

知識天地

臺灣斑馬魚中心——中研院分支介紹

黃聲蘋副研究員(細胞與個體生物學研究所)

摘要

斑馬魚為小型淡水魚，近年來成為研究脊椎動物遺傳、發育及相關人類疾病的實驗模式動物，且被利用來進行藥物篩選、毒物測試等研究。有鑑於斑馬魚在這些研究的重要性，在國科會“生物資源整合與建置計畫”的補助下，於本院細胞與個體生物學研究所內成立了臺灣斑馬魚中心的兩個分支之一——中研院分支(TZCAS)。本文將介紹斑馬魚做為實驗動物的優點、臺灣斑馬魚中心——中研院分支的設施、服務項目及相關的斑馬魚研究成果。

一、斑馬魚做為實驗動物的優點

斑馬魚(*Danio rerio*)屬於鯉科小型熱帶魚種，原分佈於孟加拉、印度、巴基斯坦、緬甸、尼泊爾的溪流。體色呈金銀色，覆蓋著從頭部延伸至尾鰭後端的一些藍紫色橫紋。體長約3-4公分，雄魚體修長且背部呈淺橄欖黃色，雌魚體渾圓腹部較膨大。適合生長溫度為23-28°C。

斑馬魚近十幾年來成為研究脊椎動物遺傳、發育及相關人類疾病的實驗模式動物[1]，且被利用來進行藥物篩選、毒物測試等研究，主要具有下列優點：

1. 可利用光周期誘發產卵，斑馬魚進行體外受精，一對雌雄魚交配可產生100-300個卵，卵量豐富。
2. 胚胎透明，容易觀察。胚胎發育時間短，包括有分裂期、囊胚期、原腸期、分節期、pharyngula期、孵化期及仔稚魚期等七階段，受精後5天大的仔稚魚各種內部器官的雛型已建立[2]。
3. 斑馬魚是脊椎動物，具有與人類相似的器官系統如心血管、神經、消化等系統。
4. 斑馬魚性成熟時間短約3個月，可進行誘發突變產生變種魚。
5. 斑馬魚基因組DNA序列已解開，基因轉殖容易、ToI2跳躍子及各種分子生物技術的建立，有利於基因功能的研究。
6. 斑馬魚養殖設備簡單且花費低。

二、臺灣斑馬魚中心——中研院分支的介紹

藉由國科會“生物資源整合與建置計畫”的補助於2010年1月1日於本院細胞與個體生物學研究所成立了臺灣斑馬魚中心的兩個分支之一——中研院分支(TZCAS)。臺灣斑馬魚中心——中研院分支位在細生所地下室，面積為80平方公尺，有4個隔間包括：(1)實驗室——具有複式正立螢光顯微鏡、實體螢光顯微鏡、解剖顯微鏡、氣動及油壓式顯微注射儀、拉針器、可程式溫度控制儀等設備。(2)小魚、中魚及草履蟲飼育室——有1座平開式5層循環水高密度飼育系統魚架，具有120個3公升魚缸供1-3個月大的幼魚養殖用，2架8層不鏽鋼架供小於1月大小魚及草履蟲的飼育。(3)洗滌室、進水過濾系統及豐年蝦孵育室-有大型水槽供清洗魚缸用、2座豐年蝦孵育不鏽鋼架及進水過濾系統。(4)成魚養殖室(圖1)——有1座滴流式5層水產飼育系統，具有60個3公升魚缸供檢疫養殖剛引進的成魚用，有2組4座串聯的兩面5層式循環水高密度飼育系統，具有960個3公升魚缸及循環過濾系統。另外我們製備了2座移動式產卵架進行成魚交配產卵用。

2010年12月我們與位在美國奧勒岡大學的斑馬魚國際資源中心(ZIRC)簽署了“中心之間有限的魚種轉移”協定，讓我們可引進不同品系的斑馬



圖1 臺灣斑馬魚中心——中研院分支的斑馬魚成魚養殖室(A)及高密度養殖魚架過濾系統(B)

魚並供給臺灣的學者使用。到2012年2月臺灣斑馬魚中心——中研院分支有5種野生種包括AS-AB、AB、TL、WIK及SJD等品系，8種基因突變魚包括黑色素突變透明魚(*absolute*)、Nodal訊息傳遞缺陷突變魚(*oep*、*ndr2*、*sox32*)、Notch訊息傳遞缺陷突變魚(*mib*)、Wnt訊息傳遞缺陷突變魚(*wnt5b*)、sphingosine-1-phosphate訊息傳遞缺陷突變魚(*mil*)及*chrna1*肌肉骨骼移動缺陷突變魚，50種基因轉殖魚包括在心臟、血管、血球、神經、中後腦交界、肝、腸道、內分泌腺臟、表皮、脊索、脊椎骨、軟骨、肌肉、腎管、視網膜、三叉神經元等器官組織表現綠色或紅色螢光蛋白品系，亦包括能由熱修克誘導產生不同轉錄因子(*foxi3a*、*foxi3b*、Notch1ICD)，不同旁分泌蛋白(*dkk1*或*Wnt8*)，FGF受體1抑制蛋白等品系及能報導Wnt8活性的Tg(*TOP:GFP*)基因轉殖魚(圖2)。除了供應不同品系斑馬魚給國內學者使用，我們也接受國內學者製備且願意分享的基因轉殖魚或突變魚的寄養，並且提供冷凍精子保存的服務，幫國內學者製備的基因轉殖魚或突變魚保留備份，減輕他們養殖的壓力。我們也提供草履蟲供養殖小於1月大小魚使用，及不同質體可供進行全覆式原位雜合反應用。

除了提供國內學者不同斑馬魚品系、質體及草履蟲外，臺灣斑馬魚

中心——中研院分支每年7月舉辦斑馬魚基礎訓練課程，內容包括不同成長階段斑馬魚的養殖、草履蟲及豐年蝦的培育、人工受精、成魚器官組織解剖、顯微注射、全覆式原位雜合反應、胚胎照相等。同時為促進國內學者在斑馬魚相關研究方面的交流，臺灣斑馬魚中心——中研院分支與衛清分支輪流每年在7月舉辦1次臺灣斑馬魚老師會議及在每年12月舉辦臺灣斑馬魚研討會。臺灣斑馬魚中心——中研院分支的網址為<http://icob.sinica.edu.tw/tzcas/>。在此網頁上除了可下訂單來訂購不同品系的斑馬魚、質體及草履蟲，亦可找到一些與斑馬魚養殖及不同研究相關的實驗流程，斑馬魚發育與遺傳國際會議資訊及與其他國家斑馬魚中心的聯結。

2010年剛成立臺灣斑馬魚中心的兩個分支時，經統計臺灣有41個實驗室主持人使用斑馬魚進行研究，但在

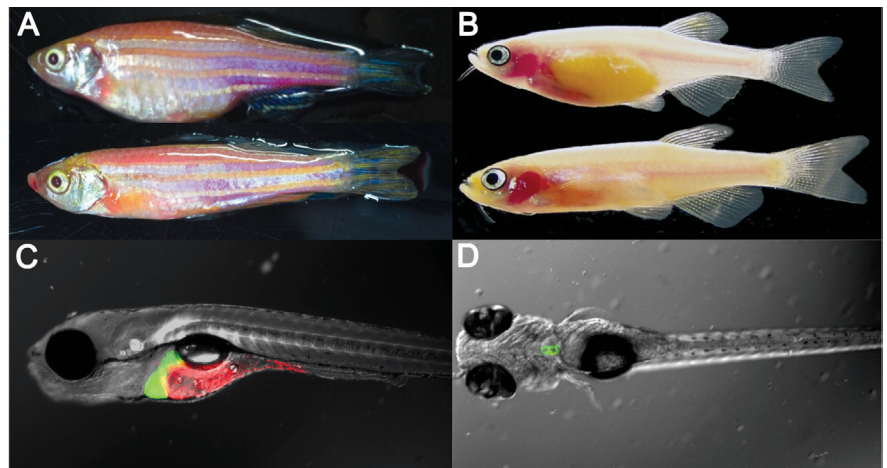


圖2 不同品系斑馬魚成魚及胚胎：(A)一對肌肉表現紅色螢光蛋白的斑馬魚成魚，(B)一對缺乏黑色素的透明斑馬魚成魚，(C)肝臟表現綠色螢光蛋白及腸道表現紅色螢光蛋白基因轉殖魚七天大胚胎，(D)心臟表現綠色螢光蛋白基因轉殖魚五天大胚胎。

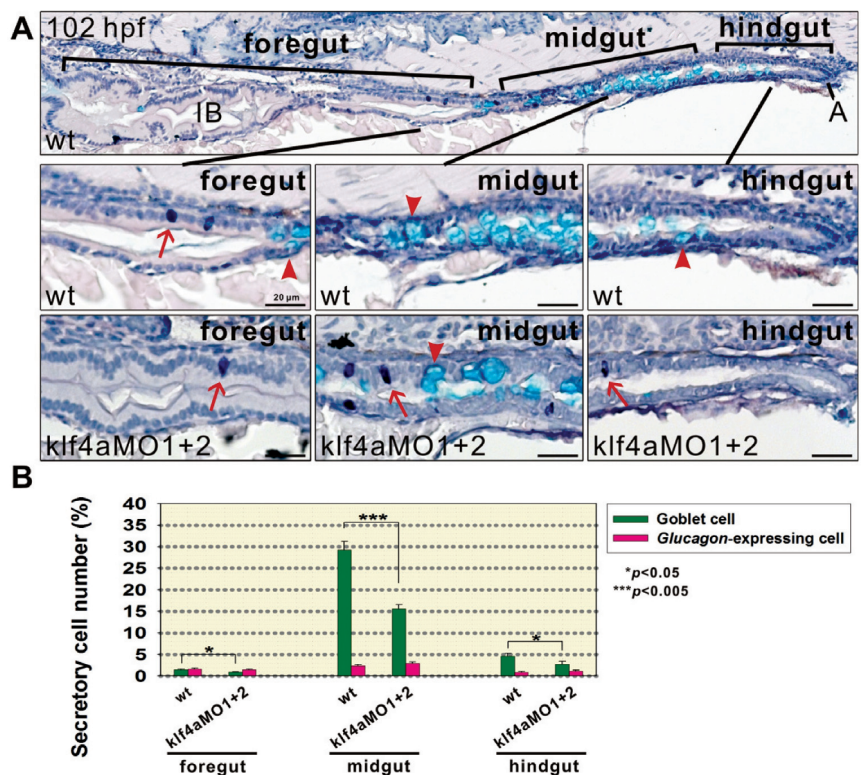


圖3 在反意morpholino寡核苷酸弱化*klf4a*表現的胚胎中，腸道杯狀細胞(goblet cell)的數目在前、中、後腸顯著的減少，但表現*glucagon*的內分泌腸道細胞的數目則不受影響。

2012年時已增加至80個實驗室主持人進行斑馬魚相關研究。由有223位包括老師、博士後研究員及學生參加在本院生醫所舉辦的“2011年百年斑馬魚研討會”及臺灣學者以斑馬魚為實驗動物所發表期刊的數目在2010年有52篇增加到2012年的136篇，更能了解以斑馬魚為實驗動物進行研究的重要性。未來臺灣斑馬魚中心——中研院分支除了繼續提供上述的各種服務項目，並期許在更多經費支持下，能在不久的將來支援以相關人類疾病的基因轉殖魚或突變魚，進行藥物篩選、藥物開發等與轉譯醫學相關的研究工作。

三、相關研究成果

與哺乳類的腸道細胞結構相比，斑馬魚的腸道細胞較簡單，由包括吸收型腸道細胞(enterocyte)、內分泌腸道細胞(enteroendocrine cell)及杯狀細胞(goblet cell)3種分化的腸道細胞所組成的。我們利用斑馬魚這個實驗動物來研究一含鋅手指轉錄蛋白(Krüppel-like factor 4a, Klf4a)在腸道細胞增生與分化所扮演的角色。斑馬魚Klf4a蛋白質是哺乳類KLF4的相似蛋白質。我們的實驗方法之一是將反意morpholino寡核酸，以顯微注射方式引進1細胞受精卵內，來阻止Klf4a蛋白質的形成。而另一實驗方法則是顯微注射更多的 $klf4a$ mRNA進入受精卵內，使胚胎能合成更多的Klf4a蛋白質。我們發現在反意morpholino寡核酸弱化 $klf4a$ 表現的胚胎中，腸道杯狀細胞的數目顯著的減少，吸收型腸道細胞的標識基因 $PepT1$ 的表現降低，但表現 $glucagon$ 的內分泌腸道細胞的數目則不受影響(圖3)。反之在過度形成Klf4a蛋白質的胚胎中，腸道杯狀細胞的數目則明顯的增加。為了解Klf4a在腸道增生所擔任的功能，我們利用BrdU標定、p-HistoneH3免疫染色及電子顯微鏡切片來分析，結果顯示在反意morpholino寡核酸弱化 $klf4a$ 表現的胚胎中，腸道細胞的數目顯著的增加，而在過度形成Klf4a蛋白質的胚胎中，腸道細胞的數目則明顯的減少。這些實驗結果指出斑馬魚Klf4a蛋白質會抑制腸道細胞的增生，亦是腸道杯狀細胞分化及吸收型腸道細胞末端分化所必需的一重要的轉錄蛋白[3]。

參考文獻

- [1] Lieschke GJ, Currie PD (2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 8: 353-367.
- [2] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203: 253-310.
- [3] Li, I-C., Chan, C-T., Lu, Y-F., Wu, Y-T., Chen, Y-C., Li, G-B., Lin, C-Y., Hwang, S-P.L.* (2011). Zebrafish Krüppel-like factor 4a represses intestinal cell proliferation and promotes differentiation of intestinal cell lineages. *PLoS one* 6(6): e20974. doi:10.1371/journal.pone.0020974