



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103776997 B

(45) 授权公告日 2016.03.02

(21) 申请号 201410064922.9

(22) 申请日 2014.02.26

(73) 专利权人 南京农业大学

地址 211225 江苏省南京市溧水区白马镇国家农业科技园南京农业大学基地

(72) 发明人 杨晓静 黄燕平 马文强 赵茹茜

(74) 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任公司 32218

代理人 徐冬涛

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

(56) 对比文件

CN 103353535 A, 2013.10.16,

A. Bennett et al.. Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. 《DOMESTIC ANIMAL ENDOCRINOLOGY》. 2010, 第 39 卷第 171-180 页.

Pier A. Accorsi et al.. Cortisol determination in hair and faeces from

domestic cats and dogs. 《General and Comparative Endocrinology》. 2008, 第 155 卷第 398-402 页.

王建琴等. 女性寻常型痤疮患者黄体期八项性激素和皮质醇水平的检测. 《中华皮肤科杂志》. 2000, 第 33 卷 (第 4 期), 第 264-265 页.

LEE KOREN et al.. A novel method using hair for determining hormonal levels in wildlife. 《ANIMAL BEHAVIOUR》. 2002, 第 63 卷第 403-406 页.

审查员 周露露

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

一种从猪毛中提取和检测皮质醇的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种从猪毛中提取和检测皮质醇的方法,属于分析检测领域,该方法是取猪毛,将猪毛用有机溶剂洗涤后晾干,将晾干后的猪毛放入装有有机溶剂的离心管中,并在转动器上旋转;经上述处理后将离心管放入离心机中离心,收集上层清液;将所述上清液用氮气流浓缩吹干,吹干后用 PBS 溶液溶解,采用放射免疫测定法测定溶液中皮质醇含量,该方法是一种对猪非侵害性,无应激的检测其生理状态的手段,简单易行,成本低,对于监测猪健康福利状况具有十分积极的作用。

CN 103776997 B

1. 一种从猪毛中提取和检测皮质醇的方法,该方法包括以下步骤:

1) 取 0.8~1.2mm 猪毛,用无水甲醇洗涤 3 次后晾干;

2) 将质量比为 1 :3.5~4.5 晾干后的猪毛和无水甲醇混合,得到混合物;

3) 将所述的混合物 360° 旋转后,在温度为 20℃ 的条件下进行离心并收集上层清液;且,所述的 360° 旋转是在转动器中进行,旋转的速度为 28~32 rpm,旋转的时间为 22~24h;所述的离心是以转速为 4500 rpm 的速度转动 12~18 分钟;

4) 将所述的上层清液用氮气流浓缩吹干,吹干后用 pH=7.4,浓度为 0.1mol/LPBS 溶液溶解,溶解后采用放射免疫测定法测定皮质醇含量。

一种从猪毛中提取和检测皮质醇的方法

技术领域

[0001] 本发明属于分析检测领域,具体涉及一种从猪毛中提取和检测皮质醇的方法。

背景技术

[0002] 我国是一个养猪大国,但是养殖业长期以来对“快速”和“高产”的盲目追求带来一系列严重的环境和社会问题,如养殖环境恶化、环境污染严重、畜禽流行病频发,这不仅造成巨大的经济损失,而且危及人类的健康。在不规范的养殖或高强度的集约化养殖模式下,猪经常受到各种应激(断奶、混群、阉割、运输等),长期的应激最终使得猪免疫力和抵抗力下降。经常依赖添加过量的抗生素和各种疫苗来维持动物健康或者生命,不但严重影响猪自身健康,而且使得猪肉食品的质量和得不到保障,从而威胁人类健康,使我国的畜牧业可持续发展受到严重的影响。

[0003] 动物应激反应的最主要特征是下丘脑-垂体-肾上腺轴(Hypothalamic-pituitary-adrenal axis,HPA axis)活性增加。HPA轴兴奋的终端产物是糖皮质激素。应激时,迅速升高的糖皮质激素有助于机体动员能量,应对应激环境,对动物的生存有重要意义。但一旦应激源长时间存在,HPA轴持续兴奋,血液中的糖皮质激素水平一直保持在高水平,就会对机体产生负面作用,使生长受阻,免疫力下降。

[0004] 目前判断猪应激的方法主要是通过检测其血液中的皮质醇。该方法在采集血液过程中需要将猪进行保定,采集过程较为困难,同时保定又给猪带来了新的应激,使测定结果难以给出准确的判断。因此,目前畜牧业生产上迫切需要一种简单、易行,对猪应激较小的,且能够反映猪皮质醇水平的方法。近年来的人类医学研究表明,毛发中含有皮质醇,并且可以反映应激状况。但是在猪上,由于其毛发特性与人类的差异,毛发粗硬,附有油脂以及其他杂物,使得其处理过程等比较复杂,并且由于种间的差异猪毛中皮质醇含量与人类也不相同,目前关于猪毛发中皮质醇含量的测定尚未见报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的是针对上述技术问题提供一种从猪毛中提取和测定皮质醇的方法,该方法是一种非侵害性,无应激的检测手段,简单易行,成本低,对于监测猪健康福利状况具有十分积极的作用。

[0006] 本发明的目的可以通过以下技术方案实现:

[0007] 一种从猪毛中提取和检测皮质醇的方法,该方法包括以下步骤:

[0008] 1)取猪毛,用有机溶剂洗涤后晾干;

[0009] 2)将晾干后的猪毛和有机溶剂混合,得到混合物;

[0010] 3)将所述的混合物 360° 旋转后,放入离心机中离心,收集上层清液;

[0011] 4)将所述的上层清液用氮气流浓缩吹干,吹干后用 PBS 溶液溶解,溶解后采用放射免疫测定法测定皮质醇含量。

[0012] 步骤 1)中所述猪毛的长度为 0.8 ~ 1.2mm。步骤 1)中所述洗涤的次数为 3 次。

[0013] 步骤 1) 中所述有机溶剂为无水甲醇, 步骤 2) 中所述的有机溶剂为无水甲醇。

[0014] 步骤 2) 中猪毛与有机溶剂的质量比为 1 : 3.5 ~ 4.5。

[0015] 步骤 3) 中所述的 360° 旋转是在转动器中进行, 旋转的速度为 28 ~ 32rpm, 旋转的时间为 22 ~ 24h。

[0016] 步骤 3) 中所述离心是以转速为 4500rpm 的速度转动 12 ~ 18 分钟, 所述步骤 3) 中的离心是在温度为 20℃ 的条件下进行。

[0017] 所述步骤 4) 中 PBS 溶液的 PH=7.4, 浓度为 0.1mol/L。

[0018] 本发明的有益效果

[0019] 随着动物福利问题受到越来越广泛的关注, 采集猪的毛发, 并进行皮质醇的提取和检测, 是一种对猪非侵害性, 无应激的检测手段, 简单易行, 成本低, 对于监测猪健康福利状况具有十分积极的作用。皮质醇是反映机体应激状态的一个重要指标, 目前反映猪的皮质醇水平都是通过检测其血液中皮质醇含量, 以往的研究表明中国地方猪种太湖猪血液皮质醇含量显著高于外来猪品种 (78.29 ± 6.89 vs 47.88 ± 4.73 , $P < 0.05$), 利用本方法我们检测了猪毛发中皮质醇, 其结果与血液结论一致, 表明用该方法检测可以基本反映动物机体的皮质醇水平。另一方面采集猪血液需要将猪进行固定, 采集过程中猪会尽力反抗, 给猪造成较大的应激, 也使得检测值易出现较大的波动, 而采集猪毛发对其没有应激, 样本采集方便, 这无疑给猪健康福利状况的监测提供了极大的帮助。

具体实施方式

[0020] 下面结合实施例对本发明作进一步说明, 但本发明的保护范围不限于此:

[0021] 本发明技术方案中采用放射免疫测定法测定溶液中皮质醇含量参照 Vaccination inhibits TLR2 transcription via suppression of GR nuclear translocation and binding to TLR2 promoter in porcine lung infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 167 (3-4): 425-433。

[0022] 仪器: 125 I 放射免疫试剂盒测定溶液中皮质醇含量 no. D10PZB, Beijing North Institute of Biological Technology (北京北方生物技术研究所), China.

[0023] 旋转器的型号: H5100-230V ser.No.: 11090975, 厂家: Labnet international, Inc.

[0024] 实施例 1

[0025] 1) 选取体重, 年龄相当的太湖猪和长白猪, 各 5 头, 分别采集颈部相同部位的猪毛, 猪毛的长度为 0.8 ~ 1.2mm; 各取 200mg 猪毛, 用 10ml 无水甲醇洗涤 3 遍, 每遍不超过 3 分钟, 可在振荡器上振荡洗涤;

[0026] 2) 将洗涤后的猪毛晾干, 并与 1ml 无水甲醇混合, 得到混合物;

[0027] 3) 将所述的混合物在转速为 30rpm 的转动器上 360° 旋转 24h, 之后在温度为 20℃ 的条件下放入离心机, 离心机的转速为 4500rpm/min, 离心 15 分钟后收集上层清液;

[0028] 4) 将收集的上层清液用氮气流浓缩吹干后, 用 PBS 溶液溶解 (PH=7.4, 0.1M), 体积为 150ul, 采用放射免疫测定法测定溶液中皮质醇含量,

[0029] 具体测定步骤如下:

[0030] 1. 根据试剂盒提供的标准品, 将 0 标准用 1ml 蒸馏水溶解, 其余标准分别加入

0.5ml 蒸馏水溶解。溶解 15 分钟后摇匀方可使用。溶解后其浓度分别为 0, 10, 50, 100, 200, 500ng/ml, 分别标记为 S0, S1, S2, S3, S4, S5。另取 50 μ l S0 标准品标记为 NSB 管。

[0031] 2. NSB 管, 各稀释完成的标准品及样品上样量都为 50 μ l, 依次加入 100 μ l I^{125} -Cor. 标记物。

[0032] 3. 往 NSB 管中单独加入 100 μ l 蒸馏水, 其他管都加入 100 μ l 兔抗 -Cor. 抗体。

[0033] 4. 摇匀, 37 $^{\circ}$ C 温育 45 分钟。

[0034] 5. 各个管中再依次加入 500 μ l 驴抗兔免疫分离剂, 充分摇匀后, 室温放置 15 分钟, 3500rpm/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 分钟, 吸弃上清, 测各沉淀管的放射性计数 (cpm)。

[0035] 计算公式: 设 S0 管为 B0, 各标准管或样品管计数为 B, 非特异管计数为 NSB,

[0036] $B/B_0 = (B - NSB) / (B_0 - NSB) \times 100\%$

[0037] 再取 logit 计算:

[0038] $Logit = \ln[(B/B_0) / (1 - B/B_0)]$

[0039] 以标准浓度取 log 值为横坐标, 对应的 logit 值为纵坐标作图。

[0040] 对数据进行分析, 结果如表 1, 其中, 毛发皮质醇含量为平均值。

[0041] 表 1 为不同品种猪的毛发皮质醇含量测定

[0042]

品种	毛发皮质醇含量 (ng/g)
	Mean \pm SE
太湖猪 (n=5)	22.3 \pm 1.36
长白猪 (n=5)	18.74 \pm 0.51

[0043] 经检测太湖猪毛发中皮质醇显著高于长白猪 ($P < 0.05$)。

专利名称(译)	一种从猪毛中提取和检测皮质醇的方法		
公开(公告)号	CN103776997B	公开(公告)日	2016-03-02
申请号	CN201410064922.9	申请日	2014-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
[标]发明人	杨晓静 黄燕平 马文强 赵茹茜		
发明人	杨晓静 黄燕平 马文强 赵茹茜		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/92 G01N2800/7004		
审查员(译)	周露露		
其他公开文献	CN103776997A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种从猪毛中提取和检测皮质醇的方法，属于分析检测领域，该方法是取猪毛，将猪毛用有机溶剂洗涤后晾干，将晾干后的猪毛放入装有有机溶剂的离心管中，并在转动器上旋转；经上述处理后将离心管放入离心机中离心，收集上层清液；将所述上清液用氮气流浓缩吹干，吹干后用PBS溶液溶解，采用放射免疫测定法测定溶液中皮质醇含量，该方法是一种对猪非侵害性，无应激的检测其生理状态的手段，简单易行，成本低，对于监测猪健康福利状况具有十分积极的作用。

品种	毛发皮质醇含量 (ng/g)
	Mean ± SE
太湖猪 (n=5)	22.3 ± 1.36
长白猪 (n=5)	18.74 ± 0.51