

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.01089

台湾地区斑马鱼研究现况

陈吉芳¹, 陈持平², 萧崇德^{1,3}

1. 中原大学生物科技系, 中坻 32023;
2. 马偕纪念医院医学研究部, 淡水 25160;
3. 中原大学奈米科技中心, 中坻 32023

摘要: 台湾地区斑马鱼研究起始于1996年, 在经历了约8年的萌芽期(1996~2003年)之后, 目前已进入到茁壮期(2004~现今), 现今全台湾共有83个实验室使用斑马鱼作为实验材料, 台湾地区斑马鱼研究社群的研究主题可大致分成3大类: (1) 胚胎发育; (2) 人类疾病; (3) 生物技术。累积至今与斑马鱼相关论文发表总数已达到342篇。自2010年起, 台湾也成立了两个斑马鱼种质资源库(TZCAS与ZeTH)。在种质资源库的充分协助下, 目前许多医院的临床医师、工程与生物信息相关领域的研究人员, 也开始加入斑马鱼研究社群进行跨领域的整合性研究, 成为现今台湾地区斑马鱼研究的一大特色。

关键词: 斑马鱼; 种质资源库; 台湾地区

Zebrafish research in Taiwan

CHEN Chi-Fang¹, CHEN Chih-Ping², HSIAO Chung-Der^{1,3}

1. Department of Bioscience Technology, Chung Yuan Christian University, Chung-Li 32023, Taiwan, China;
2. Department of Medical Research, Mackay Memorial Hospital, Tamsui 25160, Taiwan, China;
3. Center of Nanotechnology, Chung Yuan Christian University, Chung-Li 32023, Taiwan, China

Abstract: The initiation time for zebrafish research in Taiwan was around 1996 and experienced eight years (1996-2003) to establish the fundamental base. From 2004 onwards, zebrafish research project and population in Taiwan is exponentially increasing to a total number of 83 independent research laboratories at this moment. Three major research topics of developmental biology, human disease, and biotechnology are conducted by zebrafish community in Taiwan. Up to now, 342 scientific refereed papers have been published by Taiwan researchers. By 2010, two zebrafish stock centers of TZCAS and ZeTH have been established to provide fish resources to zebrafish community. By the fully support of two zebrafish stock centers, attending physicians and experts in the fields of engineering and bioinformatics are working together with zebrafish people and obtained fruitful results in zebrafish researches in recent years.

Keywords: zebrafish; stock center; Taiwan

收稿日期: 2012-03-01; 修回日期: 2012-09-12

基金项目: 马偕中原合作计划项目(编号: MMH-CY-9905; MMH-CY-10001; MMH-CY-10005)资助

作者简介: 陈吉芳, 博士后, 研究方向: 转基因斑马鱼。Tel: 886-32653546; E-mail: randeonneo@hotmail.com

通讯作者: 萧崇德, 助理教授, 研究方向: 建立斑马鱼疾病模式。E-mail: cdhsiao@cycu.edu.tw

网络出版时间: 2012-8-7 15:00

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120807.1500.003.html>

斑马鱼(*Danio rerio*)是一种新兴的脊椎动物模型,具有体型小、发育快、胚胎透明、遗传操作技术成熟与网络资讯丰富等诸多优点,可以利用斑马鱼来研究如胚胎发育机制、模拟人类疾病与鱼类生理等相关课题,再配合活体影像技术的使用,可以由斑马鱼中发掘并回答一些重要的生物学现象。在斑马鱼系统尚未引进到台湾地区之前,科研人员就已经以其他淡水或海水鱼种(例如泥鳅与罗非鱼)进行科研活动,并已累积不少鱼类相关的科研力量。1996年引进斑马鱼系统后,能激发出许多有趣的科研课题,奠定了台湾地区斑马鱼的研究基础。

本文从台湾地区斑马鱼研究的历史沿革谈起,概述了台湾地区斑马鱼研究的人力资源分布、研究活动与两大斑马鱼种质资源库的营运现况,最后分析了台湾地区斑马鱼研究的成果,并对未来需要加强的方向提出了建议,以供两岸斑马鱼研究的同仁参考。

1 台湾地区斑马鱼研究的历史沿革

1.1 萌芽期(1996~2003年)

台湾地区斑马鱼研究最早起始于“中央研究院”。1996年吴金洌研究员从美国俄勒冈大学取回野生种斑马鱼,经过1年后由黄声苹研究员于1997年发表了台湾地区第一篇斑马鱼研究相关论文,报道了***bmp4***基因在斑马鱼的表达^[1]。黄声苹研究员原本在美国接受的是海胆发育生物学训练,但是回台后由于实验材料不易获取,于是便转以使用斑马鱼进行研究(这点与大陆许多研究人员相似)。与此同时,台湾大学的蔡怀桢老师则是采用日本稻田鱼(*Medaka, Oryzias latipes*)进行鱼类胚胎研究。在研究的初期,由于受限于突变鱼种的取材不易以及***Morpholino***基因干扰技术与转基因技术尚未完全成熟,因此当时台湾地区的研究人员多半是研究斑马鱼的基因结构、基因表现、启动子活性与尝试制作转基因荧光鱼等等。2001年,建立了台湾地区第一个稳定遗传的转基因斑马鱼^[2]与稻田鱼^[3],其中转基因斑马鱼是笔者在台湾大学蔡怀桢老师实验室就读博士班时所建立,主要是利用来自腺联病毒AAV-ITR序列来增进转基因在鱼类胚胎中的表达。

而转基因稻田鱼后来授权给生物技术厂商,制作成不孕性的三倍体后推广成为发绿荧光的观赏鱼种——夜明珠(又称为邕港一号)。在研究的萌芽期,台湾地区每年发表的硕博论文量在20篇上下。

1.2 茁壮期(2004年至今)

经过了大约8年的萌芽期,台湾地区斑马鱼研究社群开始进入茁壮期,在这期间最大的特色就是每年所发表的硕博士论文量快速上升,获得补助的项目与补助金额也大幅度增长。在这个时期,从海外归来的台湾学者学习到许多核心技术(如***Tol2***跳跃基因、突变鱼种、BAC基因重组与细胞移植等),再加上基因干扰物质***Morpholino***容易购买获得,使得斑马鱼基因的功能分析变得相对容易,所以台湾地区研究人员的研究课题开始呈现较为多样的变化。而且此时研究人员开始大量聘用具有斑马鱼专长的博士或博士后进行研究工作,使得在一些传统领域如鱼类生理与病理学获得了较大的成就。例如笔者在博士后期间,加入“中央研究院”黄鹏鹏研究员实验室进行斑马鱼表皮离子细胞发育机制研究,发现了转录因子***foxi3***是控制鱼类表皮离子细胞发育的关键基因^[4],之后配合电生理与离子流的测定,开启了研究鱼类渗透压生理与发育调节的一个重要里程碑。

从2004年开始,有一批海外归来的学者与跨领域学者,将一些属于基因体、系统生物学与物理光学的新技术用于台湾斑马鱼研究领域,其中代表性人物以“国家卫生研究院”喻秋华研究员与台湾大学孙启光老师为代表。喻秋华研究员原先在美国加州理工学院以海胆为材料研究中内胚层基因调控网络,回台后,将这套系统应用在斑马鱼内胚层发育调控上,并得到相当不错的研究成果^[5-7]。孙启光老师则是应用二倍频与三倍频光学技术,在活体状态下观察斑马鱼的一些细微的组织结构^[8-10]。

2 台湾地区斑马鱼研究室的分布

台湾地区斑马鱼研究社群最早起源于“中央研究院”与台湾大学,目前台湾地区斑马鱼的实验室主持人多半接受过此两大研究机构的硕博士或博士后训练,另外也有部分实验室主持人是接受海外博士(后)教育训练后(如日本、美国、法国与德国)才回到台湾主持实验室。现今全台湾地区共计有83个

实验室使用斑马鱼作为实验材料, 若以实验室主持人服务机构来分类, 可以发现研究人员主要集中于“中央研究院”、台湾大学、中山医学大学与台湾海洋大学进行研究。若以工作地点来进行分类, 可以发现接近一半(48位)的实验室主持人在北台湾工作, 其次为中台湾(18位)、南台湾(14位)与东台湾(3位), 主要的原因是台湾北部大专院校密度较高, 学术研讨会较为密集。

3 台湾地区斑马鱼研究的课题

目前, 台湾地区斑马鱼研究社群的研究课题具有相当大的多样性, 大致上可分为三大主题: (1) 胚胎发育; (2) 人类疾病; (3) 生物技术。

3.1 胚胎发育

研究课题包含早期胚胎发育的细胞移动、3个胚层的分化、基因调控网络、器官形成、左右对称性与突变体筛选。重要的研究方向与成果包括“中央研究院”钟邦柱老师研究类固醇调节胚胎发育Epiboly过程^[11]、台湾大学蔡怀桢老师研究肌肉发育过程重要基因*myf5*的调节机理^[12-15]、台湾大学李士杰与李心予老师发现*LPA*讯息调控淋巴管的发育^[16]、“中央研究院”黄声莘老师研究*cdx1b*基因调控消化道的发育^[17]、“国家卫生研究院”喻秋华老师研究内胚层发育的基因调控网络^[5-7]、东海大学刘蕙雯老师研究内皮细胞影响间肾腺发育^[18,19]等。

3.2 人类疾病

此研究课题主要是利用斑马鱼来研究人类疾病相关机理或是建立带有类疾病表征的斑马鱼模型来协助药物筛选。主要的研究人员除了学校老师与研究机构人员外, 最大特色就是医师或医学院研究人员加入。重要研究方向与成果有“中央研究院”吴金洌老师与台湾海洋大学何国牟老师建立起消化道转基因荧光鱼与疾病模型^[20-24]、“中央研究院”黄铨珍老师鉴定*Nogo*基因启动子^[17]、中原大学萧崇德老师建立条件式皮肤凋亡系统^[25]、台大医院王一中医师鉴定两种与眼睛发育重要基因的功能^[26,27]。

3.3 生物技术

此研究课题主要是利用斑马鱼来研究鱼类生

理、病理、环境毒理与生态等与生物技术相关的研究。主要的研究人员不仅仅有学校老师, 还有环境安全卫生与生物信息领域研究人员的加入。重要研究方向与结果为“中央研究院”黄鹏鹏老师研究鱼类表皮离子细胞发育与功能调节^[4,28-31]、台湾海洋大学胡清华老师研究HIF2alpha对神经细胞抗凋亡新机理^[32]、淡江大学陈曜鸿老师利用斑马鱼鉴定化合物对斑马鱼的生物毒性^[33-36]、“中央研究院”陈志毅老师利用斑马鱼研究抗菌肽功能^[37-39]等。

4 台湾地区斑马鱼种质资源库

台湾地区的研究人员进行斑马鱼研究起始于1996年, 当时大多数实验室都是请水族馆或是自行架设水族设备, 花费非常多的心力在鱼种的管理与维持种源血统纯正上。2010年, 在台湾“国家科学委员会(简称国科会)”的多年期经费的补助下, 除了在“中央研究院”设置了TZCAS (Taiwan Zebrafish Core Facility at Academia Sinica, <http://icob.sinica.edu.tw/tzcas/>)也在“国家卫生研究院”设置了ZeTH (Zebrafish Core Facility at NTHU and NHRI, <http://www.zebrafish-nthu-nhri.org/>)两个种质资源库(见表1)。这两个种质资源库都有专业的实验室主持人进行管理, 负责下列4大业务: (1) 提供斑马鱼种鱼与胚胎; (2) 提供斑马鱼实验相关质体; (3) 提供斑马鱼相关实验方法; (4) 举办斑马鱼社群研讨会与教育训练。

表1 台湾地区两座斑马鱼种质资源库所提供的资源

项目	TZCAS	ZeTH
创设年份	2010	2010
实验室主持人	3	4
鱼缸数目	1140	1920
提供质体数	93	35
提供实验方法数	37	17
提供转基因鱼种数	42	8
提供野生种与突变体数	12	10
网页地址链接	http://icob.sinica.edu.tw/tzcas/	http://www.zebrafish-nthu-nhri.org/

4.1 提供斑马鱼种鱼与胚胎

目前, 两个种质资源库加总起来约可提供达2000缸的容量来蓄养如野生种、突变种或其他转基因

因斑马鱼品系。基本上每年也会从美国 ZIRC (Zebrafish International Resource Center, <http://zebrafish.org/zirc/home/guide.php>) 购进一些新的品系, 以提供台湾地区斑马鱼研究社群使用 (但是使用者必须单独与 ZIRC 签订 MTA), 也提供重要转基因品系的保种与资源分享的服务, 两个种质资源库可提供多达 50 种转基因鱼种与 22 种野生或突变种。由于笔者实验室致力于转基因鱼的制作, 已制作了多达 14 种转基因荧光斑马鱼, 可以标定如皮肤、心脏与软硬度等组织, 并且寄存于 TZCAS 种质资源库 (<http://icob.sinica.edu.tw/tzcas/fishlines.html>), 可以分享给斑马鱼研究同行使用。

4.2 提供斑马鱼实验相关质体

斑马鱼胚胎发育实验常需要进行大量的 RNA 原位杂交实验, 用以观察基因的时空表达。对于转基因实验也需要一些常见的质粒以方便进行表达载体的构建, 目前两个种质资源库可提供多达 128 种质粒以供上述实验使用。

4.3 提供斑马鱼相关实验方法

研究人员虽然可以从网络上下载许多与斑马鱼相关的实验方法, 但是使用者常受限于语言障碍, 或是不易从文字中充分了解复杂的实验过程。为了加速台湾地区斑马鱼研究社群对相关实验技术的交流, 两个种质资源库可提供多达 54 种实验手册以供使用者参考。笔者实验室也在 TZCAS 种质资源库 (http://icob.sinica.edu.tw/tzcas/protocol_1.html) 提供了多达 30 种斑马鱼相关的实验方法。

4.4 举办斑马鱼社群研讨会与教育训练

为了加强台湾地区斑马鱼研究社群的交流, 两个种质资源库每隔半年轮流举办实验室主持人会议与研讨会各一次。实验室主持人会议主要是由斑马鱼实验室主持人报告最新研究进度并分享实验心得, 研讨会则是由学生、助理或是博士后以口头或海报方式呈现自己最新且尚未发表的研究成果。两个种质资源库的负责人也会利用研讨会的时间发布种质资源库的最新消息。此外在暑假期间两个种质资源库也负责斑马鱼实验相关的教育训练, 训练内容包含入门技术, 如鱼种饲养、RNA 原位杂合实验、显

微注射与一些进阶技术, 如 BAC 重组技术、Tol2-Gateway 重组技术与细胞移植实验等。

5 台湾地区斑马鱼研究的经费

台湾地区科研经费主要来源是“国科会”, 大致是在每年年底前提出个人型或是群体型计划的申请, 此外也有一些如产学合作计划、“农业生物科技国家型科技计划”、国际合作计划等项目可以提出经费申请。台湾地区补助个人型计划基本上类似大陆的国家自然科学基金, 补助经费相对较少, 但可以为未来重要的研究打基础。而台湾地区的群体型项目计划类似大陆的国家 863、973 计划, 经费相对较高, 竞争较激烈, 可以进行较为重要的研究课题。本报告自“政府研究信息系统网站” (<http://grbsearch.stpi.narl.org.tw/GRB/>) 下载台湾 2001~2011 年度与斑马鱼相关计划数与补助金额 (图 1), 基本上在 2001~2010 年度通过计划数与补助金额呈现逐年成长的态势, 每项计划平均可以获得 110~170 万元新台币 (大约等同于 22~34 万元人民币) 的补助金额, 但是在 2011 年度由于受到“国科会”经费使用透支缘故, 整体计划数与补助金额呈现急速下滑现象, 与 2010 年相比, 整体计划通过率与通过金额只剩下一半的水平, 对于许多斑马鱼研究人员而言, 产生了相当大的负面冲击。目前台湾地区“国科会”正在进行方向调整, 希望能持续给予斑马鱼科研人员较为充裕的科研经费补助。

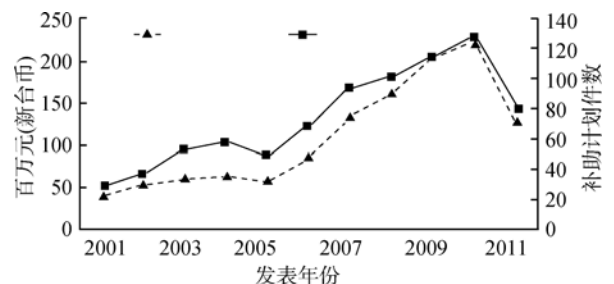


图 1 台湾地区补助斑马鱼相关研究计划数与经费统计

为争取研究经费, 研究人员也在尝试与医学单位合作利用斑马鱼进行人类疾病的相关研究。在这之前医院系统中所使用的标准模式生物为啮齿类的小鼠或大鼠, 医生对于斑马鱼的认知甚少。但最近几年由于受到西方观念引进, 现在医院的医生已经

普遍能接受利用斑马鱼研究人类疾病的机制。其中脚步最快的就属于马偕纪念医院(由加拿大籍传教士马偕医生于130年前所建立,是台湾地区第一个西式医院),已于2010年成立全台湾第一个属于医院系统的斑马鱼种质资源库(http://www.mmh.org.tw/research/inner_lab_03.htm),也大力鼓励补助院内医生同仁以斑马鱼进行人类相关疾病机制的研究。

6 台湾地区斑马鱼研究的成果

6.1 硕/博士论文发表情况

台湾地区硕/博士论文数据主要搜寻自台湾硕博学位论文加值系统(<http://ndltd.ncl.edu.tw/cgi-bin/gs32/gsweb.cgi/ccd=TzzhGt/webmge?mode=basic>),大陆硕/博士论文数据主要搜寻自中国知识资源总库(<http://cnki50.csis.com.tw/kns50/>)。在台湾的学制下,硕士生修业两年可以完成硕士学位,而博士生一般需花费4~8年才可完成博士学位。台湾地区研究斑马鱼的起步较大陆稍快,例如在2000年之前台湾就已有18篇与斑马鱼相关的硕/博士论文发表,而大陆第一篇以斑马鱼为研究对象的硕士论文是2002年由中国科学院海洋研究所的喻丹所发表。在2001~2008年间台湾地区斑马鱼相关的硕/博士论文研究数目呈现正增长,大约可维持在每年有50多篇硕/博士论文的产出。但从2008年起,在全球信贷危机与金融海啸的影响下,许多硕/博士研究生受到台湾经济环境变差的刺激纷纷辍学或放弃学籍,造成应届毕业生人数锐减,导致在2010年台湾地区只有16篇与斑马鱼相关的硕/博士论文产出,对于台湾地区斑马鱼研究产生相当大的负面冲击,随着金融危机的结束,台湾地区硕/博士研究生的论文在2011年度又回到正常的发表水平(表2)。

6.2 在西文期刊发表论文情况

期刊论文发表资料主要搜寻自PubMed(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>),若以发表期刊种类来进行分类,可以发现台湾地区斑马鱼研究同仁喜好投稿至*DevDyn*与*PLoS One*两期刊(占全部期刊数的1/4),主要原因是*PLoS One*的文章发行速度快,读者又容易免费取得论文电子文件。其他如生理学期刊*Comp BiochemPhysiol*、*Am J Physiol*与发育生

表2 台湾地区与大陆斑马鱼硕/博士论文发表数统计

发表年份	台湾硕/博士论文数	大陆硕/博士论文数
2000 之前	18	0
2001	10	0
2002	20	2
2003	16	2
2004	28	11
2005	34	22
2006	42	24
2007	54	34
2008	59	63
2009	37	59
2010	16	84
2011	54	70
总和	388	371

物学期刊*DevBiol*也受到台湾地区斑马鱼研究同行的喜爱,分别占据投稿喜好度的前3~5名(图2)。将中国大陆、台湾地区与日本进行交叉比较,结果显示(图3),在过去的10年间,台湾地区研究斑马鱼的国际期刊论文数呈现稳定但较为缓慢的增长,累积至今与斑马鱼相关论文发表总数已达到了342篇,2011年度总期刊论文数为66篇,大约只达到美国当年度发表总数的1/10。在过去10年间,中国大陆研究斑马鱼的国际期刊论文数呈现爆炸性的快速增长,2011年总期刊论文数已高达256篇,大约达到美国当年度发表论文总数的1/3。虽说发表论文数量的快速增加充分反映出大陆近几年在斑马鱼研究方面的热潮,但是若比较平均的影响因子与中高水平(2009~2011年度影响因子大于4)的文章比例,台湾较高一些(台湾与大陆分别为36.8%与28.6%,表3),这个结果显示台湾地区斑马鱼研究同仁的研究水平较均衡,有近1/3的文章能发表在中高水平的期刊上。在过去的7~8年里,日本每年产出的斑马鱼研究期刊论文数虽然只维持在100篇上下(图3),但是整体的论文平均影响因子却高达7.1(表3)。所以,在未来的研究中如何有效提升论文的质量才是值得追求的目标。

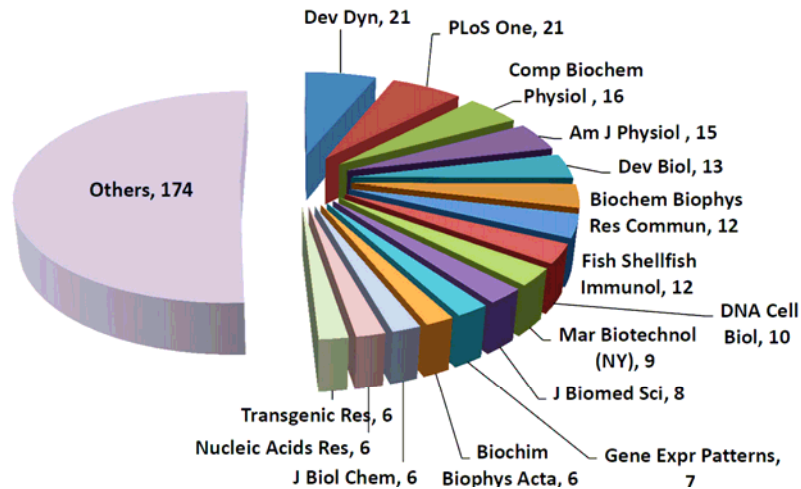


图 2 台湾地区斑马鱼研究人员投稿西文期刊排名

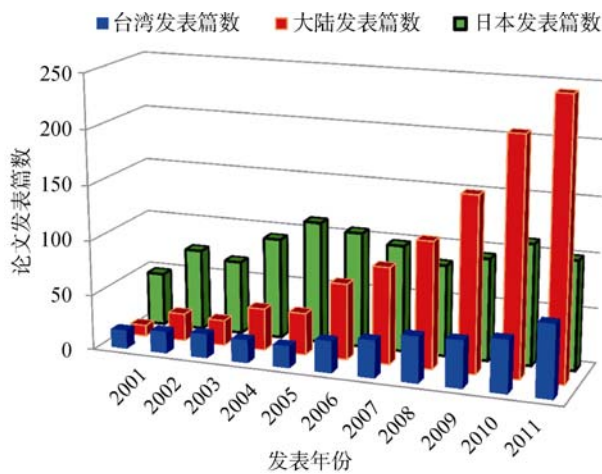


图 3 中国大陆、台湾地区与日本斑马鱼西文期刊发表数

7 台湾地区斑马鱼研究的未来展望

7.1 建立南台湾斑马鱼种质资源库

南台湾是台湾地区淡水鱼与观赏鱼的繁养殖重镇，许多具有高经济与高观赏性质的鱼种，如石斑鱼(Grouper)与小丑鱼(Anemone fish)已经能完全进行人工养殖，然而目前台湾地区从事斑马鱼基础研究者相对较缺乏进行其他经济鱼种的研究，而研究经济鱼种的人员也较缺乏和从事基础胚胎研究人员的交流，而将一些新的研究技术与知识应用在养殖现场。这个困难主要是因为淡水鱼繁养殖需要引用天然淡水，所以必须将研究室建立在湖泊或海岸旁。在大陆，例如座落在武汉东湖旁的中国科

学院水生生物研究所与青岛的中国海洋大学，已有许多实验室开始同时利用斑马鱼与养殖鱼种展开整合性的研究课题。然而，如何利用斑马鱼所发现的学理机制去协助其他经济鱼种的研究将是未来台湾地区斑马鱼研究的一个新契机。为了达到此目的，确实有必要在南台湾建构第三座斑马鱼种质资源库以协助南台湾的鱼类研究。其中以地理位置而言，最适合建构南台湾斑马鱼种质资源库的有靠近西子湾的中山大学与邻近垦丁的海洋生物博物馆。

表 3 中国大陆、台湾地区与日本斑马鱼西文期刊影响因子统计(以 2009~2011 年度论文数据进行比较)

项目	中国大陆	台湾地区	日本
被 SCI 收录的论文数	629	157	301
有影响因子的论文数	574	152	286
影响因子数总和	2035.1	559.0	1252.8
平均影响因子	3.5	3.7	7.1
影响因子>4 的论文数	164	56	120
影响因子>4 的论文比例 (%)	28.6	36.8	42.0

7.2 鼓励更多研究人员加入斑马鱼研究社群

台湾地区斑马鱼论文在 2010~2011 年度论文数快速上升的原因有二：一是两座种质资源库的成立方便研究人员取得更多相关资源；二是有其他领域研究人员(如医院医生与生物信息学家)的加入，有效地进行整合性研究并提升了发表论文的数量与质

量。目前, 台湾地区两个斑马鱼种质资源库每年暑假期间皆会举办斑马鱼实验相关的教育训练。除此之外, 也应该鼓励研究人员分享更多的实验方法与实验资源(如质粒与转基因鱼种), 甚至可以提倡成立技术指导卫星实验室, 在种质资源库网页上附注每个独立研究室的精湛的研究技术, 让同行遇到问题时可以向其提出帮助或合作的需求。

7.3 加强两岸与国际学术交流以提升研究质量

在过去, 两岸斑马鱼研究同行在研究的合作上可说是“兄弟登山、各自努力”, 彼此的交流机会并不多, 多半是利用研讨会短短的 2~3 天进行交流(例如 2011 年夏季在北京举办的亚太斑马鱼研讨会), 其成效非常有限。两岸斑马鱼研究同行可以合作对接的项目其实相当多, 例如台湾地区制作转基因荧光鱼与人类疾病模型的研究人员, 可以与大陆药物筛选专家合作, 利用大陆提炼分离的珍贵中草药或海洋药物对疾病模型进行药物筛选。大陆斑马鱼种质资源库预计 2012 年秋季在武汉的中国科学院水生生物研究所正式成立, 日后也可以与台湾地区的两个种质资源库相互交流珍贵的鱼种与质粒, 也可以派遣研究人员赴对方实验室学习一些专业技术, 以加强两岸学术交流的力度与深度。

参考文献(References):

- [1] Hwang SP, Tsou MF, Lin YC, Liu CH. The zebrafish *BMP4* gene: sequence analysis and expression pattern during embryonic development. *DNA Cell Biol*, 1997, 16(8): 1003–1011. [DOI](#)
- [2] Hsiao CD, Hsieh FJ, Tsai HJ. Enhanced expression and stable transmission of transgenes flanked by inverted terminal repeats from adeno-associated virus in zebrafish. *Dev Dyn*, 2001, 220(4): 323–336. [DOI](#)
- [3] Chou CY, Horng LS, Tsai HJ. Uniform GFP-expression in transgenic medaka (*Oryzias latipes*) at the F0 generation. *Transgenic Res*, 2001, 10(4): 303–315. [DOI](#)
- [4] Hsiao CD, You MS, Guh YJ, Ma M, Jiang YJ, Hwang PP. A positive regulatory loop between *foxi3a* and *foxi3b* is essential for specification and differentiation of zebrafish epidermal ionocytes. *PLoS One*, 2007, 2(3): e302. [DOI](#)
- [5] Tseng WF, Jang TH, Huang CB, Yuh CH. An evolutionarily conserved kernel of *gata5*, *gata6*, *otx2* and *prdm1a* operates in the formation of endoderm in zebrafish. *Dev Biol*, 2011, 357(2): 541–557. [DOI](#)
- [6] Chan TM, Chao CH, Wang HD, Yu YJ, Yuh CH. Functional analysis of the evolutionarily conserved cis-regulatory elements on the *sox17* gene in zebrafish. *Dev Biol*, 2009, 326(2): 456–470. [DOI](#)
- [7] Chan TM, Longabaugh W, Bolouri H, Chen HL, Tseng WF, Chao CH, Jang TH, Lin YI, Hung SC, Wang HD, Yuh CH. Developmental gene regulatory networks in the zebrafish embryo. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1789(4): 279–298. [DOI](#)
- [8] Hsieh CS, Chen SY, Liu TM, Ko CY, Wu JS, Hu CH, Sun CK. In vivo long-term continuous observation of gene expression in zebrafish embryo nerve systems by using harmonic generation microscopy and morphant technology. *J Biomed Opt*, 2008, 13(6): 064041. [DOI](#)
- [9] Sun CK, Chu SW, Chen SY, Tsai TH, Liu TM, Lin CY, Tsai HJ. Higher harmonic generation microscopy for developmental biology. *J Struct Biol*, 2004, 147(1): 19–30. [DOI](#)
- [10] Chu SW, Chen SY, Tsai TH, Liu TM, Lin CY, Tsai HJ, Sun CK. In vivo developmental biology study using noninvasive multi-harmonic generation microscopy. *Opt Express*, 2003, 11(23): 3093–3099. [DOI](#)
- [11] Hsu HJ, Liang MR, Chen CT, Chung BC. Pregnenolone stabilizes microtubules and promotes zebrafish embryonic cell movement. *Nature*, 2006, 439(7075): 480–483. [DOI](#)
- [12] Hsu RJ, Lin CC, Su YF, Tsai HJ. dickkopf-3-related gene regulates the expression of zebrafish *myf5* gene through phosphorylated p38a-dependent Smad4 activity. *J Biol Chem*, 2011, 286(8): 6855–6864. [DOI](#)
- [13] Hsu RJ, Lin CY, Hoi HS, Zheng SK, Lin CC, Tsai HJ. Novel intronic microRNA represses zebrafish *myf5* promoter activity through silencing dickkopf-3 gene. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(13): 4384–4393. [DOI](#)
- [14] Lin CY, Yung RF, Lee HC, Chen WT, Chen YH, Tsai HJ. Myogenic regulatory factors Myf5 and Myod function distinctly during craniofacial myogenesis of zebrafish. *Dev Biol*, 2006, 299(2): 594–608. [DOI](#)
- [15] Chen YH, Lee HC, Liu CF, Lin CY, Tsai HJ. Novel regulatory sequence -82/-62 functions as a key element to drive the somite-specificity of zebrafish *myf-5*. *Dev Dyn*, 2003, 228(1): 41–50. [DOI](#)
- [16] Lee SJ, Chan TH, Chen TC, Liao BK, Hwang PP, Lee H. LPA1 is essential for lymphatic vessel development in zebrafish. *FASEB J*, 2008, 22(10): 3706–3715. [DOI](#)
- [17] Cheng PY, Lin CC, Wu CS, Lu YF, Lin CY, Chung CC, Chu CY, Huang CJ, Tsai CY, Korzh S, Wu JL, Hwang SP. Zebrafish *cdx1b* regulates expression of downstream factors of Nodal signaling during early endoderm forma-

- tion. *Development*, 2008, 135(5): 941–952. [DOI](#)
- [18] Liu YW. Interrenal organogenesis in the zebrafish model. *Organogenesis*, 2007, 3(1): 44–48. [DOI](#)
- [19] Liu YW, Guo L. Endothelium is required for the promotion of interrenal morphogenetic movement during early zebrafish development. *Dev Biol*, 2006, 297(1): 44–58. [DOI](#)
- [20] Amali AA, Rekha RD, Lin CJF, Wang WL, Gong HY, Her GM, Wu JL. Thioacetamide induced liver damage in zebrafish embryo as a disease model for steatohepatitis. *J Biomed Sci*, 2006, 13(2): 225–232. [DOI](#)
- [21] Her GM, Cheng CH, Hong JR, Sundaram GS, Wu JL. Imbalance in liver homeostasis leading to hyperplasia by overexpressing either one of the Bcl-2-related genes, *zBLP1* and *zMc1-1a*. *Dev Dyn*, 2006, 235(2): 515–523. [DOI](#)
- [22] Her GM, Chiang CC, Wu JL. Zebrafish intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) gene promoter drives gut-specific expression in stable transgenic fish. *Genesis*, 2004, 38(1): 26–31. [DOI](#)
- [23] Her GM, Yeh YH, Wu JL. 435-bp liver regulatory sequence in the liver fatty acid binding protein (L-FABP) gene is sufficient to modulate liver regional expression in transgenic zebrafish. *Dev Dyn*, 2003, 227(3): 347–356. [DOI](#)
- [24] Her GM, Chiang CC, Chen WY, Wu JL. In vivo studies of liver-type fatty acid binding protein (L-FABP) gene expression in liver of transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *FEBS Lett*, 2003, 538(1-3): 125–133. [DOI](#)
- [25] Chen CF, Chu CY, Chen TH, Lee SJ, Shen CN, Hsiao CD. Establishment of a transgenic zebrafish line for superficial skin ablation and functional validation of apoptosis modulators in vivo. *PLoS One*, 2011, 6(5): e20654. [DOI](#)
- [26] Yeh LK, Liu CY, Chien CL, Converse RL, Kao WW, Chen MS, Hu FR, Hsieh FJ, Wang IJ. Molecular analysis and characterization of zebrafish keratocan (*zKera*) gene. *J Biol Chem*, 2008, 283(1): 506–517. [DOI](#)
- [27] Yeh LK, Liu CY, Kao WWY, Huang CJ, Hu FR, Chien CL, Wang IJ. Knockdown of zebrafish lumican gene (*zlum*) causes scleral thinning and increased size of scleral coats. *J Biol Chem*, 2010, 285(36): 28141–28155. [DOI](#)
- [28] Chou MY, Hung JC, Wu LC, Hwang SPL, Hwang PP. Isotocin controls ion regulation through regulating ionocyte progenitor differentiation and proliferation. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(16): 2797–2809. [DOI](#)
- [29] Chang WJ, Horng JL, Yan JJ, Hsiao CD, Hwang PP. The transcription factor, glial cell missing 2, is involved in differentiation and functional regulation of H⁺-ATPase-rich cells in zebrafish (*Danio rerio*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009, 296(4): R1192–R1201. [DOI](#)
- [30] Lin TY, Liao BK, Horng JL, Yan JJ, Hsiao CD, Hwang PP. Carbonic anhydrase 2-like a and 15a are involved in acid-base regulation and Na⁺ uptake in zebrafish H⁺-ATPase-rich cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 294(5): C1250–C1260. [DOI](#)
- [31] Lin LY, Horng JL, Kunkel JG, Hwang PP. Proton pump-rich cell secretes acid in skin of zebrafish larvae. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 290(2): C371–C378. [DOI](#)
- [32] Ko CY, Tsai MY, Tseng WF, Cheng CH, Huang CR, Wu JS, Chung HY, Hsieh CS, Sun CK, Hwang SPL, Yuh CH, Huang CJ, Pai TW, Tzou WS, Hu CH. Integration of CNS survival and differentiation by HIF2 α . *Cell Death Differ*, 2011, 18(11): 1757–1770. [DOI](#)
- [33] Yeh CH, Liao YF, Chang CY, Tsai JN, Wang YH, Cheng CC, Wen CC, Chen YH. Caffeine treatment disturbs the angiogenesis of zebrafish embryos. *Drug Chem Toxicol*, 2012, [Epub ahead of print]. [DOI](#)
- [34] Wang YH, Wen CC, Yang ZS, Cheng CC, Tsai JN, Ku CC, Wu HJ, Chen YH. Development of a whole-organism model to screen new compounds for sun protection. *Mar Biotechnol (NY)*, 2009, 11(3): 419–429. [DOI](#)
- [35] Wang YH, Cheng CC, Lee WJ, Chiou ML, Pai CW, Wen CC, Chen WL, Chen YH. A novel phenotype-based approach for systematically screening antiproliferation metallo-drugs. *Chem Biol Interact*, 2009, 182(1): 84–91. [DOI](#)
- [36] Chen YH, Huang YH, Wen CC, Wang YH, Chen WL, Chen LC, Tsay HJ. Movement disorder and neuromuscular change in zebrafish embryos after exposure to caffeine. *Neurotoxicol Teratol*, 2008, 30(5): 440–447. [DOI](#)
- [37] Pan CY, Peng KC, Lin CH, Chen JY. Transgenic expression of tilapia hepcidin 1-5 and shrimp chelonianin in zebrafish and their resistance to bacterial pathogens. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 31(2): 275–285. [DOI](#)
- [38] Hsieh JC, Pan CY, Chen JY. Tilapia hepcidin (TH)2-3 as a transgene in transgenic fish enhances resistance to *Vibrio vulnificus* infection and causes variations in immune-related genes after infection by different bacterial species. *Fish Shellfish Immunol*, 2010, 29(3): 430–439. [DOI](#)
- [39] Peng KC, Pan CY, Chou HN, Chen JY. Using an improved Tol2 transposon system to produce transgenic zebrafish with epinecidin-1 which enhanced resistance to bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol*, 2010, 28(5-6): 905–917. [DOI](#)