



南模生物

SHANGHAI  
MODEL ORGANISMS

# 斑马鱼模型评价 *Super Gelblue™* 毒性和安全性 (研究报告)

报告接收人：  
苏州优逸兰迪生物 夏继波



南模生物  
斑马鱼平台  
2023

Confidential

上海南方模式生物科技股份有限公司 <http://www.modelorg.com> / 未经许可，本文件不得随意复制，转发，泄露，打印，盗用，否则追究相应法律责任

# 斑马鱼模型评价 *Super Gelblue*<sup>TM</sup>毒性和安全性

## 实验目的

- ◆ 利用斑马鱼模型评价 *Super Gelblue*<sup>TM</sup>毒性和安全性

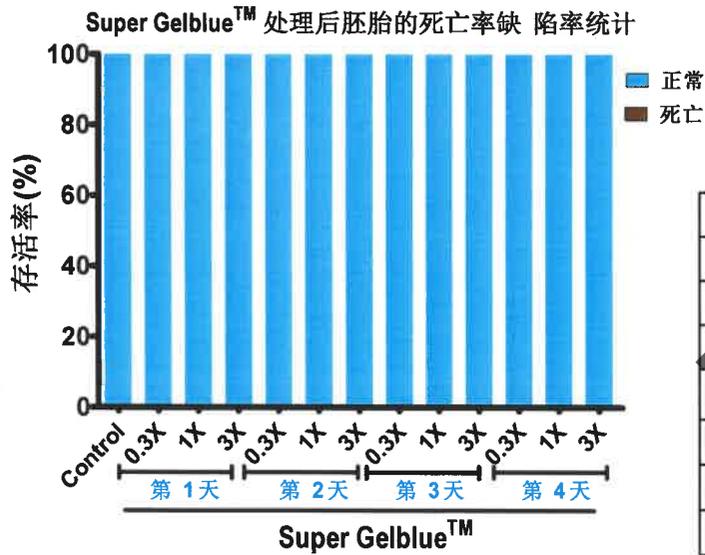
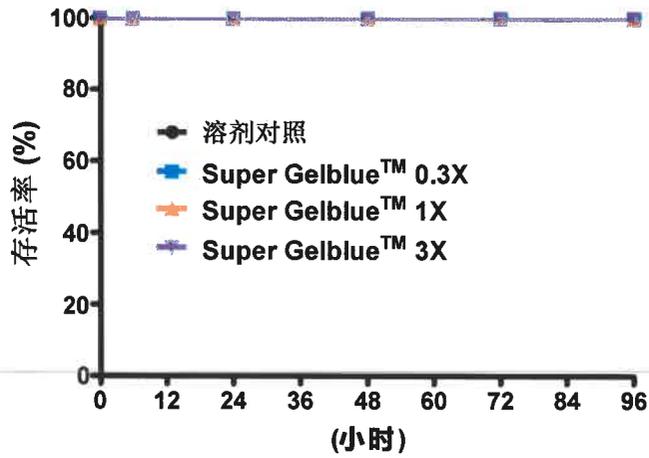
| 处理时间窗                                 | 观察终点                |
|---------------------------------------|---------------------|
| 受精后6小时 (6hpf) -受精后96小时(96hpf)         | 存活率; 表型率; 体长; 肝脏面积; |
| <i>Super Gelblue</i> <sup>TM</sup> 浓度 | 0.3X, 1X, 3X        |
| 溶剂对照                                  | Fish water          |

hpf, 受精后小时数.

## 实验参数

- ◆ 斑马鱼品系: Tg(*fabp10a:dsRed;elaSI:EGFP*) 转基因品系
- ◆ 给药途径: 溶解给药
- ◆ 实验动物数量: 每个实验参数60个胚胎

# 结果



| 时间 (小时) | 溶剂对照   | Super Gelblue™ 0.3X | Super Gelblue™ 1X | Super Gelblue™ 3X |
|---------|--------|---------------------|-------------------|-------------------|
| 6       | 100.00 | 100.00              | 100.00            | 100.00            |
|         | 100.00 | 100.00              | 100.00            | 100.00            |
|         | 100.00 | 100.00              | 100.00            | 100.00            |
| 24      | 100.00 | 100.00              | 100.00            | 100.00            |
|         | 100.00 | 100.00              | 100.00            | 100.00            |
|         | 100.00 | 100.00              | 100.00            | 100.00            |
| 48      | 100.00 | 100.00              | 100.00            | 100.00            |
|         | 100.00 | 100.00              | 100.00            | 100.00            |
|         | 100.00 | 100.00              | 100.00            | 100.00            |
| 72      | 100.00 | 100.00              | 100.00            | 100.00            |
|         | 100.00 | 100.00              | 100.00            | 100.00            |
|         | 100.00 | 100.00              | 100.00            | 100.00            |
| 96      | 100.00 | 100.00              | 100.00            | 100.00            |
|         | 100.00 | 100.00              | 100.00            | 100.00            |
|         | 100.00 | 100.00              | 100.00            | 100.00            |

| 时间 (小时) | 溶剂对照 |     | Super Gelblue™ 0.3X |      |     | Super Gelblue™ 1X |      |     | Super Gelblue™ 3X |      |     |     |
|---------|------|-----|---------------------|------|-----|-------------------|------|-----|-------------------|------|-----|-----|
|         | 均值   | 标准误 | 胚胎数                 | 均值   | 标准误 | 胚胎数               | 均值   | 标准误 | 胚胎数               | 均值   | 标准误 | 胚胎数 |
| 0       | 100% | 0   | 60                  | 100% | 0   | 60                | 100% | 0   | 60                | 100% | 0   | 60  |
| 6       | 100% | 0   | 60                  | 100% | 0   | 60                | 100% | 0   | 60                | 100% | 0   | 60  |
| 24      | 100% | 0   | 60                  | 100% | 0   | 60                | 100% | 0   | 60                | 100% | 0   | 60  |
| 48      | 100% | 0   | 60                  | 100% | 0   | 60                | 100% | 0   | 60                | 100% | 0   | 60  |
| 72      | 100% | 0   | 60                  | 100% | 0   | 60                | 100% | 0   | 60                | 100% | 0   | 60  |
| 96      | 100% | 0   | 60                  | 100% | 0   | 60                | 100% | 0   | 60                | 100% | 0   | 60  |

图1. 溶剂对照组与 Super Gelblue™ 处理组 对比连续4天的存活曲线统计图。和对照组相比， Super Gelblue™ 处理组连续4天均保持100%存活率，存活的胚胎没有出现任何缺陷。每组20个胚胎，3次独立的重复实验。



## Super Gelblue™ 处理后，斑马鱼呈现完全正常的发育状态

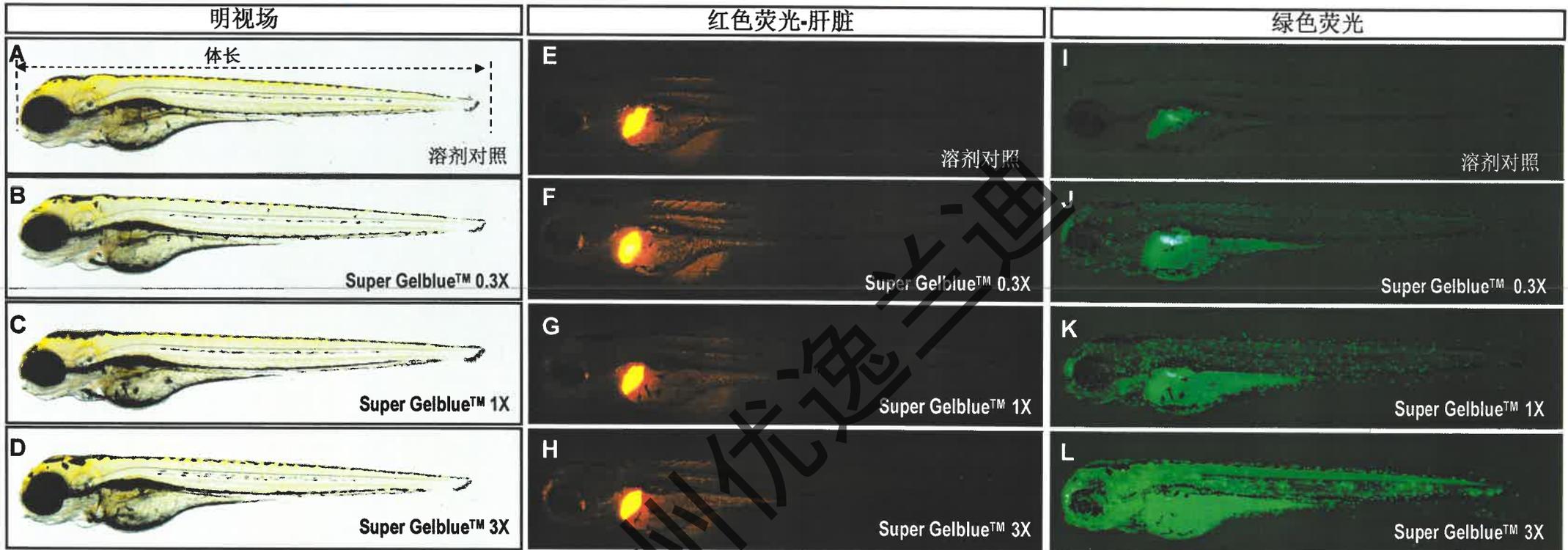
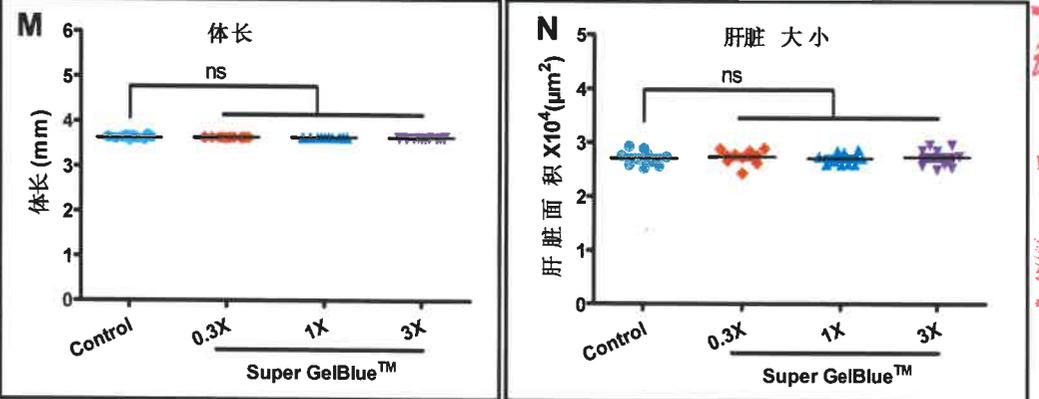


图 2. Super Gelblue™ 处理后，斑马鱼呈现完全正常的发育状态。

图(A-L) *Tg(fabp10a:dsRed;ela3l:EGFP)* 受精后4-dpf的斑马鱼胚胎明视场和荧光图。溶剂对照组，Super Gelblue™ 3个浓度处理组(0.3X, 1X and 3X)。

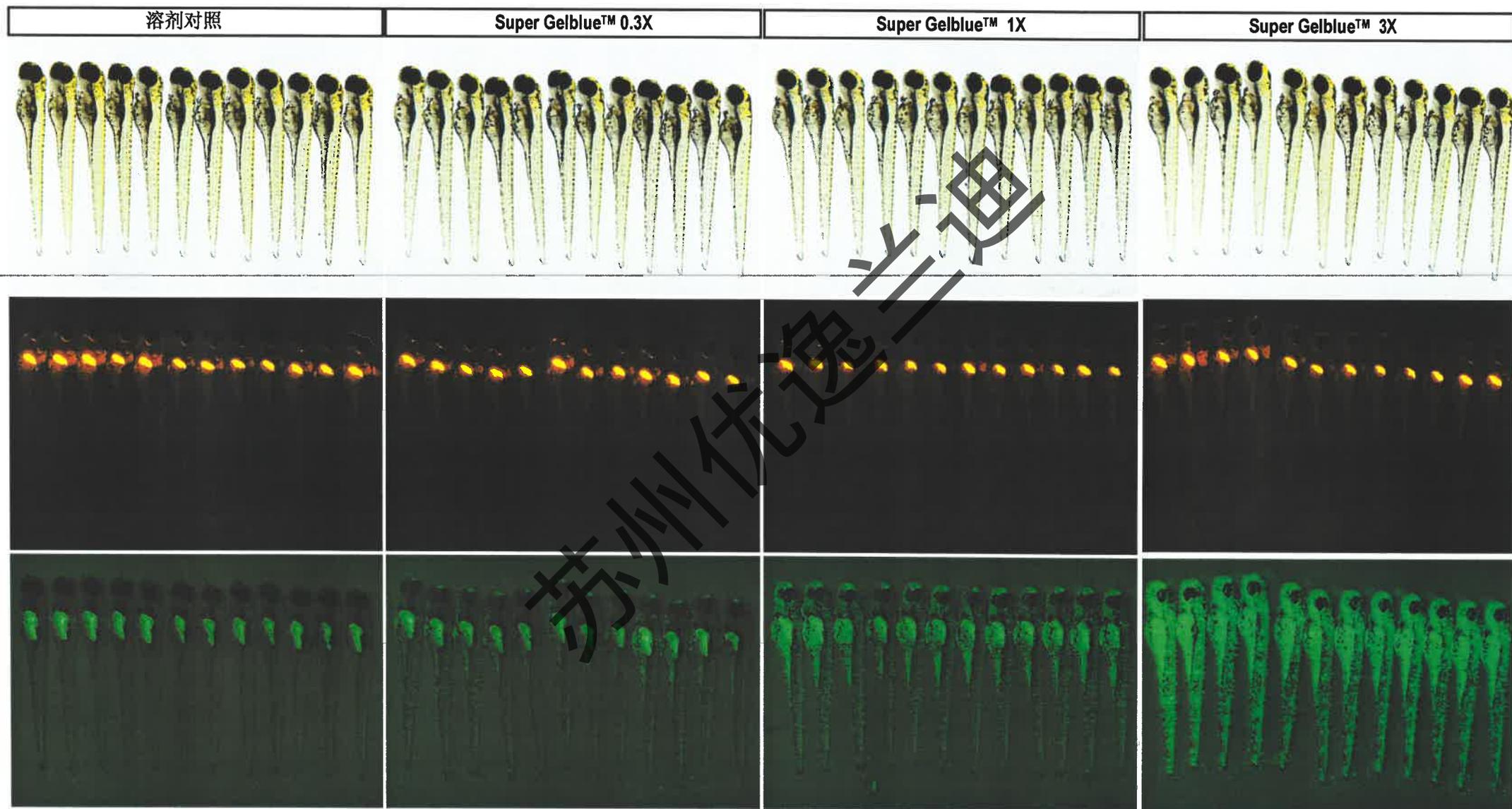
图(E) 为溶剂对照组4-dpf的斑马鱼胚胎正常的肝脏大小及形态学(侧面观)。图(F-H, J-L), 和对照组相比，Super Gelblue™ 3个浓度处理组，都没有影响斑马鱼的正常发育。斑马鱼的整体形态学，体长，肝脏大小，均没有显著改变。(附图1)。

图(M-N) 各个实验组的体长和肝脏大小定量分析。每组随机取10只胚胎，采用单因子方差分析，ns, not significant, 无显著差异。dpf, 受精后天数。



生物科学出版社

附图1



## 材料和方法

### 斑马鱼饲养及维护

成年斑马鱼饲养在28.5 °C 的水环境中，昼夜光照条件设定为白天14 h 光照/夜晚10 h 黑暗（补充文献1）。斑马鱼雌雄鱼采用自然交配的方式进行，每次配5-6缸，平均每缸产卵200-300个胚胎。选取优质的胚胎进行后续实验。胚胎用干净的系统水饲养，置于28.5 °C ± 0.5 °C 的恒温光照培养箱中。系统水(纯水中加入0.2% 的海盐，PH ≈ 6.9 ~ 7.2)。胚胎的收集以及发育时相的确定可参照（补充文献2）。转基因品系*fabp10a:dsRed;ela3l:EGFP* 的构建、生成可参考（补充文献3）。南模生物斑马鱼平台已获得AAALAC国际认可。国际实验动物评估和认可委员会（Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, 简称AAALAC）。

### 斑马鱼胚胎毒理测试

毒理测试实验中，受精后6h（6hpf）的胚胎分别用溶剂对照（新鲜的系统水）和 Super Gelblue™ (3个浓度组：0.3X, 1X 和3X)处理。胚胎置于12孔板中，每孔加入20个胚胎，处理的时间窗为6hpf到96hpf，共计90h。每隔24hpf，观察记录胚胎的死亡数并进行统计。在进口尼康显微镜（Nikon SMZ745; Japan）下对斑马鱼胚胎进行观察，失去心跳的胚胎，一般认为已经死亡。用GraphPad Prism 5.0 软件绘制存活曲线图。每组数据进行3次独立生物学重复。样品处理结束后，所有的胚胎用新鲜的系统水清洗3遍，然后用 0.016% MS-222 (三卡因甲磺酸钠, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 麻醉，麻醉之后，在体式荧光显微镜下进行表型分析，观察，拍照。主要分析整体的发育表型，体长和肝脏面积。

### 图像获取

利用Nikon SMZ18 体式荧光显微镜对斑马鱼胚胎或者幼鱼进行成像。拍照采用3种模式：明视场，红色荧光和绿色荧光。图片用Adobe Photoshop 7.0 软件（Adobe, San Jose, California）进行处理。表型定量分析采用显微镜自带的软件（NIS-Elements D4.6, Japan）和 ImageJ软件（U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>）进行处理。分析时，每组随机选择10个动物。

### 统计分析

所有数据用GraphPad Prism 5.0（GraphPad Software, San Diego, CA）进行处理。统计图采用平均值±标准误（mean ± SEM）的形式。统计分析方式采用 Student's t test, ANOVA, 或者  $\chi^2$ 。\* P < 0.05, 差异显著；\*\*\* P < 0.0001, 差异极显著。

### 补充参考文献

- [1]. Westerfield M. The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory use of Zebrafish. Eugene: The University of Oregon Press, 1993.
- [2]. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn.* 1995 Jul;203(3):253-310.
- [3]. Korzh S, Pan X, Garcia-Lecea M, et al. Requirement of vasculogenesis and blood circulation in late stages of liver growth in zebrafish. *BMC Dev Biol.* 2008 Sep 16;8:84.

## 主要试剂耗材、仪器设备

| 英文名称 (English Name)                         | 中文名称 (Chinese Name) | 分子量 (MW) | 货号 (Cat#)   | 供应商 (Supplier) |
|---------------------------------------------|---------------------|----------|-------------|----------------|
| 12-well plate                               | 12孔培养板              | 无        | #353043     | BD Falcon      |
| 100-mm petri dish                           | 100mm培养皿            | 无        | #353003     | BD Falcon      |
| 10 $\mu$ L Filter Tips                      | 10微升进口滤芯枪头          | 无        | TF-300-R-S  | Axygen         |
| 200 $\mu$ L Filter Tips                     | 200微升进口滤芯枪头         | 无        | TF-200-R-S  | Axygen         |
| 1000 $\mu$ L Filter Tips                    | 1000微升进口滤芯枪头        | 无        | TF-1000-R-S | Axygen         |
| 1.5mL microcentrifuge tubes                 | 进口1.5mL离心管          | 无        | MCT-150-C   | Axygen         |
| Methyl cellulose                            | 甲基纤维素               | 无        | M0262       | Sigma          |
| Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt | 3-氨基苯甲酸乙酯 甲磺酸盐      | 261.29   | A5040       | Sigma          |

| 中文名称 (Chinese Name)   | 型号       | 供应商 (Supplier) |
|-----------------------|----------|----------------|
| 体式荧光显微镜               | SMZ-18   | 日本尼康 (Nikon)   |
| 体式显微镜                 | SMZ-745  | 日本尼康 (Nikon)   |
| 光照恒温培养箱               | GZP-250S | 上海精宏实验设备有限公司   |
| 0.1-2 $\mu$ l单道移液枪    | P2       | 法国吉尔森 (GILSON) |
| 1-10 $\mu$ l单道移液枪     | P10      | 法国吉尔森 (GILSON) |
| 50-200 $\mu$ l单道移液枪   | P200     | 法国吉尔森 (GILSON) |
| 200-1000 $\mu$ l单道移液枪 | P1000    | 法国吉尔森 (GILSON) |