

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2206.12—2014

化妆品微生物检验方法
第 12 部分：绿脓杆菌 PCR 法

Determination of microorganism in cosmetics—
Part 12: PCR method for *Pseudomonas aeruginosa*

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 12 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。

本部分主要起草人：孙军、赵晗、田国宁、张金玲、宫小明、郝莹、王洪兵、张艺兵、孙涛。

化妆品微生物检验方法 第 12 部分:绿脓杆菌 PCR 法

1 范围

SN/T 2206 的本部分规定了化妆品中绿脓杆菌的 PCR 检测方法。
本部分适用于化妆品中绿脓杆菌的检测。

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 7918.1 化妆品微生物标准检验方法 总则
- GB 7918.4 化妆品微生物标准检验方法 绿脓杆菌
- 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

绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*

亦名为铜绿假单胞菌,具荚膜、鞭毛,为无芽孢的革兰氏阴性杆菌,能分解蛋白质,发酵糖类能力较低,能产生绿脓菌素和荧光素。

3.2 缩略语

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 酶:Taq DNA 聚合酶

4 方法提要

化妆品经增菌后,提取基因组 DNA,以提取的 DNA 为模板进行绿脓杆菌外毒素 A 基因高保守片段的 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 产物是否有 397 bp 的特征条带,从而对化妆品中是否污染绿脓杆菌进行快速检验。

5 试剂和材料

- 5.1 SCDLP 液体培养基(见 A.1)。
- 5.2 DNA 提取液:主要成分是 SDS、Tris、EDTA。
- 5.3 酚-氯仿。
- 5.4 异丙醇。
- 5.5 PCR 扩增引物及目标片断(见附录 B)。
- 5.6 灭菌双蒸水。
- 5.7 10×PCR 缓冲液(见 A.2)。
- 5.8 琼脂糖。
- 5.9 6×上样缓冲液(见 A.3)。
- 5.10 50×TAE 缓冲液(见 A.4)。
- 5.11 DNA 分子量标记物:DL2 000。
- 5.12 Eppendorf 管和 PCR 反应管。

6 仪器设备

- 6.1 恒温培养箱:36 °C±1 °C。
- 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:5 μL、10 μL、100 μL、1 000 μL。

7 操作步骤

7.1 样品增菌

按照 GB 7918.1 方法制备 1:10 化妆品稀释液,取稀释液 10 mL 加到 90 mL SCDLP 液体培养基中,置 36 °C±1 °C 培养 18 h~24 h。

注:如无 SCDLP 液体培养基时,可用普通营养肉汤培养基。检验含有防腐剂的化妆品时,在每 1 000 mL 普通肉汤中加入 1 g 卵磷脂、7 g 吐温 80。

7.2 模板 DNA 的提取

取样品增菌液 1 mL 加到 1.5 mL 无菌离心管中,8 000 r/min 离心 5 min,尽量吸弃上清;加入 750 μL DNA 提取液,沸水浴 5 min,加酚-氯仿(1:1 体积比)700 μL,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,70%乙醇冲洗一次,12 000 r/min 离心 5 min;弃上清,沉淀溶于 20 μL 核酸溶解液中,保存在-20 °C 备用。也可使用等效的商业化 DNA 提取试剂盒并按其说明制备模板 DNA。

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

A_{260} ——260 nm 处的吸光值;

N ——核酸稀释倍数。

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

7.4 绿脓杆菌外毒素 A 基因保守序列的 PCR 扩增鉴定

7.4.1 扩增

7.4.1.1 PCR 反应体系: $10 \times \text{PCR buffer}$ $5 \mu\text{L}$, 上、下游扩增引物 ($20 \mu\text{mol}/\text{L}$) 各 $0.5 \mu\text{L}$, dNTPs ($10 \text{ mmol}/\text{L}$) $4 \mu\text{L}$, 模板 DNA $2 \mu\text{L}$, *Taq* DNA 聚合酶 ($5 \text{ U}/\mu\text{L}$) $0.5 \mu\text{L}$, 双蒸水补足体积至 $50 \mu\text{L}$ 。

7.4.1.2 PCR 反应条件: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min , $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s , $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 45 s , 循环 30 次后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min , $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存反应产物。

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。阳性对照为绿脓杆菌 DNA 模板,阴性对照为非绿脓杆菌 DNA 模板,空白对照为双蒸水。

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 ($1 \times \text{TAE}$) 制备 $1.5\% \sim 2\%$ 琼脂糖凝胶 ($55 \text{ }^\circ\text{C} \sim 60 \text{ }^\circ\text{C}$ 时加入溴化乙锭至终浓度为 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$,也可在电泳后进行染色)。取 $5 \mu\text{L} \sim 8 \mu\text{L}$ PCR 扩增产物,分别与 $1 \mu\text{L}$ 上样缓冲液混合进行点样,用 DNA 分子量标记物做参照。 $3 \text{ V}/\text{cm} \sim 5 \text{ V}/\text{cm}$ 恒压电泳 $20 \text{ min} \sim 40 \text{ min}$,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。绿脓杆菌外毒素 A 基因的保守序列长度为 397 bp 。

8 结果判定

8.1 样品 PCR 反应未扩增出长度为 397 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 397 bp 目的片段时,结果报告为未检出绿脓杆菌。

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目的条带时,则可判定该样品为假定阳性,应按照 GB 7918.4 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

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 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**A.2.1 成分**

Tris-HCl(pH 值为 8.3)	100 mmol/L
氯化钾	500 mmol/L
氯化镁	15 mmol/L

A.2.2 制法

配制好 pH 值为 8.3 的 Tris-HCl 溶液,然后加入相应量的氯化钾和氯化镁混匀,4 °C 保存。

A.3 6×上样缓冲液**A.3.1 成分**

溴酚蓝	0.25 g
二甲苯青 FF	0.25 g
甘油	36 mL

A.3.2 制法

将上述成分混合后,用水定容至 100 mL,4 °C 保存。

A.4 50×TAE 缓冲液

A.4.1 成分

Tris	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 mol/L EDTA(pH 值为 8.0)	100 mL

A.4.2 制法

将上述成分混合后,用水定容至 1 000 mL,121 ℃ 20 min 高压灭菌。

附 录 B
(规范性附录)
引物及目标片段

B.1 绿脓杆菌 PCR 扩增引物

上游引物:5'-GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC-3'

下游引物:5'-CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT-3'

B.2 绿脓杆菌 PCR 扩增目标片段

外毒素 A 基因保守片段(397 bp)

gacaacgccctcagcatcaccagcgacggcctgacctccgctcgaaggcggcgtcgagccgaacaagccggtgctgctacagctacac
gcgccagggcgcggcagttggctcgtgaaactggctgggtgccgatcgccacgagaagccttcgaacatcaaggtgttcacccgaac
tgaacgccggttaaccagctcagccacatgtcgccgatctacaccatcgagatggggcgcgagttgctggcgaagctggcgcgcatgcc
accttcttcgtcagggcgcagagagcaacgagatgcagccgacgctcgccatcagccatgccggggtcagcgtgggtcatggcccaggc
ccagccgcgccgggaaaagcgtggagcgaatgggccagcg
