

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2206.10—2014

化妆品微生物检验方法
第 10 部分：金黄色葡萄球菌 PCR 法

Determination of microorganism in cosmetics—
Part 10: PCR method for *Staphylococcus aureus* in cosmetics

2014-04-09 发布

2014-11-01 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

SN/T 2206《化妆品微生物检验方法》共分为 13 部分：

- 第 1 部分：沙门氏菌；
- 第 2 部分：需氧芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌；
- 第 3 部分：肺炎克雷伯氏菌；
- 第 4 部分：链球菌；
- 第 5 部分：肠球菌；
- 第 6 部分：破伤风梭菌；
- 第 7 部分：蛋白免疫印迹法检测疯牛病病原；
- 第 8 部分：白色念珠菌；
- 第 9 部分：胆汁酸耐受革兰氏阴性菌；
- 第 10 部分：金黄色葡萄球菌 PCR 法；
- 第 11 部分：金黄色葡萄球菌 多重实时荧光 PCR 法；
- 第 12 部分：绿脓杆菌 PCR 法；
- 第 13 部分：嗜麦芽窄食单胞菌。

本部分为 SN/T 2206 的第 10 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：房保海、王波、姜英辉、刘会梅、李正义、杨捷琳、吕蓉、贾俊涛、雷质文、孙涛。

化妆品微生物检验方法

第 10 部分:金黄色葡萄球菌 PCR 法

1 范围

SN/T 2206 的本部分规定了化妆品中的金黄色葡萄球菌 PCR 检测方法。
本部分适用于化妆品中金黄色葡萄球菌的检测。

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—2008 分析实验室用水规格和试验方法
GB 7918.1 化妆品微生物标准检验方法 总则
GB 7918.5 化妆品微生物标准检验方法 金黄色葡萄球菌
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文件。

3.1 术语和定义

3.1.1

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*

为革兰氏阳性细菌,球形,呈葡萄状排列,无芽胞,无荚膜,能分解甘露醇,血浆凝固酶阳性。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PCR:聚合酶链式反应,简称 PCR(polymerase chain reaction)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dNTP:脱氧核苷酸三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)

Taq:水生栖热菌(*Thermos aquaticu*)

4 方法提要

化妆品经增菌后,提取增菌液或可以菌落的 DNA,以提取的 DNA 为模板进行金黄色葡萄球菌高保守片段的 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 产物是否有特征条带,从而对化妆品中是否污染金黄色葡萄球菌进行快速检验筛选。

5 试剂和耗材

5.1 SCDLP 液体培养基(见 A.1)。

5.2 PCR 扩增引物:上游引物:5'-GGATGGCTATCAGTAATGTTTCG-3',下游引物:5'-TTAAC-CGTATCACCATCAATCG-3',扩增长度 247 bp,扩增的特异性 DNA 序列片段和引物对应的位置见附录 B。

5.3 G⁺ 细菌基因组 DNA 纯化试剂盒或其他有效试剂。

5.4 核酸裂解液:2%CTAB,100 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3),1.4 mol/L 氯化钠,20 mol/L EDTA (pH 8.0)。

5.5 异丙醇。

5.6 70%乙醇:70%无水乙醇,30%灭菌双蒸水(体积比)。

5.7 灭菌双蒸水,应符合 GB/T 6682—2008 中一级水的规格。

5.8 10×PCR 缓冲液(见 A.2)。

5.9 dNTP:10 mmol/L,每种 2.5 mmol/L。

5.10 琼脂糖(电泳纯)。

5.11 DNA 分子量标志物(50 bp~500 bp)。

5.12 GelRed 或 GelGreen 核酸染色剂。

5.13 6×上样缓冲液: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。

5.14 50×TAE 缓冲液(见 A.3)。

5.15 Eppendorf 管和 PCR 反应管。

6 仪器设备

6.1 恒温培养箱:36℃±1℃。

6.2 PCR 仪。

6.3 电泳仪。

6.4 凝胶分析成像系统。

6.5 冷冻离心机:离心力 12 000 g。

6.6 可调移液器:2.5 μL、10 μL、100 μL、1 000 μL。

7 操作步骤

7.1 样品制备和增菌

参照 GB 7918.1 进行样品的制备,参照 GB 7918.5 在 SCDLP 液体培养基中进行增菌。

7.2 模板 DNA 的提取

7.2.1 从 7.1 样品增菌液表层取 1 mL 培养液,离心收集细菌(4 000 r/min,10 min),按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明进行提取细菌基因组 DNA 备用(不能及时检验,则放置于-20℃±1℃冰箱保存备用)。

7.2.2 也可按照如下方法进行模板 DNA 制备。从 7.1 样品增菌液表层取 1 mL 培养液,离心收集细菌(4 000 r/min,10 min),去上清液。加入 600 μL 核酸裂解液,重新悬浮细菌。100℃水浴 5 min 后,冷

却至室温。12 000 r/min 离心 3 min, 将上清液移至干净的 1.5 mL 离心管中, 加入 0.8 倍体积的异丙醇, 放入冰箱静置 1 h, 12 000 r/min 离心 2 min, 去上清液, 吸干。200 μ L 70% 乙醇轻柔倒置几次洗涤, 12 000 r/min 离心 2 min, 小心去上清液, 吸干, 风干 10 min~15 min, 100 μ L 灭菌双蒸水 4 $^{\circ}$ C 保存(如不能及时检验, 放置 -20 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C 保存备用)。

7.3 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 nm 和 280 nm 处的吸收值。DNA 的浓度按式(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(μ g/mL);

A_{260} ——260 nm 处的吸光值;

N ——核酸稀释倍数。

当浓度为 0.34 μ g/mL~340 μ g/mL, A_{260}/A_{280} 比值在 1.7~1.9 时, 适宜于 PCR 扩增。

7.4 PCR 鉴定

7.4.1 扩增

7.4.4.1 50 μ L PCR 反应体系: 10 \times PCR buffer 5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(5U/ μ L)0.5 μ L, 上下游扩增引物(20 μ mol/L)各 0.5 μ L, dNTPs(10 mmol/L)1 μ L, 模板 DNA 0.5 μ L(可根据模板 DNA 的质量调节), 双蒸水补足体积至 50 μ L。

7.4.4.2 PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min; 4 $^{\circ}$ C 保温。

7.4.2 反应体系对照的设置

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。阳性对照为金黄色葡萄球菌 DNA 模板, 阴性对照为非金黄色葡萄球菌 DNA 模板, 空白对照为灭菌双蒸水。

7.4.3 凝胶电泳检测 PCR 产物

PCR 产物进行电泳检测, 用电泳缓冲液(1 \times TAE)制备 1.5%~2% 琼脂糖凝胶(55 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C 时加入万分之一的 GelRed 或 GelGreen 核酸染色剂)。取 5 μ L PCR 扩增产物, 分别与 1 μ L 上样缓冲液混合进行点样, 用 DNA 分子量标记物做参照。3 V/cm~5 V/cm 恒压电泳 20 min~40 min, 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保存。扩增产物长度为 247 bp。

8 结果判定

8.1 样品 PCR 反应未扩增出长度为 247 bp 的产物, 且阳性对照扩增出目的片段, 阴性对照和空白对照未检测到 247 bp 目的片段时, 结果报告为未检出金黄色葡萄球菌。

8.2 样品 PCR 反应扩增出预期大小的条带, 且阳性对照扩增出目的片段, 阴性对照和空白对照未出现条带时, 则可判定该样品结果为假定阳性, 应按照 GB 7918.5 进行分离和鉴定确认, 最终结果以后者检测结果为准。

8.3 如果阴性对照出现条带和/(或)阳性对照未出现预期大小的扩增条带, 本次待测样品的结果无效, 应重新进行实验, 并排除污染因素。

9 检测过程中防止交叉污染的措施

按照 SN/T 1193 要求执行。

10 废弃物处理

检测过程中的废弃物,收集后进行高压灭菌或在焚烧炉中焚烧处理。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂配制

A.1 SCDLP 液体培养基

A.1.1 成分

酪蛋白胨	17 g
大豆蛋白胨	3 g
氯化钠	5 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
卵磷脂	1 g
吐温 80	7 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将上述成分混合后,加热溶解,调节 pH 值为 7.2~7.3 分装,121 °C 20 min 高压灭菌。注意振荡,使沉淀于底层的吐温 80 成分混合,冷却至 25 °C 左右使用。

A.2 10×PCR 缓冲液

200 mmol/L Tris-HCl(pH 值为 8.4),200 mmol/L 氯化钾,15 mmol/L 氯化镁。

A.3 50×TAE 缓冲液

称取 242 g Tris,量取 57.1 mL 冰乙酸,100 mL 0.5 mol/L EDTA(pH 值为 8.0),溶于水中,定容至 1 L。分装后高压灭菌备用。使用时稀释为 0.5×TAE 电泳缓冲液。

附 录 B

(规范性附录)

扩增的金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因片段

GGATGGCTATCAGTAATGTTTCG AAAGGGCAATACGCAAAGAGGTTTTTCTTTTTTCGCT
ACTAGTTGCTTAGTGTTAACTTTAGTTGTAGTTTCAAGTCTAAGTAGCTCAGCAAATGCA
TCACAAACAGATAACGGCGTAAATAGAATTGGTTCTGAAGATTCAACAGTATATAGTGCA
ACTTCAACTAAAAAATTACATAAAGAACCTGCGACATTAATTAAG CGATTGATGGTGATACGGTTAA

注：长度 247 bp,方框中的序列为引物对应的序列。
