国家斑马鱼资源中心
第六期及第七期
全国斑马鱼技术培训会议
手　册

2017 年 9 月

编辑人：潘鲁湲
编写人：（以姓氏排序）李阔宇、李玲璐、柳力月、谢训卫、熊凤
审定人：孙永华

版权声明：此手册为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。

致谢
CZRC 是由国家科技部和中国科学院共同支持建设的非营利性科研服务性机构，由中国科学院水生生物研究所代为管理。CZRC 是中国科学院模式和特色动物实验平台的核心成员，其主要支持课题有国家重大科学研究计划课题（2012CB944504）、中国科学院重点部署项目（KSZD-EW-Z-001）和湖北省科技支撑计划项目等。

目录

第一章 基因组编辑技术概述 1
第一节 基因组编辑技术发展 1
第二节 CRISPR/Cas9 的原理及介绍 4
第三节 双链 DNA 损伤修复机制简介 9

第二章 CRISPR/Cas9 基因敲除步骤 15
第一节 CRISPR/Cas9 基因敲除技术操作流程 15
第二节 CRISPR/Cas9 靶点设计 17
第三节 阳性 P0 代群体的构建 19
第四节 P0 代筛选 25
第五节 F1 代筛选和稳定遗传品系的构建 26

第三章 斑马鱼胚胎显微注射技术 29
第一节 胚胎显微注射技术的应用 29
第二节 显微注射系统的搭建 31
第三节 显微注射过程及注意事项 32

第四章 斑马鱼的养殖 39
第一节 斑马鱼的养殖环境 39
第二节 循环养殖设备介绍 41
第三节 斑马鱼的繁殖 45
第四节 幼苗及幼鱼的养殖 46
第五节 成鱼的养殖及安乐死 49
第六节 斑马鱼活饵的培养..... 50

第五章 斑马鱼常见鱼病 55
第一节 细菌性疾病 55
第二节 寄生虫疾病 58
第三节 非感染性和先天性疾病 60
第四节 斑马鱼日常健康维护 64

第一章 基因组编辑技术概述

第一节 基因组编辑技术发展

基因组编辑（genome-editing）是指目的明确地在基因组内引发所需 DNA 序列变化的“反向遗传学”技术。在靶向人工核酸酶（targeted nucleases）技术被发现以前，改变基因组序列的方法往往是使用随机诱变（如 ENU 诱变剂处理）或随机转基因插入的方法（如转座子介导的插入），无法实现对特定基因或特异性位点的直接编辑[1]。约 30 年前，人们发现了利用 DNA 同源重组的原理，通过长同源臂在基因组上引入特异性序列改变：敲除（knockout）和敲入（knockin）技术[2]，但是这一技术在活体动物中应用不广泛，很长时间都仅局限于小鼠中实现，且实现过程难度较高[3, 4]。过去的十年中，靶向人工核酸酶技术的出现和飞速发展，使得研究人员能够在各种各样的细胞类型和生物体中直接操作几乎任一基因位点。

靶向人工核酸酶主要由靶点序列特异性的 DNA 结合区域和一个非特异的 DNA 切割组件构成[3]。这些嵌合的核酸酶会引起定向 DNA 双链断裂（DSBs），DSBs 随之激发细胞的 DNA 修复机制，这些机制包括易于出错的非同源末端连接（NHEJ）和同源性修复（HDR）。这样，这些核酸酶就引起了高效、精确的基因改变。现在提到基因组编辑，基本指的就是基于靶向人工核酸酶技术，特异性地对基因组序列进行改变的情况。迄今为止，基因组编辑技术已发展过三代应用范围广，不同形式的靶向人工核酸酶技术，依次是锌指核酸酶（ZFNs, zinc-finger nucleases）[5]、TALENs（transcription activator-like effector nucleases）[6]和 CRISPR（clustered regularly interspaced short palindromic repeats）-Cas9（CRISPR-associated protein 9）系统[7]。其中分别于 2011 年和 2013 年出现的 TALEN 和 CRISPR/Cas9 已证明是基因组编辑中高效、可靠的工具[8]。

1.1 ZFN

锌指核酸酶（ZFNs, zinc figer nucleases）是第一代广泛应用的靶向人工核酸酶，ZFN 由锌指蛋白（ZFP, zinc-finger protein）构成的特异性的 DNA 结合域和核酸内切酶 Fok I 的 DNA 切割功能域两部分组成[9]。DNA 结合结构域由 3-6 个 Cys_2-His_2 锌指重复单元组成。每个单元可以识别并结合三个连续的碱基，之后 ZFP 介导核酸内切酶 Fok I

在靶基因相应位点将 DNA 双链切开。由于核酸内切酶 Fok I 需要形成二聚体才具有酶切活性，因此需要将两个锌指蛋白分别与核酸内切酶 Fok I 结合，使核酸内切酶 Fok I 形成二聚体将 DNA 双链切开，诱发细胞的 DNA 损伤修复机制（图 1.1）[10]。

图 1.1 ZFN 技术原理图 （引自 SIGMA-ALDRICH）

经过十几年的发展，锌指核酸酶技术已经成功实现了包括果蝇[11]、斑马鱼[12]、小鼠[13]在内的多种模式动物的基因敲除或修饰。2005 年，科学家首次利用 ZFN 技术实现了对人类细胞的基因的定点敲除[14]，随后更多类型的人类细胞也成功实现了靶基因的定点修饰[15]。

作为最先应用的靶向基因编辑技术，与 ES 细胞同源重组打靶技术相比 ZFN 技术有以下几点优势：①不需要获取 ES 细胞就能实现基因组修饰；②ZFN 可以实现基因的定点修饰；③敲除效率明显提高。但是，ZFN 也有一定的局限性，比如：上下游 ZFP 结合域之间相互有结构上的影响，并影响对靶基因序列的识别和结合。ZFN 对于每一个特定的靶点都需要构建庞大的锌指表达文库，然后再筛选出高效且特异的锌指蛋白，这一构建过程耗时耗为且费用较高，一直只有少量技术经验丰富的实验室能够实现[16]。

1.2 TALEN

TALEN（transcription activator-like effector nucleases）是第二代广泛应该的靶向人工核酸酶，与 ZFN 相比构建更加简单，特异性更强。TALEN 与 ZFN 结构类似，由特异性 DNA 序列结合域和 FokI 核酸内切酶的 DNA 切割功能域组成。其 DNA 结合域为 TALE 蛋白。TALE 蛋白的 DNA 结合域由 12 到 20 个串联重复碱基识别单元组成，每个识别单元一般含有 34 个氨基酸，其中第 12、13 位氨基酸被称为 RVD（repeat-variable diresidue）[17]。不同的 RVD 能够特异性识别一种或多种碱基，目前已经发现

了五种 RVD，它们与碱基对应关系为：组氨酸-天冬氨酸 (HD)识别碱基 C；天冬酰胺-异亮氨酸(NI)识别碱基 A；天冬酰胺-天冬酰胺 (NN)识别碱基 G 或 A；天冬酰胺-甘氨酸(NG)识别碱基 T；天冬酰胺-丝氨酸(NS)可以识别 A、T、G、C 中的任一种。与 ZFN 的工作原理一样，两个 TALE 蛋白分别与核酸内切酶 Fok I 的 DNA 切割功能域结合形成二聚体，对基因组上特定靶位点进行切割，诱导细胞 DNA 修复机制从而实现靶位点的基因修饰（图 1.2）[18]。在 2012 年，TALEN 被《科学》杂志评为十大科学突破之一。目前 TALEN 技术已经成功的应用于包括果蝇[19]、斑马鱼[20]、大鼠[21]、小鼠[22]在内的多个物种，以及人类的多能干细胞[23]。

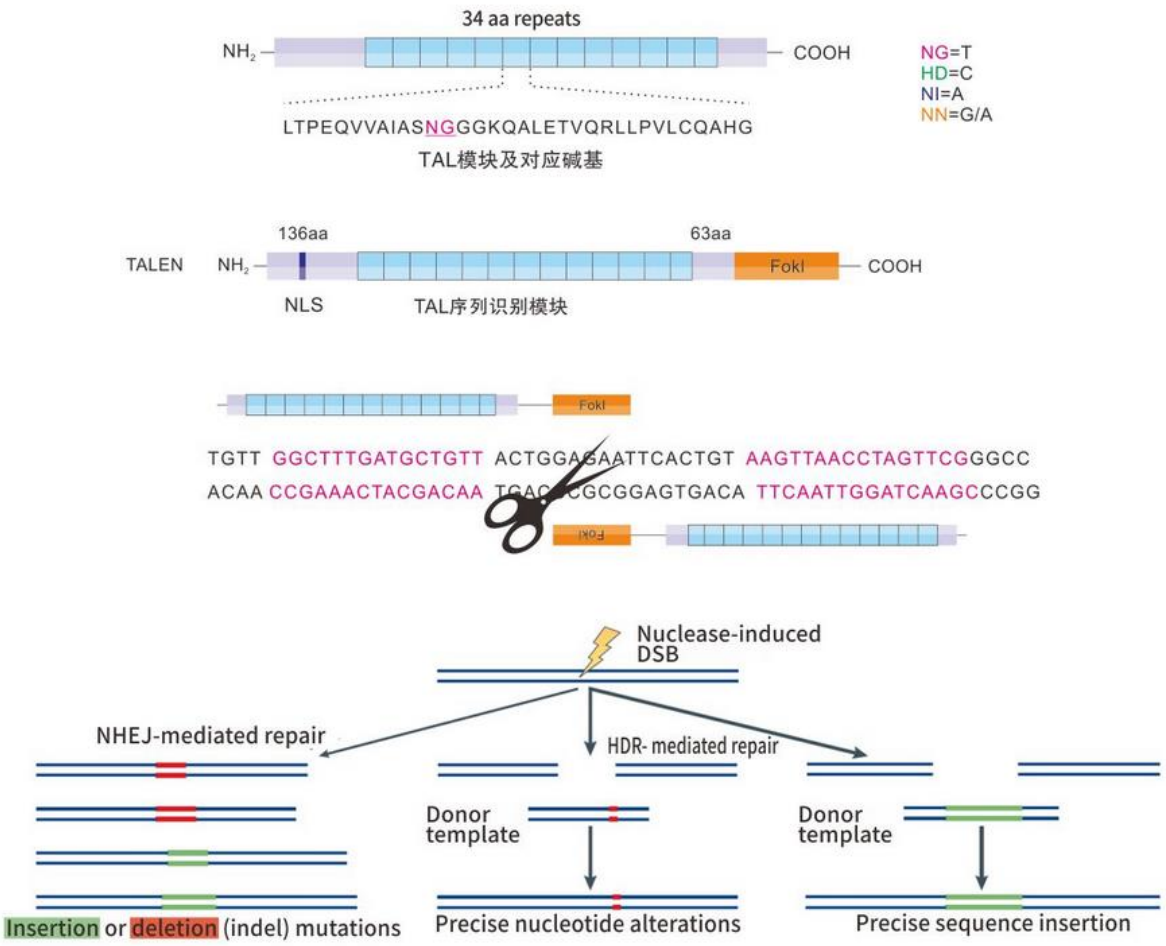

图 1.2　TALEN 技术原理图

（引自 http://www.cyagen.com/cn/zh-cn/service/talen-knockout.html）

TALEN 技术较 ZFN 技术有巨大的优势：①在构建上 TALEN 易于 ZFN，只需要简单的分子克隆技术就可以完成筛选。②TALEN 在识别靶位点时有更加广泛的选择范围，且在特异识别 DNA 序列上能力更强，特异性更强，相应的效率也高。但是，TALEN

技术目前仍然存在以下几个方面的问题：①与 ZFN 一样，TALEN 识别目的基因的成分是蛋白质，构建识别 20bp DNA 的 TALE 蛋白，可能需要设计含有一千多个氨基酸的 TALE 蛋白，这可能会引起机体的免疫反应，从而在细胞中降低 TALEN 的作用；② TALEN 也存在一定脱靶问题，这会直接影响基因的敲除效率。

1.3 CRISPR/Cas 系统

CRISPR（clustered regularly interspaced short palindromic repeats）/Cas（CRISPR-associated protein）系统是第三代靶向人工核酸酶，是迄今被应用的最广泛的基因组编辑技术。该系统最初被发现，是作为原核生物中获得性免疫功能系统，能使宿主获得抵抗噬菌体、质粒等外来 DNA 入侵的免疫能力[24]。CRISPR 序列在 1987 年就在大肠杆菌中被发现[25]，直到 2002 年，人们才正式将其命名为 clustered regularly interspaced short palindroinic repeats（CRISPR）[26]。随后 Marraffini 等报道了细菌能够利用 CRISPR/Cas 系统能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[27]。CRISPR/Cas 系统的免疫原理大致可分成 3 个不同阶段[28]：①在噬菌体侵入的起始阶段，Cas 蛋白（或者 RNase）在噬菌体入侵的初始阶段将噬菌体基因切割成很短的原型间隔序列；②这些原型间隔序列与宿主基因组中 CRISPR 位点的 5’端相互整合，然后这些间隔序列被转录成 crRNAs；③当噬菌体再次感染宿主时，crRNAs 与 Cas 蛋白复合物共同作用实现靶向降解噬菌体 DNA。CRISPR 系统通常由 RNA 以及 CRISPR-associated（Cas） 蛋白两个部分组成，其中 II 型 CRISPR 系统发生免疫反应时只需要一种 cas 蛋白即 cas9 就能够切割 DNA 双链。因此，CRISPR/Cas9 系统也目前被改造最为成功的人工核酸酶。该系统凭借自身独特的优势在包括斑马鱼[29]、大鼠[30]、小鼠[31]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。关于该技术系统技术的原理以及应用将在接下来的一节详细介绍。

第二节 CRISPR/Cas9 的原理及介绍

2.1 CRISPR/Cas9 的来源

为了能够在充满病毒威胁的环境中生存并且繁衍，原核生物在进化的历史过程中发展出了许多抵御入侵病毒基因的防御化制，其中就包括一种由规律成簇间隔短回文

重复（CRISPR）位点调控的免疫调节机制[28]。CRISPR 位点在原核生物中十分普遍，科学家们估计它存在于约 40%的细菌以及 90%的古生菌中。这个位点，和与之相邻的 CRISPR 相关（Cas）的基因原件结合成一个独特的适应性免疫系统，被称为 CRISPR/Cas 系统。该系统可以使原核生物在反复感染中利用短 RNA 引导的内切酶来指向、切开以及减少特异的病毒序列[32]。CRISPR 位点是以存在保守的大约 20-50 个重复碱基并且在它们之间有一定长度独特的间隔序列将其隔开为特点的一类序列。也就是说，一般的 CRISPR 重复序列包括三个部分：同向重复序列、数量不等的间隔序列、位于 5’末端的前导序列。大部分 CRISPR 存在前导序列，其大小约在 100-500bp 之间，富含 AT。不同 CRISPR 中，这部分序列并不保守，却都包含了转录起始位点，因此它为 CRISPR 重复序列进行转录的启动子。不同的细菌中同向重复序列也不尽相同，呈现多样性[33]。但是同一个 CRISPR 中，同向重复序列高度保守，并且它们在一些相近的属种间也具有一定同源性。此外，同向重复序列还呈现部分回文对称现象，可以形成颈环结构。间隔序列在两个同向重复序列之间，一般来讲，其长度主要在 32bp 或者 35-37bp 之间，在一个 CRISPR 中具有相似的长度，但其序列独特。间隔序列也具有强烈的种间多样性和种内同源性。这些 CRISPR 重复序列位点旁边是成簇的 Cas 基因，用来编码一些行使一般 CRISPR/Cas 功能的酶[34]。在一个给定的 CRISPR 基因座中，每个间隔区序列都是独特的，是由过去感染经验中得到的入侵病毒的核苷酸序列片段而导出的，能够使原核生物产生一种对于过去感染的基因免疫记忆存储[35]。

2.2 CRISPR/Cas9 系统的分子机制

所有的 CRISPR/Cas 系统都通过共同的三个步骤来形成免疫记忆[36]。首先，初次受到病原菌感染时，侵入的外源核酸会被切成称为前间隔序列的碎片，之后这些碎片被整合成为 CRISPR 位点的间隔序列。第二，在随后的感染中，CRISPR 位点转录产生一段长的 pre-CRISPR RNA，这一 RNA 随后被列入一个有活性的具有许多间隔序列起源的短 CRISPR RNAs（crRNAs）的基因库中。第三，crRNAs 和一个或多个 Cas 蛋白形成 RNA 引导的核酸内切酶监视复合体，这些复合体可以通过 crRNA 间隔序列区域与病毒前间隔序列之间的碱基互补配对来识别和切断入侵的外源核酸。

在自然界中存在 6 种类型的 CRISPR/Cas 系统，每种类型使用不同的机制实施上面提到的三个步骤以实现 CRISPR 介导的适应性免疫[37]。在这 6 种系统中，II 型

CRISPR/Cas 系统最具有特色，并且在某些关键方面是最简单的，一个重要的不同点是它的监视复合体需要一个单一的 Cas9 核酸内切酶，而 I 型和 III 型系统需要几种蛋白[38]。

除了 Cas9 蛋白外，II 型监视复合体还包括两个 RNA 元件，一个 crRNA 和一个反式激活的 crRNA（tracrRNA）。tracrRNA 是正常的 crRNA 加工和 II 型监视复合体形成所必需的，crRNAs 包括 20 个核苷酸组成的间隔区域，这些间隔区域起源于原始的 CRISPR 位点[39]。通过碱基互补配对，这些 crRNAs 引导监视复合体定位、结合以及降解外源遗传因子，这些外源遗传因子包含能够与间隔序列和 Cas9 特有的原间隔序列 3’邻近基序（Protospacer adjacent motif，PAM）配对的原间隔序列[40]。

具有正确的与前间隔序列直接相邻的 PAM 区序列是 II 型监视复合体的 DNA 识别和 Cas9 剪切活力的触发所必需的。实际上，PAM 区或 PAM 区附近的几个核甘酸的不配对会抑制异源双链核酸分子的形成和 dsDNA 靶点的解旋[41]。3’PAM 区通过这种方式使 II 型系统区分自身的序列和外源序列，以防止破坏自身的 CRISPR 位点[42]。在不同原核生物中发现的 II 型 Cas9 核酸内切酶中，PAM 区序列的复杂性不同，最简单的是酿脓链球菌 Cas9 的 5’-NGG PAM 区。自然界中的酿脓链球菌的 RNA-引导的 Cas9 核酸内切酶大体上都以 5’-N20--NGG-3'的形式来行使定位任意入侵前间隔序列的能力[43]。因此，II 型系统需要相对少的组成成分，并且它需要的靶点序列具有灵活性，这使得 II 型 CRISPR/Cas 系统的应用成为一个新的、强大的、可修正的基因组编辑平台。

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生成 DNA 双链断裂（double-strand breaks，DBS），进而诱导细胞产生 DNA 损伤修复。其中 Cas9 基因包含 2 个核酸酶结构域对：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。在 crRNA 与 tracrRNA 形成的双链 RNA 的指导下，Cas9 蛋白对靶位点进行切割[44]，而通过人工设计这两种 RNA，可以改造形成具有引导作用的 sgRNA（single-guide RNA），足以引导 Cas9 对 DNA 的定点切割（图 1.3）。

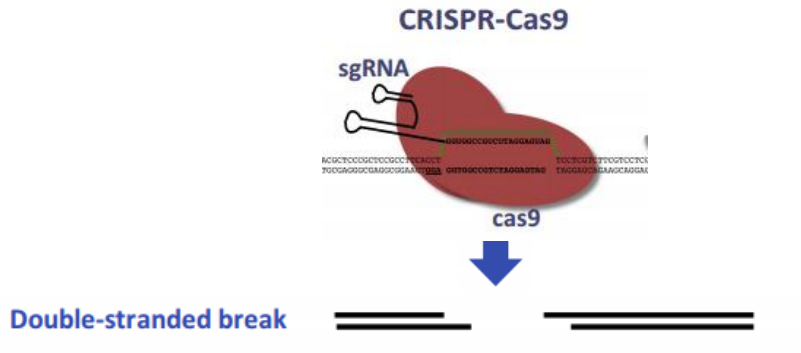

图 1.3　CRISPR/Cas9 技术原理图　（Li M et al. Trends Genet., 2016）

2.3 CRISPR/Cas9 介导的基因敲除的实验流程

CRISPR/Cas9 介导的基因敲除主要包括以下几个步骤（图 1.4）：

（A）Cas9 靶位点的选择和确认、检测引物的设计；

（B） gRNA 和 Cas9mRNA 的制备；

（C） 显微注射，F0 斑马鱼的制备与靶点突变效率检测；

（D）F0 生殖系突变情况检测；

（E） 阳性 F0 代自交观察表型；

（F）靶位点突变 F1 成鱼的筛选；

（G） 阳性 F1 代自交观察表型。

具体的操作流程将在第二章中进行详细介绍。

2.4 CRISPR /Cas 介导的基因敲除的优势

CRISPR/Cas 与其他可设计的核酸酶系统如 ZFNs 和 TALENs 相比，已经表现出了几个关键优势。第一个优势是 CRISPR/Cas 的设计与实现更加容易。ZFNs 和 TALENs 需要为每个新的基因组靶位点设计复杂的锌指结构域或 TALE 结合域。第二个优势是 CRISPR/Cas 比实验室生产的 ZFNs 更稳定、更高效而且毒性更小[16]，并且在以甲基化的基因组位点为靶点时，CRISPR/Cas 可能比 TALENs 更高效[45]。虽然在人类细胞和斑马鱼中 CRISPR/Cas 和 TALENs 的成功率和突变效率好像差不多，但是 CRISPR/Cas 在其多元基因组编辑能力方面要远比 TALENs 更优越，目前已经证明使用 CRISPR/Cas 通过 Cas9 与多元 sgRNAs 的简单结合可以实现高效的多元基因组编辑[46]。可是，使用几个 ZFN 或 TALEN 对的多元基因组编辑会因为核酸酶之间的交叉反应而

具有加剧脱靶效应恶化的风险。因此，鉴于 CRISPR/Cas 系统与之前的可设计的核酸酶平台相比所具有的各种优势，CRISPR/Cas 已经迅速成为现代基因组编辑技术中的姣姣者。

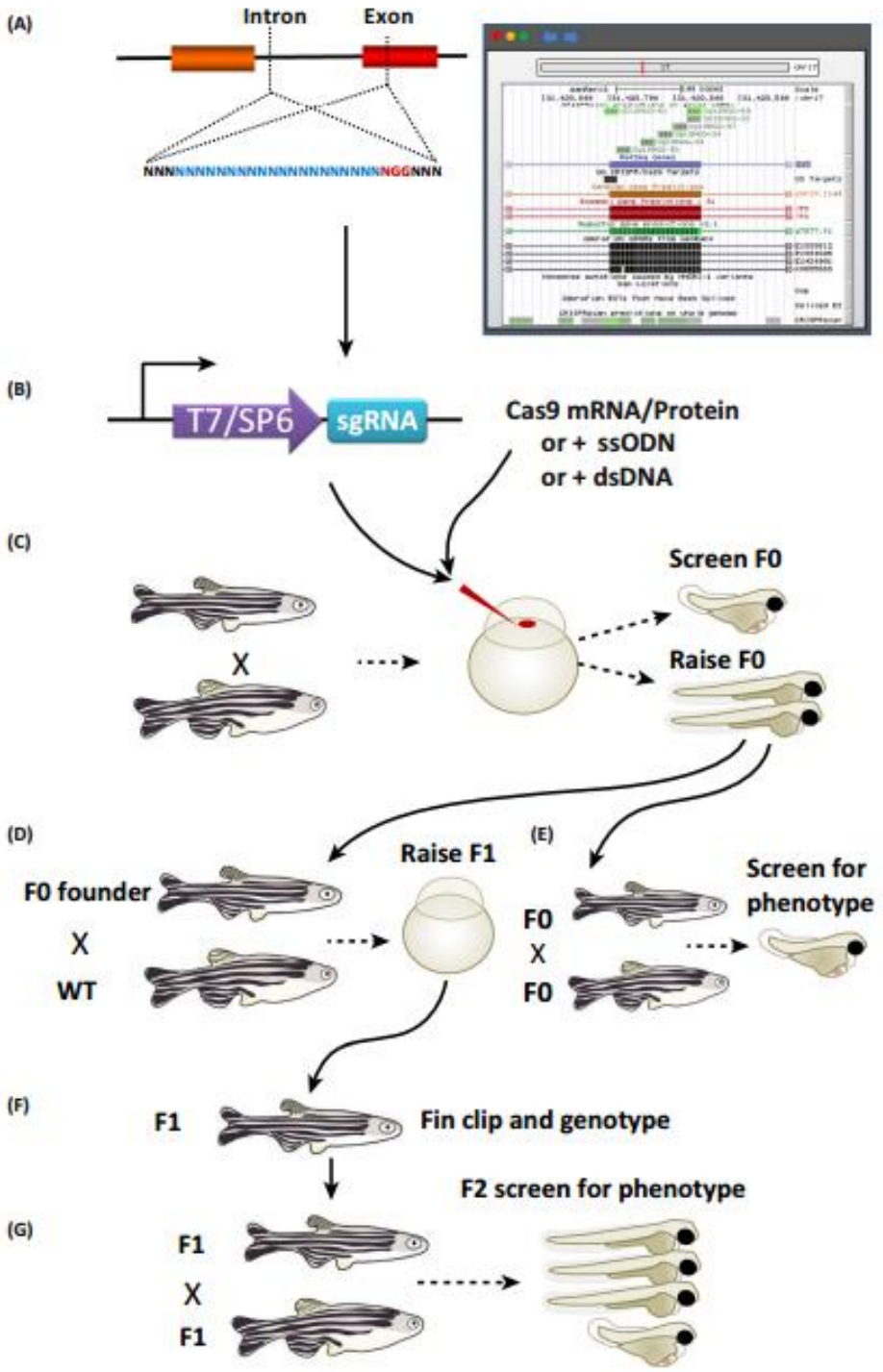

图 1.4 CRISPR/Cas9 介导的基因敲除的实验流程（Li M et al., Trends Genet., 2016）

第三节 双链 DNA 损伤修复机制简介

持续暴露在多种来自体内或外界环境的损害中，DNA 可能会发生损伤，这对所有生物都是一种致命威胁。为了对抗这种威胁，细胞进化出一系列复杂的 DNA 修复通路来校正引起各种碱基配对的或者是链结构异常的 DNA 损伤，以确保体内遗传信息的正确性。根据分子生物学多年来的研究发展，科学家已经发现无论是以单细胞形式存活的酵母还是哺乳动物细胞，都可以找到相对应的 DNA 修复机制，这说明 DNA 修复机制在各物种之间的高度保守性[47]。

在现存细胞内的 DNA 修复机制中，由 DNA 损害断裂的程度可以分为两种类型，一种是单链 DNA 损害，另一种则是双链 DNA 断裂。前者修复机制通常需要借助其对应的另一条 DNA 链作为模版（template），而后者在缺乏另一条序列当模版的情况下，则是转而通过同源的染色体（homologous-chromosome）序列或姊妹染色分体（sister-chromatid）来寻求支援。在高等生物中，有时候 DNA 双链断裂的修复有时候有可能无须任何序列当模版，而直接将断裂部分直接接合，然而这种 DNA 修复方式可能隐含错误的机率。

通过靶向人工核酸酶进行基因组编辑操作，无论是 ZFN 系统、TALEN 系统或者 CRISPR/Cas 系统，都是通过核酸酶在基因组特定位点产生双链断裂（DSB），从而利用后续的修复机制实现基因组操作。因此，本节仅介绍双链断裂后的 DNA 损伤修复。

DNA 双链断裂对细胞来说是最严重也是最致命的 DNA 损害类型。若说 DNA 单链的损害在组蛋白的保护下，或许可以逃过更进一步的损害与化学物质的攻击，而 DNA 双链断裂的结果使得 DNA 的末端直接裸露，在这种情况的发生若没有及时的处理，细胞内 DNA 损害反应（DNA damage response）机制就会活化，其后果之一是停止细胞的生长与分裂，或者是启动细胞凋亡，无论如何都是驱使细胞走向毁灭一途。真核生物阶段细胞已发展出一些机制用来防范 DNA 双链断裂的产生，主要是以下两种：同源性重组修复和非同源性末端接合。

3.1、同源性重组（Homologous recombination，HR）修复

同源性重组修复是利用细胞内的染色体两两对应的特性，若其中一条染色体上的 DNA 发生双链断裂，则另一条染色体上对应的 DNA 序列即可当作修复的模版来修复断裂前的序列，因此在某些条件下，同源性重组又称作基因转换（gene conversion）。

HR 是酵母细胞的 DNA 双链断裂主要修复方式，它的修复路径与细胞周期的进行有很高的依赖性，需要姐妹染色单体作为模板，所以 HR 仅发生在细胞分裂 S 期到 G2 期；它需要同源的 DNA——新复制的姐妹染色单体作为修复的模板来进行精确的修复。同源重组修复分为 3 大步骤：①断裂位点的加工处理； ②合成链的侵入；③Holliday 交叉的形成和解离[48]。

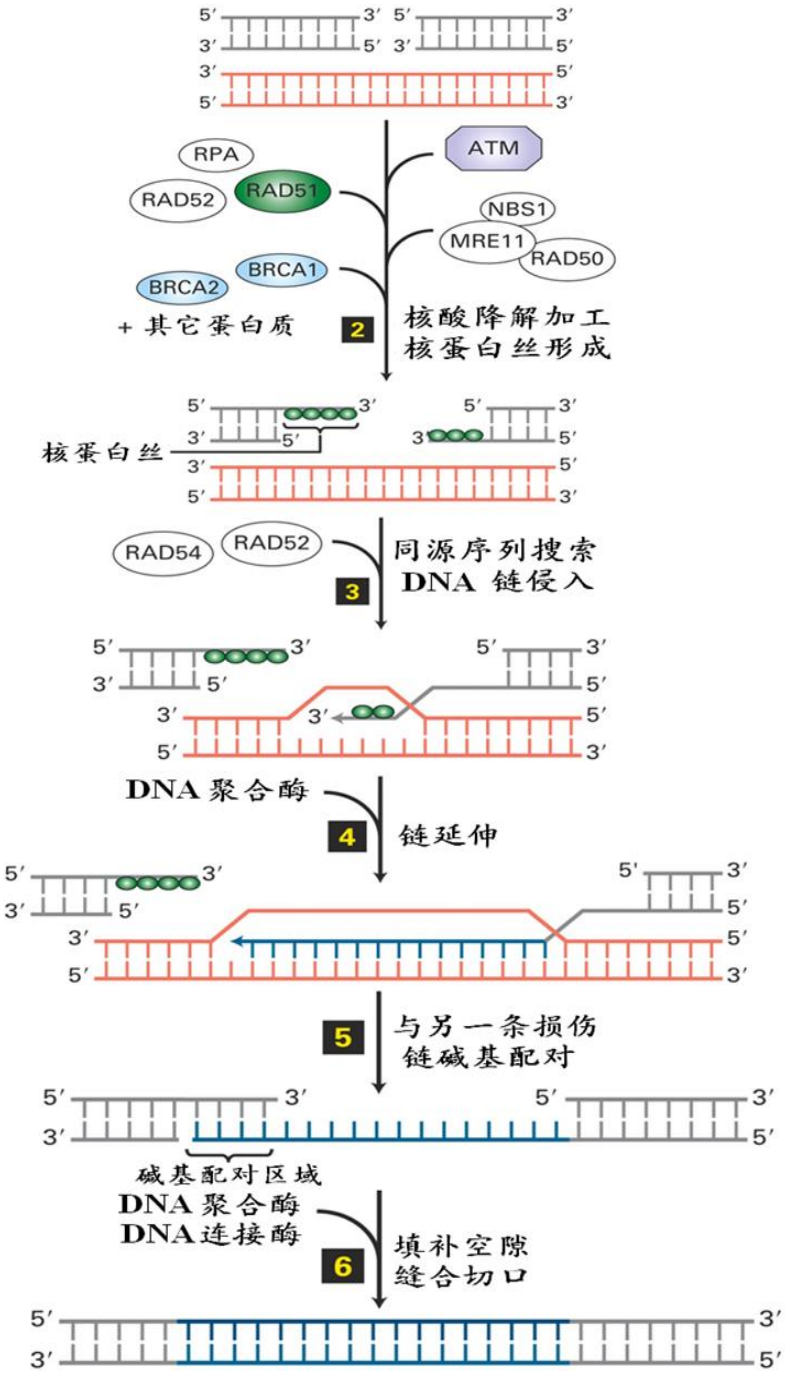

图 1.8　HR 修复原理示意图

（引自 https://wenku.baidu.com/view/d6f279781711cc7931b716e0.html?from=search）

HR 的起始是 MRN 复合体（ MRE11 /Rad50 /NBS1 complex） 识别和结合在双链断裂的区域[49]，这个过程是 MRN 从 DNA 单链的 5’端侵入进而完成对 DNA 5’到 3’方向的加工，MRN 复合体可以作为平台招募一些蛋白质，例如 CtIP 和 BRCA1 /2，完成断裂位点的加工。 CtIP 是一种与酵母细胞中 Sae2 蛋白同源的核酸酶，CtIP 招募 RPA 到细胞核并激活 ATR（ATM and Rad3- related）。乳腺癌抑制因子 BRCA1 /2 可以与 MRN、CtIP 相互作用参与 DNA 末端的剪切，BRAC1 /2 活性对于 HR 修复效率至关重要。 第二步，众多 RPA 蛋白结合到加工过的单链上，促进 DNA 链侵入过程。同源重组修复的关键是 Rad51 蛋白依赖性的 DNA 链侵入。 Rad51 与细菌中 RecA 具有同源性，并有 DNA 依赖性的 ATPase 活性。单链 DNA 能够通过 Rad51 竞争大量结合在 DNA 链上的 RPA 蛋白，替换 3’端的 RPA 蛋白，从而形成存在于 Rad51 蛋白中的单链 DNA 的核蛋白细丝（nucleoprotein filament）。最后，是 DNA 链的配对、延伸、连接形成双 Holliday 叉（double Holliday junction），经过核酸酶和连接酶的处理完成修复（图 1.8）[49]。

3.2 非同源性末端接合（Non-homologous end joining，NHEJ）

NHEJ 修复是哺乳动物体内尤其是处于 G1 期的细胞的主要修复通路，它需要 DNA 末端链接的 Ku 复合体（ Ku70 /Ku80 hetero-dimer complex） 初步识别 DNA 断裂位置，后者通过与 DNA 依赖性蛋白激酶催化亚基（ DNA-dependent protein kinase catalytic subunit，DNA-PKcs） 结合形成具有招募作用的平台，进而募集对 DNA 末端具有特定作用的酶，最终招募 XRCC4-Ligase IV 复合体使断裂的末端重连从而完成双链的修复。具体的机制分为 3 个步骤：

首先，Ku70 /Ku80 蛋白复合体识别并且结合在 DNA 断裂部位，招募 DNA-PKcs 蛋白后形成 DNA 依赖性蛋白激酶全酶（ DNA-PK） ，二者结合增加其对于 DNA 末端的粘合程度。

其次，DNA-PK 本身可进一步招募蛋白质对部分断裂双链进行加工，比如 Artemis 和 MRN Artemis 是核酸外切酶，它可以与 DNA-PK 结合并被其磷酸化，可以移除 DNA 末端的突出碱基，为最终的修复创造条件。

最后，NA-PK 招募的 DNA Ligase IV-XRCC4 复合体和 XLF（ XRCC4 like factor）进行双链断裂处的连接（图 1.9）[50]。

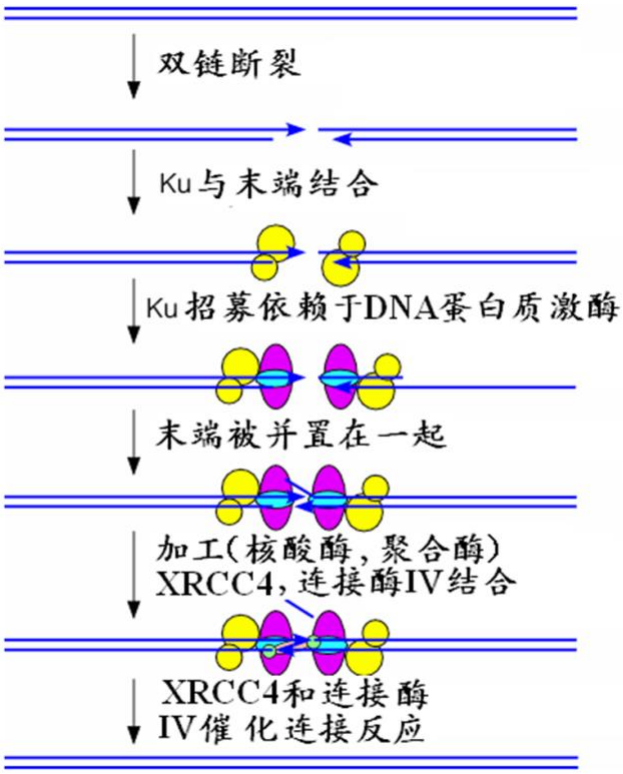

图 9　NHEJ 修复原理示意图

（引自 https://wenku.baidu.com/view/d6f279781711cc7931b716e0.html?from=search）

参考文献：

1. Mojica, F.J. and L. Montoliu, *On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals.* Trends Microbiol, 2016. **24**(10): p. 811-20.
2. Thomas, K.R., K.R. Folger, and M.R. Capecchi, *High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome.* Cell, 1986. **44**(3): p. 419-28.
3. Capecchi, M.R., *Altering the genome by homologous recombination.* Science, 1989. **244**(4910): p. 1288-92.
4. Capecchi M.R., *Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century.* Nat Rev Genet, 2005. **6**(6): p. 507-512.
5. Remy, S., et al., *Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals.* Transgenic Res, 2010. **19**(3): p. 363-71.
6. Joung, J.K. and J.D. Sander, *TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(1): p. 49-55.
7. Komor, A.C., A.H. Badran, and D.R. Liu, *CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes.* Cell, 2017. **169**(3): p. 559.
8. Nemudryi A.A., et al., *TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery.* Acta Naturae, 2014. **6**(3): p. 19-40.
9. Kim Y.G., Cha J., and Chandrasegaran S., *Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(3): p. 1156-1160.
10. Kim S., et al., *Preassembled zinc-finger arrays for rapid construction of ZFNs.* Nat Methods, 2011. **8**(1): p. 7.

11. Beumer K.J., et al., *Efficient gene targeting in Drosophila by direct embryo injection with zinc-finger nucleases.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(20): p. 19821-6.
12. Meng X., et al., *Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc finger nucleases.* Nat Biotechnol, 2008. **26**(6): p. 695-701.
13. Cui, X., et al., *Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases.* Nat Biotechnol, 2011. **29**(1): p. 64-7.
14. Urnov, F.D., et al., *Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases.* Nature, 2005. **435**(7042): p. 646-51.
15. Hockemeyer, D., et al., *Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases.* Nat Biotechnol, 2009. **27**(9): p. 851-7.
16. Maeder, M.L., et al., *Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification.* Mol Cell, 2008. **31**(2): p. 294-301.
17. Boch J., et al., *Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors.* Science, 2009. **326**(5959): p. 1509-12.
18. Moscou, M.J. and A.J. Bogdanove, *A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors.* Science, 2009. **326**(5959): p. 1501.
19. Kondo, T., et al., *TALEN-induced gene knock out in Drosophila.* Dev Growth Differ, 2014. **56**(1): p. 86-91.
20. Zu Y., et al., *TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish.* Nat Methods, 2013. **10**(4): p. 329-31.
21. Tesson, L., et al., *Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs.* Nat Biotechnol, 2011. **29**(8): p. 695-6.
22. Wefers B., et al., *Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(10): p. 3782-7.
23. Hockemeyer, D., et al., *Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases.* Nat Biotechnol, 2011. **29**(8): p. 731-4.
24. Garneau, J.E., et al., *The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA.* Nature, 2010. **468**(7320): p. 67-71.
25. 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.* J Bacteriol, 1987. **169**(12): p. 5429-33.
26. Jansen R., et al., *Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.* Mol Microbiol, 2002. **43**(6): p. 1565.
27. Marraffini L.A. and Sontheimer E.J., *CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA.* Science, 2008. **322**(5909): p. 1843-5.
28. Barrangou R., et al., *CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes.* Science, 2007. **315**(5819): p. 1709-12.
29. Hwang, W.Y., et al., *Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system.* Nat Biotechnol, 2013. **31**(3): p. 227-9.
30. Li W., et al., *Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems.* Nat Biotechnol, 2013. **31**(8): p. 684-6.
31. Yang, H., et al., *One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering.* Cell, 2013. **154**(6): p. 1370-9.
32. Bhaya, D., M. Davison, and R. Barrangou, *CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation.* Annu Rev Genet, 2011. **45**: p. 273-97.
33. Lillestol, R.K., et al., *CRISPR families of the crenarchaeal genus Sulfolobus:*

bidirectional transcription and dynamic properties. Mol Microbiol, 2009. **72**(1): p. 259-72.

34. Makarova, K.S., et al., *A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action.* Biol Direct, 2006. **1**: p. 7.
35. Bolotin A., et al., *Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin.* Microbiology, 2005. **151**(8): p. 2551-2561.
36. Wiedenheft, B., S.H. Sternberg, and J.A. Doudna, *RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea.* Nature, 2012. **482**(7385): p. 331-8.
37. Makarova K.S., et al., *Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems.* Biol Direct, 2011. **14**(6): p. 38.
38. Chylinski, K., et al., *Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems.* Nucleic Acids Res, 2014. **42**(10): p. 6091-105.
39. Deltcheva, E., et al., *CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III.* Nature, 2011. **471**(7340): p. 602-7.
40. Gasiunas, G., et al., *Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(39): p. E2579-86.
41. Sternberg, S.H., et al., *DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9.* Nature, 2014. **507**(7490): p. 62-7.
42. Horvath, P., et al., *Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in Streptococcus thermophilus.* J Bacteriol, 2008. **190**(4): p. 1401-12.
43. Jinek M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.* Science, 2012. **337**(6096): p. 816-21.
44. Friedland, A.E., et al., *Heritable genome editing in C. elegans via a CRISPR-Cas9 system.* Nat Methods, 2013. **10**(8): p. 741-3.
45. Hsu, P.D., et al., *DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases.* Nat Biotechnol, 2013. **31**(9): p. 827-32.
46. Mali, P., et al., *RNA-guided human genome engineering via Cas9.* Science, 2013. **339**(6121): p. 823-6.
47. Friedberg E.C., et al., *DNA Repair And Mutagenesis*. 2006: ASM pressed.
48. Holliday R., *A mechanism for gene conversion in fungi.* Genet Res, 2007. **89**(5-6): p. 285-307.
49. Shinohara A., Ogawa H., and Ogawa T., *Rad51 protein involved in repair and recombination in S. cerevisiae is a RecA-like protein.* Cell, 1992. **69**(3): p. 457-70.
50. Takata M., et al., *Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells.* EMBO J, 1998. **17**(18): p. 5497-508.

第二章 CRISPR/Cas9 基因敲除步骤

（仅适用于 S. pyogenes 来源 Cas9 蛋白）

第一节 CRISPR/Cas9 基因敲除技术操作流程

1.1 CRISPR/Cas9基因敲除技术基本流程

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（图 2.1）。

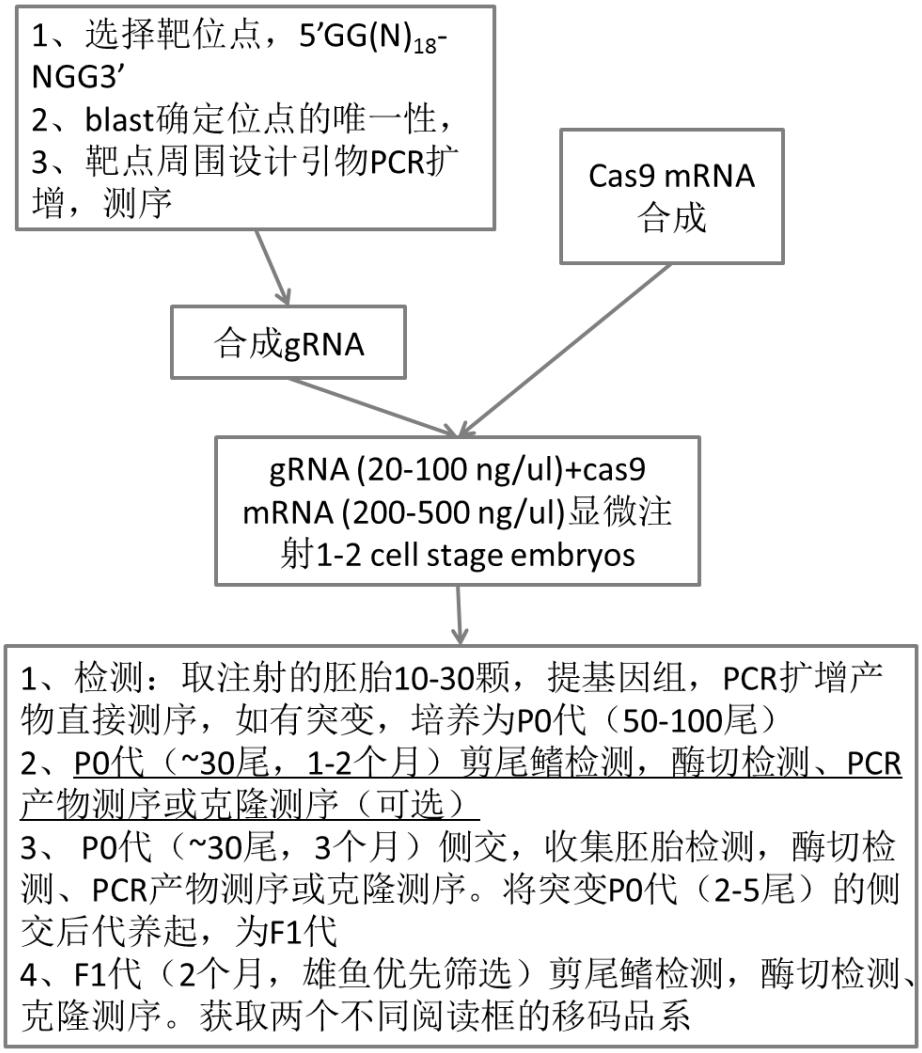

图 2.1 CRISPR/Cas9 基因敲除技术操作流程

1.2 基因敲除工具酶的选择

斑马鱼资源中心目前保藏有 3 种来源的 4 种 Cas9 工具质粒和 2 种来源的 2 种 gRNA 模板质粒，将依次作介绍。

1.2.1 pXT7-hCas9；pMD19T-gRNA

这是 2013 年初斑马鱼 1 号染色体全基因敲除计划启动时，ZKO 联盟实验室使用的质粒组合，在 ZKO 计划的成功实行过程中功不可没[1]。

pXT7-hCas9 是将 S. pyogenes 来源 Cas9 进行人源密码子优化后，克隆到 pXT7 载体中，使用时采用 XbaI 限制性内切酶线性化，T7 RNA 聚合酶合成 Cas9 mRNA。

pMD19T-gRNA 是将 cr RNA (不包括靶点对应的序列)和 tracr RNA 对应的序列(gRNA 骨架序列，共 77 bp，序列如下)克隆到 pMD19T 载体中，使用时采用 PCR 扩增的方式获取 gRNA 模板再进行 gRNA 的合成。

gRNA 骨架序列：

5’GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCT3’

1.2.2 pGH-T7-zCas9

这是北大张博老师实验室提供的 Cas9 工具质粒，是将 S. pyogenes 来源 Cas9 进行斑马鱼密码子优化后，克隆到 pGH-T7 载体中，使用时采用 XbaI 限制性内切酶线性化，T7 RNA 聚合酶合成 Cas9 mRNA。值得注意的是这个质粒最好使用 Top10 感受态进行转化。在 ZKO 计划实行中期遭遇瓶颈期时，该质粒优良的打靶效果为广大实验室带来了福音。

1.2.3 nls-zCas9-nls 和 pT7-sgRNA

这套质粒是陈文标老师实验室提供的打靶质粒，包含两个 Cas9 质粒 pT3TS-nls-zCas9-nls 和 pCS2-nls-zCas9-nls 及一个 gRNA 质粒 pT7-sgRNA [2]。

Cas9 质粒也是将 S. pyogenes 来源 Cas9 进行斑马鱼密码子优化后，分别克隆到 pT3TS 和 pCS2 载体中，得到 pT3TS-nls-zCas9-nls 和 pCS2-nls-zCas9-nls 工具质粒。pT3TS-nls-zCas9-nls 使用 XbaI 限制性内切酶线性化，T3 RNA 聚合酶合成 Cas9 mRNA。pCS2-nls-zCas9-nls 使用 NotI 限制性内切酶线性化，SP6 RNA 聚合酶合成 Cas9 mRNA。两个工具质粒的打靶效率都很高，相比之下，pT3TS-nls-zCas9-nls 略胜一筹，科研人员可根据具体实验需要选择合适的质粒。

pT7-sgRNA 不同于 pMD19T-gRNA，需要将靶点序列克隆到载体中，再采取酶切线性化的方式来获得 gRNA 模板，两者各有优劣，相较而言，PCR 扩增方式获取模板操作上要灵活一些，适于大批量的基因敲除操作。

第二节 CRISPR/Cas9 靶点设计

确定需要敲除的基因后，首先要进行基因敲除方案的设计，主要包括目标基因评估，基因敲除靶点的选择和序列确认等。

2.1 目标基因评估

首先需要对目标基因进行一个整体评估，根据以往的文献或在其他物种的研究结果推定目标基因的敲除是否会导致早期胚胎致死。Howe 及同事发现 1/4 的斑马鱼基因拥有高序列相似性的同源基因，同源基因通常拥有重叠或部分冗余的功能，导致单个基因的破坏没有表型或是只有轻微的表型[3]。因而在对这些基因进行敲除时，注意是否需要避开相似序列。从多个数据库（常用的数据库有 ensembl， NCBI， ZFIN 等）获取基因序列，对比确认序列无误，分析该基因的功能域，打靶时尽可能破坏该基因重要的功能域。

2.2 靶点的选择（仅适用于 S. pyogenes 来源 Cas9 蛋白）

Cas9靶点一般包含20个碱基（18-23个碱基均可，本次培训课程以20个碱基为例），其中5’端应为GG；紧邻靶点3’端的3 个碱基构成PAM 区，要求序列为NGG（N 为任意碱基）（图2.2）。

图2.2 靶点序列结构示意图

在正义链或反义链上选择靶位点皆可。靠近PAM区的12个碱基称为种子序列，这个区域的碱基突变有可能导致CRISPRR内切酶的酶切效率的大幅降低。其中又可细分为DPSS和PPSS区，分别代表PAM远端区（12-7）和PAM近端区（6-1，3号位点除外），DPSS区可耐受大部分的单碱基突变，往往只有某一特定的单碱基替换才会导致打靶失

败，而PPSS区的任何单碱基突变都有可能导致打靶效率的下降，不同的碱基替换对打靶效率的影响有所差异[4]。

5’端选择GG- 并非Cas9 靶点本身的要求，而是由于本实验所用的gRNA（guide RNA，引导RNA）体外转录载体采用了T7 启动子。T7 启动子要求转录起始位点的前两位为GG-，GN-（非GG）也可以合成gRNA，但效率相对要低一些；如果采用其他的启动子，如SP6启动子可以采用GG-和GA-开头的靶点。

靶点的选择可参考如下的Cas9 靶位点预测网站ZiFiT：

http：//zifit.partners.org/ZiFiT/ChoiceMenu.aspx

靶点选择的基本原则：

1）在该基因所在的基因组编码序列上选择靶点；

2）打靶位点位于基因编码序列中：

——靶点最好是位于翻译起始密码子ATG之后和基因编码序列全长2/3之前的区域进行选择，不要选择5’-UTR和3’-UTR区域；

——打靶最好能破坏重要的功能域和/或RNA剪接位点等；

——如果该基因含有多个外显子，有可能在第一个起始密码子的下游还存在额外的具有相同阅读框的起始密码子，故最好不要在第一个外显子上选择靶点，同时也要避免在最后一个外显子上选择靶点；

——如果该基因具有多个剪接体，最好在其共有外显子区域选择靶点；

——靶点也可以在外显子和内含子的交界处选择，打靶破坏掉该基因RNA的剪接。

2.3 靶点特异性的确认

靶点是否在基因组中为唯一位点对敲除效果十分重要。如果在基因组中存在相同或相似的位点，无疑会增加基因打靶脱靶现象的发生，因而在选择靶点时应尽量选择在基因组中唯一且特异的位点以减少脱靶效应。

序列特异性可在UCSC genome browser，或者ensembl上进行搜索：

http：//genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat

http：//www.ensembl.org/Danio_rerio/Tools/Blast?db=core

位点确认为基因组内单一位点后，需要进一步测序验证序列。从准备用于基因敲除的成鱼中提取适量基因组DNA，用作模板。在靶点周围设计引物，使其距离靶位点两

侧都大于100 bp，并且PCR 扩增产物最好不要超过1000bp，且为单一条带。PCR 扩增靶点及附近的序列，测序验证。如果实测序列与基因组数据库中靶点的预测序列有出入，原则上应根据实测结果设计gRNA序列；但是，如果实测序列不再符合靶点选择的原则（例如，PAM 区不是NGG，或5'端不是GG），则应重新选择靶点；如果测序结果显示靶点序列存在SNP位点，则最好重新选择实验材料或重新选择靶点。

靶点序列的确认方法如下：

1) 从准备用于打靶的成鱼中提取适量基因组DNA，用作模板（Foregene， zebra Fish Direct PCR Kit）

>1. 以合适的方式剪取少量尾鳍或收取15-30枚胚胎。

>2. 加入100 ul Buffer FP和4 ul蛋白酶K，混匀后65度反应30 min。

>3. 95度反应5 min终止反应。

>4.12000 rpm离心2 mins， 吸取上清用作基因组DNA模板，样品可以在-20度保存1个月左右。

2) 在靶点周围设计引物，使其距离靶位点两侧都大于100 bp，并且PCR 扩增产物最好不要超过1000bp，且为单一条带。

3) PCR 扩增靶点及附近的序列，测序验证。

第三节 阳性 P0 代群体的构建

靶点序列经过前期分析和实验确认后就可以进行 gRNA 和 Cas9 mRNA 的合成及其他准备工作。

3.1 打靶成鱼的准备

在前期确认靶点序列过程中使用的打靶成鱼，可适量准备一批，确保来源一致，适当加喂和配鱼，用于后续打靶过程中提供胚胎来源。

3.2 合成特异位点的 gRNA

（以 pMD19T-gRNA 为例，GG-， T7）

pMD19T-gRNA是将gRNA骨架序列克隆到pMD19T载体中，使用合适的引物对采用PCR扩增的方式获取双链DNA模板，再使用T7 RNA 聚合酶 (NEB; cat#M0251S)进行gRNA的合成。gRNA 接着用DNase I (NEB; cat#M0303S) 消化15 min以去除DNA模板，

再用 sigma post-reaction clean-up kit 进行纯化。

gRNA 引物对如下：

正向引物： T7 启动子序列+18~23bp 靶点序列+20bp gRNA 骨架序列（价格原因，尽量控制在 59bp 以内）

反向引物： ~20bp gRNA 骨架序列

实例：

T7-zkoXX-F1（正向引物）：

TGTAATACGACTCACTATA***GGAATGACGGGACTGTCACT***GTTTTAGAGCTAGAAATAGC

gRNA-RP（反向引物）： AAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACT

1) PCR 扩增合成 gRNA 模板

PCR 体系如下

成份	体积
2 X PCR mix	100 ul
DNA (50 ng/ul)	2 ul
Forward Primer (10 uM)	8 ul
Reverse Primer (10 uM)	8 ul
H2O	82
Total	200 ul

准备 100-200 ul 体系，确保回收纯化得到的 DNA 模板浓度大于 100 ng/ul。平分成 4 管进行 PCR，PCR 程序如下：

>1. 94ºC for 5 min
>2. 94ºC for 30 sec
>3. 60ºC for 30 sec
>4. 72ºC for 30 sec
>5. Go to step 2 (above) for 30 cycles
>6. 72ºC for 10 min
>7. 12.0ºC hold
>8. END

2) gRNA 模板的纯化（Fermentas GeneJET^{TM} PCR Purification Kit）

>1. 由于扩增片段只有 120 bp 左右，需要在 PCR 扩增液中加入一倍体积的异丙醇和 binding buffer (异丙醇： binding buffer： PCR 扩增液=1 倍体积： 1 倍体积： 1 倍体积)，混合均匀。

>2. 将混好的溶液加入 GeneJET^{TM} 纯化柱中，12000 rpm 离心 60s，弃掉过柱液。

>3. 加入 700 ul 的 wash buffer，12000 rpm 离心 1 min，扔掉过柱液，空管继续用 12000rpm 离心 2 min。

>4. 将纯化柱放入一个新的 1.5 ml **RNase-free** EP 管中，加入 35 ul RNase-free 水 (使用 RNase-free 枪头)， 12000 rpm 离心 1.5 min。保留过柱液即为纯化好的 gRNA DNA 模板。

>5. 测浓度，gRNA DNA 模板浓度要求> 100 ng/ul。时间充裕的话，可以进行电泳检测，大小约为 120 bp。

3) gRNA 体外合成（T7 RNA 聚合酶 (NEB; cat#M0251S)）

按照如下的体系加入各成份，操作要求 RNase-free，加样时**佩戴口罩**，防止口水污染样品

成份	体积
2.5 mM NTP	4 ul
10X Reaction Buffer	2 ul
gRNA template	0.5-1 ug
T7 RNA Pol	2 ul
Nuclease-free Water	——
Total	20 ul

37 ºC 反应 1 hrs。

4) gRNA 纯化（sigma post-reaction clean-up kit）

注意：所有的操作要求 RNase-free，加样时佩戴口罩，防止口水污染样品

>1. DNase I 处理：加入 2.5 ul 10 X buffer 和 2 ul DNase I，37 ºC 反应 15 min 以去除 DNA 模板，再进行纯化。

>2. 将纯化柱置于 2 ml 收集管中，2800 rpm 离心 15 s。

>3. 拧松管盖后，拧断管底密封柱，再扔掉管盖，将纯化柱放回收集管中，2800

rpm 离心 2 min。

>4. 将纯化柱置于一个新的 RNase-free EP 管中，弃掉收集管。

>5. 小心将 RNA 合成液加入到纯化柱中凝胶柱顶端，避免枪头堵住，2800 rpm 离心 4 min。

>6. 保留过柱液，检测 RNA 浓度。时间充裕的话，可以取 1-2 ul RNA 样品进行电泳检测。

注意：纯化后的 gRNA 最好大于> 150 ng/ul，置于-80 度冰箱中保存备用。

3.3 合成 Cas9 mRNA

（以 pT3TS-nls-zCas9-nls 为例，XbaI/ T3）

全长的斑马鱼密码子优化的 nls-zCas9-nls 全长序列克隆到 pTST3 质粒载体中 (Amp 抗性)，使用限制性内切酶 XbaI (NEB; cat#R0145T)进行线性化。Capped Cas9 mRNA 使用 mMESSAGE mMACHINE mRNA transcription synthesis kit 合成，之后纯化 (Ambion; cat#AM1344/T7 RNA polymerase；cat#AM1348/T3 RNA polymerase)。

具体操作如下所示：

1) 转录模板准备

>1. 质粒线性化：pT3TS-nls-zCas9-nls，XbaI (NEB; cat#R0145T)

成份	体积
DNA (10 ug)	——
10 X cutSMART buffer	10 ul
XbaI	40 u
H_2O	——
Total	100 ul

37 ºC 反应 3-5 hrs 后，使用 Fermentas GeneJET^{TM} PCR Purification Kit 进行纯化。

>2. 由于回收的片段较大（>5 kb），需要在反应液中加入一倍体积的异丙醇和 binding buffer (异丙醇： binding buffer： PCR 扩增液=1 倍体积： 1 倍体积： 1 倍体积)，混合均匀。

>3. 将混好的溶液加入 GeneJET^{TM} 纯化柱中，12000 rpm 离心 60s，弃掉过柱液。

>4. 加入 700 ul 的 wash buffer，12000 rpm 离心 1 min，扔掉过柱液，空管继续用

12000rpm 离心 2 min。

>5. 将纯化柱放入一个新的 1.5 ml RNase-free EP 管中，加入 45 ul RNase-free 水 (使用 RNase-free 枪头)， 12000 rpm 离心 1.5 min。保留过柱液即为纯化好的 DNA 模板。

>6. 测浓度，DNA 模板浓度要求> 100 ng/ul。时间充裕的话，可以进行电泳检测，大小约为 7.5 kb。

2) Cas9 mRNA 体外转录 (Ambion mMESSAGE mMACHINE kit)

注意：所有的操作要求 RNase-free，使用 RNase-free 枪头和 EP 管，加样时**佩戴口罩**，防止口水污染样品。

成份	体积
2X NTP/CAP	10 ul
10X Reaction Buffer	2 ul
linear template DNA	0.5-1 ug
Enzyme Mix	2 ul
Nuclease-free Water	——
Total	20 ul

37 ºC 反应 2-2.5 hrs。

3) Cas9 mRNA 纯化 (Ambion mMESSAGE mMACHINE kit)

注意：所有的操作要求 RNase-free，使用 RNase-free 枪头和 EP 管，加样时佩戴口罩，防止口水污染样品。

>1. DNase I 处理：加入 2 ul TURBO DNase I，37 ºC 反应 15 min 后进行苯酚/氯仿抽提和异丙醇沉淀操作纯化 mRNA。

>2. 苯酚/氯仿抽提和异丙醇沉淀操作可去除反应液中所有酶和大部分的自由核苷酸。首先加入 430 ul RNase-free 水和 50 ul Ammonium Acetate Stop Solution，混合均匀。

>3. 加入等体积的苯酚/氯仿抽提抽提，混合 15s，室温平衡 3 min，在 4 ºC，12000g 离心 15 min，转移上层水溶液到一个新的 RNase-free EP 管。

>4. 加入等体积的氯仿，混合均匀，在 4 ºC ，12000g 离心 10 min，转移上层水溶液到一个新的 RNase-free EP 管。重复数次。

>5. 加入等体积的异丙醇沉淀 RNA，混合均匀后，在–20°C 预冷 1 hrs (至少 15 min)，在 4 ºC ，12000g 离心 30 min，这时可以在管底观察到白色沉淀。

>6. 小心地吸去上清废液，将 RNA 沉淀重新溶于 20 ul RNAase-free 水中。

>7. RNA 检测：取 0.5 ul RNA 溶液加入到 9.5 ul RNAase-free 水中，混合均匀后，分别测量 RNA 的浓度并进行电泳检测 RNA 的质量。样品置于–80°C 保存。

3.4 样品准备

Cas9 mRNA和gRNA合成好以后，以合适的浓度配比准备注射样品，第二天用于注射到1-2细胞期的打靶用鱼胚胎中。

4 ul的注射体系如下：

储液	体积	终浓度
Cas9 mRNA	--	300-600 ng/ul
gRNA	--	30-100 ng/ul
MgCl2 (100mM)	0.4 ul	10mM（可选）
Phenol red	0.4 ul	
Nuclease-free H2O	--	
Total	4 ul	

混匀后分装到 2 个 RAase-free PCR 管中，保藏在-80 度冰箱中备用。

注意：酚红（Phenol red）和 MgCl2 溶液使用前应先在 12000 rpm 离心 2 min，以防止杂质堵塞注射玻璃针。

3.5 显微注射

提前一天配鱼，第二天收集胚胎，向约 200-500 颗胚胎中注射针对特定基因靶点的 gRNA 和 CAS9 工具酶 mRNA。

显微注射的操作方法，将在第三章中详细介绍。

3.6 P0 代突变效率检测

注射后的胚胎进行培养，24hpf 后收集 15-30 枚表型正常的注射后胚胎，提取基因组 DNA， 进行 PCR 扩增，将 PCR 扩增产物送测序，测序检测是否有突变及预估突变效率，将阳性后代培养为 P0 代（50-100 尾）。

具体步骤如下：

1) 提取注射后胚胎基因组DNA（Foregene， zebra Fish Direct PCR Kit）

>1. 显微注射后当胚胎发育到24 hpf时，收集15-30枚表型正常的胚胎提取基因组DNA，用作模板。

>2. 加入100 ul Buffer FP和4 ul蛋白酶K，混匀后65度反应30 min。

>3. 95度反应5 min终止反应。

12000 rpm离心2 mins， 吸取上清用作基因组DNA模板，样品可以在-20度保存1个月左右。

2) PCR 扩增靶点及附近的序列，测序验证。

3) 将测序检测为阳性的后代培养为 P0 代（50-100 尾），用于后续筛选可遗传的突变。

第四节 P0 代筛选

当 P0 代群体性成熟后即可进行阳性个体的筛选和传代，具体步骤如下：

1) 将 P0 代群体饲养至性成熟（3 个月）。

2) 取 10-30 尾成鱼与 AB 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，推荐使用 PCR 产物测序方法来检测靶点突变情况，步骤如下：

>1.收集15-30枚表型正常的胚胎提取基因组DNA，用作模板（Foregene， zebra Fish Direct PCR Kit）。

>2. 加入100 ul Buffer FP和4 ul蛋白酶K，混匀后65度反应30 min。

>3. 95度反应5 min终止反应。

12000 rpm离心2 mins， 吸取上清用作基因组DNA模板，样品可以在-20度保存1个月左右。

>4. PCR 扩增靶点及附近的序列，测序验证。

3) 将阳性 P0 个体的后代培养为 F1 代（50-100 尾），用于筛选带有突变的 F1 成鱼（杂合子）。

第五节 F1 代筛选和稳定遗传品系的构建

5.1 F1 代个体筛选

当 F1 群体性成熟后，即可进行 F1 代个体的筛选，检测方法类似于 P0 代个体的检测方法，具体步骤如下：

1) 将 F1 代群体培养足够大，直至适合剪尾鳍（1~2 个月即可）。

2) 取 10-30 尾成鱼（雌雄各半）剪尾鳍，提取基因 DNA（Foregene， zebra Fish Direct PCR Kit）。PCR 扩增靶点及附近的序列，测序检测基因型，筛选出 F1 杂合子。如果没有筛选到足够量的 F1 杂合子，可以再做第二轮，甚至第三轮。

3) 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，要求获取两个不同阅读框的移码品系。

4) 将阳性 F1 代个体与 AB 侧交的后代培养为 F2 代（100 尾左右）。

5.2 建系成功的后续处理

5.2.1 纯合品系的构建

在科研工作中，常常需要用到纯合品系，基因敲除品系需要到 F1 或之后才能稳定遗传，故可在 F1 代或 F2 代（推荐）筛选同一基因型的突变成鱼，自交传代，待该批子代成熟后筛选纯合子用于研究。

5.2.2 品系的保藏（推荐）

品系建立好以后，可以以侧交或自交的方式传代，等该批子代性成熟后，筛选 5-10 尾阳性雄鱼进行精子冻存，可以有效地防止品系丢失，避免品系退化问题，当该品系完成科研使命后，可以进行安乐死，节省养殖空间以及与之相应的人力物力等资源。

参考文献

1. Chang, N., et al., *Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos.* Cell Res, 2013. **23**(4): p. 465-72.
2. Jao, L.E., S.R. Wente, and W. Chen, *Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(34): p. 13904-9.
3. Howe, K., et al., *The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome.* Nature, 2013. **496**(7446): p. 498-503.
4. Jiang, W., et al., *RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems.* Nat Biotechnol, 2013. **31**(3): p. 233-9.

第三章 斑马鱼胚胎显微注射技术

显微注射技术是在显微镜下，利用显微操作系统，控制显微注射针在显微镜视野内移动，对进行细胞或早期胚胎操作的一种方法。该技术已经在越来越多的实验生物学研究领域中成为一项普遍的操作技术，并成功运用于包括小鼠、大鼠、兔子、斑马鱼及许多大型家畜，如牛、羊、猪等动物中。

斑马鱼显微注射是将实验材料直接注射到 1-4 细胞期的斑马鱼胚胎中，由于在这个胚胎发育早期没有膜分隔细胞和卵黄，注入 1 个细胞或卵黄的溶液将扩散到整个胚胎中。通过注射不同类型的实验样品，实现基因的瞬时过表达、表达敲除、以及制备转基因或突变斑马鱼品系等研究。

第一节 胚胎显微注射技术的应用

斑马鱼作为一种新兴的理想的模式生物，在生命科学研究中已得到广泛应用，斑马鱼胚胎显微注射技术是这些应用研究的基础技术平台之一。通过显微注射不同的实验样品，可以实现以下不同的目的。

第一，可以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，这样的技术则能够控制转录的基因、转录的过程和转录后 RNA 的用途，该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）进行特定蛋白的短期过表达。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行显性负调控分析。此外，还可以注射外源基因的 mRNA，实现特异性的功能。例如研制转基因品系时，需要伴随 DNA 插入片段同时注射 Tol2 转座酶的 mRNA，在胚胎内增加整合效率。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，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。

第二，可以通过注射反义吗啉环寡核苷酸（morpholino）实现敲减目的基因的表达。morpholino 是稳定的人工合成的核酸类似物，GeneTools 公司合成（http://www.gene-tools.com/），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，阻断蛋白翻译或 mRNA 剪切。与过表达相反，这种方法导致 mRNA 翻译蛋白产物减少，可以通过该蛋白减少时对生物学过程的改变来解释目的基因在发育中所扮演的角色。

第三，转基因品系的研制。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、发育生物学等研究领域。

第四，基因敲除品系的研制。基因敲除品系是在活体动物上开展基因功能研究的重要工具。近年来出现的 CRISPR/ Cas9 技术，因其效率高、可操作性强，已成为多数物种中构建定点敲除的主导技术。CRISPR/Cas9 是利用能够特异识别 DNA 序列的前导 RNA（guide RNA, gRNA）引导核酸内切酶 Cas9 在基因组的特定位点制造 DNA 双链断裂（double-strand break，DSB），然后利用细胞的非同源末端修复（non-homologous end-joint，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。

第五，定点敲入品系的研制。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，该技术是同样是基于 DNA 损伤修复机制，利用如 CRISPR/Cas 系统的基因组编辑工具产生 DSB，介导外源 DNA 整合到基因组中的特定位点，实现目的基因的靶向遗传修饰。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。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的随机插入导致位点效应。

第二节 显微注射系统的搭建

显微注射需有一套相当精密的显微操作设备，主要包括以下几种（图 3.1）：

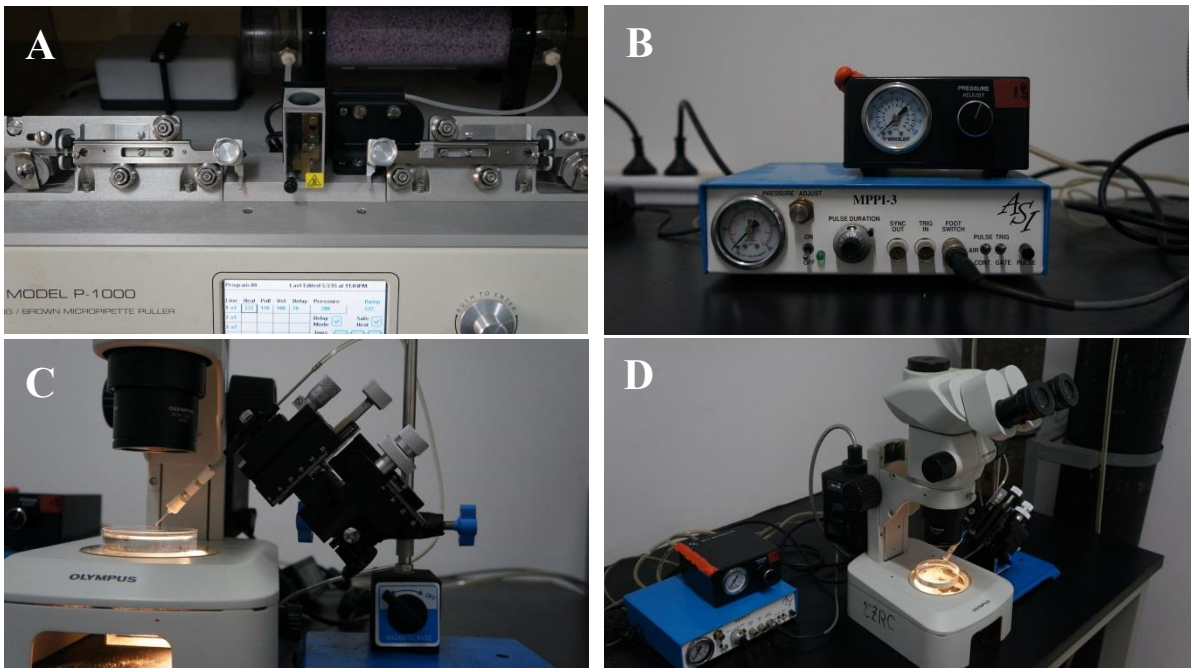

图 3.1 显微注射常用设备。A: 拉针仪; B: 显微注射器; C: 持针器和显微操纵器; D：体视显微镜

拉针仪。用于拉制毛细管成注射针，可以调节的温度、拉力、拉制时间等参数拉制出合适针尖的注射针，为了防止空气中灰尘颗粒沾染注射针引起针尖阻塞，注射针最好现用现拉。

显微注射器。用于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体积的样品注射至胚胎体内。注射器还和一个脚踏板相连，使得实验人员在使用双手的同时还可以激活压力脉冲将实验材料注射入胚胎中；

持针器。用于固定在注射过程中使用的注射针，并将它与注射器的空气管相连，常装在显微操作器上；

显微操纵器。用于注射针的显微操纵，可以在显微注射过程中对注射针的位置进行细小和精确地调节；

体视显微镜。用于显微注射时观察胚胎，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。

第三节 显微注射过程及注意事项

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：准备注射用的胚胎

注射的前一天，按照雌:雄为 1:1 或 2 :1 的比例将成年斑马鱼放置于配种缸，用隔板分开。

注射的早上，抽去隔板，雌雄鱼开始交配。一般在十多分钟左右亲鱼产卵并使卵受精。一般第一次抽板 2 缸鱼左右，随后根据实验进度适时给其它缸抽板。可在抽板前先将内缸连同亲鱼换到另一干净外缸中以节约清洁胚胎的时间。

亲鱼产卵后，取 180μm 孔径的过滤网，收集外缸底部的鱼卵，并用养殖水清洗鱼卵 2-3 次。应尽量收集 20 min 内的受精卵（即对于同一缸亲鱼，两次收集受精卵的时间间隔不得超过 20 分钟，以保证发育阶段的一致性）。受精卵分选和洗净后，用吸管将收集的卵置于平板培养皿中，清除平皿内的异物和胚胎周围的水，采用干法注射。

胚胎在受精后 10 分钟卵膜将膨胀，随后数分钟内细胞形态变得较为规整（容易找到动物极），此时可以开始注射。受精后 45 分钟左右（标准培育温度下所需时间，具体情况同室温有关）发生第一次卵裂。样品通常需要注射到 1-4 细胞时期胚胎，以下上样、断针、定量和注射都要在此段时间内或在此之前完成。

第二步：拉针、上样和仪器准备工作

1、拉针。使用拉针仪拉制一定数量的针尖大小以及针尖角度适合的毛细管。

2、可以提前准备，样品通常包括质粒 DNA、RNA、morpholino 等。

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 20-150pg，多于 200pg 胚胎死亡率上升。

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

Morpholino 样品：参见 GeneTools 公司随样品提供的说明书。通常产品总量为 300nmol 一瓶，约相当于 2400μg，加入 200μL 灭过菌的去离子水（电阻率>18MΩ/cm）稀释至 12μg/μL，每管 20μL 分装作为储液冻存在－20℃。注射时取一管稀释至 0.5-6μg/μL (ng/nL)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。在使用新的 morpholino 时，必须慎重考量该 morpholino 的有效性和特异性。

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，避免堵住针头。一般可以在注射样品中加入终浓度 10%-20%的酚红，便于观察注射过程。

3、上样装针。将拉制好的毛细管竖直固定。然后吸取 1-3μl 显微注射液，逐滴地将注射液滴在毛细管顶端，在毛细管内芯引导下，液体通过虹吸作用将汇聚于玻璃管针头部分。如果使用的毛细管没有内芯，可以使用微量上样移液枪头上样。上样体积至少为 1μL，一定不要在针内引入空气柱，否则会难以控制注射量。

4、打开注射仪。以 MPPI-3 脉冲压力注射仪为例。打开氮气罐总阀，调节压力至 0-0.5 之间。打开注射仪开关，调节主操作面板上的压力值为 10-20 左右，选择合适的注射压力和脉冲时间。（图 3.2）

图 3.2 全套搭建好的显微注射设备（左侧）和破针操作（右侧）

第三步：注射斑马鱼胚胎

1、破针。将上好样品的注射针插入持针器中固定，然后在体视镜最高倍放大率下，用尖头镊子将注射针的前端夹断。（图 3.2）

2、注射剂量调整。将显微台微尺放置到体视显微镜下，加入一滴矿物油，将注射针伸入矿物油中，踩动踏板压将一滴注射液送到矿物油，测量注射样品的大小（表 1）。注射体积与针尖大小、注射压力、注射时间、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 1nL。注射剂量应控制在 1.8nl 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。

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

表 1 显微注射台尺标准

3、注射。将收集的胚胎放置到体视显微镜镜下，用低倍物镜对准胚胎调焦，轻轻的落下针尖，并将注射针尖推入视野中心，通过微操作系统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。推动操纵杆，小心进针，使注射针针尖进入胚胎。脚踏开关将样品注入胚胎。实验结束时，先关闭氮气罐总阀（逆时针变松为关），排空仪器中的气体后，关闭总开关。

第四步：注射胚胎的培养和观察

1、胚胎养殖。注射结束后，将胚胎转移至养殖水中，置入 28^0C 培养箱培养。待胚胎发育 2 小时后，显微镜下挑出未受精的胚胎（一直处于 1 细胞期或者假分裂）、死亡的胚胎（胚胎发白，显微镜下为絮状）和畸形胚胎（视情况而定）。孵化期间每天要及时清除败育胚胎，勤换水。

2、胚胎麻醉和固定。麻醉剂可以使鱼类代谢减缓，鳃动频率下降，氧的需求量减少，从而方便进行实验操作。通常将斑马鱼浸泡于 0.016%的 Tricaine 中进行麻醉。待胚胎麻醉后，利用 4%的甲基纤维素固定胚胎，将胚胎调整到合适的位置。废弃的显微注射针的尖端烧溶后可以用于调整胚胎。

3、胚胎观察。为了便于观察显微注射的结果，下面以注射质粒 pT2(tpma:EGFP)和 *chordin* mopholino 为例，对胚胎进行荧光和表型观察。质粒 pT2(tpma:EGFP)是肌肉特异性启动子 tpma 激活 eGFP 蛋白表达，注射后，胚胎发育至 1 天时，可以在肌肉中特异表达绿色荧光蛋白（图 3.3A）。在斑马鱼早期胚胎发育过程中，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。而 *chordin* 基因是 BMP 的拮抗因子，特异地在斑马鱼胚盾中表达。注射 chordin mopholino 敲低 *chordin* 基因表达，胚胎就会发生腹部化，具体表现为头部变小、血岛增大（图 3.3B）。

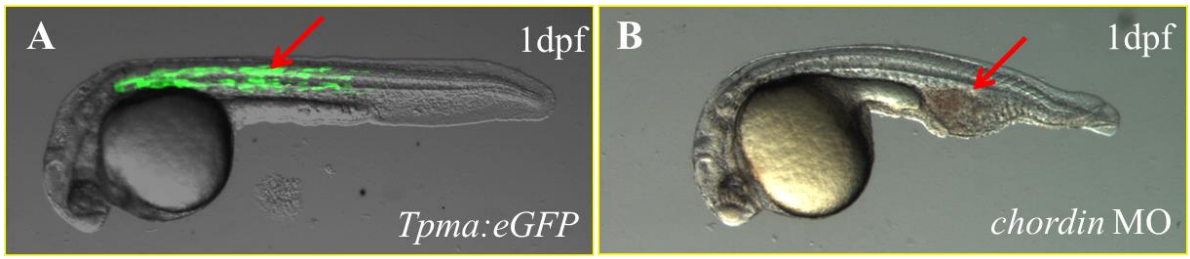

图 3.3 显微注射后 24hpf 胚胎的照片。胚胎发育至 1 天时，注射质粒 pT2(tpma:EGFP)的胚胎在肌肉细胞中特异表达绿色荧光蛋白（A）；注射 *chordin* mopholino 的胚胎产生腹部化表型（B）。

本次培训将以 *slc45a2* 基因作为靶基因进行敲除。*slc45a2* 基因参与色素形成过程，被认为是眼皮肤白化病 4 型（OCA4）的致病基因。OCA4 在日本白化病群体中占多数，病人表现为淡金色或白色毛发和不同程度的视网膜色素上皮细胞缺失。*slc45a2* 基因不仅影响皮肤色素的形成，还对色素瘤的抵抗能力有所影响。注射 slc45a2 gRNA 和 Cas9 mRNA 后，胚胎的色素将减少甚至消失（图 3.4）。

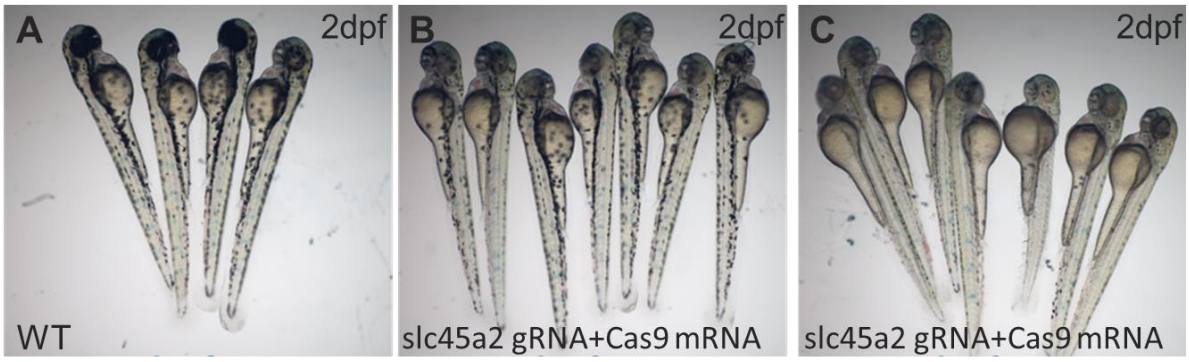

图 3.4 显微注射后 48hpf 胚胎的照片。胚胎发育至 2 天时，相对于野生型胚胎（A），注射 slc45a2 gRNA 和 Cas9 mRNA 的胚胎色素减少（B）甚至基本消失（C）。

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，主要包括以下几方面。

1、注射样品的质量和和浓度。显微注射的样品种类繁多，包括 mRNA、DNA 或蛋白质等，但是注射样品是否纯净是关系到注射效率高低的重要因素之一。此外，注射样品的浓度不易太高，例如注射 DNA 的总浓度一般控制在 200pg 以下。

2、注射前小心将显微注射针定位，注射针定位到卵表面的注射角度是穿透坚硬的卵壳注射成功的关键。

3、破针时，将针尖一点点剪断，不宜一次剪太多。显微注射针尖如果太粗，会导致 DNA 流量过多，受精卵易于裂解；太细则导致针内 DNA 流出速率过慢，且易堵塞针尖，而使 DNA 无法顺利流入，影响注射效率。因此进行显微注射时，如何制备适用的显微注射针是显微注射效率极其重要的因素。

4、在注射过程中，常发生注射针堵塞，堵塞后，通常可通过轻夹针尖、增大输出压力或按 pulse/CONT 开关而得以缓解。如果不能解决，换用新的注射针。

5、注射时注射器的压力不宜变化太快，否则会造成注射量操作难以控制，导致胚胎内环境改变过快过大甚至胀破细胞。氮气罐的压力阀显示气体的压力，压力为 0 表明罐内无气体，需要及时换气。

6、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毛细针抽出，造成受精卵的损伤。

7、在整个过程中，严禁将注射针尖对着人员和仪器，因为注射针在持针器上安装不牢时或针尖堵塞，注射器、管子及注射针内的压力，可能将注射针射出伤人。

8、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：温度(28 度培养箱养殖)；水质（早晚勤换水）；养殖密度（50 枚/10cm）等。

本节附录：

1. 试剂

亚甲基蓝稀释液：1 g 亚甲基蓝 (Sigma, MB-1)溶解于 1 L 的灭菌水至终浓度 0.1%。

甲基纤维素溶液：在容器内加入所需量 50 ml 的水，并加热到 70 ^{0}C。逐渐加入 3 g 甲基纤维素粉末，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，低温保存。

2. 本次培训使用的设备

体视显微镜　　品牌：OLYMPUS　　型号：SZ61

体视显微镜用于显微注射时观察胚胎，SZ61 体视显微镜的放大倍数从 6.7×到 45×（使用 10×目镜），变焦倍率为 6.7：1，可以让操作者在最适宜的放大倍数下进行快速、舒适的观察。

显微操纵器　　品牌：Märzhäuser Wetzlar　　型号：FP-MM

显微操纵器 FP-MM，又称为手动微操纵器,是一款手动调节的三维手动显微操纵器。

它具有 XYZ 三轴各自的调节旋钮,同时还可配带一个机械操纵杆（mechanical joystick ），以微米量级精度控制 XYZ 三个轴各自移动。手动微操纵器配备一个粗调和微调旋钮,满足快速定位和精确定位的双重需要。手动显微操纵器技术参数：行程范围：X 轴：37mm；Y 轴：20mm；Z 轴：25mm；操纵杆行程范围：0.35-4mm。

水平式毛细管拉针仪　　品牌：NARISHIGE　　型号：P-1000

水平式拉针仪一般利用弹力或电动力作单次或多次拉制毛细管。该仪器的温度、拉力、拉制时间等参数可以根据需要进行调节，并可以拉制两根相同形状和筒径的毛细管。拉针仪一般都预先安装了用于主要的不同的毛细管拉制的预置程序。通过对这些步骤序列或参数进行一些修改，便可以设定新的程序。操作者只需要按下启动按钮，便可以运行毛细管拉制程序。

选用外径为 1mm，内径 0.75-0.8mm 带芯毛细玻璃管，装在水平拉针仪上，拧紧左右两侧的夹子，做好固定，并使其中间部位对准加热丝。设定好电流、拉力和时间（本次培训的拉针参数为：Heater level：75.9，Magnet main-level：31.9，Magnet sub-level：64.0），然后按 start 键，等待毛细管被拉成两个所需的微注射针头。

脉冲压力注射仪　　品牌：ASI　　型号：MPPI-3

脉冲压力注射器 MPPI-3，是一个独立产生气体压力脉冲到注射器的装置。 该装置提供精确的压力和脉冲持续时间的线性控制，以满足您的压力注射的需要。另外可使用外部控制源，如信号发生器可用于外部控制的脉冲宽度和重复率。MPPI-3 提供的三种方法来启动压力脉冲，触发或门控模式：前面板按键开关；外部的 TTL 输入信号；选择脚踏开关。

连续的输出可以微调流量和清除堵塞管。最大输入压力为 300 帕斯卡（2000 千帕）。输出压力范围为 0 至 100 帕斯卡（0 到 690 千帕）。MPPI-3 采用内置气体过滤器，使仪器更加可靠和易于维护。MPPI-3 有一个回压输入装置，用于补偿在吸管里面的任何逆向流所产生的毛细管现象作用所造成的脉冲后提供一个可调（0 到 15 帕斯卡）回压。

第四章 斑马鱼的养殖

第一节 斑马鱼的养殖环境

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归纳。

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 ºC。目前，斑马鱼的实验室养殖水温一般控制在 24ºC 至 30 ºC，并且普遍认为 28.5 ºC 是最适合生长的温度，通常情况下鱼房室温控制在 28 ºC 左右[1, 2]。较高的养殖温度可能导致水体的溶氧度降低，且造成水体中细菌的滋生，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放缓，产卵量降低。

二、水质参数

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[3, 4]。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 值范围在 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

斑马鱼属淡水鱼类，但是能够耐受很大的盐度范围。一般养殖系统的盐度控制范围为 0.25—0.75‰，而斑马鱼养殖的适宜盐度通常控制在 0.25‰左右[5]。

电导率是表示物质传输电流能力强弱的一种测量值。在一定温度下，养殖水的电导率与盐度存在相关性，所以，许多斑马鱼养殖设备通过监测电导率来控制水体中盐度。目前，斑马鱼养殖水中电导率的控制范围较广，在 200—1700 μS/cm 均有报道。一般情况下，电导率主要控制在 500—800 μS/cm 左右，此时，相对应的盐度在 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。斑马鱼不适宜于较高硬度的水，水体硬度超过 200 mg/L 不利于斑马鱼的生长繁殖，并且对斑马鱼健康造成影响，所以养殖过程中水体硬度范围一般在 75—200 mg/L [5]。目前，尚没有系统全面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，但是有报道在过低硬度的水中生存，斑马鱼的繁殖能力会降低[6]。

4. NH_4^+、NO_2^-、NO_3^-

养殖水体中的氨氮主要来源于鱼的腮上皮组织释放、粪便排放、有机物（如死鱼，漂浮食物）的降解等。较高的氨氮浓度对鱼类有毒害作用，同时也会造成水体内的电导率升高。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，对鱼类存在毒性主要是 NH_3，一般情况下养殖水中 NH_3 的浓度要低于 0.02 mg/L[5]。

水体中的硝化细菌可以将氨氮废物转化为亚硝酸盐（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 0.1 mg/L 时，对鱼类的养殖存在危害[7]。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[7]。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。斑马鱼具有较快的新陈代谢速率，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基本维持或者不低于 6.0 mg/L （28.0 ºC），以维持斑马鱼的健康生长和活动。

然而，水体溶氧度也不是越高越好。水体内通空气过度，会造成气体达到和超过饱和浓度，产生大量气泡，此时，鱼易得气泡病而死亡。

三、光周期和光照强度

适宜的光周期有利于斑马鱼生长繁殖。斑马鱼在经历暗周期后，光照诱导斑马鱼开始交配产卵，并且交配产卵可以持续一小时左右。24 小时连续光照，或不规律的光暗周

期可能导致斑马鱼不产卵或产卵量降低。

斑马鱼养殖系统的适宜光周期是 14 小时的光照周期和 10 个小时的暗周期。同时，照明系统的渐亮和渐暗可以避免刺激斑马鱼，防止斑马鱼从养殖缸内跳出。

斑马鱼养殖的合适光强范围为水体表面的光强在 54—324 lux 范围内[8]。光照强度过高会导致水体内的藻类大量滋生，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。

第二节 循环养殖设备介绍

斑马鱼规范养殖系统由以下相关设备组成，主要包括：净水供水系统、净水储存及水质控制系统、斑马鱼中央循环养殖系统等（图 4.1）。下面依次做出介绍。

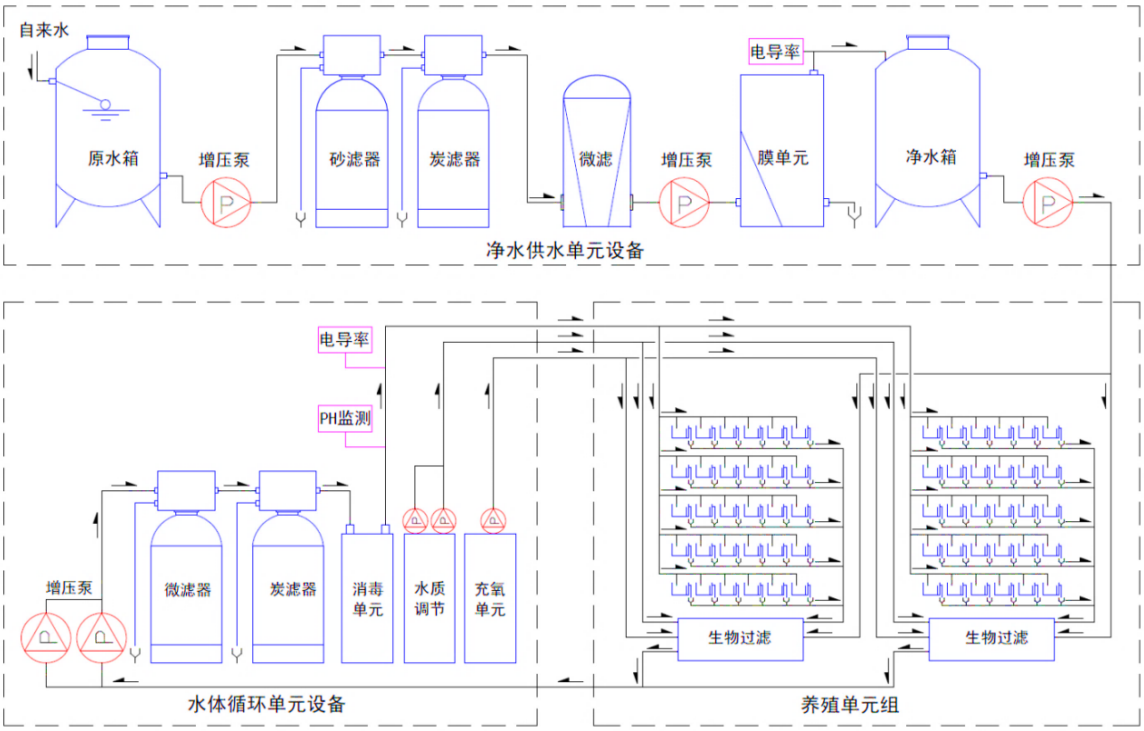

图 4.1 斑马鱼规范养殖系统水体流程图。斑马鱼规范养殖系统的水体流程主要由净水供水系统、水体循环单元（净水储存及水质控制系统和自动化控制及报警单元）、中央循环养殖系统组成。

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、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。

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）> 150MW

除菌（Bacteria rejection）99%

除颗粒物（Particle rejection） 99%

电导率（Conductivity）<30 μS/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、稳定的和可循环的水环境，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。

a、 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。固定过滤筛的筛网能够有效过滤水体中直径≥50μm 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，一般活性炭每半个月到一个月的时间更换一次。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，过滤面积就越大。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。

b、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、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、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。

c、杀菌单元

斑马鱼循环养殖系统通常使用紫外灯杀菌。紫外灯发射波长在 200—300nm 范围的紫外线，都有杀菌能力。其中以 265—266nm 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。可以穿透细菌的细胞膜，被细胞核吸收，对细菌 DNA 造成损伤，抑制了 DNA 的复制，破坏了菌体的繁殖能力，从而达到了杀菌的目的。但是紫外线杀菌需要穿透水层才能起作用，因为污水中的悬浮物、浊度等都

回干扰紫外光的传播。所以养殖水的水质是保证紫外线消毒的先决条件。

d、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

a、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。调控的基本项目有：溶氧度、盐度、温度、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 6.0mg/L 之间，pH 值在 7—8 之间，电导率在 500—800μS/cm。养殖系统对于以上指标应能够实时自动监测，发现某个指标异常，须即时自动调整。

b、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，自动对水体循环净化水仪器下达补水指令。

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。机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水流水量控制。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）。

第三节 斑马鱼的繁殖

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，同时斑马鱼的交配行为需要光周期的生物钟控制，在每次光周期开始时应激进入交配产卵的状态。此时雌雄鱼相遇则有可能交配产卵。一对健康的斑马鱼一次交配可产受精卵 200 枚以上。斑马鱼所产的卵为非黏性卵，直径大约在 1 mm 左右，沉积于缸底。

下面将详细介绍斑马鱼如何在实验室中的繁殖方法以及胚胎的养殖。

一、 配鱼

1、为了提高斑马鱼的产卵量，必须在交配前 1-2 周对亲鱼增添鲜活饵料。

2、配种当天下午，准备装满养殖水的一套配种缸，包括内部的产卵框（内框）和外缸。将雌、雄按 1:1 或 2:1 比例放入内缸，密度不易过高，并用隔离板将雌鱼和雄鱼分开，盖上盖子防止鱼跳出（图 4.2）。雌雄区别：雄斑马鱼腹部扁平体型细长，体色偏黄；雌斑马鱼腹部膨大体型丰满，腹部银亮。

3、将交配盒放置在 28℃下，避光过夜。

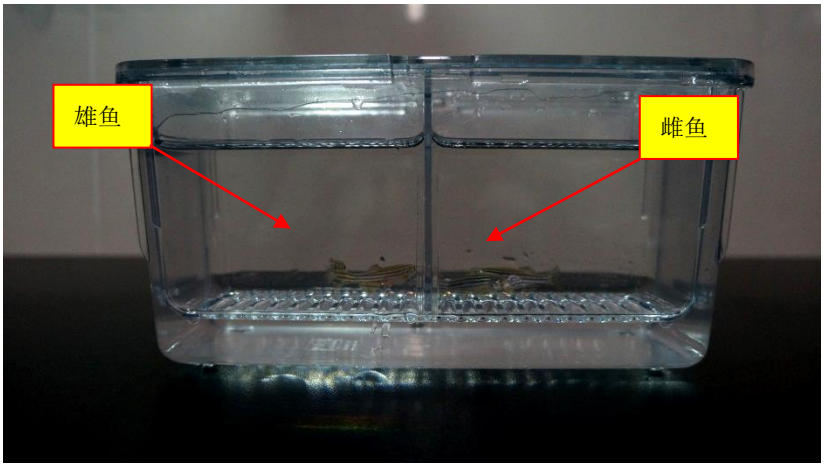

图 4.2 配鱼

二、 受精和收卵

1、次日早上给予光照，将配种内框（内有斑马鱼）小心地转移到事先准备好的装有少量系统水的配种外缸内，然后去除隔离板。斑马鱼开始交配。交配期间，尽量避免干扰。

2、待亲鱼产卵，取 180 μm 孔径的过滤网，收集外缸底部的鱼卵，并用养殖水清洗鱼卵 2-3 次。

3、放置胚胎到装满养殖水的平皿内，对于直径为 8 cm 的平皿，密度在 50 个鱼卵/皿为宜。然后清除异物和未受精的鱼卵。

三、 胚胎的养殖

1、胚胎盛养于装有亚甲基蓝（0.5 mg/L）养殖水的平皿中，避免霉菌生长（图 4.3）。

2、将装有胚胎的平皿做好标签，置于设有光周期的28.5 °C的恒温培养箱或养鱼房中培养，每天吸出死卵或胎膜，并换水一次。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。

3、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。

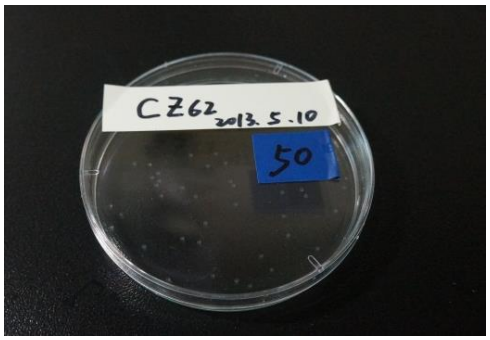

图 4.3 培育于平皿中的 0-4 天胚胎

第四节　幼苗及幼鱼的养殖

斑马鱼在5—15dpf阶段为幼苗期，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。16—90dpf为幼鱼期，根据养殖方式的不同，将斑马鱼幼鱼期分为两个时期，幼鱼初期（15—30 dpf）、幼鱼后期（31—90 dpf）。下面将介绍以上三个时期的养殖方式。

一、 幼苗期（5—15 dpf）

幼苗期（5—15 dpf）采取的是静水养殖，此时幼苗转移至1000 mL的小圆缸里养殖，小圆缸内缸底部带有过滤网，方便换水，将标签贴于内缸外侧（图 4.4）。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，每次投喂后确保小圆缸里草履虫的密度超过100个/mL。粉末饲料投喂需严格控制量，投喂量大则残渣会在水中形成絮状物，对于游泳能力弱的幼鱼来说，容易被缠住而死亡。所以，如投喂粉末饲料过多，则需每日及时用吸管吸出残渣。

每日养殖水全部更换一次，换水时将内缸缓慢提起，再轻轻放入含有新鲜养殖水的外缸里，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。在第12 d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。一般14—15 d，90%以上的幼苗具备摄食丰年虫的能力。

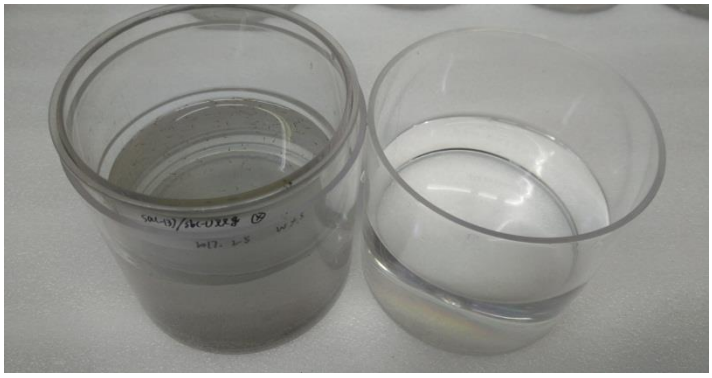

图 4.4 小圆缸里静水养殖5—15 dpf期幼鱼

二、 幼鱼初期（16—30 dpf）

幼鱼初期（16—30 dpf）采取的是滴水法换水养殖（图 4.5）。

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。待幼鱼能摄食活饵丰年虫后，将幼鱼转移到干净的3 L鱼缸中，贴好标签。在鱼缸中插入鱼苗网格（40目以上）插板，置于鱼苗养殖架上，不需要盖盖，采取滴水法换水（以每分钟100滴左右进水为宜）。养殖密度一般情况下不超过30尾/L。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5分钟内可以吃完的量为准，丰年虫过多后沉底易败坏水质。每日可搭配1次人工合成的幼鱼粉末饲料进行投喂。

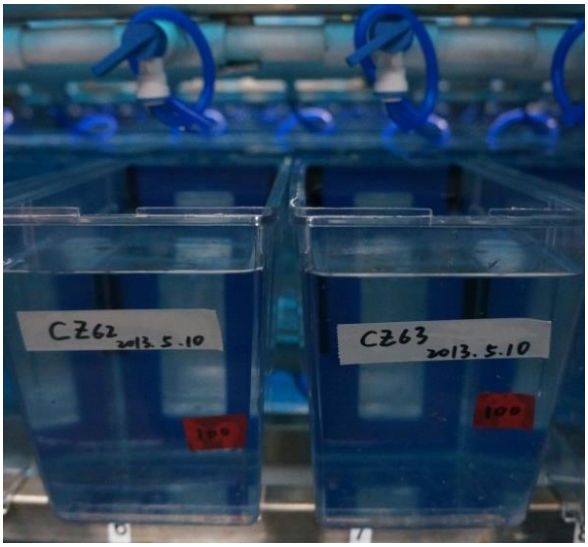

图 4.5 滴水法换水养殖15—30 dpf期幼鱼

三、 幼鱼后期（31—90 dpf）

幼鱼后期（31—90 dpf）采取的是流水法换水养殖（图 4.6）。将幼鱼分缸，每缸密度不超过10尾/L，贴好标签。在鱼缸中插入鱼苗网格（20目）插板，置于鱼苗养殖架上，需要盖盖，采取流水法换水（以10 L/h左右流速为宜）。每日投喂2—3次丰年虫，投喂前关闭水阀。每次喂食的丰年虫不宜过多，以5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 4.6 流水法换水养殖31—90 dpf期幼鱼图及喂食丰年虫

第五节 成鱼的养殖及安乐死

在斑马鱼的整个生活史中，成鱼时期持续时间最长。从而成鱼的养殖成本比重较大，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。对于使用后的斑马鱼应该妥善处理，是实验动物伦理学的要求。下面介绍成鱼的养殖及斑马鱼安乐死。

一、 成鱼的养殖（> 90 dpf）

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。记录移入成鱼缸中的斑马鱼数目，养殖密度为 5—8 尾/L，在养殖缸外贴黄色标签，在上注明缸中鱼的实际数目（图 4.7）。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。对于需要繁殖的种鱼、精子冻存的雄鱼等，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，以及每日巡视捞去死鱼。

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、霉等，所以要定期清洗消毒。

图 4.7 成年斑马鱼养殖

二、 斑马鱼安乐死

斑马鱼的自然寿命是 2—5 年，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，可及时的施以安乐死处理。常用的斑马鱼安乐死方法有 2 钟：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 5X 高浓度的 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。之后可按照生物医学实验垃圾处理。

冰浴法可用于成年斑马鱼或 2 天以上的幼鱼。用于幼鱼时，将养殖有幼鱼的水和大量的冰充分混合 30 分钟后，可视为幼鱼已死亡。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，可视为鱼已死亡。之后可按照生物医学实验垃圾处理。

第六节 斑马鱼活饵的培养

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、红线虫等活饵较为常见。下面主要介绍草履虫的培养及丰年虫的孵化方法。

一、 草履虫培养

1、 草履虫种源的培养

a、 培养液配制

1）在 1 L 纯水中加入 0.25 g $NaHCO_3$ 后，湿热灭菌。

2）称取 0.25 g 酵母粉放入 1.5 mL 离心管中密封，干热灭菌。

3）将 10—15 枚小麦粒放入灭菌管（见图 4.8）中，同时加入少量纯水浸没麦粒，湿热灭菌。

图 4.8 灭菌水、小麦粒、酵母

4）待上述灭菌结束后，静置至室温，在无菌操作台中，将灭菌酵母加入含 $NaHCO_3$

的灭菌水中混匀。即配制成 0.25 g/L 酵母培养液。

b、 草履虫接种

1）在无菌操作台中，将酵母培养液按每瓶 40 mL 分装到无菌培养瓶（T25 细胞瓶）中（图 4.9），同时在每一个培养瓶中加入 1—2 粒灭菌过的小麦粒。

2）将事先准备好的草履虫种源（可在 CZRC 购买），接种 10—20 mL 到培养瓶中，确保草履虫密度不低于 25 个/mL（密度统计方法见 6-1-4）。将接种好的培养瓶放入恒温培养箱中，15℃长期培养（1—3 个月）。

3）需要种源时，将草履虫培养瓶从 15℃培养箱中拿出，按照 1:1 接入新鲜灭菌培养液，并放置 15℃恒温培养箱中培养 3—7 天。

4）选择草履虫密度高（> 1000 个/mL）、运动快、生命力旺盛的培养瓶作为种源。

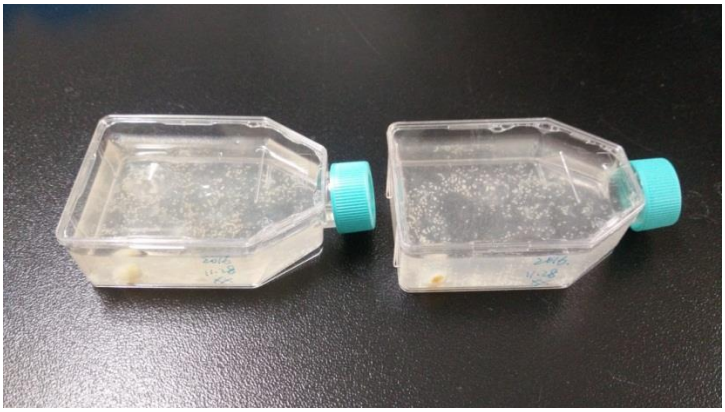

图 4.9 无菌培养瓶

2、 草履虫高密度培养

a、 培养液配制

在 1 L 纯水中分别加入 0.25 g $NaHCO_3$、0.25 g 葡萄糖、0.5 g 酵母粉后密封，70ºC 烘箱中烘 2—3 h 后放置室温待用，培养液 pH 范围为 7.0—7.5。

b、 草履虫接种

1）将草履虫种源，按照 1:2 的比例接种，即 1000 mL 草履虫种源接种到装有 2000 mL 新鲜培养液的锥形瓶（图 4.10）中。

2）将锥形瓶放置室温培养 3—7 天，每日统计锥形瓶中草履虫的密度。最高密度可达 2000 个/mL。

3）培养过程中若培养液由浑浊变清，且密度较低时，可适量的补充新鲜酵母浓度较

高的培养液。密度达到 2000 个/mL 左右时，可以按照 6-1-3 进行富集浓缩，或重复上述步骤 1 接种。此时，草履虫属于开放培养存在污染其它单细胞生物的可能，所以不能作为种源。

4）将培养温度提高到 25—30℃范围内，可加快草履虫的繁殖速度。另外，在锥形瓶中加入 1—2 枚灭菌过的小麦粒可以提高草履虫密度。

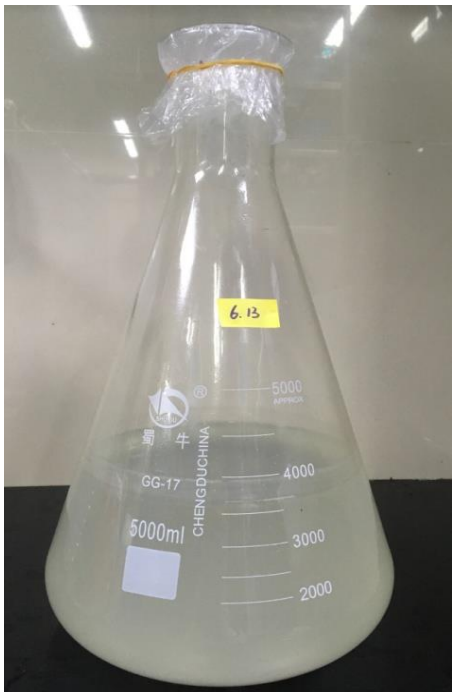

图 4.10 锥形瓶培养草履虫

3、草履虫的富集浓缩

统计草履虫的密度，当密度> 2000 个/mL 时，可进行富集浓缩。富集步骤如下：

a、用 120 目的过滤网过滤培养液，此时大部分草履虫都在过滤液中，收集过滤液。

b、将收集的过滤液倒入 500 目过滤网中进行过滤，收集过滤液。此时滤速较慢，可以轻轻地震荡过滤筛，加速滤过速度。

c、将收集的过滤液倒入 1250 目过滤网过滤，此时，草履虫富集在过滤筛上，弃掉过滤液。用适量净水轻轻冲洗过滤筛，并收集过滤筛上的草履虫，可重复冲洗 2—3 次得到干净的草履虫溶液。确定富集草履虫的密度，按照投喂后养殖水中草履虫密度大于 100 个/mL 进行投喂。

4、草履虫密度统计方法

将待计数的草履虫培养液摇匀后，用移液枪取20 μL的草履虫培养液滴于载玻片上，

在解剖镜下拍照计数，重复取样计数3次。当镜下视野中草履虫数目超过20个时，在载玻片上滴1滴0.1%冰醋酸杀死草履虫后拍照计数。

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（图 4.11）。

图 4.11 丰年虫孵化和收集好的丰年虫

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；200 ml 海盐；9 g 食用级小苏打；60 ml 的未脱壳丰年虫卵。

2、 步骤

a、将丰年虫卵孵化器放置在 24 小时光照和 24—28℃室温条件下。

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

c、待海盐和小苏打充分溶解后，加入 60 ml 的未脱壳丰年虫卵。

d、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充气 18—24 小时。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。

e、孵化 18—24 小时后，停止充气。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物，卵壳会漂浮在溶液的表面。

f、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。

g、然后用双蒸水清洗过滤收集的丰年虫 2-3 次。将清洗后的丰年虫重新悬浮到 1L 的双蒸水中，混匀后喂斑马鱼。

参考文献

1. Westerfield, M., *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio), 5rd edition.* 2007: University of Oregon Press. 385 pp.
2. Matthews, M., B. Trevarrow, and J. Matthews, *Avirtual tour of the guide for zebrafish users.* Lab Anim, 2002. **31**: p. 34–40.
3. Spence, R., et al., *The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh.* . J. Fish Biol., 2006. **69**: p. 1435–1448.
4. McClure, M.M., P.B. McIntyre, and A.R. McCune, *Notes on the natural diet and habitat of eight danioin fishes, including the zebrafish Danio rerio.* J. Fish Biol., 2006. **69**: p. 553–570.
5. Lawrence, C., *The husbandry of zebrafish (Danio rerio): a review.* Aquaculture, 2007. **269**: p. 1-20.
6. Chen Y.Y., Lu F., and Hwang P.P., *Comparisons of calcium regulation in fish larvae.* J Exp Zool A Comp Exp Biol, 2003. **295**(2): p. 127-35.
7. Lawrence C., Eisen J.S., and Varga Z.M., *Husbandry and Health Program Survey Synopsis.* Zebrafish, 2016. **13** p. Suppl 1:S5-7.
8. Matthews, M., B. Trevarrow, and J. Matthews, *A Virtual Tour of the Guide for Zebrafish Care and Users.* Lab Animal, 2001. **31**: p. 34–40.

第五章 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：一类是非感染性疾病，一类是感染性疾病。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，常常可形成大规模的爆发或感染，严重影响斑马鱼的质量和实验结果的准确性。斑马鱼属于鲤科鱼类，故感染鲤科鱼类动物的病原均有可能感染斑马鱼。本章将对斑马鱼中常见疾病及日常健康维护做一个简单的介绍。

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[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传播和人员感染，造成巨大的损失[2]。

2、临床症状：病鱼往往出现体表溃疡、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，有时也会有腹水出现（图 5.1）。

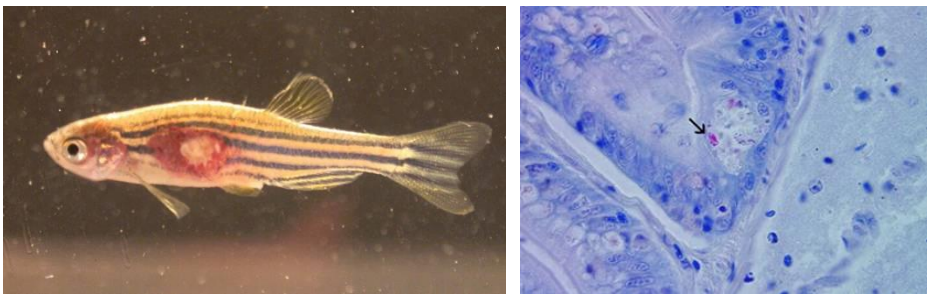

图 5.1 分支杆菌感染病征与病理图。左侧，检出过分支杆菌的体表溃烂斑马鱼，右侧分支杆菌感染鱼肠道切片的抗酸染色（分支杆菌为抗酸菌染色呈红色，非抗酸菌染色呈蓝色）（引自：http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php）

3、显微观察与诊断：诊断时根据上诉症状，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，PCR 扩增一段特异性片段，分子方法鉴定[3]。

4、防治：一般来说分支杆菌感染很难用抗生素进行根治，有文献报道 50 ppm 卡拉

霉素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*)或者水型点状假单胞菌(*Pseudomonas punctatat f. ascitae*)等细菌感染。一般认为是水质不良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、肾的颜色均变淡（图5.2）[5]。

图 5.2　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，眼睛突出。

3、显微观察与诊断：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确诊。

4、防治：水温温差过大，系统换水量过大以及换水过急的情况下比较容易出现，因此对该病的预防需要保持良好的水质。一旦发生严重竖鳞，就无法医治了。

三、腹水病

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

2、临床症状：病鱼腹部肿大，偶见腹部两侧还有出血、溃烂的症状。

3、显微观察与诊断：根据其症状，解剖后见腹水即可确诊。

4、防治：方法同竖鳞病。

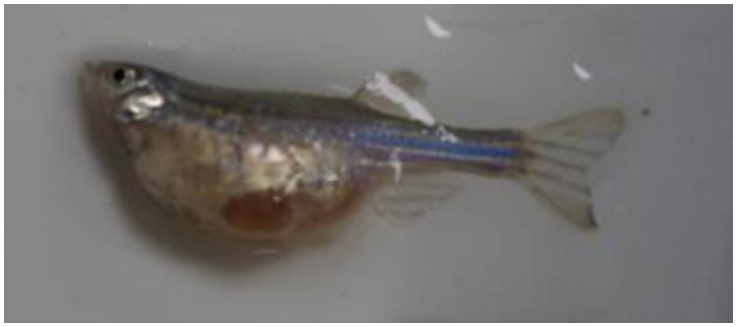

图 5.3　腹水病斑马鱼 游动缓慢，无力，腹部膨大有腹水，腹部皮肤溃烂。

四、滑动细菌感染（细菌性鳃病、环境性鳃病）

1、病原：黄杆菌属(*Flavobacterium spp.)*、屈桡杆菌属(*Flexibacter spp.)*；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]。

2、临床症状：病鱼行动缓慢，反应迟钝，呼吸困难，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 5.4）。

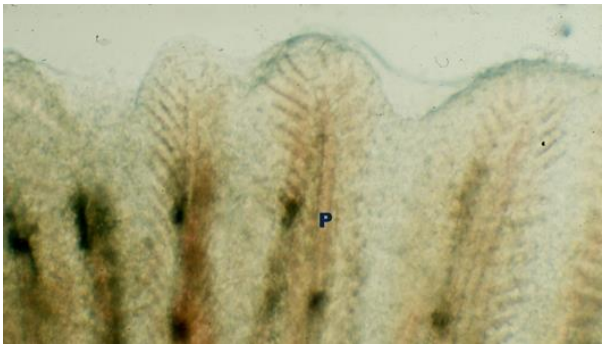

图 5.4 滑动细菌感染鱼的病征及病理图。左侧，尾部皮肤褪色。右侧，细菌性鳃病（BGD）的病鱼鳃湿片，可见明显的上皮组织增生，上皮组织将次级鳃丝（P）逐渐融合。（引自 http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php）

3、显微观察与诊断：显微镜下压片观察鳃上肿胀，粘液增多，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。分离细菌 PCR 确诊。

4、防治：防治鱼过度拥挤，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。

五、鱼鳔炎(aerocystitis)

1、病原：细菌和真菌感染都时有报道，因此不能确定其具体的发病原因[7, 8]。

2、临床症状：行动缓慢，鱼背鳍和腹鳍基部有红色出血点。病鱼多见于无法维持

自身平衡，侧躺游动或者腹部朝上游动（图 5.5）。

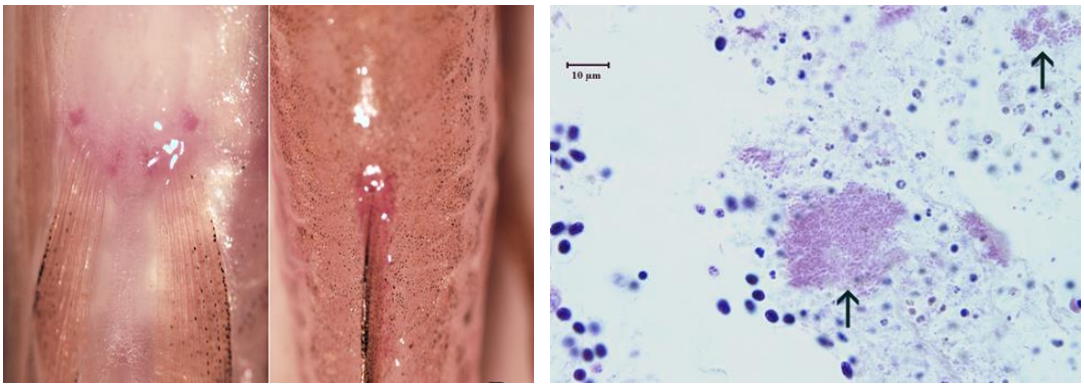

图 5.5 鱼鳔细菌性感染的病理图。左侧鱼鳔感染细菌后腹鳍和背鳍基部出现红斑；右侧，患有鱼鳔炎的病鱼的鱼鳔切片革兰氏染色，箭头处可见大量革兰氏阴性菌（引自 http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php）

3、显微观察与诊断：鱼鳔出现大范围损伤和严重慢性炎症。鱼腹鳍有红色斑点，组织切片可见明显坏死，革兰氏染色可见大量细菌群落[6]（图 5.5）。

4、防治：由于目前鱼鳔炎的病菌及致病机理尚未清楚，所以还无好的治疗方法。遇到病鱼及时隔离。养殖密度过大往往会导致鱼鳔炎发生。

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（*Microsporidiun*）属于微孢子门，特定种属名：*Paeudoloma neurophilia*，孢子呈梨形或者卵圆形，孢子小，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[9]。

2、临床症状：病鱼瘦弱，无光泽，有时脊柱弯曲。而一些外表正常的鱼也可能存在微孢子虫的潜伏性感染[10]（图 5.6）。

3、显微观察与诊断：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[11]。

4、防治：①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 uw.s/cm^2），因此需要定期检

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]；②一旦发现不明原因导致的体型瘦弱的鱼要及时清除；③严格管理好品系斑马鱼，防止微孢子虫交叉污染。

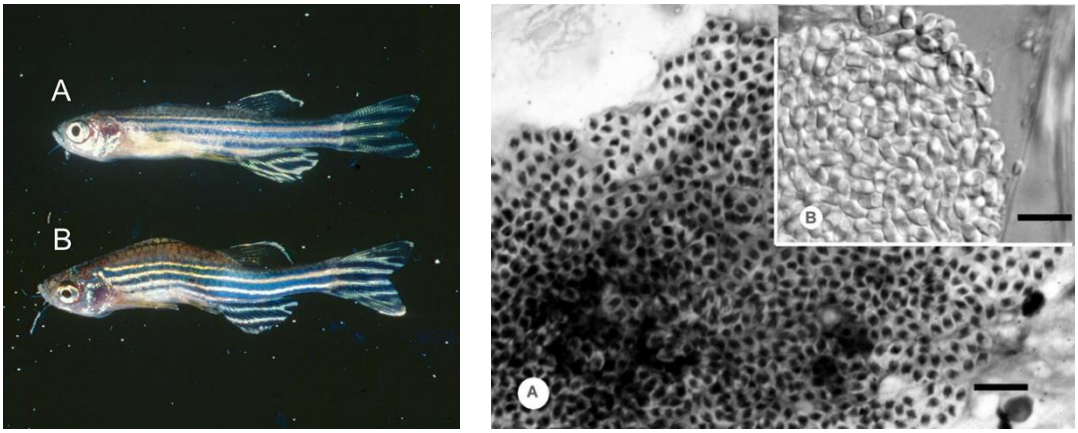

图 5.6 噬神经微孢子虫感染斑马鱼的病征及病理图。左侧，A 鱼：微孢子虫感染导致体型瘦弱；B 鱼：微孢子虫感染导致脊柱侧弯；右侧，A：头部组织的微孢子虫吉姆萨染色；B：微孢子虫湿片的电子超微结构。（引自 http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php）

二、小瓜虫感染

1、病原：多子小瓜虫（*Ichthypothirius multifiliis*），属纤毛虫纲、膜口目，凹口科[12]。

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。

3、显微观察与诊断：湿片见纤毛虫（多子小瓜虫），确诊见到有一个明显马蹄形大核的的卵圆形虫体（图 5.7）。

4、防治：发病鱼体可以采用一定浓度的次氯酸钠浸泡或者适当提高水体温度；同时养殖过程中需要避免与其他鱼类混养，避免水温温差过大。

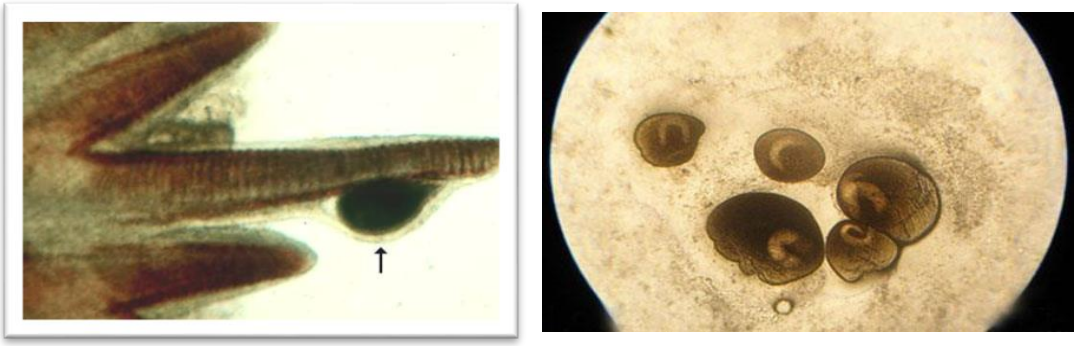

图 5.7 小瓜虫感染病鱼病征图。左侧，病鱼的鳃上可见小瓜虫滋养体；右侧，小瓜虫显微镜下结构图：刮取皮肤粘液或者鳃上虫体，于显微镜下可见有一个明显马蹄形大核的的卵圆形虫体。（引自 http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php）

三、毛细线虫感染

1、病原：*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 5.8）。此外，毛细线虫还可能会引发斑马鱼长瘤[13]。

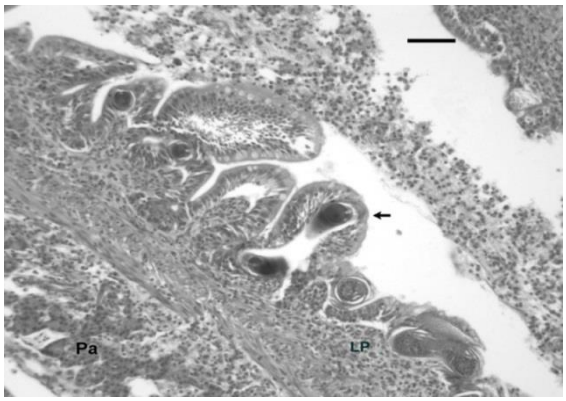

图 5.8 毛细线虫病鱼的病理图。毛细线虫感染鱼体组织的切片观察，切片中可见毛细线虫（箭头）。（引自 http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php）

3、显微观察与诊断：肠道湿片显示充满特殊虫卵，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：①对该病的治疗通常采用伊佛霉素和左旋咪唑，目前这两种药物尚未在斑马鱼身上试用。②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]。

第三节 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，卵巢成实心瘤状物。严重者甚至从内腔到体表出现出溃疡[6]（图 5.9）。

2、显微观察与诊断：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。

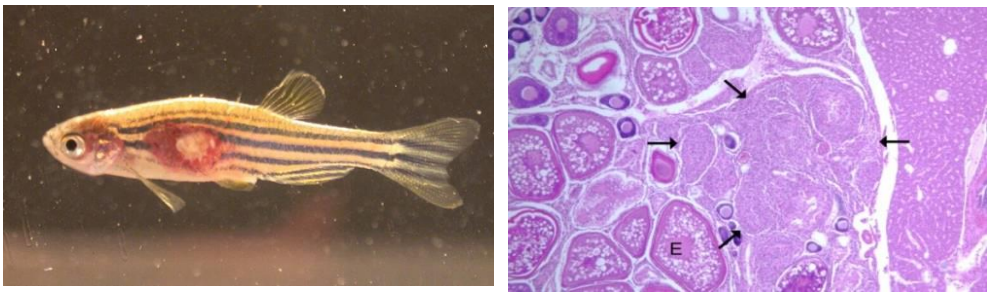

图 5.9 斑马鱼卵巢相关炎症的病征与病理图。左侧，斑马鱼卵巢炎，病鱼卵巢形成相关炎症向外溃烂的白色溃疡；右侧，卵巢炎斑马鱼的组织切片， E 为卵，箭头所指为大量炎性细胞。（引自 http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php）

二、精原细胞瘤

1、临床和显微观察诊断：雄鱼腹部膨大，精巢所在位置明显增大，约占体腔的二分之一。HE 染色确诊[6]（图 5.10）。病鱼无法正常传代。

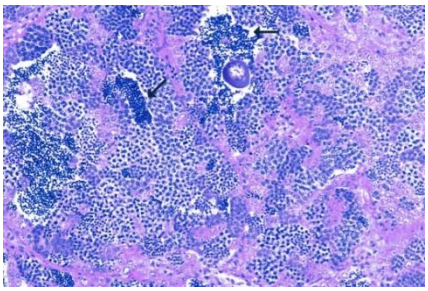

图 5.10 斑马鱼精原细胞瘤病理图。（引自 http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php）

三、甲状腺肿大

1、病原：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、临床和显微观察诊断：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 5.11）。

图 5.11 斑马鱼甲状腺肿大外观图

四、纺锤细胞瘤

临床和显微观察诊断：斑马鱼眼睛后侧长出瘤，导致斑马鱼眼睛异常凸起；或者斑马鱼身体某侧长瘤，而形成异常凸起。该病症的确诊需要配合切片 HE 染色，因其极易与毛细血管瘤引起的眼球突出混淆[6]（图 5.12）。

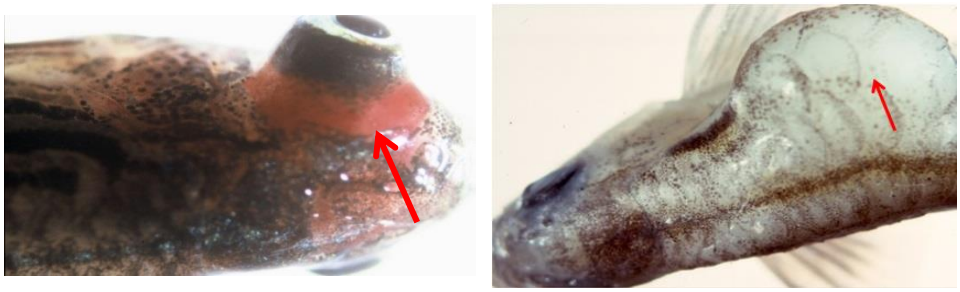

图 5.12 斑马鱼纺锤细胞瘤外观图。左侧为纺锤细胞瘤引起的眼球突出，右侧为斑马鱼侧面白色纺锤细胞瘤的凸起。（引自 http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php）

五、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、显微观察与诊断：组织切片可见心室扩张，充满液体（图 5.13）。

3、防治：发病原因待定，尚无治疗方法。

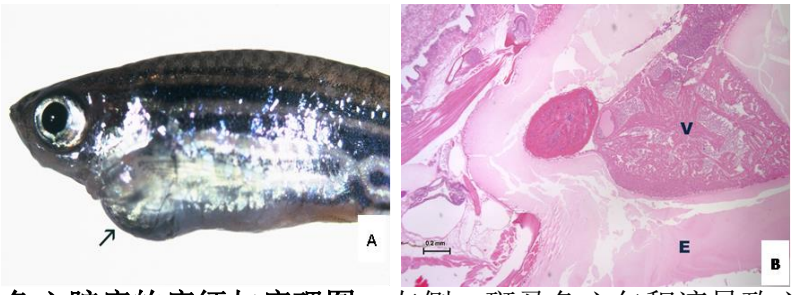

图 5.13 斑马鱼心脏病的病征与病理图。左侧，斑马鱼心包积液导致心脏外凸；右侧，心脏病斑马鱼组织切片。由图可见，心包腔囊肿，围心腔内有大量嗜酸性液体(E)，V 区为心室（引自 http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php）

六、气泡病

1、病因：水中某种气体（一般是 O2 或者 N2）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、临床症状：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 5.14）。

3、诊断：解剖及用显微镜检查，可见鳃、鳍及血管内有大量气泡，引起栓塞而死。

4、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；也可以实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溶解气体在饱和度以下的新鲜水，同时排出过饱和的水。

图 5.14 气泡病斑马鱼病征图。左侧，眼睛上方和鳃部出现气泡。右侧，气泡病致死的斑马鱼，鱼鳍上出现肉眼可见气泡（引自 http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php）

七、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。

临床症状：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[14]。

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很高。

临床症状：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]。

显微观察与诊断：压片可见鳃颜色变深红、坏死。

防治：①及时检测水体中氯离子浓度；②循环系统中及时更换清洗活性炭可以有效去除氯离子；③及时通入足够的空气。

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。

诊断：目前只有通过测量水体中的氨氮含量来确定。

防治：①加快水的流速；②增大换水量；③氨氮含量超标往往发生在新的循环系统里面，所以需要加入一定的硝化细菌来建立新系统内细菌的内稳态。

第四节 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自己的斑马鱼鱼房。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”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、**各斑马鱼鱼房都应建立在位置独立于主鱼房的外部隔离鱼房或者不同于主养殖系统的隔离鱼架**。所有从外面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：**各实验室应该严格做好引进鱼管理工作，对于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隔离，体表消毒及体外受精等操作，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保持引进鱼终身不可进入主养殖系统，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 5.15）。

3、**隔离鱼房的养殖循环系统或者单独的隔离鱼架应为独立循环系统，不应与主养殖循环系统水混用**[5]。

4、**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严禁进入主鱼房使用**[5]。

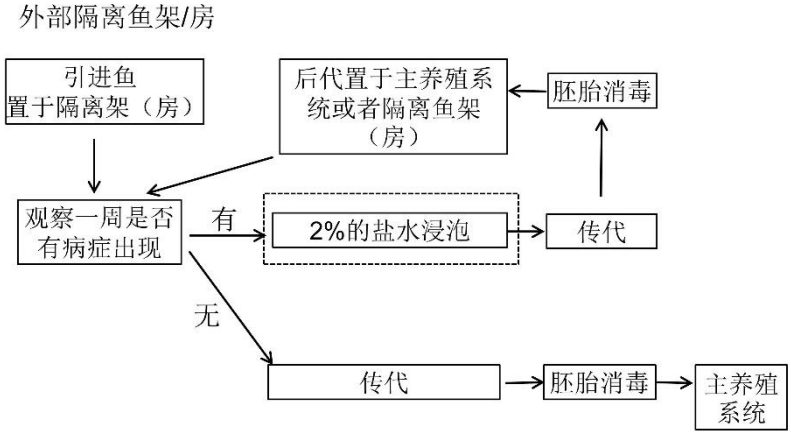

图5.15　外部鱼房隔离措施流程图

二、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，固定时间内（每月/每三月/每半年）通过对哨兵岗斑马鱼的健康状况进行监测以评估整个鱼房斑马鱼健康状况（图 5.16）。每个系统的斑马鱼哨兵岗鱼应根据系统过滤后养殖水（post-）和系统未过滤养殖水(pre-)的不同而被分别放置于循环养殖系统的不同位置，命名为系统水哨兵鱼（post-sentinel fish）和尾水哨兵鱼（pre-sentinel fish）。哨兵缸中放置 4-12 个月大的野生型外观正常的斑马鱼，固定时间内随机捞取 5-10 尾鱼，用于细菌、寄生虫等病原的检测。注：哨兵缸内斑马鱼应定期补充[5]。

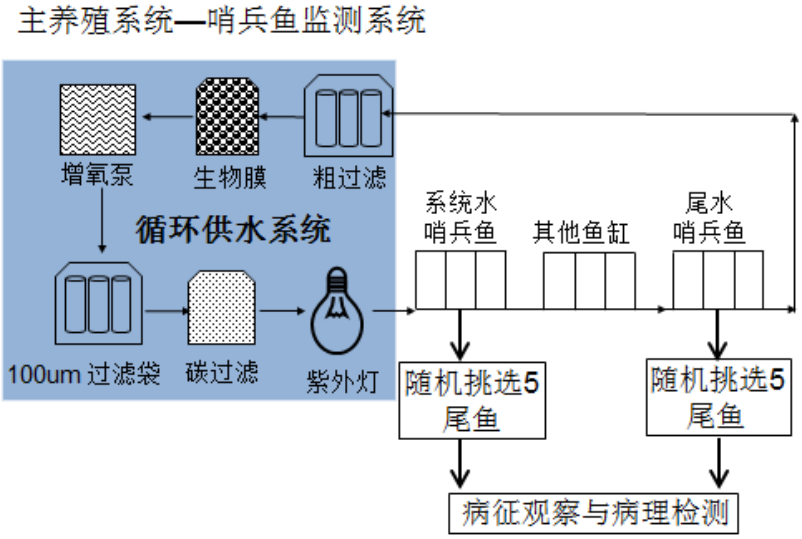

图 5.16 哨兵岗鱼监测系统布局图

2、其他缸内斑马鱼监测

a、定期从每个系统非哨兵岗鱼缸中随机捞取 5 尾鱼，用于细菌、寄生虫等病原的检测。

b、选取具有典型病症的斑马鱼进行细菌、寄生虫等病原的检测。

三、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[15]，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 5.17）。注：整个浸泡消毒及清洗过程，需要不断翻动胚胎，使得胚胎各面充分接触溶液。**

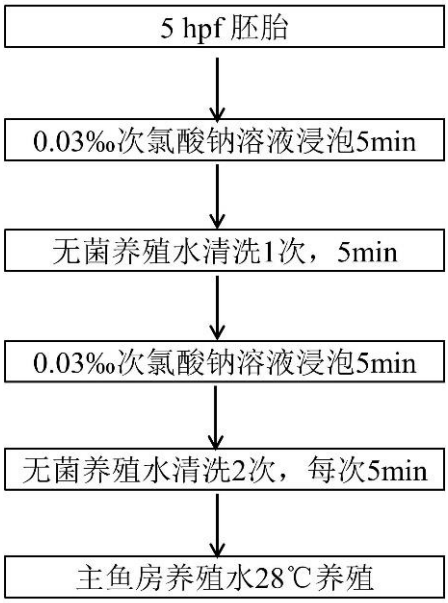

图 5.17 斑马鱼胚胎消毒流程图

四、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，尽量使用测交方法进行传代，避免自交传代，以免后代出现不良性状或者生物多样性降低。**建议：有条件的实验室可以将用于不同品系传代的

野生鱼斑马鱼分开饲养，以免不同病原在品系之间交叉传播[16]。

3、**针对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。

五、鱼房内相关设备维护及日常卫生管理

1、养殖设备维护方面操作[5]：（★★★）

a、**建立每日巡视制度**：巡视鱼房内包括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、空调等正常顺利运行；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。

b、**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）；**定期按时更换清洗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 5.1）；每年安排设备工程师定期检修循环养殖设备。

表 5.1　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

2、日常卫生管理方面操作[5]：（★★★）

a、建议执行“一缸一捞”政策，且所有鱼捞使用一次后必须 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。

b、所有配种缸，鱼缸等使用过一次后须清水洗净，放于 80℃烘箱烘干 4h，备用。

c、所有鱼缸，鱼缸挡板、盖板都会定期清洗烘干备用。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，具体视情况而定。

d、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。

e、安排每日巡视人员须及时捞出鱼房内的死鱼，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。

f、所有进入鱼房的工作人员都必须更换拖鞋或者鞋套入内；工作人员进行相关操作时也必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。

g、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。

六、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，及时将其捞出隔离在单独的小缸里**（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（清洗消毒流程见五），同时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（增大养殖循环系统中含盐量）的方法对鱼体表面进行消毒（仅限于大批量病鱼出现时使用，否则会出现斑马鱼的盐耐受）。

2、病鱼将会被送往实验室记录相关病征，并进行病原检测：a、体表粘液、鳃部组织将被取出检查是否有寄生虫；b、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；c、肾脏部位检测是否有分支杆菌的感染；d、脑部组织将被检测是否有微孢子虫的感染；e、肠道组织切片观察毛细线虫及虫卵。

3、在排除抗生素对实验结果造成干扰的前提下，可以加入一定的抗生素进行治疗。例如，寄生虫感染可选取敌百虫，细菌性感染可采用聚维酮碘（建议使用浓度 12.5~50ppm），土霉素（建议使用浓度 0.3g/L）等等（特别提醒：为防止抗生素滥用现象出现，治疗均需在小缸内进行）。

4、**因恶劣的水质会导致鱼体免疫力低下，病原入侵几率增大，所以我们需要密切关注水质和循环设备运行情况，例如水体 pH，温度，氨氮含量指标是否正常，紫外灯照度是否工作，滤网及活性炭是否及时更换清洗等等。**

5、加入硝化细菌，建立适合鱼生存的生物菌落环境，也可预防和控制鱼病。

注：★代表重要程度，★越多表示越重要

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. Miyazakai, T., S.S. Kubota, and T. Miyashita, *A Histopathological study of Pseudomonas fluorescens infection in tilapia.* Fish Pathol, 1984. **19**: p. 161-166.
8. Bowater, R.O., et al., *Deuteromycotic fungi infecting barramundi cod, Cromileptes altivelis (Valenciennes), from Australia.* J. Fish Dis, 2003. **26**: p. 681-686.
9. Sanders J. L., et al., *Expansion of the known host range of the microsporidium, Pseudoloma neurophilia* Zebrafish, 2016. **13**: p. S102-S106.
10. 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.
11. 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.
12. Noga, E., *Fish disease: diagnosis and treatment*. 1995, Mosby Electronic Publishing: St. Louis.
13. 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.
14. 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.
15. Westerfield, M., *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio), 5rd edition.* 2007: University of Oregon Press. 385 pp.
16. 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.