



中华人民共和国国家标准

GB/T 27529—2011

马接触传染性子宫炎诊断技术

Diagnostic techniques for contagious equine metritis

2011-11-21 发布

2012-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位：中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中华人民共和国新疆出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：朱来华、梁成珠、郑小龙、肖西志、邓明俊、辛学谦、谭乐义、方绍庆、王宫璞、岳志芹、季新成、王群、孙涛、赵玉然。

马接触传染性子宫炎诊断技术

1 范围

本标准规定了马接触传染性子宫炎(contagious equine metritis, CEM)的诊断技术。
本标准适用于马接触传染性子宫炎的诊断和检疫。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 4789.28—2003 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 临床检查

3.1 临床特征

公马感染马生殖道泰勒氏杆菌后不表现任何临床症状,当母马感染后表现阴道炎、子宫颈炎,初期外阴部出现大量渗出物或灰色炎症分泌物,后期渗出物或分泌物逐渐变成黏稠的脓液,其中含有大量的多核细胞、黏膜脱落细胞和崩解的细胞碎片。

3.2 判定

根据 3.1 临床检查可作出初步判定。为了确诊需进行实验室检查,细菌学检查是确诊本病最可靠的方法。

4 病原分离与初步鉴定

4.1 材料准备

4.1.1 器材

- 4.1.1.1 微量移液器。
- 4.1.1.2 二氧化碳培养箱。
- 4.1.1.3 普通冰箱及低温冰箱(4℃、-20℃)。
- 4.1.1.4 离心管。
- 4.1.1.5 普通生物显微镜。
- 4.1.1.6 暗视野或相差显微镜。
- 4.1.1.7 载玻片。
- 4.1.1.8 接种环。
- 4.1.1.9 擦镜纸。

4.1.2 实验室用水

实验室用水是指实验室用于溶解、稀释或配制溶液的水,可用多次蒸馏或离子交换等制备,符合 GB/T 6682 二级水要求。

4.1.3 培养基

- 4.1.3.1 运输培养基:见附录 A。
- 4.1.3.2 选择性琼脂培养基:见附录 A。

4.1.3.3 含硫酸链霉素(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)选择性琼脂培养基:见附录 A。

4.1.3.4 卵黄氯化钠琼脂培养基:见附录 A。

4.1.4 试剂

4.1.4.1 除特别说明以外,本标准所用试剂均为分析纯。

4.1.4.2 革兰氏染色液:按 GB/T 4789.28—2003 中 2.2 规定配制。

4.1.4.3 过氧化物酶试验试剂:按 GB/T 4789.28—2003 中 3.18 规定,临用时配制。

4.1.4.4 氧化酶试验试剂:按 GB/T 4789.28—2003 中 3.20 规定,临用时配制,于冰箱内避光保存。

4.2 样品采集和运送

在采集泌尿生殖道拭子前应至少停用抗生素药物 7 d,也不得使用消毒药物冲洗泌尿生殖道。

母马或公马保定后,用高压消毒的棉拭子刮擦泌尿生殖道黏膜(尿道隐窝、尿道窦、尿道或阴茎鞘)以刮取含有细胞、分泌物的样品。从阴蒂窝和阴蒂窦刮取拭子进行分离培养即可证明马生殖道泰勒氏杆菌的存在,但要获得纯净的培养物,应从子宫颈或子宫内膜中采集样品来分离。

公马:每匹公马分别从阴茎基部/包皮处(包皮垢)、尿道隐窝/尿道窦、尿道口采集 3 份拭子。

未怀孕母马:每匹母马分别从子宫颈、阴蒂隐窝、阴蒂窦采集 3 份拭子。

怀孕母马:每匹母马分别从阴蒂隐窝、阴蒂窦采集 2 份拭子。

棉拭子采集后,迅速插入装有 1 mL~2 mL 含活性炭的运输培养基离心管内,以吸附掉细菌代谢产生的抑制因子。

在低温条件(2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$)下,样品尽快(24 h~48 h 内)送往实验室。

4.3 病原分离培养

样品到达实验室后,立即用棉拭子蘸取样品液直接涂布于选择性琼脂培养基和含硫酸链霉素(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)选择性琼脂培养基平板上,每个拭子均接种 2 个平板。

平板在 5%~10%的二氧化碳培养箱内 35 $^{\circ}\text{C}$ ~37 $^{\circ}\text{C}$ 培养,最初 24 h 应检查是否有杂菌污染。48 h 后应每天观察,培养 7 d~14 d。

4.4 病原初步鉴定

4.4.1 菌落鉴定

48 h 后应每天观察琼脂培养基。观察培养基上无疑似特征性菌落。马生殖道泰勒氏杆菌的菌落很小,直径 2 mm~3 mm,边缘完整光滑,有光泽,呈浅灰黄色。如无特征性菌落,可弃之。

4.4.2 革兰氏染色鉴定

按 GB/T 4789.28—2003 中 2.2 规定操作。

4.4.3 湿片动力试验

取干净载玻片一块,用微量移液器加一滴生理盐水,无菌挑取少量菌落,涂抹分散均匀。使用暗视野或相差显微镜检查,先用低倍物镜,再用高倍物镜,观察细菌形态特征与动力特征。

4.4.4 生化鉴定

4.4.4.1 氧化酶试验

取典型菌落,按 GB/T 4789.28—2003 中 3.18 规定操作。

4.4.4.2 过氧化物酶试验

取典型菌落,按 GB/T 4789.28—2003 中 3.20 规定操作。

4.4.4.3 磷脂酶试验

用接种环挑取固体培养基上典型菌落,点种于卵黄氯化钠琼脂平板(每张平板至少可接种 10 点),在 5%~10%的二氧化碳培养箱内 37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养 24 h,观察接种点的变化。

磷脂酶试验阳性者产生卵磷脂酶,分解卵黄中的卵磷脂,接种点的底部及周围形成乳白色的混浊带。

4.5 结果判定

4.5.1 根据细菌的菌落特征、革兰氏染色特征、湿片动力试验、过氧化氢酶试验、磷脂酶试验和氧化酶试验的结果可进行初步鉴定。

4.5.2 马生殖道泰勒氏杆菌生长缓慢，菌落很小，直径 2 mm ~ 3 mm，边缘完整光滑，有光泽，呈浅灰黄色。

4.5.3 马生殖道泰勒氏杆菌革兰氏染色阴性，杆状或球杆状，有时呈多形态（长达 6 μm），并可表现两极着色。

4.5.4 马生殖道泰勒氏杆菌无运动性。

4.5.5 马生殖道泰勒氏杆菌能产生过氧化氢酶和磷酸脂酶，氧化酶强阳性，无其他生化反应。

4.5.6 凡符合马生殖道泰勒氏杆菌一般特征和生化特性的细菌，可初步判定为马生殖道泰勒氏杆菌，如初步判定为马生殖道泰勒氏杆菌，则需要进一步应用马生殖道泰勒氏杆菌特异抗血清进行血清学鉴定。

5 病原血清学鉴定技术

5.1 玻片乳胶凝集试验

5.1.1 试验材料

5.1.1.1 马生殖道泰勒氏杆菌的标准抗原。

5.1.1.2 马生殖道泰勒氏杆菌阳性血清致敏乳胶。

5.1.1.3 马生殖道泰勒氏杆菌阴性血清致敏乳胶。

5.1.1.4 载玻片。

5.1.1.5 玻璃铅笔。

5.1.1.6 接种环。

5.1.1.7 牙签或火柴杆。

5.1.2 操作程序

使用前，马生殖道泰勒氏杆菌的标准抗原应充分振荡，所有试剂在室温平衡使其温度达到 20 ℃ 左右。

取洁净载玻片一块，用玻璃铅笔划成小格。

滴加 1 滴马生殖道泰勒氏杆菌阳性血清致敏乳胶（约 25 μL），再用接种环在琼脂培养基上钩取待鉴定细菌培养物适量，或滴加 1 滴液体培养物（约 25 μL）。

同时于载玻片另一端滴加 1 滴马生殖道泰勒氏杆菌阴性血清致敏乳胶，同样钩取该细菌培养物混匀于其中。

以牙签或火柴杆混匀，在 3 min ~ 5 min 内判定结果。

5.1.3 结果判定

“++++”：100%凝集，全部乳胶凝集，成絮状团块，出现大的凝集片或粒状物，液体清亮。

“+++”：75%凝集，大部分乳胶凝集成较小的颗粒，有可见凝集块，液体清亮，几乎完全透明。

“++”：50%凝集，半量乳胶凝集成细小颗粒，出现比较明显的颗粒状凝集颗粒或小凝块，液体不甚透明。

“+”：25%凝集，仅可勉强看到粒状物，或较少量的乳胶凝集成可见的细颗粒，液体混浊。

“-”：无凝集现象，全部乳胶液体仍为均匀混浊，无颗粒。

以“++”或以上的反应强度作为该反应滴度的终点，判为凝集试验阳性。

5.1.4 结果说明

玻片乳胶凝集试验因可能出现非特异性凝集反应，仅用做马生殖道泰勒氏杆菌的初步血清学鉴定。

5.2 间接荧光抗体法

5.2.1 试验材料

- 5.2.1.1 马生殖道泰勒氏杆菌的标准抗原。
- 5.2.1.2 马生殖道泰勒氏杆菌荧光标记的标准阳性血清。
- 5.2.1.3 马生殖道泰勒氏杆菌标准阴性血清。
- 5.2.1.4 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗抗体诊断液。
- 5.2.1.5 0.1 mol/L pH8.0 磷酸盐缓冲液(PBS)(见附录 B)。
- 5.2.1.6 甘油缓冲液(见附录 B)。
- 5.2.1.7 丙酮:乙醇(体积比 1:1, -20 °C 预冷)。
- 5.2.1.8 恒温培养箱。
- 5.2.1.9 荧光显微镜。
- 5.2.1.10 载玻片。
- 5.2.1.11 盖玻片。
- 5.2.1.12 玻璃铅笔。
- 5.2.1.13 接种环。
- 5.2.1.14 镊子。
- 5.2.1.15 染色缸。

5.2.2 操作程序

取一干净载玻片,用玻璃铅笔画定样品区域(直径 0.5 cm),用接种环在琼脂培养基上钩取待鉴定细菌培养物适量,涂布均匀,风干。同时以马生殖道泰勒氏杆菌的标准抗原作为阳性对照。

待涂片似干未干时,滴加预冷丙酮:乙醇液,固定细胞 5 min~10 min。

用镊子将载玻片放入 PBS 液染色缸中充分漂洗,经过 3 次,每次 3 min~5 min。

将载玻片上多余的水擦干,分别取 10 μL 马生殖道泰勒氏杆菌的标准阳性血清、标准阴性血清(事先用 PBS 稀释 10 倍~20 倍)滴于标本上,放于湿盒内,37 °C 温育 30 min。

将载玻片上多余的水份擦干,滴加 10 μL 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗抗体诊断液(以 PBS 稀释至工作效价),并使它布满整个标本。

置湿盒中,放 37 °C 温箱,作用 30 min,取出玻片,用 PBS 充分漂洗,经过 3 次,每次 3 min~5 min。

将载玻片上多余的水份擦干,在标本处滴一小滴甘油缓冲液,轻轻加上盖玻片。

5.2.3 结果判定

将载玻片放在荧光显微镜载物台上,调好光源即可观察。阳性反应者 FITC 荧光色素呈明亮的黄绿色荧光。

5.2.4 结果说明

间接荧光抗体法因特异性强、灵敏度高,可用做马生殖道泰勒氏杆菌的最后确诊。

6 病原套式 PCR 分子鉴定

6.1 材料与试剂

6.1.1 仪器与器材

- 6.1.1.1 PCR 扩增仪。
- 6.1.1.2 高速台式冷冻离心机(离心速度 12 000 r/min 以上)。
- 6.1.1.3 台式离心机(离心速度 2 000 r/min)。
- 6.1.1.4 混匀器。
- 6.1.1.5 冰箱(2 °C~8 °C 和 -20 °C 两种)。
- 6.1.1.6 微量可调移液器及配套带滤芯吸头。

- 6.1.1.7 Eppendorf 管(1.5 mL 带盖塑料离心管)。
- 6.1.1.8 稳压稳流电泳仪和水平电泳槽。
- 6.1.1.9 电泳凝胶成像系统(或紫外分析仪)。
- 6.1.2 试剂
- 6.1.2.1 蛋白酶 K:见附录 C。
- 6.1.2.2 10% SDS 液:见附录 C。
- 6.1.2.3 异丙醇: -20 °C 预冷。
- 6.1.2.4 NaAc(3 mol/L):见附录 C。
- 6.1.2.5 75%乙醇:见附录 C。
- 6.1.2.6 Taq 酶:5 U/ μ L。
- 6.1.2.7 10 \times PCR 缓冲液。
- 6.1.2.8 dNTPs:含有 dATP、dTTP、dCTP、dGTP 各 2.5 mmol/L。
- 6.1.2.9 电泳缓冲液:用 5 \times TBE 电泳缓冲液稀释成工作浓度,即 0.5 \times TBE 缓冲液(见附录 C)。
- 6.1.2.10 EB:见附录 C。
- 6.1.2.11 加样缓冲液(6 \times):见附录 C。
- 6.1.2.12 0.1 mol/L PBS(pH8.0):见附录 B。
- 6.1.2.13 引物:加灭菌蒸馏水配制成 20 μ mol/L 工作液(见表 1)。

表 1 套式 PCR 引物序列

名称	序列	在 16S rRNA 位置
上游外侧引物 PP1	5'-CCATTAGAGGCTGTTAATCAATCGGGAAACC-3'	38-67
上游内侧引物 PP2	5'-CCATACCGAACCCAATACCAAGCACACAAG-3'	245-274
下游引物 PR1	5'-GTGTCATTAAGGTGTGTATTTGGTCTGGTG-3'	482-453

6.2 DNA 模板的制备

取 n 个灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管,其中 n 为被检样品、阳性对照与阴性对照的和(阳性对照、阴性对照在试剂盒中已标出),编号。

用微量可调移液器于每管加 pH7.0 PBS 1 mL,将生殖道拭子浸泡、挤压后,于 4 °C 15 000 r/m 离心 1 min,去上清液。

用微量可调移液器于每管加入蛋白酶 K 至终浓度 100 μ g/mL 和 SDS 至终浓度 10 g/L,55 °C 水浴 2 h。

用微量可调移液器于每管分别加入苯酚、苯酚-氯仿-异丙醇混合液(体积比为 25:24:1)、氯仿,在混匀器上剧烈混匀,各抽提 1 次,吸取水相转移至新 Eppendorf 管。

用微量可调移液器及配套带滤芯吸头于每管加入 1/10 体积 3 mol/L 的 NaAc 和 2.5 倍体积的无水乙醇,轻轻混匀后置 -20 °C 沉淀 1 h,4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min,弃掉上清液。

用微量可调移液器于每管加入 75%乙醇洗涤,4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 5 min,沉淀烘干后悬浮于水中,取适量用作 PCR 模板。若需长期保存应放置 -70 °C 冰箱。

6.3 半套式 PCR 程序

6.3.1 第一次 PCR 反应

第一次 PCR 反应液组成如下:

10 \times PCR 缓冲液	5 μ L
MgCl ₂ (25 mmol/L)	4 μ L
dNTP(2.5 mmol/L)	4 μ L
引物 PP1(20 μ mol/L)	1 μ L

引物 PR1(20 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
Taq 酶((5 U/ μL))	0.5 μL
DNA 模板(10 ng/ μL)	2 μL
水	32.5 μL

在 PCR 管内加入上述成分,总体积为 50 μL ,3 000 r/min 离心 10 s。

将 PCR 反应管置于 PCR 扩增仪。先 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,再进行 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35 次循环,然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。

6.3.2 第二次 PCR 反应

第二次 PCR 反应液组成如下:

10 \times PCR 缓冲液	5 μL
MgCl ₂ (25 mmol/L)	4 μL
dNTPs(2.5 mmol/L)	4 μL
引物 PP2(20 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
引物 PR1(20 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
Taq 酶((5 U/ μL))	0.5 μL
DNA 模板(10 ng/ μL)	2 μL
水	32.5 μL

第一次 PCR 产物在带稳压稳流电泳仪的水平电泳槽内进行琼脂糖凝胶电泳后,在电泳凝胶成像系统(或紫外分析仪)上进行观察。如果不出现 445 bp 的 DNA 扩增条带,取 2 μL 产物做模板;如果电泳后出现 445 bp 的 DNA 扩增条带,则需将产物按 1:1 000 稀释后,取 2 μL 作为第二次 PCR 的模板。

在 PCR 管内加入上述成分,总体积为 50 μL ,3 000 r/min 离心 10 s。

将 PCR 反应管置于 PCR 扩增仪。先 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,再进行 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35 次循环,然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。

6.3.3 对照设立

从 6.2 DNA 模板的制备开始,设立阳性对照、阴性对照。以含有已知马生殖道泰勒氏杆菌 NCTC 11184 株的细菌悬液作为阳性对照,蒸馏水作为阴性对照。

6.3.4 PCR 产物琼脂糖电泳

用 TBE 电泳缓冲液配制 2% 的琼脂糖(含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ EB)平板。将平板放入水平电泳槽,使电泳缓冲液刚好淹没胶面。将 10 μL 样品和 2 μL 加样冲液(6 \times)混匀后加入样品孔。在电泳时设立 DNA 标准分子量作对照。5 V/cm 电泳约 30 min,当溴酚蓝到达底部时停止。在紫外灯下观察结果。

6.4 结果判定

第一次 PCR 后阳性对照会出现一条 445 bp 的 DNA 片段。阴性对照则无。

第二次(半套式)PCR 后,阳性对照会出现一条 238 bp 的 DNA 片段。阴性对照则无。

待测样品 PCR 扩增后,如能在相应 445 bp、238 bp 位置上出现 DNA 条带,即可判定为阳性反应。

必要时对扩增产物进行序列测定与比对。

6.5 结果说明

套式 PCR 技术因特异性强、灵敏度高,结合 PCR 序列测定、比对,亦可用做马生殖道泰勒氏杆菌的最后确诊。

附录 A
(规范性附录)
培养基配制方法

A.1 运输培养基

氯化钠(NaCl)	3.0 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
氯化钙(CaCl ₂)	0.1 g
氯化镁(MgCl ₂)	0.1 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.2 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄)	1.15 g
巯基乙酸钠(C ₂ H ₃ NaO ₂ S)	1.0 g
活性炭	10.0 g
琼脂	4.0 g

称取上述成分,加入蒸馏水定容到 1 000 mL,稍加热溶解后 107.9 kPa、121 °C 高压灭菌 15 min。

A.2 选择性琼脂培养基:5%(体积分数)热灭活血液巧克力琼脂培养基

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g

加入 900 mL 蒸馏水,加热溶解后 107.9 kPa、121 °C 高压灭菌 15 min。冷却至 70 °C~80 °C 时,加入 50 mL 马血液,70 °C~80 °C 水浴 12min,期间不断旋摇;继续冷却到 45 °C~50 °C,加入 1 mL 的 100 mg/mL 半胱氨酸(终浓度 0.83 mol/L)、1 mL 的 277 mg/mL 亚硫酸钠(终浓度 1.59 mol/L)、三甲氧苄二氢嘧啶(1 μg/mL)、洁霉素(5 μg/mL)和两性霉素 B(5 μg/mL),以灭菌蒸馏水定容到 1 000 mL;充分振摇,倾注平皿,厚度约为 4 mm,即可获得高质量的巧克力琼脂培养基。

A.3 含硫酸链霉素(200 μg/mL)选择性琼脂培养基

在 5%(体积分数)热灭活血液琼脂培养基的基础上添加硫酸链霉素(200 μg/mL)。

A.4 卵黄氯化钠琼脂培养基(磷脂酶试验用)**A.4.1 10%氯化钠卵黄液的制备**

取新鲜鸡蛋 1 个,以无菌操作取出卵黄,加入 10%灭菌氯化钠溶液 100 mL 中,充分振摇,即得。

A.4.2 卵黄氯化钠琼脂培养基

蛋白胨	6 g
牛肉浸出粉	1.8 g
琼脂	23 g
氯化钠(NaCl)	30 g
蒸馏水	650 mL
10%氯化钠卵黄液	100 mL

取上述成分(除 10%氯化钠卵黄液外)混合,加热溶化琼脂,调节 pH 值为 7.6,107.9 kPa、121 °C 高压灭菌 15 min,待冷至约 60 °C,以无菌操作加入 10%氯化钠卵黄液 100 mL,充分振摇,倾注平皿。

附录 B

(规范性附录)

间接荧光抗体试剂配制方法

B.1 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH8.0)

磷酸氢二钾 5.59 g

磷酸二氢钾 0.41 g

取磷酸氢二钾 5.59 g 与磷酸二氢钾 0.41 g, 加蒸馏水定容至 1 000 mL, 充分溶解即可。

B.2 甘油缓冲液

甘油 90 mL

0.1 mol/L PBS(pH8.0) 10 mL

取 90 mL 甘油加 10 mL pH8.0 PBS 充分混匀, 即成甘油缓冲液。

附录 C
(规范性附录)
PCR 试剂配制方法

C.1 蛋白酶 K(10 mg/mL)

蛋白酶 K	50 mg
蒸馏水	5 mL

50 mg 蛋白酶 K 溶于 5 mL 蒸馏水中,分装成每管 1 mL, -20 °C 保存。

C.2 10% SDS

SDS(十二烷基磺酸钠)	100 g
蒸馏水	1 000 mL

100 g SDS 在 900 mL 水中溶解,加热至 68 °C 助溶,加水定容至 1 000 mL,室温保存。

C.3 3 mol/L 醋酸钠

408 g 醋酸钠($\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$),在 900 mL 水中溶解,加水定容至 1 000 mL,室温保存。107.9 kPa、121 °C 高压灭菌 15 min。

C.4 75%乙醇

蒸馏水	75 mL
无水乙醇	25 mL

用无水乙醇和蒸馏水充分混匀,-20 °C 预冷。

C.5 5×TBE 电泳缓冲液(5×浓缩液)

Tris	54.0 g
硼酸	27.5 g
EDTA	2.9 g
加三蒸水到	1 000 mL

用 5 mol/L 的盐酸(HCl)调到 pH8.0,或直接购买商品化的产品。

C.6 EB(染色剂)

溴化乙锭(EB)	100 mg
蒸馏水	10 mL

用三蒸水配制成 10 mg/mL 的浓缩液,使用时每 10 mL 琼脂溶液中加入 1 μL 。

C.7 加样缓冲液(6×)

溴酚蓝	0.25 g
蔗糖	40 g
蒸馏水	100 mL

称取溴酚蓝 0.25 g 和蔗糖 40 g,充分溶解于 80 mL 蒸馏水,最后定容至 100 mL。107.9 kPa、121 °C 高压灭菌 15 min。