

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4624.9—2016

入境环保用微生物菌剂检测方法 第9部分:致泻大肠埃希氏菌

Methods for examination of import microbial blends in the environmental
protection—Part 9: *Diarrheogenic Escherichia coli*

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

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： β 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 9 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。

本部分主要起草人：李成镛、王秋艳、于丽、姜玲玲、康凯、王芳。

入境环保用微生物菌剂检测方法

第9部分:致泻大肠埃希氏菌

1 范围

SN/T 4624 的本部分规定了入境环保用微生物菌剂卫生学检验致泻大肠埃希氏菌的形态学鉴定、生化鉴定、普通 PCR、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中致泻大肠埃希氏菌的检测和鉴定。

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 生理盐水:见附录 A 中 A.1。
- 3.3 营养肉汤:见 A.2。
- 3.4 肠道菌增菌肉汤:见 A.3。
- 3.5 麦康凯琼脂:见 A.4。
- 3.6 伊红美蓝琼脂:见 A.5。
- 3.7 三糖铁琼脂:见 A.6。
- 3.8 克氏双糖铁琼脂:见 A.7。
- 3.9 糖发酵管(乳糖、鼠李糖、木糖和甘露醇):见 A.8。
- 3.10 赖氨酸脱羧酶试验培养基:见 A.9。
- 3.11 尿素琼脂:见 A.10。
- 3.12 氰化钾:见 A.11。
- 3.13 蛋白胨水、靛基质试剂:见 A.12。
- 3.14 半固体琼脂:见 A.13。
- 3.15 氧化酶试剂:见 A.14。
- 3.16 革兰氏染色液:见 A.15。
- 3.17 致病性大肠埃希氏菌诊断血清、侵袭性大肠埃希氏菌诊断血清、产肠毒素大肠埃希氏菌诊断血清、出血性大肠埃希氏菌诊断血清。
- 3.18 细菌基因组 DNA 提取试剂盒。
- 3.19 TE 缓冲液(pH8.0):见 A.16。
- 3.20 溶菌酶(10 mg/mL):见 A.17。
- 3.21 蛋白酶 K(20 mg/mL):见 A.18。
- 3.22 10%SDS:见 A.19。

- 3.23 3 mol/L 乙酸钠:见 A.20。
- 3.24 dNTP:dATP、dTTP、dGTP、dCTP。
- 3.25 TBE:见 A.21。
- 3.26 *Taq* DNA 聚合酶。
- 3.27 琼脂糖。
- 3.28 溴化乙锭。
- 3.29 DNA 分子量标记:100 bp DNA ladder。

4 主要仪器和设备

- 4.1 电子天平(感量 0.01 g)。
- 4.2 恒温培养箱:36 °C±1 °C、42 °C±1 °C。
- 4.3 恒温水浴锅。
- 4.4 台式冷冻离心机(最高转速 15 000 r/min)。
- 4.5 PCR 扩增仪。
- 4.6 实时荧光 PCR 仪。
- 4.7 微量移液器和灭菌吸头:10 μL、20 μL、200 μL、1 000 μL。
- 4.8 高压灭菌锅。
- 4.9 PCR 超净工作台。
- 4.10 电泳仪。
- 4.11 核酸/蛋白分析仪。
- 4.12 凝胶成像系统。
- 4.13 无菌培养皿:直径 90 mm。

5 样品制备

以无菌操作取 1 g(mL)样品加入到 100 mL 生理盐水中混匀,从中移取 25 mL 加入到 225 mL 灭菌生理盐水中混匀。取样过程中,在样品旁边放置 1 个营养琼脂平板作为空白对照。

6 形态学及生化、血清学鉴定

6.1 增菌

无菌条件下,移取 25 mL 上述样品匀液至盛有 225 mL 肠道菌增菌肉汤的无菌均质袋内,用拍击式均质器拍打 1 min~2 min,将上述样品匀液于 42 °C 培养 18 h~24 h。

6.2 分离

将增菌液分别划线接种麦康凯或伊红美蓝琼脂平板,于 36 °C±1 °C 培养 18 h~24 h,观察菌落。不但要注意乳糖发酵的菌落,同时也要注意乳糖不发酵和迟缓发酵的菌落。

6.3 生化鉴定

6.3.1 自鉴别平板上直接挑取数个菌落分别接种三糖铁琼脂(TSI)或克氏双糖铁琼脂(KI)。同时将这些培养物分别接种蛋白胨水、半固体、pH7.2 尿素琼脂、KCN 肉汤和赖氨酸脱羧酶试验培养基。以上培养物均在 36 °C 培养过夜。

6.3.2 TSI 斜面产酸或不产酸,底层产酸,H₂S 阴性,KCN 阴性和尿素阴性的培养物为大肠埃希氏菌。TSI 底层不产酸,或 H₂S、KCN、尿素有任一项为阳性的培养物,均非大肠埃希氏菌。必要时做氧化酶试验和革兰氏染色。

6.4 血清学鉴定

挑取经生化试验证实为大肠埃希氏菌琼脂培养物,用致病性大肠埃希氏菌、侵袭性大肠埃希氏菌和产肠毒素大肠埃希氏菌多价 O 血清和出血性大肠埃希氏菌 O157 血清做玻片凝集试验。当与某一种多价 O 血清凝集时,再与该多价血清所包含的单价 O 血清做试验。致泻大肠埃希氏菌所包括的 O 抗原群见表 1。如与某一个单价 O 血清呈现强凝集反应,即为假定试验阳性。

表 1 致泻大肠埃希氏菌所包括的 O 抗原群

大肠埃希氏菌的种类	所包括的 O 抗原群
EPEC	O26 O55 O86 O111ab O114 O119 O125ac O127 O128ac O142 O158
EHEC	O157
EIEC	O28ac O29 O112ac O115 O124 O135 O136 O143 O144 O152 O164 O167
ETEC	O6 O11 O15 O20 O25 O27 O63 O78 O85 O114 O115 O125 O128ac O148 O149 O159 O166 O167

制备 O 抗原悬液,稀释至与 Mac Farland 3 号比浊管相当的浓度。原效价为(1 : 160)~(1 : 320)的 O 血清,用 0.5% 盐水稀释至 1:40。稀释血清与抗原悬液在 10 mm×75 mm 试管内等量混合,做单管凝集试验。混匀后放于 50 ℃ 水浴锅内,经 16 h 后观察结果。如出现凝集,可证实为该 O 抗原。

6.5 结果与报告

综合以上生化鉴定和血清学鉴定的结果,报告检出或未检出致泻大肠埃希氏菌。

7 分子生物学检测(选做项目)

7.1 细菌模板 DNA 的提取

7.1.1 直接提取法

取 6.1 中菌液 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,沉淀加入 TE100 μL、10 mg/mL 溶菌酶 100 μL,37 ℃ 温育 30 min,12 000 r/min 离心 2 min,沉淀加入 TE 缓冲液 600 μL 重悬,再加入 20 mg/mL 蛋白酶 K25 μL,55 ℃ 温育 1 h 后沸水浴 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清保存于-20 ℃ 保存以待检测。

7.1.2 有机溶剂提取法

取 6.1 中菌液 2 mL 加到 2 mL 无菌离心管中,10 000 r/min 离心 2 min,弃上清,尽量弃净上清,沉淀加入 TE 缓冲液 570 μL 重悬,然后加入 10 mg/mL 溶菌酶 100 μL,37 ℃ 温育 30 min,再加入 10% SDS 30 μL,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/氯仿(1 : 1,体积比)混匀,12 000 r/min 离心 10 min,取上清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,

SN/T 4624.9—2016

12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,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 $^{\circ}$ C 有利于 DNA 溶解),-20 $^{\circ}$ C 保存以待检测。

7.1.3 试剂盒法

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。

7.2 DNA 质量检测

将提取的 DNA 用 1.0%含溴化乙锭(或等效染料)的琼脂糖凝胶进行完整性检测。然后用核酸/蛋白分析仪分别在 260 nm 和 280 nm 下测定 OD 值,用于 PCR 反应的 DNA 纯度一般为 $1.6 \leq OD_{260} / OD_{280} \leq 2.0$ 。

DNA 浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$)= $OD_{260} \times 50 \times \text{核酸稀释倍数}$

7.3 PCR 鉴定

7.3.1 引物序列

引物序列及扩增片段长度见表 2。

表 2 PCR 扩增引物序列及扩增片段长度

致泻大肠埃希氏菌	引物来源	引物序列	扩增片段大小
肠侵袭性大肠埃希氏菌	<i>invX</i>	5'-CTG GAT GGT ATG GTG AGG-3' 5'-GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC-3'	320 bp
肠致病性大肠埃希氏菌	<i>bfpA</i>	5'-GGT CTG TAT ATT GGG CAG ACC-3' 5'-GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA-3'	209 bp
产肠毒素大肠埃希氏菌	<i>eltA</i>	5'-GCA CAC GCA GCT CCT CAG TC-3' 5'-TCC TTC ATC CTT TCA ATG GCT TT-3'	218 bp
肠出血性大肠埃希氏菌 O157:H7	<i>rfbE</i>	5'-ATT GCG CTG AGG CCT TTG-3' 5'-CGA GTA CAT TGG CAT CGT G-3'	499 bp

7.3.2 反应体系

PCR 反应体系见表 3。

表 3 PCR 反应体系

试剂名称	PCR 反应体系
10 \times PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})	2.0 μL
dNTP(10 mmol/L)	2.0 μL
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/ μL)	0.2 μL
正向引物和反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	各 1.0 μL
DNA 模板(50 ng~200 ng)	2.0 μL
双蒸水	补至 25.0 μL
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。	

7.3.3 PCR 反应条件

94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 60 s,60 ℃退火 60 s,72 ℃延伸 60 s,进行 35 个循环;72 ℃延伸 7 min,4 ℃保存反应产物。

使用不同 PCR 仪,可对参数作适当调整。

7.3.4 空白对照、阴性对照和阳性对照设置

阴性对照:非致泻大肠埃希氏菌 DNA 为模板。

阳性对照:已知致泻大肠埃希氏菌的 DNA 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 PCR 反应的空白对照(以水代替 DNA 模板)。

7.3.5 PCR 扩增产物的电泳检测

用电泳缓冲液(0.5×TBE)制备 2%琼脂糖凝胶,取 5 μL PCR 扩增产物,和 1 μL 上样缓冲液混合,进行点样,DNA marker(100 bp DNA ladder)做参照。3 V/cm~5 V/cm 恒压电泳,电泳 50 min~60 min,电泳检测结果用凝胶成像分析系统记录并保存。

7.3.6 PCR 扩增结果判定和报告

7.3.6.1 对照结果

- 阳性对照:出现已知目的扩增条带。
- 阴性对照:未出现特征条带。
- 空白对照:未出现特征条带。

7.3.6.2 结果判定和报告

对照实验结果正常,待测样品未出现已知目的扩增条带,则可判定该样品 PCR 扩增结果为阴性,报告未检出致泻大肠埃希氏菌。

对照实验结果正常,待测样品出现已知目的扩增条带,则可初步判定该样品 PCR 扩增结果为阳性,应依据第 6 章中生化鉴定和血清学鉴定对该菌进行进一步确认,最终结果以生化鉴定和血清学鉴定的检测结果为准,报告检出(或未检出)致泻大肠埃希氏菌。

对照实验结果异常,本次待测样品的结果无效,应重新做实验,并排除污染因素。

7.4 实时荧光 PCR 鉴定

7.4.1 引物和探针序列

引物和探针序列见表 4。其中探针的 5'端标记 FAM,3'端标记 TAMRA。

表 4 引物和探针序列

鉴定菌名称	引物序列	探针序列
出血性 大肠埃希氏菌	5'-TCCTCAGCTATAGGGTGCTTTTG-3'	5'FAM-TATTTTTTCCGAGTACATT GGCATCGTGTGG-TAMRA3'
	5'-ATCGAAACAAGGCCAGTTTTTTAC-3'	

SN/T 4624.9—2016

7.4.2 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 5。

表 5 实时荧光 PCR 反应体系

试剂名称	实时荧光 PCR 反应体系
10×PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})	2.5 μ L
dNTPs(10 mmol/L)	1.0 μ L
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/ μ L)	0.5 μ L
正向引物和反向引物(20 μ mol/L)	各 1.0 μ L
探针(20 μ mol/L)	1.0 μ L
DNA 模板	2.0 μ L
双蒸水	补至 25 μ 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。	

7.4.3 实时荧光 PCR 反应参数

实时荧光 PCR 反应参数:37 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火延伸 40 s,同时收集 FAM 荧光信号,进行 40 个循环,4 $^{\circ}$ C 保存反应产物。

使用不同实时荧光 PCR 仪,可对参数作适当调整。

7.4.4 空白对照、阴性对照和阳性对照设置

阴性对照:非出血性大肠埃希氏菌 DNA 为模板。

阳性对照:已知出血性大肠埃希氏菌的 DNA 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)。

7.4.5 实时荧光 PCR 扩增结果判定和报告

7.4.5.1 对照结果

阴性对照:无扩增曲线;Ct 值 ≥ 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 ≥ 40.0 。

否则,检测视为无效。

7.4.5.2 结果判定和报告

——Ct 值 ≥ 40.0 ,可判定该样品实时荧光 PCR 结果为阴性,报告未检出出血性大肠埃希氏菌。

——Ct 值 ≤ 35.0 ,可初步判定该样品实时荧光 PCR 结果为阳性,应依据第 6 章中生化鉴定和血清学鉴定对该菌进行进一步确认,最终结果以生化鉴定和血清学鉴定的检测结果为准,报告检出(或未检出)出血性大肠埃希氏菌。

—— $35.0 < \text{Ct 值} < 40.0$,建议重做。再次扩增后的外源基因 Ct 值仍小于 40,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;再次扩增后外源基因 Ct 值大于或等于 40,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,可判定为阴性。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 生理盐水

A.1.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

A.2 营养肉汤

A.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

在 1 000 mL 蒸馏水中分别加入 10.0 g 蛋白胨,3.0 g 牛肉膏,5 g 氯化钠,溶解,调节 pH 至 7.4,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

A.3 肠道菌增菌肉汤

A.3.1 成分

蛋白胨	10.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
磷酸氢二钠	8.0 g
牛胆盐	20.0 g
煌绿	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

在 1 000 mL 蒸馏水中分别加入 10.0 g 蛋白胨,5.0 g 葡萄糖,20 g 牛胆盐,8 g 磷酸氢二钠,2.0 g 磷酸二氢钾,0.015 g 煌绿加热使溶解,校正 pH 于 115 ℃ 高压灭菌 15 min。

A.4 麦康凯琼脂

A.4.1 成分

蛋白胨	17.0 g
猪胆盐(或牛、羊胆盐)	5.0 g
胨	3.0 g
琼脂	17.0 g
乳糖	10.0 g
氯化钠	5.0 g
0.5%中性红水溶液	5 mL
0.01%结晶紫水溶液	10 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.4.2 制法

将 400 mL 蒸馏水中分别加入 17.0 g 蛋白胨,3.0 g 胨,5.0 g 猪胆盐(或牛、羊胆盐),5.0 g 氯化钠,600 mL 蒸馏水溶解 17.0 g 琼脂,加热溶解,两液合并,121 ℃ 高压灭菌 15 min。临用时加热溶化琼脂,趁热加入 10 g 乳糖,加入 0.01%结晶紫水溶液和 0.5%中性红水溶液,摇匀后倾注平板。

A.5 伊红美蓝琼脂

A.5.1 成分

蛋白胨	10.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
乳糖	10.0 g
琼脂	17.0 g
0.65%伊红美蓝溶液	10 mL
2%伊红 Y 溶液	20 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

在 1 000 mL 蒸馏水中分别加入 10.0 g 蛋白胨,2.0 g 磷酸氢二钾,17.0 g 琼脂,煮沸溶解,调节 pH7.1,121 ℃ 高压灭菌 15 min,临用时加入 10 g 乳糖并加热溶化琼脂,冷却加入 2%伊红 Y 溶液 20 mL和 0.65%伊红美蓝溶液 10 mL,摇匀后倾注平板。

A.6 三糖铁琼脂

A.6.1 成分

蛋白胨	20.0g
牛肉膏	5.0g
乳糖	10.0g
蔗糖	10.0g

葡萄糖	1.0 g
氯化钠	5.0 g
硫酸亚铁铵	0.2 g
硫代硫酸钠	0.2 g
琼脂	12.0 g
0.2% 酚红水溶液	12.5 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.6.2 制法

在 1 000 mL 蒸馏水中分别加入 20.0 g 蛋白胨, 5.0 g 牛肉膏, 10.0 g 乳糖, 10.0 g 蔗糖, 1.0 g 葡萄糖, 5.0 g 氯化钠, 0.2 g 硫酸亚铁铵 $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$, 0.2g 硫代硫酸钠, 煮沸溶解, 调节 pH7.4, 加入 12.0 g 琼脂, 加热煮沸, 以溶化琼脂。加入 0.2% 酚红水溶液 12.5 mL, 摇匀。分装试管, 装量宜多些, 以便得到较高的底层。121 ℃ 高压灭菌 15 min。放置高层斜面备用。

A.7 克氏双糖铁琼脂

A.7.1 成分

蛋白胨	20.0 g
牛肉膏	3.0 g
酵母膏	3.0 g
乳糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
氯化钠	5.0 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
硫代硫酸钠	0.5 g
琼脂	12.0 g
0.2% 酚红水溶液	12.5 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.7.2 制法

先在 1 000 mL 蒸馏水中分别加入 20.0 g 蛋白胨, 3.0 g 牛肉膏, 3.0 g 酵母膏, 10.0 g 乳糖, 1.0 g 葡萄糖, 5.0 g 氯化钠, 0.5 g 柠檬酸铁铵, 0.5 g 硫代硫酸钠, 溶解, 调节 pH7.4, 加入 12.0 g 琼脂, 加热煮沸, 以溶化琼脂。加入 0.2% 酚红水溶液 12.5 mL, 摇匀。分装试管, 装量宜多些, 以便得到比较高的底层。121 ℃ 高压灭菌 15 min。放置高层斜面备用。

A.8 糖发酵管(乳糖、鼠李糖、木糖和甘露醇)

A.8.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉膏	5.0 g
氯化钠	3.0 g
0.2% 溴麝香草酚蓝溶液	12 mL

磷酸氢二钠	2.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.8.2 制法

先在 1 000 mL 蒸馏水中分别加入 5.0 g 牛肉膏, 10.0 g 蛋白胨, 3.0 g 氯化钠, 2.0 g 磷酸氢二钠 $[\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$, 12.0 mL 0.2% 溴麝香草酚蓝溶液, 上述成分配好后, 按 0.5% 加入葡萄糖, 分装于有一个倒置小管的小试管内, 121 °C 高压灭菌 15 min。其他各种糖发酵管可按上述成分配好后, 分装每瓶 100 mL, 121 °C 高压灭菌 15 min。另将各种糖类分别配好 10% 溶液, 同时高压灭菌。将 5 mL 糖溶液加入于 100 mL 培养基内, 以无菌操作分装小试管。注: 蔗糖不纯, 加热后会自行水解者, 应采用过滤法除菌。

A.9 赖氨酸脱羧酶试验培养基

A.9.1 成分

蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	5.0 g
葡萄糖	1.0 g
1.6% 溴甲酚紫-乙醇溶液	1.0 mL
L-氨基酸或 DL-氨基酸	0.5 g/100 mL 或 1.0 g/100 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.9.2 制法

先在 1 000 mL 蒸馏水中分别加入 5.0 g 蛋白胨, 3.0 g 酵母浸膏, 1.0 g 葡萄糖, 1.6% 溴甲酚紫-乙醇溶液 1 mL, 加热溶解后, 分装每瓶 100 mL, 分别加入各种氨基酸: 赖氨酸、精氨酸和鸟氨酸。L-氨基酸按 0.5% 加入, DL-氨基酸按 1% 加入。再行校正 pH 至 6.8。对照培养基不加氨基酸。分装于灭菌的小试管内, 每管 0.5 mL, 上面滴加一层液体石蜡, 115 °C 高压灭菌 10 min。

A.10 尿素琼脂

A.10.1 成分

蛋白胨	1.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
葡萄糖	1.0 g
氯化钠	5.0 g
20% 尿素溶液	100 mL
琼脂	20.0 g
0.4% 酚红溶液	3.0 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.10.2 制法

先在 1 000 mL 蒸馏水中分别加入 1.0 g 蛋白胨, 5.0 g 氯化钠, 1.0 g 葡萄糖, 2.0 g 磷酸二氢钾, 0.4% 酚红溶液, 煮沸溶解, 调节 pH, 加入 20 g 琼脂, 加热溶化, 121 °C 高压灭菌 15 min。加入除菌过滤

的尿素溶液,尿素的最终浓度为2%,调节 pH 7.2 ± 0.1 ,分装灭菌试管,放成斜面备用。

A.11 氰化钾

A.11.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
0.5%氰化钾溶液	20 mL
磷酸二氢钾	0.225 g
磷酸氢二钠	5.64 g
蒸馏水	1 000 mL

A.11.2 制法

先在1 000 mL蒸馏水中分别加入10.0 g蛋白胨,5.0 g氯化钠,0.225 g磷酸二氢钾,5.64 g磷酸氢二钠,煮沸溶解,调节 pH,121 °C高压灭菌15 min。每100 mL培养基加入0.5%氰化钾溶液2.0 mL,分装于12 mm×100 mm灭菌试管,每管4 mL,立刻用灭菌橡皮塞。4.0 °C冰箱,至少可保存两个月。同时将不加氰化钾的培养基作为对照培养基,分装试管备用。

A.12 蛋白胨水、靛基质试剂

A.12.1 成分

基础液:	
蛋白胨	20.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.12.2 制法

在1 000 mL蒸馏水中分别加入20.0 g蛋白胨,5.0 g氯化钠,煮沸溶解,调节 pH7.4,分装小试管,121 °C高压灭菌15 min。

A.12.3 靛基质试剂

A.12.3.1 柯凡克试剂:将5 g对二甲氨基甲醛溶解于75 mL戊醇中,然后缓慢加入浓盐酸25 mL。

A.12.3.2 欧-波试剂:将1 g对二甲氨基甲醛溶解于95 mL95%乙醇内,然后缓慢加入浓盐酸20 mL。

A.13 半固体琼脂

A.13.1 成分

蛋白胨	1.0 g
生肉膏	0.3 g
氯化钠	0.5 g
琼脂	0.35 g~0.4 g
蒸馏水	100 mL

A.13.2 制法

先在 100 mL 蒸馏水中分别加入 1.0 g 蛋白胨,0.3 g 生肉膏,0.5 g 氯化钠,0.35g ~0.4 g 琼脂,煮沸溶解,调节 pH 至 7.4,分装小试管,121 ℃灭菌 15 min,直立凝固备用。

A.14 氧化酶试剂

A.14.1 成分

A.14.1.1 1%盐酸二甲基对苯二胺溶液:少量新鲜配制,干冰箱内避光保存。

A.14.1.2 1%α-萘酚-乙醇溶液。

A.14.2 制法

取白色洁净滤纸沾取菌落。加盐酸二甲基对苯二胺溶液一滴,阳性者呈现粉红色,并逐渐加深;再加 α-萘酚溶液一滴,阳性者于半分钟内呈现鲜蓝色。阴性两分钟内不变色。

A.15 革兰氏染色液

A.15.1 成分

结晶紫染色液:

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20 mL
1%草酸铵溶液	80 mL

将结晶紫溶解于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

革兰氏碘液:

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300 mL

将碘与碘化钾先进行混合,加入蒸馏水少许,充分振摇,待完全溶解后,再加蒸馏水至 300 mL。

沙黄复染液:

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 mL
蒸馏水	90 mL

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.15.2 制法

涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染液,染 1 min,水洗;滴加革兰氏碘液,作用 1 min,水洗;滴加 95%乙醇脱色约 15 s~30 s,直至染色液被洗掉,不要过分脱色,水洗;滴加复染液,复染 1 min,水洗、待干、镜检。

A.16 TE 缓冲液(pH 8.0)

A.16.1 成分

1 mol/L Tris-盐酸(pH 8.0)	10 mL
-------------------------	-------

500 mmol/L EDTA(pH8.0)	2 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.16.2 制法

分装后 121 °C 高压灭菌 15 min。

A.17 溶菌酶(10 mg/mL)

A.17.1 成分

10 mM Tris-Cl(pH 8.0)	100 mL
溶菌酶	0.1 g

A.17.2 制法

用 10 mM Tris-Cl(pH 8.0) 溶解溶菌酶粉末, 配制成 10 mg/mL 的贮存液, 过滤除菌, 分装, -20 °C 保存。

A.18 蛋白酶 K(20 mg/mL)

A.18.1 成分

Tris-Cl(pH 8.0)	50 mmol/L
Ca(Ac) ₂	1.5 mmol/L

A.18.2 制法

用 50 mmol/L Tris-Cl(pH8.0), 1.5 mmol/L Ca(Ac)₂ 溶解蛋白酶 K 粉末, 配制成 20 mg/mL 的贮存液, 过滤除菌, 分装, -20 °C 保存。

A.19 10%SDS

A.19.1 成分

SDS	10.0 g
去离子水	80 mL

A.19.2 制法

称量 10 g 高纯度的 SDS 置于 100 mL~200 mL 烧杯中, 加入约 80 mL 的去离子水, 68 °C 加热溶解。滴加数滴浓盐酸调节 pH 至 7.2, 将溶液定容至 100 mL 后, 室温保存。

A.20 3 mol/L 乙酸钠

A.20.1 成分

三水乙酸钠	408.1 g
水	80 mL

A.20.2 制法

在 80 mL 水中溶解 408.1 g 三水乙酸钠,用稀乙酸调节 pH 至 7.0,加水定容到 1 L,分装后高压灭菌。

A.21 TBE

A.21.1 成分

Tris	54.0 g
硼酸	27.5 g
离子水	800 mL
0.5 mol/L EDTA(pH8.0)	20 mL

A.21.2 制法

54 g Tris,27.5 g 硼酸,800 mL 去离子水溶解,20 mL 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)定容至 1 L。

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 9 部分:致泻大肠埃希氏菌

SN/T 4624.9—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

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 30 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 · 2-32293 定价 21.00 元



SN/T 4624.9—2016