

ICS 07.100.30

B 20

备案号: 41839-2014

DB22

吉林省地方标准

DB 22/T 2051—2014

饲料中肉毒梭菌测定 PCR 方法

Determination of Clostridium botulinum in feedstuffs PCR method

2014 - 02 - 28 发布

2014 - 04 - 30 实施

吉林省质量技术监督局 发布

本标准仅供内部使用 不得翻印

本标准仅供内部使用 不得翻印

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009和GB/T 20001.4-2001给出的规则起草。

本标准由吉林省质量技术监督局提出并归口。

本标准主要起草单位：吉林省产品质量监督检验院、国家农业深加工产品质量监督检验中心、中华人民共和国吉林出入境检验检疫局、中华人民共和国顺德出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：史艳宇、刘金华、邵秋荣、刘斌、周亮、刘晓晖、王潇、任明月。

本标准仅供内部使用

不得翻印

不得翻印

本标准仅供内部使用 不得翻印

本标准仅供内部使用 不得翻印

饲料中肉毒梭菌测定 PCR 方法

1 范围

本标准规定了饲料中肉毒梭菌的PCR检验方法。
本标准适用于饲料中A、B、E、F型肉毒梭菌的快速筛选检测。

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 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

肉毒梭菌 *Clostridium botulinum*

肉毒梭菌为梭菌科梭菌属革兰氏阳性芽孢杆菌，厌氧，在适宜的培养基及特定的环境条件下产生一类具有很强毒性的神经麻痹毒素，即肉毒毒素。

4 原理

样品增菌后，培养物经DNA提取制备PCR模板，进行PCR扩增，琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物是否有特征条带，从而对饲料中是否污染肉毒梭菌进行快速检验。

5 试剂

除特别说明以外，所有试剂均为分析纯，水为按照GB/T 6682规定的一级水。所有试剂均用无DNA酶污染的容器分装。

5.1 引物：见表1。

表1 引物序列

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

- 5.2 疱肉培养基: 见附录 A.1 章。
- 5.3 胰蛋白胨葡萄糖酵母浸膏肉汤 (TPGY): 见附录 A.2 章。
- 5.4 厌氧卵黄琼脂: 见附录 A.3 章。
- 5.5 细菌基因组 DNA 提取纯化试剂盒。
- 5.6 *Taq* DNA 聚合酶。
- 5.7 dNTP: dATP (deoxyadenosine triphosphate, 脱氧腺苷三磷酸)、dGTP (deoxyguanosine triphosphate, 脱氧鸟苷三磷酸)、dCTP (deoxycytidine triphosphate, 脱氧胞苷三磷酸)、dTTP (deoxythymidine triphosphate, 脱氧胸苷三磷酸)。
- 5.8 溶菌酶。
- 5.9 蛋白酶 K。
- 5.10 无水乙醇。
- 5.11 十二烷基硫酸钠 (SDS)。
- 5.12 蔗糖。
- 5.13 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)。
- 5.14 乙二胺四乙酸二钠盐 (EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- 5.15 10×PCR 缓冲液: 含 200 mmol/L Tris-HCl (pH8.4), 200 mmol/L 氯化钾 (KCl), 15 mmol/L 氯化镁 (MgCl_2)。
- 5.16 分子量标记: 100 bp~3 000 bp DNA Marker。
- 5.17 琼脂糖: 电泳级。
- 5.18 溴化乙锭。
- 5.19 EDTA 溶液, 0.5 mol/L, pH8.0: 称取 186.1 g EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 加入 700 mL 去离子水中, 在磁力搅拌器上剧烈搅拌, 用 10 mol/L 氢氧化钠调 pH 值至 8.0, 用水定容到 1 L, 分装后高压灭菌。
- 5.20 Tris-HCl, 1 mol/L, pH8.0: 在 800 mL 去离子水中溶解 121.1 g Tris, 冷却至室温后用浓盐酸调节溶液的 pH 值至 8.0, 加水定容至 1 L, 分装后高压灭菌。
- 5.21 TE 缓冲液 (pH8.0): 在 800 mL 水中, 依次加入 10 mL 的 1 mol/L Tris-HCl (pH8.0) 和 2 mL 的 0.5 mol/L EDTA (pH8.0), 用水定容到 1 L, 分装后高压灭菌。
- 5.22 溶菌酶溶液: 用 TE 配制, 使用浓度为 10 mg/mL。
- 5.23 蛋白酶 K 溶液: 用高压灭菌的去离子水溶解蛋白酶 K 为 10 mg/mL 的溶液, 分装后于 -20 °C 保存, 避免反复冻融。
- 5.24 20% SDS 溶液: 将 20 g SDS 溶解在 100 mL 去离子水中。

- 5.25 50×TAE 电泳缓冲液(储备液):称取 484 g Tris,量取 114.2 mL 冰醋酸,200 mL 0.5 mol/L EDTA 溶液(pH8.0),溶于水中,定容至 2 L。分装后高压灭菌备用。使用前稀释成 1×TAE 电泳缓冲液(工作液)。
- 5.26 加样缓冲液:称取溴酚蓝 250 mg,加水 10 mL,在室温下过夜溶解;再称取二甲胂蓝 250 mg,用 10 mL 水溶解;称取蔗糖 50 g,用 30 mL 水溶解,合并三种溶液,用水定容至 100 mL,在 4 °C 保存。
- 5.27 阳性对照:含有扩增片段的质粒或 A、B、E、F 型肉毒梭菌的基因组 DNA。

6 仪器和设备

- 6.1 厌氧培养装置。
- 6.2 生物安全柜: AII 型。
- 6.3 恒温培养箱: 35 °C±1 °C 和 28 °C±1 °C。
- 6.4 高压灭菌器。
- 6.5 高速冷冻离心机: 转速≥12 000 r/min。
- 6.6 PCR 仪。
- 6.7 电泳仪。
- 6.8 凝胶成像分析系统。
- 6.9 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 6.10 恒温水浴锅。
- 6.11 天平: 感量 0.1 g。
- 6.12 均质器或灭菌研钵。
- 6.13 微量移液器: 0.2 μL~2 μL、2 μL~10 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL。
- 6.14 离心管: 1.5 mL。

7 检测

7.1 样品制备与增菌培养

样品经均质处理后及时接种培养。接种前,先将增菌培养基煮沸 10 min~15 min,以排除溶解于培养基中的氧,并迅速冷却,切勿摇动。每 15 mL 增菌肉汤中接种 1 g~2 g 样品,接种时将接种物慢慢接入肉汤液面以下。每份样品接种两管疱肉培养基,置 35 °C±1 °C,同时接种两管 TPGY 培养基,置 28 °C±1 °C,厌氧培养 5 d。检查培养物的浊度、产气、肉粒的消化和产生的气味。若有生长,按 7.2 分离纯培养物。若未见生长,可再培养 10 d。

7.2 分离纯培养物

取 1 mL~2 mL 培养液置于螺旋帽试管中,加入等量过滤除菌的无水乙醇。混匀,在室温下放置 1 h。或 80 °C 加热 10 min~15 min 以破坏其繁殖体。

用接种环取 1 环~2 环经乙醇或加热处理的培养物在厌氧卵黄琼脂上划线接种,置厌氧条件下 35 °C±1 °C 培养 48 h。

挑取约 10 个单个的典型菌落。肉毒梭菌的菌落为隆起或扁平,光滑或粗糙,容易蔓延生长并有不规则边缘。在卵黄培养基上用斜射光检查时,菌落表面通常呈虹彩样,亦称为珠色层。彩带通常向外延伸,继而菌落产生不规则外形。

接种可疑菌落到 TPGY 培养基中,置 35 °C±1 °C 厌氧培养 24 h。

培养液一部分用于DNA提取，剩余培养液置于4℃保存，以备确证试验使用。

7.3 DNA 提取

取1.4 mL TPGY培养物转移至1.5 mL离心管中，12 000 r/min离心2 min，弃去上清液。菌体沉淀用1.0 mL TE缓冲液洗两次后重悬于120 μL的25%蔗糖溶液中。加入10 mg/mL溶菌酶溶液120 μL，混匀，37℃±1℃水浴30 min；然后加入20% SDS溶液30 μL，轻轻混匀，室温放置5 min；再加入10 mg/mL蛋白酶K溶液9.0 μL，混匀后37℃±1℃水浴30 min。悬浮液采用细菌基因组DNA提取纯化试剂盒并按试剂盒说明书进行操作。提取的DNA溶液可于-20℃保存。

7.4 DNA 浓度测定

取10 μL DNA溶液加蒸馏水稀释至1 mL，使用核酸蛋白仪或紫外分光光度计分别检测260 nm和280 nm处的吸光值。DNA的浓度按照式(1)计算，当 A_{260}/A_{280} 比值在1.5~2.1之间时，适宜于PCR扩增。扩增前将所有样品DNA调至10 ng/μL~50 ng/μL。

$$c = \frac{A \times N \times 50}{1000} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

c —— DNA浓度，单位为纳克每微升 (ng/μL)；

A —— 260 nm处的吸光值；

N —— 核酸稀释倍数。

7.5 PCR 检验

7.5.1 PCR 反应体系

10×PCR缓冲液2.5 μL、dNTP (10 mmol/L) 0.5 μL、上下游引物 (10 μmol/L) 各1 μL、*Taq* DNA聚合酶 (5 U/μL) 0.25 μL、DNA 模板 (10 ng/μL~50 ng/μL) 2 μL、用无菌去离子水补足体积至25 μL。

针对A、B、E、F型肉毒梭菌，进行多个PCR扩增，每个PCR反应管检测一种类型的肉毒梭菌。

7.5.2 反应条件

95℃预变性5 min，94℃变性1 min，60℃退火1 min，72℃延伸1 min，40个循环，72℃后延伸10 min。结束反应，4℃保存。

不同仪器、不同*Taq* DNA聚合酶可根据要求将反应条件做适当调整。

检验过程中分别设空白对照、阴性对照、阳性对照。空白对照设为以无菌水代替DNA模板；阴性对照采用非肉毒梭菌的DNA作为PCR反应的模板；阳性对照采用含有扩增片段的质粒或A、B、E、F型肉毒梭菌的基因组DNA作为PCR反应的模板。

7.5.3 扩增产物电泳检测

取1.2 g~1.5 g琼脂糖，于100 mL电泳缓冲液中加热，充分融化，加入溴化乙锭贮存液至终浓度为0.5 μg/mL，制胶。在电泳槽中加入电泳缓冲液，使液面刚刚没过凝胶。将5 μL~8 μL PCR扩增产物分别和适量加样缓冲液混合，点样，用分子量标记作参照。9 V/cm恒压电泳，直至溴酚蓝指示剂迁移至凝胶中部，电泳检测结果用凝胶成像分析系统记录并保存。

8 结果判定

- 8.1 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，待测样品出现预期大小的扩增条带，判定为 PCR 结果阳性，按附录 B 进行确证试验。
- 8.2 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，待测样品未出现预期大小的扩增条带，判定为 PCR 结果阴性，可直接报告。
- 8.3 实验中设置的阴性对照、空白对照和阳性对照 PCR 检测结果应符合上述情况。否则，任一种对照如果出现非上述正常结果，应重做试验。

9 结果表述

- 9.1 PCR 结果阴性，直接报告“未检出 A、B、E、F 型肉毒梭菌”。
- 9.2 确证试验结果为检出肉毒梭菌，则报告“检出 A、B、E、F 型肉毒梭菌”。
- 9.3 确证试验结果为未检出肉毒梭菌，则报告“未检出 A、B、E、F 型肉毒梭菌”。

10 生物安全措施

为了保护实验室人员的安全，应由具备资格的工作人员检测，所有培养物应小心处置，并按 GB/T 27403 中的有关规定执行。

11 废弃物处理和防止污染的措施

- 11.1 检验过程中的废弃物需经 121 °C 高压灭菌处理至少 30 min 后再弃置。
- 11.2 检验过程中防止交叉污染的措施按 GB/T 27403 执行。

附录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 疱肉培养基

A.1.1 成分:

a) 新鲜牛肉	500.0 g
b) 蛋白胨	30.0 g
c) 酵母浸膏	5.0 g
d) 磷酸二氢钠	5.0 g
e) 葡萄糖	3.0 g
f) 可溶性淀粉	2.0 g
g) 蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将新鲜除脂肪和筋膜的牛肉500 g切碎，加入蒸馏水。加热至沸点，再以文火煮1 h。充分冷却，经纱布过滤，挤出余液。加入其他成分，用蒸馏水将液体体积补足至1000 mL。调节pH至 7.4 ± 0.1 ，经粗滤纸过滤。在15 mm×150 mm试管中加入碎肉渣至3 cm高，然后加入肉汤，超过肉渣表面约4 cm，上面覆盖一层液体石蜡，厚度为0.3 cm~0.4 cm。在121 °C高压灭菌20 min。

A.2 胰蛋白胨葡萄糖酵母浸膏肉汤 (TPGY)

A.2.1 成分:

a) 胰酪胨 (trypticase)	50.0 g
b) 蛋白胨	5.0 g
c) 酵母浸膏	20.0 g
d) 葡萄糖	4.0 g
e) 硫乙醇酸钠	1.0 g
f) 蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制法

将固体成分溶于1 000 mL蒸馏水中，再分装15 mm×150 mm试管，每管15 mL。上面覆盖一层液体石蜡，厚度为0.3 cm~0.4 cm。在121 °C高压灭菌10 min。最终pH为 7.0 ± 0.1 。放冰箱内保存，若2周内不用则弃掉。临用前，将基础液用蒸汽或煮沸加热10 min~15 min，以排除游离氧，迅速冷却。

A.3 厌氧卵黄琼脂

A.3.1 琼脂基础

- | | |
|---------|----------|
| a) 酵母浸膏 | 50.0 g |
| b) 胰胨 | 5.0 g |
| c) 蛋白胨 | 20.0 g |
| d) 氯化钠 | 5.0 g |
| e) 琼脂 | 20.0 g |
| f) 蒸馏水 | 1 000 mL |

在121 °C下高压灭菌15 min。最终pH为7.0 ±0.2。

A.3.2 卵黄乳状液

用硬刷洗刷2个~3个鸡蛋，沥干。将鸡蛋放在0.1%氯化汞溶液中浸泡1 h，再用70%乙醇浸泡30 min。取出鸡蛋，以无菌操作打开，弃去蛋白。用注射器取出蛋黄，放入灭菌容器，加等量灭菌生理盐水，充分混合，存于4 °C备用。

A.3.3 制法

每500 mL琼脂基础液（48 °C~50 °C）加80 mL卵黄乳状液，充分混合，制成平板。室温放置2 d，或35 °C放置24 h。剔除污染的平板，将无菌平板存于冰箱。

附录 B
(规范性附录)
确证试验

B.1 试剂

- B.1.1 明胶磷酸盐缓冲液：明胶2 g，磷酸氢二钠4 g，蒸馏水1 000 mL。将上述成分加热溶解，调pH至6.2，121 °C高压灭菌15 min。
- B.1.2 肉毒分型抗毒诊断血清。
- B.1.3 胰酶：活力1：250。

B.2 设备

- B.2.1 灭菌注射器：1 mL。
- B.2.2 小白鼠：12 g~15 g。

B.3 操作步骤

取7.2剩余培养液，离心，取一部分上清液直接进行毒素检测试验，另取一部分上清液，调pH6.2，每9份加10%胰酶（活力1：250）水溶液一份，混匀，不断轻轻搅动，37 °C作用60 min，进行毒素检测试验。

B.3.1 检出试验：

取上述离心上清液及其胰酶激活处理液分别注射小白鼠三只，每只0.5 mL，观察4 d。注射液中若有肉毒毒素存在，小白鼠一般多在注射后24 h内发病、死亡。主要症状为竖毛、四肢瘫软，呼吸困难，呼吸呈风箱式，腰部凹陷，宛若蜂腰，最终死于呼吸麻痹。

如遇小鼠猝死以至症状不明显时，则可将注射液做适当稀释，重做试验。

B.3.2 确证试验：

不论上清液或其胰酶激活处理液，凡能致小鼠发病、死亡者，取样分成三份进行试验，一份加等量多型混合肉毒抗毒诊断血清，混匀，37 °C作用30 min，一份加等量明胶磷酸盐缓冲液，混匀，煮沸10 min；一份加等量明胶磷酸盐缓冲液，混匀即可，不做其他处理。三份混合液分别注射小白鼠各两只，每只0.5 mL，观察4 d，若注射加诊断血清与煮沸的两份混合液的小白鼠均获保护存活，而唯有注射未经其他处理的混合液的小白鼠以特有的症状死亡，则可判定检样中的肉毒毒素存在。