



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102590488 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 18

(21) 申请号 201210007806. 4

(22) 申请日 2012. 01. 11

(71) 申请人 中国检验检疫科学研究院

地址 100123 北京市朝阳区高碑店北路甲 3 号

(72) 发明人 程艳 陈会明 崔媛 谢文平
周新 于文莲

(74) 专利代理机构 北京远大卓悦知识产权代理
事务所(普通合伙) 11369

代理人 刘冬梅

(51) Int. Cl.

G01N 33/48(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

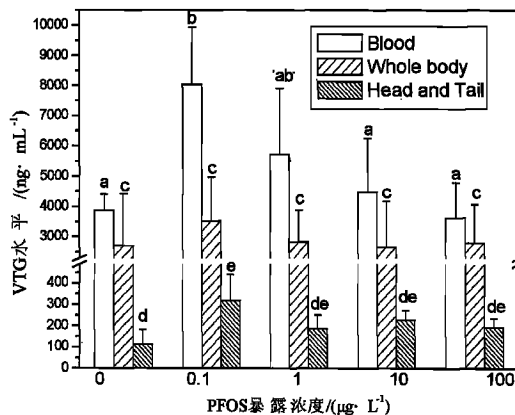
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

调控斑马鱼卵黄蛋白原水平的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种调控斑马鱼卵黄蛋白原水平的方法,该方法包括:定量待检测水生生物的血浆、全部身体匀浆液或头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量;当待检测水生生物的血浆、全部身体匀浆液或头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量高于对照水生生物的血浆、全部身体匀浆液或头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量,则表明待检测水生生物受到低浓度类雌激素干扰物的毒害或干扰。本发明方法能够准确、灵敏的检验出水生生物是否受到外源环境中低浓度的类雌激素干扰物的毒害或干扰,对于展开相关的科学研究以及环境污染物监控和安全管理等具有重要的意义。



1. 一种检验水生生物是否受到外源环境中低浓度类雌激素干扰物毒害或干扰的方法,其特征在於,该方法包括以下步骤:

定量待检测水生生物的血浆、全部身体匀浆液或头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量;当待检测水生生物血浆中的卵黄蛋白原的含量高于对照水生生物血浆中的卵黄蛋白原的含量,则表明待检测水生生物受到低浓度类雌激素干扰物的毒害或干扰;或者当待检测水生生物的头尾匀浆液或全部身体匀浆液中卵黄蛋白原的含量高于对照水生生物的头尾匀浆液或全部身体匀浆液中卵黄蛋白原的含量,则表明待检测水生生物受到低浓度类雌激素干扰物的毒害或干扰;

其中,待检测水生生物与对照水生生物是同一种水生生物,所述的对照水生生物是没有遭受类雌激素干扰物毒害或干扰的水生生物。

2. 按照权利要求1所述的方法,其特征在於:所述的水生生物是水生鱼类,优选为斑马鱼 (*Brachydanio rerio*);更优选的,所述的斑马鱼是雄性斑马鱼 (*Brachydanio rerio*)。

3. 按照权利要求1所述的方法,其特征在於:所述低浓度类雌激素干扰物的浓度为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ - $1000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 优选为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ - $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 最优选为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ - $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

4. 按照权利要求1或3所述的方法,其特征在於:所述的类雌激素干扰物包括全氟碳化物、对特辛基苯酚或 17β -雌二醇;所述的全氟碳化物包括全氟辛烷磺酰基化合物或全氟辛酸化合物;优选的,所述全氟辛烷磺酰基化合物是全氟辛烷磺酸。

5. 按照权利要求1所述的方法,其特征在於,该方法包括以下步骤:

定量待检测水生生物的头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量;当待检测水生生物头尾匀浆液中的卵黄蛋白原的含量高于对照水生生物头尾匀浆液中的卵黄蛋白原的含量,则表明待检测水生生物受到低浓度类雌激素干扰物的毒害或干扰;

其中,待检测水生生物与对照水生生物是同一种水生生物,所述的对照水生生物是没有遭受类雌激素干扰物毒害或干扰的水生生物。

6. 按照权利要求1或5所述的方法,其特征在於:采用酶联免疫吸附方法定量待检测水生生物的血浆、全部身体匀浆液或头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量。

7. 水生生物头尾匀浆液、全部身体匀浆液或血浆中卵黄蛋白原的含量水平作为检验水生生物是否受到低浓度类雌激素干扰物毒害或干扰的生物标记物的用途。

8. 按照权利要求7所述的用途,其特征在於:所述的水生生物是水生鱼类,优选为斑马鱼 (*Brachydanio rerio*);更优选的,所述的斑马鱼是雄性斑马鱼 (*Brachydanio rerio*)。

9. 按照权利要求7所述的用途,其特征在於:所述低浓度类雌激素干扰物的浓度为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ - $1000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 优选为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ - $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 最优选为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ - $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

10. 按照权利要求7或9所述的用途,其特征在於:所述的类雌激素干扰物包括全氟碳化物、对特辛基苯酚或 17β -雌二醇;所述的全氟碳化物包括全氟辛烷磺酰基化合物或全氟辛酸化合物;优选的,所述全氟辛烷磺酰基化合物是全氟辛烷磺酸。

调控斑马鱼卵黄蛋白原水平的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及到一种评价有机污染物对水生生物内分泌毒害或干扰的方法,尤其涉及到一种检验水生生物体内内分泌是否受到外源环境中低浓度类雌激素干扰物毒害或干扰的方法,属于类雌激素干扰物的检验领域。

背景技术

[0002] 生态环境中的化学污染物干扰人类和野生动物的内分泌功能,从而对个体的生殖、发育和性行为等产生多方面的影响,甚至会影响到人类的生存繁衍 (Tilghman S L, Nierth-Simpson E N, Wallace R, et al. Environmental hormones :Multiple pathways for response may lead to multiple disease outcomes[J]. Steroids, 2010, 75(8-9) : 520-523)。因而国际组织和发达国家对内分泌干扰危害效应监控实行强制管理,如联合国 GHS(全球化学品统一分类和标签制度)和欧盟 REACH(化学物质注册、评估、授权和限制)法规 1907/2006(EC)中均对内分泌干扰化学物质提出了明确管控要求。

[0003] 卵黄蛋白原 (VTG) 是卵黄蛋白的前体,通常受循环的内源性雌激素刺激,由雌性卵生脊椎动物肝脏产生,由血流进入卵巢,并被发育中的雌性配子吸收并改变。它是直接通过雌激素受体调节途径来合成的,一般只在成熟雌鱼体内合成,而在幼鱼或成年雄鱼体内含量很低,难以检测出。但在受外源性的雌激素的刺激下,肝脏能够合成并分泌 VTG。因此,通过测量 VTG 水平的变化,能够探索不同化学物质的内分泌干扰作用机制。

[0004] 全氟碳化合物 (PFCs) 已成为重要的持久性有机污染物 (POP s),广泛分布于环境、野生动物和人类中。其中代表性的全氟辛烷磺酰基化合物 (Perfluorooctanesulphonate, PFOS)、全氟辛酸 (Perfluorooctanoic acid, PFOA) 以及它们的衍生物已成为新型持久性有机污染物质,可以通过呼吸和食物被生物体摄取,有很高的生物蓄积性,可能具有内分泌干扰毒性、遗传毒性、肝脏毒性等 (Jensen A A, Leffers H. Emerging endocrine disruptors :perfluoroalkylated substances[J]. International Journal of Andrology, 2008, 31(2) :161-169 ;Clarke B O, Smith S R. Review of ‘emerging’ organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids[J]. Environment International, 2011, 37(1) :226-247), 其工业生产已于 2000 年禁止。在 2009 年 5 月 4 日 -8 日在瑞士日内瓦召开的“有关持久性有机污染物的斯德哥尔摩公约”会议上,鉴于 PFOS, 其盐化合物以及全氟辛烷磺酰氟等的剧毒性和持久性,将它们列入斯德哥尔摩公约新增受控化学物质范围。

[0005] 当水生生物处于高浓度类雌激素干扰物的外源环境的毒害或污染下会遭受到急性毒性损伤,从而呈现出较为明显的形态特征变化或生理变化,再结合采用多种生物标记物,可以非常准确和灵敏的检验出水生生物是否受到外源环境中高浓度类雌激素干扰物的毒害或污染。当水生生物受到低浓度的类雌激素干扰物的毒害或污染时,无论是外部的形态特征还是内部的生理指标都不会出现较为明显的变化 ;此外,现有的用于评价类雌激素

干扰物对于水生生物内分泌干扰效应的生物标志物均不同程度的存在敏感性较差、准确率较低的缺陷。建立一种灵敏性好、准确率高的评价水生生物内分泌是否受到类雌激素干扰物干扰的方法,对于展开相关的科学研究以及环境污染物监控和安全管理等具有重要的意义。

发明内容

[0006] 为了克服上述现有技术的不足,本发明人进行了锐意研究,发现,在暴露于低剂量的诸如全氟辛烷磺酰基化合物 (Perfluorooctanesulphonate, PFOS) 或全氟辛酸 (Perfluorooctanoic acid, PFOA) 等类雌激素干扰物时,虽然斑马鱼,特别是雄性斑马鱼体征没有发生明显变化,但斑马鱼的血浆、全鱼匀浆液或头尾组织匀浆液中的卵黄蛋白原 (VTG) 的含量明显升高,通过检测水生生物的血浆、全鱼匀浆液或头尾匀浆液的卵黄蛋白原 (VTG) 的含量就可以灵敏、准确地确定水生生物是否受到外源环境中低剂量类雌激素干扰物毒害或干扰,由此完成本发明。

[0007] 本发明的目的在于提供了一种检验水生生物是否受到外源环境中低浓度类雌激素干扰物毒害或干扰的方法,包括以下步骤:

[0008] 定量待检测水生生物的血浆、全部身体匀浆液或头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量;当待检测水生生物血浆中的卵黄蛋白原的含量高于对照水生生物血浆中的卵黄蛋白原的含量,则表明待检测水生生物受到低浓度类雌激素干扰物的毒害或干扰;或者当待检测水生生物的头尾匀浆液或全部身体匀浆液中卵黄蛋白原的含量高于对照水生生物的头尾匀浆液或全部身体匀浆液中卵黄蛋白原的含量,则表明待检测水生生物受到低浓度类雌激素干扰物的毒害或干扰。

[0009] 其中,待检测水生生物与对照水生生物是同一种水生生物,所述的对照水生生物是没有遭受类雌激素干扰物毒害或污染的水生生物。

[0010] 本发明的方法中,所述的水生生物优选为水生鱼类;更优选为斑马鱼 (*Brachydanio rerio*);特别优选的,所述的斑马鱼是雄性斑马鱼 (*Brachydanio rerio*)。

[0011] 斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 是淡水水族箱观赏鱼,原产于亚洲,体长约 4 公分,具暗蓝与银色条纹。斑马鱼基因与人类基因的相似度达到 87%,在其身上做药物实验所得到的结果在多数情况下也适用于人体,因此广泛应用于生命科学的研究,日益受到生物学家的重视。斑马鱼的胚胎是透明的,所以生物学家很容易观察到药物对其体内器官的影响。此外,雌性斑马鱼可产卵 200 枚,胚胎在 24 小时内就可发育成形,这使得生物学家可以在同一代鱼身上进行不同的实验,进而研究病理演化过程并找到病因。

[0012] 卵黄蛋白原 (VTG) 是卵黄蛋白的前体,通常受循环的内源性雌激素的刺激,由雌性卵生脊椎动物的肝脏产生,由血流进入卵巢,并被发育中的雌性配子吸收并改变。斑马鱼有 7 种 VTG 亚型 (Tong Y, Shan T, Poh Y K, et al. Molecular cloning of zebrafish and medaka vitellogenin genes and comparison of their expression in response to 17 beta-estradiol[J]. Gene, 2004, 328 :25-36 ;Wang H, Tan J T, Emelyanov A, et al. Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the Zebrafish, *Danio rerio*[J]. Gene, 2005, 356 :91-100.), 其中含 87kb 片段基因组的 VTG1、VTG2、VTG4、VTG5、VTG6 和 VTG7 主要分布于染色体 22 上,而含卵黄高磷蛋白较少的 VTG3 单独存在于

染色体 11 上。卵黄蛋白原分子进化比较保守,不同种类之间具有一定同源性 (Mouchel N, Trichet V, Naimi B Y, et al. Structure of a fish (*Oncorhynchus mykiss*) vitellogenin gene and its evolutionary implication[J]. *Gene*, 1997, 197(1-2): 147-152)。

[0013] 本发明可以通过紫外分光光度法(董纯定. 生化药物分析. 南京:中国药科大学, 1995. 142-151)、4-甲酸喹啉法(董纯定. 生化药物分析. 南京:中国药科大学, 1995. 142-151)、Bradford 法(董纯定. 生化药物分析. 南京:中国药科大学, 1995. 142-151)、Lowry 法(董纯定. 生化药物分析. 南京:中国药科大学, 1995. 142-151)、凯氏法(国家药典委员会. 中国药典 2000 版第 2 部. 北京. 化学工业出版社. 2000. 附录 50. 171) 等蛋白定量方法定量待检测水生生物血浆、头尾匀浆液或全部身体匀浆液中的卵黄蛋白原的含量或水平,这些定量方法均为本领域技术人员所通晓。作为一种最常规的技术手段,本领域技术人员可采用酶联免疫吸附(enzyme-linked immunoadsorbent assay, ELISA) 的方法测定待检测水生生物血浆、头尾匀浆液或全部身体匀浆液中的卵黄蛋白原的含量或水平。

[0014] 此外,本发明也可通过测定待检测水生生物血浆、头尾匀浆液或全部身体匀浆液中的卵黄蛋白原的 mRNA 的表达水平来实现;例如,可以通过测定斑马鱼卵黄蛋白原的 7 种亚型中的任意一种或多种在血浆、头尾匀浆液或全部身体匀浆液中的表达水平,从而间接确定待测样品中的卵黄蛋白原的含量是否高于对照样品中的卵黄蛋白原的含量,同样可以达到本发明的目的并实现本发明的技术效果。作为参考,本领域技术人员可采用实时荧光定量 PCR 或半定量 RT-PCR 等方法对卵黄蛋白原的 7 种亚型的 mRNA 的表达水平进行定量;也可以采用组织芯片和原位杂交技术检测点阵石蜡组织芯片中 7 种 VTG 亚型的 mRNA 的表达水平,再用 LeicaQ500MC 图像分析系统定量测试 7 种 VTG 亚型的 mRNA 表达水平,这些定量方法或手段均为本领域技术人员所熟练掌握。

[0015] 本发明人经过大量实验发现,当斑马鱼暴露于低浓度类雌激素干扰物诸如全氟辛烷磺酰基化合物或全氟辛酸全氟碳化合物时,雄斑马鱼对 PFOS 暴露更为敏感,在极低环境剂量浓度 ($0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 处 VTG 水平就与对照组呈现显著性差异,而在较高浓度 ($> 0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 下呈现饱和抑制效应;相比于雄鱼,雌斑马鱼对 PFOS 暴露耐受性稍高,在试验浓度范围内 VTG 水平的升高与剂量呈倒 U 型曲线, $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PFOS 浓度暴露处与对照组呈现出显著性差异。因此通过测定雄性斑马鱼的血浆、头尾匀浆液或全部身体匀浆液中卵黄蛋白原的含量可更加灵敏和准确的判定斑马鱼是否受到低浓度类雌激素的毒害或干扰。

[0016] 本发明通过实验非常意外的发现,通过检测水生生物的头尾匀浆液中的卵黄蛋白原的含量就可以非常准确和灵敏的检验出待测斑马鱼是否受到低浓度类雌激素的毒害或干扰。获取水生生物的血浆,尤其是斑马鱼的血浆,不仅操作繁琐,而且还需要一定的专业操作水平,不过血浆中卵黄蛋白原的含量是非常准确的;此外,对于获取水生生物的全部身体匀浆液而言,结果表明全部身体匀浆液中卵黄蛋白原的含量变化趋势与血浆中卵黄蛋白原的含量变化趋势不完全一致,检验效果相对差些;相对来说,获取水生生物的头尾匀浆液或全部身体匀浆液就容易的多,而且,头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量变化趋势与血浆中卵黄蛋白原的含量变化趋势具有一致性,检验效果良好。采用斑马鱼的头和尾制备匀浆液作为检测样品,不仅容易制备、而且成本也更低。由此,本发明的一种优选的技术方案是:定量待检测水生生物的头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量;当待检测水生生物的头尾匀浆液中

卵黄蛋白原的含量高于对照水生生物的头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量,则表明待检测水生生物受到低浓度类雌激素干扰物的毒害或干扰。

[0017] 在本文中,所用术语“低浓度类雌激素干扰物”的定义是指浓度为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ – $1000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的类雌激素干扰物,进一步优选为浓度为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ – $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的类雌激素干扰物,特别优选为浓度为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ – $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的类雌激素干扰物。

[0018] 在根据本发明的方法中,所述的类雌激素干扰物包括全氟碳化合物、对特辛基苯酚或 17β -雌二醇;所述的全氟碳化合物优选为全氟辛烷磺酰基化合物或全氟辛酸全氟碳化合物;进一步优选的,所述全氟辛烷磺酰基化合物是全氟辛烷磺酸。

[0019] 本发明的另一目的在于提供了将水生生物血浆、全部身体匀浆液或头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量水平作为检验水生生物体内内分泌是否受到低浓度类雌激素干扰物毒害或干扰的生物标记物;优选的,所述的水生生物是水生鱼类;进一步优选为斑马鱼 (*Brachydanio rerio*);更优选的,所述的斑马鱼是雄性斑马鱼 (*Brachydanio rerio*)。

[0020] 本发明将斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 暴露于各种不同浓度全氟辛烷磺酸 (PFOS) 的环境中,测定斑马鱼血浆、全部身体匀浆液或头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量的变化。实验结果表明,低剂量的 PFOS 暴露均不同程度地引起雄性和雌性斑马鱼血浆、全部身体匀浆液或头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量升高,说明低浓度 PFOS 暴露对斑马鱼的内分泌干扰作用明显,斑马鱼的血浆、全部身体匀浆液或头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量水平可作为 PFOS 内分泌干扰效应评价的敏感生物标志物;此外,本发明进一步的实验发现,斑马鱼暴露于低浓度全氟辛烷磺酰基化合物后,雄性斑马鱼对 PFOS 暴露更为敏感,在极低环境剂量浓度 ($0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 处,其 VTG 水平就与对照组呈现显著性差异;相比于雄性斑马鱼,雌性斑马鱼对 PFOS 暴露耐受性稍高,其在 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PFOS 浓度暴露处与对照组呈现出显著性差异。

[0021] 本发明发现,通过检测水生生物的头尾匀浆液中的卵黄蛋白原的含量水平就可以非常准确和灵敏的检验出待测斑马鱼是否受到低浓度类雌激素的毒害或干扰。综合考虑检测灵敏性、准确性、取样的难易以及成本等因素,本发明优选将斑马鱼的头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量水平作为检验水生生物是否受到低浓度类雌激素干扰物毒害或干扰的生物标记物;更优选的,将雄性斑马鱼的头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量水平作为检验水生生物是否受到低浓度类雌激素干扰物毒害或干扰的生物标记物。

[0022] 作为本发明的具体的应用方式,可以分别将斑马鱼的卵黄蛋白原或其编码基因制备成生物芯片,例如:蛋白芯片、基因芯片、组织芯片或细胞芯片等,采用高通量的方式检验待检测水生生物的血浆、全部身体匀浆液或头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量,再将其与对照水生生物相应的血浆、全部身体匀浆液或头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量进行比较,从而检验水生生物内分泌是否受到外源环境中低浓度类雌激素干扰物的毒害或干扰。

[0023] 蛋白芯片:是将标记了有特定荧光物质的各种蛋白质抗体有序地固定于载玻片等各种介质载体上成为检测芯片;然后,将待检测的抗原样品与芯片抗体作用,抗体上的荧光将指示对应的蛋白质及其表达数量。在将未与芯片上的蛋白质互补结合的抗原洗去之后利用荧光扫描仪或激光共聚焦扫描技术,测定芯片上各点的荧光强度,通过荧光强度分析蛋白质与蛋白之间相互作用的关系,达到测定各种基因表达的目的。应用蛋白芯片可以研究在不同生理状态或病理状态下蛋白水平的量变,具有微型化、集成化和高通量化等优点。

[0024] 蛋白芯片的一般操作流程如下:将抗体蛋白纯化后溶于点样液中;将溶有抗体蛋白的点样液点样于载玻片等介质载体上,洗涤未结合的蛋白质,封闭,得到检测芯片;将待检测的抗原蛋白样品加入到蛋白芯片上进行抗原抗体反应,洗涤,检测。

[0025] 作为本发明中蛋白芯片的一个具体应用实例,可参考以下方式进行:制备斑马鱼卵黄蛋白原抗体,将斑马鱼卵黄蛋白原抗体纯化后用荧光标记后再溶解于点样液中点样到载玻片等载体上,洗涤未结合的蛋白质,封闭,得到检测抗体芯片;将待检测的斑马鱼血浆、全部身体匀浆液或头尾匀浆液样品加入到蛋白芯片上进行抗原抗体反应,将未与芯片上的蛋白质互补结合的抗原洗去之后利用荧光扫描仪或激光共聚焦扫描技术测定芯片上各点的荧光强度,根据所测定的抗体上的荧光强度得到所指示对应的抗原蛋白质及其含量。

[0026] 基因芯片是在载体(尼龙膜、玻璃片或硅片等)上按照预先设计的位置高密度有序的排列大批量的核酸探针(也称DNA芯片或DNA微阵列),形成高密度点阵,与样品中的靶分子作用后,通过分子杂交技术在相同条件下进行分子反应,采用同位素法、化学荧光法或化学发光法等方法对反应结果进行显示,并采用相应的方法进行定量。

[0027] 作为本发明基因芯片的一个具体应用实施,可参考以下方式:将水生生物的卵黄蛋白原7种亚型的任意一种或多种mRNA作为探针采用原位点样法或直接点样法等方式将探针按照预先设计的位置高密度有序的排列或点样到尼龙膜载体(或玻璃片、硅片等载体)上,得到基因芯片;从待检测的水生生物的血浆、全部身体匀浆液或头尾匀浆液中提取VTG mRNA,将所提取的VTG mRNA经过逆转录后再进行PCR扩增,将扩增产物的末端用荧光标记后与芯片上的探针分子进行分子杂交,采用共聚焦荧光扫描仪进行信号检测,定量待测样品中VTG mRNA的表达水平,再与对照样品中的VTG mRNA的表达水平进行比较,就可快速、准确的检验出待检测水生生物体内内分泌是否受到外源环境中低浓度类雌激素干扰物毒害或干扰。

[0028] 组织芯片,又称组织微阵列,是将大量的组织片有序的排列于载体上而得到的微缩组织切片,用于研究同一基因或蛋白质分子在不同细胞或组织中的表达情况,具有体积小、高通量、丰富样本、快速省时等优点。组织芯片还可以与免疫组化、荧光核酸原位杂交、RNA原位杂交等技术相结合。

[0029] 本领域技术人员可以参考以下方法制备组织芯片,包括:待测样品的收集、芯片的制备、染色及染色后扫描、数据处理。其中,制作组织芯片时多采用石蜡组织芯片,石蜡组织芯片的制作是采用组织芯片制作机的活检细针,从大量供体蜡块组织中钻取若干个圆柱形的组织芯,然后将样本整齐的放到受体蜡块中制作组织芯片蜡块,对组织芯片蜡块进行切片,再将切片转移到载玻片上。利用显微镜精密的机械控制功能,进行打孔、取样、点样、观察与定位、通过化学染色或原位杂交,载玻片上所有标本的信号可以同时显现出来。与普通切片相比,组织芯片的单次可以同时对上百个样本进行免疫组织化和原位杂交,可以大规模分析样本,并具有数据统计精确性和高效性等优点。

附图说明

[0030] 图1示出PFOS暴露(0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)分别对雄性斑马鱼血浆、全鱼和头尾匀浆中VTG水平的影响;其中,雄性斑马鱼对照组血浆VTG水平为 $3882.6 \pm 521.8 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,对照组全鱼匀浆中VTG水平为 $2705.4 \pm 1716.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,对照组头尾匀浆中VTG水平为

114.6±68.3ng·mL⁻¹。

[0031] 图 2 示出 PFOS 暴露 (0.1, 1, 10, 100 μg·L⁻¹) 分别对雌性斑马鱼血浆、全鱼和头尾匀浆中 VTG 水平的影响;其中,雌性斑马鱼对照组血浆 VTG 水平为 466530.0±205096.0ng·mL⁻¹,对照组全鱼匀浆中 VTG 水平为 53454.5±30406.9ng·mL⁻¹,对照组头尾匀浆中 VTG 水平为 21959.9±9721.6ng·mL⁻¹。

具体实施方式

[0032] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚明确。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0033] 试验例 低浓度的全氟辛烷磺酸暴露对于斑马鱼血浆、全鱼匀浆或头尾匀浆中卵黄蛋白原的水平的影响试验

[0034] 1. 材料与amp;方法

[0035] 1.1 仪器与试剂

[0036] 仪器:多功能酶标仪 (BIO-RAD 680, BIO-RAD 公司,美国),洗板机 (WELLWASH 4MK2, Thermo 公司,美国),混合型球磨仪 (MM400, RETSCH 公司,德国),冷冻离心机 (3-18K, Sigma 公司,德国),全自动雪花制冰机 (YT-IMS-70, 北京海淀晶晶科技有限公司),反渗透制水机 (RO-500 型,北京英诺格林有限公司)。

[0037] 试剂:全氟辛烷磺酸 (Assay LC-MS 98%, Sigma-Aldrich 公司,美国),抑肽酶 (BioBasic INC 公司,加拿大),斑马鱼卵黄蛋白原 ELISA 检测试剂盒 (Zebrafish vitellogenin ELISA kit, Biosense Laboratories, 挪威)。

[0038] 1.2 供试生物

[0039] 实验鱼:斑马鱼 (*Brachydanio rerio*),鱼龄 3 个月,体长 1.0-1.5cm,体重 0.120-0.220g,雌雄兼有,购于北京市东郊市场。采用反渗透纯净水机制备的水。试验前将雌雄斑马鱼分开预养,在试验条件下预养 7d,水温 (25±2)℃,饲养容器为 2L 烧杯,饲养密度不大于 1g·L⁻¹ (即每升水容纳斑马鱼的质量为 1g),每日光照 12-14h,早晚定时投喂孵化的丰年虫 2 次,并每天清除排泄物,预养期间斑马鱼死亡率不超过 5%。

[0040] 1.3 21 天毒性试验

[0041] 预养结束后停止喂食 1d,然后进行以下实验:设置染毒浓度为 0.1 μg·L⁻¹, 1 μg·L⁻¹, 10 μg·L⁻¹, 100 μg·L⁻¹ 的 4 个实验组,同时设置空白对照组,分别对雌、雄斑马鱼进行 21d 的毒性试验。实验在 2L 烧杯中进行,每缸内盛有 1.8L 不同浓度的染毒液,且每缸随机投放 8 尾斑马鱼。暴露期间水温维持在 (25±2)℃,每日光照 12-14h,采用每周两次更换全部染毒液的半静态法进行暴露,暴露周期为 21d,暴露期间每天喂食 2 次,喂食量以实验鱼正好吃完为宜。

[0042] 1.4 血浆和组织匀浆液制备

[0043] 21d 染毒结束后,捞出斑马鱼并置于冰上冷冻处死,用在肝素钠溶液中浸泡过的手术剪刀横向剪开斑马鱼尾部,用浸泡过肝素钠溶液的毛细管取血,按 1:6 (血液:稀释液) 加入预冷的血样稀释液 (pH 7.4 :0.01M 的 PBS ;100mg·L⁻¹ 肝素钠溶液 ;6 μg·mL⁻¹ 抑肽

酶),混匀后 4℃,15000g 离心 10min,离心后血浆从血样本中分离且无溶血现象。取上清液分装,于 -80℃ 保存。

[0044] 将取血后的鱼头和鱼尾沿鱼鳍切分,或取全鱼置于冰上冷冻处死后,进行称重。按 200mg 鱼重 :1mL (pH 7.4 ;0.01M 的 PBS) 比例加入预冷的稀释液。用手术剪刀剪碎鱼头、鱼尾或全鱼,然后采用混合型球磨仪以 30Hz/1.5min 匀浆直至混合物匀质化,混匀后 4℃,5000g 离心 30min,离心后上清液析出与脂肪和肌肉分离。将吸液管的尖端伸入表面的脂肪层下,小心吸取表面无脂肪或颗粒部分,分装,于 -80℃ 保存。

[0045] 1.5 卵黄蛋白原 (VTG) 的 ELISA 检测

[0046] 用 ELISA 检测试剂盒分别对雌性和雄性斑马鱼不同组织的 VTG 进行检测分析。主要操作步骤包括:将预处理好的血样用样品稀释液 (0.01M PBS 缓冲液;pH 7.4;包含 1% BSA) 进行稀释处理。每孔加入 100 μ L 样品或标准品于 96 孔酶标板中,封闭酶标板,室温 (20-25℃) 孵化 1h。每孔用 300 μ L 洗液洗板三次后,每孔加入按 1 : 350 稀释的一抗各 100 μ L,室温 (20-25℃) 孵化 1h。再洗板三次,每孔加入按 1 : 2000 稀释的二抗各 100 μ L,室温 (20-25℃) 孵化 1h。洗板五次后,每孔加入 100 μ L 底物显色液,室温 (20-25℃) 避光 30min,之后每孔加入 50 μ L 的 2M 的 H₂SO₄ 终止反应,5min 后于 492nm 处测吸光值。

[0047] 1.6 数据处理

[0048] 实验数据用统计学方法进行处理,采用 SPSS 13.0 统计软件进行显著性分析,各数据均用平均值 ± 标准偏差 (Mean ± SD) 表示,各组间的差异采用单因素方差分析 (ONE-WAY ANOVA), $p \leq 0.05$ 为差异显著。

[0049] 2 实验结果

[0050] 2.1 雄性斑马鱼血浆、全鱼和头尾匀浆液中 VTG 含量

[0051] 21 天染毒结束时,4 个实验组的雄性斑马鱼没有死亡出现。对血浆、全鱼匀浆液和头尾匀浆液中 VTG 含量进行检测和分析的结果见图 1。图 1 中的数据用平均值 ± 标准偏差 (Mean ± SD) 表示,每组数据样本量 $n \geq 3$ 。柱形上方参数有一个字母相同则无显著性差异,反之则有显著性差异 ($p \leq 0.05$)。

[0052] 由图 1 中可看出,PFOS 暴露引起实验组的雄性斑马鱼血浆、全鱼匀浆液和头尾匀浆液中的 VTG 水平的升高,实验组的雄性斑马鱼不同组织中 VTG 水平及水平高低为:血浆 ($10^3 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) > 全鱼匀浆 ($10^3 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) >> 头尾匀浆 ($10^2 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

[0053] 其中,PFOS 暴露引起实验组的雄性斑马鱼血浆和头尾匀浆中 VTG 水平的升高与剂量呈负相关,在 $0.1 \mu \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露浓度处与对照组呈现显著性差异;而全鱼匀浆液中的 VTG 水平升高相比于对照组有升高,但均没有显著性差异。注:雄性斑马鱼对照组 (没有遭受类雌激素干扰物毒害或干扰的雄性斑马鱼) 血浆 VTG 水平为 $3882.6 \pm 521.8 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,全鱼匀浆中 VTG 水平为 $2705.4 \pm 1716.0 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,头尾匀浆中 VTG 水平为 $114.6 \pm 68.3 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0054] 2.2 雌性斑马鱼血浆、全鱼和头尾匀浆液中 VTG 含量

[0055] 21 天染毒结束时,4 个实验组的雌性斑马鱼没有死亡出现。对血浆、全鱼匀浆液和头尾匀浆液中 VTG 含量进行检测和分析的结果见图 2。图 2 中的数据用平均值 ± 标准偏差 (Mean ± SD) 表示,每组数据样本量 $n \geq 3$ 。柱形上方参数有一个字母相同则无显著性差异,反之则有显著性差异 ($p \leq 0.05$)。

[0056] 由图 2 中可看出,PFOS 暴露引起实验组的雌性斑马鱼血浆、全鱼匀浆液和头尾匀

浆液中的 VTG 水平的升高,实验组的雌性斑马鱼不同组织中 VTG 水平及水平高低为 :血浆 ($10^5\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) \gg 全鱼匀浆 ($10^4\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) $>$ 头尾匀浆 ($10^4\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$),而且,VTG 水平雌鱼 \gg 雄鱼。

[0057] 其中,PFOS 暴露引起雌鱼血浆和头尾匀浆中 VTG 水平的升高与剂量呈倒 U 型曲线,在 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露浓度处与对照组呈现显著性差异;而全鱼匀浆液中的 VTG 水平升高相比于对照组有升高,但均没有显著性差异;注:雌性斑马鱼对照组(没有遭受类雌激素干扰物毒害或干扰的雄性斑马鱼)血浆 VTG 水平为 $466530.0 \pm 205096.0\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,全鱼匀浆中 VTG 水平为 $53454.5 \pm 30406.9\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,头尾匀浆中 VTG 水平为 $21959.9 \pm 9721.6\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

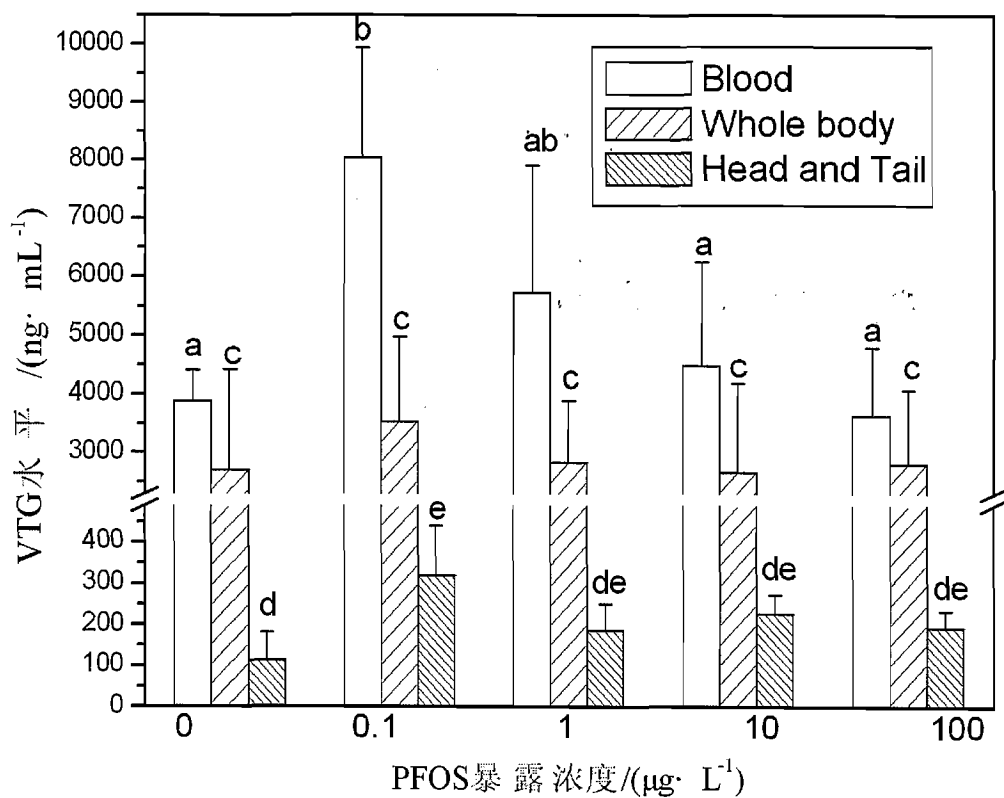


图 1

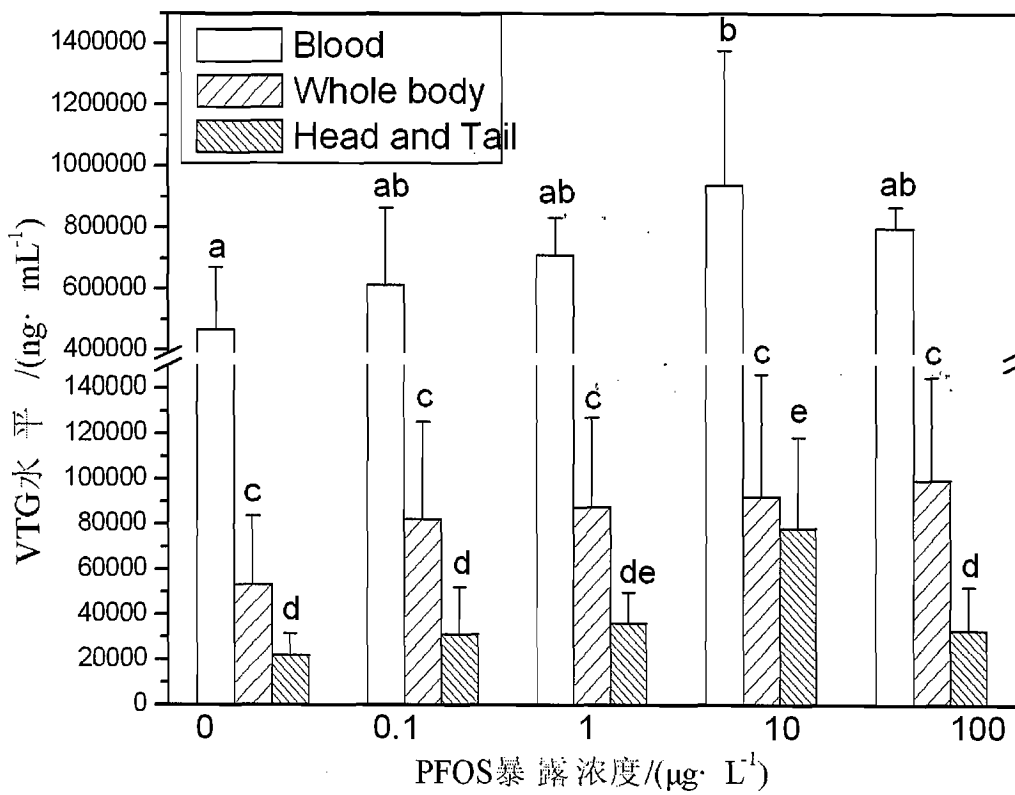


图 2

专利名称(译)	调控斑马鱼卵黄蛋白原水平的方法		
公开(公告)号	CN102590488A	公开(公告)日	2012-07-18
申请号	CN201210007806.4	申请日	2012-01-11
申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
[标]发明人	程艳 陈会明 崔媛 谢文平 周新 于文莲		
发明人	程艳 陈会明 崔媛 谢文平 周新 于文莲		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53		
代理人(译)	刘冬梅		
其他公开文献	CN102590488B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种调控斑马鱼卵黄蛋白原水平的方法，该方法包括：定量待检测水生生物的血浆、全部身体匀浆液或头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量；当待检测水生生物的血浆、全部身体匀浆液或头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量高于对照水生生物的血浆、全部身体匀浆液或头尾匀浆液中卵黄蛋白原的含量，则表明待检测水生生物受到低浓度类雌激素干扰物的毒害或干扰。本发明方法能够准确、灵敏的检验出水生生物是否受到外源环境中低浓度的类雌激素干扰物的毒害或干扰，对于展开相关的科学研究以及环境污染物监控和安全管理等具有重要的意义。

