

# SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2206.11—2014

---

化妆品微生物检验方法  
第 11 部分：金黄色葡萄球菌  
多重实时荧光 PCR 法

Determination of microorganism in cosmetics—Part 11:  
Multiplex fluorescent real-time PCR method  
for *Staphylococcus aureus*

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 11 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。本文件的发布结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。

本部分主要起草单位：中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

主部分主要起草人：许红岩、刘宁、王颖、尹伟力、鲁闽、段效辉、方绍庆、曹鹏、耿金培。

# 化妆品微生物检验方法

## 第 11 部分：金黄色葡萄球菌

### 多重实时荧光 PCR 法

#### 1 范围

SN/T 2206 的本部分规定了化妆品中金黄色葡萄球菌的多重实时荧光 PCR 检测方法。  
本部分适用于化妆品中金黄色葡萄球菌的定性检测。

#### 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

**Ct 值 Cycle threshold Ct**

每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。

##### 3.2 缩略语

Taq:水生栖热菌(*Thermus aquaticu*)  
FAM:6-羧基荧光素(6-carboxyfluorescein)  
HEX:6-羧基-2',4,4',5',7,7'-六氯荧光素(5-hexachloro-fluorescein)  
BHQ:黑洞淬灭基(Black hole quencher)

#### 4 检测方法

##### 4.1 方法原理

加入多对引物和与模板 DNA 匹配的、两端有荧光基团标记的寡核苷酸探针进行 PCR 反应。PCR 每进行一次循环,合成的新链数与释放的荧光基团数呈对应关系,即 PCR 产物的量与荧光信号的强度呈对应关系。当荧光信号超过所设定的阈值时,荧光信号可被检测出来,仪器检测荧光信号的增加量可

以间接地体现样品模板 DNA 的目的基因的扩增量。样品的模板 DNA 进行实时荧光 PCR 扩增,观察实时荧光 PCR 的增幅曲线,从而对化妆品中金黄色葡萄球菌进行实时荧光 PCR 检测。

## 4.2 设备和材料

- 4.2.1 实时荧光 PCR 仪。
- 4.2.2 冰箱:  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.2.3 高速台式离心机(最高转速 12 000 r/min 以上)。
- 4.2.4 微量移液器和灭菌吸头:  $10\text{ }\mu\text{L}$ 、 $100\text{ }\mu\text{L}$ 、 $200\text{ }\mu\text{L}$ 、 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$ 。
- 4.2.5 离心管:  $1.5\text{ mL}$ 。
- 4.2.6 恒温水浴锅。
- 4.2.7 天平:感量  $0.01\text{ g}$ 。
- 4.2.8 均质器。
- 4.2.9 灭菌锥形瓶:  $500\text{ mL}$ 、 $250\text{ mL}$ 。
- 4.2.10 生化培养箱:温度  $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.2.11 高压灭菌器。

## 4.3 培养基和试剂

除另有规定外,试剂均为分析纯或生化试剂,水为灭菌双蒸水。所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

- 4.3.1 水:应符合 GB/T 6682—2008 中一级水的规格。
- 4.3.2 SCDLP 液体培养基。
- 4.3.3 7.5%氯化钠肉汤。
- 4.3.4 *Taq* DNA 聚合酶。
- 4.3.5 dNTP:dATP、dTTP、dCTP、dGTP。
- 4.3.6  $10\times$ PCR 缓冲液:  $200\text{ mmol/L}$  Tris-HCl(pH 值为 8.4),  $200\text{ mmol/L}$  氯化钾(KCl),  $15\text{ mmol/L}$  氯化镁( $\text{MgCl}_2$ )。
- 4.3.7 DNA 提取液:称取  $0.1\text{ g}$  chelex 100 粉末,加入  $100\text{ mL}$  灭菌蒸馏水中,摇匀。
- 4.3.8 三氯甲烷。
- 4.3.9 酚-三氯甲烷(体积比 1:1)。
- 4.3.10 异丙醇。
- 4.3.11 75%乙醇。
- 4.3.12 阴阳性菌株或 DNA。
- 4.3.13 引物和探针:引物和探针序列见附录 A。

## 4.4 检测步骤

### 4.4.1 样品制备

不同类型化妆品样品的制备参照 GB 7918.1 进行。

### 4.4.2 增菌培养

参照 GB 7918.5 进行样品的增菌培养。

### 4.4.3 增菌液模板 DNA 的制备

取 4.4.2 中培养样品增菌液  $1\text{ mL}$  加到  $1.5\text{ mL}$  无菌离心管中,  $8\text{ }000\text{ r/min}$  离心  $5\text{ min}$ , 轻轻倒去

上清液,倒置于吸水纸上,吸干液体,不同样品应在吸水纸不同地方吸干;加入 750  $\mu\text{L}$  DNA 提取液,振荡混匀后沸水浴 5 min,加酚-氯仿 700  $\mu\text{L}$ ,振荡混匀,12 000 r/min 离心 5 min;吸取上清至对应无菌离心管中,加入等体积氯仿,混匀后 12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清至对应无菌离心管中,加入 0.6 倍体积预冷的异丙醇,混匀,12 000 r/min 离心 5 min,轻轻倒去上清液,倒置于吸水纸上,吸干液体,不同样品应在吸水纸不同地方吸干,加入 75%乙醇 300  $\mu\text{L}$ ,颠倒洗涤,12 000 r/min 离心 5 min 弃上清,沉淀溶于 20  $\mu\text{L}$  灭菌双蒸水中,保存在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用。也可使用等效商品化 DNA 提取试剂盒并按其说明制备模板 DNA。

#### 4.4.4 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 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( $\mu\text{g}/\text{mL}$ );

$A_{260}$ ——260 nm 处的吸光值;

$N$ ——核酸稀释倍数。

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

#### 4.4.5 PCR 反应体系

检测化妆品中金黄色葡萄球菌采用的多重实时荧光 PCR 检测的反应体系见表 1。

表 1 实时荧光 PCR 检测反应体系

试剂名称	试剂用量/ $\mu\text{L}$
10 $\times$ PCR 反应缓冲液	2.5
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	3.0
dNTP(10 mmol/L)	1.0
引物 nuc(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	各 0.875
引物 femB(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	各 0.5
Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.5
探针 nuc(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	0.5
探针 femB(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	0.5
模板	1.0
超纯水	13.25
总体积	25
注:反应体系中各试剂的量根据反应体系的总体积进行适当调整。	

#### 4.4.6 多重实时荧光 PCR 反应条件

95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 1 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,60  $^{\circ}\text{C}$  复性 30 s,45 个循环。

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。

#### 4.4.7 反应体系对照的设置

4.4.7.1 阳性对照:含有扩增片段的阳性克隆分子 DNA 或阳性菌株 DNA。

4.4.7.2 阴性对照:不含扩增片段的菌株 DNA。

4.4.7.3 空白对照:用配置反应体系的超纯水代替。

### 5 结果分析与判定

#### 5.1 质控标准

5.1.1 阴性对照:无扩增曲线,Ct 值 $\geq 40$ 。

5.1.2 阳性对照:出现两条典型扩增曲线,Ct 值 $< 30$ 。

#### 5.2 结果判定

5.2.1 若检测样品的 Ct 值 $\geq 40$ ,并且无典型扩增曲线,则判为阴性。

5.2.2 若检测样品的 Ct 值 $\leq 35$ ,并且分别出现两条典型扩增曲线,则判为阳性。

5.2.3 若检测样品的 Ct 值 $> 35$ 而 $< 40$ ,建议样品重做。如 Ct 值仍小于 40,并有两条明显扩增曲线,则判为阳性,否则判为阴性。

5.2.4 对于筛选阳性结果,应参照 GB 7918.5 做进一步的生化鉴定。

### 6 检测过程中防止交叉污染的措施

按照 SN/T 1193 要求执行。

### 7 废弃物处理

检测过程中的废弃物,收集后进行高压灭菌或焚烧。

附 录 A  
(规范性附录)

化妆品中金黄色葡萄球菌的多重实时荧光 PCR 检测所用引物和探针序列及扩增片段序列

表 A.1 引物和探针序列

金黄色葡萄球菌基因	引物序列	探针序列
Nuc(耐热核酸酶)	5'-CCTGAAGCAAGTGCATTTACGA-3'	5'-HEX-TGGACGTGGCTTAGCGTAT- ATTTATGCTGATG-BHQ1-3'
	5'-CTTTAGCCAAGCCTTGACGAACT-3'	
femB(金葡耐药辅助基因)	5'-AATTAACGAAATGGGCAGAAACA-3'	5'-FAM-AGAAATTAAGTGGATGG- TACGCGGAAGA-BHQ1-3'
	5'-TGCGCAACACCCTGAACTT-3'	

nuc 基因的扩增片段(166 bp)

cctga agcaagtgca tttacga aaa aaatggtaga aaatgctaag aaaattgaag tcgagtttga caaagggtcaa agaactgata aata  
tggacg tggccttagcg tatatttatg ctgatg gaaa aatggtaaac gaagcttt ag ttcgtcaagg cttggctaaa g

femB 基因的扩增片段(94 bp)

aattaac gaaatgggca gaaaca a aga aattaactgg atggtacgcg cgaaga atcg ctgtaggtcg tgacgggtg aagttcagggtg  
ttgcgca