



斑马鱼的质量标准化

何嘉玲, 刘静, 王天奇, 暴国, 张长勇, 孙希贞, 孙德明[#]

(国家卫生计生委科学技术研究所, 北京 100081)

【摘要】 斑马鱼在人类发育学研究、疾病动物模型以及生命科学多领域中扮演着越来越重要的角色。作为新兴的实验动物资源, 标准化已经成为斑马鱼使用中亟待解决的技术瓶颈和研究发展的必然趋势。本文综述了斑马鱼的研究历史, 生物学特性以及质量标准化的研究现状, 并对斑马鱼作为实验动物在标准化研究过程中面临的主要问题做了探讨, 以期对斑马鱼实验动物资源标准化研究提供有益的参考。

【关键词】 斑马鱼; 标准化; 质量控制

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 06-0099-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.06.018

Research of zebrafish quality standardization

HE Jia-ling, LIU Jing, WANG Tian-qi, BAO Guo, ZHANG Chang-yong, SUN Xi-zhen, SUN De-ming

(National Research Institute for Family Planning, Beijing 100081, China)

【Abstract】 At present, zebrafish has played an increasingly important role in models for human development and diseases and several areas of life sciences. As a newly laboratory animal resource, standardization research has become the technical bottleneck to be solved and an inevitable trend. In this review, we summarized the research history and characteristics of zebrafish and the status of quality standardization. We also discussed the main problem facing by the standardization research of zebrafish as a newly laboratory animal. We hope that the data can provide useful reference for the development of zebrafish quality standardization research.

【Key words】 Zebra fish; Standardization; Quality control

斑马鱼 (*Danio rerio*) 是目前生命科学领域应用最广的实验用鱼, 然而作为新兴的实验动物资源, 尚缺乏对其质量标准化进行系统和深入的研究。本文将从斑马鱼的研究历史及特性出发, 对质量标准化的进程、现状以及存在的问题展开综述, 以期对斑马鱼实验动物资源标准化的建立提供有益的参考。

1 斑马鱼的研究历史与特性

斑马鱼又名蓝条鱼、花条鱼、印度鱼, 原产自印度东部、巴基斯坦、缅甸、孟加拉国等地, 属于辐鳍亚纲 (*Actinopterygii*) 鲤科 (*Cyprinidae*) 短担尼鱼属

(*Danio*)。因身上具有像斑马一样的条纹而得名。

20世纪70年代, 著名遗传学家 George Streisinger 建立了斑马鱼的纯系^[1-2], 并在《Nature》上发表了关于斑马鱼人工雌核发育的研究论文^[1], 从此人们开始关注这一新兴的实验动物^[3-9]。为取得资源和信息的共享, 在 Monte Westerfield 领导下, 俄勒冈大学先后建成了斑马鱼信息网络—Zebrafish Information Network, ZFIN (1998)^[10]和斑马鱼国际资源中心—Zebrafish International Resource Center, ZIRC (2004), 随后世界各地也分别建立了6个斑马鱼资源中心。

【基金项目】 中央级公益性科研院所基本科研业务专项资金项目 (编号: 2012GJSSJKC02) 资助; 国家十二五科技支撑计划 (2012BA131B06)。

【作者简介】 何嘉玲 (1980 -), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 实验动物学。Email: missu329@aliyun.com

【通讯作者】 孙德明 (1958 -), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 实验动物学。联系电话: 010-62179115; Email: sundemingnet@163.com

1998 年,清华大学建立了国内第一个以斑马鱼为模式动物的发育生物学实验室,开启了斑马鱼在我国的研究。目前我国已有 250 个以上的实验室利用斑马鱼开展多学科领域的研究。2012 年 10 月,在科技部“发育与生殖重大科学研究计划”项目的资助下,我国的“国家斑马鱼资源中心, China Zebrafish Resource Center, CZRC”在中国科学院水生生物研究所正式挂牌成立,截止 2013 年 2 月,中心已通过各种渠道引进和自建 60 多个斑马鱼转基因和突变品系^[11]。

斑马鱼之所以具备实验动物化的潜质并得到广泛应用,是由其独特的优势决定的,(1) 斑马鱼成鱼个体小,易于大规模饲养;(2) 生长快、性成熟期短、产卵周期短、产卵量大,是经济、方便的研究材料;(3) 胚胎体外发育,早期胚胎完全透明,易于观察和操作;(4) 在斑马鱼上已经建立较完善的胚胎和遗传学操作技术;(5) 基因组测序完成,与爪蟾、果蝇等低等动物相比,斑马鱼的基因图谱基本清晰且与人类具有 87% 的相似度;(6) 斑马鱼的心血管、血液、消化道、肝脏、肾脏以及视觉系统与人类有许多共同特点,为开展比较医学研究和建立人类疾病动物模型提供重要基础;(7) 品系资源丰富,对开展各领域科学研究极为有利。

2 斑马鱼质量标准化的研究

实验动物标准化和动物实验的规范化研究是实验动物学科及其行业的重要特点,标准化也是实验动物区别于其他类动物的本质特征^[12]。斑马鱼的质量标准化体系主要包括对斑马鱼微生物学与寄生虫学、遗传学质量、营养以及环境条件等方面的质量控制标准和技术规范。

2.1 微生物与寄生虫控制

疾病的控制和健康状态的维持是实验用鱼标准化管理的一个首要环节。斑马鱼易感的病毒尚未见报道,在人工饲养条件下斑马鱼的质量控制的对象主要包括细菌和寄生虫的控制^[13]。目前发现的细菌种类主要包括:分支杆菌 (*Mycobacterium*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 和嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)。寄生虫主要包括:微孢子虫 (*Pseudodoloma neurophilia*), 卵圆鞭毛虫 (*Piscinoodinium pillulare*) 和多子小瓜虫 (*Ichthyophthirius multifiliis*) 等^[14]。微生物与寄生虫的感染会导致斑马鱼的发育迟缓,繁殖力下降,甚至死亡。然而在许多无临床

症状的隐性感染中^[15],科学家通过高通量测序技术发现微生物感染往往引起斑马鱼转录组水平的显著变化,进而影响实验准确性、规律性、重复性。类似的研究表明感染还会引起斑马鱼生理生化指标,免疫力指标,组织学和遗传学的改变,甚至在实验刺激下使感染显性化,最终导致实验鱼得病、死亡,迫使实验终止^[16-18]。

鉴于病原体对斑马鱼的危害,各国开始致力于无菌斑马鱼和无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 斑马鱼的研究。2004 年,美国华盛顿大学医学院的研究人员首次培育出无菌斑马鱼,相关研究成果发表在《美国科学院院报》网络版上^[19]。2014 年,中国农业科学院饲料研究所也公布了专利—“无菌斑马鱼的生产方法”(专利号:2013100962469)^[20]。2011 年, Kent 等^[21]成功培育了无微孢子虫的 SPF 斑马鱼,2010 年 10 月,第五届人类疾病的水生动物模型会议组织了题为“实验动物健康与疾病管理 (Animal Health and Disease Management in Research Animals)”的研讨会,专门讨论了水生实验动物,尤其是斑马鱼的病原控制策略^[22]。说明斑马鱼等实验鱼类的病原控制问题已经引起了国际科研工作者的广泛关注。

2.2 遗传质量控制

斑马鱼的遗传质量控制和遗传检测,是标准化的重要内容之一。

国内外学者已在逐步开展斑马鱼遗传学标准化研究,并对一些有应用价值的小型鱼类进行了纯化培育工作,如斑马鱼、虹鳉 (*Poecilia reticulatus*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、新月鱼 (*Xiphophorus maculatus*)、剑尾鱼 (*Xiphophorus helleri*) 都有近交超过 20 代的品系,这些品系已经有较高的遗传均一性。目前,斑马鱼自然野生品系有约 20 个。研究中常用的斑马鱼野生型品系纯系主要为 Tuebingen 品系 (简称 TU, 起源于 Streisinger Lab)、AB 品系、WIK 品系 (起源于 Haffter Lab), 其中斑马鱼基因组计划所用品系为 Tuebingen 品系。经过各国实验室 30 多年的研究应用和系统发展,现保存有 3000 多个突变品系和 100 多个转基因品系。

2.3 饲养管理

鱼类终身生活在水中并在水中摄食和排泄,有效的标准化水环境动态管理和饲料的营养学控制是做好斑马鱼饲养管理的关键。加拿大动物保护协会在《用于研究、技术和实验的鱼类的使用和管理指

南》中对实验用鱼水环境做了较为全面的规定^[23]。我国的王天奇^[24]等也对实验用鱼类水的供给、水质和水环境的物理指标进行了分析,为斑马鱼水环境的标准化研究提供了必要的资料。

由于目前对斑马鱼生长各阶段的营养需求缺乏清晰准确的认识,斑马鱼的配合饲料研发进展缓慢^[25]。2009 年,祝梅香等^[26]综述了多种斑马鱼饲料的优劣,发现活性饵料在提高斑马鱼的生长率和存活率方面明显优于配合饲料。然而活性饵料携带的病原体也对斑马鱼的标准化养殖提出了挑战。2012 年,杭州环特科技有限公司的张勇等研发了“一种斑马鱼鱼苗开口饲料”(专利号:201010514931)^[27]。专利提供了一种斑马鱼鱼苗开口饲料的配方,为斑马鱼幼鱼养殖的饲料选择提供了重要的技术参考。

2.4 实验用鱼北京市地方标准

2007 年,国家人口计生委科学技术研究所联合中国食品药品检定研究院、中国科学院水生生物研究所和北京大学等单位,开展了实验用鱼地方标准的系统研究。2013 年,第一部实验用鱼质量控制标准(DB11/T 1053-2013)由北京市质量技术监督局正式颁布,并于 2014 年 4 月 1 日开始实施。标准的内容包括:“实验用鱼——微生物学等级及监测^[15,28];实验用鱼——寄生虫学等级及监测;实验用鱼——遗传质量控制^[29];实验用鱼——配合饲料技术要求;实验用鱼——环境条件;实验用鱼——病理诊断规范”六个部分。该标准是国内外首部实验用鱼质量控制的技术标准。

3 问题及建议

我国从“九五”计划开始就已经将鱼类实验动物的开发与应用研究作为重点资助项目列入国家实验动物科技发展计划。将近二十年过去了,鱼类作为实验动物资源其标准化还有一系列问题亟待解决。

3.1 存在问题

3.1.1 斑马鱼的生物净化问题

斑马鱼属于热带鱼类,适于斑马鱼生长繁育的水环境,也适于病原微生物和寄生虫的迅速繁殖。虽然一些斑马鱼的品系经过纯化培养已经有较高的遗传均一性,但在微生物、寄生虫及常见疾病控制、生产繁育、应用、水环境条件等方面与真正法定意义的实验动物还有本质的差距。目前,斑马鱼的病原

学诊断主要参考其他实验动物的病原监测操作规程,没有统一的标准。缺乏标准化的快速准确的病原检测方法,标准化的评价体系,疾病防控与诊治的技术规范。

3.1.2 饲养管理问题

斑马鱼养殖的外部环境标准主要参照国标《实验动物 环境及设施 GB14925-2010》对于哺乳类实验动物普通环境级别的要求制定。但因斑马鱼的生活环境为水体,且生活环境所需的昼夜明暗交替时间与哺乳动物不同,故无法完全参照哺乳动物的标准。目前国内尚缺乏标准化的实验用斑马鱼生产机构,斑马鱼的养殖普遍存在来源混杂,遗传背景不清;微生物和寄生虫以及相关疾病未加控制;养殖环境不规范;饲料营养水平不均衡等问题。

3.1.3 标准的推广问题

日前,实验用鱼北京市地方标准已经颁布,但与之配套的标准追踪体系尚未健全,在很大程度上影响了标准的推广和示范。

3.2 为进一步推动我国实验用斑马鱼质量标准化建设,建议开展以下工作:

3.2.1 加强斑马鱼病原体的控制

加强日常健康状况的监测;建立鱼病原体检测和评价体系,对实验用斑马鱼生产和使用涉及的相关产品包括哨兵鱼、水环境、水族箱及主要器具的微生物、寄生虫感染水平进行检测评估;对国内外及科研机构间流通的斑马鱼实施严格的检疫;建立病原体感染后快速有效处理的技术规范;积极提升实验室的自检能力,利用斑马鱼网络平台及时报道新发现的隐性感染,丰富斑马鱼生物净化和健康研究的资料;研究制定实验用斑马鱼生产、饲养、运输、管理和使用的技术规范体系,并向医药研发和相关高校机构以及企业推广,形成产学研结合升级模式。

3.2.2 建立标准化斑马鱼繁育示范基地

在生物净化基础上,建立国家级能满足实验需求的实验用斑马鱼标准化种子繁育示范基地。在此基础上建立实验用鱼类质量的国家标准体系和饲养管理技术规范。标准的使用过程中,增加标准的技术培训,同时加大力度培养从事实验用斑马鱼开发和标准化的技术团队,推动标准化斑马鱼产业化基地的形成。

3.2.3 建立实验用斑马鱼质量追踪体系

以基地为中心,加大检测技术和质量控制方面研究的基础性投入和应用性投入,建立急需的标准

体系和质量追踪评价体系;建立健全监测机构和检测的 SOP;加大对斑马鱼标准化微生物与寄生虫检测技术和试剂研发,形成标准化的检测方法;开展快速筛查检测新方法和新技术的研发,为我国斑马鱼现场执法和质量管理提供必要的技术支持等。同时全面收集标准在使用过程中发现的问题,为标准的修订和完善做技术准备。

参 考 文 献

- [1] Streisinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. *Nature*. 1981, 291(5813): 293–296.
- [2] Walker C, Streisinger G. Induction of mutations by gamma-rays in pregonial germ cells of zebrafish embryos [J]. *Genetics*. 1983, 103(1): 125–136.
- [3] Mullins MC, Hammerschmidt M, Haffter P, et al. Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate [J]. *Curr Biol*. 1994, 4(3): 189–202.
- [4] Driever W, Stemple D, Schier A, et al. Zebrafish: genetic tools for studying vertebrate development [J]. *Trends Genet*. 1994, 10(5): 152–159.
- [5] Davidson AJ, Zon LI. The ‘definitive’ (and ‘primitive’) guide to zebrafish hematopoiesis [J]. *Oncogene*. 2004, 23(43): 7233–7246.
- [6] Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish [J]. *Nat Rev Drug Discov*. 2005, 4(1): 35–44.
- [7] Peterson RT, Fishman MC. Discovery and use of small molecules for probing biological processes in zebrafish [J]. *Methods Cell Biol*. 2004, 76:569–591.
- [8] Poss KD, Keating MT, Nechiporuk A, et al. Tales of regeneration in zebrafish [J]. *Dev Dyn*. 2003, 226(2): 202–210.
- [9] Renshaw SA, Trede NS. A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity [J]. *Dis Model Mech*. 2012, 5(1): 38–47.
- [10] Sprague J, Doerry E, Douglas S, et al. The Zebrafish Information Network (ZFIN): a resource for genetic, genomic and developmental research [J]. *Nucleic Acids Res*. 2001, 29(1): 87–90.
- [11] 孙永华. 国家斑马鱼资源中心简介 [J]. *遗传*. 2013, 35(4): 549–550.
- [12] 武筠, 陈晓霞. 关于加强实验动物管委会职责的建议 [J]. *实验动物科学与管理*. 2002, 19(3): 25–26.
- [13] Kent ML, J M Spitsbergen JM. Health Services Zebrafish Disease Manual [M]. ZIRC. 2002, 1–51.
- [14] Kent ML, Harper C, Wolf JC, et al. Documented and potential research impacts of subclinical diseases in zebrafish [J]. *ILAR J*, 2012, 53(2): 126–134.
- [15] 吴思鼻, 王箐, 高昌, 等. 实验用斑马鱼主要疾病及其实验动物标准化研究过程面临的主要问题 [J]. *实验动物科学*. 2009, 26(4): 51–56.
- [16] Hegedus Z, Zakrzewska A, Agoston VC, et al. Deep sequencing of the zebrafish transcriptome response to mycobacterium infection [J]. *Mol Immunol*. 2009, 46(15): 2918–2930.
- [17] van der Sar AM, Spaink HP, Zakrzewska A, et al. Specificity of the zebrafish host transcriptome response to acute and chronic mycobacterial infection and the role of innate and adaptive immune components [J]. *Mol Immunol*. 2009, 46(11–12): 2317–2332.
- [18] Stockhammer OW, Zakrzewska A, Hegedus Z, et al. Transcriptome profiling and functional analyses of the zebrafish embryonic innate immune response to Salmonella infection [J]. *J Immunol*. 2009, 182(9): 5641–5653.
- [19] 美国科学家首次培育出无菌斑马鱼 [J]. *畜牧兽医科技信息*. 2004, 5: 47.
- [20] 周志刚, 覃初斌, 徐莉, 等. 无菌斑马鱼的生产方法 [P]. 中国专利: 201310096246.9, 2013–6–12
- [21] Kent M L, Buchner C, Watral V G, et al. Development and maintenance of a specific pathogen-free (SPF) zebrafish research facility for *Pseudoloma neurophilia* [J]. *Dis Aquat Org*, 2011, 95(1): 73–79.
- [22] Lawrence C, Ennis DG, Harper C, et al. The challenges of implementing pathogen control strategies for fishes used in biomedical research [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2012, 155(1): 160–166.
- [23] Griffin G, Gauthier C, et al. Guidelines development and scientific uncertainty: use of previous case studies to promote efficient production of guidelines on the care and use of fish in research, teaching and testing [J]. *Anim Welfare*. 2004, 13: S181–S186.
- [24] 王天奇, 孙荣泽, 孙德明, 等. 实验用鱼类的水环境及其标准化 [J]. *中国比较医学杂志*. 2009, 19(12): 44–51.
- [25] Watts SA, Powell M, D’Abramo LR, et al. Fundamental approaches to the study of zebrafish nutrition [J]. *ILAR J*, 2012, 53(2): 144–60.
- [26] 祝梅香, 王天奇, 张长勇, 等. 实验用斑马鱼剑尾鱼营养需求及饲料现状分析 [J]. *中国比较医学杂志*. 2009, 19(12): 61–65.
- [27] 张勇, 彭恩泽. 一种斑马鱼鱼苗开口饲料 [P]. 中国专利: 201010514931.5, 2011–02–09
- [28] 孙德明, 穆苑, 高昌, 等. 模型动物斑马鱼及其特定病原净化 [J]. *中国比较医学杂志*. 2009, 19(12): 52–60.
- [29] 孙德明, 王天奇, 朱晓红, 等. 实验用鱼遗传质量控制及标准化 [J]. *遗传*. 2012, 34(9): 1202–1207.

[收稿日期] 2014-10-11