

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103336097 A

(43) 申请公布日 2013. 10. 02

(21) 申请号 201310291553. 2

(22) 申请日 2013. 07. 11

(71) 申请人 大连理工大学

地址 116024 辽宁省大连市凌工路 2 号

(72) 发明人 刘薇 王凡 李崇磊 金一和

(74) 专利代理机构 大连理工大学专利中心

21200

代理人 梅洪玉

(51) Int. Cl.

G01N 33/00 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

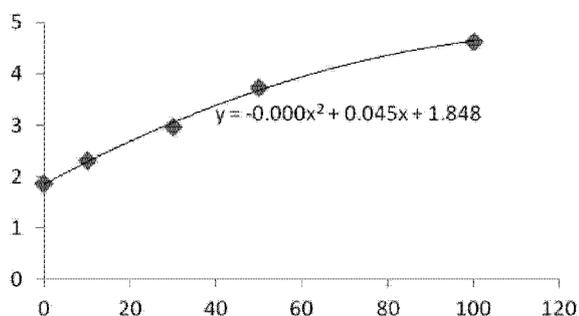
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测室内空气急性暴露免疫毒性方法

(57) 摘要

本发明提供了一种淋巴细胞亚群检测试验检测室内空气免疫毒性的方法,采用不同浓度的 VOCs 为标准毒性物质,对 4-6 周雄性小鼠进行染毒处理,每天染毒 2 小时,连续 10 天染毒,将染毒后的小鼠的脾脏的细胞进行淋巴细胞亚群试验,测得 CD4+/CD8+, 绘制标准曲线。将小鼠在污染的室内空气中用同样的方法处理,得到小鼠的脾脏细胞的 CD4+/CD8+, 带入到标准曲线得到 VOCs 浓度表示的待测室内空气的毒性,本发明通过 VOCs 浓度对 CD4+/CD8+ 的曲线实现对室内空气定量化的评价,本方法能够更加直观、准确的检测室内空气的免疫毒性,结果易于统一,重现性好,能够对室内空气污染状况做出判断。



1. 一种检测室内空气急性暴露免疫毒性的方法,是一种以复合挥发性有机物为标准物检测室内空气致免疫毒性的方法,其特征包括以下步骤:

(1) 用不同浓度的 VOCs 对 4-6 周小鼠进行每天 2 小时,连续 10 天的气体染毒,然后对上述染毒小鼠的脾细胞进行淋巴细胞亚群检测,经制备单细胞悬液、染色、重悬、上机检测步骤,计算不同浓度 VOCs 染毒的 CD4+/CD8+;

(2) VOCs 浓度为现行室内空气标准的整数倍,以 VOCs 浓度为横坐标,以 CD4+/CD8+ 为纵坐标,绘制标准曲线;

(3) 用污染的待测室内空气对小鼠进行每天 2 小时,连续 10 天的染毒处理,对染毒的小鼠进行脾淋巴细胞亚群检测,测定 CD4+T 和 CD8+T 细胞的百分比,并计算 CD4+/CD8+ 的比例;将 CD4+/CD8+ 带入到上述标准曲线,得到 VOCs 浓度表示的待测室内空气的毒性。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的小鼠是雄性昆明系小鼠,小鼠在待测室内空气相同的温度、湿度和压力环境下暂养 7 天。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,所述的待测室内空气毒性小于室内空气质量标准 100 倍的 VOCs 的毒性。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,染色所加入的荧光抗体分别为 anti-CD3-FITC、anti-CD4-PE 或者 anti-CD8-PERCP、anti-CD4-PE;孵育条件为:室温避光孵育 30min。

5. 根据权利要求 3 所述的方法,其特征在于,染色所加入的荧光抗体分别为 anti-CD3-FITC、anti-CD4-PE 或者 anti-CD8-PERCP、anti-CD4-PE;孵育条件为:室温避光孵育 30min。

一种检测室内空气急性暴露免疫毒性方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种室内污染空气毒性的评价方法,具体涉及到一种利用淋巴细胞亚群检测试验使室内空气免疫毒性可以定量检测的方法。

背景技术

[0002] 为了保障室内空气的安全,降低室内装潢、装饰所带来的威胁,人民常用各种方法对室内空气进行评价,以有效的方法掌握室内空气引起的健康风险。

[0003] 常用检测免疫毒性的方法有,免疫病理学检查、超敏反应检测、细胞因子检测、和免疫功能检测,免疫器官的淋巴细胞亚群检测是一种免疫功能检测,用流式细胞仪检测淋巴细胞亚群是近些年来检测免疫毒性的新技术,具有敏感、简便、所需样品少等优点。得到了广泛的应用,相对于病理学、超敏反应和细胞因子检测具有一定的优势,虽然淋巴细胞亚群检测早已作为规范性方法,但用流式细胞仪检测淋巴细胞亚群的试验方法和结果分析仍需进一步的标准化,且毒性反应不够直观,因此寻找一种直观、明确、结果易于统一的方法对室内空气毒性进行检测是室内空气毒性物质的定量化评价发展的要求。

发明内容

[0004] 本发明针对现有室内空气免疫毒性检测方法的不足,提供了一种淋巴细胞亚群试验检测空气免疫毒性的方法,该方法将 VOCs 作为标准毒性物质,在评价室内空气在免疫毒性时以 VOCs 浓度表示室内空气的免疫毒性,实现了室内空气毒性评价的定量化,而且检测结果更加直观、明确、易于统一,为室内空气进行定量化评价提供有力的支持。

[0005] 本发明选则复合 VOCs 作为标准毒性物质,甲醛、苯是世界卫生组织致癌物质名单中的两种,甲苯、二甲苯在室内空气中也较为常见,也能够增加致癌性,现行室内空气标准分别为:0.10mg/m³、0.11mg/m³、0.20mg/m³、0.20mg/m³。因此用复合 VOCs 浓度表示室内空气毒性结果易于统一。其操作为:用小鼠在不同浓度下的复合 VOCs 进行染毒,以复合 VOCs 浓度为横坐标,以 CD4⁺/CD8⁺ 为纵坐标绘制标准曲线,然后用小鼠在待测空气中染毒,得出小鼠脾的 CD4⁺/CD8⁺,带入到标准曲线。就得到了 VOCs 浓度表示的室内空气毒性。这种方法避免了其他试验因素所产生的影响,是室内空气毒性更加准确,检测结果更易于统一。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明采用如下步骤

[0007] 一种单细胞凝胶电泳试验检测室内空气免疫毒性的方法,其特征至少包括以下步骤:

[0008] (a) 将小鼠放入到合适浓度的 VOCs 中进行连续 10 天的染毒处理,每天 2 小时;

[0009] (b) 脾单细胞悬液的制备:小鼠脾脏用注射器芯轻轻研磨或用小剪刀轻轻剪碎,加入到含 2mL2% 的小牛血清的 PBS 中,然后过 200 目滤网,剩余液体在 1,200rpm 下离心 10min。经 0.17mol/L 的 NH₄Cl 红细胞裂解液裂解红细胞 10min,1,200rpm 离心 5min,弃上清,用 2mL PBS 洗涤两遍,弃上清,然后用台盼蓝染色确定脾细胞的活性超过 90%,最后用 2% 热灭活 FCS 的 PBS 调节细胞数为 2-10×10⁶/mL/管;

[0010] (c) 染色 :在上述单细胞悬液管中加入荧光抗体 anti-CD3-FITC、anti-CD4-PE 或者 anti-CD8-PERCP、anti-CD4-PE 室温避光孵育 30min ;

[0011] (d) 重悬 :用 PBS 重悬细胞,避光保存 ;

[0012] (e) 上机检测 :建立 CD3/CD4、CD8/B220 散点图并设置为显示 G3=R1*R2 门内的细胞,获取细胞总数 10000 个,根据同型对照设十字门分析 TH(CD3+CD4+) 和 Ts(B220+CD8+) 细胞的表达情况 ;

[0013] (f) 计算 CD4+/CD8+,以 VOCs 浓度为横坐标,以 CD4+/CD8+ 为纵坐标,绘制 CD4+/CD8+ 对 VOCs 浓度的标准曲线 ;

[0014] (g) 将小鼠放入到待测室内空气进行连续 10 天的染毒处理,每天 2 小时 ;

[0015] (h) 然后按照 b-e 步骤对小鼠脾进行淋巴细胞亚群的检测,并计算出 CD4+/CD8+ ;

[0016] (i) 用待测室内空气的 CD4+/CD8+ 带入到上述标准曲线,即可得到以 VOCs 浓度表示待测室内空气毒性 ;

[0017] 所述的待测室内空气毒性小于室内空气质量标准 100 倍的 VOCs 的毒性。

[0018] 本发明选择复合 VOCs 为表准毒性物质,通过复合 VOCs 对 CD4+/CD8+ 的曲线实现了室内空气毒性的定量化评价,本发明的方法更加直观,准确的检测室内空气的免疫毒性,结果易于统一,重现性较好,能够对室内空气污染状况作出判断,为室内空气污染和设备的研发提供支持,降低由于室内空气污染而导致的人类的致癌风险。

附图说明

[0019] 附图脾细胞的 CD4+T/CD8+T 与室内空气质量水平之间的关系图。

[0020] 图中 :横坐标为室内空气质量标准的倍数,纵坐标为脾细胞的 CD4+T/CD8+T。

具体实施方式

[0021] 以下结合技术方案和附图详细叙述本发明的具体实施方式。

[0022] (1) 用不同浓度的 VOCs 对 4-6 周小鼠进行每天 2 小时,连续 10 天的气体染毒,然后对上述染毒小鼠的脾细胞进行淋巴细胞亚群检测,经制备单细胞悬液、染色、重悬、上机检测步骤,计算不同浓度 VOCs 染毒的 CD4+/CD8+ ;

[0023] (2) VOCs 浓度为现行室内空气标准的整数倍,以 VOCs 浓度为横坐标,以 CD4+/CD8+ 为纵坐标,绘制标准曲线 ;

[0024] (3) 用污染的待测室内空气对小鼠进行每天 2 小时,连续 10 天的染毒处理,对染毒的小鼠进行脾淋巴细胞亚群检测,测定 CD4+T 和 CD8+T 细胞的百分比,并计算 CD4+/CD8+ 的比例 ;将 CD4+/CD8+ 带入到上述标准曲线,得到 VOCs 浓度表示的待测室内空气的毒性 ;

[0025] 具体步骤如下 :

[0026] (a) 将 4-6 周雄性昆明系小鼠在待测室内空气相同的温度、湿度和压力环境下暂养 7 天,然后将 4-6 周雄性昆明系小鼠放入到合适浓度的 VOCs 中进行连续 10 天的染毒处理,每天 2 小时 ;

[0027] (b) 脾单细胞悬液的制备 :小鼠脾脏用注射器芯轻轻研磨或用小剪刀轻轻剪碎,加入到含 2mL2% 的小牛血清的 PBS 中,然后过 200 目滤网,剩余液体在 1, 200rpm 下离心 10min。经 0. 17mol/L 的 NH₄Cl 红细胞裂解液裂解红细胞 10min, 1, 200rpm 离心 5min, 弃上清,用 2mL

PBS 洗涤两遍,弃上清,然后用台盼蓝染色确定脾细胞的活性超过 90%,最后用 2% 热灭活 FCS 的 PBS 调节细胞数为 $2-10 \times 10^6/\text{mL}/\text{管}$;

[0028] (c) 染色:在上述单细胞悬液管中加入荧光抗体 anti-CD3-FITC、anti-CD4-PE 或者 anti-CD8-PERCP、anti-CD4-PE 室温避光孵育 30min;

[0029] (d) 重悬:用 PBS 重悬细胞,避光保存;

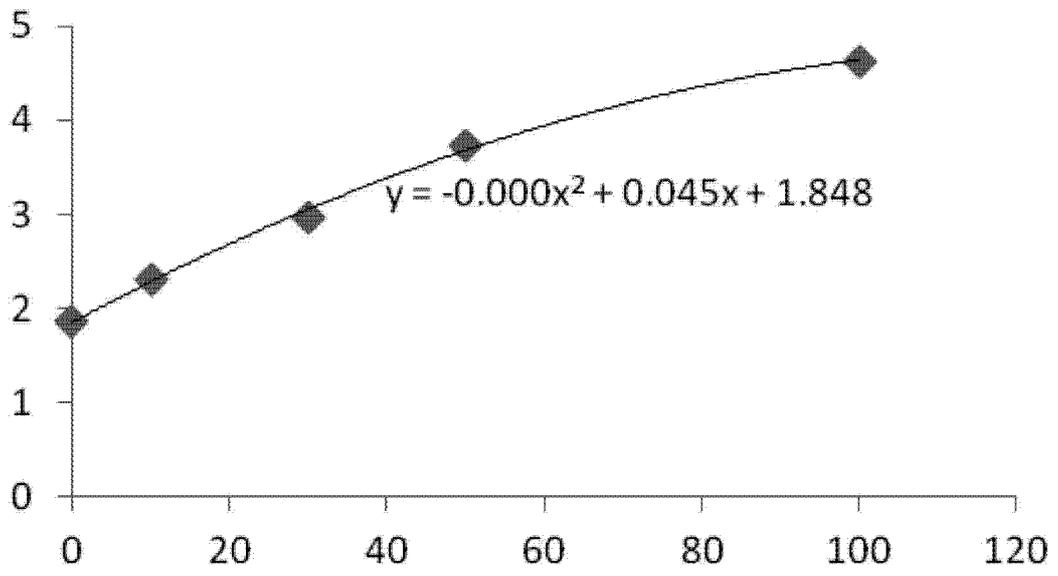
[0030] (e) 上机检测:建立 CD3/CD4、CD8/B220 散点图并设置为显示 G3=R1*R2 门内的细胞,获取细胞总数 10000 个,根据同型对照设十字门分析 TH(CD3+CD4+) 和 Ts(B220+CD8+) 细胞的表达情况;

[0031] (f) 计算 CD4+/CD8+,以 VOCs 浓度为横坐标,以 CD4+/CD8+ 为纵坐标,绘制 CD4+/CD8+ 对 VOCs 浓度的标准曲线;

[0032] (g) 将小鼠放入到待测室内空气进行连续 10 天的染毒处理,每天 2 小时;

[0033] (h) 然后按照 b-e 步骤对小鼠脾进行淋巴细胞亚群的检测,并计算出 CD4+/CD8+;

[0034] (i) 用待测室内空气的 CD4+/CD8+ 带入到上述标准曲线,即可得到以 VOCs 浓度表示待测室内空气毒性。



专利名称(译)	一种检测室内空气急性暴露免疫毒性方法		
公开(公告)号	CN103336097A	公开(公告)日	2013-10-02
申请号	CN201310291553.2	申请日	2013-07-11
[标]申请(专利权)人(译)	大连理工大学		
申请(专利权)人(译)	大连理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	大连理工大学		
[标]发明人	刘薇 王凡 李崇磊 金一和		
发明人	刘薇 王凡 李崇磊 金一和		
IPC分类号	G01N33/00 G01N33/53		
CPC分类号	Y02A50/249		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)
 本发明提供了一种淋巴细胞亚群检测试验检测室内空气免疫毒性的方法，采用不同浓度的VOCs为标准毒性物质，对4-6周雄性小鼠进行染毒处理，每天染毒2小时，连续10天染毒，将染毒后的小鼠的脾脏的细胞进行淋巴细胞亚群试验，测得CD4+/CD8+，绘制标准曲线。将小鼠在污染的室内空气中用同样的方法处理，得到小鼠的脾脏细胞的CD4+/CD8+，带入到标准曲线得到VOCs浓度表示的待测室内空气的毒性，本发明通过VOCs浓度对CD4+/CD8+的曲线实现对室内空气量化的评价，本方法能够更加直观、准确的检测室内空气的免疫毒性，结果易于统一，重现性好，能够对室内空气污染状况做出判断。

