

【斑马鱼】研究基因功能，就是快准狠

2013年4月，英国桑格研究所（Sanger Institute）协同全球最权威的14家斑马鱼研究机构，将斑马鱼全基因组和人类基因组进行比较分析发现，人类2万多个蛋白编码基因至少可以在斑马鱼体内找到1个同源基因与之对应。

在前两期斑马鱼专题中我们已经介绍了斑马鱼作为模式生物的诸多优势、以及斑马鱼在药物研发中的应用。今天小编就通过实际案例来说说斑马鱼在基因功能研究中的应用。

在斑马鱼中，我们可以通过简单且有效的反向遗传学手段，在斑马鱼基因组中实现特定基因的突变、过表达或缺失，例如：通过注射体外合成的mRNA实现目的基因的过表达，或者通过注射反义吗啉环寡核苷酸敲减目的基因的表达（Morpholino Knockdown），并通过观察表型推测目的基因的功能。

Morpholino Knockdown

反义吗啉环寡核苷酸（Morpholino）是稳定的人工合成的核酸类似物，通过碱基互补配对与mRNA结合，阻断蛋白翻译或mRNA剪切，导致蛋白产物减少或缺失。

Case1

斑马鱼体内实验有力地佐证了编码ADA2蛋白的CECR1基因遗传突变导致早发型中风和血管病变，这种新的遗传缺陷被称为ADA2缺失或DADA2。这项研究已经发表在顶级医学杂志新英格兰医学杂志上。

美国NIH研究人员在临幊上发现CECR1基因（该基因编码ADA2蛋白）遗传突变可能在童年早期造成不定期发烧症状、皮疹和经常性中风。

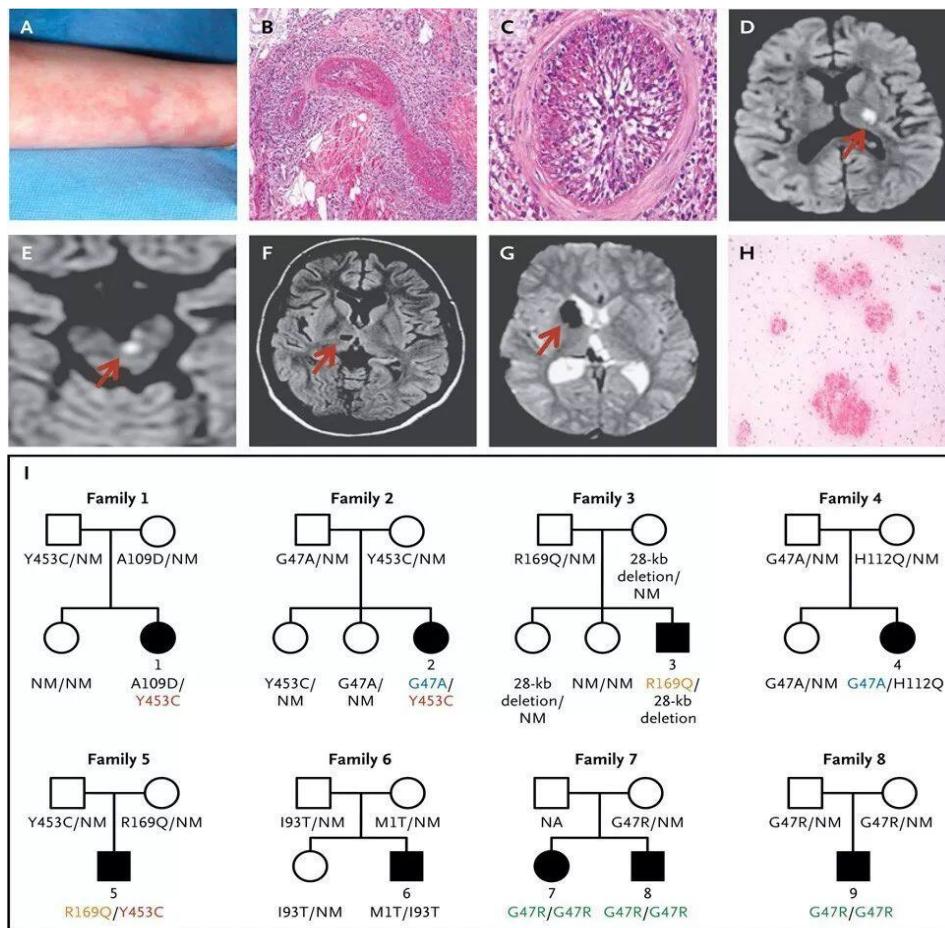


图1. Clinical Findings and Pedigrees of Patients with Deficiency of Adenosine Deaminase 2 (ADA2) (图片来自ref1)

利用Morpholino knockdown技术在斑马鱼中敲低CECR1同源基因Cecr1b，研究人员发现Cecr1b基因缺失影响了血管形成与完整性，斑马鱼表现出颅内出血的症状；而这种表型可以通过注射未突变的正常人CECR1基因mRNA得到拯救。

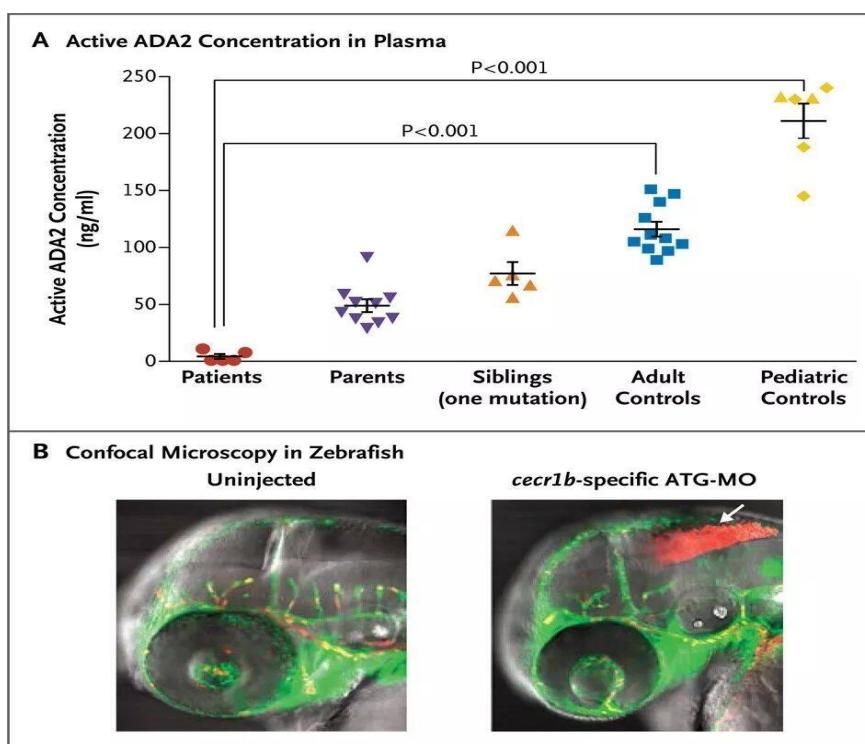


图2. Evidence of Loss-of-Function Mutations in ADA2 (图片来自ref1)

Case2

中科院昆明动物所-张亚平院士课题组在某家鸡品种中克隆获得了VIT(vitrin)基因, VIT(vitrin)基因在物种进化上高度保守, 斑马鱼体内存在一个与家鸡VIT(vitrin)基因对应的同源基因ch1073-291c23.1 (VIT)。

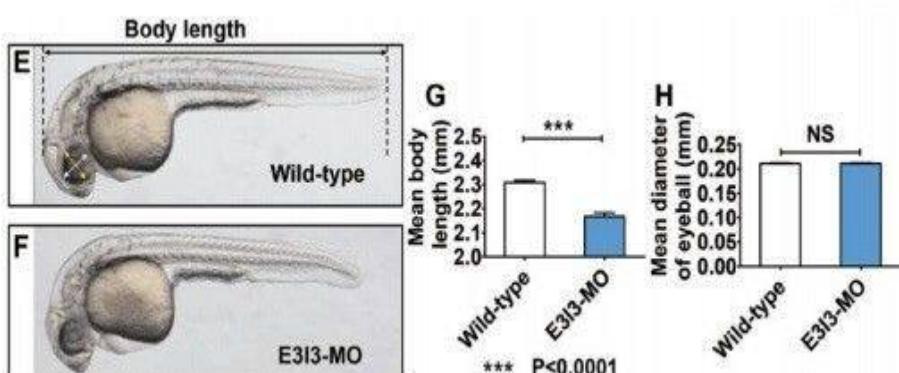
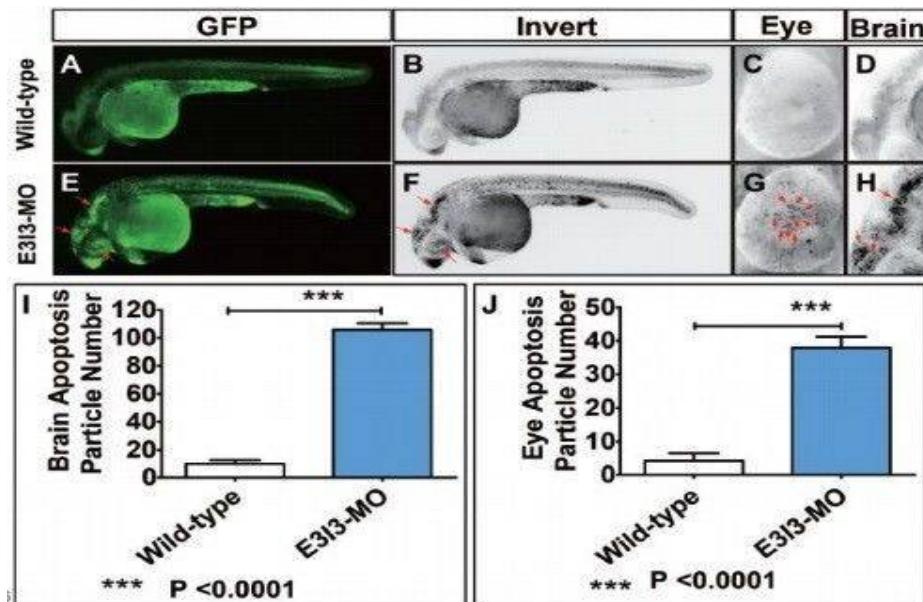


图3. VIT knockdown斑马鱼表型分析 (图片来自ref2)

采用Morpholino Knockdown技术对斑马鱼VIT基因进行敲低，通过表型分析，首次发现该基因在斑马鱼早期生长发育（体长），脑细胞/眼睛凋亡，心脏凋亡等方面扮演重要功能。该研究斑马鱼体内实验由上海南方模式生物斑马鱼技术团队完成，完整研究成果发表于2016年5月的Nature子刊《Cell Research》。

Case3

小肠毛细血管扩张症Gastrointestinal vascular malformation (GIVM)，在临幊上发病概率很低。小肠毛细血管扩张症患者之所以会发生出血，主要是小肠血管出现异常增生，新生的无效血管发生渗漏，最终导致出血。该病的发病机制尚不清楚。沙利度胺 (Thalidomide) 在临幊上已用于治疗小肠毛细血管扩张症，但对该药物治疗机制也没有详细的研究。

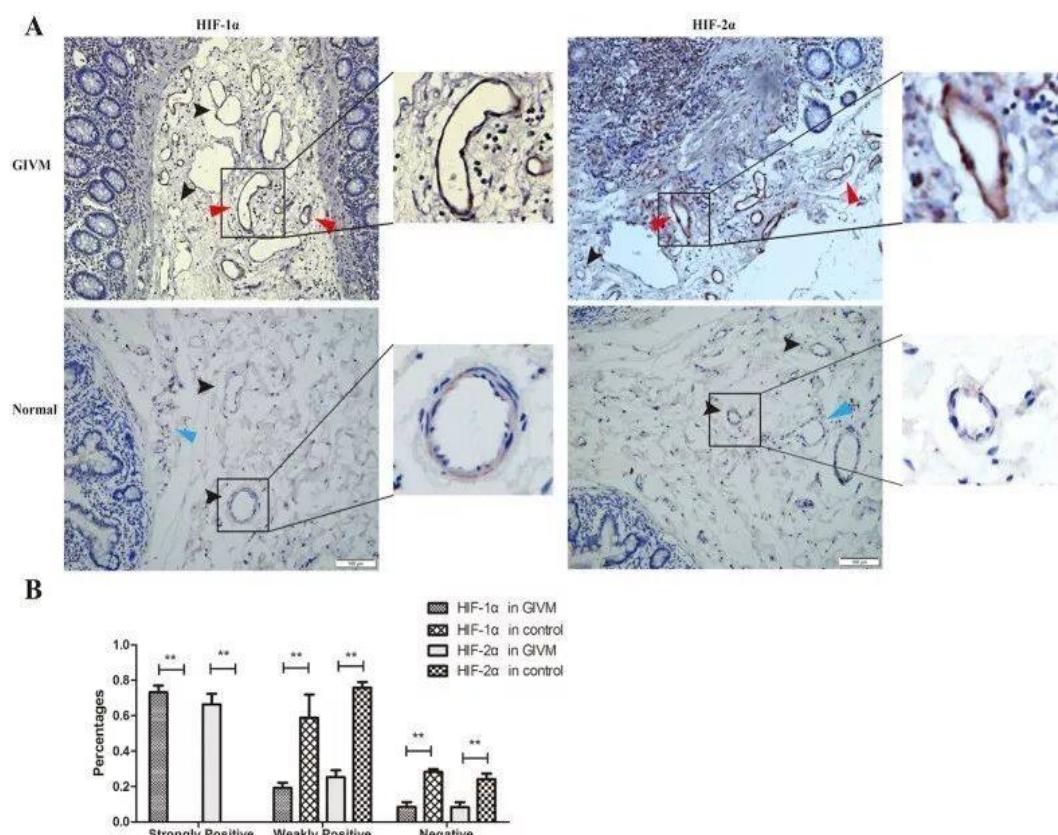


图4. (A) The expression of HIF-1 α and HIF-2 α in gastrointestinal vascular malformations and normal vessels. Red arrow: strongly positive; Black arrow: weakly positive; Blue arrow: negative. (B) Percentages of positive and negative vessels in GIVM and normal tissues. **P < 0.01.

上海南方模式生物与上海交通大学附属仁济医院消化科合作，利用斑马鱼模型首次过表达人源HIF-2 α ，发现HIF-2 α 可以成功诱导斑马鱼肠下静脉 (SIVs) 异常增生，该模型成功复制了人类小肠毛细血管扩张症。

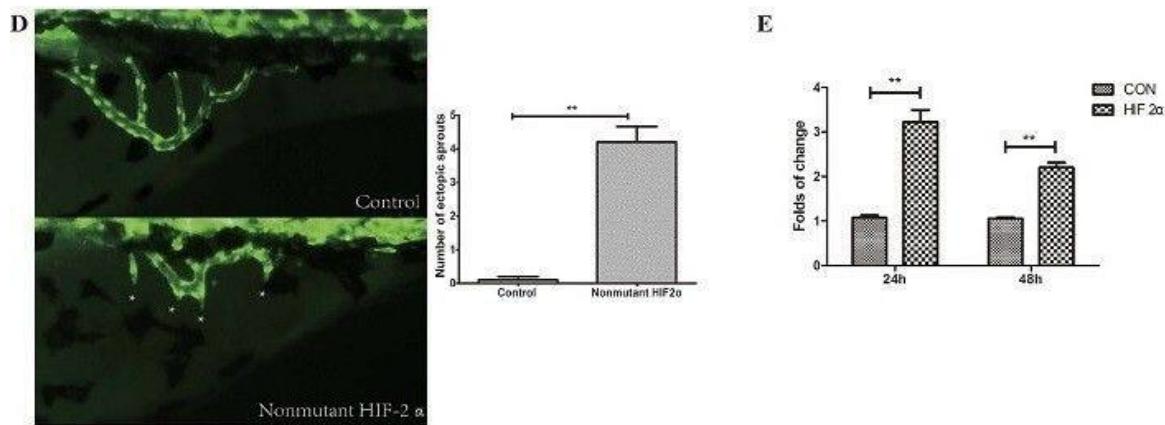


图5. HIF-2 α 过表达斑马鱼肠下静脉增生

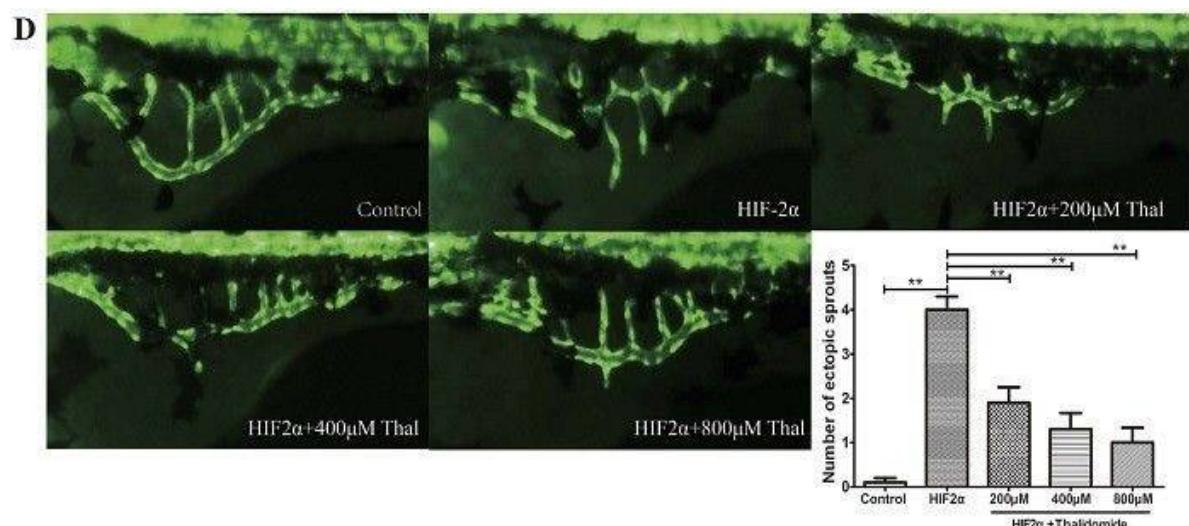


图6. (D) Fluorescence microscope observations of the effect of thalidomide at different concentrations on vascular development in zebrafish with HIF-2 α overexpression. ** P < 0.01 vs. HIF-2 α (图片来源自 ref3)

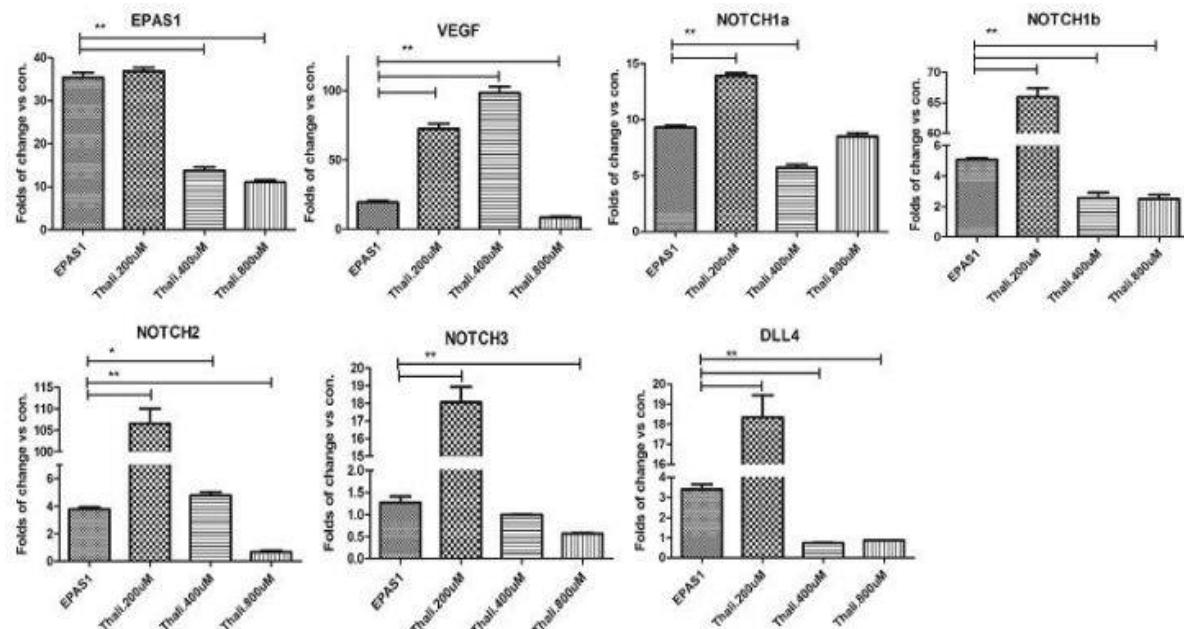


图7. The expression of HIF-2 α (EPAS1), VEGF, Notch1a, Notch1b, Notch2, Notch3, and DLL4 in the zebrafish model. * P < 0.05, ** P < 0.01. (图片来自ref3)

参考文献

- [1] Zhou Q, Yang D, et al. Early-onset stroke and vasculopathy associated with mutations in ADA2. *N Engl J Med.* 2014 March 6;370(10): 911-920.
- [2] Wang MS, Zhang RW, et al. Positive selection rather than relaxation of functional constraint drives the evolution of vision during chicken domestication. *Cell Res.* 2016 May;26(5):556-73.
- [3] Feng N, Chen H, et al. HIF-1 α and HIF-2 α induced angiogenesis in gastrointestinal vascular malformation and reversed by thalidomide. *Sci Rep.* 2016 Jun 1;6:27280.