

国家斑马鱼资源中心的资源、技术和服务建设

熊凤, 谢训卫, 潘鲁媛, 李阔宇, 柳力月, 张昀, 李玲璐, 孙永华

中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 国家斑马鱼资源中心, 武汉 430072

摘要: 随着我国斑马鱼研究群体的日益壮大, 对各类斑马鱼研究资源和技术的需求日益增加, 国家斑马鱼资源中心(China Zebrafish Resource Center, CZRC, 网址: <http://zfish.cn>)于 2012 年在中国科学院水生生物研究所成立。目前, CZRC 已发展成为国内规模最大的单体斑马鱼养殖系统, 建成包含 1200 多个斑马鱼品系和 10 000 余份冻存精子的斑马鱼资源保藏库, 其中有超过 200 个突变和转基因品系是由 CZRC 自主创制。在此基础上, CZRC 建立了安全规范的斑马鱼养殖和健康平台、高效的基因操作平台和稳定高效的精子冻存平台。CZRC 致力于为国内外从事斑马鱼研究的科研人员提供各类服务, 包括提供斑马鱼品系等资源服务、转基因和基因敲除等技术服务、养殖和健康等咨询服务, 以及技术培训和学术会议服务等。经过 5 年的建设, CZRC 已成为国际学术界公认的全球三大斑马鱼资源库之一。

关键词: 斑马鱼; 国家中心; 资源; 技术; 服务

Development of resources, technologies and services at the China Zebrafish Resource Center

Feng Xiong, Xunwei Xie, Luyuan Pan, Kuoyu Li, Liyue Liu, Yun Zhang, Linglu Li, Yonghua Sun

China Zebrafish Resource Center, State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

Abstract: With the rapid growth of the Chinese zebrafish community, there is an increasing demand for various types of zebrafish-related resources and technologies. The China Zebrafish Resource Center (CZRC, web: <http://zfish.cn>) was established at the Institute of Hydrobiology (IHB), Chinese Academy of Sciences (CAS) in 2012. Till now, CZRC has built the largest zebrafish aquaculture unit in China, organized a resource bank containing more than 1200 zebrafish lines and more than 10 000 frozen sperm samples, among which over 200 mutant and transgenic lines were generated by CZRC. CZRC has established several technical supporting platforms, such as the zebrafish husbandry and health control program of international standard, a high-efficient gene manipulation technology platform, and a stable and efficient sperm

收稿日期: 2018-05-29; 修回日期: 2018-07-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31671501, 39970774, 31672378) 资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31671501, 39970774, 31672378)]

作者简介: 熊凤, 博士, 工程师, 研究方向: 斑马鱼模式动物。E-mail: xiongfeng@ihb.ac.cn

通讯作者: 孙永华, 博士, 研究员, 研究方向: 鱼类发育与生物技术学。E-mail: yhsun@ihb.ac.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.18-151

网络出版时间: 2018/7/26 18:46:07

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180726.1845.001.html>

cryopreservation technology platform. The main task of CZRC is to provide different types of services to zebrafish investigators in China and worldwide, such as resource services (e.g. zebrafish lines), technical services (e.g. gene knockout) and transgenic services, consultancy services (e.g. zebrafish husbandry and health consultation), and conference services [e.g. holding regular technical training courses and biennale Chinese Zebrafish Principal Investigator Meeting (CZPM)]. After five years' development, CZRC is now recognized as one of the three major resource centers in the global zebrafish community.

Keywords: zebrafish; national center; resources; technology; services

斑马鱼(*Danio rerio*)作为模式动物在生命科学、健康科学和环境科学等研究领域扮演着越来越重要的角色。其基因组序列和人类的相似度达到 70% 以上^[1],素有“水中小白鼠”之称。斑马鱼具有产卵量大、发育迅速、胚胎透明、体外受精和体外发育等生物学特征,使得研究者可以更加高效地开展各类实验^[2,3]。

利用 PubMed 数据库统计发现,在 2010~2017 年间以斑马鱼为材料发表的研究论文增加速度明显高于小鼠(*Mus musculus*)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)和线虫(*Caenorhabditis elegans*)等 6 种实验动物的研究(图 1A)。在中国,自 1998 年第一家斑马鱼实验室在清华大学建立以来,斑马鱼研究群体迅速发展,发表的论文数量逐年递增^[4]。2010 年,中国发表的斑马鱼相关论文在国际论文中占比首次超过 10%^[5],中国成为仅次于美国的第二大斑马鱼研究大国。此后,我国以斑马鱼为研究材料发表的科研论

文总数占全球同类研究的比重一直保持快速增加的势头(图 1B)。

为加强国内斑马鱼研究人员的交流,中国自 2010 年开始举办每年一届的全国性斑马鱼大会。2012 年以后,全国斑马鱼 PI(Principal Investigator)大会和全国斑马鱼研究大会交替举行成为业界瞩目的盛会。2012 年,首届中国斑马鱼 PI 大会的参会人数仅 80 人;而到了 2016 年,前来参加第三届中国斑马鱼 PI 大会的人数达到空前的 240 人;全国斑马鱼研究大会的参会人数也呈现爆发式增长,从 2010 年的 50 人迅速增加到 2017 年的 600 人。随着我国斑马鱼研究的迅速发展和研究团队的迅速扩张,迫切建设国家级的斑马鱼资源中心,以便更加高效地收集、创制、保藏和分享各类斑马鱼研究资源。

中国科学院水生生物研究所(以下简称水生所)是我国淡水鱼类生物学研究的综合性研究机构,在这里诞生了世界首例转基因鱼和体细胞克隆鱼^[6]。

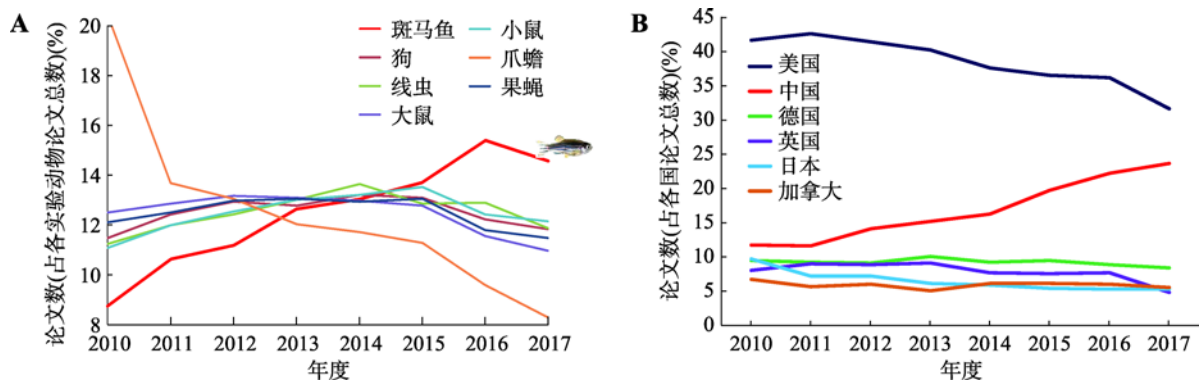


图 1 统计分析以斑马鱼为研究材料发表的科研论文

Fig. 1 Statistical analysis of scientific papers related to zebrafish research

A: 各主要实验动物发表相关论文在 2010~2017 年的发展走势图。通过 PubMed 数据库以各类实验动物为主题分析出其相关论文数量, X 轴是时间, Y 轴是各个实验动物在各时期发表论文数占该实验动物在 8 年中论文总数的比例; B: 全球主要斑马鱼研究国家发表斑马鱼相关论文占全球斑马鱼论文比例在 2010~2017 年的发展走势图。通过 Web of Science 数据库以斑马鱼为主题同时限定区域分析出 6 个主要研究大国以斑马鱼为研究材料发表的科研论文数量。X 轴是时间, Y 轴是各国论文数占国际论文总数比例。

鉴于此,在 2010 年 4 月举行的“第一届全国斑马鱼研究大会”上,朱作言院士和孟安明院士等 40 多位研究学者一致呼吁,尽快在水生所建立“国家斑马鱼资源中心”,将我国学者已有的斑马鱼品系和相关研究资源收集、保藏和分享,以提高科研效率和促进各单位间的合作。2012 年 10 月,国家斑马鱼资源中心(China Zebrafish Resource Center, CZRC)在水生所正式挂牌成立,这对我国的斑马鱼研究具有标志性意义^[7]。本文将对 CZRC 的资源建设情况以及对外服务等工作内容进行简要介绍,以增强研究者和公众对 CZRC 的了解。

1 硬件设施建设

2011 年初,水生所启动了 CZRC 一期建设,至

2014 年,CZRC 二期建设完成。CZRC 的建设面积为 600 m²,由一流标准的斑马鱼资源保藏区和遗传学实验室组成。其中,资源保藏区包括主鱼房、外来鱼隔离房、育苗室、显微注射室和精子超低温保藏室等功能区域(图 2)。主鱼房装配有 6 套全自动水循环养殖系统,共计 72 个斑马鱼养殖架,可活体养殖 16 万条成年斑马鱼;外来鱼隔离房装配有 4 个独立水循环养殖架,可平行引进 400 多个斑马鱼品系;显微注射室装配有 6 套显微注射仪,可日均注射数以万计的斑马鱼胚胎;精子超低温保藏室装配有程序降温仪和 2 个 600 L 大型气态液氮罐,可开展高通量精子冻存工作,容纳 5 万管以上的精子冻存样本。遗传学实验室配备有开展各类分子生物学、细胞生物学、组织学和生物影像学等研究的仪器设备,可进行品系研制、基因型鉴定、表型分析和病理诊



图 2 CZRC 鱼房鸟瞰效果图

Fig. 2 Aerial view of the CZRC fish facility

断等相关实验研究。先进的斑马鱼养殖设备和完善的分子生物学实验条件为 CZRC 的工作开展提供了有力的保障。

2 资源建设与服务

2.1 资源建设及保藏

各类转基因和突变品系资源、基因资源等是利用斑马鱼开展发育生物学、遗传学、生物医学等研究的重要工具^[8,9]。CZRC 通过资源交换、引进和创建,已保藏超过 1200 个斑马鱼品系(图 3A),超过国际斑马鱼资源中心(Zebrafish International Resource Center, ZIRC)建设前 10 年的品系资源增量。此外, CZRC 还保藏有 2000 多个 DNA 探针、150 个质粒资源、61 个斑马鱼抗体资源和 2 个斑马鱼细胞系等。所有的资源信息均公布在国家斑马鱼资源中心网站

(<http://zfish.cn>),并可以通过国际斑马鱼信息中心数据库(<http://zfin.org>)进行交叉搜索。

从创建初始, CZRC 积极与国内外科研人员开展合作,引进斑马鱼品系,并将这些品系以活体或冻存精子的形式进行合理的保存。目前 CZRC 已经和 ZIRC 建立正式合作,有计划地从 ZIRC 批量引进斑马鱼品系。2013 年初,斑马鱼 1 号染色体全基因敲除计划(简称“ZKO 计划”)正式启动,由中国科学院水生生物研究所、北京大学和清华大学等单位的 38 家实验室共同参与,历时近 3 年,获得了 694 个基因型明确的突变品系,目前这些品系均已在 CZRC 妥善保藏并对国内外学术界公开(<http://www.zfish.cn/TargetList.aspx>)。与此同时, CZRC 利用 TALEN 和 CRISPR/Cas9 等基因组编辑技术和 Tol2 介导的转基因技术自主研制了超过 200 个基因敲除品系和转基因品系,有效地丰富了 CZRC 的品系资源库。

中心的斑马鱼品系资源使用活体养殖和冻存精

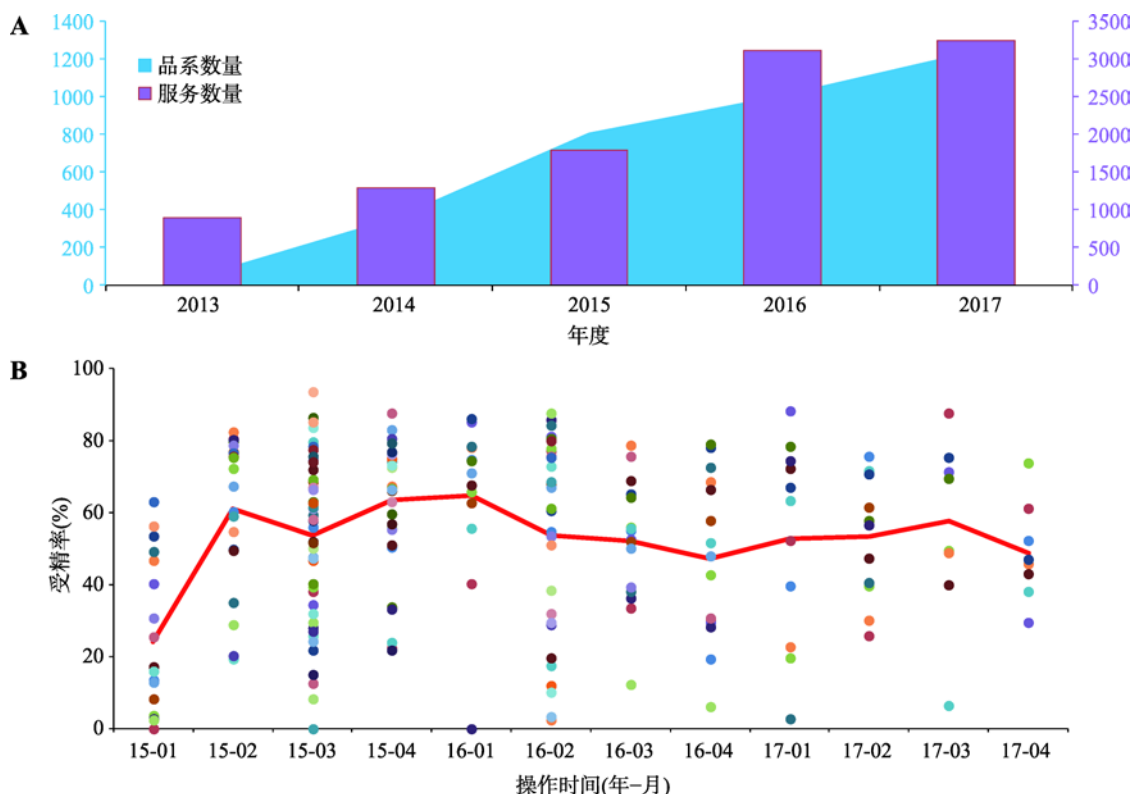


图 3 CZRC 品系资源保存与服务

Fig. 3 Resources and services in CZRC

A: CZRC 成立前 5 年的品系资源库增量情况(蓝色堆叠曲面图,左坐标轴)和每年的资源服务人次增量情况(紫色柱状图,右坐标轴)。

B: CZRC 精子冷冻库质量评估。散点图表示单次操作的复苏受精率,红色折线为同批次冻存样品的复苏受精率平均值。

子的形式进行维持和长期保藏。目前 CZRC 养殖的各类常用的活体斑马鱼品系有 140 余个, 有力地保障了同行研究人员能够及时获取到宝贵的斑马鱼品系直接开展实验研究。为防止珍贵品系资源的丢失, CZRC 的所有品系均以冻存精子的形式进行保藏。精子低温保藏技术是维持鱼类重要资源的一种长期、经济的方法, 该技术的建立可以有效地节省大量的人力和物力成本, 并且使鱼类重要品系的使用和维持更加灵活持久^[10, 11]。经过 5 年时间的发展, CZRC 建立了一个高品质的斑马鱼精子库。在经典的 Harvey 斑马鱼精子低温保藏术基础上^[12], CZRC 进一步优化了从精子收集到复苏操作的流程。到目前为止, CZRC 的斑马鱼精子冷冻库已存储超过 10 000 管精子样本, 冻存精子的平均复苏受精率为 56.2% (图 3B), 居世界领先水平。总之, CZRC 不仅有效地实现了斑马鱼品系资源在斑马鱼研究团体中的共享, 同时精子冻存库的成功建立也为珍贵品系资源提供了一个有力的安全保障。

2.2 资源服务

历时 5 年, CZRC 从 2013 年的资源总量不足 100 个增加到目前的 1200 多个品系资源。在建立之初, CZRC 保藏的资源有限, 2013 年仅向国内研究者提供 800 多人次的斑马鱼品系资源服务。随着中心资源的丰富与多样化, 在斑马鱼品系资源服务方面有了质和量的飞跃。2016 年, 斑马鱼品系资源服务次数提升至 3000 多人次, 涉及斑马鱼品系、细胞、质粒、抗体、草履虫等多种资源(图 3A)。CZRC 不仅服务于国内的研究机构, 也为美、法、德、日等海外国家和地区的实验室提供了斑马鱼资源服务。2015 年 3 月, 美国匹兹堡大学向 CZRC 一次订购了 4 种斑马鱼品系: CZ24 (*ihb25*)、CZ93 (*ihb31*)、CZ102 (*gd2Gt*)、CZ104 (*ihb50*)。CZRC 克服重重困难, 办理检验检疫、海关、外贸等多达 19 项审核材料和相关手续, 最终将 4 个品系安全送抵匹兹堡大学, 接收实验室已利用获得品系开展研究并发表相关论文^[13]。CZRC 的服务获得了国内外研究同行的高度认可, 截至 2017 年底, 使用本中心提供品系资源所发表的相关文献累计超过 100 篇。

CZRC 的快速发展引起国际同行的关注, 目前

CZRC 与 ZIRC 和欧洲斑马鱼资源中心(European Zebrafish Resource Center, EZRC)一同被并称为国际斑马鱼学界的三大资源库^[14]。三大资源库均以提供斑马鱼品系资源为核心任务。经过近 20 年的发展, ZIRC 在线公布的品系信息达到 38 738 条, 但其中 26 259 个突变品系是由英国 Sanger 研究所主持的斑马鱼突变筛选计划(Zebrafish Mutation Project, ZMP)提供^[15]。如果计入 Shawn 和 Lin 实验室所提供的逆转录病毒插入品系^[16], 则在 ZIRC 保藏的所有突变品系中, 有 36 401 个品系的基因型均未被复核(unverified genotype, 据 ZIRC 官方网站声明), 这对研究人员索取和利用这些品系造成一定困难。EZRC 在线列出 22 346 个品系, 但其中也有 19 980 个品系是来源于 ZMP 计划。CZRC 成立相对较晚, 目前仅在线公布了 1241 个品系, 但所有公布品系的基因型均经过确认。更值得一提的是, 为了让研究人员更加方便快捷地获取品系用于研究, CZRC 将 140 多个索取相对较频繁的品系以活体的形式进行养殖维护(表 1)。虽然 CZRC 已经与 Sanger 研究所签订了资源引进协议, 但是该研究所已将 ZMP 计划产生的所有突变品系冻存精子拷贝交由 ZIRC 和 EZRC 保藏, 因此我国迫切需要在前期开展 ZKO 计划的基础之上, 启动新的斑马鱼基因组定向突变和表型分析计划, 以建立具有我国自主知识产权的斑马鱼资源品系库。

3 技术开发与服务

CZRC 在确保高品质的品系资源服务的同时, 积极构建斑马鱼品系创制相关技术平台, 为斑马鱼研究科研人员提供及时有效的技术支撑。目前中心已经成功地建立了 Tol2 介导的转基因技术平台, 以及 TALEN 和 CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术平台。

3.1 转基因技术平台及服务

转基因技术的核心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^[17, 18]。在构建转基因斑马鱼过程中, 常用的导入外源基因的方式

表 1 ZIRC、EZRC、CZRC 等全球三大斑马鱼资源库比较

Table 1 Comparison of three major resource centers in the global zebrafish community: ZIRC, EZRC and CZRC

资源中心	品系数目(未复核基因型品系/ZMP计划品系)	活鱼品系	固定人员	主要经费来源渠道	网址及联系方式	提供的服务项目
ZIRC	38 738 (36 401/26 191)	27	18	美国国立卫生研究院(稳定支持), 俄勒冈大学, 部分服务收入	Web: http://zebrafish.org Email: zirc@zebrafish.org Phone: +1-541-346-6028	5 种资源服务(Fish, ESTs/cDNAs, Antibodies, The zebrafish book, Paramecia)
EZRC	22 346 (20 043/19 980)	12	11	德国亥姆霍兹国家研究中心联合会(稳定支持), 卡尔斯鲁厄理工学院	Web: http://www.ezrc.kit.edu/ Email: EZRC-Requests@itg.kit.edu Tel.: +49-721-608-22716	2 种资源服务(Fish, Plasmids) 3 种技术服务(Sequencing and bioinformatics, Screening service, Meetings and Courses)
CZRC	1241 (0/0)	144	7	科技部国家重大科学研究计划(竞争性经费, 已结题), 中科院重点部署项目(竞争性经费, 已结题), 中科院科技服务网络计划补助经费	Web: http://www.zfish.cn/ Email: zebrafish@ihb.ac.cn Phone: +86-27-6878-0570	6 种资源服务(Fish, Plasmids, ESTs/cDNAs, Antibodies, Cell lines, Paramecia) 4 种技术服务(Transgenic Service, Knock out Service, Zebrafish and health, Training Courses)

是通过显微注射技术, 在显微镜下将外源基因通过注射导入斑马鱼受精卵中, 外源基因可整合到基因组中, 通过基因组筛选获得稳定遗传外源基因的品系^[19]。转基因斑马鱼模型, 尤其是特异组织细胞表达荧光蛋白的品系, 被广泛应用于遗传学、发育生物学、医学、环境毒理学和水产育种学等研究领域^[20]。Tol2 转座子系统是被广为使用的斑马鱼转基因工具。为进一步提高转基因表达效率, CZRC 建立了高效、特异的斑马鱼原始生殖细胞转基因操作平台, 可在胚胎发育期快速高效地筛选出生殖细胞整合有外源基因的 P₀ 代斑马鱼, 大大提高了外源基因在斑马鱼中的表达效率和生殖传递效率^[21,22]。CZRC 不仅向斑马鱼研究人员提供个性化的转基因斑马鱼定制服务, 还利用这一平台自主创制特异表达的工具类转基因品系, 为斑马鱼研究提供了宝贵的研究材料。例如, CZRC 利用转基因技术自主构建 *ihb20Tg* 品系, 对外服务已达 210 人次。

3.2 基因组编辑技术平台及服务

基因组编辑技术是人为地使靶向 DNA 序列发生碱基对的插入、缺失或替换, 从而改变目标基因的结构和功能^[18, 23], 该技术是反向遗传学研究的重

要技术手段。2011 年, TALEN 技术以较为精准的打靶定位、构建简单易行和脱靶效应低等优势迅速取代锌指核酸酶技术, 被广泛应用于包括斑马鱼等多个物种的基因编辑^[24]。2012 年出现的 CRISPR/Cas9 技术^[25,26]为基因编辑带来革命性的影响, 效率极高、可操作性极强, 迅速成为多数物种中构建基因敲除品系的主导技术。CZRC 建立了基于 TALEN 技术的基因敲除平台和基于 CRISPR/Cas9 技术的基因敲除平台, 均可高效特异地进行斑马鱼基因的敲除^[27]。利用这个技术平台, 中心不仅参与 ZKO 计划, 独立完成针对 1 号染色体基因的 88 个敲除品系构建, 还根据学术界的需求自主构建了 168 个基因敲除品系, 为学术界提供更多的研究工具。CZRC 还建立了基于 CRISPR/Cas9 技术的斑马鱼原始生殖细胞基因敲除平台, 该平台应用的转基因品系可在 PGC 中高效、特异表达斑马鱼偏好密码子 Cas9, 相比常规的 Cas9 敲除, 可更加高效地筛选获得特定基因的敲除子代, 为研制斑马鱼工具品系提供更加高效的技术支撑。目前, 中心提供 CRISPR/Cas9 技术介导的斑马鱼基因敲除技术服务, 并承诺在签订协议后 140 个工作日内提供 2 个具有不同移码框的突变品系。

4 健康养殖、咨询和学术服务

4.1 斑马鱼养殖和疾病咨询服务

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。斑马鱼的生长、发育以及繁殖离不开良好的养殖环境。随着越来越多的实验室开展斑马鱼相关研究,科学的斑马鱼养殖技术和良好的鱼房管理制度显得尤为重要。CZRC 从建立初始即努力为领域内提供斑马鱼养殖健康等咨询服务,介绍科学的养殖参数以及养殖要点。斑马鱼养殖环境重要参数主要有温度、水质参数(包括 pH、硬度、氨氮水平、溶氧、盐度和电导率)、光周期和光照强度等,定期监控这些参数对维持斑马鱼的健康养殖至关重要^[28]。CZRC 希望通过这种咨询服务可以在一定程度上提高鱼房管理人员的科学养殖技术水平,以加强国内斑马鱼鱼房的健康发展。

目前,越来越多的实验室利用循环水养殖系统建立了斑马鱼鱼房。鱼病问题一直困扰各大斑马鱼鱼房,不管是具明显可见病征或无明显可见病征的鱼类疾病都将危害实验用鱼的健康,影响实验研究结果,并经水体传播或直接接触导致鱼病在实验室之间相互传播。斑马鱼属于鲤科鱼类,故可感染鲤科鱼类动物的病原体均有可能感染斑马鱼^[29]。斑马鱼的鱼病种类很多,根据发病机制,可分为两类:一类是非感染性疾病,一类是感染性疾病。两类疾病都可对斑马鱼的健康产生严重的危害,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式感染,严重影响斑马鱼的健康和实验结果的准确性。

在过去的 3 年中,CZRC 工作人员考察了中国的 20 家主要的斑马鱼鱼房设施,发现在大多数设施中普遍存在着一些常见病症,例如竖鳞病、腹水、白点病、微孢子虫病、气泡病、肿瘤以及甲状腺肿等。多数鱼房存在着管理及实验操作上的问题,例如没有日常设施维护、缺乏水质监测系统、缺乏检疫程序、没有卫生措施和健康监测等,这些措施是维持良好养殖环境的必要条件,直接关系到鱼类健康和研究结果的准确性^[30, 31]。因此,CZRC 在向斑马鱼研究人员提供鱼病健康咨询的过程中,积极推

广 CZRC 所实施的健康监测方案,包括环境和水质参数监测、定期设备维护、斑马鱼胚胎进口检疫程序、消毒程序、卫生措施、卫生监督和疾病预防等^[32, 33]。健康监测程序的有效施行可以防止新的斑马鱼病原体的引入,最大限度地减少已经存在的设施中的病原体,从而促进实验动物斑马鱼的健康和提高实验结果的有效性和可重复性。

4.2 斑马鱼相关学术服务

4.2.1 斑马鱼技术培训会议

斑马鱼研究领域的发展,离不开优秀的青年科技队伍的发展壮大,从 2014 年开始,CZRC 每年举办 1~2 届与斑马鱼研究相关的技术培训,到目前为止已经成功举办了八期全国培训会议。培训会议的对象主要针对中国斑马鱼研究领域的青年科研人员,培训专题包括斑马鱼鱼房建设和健康养殖、RNA 原位杂交、显微注射、精子冻存和基因组编辑技术等斑马鱼实验技术。培训班采用理论课程与实验操作相结合的授课方式,学员在学习相关技术理论的同时,可以通过实际操作巩固所学技术要点。值得一提的是,在 CZRC 举办的斑马鱼基因组编辑技术培训会议中,学员在掌握该技术的同时,还可以对自己感兴趣的基因进行现场敲除,获得并带回敲除阳性的 F₀ 代胚胎。为了更好地掌握斑马鱼青年人才的切实需求和提高 CZRC 技术培训的质量,CZRC 在每届培训班结束时进行匿名问卷评估,历届问卷评估的评分均达到 9.0 分以上(满分为 10 分)。在今后的培训会议中,CZRC 要切实回应斑马鱼科研和产业领域的发展需求,进一步丰富课程内容,提高授课质量,提升理论和操作相结合的授课模式,以期更好地培养未来的斑马鱼科研人才。

4.2.2 全国斑马鱼 PI 大会

2011 年,在广州举办的第二届全国斑马鱼研讨会上,包括孟安明院士在内的全国斑马鱼研究学术集体商定,今后的全国性斑马鱼会议采取“PI 大会”和“研究大会”的形式交替隔年举行,并决定自 2012 年起固定在 CZRC 的依托单位水生所召开“全国斑马鱼 PI 大会”。至今为止,已成功举办了 3 届全国

斑马鱼 PI 会议。在历届会议中,国内斑马鱼研究的科研带头人济济一堂,展示最新的斑马鱼相关的科研进展,寻求新的科研机遇。全国斑马鱼 PI 大会代表国内斑马鱼研究领域最高水平的学术会议,会议的主题主要有早期发育、信号通路、器官发育、疾病模型和环境健康等方面。目前我国有超过 300 家的实验室利用斑马鱼开展相关科学研究,通过全国斑马鱼 PI 大会平台,研究者可以更加全面地了解斑马鱼研究相关的最新进展,获得许多宝贵的科研经验、知识以及启示,促进斑马鱼研究获得更高水平的科研产出。

4.2.3 中国动物学会斑马鱼分会成立

2016 年 9 月,在武汉举行的第三届“全国斑马鱼 PI 会议”上,中国动物学会斑马鱼分会(简称中国斑马鱼学会,英文名 China Zebrafish Society)正式成立。学会的挂靠单位为 CZRC 的依托单位水生所,秘书处设在 CZRC,学会的名誉理事长由朱作言院士和孟安明院士担任,理事长由中国科学院动物研究所刘峰研究员担任,秘书长由 CZRC 主任孙永华研究员担任,常务委员会由 17 名成员构成,委员会包含 54 名成员。斑马鱼分会将遵守中国动物学会章程,根据斑马鱼的学科特点和国际发展趋势,开展相关工作。该学会的成立标志着中国的斑马鱼研究步入了新的发展阶段。

5 国际合作

鉴于斑马鱼作为模式动物在科研领域的重要作用 and 独特地位,在全球范围内,除 CZRC 外,美国、日本、澳大利亚、欧洲和中国台湾等国家和地区均设立有斑马鱼资源中心。目前全球最大的斑马鱼资源中心是 ZIRC,位于美国俄勒冈州。ZIRC 成立于 1999 年,现在保藏有全球斑马鱼研究者提供的将近 3 万多个斑马鱼品系,包括野生型、基因突变和转基因品系等。ZIRC 还提供斑马鱼 cDNA、抗体资源,以及养殖和疾病等方面的咨询服务。继 ZIRC 之后,欧洲、澳洲、日本、中国台湾等国家和地区都相继成立了提供斑马鱼资源保藏和服务的资源库。

CZRC 非常重视和 ZIRC 以及其他同类型斑

马鱼资源库建立良好的合作关系。国际斑马鱼资源中心主任 Monte Westerfield 教授两次到访国家斑马鱼资源中心,CZRC 也两次派工作人员访问国际斑马鱼资源中心,讨论有关资源交流和合作的细节。CZRC 和 ZIRC 已签订资源交流协议,同时 CZRC 也与国际斑马鱼信息中心(Zebrafish Information Network, ZFIN)紧密合作,所有公布于 CZRC 的斑马鱼品系信息都会及时在 ZFIN 网站进行更新。这些合作将有助于提升我国斑马鱼研究和资源的国际展示度,促进我国斑马鱼研究的快速健康发展。

6 结语与展望

随着中国斑马鱼研究群体的迅速壮大,对各类综合信息和鱼房科学管理的需求更加迫切。CZRC 正着手为国内斑马鱼科研工作者打造中国斑马鱼信息中心(Chinese Zebrafish Information Network, CZIN, 网址: <http://zfin.cn>), CZIN 将不仅为中国斑马鱼群体提供学术展示与交流的平台,同时还将开发品系管理的云平台,为各实验室管理日益增加的品系资源提供更加高效可靠的数字平台。品系共享和信息化服务将有助于建立 CZRC 以及国内外斑马鱼实验室之间的合作及协调关系,最大限度地满足斑马鱼研究学者对斑马鱼相关资源和信息的需求。目前,CZIN 的学术展示和交流平台已经正式上线开放。

总之,CZRC 将遵循中心章程^[34],以斑马鱼研究资源的收集、创制、整理、保藏和分享为主要任务,以服务于全国斑马鱼研究学者为宗旨,不忘初心,不断进取,整合资源,促进合作,为我国斑马鱼研究事业的长期健康发展奠定基础。

参考文献(References):

- [1] Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, McLaren S, Sealy I, Caccamo M, Churcher C, Scott C, Barrett JC, Koch R, Rauch GJ, White S, Chow W, Kilian B, Quintais LT, Guerra-Assuncao JA, Zhou Y, Gu Y, Yen J, Vogel JH, Eyre T, Redmond S, Banerjee R, Chi J, Fu B, Langley E, Maguire SF, Laird GK, Lloyd D, Kenyon E, Donaldson S, Sehra H, Almeida-King J, Loveland J,

- Trevanion S, Jones M, Quail M, Willey D, Hunt A, Burton J, Sims S, McLay K, Plumb B, Davis J, Clee C, Oliver K, Clark R, Riddle C, Elliot D, Threadgold G, Harden G, Ware D, Begum S, Mortimore B, Kerry G, Heath P, Phillimore B, Tracey A, Corby N, Dunn M, Johnson C, Wood J, Clark S, Pelan S, Griffiths G, Smith M, Glithero R, Howden P, Barker N, Lloyd C, Stevens C, Harley J, Holt K, Panagiotidis G, Lovell J, Beasley H, Henderson C, Gordon D, Auger K, Wright D, Collins J, Raisen C, Dyer L, Leung K, Robertson L, Ambridge K, Leongamornlert D, McGuire S, Gilderthorp R, Griffiths C, Manthavadi D, Nichol S, Barker G, Whitehead S, Kay M, Brown J, Murnane C, Gray E, Humphries M, Sycamore N, Barker D, Saunders D, Wallis J, Babbage A, Hammond S, Mashreghi-Mohammadi M, Barr L, Martin S, Wray P, Ellington A, Matthews N, Ellwood M, Woodmansey R, Clark G, Cooper J, Tromans A, Grafham D, Skuce C, Pandian R, Andrews R, Harrison E, Kimberley A, Garnett J, Fosker N, Hall R, Garner P, Kelly D, Bird C, Palmer S, Gehring I, Berger A, Dooley CM, Ersan-Urun Z, Eser C, Geiger H, Geisler M, Karotki L, Kirn A, Konantz J, Konantz M, Oberlander M, Rudolph-Geiger S, Teucke M, Lanz C, Raddatz G, Osoegawa K, Zhu B, Rapp A, Widaa S, Langford C, Yang F, Schuster SC, Carter NP, Harrow J, Ning Z, Herrero J, Searle SM, Enright A, Geisler R, Plasterk RH, Lee C, Westerfield M, de Jong PJ, Zon LI, Postlethwait JH, Nusslein-Volhard C, Hubbard TJ, Roest Crolius H, Rogers J, Stemple DL. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 2013, 496(7446): 498–503. [DOI]
- [2] Pichler FB, Laurenson S, Williams LC, Dodd A, Copp BR, Love DR. Chemical discovery and global gene expression analysis in zebrafish. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(8): 879–883. [DOI]
- [3] Pott A, Rottbauer W, Just S. Functional genomics in zebrafish as a tool to identify novel antiarrhythmic targets. *Curr Med Chem*, 2014, 21(11): 1320–1329. [DOI]
- [4] Jia SJ, Meng AM. The development of zebrafish research in China. *Hereditas(Beijing)*, 2012, 34(9): 1082–1088.
贾顺姬, 孟安明. 中国斑马鱼研究发展历程及现状. *遗传*, 2012, 34(9): 1082–1088. [DOI]
- [5] Xie XW, Pan LY, Sun YH. Growing with the world: rapid development of the zebrafish research in China and the China Zebrafish Resource Center. *Sci China Life Sci*, 2015, 58(4): 396–399. [DOI]
- [6] Zhu ZY, Sun YH. Embryonic and genetic manipulation in fish. *Cell Res*, 2000, 10(1): 17–27. [DOI]
- [7] Li KY, Pan LY, Sun YH. Development and maintenance of zebrafish resources, and the China Zebrafish Resource Center. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2014 22(6): 93–98, 105.
李阔宇, 潘鲁媛, 孙永华. 斑马鱼资源的开发保藏与国家斑马鱼资源中心. *中国实验动物学报*, 2014, 22(6): 93–98, 105. [DOI]
- [8] Kim SH, Kowalski ML, Carson RP, Bridges LR, Ess KC. Heterozygous inactivation of *tsc2* enhances tumorigenesis in p53 mutant zebrafish. *Dis Model Mech*, 2013 6(4): 925–933. [DOI]
- [9] Krøvel AV, Olsen LC. Expression of a *vas::EGFP* transgene in primordial germ cells of the zebrafish. *Mech Dev*, 2002, 116(1–2): 141–150. [DOI]
- [10] Tiersch TR, Yang H, Jenkins JA, Dong Q. Sperm cryopreservation in fish and shellfish. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 2007, 65: 493–508. [DOI]
- [11] Yang H, Tiersch TR. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: zebrafish, medaka, and *Xiphophorus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2009, 149(2): 224–232. [DOI]
- [12] Harvey B, Kelley, RN, Ashwood-Smith MJ. Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol. *Can J Zool*, 1982, 60(8): 1867–1870. [DOI]
- [13] Khaliq M, Ko S, Liu Y, Wang H, Sun Y, Solnica-Kreze L, Shin D. Stat3 regulates liver progenitor cell-driven liver regeneration in zebrafish. *Gene Expr*, 2018, doi: 10.3727/105221618X15242506133273. [DOI]
- [14] Ruzicka L, Bradford YM, Frazer K, Howe DG, Paddock H, Ramachandran S, Singer A, Toro S, Van Slyke CE, Eagle AE, Fashena D, Kalita P, Knight J, Mani P, Martin R, Moxon SA, Pich C, Schaper K, Shao X, Westerfield M. ZFIN, The zebrafish model organism database: Updates and new directions. *Genesis*, 2015, 53(8): 498–509. [DOI]
- [15] Kettleborough RN, Busch-Nentwich EM, Harvey SA, Dooley CM, de Bruijn E, van Eeden F, Sealy I, White RJ, Herd C, Nijman IJ, Fenyes F, Mehroke S, Scahill C, Gibbons R, Wali N, Carruthers S, Hall A, Yen J, Cuppen E, Stemple DL. A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function. *Nature*, 2013, 496(7446): 494–497. [DOI]
- [16] Varshney GK, Lu J, Gildea DE, Huang H, Pei W, Yang Z, Huang SC, Schoenfeld D, Pho NH, Casero D, Hirase T, Mosbrook-Davis D, Zhang S, Jao LE, Zhang B, Woods IG, Zimmerman S, Schier AF, Wolfsberg TG, Pellegrini M, Burgess SM, Lin S. A large-scale zebrafish gene knockout resource for the genome-wide study of gene function. *Genome Res*, 2013, 23(4): 727–735. [DOI]

- [17] Lee O, Green JM, Tyler CR. Transgenic fish systems and their application in ecotoxicology. *Crit Rev Toxicol*, 2015, 45(2): 124–141. [DOI]
- [18] Sertori R, Trengove M, Basheer F, Ward AC, Liongue C. Genome editing in zebrafish: a practical overview. *Brief Funct Genomics*, 2016, 15(4): 322–330. [DOI]
- [19] Holder N, Xu Q. Microinjection of DNA, RNA, and protein into the fertilized zebrafish egg for analysis of gene function. *Methods Mol Biol*, 1999, 97: 487–490. [DOI]
- [20] Amsterdam A, Becker TS. Transgenes as screening tools to probe and manipulate the zebrafish genome. *Dev Dyn*, 2005, 234(2): 255–268. [DOI]
- [21] Xiong F, Wei ZQ, Zhu ZY, Sun YH. Targeted expression in zebrafish primordial germ cells by Cre/loxP and Gal4/UAS systems. *Mar Biotechnol (NY)*, 2013, 15(5): 526–539. [DOI]
- [22] Wei ZQ, Xiong F, He MD, Wang HP, Zhu ZY, Sun YH. Suppression of Ligase 4 or Xrcc6 activities enhances the DNA homologous recombination efficiency in zebrafish primordial germ cells. *Acta Hydrobiol Sin*, 2015 39(2): 339–348.
魏志强, 熊凤, 何牡丹, 王厚鹏, 朱作言, 孙永华. 抑制 Ligase4 或 Xrcc6 活性增强斑马鱼原始生殖细胞中 DNA 同源重组的效率. 水生生物学报, 2015, 39(2): 339–348. [DOI]
- [23] Mortensen R. Overview of gene targeting by homologous recombination. *Curr Protoc Neurosci*, 2007, Chapter 4: Unit 4. 29. [DOI]
- [24] Huang P, Xiao A, Zhou M, Zhu Z, Lin S, Zhang B. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 699–700. [DOI]
- [25] Chang N, Sun C, Gao L, Zhu D, Xu X, Zhu X, Xiong JW, Xi JJ. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res*, 2013, 23(4): 465–472. [DOI]
- [26] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, 343(6166): 84–87. [DOI]
- [27] Zhang FH, Wang HP, Huang SY, Xiong F, Zhu ZY, Sun YH. A comparison of the knockout efficiencies of two codon-optimized *Cas9* coding sequences in zebrafish embryos. *Hereditas(Beijing)*, 2016, 38(2): 144–154.
张峰华, 王厚鹏, 黄思雨, 熊凤, 朱作言, 孙永华. 两种密码子优化的 *Cas9* 编码基因在斑马鱼胚胎中基因敲除效率的比较. 遗传, 2016, 38(2): 144–154. [DOI]
- [28] Westerfield M. The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish *Danio(Brachydanio) rerio*. *University of Oregon Press, Eugene, OR*, 2007. [DOI]
- [29] Liu L, Pan L, Li K, Zhang Y, Zhu Z, Sun Y. Zebrafish health conditions in the China Zebrafish Resource Center and 20 major Chinese zebrafish laboratories. *Zebrafish*, 2016, 13(Suppl. 1): S8–S18. [DOI]
- [30] Lawrence C, Mason T. Zebrafish housing systems: a review of basic operating principles and considerations for design and functionality. *ILAR J*, 2012, 53(2): 179–191. [DOI]
- [31] Varga ZM. Aquaculture and husbandry at the zebrafish international resource center. *Methods Cell Biol*, 2011 104: 453–478. [DOI]
- [32] Lu CP. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it. *J Fish China*, 1992; 16(3): 282–288.
陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述. 水产学报, 1992; 16(3): 282–288. [DOI]
- [33] 马国文, 温海深, 刘振崎, 王世吉. 鲤鱼竖鳞病的临床病理学研究. 哲里木畜牧学院学报, 1998; 3: 1–8. [DOI]
- [34] Sun YH. A brief introduction to the China Zebrafish Resource Center. *Hereditas(Beijing)*, 2013, 35(4): 549–550.
孙永华. 国家斑马鱼资源中心简介. 遗传, 2013, 35(4): 549–550. [DOI]

(责任编辑: 刘峰)