



中国畜牧兽医学动物福利与健康养殖分会技术标准

T/AWHB 2001—2017

魏氏梭菌类毒素疫苗制备技术规程

Technical Specification for the preparation of the
Clostridium perfringens toxoid vaccine

2017-06-11 发布

2017-07-11 实施

中国畜牧兽医学动物福利与健康养殖分会 发布

前 言

本规程按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规则起草。

本规程由中国畜牧兽医学会动物福利与健康养殖分会提出并归口。

本文件规程由中国畜牧兽医学会动物福利与健康养殖分会发布，版权归中国畜牧兽医学会动物福利与健康养殖分会所有，任何组织及个人未经规程所有单位许可，不得以任何形式全部或部分使用。

本规程的附录A、B、C为规范性附录。

本规程起草单位：山东农业大学、江苏省农业科学院兽医研究所、山东绿都生物科技有限公司、金宇保灵生物药品有限公司、重庆澳龙生物制品有限公司、吉林正业生物制品股份有限公司、青海生物药品厂有限公司、山东戴尔塔生物工程有限公司。

本规程主要起草人：柴同杰、韦良孟、沈志强、王芳、伏刚、冉智光、韩四娥、宋松林、廉维、贾青燕、王海荣、李宁、戴培强、曲正秀、郭志云。



魏氏梭菌类毒素疫苗制备技术规程

1 范围

本技术规程规定了魏氏梭菌病类毒素的制备技术。

本规程适用于家畜魏氏梭菌毒素、类毒素及其疫苗的研制。

2 产气荚膜梭菌的分离、鉴定

2.1 仪器、材料准备

2.1.1 仪器

酒精灯、接种环、光学显微镜、超净工作台、高压灭菌锅、厌氧培养箱。

2.1.2 培养基和试剂

TSC 培养基（配制方法见附录 A1）、血琼脂平板（配制方法见附录 A2）、增菌培养基（配制方法见附录 A3）、鲜牛乳、生化鉴定试剂、革兰氏染色液。

2.2 涂片、镜检

采取清洁玻片在病死畜禽肠道病变部位粘膜进行组织触片，革兰氏染色、镜检。观察到视野中革兰氏染色反应阳性，一般是直径 $0.8\ \mu\text{m}$ ~ $1.5\ \mu\text{m}$ 、长 $5\ \mu\text{m}$ ~ $17\ \mu\text{m}$ 的蓝紫色的细菌。

2.3 样品采集

无菌采集病死家畜的肠内容物或粪便 5 g，加入到 45 mL 灭菌营养肉汤培养基中增菌，在厌氧环境（ $88\%\text{N}_2$ 、 $7\%\text{H}_2$ 、 $5\%\text{CO}_2$ ） $43\ ^\circ\text{C}$ 培养 24 h。

2.4 细菌分离培养

接种环取 3~5 环，接种在胰月示-亚硫酸盐-环丝氨酸琼脂基础培养基（TSC）上， $43\ ^\circ\text{C}$ 厌氧培养 24 h。观察菌落形态，将黑色可疑菌落再接种到血琼脂平板上（血琼脂基础培养基+5%绵羊血+1%葡萄糖）， $43\ ^\circ\text{C}$ 厌氧培养 24 h 分离培养。血琼脂平板上菌落直径 1 mm~2 mm、双溶血环，平板从培养箱取出后，有异臭味，菌落颜色由灰褐变为绿色。（附录 A）

2.5 产气荚膜梭菌纯培养

挑取疑似菌落，涂片镜检。再对疑似菌落纯分离培养，得到纯分离株。

2.6 生化鉴定

对葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、果糖、乳糖、木糖、甘露醇、水杨苷、吲哚试验、 H_2S 试验、MR、还原性硝酸盐试验、明胶液化进行试验。把分离菌株液加入生化反应发酵管中，厌氧培养 24 h，观察生化试验结果。

2.7 牛乳培养基进行暴烈发酵试验

该菌能使牛奶培养基“暴烈发酵”。

2.8 结果判定

TSC 培养基上可疑菌落为黑（玄）色；血平板上可疑菌落双溶血环，平板从培养箱取出后，菌落颜色由灰褐变为绿色。生化反应是：葡萄糖+、麦芽糖+、蔗糖+、果糖-、乳糖+、木糖-、甘露醇-、水杨苷-、吲哚试验-、H₂S 试验+、MR+、还原性硝酸盐试验+、明胶液化+，以及牛奶培养基“暴烈发酵”的分离株可判定为产气荚膜梭菌。

3 产气荚膜梭菌毒素基因的 PCR 检测

3.1 材料准备

3.1.1 仪器

厌氧培养箱、超净工作台、PCR仪、电泳仪、凝胶成像仪、数显恒温水浴锅、振荡器、离心机、高压灭菌锅。

3.1.2 培养基和试剂

血琼脂平板、增菌培养基、Taq酶、DNA模板、dNTPs、双蒸水。

3.2 引物

根据产气荚膜梭菌4种主要毒素基因序列和国内外公开发表的引物序列合成通用引物。

表 1 引物序列

基因 (bp)	上游引物 (5' -3')	下游引物 (5' -3')
α (alpha) cpa (325)	GCTAATGTTACTGCCGTTGA	CCTCTGATACATCGTGTAAG
β (beta) cpb (196)	GCGAATATGCTGAATCATCTA	GCAGGAACATTAGTATATCTTC
ε (epsilon) etx (656)	GCGGTGATATCCATCTATTC	CCACTTACTTGTCTACTAAC
ι (iota) iap (446)	ACTACTCTCAGACAAGACAG	CTTTCCTTCTATTACTATACG

3.3 DNA 模板的制备

3.3.1 增菌

将 3 分离鉴定的产气荚膜梭菌接种于营养肉汤培养基中，43 °C厌氧培养12 h。（附录A）

3.3.2 模板制备

取增菌培养物于1 mL离心管中，8,000 g/min离心1.5 min ~2 min，弃去上清，加入100 μL灭菌双蒸水混匀作为模板。

3.4 PCR 反应体系 (25 μL)

3.4.1 PCR 反应体系

表 2 PCR 反应体系

10 \times Tag buffer(含 Mg^{2+})	2.5 μL
dNTPs	2.5 μL
上游和下游引物(10 $\text{pmol}/\mu\text{L}$)	各 1 μL
模板	2 μL
无菌双蒸水	15.75 μL
Taq DNA 聚合酶	0.25 μL

3.4.2 对照

同时设立阳性对照、阴性对照和空白对照，用 B 型 (NCTC 8533)、E 型 (NCTC 8084) 产气荚膜梭菌标准菌株的菌体作阳性对照，用大肠杆菌标准菌株的菌体作阴性对照，用无菌双蒸水作空白对照。

3.5 PCR 反应

94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min，然后 30 个循环，分别为：94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s；53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min。最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3.6 电泳

制备 1% 琼脂糖凝胶，加样 6 μL ~8 μL ，在电压 80 V~100 V、电流 40 mA 下在 1 \times TAE 电泳缓冲液进行电泳 30 min~40 min。（附录 B）

3.7 结果判定

用凝胶成像仪观察扩增条带，在阴性和空白对照泳道无条带，阳性对照泳道出现 α 325bp、 β 196bp、 ϵ 656bp、 ι 446bp 的清晰条带的条件下。根据阳性条带大小判断样品阳性或者阴性（琼脂糖凝胶电泳结果在附录 B）。

4 类毒素的制备技术

4.1 材料准备

4.1.1 仪器

恒温水浴锅、高压灭菌锅、超净工作台、厌氧培养箱、恒温箱等。

4.2 实验动物

新西兰白兔 (1.5-2.0kg)	
昆明鼠 (18-20g)	
绵羊 (30-40kg)	

4.3 主要试剂及仪器

高速台式离心机: TGL-16G	
厌氧培养箱: YQX-II 型	
组织捣碎机: JJ-2 型	
数字式粘度计: NDJ-5S	
酶标仪: ELX800	
生物净化工作台: BCM-1000 型	
万向摇床: TS-92 型	
电热恒温培养箱 500 型	
电热恒温培养箱 300 型	
电泳仪: JY600C	
数显恒温水浴锅 HH-4	
双光紫外可见分光光度计: TU—1901 系列	
Bio-X Enterotoxaemia ELISA Kit	
Bio-X Epsilon Toxin ELISA Kit Sero	
丙烯酰胺	
SDS	
Tris-Base	
考马斯亮蓝 R-250	
N,N ¹ -亚甲双丙烯酰胺	
氯化钠	
氯化钾	
十二水磷酸氢二钠	
磷酸氢二钾	
硫酸铵	
YEAST EXTRACT	
糊精	
L-Arginine	
硫乙醇酸盐流体培养基	
甲醛溶液	
Tween-80	
Aluminum tristearate	
Span-80	

4.4 试验方法

4.4.1 菌种的复苏

将 D 型产气荚膜梭菌种 (National Collection of Type Cultures 英国微生物菌种保藏中心保藏, 保藏号: NCTC 528/1、NCTC 3180、NCTC 8346) 接种于血琼脂基础培养基, 37°C 在厌氧箱 (厌氧环境气体组成成分 88%N₂、7%H₂、5%CO₂) 培养 36 小时。(附录 A)

4.4.2 细菌增菌

挑取单个菌落接种于硫乙醇酸盐流体培养基 45°C 厌氧增菌 10h 后, 取 5ml FT 细菌培养液加入到 Gardon 汤中, 43°C 厌氧培养 6h, 得到 Gardon 汤菌液。(附录 A)

4.4.3 毒素的制备

将 Gardon 汤菌液 4°C 10000r/min 离心 15min, 再用孔径 0.22μm 蔡氏滤器过滤取上清得到毒素溶液。

4.4.4 验证毒素 α 、 β 、 ϵ 、 ι 的存在

4.4.4.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测外毒素中存在 α 、 β 、 ϵ 、 ι

4.4.4.1.1 D 型产气荚膜梭菌外毒素粗提

向过滤所得 D 型产气荚膜梭菌毒素溶液慢慢加入饱和硫酸铵溶液, 最终使混合溶液中硫酸铵达到 50% 饱和度, 4°C 静置过夜。然后 4°C 8000r/min 离心 30min, 倒掉上清液, 将沉淀用适量 0.05M Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 溶解后, 再次加入饱和硫酸铵溶液, 使混合溶液中硫酸铵达到 40% 饱和度, 4°C 静置过夜。然后 4°C 8000r/min 离心 30min, 倒掉上清液, 最后将沉淀溶解于 5ml 同一缓冲液中即为粗提外毒素。

4.4.4.1.2 粗提毒素聚丙烯酰胺凝胶电泳

(1) 准备: 用自来水清洗烧杯、电泳仪及其配件, 再用双蒸水将其冲洗干净, 晾干备用; 先用自来水把玻璃板清洗干净并擦干后再用酒精棉球将玻璃板擦拭干净, 在自然环境中晾干待用。

(2) 配胶: 先把胶板组装好, 低的一面玻璃朝里, 两块玻璃底部要平, 防止漏胶。在玻璃平板中依次加入配好的胶液, 混合吹打混匀后, 用移液枪立刻加入到胶板中 (倒胶时, 以梳子齿端为参照, 预留 1cm 积层胶空间)。然后进行封闭即在胶上加满超纯水, 可有效的防止蒸发。在室温下分离胶大约 30min 即可完全凝固。待分离胶完全凝固后, 先倒掉分离胶上用做封闭的超纯水, 再配制 5% 的积层胶。在玻璃平板中依次加入配好的积层胶的胶液, 插上梳子。大约三十分钟后积层胶可完全凝固。(附录 C)

(3)加样品:待积层胶完全凝固后将梳子小心的拔掉,然后再把电泳仪组装好,再倒入 1×Running Buffer,务必使电泳液没过胶板内层的短板,胶外板到 1/3 处即可,但是没过电泳仪下方的电极线。将样品与 buffer 按 1: 1 比例混匀再用移液器加入到胶孔中,最后加入蛋白 Marker。记录好加入顺序。(附录 C)

(4)跑胶:加样完毕后,立刻跑胶。将电泳仪固定在 125V,大约需要 2.5h,跑胶完成的一个重要的标志就是染带刚刚跑出胶板。

(5)卸胶:小心将胶板进行拆卸,小心将两层玻璃板用分离器分离,再把积层胶切去。

(6)染色:将分离胶放于盛有 20ml 考马斯亮蓝染色液 染色盒中,然后将染色盒放在万向摇床上慢慢摇动,20min 左右即可完成染色。若染色液为多次利用则适当延长时间。

(7)脱色:把分离胶取出放入盛有 30ml 脱色液的脱色盒中,半个小时换一次脱色液,换三次。脱色完成。

(8)对结果分析并保存:将分离胶用超纯水清洗干净,放置在白板上,并且拍照保存。

4.4.4.2 应用 ELISA 试剂盒检测外毒素中存在 α 、 β 、 ϵ 、 ι

(1)准备工作:将清洗液、稀释缓冲液、结合物、对照抗原、染色液、终止液使用前放在 21°C。

(2)将浓缩液用去离子水稀释 20 倍,确保稀释前没有结晶。将浓缩缓冲液稀释 5 倍将溶液放于 2~8 °C 保存。

(3)将待检的 D 型产气荚膜梭菌毒素加入凝集板:样品从 A1 至 H1 各孔依次加入,将对照抗原从 A2 至 H2 各孔依次加入。将加好样品的凝集板于 17°C-24°C 温度下孵育 1 小时。

(4)在洗涤槽上方轻弹微量凝集板使内容物倒空,然后倒扣在吸水纸上拍干。用移液器每孔加入 200ul 清洗液,第一遍先冲洗一下,倒掉,甩干。第 2、3 遍时,加入 200ul 清洗液,每次摇洗三分钟。最后一次要把凝集板彻底甩干。

(5)每孔加入 100 μ l 酶标抗体,18-24°C 孵育 1 小时。用盖子盖住凝集板。

(6)在洗涤槽上方轻弹微量凝集板使内容物倒空,然后倒扣在吸水纸上拍干。用移液器每孔加入 200ul 清洗液,第一遍先冲洗一下,倒掉,甩干。第 2、3 遍时,加入 200ul 清洗液,每次摇洗三分钟,最后一次要把凝集板彻底甩干。

(7)每孔加入 100 μ l 显色底物。操作时显色底物必须是无色的,如果移液管中的底物显示蓝色则表明底物已被污染。在 18-24°C 避光培养 10 分钟,不用盖盖子。

(8)十分钟后,每孔加入 50 μ l 终止液。

(9) 用酶标仪在 450nm 下测定反应物的光密度。加入停止液后应立即读数，因为显色底物有可能结晶而干扰正确的读数。

4.4.5 D 型产气荚膜梭菌外毒素毒力测定

用灭菌的生理盐水将毒素分别按 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 进行倍比稀释，然后每只小白鼠腹腔注射 1ml。小白鼠分 6 组，对照组注射无菌生理盐水，3 只/组，注射后观察 72 小时，记录死亡情况，按 Reed-Muench 氏法计算 LD_{50} 。

4.4.6 毒素的灭活及类毒素疫苗的制备

4.4.6.1 D 型产气荚膜梭菌毒素灭活时间的测定

将制取好的毒素用 1M NaOH 调 pH 至 7.2，然后加入 0.3% 的甲醛，充分振荡混匀，然后置于 37°C 温箱，选择六个不同的时间(8h、16h、32h、64h、96h、128h)进行灭活，期间每隔 5-6h 振摇一次。分别在第 8h、16h、32h、64h、96h、128h 时各取 1ml 灭活的毒素，腹腔接种 3 只小白鼠，检验灭活效果。于此同时设立对照组（用灭菌的生理盐水代替），观察 72h (实验重复三次)。

4.4.6.2 白油佐剂类毒素疫苗的制备

将白油和 Span-80 按照 94: 6 的体积比混合，再在白油和 Span-80 混合液中加入硬脂酸铝使硬脂酸铝终浓度为 2%，溶化混匀，121°C 高压灭菌 30 分钟即为油相；在类毒素溶液加入 Tween-80s 使 Tween-80s 终浓度达到 2%，混匀，即为水相；将油相与水相按 1: 1 的体积比乳化，在乳化液中加入硫柳汞使硫柳汞终浓度为 0.01%，即得类毒素疫苗。

4.4.7 类毒素疫苗的检验

4.4.7.1 类毒素疫苗物理性状检验

4.4.7.1.1 类毒素疫苗剂型检查

打开瓶塞，用 1000ul 的移液器吸取疫苗约 1mL，在距离水面 2~3cm 上方处先将一滴疫苗滴到盛有水的玻璃平皿的水面上，液滴由于表面张力影响往往在液面上扩散，然后再滴入 2~3 滴疫苗，观察疫苗在液面扩散情况和从容器侧面观察疫苗向下扩散情况，并记录液滴的扩散情况。

结果判定：油包水剂型除第一滴在液面出现扩散外，其他各滴滴入水中均不扩散。水包油包水剂型滴入水中在液面及水中均呈现云雾状扩散，并有拖尾现象。

4.4.7.1.2 类毒素疫苗稳定性检查

打开铝塑盖和瓶塞，用 10mL 吸管吸取疫苗 10mL，加入离心管中，3000r/min 离心 15min。

结果判定：离心管中疫苗出现大量水相或油相析出或明显的水油分层时，描述为破乳或分层，否则为未破乳。

4.4.7.1.3 甲醛及硫柳汞的测定

4.4.7.1.3.1 甲醛残留量的测定

(1) 对照品溶液的制备 取已标定的甲醛溶液适量，配成甲醛含量为 1mg/ml 的溶液，精确量取 5.0ml 置于 50ml 量瓶中，加 20%吐温—80 乙醇溶液 10ml,加水定容至 50ml,摇匀，即得对照品溶液。

(2) 待检溶液制备 用 5.0ml 刻度吸管量取待疫苗 5.0ml,置于 50ml 量瓶中，用 20%吐温—80 乙醇溶液 10ml，分次洗涤吸管，洗液并入 50ml 量瓶中，摇匀，定容至 50ml。强烈振荡摇晃，静置分层，下层液如果不澄清，滤过，弃去初滤液，取澄清续滤液，即得。

(3) 测定 精确吸取对照品溶液和待检溶液各 0.5ml,分别加入醋酸—醋酸铵缓冲液 10ml,乙酰丙酮试液 10ml，60℃水浴 15min，冷水冷却 5min，放置 20min 后，用紫外分光光度计 410nm 的波长处测定吸收度，计算即得。

4.4.7.1.3.2 硫柳汞防腐剂残留量的测定

(1) 对照品溶液制备

取置硫酸干燥器中干燥至恒重的二氯化汞 0.1354g,精密称定置 100ml 量瓶中，加 0.5mol/L 硫酸液使其溶解并稀释至刻度，摇匀，即为对照汞贮备液。临用前精确量取标准汞贮备液 5.0ml 置于 100ml 量瓶中，用 0.5mol/L 硫酸溶液稀释至刻度，摇匀，即为 1.0ml 相当于 50ug Hg 的对照汞溶液。

(2) 油乳剂疫苗消化

用经标定的 1.0ml 注射器精确抽取摇匀的待检疫苗 1.0ml，置于 25ml 凯氏烧瓶底，加硫酸 3.0ml、硝酸溶液 0.5ml，小心加热，待泡沸停止，稍冷，加硝酸溶液 0.5~1.0ml，再加热消化，如此反复加硝酸溶液消化，加热达白炽化，继续加热 15min 后，溶液与上次加热后的颜色无改变为止，冷却（溶液应无色），加水 20ml，冷却至室温，即得。

(3) 滴定

将上述消化液由凯氏烧瓶转移到 125ml 分液漏斗中，用水分多次洗剂凯氏烧瓶，使总体积为 80ml，加 20%盐酸羟胺试液 5.0ml，摇匀，用 0.001 25%双硫脲滴定液滴定，开始时每次滴加 3.0ml 左右，以后逐渐减少，至每次 0.5ml，最后可减少至 0.2ml，每次加入滴定液后，强烈振摇 10s，静置分层，弃去四氯化碳层，继续滴定直至双硫脲的绿色不变，即为终点。

(4) 对照品滴定

精确两区对照液 1.0ml，置于 125ml 分液漏斗中，加硫酸 2.0ml、80ml、20%盐酸羟胺溶液 5.0ml，然后用双硫脲滴定液滴定。开始时每次滴加 3.0ml 左右，以后逐渐减少，至每次 0.5ml，最后可减少至 0.2ml，每次加入滴定液后，强烈振摇 10s，静置分层，弃去四氯化碳层，继续滴定直至双硫脲的绿色不变，即为终点。

4.4.7.2 无菌检验

硫乙醇酸盐培养基 (T.G) 用于厌氧性及需氧性细菌检验；酪胨琼脂 (G.A) 固体培养基用于需氧性细菌检验；葡萄糖蛋白胨汤 (G.P) 用于霉菌及腐生菌检验。类毒素脱毒过滤后，接种 TG 小管、GA 斜面各两支，每支 0.2ml，一支置 25℃培养，一支置于 37℃培养，另取 0.2ml 接种 1 支 GP 小管置 25℃培养。均培养 7 日，应无菌生长。将 1mL 样品接种到产毒培养基中，43℃厌氧条件下 (88%N₂、7%H₂、5%CO₂) 培养 5d，应无菌生长。(附录 A)

4.4.7.3 类毒素疫苗安全检验

取 1.5-2kg 健康兔 4 只，分别肌肉接种超大剂量 5ml 类毒素疫苗，连续观察 10 天。观察无局部或全身异常反应。

4.4.7.4 绵羊的最小致死量 (MLD) 测定

取 6-12 月龄、30-40kg 的绵羊 12 只，3 只一组用 8ml、10ml、12ml、14ml 经 0.22um 蔡氏滤器过滤得到的上清液对绵羊进行静脉注射，观察 24h。

4.4.7.5 类毒素疫苗免疫效力检验

取 6-12 月龄、30-40kg 绵羊 15 只，每 3 只为一组(每组分别肌肉注射 1ml、2ml、3ml、4ml 类毒素疫苗)，最后 3 只作为对照组。21 天后先对所有绵羊进行颈静脉采血并分离血清保存，再均用一个 MLD 的产气荚膜梭菌毒素进行静脉接种攻毒，观察 72h，记录发病死亡情况。

4.4.7.6 类毒素疫苗的抗体消长规律

取 6-12 月龄、30-40kg 左右的绵羊(未进行过魏氏梭菌菌苗免疫) 6 只, 三只各肌肉注射 2ml 制备的类毒素疫苗, 三只肌肉注射相同剂量的生理盐水作为对照。分别于注射后 1 周、2 周、3 周、4 周、5 周、6 周、8 周、12 周、14 周、17 周、20 周、24 周对六只绵羊进行颈静脉采血, 应用 ELISA 试剂盒检测其血清中的 α 、 β 、 ϵ 、 ι 毒素抗体效价。

4.4.7.6.1 应用 ELISA 检测抗毒素抗体效价

(1)准备工作: 将清洗液、稀释缓冲液、结合物、对照抗原、染色液、终止液使用前放在 21℃。

(2)将浓缩液用去离子水稀释 20 倍, 确保稀释前没有结晶。将浓缩缓冲液稀释 5 倍将溶液放于 2~8℃保存。

(3)将待检血清、阳性血清、阴性血清和稀释缓冲液按 1: 1 的比例稀释, 然后将稀释好的待检血清按每孔 100 μ l 的量加入酶标板中同时加入阳性血清、阴性血清, 在 37℃下孵育 2h。

(4)在洗涤槽上方轻弹微量凝集板使内容物倒空, 然后倒扣在吸水纸上拍干。用移液器每孔加入 200 μ l 清洗液, 第一遍先冲洗一下, 倒掉, 甩干。第 2、3 遍时, 加入 200 μ l 清洗液, 每次摇洗三分钟。最后一次要把凝集板彻底甩干。

(5)每孔加入 100 μ l 经 20 稀释的酶标抗体, 37℃下孵育 0.5 小时。用盖子盖住凝集板。

(6)在洗涤槽上方轻弹微量凝集板使内容物倒空, 然后倒扣在吸水纸上拍干。用移液器每孔加入 200 μ l 清洗液, 第一遍先冲洗一下, 倒掉, 甩干。第 2、3 遍时, 加入 200 μ l 清洗液, 每次摇洗三分钟。最后一次要把凝集板彻底甩干。

(7)每孔加入 100 μ l 显色底物。操作时显色底物必须是无色的, 如果移液管中的底物显示蓝色则表明底物已被污染。在 18-24℃避光培养 10 分钟, 不用盖盖子。

(8)十分钟后, 每孔加入 50 μ l 终止液, 蓝色变成黄色。

(9)用酶标仪在 450nm 下测定反应物的光密度。加入停止液后应立即读数, 因为显色底物有可能结晶而干扰正确的读数。

附 录 A

(规范性附录)

细菌培养基的配制

A.1 TSC培养基

TSC培养基	47.0g
0.5% D-环丝氨酸溶液	80ml

TSC培养基加热溶解于1000ml 蒸馏水中，121℃高压灭菌15分钟。冷至50℃时，加入过滤除菌的0.5% D-环丝氨酸溶液 80ml，倾倒平皿。

A.2 血琼脂基础培养基

血琼脂基础培养基	40.0g
葡萄糖	10g

加热溶解于1000 ml 蒸馏水中，116℃灭菌30min，冷至45~50℃时，加入5%的无菌脱纤维绵羊血，混匀，倾入无菌平皿。

A.3 营养肉汤培养基

蛋白胨	10.0g
氯化钠	5.0g
牛肉浸出粉	3.0g

称取本品18.0g于1L蒸馏水或去离子水中，121℃高压灭菌15分钟,备用。

A.4 硫乙醇酸盐流体培养基

营养肉汤培养基	33.0g
---------	-------

溶解于1000 ml蒸馏水中，116℃灭菌30min。

A.5 产毒培养基

蛋白胨	20g
L-精氨酸	12g
酵母浸粉	20g
糊精	10g

加热溶解于1000 ml PBS缓冲液中，调整pH为7.4后，116℃，30min灭菌。

附录 B

(规范性附录)

琼脂糖凝胶电泳

B.1 1%琼脂糖凝胶

琼脂糖 5g
 1×TAE 50ml
 荧光染料溴乙锭 (EB) 染色液 5ul

微波炉加热煮沸3次至琼脂糖全部融化,摇匀,即成1.0%琼脂糖凝胶液。

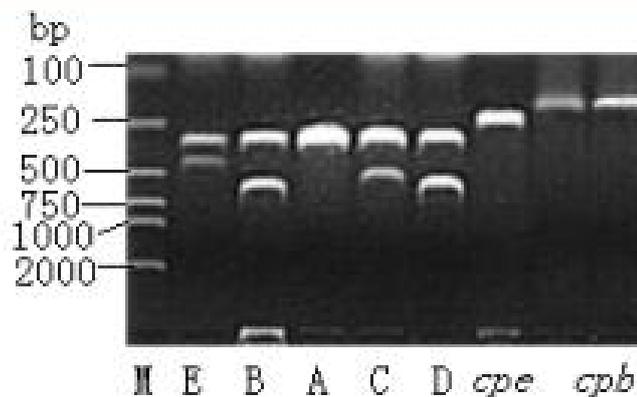
B.2 TAE电泳缓冲液 (pH约 8.5) 的配制

50×TAE电泳缓冲液储存液:

三羟甲基氨基甲烷 (Tris碱) 242g
 乙二胺四乙酸二钠 (Na₂EDTA) 37.2g
 双蒸水 800mL

待上述混合物完全溶解后,加入57.1mL的醋酸充分搅拌溶解,加双蒸水至1L后,置室温保存。应用前用双蒸水将50×TAE电泳缓冲液50倍稀释。

B.3 产气荚膜梭菌毒素基因的 PCR 检测



A: A型魏氏梭菌, α 毒素基因; B: α 、 β 、 ϵ 毒素基因; C: α 、 β 毒素基因; E: α 、 ι 毒素基因

附录 C

(规范性附录)

聚丙烯酰胺凝胶电泳

C.1 聚丙烯酰胺凝胶

分离胶 12% (10ml) :

超纯水	3.3ml
30%丙烯酰胺	4 ml
1.5M Tris-CL	2.5ml
10%SDS	0.1ml
10%APS	0.1ml
TEMED	0.004ml

置于小烧杯中使用移液枪吹打混匀, 缓慢均匀加入玻璃板中, 用超纯水压胶后等待 40min。倒空吸干超纯水后配置积层胶。

积层胶 5% (5ml) :

超纯水	3.4ml
30%丙烯酰胺	0.83ml
1.5M Tris-CL	0.63ml
10%SDS	0.05ml
10%APS	0.05ml
TEMED	0.005ml

置于小烧杯中使用移液枪吹打混匀, 缓慢均匀加入玻璃板中, 并接着插上梳齿, 等待 30min。凝固后使用或浸泡在去离子水中 4℃ 保存。

C.2 1×Running Buffer 电泳液

Tris 碱	6.06g (0.05 mol/L)
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.37g (1 mol/L)
NaCL	8.77g (0.151 mol/L)
双蒸水	930 mL

待上述混合物完全溶解后, 加双蒸水至 1 L, 用 1M HCL 滴定至 pH 7.6, 置室温保存。