

中华人民共和国国家标准

GB 23748—2016

食品安全国家标准 辐照食品鉴定 筛选法

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 23748—2009《辐照食品的鉴定 DNA 蕃星试验法 筛选法》、NY/T 2214—2012《辐照食品鉴定 光释光法》和 SN/T 2910.2—2011《出口辐照食品的鉴别方法 第 2 部分：单细胞凝胶电泳法》。

本标准与 GB/T 23748—2009 相比，主要变化如下：

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 辐照食品鉴定 筛选法”；
- 增加了两种筛选方法：光释光法和微生物学筛选法；
- 增加了 DNA 蕃星试验法的限制性说明。

食品安全国家标准

辐照食品鉴定 筛选法

1 范围

本标准规定了三种快速筛选食品是否接受过辐照的鉴定方法:光释光法、DNA 萤火虫试验法和微生物学筛选法。

本标准中的光释光法适用于甲壳类、香辛料和调味品类产品的辐照鉴定;DNA 萤火虫试验法适用于动物产品、谷物、坚果、果蔬的辐照鉴定;微生物学筛选法适用于冷冻畜禽肉和水产品等各类生鲜食品的辐照鉴定。

第一法 光释光法

2 术语和定义

2.1 光释光(photostimulated luminescence, PSL)

富含硅酸盐类样品俘获的辐射能量经一定波长的光激发后,以光的形式释放出来的现象。

2.2 PSL 强度(PSL intensity)

样品经光激发后检测到的发光量,以光子计数率表示。

2.3 筛查 PSL(screening PSL)

样品初次测量的 PSL 强度。

2.4 校正 PSL(calibrated PSL)

筛查 PSL 测量之后,同一样品用已知剂量辐照后测量的 PSL 强度。

2.5 阈值(thresholds)

在筛查模式下,用于判定样品辐照与否的 PSL 强度,包括一个低阈值(T_1)和一个高阈值(T_2)。

2.6 阴性 PSL(negative PSL result)

PSL 测量强度低于低阈值。

2.7 可疑 PSL(intermediate PSL result)

PSL 测量强度在低阈值和高阈值之间。

2.8 阳性 PSL(positive PSL result)

PSL 测量强度高于高阈值。

2.9 空白对照(dark count)

无光刺激时,对空样品容器获得的光子计数率。

2.10 阳性对照(light count)

将参考光源(比如装有¹⁴C 的闪烁体或者等效物)置于样品容器中得到的光子计数率。

3 原理

富含硅酸盐类物质的样品能够储存射线能量。通过一定波长的光再次激发照射,样品中储存的能量可以释放,产生光释放光信号。利用光释放光检测仪测试光信号的强度,比较不同光信号强度的大小,判定样品是否经过辐照。

4 仪器和设备

4.1 光释光测量系统;包括样品容器、光激发源、脉冲刺激仪和同步光子计数系统。

4.2 测量盘:直径 5 cm。

4.3 电离辐射源;对电离辐射源的使用和管理按 GB 17568 和 GB/T 25306 的规定。

5 分析步骤

注:样品在测量前避光放置。测量时使用一次性测量盘。

5.1 香辛料和调味品的样品制备

准备双份样品,均匀铺在测量盘底部,分别检测。如果两次检测结果与判定阈值相比不一致,则将样品 4 等分后重新进行检测,取其中最高的两个检测值作为结果进行判定,依此类推。

5.2 甲壳类动物的样品制备

将带壳或去壳样品放入测量盘中,样品中带有动物肠子时有利于光释光信号的检测。如个体较大,可对样品切割;也可取肠子(不少于 6 根)放入测量盘中进行测量。

5.3 仪器设置

设定辐照食品筛查系统的个体测量参数。

检查空白对照和阳性对照。

注:应当定期或者当测量出现阳性结果后,对容器进行空样品检测,检查仪器是否受到污染。

5.4 样品测定

5.4.1 筛查测量

进行样品检测并记录结果。

5.4.2 校正测量

筛查测量后的样品加盖保存,防止样品损失或污染。对这些样品再辐照特定剂量(香辛料和贝类食物辐照 1 kGy),辐照后室温(甲壳类动物和其他易腐烂样品应冷藏)避光保存 12 h,进行校正测量。

6 分析结果表述

6.1 阈值设定

香料和调味品的阈值设定为: $T_1 = 700 \text{ counts/min}$, $T_2 = 5\,000 \text{ counts/min}$ 。

甲壳类动物的阈值设定为: $T_1 = 1\,000 \text{ counts/min}$, $T_2 = 4\,000 \text{ counts/min}$ 。

6.2 结果判断

根据与阈值的比较,样品测量结果可分为阴性、可疑、阳性三种情况,分别进行判定。

6.2.1 阴性结果

6.2.1.1 筛查 PSL

筛查 PSL 为阴性结果时,可判定样品未经辐照。

6.2.1.2 校正 PSL

校正 PSL 和筛查 PSL 同为阴性时,该样品不能被判定为辐照食品。若要进一步确认样品是否接受过辐照,应采用辐照食品鉴定的其他确证方法。

校正 PSL 为阴性,但筛查 PSL 为阳性时,表明测量系统有错误,应当取新鲜的原始样品重新测量。

6.2.2 可疑结果

6.2.2.1 筛查 PSL

筛查 PSL 为可疑结果时,不能直接判定样品是否接受过辐照。

6.2.2.2 校正 PSL

校正 PSL 和筛查 PSL 同为可疑结果时,判定样品接受过辐照。

校正 PSL 为可疑结果,筛查 PSL 为阴性结果时,表明样品可能是低敏感性未辐照食品。若要进一步确认样品是否接受过辐照,应采用辐照食品鉴定的其他确证方法。

校正 PSL 为可疑结果,筛查 PSL 为高数值阳性结果时,表明测量有误。

校正 PSL 为可疑结果,筛查 PSL 为接近 T_2 的阳性结果时,表明样品可能接受过高于校正剂量的辐照。应当重新测量样品进行判定。

6.2.3 阳性结果

6.2.3.1 筛查 PSL

筛查 PSL 为阳性结果时,可判定样品接受过辐照。

6.2.3.2 校正 PSL

校正 PSL 和筛查 PSL 为同级别的阳性结果时,判定样品接受过辐照。

校正 PSL 为阳性结果,且远高于阴性或可疑结果的筛查 PSL 时,表明样品可能未经辐照。

校正 PSL 和筛查 PSL 为阳性结果,但校正 PSL 小于筛查 PSL 时(相差 1 到 2 个数量级),表明测量有误,需要重新进行测量。

第二法 DNA 萤星试验法

7 原理

DNA 分子经过辐照后会发生断裂。将细胞包埋在琼脂中,用裂解试剂溶解细胞膜,然后在一定的电压下进行电泳。受损的 DNA 片段在电场中向阳极方向快速移动,形成尾状分布。染色后,DNA 受损的细胞就会出现彗星状电泳图谱,未受辐射的细胞图谱接近圆形或者轻微拖尾。

8 试剂

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的三级水。

- 8.1 二甲基亚砜(DMSO,C₂H₆OS)。
- 8.2 氯化钠(NaCl)。
- 8.3 氯化钾(KCl)。
- 8.4 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄ · 12H₂O)。
- 8.5 磷酸二氢钾(KH₂PO₄)。
- 8.6 乙二胺四乙酸二钠(Na₂EDTA,C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂ · 2H₂O)。
- 8.7 氢氧化钠(NaOH)。
- 8.8 三羟甲基氨基甲烷(Tris,C₄H₁₁NO₃)。
- 8.9 硼酸(H₃BO₃)。
- 8.10 十二烷基磺酸钠(SDS,C₁₂H₂₅O₄NaS)。
- 8.11 吖啶橙(C₁₇H₁₉N₃ · HCl · ZnCl₂)。
- 8.12 溴化乙锭(C₂₁H₂₀BrN₃)。
- 8.13 三氯乙酸(TCA,C₂HCl₃O₂)。
- 8.14 硫酸锌(ZnSO₄)。
- 8.15 甘油(C₃H₈O₃)。
- 8.16 碳酸钠(Na₂CO₃)。
- 8.17 硝酸铵(NH₄NO₃)。
- 8.18 硝酸银(AgNO₃)。
- 8.19 钨硅酸(H₄[Si(W₃O₁₀)₄] · xH₂O)。
- 8.20 甲醛(CH₂O)。
- 8.21 冰乙酸(CH₃COOH)。
- 8.22 磺化毗啶(C₁₀H₁₂O₄N₂S)。
- 8.23 琼脂糖。
- 8.24 低熔点琼脂糖。

9 试剂配制

试验中所用的试剂配制见附录 A。

10 仪器和设备

- 10.1 水平电泳槽。
- 10.2 电子天平:感量为 0.1 g。
- 10.3 电加热磁力搅拌器。
- 10.4 微波炉。
- 10.5 微孔滤膜:孔径 100 μm、200 μm、500 μm。
- 10.6 显微镜载玻片:76 mm×26 mm,带磨砂边。
- 10.7 荧光显微镜:100 倍~400 倍;蓝色激发波长 460 nm~485 nm,用于吖啶橙染色观察;绿色激发波长 515 nm~560 nm,用于碘化吡啶或溴化乙锭染色观察。

11 分析步骤

11.1 样品制备

11.1.1 动物组织

11.1.1.1 骨髓样品制备

切开骨头,称取约 50 mg 骨髓置于试管中,加入 3 mL 冰预冷的 PBS 缓冲液。用玻璃棒搅拌,将细胞悬起,用 100 μm 的微孔滤膜过滤细胞悬液,收集滤液并将滤液置于冰盒上,备用(细胞悬液可置于冰上放置,时间不超过 10 min;在加入 5%~10% 的 DMSO 作为防冻剂后,细胞可置于-20 ℃ 保存 26 h)。

11.1.1.2 肌肉组织样品制备

用解剖刀将肌肉组织切成薄片(不能有可见脂肪)。称取 1 g 肌肉置于小烧杯中,加入 5 mL 冰预冷的 PBS 缓冲液。将该烧杯置于冰盒中,玻璃棒搅拌 5 min,依次用 500 μm 和 200 μm 的微孔滤膜过滤,收集滤液并在冰盒上放置 5 min,备用。

11.1.2 植物组织

11.1.2.1 原粮、坚果和调味料等食品

称取样品 0.25 g,用研钵碾碎,置于小烧杯中,加入 3 mL 冰预冷的 PBS 缓冲液。将该烧杯置于冰盒中,用玻璃棒搅拌 5 min,依次用 500 μm 和 200 μm 的微孔滤膜过滤,收集滤液并在冰盒上放置 15 min~60 min,备用。

11.1.2.2 草莓等浆果

称取 0.25 g 草莓浆果,用研钵碾碎,置于小烧杯中,加入 3 mL 冰预冷的 PBS 缓冲液。将该烧杯置于冰盒中,用玻璃棒搅拌 5 min,依次用 500 μm 和 200 μm 的微孔滤膜过滤,收集滤液并在冰盒上放置 15 min~60 min,备用。

11.1.2.3 蔬菜(不包括食用菌)

将蔬菜的可食部分用解剖刀切成薄片,取 4 g,加入 5 mL 冰预冷的 PBS 缓冲液,用研钵碾碎,置于小烧杯中,加入 3 mL 冰预冷的 PBS。将该小烧杯置于冰盒中,玻璃棒搅拌 5 min,依次用 500 μm 和 200 μm 的微孔滤膜过滤,收集滤液并在冰盒上放置 15 min~60 min,备用。

11.2 预涂载玻片

涂布前,应将载玻片用甲醇浸泡以除去表面油脂。风干后,滴一滴(约 50 μL)涂层琼脂糖溶液于载玻片上,立即取另一个载玻片盖在琼脂糖上,使琼脂糖溶液散开,取下上层载玻片,风干 30 min,待用。

11.3 包埋凝胶

取 100 μL 细胞悬液与 1 mL 包埋凝胶溶液混匀,然后取 100 μL 该混合液用微量移液器的吸头轻轻涂布在预涂载玻片上,立即盖上盖玻片使凝胶铺展均匀,注意不可产生气泡。将载玻片置于冰盒上 5 min,然后用解剖刀尖将盖玻片从琼脂糖上剥离。

11.4 溶解细胞

将 11.3 制备的载玻片完全浸入裂解缓冲液中(动物细胞 \geqslant 5 min,植物细胞 \geqslant 15 min),使细胞溶解,溶解过程不要碰触琼脂糖。

11.5 回湿

将载玻片浸入电泳缓冲液中,时间 5 min。

11.6 电泳

将载玻片并排放入水平电泳槽,磨砂边缘朝向阴极。电泳槽中加入电泳缓冲液没过载玻片 2 mm~4 mm。室温下电泳 20 min,电压 2 V/cm。关闭电源后,将载玻片放入水中 5 min,室温下风干 1 h。

11.7 染色

11.7.1 吖啶橙、碘化毗啶或溴化乙锭染色

将载玻片浸入染色液(吖啶橙染色液、碘化毗啶染色液或溴化乙锭染色液)3 min~5 min,然后浸入水中清洗 0.5 min~1 min,擦干载玻片下多余的水分,荧光显微镜观察。

11.7.2 硝酸银染色

将载玻片置于混合液 A 10 min,水洗 1 min,40 °C~50 °C 恒温干燥箱干燥 1 h 或室温风干。然后将载玻片浸入混合液 D 10 min~20 min,重复该步骤 1 次~2 次,染色时间 5 min~10 min,直至载玻片呈现棕色。水洗 1 min,用停止液 E 浸泡 5 min 停止染色反应,再水洗 1 min。最后将载玻片室温放置,自然风干。染色后的载玻片不会褪色,可长期保存观察。

注: 荧光染料易淬灭,染色要迅速;染色液有毒,试验结束后,应对废液进行净化处理再行弃置。

11.8 观察鉴别

11.8.1 荧光观察

吖啶橙染色的载玻片应用荧光显微镜(460 nm~485 nm,蓝光激发)观察,染色 DNA 发出绿色荧光。

碘化毗啶或溴化乙锭染色的载玻片应用荧光显微镜(515 nm~560 nm,绿色激发)配合 590 nm 滤光片观察,染色 DNA 发出红色荧光。

11.8.2 白光观察

硝酸银染色的载玻片可使用普通显微镜观察。

12 分析结果的表述

12.1 结果表述

通过显微镜观察,辐照过的样品几乎没有完整细胞,全部是彗星图像(见图 B.1 和图 B.2);未受损的细胞不拖尾或者有轻拖尾(见图 B.3 和图 B.4)。

12.2 判定结果

出现彗星图像时,结果报告为阳性,样品可能经过辐照。

未出现彗星图像时,结果报告为阴性,样品未经辐照。

13 限制性说明

实际上不同样品产生的彗星形状会有明显差异,而且其他处理过程也可能影响 DNA 形态,这给辐照食品的判定带来困难。故 DNA 彗星试验法只能作为辐照食品的筛查办法,最终确定食品是否接受了辐照,需要配合其他辐照食品确证方法进行检测。

第三法 微生物学筛选法

14 术语和定义

内毒素(endotoxin)

革兰氏阴性菌的菌体中存在的毒性物质的总称,是细菌细胞壁上的特有成分,其毒性成分主要为类脂质 A。只有在细菌裂解后,内毒素才会释放出来,可引起宿主发热和内毒素休克等症状。

15 原理

在适宜条件下,细菌内毒素可激活鲎试剂中的凝固酶原,使鲎试剂产生凝集反应形成凝胶。内毒素与革兰氏阴性菌含量呈正相关,所以可根据内毒素的含量测定革兰氏阴性菌的含量。

食品经过一定剂量的辐照后,食品中的革兰氏阴性细菌基本上被杀死,但残留的内毒素不会因辐照处理而消失。因此可通过内毒素浓度测定,计算被辐照食品中死亡和存活革兰氏阴性细菌的总数,同时对食品中存活的革兰氏阴性细菌进行培养计数,通过两者的差异,可判断食品是否经过辐照。若两个数值的差异明显,表明样品可能接受过辐照。

16 试剂和材料

16.1 试剂

16.1.1 鲎试剂:灵敏度 0.5 EU/mL。

16.1.2 注射用无热源生理盐水。

16.2 材料

16.2.1 蛋白胨溶液(见 C.1)。

- 16.2.2 营养琼脂培养基(见 C.2)。
- 16.2.3 牛奶琼脂培养基(见 C.3.1)。
- 16.2.4 结晶紫溶液(见 C.3.2)。
- 16.2.5 青霉素溶液(见 C.3.3)。
- 16.2.6 革兰氏阴性细菌选择性培养基(见 C.3.4)。

16.3 标准品

内毒素标准样品(CAS 号 1235503):50 EU/管,纯度 $\geqslant 99\%$ 。

16.4 标准溶液配制

内毒素标准液:取内毒素标准样品,加入 1 mL 无热源生理盐水,溶解为 50 EU/mL 的标准溶液。

17 仪器和设备

- 17.1 可调温水浴锅。
- 17.2 高压灭菌锅。
- 17.3 电子天平:感量 0.1 g。
- 17.4 恒温干燥箱。
- 17.5 涡旋振荡器。
- 17.6 电热恒温培养箱。
- 17.7 均质器:8 000 r/min~10 000 r/min。

18 分析步骤

注:样品应在 4 ℃保存,24 h 内检验。如不能立即检验,应置于 -20 ℃保存,最长保存时间不超过 30 d。

18.1 制样

无菌条件下,在样品的不同部位取样,共取 10 g。将样品置于无菌塑料容器中,用一次性针筒加入 90 mL 无热源生理盐水。8 000 r/min 均质 1 min~2 min,制成浓度为 10^{-1} 的样品溶液,4 ℃保存备用,最长保存时间不超过 24 h。

18.2 革兰氏阴性细菌培养计数

18.2.1 培养基制备

制备蛋白胨溶液、营养琼脂培养基、革兰氏阴性菌选择性培养基(见附录 C),倾注平板前将融化的培养基于 45 ℃ ± 1 ℃水浴保温。

18.2.2 稀释和培养

18.2.2.1 根据样品污染情况,对样品溶液(10^{-1})作进一步的稀释,用蛋白胨溶液对样品稀释液按照 9 mL 比 1 mL 的体积比进行 10 倍梯度稀释,得到浓度为 $10^{-2} \sim 10^{-5}$ 的样品稀释液。

18.2.2.2 将 0.1 mL 不同稀释度的样品稀释液涂布在琼脂营养板上,室温下,正面向上静置 90 min。每个稀释度做 2 个平板。

18.2.2.3 每个平板覆盖 10 mL 革兰氏阴性菌选择性培养基。水平放置,使琼脂凝固。倒置平板于

21 °C±1 °C培养箱中培养 24 h±1 h。

18.2.2.4 选择菌落数为 15~300 的 2 个连续稀释度平板计数(见表 D.1 的例 1)。每克样品中的革兰氏阴性菌数按式(1)计算:

式中：

N ——每克样品中革兰氏阴性细菌数,单位为菌落形成单位每克(CFU/g);

Σc ——长有 15 个~300 个菌落的 2 个连续稀释度平板的菌落之和；

V ——每个平板接种的菌液体积,单位为毫升(mL);

n_1 ——第一个稀释度的计数平板数;

n_2 ——第三个稀释度的计数平板数;

d ——计数有效平板的第一个稀释度。

若只有一个稀释度的平板长有 15 个~300 个菌落时,则 n_2 计为 0(见表 D.1 的例 2)。

若所有稀释度的平板菌落数均小于 15 时，则以菌落数最多的平板的菌落数作为 N 值的估计值（见表 D.1 的例 3）。

若所有稀释度的平板菌落均未长菌时,结果表示为未检测到革兰氏阴性菌,N值计为0(见表D.1例4)。

18.3 内毒素检测

18.3.1 蓖试剂检测

18.3.1.1 萘试剂溶解与分装

按试剂标示量，加入无热源生理盐水溶解，混匀，以每支 0.1 mL 分装于安培瓶内。

18.3.1.2 样品稀释

使用 96 孔板稀释样品。每一个样品稀释孔中加入 $650 \mu\text{L}$ 无热源生理盐水。取 $300 \mu\text{L}$ 样品溶液加入到第一个样品稀释孔中，混合均匀，得到 $10^{-0.5}$ 样品稀释液。将 $300 \mu\text{L} 10^{-0.5}$ 样品稀释液加入到第二个样品稀释孔中，得到 10^{-1} 样品稀释液。再将 $300 \mu\text{L} 10^{-1}$ 样品稀释液加入到第三个样品稀释孔中，得到 $10^{-1.5}$ 样品稀释液。继续稀释，直到最后一个稀释倍数的样品内毒素检测为阴性（见图 D.3）。最终的稀释倍数视样品情况而定。

18.3.1.3 内毒素标准品溶液稀释

将配制好的内毒素标准液按照 18.3.2.2 中的样品稀释法进行不同倍数的稀释。

18.3.1.4 鲨试剂检测

反应在 96 孔板中进行。以内毒素标准品溶液作为阳性对照，无热源生理盐水作为阴性对照。每个反应孔中加入 0.1 mL 稀释样品和 0.1 mL 酶试剂，混匀。盖上 96 孔板盖子，置于 37 °C ± 0.5 °C 水浴中反应 1 h。

18.3.2 结果计数

当试剂发生完全凝集时记为“+”，部分凝集时记为“+/-”，未凝集时记为“-”。

18.3.3 内毒素定量

根据不同稀释倍数内毒素标准品溶液的检测情况确定检测鲎试剂的灵敏度。以发生凝固的最后一

个样品稀释溶液的滴度用于计算,如果完全凝固时,以实际滴度用于计算(见表 D.2 中例 1),如果为部分凝固“+/-”时,则以该倍数的指数减去 0.25 后作为滴度值用于计算(见表 D.2 中例 2)。每克样品中内毒素含量按式(2)计算:

式中：

LAL ——每克样品中内毒素含量,单位为内毒素单位每克(EU/g);

c ——标准品中内毒素含量,单位为内毒素单位每毫升(EU/mL);

t ——样品的滴度值；

T ——标准品稀释倍数。

19 分析结果的表述

19.1 结果分析

19.1.1 计算 $\lg LAL$ 、 $\lg N$ 和 $\lg LAL - \lg N$ 值。

19.1.2 $\lg LAL - \lg N > 0$ 时, 表示样品经检测含有较高的内毒素含量, 但经培养的革兰氏阴性菌数目较少或者未检测出有可培养的革兰氏阴性菌。

19.1.3 $\lg LAL - \lg N$ 值 ≤ 0 , 表示样品经检测含有较高的内毒素含量,且培养的革兰氏阴性菌数目较多。

19.1.4 $\lg LAL < 2$ 表示样品中内毒素含量较低。

19.1.5 $\lg N < 2$ 表示培养的革兰氏阴性菌数目较少。

19.2 判定结果

19.2.1 $\lg LAL - \lg N > 0$ 时, 判定该样品可能经过辐照处理。

19.2.2 $\lg LAL - \lg N$ 值 ≤ 0 , 判定该样品未经过辐照处理。

19.2.3 $\lg LAL < 2$ 且 $\lg N < 2$ 时, 不适用 19.2.1 和 19.2.2 判定条件, 不可判定样品是否经过辐照处理。

附录 A

试剂配制方法

A.1 盐酸(1 mol/L)

量取 90 mL 盐酸,加适量水稀释到 1 000 mL。

A.2 PBS 缓冲液(pH7.4)

称取 8.0 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾、2.94 g 十二水合磷酸氢二钠、0.24 g 磷酸二氢钾溶于 900 mL 水中,混合均匀,用盐酸(A.1)调 pH=7.4,然后定容到 1 000 mL,高压灭菌后备用。

A.3 涂层琼脂糖溶液(0.5%)

10 mL 蒸馏水中加入 50 mg 琼脂糖,加热或微波煮沸,45 ℃水浴待用。

A.4 包埋凝胶溶液(0.8%)

10 mL PBS(A.2)中加入 80 mg 低熔点琼脂糖,加热或微波煮沸,45 ℃水浴待用。

A.5 氢氧化钠溶液(40%)

称取 40 g 氢氧化钠,溶于 60 mL 水中。

A.6 EDTA 储存液(0.5 mol/L)

称取 93.05 g 乙二胺四乙酸二钠溶于 300 mL 水中,混合均匀,用氢氧化钠溶液(A.5)调 pH=8.0,然后定容至 500 mL,高压灭菌后备用。

A.7 TBE 贮存液

称取 54 g Tris 和 27.5 g 硼酸溶于 20 mL EDTA 贮存液(A.6),用水稀释至 1 000 mL。该 TBE 贮存液置于玻璃瓶中,室温保存。使用时若有沉淀,应重新配置。

A.8 电泳缓冲液

准确量取 10 mL TBE 贮存液(A.7)和 90 mL 水,调 pH=8.4,混合后备用。

A.9 裂解缓冲液

称取 25 g 十二烷基磺酸钠用电泳缓冲液稀释至 1 000 mL,混匀后备用。

A.10 荧光染色试剂

A.10.1 吖啶橙贮存液

称取 100 mg 吖啶橙溶于 100 mL 水中,4 ℃~6 ℃避光保存。

A.10.2 吖啶橙染色液

量取 0.5 mL 吖啶橙贮存液(A.10.1),用 PBS 缓冲液(A.2)稀释至 100 mL,4 ℃~6 ℃可保存 1 周。

A.10.3 碘化毗啶贮存液

称取 100 mg 碘化毗啶溶于 100 mL 水中,4 ℃~6 ℃避光保存。

A.10.4 碘化毗啶染色液

量取 1 mL~5 mL 碘化毗啶贮存液(A.10.3),用 PBS 缓冲液(A.2)稀释至 100 mL,混匀后备用。

A.10.5 溴化乙锭贮存液

称取 1 g 溴化乙锭溶于 100 mL 水中,转移至棕色瓶或铝箔包裹容器中,室温避光保存。

A.10.6 溴化乙锭染色液

量取 2 mL 溴化乙锭贮存液(A.10.5),用水稀释至 100 mL,混匀后备用。

A.11 银染试剂

A.11.1 混合液 A

准确称取 150 g 三氯乙酸,50 g 硫酸锌,50 g 甘油,用水溶解并稀释到 1 000 mL,混匀后备用。

A.11.2 染色液 B

准确称取 12.5 g 碳酸钠,用水溶解并稀释至 250 mL,混匀后备用。

A.11.3 染色液 C

准确称取 100 mg 硝酸铵,100 mg 硝酸银,500 mg 钨硅酸溶于水,加入 250 μL 甲醛(37%),水用稀释至 500 mL,混匀后备用。

A.11.4 染色液 D

准确量取 68 mL 染色液 C 加入到 32 mL 染色液 B 中,加液同时要不断用力搅拌混合液。染色液 D 应现用现配。

A.11.5 停止液 E

准确量取 10 mL 冰乙酸,加水稀释至 1 000 mL。

附录 B
DNA 莘星试验图谱

B.1 辐照动物组织细胞电泳图

辐照动物组织细胞电泳图见图 B.1, 图片拍摄条件为: 辐照剂量 5 kGy, 溴化乙锭染色, 放大倍数 150 倍。

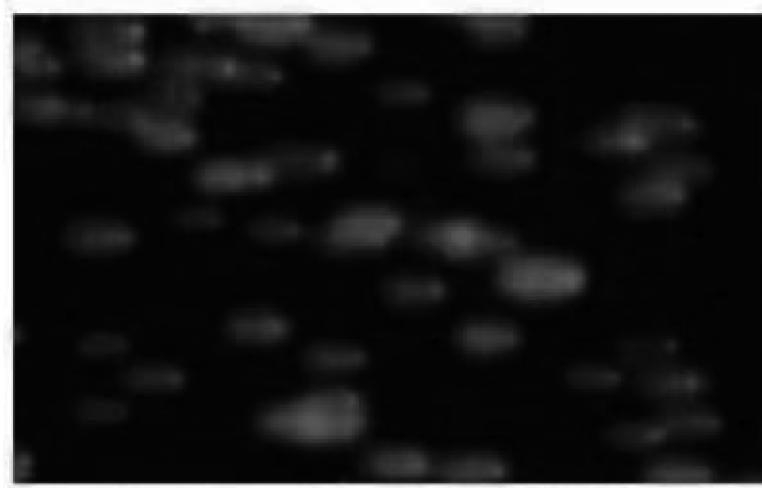


图 B.1 辐照动物组织细胞电泳图

B.2 辐照植物组织细胞电泳图

辐照植物组织细胞电泳图见图 B.2, 图片拍摄条件为: 辐照剂量 5 kGy, 溴化乙锭染色, 放大倍数 200 倍。



图 B.2 辐照植物组织细胞电泳图

B.3 未辐照动物组织细胞电泳图

未辐照动物组织细胞电泳图见图 B.3, 图片拍摄条件为: 辐照剂量 0 kGy, 溴化乙锭染色, 放大倍数 200 倍。

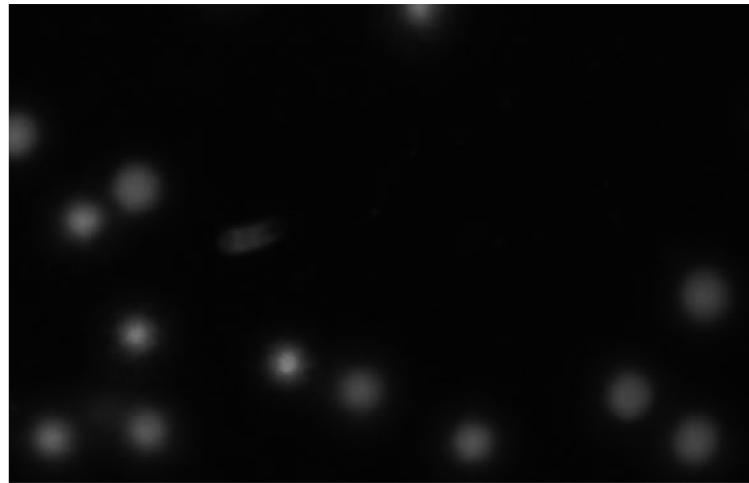


图 B.3 未辐照动物组织细胞电泳图

B.4 未辐照植物组织细胞电泳图

未辐照植物组织细胞电泳图见图 B.4, 图片拍摄条件为: 辐照剂量 0 kGy, 溴化乙锭染色, 放大倍数 200 倍。

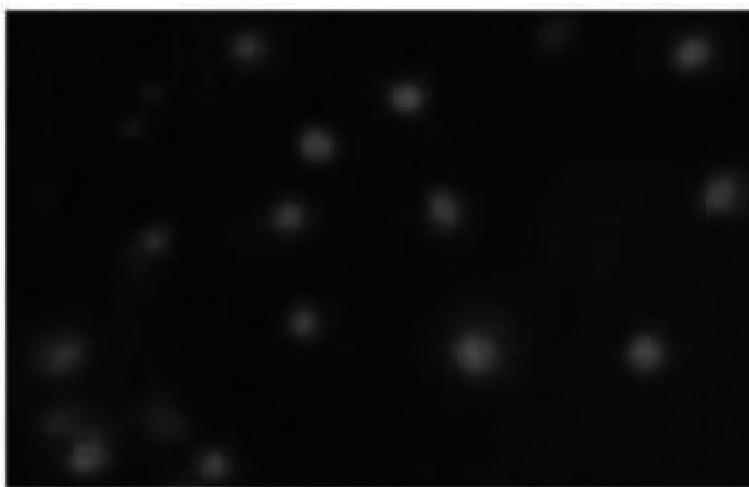


图 B.4 未辐照植物组织细胞电泳图

附录 C
培养基试剂

C.1 蛋白胨溶液**C.1.1 成分**

- C.1.1.1 氯化钠 8.5 g。
- C.1.1.2 酪蛋白酶 1.0 g。
- C.1.1.3 去离子水 1 000 mL。

C.1.2 制法

将上述各成分混匀,不断加热搅拌溶解,调 pH 为 7.0 ± 0.2 ,分装试管,高压灭菌 $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,
15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用,可储藏 14 d。

C.2 营养琼脂培养基**C.2.1 成分**

- C.2.1.1 氯化钠 5.0 g。
- C.2.1.2 酪蛋白酶 5.0 g。
- C.2.1.3 牛肉膏 1.0 g。
- C.2.1.4 酵母提取物 2.0 g。
- C.2.1.5 琼脂 $9.0\text{ g} \sim 18.0\text{ g}$ (根据琼脂的凝胶性能决定)。
- C.2.1.6 去离子水 1 000 mL。

C.2.2 制法

将上述各成分加热煮沸溶解后,调 pH 为 7.4 ± 0.2 ,高压灭菌 $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$,15 min,冷却至 $45\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

C.3 革兰氏阴性菌选择性培养基**C.3.1 牛奶琼脂培养基****C.3.1.1 成分**

- C.3.1.1.1 酵母提取物 2.0 g。
- C.3.1.1.2 蛋白胨 5.0 g。
- C.3.1.1.3 奶粉 1.0 g。
- C.3.1.1.4 琼脂 15.0 g。
- C.3.1.1.5 乳酸链球菌肽(1.0×10^6 单位)1.6 mg。
- C.3.1.1.6 水 997 mL。

C.3.1.2 制法

将上述各成分加热煮沸溶解后,调 pH 为 7.4 ± 0.2 , 高压灭菌 $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min, 冷却至 $45\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

C.3.2 结晶紫溶液

C.3.2.1 成分

C.3.2.1.1 结晶紫 10.0 mg。

C.3.2.1.2 水 10.0 mL。

C.3.2.2 制法

溶液用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后备用, $4\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 可储存 14 d。

C.3.3 青霉素溶液

C.3.3.1 成分

C.3.3.1.1 青霉素-G(80 万单位)2.5 mg。

C.3.3.1.2 水 10.0 mL。

C.3.3.2 制法

溶液用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后备用, $4\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 可储存 1 d。

C.3.4 革兰氏阴性菌选择性培养基

C.3.4.1 成分

C.3.4.1.1 青霉素溶液 1.2 mL。

C.3.4.1.2 结晶紫溶液 2.0 mL。

C.3.4.1.3 牛奶琼脂培养基 997 mL。

C.3.4.2 制法

高压灭菌的牛奶琼脂培养基, 熔化后冷却至 $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后加入青霉素溶液和结晶紫溶液, 充分混匀后倾注平板。

附录 D
革兰氏阴性菌菌落数和内毒素滴度计算示例表

D.1 革兰氏阴性菌菌落数计算示例表

革兰氏阴性菌菌落数计算示例见表 D.1。

表 D.1 革兰氏阴性菌菌落数计算示例

例次	稀释液浓度及菌落数								计算方式
	10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		
1	>300	>300	>300	>300	256	236	16	18	$N = \frac{256 + 236 + 16 + 18}{0.1 \times (2 + 0.2) \times 10^{-3}}$
2	78	53	6	2	2	1	0	1	$N = \frac{78 + 53}{0.1 \times 2 \times 10^{-1}}$
3	4	5	2	3	0	0	0	0	$N = 5$
4	0	0	0	0	0	0	0	0	$N = 0$

注：N——每克样品中革兰氏阴性细菌数，单位为 CFU/g。

D.2 内毒素滴度计算示例表

内毒素滴度计算示例见表 D.2。

表 D.2 内毒素滴度计算示例

例次	稀释度及内毒素反应情况						滴度
	10 ^{-0.5}	10 ^{-1.0}	10 ^{-1.5}	10 ^{-2.0}	10 ^{-2.5}	10 ^{-3.0}	
1	+	+	+	+	-	-	2.0
2	+	+	+	+/-	-	-	1.75

注：“+”代表试剂完全凝集，“-”代表试剂未凝集，“+/-”代表试剂部分凝集。

D.3 96 孔板稀释样品溶液示意图

96 孔板稀释样品溶液操作步骤见图 D.1。

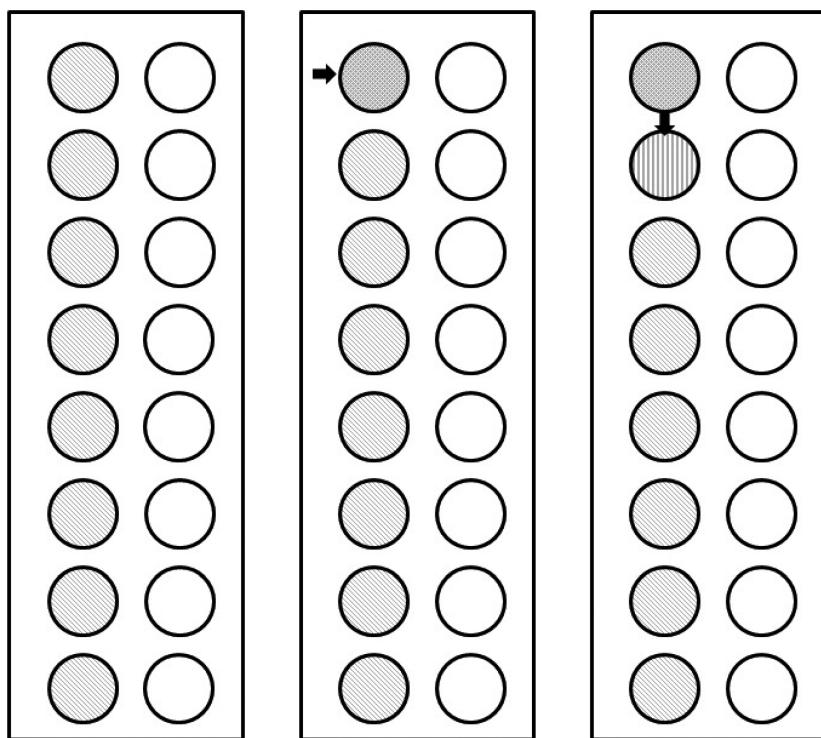


图 D.1 96 孔板稀释样品溶液示意图

注：第 1 步，在每一个样品稀释孔中加入 $650 \mu\text{L}$ 无热源生理盐水。第 2 步，在第一个稀释孔中加入 $300 \mu\text{L}$ 样品溶液，混匀。第 3 步，将第一个稀释孔中的测试液 $300 \mu\text{L}$ 加入到第二个稀释孔中，混匀。第 4 步，重复第 2 步、3 步，直到样品稀释到合适的倍数。
