

·基础研究·

# 肌萎缩侧索硬化症基因 TDP43 致病突变对斑马鱼毒性的影响

石磊<sup>1</sup>, 叶城辉<sup>2</sup>, 何若洁<sup>1</sup>, 卢锡林<sup>1</sup>, 裴中<sup>1</sup>, 姚晓黎<sup>1\*</sup>

(中山大学附属第一医院 1. 神经内科, 2. 老年科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨肌萎缩侧索硬化症基因 TDP43 致病突变对斑马鱼毒性的影响。【方法】以野生型 AB 系斑马鱼作为研究对象, 构建携带红色荧光蛋白(RFP)的 TDP43 基因野生型(WT)和突变型(S292N)质粒, 通过显微注射法转染斑马鱼单细胞期胚胎, 建立转基因斑马鱼模型。通过比较正常 AB 系斑马鱼、TDP43-WT 转基因斑马鱼以及 TDP43-S292N 基因突变斑马鱼的胚胎发育、运动能力等, 探讨 TDP43 基因突变的毒性作用。【结果】通过显微注射, 成功获得表达红色荧光的 TDP43-WT 及 TDP43-S292N 转基因鱼。与正常 AB 系斑马鱼及 TDP43-WT 转基因斑马鱼相比, TDP43-S292N 基因突变斑马鱼的胚胎死亡率及畸形率升高, 胚胎孵化率、胚胎摆尾次数以及孵化后运动活力降低( $P < 0.01$ )。【结论】TDP43 基因突变影响斑马鱼胚胎发育并降低孵化后的运动功能。

**关键词:** TDP43 基因突变; 斑马鱼; 胚胎发育; 运动功能

**中图分类号:** R746.4

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1672-3554(2014)04-0481-07

## Toxicity of Amyotrophic Lateral Sclerosis Gene TDP43 Mutations on Zebrafish

SHI Lei<sup>1</sup>, YE Cheng-hui<sup>2</sup>, HE Ruo-jie<sup>1</sup>, LU Xi-lin<sup>1</sup>, PEI Zhong<sup>1</sup>, YAO Xiao-li<sup>1\*</sup>

(1. Department of Neurology, 2. Department of Geriatrics, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the toxicity of amyotrophic lateral sclerosis gene TDP43 mutations on zebrafish. 【Methods】TDP43 Wild Type and S292N mutation were successfully cloned into the red fluorescent protein tagging vectors. The plasmids were then microinjected into zebrafish embryos to obtain the transgenic lines. The toxicity was evaluated by assessing the embryonic development and motor function in normal AB, TDP43-WT, and TDP43-S292N transgenic zebrafish. 【Results】Red fluorescent was evident in both TDP43-WT and TDP43-S292N transgenic zebrafish following microinjection. Compared with normal AB and TDP43-WT transgenic zebrafish, TDP43-S292N mutant had higher embryonic mortality and abnormality rates and lower embryonic hatch rates. The tail beat frequency and motor ability was also significantly lower in TDP43-S292N mutant ( $P < 0.01$ ). 【Conclusion】Expression of human mutant TDP43 in zebrafish disturbs the normal embryonic development and reduced the motor ability.

**Key words:** TDP43 gene mutation; zebrafish; embryonic development; motor function

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(4):481-487]

肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是最常见的运动神经元退行性疾病, 引起上下运动神经元进行性变性坏死, 导致延髓、四肢及躯干肌肉无力和萎缩<sup>[1]</sup>。多数患者会在首发症状出现后 3 ~ 5 年因呼吸衰竭而死亡<sup>[2-3]</sup>。目前该病病因不明, 尚无特效治疗方法, 利鲁唑

(riluzole) 作为唯一被美国 FDA 批准的 ALS 临床药物, 也只使 ALS 病人的生存期平均延长 3 ~ 6 个月, 无法完全阻止疾病的进展<sup>[4-5]</sup>。2006 年 Neumann 等<sup>[6]</sup>发现在 ALS 和额颞叶痴呆病人脑组织切片中有大量的 TDP-43 蛋白异常聚集, 在神经元及胶质细胞内形成病理性的包涵体。接着, 多

收稿日期: 2014-03-05

基金项目: 国家自然科学基金(81100936); 广东省自然科学基金(S20110110004860)

作者简介: 石磊, 硕士研究生, 从事神经肌肉疾病相关研究, E-mail: shilei.victory@163.com; \* 通信作者: 姚晓黎, 主任医师, 副教授, E-mail: liliyao71@163.com

个临床研究也证实 TDP43 基因突变与 ALS 有一定联系<sup>[7-9]</sup>。自此,TDP43 成为 ALS 发病的第二常见突变基因,但由于其确切致病机制尚不清楚,许多针对 TDP43 基因突变的疾病模型随之建立<sup>[10-12]</sup>。斑马鱼因其成本低、传代快、胚胎透明易观察等特点受到国内外研究者的青睐<sup>[13-14]</sup>。本实验将首次选用国内最早发现的 TDP43-S292N 作为突变位点,通过显微注射法将带有该突变的质粒导入斑马鱼体内,观察 TDP43 突变对斑马鱼胚胎发育及运动功能的影响,为体内模拟 ALS 提供可能。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

DEPC 水、HEPES、DMSO (Sigma 公司),PCR 试剂盒、*Nhe* I、*Kpn* I、*Eco*RI 及 T4 DNA 连接酶 (NEB 公司),DH5 $\alpha$  感受态细胞 (TIANGEN 公司),DNA 凝胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒 (Omega 公司),显微注射的硅酸硼毛细玻璃管 (HARVARD 公司),引物合成、Gateway<sup>®</sup> pENTR<sup>™</sup> Dual Selection Vectors (Invitrogen 公司),斑马鱼行为分析系统 (Viewpoint Life Science 公司),丰年虾卵 (HOPE 公司),TDP43-WT 基因 (武汉三鹰公司)。10 $\times$ Holt Buffer (用于幼鱼培养):NaCl 35 g、KCl 0.5 g、NaHCO<sub>3</sub> 0.25 g、CaCl<sub>2</sub> 1 g,用水补至 1 L。1 $\times$ Danieu 溶液:8 mmol/L NaCl、0.7 mmol/L KCl、0.6 mmol/L Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、5.0 mmol/L pH 7.6 HEPES,水补至 1 L。Tricaine 溶液(麻醉剂):Tricaine 粉末以 4 g/L 溶于 Holt Buffer,即为 25 $\times$ 储液,-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存,一般情况下用 5X(0.08%)溶液。甲基纤维素溶液:按 30 g/L 加到 Holt Buffer 中,溶解后分装放 4 $^{\circ}$ C 保存。

### 1.2 构建 TDP43-WT 及 TDP43-S292N 的 GAL4/UAS 质粒

以 TDP43-WT 为模板,利用 PCR 法获取 TDP43 基因编码序列。上游引物为 5'-GCTAAGGCTAGCTAGCGCCACCATGTCTGAATATATTCGGGTAAC-3',下游引物 5'-CGGGGTACCC TACATTCGCCAGCCAGAAGAC-3'。同理,以 TDP43-WT 为模板,设计 S292N 突变引物,上游为 5'-GTGGATTTGCTAATAACAGAG GGGGTGGAGC-3',下游为 5'-GCTCCACCCCCTCTGTTATTACCA AATCCAC-3',利用 PCR 反应得到突变体。并将所得 TDP-WT 及 S292N 突变 PCR 产物进行测序鉴

定。参考 Paquet 等<sup>[15]</sup>的方法,利用 GAL4/UAS 系统,将 TDP43-WT 及 TDP43-S292N 两个目的基因分别连接于携带红色荧光蛋白基因的 UAS 应答子中,然后与包含神经组织特异性 Huc 启动子的 GAL4 驱动部分及 Tol2 转座子融合,构建待注射质粒。

### 1.3 将已构建质粒显微注射入斑马鱼胚胎

1.3.1 凹槽注射板准备 在 10 cm 细菌培养皿底部平放一张载玻片,另外一张载玻片与底部载玻片成 45 $^{\circ}$ C。称量 0.9 g 琼脂糖与 30 mL ddH<sub>2</sub>O 混合,在微波炉加热至沸腾 2 次,倒入上述 10 cm 细菌培养皿。半小时后胶凝固后,移开倾斜 45 $^{\circ}$ C 的载玻片,凹槽注射板即成型。盖上培养皿盖子,用封口膜密封,于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。使用前提前 15 min 拿出冰箱放置于室温。

1.3.2 磨 针 毛细管玻璃针(内径 0.58 mm,外径 1 mm)用拉针仪拉针成形(参数:Heater lever=90 $^{\circ}$ C, Main Magnet=60, Sub Magnet=35.3),将拉针保存于洁净干燥盒子中。使用时,置于磨针器上,在目镜下调节注射针与水平线为 45 $^{\circ}$ C,转速为极速,开始磨针,10 min 后取下。

1.3.3 显微注射 将样品 GAL4 启动子+UAS 目的基因+Tol2 转座子+酚红(占总体积 10%~20%)吸于毛细管中。调节自动注射仪压力,使每次注射样品体积为 1~2 nL。收集透明鱼卵,Holding buffer 洗净后置 10 cm 细菌皿。然后置透明鱼卵于凹槽注射板,排列成行,在体视显微镜下选择 1~4 细胞的斑马鱼胚胎的胞质为注射对象。注射完毕,收集鱼卵,Holding buffer 反复微冲洗 3 次,置于 28.5 $^{\circ}$ C 孵箱孵育。

### 1.4 鉴定显微注射效果

显微注射后 12、24、48 h 在倒置相差荧光显微镜下,打开绿色激发光,观察斑马鱼胚胎是否携带红色荧光。同时收集 24 h 鱼胚胎,提取蛋白,Western blot 法鉴定 TDP-43 蛋白是否在斑马鱼中表达。将注射成功的转基因鱼胚胎转移至洁净的细菌皿继续在 28.5 $^{\circ}$ C 恒温孵箱孵育以便后续研究。

### 1.5 观察斑马鱼胚胎发育及运动功能

①观察 24 h 斑马鱼胚胎的死亡情况。随机观察 TDP43-WT、TDP43-S292N 及野生型 AB 斑马鱼 24 h 胚胎各 200 枚,比较 3 组胚胎死亡情况(每组实验重复 5 次)。②观察 24 h 斑马鱼胚胎尾巴

摆动次数<sup>[16]</sup>。随机选取携带红色荧光 TDP43-WT、TDP43-S292N 及野生型 AB 鱼 24 h 胚胎各 50 枚置于倒置相差显微镜下,在电脑屏幕上分别数 30 s 内斑马鱼胚胎鱼尾摆动次数,了解 TDP-43 对早期斑马鱼胚胎活动能力影响。③观察 48 h 斑马鱼胚胎的孵化情况。随机观察 TDP43-WT、TDP43-S292N 及野生型 AB 斑马鱼 48 h 胚胎各 200 枚,比较三组胚胎孵化情况(每组实验重复 5 次)。④观察 48 h 斑马鱼胚胎的畸形率。随机观察 TDP43-WT、TDP43-S292N 及野生型 AB 斑马鱼 48 h 胚胎各 200 枚,比较 3 组胚胎发育畸形率(每组实验重复 5 次)。⑤观察 5 d 斑马鱼幼鱼运动轨迹及活力。用斑马鱼行为学观察系统(zebralab viewpoint)观察 5 d 的 AB 鱼及 TDP43-WT、TDP43-S292N 转基因斑马鱼幼鱼 1 min 运动轨迹及活力。在 Tracking 模式的参数设置为:背景像素 18 ~ 24 pixels;速度 0.4 ~ 10 mm/s;数据输出间隔时间为 10 s。了解 TDP-43 对早期斑马鱼运动能力影响(每组鱼选择 20 条)。

### 1.6 统计学处理

所有数据用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析。计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用单因素的方差分析比较各组结果。 $P < 0.01$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TDP43 野生型与突变型质粒测序结果

成功建立 TDP43-WT 及 TDP43-S292N 突变体质粒,所得 PCR 产物已通过基因测序验证。TDP43-WT 测序结果为 Identities = 495/496 (99%),其中 GCC 同义突变为 GCT(图 1)。TDP43-S292N 测序结果为 Identities = 491/493 (99%),其中 GCC 同义突变为 GCT,AGC 错意突变为 AAC,即丝氨酸(S)突变成天冬酰胺(N)(图 2)。

### 2.2 斑马鱼胚胎中转基因质料的表达

将携带红色荧光蛋白基因及 TDP43-WT、TDP43-S292N 目的基因的质粒显微注射入斑马鱼透明胚胎,在注射后 12、24、48 h 均可观察到红色荧光的表达(图 3-5)。提取 24 h 斑马鱼胚胎的蛋白,Western blot 法检测到 TDP-43 蛋白的表达:TDP43-WT、TDP43-S292N 在 43 ku 处均有亮带(图 6)。

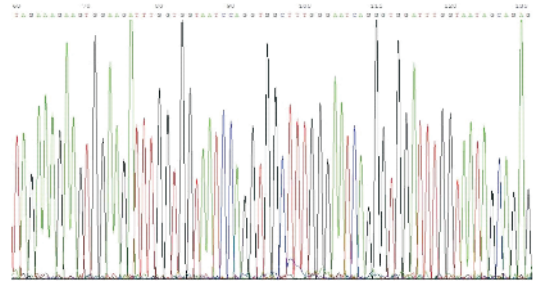


图 1 TDP43-WT 测序结果图

Fig.1 The sequencing result of TDP43-WT cDNA

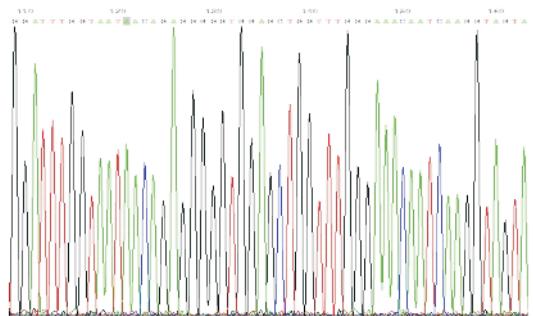


图 2 TDP43-S292N 测序结果图

Fig.2 The sequencing result of TDP43-S292N cDNA

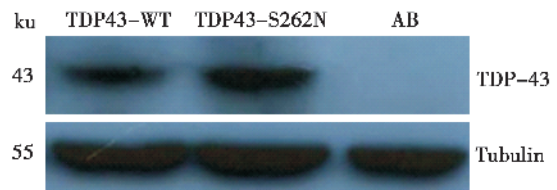


图 6 24 h 斑马鱼胚胎 TDP-43 蛋白表达图

Fig.6 The expression of TDP-43 protein in 24 h zebrafish embryos

Both TDP43-WT and TDP43-S292N zebrafish embryos could express the TDP43 protein, while normal AB group could not.

### 2.3 斑马鱼胚胎死亡率比较

注射质粒 24 h 后,斑马鱼胚胎死亡率 AB( $6.5 \pm 1.27\%$ ),TDP43-WT( $7.1 \pm 1.4\%$ ),TDP43-S292N( $41.7 \pm 3.3\%$ ),AB vs TDP43-WT, $P = 0.018 > 0.01$ ,说明 TDP43-WT 和 AB 斑马鱼 24 h 胚胎死亡率在  $\alpha = 0.01$  的水平无统计学差异,其余两组比较  $P < 0.01$ ,即 TDP43-S292N 斑马鱼胚胎死亡率高于其他两组。表明 TDP43-WT 对 24 h 胚胎暂无明显毒性作用,而 TDP43-S292N 突变会导致早期斑马鱼胚胎的死亡。

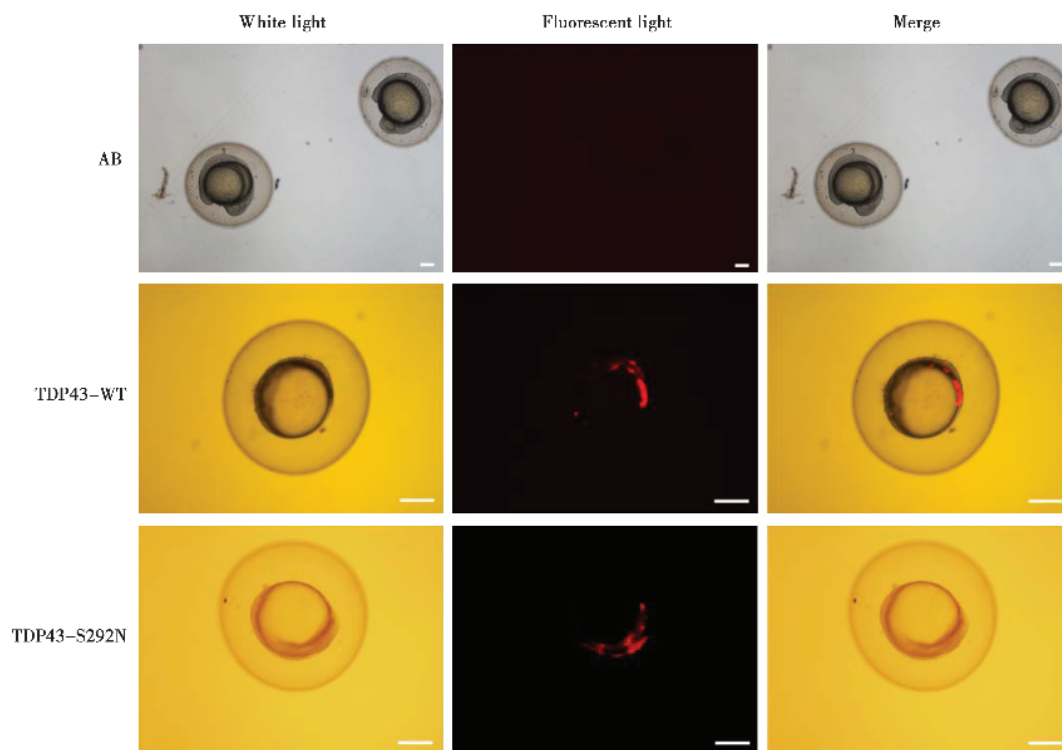


图 3 12 h 斑马鱼胚胎观察图

Fig.3 The observation of 12 h zebrafish embryos

TDP43-WT and TDP43-S292N transgenic zebrafish embryos could express red fluorescent protein after microinjecting the plasmids. (Bar = 100  $\mu\text{m}$ )

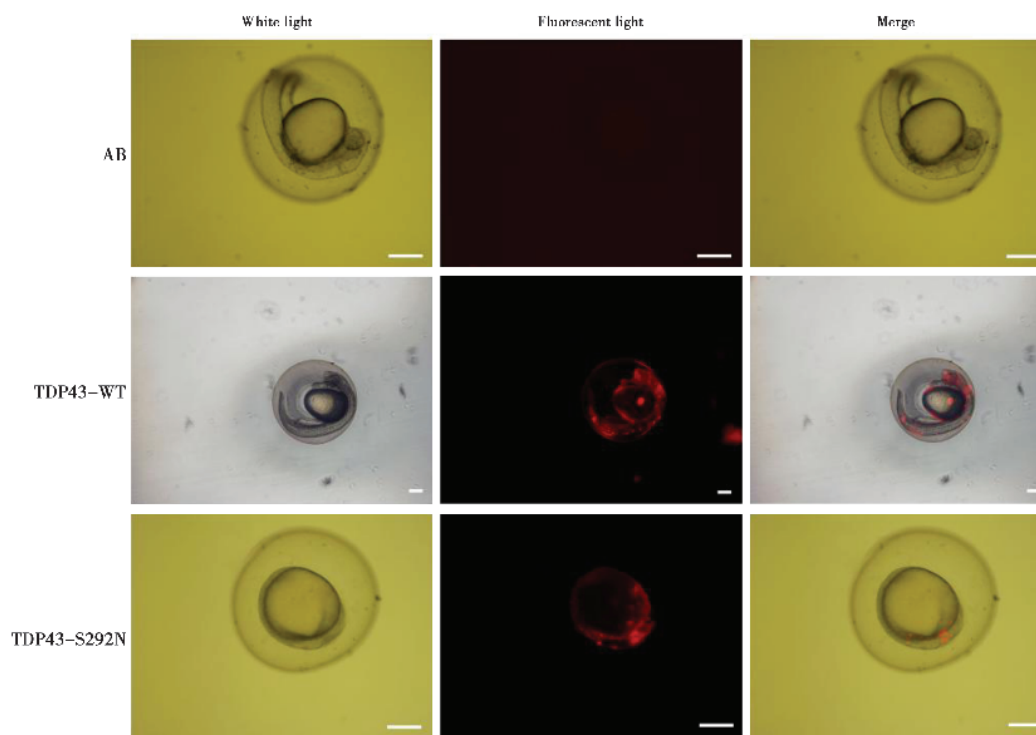


图 4 24 h 斑马鱼胚胎观察图

Fig.4 The observation of 24h zebrafish embryos

TDP43-S292N transgenic zebrafish embryos had no such obvious development like the other two groups. (Bar = 100  $\mu\text{m}$ )

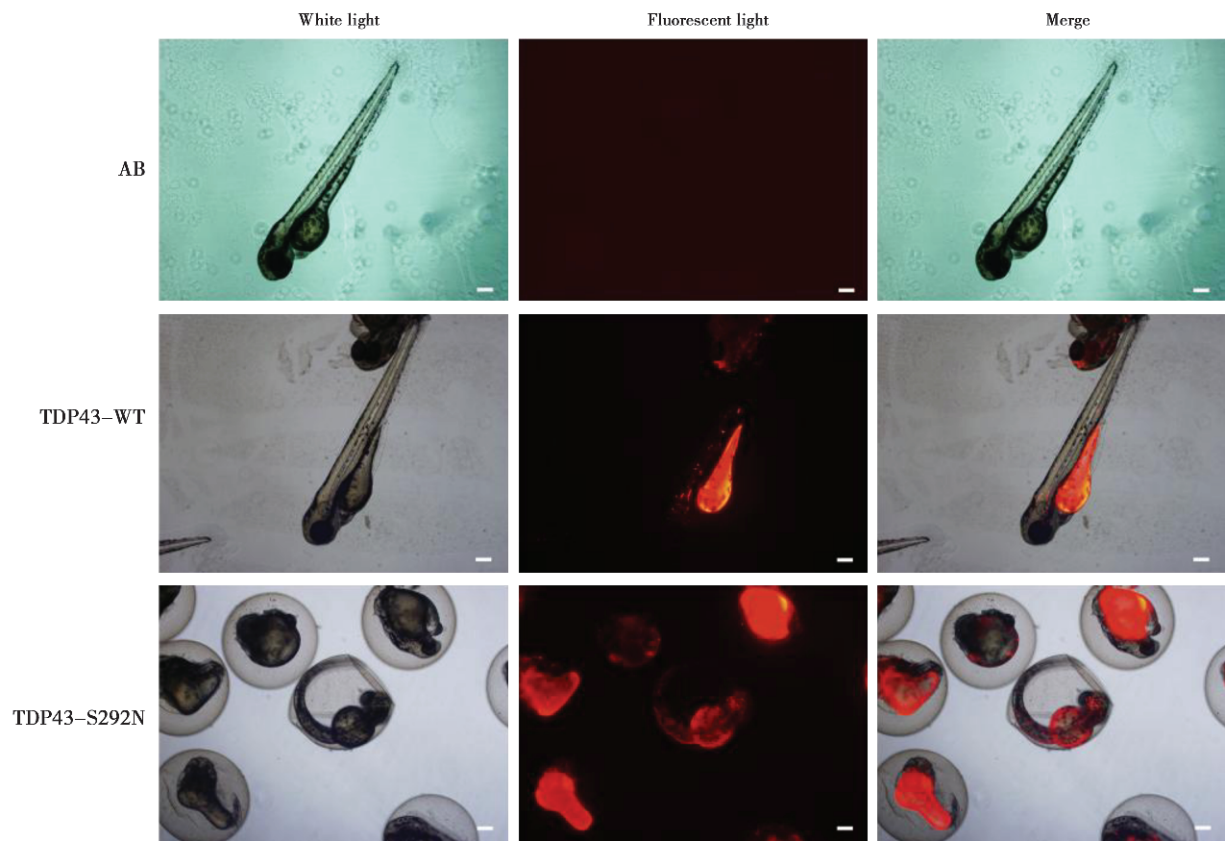


图 5 48 h 斑马鱼胚胎孵化及畸形情况观察图

Fig.5 The hatching and abnormality observation of 48 h zebrafish embryos

TDP43-S292N transgenic zebrafish embryos had more difficulty in hatching and normal development than the other two groups. (Bar = 100 μm)

2.4 斑马鱼胚胎尾巴摆动次数(30s)的比较

注射质粒 24 h 后,斑马鱼胚胎 30 s 尾巴摆动次数:AB (23.44 ± 2.05) 次,TDP43-WT (22.5 ± 3.41) 次,TDP43-S292N (9.60 ± 3.28) 次。AB vs TDP43-WT, $P = 0.388 > 0.01$ ,其余两组比较  $P < 0.01$ ,说明 TDP43-WT 和 AB 斑马鱼 24 h 胚胎尾巴摆动次数无统计学差异,而 TDP43-S292N 斑马鱼低于其他两组,表明 TDP43-S292N 突变可引起早期斑马鱼胚胎运动障碍。

2.5 斑马鱼胚胎孵化率比较

注射质粒 48 h 后,斑马鱼胚胎孵化率 AB(79 ± 3.3)%,TDP43-WT(65.2 ± 3.5)%,TDP43-S292N (25.5 ± 2.5)%。三组两两比较  $P < 0.01$ ,说明 3 组斑马鱼胚胎孵化率均具有统计学差异。结果表明,TDP43-WT 对 48 h 胚胎孵化有一定影响,但毒性程度较 TDP43-S292N 突变组低。

2.6 斑马鱼胚胎畸形率比较

注射质粒 48 h 后,斑马鱼胚胎畸形率:AB

(3.6 ± 0.8)%、TDP43-WT (4.2 ± 1.1)%、TDP43-S292N (12.9 ± 1.6)%。3 组两两比较  $P < 0.01$ ,说明 3 组斑马鱼胚胎畸形率具有统计学差异。结果表明 TDP43-WT 的注入对胚胎早期发育有一定影响,但毒性程度远低于 TDP43-S292N 突变组。

2.7 斑马鱼幼鱼运动轨迹及活力分析

注射质粒 5 d 后,AB 与 TDP43-WT 鱼 1 min 运动轨迹及活力无明显差别,TDP43-S292N 与前两组相比运动轨迹及活力有差异,游动范围及活力下降。表明 TDP43-S292N 可导致早期斑马鱼运动功能障碍(图 7)。

3 讨论

斑马鱼作为模式生物有许多优点。首先,遗传背景清楚,其基因组与人类有高达 70%的同源性<sup>[17]</sup>,可很好的模拟人类疾病的演变;其次,其体

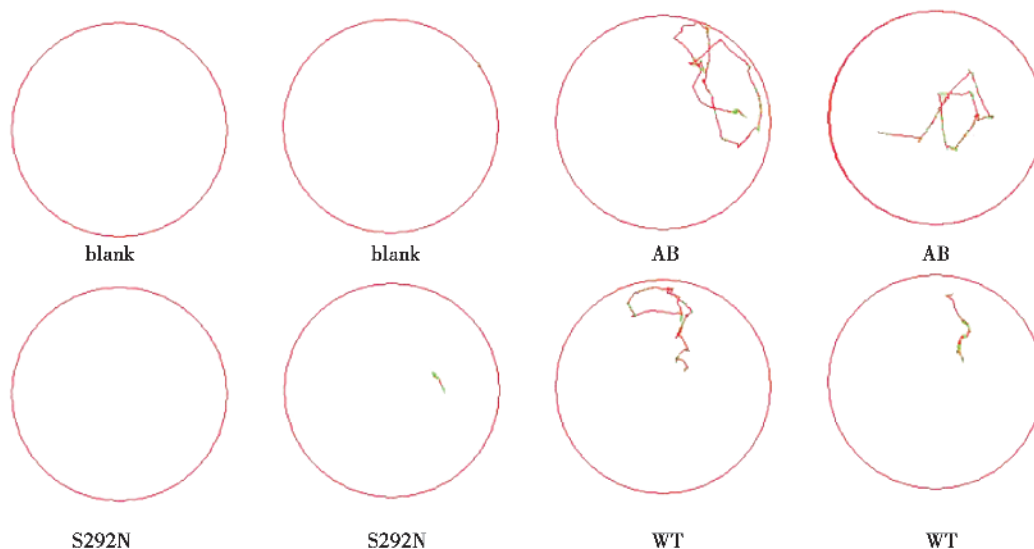


图 7 5 d 斑马鱼幼鱼 1 min 运动轨迹及活力分析图

Fig.7 The observation of motor function in 5 d juvenile zebrafish

Red represents the velocity(>10 mm/s), green (0.4–10 mm/s), black (<0.4 mm/s).

积小,成熟周期短,易繁殖饲养,体外发育,胚胎透明,易于观察和操作。因此,斑马鱼不仅具备高等生物的实用性,而且具有低等生物的可测量性,近年来逐渐受到国内外科学家关注,并已用于人类多种基因异常疾病的模拟<sup>[18–20]</sup>。对斑马鱼进行基因功能方面的研究主要有基因敲除及过表达两种途径,具体方法包括转基因技术、基因过量表达技术、利用反义寡核苷酸抑制基因表达的技术等。但多数技术都存在耗时、效率低、特异性不强等缺点。近来,通过 Tol2 转座子构建的双向性 Gal4/UAS 系统成为一种新的选择。GAL4/UAS 系统<sup>[15]</sup>分两部分:第一部分 GAL 4 驱动:将神经组织特异性 Huc 启动子、减弱的单纯疱疹病毒 VP16、Tol2 转座子与 GAL4 基因连接,组成 GAL4 驱动。第二部分 UAS 应答:将 UAS 与目的基因、红色荧光蛋白、Tol2 转座子融合,组成 UAS 应答。将以上两部分同时显微注射入斑马鱼胚胎胞质中,GAL4–Huc 启动子就可调节 UAS–目的基因的表达。这一系统不仅能调控外源基因,使其在特定细胞、特定时间表达,而且大大增加转染率和减少镶嵌现象。因此,本研究主要利用 GAL4/UAS 系统构建质粒,然后通过显微注射法将所需目的基因转入斑马鱼胚胎内,实现基因的过表达。

TDP43 基因编码分子质量为 43 ku 的 TDP–43

蛋白,该蛋白主要集中在细胞核中,有特异 mRNA 前体的剪接和转录功能<sup>[21]</sup>。当 TDP43 基因突变时,异常的 TDP–43 蛋白会在神经元和胶质细胞胞质内出现聚集,形成病理性包涵体,引起神经系统疾病,如肌萎缩侧索硬化症<sup>[6]</sup>。但其具体致病机制尚不明确,目前对于 TDP43 基因的某些突变体已在小鼠、酵母、果蝇、斑马鱼等体内进行功能验证,可观察到运动神经元功能缺陷的表现<sup>[10–13]</sup>。TDP43–S292N 突变作为国内最早发现的突变位点,目前尚无相关研究证据。因此,本实验以野生型 TDP43 基因为模板,通过突变体系诱导 TDP43–S292N 突变,并已经测序验证。然后通过显微注射转基因技术,首次将该突变转入斑马鱼胚胎,以研究该位点突变对斑马鱼胚胎发育及运动功能的影响。

本实验首次成功建立 TDP43–S292N 突变的转基因斑马鱼模型,并对转基因后的斑马鱼胚胎及幼鱼进行发育及运动方面的观察。结果发现,与正常 AB 斑马鱼及 TDP43–WT 转基因斑马鱼相比,TDP43–S292N 基因突变斑马鱼的 24 h 胚胎死亡率及 48 h 胚胎畸形率明显升高,48 h 胚胎孵化率、24 h 胚胎摆尾次数以及 5 d 斑马鱼幼鱼的运动活力明显降低。这些现象表明,TDP43–S292N 基因突变对早期胚胎发育有较强的毒性作用,同时影响幼鱼的活动能力,出现相应的运动缺损现象。

## 参考文献

- [1] Rocha JA, Reis C, Simoes F, et al. Diagnostic investigation and multidisciplinary management in motor neuron disease[J]. *J Neurol*, 2005, 252(12): 1435–1447.
- [2] Mitchell JD, Borasio GD. Amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Lancet*, 2007, 369(9578): 2031–2041.
- [3] Ringel SP, Murphy JR, Alderson MK, et al. The natural history of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Neurology*, 1993, 43(7): 1316–1322.
- [4] Guilloff RJ, Goonetilleke A, Emami J. Riluzole and amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Lancet*, 1996, 348(9023): 336–337.
- [5] Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole study group[J]. *N Engl J Med*, 1994, 330(9): 585–591.
- [6] Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Science*, 2006, 314(5796): 130–133.
- [7] Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Science*, 2008, 319(5870): 1668–1672.
- [8] Van Deerlin VM, Leverenz JB, Bekris LM, et al. TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis[J]. *Lancet Neurol*, 2008, 7(5): 409–416.
- [9] Yokoseki A, Shiga A, Tan CF, et al. TDP-43 mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Ann Neurol*, 2008, 63(4): 538–542.
- [10] Johnson BS, McCaffery JM, Lindquist S, et al. A yeast TDP-43 proteinopathy model: Exploring the molecular determinants of TDP-43 aggregation and cellular toxicity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(17): 6439–6444.
- [11] Wils H, Kleinberger G, Janssens J, et al. TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(8): 3858–3863.
- [12] Li Y, Ray P, Rao EJ, et al. A Drosophila model for TDP-43 proteinopathy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(7): 3169–3174.
- [13] Kabashi E, Lin L, Tradewell ML, et al. Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(4): 671–683.
- [14] Hewamadduma CA, Grierson AJ, Ma TP, et al. Tardbp splicing rescues motor neuron and axonal development in a mutant tardbp zebrafish [J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(12): 2376–2386.
- [15] Paquet D, Bhat R, Sydow A, et al. A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(5): 1382–1395.
- [16] Saint-Amant L, Sprague SM, Hirata H, et al. The zebrafish ennui behavioral mutation disrupts acetylcholine receptor localization and motor axon stability[J]. *Dev Neurobiol*, 2008, 68(1): 45–61.
- [17] Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 498–503.
- [18] Sun Z, Amsterdam A, Pazour GJ, et al. A genetic screen in zebrafish identifies cilia genes as a principal cause of cystic kidney [J]. *Development*, 2004, 131(16): 4085–4093.
- [19] Whitfield TT. Zebrafish as a model for hearing and deafness[J]. *J Neurobiol*, 2002, 53(2): 157–171.
- [20] Goldsmith P, Harris WA. The zebrafish as a tool for understanding the biology of visual disorders[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2003, 14(1): 11–18.
- [21] Ou SH, Wu F, Harrich D, et al. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs[J]. *J Virol*, 1995, 69(6): 3584–3596.

(编辑 刘清海)