



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102907356 B

(45) 授权公告日 2016. 05. 25

(21) 申请号 201210377599. 1

(22) 申请日 2012. 09. 27

(73) 专利权人 杭州环特生物科技股份有限公司
地址 310052 浙江省杭州市滨江区江陵路
88 号 5 幢 1 楼 A 区

(72) 发明人 李春启 张勇 劳乔聪 朱凤
郭胜亚

(51) Int. Cl.
A01K 61/00(2006. 01)

(56) 对比文件

曹阅 等. 坏死梭杆菌斑马鱼模型建立与 LD50 的测定. 《特产研究》. 2012, (第 1 期), 第 14-18 页.

柯翎 等. 斑马鱼作为模式动物在鱼类病原学中的研究进展. 《福建农业科技》. 2012, (第 5 期), 第 77-79 页.

石竹 等. 基于斑马鱼模型的鳃弧菌减毒活疫苗的生物安全性评价. 《华东理工大学学报(自然科学版)》. 2011, 第 37 卷(第 6 期), 摘要, 第 723 页右栏第 3-5 段.

王雪鹏 等. 应用绿色荧光蛋白标记迟缓爱德华菌感染斑马鱼. 《中国实验动物学报》. 2011, 第 19 卷(第 5 期), 第 433-435 页.

Astrid M. van Sar 等. “zebrafish embryos as a model host for the real time analysis of salmonella typhimurium infections”. 《Cellular Immunology》. 2003, 第 5 卷(第 9 期), 第 602 页左栏第 3 段, 右栏第 2 段, 第 608 页左栏第 1 段, 第 609 页左栏第 3-4 段, 右栏第 1-2 段, 图 1.

Astrid M. van Sar 等. “zebrafish embryos as a model host for the real time analysis of salmonella typhimurium infections”. 《Cellular Immunology》. 2003, 第 5 卷(第 9 期), 第 602 页左栏第 3 段, 右栏第 2 段, 第 608 页左栏第 1 段, 第 609 页左栏第 3-4 段, 右栏第 1-2 段, 图 1.

审查员 孟海燕

权利要求书1页 说明书12页 附图6页

(54) 发明名称

一种斑马鱼细菌感染模型的构建方法及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种细菌感染模型的构建方法, 并利用该动物模型进行细菌感染研究以及筛选抗生素。模型的构建方法主要包括: 斑马鱼选取, 细菌注射, 图像分析和 / 或微孔板分析, 统计学分析几个步骤。本发明的方法具有简便、快速、经济、高效、高通量等优点, 本模型可用于细菌感染研究以及筛选抗生素。本发明对加快降抗生素的研发及改善细菌感染患者的治疗具有意义重大。



1. 一种斑马鱼细菌感染模型的构建方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)斑马鱼选取

挑取发育正常的斑马鱼放入微孔板中,所挑选的斑马鱼为受精后2天的斑马鱼;

(2)细菌注射

设置若干个细菌注射组、1个溶剂注射组、1个空白对照组,将带有荧光标记的细菌用灭菌的1×PBS缓冲液洗脱3次,然后用显微注射的方式将细菌注入斑马鱼体内,注射结束后,洗脱除去残留的麻醉剂,并将斑马鱼转入6孔板中,每孔中加入等体积的养殖用水,作为细菌注射组;溶剂注射组注射等体积灭菌的1×PBS缓冲液;空白对照组注射等体积的养殖用水;恒温培养;所述的显微注射细菌的方式为心包注射或卵黄囊注射;每个斑马鱼细菌注射量为3000-3500 CFU;

步骤(2)中细菌为大肠杆菌;

步骤(2)中养殖用水其溶解氧浓度为6-8mg/L、水温为28℃、pH为7.2-7.6、总硬度为200-250mg/L;

步骤(2)中斑马鱼恒温培养的温度为34℃;

步骤(2)中斑马鱼恒温培养的时间为72h。

一种斑马鱼细菌感染模型的构建方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物模型构建领域,具体涉及一种斑马鱼细菌感染模型的构建方法及其应用。

背景技术

[0002] 细菌产生耐药性是人类在病菌控制和治疗中碰到的一个棘手问题,对抗生素产生耐药性的细菌正在成为日益严重的威胁,并且变得越来越普遍。而抗生素的过度使用导致细菌产生多重耐药性,从而使人类面临“超级细菌感染”的危险[1]。大肠杆菌是革兰氏阴性菌中最易产生耐药性的细菌,2011年5月在德国爆发的肠出血性大肠杆菌(EHEC)疫情就是由一种名为“husec41”的肠出血性大肠杆菌(EHEC)变种引起的,这一变种对很多抗生素具有耐药性。抗生素在畜牧业中的滥用也导致多种动物源大肠杆菌具有了一定抗生素耐药性[2],这使得畜牧业的稳定和健康发展时刻面临巨大的威胁。要解决具有多重耐药性的超级细菌对人类健康和畜牧业发展的威胁,除了加强对抗生素使用的规范管理,减少抗生素的滥用外,最根本的办法还是要加快抗生素的研发速度,开发出新的、更为有效的抗生素。只有不断采用新的研究技术和工艺,才能加快抗生素的研发速度。

[0003] 虽然体外细胞实验可以很好地阐明病菌和宿主之间相互作用的关键步骤,但是无法获得与整体动物相关的一些重要信息。随着生物学技术的进步和动物替代模型的出现,曾经阻碍用活体动物进行病菌毒性研究的技术障碍和伦理问题都已经得到了很好地解决。常用的较为低等的病菌感染替代动物模型包括果蝇[3]、线虫[4,5]和阿米巴虫[6]等一些发育生物学研究已经很广泛的动物,对这些低等动物发育生物学的深入研究已经为医药学家提供了大量的实验工具和实验材料。但是,果蝇和线虫等低等动物与人类的生物等级差别太大,基因相似度低,生理结构和生理功能有较大差别,因此,其药物实验结果的预测可靠性与可比性较差。所以,迫切需要开发新的较为低等的动物模型,以便既能替代大小鼠等高等动物,又能保证实验结果的预测可靠性与可比性较高。斑马鱼是一种硬骨鱼,属于脊椎动物,与果蝇、线虫和阿米巴虫等低等相比,斑马鱼与人类的基因相似度更高(85%以上)、生理结构和生理功能更为接近;与鼠类等哺乳动物相比,斑马鱼胚胎透明,可同时观察分析多个器官,实验周期短,样本容量大,结果可信度高,所需费用低[7]。此外,斑马鱼有着与哺乳动物非常相似的发育良好的免疫系统(包括先天性免疫和获得性免疫)[8,9]。这些优点使得斑马鱼成为了研究病菌感染机制和筛选抗生素的一种非常有用的动物模型。

发明内容

[0004] 为了克服上述现有技术的缺陷和不足,发明人经研究,旨在提供一种简单、快速、经济、高通量的斑马鱼细菌感染模型的构建方法及其应用。

[0005] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0006] 1.一种斑马鱼细菌感染模型的构建方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0007] (1)斑马鱼选取

- [0008] 挑取发育正常的斑马鱼放入微孔板中；
- [0009] (2)细菌注射
- [0010] 设置若干个细菌注射组、1个溶剂注射组、1个空白对照组，将带有荧光标记的细菌用灭菌的1×PBS缓冲液洗脱3次，然后用显微注射的方式将细菌注入斑马鱼体内，注射结束后，洗脱除去残留的麻醉剂，并将斑马鱼转入6孔板中，每孔中加入等体积的养殖用水，作为细菌注射组；溶剂注射组注射等体积灭菌的1×PBS缓冲液；空白对照组注射等体积的养殖用水；恒温培养。
- [0011] 优选的，还包括以下步骤：
- [0012] (3)图像分析和/或微孔板分析；
- [0013] (4)统计学分析。
- [0014] 优选的，步骤(1)中挑选的斑马鱼为受精后2天的斑马鱼；
- [0015] 优选的，步骤(2)中每个斑马鱼细菌注射量为3000-3500CFU；
- [0016] 优选的，步骤(2)中的注射方式为心包注射或卵黄囊注射；
- [0017] 优选的，步骤(2)中细菌为大肠杆菌；
- [0018] 优选的，所述养殖用水其溶解氧浓度为6-8mg/L、水温为28℃、pH为7.2-7.6、总硬度为200-250mg/L；
- [0019] 优选的，步骤(2)中斑马鱼恒温培养的温度为34℃；
- [0020] 优选的，步骤(2)中斑马鱼恒温培养的时间为72h。
- [0021] 优选的，图像分析具体步骤为：移除微孔板中的液体，加入等体积浓度为0.64mM的甲磺酸将斑马鱼麻醉处死后，用3%甲基纤维素胶将斑马鱼固定于双凹载玻片上后，置于荧光显微镜下观察各实验组斑马鱼体内的细菌生长情况并拍照保存，用ImageJ图像分析软件或尼康NIS-Elements D3.10高级图像处理软件对图像进行分析，计算斑马鱼体内的细菌相对荧光强度；
- [0022] 优选的，微孔板分析具体步骤为：将斑马鱼转入96孔板，每孔1尾。然后将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度；
- [0023] 优选的，统计学分析步骤为：统计学处理结果以±SE表示，多组间比较采用单因子方差分析，两组间比较采用Dunnett's T-检验进行统计学处理， $p < 0.05$ 为差异性显著。
- [0024] 2. 前述的构建方法得到的斑马鱼细菌感染模型用于细菌感染研究的用途。
- [0025] 3. 前述的构建方法得到的斑马鱼细菌感染模型用于评价或筛选抗生素的用途。
- [0026] 优选的，还包括以下步骤：
- [0027] (3)化合物处理
- [0028] 移除微孔板中的养殖用水，设置多个实验组：若干个化合物处理组，1个模型组，1个阳性对照组，化合物处理组中加入相同体积、浓度分别为0.1μM、1μM、10μM、100μM和200μM的化合物；模型组加入等体积的养殖用水；于34℃恒温培养箱中培养；
- [0029] (4)图像分析和/或微孔板分析；
- [0030] (5)统计学分析。
- [0031] 优选的，步骤(3)阳性对照组加入的溶液为氨苄西林；
- [0032] 优选的，图像分析具体步骤为：移除微孔板中的液体，加入等体积浓度为0.64mM的甲磺酸将斑马鱼麻醉处死后，用3%甲基纤维素胶将斑马鱼固定于双凹载玻片上后，置于荧

光显微镜下观察各实验组斑马鱼体内的细菌生长情况并拍照保存,用ImageJ图像分析软件或尼康NIS-Elements D3.10高级图像处理软件对图像进行分析,计算斑马鱼体内的细菌相对荧光强度;

[0033] 优选的,微孔板分析具体步骤为:将斑马鱼转入96孔板,每孔1尾。然后将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度;

[0034] 优选的,统计学分析步骤为:统计学处理结果以 \pm SE表示,多组间比较采用单因子方差分析,两组间比较采用Dunnett's T-检验进行统计学处理, $p < 0.05$ 为差异性显著。

[0035] 优选的,化合物处理后的斑马鱼培养时间为48小时。

[0036] 优选的,所述的化合物为卡那霉素、庆大霉素、氯霉素或链霉素。

[0037] 本发明提供了一种斑马鱼细菌感染模型的构建方法及其应用,该方法具有简便、快速、成功率高、重复性好且稳定可靠等优点,能实现定性分析与定量分析。将用荧光标记的细菌注射到斑马鱼体内之后,只要在荧光显微镜下观察斑马鱼体内的荧光强度就可以斑马鱼体内的细菌数量进行定性分析;在荧光显微镜下拍照并利用图像分析软件对斑马鱼体内的细菌数量进行定量分析;也可以用荧光酶标仪对斑马鱼体内的细菌数量进行高通量的定量分析。具体地说,本发明具有如下优点:

[0038] 1)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。

[0039] 2)高通量——斑马鱼幼鱼很小,只有1-4毫米,能够在标准的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自动化体内药物筛选的理想模型。

[0040] 3)经济——所需费用低,以猴子为实验载体的筛选实验每只每天耗费大于10美元,以老鼠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。

[0041] 4)化合物用量少——检测化合物用量少,通常只需几毫克,而传统的筛选实验则需几毫克以上的化合物。

[0042] 5)简便——实验过程操作简单,斑马鱼经药物处理后便可直接观察并进行定量与定性分析,不需要其它实验操作,而传统实验操作过程复杂且容易产生假阳性结果。

[0043] 6)快速——实验周期短,可在2~3天内完成;而老鼠常需要数周到数月的时间,猴子常需要数月至数年的时间。斑马鱼在第一个72小时(h)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24-48h内快速成型,传统的实验载体老鼠和猴子则分别需要21天和9个月方可完成胚胎发育。

[0044] 7)高效——斑马鱼胚胎及幼鱼透明,可同时观察多个器官系统,实验分析方法简单、快速。

[0045] 8)可靠的预测性——斑马鱼的基因与人类基因的相似度高达85%以上,其生物学功能与哺乳动物及人类高度相似,实验结果可比性强,预测性好。

[0046] 9)直观性强——胚胎及幼鱼透明,可直接置于显微镜下观察细菌的生长和繁殖。

[0047] 10)稳定性高、重复性好——本发明重复实验十几次,所获实验结果基本相同。

[0048] 本发明应用价值

[0049] 斑马鱼细菌感染模型具有可靠、快速、高效、低廉、高性价比等优点,本模型可用于

细菌感染研究以及筛选抗生素。本发明对加快降血脂药物的研发及改善高脂血症患者的治疗具有意义重大。

[0050] 发明详述

[0051] 本发明的目的在于提供一种斑马鱼细菌感染模型的构建方法及其应用。本发明提供的方法具有简便、快速、经济、高效、高通量等优点。

[0052] 一、本发明提供一种建立斑马鱼细菌感染模型的方法,设计方案为:

[0053] 1.细菌的培养

[0054] 将带有卡那霉素抗性的红色荧光质粒RFP(Kan⁺)转入氯霉素抗性大肠杆菌BL21(DE3)Plyss(Chl⁺)中,转化成功后涂LB固体平板(Kan⁺、Chl⁺),筛选能够产生红色荧光且具有卡那霉素抗性和氯霉素抗性的大肠杆菌(下文简称BL21RFP),长出单菌落后4℃保存平板。每次对斑马鱼进行细菌注射前一天,挑取BL21RFP单菌落到LB液体培养基中(Kan⁺、Chl⁺),37℃、200rpm培养16h,备用。

[0055] 2.斑马鱼选取

[0056] 取4~5对斑马鱼亲本交配,按照Westerfield[10]的方法孵化胚胎。将处于最佳处理阶段的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常且发育阶段一致的斑马鱼移入6、12、24、48、96或384孔微孔板中,根据微孔板规格放入不同数量的斑马鱼。

[0057] 3.细菌注射

[0058] 设置5个实验组:3个细菌注射组、1个溶剂注射组、1个空白对照组。将步骤1中培养好的细菌用灭菌的1×PBS缓冲液洗脱3次;将斑马鱼麻醉后,用显微注射的方式将细菌注入斑马鱼体内——可采用心包注射或卵黄囊注射。3个细菌注射组的细菌注射量分别为:600-700CFU、3,000-3,500CFU和15,000-18,000CFU,溶剂注射组注射等体积灭菌的1×PBS缓冲液。注射结束后,洗脱除去残留的麻醉剂,并将斑马鱼转入6孔板中,每孔中加入等体积的养殖用水(溶解氧质量浓度为6-8mg/L;水温为28℃;pH为7.2-7.6;总硬度为200-250mg/L,下同),按最佳培养时间长度于34℃恒温培养箱中培养。

[0059] 4.结果分析

[0060] 统计各实验组的斑马鱼存活率,并在荧光显微镜下观察斑马鱼体内细菌的生长情况,拍照并保存。用ImageJ图像分析软件或尼康NIS-Elements D3.10高级图像处理软件对图像进行分析,定量分析斑马鱼体内的细菌荧光强度,进而定量评价斑马鱼体内的细菌生长情况。

[0061] 二、本发明提供了一种利用斑马鱼细菌感染模型评价与筛选抗生素的方法,设计方案为:

[0062] 1.细菌的培养

[0063] 每次对斑马鱼进行细菌注射前一天,挑取BL21RFP单菌落到LB液体培养基中(Kan⁺、Chl⁺),37℃、200rpm培养16h,备用。

[0064] 1.细菌的培养

[0065] 将带有卡那霉素抗性的红色荧光质粒RFP(Kan⁺)转入氯霉素抗性大肠杆菌BL21(DE3)Plyss(Chl⁺)中,转化成功后涂LB固体平板(Kan⁺、Chl⁺),筛选能够产生红色荧光且具有卡那霉素抗性和氯霉素抗性的大肠杆菌(下文简称BL21RFP),长出单菌落后4℃保存平板。每次对斑马鱼进行细菌注射前一天,挑取BL21RFP单菌落到LB液体培养基中(Kan⁺、Chl⁺)

⁺), 37°C、200rpm培养16h, 备用。

[0066] 2. 斑马鱼选取

[0067] 取4~5对斑马鱼亲本交配, 按照Westerfield^[10]的方法孵化胚胎。将处于最佳处理阶段的斑马鱼置于解剖显微镜下观察, 挑取发育正常且发育阶段一致的斑马鱼移入6、12、24、48、96或384孔微孔板中, 根据微孔板规格放入不同数量的斑马鱼。

[0068] 3. 细菌注射

[0069] 设置9个实验组: 7个细菌注射组、1个溶剂注射组、1个空白对照组。将步骤2中培养好的细菌用灭菌的1×PBS缓冲液洗脱3次; 将斑马鱼麻醉后, 用显微注射的方式将细菌注入斑马鱼体内——可采用心包注射或卵黄囊注射。5个细菌注射组的细菌注射量均为3,000-3,500CFU, 溶剂注射组注射等体积灭菌的1×PBS缓冲液。注射结束后, 洗脱除去残留的麻醉剂, 并将斑马鱼转入6孔板中, 每孔中加入等体积的养殖用水。

[0070] 4. 化合物处理

[0071] 7个细菌注射组中, 5个化合物处理组, 1个模型组, 1个阳性对照组。移除微孔板中的养殖用水, 化合物处理组中加入一定体积(根据微孔板规格而定)浓度分别为0.1μM、1μM、10-、100μM和200μM的庆大霉素; 阳性对照组中加入氨苄西林; 模型组加入等体积的养殖用水。按照最佳处理时间长度于34°C恒温培养箱中培养。

[0072] 5. 图像分析

[0073] 移除微孔板中的液体, 加入等体积浓度为0.64mM的甲磺酸将斑马鱼麻醉处死后, 用3%甲基纤维素胶将斑马鱼固定于双凹载玻片上后, 置于荧光显微镜下观察各实验组斑马鱼体内的细菌生长情况并拍照保存, 定性评价化合物的体内抗菌效果。空白组和溶剂组在荧光显微镜下观察无荧光, 细菌注射模型组的荧光很强, 阳性对照组和化合物处理组的荧光强度减弱(图1)。

[0074] 用ImageJ图像分析软件或尼康NIS-Elements D3.10高级图像处理软件对图像进行分析, 计算斑马鱼体内的细菌相对荧光强度(S), 定量评价化合物的体内抗菌效果(图2)。化合物的抗菌效果评价公式如下:

$$[0075] \quad \text{抗菌效果 (\%)} = \left[1 - \frac{S(\text{化合物处理组}) - S(\text{溶剂组})}{S(\text{模型组}) - S(\text{溶剂组})} \right] \times 100\% \quad (1)$$

[0076] 6. 微孔板分析

[0077] 药物处理一段时间后, 将斑马鱼转入96孔板, 每孔1尾。然后将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度(S), 激发和发射滤光片为EX540nm/EM575nm, 试验重复3次取其平均值。化合物的抗菌效果按照公式(1)进行评价。

[0078] 例如: 溶剂组荧光强度为1300, 模型组荧光强度为23000, 化合物处理组荧光强度分别为22349、22132、14320、7810、5206, 阳性化合物处理组荧光强度为8027, 则根据计算公式得: 化合物处理组抗菌效果分别为3%、4%、40%、70%、82%, 阳性化合物处理组抗菌效果为69%(图3)。

[0079] 统计学处理结果以 $\bar{X} \pm SE$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用Dunnett's T-检验进行统计学处理, $p < 0.05$ 为差异性显著。根据统计学处理结果可定量确定斑马鱼细菌感染模型。

附图说明

[0080] 图1为化合物处理后的斑马鱼荧光图片。与细菌注射模型组(C)相比,阳性对照组(D)和化合物处理组(E)体内细菌荧光强度明显减弱。A为空白对照组,B为溶剂注射组。

[0081] 图2为庆大霉素体内抗菌效果柱状图(图像分析)。庆大霉素体内抗菌效果有明显的浓度依赖。

[0082] 图3为庆大霉素体内抗菌效果柱状图(微孔板分析)。庆大霉素体内抗菌效果有明显的浓度依赖。

[0083] 图4为显微注射荧光标记细菌后的斑马鱼。A为空白组;B为细菌注射组,白圈内及箭头所指的亮点均为细菌。

[0084] 图5为细菌注射量不同的斑马鱼在注射后3天的体内荧光强度及其存活率统计图。随着细菌注射量的增加,斑马鱼体内荧光强度逐渐增强,但存活率也随之下降。

[0085] 图6为不同发育阶段斑马鱼注射细菌后的3天的体内荧光强度及存活率统计图。受精后1天(1dpf)注射细菌的斑马鱼荧光强度最大,受精后2天(2dpf)注射细菌的斑马鱼存活率最高。

[0086] 图7为药物处理48h后的斑马鱼。与细菌注射模型组斑马鱼(A)相比,阳性药物处理组斑马鱼(B)体内几乎没有细菌荧光。

[0087] 图8为不同处理时间下的氨苄西林抑菌率柱状图(图像分析)。氨苄西林抑菌率在48小时达到最大值。

[0088] 图9为不同处理时间下的氨苄西林抑菌率柱状图(微孔板分析)。氨苄西林抑菌率在48小时达到最大值。

[0089] 图10为不同抗生素体外对细菌BL21RFP抑制作用的柱状图(培养24h)。

[0090] 图11为不同药物处理48h后的斑马鱼。与细菌注射模型组斑马鱼(A)相比,Amp处理组(B)和Gen处理组(C)斑马鱼体内没有细菌荧光,Strep处理组(F)斑马鱼体内细菌荧光很弱,Kan处理组(D)和Chl处理组(E)的斑马鱼体内细菌荧光很强。

[0091] 图12为不同抗生素对细菌BL21RFP体内抑菌率统计柱状图(图像分析)。

[0092] 图13为不同抗生素对细菌BL21RFP体内抑菌率统计柱状图。

具体实施方式

[0093] 以下实施例是为了进一步说明本发明提供的斑马鱼细菌感染模型的实施方式和用途。实施例是为了解释而不是以任何方式限制本发明的范围,本领域技术人员在权利要求的范围内所做出的某些改变和调整也应认为属于本发明的范围。

[0094] 试剂及仪器

[0095] 大肠杆菌BL21(DE3)PlysS(Chl+)和红色荧光质粒RFP(Kan+)均购自Sigma,氨苄西林、硫酸卡那霉素、庆大霉素、新霉素硫酸盐等抗生素均购自北京鼎国昌盛科技有限公司提供,解剖显微镜(SZX7,Olympus公司,日本),电动可编程微量注射器(IM-300,Narishige公司,日本),电动聚焦连续变倍荧光显微镜(AZ100,Nikon公司,日本),多功能微孔板分析仪(Mithras LB940,Berthold Technologies公司,德国),LB液体培养基(胰蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,氯化钠10g/L,用NaOH调节该培养基的pH至7.4,高压灭菌),LB固体培养基

(胰蛋白胨10g/L,酵母提取物5g/L,氯化钠10g/L,琼脂粉20g/L,用NaOH调节该培养基的pH至7.4,高压灭菌后到平板)。

[0096] 实施例1细菌注射量的选择

[0097] 1.细菌的培养

[0098] 将带有卡那霉素抗性的红色荧光质粒RFP(Kan⁺)转入氯霉素抗性大肠杆菌BL21(DE3)Plyss(Chl⁺)中,转化成功后涂LB固体平板(Kan⁺、Chl⁺),筛选能够产生红色荧光且具有卡那霉素抗性和氯霉素抗性的大肠杆菌(下文简称BL21RFP),长出单菌落后4℃保存平板。每次对斑马鱼进行细菌注射前一天,挑取BL21RFP单菌落到LB液体培养基中(Kan⁺、Chl⁺),37℃、200rpm培养16小时(h),备用。

[0099] 2.斑马鱼选取

[0100] 将受精后2天(2dpf)且已经自然孵化的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常且发育阶段一致的斑马鱼。(注:本发明中的dpf=day post fertilization,中文是指斑马鱼受精后天数,如2dpf是指斑马鱼受精后2天。)

[0101] 3.细菌注射

[0102] 将斑马鱼分成5个实验组:3个细菌注射组、1个溶剂注射组、1个空白对照组。将步骤1中培养好的细菌BL21RFP用灭菌的1×pBS缓冲液洗脱3次;将斑马鱼麻醉后,用显微注射的方式将细菌注入斑马鱼心包注射。3个细菌注射组的细菌注射量分别为:600-700CFU、3,000-3,500CFU和15,000-18,000CFU,溶剂注射组注射等体积灭菌的1×PBS缓冲液。注射结束后,洗脱除去残留的麻醉剂,并将斑马鱼转入6孔板中,每孔中加入等体积的养殖用水(溶解氧质量浓度为6-8mg/L;水温为28℃;pH为7.2-7.6;总硬度为200-250mg/L,下同),在34℃恒温培养箱中培养72h。

[0103] 4.结果分析

[0104] 在解剖显微镜下观察并统计各实验组的斑马鱼存活率。然后在荧光显微镜下观察斑马鱼体内细菌的生长情况,拍照并保存。溶剂组和空白组在荧光显微镜下观察体内无荧光,各细菌注射组体内都有荧光(图4)。用ImageJ图像分析软件或尼康NIS-Elements D3.10高级图像处理软件对图像进行分析,定量分析斑马鱼体内的细菌荧光强度,进而定量评价斑马鱼体内的细菌生长情况。

[0105] 通过比较不同细菌注射量组斑马鱼在注射后3天的存活率和体内细菌荧光强度(图5),发现细菌注射量为3,000-3,500CFU时斑马鱼体内细菌荧光强度已经很强,而且对斑马鱼存活率影响不大。因此,细菌BL21RFP的注射量在3,000-3,500CFU时较为合适。不同细菌的侵染力和毒力不同,因此,注射不同细菌时的最佳细菌注射量也会有所不同。

[0106] 实施例2 斑马鱼发育阶段的选择

[0107] 1.细菌的培养

[0108] 方法同实施例1的步骤1。

[0109] 2.斑马鱼选取

[0110] 分别将1dpf、2dpf、3dpf和4dpf的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常且发育阶段一致的斑马鱼。

[0111] 3.细菌注射

[0112] 1dpf、2dpf、3dpf和4dpf发育阶段的斑马鱼均设置3个实验组:1个细菌注射组、1个

溶剂注射组、1个空白对照组。将步骤1中培养好的细菌BL21RFP用灭菌的1×PBS缓冲液洗脱3次；将斑马鱼麻醉后，用显微注射的方式将细菌注入斑马鱼体内。细菌注射组的细菌注射量均为：3,000CFU，溶剂组注射等体积灭菌的1×PBS缓冲液。注射结束后在荧光显微镜下挑选注射成功的斑马鱼作为细菌注射组；洗脱除去残留的麻醉剂后将斑马鱼转入6孔板中，每孔中30尾斑马鱼，空白组与溶剂组中同样是每孔30尾斑马鱼，每孔中加入等体积的养殖用水，34℃恒温培养箱中培养72h。空白组用于证实所用斑马鱼发育正常，溶剂组用于证实溶剂不会对斑马鱼健康造成损害。

[0113] 4. 结果分析

[0114] 统计各实验组的斑马鱼存活率，发现2dpf组斑马鱼的存活率最高，4dpf组的斑马鱼存活率最低。在荧光显微镜下观察斑马鱼体内细菌的生长情况，拍照并保存。用尼康NIS-Elements D3.10高级图像处理软件对图像进行分析，定量分析斑马鱼体内的细菌荧光强度，发现1dpf组斑马鱼体内细菌荧光强度最强，4dpf组斑马鱼体内细菌荧光强度最低。从斑马鱼存活率和体内细菌荧光强度的双因素考虑，选择2dpf的斑马鱼进行细菌注射比较合适(图6)。

[0115] 实施例3确定化合物最佳处理时间长度

[0116] 1. 细菌的培养

[0117] 方法同实施例1的步骤1。

[0118] 2. 斑马鱼选取

[0119] 将2dpf的斑马鱼置于解剖显微镜下观察，挑取发育正常且发育阶段一致的斑马鱼。

[0120] 3. 细菌注射

[0121] 将步骤1中培养好的细菌BL21RFP用灭菌的1×PBS缓冲液洗脱3次，将斑马鱼麻醉后，用显微注射的方式将细菌注入斑马鱼体内。细菌注射组的细菌注射量均为：3,000CFU，溶剂组注射等体积灭菌的1×PBS缓冲液。注射结束后在荧光显微镜下挑选注射成功的斑马鱼用于后续实验，洗脱除去残留的麻醉剂后将斑马鱼转入6孔板中，在34℃恒温培养箱中培养24小时。同时也将空白对照组和溶剂组在34℃恒温培养箱中培养24小时，空白组用于证实所用斑马鱼发育正常，溶剂用于证实溶剂不会对斑马鱼健康造成损害。

[0122] 4. 化合物处理

[0123] 34℃恒温培养箱中培养24小时后，将细菌注射组斑马鱼分成2组：1个模型组和1个阳性药物处理组，移除微孔板中的养殖用水，向模型组中加入3mL养殖用水，阳性药物处理组中加入3mL 100μM的氨苄西林。将模型组、阳性药物处理、溶剂组和空白对照组分成4个平行样，每个样本中均有30尾斑马鱼，将每个实验组中的4个平行样分别在34℃恒温培养箱中培养12小时、24小时、48小时和72小时。

[0124] 5. 图像分析

[0125] 移除微孔板中的液体，加入3mL浓度为0.64mM的甲磺酸将斑马鱼麻醉处死后，用3%甲基纤维素胶固定于双凹载玻片上后，置于荧光显微镜下观察、拍照并保存照片。

[0126] 一方面通过观察对比各实验组斑马鱼荧光强度可定性确定最佳处理时间长度。培养12小时后，模型组斑马鱼体内细菌已经从注射部位扩散到斑马鱼整个腹部；阳性药物处理组斑马鱼体内细菌也有一定程度的扩散，但荧光强度较弱。培养24小时后模型组斑马鱼

体内细菌扩散到斑马鱼整个躯干,而阳性药物处理组斑马鱼体内细菌的扩散范围并没有扩大,荧光强度进一步减弱。培养48小时和72小时后模型组斑马鱼体内细菌进一步扩增,整条鱼都可以看到红色荧光亮点,而阳性药物处理组斑马鱼体内红色荧光亮点已经基本消失(图7)。溶剂组和空白对照组斑马鱼体内一直没有红色荧光。因此,定性确定处理48h作为化合物最佳处理时间长度。

[0127] 另一方面可利用尼康NIS-Elements D3.10高级图像处理软件对图像进行定量分析,计算斑马鱼体内细菌荧光强度(S)。氨苄西林的抗菌效果按照公式(1)进行评价。

[0128] 统计学处理结果以 $\bar{X} \pm SE$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用Dunnett's T-检验进行统计学处理, $p < 0.05$ 表明具有显著性差异。统计学处理结果显示:氨苄西林处理12h、24h、48h和72h的抑菌率分别为 $(15.18 \pm 2.53)\%$ 、 $(47.23 \pm 5.51)\%$ 、 $(73.58 \pm 8.13)\%$ 、 $(74.07 \pm 5.74)\%$ (图8)。这表明随着处理时间的延长,氨苄西林的抑菌率逐渐上升。通过方差分析,氨苄西林处理组处理48h和72h的抑菌率显著高于24h处理组,统计学差异显著($p < 0.05$),但处理48h和72h的抑菌率无显著性差异($p > 0.05$),因此选择处理48h作为化合物最佳处理时间长度。不同化合物最佳处理时间长度也不相同,需要具体化合物具体分析,本发明按照阳性药物的最佳处理时间长度进行实验。

[0129] 6.微孔板分析

[0130] 药物处理一段时间后,将斑马鱼转入96孔板,每孔1尾。然后将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度(S),激发和发射滤光片为EX540nm/EM575nm,试验重复3次取其平均值。氨苄西林的抗菌效果按照公式

[0131] (1)进行评价。

[0132] 统计学处理结果以 $\bar{X} \pm SE$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用Dunnett's T-检验进行统计学处理, $p < 0.05$ 表明具有显著性差异性。统计学处理结果显示氨苄西林氨苄西林处理12h、24h、48h和72h的抑菌率分别为 $(13.18 \pm 2.01)\%$ 、 $(42.73 \pm 5.72)\%$ 、 $(69.83 \pm 9.04)\%$ 、 $(70.78 \pm 8.56)\%$ (图9)。通过方差分析,氨苄西林处理组处理48h和72h的抑菌率显著高于溶剂对照组和24h处理组,统计学差异显著($p < 0.01$),但处理48h和72h的抑菌率无显著性差异($p > 0.05$),因此选择处理48h作为化合物最佳处理时间长度。不同化合物最佳处理时间长度也不相同,需要具体化合物具体分析,本发明按照阳性药物氨苄西林的最佳处理时间长度进行实验。

[0133] 实施例4验证斑马鱼抗生素筛选模型

[0134] 1.细菌的培养

[0135] 方法同实施例1的步骤1。

[0136] 2.体外实验评价抗生素的抗菌效果

[0137] 将步骤1中培养好的细菌BL21RFP按照2%的接种量转接到装有3ml已灭菌LB液体培养基的试管中,然后分别向不同的试管中各自加入氨苄西林(Amp)、庆大霉素(Gen)、卡那霉素(Kan)、氯霉素(Chl)或链霉素(Strep),每种抗生素有20 μ g/ml和50 μ g/ml两个给药浓度,每个给药浓度均接3根试管。阴性对照组中只转接细菌而不加抗生素。将接好BL21RFP和抗生素的试管放入振荡摇床中培养,温度34 $^{\circ}$ C,转速200rpm。培养24h后肉眼观察各试管中的细菌是否生长,然后在紫外分光光度计上读取各个试管中液体的OD₆₂₀,以此判断各种抗生素对细菌BL21RFP的体外杀菌效果。结果表明氨苄西林、庆大霉素在20 μ g/ml和50 μ g/ml时

均能抑制细菌BL21RFP的生长;卡那霉素和氯霉素在20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时均不能抑制细菌BL21RFP的生长;链霉素在20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时不能抑制细菌BL21RFP的生长,而在50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 能完全抑制细菌BL21RFP的生长(图10)。

[0138] 3.斑马鱼选取

[0139] 将2dpf的斑马鱼置于解剖显微镜下观察,挑取发育正常且发育阶段一致的斑马鱼。

[0140] 4.细菌注射

[0141] 将步骤1中培养好的细菌BL21RFP用灭菌的1 \times pBS缓冲液洗脱3次,将斑马鱼麻醉后,用显微注射的方式将细菌注入斑马鱼体内。细菌注射组的细菌注射量均为:3,000CFU,溶剂组注射等体积灭菌的1 \times PBS缓冲液。注射结束后在荧光显微镜下挑选注射成功的斑马鱼用于后续实验,洗脱除去残留的麻醉剂后将斑马鱼转入6孔板中,在34 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养24小时。同时也将空白对照组和溶剂组在34 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养24小时,空白组用于证实所用斑马鱼发育正常,溶剂用于证实溶剂不会对斑马鱼健康造成损害。

[0142] 5.化合物处理

[0143] 34 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养24h后,挑选生长健康且仍然有荧光的细菌注射组斑马鱼并将其转入6孔板中,每组30尾斑马鱼分成6组:1个模型组和5个药物处理组。移除微孔板中的养殖用水,向模型组中加入3mL养殖用水,5个药物处理组中分别加入3mL 100 μM 的氨苄西林(Amp)、庆大霉素(Gen)、卡那霉素(Kan)、氯霉素(Chl)或链霉素(Strep)。将斑马鱼在34 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养48h。

[0144] 6.图像分析

[0145] 移除微孔板中的液体,加入3mL浓度为0.64mM的甲磺酸将斑马鱼麻醉处死后,用3%甲基纤维素胶固定于双凹载玻片上后,置于荧光显微镜下观察、拍照并保存照片(图11)。利用尼康NIS-Elements D3.10高级图像处理软件对图像进行定量分析,计算斑马鱼体内细菌荧光强度(S)。抗生素的抗菌效果按照公式(1)进行评价。

[0146] 统计学处理结果以 $\bar{X} \pm \text{SE}$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用Dunnett's T-检验进行统计学处理, $p < 0.05$ 表明具有显著性差异。统计学处理结果显示,氨苄西林处理组、庆大霉素处理组和链霉素处理组斑马鱼体细菌荧光强度明显弱于模型组斑马鱼,具有极显著性差异($p < 0.01$);卡那霉素处理组和氯霉素处理组斑马鱼体细菌荧光强度与模型组斑马鱼相比无显著性差异($p > 0.05$)。按照公式(1)得出的各处理组抑菌率分别为:氨苄西林处理组(67.35 \pm 7.03)%、庆大霉素处理组(79.31 \pm 8.16)%、卡那霉素处理组(5.58 \pm 4.13)%、氯霉素处理组(4.97 \pm 5.01)%、链霉素处理组(54.26 \pm 9.72)%(图12)。

[0147] 7.微孔板分析

[0148] 药物处理一段时间后,将斑马鱼转入96孔板,每孔1尾。然后将微孔板置于多功能微孔板分析仪下检测荧光强度(S),激发和发射滤光片为EX540nm/EM575nm,试验重复3次取其平均值。抗生素对细菌BL21RFP的的抗菌效果按照公式(1)进行评价。

[0149] 统计学处理结果以 $\bar{X} \pm \text{SE}$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用Dunnett's T-检验进行统计学处理, $p < 0.05$ 表明具有显著性差异。统计学处理结果显示,氨苄西林处理组、庆大霉素处理组和链霉素处理组斑马鱼体细菌荧光强度明显弱于模型组

斑马鱼,具有极显著性差异($p < 0.01$);卡那霉素处理组和氯霉素处理组斑马鱼体细菌荧光强度与模型组斑马鱼相比无显著性差异($p > 0.05$)。按照公式(1)得出的各处理组抑菌率分别为:氨苄西林处理组(65.24 ± 8.35)%、庆大霉素处理组(74.26 ± 9.03)%、卡那霉素处理组(3.18 ± 3.01)%、氯霉素处理组(5.38 ± 5.191)%、链霉素处理组(50.74 ± 7.93)%(图13)。

[0150] 采用图像分析和微孔板分析两种定量分析方法对斑马鱼抗生素筛选模型的验证实验结果进行分析,结果都表明100 μ M的氨苄西林、庆大霉素和链霉素均对细菌BL21RFP有明显的抗菌效果,而卡那霉素或氯霉素则对细菌BL21RFP无抗菌效果。斑马鱼体内实验结果与体外实验结果一致,表明斑马鱼抗生素筛选模型具有很好的可靠性和稳定性。

[0151] 由上述实施例可见:本发明提供的利用活体斑马鱼模型筛选和评价抗生素的方法能够简便、快速、经济、高效、高通量、准确地筛选和评价化合物的抑菌效果。本发明提供的方法步骤简单,成本低廉,准确性高,具有很好的稳定性和可靠性,活体斑马鱼能够真正反映药物的整体生物活性,包括药物的吸收、分布、代谢、排泄,可实现高通量筛选。

[0152] 尽管发明人已经对本发明的技术方案做了较为详细的阐述和列举,应当理解,对于本领域一个熟练的技术人员来说,对上述实施例作出修改和/或变通或者采用等同的替代方案是显然的,都不能脱离本发明精神的实质,本发明中出现的术语用于对本发明技术方案的阐述和理解,并不能构成对本发明的限制。

[0153] 参考文献

[0154] [1]Harrison JW,Svec TA.The beginning of the end of the antibiotic era?Part II.Proposed solutions to antibiotic abuse[J].Quintessence International.1998,29(4):223-9.

[0155] [2]赖婧 刘洋 汪宇 秦上尚 李岩 吴聪明.800株不同动物源大肠杆菌的耐药性监测[J].中国兽医杂志,2011年,4:12-14.

[0156] [3]Lemaitre,B.et al.(1997)Drosophila host defense:differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.94,14614-14619.

[0157] [4]Tan,M.W.et al.(1999)Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.96,715-720.

[0158] [5]Ewbank,J.J.(2002)Tackling both sides of the host-pathogen equation with *Caenorhabditis elegans*.Microbes Infect.4,247-256.

[0159] [6]Hagele,S.et al.(2000)*Dictyostelium discoideum*:a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*.Cell.Microbiol.2, 165-171

[0160] [7]McGrath P,Li C Q.Zebrafish:a predictive model for assessing drug-induced toxicity[J].Drug Discover Today,2008,13(9):394-401.

[0161] [8]Trede,N.S.,Zapata,A.,and Zon,L.I.Fishing for lymphoid genes.Trends Immunol,2001,22:302-307.

[0162] [9]Zarkadis,I.K.,Mastellos,D.,and Lambris,J.D.Phylogenetic aspects of

the complement system. Dev Comp Immunol, 2001, 25: 745-762.

[0163] [10] Westerfield M.. The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish. Eugene, Oregon: The University of Oregon Press, 1993.

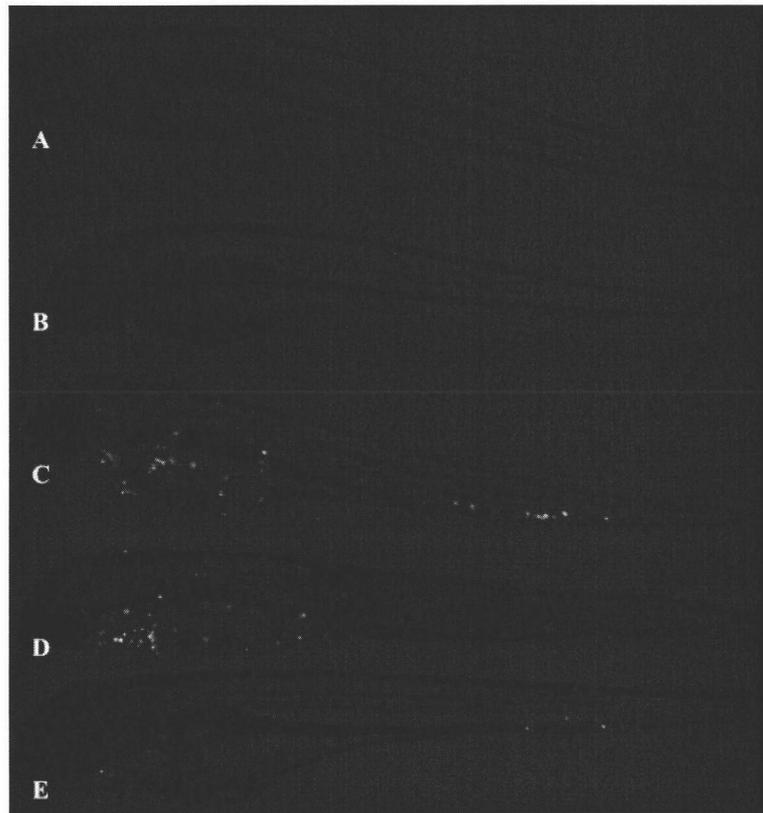


图1

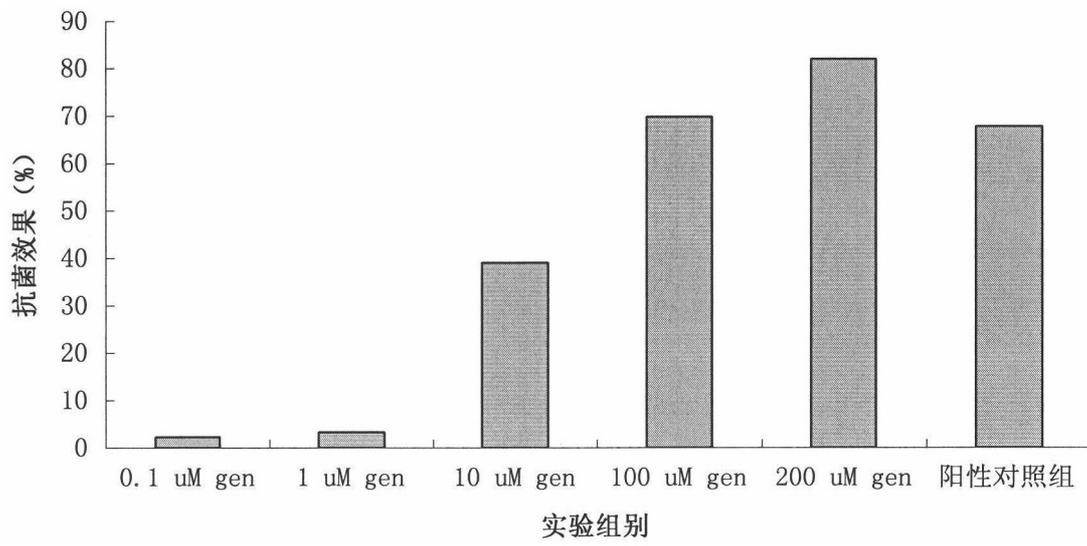


图2

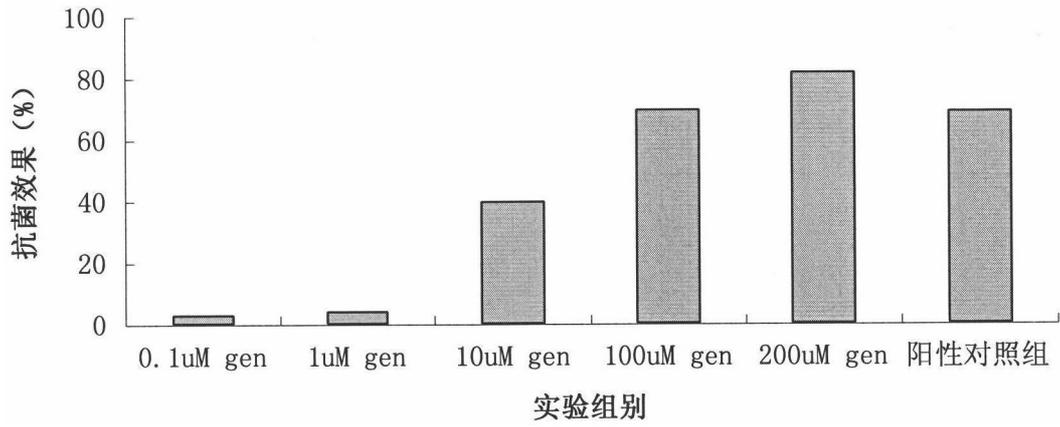


图3

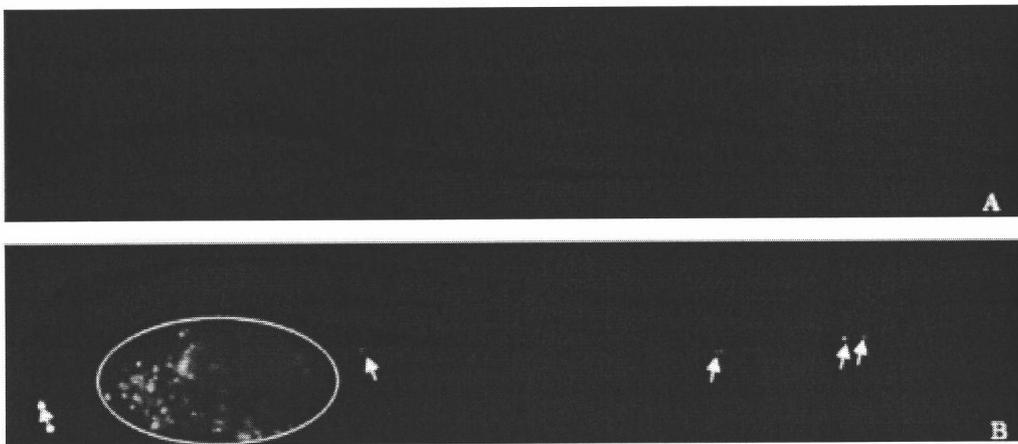


图4

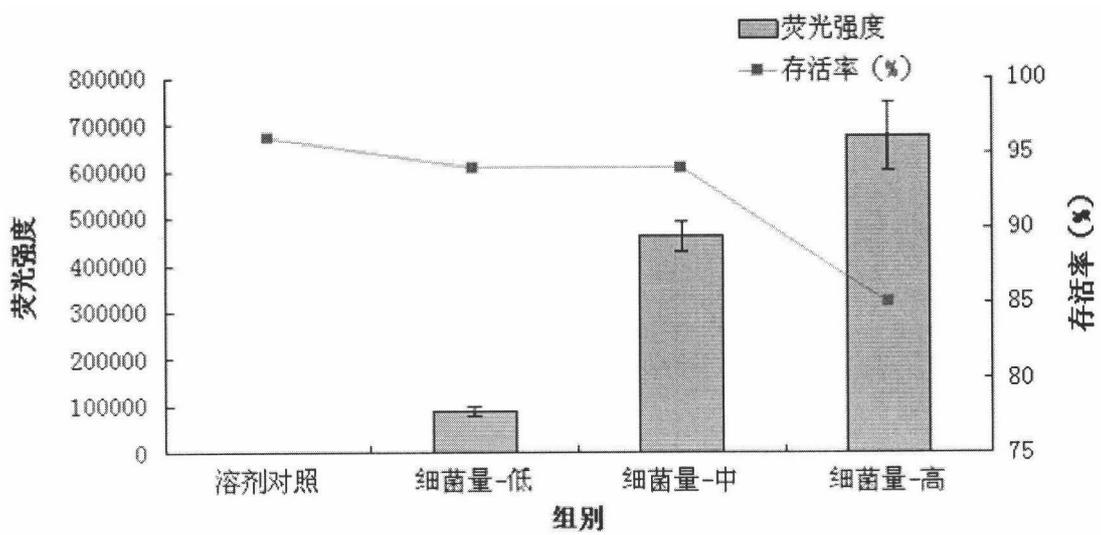


图5

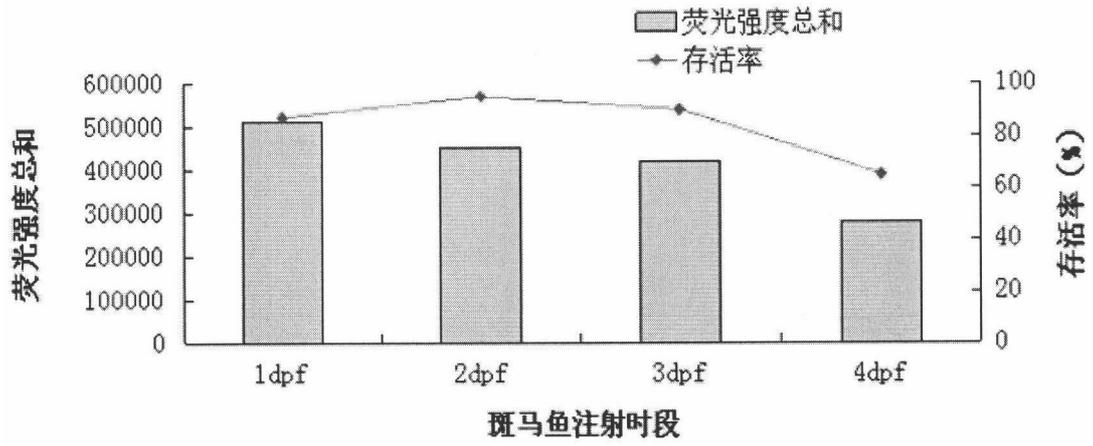


图6



图7

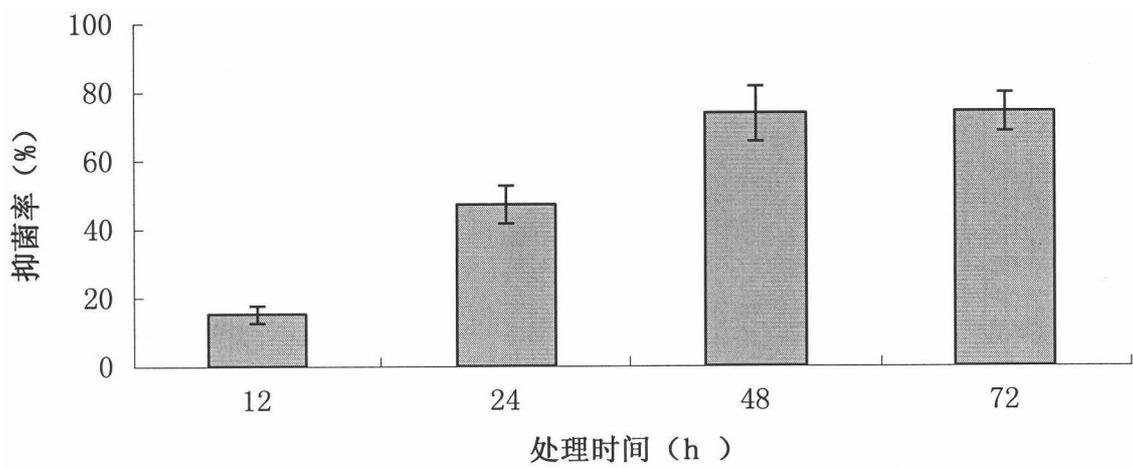


图8

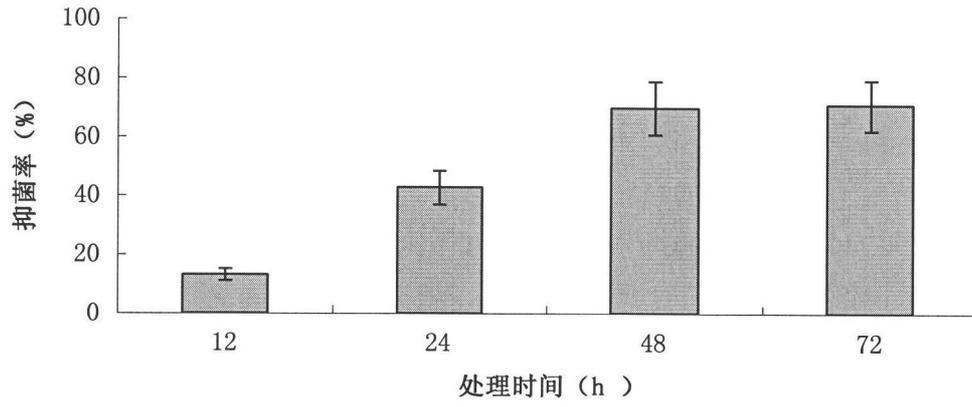


图9

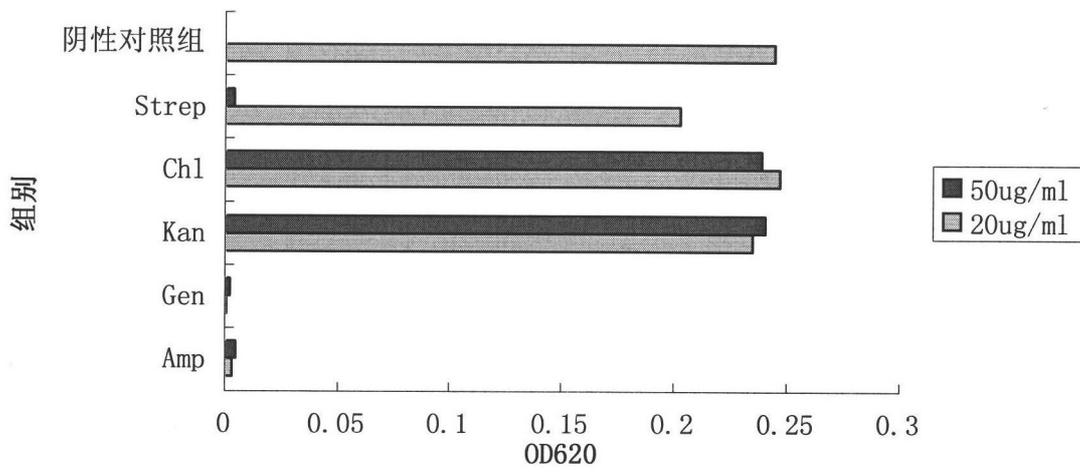


图10

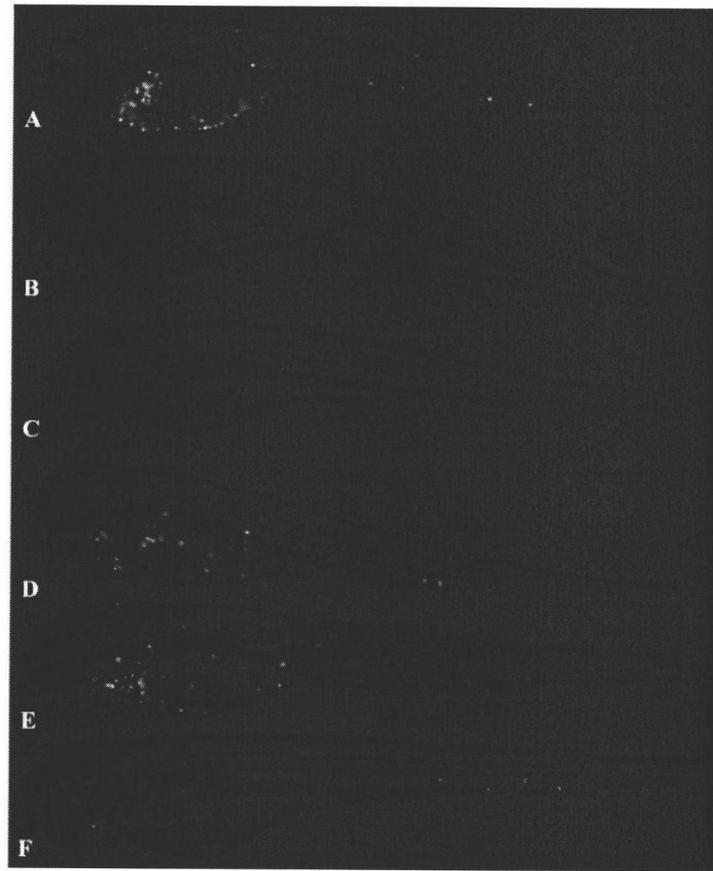


图11

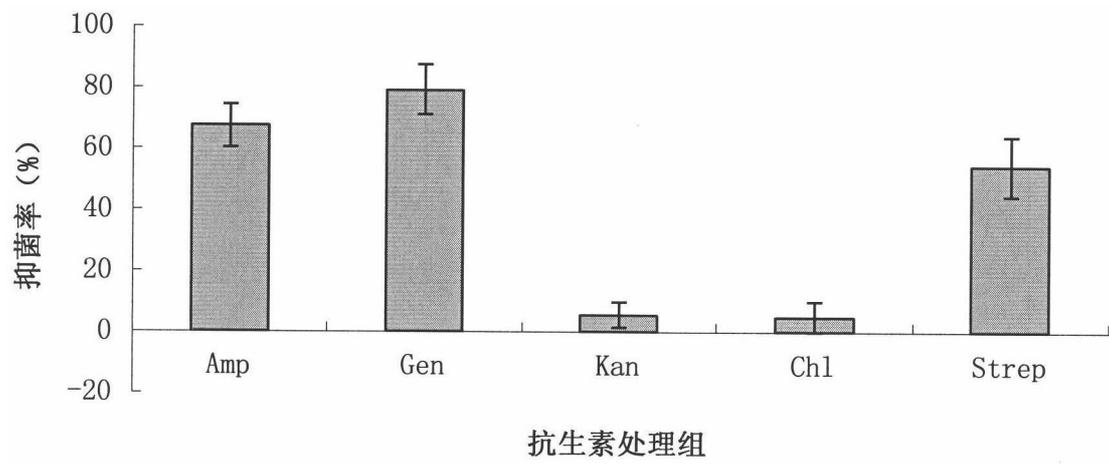


图12

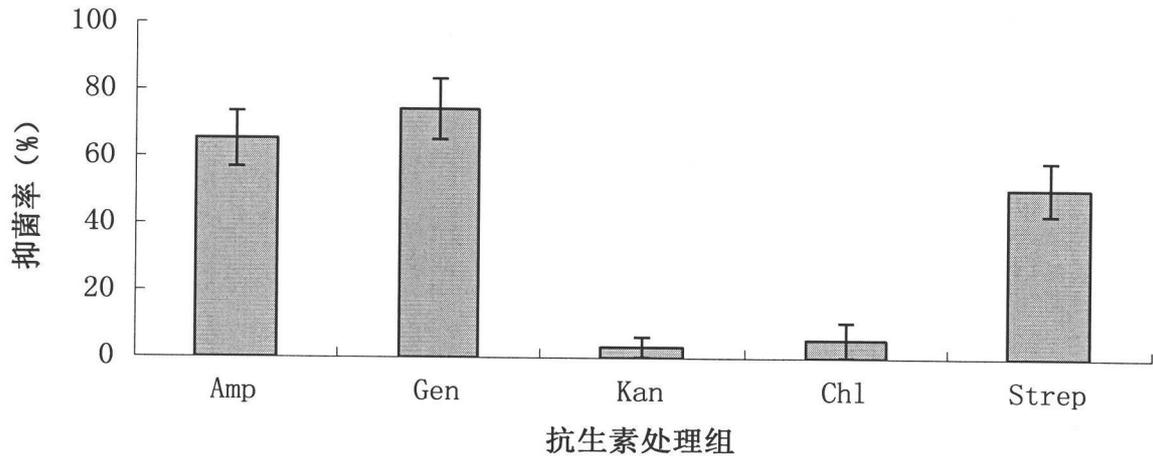


图13