

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2206.1—2016
代替 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*

2016-03-09 发布

2016-10-01 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《化妆品中微生物检验方法》共分为 13 个部分：

- 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：进出口化妆品中白色念珠菌检测方法；
- 第 9 部分：进出口化妆品中胆汁酸耐受革兰氏阴性菌检测方法；
- 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 1 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分代替 SN/T 2206.1—2008《化妆品微生物检验方法 第 1 部分：沙门氏菌》。

本部分与 SN/T 2206.1—2008 相比，主要技术变化如下：

- 更新了第一法试剂配制的引用标准。
- 删除了第二法涉及商品试剂盒信息。
- 删除了 2008 年版中的部分缩略语（2008 年版的 9.3、9.5、9.7）。

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：中华人民共和国广东出入境检验检疫局、广州迪澳生物科技有限公司。

本部分主要起草人：凌莉、易敏英、刘静宇、王志强、胡科锋、袁慕云、陈碧玲、阳静、张旺、李志勇、石磊、张璜。

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 4789.4—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验
GB 7918.1 化妆品微生物标准检验方法总则

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 μ L~100 μ L,100 μ L~1 000 μ L。
- 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 $^{\circ}$ C~4 $^{\circ}$ C。
- 3.11 乳液分散机(转速 1 000 r/min 以上)。
- 3.12 恒温培养箱:36 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C、42 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C。
- 3.13 显微镜:10 \times ~100 \times 。
- 3.14 全自动微生物生化鉴定系统。

4 培养基和试剂

- 4.1 SCDLP 液体培养基:按 GB 7918.1 中规定。
- 4.2 四硫酸钠煌绿(TTB)增菌液:按 GB 4789.4—2010 中附录 A 中 A.2 规定。
- 4.3 亚硫酸铋琼脂(BS):按 GB 4789.4—2010 中 A.4 规定。
- 4.4 木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂:按 GB 4789.4—2010 中 A.6 规定。
- 4.5 HE 琼脂:按 GB 4789.4—2000 中 A.5 规定。

- 4.6 沙门氏菌属显色培养基。
- 4.7 三糖铁琼脂:按 GB 4789.4—2000 中 A.7 规定。
- 4.8 蛋白胨水、靛基质试剂:按 GB 4789.4—2000 中 A.8 规定。
- 4.9 尿素琼脂(pH7.2):按 GB 4789.4—2000 中 A.9 规定。
- 4.10 氰化钾(KCN)培养基:按 GB 4789.4—2000 中 A.10 规定。
- 4.11 氨基酸脱羧酶试验培养基:按 GB 4789.4—2000 中 A.11 规定。
- 4.12 糖发酵管:按 GB 4789.4—2010 中 A.12 规定。
- 4.13 ONPG 培养基:按 GB 4789.4—2010 中 A.13 规定。
- 4.14 半固体琼脂:按 GB 4789.4—2010 中 A.14 规定。
- 4.15 丙二酸钠培养基:按 GB 4789.4—2010 中 A.15 规定。
- 4.16 沙门氏菌 O 和 H 诊断血清。
- 4.17 生化鉴定试剂盒。

5 检测程序

5.1 方法提要

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

5.2 检测程序

化妆品中沙门氏菌的检测程序示意图见图 1。

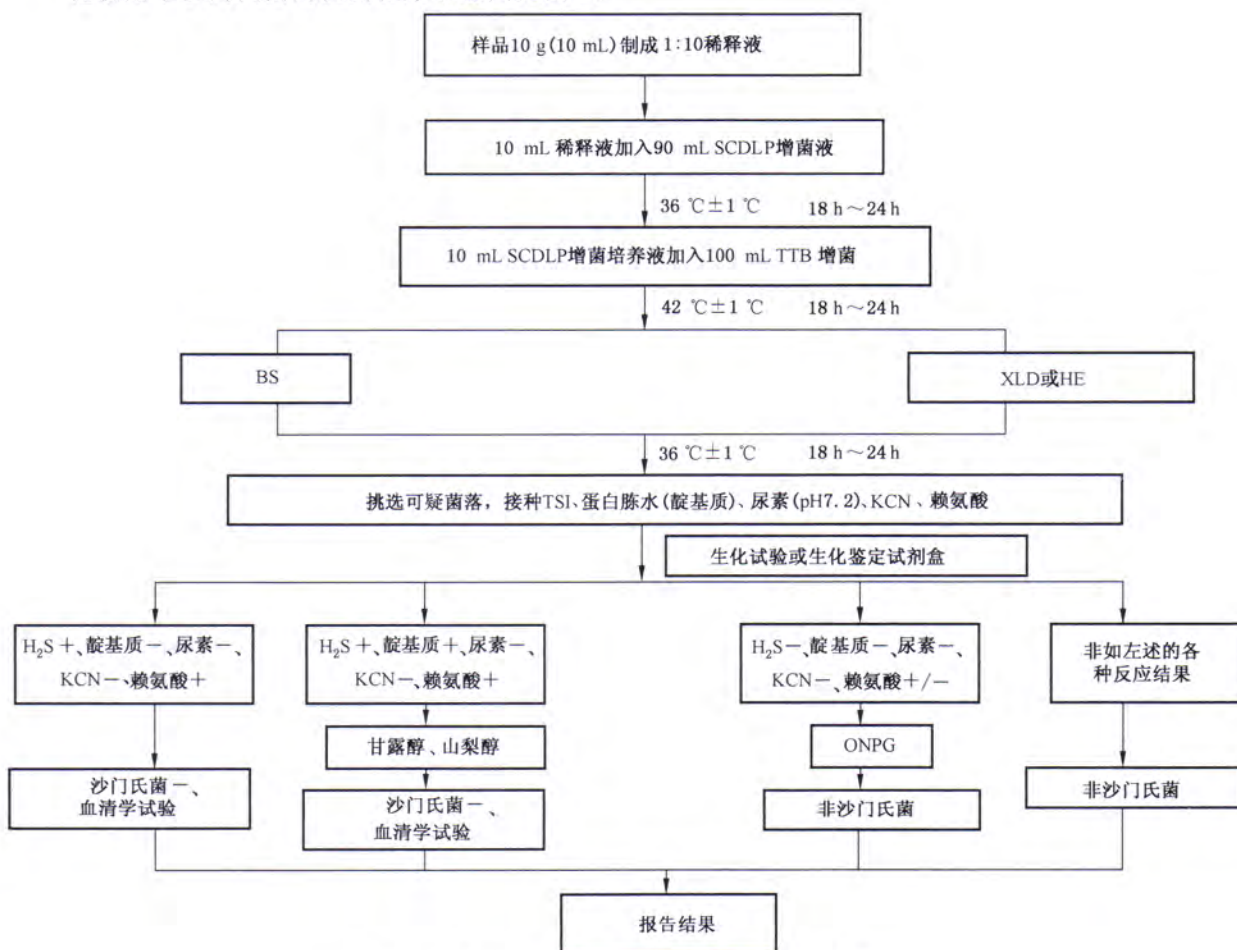


图 1 化妆品中沙门氏菌检验程序示意图

6 样品制备

参照 GB 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 4789.4—2000 中 5.3 规定。

7.3 生化反应

按 GB 4789.4—2000 中 5.4 规定的生化反应,也可采用生化鉴定试剂盒。

7.4 血清学分型鉴定

按 GB 4789.4—2000 中 5.5 规定。

7.5 结果报告

综合生化反应和血清学鉴定结果,按 GB 4789.4—2000 中 5.5 判定菌型,报告 10 g(mL)样品中检出或未检出沙门氏菌。

第二法 环介导等温扩增(LAMP)法

8 范围

本部分规定了化妆品中沙门氏菌的环介导等温扩增(LAMP)检测方法。

本部分适用于化妆品中沙门氏菌的筛选检测。

本方法用于清洁类、护理类和美容/修饰类化妆品的定性检测低限为 10^2 CFU/g(mL)。

9 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 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/T 27403—2008 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

10 缩略语

10.1 Betaine:甘氨酸三甲胺内盐。

- 10.2 *Bst* 酶:*Bst* DNA polymerase(Large Fragment)。
- 10.3 dNTP(deoxyribonucleoside triphosphate):脱氧核苷三磷酸。
- 10.4 LAMP(loop-mediated isothermal amplification):环介导等温扩增。
- 10.5 Triton X-100:聚乙二醇辛基苯基醚。

11 防污染措施

环介导等温扩增检测过程的防污染措施应符合 GB/T 27403—2008 附录 D 的规定。

12 抽样与制样

按照 GB 7918.1 的规定执行。

13 LAMP 检测方法

13.1 原理

13.1.1 一般原理

根据沙门氏菌 *fimI* 基因序列设计内引物、外引物和环状引物各一对,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,在沙门氏菌 *fimI* 特异基因序列启动互补链合成,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;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,即可通过颜色变化观察判定结果。

13.1.2 显色液显色原理

SYBR Green I 是一种高灵敏的 DNA 荧光染料,可以嵌入方式结合到双链 DNA 的小沟内。当它与双链 DNA 结合时,荧光信号是游离状态的 800 倍~1 000 倍。在不发生扩增反应时,SYBR 染料分子的荧光信号不发生改变,颜色显现为橙色;当发生扩增反应时,随着双链 DNA 的增加,SYBR 染料的荧光信号也随之大幅度增强,其信号强度可代表双链 DNA 分子的数量,同时颜色由橙色变为绿色。

13.2 仪器和设备

- 13.2.1 水浴锅或加热模板:63.0 °C ± 0.5 °C 和 80.0 °C ± 0.5 °C。
- 13.2.2 离心管:0.1 mL、1.5 mL。
- 13.2.3 离心机:12 000 r/min。
- 13.2.4 移液器:量程 0.5 μL~10 μL;量程 10 μL~100 μL;量程 100 μL~1 000 μL。
- 13.2.5 计时器。

13.3 试剂和材料

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。

- 13.3.1 试验用水:应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。
- 13.3.2 dNTPs 溶液:每种核苷酸浓度 10 mmol/L。
- 13.3.3 *Bst* DNA 聚合酶(如 NEB 公司或具有同等效果的 DNA 聚合酶):酶浓度 8 U/μL。
- 13.3.4 10×ThermolPol 缓冲液:含 200 mmol/L Tris-HCl(pH8.8)、100 mmol/L 硫酸铵、100 mmol/L 氯

化钾、20 mmol/L 硫酸镁、1% TritonX-100。

13.3.5 硫酸镁溶液:150 mmol/L。

13.3.6 甜菜碱:5 mol/L。

13.3.7 显色液:SYBR Green I 荧光染料,1 000×。

13.3.8 引物:根据沙门氏菌 *fimI* 基因序列设计一套特异性引物,包括外引物 1(F3),外引物 2(B3),内引物 1(FIP),内引物 2(BIP),环状上游引物(LF)和环状下游引物(LB),参见附录 A。

外引物扩增片段长度:262 bp

外引物 1(F3,5'-3'):CACTAAATCCGCCGATCAA

外引物 2(B3,5'-3'):CAACGGTGAGGAGGTATTATC

内引物 1(FIP,5'-3'):TTCGGATCGCAGTCATTCAGGCCGATTGGTGATACGACCG

内引物 2(BIP,5'-3'):GGTCAGGCAGATAACACCAACATTGCGGTGGTGCTATTATC

环状上游引物(LF,5'-3'):TGGTGAAAGGCACCTGTG

环状下游引物(LB,5'-3'):ATTTGCTGGCTGTCTCCTC

13.4 检测程序

化妆品中沙门氏菌 LAMP 方法检测程序见图 2。

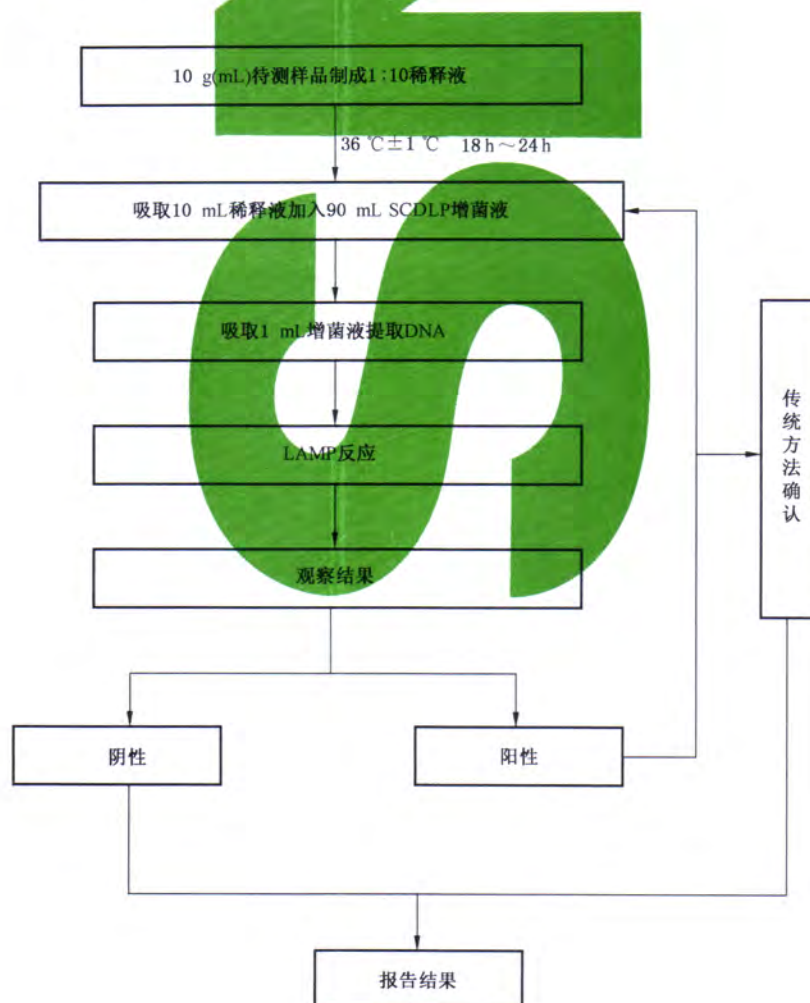


图 2 化妆品中沙门氏菌 LAMP 检测程序示意图

13.5 试验步骤

13.5.1 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照:采用不含有待测基因序列的细菌 DNA 为模板。

阳性对照:采用含有目标基因序列的细菌 DNA 或质粒 DNA 作为模板,浓度应略高于方法检测低限。

设两个空白对照:

- 提取 DNA 时设置的提取空白对照(以水代替样品);
- LAMP 反应的空白对照(以 DNA 溶解液代替 DNA 模板)。

13.5.2 沙门氏菌 LAMP 反应体系

LAMP 反应体系见表 1。每个样品各做 2 个平行管。加样时应使样品 DNA 溶液完全加入反应液中,不要粘附于管壁上。在反应体系配制完成后,将 1 μL 显色液滴在管盖内侧,盖管盖时应小心,防止显色液混合进入反应液中。

表 1 沙门氏菌 LAMP 反应体系

组 分	工作液浓度	加样量/ μL	反应体系终浓度
ThermolPol 缓冲液	10 \times	2.5	1 \times
外侧上游引物(F3)	5 $\mu\text{mol/L}$	1.0	0.2 $\mu\text{mol/L}$
外侧下游引物(B3)	5 $\mu\text{mol/L}$	1.0	0.2 $\mu\text{mol/L}$
内侧上游引物(FIP)	40 $\mu\text{mol/L}$	1.0	1.6 $\mu\text{mol/L}$
内侧下游引物(BIP)	40 $\mu\text{mol/L}$	1.0	1.6 $\mu\text{mol/L}$
环状上游引物(LF)	20 $\mu\text{mol/L}$	1.0	0.8 $\mu\text{mol/L}$
环状下游引物(LB)	20 $\mu\text{mol/L}$	1.0	0.8 $\mu\text{mol/L}$
dNTPs	10 mmol/L	4	1.6 mmol/L
甜菜碱	5 mol/L	5	1.0 mol/L
硫酸镁	150 mmol/L	1	6 mmol/L
<i>Bst</i> DNA 聚合酶	8 U/ μL	1	0.32 U/ μL
DNA 模板	100 ng/ μL	2	8 ng/ μL
水	—	补足至 25	—

13.5.3 LAMP 反应参数

63.0 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ $^{\circ}\text{C}$ 恒温扩增 45 min, 80.0 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ $^{\circ}\text{C}$ 5 min 使酶灭活,反应结束。

13.5.4 显色反应

反应结束后,将显色液与反应液上下颠倒轻轻混匀,立即在黑色背景下进行颜色观察。

13.6 质量控制

13.6.1 基本原则:实验室中设置的各种对照 LAMP 显色法检测结果应符合以下情况。否则,任一种对照如果出现非下述正常结果,应重做试验。

13.6.2 空白对照:反应管中液体呈橙色。

13.6.3 阴性对照:反应管中液体呈橙色。

13.6.4 阳性对照:反应管中液体呈绿色。

14 结果判断和确证

14.1 待检样品 2 个平行样反应管中液体均呈橙色,同时各种试验对照结果正常,可判断该样品检测结果为阴性。

14.2 待检样品 2 个平行样反应管中液体至少有 1 管呈绿色,同时各种试验对照结果正常,可判断该样品沙门氏菌系初筛阳性,应对原增菌液采用本标准的第一法进行确证试验。

15 结果表述

15.1 对 LAMP 检测结果为阴性的样品,表述为该 10 g(mL)样品中未检出沙门氏菌。

15.2 对 LAMP 检测结果为沙门氏菌初筛阳性的样品,应按照确证试验情况进行结果判断,报告该 10 g(mL)样品中检出或未检出沙门氏菌。

附 录 A
(资料性附录)
沙门氏菌特异基因序列

A.1 沙门氏菌 *fimI* 特异基因序列(Accession no.AF083911.1)

CACTAAATCCGCCGATCAAACGGTGACGTTGGGTCAATACCGTACCGCCAGCTTTACG
GCGATTGGTGATACGACCGCACAGGTGCCTTTCACCATCGTCCTGAATGACTGCGATCCGA
AAGTGGCGGCCACCGCTGCCGTTGCTTTCTCTGGTCAGGCAGATAACACCAACAATAATTT
GCTGGCTGTCTCCTCTGCGGATAATAGCACCACCGCAACCGGCGTCGGGATTGAAATTCTT
GATAATACCTCCTCACCGTTG

A.2 引物碱基序列及构成

F3:CACTAAATCCGCCGATCAA

B3:CAACGGTGAGGAGGTATTATC

FIP: TTCGGATCGCAGTCATTCAGG CGATTGGTGATACGACCG

BIP: GGTCAGGCAGATAACACCAACA TTGCGGTGGTGCTATTATC

LF:TGGTGAAAGGCACCTGTG

LB:ATTTGCTGGCTGTCTCCTC
