

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4624.20—2021

入境环保用微生物菌剂检测方法 第 20 部分：泛养副球菌

Test method of import microbe agentia in the environment protection –
Part 20: *Paracoccus pantotrophus*

2021-06-18 发布

2022-01-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

以正式出版文本为准

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 20 部分：泛养副球菌
SN/T 4624.20—2021

*

中国海关出版社有限公司出版发行
北京市朝阳区东四环南路甲 1 号 (100023)
编辑部：(010) 65194242-7531
网址 www.customskb.com/book
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 31 千字
2021 年 7 月第一版 2021 年 7 月第一次印刷
印数 1—500

*

书号：155175·327 定价 18.00 元

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件为 SN/T 4624《入境环保用微生物菌剂检测方法》的第20部分。SN/T 4624已经发布了以下部分：

- 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
- 第18部分：短短芽孢杆菌
- 第19部分：红串红球菌
- 第20部分：泛养副球菌

本文件由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本文件起草单位：中华人民共和国沈阳海关、诺微信（沈阳）生物技术有限公司。

本文件主要起草人：王金玲、张莹、李秀峰、王旭、于丽、张森

入境环保用微生物菌剂检测方法

第 20 部分 泛养副球菌

1 范围

本文件规定了入境环保用微生物菌剂泛养副球菌 (*Paracoccus pantotrophus*) 的检测方法。

本文件第一法适用于入境环保用微生物菌剂泛养副球菌的定性检测；第二法适用于入境环保用微生物菌剂中泛养副球菌的定量检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 泛养副球菌分类地位

学名：*Paracoccus pantotrophus*。

曾用名：*Thiosphaera pantotropha*。

分类地位：科（aerobic chemolithotrophic bacteria and associated organism），球硫细菌属（*Thiosphaera*）。

5 方法原理

分离纯化菌株后，进行形态学鉴定、生化鉴定、实时荧光 PCR 检测，根据菌的形态特征结果、生化鉴定结果、实时荧光 PCR 特异性片段扩增结果，3 项结果都符合时判断该菌为目标菌株。

6 主要仪器和设备

- 6.1 电子天平（感量 0.01 g）。
- 6.2 恒温培养箱：35 °C ± 1 °C。
- 6.3 恒温振荡培养箱：35 °C ± 1 °C。
- 6.4 腕式振荡器。
- 6.5 恒温水浴锅。
- 6.6 台式冷冻离心机（最高转速 15 000 r/min）。

- 6.7 实时荧光 PCR 扩增仪。
- 6.8 生物显微镜：10×~100×。
- 6.9 微量移液器和灭菌吸头：10 μL、20 μL、200 μL、1 000 μL。
- 6.10 高压灭菌锅。
- 6.11 PCR 超净工作台。
- 6.12 电泳仪。
- 6.13 核酸 / 蛋白分析仪。
- 6.14 凝胶成像系统。
- 6.15 无菌培养皿：直径 90 mm。

7 主要试剂和培养基

- 7.1 实验用水（应符合 GB/T 6682 中一级水的规格）。
- 7.2 磷酸盐缓冲液：按附录 A 中 A.1 配制。
- 7.3 硫酸链霉素胰蛋白胨大豆琼脂：按附录 A 中 A.2 配制。
- 7.4 接触酶：按附录 A 中 A.3 配制。
- 7.5 氧化酶：按附录 A 中 A.4 配制。
- 7.6 甲基红试验：按附录 A 中 A.5 配制。
- 7.7 糖发酵管：按附录 A 中 A.6 配制。
- 7.8 硝酸盐还原试验培养基：按附录 A 中 A.7 配制。
- 7.9 淀粉水解试验培养基：按附录 A 中 A.8 配制。
- 7.10 TE 缓冲液（pH 值 8.0）：按附录 A 中 A.9 配制。
- 7.11 1%~3% 琼脂糖凝胶：按附录 A 中 A.10 配制。
- 7.12 25 mM EDTA：按附录 A 中 A.11 配制。
- 7.13 3 M 醋酸钠：按附录 A 中 A.12 配制。
- 7.14 dNTP：dATP、dTTP、dGTP、dCTP。
- 7.15 TBE：按附录 A 中 A.13 配制。
- 7.16 *Taq* DNA 聚合酶。
- 7.17 细菌基因组 DNA 提取试剂盒。
- 7.18 琼脂糖。
- 7.19 溴化乙锭。
- 7.20 DNA 分子量标记：100 bp DNA ladder。

第一法 泛养副球菌定性检测

8 样品制备、培养

- 8.1 以无菌操作称取 1 g (mL) 样品加入到 99 mL 无菌磷酸盐缓冲液中，在室温下用腕式振荡器震荡 10 min，振荡器震荡速率 300 次/min~400 次/min，制成 1:100 的样品匀液。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。
- 8.2 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:100 样品匀液 1 mL，沿管壁缓慢注于盛有 9 mL 无菌磷酸盐缓冲液的无菌试管中（注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面），并在振荡器上进行振摇，至少振摇 15 s，制成 1:1 000 的样品匀液。

8.3 按8.2操作程序，制备10倍系列稀释样品匀液。每递增稀释一次，换用1次1 mL无菌吸管或吸头。

8.4 根据对样品菌量的估计，选择2个~3个适宜稀释度的样品匀液，在进行10倍递增稀释的同时，每个稀释度分别移取1环菌连续划线接种5个硫酸链霉素胰蛋白胨大豆琼脂平板，35℃±1℃培养48 h。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。

9 形态学鉴定

9.1 培养性状

泛养副球菌在硫酸链霉素胰蛋白胨大豆琼脂上的菌落圆形、颜色大多数为白色、淡黄色，表面光滑，边缘整齐。

9.2 形态特征

革兰氏染色：将8.4中平板上的菌落做涂片进行革兰氏染色，镜检。泛养副球菌为革兰氏阴性短杆状或球形、近球形的菌，不运动，不形成芽孢。

10 生化鉴定

也可选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物鉴定系统等。

取8.4中菌液利用细菌微量生化鉴定管进行生化鉴定，每个生化管加入100 μL增菌肉汤。

泛养副球菌生化特征见表1。

表1 泛养副球菌生化特征

鉴定项目	泛养副球菌
接触酶	+
氧化酶	+
甲基红试验	-
甘露糖	-
葡萄糖	-
硝酸盐还原	+/-
淀粉水解	-

11 分子生物学检测

11.1 细菌模板DNA的提取

11.1.1 直接提取法

取8.4中菌液1 mL加到1.5 mL无菌离心管中，10 000 r/min离心2 min，尽量弃净上清液（如果肉眼观察沉淀量不可见或较少时，可重复此步操作）。沉淀加入TE 100 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15 mg/mL蛋白酶K 25 μL，55℃温育1 h后沸水浴10 min，12 000 r/min离心5 min，取上清液保存于-20℃保存以待检测。

11.1.2 有机溶剂提取法

取8.4中菌液1 mL加到1.5 mL无菌离心管中，10 000 r/min离心2 min，尽量弃净上清液（如果肉眼观察沉淀量不可见或较少时，可重复此步操作）。沉淀加入TE缓冲液570 μL重悬，然后

加入 10 mg/mL 溶菌酶 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min, 再加入 10 % SDS 30 μ L, 65 $^{\circ}$ C 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液加等体积的酚/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 $^{\circ}$ C 有利于 DNA 溶解), -20 $^{\circ}$ C 保存以待检测。

11.1.3 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。

11.1.4 DNA 质量检测

用核酸/蛋白分析仪分别在 260 nm 和 280 nm 下测定 OD 值, 用于实时荧光 PCR 反应的 DNA 纯度一般为 $1.6 \leq OD_{260}/OD_{280} \leq 2.0$ 。

$$\text{DNA 纯度} = OD_{260} / OD_{280}$$

$$\text{DNA 浓度 (mg/mL)} = 50 \times OD_{260}$$

11.2 实时荧光 PCR 鉴定

11.2.1 引物和探针序列

引物和探针序列见表 2。其中探针的 5' 端标记 FAM, 3' 端标记 TAMRA。

表 2 引物和探针序列

鉴定菌名称	引物序列	探针序列
泛养副球菌 (ccdA) GenBank AF308446.1	5'-CAGCCTTCCACGAAAGAGTGA-3'	5'FAM-CCCTTTCCATGAGCCAA-TAMRA3'
	5'-GCATCTGCAAGCTCGATTCC-3'	

11.2.2 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 3。

表 3 实时荧光 PCR 反应体系

试剂名称	实时荧光 PCR 反应体系
2.5 \times Real Master Mix	12.5 μ L
正向引物 (10 pmol/ μ L)	1 μ L
反向引物 (10 pmol/ μ L)	1 μ L
探针 (5 pmol/ μ L)	1 μ L
DNA 模板	2 μ L (约 50 ng-200 ng)
50 \times ROX Reference Dye*3	0.25 μ L
ddH ₂ O	补充至 25 μ L
注 1: 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。	
注 2: 50 \times ROX Reference Dye*3 荧光试剂仅在具有 ROX 校正通道的实时荧光 PCR 仪上进行扩增添加, 否则用超纯水补足。	
注 3: 检测样品设置两个平行反应。	

11.2.3 实时荧光 PCR 反应参数

实时荧光 PCR 反应参数见表 4。

表 4 实时荧光 PCR 反应参数

循环	步骤	温度/℃	时间	内容
1	1	94	15 min	起始模板变性
40	2	94	3 s	PCR 循环中模板变性
	3	56	32 s	退火延伸
注 1：使用不同实时荧光 PCR 仪，可对参数作适当调整。 注 2：设置实时荧光 PCR 反应管荧光信号收集条件，应与探针标记的报告基团一致。具体设置方法可参照仪器使用说明书。				

11.2.4 空白对照、阴性对照和阳性对照设置

11.2.4.1 阴性对照：非泛养副球菌 DNA 为模板。

11.2.4.2 阳性对照：已知泛养副球菌的 DNA 或含有待测基因序列的质粒为模板（见附录 B）。

11.2.4.3 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。

11.2.5 实时荧光 PCR 扩增结果判定

11.2.5.1 对照结果

11.2.5.1.1 阴性对照：无扩增曲线。

11.2.5.1.2 阳性对照：出现典型的扩增曲线， C_t 值应 < 30.0 。

11.2.5.1.3 空白对照：无扩增曲线。

11.2.5.1.4 否则，检测视为无效。

11.2.5.2 结果判定

11.2.5.2.1 C_t 值大于等于 40.0，可判定该样品实时荧光 PCR 结果为阴性。

11.2.5.2.2 C_t 值小于等于 35.0，可判定该样品实时荧光 PCR 结果为阳性。

11.2.5.2.3 C_t 值大于 35.1 且小于 40.0，建议重做。再次扩增后的外源基因 C_t 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 C_t 值大于 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。

12 结果报告

12.1 形态学鉴定、生化鉴定、分子生物学检测结果均符合时，报告检出泛养副球菌。

12.2 形态学鉴定、生化鉴定、分子生物学检测有一项不符合时，建议重做。仍有不符合时，报告未检出泛养副球菌。

第二法 泛养副球菌定量检测

13 样品稀释

13.1 以无菌操作称取 1 g (mL) 样品加入到 99 mL 无菌磷酸盐缓冲液中, 在室温下用腕式振荡器振荡 10 min, 振荡器振荡速率 300~400 次/min, 制成 1:100 的样品匀液。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。

13.2 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1:100 样品匀液 1 mL, 沿管壁缓慢注于盛有 9 mL 无菌磷酸盐缓冲液的无菌试管中 (注意吸管或吸头尖端不要触及稀释液面), 并在振荡器上进行振摇, 至少振摇 15 s, 制成 1:1000 的样品匀液。

13.3 按 13.2 操作程序, 制备 10 倍系列稀释样品匀液。每递增稀释一次, 换用 1 次 1 mL 无菌吸管或吸头。

14 样品接种

根据对样品菌量的估计, 选择 2 个~3 个适宜稀释度的样品匀液, 在进行 10 倍递增稀释的同时, 每个稀释度分别吸取 1 mL 样品匀液以 0.3 mL、0.3 mL、0.4 mL 接种量分别加入到硫酸链霉素胰蛋白胨大豆琼脂平板, 然后用无菌涂布棒涂布整个平板, 注意不要触及平板边缘。使用前, 如硫酸链霉素胰蛋白胨大豆琼脂平板表面有水珠, 可适当放置以肉眼可见无水珠。

15 培养

在通常情况下, 涂布后, 将平板静置 10 min, 如样液不易吸收, 可将平板放在培养箱 35 °C ± 1 °C 条件下培养 1 h; 等样品匀液吸收后翻转平板, 倒置后于 35 °C ± 1 °C 条件下培养 48 h。

16 菌落计数和确认

选择硫酸链霉素胰蛋白胨大豆琼脂上的菌落圆形、颜色大多数为白色、淡黄色, 表面光滑, 边缘整齐, 同一稀释度 3 个平板所有菌落数合计在 20 CFU~200 CFU 之间的平板, 计数典型菌落数。

从典型菌落中至少选 5 个可疑菌落 (小于 5 个全选) 进行鉴定试验。分别做染色镜检, 生化鉴定 (见第 10 章); 同时接种营养肉汤, 35 °C ± 1 °C 条件下培养 48 h, 进行分子生物学检测 (见第 11 章)。

17 结果计算

17.1 若只有一个稀释度平板的典型菌落数在 20 CFU~200 CFU 之间, 计数该稀释度平板上的典型菌落, 按式 (1) 计算。

$$T = \frac{AB}{Cd} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- T*——样品中泛养副球菌菌落数;
- A*——某一稀释度典型菌落的总数;
- B*——某一稀释度鉴定为阳性的菌落数;
- C*——某一稀释度用于鉴定试验的菌落数;
- d*——稀释因子。

17.2 若最低稀释度平板的典型菌落数小于 20 CFU，计数该稀释度平板上的典型菌落，按式（1）计算。

17.3 若某一稀释度平板的典型菌落数大于 200 CFU，但下一稀释度平板上没有典型菌落，计数该稀释度平板上的典型菌落，按式（1）计算。

17.4 若某一个稀释度平板的典型菌落数大于 200 CFU，而下一稀释度平板上虽有典型菌落但不在 20 CFU~200 CFU 范围内，应计数该稀释度平板上的典型菌落，按式（1）计算。

17.5 若 2 个连续稀释度的平板典型菌落数均在 20 CFU~200 CFU 之间，按式（2）计算。

$$T = \frac{A_1 B_1 / C_1 + A_2 B_2 / C_2}{1.1d} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

T ——样品中泛养副球菌菌落数；

A_1 ——第一稀释度（低稀释倍数）典型菌落的总数；

B_1 ——第一稀释度（低稀释倍数）鉴定为阳性的菌落数；

C_1 ——第一稀释度（低稀释倍数）用于鉴定试验的菌落数；

A_2 ——第二稀释度（高稀释倍数）典型菌落的总数；

B_2 ——第二稀释度（高稀释倍数）鉴定为阳性的菌落数；

C_2 ——第二稀释度（高稀释倍数）用于鉴定试验的菌落数；

1.1 ——计算系数；

d ——稀释因子（第一稀释度）。

18 结果报告

根据公式计算结果，报告每 g (mL) 样品中泛养副球菌数，以 CFU/g (mL) 表示；如 T 值为 0，则以小于 1 乘以最低稀释倍数报告。

附 录 A
(规范性)
培养基和试剂

A.1 磷酸盐缓冲液

A.1.1 成分

磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₃)	34.0 g
蒸馏水	500 mL

A.1.2 制法

贮存液：称取 34.0 g 的磷酸二氢钾溶于 500 mL 蒸馏水中，用大约 175 mL 的 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.2 ± 0.2 ，用蒸馏水稀释至 1 000 mL 后贮存于冰箱。稀释液：取贮存液 1.25 mL，用蒸馏水稀释至 1000 mL，分装于适宜容器中，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2 硫酸链霉素胰蛋白胨大豆琼脂

A.2.1 成分

胰蛋白胨	15 g/L
大豆蛋白胨	5 g/L
氯化钠	5 g/L
琼脂粉	15 g/L
pH 值	7.3 ± 0.2

A.2.2 制法

灭菌锅中 121 °C 下灭菌 15 min。灭菌后在 45 °C ~50 °C 水浴锅中冷却，加入准备好的硫酸链霉素试剂，加入量为每 1 L 培养基中加入 10 mL 试剂，使硫酸链霉素最终浓度为 50 µg /mL。在无菌室中将培养基倒入无菌平皿中。冷却凝固，确保平皿在使用前表面干燥。暂时不使用的培养基放入冰箱存储备用。

A.3 接触酶

A.3.1 成份

3 % 过氧化氢溶液。

A.3.2 制法

挑取固体培养基上菌落一接种环，置于洁净试管内，滴加 3 % 过氧化氢溶液 2 mL，观察结果。

A.4 氧化酶

A.4.1 成份

A.4.1.1 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.4.1.2 1 % α -萘酚 - 乙醇溶液。

A.4.2 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，阴性于两分钟内不变色。

以毛细吸管吸取试剂，直接滴加于菌落上，其显色反应与以上相同。

A.5 甲基红 (MR) 试验

A.5.1 成份

甲基红	10 mg
95 % 乙醇	30.0 mL
蒸馏水	20.0 mL

A.5.2 制法

10 mg 甲基红溶于 30 mL 95 % 乙醇中，然后加入 20 mL 蒸馏水。

A.5.3 试验方法

取适量琼脂培养物接种接种于缓冲葡萄糖蛋白胨水中， $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d~5 d。滴加甲基红试剂一滴，立即观察结果。鲜红色为阳性，黄色为阴性。

A.6 糖发酵管

A.6.1 成份

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	1000 mL
pH 值	7.4

A.6.2 制法

葡萄糖发酵管按上述成分配好后，校正 pH 值至 7.4 ± 0.2 。按 0.5 % 加入葡萄糖，分装于有一个倒置小管的小试管内， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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。

A.6.3 试验方法

从琼脂斜面上挑取小量培养物接种，于 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养，一般观察 2 d~3 d。迟缓反应需观察 14 d~30 d。

A.7 硝酸盐还原试验培养基

A.7.1 成份

硝酸钾	0.2 g
-----	-------

蛋白胨	5 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 值	7.4

A.7.2 制法

溶液，校正 pH 值，分装试管，每管约 5 mL，121 °C 高压灭菌 15 min。

A.7.3 硝酸盐还原剂

甲液：将对氨基苯磺酸 0.8 g 溶解于 2.5 mol/L 乙酸溶液 100 mL 中。

乙液：将甲萘胺 0.5 g 溶解于 2.5 mol/L 乙酸溶液 100 mL 中。

A.7.4 试验方法

接种后在 36 °C ± 1 °C 培养 1 d~4 d，加入甲液和乙液各一滴，观察结果。硝酸盐还原为亚硝酸盐时立刻或数分钟内显红色。

注：本试验阴性的原因有三：细菌不能还原硝酸盐；亚硝酸盐继续分解，生成氨和氮；培养基不适于细菌的生长。如欲检查培养基中硝酸盐是否未被分解，可再加入锌粉少许，可使硝酸盐还原为亚硝酸盐而呈现红色。

A.8 淀粉水解试验培养基

A.8.1 成分

蛋白胨	5 g
牛肉膏	3 g
氯化钠	5 g
可溶性淀粉	20 g
琼脂	15 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 值	7.4

A.8.2 制法

用少量水先将可溶性淀粉溶解，其他成分溶化在蒸馏水中，校正 pH 值。115 °C 高压灭菌 15 min。

A.8.3 试验方法

将细菌划线接种于可溶性淀粉琼脂平板上，在 37 °C 培养 24 h。取出平板，在菌落处滴加碘液少许，观察。培养基呈深蓝色，说明淀粉未被水解，即淀粉酶阴性。能水解淀粉的细菌的菌落周围有透明的环（即淀粉酶阳性）。

A.9 TE 缓冲液（pH 值 8.0）

A.9.1 成份

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

A.9.2 制法

在 800 mL 去离子水中，依次加入以上成分，校正 pH 值至 8.0，用去离子水定容到 1 L，分装后

121 °C高压灭菌 15 min。

A.10 1%~3% 琼脂糖凝胶

A.10.1 成份

琼脂糖	1~3 g
0.5 × TBE	100 mL

A.10.2 制法

在 100 mL 的 0.5 × TBE 中，加入琼脂糖，在微波炉中加热熔化。待溶液冷却至 60 °C 左右，灌注模具冷却形成。

A.11 25 mM EDTA

A.11.1 成份

Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	46.525 g
去离子水	1 000 mL

A.11.2 制法

在 800 mL 去离子水中，加入 Na₂EDTA · 2H₂O，充分搅拌，用 NaOH 校正 pH 值至 8.0，加去离子水定容到 1 L，分装后 121 °C 高压灭菌 15 min。

A.12 3M 醋酸钠

A.12.1 成份

NaAC · 3H ₂ O	40.8 g
去离子水	100 mL

A.12.2 制法

在 40 mL 去离子水中，加入 NaAC · 3H₂O，充分搅拌，用冰醋酸调节 pH 值至 5.2，加去离子水定容到 100 mL，分装后 121 °C 高压灭菌 15 min。

A.13 TBE

A.13.1 成分

Tris	54.0 g
硼酸	27.5 g
去离子水	800 mL
0.5 mol/L EDTA (pH 值 8.0)	20 mL

A.13.2 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 值 8.0) 定容至 1 L。

附录 B
(资料性)

泛养副球菌基因序列 (GenBank AF308446.1)

601	ccgcgccgc	gcaccggac	gcgccgcgc	aagccggaag	aaccggccga	aaccgccgtg
661	gaggagccgg	aggcgggtgt	cgaagccgag	ccggcgctcc	agaccgtcga	gcctgccgcg
721	gaggccgcat	cggcggacgc	cgcgccggca	ccgcaggatg	cgcaggccgg	ggagccggtt
781	gccgagcctg	ccgtcggcga	ggcggccgcac	gccgaggetg	ttgaaccgc	cgcgaccgac
841	gccgaggaag	ccgagccgc	ggaaccgaa	accgtcgggg	cagaggccga	agcggccgtt
901	gcaccgaaag	ccgtgccggc	gcccgtcccc	gagcccgc	ccgagcccgc	tcccgc
961	gccgcggcga	acgaggagcc	ggcgcgtccc	aagcgcgcg	gctggtggtc	catgggtga
1021	tctgtcgag	cctccacga	aagagtgacg	ggcgcggggc	ttcccgcg	ccttccatg
1081	agccaaggtg	ccggacatgt	tgggaatcga	gcttgcagat	gccgccttcc	tgcccgccg
1141	gacggtcgcg	ctgtggccg	ggatcctgtc	tttctgtcg	ccttgcgtcc	tgccggtggt
1201	gccccctat	ctggctata	tgaccggggt	cggcgtcggc	gggctgaaat	cggcgcaacg
1261	cagcgcctg	gttccggcgc	tgttcttctg	cctggggctg	tcgacggttt	tctgttcat
1321	gggcatggcg	gcctcggcct	ttggccggat	gttctgcaa	tggcaggact	ggctggcg
1381	cggggcggga	gtggcggta	tcatcatggg	cctgcacttc	ctgcgatca	tcgatccc
1441	cttctggac	accgagcgc	ggctggatgc	cggcgacaag	ggcggctcct	cgtgggagc
1501	ctatatcctg	gggtggcct	tcgattcgg	ctggacgcc	tgatcgggc	cgaactggg
1561	catgatcctg	tcgtggccg	tcaccggg	cgaggccggg	cgcggcgcg	ccttctggc
1621	cgtctatcgc	ctgggctgg	gcattccctt	cctgctgtcg	gcgatctta	tcaaccgcg
1681	cattggcgtg	atgaaccgca	tcaagccgca	cctgaaactg	atcagcgca	tgatggcgg
1741	gcttttgggtg	gcggtcgggg	cggcgtgct	gaccggcgc	ttccccact	tcgctattg
1801	gctgctggag	accttccct	ggctggccac	gctgggttag	gcgcgggcgt	cattcccagt
1861	tcggcggccg	ctttccagg	aaggcctgga	tgccctcggc	ggtatcgggc	agcagcaggt
1921	tctcagat	caccgcgct	gcggtctcat	aggcatcggc	gaggccagg	ttcgcgtgtg
1981	cgtggaagcc	acgctgccc	atgcgcacgg	cggcgggcag	cttggcggca	atggtcggg
2041	ccatcgccat	cgcctcggcc	tcaagcgcgg	cgggcgggac	gacgcgattc	accaggccca
2101	gctcccgcgc	ccggtcggcg	tcatgaact	cgcctcgc	cagcagttcg	aaggcggcgc



SN/T 4624.20—2021

书号: 155175 · 327
定价: 18.00 元