



讲座八：
国家水生生物种质资源库 (NABRRC)
斑马鱼的发育及研究应用

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

潘鲁媛

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

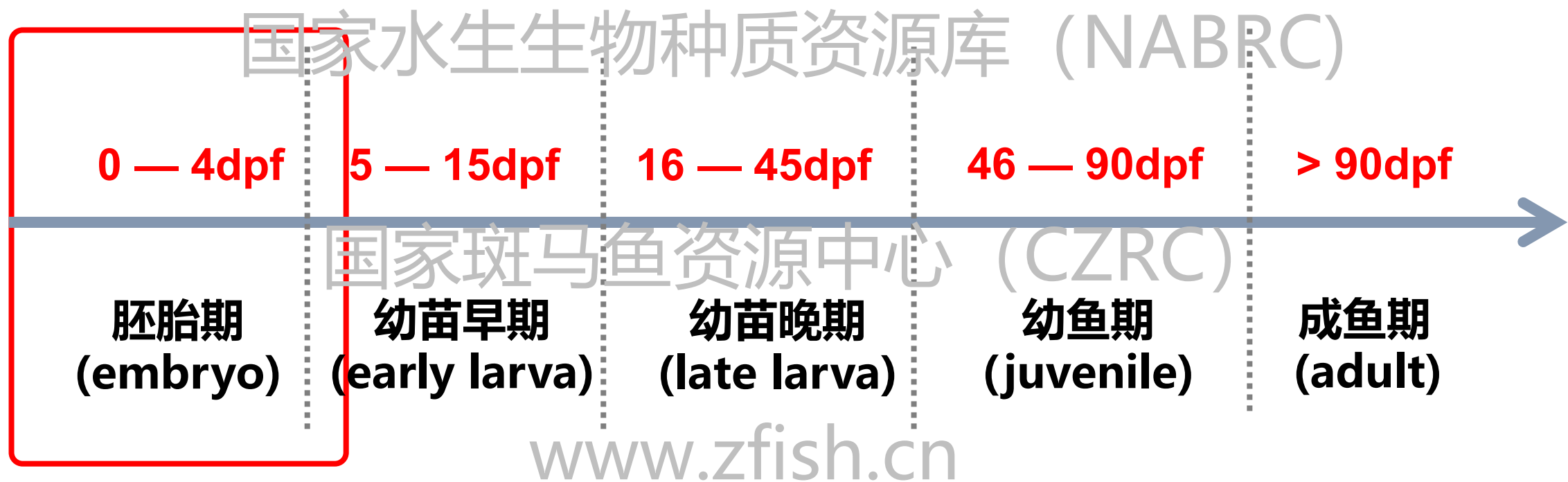
本讲大纲

- 斑马鱼发育
国家水生生物种质资源库 (NABRC)
 - 胚胎发育阶段及命名
 - 发育进程简介
- 斑马鱼研究应用
国家斑马鱼资源中心 (CZRC)
 - 基础研究应用
www.zfish.cn
 - 人类疾病及药物筛选应用
 - 环境毒理学应用

本讲大纲

- 斑马鱼发育
国家水生生物种质资源库 (NABRC)
 - 胚胎发育阶段及命名
 - 发育进程简介
- 斑马鱼研究应用
国家斑马鱼资源中心 (CZRC)
 - 基础研究应用
www.zfish.cn
 - 人类疾病及药物筛选应用
 - 环境毒理学应用

斑马鱼发育阶段



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 (NABRC)
 - 一般命名:
 - hpf* (hours post fertilization)
 - dpf* (days post fertilization)
 - 幼苗期 (larval) : 5-45dpf
 - 幼鱼期 (juvenile) : 45dpf-3m
 - 成鱼期 (adult) : >3m
 - 了解发育阶段的重要性

DEVELOPMENTAL DYNAMICS 203:253-310 (1995)

国家水生生物种质资源库

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.)

(NABRC)
Kimmel CB, et al.
Dev Dyn. 1995.
PMID: 8589427

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

DEVELOPMENTAL DYNAMICS 238:2975-3015, 2009

RESEARCH ARTICLE

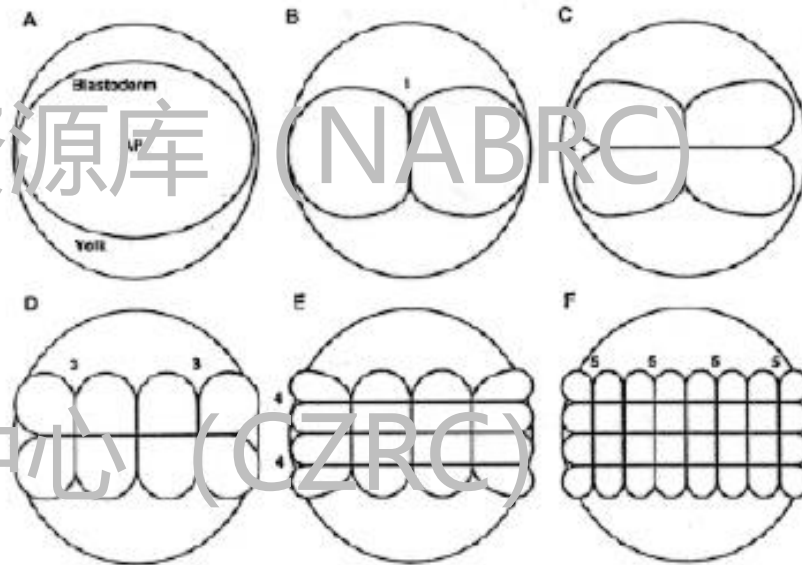
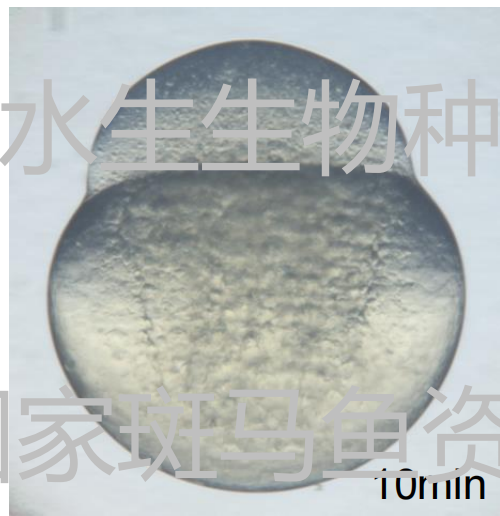
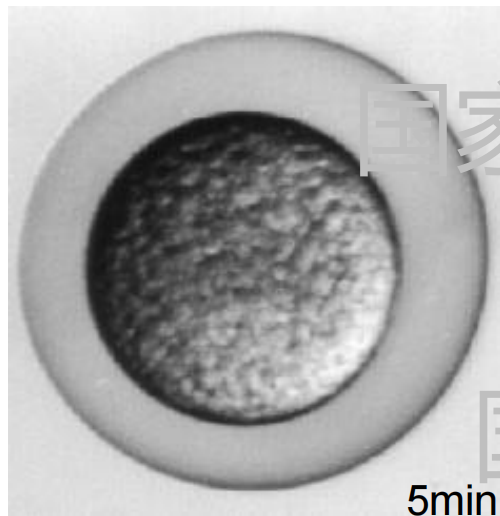
Normal Table of Postembryonic Zebrafish Development: Staging by Externally Visible Anatomy of the Living Fish

David M. Parichy,* Michael R. Elizondo, Margaret G. Mills, Tiffany N. Gordon, and Raymond E. Engeszer

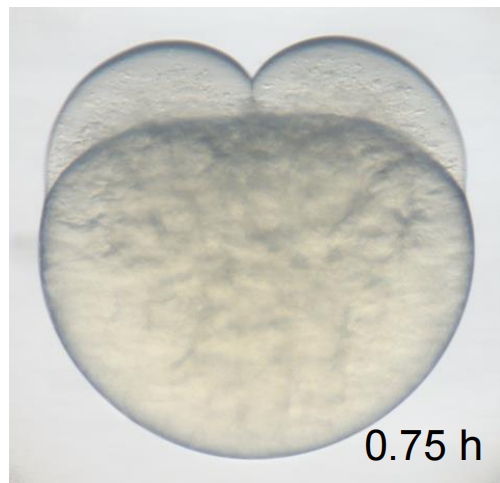
Parichy DM, et al.
Dev Dyn. 2009.
PMID: 19891001

www.zfish.cn

胚胎发育阶段: Zygote to Cleavage



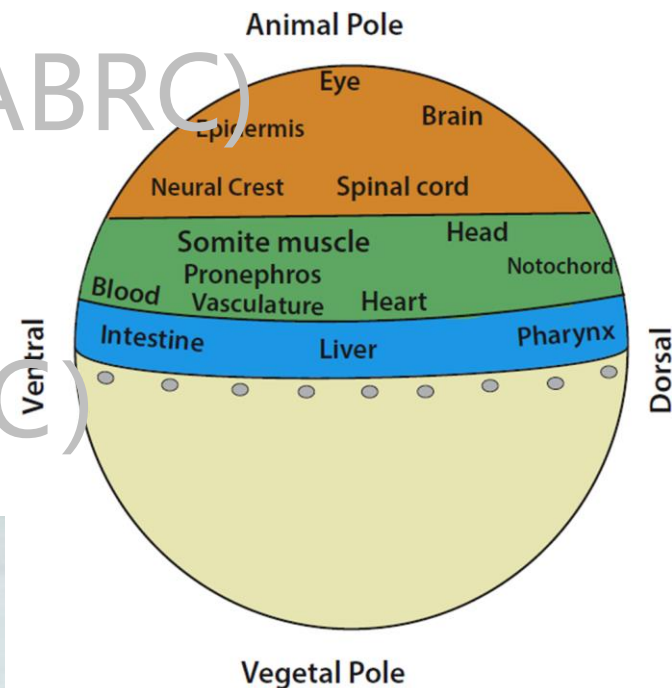
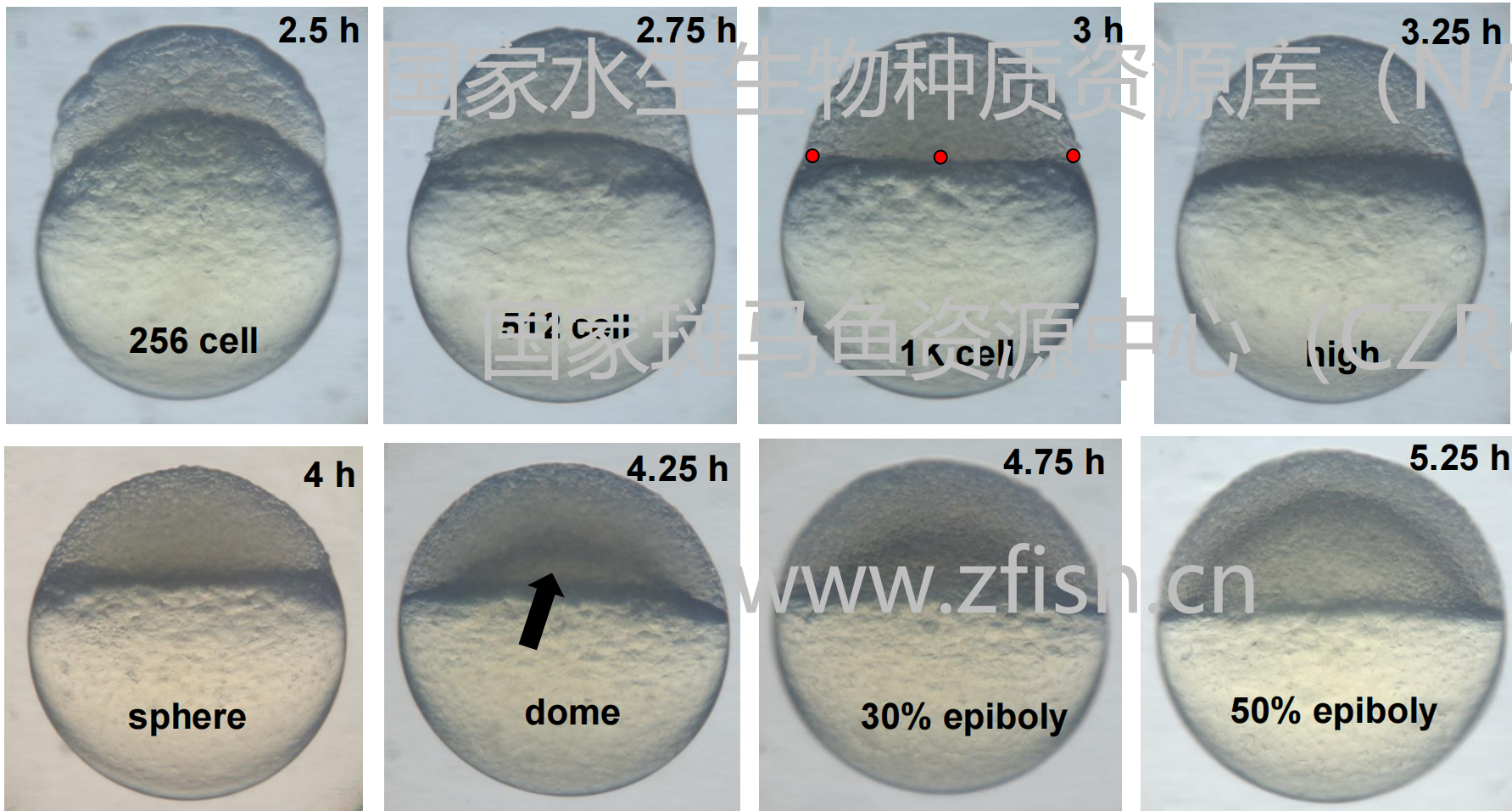
Kimmel et al, 1995



Zygote/0-0.75 hpf/1 cell
Cleavage/0.75-2 hpf/2-64 cell

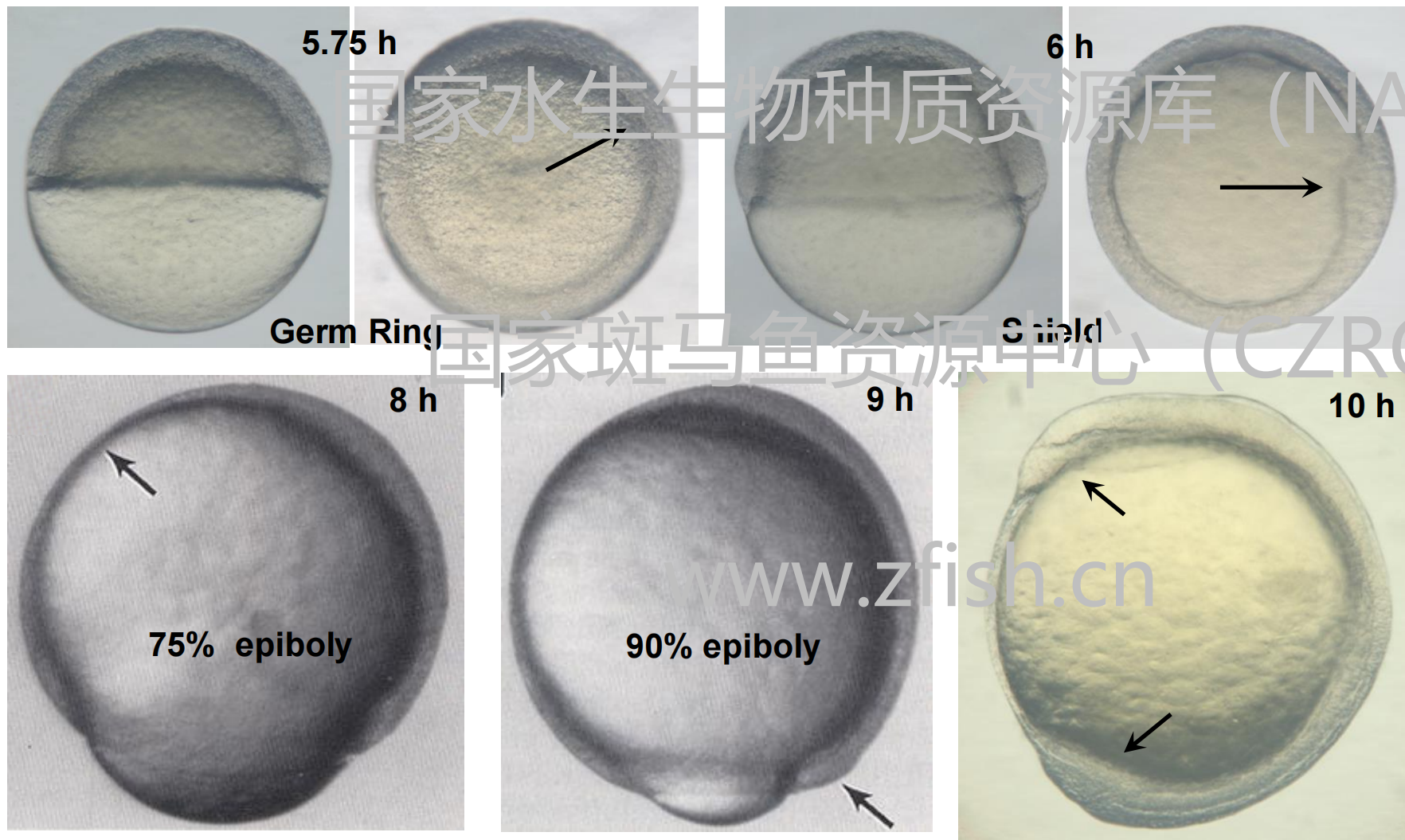
www.zfish.cn

胚胎发育阶段: Blastula Period



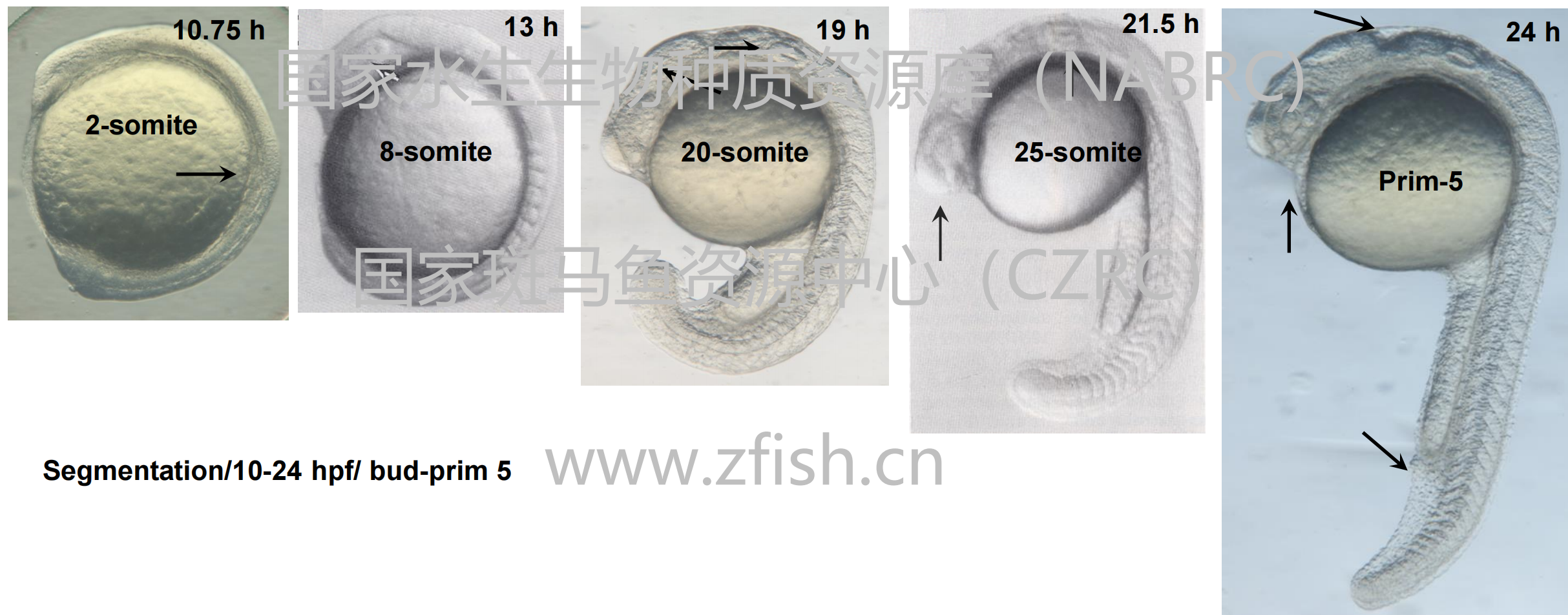
**Balstula/2.25-5.25 hpf/
128 cell-50% epiboly**

胚胎发育阶段: Gastrula Period



Gastrula/5.25-10 hpf/
50% epiboly-bud

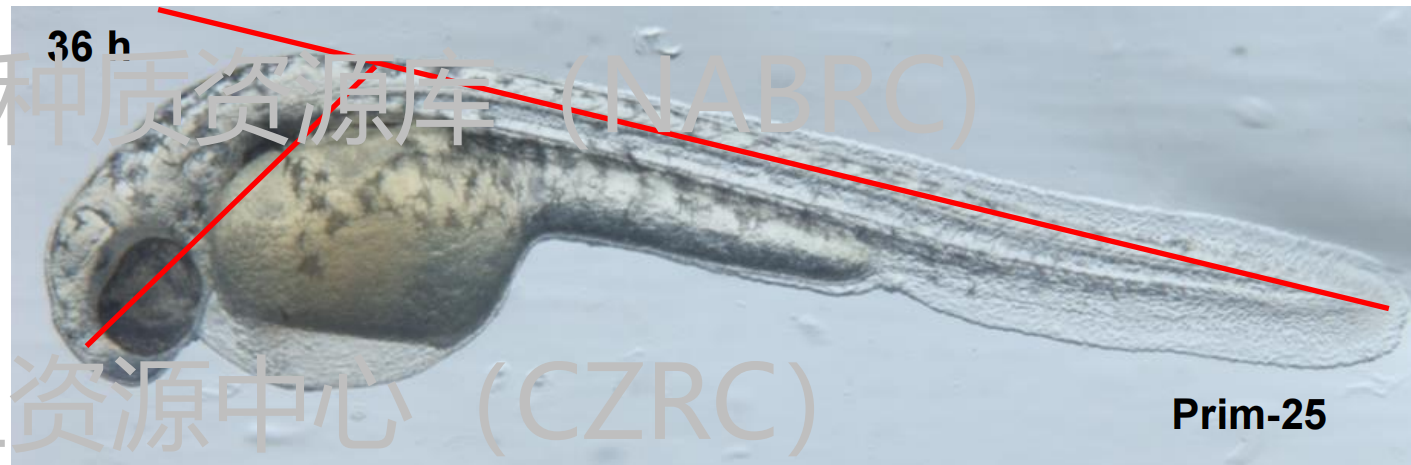
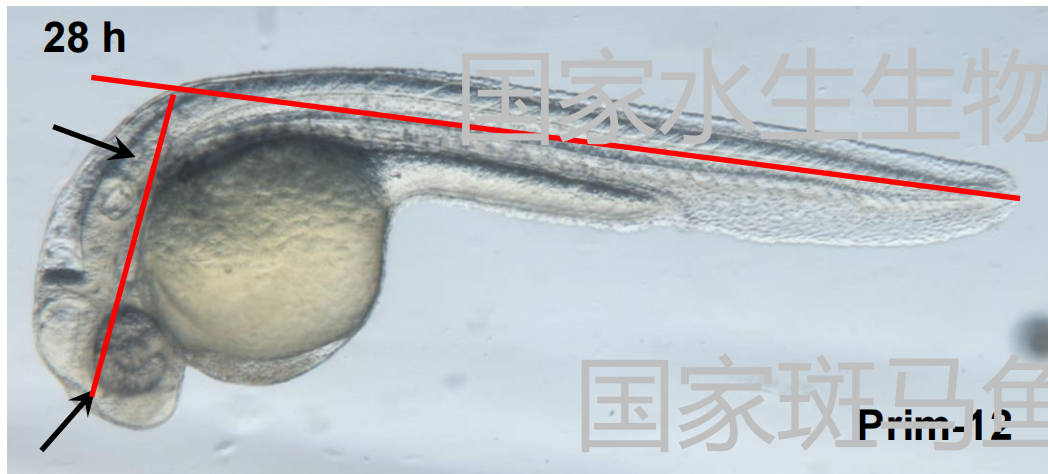
胚胎发育阶段: Segmentation Period



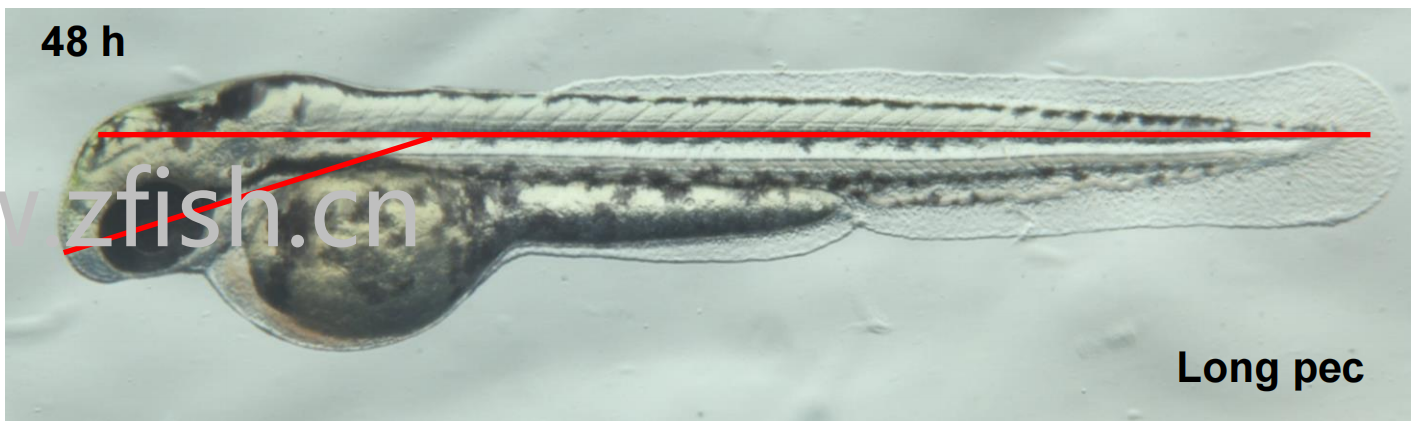
Segmentation/10-24 hpf/ bud-prim 5

www.zfish.cn

胚胎发育阶段：Pharyngula Period

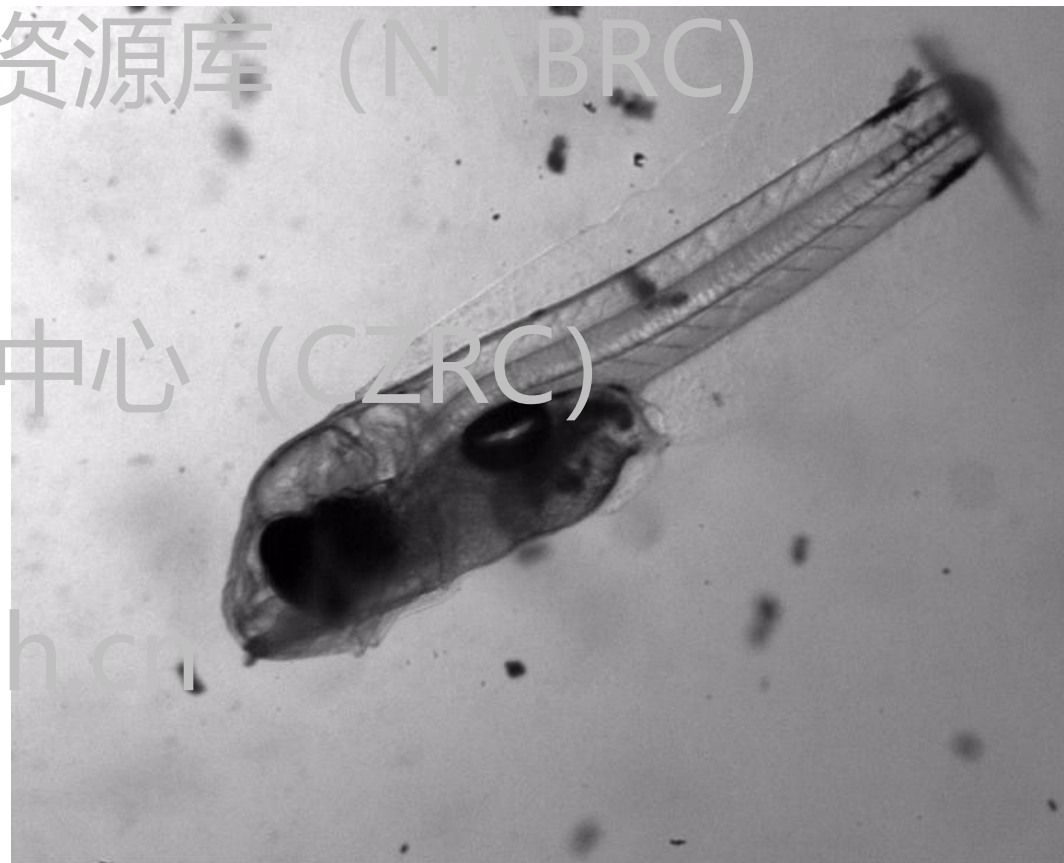
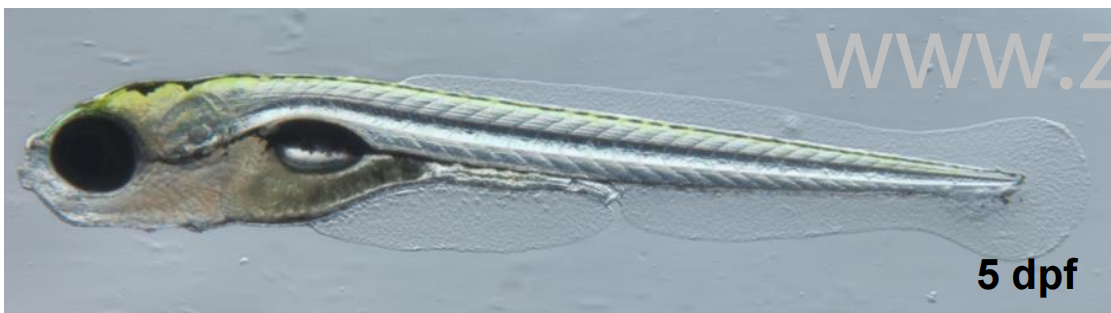
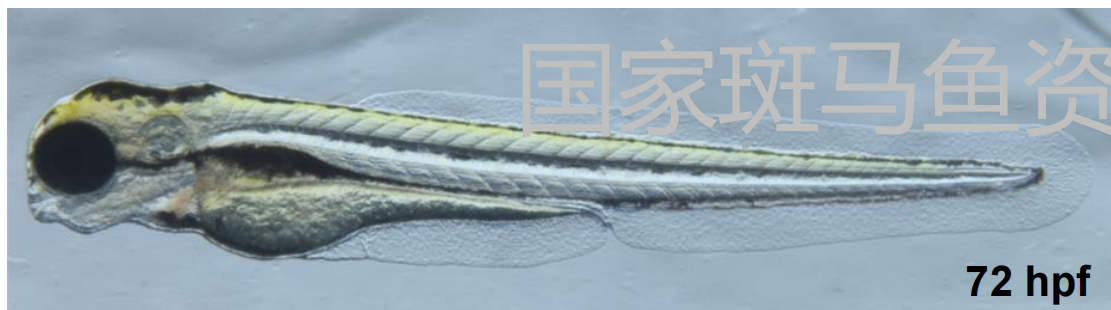
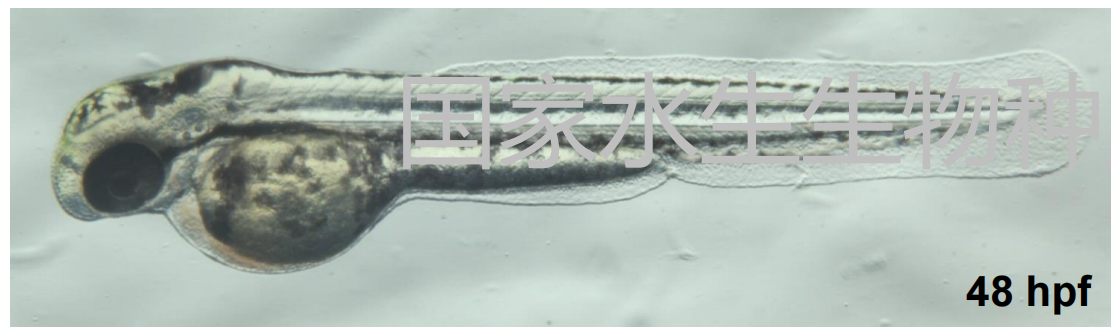


Pharyngula/24-48 hpf/
prim 6 – long pec



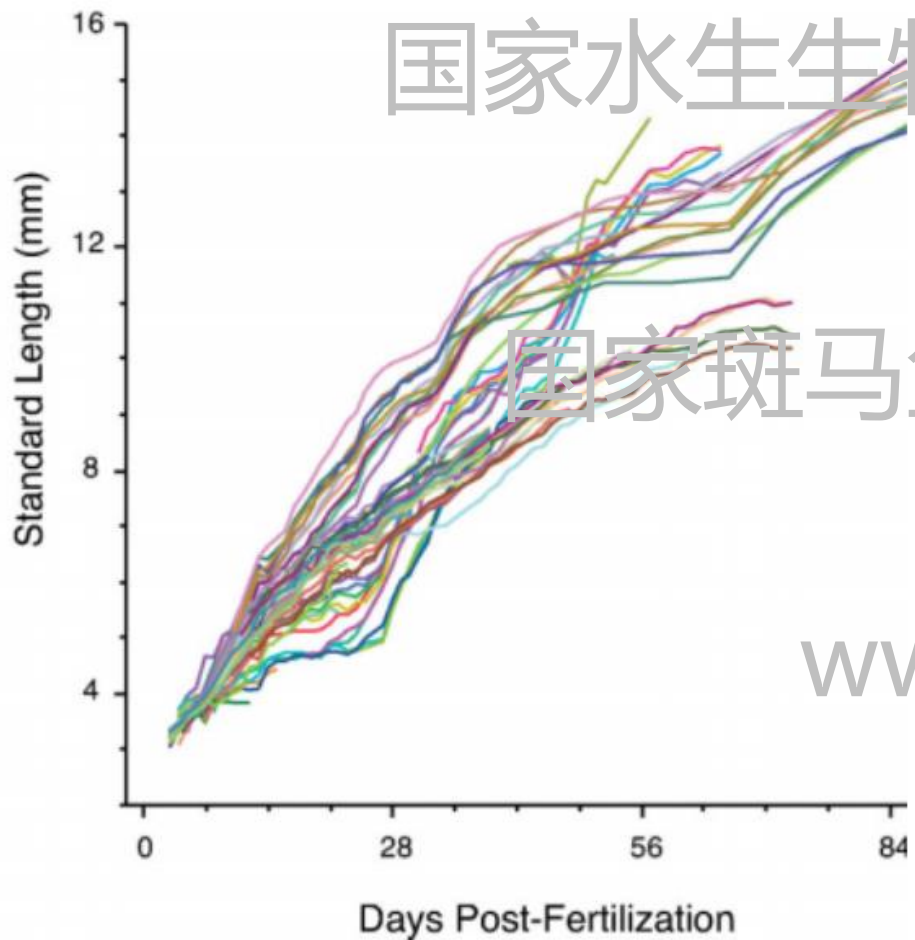
www.zfish.cn

胚胎发育阶段：Hatching



幼苗第5天开口，及时喂食对存活很重要

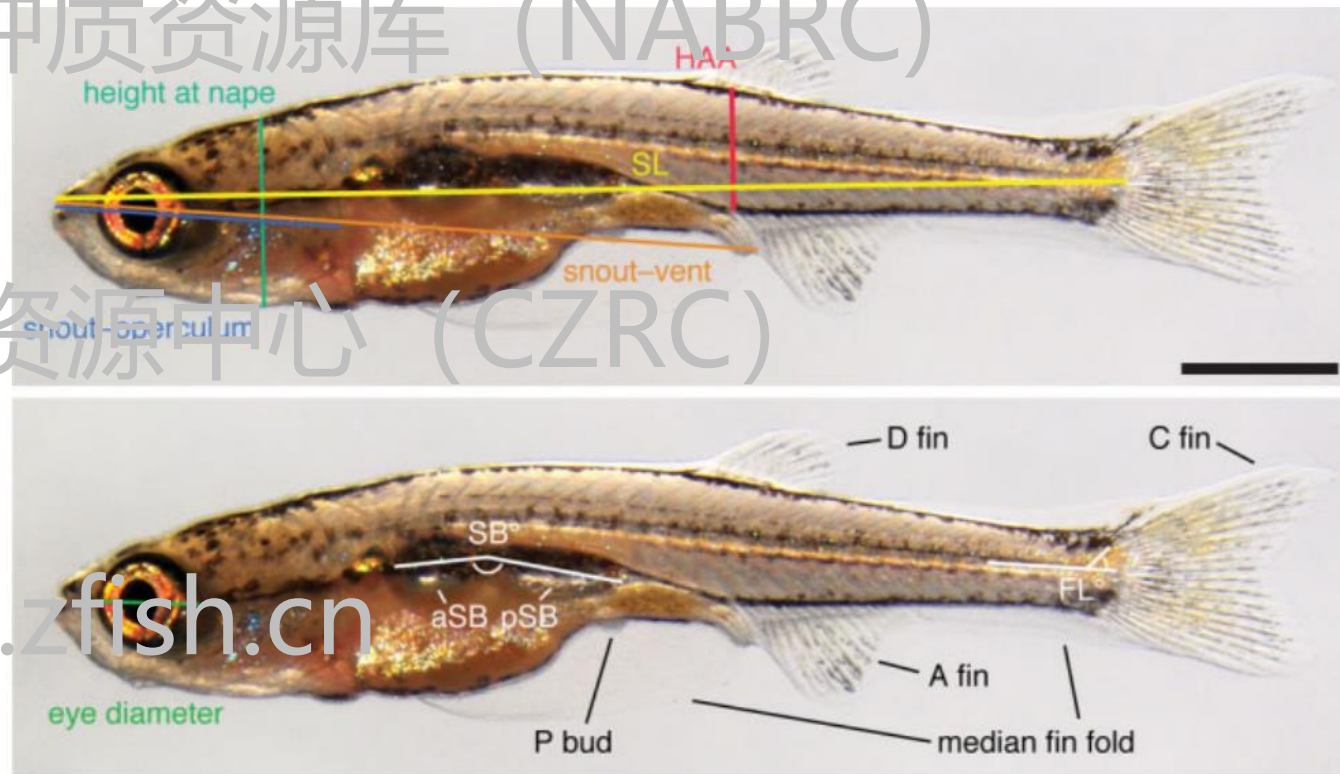
幼苗和幼鱼期 (以SL为标准判断)



国家水生生物种质资源库 (NABRC)

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

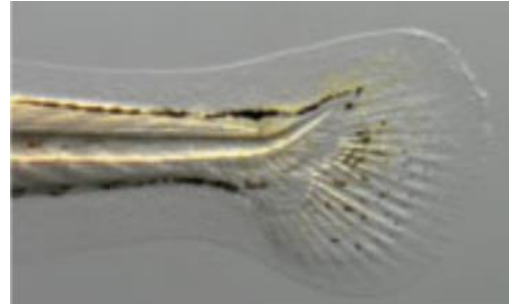
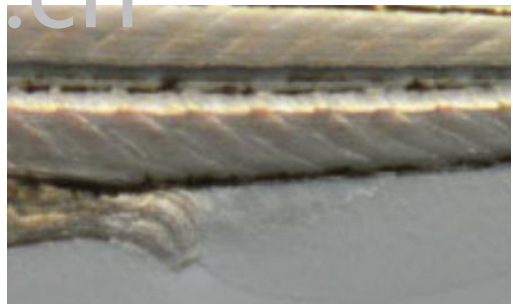
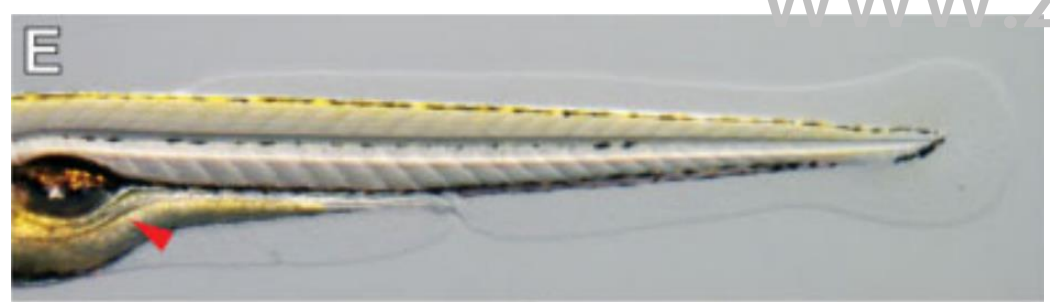
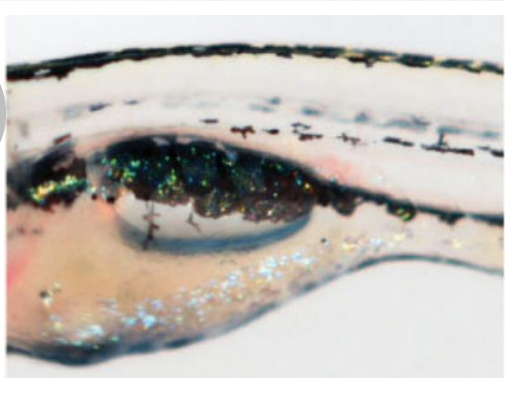
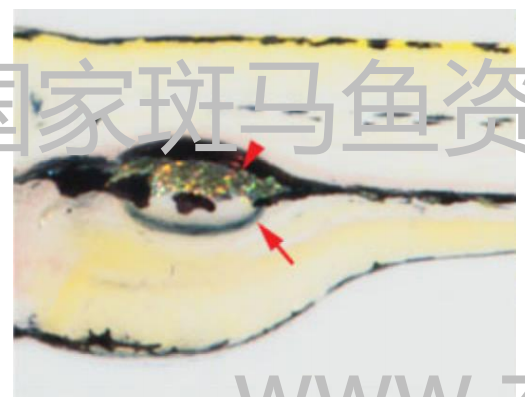
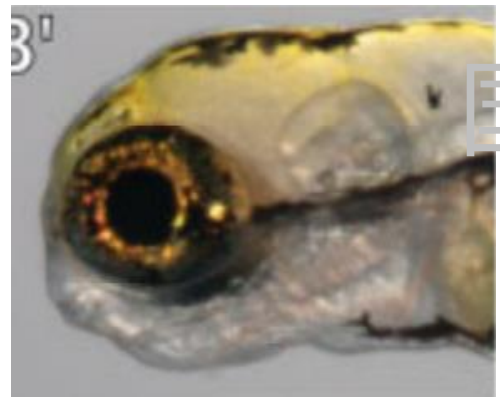
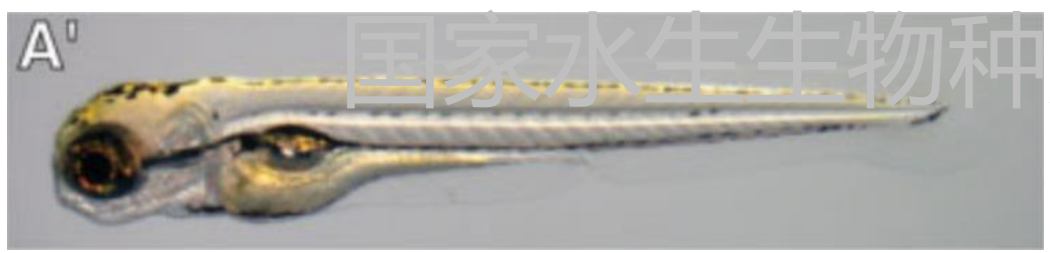
www.zfish.cn



幼苗早期 (early larva ~3.5-5.5mm)

3.5mm

5.5mm

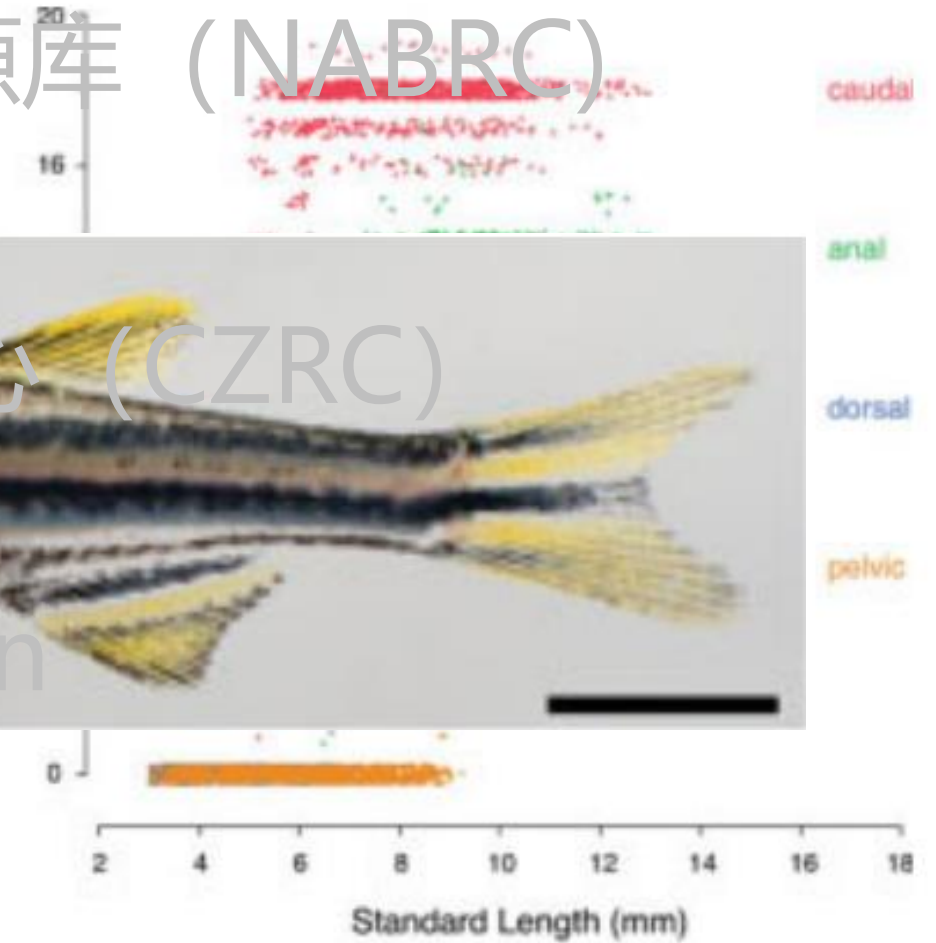
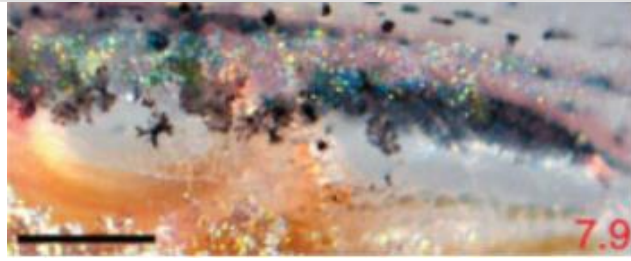
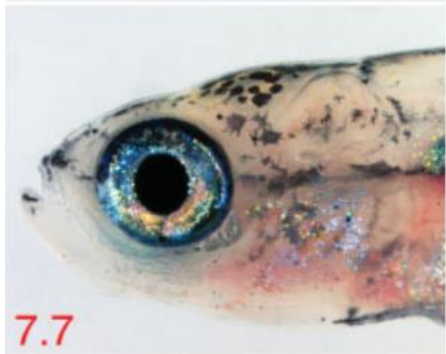
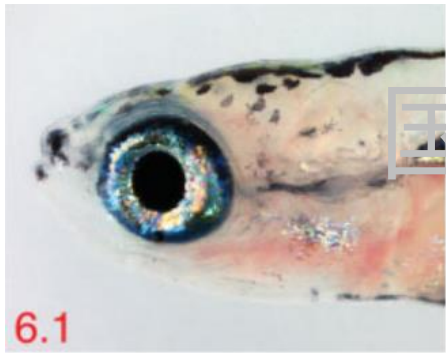


国家水生生物种质资源库 (NABRC)

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

www.zfish.cn

幼苗晚期 (late larva ~5.5-12mm)

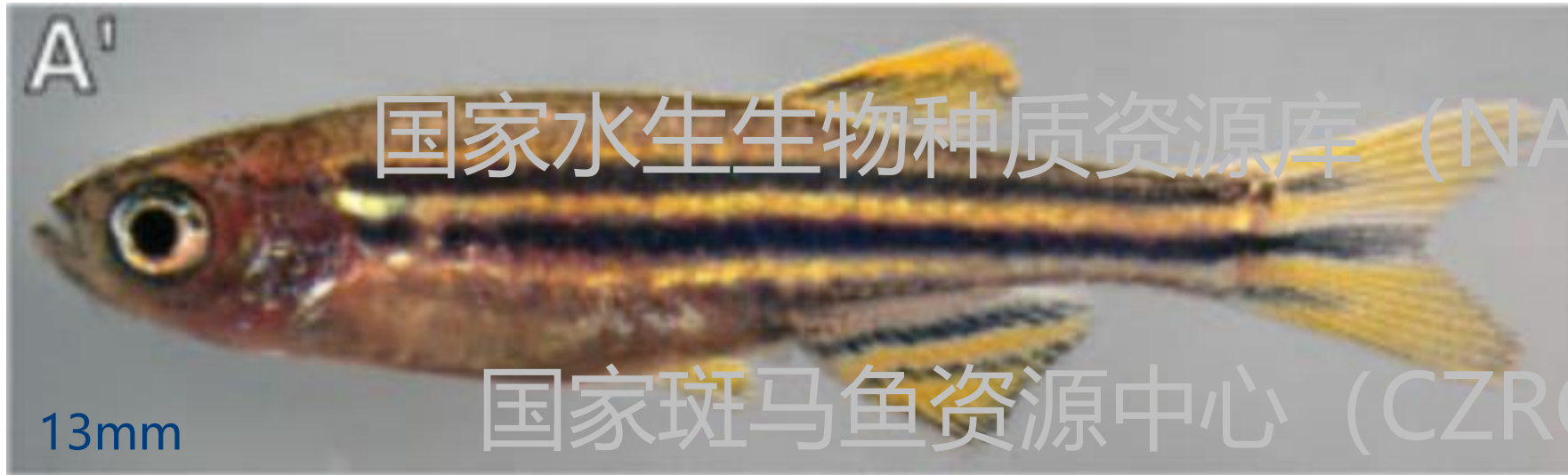


国家水生生物种质资源库 (NABRC)

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

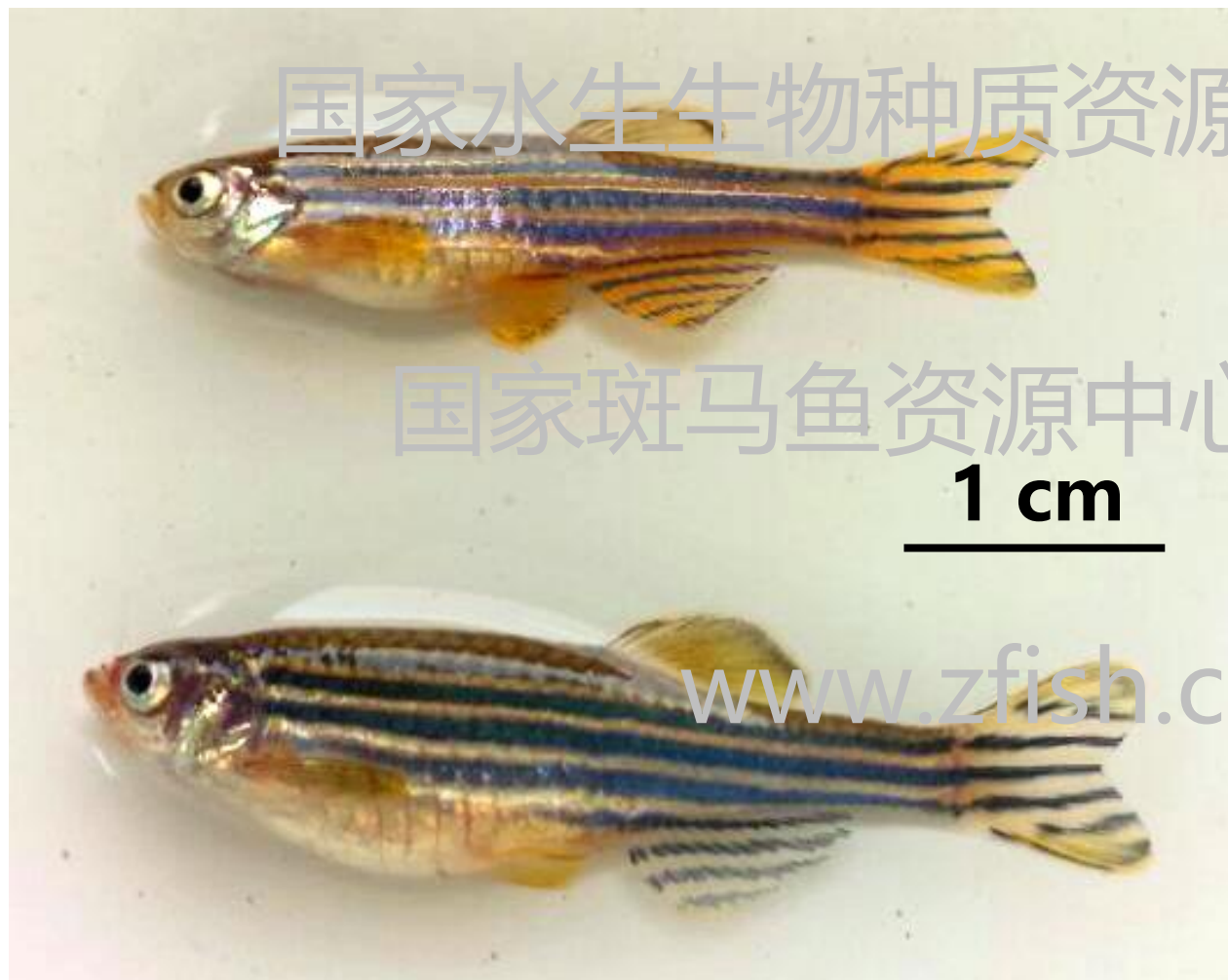
www.zfish.cn

幼鱼期 (juvenile, ~12-23mm)



juvenile:
most adult characteristics have been acquired in the absence of sexual maturity

实验养殖环境下，约三个月性成熟



国家水生生物种质资源库 (NABRC)

雄鱼：

体型修长，腹部扁平
体色为柠檬色

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

1 cm

雌鱼：

体型丰满，腹部膨大、银亮
体色银灰

发育指标和环境因素

- swim bladder
- fin fold disappear
- fin ray
- pigment pattern
- squamation
- lateral line
- temperature (24°C, 28°C, 33°C)
- density
- food level
- nutrition

www.zfish.cn

- 斑马鱼发育
国家水生生物种质资源库 (NABRC)
 - 胚胎发育阶段及命名
 - 发育进程简介
- 斑马鱼研究应用
国家斑马鱼资源中心 (CZRC)
 - 基础研究应用举例
 - 人类疾病及药物筛选应用举例
 - 环境毒理学应用举例

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）
- 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

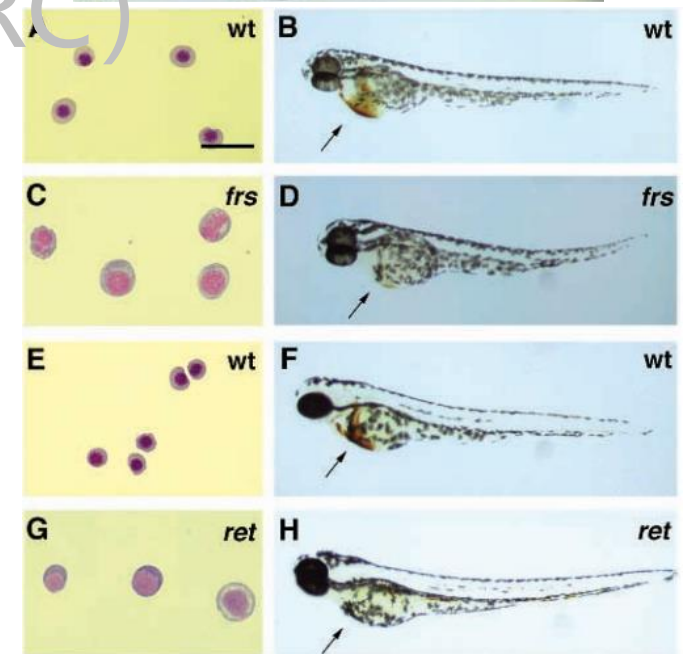
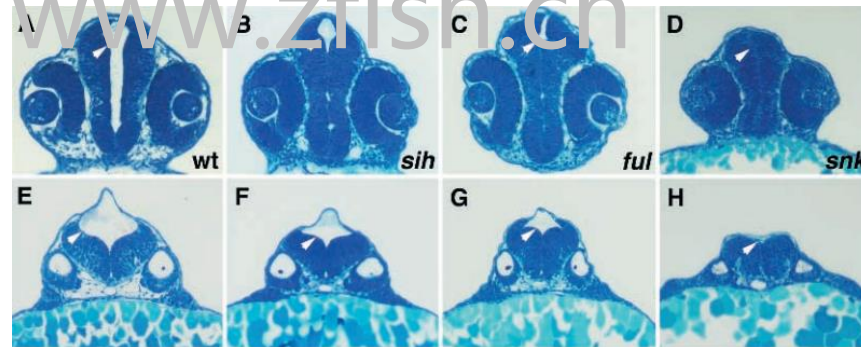
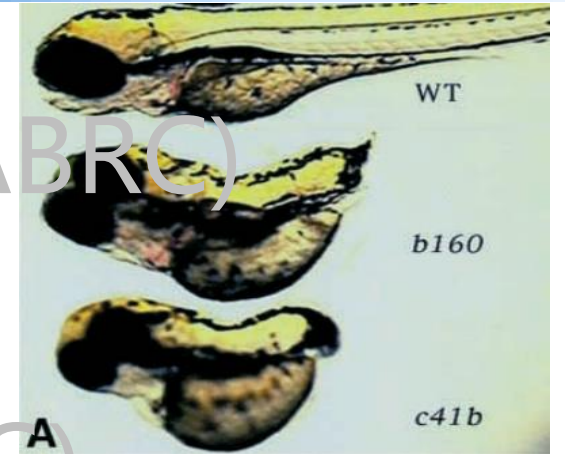
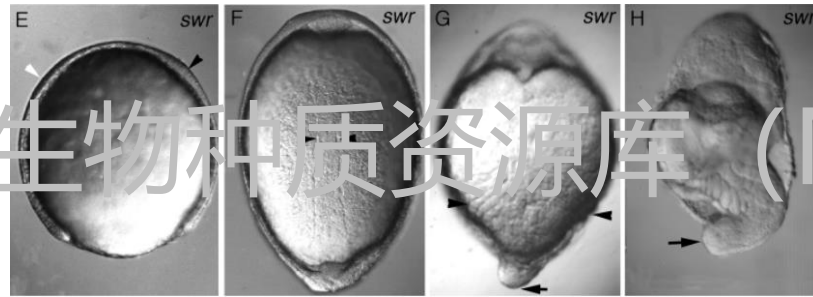
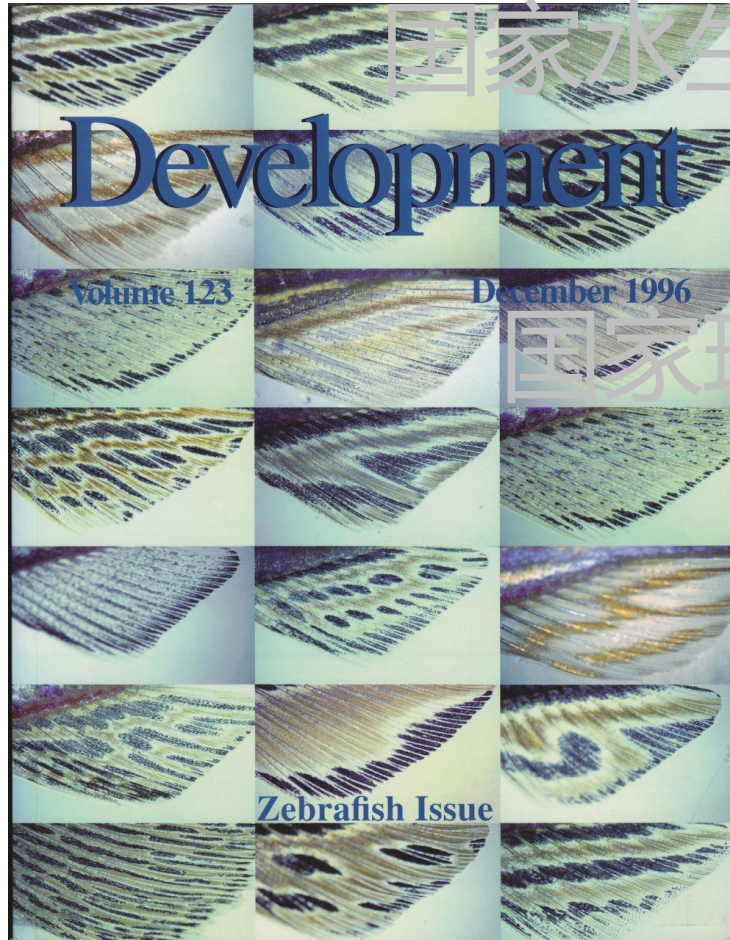
- 发育生物学
- 遗传学
- 分子遗传学
- 细胞生物学
- 神经生物学
- 基因组学
- 感染和免疫
- 损伤和再生科学
- 细胞自噬
- 生物节律
- 人类疾病模型
- 动物行为学
- 环境生物学
- 毒理学
- 化合物筛选
- 进化生物学
- 鱼类遗传学
- 鱼类育种

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

www.zfish.cn

1990s: The Tübingen/Boston Screens

the big screen



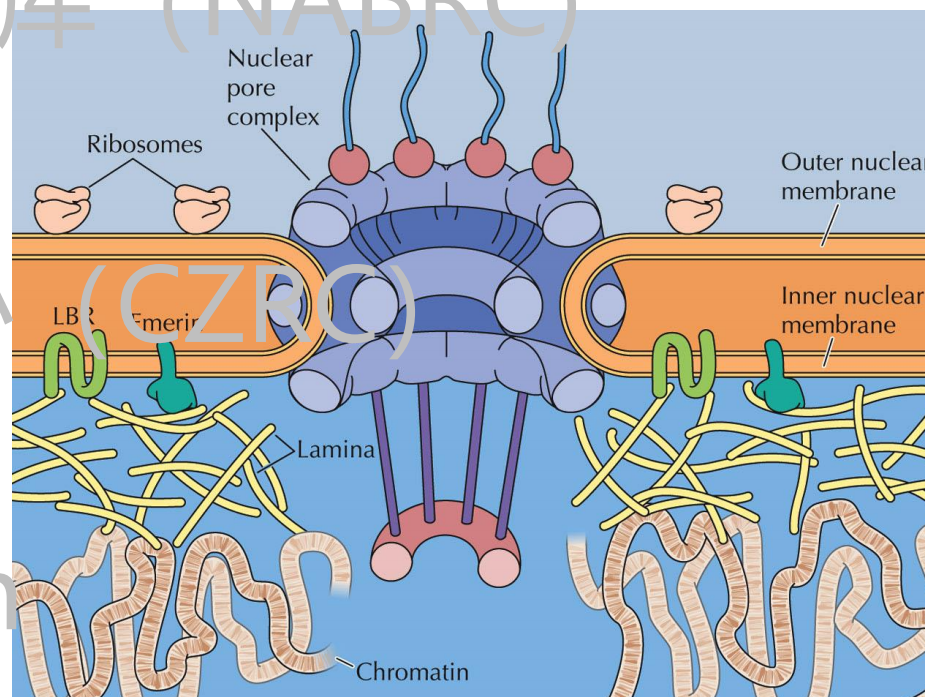
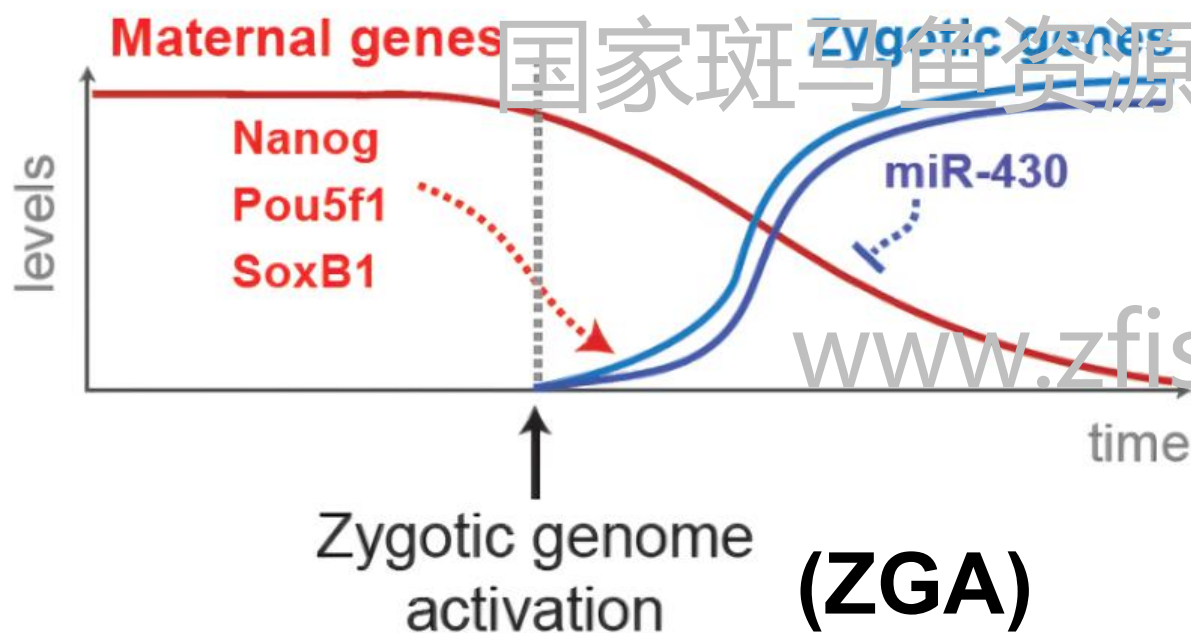
国家水生生物种质资源库 (NABRC)
国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

www.zfish.cn

基础研究：脊椎动物早期胚胎发育

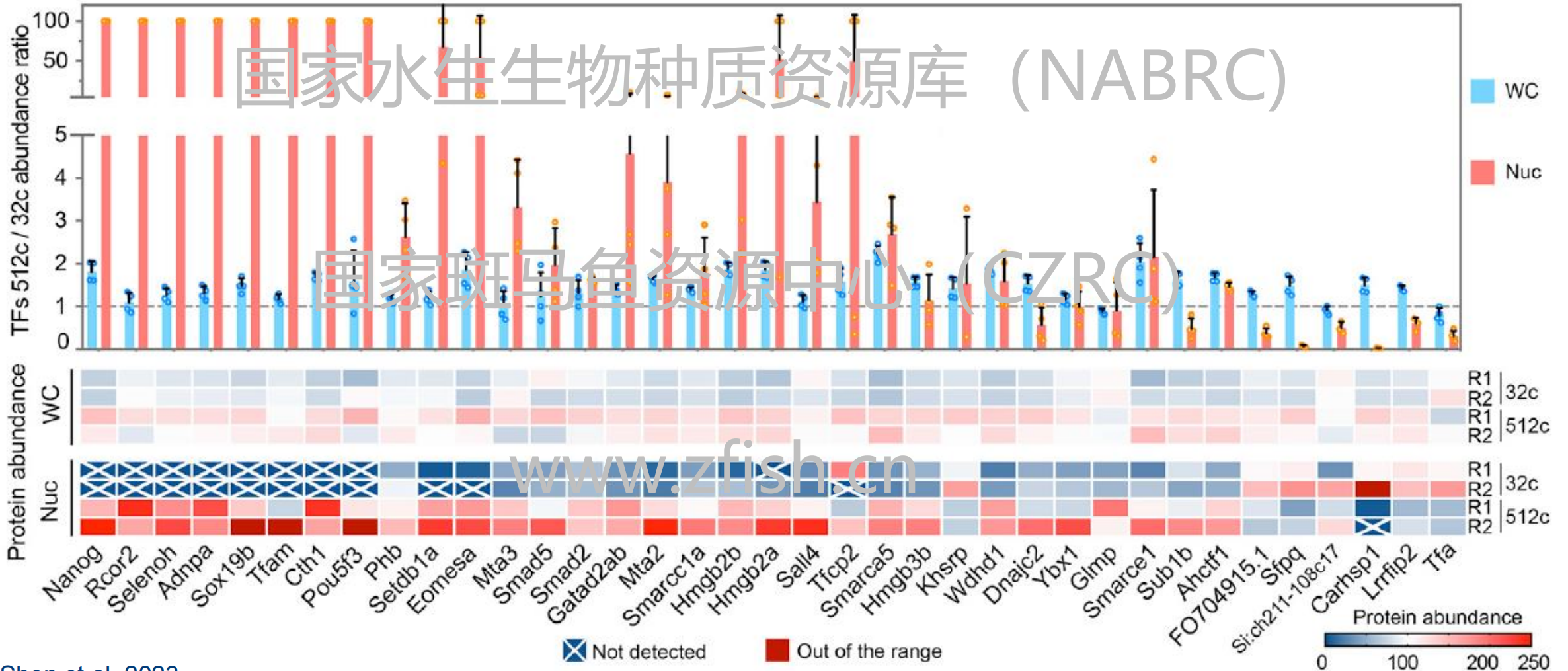


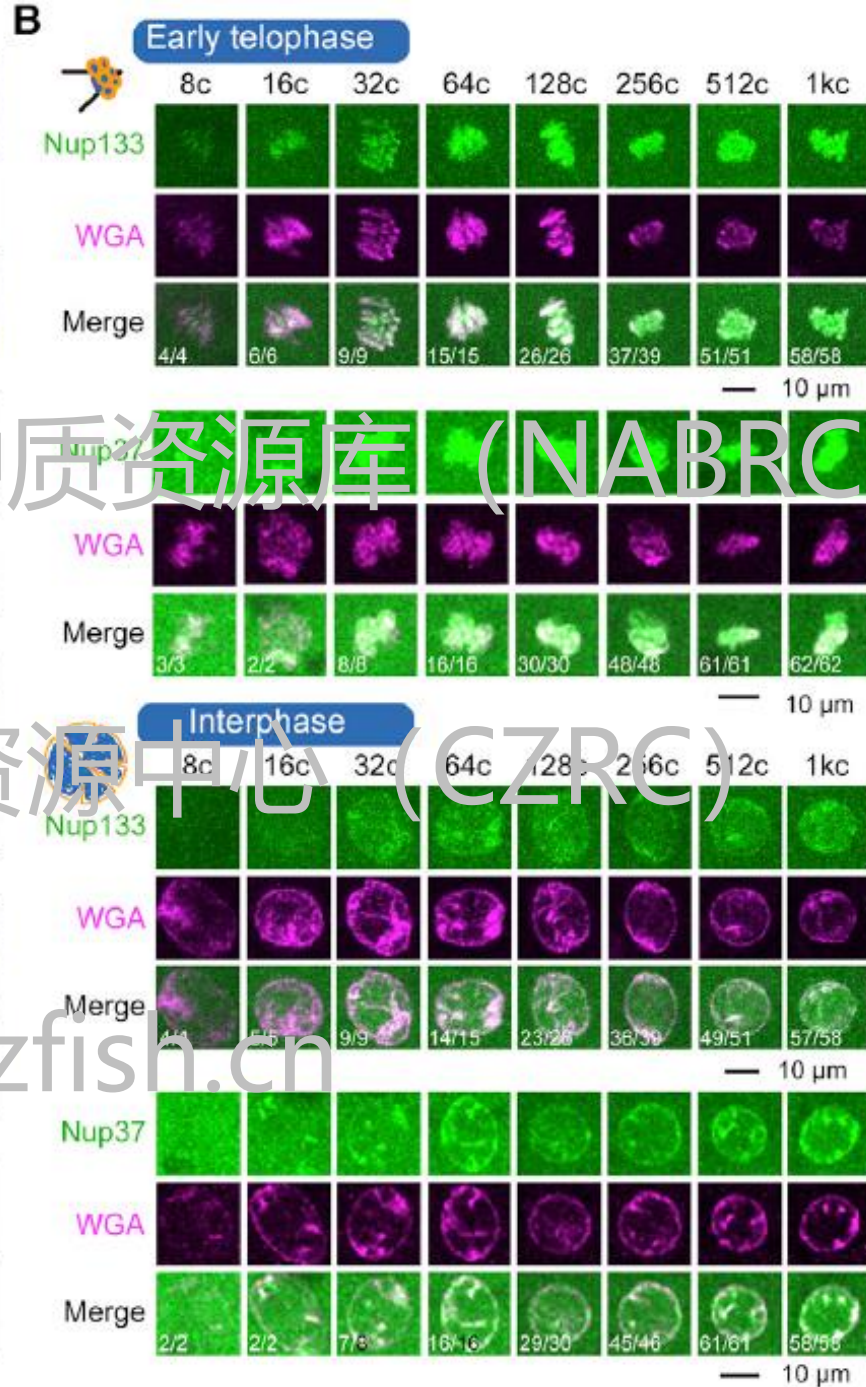
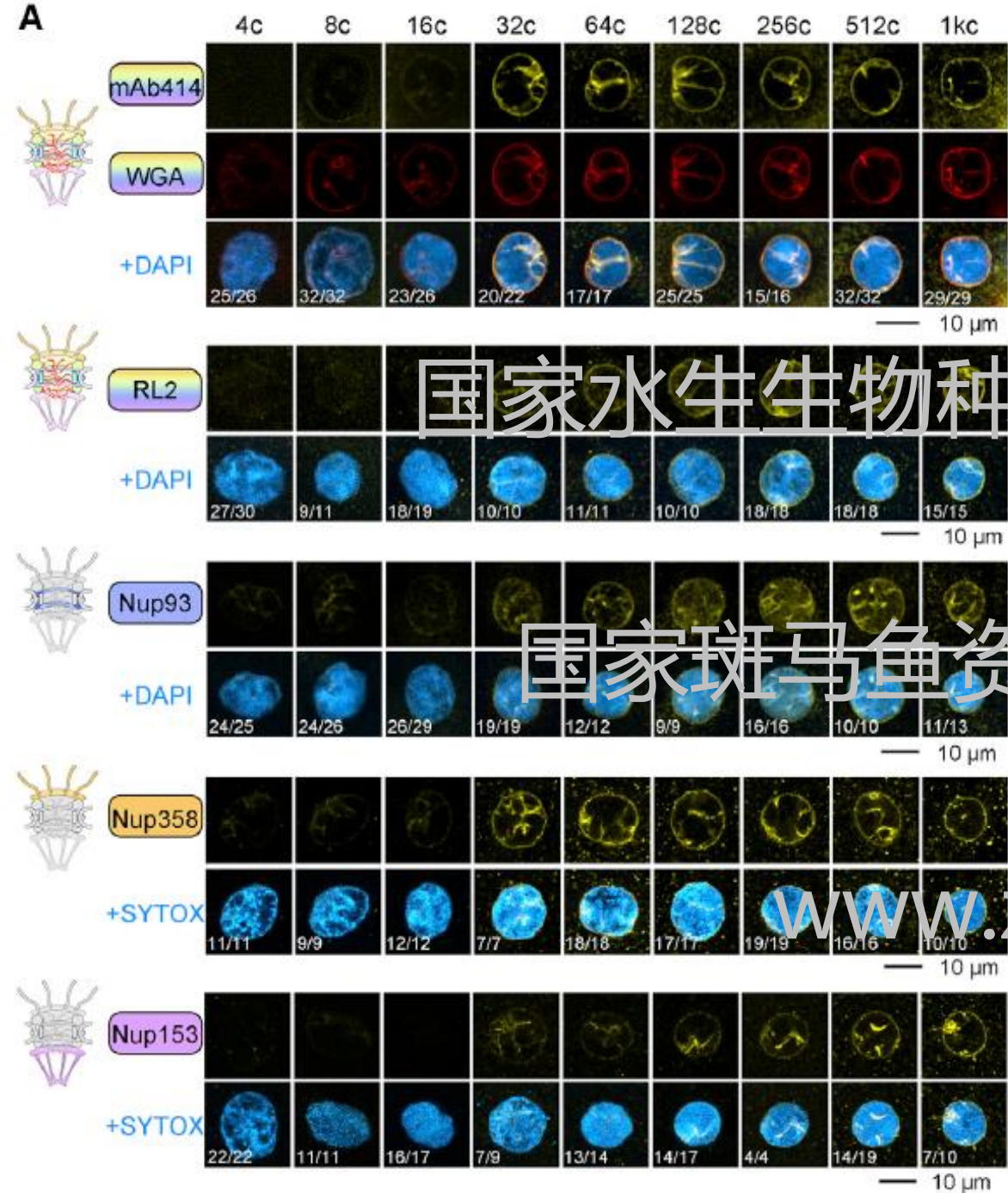
国家水生生物种质资源库 (NABRC)



www.zfish.cn

基础研究：大量TF核内聚集启动ZGA





国家水生生物种质资源库 (NABRC)

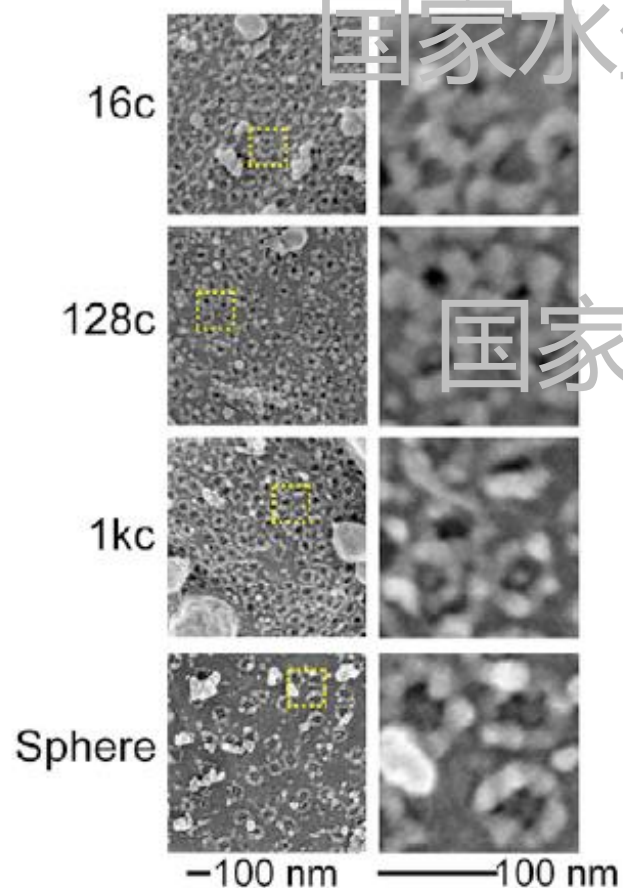
国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

www.zfish.cn

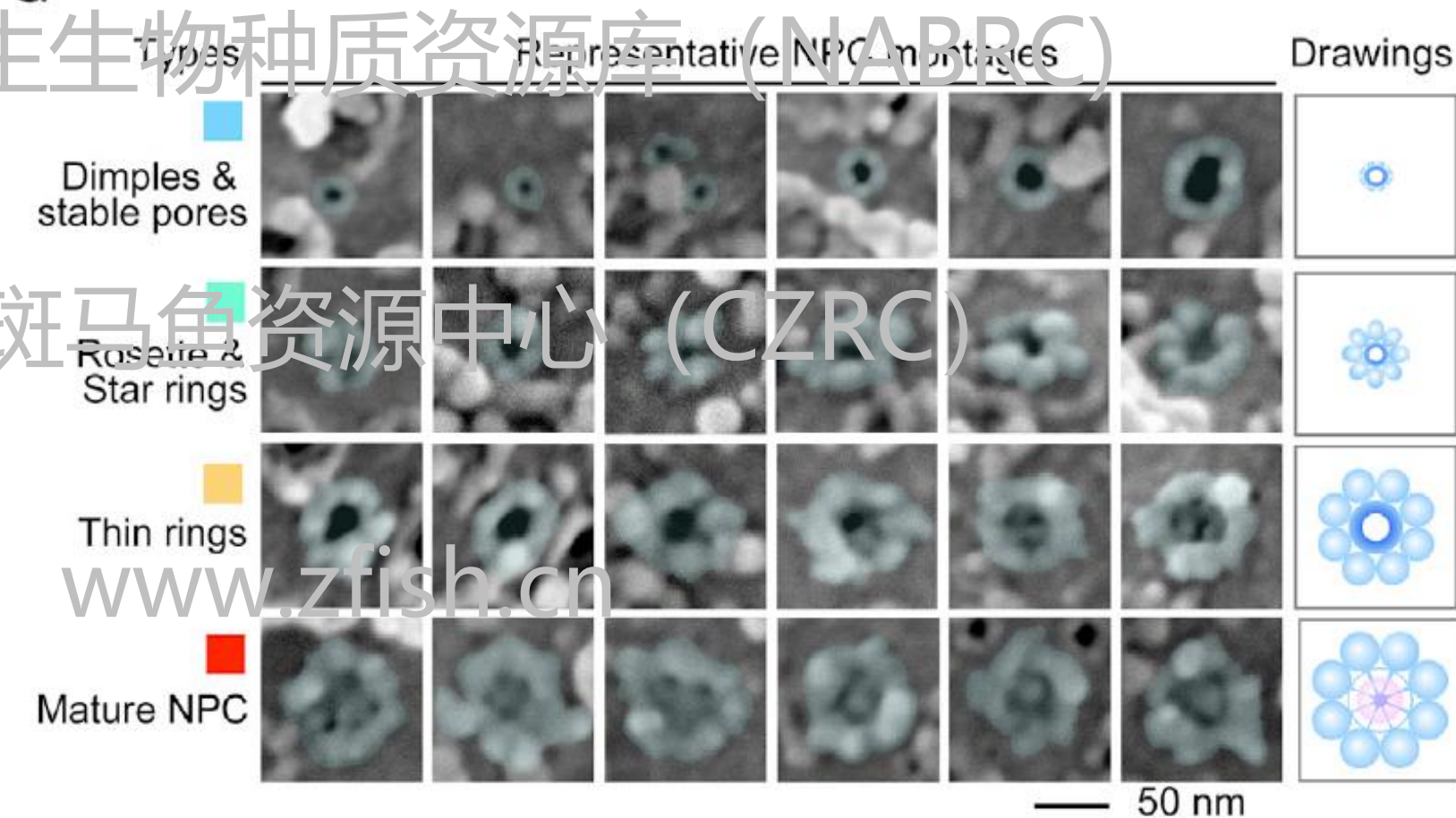
在发育过程中，
核孔蛋白逐渐聚集并成熟

基础研究：核孔成熟调控胚胎发育进程

F



G

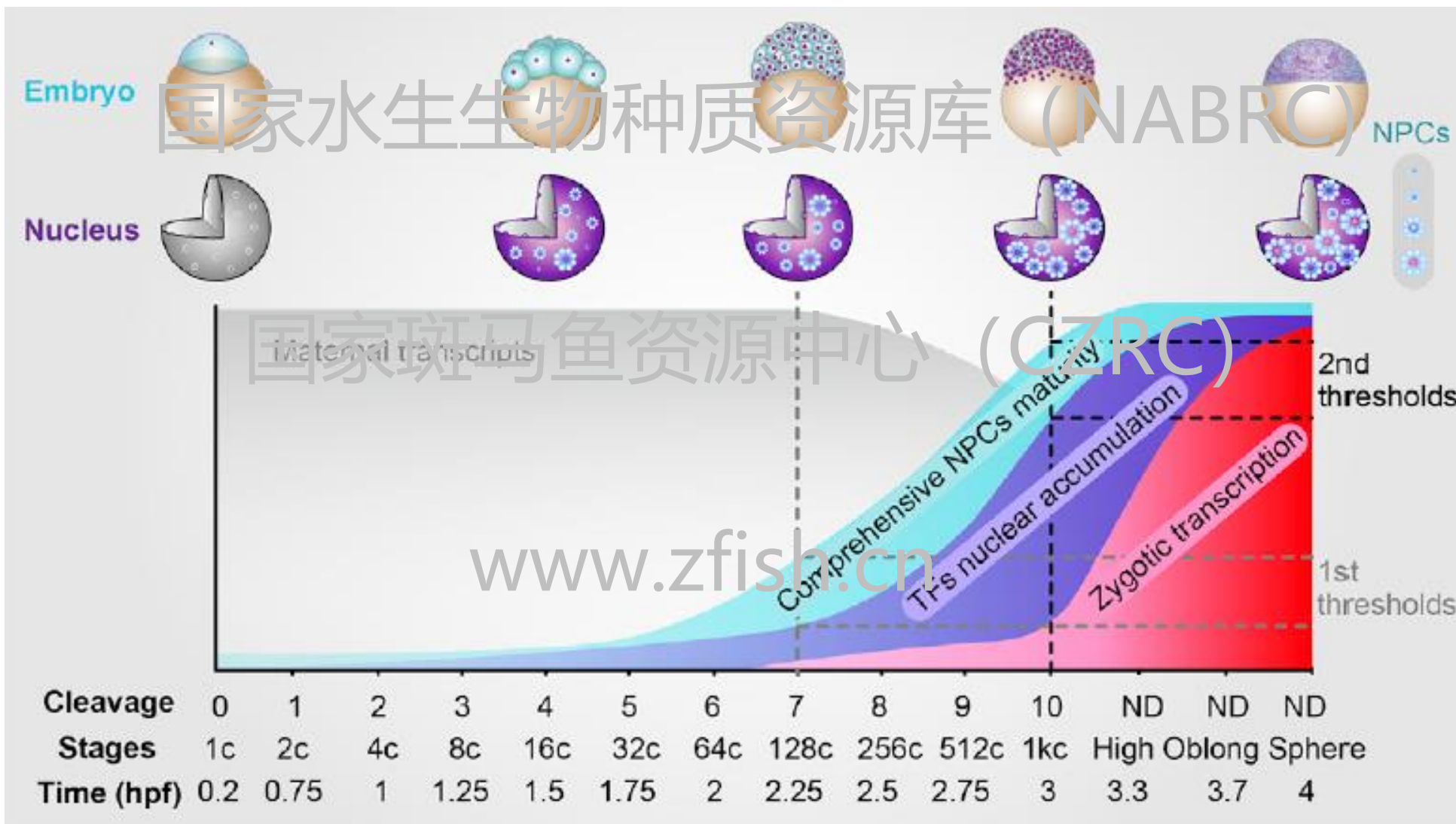


国家水生生物种质资源库 (NABRC)

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

www.zfish.cn

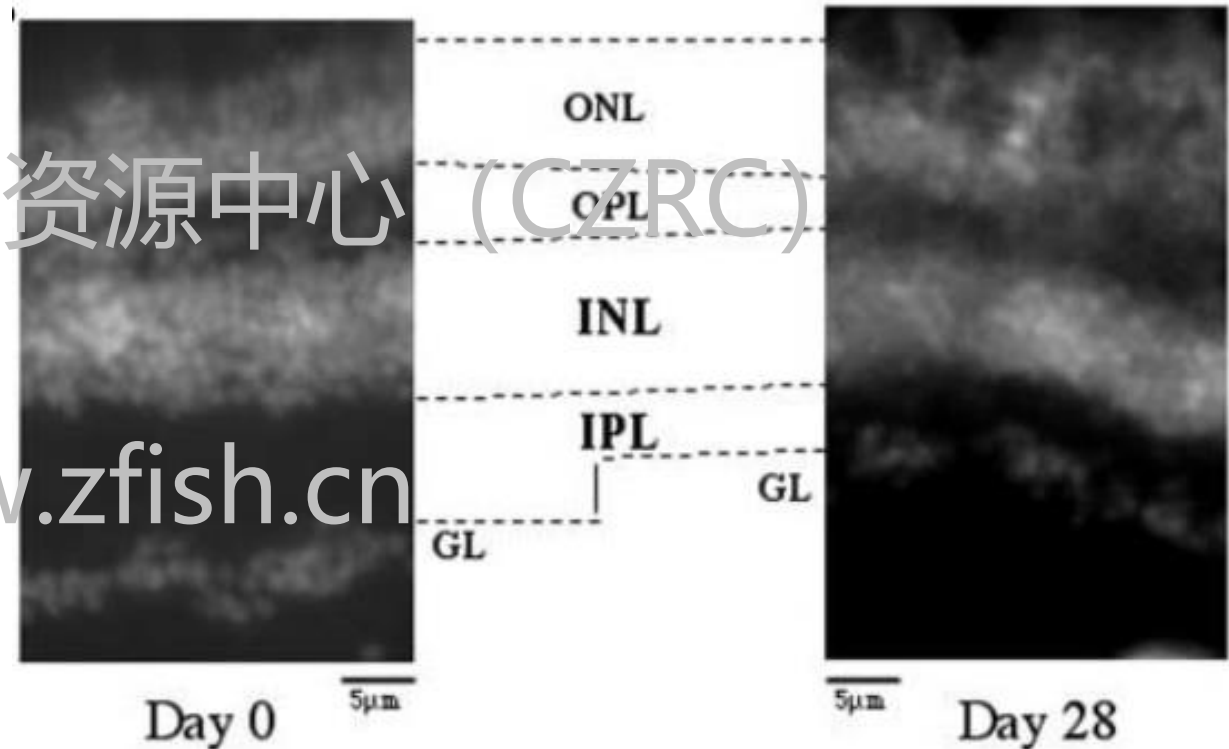
核孔蛋白成熟在ZGA中扮演生物钟



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



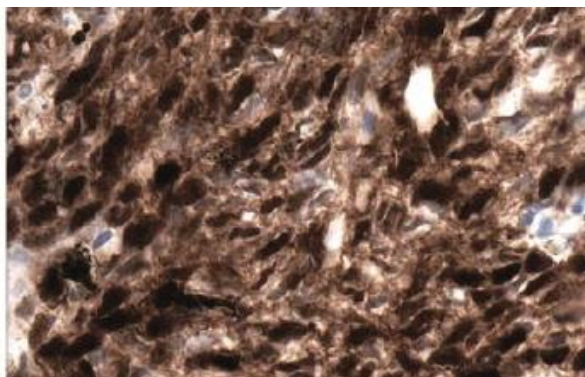
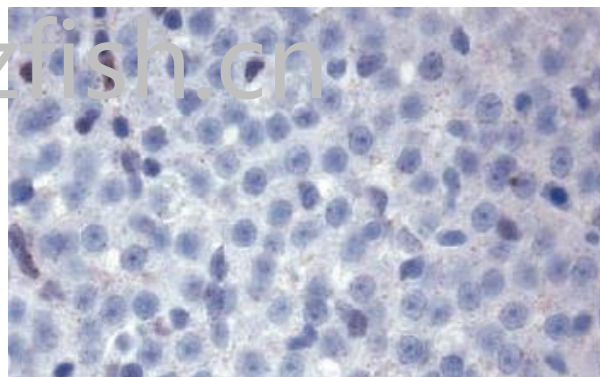
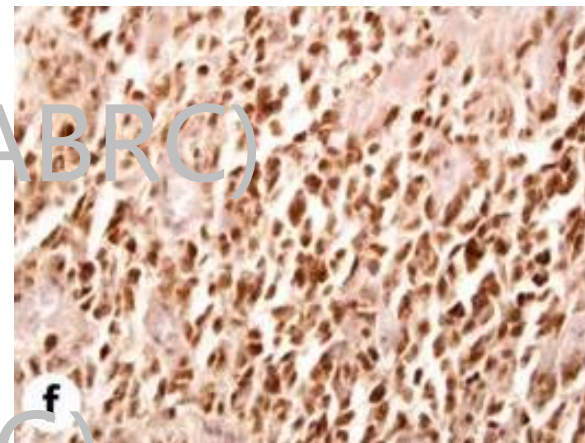
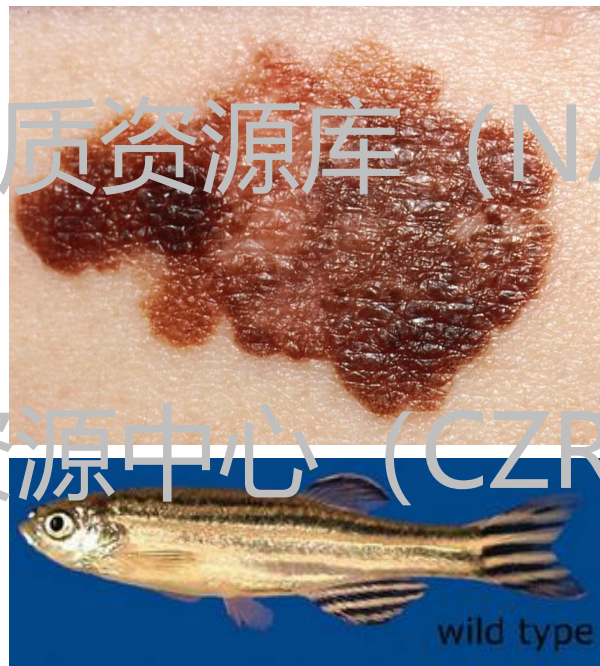
临床研究：构建人类疾病模型

- 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

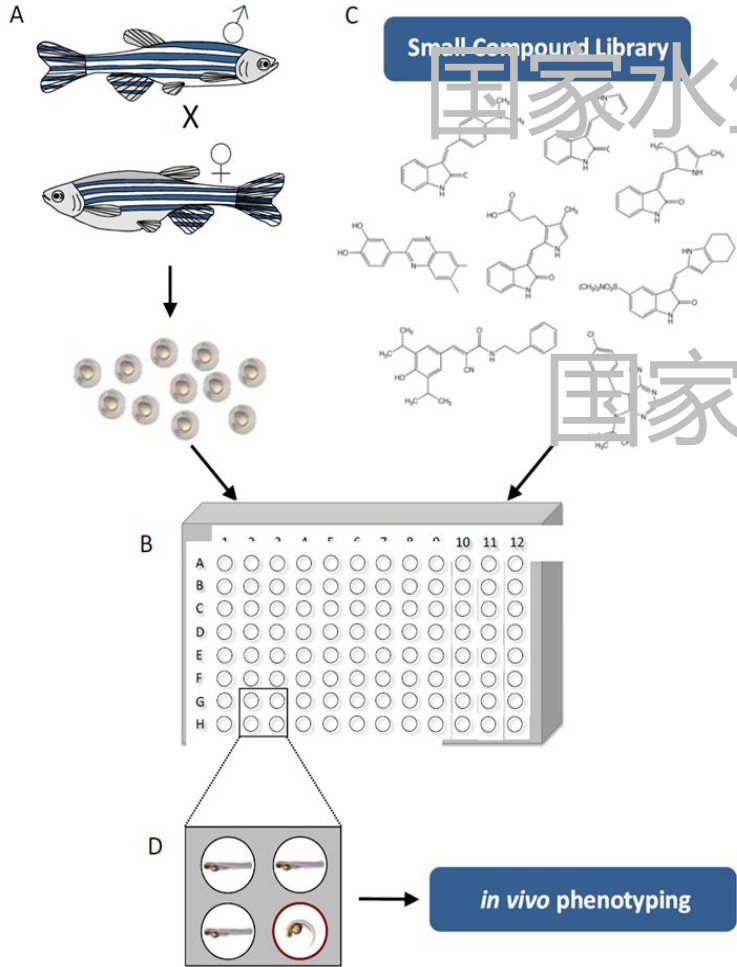
国家水生生物种质资源库 (NABRC)

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

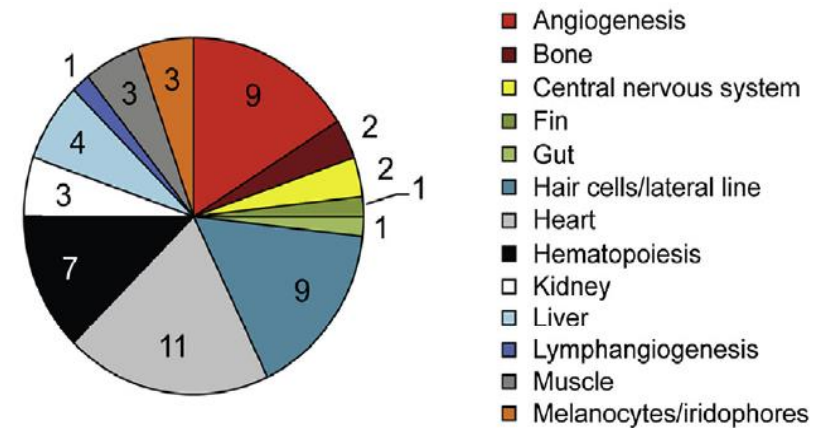
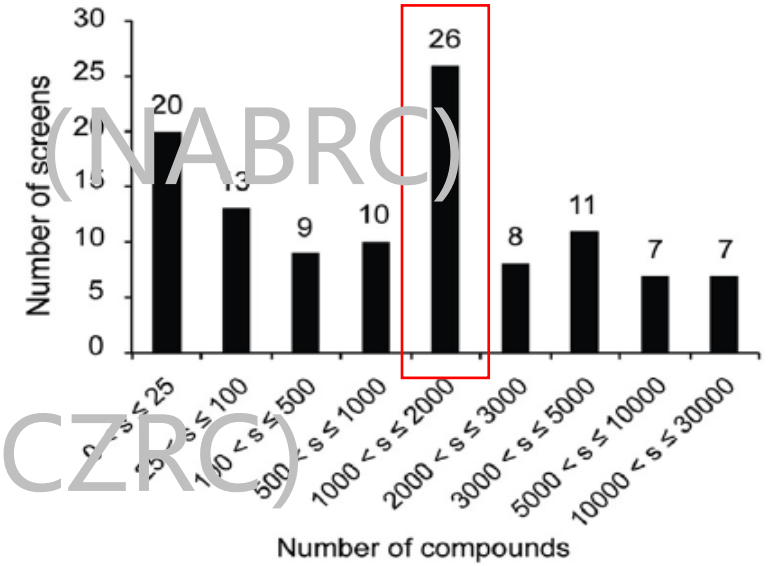
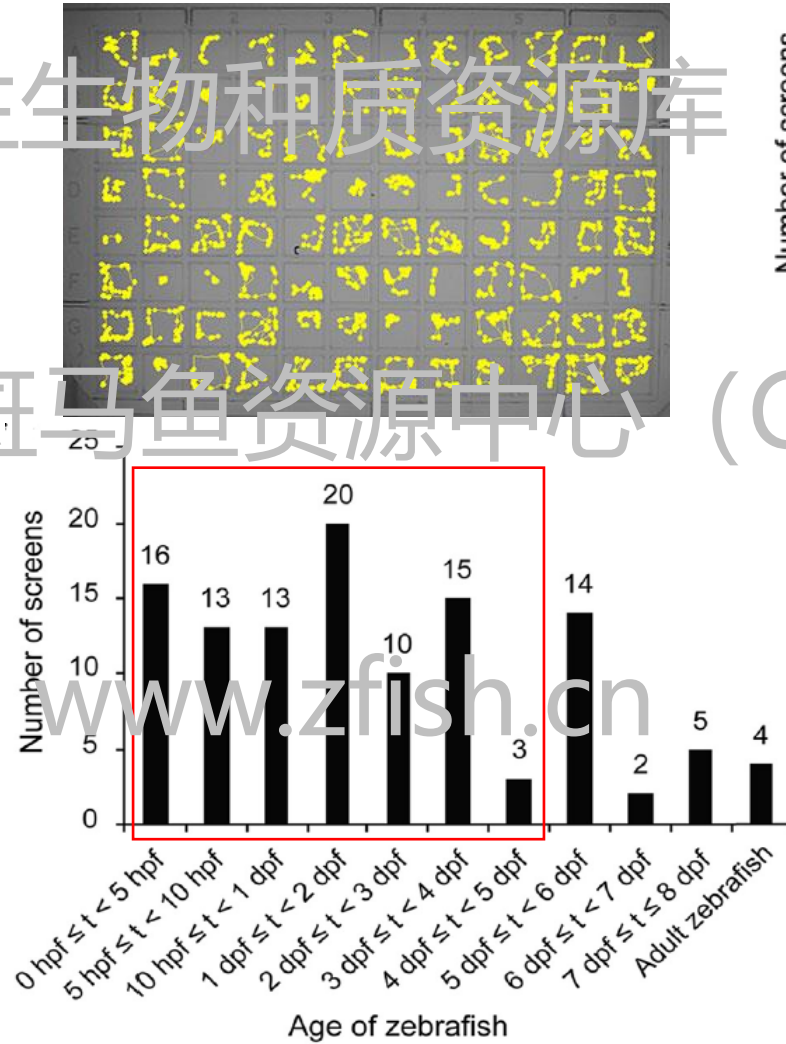
www.zfish.cn



应用研究：新型药物的筛选



Rennekamp&Peterson, 2015

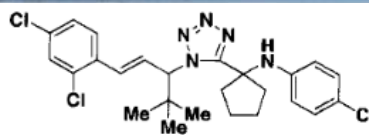
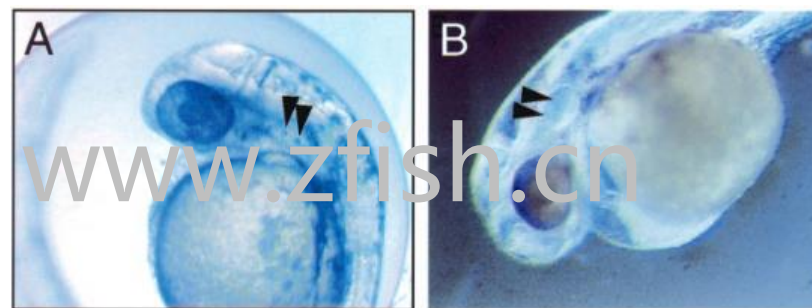
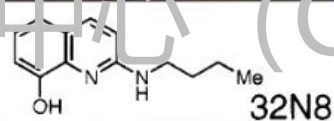
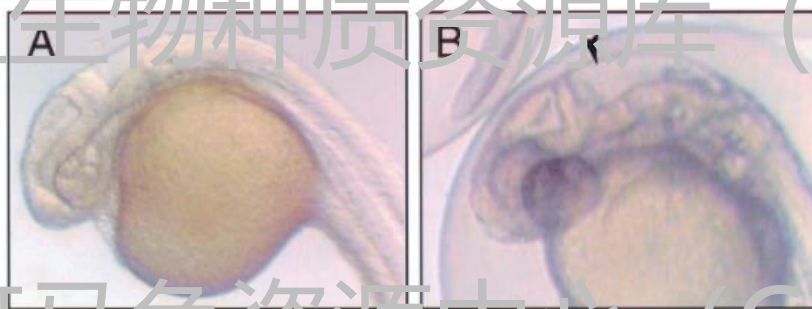


Zhang&Peterson, 2020

斑马鱼中的首次化合物筛选

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

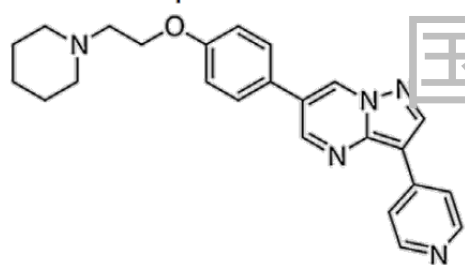
- ✓ Small molecules
- ✓ 1100 synthetic small molecules
- ✓ early development
- ✓ fertilized zebrafish eggs
- ✓ Wild type
- ✓ 96-well plates
- ✓ 3 embryos per well (per compound)
- ✓ Molecules were added to water



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

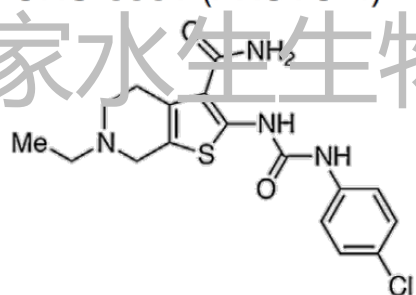
斑马鱼的药物筛选成功进入临床

Dorsomorphin



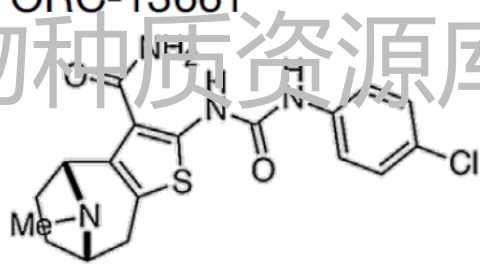
进行性骨化性
纤维发育不良

ORC-0001 (PROTO-1)

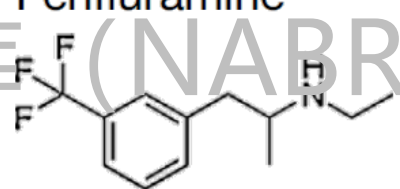


氨基糖苷类抗生素引起的毛细胞死亡

ORC-13661

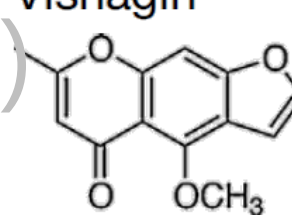


Fenfluramine



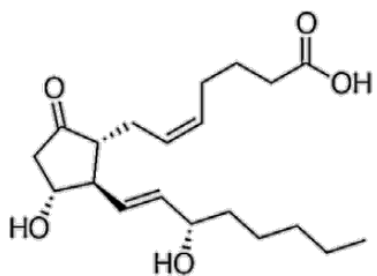
Dravet
Syndrome

Visnagin

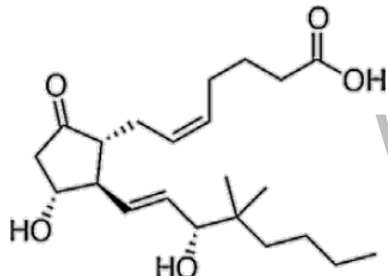


多柔比星引发心肌病

Prostaglandin E2 (PGE2) dmPGE2



脐带血干细胞移植

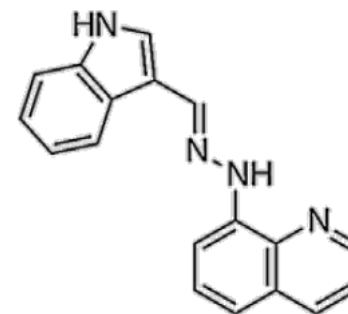


Finazine



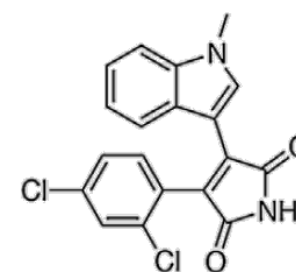
精神病

Lenaldekar



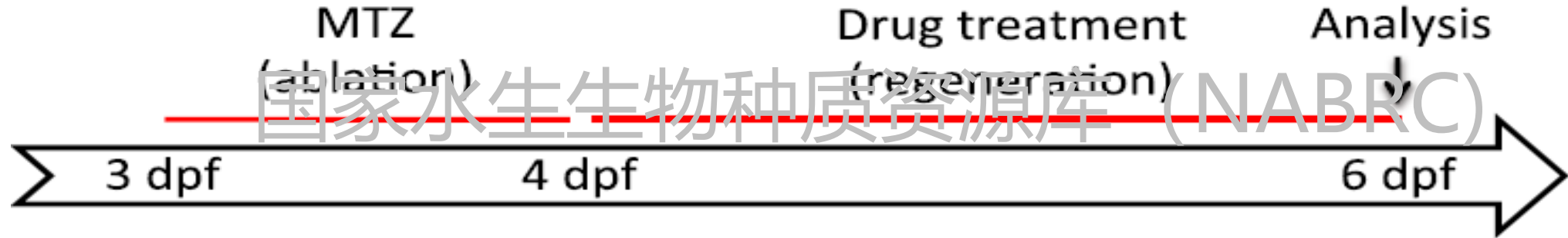
白血病

SB216763



心律失常性心肌病

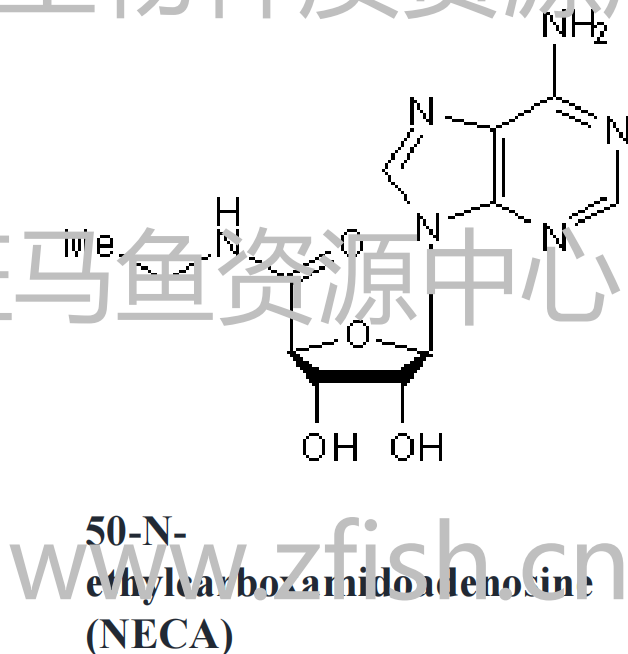
人类疾病模型构建



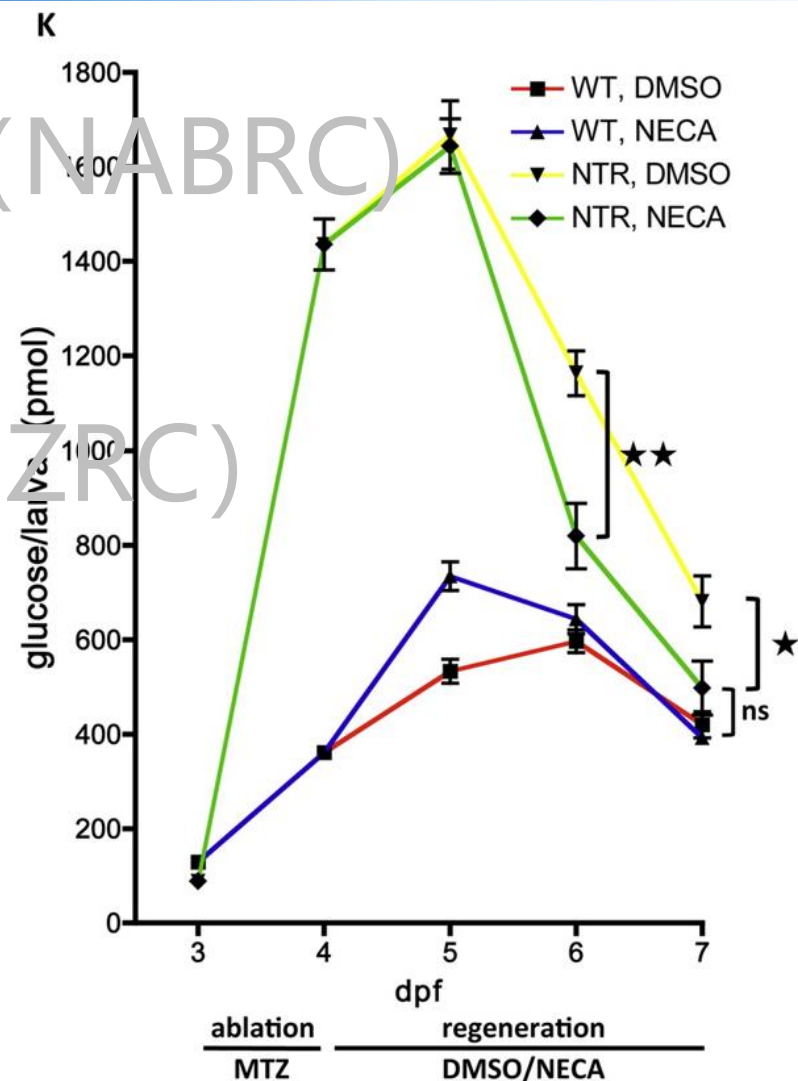
- 斑马鱼在发育的第一周，只有一颗胰岛
- 双重转基因品系：特异性标记胰岛细胞，和特异性在胰岛中产生硝基还原酶（NTR）
- 以甲硝哒唑（Mtz）处理特异性杀灭表达NTR的细胞
- 用药物处理胰岛被破坏的鱼，观察胰岛细胞的再生情况

新型药物筛选

- 7,186 compounds
- ~ 100,000 larvae
- 5 compounds doubled the number of β cells
- 4 of 5 converge on the adenosine signaling pathway
- NECA increases regeneration, not survival by promoting cell proliferation
- NECA helps restoration of a normal free glucose level

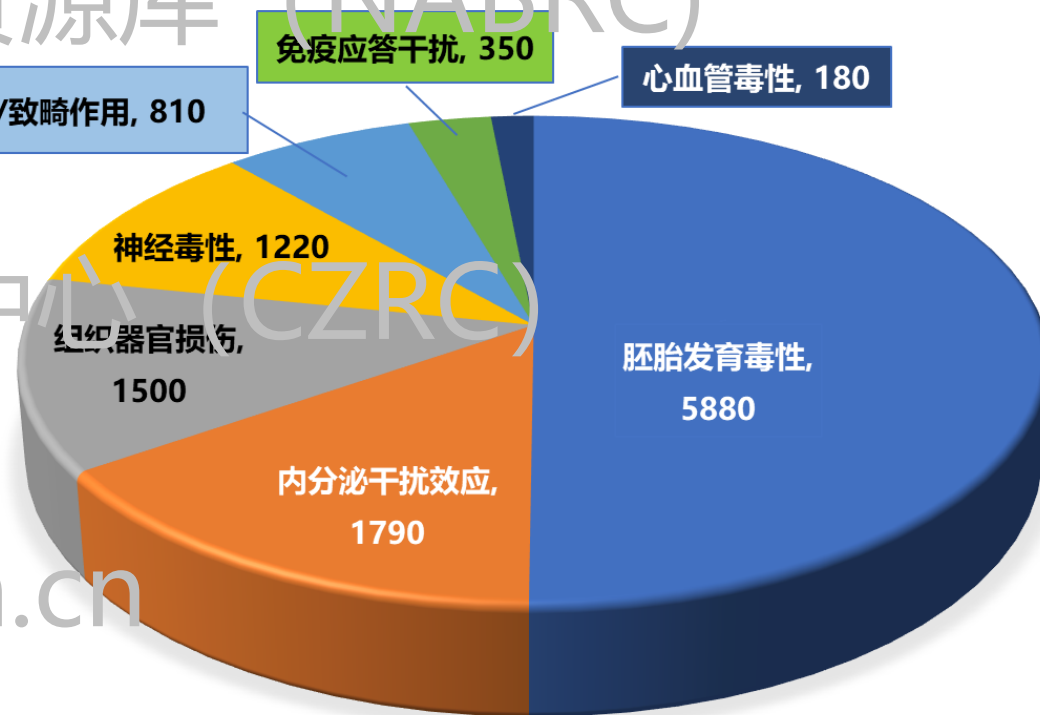
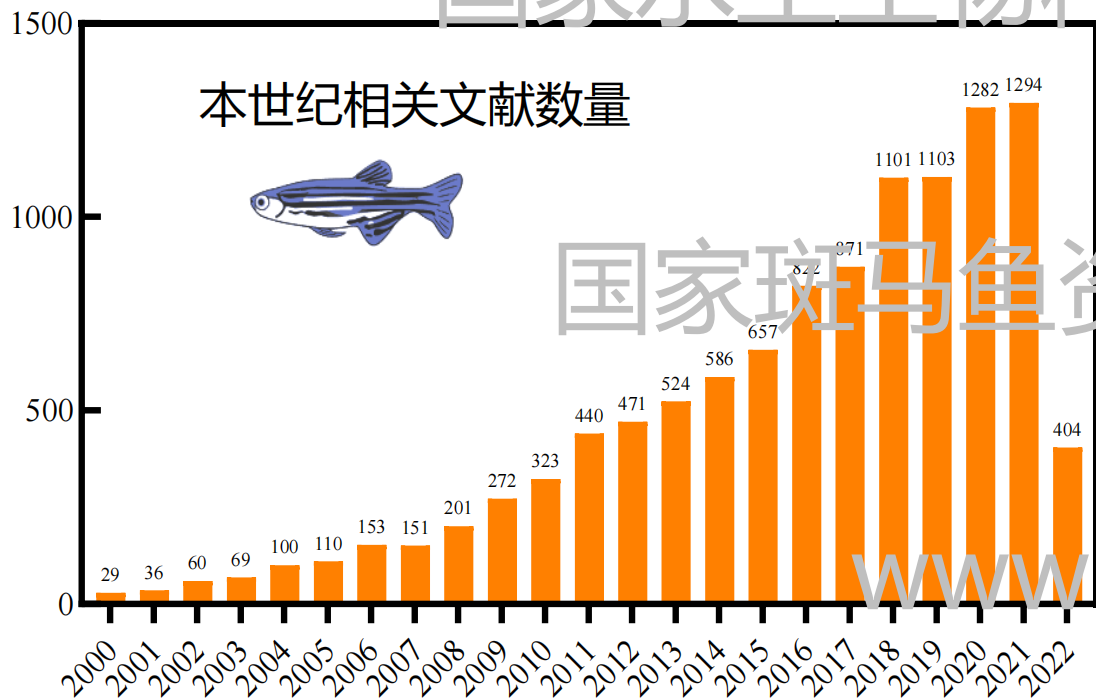


Andersson et al., 2012



斑马鱼在环境毒理学中应用

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

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

已颁布斑马鱼相关国家标准

ICS 65.020.30
B 44



中华人民共和国国家标准

GB/T 39649—2020

实验动物 实验鱼质量控制
Laboratory animal—Quality control of laboratory fish

2020-12-14 发布

2020-12-14 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会



中华人民共和国国家环境保护标准

HJ 1069—2019

水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法

Water quality—Determination of acute toxicity
—Zebra fish (*Danio rerio*) eggs method
(发布稿)

本电子版为发布稿。请以中国环境出版集团出版的正式标准文本为准。

www.zfish.cn

2019-12-31 发布

2020-06-30 实施

生态环境部 发布

ICS 65.100
B 13



中华人民共和国国家标准

GB/T 31270.12—2014

化学农药环境安全评价试验准则
第12部分：鱼类急性毒性试验

Test guidelines on environmental safety assessment for chemical
pesticides—Part 12: Fish acute toxicity test

2014-10-10 发布

2015-03-11 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

讲座一、八

- 模式生物斑马鱼的概况 国家水生生物种质资源库 (NABRC)
- 斑马鱼的研究历史
- 斑马鱼基因组及遗传学命名 国家斑马鱼资源中心 (CZRC)
- 斑马鱼发育 www.zfish.cn
- 斑马鱼在各类科学研究中的应用

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