###

发布

GB/T XXXXX—201X

中华人民共和国国家标准

ICS 07.080

A 21

工业微生物菌株质量评价 拉曼光谱法

**Evaluation of industrial microorganism strain——Raman spectroscopy**

（征求意见稿）



发布

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

201X-XX-XX 发布

201X-XX-XX实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

工业微生物菌株质量评价 拉曼光谱法

1 范围

本标准规定了工业微生物菌株质量评价拉曼光谱法的原理、试剂材料、仪器设备、操作步骤、结果分析。

本标准适用于工业微生物菌株的质量评价。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

利用高度汇聚的激光束，囚禁溶液中的活细胞，再通过瞬时加大囚禁细胞的光束激发细胞内分子的拉曼散射。

4 试剂材料

除特殊说明外，本标准所用试剂均为分析纯，水均为符合 GB/T 6682中规定的二级水。

4.1 基础培养基

按照GB/T 15818中方法配制。或选用商品化的预制干燥培养基，严格按照商品说明书加水配制。

5 仪器设备

5.1 单细胞拉曼光谱测试系统：532nm激光，输出强度不低于100mW，800mm长焦，600刻线光栅，100倍物镜，光谱分辨率不低于2cm-1，波数范围需包含“指纹区”，即390 cm-1～1800 cm-1。

5.2 离心机

5.3 无菌EP管：容量1.5毫升。

5.4 微量移液器及枪头：1毫升，200微升，10微升。

5.5 氟化钙载玻片：尺寸25.4mm\*76.2mm

6 操作步骤

6.1 细胞培养

取活化过的表型明确的菌株及待评价菌株，以相同的浓度一式三份接种至标准培养基中；在相同的培养条件下培养至相同的生长阶段。其中以表型明确的菌株作为对照组。

6.2 前处理

每个样本取1mL菌液，常温4500 rpm离心5 min，取到上清，收集菌体。然后加入1 mL符合 GB/T 6682要求的无菌双蒸水，用移液枪轻轻吹打重悬菌体，反复清洗3次后，再加如1mL 无菌双蒸水，重悬菌体。用无菌双蒸水将菌液稀释100倍。最后用移液枪吸取2 uL稀释过的菌液，点样在洁净的CaF2载玻片上，室温风干。

6.3 测量

提前半小时打开拉曼检测系统的532 nm激光器，设置输出功率为100 mW。

将硅片置于样品台，100倍物镜聚焦硅片表面，设置光栅为600格栅；调整光栅位置将圭峰调整至520.7cm-1。

将风干后的CaF2载玻片，置于显微拉曼光谱仪载物台上，100倍物镜找到细胞。

调整滤光片使照射于细胞上的激光光强约为25 mW，光谱采集时间为10 s，波数范围需包括“指纹区”即400 cm-1～1850 cm-1。

每个样本随机选取20个细胞采集其单细胞拉曼光谱数据，选取4个细胞旁边采集背景信号。

6.4 数据前处理

原始拉曼数据用软件进行处理，包括减背景、基线校正和基于面积的归一化处理。

采用平均值标准偏差（Standard Deviation of the Means，SDM）进行拉曼光谱质量检测，SDM值越小说明数据的可重复性越高，SDM需小于0.2；且以细胞数为横坐标，SDM值为纵坐标作图，曲线达到饱和，说明细胞数已足够，满足统计学分析基本要求。

7 结果分析

7.1 结果计算

样本间表型的相似程度按式（1）计算：

………………………………….（1）

式中：

*R*——相似程度；

Rb——组间差异均值；

Rw——组内差异均值；

N——组内样本个数。

7.2 结果分析

评价待选菌株与对照菌株相似性程度的R值，越小（最小为0）说明组间差异越小，即待评价组表型与对照组越接近，当R值小于0.1时，可认为待选株表型与对照组相似；R值越大（最大为1）说明待评价组表型与对照组差异越大，即待评价组表型与对照组越不接近。

7.3 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_