



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102087277 A

(43) 申请公布日 2011.06.08

(21) 申请号 201010587802.9

(22) 申请日 2010.12.14

(71) 申请人 张振冬

地址 116023 辽宁省大连市沙河口区凌河街
42 号

(72) 发明人 张振冬 闫启仑 米盛景 王睿睿
王立俊

(74) 专利代理机构 大连东方专利代理有限责任
公司 21212

代理人 贾汉生

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 15/10(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

利用鱼类血细胞监测海水苯并 a 芘污染的方
法

(57) 摘要

利用鱼类血细胞监测海水中苯并 a 芘的方
法。取 50 μL 经缓冲液在冰上处理好的金黄色葡
萄球菌悬液与暴露于含有苯并 a 芘海水中的牙鲆
红细胞悬液等体积混合，细胞数的比为 20 : 1，
20 °C 恒温孵育 30min。其间每隔 10min 摆匀混
合，防止沉淀。孵育完成后终止反应。每管加入
20 μL 预冷的 0.25% 的戊二醛溶液，4 °C 冰箱中固
定 15min。取孵育液涂片，晾干后甲醇固定。每张
涂片经 Wright's 染液染色 3min，用蒸馏水冲洗至
无色为止。晾干后油镜下观察计算红细胞 C3b 受
体花环率。将每个红细胞粘附两个及两个以上金
黄色葡萄球菌为一个花环。检测方法在 1h 内完
成，可以较好的监测分析海水是否受到苯并 a 芘
的污染。

1. 利用鱼类血细胞监测海水苯并 a 芘污染的方法,其特征在于具体的检测分析方法:

(1) 将金黄色葡萄球菌用 0.1mol/L PBS 缓冲液离心洗涤 3 次,并调整成浓度为 2×10^8 CFU/mL 的菌悬液,4℃保存备用;

(2) 取 50 μL 金黄色葡萄球菌悬液分别与在正常海水和含有苯并 a 芘海水养殖的牙鲆的红细胞悬液等体积混合,细胞数比例约为 20 : 1,轻轻混匀后,于 20℃恒温孵育 30min;

(3) 孵育过程中每隔 10min 轻轻摇动混匀,防止红细胞和菌体细胞沉淀;

(4) 孵育完成后,于冰上终止反应。每管加入 20 μL 预冷的 0.25% 的戊二醛溶液,4℃ 固定 15min。取适量孵育液制作涂片,晾干后甲醇固定 2min;

(5) 每张涂片加入适量的 Wright's 染液染色 3min,用蒸馏水冲洗至水流无色。晾干后油镜下观察红细胞对抗原的免疫粘附,计算红细胞 C3b 受体花环率;

(6) 每个样品涂 3 张片观察计数取平均值。将每个红细胞粘附两个及两个以上金黄色葡萄球菌记为一个花环;

(7) 0.1mol/L PBS⁺⁺ 实验组中 200 个红细胞中形成的花环数记为 x_1 ,0.1mol/L PBS-EDTA 阴性对照组中 200 个红细胞中形成的花环数记为 x_2 ;

(8) 红细胞 C3b 受体花环率 = $(x_1 - x_2) / 200 \times 100\%$ 。实验结果采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析;

所述金黄色葡萄球菌悬液的制备方法是:将金黄色葡萄球菌单菌落于 LB 液体培养基中,37℃过夜振荡培养。用 0.1M PBS 缓冲液离心洗涤两次,用终浓度 1% 的福尔马林溶液 65℃水浴 40min 将其灭活。取金黄色葡萄球菌悬液 300 μL 于 2mL 灭菌离心管中,加入等体积牙鲆血清,冰上充分混匀后,于 20℃孵育 30min。孵育完成后,4℃条件下 10000rpm 离心 5min,菌体沉淀用 300 μL 相应缓冲液重悬,恢复至原来的菌悬液浓度,4℃保存备用;

所述反应中所用缓冲液及其它液体为:

PBS 缓冲液:NaCl 8g, KCl 0.2g, KH₂PO₄ 0.24g, Na₂HPO₄-12H₂O 2.9g, 蒸馏水定容至 1000ml, pH7.4; 牙鲆血清稀释 10 倍。

2. 根据权利要求 1 所述利用鱼类血细胞监测海水苯并 a 芘污染的方法,其特征在于步骤(2)中,将暴露于苯并 a 芘污染海水中的鱼类血细胞与金黄色葡萄球菌悬液混匀孵育,于 20℃恒温孵育 30min,轻微摇动。

利用鱼类血细胞监测海水苯并 a 芘污染的方法

技术领域

[0001] 本发明属于本发明涉及基于鱼类血细胞免疫粘附活性变化的海水有毒有机污染物的检测方法。

背景技术

[0002] 近年来,随着科学技术的进步和工农业生产的发展,越来越多人工合成的有毒有机污染物(包括石油烃、多氯联苯、有机氯农药、多环芳烃、三丁基锡等)在近岸海水、沉积物和海洋生物体内普遍检出,有机污染问题日渐突出,已成为世界各国科学界和政府关注的新热点。研究表明,有毒有机污染物毒性大,容易溶解在生物有机相中,在海洋生物体内高度富集,破坏海洋生物的遗传物质,影响海洋生物的繁殖能力,改变受污染水域的海洋生物的种群组成,导致海洋生态系统失调,而且可通过鱼类、贝类及其它海产品进入人体,危及人类健康。因此,国内外研究学者越发关注海洋中有毒有机化合物的污染监测及其潜在危害。

[0003] 对于海洋中有毒有机化合物的监测,主要有化学监测和生物监测两种方法,其中化学监测法主要通过液-液萃取方法,富集海水中有毒有机化合物,通过测定萃取液中有机化合物的量来反映它们对海洋环境的污染程度,包括荧光分光光度法¹、紫外分光光度法、气相色谱-质谱联用(GC-MS)联用技术等²。生物监测方法主要是利用海洋底栖生物贻贝、蛤、蚝等滤食性贝类体内有机污染物的残留水平来反映背景水体中各种有毒有机污染物质含量³。但在实际海洋有毒有机污染物监测过程,化学监测方法相对繁琐,并且检测灵敏度越高所需仪器价格就越贵,因此在地方基层海洋环境监测单位不容易推广。生物监测方法则主要以底栖贝类作为指示物种,并不能真实反映表层海水中的有机污染情况。因此以鱼类作为有毒有机污染物的指示物种,建立一种相对灵敏而便捷的检测分析方法,对于丰富海水中有毒有机污染物检测方法、完善海水水质检测标准具有重要意义。

参考文献

- [0005] 1. 韦蔓新,何本茂. 钦州湾近 20a 来水环境指标变化趋势 II 油类的分布特征及其污染状况. 海洋环境科学, 2003, 22 (2) :49-52.
- [0006] 2. 江桂斌,徐福正,何滨等. 有机锡化合物测定方法研究进展. 海洋环境化学, 1999, 18 (3) :61-68.
- [0007] 3. 刘仁沿,吴世培,王斌. 长江口以北沿海主要经济贝类中有机氯农药和多氯联苯的分布及评价. 海洋环境科学, 1996, 15 (3) :29-35.

发明内容

[0008] 本发明旨在建立一种基于不同海水环境条件下牙鲆血细胞免疫粘附活性变化的快速监测海水中苯并 a 芘污染的方法。通过在正常海水和含苯并 a 芘海水中牙鲆的血细胞对金黄色葡萄球菌的免疫粘附活性的变化,初步建立研究分析海水中苯并 a 芘的污染情况及其毒性效应的实验方法。在 0.1mol/L PBS⁺⁺ 缓冲液体系中,分别采集养殖在正常海水和

含苯并 a 芘海水中的牙鲆血细胞,与金黄色葡萄球菌孵育,观察计算鱼类血细胞免疫粘附金黄色葡萄球菌形成 C3b 受体花环的百分率。将每个血细胞粘附两个及两个以上金黄色葡萄球菌记为一个花环,计数 200 个血细胞,算出花环阳性细胞百分率。血细胞 C3b 受体花环率=成花环细胞数 /200×100%。

[0009] 具体方法和步骤为:

[0010] 1. 牙鲆血清和菌悬液的制备:

[0011] 用无菌注射器分别从实验牙鲆的尾静脉采血,注入 5mL 离心管中,平放于桌面上,室温放置 30min。待血凝固后,放于 4℃ 冰箱中过夜。吸出析出的血清,分装于 1.5mL 灭菌离心管中,-80℃ 保存备用。取处理好的金黄色葡萄球菌悬液 300 μ L 于 2mL 灭菌离心管中,加入等体积牙鲆血清,冰上充分混匀后,于 20℃ 孵育 30min。每隔 10min 轻轻混匀一次,防止菌体沉淀。孵育完成后,4℃ 条件下 10000rpm 离心 5min,菌体沉淀用 300 μ L 相应缓冲液重悬,恢复至原来的菌悬液浓度,4℃ 保存备用。

[0012] 2. 牙鲆红细胞的制备:

[0013] 从实验牙鲆的尾静脉取血,采用阿氏抗凝剂与牙鲆外周血 1 : 1 混合。利用比重为 1.083 的淋巴细胞分离液 (TBD 公司) 分离制备牙鲆红细胞。将最底层的红细胞沉淀用 0.1M PBS 于 4℃ 下离心洗涤两次,用血球计数板计数后调整浓度至 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。然后取适量红细胞用缓冲液于 4℃ 离心洗涤两次,恢复至 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。

[0014] 3. 红细胞免疫粘附活性的检测:

[0015] 分别取 50 μ L 用缓冲液处理的菌悬液与红细胞悬液等体积混合,细胞数的比例约为 20 : 1(上述操作在冰上进行),于 20℃ 恒温孵育 30min。孵育过程中每隔 10min 轻轻摇动混匀,防止红细胞和菌体细胞沉淀。孵育完成后,于冰上终止反应。每管加入 20 μ L 预冷的 0.25% 的戊二醛溶液,4℃ 冰箱中固定 15min。取适量孵育液制作涂片,晾干后甲醇固定 2min。每张涂片经 Wright's 染液染色 3min,用蒸馏水冲洗至水流无色为止。晾干后油镜下观察计算红细胞 C3b 受体花环率。实验中将每个红细胞粘附两个及两个以上金黄色葡萄球菌记为一个花环。每个样品涂 3 张平行片观察计数。红细胞 C3b 受体花环率=成花环细胞数 /200×100%。

[0016] 实验结果的统计学处理采用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验分析。

[0017] 本检测方法,主要是做定性检测海洋环境中的有机污染状况,但在需要精确定量检测时,不建议采用此法。

[0018] 本发明检测过程操作简单,所需试剂配制方便,而且不需要使用复杂的仪器设备。

附图说明

[0019] 图 1:为正常自然海水中和受到有机污染海水中牙鲆红细胞免疫粘附金黄色葡萄球菌的粘附状态。

[0020] 图 2:苯并 a 芘加标海水中牙鲆红细胞免疫粘附金黄色葡萄球菌的粘附状态

具体实施方式

[0021] 实施例 1

[0022] 1. 将金黄色葡萄球菌用 0.1mol/L PBS 缓冲液离心洗涤 3 次,并调整成浓度为

2×10^8 CFU/mL 的菌悬液, 4℃保存备用。

[0023] 2. 取 50 μL 金黄色葡萄球菌悬液分别与在正常海水和含苯并 a 芘海水中养殖的牙鲆的红细胞悬液等体积混合, 细胞数比例约为 20 : 1, 轻轻混匀后, 于 20℃恒温孵育 30min。

[0024] 3. 孵育过程中每隔 10min 轻轻摇动混匀, 防止红细胞和菌体细胞沉淀。

[0025] 4. 孵育完成后, 于冰上终止反应。每管加入 20 μL 预冷的 0.25% 的戊二醛溶液, 4℃固定 15min。取适量孵育液制作涂片, 晾干后甲醇固定 2min。

[0026] 5. 每张涂片加入适量的 Wright's 染液染色 3min, 用蒸馏水冲洗至水流无色。晾干后油镜下观察红细胞对抗原的免疫粘附, 计算红细胞 C3b 受体花环率。

[0027] 6. 每个样品涂 3 张片观察计数取平均值。将每个红细胞粘附两个及两个以上金黄色葡萄球菌记为一个花环。

[0028] 7. 0.1mol/L PBS⁺⁺ 实验组中 200 个红细胞中形成的花环数记为 x_1 , 0.1mol/L PBS-EDTA 阴性对照组中 200 个红细胞中形成的花环数记为 x_2 。

[0029] 8. 红细胞 C3b 受体花环率 = $(x_1 - x_2) / 200 \times 100\%$ 。实验结果采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。

[0030] 实施例 2

[0031] 选用 3L 的玻璃烧杯作为实验容器, 加入总体积为 2L 的加标海水, 每个烧杯放实验鱼 5 尾, 每个加标浓度 2 个平行。苯并 a 芘浓度梯度: 0.49 μg/L、0.98 μg/L、1.96 μg/L、3.92 μg/L、7.84 μg/L。实验周期 14d, 温度 (20±2)℃, 24h 换加标液, 测定血细胞免疫粘附率的变化情况。

[0032] 1. 用 2.5mL 无菌注射器从实验鱼尾静脉采血, 采用阿氏抗凝剂与牙鲆外周血 1 : 1 混合, 放于 4℃冰箱保存备用

[0033] 2. 将金黄色葡萄球菌用 0.1mol/L PBS 缓冲液离心洗涤 3 次, 并调整成浓度为 2×10^8 CFU/mL 的菌悬液, 4℃保存备用

[0034] 3. 取 50 μL 金黄色葡萄球菌悬液分别与在正常海水和加标海水中养殖的牙鲆的红细胞悬液等体积混合, 细胞数比例约为 20 : 1, 轻轻混匀后, 于 20℃恒温孵育 30min。

[0035] 4. 孵育完成后, 于冰上终止反应。每管加入 20 μL 预冷的 0.25% 的戊二醛溶液, 4℃固定 15min。取适量孵育液制作涂片, 晾干后甲醇固定 2min。

[0036] 5. 每张涂片加入适量的 Wright's 染液染色 3min, 用蒸馏水冲洗至水流无色。晾干后油镜下观察红细胞对抗原的免疫粘附, 计算红细胞 C3b 受体花环率。

[0037] 6. 每个样品涂 3 张片观察计数取平均值。将每个红细胞粘附两个及两个以上金黄色葡萄球菌记为一个花环。

[0038] 7. 0.1mol/L PBS⁺⁺ 实验组中 200 个红细胞中形成的花环数记为 x_1 , 0.1mol/L PBS-EDTA 阴性对照组中 200 个红细胞中形成的花环数记为 x_2 。

[0039] 红细胞 C3b 受体花环率 = $(x_1 - x_2) / 200 \times 100\%$ 。实验结果采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。



图 1

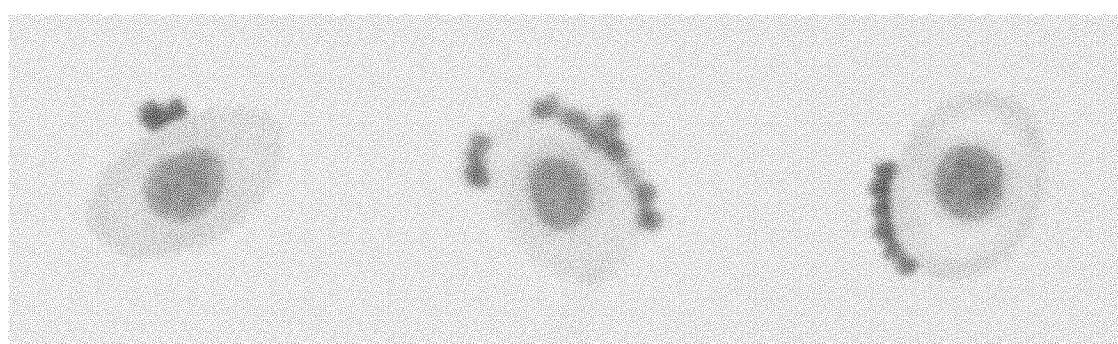


图 2

专利名称(译)	利用鱼类血细胞监测海水苯并a芘污染的方法		
公开(公告)号	CN102087277A	公开(公告)日	2011-06-08
申请号	CN201010587802.9	申请日	2010-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	张振冬		
申请(专利权)人(译)	张振冬		
当前申请(专利权)人(译)	张振冬		
[标]发明人	张振冬 闫启仑 米盛景 王睿睿 王立俊		
发明人	张振冬 闫启仑 米盛景 王睿睿 王立俊		
IPC分类号	G01N33/53 G01N15/10		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

利用鱼类血细胞监测海水中苯并a芘的方法。取50μL经缓冲液在冰上处理好的金黄色葡萄球菌悬液与暴露于含有苯并a芘海水中的牙鲆红细胞悬液等体积混合，细胞数的比为20:1，20℃恒温孵育30min。其间每隔10min摇动混匀，防止沉淀。孵育完成后终止反应。每管加入20μL预冷的0.25%的戊二醛溶液，4℃冰箱中固定15min。取孵育液涂片，晾干后甲醇固定。每张涂片经Wright's染液染色3min，用蒸馏水冲洗至无色为止。晾干后油镜下观察计算红细胞C3b受体花环率。将每个红细胞粘附两个及两个以上金黄色葡萄球菌为一个花环。检测方法在1h内完成，可以较好的监测分析海水是否受到苯并a芘的污染。

