

食品微生物之檢驗方法—肉毒桿菌之檢驗(草案)

Methods of Test for Food Microorganisms—Test of *Clostridium botulinum*

第一部份：肉毒桿菌及其毒素之檢驗

1. 適用範圍：本方法適用於食品中肉毒桿菌及其毒素之檢驗。
2. 實驗室生物安全措施：
 - 2.1. 生物危害標幟應懸掛於實驗室入口處，並管制人員進入，以及將該實驗區之人數維持至最低需求。
 - 2.2. 備有治療用肉毒桿菌抗毒素之醫療院所緊急連絡電話號碼應張貼在明顯處。
 - 2.3. 實驗操作應在生物安全操作櫃進行。
 - 2.4. 應有洗眼用噴水器及腳踏或自動式洗手設備。
 - 2.5. 絕不可以用口吸取任何檢體，應以機械式吸管輔助器操作。
 - 2.6. 工作前、後應以1%次氯酸溶液擦拭工作檯。
 - 2.7. 實驗後，工作人員應將所使用過之器材及廢棄物，立即滅菌處理。
3. 檢驗方法：檢體經前處理後，經增菌，續以選擇性培養基培養，配合肉毒桿菌毒素檢測與型別鑑定之方法。
 - 3.1. 工作環境：工作平臺須寬敞、潔淨、光線良好，操作平臺光度為100呎燭光以上，密閉室內換氣良好，儘可能沒有灰塵及流動空氣。每15分鐘落菌數不得超過15 CFU/培養皿。
 - 3.2. 器具及材料：
 - 3.2.1. 生物安全操作櫃(Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
 - 3.2.2. 高壓滅菌釜。
 - 3.2.3. 乾熱滅菌器。
 - 3.2.4. 冰箱：能維持 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 者。
 - 3.2.5. 培養箱：能維持內部溫度溫差 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以內者。
 - 3.2.6. 天平：可稱量到 2000 g者，靈敏度為0.1 g；可稱量到120 g者，靈敏度為5 mg。
 - 3.2.7. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 3.2.8. 加熱板(Hot plate)。

- 3.2.9. 顯微鏡：能放大至1000倍之一般光學顯微鏡。
- 3.2.10. 吸管輔助器(Pipette aid)。
- 3.2.11. 微量吸管(Micropipette)：10 μ L、20 μ L、200 μ L及1000 μ L。
- 3.2.12. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
- 3.2.13. 水浴：能維持水溫溫差在 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 以內者。
- 3.2.14. 培養皿：已滅菌，內徑約90 mm，深度約15 mm，底皿之內外面應平坦，無氣泡、刮痕或其他缺點。
- 3.2.15. 吸管尖頭(Tip)：可滅菌。10 μ L、20 μ L、200 μ L及1000 μ L。
- 3.2.16. 吸管(Pipette)：已滅菌，1 mL吸管應有0.01 mL之刻度；5 mL及 10 mL吸管應有0.1 mL之刻度。
- 3.2.17. 容器：附螺旋蓋之玻璃、聚乙烯、鐵弗龍或其他能耐 121°C 溼熱滅菌20分鐘以上之三角錐瓶、玻璃瓶或廣口瓶，125 mL、250 mL、500 mL及2 L。
- 3.2.18. 附螺旋蓋試管：10 \times 100 mm，13 \times 100 mm，15 \times 150 mm 試管，或其他適用者。
- 3.2.19. 載玻片及蓋玻片：適用於染色及鏡檢用。
- 3.2.20. 接種針及接種環(直徑約 3 mm)：鎳鉻合金，鉑銻或鉻線材質，或可拋棄式者。
- 3.2.21. 厭氧瓶 (Anaerobic jar)。
- 3.2.22. 氣體包：適合厭氧菌培養者。使用時，反應30分鐘後，厭氧瓶內空氣組成為氧氣含量低於1%，二氧化碳含量介於9~13%。
- 3.2.23. 離心管及微量離心管：已滅菌，15 mL、50 mL、0.2 mL、2.0 mL。
- 3.2.24. 注射筒：1 mL、3 mL，附25號，5/8吋注射針。
- 3.2.25. 小鼠：雄性，體重16~24 g。
- 3.2.26. 小鼠用籠子、飼料、飲水瓶等。
- 3.2.27. 藥勺、剪刀、鑷子、開罐器、鉢及杵臼：可滅菌。
- 3.2.28. 無菌濾膜：孔徑 0.2 μm 及 0.45 μm 之親水性醋酸纖維濾膜。
- 3.2.29. 試藥：碘、碘化鉀、磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)、次氯酸鈉 (sodium hypochlorite)、氫氧化鈉、葡萄糖(glucose)、葡萄糖(dextrose)、鹽酸、95%乙醇、無水乙醇、氯化鈉、無水磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4 , anhydrous)、磷酸二氫鉀、硫甘醇鈉(sodium thioglycollate)、結晶紫(crystal violet)、草酸銨(ammonium oxalate)及沙黃O (safranin O)均採用化學試藥級；明膠(gelatin)、胰蛋白酶、牛心(beef heart)、豚蛋白胨(proteose peptone)、胰化酪蛋白(trypticase)、蛋白胨

(peptone)、酵母抽出物(yeast extract)及洋菜(agar)均採微生物級。

3.2.30. 試劑：

3.2.30.1. 碘酒溶液(Alcoholic iodine solution)：

稱取碘10 g及碘化鉀10 g，溶於70%乙醇溶液500 mL中，攪拌溶解置於密閉容器避光保存。

3.2.30.2. 明膠-磷酸鹽緩衝溶液(Gel-phosphate buffer)：

稱取明膠2 g及磷酸氫二鈉4 g，溶於蒸餾水1 L，微加熱至溶解，以121°C滅菌20分鐘，最終pH值為6.2。

3.2.30.3. 革蘭氏染色液(Gram stain solution)^(註1)：

3.2.30.3.1. 哈克氏(Hucker's)結晶紫液(初染劑)：

溶液A：取結晶紫2 g溶於95%乙醇20 mL。

溶液B：取草酸銨0.8 g溶於蒸餾水80 mL。

將溶液A與溶液B混合，靜置24小時後以濾紙過濾，取濾液作為初染劑。

3.2.30.3.2. 革蘭氏碘液(媒染劑)：

取碘化鉀2 g及碘1 g置於研鉢中，經研磨5-10秒鐘後，加蒸餾水1 mL研磨，次加蒸餾水5 mL研磨，再加蒸餾水10 mL，研磨至碘化鉀和碘完全溶於蒸餾水中，將此溶液注入褐色瓶中，再以適量蒸餾水洗滌研鉢及杵後，併入洗液，加蒸餾水至300 mL，供作媒染劑。

3.2.30.3.3. 哈克氏複染劑(複染劑)：

取沙黃O 2.5 g，溶於95%乙醇100 mL，供作複染原液。使用時，取原液10 mL加蒸餾水90 mL，作為複染劑。

註1：革蘭氏染色液因放久可能失效，購置成品時，需注意其保存期限；自行配製者，應檢查其染色效果。

3.2.30.4. 0.85%生理食鹽水：

稱取氯化鈉8.5 g，溶於蒸餾水1000 mL，以121°C滅菌15分鐘。

3.2.30.5. 1N氫氧化鈉溶液：

稱取氫氧化鈉4 g，加蒸餾水溶解使成100 mL。

3.2.30.6. 1N鹽酸溶液：

量取鹽酸89 mL，加蒸餾水使成1000 mL。

3.2.30.7. 70%乙醇溶液：

取95%乙醇737 mL，加蒸餾水使成1000 mL。

3.2.30.8. 胰蛋白酶溶液：

稱取胰蛋白酶(1:250) 0.5 g，加蒸餾水10 mL溶解，可冷藏存放1週。配製時應戴口罩。

3.2.30.9. 1%次氯酸鈉溶液：

依次氯酸鈉溶液濃度進行稀釋，量取6%次氯酸鈉溶液50 mL，加蒸餾水使成300 mL，或量取12%次氯酸鈉溶液25 mL，加蒸餾水使成300 mL。

3.2.30.10. 50%蛋黃液：

雞蛋洗淨，浸入70%乙醇溶液中1小時，以無菌針筒無菌操作取出蛋黃，加入等量0.85%無菌生理食鹽水，混勻，儲存於4°C備用。

3.2.31. A-F型單價肉毒桿菌抗毒素(Monovalent botulinal antitoxins)與A-F型多價肉毒桿菌抗毒素(Polyvalent botulinal antitoxins)：

冷凍乾燥之抗毒素以無菌0.85%生理食鹽水依標示復水，置於4°C冰箱貯存備用。絕不可以使用甘油溶液稀釋抗毒素原液。

3.2.32. 培養基：

3.2.32.1. 肉質培養液(Cooked meat medium, CMM)

牛心(beef heart)	454 g
胨蛋白胨(proteose peptone)	20 g
葡萄糖(dextrose)	2 g
氯化鈉	5 g
蒸餾水	1000 mL

稱取脫水肉質培養基1.25 g，置入20 × 150 mm試管中，加入蒸餾水10 mL (或稱取12.5 g，加入蒸餾水100 mL)，充分混合，放置約15分鐘使之完全溼潤，於121°C滅菌20分鐘，最終pH值為7.2±0.2。臨用前，以蒸氣或沸水加熱去除液體中之溶氧，冷卻後使用。

3.2.32.2. 胰化酪蛋白-蛋白胨-葡萄糖-酵母抽出物培養液

(Trypticase-peptone-glucose-yeast extract broth, TPGY)

胰化酪蛋白(trypticase)	50 g
蛋白胨(peptone)	5 g
酵母抽出物(yeast extract)	20 g
葡萄糖(glucose)	4 g
硫甘醇鈉(sodium thioglycollate)	1 g
蒸餾水	1000 mL

使完全溶解後，分裝15 mL至20 × 150 mm試管中，於121°C滅菌10分鐘。最終pH值為7.0±0.2。配製後之培養液應於4°C中保存。臨用前以蒸氣或沸水加熱去除液體中之溶氧，冷卻後使用。

3.2.32.3. 厭氧蛋黃培養基(Anaerobic egg yolk agar, AEYA)

酵母抽出物(yeast extract)	5 g
胰化蛋白胨(tryptone)	5 g
胨蛋白胨(proteose peptone)	20 g
氯化鈉	5 g
洋菜(agar)	20 g
蒸餾水	1000 mL

使完全溶解後，於121°C滅菌15分鐘，最終pH值為7.0±0.2。冷卻至48~50°C，添加50%蛋黃液80 mL充分混合，避免產生氣泡。每一培養皿注入約15~20 mL，凝固後，確認表面乾燥後使用，使用前應確認培養基未受污染。

3.2.32.4. 胰化酪蛋白-蛋白胨-葡萄糖-酵母抽出物-胰蛋白酶培養液(Trypticase-peptone-glucose-yeast extract broth with trypsin, TPGYT)

培養液用胰蛋白酶溶液之配製：將胰蛋白酶1.5 g加入蒸餾水100 mL中，攪拌使完全懸著，靜置使顆粒沉澱，以0.45 µm無菌濾膜過濾上清液，備用。

TPGYT之配製：依3.2.32.2.節配製TPGY培養液。使用前以蒸氣或沸水加熱10分鐘，去除液體中之溶氧，冷卻，取胰蛋白酶溶液1 mL，加至TPGY培養液15 mL，或取胰蛋白酶溶液6.7 mL，加至TPGY培養液100 mL，混勻。

3.3. 檢體之處理：

將檢體冷藏於冰箱中，直至檢驗時方取出。除非有快速膨脹及爆裂之慮，未開封之罐頭食品不需冷藏。將檢體分為三部份，一部份依 3.4.節進行肉毒桿菌檢測，一部份依 3.6.節檢測肉毒桿菌毒素，其餘部份則保存於冰箱中。

3.3.1. 固態及液態食品：

以無菌操作將固態或僅含微量液體之食品，置入已滅菌研鉢中，加入等量的明膠-磷酸鹽緩衝溶液，用已滅菌之研杵研磨後(或用

已滅菌的鑷子夾取小塊檢體)，接種於不同培養液中；液態食品則用無菌吸管，接種於不同培養液中。接種完後，將剩餘檢體以無菌操作移入無菌之檢體保存袋(罐)中，冷藏備用。

3.3.2. 罐頭食品：

3.3.2.1. 罐頭前處理：檢查檢體之外觀及氣味，記錄任何產品分解之事實，及所見之狀況。取6瓶非膨罐(non-swollen cans)的待測罐頭於35°C培養14天，觀察是否有膨罐情形，當發生膨罐或送驗罐頭檢體已膨罐，則直接進行分析。無膨罐情形發生時，培養14天後進行分析。

3.3.2.2. 罐頭開封：開封前將罐頭置於冰箱中或以冰水冷卻罐身。洗淨罐身，以碘酒溶液浸泡開封處30分鐘，並以無菌操作擦除殘留的碘，不可使用火燄燒烤膨罐。開罐器使用前須經過火焰燒烤至幾乎接近紅色或使用無菌開罐器。溫和搖勻罐內內容物，在無菌環境下開啟罐頭，開罐範圍大小需足供罐內取樣。

3.3.2.3. 罐內取樣：自罐中心挖取或吸取內容物。接種完後，將剩餘檢體以無菌操作移入無菌之檢體保存袋(罐)中，冷藏備用。

3.4. 肉毒桿菌檢測：

3.4.1. 增菌培養：

接種前將增菌用培養液以蒸氣或沸水加熱10~15分鐘，去除溶氧，快速冷卻並避免振盪。取二支裝有CMM培養液之試管，分別接種入檢體1~2 g或1~2 mL，於35°C培養。依前述方法將檢體同時接種於另二支含TPGY培養液試管，於28°C培養。當懷疑檢體中有非蛋白水解性B型、E型或F型產毒性肉毒桿菌時，接種檢體至TPGYT培養液中增菌。將檢體沿管壁緩緩接種至試管中，厭氧培養5日後，觀察增菌培養液，包括混濁度、氣體產生及粒狀培養基分解情形，並注意氣味。培養5日後，仍無明顯之細菌增長現象時，則再繼續培養10日，供作檢液。

3.4.2. 分離培養：

3.4.2.1. 前處理：

吸取3.4.1.節各試管檢液1或2 mL 至已滅菌附螺旋蓋試管中，添加等量經0.2 μm無菌濾膜過濾之無水乙醇，充分混合，在室溫下放置1小時。若欲直接自檢體中分離肉毒桿菌，則取1~2 mL或1~2 g保留之檢體，加入等量經0.2 μm無菌濾膜過濾之無水乙

醇於附螺旋蓋試管中，充分混合，於室溫下放置1小時。或吸取3.4.1.節檢液1或2 mL，於80°C加熱10~15分鐘，以破壞營養細胞^(註2)。

註2：絕對不可以加熱方式處理非蛋白水解型肉毒桿菌。

3.4.2.2. 劃線培養：

以接種環取1或2環經3.4.2.1.節處理之檢液，劃線接種於AEYA培養基上。必要時，適當稀釋3.4.2.1.節處理之檢液以獲得良好分離的單一菌落。在厭氧環境，35°C下培養48小時^(註3)，觀察菌落型態。可疑肉毒桿菌者，其菌落凸起或扁平、平滑或粗糙，菌落常呈現擴散而周緣輪廓不規則狀。在AEYA培養基上，以斜角度檢視培養基時，菌落常呈現珍珠光澤。珍珠光澤區域常常跨越過菌落周緣之不規則狀輪廓，而呈現向外擴散之趨勢。除了珍珠光澤區域外，C型、D型及E型肉毒桿菌之菌落，其外常圍繞著一約2~4 mm寬之黃色沈澱環。A型及B型肉毒桿菌，通常菌落周圍之沈澱環較小^(註4)。

註3：採用厭氧瓶或是厭氧性氣體產生系統，以維持一厭氧環境，亦可使用其它相似之系統以維持厭氧環境。

註4：為數甚多之梭狀桿菌屬細菌(*Clostridium* spp.)菌落形態與肉毒桿菌相似，但不會產生肉毒桿菌毒素。

3.5. 鑑定試驗：

3.5.1. 選取約10個生長良好之可疑菌落，各別接種至已滅菌CMM培養液，於35°C厭氧培養5日。接種可疑E型肉毒桿菌至已滅菌TPGY培養液，於28°C厭氧培養5日。5日後，依3.6.1.4.節處理，以進行毒性試驗。

3.5.2. 將可能含毒素之培養液，以二重複再次劃線於AEYA培養基。其中一個培養皿於厭氧下35°C培養，另一培養皿置於有氧環境下35°C培養。典型之肉毒桿菌菌落，僅在厭氧環境下生長^(註5)。將經分離純化之肉毒桿菌，以芽胞狀態貯存於冰箱中，或是凍結乾燥保存。

註5：當無法由含肉毒桿菌毒素培養液中分離到肉毒桿菌時，表示肉毒桿菌在混合菌叢中相對之分離比例甚低，可經由系列性連續增菌培養步驟提高菌量，以分離到單一菌落。

3.5.3. 革蘭氏染色(Gram stain)：以無菌接種針自AEYA培養基中挑取可疑菌株，依下列步驟進行革蘭氏染色後鏡檢。

- (1) 鉤取菌體，於載玻片上製成薄抹片，風乾或微熱固定。
- (2) 初染：將已固定之抹片，用哈克氏結晶紫液染1分鐘後水洗，水洗時間應不超過5 秒鐘。
- (3) 媒染：加革蘭氏碘液作用1分鐘，水洗。
- (4) 脫色：以95%乙醇洗至不再有紫色褪出時，再水洗，此步驟需時甚短，僅數秒即可，惟視抹片之厚薄而定。
- (5) 複染：用哈克氏複染劑複染30秒鐘，水洗。
- (6) 風乾。
- (7) 鏡檢：呈現深紫色者為革蘭氏陽性菌，呈現淡紅色者為革蘭氏陰性菌。肉毒桿菌為革蘭氏陽性菌。

3.5.4. 生化試驗：可參考使用經確效認可之市售生化檢測套組。

3.6. 肉毒桿菌毒素之檢測與型別鑑定：

3.6.1. 檢體之處理^(註6)：

3.6.1.1. 含液體之食品：

取含液體之檢體25~50 g，於低溫下離心，取上清液供作肉毒桿菌毒性試驗用檢液。

3.6.1.2. 固態食品：

取經預冷(prechilled)處理之研鉢及研杵，稱取固態檢體25~50 g，加入等量已滅菌之明膠-磷酸鹽緩衝溶液，當檢體浸軟後研磨，於低溫下離心，取上清液供作毒性試驗用檢液。

3.6.1.3. 可疑容器檢體：

取已滅菌之明膠-磷酸鹽緩衝溶液數mL，清洗盛裝檢體之容器；儘可能減少明膠-磷酸鹽緩衝溶液之用量，以防止毒素被稀釋至檢測極限之下，必要時，清洗液於低溫下離心，取上清液供作毒性試驗用檢液。

3.6.1.4. 增菌培養液：

取前述3.5.1.節TPGY增菌培養液10 mL，於低溫離心，取上清液，測定pH值，若超過pH 6.5，則以1N鹽酸溶液調整至pH 6.0~6.2，供作毒性試驗用檢液。

註6：(1) 檢體應置於密封且具有安全杯之離心機內離心。

- (2) 供毒性試驗的上清液應經0.45 μm無菌濾膜過濾，以避免或減低試驗小鼠非專一性死亡。

3.6.2. 毒性確認：

3.6.2.1. 胰蛋白酶處理：

為檢測非蛋白水解型毒素，取經3.6.1.節處理過之部分檢液或TPGY增菌培養液，在檢測毒素前先以胰蛋白酶處理^(註7)。將檢液以1N氫氧化鈉溶液或1N鹽酸溶液，調整pH值至6.2後，吸取1.8 mL注入試管中，添加胰蛋白酶溶液0.2 mL，在35~37°C放置1小時，時時搖動之，作為胰蛋白酶處理組檢液。

註7：TPGYT培養液中含有胰蛋白酶，其增菌培養液不必再以胰蛋白酶處理，否則可能使存於其中已活化毒素被分解。

3.6.2.2. 毒性試驗：

3.6.2.2.1. 以明膠-磷酸鹽緩衝溶液將未經胰蛋白酶處理(未處理組)及經胰蛋白酶處理之檢液(胰蛋白酶處理組)分別稀釋成5、10及100倍的稀釋檢液，備用。另取未處理組檢液1.5 mL，於100°C加熱10分鐘(熱處理組)後，稀釋成5、10及100倍稀釋檢液，備用。

3.6.2.2.2. 所有檢液包括未處理組、胰蛋白酶處理組及熱處理組之原液及各稀釋檢液，各取0.5 mL注射至小鼠腹腔，均行二重複試驗^(註8)。48小時內定時觀察試驗小鼠有無肉毒桿菌毒素中毒症狀及死亡，並作成紀錄。典型之肉毒桿菌毒素中毒症狀，在投予檢液 24小時內，引起小鼠皮毛豎立，繼而呼吸困難、四肢軟弱，終至呼吸麻痺，呼吸衰竭死亡^(註9)。經過48小時觀察，若僅有接受熱處理組檢液之小鼠存活，其餘試驗小鼠均死亡，則須以更高稀釋倍數之檢液，重複此一毒性試驗。此毒性試驗中必須要有致小鼠死亡之稀釋倍數及不會致死小鼠之稀釋倍數，以計算試驗終點或最小致死量(minimum lethal dose, MLD)，以預估毒素含量。能殺死所有接種小鼠之最高稀釋倍數謂之最小致死量，以計算出每mL或g檢液中含肉毒桿菌毒素的最小致死量數值。

註8：熱會破壞肉毒桿菌毒素，因此檢液經 100°C加熱10分鐘後，應不會引發小鼠死亡。

註9：沒有肉毒桿菌毒素中毒症狀之小鼠死亡，表示檢液中不含有肉毒桿菌毒素，小鼠之死亡可能肇因於其它化學物質或外力(trauma)。

3.6.2.3. 毒素型別鑑定：

3.6.2.3.1. 將A、B、E及F型抗毒素原液，以無菌0.85%生理食鹽水稀釋至每mL含有2個國際單位。

3.6.2.3.2. 取經3.6.2.2.節試驗，可推算出較高最小致死量之未處理組或胰蛋白酶處理組檢液^(註10)，進行毒性試驗用檢液製備，其中至少需包括最小致死量之10、100及1000稀釋倍數。未處理組之毒性檢液，依照3.6.2.2.節進行製備。

3.6.2.3.3. 取3.6.2.3.1.節各型單價肉毒桿菌抗毒素0.5 mL分別注射至小鼠腹腔，經30分鐘至1小時後，再腹腔注射檢液0.5 mL，每一稀釋檢液均行二重複試驗。每一稀釋之毒性試驗用檢液，亦注射至二隻未經任何抗毒素保護的小鼠，以作為對照組。使用A、B、E及F四型單價抗毒素，每一抗毒素計使用6隻小鼠，四種抗毒素，共24隻小鼠，外加三種稀釋對照組檢液，共6隻小鼠，合計使用30隻小鼠。觀察小鼠48小時，並記錄肉毒桿菌毒素中毒症狀及死亡。當試驗結果顯示毒素未被中和時，則使用單價抗毒素測定C型及D型毒素，與多價抗毒素重新測定A型至F型毒素。

註10：由於胰蛋白酶之持續作用會破壞肉毒桿菌毒素，當進行毒素型別鑑定時，檢液必須採用胰蛋白酶新鮮處理者。

3.6.2.3.4. 肉毒桿菌 A、B、E 及 F 型毒素基因型別之鑑定，依第二部分：肉毒桿菌毒素基因之 PCR 檢測。

3.7. 肉毒桿菌毒素分析須知：

3.7.1. 試驗初期24小時，是觀察小鼠症狀和死亡之關鍵時刻，98~99%之試驗動物於24小時內死亡。典型之肉毒桿菌中毒症狀和死亡，可能在投予含肉毒桿菌毒素之檢液後4到6小時內出現。

3.7.2. 當小鼠死亡發生在腹腔注射24小時之後，除非有非常明確之典型肉毒桿菌中毒症狀，否則僅屬疑似個案。

3.7.3. 當注射2或5倍之稀釋檢液的小鼠死亡，但不見任何注射更高稀釋倍數檢液的小鼠死亡，則僅屬疑似個案，小鼠死亡可能是由於不明原因所致。

- 3.7.4. 可用不易脫落之染料塗佈在小鼠尾部，以供識別投予不同稀釋倍數檢液之用。
 - 3.7.5. 注射肉毒桿菌毒素的小鼠，在出現症狀之前可能變得較為過度活動(hyperactive)。
 - 3.7.6. 注射檢液後可立即供應小鼠食物及飲水，其並不會影響試驗之正確性。
 - 3.7.7. 復水後之抗毒素可冷藏保存6個月效期，冷凍保存則可維持更長的效期。
 - 3.7.8. TPGY培養液具有相當之穩定性，可冷藏保存2~3週。
 - 3.7.9. 使用CMM培養基應旋緊試管蓋，因為肉毒桿菌毒素可能吸著於培養基之肉粒上。
 - 3.7.10. 注射單價肉毒桿菌抗毒素之小鼠，再注射檢液可免於中毒和死亡，即可確認檢體中含有肉毒桿菌毒素，及該毒素型別。
 - 3.7.11. 小鼠若無法受到一種單價肉毒桿菌抗毒素保護，仍然有死亡發生時，可能是由於檢體中的肉毒桿菌毒素含量太高，或是檢體中可能存有一種以上之肉毒桿菌毒素，亦有可能由其他不明原因所引起。此時必須對含毒性之檢液進行高倍率稀釋，且以多價肉毒桿菌抗毒素取代單價肉毒桿菌抗毒素。某些耐熱之毒性物質，可能引起加熱組及未加熱組試驗小鼠死亡。這些耐熱之毒性物質，可能遮掩肉毒桿菌毒素之毒性。
- 3.8. 可參考使用經確效認可之市售培養基及分生檢驗套組，惟檢驗結果有爭議時，應以傳統方法為主。

第二部份：肉毒桿菌毒素基因之 PCR 檢測

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於肉毒桿菌菌株及食品檢體增菌液中肉毒桿菌毒素基因 A 型、B 型、E 型與 F 型之鑑別。
2. 檢驗方法：檢體之增菌液或分離純化後之菌株，經 DNA 萃取後，以聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction, PCR)及即時聚合酶鏈反應(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)鑑別毒素基因之方法。
 - 2.1. 工作環境：工作平台需寬敞、潔淨、光線良好。檢體前處理、檢體 DNA 抽取、PCR 試劑配製及 PCR 等實驗過程皆需有區隔空間，避免交叉污染。PCR 試劑之配製應於生物安全操作櫃內進行。
 - 2.2. 裝置^(註 1)
 - 2.2.1. 生物安全操作櫃 (Biological safety cabinet, BSC)：第二等級(class II)(含)以上者。
 - 2.2.2. 聚合酶鏈反應器：GeneAmp® PCR System 9700，或同級品。
 - 2.2.3. 即時聚合酶鏈反應器^(註 2)：ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System 或 Roche LightCycler，或同級品。
 - 2.2.4. 真空乾燥裝置：供 DNA 乾燥用。
 - 2.2.5. 高壓滅菌釜。
 - 2.2.6. 無菌操作台。
 - 2.2.7. 加熱振盪器：具 55°C 溫控及振盪功能。
 - 2.2.8. 微量冷凍離心機(Micro refrigerated centrifuge)：可達 20000 × g，並具 4°C 溫控功能。
 - 2.2.9. 離心機：供各式微量離心管離心用。
 - 2.2.10. 分光光度計：具波長 260 nm、280 nm。
 - 2.2.11. 冷凍設備：具冷藏及凍結功能。
 - 2.2.12. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2.13. 電泳槽：供 DNA 電泳用。
 - 2.2.14. 照相裝置：供拍攝電泳膠片用。
 - 2.2.15. 紫外燈箱：具波長 302 nm、365 nm 紫外燈。
 - 2.2.16. 酸鹼度測定儀(pH meter)。
 - 2.2.17. 水浴裝置：溫差±1°C 以內者。
 - 2.2.18. 天平：最大稱重量為 2000 g，靈敏度為 0.1 g；最大稱重量為 100 g，靈敏度為 1 mg。

註 1：本方法所使用或提及之產品品牌不代表為同類產品中最好者；反之，未使用或提及之產品品牌亦不代表為同類產品中較差者。

註 2：確認試驗用。

2.3. 試藥

2.3.1. DNA 抽取用試藥：適用於革蘭氏陽性細菌 DNA 抽取之市售套組。

2.3.2. PCR 用^(註 3)

2.3.2.1. 鑑別試驗用引子

2.3.2.1.1. A 型毒素基因肉毒桿菌(標的基因：肉毒桿菌 A 型毒素基因)

引子 F：Type A-F, 5'-GTGATACAACCAGATGGTAGTTAT
AG-3'

引子 R：Type A-R, 5'-AAAAAACAAGTCCCAATTATTAAC
TTT-3'

PCR 增幅產物大小 983 bp

2.3.2.1.2. B 型毒素基因肉毒桿菌(標的基因：肉毒桿菌 B 型毒素基因)

引子 F：Type B-F, 5'-GAGATGTTTGTGAATATTATGATCC
AG-3'

引子 R：Type B-R, 5'-GTTCATGCATTAATATCAAGGCTGG-3'

PCR 增幅產物大小 492 bp

2.3.2.1.3. E 型毒素基因肉毒桿菌(標的基因：肉毒桿菌 E 型毒素基因)

引子 F：Type E-F, 5'-CCAGGCGGTTGTCAAGAATTTTAT-3'

引子 R：Type E-R, 5'-TCAAATAAATCAGGCTCTGCTCCC-3'

PCR 增幅產物大小 410 bp

2.3.2.1.4. F 型毒素基因肉毒桿菌(標的基因：肉毒桿菌 F 型毒素基因)

引子 F：Type F-F, 5'-GCTTCATTAAAGAACGGAAGCAGT
GCT-3'

引子 R：Type F-R, 5'-GTGGCGCCTTTGTACCTTTTCTAGG-3'

PCR 增幅產物大小 1137 bp

2.3.2.1.5. 梭狀芽孢桿菌屬(*Clostridium* cluster I)通用引子(標的基因：16S ribosomal RNA，供作內部對照基因)

引子 F：CL-F, 5'-TACCHRAGGAGGAAGCCAC-3'

引子 R：CL-R, 5'-GTTCTTCCTAATCTCTACGCAT-3'

PCR 增幅產物大小約 232 bp。

2.3.2.2. 確認試驗用引子及探針

2.3.2.2.1. A 型毒素基因肉毒桿菌(標的基因：肉毒桿菌 A 型毒素基因)

引子 F：CbA-F, 5'-GGAGTCACTTGAAGTTGATACAAATC-3'

引子 R：CbA-R, 5'-GCTAATGTTACTGCTGGATCTGTAG-3'

探針 P：CbA-P, 5'-(FAM)-TCTTTTAGGTGCAGGCAAATTT-(BHQ1)-3'

PCR 增幅產物大小 75 bp

2.3.2.2.2. B 型毒素基因肉毒桿菌(標的基因：肉毒桿菌 B 型毒素基因)

引子 F：CbB-F, 5'-AGTAATCCAGGAGAAGTGGAGCGA-3'

引子 R：CbB-R, 5'-CRAAGCCTTCCCTTGATGCAAA-3'

探針 P：CbB-P, 5'-(FAM)-CGCAAATTTAATAATTTGGACCTGGGCC-(BHQ1)-3'

PCR 增幅產物大小 136 bp

2.3.2.2.3. E 型毒素基因肉毒桿菌(標的基因：肉毒桿菌 E 型毒素基因)

引子 F：CbE-F, 5'-CTATCCAAAATGATGCTTATATACCAAA-3'

引子 R：CbE-R, 5'-GGCACTTTCTGTGCATCTAAATA-3'

探針 P：CbE-P, 5'-(FAM)-ATGATTCTAATGGAACAAGTGATATAGAACAACATGATGT-(BHQ1)-3'

PCR 增幅產物大小 115 bp

2.3.2.2.4. F 型毒素基因肉毒桿菌(標的基因：肉毒桿菌 F 型毒素基因)

引子 F：CbF-F, 5'-GCAATATAGGATTACTAGGTTTTTCATTC-3'

引子 R：CbF-R, 5'-GAAATAAACTCCAAAAGCATCCATT-3'

探針 P：CbF-P, 5'-(FAM)-TTGGTTGCTAGTAGTTGGTATTATAACAA-(BHQ1)-3'

PCR 增幅產物大小 112 bp

2.3.2.2.5. 梭狀芽孢桿菌屬(*Clostridium* cluster I)通用引子與探針(標的基因：16S ribosomal RNA，供作內部對照基因)

引子 F：CL-F, 5'-TACCHRAGGAGGAAGCCAC-3'

引子 R：CL-R, 5'-GTTCTTCCTAATCTCTACGCAT-3'

探針 P：U16Cspp, 5'-(FAM)-GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG-(BHQ1)-3'

PCR 增幅產物大小約 232 bp。

- 註 3： 1. 合成之引子及探針，拆封後，以無菌去離子水稀釋成適當濃度，分裝後置於 -20°C 貯存備用，另探針需避光保存，探針 5'端採用 6-carboxy-fluorescein (FAM)標記，3'端採用 Black Hole Quencher 1 (BHQ1)標記。
2. 引子序列中，R 為混合鹼基代碼(A/G)，表示同時含 A 及 G；H 為混合鹼基代碼(A/C/T)，表示同時含 A、C 及 T。
- 2.3.2.3. 去氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP)溶液含去氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate, dATP)，去氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate, dCTP)，去氧鳥糞嘌呤核苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphate, dGTP)及去氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate, dTTP)各 2.5 mM 之溶液。
- 2.3.2.4. 聚合酶
Taq DNA polymerase (2 U/ μL)，內附 10 倍 PCR 緩衝溶液及 25 mM 氯化鎂溶液，或同級品。
- 2.3.2.5. TaqMan Universal PCR Master Mix (確認試驗用，適用於 ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System)
本試劑內含 real-time PCR 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，使用時添加引子、探針及待測檢體 DNA。
- 2.3.2.6. LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe (確認試驗用，適用於 Roche LightCycler)
本試劑內含 real-time PCR 所需去氧核糖核苷三磷酸、聚合酶等，且內附 25 mM 氯化鎂溶液，使用時添加引子、探針及待測檢體 DNA。
- 2.3.3. 電泳用：溴化乙錠(ethidium bromide)、瓊膠(agarose)、溴酚藍(bromophenol blue)、二甲苯藍(xylene cyanol FF)、乙二胺四乙酸二鈉(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, $\text{Na}_2\text{-EDTA}$)、三羥甲基氨基甲烷(tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris)、氫氧化鈉及硼酸採試藥級。瓊膠(agarose)及甘油採分子生物分析級試藥。DNA 分子量標記物質(DNA molecular weight marker)：100 bp DNA ladder marker。
- 2.3.4. 對照用物質：A 型、B 型、E 型與 F 型毒素基因肉毒桿菌、參考質體或其 DNA。

2.4. 器具及材料^(註4)

- 2.4.1. 微量吸管(Micropipette)：10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。
- 2.4.2. 吸管尖頭(Tip)：可滅菌。10 μ L、20 μ L、200 μ L 及 1000 μ L。
- 2.4.3. 電泳膠片製作盤。
- 2.4.4. 離心管：200 μ L、600 μ L、1.5 mL 及 2 mL。
- 2.4.5. PCR 反應管：200 μ L 及 500 μ L。
- 2.4.6. PCR 玻璃毛細管：Roche LightCycler 專用。
- 2.4.7. PCR 反應盤：具 96 個反應孔，適用於 ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System。
- 2.4.8. 玻璃或塑膠瓶：50 mL、100 mL、250 mL、500 mL、1000 mL 及 2000 mL。

註 4：使用之塑膠或玻璃器皿均為無 DNase 污染。

2.5. 試劑之配製

2.5.1. 0.5M 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液

稱取乙二胺四乙酸二鈉 186.1 g，加去離子水 800 mL 溶解，再加入氫氧化鈉 20 g 以調整 pH 值至 8.0，並加去離子水使成 1000 mL。

2.5.2. 0.5 倍 TBE (Tris-borate-EDTA) 緩衝溶液

稱取三羥甲基氨基甲烷 54 g 及硼酸 27.5 g，加入 0.5M EDTA 溶液 20 mL，再加水溶解使成 1000 mL，供作 5 倍 TBE 緩衝溶液，或使用市售 5 倍 TBE 緩衝溶液。臨用時以去離子水將 5 倍 TBE 緩衝溶液稀釋為 0.5 倍，作為 0.5 倍 TBE 緩衝溶液。

2.5.3. 1.5% 膠片

稱取瓊膠 1.5 g，加入 0.5 倍 TBE 緩衝溶液 100 mL，加熱攪拌至瓊膠完全溶解，適當冷卻後，倒入電泳膠片製作盤，並置入適當之尺梳，待膠片凝固後，即可使用。

2.5.4. 6 倍載入膠片緩衝溶液(6 \times gel loading buffer)

稱取溴酚藍 25 g 及二甲苯藍 0.25 g，加入甘油 30 mL，再加入無菌去離子水使成 100 mL，並置於 4 $^{\circ}$ C 冰箱貯存備用。

2.5.5. 膠片染液

稱取溴化乙錠 0.1 g，加水 10 mL 溶解，供作原液(10 mg/mL)，使用前以水稀釋成 1 μ g/mL。溴化乙錠為致癌物質，配製時應注意安全。

2.5.6. PCR 溶液^(註 5)

2.5.6.1. 鑑別試驗用

(A 型、B 型、E 型與 F 型毒素基因肉毒桿菌)

10 倍 PCR 緩衝溶液.....	10.0 μL
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 U/ μL)	0.5 μL
25 mM 氯化鎂溶液.....	10.0 μL
2.5 mM dNTP	8.0 μL
10 μM 引子 F	5.0 μL
10 μM 引子 R	5.0 μL
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng).....	2.0 μL
無菌去離子水.....	10.5 μL
總體積.....	100.0 μL

2.5.6.2. ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System 確認試驗用

(A 型、E 型與 F 型毒素基因肉毒桿菌)

5 μM 引子 F.....	1.50 μL
5 μM 引子 R.....	1.50 μL
5 μM 探針 P.....	0.50 μL
TaqMan Universal PCR Master Mix	12.50 μL
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng).....	5.00 μL
無菌去離子水.....	4.00 μL
總體積.....	25.00 μL

2.5.6.3. ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System 確認試驗用

(B 型毒素基因肉毒桿菌)

5 μM 引子 F.....	2.50 μL
5 μM 引子 R.....	2.50 μL
5 μM 探針 P.....	2.50 μL
TaqMan Universal PCR Master Mix	12.50 μL
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng).....	5.0 μL
總體積.....	25.00 μL

2.5.6.4. Roche LightCycler 確認試驗用

(A 型、B 型、E 型與 F 型毒素基因肉毒桿菌)

5 μM 引子 F.....	1.5 μL
5 μM 引子 R.....	1.5 μL
5 μM 探針 P.....	0.5 μL
LightCycler [®] FastStart DNA Master HybProbe	2.0 μL

25 mM 氯化鎂溶液.....	2.4 μ L
檢體 DNA 溶液(總量 100 ng).....	5.0 μ L
無菌去離子水.....	7.1 μ L
總體積.....	20.0 μ L

註 5：PCR 溶液應置於冰浴中配製。

2.6. 檢體 DNA 溶液之製備

2.6.1. 檢體增菌液之 DNA 溶液製備

自第一部份 3.4.1. 節增菌液中吸取菌液 1 mL，置入已滅菌之 1.5 mL 離心管中，以 $14000 \times g$ 離心 2 分鐘，去除上清液。

2.6.1.1. 直接煮沸法

將沉澱物加入無菌去離子水 1 mL，震盪混合均勻，以 $14000 \times g$ 離心 2 分鐘，去除上清液。再將沉澱物加入無菌去離子水 1 mL，震盪混合均勻，置入加熱振盪器中煮沸 10 分鐘，取出離心管，待冷卻後以 $14000 \times g$ 離心 2 分鐘，吸取上清液至另一已滅菌 1.5 mL 離心管，作為檢體 DNA 原液，置於 -20°C 冷凍保存。

2.6.1.2. 抽取 DNA 法

採用適用於革蘭氏陽性細菌 DNA 抽取之市售套組，並依套組操作說明步驟抽取 DNA。抽取之 DNA 溶液收集至已滅菌之 1.5 mL 離心管，作為檢體 DNA 原液，置於 -20°C 冷凍保存。

2.6.2. 肉毒桿菌分離菌株之 DNA 溶液製備

自培養基上鈎取一接種環的菌量，置入含有無菌去離子水 1 mL 之已滅菌 1.5 mL 離心管中，震盪混合均勻，置入加熱振盪器中煮沸 10 分鐘，取出離心管，待冷卻後以 $14000 \times g$ 離心 2 分鐘，吸取上清液至另一已滅菌 1.5 mL 離心管，作為檢體 DNA 原液，置於 -20°C 冷凍保存。亦可依 2.6.1.2. 節進行檢體 DNA 原液之製備。

2.6.3. DNA 濃度測定及純度判斷

取適量之檢體 DNA 原液，以無菌去離子水做適當倍數之稀釋，分別測定 260 nm 及 280 nm 之吸光值(O.D.)。以波長 260 nm 吸光值乘 50 ng/ μ L 及稀釋倍數，即為檢體 DNA 原液濃度。DNA 溶液純度則以 $\text{O.D.}_{260}/\text{O.D.}_{280}$ 比值作判斷，其比值應介於 1.7~2.0。

2.7. 鑑別試驗^(註 6)

2.7.1. PCR 操作步驟

以無菌去離子水適當稀釋檢體 DNA 原液、引子備用。取 PCR 反應管，依照 2.5.6.1.節配製 PCR 溶液，依序加入無菌去離子水、10 倍 PCR 緩衝溶液、25 mM 氯化鎂溶液、dNTP、引子、*Taq* DNA polymerase 及檢體 DNA 溶液，混合均勻後，將反應管置於離心機瞬間離心，使混合液聚積於反應管之底部。移入 PCR 反應器，並參照 2.7.2.節設定反應條件，進行反應，結束後，取出 PCR 增幅產物，進行電泳分析。

2.7.2. PCR 條件

步驟	溫度	時間
1. 最初變性	95°C	5 min
2. 變性	94°C	1 min
3. 黏接	60°C	1 min
4. 延展	72°C	1 min
步驟 2 至步驟 4，共進行 30 個循環反應。		
5. 最終延展	72°C	10 min

2.7.3. 膠片電泳分析

取適量之 6 倍載入膠片緩衝溶液，分別與無菌去離子水(空白組)及 PCR 增幅產物混合均勻，注入 1.5%膠片孔中，以 50 或 100 伏特電壓進行電泳。同時另取 DNA 分子量標記物質進行電泳，作為 PCR 增幅產物大小之判別與計算依據。電泳後之膠片置入膠片染液中進行染色約 15 分鐘，置入水中漂洗及褪染，再以紫外光照射觀察是否有明顯之 DNA 螢光帶，並判讀結果。同時另測試正反應及負反應對照組。

2.7.4. 鑑別

檢體 DNA 需同時進行內部對照基因及四型肉毒桿菌毒素基因正反應對照組 (A 型、B 型、E 型與 F 型) 之 PCR 測試。檢體 DNA 之 PCR 增幅產物電泳結果，與正反應對照組及 DNA 分子量標記物質之電泳結果進行相互比對，當檢體 DNA 與正反應對照組 DNA 均出現 PCR 增幅產物，經由 DNA 分子量標記物質估算 PCR 增幅產物大小分別為 983 bp (A 型); 492 bp (B 型); 410 bp (E 型); 1137 bp (F 型) 者，即判定該檢體含有肉毒桿菌 A 型、B 型、E 型或 F 型毒素基因。

- 註 6：1. PCR 鑑別試驗結果之判讀係以 PCR 增幅產物大小判定，當測試結果判讀困難時，應進行確認試驗。
2. 本 PCR 定性反應條件係採 GeneAmp® PCR System 9700 設定之，當使用其他機型時，應自行探討反應條件。

2.8. 確認試驗：本實驗視需要而操作之。

2.8.1. Real-time PCR 操作步驟

2.8.1.1. Real-time PCR—ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System

以無菌去離子水適當稀釋檢體 DNA 原液、引子及探針備用。取已滅菌之 1.5 mL 離心管，依照 2.5.6.2.節與 2.5.6.3.節配製 PCR 溶液，依序加入 TaqMan Universal PCR Master Mix、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝 20 μ L 入 PCR 反應盤的反應孔中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 μ L，再將 PCR 反應盤置於離心機中，以 200 \times g 瞬間離心，移入 real-time PCR 反應器，依下列條件進行反應。同時另製作正反應及負反應對照組。

步驟	溫度	時間
1. 熱活化	50°C	2 min
2. 最初變性	95°C	10 min
3. 變性	95°C	15 sec
4. 黏接、延展	60°C	1 min

步驟 3 至步驟 4，共進行 45 個循環反應。

設定 PCR 模式：9600 Emulation

設定反應體積：25 μ L

2.8.1.2. Real-time PCR—Roche LightCycler

以無菌去離子水適當稀釋檢體 DNA 原液、引子及探針備用。取 PCR 反應管，依照 2.5.6.4.節配製 PCR 溶液，依序加入 LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe、25 mM 氯化鎂溶液、稀釋過之引子及探針，混合均勻後，分裝 15 μ L 於玻璃毛細管中，各別加入檢體 DNA 溶液 5 μ L，再將毛細管置於離心機中，以 800 \times g 瞬間離心，移入 real-time PCR 反應器，依下列條件進行反應。同時另製作正反應及負反應對照組。

步驟	溫度	時間
1. 最初變性	95°C	10 min
2. 變性	95°C	5 sec
3. 黏接	60°C	25 sec
4. 延展	72°C	8 sec
步驟 2 至步驟 4，共進行 45 個循環反應。		
5. 冷卻	40°C	45 sec

2.8.2. Real-time PCR 螢光分析

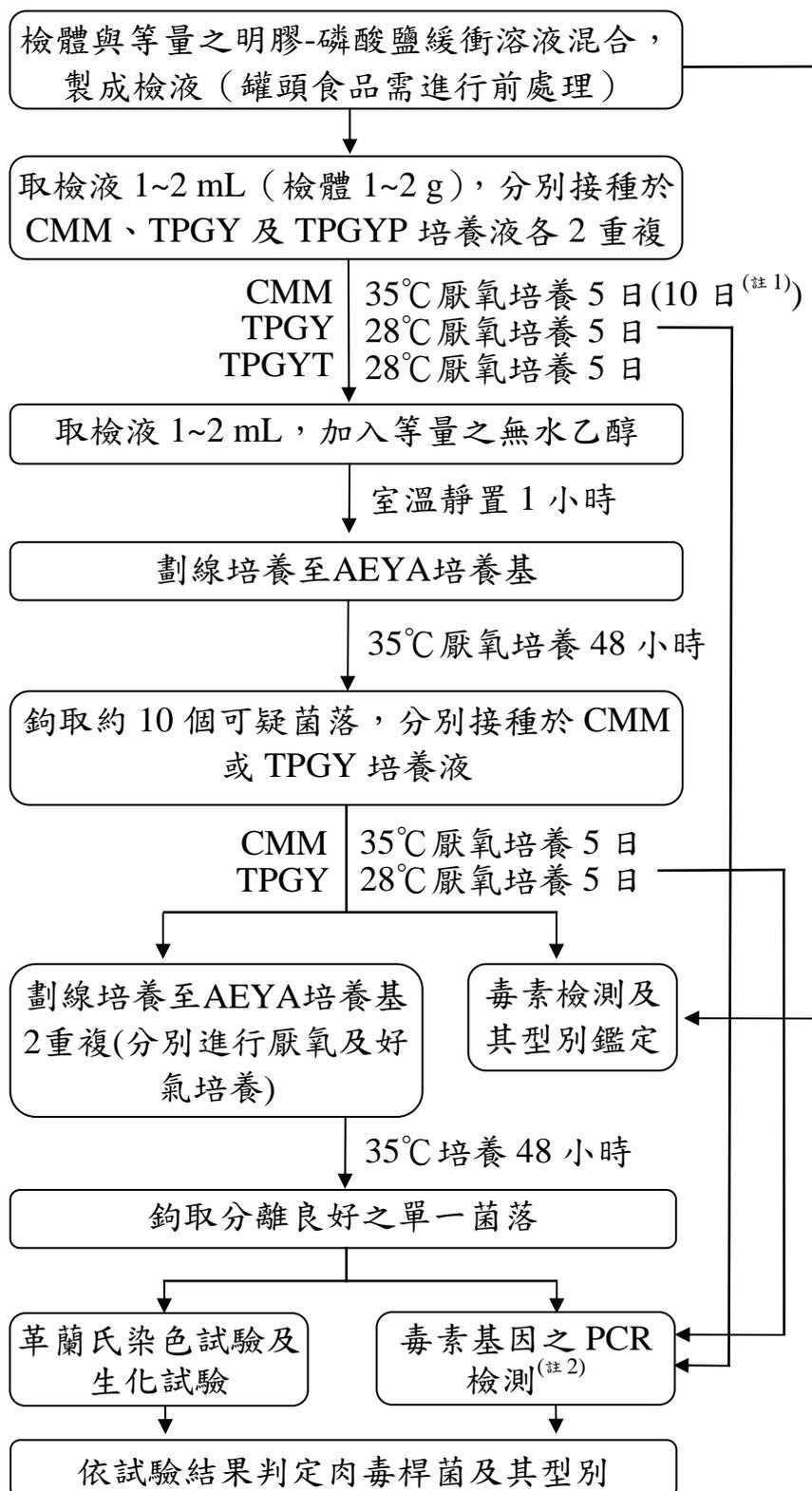
檢體 DNA 經 real-time PCR 反應後，直接從 real-time PCR 反應器上之螢幕觀察探針所產生之螢光增幅曲線，即可判讀反應結果。同時另測試正反應及負反應對照組。

2.8.3. 確認

檢體 DNA 需同時進行內部對照基因及四型肉毒桿菌毒素基因之 real-time PCR 測試。檢體 DNA 之 PCR 增幅產物螢光分析圖與正反應對照組螢光分析圖進行相互比對，當檢體 DNA 與正反應對照組之 PCR 螢光分析圖，均出現經由探針所產生之螢光增幅曲線，即可視所使用之肉毒桿菌毒素基因 real-time PCR 探針種類 (A 型、B 型、E 型與 F 型)，確認該 PCR 增幅產物為肉毒桿菌 A 型、B 型、E 型或 F 型毒素基因之基因片段，可確認該檢體中含有 A 型、B 型、E 型或 F 型肉毒桿菌。

附註：第二部份肉毒桿菌毒素基因之 PCR 檢測可視需要執行。

檢驗流程圖



註 1：培養 5 日後，仍無明顯之細菌增長現象時，則再繼續培養 10 日。

註 2：可依檢體含菌量情況自行探討接續 PCR 之步驟及增菌時間，以達快速鑑別目的。