



斑马鱼资源的开发保藏与国家斑马鱼资源中心

李阔宇, 潘鲁媛, 孙永华

(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 国家斑马鱼资源中心, 武汉 430072)

【摘要】 斑马鱼是一种新兴的脊椎模式动物。在过去的30年中, 斑马鱼已被广泛应用于生命科学、健康科学、环境农业等诸多科研领域。为了满足不同的科研需要, 研究人员开发和利用各种技术创建了大量的斑马鱼基因突变和转基因品系, 这些品系已成为开展相关科学研究的宝贵资源。为了更好地保藏和利用这些资源, 在全球范围内建设有多个规模不一的斑马鱼资源库。2012年, 我国的国家斑马鱼资源中心(<http://zfish.cn>)在中国科学院水生生物研究所正式成立。本文将重点介绍全球斑马鱼资源的开发和保藏情况, 以及我国国家斑马鱼资源中心的最新建设进展。

【关键词】 模式动物, 斑马鱼, 国家斑马鱼资源中心

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 06-0093-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.06.017

Development and maintenance of zebrafish resources, and the China Zebrafish Resource Center

LI Kuo-yu, PAN Lu-yuan, SUN Yong-hua

(China Zebrafish Resource Center, State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology,
Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei 430072, China)

【Abstract】 Zebrafish is a relatively new and booming vertebrate animal model. Over the past three decades, zebrafish has been applied in various aspects of life science, as well as health sciences, environmental studies and aquaculture research. To meet the requirement for different research purposes, large amounts of zebrafish resources, including mutant and transgenic lines, have been developed with different techniques. All of these resources need well and careful collection and maintenance, therefore several zebrafish resource facilities have been built worldwide. As one of them, the China Zebrafish Resource Center (CZRC, <http://zfish.cn>) was founded in 2012. This review is trying to introduce the development and maintenance of zebrafish scientific resources, and the updated progress of CZRC.

【Key words】 Animal model; Zebrafish; China Zebrafish Resource Center

在现代生命科学等相关学科的发展历程中, 实验动物发挥了重要的作用。那些被广泛认同、使用、研究的实验动物物种, 被称为模式动物。斑马鱼 (*Danio rerio*) 是一种原产于印度半岛热带淡水水域的新兴模式动物^[1], 它具有胚胎体外受精、体外发育、发育迅速、胚体透明、体型较小、性成熟快、产卵

量大、适于高通量养殖和筛选等优点^[2], 因而受到遗传学^[3]、发育生物学^[4, 5]、神经生物学^[6]、肿瘤学^[7]、再生和干细胞研究^[8]、疾病模型和药物筛选^[9, 10]、环境毒理学^[11]、水产基础学^[12]等科研领域的青睐。自上世纪70年代末 Steisinger 和同事们首次将斑马鱼作为实验材料进行全面和详细的描述以

【基金项目】 国家重大科学研究计划课题 (No 2012CB944504); 中国科学院重点部署项目 (No KSZD-EW-Z-001); 国家自然科学基金优秀青年科学基金 (No 31222052)。

【作者简介】 李阔宇 (1977 -), 男, 国家斑马鱼资源中心实验师, 研究方向: 斑马鱼资源开发保藏与利用, Tel: 027 - 68780570, E-mail: zebrafish@ihb.ac.cn

【通讯作者】 孙永华 (1976 -), 男, 研究员, 博导, 国家斑马鱼资源中心主任, 研究方向: 鱼类遗传发育与分子育种, Tel: 027 - 68780235, E-mail: yhsun@ihb.ac.cn

来^[13],斑马鱼作为实验动物已历经 30 多年的研究应用和系统发展。上世纪 90 年代,位于德国 Tübingen 和美国 Boston 的研究者对斑马鱼进行了大规模的诱变和筛选,获得了大批具有不同表型的突变品系,奠定了斑马鱼作为模式动物的坚实基础^[4, 5]。在此后的 20 年中,以斑马鱼为实验材料的研究飞速发展,研究总量扩展了近 20 倍^[6, 14],现已成为仅次于小鼠的第二大脊椎模式动物。

一般认为,我国的斑马鱼研究始于上世纪末清华大学孟安明实验室的建立。我国的斑马鱼研究在本世纪得到了飞速的发展,2001 ~ 2013 年,我国以斑马鱼为研究材料发表的科研论文总数占全世界同类文章的比重,由 2.09% 迅速提高到 15.6%^[15]。顺应这种发展,在国家科技部和中国科学院的支持下,我国的国家斑马鱼资源中心(China Zebrafish Resource Center,以下简称 CZRC)于 2012 年 10 月在中国科学院水生生物研究所正式挂牌成立。CZRC 的主要任务是收集、创制、保藏、分享斑马鱼转基因和突变品系等相关资源,为中国、亚洲乃至全球的斑马鱼研究领域提供斑马鱼资源和技术服务。

本文将重点介绍全球范围内斑马鱼研究资源的开发与保藏现状,以及 CZRC 的相关建设情况。

1 斑马鱼资源的开发技术

1.1 斑马鱼品系资源的正向遗传筛选

斑马鱼作为模式动物的一大优势在于其非常适合于开展高通量遗传筛选^[4, 5]。早期使用 γ 射线诱变斑马鱼胚胎的方法获得突变体以进行正向遗传筛选^[16]。由于 γ 射线会导致斑马鱼染色体大片段的缺失、异位等损伤,会对后续表型-基因型关联分析带来困难,因此很快被 N-乙基-N-亚硝基脲(ENU)随机诱变所取代^[17]。以 ENU 处理成年雄性斑马鱼可高效率地诱变减数分裂前的精原干细胞,其单位点突变效率可达每 $(1 \sim 1.5) \times 10^5$ bp 出现 1 个点突变^[18]。德国 Nüsslein-Volhard 和美国 Driever 研究小组分别同时使用 ENU 大规模诱变斑马鱼,筛选出 4000 多种和 2000 多种斑马鱼突变品系^[4, 5]。这两个实验室的研究表明斑马鱼是开展高通量饱和诱变筛选的理想脊椎模式动物。

虽然 ENU 的诱变效率高,但是对其所造成的点突变进行图位克隆需要耗费相当大的人力物力。为解决这一问题,研究人员在斑马鱼中建立了利用逆转录病毒或转座子插入染色体的突变技术^[19, 20]。

该技术是通过将转座子或逆转录病毒 DNA 导入斑马鱼胚胎,外源 DNA 随机插入胚胎原始生殖细胞的染色体,经后续培养、筛选可形成稳定遗传的突变品系。通过已知的外源 DNA 序列,可以较为方便地鉴定造成特定表型的突变基因。Kawakami 研究小组利用 Tol2 转座子介导的增强子捕获技术成功地筛选得到 72 个斑马鱼突变品系^[20]。Hopkins 研究小组通过将小鼠逆转录病毒 DNA 注射入斑马鱼胚胎,筛选得到约 1000 个斑马鱼突变品系^[21]。但是,与 ENU 诱变技术相比较,转座子或逆转录病毒介导的突变效率相对较低,这也是一个必需考量的因素。

1.2 斑马鱼品系资源的反向遗传筛选

随着斑马鱼全基因组测序的基本完成^[22],反向遗传筛选技术在斑马鱼突变品系大规模开发方面发挥出越来越大的作用。在斑马鱼中,基于 ENU 诱变库的 TILLING (targeting induced local lesions in genomes) 技术是最早得以被成功应用的反向遗传筛选技术^[23-25]。经典的 TILLING 策略是:PCR 扩增诱变库中目的基因片段,将 PCR 产物变性和退火处理,用能够识别并切割非互补碱基的核酸内切酶 CELI 酶切退火产物加以判断,并进一步通过 DNA 测序确认^[26-29]。近年来,随着高通量测序技术的发展,对文库整体进行定点测序替代了原有的酶切检测方法。TILLING 技术具有高通量、自动化、快速有效地从 ENU 诱变的突变群体中鉴定出点突变等优点。

逆转录病毒或者转座子介导的插入突变技术也被用于斑马鱼反向遗传筛选^[30]。与正向遗传学方法不同,这种筛选并非基于表型主导的突变基因发掘,而是从已知插入序列出发,直接寻找突变库中可能存在的目的基因突变。北京大学、美国国立卫生研究院(NIH)、加州大学洛杉矶分校(UCLA)等机构合作,利用小鼠白血病病毒构建斑马鱼插入突变库,液氮冻存 F1 代精子后通过侧翼序列检测技术分析外源 DNA 的插入位点^[31, 32],研究人员可选择目标基因携带外源插入的 F1 精子复苏开展进一步基因功能研究。与此类似,有研究者利用 Tol2 和睡美人转座子插入突变构建了斑马鱼插入突变库^[33, 34]。

基于 ENU 诱变的 TILLING 技术、逆转录病毒或转座子介导的插入突变在应用到斑马鱼反向遗传筛选时,需要耗费大量的人力物力用以建立大规模突

变库;另一方面,筛选过程也相对耗时费力。人工靶向核酸酶技术的出现,开创了快速、定向突变特定基因、获得稳定突变品系的新纪元。对于每一种人工靶向核酸酶技术,斑马鱼都是作为最早实现该技术的模式动物之一。

锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFN)技术的出现使得斑马鱼中的定点突变成为可能。Chandra-segaran 实验室首次将能够识别特异性 DNA 序列的锌指核酸酶和 FokI 核酸内切酶酶切结构域融合,使得人工定制识别特定 DNA 靶位的内切酶成为可能^[35];锌指核酸酶的 DNA 结合域能够特异性的识别靶位点序列,引导 FokI 核酸内切酶对靶位点进行酶切,形成 DNA 双链断裂(DSBs),细胞采取非同源末端修复的机制修补 DSBs 时,常伴有碱基片段的插入或缺失从而导致靶基因的突变。利用 ZFN 技术,在斑马鱼中已经建立了多种定点基因敲除突变品系,例如 *ntl* 和 *kdr* 等突变品系^[36, 37]。但是由于锌指核酸酶的 DNA 结合域构建难度较大,识别效率较低,在 TALEN(transcription activator-like effector nuclease)技术出现后被迅速取代。TALEN 技术是将 TALE 因子的 DNA 结合域与 FokI 的 DNA 切割域融合,同样能够特异性切割靶序列造成基因突变^[38, 39]。北京大学的张博实验室是世界上最早使用 TALEN 技术在斑马鱼中实现定点诱变的实验室之一^[40, 41]。最近,他们利用 TALEN 技术结合长片段同源序列介导的 DNA 重组,实现了对斑马鱼中 3 个基因的同源重组基因打靶^[42]。与 ZFN 技术相比,TALEN 技术具有 TALE 模块识别关系简单、构建相对快捷、识别效率高、非特异性结合少等优势。然而,TALEN 依然需要根据靶位点的 DNA 序列进行特异性 TALE 模块的设计和构建,这一步骤相对复杂和费时,限制了该技术高通量应用的前景。

近年来,一种新兴的定向基因敲除技术,CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 技术,已经被广泛应用于各种生物中^[43-46]。CRISPR/Cas 系统源于细菌中的原始获得性免疫机制^[47]。该技术只需将特异性识别靶位点的导向 RNA(gRNA)和表达 Cas9 核酸内切酶的 RNA 或表达载体共同导入胚胎或细胞,利用 gRNA 在染色体上识别靶点并引导 Cas9 切割靶点 DNA 而产生突变。北京大学熊敬维等实验室也是最早在斑马鱼中实现 CRISPR/Cas9 敲除技术的实验室之一^[46, 48]。由于 CRISPR/Cas9 技术的靶序列

识别是由 gRNA 与靶点 DNA 的一一对应来实现的,无需构建复杂的识别模块,所以操作更简便、快捷,有可能应用于高通量的基因敲除。同时,由于 CRISPR/Cas9 技术识别和切割双链 DNA 的效率非常高,为利用其造成的靶位 DSBs 进行更深入的基因组编辑提供了条件,例如使用 2 个或多个 gRNA 引导多位点酶切造成大片段缺失或多基因的平行编辑,以及在双链断裂处插入外源 DNA 序列等。

1.3 条件性转基因资源的开发

条件性转基因技术可以实现时空特异地表达或关闭特定基因,因此利用这一类技术可以更为深入地研究目标基因及相关生物学过程。Gal4/UAS 和 Cre/loxP 系统是最被广泛使用的条件性转基因技术。Gal4/UAS 系统中,需要构建两种不同的转基因品系,其中一个品系组织特异性表达或者诱导表达酵母转录因子 Gal4;另一个品系中的目的基因受到 Gal4 蛋白识别的 UAS 序列的转录调控。在这两个品系杂交后获得的子代中,目的基因仅在 Gal4 表达的细胞中得以表达。Campos-Ortega 实验室构建了鲤鱼 β -actin 启动子和 SVTK 启动子驱动的 Gal4 转基因品系和 UAS-myc-notch1;intra 转基因品系,通过杂交首次在斑马鱼中实现了由 Gal4 表达驱动的目标基因表达^[49]。与 Gal4/UAS 系统相类似,Cre/loxP 系统需要独立构建两个不同的转基因品系:一个转基因品系中表达噬菌体 Cre 重组酶,另一个转基因品系基因组中引入被 Cre 酶所识别的 loxP 序列。在这两个品系杂交的后代中,诱导表达的 Cre 重组酶可以将 loxP 位点之间的靶序列切除,从而实现靶基因在特定时间和组织中的失活或表达^[50]。利用该系统,Zon 实验室在斑马鱼中诱导表达了人类原癌基因 *kras* 和 *myc* 从而构建可诱导的肿瘤模型^[51]。我们在斑马鱼中建立了原始生殖细胞中高效、特异的 Cre/loxP 和 Gal4/UAS 条件性基因表达和转基因系统^[52],这将为更高效获得具备生殖传递能力的转基因和突变品系提供技术平台。

2 斑马鱼资源的开发现状

近十多年来,随着斑马鱼研究领域的拓展,研究技术的发展和遗传学工具的涌现,各种斑马鱼突变库的规模化创建成为新的热点^[53]。英国 Sanger 研究所开展的 ZMP(Zebrafish Mutation Project, http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_gerio/zmp/)计划是一项基于 ENU 诱变的大规模斑马鱼突变筛选

计划[54]。近年来,该项目使用高通量测序技术对突变品系库进行全基因组测序,试图获得该品系库所携带的全部突变信息并建立相应的突变品系。目前该计划已经筛选检测到约 24000 多种突变,相应的品系建立工作也在进行中。

美国麻省理工学院的 Hopkins 实验室利用逆转录病毒大规模插入诱变技术、构建了斑马鱼插入突变品系资源库(<http://web.mit.edu/hopkins/>)。基于表型筛选的方法已经筛选得到约 340 个突变品系^[55]。同时,美国 NIH、北京大学、美国 UCLA 等的多个实验室共同努力,在 NIH 和中国国家自然科学基金委员会的共同资助下,利用高通量逆转录病毒插入突变技术,展开了构建斑马鱼插入突变资源库的工作。目前,该计划已获得约 3000 多个斑马鱼的基因突变^[32]。

美国 NIH 资助了斑马鱼 TILLING 计划(Zebrafish TILLING Project, <http://webapps.fhrc.org/science/tilling/>)。该计划由 Moens 和 Solnica-Krezel 两个实验室共同主持。与 ZMP 相类似,基于 ENU 诱变技术和改进后的 TILLING 技术,应用下一代测序,直接从 1 万多株突变斑马鱼中寻找特定突变。该计划为同行提供特定基因的无义突变筛选服务,现已成功获得 100 多个基因的无义突变品系。研究人员可以向这两个实验室直接索取这些斑马鱼突变体。

2010 年,欧盟启动了 ZF-HEALTH (Zebrafish Regulomics for Human Health) 计划(<http://zf-health.org/>)。该计划使用高通量行为学和形态学检测,对与人类疾病相关的基因突变进行表型检测和小分子药物筛选。其目标是在斑马鱼中筛选到人类疾病相关基因的突变体和基因表达调控相关的元件,为建立疾病模型和筛选先导药物提供基础。该计划预期筛选 1000 种与人类疾病相关的斑马鱼突变品系。

2011 年,国际斑马鱼蛋白诱捕协会(International Zebrafish Protein Trap Consortium)的多家实验室共同合作,利用 Tol2、睡美人等转座子插入突变技术构建了 zfishbook 插入突变数据库(<http://www.zfishbook.org/>)^[56]。目前,该计划已公布了 736 个插入突变品系。

2013 年,我国的近 40 家实验室联合启动了斑马鱼 1 号染色体全基因敲除项目(<http://www.zfish.cn/TargetList.aspx>)。该项目使用 CRISPR/

Cas9 技术,对斑马鱼 1 号染色体上的 1333 个基因进行系统敲除。基因敲除后产生的斑马鱼突变品系,将被提交到 CZRC 进行整理和保藏,并向全球学术界公开。预计在项目完成后,CZRC 将储备斑马鱼 1 号染色体上 80% 以上的基因突变品系。

3 斑马鱼资源的保藏

3.1 世界范围内斑马鱼研究资源的保藏

鉴于斑马鱼作为模式动物的重要作用和独特地位,在全球范围内,美国、欧洲、日本、澳大利亚、我国台湾等国家和地区也已设立有其斑马鱼资源中心。目前,这些中心保藏的大量斑马鱼品系、cDNA、工具载体、抗体等方面的资源,通过收取服务费的方式提供给研究同行。

斑马鱼作为重要模式动物的一大优势是可体外受精,精子可冻存保藏。斑马鱼精子冻存技术始于 1982 年,Harvey 等以甲醇作为抗冻剂,冷冻保存斑马鱼精液,获得 57% 的受精率^[57]。斑马鱼精子的超低温保藏,现在已有较成熟的技术操作规范^[58]。保藏的精子在稳定的液氮环境下可保持活性 10 年以上,复苏后的平均受精率依然可达 30% 以上^[59]。这为低成本、规模化、长期地保藏斑马鱼品系资源提供了条件。

现在全球最具影响力的斑马鱼资源中心,是位于美国俄勒冈州的国际斑马鱼资源中心(International Zebrafish Resource Center, <http://www.zebrafish.org>,以下简称 ZIRC)。ZIRC 成立于 1999 年,现在保藏有全球斑马鱼研究者提供的将近 2 万个野生型、基因突变和转基因鱼品系。同时 ZIRC 还提供斑马鱼 cDNA、抗体资源,以及养殖、疾病等方面的咨询服务。继 ZIRC 之后,欧洲、澳洲、日本、台湾等国家和地区都相继成立了提供斑马鱼资源保藏和服务的资源库,但规模都远远小于 ZIRC。

3.2 我国斑马鱼研究资源保藏情况

在我国,自上世纪 90 年代开始有研究者采用斑马鱼为模式动物开展有关研究工作。研究方向涉及遗传学、发育生物学、神经生物学、肿瘤学、再生与干细胞、疾病模型和药物研发、水产性状改良、环境水质监测、毒理学等方面。2014 年 10 月,由中国科学院水生生物所主办,在武汉召开的第二届全国斑马鱼 PI 大会上,有来自全国各地各研究方向的 150 多位学者与会。粗略估算,中国现在以斑马鱼为工具进行研究的各种实验室超过 300 家。中国斑马鱼实

验室不仅在数量上增加迅速,其研究方向的发展和国际同步,涉及斑马鱼研究的方方面面。

据不完全统计,目前散布在我国各个实验室的各类斑马鱼突变或转基因稳定遗传品系已有 500 余种。中国迫切需要建设国家级的斑马鱼资源中心,以更加高效整合、收集、创制、保藏、分享斑马鱼研究资源。在朱作言、孟安明、彭金荣等学者的大力推动下,国家斑马鱼资源中心(CZRC)于 2012 年 10 月在中国科学院水生生物研究所正式挂牌成立。CZRC 现在拥有近 600 平米的建设空间,已建设了总面积达 300 平米的主鱼房,总容量超过 1 万缸。并装备了设备间、显微操作间、外部隔离鱼房、育苗室、显微镜间、细胞培养间、超低温保藏间、和分子生物学实验室等条件。CZRC 完全建设完成后,可容纳数千个活体保藏品系和数以万计的精子冻存品系。

2012 年 10 月,国家斑马鱼资源中心第一届理事会在中科院水生所成立,制定了 CZRC 章程。该章程规范了 CZRC 主要任务,具体如下:1)负责我国斑马鱼研究资源的收集、创制、整理、鉴定和保存,建立斑马鱼研究资源的国家级安全保存体系;2)在签订相关协议的基础上,负责与国际上其他斑马鱼研究资源库进行资源的引进与交流;3)负责国家斑马鱼资源中心数据库和网站(<http://www.zfish.cn>)的建设和维护,整合国内斑马鱼研究和资源信息;4)在保护生物安全和尊重知识产权的前提下,向我国各科研机构、大专院校和科普基地等提供可利用的斑马鱼资源材料及相关信息;5)开展斑马鱼研究资源保护和开发的基础理论与技术方法的研究;6)向国内研究者提供斑马鱼研究相关的技术培训和技术服务。

CZRC 成立 2 年以来,已建立了成熟的斑马鱼养殖规范、精子冻存技术、基于 TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统的基因敲除技术,和基于原始生殖细胞操作的转基因和基因敲入技术。截止 2014 年底,中心活体保藏有 300 多个斑马鱼转基因和基因突变品系。2 年来,共向国内外斑马鱼研究人员提供了 1000 多人次资源和技术服务。自斑马鱼 1 号染色体全基因敲除计划启动以来,CZRC 独立承担了 50 多个基因的敲除品系构建,和全部品系的整理、保藏和公布的工作。预期到 2015 年底,CZRC 所保藏的各类斑马鱼品系将超过 2000 个,成为亚洲最大的斑马鱼资源中心。CZRC 还将继续开发更多具有自主知识产权的斑马鱼品系。

同时,因应中国斑马鱼科研领域快速发展的需求,CZRC 将每年举办斑马鱼养殖、品系构建、超低温保藏、常规遗传和发育操作、常见鱼病鉴定和处理、常规分子生物学和影像学等方面的技术培训。CZRC 期望为中国的斑马鱼研究的发展提供全面的资源与技术服务。

4 总结

与其他经典的模式动物相比,斑马鱼的应用历史并不长,但斑马鱼研究领域的发展最为迅速^[6],前景非常广阔。在全球范围内,开发和利用斑马鱼资源往往成为新兴的科研热点。我国的斑马鱼研究在最近 10 年间已有长足的发展。对斑马鱼研究资源的开发、保藏和利用进行大规模的投入,将对我国相关领域的科研工作起到极大的推动作用。随着我国国家斑马鱼资源中心资源保有量、技术和服务水平的提升,我们相信我国利用斑马鱼为模式动物的科研工作将会得到更快和更好的发展,我们也期待更多精彩的研究成果在斑马鱼研究领域不断涌现。

参 考 文 献

- [1] Driever W, Stemple D, Schier A, et al. Zebrafish: genetic tools for studying vertebrate development [J]. Trends Genet, TIG 1994, 10(5): 152 - 159.
- [2] Nusslein-Volhard C. Of flies and fishes [J]. Science 1994, 266: 572 - 574.
- [3] Davis EE, Frangakis S, Katsanis N. Interpreting human genetic variation with in vivo zebrafish assays [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842: 1960 - 1970.
- [4] Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, et al. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish [J]. Development, 1996, 123: 37 - 46.
- [5] Haffter P, Granato M, Brand M, et al. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio* [J]. Development, 1996, 123: 1 - 36.
- [6] Stewart AM, Braubach O, Spitsbergen J, et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside [J]. Trends Neurosci, 2014, 37: 264 - 278.
- [7] White R, Rose K, Zon L. Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward [J]. Nature Rev Cancer, 2013, 13: 624 - 636.
- [8] Gemberling M, Bailey TJ, Hyde DR, et al. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration [J]. Trends Genet, 2013, 29(11): 611 - 620.
- [9] Das BC, McCormick L, Thapa P, et al. Use of zebrafish in chemical biology and drug discovery [J]. Future Med Chem, 2013, 5: 2103 - 2116.
- [10] Bruni G, Lakhani P, Kokel D. Discovering novel neuroactive

- drugs through high-throughput behavior-based chemical screening in the zebrafish [J]. *Front pharmacol*, 2014, 5: 153.
- [11] Dai YJ, Jia YF, Chen N, et al. Zebrafish as a model system to study toxicology [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2014, 33: 11 – 17.
- [12] Ribas L, Piferrer F. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research [J]. *Rev Aquaculture*, Doi: 10.1111/raq.12041.
- [13] Streisinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*) [J]. *Nature* 198, 291: 293 – 296.
- [14] 贾顺姬, 孟安明. 中国斑马鱼研究发展历程及现状 [J]. *遗传*, 2012, 34: 1082 – 1088.
- [15] Xie XW, Sun YH. An introduction of the zebrafish animal model and the China Zebrafish Resource Center (CZRC) [J]. *Sci China Life Sci*, 2014, In press.
- [16] Chakrabarti S, Streisinger G, Singer F, et al. Frequency of gamma-ray induced specific locus and recessive lethal mutations in mature germ cells of the zebrafish, *Brachydanio rerio* [J]. *Genetics* 1983, 103: 109 – 123.
- [17] Mullins MC, Hammerschmidt M, Haffter P, et al. Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate [J]. *Curr Biol*, 1994, 4: 189 – 202.
- [18] de Bruijn E, Cuppen E, Feitsma H. Highly efficient ENU mutagenesis in zebrafish [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 546: 3 – 12.
- [19] Gaiano N, Amsterdam A, Kawakami K, et al. Insertional mutagenesis and rapid cloning of essential genes in zebrafish [J]. *Nature* 1996, 383: 829 – 832.
- [20] Nagayoshi S, Hayashi E, Abe G, et al. Insertional mutagenesis by the Tol2 transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes: *tcf7* and *synembryonic-like* [J]. *Development* 2008, 135: 159 – 169.
- [21] Amsterdam A1, Burgess S, Golling G, et al. A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish [J]. *Genes Dev*, 1999, 13 (20): 2713 – 2724.
- [22] Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. *Nature*, 2013, 496: 498 – 503.
- [23] Wienholds E, van Eeden F, Kosters M, et al. Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish [J]. *Genome Res*, 2003, 13: 2700 – 2707.
- [24] Wienholds E, Schulte-Merker S, Walderich B, et al. Target-selected inactivation of the zebrafish *rag1* gene [J]. *Science* 2002, 297: 99 – 102.
- [25] Draper BW, McCallum CM, Stout JL, et al. A high-throughput method for identifying N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-induced point mutations in zebrafish [J]. *Methods Cell Biol*, 2004, 77: 91 – 112.
- [26] Colbert T, Till BJ, Tompa R, et al. High-throughput screening for induced point mutations [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126: 480 – 484.
- [27] Oleykowski CA, Bronson Mullins CR, Godwin AK, et al. Mutation detection using a novel plant endonuclease [J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26: 4597 – 602.
- [28] Henikoff S, Till BJ, Comai L. TILLING. Traditional mutagenesis meets functional genomics [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135: 630 – 636.
- [29] Stemple DL. TILLING—a high-throughput harvest for functional genomics [J]. *Nature Rev Genet*, 2004, 5: 145 – 150.
- [30] Jao LE, Maddison L, Chen W, et al. Using retroviruses as a mutagenesis tool to explore the zebrafish genome [J]. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2008, 7(6): 427 – 443.
- [31] Wang D, Jao LE, Zheng N, et al. Efficient genome-wide mutagenesis of zebrafish genes by retroviral insertions [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 12428 – 12433.
- [32] Varshney GK, Lu J, Gildea DE, et al. A large-scale zebrafish gene knockout resource for the genome-wide study of gene function [J]. *Genome Res*, 2013, 23: 727 – 735.
- [33] Clark KJ, Geurts AM, Bell JB, et al. Transposon vectors for gene-trap insertional mutagenesis in vertebrates [J]. *Genesis* 2004, 39: 225 – 233.
- [34] Kawakami K, Takeda H, Kawakami N, et al. A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish [J]. *Dev Cell*, 2004, 7: 133 – 144.
- [35] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93: 1156 – 1160.
- [36] Doyon Y, McCammon JM, Miller JC, et al. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 702 – 708.
- [37] Meng X, Noyes MB, Zhu LJ, et al. Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 695 – 701.
- [38] Cermak T, Doyle EL, Christian M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting [J]. *Nucleic acids Res*, 2011, 39: e82.
- [39] Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, et al. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system [J]. *Nature*, 2012, 491: 114 – 118.
- [40] Huang P, Xiao A, Zhou M, et al. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 699 – 700.
- [41] Sander JD, Cade L, Khayter C, et al. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 697 – 698.
- [42] Zu Y, Tong X, Wang Z, et al. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish [J]. *Nat Methods*, 2013, 10: 329 – 331.
- [43] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337: 816 – 821.

