



中华人民共和国国家标准

GB 4789.12—2016

食品安全国家标准 食品微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验

2016-12-23 发布

2017-06-23 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会
国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

本标准代替 GB/T 4789.12—2003《食品卫生微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验》。

本标准与 GB/T 4789.12—2003 相比,主要变化如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 食品微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验”;
- 增加了 PCR 鉴定方法;
- 增加了结果与报告;
- 增加了附录 A;
- 修改了设备和材料;
- 修改了培养基和试剂;
- 修改了检验程序;
- 规范了样品制备过程;
- 修改了操作步骤中增菌和分离培养部分试验方法。

食品安全国家标准

食品微生物学检验

肉毒梭菌及肉毒毒素检验

1 范围

本标准规定了食品中肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)及肉毒毒素(botulinum toxin)的检验方法。

本标准适用于食品中肉毒梭菌及肉毒毒素的检验。

2 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,其他设备和材料如下:

- 2.1 冰箱:2℃~5℃、-20℃。
- 2.2 天平:感量0.1g。
- 2.3 无菌手术剪、镊子、试剂勺。
- 2.4 均质器或无菌乳钵。
- 2.5 离心机:3 000 r/min、14 000 r/min。
- 2.6 厌氧培养装置。
- 2.7 恒温培养箱:35℃±1℃、28℃±1℃。
- 2.8 恒温水浴箱:37℃±1℃、60℃±1℃、80℃±1℃。
- 2.9 显微镜:10倍~100倍。
- 2.10 PCR仪。
- 2.11 电泳仪或毛细管电泳仪。
- 2.12 凝胶成像系统或紫外检测仪。
- 2.13 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 2.14 可调微量移液器:0.2 μL~2 μL、2 μL~20 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL。
- 2.15 无菌吸管:1.0 mL、10.0 mL、25.0 mL。
- 2.16 无菌锥形瓶:100 mL。
- 2.17 培养皿:直径90 mm。
- 2.18 离心管:50 mL、1.5 mL。
- 2.19 PCR反应管。
- 2.20 无菌注射器:1.0 mL。
- 2.21 小鼠:15 g~20 g,每一批次试验应使用同一品系的KM或ICR小鼠。

3 培养基和试剂

除另有规定外,PCR试验所用试剂为分析纯或符合生化试剂标准,水应符合GB/T 6682中一级水的要求。

- 3.1 庖肉培养基:见 A.1。
- 3.2 胰蛋白酶胰蛋白胨葡萄糖酵母膏肉汤(TPGYT):见 A.2。
- 3.3 卵黄琼脂培养基:见 A.3。
- 3.4 明胶磷酸盐缓冲液:见 A.4。
- 3.5 革兰氏染色液:见 A.5。
- 3.6 10%胰蛋白酶溶液:见 A.6。
- 3.7 磷酸盐缓冲液(PBS):见 A.7。
- 3.8 1 mol/L 氢氧化钠溶液。
- 3.9 1 mol/L 盐酸溶液。
- 3.10 肉毒毒素诊断血清。
- 3.11 无水乙醇和 95%乙醇。
- 3.12 10 mg/mL 溶菌酶溶液。
- 3.13 10 mg/mL 蛋白酶 K 溶液。
- 3.14 3 mol/L 乙酸钠溶液(pH5.2)。
- 3.15 TE 缓冲液。
- 3.16 引物:根据表 1 中序列合成,临用时用超纯水配制引物浓度为 10 μ mol/L。
- 3.17 10 \times PCR 缓冲液。
- 3.18 25 mmol/L $MgCl_2$ 。
- 3.19 dNTPs;dATP、dTTP、dCTP、dGTP。
- 3.20 *Taq* 酶。
- 3.21 琼脂糖:电泳级。
- 3.22 溴化乙锭或 Goldview。
- 3.23 5 \times TBE 缓冲液。
- 3.24 6 \times 加样缓冲液。
- 3.25 DNA 分子量标准。

4 检验程序

肉毒梭菌及肉毒毒素检验程序见图 1。

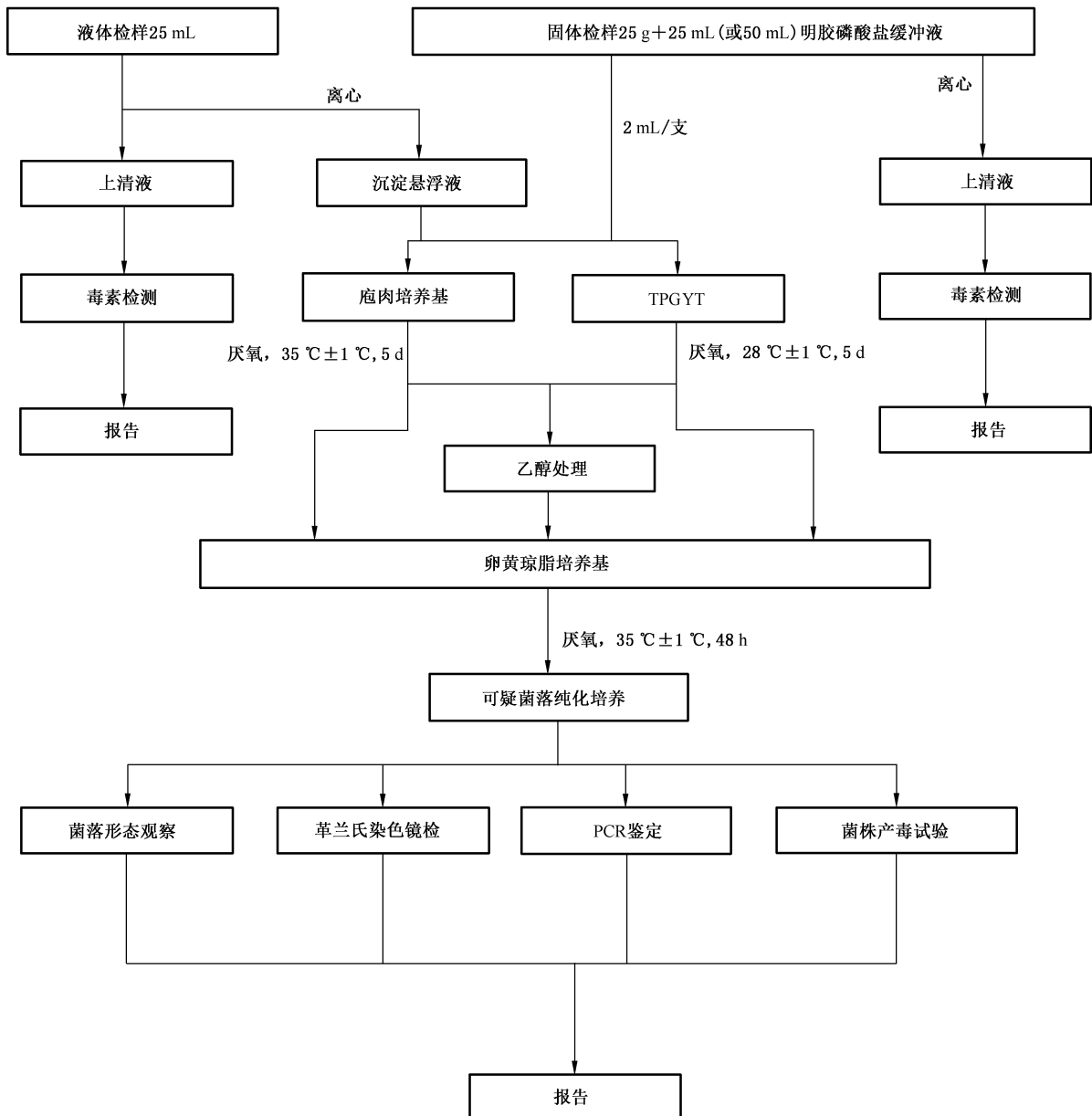


图1 肉毒梭菌及肉毒毒素检验程序

5 操作步骤

5.1 样品制备

5.1.1 样品保存

待检样品应放置 2 °C ~ 5 °C 冰箱冷藏。

5.1.2 固态与半固态食品

固体或游离液体很少的半固态食品,以无菌操作称取样品 25 g,放入无菌均质袋或无菌乳钵,块状食品以无菌操作切碎,含水量较高的固态食品加入 25 mL 明胶磷酸盐缓冲液,乳粉、牛肉干等含水量低

的食品加入 50 mL 明胶磷酸盐缓冲液,浸泡 30 min,用拍击式均质器拍打 2 min 或用无菌研杵研磨制备样品匀液,收集备用。

5.1.3 液态食品

液态食品摇匀,以无菌操作量取 25 mL 检验。

5.1.4 剩余样品处理

取样后的剩余样品放 2 °C~5 °C 冰箱冷藏,直至检验结果报告发出后,按感染性废弃物要求进行无害化处理,检出阳性的样品应采用压力蒸汽灭菌方式进行无害化处理。

5.2 肉毒毒素检测

5.2.1 毒素液制备

取样品匀液约 40 mL 或均匀液体样品 25 mL 放入离心管,3 000 r/min 离心 10 min~20 min,收集上清液分为两份放入无菌试管中,一份直接用于毒素检测,一份用于胰酶处理后进行毒素检测。液体样品保留底部沉淀及液体约 12 mL,重悬,制备沉淀悬浮液备用。

胰酶处理:用 1 mol/L 氢氧化钠或 1 mol/L 盐酸调节上清液 pH 至 6.2,按 9 份上清液加 1 份 10% 胰酶(活力 1 : 250)水溶液,混匀,37 °C 孵育 60 min,期间间或轻轻摇动反应液。

5.2.2 检出试验

用 5 号针头注射器分别取离心上清液和胰酶处理上清液腹腔注射小鼠 3 只,每只 0.5 mL,观察和记录小鼠 48 h 内的中毒表现。典型肉毒毒素中毒症状多在 24 h 内出现,通常在 6 h 内发病和死亡,其主要表现为竖毛、四肢瘫软、呼吸困难,呈现风箱式呼吸、腰腹部凹陷、宛如峰腰,多因呼吸衰竭而死亡,可初步判定为肉毒毒素所致。若小鼠在 24 h 后发病或死亡,应仔细观察小鼠症状,必要时浓缩上清液重复试验,以排除肉毒毒素中毒。若小鼠出现猝死(30 min 内)导致症状不明显时,应将毒素上清液进行适当稀释,重复试验。

注:毒素检测动物试验应遵循 GB 15193.2《食品安全国家标准 食品毒理学实验室操作规范》的规定。

5.2.3 确证试验

上清液或(和)胰酶处理上清液的毒素试验阳性者,取相应试验液 3 份,每份 0.5 mL,其中第一份加等量多型混合肉毒毒素诊断血清,混匀,37 °C 孵育 30 min;第二份加等量明胶磷酸盐缓冲液,混匀后煮沸 10 min;第三份加等量明胶磷酸盐缓冲液,混匀。将三份混合液分别腹腔注射小鼠各两只,每只 0.5 mL,观察 96 h 内小鼠的中毒和死亡情况。

结果判定:若注射第一份和第二份混合液的小鼠未死亡,而第三份混合液小鼠发病死亡,并出现肉毒毒素中毒的特有症状,则判定检测样品中检出肉毒毒素。

5.2.4 毒力测定(选做项目)

取确证试验阳性的试验液,用明胶磷酸盐缓冲液稀释制备一定倍数稀释液,如 10 倍、50 倍、100 倍、500 倍等,分别腹腔注射小鼠各两只,每只 0.5 mL,观察和记录小鼠发病与死亡情况至 96 h,计算最低致死剂量(MLD/mL 或 MLD/g),评估样品中肉毒毒素毒力,MLD 等于小鼠全部死亡的最高稀释倍数乘以样品试验液稀释倍数。例如,样品稀释两倍制备的上清液,再稀释 100 倍试验液使小鼠全部死亡,而 500 倍稀释液组存活,则该样品毒力为 200 MLD/g。

5.2.5 定型试验(选做项目)

根据毒力测定结果,用明胶磷酸盐缓冲液将上清液稀释至 10 MLD/mL~1 000 MLD/mL 作为定型试验液,分别与各单型肉毒毒素诊断血清等量混合(国产诊断血清一般为冻干血清,用 1 mL 生理盐水溶解),37 °C 孵育 30 min,分别腹腔注射小鼠两只,每只 0.5 mL,观察和记录小鼠发病与死亡情况至 96 h。同时,用明胶磷酸盐缓冲液代替诊断血清,与试验液等量混合作为小鼠试验对照。

结果判定:某一单型诊断血清组动物未发病且正常存活,而对照组和其他单型诊断血清组动物发病死亡,则判定样品中所含肉毒毒素为该型肉毒毒素。

注:未经胰酶激活处理的样品上清液的毒素检出试验或确证试验为阳性者,则毒力测定和定型试验可省略胰酶激活处理试验。

5.3 肉毒梭菌检验

5.3.1 增菌培养与检出试验

5.3.1.1 取出庖肉培养基 4 支和 TPGY 肉汤管 2 支,隔水煮沸 10 min~15 min,排除溶解氧,迅速冷却,切勿摇动,在 TPGY 肉汤管中缓慢加入胰酶液至液体石蜡液面下肉汤中,每支 1 mL,制备成 TPGYT。

5.3.1.2 吸取样品匀液或毒素制备过程中的离心沉淀悬浮液 2 mL 接种至庖肉培养基中,每份样品接种 4 支,2 支直接放置 35 °C±1 °C 厌氧培养至 5 d,另 2 支放 80 °C 保温 10 min,再放置 35 °C±1 °C 厌氧培养至 5 d;同样方法接种 2 支 TPGYT 肉汤管,28 °C±1 °C 厌氧培养至 5 d。

注:接种时,用无菌吸管轻轻吸取样品匀液或离心沉淀悬浮液,将吸管口小心插入肉汤管底部,缓缓放出样液至肉汤中,切勿搅动或吹气。

5.3.1.3 检查记录增菌培养物的浊度、产气、肉渣颗粒消化情况,并注意气味。肉毒梭菌培养物为产气、肉汤浑浊(庖肉培养基中 A 型和 B 型肉毒梭菌肉汤变黑)、消化或不消化肉粒、有异臭味。

5.3.1.4 取增菌培养物进行革兰氏染色镜检,观察菌体形态,注意是否有芽胞、芽胞的相对比例、芽胞在细胞内的位置。

5.3.1.5 若增菌培养物 5 d 无菌生长,应延长培养至 10 d,观察生长情况。

5.3.1.6 取增菌培养物阳性管的上清液,按 5.2 方法进行毒素检出和确证试验,必要时进行定型试验,阳性结果可证明样品中有肉毒梭菌存在。

注:TPGYT 增菌液的毒素试验无需添加胰酶处理。

5.3.2 分离与纯化培养

5.3.2.1 增菌液前处理,吸取 1 mL 增菌液至无菌螺旋帽试管中,加入等体积过滤除菌的无水乙醇,混匀,在室温下放置 1 h。

5.3.2.2 取增菌培养物和经乙醇处理的增菌液分别划线接种至卵黄琼脂平板,35 °C±1 °C 厌氧培养 48 h。

5.3.2.3 观察平板培养物菌落形态,肉毒梭菌菌落隆起或扁平、光滑或粗糙,易成蔓延生长,边缘不规则,在菌落周围形成乳色沉淀晕圈(E 型较宽,A 型和 B 型较窄),在斜视光下观察,菌落表面呈现珍珠样虹彩,这种光泽区可随蔓延生长扩散到不规则边缘区外的晕圈。

5.3.2.4 菌株纯化培养,在分离培养平板上选择 5 个肉毒梭菌可疑菌落,分别接种卵黄琼脂平板,35 °C±1 °C,厌氧培养 48 h,按 5.3.2.3 观察菌落形态及其纯度。

5.3.3 鉴定试验

5.3.3.1 染色镜检

挑取可疑菌落进行涂片、革兰氏染色和镜检,肉毒梭菌菌体形态为革兰氏阳性粗大杆菌、芽胞卵圆

形、大于菌体、位于次端，菌体呈网球拍状。

5.3.3.2 毒素基因检测

- a) 菌株活化:挑取可疑菌落或待鉴定菌株接种 TPGY, 35 °C ± 1 °C 厌氧培养 24 h。
- b) DNA 模板制备:吸取 TPGY 培养液 1.4 mL 至无菌离心管中, 14 000×g 离心 2 min, 弃上清, 加入 1.0 mL PBS 悬浮菌体, 14 000×g 离心 2 min, 弃上清, 用 400 μL PBS 重悬沉淀, 加入 10 mg/mL 溶菌酶溶液 100 μL, 摇匀, 37 °C 水浴 15 min, 加入 10 mg/mL 蛋白酶 K 溶液 10 μL, 摇匀, 60 °C 水浴 1 h, 再沸水浴 10 min, 14 000×g 离心 2 min, 上清液转移至无菌小离心管中, 加入 3 mol/L NaAc 溶液 50 μL 和 95% 乙醇 1.0 mL, 摇匀, -70 °C 或 -20 °C 放置 30 min, 14 000×g 离心 10 min, 弃去上清液, 沉淀干燥后溶于 200 μL TE 缓冲液, 置于 -20 °C 保存备用。

注: 根据实验室实际情况, 也可采用常规水煮沸法或商品化试剂盒制备 DNA 模板。

- c) 核酸浓度测定(必要时): 取 5 μL DNA 模板溶液, 加超纯水稀释至 1 mL, 用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计分别检测 260 nm 和 280 nm 波段的吸光值 A_{260} 和 A_{280} 。按式(1)计算 DNA 浓度。当浓度在 0.34 μg/mL ~ 340 μg/mL 或 A_{260}/A_{280} 比值在 1.7 ~ 1.9 之间时, 适宜于 PCR 扩增。

$$C = A_{260} \times N \times 50 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

C —— DNA 浓度, 单位为微克每毫升(μg/mL);

A_{260} —— 260 nm 处的吸光值;

N —— 核酸稀释倍数。

- d) PCR 扩增:

- 1) 分别采用针对各型肉毒梭菌毒素基因设计的特异性引物(见表 1)进行 PCR 扩增, 包括 A 型肉毒毒素(botulinum neurotoxin A, bont/A)、B 型肉毒毒素(botulinum neurotoxin B, bont/B)、E 型肉毒毒素(botulinum neurotoxin E, bont/E)和 F 型肉毒毒素(botulinum neurotoxin F, bont/F), 每个 PCR 反应管检测一种型别的肉毒梭菌。

表 1 肉毒梭菌毒素基因 PCR 检测的引物序列及其产物

检测肉毒梭菌类型	引物序列	扩增长度/bp
A 型	F 5'-GTG ATA CAA CCA GAT GGT AGT TAT AG-3' R 5'-AAA AAA CAA GTC CCA ATT ATT AAC TTT-3'	983
B 型	F 5'-GAG ATG TTT GTG AAT ATT ATG ATC CAG-3' R 5'-GTT CAT GCA TTA ATA TCA AGG CTG G-3'	492
E 型	F 5'-CCA GGC GGT TGT CAA GAA TTT TAT-3' R 5'-TCA AAT AAA TCA GGC TCT GCT CCC-3'	410
F 型	F 5'-GCT TCA TTA AAG AAC GGA AGC AGT GCT-3' R 5'-GTG GCG CCT TTG TAC CTT TTC TAG G-3'	1 137

- 2) 反应体系配制见表 2, 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相应调整。

表 2 肉毒梭菌毒素基因 PCR 检测的反应体系

试剂	终浓度	加入体积/ μL
10 \times PCR 缓冲液	1 \times	5.0
25 mmol/L MgCl ₂	2.5 mmol/L	5.0
10 mmol/L dNTPs	0.2 mmol/L	1.0
10 $\mu\text{mol/L}$ 正向引物	0.5 $\mu\text{mol/L}$	2.5
10 $\mu\text{mol/L}$ 反向引物	0.5 $\mu\text{mol/L}$	2.5
5 U/ μL Taq 酶	0.05 U/ μL	0.5
DNA 模板	—	1.0
ddH ₂ O	—	32.5
总体积	—	50.0

- 3) 反应程序,预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min;循环参数 94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min,60 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min;循环数 40;后延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。
- 4) PCR 扩增体系应设置阳性对照、阴性对照和空白对照。用含有已知肉毒梭菌菌株或含肉毒毒素基因的质控品作阳性对照、非肉毒梭菌基因组 DNA 作阴性对照、无菌水作空白对照。
- e) 凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,用 0.5 \times TBE 缓冲液配制 1.2%~1.5% 的琼脂糖凝胶,凝胶加热融化后冷却至 60 $^{\circ}\text{C}$ 左右加入溴化乙锭至 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 Goldview 5 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ 制备胶块,取 10 μL PCR 扩增产物与 2.0 μL 6 \times 加样缓冲液混合,点样,其中一孔加入 DNA 分子量标准。0.5 \times TBE 电泳缓冲液,10 V/cm 恒压电泳,根据溴酚蓝的移动位置确定电泳时间,用紫外检测仪或凝胶成像系统观察和记录结果。

PCR 扩增产物也可采用毛细管电泳仪进行检测。

- f) 结果判定,阴性对照和空白对照均未出现条带,阳性对照出现预期大小的扩增条带(见表 1),判定本次 PCR 检测成立;待测样品出现预期大小的扩增条带,判定为 PCR 结果阳性,根据表 1 判定肉毒梭菌菌株型别,待测样品未出现预期大小的扩增条带,判定 PCR 结果为阴性。

注:PCR 试验环境条件和过程控制应参照 GB/T 27403《实验室质量控制规范 食品分子生物学检测》规定执行。

5.3.3.3 菌株产毒试验

将 PCR 阳性菌株或可疑肉毒梭菌菌株接种庖肉培养基或 TPGYT 肉汤(用于 E 型肉毒梭菌),按 5.3.1.2 条件厌氧培养 5 d,按 5.2 方法进行毒素检测和(或)定型试验,毒素确证试验阳性者,判定为肉毒梭菌,根据定型试验结果判定肉毒梭菌型别。

注:根据 PCR 阳性菌株型别,可直接用相应型别的肉毒毒素诊断血清进行确证试验。

6 结果报告

6.1 肉毒毒素检测结果报告

根据 5.2.2 和 5.2.3 试验结果,报告 25 g(mL)样品中检出或未检出肉毒毒素。

根据 5.2.5 定型试验结果,报告 25 g(mL)样品中检出某型肉毒毒素。

6.2 肉毒梭菌检验结果报告

根据 5.3 各项试验结果,报告样品中检出或未检出肉毒梭菌或检出某型肉毒梭菌。

附 录 A 培养基和试剂

A.1 庖肉培养基

A.1.1 成分

新鲜牛肉	500.0 g
蛋白胨	30.0 g
酵母浸膏	5.0 g
磷酸二氢钠	5.0 g
葡萄糖	3.0 g
可溶性淀粉	2.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.1.2 制法

称取新鲜除去脂肪与筋膜的牛肉 500.0 g,切碎,加入蒸馏水 1 000 mL 和 1 mol/L 氢氧化钠溶液 25 mL,搅拌煮沸 15 min,充分冷却,除去表层脂肪,纱布过滤并挤出肉渣余液,分别收集肉汤和碎肉渣。在肉汤中加入成分表中其他物质并用蒸馏水补足至 1 000 mL,调节 pH 至 7.4 ± 0.1 ,肉渣凉至半干。

在 20 mm×150 mm 试管中先加入碎肉渣 1 cm~2 cm 高,每管加入还原铁粉 0.1 g~0.2 g 或少许铁屑,再加入配制肉汤 15 mL,最后加入液体石蜡覆盖培养基 0.3 cm~0.4 cm,121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

A.2 胰蛋白酶胰蛋白胨葡萄糖酵母膏肉汤(TPGYT)

A.2.1 基础成分(TPGY 肉汤)

胰酪胨(trypticase)	50.0 g
蛋白胨	5.0 g
酵母浸膏	20.0 g
葡萄糖	4.0 g
硫乙醇酸钠	1.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.2.2 胰酶液

称取胰酶(1:250)1.5 g,加入 100 mL 蒸馏水中溶解,膜过滤除菌,4 °C 保存备用。

A.2.3 制法

将 A.2.1 中成分溶于蒸馏水中,调节 pH 至 7.2 ± 0.1 ,分装 20 mm×150 mm 试管,每管 15 mL,加入液体石蜡覆盖培养基 0.3 cm~0.4 cm,121 °C 高压蒸汽灭菌 10 min。冰箱冷藏,两周内使用。临用接种样品时,每管加入胰酶液 1.0 mL。

A.3 卵黄琼脂培养基

A.3.1 基础培养基成分

酵母浸膏	5.0 g
胰胨	5.0 g
豚胨(proteose peptone)	20.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	20.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.3.2 卵黄乳液

用硬刷清洗鸡蛋 2 个~3 个,沥干,杀菌消毒表面,无菌打开,取出内容物,弃去蛋白,用无菌注射器吸取蛋黄,放入无菌容器中,加等量无菌生理盐水,充分混合调均,4 ℃保存备用。

A.3.3 制法

将 A.3.1 中成分溶于蒸馏水中,调节 pH 至 7.0 ± 0.2 ,分装锥形瓶,121 ℃高压蒸汽灭菌 15 min,冷却至 50 ℃左右,按每 100 mL 基础培养基加入 15 mL 卵黄乳液,充分混匀,倾注平板,35 ℃培养 24 h 进行无菌检查后,冷藏备用。

A.4 明胶磷酸盐缓冲液

A.4.1 成分

明胶	2.0 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	4.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.4.2 制法

将 A.4.1 中成分溶于蒸馏水中,调节 pH 至 6.2,121 ℃高压蒸汽灭菌 15 min。

A.5 革兰氏染色

A.5.1 结晶紫染色液

A.5.1.1 成分

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20.0 mL
1%草酸铵水溶液	80.0 mL

A.5.1.2 制法

将结晶紫完全溶于乙醇中,再与草酸铵溶液混合。

A.5.2 革兰氏碘液

A.5.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300.0 mL

A.5.2.2 制法

将碘和碘化钾混合,加入少许蒸馏水充分振摇,待完全溶解后,再加蒸馏水至 300 mL。

A.5.3 沙黄复染液

A.5.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A.5.3.2 制法

将沙黄溶于乙醇中,再加蒸馏水至 100 mL。

A.5.4 染色方法

涂片在酒精灯火焰上固定,滴加结晶紫染色液覆盖,染色 1 min,水洗;滴加革兰氏碘液覆盖,作用 1 min,水洗;滴加 95%乙醇脱色约 15 s~30 s(可将乙醇覆盖整个涂片,立即倾去,再用乙醇覆盖涂片,作用约 10 s,倾去脱色液,滴加乙醇从涂片流下至出现无色为止),水洗;滴加沙黄复染液覆盖,染色 1 min,水洗,待干、镜检。

A.6 胰蛋白酶溶液

A.6.1 成分

胰蛋白酶(1:250)	10.0 g
蒸馏水	100.0 mL

A.6.2 制法

将胰蛋白酶溶于蒸馏水中,膜过滤除菌,4℃保存备用。

A.7 磷酸盐缓冲液(PBS)

A.7.1 成分

氯化钠	7.650 g
磷酸氢二钠	0.724 g

磷酸二氢钾	0.210 g
超纯水	1 000.0 mL

A.7.2 制法

准确称取 A.7.1 中化学试剂,溶于超纯水中,测试 pH7.4。
