

斑马鱼应激行为分析装置的研制

乔志仙

(中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

摘要: 斑马鱼行为学实验是一种简单快速地检测各种因子对斑马鱼活动影响的手段。ZebraLab系统是斑马鱼行为研究主流的系统, 该系统能够采集快速移动的图像, 实时追踪实验动物的运动轨迹和行为。斑马鱼应激行为分析装置基于本单位ZebraLab斑马鱼行为分析系统研制, 能够搭载该系统上, 通过观察箱与振动及声音模块、强光刺激模块的结合, 实时记录和分析环境因子对斑马鱼运动及行为的影响。

关键词: 斑马鱼;行为学

1 专业技术成果介绍

1973年诺贝尔科学奖第一次授予了动物行为学, 掀开了动物行为研究的新篇章。行为学实验是在动态与整体的水平上研究生命活动的本质, 是对形态、电生理检测的一种必要的补充。传统的动物行为学实验, 所需数据往往是通过人眼观测或者人工标注来获取。这不仅耗费大量人力时间, 而且想要获取高通量的行为学数据也极其困难。在现代生命科学中, 一般都需要高通量的行为学数据来量化分析动物的行为特点。斑马鱼具有繁殖量大, 遗传操作简单, 胚胎通体透明, 便于活体成像等优势^[1-2]。另外, 斑马鱼拥有与人相似的组织器官和系统, 基因和信号通路与人类高度保守 (>85%)^[3-5]。斑马鱼是目前唯一适用于高通量筛选的脊椎类动物, 是研究心血管代谢功能、神经功能发育、药理毒理学、干细胞发育及分化的优秀研究模型^[6-8]。

ZebraLab系统是斑马鱼行为研究主流的系统, 该系统能够采集快速移动的图像, 实时追踪实验动物的运动轨迹和行为。该系统的主要缺陷在于没有相关的环境刺激模块, 不能提供振动及声音刺激, 不能提供强光刺激。斑马鱼应激行为分析装置基于本单位 ZebraLab 斑马鱼行为分析系统研制, 能够搭载该系统上, 通过观察箱与振动及声音模块、强光刺激模块的结合, 实时记录和分析环境因子对斑马鱼运动及行为的影响。

1.1 技术路线及设计图

整套系统包括红外感应摄像头、红外背光 LED 灯、电脑软件控制系统、强光刺激模块、振动及声音刺激模块、斑马鱼观测微孔板。系统技术路线及设计图如下所示:

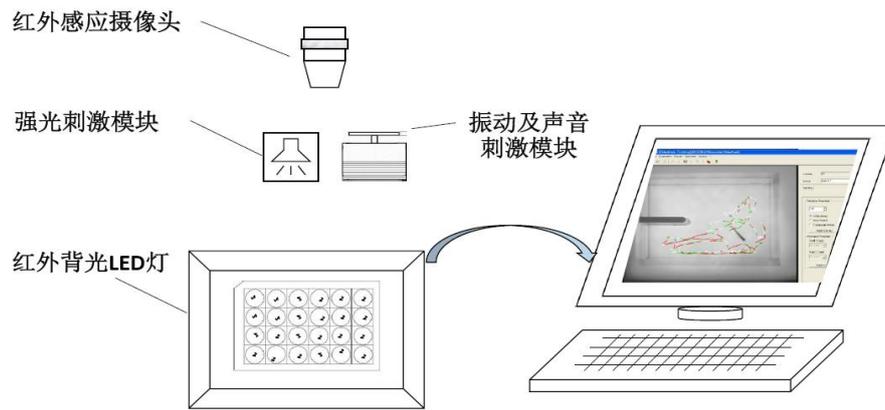


图1 系统技术路线及设计图

振动及声音刺激模块包括扬声器和振子，振动模式由振子和扬声器提供，通过振动的频率来体现。频率高，输出形式就是声音，频率低，输出形式就是振动。强光刺激模块包括散热板和LED强光源元件，主控MCU连接硬件驱动以及系统电脑，以此实现系统软件调控实验参数及条件。技术路线图如下所示：

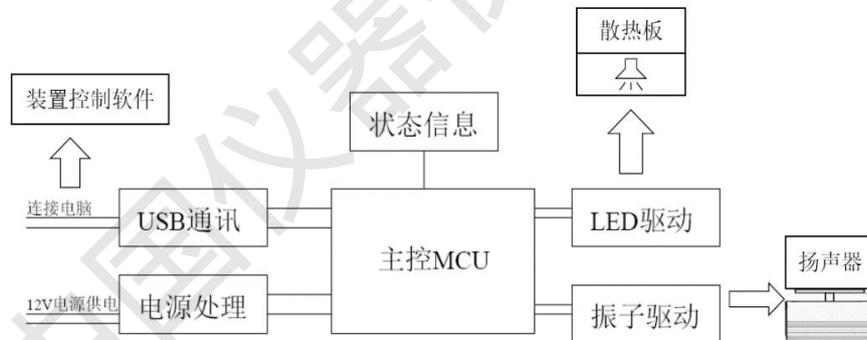


图2 技术路线图

1.2 技术创新点

振动及声音刺激模块的硬件加工及组装调试，振动出现的时间、振动频率范围、持续时间（可伴随整个实验过程）均可灵活设置；

强光刺激模块硬件加工及组装调试，光刺激出现时间、光刺激模式（渐强光刺激、渐弱光刺激、恒定光强度刺激）、光照强度灵活设置；

调试配套软件，实现和控制刺激条件的不同模式；软件实时显示实验执行进度和具体参数。

1.3 研制过程

1.3.1 振动及声音刺激模块研制过程

根据现有设备硬件条件及相关技术指标，确定振子频率范围及搭建位置，振子尺寸，振子支架 3D 打印图，系统电路改造图。振子功率范围选择 70Hz-10000Hz，3D 打印材料选择白色树脂，表面光洁度好，韧性强，热变形温度为 46°C。

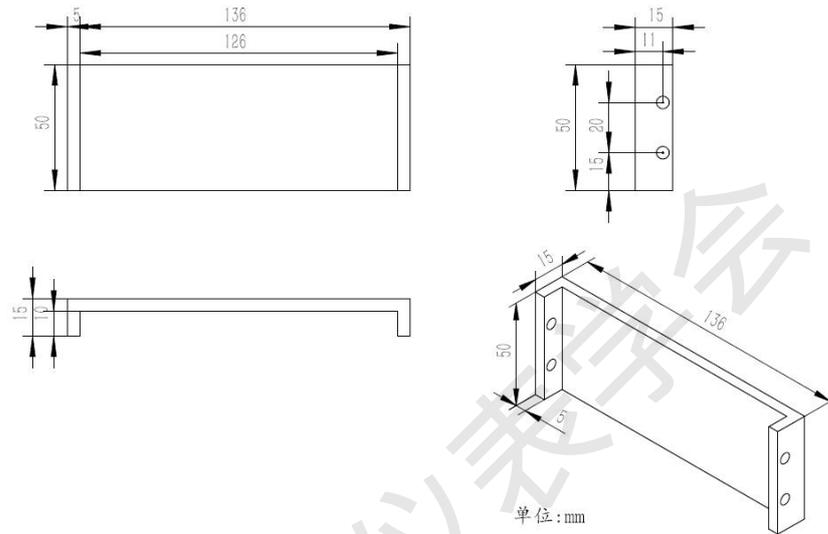


图 3 振子支架 3D 打印图（俯视图、正视图、侧视图、三维效果图）

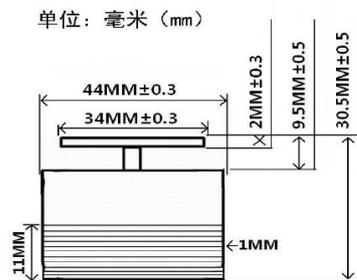
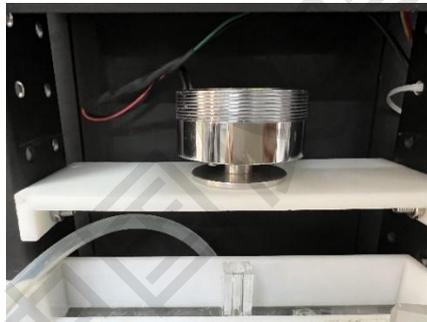


图 4 振动及声音刺激组装完成图与振子设计尺寸图

1.3.2 强光刺激模块研制过程

根据现有设备硬件条件及相关技术指标，确定强光源搭载支架的 3D 打印图，系统电路改造图。光源支架可旋转，光源选择标准 4 路 LED 正白光，光源上方配置两个散热风扇。3D 打印材料为黑色高性能尼龙，热变形温度 147°C，表面有颗粒感及纹理，韧性好，断裂延长率高。

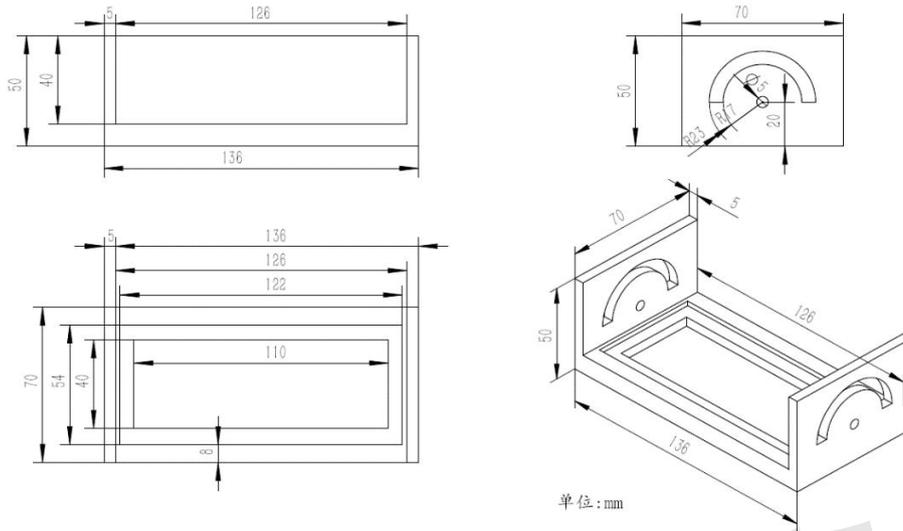


图 5 强光源搭载支架 3D 打印图（俯视图、正视图、侧视图、三维效果图）

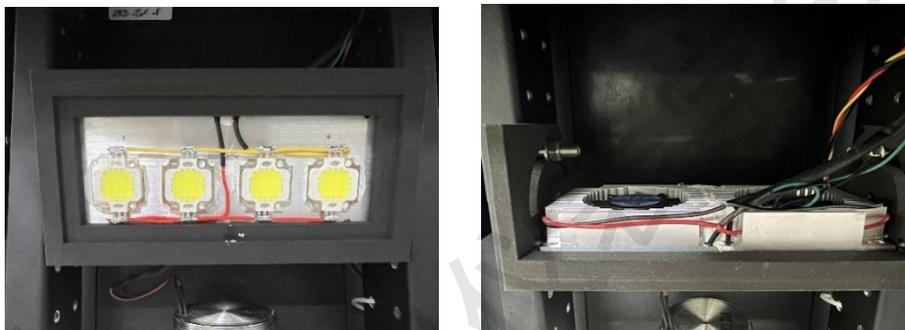


图 6 强光源刺激模块组装完成图

1.3.3 软件设计

软件能够实现以下功能：（1）控制振动及声音的频率大小，以及振动持续时间；（2）控制光照的强度及光照持续时间，实现渐强光、渐弱光、恒定光强度刺激；（3）显示刺激程序进程图，方便校准核对实验程序；（4）实验过程中实时监测振动及光照的信号强度。

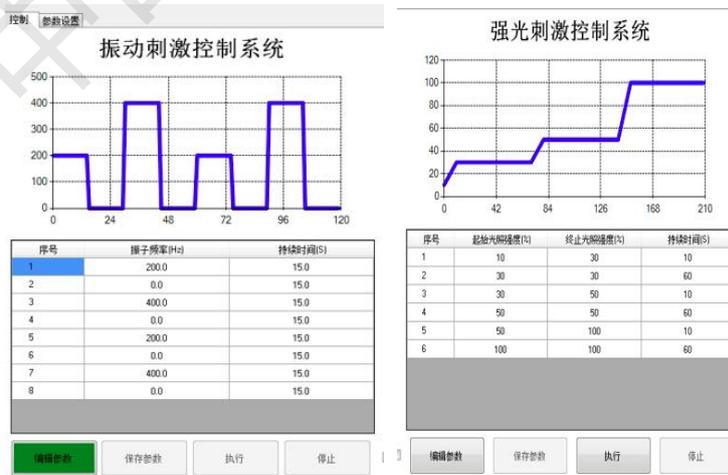


图 7 系统软件界面

1.4 系统测试

1.4.1 振动刺激斑马鱼行为分析

通过一定频率和强度的声音信号去刺激斑马鱼，斑马鱼会产生突然的逃逸反应，在行为上表现为运动的突然加速与转变运动方向。选取 7dpf 的斑马鱼幼鱼，200Hz 振动 15S 后，斑马鱼行为活跃，轨迹多为红色的大运动，如图 8.1 所示，斑马鱼运动速度较快；不提供刺激的斑马鱼行为较少，轨迹多为绿色的小运动，如图 8.2 所示，斑马鱼运动速度较慢。

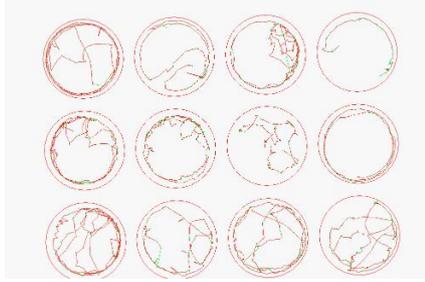


图 8.1 200Hz 振动斑马鱼轨迹图

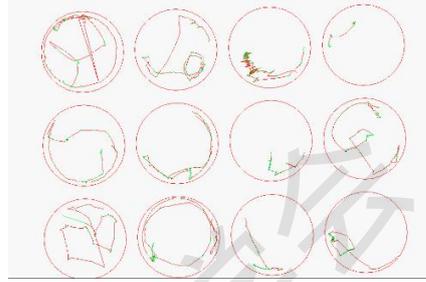


图 8.2 对照组斑马鱼轨迹图

1.4.2 强光刺激斑马鱼的行为分析

斑马鱼幼鱼具有避光性，长期暴露在强光刺激的环境中会表现出焦虑的行为，具体表现为剧烈运动变多，运动速度加快。选取 7dpf 的斑马鱼幼鱼，强光刺激 30S，斑马鱼行为活跃，轨迹多为红色的大运动，如图 9.1 所示，斑马鱼运动速度较快；黑暗环境斑马鱼行为较少，如图 9.2 所示，轨迹多为绿色的小运动，斑马鱼运动速度较慢。斑马鱼幼鱼在黑暗环境中的稳定运动速度要低于强光刺激环境。

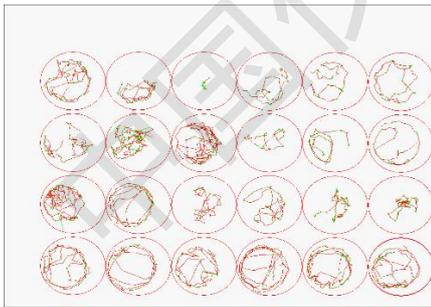


图 9.1 强光刺激斑马鱼轨迹图

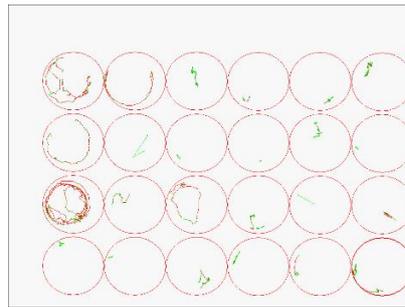


图 9.2 黑暗周期斑马鱼轨迹图

1.5 结论

斑马鱼行为学实验是一种简单快速地检测各种因子对斑马鱼活动影响的手段。斑马鱼应激行为分析装置能够为斑马鱼提供多种环境刺激因子，能够实现高通量实时筛选和分析斑马鱼行为，振动刺激频率可调，光照刺激模式多样，广泛适用于听觉研究、视觉研究、发育生物学、神经生物学、药物开发、环境毒理学、行为遗传学、昼夜节律和人类遗传疾病相关研究。该装置能够为相关的基础研究和应用研究提供有力的技术支撑，将成为行为学、神经生

物学、发育生物学等领域进一步拓展的方向。

参考文献:

- [1] Nabinger D D , Altenhofen S , Bonan C D . Zebrafish models: Gaining insight into purinergic signaling and neurological disorders[J]. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2019, 98(2 and 3-Spec Issue):109770.
- [2] Guo S . Using zebrafish to assess the impact of drugs on neural development and function[J]. Expert Opinion on Drug Discovery, 2009.
- [3] Howe K , Clark M D , Torroja C F , et al. Corrigendum: The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. Nature, 2013.
- [4] Mathur P , Su G . Use of zebrafish as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes[J]. Neurobiology of Disease, 2010, 40(1):66-72.
- [5] Blaser R , Gerlai R . Behavioral phenotyping in zebrafish: Comparison of three behavioral quantification methods[J]. Behav Res Methods, 2006, 38(3):456-469.
- [6] Yingzi H , Chengfu C , Dongmei T , et al. Effect of histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid on hair cell regeneration in zebrafish lateral line neuromasts[J]. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2014, 8:382.
- [7] Steiner A B , Kim T , Cabot V , et al. Dynamic gene expression by putative hair-cell progenitors during regeneration in the zebrafish lateral line[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(14):E1393.
- [8] Bisgrove, Brent, W, et al. GENETICS OF HUMAN LATERALITY DISORDERS: Insights from Vertebrate Model Systems.[J]. Annual Review of Genomics & Human Genetics, 2003.