



# 中华人民共和国国家标准

GB 4789.12—××××

食品安全国家标准  
食品微生物学检验  
产肉毒毒素梭菌及肉毒毒素检验  
(征求意见稿)

食品安全国家标准公告

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会  
国家市场监督管理总局 发布

## 前 言

本标准代替GB 4789.12-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 肉毒梭菌及肉毒毒素检验》。

本标准与GB 4789.12-2016相比，主要变化如下：

- 增加了梭菌荧光定量PCR鉴定方法；
- 修改了标准名称；
- 修改了设备和材料、培养基和试剂；
- 修改了检验程序、样品制备过程、结果与报告及附录A。

食品安全国家标准公开征求意见

# 食品安全国家标准

## 食品微生物学检验

### 产肉毒毒素梭菌及肉毒毒素检验

#### 1 范围

本标准规定了食品中产肉毒毒素梭菌及肉毒毒素（botulinum neurotoxin）的检验方法。  
本标准适用于食品中产肉毒毒素梭菌及肉毒毒素的检验。

#### 2 术语和定义

**产肉毒毒素梭菌** botulinum neurotoxin-producing clostridia

革兰氏阳性厌氧杆菌，可形成卵圆形芽孢，大于菌体，位于次端，在适宜培养条件下可产生肉毒毒素的一类细菌的统称。包含肉毒梭菌、丁酸梭菌等。

#### 3 设备和材料

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外，其他设备和材料如下：

- 3.1 冰箱：2℃～8℃、-20℃、-80℃。
- 3.2 天平：感量0.1 g及0.001 g。
- 3.3 pH计、pH比色管或pH试纸。
- 3.4 无菌剪刀、镊子、试剂勺。
- 3.5 均质器或无菌乳钵。
- 3.6 离心机：3 000 ×g、14 000 ×g。
- 3.7 厌氧培养装置：厌氧培养箱、厌氧罐、厌氧袋等或提供同等厌氧效果的装置。
- 3.8 恒温培养箱：36℃±1℃、28℃±1℃。
- 3.9 恒温装置：36℃±1℃、60℃±1℃、80℃±1℃。
- 3.10 显微镜物镜：10倍～100倍。
- 3.11 PCR仪。
- 3.12 实时荧光定量PCR仪。
- 3.13 电泳仪或毛细管电泳仪。
- 3.14 凝胶成像系统或紫外检测仪。
- 3.15 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 3.16 微量移液器和配套灭菌吸头：2 μL、10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL。
- 3.17 无菌吸管：1 mL（具0.01 mL刻度）、10 mL（具0.1 mL刻度）、25 mL（具0.1 mL刻度）。

- 3.18 无菌锥形瓶：100 mL 。
- 3.19 培养皿：直径90 mm 。
- 3.20 离心管：1.5 mL、5 mL 、50 mL 。
- 3.21 滤器：0.45  $\mu\text{m}$  。
- 3.22 PCR 反应管。
- 3.23 无菌注射器：1 mL 。
- 3.24 小鼠：15 g ~20 g ，每一批次试验应使用同一品系单一性别的KM 或ICR 小鼠，同性别小鼠个体间体重相差不超过平均体重的 $\pm 20\%$  ，且如是雌性动物应未交配、未妊娠。

#### 4 培养基和试剂

除另有规定外，PCR 试验所用试剂为分析纯或符合生化试剂标准，水应符合GB 4789.28中的要求。

- 4.1 生理盐水：见附录A 中A.1 。
- 4.2 庖肉培养基：见附录A 中A.2 。
- 4.3 胰蛋白酶胰蛋白胨葡萄糖酵母膏肉汤（TPGYT ）培养基：见附录A 中A.3 。
- 4.4 卵黄琼脂培养基：见附录A 中A.4 。
- 4.5 哥伦比亚血琼脂培养基：见附录A 中A.5 。
- 4.6 明胶磷酸盐缓冲液：见附录A 中A.6 。
- 4.7 磷酸盐缓冲液（PBS ）：见附录A 中A.7 。
- 4.8 革兰氏染色液：见附录A 中A.8 。
- 4.9 胰蛋白酶：活力1:250 或0.25%。
- 4.10 肉毒毒素诊断血清：混合、A 型、B 型、E 型、F 型。
- 4.11 1 mol/L 氢氧化钠。
- 4.12 1 mol/L 盐酸。
- 4.13 无水乙醇和95%乙醇。
- 4.14 10 mg/mL 溶菌酶溶液。
- 4.15 10 mg/mL 蛋白酶K 溶液。
- 4.16 3 mol/L 乙酸钠溶液（pH 5.2 ）。
- 4.17 TE 缓冲液。
- 4.18 引物和探针：临用时用灭菌超纯水或TE 液配制成浓度为10  $\mu\text{mol/L}$  。
- 4.19 10 $\times$ PCR 缓冲液：500 mM KCl 、100 mM Tris-HCl（pH 8.3）、15 mM MgCl<sub>2</sub> 。
- 4.20 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 。
- 4.21 dNTPs ：dATP 、dTTP 、dCTP 、dGTP 浓度均为2.5 mM 。
- 4.22 *Taq* DNA 聚合酶：5 U/ $\mu\text{L}$ 。

- 4.23 琼脂糖：电泳级。
- 4.24 溴化乙锭、Goldview或其它DNA 染料。
- 4.25 5×TBE 缓冲液。
- 4.26 6×加样缓冲液。
- 4.27 DNA 分子量标准：涵盖目标条带长度。

## 5 检验程序

产肉毒毒素梭菌及肉毒毒素检验程序见图1。

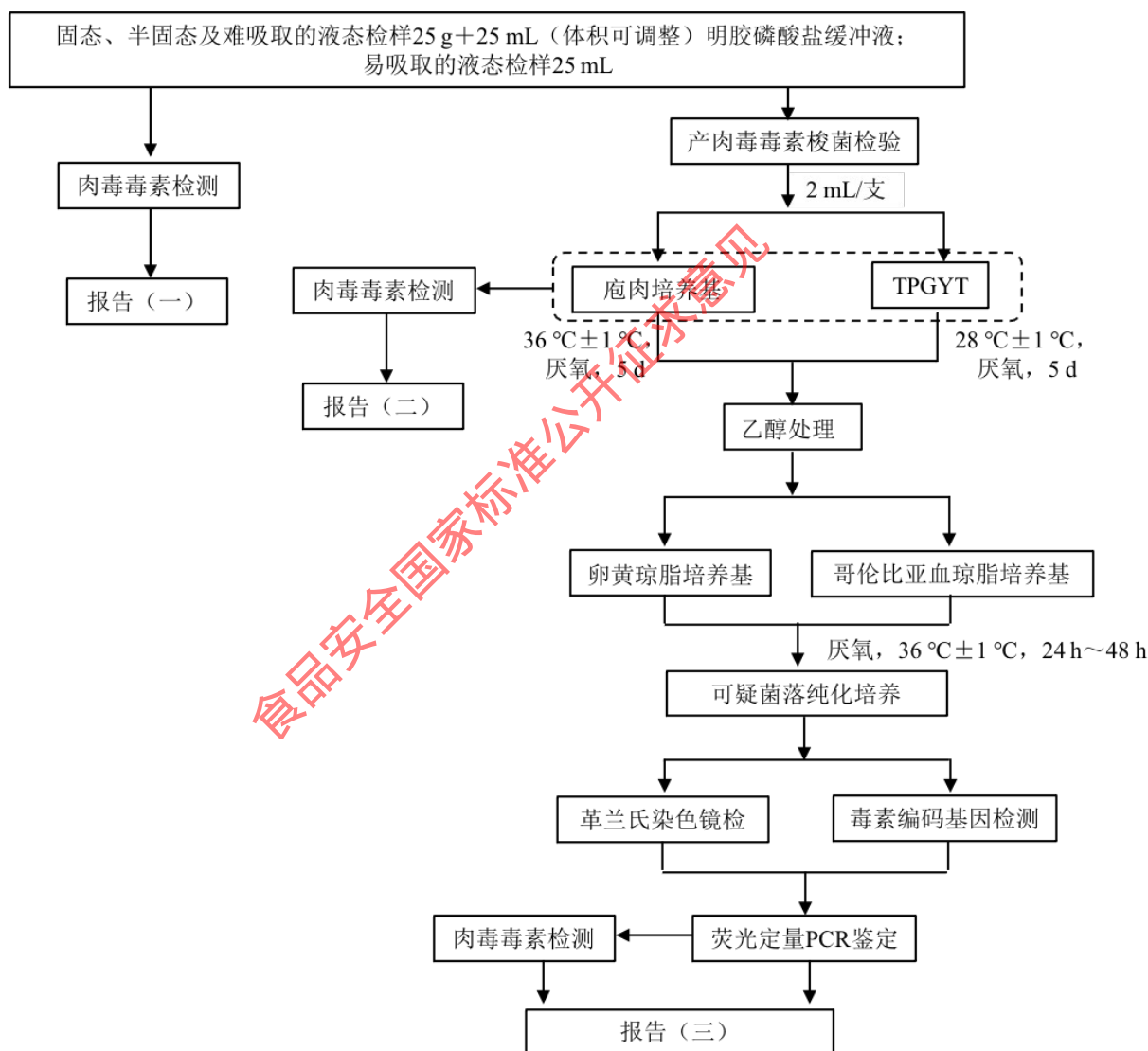


图1 产肉毒毒素梭菌及肉毒毒素检验程序

注：报告（一）：样品中含有（某型别）肉毒毒素；报告（二）：样品中含有产（某型别）肉毒毒素梭菌；报告（三）：样品中含有产（某型别）肉毒毒素某种梭菌。

## 6 操作步骤

## 6.1 样品制备

固态、半固态及难吸取的液态食品，以无菌操作称取样品25 g，放入无菌均质袋或无菌乳钵，块状食品以无菌操作切碎，含水量较高的食品加入25 mL 明胶磷酸盐缓冲液，乳粉、牛肉干等含水量低的食品加入50 mL（或更多，稀释液体积可根据样品水分含量酌情增加，一般稀释至可接种即可）明胶磷酸盐缓冲液，浸泡30 min，用拍击式均质器拍打1 min ~2 min 或用无菌研杵研磨制备样品匀液，收集备用。

易吸取的液态食品摇匀后备用。

注：取样后的剩余样品放2℃ ~8℃ 冰箱冷藏，直至检验结果报告发出后，检出阳性的样品应采用压力蒸汽灭菌方式进行无害化处理，建议121℃ 高压蒸汽灭菌30 min 以上。

## 6.2 肉毒毒素检测

### 6.2.1 毒素液制备

取6.1.2中制备的样品匀液约30 mL 或均匀液体样品10 mL 放入离心管，3 000 ×g 离心10 min ~20 min，收集上清液分为两份放入无菌试管中，一份直接用于毒素检测，一份用于10%胰蛋白酶处理后进行毒素检测。

### 6.2.2 含10%胰蛋白酶处理上清液制备

用1 mol/L 氢氧化钠或1 mol/L 盐酸调节上清液pH 至6.2±0.2，按9份上清液加1份胰蛋白酶（活力1:250）水溶液，混匀，36℃±1℃ 孵育60 min，期间间或轻轻摇动反应液。

### 6.2.3 毒素检出

用1 mL 注射器分别取离心上清液和10%胰蛋白酶处理上清液分别腹腔注射小鼠各三只，每只0.5 mL，观察和记录小鼠48 h 内的中毒表现。典型肉毒毒素中毒症状多在24 h 内出现，通常在6 h 内发病和死亡，其主要表现为竖毛、四肢瘫软，呼吸困难，呈现风箱式呼吸、腰腹部凹陷、宛如蜂腰，多因呼吸衰竭而死亡，可初步判定为肉毒毒素所致。若小鼠在24 h 后发病或死亡，应仔细观察小鼠症状，必要时采用低温蒸发等方法浓缩上清液重复试验，以确认肉毒毒素中毒。若小鼠出现猝死（注射后30 min 内）导致肉毒毒素中毒症状不明显时，应用明胶磷酸盐缓冲液对毒素上清液进行适当稀释，重复试验。

### 6.2.4 毒素确证

上清液或（和）10%胰蛋白酶处理上清液的毒素试验阳性者，取相应阳性试验液三份，每份0.5 mL，其中第一份加等量多型混合肉毒毒素诊断血清，混匀，36℃±1℃ 孵育30 min；第二份加等量明胶磷酸盐缓冲液，混匀后煮沸10 min；第三份加等量明胶磷酸盐缓冲液，混匀。将三份混合液分别腹腔注射小鼠各两只，每只0.5 mL；观察96 h 内小鼠的中毒和死亡情况。

若注射第一份和第二份混合液的小鼠未死亡，而第三份混合液小鼠发病死亡，并出现肉毒毒素中毒的典型症状，则判定检测样品中检出肉毒毒素。

### 6.2.5 毒力测定（如需开展，可按以下条款执行）

取6.2.4中阳性的上清液，用明胶磷酸盐缓冲液稀释制备一定倍数稀释液，如10倍、50倍、100倍、500倍等，分别腹腔注射小鼠各两只，每只0.5 mL，观察96 h 内小鼠的中毒和死亡情况，计算最低致死剂量（minimum lethal dose，MLD），以MLD/mL或MLD/g表示，评估样品中肉毒毒素毒力，MLD 等于小鼠全部死亡的最高稀释倍数乘以样品稀释倍数。例如，样品稀释两倍制备的上清液，再稀释100倍组小鼠全部死亡，而500倍稀释液组存活，则该样品毒力为200 MLD/g。

### 6.2.6 毒素定型（如需开展，可按以下条款执行）

根据毒力测定结果，用明胶磷酸盐缓冲液将上清液稀释至10 MLD/mL ~1 000 MLD/mL 用于定型试验，分别与各单型肉毒毒素诊断血清等量混合（国产诊断血清一般为冻干血清，用1 mL 生理盐水溶解），36℃±1℃ 孵育30 min，分别腹腔注射小鼠两只，每只0.5 mL，观察96 h 内小鼠的中毒和死亡情况。同时，用明胶磷酸盐缓冲液代替诊断血清，与上清液等量混合作为小鼠试验对照。当某一单型诊断血清组动物未发病且正常存活，而对照组和其他单型诊断血清组动物发病死亡，则判定样品中所含肉毒毒素为该型肉毒毒素。

注：未经10%胰蛋白酶激活处理的样品上清液的毒素检出或确证试验为阳性者，则毒力测定和定型试验可省略10%胰蛋白酶处理试验。

### 6.3 产肉毒毒素梭菌检验

#### 6.3.1 增菌培养

6.3.1.1 取庖肉培养基4支和TPGY培养基2支，隔水煮沸10 min～15 min，排除溶解氧，迅速冷却，切勿摇动，在TPGY培养基中缓慢加入10%胰蛋白酶溶液至液面下肉汤中，每支1 mL，制备成TPGYT。

6.3.1.2 吸取6.1制备的样品匀液接种至庖肉培养基和TPGYT培养基，每管接种2 mL。每份样品接种4支庖肉培养基，其中2支直接放置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养至5 d，另2支放置 $80\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温10 min，再放置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养至5 d；接种2支TPGYT培养基， $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养至5 d。

注：接种时，用无菌吸管轻轻吸取样品匀液或离心沉淀悬浮液，将吸管口小心插入肉汤管底部，缓缓放出样液至肉汤中，切勿搅动或吹气。

6.3.1.3 检查记录增菌培养物的浊度、产气、肉渣颗粒消化情况，并注意气味。部分产肉毒毒素梭菌培养物为肉汤浑浊、产气、消化肉粒、有异臭味。

6.3.1.4 取增菌培养物进行革兰氏染色镜检，观察菌体形态，注意是否有芽孢、芽孢的相对比例、芽孢在细胞内的位置。

6.3.1.5 若增菌培养物5 d 无菌生长，应延长培养至10 d，观察生长情况。

6.3.1.6 取有菌生长且有芽孢的阳性管上清液，按6.2方法进行毒素检出和确证试验，必要时进行毒素定型试验，阳性结果可证明样品中有产肉毒毒素梭菌存在。

#### 6.3.2 分离与纯化培养

6.3.2.1 吸取1 mL 有菌生长且有芽孢的阳性管增菌液至无菌螺旋帽试管中，加入1 mL 无水乙醇，混匀，在室温下放置1 h。

6.3.2.2 取经乙醇处理的增菌液分别划线接种至卵黄琼脂平板和哥伦比亚血琼脂平板， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养24 h～48 h。

6.3.2.3 观察平板培养基上菌落形态。在卵黄琼脂平板上，产肉毒毒素梭菌呈隆起或扁平、光滑或粗糙，易成蔓延生长，边缘不规则，在菌落周围形成乳色沉淀晕圈，在斜视光下观察，菌落表面呈现珍珠样虹彩，这种光泽区可随蔓延生长扩散到不规则边缘区外的晕圈，部分型别菌株周围形成的乳色沉淀晕圈，珍珠样虹彩光泽不明显。在哥伦比亚血琼脂平板上，产肉毒毒素梭菌呈圆形、半透明扁平菌落，边缘整齐或不整齐，易蔓延生长，部分型别菌株也可呈白色隆起、不蔓延生长菌落。

6.3.2.4 在分离培养平板上选择5个梭菌可疑菌落（少于5个时则全选），接种卵黄琼脂平板或哥伦比亚血琼脂平板， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，厌氧培养24 h～48 h，按6.3.2.3观察菌落形态及其纯度。

#### 6.3.3 鉴定试验

##### 6.3.3.1 染色镜检

挑取可疑单个菌落进行涂片、革兰氏染色和镜检，产肉毒毒素梭菌菌体形态为革兰氏阳性粗大杆菌、芽孢卵圆形、大于菌体、位于次端，菌体呈网球拍状。

##### 6.3.3.2 毒素编码基因检测

a) 菌株纯化：挑取可疑菌落或待鉴定菌株接种TPGY培养基， $28\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养20 h～24 h。

b) DNA 模板制备：吸取TPGY培养液1.4 mL至无菌离心管中， $14\ 000\times g$ 离心2 min，弃上清，加入1.0 mL PBS悬浮菌体， $14\ 000\times g$ 离心2 min，弃上清，用400  $\mu\text{L}$  PBS重悬沉淀，加入10 mg/mL溶菌酶溶液100  $\mu\text{L}$ ，摇匀， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴15 min，加入10 mg/mL蛋白酶K溶液10  $\mu\text{L}$ ，摇匀， $60\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴1 h，再沸水浴10 min， $14\ 000\times g$ 离心2 min，上清液转移至无菌小离心管中，加入3 mol/L 乙酸钠溶液50  $\mu\text{L}$ 和95%乙醇1.0 mL，摇匀， $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置30 min， $14\ 000\times g$ 离心10 min，弃去上清液，沉淀干燥后溶于200  $\mu\text{L}$  TE 缓冲液，置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

注：根据实验室实际情况，也可采用商品化试剂盒制备 DNA 模板。

c) 核酸浓度测定（必要时）：取5 μL DNA 模板溶液，加超纯水稀释至1 mL，用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计分别检测260 nm 和280 nm 波段的吸光值 $A_{260}$  和 $A_{280}$ 。按式（1）计算DNA 浓度。当浓度在0.34 μg/mL ~340 μg/mL 或 $A_{260}/A_{280}$  比值在1.7 ~1.9 之间时，适宜于PCR扩增。

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

式中：

C—DNA 浓度，单位为μg/mL；

$A_{260}$ —260 nm 处的吸光值；

N—核酸稀释倍数。

d) PCR扩增

1) 分别采用针对各型肉毒毒素编码基因设计的特异性引物（见表1）进行PCR扩增，包括A型肉毒毒素（botulinum neurotoxin A，BoNT/A）、B型肉毒毒素（botulinum neurotoxin B，BoNT/B）、E型肉毒毒素（botulinum neurotoxin E，BoNT/E）和F型肉毒毒素（botulinum neurotoxin F，BoNT/F）共计四型肉毒毒素编码基因，每个PCR反应管检测一种型别的肉毒毒素编码基因。

表1 肉毒毒素编码基因PCR 检测的引物序列及其产物

肉毒毒素编码基因型别	引物	序列（5'-3'）	扩增长度 bp	序列位置
A 型	上游引物	GTG ATA CAA CCA GAT GGT AGT TAT AG	983	GenBank 号： CP046450.1 位置：1 596 654-1 597 636
	下游引物	AAA AAA CAA GTC CCA ATT ATT AAC TTT		
B 型	上游引物	GAG ATG TTT GTG AAT ATT ATG ATC CAG	492	GenBank 号： CP014219.1 位置：927 932-928 423
	下游引物	GTT CAT GCA TTA ATA TCA AGG CTG G		
E 型	上游引物	CCA GGC GGT TGT CAA GAA TTT TAT	410	GenBank 号： CP010521.1 位置：1 165 510-1 165 919
	下游引物	TCA AAT AAA TCA GGC TCT GCT CCC		
F 型	上游引物	GCT TCA TTA AAG AAC GGA AGC AGT GCT	1137	GenBank 号： CP022400.1 位置：2 177 283-2 178 419
	下游引物	GTG GCG CCT TTG TAC CTT TTC TAG G		

2) 反应体系配制见表2，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相应调整。

表2 肉毒毒素编码基因PCR 检测的反应体系

试剂	终浓度	加入体积/μL
10×PCR缓冲液	1×	5.0
25 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	2.5 mmol/L	5.0
10 mmol/L dNTPs	0.2 mmol/L	1.0
10 μmol/L 正向引物	0.5 μmol/L	2.5



10 $\mu\text{mol/L}$ 反向引物	0.5 $\mu\text{mol/L}$	2.5
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	0.05 U/ $\mu\text{l}$	0.5
DNA 模板	-	1.0
ddH <sub>2</sub> O	-	32.5
总体积	-	50.0

注：也可使用商品化试剂盒进行反应体系配制。

3) 反应程序：预变性95  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min；循环参数94  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min，60  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min，72  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min；循环数40；后延伸72  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min；反应产物可2  $^{\circ}\text{C}$ ~8  $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

4) PCR扩增体系应设置阳性对照、阴性对照和空白对照。用含有已知产肉毒毒素梭菌菌株或含肉毒毒素编码基因的质控品作阳性对照、非产肉毒毒素梭菌基因组DNA作阴性对照、无菌水作空白对照。

e) 凝胶电泳检测PCR扩增产物，用0.5 $\times$ TBE缓冲液配制1.2%~1.5%的琼脂糖凝胶，凝胶加热融化后冷却至60  $^{\circ}\text{C}$ 左右加入相应体积的核酸染料（溴化乙锭至0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、Goldview 5  $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ 或其他染料）制备胶块，取10  $\mu\text{L}$ PCR扩增产物与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。0.5 $\times$ TBE电泳缓冲液，10 V/cm恒压电泳，根据溴麝香草酚蓝的移动位置确定电泳时间，用紫外检测仪或凝胶成像系统观察和记录结果。PCR扩增产物也可采用毛细管电泳仪进行检测。

f) 结果判定标准为，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（表1），判定本次PCR检测成立；待测样品出现预期大小的扩增条带，判定为PCR结果阳性，根据表1判定产肉毒毒素梭菌菌株型别，待测样品未出现预期大小的扩增条带，判定PCR结果为阴性。

注：PCR试验环境条件和过程控制应参照《实验室质量控制规范 食品分子生物学检测》（GB/T 27403）规定执行。

### 6.3.3.3 实时荧光定量PCR鉴定

a) 菌的培养及DNA模板制备：取6.3.3.2中肉毒毒素编码基因阳性菌株，按照6.3.3.2步骤进行菌株培养及DNA模板制备。

b) PCR反应体系：总反应体系体积为25  $\mu\text{L}$ ：10 $\times$ PCR缓冲液2.5  $\mu\text{L}$ 、上/下游引物（10  $\mu\text{mol/L}$ ）各0.8  $\mu\text{L}$ 、探针（10  $\mu\text{mol/L}$ ）0.5  $\mu\text{L}$ 、dNTPs（2.5  $\mu\text{mol/L}$ ）3  $\mu\text{L}$ 、*Taq* DNA聚合酶（5U/ $\mu\text{L}$ ）0.5  $\mu\text{L}$ 、模板DNA 1  $\mu\text{L}$ 、灭菌去离子水补足至25  $\mu\text{L}$ 。每个反应均应设置至少2个平行。

注：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调整。亦可选用含有PCR缓冲液、MgCl<sub>2</sub>、dNTP和*Taq* DNA聚合酶等成分基于Taqman探针的实时荧光PCR预混液。

c) PCR反应条件：95  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min（可根据不同厂家的聚合酶要求调整时间），1个循环；95  $^{\circ}\text{C}$ 、20 s，60  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s，72  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s（FAM荧光采集），45个循环。

注：PCR反应参数可根据基因扩增仪型号实时荧光PCR反应体系进行适当调整。

d) 引物和探针序列见表3。

表3 产肉毒毒素梭菌荧光PCR检测引物序列

菌种名称	基因名称	引物和探针	序列（5'-3'）	序列位置
梭菌属	<i>16S rRNA</i>	上游引物	GCT CGT GTC GTG AGA TGT T	GenBank 号： MT279666.1 位置：1 036-1 123
		下游引物	CTC RYT AGA GTS CTC AAC YWA A	
		探针	FAM-AAY AAY AAG GGT TGC GCT CGT TGC-BHQ1	
肉毒梭菌	<i>hvdA</i>	上游引物	GTG GYA CTA CAA GTA TAG TAG ATC AT	GenBank 号： CP046450.1 位置：3 318 645-3 318 779
		下游引物	GTT GTA TAA CAC CAT GAA AMC CAT AG	
		探针	FAM-TCG GAC CTA AAG GAT GTG ATT TAC ACC	

			A-BHQ1	
丁酸梭菌	<i>hydA</i>	上游引物	ATG GGT TAG GCA AGC AGA AA	GenBank 号 : CP033249.1 位置 : 3 318 645-3 318 779
		下游引物	TCC TTC CAC TGT AGG GTA ATA TG	
		探针	FAM-CAC CAC AAC AAA TAT TTG GAG CAG CAA GT-BHQ1	

e) 对照设置：检测过程（包括DNA 提取）中，每个反应均应设置阳性对照、阴性对照和空白对照。其中阳性对照模板为扩增片段的阳性克隆分子DNA 或阳性菌株DNA ，阴性对照模板为非梭菌菌株DNA ，空白对照模板为无菌水。

f) 结果判读：阳性对照出现典型扩增曲线， $Ct < 30$ ；阴性对照无典型扩增曲线或 $Ct \geq 40$ ；空白对照无典型扩增曲线或 $Ct \geq 40$ 。否则，结果视为无效。

当样品检测 $Ct \geq 40$ 时，判定样品结果为梭菌属或某种梭菌阴性；当检测 $Ct < 30$ ，可判定该样品结果为梭菌属或某种梭菌阳性；当检测 $30 \leq Ct < 40$ 时，重复试验，若重复试验结果检测 $Ct \geq 40$ 则判定为梭菌属或某种梭菌阴性，否则，判定为梭菌属或某种梭菌阳性。

注：若肉毒毒素检测结果为阳性，荧光 PCR 鉴定结果为梭菌属阳性，肉毒梭菌和丁酸梭菌均为阴性，可进一步检测菌株是否为巴氏梭菌。

#### 6.3.3.4 菌株产毒试验

将 6.3.3.2 或 6.3.3.3 检出的可疑产肉毒毒素梭菌阳性菌株接种庖肉培养基或 TPGYT 培养基，按 6.3.1.2 条件厌氧培养 5 d，按 6.2 方法进行毒素检测，毒素确证试验阳性者，判定为产肉毒毒素梭菌，根据毒素定型试验结果判定梭菌型别。

注：根据 PCR 阳性菌株型别，可直接用相应型别的肉毒毒素诊断血清进行毒素确证试验。

## 7 结果报告

### 7.1 肉毒毒素检测结果报告

根据 6.2.3 和 6.2.4 试验结果，报告 25g/(mL)样品中检出或未检出肉毒毒素。

根据 6.2.6 定型试验结果，报告 25g/(mL)样品中检出某型肉毒毒素。

### 7.2 产肉毒毒素梭菌检验结果报告

根据 6.3 各项试验结果，报告 25g/(mL)样品中检出或未检出某型/某种产肉毒毒素梭菌。

## 附 录A

## 培养基和试剂

## A.1 生理盐水

## A.1.1 成分

NaCl	8.5 g
------	-------

## A.1.2 制法

将上述成分加入到1 000 mL蒸馏水中，加热溶解，分装后121 °C高压灭菌15 min。

## A.2 庖肉培养基

## A.2.1 成分

新鲜牛肉	500.0 g
蛋白胨	30.0 g
酵母浸粉	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	1 000.0 mL

## A.2.2 制法

称取新鲜除去脂肪与筋膜的牛肉500.0 g，切碎，加入蒸馏水1 000 mL和1 mol/L氢氧化钠溶液25 mL，搅拌煮沸15 min，充分冷却，除去表层脂肪，纱布过滤并挤出肉渣余液，分别收集肉汤和碎肉渣。在肉汤中加入成分表中其他物质并用蒸馏水补足至1 000 mL，调节pH至7.4±0.1，肉渣凉至半干。

在20 mm×150 mm试管中先加入碎肉渣1 cm~2 cm高，每管加入还原铁粉0.1 g~0.2 g或少许铁屑，再加入配制肉汤15 mL，如厌氧装置较简易，且在有氧环境中操作时间较长，可向管内加入液体石蜡覆盖培养基0.3 cm~0.4 cm，121 °C高压蒸汽灭菌15 min。

## A.3 胰蛋白酶胰蛋白胨葡萄糖酵母膏肉汤（TPGYT）

## A.3.1 基础成分（TPGY）

胰酪胨	50.0 g
蛋白胨	5.0 g
酵母浸粉	20.0 g
葡萄糖	4.0 g
硫乙醇酸钠	1.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

## A.3.2 胰蛋白酶液

称取胰蛋白酶（1:250活力）1.5 g，加入100 mL蒸馏水中溶解，膜过滤除菌，2 °C~8 °C保存备用。

## A.3.3 制法

将A.3.1中成分溶于蒸馏水中，调节pH至7.2±0.1，分装20 mm×150 mm试管，每管15 mL，加入液体石蜡覆盖培养基0.3 cm~0.4 cm，121 °C高压蒸汽灭菌10 min。冰箱冷藏，两周内使用。临用接种样品时，每管加入胰蛋白酶液1.0 mL。

## A.4 卵黄琼脂培养基

## A.4.1 基础培养基成分

酵母浸粉	5.0 g
------	-------

胰胨	5.0 g
豚胨	20.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	20.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

#### A. 4.2 卵黄乳液

用硬刷清洗鸡蛋2个~3个，沥干，杀菌消毒表面，无菌打开，取出内容物，弃去蛋白，用无菌注射器吸取蛋黄，放入无菌容器中，加等量无菌生理盐水，充分混合调均，2℃~8℃保存备用。

#### A. 4.3 制法

将A.4.1中成分溶于蒸馏水中，调节pH至7.0±0.2，分装锥形瓶，121℃高压蒸汽灭菌15 min，冷却至50℃左右，按每100 mL基础培养基加入15 mL卵黄乳液，充分混匀，倾注平板，36℃±1℃培养24 h进行无菌检查后，冷藏备用。

### A. 5 哥伦比亚血琼脂培养基

#### A. 5.1 基础培养基成分

动物组织酶解物	23.0 g
淀粉	1.0 g
氯化钠	5.0g
琼脂	8.0~18.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

#### A. 5.2 无菌脱纤维羊血

无菌操作条件下，将绵羊血倒入盛有灭菌玻璃珠的容器中，沿同一方向连续振摇约10 min，静置后除去附有血纤维的玻璃珠即可。

#### A. 5.3 制法

将A.5.1中成分溶于蒸馏水中，调节pH至7.3±0.2，分装锥形瓶，121℃高压蒸汽灭菌15 min，冷却至45℃左右，加入5%无菌脱纤维羊血，充分混匀，倾注平板，备用。

### A. 6 明胶磷酸盐缓冲液

#### A. 6.1 成分

明胶	2.0 g
磷酸氢二钠 (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	4.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

#### A. 6.2 制法

将A.6.1中成分溶于蒸馏水中，调节pH至6.2，121℃高压蒸汽灭菌15 min。

### A. 7 磷酸盐缓冲液 (PBS)

#### A. 7.1 成分

氯化钠	7.650 g
磷酸氢二钠	0.724 g
磷酸二氢钾	0.210 g
蒸馏水	1 000.0 mL

#### A. 7.2 制法

将A.7.1中成分溶于蒸馏水中，调节pH至7.4，121℃高压蒸汽灭菌15 min。

### A. 8 革兰氏染色

#### A. 8.1 结晶紫染色液

## A.8.1.1 成分

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20.0 mL
1%草酸铵水溶液	80.0 mL

## A.8.1.2 制法

将结晶紫完全溶于乙醇中，再与草酸铵溶液混合。

## A.8.2 革兰氏碘液

## A.8.2.1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300.0 mL

## A.8.2.1 制法

将碘和碘化钾混合，加入少许蒸馏水充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水至 300 mL。

## A.8.3 沙黄复染液

## A.8.3.1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

## A.8.3.2 制法

将沙黄溶于乙醇中，再加蒸馏水至 100 mL。

## A.8.4 染色方法

涂片在酒精灯火焰上固定，滴加结晶紫染色液覆盖，染色 1 min，水洗；滴加革兰氏碘液覆盖，作用 1 min，水洗；滴加 95%乙醇脱色约 15 s~30 s(可将乙醇覆盖整个涂片，立即倾去，再用乙醇覆盖涂片，作用约 10 s，倾去脱色液，滴加乙醇从涂片流下至出现无色为止)，水洗；滴加沙黄复染液覆盖，染色 1 min，水洗，待干、镜检。

食品安全国家标准公开征求意见