

· 综 述 ·

斑马鱼动物模型在眼科及视觉科学研究中的应用:历史与现状

陈雪莉 荆洋 张琪

02114 美国哈佛大学医学院麻省眼耳医院眼科(陈雪莉,现在上海复旦大学附属眼耳鼻喉科医院眼科)

通信作者:张琪,Email:Qi_Zhang@meei.harvard.edu

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.04.017

【摘要】近年来,斑马鱼凭借其体型小、繁殖力强、生长发育快、胚胎透明等独特的生物学特性,成为人类疾病动物模型的理想选择,加之与人类眼部结构和基因的高度保守性,使斑马鱼受到眼科学和视觉科学领域工作者的关注。本文主要以斑马鱼模型在视觉研究中的文献为基础,对目前常用和新近发展的基因调控和编辑技术在这一领域的应用进行综述。

【关键词】 斑马鱼;模型;动物;眼;遗传学

Application of zebrafish in ophthalmology and vision research: history and current progress Chen Xueli, Jing Yang, Zhang Qi

Ocular Genomic Institute, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Harvard Medical School, Boston, MA 02114, USA (Chen XL, now Department of Ophthalmology and Vision Science, Shanghai Medical College, Eye and Ear Nose Throat Hospital, Fudan University, Shanghai 200031, China)

Corresponding author: Zhang Qi, Email: Qi_Zhang@meei.harvard.edu

【Abstract】 In recent years, zebrafish has become ideal animal models of human disease with its unique characteristics, such as small body, fecundity, fast development and growth, embryo transparency, and so on. Furthermore, the structure and gene of zebrafish eye are highly conservative with human eye, which make ophthalmologists to pay close attentions to zebrafish. This review focused on the studies and applications on zebrafish embryonic development of eyes, and also the applications of currently used genetic regulation and editing techniques and tools.

【Key words】 Zebrafish; Model, animal; Eye; Genetics

斑马鱼的眼部结构和基因与人类相似且高度保守,是人类疾病动物模型的理想选择,近年来斑马鱼的眼病动物模型在眼科学和视觉科学领域中的应用日益受到重视。斑马鱼是一种亚热带淡水鱼,Streisinger 博士于 1982 年首次将其胚胎用作突变研究,奠定了斑马鱼用于人类疾病动物模型的早期基础^[1-2]。

斑马鱼每次繁殖可产卵 200 个以上,鱼卵是体外受精,胚胎早期呈透明状,有利于肉眼及显微镜下的观察和操作。此外其发育快,生长周期短,成本低廉,故成为研究遗传发育学常用的脊椎动物模型^[1-4]。目前,美国 NIH 已资助对斑马鱼的研究,使其成为仅次于小鼠、果蝇和线虫的常见疾病动物模型。

除上述常见的优点外,斑马鱼发育早期眼球比例较大,视网膜及视觉发育迅速。斑马鱼的视觉发育程度是以受精后小时数(天数)[hours(days) post fertilization, hpf(dpf)]进行评估的,例如斑马鱼的视杯在 24 hpf 后形成,70~72 hpf 后胚胎视网膜就可测到视觉及电生理反应,3 dpf 后除了视杆细胞外,其他与视觉有关的视网膜细胞也基本发育成熟,细胞的种类及神经

细胞的突触连接也基本建立。斑马鱼早期测得的视网膜电图(electroretinogram, ERG)主要来源于视锥细胞,视杆细胞发育成熟在 12~21 dpf,30 dpf 后其夜视觉接近成年鱼。与其他脊椎类动物一样,斑马鱼视网膜主要有 6 种神经元细胞和 1 种神经胶质细胞,而斑马鱼还有 4 种不同的视锥细胞,包括成对的红/绿视锥细胞、单个较长的对蓝光敏感视锥细胞和较短的对紫外光敏感的视锥细胞^[5-6],因此是视觉研究中常见的动物模型。

Schmitt 等^[6]的研究提供了斑马鱼各种视网膜神经细胞出现及分化时期的资料。5 dpf 的幼鱼视觉发育已大部分成熟,可以进行视觉行为学的测试以检测基因功能是否丧失或基因突变是否影响到视觉系统的完整性。视动反应(optokinetic response, OKR)是一种无创性技术,可用于基因功能丧失或突变的筛选^[7-8]。Wong 等^[9]的研究表明,用离体的斑马鱼眼球可记录到活体斑马鱼同样的 ERG 结果。对斑马鱼的组织学研究可了解基因突变/基因功能丧失是否影响与视觉有关的细胞形态(排列及位置)或引起退行性变化,为疾病的发病机制研究

提供依据。组织学研究时常用塑料包埋眼球,制备 1 μm 超薄切片,用甲苯胺蓝染色光学显微镜下观察一般组织学形态,然后将塑料包埋组织块制备 90 nm 厚的切片,在透射电子显微镜下观察视网膜细胞超微结构,鉴定视网膜是否存在细胞形态改变、层次发育缺陷、细胞器异常,进一步提供基因功能的信息^[10]。斑马鱼也是一种广泛用于研究视细胞外节纤毛基因的常见工具。近年来,关于纤毛蛋白的质谱学研究成为研究热点,许多视觉细胞纤毛蛋白的基因突变可引起视觉系统异常的综合征,如多指/趾症、肾囊肿等。相应的斑马鱼疾病模型已建立,例如 *TTC26*^[10]、*IFT88*^[11]、*IFT80*^[12]、*IFT172*^[11-14]、*TTC21B*^[15],许多未知功能的新纤毛蛋白突变动物模型也有待建立。我们重点以斑马鱼模型在视觉研究中的文献为基础介绍其在生物遗传研究中常用到的技术及手段。

1 常用网上相关资源

关于斑马鱼在生物遗传研究中常用到的技术及手段可参考下列网上资源:(1)野生型和常见突变型鱼的来源:<https://zebrafish.org>;(2)鱼的基因组和基因表达、解剖等常见信息:<http://zfin.org>;(3)MOs 的设计及定制:<http://www.gene-tools.com>;(4)转基因质粒及技术信息:<http://tol2kit.genetics.utah.edu>;(5)Cas9 质粒:<https://www.addgene.org>。

2 吗啉核酸反义核酸技术

吗啉核酸(morpholino oligonucleotides, MOs)是一种化学合成的 DNA 分子类似物,大小一般为 25 bp,其核苷酸上面的吗啉环取代了五碳糖环,同时对原有的磷酸基团也做了改变。MOs 可同 RNA 互补结合,但是由于其不带有电荷,无法被核酸酶所识别,因此这类物质在细胞内有着极强的稳定性和较小的细胞毒性^[16]。此技术可以阻断功能蛋白质的转录/翻译水平:(1)翻译起始阻断 MOs 与 mRNA 的 5'-UTR(非翻译区域)和翻译起始密码 ATG 结合,使携带氨基酸的转运 RNA(transfer RNA, tRNA)不能结合到互补位置的 mRNA 遗传密码,使蛋白质翻译无法启动及延长,从而阻断该基因的蛋白质翻译。(2)剪切阻断 MOs 与未成熟 mRNA 的剪切供点或受点结合,使其产生包含内含子或缺少外显子的错误剪切产物,从而在氨基酸合成时发生遗传密码框移及紊乱,合成短头或错误蛋白质而使其功能部分或完全缺失。两者都能实现基因转录或翻译水平的抑制,继而达到基因功能短期丧失的目的^[17]。MOs 的对照设计包括标准对照(随机序列,不与任何 mRNA 序列结合)和特定基因错配对照(与设计的目的基因 mRNA 5 bp 以上的错配)。

实验时把设计好的 MOs 稀释到不同梯度浓度,于斑马鱼胚胎早期,一般在 1 hpf 内注射入胚胎卵黄囊或细胞内,然后通过卵黄与胚胎间的胞浆流动进入到细胞内发挥阻断作用。随后将注射后的胚胎置于 28.5 $^{\circ}\text{C}$ 温箱,每日多次观察幼鱼表型特征,多次重复实验,找出最适浓度。然后可进行 2 类外源性 mRNA 补充实验:(1)注射 MOs 的同时给予其他物种的野生型 mRNA 由于不同物种的核酸序列差异,MOs 不与其结合,外源性 mRNA 可在细胞内翻译成蛋白质而替代被阻断的内源性蛋

白,从而实现挽救表型的目的。(2)注射 MOs 的同时给予其他物种的突变型 mRNA 如突变型 mRNA 不能拯救表型,则可证实该突变具有功能性意义^[13]。除此之外,采用 RNA 干扰或者 CRISPR-Cas9 基因编辑的方法可进一步佐证该基因在 MOs 实验中的结果。

尽管 MOs 具有上述优点,但它也有一定的局限性。(1)由于 MOs 并不是在基因组水平的干预,通常其作用时间在斑马鱼胚胎 1 ~ 3 d,从 3 ~ 5 dpf 开始逐渐减弱,但这已为基因的功能缺失型研究提供了足够的证据。(2)MOs 主要通过 p53 介导的细胞凋亡而产生脱靶效应,因此可联合 p53 MOs 注射来阻断该凋亡通路,从而减少脱靶效应^[18]。(3)合成的 MOs 阻断基因功能后,并非 100% 产生期望的表现型。这是由于体内存在类似的功能基因或其他网络通路可替代该基因的功能,通常产生表现型的 MOs 只有 70% ~ 80% (参看 Gene tools, <http://www.gene-tools.com>)。由于专利原因, Gene Tools 是唯一一家合成 MOs 的公司。MOs 的单价已由过去的 600 美元降到现在的 400 美元。由于其可重复性及多年的应用经验,MOs 目前仍是不能完全替代的基因功能验证工具。

3 致突变研究的手段

了解致突变研究的手段有助于相关疾病模型的建立,主要有以下几种方法。

3.1 随机性致突变

3.1.1 化学性致突变 化学性致突变常用乙烷亚硝基脒(N-ethyl-N-nitrosourea, ENU)作为致突变剂,造成的突变是多位点随机性的,可以用繁殖及定位克隆发现突变的位点,但比较费时费力^[19]。

3.1.2 插入性突变 用反转录病毒的转位子造成基因组的插入性突变,从而导致基因功能丧失。与化学性致突变一样,这种致突变方法需要费时费力的定位克隆^[20]。由于使用的转位子质粒的不同,插入是随机的,所以可能会影响到附近基因组的一些功能性序列,造成脱靶效应。

3.2 转基因

转基因是用质粒的方法导入突变的基因及调控序列,主要用于显性遗传基因突变研究。常用 Tol2 试剂盒,采用 Gateway 的技术方法来构造突变基因及附属序列^[21]。最近,一种新型的质粒可以定位到基因组的无功能基因组区域,从而大大减少脱靶效应^[22]。

3.3 定位性的致突变技术(基因组编辑)

常见的定位性的致突变技术有 3 种,包括早期的锌指核酸酶及近来的转录激活因子样效应物核酸酶和 CRISPR-Cas9^[23]。从经济和适用的角度考虑,Cas9 近两年发展迅速,有可能取代前 2 种技术。本研究中主要讨论 Cas9 II 型化脓性链球菌核酸酶。

CRISPR-Cas9 是细菌对病毒噬菌体感染形成的一种被动免疫。在 2005 年,3 个不同的实验室各自独立研究发现 CRISPR spacer 序列同源于噬菌体或质粒的 DNA 序列,推测此核酸序列可能是细菌本身的免疫记忆。在 2012 年,有研究发现体外组装的导向性核糖核酸可以引导 Cas9 核酸内切酶结合并切断特

定的 DNA 序列^[24]。2013 年,有文献报道这一技术可用于细胞的基因编辑,实现基因阻断或精确定位性突变^[25-26],该系统主要有 2 个部分,即从细菌分离出来无特异的 Cas9 核酸内切酶及有特异性结合核酸序列(20 nt)的 crRNA(CRISPR RNA)。实际应用中,将 tracrRNA(trans-activating crRNA)和 crRNA 放在同一质粒上,成为 sgRNA(single-guide RNA),Cas9 和 sgRNA 结合成聚合体并与特异性的基因组 DNA 结合。此外,Cas9 还需辨认 3nt PAM(proto-spacer adjacent motif)核酸序列 NGG,从而激活 Cas9 酶并切断 DNA 的双链。此后,主要有 2 种修复被切断的 DNA 的方法,一种是将断裂两端连接起来,常造成插入/缺失的核酸序列突变,从而打乱基因翻译密码,或发生遗传密码框移而造成蛋白质功能丧失,达到敲除基因的目的。另一种修复的方法是细胞内 DNA 重组酶以碱基配对的形式植入模板 DNA,达到引入特定突变的目的。该方法一方面能造成植入性基因突变,另一方面也可导入正常 DNA 序列以达到纠正突变核酸的目的,具有临床治疗的应用前途。

在 CRISPR-Cas9 应用于斑马鱼之前,应先将细菌的 Cas9 基因进行翻译密码的优化,以利于在斑马鱼的细胞内表达^[27]。在体外合成 Cas9 mRNA 以及 sgRNA,然后用显微注射技术将它们导入单细胞期的胚胎,3 d 后斑马鱼发育成幼鱼时,提取 DNA 进行突变序列的分析。合成高质量的 RNA 是下一步实验的关键,可以用上述试剂盒内的氯化锂或用 RNeasy PlusMicro Kit(QIAGEN)进行纯化,然后将 RNA 储存于低温冰箱(-80℃)备用。将 sgRNA 与 Cas9 mRNA 混合后注射,每个胚胎使用 80~120 pg sgRNA 和 250~350 pg Cas9 mRNA 进行微量注射,尽量在单细胞胚胎期完成注射,然后置于 28.5℃ 温箱中孵化。

4 小结

斑马鱼是一种方便、经济、快速的眼科及视觉科学动物模型,已积累的文献提供了关于斑马鱼的组织解剖学^[28]和视觉系统的发育学信息资料;视觉行为学和视觉电生理学检测提供了评价视功能的手段;基因组学数据库提供了各种基因的信息;再加上各种基因致突变技术的发展,使得斑马鱼作为一种动物模型在视觉科学研究中有着广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Chakrabarti S, Streisinger G, Singer F, et al. Frequency of gamma-ray induced specific locus and recessive lethal mutations in mature germ cells of the Zebrafish, BRACHYDANIO RERIO [J]. Genetics, 1983, 103(1): 109-123.
- [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] Fadool JM, Dowling JE. Zebrafish: a model system for the study of eye genetics [J]. Prog Retin Eye Res, 2008, 27(1): 89-110. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2007.08.002.
- [4] Ota S, Kawahara A. Zebrafish: a model vertebrate suitable for the analysis of human genetic disorders [J]. Congenit Anom (Kyoto), 2014, 54(1): 8-11. DOI: 10.1111/cga.12040.
- [5] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. Dev Dyn, 1995, 203(3): 253-310. DOI: 10.1002/aja.1002030302.
- [6] Schmitt EA, Dowling JE. Early eye morphogenesis in the zebrafish, Brachydanio rerio [J]. J Comp Neurol, 1994, 344(4): 532-542. DOI: 10.1002/cne.903440404.
- [7] Brockerhoff SE. Measuring the optokinetic response of zebrafish larvae [J]. Nat Protoc, 2006, 1(5): 2448-2451. DOI: 10.1038/nprot.2006.255.
- [8] Mueller KP, Neuhauss SC. Quantitative measurements of the optokinetic response in adult fish [J]. J Neurosci Methods, 2010, 186(1): 29-34. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2009.10.020.
- [9] Wong KY, Gray J, Hayward CJ, et al. Glutamatergic mechanisms in the outer retina of larval zebrafish: analysis of electroretinogram b- and d-waves using a novel preparation [J]. Zebrafish, 2004, 1(2): 121-131. DOI: 10.1089/zeb.2004.1.121.
- [10] Zhang Q, Liu Q, Austin C, et al. Knockdown of ttc26 disrupts ciliogenesis of the photoreceptor cells and the pronephros in zebrafish [J]. Mol Biol Cell, 2012, 23(16): 3069-3078. DOI: 10.1091/mbc.E12-01-0019.
- [11] Lunt SC, Haynes T, Perkins BD. Zebrafish ift57, ift88, and ift172 intraflagellar transport mutants disrupt cilia but do not affect hedgehog signaling [J]. Dev Dyn, 2009, 238(7): 1744-1759. DOI: 10.1002/dvdy.21999.
- [12] Hudak LM, Lunt S, Chang CH, et al. The intraflagellar transport protein ift80 is essential for photoreceptor survival in a zebrafish model of jeune asphyxiating thoracic dystrophy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(7): 3792-3799. DOI: 10.1167/iov.09-4312.
- [13] Bujakowska KM, Zhang Q, Siemiakowska AM, et al. Mutations in IFT172 cause isolated retinal degeneration and Bardet-Biedl syndrome [J]. Hum Mol Genet, 2015, 24(1): 230-242. DOI: 10.1093/hmg/ddu441.
- [14] Tsujikawa M, Malicki J. Genetics of photoreceptor development and function in zebrafish [J]. Int J Dev Biol, 2004, 48(8-9): 925-934. DOI: 10.1387/ijdb.041890mt.
- [15] Davis EE, Zhang Q, Liu Q, et al. TTC21B contributes both causal and modifying alleles across the ciliopathy spectrum [J]. Nat Genet, 2011, 43(3): 189-196. DOI: 10.1038/ng.756.
- [16] Bill BR, Petzold AM, Clark KJ, et al. A primer for morpholino use in zebrafish [J]. Zebrafish, 2009, 6(1): 69-77. DOI: 10.1089/zeb.2008.0555.
- [17] Corey DR, Abrams JM. Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development [J/OL]. Genome Biol, 2001, 2(5): REVIEWS1015 [2015-09-23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11387041/>.
- [18] Robu ME, Larson JD, Nasevicius A, et al. p53 activation by knockdown technologies [J/OL]. PLoS Genet, 2007, 3(5): e78 [2015-10-21]. <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.0030078>. DOI: 10.1371/journal.pgen.0030078.
- [19] Amsterdam A, Hopkins N. Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease [J]. Trends Genet, 2006, 22(9): 473-478. DOI: 10.1016/j.tig.2006.06.011.
- [20] Hardy S, Legagneux V, Audic Y, et al. Reverse genetics in eukaryotes [J]. Biol Cell, 2010, 102(10): 561-580. DOI: 10.1042/BC20100038.
- [21] Kwan KM, Fujimoto E, Grabber C, et al. The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs [J]. Dev Dyn, 2007, 236(11): 3088-3099. DOI: 10.1002/dvdy.21343.
- [22] Mosimann C, Puller AC, Lawson KL, et al. Site-directed zebrafish transgenesis into single landing sites with the phiC31 integrase system [J]. Dev Dyn, 2013, 242(8): 949-963. DOI: 10.1002/dvdy.23989.
- [23] Auer TO, Del BF. CRISPR/Cas9 and TALEN-mediated knock-in approaches in zebrafish [J]. Methods, 2014, 69(2): 142-150. DOI: 10.1016/j.ymeth.2014.03.027.
- [24] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. Science, 2012, 337(6096): 816-821. DOI: 10.1126/science.1225829.
- [25] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823. DOI: 10.1126/science.1231143.
- [26] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. Science, 2013, 339(6121): 823-826. DOI: 10.1126/science.1232033.
- [27] Hwang WY, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system [J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(3): 227-229. DOI: 10.1038/nbt.2501.
- [28] Menke AL, Spitsbergen JM, Wolterbeek AP, et al. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish [J]. Toxicol Pathol, 2011, 39(5): 759-775. DOI: 10.1177/0192623311409597.

(收稿日期:2016-02-01)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)