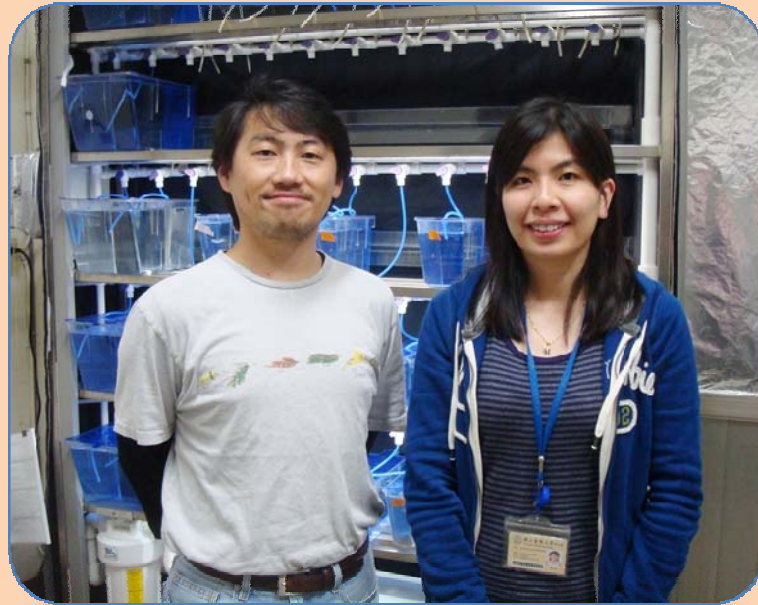


以斑馬魚為模式生物

劉逸軒/台灣大學動物科學技術學系助理教授

謝嘉珊/台灣大學基因體與系統生物學學位學程博士班



斑馬魚 (*Danio rerio*) 是一種熱帶淡水魚，原產於東南部的喜馬拉雅地區的河流，包括印度，巴基斯坦，孟加拉國，尼泊爾，和緬甸。它出現在印度東部恒河地區，通常棲息於溪流，運河，溝渠，池塘。目前斑馬魚已被引進到許多國家，如美國、日本、菲律賓等地。牠的體色為銀色或金色，覆蓋著一些藍色或紫色的橫紋，這些橫紋從頭部延伸至尾鰭的後端，臀鰭和尾鰭上同樣也有這種條紋，背部呈淺橄欖黃。雄魚比雌魚更修長，但略小一些。體長可達3.8公分。有許多人工培養的品種。牠是一種觀賞魚，而在科學研究中，也是一個重要的脊椎動物模式生物，斑馬魚一共有25對染色體，其基因組已於2009年定序完成，有 1.7×10^9 個鹼基，可以在ZFIN (The Zebrafish Model Organism Database) 這個資料庫搜尋到完整的資訊。



被選為模式生物的原因[1]

- 1.斑馬魚在胚胎及幼魚階段全身透明，肌肉、心臟、肝臟、腸道、血管、血球和內臟在解剖立體顯微鏡下清楚可見。
- 2.斑馬魚的發育過程、器官構造、生理功能、基因結構等都與哺乳類動物非常相近。
- 3.斑馬魚易於飼養，生長溫度大約在 $25-30^{\circ}\text{C}$ 之間，且易於繁殖，產卵無季節性，可利用人為調控光週期使雌魚產卵，每次可達數百顆。此次至下次產卵只需 3-6 天，為體外受精。
- 4.可以進行forward genetics研究(利用ENU誘導產生突變體)，以及reverse genetics研究(利用Morpholino降低或剔除基因表現)。
5. 可進行藥物篩選[2]。



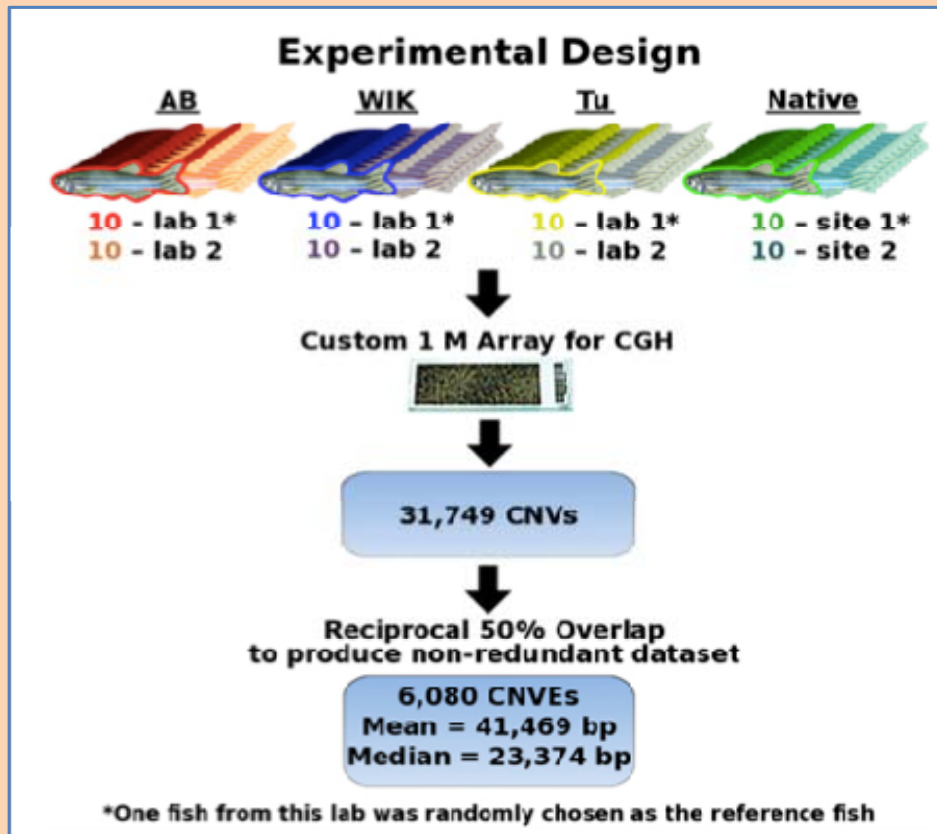
Cover image: Zebrafish (pictured) are a model organism for studying human disease, although the extent of genetic variation between commonly used laboratory strains is not well understood. Kim H. Brown et al. found a high level of copy number variants (CNVs)—gains and losses of large sequences of DNA—among fish representing three commonly used laboratory strains. About 70% of all identified CNVs appeared to be strain-specific. The authors suggest that the extensive genetic variation within and among strains may have functional effects that could potentially confound studies intended for translation to human diseases. See the article by Brown et al. on pages 529–534. Image courtesy of William T. Lester (Massachusetts General Hospital, Boston) and Charles Lee.

From the Cover

- 529 Structural genetic diversity among zebrafish
- 378 Microfluidics technology and drug screening
- 443 Ionizing radiation and DNA repair
- 478 Engineering carbon-fixing compartments
- 582 Circadian control of immunity

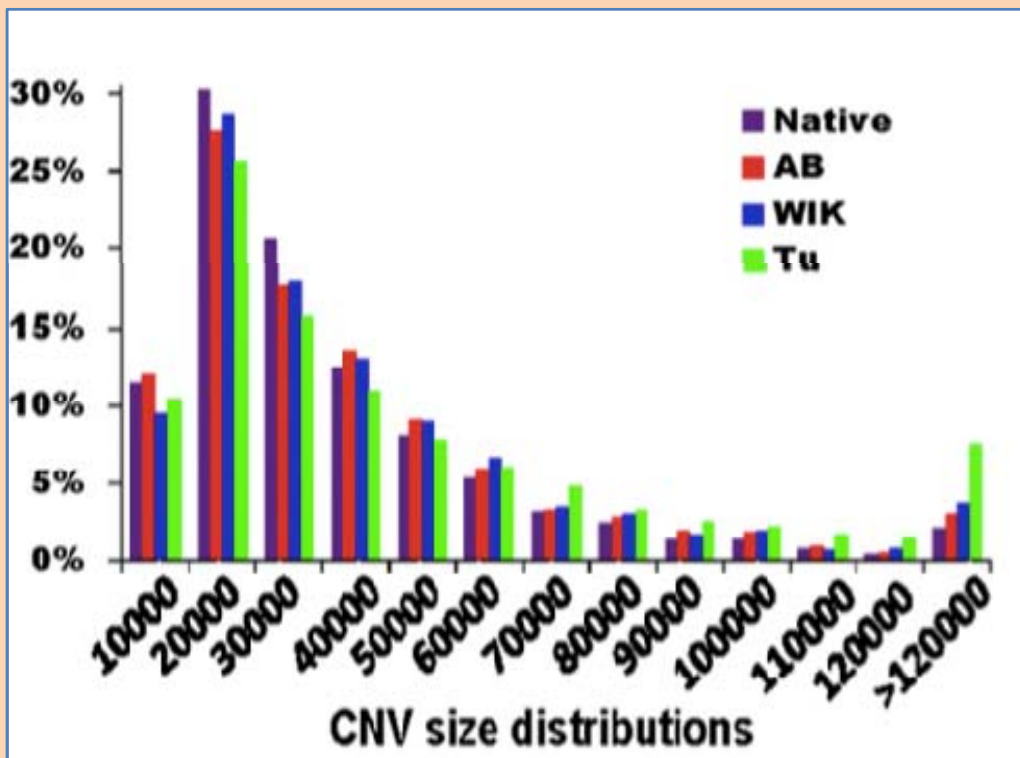
圖一：2012年1月10日出版的PNAS期刊封面。

2012年1月10日出版的PNAS期刊，以斑馬魚為封面，內容涵蓋多篇以斑馬魚為模式之研究報告。其中封面所引用之研究報告，針對目前在實驗室中所使用的斑馬魚品系 (AB, WIK, TU) 以及原生種 (Native) 的斑馬魚，利用 **array-based comparative genomic hybridization (aCGH)** 的方法對於 **copy number variations (CNVs)** 進行分析[3]。目的是想要了解，不同品系之斑馬魚之間，是否在遺傳基因上存有結構性的重要差異，進而讓我們可以更清楚的了解實驗室所使用的斑馬魚品系的基因組歧異度。**Comparative genomic hybridization (CGH)** 是利用兩種不同的螢光分別標定兩種不同的 **Genomic DNA**，再同時與正常的染色體進行 **hybridization**，藉由比較染色體上不同螢光間的強弱比值，而偵測基因體中之特定基因的拷貝數差異 (**copy number changes**)。**Array-based comparative genomic hybridization (aCGH)** 之基本原理與 **CGH** 相同，但是將原有的染色體雜交模板替換成微陣列式，可大幅提升 **CGH** 之解像力到 **5-20kb**。**Copy number variations (CNVs)** 指的是基因組裡的序列可能會有部分區域是重複的 (**duplication**)，或是缺失 (**deletion**)，這種遺傳基因序列上的結構性差異與基因表現有關，進而影響到個體的外表型，以人類基因組而言，目前已知 **CNVs** 與許多人類的疾病有相關性[4]。

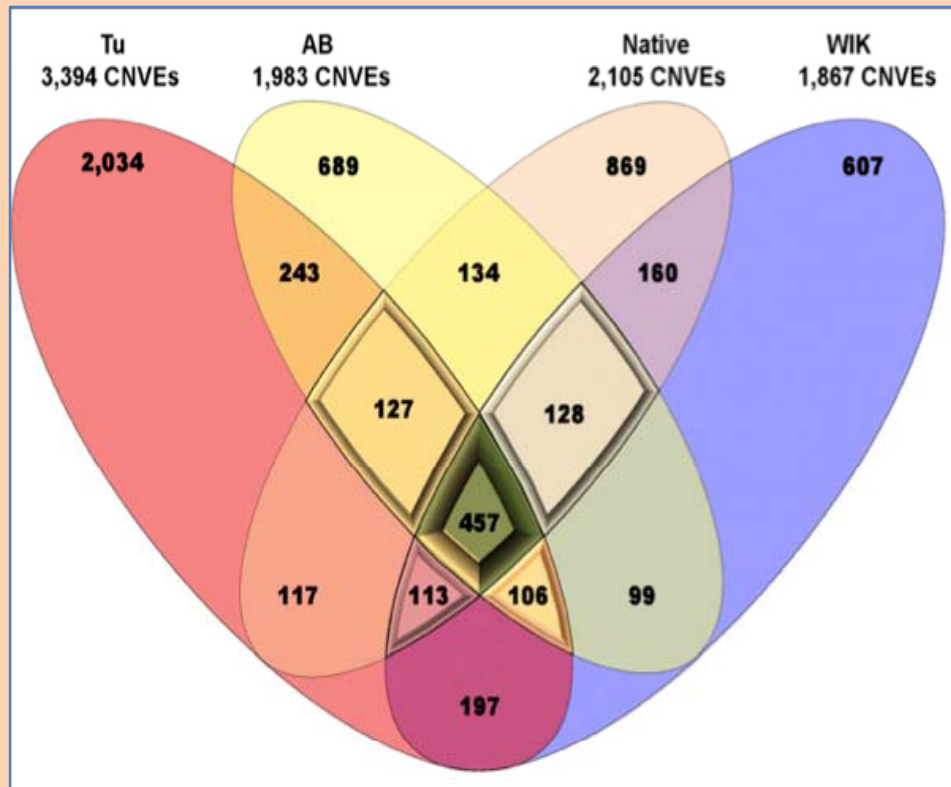


圖二: 實驗設計流程圖 [3]

該篇研究選擇AB,WIK,TU以及Native品系為研究對象（圖二），每個品系分別從兩個不同實驗室，隨機選擇10隻斑馬魚，也就是每一品種一共有20隻魚進行CNVs分析，一共分析了31,749個CNVs，經過扣除掉序列重複的部分，一共分析了6,080個CNVEs。這些序列長度平均值為41,469 bp，而序列長度的中間數為23,374 bp。實驗的結果如圖三和圖四：



圖三：CNV片段大小分佈以及所佔的百分比[3]



圖四：CNVEs在各品種間的數目以及重複情形[3]

由其結果可以得知，CNVs序列長度的分佈可從10,000bp至120,000bp，甚至大於120,000bp，大部份的序列長度約為20,000bp左右（也就是中間數23,374bp）(圖三)。而平均數高於中間數表示，斑馬魚CNVs的片段長度偏向長片段的分佈，並且在片段長度大於120,000bp的CNVs中，Tu品系的數目明顯高於其他三種品系。詳細分析這四種品系間CNVEs的數目以及重複情形，顯示Tu品系CNVEs數目最多，而從各品系之間CNVEs互相重複的情形看來，Tu與WIK間的差異最大(圖四)。

表一:分析CNVEs片段的位置與NCBI RefSeq基因的關係[3]

Strain	Genes	Whole gene	Intronic	5' UTR	3' UTR	Other*
AB	1,094	677	75	133	123	86
WIK	1,091	682	85	150	133	41
Native	955	629	92	107	82	45
Tu	2,151	1,401	95	290	254	111
Total	2,865	1,802	279	409	351	24

將6080個CNVEs在基因組中的位置，與NCBI Reference Sequence (RefSeq) genes進行比較(表一)，發現有2244個CNVEs (37%)可以與2865個NCBI RefSeq genes (19.4%)有同樣的片段。而在2865個基因中，有279個CNVEs是位在introns，剩下的2586個基因中，CNVEs是位在與5'UTR、3'UTR或是exons上，這些位置都有可能影響到相關基因的表現。

於2012年在PNAS發表的這篇文章中特別提及一篇發表於2004年的研究[3]，該研究表示不同品系的斑馬魚暴露在乙醇中，對發育所造成的影響會有不同[5]。作者認為會有這樣的結果，很有可能就是因為不同品系的斑馬魚，因為CNVs的關係以至於對於乙醇所造成的影響並不相同。若我們挑選出不同外表型的斑馬魚，進一步分析其CNVs，找出影響到外表型的候選基因，即可進一步釐清這些基因的功能。

目前針對人類的CNVs也有相當多的研究正在進行，我們也因此了解到CNVs對於藥物的治療以及致病的機轉會造成不同的情況發生，因此根據這篇研究的結果，使我們注意到在以斑馬魚為模式生物進行科學研究或是藥物篩選時，也必須考慮到CNVs所造成的影響。

參考文獻:

- 1. Graham J. Lieschke & Peter D. Currie. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. 2007. Nat. Rev. Genetics 8, 353-367**
- 2. Howard M. Stern and Leonard I. Zon. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. 2003. Nat. Rev. Cancer. 3: 1-7**
- 3. Kim H. Brown, Kimberly P. Dobrinski, Arthur S. Lee. Et al., Extensive genetic diversity and substructuring among zebrafish strains revealed through copy number variant analysis. 2012. PNAS. 109: 529-534.**
- 4. McCarroll SA, Altshuler DM. Copy-number variation and association studies of human disease. 2007. Nat Genet 39(Suppl 7):S37–S42.**
- 5. Loucks E, Carvan MJ, III. Strain-dependent effects of developmental ethanol exposure in zebrafish. 2004. NeurotoxicolTeratol. 26:745–755.**