

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2206.7—2010

化妆品微生物检测方法
第7部分：蛋白免疫印迹法检测
疯牛病病原

Determination of microbiological in cosmetics—
Part 7: Determination of bovine spongiform encephalopathy (BSE) by
western blot method

2010-03-02 发布

2010-09-16 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《化妆品微生物检测方法》系列标准共分为 7 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。

本部分为 SN/T 2206 的第 7 部分。

本部分附录 A 为规范性附录。

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：中华人民共和国北京出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：马贵平、史喜菊、李炎鑫、刘全国、李冰玲、刘旭辉。

本部分系首次发布的检验检疫行业标准。

化妆品微生物检测方法

第7部分:蛋白免疫印迹法检测 疯牛病病原

1 范围

SN/T 2206 的本部分规定了进出口化妆品中疯牛病病原检测——蛋白免疫印迹法。
本部分适用于化妆品中疯牛病病原的检测。

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 6682 分析实验用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

化妆品卫生规范(卫生部)

3 缩略语

下列缩略语适用于 SN/T 2206 的本部分。

3.1

western blot

蛋白免疫印迹。

3.2

PrP

朊蛋白。

3.3

PrP^c

细胞型朊蛋白。

3.4

PrP^{sc}

致病性朊蛋白。

3.5

PK

蛋白酶 K。

3.6

PMSF

苯甲基磺酰氟。

3.7

tris base

三(羟甲基)氨基甲烷。

3.8

SDS

十二烷基硫酸钠。

3.9

SDS-PAGE

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

3.10

PVDF

聚偏二氟乙烯。

3.11

PBS

磷酸盐缓冲盐水。

3.12

ECL

电化学发光。

4 主要仪器设备

4.1 生物安全柜(2B II型)。

4.2 台式高速离心机(最高离心力可达 12 000g 以上)。

4.3 组织匀浆机。

4.4 垂直电泳系统(含转印装置)。

4.5 水浴锅(温度可达到 $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)。

4.6 恒温培养箱($37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$)。

4.7 X光片洗片机。

4.8 磁力搅拌器和搅拌子(可以加热)。

4.9 微量可调移液器($2\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\text{ }\mu\text{L}$ 、 $100\text{ }\mu\text{L}$ 、 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$)和相应吸头。

4.10 各种冰箱(精度分别达到 $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$)。

4.11 高压灭菌锅(温度可达到 $135\text{ }^{\circ}\text{C}$)。

4.12 PVDF 转印膜($0.45\text{ }\mu\text{m}$)。

5 方法原理

疯牛病的病原是宿主细胞编码的一种正常蛋白质的异构体,这种正常蛋白简称为 PrP^c,其异构体简称为 PrP^{sc}。正常的 PrP^c 对蛋白酶 K 敏感,不致病;但其异构体 PrP^{sc}对蛋白酶 K 有抗性,可致病,称为朊病毒(prion)。将被检化妆品制备成可溶性溶液,分成两等份,一份用蛋白酶 K 消化,另一份不用蛋白酶 K 消化,然后进行蛋白质电泳和转印试验,在 PVDF 膜上进行抗原抗体反应。如果出现特异性条带,即可判定被检化妆品溶液中存在 PrP^{sc}。

6 试剂

6.1 12% Tris-Glycine 预制凝胶(或自制 12% Tris-甘氨酸-SDS 聚丙烯酰胺凝胶)。

6.2 PrP 单克隆抗体(鼠抗 PrP IgG1,如 6H4)。

6.3 辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG。

- 6.4 裂解缓冲液(配方见附录第 A.1 章)。
- 6.5 SDS-PAGE 上样缓冲液(配方见附录第 A.2 章)。
- 6.6 电泳缓冲液(配方见附录第 A.3 章)。
- 6.7 电转缓冲液(配方见附录第 A.4 章)。
- 6.8 PBS(pH 7.4)(配方见附录第 A.5 章)。
- 6.9 PBS-Tween20(配方见附录第 A.6 章)。
- 6.10 PK 储存液(配方见附录第 A.7 章)。
- 6.11 ECL(电化学发光增强剂,配方见附录第 A.8 章)。
- 6.12 PMSF(蛋白酶抑制剂,配方见附录第 A.9 章)。
- 6.13 DMSO(分析级纯)。
- 6.14 乙醇(分析级纯)。
- 6.15 实验用水:所有试剂的配制用水应为蒸馏水或去离子水,符合 GB/T 6682 的要求。

7 操作步骤

7.1 样品制备

7.1.1 被试化妆品应在使用前制备。按照卫生部《化妆品卫生规范》中有关规定,根据溶解性不同,水溶性化妆品用 PBS 作溶剂,脂溶性化妆品用 DMSO 或乙醇作溶剂,制成终浓度为 10% 的溶液。如果需要,可以使用涡旋混合或超声波处理或 37 °C 加热等来帮助溶解。

7.1.2 取上述溶液 0.7 mL 加入到 1.5 mL Eppendorf 管中,再加入 0.7 mL 裂解缓冲液,振荡混匀,2 000g 离心 5 min。

7.1.3 将上清液转移到一个新的 1.5 mL Eppendorf 管中。

7.1.4 将上述上清液 390 μ L 加入到一个新的 1.5 mL Eppendorf 管中,并加入 10 μ L 2 mg/mL PK (PK 终浓度为 50 μ g/mL),37 °C 温箱中反应 1 h 后,再加入 8 μ L PMSF(1 mg/mL)终止 PK 反应,该样品称为样品^{+pk}。7.1.3 中剩余的没有用 PK 消化的上清液称为样品^{-pk}。

7.1.5 试验中对照为重组 PrP^c,不用进行 PK 处理,直接进行 SDS-PAGE 检测。

7.2 蛋白免疫印迹试验

7.2.1 制备 SDS-PAGE 样品:取被测样品^{-pk}和样品^{+pk}以及阴、阳性对照品各 30 μ L,分别加入到四个 1.5 mL Eppendorf 管中,再分别加入等量的上样缓冲液,振荡混匀。沸水煮 10 min 后冷却至室温,即为制备好的 SDS-PAGE 样品。

7.2.2 SDS-PAGE 电泳:除去预制凝胶的外包装,用记号笔标记上样孔的位置,撕去预制凝胶底部的凝胶封闭条,拔出梳子,将预制凝胶放入电泳槽内,按要求固定好,加入电泳缓冲液。将每个制备好的 SDS-PAGE 被测样品^{-pk}和样品^{+pk}及阴、阳性对照品分别加入到预制凝胶的四个相邻的孔中,每个孔中加入 15 μ L。每次试验均设蛋白质分子量标准 Marker。将电泳槽与电泳仪的电源线连接好,在电压 200 V 下,电泳 45 min~60 min(样品接近凝胶底部为止)。

7.2.3 电转(蛋白质从预制凝胶转移到 PVDF 膜):剪切与海绵垫大小相等的两张滤纸和一张 PVDF 膜,将滤纸和海绵垫在电转缓冲液中浸透;PVDF 膜先经甲醇浸透(2 min~3 min)后,再浸入电转缓冲液。按下述图 1 所示将海绵垫、滤纸、电泳后的凝胶、PVDF 膜、滤纸、海绵垫依次放好,将转印装置一起放入电泳槽中,加入电转缓冲液,在电压 25 V,电流 110 mA 下电转 1 h。需要特别注意的是,海绵垫、滤纸中不能含有气泡。

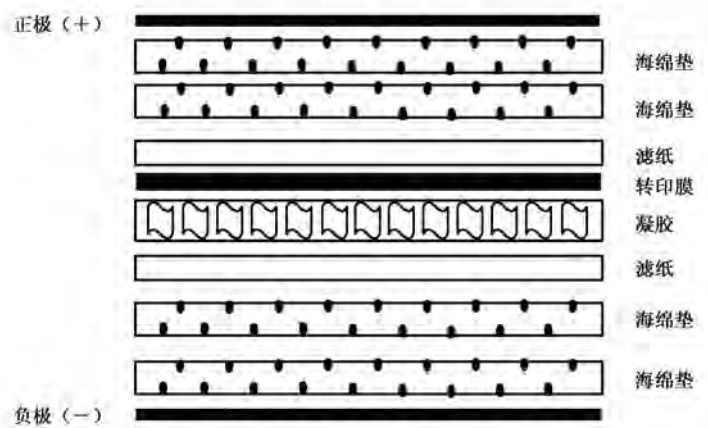
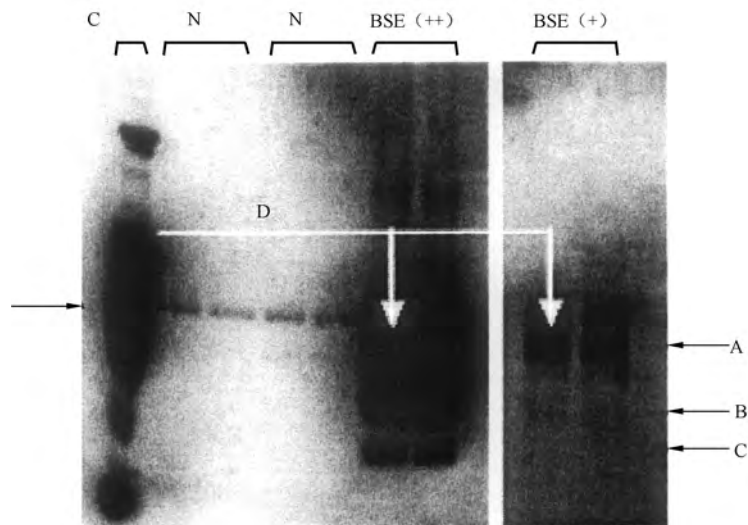


图 1 蛋白质从凝胶转移到 PVDF 膜装载示意图

- 7.2.4 电转完成后,将 PVDF 膜放入 20 mL 用 PBS-Tween20 配制的 5% 的脱脂奶粉溶液(以下简称封闭液)中,室温振荡反应 1 h(也可 4 °C 过夜)。
- 7.2.5 倒掉上述奶粉溶液,将 PVDF 膜浸入 PrP 单克隆抗体溶液(用封闭液按 PrP 单克隆抗体说明书稀释比例配制)中,室温振荡反应 1 h(也可 4 °C 过夜)。
- 7.2.6 倒掉 PrP 单克隆抗体溶液,PVDF 膜用 PBS-Tween20 洗三次,每次 5 min。
- 7.2.7 将 PVDF 膜浸入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 抗体溶液(用封闭液按辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 抗体说明书稀释比例配制)中,室温振荡反应 1 h。
- 7.2.8 倒掉酶标二抗溶液,PVDF 膜用 PBS-Tween20 洗三次,每次 5 min。
- 7.2.9 将沥干的 PVDF 膜浸入到 12 mL ECL 溶液中,作用 1 min 后取出,吸去多余液体,用单层透明的聚乙烯膜(polythene wrap)(也可用食品保鲜膜替代)包裹,立即送到暗室。
- 7.2.10 在暗室中,剪切与 PVDF 膜大小相仿的 X 光胶片,与 PVDF 膜重叠放入曝光暗盒中曝光,直到阳性对照的强信号出现和膜背景或蛋白酶 K 带出现 4 min~8 min 左右,为了观察到最佳可见信号,曝光时间可以更长或更短;也可使用化学发光检测系统进行检测。

8 结果判定

如果检测样品(PK+)在 X 光胶片上显示 3 条特异性信号带,则判为阳性;未出现特性条带则判为阴性。结果判定示意图见图 2。



注:图中 C 带为重组 PrP^c 对照,N 带为阴性样品,BSE(++),BSE(+)分别为强阳性和弱阳性样品。

图 2 结果判定示意图

9 生物安全措施

为了保护实验室人员的安全,应由具备资格的实验室和实验人员检测疯牛病病原,所有培养物和废弃物应小心处置,严格按照 GB 19489 中的有关规定执行。

附 录 A
(规范性附录)
试剂的配制

A.1 裂解缓冲液

N-十二烷基肌氨酸钠	10 g
0.01 mol/L PBS(pH 7.4)	100 mL

此溶液最好新鲜配制,4℃保存不超过3 d。

A.2 1×SDS PAGE 上样缓冲液

Tris Base	1.51 g
SDS	8.0 g
蔗糖	20.0 g
溴酚蓝	0.1%(终浓度)

加蒸馏水并调节酸碱度至终体积95 mL,pH 6.8。

使用前每95 μL SDS-PAGE 上样缓冲液加入5 μL β-巯基乙醇。

A.3 10×电泳缓冲液

Tris Base	30.3 g
甘氨酸	144.0 g
SDS	10.0 g

用蒸馏水定容至1 000 mL。

A.4 1×电转缓冲液

Tris	1.45 g
甘氨酸	7.20 g
SDS	0.1 g
甲醇	200 mL

用蒸馏水定容至1 000 mL。

此溶液在4℃可保存1周。

A.5 PBS(pH 7.4)

氯化钠(NaCl)	8 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄)	1.44 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.24 g

加800 mL 蒸馏水溶解,用盐酸调pH值至7.4,再加蒸馏水至1 000 mL,121℃±2℃,20 min 高压蒸气灭菌后,室温保存。

A.6 PBS-Tween20

100 mL PBS(pH 7.2)加入100 μL Tween20

A.7 蛋白酶 K(2 mg/mL)贮存液

以可溶性粉剂购入的蛋白酶 K 应以灭菌的 50 mmol/L Tris (pH 8.0), 1.5 mmol/L 乙酸钙溶解, 配制成浓度为 2 mg/mL 的溶液, 分装, 在 -20 °C 下保存。

A.8 ECL

增强化学发光免疫印迹检测试剂, 包括 A 液和 B 液。

使用前等量混合 A 液和 B 液, 混合后尽快使用, 每平方厘米转印膜至少需要 0.125 mL 混合液。

A.9 100 mmol/L PMSF(蛋白酶抑制剂)

0.435 g PMSF 溶解在 25 mL 正丙醇中, 混匀, 4 °C 避光保存。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
化妆品微生物检测方法
第 7 部分：蛋白免疫印迹法检测
疯牛病病原

SN/T 2206.7—2010

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街 16 号
邮政编码：100045

网址 www.spc.net.cn

电话：68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

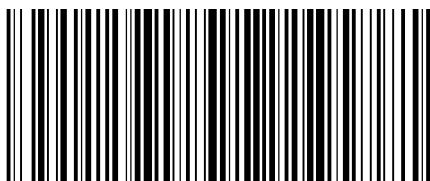
开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 12 千字

2010 年 5 月第一版 2010 年 5 月第一次印刷

印数 1—1 600

*

书号：155066·2-20840 定价 16.00 元



SN/T 2206.7-2010