

T/SDAQI

团 体 标 准

T/SDAQI 005—2021

化妆品中铜绿假单胞菌的快速定性检测 实时荧光 PCR 方法

Rapid qualitative detection of *Pseudomonas aeruginosa* in cosmetic
Real-time PCR method

2021-09-25 发布

2021-10-25 实施

版 权 说 明

本文件系由山东质量检验协会（简称“协会”）组织创制的团体标准文本（含制定过程中的草案），协会拥有本文件的著作权，受《中华人民共和国著作权法》保护。除法律所允许的情形或事先得到协会书面许可外，任何组织和个人不得以任何理由进行复制、销售、传播本文件，或抄袭、歪曲本文件等侵权行为，否则，行为人应承担相应的民事、行政责任，构成犯罪的，将依法追究其刑事责任。其他文件引用本文件，不属侵权行为。

凡利用本文件进行或支持贸易、认证等商业活动，应事先购买正式文本或得到协会书面授权。购买本文件或获得授权，请与协会联系。

欢迎社会各界举报侵权盗版行为，协会将依法严格保护举报人信息。

联系人：范红梅

联系电话：0531-89701986 15668365153

联系邮箱：keyanjishuzhongxin@163.com

协会对本版权声明拥有最终解释权。

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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专利的责任。

本文件由山东质量检验协会提出并归口。

本文件起草单位：山东省产品质量检验研究院、滨州市食品药品检验检测中心、南京诺唯赞生物科技股份有限公司、山东福瑞达生物工程有限公司。

本文件主要起草人：王一村、赵彤彤、高静静、李娜、周莉莉、侯广月、张宇鑫、顾晶晶、孙冬梅、朱玉兰、李燕、刘菲。本文件的所有权和解释权归山东质量检验协会。

如果您在本文件使用中发现错误或技术内容有不当之处，请及时与协会秘书处联系，将意见发送到keyanjishuzhongxin@163.com。

化妆品中铜绿假单胞菌的快速定性检测 实时荧光 PCR 法

1 范围

本文件规定了化妆品中铜绿假单胞菌的检测方法。
本文件适用于化妆品中铜绿假单胞菌的快速定性检测。
本方法的检出限50 CFU/g（或/mL）。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 分析实验室用水规格和试验方法
GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测
GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求
GB 19489 实验室 生物安全通用要求
化妆品安全技术规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

样品经培养后，收集菌液进行DNA提取。以DNA为模板，采用细菌16S rDNA基因序列作为内参照，以铜绿假单胞菌中外毒素A (*eta*) 基因中相对保守且高度特异的引物和探针进行目标物的实时荧光PCR扩增，根据Ct值，判断样品中是否含有铜绿假单胞菌。其中，对内参照反应的检测，可以监控反应是否正常进行，防止假阴性结果。

5 仪器设备

- 5.1 电子天平：感量0.01 g。
- 5.2 微量可调移液器。
- 5.3 恒温水浴锅。
- 5.4 磁力搅拌器。
- 5.5 高速冷冻离心机：离心力12 000 g，4℃。
- 5.6 二级生物安全柜。
- 5.7 高压灭菌锅。
- 5.8 普通冰箱：4℃，-20℃。
- 5.9 pH计。

- 5.10 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
 5.11 实时荧光定量PCR仪。
 5.12 恒温培养箱：36℃±1℃。

6 试剂或材料

试剂的配制及试验中的操作规范应按GB/T 27403规定执行。除另有规定外，试剂应为分析纯或化学纯级别，实验用水应符合GB/T 6682的要求。所有试剂均用无DNA酶污染的容器分装。

6.1 检测用引物和 Taqman 探针序列（详见表1）

表1 检测用引物和 Taqman 探针

名称	序列（5'—3'）	目的基因
内参照5'端引物 内参照3'端引物 内参照探针	F: 5'-TTAAGTCCCGCAACGAGC-3' R: 5'-TTGTAGCACGTGTGTAGCCC-3' P: 5'-VIC-TTGACGTCATCCCCACCTTCCTCC-TRAMA-3'	细菌16S rRNA基因
检测用5'端引物 检测用3'端引物 检测用探针	F: 5'-AAGGTGTTTCATCCACGAACTGA-3' R: 5'-ATGGTGTAGATCGGCGACATG-3' P: 5'-FAM-CCGGTAACCAGCTCAG-MGBNFQ-3'	铜绿假单胞菌 <i>eta</i> 基因

- 6.2 三氯甲烷。
 6.3 异戊醇。
 6.4 异丙醇。
 6.5 商品化2×荧光定量PCR预混液。
 6.6 70%乙醇。
 6.7 蛋白酶K：20 mg/μL。
 6.8 RNA酶溶液：5 μg/μL。
 6.9 Tris饱和酚。
 6.10 TE冲液：10 mmol/L Tris-HCl（pH 8.0），1 mmol/L EDTA（pH 8.0）。
 6.11 CTAB缓冲液：55 mmol/L CTAB，1.4 mol/L NaCl，20 mmol/L EDTA，100 mmol/L Tris，调pH5至8.0。121℃高压灭菌20 min，备用。
 6.12 SCDLP液体培养基：见附录A。

7 样品

7.1 稀释液制备

水溶性液体样品，用灭菌吸管吸取10 mL样品加到90 mL 0.9%灭菌生理盐水中，混匀后，制成1:10检液。油性液体样品，取样品10 g，先加5 mL灭菌液体石蜡混匀，再加10 mL灭菌的吐温80，在40℃—44℃水浴中振荡混合10 min，加入灭菌的0.9%生理盐水75 mL（在40℃—44℃水浴中预温），在40℃—44℃水浴中乳化，制成1:10的悬液。膏、霜、乳剂半固体状样品，称取10 g，加到装有玻璃珠及90 mL 0.9%灭菌生理盐水的三角瓶中，充分振荡混匀，静置15 min。用其上清液作为1:10的检液。固体样品，称取10 g，加到90 mL 0.9%灭菌生理盐水中，充分振荡混匀，使其分散混悬，静置后，取上清液作为1:10的检液。

7.2 增菌培养

取1:10样品稀释液10 mL加到90 mL SCDLP液体培养基中，置36℃±1℃培养18 h—24 h。如有铜绿假单胞菌生长，培养液表面多有一层薄菌膜，培养液常呈黄绿色或蓝绿色。

7.3 菌液收集

将菌液中的薄膜或富集后的菌液置于灭菌的2 mL离心管中，6 000 g离心1 min，弃上清。如果收集后的菌较少，该步骤可重复多次后合并菌液，进行下一步检测。

8 试验步骤

8.1 DNA 提取

将上述菌液收集于2 mL灭菌离心管中的菌液6 000 g离心1 min，弃上清。加入1 000 μL CTAB缓冲液和40 μL蛋白酶K，震荡混匀，65℃温浴30 min，每隔10 min振荡混匀。12 000 g离心10 min，吸取1 mL上清液至2 mL离心管中，勿吸取管内杂质。向离心管中加入500 μL体积比为25: 24: 1的酚-三氯甲烷-异戊醇的混合液（现用现配），剧烈震荡，12 000 g离心12 min。吸取上清液至一新离心管中，加入等体积异丙醇，剧烈震荡，12 000 g离心10 min。弃上清液，用65℃预热的双蒸水溶解DNA。加入5 μL RNA酶，37℃温浴30 min。加入200 μL体积比为24: 1的三氯甲烷-异戊醇混合液，剧烈震荡，12 000 g离心12 min。吸取上清液至一新离心管中，加入等体积异丙醇，震荡均匀，12 000 g离心10 min。弃上清，70%乙醇洗涤一次，12 000 g离心1 min。弃上清液，晾干后加入50 μL TE缓冲液溶解DNA，-20℃保存。DNA提取也可使用等效的DNA提取试剂盒替代。

8.2 DNA 浓度及纯度的测定

取适量的DNA模板溶液加双蒸水稀释一定倍数后，使用紫外分光光度计测定260 nm和280 nm处的吸光值A₂₆₀和A₂₈₀，DNA浓度计算按式（1）计算，

$$C=A \times N \times 50 \quad \dots \dots \dots (1)$$

式中：

C-----DNA浓度，单位为纳克每微升（ng/μL）；

A-----260 nm处的吸光值；

N-----核酸稀释倍数；

50-----吸光值A₂₆₀为1时，相对应双链DNA的浓度常数；

当A₂₆₀/A₂₈₀比值在1.8~2.0之间时，DNA模板适宜荧光定量PCR扩增。

若检测DNA模板浓度不在规定范围内，可适当增加样品采样量或增加荧光定量PCR反应过程中模板量或减少溶解DNA的溶剂的量，提高浓度，以保证检测的有效性。

8.3 实时荧光 PCR 检测

8.3.1 实时荧光 PCR 反应体系

表 2 实时荧光 PCR 反应体系

试剂成分	体积（单位：μL）
2×荧光定量PCR预混液	12.5
引物F（10 μM）	0.6
引物R（10 μM）	0.6

试剂成分	体积 (单位: μL)
探针P (5 μM)	0.3
样品DNA (10 $\text{ng}/\mu\text{L}\sim 100 \text{ng}/\mu\text{L}$)	1
dd H ₂ O	补至 25

8.3.2 实时荧光 PCR 反应参数

95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 40 s, 45 个循环。

8.3.3 实验对照

检验过程中分别设内参照、阳性对照、阴性对照、空白对照。以荧光假单胞菌的DNA为内参照、以铜绿假单胞菌标准菌株或构建的标准质粒DNA为阳性对照、以其他细菌的DNA为阴性对照,以灭菌水为空白对照。所有反应均设置两个平行反应体系。

9 质量控制

以下条件有一条不满足时,实验视为无效,需重新进行实验。

- 空白对照:无荧光对数增长,相应的Ct值 >40.0 ;
- 阴性对照:无荧光对数增长,相应的Ct值 >40.0 ;
- 阳性对照:有荧光对数增长且荧光通道出现典型的扩增曲线,相应的Ct值 <30.0 ;
- 内参照:有荧光对数增长且荧光通道出现典型的扩增曲线,相应的Ct值 <30.0 。

10 结果判定及表述

10.1 结果判定

在符合第9部分的情况下,被检样品进行检测时:

- 如两个平行样品Ct值均 ≤ 35.0 ,则判定为被检样品阳性;
- 如两个平行样品Ct值均 ≥ 40.0 ,则判定为被检成分阴性;
- 如 $35.0 < \text{Ct值} < 40.0$,判为结果可疑,需要重新检测。重新检测需从提取DNA开始重新检测,由于为定性检测,可从多个方面提高检测率,根据各种具体情况在可选使用量的几个因素中重新调整优化检测过程,如增加样品取样量、减少溶解DNA的TE剂量,增加PCR反应中加入的模版量、适量增加PCR反应循环数等。如再次扩增后Ct值仍为 <40.0 ,则判定相应被检成分阳性;如再次扩增后Ct值 ≥ 40.0 ,则判定相应被检成分阴性。

10.2 结果表述

10.2.1 结果为阳性者,表述为/g (或/ mL) 中“检出铜绿假单胞菌”。

10.2.2 结果为阴性者,表述为/g (或/ mL) 中“未检出铜绿假单胞菌”。

11 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照GB/T 27403中的规定执行。

附录 A
(规范性)
SCDLP液体培养基

A.1 成分

表 A.1 成分

成分	用量
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	1000 mL

A.2 制法

先将卵磷脂在少量蒸馏水中加温溶解后，再与其他成分混合，加热溶解，调pH为7.2—7.3分装，每瓶90 mL，121℃高压灭菌20 min。注意振荡，使沉淀于底层的吐温80充分混合，冷却至25℃左右使用。