



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102605035 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 27

(21) 申请号 201210064677. 2

的应用》. 《食品科学》. 2011, 第 32 卷 (第 17 期), 384-387.

(22) 申请日 2012. 03. 13

审查员 赵彦豪

(73) 专利权人 西交利物浦大学

地址 215123 江苏省苏州市工业园区独墅湖
高等教育区仁爱路 111 号

(72) 发明人 张俊龙 熊伊韦 孙涛 张百灵
吕文进

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有
限公司 32103

代理人 范晴

(51) Int. Cl.

C12Q 1/02 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1169534 A, 1998. 01. 07, 说明书全文, 权利要求书.

蒋方群 等. 《地沟油的快速检测技术及资源化利用》. 《食品工业科技》. 2011, 第 32 卷 (第 10 期), 467-469.

李兵霞 等. 《细胞毒理学在食品领域中

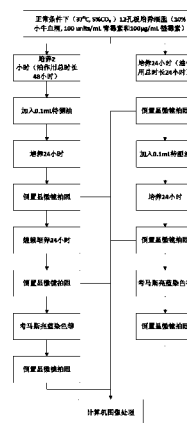
权利要求书1页 说明书8页 附图8页

(54) 发明名称

地沟油快速检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种地沟油快速检测方法, 其特征在于所述方法包括以下步骤: (1) 按照常规细胞培养方法在培养基中进行正常细胞的培养, 待正常细胞达到预定数量时加入待测地沟油样品继续培养; (2) 对培养后的细胞死亡情况进行统计或对细胞毒性进行检测, 根据培养后的细胞毒性或细胞死亡情况判断待测地沟油样品是否为地沟油. 该方法解决了现有技术中检测方法只能在一定范围内适用特定类型的地沟油的缺陷.



1. 一种地沟油快速检测方法,其特征在于所述方法包括以下步骤:

(1) 按照常规细胞培养方法在培养基中进行正常细胞的培养,当正常细胞达到预定数量时加入待测地沟油样品继续培养;在步骤(1)进行正常细胞的培养后加入常用食用油进行继续培养,以常用食用油为对照,通过检测常用食用油与待测地沟油样品进行对比检测;

(2) 采用考马斯亮蓝染色方法处理继续培养的细胞后,通过检测蓝染的细胞数量进行死亡细胞统计,对培养后的细胞死亡或存活情况进行统计或对细胞毒性进行检测,根据培养后的细胞毒性或细胞死亡或存活情况判断待测地沟油样品是否为地沟油;判断待测地沟油样品是否为地沟油是通过先分别采用地沟油与常用食用油处理细胞培养后的细胞存活或死亡情况进行对比统计,获得常用食用油与地沟油间的阈值;根据待测地沟油样品处理细胞培养后的细胞存活或死亡情况与阈值的比较判断待测地沟油样品是否为地沟油;具体步骤包括:

1) 考马斯亮蓝染色成像后,利用计算机图像处理技术,分析蓝染细胞区域的面积大小;

2) 分析正常培养组、商品食用油组、浓度梯度稀释的阳性对照组的蓝染面积大小,并以正常培养组的数据进行校正,得各组校正值;利用统计软件,设置置信区间大小,分析组间差异,选择与商品食用油组相比有统计学差异的阳性对照组的校正值作为低毒、中毒、高毒的阈值,无统计学差异的为安全的阈值;

3) 得到阈值后,将地沟油组的校正值与各阈值进行比较,判断待测油样的是否有毒性,以及毒性等级。

2. 根据权利要求1所述的地沟油快速检测方法,其特征在于所述方法步骤(1)待测地沟油样品在加入培养基前进行过滤处理。

3. 根据权利要求1所述的地沟油快速检测方法,其特征在于所述方法步骤(1)中常规细胞培养方法培养正常细胞的时间控制在1~36小时。

4. 根据权利要求1所述的地沟油快速检测方法,其特征在于所述方法步骤(1)中加入的待测地沟油样品的体积为0.1mL。

5. 根据权利要求1所述的地沟油快速检测方法,其特征在于所述方法步骤(1)中加入待测地沟油样品继续培养的时间控制在24~48小时。

地沟油快速检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于地沟油检测技术领域,具体涉及一种地沟油快速检测方法。

背景技术

[0002] 现有的各种地沟油检测方法主要有常规油脂理化指标法(参见潘剑宇,尹平河,余汉豪.2003. 溜水油、煎炸老油与合格食用植物油的鉴别研究. 食品科学 24 :27-29 以及张璇,余汉豪,单习章.2004. 餐饮业废油脂有害成分及特征指标研究. 广州环境科学 19 :29-31.)、胆固醇含量判定法(张蕊,祖丽亚,樊铁.2006. 测定胆固醇含量鉴别地沟油的研究. 中国油脂 31 :65-67)、薄层色谱检测极性物法(尹平河,潘剑宇,赵玲.2004. 薄层色谱法快速鉴别溜水油和煎炸老油的研究. 食品科学 29 :47-49)、电导率法(朱锐,王睿,王小京.2008. 电导率测定在鉴别食用植物油掺伪应用研究. 粮食与油脂 11 :42-43)、顶空-气相色谱联用质谱检测油脂的挥发性成分(全常春,尹平河.2004. 精炼餐饮业地沟油挥发性危害成分的GC/MS 静态顶空分析. 食品科学 25 :128-134)、脂肪酸相对不饱和度(兰庆丰,梁敏.2006. 气相色谱法鉴别掺假食用油的研究. 刑事技术 1 :37-39)、测真菌毒素法(黄军,熊华,李亮.2008. 溜水油在精炼中卫生指标的检测与分析. 中国油脂 33 :70-74)、表面活性剂残留法(曹文明,薛斌,杨波涛,丁丹华,孙禧华.2011. 地沟油检测技术的发展与研究. 粮食科技与经济 36 :42-44 以及张清,沈群.2010. 我国食用植物油中地沟油检测技术回顾. 食品科技 35 :311-314)等。方法考察的对象多为地沟油中的特征化学成分,涉及的技术手段也主要为分析化学方法如荧光光谱、气相色谱、原子吸收光谱等。

[0003] 现有的各种检测方法都存在或特征指标专一性不强,或检测灵敏度不高,或检测准确性不高,仅能在一定范围内适用特定类型的地沟油的检测判定的特点。由于地沟油不是一种化学组分固定不变的物质,因来源不同、精炼加工程度不同,其内在物质组成会呈现或多或少的差异。因此,包括以上列举的现有检测技术,都未能针对地沟油独有的特征指标及其量值来进行检测判断,检测结果的判定不能适用所有类型的地沟油(曹文明,薛斌,杨波涛,丁丹华,孙禧华.2011. 地沟油检测技术的发展与研究. 粮食科技与经济 36 :42-44)。用分析化学的方法去测定地沟油中有害残留的成分,容易出现漏检和对不同有害成分检测灵敏度不够的情况。地沟油成分的复杂性,又导致了无法根据分析化学所测定的各项指标而制定一个统一的,切实可行的地沟油检测标准。换句话说,要根据有害物质残留量来制定地沟油标准是极其困难的,甚至是不可能的。因此,要解决地沟油检测这一技术问题,必须另辟蹊径。

发明内容

[0004] 本发明目的在于提供一种地沟油快速检测方法,解决了现有技术中地沟油检测方法中以特定的化学组分为目标化合物为检测目标导致检测方法只能在一定范围内适用特定类型的地沟油的缺陷。

[0005] 为了解决现有技术中的这些问题,本发明提供的技术方案是:

[0006] 一种地沟油快速检测方法,其特征在於所述方法包括以下步骤:

[0007] (1) 按照常规细胞培养方法在培养基中进行正常细胞的培养,当正常细胞达到预定数量时加入待测地沟油样品继续培养;

[0008] (2) 对培养后的细胞死亡或存活情况进行统计或对细胞毒性进行检测,根据培养后的细胞毒性或细胞死亡或存活情况判断待测地沟油样品是否为地沟油。

[0009] 优选的,所述方法步骤(1)待测地沟油样品在加入培养基前进行过滤处理。

[0010] 优选的,所述方法步骤(1)中常规细胞培养方法培养正常细胞的时间控制在1~36小时。

[0011] 优选的,所述方法步骤(1)中加入的待测地沟油样品的体积为0.1mL。

[0012] 优选的,所述方法步骤(1)中加入待测地沟油样品继续培养的时间控制在24~48小时。

[0013] 优选的,所述方法步骤(2)中细胞死亡情况统计是采用考马斯亮蓝染色、活/死细胞染色方法处理继续培养的细胞后,通过检测蓝染的细胞数量进行死亡细胞统计。

[0014] 优选的,所述方法还包括在步骤(1)进行正常细胞的培养后加入常用食用油进行继续培养,以常用食用油为对照,通过检测常用食用油与待测地沟油样品进行对比检测。

[0015] 优选的,所述方法步骤(2)中判断待测地沟油样品是否为地沟油是通过先分别采用地沟油与常用食用油处理细胞培养后的细胞存活或死亡情况进行对比统计,获得常用食用油与地沟油间的阈值;根据待测地沟油样品处理细胞培养后的细胞存活或死亡情况与阈值的比较判断待测地沟油样品是否为地沟油。

[0016] 优选的,所述方法步骤(2)中设置若干个阈值将地沟油分为低度毒性地沟油、中度毒性地沟油和高度毒性地沟油。

[0017] 优选的,所述方法步骤(2)中对培养后的细胞死亡或存活情况进行统计是通过计算机图像处理技术进行统计的。

[0018] 众所周知,地沟油问题的关键是它对人体健康的潜在危害。凡对人体健康有毒害的物质,必然对细胞有毒害作用,因为细胞对环境有毒物质的敏感度要大大高于人体。因此,本发明提出了一个生物方法来鉴定地沟油,即用人的细胞(肝脏细胞和肾脏细胞等)来鉴定地沟油是否具有毒性。实际上,用细胞系统对化合物进行毒理鉴定,已在国外药物公司新药开发中应用20多年之久(Fang, J. F., Y. Kitagawa, S. Ishikawa. 1986. Toxicity assessments of chemical substances using primary culture of rat hepatocytes. Sangyo igaku 28:438-444)。本发明提出的地沟油生物细胞检测体系,正是基于细胞对有毒物质敏感这一特性,将检测的重点放在是否对细胞有毒这一关键问题,而对地沟油可能含有的有毒物质的种类和浓度则予以忽略。这是一个地沟油检测的新思路。

[0019] 本方法的主要思路为在培养的细胞中加入地沟油,若地沟油中含有有毒物质,细胞的生理和代谢会发生相应的变化。例如,细胞的形态、生长繁殖的速度、细胞炎症分子的表达、细胞代谢物质的分泌等都会发生显著的变化。这种显著的变化,可以用相应的仪器设备加以检测和记录。利用计算机技术,快速、准确地处理生理生化数据,代谢数据和显微图像数据,根据预实验得到的阈值区分地沟油与健康无害的食用油。

[0020] 本发明中待测地沟油样品优选进行过滤处理,一般可以待测油样均经0.22 μm 无菌针头过滤器于超净台内滤过,室温暗处保存。如待测地沟油样品为有明显白色沉淀的样

品油液,如粗提的地沟油样品,于 4000 转离心 1 小时,取上清油液,用 0.22 μm 无菌针头过滤器依次于开放环境及超净台内滤过,室温暗处保存。

[0021] 本发明中细胞培养方法采用常规的细胞培养技术。

[0022] 检测方法有考马斯亮蓝染色、活/死细胞染色。其中考马斯亮蓝染色方法原理为考马斯亮蓝染料与蛋白质特异性结合,细胞染色后显微成像呈蓝色。地沟油含有的有毒物质对贴壁细胞的生长状态产生影响,主要表现在贴壁程度以及细胞形态上。染色过程中死细胞或者活力不佳、贴壁不牢的细胞被移出,显微成像后蓝色区域的面积与残存的活细胞的个数及状态有关,待测油样毒性越大其残存细胞数量越少。该方法可以通过紫外分光光度法进行验证。其原理是待测油样处理后活细胞仍贴附于培养板壁,考马斯亮蓝染色后细胞呈蓝色。5% SDS 溶液可以提取细胞中的蛋白质,蛋白质提取液因染色而呈蓝色,并且于 614nm 附近有最大吸收峰。通过测量蛋白提取液的光度值,与预实验得到的标准曲线对应,得出残存细胞的数量。

[0023] 本发明以 CHO 与 NIH3T3 细胞株的培养为例进行说明的。CHO 与 NIH3T3 细胞株的正常培养方法如下:

[0024] (1) 培养基成分:高糖 DMEM,10% 新生小牛血清,100units/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素。

[0025] (2) 细胞瓶内培养条件:正常细胞以适当浓度接种于 5mL 培养基,25cm² 培养瓶内,置于 37°C,5% CO₂ 的恒温培养箱内培养。培养基每 2-3 天更换一次。至细胞铺满长满后,胰酶消化进行下一步的细胞瓶接种以及 12 孔板接种。

[0026] (3) 12 孔板内培养条件:细胞以每孔 10⁵ 个的浓度种板,培养基体积为 2mL,置于 37°C,5% CO₂ 的恒温培养箱内培养。

[0027] 注:培养基成分和种板浓度需根据细胞株具体特性进行调整,表现在血清的品种、用量以及细胞浓度的选择上。预实验证明上述条件下 CHO 和 NIH3T3 细胞株均能保持正常生长状态。

[0028] 本地沟油检测方法适用于贴壁细胞,但值得注意的是,正常细胞的培养方法需根据不同的细胞株进行调整。

[0029] 正常条件下培养细胞 2 小时或者 24 小时,接着加入待测油样继续培养。油作 24 小时和 48 小时后,用倒置显微镜拍照。细胞于正常条件下培养 2 小时的处理组,油作用时长为 48 小时,正常条件下培养 24 小时的处理组,油作用时长为 24 小时。细胞培养后加入油样后进行 48h 处理,为正常培养 2 小时后向培养基加入一定体积的待测油样,于 37°C,5% CO₂ 恒温培养箱中继续培养 48 小时,即油样作用(即处理)时间为 48 小时。

[0030] 食用油对细胞没有毒性,因而不会影响细胞的活性。而地沟油含有有毒物质,从而使得培养的细胞部分或大部分死亡。通过细胞死亡的量,可以判断地沟油的毒性。

[0031] 区分地沟油与商品食用油的阈值设置方法如下:

[0032] (1) 考马斯亮蓝染色成像后,利用计算机图像处理技术,分析蓝染细胞区域的面积大小。

[0033] (2) 分析空白对照组(正常培养组)、阴性对照组(商品食用油组)、浓度梯度稀释的阳性对照组(证实有细胞毒性物质,非地沟油)的蓝染面积大小,并以空白对照组的数据进行校正,得各组校正值。(例,假设空白对照组面积大小为 100pixel²,阴性对照组为

95pixel²,校正后空白对照组结果为 1,阴性对照组为 0.95)。利用统计软件,设置置信区间大小,分析组间差异,选择与商品食用油组相比有统计学差异的阳性对照组的校正值作为低毒、中毒、高毒的阈值,无统计学差异的为安全的阈值。

[0034] (3) 得到阈值后,将地沟油组的校正值与各阈值进行比较,判断待测油样的是否有毒性,以及毒性等级。

[0035] 活 / 死细胞染色、细胞炎症因子表达检测与考马斯亮蓝染色法类似,均需借助显微镜成像及图像处理技术。活 / 死细胞染色是利用活细胞 / 死细胞特异的荧光染料,如 PI(碘化丙啶,一种不能透过细胞膜的红色荧光染料) 特异性地染色死细胞,而染色活细胞的染料因发射和激发波长不同,两种荧光信号利用不同的滤光片分离,从而在成像上区分活细胞与死细胞。

[0036] 相对于现有技术中的方案,本发明的优点是:

[0037] 1. 本发明的检测方法具有很高的灵敏度。现有的分析化学方法测定地沟油有毒成份的含量,可能出现漏检或检测不出来等问题。由于本发明的原理是基于细胞对于有毒物质的反应,只要食用油含有有毒物质,无论有毒物质的种类是什么,本发明均可以测定出来。

[0038] 2. 本发明的检测方法可靠性强。不管地沟油在加工过程中使用什么方法,只要其中含有有毒成份,细胞都能检测出来。

[0039] 3. 本发明的检测方法适应面广。无论哪种地沟油,只要对细胞有毒性,本方法均可以检测出来。

附图说明

[0040] 下面结合附图及实施例对本发明作进一步描述:

[0041] 图 1 为采用考马斯亮蓝法检测待测地沟油样品的方法流程图;

[0042] 图 2 为应用紫外分光光度法验证考马斯亮蓝染色法的方法流程图;

[0043] 图 3 为细胞数与紫外光度值的线性关系及对应的回归方程 ($n = 3$)。a 为小鼠胚胎成纤维细胞 (NIH3T3), b 为中国仓鼠卵巢细胞 (CHO)。

[0044] 图 4 为以商品茶籽油、医用硅胶片、毒性培养基处理 CHO 细胞株 24 和 48 小时后细胞形态变化以及考马斯亮蓝染色结果。

[0045] 图 5 为以商品茶籽油、医用硅胶片、毒性培养基处理 CHO 细胞株 24 小时后细胞形态变化以及考马斯亮蓝染色结果。

[0046] 图 6 为以商品茶籽油、医用硅胶片、毒性培养基处理 NIH3T3 细胞株 24 和 48 小时后细胞形态变化以及考马斯亮蓝染色结果。

[0047] 图 7 为以商品茶籽油、医用硅胶片、毒性培养基处理 NIH3T3 细胞株 24 小时后细胞形态变化以及考马斯亮蓝染色结果。

[0048] 图 8 为以商品茶籽油和食堂废油处理 CHO 细胞株 24 和 48 小时后细胞形态变化以及考马斯亮蓝染色结果。

[0049] 图 9 为以商品茶籽油和食堂废油处理 NIH3T3 细胞株 24 和 48 小时后细胞形态变化以及考马斯亮蓝染色结果。

[0050] 图 10 为以商品茶籽油和粗提地沟油处理 CHO 细胞株 24 小时后细胞形态变化以及

考马斯亮蓝染色结果。

[0051] 图 11 为以 3 种商品食用油处理 CHO 细胞株 24 和 48 小时后细胞形态变化以及考马斯亮蓝染色结果。

[0052] 图 12 为 3 种商品食用油处理 48 小时后残余细胞数对比。

具体实施方式

[0053] 以下结合具体实施例对上述方案做进一步说明。应理解,这些实施例是用于说明本发明而并不限于限制本发明的范围。实施例中采用的实施条件可以根据具体厂家的条件做进一步调整,未注明的实施条件通常为常规实验中的条件。

[0054] 实施例 1 商品茶籽油与医用硅胶对比实验

[0055] 1、样品前处理:

[0056] 医用硅胶为预实验证明有细胞毒性,在此试验中作为阳性对照组。毒性培养基为取适量医用硅胶浸泡于 15 毫升培养基中,浸泡时间不少于 24 小时,4 度保存。

[0057] 待测油样前处理方法如下:

[0058] 1.1 待测油样均经 0.22 μm 无菌针头过滤器于超净台内滤过,室温暗处保存。除特别说明外,只过滤一次。

[0059] 1.2 有明显白色沉淀的样品油液,如粗提的地沟油样品,于 4000 转离心 1 小时,取上清油液,用 0.22 μm 无菌针头过滤器依次于开放环境及超净台内滤过,室温暗处保存。

[0060] 2、样品检测方法:

[0061] 如图 1 所示,样品检测方法步骤如下:

[0062] (1) 正常条件下培养细胞 2 小时或者 24 小时;

[0063] (2) 加入 0.1mL 的待测油样;

[0064] (3) 油处理 24 小时和 48 小时后,用倒置显微镜拍照。细胞于正常条件下培养 2 小时的处理组,油作用总时长为 48 小时,正常条件下培养 24 小时的处理组,油作用总时长为 24 小时;

[0065] (4) 按照考马斯亮蓝染色、live/dead 细胞染色、细胞炎症因子表达检测等方法的要求处理细胞后,用倒置显微镜 / 倒置荧光显微镜拍照;

[0066] (5) 每组处理平行操作 3 次。

[0067] 如图 2 所示,样品检测方法的验证采用紫外分光光度法验证(以考马斯亮蓝染色法为例),具体操作步骤如下:

[0068] (1) 细胞培养至考马斯亮蓝染色的步骤同前面所述的样品检测方法步骤(1)~(4)。

[0069] (2) 将染色液转移至 15mL 离心管;

[0070] (3) 用 1X PBS 润洗 12 孔板,回收 PBS 至(2)步离心管中,重复 3 次至 PBS 洗液基本无色,4000rpm 离心 5 分钟,弃上清;

[0071] (4) 每孔加入 1mL 5% SDS,振摇 10 分钟,将 SDS 提取液回收至(3)步离心管中,重复操作 3 次,至孔内无可见蓝色斑块;

[0072] (5) 4000rpm 离心 10 分钟或者用 0.22 μm 针头过滤器过滤。取上清液或滤液,于 614nm 处测其紫外吸收光度值。

[0073] 2.1 中国仓鼠卵巢细胞 (CHO)

[0074] CHO 与 NIH3T3 细胞株的正常培养方法如下：

[0075] (1) 培养基成分：高糖 DMEM, 10% 新生小牛血清, 100units/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素。

[0076] (2) 细胞瓶内培养条件：正常细胞以适当浓度接种于 5mL 培养基, 25cm² 培养瓶内, 置于 37℃, 5% CO₂ 的恒温培养箱内培养。培养基每 2-3 天更换一次。至细胞铺满长满后, 胰酶消化进行下一步的细胞瓶接种以及 12 孔板接种。

[0077] (3) 12 孔板内培养条件：细胞以每孔 10⁵ 个的浓度种板, 培养基体积为 2mL, 置于 37℃, 5% CO₂ 的恒温培养箱内培养。

[0078] 注：培养基成分和种板浓度需根据细胞株具体特性进行调整, 表现在血清的品种、用量以及细胞浓度的选择上。预实验证明上述条件下 CHO 和 NIH3T3 细胞株均能保持正常生长状态。

[0079] 2.11 正常条件下培养 2 小时处理组结果：

[0080] 处 24 小时后, 医用硅胶组内细胞出现皱缩, 毒性培养基组与商品茶籽油组的细胞形态与阴性对照组无可见区别。继续处 24 小时后, 医用硅胶组培养基内有大量死细胞团块漂浮, 毒性培养基组与商品茶籽油组均有抑制细胞生长的现象。结果如图 4 所示。

[0081] 图 4 为以商品茶籽油、医用硅胶片、毒性培养基处理 CHO 细胞株 24 和 48 小时后细胞形态变化以及考马斯亮蓝染色结果。阴性对照组为正常培养的细胞。处理前细胞于正常条件下培养 2 小时。每组处理平行操作 3 份, 实验重复 3 次。a：4 倍镜下处 24 小时后结果；b：4 倍镜下处理 48 小时后结果；c：4 倍镜下考马斯亮蓝染色结果。

[0082] 2.12 正常条件下培养 24 小时处理组结果：

[0083] 与正常条件下培养 2 小时处理组相比, 医用硅胶组处理 24 小时后仅有轻微毒性。当细胞密度高时, 培养基内无可见死细胞团块漂浮。毒性培养基组和商品茶籽油组与正常条件下培养 2 小时处理组结果类似, 有轻微细胞生长抑制作用。结果如图 5 所示。

[0084] 图 5 为以商品茶籽油、医用硅胶片、毒性培养基处理 CHO 细胞株 24 小时后细胞形态变化以及考马斯亮蓝染色结果。阴性对照组为正常培养的细胞。处理前细胞于正常条件下培养 24 小时。每组处理平行操作 3 份, 实验重复 3 次。a：4 倍镜下处理 24 小时后结果；b：4 倍镜下考马斯亮蓝染色结果。

[0085] 2.2 小鼠胚胎成纤维细胞 (NIH3T3)

[0086] 2.21 正常条件下培养 2 小时处理组结果：

[0087] 与 2.1 CHO 细胞组相比, 处理 24 小时后, 医用硅胶组有较弱细胞毒性, 但继续处理 24 小时后, 大部分细胞死亡。阴性对照组、商品茶籽油组以及毒性培养基组, 处理 24 小时和 48 小时后, 无显著差异。结果如图 6 所示。

[0088] 图 6 为以商品茶籽油、医用硅胶片、毒性培养基处理 NIH3T3 细胞株 24 和 48 小时后细胞形态变化以及考马斯亮蓝染色结果。阴性对照组为正常培养的细胞。处理前细胞于正常条件下培养 2 小时。每组处理平行操作 3 份, 实验重复 3 次。a：4 倍镜下处理 24 小时后结果；b：4 倍镜下处理 48 小时后结果；c：4 倍镜下考马斯亮蓝染色结果。

[0089] 2.22 正常条件下培养 24 小时处理组结果：

[0090] 结果与正常条件下培养 2 小时处理组类似, 但所有处理组对细胞均有轻微毒性。

医用硅胶组对细胞的毒性大于正常条件下培养 2 小时处理组。值得指出的是,实验中正常的 NIH3T3 细胞株贴壁不牢,因此染色过程中润洗细胞的操作对考马斯亮蓝染色成像有较大的影响。结果如图 7 所示。

[0091] 图 7 为以商品茶籽油、医用硅胶片、毒性培养基处理 NIH3T3 细胞株 24 小时后细胞形态变化以及考马斯亮蓝染色结果。阴性对照组为正常培养的细胞。处理前细胞于正常条件下培养 24 小时。每组处理平行操作 3 份,实验重复 3 次。a:4 倍镜下处理 24 小时后结果;b:4 倍镜下考马斯亮蓝染色结果。

[0092] 图 3 为健康中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 与小鼠胚胎成纤维细胞 (NIH3T3) 的细胞数与紫外光度值的线性关系及对应的回归方程 ($n = 3$)。a 为小鼠胚胎成纤维细胞 (NIH3T3), b 为中国仓鼠卵巢细胞 (CHO)。

[0093] 实施例 2 商品茶籽油与食堂废弃油对比试验

[0094] 样品预处理、检测方法类似实施例 1,可以采用实施例 1 相同的条件。样品来源:食堂废弃油收集于独墅湖高教区文星广场餐馆。

[0095] 实验结果:

[0096] 1.1 中国仓鼠卵巢细胞 (CHO):

[0097] 与商品茶籽油相比,处理 24 小时以及 48 小时后,食堂废油对细胞有较强毒性。结果显示,CHO 细胞株在正常条件下培养 24 小时后对食堂废油的灵敏度不及 2 小时组。结果如图 8 所示。

[0098] 图 8 为以商品茶籽油和食堂废油处理 CHO 细胞株 24 和 48 小时后细胞形态变化以及考马斯亮蓝染色结果。阴性对照组为正常培养的细胞。除食堂废油 24 小时组外,其他处理组细胞在加样前均于正常条件下培养 2 小时。每组处理平行操作 3 份。a:4 倍镜下处理 24 小时后结果;b:4 倍镜下处理 48 小时后结果;c:4 倍镜下考马斯亮蓝染色结果。

[0099] 1.2 小鼠胚胎成纤维细胞 (NIH3T3)

[0100] 结果与中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 细胞株相似(图 9),食堂废油对细胞有较强毒性。正常条件下培养 24 小时后细胞对食堂废油的灵敏度不及 2 小时组。

[0101] 图 9 为以商品茶籽油和食堂废油处理 NIH3T3 细胞株 24 和 48 小时后细胞形态变化以及考马斯亮蓝染色结果。阴性对照组为正常培养的细胞。除食堂废油 24 小时组外,其他处理组细胞在加样前均于正常条件下培养 2 小时。每组处理平行操作 3 份。a:4 倍镜下处理 24 小时后结果;b:4 倍镜下处理 48 小时后结果;c:4 倍镜下考马斯亮蓝染色结果。

[0102] 实施例 3 商品茶籽油与粗提地沟油对比实验 (CHO 细胞株)

[0103] 样品预处理、检测方法类似实施例 1,可以采用实施例 1 相同的条件。样品来源采用粗提地沟油由苏州市公安局苏州独墅湖高等教育区分局取样,为未经深加工的地沟油,有异臭。

[0104] 结果显示(如图 10 所示),细胞经粗提地沟油处理 24 小时后,培养基内出现大量漂浮的死细胞团块,细胞死亡。

[0105] 图 10 为以商品茶籽油和粗提地沟油处理 CHO 细胞株 24 小时后细胞形态变化以及考马斯亮蓝染色结果。阴性对照组为正常培养的细胞。细胞在处理前于正常条件下培养 2 小时。每组处理平行操作 3 份。a:10 倍镜下处理 24 小时后结果;b:4 倍镜下考马斯亮蓝染色结果。

[0106] 实施例 43 种商品食用油对比实验 (CHO 细胞株)

[0107] 样品预处理、检测方法类似实施例 1, 可以采用实施例 1 相同的条件。样品来源采用 3 种商品食用油为茶籽油、葵花橄榄油以及葵花籽油, 均为市场流通品种。

[0108] 显微成像结果显示 (图 11), 阴性对照组、葵花橄榄油、以及葵花籽油组无可见差异。处理 48 小时后, 茶籽油显示轻微抑制细胞生长作用。应用紫外分光光度法验证考马斯亮蓝染色方法 (图 12), 用 One-way ANOVA (SNK) 法比较四组结果后, 显示在 99% 置信区间内 ($p = 0.01$), 各处理组间无显著统计学差异。

[0109] 图 11 为以 3 种商品食用油处理 CHO 细胞株 24 和 48 小时后细胞形态变化以及考马斯亮蓝染色结果。阴性对照组为正常培养的细胞。细胞在处理前于正常条件下培养 2 小时。每组处理平行操作 3 份。a: 4 倍镜下处理 24 小时后结果; b: 4 倍镜下处理 48 小时后结果; c: 4 倍镜下考马斯亮蓝染色结果。图 12 为 3 种商品食用油处理 48 小时后残余细胞数对比。

[0110] 上述实例只为说明本发明的技术构思及特点, 其目的在于让熟悉此项技术的人是能够了解本发明的内容并据以实施, 并不能以此限制本发明的保护范围。凡根据本发明精神实质所做的等效变换或修饰, 都应涵盖在本发明的保护范围之内。

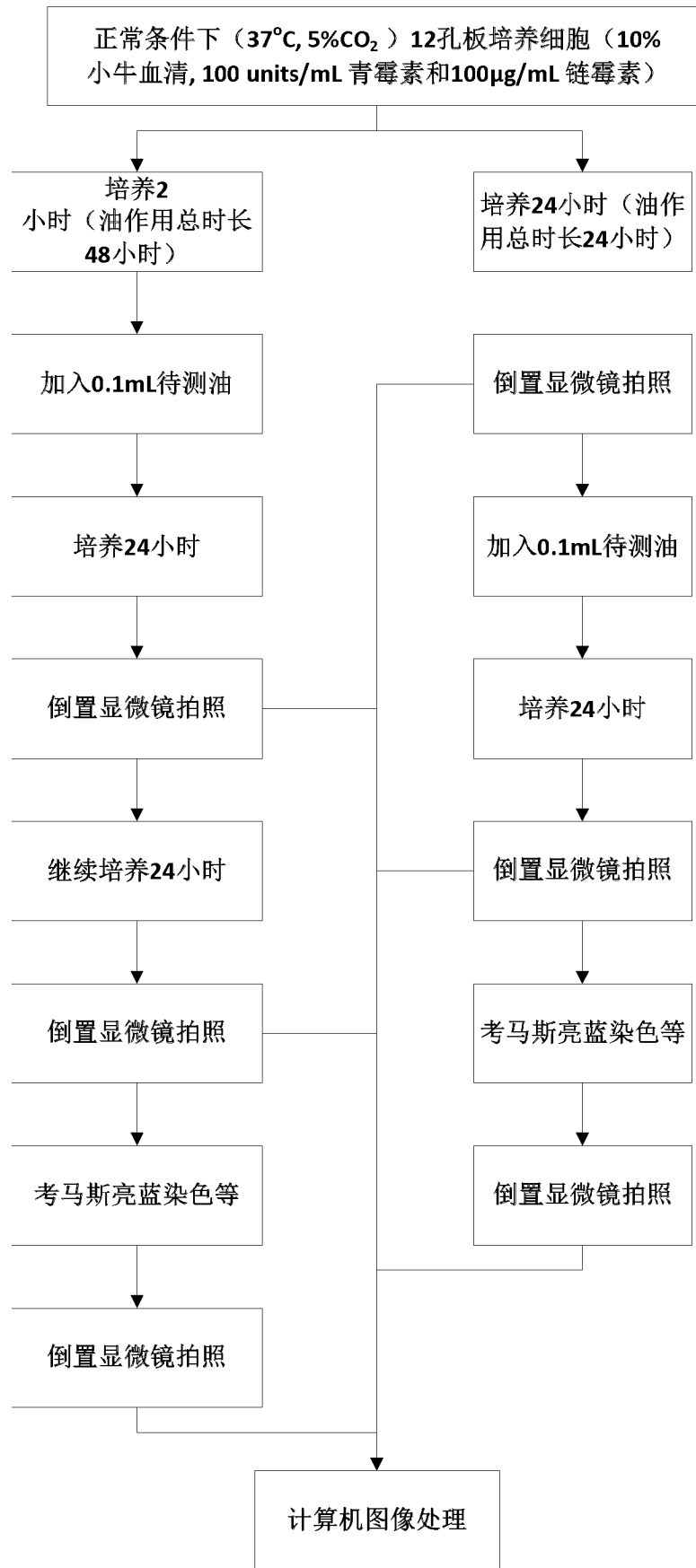


图 1

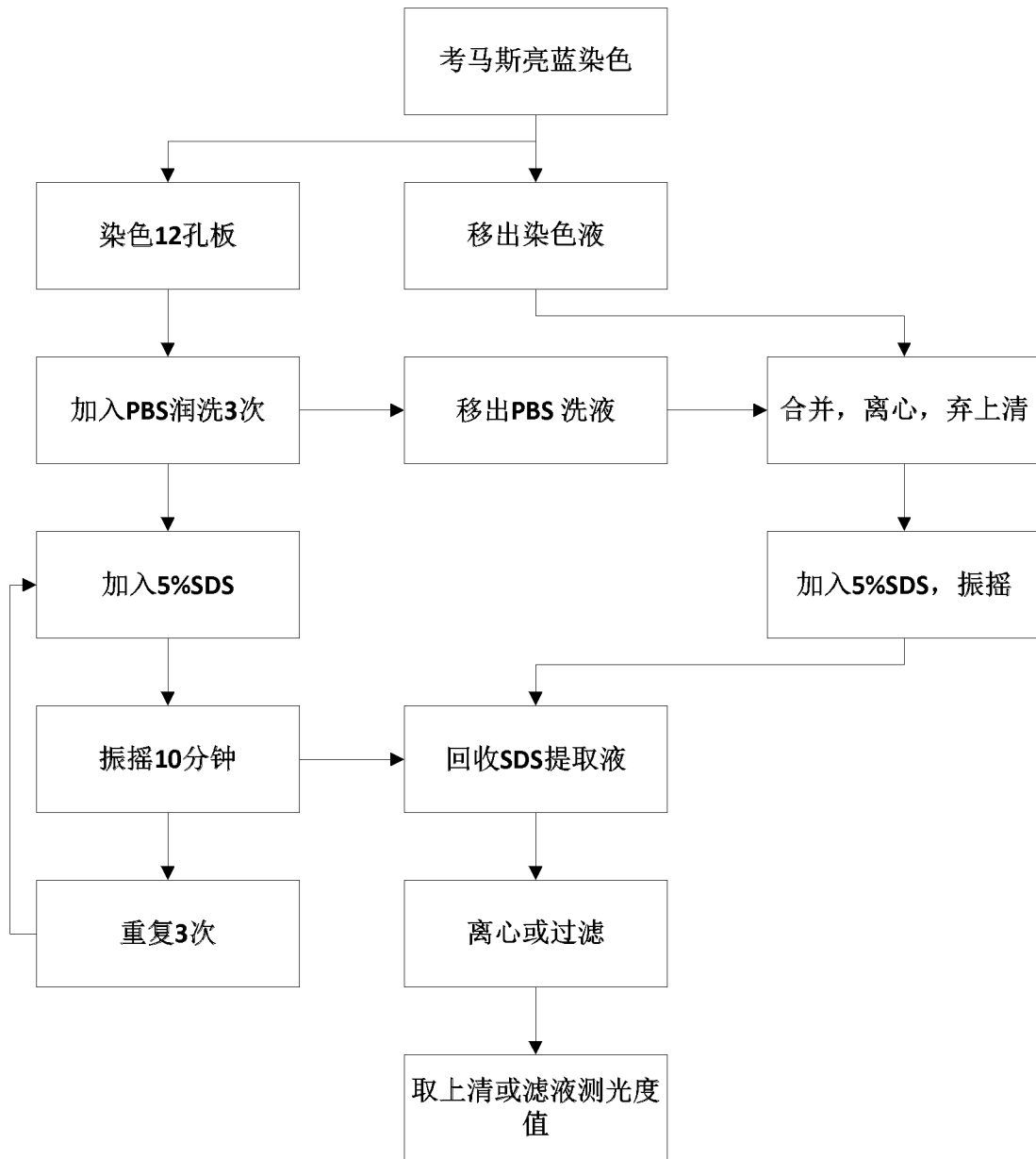


图 2

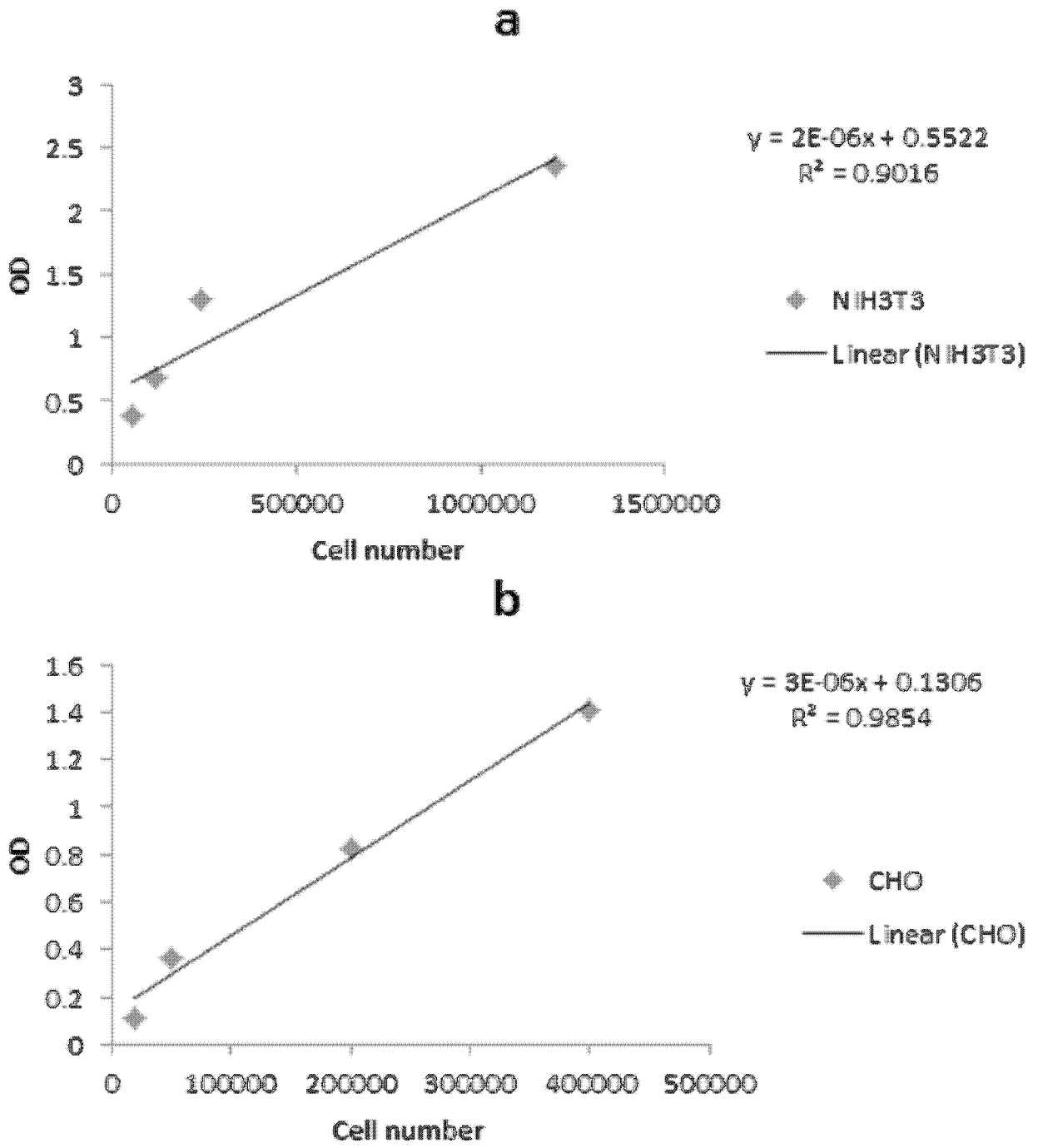


图 3

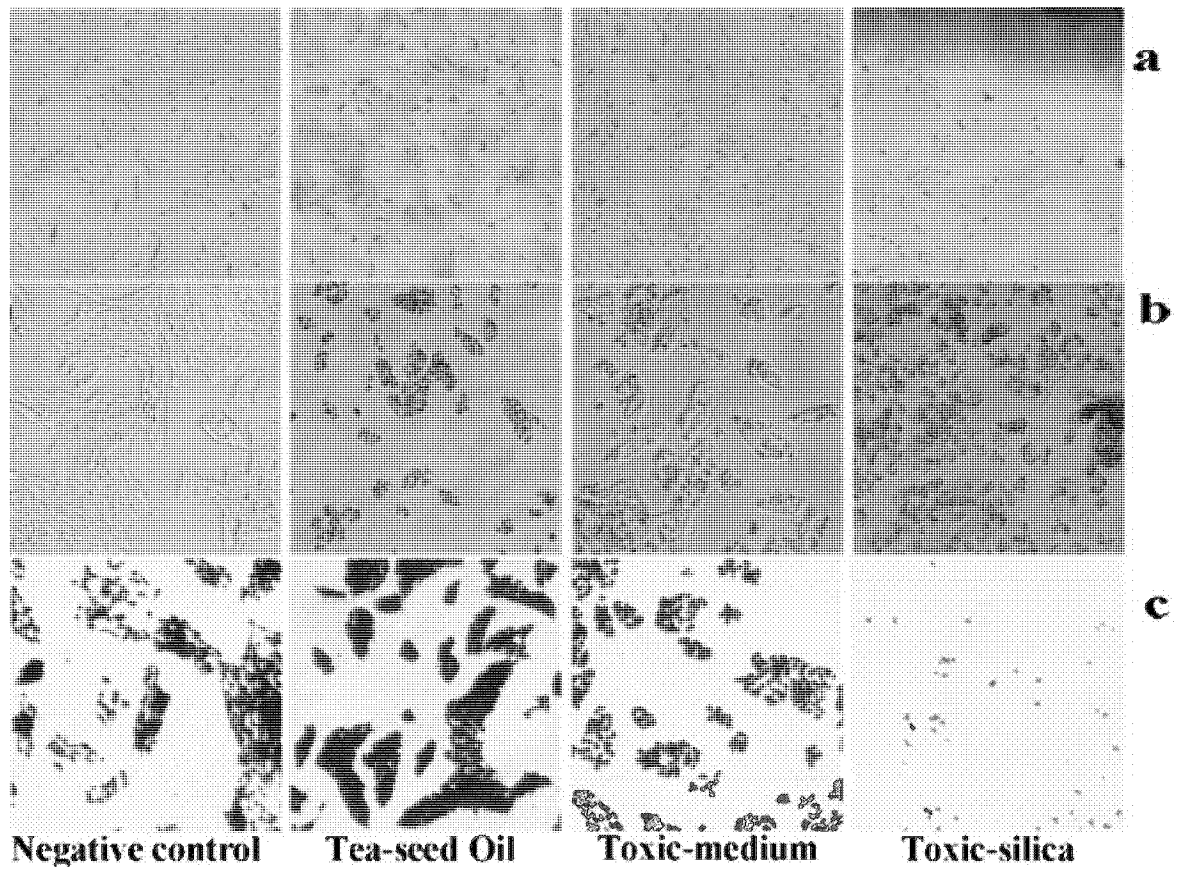


图 4

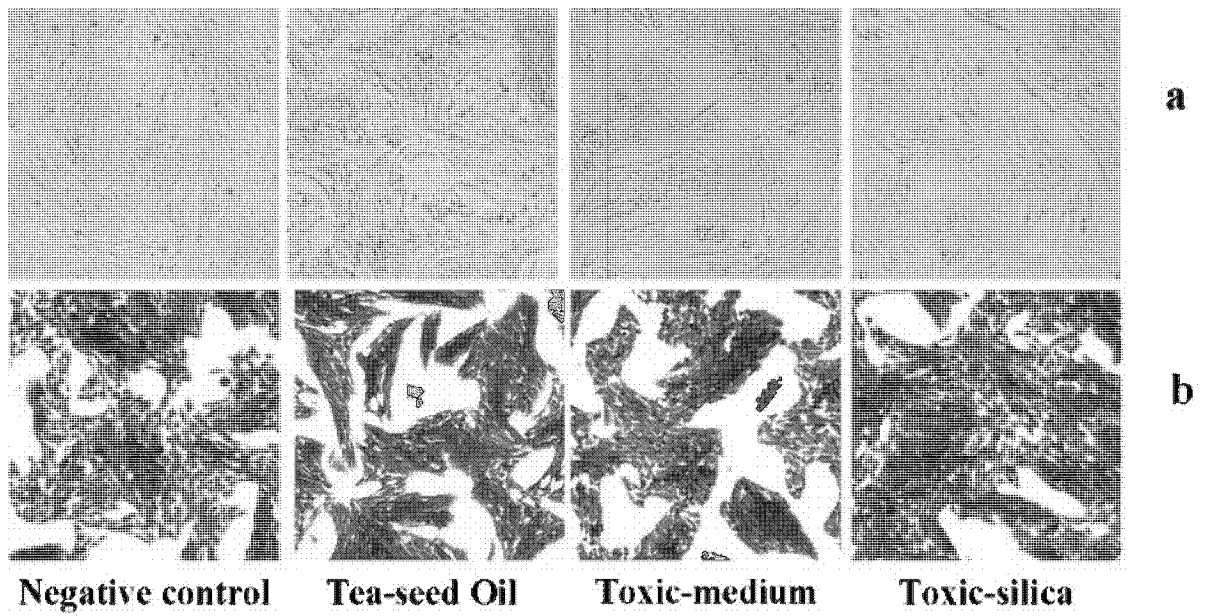


图 5

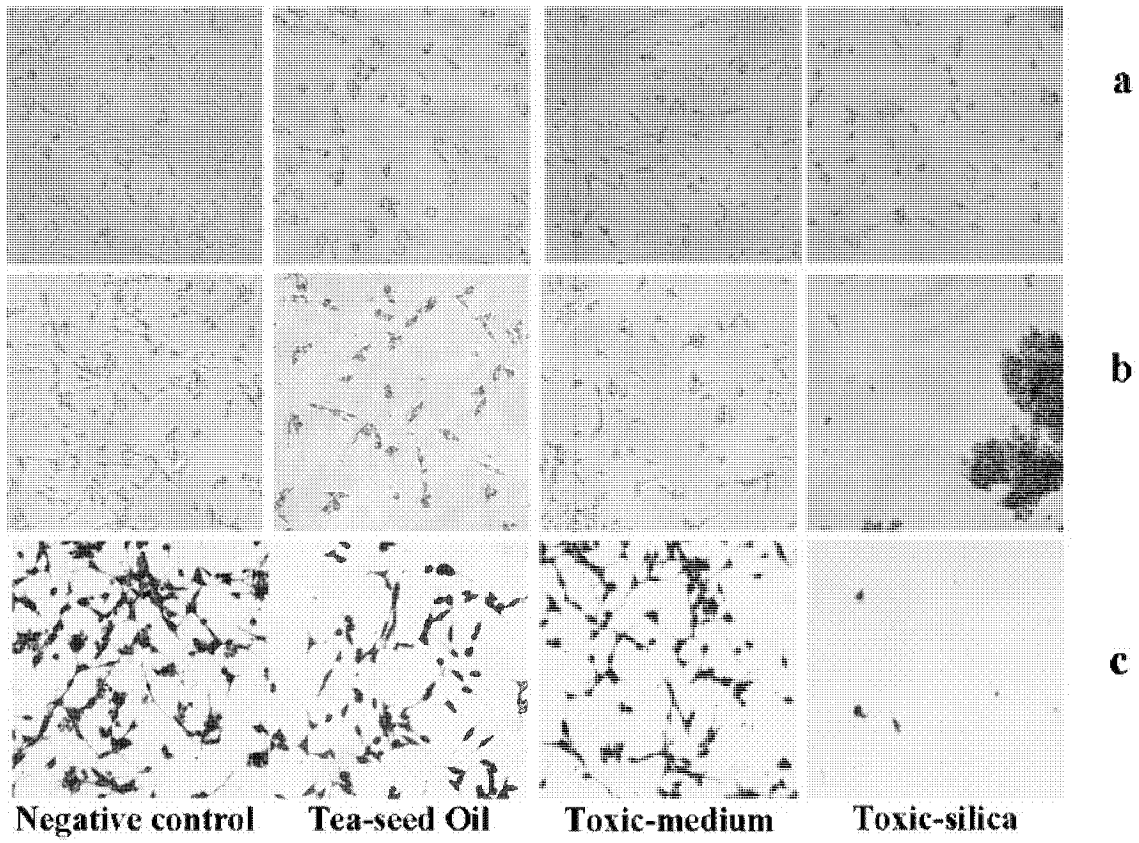


图 6

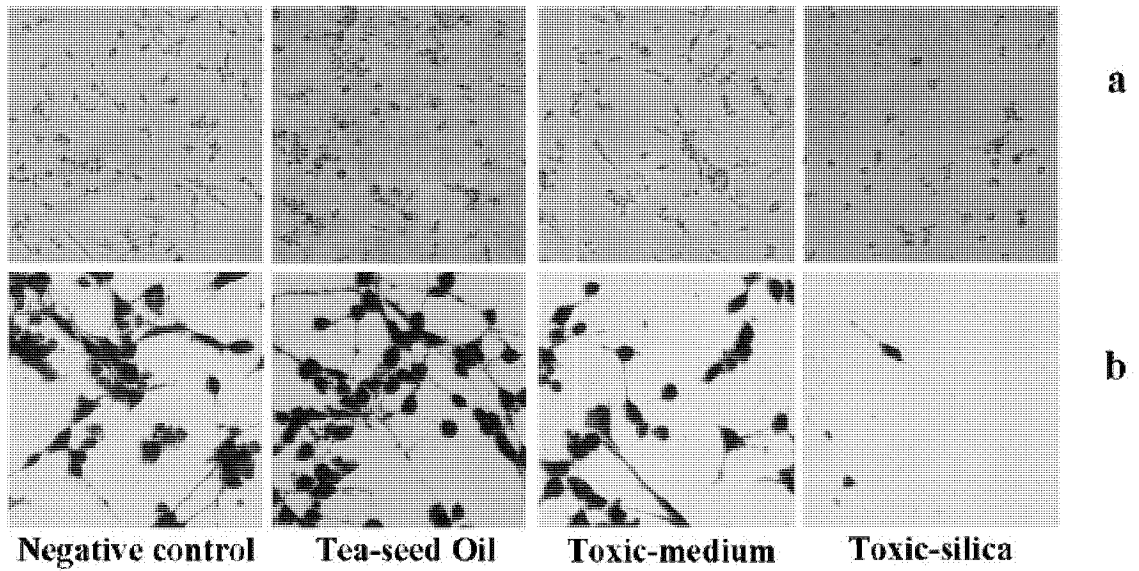


图 7

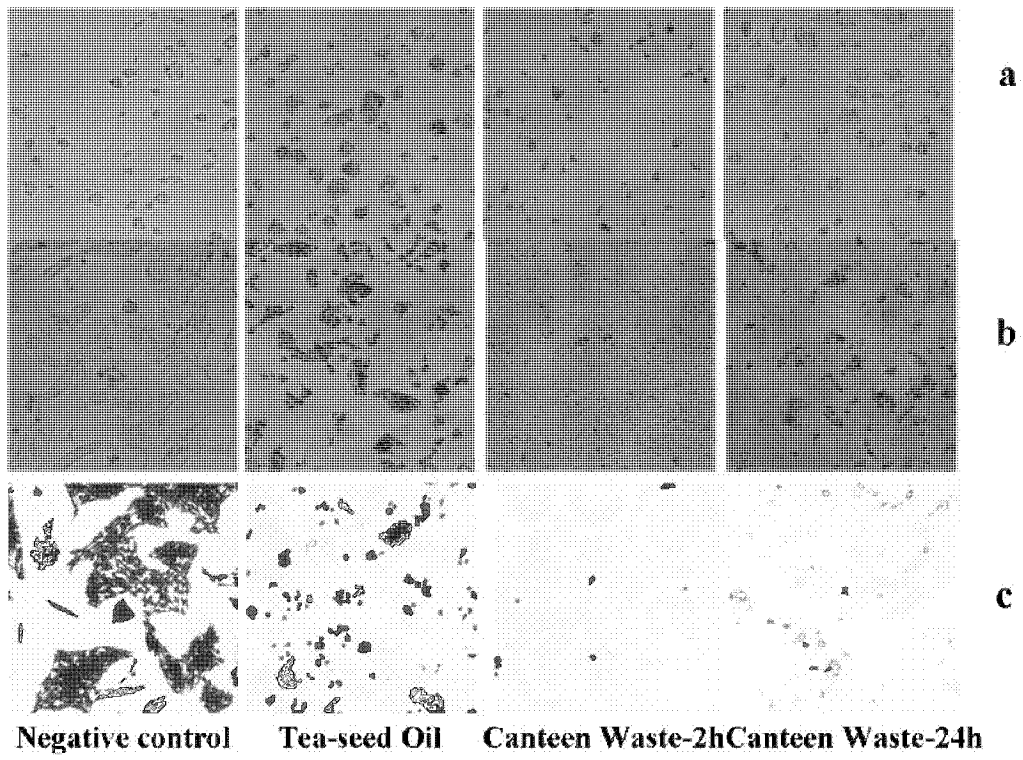


图 8

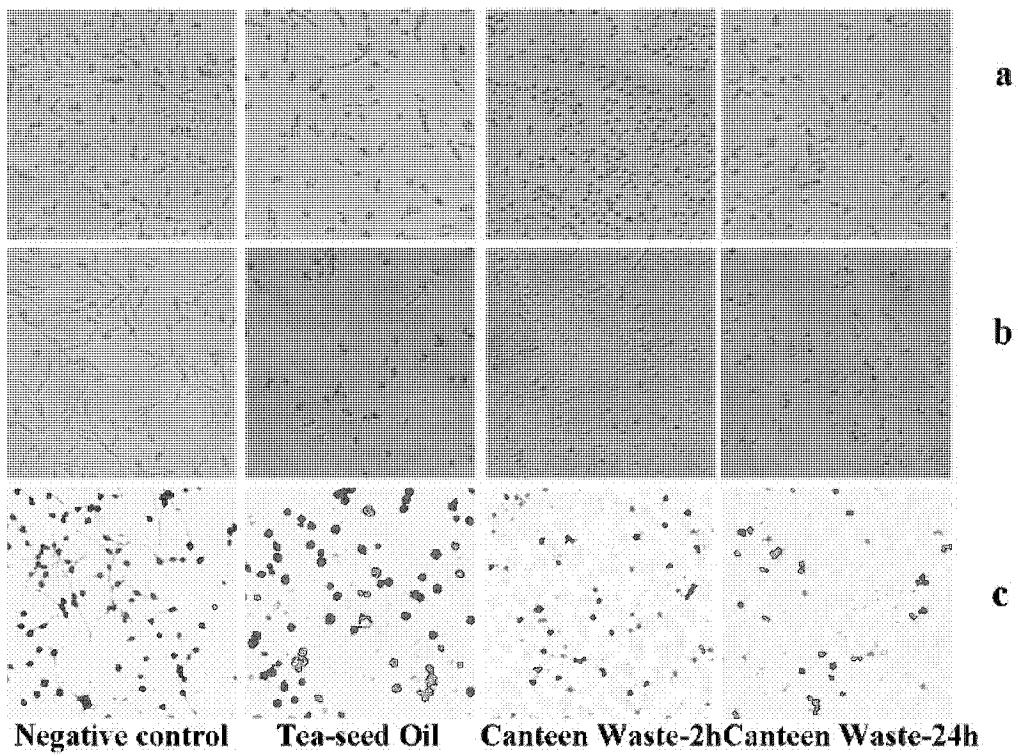


图 9

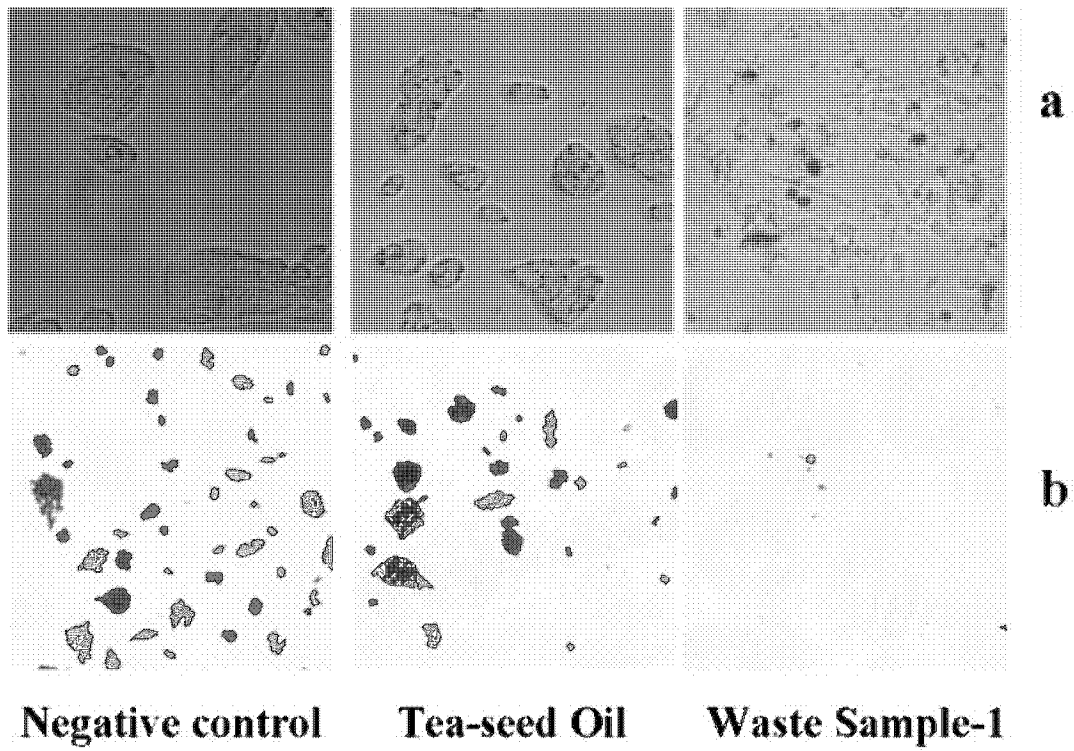


图 10

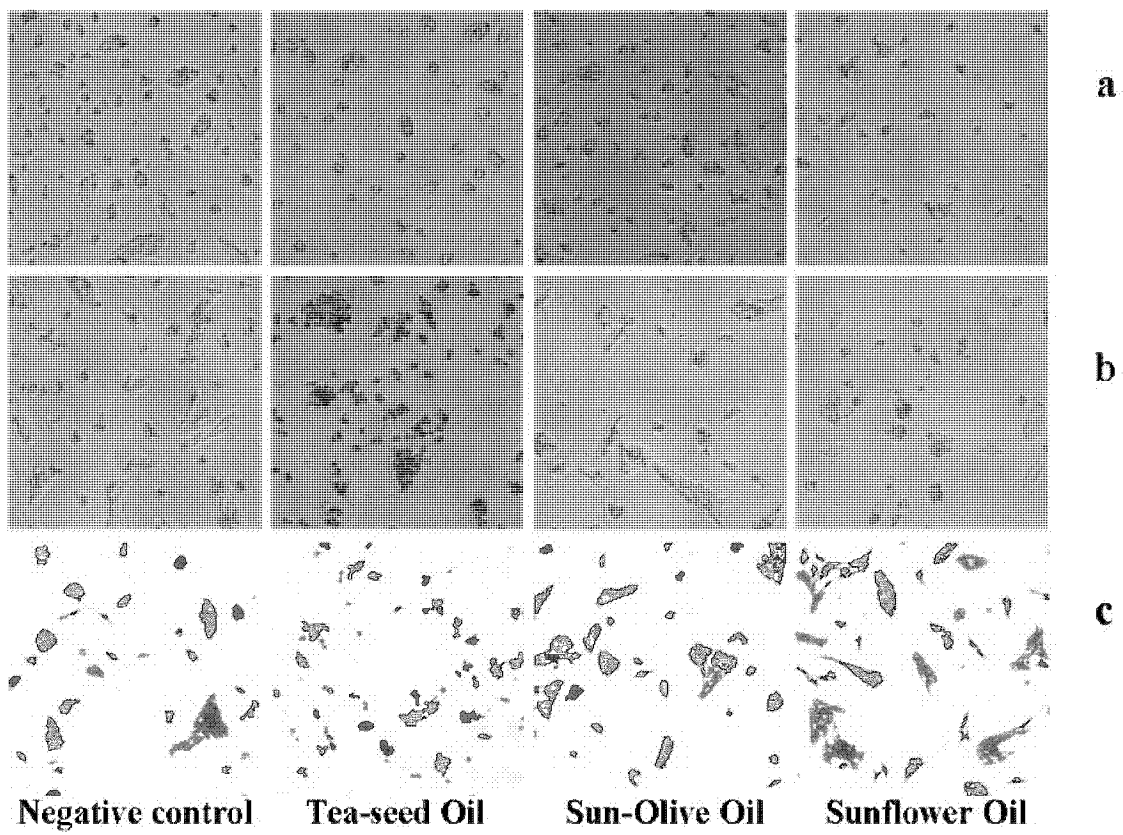


图 11

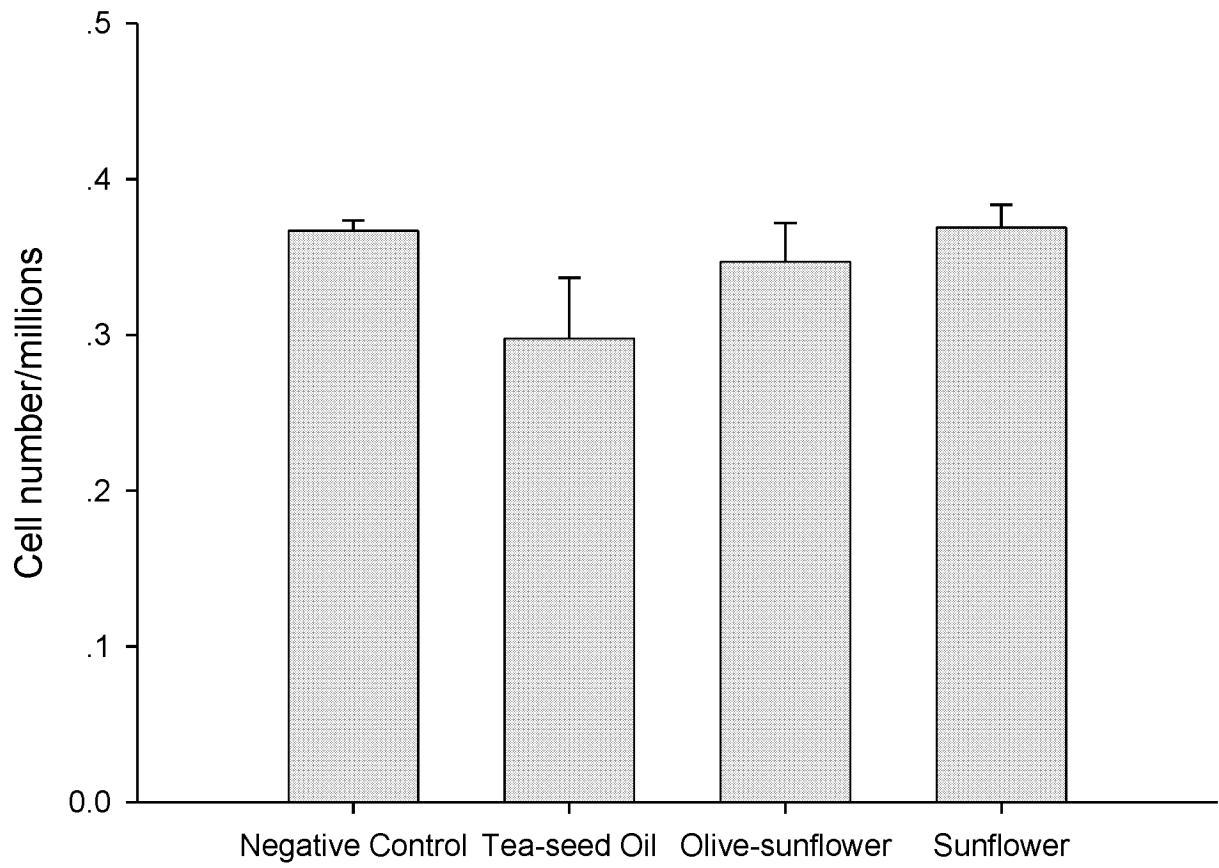


图 12