

何嘉玲, 暴国, 王天奇, 等. 斑马鱼幼鱼整鱼石蜡切片制作 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 35-41.

He JL, Bao G, Wang TQ, et al. Preparation of paraffin-embedded sections of zebrafish larva [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 35-41.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.08.006

斑马鱼幼鱼整鱼石蜡切片制作

何嘉玲, 暴国, 王天奇, 张长勇, 李楠, 孙德明*

(国家卫生健康委科学技术研究所实验动物中心, 北京 100081)

【摘要】 目的 探讨斑马鱼幼鱼整鱼的石蜡切片制作。**方法** 以4 d 斑马鱼幼鱼为材料, 探讨使用不同固定剂和脱水剂的切片效果。**结果** 4% PFA 过夜不适合幼鱼脑组织和肌肉固定, 组织脆裂严重, 但对肠道影响较小。Bouin's 液适合幼鱼固定, 后续使用叔丁醇脱水稍优于乙醇。Bouin's 液固定的幼鱼脑组织脱水 1 min, 肌肉组织脱水 4 min 能获得良好的切片效果。**结论** 在优化条件下, 制作的切片基本达到了切片完整, 薄厚均匀, 无褶无刀痕, 裂痕; 染色核质分明, 红蓝适度, 透明洁净等要求。可供需进行斑马鱼幼鱼石蜡切片的研究者参考。

【关键词】 斑马鱼幼鱼; 石蜡切片; 固定剂; 脱水剂

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0035-07

Preparation of paraffin-embedded sections of zebrafish larva

HE Jialing, BAO Guo, WANG Tianqi, ZHANG Changyong, LI Nan, SUN Deming*

(Experimental Animal Center of National Research Institute for Family Planning, Beijing 100081, China)

【Abstract】 Objective To develop a method of paraffin-embedded section preparation of whole zebrafish larva. **Methods** At 4 days post-fertilization, zebrafish larvae were used to explore the effect of two kinds of fixative solution and dehydration reagent on paraffin-embedded sections. **Results** Overnight 4% PFA fixation was not suitable for brain or muscle tissues of zebrafish larva. The tissue was severely brittle, but it had little effect on the intestines. Bouin's fixative solution was suitable for fixation of zebrafish larva, and subsequent use of tert-butanol or ethanol showed little difference. The dehydration by tert-butanol was slightly better than that of ethanol. For Bouin's solution-fixed zebrafish larva, brain tissue dehydrated for 1 minute and muscle tissue dehydrated for 4 minutes can obtain a standard paraffin section which has no folds, no cracks and clearly dyed. **Conclusions** Under optimized conditions, the prepared sections met the standard for paraffin-embedded sections: a complete, uniform thickness, no folds, no knife marks or cracks, a clearly dyed nucleus, moderately red and blue, transparent, and clean. This method can be used as a reference for researchers who need to prepare paraffin-embedded sections of zebrafish larva.

【Keywords】 zebrafish larva; paraffin-embedded section; fixative solution; dehydration reagent

斑马鱼 (*Danio rerio*) 又名蓝条鱼、花条鱼、斑马担尼鱼, 隶属辐鳍亚纲鲤科短担尼鱼属, 是发育生物学、遗传学、毒理学等领域重要的脊椎动物模

型^[1-5]。然而, 目前国内尚缺乏其系统的组织形态学描述。为数不多的国内研究也较多地关注斑马鱼成鱼的组织形态学变化, 如成鱼的脑、肠道、心

【基金项目】 2019 年度国家卫生健康委科研所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2019GJM03); 2018 年度国家卫计委科研所科技创新重点项目 (2018GJ07)。

【作者简介】 何嘉玲 (1980—), 女, 助研, 研究方向: 实验动物科学。E-mail: missu329@aliyun.com

【通信作者】 孙德明 (1958—), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物科学。E-mail: sundemingnet@163.com

脏和肝等^[6-8]。在生物学及医学领域,由于斑马鱼早期胚胎透明,易于观察,其在各领域的应用远远较成鱼广泛。然而目前国内尚未检索到关于斑马鱼幼鱼石蜡切片条件优化的文献。研究者在进行幼鱼石蜡切片的过程中多采用传统石蜡切片制备方法,切片质量良莠不齐^[9-10]。斑马鱼幼鱼体型小,含水量高,有必要摸索出一套适合于斑马鱼幼鱼的石蜡切片方法,以获得优质的组织切片。

优质的石蜡组织切片能够保持细胞间的正常相互关系,清晰显示组织细胞的形态结构,真实地展示组织形态学结构。在条件摸索中我们发现,不恰当的石蜡切片制作方法,可能人为导致正常的生理组织出现“异常”的形态和结构,影响实验的判断。本实验以斑马鱼幼鱼整鱼为实验材料,从固定、脱水、透明等环节出发摸索实验条件。通过 HE 染色后采集图像,展示不同条件下获得的切片效果,为后续研究者进行斑马鱼幼鱼切片制作提供有益的参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验所用斑马鱼成鱼为野生型 TU 品系,由北京大学生命科学学院细胞增殖与分化教育部重点实验室张博教授馈赠,20~24 周龄,体重约 350~390 mg,雌雄各 4 尾。按照 Westerfield^[11]述及的方法饲养、繁育、收集受精卵。受精卵清洗和消毒后,放入含有 1‰(w/v)亚甲基蓝的培养液中,于 28.5℃ 培养箱中培养 4 d,期间每天更换新鲜培养液。上述斑马鱼饲养及实验均在国家卫生健康委科学技术研究所实验动物中心[SYXK(京)2018-0010]完成。所有研究方案均通过国家卫生健康委科学技术研究所实验动物福利伦理委员会审批(NRIFH11-1912-6),严格遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

Tricaine(sigma);多聚甲醛(天津市致远化学试剂有限公司);波恩氏液(北京百奥莱博科技有限公司);乙醇(宜兴市第二化学试剂厂);二甲苯(宜兴市第二化学试剂厂);叔丁醇(上海阿拉丁化学试剂有限公司);苏木素染液(珠海贝索生物技术有限公

司);伊红(天津市大茂化学试剂厂)。切片机(德国莱卡公司);正置光学显微镜(德国莱卡公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 固定、脱水、透明

受精后 4 d(4 days post fertilization, 4dpf) 幼鱼固定前,用 0.02% 的 Tricaine (ethylm-aminobenzoate, 1 mol/L Tris - HCl, pH9.0) 进行安乐死。随后分别用 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 和 Bouin's 液固定 24 h。固定完成后,4% 多聚甲醛固定的样品放入装有蒸馏水的离心管中,置摇床上,清洗 3~4 次,每 15~30 min 换一次水。Bouin's 液固定的样品放入装有 70% 乙醇(配制时 50 mL 中加 30 μL 浓氨水)的离心管中,同法清洗固定组织,以去除固定液中色素的干扰。

脱水时间分别为 1 min 和 4 min,叔丁醇脱水后直接浸蜡,乙醇脱水后经二甲苯透明后浸蜡,透明程序为:无水乙醇-二甲苯等体积混合液 2.5 min,二甲苯 I 1 min,二甲苯 II 1 min。

实验设计详见表 1、表 2 和表 3。

1.3.2 浸蜡、包埋、切片

按照常规方法进行浸蜡,包埋和切片处理。透明后于 65℃ 浸蜡,共 2 次,分别为 20 min 和 40 min。为获得斑马鱼不同切面的切片,包埋时可使用高精密镊子在液态石蜡中摆放幼鱼。待蜡块彻底冷却后,蜡块于 -20℃ 冰箱冷冻 1~2 h,修块,制备 5 μm 切片。

1.3.3 HE 染色

石蜡切片的 HE 染色参考常规方法进行。切片 65℃ 干烤 1 h 后立即浸入二甲苯脱蜡,二甲苯 I 和二甲苯 II 各 25 min。随后梯度水化:无水乙醇 I,无水乙醇 II,95% 乙醇 I,95% 乙醇 II,75% 乙醇,蒸馏水各 10 min。苏木精-伊红(HE)染色按常规方法进行:苏木素染液染色 2 min,蒸馏水洗 3 次,盐酸乙醇 2 s,蒸馏水洗 3 次,氨水乙醇 20 s,蒸馏水洗 3 次,伊红染色 1 min,蒸馏水洗 3 次。随后 75% 乙醇快速脱水,95% 乙醇 I,95% 乙醇 II,100% 乙醇 I,100% 乙醇 II 各脱水 5 min,二甲苯 I 和二甲苯 II 各 15 min,最后中性树胶封片,制成永久切片。用正置显微镜观察并采集图片。

表 1 斑马鱼 4 dpf 幼鱼石蜡切片实验分组
Table 1 Experimental group of 4dpf zebrafish larva for paraffin section

组别 Groups	固定液 Fixative solution	脱水剂 Dehydrating agent	透明剂 Transparent agent
组 I Group I	4%多聚甲醛 4% PFA	叔丁醇 Tertiary butanol	/
组 II Group II	4%多聚甲醛 4% PFA	乙醇 Ethanol	二甲苯 Xylene
组 III Group III	波恩氏液 Bouin's solution	叔丁醇 Tertiary butanol	/
组 IV Group IV	波恩氏液 Bouin's solution	乙醇 Ethanol	二甲苯 Xylene

表 2 脱水过程
Table 2 Process of dehydration

组 I Group I	时间 (min) Time	组 II Group II	时间 (min) Time	组 III Group III	时间 (min) Time	组 IV Group IV	时间 Time (min)
30%叔丁醇 30% Tertiary butanol	1 4	30%乙醇 30% Ethanol	1 4	70%叔丁醇 70% Tertiary butanol	1 4	70%乙醇 70% Ethanol	1 4
40%叔丁醇 40% Tertiary butanol	1 4	40%乙醇 40% Ethanol	1 4	80%叔丁醇 80% Tertiary butanol	1 4	80%乙醇 80% Ethanol	1 4
50%叔丁醇 50% Tertiary butanol	1 4	50%乙醇 50% Ethanol	1 4	90%叔丁醇 90% Tertiary butanol	1 4	90%乙醇 90% Ethanol	1 4
60%叔丁醇 60% Tertiary butanol	1 4	60%乙醇 60% Ethanol	1 4	95%叔丁醇 95% Tertiary butanol	1 4	95%乙醇 95% Ethanol	1 4
70%叔丁醇 70% Tertiary butanol	1 4	70%乙醇 70% Ethanol	1 4	100%叔丁醇 100% Tertiary butanol	1 4	100%乙醇 100% Ethanol	1 4
80%叔丁醇 80% Tertiary butanol	1 4	80%乙醇 80% Ethanol	1 4	100%叔丁醇 100% Tertiary butanol	1 4	100%乙醇 100% Ethanol	1 4
90%叔丁醇 90% Tertiary butanol	1 4	90%乙醇 90% Ethanol	1 4				
95%叔丁醇 95% Tertiary butanol	1 4	95%乙醇 95% Ethanol	1 4				
100%叔丁醇 100% Tertiary butanol	1 4	100%乙醇 100% Ethanol	1 4				
100%叔丁醇 100% Tertiary butanol	1 4	100%乙醇 100% Ethanol	1 4				

表 3 透明过程
Table 3 Process of transparency

组 II Group II	时间 (min) Time	组 IV Group IV	时间 (min) Time
乙醇-二甲苯 (1:1) Ethanol-Xylene (1:1)	2.5	乙醇-二甲苯 (1:1) Ethanol-Xylene (1:1)	2.5
二甲苯 Xylene	1	二甲苯 Xylene	1
二甲苯 Xylene	1	二甲苯 Xylene	1

2 结果

2.1 固定剂对切片效果的影响

参考斑马鱼成鱼组织的固定,采用应用较多的单一固定剂 4% PFA 和复合固定剂 Bouin's 液分别固定斑马鱼幼鱼。4%多聚甲醛固定的幼鱼,后续无论何种脱水条件,脑组织(图 1a、1b、1e、1f)都出现了明显的收缩和脆裂,骨骼肌纤维也出现不同程度的收缩,间隙异常增宽(图 2a、2b、2e、2f)。而经 Bouin's 液固定的幼鱼,都较好地保持组织的原形,低倍镜下没有观察到明显的组织脆裂的现象(图 1C、1D、1G、1H)。但对于幼鱼深部的器官,如肠道

等则受固定液影响较小,除 4% PFA 固定后乙醇梯度脱水 1 min 的幼鱼(图 2b)以外,其余 PFA 固定幼鱼的肠道没有出现类似脑和肌肉组织脆裂的现象。结果详见图 1。

此外,在固定过程中应注意,为避免机体出现自溶引起组织结构的改变,鱼施行安乐死后,应尽快进行固定;固定过程中,由于前期硬度不够,应确保幼鱼水平摆放,避免体轴弯曲而影响后续切片和观察。

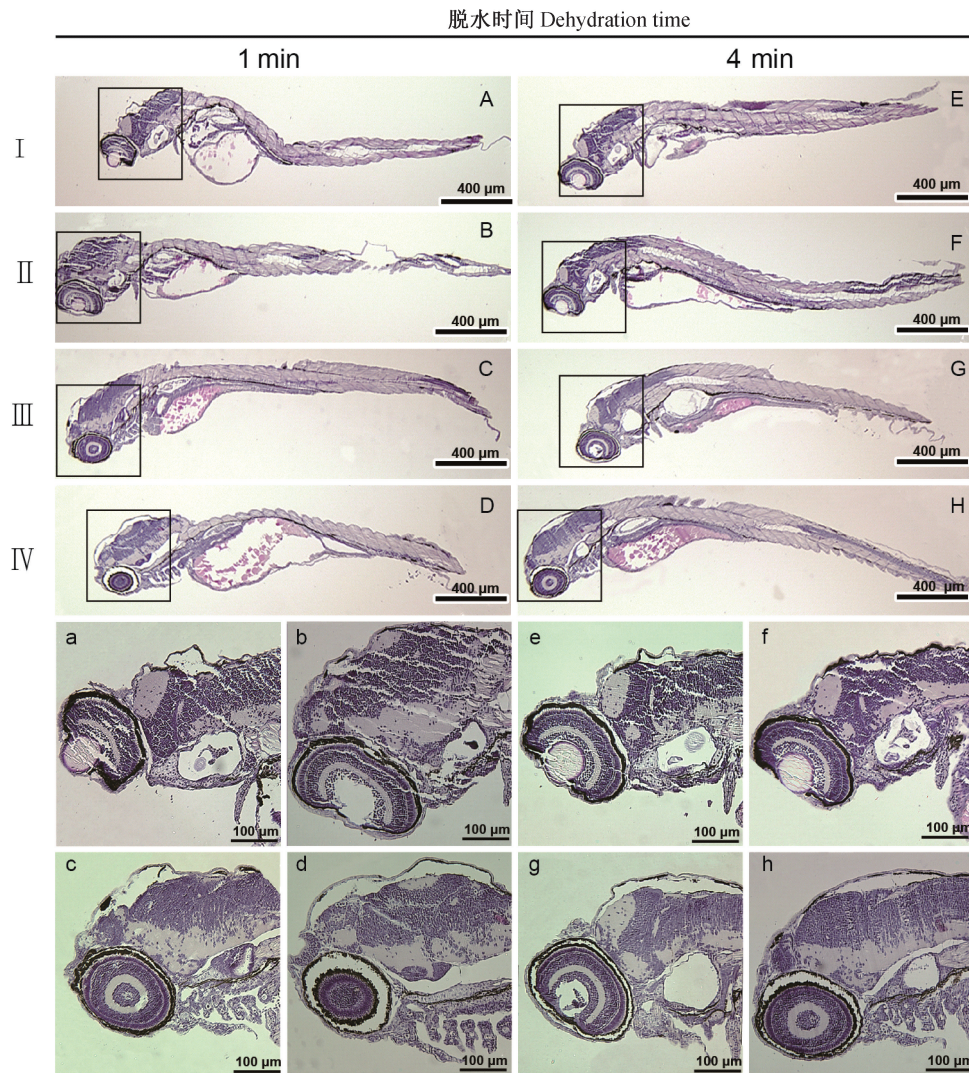
2.2 脱水对切片效果的影响

选用常规的脱水剂乙醇和脱水能力较弱的叔丁醇分别进行脱水。为防止高浓度脱水剂脱

水时间过长导致组织脆化,摸索脱水时间,分别进行 1 min 和 4 min 梯度脱水。乙醇属于非石蜡溶剂,脱水后选择二甲苯进行透明,叔丁醇为兼石蜡溶剂,无需进行透明,脱水后可直接浸蜡。

对于脑组织,经 PFA 固定的幼鱼,无论用叔丁

醇或乙醇作为脱水剂,脆裂都比较严重,叔丁醇脱水(图 1a、1e)的脆裂程度较乙醇脱水(图 1b、1f)稍轻。对于眼睛,经 PFA 固定的幼鱼,都出现了明显的裂痕,其中叔丁醇 1 min 梯度脱水的效果最差,裂纹非常严重(图 1a)。在 Bouin's 液固定的鱼中,对于脑组织和眼睛,无论是叔丁醇或是乙醇梯度脱



注:小写字母标记的图片是相应大写字母标记图片的局部放大图。A、a:4% PFA 固定,叔丁醇脱水 1 min; E、e:4% PFA 固定,叔丁醇脱水 4 min; B、b:4% PFA 固定,乙醇脱水 1 min; F、f:4% PFA 固定,乙醇脱水 4 min; C、c:Bouin's 液固定,叔丁醇脱水 1 min; G、g:Bouin's 液固定,叔丁醇脱水 4 min; D、d:Bouin's 液固定,乙醇脱水 1 min; H、h:Bouin's 液固定,乙醇脱水 4 min。

图 1 4 d 斑马鱼幼鱼不同实验分组的大体和局部切片效果

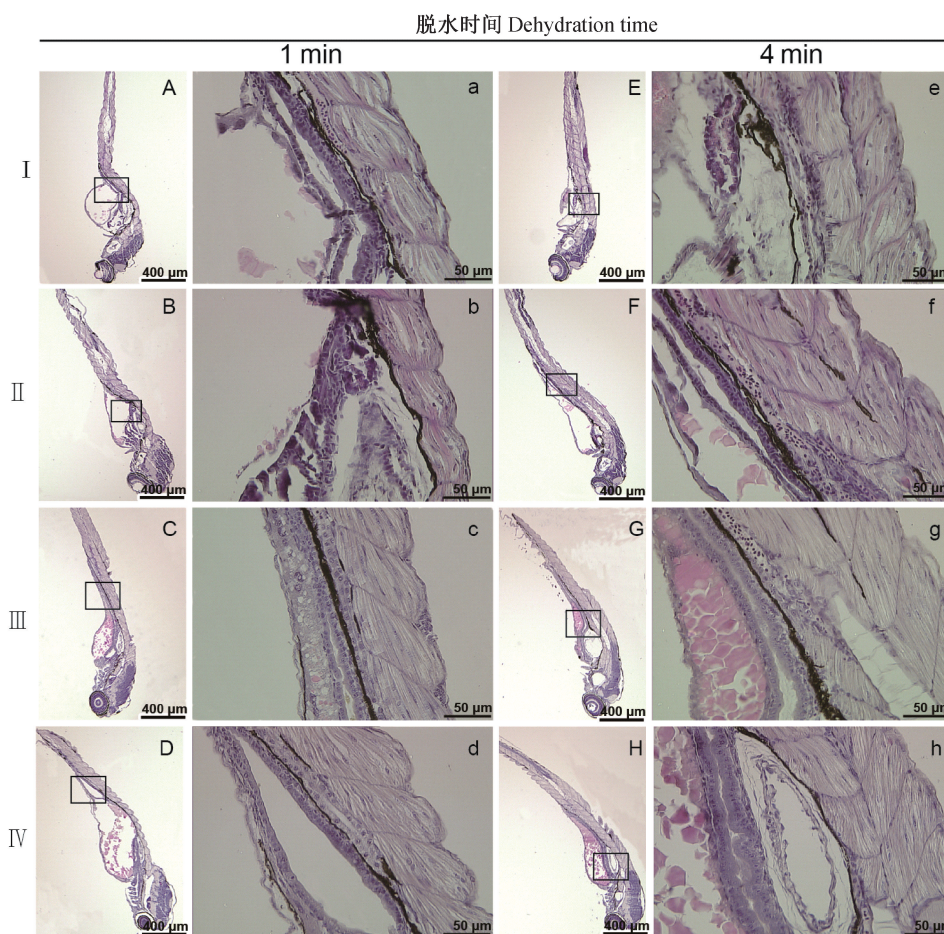
Note. The pictures marked with lower case letters are partial enlarged views of the pictures marked with corresponding upper case letters. A/a, 4% PFA fixation, tert-butanol dehydration for 1 min. E/e, 4% PFA fixation, t-butanol dehydration for 4 min. B/b, 4% PFA fixation, ethanol dehydration for 1 min. F/f, 4% PFA Fixation, ethanol dehydration for 4 min. C/c, Bouin's solution fixation, tert-butanol dehydration for 1 min; G/g, Bouin's solution fixation, tert-butanol dehydration for 4 min. D/d, Bouin's solution fixation, ethanol dehydration for 1 min. H/h, Bouin's solution fixed, ethanol dehydrated for 4 min.

Figure 1 General and local sectioning effects of different experimental groupings of 4dpf zebrafish larva

水,都获得了较好的切片效果,切片无褶无裂痕。但乙醇脱水时间为 4 min 的样品,可观察到轻微的刀痕(图 1H、1h),可能与脱水时间较长,组织硬度较大有关系。因此,对于脑组织而言,Bouin's 液固定后,脱水时间不宜过长,叔丁醇或乙醇 1 min 梯度脱水即可获得较好的切片效果。

对于肌肉组织,经 PFA 固定的幼鱼,无论利用叔丁醇或乙醇作为脱水剂的切片效果差异不大,都出现不同程度的收缩,间隙增宽。对于 Bouin's 固

定的样品,使用乙醇进行脱水的样品出现轻微的肌纤维收缩(图 2d、2h),叔丁醇(图 2c、2g)的切片效果优于乙醇。观察脱水时间对肌肉组织切片效果的影响发现,脱水时间 4 min 样品(图 2e、2f、2g、2h)的收缩程度明显小于 1 min 梯度脱水的样品(图 2a、2b、2c、2d)。因此,对于肌肉组织,Bouin's 液固定后,使用叔丁醇脱水优于乙醇,且脱水时间不宜过短,4 min 的叔丁醇梯度脱水能达到较好的切片效果。结果详见图 2。



注:小写字母标记的图片是相应大写字母标记图片的局部放大图。A、a:4% PFA 固定,叔丁醇脱水 1 min; E、e:4% PFA 固定,叔丁醇脱水 4 min; B、b:4% PFA 固定,乙醇脱水 1 min; F、f:4% PFA 固定,乙醇脱水 4 min; C、c:Bouin's 液固定,叔丁醇脱水 1 min; G、g:Bouin's 液固定,叔丁醇脱水 4 min; D、d:Bouin's 液固定,乙醇脱水 1 min; H、h:Bouin's 液固定,乙醇脱水 4 min。

图 2 4 d 斑马鱼幼鱼不同实验分组的大体和局部切片效果

Note. The pictures marked with lower case letters are partial enlarged views of the pictures marked with corresponding upper case letters. A/a, 4% PFA fixation, tert-butanol dehydration for 1 min. E/e, 4% PFA fixation, t-butanol dehydration for 4 min. B/b, 4% PFA fixation, ethanol dehydration for 1 min. F/f, 4% PFA Fixation, ethanol dehydration for 4 min. C/c, Bouin's solution fixation, tert-butanol dehydration for 1 min. G/g, Bouin's solution fixation, tert-butanol dehydration for 4 min. D/d, Bouin's solution fixation, ethanol dehydration for 1 min. H/h, Bouin's solution fixed, ethanol dehydrated for 4 min.

Figure 2 General and local sectioning effects of different experimental groupings of 4 dpf zebrafish larva

2.3 不同组织最佳的切片条件

对于斑马鱼幼鱼的不同组织,由于存在蛋白质、脂肪及水等含量的差异,对切片的条件有不同的要求^[12]。在本文摸索的条件中,对于斑马鱼幼鱼的脑组织,最佳的固定液为 Bouin's 液,后续使用乙醇或叔丁醇脱水 1 min 可以达到良好的切片效果;对于骨骼肌,最佳的固定液仍是 Bouin's 液,但是对于肌肉组织,叔丁醇脱水的效果明显优于乙醇,并且脱水 4 min 的效果优于脱水 1 min 的效果;消化道组织,受不同固定液和脱水液的影响较小,除 4% PFA 固定后,乙醇 1 min 梯度脱水出现了较明显的脆裂外,其余固定和脱水条件下,切片效果都较好,没有显著差异;对于幼鱼眼睛,4% PFA 固定后裂纹明显,而经 Bouin's 液固定后,除了乙醇梯度脱水 4 min 出现轻微刀痕外,都能获得良好的切片效果。结果详见表 4。

3 讨论

斑马鱼由于其独特的优势在生命科学领域得到了广泛的应用。相较于成鱼,斑马鱼胚胎和幼体具有身体透明,便于显微镜观察,数量多,有利于高通量实验等优点,在药物发育毒理学,环境毒理学,肿瘤异体移植,遗传学,疾病动物模型等方面应用更为广泛^[13-14]。研究者往往通过操作斑马鱼幼鱼或胚胎,观察表型变化,获得实验结论。而组织器官细胞水平的变化是表型变化的根本。组织切片技术克服了无法观察组织内部变化的不足,是反映组织实时状况最有效的手段,甚至是某些诊断和评价的金标准。

随着斑马鱼应用的日益广泛,笔者通过搜索引擎发现,研究人员对斑马鱼幼鱼石蜡切片方法有较大的需求。但经文献搜索,发现国内关于幼鱼石蜡切片的文献非常匮乏。仅有几篇关于斑马鱼成鱼石蜡切片的文献^[7, 14-15]。斑马鱼幼鱼具有与成鱼不同的组织特性,加之体型小,较难分离组织器官等特点,亟需一套适用于斑马鱼幼鱼整体石蜡切片的方法。

合适的染色前处理是获得优质组织病理切片的基础。笔者通过多轮实验和实验条件摸索,获得了良好的幼鱼整体石蜡切片结果。以下将重点讨论实验中需要注意的问题及解决办法。

染色前的固定、脱水、透明、浸蜡是影响切片质量至关重要的环节。处理不当,石蜡切片往往容易出现收缩,裂纹等问题,既不符合石蜡切片的要求,也影响结果的判断。

固定是石蜡切片制片的关键,良好的固定剂能迅速穿透组织,保持组织原形,不发生膨胀或收缩。多聚甲醛是甲醛的聚合物,性质比甲醛稳定,在传统的石蜡切片组织样本固定中广泛应用。但本实验结果显示,斑马鱼幼鱼经 4% PFA 过夜固定后,导致了幼鱼组织不可回复的硬化,无论后续脱水条件如何优化,脑组织和肌肉组织都出现了明显的裂痕,严重影响实验观察。可能与斑马鱼幼鱼组织器官的特性有关。Bouin's 固定液是一种混合固定剂,对幼鱼组织硬化作用适中,后续经过适当的脱水,透明和浸蜡等处理,能获得较满意的切片,与斑马鱼成鱼结果类似^[15]。

脱水就是除去组织内部水分以便后续石蜡的

表 4 不同组织在不同条件下的切片效果
Table 4 Effects among different tissues under different conditions

组织 Tissues	4% PFA				波恩氏液 Bouin's solution			
	乙醇 Ethanol		叔丁醇 Tertiary butanol		乙醇 Ethanol		叔丁醇 Tertiary butanol	
	1 min	4 min	1 min	4 min	1 min	4 min	1 min	4 min
脑组织 Brain tissue	收缩,脆裂严重 Severe contracted and brittle	收缩,脆裂严重 Severe contracted and brittle	稍收缩,脆裂 Slightly contracted and brittle	稍收缩,脆裂 Slightly contracted and brittle	良好 Good	轻微刀痕 Slightly cutter mark	良好 Good	良好 Good
骨骼肌 Skeletal muscle	收缩,间隙增宽 Contracted and gap widening	收缩,间隙增宽 Contracted and gap widening	收缩,间隙增宽 Contracted and gap widening	收缩,间隙增宽 Contracted and gap widening	轻微收缩 Slightly contracted	轻微收缩 Slightly contracted	轻微收缩 Slightly contracted	良好 Good
消化道 Digestive tract	脆裂 Brittle	良好 Good	良好 Good	良好 Good	良好 Good	良好 Good	良好 Good	良好 Good
眼睛 Eye	裂纹明显 Obvious cracks	裂纹明显 Obvious cracks	严重裂纹 Severe cracks	裂纹明显 Obvious cracks	良好 Good	轻微刀痕 Slightly cutter mark	良好 Good	良好 Good

浸入,梯度乙醇是应用最广泛的脱水剂,但对于斑马鱼幼鱼的肌肉组织而言,即使是 30% 起始的梯度乙醇脱水都能引起肌肉纤维的收缩,说明对于幼鱼而言,乙醇作为脱水剂脱水能力过强。改用叔丁醇后,肌肉收缩现象显著改善。另外叔丁醇作为脱水剂兼透明剂,可以获得良好的脱水效果,同时避免二甲苯透明的环节,减少了导致组织硬化和脆裂的可能。对于肌肉组织,Bouin's 液固定后,无论使用乙醇或叔丁醇作为脱水剂,4 min 的脱水效果都优于 1 min,可能是与短时间内脱水不尽,残留在组织细胞中的水分无法与二甲苯相溶,导致石蜡无法完全渗入有关。

通过条件摸索和优化,本方法制备的石蜡切片能达到石蜡切片的质量要求,可供以斑马鱼幼鱼为研究对象的研究者参考。

参考文献:

- [1] 张博,李绍武.《遗传》与中国斑马鱼遗传发育研究共同成长[J]. 遗传, 2012, 34(9): 1079-1081.
- [2] 尚春峰,穆宇,杜久林.以透明脑,观澄明心——斑马鱼神经功能研究进展[J]. 中国科学:生命科学, 2015, 45(3): 223-236.
- [3] 梁锦锋,朱勇,张洪瑶,等.斑马鱼模型在药物研发早期肾脏毒性中的应用研究[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(9): 30-35.
- [4] 于学慧,张世栋,张承梅.发育生物学的理想动物模型——斑马鱼[J]. 中国实验动物学杂志, 2001, 3(11): 45-48.
- [5] 邸亚男,朱丽英,沈婕,等.四种有机溶剂对斑马鱼眼睛发育的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 75-80.
- [6] 陈微,章琳俐,刘仪,等.斑马鱼中脑微细结构及相关免疫组化反应[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(12): 89-93.
- [7] 王宁军,赵燕,刘娟.斑马鱼器官石蜡组织切片制作与观察[J]. 解剖学研究, 2019, 41(3): 240-241.
- [8] 林金杏,章琳俐,姚一琳,等.斑马鱼肠道显微和超微结构的研究[J]. 畜牧与兽医, 2013, 45(3): 60-66.
- [9] 杨国威,彭世泽,赵建元,等.基于海分枝杆菌感染斑马鱼模型的抗结核药物评价方法研究[J]. 药科学报, 2019, 54(5): 854-860.
- [10] 苑朋辉,赵维超,胡南,等.低剂量率 γ 射线辐照对斑马鱼胚胎脑部发育形态学的影响[J]. 南华大学学报(自然科学版), 2019, 33(3): 28-32.
- [11] M W. The Zebrafish Book: A Guide for The Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio) [M]// Oregon: University of Oregon Press, 1995.
- [12] 徐玉环,刘颖,徐艳峰,等.小鼠整体胚胎和新生鼠石蜡切片技术的改进[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(12): 39-41.
- [13] 戴明珠,黄燕烽,彭逸,等.斑马鱼发育毒性与致畸性相关实验研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 137-142.
- [14] 郭胜亚,朱晓宇,周佳丽,等.斑马鱼在功能性食品研究中的应用进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 143-147.
- [15] 郑伟,严继舟.斑马鱼组织石蜡切片质量的优化[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 260-263.

[收稿日期] 2020-06-18