

Noninvasive heart rate measurement system of nontransparent wild-type adult zebrafish

不透明野生種成年斑馬魚非侵入性心率量測系統

組別：A15

組員姓名：林均容

指導教授：李夢麟 教授

摘要

斑馬魚（*Danio rerio*）作為近年來重要的模式生物，因為其具有：體外受精、胚胎透明、性成熟期短等特性，更重要的是斑馬魚的基因組已被完整定序，且其具有與人類相似的心血管系統，因此經常被運用在心血管疾病之研究上。然而現今成年斑馬魚的心率量測，主要都是以侵入式的針狀電極探針來取得心電圖，該實驗方式容易在插針的過程造成實驗個體死亡，且為了排除腮動造成的雜訊，在後續的訊號處理上複雜度都相對較高。

本專題之研究目標，是期望能對不透明成年斑馬魚建立一個簡便的非侵入性心率量測系統，以降低斑馬魚在心血管研究上的複雜度及實驗成本。

本專題使用 Tricaine 和 Isoflurane 之混合物作為麻醉劑，以降低斑馬魚心率受到麻醉劑之影響，使用 Dino-lite 手持式數位顯微鏡作為影像擷取設備，使用 MATLAB 作為影像分析及系統整合的軟體。透過將影像轉換成灰階並計算影像平均亮度之變化，以求得不透明成年斑馬魚之心率，最後簡化實驗裝置並將所有功能整合，將實驗流程標準化，讓使用者能夠在無經驗的情況下，在 20 秒內快速求得斑馬魚之心率，並大幅降低實驗體在實驗過程所受的傷害。

研究內容

一、實驗裝置精簡化

本專題採用非侵入式的方式來對成年斑馬魚進行心率測量，其一是為了消除侵入性的心電圖量測方式，在插探針時人為操作的不同對實驗結果造成變異。其二是因為非侵入的量測方式，不需要專業的數據採集系統、放大器、電極探針等繁雜的設備，且資料分析上也比需要調整濾波頻率的侵入性量測方式簡單很多。這些設備及數據分析的簡化都有利於後續的系統整合及實驗流程標準化。

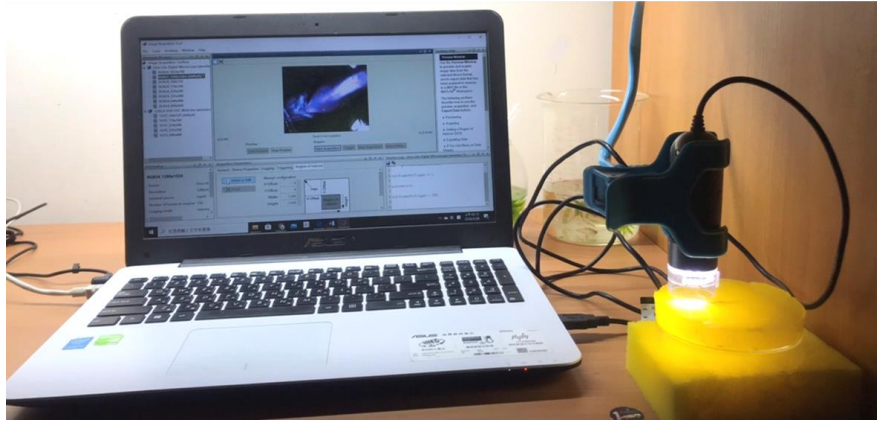


圖 1 本專題之實驗裝置

二、斑馬魚之麻醉

本專題將 7 毫升濃度為 2000ppm 之 Tricaine，與 0.13 毫升濃度為 100,000ppm 之 isoflurane，加入 193 毫升純淨水製成實驗用麻醉劑。

在無麻醉的情況下對斑馬魚進行實驗，此方法相較於有麻醉的實驗方式，完全消除了麻醉劑對斑馬魚心率的影響，然而目前的實驗裝置並不能完全限制斑馬魚的行動，若是斑馬魚在攝影過程中劇烈掙扎，便有可能會脫離實驗平台。

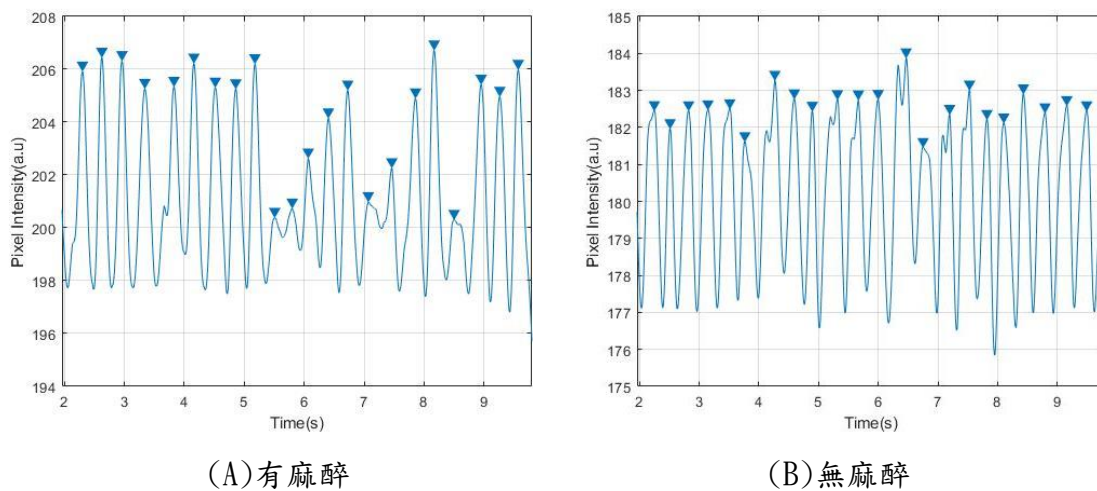


圖 2 有無麻醉之斑馬魚心率圖(兩種方法所得之心率皆為 165 每分鐘)

在胸口覆蓋玻片的功能，其一是為了要固定斑馬魚防止他在實驗過程中掙扎，其二是為了要得到更乾淨的影像資料，降低鰓動造成的雜訊對心率分析的影響。由圖 3 可見經過加蓋玻片所得之心率圖波形較為乾淨。

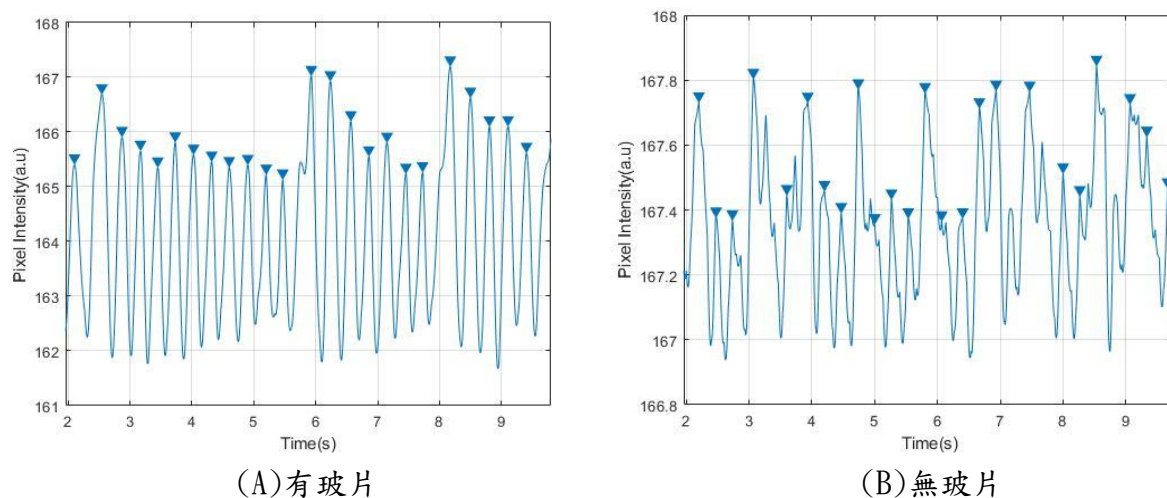


圖 3 有無玻片之斑馬魚心率圖(A之心率為 180 每分鐘、B 為 172.5 每分鐘)

三、系統介面整合及

本專題使用 Dino-lite 數位顯微鏡拍攝，此攝影裝置之影格率為 15 個影格每秒，足以用來記錄心臟跳動的影像變化。

使用 Image acquisition toolbox 支援封包，該封包讓我們能夠隨意調整錄影區域以及瀏覽錄影畫面，並外加攝影機之 LED 燈照明指令，讓攝影期間自動補光以減少外界光線對實驗結果的影響。

四、實驗步驟標準化

不透明成年斑馬魚非侵入性心率量測的實驗標準流程：

1. 將斑馬魚腹部朝上固定於注滿水之培養皿上
2. 在斑馬魚之胸腔覆蓋一玻片以利實驗攝影
3. 選取適當拍攝位置後執行整合後的分析系統
4. 等待 15 秒便可獲得當時斑馬魚之心率

參考文獻

- [1] Min-Hsuan Lin, Huang-Cheng Chou, Yu-Fu Chen, Wangta Liu, Chi-Chun Lee, Lawrence Yu-Min Liu & Yung-Jen Chuang. (2018) *Development of a rapid and economic in vivo electrocardiogram platform for cardiovascular drug assay and electrophysiology research in adult zebrafish*
- [2] Jie-Yun Ma, Shang-Cing Wei & Meng-Lin Li (2019). *Noninvasive heart rate measurement of adult zebrafish*. 清大電機實作專題競賽報告

心得感想

首先，真的非常感謝李夢麟老師這一年的指導，在專題實作的過程中，老師習慣給予我們一個解決問題的大方向，再讓我們自己尋找解決問題的辦法，讓我們不至於在研究的過程中無所適從，而依然可以學到很多東西。老師每個星期都會預留一個小時的時間，親自來與我們進行專題討論，討論時總是能精準地說出目前實驗結果的不足之處，讓我們快速的找到下一個努力的目標，雖然每個禮拜的專題討論讓我心理壓力有點大，但我很肯定在這一周又一周的訓練下，我一定能進步。

由於專題內容的關係，我經常需要上網找資料，再從那些龐大的資料庫中尋找我需要的答案，其實困難的不是在實驗本身，而是因為需要自己去接觸沒有學習過的知識，並且將那些零散的知識快速消化，而後應用在自己的專題上。礙於硬體設備的限制，很多時候應該要可行的解決方法，在實作時也無法派上用場，因此又需要去繞另一條更遠的路，嘗試從新的方向中找到出口。在這樣的訓練過程中，我相信我在自我學習的能力以及解決問題的能力都在不斷的成長。

最後，在一次謝謝老師以及實驗室學長們的指導，我在這年的實作專題中學到了也成長了很多，這年所學在之後學習的路上一定是非常寶貴的經驗。