

SN

İ ĸ | ö „ S Æ â _ _ f > < S

TOLU ääè ě äää

Ä Ö ± 3 p _ © Z E
» é † s M â ç f † E _ ©
... d h h ð

Efficiency of repair Repair of the
Qos é Efficiency of repair Repair of the
xfo cnu nce

äää ŠăŠă ? f

äää Šă Šă L @

İ ĸ | ö _ _ f 9 S ? f

前 言

/ 《化妆品微生物检测方法》系列标准共分为 部分：

- 第 部分：沙门氏菌；
- 第 部分：需氧芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌；
- 第 部分：肺炎克雷伯氏菌；
- 第 部分：链球菌；
- 第 部分：肠球菌；
- 第 部分：破伤风梭菌；
- 第 部分：蛋白免疫印迹法检测疯牛病病原。

本部分为 sn/ 的第 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 部分:蛋白免疫印迹法检测 疯牛病病原

范围

sn/ 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。

规范性引用文件

下列文件中的条款通过 sn/ 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。

/ 分析实验用水规格和试验方法
gb 实验室 生物安全通用要求
化妆品卫生规范(卫生部)

缩略语

下列缩略语适用于 sn/ 的本部分。

蛋白免疫印迹。

朊蛋白。

细胞型朊蛋白。

致病性朊蛋白。

/ 蛋白酶 k。

;
苯甲基磺酰氟。

三(羟甲基)氨基甲烷。

/ —

十二烷基硫酸钠。

十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。

聚偏二氟乙烯。

磷酸盐缓冲盐水。

：
电化学发光。

主要仪器设备

生物安全柜(Ⅱ型)。

台式高速离心机(最高离心力可达 g 以上)。

组织匀浆机。

垂直电泳系统(含转印装置)。

水浴锅(温度可达到 $^{\circ}\text{C}$)。

恒温培养箱()。

光片洗片机。

磁力搅拌器和搅拌子(可以加热)。

微量可调移液器(μL 、 μL 、 μL 、 μL)和相应吸头。

各种冰箱(精度分别达到 $^{\circ}\text{C}$ 、 $^{\circ}\text{C}$ 和 $^{\circ}\text{C}$)。

高压灭菌锅(温度可达到 $^{\circ}\text{C}$)。

转印膜(μm)。

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 p p^+ ,其异构体简称为 p p^- 。正常的 p p^+ 对蛋白酶 k 敏感,不致病;但其异构体 p p^- 对蛋白酶 k 有抗性,可致病,称为朊病毒()。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 pvd f 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 p p^- 。

试剂

预制凝胶(或自制 $\text{t} \sim \text{甘氨酸} \sim \text{sds}$ 聚丙烯酰胺凝胶)。

单克隆抗体(鼠抗 p p^- ige,如 h)。

辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 ige 。

蛋白质从预制凝胶转移到 p v d f 膜):剪切与海绵垫大小相等的两张滤纸和一张 p v d f 膜先在电转缓冲液中浸透; 膜先经甲醇浸透() , 滤纸、海绵垫依次放好,将转印装置一起

特别注意的是,海绵垫、滤纸中不能含有气泡

图 蛋白质从凝胶转移到 pvdf 膜装载示意图

电转完成后,将 pvdf 膜放入 1L 用 pbstween 配制的 的脱脂奶粉溶液(以下简称封闭液)

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 中的有关规定执行。

附 录 (规范性附录) 试剂的配制

a 裂解缓冲液

N 十二烷基肌氨酸钠 々
 100 mg/ml (())

此溶液最好新鲜配制， 保存不超过 周。

上样缓冲液

10 mmol/L 々
 2 mmol/L sds 々
蔗糖 々
溴酚蓝 (终浓度)

加蒸馏水并调节酸碱度至终体积 1 mL , ()。

使用前每 μL 上样缓冲液加入 μL β 巯基乙醇。

电泳缓冲液

10 mmol/L 々
甘氨酸 々
sds 々

用蒸馏水定容至 1 L 。

电转缓冲液

10 mmol/L 々
甘氨酸 々
sds 々
甲醇 1 mL

用蒸馏水定容至 1 L 。

此溶液在 4°C 可保存 周。

(())

氯化钠()

氯化钾(/)

磷酸氢二钠(())

磷酸二氢钾(勝 r 標 蒙

蛋白酶 k (/) 贮存液

以可溶性粉剂购入的蛋白酶 k 应以灭菌的 ' ' ' / (() , / 乙酸钙溶解, 配制成浓度为 ' % 的溶液, 分装, 在 j 下保存。

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 ' l 混合液。

/ (蛋白酶抑制剂)

溶解在 ' l 正丙醇中, 混匀, 避光保存。
