

用 ENU 诱导斑马鱼突变的初步研究

金鹏 田甜 孙智慧 孟安明*

(清华大学生物科学与技术系发育生物学实验室, 北京 100084. * 联系人, E-mail: mengam@mail.tsinghua.edu.cn)

摘要 斑马鱼作为一种脊椎动物发育模型, 正越来越受到重视. 用 ENU 诱变的方法, 建立了 320 个斑马鱼 F₂ 家系. 通过对 F₃ 代胚胎的表型观察, 鉴定在外包、体轴、体节、头部、心血管系统等表现异常的突变体. 目前已获得 35 个突变品系, 其中以体轴和体节异常的突变体为主. 这些突变体斑马鱼品系的建立为克隆突变的基因、研究胚胎早期发育机制打下了良好的基础.

关键词 斑马鱼 ENU 诱变 突变体 筛选

多细胞生物的发育过程是复杂的, 通常要受到许多基因的表达产物的调控. 虽然一些物种的基因组草图已经完成, 我们仍然不知道这些物种中所具有基因的确切数目, 更不知道在胚胎早期发育中起决定作用的基因有多少. 从浩瀚的基因海洋中甄别出这些基因并了解它们的功能, 是当代发育生物学的重要任务之一. 要了解一个基因的功能, 不仅要知道其表达产物的结构和生化特性, 更应弄清该基因突变或缺失后对个体发育的影响. 通过人工诱变筛选突变体, 是研究基因功能的重要手段.

斑马鱼已成为研究脊椎动物胚胎发育机制的重要模式动物, 具有产卵多、性成熟周期短等优点, 是迄今最适合大规模诱变的脊椎动物^[1]. 其胚胎体外受精、体外发育, 而且透明, 容易在解剖镜下观察到早期发育缺陷. 1989 年, Kimmel 等人^[2]用 X 射线照射进行诱变, 获得了许多斑马鱼胚胎发育突变体. 但 X 射线照射会造成大段染色体缺失, 可使多个基因同时缺失, 难以确定真正引起突变表型的基因. 1994 年, 德国 Tübingen 研究所的 Nüsslein-Volhard 小组花了 2 年时间用 ENU (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, *N*-乙基-*N*-亚硝基脲) 对斑马鱼进行饱和诱变筛选^[3]. ENU 是一种化学诱变剂, 它通过对基因组 DNA 碱基的烷基化修饰, 诱导 DNA 在复制时发生错配而产生突变. 它主要诱发单碱基突变, 造成单个基因发生突变(双突变的情况非常少), 更接近于大多数的人类遗传性疾病的基因突变情况. 同时, ENU 的突变效率非常高, 可以达到 0.2%, 是其他突变手段的 10 倍左右, 而且这种突变是随机的, 不具有任何的倾向性, 所以适用于饱和诱变分析斑马鱼的功能基因组^[4].

虽然用 ENU 进行诱变筛选较容易获得许多突变

体, 但从这些突变体克隆出突变基因的难度较大. 随着斑马鱼基因组测序工作的完成及大量分子遗传标记的发现, 对突变基因进行定位和克隆逐渐变得相对容易. 鉴于目前国内还没有单位开展斑马鱼的 ENU 诱变研究, 本研究对此进行了小规模尝试, 获得了一批胚胎发育突变体, 为进一步大规模诱变、开展斑马鱼功能基因组研究打下了基础.

1 材料与方法

() 材料. 鱼种为德国 Tuebingen 品系. 培养胚胎和幼鱼(不到 6 d)溶液的配制: 60 mmol/L NaCl, 0.67 mmol/L KCl, 1.3 mmol/L CaCl₂, 0.3 mmol/L NaHCO₃, pH 7.0. 养殖成鱼水的配制: 2.35 mmol/L NaCl, 0.45 mmol/L NaHCO₃, pH 7.0. 麻醉剂贮液的配制: 按 16 g/L 配制 Tricaine (Sigma 公司) 贮液, 先将所需量溶于水, 再用 1 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0) 调 pH 7.0. 磷酸钠缓冲液(pH 6.6)配制: A 液, 11.7 g NaH₂PO₄ 溶于 375 mL 水; B 液, 11.1 g Na₂HPO₄ 溶于 225 mL 水. 将 AB 2 种溶液兑在一起混匀, 使用时稀释 20 倍. ENU 贮液配制: 将 5 g 的 ENU (Sigma 公司) 溶于 10 mmol/L NaOAc 溶液, 配成 1% 的贮液. 处理成鱼时在磷酸钠缓冲液(pH 6.6)中稀释到工作浓度(3.0 mmol/L)^[5]. Alcian blue 溶液的配制: Alcian Blue 溶于冰醋酸和乙醇的混合溶液(1 : 4)中, 终浓度为 0.03%^[6].

() 鱼的喂养和诱变. 孵化和喂养的方法参照文献^[1]. 用于诱变的雄鱼必须是经过挑选的, 即和雌鱼交配得到的胚胎受精率接近 100%. 诱变容器采用容积约为 500 mL 的普通塑料饭盒, 在其中倒入 290 mmol/L 的磷酸钠缓冲液(pH 6.6), 再加入 10 mL ENU 贮液混匀. 在容器中放入 5~6 条雄鱼, 用锡箔纸遮盖

容器, 避光处理 1 h. 然后将鱼小心移到另一盛有 300 mL 养鱼水的容器中漂洗 1 h, 再放入新鲜的养鱼水中漂洗 1 h 以上. 如此处理过的鱼才可以放入大鱼缸正常喂养. 上述过程每周重复 1 次, 连续做 4 周^[5]. 由于 ENU 同时也是一种神经毒剂, 所以操作时必须非常小心, 防止过度扰动造成鱼的死亡. 另外, 在 ENU 溶液中加入 1/20 体积的麻醉剂贮液, 使鱼 轻微麻醉, 以及降低温度至 16 °C 左右, 都有利于提高鱼的成活率. 用完的容器必须用 1 mol/L NaOH 处理^[7].

() 突变体的筛选. 本研究的目的是筛选隐性突变体. ENU 处理的雄鱼与野生型雌鱼配种获得的子代为 F1 代, 这些 F1 代个体是不同诱变基因的杂合体, 因此将 F1 的雌雄个体之间互相配种, 获得的后代构成 F2 代家系. 从理论上计算, 在一个 F2 家系中, 平均 4 对同胞配种中将有一对会是杂合体之间的交配, 在 F3 代胚胎中将有 1/4 为突变纯合体, 可能会出现发育缺陷表型. 因此, 我们对一个 F2 家系的筛选一般要配 6 对, 如果这 6 对的子代群体中未出现符合比例(1/4)的异常发育个体, 则将此家系淘汰. 突变体筛选分 4 个时期在解剖镜下观察. 30% 外包-尾芽期: 观察胚胎的外包过程是否受阻, 尾芽和头部的位置以及形态是否正常; 受精后 24~36 h(咽胚期): 该时期主要观察眼睛的大小, 脑的形态结构, 脊索的形态, 体节的形态和数目; 受精后 48~60 h 时(孵化期): 主要观察鳍的形态, 心脏的形态、位置和搏动速度, 血液的流动等; 受精后 5 d(幼鱼期): 主要观察色素、胸鳍、颚、腮弓、鱼鳃、耳、肝脏、血液以及各种内脏.

如果超过 6 d 仍没能看出有明显异常的胚胎, 则不再继续对其观察. 对那些出现异常胚胎、且符合孟德尔遗传规律的 F3 家系则养至成年期, 同时反复配种其亲本, 以验证结果的可靠性和增加保种数量.

2 结果

2.1 ENU 处理对雄鱼的影响

第 1 次的 ENU 处理共包括 18 条雄鱼, 每次处理后的存活情况见表 1. 在处理时如果稍有扰动, 雄鱼便加剧游动. 雄鱼的死亡多发生在处理完将其捞出漂洗的过程中, 可能是该过程的刺激所引起, 所以捞鱼操作要轻柔.

经历 4 次 ENU 处理后的雄鱼和野生型雌鱼交配, 开始的 2 次(前 2 周)胚胎受精率较未处理的鱼低, 并且后代出现大量畸形(表 2). 但从第 3 次配种开始, 受精率基本稳定在 90% 以上, 胚胎畸形率降至正常鱼配种的水平. 前 2 周产的胚胎的畸形率高的原因, 可能是 ENU 使雄鱼的部分正在成熟的精子丧失某些活性, 其受精产生的畸形胚胎为嵌合型突变, 性状不能稳定遗传. 因此, 我们将前 2 次配种产生的胚胎全部淘汰. ENU 处理的雄鱼在 2 周后产的精子绝大部分为精原细胞新分化成熟的, 这些精子往往携带单基因突变, 受精后胚胎都比较正常, 因此我们将 2 周后配种获得的 F1 养到成年以繁殖 F2 群体.

表 1 ENU 处理对雄鱼存活的影响

处理回次	雄鱼数量	死亡数	存活数	死亡率(%)
1	18	5	13	38.5
2	13	0	13	0
3	13	2	11	18.2
4	11	0	11	0

表 2 ENU 处理的雄鱼配种后的受精率及胚胎畸形率^{a)}

配种回次	平均胚胎数	平均受精率	平均胚胎畸形率
第 1 周	163	76.0%	27.0%
第 2 周	212	86.3%	16.3%
第 3 周	205	93.8%	0.90%

a) 受精率是指受精的胚胎占总胚胎数的比例; 胚胎畸形率是指受精后 24 h 畸形胚胎占总胚胎数的比例

2.2 突变体筛选结果

目前已在 F2 中配种筛选了 600 多对鱼, 分属 230 个 F2 家系, 其中筛选完全的 F2 家族(即完成了 6 对筛选)为 60 个, 鉴定出突变体 35 种. 由此可见, 有突变体的 F3 家系的发生率为 58.3%.

2.3 突变体表型的分类

根据形态观察得到的结果, 目前筛选到的突变体可分为 8 类(表 3).

() 早期致死性突变. 只发现 1 种该类型的突变, 胚胎表现为外包缓慢, 到胚盾期以后外包几乎停止, 胚胎开始死亡. 这种突变体和Kane等人^[8]鉴定的 spb, zom等早期外包受阻的突变体并不完全一样, 因为 spb, zom等可以活至 24 h.

() 脊椎形态异常. 有这种表型的突变体比较

多, 主要表现为脊椎向腹部或背部弯折成弧形或折线形. 如 M3-1(图 1(o)), M28-1(图 1(p))和 M175-4(图 1(q))的脊椎弯向腹部, M189(图 1(m)), M210(图 1(n))

表 3 突变体类型汇总

表现型类型	家系数	比例(%)
总数	35	
早期致死性	1	2.86
脊椎形态异常	8	22.9
体节减少	5	14.3
心脏血液系统异常	3	8.57
鳃弓及腭发育异常	5	14.3
脑和神经系统退化	8	22.9
鱼鳍发育不全	1	2.86
鱼鳔的缺失	1	2.86

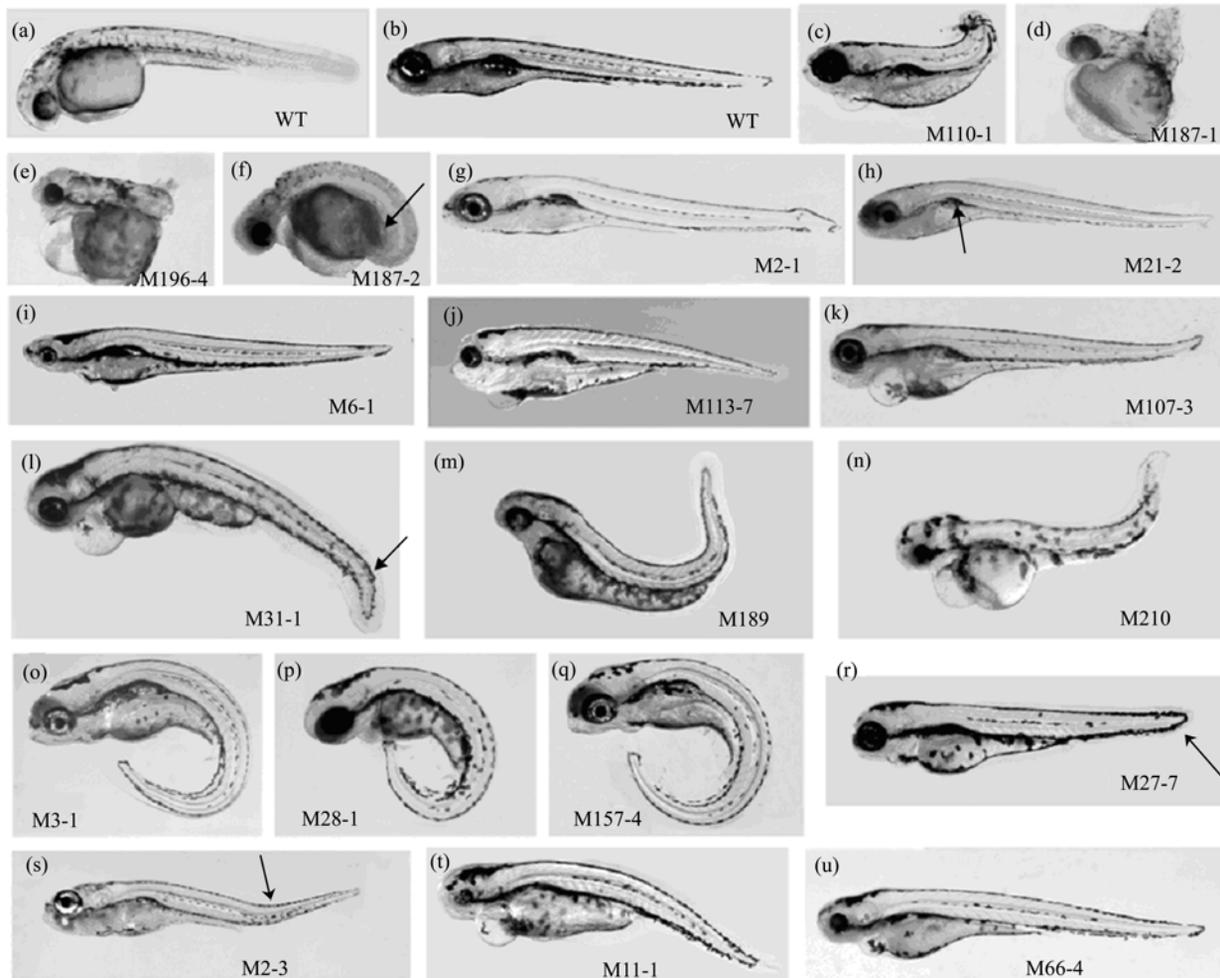


图 1 各突变体的表现型

(a), (c)~(f)示发育至 48 h 的胚胎; 其他为发育至 4 d 的胚胎. (a)和(b)示野生型对照. 各突变品系的编号标于图下方

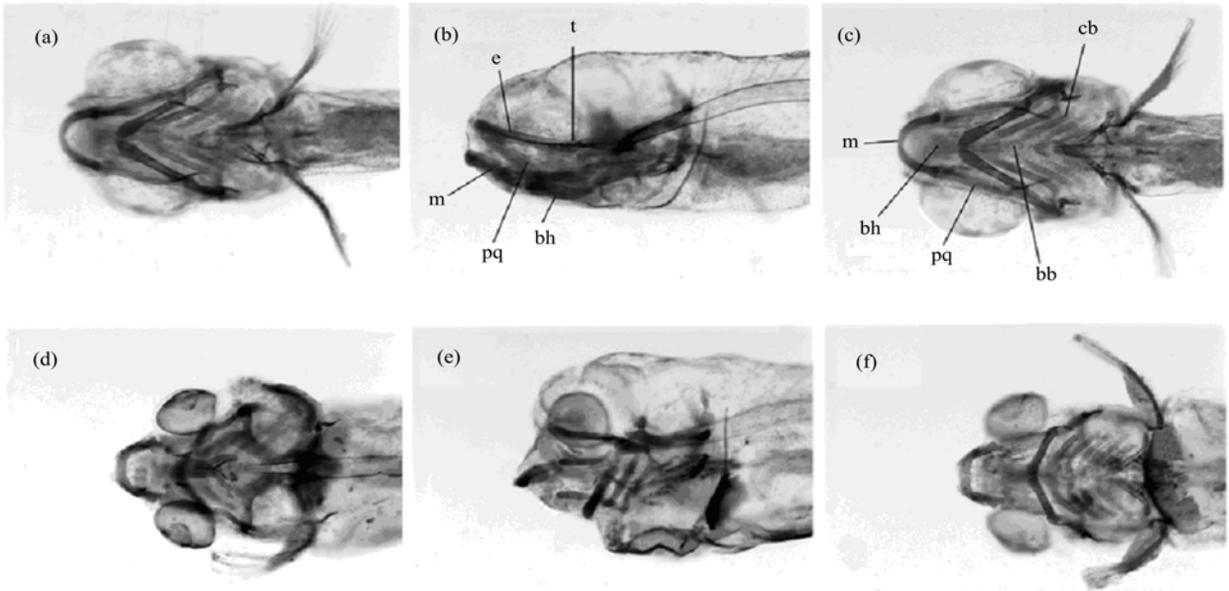


图 2 5 日龄野生型和突变体 M113-7 的鳃弓和腭的软骨结构

(a)~(c)示野生型; (d)~(f)示 m113-7 突变体. 其中(a)和(d)是背面观, (b)和(e)是侧面观, (c)和(f)是腹面观. 突变体的鳃弓和腭的软骨表现为短小、走向等异常. bb 示鳃基骨; bh 示舌基骨; cb 示鳃舌骨; e 示筛骨板; m 示第 1 鳃弓软骨; pq 示腭方骨; t 示柱状颅骨

的脊椎弯向背部, M2-3 脊椎弯曲呈折线状(图 1(s), 箭头所示), M31-1(图 1(l))在尾部发生弯曲呈“L”形(箭头所示), M187-2 从身体中部开始到尾部盘缠折叠呈螺旋型(图 1(f), 箭头所示). 除 M3-1, M28-1, M175-4, M2-3 和 M2-3 外, 该类的其他突变体的其他组织器官也有异常表现.

() 体节减少. 表现为体节部分或完全缺失, 突变体 M110-1(图 1(c))、M187-1(图 1(d))、M196-4(图 1(e))即属于这种类型. M110-1 症状较轻, 仍有 10 个左右的体节, M187-1 症状较严重, 24 h 的时候观察不到体节.

() 心脏血液循环异常. 以 M31-1 为代表(图 1(l)). M31-1 表型为心脏搏动缓慢甚至完全停止, 血液循环不畅, 几乎全部积压在心脏中, 这种鱼活到 6 d 左右即死亡.

() 鳃弓及腭发育异常. 鳃弓及腭是支撑脊椎动物头部的的基础, 鳃弓最初的形成和神经外胚层的分节是联系在一起的, 而且鳃弓及腭的异常一般会导致脑颅体积缩小, 前脑和中脑可能会部分缺失. M6-1(图 1(i)), M107-3(图 1(k)), M113-7(图 1(j))属于这一类. 我们挑选 M113-7 做了进一步研究. 首先用

Alcian Blue 染 4 d 的鱼头部软骨(图 2), 发现第 1 鳃弓软骨(Meckel 软骨)、筛骨板、柱状颅骨和腭方骨长度明显短于正常鱼(图 2(e)), 且第 1 鳃弓软骨和腭方骨之间的角度由 150°左右变为 200°, 舌骨、鳃底骨和鳃舌骨向下塌陷(可能是受挤压造成的), 最终造成颅内前后轴向距离缩小, 而背腹轴向距离增大.

() 脑和神经系统的退化. 24 h 的正常胚胎头部透明, 但 M187-2(图 1(f)), M189(图 1(m)), M210(图 1(n))等突变体的头部等发黑, 这是由细胞死亡引起.

() 鱼鳍发育不全. 仅筛选到一种尾鳍发育不全的突变体, 即 M27-7(图 1(R)). 其尾鳍长度(箭头所示)仅有野生型的不到 1/10, 所以运动机能受到影响, 几乎不能游动.

() 鱼鳔缺失. 仅一种突变体(M21-2, 图 1(h))几乎没有鱼鳔(箭头所示).

某些致死性突变体如 M11-1(图 1(t))和 M66-4(图 1(u))在 6 d 左右开始死亡, 它们的细胞坏死、胸腔水肿, 但此前未能观察到有特异性缺陷的组织或器官.

3 讨论

在生物学研究过程中, 任何一个突变体都有可

能是弄清某个生命过程奥秘的一条线索,可帮助理解发育或生理过程,发现一些新的信号通路或新的介导因子和调节因子。所以,虽然化学诱变的工作早在20多年前便开始,但迄今仍不断有人为了获得他们所期望的突变体而开始开展这项工作。尽管国内利用斑马鱼研究胚胎发育机制取得了一些成果^[9~13],但还没有开展诱变研究。我们开始斑马鱼的ENU诱变研究,是希望获得大量的突变体品系,建立自己的突变体遗传资源库,便于相关单位的利用。我们不仅可以克隆突变体中的突变基因,了解相关基因的功能,还可以利用它们研究基因与基因之间的相互作用网络,甚至用作药物筛选平台。

在先期小规模筛选中,我们一共鉴定出35种突变体。我们注意到,其中一些突变体与国外已经报道过的突变体在表型上相似,这些表型相似的突变体是否携带相同突变基因还有待鉴定。在下一步克隆突变基因时,我们将主要选择那些表型新颖的突变体,如M187-2。

本研究得到的35种突变体中,以脊柱和体节异常突变体为主,这与以前其他人报道的相似^[3]。尽管我们非常希望筛选到大量的在囊胚期和原肠作用期即致死的突变体,但实际上迄今只找到1个这样的突变体品系,这主要是因为胚胎早期发育主要受母源因子(来自于卵母细胞的蛋白和mRNA等)的影响^[14,15]。此外,我们也正在利用特定标记基因进行突变体筛选,以期筛选出影响其所代表的信号通路的系列突变体。

致谢 感谢本实验室其他成员的有益讨论。本研究为国家杰出青年基金(批准号:30025020)、国家自然科学基金(批准号:90208002)和教育部优秀青年教师基金资助项目。

参 考 文 献

1 Westerfield M. The Zebrafish Book. Eugene: University of Oregon

Press, 1993

- 2 Kimmel C B, Kane D A, Walker C, et al. A mutation that changes cell movement and cell fate in the zebrafish embryo. *Nature*, 1989, 337(6205): 358~362 [\[DOI\]](#)
- 3 Haffter P, Granato M, Brand M, et al. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 1996, 123: 1~36
- 4 Mullins M C, Hammerschmidt M, Haffter P, et al. Large-scale mutagenesis in the zebrafish: In search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr Biol*, 1994, 4(1): 189~202 [\[DOI\]](#)
- 5 van Eeden F J, Granato M, Odenthal J, et al. Developmental mutant screens in the zebrafish. *Meth Cell Biol*, 1999, 60: 21~41
- 6 Schilling T F, Piotrowski T, Grandel H, et al. Jaw and branchial arch mutants in zebrafish : branchial arches. *Development*, 1996, 123: 329~344
- 7 Ashburner M. *Drosophila, a Laboratory Handbook*. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989. 299~418
- 8 Kane D A, Maischein H M, Brand M, et al. The zebrafish early arrest mutants. *Development*, 1996, 123: 57~66
- 9 Zhao J, Cao Y, Zhao C T, et al. An SP1-like transcription factor Spr2 acts downstream of Fgf signaling to mediate mesoderm induction. *EMBO J*, 2003, 22(22): 6078~6088 [\[DOI\]](#)
- 10 Cao Y, Zhao J, Sun Z H, et al. fgf17b, a novel member of Fgf family, helps patterning zebrafish embryos. *Dev Biol*, 2004, 271(1): 130~143 [\[DOI\]](#)
- 11 Li M, Cao Y, Zhao Z X, et al. Characterization and expression pattern of pouII1, a novel class POU gene in zebrafish. *Chinese Science Bulletin*, 2001, 46(18): 1523~1527 [\[摘要\]](#) [\[PDF\]](#)
- 12 李明, 苏颖, 孟安明. 外源视黄酸诱导斑马鱼头部和尾部神经嵴的发育. *科学通报*, 2002, 47(8): 596~599 [\[摘要\]](#) [\[PDF\]](#)
- 13 Zhang L X, Zhou H, Su Y, et al. Zebrafish Dpr2 inhibits mesoderm induction by promoting lysosomal degradation of Nodal receptors. *Science*, 2004, 306: 114~117 [\[DOI\]](#)
- 14 Dosch R, Wagner D S, Mintzer K A, et al. Maternal control of vertebrate development before the midblastula transition: mutants from the zebrafish . *Dev Cell*, 2004, 6(6): 771~780 [\[DOI\]](#)
- 15 Wagner D S, Dosch R, Mintzer K A, et al. Maternal control of development at the midblastula transition and beyond: mutants from the zebrafish . *Dev Cell*, 2004, 6(6): 781~790 [\[DOI\]](#)

(2004-09-23 收稿, 2004-09-27 收修改稿)