

实验十

斑马鱼早期胚胎发育形态学观察

邮箱: yuxw@xmu.edu.cn

电话: 13600924969



斑马鱼 (*Danio rerio*, zebrafish) 简介

中文学名： 斑马鱼

别称： 蓝条鱼、花条鱼、蓝斑马鱼、印度鱼、印度斑马鱼

二名法： **Danio rerio**

界： 动物界

门： 脊索动物门 **Chordata**

亚门： 脊椎动物亚门

纲： 辐鳍鱼纲 **Actinopterygii**

亚纲： 新鳍亚纲

目： 鲤形目 **Cypriniformes**

科： 鲤科 **Cyprinidae**

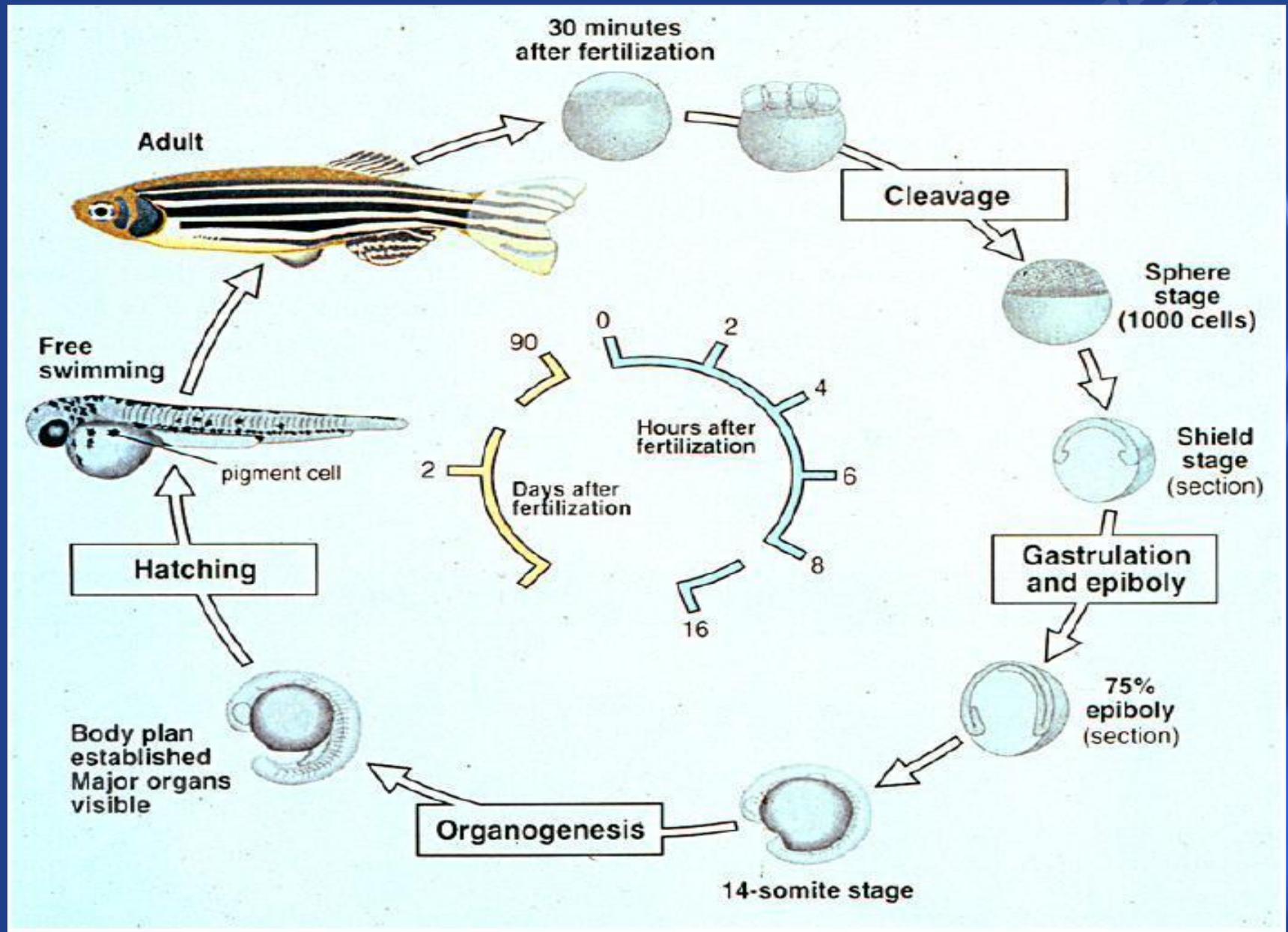
属： (鱼丹)属 **Danio**

种： 斑马鱼 **D. rerio**

分布区域： 孟加拉、印度、巴基斯坦、缅甸、尼泊尔的溪流



斑马鱼的生长周期



什么是模式生物？

为什么斑马鱼可被用作模式生物？

用斑马鱼作为模式生物可以研究哪些问题？

什么是模式生物？

模式生物（**model organism**）是指受到广泛研究，对其生物现象有深入了解的物种。根据从这些物种所得的科学研究结果，可以归纳出一些涵盖许多生物的模式，并应用在各领域的研究。

脊椎动物

非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)

斑马鱼(*Danio rerio*)

鸡(*Gallus domesticus*)

小鼠/大鼠mouse(*Mus musculus*);

rat (*Rattus norvegicus*)

猴子

无脊椎动物

海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)

线虫(*Caenorhabditis elegans*)

黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)

植物

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)

玉米(*Zea mays*)

金鱼草 Snapdragon (*Antirrhinum*)

水稻 rice (*Oryza sativa*)

烟草 tobacco (*Nicotiana tabacum*)

短柄草 slender false brome grass; (*Brachypodium distachyon*)

模式生物的选择与应用:

模式生物的选择上，要考虑到生物的多胎性、生命周期长短、生物体型或胚胎大小是否利于观察、品种特异性、能供大部分研究者使用及交流、能精确控制疾病或病变的再现性。

动物模式可应用于癌症、糖尿病、高血压或其他疾病研究，近年的动物模式也应用于致癌原或环境毒物对人类的影响。

斑马鱼(zebrafish)作为模式生物，具有以下几个优势

✓ 成鱼个体小，方便饲养；

斑马鱼成鱼体积小，仅3-4cm；繁殖周期较短，一般只需3个月；养殖成本低。

✓ 发育快、繁殖能力强；

受精24小时后，主要器官已经形成，脑室、眼睛、耳和体节等清晰可见，相当人类第28天的胚胎，3个月可达到性成熟。雌鱼每周产300枚卵，易获取大量的卵用于胚胎学和大规模的突变实验。

✓ 体外胚胎发育方便观察和操作

胚胎直径500μm，发育在母体外进行；头3天内完全透明，3-7天半透明，发育快、繁殖能力强因而在解剖显微镜下可以直视胚节分化和细胞迁移。

✓ 拥有较完善的胚胎和遗传学操作技术

可以很方便地进行细胞标记和细胞谱系跟踪、胚胎的细胞移植；培育单倍体，基因组倍增；在基因功能研究方面，已发展了转基因技术、基因过量表达，体细胞克隆等技术。

斑马鱼(zebrafish)作为模式生物，具有以下几个优势：

✓ 适于用来研究人类疾病

斑马鱼属于脊椎动物且生长发育过程和组织系统结构与人类有很高的相似性，斑马鱼和人类基因有着87%的高度同源性，两者在基因和蛋白质的结构和功能上表现出较高的保守性，可以作为研究人类疾病发生机理的优良模式生物。

- 研究发现斑马鱼gridlock突变体表现与人类先天性动脉血管收缩症类似；Drummond等发现doublebubble突变体的表型类似于人类常染色体显性多囊肾病的症状，Hopkins教授鉴定了11种发生多囊肾的斑马鱼突变体；Fleer 和elipsa突变体表现出肾，眼发育不良，类似于人类Senior-Loken综合症；sapje突变体是人类肌无力的模型。另外，斑马鱼成为肿瘤研究的动物模型，而且还是唯一的脊椎动物高通量药物筛选模型。

药物毒理学中的应用

斑马鱼胚胎和幼鱼对有害物质非常敏感斑马鱼模型现已广泛应用于包括急性毒性、发育毒性与致畸性、胚胎毒性、心血管毒性、肝毒性、神经毒性、肾毒性、行为毒性和生殖毒性等在内的一系列药物毒性评价中。

肿瘤学研究中的应用

致癌剂处理斑马鱼，如使用亚硝基二乙胺诱导肝癌和胰腺癌或采用亚硝基二甲胺诱导肝癌发生；体内移植哺乳动物肿瘤细胞系，结合斑马鱼胚胎透明的特点，可实时观察肿瘤细胞浸润转移以及生成新生血管的动态过程。

血液恶性肿瘤学研究中的应用

斑马鱼已成为良好的血液肿瘤学模型，在这些模型基础上能筛选影响肿瘤进程的特定疾病相关基因，如影响肿瘤的发生、细胞特异性、疾病进展速度和肿瘤转移过程等的基因，进而寻找抑制肿瘤的相关机制，从而加深对血液肿瘤治疗的认识。

实验目的：

通过斑马鱼胚胎早期发育的动态观察，
了解斑马鱼胚胎卵裂到胚层形成的形态变化特征，
加深对模式生物胚胎发育分期的理解。

斑马鱼胚胎早期发育分期的简单介绍

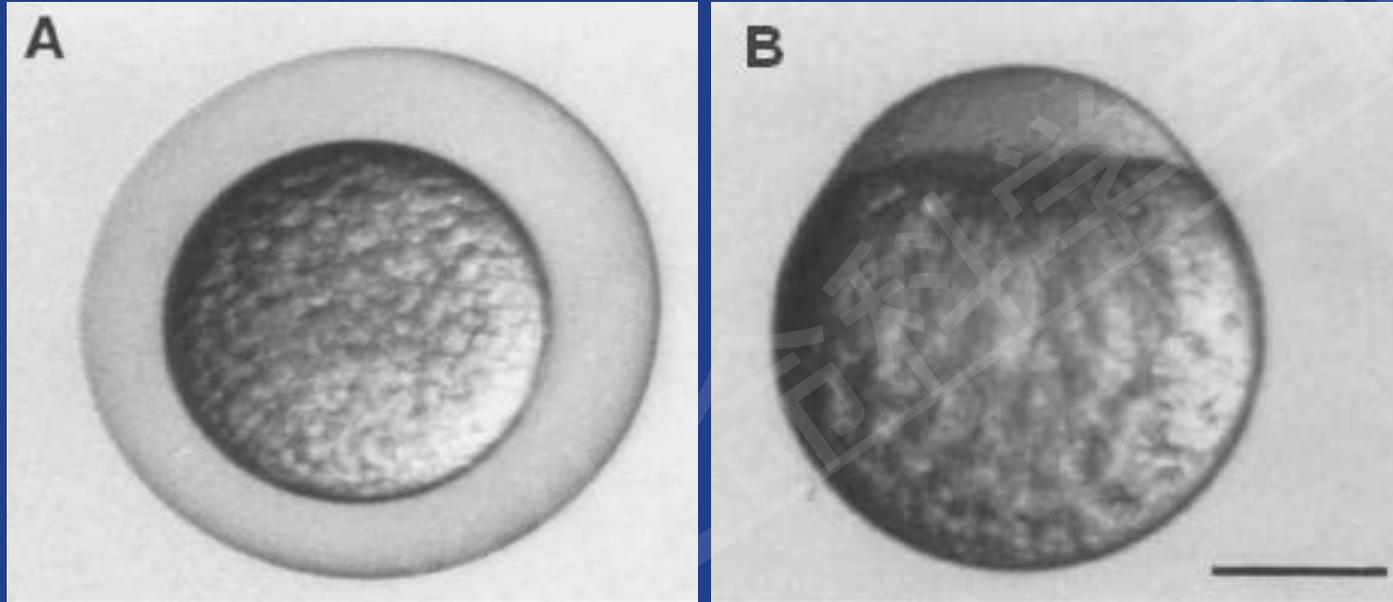
斑马鱼胚胎发育的分期信息在有些情况之下也被记录为“标准发育时间”，常用字母h表示，h 代表的是斑马鱼胚胎在 28°C 这个适宜温度孵育下受精后的小时数，在研究文献中有时以hpf (hours post fertilization) 来描述胚胎发育的时期。

1. 受精卵期 (0~0.75 h)
2. 卵裂期 (0.75~2.20 h)
3. 囊胚期 (2.20~5.25h)
4. 原肠胚期 (5.25~10 h)
5. 体节期 (10~24h)
6. 咽囊期 (24~48h)
7. 孵化期 (48~72h)

早期胚胎发育

- **卵裂**：受精卵分裂形成一定数量分裂球的过程。
 - 完全卵裂：
 - 不完全卵裂：端黄卵、中黄卵。包括盘裂（头足类、硬骨鱼类、爬行类、鸟类）、表面卵裂（昆虫）。
- **囊胚的形成**：分裂球形成一个中空的球的过程。
- **原肠胚的形成**：囊胚通过细胞迁移而分化成2胚层的过程。
- **神经胚（中胚层和体腔）的形成**：由原肠胚中预定的神经外胚层细胞形成神经管的过程。
- **器官发生（胚层分化）**：器官形成。

斑马鱼卵裂的特点简介

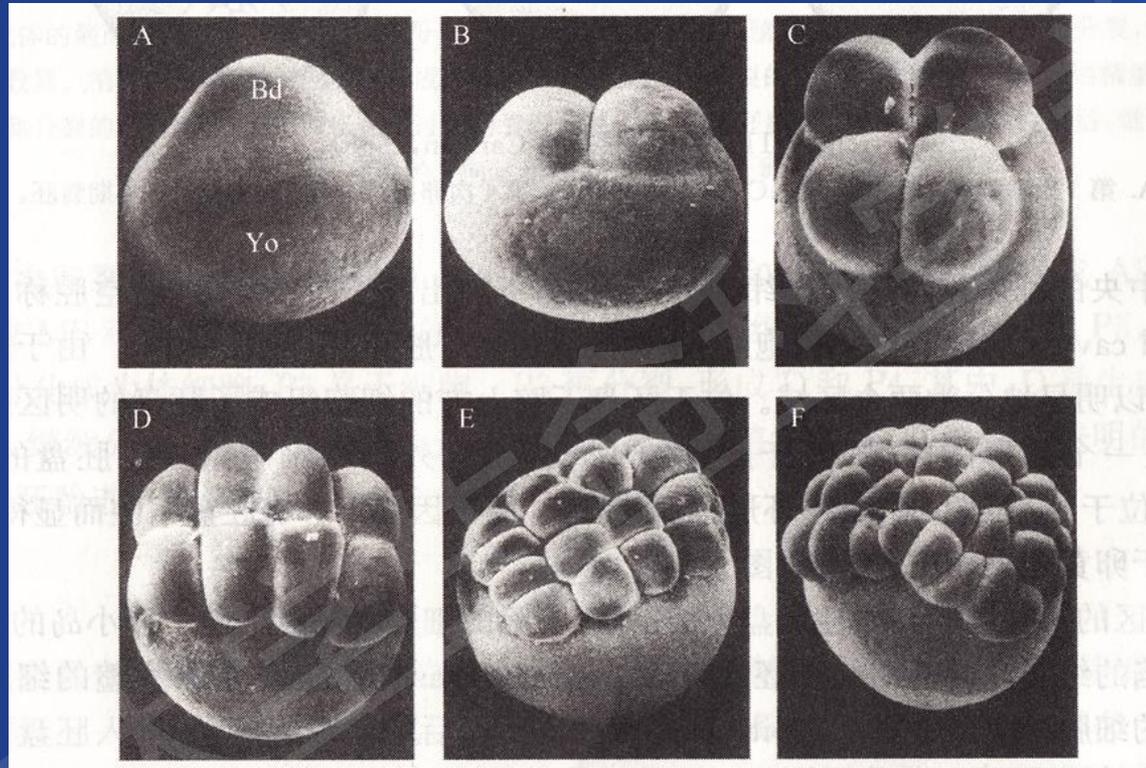


受精卵期。（Kimmel C, et al, 1995）

A: 受精后数分钟，卵膜膨胀。**B:** 受精后约10分钟，动物极朝上的去卵膜受精卵。非卵黄胞质开始分离进入动物极。
比例尺=250 μ m

卵裂是受精后进行的一系列特殊的有丝分裂。

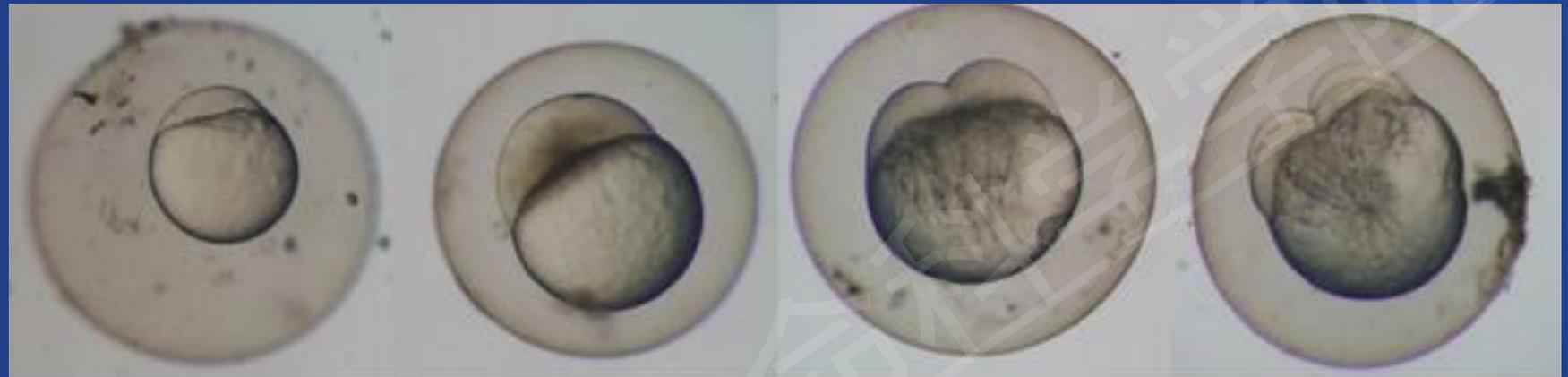
斑马鱼卵裂的特点简介



斑马鱼的盘状卵裂过程（Gibert and Raunio, 1997）

A: 受精后胚盘突起； **B:** 2 细胞期； **C:** 4 细胞期； **D:** 8 细胞期；
E: 16 细胞期； **F:** 32 细胞期； **Bd,** 胚盘； **Yo:** 卵黄

斑马鱼卵裂的特点简介

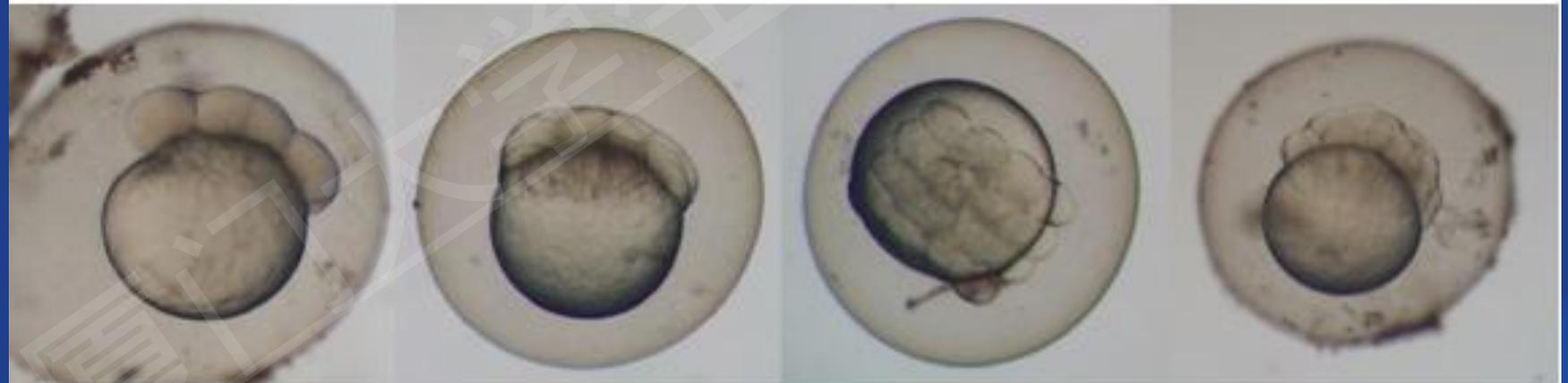


zygote

1-cell

2-cell

4-cell



8-cell

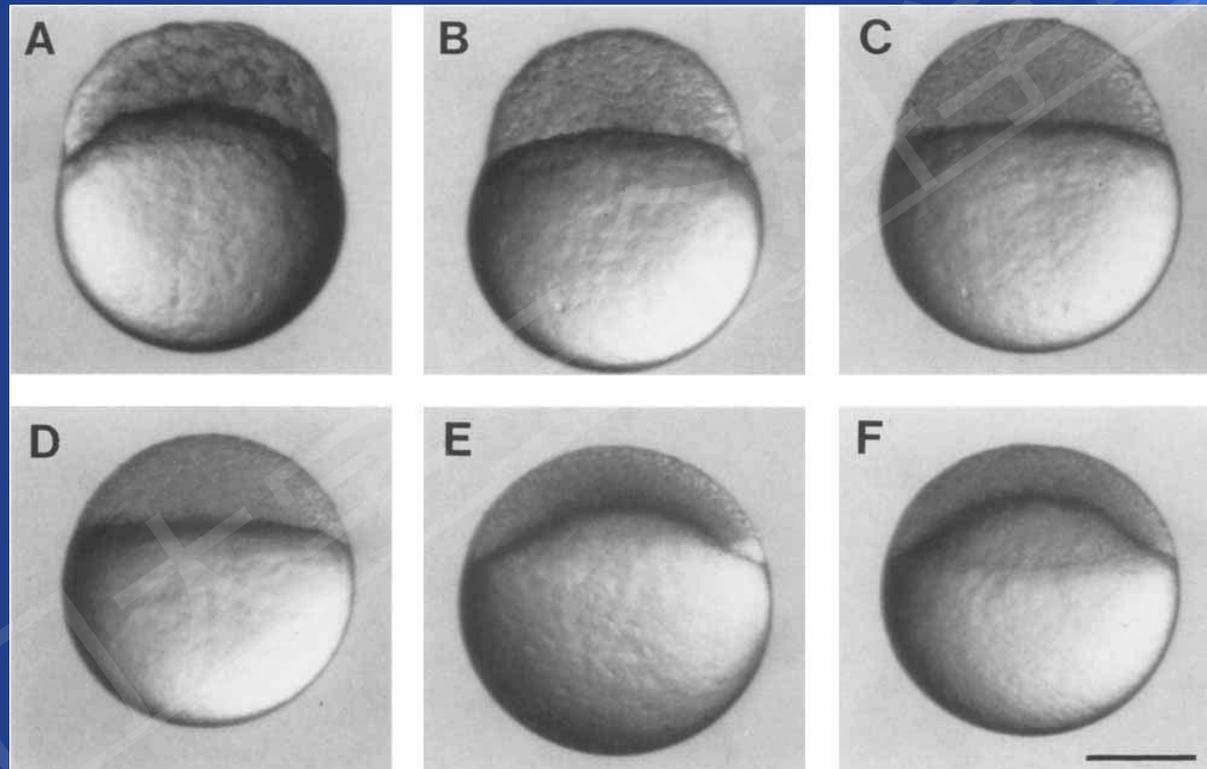
16-cell

16-cell

32-cell

斑马鱼囊胚发育的特点简介

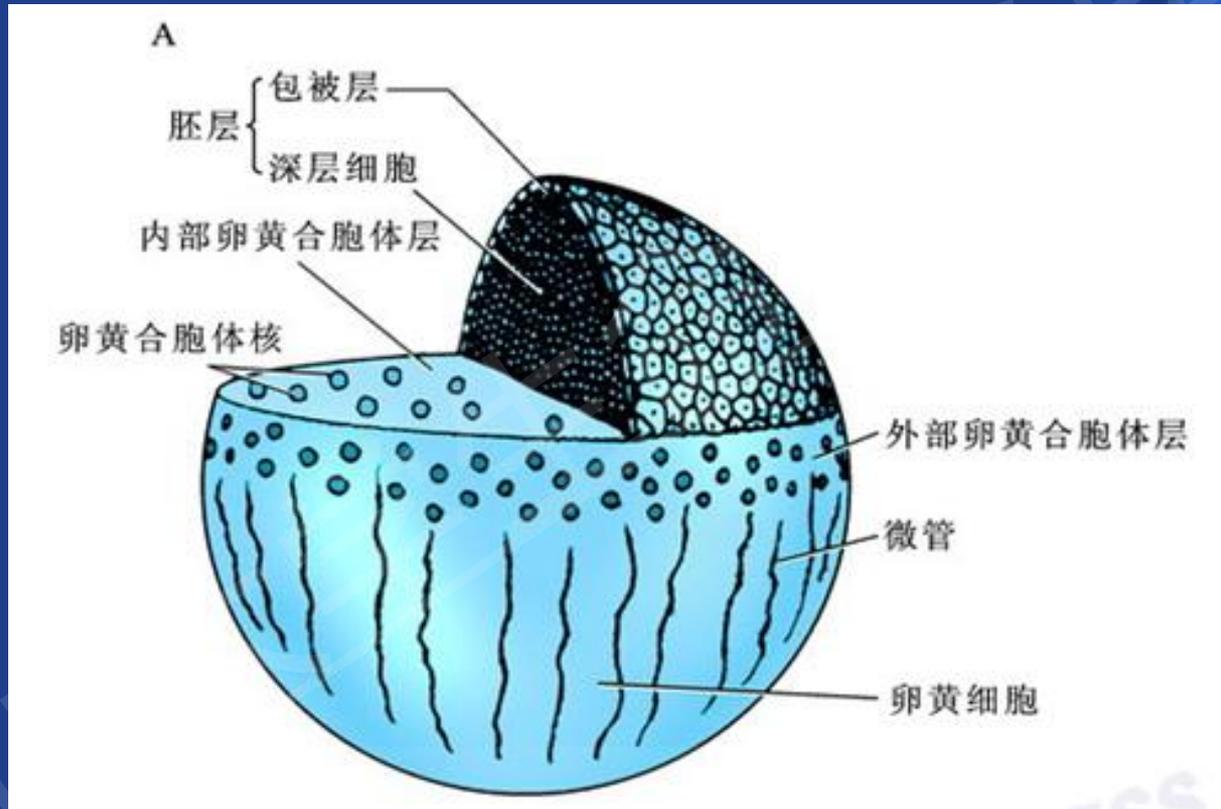
囊胚期指从**128-细胞期**或**第8次合子细胞分裂**开始形成球形胚盘直到**第14次卵裂**开始原肠期为止这一段时期。



囊胚期胚胎正面观。

A: 256-细胞期 (2.5h) ; B: 高囊胚期 (3.3h) ; C: 高囊胚期和椭圆形期之间的转变 (3.5h) ; D: 椭圆形期和球形期之间的转变 (3.8h) ; E: 穹顶期 (4.3h) ; F: 30%-外包期 (4.7h) 。比例尺=250 μ m

斑马鱼胚胎囊胚中期转变形态特征



斑马鱼囊胚发育的特点简介

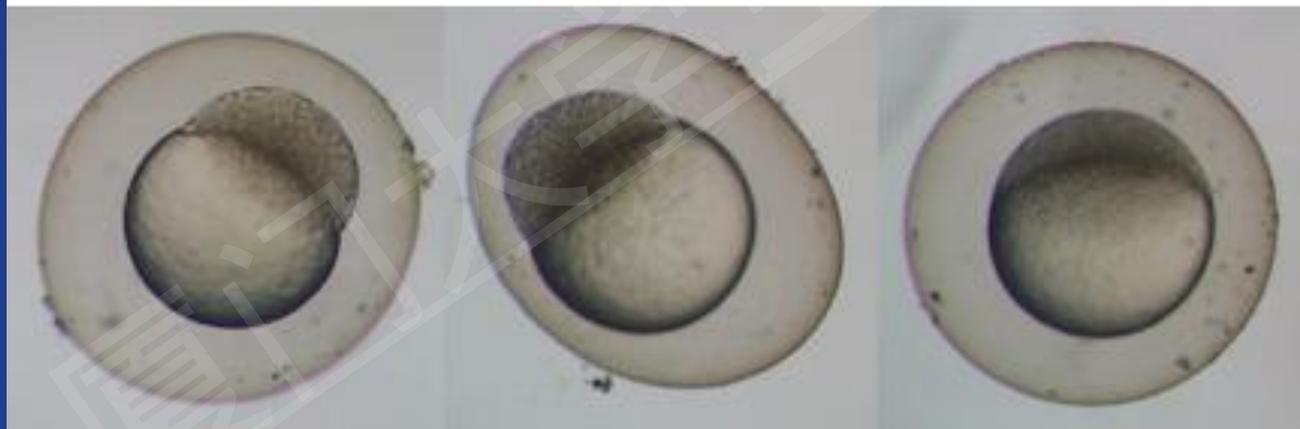


64-cell

128-cell

256-cell

512-cell



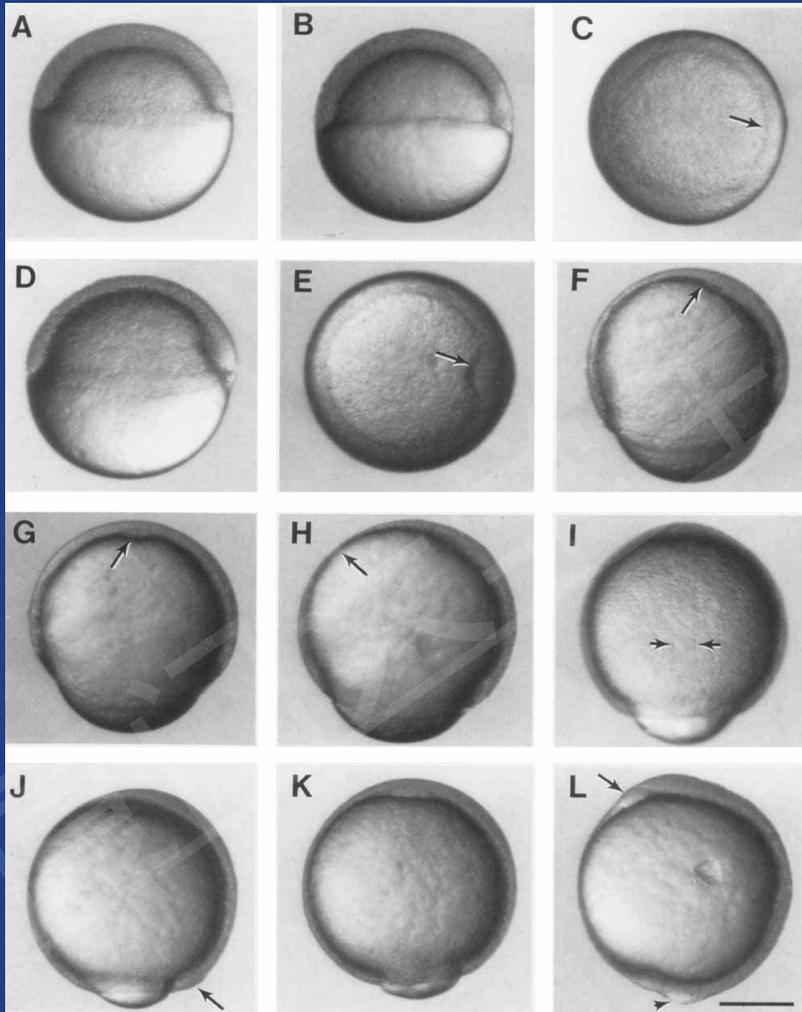
1K-cell

2K-cell

oblong

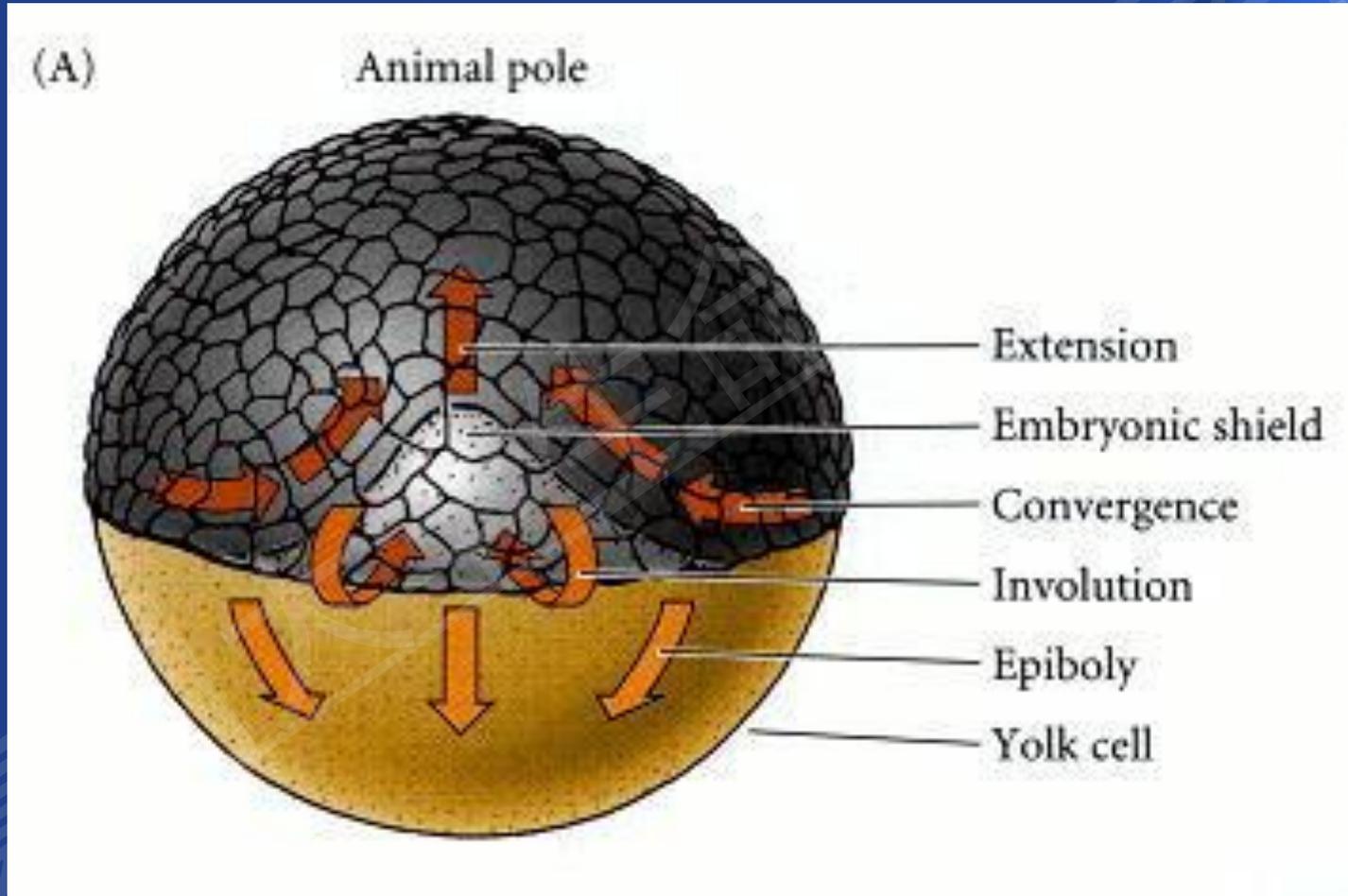
斑马鱼原肠胚发育的特点简介

外包运动的继续，以及形态发生细胞的内卷（involution）、集合（convergence）和延伸（extension）运动的发生，产生了原始胚层和胚轴。

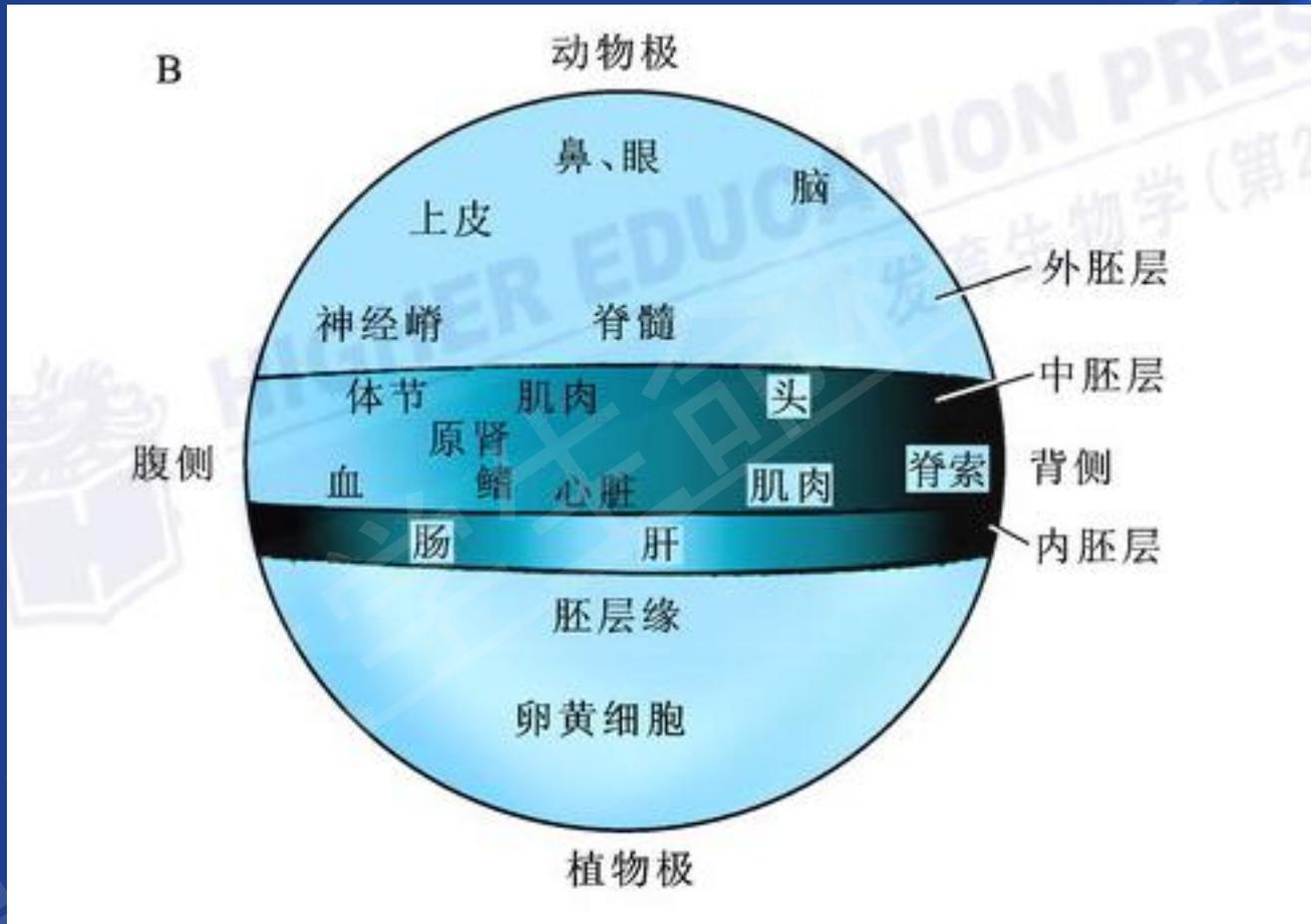


- A: 50%-外包期 (5.25h)**
- B: 胚环期 (5.7h)**
- C: 动物极观胚环期, 箭头指示胚环**
- D: 胚盾期 (6h), 胚盾标志背侧, 是胚环左侧增厚区域**
- E: 动物极观胚盾期, 箭头指示胚盾**
- F: 70%-外包期 (7.7h)**
- G: 70%-外包期腹侧观**
- H: 75%-外包期 (8h)**
箭头示腹侧薄的排泄区
- I: 80%-外包期 (8.4h) 背侧观,**
箭头示轴中胚层与中线边界
- J: 90%-外包期 (9h)**
在一些胚胎中可见尾芽
- K: 90%-外包期腹侧观**
- L: 尾芽期 (10h), 箭头示小膨出,**
短箭头尾芽

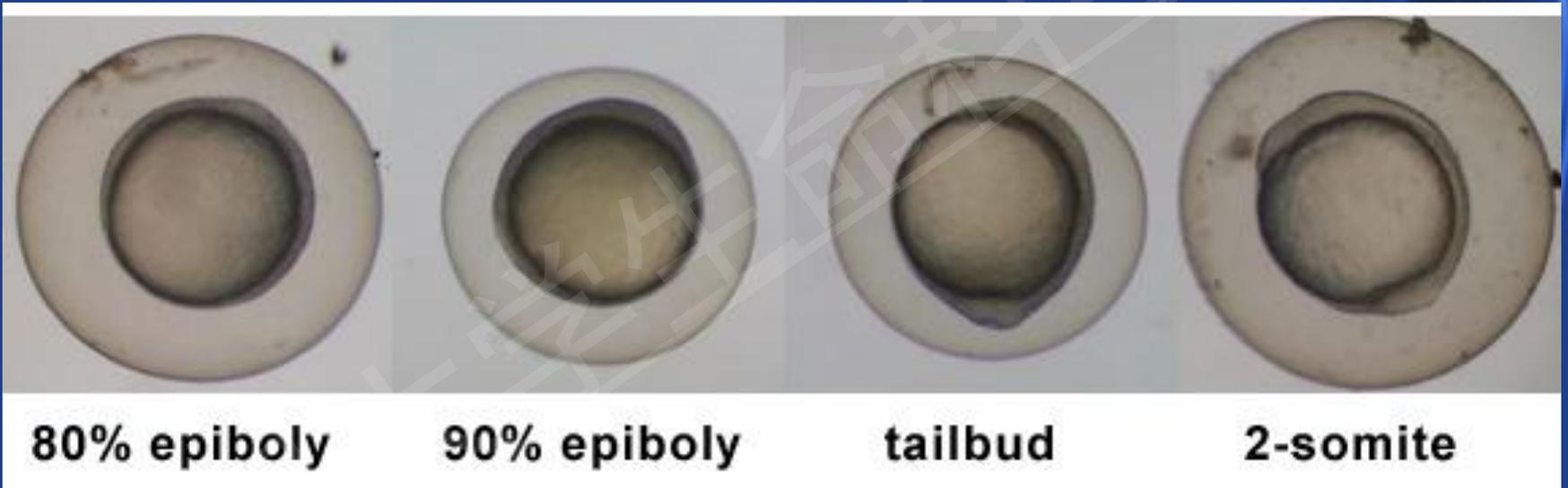
斑马鱼囊胚—原肠胚发育的特点简介



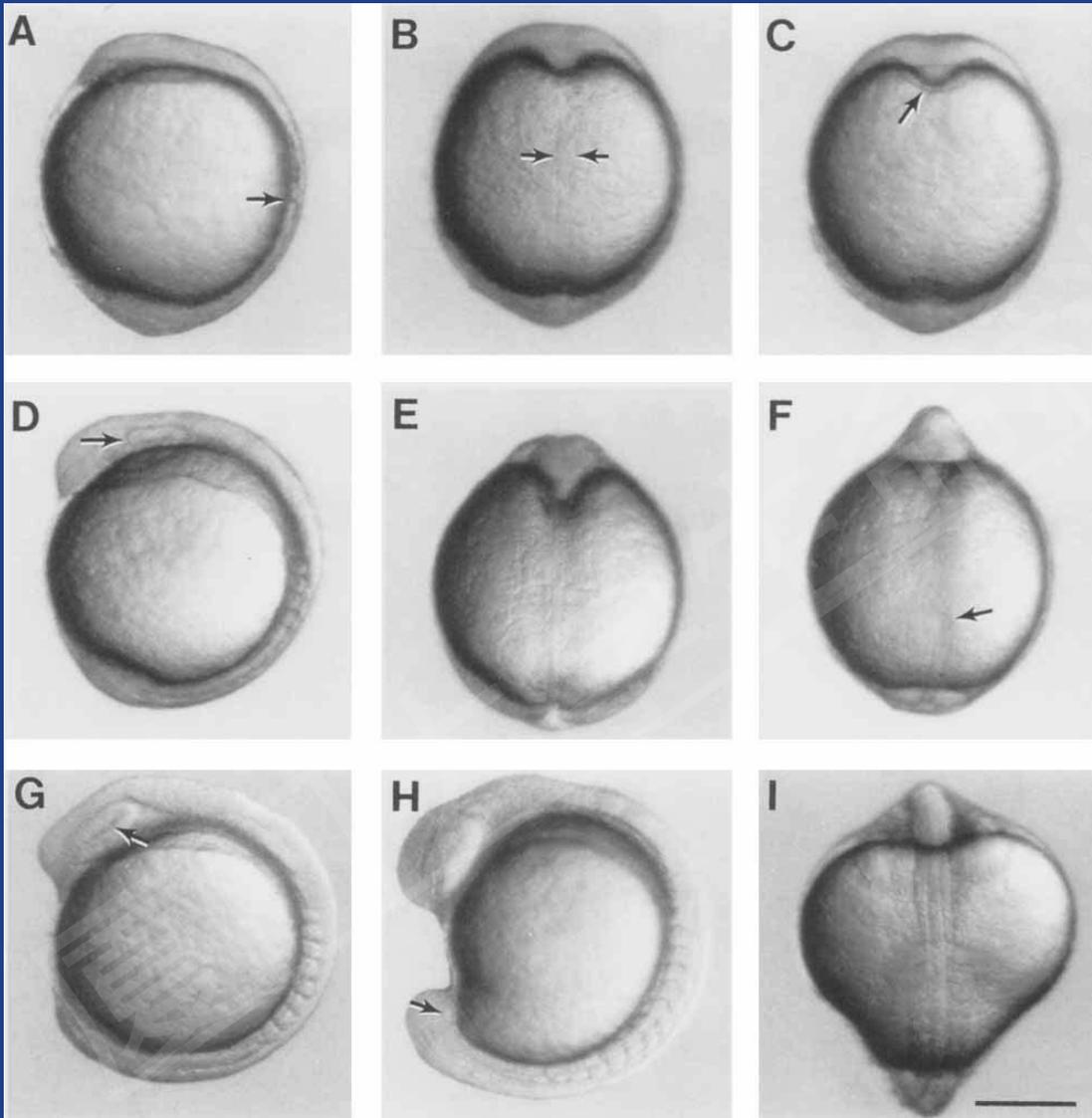
斑马鱼原始胚层和胚轴产生示意图



斑马鱼原肠胚—体节期发育的特点简介

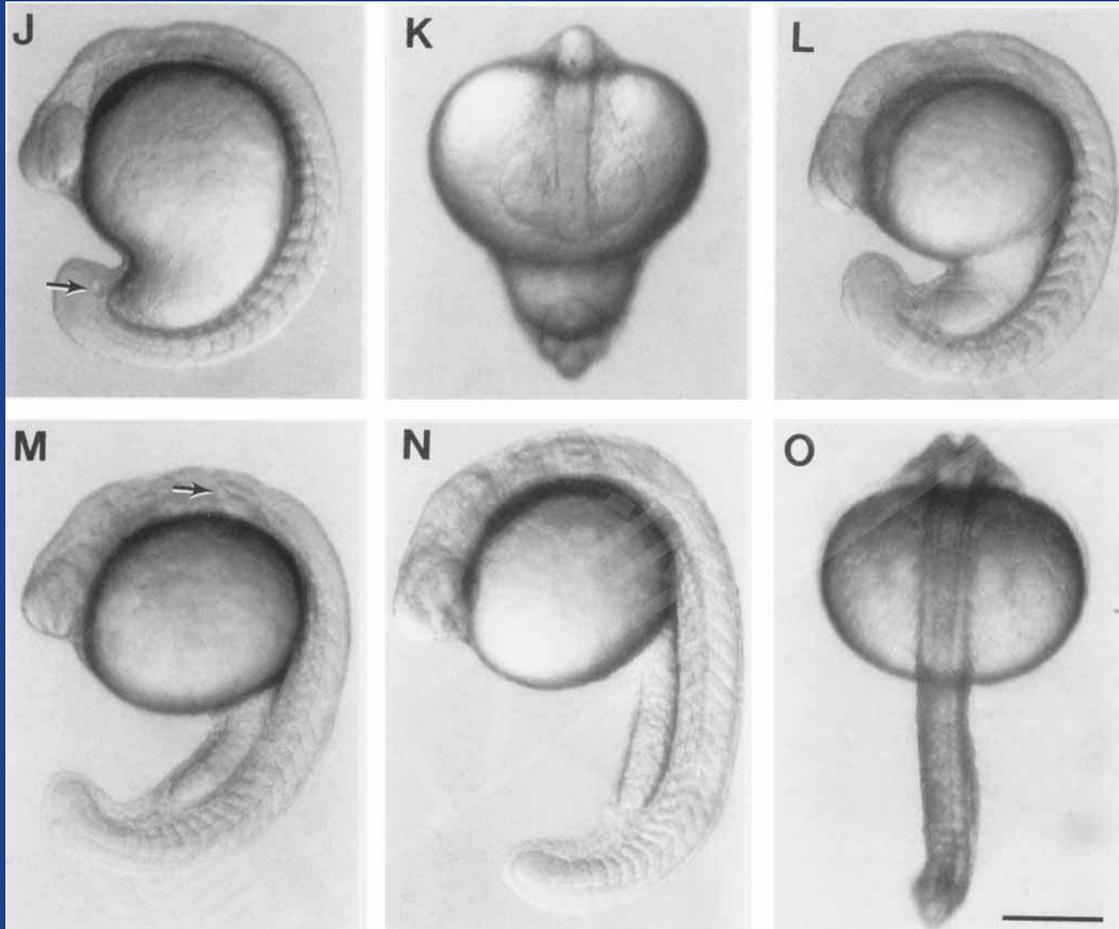


斑马鱼胚胎体节期发育特点简介



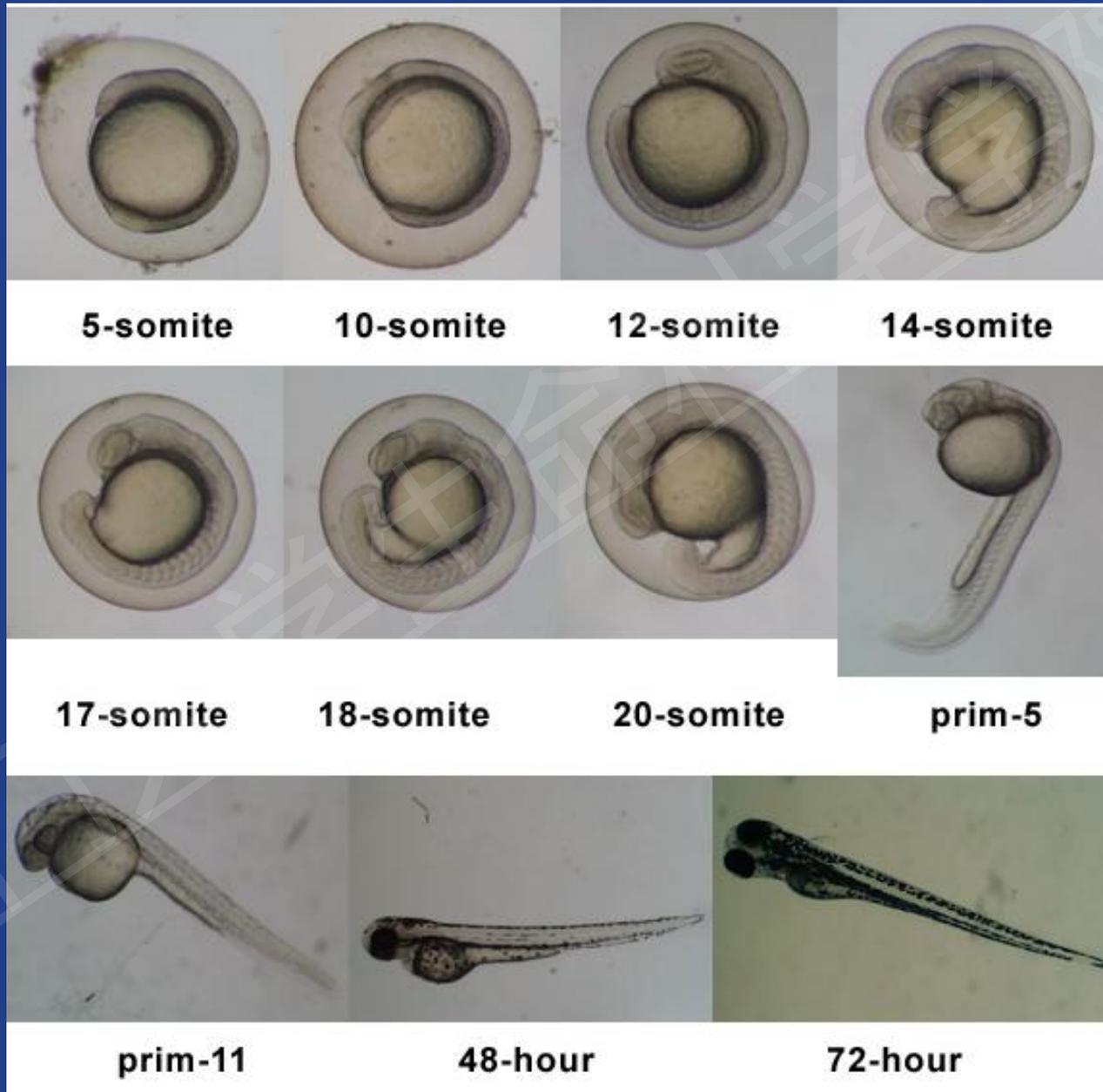
除特别标注外均为左侧观，前侧朝上，背侧朝左。**A: 2- (10.7h)**，箭头示第2体节后界，此期第1体节正在形成前界；**B: 2-**，背侧观，两箭头之间为脊索原基，第1体节水平前侧；**C: B-**，腹侧观，箭头示小膨出；**D: 4- (11.3h)** 眼原基开始出现（箭头所示）；**E: D-**，背侧观，聚焦于第2, 3体节边界水平的脊索，注意到顶部的脑原基和下面的轴中胚层如何在中线明显切割卵黄；**F (11.7h)**，腹侧观，聚焦于新形成的**Kupffer囊**（箭头所示）；**G: 8- (13h)**，眼原基由明显的水平折痕（箭头所示）**H: 13- (15.5h)**，体节开始形成**V形**。

斑马鱼胚胎体节期发育特点简介

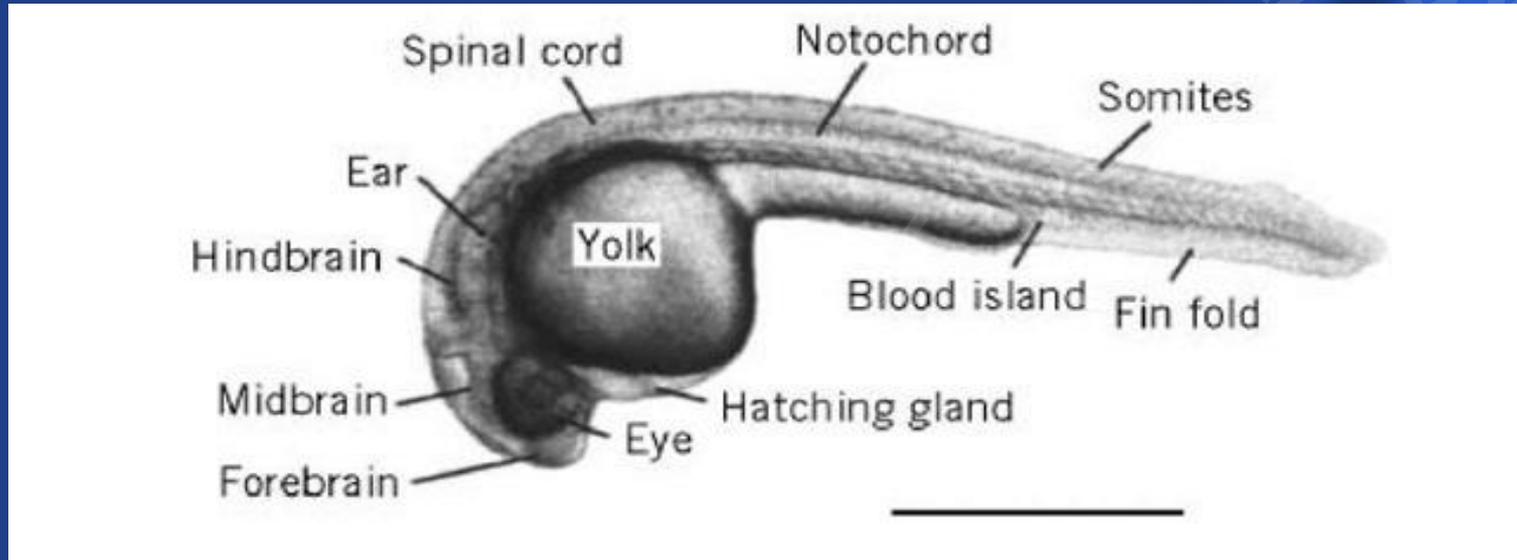


J: (16.5h), 箭头示 Kupffer囊; **K:** J 背侧观, 示眼原基, Kupffer囊也在焦点附近; **L:** 17-(17.5h), 耳基板开始中空, 随尾部伸出, 卵黄延伸部明显突出于卵黄; **M:** (19h), 箭头示耳囊; **N:** (21.5h), 端脑 (telencephalon) 在神经轴 (neuraxis) 前端背侧显著; **O:** N 背侧观, 顶部显示后脑第四脑室。

斑马鱼胚胎体节期发育特点简介



斑马鱼胚胎体节期发育特点简介



体节期后期斑马鱼胚胎的形态概况

如何取得斑马鱼胚胎？



影片?!

性别特征

雌性斑马鱼



雌鱼鱼体较肥大，体色较淡，偏蓝，臀鳍呈淡黄色，怀卵期鱼腹膨大明显。

雄斑马鱼鱼体修长，鳍大，体色偏黄，臀鳍呈棕黄色，条纹显著。

雄性斑马鱼



材料与器具

(一) 材料

新生的斑马鱼胚胎，囊胚期和原肠期的斑马鱼胚胎，体节期斑马鱼胚

(二) 器具

体视显微镜、28℃ 恒温生化培养箱，解剖针，90mm 塑料培养皿，一次性塑料滴管，烧杯，24孔培养皿，铅笔(HB 或 2B)。



基本配置



目镜

升降机构

上光源

镜体

黑白台板

调光手轮

底座



1. 双目镜筒中的左右两光束不是平行的，而是具有一定的夹角——体视角（一般为 $12^{\circ} \sim 15^{\circ}$ ），因此成像具有三维立体感；
2. 像是直立的，便于操作和解剖，这是由于在目镜下方的棱镜把像倒转过来的缘故；
3. 虽然放大率可高达**200**倍左右，但其工作距离甚长，在物镜前加上附加镜后，工作距离可达**200mm**；
4. 焦深大，便于观察被检物体的全层，在低倍率下，焦深可达**5.6mm**；
5. 视场直径大，在低倍率情况下可达**65.7mm**左右。

实验内容以及步骤

(一) 斑马鱼胚胎卵裂的观察

实验步骤：用一次性塑料滴管移取新生的斑马鱼胚胎约**20**枚，置于**90**毫米的塑料培养皿中，加入约**30**毫升的海盐培养液，在体视显微镜下观察新生斑马鱼的卵裂现象。观察斑马鱼胚胎从**2**个细胞到**16**个细胞分裂的卵裂过程，对每次分裂的形态变化进行作图记录。

实验内容以及步骤

(二) 辨别斑马鱼胚胎早期发育不同时期的形态特征

一对斑马鱼成鱼断断续续产了一些斑马鱼胚胎，这些胚胎被收集之后发现他们所处的发育时期有些参差不齐，请根据斑马鱼胚胎从囊胚期到原肠期不同发育时期的形态特征，将这些胚胎按不同的发育时期进行分类，并把这些胚胎按发育从早到晚的顺序放在一个**12孔**培养板的同一横排中，每个孔代表其中一个时期，每个时期放入3~5枚胚胎即可。请作图记录你所放入的胚胎的形态，并标出这些胚胎的发育期，简要说明你分辨这些发育时期的依据。



请注意：请用写名字的纸条标记，不能直接标记在多孔板的盖子上。

实验内容以及步骤

youngest	1	2	3	4	5	6	oldest
----------	---	---	---	---	---	---	--------

1	2	3
4	5	6

实验内容以及步骤

(三) 体节期斑马鱼胚胎的器官发育观察

实验步骤: (1) 将**24hpf** 时期的胚胎置于含有三甲卡因的海盐培养液中麻醉**10**分钟, 用镊子除去 斑马鱼胚胎的卵膜, 在体视镜下观察体节期斑马鱼的眼睛、耳孔、心脏、肌节等器官的发育状况, 并绘图记录。

(2) 观察**24hpf** 时期的斑马鱼胚胎的心跳情况, 测量**24hpf** 时期的胚胎每分钟的心跳次数。建议测量**2~3** 个胚胎, 每个胚胎至少测量两次, 并计算其平均值, 记录。同时也测量实验组内每个成员每分钟的心跳次数, 进行比较。

实验注意事项

- ◆解剖针的尖端非常尖利，使用时请小心，不能拿着解剖针玩闹，解剖针接触培养皿时不要用力刮擦，以免留下划痕。
- ◆若培养培养盐水滴落到实验台以及体视镜，请及时擦拭。
- ◆实验结束后，不用的胚胎请集中倒于指定的烧杯，然后用自来水冲洗，开盖倒置于白搪瓷盘。
- ◆12孔培养板的实验结果应请老师和教辅检查并记录才可离开。