



中国科学院水生生物研究所
国家水生生物种质资源库
国家斑马鱼资源中心

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

第十五期

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)
全国斑马鱼实验技术培训会议

培训手册

www.zfish.cn

2021 年 11 月 15 日-11 月 19 日

中国·武汉



国家水生生物种质资源库

国家斑马鱼资源中心

第十五期

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

全国斑马鱼实验技术培训会议

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

2021年11月



编辑人：潘鲁媛
编写人：第一章：潘鲁媛、柳力月
第二章：李阔宇、李玲璐
第三章：柳力月
第四章：谢训卫
第五章：熊凤
排版人：罗姣
审定人：孙永华

国家水生生物种质资源库（NABRC）

版权声明：此手册为国家水生生物种质资源库（简称 NABRC），国家斑马鱼资源中心（简称 CZRC）编写，服务于 CZRC 主办的各类斑马鱼实验技术培训会议和技术咨询服务。本手册引用图片均已标明出处，未标明出处的图片为 CZRC 原创。此手册的版权和最终解释权归 CZRC 所有。

www.zfish.cn

致谢

国家水生生物种质资源库是由科技部和财政部支持建立的国家科技资源共享服务平台。国家斑马鱼资源中心是中国科学院模式和特色动物实验平台的核心成员。全国斑马鱼实验技术培训会议得到中国科学院继续教育学院专项经费支持。



目 录

第一章 模式动物斑马鱼.....	1
第一节 斑马鱼的基本信息.....	1
第二节 斑马鱼的发育过程简述.....	2
第三节 斑马鱼的研究概况.....	8
第四节 斑马鱼的遗传学介绍.....	10
第五节 斑马鱼成鱼外部形态观察及内部解剖.....	13
第二章 斑马鱼鱼房建设及实验室养殖.....	21
第一节 斑马鱼的规范养殖系统.....	21
第二节 正规斑马鱼鱼房的搭建.....	25
第三节 斑马鱼养殖环境.....	29
第四节 斑马鱼的实验室繁育及体外受精.....	31
第五节 斑马鱼的饲养及饵料预备.....	43
第六节 斑马鱼的实验室安乐死.....	46
第七节 斑马鱼养殖中常见问题.....	46
第三章 斑马鱼常见鱼病及健康维护.....	49
第一节 细菌性疾病.....	49
第二节 寄生虫疾病.....	53
第三节 真菌性疾病.....	55
第四节 非感染性和先天性疾病.....	56
第五节 斑马鱼日常健康维护.....	59
第四章 斑马鱼基因突变技术及鉴定方法.....	67
第一节 斑马鱼基因的下调表达及敲除技术.....	67
第二节 斑马鱼中常规基因突变的鉴定.....	79
第三节 斑马鱼整胚原位杂交技术.....	83



第五章 斑马鱼中的各类转基因技术及鉴定.....	105
第一节 斑马鱼基因过表达、转基因及基因敲入技术.....	105
第二节 斑马鱼中常规转基因品系的鉴定.....	110
第三节 斑马鱼胚胎显微注射技术.....	112
附录：国家斑马鱼资源中心 SOPs.....	123
国家斑马鱼资源中心配鱼产卵操作规范.....	123
国家斑马鱼资源中心胚胎消毒操作规范.....	126
国家斑马鱼资源中心胚胎（1-5dpf）养殖操作规范.....	128
国家斑马鱼资源中心幼苗（5-15dpf）养殖操作规范.....	130
国家斑马鱼资源中心幼鱼（15-90dpf）养殖操作规范.....	132
国家斑马鱼资源中心成鱼（>90dpf）养殖操作规范.....	134
国家斑马鱼资源中心饵料草履虫培养操作规范.....	136
国家斑马鱼资源中心渔捞使用及消毒操作规范.....	138
国家斑马鱼资源中心鱼缸及配种缸消毒操作规范.....	140

国家斑马鱼资源中心（CZRC）

www.zfish.cn



第一章 模式动物斑马鱼

第一节 斑马鱼的基本信息

斑马鱼 (*Danio rerio*)，英文名称 zebrafish，属辐鳍鱼纲 (Actinopterygii)，鲤形目 (Cypriniformes)，鲤科 (Cyprinidae)，鲃属 (*Danio*)。原产于印度半岛的淡水水域，为杂食性的热带淡水鱼类[1]。

斑马鱼鱼体呈梭形，长度 3 至 5 厘米，从背部至腹部、臀鳍，有多条深蓝色纵向条纹直达尾鳍，因满身条纹似斑马而得名；背鳍、臀鳍偏后，尾鳍深叉形，诸鳍均淡黄色透明。成体雌鱼为银灰色，体态丰满，腹部膨大；成体雄鱼为柠檬色，身材修长，腹部扁平 (图 1.1.1)。



图 1.1.1 成年野生型 (AB 品系) 斑马鱼。

斑马鱼以从头部直达尾鳍的纵向蓝色条纹而得名。

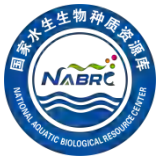
图片上方为雄鱼，体型修长，体色为柠檬色，腹部扁平。

图片下方为雌鱼，体型丰满，腹部膨大，银亮，体色银灰。

同龄雌鱼较雄鱼体型略大。

斑马鱼的适宜生长温度为 20-30 °C，在自然环境中观察到的斑马鱼可耐受生存温度为 12-39 °C；观察胚胎发育的标准养殖温度为 28.5 °C[2]。在实验室养殖环境下，斑马鱼性成熟期为 3 个月左右，全年皆可交配产卵，两次产卵间隔仅需一周。一对健康的成年斑马鱼一次交配可产卵 200 枚以上。斑马鱼的自然寿命可大于 5 年[3]，但在实验室中，出于养殖系统健康考虑，除特殊需求外，一般不会养殖年龄大于 2 年的鱼。





斑马鱼被引入生物学研究领域的历史并不长，但以斑马鱼为工具的各类研究发展非常迅速，现在已经成为最主要的模式动物之一。作为研究工具，斑马鱼具有如下的优势：体型小、易于养殖、成本低廉，体外受精、体外发育，产卵量大、胚胎透明、发育迅速，多种组织器官具有再生能力，精子可冷冻保存，对外界环境反应迅速以及基因组与人类同源性高等特点[4,5]。因此在近 20 年来，被广泛应用于遗传学[6]、发育生物学[7,8]、神经生物学[9]、肿瘤学[10]、再生和干细胞研究[11]、疾病模型和药物筛选[12]、环境毒理学[13]、基础水产学[14]等科研领域。

第二节 斑马鱼的发育过程简述

体外受精、体外发育、产卵量大、胚胎透明是斑马鱼作为生物学研究工作的重要优势之一。

斑马鱼受精卵直径在 0.7 mm 左右，外部由一层卵壳覆盖保护。受精卵从结构上可分为动物极和植物极两部分。动物极为进行细胞分裂的动物发育部分；植物极俗称卵黄，在胚胎发育早期为动物极提供所需的物质和营养（图 1.2.1）；斑马鱼胚胎在受精后的 5 天时间内不需要从外界摄取食物。

在 28.5 °C 的标准水温，稀疏培养（5-10 枚胚胎/mL）情况下，斑马鱼胚胎的早期发育大致可划分为以下八个发育阶段（表 1.2.1）。

表 1.2.1 斑马鱼胚胎早期发育时期（参考 Kimmel et al., 1995）

发育时期	hpf	特征描述
合子期	0-0.75	受精卵完成首个细胞周期
卵裂期	0.75-2.25	第 2-7 个细胞周期
囊胚期	2.25-5.25	第 8-9 个细胞周期，外包开始
原肠胚期	5.25-10	持续到外包结束，胚层胚轴形成
体节期	10-24	体节分化，原始器官发生，尾部出现
咽胚期	24-48	体轴开始伸直，循环系统、色素细胞和鳍开始发育
孵化期	48-72	原始器官发育完成，软骨在头和鳍中发育，孵化开始
早幼期	72-120	鱼鳔膨起，出现觅食及主动躲避行为



一、 合子期 (zygote period) 及卵裂期 (cleavage period)

首先, 受精卵在受精后 10 分钟左右卵壳膨开, 形成空腔。动物极的首次细胞分裂发生在受精后 45 分钟左右, 胚胎进入卵裂期; 之后以大约以每 15 分钟一次细胞分裂的速度快速发育; 在受精后 2 小时 (2 hpf, hours post fertilization) 分裂达到 64 个细胞, 进入囊胚期 (图 1.2.1)。



图 1.2.1 斑马鱼胚胎早期发育过程图 (引自 Schier&Talbot, Annu Rev. Genet., 2005; a, 刚刚进入卵裂期的胚胎; b, 椭球形期, 外包尚未开始; c, 胚盾阶段; d, 尾芽期; e, 15 体节期; f, 20 体节期; g, 囊咽期。图中缩写: sh: embryonic shield; kv: Kupffer's vesicle; som: somite; hg: hatching gland; fb: forebrain; mb: midbrain; hb: hindbrain; nc: notochord; sc: spinal cord; fp: floor plate)



二、 囊胚期 (blastula period)

2.75 hpf, 胚胎达到 512 细胞期, 胚胎自身的合子基因开始表达。3 hpf 胚胎达到 1000 细胞期, 在动物极和卵黄之间可见清晰的单层 YSL 细胞核层(yolk syncytial layer nuclei)。经过再一次细胞周期后, 胚胎进入高囊胚阶段 (high stage)。这一阶段的胚胎, 细胞堆叠很高, 卵黄和细胞之间界线清晰, 最利于区别和分拣受精与未受精的胚胎。之后胚胎细胞在继续分裂的同时进行急速的细胞迁徙 (cell migration), 向植物极扩展, 外包运动 (epiboly) 开始。

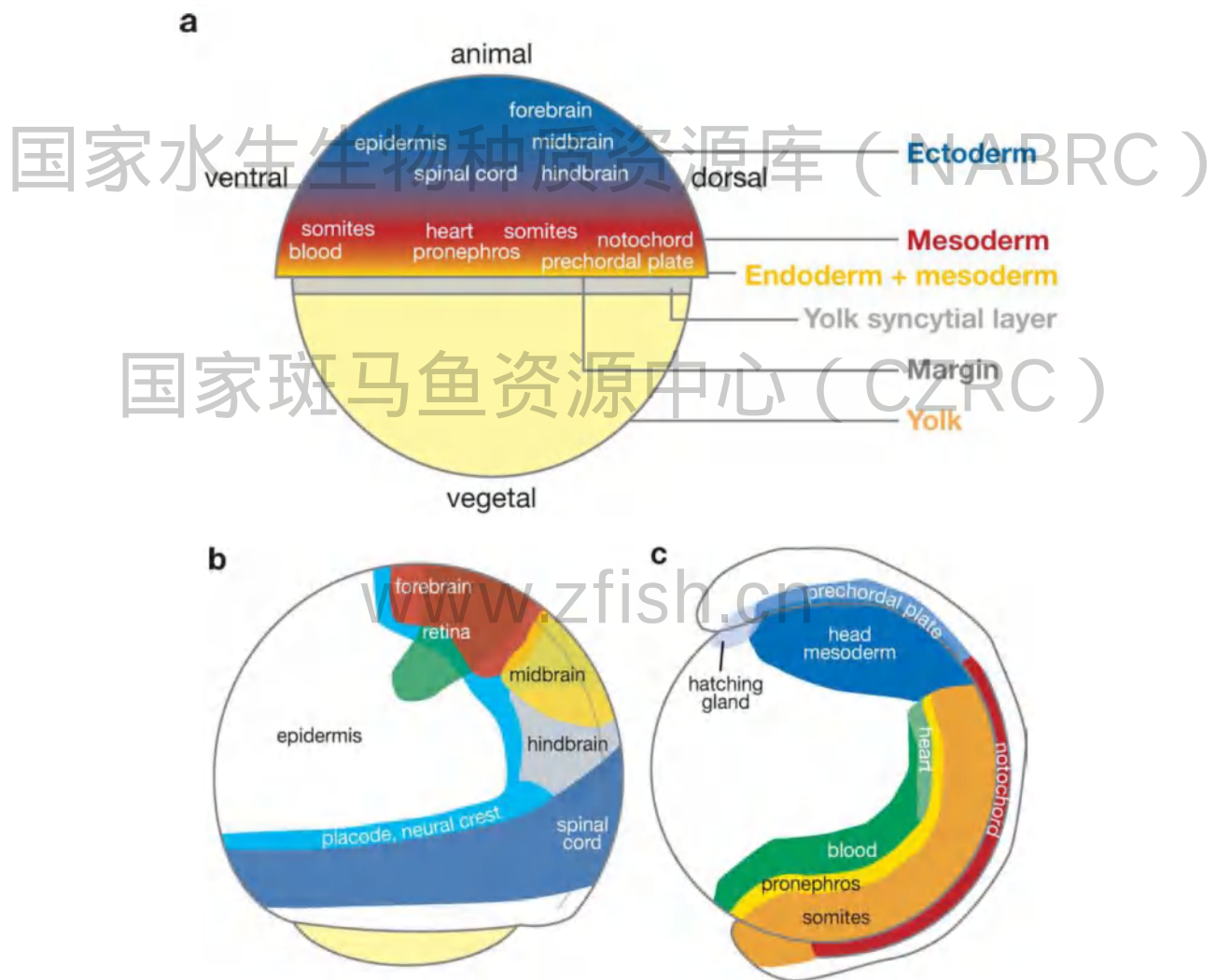
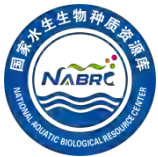


图 1.2.2 斑马鱼胚胎器官-组织命运图谱 (引自 Schier&Talbot, Annu Rev. Genet., 2005; 细胞命运图谱; a: 50% epiboly,即原肠胚早期; b: 90% epiboly; c:体节早期中胚层)





三、 原肠胚期 (gastrula period)

5.25 hpf 胚胎进入原肠胚期，细胞内卷 (involution) 开始。当胚胎发育进入原肠胚期，器官-组织的命运就基本确定下来 (图 1.2.2)。5.7 hpf，胚环 (germ ring) 从动物极清晰可见，外包运动短暂停顿；6 hpf，胚盾开始形成，从动物极可见 (图 1.2.1)，背腹轴 (dorsal-ventral axis) 确立；胚盾形成后，外包运动继续，上胚层 (epiblast) 及下胚层 (hypoblast) 分开，胚盾持续向动物极延伸；10 hpf 外包运动完成，尾芽 (tail bud) 萌出 (图 1.2.1)。

四、 体节期 (segmentation period)

10.3 hpf 第一对体节 (somite) 萌出，胚胎进入体节期。之后伴随胚体的增长，约每半小时增加一对体节，在 18 hpf 达到 18 体节期。在 12 hpf 左右，胚胎进入 6 体节 (6-somite) 阶段，眼原基 (eye primordium) 和 KV (Kupffer's vesicle) 明显可见。在此阶段，胚胎发育出脊椎动物的基本身体结构 (body plan)，神经系统开始发育。在 10 体节阶段，耳基板 (otic placode) 开始出现。在 14 体节阶段，主要器官开始发育，循环系统、大脑神经节管 (brain neuromeres) 和前肾管 (pronephric duct) 出现。随着新的体节不断萌出，之前发育的体节逐渐发育为肌节 (myomere)。在 20 体节阶段，晶状体 (lens)、耳泡 (otic vesicle) 陆续可见，后脑神经管 (hindbrain neuromeres) 结构开始突出 (图 1.2.1)。25 至 26 体节阶段，端脑 (telencephalon) 在神经轴 (neuraxis) 前段明显突出，内耳石 (otoliths) 明显可见。此后，体节会继续增长但形成速度放缓，最终大致生成 30-34 个体节，早期血岛 (blood island) 分化出现，中后脑分界 (midbrain-hindbrain boundary) 明显可见 (图 1.2.3)。

五、 咽胚期 (pharyngula period)

24 hpf 胚胎进入咽胚期，至 48 h 结束 (图 1.2.3)，这一时期是重要的组织器官完成分化的时期，也是传统认为的最合适比较不同种类脊椎动物胚胎形态发生的时期。在此时期内，头和躯干的夹角是一个重要的观察指标；在此阶段开始时，头躯夹角小于 90 度，此后头部逐渐伸直，在 48 hpf 左右，夹角将大于 120 度。在此阶段早期，心脏还是管状结构但已开始搏动；稍后血液循环开始运行；此阶段晚期心房心室开始生成。色素生成 (pigment formation) 于此阶段早期，开始于视网膜上皮细胞，随后是背部皮肤，之后逐渐向腹部和尾部延伸。同时大脑结构出现明显的脑室分区；孵化腺 (hatching gland)



和侧线（lateral line）开始显现。

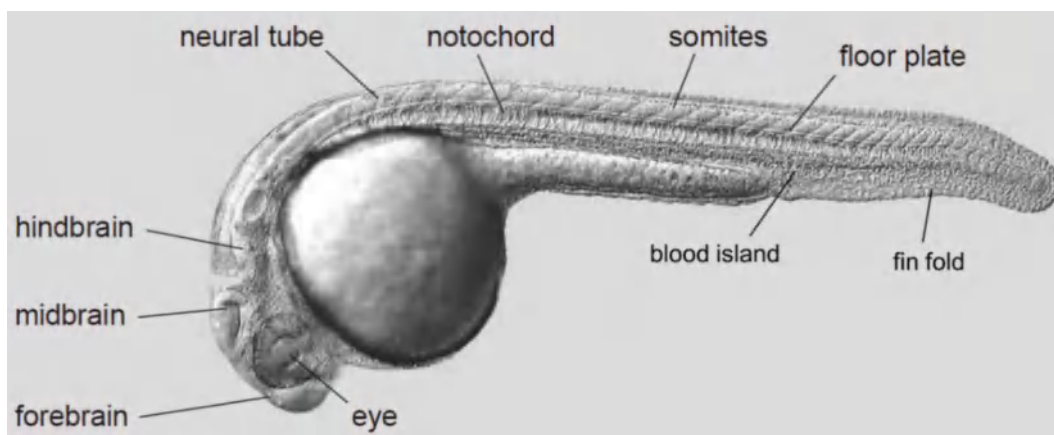


图 1.2.3 刚刚结束体节期进入囊咽期的胚胎（修改自 Haffter et al., Development, 1996）

六、 孵化期（hatching period）

48 至 72 hpf 被称为孵化期，此阶段胚胎的组织器官发育十分迅速，形成幼鱼，逐渐破出卵膜，进入水中，但是破膜孵化并不能作为此阶段的指标。此阶段，咽区发生显著变化：首先是两眼之间见到很小的开口，随后将逐渐发育为口（mouth）；咽弓（pharyngeal arches）发育明显，前端的咽弓逐渐发育为下颌（jaws）和鳃盖（operculum），而后端的咽弓将发育为鳃（gills）。背部的黑色素条纹显著，沿中线从头部一直延伸到尾部。心包腔变得明显，心脏结构完整、跳动有力。4 天左右，鱼鳔（swim bladder）开始充气，幼鱼开始具备自由游动能力[15,16]。

七、 早幼期（early larval period）

此后，早期器官发育继续进行，在 5 dpf 左右，除生殖系统外，大部分组织器官的早期发育基本完成（图 1.2.4），幼鱼开始自由游泳。在此阶段，可以观察到幼鱼的眼睛追随移动目标、自主摄食及应激躲避等行为，并开始表现出周期性的昼夜节律[17]。

在恒定的温度环境（25-30 °C）、正常的饲养密度和充分的食物供给情况下，斑马鱼 3 个月左右达到性成熟，可以交配产生下一代。



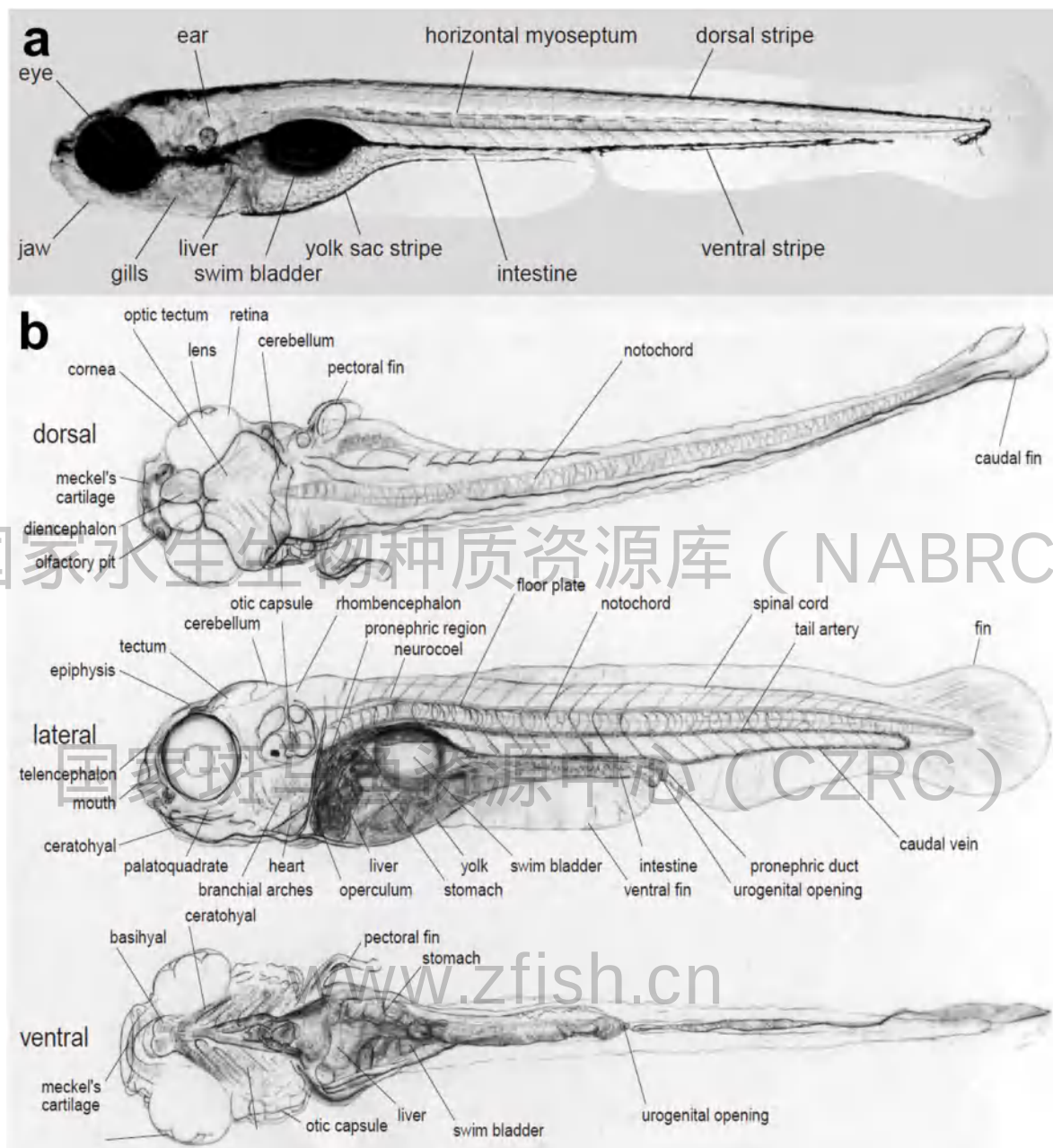
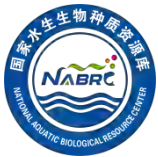


图 1.2.4 早幼期斑马鱼幼鱼组织器官分化情况 (a, 活体侧面图, b, 组织器官位置示意图, 从上到下依次为背视图、侧视图及腹视图。 引自 Haffter et al., Development, 1996。)





第三节 斑马鱼的研究概况

斑马鱼作为生物学研究工具的历史不长。在 20 世纪 70 年代末，位于美国俄勒冈大学（University of Oregon）的 George Streisinger 研究组，从当地的宠物商店购买斑马鱼进行发育生物学实验，是斑马鱼作为实验室研究工具的开始。

Steisinger 和同事们通过静水压（hydrostatic pressure）处理分裂过一次的卵子细胞获得携带突变的纯合子，研究脊椎动物早期胚胎发育相关的重要基因[18]。同样是俄勒冈大学的 Charles Kimmel 研究组，在上世纪 80 至 90 年代，对斑马鱼的早期胚胎发育和基因表达进行了一系列全面和详细的描述，为斑马鱼成为广泛使用的科研工具奠定了基础[19]。

1996 年 12 月，美国发育生物学报（Development）第 123 卷，以专刊形式发表 22 篇斑马鱼相关文章。这些成果来自 3 个研究小组合作完成的斑马鱼大规模基因诱变和突变筛选工作[7,8]。他们分别是位于美国波士顿（Boston）哈佛大学的 Marc Fishman 和 Wolfgang Driever 研究小组，以及位于德国蒂宾根（Tübingen）的马普研究所的 Christiane Nüsslein-Volhard 研究小组。他们通过 ENU 处理斑马鱼雄鱼，诱导配子基因组发生随机突变，筛选对胚胎发育早期有重要影响的基因，获得了上千个具有不同表型的突变品系。他们的工作在此后被称为“the Boston- Tübingen Screen”，不仅奠定了斑马鱼作为模式动物的坚实地位，也为斑马鱼研究领域培养了一大批优秀科学家[20,21]。此后，以斑马鱼为实验材料的研究飞速发展。相关研究领域也从最开始的以研究脊椎动物早期发育为主，拓展到生物学相关研究的方方面面。从上世纪 90 年代至今的近 30 年中，以斑马鱼为工具的研究总量扩展了近 20 倍；近 10 年来更是在诸多模式动物中脱颖而出，成为研究规模发展最快的模式动物[9]。

我国的斑马鱼相关研究始于上世纪末。清华大学孟安明实验室是我国第一家以斑马鱼为主要研究工具的生物学实验室。在本世纪，我国的斑马鱼研究飞速发展，2000 年，我国以斑马鱼为研究材料发表的科研论文总数占全世界同类文章的比重不足 1%，此后不断发展，在 2010 超过 10%，在 2020 年已超过 29%（图 1.3.1）[4]。与此同时，中国斑马鱼相关研究的领域也在快速发展。Web of Science™ Core Collection 的统计数字显示，以斑马鱼为工具的研究论文主要集中在 10 个领域：发育生物学、生物化学及分子生物学、细胞生物学、神经生物学、遗传学、生物技术、毒理学、动物学、环境生物学以及





海洋生物学，显示了我国斑马鱼相关研究内容的多样性。

斑马鱼不仅在基础生物学领域成为发展迅速的研究工具，也在生物医学领域发挥越来越大的作用。斑马鱼和人类的基因组同源性高，80%的已知人类疾病相关基因，都可以在斑马鱼的基因组中找到同源基因[22]，因此，以斑马鱼为工具可建立大量的人类疾病模型，探索人类疾病的遗传和发病机理。斑马鱼作为淡水鱼类，对水质环境高度敏感。以药物、化合物溶入水中，即可能对斑马鱼的胚胎、幼鱼和成鱼产生显著的影响，因此斑马鱼也可作为环境学、毒理学和药物筛选的研究工具。由于斑马鱼养殖成本低，产卵量大，以斑马鱼为对象进行药物筛选，不仅可以完成高通量和高内涵的筛选工作，而且较之传统体系筛选化合物的准确度更高[12]。

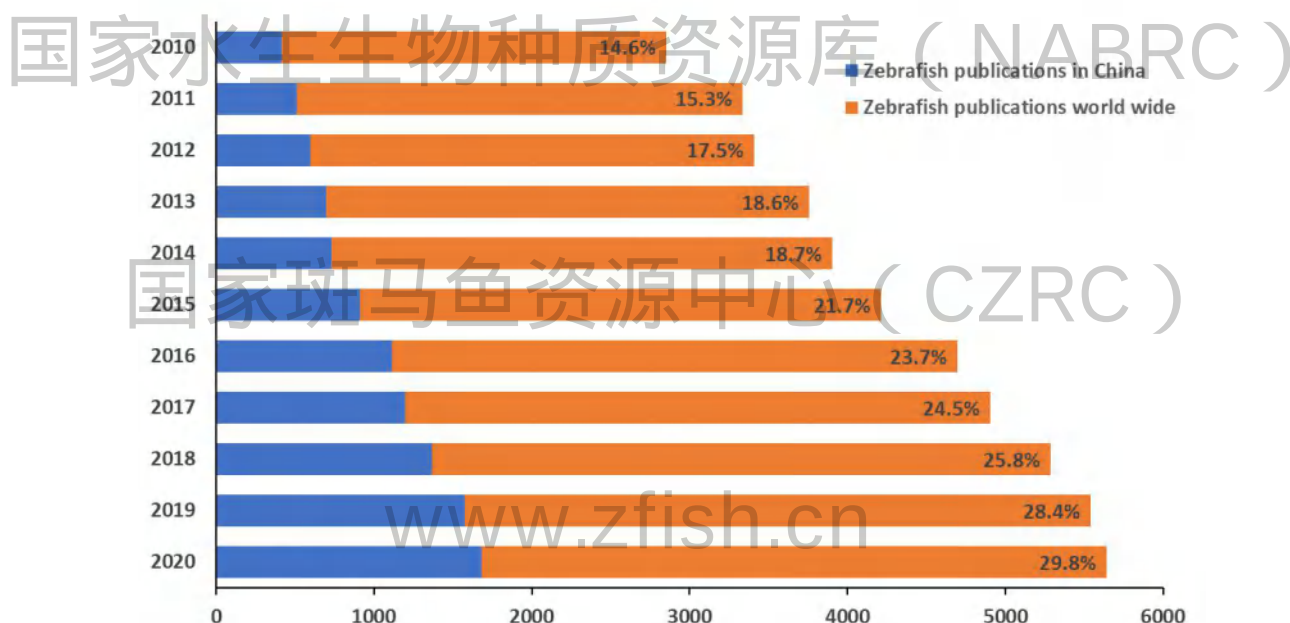


图 1.3.1 中国及世界斑马鱼研究发展概况。图中数字为 Web of Science™ Core Collection 中以 zebrafish 为关键词搜索发表的研究论文的数量。橙色柱形为全世界范围内斑马鱼相关研究发表数量，蓝色为中国研究者发表数量，百分比数字为中国斑马鱼研究全球占比。





第四节 斑马鱼的遗传学介绍

斑马鱼是二倍体动物，有 25 对染色体，雌雄异体，有性繁殖，无已确认的性染色体。

一、 斑马鱼基因组概况

根据基因组参考序列联盟（The Genome Reference Consortium）2017 年最新公布的 GRCz11 版本（http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Location/Genome）斑马鱼基因组的数据，斑马鱼基因组大小为 1.56 Gb，约为人类基因组大小的一半；含有 25,592 个蛋白质编码基因（coding genes），6,599 个非编码基因（non coding genes）和 315 个假基因（pseudogenes）。全基因组含有 59,876 个转录本（transcript）[22]。

斑马鱼的基因组有较低的 GC 含量（36.7%），不仅低于人类基因组，也低于同为鱼类的青鳉（Medaka），河豚（Fugu），和棘鱼（Stickleback）。斑马鱼基因组中 52.2% 的基因组序列为重复序列，是已知测序的脊椎动物中，重复序列含量最高的生物。斑马鱼基因组的另一大特点是富含单核苷酸多态性（SNP，Single Nucleotide Polymorphism）。在两种最常用的野生型斑马鱼品系 AB 和 Tü 之间，SNP 数量可多达 700 万个，密度为每 10 Kb 序列含有 50 SNPs，远远高于 2 个人类个体之间的 SNP 数量[22]。

斑马鱼的基因组与人类基因组高度相似。71.4% 的人类基因都可在斑马鱼基因组中找到至少一个直系同源基因（orthologue），69% 的斑马鱼基因都可以在人类基因组中找到至少一个直系同源基因（表 1.4.1）。约 80% 的已知人类疾病基因都可在斑马鱼基因组中找到直系同源基因[22]。

表 1.4.1 人类基因组和斑马鱼基因组编码基因的同源关系
（引自 Howe et. al., Nature, 2013）

Relationship type	Human	Core relationship	Zebrafish	Ratio
One to one	-	9,528	-	-
One to many	3,105	-	7,078	1:2.28
Many to one	1,247	-	489	2.55:1
Many to many	743	233	934	1:1.26
Orthologous total	14,623	13,355	18,029	1:1.
Unique	5,856	-	8,177	-
Coding-gene total	20,479	-	26,206	-





二、 常见野生型斑马鱼

目前，被定义为野生型的斑马鱼有超过 30 种之多，但是常用的不超过 5 种。其中最常用的两种：源于德国 Tübingen 马普研究所实验室的 Tü 品系和源于美国俄勒冈大学实验室的 AB 品系。两种品系外观近似，都是短鳍正常条纹外观品系，最初都是由当地的宠物商店购入，经过数代筛选移除可造成胚胎早期死亡或畸形的突变。其中 Tü 品系是英国 Sanger 中心进行斑马鱼基因组测序时最初使用的野生型品系。其他的常用野生型品系还包括 SAT (Sanger AB Tü, Sanger 中心产生的 AB 和 Tü 杂交后代)，TL (Tupfel long fin, 携带 leo^{tl} 和 lof^{dl2} 的双突变纯合子，为长鳍斑点外观品系)，WIK (与 Tü 有亲缘关系的，携带更多 SNP 的品系)。

三、 斑马鱼基因及品系的命名规则

斑马鱼基因的命名基本遵循哺乳动物的同源基因命名方式。一个基因一旦确定了在哺乳动物中的直系同源基因，则尽量与之保持一致，如原有其他命名则往往会被取代，因此斑马鱼的基因名称（含缩写）的变化比较频繁。如果斑马鱼中该直系同源基因不止一个，则按发现顺序依次在基因名称后添加“a”、“b”等予以区分。如果添加“a”，“b”会造成与其他基因的名字冲突，则添加“.1”、“.2”等予以区分。在斑马鱼基因的命名中，一般不使用之前添加“z”或者“zf”以示物种来源的方法。在书写斑马鱼的基因名称和基因编码的蛋白质名称时，使用惯例与其他模式动物也略有不同（表 1.4.2）。基因名称（通常使用 Gene Symbol）应当全部小写并使用斜体字（如：*shha*），相对应的蛋白质名称则不使用斜体，但是首写字母大写（如：Shha）。

表 1.4.2 斑马鱼、小鼠、人类基因及蛋白质命名格式示例
(参考 <https://wiki.zfin.org/>)

物种	基因命名	对应编码蛋白命名
人类	<i>SHH</i>	SHH
小鼠	<i>Shh</i>	SHH
斑马鱼	<i>shha, shhb</i>	Shha, Shhb

在描述突变或转基因斑马鱼的基因型和品系时，也有一些约定的命名规则。每一种独立产生的突变或转基因的 Allele，都可以由原始创制者命名。领域内，普遍接受的命名方式是以原始创制者实验室所在的机构缩写（或机构标示）进行命名，但是缩写长度





不能超过 3 个英文字母，后接编号。例如：中国科学院水生生物研究所（Institute of Hydrobiology, CAS）内所有斑马鱼相关研究实验室创制的新 Allele，都以“*ihb*”为缩写命名。选取的英文缩写，不能与已有的基因名称或其他已有的机构命名重复，也不能使用数字字母外的其他特殊字符。表 1.4.3 列出了一些常见的斑马鱼突变及转基因品系命名的例子，可作为参考。全部已有的斑马鱼品系命名（Line Designations）请查看 ZFIN 数据库的相关页面下的清单表格（<http://zfin.org/action/feature/line-designations>）。转基因品系一般在 Allele 的命名之后加 Tg（Transgenic）为后缀。更详细的命名规则及解释参见 ZFIN 数据库中公布的领域内相关协议条款（<https://wiki.zfin.org/display/general/ZFIN+Zebrafish+Nomenclature+Conventions>），为了方便国内的研究者，国家斑马鱼资源中心已将此条款全文翻译为中文，公布在中心的网站上（<http://www.zfish.cn/inforscan/1383.html>）。

表 1.4.3 斑马鱼常见品系命名示例

品系命名	实验室所属机构	举例
<i>a</i>	美国哈佛大学	<i>a9</i> (<i>mpv17</i> 突变)
<i>b</i>	美国俄勒冈大学	<i>b692</i> (<i>mitfa</i> 突变)
<i>fdu</i>	复旦大学	<i>fdu102Tg</i> (<i>Tg3(myl7:mCherry)</i>)
<i>ihb</i>	中国科学院水生生物研究所	<i>ihb20Tg</i> (<i>Tg2(mpeg1:EGFP)</i>)
<i>ion</i>	中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心	<i>ion13dTg</i> (<i>Tg2(elavl3:GCaMP5G)</i>)
<i>ioz</i>	中国科学院动物研究所	<i>ioz4Tg</i> (<i>Tg(tg:EGFP)</i>)
<i>nju</i>	南京大学	<i>nju19</i> (<i>foxcl1a</i> 突变)
<i>pku</i>	北京大学	<i>pku1Et</i> (<i>Et(gata2a:EGFP)</i>)
<i>sa</i>	英国桑格研究中心	<i>sa2</i> (<i>cyp26b1</i> 突变)
<i>t</i>	德国图宾根马普研究所	<i>t1</i> (<i>gja5b</i> 突变)
<i>tsu</i>	清华大学	<i>tsu01sm</i> (<i>huluwa</i> 突变)
<i>zju</i>	浙江大学	<i>zju130</i> (<i>upf1</i> 突变)
<i>zko</i>	中国斑马鱼基因组敲除联盟	<i>zko216b</i> (<i>ndella</i> 突变)



第五节 斑马鱼成鱼外部形态观察及内部解剖

一、解剖用材料

1× PBS 缓冲液

4% 多聚甲醛

冰水混合物

15mL 离心管

解剖剪 1 把

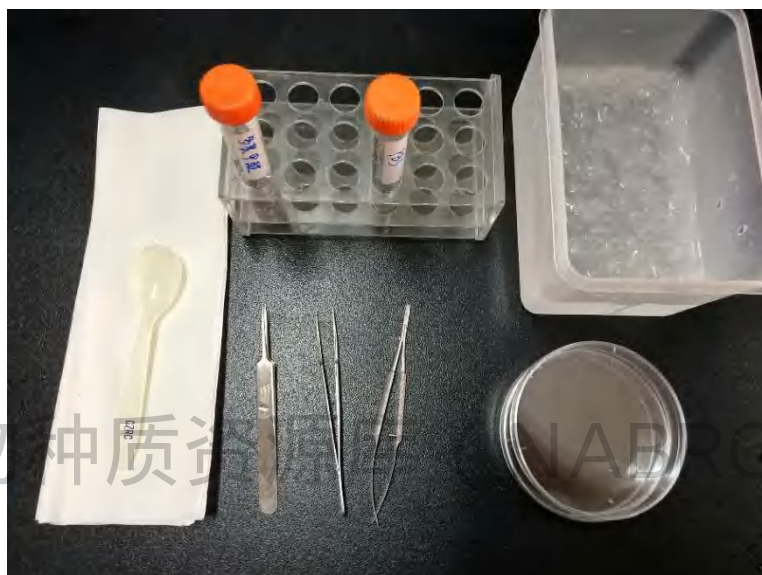
细镊子 2 把

解剖镜

培养皿 (90 mm)

纸巾

小勺



成年野生型斑马鱼 (雌鱼、雄鱼)

图 1.5.1 斑马鱼成鱼解剖工具

二、解剖步骤

1. 斑马鱼的安乐死与外形观察

1.1 选择年龄在 3-18 个月之间的成年斑马鱼 (雌鱼/雄鱼)。

1.2 安乐死：斑马鱼的安乐死有 2 种常用方法。①麻醉剂法，将成鱼浸入 0.2% 浓度的 tricaine 溶液中，观察鱼鳃的活动，鱼在麻醉剂中会缓慢停止呼吸，鳃动停止后继续浸泡 10-15 分钟，以保证鱼已死亡[23]。②冰浴法，将鱼浸入冰水混合液中 20 分钟以上，可视为鱼已死亡 (本次实验采用冰浴法)。

1.3 捞出鱼，放到纸巾上，吸干体表水分[23,24]。

1.4 将斑马鱼置于培养皿中，进行形态观察 (图 1.5.2-图 1.5.4)。

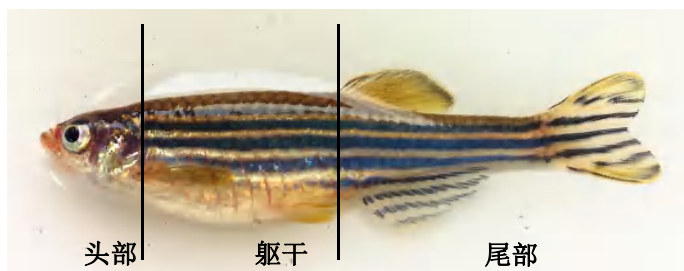


图 1.5.2 斑马鱼身体的分段 (以雌鱼为例)

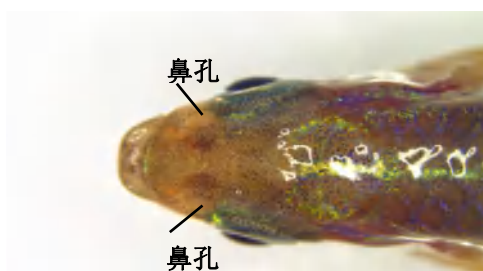


图 1.5.3 斑马鱼鼻孔所在位置



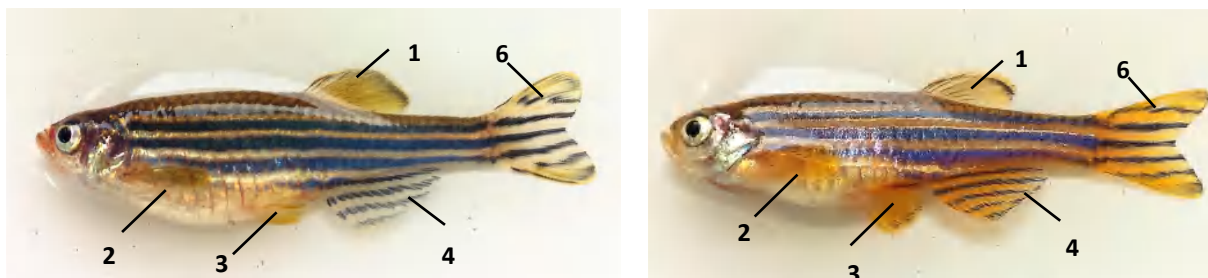


图 1.5.4 斑马鱼鱼鳍的分布。左侧为雌鱼，右侧为雄鱼；1.背鳍 2.胸鳍 3.腹鳍 4.臀鳍 5.尾鳍。

2. 斑马鱼的内部解剖与观察[24]

2.1 将麻醉后的斑马鱼置于培养皿中，腹部向上，在 2 片腹鳍之间找到泄殖孔，用解剖剪在泄殖孔与体轴垂直方向剪一小口（图 1.5.5）。

2.2 将鱼侧卧，自泄殖孔向背方剪到脊柱，沿侧线下方剪至鳃盖后缘，再由鳃盖后缘剪至下颚^[23]（图 1.5.6）。



图 1.5.5 斑马鱼泄殖孔位置



图 1.5.6 斑马鱼解剖线路示意图

2.3 将体侧体壁肌肉小心揭起，暴露心脏和内脏；之后剪开一侧鳃盖，置于培养皿中解剖镜下观察。注：揭开体壁前先将体腔膜与体壁分开，以免内脏器官与体壁分开时被损坏。

2.4 解剖镜下原位观察鳃、肝、心脏、性腺和肠等器官[25]（图 1.5.7）。



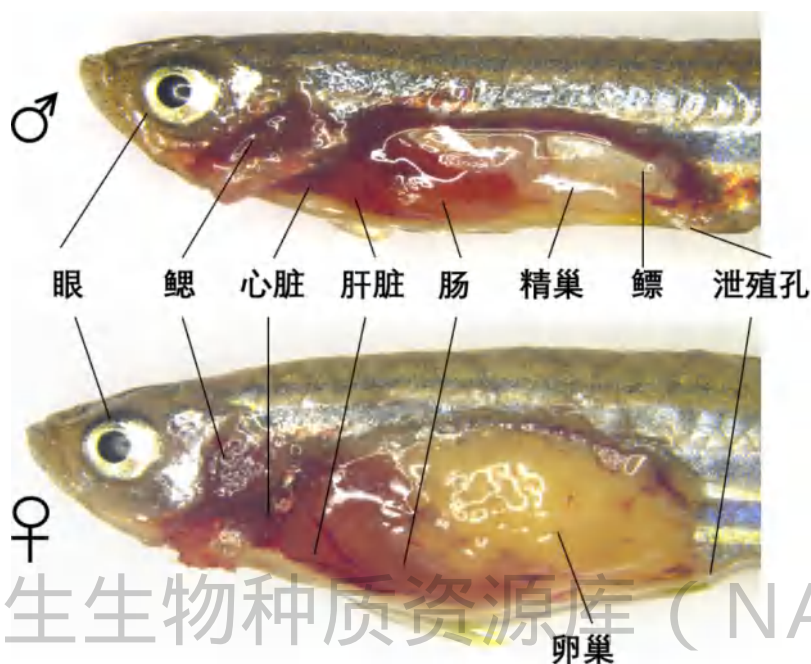


图 1.5.7 斑马鱼 (♂/♀) 整体解剖图

2.5 将打开胸腹腔的鱼（雌鱼雄鱼各一尾）置于 4%多聚甲醛中，4℃固定过夜（确保鱼完全浸泡于多聚甲醛溶液）[23]。

2.6 第二日解剖固定后的鱼样品。（备注：多聚甲醛固定后组织稍微坚硬，利于初学者掌握和操作；熟练操作后亦可不固定直接取鱼安乐死后解剖。）

2.7 取过夜固定斑马鱼，1×PBS 清洗两次。用镊子沿着胸腹腔打开，小心取出一侧生殖腺；待整个内脏团取出后，再取另一侧生殖腺，置于盛有 PBS 缓冲液的培养皿中于解剖镜下观察[25]。

a) 雄性有精巢一对，性成熟时纯白色，呈长带状；解剖镜下可见乳白色的生精小管曲折分布于整个精巢[26]（图 1.5.8 左）。

b) 雌性有卵巢一对，性成熟时微黄色，呈长囊状，通过系膜固定于腹腔两侧[25]（图 1.5.8 右）。



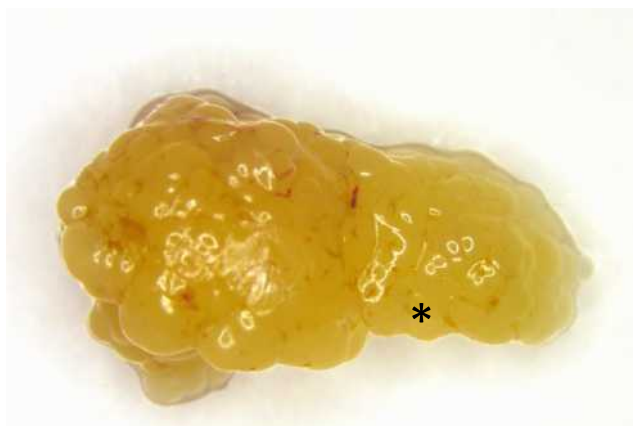


图 1.5.8 斑马鱼精巢和卵巢解剖图 左侧为精巢，由乳白色曲折的生精小管曲（→）构成；右侧为卵巢，由众多处于不同发育阶段的卵母细胞（*）组成。

2.8 于胸腹腔内取出内脏器团，置于培养皿中于解剖镜下观察（图 1.5.9）。

- a) 脏器团中盘曲管道为肠管，起始端膨大，肠壁厚，肉眼观透明[27]（图 1.5.10）；呈暗红色，薄而狭长的组织为肝脏，是内脏团中最大的实质性器官，分为左叶、右叶和腹叶三叶[25]（图 1.5.10，图 1.5.11）。
- b) 胰腺较小，弥散分布在肝脏、胆囊和肠道周围，解剖时不易分辨和分离。
- c) 肠管和肝胰脏间细长亮红色器官为脾脏，薄而小，其前部与肝右叶相连，后部紧贴肝左叶和后肠[25]（图 1.5.12，图 1.5.13）。
- d) 位于肠管前侧和肝右侧之间有椭圆形胆囊，固定后的胆囊无色（固定前为绿色）[25]（图 1.5.14）。
- e) 胸腹腔前方有围心腔，内有心脏。其位于最后一对鳃的后下方，靠近头部，由一心房和一心室组成[24,25,28]（图 1.5.15）。
- f) 胸腹腔脊柱腹侧有银白色囊状鱼鳔[25]（图 1.5.16）。
- g) 胸腹腔脊柱内侧有肾脏一对，分别为头肾、中肾和尾肾。可用镊子小心从体壁将肾脏刮取下来，置于盛有 PBS 的培养皿中于解剖镜下观察（图 1.5.17）[23]。

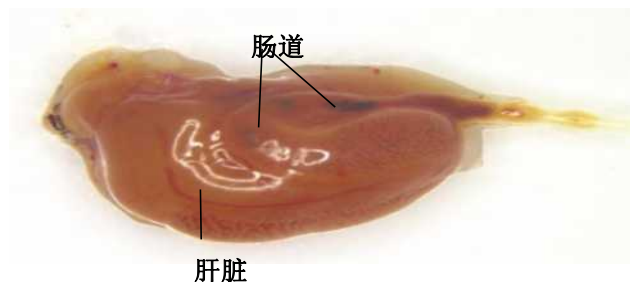


图 1.5.9 斑马鱼内脏团解剖图总观

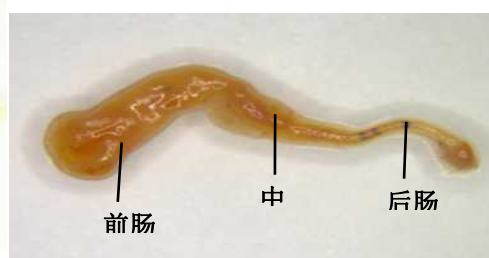


图 1.5.10 斑马鱼肠道解剖图



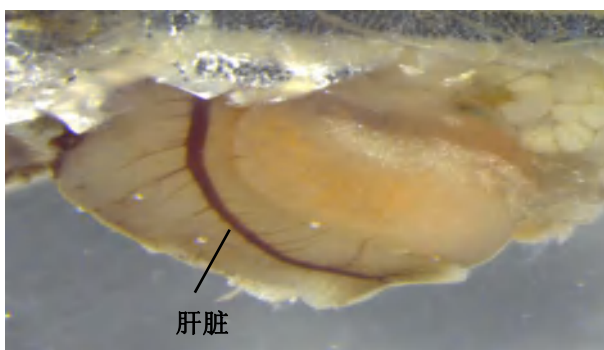


图 1.5.11 固定 12h 后肝组织图



图 1.5.12 完整脾脏图

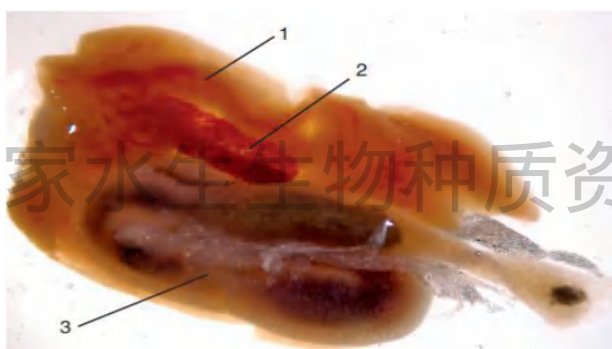


图 1.5.13 斑马鱼内脏团解剖图总观 1 为肝脏, 2 为脾脏, 3 为肠道 (图片引自:《斑马鱼组织细胞学彩色图谱》胡建华, 陈秋生, 林金杏著)

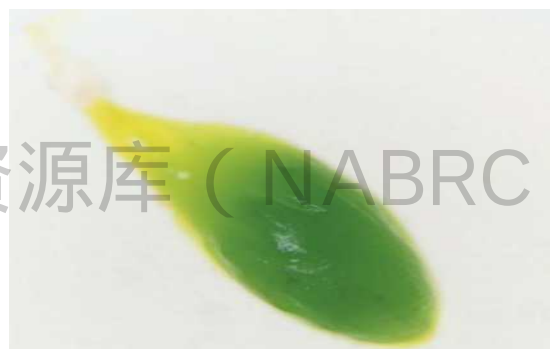


图 1.5.14 胆囊 内含绿色胆汁 (图片引自:《斑马鱼组织细胞学彩色图谱》胡建华, 陈秋生, 林金杏著)

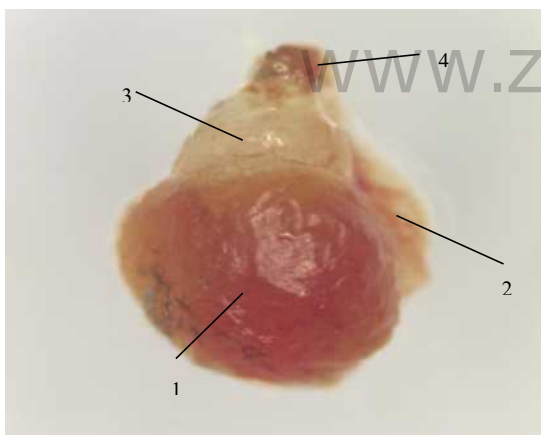


图 1.5.15 心脏 1.心室;2.心房;3.动脉球;4.主动脉



图 1.5.16 鳃解剖图



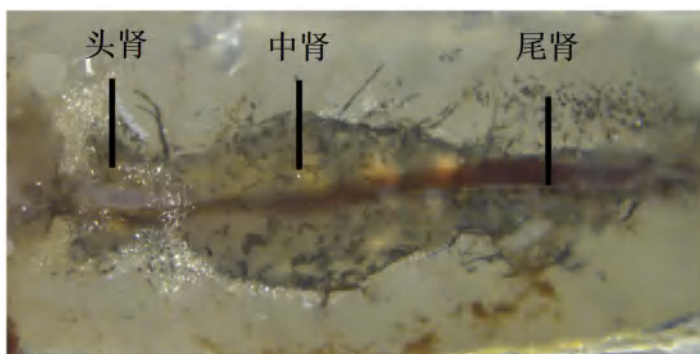


图 1.5.17 斑马鱼肾脏解剖图

2.9 将斑马鱼头部转移至解剖镜下解剖。尖镊子轻轻挑去脑骨肌肉后，将斑马鱼头部放置于新 PBS 溶液中进一步剥离脑组织，将整个脑取出置于解剖镜下观察形态。脑包括端脑、间脑、中脑、后脑[24,25]（图 1.5.18，图 1.5.19）。

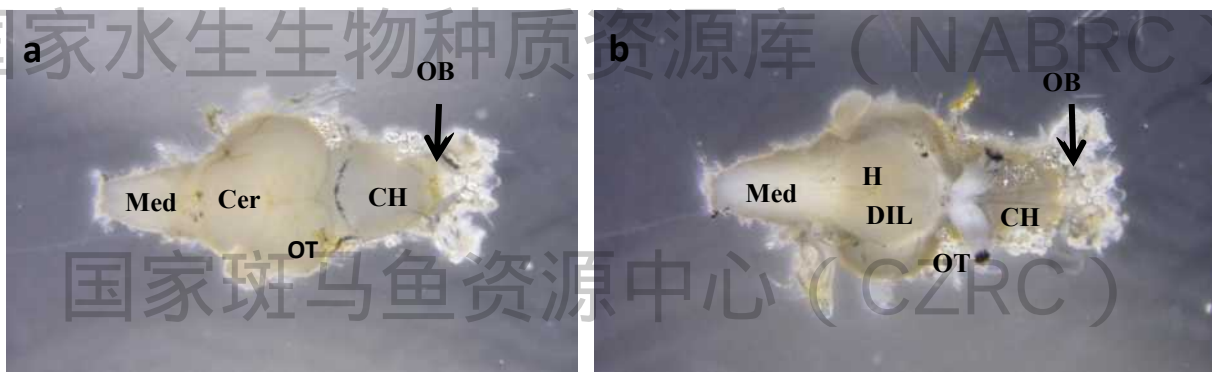


图 1.5.18 斑马鱼脑的大体解剖图 a. 脑的背侧面；b. 脑的腹侧面 OB: 嗅球；CH: 大脑半球；OT: 视盖；Cer: 小脑；Med: 延髓；H: 下丘脑；DIL: 丘脑下叶

www.zfish.cn



- a) 端脑位于中枢神经最前端，包括嗅球和大脑半球。
- b) 间脑位于端脑后方，包括上、下丘脑等部位。
- c) 中脑位于间脑背侧，包括视盖等部位。
- d) 后脑位于中枢神经最末端，包括小脑和延脑。

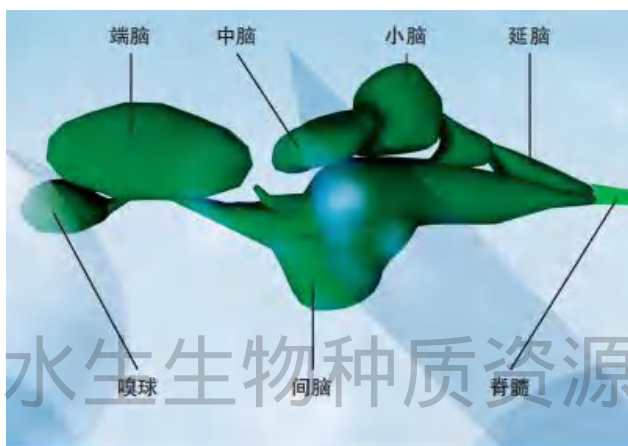


图 1.5.19 斑马鱼脑的虚拟 3D 解剖图（图片引自：《斑马鱼组织细胞学彩色图谱》胡建华，陈秋生，林金杏著）

参考文献

- [1] Kimmel C B.Genetics and early development of zebrafish[J].Trends in Genetics,1989, 5 (none): 283-288.
- [2] Lee C J, Tyler C R, Paull G C: Chapter 4 - Geographic Range and Natural Distribution, Cartner S C, Eisen J S, Farmer S C, Guillemain K J, Kent M L, Sanders G E,editor,The Zebrafish in Biomedical Research: Academic Press,2020: 41-56.
- [3] Lee C J, Tyler C R, Paull G C: Chapter 5 - Behavior of Wild Populations, Cartner S C, Eisen J S, Farmer S C, Guillemain K J, Kent M L, Sanders G E,editor,The Zebrafish in Biomedical Research: Academic Press,2020: 57-72.
- [4] Xie X W, Pan L Y, Sun Y H, et al.Growing with the world: rapid development of the zebrafish research in China and the China Zebrafish Resource Center[J].Science China(Life Sciences),2015.
- [5] Nüsslein-Volhard C.Of flies and fishes[J].Science,1994, 266 (266): 572-574.
- [6] Davis E E, Frangakis S, Katsanis N.Interpreting human genetic variation with in vivo zebrafish assays[J].Biochim Biophys Acta,2014, 1842 (10): 1960-1970.
- [7] Driever W, Solnica-Krezel L, Schier A F, et al.A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish[J].Development,1996, 123: 37-46.
- [8] Haffter P, Granato M, Brand M, et al.The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, Danio rerio[J].Development,1996, 123: 1-36.
- [9] Stewart A M, Braub Ac H O, Spitsbergen J, et al.Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside[J].Trends in Neurosciences,2014, 37 (5): 264-278.
- [10] White R, Rose K, Zon L.Zebrafish cancer: The state of the art and the path forward[J].Nature Reviews Cancer,2013, 13 (9): 624-636.
- [11] Gemberling M, Bailey T J, Hyde D R, et al.The zebrafish as a model for complex tissue





regeneration[J].Trends in Genetics Tig,2013, 29 (11): 611-620.

[12] Rennekamp A J, Peterson R T.15 years of zebrafish chemical screening[J].Current Opinion in Chemical Biology,2015, 24: 58-70.

[13] Dai Y J, Jia Y F, Chen N, et al.Zebrafish as a model system to study toxicology[J].Environmental toxicology and chemistry,2014, 33 (1): 11-17.

[14] Ribas L, Piferrer F.The zebrafish (D anio rerio) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research[J].Reviews in Aquaculture,2014, 6 (4): 209-240.

[15] Kimmel C B, Ballard W W, Kimmel S R, et al.Stages of embryonic development of the zebrafish[J].Developmental dynamics,1995, 203 (3): 253-310.

[16] Lindsey B W, Smith F M, Croll R P.From inflation to flotation: contribution of the swimbladder to whole-body density and swimming depth during development of the zebrafish (Danio rerio)[J].Zebrafish,2010, 7 (1): 85-96.

[17] Colwill R M, Creton R.Imaging escape and avoidance behavior in zebrafish larvae[J].Reviews in the Neurosciences,2011, 22 (1): 63-73.

[18] Streisinger G, Walker C, Dower N, et al.Production of clones of homozygous diploid zebra fish (Brachydanio rerio)[J].Nature,1981, 291 (5813): 293-296.

[19] Grunwald D J, Eisen J S.Headwaters of the zebrafish—emergence of a new model vertebrate[J].Nature reviews genetics,2002, 3 (9): 717-724.

[20] Nusslein-Volhard, C.The zebrafish issue of Development[J].Development,2012, 139 (22): 4099-103.

[21] Howe K, Clark M D, Torroja C F, et al.The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J].Nature,2013, 496 (7446): 498-503.

[22] Howe K, Clark M, Torroja C F, et al.The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J].Nature,2013, 496 (7446).

[23] Gerlach G F, Schrader L N, Wingert R A.Dissection of the Adult Zebrafish Kidney[J].Journal of Visualized Experiments,2011 (54).

[24] Gupta T, Mullins M C.Dissection of Organs from the Adult Zebrafish[J].Journal of Visualized Experiments Jove,2010 (37): 521-522.

[25] 林金杏.《斑马鱼组织细胞学彩色图谱》出版[J].实验动物与比较医学,2019 (1).

[26] Leal M C, Cardoso E R, Nóbrega R, et al.Histological and Stereological Evaluation of Zebrafish (Danio rerio) Spermatogenesis with an Emphasis on Spermatogonial Generations[J].Biology of Reproduction,2009, 81 (1): 177-187.

[27] Wallace K N, Akhter S, Smith E M, et al.Intestinal growth and differentiation in zebrafish[J].Mechanisms of Development,2005, 122 (2): 157-173.

[28] Hu N, Yost H J, Clark E B.Cardiac morphology and blood pressure in the adult zebrafish[J].Anatomical Record,2010, 264 (1): 1-12.



第二章 斑马鱼鱼房建设及实验室养殖

第一节 斑马鱼的规范养殖系统

斑马鱼的规范养殖系统由相关设备组成，主要包括：净水供水及储存系统、水质控制系统、斑马鱼中央循环养殖系统等（图 2.1.1）。下面依次做出介绍。

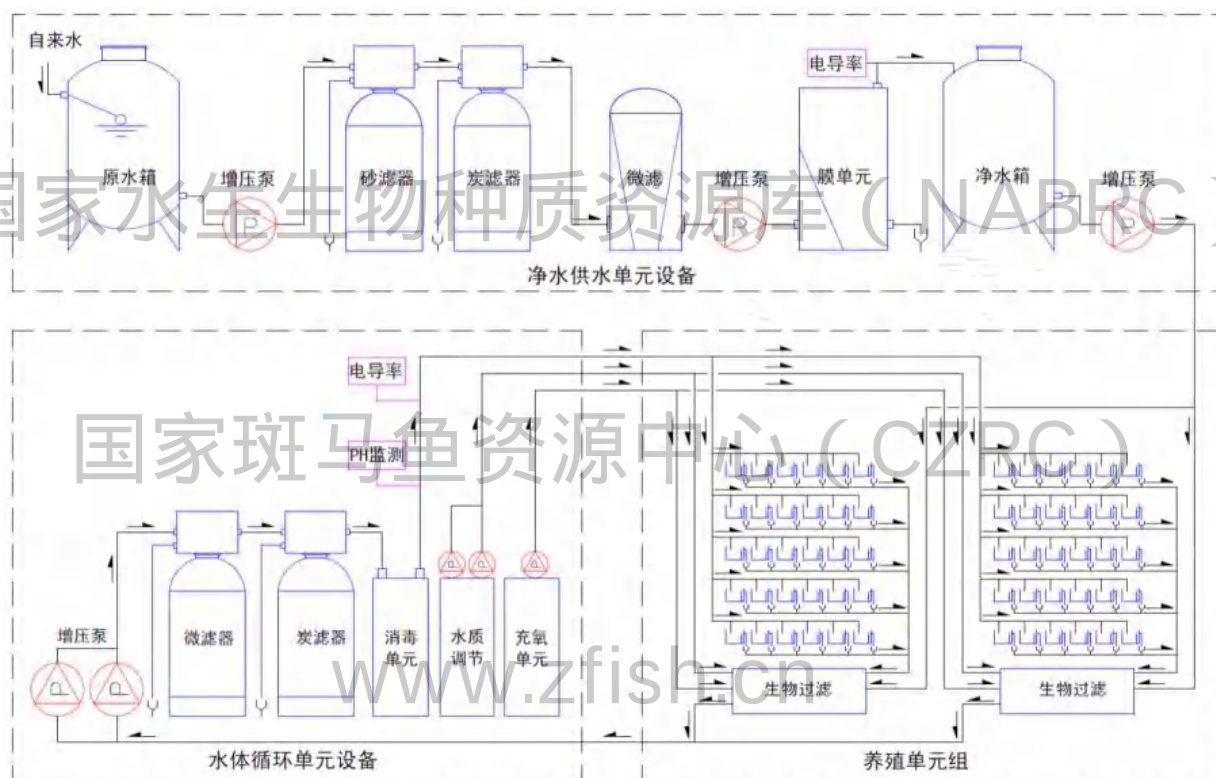


图 2.1.1 斑马鱼规范养殖系统水体流程图。斑马鱼规范养殖系统的水体流程主要由净水供水系统、水体循环单元、中央循环养殖系统组成。

一、净水供水系统

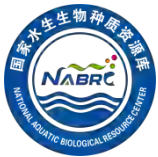
净水供水系统主要是通过物理过滤、活性炭过滤和反渗透膜过滤对供水的水质进行有效的净化，去除水中可能含有的泥沙、铁锈、细菌、悬浮物、藻类以及大分子有机物等多种有害物质，制造适合于斑马鱼养殖的净水[1]。

经净水供水设备净化后的水质应满足如下要求：

脱盐（Salt rejection） 95 - 98%

有机分子截留（Organic rejection）> 150 MW





除菌 (Bacteria rejection) 99%

除颗粒物 (Particle rejection) 99%

电导率 (Conductivity) < 30 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 。

二、 净水储存及水质控制系统

净水供水系统生产的净水在温度、pH 和盐度等方面不适宜斑马鱼的生长繁殖。净水储存及水质控制设备能够自动调控净水水质，使水质符合斑马鱼生长繁殖的要求。经调控后的养殖水可以向斑马鱼循环养殖设备补充新鲜的养殖水。该设备主要包括水处理单元和水循环动力单元。

水处理单元具有实时监测和调控净水的温度、pH 及盐度等水质参数的功能。经处理后的水质符合斑马鱼养殖水水质的要求。

水循环动力单元驱动净水循环，保证净水的温度及理化性质的均一性。

三、 斑马鱼中央循环养殖设备

斑马鱼中央养殖系统能够通过自动化控制为斑马鱼的生长繁殖提供适宜、稳定和可循环的水环境，支持大规模、多品系的斑马鱼养殖。系统主要包括养殖水处理单元、水循环动力单元、斑马鱼养殖单元和自动化控制及报警单元等。

1. 养殖水处理单元

食物残渣和鱼类排泄物会导致斑马鱼养殖系统的水质变差，影响斑马鱼的健康。养殖水处理单元具有净化斑马鱼养殖水的功能。该设备主要包括物理过滤单元、生物净化单元、杀菌单元及水质调控单元。

1.1 物理过滤单元

物理过滤单元可以有效地去除养殖水体中的悬浮颗粒及其它有害废弃物。该单元由固定过滤筛和活性炭过滤筛组成。在循环水养殖过程中，鱼类的粪便及其所食饵料的 20-60% 最终以固体废弃物的形式排入水中；其中，约一半以上是悬浮性固体颗粒物，是养殖水体污染物的主要来源。固定过滤筛网能够有效过滤水体中直径 $\geq 50 \mu\text{m}$ 的固体颗粒。活性炭过滤筛能够有效地将养殖水体中的有机物质杂质吸附到活性炭颗粒内，从而达到去除有机物质的目的。但时间一长，活性炭的吸附能力会不同程度地减弱，吸附效果也随之下降。如果养殖水质混浊，有机物含量高，活性炭很快就会丧失过滤功能。所以，活性炭应定期清洗或更换。活性炭颗粒的大小对吸附能力也有影响。一般来说，活





性炭颗粒越小，吸附面积就越大。所以，粉末状的活性炭总面积最大，吸附效果最佳，但粉末状的活性炭很容易随水流入水族箱中，难以控制，很少采用。颗粒状的活性炭因颗粒成形不易流动，水中有机物等杂质在活性炭过滤层中也不易阻塞，其吸附能力强，已经广泛地被使用在斑马鱼循环养殖系统[2]。

1.2 生物净化单元

在溶氧充足的水体中，养殖水体中的氨在氨化细菌的作用下，进行有机氮化合物的脱氨基作用，生成氨态氮，即氨化作用；氨氮在亚硝化单胞菌和硝化单胞菌的作用下，使氨氮转化成亚硝酸盐再转化成硝酸盐的过程，即硝化作用。目前，常用的方法是在生物过滤器上附着生物膜进行脱氮。生物膜是一稳定的、多样的微生物生态系统。悬浮于液相中的有机污染物及微生物移动并附着在载体的表面上；然后附着在载体上的微生物对有机物进行降解，并发生代谢、生长和繁殖。生物膜反应器分为固定床和流化床两类。在固定床中生物膜载体固定不动，在反应器内的相对位置基本不变；在流化床中生物膜载体不固定，在反应器内处于连续流动的状态。生物流化床，生物膜载体在高速水流和气流或机械搅拌作用下不断运动（搅动、流化和循环等）的生物膜反应器。斑马鱼循环养殖系统中最常用的是固定床生物滤器[3]。

1.3 杀菌单元

斑马鱼循环养殖系统通常使用紫外灯杀菌。紫外灯能够发射波长在 200-300 nm 范围的具有杀菌能力的紫外线，尤以 265-266 nm 的杀菌力最强。在波长一定的情况下，紫外线的杀菌效率与强度和时间的乘积成正比。紫外线可以穿透细菌的细胞膜并被细胞核吸收，从而损伤细菌 DNA，抑制 DNA 的复制，破坏菌体的繁殖能力，从而达到了杀菌的目的。但是紫外线需要穿透水层才能起作用，而污水中的悬浮物、浊度等都会干扰紫外光的传播，因此养殖水的水质是保证紫外线消毒的先决条件[4]。

1.4 增氧单元

充气式增氧是目前规范化养殖中应用较多的一种方法。用空气压缩机将空气或纯氧通过气石等散气装置，释放为小的气泡。小气泡与水进行传质，将氧慢慢溶于水体中，成为溶解氧。





2. 水循环动力单元

水循环动力单元能够为斑马鱼养殖水体的循环提供基本的动力。水循环动力单元需具有水流旁路，能够在不关闭主水泵情况下进行系统维护（例如更换 UV 灯管，清洁 pH 探头和更换过滤器等）；主水泵提供的水循环速率应满足每个养殖缸的水被更换次数不少于 5 次/小时；系统必须有备用水泵。在主水泵不能工作时，备用水泵能够立刻自动工作；所有主水泵和备用主水泵有减震设计。

3. 自动化控制及报警单元

3.1 水质调控单元

水质调控单元具有实时监测和调控斑马鱼养殖水的理化性质的功能。调控的基本项目有：溶氧量、盐度、温度及 pH 值。保证这些水质指标都控制在养殖对象的适应范围内。一般要求斑马鱼养殖水体的溶氧不低于在 6.0 mg/L，pH 值在 7-8 之间，电导率在 500-800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 之间。养殖系统对于以上指标应能够实时自动监测，如发现某个指标异常，即时自动调整。

3.2 报警单元

具有监控、报警功能。当养殖系统中仪器不能正常工作，或者养殖系统水质超出设定范围时，能够自动报警；当养殖系统中仪器不能正常工作时，自动化控制单元能够自动启动备用仪器；自动指令具有对水体循环净化水仪器补水的功能。

4. 斑马鱼养殖单元

该单元主要包括斑马鱼养殖架和放置其中的养殖缸。养殖架的制作采用坚固和耐腐蚀的材料。养殖架可根据斑马鱼房地面坡度进行调节；养殖架整体及各层都能实现对水流量的控制。给排水管道（含阀门）易于维修和更换。养殖缸的制作采用优质塑料（例如 Polycarbonate, Polysulfone）注塑成型。养殖缸能够防止斑马鱼逃逸（含成年斑马鱼和斑马鱼鱼苗）。



第二节 正规斑马鱼鱼房的搭建

一、斑马鱼房建设规划

规范的斑马鱼鱼房，按功能划分，应该包括以下几个功能区域（图 2.2.1）[5]：

1. 斑马鱼主养殖区域。该区域是斑马鱼的中央饲养及繁殖的区域。房间要求温度维持在 28℃左右，房间灯控，且具有新风系统。
2. 斑马鱼苗养殖区域。该区域主要用于饲养<3 个月的斑马鱼苗。房间要求温度维持在 28℃左右，房间灯控，且具有新风系统。
3. 食物准备区域。主要用于准备斑马鱼的食物，例如孵化丰年虫卵。要求温度维持在 28℃左右，具有新风系统。
4. 设备间区域。主要用于安装放置净化水设备及水循环动力设备等。房间要求温度维持在 28℃左右，具有新风系统。
5. 斑马鱼实验操作区域。主要用于斑马鱼的实验显微操作。房间要求通风干燥。
6. 斑马鱼检疫隔离区域。主要用于外源斑马鱼的隔离养殖，防止外源鱼类传染病在斑马鱼房扩散。房间要求温度维持在 28℃左右，房间灯控，且具有新风系统。



图 2.2.1 斑马鱼鱼房建设规范范例（中国国家斑马鱼资源中心鱼房建设规划图）





二、斑马鱼房基地的选址

斑马鱼房基地的选址应该符合以下要求：

1. 应避开自然疫源地；
2. 宜环境安静，远离铁路、码头、飞机场和交通要道等有严重震动或噪声污染的区域；
3. 宜环境空气质量较好，远离散发大量粉尘和有害气体的工厂、仓库及堆场；
4. 应远离易燃、易爆物品的生产和储存区，并远离高压线路及其设施；
5. 宜建设在建筑物的底层。

三、斑马鱼房基础设施的建筑要求

1. 货物出入口应设置坡道或卸货平台，坡道坡度不应大于 1/10。
2. 应充分考虑空调机和通风机等设备的面积需求，并对噪音和震动进行处理。
3. 楼层在二层以上的斑马鱼房设施宜设置货梯。
4. 楼梯宽度不宜小于 1.2 m，走廊净宽不宜小于 1.5 m，门宽度不宜小于 1.0 m，高度不低于 2.1 m。
5. 楼层高不宜小于 3.5 m。室内净高不宜低于 2.4 m，并应满足设备对净高的需求。
6. 送回风管和其他管线暗敷时，宜设置技术夹层，当采用轻质构造顶棚做技术夹层时，夹层内宜设检修通道。
7. 吊顶宜为防潮吊顶，高度统一，高度不低于 2.4 m。
8. 墙面和顶棚的材料应易于清洗消毒、耐腐蚀、不起尘、不开裂、无反光、耐冲击、光滑防水以及防霉。
9. 地面要求防水处理，且地面整体向地漏处倾斜。
10. 地面材料应防滑、耐磨、耐腐蚀及无渗漏，踢脚不应突出墙面。潮湿地区的地面垫层应做防潮构造。
11. 斑马鱼养殖区地面承重荷载不小于 1000 kg/m²。
12. 地面设置地漏或排水沟，且应做防水处理。
13. 房门宜为防潮门，应有良好的密闭性和不透光。
14. 封闭斑马鱼养殖区域的窗户，保证养殖区统一的光周期。
15. 应有防止昆虫及鼠等动物进入的措施。





16. 斑马鱼养殖区安装防潮并耐腐蚀的实验台面。

四、斑马鱼房空调系统和新风排风系统

1. 空调系统的设计应充分考虑斑马鱼房所在地的自然气候。空调系统应具备维持养殖区域温度在 28℃左右[5]。对于冬季气温过低的城市,可考虑安装辅助加热设施,例如燃气取暖等,保证养殖区域温度维持在 28℃左右。

2. 空调系统的安装便于日常的维修工作。

3. 空调系统宜自动控制功能和节能运行。

4. 空调系统宜具有抽湿功能。

5. 新风排风系统具除尘净化,除湿(湿度不大于 60%)功能。

6. 新风排风系统宜具有自动控制功能和节能运行。

7. 新风排风系统新风量宜 ≥ 5 倍养殖区域体积/小时。

8. 新风排风系统加全热式换热器,节能环保。

9. 新风排风系统所铺设的管道应防潮和耐腐蚀。

10. 斑马鱼检疫隔离区域应具有独立的空调系统及新风排风系统。

五、给水排水系统

1. 给水

1.1 供水应符合国家标准 GB 5749《生活饮用水卫生标准》的要求。

1.2 给水管道,应选用不生锈、耐腐蚀和连接方便、可靠的管材。

1.3 管道外表面可能结露时,应采取有效的防结露措施。

1.4 管径 DN25,供水量宜大于 4 m³/h,水温 15-25℃,供水压力大于 0.1 Mpa,小于 0.4 Mpa;接口设置阀门。

1.5 斑马鱼检疫隔离区域应独立给水。

2. 排水

2.1 净水供水单元设备排水地漏 DN80,最大排水量大于 4 m³/h。

2.2 循环单元排水地漏 DN50,最大排水量大于 2 m³/h。

2.3 养殖单元排水排水地漏 DN50,最大排水量大于 2 m³/h。

2.4 给水管道,应选用不生锈、耐腐蚀和连接方便可靠的管材。

2.5 斑马鱼检疫隔离区域排水宜与建筑生活排水分开设置。





2.6 排水管道应采用不易生锈、耐腐蚀的管材。

六、 电气

1. 配电

1.1 斑马鱼鱼房养殖区域用电负荷不宜低于 2 级，宜设置备用电源。

1.2 总供电要求：配电时应考虑用电平衡，空调供电、水体循环单元设备供电、插座供电每一路供电安装独立的断路器。

1.3 斑马鱼养殖区所使用的开关、插座、空开和配电箱等设备的安全等级不低于 IP67。

1.4 设置专用配电柜，配电柜宜设置在通风干燥的房间。

1.5 如供电电压/电流不稳定，宜加装稳压设备。

1.6 斑马鱼养殖区域设施的电气管线应暗敷，设施内电气管线的管口，应采取可靠的密封措施。

1.7 配电管线宜采用金属管，穿过墙和楼板的电线管应加套管，套管内应采用不收缩、不燃烧的材料密封。

1.8 水体循环单元设备供电设 380V ($\pm 5\%$)，50 Hz。三相五线制电源，线径不小于 10 mm²；安装四极漏电保护断路器，零线排、地线排。

1.9 净水供水单元设备供电设 380V ($\pm 5\%$)，50 Hz。三相五线制电源，线径不小于 10 mm²；安装四极漏电保护断路器、地线排、零线排。

1.10 独立养殖单元供电 220V ($\pm 5\%$)，50 Hz，10A 插座。

1.11 食物培养器供电 220V ($\pm 5\%$)，50 Hz，10A 插座。

2. 照明

2.1 照明灯具应采用密闭洁净灯，安全等级不低于 IP65。

2.2 斑马鱼养殖区照明系统可自动化控制，可定时开关独立控制。

2.3 安装应急照明系统。

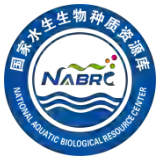
3. 消防

3.1 新建斑马鱼房建筑的周边宜设置环行消防车道，或必须沿建筑的两个长边设置消防车道。

3.2 基础设施的耐火等级不应低于二级，或设置在不低于二级耐火等级的建筑中。

3.3 斑马鱼房吊顶空间较大的区域，其顶棚装修材料应为不燃材料且吊顶的耐火极





限不应低于 0.5 h。

3.4 吊顶内可不设消防设施。

3.5 应设置火灾事故照明。疏散走道和疏散门均应设置灯光疏散指示标志。火灾事故照明和疏散指示标志可采用蓄电池作备用电源，但连续供电时间不应少于 20 分钟。

3.6 宜设火灾自动报警装置。

3.7 不应设置自动喷水灭火系统。

3.8 斑马鱼养殖区宜配置对斑马鱼无毒和对养殖设备无损害的灭火设备。

3.9 应设置消火栓系统且应保证两个水枪的充实水柱同时到达任何部位。

国家水生生物种质资源库 (NABRC) 第三节 斑马鱼养殖环境

斑马鱼的健康养殖是开展一切与斑马鱼相关研究工作的基础。养殖环境对斑马鱼的生长、发育以及繁殖至关重要。本节针对斑马鱼养殖过程中的主要环境参数进行了简单的总结。

一、温度

斑马鱼是一种小型热带淡水鱼类，对生长温度有一定的耐受能力。最大耐受的温度范围为 6-38℃。通常情况下，斑马鱼的实验室养殖水温一般控制在 24℃至 30℃之间，鱼房室温控制在 25-27℃之间[6,7]；并将 28.5℃作为观察胚胎发育的标准温度。

较高的养殖温度可能导致水体的溶氧度降低和有害病原菌的繁殖，影响斑马鱼的健康。而过低的养殖温度会造成斑马鱼的生长发育缓慢，产卵量降低。

二、水质

1. pH

水体的 pH 值对鱼类的生长繁殖具有重要的影响。水体中 pH 低于 6.0 会造成斑马鱼生病甚至死亡。相对而言，斑马鱼可耐受一定的碱性环境。有文献报道，斑马鱼野外自然群体生长的水环境 pH 在 8.0 左右[8,9]。目前，仍然缺乏系统的实验结果确定斑马鱼生长繁殖的最佳 pH 值。大部分斑马鱼养殖设备维持水质 pH 值范围为 7.0-8.0，这一范围不仅符合大部分淡水鱼类生活环境，而且是循环设备中生物膜生长适宜的环境。





2. 盐度和电导率

斑马鱼虽然属于淡水鱼类，但是能够耐受很大的盐度范围。一般养殖系统的盐度控制在 0.25-0.75 ‰之间，而斑马鱼养殖的适宜盐度通常控制在 0.25-0.50 ‰之间[10]。

电导率是表示物质传输电流能力强弱的指标。在一定温度下，养殖水的电导率与盐度存在相关性，因此，许多斑马鱼养殖设备通过监测电导率来控制水体中盐度。斑马鱼养殖水中电导率的控制范围较广，在 200-1700 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 均有报道。一般情况下，电导率主要控制在 500-800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 之间，相对应的盐度范围为 0.25-0.50 ‰。

3. 硬度

水的总硬度指水中 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 等离子的总浓度。斑马鱼适宜于较高硬度的水，水体硬度超过 100 mg/L CaCO_3 有利于斑马鱼的生长繁殖。但是，这种适应是有限的，因此养殖过程中硬度范围一般在 75-200 mg/L CaCO_3 [10]。目前，尚没有系统的研究不同范围的硬度条件对斑马鱼生长发育方面的影响，但是有报道发现硬度较低的水会降低斑马鱼的繁殖能力[11]。

4. NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^-

养殖水体中的氨氮主要来源于鱼腮上皮组织释放、粪便排放和有机物（如死鱼、粪便和食物残渣等）的降解。较高的氨氮浓度不仅会造成水体电导率的升高，而且对鱼类有毒害作用。在养殖水中，氨态氮主要有两种存在形式：离子态 NH_4^+ 和非离子态 NH_3 。养殖过程中，对鱼类存在毒性作用的主要是 NH_3 。因此，一般情况下控制养殖水中 NH_3 的浓度低于 0.02 mg/L [12]。

水体中的硝化细菌可以将氨氮转化为亚硝酸盐 (NO_2^-)，进而转化为硝酸盐 (NO_3^-)。因此，对于大型的循环水养殖系统，培养和维持水体内的硝化细菌水平对水体健康非常重要。水体中 NO_2^- 浓度超过 0.2 mg/L 时，将会威胁养殖鱼类的健康[13]。较低浓度的 NO_3^- 对鱼类基本无害，但是浓度超过 5 mg/L ，就可能对斑马鱼的健康造成影响[13]。因此，监控水体中的氨氮水平以及硝酸盐浓度对维持一个健康的养殖水系是很重要的。

5. 溶氧

溶解氧是鱼类养殖中的重要条件参数。低水平的溶解氧往往会造成养殖系统内鱼类的大量死亡。斑马鱼具新陈代谢速率较快，因而消耗氧气的水平也比较高。建议养殖水体的溶解氧水平维持在 5-8 mg/L (28.0 $^{\circ}\text{C}$) 之间，以维持斑马鱼的健康生长和活动。





水体溶氧量并非越高越好。水体通气过度，会造成水体达到过饱和状态，导致斑马鱼患气泡病而死亡。

6. 氯

斑马鱼对氯的耐受性很低，水体中的氯，会对斑马鱼的皮肤、眼睛和腮等器官造成损伤，含量过高甚至会造成斑马鱼的死亡。因此，使用自来水养殖斑马鱼时，必须经过充分曝气后才可以使使用。并且，养殖器具消毒后要充分冲洗干净，避免引入游离态氯威胁斑马鱼的健康。

三、光周期和光照强度

适宜的光、暗周期对斑马鱼的生长繁殖至关重要。斑马鱼在经历暗周期后，光照诱导斑马鱼开始交配产卵，并持续一小时左右。24 小时连续光照，或者不规律的光照周期会导致斑马鱼产卵受精率下降，甚至不产卵。

斑马鱼养殖系统的常用光周期是 14 小时的光照周期和 10 个小时的暗周期交替。同时，建议采用渐亮和渐暗的照明系统，可以避免刺激斑马鱼，防止斑马鱼应激跳缸。

斑马鱼养殖的合适光强范围为水体表面的 54-324 lux[12]。光照强度过高会导致水体内存生大量藻类，影响斑马鱼的健康。鱼房内灯光太暗，光照不足，会造成斑马鱼的条纹灰暗，活力不足。

www.zfish.cn

第四节 斑马鱼的实验室繁育及体外受精

在实验室养殖环境下，斑马鱼一般在 3—4 月龄进入性成熟期，而 5—14 月龄的斑马鱼的繁殖能力较强。斑马鱼在合适的温度下一年四季都可以产卵，其交配行为受光周期的生物钟控制，在每次光周期开始后进入交配产卵的状态，此时雌、雄鱼相遇则有可能交配产卵。此外，每日食用定量的鲜活饵料也是斑马鱼产卵的必要条件。一对健康的斑马鱼一次交配可产受精卵 200 枚以上。斑马鱼卵为非黏性卵，直径大约在 1 mm 左右，沉积于缸底。

当斑马鱼的一些重要品系雌、雄鱼自然交配不成功时，应选择体外授精技术进行传代，以免品系遗失。在体外授精实验之前，应将雌、雄鱼分开饲养，保证每天至少 2 次的活饵饲料。



下面将详细介绍斑马鱼如何在实验室中的自然繁育以及体外授精技术的具体流程。

一、 配鱼

1. 为了提高斑马鱼的产卵量，应该在交配前 1—2 周对雌、雄鱼增添鲜活饵料。长期规律使用的雌、雄鱼应坚持每日至少 2 次以上活饵喂养。

2. 配鱼产卵的前一天下午，准备含有三分之二体积水量的配种缸。配种缸由内缸、外缸、隔板和盖板四部分组成，外缸盛水可保障鱼基本的生存环境；内缸为镂空结构，便于鱼卵下沉，可阻止亲鱼吞掉鱼卵；隔板分离成年雄、雌鱼，防止雌、雄鱼过早接触相互攻击或者提前交配产卵；盖板放置于配种缸顶部，防止鱼跳出（图 2.4.1）。雌、雄区别：雄性斑马鱼腹部扁平，体型细长，体色偏黄；雌性斑马鱼腹部膨大，体型丰满，腹部银亮（图 1.1.1）。

3. 准备另一个外缸，加入新鲜养殖水至体积的三分之一，此缸为换水备用缸。

4. 将配种缸放置在室温 28℃ 下的鱼房养殖环境，按照斑马鱼平时的光周期，避光过夜。

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)



图 2.4.1 配种缸内挡板隔开的雌、雄鱼（隔板右侧是 1 尾雄鱼，左侧是 2 尾雌鱼）

二、 受精和收卵

1. 次日早上按照鱼房正常光周期给予光照，将配种内缸（内有斑马鱼）小心地转移到事先准备好的换水备用缸，抽去隔板使雌、雄鱼接触。雌、雄鱼在光照后很快出现追逐行为，并开始交配产卵。交配期间，尽量避免干扰。原缸水体经鱼过夜排泄，氨氮含量可能过高，换水可以保持水体洁净度；同时浅水层有助于雌、雄鱼交配产卵。

2. 待亲鱼产卵后，鱼卵会沿配种内缸底部缝隙沉积于外缸底部。产卵一定时间后，可以把亲鱼和内缸一起再换置到换水备用缸内，亲鱼可能会继续产卵。产卵结束后，收集配种缸内的鱼卵。将外缸内的水缓慢倒入鱼卵捞网内，用胚胎养殖水清洗鱼卵 2~3 次，





弃掉粪便、死卵等杂质。

3. 放置胚胎到装满养殖水的平皿内，然后清除异物和未受精的鱼卵。

三、 胚胎的消毒和养殖

1. 分拣：待收集鱼卵发育3至6小时之间于显微镜下分拣出受精卵。28.5 °C培养条件下，产卵后约 3小时进入1000细胞期，6小时胚盾开始形成，期间是较容易观察分辨受精与未受精鱼卵的时期。只有正常受精的鱼卵才能发育成胚胎。

2. 消毒：为保证养殖系统的健康，分拣出来的胚胎参照以下方式进行消毒（胚胎应在受精24 小时内，卵膜依然完整的情况下进行消毒）。

2.1 滤去胚胎养殖平皿中的养殖水，向平皿中加入适量现配的胚胎消毒（0.003%次氯酸钠溶液），加入体积必须可以完全淹没需消毒的胚胎。

2.2 将挑拣出的胚胎放置于消毒工作液中 5 分钟。期间轻轻地摇动平皿，保证胚胎卵膜与消毒液充分接触。

2.3 滤去胚胎消毒液，在平皿中加入灭菌胚胎养殖水，加入体积必须完全淹没胚胎，放置 5 分钟，期间轻轻地摇动平皿，保证胚胎卵膜得到充分清洗以去掉残留氯离子。

2.4 重复操作步骤 2.1-3 的步骤 1 次。

2.5 用灭菌胚胎养殖水反复清洗胚胎 2 次，保证次氯酸钠全部清洗掉。

3. 将收集的胚胎消毒后，养殖在直径为 90 mm 的一次性培养皿中，密度在 50 个鱼卵/皿为宜。胚胎盛养于含有亚甲基蓝的培养养殖水（embryo media）的一次性培养皿中，液面不超过培养皿的 2/3 处。注意：直径 70mm 的培养皿，养殖密度不超过 30 颗；直径 150mm 的培养皿，养殖密度不超过 100 颗。

4. 在一次性培养皿外贴上标签，标签上须注明胚胎的品系信息，出生日期等信息。（图 2.4.2）置于 28.5 °C 的恒温培养箱中培养，每天吸出死卵或胎膜，并更换含有亚甲基蓝的培养养殖水一次。注：换水的水温相差不宜过大，要保持相对恒定，剧烈的温度变化会引起胚胎死亡。

5. 在 1-4 dpf 期，胚胎会发育至幼苗并出膜，此期间幼苗游泳能力弱，无需喂食。

6. 在 5 dpf 时，在显微镜下观察幼苗的鱼鳔是否发育成熟，发育成熟后即可进入幼苗养殖阶段。



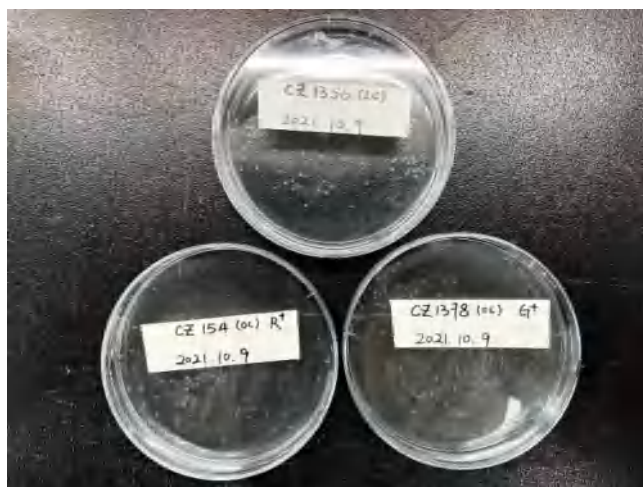


图 2.4.2 培育于平皿中的 0-4 天胚胎

四、幼苗期的养殖

斑马鱼在5-15 dpf为幼苗期，幼苗期斑马鱼对环境非常敏感，所以此阶段的养殖是影响斑马鱼存活率的重要环节。

幼苗期采取的是静水养殖，此时幼苗转移至幼苗养殖缸，以国家斑马鱼资源中心为例，现用下图所示的1000 mL幼苗养殖缸里饲养，幼苗养殖缸内缸底部带有过滤网，方便换水，将标签贴于内缸外侧（图 2.4.3）。养殖步骤如下：



图 2.4.3 幼鱼养殖缸里静水养殖5-15 dpf期幼鱼





1. 当胚胎发育至4天时，提前准备装有养殖水的幼苗养殖缸和换水备用缸，水量约占外缸的1/2。幼苗养殖缸分为外缸和内缸，换水备用缸只有外缸。提前将幼苗养殖缸和换水备用缸放置在鱼房养殖环境下，冬天可以适当在底部垫上恒温加热垫。

2. 5天左右当幼苗的鱼鳔发育成熟后，将幼苗转移至幼苗养殖缸中。养殖密度一般为50尾/L，不超过100尾/L。每日投喂2-3次，以草履虫为主要饵料，幼苗粉末饲料为辅。草履虫的投喂次数不低于每日2次，每次投喂后确保幼苗养殖缸里草履虫的密度不低于100个/mL。

3. 每日养殖水全部更换一次，换水时将内缸缓慢提起，再轻轻放入换水备用缸里，注意保证换水前后水温一致，剧烈的温差变化易造成幼苗死亡。换水之前观察幼苗养殖缸底部是否有絮状物，要及时用一次性塑料吸管吸出残渣，以免影响幼苗的游动。

4. 在第12 dpf后，每日可适当的加入活饵丰年虫，观察幼苗是否主动摄食丰年虫。此时在幼苗养殖缸中加入活饵丰年虫后，经过15分钟后，如有幼苗肚子出现黄褐色后，即可判定幼苗具备摄食活饵丰年虫的能力。如果幼苗没有具备摄食活饵丰年虫的能力，应及时用一次性塑料吸管吸出沉底的丰年虫。一般14-15 dpf，90%以上的幼苗具备摄食活饵丰年虫的能力。

五、 幼鱼初期的养殖

斑马鱼在16-30 dpf为幼鱼初期，在这个时期，幼鱼游泳能力相对较弱，过大的水流不利于幼鱼的生长，因此采取的是滴水法换水养殖（图 2.4.4）。斑马鱼幼苗15 dpf左右，待幼鱼能摄食活饵丰年虫后，将幼鱼转移到已经插入40目幼鱼插板的3 L养殖缸中，贴好标签，养殖密度一般情况下不超过30尾/L。在鱼缸中插入鱼苗网格（40目以上）插板，置于鱼苗养殖架上，不需要盖缸盖，采取滴水法换水（以每分钟100滴左右进水为宜）。每日投喂2-3次丰年虫，投喂前关闭水阀。每次喂食的丰年虫不宜过多，以15分钟内可以吃完的量为准，丰年虫过多后沉底易败坏水质，沉底的食物残渣应及时清理。每日可搭配1次人工合成的幼鱼粉末饲料进行投喂。





图2.4.4 滴水法换水养殖15-30 dpf期幼鱼

六、 幼鱼后期的养殖

斑马鱼在31-90 dpf为幼鱼后期，此时幼鱼已经具备良好的游泳能力，采取流水法换水养殖（图 2.4.5）。将幼苗转移至已经插入20目幼鱼插板的3 L养殖缸或10L养殖缸中，贴好标签，养殖密度不超多10尾/L，养殖密度过大可用鱼卵捞网将其分散至其他3L养殖缸或10L养殖缸，并贴好标签。此时养殖缸需要盖缸盖，采取流水法换水（以10 L/h左右流速为宜）。每日投喂2-3次活饵丰年虫，投喂前关闭水阀。每次投喂的活饵丰年虫不宜过多，以20分钟内可以吃完的量为准。每日可搭配1次人工合成的幼鱼粉末饲料进行投喂。

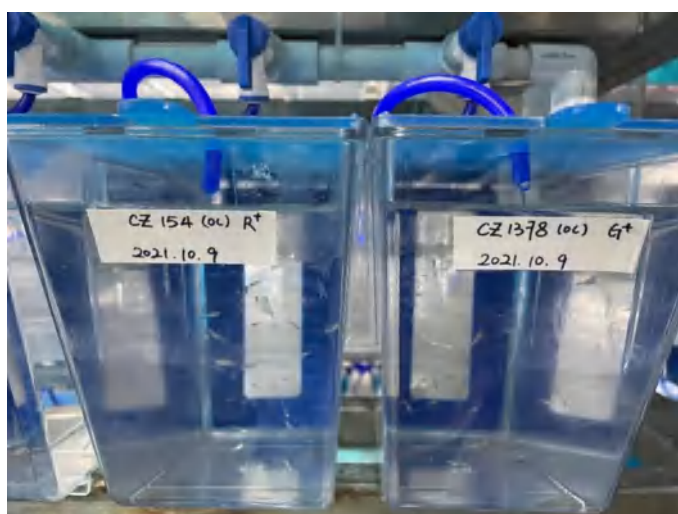


图2.4.5 流水法换水养殖31-90 dpf期幼鱼图



七、 成鱼的养殖

在斑马鱼的整个生活史中，成鱼时期持续时间最长，养殖成本比重最大，所以，在满足科研需求的前提下，合理、健康的投喂方式尤为重要。

一般情况下，当幼鱼达到3月龄时，均已经成年，并具备繁殖能力。将斑马鱼转移至成鱼养殖区，同时鱼缸插板换成成年鱼插板。记录成鱼缸中的斑马鱼数目，养殖密度为5-8尾/L，养殖缸需要盖缸盖，采取流水法换水(以10 L/h左右流速为宜)。(图 2.4.6)。



图 2.4.6 成年斑马鱼养殖及喂食丰年虫

每日按成年鱼喂食标准给予喂食丰年虫2次、颗粒饲料1次。投喂前关闭水阀，每次投喂的活饵丰年虫不宜过多，以20分钟内可吃完的量为准。对于需要繁殖的种鱼、精子冻存的雄鱼等，养殖密度建议不超过5尾/L，每日可加喂1-2次丰年虫，增加产卵量和精液量。及时清洁未吃完的食物残渣，以及每日巡视捞出缸内的死鱼并隔离病鱼。

成鱼阶段的养殖时间相对较长，在这个阶段鱼缸内表面会长藻、水霉等，所以要定期清洗消毒鱼缸，防止细菌滋生影响斑马鱼的健康。

八、 斑马鱼日常传代维护

在斑马鱼鱼房的日常管理过程中要及时捞出死鱼，隔离病鱼，以免影响系统中其他健康斑马鱼。对于品系鱼传代尽量采用与野生型侧交的方式，避免长期自交导致退化。如果条件允许，鱼房可以将维系野生型种源的斑马鱼与平时频繁用于实验的野生型斑马鱼分开饲养。对于野生型斑马鱼的传代，要尽量保持遗传多态性，这里介绍一种国际斑马鱼资源中心和中国国家斑马鱼资源中心使用的斑马鱼封闭群繁育方法。





1. 准备：每次繁育，从野生型封闭群中选取体型正常、外形健康的成熟斑马鱼雌、雄个体各 50 尾。在繁殖前一天，以随机配对方式置入配种缸，每缸雌、雄亲本各 1 尾，以隔板隔开。

2. 繁殖：繁殖当日，在鱼房的光周期恢复后的半小时内，抽取配种缸内隔板，让雌、雄亲鱼接触 2 小时统计成功产卵的缸数。如产卵率 $\geq 50\%$ ，则分别收集每缸受精卵；如产卵率 $< 50\%$ ，则终止本次繁育试验，加喂一周并从步骤 1 重新开始。

3. 子代养殖：对于封闭群，每一批子代的养殖数量应该大于 200 尾，并从成功繁殖的每一缸子代胚胎中平均选取。具体操作为，在解剖镜下对每一缸受精卵依次镜检，选取同样数量、发育正常的受精卵，混合成为下一代封闭群胚胎。封闭群胚胎按照常规斑马鱼饲养条件进行养殖。

4. 封闭群评估：子代养殖 3 个月后，统计本次封闭群子代的存活率。如存活率 $\geq 80\%$ 则本次封闭群繁育成功；如存活率 $< 80\%$ ，则本次封闭群繁育失败，需重新从步骤 1 开始。

九、斑马鱼的体外受精技术

斑马鱼的性成熟周期是三个月，3月龄的斑马鱼雄鱼和雌鱼已可以开始用于自然交配产卵。但是由于一些不确定性因素造成重要实验品系的成年斑马鱼不能自然交配产卵，影响其品系的传代和实验进度。体外授精技术可严格控制受精时间，获得同龄受精卵。因此，常通过体外授精技术对自然交配产卵有困难的品系进行传代。

实验前，必须提前 1 至 2 周将雌、雄鱼分开饲养。养殖密度不超过 3 尾/L。保证每天至少 2 次的活体饵料投喂。长期活体饵料投喂不足会影响精液或卵子的产量和质量。

斑马鱼体外授精的精液来源一般有 2 种：在麻醉后挤压雄鱼腹部收集的新鲜精液和复苏超低温保存的冻存精子样品。这里我们主要介绍在第一种方法，斑马鱼的精子在相对高渗透压的环境下保持无受精活性状态；接触淡水之后被激活，活力可维持 1-2 分钟。这段时间是接触卵子受精的最佳时间。

实验操作收集到的斑马鱼精液样品，如仅需短期保存（一周之内），可将样品直接溶于 Hanks Buffer 中，放置在 4℃条件下。在所有实验操作中，Hanks Buffer 的终溶液都需在使用当天新鲜配置。如样品需长期保藏，则要将收集的精子样品按一定比例溶于冻存保护液中，液氮冻存。





1. 准备工作

1.1 实验材料

- a) 250ml 烧杯 (Bomex, 20201-250)
- b) 海绵鱼托 (自制, 用于固定雄鱼位置)
- c) 解剖显微镜 (OLYMPUS, SZ2-LGB)
- d) 鹅颈灯 (OLYMPUS, LG-PS2)
- e) 移液器 (eppendorf, Cat. No. 3120000216)
- f) 宽头镊子 (Vetus, 33A-SA)
- g) 长柄刮勺
- h) 塑料勺子 (边缘光滑)
- i) 15 毫升离心管 (Falcon # 352099)
- j) 1.5 mL 离心管若干 (Axygen, MCT-150-C)
- k) 0.1-2.5 μ L 和 20-200 μ L 移液器
- l) 10 μ L 和 200 μ L 一次性吸头
- m) 35mm 一次性塑料平皿 (海门, HC027)
- n) 3 mL 塑料吸管 (海泰, HC001)
- o) 吸水棉签和吸水纸巾若干

1.2 实验溶液配方

a) 麻醉剂 Tricaine 储存液 (pH 7.0)

400 mg Tricaine (Sigma, E10521) 溶于 90 ml 水中, 加入约 2.1 mL Tris (1M, pH 9.0) 调节 pH 至 7 左右, 定容至 100 mL。4°C 短期储存, -20°C 长期储存。

使用时, 将 1 mL tricaine 储存液稀释于 25 mL H₂O (终浓度 0.16 g/L)。

b) Hanks 储存液

Hanks 储液 1: 8.0 g NaCl (Sigma-Aldrich, 746398), 0.4 g KCl (Sigma-Aldrich, 746436) 溶于 100 mL 灭菌水中, 过滤除菌, 4°C 储存。

Hanks 储液 2: 0.358 g Na₂HPO₄ (无水) (Sigma-Aldrich, RES20908), 0.60 g KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, PHR1330) 溶于 100 mL 灭菌水, 过滤除菌, 4°C 储存。

Hanks 储液 4: 0.72 g CaCl₂ (Sigma-Aldrich, 793639) 溶于 50 mL 灭菌水中,





过滤除菌，4℃储存。

Hanks 储液 5: 0.601 g MgSO_4 (Sigma-Aldrich, 63138) 溶于 50 mL 灭菌水中，过滤除菌，4℃储存。

c) Hanks Premix 溶液

10.0 mL Hanks 储液 1

1.0 mL Hanks 储液 2

1.0 mL Hanks 储液 4

86.0 mL ddH₂O

1.0 mL Hank's 储液 5

按照顺序依次加入，避免产生沉淀，无菌容器，4℃储存（使用期 6 个月）。

d) Hanks Final 溶液（即 Hanks Buffer 溶液）

Hanks 储液 6: 0.35 g NaHCO_3 (Sigma-Aldrich, 792519) 溶于 10.0 mL 灭菌水中，现用现配。

9.9 mL Hanks Premix

0.1 mL Hanks 储液 6

总计 10 mL.

2. 精液收集

2.1 提前准备好 1.5 mL 离心管，加入 50 μL Hanks Buffer 待用。

2.2 使用麻醉剂将斑马鱼雄鱼麻醉。

2.3 将已经充分麻醉的雄鱼用塑料勺子捞出，放在吸水纸上，吸掉鱼身上的水分，不要过分干燥以免损伤鱼鳞造成不可逆转的伤害。

2.4 将吸干水分的雄鱼放置在自制海绵鱼托上，腹部朝上，固定住鱼头（图 2.4.7A），用细轴吸水棉签分开腹鳍，露出泄殖孔，并将泄殖孔附近的水分进一步吸干（图 2.4.7B）

2.5 将夹有雄鱼的海绵鱼托放在解剖显微镜下，并且将鹅颈灯光源集中在雄鱼腹部泄殖孔的位置。在显微镜下用宽头镊子轻轻挤压雄鱼的腹部，用 2.5 μL 移液器收集精液。精液样品以白色乳状液体为佳（图 2.4.7C），如呈透明水状则样品质量较差（图 2.4.7D）不建议使用。

2.6 将白色乳液状精液样品加入 2.1 准备好的离心管中，混匀。4℃可以保存一周。



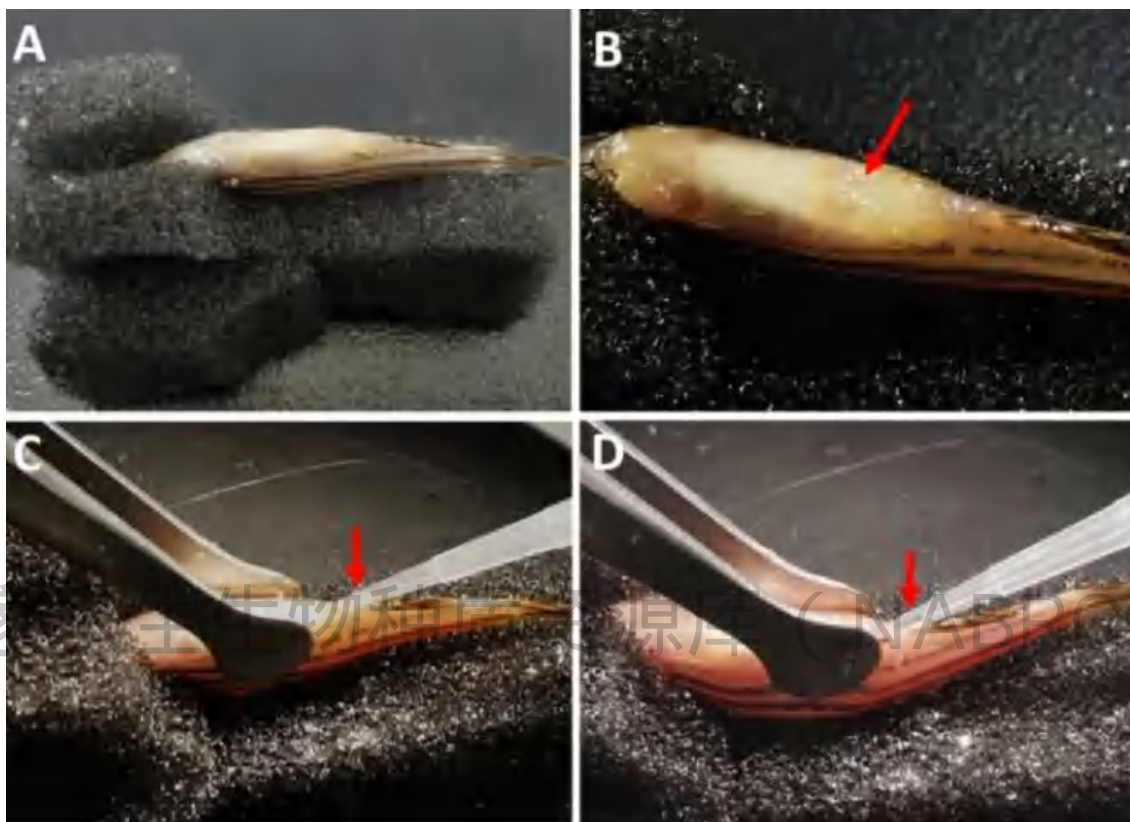


图 2.4.7 斑马鱼精液样品收集操作示意图。(A)雄鱼固定在海绵鱼托上；(B)光源集中在腹部泄殖孔处，红色箭头处为泄殖孔；(C)收集精子样品，红色箭头标示收集到优质精子样品呈乳白状；(D)收集精子样品，红色箭头标示收集到劣质精子样品呈透明状。

3. 鱼卵收集

3.1 在所有精液样品都准备好的前提下，开始进行卵子收集。捞取斑马鱼雌鱼放入麻醉剂中进行麻醉。

3.2 将已经充分麻醉的雌鱼用勺子捞出，放在吸水纸上，吸掉鱼身上的水分（图 2.4.8A）。

3.3 用勺子将雌鱼侧躺放入 35 mm 平皿中，略略润湿两手食指，湿润但不要滴水，以减轻对鱼体表面的伤害。用左手食指轻轻抵住鱼背，防止鱼移动，用右手食指轻轻挤压雌鱼腹部，卵子会由泄殖孔排出（图 2.4.8B）。用长柄刮勺轻轻将卵子与鱼身分离，不要刮伤鱼身，之后将雌鱼放回水[13]。

3.4 一尾雌鱼产卵量少时，可混合 2 至 3 尾雌鱼产的卵子。卵子质量是受精成功与否的决定因素之一。质量好的卵呈金黄色、饱满、粘稠和透亮的；而颜色苍白、质地不均、含有絮状物或缺少完整卵型等情况都属于质量不好的卵子（图 2.4.8C），不建议使用，会严重影响受精率。



3.5 鱼卵收集后，将装有卵子的平皿倒置在桌上以防止风干。卵子离开母体后要尽快使用，放置超过 2 分钟的卵子表面干燥，不能再接受精子进行受精。

4. 体外受精

4.1 卵子收集好后，将收集到含有新鲜精子样品的 Hanks Buffer 溶液加入未受精卵中，再加入一小勺（约 750 μL ）养殖水，激活精子让其与卵子充分接触，在培养皿盖上做好标记。

4.2 装有受精卵的 35 mm 培养皿室温放置 5 分钟后，用吸管吸取胚胎养殖水小心地将胚胎冲洗至 90 mm 培养皿中（图 2.4.8D），加入胚胎养殖水至平皿 2/3 处，并在培养皿盖上做好标记。放入 28.5°C 恒温培养箱内养殖。

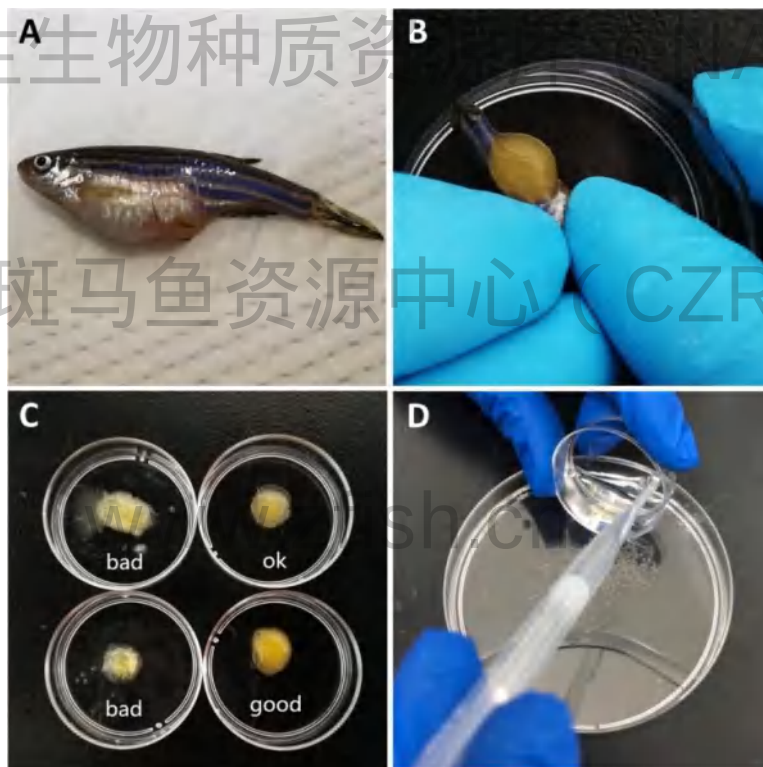


图 2.4.8 斑马鱼卵子收集操作示意图(A) 将麻醉好的雌鱼吸干水分；(B) 轻轻挤压雌鱼腹部，卵子由泄殖孔流出；(C) 不同质量的卵子样品；(D) 将受精后的胚胎冲洗至 90 mm 平皿中。

5. 注意事项

5.1 雌鱼和雄鱼的鱼龄太小、太大，或有鱼病都会影响精子和卵子的质量，因此用于实验的雌、雄鱼应在 6 至 18 个月龄之间，并且健康无病。同时用于体外受精的雌、雄鱼建议以 3 尾/L 的密度分开饲养。每日不得少于 2 顿活体饵料，或者投喂的颗粒性饲料应含有较多蛋白质。





5.2 雌鱼感应明、暗光周期，在光周期开始后 1-3 小时为产卵状态，是每天收集鱼卵的唯一可行时间。光周期开始 3 小时后，雌鱼腹中的鱼卵会降解，即便收获鱼卵，也为坏卵，不适于体外受精。因此体外受精只能在光周期开始后的 1-3 小时进行。

5.3 体外受精前一天，应将雌鱼和雄鱼共同放置在配种缸内，用隔板隔开。一个配种缸中雌鱼的数量不要超过 3 尾，整个配种缸中斑马鱼的数量不要超过 4 尾，这样不会因为密度过高导致水质不佳而影响鱼的精神状态。

5.4 在收集精、卵样品过程中，用宽头镊子挤压雄鱼腹部，或用手指积压雌鱼腹部时，用力过度可能造成内脏损伤、鱼鳔破裂和腹部出血，甚至死亡。因此，挤压过程动作要轻柔。在按压过程中，对鱼有一定的伤害，操作频率不能超过半个月一次，最好为一月一次或者间隔更久。挤过的雌、雄鱼，一周后可用于自然配鱼产卵。

第五节 斑马鱼的饲养及饵料预备

斑马鱼养殖过程中，活饵的培养是必不可少的环节。在幼鱼初期，常用的开口活饵为草履虫、轮虫等，在幼鱼后期至成年，丰年虫等活饵较为常见。下面主要介绍草履虫的高密度培养及丰年虫的孵化方法。

一、草履虫高密度培养

1. 培养液配制

在已灭菌的 5 L 锥形瓶中分别加入 1.5 g 碳酸氢钠、1.5 g 氯化钠、0.9g 酵母粉和 7 颗熟麦粒后，倒入 2.5L 灭菌后的纯水，倒入 2.5 L 灭菌后的纯水混匀，调节培养液 pH 范围为 7.0-7.5。

2. 草履虫接种

2.1 将草履虫种源，按照 1:5 的比例接种，即 500mL 草履虫种源接种到装有 2.5L 室温新鲜培养液的锥形瓶（图 2.5.1）中，瓶口用封口膜盖住。注意：接种之前，应将草履虫种源放置显微镜下观察生长情况。有条件的情况下，应挑选游动较快且密度合适的草履虫作为种源进行接种。



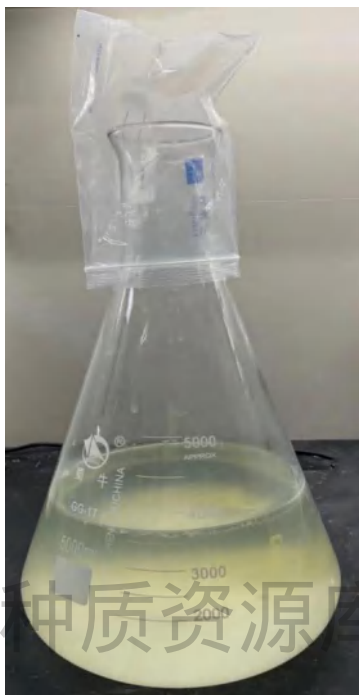


图 2.5.1 高密度培养草履虫

2.2 将接种后的锥形瓶放置室温培养 3-5 天，每日统计锥形瓶中草履虫的密度。最高密度可达 2000 个/mL。培养液应为略浑浊的白色液体，过程中若培养液由浑浊变澄清，或发现草履虫密度较低时，可适量的补充新鲜酵母培养液。如果将培养温度提高到 25-30 °C 范围内，可加快草履虫的繁殖速度。

3. 草履虫的投喂

将草履虫扩大培养至 4 天左右，首先用 120 目的过滤网过滤培养液，收集到的过滤液再用 1250 目的过滤网，尽可能过滤掉多余的培养液，将 1250 目过滤网上收集到的草履虫培养液，然后用纯水冲洗过滤网上面残余的草履虫后，倒入收集容器中。最后，确定富集草履虫的密度后，按照投喂后养殖水中草履虫密度大于 100 个/mL 进行投喂斑马鱼幼苗。

二、 丰年虫的孵化

根据丰年虫卵的脱壳情况，孵化方法可以分为两种，脱壳孵化法和未脱壳孵化法，下面主要介绍常见的未脱壳孵化法。

1. 材料

去氯自来水（或双蒸水）；海盐；食用级小苏打（ NaHCO_3 ）；未脱壳丰年虫卵；丰年虫卵孵化器；增氧泵。



丰年虫卵的孵化量要根据斑马鱼养殖规模确定，如果以 12 L 孵化体系计，还需以下材料：12 L 的去氯自来水，或双蒸水；200mL 海盐；9 g 食用级小苏打；60mL 的未脱壳丰年虫卵。

2. 步骤

2.1 将丰年虫卵孵化器放置在 24 小时光照和 24-28℃ 室温条件下。

2.2 向孵化器中加入 12 L 去氯自来水或净水、200mL 海盐和 9 g 食用级小苏打。

2.3 待海盐和小苏打充分溶解后，加入 60 mL 的未脱壳丰年虫卵。

2.4 根据丰年虫孵化体积，选用适当功率的增氧泵向孵化器内连续通气 18-24 小时(图 2.5.2)。将增氧石放置在孵化器的底部，调节增氧泵至适当的充气强度，避免剧烈充气。

2.5 孵化 18-24 小时后，停止通气。静置适当的时间(约 15 min)后，孵化的丰年虫会沉积在孵化器的底部，卵壳会漂浮在溶液的表面。

2.6 打开孵化器底部的阀门，收集沉积在底部的丰年虫。切勿收集表层的卵壳。

2.7 过滤收集丰年虫，并用双蒸水清洗 2-3 次，每次稍静置后将表面的壳用 180 μm 孔径的过滤网捞出。最后将清洗后的丰年虫重新悬浮到 1 L 的双蒸水中，搅拌混匀后投喂斑马鱼。



图 2.5.2 丰年虫孵化和收集好的丰年虫





第六节 斑马鱼的实验室安乐死

斑马鱼的自然寿命是 2-5 年，对于使用后的斑马鱼的妥善处理，是实验动物伦理学的要求。在实验室中，由于 18 个月以上的斑马鱼开始老化，产卵减少，免疫力降低，容易感染细菌或生长肿瘤，可施以安乐死处理。常用的斑马鱼安乐死方法有 2 种：高剂量麻醉法和冰浴法。

成年斑马鱼可以使用高剂量麻醉法。将成鱼浸入约 0.8 g/L 高浓度的 Tricaine 溶液中。鳃动停止活动后继续浸泡 10-15 分钟，以保证鱼已死亡。之后按照生物医学实验垃圾处理。

冰浴法适用于胚胎、由于和成年斑马鱼。用于胚胎和幼鱼时，将大量的冰加入到有幼鱼的养殖缸内，30 分钟后，可认为幼鱼已死亡。成年鱼可直接将鱼捞出，浸入冰水混合液中（保证有足够体积的冰）。鱼在冰水中心跳会逐渐放缓到彻底停止。冰浴浸泡 20 分钟以上，可认为鱼已死亡。之后按照生物医学实验垃圾处理。

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

第七节 斑马鱼养殖中常见问题

一、为什么斑马鱼成鱼不产卵？

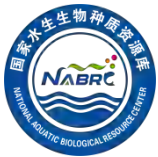
答：斑马鱼不产卵的最常见的原因是投喂不足。斑马鱼日常投喂饵料不足，或者投喂的颗粒饲料中淀粉含量过高，都可能导致其不产卵或者产卵量低。故用于产卵的斑马鱼每日不得投喂少于 2 顿活饵料，或者投喂蛋白质含量较高的颗粒性饲料。

第二个常见的原因是养殖水水质异常，应手动检测水质，查看相关参数是否在《斑马鱼养殖环境》章节中所示的正常范围内，一般出现异常的指标是 pH、水温、氨氮和溶氧量。

第三个原因是雌、雄鱼年龄或体型相差过大。斑马鱼胚胎体外受精，体外发育，受精过程需要雌、雄鱼有正常的伴随游动。年龄或体型相差过大的斑马鱼可能无法形成正确的伴随游动。体型过小的雄鱼也可能不敢追逐体型较大的雌鱼，造成产卵量少或者不产卵。因此，配对产卵应选用年龄相仿，体型大小接近的斑马鱼。

其他不产卵的原因与配鱼的频率和光、暗周期有关。斑马鱼最好一周配一次，如果使用过于频繁或者鱼龄太大、小都会影响产卵。此外，应保证 10 小时的光周期和 14 小时的暗周期，并且光照强度在正常指标范围内。





二、为什么斑马鱼幼鱼存活率低？

答：影响斑马鱼幼鱼存活率的主要因素是温度、密度和水质。

养殖水温一般控制在 27 °C 左右，特别是在冬季，鱼房空气流动较大使得室温偏低，此时应在幼苗养殖缸底部放置保温垫，以维持养殖水温恒定。养殖密度控制在 100 尾/L 以下，以 50 尾/L 为佳。投喂之前应在显微镜下观察草履虫的密度，保证缸内每一尾幼苗都能吃到充足的食物。每日检查幼苗摄食情况，如果投喂粉末饲料过多，则需每日及时用吸管吸出残渣，以免败坏水质。此外，每天应更换一次养殖水，换水量以总水量的 1/2 为宜。

三、为什么斑马鱼成鱼状态不好？

答：影响成鱼状态的主要原因是水质，应定时手动检测水质，查看相关参数是否在正常范围之内。斑马鱼状态异常的另一个原因可能是成鱼鱼龄，18 个月以上的斑马鱼开始老化，产卵减少，免疫力降低，容易感染细菌，很容易生病造成游动状态异常。因此要及时处理鱼缸里的死鱼、老鱼和病鱼，以免影响鱼缸和系统中其他健康的鱼。

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

www.zfish.cn





参考文献

- [1] Wimalawansa S J. Purification of contaminated water with reverse osmosis: effective solution of providing clean water for human needs in developing countries[J]. International journal of emerging technology and advanced engineering, 2013, 3 (12): 75-89.
- [2] Brand M, Granato M, Nüsslein-Volhard C. Keeping and raising zebrafish[J]. Zebrafish: a practical approach, 2002: 7-37.
- [3] Vargesson N. Zebrafish in manual of animal technology (ed. S. Barnett) Blackwell Publishing Ltd: Oxford, UK, 2007.
- [4] 孙永华. 国家斑马鱼资源中心简介[J]. 遗传, 2013, 35 (4): 549-550.
- [5] Lawrence C. Lawrence, C. The husbandry of zebrafish (Danio rerio): A review. Aquaculture 269, 1-20[J]. Aquaculture, 2007, 269 (1-4): 1-20.
- [6] Westerfield M. The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio), 5rd edition.[M]. University of Oregon Press, 2007: 385 pp.
- [7] Matthews M, Trevarrow B, Matthews J. A virtual tour of the guide for zebrafish users[J]. Lab Anim, 2002, 31: 34-40.
- [8] Spence R, Runa K F, Reichard M, et al. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. [J]. J. Fish Biol., 2006, 69: 1435-1448.
- [9] Mcclure M M, McIntyre P B, McCune A R. Notes on the natural diet and habitat of eight danioin fishes, including the zebrafish Danio rerio.[J]. J. Fish Biol., 2006, 69: 553-570.
- [10] Lawrence C. Lawrence, C. The husbandry of zebrafish (Danio rerio): A review. Aquaculture 269, 1-20[J]. Aquaculture, 2007, 269 (1-4): 1-20.
- [11] Lawrence C., Eisen J.S., Varga Z.M. Husbandry and Health Program Survey Synopsis[J]. Zebrafish, 2016, 13 Suppl 1: S5-7.
- [12] Matthews M, Trevarrow B, Matthews J. A Virtual Tour of the Guide for Zebrafish Care and Users[J]. Lab Animal, 2001, 31: 34-40.
- [13] Carmichael C, Westerfield M, Varga Z M. Cryopreservation and In Vitro Fertilization at the Zebrafish International Resource Center[J]. Methods Mol Biol, 2009, 546: 45-65.



第三章 斑马鱼常见鱼病及健康维护

鱼病种类很多。按照发生原因的不同，大体分为两类：非感染性疾病及感染性疾病。两类疾病对斑马鱼的健康均可形成严重的危害。其中以感染性疾病造成的危害较为严重，常常形成大规模的爆发或感染，严重影响实验用斑马鱼的质量以及实验结果的准确性。斑马鱼为鲤科鱼类，故感染鲤科鱼类动物的病原均有可能感染斑马鱼。本章将对斑马鱼鱼房内中常见疾病及日常健康维护做一个简单的介绍。

国家水生生物种质资源库 (NABRC) 第一节 细菌性疾病

一、分支杆菌感染

1. 病原：海分支杆菌(*M. marinum*)、龟分支杆菌(*M. Chelonae*)、偶发分支杆菌(*M. Fortuitum*)和嗜血分支杆菌(*M. Haemophilum*)等细菌感染[1]。分支杆菌属细菌一般不易着色，需要进行抗酸性染色。其中海分支杆菌以及嗜血分支杆菌是一种非常严重的人畜共患病原，在斑马鱼鱼房内出现过恶性传播和人员感染，造成巨大的损失[2]。

2. 临床症状：病鱼常出现体表溃疡、出血、头部周围充血，卵巢所靠近部位的体表溃烂。内脏器官会有白色结节出现，有时也会伴有腹水（图 3.1.1）。

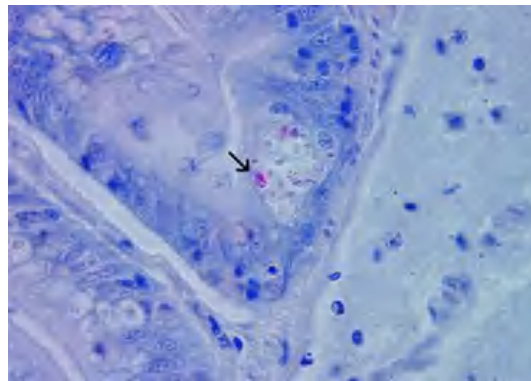


图 3.1.1 分支杆菌感染病征与病理图。左侧，检出过分支杆菌的体表溃烂斑马鱼，右侧分支杆菌感染鱼肠道切片的抗酸染色（分支杆菌为抗酸菌染色呈红色，非抗酸菌染色呈蓝色）（引自：<http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php>）



3. 诊断：诊断时根据上述症状，取内脏中的小结节做涂片，进行抗酸染色后如发现长杆形的抗酸菌，基本就可以确诊。也可根据分支杆菌 16S rDNA 基因保守序列设计引物，分离分支杆菌，特异性 PCR 扩增并测序的方法鉴定[3]。

4. 防治：一般来说分支杆菌感染很难用药物根治，有文献报道 50 ppm 卡拉霉素 (kalamycin) 对其有一定的控制作用[4]，也有实验室采取高浓度的次氯酸钠 (100 ppm) 或者聚维酮碘溶液 (1000 ppm) 消毒胚胎的方法来去掉分支杆菌[2]。此外，优化饲养条件、增加鱼的天然免疫力对其预防也有一定作用。

二、竖鳞病

1. 病原：嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和水型点状假单胞菌(*Pseudomonas punctatata* f. *ascitae*)等细菌感染。一般认为是水质不良，鱼体受伤时导致鳞片间淋巴液感染细菌所致。

2. 临床症状：病鱼离群独游，游动缓慢，无力，体表粗糙，鳞囊内积水，鳞片竖起，用手指轻压鳞片，渗出液就从鳞片下喷射出来，鳞片也随之脱落。病鱼严重贫血，鳃、肝、脾、肾的颜色均不同程度的发白（图3.1.2）[5]。



图 3.1.2 竖鳞病斑马鱼。游动缓慢，无力，体表粗糙，鳞片竖起，腹部膨大有腹水，眼球突出。

3. 诊断：根据其症状，如鳞片竖起，眼球突出，腹部膨大有腹水可初步判断。进一步确认病原可以染色观察到细菌，分离培养细菌并PCR扩增16S rDNA，测序确诊。

4. 防治：对该病的预防需要保持良好及稳定的水质。短时间换水量过大造成水温急剧变化，或系统换水流速过急的情况下比较容易出现。当斑马鱼发生竖鳞病症时，应检查设备情况，更换旧滤材，及时更换清洗鱼缸、并调整缸中的水质，来减轻水中有害物质对鱼的二次伤害。发病初期鳞片只会有稍微的掀翘，此时为最有效的治疗时期，往往采用磺胺类药物进行治疗。若无法排除药物对实验的干扰，可采取 3%食盐浸泡病鱼 10~15min；或用2%食盐和3%小苏打混合液浸泡10min，多次浸泡，有一定的疗效。但是一旦发生严重竖鳞并腹水症状，就无法医治了，应该及时隔离及处死病鱼，清洗接触



过病鱼的鱼缸、渔捞，避免病原传播。

三、细菌性败血症

1. 病原：细菌性感染，水质不良，鱼体免疫力低下或者鱼吞食了带壳的丰年虫卵使内脏器官被划伤受损，细菌易感导致。

2. 临床症状：发病初期，鱼腹部肿胀，眼眶、肌肉充血，肛门或鱼鳍基部变红，其腔内堆积液体，内部器官变色，部分病鱼还有鳞片竖起、肌肉充血等症状（图3.1.3）。大量急性死亡时，可发现少数鱼甚至在肉眼看不出明显症状的情况下就已死亡，这是由这些鱼的体质弱，病原菌侵入的数量多、毒力强所致。

3. 诊断：根据其症状，全身充血，腹部肿胀有腹水，解剖肝胆脾肿大充血可初步确诊。

4. 防治：发病时必须先将病鱼隔离，然后停食，这样能减小鱼鳔的负担，也能减少水质污染。四环素、氟苯尼考等药物针对早期腹水病有一定的疗效。



图 3.1.3 腹水病斑马鱼。
游动缓慢，无力，腹部膨大
有腹水，腹部皮肤溃烂。

四、滑动细菌感染（细菌性鳃病、烂鳃病）

1. 病原：黄杆菌属(*Flavobacterium spp.*)、屈挠杆菌属(*Flexibacter spp.*)等细菌感染；淡水养殖中常被检测出来的菌为柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)和嗜鳃黄杆菌(*F. branchiophilum*)[6]，系统内的带病鱼是该病的主要传染源，被病原污染的水体等也可成为重要的污染源。

2. 临床症状：病鱼行动缓慢，反应迟钝，呼吸困难，体色发黑；鳃丝呈暗红色，充血明显，糜烂严重；鱼鳍和鱼尾表现特征性的腐蚀，颜色发白，传播迅速，死亡率高（图3.1.4）。

3. 诊断：取鳃丝，压片观察鳃上肿胀，上皮增生，次级鳃瓣融合，有些鳃瓣坏死，切片染色后病变部位可见大量细菌。采集病变部位的黏液性物质，涂布在载玻片上，在



显微镜下可见滑动运行的细长杆菌。分离培养细菌，PCR 扩增 16S rDNA 并测序或者生化鉴定确诊。

4. 防治：降低饲养密度，保持好的水质；关注紫外灯的工作状态；尽量不要把有伤口的鱼放置循环系统中饲养；减少氨等有害物质的刺激，保证鱼缸的清洁，减少细菌感染的机会。采用 3%盐浴 5~10min，或者使用土霉素进行治疗可较有效的控制该疾病。



图 3.1.4 滑动细菌感染鱼的病征图。病鱼尾部皮肤褪色。

五、爱德华氏菌病

1. 病原：目前斑马鱼实验室检出的主要是鮠爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)，病菌可通过水和粪便进行传播，国内外已报道的主要感染途径有两种，一是经消化道感染，病原菌被食入后经消化道侵入血液进入各组织器官，引起炎症、坏死等；二是由体外感染神经系统而引起炎症。病菌一般先侵入脑组织，然后经血流散步全身，导致疾病发生[7]。

2. 临床症状：以头盖穿孔型病征最为常见，病菌最初感染部位是鼻根的嗅觉囊，再经嗅觉器官移行到脑，形成肉芽肿性炎症。病鱼行为异常，伴有交替的不规则游泳，或嗜睡；后期头盖骨溃烂成一深孔，直到裸露整个脑组织，同时头部伴有不同程度出血。（图 3.1.5）。



图 3.1.5 鮠爱德华氏菌感染斑马鱼的病征图。





3. 诊断：头盖穿孔，病鱼体壁有紫色出血，肝脾肾肿大。取病鱼脑组织于BHIA平板划线接种可以分离出鮠爱德华氏菌（图3.1.5）。

4. 防治：由于带病鱼可以通过粪便将病原释放到水体，引起斑马鱼持续性发病，因此要在源头上杜绝该病原的存在，引种外来鱼隔离饲养，后代胚胎严格消毒。饲养过程中，适当降低密度和温度，减少应激可以一定程度上预防该病原。此外，药敏实验虽证明该病原对喹诺酮类药物敏感，但该类药物治疗患病鱼的效果并不佳，目前针对该病尚无好的治疗方法。

第二节 寄生虫疾病

一、噬神经微孢子虫感染

1. 病原：微孢子虫（*Pseudoloma neurophilia*）属于微孢子门，孢子呈梨形或者卵圆形，孢子小（ $0.8\sim 1\times 1.2\sim 1.6\mu\text{m}$ ），内部构造需在电镜下才能看清楚。专性细胞内寄生，复杂生命周期，产生具有传染性和抵抗性的孢子。鱼通过摄入具有传染性的孢子感染，该病原潜伏期长，发病时间慢，是一种慢性疾病[8]。

2. 临床症状：病鱼瘦弱，无光泽，有时脊柱弯曲，病变组织肿大。而一些外表正常的鱼也可能存在微孢子虫的潜伏性感染[9]（图 3.2.1）。

3. 诊断：中枢神经系统（脊髓和后脑）可见孢子（湿片或切片），革兰氏染色和抗酸性染色均可以用。病鱼脑部及肾脏组织的分子检测可以快速鉴定出微孢子虫感染[10]。

4. 防治：对微孢子虫较有效的控制手段是紫外线（UV）对水体进行照射，因此要保证养殖循环系统中有足够照度的紫外线消毒（ $>30,000\text{ uw.s/cm}^2$ ），定期检查紫外灯的照度，及时更换紫外灯。然而紫外线并不能完全去除掉微孢子虫孢子体[6]；因此一旦发现不明原因导致的体型瘦弱鱼要及时清除；严格管理好品系斑马鱼种源，防止微孢子虫交叉污染。针对微孢子虫的治疗目前尚无有效药，可试用一些抗原虫的药物，例如地克珠利或者盐酸氯苯胍。





图 3.2.1 噬神经微孢子虫感染斑马鱼的病征图。左侧受感染斑马鱼异常瘦弱；右侧斑马鱼脊柱弯曲，游动异常

二、小瓜虫感染

1. 病原：多子小瓜虫 (*Ichthyophthirius multifiliis*)，属纤毛虫纲、膜口目，凹口科[11]。

2. 临床症状和病变：粘液过多、呼吸困难和精神萎靡，皮肤上附着的白色点状物。

3. 诊断：镜检皮肤和鳃，将有白色小点的鳃或鳍剪下，放在载玻片上，压片后显微镜下可见纤毛虫（多子小瓜虫），确诊见到有一个明显马蹄形大核的卵圆形虫体（图 3.2.2）。

4. 防治：养殖过程中需要避免与其他鱼类混养引进外来病原，避免急剧水温变化，同时也要保证水质。治疗时多利用小瓜虫不耐高温的弱点，提高水温，再配和药物治疗，通常治愈率可达 90% 以上。采用 20% 盐水浸泡 5-10min，或用百万分之二 (2ppm) 的甲基蓝溶液，每天浸泡 6 小时，有一定的疗效。



图 3.2.2 小瓜虫感染病鱼病征图。左侧，病鱼的鳃上可见小瓜虫滋养体；右侧，小瓜虫显微镜下结构图：刮取皮肤粘液或者鳃上虫体，于显微镜下可见有一个明显马蹄形大核的卵圆形虫体。（引自 <http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php>）



三、毛细线虫感染

1. **病原：**毛细线虫 (*Pseudocapillaria tomentosa*) 为第一个被发现的感染斑马鱼的毛细线虫，具有广泛的宿主。属毛细科，卵生，卵随寄主粪便排入水中，开始分裂，形成幼虫，但幼虫并不出壳，鱼吞食含有幼虫的卵而感染。

2. **临床症状和病变：**病鱼发黑，瘦弱，毛细线虫以其头部钻入寄主肠壁黏膜层，破坏组织，引起肠壁发炎，剖检肝肿大和贫血（图 3.2.3）。此外，毛细线虫还可能会引发斑马鱼肠瘤[12]。

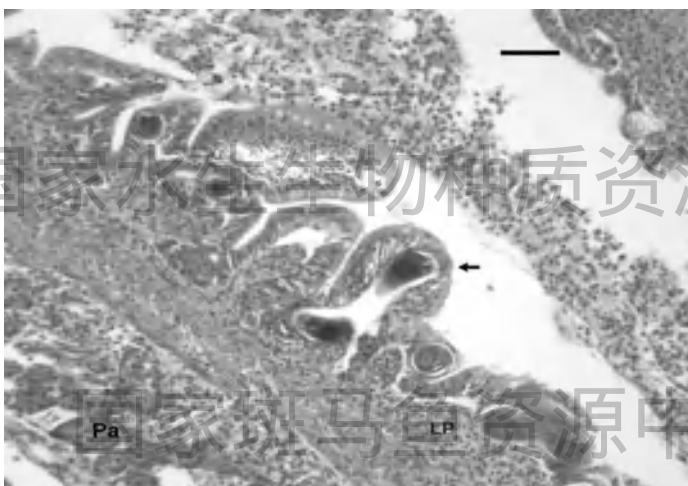


图 3.2.3 毛细线虫病鱼的病理图。

毛细线虫感染鱼体组织的切片观察，切片中可见毛细线虫（箭头）。
(引自 <http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php>)

3. **诊断：**组织切片见毛细线虫位于肠壁，且有椭圆形、具双极囊的卵存在；确诊还需要观察、分离虫体，分子检测确诊。

4. **防治：**预防时需严格控制喂养斑马鱼的食物来源，因为食物中可能带有该病原[6]。毛细线虫的防治非常不易，针对斑马鱼目前尚无特效药物。消毒鱼卵和隔离外来鱼是目前较有效的控制毛细线虫的手段。

第三节 真菌性疾病

一、水霉病

1. **病原：**水霉属和绵霉属的一些种类。水霉在淡水中广泛存在，对温度的适应范围很广，5~26℃均可生长繁殖，繁殖适温为 13~18℃。

2. **临床症状：**又称白毛病，病原可以感染受伤鱼体，也可感染鱼卵。患病早期没有明显症状，随着病情发展，病原迅速生长，菌丝一端深入皮肤内，造成发炎坏死；另



端露在体表外大量生长，形成肉眼可见的灰白色棉絮状物（图 3.3.1）。病鱼会焦躁不安，在缸壁摩擦；或游动迟缓，食欲减弱，瘦弱而死。

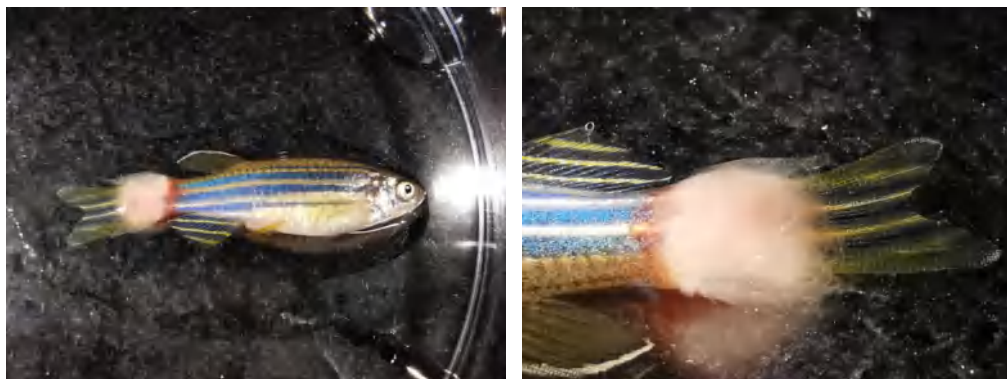


图 3.3.1 斑马鱼水霉病。病鱼受伤部位长出白色絮状物

3. 诊断：体表肉眼可见灰白色棉毛絮状物；进一步检查需对病样进行真菌人工培养。

4. 防治：水霉病的发生与宿主的健康状况密切相关，特别是当鱼体表面受外伤时，水霉菌可趁虚而入引发水霉病。因此，对该病的预防主要是避免鱼体受伤。该病目前尚未理想治疗方法，在患病早期及时处理有一定效果，常采用对真菌具有杀灭作用的含碘制剂，例如聚维酮碘溶液。

第四节 非感染性和先天性疾病

一、卵巢相关炎症

1. 临床症状和病变：腹部膨胀扩张，卵巢成实肿瘤状物。严重者甚至从内腔到体表出现溃疡[6]（图 3.4.1）。



图 3.4.1 斑马鱼卵巢相关炎症的病征与病理图。

病鱼卵巢形成相关炎症向外溃烂的白色溃疡

2. 诊断：组织学上可见严重慢性炎症，以及大量退化的卵。



3. 防治：具体病因尚不清楚，可能是分支杆菌感染所致。猜测雌性斑马鱼未及时将卵排出可能是该病发生的一个原因，因此需要定期将雌鱼体内的卵排出或者将雌鱼雄鱼混养在一起。

二、甲状腺肿大

- 1. 病因：**怀疑是水体含碘量过低或者水体中含有某种致甲状腺肿大的物质。
- 2. 诊断：**下颚处或者鳃盖处长出一种瘤状增生，或成红色或成粉白色（图 3.4.2）。



图 3.4.2 斑马鱼甲状腺肿大外观图

3. 防治：由于发病原因尚不明确，甲状腺肿斑马鱼尚无明确防治方法。但是其可能具有传染性，日常饲养中需要维护好鱼房卫生，及时捞出病鱼可以控制该病的扩散。

三、心脏病

- 1. 临床症状和病变：**心肌炎或者心包积液。外观上可见心脏区域异常肿胀，解剖后发现心脏严重出血或有大块的血块儿[6]。
- 2. 诊断：**组织切片可见心室扩张，充满液体（图 3.4.3）。
- 3. 防治：**发病原因待定，尚无治疗方法。



图 3.4.3 斑马鱼心脏病的病征与病理图。
斑马鱼心包积液导致心脏外凸



四、气泡病

1. 病因：水中某种气体（一般是 O_2 或者 N_2 ）过饱和，导致鱼体液平衡被打乱相继出现体内气体过饱和，气泡析出。一般越幼小的个体越敏感，可引起幼鱼大批死亡；常见于循环养殖设备中增氧泵故障或者进水管故障导致空气进入，从而引起水体某种气体含量过饱和[6]。

2. 诊断：鱼最初因感到不舒服，在水面做混乱无力游动或者失去平衡，不久在体表及体内出现气泡，随着气泡的增大及体力的消耗，鱼逐渐失去游动能力而浮在水面，不久即死，一旦发生，难以逆转（图 3.4.4）；解剖于显微镜下检查，可见鳃、鳍及血管内有大量气泡，引起栓塞而死；症状明显时，肉眼即可见体表有气泡产生。

3. 防治：气泡病是水体的气体过饱和所致，因此要监测水体气体饱和度并设立报警范围；按时对水体含氧量进行监测以防止报警系统故障导致气体过饱和。同时需要定期检修增氧泵及进水管等设备，严格控制进入循环系统的水温，不可相差太大。一旦发现有气泡病时应立即加入新鲜水，同时排出旧水。



图 3.4.4 气泡病斑马鱼病征图。左侧，病鱼皮肤出现肉眼可见气泡（白色所指即为气泡）；右侧，病鱼尾鳍上出现肉眼可见气泡

五、其他一些水质因素引起的疾病

1. 铜中毒

病因：循环养殖系统中的铜元素超标。在新建立的鱼房中比较常见。

临床病征：斑马鱼嗜睡，无精神，抵抗力差，易感其它病原。铜中毒会影响斑马鱼的发育及繁殖[13]。



2. 氯中毒

病因：养殖系统中活性炭系统未及时更换；同时养殖鱼房内，常常用含氯制剂进行鱼缸等器皿及工具的消毒，从而导致水体中氯离子含量过高。

临床病征：氯中毒往往会导致斑马鱼呼吸困难，鳃肿胀变红进而坏死[6]。

诊断：压片可见鳃颜色变深红、坏死。

防治：循环系统中及时更换清洗活性炭可以有效去除氯离子，通入足够的氧气也可缓解氯离子中毒。

3. 氨氮中毒

病因：水体中氨氮含量超标，常见于鱼长途运输的打包袋或者新建循环系统，生物膜内稳态尚未建立[6]。

临床病征：斑马鱼极度兴奋，厌食，停止生长，继而死亡，有些病鱼会在体表形成溃烂（图 3.4.5）。



图 3.4.5 氨氮中毒斑马鱼病征图。氨氮中毒的斑马鱼皮肤上出现溃烂

诊断：目前只有通过测量水体中的氨氮含量来确定。

防治：加快水的流速，增大换水量，加入硝化细菌可以缓解系统氨氮量过高的情况。

第五节 斑马鱼日常健康维护

近年来，越来越多的实验室都已建立了斑马鱼鱼房。实验用斑马鱼在养殖与操作中存在的问题给斑马鱼鱼病的爆发和传播带来了一定风险，对斑马鱼疾病的控制，我们一般也采用“预防为主，治疗为辅”的原则，因此斑马鱼日常健康维护对斑马鱼各领域相



关研究的顺利开展尤为重要。本节对斑马鱼日常健康维护的相关工作做一个简单的介绍。

一、外来及引进鱼隔离管理

1. 斑马鱼鱼房应当建立独立于主鱼房的外部隔离鱼房或者独立于主养殖系统的隔离鱼架。隔离鱼房内养殖循环系统或者隔离鱼架应为独立循环系统。所有引进鱼都必须在外部隔离鱼房或者隔离鱼架进行隔离[5]。

2. 引进鱼隔离管理：实验室应重视引进鱼管理工作，对放在隔离鱼架上引进鱼进行1-2周的病征观察；若出现明显病征，则需要立即对鱼采取捞出隔离，体表消毒及体外受精传代并对胚胎进行消毒操作，防止病原传播及保护品系安全；若未观察到明显病征则可将鱼放入主养殖系统中进行饲养。建议有条件的实验室可以实行“引进鱼终身不进入主养殖系统”的原则，只有其后代胚胎经过消毒后方可放入主养殖系统饲养[5]（图3.5.1）。

3. 外部鱼房在鱼缸配种缸鱼捞等工具上也严格与主养殖系统分开使用。所有使用过的鱼缸鱼捞等工具都应进行消毒处理；未经消毒的外部鱼房鱼捞鱼缸等渔具严禁进入主鱼房使用[5]。

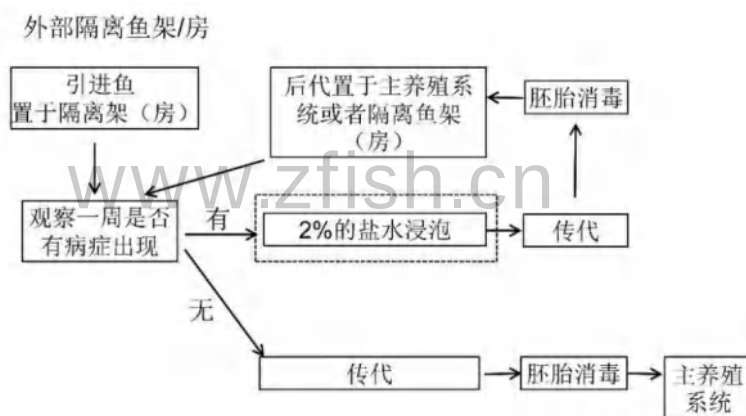


图3.5.1 外部鱼房隔离措施流程图

二、胚胎消毒方法

所有进入主养殖系统的斑马鱼后代胚胎均应进行消毒。常用胚胎消毒方法参照《The zebrafish book》(5th edition)方法执行[14]。具体操作为：挑选受精5 hpf后胚胎，置于含氯量为0.03%的次氯酸钠溶液中浸泡5 min，取出置于无菌养殖水中清洗1次 5 min，再次取出后再次浸泡于新的含氯量为0.03%的次氯酸钠溶液中5 min，无菌养殖水中清洗2次，每次5 min即可（图 3.5.2）。



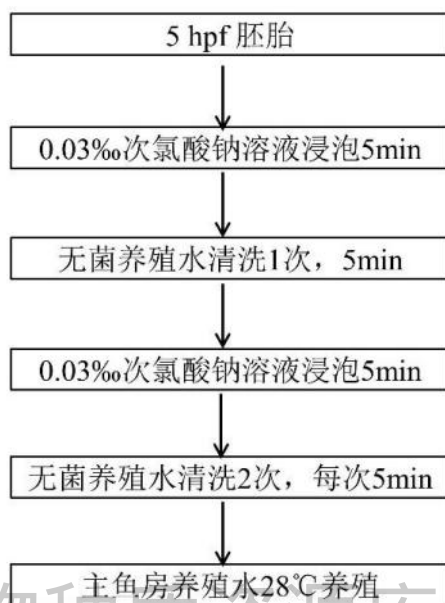


图3.5.2 斑马鱼胚胎消毒流程图

三、鱼房内相关设备维护及水质监测[5]

1. 建立每日巡视制度：巡视鱼房内包括循环养殖设备在内的各项设施，保证养殖循环设备、纯水系统、紫外灯、空调等正常运行；记录设备上的各项水质参数（包括水温，pH，电导率，溶氧量等）以及室温等，保证各项参数在斑马鱼养殖所需的正常范围。

2. 建立养殖设备定期监测及维护制度：每月手工监测养殖循环系统的水质参数（包括水温，pH，电导率，溶氧量，氨氮含量等）以防止因系统探头故障出现水质隐患问题；每半年校准设备仪器探头（温度，pH，电导，溶氧探头等）；定期按时清洗更换养殖设备中各项耗材，例如活性炭，过滤棉，紫外灯等（更换频率见表 3.1）；每年安排设备工程师定期检修循环养殖设备。

表 3.1 循环系统各设备耗材更换清洗频率

设备	维护频率
活性炭	每半个月更换一次
粗过滤棉	每周更换清洗两次
细过滤棉	每周更换清洗一次
紫外灯	每日检查，每半年更换一次





四、日常卫生管理操作[5]:

1. 建议执行“一缸一捞”政策，且所有鱼捞使用后必须 0.1% 的次氯酸钠浸泡消毒 30min，清水洗净，80℃烘箱烘干 1 h，方可再次使用。
2. 所有配种缸，鱼缸、挡板、盖板使用过一次后须清水洗净，放于 80℃烘箱烘干 4h，备用。一般情况下，鱼缸每三个月清洗更换一次，鱼缸挡板、盖板每月或者每两周定期清洗更换，具体视使用情况而定。
3. 鱼房地面每周定期清洗一次；鱼房内台面使用完后 75% 的酒精喷洒擦拭干净。
4. 安排每日巡视人员及时捞出死鱼，隔离病鱼；清理掉鱼房各项垃圾，防止细菌和蚊虫滋生，并做好相应详细记录，及时通报。
5. 所有进入鱼房的工作人员须更换干净拖鞋或者鞋套入内；工作人员进行相关操作时须配戴无粉橡胶手套以防止病原带入鱼房及保护自身安全。同时建议相关实验室严格控制鱼房进出人员，非相关工作者严禁入内以防止病原带入；若有外来人员入内可采取一次性鞋套等防护措施。

五、主鱼房斑马鱼健康状况监测

1. 哨兵岗监测系统： 养殖系统中应设有哨兵岗监测系统，通过对哨兵岗斑马鱼健康状况监测以评估整个鱼房斑马鱼健康状况（监测过程即为常规的鱼病检测过程）（图 3.5.3）。斑马鱼哨兵岗鱼分系统过滤后养殖水（post-filtration）和系统未过滤养殖水（pre-filtration）的不同而被分别放置于循环养殖系统的不同位置。哨兵缸中放置 4-12 个月大的野生型且外观正常的斑马鱼，定期随机捞取 5-10 尾鱼，用于细菌、寄生虫等病原的检测，哨兵鱼用后应及时补充[5]。



哨兵鱼监测系统

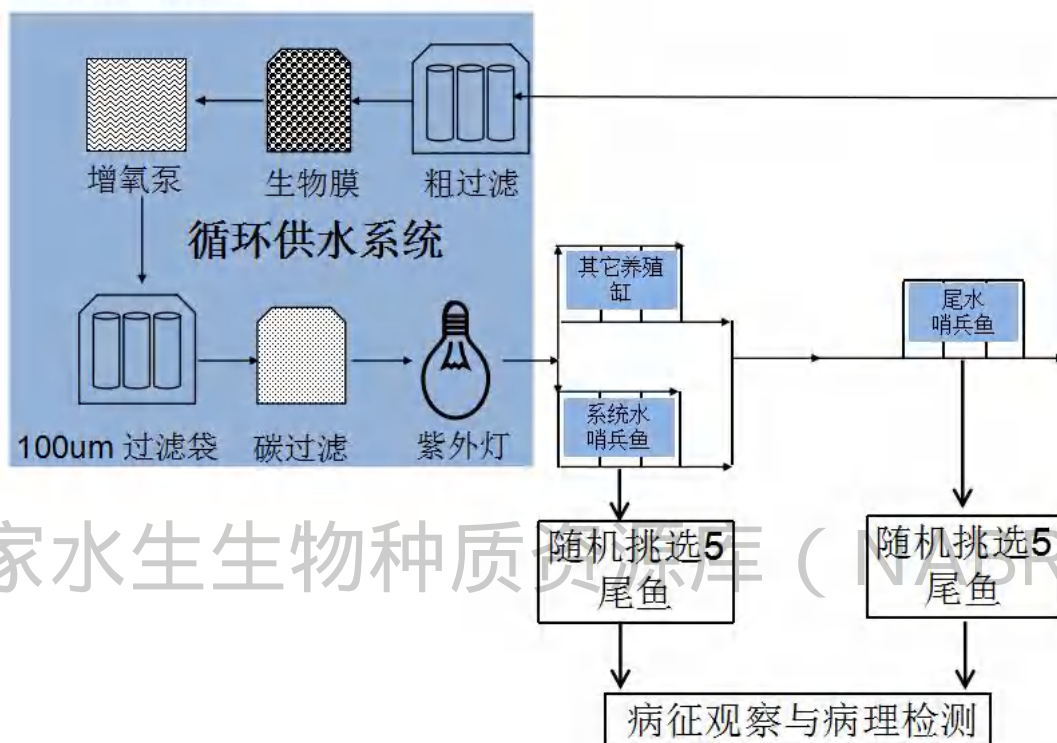


图 3.5.3 哨兵岗鱼监测系统布局图

2. 若没有条件设立哨兵岗监测，则采取以下替代方案：

2.1 定期从系统鱼缸中随机捞取 5 尾鱼，用于细菌、寄生虫等病原的检测。

2.2 选取系统内具有典型病症的斑马鱼进行细菌、寄生虫等病原的检测。

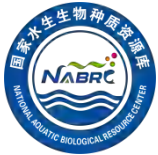
六、品系鱼日常传代维护管理

1. 及时捞出死鱼，隔离病鱼；针对 18 个月以上的老鱼及时安乐死。

2. 针对需要传代的品系，部分采取测交方法进行传代，避免全部自交传代，以免后代出现不良性状或者生物多样性降低[15]。

3. 野生型品系自身传代要尽量保持基因异质性及多态性，避免近交系数随繁殖代数增加而过快上升。作为繁殖用的野生型原种必须遗传背景明确或来源清楚，有较完整的资料（包括来源、种群名称、日期及主要生物学特征等），且引种数目一般不应少于 25 对。





七、应对和控制鱼病措施

1. 一旦在鱼缸内发现有病征的斑马鱼，及时将其捞出并隔离在单独小缸（注：小缸非循环系统中鱼缸）。病鱼所在原缸将被清洗消毒处理（清洗消毒流程见四），同时将缸内其他未见病征鱼将被捞出，2%的盐水浸泡 10min 或聚维酮碘溶液 25ppm 浸泡 10min，密切观察后续是否会有相应症状出现。对于系统中的其他鱼，可相应采取增大水体电导率（增大养殖循环系统含盐量）的方法对鱼体表面进行消毒。

2. 病鱼送往实验室记录相关病征，并进行病原检测：

2.1 体表粘液、鳃部组织将被取出检查是否有寄生虫；

2.2 腹腔解剖观察是否有腹水及肝糜烂状况，穿刺肝组织涂平板，检测相关细菌感染情况；

2.3 肾脏部位检测是否有分支杆菌的感染；

2.4 脑部组织将被检测是否有微孢子虫的感染；

2.5 肠道组织切片观察毛细线虫及虫卵。

3. 因恶劣的水质会导致鱼体免疫力低下，病原入侵几率增大。一旦出现病鱼增多，第一时间应手工检测水质。

4. 在排除药物对实验结果造成干扰的前提下，可以加入一定的药物进行治疗，但必须对症对因。例如，蠕虫类感染可选取晶体敌百虫，细菌性感染可采用聚维酮碘（建议使用浓度 12.5~50ppm），氟苯尼考等等（特别提醒：为防止药物滥用现象出现，治疗均需在小缸内进行）。

5. 适量加入硝化细菌等微生态制剂，建立适合鱼生存的生物菌落环境，也可预防和控制鱼病。





参考文献:

- [1] Kent, M.L., et al., *Mycobacteriosis in zebrafish (Danio rerio) research facilities*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2004. **138**: p. 383-390.
- [2] Mason, T., et al., *Strategies to mitigate a Mycobacterium marinum outbreak in a zebrafish research facility*. Zebrafish, 2016. **13**: p. S77-S87.
- [3] Colorni, A., et al., *Detection of mycobacteriosis in fish using the polymerase chain reaction technique*. Fish Pathol, 1994. **6**: p. 195-198.
- [4] Conroy, G. and D. Conroy, *Acid-fast bacterial infection and its control in guppies (Lesbistes reticulatus) reared on an ornamental fish farm in Venezuela*. Vet. Rec, 1999. **13**: p. 177-178.
- [5] Liu, L.Y., et al., *Zebrafish health conditions in the China Zebrafish Resource Center and 20 major Chinese zebrafish laboratories*. Zebrafish, 2016 **13**: p. S8-S18.
- [6] Kent, M.L., et al., *Diseases of zebrafish in research facilities*. Zebrafish International Resource Center.
- [7] Kent, M.L., et al., *Review of diseases and health management in zebrafish Danio rerio (Hamilton 1822) in research facilities*. J Fish Dis, 2020. **43**(6): p. 637-650.
- [8] Sanders J. L., et al., *Expansion of the known host range of the microsporidium, Pseudoloma neurophilia*. Zebrafish, 2016. **13**: p. S102-S106.
- [9] Kent, M.L. and J.L. Bishop-Stewart, *Transmission and tissue distribution of Pseudoloma neurophilia (Microsporidia) of zebrafish Danio rerio*. J. Fish Dis, 2003. **26**: p. 1-4.
- [10] Whipps C. M. and Kent M. L., *Polymerase chain reaction detection of Pseudoloma neurophilia, a common microsporidian of zebrafish (Danio rerio) reared in research laboratories*. Contemp. Top. Lab. Anim. Sci, 2006. **45**: p. 13-16.
- [11] Noga, E., *Fish disease: diagnosis and treatment*. 1995, Mosby Electronic Publishing: St. Louis.
- [12] Kent, M.L., et al., *Pseudocapillaria tomentosa, a nematode pathogen, and associated neoplasms of zebrafish (Danio rerio) kept in research colonies*. Comp Med., 2002. **52**(4): p. 354-358.
- [13] Dave G. and Xiu R. Q., *Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, Brachydanio rerio*. Arch Environ Contam Toxicol, 1991. **21**(1): p. 126-34.
- [14] Westerfield, M., *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 5rd edition. 2007: University of Oregon Press. 385 pp.
- [15] Murray, K.N., Z.M. Varga, and M.L. Kent, *Biosecurity and Health Monitoring at the Zebrafish International Resource Center*. Zebrafish, 2016. **13**: p. S30-S38.





第四章 斑马鱼基因突变技术及鉴定方法

传统的遗传学策略大致可分为正向遗传学(Forward genetics)和反向遗传学(Reverse genetics)两类。正向遗传学是指通过生物个体或细胞的基因组的自发突变或人工诱变,寻找相关表型或性状的改变,然后从这些特定性状变化的个体或细胞中找到对应的突变基因,并揭示其功能。早期在斑马鱼中建立突变品系使用的 ENU 诱变或随机插入突变的方式就是典型的正向遗传学手段。

反向遗传学则是在已知基因组 DNA 序列的基础上,通过 DNA 重组、基因组编辑技术等手段在基因组特定基因位点引入突变,并研究该基因突变造成的表型,从而研究基因的生物学功能,阐释生命现象和规律。2013 年,英国桑格研究所(Wellcome Trust Sanger Institute)完成了斑马鱼的参考基因组,对斑马鱼进行了系统性的全基因组分析,深入解析了斑马鱼蛋白编码基因的功能。目前,在斑马鱼的基因组中已经发现了 26,000 多个蛋白编码基因,这是已测序脊椎动物中数目最多的[1]。高质量斑马鱼参考基因组的完成和日趋成熟的基因组编辑技术为建立斑马鱼突变体库提供了新的技术平台,为探索斑马鱼基因功能奠定了坚实的基础。大约 38%的蛋白编码基因已经通过各种突变方法和功能研究确定其在斑马鱼发育过程中的作用[2]。本章将简要介绍斑马鱼中应用较广的基因突变技术和突变品系的常规鉴定方法。

第一节 斑马鱼基因的下调表达及敲除技术

人为地调低基因表达水平是研究基因功能的一项重要研究手段。在斑马鱼中,可通过向胚胎中注射吗啉环修饰的反义寡核苷酸(Morpholino, MO),在基因转录水平上进行调控,短时间敲低靶基因的表达水平,也可以利用基因突变技术在基因组水平上实现可稳定遗传的基因敲除。

一、Morpholino 介导的基因敲降技术

吗啉环修饰的反义寡核苷酸(Morpholino, MO)是一种人工合成的稳定的核酸类似物,由美国 Gene Tools 公司(<http://www.gene-tools.com/>)独家研制和销售,一般长度为 25 个核苷酸,通过标准的碱基互补配对与 mRNA 结合。Morpholino 调控基因表达通



常有两种途径：一种是通过与编码区前端（起始密码子附近）结合阻止翻译，另一种是通过与剪切连接点结合来阻断 mRNA 前体（Pre-mRNA）的正常剪接（图 4.1.1）。通过注射 MO 导致靶标 mRNA 的蛋白产物减少，研究其对生物学过程的改变来解释靶标基因在发育中所扮演的角色。实验中可以通过 western blot 或者 RT-PCR 技术来检测 MO 下调基因表达的效果。虽然通过注射 MO 可以方便快捷地在胚胎中下调基因的表达，从而通过表型研究基因的功能，但是注射 MO 也有一些局限性。例如 MO 在胚胎中的维持时间较短，一般认为是 3 天左右，所以利用 MO 下调基因表达的作用主要应用于早期发育胚胎中[3, 4]。

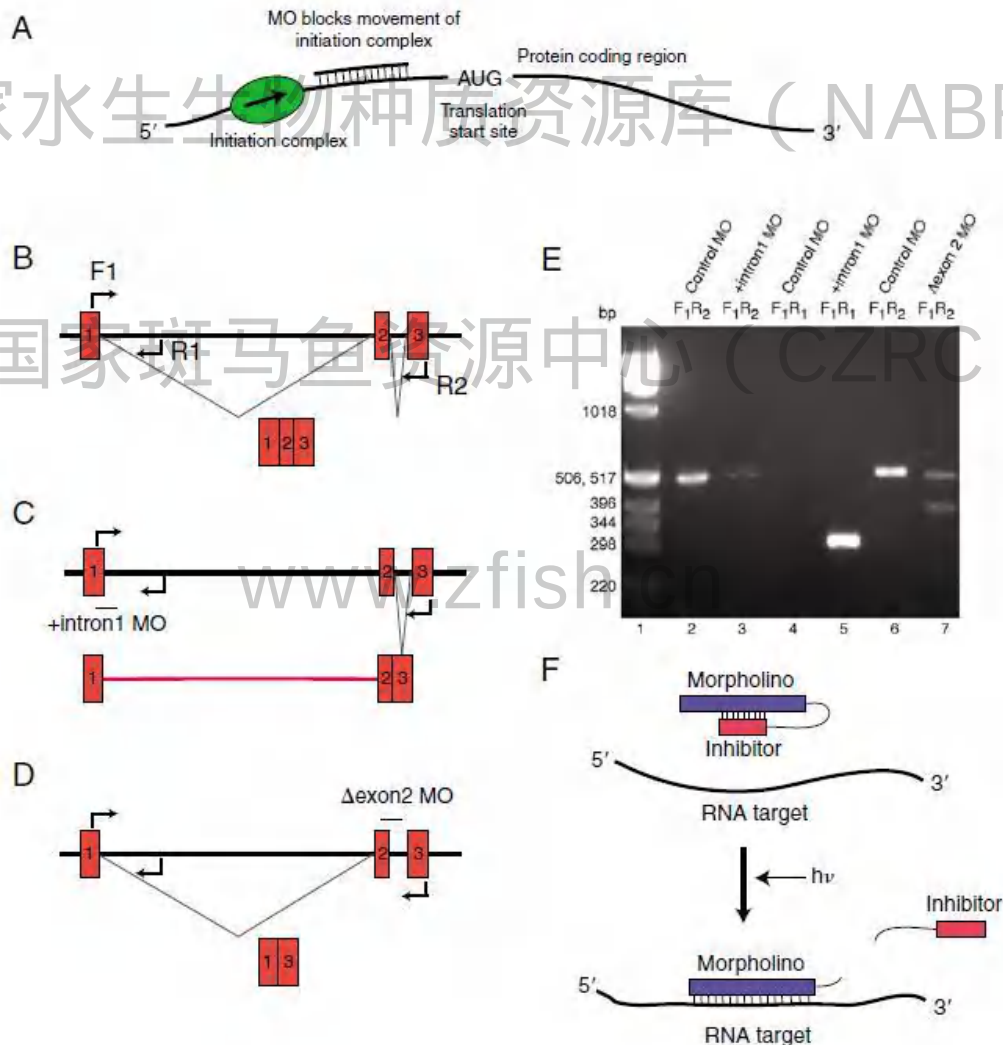


图 4.1.1 Morpholino 工作原理示意图（Eisen and Smith 2008）



在斑马鱼中，某一基因的敲除品系有时无法复刻敲降品系的表型，针对这一现象，研究人员提出“遗传补偿效应机制”，基因敲除品系中会产生无义突变 mRNA，触发机体降解机制，无义突变 mRNA 被降解，该基因的同源基因表达上升，弥补了该基因缺失所导致的表型[5]。

二、 基因敲除技术

1. ENU 诱变及 TILLING 技术

1.1 ENU 诱导点突变

20 世纪 90 年代，德国的 Christiane Nüsslein-Volhard 实验室和美国的 Wolfgang Driever 实验室分别启动的大规模 ENU 诱变[6, 7]，产生了上千个对胚胎早期发育产生影响的突变品系，奠定了斑马鱼作为模式生物的基础[8, 9]。乙烷基亚硝基脲 (Ethenitrosourea, ENU) 是一种人工合成的化合物，在机体内可以通过烷化反应将其自身携带的乙烷基转移到 DNA 碱基的氧原子或氮原子上，复制过程中这些被修饰的碱基会被错误的识别，造成碱基错配。经过多轮复制，生物体就会累积随机的单碱基突变。ENU 致突变的效率因剂量、组织细胞类型和检测系统而有所不同。在斑马鱼中，研究人员采用 ENU 处理雄性斑马鱼，在其生殖细胞中诱导大量的突变，然后与雌鱼杂交，可以在短时间内得到包含大量点突变的突变体库（图 4.1.2）。

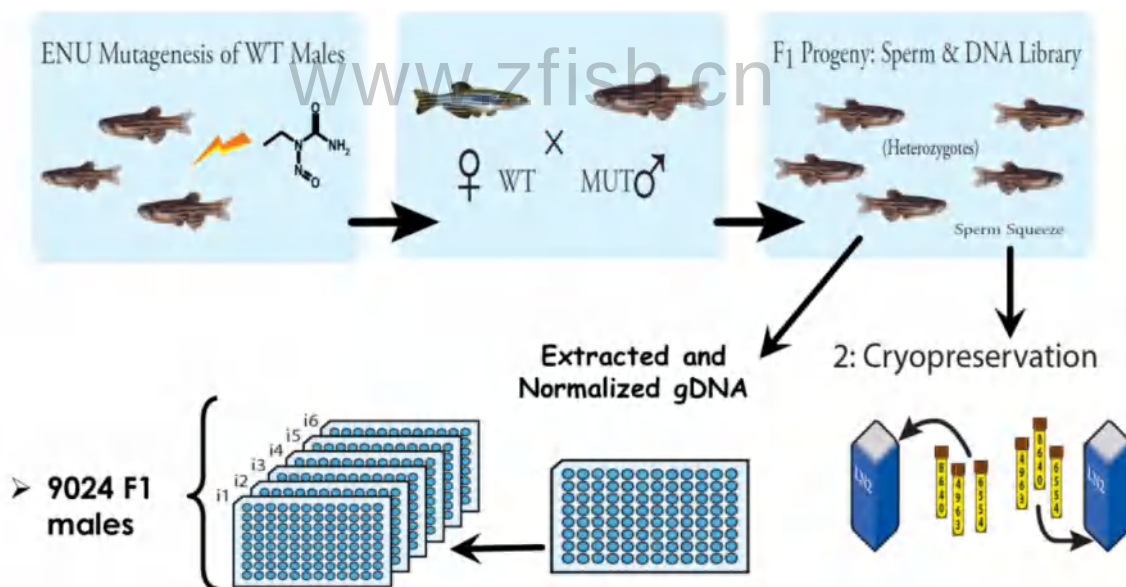


图 4.1.2 ENU 诱变建立斑马鱼突变体库示意图





1.2 基于 TILLING 技术的突变体筛选

ENU 诱变产生的非致死的显性突变个体在 F1 代就可以获得，然后进行表型分析和突变基因的染色体定位。其他的多数发育异常的表型筛选则需要经过至少 3 代的交配来获得纯合的隐性突变。还有大量的突变品系在 F1 代时以活体或冻存形式的突变体库进行保存[10]。随后的突变体筛选基于 TILLING 技术（Targeting Induced Local Lesions IN Genomes，定向诱导基因组局部突变技术），借助高通量的检测手段，快速有效地从突变体库中鉴定出点突变。

TILLING 技术是由美国 Fred Hutchinson 癌症研究中心 Steven Henikoff 领导的研究小组开发的一种反向遗传学技术，主要路线是将经 ENU 诱变产生的点突变，使用 PCR 放大，再将 PCR 片段变性退火，产生异源双链核酸分子，经 *CEL1* 核酸酶处理后，进行双色电泳分析或 HRM（High Resolution Melt，高分辨率熔解）曲线分析[11]。

TILLING 技术的步骤是：

- i. 从 ENU 诱变后产生的突变体库（活体或冻存形式）取少量样本并抽提 DNA，将 DNA 样本存放于 96 孔板；
- ii. 将 6-8 个 96 孔板的 DNA 样本合并到一个 96 孔板内得到 DNA 池；
- iii. 根据目标基因序列设计一对特异性引物进行 PCR 扩增，引物需做好荧光标记；
- iv. PCR 扩增片段变性、退火，从而得到野生型和突变型所形成的异源双链核酸分子；
- v. 用特异性识别并切割错配碱基的核酸内切酶（*CEL1*）剪切异源双链核酸分子，酶切产物用变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，经电泳图像分析获得突变池；
- vi. 利用相同方法从突变池中筛选突变个体；
- vii. 突变个体 PCR 片段测序验证，突变表型鉴定。检测方法如果使用 HRM 曲线分析，则在 PCR 结束后直接运行高分辨率熔解，即可完成对样品基因型的分析。HRM 曲线分析是一种很实用的 SNP 及突变研究工具，不受突变碱基位点与类型的局限，具有操作简便、快速，使用成本低，结果准确的优点，并且实现了真正的闭管操作。



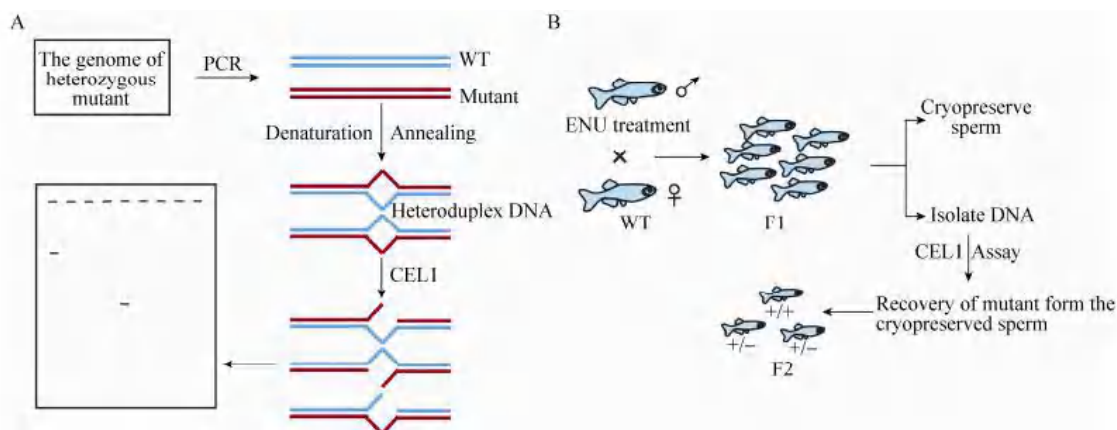


图 4.1.3 TILLING 技术流程 (Gao et al., 2017)

2. 随机插入突变技术

虽然 ENU 诱变在基因组中产生突变的效率相对较高，但点突变的基因定位很困难，即使到了后基因组时代的今天，要在斑马鱼基因组中定位并克隆一个化学诱变的基因平均也需要将近一年的时间。为了提高突变基因克隆的速度，科研人员采取插入突变的方法，即将外源 DNA 整合入受体基因组，造成插入位点所在基因的失活，实现基因突变的目的。这种技术的优势在于插入片段可以作为标记对插入位点上下游 DNA 片段进行克隆，极大地简化了突变基因的定位和克隆工作。该技术需要突破的技术壁垒是提高基因组整合效率和减少插入位点的偏好性。在斑马鱼中应用较广的是反转录病毒介导的插入突变和转座子介导的基因捕获技术，并筛选到一大批斑马鱼胚胎发育的突变体，揭示了一批相关基因的功能。

2.1 反转录病毒介导的插入突变技术

美国麻省理工学院的 Hopkins 实验室建立了一个应用反转录病毒在斑马鱼基因组中大规模插入诱变，基于表型筛选突变体，并进行突变基因定位的工作系统，成功获得一批斑马鱼早期发育突变品系[12]。反转录病毒是一种单链 RNA 病毒，来源于啮齿类或禽类，经过改造成为反转录病毒载体，可以将非病毒基因导入生物体内或培养细胞中。该技术的基本原理是将改造过的包含有外源 DNA 的反转录病毒感染靶细胞，病毒 RNA 基因组在反转录酶作用下转变为双链 DNA，在整合酶的帮助下整合到受体基因组中，病毒基因组随受体基因组一同复制，并稳定地传递给子代细胞。外源 DNA 片段的随机插入，破坏了基因的正常表达，并可以作为标记，利用 PCR 方法来鉴定导致表型产生的突变基因。在大多数脊椎动物基因组中外显子一般占 1%–2%左右，插入基因组的片段



要求对基因以及基因表达的产物没有任何影响,或者影响很少。无论选择何种载体,DNA随机插入基因组破坏外显子的几率都不高,故在突变体筛选时先从F1代中通过定量PCR预筛选出插入拷贝数比较多的鱼,来提高下一代突变的频率,将F1代杂交得到F2代,在F2代中进行6组杂交,将可以得到大部分的插入突变的纯合体,获得具有可见突变表型的个体后,就可以鉴定插入位点临近的基因[13]。得益于飞速发展的测序技术,我们也可以将F1代突变体库的插入位点附近的基因组进行高通量测序,得到一组插入位点旁侧序列,再到斑马鱼基因组数据中进行比对定位。大量的研究结果发现反转录病毒插入技术的基因组整合位点不完全是随机的,而是偏好于发生在基因的5'端,即启动子、第一个外显子以及第一个内含子区域。

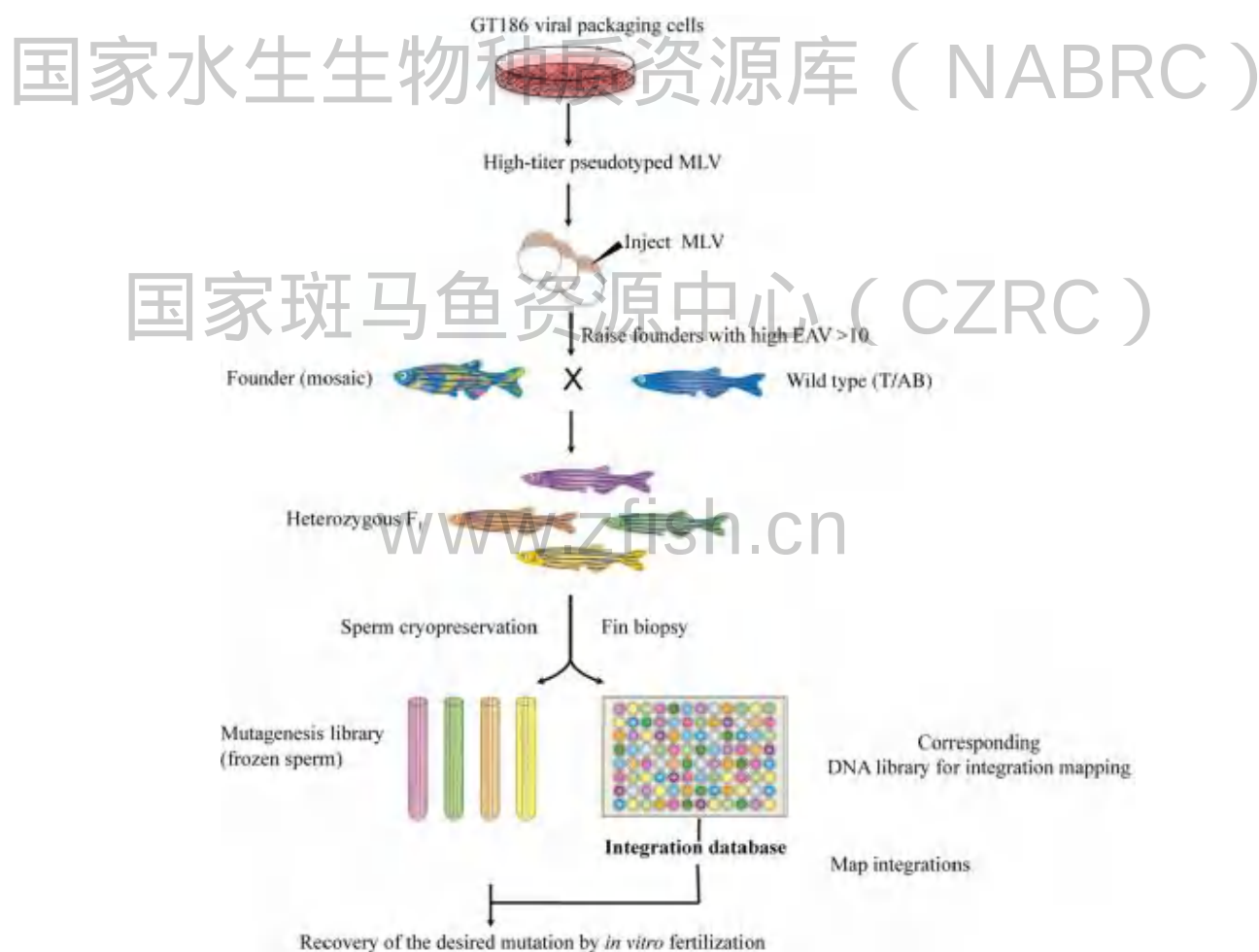


图 4.1.4 反转录病毒插入突变筛选流程 (Amsterdam and Hopkins 2004)



2.2 转座子介导的基因捕获技术

1997 年 Hackett 小组利用鲑鱼基因组中沉默的睡美人 (Sleeping Beauty, SB) 转座酶, 采用 DNA 突变和重组技术构建出 SB 转座系统, 这个转座系统在多种脊椎动物中具有活性。Kawakami 等人随后发现了具有自主活性的 Tol2 转座子。这些具有活性的转座子被广泛用于斑马鱼插入突变研究中。利用 Tol2 转座子或 SB 转座子介导的基因组插入突变方法被称为基因捕获技术, 将基因捕获载体随机整合入基因组中, 通过筛选可以得到带有单基因剔除的品系[14, 15]。该技术的基本过程是将一个含有报告基因的 DNA 载体随机插入基因组, 产生内源基因的失活突变, 通过报告基因的表达激活可以标记插入突变的存在和揭示突变内源基因的表达模式, 进而通过反向 PCR、Linker 介导的 PCR、5'-RACE 或 3'-RACE 等方法进一步克隆突变的内源基因, 进行基因功能分析[16]。基因捕获技术是建立高通量、大规模基因突变模型库的便利手段之一, 利用该技术已在斑马鱼中鉴定出一些在胚胎发育过程中很重要的功能基因, 同时该技术弥补了斑马鱼中由于缺少胚胎干细胞而无法进行基因敲除的缺陷。该技术的缺点在于许多经过基因捕获获得的带有基因无义突变的个体没有明显的表型或者在胚胎期死亡, 很难得到与人类疾病相似的模型生物。相比于完全的基因剔除, 基因突变的品系更有利于对基因功能的刻画。

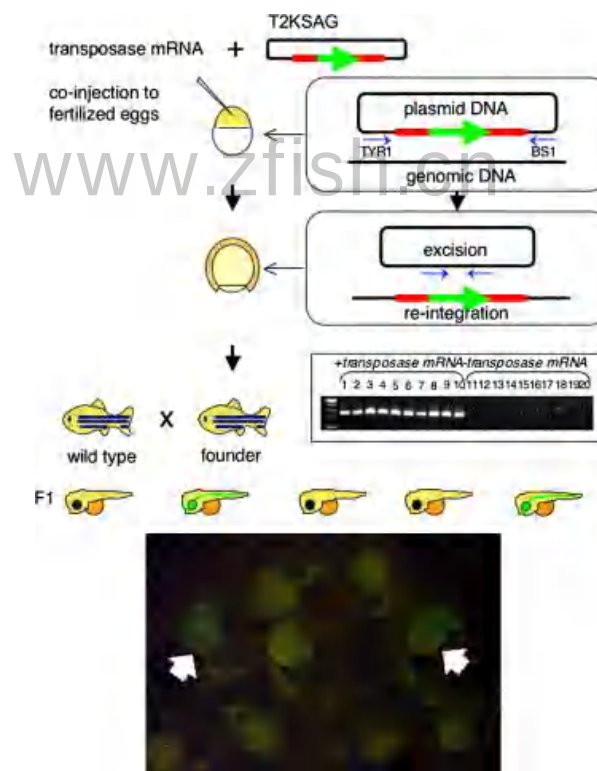
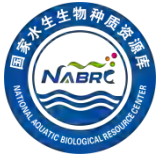


图 4.1.5 基因捕获技术流程 (Kotani, Nagayoshi et al. 2006)





基因捕获载体根据报告基因在载体中的位置及其激活表达的方式可以分为增强子捕获（enhancer-trapping）载体、启动子捕获（promoter-trapping）载体和基因捕获（gene-trapping）载体。增强子捕获载体包含有一个最小的启动子和报告基因，当载体整合到基因组中的某个增强子元件附近，该增强子将会调控报告基因的表达。启动子捕获载体由无启动子序列的报告基因和一个筛选标记基因构成，只有当载体插入到内源基因的编码区序列中，报告基因才能以融合转录本的形式进行表达，该方法的捕获效率很低，但启动子捕获的致突变比率比较高。基因捕获载体同样不包含启动子序列，在其报告基因的上下游分别加有一个剪接受体（Splice acceptor, SA）和多聚腺苷酸加尾序列（poly(A)），当内源基因的启动子和增强子元件被捕获基因转录激活时，载体中 SA 会与该内源基因的剪接供体（splice donor, SD）作用产生报告基因融合转录本，基因捕获的载体整合事件发生在内含子中，效率相对启动子捕获要高很多。研究人员在基因捕获载体中引入 IRES（internal ribosome entry site），这样报告基因与捕获基因不发生融合也可以进行表达。新型基因捕获载体如 Poly(A)捕获载体，主要用来捕获基因的 poly(A) 信号，使用组成型启动子驱动报告基因的表达，由于本身缺少 poly(A) 信号，而是携带一个 SD 信号，通过 SD 信号和内源基因的 SA 信号发生剪接，并借助内源基因的 poly(A) 信号稳定报告基因的 mRNA，使报告基因稳定表达。因此 Poly(A)捕获载体不受基因表达活性的限制，可以捕获不表达或者表达量低的基因。

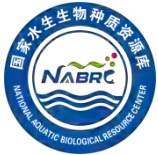
3. 基因组编辑技术

基因组编辑技术应用范围广，目前已发展三代，依次是锌指核酸酶（ZFNs, zinc-finger nucleases），TALENs（transcription activator-like effector nucleases），CRISPR（clustered regularly interspaced short palindromic repeats）/Cas9（CRISPR-associated protein 9）系统。特别是 2012 年诞生的 CRISPR/Cas9 技术，因其效率高、可操作性强，研究人员能够在各种各样的细胞类型和生物体中操作几乎任一基因位点，已成为多数物种中构建基因突变体的主导技术。

3.1 第一代 ZFN 基因组编辑技术

1998 年，出现了第一代人工核酸内切酶技术——锌指核酸内切酶（ZFN）技术。锌指核酸酶（Zinc finger nuclease, ZFN）是一种人工改造合成的核酸内切酶，由一个负责 DNA 识别的锌指蛋白结构域（ZF）和一个非特异性核酸内切酶结构域（FokI）组成，其中锌指蛋白结构域能够识别并结合特异的 DNA 序列，非特异性核酸内切酶具有 DNA 剪





切的功能。通过两个功能结构域的组合就可以在 DNA 序列的特定靶位点产生双链断裂 (Double strand break, DSB)。断裂的双链通过非同源末端连接 (Nonhomologous end-joining, NHEJ) 和同源重组 (Homologous recombination, HR) 机制进行修复, 其中 NHEJ 修复机制通过随机的删减或添加碱基可以引起移码突变。2008 年, 首次成功地使用 ZFN 技术对斑马鱼基因组进行精确的位点特异性编辑[17, 18]。

ZFN 的 DNA 识别结构域是由一系列 Cys2-His2 锌指蛋白 (zinc-fingers) 串联组成 (一般 3~4 个), 每个锌指蛋白识别并结合一个特异的三联体碱基。两个 ZFN 上的核酸内切酶结构域形成二聚体产生核酸酶酶切功能, 达到 DNA 定向剪切的效果。两条 ZFN 之间具有被称为“间隔区”的结构, 该结构的长度以 5-7 bp 为宜。合理的“间隔区”设计才能保证 ZFN 二聚体拥有最佳的工作空间。ZFN 识别靶 DNA 位点时存在上下文依赖效应, 识别靶 DNA 的重复氨基酸之间会相互作用, 导致识别的特异性发生改变, 即识别靶 DNA 的特异性不高, 影响基因打靶的效果。

3.2 第二代 TALEN 基因组编辑技术

TALEN 基因敲除技术以较为精准的打靶定位、构建简单易行和脱靶效应低等优势取代 ZFN 技术, 被广泛应用于包括斑马鱼在内的多个物种的基因编辑工作。TALEN 的组成结构和 ZFN 类似, 包括非特异性核酸内切酶结构域 FokI 和 DNA 识别结构域 TALEs 蛋白, TALEs 蛋白来源于植物的致病菌黄单胞菌 (*Xanthomonas*), TALEs 蛋白能识别特异性 DNA 碱基对。通过设计一串合适的 TALEs 蛋白就可以识别和结合到任意特定序列上, 借助于附加其上的 FokI 核酸酶, 就可以在特定位点对 DNA 进行切割, 结合机体修复系统在双链断裂处或附近引入突变。2011 年, 首次成功地使用 TALEN 技术对斑马鱼基因组进行精确的基因编辑[19, 20]。



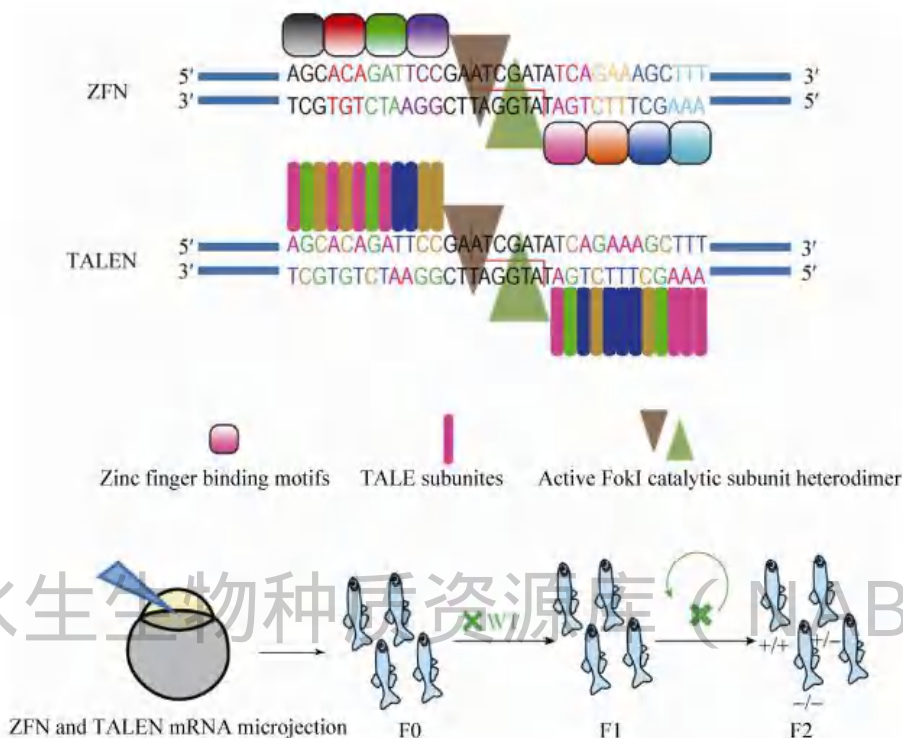


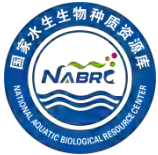
图 4.1.6 ZFN 和 TALEN 的工作示意图 (Gao et al., 2017)

TALEN 技术克服了常规的 ZFN 技术不能识别任意目标基因序列，以及识别序列经常受上下游序列影响等问题，使用更为灵活便捷。TALEN 技术相对而言毒性较低，脱靶情况大为减少，成功率可达 90% 以上，而且整个实验周期短，成本低，已被成功应用于植物、酵母、斑马鱼、小鼠、大鼠及人类细胞等的基因编辑工作中。

3.3 第三代 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术

CRISPR/Cas 系统是第三代靶向人工核酸酶，于 2012 年诞生，是迄今被应用的最广泛的基因组编辑技术。细菌为了对抗入侵的病毒，进化出很多成簇的、规律间隔的短回文重复序列(CRISPR 序列)和 CRISPR 相关基因。该系统最初被发现，是作为原核生物的获得性免疫系统，能使宿主获得抵抗噬菌体等入侵的免疫能力[21, 22]。CRISPR 序列在 1987 年就在大肠杆菌中被发现[23]，直到 2002 年，人们才正式将其命名为 clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) [24]。随后 Marraffini 等报道了细菌能够利用 CRISPR/Cas 系统阻止外源性质粒的侵入，从此揭开了研究 CRISPR 系统功能的序幕[25]。该系统凭借自身独特的优势在斑马鱼、大鼠、小鼠等许多物种实现基因组的靶向编辑，很大程度上推动了生命科学和医学研究的进程[26-28]。2013 年，中国科学院水生生物研究所、清华大学、中国科学院动物研究所及北京大学等 24 家科研单





位的学者组成“斑马鱼1号染色体全基因敲除联盟”，针对斑马鱼1号染色体上的1333个基因进行系统性基因敲除。目前已成功敲除了1029个基因，获得了针对636个基因的1039个可传代的突变型，在获得的1039个突变体中，约四分之一与人类疾病相关[29]。

a) CRISPR/Cas9 系统的分子机制

在CRISPR/Cas9系统中，CRISPR基因座转录crRNA（CRISPR RNA）与转录激活crRNA（Trans-activating crRNA, tracrRNA）退火形成复合物特异识别基因组序列，然后引导Cas9核酸内切酶在目的片段进行剪切生成DNA双链断裂（double-strand breaks, DBS），诱导细胞进行DNA损伤修复，利用细胞的非同源末端修复（non-homologous end-join, NHEJ）机制在靶点序列产生核酸序列的随机插入或缺失（Indel），从而达到失活靶基因的目的。Cas9基因包含2个核酸酶结构域，分别是氨基端的RuvC-like结构域及位于蛋白中间位置的HNH核酸酶结构域，HNH核酸酶结构域可以切割与crRNA互补配对的模板链，RuvC-like结构域可以对另一条链进行切割。为了简化操作过程，通过人工设计、改造crRNA与tracrRNA，形成具有导向作用的sgRNA (Single guide RNA)，来引导Cas9对DNA的定点切割，剪切位点位于sgRNA互补序列下游PAM区(Protospacer adjacent motif, PAM)附近[30]。对于酿脓链球菌 (*S. pyogenes*) 来源的Cas9蛋白，PAM的格式要求为“NGGNN”模式 (N为任意碱基)。sgRNA设计简单，长度为20个碱基，并且在3'端下游紧邻NGG序列。2018年David Liu的实验室利用噬菌体辅助持续进化器PACE对spCas9s做了大量微调改造工作，选择使用范围更广的原型间隔序列邻近基序(PAM)区，他们将这种酶命名为xCas9s。xCas9s酶的最佳识别序列是NGN（识别序列包括NGN, GAA和GAT），该组合在基因组中的含量约为四分之一，相较于原来的spCas9，适用范围扩大4倍，特异性提升百倍。xCas9s在转录激活，DNA切割和单碱基编辑方面的表现也十分突变，效率和适用范围都有大幅度的提升[31]。



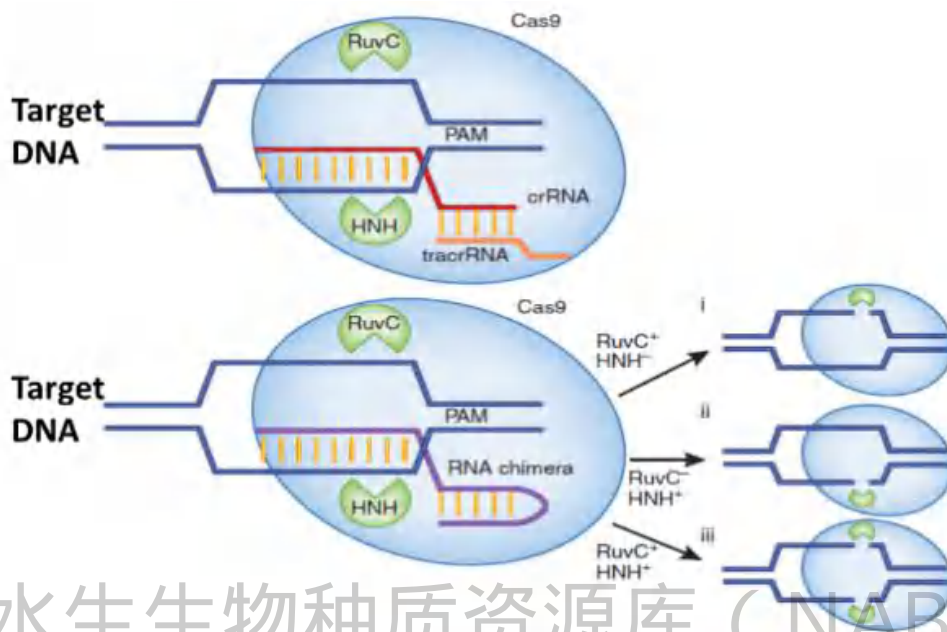


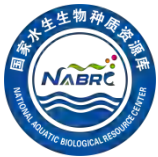
图 4.1.7 CRISPR/Cas9 技术原理 (Barrangou, 2012)

b) CRISPR/Cas9 介导的基因敲除的实验流程

使用 CRISPR/Cas9 技术进行基因敲除操作的基本过程是：确认敲除靶点后，根据靶点序列合成 gRNA，之后通过显微注射，将针对特定基因靶点的 gRNA 和 Cas9 工具酶 mRNA 注入 1-2 细胞期的斑马鱼胚胎，导致斑马鱼基因组中相应靶点发生碱基的缺失或插入，从而制备能够将突变位点稳定遗传给后代的基因敲除斑马鱼。具体过程如下，

- i. 靶点设计与序列确认。在基因上选择合适的位点设计靶点，在可能的情况下，推荐尽量在基因的中后段设计靶点。在靶点上下游设计引物进行 PCR 扩增，测序确认靶点序列。
- ii. gRNA 及 Cas9 mRNA 制备。体外转录合成靶点 gRNA 和 Cas9 工具酶 mRNA。
- iii. 显微注射。向约 1-4 细胞期胚胎中共注射针对特定基因靶点的 gRNA 和 Cas9 工具酶 mRNA。
- iv. P0 代突变效率检测。取少量注射后胚胎，提取基因组 DNA 并进行 PCR 扩增，测序检测是否有突变及预估突变效率。如突变阳性率较高，则将同批次胚胎培养为 P0 代个体。
- v. P0 代个体筛选鉴定。将 P0 代群体培养至性成熟，与野生型斑马鱼侧交，收集胚胎作遗传检测。一般的检测方法有酶切检测、PCR 产物测序或克隆测序，将视具体情况而定。将阳性 P0 个体的后代培养为 F1 代。





- vi. F1 代个体的筛选鉴定。将 F1 代群体培养至性成熟，成鱼剪尾鳍，提取基因组 DNA 做基因型检测，检测方法同 P0 代个体的检测方法，将阳性个体作克隆测序检测，以确定其基因型（此阳性个体为杂合子）。

第二节 斑马鱼中常规基因突变的鉴定

斑马鱼的基因组与人类基因组拥有较高的相似性，同为脊椎动物，发育模式有较高的相似性，82%的人类疾病相关基因可以在斑马鱼基因组上找到同源基因，故可利用斑马鱼构建丰富的人类疾病模型。早期自然突变，大规模 ENU 诱变，以及近年来大热的基因组编辑技术的出现，斑马鱼的突变品系资源日渐丰富。以 CZRC 为例，目前 CZRC 保藏有 1000 多种突变品系，大部分突变品系的突变位点是已知的，因而是可以采用简单的 PCR 扩增和测序的方式进行鉴定。

一、基于基因型的鉴定方法

对于位点已知的品系，可以用 PCR 扩增后测序的方法来鉴定。

1. 确认突变位点

查阅原始发表文献或其他资料，确认突变位点信息，在突变位点周围设计一对引物，使其距离靶点两侧都大于 100 bp，并且 PCR 扩增产物全长最好不要超过 1000 bp，且为单一条带。

2. PCR 鉴定及测序

具体步骤如下：

取若干尾成鱼剪尾鳍，提取基因组 DNA（Foregene，zebra Fish Direct PCR Kit）。PCR 扩增位点及附近的序列，测序检测基因型。

- 剪取少量尾鳍或收集 15-30 枚胚胎提取基因组 DNA，用作模板（Foregene，zebra Fish Direct PCR Kit）。
- 加入 100 μ L Buffer FP 和 4 μ L 蛋白酶 K，混匀后 65 $^{\circ}$ C 反应 30 min。
- 95 $^{\circ}$ C 反应 5 min 终止反应。
- 12000 rpm 离心 2 min，吸取上清用作基因组 DNA 模板，样品可以在 -20 $^{\circ}$ C 保存 1 个月左右。



e) PCR 扩增位点周围的序列，测序检测。

3. 测序结果分析

根据测序结果判断该成鱼是杂合子、纯合子还是野生型。可以进一步做克隆测序检测，以确定其基因型。常见的突变类型有 single-base substitution (单碱基替换)、deletion (碱基缺失)、insertion (碱基插入)、indel (同时包含碱基缺失和插入) 等。

不同的突变类型所得到的峰图会有所差异，现举例说明如下。

3.1 单碱基替换

单碱基替换的杂合子一般仅在碱基替换位点出现一个双峰，其他的序列峰图不受影响，如 *wnt11^{tz216/+}* (GGA→TGA, CZ28)。单碱基替换的纯合子表现为单一的峰图，可以直接通过峰图或序列比列来获取突变信息 (图 5.1.3)。

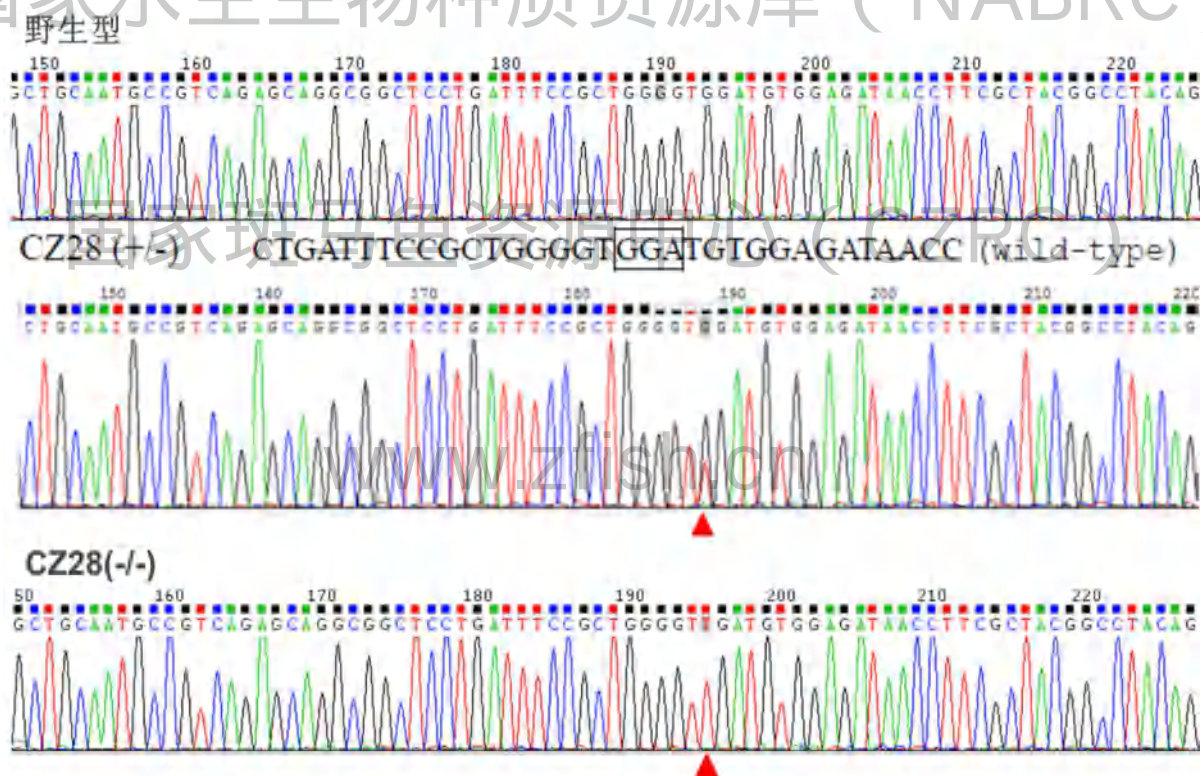


图 4.2.1 单碱基替换突变类型的测序峰图示例

3.2 碱基缺失或插入

碱基缺失、碱基插入和 indel 这 3 种突变类型的杂合子都是在突变位点开始出现双峰，野生序列和突变序列均以近似的概率被读取，序列在突变位点开始出现差异，两条 DNA 链的序列均呈现在测序结果中形成双峰，如 indel 突变类型 *lhx1a^{ihb25/+}* (CGAG→GTT, CZ24)、碱基缺失突变类型 *socs1a^{ihb33/+}* (C66 碱基缺失, CZ94) 和碱基插入突变类型



nlrc5^{ihb51/+} (AGTA 碱基插入, CZ140) (图 5.1.4)。

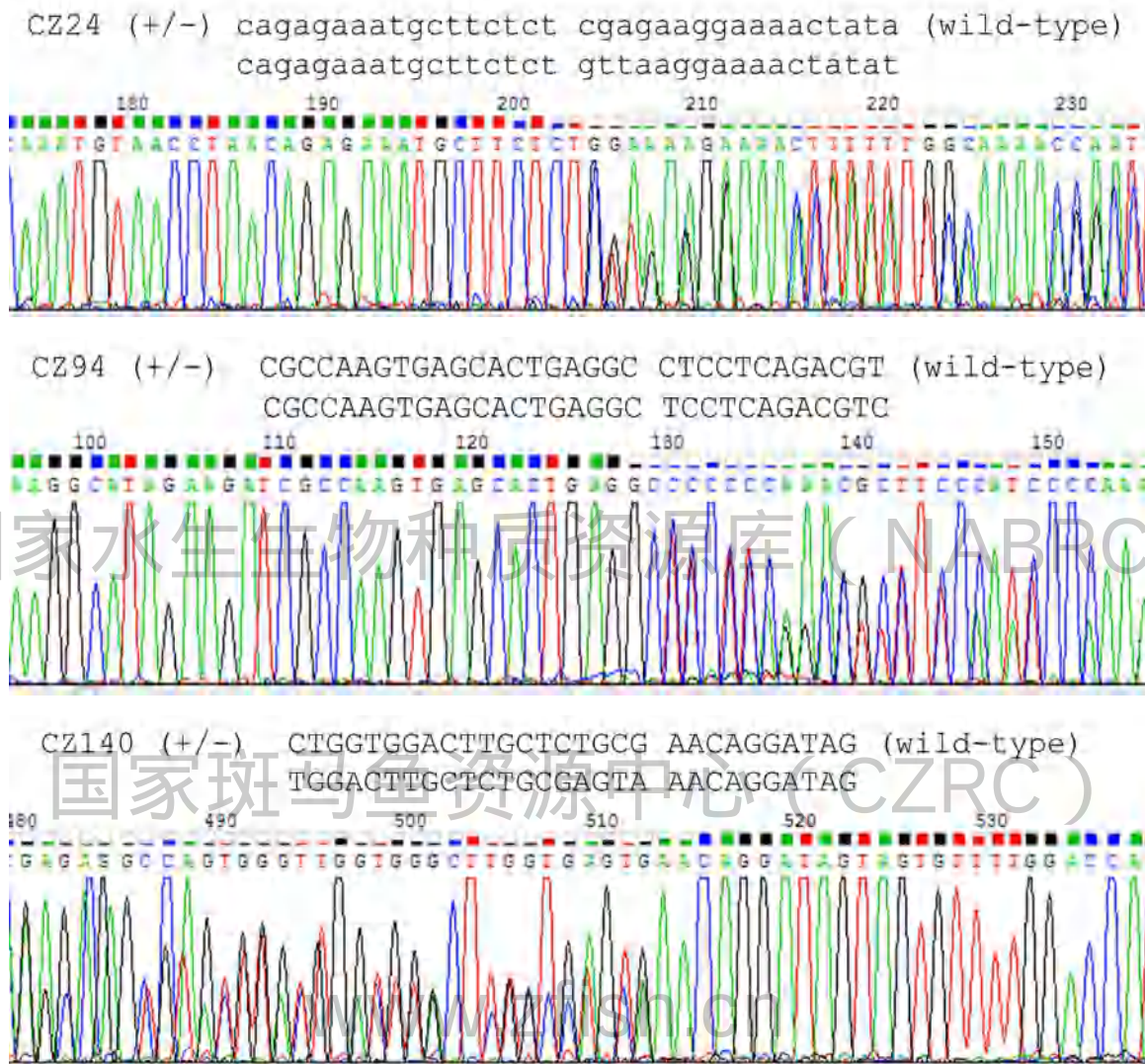
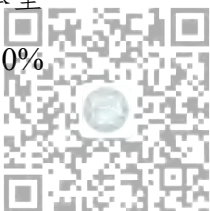


图 4.2.2 indel/deletion/insertion 突变类型的测序峰图示例

二、 基于表型的鉴定方法

对于突变位点仍未确定的品系，如一些自然突变品系或 ENU 诱变品系，所幸这些品系一般是有特定表型的，可以根据表型特征进行鉴定。以 *casper* (*mitfa*^{w2/w2}; *roya9/a9* , CZ73) 为例，这是一个双基因突变的品系，分别在 *mitfa* 基因和 *mpv17* 基因携带有突变。*Mitfa* 基因携带有一个点突变 Q113X，导致斑马鱼中黑色素细胞的缺失[32]；而 *mpv17* 基因对银色素细胞的形成是至关重要的，它的突变导致斑马鱼银色素缺失，因突变位点位于 2 号内含子上，分子鉴定方法较为麻烦，因此我们在鉴定 *mpv17* 基因突变品系时依旧根据表型来筛选[33]。双基因突变的个体同时缺失黑色素细胞和银色素细胞，通体呈透明色(图 5.1.5)[34]。能使用表型鉴定方法的突变品系占比并不高，斑马鱼中大约 5-10%



的基因突变会导致早期发育异常[35]。



图 4.2.3 基于表型的鉴定方法示例。*mitfa* 基因突变纯合子 *nacre*^{-/-} 和 *roy* 基因突变纯合子 *mpv17*^{-/-} 分别表现为黑色素细胞和银色素细胞的缺失，而双基因突变纯合子 *casper* 由于两种色素细胞的缺失，通体呈透明，内部器官清晰可见（(Richard Mark White 2008)）。

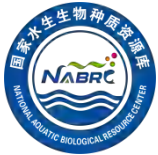
三、基于基因表达的鉴定方法

以上是基于基因和表型层面对一个突变品系进行鉴定，我们还可以根据基因表达水平进一步鉴定，常用的方法有原位杂交方法（具体的实验方法见第三节）和 western blot 等。以 *kdrl*^{*ihb123*+/+}（AGTG 碱基缺失，CZ265）为例，该品系是使用 CRISPR-Cas9 技术在斑马鱼 *kdrl* 基因引入突变得到的，突变后的 *kdrl* 基因编码提前终止。我们使用整体原位杂交技术也可以检测到 *kdrl* 基因 mRNA 水平上的表达下降，进一步佐证了该基因的功能缺失（图 5.1.6）。



图 4.2.4 基于基因表达的鉴定方法示例。整体原位杂交结果显示，在 *kdrl*^{*ihb123*+/+} 突变品系（b 和 c）中，*kdrl* 的表达水平呈现显著的下调。





第三节 斑马鱼整胚原位杂交技术

一、 原位杂交技术的历史

Joseph G. Gall 被誉为现代细胞生物学的奠基人之一，他在染色体结构和功能领域作出了杰出贡献，并发明了原位杂交技术 (*in situ* hybridization, ISH)。自 Gall 同他的研究生 Mary Lou Paudue 和 Susan Gerbi 在 1969 年利用放射性标记 DNA 在爪蟾组织切片中检测基因表达后，原位杂交技术逐渐发展为一种能使研究人员在一个染色体上定位并确定出基因和特殊的 DNA 序列的强大方法，推动了分子生物学的巨大进步。

Kathleen H. Cox 于 1984 年发明了用单链 RNA 探针进行原位杂交的技术。ISH 技术在斑马鱼中的应用始于 Westerfield 等利用该技术在斑马鱼切片中检测基因的表达。同年，Nusslein-Volhard 等将 Cox 建立的 RNA 原位杂交技术进行了改进，用地高辛 (digoxin) 标记的 RNA 在斑马鱼胚胎中检测基因表达。2008 年，Bernard Thisse 等将该技术进一步优化，使之更加灵敏，同时也提高了基因表达检测的分辨率，我们在这里介绍的整体原位杂交技术主要参照 Thisse 实验室 2008 年版[35]。

二、 原位杂交技术的原理

原位杂交能在成分复杂的组织中进行单一细胞的研究而不受其他成分的影响，因此对于那些细胞数量少且散布于其他组织中的细胞内 DNA 或 RNA 的研究更为方便；同时由于原位杂交不需要从组织中提取核酸，对于组织中含量极低的靶序列有极高的敏感性，并可完整地保持组织与细胞的形态，更能准确地反映出组织细胞的相互关系及功能状态。

整体原位杂交 (whole-mount *in situ* hybridization) 不同于一般的在载玻片上对细胞和组织切片进行探针杂交及检测的原位杂交，而是对完整的斑马鱼胚胎进行探针杂交及检测，从整体上把握探针的结合部位。整体原位杂交指在胚胎组织或细胞结构保持不变的条件下，用标记的已知的 RNA 核苷酸片段，按核酸杂交中碱基配对原则，与待测组织中相应的基因转录片段相结合 (杂交)，所形成的杂交体 (Hybrids) 经显色反应后在光学显微镜或电子显微镜下观察，标示其细胞内相应的 mRNA、rRNA 和 tRNA 分子的位置和含量的方法。该技术不仅可以用于检测基因的时空表达，为研究该基因功能以及基因分类提供线索，还可以应用于高通量药物筛选或突变体筛选，以特异表达的基因标记作为筛选的重要依据。(图 5.3.1)



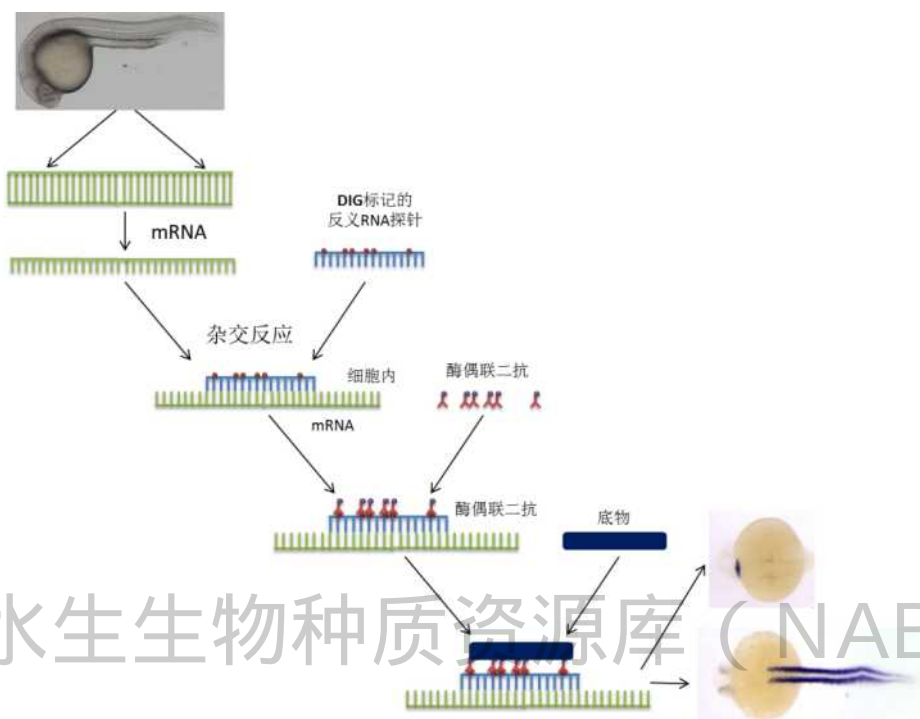


图 4.3 斑马鱼整体原位杂交技术原理。地高辛标记的反义 RNA 探针与细胞内的 mRNA 特异性结合，利用免疫组织化学的方法，碱性磷酸酶结合的抗地高辛抗体与杂交的核酸探针特异性结合，然后用碱性磷酸酶的发光底物进行显色。图中原位杂交结果为 24 hpf *myl7* 和 *tpma* 基因的表达情况。

三、原位杂交技术的要点

由于核酸探针的种类和标记物的不同，在具体应用的技术方法上也各有差异，但基本方法和应用原则大致相同。主要包括以下几步：

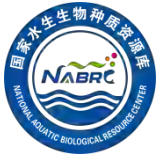
- 1) 杂交前准备（取材和固定）
- 2) 组织的处理（增强核酸探针的穿透性/减低背景染色）
- 3) 杂交反应
- 4) 杂交后处理
- 5) 显示（放射性自显影或非放射性标记的显色）

1. 固定

原位杂交技术(*In Situ Hybridization*, ISH)在固定剂的应用和选择上应兼顾到三个方面：保持细胞结构，最大限度地保持细胞内 DNA 或 RNA 的水平，使探针易于进入细胞或组织。

DNA 是比较稳定的，mRNA 是相对稳定的但易为酶合成和降解。故对于 DNA 的定





位来说,固定剂的种类和浓度并不十分重要。而在 RNA 的定位上,要使 RNA 的降解减少到最低限度,不仅固定剂的种类浓度和固定的时间十分重要,而且取材后应尽快予以冷冻或固定。最常用的固定剂是多聚甲醛,多聚甲醛不会与蛋白质产生广泛的交叉连接,因而不会影响探针穿透进入细胞或组织。我们常采用的方法是将组织固定于 4%多聚甲醛磷酸缓冲液中,置于 4°C 冰箱过夜。

各种固定剂均有各自的优缺点,如沉淀性(Precipitating)固定剂:酒精/醋酸混合液、Bouin's 液以及 Carnoy's 液等能为增加核酸探针的穿透性提供最佳条件,但它们不能最大限度地保存 RNA,而且对组织结构有损伤。戊二醛能较好地保存 RNA 和组织形态结构,但由于和蛋白质产生广泛的交叉连接,从而大大地影响了核酸探针的穿透性。至今,多聚甲醛仍被公认为 ISH 较为理想的固定剂。

2. 组织的处理

2.1 增强组织的通透性和核酸探针的穿透性

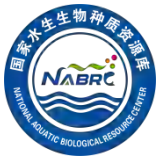
此步骤根据所选固定剂的种类、组织的种类和核酸探针的长度而定。比如用戊二醛固定的组织由于其与蛋白质产生广泛的交叉连接就需要应用较强的增强组织通透性的试剂。增强组织通透性常用的方法有稀释的酸洗涤、去垢剂(detergent),清洗剂 Triton X-100、酒精或某些消化酶如胃蛋白酶、胰蛋白酶、胶原蛋白酶和淀粉酶(diastase)等。这种广泛的去蛋白作用可以增强组织的通透性和核酸探针的穿透性,提高杂交信号,但也会影响组织结构的形态,因此应掌握好用量和孵育时间。

使用较为广泛的是蛋白酶 K(Proteinase K),一般工作浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$,孵育时间视胚胎组织发育阶段而定,跨度从 1 到 30 min,以达到充分的蛋白消化作用而不致影响组织的形态为准。蛋白酶 K 还具有消化包围着靶 DNA 的蛋白质的作用,从而提高杂交信号。在蛋白酶 K 消化后,用 0.1 mol/L 的甘氨酸溶液(在 PBS 中)清洗以终止蛋白酶 K 的消化作用。为保持组织结构,通常用 4%多聚甲醛再固定。

2.2 减低背景染色

ISH 中背景染色的形成是诸多因素构成的。预杂交和杂交后的洗涤均有助于减低背景染色。将固定的组织浸入预杂交液中可达到封闭非特异性杂交点的目的,从而减低背景染色。有的实验室在杂交后洗涤中采用低浓度的 RNA 酶溶液(20 $\mu\text{g/mL}$)洗涤一次,以减低残留的和内源性 RNA,减低背景染色。





2.3 防止 RNA 酶的污染

由于在手指皮肤及实验用玻璃器皿上均可能含有 RNA 酶，为防止其影响实验结果，在整个杂交前处理过程都需戴消毒手套。所有实验用玻璃器皿及镊子都应于实验前一日进行高温烘烤或使用 DEPC 过夜处理以达到消除 RNA 酶的目的。要破坏 RNA 酶，其最低温度必须在 150°C 左右。可以在消毒的玻璃器皿外包以锡箔纸以利于标记和防止取出时空气污染。杂交前及杂交时所应用的溶液均需经高压消毒处理。

3. 杂交反应

杂交前的一切准备工作如增加组织通透性都是为了在杂交这一步骤中核酸探针能进入细胞或组织与其内的靶核苷酸相结合，杂交是 ISH 中关键且最重要的一个环节。要获得满意的实验结果，在杂交这一实验过程中还须注意以下的环节。

3.1 探针的浓度

很难事先确定每一种实验探针的浓度，但要掌握一个原则，即探针浓度必须给予该实验最大的信/噪比值。此外，背景染色的高低也与探针浓度有关。

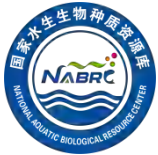
原位杂交的探针可以是同位素的探针，用放射自显影来检测；也可以是非同位素的探针，通过荧光或化学显色法予以检测。探针浓度依其种类和实验需要略有不同，放射性标记的 dsDNA 或 cRNA 探针浓度在 1~5 ng/μL，而非放射性标记（生物素或地高辛）cRNA 探针，其最佳浓度在 0.5~5 ng/μL。同时杂交液的要适当，过量的杂交液含有过多的核酸探针，反易导致高背景染色等不良后果。

我们实验中使用的是以地高辛(DIG)标记的反义 RNA 探针，通过 DNA 转录而来的。常采用的方法是以总 RNA 反转录产物 cDNA 为模板，克隆得到相应的 DNA 片段，并将该片段连接到 pGEM-T 或 pGEM-T easy 载体中，通过转化获得反向重组质粒。并以此为模板，在体外用相应的 T7 或 T3 RNA 聚合酶进行转录（应避免使用 SP6 RNA 聚合酶，该酶整合 DIG 标记的 UTP 效率较低）。相对于直接用 PCR 产物为模板转录得到反义 RNA 探针的方法，该方法所需时间比较长，但探针获得量较大，而且各阶段所得的产物相对比较稳定，可长时间储存。

3.2 探针的长度

用于原位杂交的探针可以是单链或双链 DNA，也可以是 RNA 探针。对于反义 RNA 探针，要想获得较理想的标记效果，长度最好大于 1 Kb。有时候短探针也可以获得较好的效果，但最短也不宜小于 200 bp。当两个基因的序列相似度较高，设计特异性





的探针相当有挑战性。一般而言探针长度为 200~1200 bp，过长会造成杂交效率减低。为减少非特异性结合，在设计探针时常常选择覆盖部分 3' 非翻译区 (3' untranslated region, UTR)。

3.3 杂交的温度和时间

杂交的温度也是杂交成功与否的一个重要环节，DNA 或 RNA 需加热或变性、解链后才能进行杂交。能使 50% 的核苷酸变性解链所需的温度，叫解链温度或融解温度 (melting temperature, 简称 T_m)。原位杂交中，多数 DNA 探针需要的 T_m 是 90°C，而 RNA 则需要 95°C。这种高温对保存组织形态完整和保持组织切片粘附在载玻片上是不可能的。 T_m 值与盐的浓度、探针的长度以及甲酰胺的百分比等诸多因素有关。因此，在杂交的程序中常规的加入 30%~50% 甲酰胺 (formamide) 于杂交液中。McConaughy 发现，反应液中每增加 1% 的甲酰胺浓度， T_m 值可降低 0.72°C。此外还可以通过调节盐浓度的办法来调节 T_m 。在实际操作中，采用的杂交温度在 $T_m-25^\circ\text{C}$ 左右（即比 T_m 减低 25°C，大约在 50~70°C 之间）。根据探针的种类不同，温度略有差异。

杂交的时间如过短会造成杂交不完全，而过长则会增加非特异性染色。理论上核苷酸杂交的有效反应时间在 3 h 左右，为稳妥起见，一般将杂交反应时间定为 16~20 h（杂交孵育过夜）。杂交反应的时间与核酸探针长度与组织通透性有关，在确定杂交反应时间应予以考虑，并经反复实验确定。

此外，甲酰胺还可防止在低温时非同源性片段的结合，但甲酰胺具有破坏氢键的作用，从而具有一种不稳定性。故有研究者主张杂交反应的孵育应在黑暗环境中进行，因为光线会促进甲酰胺的电离作用。

3.4 杂交严格度

杂交严格度 (Hybridization stringency) 表示通过杂交及冲洗条件的选择对完全配对及不完全配对杂交体的鉴别程度。不完全配对杂交体的稳定性较完全配对杂交体差，通过控制杂交温度、盐浓度等，可减弱非特异性杂交体的形成，提高杂交的特异性。杂交的条件愈高，特异性愈强，但敏感性降低，反应亦然。一般来说，低严格度杂交及冲洗条件在 $T_m-35^\circ\text{C}$ 至 $T_m-40^\circ\text{C}$ 之间，高盐或低甲酰胺浓度下，大约有 70~90% 的同源性核苷酸序列被结合，其结果是导致非特异性杂交信号的产生。中严格度， $T_m-20^\circ\text{C}$ 至 $T_m-30^\circ\text{C}$ 的范围。高严格度为 $T_m-10^\circ\text{C}$ 至 $T_m-15^\circ\text{C}$ ，低盐和高甲酰胺浓度下，只有具有高同源性的核苷酸序列才能形成稳定的结合。





原位杂交技术多数是在 $T_m-25^{\circ}\text{C}$ 温度下进行的，不属于高严格度范围，会产生非特异性结合导致信/噪比减低。在这种情况下，可用加强杂交后冲洗的严格度使非特异性的杂交体减少。由于 RNA 杂交的稳定性，应用 cRNA 探针进行细胞或组织的原位杂交时的杂交温度比其它核酸探针要高 $10\sim 15^{\circ}\text{C}$ 。实验证明，cRNA 产生的信号比双链 cDNA 要强，如单链 RNA 探针的杂交信号是双链 cDNA 探针的 8 倍左右。

4. 杂交后处理

杂交后处理包括一系列不同浓度、温度的盐溶液的漂洗。因为大多数的原位杂交实验是在严格度不高的条件下进行的，非特异性的结合会增强背景染色。RNA 探针杂交时产生的背景染色特别高，但通过杂交后的洗涤能有效地减低背景染色，获得较好的反差效果。洗涤的条件如盐溶液的浓度、温度、洗涤次数和时间因核酸探针的类型和标记的种类不同而略有差异，一般遵循的是盐溶液浓度由高到低的原则。在漂洗液中常加入 Tween-20，可提高特异性的识别能力。Tween-20 为聚氧乙烯去水山梨醇单月桂酸酯和一部分聚氧乙烯双去水山梨醇单月桂酸酯的混合物，是一种非离子型去污剂，具有有复性抗原的作用。如何控制漂洗的严格度从而达到理想的信/噪比无既定方案可循，必须从反复的实践中取得经验。

在做抗体反应前，需要先用惰性蛋白质或非离子去污剂封闭组织上的未结合位点可以降低抗体的非特异性结合。封闭剂应该封闭所有未结合位点而不替换靶标，也不与抗体或检测试剂有交叉反应。最常见的封闭剂是 BSA、脱脂奶粉、酪蛋白、明胶和 $0.05\sim 0.1\%$ 的 Tween-20 稀溶液。

5. 显色

根据核酸探针标记物的种类分别进行放射自显影或利用酶检测系统进行不同显色处理。放射自显影可利用人工或计算机辅助的图象分析检测仪 (computer-assisted image analysis) 检测银粒的数量和分布的差异。非放射性核酸探针杂交的细胞或组织可利用酶检测系统显色。

5.1 几种常见探针及其特点

探针是指带有标记的能与组织内相对应的核苷酸序列互补结合的一段单链 cDNA 或 cRNA 分子。根据在杂交中所使用的探针依其来源可分为三种：即特异性 cRNA、cDNA 探针和人工合成寡核苷酸探针。





a) **cRNA 探针**。cRNA 探针是以 cDNA 为模板，通过体外转录而获得的单链探针。cRNA 与 RNA 之间形成的杂交体不受 RNA 酶的影响，比 cDNA-RNA 杂交体稳定。杂交反应后可用 RNA 酶处理，以除去未结合的探针。cRNA 探针的杂交饱和水平又比双链 DNA 探针高出 8 倍左右，在原位杂交中应用广泛。但 cRNA 探针的制备过程比较复杂，需要较好的分子生物学实验设备，它对 RNA 酶敏感，易降解，操作中要谨防 RNA 酶污染。

b) **单链 cDNA 探针**。由于 cDNA 中不存在内含子及其它高度重复序列，又克服了双链 cDNA 探针在杂交反应中两条链之间复性的缺点，从而提高了杂交反应的敏感性。但由于单链 cDNA 探针的制备比较困难，在 RNA 原位杂交中已很少应用。

c) **寡核苷酸探针**。人工合成的寡核苷酸探针是以核苷酸为原料，通过 DNA 合成仪合成，避免了真核细胞中存在的高度重复序列带来的不利影响。大多数寡核苷酸序列较短，不需要纯化，组织穿透性好；此外，根据目的基因的特异性序列设计的探针具有较强的特异性。合成的寡核苷酸探针的缺点是：探针长度必须适宜，探针太长可造成内部错误配对杂交，探针太短可形成非特异性结合。它与 mRNA 形成的杂交体不如 cRNA-RNA 杂交体稳定；再则探针较短，所携带的标记物少，敏感性较低。

探针设计的位置很重要，为了避免检测 mRNA 时基因组序列的干扰，设计探针时尽量选择在跨内含子的部位，即能检测到 mRNA，但检测不到基因组序列。

依标记物不同，探针又可分为同位素标记探针和非同位素标记探针两大类。前者主要包括 ³H、³⁵S、³²P 和 ¹²⁵I 等，不同的同位素探针其穿透力、定位和半衰期各不相同，无一种同位素探针同时具有穿透力强、定位好和半衰期长等所有优点。由于半衰期短，性能不稳定，污染环境和危害健康等原因，在 RNA 原位杂交中应用同位素标记探针已日趋减少，而非同位素标记探针在近年来得到迅速发展，如生物素、地高辛、酶和荧光标记等。其中地高辛标记的 cDNA、RNA 和寡核苷酸探针，不但具有生物素标记的优点，还克服了生物素标记探针在原位杂交过程中受组织内源性生物素干扰等缺点，应用越来越广泛。

5.2 酶检测系统显色原理

本实验中使用的地高辛标记的反义寡聚核苷酸探针，显色采取的是 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶检测系统。BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate, 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸)





是碱性磷酸酯酶的常用底物，常与 NBT (Nitrotetrazolium Blue chloride, 氯化硝基四氮唑蓝) 联合使用来增强检测灵敏度。在碱性磷酸酯酶 (AP) 的催化下, BCIP 首先被水解去除磷酸基团产生强反应性的中间产物, 然后进一步氧化和二聚合产生一种靛青染料 (indigo dye)。而二聚合反应中产生的两个还原当量 (-2H) 能够还原 NBT 形成不溶性的 NBT-formazan, 呈深紫色或者蓝紫色。BCIP 对人体有刺激性, NBT 对人体有害, 请注意适当防护。

注: 本章后附斑马鱼整体原位杂交实验流程。

参考文献

- [1] Howe, K., et al., *The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome*. Nature, 2013. **496**(7446).
- [2] Kettleborough, R., et al. *A Systematic Genome-Wide Analysis of Zebrafish Protein-Coding Gene Function*. in *International Plant and Animal Genome Conference XXI 2013*. 2013.
- [3] Eisen, J.S. and J.C. Smith, *Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense*. Development, 2008. **135**(10): p. 1735-43.
- [4] Blum, M., et al., *Morpholinos: Antisense and Sensibility*. Dev Cell, 2015. **35**(2): p. 145-9.
- [5] Ma, Z., et al., *PTC-bearing mRNA elicits a genetic compensation response via Upf3a and COMPASS components*. Nature, 2019. **568**(7751): p. 259-263.
- [6] Mullins, M.C., et al., *Large-Scale Mutagenesis in the Zebrafish - in Search of Genes-Controlling Development in a Vertebrate*. Current Biology, 1994. **4**(3): p. 189-202.
- [7] Solnickakrezel, L., A.F. Schier, and W. Driever, *Efficient recovery of ENU-induced mutations from the zebrafish germline*. Genetics, 1994. **136**(4): p. 1401-20.
- [8] Driever, W., et al., *A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish*. Development, 1996. **123**: p. 37-46.
- [9] Haffter, P., et al., *The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, Danio rerio*. Development, 1996. **123**: p. 1-36.
- [10] Moens, C.B., et al., *Reverse genetics in zebrafish by TILLING*. Briefings in Functional Genomics and Proteomics, 2008. **7**(6): p. 454.
- [11] Gao, Y., et al., *[Genetic manipulation in zebrafish]*. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2017. **33**(10): p. 1674-1692.
- [12] Amsterdam and Adam, *[Methods in Cell Biology] The Zebrafish: Genetics, Genomics, and Informatics Volume 77 || Retroviral-Mediated Insertional Mutagenesis in Zebrafish*. 2004: p. 3-20.
- [13] Amsterdam, A. and N. Hopkins, *Retroviral-mediated insertional mutagenesis in zebrafish*. Methods Cell Biol, 2004. **77**: p. 3-20.
- [14] Kawakami, K., et al., *A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish*. Developmental Cell, 2004. **7**(1): p. 133-144.
- [15] Asakawa, K., et al., *Genetic dissection of neural circuits by Tol2 transposon-mediated Gal4 gene and*

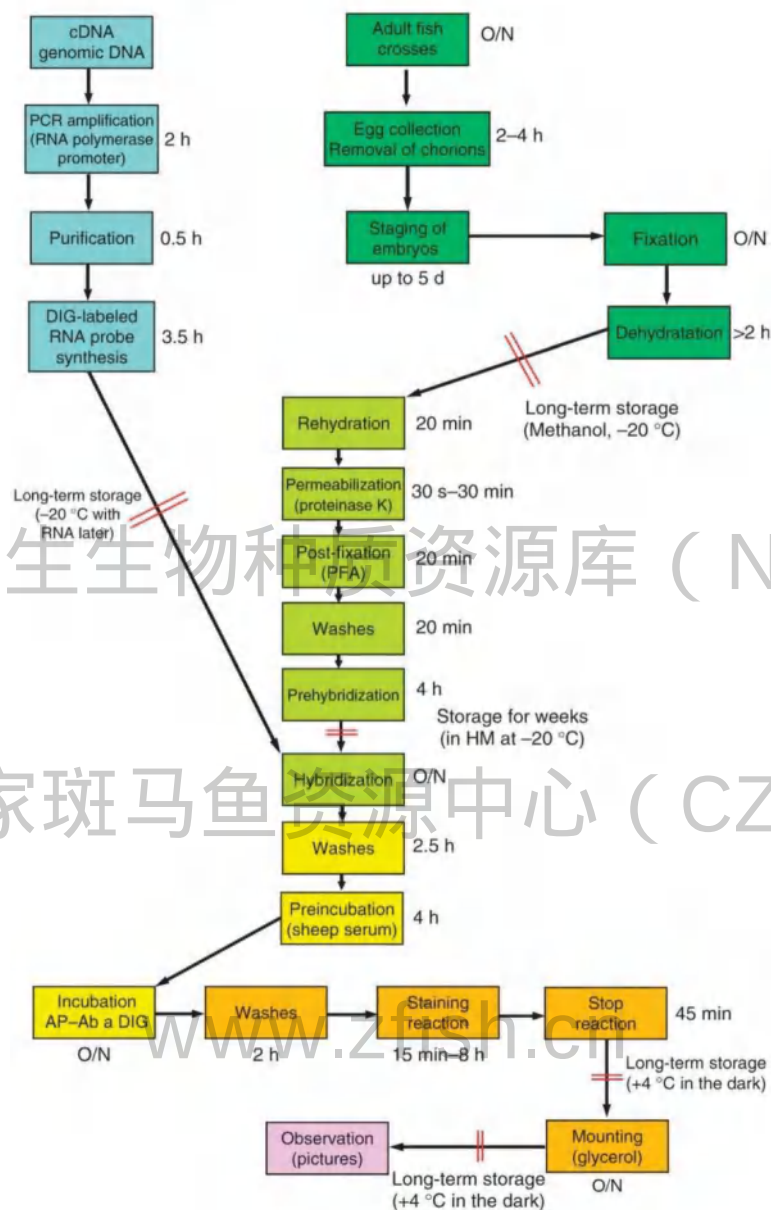




- enhancer trapping in zebrafish*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(4): p. 1255-60.
- [16] Kotani, T., et al., *Transposon-mediated gene trapping in zebrafish*. Methods, 2006. **39**(3): p. 199-206.
- [17] Doyon, Y., et al., *Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases*. Nature Biotechnology, 2008. **26**(6): p. 702-708.
- [18] Meng, X., et al., *Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases*. Nature Biotechnology, 2008. **26**(6): p. 695-701.
- [19] Huang, P., et al., *Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs*. Nature Biotechnology, 2011. **29**(8): p. 699-700.
- [20] Sander, J.D., et al., *Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs*. Nature Biotechnology, 2011. **29**(8): p. 697-698.
- [21] Sapranas, R., et al., *The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli*. Nucleic Acids Research, 2011. **39**(21): p. 9275-9282.
- [22] Gasiunas, G., et al., *Gasiunas, G, Barrangou, R, Horvath, P and Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria*. Proc Natl Acad Sci USA 109: E2579-E2586. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(39): p. E2579-86.
- [23] Ishino, Y., et al., *Nucleotide-Sequence of the Iap Gene, Responsible for Alkaline-Phosphatase Isozyme Conversion in Escherichia-Coli, and Identification of the Gene-Product*. Journal of Bacteriology, 1987. **169**(12): p. 5429-5433.
- [24] Jansen, R., et al., *Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes*. Molecular microbiology, 2002. **43**(6): p. 1565-1575.
- [25] Marraffini, L.A. and E.J. Sontheimer, *CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in Staphylococci by Targeting DNA*. Science, 2008. **322**(5909): p. 1843-1845.
- [26] Chang, N., et al., *Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in Zebrafish embryos*. Cell Research, 2013(4): p. 465-472.
- [27] Mali, P., et al., *RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9*. Science, 2013. **339**(6121).
- [28] Cho, S.W., et al., *Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease*. Nature Biotechnology, 2013. **31**(3): p. 230-232.
- [29] Sun, Y., et al., *Systematic genome editing of the genes on zebrafish Chromosome 1 by CRISPR/Cas9*. Genome research, 2020. **30**(1): p. 118-126.
- [30] Barrangou, R., *RNA-mediated programmable DNA cleavage*. Nature biotechnology, 2012. **30**(9): p. 836-838.
- [31] Hu, J.H., et al., *Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity*. Nature, 2018. **556**(7699): p. 57-63.
- [32] Lister, J.A., et al., *Nacre encodes a zebrafish microphthalmia-related protein that regulates neural-crest-derived pigment cell fate*. Development, 1999. **126**(17): p. 3757-3767.
- [33] D'Agati, G., et al., *A defect in the mitochondrial protein Mpv17 underlies the transparent casper zebrafish*. Developmental biology, 2017. **430**(1): p. 11-17.
- [34] Richard Mark White, A.S., Christopher Burke, Teresa Bowman, Jocelyn LeBlanc, Craig Ceol, Caitlin Bourque, Michael Dovey, Wolfram Goessling, Caroline Erter Burns, and Leonard I. Zon, *Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis*. Cell Stem Cell, 2008. **February 7; 2**(2): p. 183-189.
- [35] Thisse, C. and B. Thisse, *High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos*. Nature protocols, 2008. **3**(1): p. 59.



附：斑马鱼整体原位杂交实验流程



附图 1 整体原位杂交技术流程图

斑马鱼整体原位杂交(whole-mount in situ hybridization, WISH)技术流程如附图 1 所示，蓝色框部分表示探针合成，深绿色部分表示材料准备，浅绿色部分表示 WISH 第 1 天实验内容，黄色部分代表 WISH 第 2 天实验内容，橙黄色部分表示 WISH 第 3 天实验内容，粉色部分表示 WISH 最后一步。每一步实验需要的时间在框旁注明（O/N：过夜处理）。箭头上并行的两条红线表示 WISH 可在上一步结束后依据相应条件有较长时间中断而不影响实验结果。





1. 探针制备

探针制备体系如下表所示

Component	Amount per reaction	Final
Linear Template DNA	6.0 μ L	50-100 ng
5x Transcription buffer	2.0 μ L	1X
DTT 0.1M	——	——
DIG-RNA labeling mix (UTP)	1.0 μ L	
RNasein (40U/ μ L)	0.5 μ L	1-10 U
T3 or T7 RNA polymerase (20U/ μ L)	0.5 μ L	1-5U
Total	10 μ L	

- 1) 混匀后在 37°C 反应 2 小时。
- 2) 10 μ L 的反应体系中加入 2 μ L RNase-free DNase I 和 18 μ L RNase-free 水。混匀后在 37°C 反应 30 min。
- 3) 加入 1 μ L RNase-free 的 0.5 M EDTA 和 9 μ L RNase-free 水终止反应。
- 4) 将 Sigma spin Post Reaction 纯化柱放入一个收集管中，750 g (=2800 rpm)离心 15 s。
- 5) 将纯化柱去尾去盖，750 g 离心 2 min。
- 6) 将纯化柱放入一个新的 RNase-free 的 EP 管中，将 RNA 反应液慢慢加入到纯化柱的凝胶柱上，750 g 离心 4 min。
- 7) 加入 1 μ L RNase-free 的 EDTA 0.5M 和 9 μ L of RNAlater (RNAlater 有防止 RNA 降解的作用，毒性较大，小心操作)，取 1-2 μ L 合成液电泳检测。

2. 材料准备

- 1) 收集斑马鱼受精卵，放于 35 mm 平皿中，加入少量的 egg water 覆盖胚胎即可。
- 2) 待胚膜略微膨起，加入 100-200 μ L Pronase (1/100 比例加入，储液为 20 mg/mL)，混匀，定时查看，一般消化 1 min 左右。
- 3) 当观察到有个别胚胎出膜，立即将整皿胚胎转入装满养殖水的 250 mL 烧杯中，轻轻洗 3 次，即可将大部分的胚膜脱除。
- 4) 使用玻璃吸管将胚胎转入盛满 0.3 x Danieau medium 的 2%琼脂平皿中，注意此时的胚胎十分脆弱，应小心操作，保持处于液面下，避免接触空气。重复操作一次后即





可转入干净的琼脂平皿中饲养。

5) 养殖密度大约是 100 枚胚胎/100 mm 平皿，胚胎尽量分散培养，以保证充足的生存空间。

6) 28.5°C生化培养箱中培养，前 2 天每半天换一次新鲜的 0.3 x Danieau medium。

7) 当胚胎发育到目标时期，使用 4% (wt/vol) 多聚甲醛 (PFA, paraformaldehyde) PBS 缓冲液 4°C固定过夜。

8) 胚胎于 24 hpf 开始出现少量的黑色素，后期日渐增多，色素会影响观察。一般采取在体节期或 20 hpf 时加入 1-Phenyl-2-Thiourea (PTU，使用浓度为 0.0045%)，以阻断色素形成，一天换一次液。或者使用双氧水处理，以去除色素。

9) 第二天进行梯度脱水：将固定的胚胎从 4%多聚甲醛中逐步替换成 100%甲醇(三次，每次 15 min)。

10) 更换新鲜的 100%甲醇，在-20°C 保存，可达数月之久。待用胚胎最好在甲醇中过夜或至少 2 个小时，可以使组织间的空隙更大，利于探针的结合。

3. 原位杂交

原位杂交第一天

梯度复水 (室温下)

- | | |
|----------------|--------------------------------|
| 1) 1 次 x 5 min | 100% Methanol |
| 2) 1 次 x 5 min | 75% Methanol -25% PBS |
| 3) 1 次 x 5 min | 50% Methanol -50% PBS |
| 4) 1 次 x 5 min | 25% Methanol -75% PBS |
| 5) 4 次 x 5 min | PBT (PBS 1 x / Tween 20(0.1%)) |

蛋白酶处理与固定 (室温下)

6) 胚胎杂交前应先用蛋白酶 K (储液为 10 mg/mL，以 1/1000 比例加入 PBT 稀释) 处理，以疏松组织，便于杂交。发育时期不同的胚胎采用不同消化的时间 (下列时间以供参考)。

For embryos at 75 % epiboly (Gastrula)	0 min
For embryos from 5-6 somites (ES)	1 min
For embryos from 18-20 somites (MS)	3 min
For embryos of 24 h	10 min



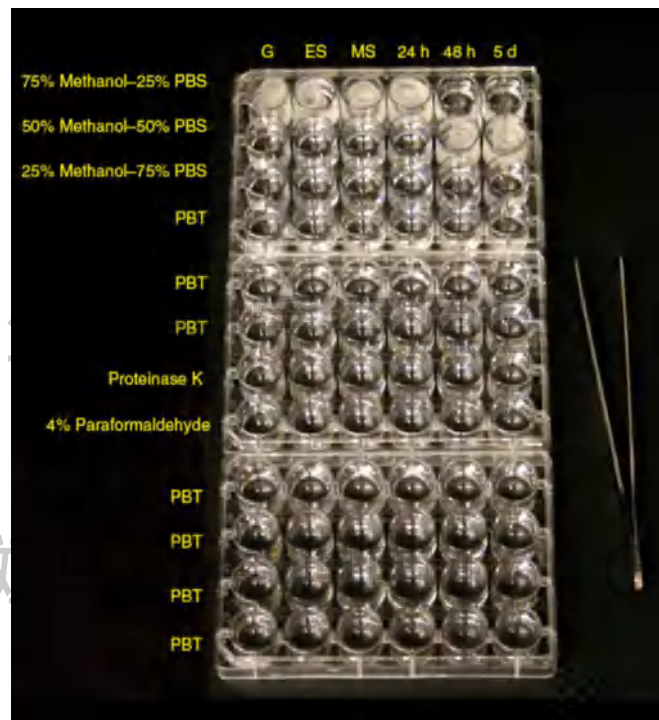
For embryos of 36 h 20 min

For embryos of 48 h and later 30 min

7) 终止酶消化与固定： 1 次 x 20 min 4% PFA-PBS

8) 洗脱：5 次 x 5 min PBT

9) 将胚胎转入 1.5 mL RNase-free 的 EP 管中。



附图 2 原位杂交第一天，在 24 孔板中胚胎梯度复水与蛋白酶 K 处理过程图示。

预杂交反应

10) 每管胚胎中置换成大约 0.6 到 1 mL 杂交液，70°C 水浴，预杂交 2-5 小时（3-4 小时为宜）。

杂交液（HM）配方：

	volume	final
Formamide	25.0 mL	50% formamide
20 x SSC	12.5 mL	5 x SSC
Heparin 5 mg/mL	0.5 mL	50 µg/mL
tRNA 50 mg/mL	0.5 mL	500 µg/mL
Tween 20 (20%)	0.25 mL	0.1%
Acide citrique 1M	0.46 mL	> pH 6
H ₂ O	to 50 mL	





✓ 对于信号较强，不需要过长孵育时间的探针，无需在杂交液中加入 heparin 和 tRNA。

✓ 胚胎在杂交液中的保存时间：4°C可以存放一天，-20°C可以存放数个星期。

杂交

11) 吸去预杂交液，加上 200 μ L 已加入探针的杂交液（包含 30-100 ng 探针）

12) 70°C 水浴过夜

原位杂交第二天

漂洗

回收探针，放于-20°C保存（通常探针可重复使用 3 次左右）

使用 HM/SSC 混合液，2 x SSC 和 0.2 x SSC 进行梯度漂洗

1) 1 次 x 10 min HM (without heparin/tRNA) 快速漂洗一次

2) 1 次 x 10 min 75% HM / 25% 2 x SSC at 70°C

3) 1 次 x 10 min 50% HM / 50% 2 x SSC at 70°C

4) 1 次 x 10 min 25% HM / 75% 2 x SSC at 70°C

5) 1 次 x 10 min 2 x SSC at 70°C

6) 2 次 x 30 min 0.2 x SSC at 70°C

7) 1 次 x 10 min 75% 0.2 x SSC / 25% PBT at RT

8) 1 次 x 10 min 50% 0.2 x SSC / 50% PBT at RT

9) 1 次 x 10 min 25% 0.2 x SSC / 75% PBT at RT

10) 1 次 x 10 min PBT at RT

封闭反应

11) 在胚胎中加入 1 mL blocking buffer，室温下在摇床上低速反应 3-4 小时。

blocking buffer: 在 PBT 中加入 2%羊血清和 2 mg/mL BSA

抗体反应

12) 按 1: 5000 的比例在 blocking buffer 中加入 Anti-Dig-AP（酶连地高辛抗体），稀释好后加入胚胎中（500-1000 μ L），4°C下摇床上低速反应过夜。





原位杂交第三天

漂洗

- 1) 弃抗体反应液，PBT 快速漂洗一次

6 次 x 15 min PBT at RT

摇床上低速漂洗

最后一次漂洗后在转移至下一个溶液前，应尽可能移去前 PBT 溶液，以防在胚胎上形成磷酸盐沉淀。

- 2) 碱性 Tris 缓冲液 (alkaline tris buffer) 快速漂洗一次

3 次 x 5 min alkaline tris buffer at RT

摇床上低速漂洗

碱性 Tris 缓冲液 (alkaline tris buffer) 配方：

	volume	final
Tris HCl pH 9.5 1M	10 mL	100 mM
MgCl ₂ 1M	5 mL	50 mM
NaCl 5M	2 mL	100 mM
Tween 20 (20%)	0.5 mL	0.1%
H ₂ O	to 100 mL	

显色反应

- 3) 小心吸去多余的 alkaline tris buffer，加入 700 μ L 新鲜配制的显色液

显色液：20 μ L NBT-BCIP/ 1 mL alkaline tris buffer

- 4) 将胚胎转移到 12 孔白瓷盘，室温下避光显色

半小时以内，每 5 min 查看一下胚胎显色情况

1 小时以后，每 30 min 或 1 h 查看一下胚胎显色情况

- 5) 显色成功后，及时吸去多余的显色液，加入 1 mL stop solution (PBS pH 5.5 EDTA 1 mM) 终止反应

1 次 x 10 min stop solution at RT

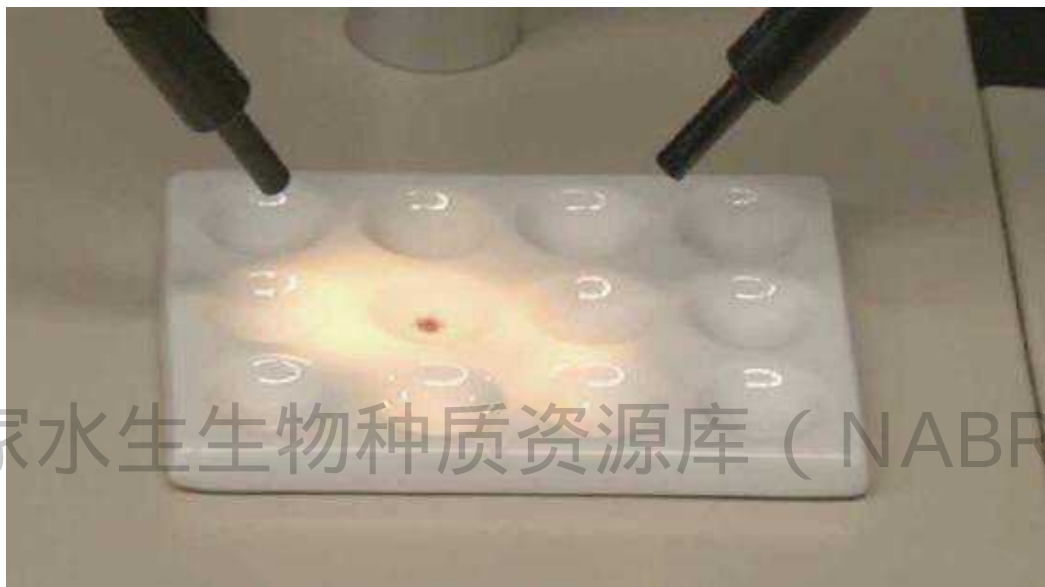
1 次 x 30 min stop solution at RT

1 次 x 1 h stop solution at RT

摇床上低速漂洗。胚胎可以在 stop solution 中避光保存数月至数年



- 6) 将胚胎转入盛放 100%甘油的 6 孔板中，注意尽量少带入 stop solution，室温下摇床上低速避光平衡过夜，以保证胚胎中的水和甘油的充分交换，增加胚胎的光透性。
- 7) 第二天使用 Olympus 显微镜，使用顶光源进行拍照，保存照片。



附图 3 原位杂交第三天，胚胎显色反应观察图示



图 4 拍照用载玻片图示

图示中的载玻片分别在两侧用胶水粘附有 3-4 层盖玻片，具体使用几层视胚胎厚度而定，大于 24 hpf 的胚胎，建议使用 3 层盖玻片，小于 24 hpf 的胚胎，建议使用 4 层。胚胎在 100%甘油中平衡过夜后，可以进行拍照。先在载玻片中间滴一小滴甘油（不能太多，勿将两端盖玻片桥连起），将一个胚胎转入油滴中，盖上长盖玻片，通过轻轻移动盖玻片可以调整胚胎的方位。





实验试剂

- 1) cDNA or genomic DNA
- 2) PCR master mix (Promega, cat. No. M7505)
- 3) Sterile double distilled water
- 4) Trizma® base (Sigma, cat. no. T1503)
- 5) Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Eurobio, cat. no. GAUEDT00-66)
- 6) Boric acid (Sigma, cat. no. B7901)
- 7) Agarose (Sigma, cat. no. A9539)
- 8) Transcription buffer (Promega, cat. no. P118B)
- 9) DL-Dithiothreitol (DTT) (Promega, cat. no. P117B)
- 10) DIG RNA Labeling Mix (UTP) (Roche, cat. no. 1277073)
- 11) RNasein (Promega, cat. no. N251X)
- 12) T3 RNA-Polymerase (Promega, cat. no. P207C)
- 13) T7 RNA-Polymerase (Promega, cat. no. P207B)
- 14) RNase free DNase I (Roche, cat. no. 776785)
- 15) NaOH (Sigma, cat. no. S8045)
- 16) RNAlater (Sigma, cat. no. R-0901)
- 17) Adult male and female zebrafish (*Danio rerio*) of comparable size and age (within the range of 3 months to 2 years old). 所有的动物实验应遵循实验动物管理规则和条例。
- 18) Pronase (Protease from *Streptomyces griseus*, Sigma, cat. no. P6911)
- 19) Fish water (养殖系统水)
- 20) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Modified, without calcium chloride and magnesium chloride. (PBS) (Sigma, cat. no. D-5652)
- 21) Paraformaldehyde (PFA) (Sigma, cat. no. P-6148) 有毒试剂, 使用应注意防护眼睛, 避免接触皮肤, 有条件的话可以穿防护服。
- 22) Methanol (Technisolv, cat. no. prol83809-360), 避免吸入, 避免接触到眼睛和皮肤。
- 23) 1-phenyl-2-thiourea (PTU) (Sigma, cat. no. P7629) 高毒试剂, 吞入或吸入可致命或造成严重后果。使用时避免散入周围环境中。
- 24) NaCl (Sigma, cat. no. S3014)
- 25) KCl (Sigma, cat. no. P9541)
- 26) MgSO₄ (Sigma, cat. no. M2643)





- 27) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Sigma, cat. no. C1396)
- 28) HEPES (Sigma, cat. no. H3375)
- 29) H_2O_2 (Sigma, cat. no. 31642)
- 30) KOH (Sigma, cat. no. P1767)
- 31) Tween20 (Sigma, cat. no. P-1379)
- 32) Proteinase K (Roche Diagnostics, cat. no. 1092766), 母液浓度为 10 mg/mL, 使用 PBT 溶解, 分装成 100 μL 每份, 存于 -20°C 。使用终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- 33) Formamide high purity grade (Carlo Erba, cat. no. 452286)
- 34) Serdolit MB-3 (Serva, 40721)
- 35) Citric acid trisodium salt (Sigma cat. no. C3674)
- 36) Citric acid monohydrate (Sigma, cat. no. C1909)
- 37) Heparin sodium salt (Sigma, cat. no. H-3393)
- 38) tRNA from wheat germ Type V, lyophilized powder (Sigma, R7876)
- 39) Phenol solution Saturated with 0.1 M citrate buffer, pH 4.3 (Sigma, P4682)
- 40) Chloroform (Carlo erba, cat. no. 438603)
- 41) Sodium acetate (Merck, cat. no. 0095096B)
- 42) Ethanol absolute (Technisolv, cat. no. PROL83813-360)
- 43) Sheep serum (Interchim SA, cat. no. 013-000-121). 使用无菌水配制, 分装成小管, 保存于 -20°C
- 44) Albumin from bovine serum, further purified Fraction V, 99% pure (BSA) (Sigma, A3059)
- 45) Sheep anti Digoxigenin-AP Fab fragments (Roche Diagnostic, cat. no. 1093274)
- 46) HCl (Sigma, cat. no. H1758)
- 47) MgCl_2 (Sigma, cat. no. 63068)
- 48) Nitro Blue Tetrazolium (NBT, Sigma, N6639). 将 50 mg 的 Nitro Blue Tetrazolium 溶于 0.7 mL N, N-dimethylformamide 和 0.3 mL 无菌水中, 保存于 -20°C 。
- 49) 5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate (BCIP, Sigma, B-8503). 将 50 mg 的 5-Bromo 4-Chloro 3-Indolyl Phosphate 溶于 1 mL 的无水 N, N-dimethylformamide, 保存于 -20°C 。
- 50) N, N-Dimethylformamide anhydrous, 99.8% (Aldrich, cat. no. 227056)
- 51) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Fluka, 71650)
- 52) NaH_2PO_4 (Merck, cat. no. 1,06346,1000)





53) Glycerol $\geq 99\%$ (Sigma, G6279)

溶液配方

1) **10 x PBS stock solution (pH=5.5)**: 将 10.8 g Na_2HPO_4 , 65 g NaH_2PO_4 , 80 g NaCl , 2 g KCl 溶于 1 L 水中, 调节 PH 至 5.5, 灭菌备用。

2) **PBT**: 1 x PBS, 0.1% Tween 20 (vol/vol)

3) **Stop solution**: 1 x PBS (pH=5.5), 1 mM EDTA, 0.1% Tween 20 (vol/vol)

4) **20 x SSC stock solution**: 将 NaCl 175.3 g, Citric acid trisodium salt 88.2 g 溶于 1 L 水中, 灭菌备用。

5) **Blocking buffer**: 1 x PBT, 2% sheep serum (vol/vol), 2 mg/mL BSA.

6) **0.3 x Danieau medium (pH=7.6)**: 17 mM NaCl , 2 mM KCl , 0.12 mM MgSO_4 , 1.8 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1.5 mM HEPES

7) **Alkaline Tris buffer**: 100 mM Tris HCl (pH=9.5), 50 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl , 0.1% Tween 20

8) **1 x TBE**: 将 12.1 g Trizma® base, 0.75 g EDTA 和 7.6 g Boric Acid 溶于 1 L 水中。

9) **0.5 M EDTA (pH=8.0)**: 将 186.1 g EDTA-Na 盐溶于 800 mL 水中, 加入大约 15 g NaOH 固体调节 pH 至 8.0, 定容到 1 L。

10) **Pronase preparation**: 将 1 g Protease 溶于 100 mL 0.3 x Danieau buffer, 37°C 水浴 2 小时充分溶解, 分装成 5 mL 每管, 保存于 -20°C。

11) **4% (wt/vol) paraformaldehyde in 1 x PBS**: 将 4 g paraformaldehyde 溶于 1 x PBS, 加热直至所有粉末溶解, 冷却到室温。可保存于室温下, 使用 2 周左右。PFA 容易降解, 不宜反复加热, 使用过程中会因甲醛的形成而呈酸性。

12) **20% Tween 20**: 将 200 mL Tween 20 溶于 800 mL 无菌水中, 充分溶解后, 可避光保存于室温下。

13) **RNAse free tRNA**: 将 tRNA 配制成 50 mg/mL, 使用酚/氯仿抽提以去除蛋白质杂质。

14) **Hybridization Mix (HM)**: 50% 去离子 Formamide, 5 x SSC, 0.1% Tween20, 50 $\mu\text{g/mL}$ Heparin, 500 $\mu\text{g/mL}$ RNAse Free tRNA, 使用柠檬酸调节 pH 至 6.0 (50 mL HM 大约加 460 μL 1M 柠檬酸即可)。





15) **Deionization of Formamide:** 将优质的 formamide 加入到 10 g/l Serdolit MB-3 中, 慢慢搅匀大约 15 min, 重复一次, 过滤以去除树脂, 避光保存于 4°C.

16) **1M Tris HCl (pH=9.5), stock solution:** 将 121.1 g of Trizma® base 溶于 900 mL 水中, 使用 HCl 调节 pH 至 9.5, 定容到 1 L。

17) **Labeling solution:** 20 μ L NBT-BCIP 混合液加入到 1 mL alkaline tris buffer 中混匀即可。

设备

- 1) SigmaSpin Post Reactions Purification Columns (Sigma, cat. no. S-5059)
- 2) Breeding tanks with dividers diagonal
- 3) Dissecting stereomicroscope with diascopic stand and a fiber optic illuminator with articulated arms.
- 4) Pipette pump filler (Fisher, cat. no. 13-683C)
- 5) Pasteur capillary pipette 15 cm (VWR, cat. no. 612.1701)
- 6) Pasteur capillary pipette large diameter (diameter of the capillary 2 mm) (Dominique Dutscher S.A. - cat. no. 042000L)
- 7) Incubator (28.5°C)
- 8) Small baskets
- 9) Multiwell 6 well plates
- 10) Multiwell 24 well plates
- 11) Water bath with agitation
- 12) Styrofoam float
- 13) Horizontal orbital shaker (VWR, cat. no. 47742-752)
- 14) Spot plates in white porcelain, 12 cavities (Fisher, cat. no. S337241)
- 15) Single end frosted microscope slides 75 x 25 mm, thickness 1 mm (VWR, cat. no. 16004-368)
- 16) Micro cover glasses square (22 x 22 mm) thickness 1 $\frac{1}{2}$ (VWR, cat. no. 48366-227).
- 17) Micro cover glasses rectangular (24 x 40 mm) thickness 1 (VWR, cat. no. 48393-060)
- 18) Super glue (cyanoacrylate) (Fisher, cat. no. 11-999-24)
- 19) Macroscope
- 20) Compound microscope with Differential Interference Contrast (DIC) Digital camera linked to a PC.





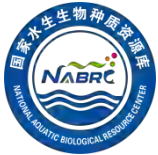
21) Imaging software

22) **Agarose-coated Petri dishes:** 用于脱膜胚胎饲养, 平皿中倒入溶解好的 2% 琼脂溶液, 大约 2 mm 厚度。

原位杂交常见问题

常见问题	可能原因	解决方案
RNA 合成浓度低	使用 SP6 RNA 聚合酶, 整合 DIG 标记的 UTP 效率低下	使用 T7 或 T3 RNA 聚合酶
RNA 电泳条带拖尾	合成过程中使用的试剂和耗材没有做到 RNase-free	操作过程中注意 RNase-free
胚胎脱膜不完全或破碎	链霉菌蛋白酶 pronase 使用浓度不当或处理时间不当。pronase 失效。	选择合适的 pronase 浓度, 掌握好处理时间
胚胎破碎	蛋白酶 K 处理太过	严格控制好蛋白酶 K 处理的浓度和时间
	胚胎固定问题	最好用新鲜配制的 4%PFA 溶液进行固定, 控制好固定时间
	吸取胚胎用力过猛	操作胚胎时, 动作一定要轻柔
染色背景过高	杂交温度太低	RNA-RNA 杂交温度最好为 65°C, 严格控制杂交温度
	清洗不彻底	保证清洗所需的时间及温度
	杂交液中的甲酰胺质量欠佳	使用优质产品
染色呈蓝绿色	探针浓度过高	将探针稀释至合适浓度
无染色	探针合成问题或探针降解	探针合成后一定要跑电泳检测探针合成的质量
	基因表达时间与胚胎时期不一致	用 RT-PCR 检测基因表达时间
染色只在表面	PFA 固定时间太长或固定温度过高	最好用新鲜配制的 4%PFA 溶液进行固定, 控制好固定时间和温度
	胚胎发生黏连	控制好蛋白酶 K 处理时间, 遇到黏连情况应及时将胚胎轻轻吹散开
胚胎变成粉或棕色	曝光过度	胚胎应避光染色, 染好色后应避光保存





第五章 斑马鱼中的各类转基因技术及鉴定

斑马鱼的基因组为二倍体，由 25 对染色体组成，其 DNA 大约包含 1.7×10^9 个碱基对，大小约为人类基因组的一半。根据 Ensembl 网站最新版本 (GRCz11) 对斑马鱼基因组的注释，斑马鱼有 25,592 个蛋白质编码基因以及 6,599 个非编码基因[1]。随着全基因组测序的完成，斑马鱼被广泛的应用于生命科学、生物医学、环境科学和农业等诸多研究领域，越来越多的遗传学操作方法得以在斑马鱼中实现。本章将简要介绍基因过表达、转基因及原位基因敲入技术在斑马鱼中的应用[2-4]。

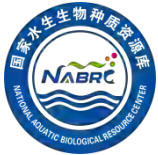
第一节 斑马鱼基因过表达、转基因及基因敲入技术

在斑马鱼中可以通过向早期胚胎注射 DNA 或 RNA 的方法实现外源基因短期过量表达，也可以利用转基因或基因敲入技术构建可稳定遗传的插入品系，调控目的基因在斑马鱼中持续表达，从而研究基因的生物学功能，阐释生命现象和规律。

一、过表达技术

在斑马鱼中，通过注射体外合成的 mRNA 实现目的基因的过表达，并通过观察表型推测目的基因的功能。转录通常发生在生物体内，在体外无细胞系统中，如果我们将含有 RNA 转录酶、NTP 等条件，用 DNA 作为模板，模仿体内转录过程生成 RNA，这样在体外能够控制基因转录的过程的技术被称为体外转录。将体外转录获得的编码目的蛋白的 mRNA 导入刚刚开始发育两小时的斑马鱼胚胎内，可以实现斑马鱼胚胎的早期阶段（直到发育的第三天）特定蛋白的短期过表达[5]。如果注射内源基因的 mRNA，可进行过表达分析。例如，BMP 分子的浓度梯度影响斑马鱼背侧和腹侧的发育，BMP 分子表达量高的区域将发育为腹部，表达量低的一侧，发育为背部。如果在胚胎中注射 *bmp4* 基因的 mRNA，胚胎将产生腹部化表型。如果注射某些内源基因显性负调控（dominant negative）的突变型 mRNA，则可干扰正常基因的功能，进而进行显性负调控分析。尽管通过 mRNA 注射来实现蛋白的短期表达可以快速简便地在斑马鱼早期发育过程中进行蛋白定位和功能研究，但这种方法却不适合在发育晚期或是目的蛋白必须在特定组织和细胞中进行表达时使用。





二、转基因技术

转基因技术是将人工分离和修饰过的基因导入到生物体基因组中，由于导入基因的表达，引起生物体的性状产生可遗传的修饰。在转基因品系研制中，转基因载体是承载外源基因，携带靶基因进入斑马鱼胚胎细胞，并将目的基因整合到斑马鱼基因组使其稳定维持的 DNA 分子。转基因模型，尤其是在特异性组织细胞中表达荧光蛋白的转基因品系，广泛应用于遗传学、细胞生物学和发育生物学等研究领域[6-11]。

1. 斑马鱼转基因载体介绍

在转基因品系研制中，转基因载体是承载外源基因，携带靶基因进入斑马鱼胚胎细胞，并将目的基因整合到斑马鱼基因组使其稳定维持的 DNA 分子。转基因载体整合到基因组后，由于导入基因的表达，引起生物体的性状产生可遗传的修饰，从而制备出转基因品系。

2. 转基因载体的基本元件

随着转基因技术的发展，适合于不同研究目的的各种转基因载体应运而生，为使外源基因高效或者特异表达，转基因载体一般应该具备以下几个基础元件：

2.1 启动子。启动子是 DNA 模板上专一地与 RNA 聚合酶结合并决定转录从何处起始的部位，也决定基因的转录效率。常用的启动子有以下 3 大类：

泛表达启动子，如 CMV， β -actin promoter 等；

组织特异性启动子，如原始生殖细胞特异性 *kop* 启动子，肌肉细胞特异性启动子 *tpma* 等；

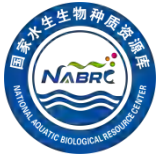
诱导型表达系统，如 GAL4-UAS、Cre-loxp 和物理诱导启动子，如温度 *hsp* 启动子。

2.2 表达基因。转基因斑马鱼中最常见的表达基因是荧光报道蛋白，如 eGFP、mCherry 等，在特异性启动子的调控下表达以标记特定的组织器官或细胞类型。荧光蛋白也常常与目的基因的 cDNA 融合表达，作为转基因筛选的标志物。

2.3 终止子。终止子是在转录过程中，提供转录终止信号的序列。常用的终止子序列包括：维持 mRNA 在所有细胞中稳定存在的通用终止子，如 SV40 polyA；特异性基因的终止子，例如维持 mRNA 在原始生殖细胞特异稳定存在的 *nanos* 3'UTR 等。

2.4 转座子。转座子又称为跳跃基因，是存在于基因组上可自主复制和移位的 DNA 片段，可直接从基因组内的一个位点转移到另一个位点。Tol2 转座子最早在青鳞中发现，





作为基因转移工具在斑马鱼转基因品系研制中得到广泛的应用。现在常用的 pMiniTol2 载体是对 Tol2 转座子的精简,保留了正常转座功能所必需的元件。Mini-Tol2 包含长度分别为 200 bp 和 150 bp 的左右两臂,将外源片段克隆到左右两臂之间,配合转座酶即可以实现高效地插入。将带有转座子的转基因载体和人工合成的编码转座酶的 RNA 通过显微注射注入到受精卵内,Tol2 转座酶使转座子从转基因载体“跳”到斑马鱼染色体上,使目的基因在染色体上稳定存在。

3. 转基因载体构建方法

3.1 传统的酶切连接法。这个方法一般的步骤是,先在具有多克隆位点的载体上寻找合适的酶切位点,质粒载体 DNA 在体外经限制性内切酶酶切,然后在 DNA 连接酶的作用下同目的基因结合成环。以下举例说明,向初步载体中添加目的基因的实验方法:设计引物。引物扩增目的基因全长 ORF 序列,为了增加翻译效率,可以在起始密码子前面添加 kozak 序列,同时两端添加限制性内切酶的识别序列。

扩增序列。用高保真的 DNA 聚合酶从 cDNA 中或者质粒中扩增目的基因,电泳检测验证扩增序列的正确性后回收 PCR 产物。

酶切。PCR 产物和初步转基因载体进行双酶切,回收酶切产物。

连接。用 T4 连接酶将酶切后的 PCR 产物和初步载体进行连接。

转化并挑克隆。将连接产物转化到感受态细胞中,挑选阳性克隆进行 PCR 扩增,测序验证获得的载体中序列的准确性。

然后重复性地通过一系列的酶切,回收,连接和转化等工作构建多个中间载体用于添加其它的基本元件,最终得到转基因载体。因此,传统的载体构建方法在构建多片段拼接的复杂载体时,其路线设计和实际操作往往比较麻烦,通常需要构建多个中间载体,费时费力。但是,在没有更便捷的方法之前或者构建的载体比较简单时,采用传统的构建方法还是一种比较安全、稳妥的选择,而且能够获得预期的结果。

3.2 Gateway 技术。Gateway 是 Invitrogen 公司开发的一项基因克隆和表达的新技术,它利用位点特异重组构建入门载体(entryclone)后,不再需要使用限制性内切酶和连接酶,而且一旦拥有了一个入门载体,就可以利用它将目标基因多次转移到各种不同的表达载体(目的载体,destinationvector)上[12]。由于在重组时 DNA 片段的阅读框和方向保持不变,因而不会影响不同基因的测序结果,因而每当使用一种新的表达系统时,可以节省大量



时间（图 5.1.1）。

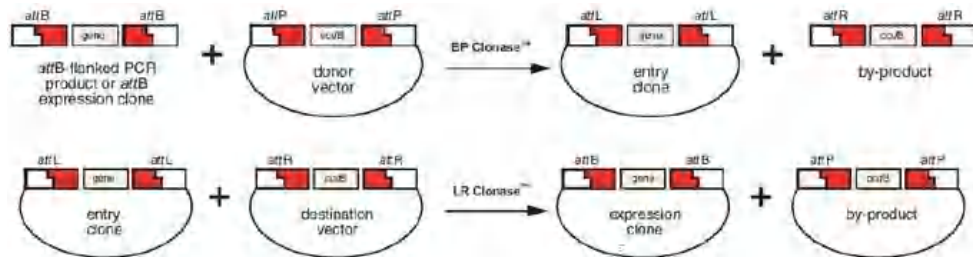


图 5.1.1 Gateway 技术原理示意图 (Walhout et al., *Nat Protoc*, 2000)

4. 转基因品系构建流程

4.1 转基因载体去内毒素处理。转基因载体重新转化后，用去内毒素的质粒试剂盒重新提取质粒，并用 RNase-free 的水溶解。

4.2 表型初筛。向约 100 颗胚胎中注射转基因载体，观察注射后的胚胎是否具有预期表达特征，如荧光表达是否特异。

4.3 合成转座酶 mRNA。

4.4 显微注射。向约 1 至 4 细胞期的胚胎中注射转基因载体和转座酶 mRNA。

4.5 P0 代转基因斑马鱼的遗传检测。将 P0 代转基因群体培养至性成熟，逐条与野生型品系侧交，收集胚胎作遗传检测。一般的检测方法有 PCR 测序鉴定、表型鉴定和荧光观察，筛选出配子中携带转基因插入的 P0 个体。

4.6 繁殖 F1 代。将上一步筛选的阳性个体，即配子中携带转基因插入的 P0 个体与野生型品系侧交，培养 F1 代群体（50-100 尾）。

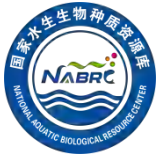
4.7 F1 代个体的筛选鉴定。将 F1 代群体培养至性成熟，取 F1 代斑马鱼尾鳍进行基因型检测，检测方法为 PCR 测序鉴定，筛选出转基因阳性 F1 代个体。

4.8 繁殖 F2 代胚胎。将转基因阳性的 F1 代个体与野生型品系侧交，制备转基因 F2 代胚胎，即获得稳定遗传的转基因品系。

三、定点敲入技术

随着基因编辑技术的发展，“基因定点敲入技术”正逐步建立和发展起来，该技术是基于 DNA 损伤修复机制，利用如 CRISPR/Cas 系统的基因组编辑工具产生双链断裂（double strand break, DSB），介导外源 DNA 整合到基因组中的特定位置，实现目的基因的靶向遗传修饰[13-15]。该技术能够对特异基因序列进行人为地精细编辑，不仅可





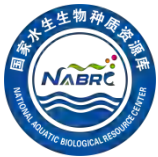
以特异地破坏目的基因，还可以将外源序列引入内源基因位点，例如引入 eGFP 等报告基因便于检测[16]。因此，定点敲入技术介导的外源基因在基因组中的整合能够更加真实地模拟内源基因的表达，规避了传统转基因技术随机整合的问题，必将成为动物遗传定向改造的强大工具。

有很多实验室尝试在斑马鱼中利用不同的 DSB 修复机制来实现外源基因在基因组水平的定位整合，获得一定的成功。2013 年，张博/林硕实验室首次基于同源重组（homologous recombination, HR）修复机制，利用 TALENs 和质粒供体在斑马鱼中定点插入报告基因 eGFP，其生殖传递率仅为 1.5%[17]。2014 年，Auer 等人在斑马鱼中建立了 CRISPR/Cas9 介导的基于非同源末端连接（NHEJ）修复机制的定点敲入技术，该技术的出现使斑马鱼中定点敲入外源序列的生殖传递率提高到 10%[18]。在此基础上，杜久林实验室利用内含子靶位介导的外源基因敲入，并能保持内源基因编码区和调控序列完整性，实现高效的以转基因标记为目的的基因敲入，其 F1 代中携带有效敲入的胚胎比例在 15.5-21.1%之间[19,20]。但是，基于 NHEJ 修复机制的定点敲入技术仍然有一些弊端：整合方向不确定；整合位点旁侧序列无法预测。在斑马鱼中，微同源末端连接（microhomology-mediated end joining, MMEJ）修复机制可能是斑马鱼早期发育进程中的 DNA 双链断裂修复的更常用机制。Hisano 等人报道了利用 MMEJ 修复机制在斑马鱼基因组中进行有效敲入的技术，这一技术可以实现基因组水平的精确同框整合，F0 代生殖细胞中的插入效率为 15%[21]。

作为重要的模式动物，斑马鱼的条件性基因敲除技术仍不成熟，极大地限制了其基因功能研究。2019 年 10 月 30 日，北京大学张博团队通过设计正-负双元件供体（dual-cassette donor）靶向插入策略和改进实验方法，在斑马鱼中利用非同源末端连接（NHEJ）途径在靶基因的内含子中通过一次插入同时引入两个 loxP 序列以及荧光蛋白报告基因，从而快速、高效地对目的基因实现了双功能遗传修饰，所获 KI 鱼系既可进行条件性/组织特异性敲除，又可达到基因/等位基因表达的活体标记与细胞示踪效果[21]。该研究成果，实现了一步法产生双色标记的敲入及条件性基因敲除品系，填补了一直无法高效地在斑马鱼上进行基因特异性敲除的空白，为斑马鱼基因功能的研究提供了重要的技术手段。

虽然目前利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术可以在斑马鱼中高效制备简单的 indel 突





变，但是斑马鱼中实现精确的基因敲入或者序列编辑，仍较难成功实现。斑马鱼中基因敲入实验所面临的主要挑战之一就是插入效率偏低，同时还有技术细节繁琐以及基因敲入过程中 DNA 修复的精细分子机制尚不完全明确等，导致定点敲入技术在斑马鱼中仍然难以广泛使用。

第二节 斑马鱼中常规转基因品系的鉴定

随着转基因技术及基因编辑技术的发展和革新，研究者们构建了多种转基因斑马鱼品系，下面对斑马鱼中常规转基因品系的鉴定方法进行简要介绍。

一、转基因在斑马鱼中的整合与拷贝数鉴定

1. PCR（聚合酶链式反应）

根据外源基因设计出特异性的引物，通过 PCR 便可以特异性地扩增出斑马鱼基因组中的外源基因序列，从而鉴定转基因整合情况。PCR 可以方便快捷地鉴定斑马鱼基因型，但是实验过程中需要注意：1. PCR 灵敏度高，实验过程中注意交叉污染；2. 扩增产物最好是跨多个转基因元件，避免基因组序列污染。

2. Southern 杂交

Southern 印迹杂交是进行基因组 DNA 特定序列定位的通用方法。该方法是利用标记探针与靶 DNA 进行特异性杂交，分析外源基因在基因组中地整合情况及拷贝数。该方法特异性强，准确度高，但是实验步骤繁琐，对实验技术要求要，且成本高。

二、转基因在斑马鱼中的转录情况鉴定

1. 原位杂交技术

原位杂交技术(*in situ* hybridization, ISH)是分子生物学、组织化学及细胞学相结合而产生的一门新兴技术。该技术可以准确地利用核酸探针进行细胞或组织的基因表达定位。原位杂交技术具有高度的灵敏性和准确性，并且随着原位杂交技术的不断改进与完善，（如多彩色荧光原位杂交技术地建立），原位杂交技术优越性越来越突出，该技术日益受到斑马鱼研究者的欢迎。





2. RT-PCR（反转录 PCR）、半定量 PCR，定量 PCR；

RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 是将 RNA 的反转录 (RT) 和 cDNA 的聚合酶链式扩增 (PCR) 相结合的技术。在反转录酶的作用下，将 mRNA 反转录为 cDNA，再以 cDNA 为模板，在 DNA 聚合酶作用下扩增出目的片段。RT-PCR 技术灵敏度高而且用途广泛，可用于检测转基因在 mRNA 水平表达情况。由于 RT-PCR 是在 RNA 水平上操作，实验过程需注意 RNA 降解及 DNA 污染。

半定量 PCR 是在 RT-PCR 体系中同时加入内参标基因的引物，使目的基因和内参基因在同一条件下同时扩增。在扩增反应结束之后，可以通过凝胶电泳的方法对扩增产物进行半定量分析，但分析的是 PCR 终产物，不能准确分析未经 PCR 信号放大之前的起始模板量。

定量 PCR 是普通 PCR 技术发展而来，它是在传统 PCR 反应体系中加入荧光化学物质（荧光染料或者荧光探针），根据各自不同的发光机制实时检测 PCR 退火、延伸过程中荧光信号变化来计算 PCR 每个循环中产物的变化量，以一定时间内 DNA 的增幅量为基础进行 DNA 的定量分析。定量 PCR 技术可以用微量的 RNA 定量分析特定时间细胞组织内基因表达情况。

3. Northern 杂交

Northern 印迹杂交是一种将 RNA 从琼脂糖凝胶中转印到硝酸纤维素膜上的方法，包括 3 步：探针制备、总 RNA 提取，RNA 甲醛凝胶电泳和吸印。利用 Northern 杂交可以分析转基因在斑马鱼中的转录情况，但是 Northern 杂交灵敏度低，对细胞中低丰度 mRNA 检出率低，从而使该方法在实际使用中受到限制。

三、转基因在斑马鱼中的蛋白表达情况鉴定

1. 表型鉴定（荧光表达观察）

斑马鱼中最常见的是荧光表达转基因品系，在显微镜下追踪观察荧光是否表达或者表达特征，是鉴定转荧光蛋白基因斑马鱼最常用的鉴定方法。

2. ELISA 检测

酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immuno sorbent assay, ELISA) 基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。该技术首先利用抗原与抗体的特异反应将待测物与酶连接，然后加入酶反应底物，底物被催化成有色产物，最后根据颜色的深浅进行定性或定量分析。利用 ELISA 检测转基因表达蛋白具有方便快捷、特异性高等特点，但也





易出现缺乏标准化和本底高等问题。

3. Western 杂交

Western 杂交（杂交蛋白质印迹法）即是分子生物学、生物化学和免疫遗传学中常用的一种实验方法。与 Southern Blot 或 Northern Blot 杂交方法类似，但 Western Blot 法被检测物是蛋白质，采用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳，“探针”是抗体，“显色”用标记的二抗，最后通过着色的位置及深度分析特定蛋白在细胞或组织中的表达情况。Western 杂交直接反应了目的基因在蛋白水平的表达，具有非常重要的意义，但是该技术步骤繁琐，费用高，不适于批量检测。

第三节 斑马鱼胚胎显微注射技术

斑马鱼胚胎显微注射技术通常是指，在显微镜下，利用显微操作系统，将实验材料直接注射到 1 至 4 细胞期的斑马鱼胚胎中。由于这个时期的胚胎中没有膜分隔动物极和卵黄，注入的溶液将随卵流运输至胚盘细胞中。通过注射不同类型的实验样品，可以实现基因的瞬时过表达、基因敲降、研制转基因品系和基因突变斑马鱼品系等实验目标。

一、显微注射系统的搭建

显微注射需要一套精密的显微操作设备，主要包括以下几个组成（图 5.3.1）：

氮气供给罐（图 5.3.1A）。

显微注射仪（图 5.3.1B）。显微注射仪连接氮气供给罐，用于对注射针内的溶液施加压力脉冲，利用可调节气压脉冲将精确微量体积的样品注射至胚胎体内。注射器和一个脚踏板相连，帮助实验人员在双手进行实验的同时可以通过踩踏板激活压力脉冲将实验样品注射入胚胎。

显微操纵器（图 5.3.1C）。用于注射针的精准位移控制，可以在显微注射过程中对注射针的运动进行精密调节。

体视显微镜（图 5.3.1D）。用于显微注射时观察整个实验过程，可以在显微注射过程中看到胚胎并对注射针所在的位置聚焦。



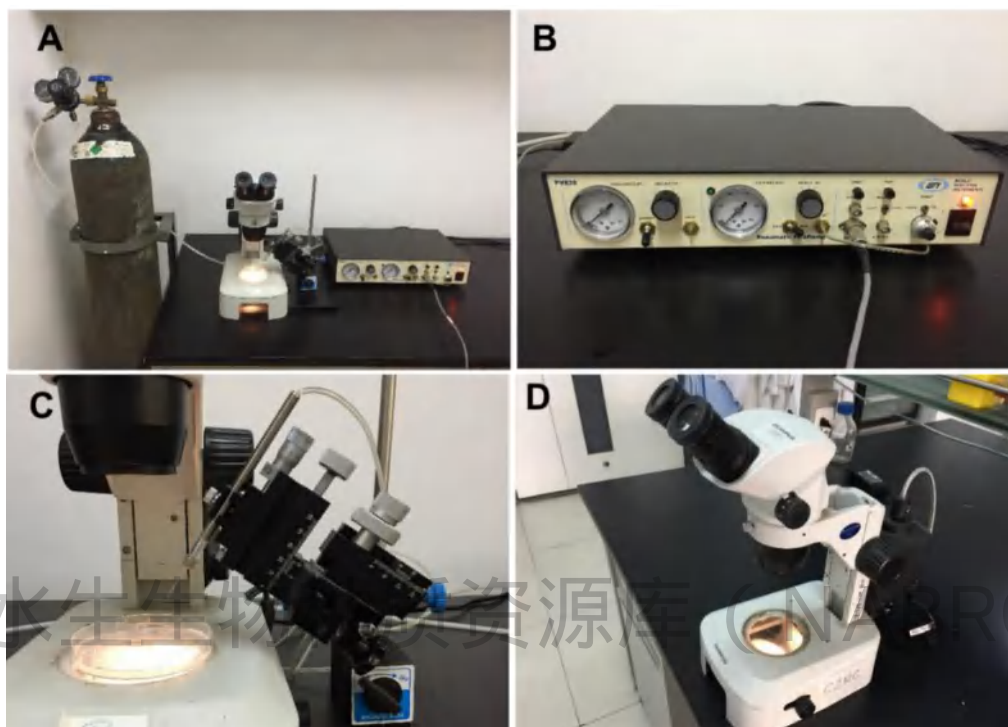


图 5.3.1 显微注射常用设备。(A) 全套搭建好的显微注射设备；(B) 显微注射仪；(C) 显微操纵器；(D) 体视显微镜。

二、显微注射过程

显微注射技术是一个相对精细的实验操作，主要有以下步骤：

第一步：显微注射样品准备

注射样品需提前准备，根据不同的实验目的，注射样品通常包括质粒 DNA、RNA 和 morpholino 等，可以在注射样品中加入酚红便于观察注射过程[22-24]。

1. DNA 质粒样品：质粒 DNA 需使用“去内毒素”的试剂盒提取。一般注射量为每枚胚胎 20-150 pg，多于 200 pg 胚胎死亡率上升。

2. mRNA 样品：一般注射量为每枚胚胎 10-500 pg，针对不同的 mRNA 样品，需要摸索各自适宜的浓度。

3. Morpholino 样品：Morpholino 由美国 GeneTools 公司提供，通常产品总量为 300 nmol 一瓶，约相当于 2400 μg ，加入 200 μL 灭过菌的去离子水（电阻率 $>18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ ）稀释至 12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，每管 20 μL 分装作为储液在 -20°C 冻存保存。注射时取一管稀释至 0.5-6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 左右。针对不同的 morpholino，需摸索各自合适的浓度，以获得理想的表型而不产生毒性效应为宜。使用新的 morpholino 时，必须慎重考量该 morpholino 的有效性和



特异性。

第二步：显微注射针准备

在显微注射实验前，需使用拉针仪（图 5.3.2A）拉制一定数量，针尖大小以及针尖角度适合的注射针[25]。拉制好的针可以放置在 10 x 10 mm 培养皿中，内部用橡皮泥固定以防晃动（图 5.3.2B）。注射针最好提前一天准备，且不宜一次准备过多，避免长期存放使注射针沾染空气中的灰尘颗粒引起针尖阻塞。

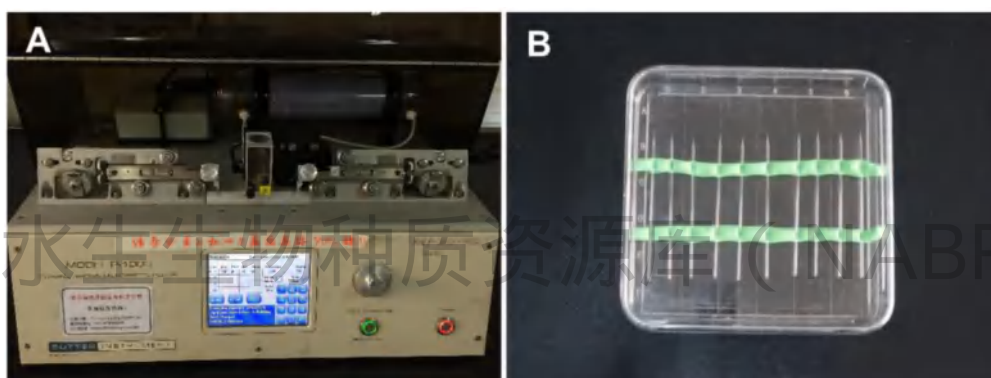


图 5.3.2 显微注射针准备。（A）拉针仪；（B）拉制好的注射针。

第三步：注射用平皿的制备

称取 1.5 g 琼脂糖粉末溶于 100 mL 去离子水中，微波炉加热至溶解，将约 15 mL 琼脂糖液倒入 90 mm 培养皿中。待其稍凉至手可触摸但尚未开始凝固后，将平皿制备模具缓慢倒扣于琼脂糖液面上。待其完全凝固后，先用尖镊子或刀片沿着模具四边划一下，然后从其一侧短边向上拔出模具，即得到显微注射用平皿（图 5.3.3A）。

第四步：胚胎准备

1. 配鱼。注射前一天，将成年雌、雄鱼按照 1:1 或 2:1 的比例放置于配种缸中，用隔板隔开，盖好盖子。将配种缸放置在平时养殖鱼房台面上，让斑马鱼保持正常作息。

2. 亲鱼产卵。进行显微注射实验的早上，抽去配种缸中的隔板，雌、雄鱼接触，一般在十分钟左右开始交配产卵。在具体实验中，可以先抽取 2 缸鱼的隔板，使其接触产卵，随后根据实验进度再适时抽取其它缸的隔板，以保证所收集的鱼卵都处于发育早期。在抽取隔板前，可先将内缸连同亲鱼置换到另一盛有干净养殖水的外缸中，以促进亲鱼产卵并节省清洁胚胎的时间。

3. 收集受精卵。亲鱼产卵后，用鱼卵捞网收集鱼卵，应尽量收集受精 20 分钟内的鱼卵，即对于同一缸亲鱼，两次收集鱼卵的时间间隔不得超过 20 分钟，以保证显微注



射的目标胚胎都处于接近的发育阶段，并在胚胎 4 细胞期前完成注射。将鱼卵倒入装有养殖水的培养皿中，吸走其中的杂质。然后用吸管将鱼卵排列到显微注射皿的凹槽中，清除胚胎周围多余的养殖水就可以用于注射了（图 5.3.3A）。

4. 注射用胚胎的发育阶段控制。胚胎在受精后 1 至 2 分钟内卵膜将膨胀，之后 10 分钟动物极膨起，细胞形态变得较为规整，此时可以开始注射。受精后 45 分钟左右（标准培育温度 28.5℃ 下所需时间，可因实验时室温情况有所不同）发生第一次卵裂，受精后 1 小时发生第二次细胞分裂达到 4 细胞期。样品通常在 1 至 4 细胞时期内进行注射。

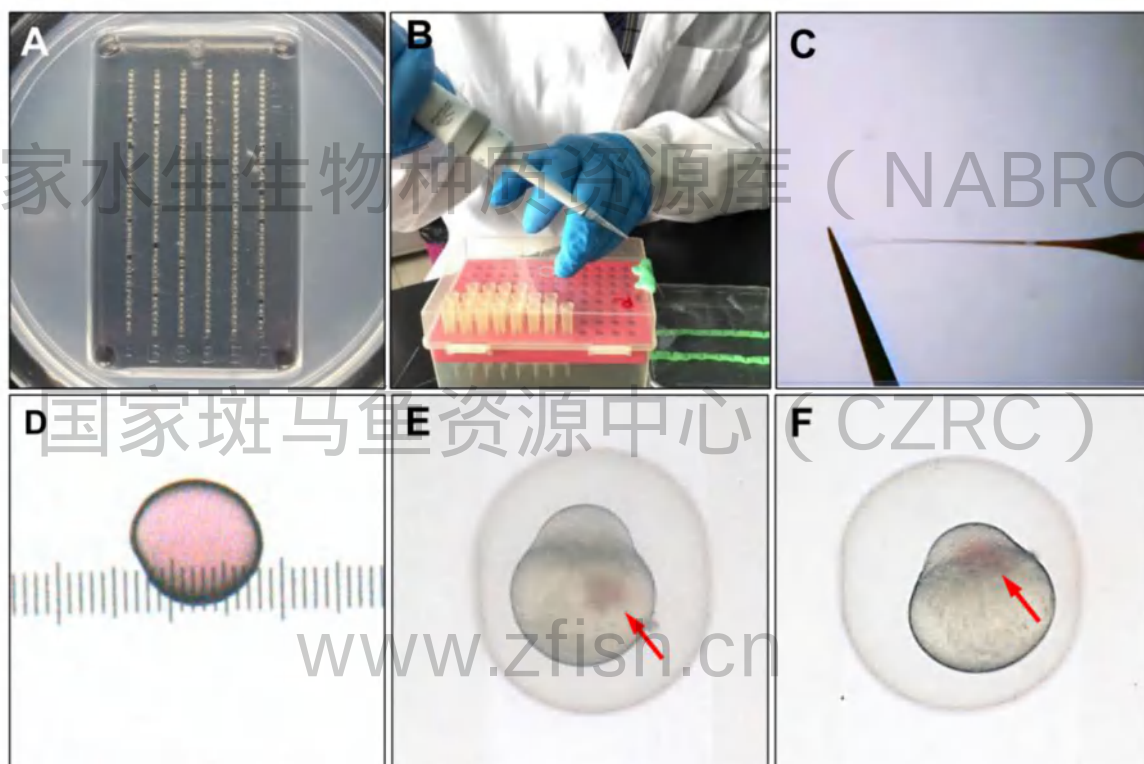


图 5.3.3 斑马鱼胚胎显微注射操作。（A）待注射的胚胎排列在注射用培养皿凹槽中；（B）装针上样；（C）显微镜下的破针操作；（D）通过将液滴注入放在台微尺上的矿物油中测量注射样品体积；（E）样品注射入卵黄；（F）样品注射入动物极；红色箭头指出酚红标记样品的情况。

第五步：斑马鱼胚胎显微注射

1. 开启显微注射仪。首先打开氮气罐总阀，调节压力至 0-0.5 MPa 之间。之后打开显微注射仪开关，调节主操作面板上的注射压力值到 15-20 psi 之间，调节脉冲时间至 40-50ms 之间，调节负压面板上的压力值到 0.5 psi 左右避免注射时回吸和样品外流。之后在实验过程中，还需根据破针的大小进行微调，直至合适的注射压力和脉冲时间。不同厂家的显微注射仪显示方式和设置会略有不同，一般来讲斑马鱼胚胎显微注射注射压力控制在 15-25 psi 之间，脉冲时间在 30-60 ms 之间。





2. 上样装针。将拉制好的注射针用橡皮泥竖直固定，然后吸取 1 至 3 μL 显微注射样品，逐滴地将注射样品滴在注射针顶端，在注射针内芯引导下，样品通过虹吸作用将汇聚于玻璃管针头部分（图 5.3.3B）。

3. 破针。将上好样品的注射针插入持针器中固定，然后在体视镜最高放大倍率下，用尖头镊子将注射针的前端夹断（图 5.3.3C）。破针的步骤需配合下面的剂量调整逐渐进行，注射针尖太细则很难刺破卵膜，注射针尖太粗则会给胚胎造成比较大损伤。

4. 注射剂量调整。将台微尺放置到体视显微镜下，其上滴一滴矿物油，将注射针小心地伸入矿物油中，踩动踏板压将一滴注射液送到矿物油中，并在油中形成比较完美的球型。通过观察台微尺显示的液滴直径，推算注射样品的体积大小（表 5.3.1）。注射体积与针尖大小、注射压力、脉冲时间、溶液粘度和外部压力有关，理想的注射剂量为胚胎体积的 10%，一般为 1 nL，因此液滴直径要控制在 0.1 至 0.15 mm 之间。注射剂量应控制在 1.8 nL 以内，注射剂量过大体积会损伤胚胎，过小可能影响定量精确度和扩散的均匀程度（图 5.3.3D）。

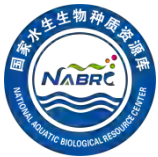
表 5.3.1 显微注射台尺标准

液滴直径	注射剂量
0.125 mm	1 nL
0.15 mm	1.76 nL
0.16 mm	2.15 nL

5. 注射。将待注射的胚胎放置到体视显微镜下，用低倍物镜对准胚胎调焦，调节操作器轻轻的落下针尖，将注射针尖推入视野中心，通过显微操纵器的微调调整注射针位置，直到清晰见到针尖为止。进一步调整显微镜焦距和注射针及胚胎的位置，使胚胎和注射针尖均达到最佳清晰程度。对于不同的样品，显微注射的操作要求各有不同。注射 mRNA 或 Morpholino 样品，应把样品注射到动物极下方的卵黄区域内；注射 DNA 样品，则常常需要注射针穿过卵黄，把样品注射到动物极内。

①卵黄注射：卵黄注射是将样品注射到卵黄中，细胞质的流动和扩散会将注射样品带入到动物极（图 5.3.3E）。推动操纵器，小心进针，使注射针针尖穿过卵壳和卵黄膜进入卵黄，迅速踩动脚踏开关将样品注入胚胎，然后将针拔出。由于在注射样品中加入了酚红，所以可以看到样品在胚胎中扩散流动。通过卵黄注射相对比较容易，胚胎存活率高，但是样品需要时间扩散到细胞质中。





② 动物极注射。由于动物极的膜相对比卵黄膜结构更加严谨，直接注射动物极会造成胚胎极大的损伤，所以首先调整胚胎的朝向，使胚胎的动物极朝向平皿底部。然后从卵黄处进针，穿过卵黄到达动物极，将注射样品直接注射到动物极中，这个操作过程需要平稳，避免晃动（图 5.3.3F）。动物极注射需要正确的胚胎定位和注射技术，相对耗时较长，胚胎死亡率也比注射入卵黄高，但是 DNA 样品需注射入动物极才能高效率发挥作用。

第六步：注射胚胎的培养和观察

1. 胚胎养殖。注射结束后，用滴管吸取养殖水将胚胎冲洗至 90mm 平皿内，置入 28.5℃ 培养箱培养。待胚胎发育 3 至 6 小时后，在显微镜下挑出未受精的鱼卵（一直处于 1 细胞期或者只发生假分裂）、死亡的胚胎（内部呈现白色絮状）和发育畸形胚胎（视情况而定，取决于注射样品）。为保证养殖系统的健康，挑拣出来的胚胎用胚胎消毒液消毒 2 次，再用胚胎养殖水冲洗干净。消毒后的胚胎放置于含 0.5 mg/L 亚甲基蓝的胚胎养殖水中，并放置于 28.5℃ 恒温培养箱内静水养殖，每日换水。

2. 胚胎观察。通过向 1 至 4 细胞期的斑马鱼胚胎中注射不同的 DNA、RNA 以及 morpholino 等样品，可以实现基因突变或转基因品系的构建、短时间过表达目的蛋白或敲降目标基因表达等目的。对于不同的样品，可根据实际情况和预期的表型，选择基因型鉴定与表型观察的时间。现分别以注射质粒 DNA pT2(tpma:eGFP-UTRglobin) 和 *chordin* 基因 morpholino 为例，介绍显微注射的结果和胚胎荧光及表型观察。

为了便于观察显微注射的结果，首先对胚胎进行麻醉和固定。通常将发育至 1dpf (day post fertilization) 的斑马鱼胚胎脱膜后，浸泡于 0.016% 的 Tricaine 中进行麻醉。麻醉剂可以使鱼类代谢减缓，减少对氧的需求量，从而方便进行实验操作。待胚胎麻醉后，将胚胎小心地嵌入 4% 的甲基纤维素中，固定位置避免移动，用毛细针将胚胎小心地调整到合适观察的位置。

质粒 pT2(tpma:eGFP-UTRglobin) 是通过肌肉特异性启动子 *tpma* 激活 eGFP 蛋白表达 [26]。注射质粒后，胚胎发育至 1dpf 时可以在肌肉组织中看到特异表达绿色荧光蛋白（图 5.3.4A）。



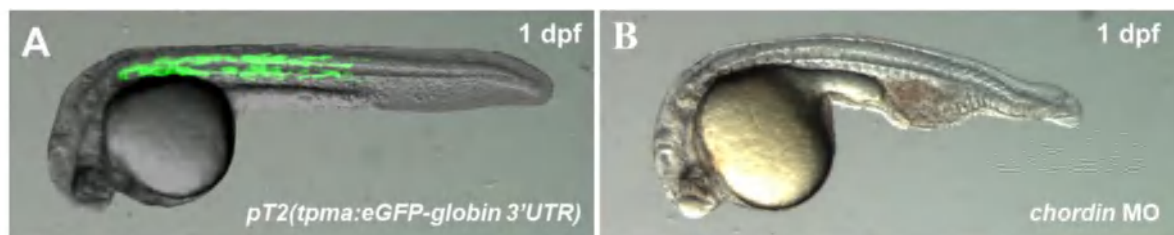


图 5.3.4 显微注射 1dpf 胚胎的示例. A. 注射质粒 pT2(tpma:eGFP-UTRglobin)后, 1dpf 的胚胎在肌肉细胞中特异表达绿色荧光蛋白; B. 注射 chordin morpholino 后, 1dpf 的胚胎产生典型的腹部化表型。

chordin 是骨形态发生素 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 的拮抗因子, 特异地表达于斑马鱼原肠胚的胚盾区域。在斑马鱼早期胚胎发育过程中, BMPs 的浓度和活性梯度直接影响斑马鱼背腹轴的发育, BMPs 整体活性过高将导致胚胎的腹部化[27]。注射 *chordin* morpholino 敲低 *chordin* 表达, 会造成 BMP 信号的过度增强, 胚胎就会发生腹部化, 具体表现为发育至 1dpf 的胚胎头部变小、血岛增大、腹侧尾鳍褶皱等 (图 5.3.4B)。

三、显微注射的注意事项

显微注射的操作过程中有许多细节影响实验的成功率, 需要特别关注, 否则容易造成实验失败, 主要包括以下几方面。

1. 注射针堵塞, 主要原因是注射样品有杂质。显微注射的样品种类繁多, 包括 mRNA、DNA 或蛋白质等, 但是注射样品中是否存在固体悬浮物等杂质是否纯净是关系到注射效率高低的重要因素之一。所有样品使用前需要先离心, 使可能存在的固体悬浮物沉淀到管底, 取上清液做注射样品, 避免堵住针头。如果发生堵塞, 通常可通过轻夹针尖、增大输出压力得以缓解。如果不能解决, 需更换新的注射针, 重新上样。

2. 注射样品量过大或过小, 主要是破针针尖准备过程操作不当造成的。进行显微注射时, 如何准备好针尖破针是显微注射成功和保证效率极其重要的因素。破针准备针尖时, 将注射针尖一点点剪断, 不宜一次剪太多。注射针尖如果太粗, 会导致样品流量过多, 且给受精卵造成过大的伤口, 易于裂解; 太细则导致针内样品流出速率过慢, 易堵塞针尖而使样品无法顺利流出, 且难以刺穿卵膜, 影响注射效率。

3. 调节注射节气压不当。主要表现在测量液滴大小的时候, 没有调控至合适的正压和负压。正压过大会导致脉冲结束后多余样品流入胚胎, 而负压过大会导致脉冲结束后样品甚至胚胎内容液被吸出来。正确的做法是在测量液滴大小的时候, 观察液滴的稳定





性。压力调节合适的时候，一个脉冲压力产生的液滴不会在脉冲结束后持续扩大或者在慢慢缩小，而是在脉冲结束后轻松脱离针尖，在矿物油内形成稳定不变的液滴。此外，在注射进行中如需对压力进行微调，压力调节不宜变化太快，否则会造成注射量难以控制，导致胚胎内环境改变过快过大甚至胀破细胞。

4. 显微注射后胚胎死亡率过高，有多种可能的原因。

a. 注射操作不熟练。注射完毕，慢慢抽出注射针，要一气呵成，避免受精卵内物质随着注射针抽出，造成受精卵的损伤及堵针。

b. 样品浓度过高也是胚胎死亡率高的一个常见因素。针对不同的样品初次注射时，可尝试不同的浓度梯度，摸索条件，找到适宜实验目的，且不产生过多毒性的注射样品浓度。

c. 后续养殖的不精细。注射后胚胎需要细心照顾，影响胚胎发育的外界因素主要有：水温（28.5℃恒温培养箱养殖）；水质（及时挑出死胚和杂质并每日换水）和养殖密度（对于直径为 90 mm 的培养皿，胚胎养殖密度以不高于 50 颗/皿为宜）。

本节附录：

1. 本次培训使用的材料与试剂

1. 台微尺（OPLINIC, P/N: 106012）
2. 0.1-2.5 μ L 移液器（Eppendorf, 3120000216）
3. 10 μ L 吸头（Axygen, T-300）
4. 注射玻璃针（WPI, TW100F-4）
5. 镊子（VETUS, SS-JP）
6. 90 mm 培养皿（海门，HC030）
7. 10 x10 mm 培养皿海门，HX-D12）
8. 橡皮泥（得力，7021）
9. 3 mL 塑料吸管（海泰，HC001）
10. 鱼卵捞网（上海海圣，HS019）
11. 显微注射用平皿制备模具（WPI, Z-MOLDS）
12. 无菌注射过滤器（Millipore, SLGP033RB）
13. 磁力搅拌器（梅颖浦，MYP11-2）





14. 甲基纤维素 M450 (康朗生物, KL-11268)

15. 酚红 (Sigma-Aldrich, P3532)

16. 矿物油 (Sigma-Aldrich, M8410)

17. Tricaine (Sigma, E10521)

18. 琼脂糖粉末 (BIOWESTE, 111860)

2. 本次培训使用的仪器设备的品牌及型号

1. 拉针仪 (NARISHIGE, P-1000)

2. 显微注射仪 (WPI, PV820)

3. 显微操纵器 (Märzhäuser Wetzlar, FP-MM)

4. 体视显微镜 (OLYMPUS, SZ61)

5. 恒温培养箱 (精宏, HWS-080)

3. 本次培训使用的溶液配方

1. 0.5% 酚红: 称取 0.5 g 酚红, 加去离子水 100 mL; 混合后放在磁力搅拌器上搅拌 30 分钟左右。酚红中如存在块状的, 需要先在纸上揉碎, 否则会造成溶解困难。充分溶解后, 使用 0.45 μm 无菌注射过滤器过滤。配制注射溶液时, 稀释酚红终浓度为 0.025-0.050%。

2. 麻醉剂 Tricaine 储液: 400 mg Tricaine 溶于 90 mL 去离子水中, 加入 2.1 mL Tris (1M, pH=9.0) 调节 pH 至 7.0, 定容至 100 mL, 4°C 短期储存, -20°C 长期储存。使用时, 将 4.2 mL Tricaine 储液稀释于 100 mL 去离子水中, 工作液要求现用现配。

3. 4% 的甲基纤维素溶液: 在容器内加入 50 mL 的去离子水, 并加热到 70°C。逐渐加入 3 g 甲基纤维素粉末 M450, 并不停的搅拌, 制备出热水淤浆。在热水淤浆中加水至 100 mL, 充分搅拌之后冷却, 4°C 保存。使用时, 需要先放置到 28°C 水浴中预热。





参考文献

- [1] Howe K, Clark M D, Torroja C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. *Nature*, 2013, 496 (7446): 498-503.
- [2] Lawson, Nathan D. Reverse Genetics in Zebrafish: Mutants, Morphants, and Moving Forward[J]. *Trends in Cell Biology*, 2016: 77-79.
- [3] Skromne I, Prince V E. Current perspectives in zebrafish reverse genetics: moving forward[J]. *Dev Dyn*, 2008, 237 (4): 861-82.
- [4] Sugano Y, Neuhauss S. Reverse genetics tools in zebrafish: A forward dive into endocrinology[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 188 (1): 303-308.
- [5] Wei C Y, Wang H P, Zhu Z Y, et al. Transcriptional factors smad1 and smad9 act redundantly to mediate zebrafish ventral specification downstream of smad5[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289 (10): 6604-18.
- [6] Urasaki A, Morvan G, Kawakami K. Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition[J]. *Genetics*, 2006, 174 (2): 639-49.
- [7] Asakawa K, Suster M L, Mizusawa K, et al. Genetic dissection of neural circuits by Tol2 transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105 (4): 1255-60.
- [8] Gupta P, Zhao X F, Prat C R, et al. Zebrafish transgenic lines co-expressing a hybrid Gal4 activator and eGFP in tissue-restricted patterns[J]. *Gene Expression Patterns*, 2011, 11 (8): 517-524.
- [9] Ni T T, et al. Conditional control of gene function by an invertible gene trap in zebrafish[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109 (38): 15389-15394.
- [10] Kawakami K, Takeda H, Kawakami N, et al. A Transposon-Mediated Gene Trap Approach Identifies Developmentally Regulated Genes in Zebrafish[J]. *Developmental Cell*, 2004, 7 (1): 133-144.
- [11] Davison J M, Akitake C M, Goll M G, et al. Transactivation from Gal4-VP16 transgenic insertions for tissue-specific cell labeling and ablation in zebrafish[J]. *Dev Biol*, 2007, 304 (2): 811-24.
- [12] Walhout, Albertha J M. GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes[J]. *Methods Enzymol*, 2000: 575-592.
- [13] Auer T O, Bene F D. CRISPR/Cas9 and TALEN-mediated knock-in approaches in zebrafish[J]. *Methods*, 2014, 69 (2): 142-150.
- [14] Kimura Y, Hisano Y, Kawahara A, et al. Efficient generation of knock-in transgenic zebrafish carrying reporter/driver genes by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 6545.
- [15] Rappaport A, Johnson L. Genetically engineered knock-in and conditional knock-in mouse models of cancer[J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2014, 2014 (9): 897-911.
- [16] Auer T O, Duroure K, De Cian A, et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair[J]. *Genome Res*, 2013.
- [17] Zu Y, Tong X, Wang Z, et al. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish[J]. *Nature Methods*, 2013, 10 (4): 329.
- [18] Auer T O, Duroure K, Cian A D, et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair[J]. *Genome Research*, 2014, 24 (1): 142.
- [19] Auer T O, Duroure K, Concordet J P, et al. CRISPR/Cas9-mediated conversion of eGFP- into Gal4-transgenic lines in zebrafish[J]. *Nat Protoc*, 2014, 9 (12): 2823-40.
- [20] Hisano Y, Sakuma T, Nakade S, et al. Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8841.





- [21] Li W, Zhang Y, Han B, et al. One-step efficient generation of dual-function conditional knockout and geno-tagging alleles in zebrafish[J]. *Elife*, 2019, 8.
- [22] Rosen J N, Sweeney M F, Mably J D. Microinjection of Zebrafish Embryos to Analyze Gene Function[J]. *Journal of Visualized Experiments Jove*, 2009, 9 (25).
- [23] Yuan S, Sun Z. Microinjection of mRNA and Morpholino Antisense Oligonucleotides in Zebrafish Embryos[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2009, 7 (27).
- [24] Holder N, Xu Q. Microinjection of DNA, RNA, and protein into the fertilized zebrafish egg for analysis of gene function[J]. *Methods Mol Biol*, 1999, 97: 487-490.
- [25] Zhao Y, Sun H, Sha X, et al. A Review of Automated Microinjection of Zebrafish Embryos[J]. *Micromachines*, 2018, 10 (1).
- [26] Pang S C, Wang H P, Zhu Z Y, et al. Transcriptional Activity and DNA Methylation Dynamics of the Gal4/UAS System in Zebrafish[J]. *MARINE BIOTECHNOLOGY*, 2015, 17 (5): 593-603.
- [27] Kishimoto Y, Lee K H, Zon L, et al. The molecular nature of zebrafish swirl: BMP2 function is essential during early dorsoventral patterning[J]. *Development*, 1997, 124 (22): 4457-66.

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

www.zfish.cn

