

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2206.1—2008

化妆品微生物检验方法 第 1 部分：沙门氏菌

Method of microbiology examination for cosmetics—
Part 1: *Salmonella*

2008-11-18 发布

2009-06-01 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

本部分的附录 A 为资料性附录。

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：中华人民共和国广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、中华人民共和国福建出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、广州华峰生物科技有限公司。

本部分主要起草人：李志勇、王志强、李晓虹、郑晶、石磊、凌莉、易敏英、高东微、吕敬章、陈洵、胡科锋、许龙岩、黄晓蓉、曹以诚。

本部分系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

化妆品微生物检验方法

第1部分:沙门氏菌

第一法 常规培养法

1 范围

SN/T 2206 的本部分规定了化妆品中沙门氏菌的常规检验方法。
本部分适用于化妆品中沙门氏菌的检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 SN/T 2206 的本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

GB/T 4789.4—2003 食品微生物学检验 沙门氏菌检验

GB/T 4789.28—2003 食品微生物学检验 染色法、培养基和试剂

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

GB/T 7918.1 化妆品微生物标准检验方法 总则

WS/T 230 临床诊断中整合酶链反应(PCR)技术的应用

ISO 6579 食品微生物学 沙门氏菌检测水平法

3 材料与设备

- 3.1 吸管:2 mL,分刻度 0.1 mL,10 mL,分刻度 1 mL。
- 3.2 灭菌平皿:直径 90 mm,底部平整的玻璃或一次性塑料灭菌平皿。
- 3.3 100 mL 三角瓶。
- 3.4 接种针、接种环。
- 3.5 灭菌的样品处理器具:镊子、剪刀、勺子。
- 3.6 灭菌小试管:3 mm×50 mm。
- 3.7 可调移液器:10 μL~100 μL,100 μL~1 000 μL。
- 3.8 天平:量程 0 g~500 g,精度 0.1 g。
- 3.9 高压灭菌器。
- 3.10 冰箱:0℃~4℃。
- 3.11 乳液分散机(转速 1 000 r/min 以上)。
- 3.12 恒温培养箱:36℃±1℃、42℃±1℃。
- 3.13 显微镜:10×~100×。
- 3.14 VITEK 全自动微生物鉴定系统或类似设备。

注:VITEK 是由法国生物梅里埃公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本部分的使用者,并不表示对该产品的唯一认可。如果其他等效产品具有相同的效果,也可使用这些等效产品。

4 培养基和试剂

- 4.1 SCDLP 液体培养基:按 GB/T 7918.1 中规定。

SN/T 2206.1—2008

- 4.2 四硫酸钠煌绿(TTB)增菌液:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.14、4.15 规定。
- 4.3 亚硫酸铋琼脂(BS):按 GB/T 4789.28—2003 中 4.19 规定。
- 4.4 DHL 琼脂:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.20 规定。
- 4.5 HE 琼脂:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.21 规定。
- 4.6 WS 琼脂:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.23 规定。
- 4.7 SS 琼脂:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.22 规定。
- 4.8 三糖铁琼脂:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.26、4.27 规定。
- 4.9 蛋白胨水、靛基质试剂:按 GB/T 4789.28—2003 中 3.13 规定。
- 4.10 尿素琼脂(pH7.2):按 GB/T 4789.28—2003 中 3.15 规定。
- 4.11 氰化钾(KCN)培养基:按 GB/T 4789.28—2003 中 3.16 规定。
- 4.12 氨基酸脱羧酶试验培养基:按 GB/T 4789.28—2003 中 3.12 规定。
- 4.13 糖发酵管:按 GB/T 4789.28—2003 中 3.2 规定。
- 4.14 ONPG 培养基:按 GB/T 4789.28—2003 中 3.3 规定。
- 4.15 半固体琼脂:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.30 规定。
- 4.16 丙二酸钠培养基:按 GB/T 4789.28—2003 中 3.7 规定。
- 4.17 沙门氏菌因子血清:按 26 种用于初步分型;57 种用于进一步分型;163 种用于详细分型。
- 4.18 API 20E 测试条。
- 4.19 GNI⁺测试卡。

注:API 20E 测试条和 GNI⁺测试卡是由法国生物梅里埃公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本部分的使用者,并不表示对该产品的唯一认可。如果其他等效产品具有相同的效果,也可使用这些等效产品。

5 检验程序

5.1 方法提要

化妆品中沙门氏菌的检验方法是通过前增菌、选择性增菌、分离、生化鉴定、血清学分型鉴定等方法对化妆品中可能存在的沙门氏菌进行定性检验。

5.2 检验程序

沙门氏菌的检验程序见图 1。

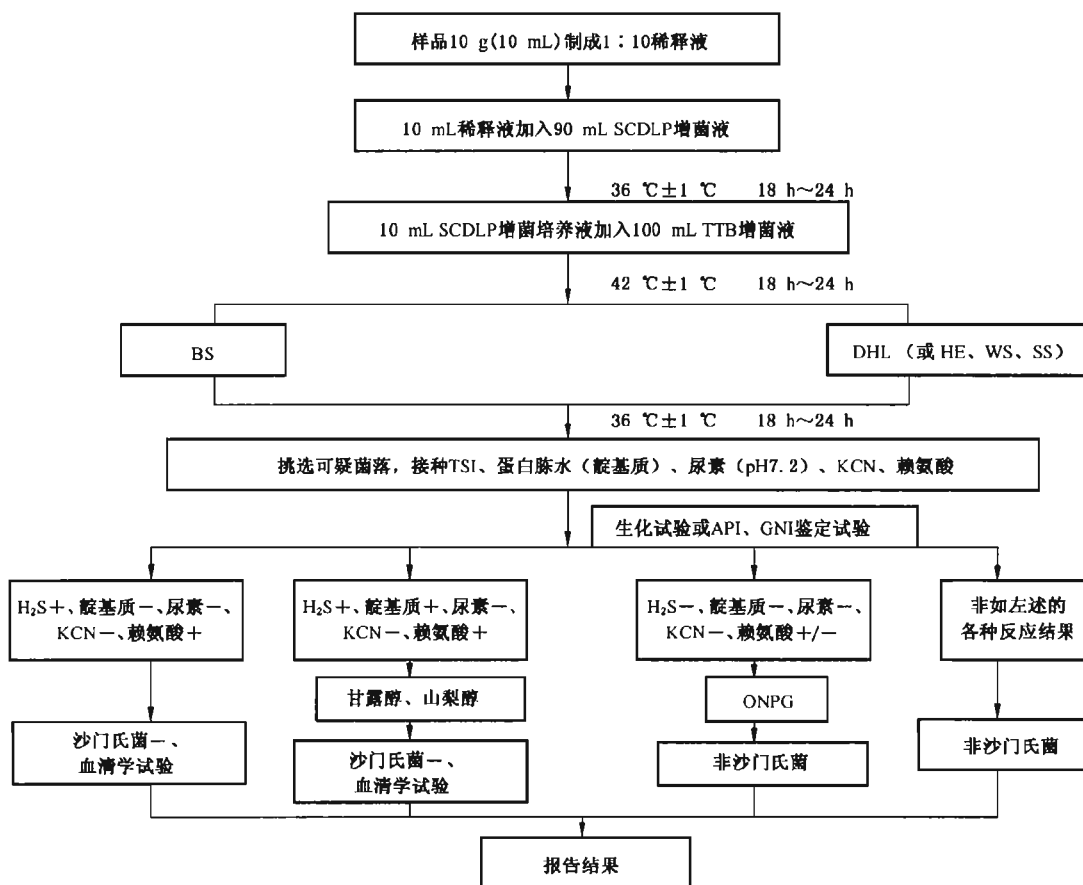


图 1 检验程序

6 样品制备

参照 GB/T 7918.1 进行制样。

7 检验步骤

7.1 前增菌和增菌

取 1:10 样品稀释液 10 mL 加到 90 mL SCDLP 液体培养基中,置培养箱 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。移取 10 mL,转种于 100 mL 四硫酸钠煌绿(TTB)增菌液内, $42\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

7.2 分离

按 GB/T 4789.4—2003 中 6.2 规定。

7.3 生化反应

按 GB/T 4789.4—2003 中 6.3 规定的生化反应,也可采用 API 20E、GNI+测试卡或其他等效产品。

7.4 血清学分型鉴定

按 GB/T 4789.4—2003 中 6.4 规定。

7.5 结果报告

综合生化反应和血清学鉴定结果,按 GB/T 4789.4—2003 中 6.5 判定菌型,并报告结果。

SN/T 2206.1—2008

第二法 环介导恒温扩增(LAMP)法

8 范围

SN/T 2206 的本部分规定了化妆品中沙门氏菌的 LAMP 检验方法。
本部分适用于化妆品中沙门氏菌的快速检验。

9 缩略语

下列缩略语适用于 SN/T 2206 的本部分。

9.1 Betaine

甘氨酸三甲内盐。

9.2 *Bst* 酶 *Bst* DNA polymerase(Large Fragment)

Bst DNA 聚合酶(大片段)。

9.3 DNA deoxyribonucleic acid

脱氧核糖核酸。

9.4 dNTP deoxyribonucleoside triphosphate

脱氧核苷三磷酸。

9.5 EDTA ethylenediamine tetraacetic acid

乙二胺四乙酸。

9.6 LAMP loop-mediated isothermal amplification

环介导恒温扩增。

9.7 PCR polymerase chain reaction

聚合酶链式反应。

9.8 Triton X-100

聚乙二醇辛基苯基醚。

10 防污染措施

参照 WS/T 230 中第 6 章。

11 原理

LAMP 是一种连续、恒温、基于酶反应的核酸扩增技术。根据靶基因序列设计的两对特殊的内、外引物,特异性识别靶序列上的六个独立区域,利用 *Bst* 酶启动循环链置换反应。在靶标 DNA 区启动互补链合成,结果在同一链上互补序列周而复始形成有很多环的花椰菜结构的茎-环 DNA 混合物。LAMP 反应过程中,从 dNTP 析出的焦磷酸根离子与反应溶液中的 Mg^{2+} 结合,产生副产物(焦磷酸镁)形成乳白色沉淀,加入显色液,即可通过肉眼观察判定结果。

12 设备和材料

12.1 设备

一次性手套、移液器(量程 0.5 μ L 到 1 000 μ L)、枪头、1.5 mL 塑料离心管、1.5 mL 离心管架、计时器、冰盒、高速台式离心机、水浴锅或加热模块等。

12.2 引物

根据沙门氏菌属特有的靶序列 *agfA* 设计一套特异性引物,包括外引物 1、外引物 2 和内引物 1、内引物 2。

外引物扩增片段长度:200 bp。

12.3 检测试剂

- a) 样品预处理液:成分包括 Tris-HCl[pH 8.0],EDTA,Triton X-100;
- b) 反应液:主要成分 dNTP,Tris-HCl[pH 8.8],MgSO₄,Triton X-100,Betaine,内/外引物;
- c) DNA 聚合酶:*Bst* 酶;
- d) 显色液;
- e) 沙门氏菌 LAMP 检测试剂盒:试剂盒组成、说明及使用注意事项参见附录 A。

注:由指定单位提供,给出这一信息是为了方便本部分的使用者,并不表示对该产品的唯一认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

13 检测程序

化妆品中沙门氏菌 LAMP 方法检测程序见图 2。

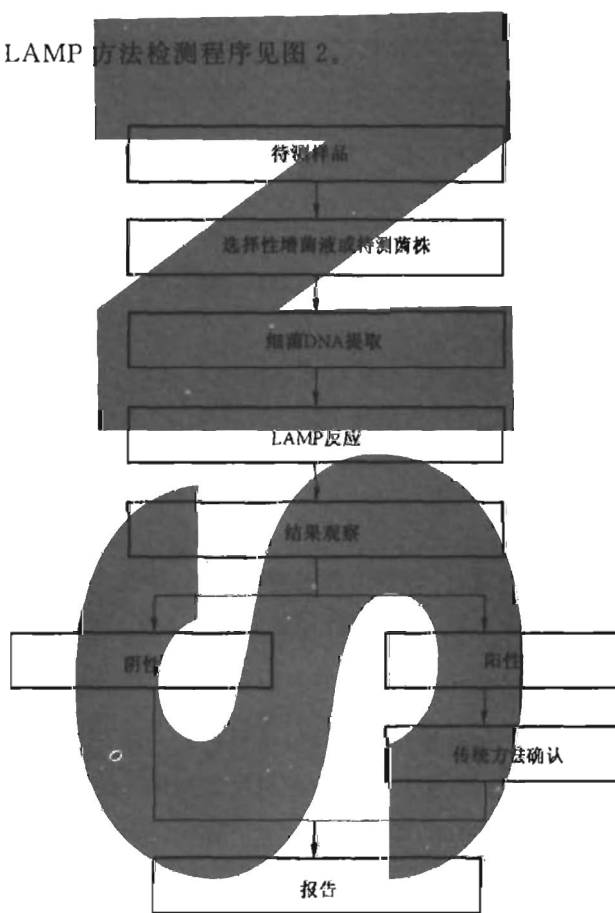


图 2 检验程序

14 操作步骤

14.1 样品制备、增菌培养和分离

样品制备参照 GB/T 7918.1 进行。增菌培养和分离按 7.1~7.2 规定。

14.2 细菌模板 DNA 的制备

14.2.1 增菌液模板 DNA 的制备

对于 14.1 方法培养的增菌液:

- a) 直接取该增菌液 1 mL 加到 1.5 mL 无菌离心管中,10 000 r/min 离心 2 min,尽量吸弃上清液;

SN/T 2206.1—2008

- b) 加入 80 μL 样品预处理液,混匀后沸水浴 10 min,置冰上 10 min;
c) 10 000 r/min 离心 2 min,上清液即为核酸模板;取上清液置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 可长期保存备用。

14.2.2 可疑菌落模板 DNA 的制备

对于 14.1 方法分离到的可疑菌落,可直接挑取可疑菌落,加入 80 μL 样品预处理液,再按照 14.2.1 b) 步骤制备模板 DNA 以待检测。

也可使用等效的商品化的 DNA 提取试剂盒并按其说明提取制备模板 DNA。

14.3 核酸扩增

14.3.1 反应过程

- a) 在向上述 2 μL 核酸模板[见 14.2.1 c)]中加入 23 μL 扩增液(参见表 1);
b) $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 90 min。

表 1 LAMP 反应体系

试 剂	贮备液浓度	25 μL 反应体系中加样体积/ μL
沙门氏菌反应液	—	22 μL
<i>Bst</i> 酶	8U/ μL	1 μL
DNA 模板	—	2 μL

注 1: 沙门氏菌反应液与 *Bst* 酶混合液即为扩增液;
注 2: 每次反应必须设置阴性和阳性各一个质控。

14.3.2 阴性对照、阳性对照设置

阴性对照设为 LAMP 反应的空白对照(以样品预处理液代替 DNA 模板)。

阳性对照采用已知浓度的沙门氏菌标准菌株 DNA 溶液作为 LAMP 反应的模板。

14.3.3 LAMP 反应体系

常规 LAMP 反应体系见表 1。

14.4 结果观察

在上述反应管中加入 1 μL 显色液,轻轻混匀即可判定结果;建议在黑色背景下观察。

建议使用 LAMP 试剂盒专用反应管,将反应液和显色液一次性加入,DNA 扩增反应后可不必开盖即可观察结果。

14.5 结果判定

在阴性对照反应管液体为橙色,阳性对照反应管液体呈绿色的条件下:

- a) 待检样品反应管液体呈绿色,该样品结果为沙门氏菌初筛阳性,采用样品增菌液或纯菌落进一步按 7.3~7.5 步骤进行确认后报告结果;
b) 待检样品反应管液体呈橙色则可报告沙门氏菌检验结果为阴性。
若与上述条件不符,则本次检测结果无效,应重新检测。

附录 A
(资料性附录)
沙门氏菌 LAMP 检测试剂盒

A.1 试剂盒组成

每个试剂盒(20 T/kit, 每个反应体系体积为 25 μ L)包括的成分见表 A.1。

表 A.1

组成成分	规格
DNA 提取液	1 管, 1.5 mL
沙门氏菌反应液	1 管, 500 μ L
<i>Bst</i> 酶	1 管, 30 μ L
显色液	25 管, 1 μ L/管
沙门氏菌阳性对照 DNA	1 管, 50 μ L
LAMP 反应专用管	25 个

A.2 说明

- a) 反应液中含有特异性引物及各种离子;
- b) 扩增试剂[见 14.3.1 a)]的配制: 反应液 22 μ L 与 *Bst* 酶 1 μ L 混匀即可;
- c) LAMP 反应专用管已含显色液。

A.3 使用注意事项

- a) 严格执行行业行政主管部门颁布的有关基因扩增检验实验室的管理规范;
- b) 本试剂盒仅用于体外检测, 开始检测前要仔细阅读试剂盒说明书全文;
- c) 试剂盒内各试剂使用前, 充分融化后稍离心。反应液分装时应尽量避免产生气泡, 反应前注意检查各反应管是否盖紧, 以免泄露污染仪器;
- d) 试剂盒内的阳性对照应视为具有污染性物质, 应注意避免污染其他样品和反应试剂, 导致错误检验结果。