

3M 大肠杆菌0157操作手册



3M

长沙湘安环保科技有限公司 www.xianganse.com

电话：0731-88125198 传真：0731-88125580 QQ 1640035860

3M

3M™ Tecra™大肠杆菌0157微孔板法使用说明书

目录

1. 操作示意图	2
2. 注意事项	3
3. 增菌方法	4
4. 免疫试剂制备	5
5. 微孔板试剂盒的操作	5
6. 附录1 实验材料	8
7. 附录2 培养基的配制	9
8. 附录3 3M Tecra大肠杆菌0157微孔板法检测流程图	10
9. 附录4 行标SN/T 0973-2000 进出口肉和肉制品中大肠杆菌0157:H7的检验流程图	11
10. 附录5 国标GB4789.6-2003 大肠埃希氏菌检验流程图(含大肠埃希氏菌0157验证部分)	12
11. 附录6 比色对照卡	13
12. 附录7 中文标签(样本)与试剂配对表	13

大肠杆菌O157检测

AOAC 方法 RI001101

3M™ Tecra™ 大肠杆菌O157微孔板法是一种检测食品中大肠杆菌O157的快速、特异的筛选方法。该方法的灵敏度为1cfu/25g。

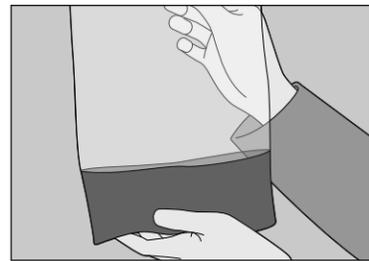
推测性的阳性结果应使用您认可的或当地标准规定的方法来验证。

3M微生物产品获得ISO9001:2000标准认可。

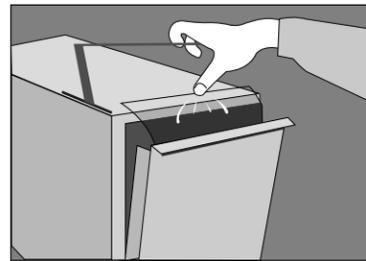
1. 操作示意图

示意图仅列出了主要的操作步骤，详细的操作内容请参照后面的具体描述。操作流程图解请详见附录3。

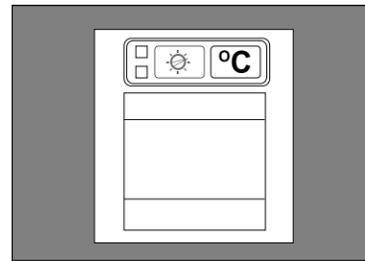
1.1 增菌和热处理



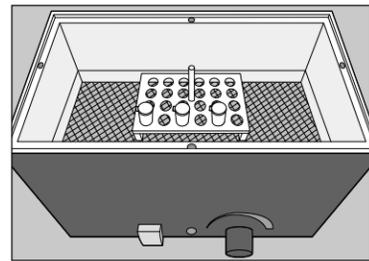
1. 取25g样品加入盛有225mL增菌溶液的无菌容器内。



2. 充分均质样品。



3. 将均质好的样品匀液于42°C培养18h-24h。



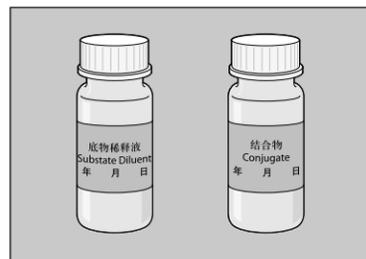
4. 吸取50μL样品添加剂和1mL增菌液到小试管中。于100°C水浴中加热15min。取出后冷却至室温。



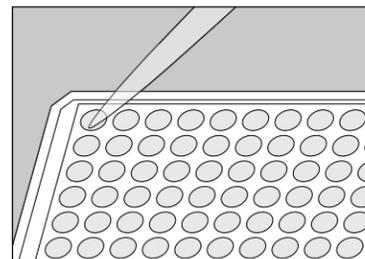
1.2 微孔板试剂盒的操作



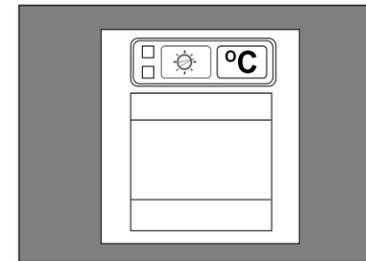
5. 使用前将2-8°C下保存的试剂盒回复到室温。



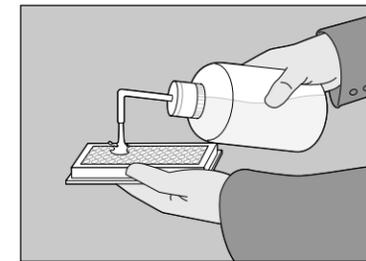
6. 将标签纸贴于各试剂瓶上。



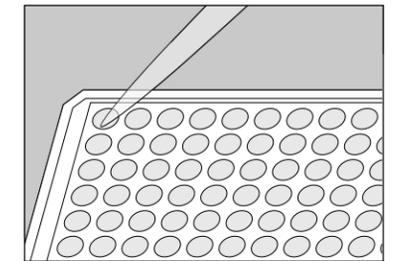
7. 分别吸取200μL的阳性对照液，阴性对照液以及加热处理过的增菌液到不同的微孔内。



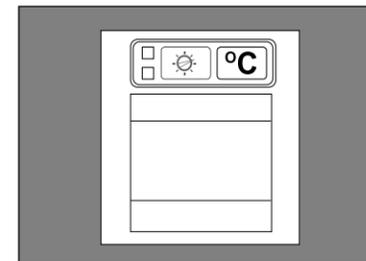
8. 封好微孔后，将微孔板置入培养箱内36±1°C孵育30min。



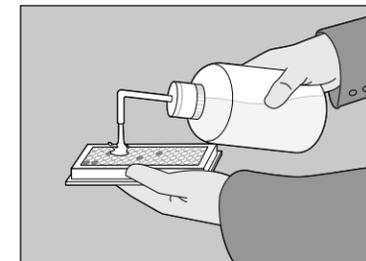
9. 取出微孔板，冲洗微孔3次。



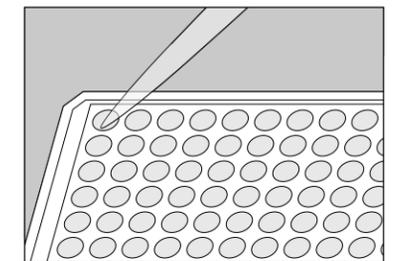
10. 各添加200μL结合物到每个微孔内。



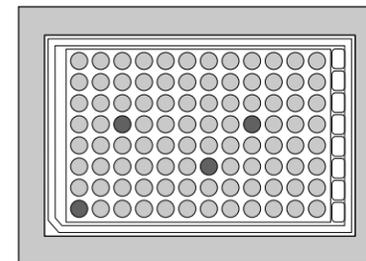
11. 封好微孔后，将微孔板置入培养箱内36±1°C孵育30min。



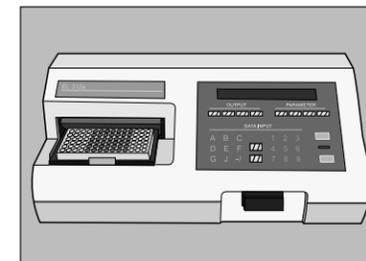
12. 取出微孔板，冲洗微孔4次。



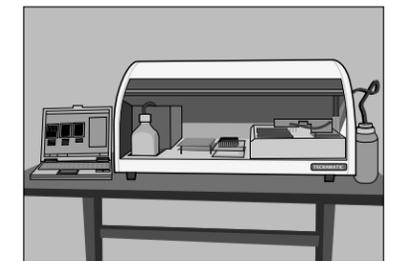
13. 各添加200μL底物到每个微孔内。



14. 于室温下放置15min后，即可参照比色卡用肉眼判读颜色。(比色卡见附录6)



15. 于室温下放置15min后，也可以用酶标仪来进行判定结果。但酶标仪的使用仅为可选，并非必须。



16. 使用Tecra™致病菌全自动检测仪可以自动完成上述微孔板试剂盒手工操作中的所有步骤。具体操作请参考其说明书。

2. 注意事项

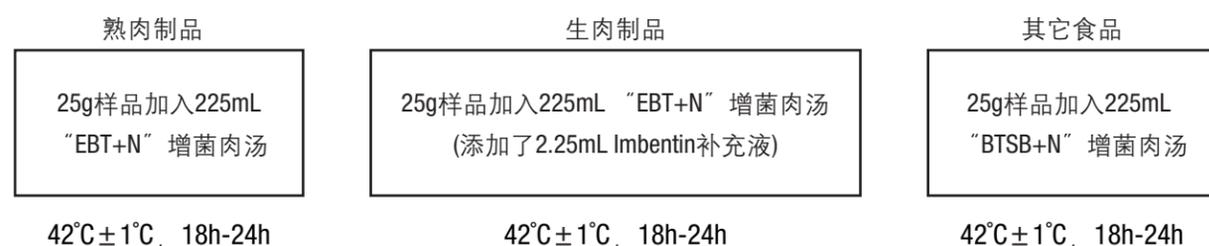
- 实验材料请参见附录1；
- 所有试剂必须仔细配制，培养基的配制请参见附录2；
- 有两套结合物和结合物稀释液。请在第一套结合物使用完毕后再开启第二套结合物，因为结合物一旦溶解后需在1个月内用完；
- 除结合物外的试剂配制好后，请在2个月内用完；

- 试剂盒于**2-8°C**保存，不能冷冻；不用时，所有试剂包括洗液于2-8°C保存；
- 试剂盒内各组分是整体使用的，阳性对照，结合物和包被的微孔的批号需相同；
- 每次试验必须做阳性和阴性对照；
- 未使用的微孔必须始终保存在铝箔袋中，并密封好；
- 每个包装外面都标有批号和失效期；
- “用户责任”请参见试剂盒内的说明书。

3. 增菌方法

样品增菌时，所有增菌液使用前必须预热到培养温度后再使用。

不同食品的增菌流程如下。如果您对增菌程序的选择有任何疑问，请联系3M微生物代表。



说明：

1. “EBT+N” 为3M™ Tecra™ 改良EC肉汤加20mg/L的新生霉素；“BTSB+N” 为胰蛋白胍大豆肉汤(TSB)加1.5g/L磷酸氢二钾和20mg/L新生霉素。配制方法详见附录2。
2. 与 Tecra™ 试剂盒配套用的3M™ Tecra 改良 EC肉汤的配方和多数EC肉汤不同，它不含有胆盐。
3. 均质生肉样品时，建议使用过滤式均质袋。因为这样可以有效去除样品匀液中固体颗粒的影响。

4. 免疫试剂制备

为避免试剂交叉污染，不要将试剂瓶盖换错。溶解试剂时，轻轻颠倒混匀，使试剂在20-25°C下充分溶解。不要剧烈摇晃内容物。在每个试剂瓶上记录溶解日期(和新的失效期)。结合物溶解后需在1个月内用完，其它试剂必须在2个月内用完。

为了防止取错试剂瓶，请在使用前，将不同颜色的标签纸贴于试剂瓶上。标签纸样本请见附录7。试剂瓶标签纸的供应请联系您就近的3M销售代表或经销商。

4.1 浓缩洗液(Wash Concentrate) # 1

用去离子水或蒸馏水将洗液浓缩液稀释到2L。如果水容易污染，则建议使用无菌水。

4.2 阳性对照液(Positive Control)

一步移取3mL阴性对照液至阳性对照瓶内。

4.3 结合物(Conjugate)

将结合物稀释液全部倒入结合物瓶中。每个试剂盒内有两套结合物和结合物稀释液。先溶解1套，1个月后丢弃，然后再溶解第二套。

4.4 底物(Substrate)

将底物稀释液加入底物瓶中。

4.5 终止液(Stop Solution)、样品添加剂(Sample Additive) # 4和阴性对照液(Negative Control)

上述试剂可直接使用。

5. 微孔板试剂盒的操作

确保使用前试剂盒内所有试剂处于室温(20-25°C)。

5.1 样品热处理

首先添加50μL的样品添加剂到合适的试管中(如离心管或3M™ Tecra™ 试管)，然后再加入1mL增菌液到同一试管内，充分混合。按下面条件热处理。

在沸水浴中将试管加热15min。也可以将试管置于灭菌锅内用流动蒸汽100°C加热15min(不要对试管施加压力)，最后将试管冷却到室温。

冷藏未热处理的增菌溶液，以备微孔板法阳性样品的验证。

5.2 配置微孔

打开包装，取下所需数量的微孔，一个微孔检测一个样品，1个微孔用于阳性对照，1个用于阴性对照。将微孔用力压入孔板槽内。将未用的微孔放回铝箔包装内，密封好。

5.3 添加样品和样品培养

吸取每个样品时换用一个新的移液器吸头，每个微孔加入200μL的阳性/阴性对照液或200μL热处理过的样品。覆盖微孔后，于36 ± 1°C孵育30min。

5.4 第一次冲洗

快速翻转孔板，将微孔中的溶液倒入废液容器中。将孔板面朝一叠吸水纸用力敲击几次，以去除剩余液体。这样能有效去除残留样液。用宽喷嘴洗瓶将洗液充满每个微孔，注意不要将气泡滞留于微孔底部。窄喷嘴洗瓶容易产生较多的气泡。

按照上述程序冲洗并完全清空微孔3次。

5.5 添加结合物

每个微孔加入200 μ L的结合物。覆盖微孔后，于 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 孵育30min。

5.6 第二次冲洗

按5.4步骤冲洗微孔4次。

5.7 添加底物

每个微孔加入200 μ L的底物。置于室温 $20\text{-}25^\circ\text{C}$ ，放置15min。不要将微孔板置于温度波动的场所(如空调正下方)。

5.8 检查阳性对照颜色

15min后，轻敲微孔板使微孔内的颜色均匀分布。阳性对照应当达到比色卡4号颜色(比色卡见附录6)或酶标仪读数至少为1.0(如图1中的1号曲线)。如果阳性对照没到比色卡4号颜色或酶标仪读数不到1.0时，需要延长显色时间(如图1中的2号曲线)。如果阳性对照孔颜色在30min(从底物加入开始算起)后仍然未达到比色卡4号颜色，本次检测结果无效。(如图1中的3号曲线)。

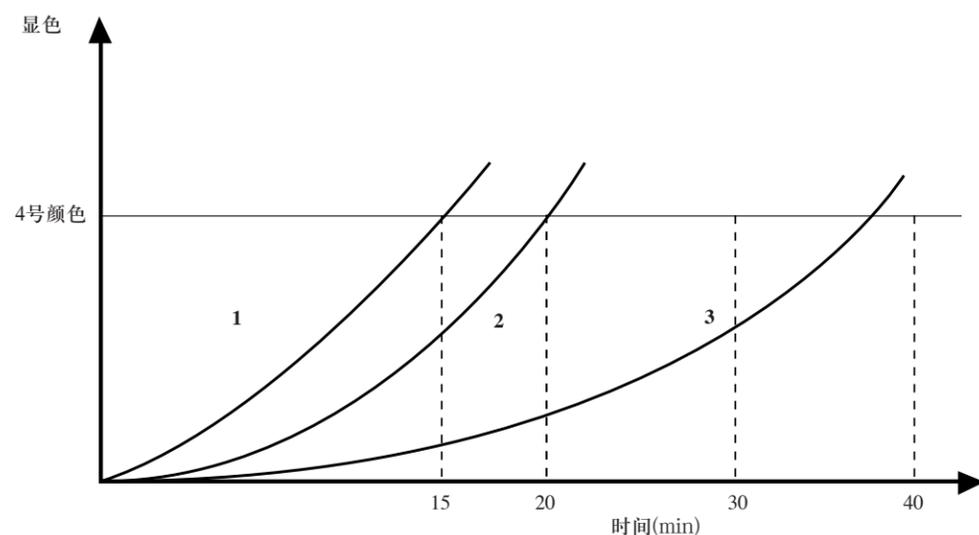


图1 加入底物后，阳性对照微孔颜色随时间变化曲线图

5.9 添加终止液(可选)

如果不能立即判读孔板时需添加。每个微孔添加20 μ L终止液。轻敲孔板边缘以混合内容物，然后在30min(从终止液加入开始算起)内判读结果。

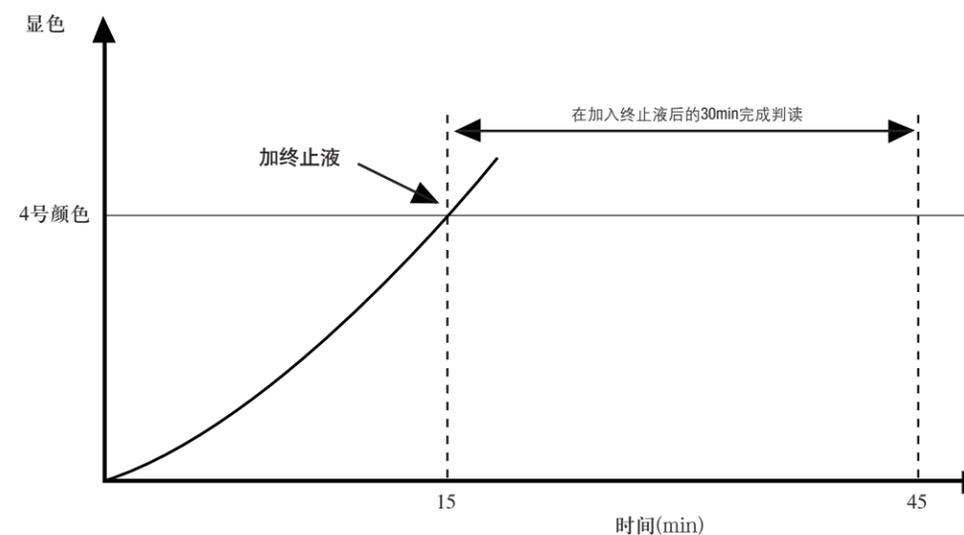


图2 加入终止液后的判读时间

5.10 判读结果

a. 使用比色卡使用2号比色卡来判读每个微孔的颜色。注意阳性对照必须至少达到比色卡4号颜色，并且阴性对照颜色必须浅于比色卡2号颜色，此时实验结果有效。判读时，需要将微孔置于白色背景上判读颜色。

b. 使用酶标仪

使用酶标仪在 $414 \pm 10\text{nm}$ 处读取样品的吸光值。如果使用单波长酶标仪，可以用盛有200 μ L水的微孔作为空白。如果使用双波长酶标仪，以空气作为空白，参比波长设为 $490 \pm 10\text{nm}$ 。吸光值大于等于0.2的样品为阳性。注意阳性对照的酶标仪读数至少达到1.0，并且阴性对照的酶标仪读数小于0.2，此时实验结果有效。

5.11 阳性结果的验证

微孔板法检测出阳性结果后，需要将增菌液划线于传统选择性平板上，然后按照行标、国标或其它标准方法进行后续生化和血清学等验证。行标和国标的流程图请参见附录4和5。

附录1 实验材料

1. 样品增菌所需材料

- 培养基
- 搅拌器或均质机
- 均质袋
- 培养箱：42±1°C
- 移液管(1mL)
- 过滤式均质袋

2. 免疫分析所需材料

- 培养箱：35-37°C
- 移液管(1mL)
- 塑料洗瓶(500mL)
- 能移取20μL, 200μL的移液器
- 移液器吸头
- 覆盖微孔的材料：可选用铝箔、塑料薄膜、塑料密封袋或微孔板专用密封膜
- 沸水浴锅或等效100°C的加热设备
- 适合于煮沸用的试管：如离心管或Tecra试管

3. 3M提供的材料

产品编号	产品描述	规格
IMBSUP50	Imbentin补充液	50mL
MECMED500	Tecra改良EC肉汤	500g
FSTBAG100	过滤式均质袋	100支
MEATPK20	生肉检测用套件	
	- 过滤式均质袋	20支
	- Imbentin补充液	50mL
Tecra试管组件		
CSNTTS960	试管盖	960个
TSNTTS960	试管(无盖)	960支
RSNTTS10	试管盒 (包含960个试管)	10 盒

“3M”和“Tecra”为3M公司的商标。

附录2 培养基的配制

1. 含新生霉素的改良EC肉汤培养基(EBT+N)的配制

可直接使用3M Tecra改良EC肉汤，或者按下面成分配制：

胰蛋白胨	20g
乳糖	5g
磷酸氢二钾	4g
磷酸二氢钾	1.5g
氯化钠	5g
蒸馏水	1L

检查pH在6.7-7.1。如有必要，用1M HCl或1M NaOH调节pH。然后高压灭菌121°C，15min。冷却到室温后添加5mL过滤灭菌好的新生霉素(4mg/mL，水溶液)到1L的培养基。新生霉素的终浓度为20mg/L。

新生霉素必须在培养基灭菌后添加。

2. Imbentin补充液的配制

试剂瓶中盛有50mL的Imbentin补充液：在沸水浴中加热或100°C蒸汽处理15min，过程中保持瓶口微微松开，试剂瓶直立。然后，取出试剂瓶，冷却到室温(20 - 25°C)。注意：Imbentin在受蒸汽处理后会分两层，等回复到室温后，盖紧瓶盖，翻转数次以使溶液混合。标上灭菌日期后，于10°C以上保存。使用时，按规定添加到增菌肉汤中。

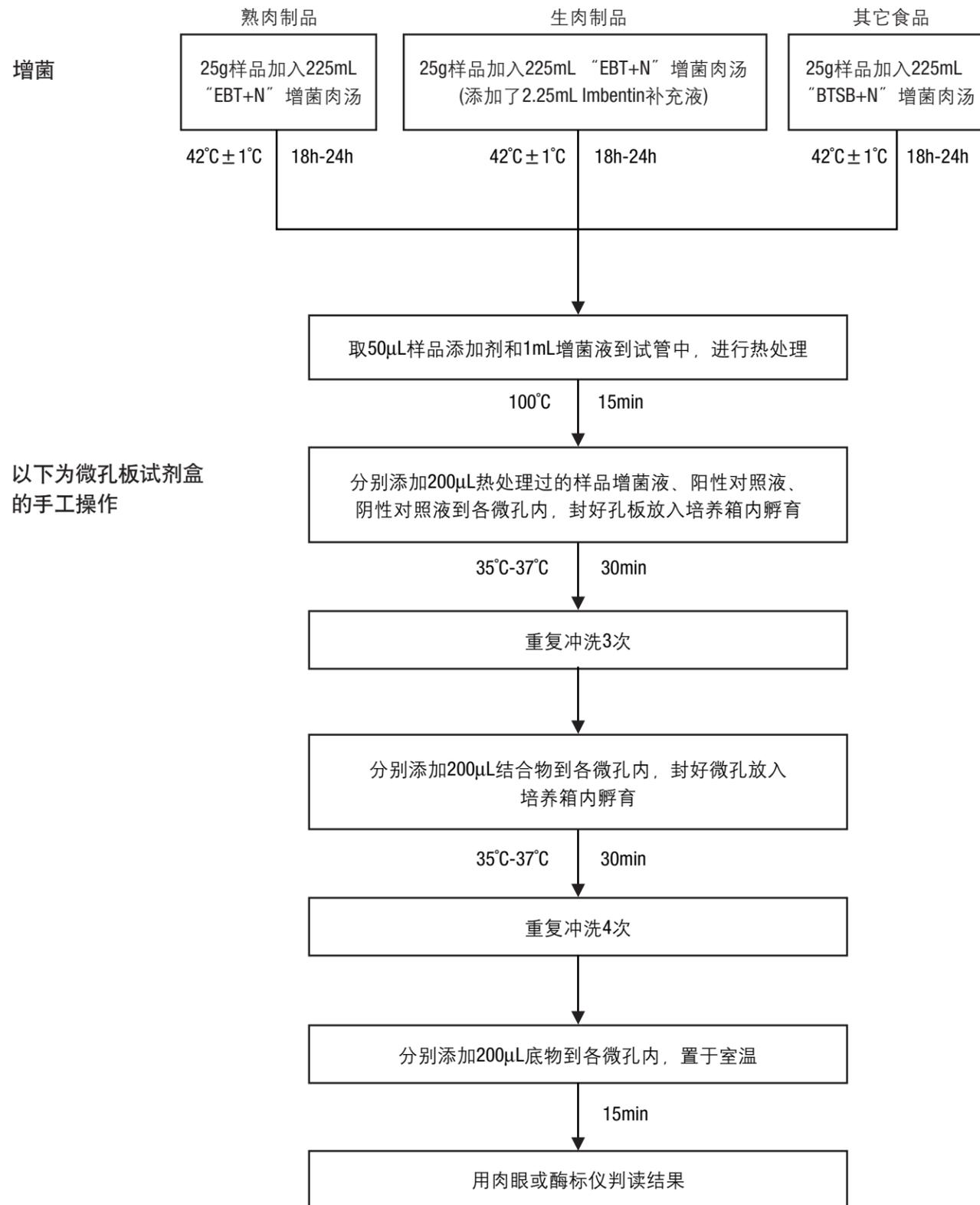
3. 含新生霉素的缓冲胰蛋白胨大豆肉汤(BTSB+N)的配制

胰蛋白胨	17g
大豆蛋白胨	3g
磷酸氢二钾	4g
氯化钠	5g
葡萄糖	2.5g
蒸馏水	1L
或	
胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)	30g
磷酸氢二钾	1.5g
蒸馏水	1L

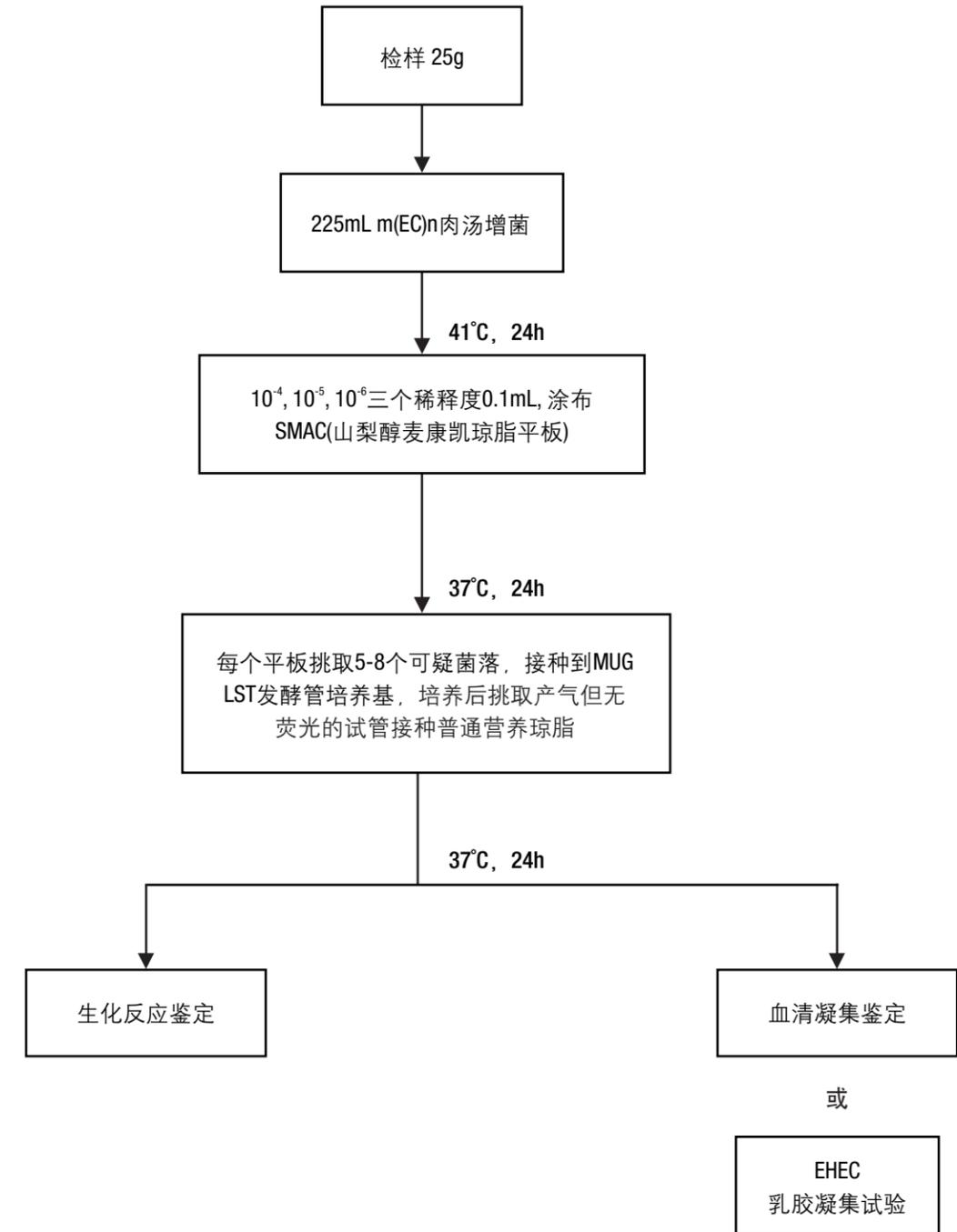
检查pH为7.2-7.6。如有必要，用1M HCl或1M NaOH调节pH。然后高压灭菌121°C，15min。冷却到室温后，添加5mL过滤灭菌好的新生霉素(4mg/mL，水溶液)到1L的培养基。新生霉素的终浓度为20mg/L。

新生霉素必须在培养基灭菌后添加。

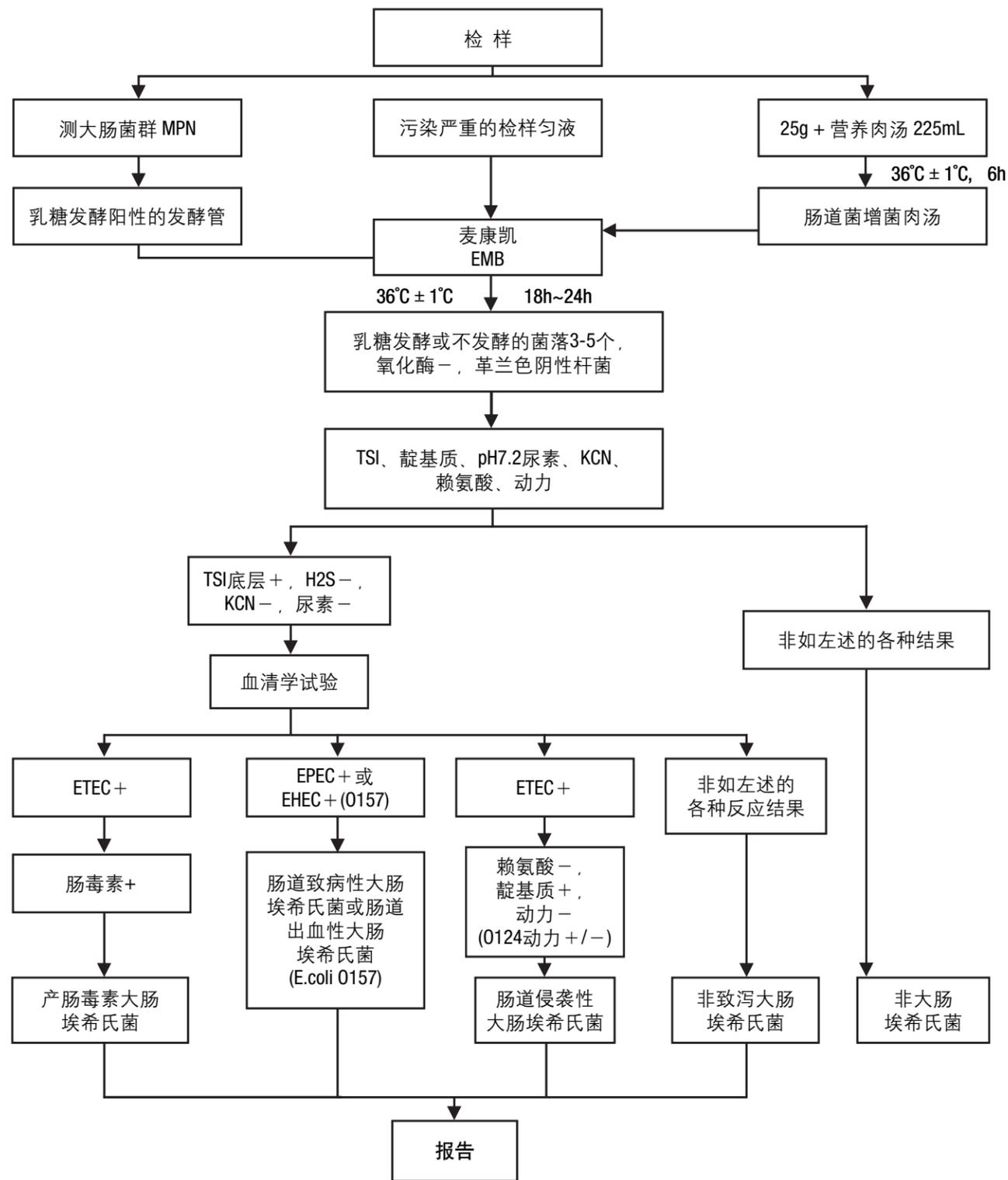
附录3 3M Tecra大肠杆菌O157微孔板法检测流程图



附录4 行标SN/T 0973-2000 进出口肉和肉制品中大肠杆菌O157:H7的检验流程图

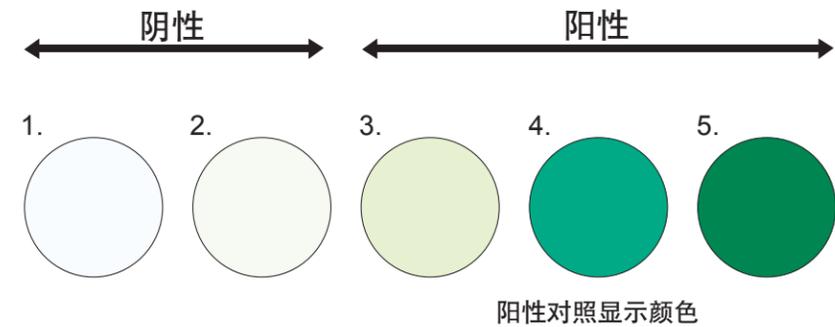


附录5 国标GB4789.6-2003 大肠埃希氏菌检验流程图 (含大肠埃希氏菌O157验证部分)



附录6 比色卡

2号比色卡：适用于除沙门氏菌外其他致病菌微孔板试剂盒



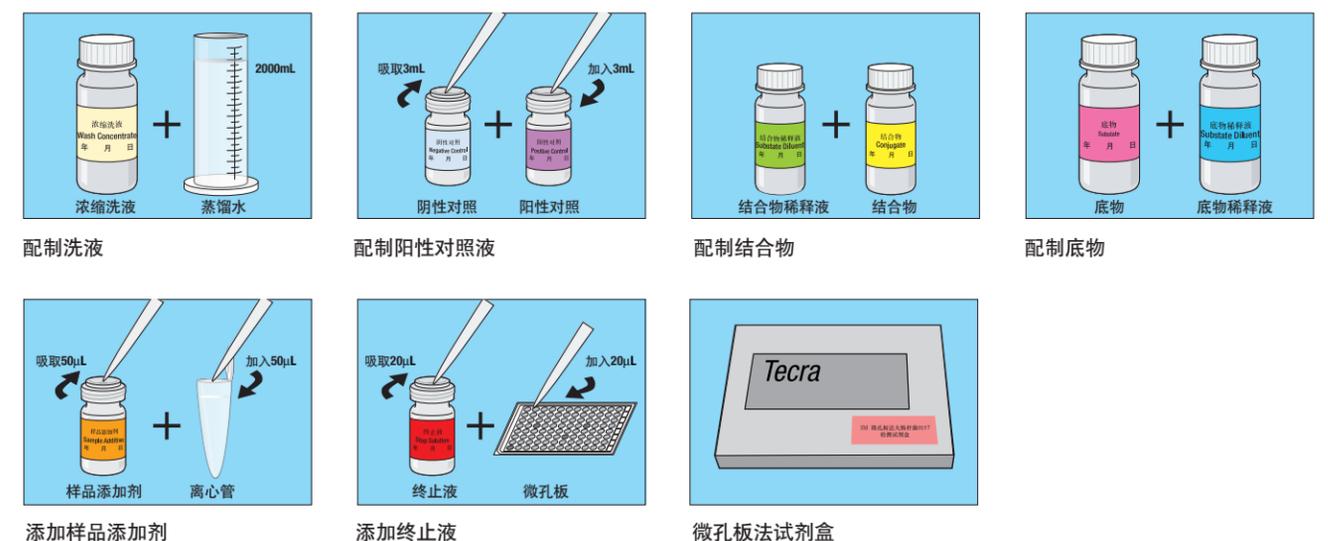
附录7 中文标签(样本)与试剂配对表

为了防止取错试剂瓶，请在使用前，将不同颜色的标签纸贴于试剂瓶上。配对方式请参照下图配对表，试剂瓶标签纸的供应请联系您就近的3M销售代表或经销商。

中文标签

浓缩洗液 Wash Concentrate 年 月 日	阳性对照 Positive Control 年 月 日	阴性对照 Negative Control 年 月 日	终止液 Stop Solution 年 月 日
结合物 Conjugate 年 月 日	结合物 Conjugate 年 月 日	结合物稀释液 Conjugate Diluent 年 月 日	结合物稀释液 Conjugate Diluent 年 月 日
底物 Substrate 年 月 日	底物稀释液 Substrate Diluent 年 月 日	样品添加剂 Sample Additive 年 月 日	3M 微孔板法大肠杆菌O157 检测试剂盒

试剂配对表



配制洗液 配制阳性对照 配制结合物 配制底物 添加样品添加剂 添加终止液 微孔板法试剂盒