

斑馬魚心肌細胞分離技術

一.前言

斑馬魚又名藍條魚、花條魚、藍斑馬魚。體色為銀色或金色，覆蓋著一些名藍色或紫色的橫紋，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。有許多人工培養的品種。



圖 1. 成年斑馬魚

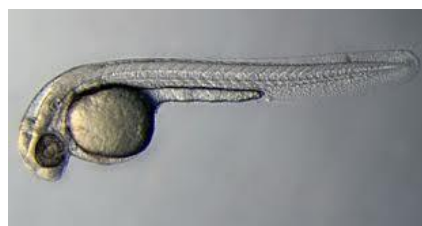


圖 2. 幼年斑馬魚

斑馬魚由於具有飼育容易、胚胎透明、體外受精、突變種多等優點，近年來已成為研究脊椎動物發育與人類遺傳疾病的新興模式動物

我們知道人體大部分的組織和器官都無法再生，因此，現代研發出讓退化的組織或器官能再生已成為醫學的目標，可以使用幹細胞作器官再造用途，這個細胞具有潛力發育成其他有功能和特定的細胞,因此此細胞能用作器官再造和修復等功能用途。

在自然界中很多動物有與生俱來的再生能力，受到損傷的組織或器官都能完全再生。在較早前的研究發現蝾螈肢體有再生能力，而斑馬魚做再生能力的研究最早是從尾鰭再生開始的，後來陸陸續續發現斑馬魚很多的組織器官都有再生能力，其中包括脊椎神經和心臟。

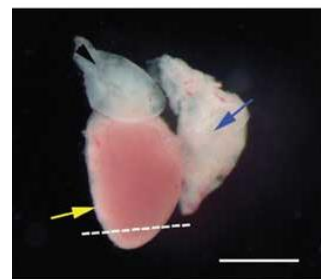


圖 3. 成年斑馬魚之心臟

孫彬學者指出斑馬魚心臟再生大約需要 2 個月，切除後不久就會形成血凝塊封堵傷口，且再生後的心臟完全能夠行使其功能，但他也指目前的研究對斑馬魚心臟再生的瞭解仍十分有限，但可以從斑馬魚心臟再生模型中掌握的知識無疑將有助於增進對人類心臟再生能力缺陷的認識。

二.新聞

研究斑馬魚揭示器官再生之謎

2013年08月28日 04:19 澳網-長江日報

斑馬魚連身長約4釐米，具暗藍與銀色縱條紋基因與人類的相似度達87%心臟能再生約2000種人類疾病能出現在其身上胚胎在體外發育，且完全透明一種經濟實惠的實驗動物，一對斑馬魚一次可生產300只“魚寶寶”

本報訊(記者熊琳暉 通訊員孫慧)“斑馬魚的基因與人類相似度高達87%，人類無法長出第二個心臟，而斑馬魚的心臟卻能再生。”昨日從國家斑馬魚資源中心獲悉，國家重大科研項目“心臟與肝臟發育和再生的遺傳調控研究”近日完成中期總結，科學家希望通過對斑馬魚的研究來揭示器官再生之謎。

昨日上午，記者走進位於中科院水生所的國家斑馬魚資源中心。在一間約250平方米的實驗室內，有5萬條斑馬魚在一個個培養器皿中來回遊動。科研人員不時給它們餵食，並記錄下相關資料。

國家斑馬魚資源中心由科技部和中科院共同支持建立，去年10月落戶武漢。中心主任孫永華介紹，斑馬魚是一種熱帶魚類，其原產地不在中國。由於和人類基因十分接近，大約2000種人類疾病都能出現在斑馬魚身上，比如感冒、白血病、動脈粥樣硬化、癌症等。這意味著，如果要研製治療上述疾病的藥物，可以先在斑馬魚身上實驗療效。

目前，全世界有超過1500個實驗室把斑馬魚當做研究物件，我國有近100個斑馬魚實驗室。

據瞭解，近一年來，中心已收集和創造搜集保藏超過100個基因突變品系的斑馬魚，為全國斑馬魚研究學者提供服務。預計該中心將在兩年內成為全球第二大斑馬魚資源中心。

“斑馬魚之所以如此受科學家青睞，還因為它是一種經濟實惠的實驗動物。”據介紹，與大家熟知的實驗動物——小白鼠不同，斑馬魚的胚胎在體外發育，且完全透明，科學家能方便地觀察胚胎發育過程。一對斑馬魚一次可生下300個“魚寶寶”，可以滿足實驗大量操作需求。此外，斑馬魚胚胎發育一天相當於人類胚胎在母體內發育21天，節省了實驗時間。

記者高寶燕 攝

(原標題：研究斑馬魚揭示器官再生之謎)

三.實驗目的


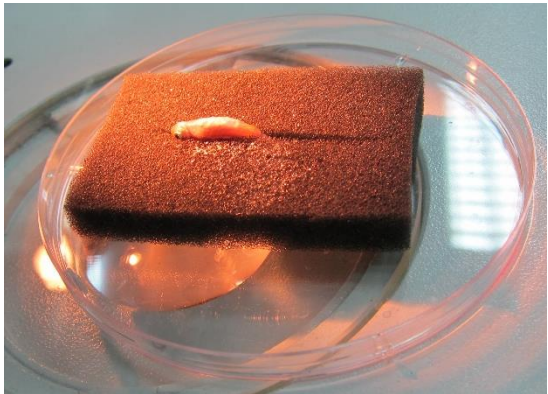
通過本實驗學習簡單的動物心肌細胞分離技巧，和了解斑馬魚心肌細胞的形態特徵。

四.實驗材料

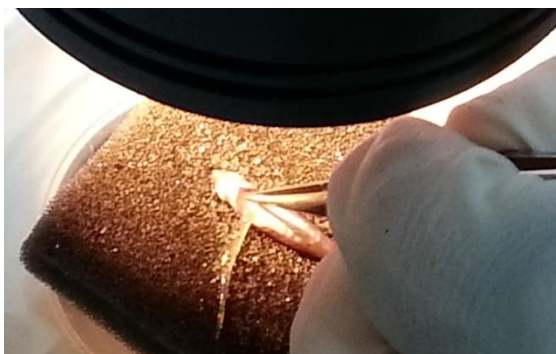
1. 野生斑馬魚心臟
2. Tyrode 溶液
3. Tyrode 溶液成分：
NaCl、KCl、MgCl₂、NaHCO₃、NaH₂PO₄、HEPES、glucose、creatine、pyruvate、collagenase type、Trypsin
4. 心肌細胞培養液
由 Tyrode、0.5%FBS、glucose 組成
5. 細胞消化液
由 Tyrode、collagenase、trypsin、glucose 組成

五.實驗步驟

(因為本實驗所使用的技巧較高，學生在短時間難以操作，因此以專人示範實驗，學生觀察)

<p>1. 先將斑馬魚從水中撈起，放至裝有麻醉藥(Tricaine)的燒杯中</p>	
<p>2. 待一分鐘後，將魚放置在特製海綿上固定</p>	

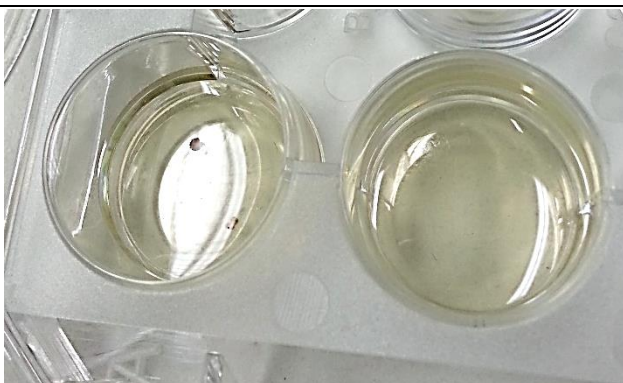
3. 利用鑷子和特製剪刀從魚的背部靠頭部的地方下刀，這時可見不停跳動的心臟



4. 慢慢將心臟附近的組織切除，便可將心臟完全取出，放置在 Tyrode 培養液中



5. 利用特製剪刀將心臟的心房切除，保留心室，並將其切成 4-5 份
6. 放置在已裝有消化液的六孔板中以 37°C 培養



7. 每半小時便要更換至新的孔中繼續培養
8. 兩小時後，心肌細胞便會被消化出來
9. 將分離出來的心肌細胞移至 40 倍的白光顯微鏡進行觀察



六.問題

1. 試繪畫出顯微鏡中之斑馬魚之跳動的心臟



2. 斑馬魚之心臟在取出後為什麼可以維持正常的運作?

3. 試計算一分鐘內斑馬魚的心臟細胞跳動的頻律和次數?

4. 你覺得斑馬魚的其他器官的細胞也能跳動嗎?

5. 為何要使用斑馬魚之心肌細胞作為研究之對象?

六. 參考文獻

1. http://www.cmrh.eu/centre-investigacio/en_projectes4.html
2. <http://circres.ahajournals.org/content/99/3.cover-expansion>
3. https://www.mdc-berlin.de/886318/en/news/archive/2007/20070115-mdc_researchers_discover_new_function_of
4. http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=Zebrafish_Development
5. <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fphys.2012.00255/full>