



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108802226 A

(43)申请公布日 2018.11.13

(21)申请号 201810620847.8

(22)申请日 2018.06.15

(71)申请人 集美大学

地址 361000 福建省厦门市集美区银江路
185号

(72)发明人 刘贤德 蔡晓芳 李庆昌

(74)专利代理机构 厦门市精诚新创知识产权代
理有限公司 35218

代理人 秦华

(51)Int.Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种大黄鱼皮质醇的无损检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种大黄鱼皮质醇的无损检测方法。该方法包括采样:采集大黄鱼养殖水样,微孔滤膜过滤;吸附洗脱:将过滤后的水样通过装有硅胶的反向萃取柱进行吸附后,加入有机溶剂洗脱;浓缩复溶:将洗脱液用氮气浓缩吹干,吹干后用PBS溶液溶解;检测:测定得到的溶液中的皮质醇的浓度。本发明的方法对大黄鱼无侵害性,简单易行,无需大型仪器设备,成本低,对于大黄鱼应激检测、健康养殖及动物福利研究具有十分积极的作用。

1. 一种大黄鱼皮质醇的无损检测方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:
采样:采集大黄鱼养殖水样,微孔滤膜过滤;
吸附洗脱:将过滤后的水样通过装有硅胶的反向萃取柱进行吸附后,加入有机溶剂洗脱;
浓缩复溶:将洗脱液用氮气浓缩吹干,吹干后用PBS溶液溶解;
检测:测定得到的溶液中的皮质醇的浓度。
2. 根据权利要求1所述一种大黄鱼皮质醇的无损检测方法,其特征在于,所述采样步骤中,所述养殖水样从海上网箱养殖、池塘养殖、循环水养殖水体中取得。
3. 根据权利要求1所述一种大黄鱼皮质醇的无损检测方法,其特征在于,所述采样步骤中,所述采集大黄鱼养殖水样的体积为200~1000mL。
4. 根据权利要求1所述一种大黄鱼皮质醇的无损检测方法,其特征在于,所述采样步骤中,所述微孔滤膜的孔径为0.2 μ m~10 μ m。
5. 根据权利要求1所述一种大黄鱼皮质醇的无损检测方法,其特征在于,所述吸附洗脱步骤中,所述硅胶为C18,硅胶的粒度为10~80 μ m,孔径为50~120 Å。
6. 根据权利要求1或5所述一种大黄鱼皮质醇的无损检测方法,其特征在于,所述吸附洗脱步骤中,所述装有硅胶的反向萃取柱的填料的质量为1~3g。
7. 根据权利要求1所述一种大黄鱼皮质醇的无损检测方法,其特征在于,所述吸附洗脱步骤中,所述有机溶剂为无水乙醇或甲醇;优选的,有机溶剂的体积为5~8mL。
8. 根据权利要求1所述一种大黄鱼皮质醇的无损检测方法,其特征在于,所述浓缩复溶步骤中,所述PBS溶液的组份浓度为:137mM NaCl,2.7mM KCl,8mM Na₂HPO₄·12H₂O,1.47mM KH₂PO₄,pH=7.4~7.5,所用PBS溶液的体积为0.25~1mL。
9. 根据权利要求1所述一种大黄鱼皮质醇的无损检测方法,其特征在于,所述检测中,测定方法为酶联免疫吸附测定法、放射免疫测定法或高效液相色谱法。

一种大黄鱼皮质醇的无损检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及鱼类养殖检测领域,尤其涉及一种大黄鱼皮质醇的无损检测方法。

背景技术

[0002] 鱼类的应激反应(stress response)是鱼体对各种环境因子的超常刺激(应激原, stressor)所产生的一种非特异性生理反应。过强或过长的应激反应会对机体产生危害,导致生长发育缓慢、繁殖能力下降、免疫机能低下及发病率、死亡率升高。血浆皮质醇浓度是判断鱼类应激状态的重要指标,研究表明,几乎所有的应激因子都能激活鱼类的HPI轴(下丘脑-垂体-肾间组织轴),使血浆皮质醇水平迅速升高,其幅度及持续时间与应激因子的强度及作用时间呈正相关。

[0003] 大黄鱼是我国近海重要经济鱼类。自1985年突破人工育苗技术以来,大黄鱼的养殖规模不断扩大,产量逐年增加,目前大黄鱼已成为我国最大规模的海水养殖鱼类,年产量高达16.5万吨(2016年)。在养殖过程中,大黄鱼经常遭受夏季高温、台风、分鱼、换网等应激,导致生长减缓、发病率和死亡率增加。因此,开发一种简便的大黄鱼应激程度检测方法,对于监测养殖过程中大黄鱼的应激状态并根据情况及时安排应对措施具有重要意义。

[0004] 目前鱼类中皮质醇的含量通常通过取血、根据血样来进行判定,而这会对鱼体造成伤害甚至死亡。此外,在取样过程中操作应激也会对实验结果造成一定的影响,且不适合幼体的检测,也违反了动物福利法规。

[0005] 因此急需一种简单快捷,不伤及大黄鱼的皮质醇的检测方法。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种对大黄鱼无侵害性,无任何应激的皮质醇的检测手段,简单易行,无需大型仪器设备,成本低,对于大黄鱼应激检测、健康养殖及动物福利研究具有十分积极的作用。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供一种大黄鱼皮质醇的无损检测方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

[0008] 采样:采集大黄鱼养殖水样,微孔滤膜过滤;

[0009] 吸附洗脱:将过滤后的水样通过装有硅胶的反向萃取柱进行吸附后,加入有机溶剂洗脱;

[0010] 浓缩复溶:将洗脱液用氮气浓缩吹干,吹干后用PBS溶液溶解;

[0011] 检测:测定得到的溶液中的皮质醇的浓度。

[0012] 进一步,所述采样步骤中,所述养殖水样从海上网箱养殖、池塘养殖、循环水养殖水体中取得。

[0013] 进一步,所述采样步骤中,所述采集大黄鱼养殖水样的体积为200~1000mL。

[0014] 进一步,所述采样步骤中,所述微孔滤膜的孔径为0.2 μ m~10 μ m。

[0015] 进一步,所述吸附洗脱步骤中,所述硅胶为C18,硅胶的粒度为10~80 μ m,孔径为50

~120 Å。

[0016] 进一步,所述吸附洗脱步骤中,所述装有硅胶的反向萃取柱的填料的质量为1~3g。

[0017] 进一步,所述吸附洗脱步骤中,所述有机溶剂为无水乙醇或甲醇;优选的,有机溶剂的体积为5~8mL。

[0018] 进一步,所述浓缩复溶步骤中,所述PBS溶液的组份浓度为:137mM NaCl,2.7mM KCl,8mM Na₂HPO₄·12H₂O,1.47mM KH₂PO₄,pH=7.4~7.5,所用PBS溶液的体积为0.25~1mL。

[0019] 进一步,所述检测中,测定方法为酶联免疫吸附测定法、放射免疫测定法或高效液相色谱法。

[0020] 本发明的发明人经过研究,发现大黄鱼的皮质醇可以通过鳃和皮肤向水体中分泌。因此检测养殖水体中的皮质醇即可用于大黄鱼皮质醇的检测。养殖水体中的皮质醇浓度与大黄鱼血浆皮质醇浓度、大黄鱼养殖密度、分泌时间有关,我们通过试验研究发现大黄鱼在30kg/m³的养殖密度下,0-0.5h养殖水体中皮质醇浓度快速增加,之后浓度趋于平衡,此时养殖水体中皮质醇的浓度与大黄鱼血浆中皮质醇的浓度呈正相关关系,血浆皮质醇浓度是养殖水体的700-900倍,因此我们通过检测养殖水体中的皮质醇即间接衡量大黄鱼血液皮质醇。

[0021] 应激程度检测在大黄鱼日常养殖及育种研究中至关重要,传统取血测量皮质醇含量来判定鱼体应激程度的方法会在操作过程中对鱼体造成较大损伤,测量结果也会受到一定的影响,且不适合幼体的检测。本发明有以下优点:零干预(即无麻醉、取血或操作应激);测量结果不受取样应激的影响;对一条鱼或一群鱼可重复测量;可对幼鱼进行检测,不受鱼体规格影响;可同时对多条鱼进行检测,整体把控;可实现应激程度的实时监控。

具体实施方式

[0022] 下面详细描述本发明的实施例,所述实施例的示例旨在用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0023] 一种大黄鱼皮质醇的无损检测方法,实验选取体重大小为210±10g的大黄鱼,首先于实验室水箱中暂养7天,水温20±0.5℃,pH 7.5,投喂普通配合饲料,每天投喂1次,投喂量为体重的1.5%,投喂1个小时后排污换水,换水量100%,暂养期间连续曝气。

[0024] 实施例1

[0025] 实验采取急性温度应激的方法,实验设置20℃室温对照和28℃实验组,实验在两组盛有15L干净海水的水箱中进行,实验组事先用加热棒将水体加热至28℃,实验开始时每个水箱中各放进2条大黄鱼,开始计时,分别采集0h、0.5h、1h、1.5h、2h五个时间点的养殖水箱中的水样,每次采集500mL,采集的水样立即进行接下来的处理。

[0026] 将所述采集的水样用0.45μm微孔滤膜过滤。

[0027] 称取固相萃取填料(SiliaSphere PC C18polymeric,50μm,120 Å)2g,装于60mL的固相萃取空柱;加入10mL无水乙醇(分析纯)活化柱子,15mL去离子水洗涤;将所述过滤后的水体通过固相萃取柱吸附,此过程控制上样速度在20mL/min以内;15mL去离子水冲洗柱子。

[0028] 用6mL无水乙醇(分析纯)洗脱柱子,洗脱液在50℃氮气下吹干得到提取物。

[0029] 将所述提取物用1mL PBS磷酸缓冲液溶解(137mM NaCl,2.7mM KCl,8mM Na₂HPO₄•12H₂O,1.47mM KH₂PO₄,pH=7.4~7.5),所述溶解液采用酶联免疫吸附测定法进行检测。

[0030] 将所述检测结果统一换算为:养殖密度:30kg/m³,皮质醇浓度单位:ng/L。检测结果见表1,结果以平均值±标准误(Mean±S.E.)表示。

[0031] 养殖密度=养殖鱼的总重/养殖水体的体积;例如,2条总重为1kg的鱼,养殖在1m³的水体中,养殖密度即为1kg/m³;水体中皮质醇的浓度是经过浓缩后进行测量的,得到测量结果后根据浓缩倍数进行数量换算。

[0032] 表1不同时间点20℃和28℃皮质醇检测结果表(ng/L)

[0033]

时间	0h	0.5h	1h	1.5h	2h
20℃	14.13±0.73 ^a	16.32±1.64 ^a	16.47±0.78 ^a	17.63±0.57 ^a	16.32±1.09 ^a
28℃	14.13±0.73 ^a	23.56±0.83 ^b	22.59±1.39 ^b	22.37±2.43 ^b	22.43±1.04 ^b

[0034] 注:同一列相同字母表示差异不显著(P>0.05),同一列不同字母表示差异显著(P<0.05)

[0035] 本实施例,是申请人重复了16次的结果,经检测发现,大黄鱼在28℃急性应激条件下,0.5h小时及以后皮质醇含量显著高于20℃的皮质醇含量(P<0.05)。证明本发明的方法灵敏,准确和可靠。

[0036] 实施例2

[0037] 实验采取急性温度应激的方法,实验设置20℃室温对照和24℃实验组,实验在两组盛有15L干净海水的水箱中进行,实验组事先用加热棒将水体加热至24℃,实验开始时每个水箱中各放进两条大黄鱼,开始计时,分别采集0h、0.5h、1h、1.5h、2h五个时间点的养殖水样,每次采集500mL,采集的水样立即进行接下来的处理。

[0038] 将所述采集的水样用0.45μm微孔滤膜过滤。

[0039] 称取固相萃取填料(SiliaSphere PC C18polymeric,50μm,120 Å)2g,装于60mL的固相萃取空柱;加入10mL无水乙醇(分析纯)活化柱子,15mL去离子水洗涤;将所述过滤后的水体通过固相萃取柱吸附,此过程控制上样速度在20mL/min以内;15mL去离子水冲洗柱子。

[0040] 用6mL无水乙醇(分析纯)洗脱柱子,洗脱液在50℃氮气下吹干得到提取物。

[0041] 将所述提取物用1mL PBS磷酸缓冲液溶解(137mM NaCl,2.7mM KCl,8mM Na₂HPO₄•12H₂O,1.47mM KH₂PO₄;pH7.4),所述溶解液采用酶联免疫吸附测定法进行检测。

[0042] 将所述检测结果统一换算(换算方法同上)为:养殖密度:30kg/m³,皮质醇浓度单位:ng/L。检测结果见表2,结果以平均值±标准误(Mean±S.E.)表示。

[0043] 表2不同时间点20℃和24℃皮质醇检测结果表(ng/L)

[0044]

	0h	0.5h	1h	1.5h	2h
20℃	14.13±0.73 ^a	16.32±1.64 ^a	16.47±0.78 ^a	17.63±0.57 ^a	16.32±1.09 ^a
28℃	14.13±0.73 ^a	21.73±0.78 ^b	21.07±0.88 ^b	20.30±0.05 ^b	21.22±0.42 ^b

[0045] 注:同一列相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$),同一列不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)

[0046] 本实施例,是申请人重复了16次的结果,经检测发现,大黄鱼在24℃急性应激条件下,0.5h小时及以后皮质醇含量显著高于20℃的皮质醇含量 ($P<0.05$),证明本发明的方法灵敏,准确和可靠。

[0047] 实施例3

[0048] 实验采取模拟实际生产上的抓取、触碰、搅拌水体的机械应激方法,实验设置机械应激组和对照组,在两组盛有15L干净海水、水温为20℃的条件下进行。实验开始时每个水箱中各放进两条大黄鱼,开始计时,其中实验组进行抓取、触碰、搅拌水体的方法刺激鱼体10分钟,对照组不做任何处理,实验进行0.5h后采集两组实验的水体,每个水箱中采集500ml,采集的水样立即进行如下处理(实验重复了24次)。

[0049] 将所述采集的水样用0.45μm微孔滤膜过滤。

[0050] 称取固相萃取填料(SiliaSphere PC C18polymeric,50μm,120 Å)2g,装于60mL的固相萃取空柱;加入10mL无水乙醇(分析纯)活化柱子,15mL去离子水洗涤;将所述过滤后的水体通过固相萃取柱吸附,此过程控制上样速度在20mL/min以内;15mL去离子水冲洗柱子。

[0051] 用6mL无水乙醇(分析纯)洗脱柱子,洗脱液在50℃氮气下吹干得到提取物。

[0052] 将所述提取物用1mL PBS磷酸缓冲液溶解(137mM NaCl,2.7mM KCl,8mM Na₂HPO₄•12H₂O,1.47mM KH₂PO₄;pH7.4),所述溶解液采用酶联免疫吸附测定法进行检测。

[0053] 将所述检测结果统一换算(换算方法同上)为:养殖密度:30kg/m³,皮质醇浓度单位:ng/L。检测结果见表3,结果以平均值±标准误(Mean±S.E.)表示。

[0054] 表3机械应激组与对照组皮质醇检测结果表

[0055]

处理	自由度	均值 (ng/L)	t	P
机械应激组	23	28.02±1.81	-10.59	4.21×10 ⁻¹⁰
对照组	23	15.6±0.66		

[0056] 注:自由度是指当以样本的统计量来估计总体的参数时,样本中独立或能自由变化的自变量的个数;T和P是用SPSS做统计学检验得到的数值。

[0057] 本实施例,是申请人重复了16次的结果,经检测发现,大黄鱼在机械应激条件下,0.5h小时的皮质醇含量显著高于非处理的大黄鱼皮质醇含量 ($P<0.01$),证明本发明的方法灵敏,准确和可靠。

[0058] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

专利名称(译)	一种大黄鱼皮质醇的无损检测方法		
公开(公告)号	CN108802226A	公开(公告)日	2018-11-13
申请号	CN201810620847.8	申请日	2018-06-15
[标]申请(专利权)人(译)	集美大学		
申请(专利权)人(译)	集美大学		
当前申请(专利权)人(译)	集美大学		
[标]发明人	刘贤德 蔡晓芳 李庆昌		
发明人	刘贤德 蔡晓芳 李庆昌		
IPC分类号	G01N30/02 G01N30/06 G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N30/02 G01N30/06 G01N33/53 G01N33/531 G01N2030/062		
代理人(译)	秦华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种大黄鱼皮质醇的无损检测方法。该方法包括采样：采集大黄鱼养殖水样，微孔滤膜过滤；吸附洗脱：将过滤后的水样通过装有硅胶的反向萃取柱进行吸附后，加入有机溶剂洗脱；浓缩复溶：将洗脱液用氮气浓缩吹干，吹干后用PBS溶液溶解；检测：测定得到的溶液中的皮质醇的浓度。本发明的方法对大黄鱼无侵害性，简单易行，无需大型仪器设备，成本低，对于大黄鱼应激检测、健康养殖及动物福利研究具有十分积极的作用。

时间	0h	0.5h	1h	1.5h	2h
20℃	14.13±0.73 ^a	16.32±1.64 ^a	16.47±0.78 ^a	17.63±0.57 ^a	16.32±1.09 ^a
28℃	14.13±0.73 ^a	23.56±0.83 ^b	22.59±1.39 ^b	22.37±2.43 ^b	22.43±1.04 ^b