

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2525—2010

食品中肉毒梭菌的 PCR 检测方法

Detection of *Clostridium botulinum* in foods by PCR

2010-03-02 发布

2010-09-16 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准参照美国 FDA BAM 第 17 章第 5 部分：A、B、E、F 型肉毒梭菌 PCR 检测方法[U. S. FDA, Bacteriological Analytical Manual Online, Chapter 17(V), 2001; Specific Detection of Clostridium botulinum Types A, B, E and F Using the Polymerase Chain Reaction(PCR).]经研究和验证后制定。

本标准的附录 A、附录 B 均为规范性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国厦门出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：陈双雅、谢明星、张永祥、陈伟玲、王群力、刘棠、彭小莉、周赞虎、张孟璋。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

食品中肉毒梭菌的 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了食品中肉毒梭菌的 PCR 检测方法。
本标准适用于食品中 A、B、E、F 型肉毒梭菌的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 4789.12 食品卫生微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验
GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法
GB 19489 实验室 生物安全通用要求
GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测
SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 术语、定义和缩略语

下列术语、定义和缩略语适用于本标准。

3.1 术语和定义

3.1.1

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。

3.1.2

聚合酶链式反应 **polymerase chain reaction, PCR**

模板 DNA 先经高温变性成为单链，在 DNA 聚合酶作用和适宜的反应条件下，根据模板序列设计的两条引物分别与模板 DNA 两条链上相应的一段互补序列发生退火而相互结合，接着在 DNA 聚合酶的作用下以四种脱氧核糖核酸(dNTP)为底物，使退火引物得以延伸，然后不断重复变性、退火和延伸这一循环，使位于两段已知序列之间的 DNA 片段呈几何倍数扩增。

3.2 缩略语

3.2.1

bp base pair

碱基对。

3.2.2

DNA deoxyribonucleic acid

脱氧核糖核酸。

3.2.3

dNTP deoxyribonucleoside triphosphate

脱氧核苷三磷酸。

3.2.4

dATP deoxyadenosine triphosphate

脱氧腺苷三磷酸。

3.2.5

dCTP deoxycytidine triphosphate

脱氧胞苷三磷酸。

3.2.6

dGTP deoxyguanosine triphosphate

脱氧鸟苷三磷酸。

3.2.7

dTTP deoxythymidine triphosphate

脱氧胸苷三磷酸。

3.2.8

Taq *Thermus aquaticu*

水生栖热菌。

3.2.9

Tris tris (hydroxymethyl) aminomethane

三(羟甲基)氨基甲烷。

3.2.10

EDTA ethylene diaminetetraacetic acid

乙二胺四乙酸。

4 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肉毒梭菌,所有培养物和废弃物应小心处置,并按照 GB 19489 和 GB/T 27403 中的有关规定执行。

5 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 SN/T 1193 中的规定执行。

6 方法提要

样品经增菌后划平板分离单菌落,挑取可疑菌落到 TPGY 培养,对培养物采用热裂解抽提 DNA 法,或商品化细菌基因组 DNA 提取试剂盒抽提 DNA 法制备 PCR 模板,进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 产物是否有特征条带,从而对食品中是否污染肉毒梭菌进行快速检验。

7 设备和材料

7.1 天平:感量 0.001 g。

7.2 生物安全柜。

7.3 厌氧培养装置。

7.4 恒温培养箱:35 °C ± 1 °C 和 28 °C ± 1 °C。

7.5 高压灭菌锅。

7.6 恒温水浴:37 °C ± 1 °C 和 60 °C ± 1 °C。

- 7.7 高速台式冷冻离心机:14 000g。
- 7.8 冰箱:—20 ℃和—70 ℃。
- 7.9 PCR 仪。
- 7.10 电泳仪。
- 7.11 凝胶成像分析系统。
- 7.12 紫外分光光度计。
- 7.13 微量可调移液器:0.2 μL~2 μL、2 μL~20 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL。
- 7.14 离心管:1.5 mL。
- 7.15 PCR 反应管:200 μL~500 μL。

8 培养基和试剂

除另有规定外,试剂为分析纯或生化试剂,水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

- 8.1 庖肉培养基:见附录第 A.1 章。
- 8.2 胰蛋白胨葡萄糖酵母浸膏肉汤(TPGY):见附录第 A.2 章。
- 8.3 厌氧卵黄琼脂:见附录第 A.3 章。
- 8.4 无水乙醇和 95%乙醇。
- 8.5 PBS 缓冲液:氯化钠 7.650 g/L、磷酸氢二钠 0.724 g/L、磷酸二氢钾 0.210 g/L(pH7.4)。
- 8.6 TE 缓冲液:10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)、1 mmol/L EDTA(pH8.0)。
- 8.7 蛋白酶 K 溶液:用 TE 配制,使用浓度为 10 mg/mL。
- 8.8 溶菌酶溶液:用 TE 配制,使用浓度为 10 mg/mL。
- 8.9 3 mol/L 乙酸钠溶液(pH5.2)。
- 8.10 20%SDS 溶液。
- 8.11 引物:根据附录 B 中表 B.1 的序列合成引物,加超纯水配制成 100 μmol/L 储液,用于 PCR 测试的引物浓度为 10 μmol/L。
- 8.12 *Taq* DNA 聚合酶。
- 8.13 dNTP:dATP、dTTP、dCTP、dGTP。
- 8.14 琼脂糖:电泳级。
- 8.15 溴化乙锭。
- 8.16 DNA 分子量标准。
- 8.17 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。
- 8.18 商品化细菌基因组 DNA 提取试剂盒。
- 8.19 10×PCR 缓冲液:200 mmol/L Tris-HCl(pH8.4)、200 mmol/L 氯化钾、15 mmol/L 氯化镁。
- 8.20 5×TBE 电泳缓冲液:Tris 54 g、硼酸 27.5 g、0.5 mol/L EDTA(pH8.0)20 mL,加蒸馏水至 1 000 mL,使用时稀释为 0.5×TBE 电泳缓冲液。
- 8.21 6×加样缓冲液:30 mmol/L EDTA,36%(体积分数)甘油,0.05%(质量浓度)二甲苯腈蓝 FF,0.05%(质量浓度)溴酚蓝。

9 检验程序

检验程序见图 1。

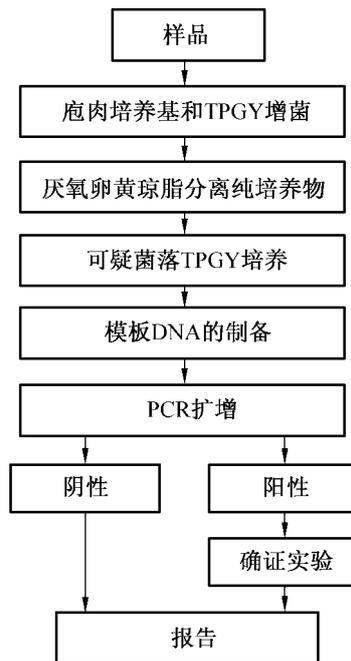


图 1 肉毒梭菌 PCR 检测程序

10 检验步骤

10.1 样品制备和增菌培养

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 固体食品或 1 mL~2 mL 液体食品,接种时将接种物慢慢接入肉汤液面以下。每份样品接种两管庖肉培养基,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 10.2 分离纯培养物。若未见生长,则继续培养 10 d。

10.2 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。

10.3 模板 DNA 的制备

以下两种方法任选一种进行。剩余培养液置 4 °C 保存,以备确证试验使用。

10.3.1 热裂解抽提 DNA 法

取 1.4 mL TPGY 培养物转移至 1.5 mL 离心管中,14 000g 离心 2 min,弃去上清液。加入 1.0 mL PBS 悬浮菌体沉淀,14 000g 离心 2 min,去上清。用 400 μL PBS 重悬沉淀,加入 10 mg/mL 溶菌酶溶液 100 μL,37 °C±1 °C 水浴 15 min,期间每 5 min~7 min 颠倒混匀离心管。加入 10 mg/mL 蛋白酶 K 溶液 10 μL,60 °C±1 °C 水浴 1 h,期间每 10 min~15 min 颠倒混匀离心管。沸水浴 10 min,14 000g 离心 2 min,上清液转移至新的灭菌小离心管中。加入 3 mol/L NaAc 溶液 50 μL 和 95%乙醇 1.0 mL,颠

倒混匀, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min, $14\ 000g$ 离心 10 min, 弃去上清, 沉淀干燥后溶于 $200\ \mu\text{L}$ TE 溶液。按 10.4 进行纯度和浓度测定后置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

10.3.2 试剂盒抽提 DNA 法

取 $1.4\ \text{mL}$ TPGY 培养物转移至 $1.5\ \text{mL}$ 离心管中, $14\ 000g$ 离心 2 min, 弃去上清液。菌体沉淀用 $1.0\ \text{mL}$ TE 缓冲液洗两次后重悬于 $120\ \mu\text{L}$ 的 25% 蔗糖溶液中。加入 $10\ \text{mg/mL}$ 溶菌酶溶液 $120\ \mu\text{L}$, 混匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min; 然后加入 20% SDS 溶液 $30\ \mu\text{L}$, 轻轻混匀, 室温放置 5 min; 再加入 $10\ \text{mg/mL}$ 蛋白酶 K 溶液 $9.0\ \mu\text{L}$, 混匀后 $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。悬浮液采用商品化细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 使用时按照试剂盒说明书进行操作。提取的 DNA 按 10.4 进行纯度和浓度测定后置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

10.4 核酸纯度和浓度的测定

取适量 DNA 溶液原液加双蒸水稀释一定倍数后, 使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计测 $260\ \text{nm}$ 和 $280\ \text{nm}$ 处的吸收值。DNA 的浓度按照式(1)计算。

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

式中:

c ——DNA 浓度, 单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

A_{260} —— $260\ \text{nm}$ 处的吸光值;

N ——核酸稀释倍数。

当浓度为 $0.34\ \mu\text{g/mL} \sim 340\ \mu\text{g/mL}$, A_{260}/A_{280} 比值在 $1.7 \sim 1.9$ 之间时, 适宜于 PCR 扩增。

10.5 PCR 扩增

10.5.1 采用分别针对 A、B、E、F 型肉毒梭菌肉毒毒素基因设计的型特异性引物(附录 B 中表 B.1), 进行多个 PCR 扩增, 每个 PCR 反应管检测一种类型的肉毒梭菌。

10.5.2 PCR 反应体系和参数见附录 B 中表 B.2 和表 B.3。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适当的调整。

10.5.3 PCR 检测时反应体系应设置阳性对照、阴性对照和空白对照。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 作阳性对照, 用非肉毒梭菌基因组 DNA 作阴性对照, 用无菌水作空白对照。

10.6 凝胶电泳检测 PCR 产物

用 $0.5 \times \text{TBE}$ 缓冲液制备 $1.2\% \sim 1.5\%$ (质量浓度) 的琼脂糖凝胶(凝胶加热融化后冷却至 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右加入溴化乙锭至 $0.5\ \mu\text{g/mL}$, 或者在电泳后用 $0.5\ \mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭溶液进行染色), 将 $10\ \mu\text{L}$ 的 PCR 产物与 $2.0\ \mu\text{L}$ $6 \times$ 加样缓冲液混合, 点样, 其中一孔加入 DNA 分子量标准, 以判断 PCR 产物的片段大小。 $0.5 \times \text{TBE}$ 电泳缓冲液, $10\ \text{V/cm}$ 恒压电泳, 电泳时间根据溴酚蓝的移动位置来确定, 电泳检测结果用凝胶成像系统记录。

11 PCR 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, 待测样品出现预期大小的扩增条带, 判定为 PCR 结果阳性, 按第 12 章进行确证试验; 待测样品未出现预期大小的扩增条带, 判定 PCR 结果为阴性, 按第 13 章直接报告结果。

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, 应重做实验。

12 确证试验

取 10.3 剩余培养液, 按 GB/T 4789.12 规定的方法进行确证试验。

13 结果报告

PCR 结果阴性,直接报告“未检出 A、B、E、F 型肉毒梭菌”。

确证试验结果为检出肉毒梭菌,则报告“检出某型(A、B、E、F 型)肉毒梭菌”。

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”。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂的配制

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 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 1 000 mL。调节 pH 至 7.4 ± 0.1 ,经粗滤纸过滤。在 15 mm×150 mm 试管中先加入碎肉渣至 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**

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 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 下高压灭菌 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**

酵母浸膏	50.0 g
胰胨	5.0 g
蛋白胨	20.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	20.0 g
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)

肉毒梭菌 PCR 检测方法参照表

表 B.1 肉毒梭菌肉毒毒素基因 PCR 检测的引物序列

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

表 B.2 肉毒梭菌肉毒毒素基因 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 <i>Taq</i> 酶	0.05 U/ μL	0.5
DNA 模板	—	1.0
ddH ₂ O	—	32.5
总体积	—	50.0

注：反应体系中各试剂的量可根据反应体系的总体积进行适当调整。

表 B.3 肉毒梭菌肉毒毒素基因 PCR 检测的反应参数

预变性	扩 增	循环数	后延伸
95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min	94 $^{\circ}\text{C}$, 1 min; 60 $^{\circ}\text{C}$, 1 min; 72 $^{\circ}\text{C}$, 1 min	40	72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min

注：PCR 反应参数可根据基因扩增仪型号的不同进行适当的调整。