



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108241053 A

(43)申请公布日 2018.07.03

(21)申请号 201710916229.3

(22)申请日 2017.09.30

(71)申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

(72)发明人 丁森 彭世贤

(74)专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 张红兵

(51)Int.Cl.

G01N 33/534(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种小型鱼类个体全身皮质醇含量测定的方法

(57)摘要

本发明属于鱼类生化检测分析领域。涉及一种小型鱼类个体全身皮质醇含量测定的方法。步骤包括:1)将冻干的鱼类样品分别研磨均匀,取适量样品分别用体积比为2:1的氯仿-甲醇溶液浸泡至少24h;2)向体积比为2:1的氯仿-甲醇溶液浸泡的样品中加入等量体积比为2:1的氯仿-甲醇溶液,摇匀,抽滤,得到黄色透明溶液,加少量蒸馏水在梨形漏斗中使之分成界限清晰的两层;3)用球形瓶取下层液体,用旋转蒸发器蒸干;4)用体积比为1:1的氯仿-甲醇溶液溶解球形瓶中蒸干后固体,转至具刻度的玻璃试管中,氮气吹干,得到每条鱼全部含皮质醇的体脂肪;5)以吐温-80溶液溶解所得的体脂肪,用于皮质醇含量的测定。

1. 一种小型鱼类个体全身皮质醇含量测定的方法,其特征在于,包括下列步骤:

(1) 将冻干的鱼类样品分别研磨均匀,从研磨好的每个鱼类样品中分别取适量样品,用体积比为2:1的氯仿-甲醇溶液浸泡鱼类样品至少24h;

(2) 向体积比为2:1的氯仿-甲醇溶液浸泡的鱼类样品中加入等量的体积比为2:1的氯仿-甲醇溶液,摇匀,抽滤,得到黄色透明溶液;将黄色透明溶液转移至梨形漏斗,再向漏斗中加入少量蒸馏水,盖好,摇匀后静置直至漏斗内液体分成明显的上下两层;

(3) 用球形瓶取下层液体,并用旋转蒸发仪蒸干;

(4) 用体积比为1:1的氯仿-甲醇溶液溶解球形瓶中蒸干后的固体,并转移至具刻度的玻璃试管中,用氮气吹干,得到每条鱼全部含皮质醇的体脂肪;

(5) 用包含有10%的乙醇的10%浓度的吐温-80溶液溶解从小型鱼类个体中提取出来的体脂肪,用于皮质醇含量的测定。

一种小型鱼类个体全身皮质醇含量测定的方法

技术领域

[0001] 本发明属于鱼类生化检测分析技术领域,具体涉及一种小型鱼类全身皮质醇含量测定的方法。本发明的方法可用于河流生态健康环境的评价。

背景技术

[0002] 皮质醇作为糖皮质激素中的主要成分,通常用来反映生物体的应激水平。然而目前皮质醇测定的方法都仅限于测定生物体血液中的皮质醇含量,具有一定的局限性。对于个体体长较小(约3cm~8cm),血量较少的鱼类,想要从个体水平上反应其应激性,目前还没有一套完善的方法。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于克服现有技术的缺陷,提供一种用于一种小型鱼类个体全身皮质醇含量测定的方法,以解决现有技术的不足。

[0004] 本发明结合Folch脂肪提取的方法和大型鱼类血液中皮质醇含量测定的方法,并在此基础上加以改善,提供了一种小型鱼类全身皮质醇含量测定的方法。

[0005] 本发明的技术方案如下:

[0006] 一种小型鱼类个体全身皮质醇含量测定的方法,其步骤包括:

[0007] (1)将冻干的鱼类样品分别研磨均匀,从研磨好的每个鱼类样品中分别取适量,用体积比为2:1的氯仿-甲醇溶液浸泡样品至少24h;

[0008] (2)向体积比为2:1的氯仿-甲醇溶液浸泡的样品中再加入等量的体积比为2:1氯仿-甲醇溶液,摇匀,抽滤,直到得到黄色透明溶液,将其转移至梨形漏斗,再向漏斗中加入少量蒸馏水,盖好摇匀后静置直至漏斗内液体分成明显的上下两层(见图1);

[0009] (3)用球形瓶取下层液体,并用旋转蒸发仪蒸干;

[0010] (4)用体积比为1:1的氯仿-甲醇溶液溶解球形瓶中蒸干后的固体,并转移至具刻度的玻璃试管中,用氮气吹干,得到每条鱼全部的含皮质醇的体脂肪;

[0011] (5)用包含有10%的乙醇的10%浓度的吐温80溶液溶解从小型鱼类个体中提取出来的体脂肪(见图2),用于皮质醇含量的测定。

[0012] 本发明的有益效果:

[0013] 本发明获得一个可用于一种小型鱼类个体全身(包括肌肉,血液等组织)皮质醇含量测定的方法鱼类全身的皮质醇含量的方法,由此反映小型鱼类的应激水平。

附图说明

[0014] 图1:拉氏鲮样品脂肪溶液分层图。

[0015] 图2:利用吐温-80溶解不同拉氏鲮脂肪样品的对比图。

具体实施方式

[0016] 以下结合实例对本发明小型鱼类全身皮质醇含量的测定的具体操作方式进行进一步说明。

[0017] 实施例1小型鱼类全身皮质醇含量测定(以拉氏鲮测定为例)

[0018] 1、鱼类样品的采集

[0019] 将拉氏鲮从水中捞起后迅速投入液氮中,使其立即死亡,从而避免捕捞行为对拉氏鲮体内皮质醇含量产生的影响。

[0020] 2、脂质提取前的准备工作

[0021] (1) 将拉氏鲮鲜鱼样品在冷冻干燥前最好放在-80℃冰箱保存,以免皮质醇被分解。

[0022] (2) 将体长为60mm,鲜重为2.98g的拉氏鲮用密封袋装好,放入冷冻干燥机中干燥至体重不再减轻。中途可将拉氏鲮取出,剪碎,继续干燥,以提高干燥效率。

[0023] (3) 干燥完成后的样品充分研磨,再倒入20mL塑料离心管中,拉氏鲮的干重为0.6383g;

[0024] (4) 从每个样品中取0.2g转移至10mL塑料离心管中。

[0025] 3、脂质提取

[0026] (1) 按照30mg-100mg干燥样品加入2mL体积比为2:1的氯仿-甲醇溶液的比例来添加加入氯仿-甲醇溶液,静置24小时以后,再向每个离心管中分别加入同样体积的体积比为2:1的氯仿-甲醇溶液。

[0027] (2) 将再次加入体积比为2:1的氯仿-甲醇溶液的样品摇匀,倒入与抽滤机连接的布氏漏斗,滴加体积比为1:1的氯仿-甲醇溶液,使滤纸湿润;抽滤瓶用体积比为1:1的氯仿-甲醇溶液润洗。

[0028] (3) 用100uL移液枪将抽滤瓶中的液体转移到分液漏斗(分液漏斗也需要同抽滤瓶一样清洁、润洗);用洗瓶加少量蒸馏水至分液漏斗,待上层出现泡沫,分液漏斗加盖,振荡,溶液呈乳白色并逐渐分层。若不分层,可再加少量蒸馏水;若分三层,则说明水加多了,可再加入少量体积比为1:1的氯仿-甲醇溶液。振荡以后,若溶液呈现清晰的两层(如图1),即可用球形瓶盛装漏斗中的下层液体。

[0029] 4、脂肪的干燥

[0030] (1) 将球形瓶接上旋转蒸发仪,保持真空工作状态,工作温度为39℃,转速为39rpm/min。

[0031] (2) 蒸干后的成分用适量体积比为1:1的氯仿-甲醇溶液溶解,再用移液枪转移至10mL具刻度玻璃离心管中。

[0032] (3) 用氮吹仪将溶解后的脂肪吹干,至温度39℃,确保再无氯仿或甲醇气味,得到拉氏鲮干脂肪。

[0033] 5、拉氏鲮干脂肪的溶解

[0034] 选择以乙二醇甲醚或吐温80作为脂质增溶剂,从而避免在后续操作中加入蒸馏水难以溶解脂肪。由于乙二醇甲醚有剧毒,且在溶解脂肪后静置一段时间出现了脂质悬浮物,而吐温80无毒且脂肪溶解效率较高,在后面的试验操作中申请人选择吐温80作为脂质增溶剂。

[0035] 具体步骤如下:向以上所述的10mL玻璃刻度管中加入10%的吐温80溶液(其中含

10%乙醇)至2mL刻度线。脂肪量越少,越易溶解,最终溶液接近淡青色最好(以图2为例)。

[0036] 振荡摇匀,或用低温(按常规方法)水浴使脂质充分溶解。

[0037] 6、皮质醇含量的测定

[0038] (1) 试剂配制、使用方法和保存

[0039] 1) Cor.标准品(S1~S2)的制备:将Cor.标准品用0标准1mL蒸馏水溶解,其余标准的Cor.标准品分别准确加入0.5mL蒸馏水溶剂解。溶解15分钟后摇匀方可使用。溶解后使其浓度分别为0,10,50,100,200,500ng/mL六个梯度浓度。标准复溶后于2~8℃下保存可稳定42天,将冻干品于-20℃下保存。Cor.标准品在有效期内性能稳定。其中:Cor.标准品(S1~S2),来源于碘[¹²⁵I]皮质醇放射免疫分析药盒,购自北京生物技术所有限公司。

[0040] 2) ¹²⁵-Cor.标记物的制备:按冻干品100管用10mL、50管用5mL缓冲液溶解。加样前摇匀。100管标记物放射性不大于111KBq(3u Ci),50管标记物放射性均不大于55KBq(1.5u Ci),在2~8℃避光保存可稳定贮藏42天。

[0041] 3) 兔抗体-Cor.抗体的制备:将商品兔抗体-Cor.抗体用蒸馏水溶解,溶剂热方法见封底。同此试验样品超过100管时,两瓶溶解后混合使用。抗体溶解后2~8℃保存可稳定42天,冻干品-20℃保存有效期内稳定。其中:兔抗-Cor.抗体,来源于碘[¹²⁵I]皮质醇放射免疫分析药盒,购自北京生物技术所有限公司。

[0042] 4) Cor.缓冲液的制备:Cor.缓冲液(Cor.标准品(S1~S2)来源于碘[¹²⁵I]皮质醇放射免疫分析药盒,购自北京生物技术所有限公司)为液体,可直接使用,在2~8℃下保存,在标识的有效期内使用。

[0043] 5) 驴抗兔兔免疫分离剂:驴抗兔兔免疫分离剂加样前必须充分摇匀。于2~8℃下保存,有效期内稳定,但开盖后,最多可保存45天。其中:驴抗兔兔免疫分离剂来源于碘[¹²⁵I]皮质醇放射免疫分析药盒,购自北京生物技术所有限公司。

[0044] 6) Cor质控血清的制备:

[0045] 使用方法、保存条件、有效期及附值,参见见表1(测定步骤:每管做两个重复)。

[0046] 表1加样程序及其相关试剂的配置(单位:ul)

[0047]

试剂 管别	总T	NSB管	“0”管	各标准管	样品管
零标准 (S0)		50	50		
Cor. 标准品 (S1~S2)				50	
样品或质控					50
125-I-Cor.	100	100	100	100	100
蒸馏水		100			
兔抗-Cor.抗体			100	100	100
摇匀, 37℃温育45分钟。					
驴抗兔免疫分离 剂		500	500	500	500
充分摇匀后, 在室温下放置15分钟, 于3500转/分钟离心15分钟, 吸弃上清, 测各沉淀管的放射性计数 (cpm)。					

[0048] 试验结果:

[0049] 完成步骤6后, 使用伽马计数器获得的脂肪溶液中的皮质醇含量为153.20ng/mL, 经计算本实施例中使用的拉氏鲮样本皮质醇含量为330.36ng/g。

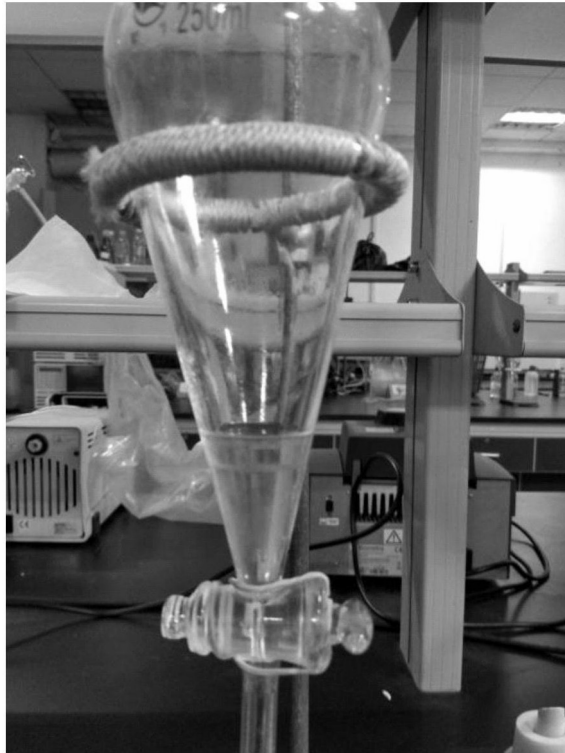


图1

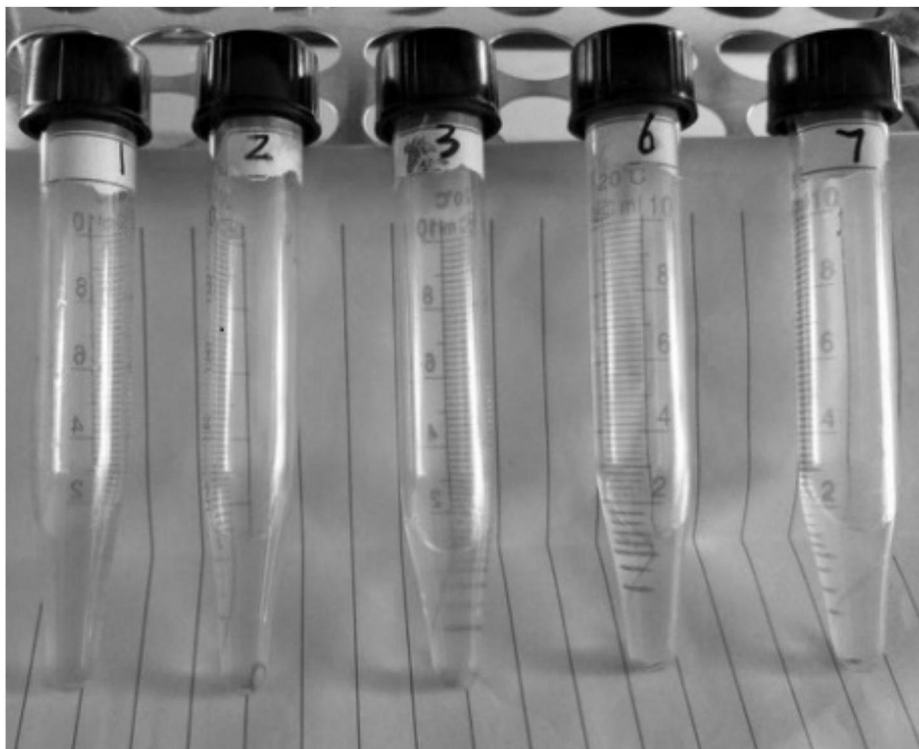


图2

专利名称(译)	一种小型鱼类个体全身皮质醇含量测定的方法		
公开(公告)号	CN108241053A	公开(公告)日	2018-07-03
申请号	CN201710916229.3	申请日	2017-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	丁森 彭世贤		
发明人	丁森 彭世贤		
IPC分类号	G01N33/534 G01N33/536		
CPC分类号	G01N33/534 G01N33/536		
代理人(译)	张红兵		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于鱼类生化检测分析领域。涉及一种小型鱼类个体全身皮质醇含量测定的方法。步骤包括：1)将冻干的鱼类样品分别研磨均匀，取适量样品分别用体积比为2：1的氯仿-甲醇溶液浸泡至少24h；2)向体积比为2：1的氯仿-甲醇溶液浸泡的样品中加入等量体积比为2：1的氯仿甲醇溶液，摇匀，抽滤，得到黄色透明溶液，加少量蒸馏水在梨形漏斗中使之分成界限清晰的两层；3)用球形瓶取下层液体，用旋转蒸发器蒸干；4)用体积比为1：1的氯仿-甲醇溶液溶解球形瓶中蒸干后固体，转至具刻度的玻璃试管中，氮气吹干，得到每条鱼全部含皮质醇的体脂肪；5)以吐温-80溶液溶解所得的体脂肪，用于皮质醇含量的测定。

试剂 管别	总T	NSB管	“0”管	各标准管	样品管
零标准(S0)		50	50		
Cor. 标准品 (S1-S2)				50	
样品或质控					50
125-I-Cor.	100	100	100	100	100
蒸馏水		100			
兔抗-Cor.抗体			100	100	100
摇匀，37℃温育45分钟。					
驴抗兔免疫分离剂		500	500	500	500
充分摇匀后，在室温下放置15分钟，于3500转/分钟离心15分钟，吸弃上清，测各沉淀管的放射性计数(cpm)。					