



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

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

Microbiological examination for milk and milk products hygiene—
Part 8: Detection of *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis*

2010-05-27 发布

2010-12-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

SN/T 2552《乳及乳制品卫生微生物学检验方法》分为十三个部分：

- 第1部分：取样指南；
- 第2部分：检验样品的制备与稀释；
- 第3部分：酵母、霉菌菌落计数；
- 第4部分：嗜冷菌微生物菌落计数；
- 第5部分：沙门氏菌检验；
- 第6部分：柠檬酸杆菌检验；
- 第7部分：阴沟肠杆菌检验；
- 第8部分：普通变形杆菌和奇异变形杆菌检验；
- 第9部分：克雷伯氏菌检验；
- 第10部分：阪崎肠杆菌检验 免疫荧光法；
- 第11部分：蜡样芽孢杆菌的分离与计数；
- 第12部分：单核细胞增生李斯特氏菌检测与计数；
- 第13部分：假单胞菌属的分离与计数。

本部分是 SN/T 2552 的第 8 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：中国检验检疫科学研究院，广西出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：刘军义、赵贵明、罗兆飞、韦梅良、盘宝进、汪文龙。

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

1 范围

SN/T 2552 的本部分规定了乳及其制品中普通变形杆菌和奇异变形杆菌的常规检验方法和 PCR 检测方法。

本部分适用于乳及其制品中普通变形杆菌和奇异变形杆菌检验。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 2552.1 乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第1部分:取样指南

SN/T 1869—2007 食品中多种致病菌快速检测方法 PCR法

WS/T 230—2002 临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用

3 缩略语

下列缩略语适于本文件。

3.1

PCR polymerase chain reaction

聚合酶链反应。

3.2

DNA deoxyribonucleic acid

脱氧核糖核酸。

3.3

dNTP deoxyribonucleoside triphosphate

脱氧核苷三磷酸。

3.4

dATP deoxyadenosine triphosphate

脱氧腺苷三磷酸。

3.5

dCTP deoxycytidine triphosphate

脱氧胞苷三磷酸。

3.6

dGTP deoxyguanosine triphosphate

脱氧鸟苷三磷酸。

3.7

dTTP deoxythymidine triphosphate

脱氧胸苷三磷酸。

3.8

bp base pair

碱基对。

4 培养基和试剂

4.1 普通变形杆菌:ATCC47132 或经过合格验证的菌株。

4.2 奇异变形杆菌:ATCC25933 或经过合格验证的菌株。

4.3 GN 增菌液:见附录 A 第 A.1 章。

4.4 SS 琼脂:见附录 A 第 A.2 章。

4.5 克氏双糖培养基:见附录 A 第 A.3 章。

4.6 尿素琼脂:见附录 A 第 A.4 章。

4.7 苯丙氨酸培养基:见附录 A 第 A.5 章。

4.8 营养琼脂:见附录 A 第 A.6 章。

4.9 糖发酵管:见附录 A 第 A.7 章。

4.10 鸟氨酸脱羧酶试验培养基:见附录 A 第 A.8 章。

4.11 蛋白胨水:见附录 A 第 A.9 章。

4.12 甘露醇发酵培养基:见附录 A 第 A.10 章。

4.13 明胶培养基:见附录 A 第 A.11 章。

4.14 引物:根据表 1 合成引物,加灭菌超纯水配制成 50 $\mu\text{mol/L}$ 储存液。

表 1 普通变形杆菌和奇异变形杆菌 PCR 检测引物

检测菌株	引物序列	扩增片段 大小/bp
普通 变形杆菌	正义引物 P413F:5'GATGGCAAGTACAAGTAAG3'	413
	反义引物 P413R:5'GACGCTGAGATTGACCTA3'	
奇异 变形杆菌	正义引物 Q241F:5'CAACGTGAGATTAGTGGTGA3'	241
	反义引物 Q241R:5'CTGCTTATAAGTTCACAAATTAAGTG3'	

4.15 DNA 聚合酶。

4.16 PCR 缓冲液:500 mmol/L 氯化钾,100 mmol/L Tris-HCl(pH9.0,25 $^{\circ}\text{C}$),15 mmol/L 氯化镁。

4.17 DNA 分子量标记:100 bp~2 000 bp。

4.18 50 $\times$ TAE 缓冲液:见附录 A 第 A.12 章。4.19 溴化乙锭(10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$):见附录 A 第 A.13 章。4.20 含 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溴化乙锭的 1.5%琼脂糖凝胶:见附录 A 第 A.14 章。4.21 10 $\times$ 上样缓冲液:见附录 A 第 A.15 章。

4.22 DNA 提取试剂盒:细菌基因组 DNA 提取试剂盒。

4.23 dNTP 溶液:含 dATP,dTTP,dCTP,dGTP 各 10 mmol/L。

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水或去离子水。

5 设备和材料

- 5.1 培养箱: $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.2 天平: $0\text{ g} \sim 500\text{ g}$, 感量 0.1 g 。
- 5.3 均质器及配套的均质杯或均质袋。
- 5.4 吸管: 1 mL 、 10 mL , 具刻度。
- 5.5 玻璃三角瓶: 250 mL 。
- 5.6 培养皿: 直径 90 mm 。
- 5.7 PCR 仪。
- 5.8 离心管: 1.5 mL 。
- 5.9 PCR 反应管。
- 5.10 离心机。
- 5.11 冰箱: $4^{\circ}\text{C} \sim -20^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.12 微量可调移液器和灭菌吸头: $2\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ }\mu\text{L}$, $100\text{ }\mu\text{L}$, $200\text{ }\mu\text{L}$, $1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$ 。
- 5.13 电泳仪。
- 5.14 紫外透视仪或凝胶成像分析系统。
- 5.15 高压灭菌锅。
- 5.16 VITEK、BD 或其他细菌生化鉴定系统。

注: VITEK、BD 是适合的商品化生化鉴定系统实例之一。给出这一信息仅为了方便本部分的使用者, 如果其他产品的符合使用要求, 可经实验评估后采用。

6 检验方法

6.1 常规检验方法

6.1.1 检测程序

普通变形杆菌和奇异变形杆菌检验程序见图 1。

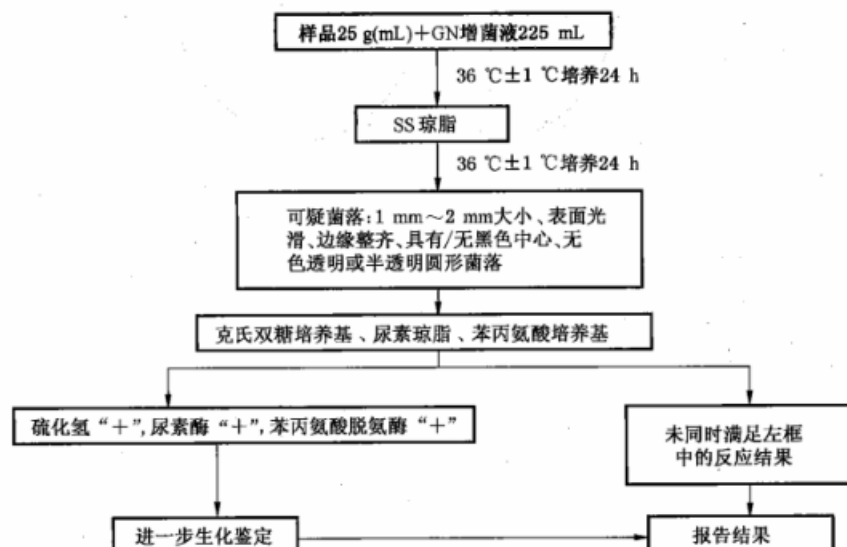


图 1 普通变形杆菌和奇异变形杆菌检验程序

6.1.2 检测步骤

6.1.2.1 选择性增菌

以无菌操作取样 25 g(mL),按 SN/T 2552.1 操作,加入装有 225 mL GN 增菌液的灭菌均质杯内,用均质器均质 1 min~3 min,使样品充分混匀,于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,培养 18 h~24 h。

6.1.2.2 选择性分离

取增菌液 1 环,划线接种于 SS 平板,于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,培养 18 h~24 h,普通变形杆菌和奇异变形杆菌在 SS 琼脂培养基上的典型菌落为:1 mm~2 mm 大小,无色半透明或有黑色中心,边缘整齐,表面光滑的圆形菌落。

6.1.2.3 初步生化鉴定

挑取 SS 平板上的可疑菌落分别接种克氏双糖培养基,尿素琼脂,苯丙氨酸脱氨酶培养基各一管。一般应多挑取几个可疑菌落,以免遗漏,于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,培养 18 h~24 h,分别观察结果。

普通变形杆菌和奇异变形杆菌应同时满足以下条件:

- 不发酵乳糖,分解葡萄糖产酸产气或者只产酸不产气,产硫化氢;
- 尿素酶阳性;
- 苯丙氨酸脱氨酶阳性。

6.1.2.4 最终生化鉴定

符合 6.1.2.3 鉴定要求的可疑菌株需进一步鉴定,进行其他生化试验,即:靛基质、鸟氨酸脱羧酶、糖发酵试验、甘露醇发酵、明胶液化,鉴别结果见表 2;此外,也可采用 VITEK 等经过合格验证的微生物鉴定系统进行鉴定。必要时,还应做革兰氏染色检查和氧化酶试验,普通变形杆菌和奇异变形杆菌应为氧化酶阴性的革兰氏阴性杆菌。

表 2 普通变形杆菌和奇异变形杆菌生化鉴别表

生化反应	明胶液化	甘露醇	靛基质	鸟氨酸 脱羧酶	麦芽糖	木糖	鼠李糖
普通变形杆菌	+	-	+	-	+	+	-
奇异变形杆菌	+	-	-	+	-	+	-

6.2 PCR 方法

6.2.1 方法提要

样品经增菌后,采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,以提取的 DNA 为模板进行 PCR 扩增,利用琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 产物是否有特征条带,从而对样品中是否污染普通变形杆菌和奇异变形杆菌进行快速检验。

6.2.2 PCR 检验步骤

6.2.2.1 选择性增菌

方法见 6.1.2.1。

6.2.2.2 模板 DNA 提取

取样品 GN 增菌培养液 1 mL, 10 000 r/min 离心 3 min, 尽量倒尽上清液。按细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书规定的方法提取模板 DNA, 所提取的 DNA 溶于 50 μ L 超纯水或试剂盒配备的溶解液中。剩余的 GN 增菌液, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 以备确证试验使用。

DNA 提取也可参照 SN/T 1869—2007 中 9.2.2 进行。

6.2.2.3 PCR 反应体系

见表 3。

表 3 PCR 反应体系

名 称	贮液浓度	终 浓 度	加样量/ μ L
PCR 缓冲液	10 $\times$	1 $\times$	5
dNTPs	10 mmol/L	0.2 mmol/L	1
正义引物	50 μ mol/L	1 μ mol/L	1
反义引物	50 μ mol/L	1 μ mol/L	1
DNA 聚合酶	5 U/ μ L	0.1 U/ μ L	1
模板	—	—	1
去离子水	—	—	40
总体积	—	—	50

可根据所配置储液的浓度不同调整加样量, 但最终浓度要符合“终浓度”要求。

每种目标菌检测共进行 4 个反应体系, 分别是样品、阳性对照、阴性对照、空白对照。分别接种普通变形杆菌、奇异变形杆菌、沙门氏菌或志贺氏菌到 GN 增菌液中, 36 $^{\circ}$ C $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 培养过夜, 取 1.5 mL 增菌液, 提取 DNA 模板。普通变形杆菌、奇异变形杆菌的模板 DNA 作为阳性对照, 沙门氏菌或志贺氏菌的 DNA 模板作为阴性对照, 以水代替模板作为空白对照。

6.2.2.4 PCR 反应条件

94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共进行 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

注: 不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

6.2.2.5 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测

6.2.2.5.1 方法一

将适量 50 $\times$ TAE 溶液稀释成 1 $\times$ TAE 溶液, 配制溴化乙锭含量为 0.5 μ g/mL 的 1.5% 琼脂糖凝胶。

取 15 μ L PCR 产物, 加 1.5 μ L 上样缓冲液点样进行电泳, 并加 DNA 分子量标记点样以判断 PCR 产物的片段大小。电压大小根据电泳槽长度来确定, 一般控制在 3 V/cm~5 V/cm 长度, 待电泳溴酚蓝移动到凝胶的三分之二位置时停止, 电泳检测结果用紫外透射仪或凝胶成像分析系统观察和记录。

6.2.2.5.2 方法二

将适量 50 $\times$ TAE 溶液稀释成 1 $\times$ TAE 溶液, 配制 1.5% 琼脂糖凝胶。

取 15 μL PCR 产物,加 1.5 μL 上样缓冲液点样行电泳,并加 DNA 分子量标记点样以判断 PCR 产物的片段大小。电压大小根据电泳槽长度来确定,一般控制在 3 V/cm~5 V/cm 长度,待电泳溴酚蓝移动到凝胶的三分之二位置时停止,将凝胶转移至 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭溶液中浸泡 20 min~30 min,用紫外透射仪或凝胶成像分析系统观察和记录结果。

6.2.3 PCR 检验结果及判断

6.2.3.1 PCR 扩增产物电泳检测结果

普通变形杆菌 PCR 扩增产物片段大小为 413 bp;奇异变形杆菌 PCR 扩增产物片段大小为 241 bp。

6.2.3.2 结果判断

阳性对照出现预期大小的扩增条带,阴性对照和空白对照均未出现扩增条带,实验成立;待测样品未出现预期大小的扩增条带,判断结果为阴性;待测样品出现预期大小的扩增条带,判断结果为可疑阳性,需进一步确证,按照 6.1.2 方法,挑取可疑菌落进行鉴定。

7 结果报告

7.1 按照常规方法,未分离到可疑菌落或可疑菌落生化反应不符,报告未检出普通变形杆菌和奇异变形杆菌;分离到的可疑菌落生化反应符合,报告检出普通变形杆菌和奇异变形杆菌。

7.2 按照 PCR 方法检测结果为阴性,报告未检出普通变形杆菌和奇异变形杆菌。

7.3 按照 PCR 方法检测结果为阳性,进一步分离鉴定后,按照 7.1 报告结果。

8 生物安全措施

为了保护实验室人员的安全,应由具备资格的工作人员检测致病菌,所有培养物应小心处置,并按照 GB 19489 中的相关规定执行。

9 废弃物处理和防止污染的措施

检测过程中的废弃物需经 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌处理 30 min 后再弃置。

检测过程中防止交叉污染的措施参照部分 WS/T 230—2002 中第 6 章进行。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和溶液的配制

A.1 GN 增菌液

A.1.1 成分

胰蛋白胨	20 g
葡萄糖	1 g
甘露醇	2 g
柠檬酸钠	5 g
去氧胆酸钠	0.5 g
磷酸氢二钾	4 g
磷酸二氢钾	1.5 g
氯化钠	5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

按上述成分配好,加热使溶解,校正 pH7.0。分装每瓶 225 mL,115℃ 高压灭菌 15 min。

A.2 SS 琼脂

A.2.1 基础培养基

牛肉膏	5 g
蛋白胨	5 g
三号胆盐	3.5 g
琼脂	17 g
蒸馏水	1 000 mL

将牛肉膏、蛋白胨和胆盐溶解于 400 mL 蒸馏水中,将琼脂加入于 600 mL 蒸馏水中,煮沸使其溶解,再将两液混匀,121℃ 高压灭菌 15 min,保存备用。

A.2.2 完全培养基

基础培养基	1 000 mL
乳糖	10 g
柠檬酸钠	8.5 g
硫代硫酸钠	8.5 g
10%柠檬酸铁溶液	10 mL
1%中性红溶液	2.5 mL
0.1%煌绿溶液	0.33 mL

加热溶化基础培养基,按比例加入上述除染料以外之各成分,充分混合均匀,校正至 pH7.0,加入

中性红和煌绿溶液,倾注平板。

注1:制好的培养基宜当日使用,或保存于冰箱内于48 h内使用。

注2:煌绿溶液配好后应在10 d以内使用。

注3:可以购用SS琼脂的干燥培养基。

A.3 克氏双糖培养基

A.3.1 成分

蛋白胨	20 g
牛肉膏	3 g
酵母膏	3 g
乳糖	10 g
葡萄糖	1 g
氯化钠	5 g
柠檬酸铁铵	0.5 g
硫代硫酸钠	0.5 g
琼脂	12 g
酚红	0.025 g
蒸馏水	1 000 mL

A.3.2 制法

将除琼脂和酚红以外的各成分溶解于蒸馏水中,校正 pH7.4。加入琼脂,加热煮沸,以融化琼脂。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.4 尿素琼脂

A.4.1 成分

蛋白胨	1 g
氯化钠	5 g
葡萄糖	1 g
磷酸二氢钾	2 g
0.4%酚红溶液	3 mL
琼脂	20 g
蒸馏水	1 000 mL
20%尿素溶液	100 mL

A.4.2 制法

将除尿素和琼脂以外的成分配好,并校正 pH 7.2±0.1,加入琼脂,加热溶化并分装烧瓶。121℃高压灭菌15 min。冷至50℃~55℃,加入经除菌过滤的尿素溶液。尿素的最终浓度为2%,最终 pH 应为7.2±0.1。分装于灭菌试管内,放成斜面备用。

A.4.3 试验方法

挑取琼脂培养物接种,在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,观察结果。尿素酶阳性者由于产碱而使培养基变为红色。

A.5 苯丙氨酸培养基

A.5.1 成分

酵母浸膏	3 g
DL-苯丙氨酸(或 L-苯丙氨酸 1 g)	2 g
磷酸氢二钠	1 g
氯化钠	5 g
蒸馏水	1 000 mL

A.5.2 制法

加热溶解后分装试管,121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min,制成液体培养基。

A.5.3 试验方法

自琼脂斜面上挑取大量培养物,移种于苯丙氨酸培养基,在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。滴加 10% 三氯化铁溶液 2 滴~3 滴,混匀,苯丙氨酸脱氨酶阳性者,培养基呈深绿色。

A.6 营养琼脂

A.6.1 成分

蛋白胨	10 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
琼脂	20 g
蒸馏水	1 000 mL

A.6.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于蒸馏水内,加入 15% 氢氧化钠溶液约 2 mL 校正 pH 至 7.2~7.4。加入琼脂,加热煮沸,使琼脂融化。分装烧瓶,121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.7 糖发酵管

A.7.1 成分

牛肉膏	5 g
蛋白胨	10 g
氯化钠	3 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2 g
0.2% 溴麝香草酚蓝溶液	12 mL

蒸馏水	1 000 mL
pH7.4	

A.7.2 制法

各种糖发酵管可按上述成分配好后,分装每瓶 100 mL,121 ℃ 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.7.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取小量培养物接种,于 36 ℃ ±1 ℃ 培养,一般观察 2 d~3 d,发酵管溶液变黄者为阳性反应。

A.8 鸟氨酸脱羧酶试验培养基

A.8.1 成分

蛋白胨	5 g
酵母浸膏	3 g
葡萄糖	1 g
蒸馏水	1 000 mL
1.6% 溴甲酚紫-乙醇溶液	1 mL
L-鸟氨酸	1 g/100 mL
pH6.8	

A.8.2 制法

除鸟氨酸以外的成分加热溶解后,分装每瓶 100 mL,按 1% 加入鸟氨酸,再行校正 pH 至 6.8。对照培养基不加鸟氨酸。分装于灭菌的小试管内,每管 0.5 mL,115 ℃ 高压灭菌 10 min。

A.8.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取培养物接种,接种后封石蜡油,于 36 ℃ ±1 ℃ 培养 18 h~24 h,观察结果。鸟氨酸脱羧酶阳性者由于产碱,培养基应呈紫色。阴性者无碱性产物,但因葡萄糖产酸而使培养基变为黄色。对照管应为黄色。

A.9 蛋白胨水(靛基质试验用)

A.9.1 成分

蛋白胨(或胰蛋白胨)	20 g
氯化钠	5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH7.4	

A.9.2 制法

按上述成分配制,分装小试管,121 ℃ 高压灭菌 15 min。

A.9.3 靛基质试剂

A.9.3.1 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.9.3.2 欧-波试剂:将1 g对二甲氨基苯甲醛溶解于95 mL 95%乙醇内,然后缓慢加入浓盐酸20 mL。

A.9.4 试验方法

挑取小量培养物接种,在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养1 d~2 d,必要时可培养4 d~5 d。加入柯凡克试剂约0.5 mL,轻摇试管,阳性者于试剂层呈深红色;或加入欧-波试剂约0.5 mL,沿管壁流下,覆盖于培养液表面,阳性者于液面接触处呈玫瑰红色。

注:蛋白胨中应含有丰富的色氨酸。每批蛋白胨买来后,应先用已知菌种鉴定后方可使用。

A.10 甘露醇发酵培养基

A.10.1 成分

蛋白胨	10 g
氯化钠	5 g
甘露醇	10 g
牛肉膏	5 g
0.2%溴麝香草酚蓝溶液	12 mL
蒸馏水	1 000 mL

A.10.2 制法

将蛋白胨、氯化钠、牛肉膏加到蒸馏水中,加热溶解,调pH7.4,加入甘露醇和指示剂,混匀后分装试管中,115 $^{\circ}\text{C}$,20 min灭菌备用。

A.11 明胶培养基

A.11.1 成分

蛋白胨	5 g
牛肉膏	3 g
明胶	120 g
蒸馏水	1 000 mL

A.11.2 制法

将上述成分混合,加热溶解,校正pH至7.0~7.2,用绒布过滤。分装试管,121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌15 min,备用。

A.12 50×TAE缓冲液

A.12.1 0.5 mol/L EDTA- $\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (二水乙二铵四乙酸二钠)溶液,pH8.0

EDTA- $\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	186.1 g
--	---------

SN/T 2552.8—2010

灭菌双蒸水	800 mL
-------	--------

用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0。灭菌双蒸水加至 1 000 mL, 121 °C, 15 min 灭菌备用。

A. 12.2 TAE 电泳缓冲液(50×)配制

羟基甲基氨基甲烷(Tris)	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L EDTA 溶液, pH8.0	100 mL

将上述成分混合, 灭菌双蒸水加至 1 000 mL, 121 °C, 15 min 灭菌备用。用时用灭菌双蒸水稀释至 1× 使用。

A. 13 溴化乙锭(EB)溶液(10 μg/μL)

溴化乙锭	20 mg
灭菌双蒸水	20 mL

A. 14 含 0.5 μg/mL 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶的配制

琼脂糖	1.5 g
1×TAE 电泳缓冲液	100 mL

将上述成分混合后加热至完全融化, 待冷至 50 °C ~ 55 °C 时, 加溴化乙锭(EB)溶液(10 μg/μL) 5 μL, 轻轻晃动摇匀, 避免产生气泡, 将梳子置入电泳槽中, 然后将琼脂糖溶液倒入电泳板上, 待凝固后(需约 40 min), 取下梳子, 备用。

A. 15 10×上样缓冲液

聚蔗糖	25 g
溴酚蓝	0.1 g
二甲苯青	0.1 g
灭菌双蒸水	100 mL
