

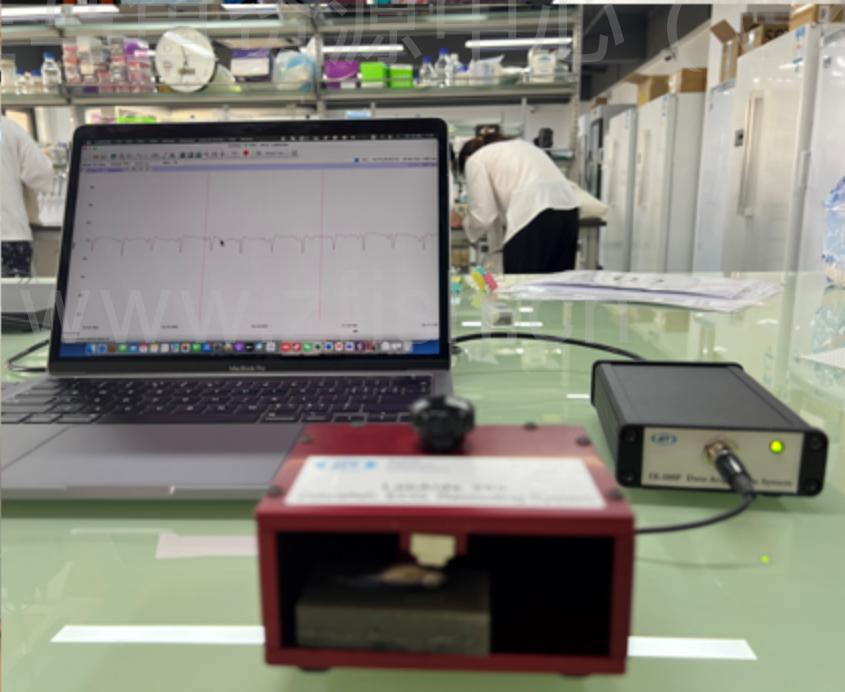
# 第二十一期全国斑马鱼技术培训



- 讲座一：模式动物斑马鱼概论
- 讲座二：斑马鱼的养殖与繁育
- 讲座三：斑马鱼鱼房和养殖系统的建设与维护
- 讲座四：斑马鱼常见鱼病和鱼房健康管理
- 讲座五：斑马鱼常用研究资源介绍
- 讲座六：斑马鱼原位杂交技术
- 讲座六：斑马鱼突变构建和突变鉴定技术
- 讲座七：斑马鱼胚胎显微注射及转基因研究概述
- 讲座八：斑马鱼中基于PGC移植的突变构建技术
- 讲座九：斑马鱼转基因构建技术
- 讲座十：斑马鱼基因敲入技术

The screenshot shows the homepage of the China Zebrafish Resource Center (CZRC). At the top right, there are language options (Chinese | English), user login fields (用户名, 密码, 验证码, 登录, 密码找回, 注册), and a search bar. The main navigation menu includes: 国家斑马鱼资源中心 (National Zebrafish Resource Center), 资源与订购 (Resources and Ordering), 技术服务 (Technical Services), 资源提交 (Resource Submission), ZK0品系 (ZK0 Strain), 信息浏览 (Information Browsing), and 联系我们 (Contact Us). A large image of a group photo of many people is displayed below the menu. On the right side, there is a sidebar with a blue header "资源推荐" (Resource Recommendation) containing links to various documents. One link, "技术资料" (Technical Materials), is highlighted with a red box. Below the sidebar, there is a section titled "公告" (Announcement) with several news items.

公告标题	发布日期
关于营利性机构购买野生型品系须知	2022-10-08
第十八期全国斑马鱼技术培训(在线)会议通知	2022-10-08
“飞鱼论坛”第十期：浙江大学陈才勇教授-血红素代谢	2022-09-23
科普与动态	



# 讲座一：模式动物斑马鱼概论

国家水生生物种质资源库（NABRC

国家斑马鱼资源中心（CZRC）

潘鲁湲

www.zfish.cn

国家水生生物种质资源库

国家斑马鱼资源中心

luyuanpan@ihb.ac.cn

# 本讲大纲



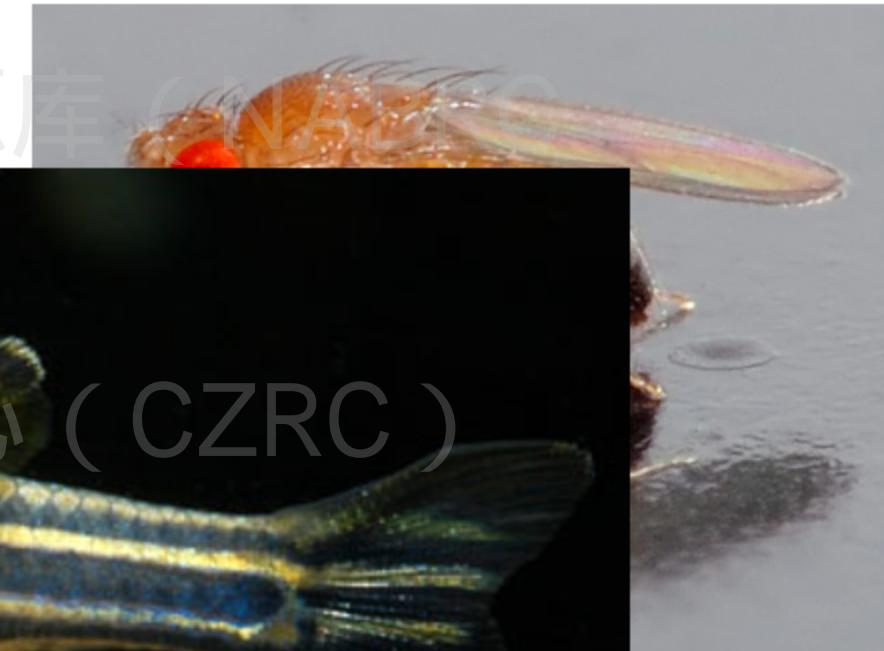
- 模式生物斑马鱼的概况
- 斑马鱼的研究历史
- 斑马鱼胚胎早期发育
- 斑马鱼研究应用

# 本讲大纲



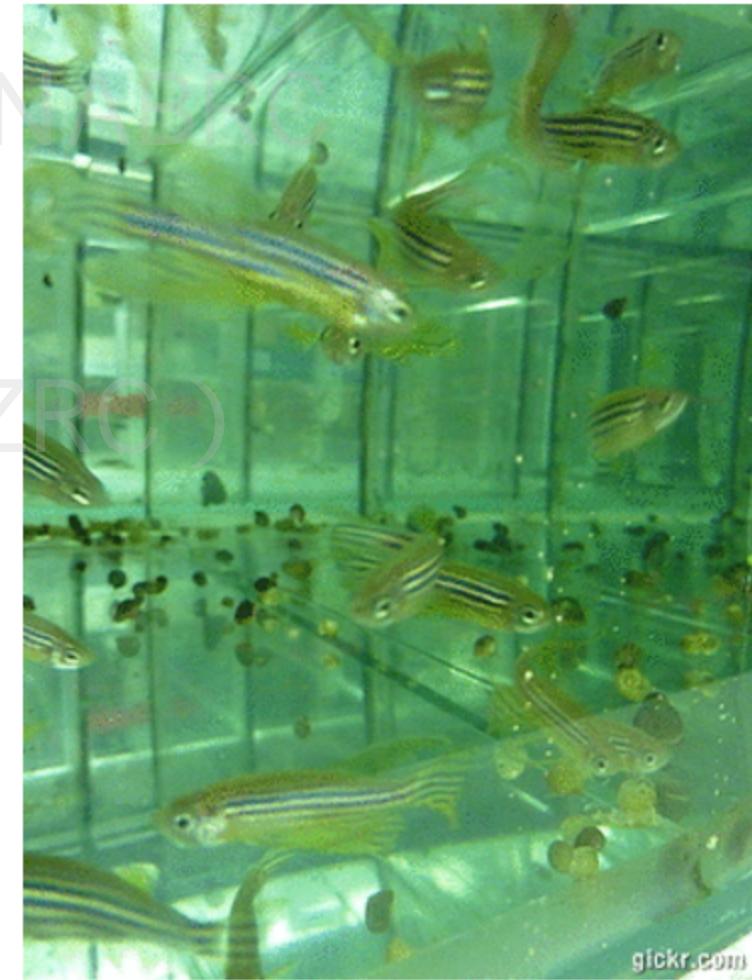
- 模式生物斑马鱼的概况
- 斑马鱼的研究历史
- 斑马鱼胚胎早期发育
- 斑马鱼研究应用 [www.zfish.cn](http://www.zfish.cn)

# 模式生物：发现生物学的普遍规律



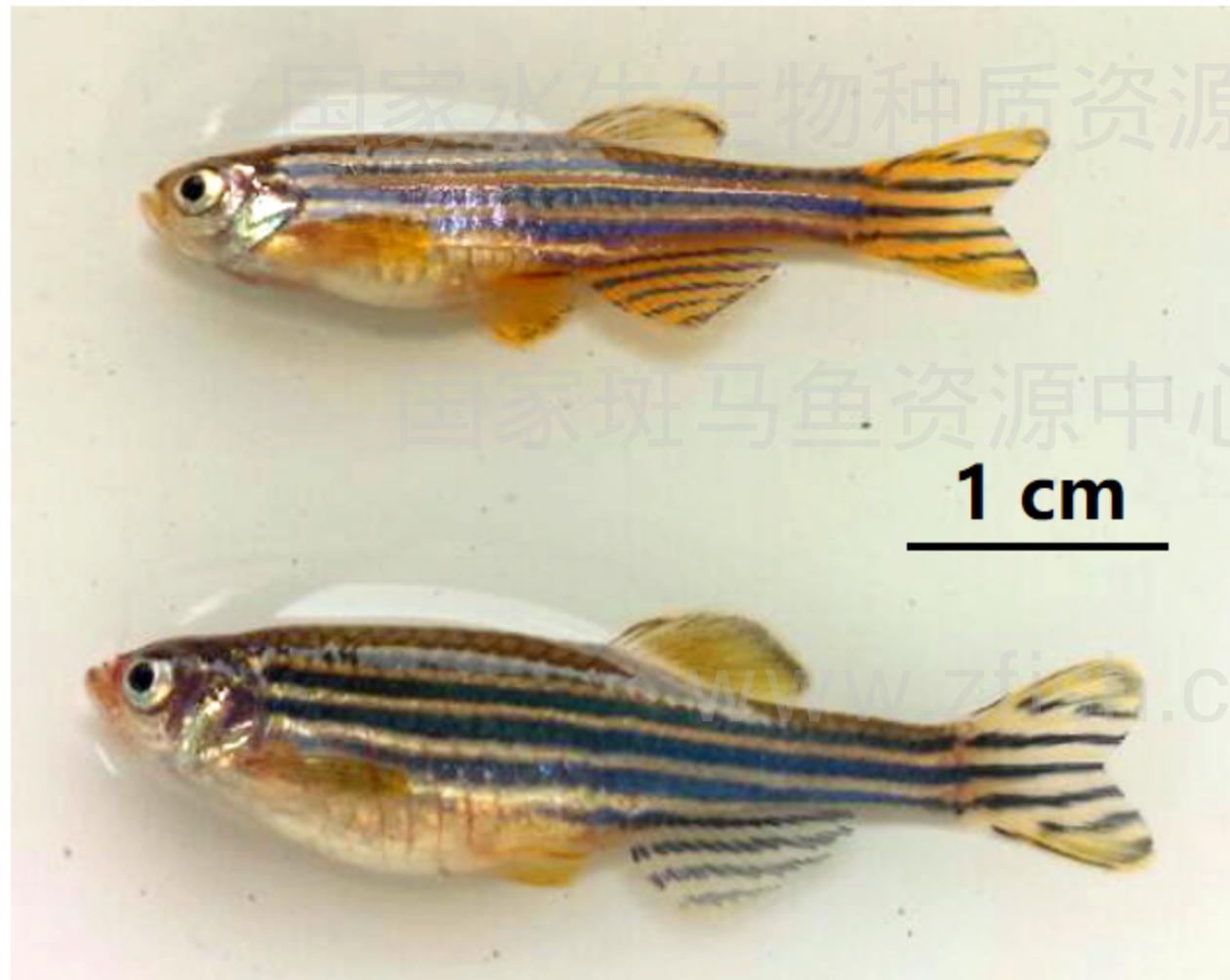
# 斑马鱼：小型热带淡水鱼

- Zebrafish (英文) ; *Danio rerio* (拉丁文)
- 原产于印度半岛的淡水水域，溪流、池塘、沼泽、稻田
- 体长3-5厘米，背部有蓝色条纹
- 自然寿命>5年；实验室养殖：~2年



Lee et al., 2020

# 斑马鱼雌雄鱼外观



## 雄鱼：

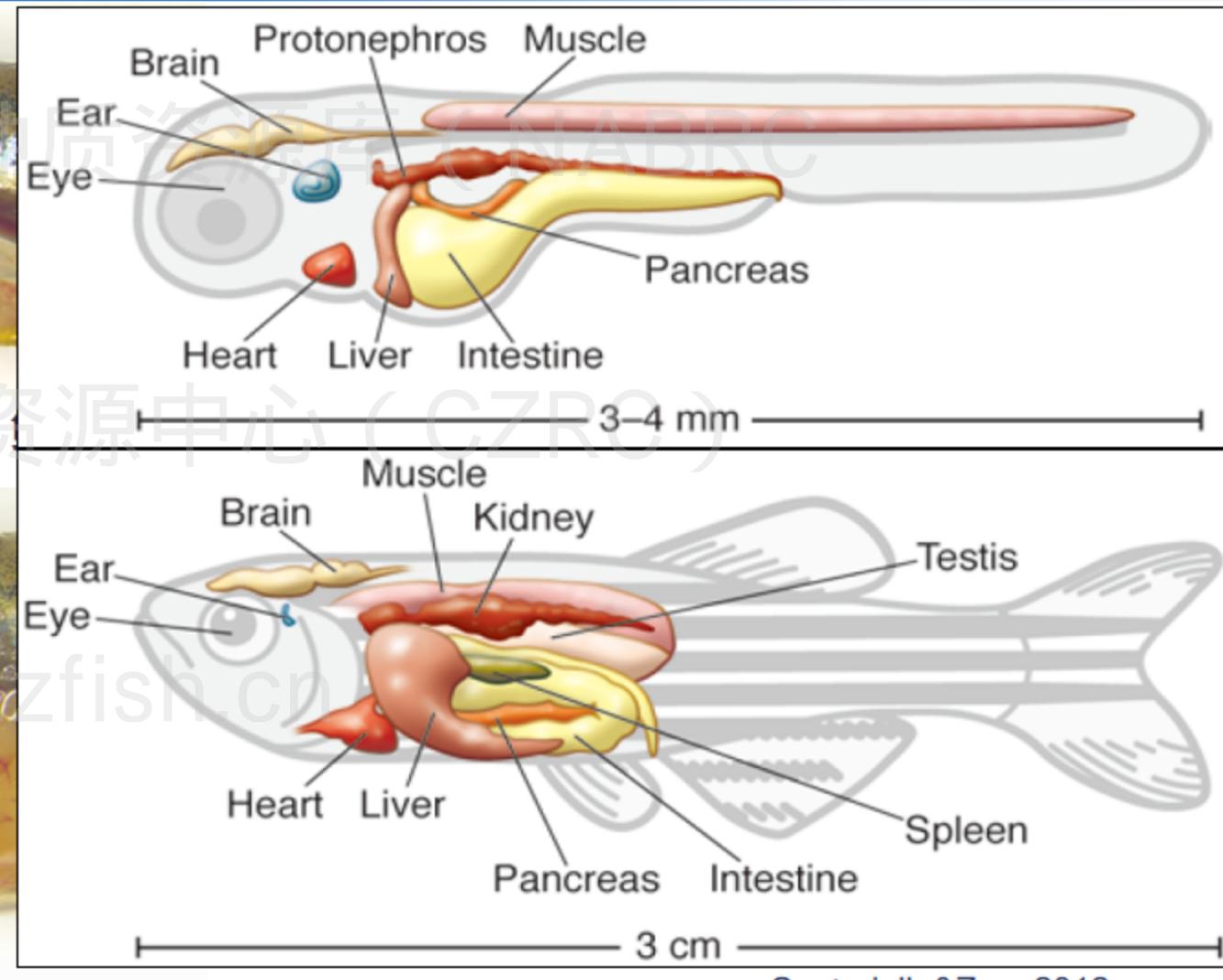
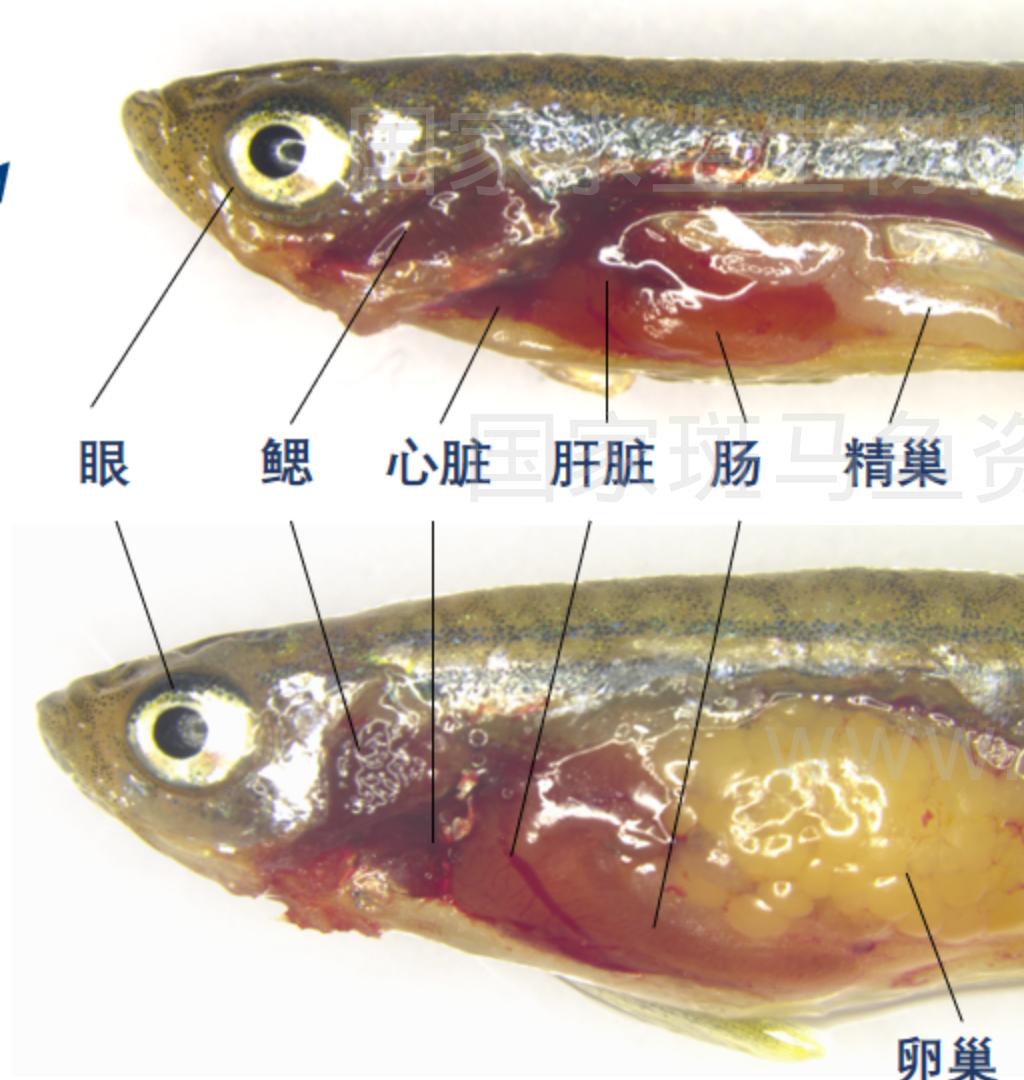
体型修长，腹部扁平  
体色为柠檬色

## 雌鱼：

体型丰满，腹部膨大、银亮  
体色银灰

# 斑马鱼组织器官发育

♂



Santoriello&Zon, 2012

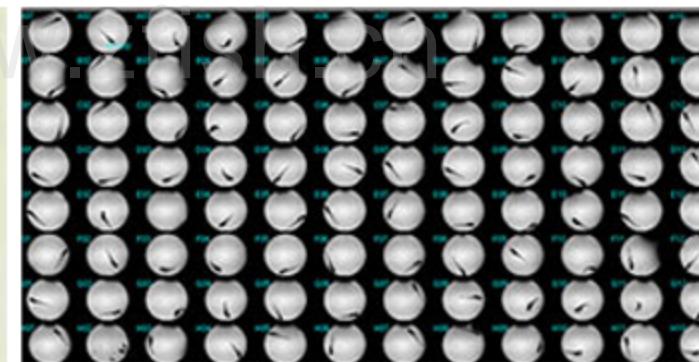
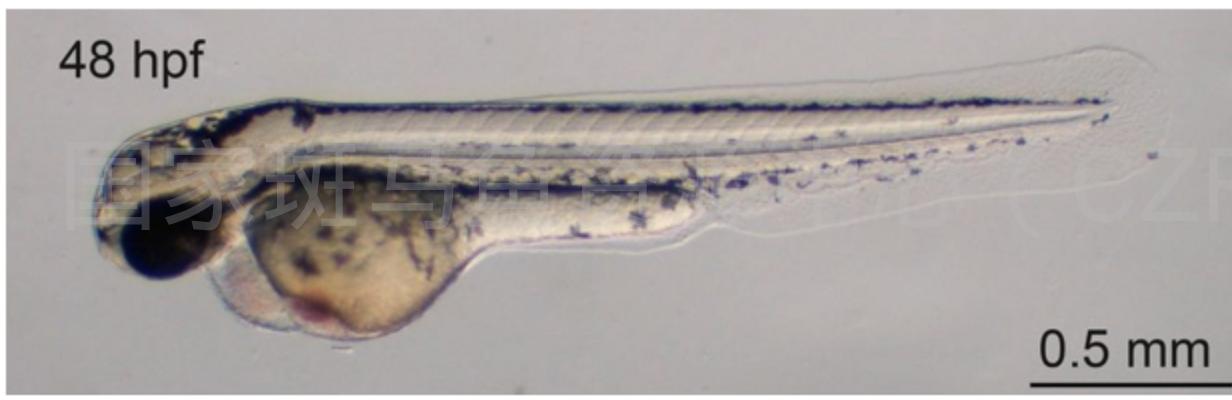
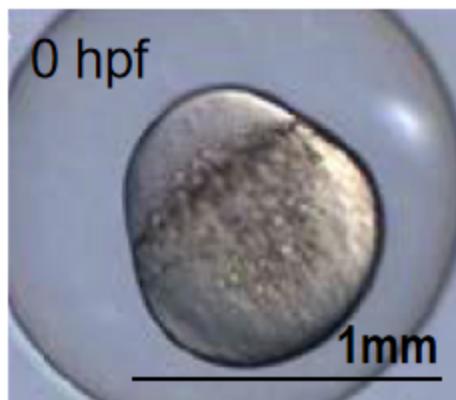
# 斑马鱼的生物学特性及优势



- 体型小 (成鱼3-5厘米、养殖密度5尾/L、占用空间小)
- 易于养殖 (低成本、低硬件门槛、高样品数)
- 发育快 (24hpf完成早期发育、3个月可性成熟)
- 四季产卵、产卵量大 (>200枚/对，每周可交配产卵，实验方便)
- 体外受精、体外发育 (易于实现多样的实验操作)
- 胚胎透明 (易于操作，易于进行活体观察)
- 与人类基因组同源性高 (利于建立各类人类疾病模型)

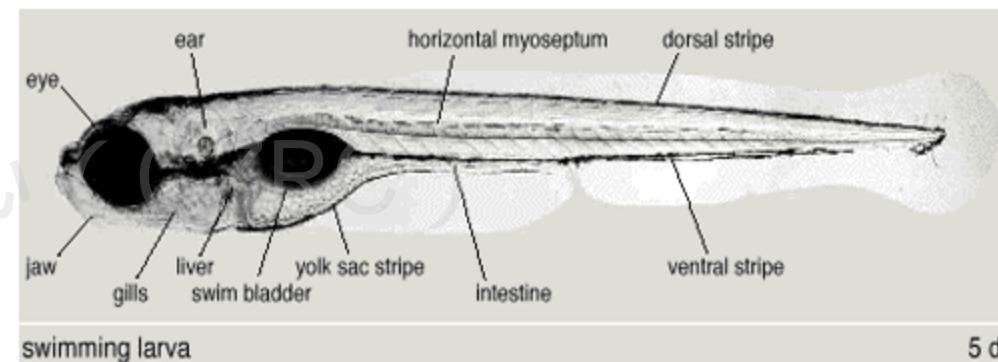
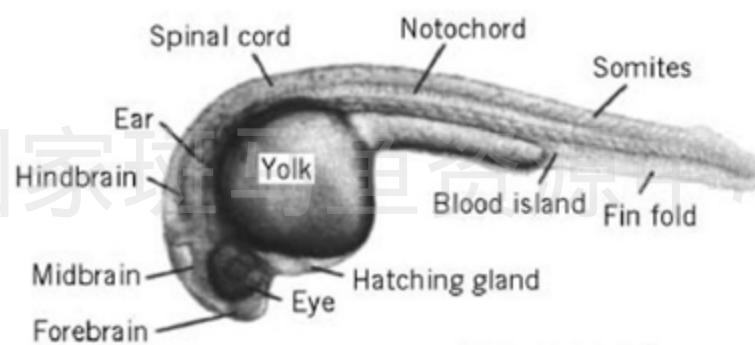
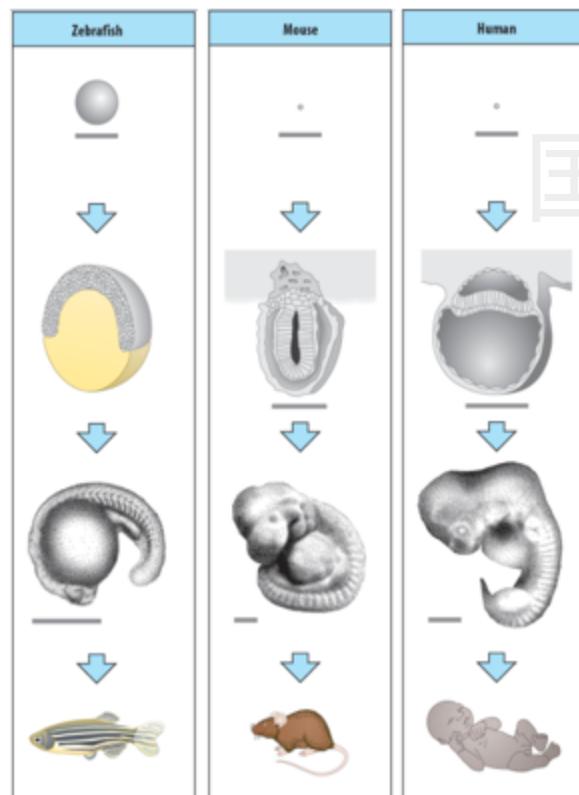
# 斑马鱼的生物学特性及优势

- 体型小（成鱼2-5厘米、养殖密度10条/L、占用空间小）
- 易于养殖（低成本、低硬件门槛、高样品数）



# 斑马鱼的生物学特性及优势

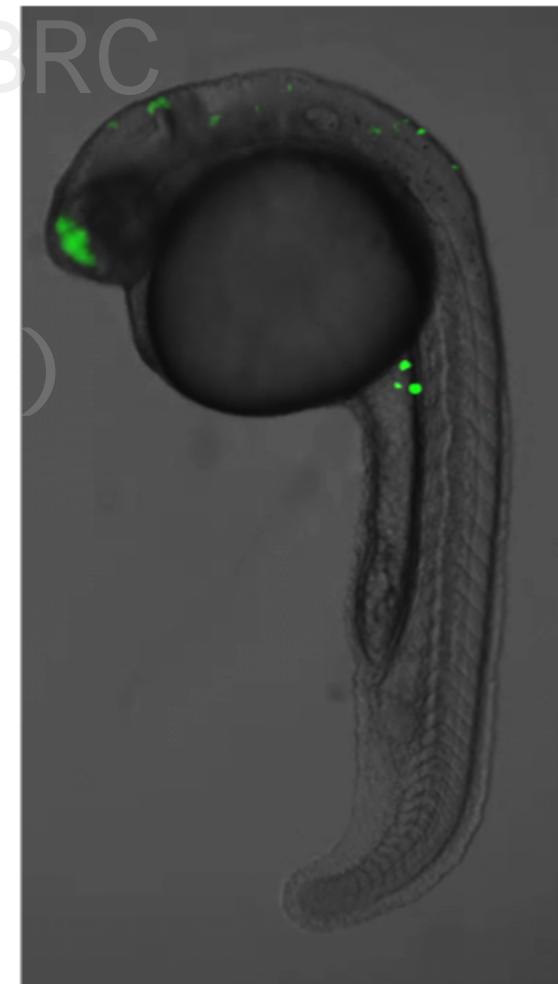
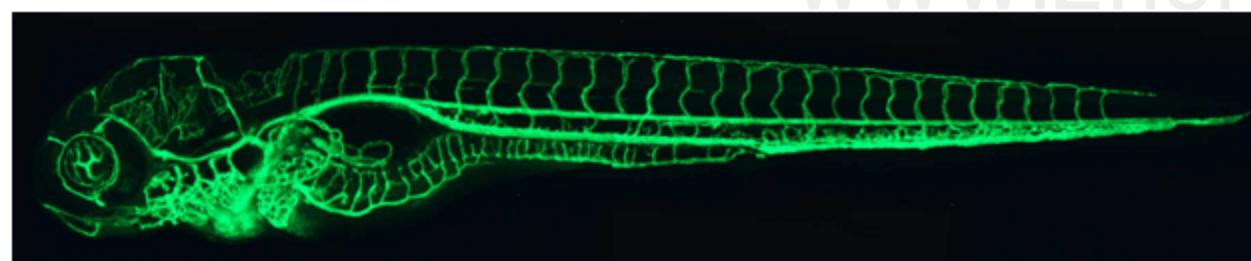
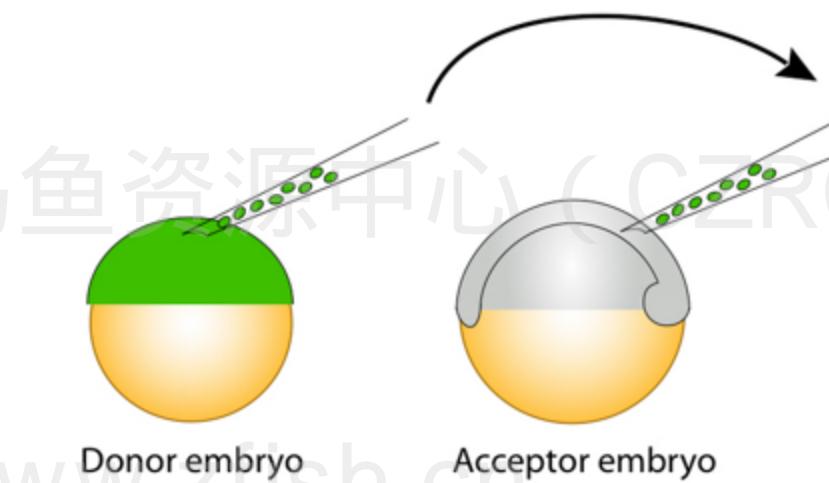
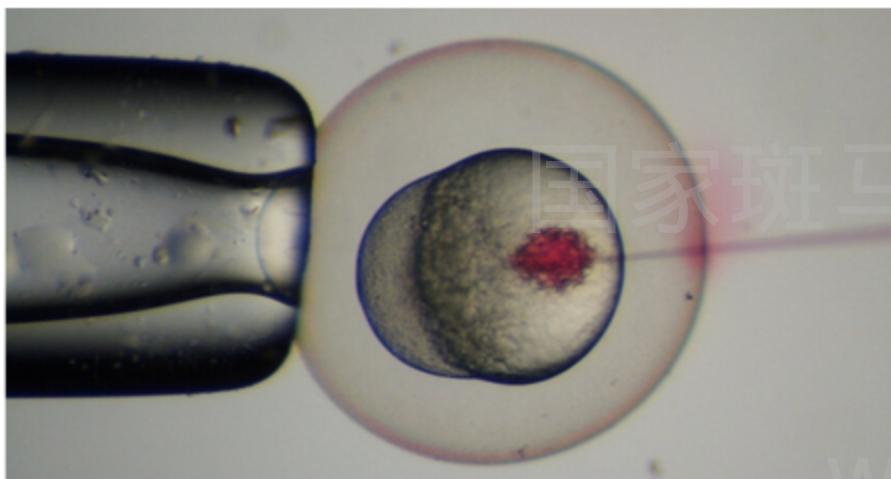
- 发育快 (24hpf完成早期发育、3个月可性成熟)
- 四季产卵、产卵量大 (>200枚/对，每周可交配产卵，实验方便)



Andersson et al, 2012

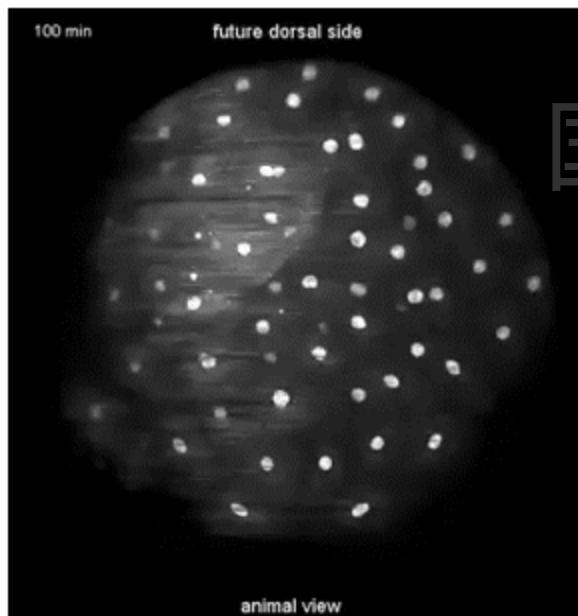
# 斑马鱼的生物学特性及优势

- 体外受精、体外发育（易于实现多样的实验操作）
- 胚胎透明（易于操作，易于进行活体观察）

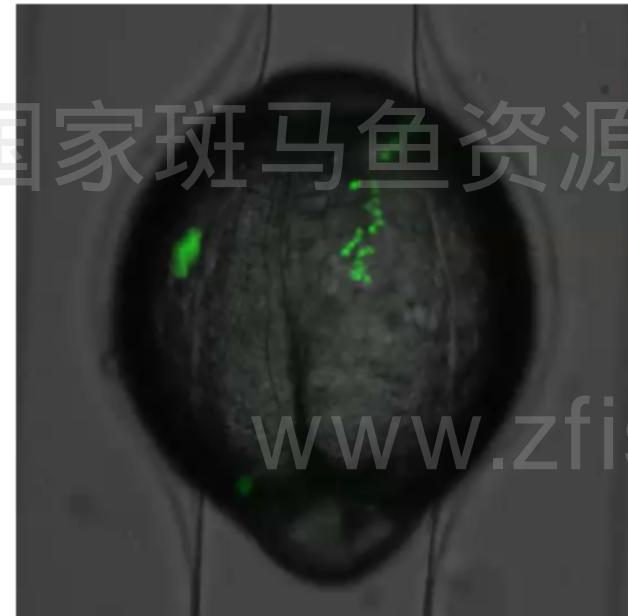


# 斑马鱼的生物学特性及优势

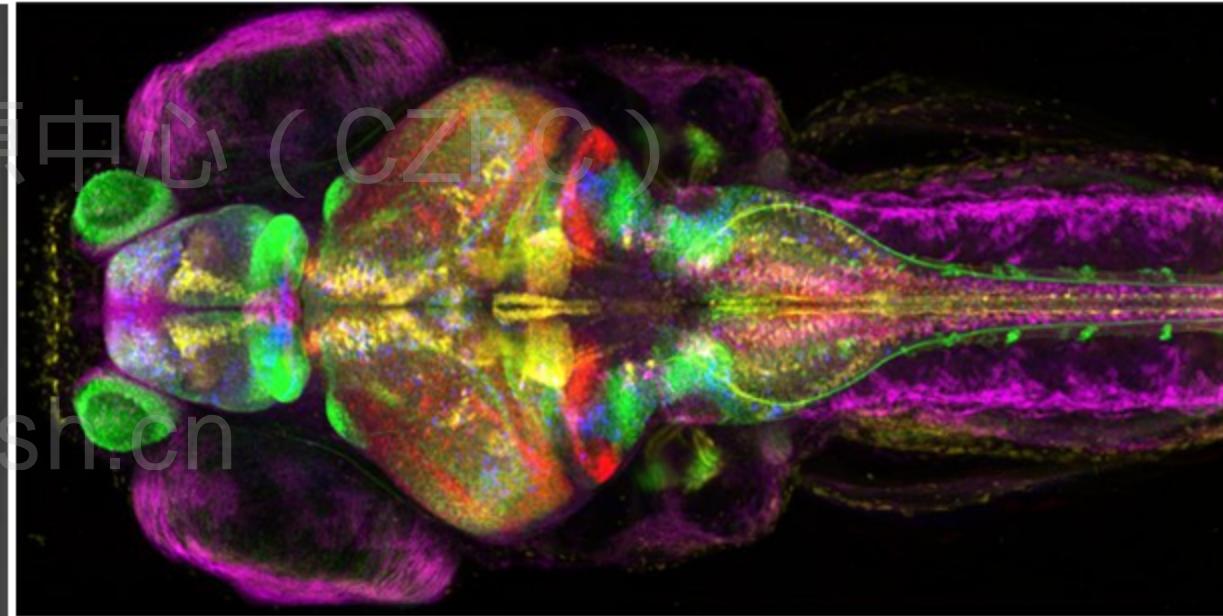
- 体外受精、体外发育（易于实现多样的实验操作）
- 胚胎透明（易于操作，易于进行活体观察）



Kelly et al., 2008



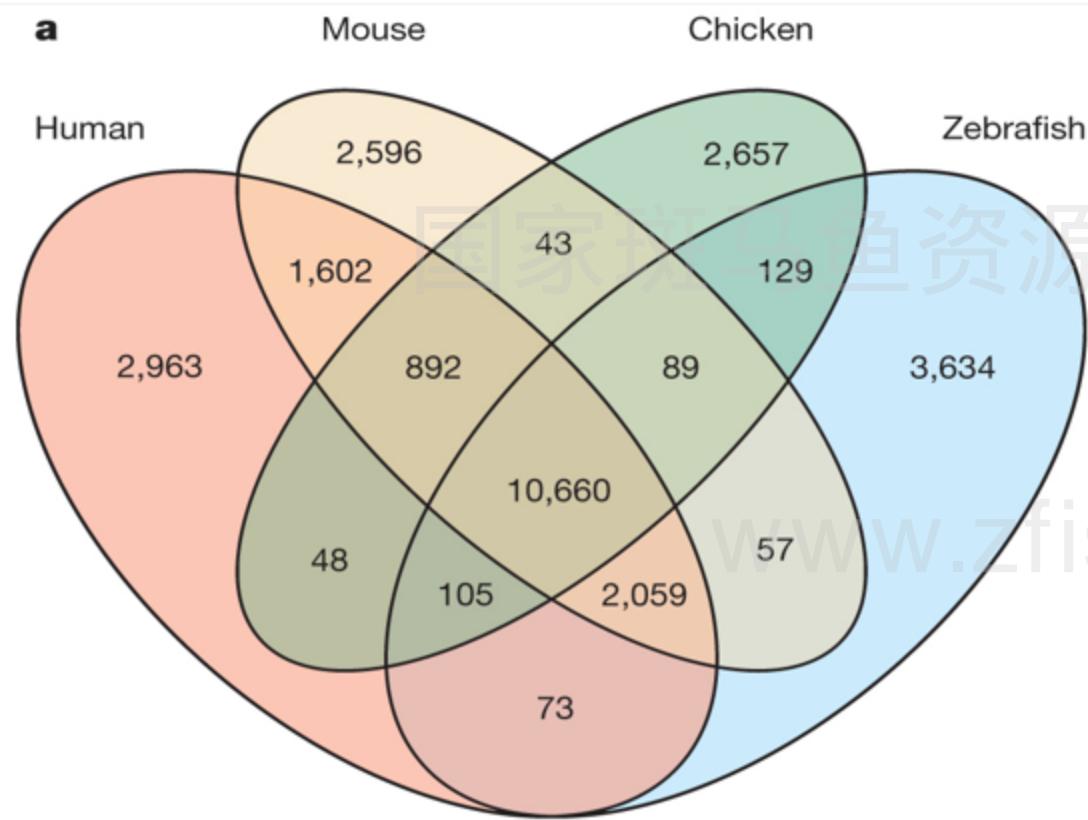
Ye et al., 2019



中科院脑科学与智能技术卓越创新中心，未发表成果

# 斑马鱼的生物学特性及优势

- 与人类基因组同源性高 (利于建立各类人类疾病模型)



- 鸡+人类: 11705
- 斑马鱼+人类: 12897
- 小鼠+人类: 15213

Howe et al, 2013

# 斑马鱼的基因组

LETTER

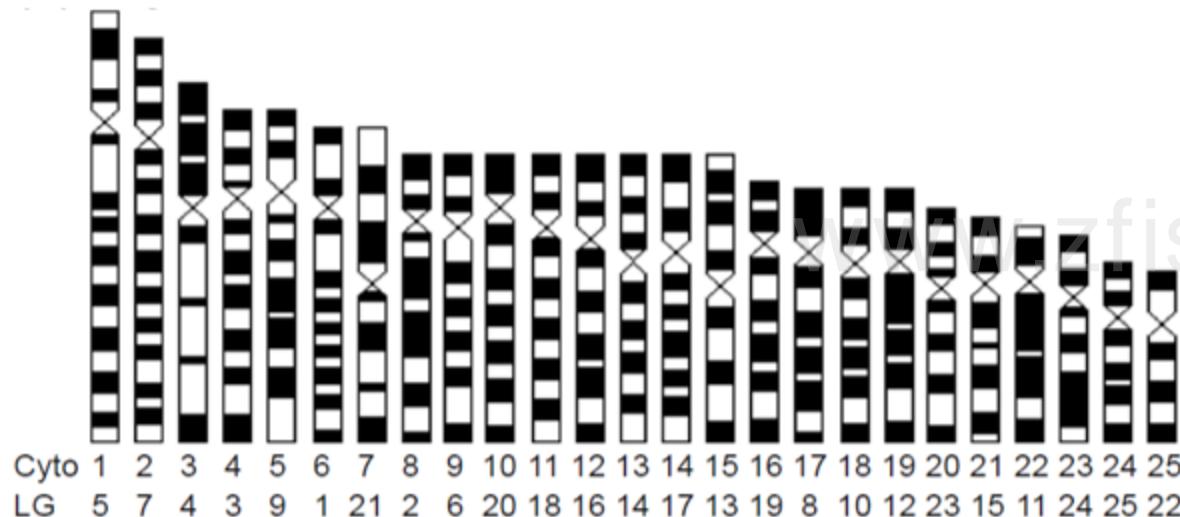
国家水生生物种质资源库 (NABRC)

OPEN

doi:10.1038/nature12111

## The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome

Kerstin Howe<sup>1\*</sup>, Matthew D. Clark<sup>1,2\*</sup>, Carlos F. Torroja<sup>1,3</sup>, James Torrance<sup>1</sup>, Camille Berthelot<sup>4,5,6</sup>, Matthieu Muffato<sup>7</sup>, John E. Collins<sup>1</sup>, Sean Humphray<sup>1,8</sup>, Karen McLaren<sup>1</sup>, Lucy Matthews<sup>1</sup>, Stuart McLaren<sup>1</sup>, Ian Sealy<sup>1</sup>, Mario Caccamo<sup>2</sup>, Carol Churcher<sup>1</sup>, Carol Scott<sup>1</sup>, Jeffrey C. Barrett<sup>1</sup>, Romke Koch<sup>9</sup>, Gerd-Jörg Rauch<sup>10</sup>, Simon White<sup>1</sup>, William Chow<sup>1</sup>, Britt Kilian<sup>1</sup>, Leonor T. Quintais<sup>7</sup>, José A. Guerra-Assunção<sup>7</sup>, Yi Zhou<sup>11</sup>, Yong Gu<sup>1</sup>, Jennifer Yen<sup>1</sup>, Jan-Hinnerk Vogel<sup>1</sup>, Tina Eyre<sup>1</sup>,  
Costa Dardoufa et al., Daniel Domínguez, Hervé Guiguen, Chil Dujon, Paul Chintapalli, Jennifer Coughlin, Constance F. Morrison, Constança V. Lopes, David Llorente



- 始于2001年，2010年公布zv9
- 现版本为GRCz11 (2018)
- 基因组大小: 1.41Gb
- 富含SNP: ~7,000,000 SNP

<b>Coding genes</b>	25,592
<b>Non coding genes</b>	6,599
Small non coding genes	3,227
Long non coding genes	3,278
Misc non coding genes	94
<b>Pseudogenes</b>	315
<b>Gene transcripts</b>	59,876

# 与人类基因组同源性高

Table 2 | Comparison of human and zebrafish protein-coding genes and their orthology relationships

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	1:1.28
Unique	5,856	-	8,177	-
Coding-gene total	20,479	-	26,206	-

- TGD: Teleost Genome Duplication
- 20-25% genes retained in duplicate

- 71%的人类基因在斑马鱼基因组中有同源基因
- 69%的斑马鱼基因在人类基因组中有同源基因
- OMIM数据库中，人类疾病相关基因82%都可以在斑马鱼基因组中找到同源基因

# 本讲大纲

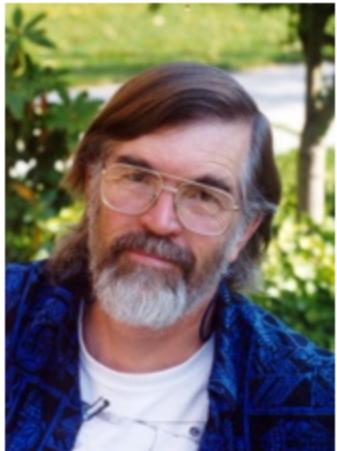


- 模式生物斑马鱼的概貌
- 斑马鱼的研究历史
- 斑马鱼胚胎早期发育
- 斑马鱼研究应用 [www.zfish.cn](http://www.zfish.cn)

# 1970-1990：脊椎动物胚胎发育研究



George Streisinger



Charles Kimmel

## 美国俄勒冈大学生物系

Nature Vol. 291 28 May 1981

293

### Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*)

George Streisinger, Charline Walker, Nancy Dower, Donna Knauber & Fred Singer

Institute of Molecular Biology, University of Oregon, Eugene, Oregon 97403, USA

*Homozygous diploid zebra fish have been produced on a large scale by the application of simple physical treatments. Clones of homozygous fish have been produced from individual homozygotes. These clones and associated genetic methods will facilitate genetic analyses of this vertebrate.*

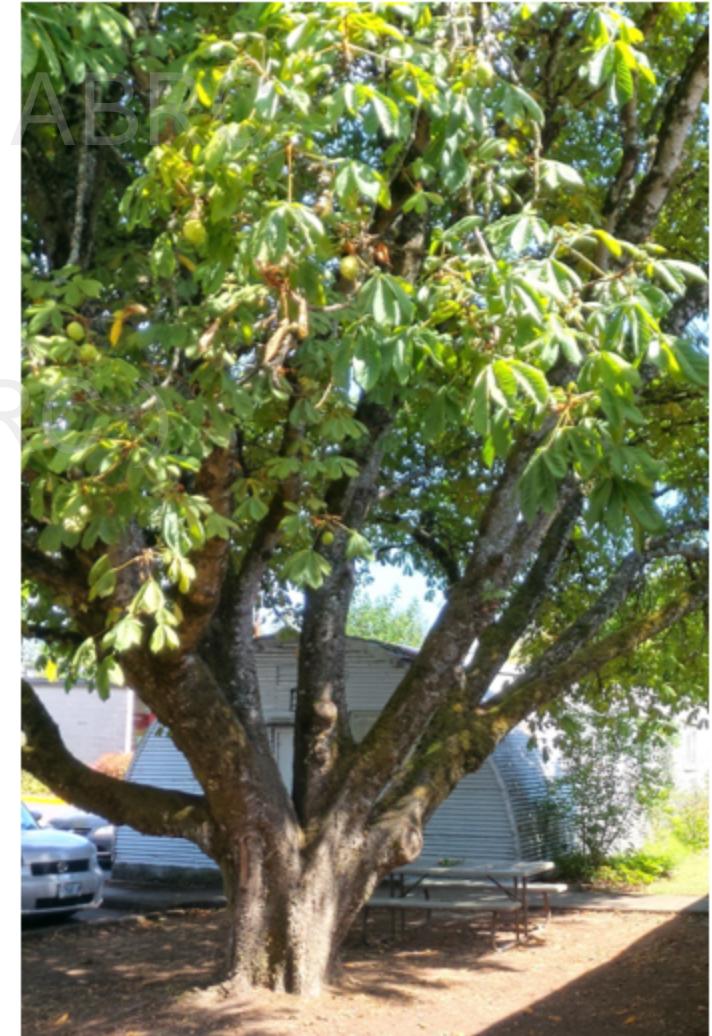
DEVELOPMENTAL DYNAMICS 203:253-310 (1995)

www.zfish.cn

### Stages of Embryonic Development of the Zebrafish

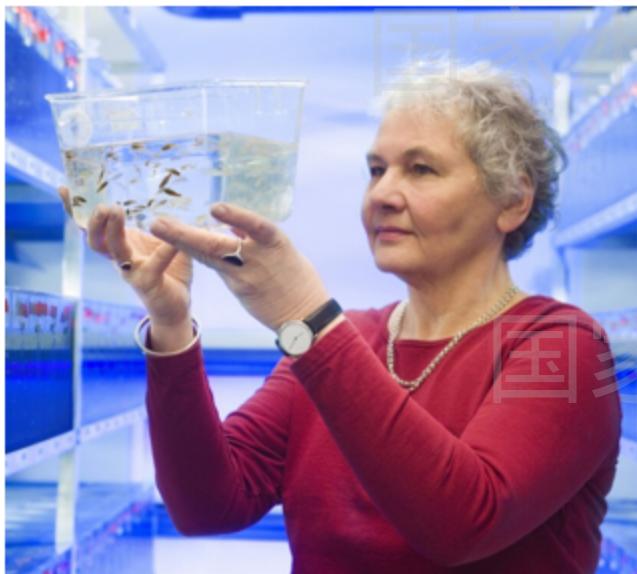
CHARLES B. KIMMEL, WILLIAM W. BALLARD, SETH R. KIMMEL, BONNIE ULLMANN, AND THOMAS F. SCHILLING

*Institute of Neuroscience, University of Oregon, Eugene, Oregon 97403-1254 (C.B.K., S.R.K., B.U., T.F.S.); Department of Biology, Dartmouth College, Hanover, NH 03755 (W.W.B.)*



# 1990s: The Tübingen/Boston Screens

德国马普研究所



Christiane Nüsslein-Volhard

哈佛医学院

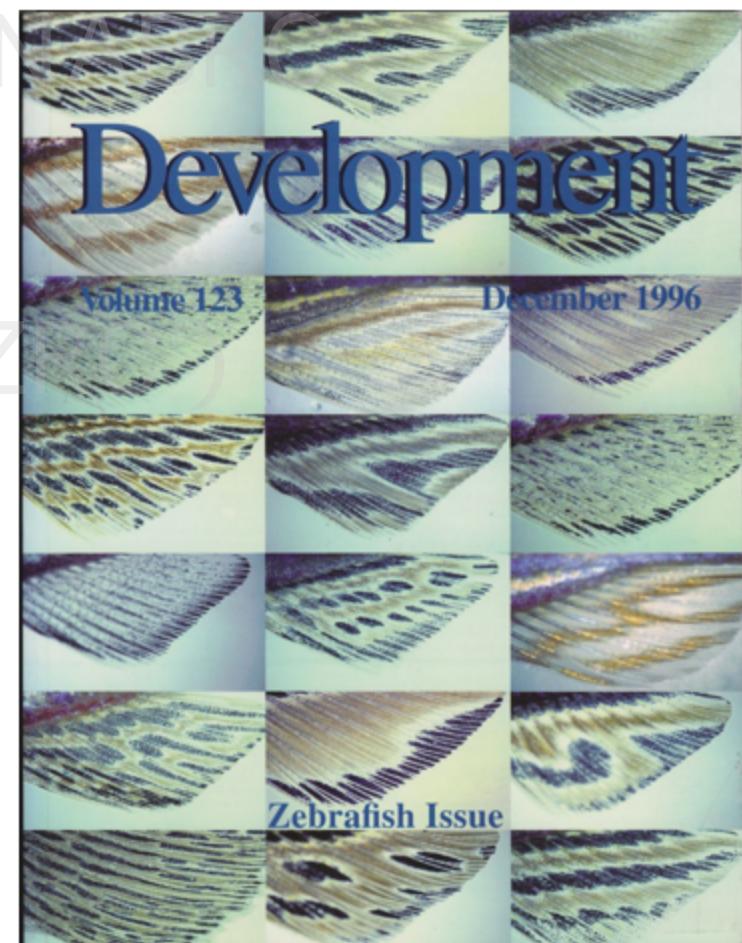


Marc Fishman



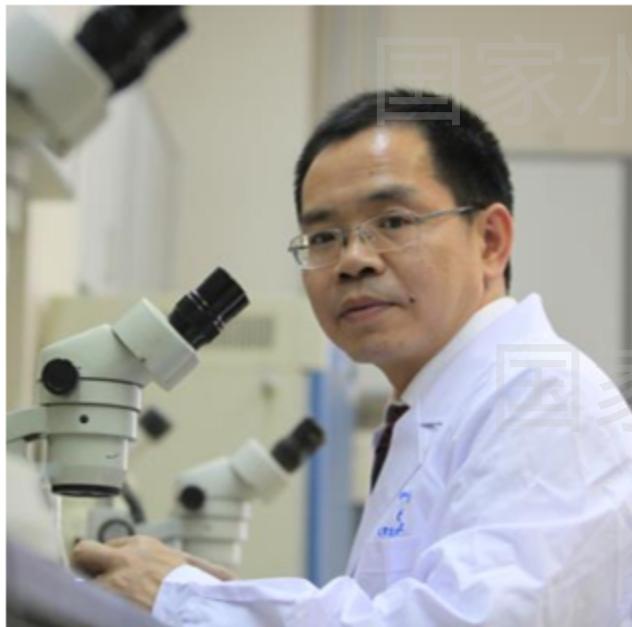
Wolfgang Driever

the big screen

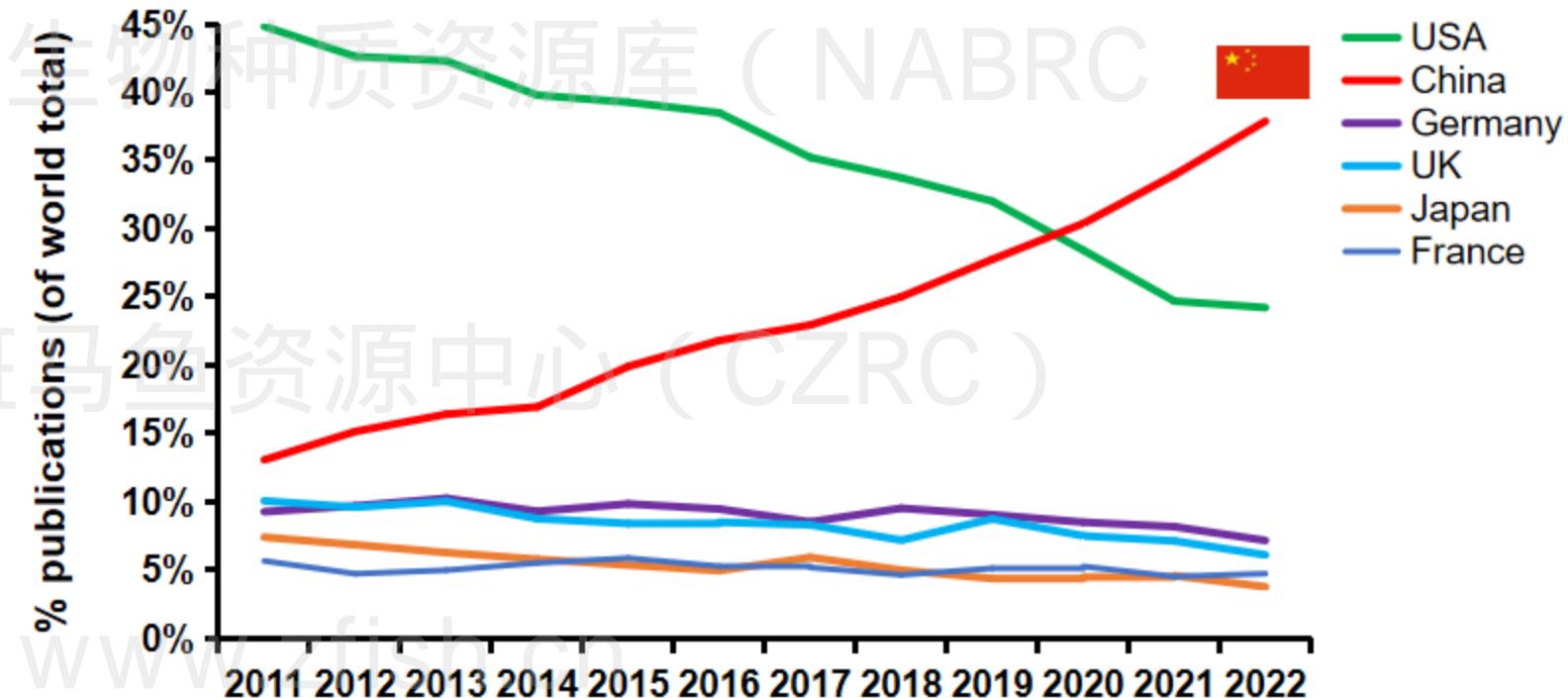


- 1993-1996, 德国Tübingen/美国Boston
- ENU诱变产生上千个胚胎早期发育产生影响的突变品系
- 奠定了斑马鱼作为模式动物的基础
- 培养了斑马鱼研究领域众多科学家

# 中国斑马鱼研究的发展



- 2000年：中国斑马鱼研究元年
- 清华大学，孟安明实验室
- 早期胚胎发育研究



# 本讲大纲



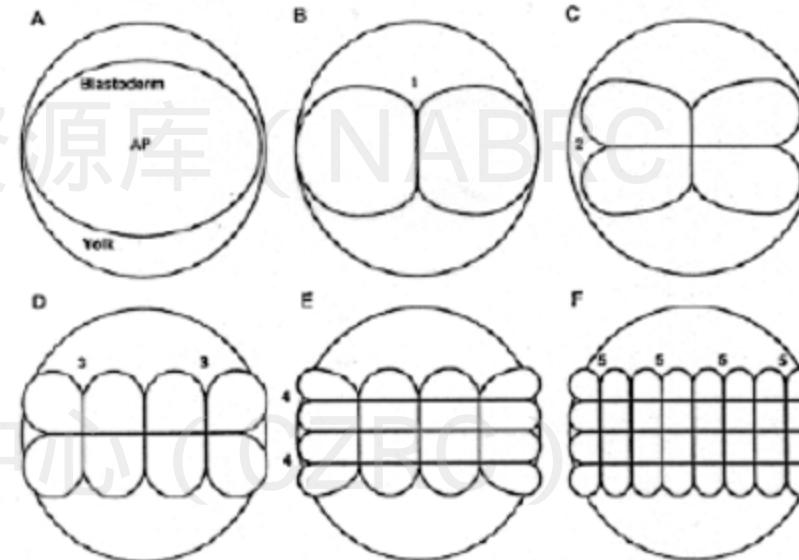
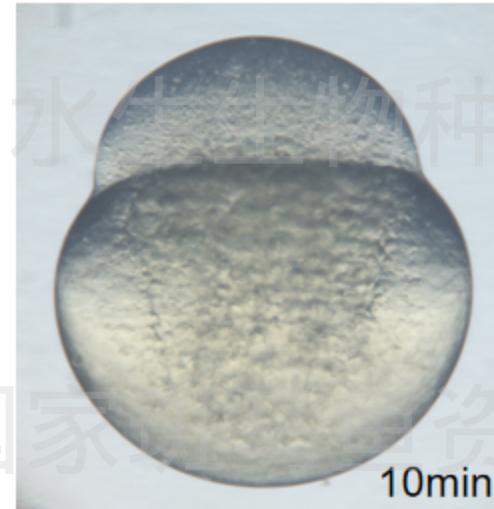
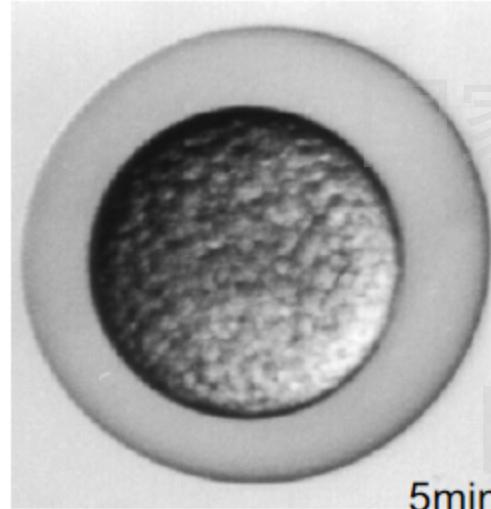
- 模式生物斑马鱼的概貌
- 斑马鱼的研究历史
- 斑马鱼胚胎早期发育
- 斑马鱼研究应用 [www.zfish.cn](http://www.zfish.cn)

# 斑马鱼主要胚胎发育阶段



- 胚胎期 (Embryo) 可分为7个时期 (Period)
  - 合子期 (Zygote) : 0-0.75hpf
  - 卵裂期 (Cleavage) : 0.75-2.25hpf
  - 囊胚期 (Blastula) : 2.25-5.25hpf
  - 原肠胚期 (Gastrula) : 5.25-10hpf
  - 体节期 (Segmentation) : 10-24hpf
  - 咽胚期 (Pharyngula) : 24-48hpf
  - 孵化期 (hatching period) : 48-72hpf
- 发育速度受水温(**28.5 °C**)及密度的影响  
(50枚 / 90mm平皿)
- 时期内分阶段 (stage), stage name
  - 一般命名:
    - hpf*(hours post fertilization)
    - dpf*(days post fertilization)
  - 幼苗期 (larval) : 5-15dpf
  - 幼鱼期 (juvenile) : 15dpf-3m
  - 成鱼期 (adult) : >3m
  - 了解发育阶段的重要性

# 胚胎发育阶段：Zygote to Cleavage

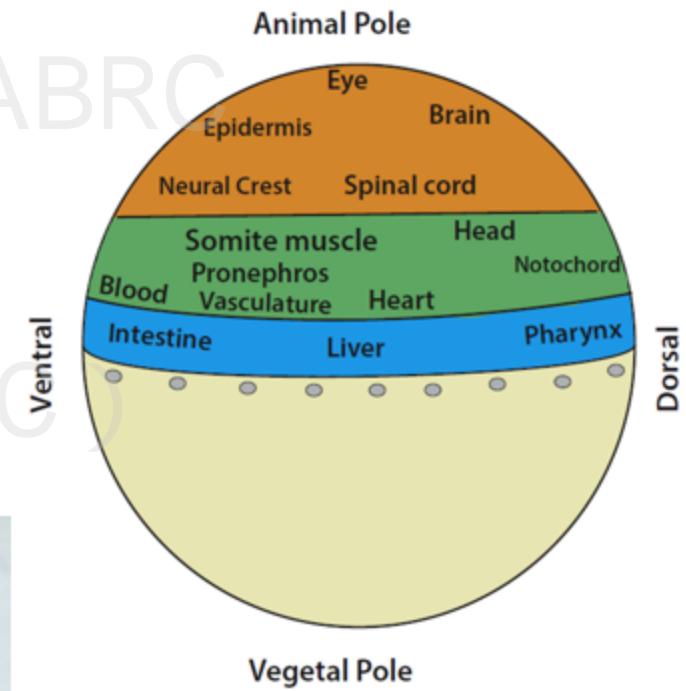
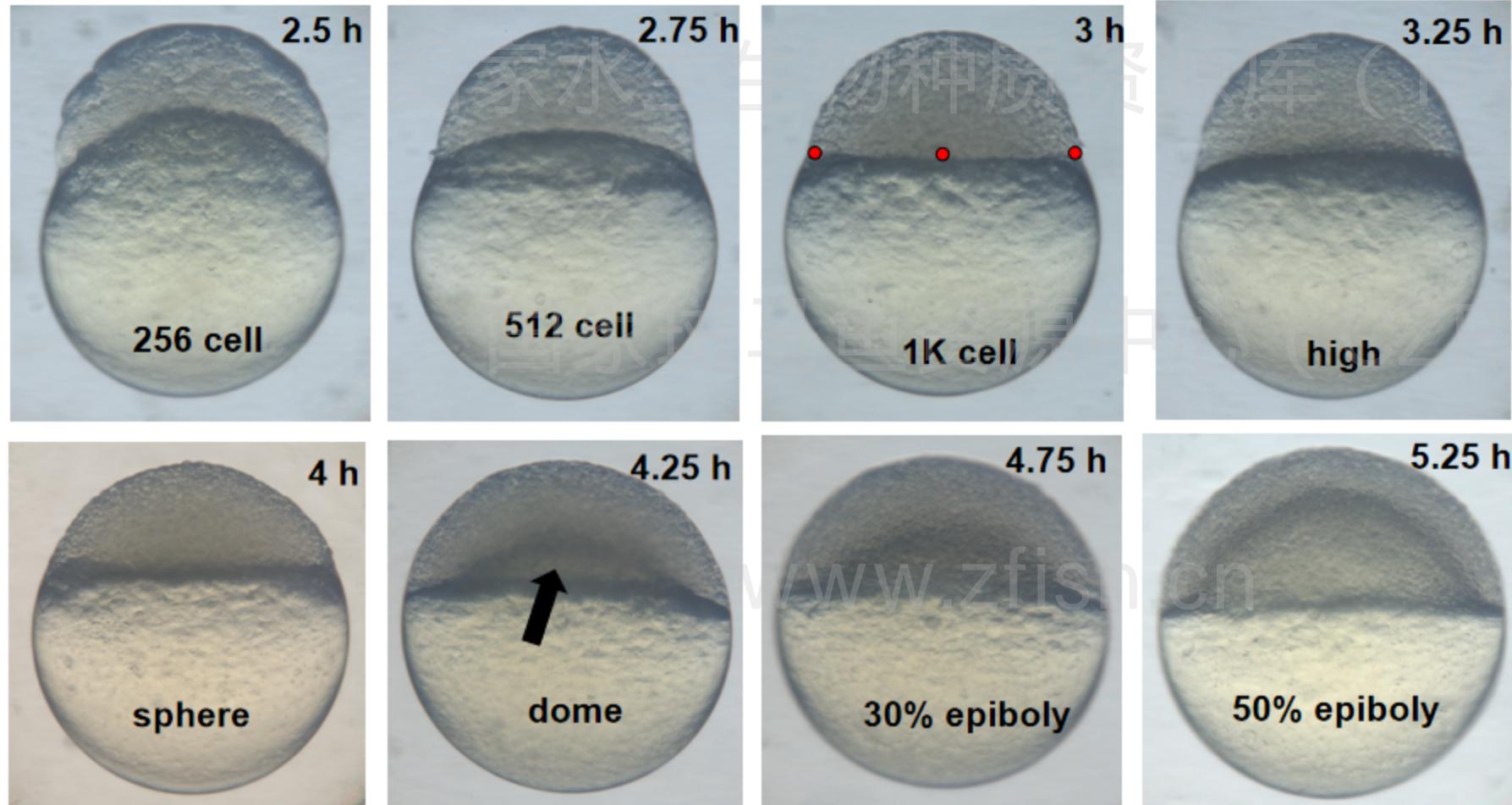


Kimmel et al, 1995

Zygote/0-0.75 hpf/1 cell

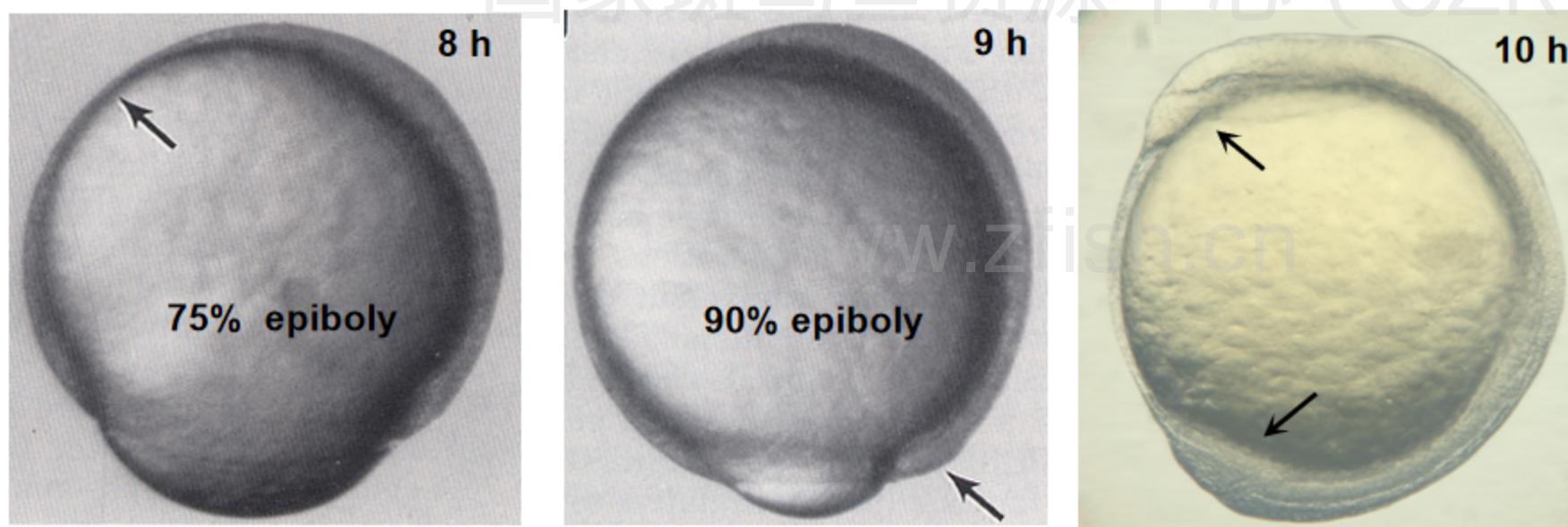
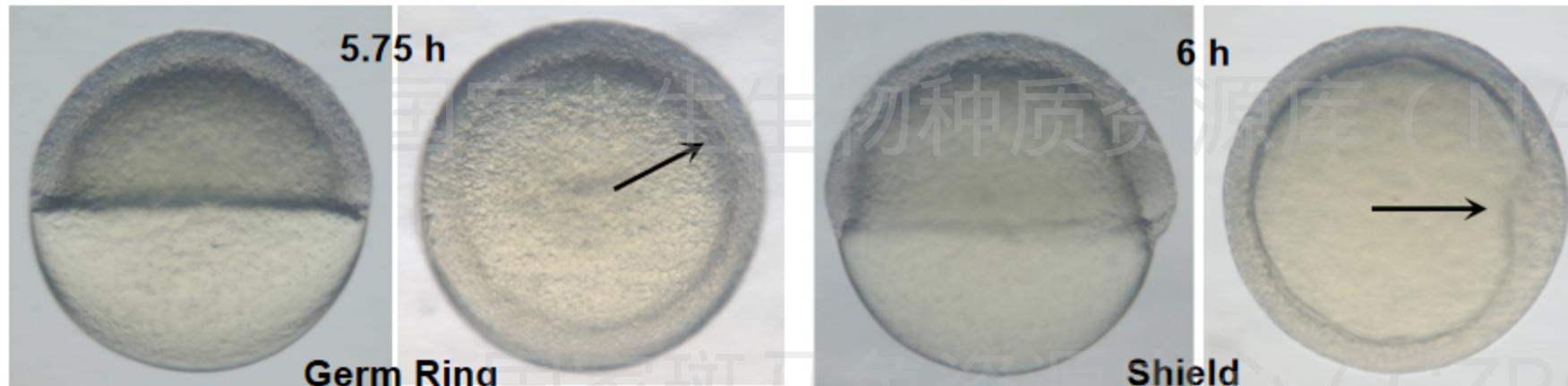
Cleavage/0.75-2 hpf/2-64 cell

# 胚胎发育阶段: Blastula Period

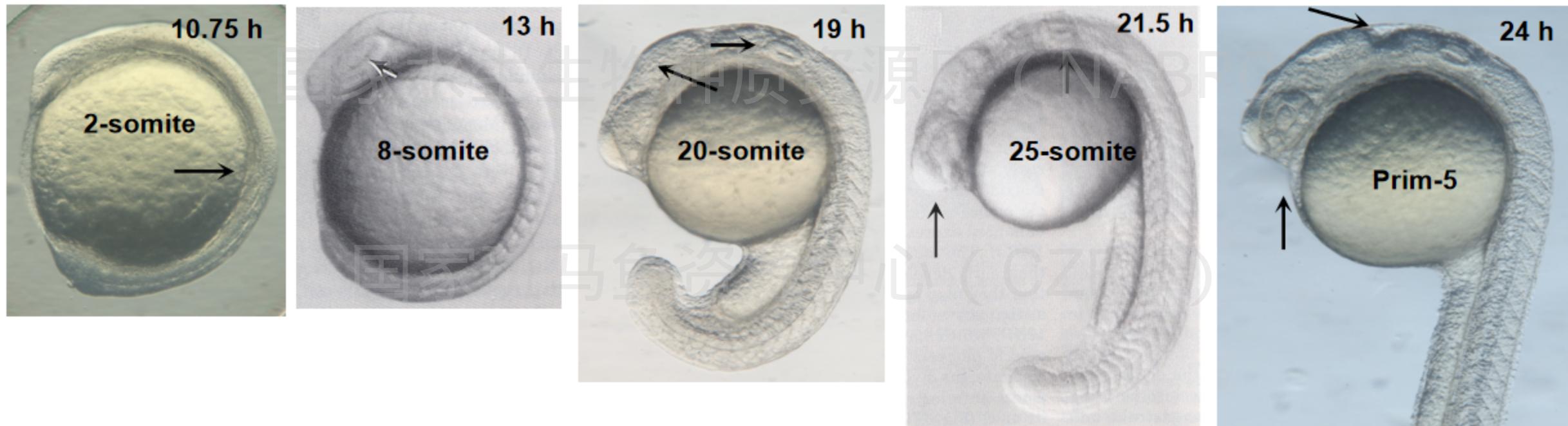


Blastula/2.25-5.25 hpf/  
128 cell-50% epiboly

# 胚胎发育阶段: Gastrula Period



# 胚胎发育阶段: Segmentation Period



Segmentation/10-24 hpf/ bud-prim 5

[www.zfish.cn](http://www.zfish.cn)

# 胚胎发育阶段：Pharyngula Period



Pharyngula/24-48 hpf/  
prim 6 – long pec

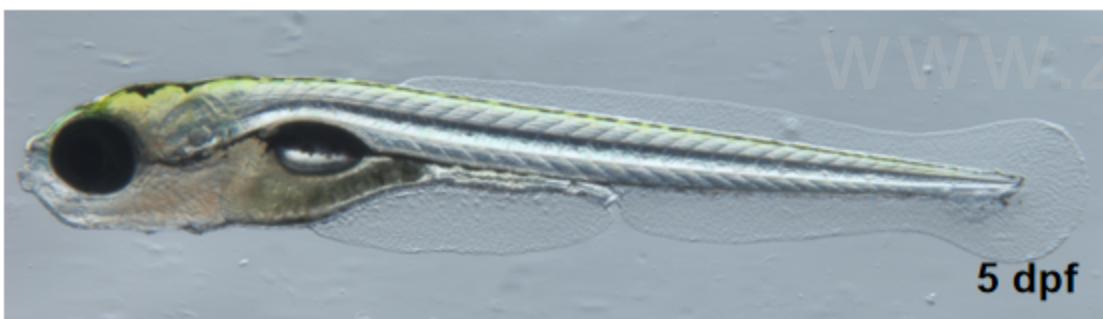
# 胚胎发育阶段: Hatching



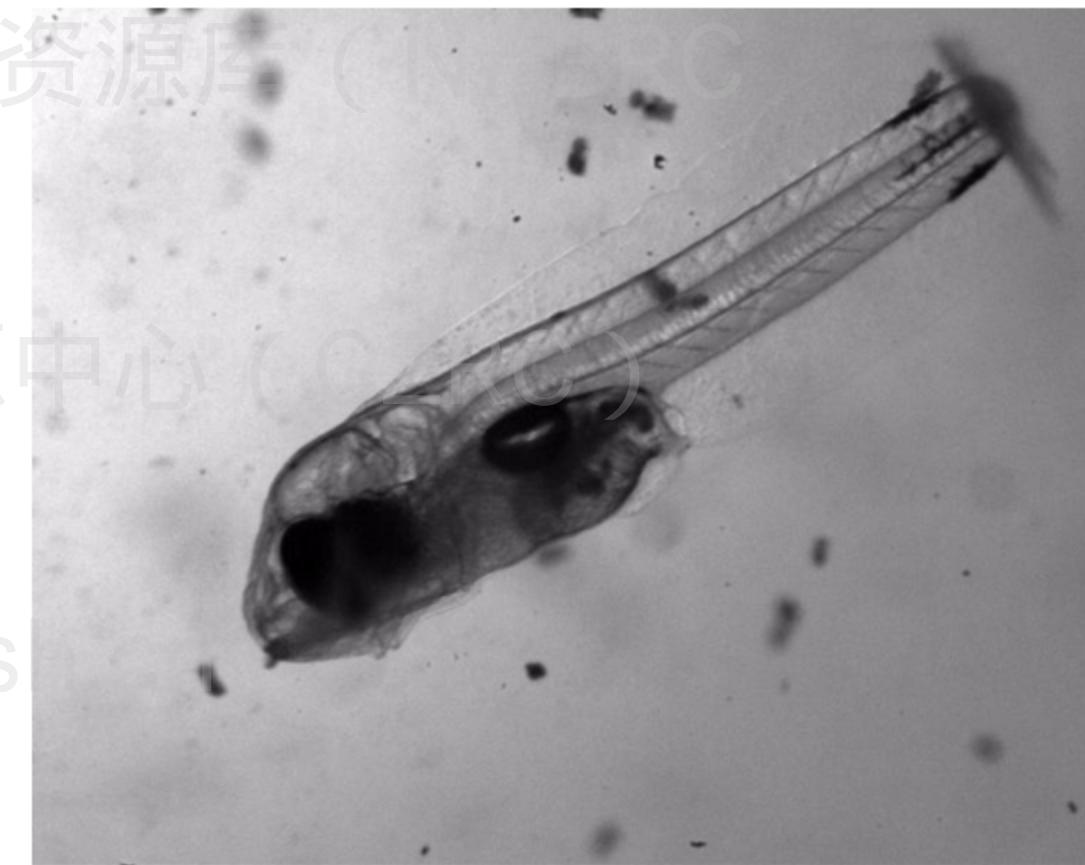
48 hpf



72 hpf



5 dpf



幼苗第5天开口，及时喂食对存活很重要

# 本讲大纲



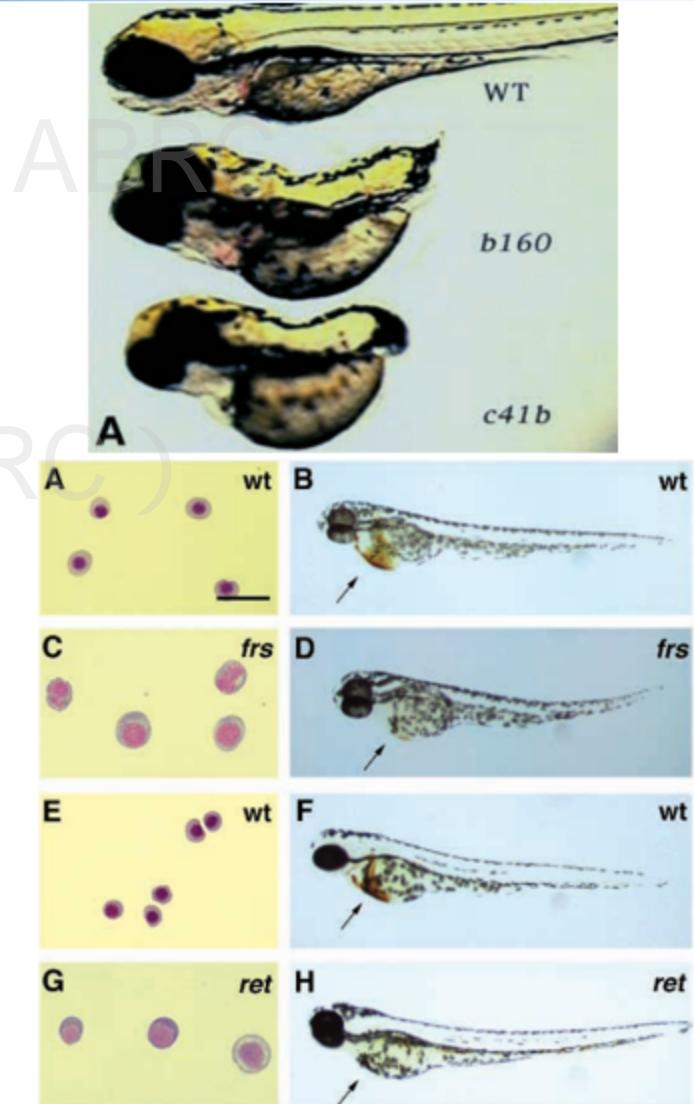
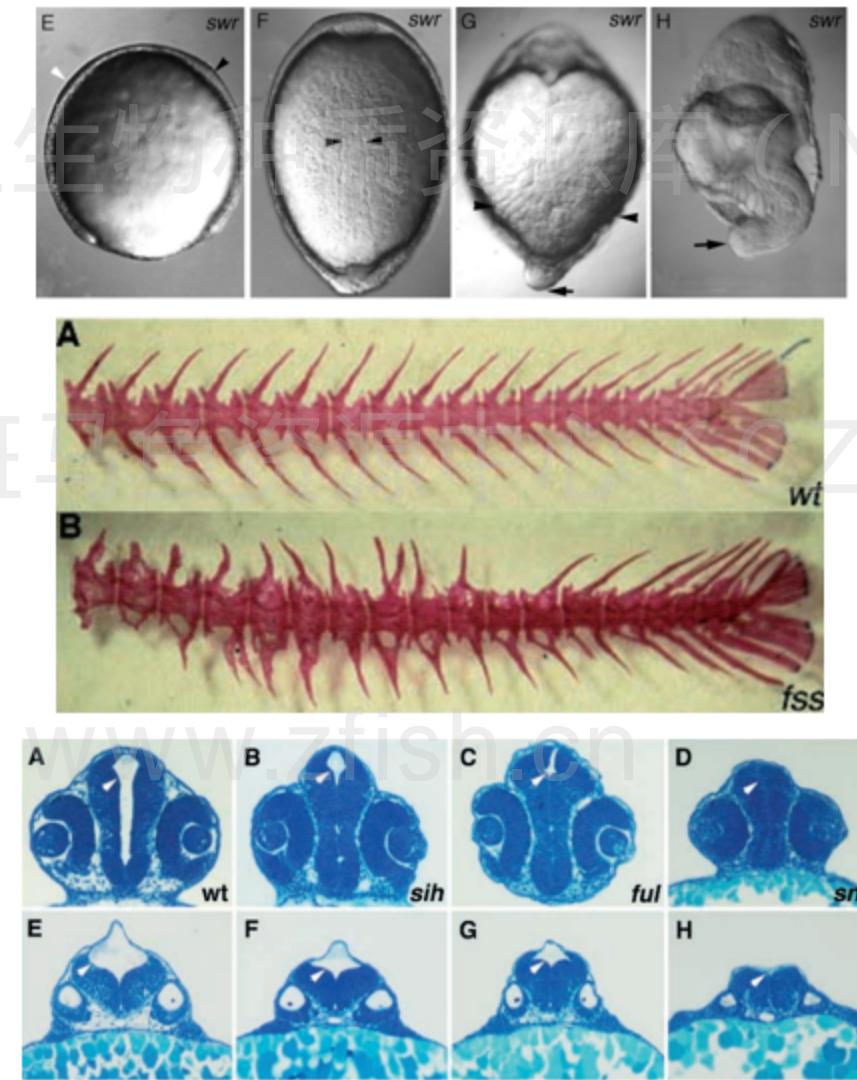
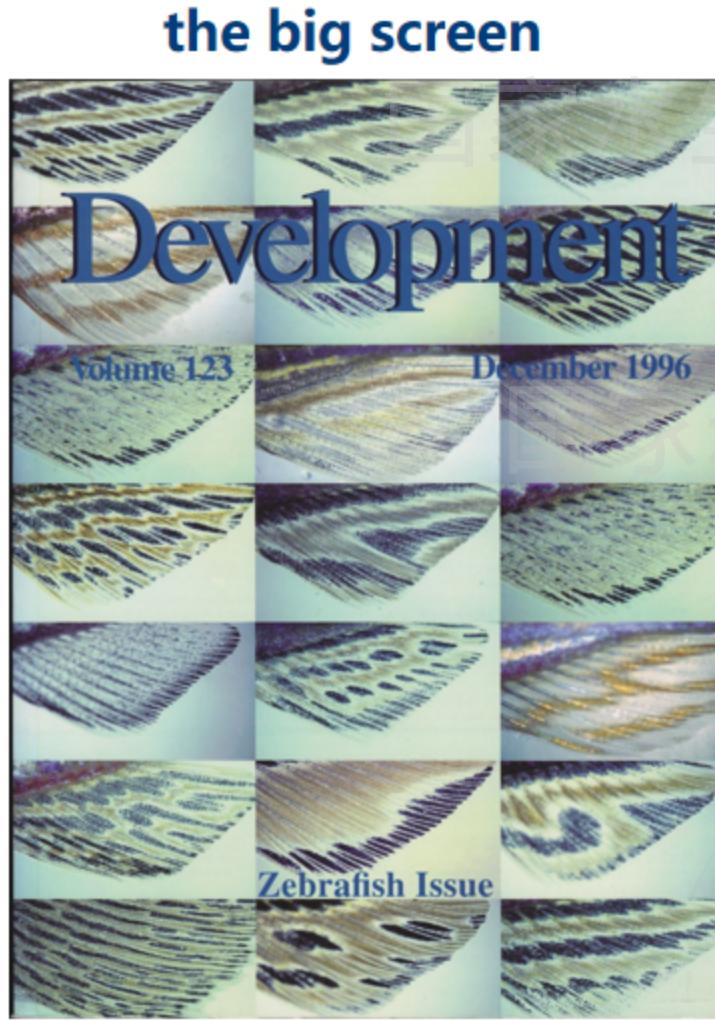
- 模式生物斑马鱼的概貌
- 斑马鱼的研究历史
- 斑马鱼胚胎早期发育
- 斑马鱼研究应用

# 斑马鱼的研究应用领域

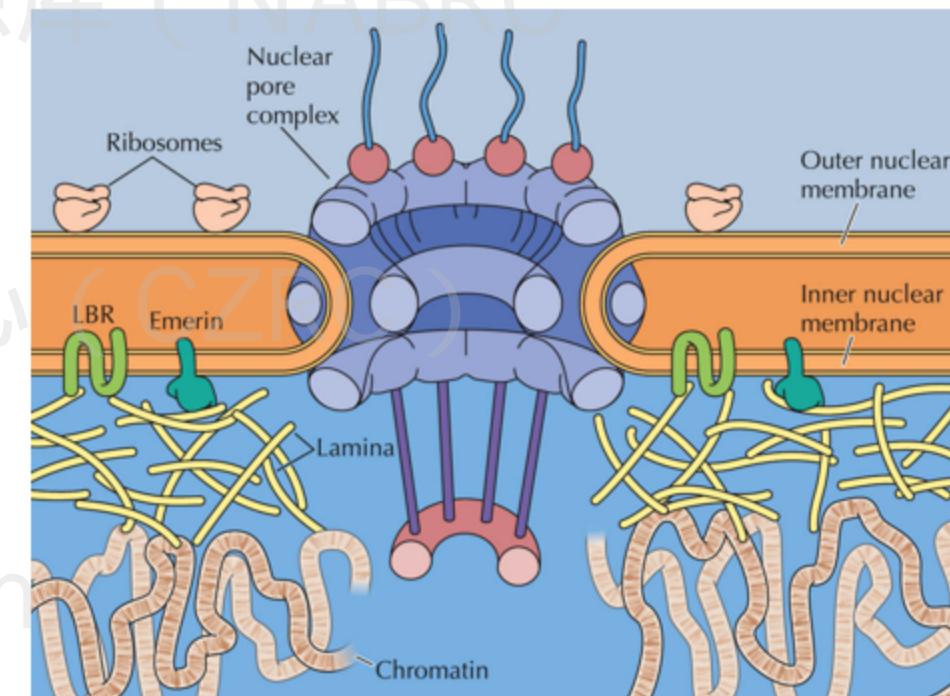
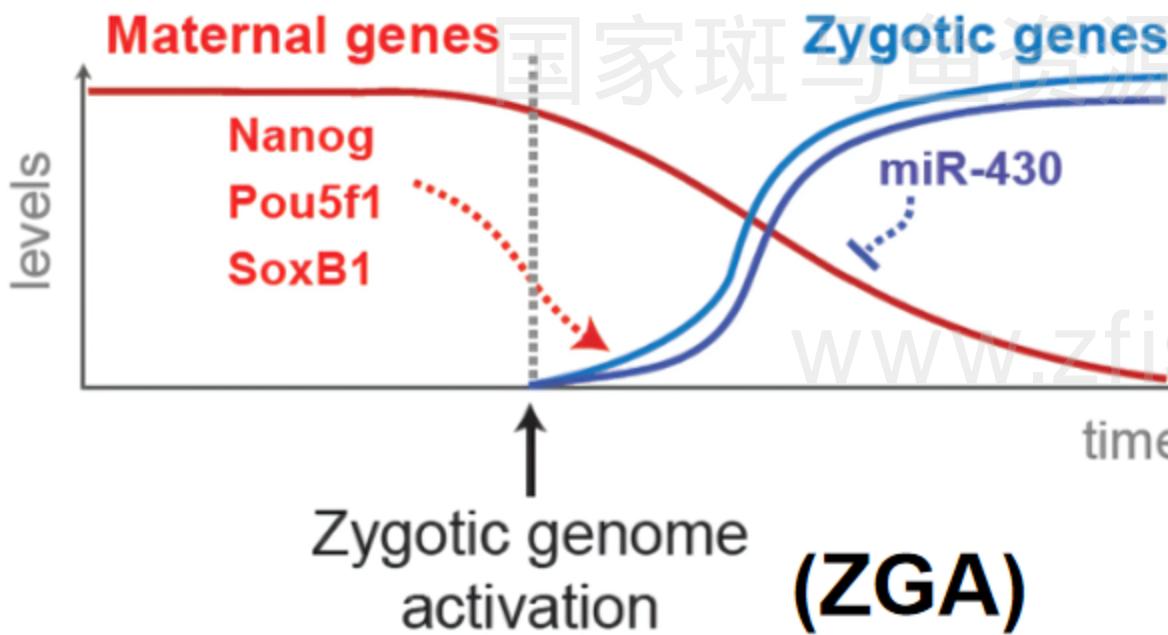
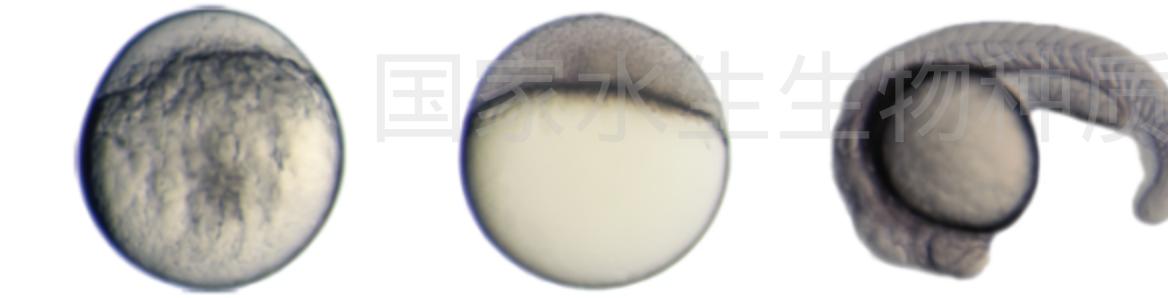


- 发育生物学
- 遗传学
- 分子遗传学
- 细胞生物学
- 神经生物学
- 基因组学
- 感染与免疫
- 损伤和再生科学
- 细胞自噬
- 生物节律
- 人类疾病模型
- 动物行为学
- 环境生物学
- 毒理学
- 化合物筛选
- 进化生物学
- 鱼类遗传学
- 鱼类育种

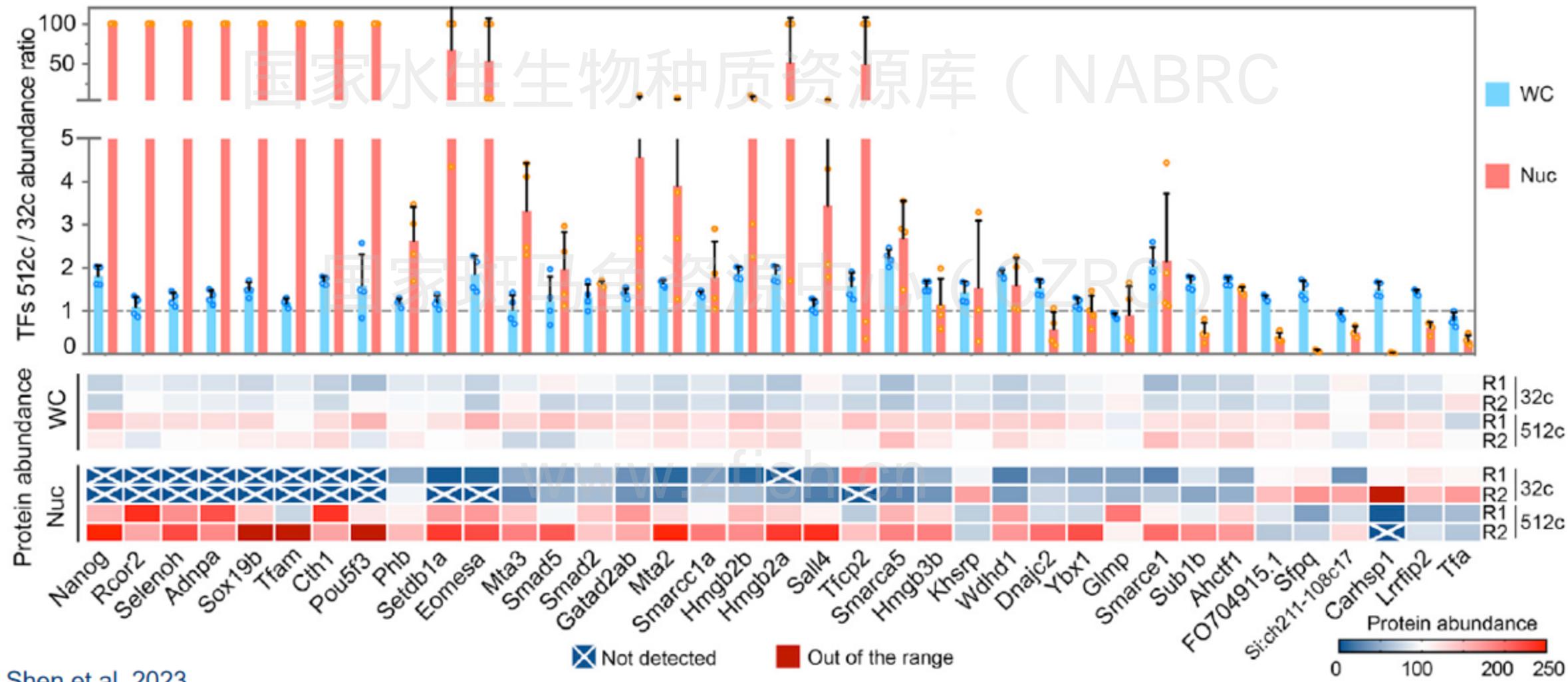
# 1990s: The Tübingen/Boston Screens

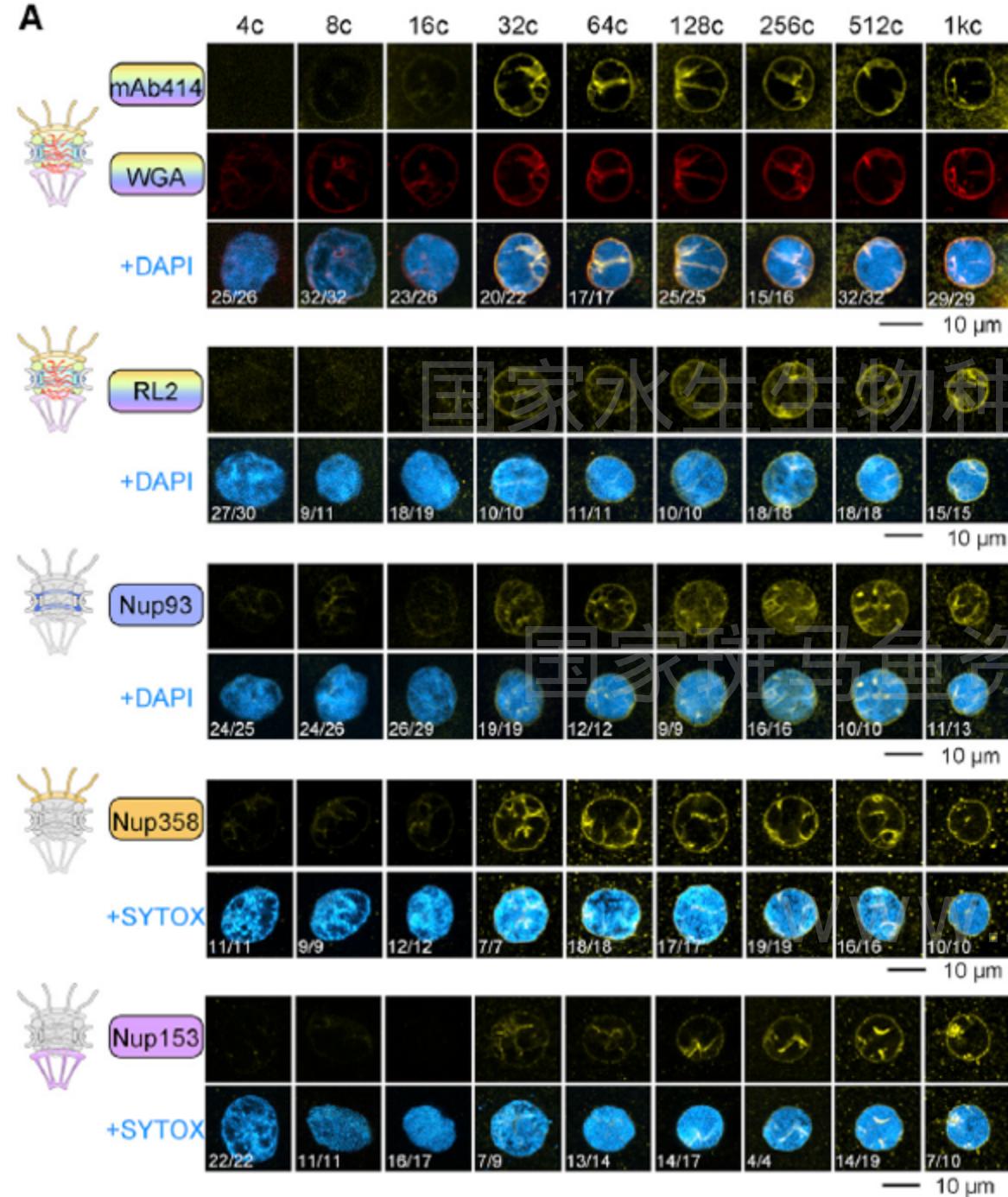
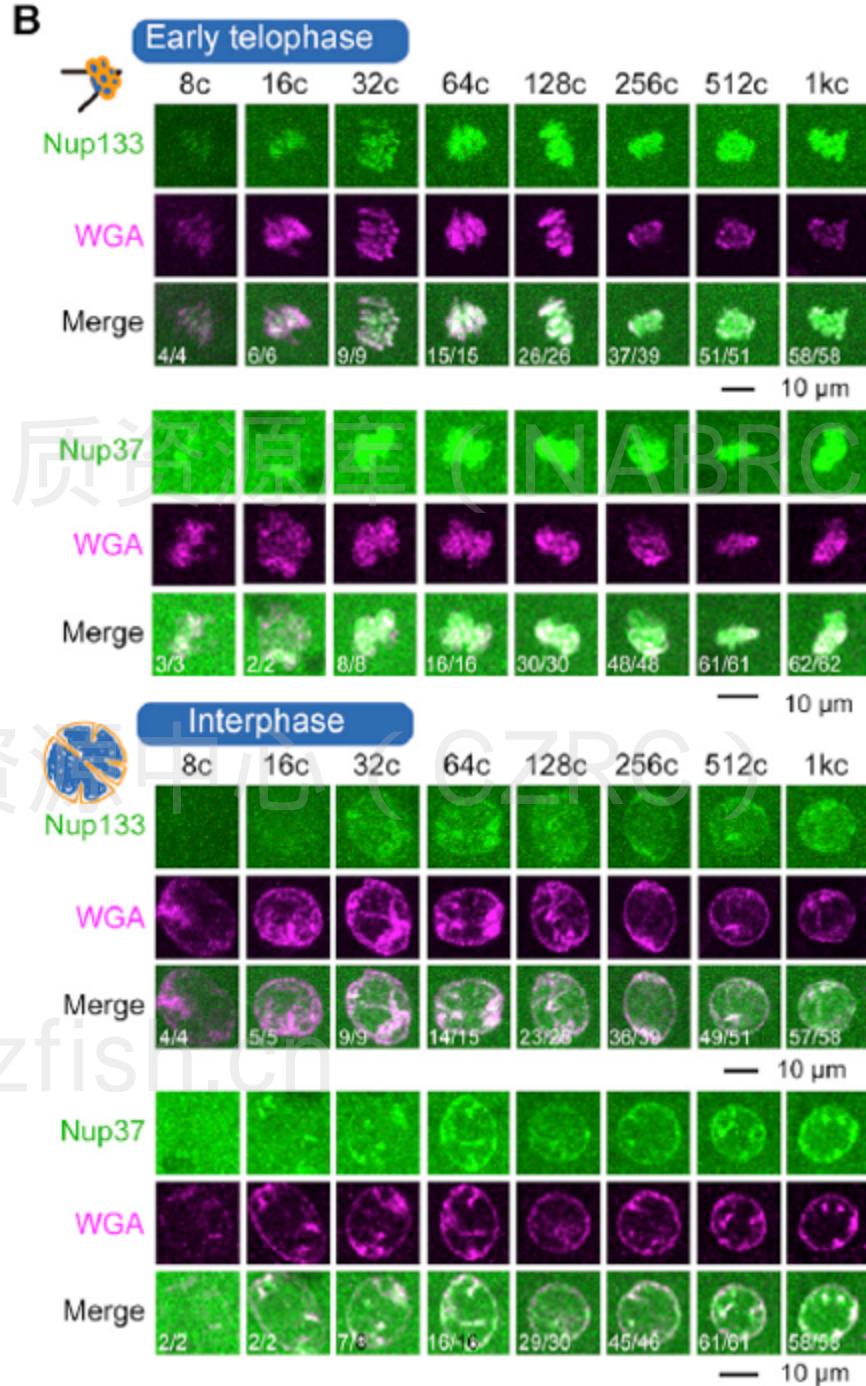


# 基础研究：脊椎动物早期胚胎发育



# 基础研究：大量TF核内聚集启动ZGA

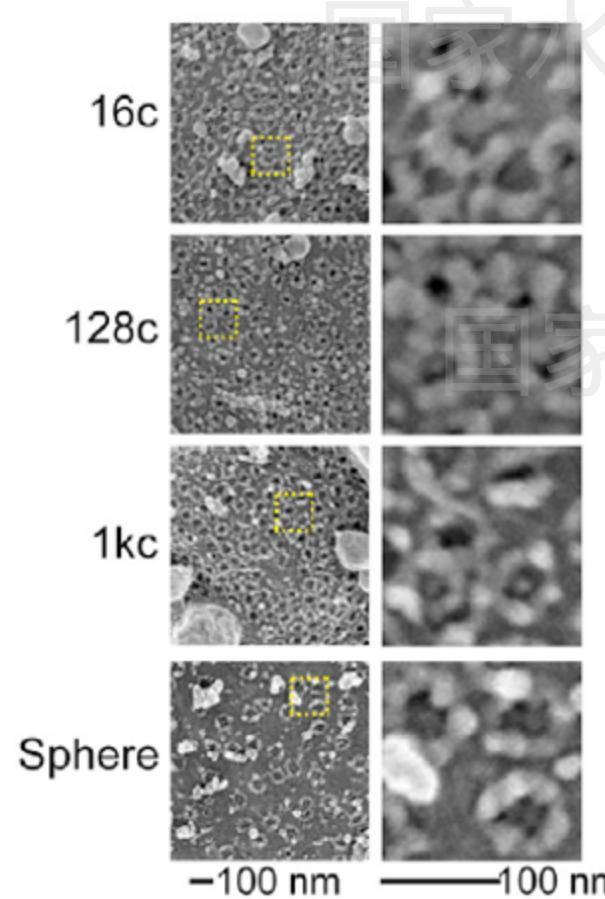


**A****B**

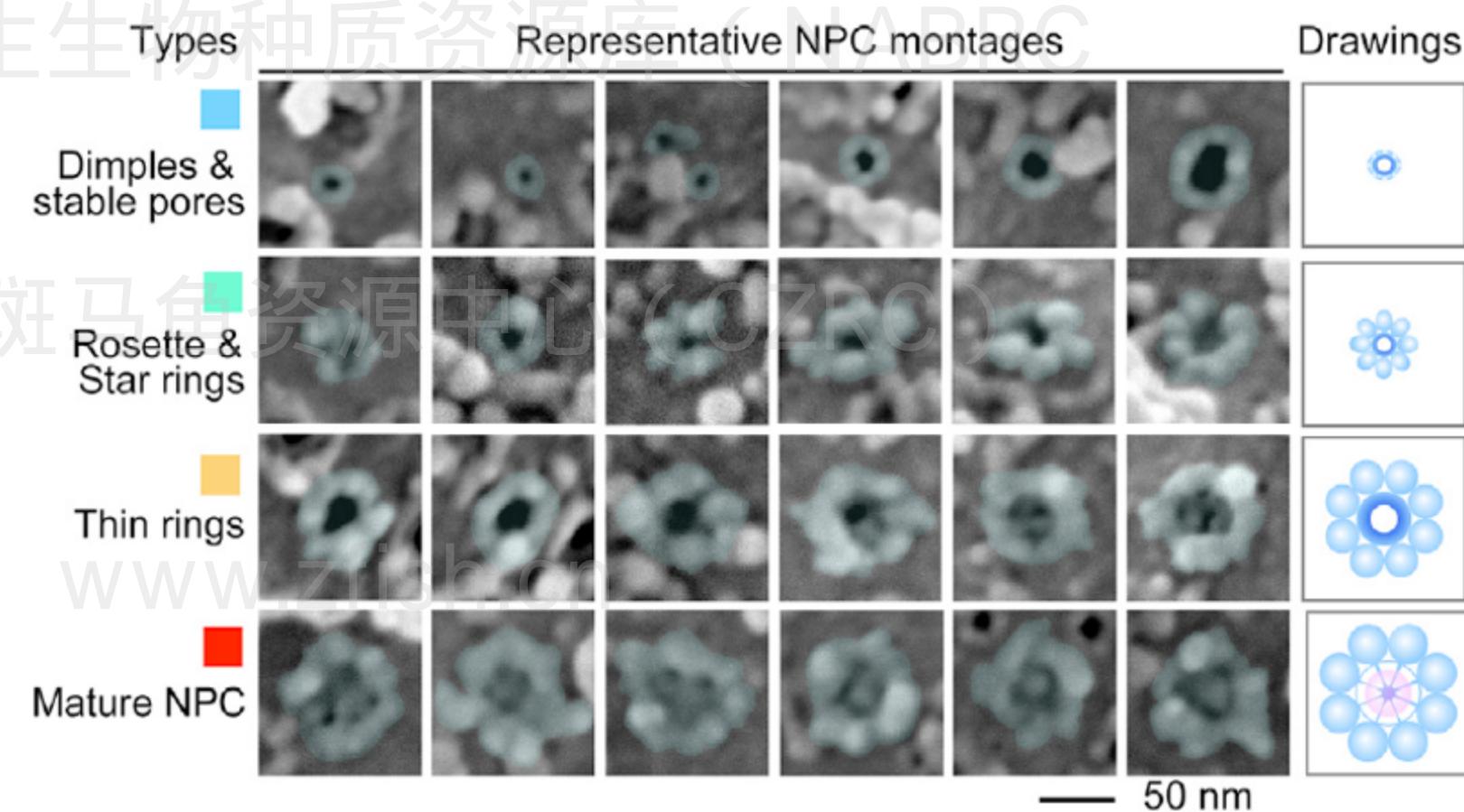
在发育进程中，核孔蛋白逐渐聚集并成熟

# 基础研究：核孔成熟调控胚胎发育进程

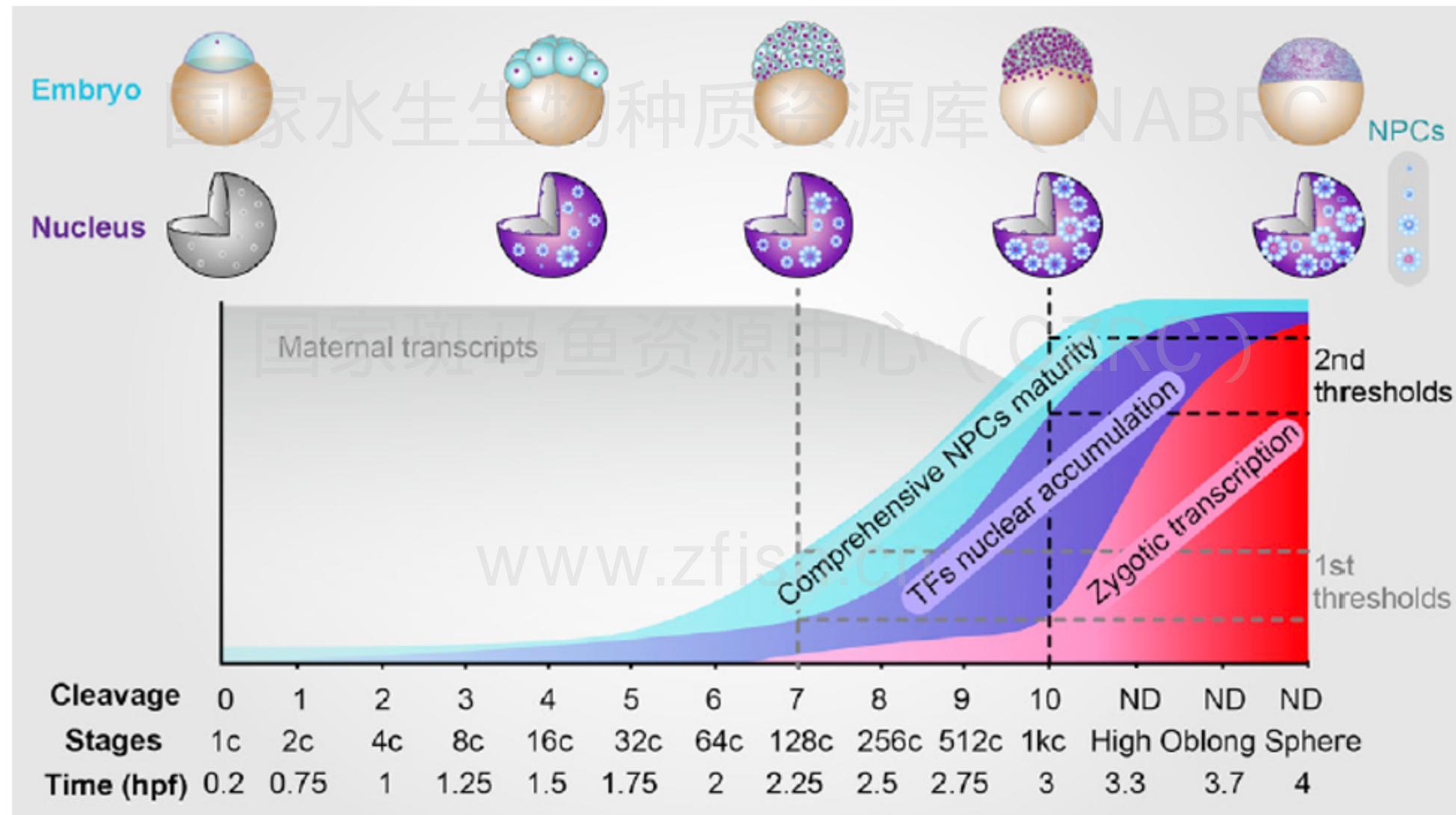
F



G

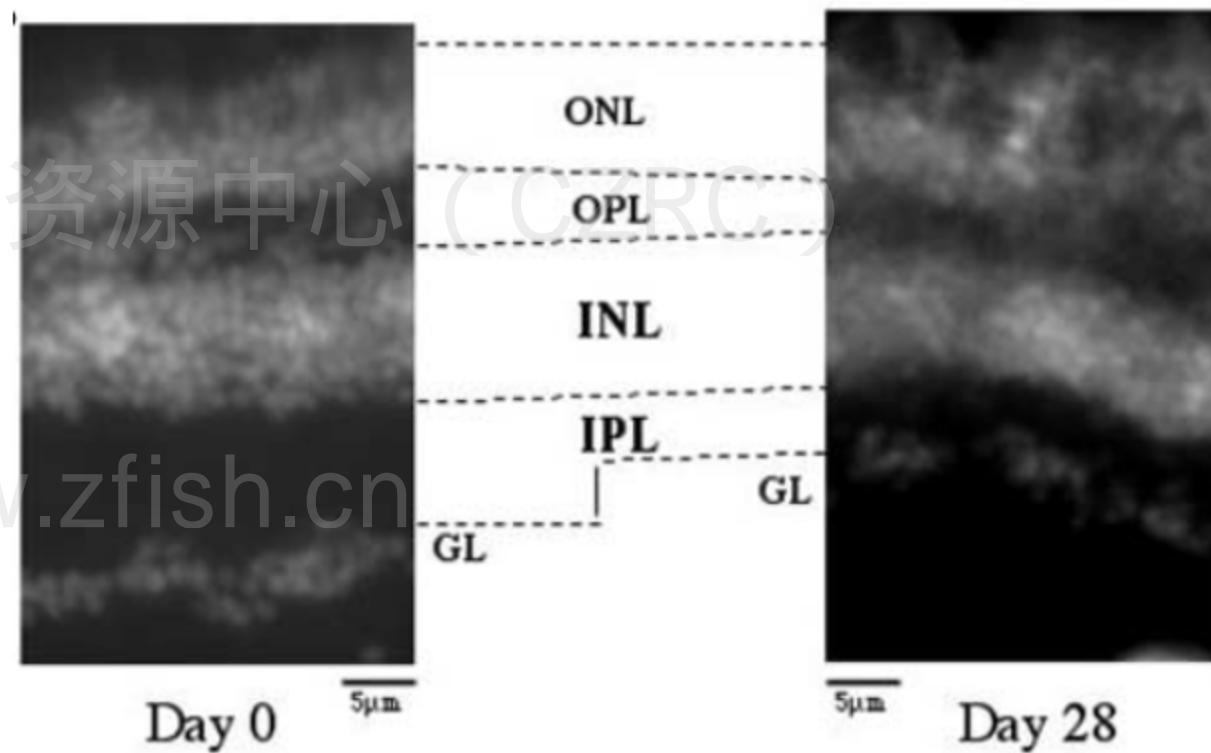


# 核孔蛋白成熟在ZGA中扮演生物钟



# 临床研究：构建人类疾病模型

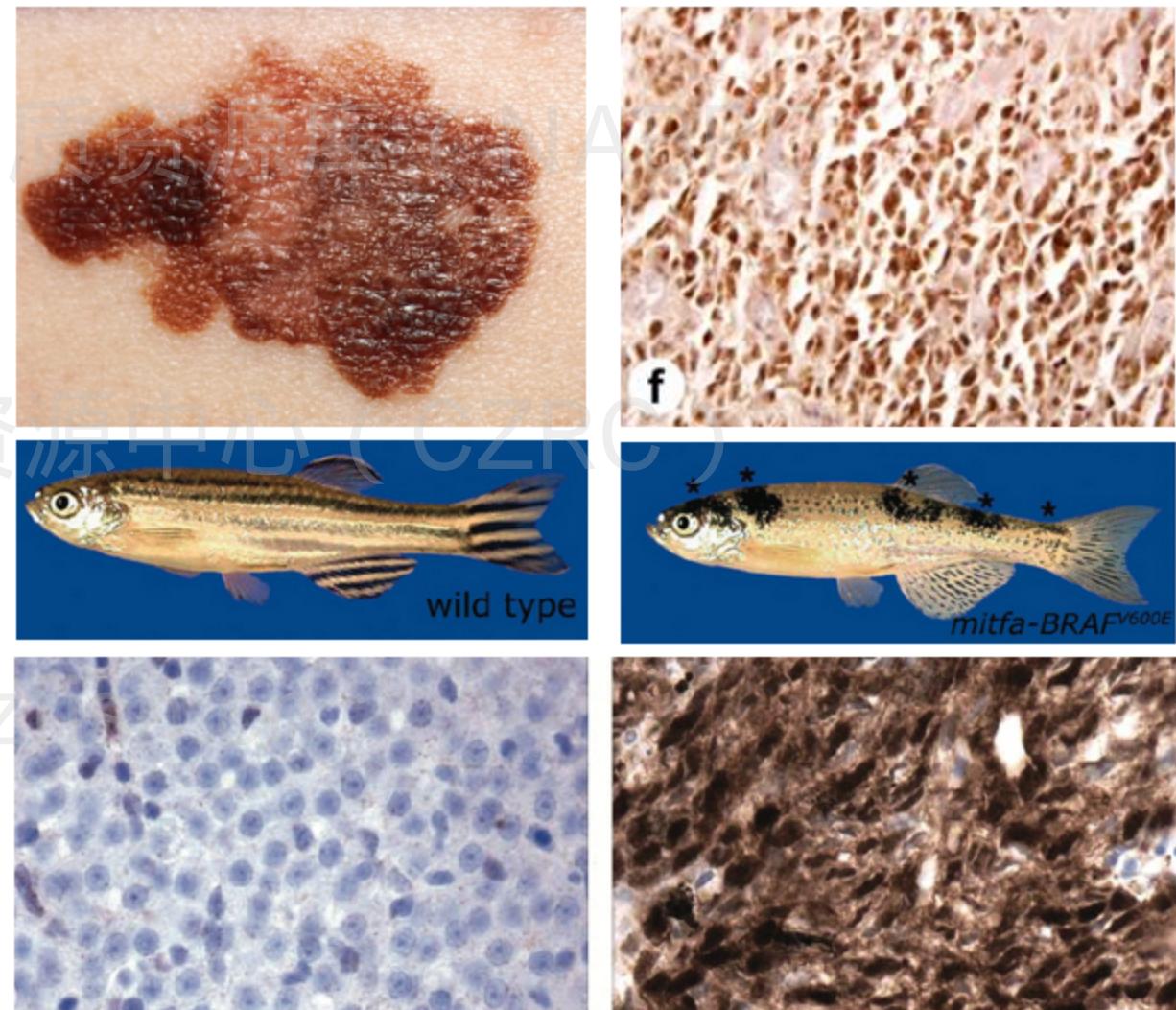
- 遗传发育类疾病
  - 癌症
  - 心血管疾病
  - 肝/肾/代谢相关疾病
  - 感染与免疫模型
  - 肌肉/骨骼相关疾病
  - 血液发生/血液健康类疾病
  - 炎症/凝血/组织再生类疾病
  - 神经系统疾病
- 最简单的疾病模型——以葡萄糖溶液浸泡斑马鱼胚胎
    - 处理28天后，观察糖尿病视网膜病变



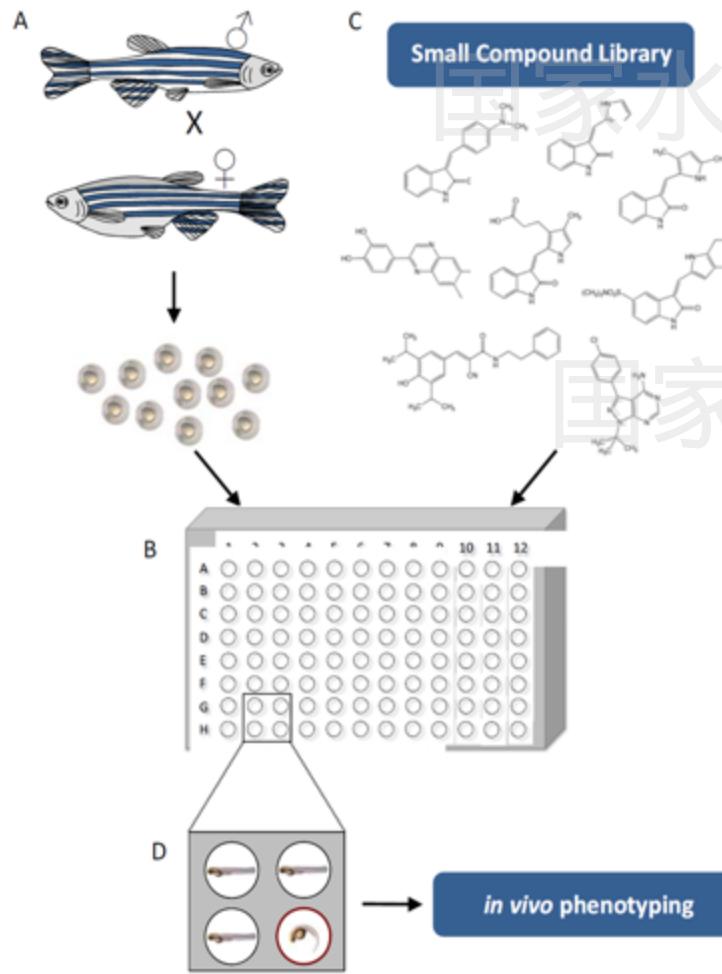
# 临床研究：构建人类疾病模型

- 遗传发育类疾病
- 癌症
- 心血管疾病
- 肝/肾/代谢相关疾病
- 感染与免疫模型
- 肌肉/骨骼相关疾病
- 血液发生/血液健康类疾病
- 炎症/凝血/组织再生类疾病
- 神经系统疾病

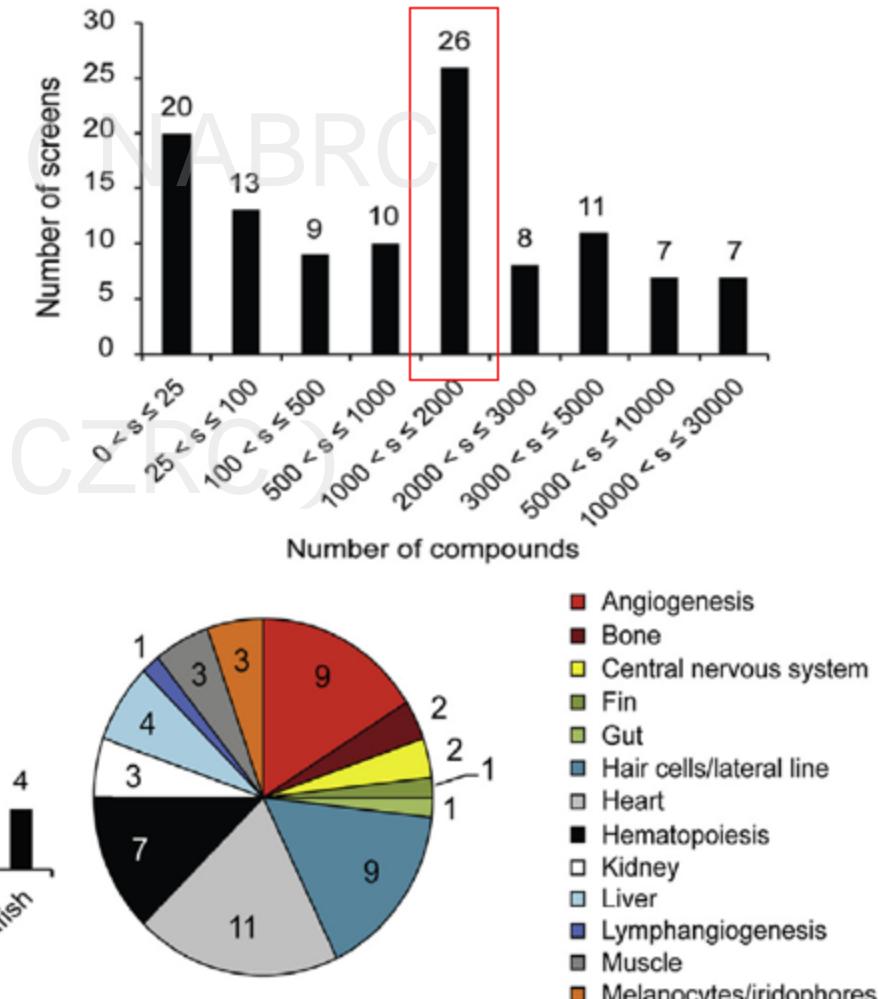
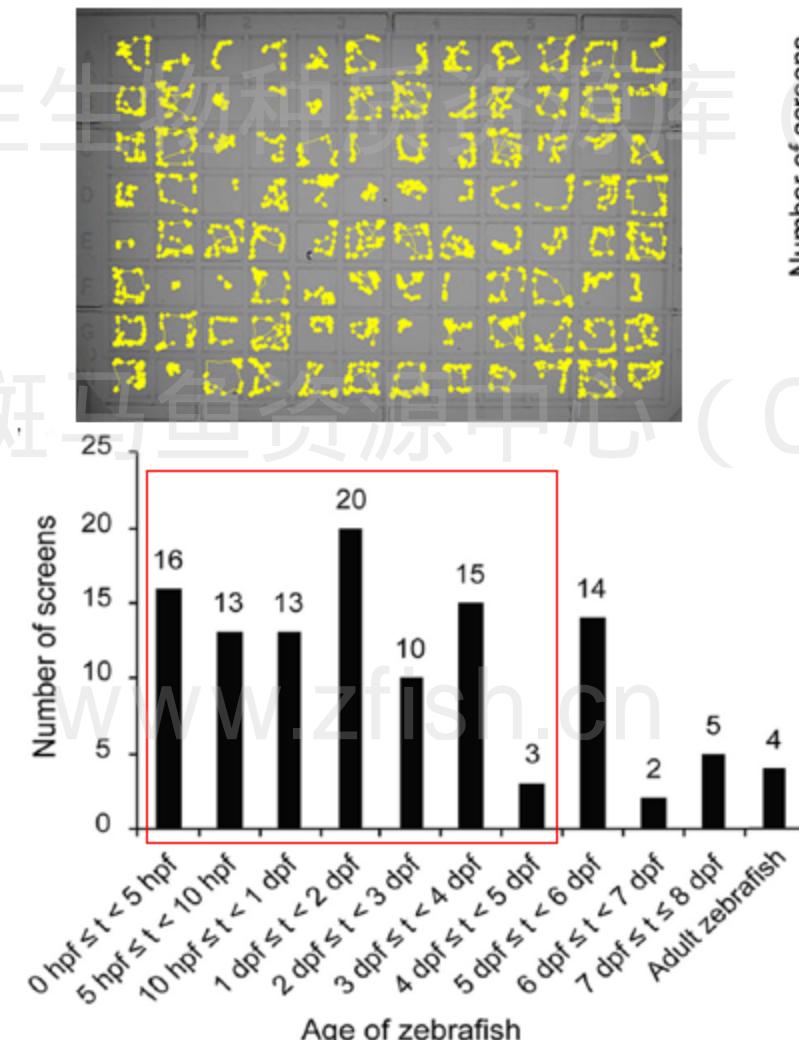
Patton et al. 2005



# 应用研究：新型药物的筛选



Rennekamp&Peterson, 2015

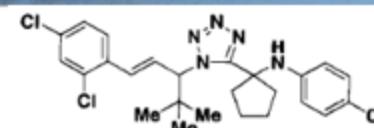
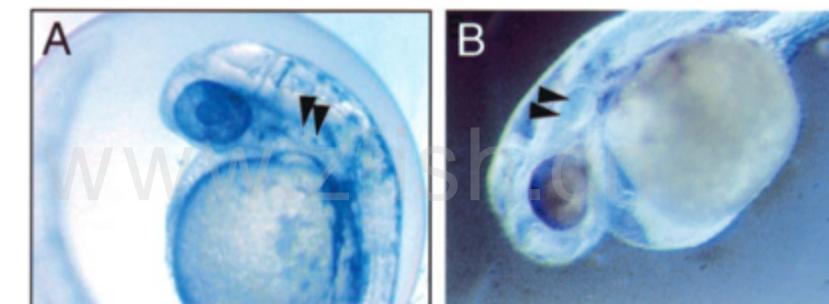
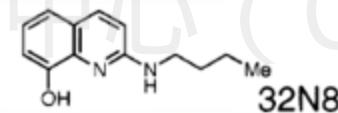
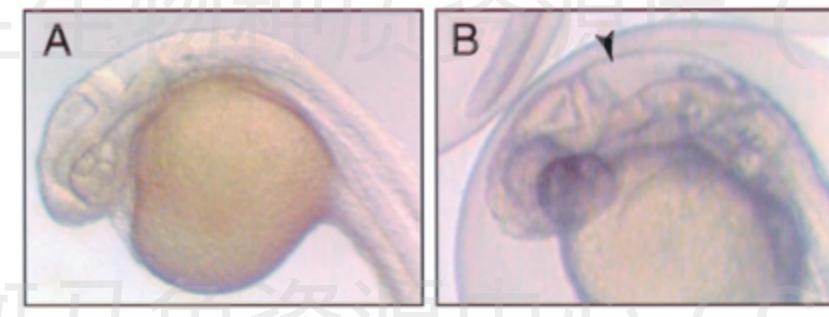


Zhang&Peterson, 2020

# 斑马鱼中的首次化合物筛选

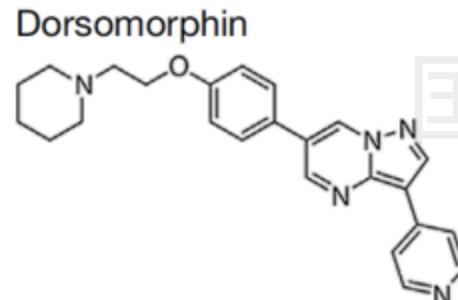
First screen: Harvard University, Department of Molecular and Cellular Biology, 2000

- ✓ Small molecules
- ✓ 1100 synthetic small molecules
- ✓ early development
- ✓ fertilized zebrafish eggs
- ✓ Wild type
- ✓ 96-well plates
- ✓ 3 embryos per well (per compound)
- ✓ Molecules were added to water

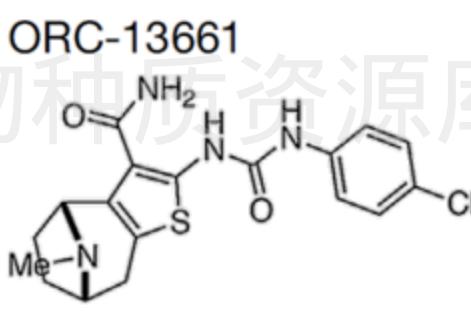
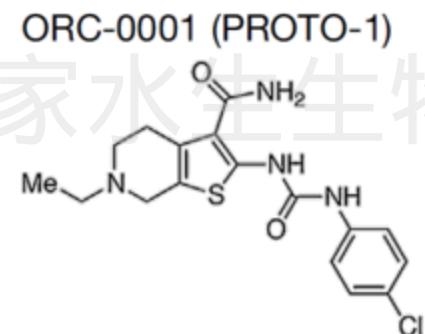


- ✓ Screen what?
- ✓ Size of the library?
- ✓ What phenotype?
- ✓ Animal age?
- ✓ Animal genotypes?
- ✓ Size of screening system?
- ✓ Sample size of animal?
- ✓ How to apply chemicals?

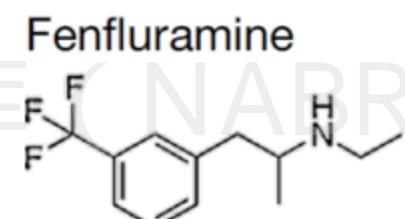
# 斑马鱼的药物筛选成功进入临床



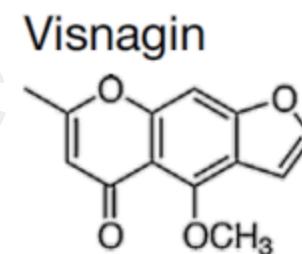
进行性骨化性  
纤维发育不良



氨基糖苷类抗生素引起的毛细胞死亡

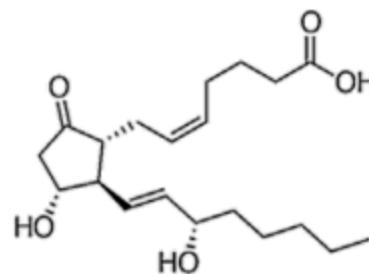


Dravet  
Syndrome



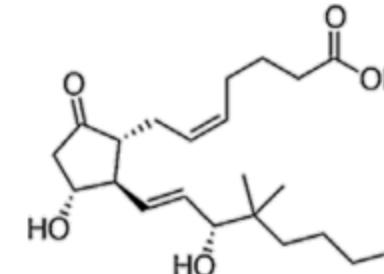
多柔比星引发心肌病

Prostaglandin E2 (PGE2) dmPGE2



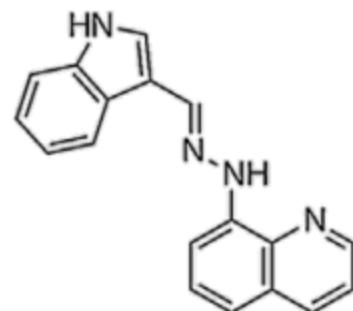
脐带血干细胞移植

Finazine



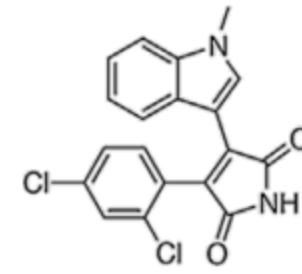
精神病

Lenaldekar



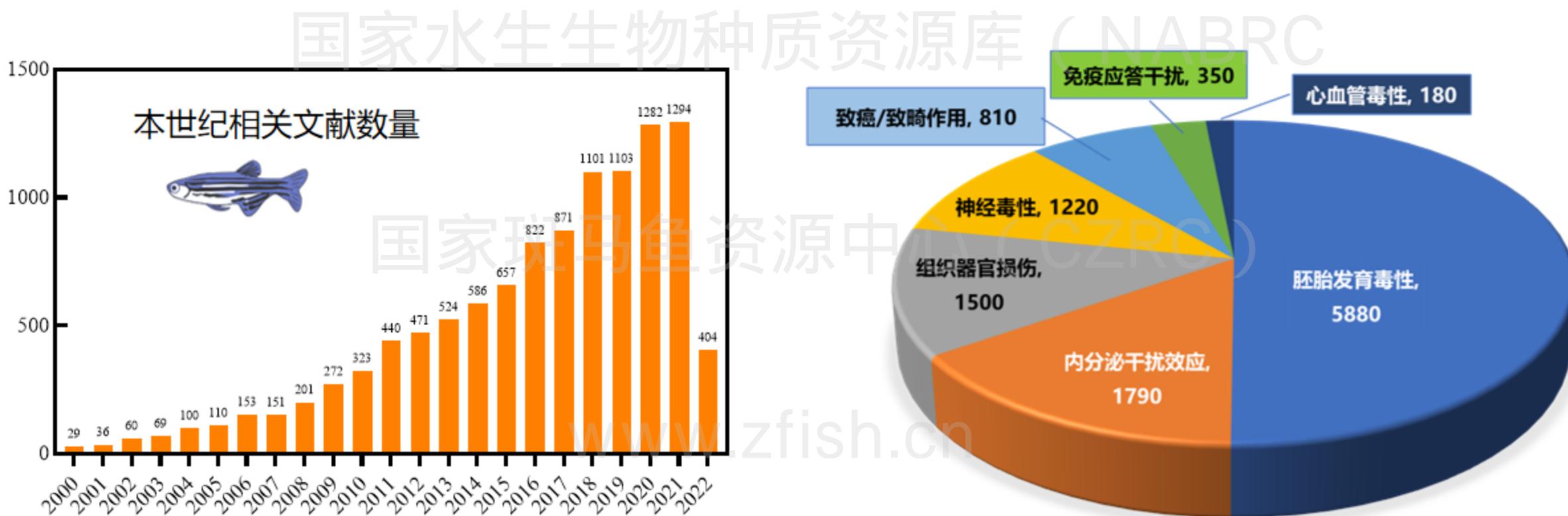
白血病

SB216763



心律失常性心肌病

# 斑马鱼在环境毒理学中应用



# 斑马鱼在环境毒理学中应用



毒性	检测手段举例	参考文献
发育毒性/致畸	发育进程、形态、指标	19486937 20544698
心脏毒性	心律、钙和电压图谱、hERG活性抑制检测	14678746 20657579
肝毒性	肝细胞死亡/功能标志物、肝细胞转录变化	20353558 24388745
肾毒性	组织学检测、胞外体积稳态检测、肾小球过滤荧光标记	21519251 31701443
神经毒性	行为学、神经细胞凋亡/形态、功能成像	20081854 20075256
胃肠道毒性	肠道运动、肠道功能、组织学	18585469 19140958
肌毒性	组织学、他汀药物致病	17992259
致癌性	组织学、形态学、体内肿瘤	17557959 33987182

# 本讲大纲



- 模式生物斑马鱼的概况
- 斑马鱼的研究历史
- 斑马鱼胚胎早期发育
- 斑马鱼研究应用

国家水生生物种质资源库 (NABRC)  
**本讲内容完毕**  
**欢迎交流**  
国家斑马鱼资源中心 (CZRC)



中国斑马鱼信息中心