1\text{ }\mu\text{m} \sim 3.5\text{ }\mu\text{m}) \times (1.4\text{ }\mu\text{m} \sim 2.4\text{ }\mu\text{m})$ 。无厚垣孢子。



7 分子生物学检测

7.1 模板 DNA 的提取

7.1.1 直接提取法

取 5.3 中菌液过滤抽干收集菌丝,取 0.1 g 菌丝于液氮中研磨至粉末状,收集粉末于 1.5 mL 离心管中,加入 500  $\mu$ L CTAB 缓冲液(其中含 0.1 g 蛋白酶 K)混匀,65  $^{\circ}$ C 水浴 1 h;13 000 r/min 离心 5 min~10 min,保留上清液;加 500  $\mu$ L Tris 饱和酚:三氯甲烷:异戊醇(体积为 25:24:1)混匀,13 000 r/min 离心 5 min~10 min,保留上清液;加 500  $\mu$ L 三氯甲烷:异戊醇(体积为 24:1)混匀,13 000 r/min 离心 5 min~10 min,保留上清液;加入 1 mL 异丙醇混匀,-70  $^{\circ}$ C 下放置 1 h,或-20  $^{\circ}$ C 过夜;13 000 r/min 离心 30 min,可见 DNA 沉淀;70%乙醇冲洗 DNA 沉淀,室温干燥;用 50  $\mu$ L~100  $\mu$ L TE 溶解 DNA,置于-20  $^{\circ}$ C 下保存备用。

7.1.2 试剂盒法

使用商品化的真菌基因组 DNA 提取试剂盒,具体提取操作参照说明书进行。选择商品化试剂盒的原则是所提取的 DNA 质量好并且提取率高。

7.1.3 DNA 质量检测

将提取的 DNA 用 1.0%的琼脂糖凝胶(含溴化乙锭或等效染料)进行完整性检测。  
采用分光光度法测定 DNA 的浓度和纯度。DNA 浓度计算公式:  
$$\text{DNA 浓度}(\text{ng}/\mu\text{L})=\text{OD}_{260}\times 50\times \text{核酸稀释倍数}$$
  
若  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  在 1.8~2.0 之间,表明 DNA 纯度较好,可用于实时荧光 PCR 检测。

7.2 实时荧光 PCR 鉴定

7.2.1 引物和探针序列

引物和探针序列见表 1。其中探针的 5'端标记 FAM,3'端标记 TAMRA。

表 1 引物和探针序列

名称	引物序列	探针序列
淡紫拟青霉	5'-GACCCAAACTCTTTTGCATTACG-3' 5'-AGATCCGTTGTTGAAAGTTTGTATTCATTTGTTTTG-3'	5'FAM-CCGGCGGAATTTCT-TCTCTGAGTTGC-TAMRA3'

7.2.2 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 2。

SN/T 4624.10—2016

表 2 实时荧光 PCR 反应体系

试剂名称	实时荧光 PCR 反应体系
2.5×Real Master Mix	10 $\mu$ L
正向引物(25 pmol/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
反向引物(25 pmol/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
探针(5 pmol/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
20×Probe Enhancer solution	1.25 $\mu$ L
DNA 模板	20 ng
ddH <sub>2</sub> O	补充至 25 $\mu$ L
注: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。	

## 7.2.3 实时荧光 PCR 反应参数

实时荧光 PCR 反应参数见表 3。

表 3 实时荧光 PCR 反应参数

循环	步骤	温度 ℃	时间 s	内容
1	1	94	120	起始模板变性
40	2	94	15	PCR 循环中模板变性
	3	60	30	退火
	4	68	30	延伸
注:使用不同实时荧光 PCR 仪,可对参数作适当调整。				

## 7.2.4 空白对照、阴性对照和阳性对照设置

阴性对照:非淡紫拟青霉 DNA 为模板;

阳性对照:已知淡紫拟青霉的 DNA(参见附录 B)或含有待测基因序列的质粒为模板;

空白对照:设两个,一是提取 DNA 时设置的提取空白对照(以等体积水代替样品),二是实时荧光 PCR 反应的空白对照(以水代替 DNA 模板)。

## 7.2.5 实时荧光 PCR 扩增结果判定

## 7.2.5.1 对照结果

阴性对照、阳性对照、空白对照结果应满足下列要求:

——阴性对照:无扩增曲线,Ct 值 $\geq 40.0$ ;

——阳性对照:出现典型的扩增曲线,Ct 值应 $< 30.0$ ;

——空白对照:无扩增曲线,Ct 值 $\geq 40.0$ 。

否则,检测视为无效。

#### 7.2.5.2 结果判定

在阴性对照、阳性对照、空白对照均正常的情况下：

- Ct 值 $\geq 40.0$ ,可判定该样品实时荧光 PCR 结果为阴性；
- Ct 值 $\leq 35.0$ ,可判定该样品实时荧光 PCR 结果为阳性；
- $35.0 < \text{Ct 值} < 40.0$ ,建议重做。再次扩增后的目标基因 Ct 值仍小于 40.0,且曲线有明显的对数增长期,并且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,则可判定为阳性；再次扩增后目标基因 Ct 值大于或等于 40.0,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,可判定为阴性。

#### 8 结果报告

当形态学试验、实时荧光 PCR 检测试验结果均符合时,报告检出淡紫拟青霉。

当形态学试验、实时荧光 PCR 检测试验出现不符合结果时,建议重做。仍不符合时,报告未检出淡紫拟青霉。





SN/T 4624.10—2016

附 录 A  
(规范性附录)  
培养基和试剂

## A.1 查氏琼脂

## A.1.1 成分

蔗糖( $C_{12}H_{22}O_{11}$ )	30.0 g
磷酸氢二钾( $K_2HPO_4$ )	1.0 g
硫酸镁( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.5 g
氯化钾(KCl)	0.5 g
硫酸亚铁( $FeSO_4 \cdot 4H_2O$ )	0.01 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

## A.1.2 制法

将以上成分混合加热溶化,调节 pH 至 6.0~6.5,121 °C 高压灭菌 15 min。

## A.2 查氏液体培养基

## A.2.1 成分

蔗糖( $C_{12}H_{22}O_{11}$ )	30.0 g
磷酸氢二钾( $K_2HPO_4$ )	1.0 g
硫酸镁( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.5 g
氯化钾(KCl)	0.5 g
硫酸亚铁( $FeSO_4 \cdot 4H_2O$ )	0.01 g
蒸馏水	1 000 mL

## A.2.2 制法

将以上成分混合加热溶化,调节 pH 至 6.0~6.5,121 °C 高压灭菌 15 min。

## A.3 CTAB 缓冲液

## A.3.1 成分

氯化钠(NaCl)	46.75 g
十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)	20.0 g
1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)	50 mL
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	20 mL
去离子水	800 mL

### A.3.2 制法

将以上成分混合溶化,用去离子水定容至 1 000 mL,121 °C 高压灭菌 15 min。

## A.4 TE 缓冲液

### A.4.1 成分

Tris 碱	1.21 g
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	1.86 g
去离子水	1 000 mL

### A.4.2 制法

在 800 mL 去离子水中,依次加入以上成分,调节 pH 至 8.0,用去离子水定容到 1 L,分装后 121 °C 高压灭菌 15 min。

## A.5 50×TAE 缓冲液

### A.5.1 成分

Tris	242.0 g
冰醋酸	57.1 mL
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	100 mL
去离子水	800 mL

### A.5.2 制法

将以上成分混合溶化,用去离子水定容至 1 000 mL,121 °C 高压灭菌 15 min。

附 录 B  
(资料性附录)

淡紫拟青霉基因序列(GenBank AF368804)

1 gtttccgtag gtgaacctgc ggagggatca ttaccgagtt atacaactcc caaaccact  
61 gtgaacctta cctcagttgc ctggcggga acgccccggc cgccggcctc cgcgccggcg  
121 ccggaccag gcgcccgccg cagggaacca aaactctttt gcattacgcc cgccggcgga  
181 atttcttctc tgagttgcac aagcaaaaca aatgaatcaa aactttcaac aacggatctc  
241 ttggttctgg catcgatgaa gaacgcagcg aaatgcgata agtaatgtga attgcagaat  
301 tcagtgaatc atcgaatctt tgaacgcaca ttgcgccgc cagcattctg gcgggcatgc  
361 ctgttcgagc gtcatttcaa ccctcgagcc cccccggggg cctcggtgtt gggggacggc  
421 acaccagccg ccccgaaat gcagtggcga ccccgccgca gcctccctg cgtagtagca  
481 cacacctgc accggagcgc ggaggcggtc acgccgtgaa acgeccaact ttcttagagt  
541 tgacctcgga tcaggtagga ataccgctg aacttaagca tat

---



SN/T 4624.10—2016

书号:155066 • 2-32294

定价: 16.00 元