



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102023207 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 20

(21) 申请号 201010547814. 9

(22) 申请日 2010. 11. 17

(71) 申请人 彭恩泽

地址 311231 浙江省杭州市萧山经济技术开  
发区传化大地

(72) 发明人 彭恩泽

(74) 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公  
司 33212

代理人 唐银益

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

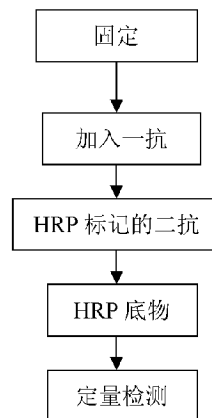
权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图 4 页

## (54) 发明名称

在整体斑马鱼上进行酶联免疫吸附检测的方法及其应用

## (57) 摘要

本发明涉及一种在整体斑马鱼上进行酶联免疫吸附检测的方法,以及此方法在鉴别基因毒性化合物、筛选抗肿瘤药物、修复 DNA 损伤的药物中的应用。该发明一方面可用于评价化合物的基因毒性,包括环境化合物、药物,化妆品、食品添加剂等,另一方面可用于筛选新药,如筛选抗肿瘤药、抗氧化剂、抗衰老、抗神经退行性疾病等药物。本发明对于诊断和治疗某些疾病,对于新药研发和化合物毒性筛选具有非常重要的指导意义。应用斑马鱼评价化合物毒性和筛选新药,既具有花费少、样品用量少、操作可实现自动化等优点,又能够提供活体动物的体内生理环境,因此能够实现评价和筛选工作简便、快速、经济、高效、高通量的目的。



1. 一种在整体斑马鱼上进行酶联免疫吸附检测的方法，其特征在于，步骤如下：

1) 固定：

整体斑马鱼在含有固定液的微孔板中固定，时间为 15-17 小时；

2) 水化：

2.1) 将斑马鱼在 20-25℃ 室温下放置 5-10 分钟；

2.2) 在不同浓度的甲醇 - 含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化，步骤如下：

① 20-25℃ 室温下，在 10-20ml 的 75% 甲醇 / 25% 含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化，时长为 5-10 分钟；

② 20-25℃ 室温下，在 10-20ml 的 50% 甲醇 / 50% 含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化，时长为 5-10 分钟；

③ 20-25℃ 室温下，在 10-20ml 的 25% 甲醇 / 75% 含 0.1% tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化，时长为 5-10 分钟；

④ 20-25℃ 室温下，在 10-20ml 含 0.1% tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化，时长为 5-10 分钟；

3) 增加通透性：

3.1) 加入蛋白酶 K，在 35-37℃ 下温浴 10-15 分钟；

3.2) 用含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液清洗 2 次，每次 5-10 分钟；

4) 20-25℃ 室温下，用阻断 (blocking) 内源性过氧化物酶溶液 (含 5% 羊血清，1% 牛血清白蛋白，1% 二甲基亚砷的 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液) 处理 1-1.5 小时；

5) 将斑马鱼与抗单链 DNA 损伤抗体温浴，温度 4-6℃，温浴时间 15-17 小时；

6) 用含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液清洗斑马鱼，至少 4 次，每次 10-15 分钟；

7) 加入稀释好的辣根过氧化物酶 (HRP) 标二抗，20-25℃ 室温下孵育 2-3 小时；

8) 用磷酸缓冲液 (PBS, NaCl 8g, KCL 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(12H<sub>2</sub>O) 1.44g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g, 加蒸馏水至 1000ml, PH7.0) 溶液洗 3 次，每次 10-15 分钟；

9) 将斑马鱼转移到另一孔微孔板中，每个微孔放入 1 尾斑马鱼；

10) 加入染色底物化学发光试剂辣根过氧化物酶底物 (PS-atto)，孵育 20-30 分钟；

11) 利用酶标仪读取各个微孔的化学光 (chemiluminescence) 强度值。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的微孔板可以是 6 孔微孔板或 12 孔微孔板或 24 孔微孔板或 48 孔微孔板或 96 孔微孔板或 384 孔微孔板。

3. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述的固定液可以是 4% 多聚甲醛、邓氏固定液 (Dent' s fixation, 甲醇 / 二甲基亚砷 = 4 : 1)、生物组织固定剂 (Dietrich' s solution)、布安氏固定液 (Bouin' s fixtion, 苦味酸饱和水溶液 75ml, 10% 福尔马林液 25ml, 冰醋酸 5ml)。

4. 根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述的染色底物还可以是显色底物或者荧光底物。

5. 一种定量检测基因毒性化合物或者筛选抗肿瘤药物的方法，其特征在于，步骤如下：

步骤一，胚胎采集：

取成年斑马鱼种鱼，配对交配，采集斑马鱼，吸出沉淀物质，放入温度在 20-30℃ 的培养箱中孵化；

步骤二，将受精后 6-72 小时的斑马鱼置于微孔板中，在 20-30℃ 的水温中进行待测化合物处理，处理时间可以是 24-72 小时；

步骤三，对整体斑马鱼进行酶联免疫吸附检测；

步骤四，定量分析：

DNA 损伤率计算公式为，

$$\text{DNA 损伤率}\% = \left( \frac{\text{化合物处理组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}}{\text{溶剂组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}} - 1 \right) \times 100\%。$$

6. 根据权利要求 5 所述的定量检测基因毒性化合物的方法，其特征在于，所述的步骤一中，在斑马鱼卵受精后 6-8 小时和 24-26 小时，取出死亡的胚胎。

7. 一种筛选修复 DNA 损伤药物的方法，其特征在于，步骤如下：

步骤一，胚胎采集：

取成年斑马鱼种鱼，配对交配，采集斑马鱼，吸出沉淀物质，放入温度在 20-30℃ 的培养箱中孵化；

步骤二，将受精后 6-72 小时斑马鱼置于微孔板中，在 20-30℃ 的水温中进行 50 μ M 星孢菌素 (staurosporine) 加待测药物处理，处理时间可以是 24-72 小时；

步骤三，对整体斑马鱼进行酶联免疫吸附检测；

步骤四，定量分析：

DNA 损伤率计算公式为，

$$\text{DNA 损伤修复率}\% = \left( 1 - \frac{\text{联合用药处理组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}}{\text{模型组组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}} \right) \times 100\%$$

8. 根据权利要求 7 所述的筛选修复 DNA 损伤药物的方法，其特征在于，所述的步骤一中，在斑马鱼卵受精后 6-8 小时和 24-26 小时，取出死亡的胚胎。

## 在整体斑马鱼上进行酶联免疫吸附检测的方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种酶联免疫吸附法，更具体地说，涉及一种在整体斑马鱼上进行酶联免疫吸附检测的方法，以及此方法在鉴别基因毒性化合物、筛选抗肿瘤药物、修复 DNA 损伤的药物中的应用。

### 背景技术

[0002] 基因毒性是指直接或间接的细胞 DNA 损伤。DNA 是细胞内具有遗传信息传递作用的一种重要的生物大分子，是生物化学与分子生物学的重要研究对象。DNA 分子由反平行的两条多聚核苷酸链经由碱基配对原则构成双螺旋结构，其所携带的遗传信息由多核苷酸链上的碱基的种类、数量以及排列次序决定，碱基序列深藏于 DNA 双螺旋的内部，两条多核苷酸链组成的双螺旋结构形成了稳定的 DNA 分子并使其能够正确传递遗传信息 (Phillips DH, Arlt VM. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. EXS., 2009, 99: 87-110.)。然而外界的各种理化及生物因子都可能引起 DNA 损伤。这些损伤的形式有单链 DNA 链损伤，双链 DNA 损伤、嘧啶二聚体的形成、DNA 加合物、点突变、DNA 交联等 (马云彤, 齐浩, 罗明志, 细胞 DNA 单链断裂检测技术. 西安文理学院学报, 2005, 8(3): 22-25.)。

[0003] 随着工农业的发展与人民生活水平的提高，日常生活中可以造成 DNA 损伤的化学物质越来越多，如生物生化药物、工业化学产品、农业化学产品 (如农药、除草剂)、纯天然 (植物) 产品、食品添加剂、营养保健品、护肤美容产品、工业三废。如果各种化学物质造成的 DNA 损伤发生在生殖细胞，则可能会影响生殖细胞遗传稳定性，并可能对后代产生影响，例如引起流产、死胎、畸形和某些遗传疾病。如果 DNA 损伤发生在体细胞中，则有可能造成疾病包括癌症，威胁人类健康 (柴国林, 朱卫国, DNA 的损伤与修复, 中华肿瘤杂志, 2005, 27(10): 557-580.)。同时对于基因毒性研究 (Genotoxicity Study) 也是药物非临床安全性评价的重要内容，它与其他毒理学研究尤其是致突变和致癌性研究、生殖毒性研究有着密切的联系，是药物进入临床试验及上市前必需的毒性检测资料。

[0004] 癌症是严重危害人类健康的主要疾病之一，攻克癌症一直是世界瞩目的研究课题。世界卫生组织调查表明癌症患者正在逐年增加，我国癌症年发病人数在 120 万左右，每年死于癌症的人数高达 90 万人以上，现已成为仅次于心血管病的第二大杀手 (刘峰, 魏新庭, 王冬冬, 孙德志, 李林尉, 抗癌药物的研究现状, 聊城大学学报 2006, 19: 39-43.)。利用基因毒性化合物可以造成癌细胞 DNA 损伤的性质，基因毒性化合物有可能用于癌症的治疗。

[0005] 当细胞受到 DNA 损伤的刺激时，基因组的完整性面临威胁，将产生一系列生物学效应。DNA 损伤无法修复时，将诱导细胞凋亡。细胞凋亡是在生理条件下细胞基因编码引导的细胞程序性死亡，所以又称为细胞程序死亡。它保证细胞增殖及细胞死亡之间平衡，是正常生理过程的一部分，是由基因控制的细胞自我消亡过程。细胞凋亡在胚

胎发育、造血、免疫系统的成熟以及维持正常组织和器官的细胞数目恒定与生长平衡，甚至人体衰老及疾病发生中都起着重要的作用。由于凋亡存在缺陷，细胞死亡程序异常表达，或者凋亡细胞死亡程序执行有缺陷以及凋亡受到促进，都与疾病发病有关。包括肿瘤、神经退行性疾病。因而我们可以通过筛选基因毒性药物，调控细胞凋亡。同样，筛选 DNA 修复剂，对疾病防治和抗衰老具有重大的现实意义（蒋雪，杨宏莉，细胞凋亡及其在肿瘤发生发展和治疗中的作用，临床荟萃，1997，12(17)：774-776.）。

[0006] 利用检测 DNA 单链损伤的方法是筛选基因毒性化合物的有效方法（柴国林，朱卫国，DNA 的损伤与修复，中华肿瘤杂志，2005，27(10)：557-580.），因为在哺乳动物细胞中 DNA 单链损伤是发生频率最高的 DNA 损伤类型。

[0007] 当前鉴别 DNA 单链损伤的方法，主要是单细胞凝胶电泳（彗星实验）和微核试验，也是目前最主要的筛选基因毒性化合物方法。

[0008] 单细胞凝胶电泳（single cell gel electrophoresis assay，简称 SCGE，又名彗星试验，comet assay）是一个广泛用于真核生物基因毒性检测的手段。该技术是由 Ostling 于 1984 年首创，又由 Singh 和 Olive 分别加以改进，形成了目前的碱性和中性裂解二类方法。其基本原理是：在中性或碱性条件下，包埋在琼脂凝胶中的细胞裂解，DNA 解螺旋后进行电泳，如细胞未受损伤，DNA 断片较少，片段较大，电泳时 DNA 因其分子质量大而停留在核基质中，经荧光染色后呈圆形的荧光团无拖尾现象；若细胞受损，DNA 断片较多，在碱性条件下 DNA 解螺旋变为单链，电泳时因 DNA 分子量小可以进入凝胶中，向阳极伸展，荧光显微镜下呈一个亮的头部和尾部，形似彗星，故又称彗星试验（Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnstrom G, The comet assay: mechanisms and technical considerations, Mutation Research, 1996, 363(2)：89-96.）。细胞和 DNA 受损越严重，产生的断片越多并且片段越小，电泳时迁移的 DNA 量也就越大，迁移距离越长，荧光显微镜下可观察尾长增加、尾部荧光强度增强，通过测定迁移部份的光密度和迁移长度就可测定单个细胞的 DNA 损伤程度。其操作过程包括：胶板制备、细胞裂解、电泳、中和、染色、镜检、分析（李宏，微核试验的研究进展，安徽农业科学，2009，37(7)：2864-2866.）。

[0009] 另一种方法是微核试验，它是以动植物为材料，利用细胞生物学方法观察其出现的微核率来表示材料受遗传损伤程度的一种检测基因毒物的方法。微核（micronucleus，MN）是指位于生物细胞的细胞质中独立于主核，直径小于主核 1/20 ~ 1/3，完全与主核分开的圆形或椭圆形的微小核。它可以是整条染色体，也可以是染色体断片，染色性与主核一致，其中部分微核具有 DNA 复制能力。微核是由于外界损害因素使染色体发生断裂，细胞进入下一次分裂时，染色体不能随有丝分裂进入子细胞，而导致染色体丢失或断裂，从而形成一个或数个小核。微核率是指生物材料经细胞生物学方法制片后，在显微镜下观测 1000 个细胞当中微核细胞所占的比率，也可以是以每个细胞当中含微核数的平均值来计算。具体操作步骤包括：涂片、固定、染色、封片、观察与计数、分析（王兰，刘心荣，单细胞凝胶电泳技术的应用和发展，中国卫生检验杂志，2008，12(18)：2829-2831.）。

[0010] 这两种方法可以在体外水平上检测基因毒性，任何真核细胞都能用于体外基因毒性研究，最常用的细胞是人外周血淋巴细胞，鼠外周血淋巴细胞和骨髓红细胞。但是

在体外试验中由于细胞不是在体内环境中，没有药物的吸收、分布、代谢、排泄过程，试验的结果并不能反映药物体内的真实情况，并且这些试验中假阳性结果很普遍，特别是微核试验，该方法简单，但可信度较低。微核检测将细胞制成图片，固定染色后用显微镜计数 1000 多个染红细胞的微核数，技术工作量极大，人为影响因素多，且容易出现微核误判，操作过程复杂，重复性差。

[0011] 这两个试验也可以通过体内试验鉴别化合物基因毒性，最常用的动物模型是啮齿动物，大多数体内实验通过药物直接处理实验动物，然后取动物的组织或者血液，制成单细胞悬液，然后在进行单细胞凝胶电泳或者微核试验。这种类型的体内试验实际上是体内试验（化合物处理）与体外试验（动物细胞基因毒性分析）相结合的办法，通常实验周期长，操作复杂，价格昂贵，特异性差，而且不可以进行高通量筛选，假阳性结果高。

[0012] 而后出现了利用斑马鱼检测化合物的基因毒性的方法，主要有如下几种方法：

[0013] 1) 体内实验：通过化合物处理斑马鱼、幼鱼或者成鱼，然后将斑马鱼幼鱼、胚胎碾碎或者取成年斑马鱼的组织或者血液，制成单细胞悬液，通过胶板制备、细胞裂解、电泳、中和、染色、镜检、分析，利用彗星实验鉴别化合物的基因毒性 (Jarvis RB, Knowles JF, DNA damage in zebrafish larvae induced by exposure to low-dose rate  $\gamma$ -radiation: detection by the alkaline comet assay, Mutation Research, 2003, 541: 63-69.)。或者是将斑马鱼幼鱼、胚胎碾碎或者取成年斑马鱼的组织或者血液，固定后，吉姆萨染色，观察细胞中出现微核的概率 (Oliveira R, Domingues I, Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. Environ. Sci. Pollut. Res., 2009, 16: 679-688.)。但是这两种方法操作复杂，容易产生假阳性结果，不能进行高通量筛选。

[0014] 2) 体外实验：将斑马鱼的肝脏细胞进行原代培养，利用待测化合物处理细胞一段时间，通过彗星实验鉴别基因毒性 (Sun LW, Qu MM, Li YQ, et al, Toxic Effects of Aminophenols on Aquatic Life Using the Zebrafish Embryo Test and the Comet Assay. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 2004, 73: 628-634.)，虽然该方法试验周期短，可以进行高通量筛选，但是操作复杂、假阳性结果多，更重要的是细胞在体外没有药物的吸收、分布、代谢、排泄过程，试验的结果并不能反映化合物在体内的真实情况。

[0015] 与单细胞凝胶电泳和彗星实验相比，上述方法具有成本低、用药量少、操作较简单等优点，但仍存在实验周期长、操作仍然较为复杂、特异性差，而且不可以进行高通量筛选，假阳性结果高。

## 发明内容

[0016] 本发明的目的是解决以上提出的问题，提供一种成本低、用药量少、操作较简单、实验周期短、可以进行高通量筛选、预测性强、敏感度高、假阳性率低的一种在整体斑马鱼上进行酶联免疫吸附检测的方法，以及此方法在鉴别基因毒性化合物及筛选抗肿瘤药物、修复 DNA 损伤药物中的应用。

[0017] 本发明的技术方案是这样的：

[0018] 一种在整体斑马鱼上进行酶联免疫吸附检测的方法，步骤如下：

[0019] 1) 固定：

- [0020] 整体斑马鱼在含有固定液的微孔板中固定，时间为 15-17 小时；
- [0021] 2) 水化：
- [0022] 2.1) 将斑马鱼在 20-25℃ 室温下放置 5-10 分钟；
- [0023] 2.2) 在不同浓度的甲醇 - 含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化，步骤如下：
- [0024] ① 20-25℃ 室温下，在 10-20ml 的 75% 甲醇 / 25% 含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化，时长为 5-10 分钟；
- [0025] ② 20-25℃ 室温下，在 10-20ml 的 50% 甲醇 / 50% 含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化，时长为 5-10 分钟；
- [0026] ③ 20-25℃ 室温下，在 10-20ml 的 25% 甲醇 / 75% 含 0.1% tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化，时长为 5-10 分钟；
- [0027] ④ 20-25℃ 室温下，在 10-20ml 含 0.1% tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化，时长为 5-10 分钟；
- [0028] 3) 增加通透性：
- [0029] 3.1) 加入蛋白酶 K，在 35-37℃ 下温浴 10-15 分钟；
- [0030] 3.2) 用含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液清洗 2 次，每次 5-10 分钟；
- [0031] 4) 20-25℃ 室温下，用阻断 (blocking) 内源性过氧化物酶溶液 (含 5% 羊血清，1% 牛血清白蛋白，1% 二甲基亚砷的 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液) 处理 1-1.5 小时；
- [0032] 5) 将斑马鱼与抗单链 DNA 损伤抗体温浴，温度 4-6℃，温浴时间 15-17 小时；
- [0033] 6) 用含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液清洗斑马鱼，至少 4 次，每次 10-15 分钟；
- [0034] 7) 加入稀释好的辣根过氧化物酶 (HRP) 标二抗，20-25℃ 室温下孵育 2-3 小时；
- [0035] 8) 用磷酸缓冲液 (PBS, NaCl 8g, KCL 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(12H<sub>2</sub>O) 1.44g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g, 加蒸馏水至 1000ml, PH7.0) 溶液洗 3 次，每次 10-15 分钟；
- [0036] 9) 将斑马鱼转移到另一孔微孔板中，每个微孔放入 1 尾斑马鱼；
- [0037] 10) 加入染色底物化学发光试剂辣根过氧化物酶底物 (PS-atto)，孵育 20-30 分钟；
- [0038] 11) 利用酶标仪读取各个微孔的化学光 (chemiluminescence) 强度值。
- [0039] 作为优选，所述的微孔板可以是 6 孔微孔板或 12 孔微孔板或 24 孔微孔板或 48 孔微孔板或 96 孔微孔板或 384 孔微孔板。
- [0040] 作为优选，所述的固定液可以是 4% 多聚甲醛、邓氏固定液 (Dent' s fixation, 甲醇 / 二甲基亚砷 = 4 : 1)、生物组织固定剂 (Dietrich' s solution)、布安氏固定液 (Bouin' s fixtion, 苦味酸饱和水溶液 75ml, 10% 福尔马林液 25ml, 冰醋酸 5ml)。
- [0041] 作为优选，所述的染色底物还可以是显色底物或者荧光底物。
- [0042] 一种定量检测基因毒性化合物或者筛选抗肿瘤药物的方法，步骤如下：
- [0043] 步骤一，胚胎采集：
- [0044] 取成年斑马鱼种鱼，配对交配，采集斑马鱼，吸出沉淀物质，放入温度在 20-30℃ 的培养箱中孵化；

[0045] 步骤二，将受精后 6-72 小时的斑马鱼置于微孔板中，在 20-30℃ 的水温中进行待测化合物处理，处理时间可以是 24-72 小时；

[0046] 步骤三，对整体斑马鱼进行酶联免疫吸附检测；

[0047] 步骤四，定量分析；

[0048] DNA 损伤率计算公式为，

[0049]

$$\text{DNA 损伤率}\% = \left( \frac{\text{化合物处理组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}}{\text{溶剂组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}} - 1 \right) \times 100\%。$$

[0050] 作为优选，所述的步骤一中，在斑马鱼卵受精后 6-8 小时和 24-26 小时，取出死亡的胚胎。

[0051] 一种筛选修复 DNA 损伤药物的方法，步骤如下：

[0052] 步骤一，胚胎采集；

[0053] 取成年斑马鱼种鱼，配对交配，采集斑马鱼，吸出沉淀物质，放入温度在 20-30℃ 的培养箱中孵化；

[0054] 步骤二，将受精后 6-72 小时斑马鱼置于微孔板中，在 20-30℃ 的水温中进行 50 μ M 星孢菌素 (staurosporine) 加待测药物处理，处理时间可以是 24-72 小时；

[0055] 步骤三，对整体斑马鱼进行酶联免疫吸附检测；

[0056] 步骤四，定量分析；

[0057] DNA 损伤率计算公式为，

[0058]

$$\text{DNA 损伤修复率}\% = \left( 1 - \frac{\text{联合用药处理组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}}{\text{模型组组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}} \right) \times 100\%$$

[0059] 作为优选，所述的步骤一中，在斑马鱼卵受精后 6-8 小时和 24-26 小时，取出死亡的胚胎。

[0060] 本发明的有益效果如下：

[0061] 1. 整体水平上的鉴别基因毒性的方法——可以在斑马鱼个体、器官、组织水平上检测化合物的基因毒性，这是以往的方法所不具备的。以往的方法都是在单个细胞水平上鉴别化合物的基因毒性，因而不能够在组织、器官（如眼睛）水平上评价基因毒性，同时也失去了评价其他潜在靶器官（如心脏、脑、肝脏、肾脏、肠、生殖腺、皮肤等）基因毒性的机会。

[0062] 2. 活体内——实验材料为活体斑马鱼，作为一种脊椎动物，其筛选模型属体内模型，能够真实反映药物在体内的吸收、分布、代谢与排泄，真正反映药物的整体生物活性。

[0063] 3. 高通量——斑马鱼体积小，斑马鱼幼鱼体长只有 1-4mm，可能在一个标准的 6, 12, 24, 48, 96 或 384 孔板内进行分析和实验周期短使斑马鱼成为一种能进行高通量全自动化实验的理想体内筛选模型。而啮齿动物体长在 10-30cm 左右。

[0064] 4. 实验周期短——可在 2~3 天内完成；而小鼠常需要数周到数月的时间，灵长类动物常需要数月至数年的时间。斑马鱼在第一个 72 小时以内完成胚胎发育。多数的内部器官，包括心血管系统、肠、肝脏和肾，在 24-48 小时内快速成型，传统的实验载

体小鼠和猴子则分别需要 21 天和 9 个月方可完成胚胎发育。

[0065] 5. 实验费用低——以灵长类动物为实验载体的筛选实验每只每天耗费大于 10 美元，以啮齿动物为实验载体的筛选实验每只每天耗费大于 1 美元，而以斑马鱼为实验载体的筛选实验每只每天耗费小于 0.01 美元。

[0066] 6. 化合物用量少——所需测试化合物的用量仅为几 mg，而传统的以啮齿动物为代表的筛选实验则需几 g 以上的化合物。

[0067] 7. 预测性高——斑马鱼为脊椎类动物，与哺乳动物生物结构与功能高度相似，斑马鱼的基因与人类基因的相似度高达 70-80%，斑马鱼的生理和新陈代谢系统的构成与哺乳类动物极为相似，斑马鱼鉴别基因毒性实验结果的可比性与哺乳类动物相比可达 80% 以上。

[0068] 8. 简便——实验过程操作简单，斑马鱼经药物处理、染色后便可置于多功能微孔板分析仪及荧光显微镜下进行定量与定性分析，而传统实验操作过程复杂，容易产生假阳性结果。

[0069] 9. 给药方式简单安全——斑马鱼可以在 50L-10mL 的培养液中存活一周，因而将化合物直接加入斑马鱼培养液中，方便药物传递和加快分析过程。啮齿动物中的给药方式主要是灌胃法。但是该方法效率低下，易造成消化道损伤或误入气道致死。

[0070] 10. 重复性好，特异性高——利用抗原抗体反应检测化合物的基因毒性特异性在 95% 以上。经过多次实验，实验结果稳定。

[0071] 11. 敏感性好——本发明利用抗原抗体反应，将反应信号逐级放大。

[0072] 12. 应用前景好——本发明在整体斑马鱼上进行酶联免疫吸附检测的方法鉴别基因毒性化合物的应用，必将大大提高基因毒性化合物的筛选速度。对环境中基金毒性化合物的鉴别、新药的基因毒性的鉴定以及发展新型抗肿瘤药物和 DNA 损伤修复药物具有重大意义。

## 附图说明

[0073] 图 1 是本发明的步骤流程图；

[0074] 图 2 是斑马鱼不同发育阶段 DNA 损伤率对比图；

[0075] 图 3 是星孢菌素处理不同时间 DNA 损伤率对比图；

[0076] 图 4 是顺铂处理后 DNA 损伤率对比图，其中 50  $\mu$  M 星孢菌素处理组作为阳性对照；

[0077] 图 5 是苯并 (a) 芘处理后 DNA 损伤率对比图，其中 50  $\mu$  M 星孢菌素处理组作为阳性对照；

[0078] 图 6 是卡铂处理后 DNA 损伤率对比图，其中 50  $\mu$  M 星孢菌素处理组作为阳性对照；

[0079] 图 7 是二甲氧基姜黄素 DNA 损伤修复率对比图，其中 50  $\mu$  M 星孢菌素 +DNA 损伤修复剂硒代蛋氨酸 (seleno-L-methionine) 组作为阳性对照，阳性对照组 DNA 损伤修复率为 (29.8 $\pm$ 0.80)%；

[0080] 图 8 是顺铂处理后 DNA 损伤率对比图，其中 50  $\mu$  M 星孢菌素处理组作为阳性对照；

[0081] 图 2、3、4、5、6、8 中的 \* 表示实验处理组与对照组相比存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

### 具体实施方式

[0082] 下面结合附图对本发明的实施例进行进一步详细说明：

[0083] 图 1 所示的在整体斑马鱼上进行酶联免疫吸附检测的方法，步骤如下：

[0084] 1) 固定：

[0085] 整体斑马鱼在含有固定液的微孔板中固定，时间为 15-17 小时；

[0086] 2) 水化：

[0087] 2.1) 将斑马鱼在 20-25℃ 室温下放置 5 分钟；

[0088] 2.2) 在不同浓度的甲醇 - 含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化，步骤如下：

[0089] ① 20-25℃ 室温下，在 10-20ml 的 75% 甲醇 / 25% 含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化，时长为 5-10 分钟；

[0090] ② 20-25℃ 室温下，在 10-20ml 的 50% 甲醇 / 50% 含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化，时长为 5-10 分钟；

[0091] ③ 20-25℃ 室温下，在 10-20ml 的 25% 甲醇 / 75% 含 0.1% tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化，时长为 5-10 分钟；

[0092] ④ 20-25℃ 室温下，在 10-20ml 含 0.1% tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化，时长为 5-10 分钟；

[0093] 3) 增加通透性：

[0094] 3.1) 加入蛋白酶 K，在 35-37℃ 下温浴 10-15 分钟；

[0095] 3.2) 用含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液清洗 2 次，每次 5-10 分钟；

[0096] 4) 20-25℃ 室温下，用阻断 (blocking) 内源性过氧化物酶溶液 (含 5% 羊血清，1% 牛血清白蛋白，1% 二甲基亚砷的 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液) 处理 1-1.5 小时；

[0097] 5) 将斑马鱼与抗单链 DNA 损伤抗体温浴，温度 4-6℃，温浴时间 15-17 小时；

[0098] 6) 用含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液清洗斑马鱼，至少 4 次，10-15 分钟；

[0099] 7) 加入稀释好的辣根过氧化物酶 (HRP) 标二抗，20-25℃ 室温下孵育 2 小时；

[0100] 8) 用磷酸缓冲液 (PBS, NaCl 8g, KCL 0.2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4(12\text{H}_2\text{O}) 1.44\text{g}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 0.24\text{g}$ , 加蒸馏水至 1000ml, PH7.0) 溶液洗 3 次，每次 10-15 分钟；

[0101] 9) 将斑马鱼转移到另一孔微孔板中，每个微孔放入 1 尾斑马鱼；

[0102] 10) 加入染色底物化学发光试剂辣根过氧化物酶底物 (PS-atto)，孵育 20-30 分钟；

[0103] 11) 利用酶标仪读取各个微孔的化学光 (chemiluminescence) 强度值。

[0104] 所述的微孔板可以是 6 孔微孔板或 12 孔微孔板或 24 孔微孔板或 48 孔微孔板或 96 孔微孔板或 384 孔微孔板。

[0105] 所述的固定液可以是 4% 多聚甲醛、邓氏固定液 (Dent' s fixation, 甲醇 / 二甲基亚砷 = 4 : 1)、生物组织固定剂 (Dietrich' s solution)、布安氏固定液 (Bouin' s fixation,

苦味酸饱和水溶液 75ml, 10%福尔马林液 25ml, 冰醋酸 5ml); 所述的染色底物还可以是显色底物或者荧光底物。

[0106] 一种定量鉴别基因毒性化合物或者筛选抗肿瘤药物的方法, 步骤如下:

[0107] 步骤一, 胚胎采集:

[0108] 取成年斑马鱼种鱼, 配对交配, 采集斑马鱼, 吸出沉淀物质, 放入温度在 20-30°C 的培养箱中孵化;

[0109] 步骤二, 将受精后 6-72 小时的斑马鱼置于微孔板中, 在 20-30°C 的水温中进行待测化合物处理, 处理时间可以是 24-72 小时;

[0110] 步骤三, 对整体斑马鱼进行酶联免疫吸附检测:

[0111] 1) 固定:

[0112] 整体斑马鱼在含有固定液的微孔板中固定, 时间为 15-17 小时;

[0113] 2) 水化:

[0114] 2.1) 将斑马鱼在 20-25°C 室温下放置 5-10 分钟;

[0115] 2.2) 在不同浓度的甲醇-含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化, 步骤如下:

[0116] ① 20-25°C 室温下, 在 10-20ml 的 75% 甲醇 / 25% 含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化, 时长为 5-10 分钟;

[0117] ② 20-25°C 室温下, 在 10-20ml 的 50% 甲醇 / 50% 含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化, 时长为 5-10 分钟;

[0118] ③ 20-25°C 室温下, 在 10-20ml 的 25% 甲醇 / 75% 含 0.1% tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化, 时长为 5-10 分钟;

[0119] ④ 20-25°C 室温下, 在 10-20ml 含 0.1% tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化, 时长为 5-10 分钟;

[0120] 3) 增加通透性:

[0121] 3.1) 加入蛋白酶 K, 在 35-37°C 下温浴 10-15 分钟;

[0122] 3.2) 用含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液清洗 2 次, 每次 5-10 分钟;

[0123] 4) 20-25°C 室温下, 用阻断 (blocking) 内源性过氧化物酶溶液 (含 5% 羊血清, 1% 牛血清白蛋白, 1% 二甲基亚砷的 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液) 处理 1-1.5 小时;

[0124] 5) 将斑马鱼与抗单链 DNA 损伤抗体温浴, 温度 4-6°C, 温浴时间 15-17 小时;

[0125] 6) 用含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液清洗斑马鱼, 至少 4 次, 每次 10-15 分钟;

[0126] 7) 加入稀释好的辣根过氧化物酶 (HRP) 标二抗, 20-25°C 室温下孵育 2-3 小时, 标记为化合物处理组; 另取 0.1% 二甲基亚砷 (DMSO) 溶剂按步骤二处理的斑马鱼作为阴性对照组, 将该对照组分成两组, 一组加入稀释好的辣根过氧化物酶 (HRP) 标二抗, 在 20-25°C 室温下孵育 2-3 小时, 标记为溶剂组; 另一组不加入稀释好的辣根过氧化物酶 (HRP) 标二抗, 室温下孵育 2-3 小时, 标记为背景组;

[0127] 8) 用磷酸缓冲液 (PBS, NaCl 8g, KCL 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(12H<sub>2</sub>O) 1.44g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g, 加蒸馏水至 1000ml, PH7.0) 溶液洗 3 次, 每次 10-15 分钟, 然后使斑马鱼转移成微孔板中, 每孔 1 条斑马鱼;

- [0128] 9) 将斑马鱼转移到另一孔微孔板中，每个微孔放入 1 尾斑马鱼；
- [0129] 10) 加入染色底物化学发光试剂辣根过氧化物酶底物 (PS-atto)，孵育 20-30 分钟；
- [0130] 11) 利用酶标仪读取各个微孔的化学光 (chemiluminescence) 强度值；
- [0131] 步骤四，定量分析：
- [0132] 将微孔板置于酶标仪下检测化学发光强度，DNA 损伤率计算公式为：
- [0133]

$$\text{DNA 损伤率}\% = \left( \frac{\text{化合物处理组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}}{\text{溶剂组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}} - 1 \right) \times 100\%$$

- [0134] 步骤五，统计学分析：
- [0135] 1) 如果化合物的处理是单一浓度，那么用 T 检验与对照组比较，证实是否有显著性差异；
- [0136] 2) 如果多个浓度组，用方差分析 (ANOVA) 评价化合物的各浓度的平均强度是否存在显著性差异。
- [0137] 所述的步骤一中，在斑马鱼卵受精后 6-8 小时和 24-26 小时，取出死亡的胚胎。
- [0138] 所述的微孔板可以是 6 孔微孔板或 12 孔微孔板或 24 孔微孔板或 48 孔微孔板或 96 孔微孔板或 384 孔微孔板；所述的固定液可以是 4% 多聚甲醛、邓氏固定液 (Dent' s fixation, 甲醇 / 二甲基亚砜 = 4 : 1)、生物组织固定剂 (Dietrich' s solution)、布安氏固定液 (Bouin' s fixation, 苦味酸饱和水溶液 75ml, 10% 福尔马林液 25ml, 冰醋酸 5ml)；所述的染色底物还可以是显色底物或者荧光底物。
- [0139] 一种筛选修复 DNA 损伤药物的方法，步骤如下：
- [0140] 步骤一，胚胎采集：
- [0141] 取成年斑马鱼种鱼，配对交配，采集斑马鱼，吸出沉淀物质，放入温度在 20-30℃ 的培养箱中孵化；
- [0142] 步骤二，将受精后 6-72 小时斑马鱼置于微孔板中，在 20-30℃ 的水温中进行 50 μ M 星孢菌素 (staurosporine) 加待测药物处理，处理时间可以是 24-72 小时；
- [0143] 步骤三：对整体斑马鱼进行酶联免疫吸附检测：
- [0144] 1) 固定：
- [0145] 整体斑马鱼在含有固定液的微孔板中固定，时间为 15-17 小时；
- [0146] 2) 水化：
- [0147] 2.1) 将斑马鱼取出，在 20-25℃ 室温下放置 5-10 分钟；
- [0148] 2.2) 在不同浓度的甲醇 - 含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化，步骤如下：
- [0149] ① 20-25℃ 室温下，在 10-20ml 的 75% 甲醇 / 25% 含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化，时长为 5-10 分钟；
- [0150] ② 20-25℃ 室温下，在 10-20ml 的 50% 甲醇 / 50% 含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化，时长为 5-10 分钟；
- [0151] ③ 20-25℃ 室温下，在 10-20ml 的 25% 甲醇 / 75% 含 0.1% tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化，时长为 5-10 分钟；

[0152] ④ 20-25℃室温下，在 10-20ml 含 0.1% tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液中水化，时长为 5-10 分钟；

[0153] 3) 增加通透性：

[0154] 3.1) 加入蛋白酶 K，在 35-37℃ 下温浴 10-15 分钟；

[0155] 3.2) 用含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液清洗两次，每次 5-10 分钟；

[0156] 4) 20-25℃室温下，用阻断 (blocking) 内源性过氧化物酶溶液 (含 5% 羊血清，1% 牛血清白蛋白，1% 二甲基亚砷的 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液) 处理 1-1.5 小时；

[0157] 5) 将斑马鱼与抗单链 DNA 损伤抗体温浴，温度 4-6℃，温浴时间 15-17 小时；

[0158] 6) 用含 0.1% Tween-20 磷酸缓冲液 (PBST) 溶液清洗胚胎，至少 4 次，每次 10-15 分钟；

[0159] 7) 加入稀释好的辣根过氧化物酶 (HRP) 标二抗，室温下孵育 2-3 小时，标记为联合用药组；另取 50 μ M 星孢菌素 (staurosporine) 加 DNA 损伤修复剂按步骤二处理的斑马鱼作为对照组，将该对照组分成两组，一组加入稀释好的辣根过氧化物酶 (HRP) 标二抗，在 20-25℃室温下孵育 2-3 小时，标记为模型组；另一组不加入稀释好的辣根过氧化物酶 (HRP) 标二抗，室温下孵育 2-3 小时，标记为背景组；

[0160] 8) 用磷酸缓冲液 (PBS, NaCl 8g, KCL 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(12H<sub>2</sub>O) 1.44g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g, 加蒸馏水至 1000ml, PH7.0) 溶液洗 3 次，每次 10-15 分钟，然后使斑马鱼转移成微孔板中，每孔一条斑马鱼；

[0161] 9) 将斑马鱼转移到另一孔微孔板中，每个微孔放入 1 尾斑马鱼；

[0162] 10) 加入染色底物化学发光试剂辣根过氧化物酶底物 (PS-atto)，孵育 20-30 分钟；

[0163] 11) 利用酶标仪读取各个微孔的化学光 (chemiluminescence) 强度值；

[0164] 步骤四，定量分析：

[0165] 将微孔板置于酶标仪下检测化学发光强度，DNA 损伤修复率计算公式为：

[0166]

$$\text{DNA损伤修复率}\% = \left( 1 - \frac{\text{联合用药处理组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}}{\text{模型组组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}} \right) \times 100\%$$

[0167] 步骤五，统计学分析：

[0168] 1) 如果化合物的处理是单一浓度，那么用 T 检验与对照组比较，证实是否有显著性差异；

[0169] 2) 如果多个浓度组，用方差分析 (ANOVA) 评价化合物的各浓度的平均强度是否存在显著性差异。

[0170] 所述的步骤一中，在斑马鱼卵受精后 6-8 小时和 24-26 小时，取出死亡的胚胎。

[0171] 所述的微孔板可以是 6 孔微孔板或 12 孔微孔板或 24 孔微孔板或 48 孔微孔板或 96 孔微孔板或 384 孔微孔板；所述的固定液可以是 4% 多聚甲醛、邓氏固定液 (Dent' s fixation, 甲醇 / 二甲基亚砷 = 4 : 1)、生物组织固定剂 (Dietrich' s solution)、布安氏固定液 (Bouin' s fixation, 苦味酸饱和水溶液 75ml, 10% 福尔马林液 25ml, 冰醋酸 5ml)；所述的染色底物还可以是显色底物或者荧光底物。

[0172] 实施例 1 化合物处理时斑马鱼最佳发育阶段的测定

**[0173] 胚胎采集**

[0174] 清晨取 5 对斑马鱼，自由组合分成 5 组交配孵化胚胎，采集 1200 个斑马鱼，吸出沉淀物质，放入孵化液中，28℃培养箱中孵化。中间及时取出白色胚胎（已死）以防止水质变坏，由于在此期间斑马鱼通过卵黄取得养料，因此不需要其他的养料。

**[0175] 药物处理**

[0176] 将斑马鱼分成 7 个实验组，分别为斑马鱼受精后 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天实验组。每个实验组又分为三个组，空白组，0.1%二甲基亚砜 (DMSO) 阴性对照组以及实验处理组 (50 μM 星孢菌素 (staurosporine)，0.1%的二甲基亚砜 (DMSO) 溶解)，分别在斑马鱼受精后 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天开始处理一段时间。

**[0177] 斑马鱼抗单链 DNA 损伤抗体整体染色**

[0178] 首先将胚胎置于 4%的多聚甲醛中 4℃处理 15-17 小时，一般不超过 24 小时，利用蛋白酶 K 在 37℃下温浴，增加斑马鱼细胞膜、核膜的通透性，然后进行斑马鱼整体染色，小鼠抗单链 DNA 损伤抗体作为一抗。一抗反应后，将阴性对照组分成两组，其中一组与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠抗体 (二抗) 进行反应 (溶剂组)，另一组不与 HRP 标记的羊抗鼠抗体 (二抗) 反应 (背景组)。然后加入化学发光剂辣根过氧化物酶底物 (PS-atto) 作为底物，利用多功能微孔板分析仪读取各个微孔的化学光 (chemiluminescence) 强度值。

**[0179] 测定基因毒性**

[0180] 将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测化学发光强度。将试验重复 3 次取其平均值。DNA 损伤率计算公式为：

**[0181]**

$$\text{DNA损伤率}\% = \left( \frac{\text{星孢菌素处理组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}}{\text{溶剂组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}} - 1 \right) \times 100\%$$

[0182] 实验数据以  $\bar{x} \pm \text{SE}$  表示，多组间比较采用方差分析，两组间比较采用 T 检验进行统计学处理。

[0183] 比较统计学处理结果，将 p 值最小、DNA 损伤率最高的实验组作为活体斑马鱼药物最佳处理阶段。如图 2 所示，统计学处理结果显示：受精后 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天的斑马鱼 DNA 损伤率分别为 (6.3±1.37) %，(27.4±1.17) %，(25.3±1.67) %，(17.7±1.18) %，(15.3±1.74) %，(12.3±1.48) %，(11.9±1.34) %，结果表明斑马鱼在 2, 3dpf 时与对照组相比有显著性差异 (p < 0.05)，并且在 2dpf 时斑马鱼的 DNA 损伤率最高，因此 2dpf 是本实验中化合物处理时斑马鱼最佳发育阶段。

**[0184] 实施例 2 化合物处理最佳时间长度的测定****[0185] 胚胎采集**

[0186] 清晨取 5 对斑马鱼，自由组合分成 5 组交配孵化胚胎，采集 1200 个斑马鱼，吸出沉淀物质，放入孵化液中，28℃培养箱中孵化。中间及时取出白色胚胎（已死）以防止水质变坏，由于在此期间斑马鱼通过卵黄取得养料，因此不需要其他的养料。

**[0187] 药物处理**

[0188] 将斑马鱼分成五个实验组，每组包括空白组、处理组 (50 μM 星孢菌素 (staurosporine)，0.1%的二甲基亚砜 (DMSO) 溶解) 以及阴性对照组 (0.1%二甲基亚砜

(DMSO))。在斑马鱼受精后 2 天开始处理实验组，处理时间分别为 6 小时、12 小时、24 小时，48 小时，72 小时。

[0189] 斑马鱼抗单链 DNA 损伤抗体整体染色

[0190] 首先将胚胎置于 4% 的多聚甲醛中 4℃ 处理 15-17 小时，一般不超过 24 小时，利用蛋白酶 K 在 37℃ 下温浴，增加斑马鱼细胞膜、核膜的通透性，然后进行斑马鱼整体染色，小鼠抗单链 DNA 损伤抗体作为一抗。一抗反应后，将阴性对照组分成两组，其中一组与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠抗体 (二抗) 进行反应 (溶剂组)，另一组不与 HRP 标记的羊抗鼠抗体 (二抗) 反应 (背景组)。然后加入化学发光剂辣根过氧化物酶底物 (PS-atto) 作为底物，利用多功能微孔板分析仪读取各个微孔的化学光 (chemiluminescence) 强度值。

[0191] 测定基因毒性

[0192] 将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测化学发光强度。将试验重复 3 次取其平均值。DNA 损伤率计算公式为：

[0193]

$$\text{DNA 损伤率}\% = \left( \frac{\text{星孢菌素处理组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}}{\text{溶剂组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}} - 1 \right) \times 100\%$$

[0194] 实验数据以  $\bar{x} \pm \text{SE}$  表示，多组间比较采用方差分析，两组间比较采用 T 检验进行统计学处理。

[0195] 比较统计学处理结果，将 p 值最小、DNA 损伤率最高的实验组作为活体斑马鱼药物最佳处理时间长度。如图 3 所示，统计学处理结果显示：用星孢菌素处理斑马鱼 6 小时、12 小时、24 小时，48 小时，72 小时，斑马鱼 DNA 损伤率分别为 (4.3±1.37)%，(12.4±1.17)%，(28.4±1.67)%，(30.7±1.18)%，(31.3±1.14)%，结果表明斑马鱼在星孢菌素处理斑马鱼 24 小时、48 小时、72 小时与对照组相比有显著性差异 (p < 0.05)，星孢菌素处理斑马鱼 24 小时时斑马鱼的 DNA 损伤率最早出现显著性差异，因此选择最短处理时间 24h 作为化合物最佳处理时间。不同化合物最佳处理时间也不相同，需要具体化合物需具体分析，本发明按照 DNA 损伤诱导剂的最佳处理时间长度进行实验。

[0196] 实施例 3 药物基因毒性的检测

[0197] 胚胎采集

[0198] 清晨取 10 对斑马鱼，自由组合分成 10 组交配孵化胚胎，采集 1200 个斑马鱼，吸出沉淀物质，放入孵化液中，28℃ 培养箱中孵化。中间及时取出白色胚胎 (已死) 以防止水质变坏，由于在此期间斑马鱼通过卵黄取得养料，因此不需要其他的养料。

[0199] 药物处理

[0200] 将斑马鱼分成八个实验组，分别为 0.1, 1, 10, 100, 1000 μM 基因毒性药物顺铂 (cisplatin)，然后按上述浓度溶于孵化液中；空白组为不做任何处理，0.1% 二甲基亚砜 (DMSO) 阴性对照组，可以引起基因毒性的 50 μM 星孢菌素 (staurosporine) 阳性对照组。在 2dpf 开始处理，处理时间为 24 小时。

[0201] 斑马鱼抗单链 DNA 损伤抗体整体染色

[0202] 首先将胚胎置于 4% 的多聚甲醛中 4℃ 处理 15-17 小时，一般不超过 24 小时，利用蛋白酶 K 在 37℃ 下温浴，增加斑马鱼细胞膜、核膜的通透性，然后进行斑马鱼整

体染色，小鼠抗单链 DNA 损伤抗体作为一抗。一抗反应后，将阴性对照组分成两组，其中一组与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠抗体 (二抗) 进行反应 (溶剂组)，另一组不与 HRP 标记的羊抗鼠抗体 (二抗) 反应 (背景组)。然后加入化学发光剂辣根过氧化物酶底物 (PS-atto) 作为底物，利用多功能微孔板分析仪读取各个微孔的化学光 (chemiluminescence) 强度值。

[0203] 测定基因毒性

[0204] 将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测化学发光强度。将试验重复 3 次取其平均值。DNA 损伤率计算公式为：

[0205]

$$\text{DNA损伤率}\% = \left( \frac{\text{药物处理组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}}{\text{溶剂组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}} - 1 \right) \times 100\%$$

[0206] 实验数据以  $\bar{x} \pm \text{SE}$  表示，多组间比较采用方差分析，两组间比较采用 T 检验进行统计学处理。通过统计学处理结果可定量评价待测药物的基因毒性。如图 4 所示，在评价基因毒性药物顺铂 (cisplatin) 时，统计学处理结果所得阳性对照组 DNA 损伤率为  $(28.4 \pm 1.67)\%$ ，药物处理组 DNA 损伤率分别为  $(6.4 \pm 1.69)\%$ 、 $(19.5 \pm 1.07)\%$ 、 $(25.5 \pm 1.01)\%$ 、 $(36.9 \pm 51.36)\%$ 、 $(40.5 \pm 1.57)\%$ 。结果表明药物处理斑马鱼在 100、1000  $\mu\text{M}$  顺铂浓度组与对照组相比存在显著性差异 ( $p < 0.05$ )，并且药物在这两个浓度的 DNA 损伤率高于星孢菌素阳性对照组  $(28.4 \pm 1.67)\%$ ，因此我们可以得出该药物具有基因毒性。

[0207] 实施例 4 环境基因毒性化合物的检测

[0208] 胚胎采集

[0209] 清晨取 10 对斑马鱼，自由组合分成 10 组交配孵化胚胎，采集 1200 个斑马鱼，吸出沉淀物质，放入孵化液中，28℃ 培养箱中孵化。中间及时取出白色胚胎 (已死) 以防止水质变坏，由于在此期间斑马鱼通过卵黄取得养料，因此不需要其他的养料。

[0210] 药物处理

[0211] 将待测环境基因毒性化合物苯并 (a) 芘 (benzo (a) pyrene) 分为 5 个不同的处理组，分别为 0.1, 1, 10, 100, 1000  $\mu\text{M}$ ，然后按上述浓度溶于孵化液中；空白组为不做任何处理，0.1% 二甲基亚砜 (DMSO) 阴性对照组，可以引起基因毒性的 50  $\mu\text{M}$  星孢菌素 (staurosporine) 阳性对照组。在 2dpf 开始处理，处理时间为 24 小时。

[0212] 斑马鱼抗单链 DNA 损伤抗体整体染色

[0213] 首先将胚胎置于 4% 的多聚甲醛中 4℃ 处理 15-17 小时，一般不超过 24 小时，利用蛋白酶 K 在 37℃ 下温浴，增加斑马鱼细胞膜、核膜的通透性，然后进行斑马鱼整体染色，小鼠抗单链 DNA 损伤抗体作为一抗。一抗反应后，将阴性对照组分成两组，其中一组与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠抗体 (二抗) 进行反应 (溶剂组)，另一组不与 HRP 标记的羊抗鼠抗体 (二抗) 反应 (背景组)。然后加入化学发光剂辣根过氧化物酶底物 (PS-atto) 作为底物，利用多功能微孔板分析仪读取各个微孔的化学光 (chemiluminescence) 强度值。

[0214] 测定基因毒性

[0215] 将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测化学发光强度。将试验重复 3 次取其

平均值。DNA 损伤率计算公式为：

[0216]

$$\text{DNA损伤率}\% = \left( \frac{\text{化合物处理组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}}{\text{溶剂组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}} - 1 \right) \times 100\%$$

[0217] 实验数据以  $\bar{x} \pm \text{SE}$  表示，多组间比较采用方差分析，两组间比较采用 T 检验进行统计学处理。通过统计学处理结果可定量评价待测环境中化合物的基因毒性。如图 5 所示，在评价苯并 (a) 芘时，统计学处理结果所得阳性对照组 DNA 损伤率为  $(28.4 \pm 1.67)\%$ ，药物处理组 DNA 损伤率分别为  $(3.4 \pm 1.69)\%$ 、 $(10.5 \pm 1.07)\%$ 、 $(19.5 \pm 1.01)\%$ 、 $(26.9 \pm 1.36)\%$ 、 $(31.5 \pm 1.57)\%$ 。结果表明， $1000 \mu\text{M}$  的苯并 (a) 芘处理组与阴性对照组相比存在显著性差异 ( $p < 0.05$ )，可以得出我们实验所用的环境化合物具有基因毒性，可以对 DNA 造成损伤，从而证明环境化合物苯并 (a) 芘具有引起人类疾病如癌症的潜在能力。

[0218] 实施例 5 用于肿瘤治疗的基因毒性药物的筛选

[0219] 胚胎采集

[0220] 清晨取 10 对斑马鱼，自由组合分成 10 组交配孵化胚胎，采集 1200 个斑马鱼，吸出沉淀物质，放入孵化液中， $28^\circ\text{C}$  培养箱中孵化。中间及时取出白色胚胎（已死）以防止水质变坏，由于在此期间斑马鱼通过卵黄取得养料，因此不需要其他的养料。

[0221] 药物处理

[0222] 将卡铂 (carboplatin) 分为 5 个不同的处理组，分别为 0.1, 1, 10, 100,  $1000 \mu\text{M}$ ，然后按上述浓度溶于孵化液中；空白组为不做任何处理，0.1% 二甲基亚砜 (DMSO) 阴性对照组，可以引起基因毒性的  $50 \mu\text{M}$  星孢菌素 (staurosporine) 阳性对照组。在 2dpf 开始处理，处理时间为 24 小时。

[0223] 斑马鱼抗单链 DNA 损伤抗体整体染色

[0224] 首先将胚胎置于 4% 的多聚甲醛中  $4^\circ\text{C}$  处理 15-17 小时，一般不超过 24 小时，利用蛋白酶 K 在  $37^\circ\text{C}$  下温浴，增加斑马鱼细胞膜、核膜的通透性，然后进行斑马鱼整体染色，小鼠抗单链 DNA 损伤抗体作为一抗。一抗反应后，将阴性对照组分成两组，其中一组与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠抗体（二抗）进行反应（溶剂组），另一组不与 HRP 标记的羊抗鼠抗体（二抗）反应（背景组）。然后加入化学发光剂辣根过氧化物酶底物 (PS-atto) 作为底物，利用多功能微孔板分析仪读取各个微孔的化学光 (chemiluminescence) 强度值。

[0225] 测定基因毒性

[0226] 将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测化学发光强度。将试验重复 3 次取其平均值。DNA 损伤率计算公式为：

[0227]

$$\text{DNA损伤率}\% = \left( \frac{\text{化合物处理组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}}{\text{溶剂组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}} - 1 \right) \times 100\%$$

[0228] 实验数据以  $\bar{x} \pm \text{SE}$  表示，多组间比较采用方差分析，两组间比较采用 T 检验进行统计学处理。通过统计学处理结果可定量评价筛选用于肿瘤治疗的基因毒性药物。如图 6 所示在评价卡铂 (carboplatin) 时，统计学处理结果所得阳性对照组 DNA 损伤率

为 (28.4±1.67) %，药物处理组 DNA 损伤率分别为 (5.4±1.69) %、(17.5±1.07) %、(28.5±1.01) %、(35.9±1.36) %、(43.5±1.57) %。结果表明该药物在 10, 100, 1000 μ M 引起的基因毒性与对照组相比存在显著性差异 (p < 0.05)。由此可以得出该药物具有基因毒性，并可能由此诱发肿瘤细胞的凋亡 (死亡)。

[0229] 实施例 6 修复 DNA 损伤药物的筛选

[0230] 胚胎采集

[0231] 清晨取 10 对斑马鱼，自由组合分成 10 组交配孵化胚胎，采集 1200 个斑马鱼，吸出沉淀物质，放入孵化液中，28℃培养箱中孵化。中间及时取出白色胚胎 (已死) 以防止水质变坏，由于在此期间斑马鱼通过卵黄取得养料，因此不需要其他的养料。

[0232] 药物处理

[0233] 设置 9 个实验组：5 个联合用药处理组、1 个 DNA 损伤诱导剂模型组、1 个阳性对照组、1 个溶剂对照组、1 个空白对照组。移除微孔板中孵化液，联合用药处理组中加入 50 μ M 星孢菌素 +0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1000 μ M 的待测化合物二甲氧基姜黄素 (dimethoxy Curcumin, 1, 7-bis(3, 4-dimethoxyphenyl)-1, 6-heptadiene-3, 5-dione)；DNA 损伤诱导剂模型组中加入 50 μ M 星孢菌素；阳性对照组中加入等体积浓度为 50 μ M 星孢菌素 +DNA 损伤修复剂硒代蛋氨酸 (seleno-L-methionine) (Smith ML, Kumar MA., Seleno-L-Methionine Modulation of Nucleotide Excision DNA Repair Relevant to Cancer Prevention and Chemotherapy. Mol Cell Pharmacol, 2009, 1(4) : 218-221)；溶剂对照组中加入等体积 0.1% 二甲基亚砷 (DMSO)。于 28℃ 恒温培养箱中培养 24h。

[0234] 另外，联合用药处理组也可采用以下两种方式处理：

[0235] 第一：加入一定体积 (根据微孔板规格而定) 终浓度为 50 μ M 星孢菌素或 6-24h 后，再加入 0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1000 μ M 的待测化合物硒代蛋氨酸 (seleno-L-methionine) 溶液；

[0236] 第二：首先加入 0.1 μ M、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1000 μ M 的待测化合物硒代蛋氨酸 (seleno-L-methionine) 溶液 6-24h 后，再加入终浓度为 50 μ M 星孢菌素。

[0237] 斑马鱼抗单链 DNA 损伤抗体整体染色

[0238] 首先将胚胎置于 4% 的多聚甲醛中 4℃ 处理 15-17 小时，一般不超过 24 小时，利用蛋白酶 K 在 37℃ 下温浴，增加斑马鱼细胞膜、核膜的通透性，然后进行斑马鱼整体染色，小鼠抗单链 DNA 损伤抗体作为一抗。一抗反应后，将阴性对照组分成两组，其中一组与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠抗体 (二抗) 进行反应 (溶剂组)，另一组不与 HRP 标记的羊抗鼠抗体 (二抗) 反应 (背景组)。然后加入化学发光剂辣根过氧化物酶底物 (PS-atto) 作为底物，利用多功能微孔板分析仪读取各个微孔的化学光 (chemiluminescence) 强度值。

[0239] 测定基因毒性

[0240] 将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测化学发光强度。将试验重复 3 次取其平均值。DNA 损伤率计算公式为：

[0241]

$$\text{DNA 损伤修复率} \% = \left( 1 - \frac{\text{联合用药处理组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}}{\text{模型组组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}} \right) \times 100\%$$

[0242] 实验数据以 $\bar{x} \pm SE$ 表示，多组间比较采用方差分析，两组间比较采用 T 检验进行统计学处理。通过统计学处理结果可定量筛选可以修复 DNA 损伤的药物。例如：如图 7 所示，在筛选 DNA 损伤修复剂二甲氧基姜黄素 (dimethoxy Curcumin, 1, 7-bis(3, 4-dimethoxyphenyl)-1, 6-heptadiene-3, 5-dione) 时，统计学处理结果所得阳性对照组 DNA 损伤修复率为 (29.8±0.80) %，联合用药处理组线粒体损伤保护率分别为 (6.3±1.12) %、(13.4±1.32) %、(20.6±1.31) %、(30.4±1.34) %、(31.1±2.33) %。联合用药处理组与溶剂对照组相比差异有统计学意义 ( $p < 0.05$ )。从而证明该化合物可以修复 DNA 损伤，有待于进一步的研究和开发应用。

[0243] 实施例 7 定量检测化合物基因毒性方法

[0244] 胚胎采集

[0245] 清晨取 10 对斑马鱼，自由组合分成 10 组交配孵化胚胎，采集 1200 个斑马鱼，吸出沉淀物质，放入孵化液中，28℃培养箱中孵化。中间及时取出白色胚胎（已死）以防止水质变坏，由于在此期间斑马鱼通过卵黄取得养料，因此不需要其他的养料。

[0246] 药物处理

[0247] 将待测样品顺铂 (cisplatin) 分为 5 个不同的处理组，分别为 0.1, 1, 10, 100, 1000  $\mu M$ ，空白组为不做任何处理，0.1%二甲亚砜 (DMSO) 阴性对照组，可以引起基因毒性的 50  $\mu M$  星孢菌素 (staurosporine) 阳性对照组。将斑马鱼放入到 6 孔微孔板中，也可以在 6 孔微孔板或 12 孔微孔板或 24 孔微孔板或 48 孔微孔板或 96 孔微孔板或 384 孔微孔板中，在 2dpf 开始处理，处理时间为 24 小时。

[0248] 斑马鱼抗单链 DNA 损伤抗体整体染色

[0249] 首先将胚胎置于 4%的多聚甲醛中 4℃处理 15-17 小时，一般不超过 24 小时，利用蛋白酶 K 在 37℃下温浴，以增加斑马鱼细胞膜、核膜的通透性，然后进行斑马鱼整体染色，小鼠抗单链 DNA 损伤抗体作为一抗。一抗反应后，将阴性对照组分两组，其中一组与辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠抗体 (二抗) 进行反应 (溶剂组)，另一组不与 HRP 标记的羊抗鼠抗体 (二抗) 反应 (背景组)。然后加入四甲基联苯胺 (TMB) 或者辣根过氧化物酶荧光底物 (QuantaBlu) 作为显色底物，利用多功能微孔板分析仪读取各个微孔的光密度 (OD) 值。

[0250] 定量分析

[0251] 将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度或者可见光的吸光度值。将试验重复 3 次取其平均值。DNA 损伤率计算公式为：

[0252]

$$\text{DNA损伤率}\% = \left( \frac{\text{药物处理组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}}{\text{溶剂组化学光强度} - \text{背景组化学光强度}} - 1 \right) \times 100\%$$

[0253] 实验数据以 $\bar{x} \pm SE$ 表示，多组间比较采用方差分析，两组间比较采用 T 检验进行统计学处理。通过统计学处理结果可定量评价待测化合物的基因毒性。如图 8 所示，在评价顺铂 (cisplatin) 基因毒性时，统计学处理结果所得阳性对照组 DNA 损伤率为 (28.4±1.67) %，药物处理组 DNA 损伤率分别为 (6.4±0.69) %、(19.5±1.07) %、(21.5±1.01) %、(33.9±1.36) %、(40.3±1.57) %。图中结果表明药物处理斑马鱼在 100、1000  $\mu M$  浓度组与对照组相比存在显著性差异 ( $p < 0.05$ )，并且药物在这两个

浓度的 DNA 损伤率高于星孢菌素阳性对照组 ( $28.4 \pm 1.67$ )%，因此我们可以得出顺铂 (cisplatin) 具有基因毒性。

[0254] 药物筛选是发现、开发药物过程中一个重要的环节，而筛选模型在药物筛选过程中起着关键性作用。应用斑马鱼评价化合物毒性和筛选新药，既具有花费少、样品用量少、操作可实现自动化等优点，又能够提供活体动物的体内生理环境，因此能够实现评价和筛选工作简便、快速、经济、高效、高通量的目的。本发明涉及一种利用整体斑马鱼酶联免疫法评价化合物的基因毒性和筛选新药的方法。该发明一方面可用于评价化合物的基因毒性，包括环境化合物、药物，化妆品、食品添加剂等，另一方面可用于筛选新药，如筛选抗肿瘤药、抗氧化剂、抗衰老、抗神经退行性疾病等药物。本发明对于诊断和治疗某些疾病，对于新药研发和化合物毒性筛选具有非常重要的指导意义。

[0255] 本发明与现有技术方案之间的效果对比如下：

[0256]

方法	本发明	彗星实验		微核实验		斑马鱼		
		体内	体外	体内	体外	体内彗星实验	体内微核实验	体外彗星实验
实验周期	2 天	4 周	1 周	4 周	1 周	1 周	1 周	1 周
检测水平	整体	细胞	细胞	细胞	细胞	细胞	细胞	细胞
饲养费用 (每只每天)	<0.01 \$	>1 \$	>1 \$	>1 \$	>1 \$	<0.01 \$	<0.01 \$	<0.01 \$
高通量 筛选	可以	不可以	不可以	不可以	不可以	不可以	不可以	不可以
预测性	>80%	80%	70%	80%	70%	80%	80%	70%

[0257]

灵敏度	95%	90%	90%	90%	90%	90%	90%	90%
实验动物数量 (每组)	36	6	无	6	无	36	36	无
实验需要药物量	mg	g	mg	g	mg	mg	mg	mg
假阳性率	<5%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%

[0258] 本实施例中采用的抗单链 DNA 损伤抗体购自 Cell Technology 公司；化学发光试剂辣根过氧化物酶底物 (PS-atto) 购自 Lumigen 公司。星孢菌素 (staurosporine) 购自美国 Sigma 公司。QuantaBlu 购自美国 Thermo 公司。二甲氧基姜黄素 (Curcumin) 购自美国 Cayman 公司。其他试剂由北京鼎国昌盛科技有限公司提供。

[0259] 本实施例中采用的多功能微孔板分析仪，为 Berthold Technologies 公司生产的 Mithras LB940。

[0260] 以上所述的仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域中的普通技术人员来说，在不脱离本发明核心技术特征的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

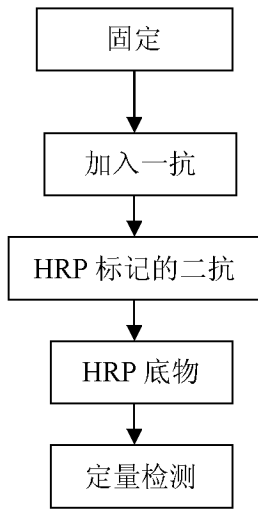


图 1

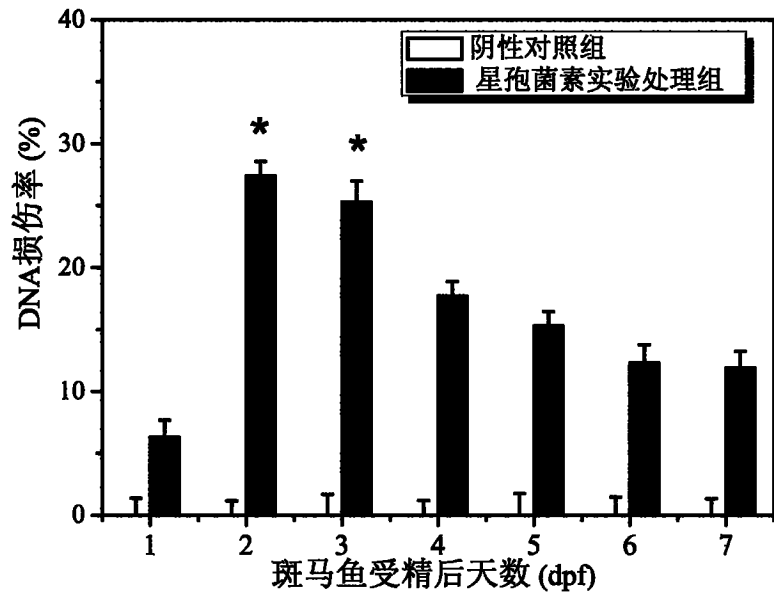


图 2

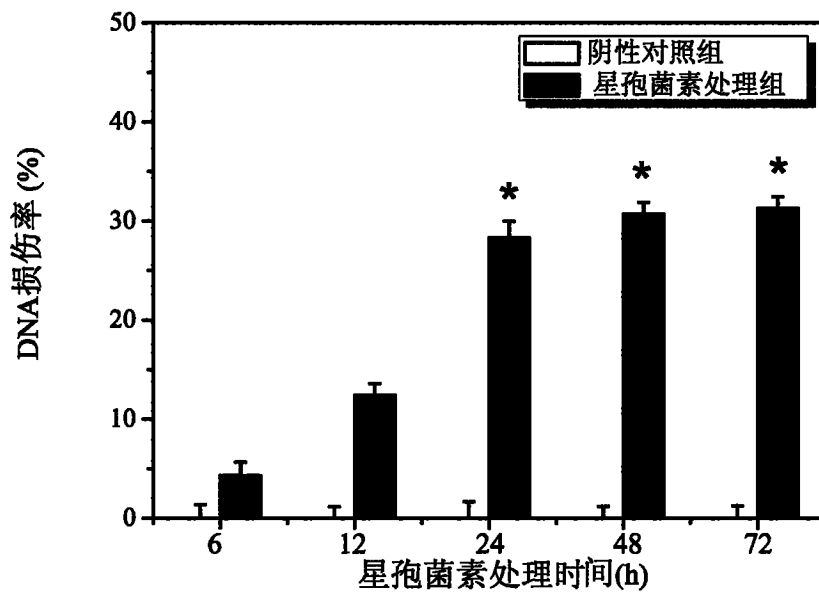


图 3

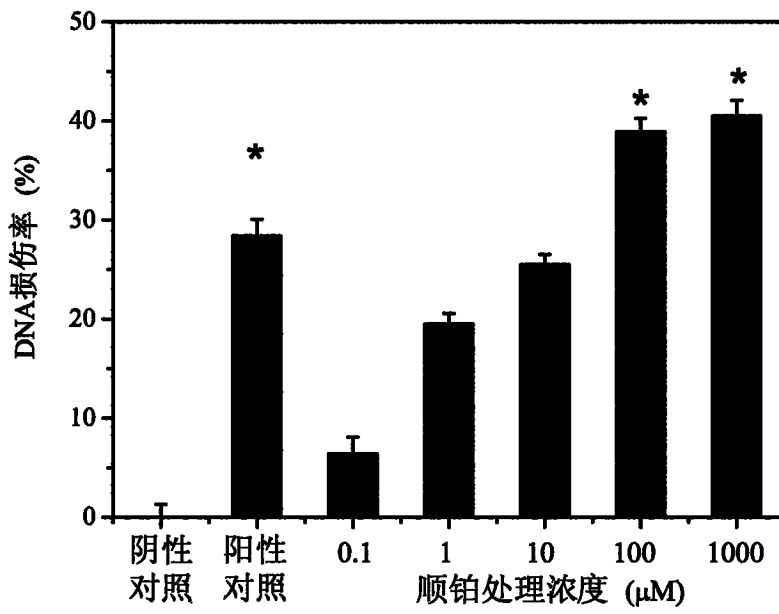


图 4

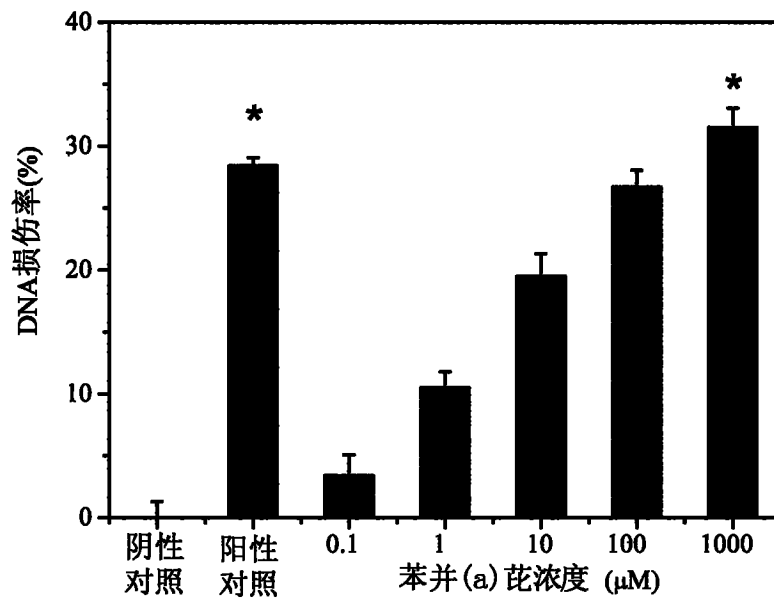


图 5

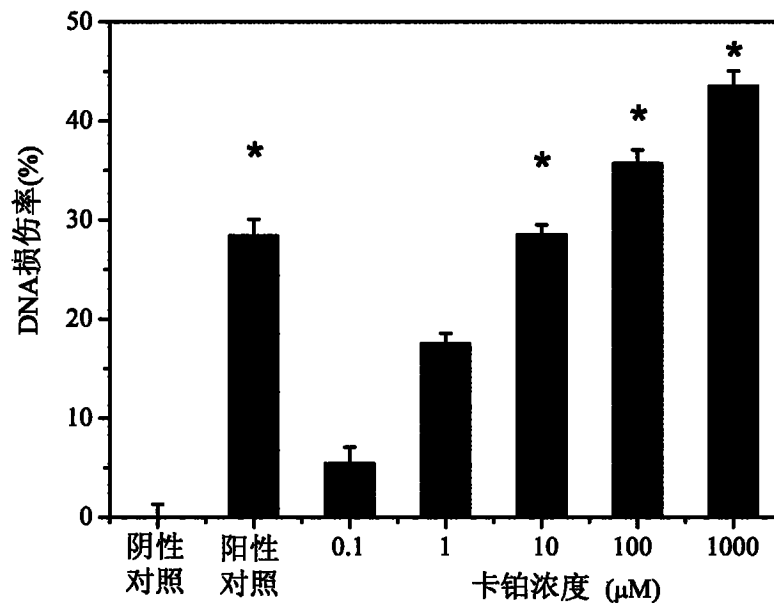


图 6

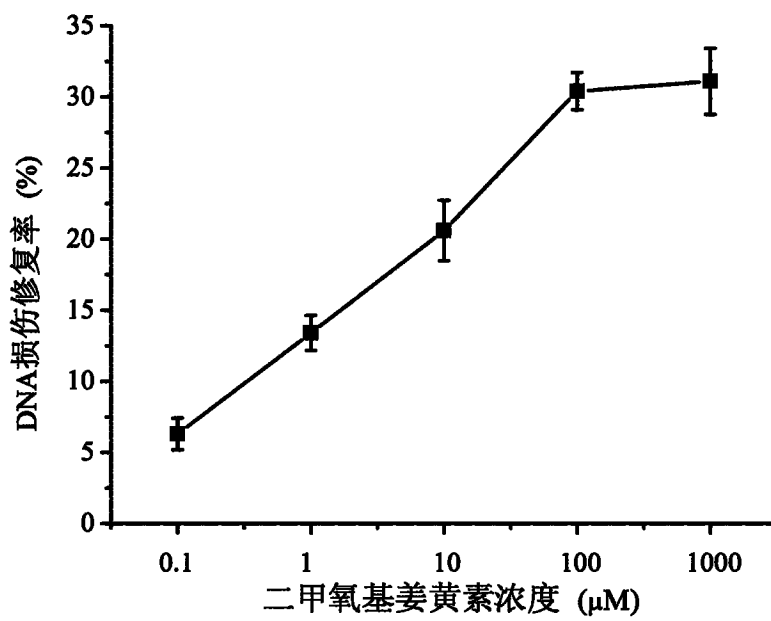


图 7

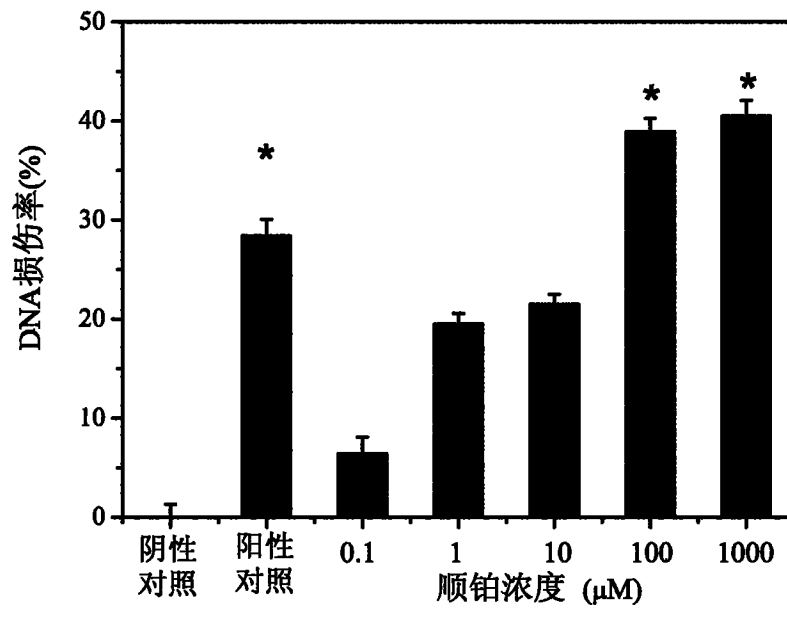


图 8

专利名称(译)	在整体斑马鱼上进行酶联免疫吸附检测的方法及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN102023207A</a>	公开(公告)日	2011-04-20
申请号	CN201010547814.9	申请日	2010-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	彭恩泽		
申请(专利权)人(译)	彭恩泽		
当前申请(专利权)人(译)	彭恩泽		
[标]发明人	彭恩泽		
发明人	彭恩泽		
IPC分类号	G01N33/53		
其他公开文献	CN102023207B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种在整体斑马鱼上进行酶联免疫吸附检测的方法，以及此方法在鉴别基因毒性化合物、筛选抗肿瘤药物、修复DNA损伤的药物中的应用。该发明一方面可用于评价化合物的基因毒性，包括环境化合物、药物，化妆品、食品添加剂等，另一方面可用于筛选新药，如筛选抗肿瘤药、抗氧化剂、抗衰老、抗神经退行性疾病等药物。本发明对于诊断和治疗某些疾病，对于新药研发和化合物毒性筛选具有非常重要的指导意义。应用斑马鱼评价化合物毒性和筛选新药，既具有花费少、样品用量少、操作可实现自动化等优点，又能够提供活体动物的体内生理环境，因此能够实现评价和筛选工作简便、快速、经济、高效、高通量的目的。

$$DNA损伤率 = \frac{\left( \begin{array}{c} \text{化合物处理组化学发光度} - \text{背景组化学发光度} \\ \text{溶剂组化学发光度} - \text{背景组化学发光度} \end{array} \right)}{\left( \begin{array}{c} \text{化合物处理组化学发光度} - \text{背景组化学发光度} \\ \text{溶剂组化学发光度} - \text{背景组化学发光度} \end{array} \right)} \times 100\%$$