



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107290517 A

(43)申请公布日 2017.10.24

(21)申请号 201710507071.4

(22)申请日 2017.06.28

(71)申请人 南通大学

地址 226000 江苏省南通市崇川区啬园路9号

(72)发明人 连玉龙 肖静 孙晴 张琼  
徐苗苗 彭美娟 金云霞 周云薇  
姜海悦 张宵月 毛伟明

(74)专利代理机构 北京商专永信知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11400

代理人 高之波 倪金磊

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 1/34(2006.01)

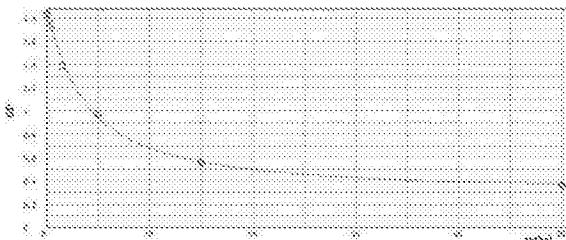
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种人体毛发褪黑素含量的测量方法

(57)摘要

本发明提供一种人体毛发褪黑素含量的测量方法,包括如下步骤:S1、取人体毛发,并去角质;S2、萃取去角质后人体毛发,提取褪黑素;S3、酶联免疫吸附法测试褪黑素的含量。本发明提供的测量人毛发中的褪黑素水平,对于研究褪黑素与毛发生理学、病理学之间关系提供了一种新的方法。本次实验提供了人体毛发中的褪黑素测试方法的可行性研究。



1. 一种人体毛发褪黑素含量的测量方法,其特征在于,包括如下步骤:
  - S1、取人体毛发样品,并去角质;
  - S2、萃取去角质后人体毛发,提取褪黑素;
  - S3、酶联免疫吸附法测试褪黑素的含量。
2. 根据权利要求1所述的一种人体毛发褪黑素含量的测量方法,其特征在于,S1中去角质的步骤为:将所述人体毛发加入异丙醇浸泡,人体毛发与异丙醇的重量比为1:30~40;浸泡时间为4分钟以上。
3. 根据权利要求2所述的一种人体毛发褪黑素含量的测量方法,其特征在于,还包括位于S1与S2之间的步骤S1.1、蒸发去除异丙醇,粉碎去角质后的人体毛发。
4. 根据权利要求3所述的一种人体毛发褪黑素含量的测量方法,其特征在于,粉碎去角质后的人体毛发的步骤为液氮冷冻去角质后人体毛发6小时以上,再将冷冻后人体毛发研磨粉碎。
5. 根据权利要求1所述的一种人体毛发褪黑素含量的测量方法,其特征在于,S2、萃取去角质后人体毛发的步骤中,萃取溶剂为体积比5:3的甲醇和乙醚的混合液。
6. 根据权利要求5所述的一种人体毛发褪黑素含量的测量方法,其特征在于,所述萃取温度为50.8°C,萃取时间为12小时以上。
7. 根据权利要求5所述的一种人体毛发褪黑素含量的测量方法,其特征在于,S2、提取褪黑素的步骤中,离心分离萃取后混合液,提取离心分离后混合液的上层液相,再去除上层液相的溶剂,得到褪黑素固相。
8. 根据权利要求7所述的一种人体毛发褪黑素含量的测量方法,其特征在于,所述离心分离的转速为3000~4000转/分钟,时间为10min以上。
9. 根据权利要求1所述的一种人体毛发褪黑素含量的测量方法,其特征在于,S3、酶联免疫吸附法测试褪黑素的含量的步骤中,将褪黑素固相加入PH为7.35的PBS溶液,采用酶联免疫吸附法测试褪黑素。

## 一种人体毛发褪黑素含量的测量方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种人体毛发褪黑素含量的测量方法领域。

### 背景技术

[0002] 褪黑素能够调节人体生物节律、睡眠、情绪、免疫功能、生殖、衰老以及毛发生长等多种生理功能。现有利用血液、唾液及尿液等生物样品中褪黑素检测受到人体生理节律影响以及无法真正反映皮肤毛囊中的褪黑素水平。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种人体毛发褪黑素含量的测量方法,解决上述技术问题中的一个或者多个。

[0004] 本发明提供一种人体毛发褪黑素含量的测量方法,包括如下步骤:

[0005] S1、取人体毛发,并去角质;

[0006] S2、萃取去角质后人体毛发,提取褪黑素;

[0007] S3、酶联免疫吸附法测试褪黑素的含量。

[0008] 除了松果腺这个主要分泌器官分泌褪黑素外,皮肤毛囊也可分泌,其对于人体毛发在生长、色素沉着、脱毛等生理具有重要调节功能。基于此,本发明提供一种人体毛发褪黑素含量的测量方法,测量结果更加稳定,为明确褪黑素对于毛发生理功能以及毛发相关疾病如脱发、色素性疾病的治疗提供研究基础。

[0009] 在一些实施方式中,S1中去角质的步骤为:将人体毛发加入异丙醇浸泡,人体毛发与异丙醇的重量比为1:30~40;浸泡时间为4分钟以上。

[0010] 去除角质蛋白,便于后续萃取,并有利于清理毛发。

[0011] 在一些实施方式中,还包括位于S1与S2之间的步骤S1.1、蒸发去除异丙醇,粉碎去角质后的人体毛发。

[0012] 在一些实施方式中,粉碎去角质后的人体毛发的步骤为液氮冷冻去角质后人体毛发6小时以上,再将冷冻后人体毛发研磨粉碎。

[0013] 在一些实施方式中,S2、萃取去角质后人体毛发的步骤中,萃取溶剂为体积比5:3的甲醇和乙醚的混合液。

[0014] 在一些实施方式中,萃取温度为50.8℃,萃取时间为12小时以上。

[0015] 在一些实施方式中,S2、提取褪黑素的步骤中,离心分离萃取后混合液,提取离心分离后混合液的上层液相,再去除上层液相的溶剂,得到褪黑素固相。

[0016] 本发明采用上层液相,上层液相中褪黑素含量稳定,进而检出水平较稳定。

[0017] 在一些实施方式中,离心分离的转速为3000~4000转/分钟,时间为10min以上。

[0018] 在一些实施方式中,S3、酶联免疫吸附法测试褪黑素的含量的步骤中,将褪黑素固相加入PH为7.35的PBS溶液,再采用酶联免疫吸附法测试褪黑素。

[0019] 具体的,S3利用非提取性褪黑素ELISA试剂盒,具体的操作方法严格按说明书进

行。

## 附图说明

图1为酶联免疫吸附法褪黑素浓度与吸光度关系标准曲线图。

## 具体实施方式

[0020] 本发明提供一种人体毛发褪黑素含量的测量方法，  
 [0021] 首先选择年龄22-23岁的2名健康成年女性，  
 [0022] 采集唾液与头发，各检测其褪黑素水平，用唾液收集管收集三名 女生一天中1am、4am、7am、8am、9am、10am、3pm、16pm、19pm、20pm、21pm、22pm十二个时间点的唾液，离心，-20℃保存。  
 [0023] 同时在采样前一天上午十点，2名女性每次各取头枕部发根头发50mg。  
 [0024] 包括如下步骤：  
 [0025] S1、将50mg人体毛发加入异丙醇浸泡，2~3ml异丙醇浸泡时间 5分钟以上；  
 [0026] S1.1、蒸发去除异丙醇，液氮冷冻去角质后人体毛发6小时以上，再将冷冻后人体毛发研磨粉碎；  
 [0027] S2、萃取去角质后人体毛发，萃取溶剂为体积比5ml甲醇和3ml 乙醚的混合溶剂，萃取温度为50.8℃，萃取时间为12小时以上，  
 [0028] 离心分离萃取后混合液；离心分离的转速为3000~4000转/分钟，时间为10min以上；提取离心分离后混合液的上层液相，使用氮吹仪 去除上层液相的溶剂，得到褪黑素固相；  
 [0029] S3、将褪黑素固相加入PH为7.35的PBS溶液，采用酶联免疫 吸附法测试褪黑素的含量。  
 [0030] 本发明的S3中酶联免疫吸附法采用德国IBL公司ELISA试剂 盒，具体包括如下成分：

数量	标记	成分
1×12×8	MTP	包被板，可拆，包被了抗兔IgG (羊，多克隆)
1×12ml	BIOTIN	褪黑激素生物素，即用，内含稳定剂。
1×7ml	ANTISERUM	褪黑激素抗血清，即用，内含抗血清(兔，多克隆)和稳定剂，即用
1×12ml	ENZCONJ	酶联物，即用，内含链霉素标记的辣根过氧化物酶和稳定剂
1×10ml	CAL A	标准品A 标准品B-F，即用，内含稳定剂，具体浓度请见试剂瓶标签或质控单。
1×5×1ml	CAL B-F	
1×2×1ml	CONTROL 1+2	质控品1+2，内含稳定剂，具体浓度请见试剂瓶标签或质控单。
1×12ml	TMB SUBS	TMB底物溶液，即用，内含TMB、缓冲液和稳定剂
1×12ml	TMB STOP	TMB终止液，即用，内含1M的H2SO4。
1×50ml	WASHBUF CONC	洗涤缓冲液，20倍浓缩，内含磷酸缓冲液、吐温和稳定剂。
3×	FOIL	粘性金属板

[0032] 实验步骤:

[0033]	1	将标准品、质控品和样品分别 100ul 加入到相应的微孔中，空白孔加 100ul 标准品 A。
	2	除空白孔外每孔加入 50ul 抗血清溶液。盖板，轻轻振荡 10 秒。
	3	2-8℃温育 16-20 小时
[0034]	4	移去粘性金属板，弃去孔内反应液。用稀释好的洗涤缓冲液 (250ul) 洗板 4 次，最后在吸水纸上拍干以除去残余液体。
	5	在每一微孔中加入 100ul 生物素溶液，盖板。
	6	轨道摇床 (500ul) 室温温育 2 个小时。
	7	移去粘性金属板，弃去孔内反应液。用稀释好的洗涤缓冲液 (250ul) 洗板 4 次，最后在吸水纸上拍干以除去残余液体。
	8	在每一微孔中加入 100ul 酶联物，盖板
	9	轨道摇床 (500ul) 室温温育 1 个小时。
	10	移去粘性金属板，弃去孔内反应液。用稀释好的洗涤缓冲液 (250ul) 洗板 4 次，最后在吸水纸上拍干以除去残余液体。
	11	在每一微孔中加入 100ul TMB 底物液
	12	轨道摇床 (500ul) 室温温育 15 分钟。
	13	在每一微孔中加入 100ul TMB 终止液终止底物反应，轻轻振荡，此时溶液颜色由蓝色变成黄色。
	14	加终止液后 15 分钟内 450nm 处读取 OD 值 (参考波长: 600-650nm)。

[0035] 考虑到褪黑素水平分泌个体间还存在着广泛的差异以及分泌节律性模式也不同，本实验以比较成熟的唾液褪黑素测量作为参照，唾液采样时间点:1:00、4:00、7:00、8:00、9:00、10:00、13:00、16:00、19:00、20:00、21:00、22:00，按照时间顺序101-112为第1人，201-212为第2人。

[0036] 人体毛发样品如表1,发样为1a,2a,1a为第1人发样,2a为第2人发样。

[0037] 表1标准品及样品编号

[0038]

编号	1	2	3	4	5
A	标A	101	109	205	1a
B	标B	102	110	206	2a
C	标C	103	111	207	
D	标D	104	112	208	
E	标E	105	201	209	
F	标F	106	202	210	
G	质控1	107	203	211	
H	质控2	108	204	212	

[0039] 表2为上述各个标准品及样品的测得OD值,具体见表2。

[0040] 表2测试样品OD值

	1	2	3	4	5
[0041]	A	1.944	0.987	1.813	1.537
	B	1.851	0.867	1.749	1.400
	C	1.748	1.482	1.861	1.633
[0042]	D	1.103	1.539	1.598	1.587
	E	0.738	1.516	0.622	1.611
	F	0.592	1.652	0.691	1.566
	G	1.558	1.782	0.962	1.778
	H	0.673	1.705	1.417	1.470

[0043] 采用四参数拟合曲线法。将所有的OD值(标准品、质控品和样品)减去空白孔的平均值。以标准品的OD值(Y轴,线性)对其浓度(X轴,对数)做一条标准曲线。在推算标准曲线时,应当充分利用好每一个标准品数值(明显逸出的数值应当被忽略,再使用更加合理的数值代替它)。样品的浓度可以从标准曲线上直接读取。从坐标纸上读取结果时应当把起始的稀释倍数考虑进去。将稀释了的样品结果乘以稀释因子即可得到其相应的结果。样品中抗体浓度高于最高标准品的样品,应当按实验前准备说明所述的方法进行稀释,并重新检测。

[0044] 表3为各测试样品的浓度测试值,详见表3。

[0045] 表3测试样品浓度(pg/ml)

[0046]

	1	2	3	4	7
A	0	7.184	0.945	2.367	0.540
B	0.500	9.617	1.274	3.171	0.609
C	1.500	2.675	0.680	1.861	
D	5.000	2.356	2.041	2.099	
E	15.000	2.482	29.339	1.974	
F	50.000	1.763	13.421	2.210	
G	2.253	1.106	7.599	1.127	
H	20.093	1.496	3.064	2.745	

[0047] 实验结果发现被测试者两人唾液褪黑素水平为白天水平低,夜间水平高,符合人体褪黑素分泌生理节律性,而褪黑素含量分别为0.540 和0.609pg/ml,并均低于唾液褪黑素最低水平。

[0048]

[0049] 本发明提供的测量人毛发中的褪黑素水平,对于研究褪黑素与毛发生理学、病理学之间关系提供了一种新的方法。本次实验提供了人体毛发中的褪黑素测试方法的可行性研究。实验结果中毛发褪黑素水平与唾液褪黑素同时段水平的数量关系还需要后续进一步的研究探讨。

[0050] 以上所述的仅是本发明的一些实施方式。对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明创造构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。

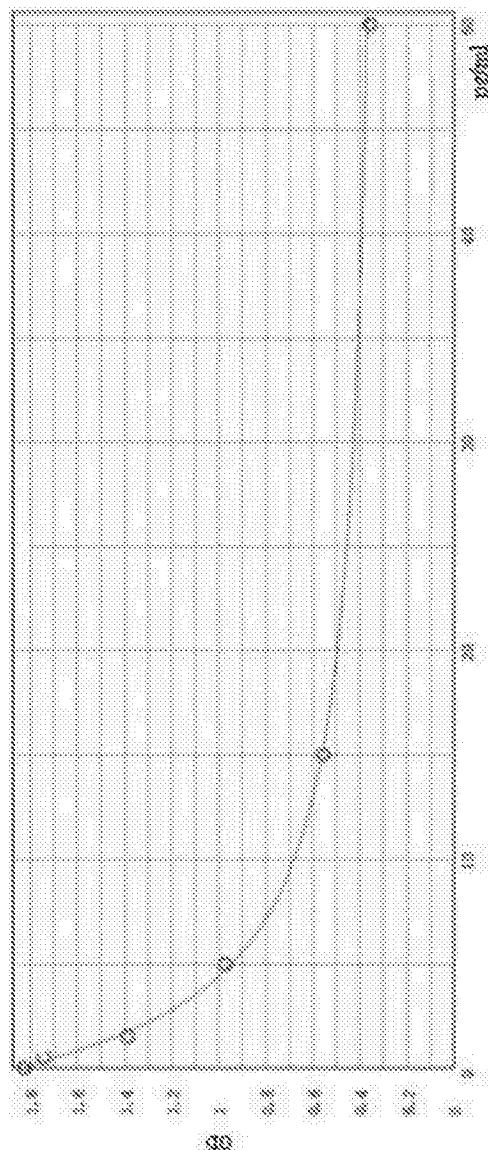


图1

专利名称(译)	一种人体毛发褪黑素含量的测量方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107290517A</a>	公开(公告)日	2017-10-24
申请号	CN201710507071.4	申请日	2017-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	南通大学		
申请(专利权)人(译)	南通大学		
当前申请(专利权)人(译)	南通大学		
[标]发明人	连玉龙 肖静 孙晴 张琼 徐苗苗 彭美娟 金云霞 周云薇 姜海悦 张宵月 毛伟明		
发明人	连玉龙 肖静 孙晴 张琼 徐苗苗 彭美娟 金云霞 周云薇 姜海悦 张宵月 毛伟明		
IPC分类号	G01N33/53 G01N1/34		
CPC分类号	G01N33/5308 G01N1/34		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

**摘要(译)**

本发明提供一种人体毛发褪黑素含量的测量方法，包括如下步骤：S1、取人体毛发，并去角质；S2、萃取去角质后人体毛发，提取褪黑素；S3、酶联免疫吸附法测试褪黑素的含量。本发明提供的测量人毛发中的褪黑素水平，对于研究褪黑素与毛发生理学、病理学之间关系提供了一种新的方法。本次实验提供了人体毛发中的褪黑素测试方法的可行性研究。

