

# 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

合同专用章

## 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

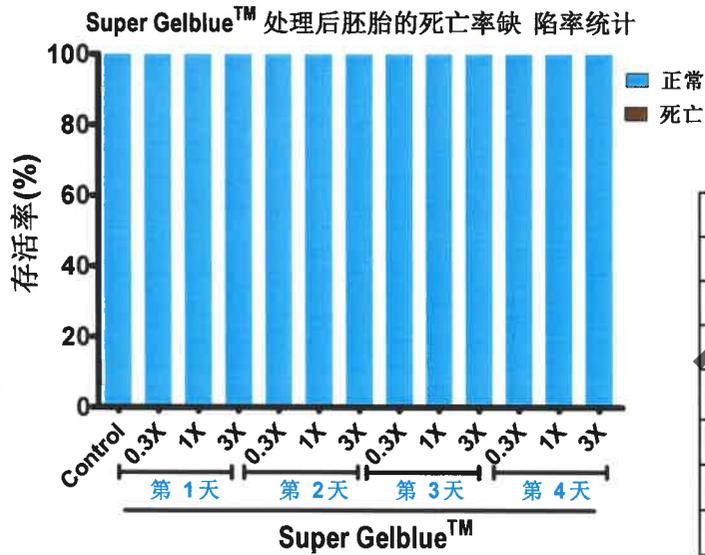
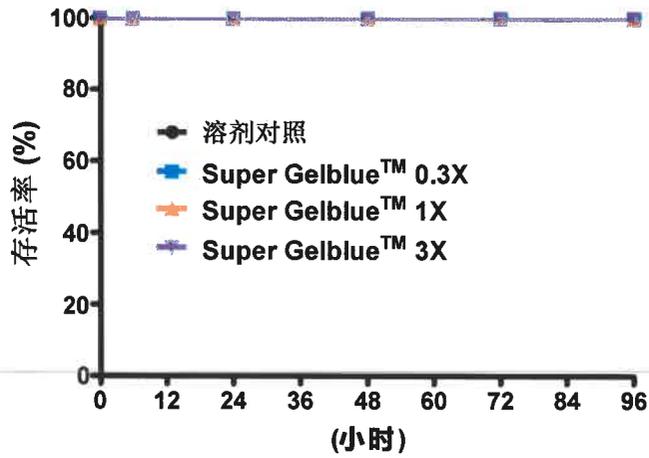
处理时间窗	观察终点
受精后6小时 (6hpf) -受精后96小时(96hpf)	存活率; 表型率; 体长; 肝脏面积;
<i>Super Gelblue</i> <sup>TM</sup> 浓度	0.3X, 1X, 3X
溶剂对照	Fish water

hpf, 受精后小时数.

### 实验参数

- ◆ 斑马鱼品系: Tg(*fabp10a:dsRed;elaSh: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日均保持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

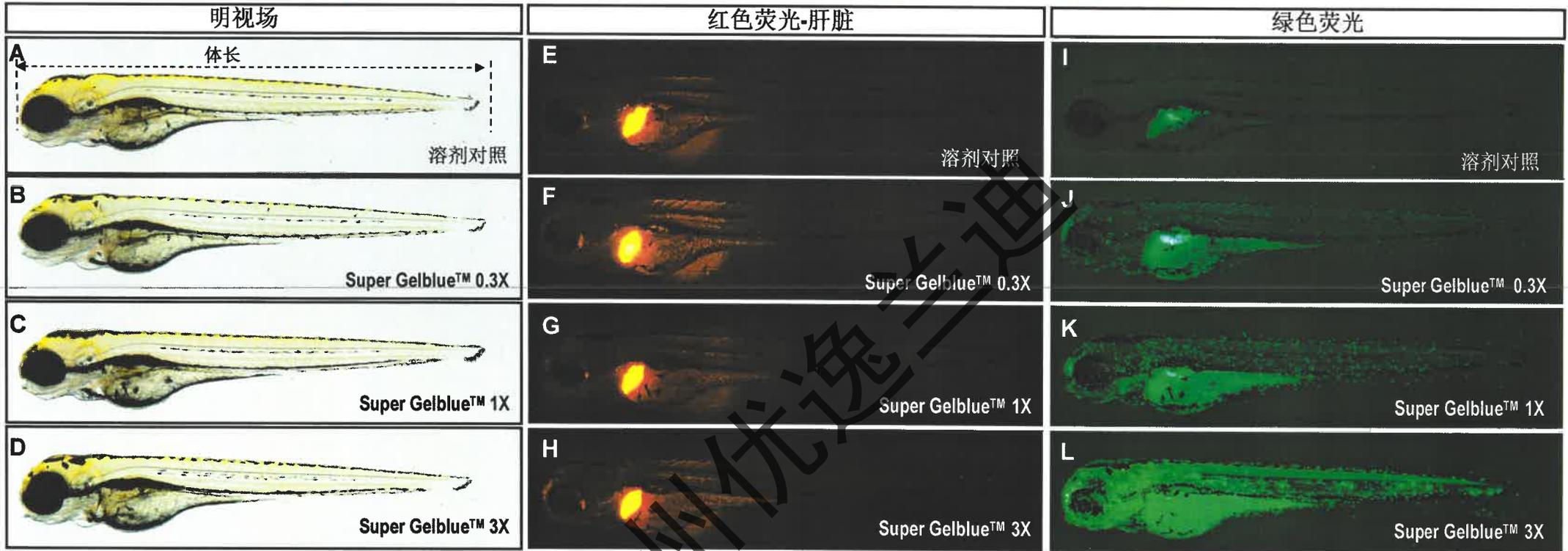
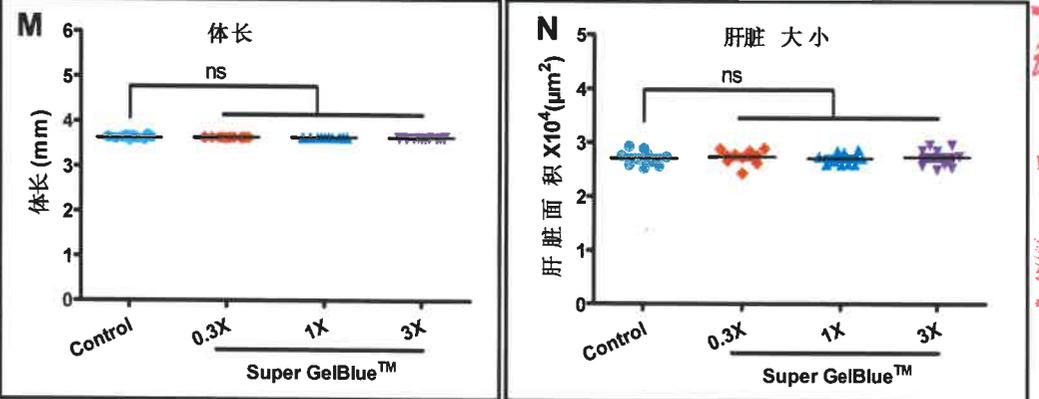


图 2. Super Gelblue™ 处理后，斑马鱼呈现完全正常的发育状态。

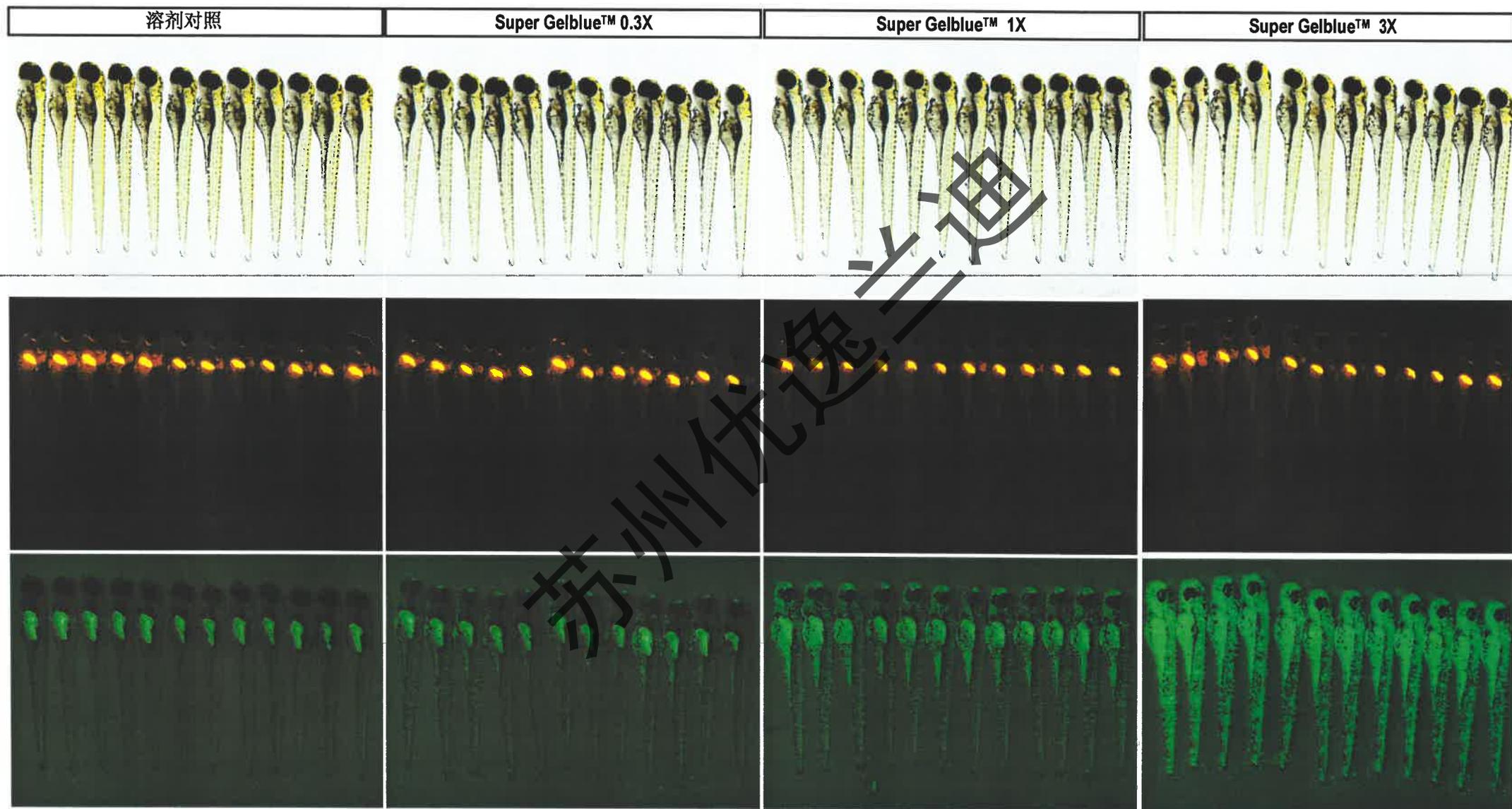
图(A-L) *Tg(fabp10a:dsRed;ela3l:EGFP)* 受精后4-dpf的斑马鱼胚胎明视场和荧光图。溶剂对照组，Super Gelblue™ 3个浓度处理组(0.3X, 1X and 3X)。

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。



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)