

## Tafazzin 基因缺失对斑马鱼生长及肌纤维收缩的影响

车金远<sup>1,2</sup>, 胡存洁<sup>1,2</sup>, 王琪<sup>1,2</sup>, 鲍宝龙<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

**摘要:** 鱼类骨骼肌中富含大量线粒体, 尤其在红肌中线粒体含量很高。线粒体对维持鱼类骨骼肌的收缩具有重要作用。*Tafazzin* (*taz*) 基因作为合成线粒体特异性磷脂心磷脂的重要基因, 对线粒体 ATP 的产生有关键作用。通过对斑马鱼的肌肉组织进行 *taz* 基因切片原位杂交, 结果显示: *taz* 基因在斑马鱼骨骼肌中大量表达, 且特异性表达在肌原纤维的 I 带中。通过 CRISPR/Cas9 技术在构建斑马鱼 *taz* 缺失突变体 *taz*<sup>-/-</sup> 过程中发现 *taz* 缺失后, 斑马鱼生长发育缓慢, 突变体的体长、体质量、体宽、体高均显著小于野生型斑马鱼 ( $P < 0.05$ )。受精后 48 h 胚胎的肌动蛋白荧光染色结果显示, *taz* 突变体肌纤维排列变疏松, 肌动蛋白长度显著变长 ( $P < 0.05$ )。整体骨骼染色结果显示, *taz* 突变后肌间骨的生长受到抑制。以上结果表明, 在斑马鱼中, *taz* 基因影响斑马鱼生长、骨骼肌的收缩及肌间骨的发育。

**关键词:** *tafazzin* 基因; 斑马鱼; 骨骼肌; 肌动蛋白; 肌间骨

中图分类号: S 917

文献标志码: A

鱼体内骨骼肌是占体质量比例最大的一类组织(可达 40%~60%), 在运动过程中是体内代谢最活跃组织之一<sup>[1-2]</sup>。鱼类骨骼肌由富含线粒体的快慢肌纤维组成, 慢肌纤维中的线粒体数量远大于快肌纤维<sup>[3-5]</sup>。线粒体的数量决定了两种类型的肌纤维行使不同的功能。快肌纤维线粒体含量少, 收缩速度快但容易疲劳, 而慢肌纤维中的线粒体数目多, 有氧代谢酶活性高, 更耐疲劳。鱼类游泳主要依靠肌纤维的收缩, 也就是“肌丝滑动”。在肌肉收缩过程中, 肌球蛋白水解 ATP 释放能量, 从而完成肌球蛋白细丝移动。该过程中的 ATP 由位于肌纤维 I 带中的线粒体氧化磷酸化途径生成<sup>[6]</sup>。通过对酵母和哺乳动物细胞的亚细胞分离及 *tafazzin* 基因标记实验证明 *tafazzin* 基因位于线粒体中的内外膜间<sup>[7-11]</sup>。

*Tafazzin* (*taz*) 基因由 BIONE 等于 1996 年发现并命名, 编码 TAZ 蛋白<sup>[12]</sup>。TAZ 蛋白是一种线粒体酶: 磷脂-溶血磷脂转酰基酶, 在线粒体中起

重要作用。存在于线粒体的内外膜间, 它主要的酶促功能是产生成熟的心磷脂<sup>[13-14]</sup>。心磷脂是一种高度特异地分布在线粒体内膜的磷脂, 是线粒体进行氧化磷酸化和高效产生 ATP 的必需分子之一。*taz* 基因突变会引起罕见的 X 连锁遗传病巴斯综合征 (Barth syndrome), 患者表现出生长迟缓等症状<sup>[15]</sup>。随后, 在人、酵母和果蝇中均发现 *taz* 基因突变导致心磷脂分子种类严重紊乱, 证实 *taz* 参与心磷脂重塑<sup>[11, 16-17]</sup>。在斑马鱼中 *taz* 基因的敲降导致严重的发育和生长迟缓、明显的心动过缓和心包积液以及全身水肿, 这些迹象类似于人类 Barth 综合征心力衰竭<sup>[8]</sup>。目前, 尚没有在斑马鱼中敲除 *taz* 的表型研究。本研究通过在斑马鱼中构建 *taz* 基因功能缺失的突变模型, 利用原位杂交及免疫荧光染色探究 *taz* 基因在骨骼肌组织的表达位置及功能, 明确 *taz* 基因在鱼类骨骼肌发育中的作用。

收稿日期: 2021-07-15 修回日期: 2021-12-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31872546)

作者简介: 车金远 (1994—), 女, 博士研究生, 研究方向为发育生物学。E-mail: 1208632026@qq.com

通信作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

斑马鱼 AB 品系来自中科院上海生命科学研究所以,饲养于上海海洋大学水产与生命学院。养殖循环水温度为 28.5 °C。分别于每天 8:00 和 17:00 投喂两次,其中幼鱼投喂草履虫,成体鱼投喂卤虫。光照周期为 10 h 黑暗和 14 h 光照。实验方案经上海海洋大学动物伦理委员会批准,并遵守中国科学技术部制定的《实验动物伦理待遇指南》。

### 1.2 斑马鱼 *taz* 基因的切片原位杂交

#### 1.2.1 原位杂交探针合成

根据 NCBI 网站提供的斑马鱼 *taz* cDNA 基因序列设计探针引物,上游引物 F: CTGGTCCAAAGGTAAGTGTATG;下游引物 R: GCTGGACATTCTTCCAGATG。克隆探针序列至 pGEM-T 载体。大量抽提含目的片段基因的质粒,用限制性内切酶(ThermoFisher Scientific,美国)线性化质粒,用 DNA 纯化试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]回收线性化的模板质粒,重悬于 0.1% DEPC 水。用 SP6 RNA Polymerase 或 T7 RNA Polymerase (Promega,美国)合成地高辛(DIG)标记的 RNA 反义或正义探针, RNA 转录反应体系如下: 1 μL SP6 或 T7 RNA Polymerase, 0.5 μL RNase Inhibitor(40 U), 2 μL 10×DIG Mix, 2 μL DTT(100 mmol/L), 4 μL 5×Transcription buffer, 线性化质粒 DNA 1 μg, RNase free 水补足至 20 μL, 37 °C PCR 仪孵育 2 h, 电泳检测转录效果,若转录成功加 1 μL RNase-free DNAase, 37 °C PCR 仪孵育 15 min 消除 DNA 模板。然后加入 2.2 μL RNase-free LiCl (5 mol/L)和 40 μL 的无水乙醇(冰预冷), -20 °C 下静置至少 4 h 沉淀 RNA。然后 4 °C 13 000 r/min 离心 30 min, 去上清, 用 75% 乙醇漂洗, 4 °C 13 000 r/min 离心 15 min, 去上清, 在无菌操作台吹干 10 min, 最后向 RNA 沉淀中加 30 μL DEPC 水溶解, 取 1 μL 进行电泳检测其完整性, 并用 NanoDrop 2 000 测定 RNA 浓度, 保存于 -80 °C 备用。

#### 1.2.2 石蜡切片的制备

取 1 月龄斑马鱼(此时肌肉组织发育基本完全), 经麻醉剂处理用 4% 多聚甲醛(4% PFA)溶液在室温条件下固定 24 h。在显微镜下剪去鳍条组织、去除皮肤鳞片后, 将样本于 PBS 中清洗 3 次, 每次 10 min。组织经梯度脱水后, 二甲苯

处理样本至透明并于 65 °C 浸蜡包埋。用 Leica 轮转式切片机进行连续切片, 切片厚度 7 μm。

#### 1.2.3 切片原位杂交

将制备好的切片经二甲苯脱蜡, 并梯度复水。使用 PBST 孵育数次, 向组织上滴加 20 μL 的 10 μg/mL 蛋白酶 K, 37 °C 消化 3 min, 暴露目的核苷酸。经甘氨酸处理后, 使用 PBST 漂洗数次后, 入 5×SSC 中平衡 15 min, 55 °C 预杂交 3.5 h。向每张玻片滴加 40 μL 探针浓度为 5 ng/μL 的杂交液, 置于含少量 2×SSC 的湿盒中放置于黑暗环境 65 °C 过夜(10~12 h)。使用 65 °C 的 2×SSCT 和 0.1×SSCT 漂洗组织各两次, 取出玻片冷却片刻, 用少量室温 PBST 冲洗玻片数次。1% 封闭液室温孵育 1 h, 滴加 40 μL 用封闭液稀释 5 000 倍的抗地高辛抗体-AP 结合物, 室温湿盒孵育 2 h, 使用适量 PBS 冲洗后, 漂洗数次, AP Buffer 浸洗 30 min, 向玻片上滴加 40 μL BCIP-NBT 显色液在黑暗条件下显色 1~12 h, 定时镜检以防显色过度。显色结束后, 适量 PBST 漂洗后, 浸洗 10 min, 再入蒸馏水中浸洗数次, 将切片梯度脱水、封片并拍照。

### 1.3 利用 CRISPR/Cas9 构建 *taz*<sup>-/-</sup> 突变体

在 UCSC 数据库上查询斑马鱼 *taz* 基因的基因组 DNA 序列(GeneID: 30526)。根据 CRISPR/Cas9 基因编辑靶点设计网站(<http://genome-asia.ucsc.edu/>)选择基因敲除的靶点。利用 HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit (NEB, cat#E2050) 进行体外转录, 并用 RNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research, cat#R1017) 纯化获得 sgRNA。将 sgRNA (50 pg) 和 Cas9 蛋白 (Genescript, cat#Z03389-50) 混合后用于注射, Cas9 蛋白的工作浓度为 1 μg/μL, 每个胚胎注射量约为 1.4 nL。将注射后经检测有效编辑的 F<sub>0</sub> 斑马鱼饲养至成年, 并进行突变体纯合品系构建。

### 1.4 免疫荧光染色

对 48 hpf 斑马鱼的胚胎进行整体荧光染色。胚胎经过 0.6 mmol/L 麻醉剂(药品名: Ethyl 3-Aminobenzoate methanesulfonate, cat#886862, 麦克林公司)麻醉后, 于 4% PFA 中 4 °C 固定过夜。用含 0.1% Tween-20 的 PBST 清洗胚胎 3 次每次 10 min。通过冰丙酮处理 8 min, 以增加细胞膜通透性。PBST 清洗 30 min 后, 用 phalloidin-TRITC [cat#40734ES75, 翌圣生物科技(上海)股份有限公司] 进行肌动蛋白染色 20 min。PBST

清洗 30 min 后,用抗荧光淬灭封片剂 [cat#E675011-0010,生工生物工程(上海)股份有限公司]封片。样品经 Leica SP8 激光扫描共聚焦拍照分析。

### 1.5 整体骨骼染色及肌间骨分离

利用茜素红染色对3月龄斑马鱼进行整体骨骼染色。斑马鱼经过麻醉剂麻醉后,用4% PFA 固定至少 24 h。然后,用 PBS 清洗鱼体 30 min,去除多聚甲醛溶液。接着用含 1% Tween20 的 TBST 浸泡样品 30 min,脱去鱼体表皮脂肪;然后浸泡在  $V(3\% \text{H}_2\text{O}_2):V(1\% \text{KOH})=1:9$  溶液中,于强光照下脱去鱼体表皮色素;经 1% 胰蛋白酶消化至鱼体透明后,用含 1% 茜素红的 1% KOH 溶液进行硬骨染色,最后经过甘油梯度进行观察。茜素红染色后的鱼体用于单根肌间骨的分离实验。于解剖镜下进行鱼体解剖,从尾部开始取出肌肉组织中的肌间骨,去除多余肌肉组织后,排列在盖玻片上,最后用 50% 甘油进行封片。

### 1.6 数据分析

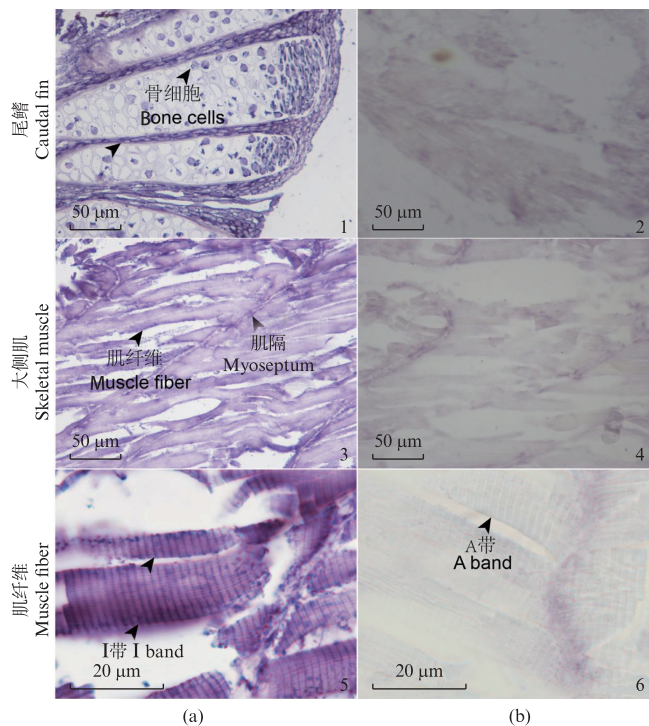
利用 Image J 软件进行肌动蛋白长度统计。

所有数据均以平均值  $\pm$  标准误表示。使用 Graphpad 6.0 软件进行  $t$  检验,  $P<0.05$  表示显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 *taz* 基因的表达分布

对受精后 30 d(30 dpf)的斑马鱼躯干进行切片原位杂交,观察 *taz* 基因在胚后发育的表达情况。结果显示,在斑马鱼躯干组织, *taz* 基因的 mRNA 探针在肌原纤维、部分骨组织如鳍条骨、肌隔中均有表达,尤其在肌肉组织中高表达。为了进一步了解 *taz* 基因在肌肉组织中的表达,对肌肉组织切片进行局部放大,观察 *taz* 基因在肌原纤维中的表达情况(图版 I)。结果显示, *taz* 基因的 mRNA 探针信号在肌纤维中表现为明显的明暗带变化,且信号主要位于肌原纤维的 I 带上,而 A 带上信号较弱几乎无信号。结果表明 *taz* 基因的 mRNA 探针在肌纤维组织中的表达位置有明显的位置特异性,主要表达于组成肌纤维的单位肌原纤维的 I 带中。



(a) 尾鳍组织及肌肉组织 *taz* 基因探针原位杂交的实验组及反义探针组,  $n=3$ ; (b) 尾鳍组织及肌肉组织 *taz* 基因原位杂交的正义探针杂交图,  $n=3$ 。

(a) In situ hybridization of caudal fin and skeletal muscle tissue with anti-sense probe; (b) The hybridization with the sense probe of *taz*; Sample size for experimental group and control are 3.

图版 I 斑马鱼大侧肌及尾鳍组织 *taz* 基因的原位杂交

Plate I In situ hybridization for *taz* in skeletal muscle and caudal fin tissue

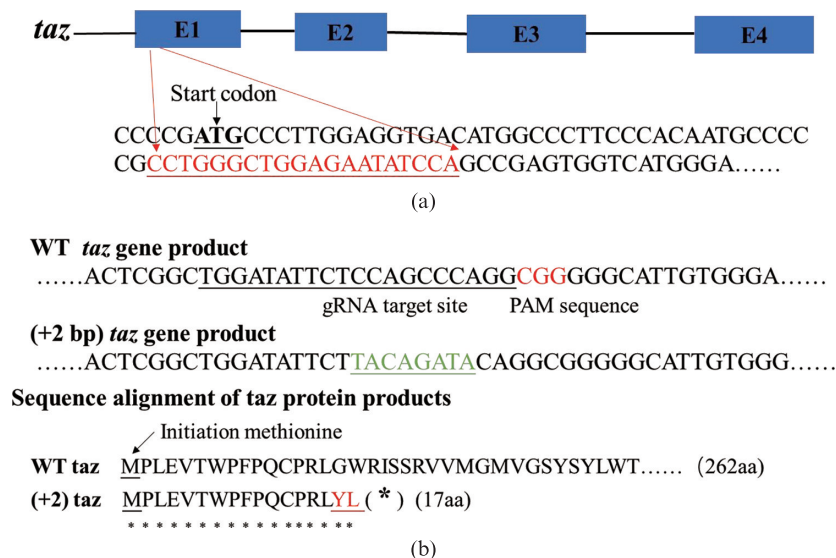


## 2.2 利用 CRISPR/Cas9 技术构建斑马鱼 *taz* 基因突变体

在斑马鱼中, *taz* 基因共有 4 个外显子, 为成功破坏 *taz* 的基因功能, 在第一外显子区选择靶点, 设计 20 bp 的靶点序列 (图 1a)。通过 CRISPR/Cas9 技术, 成功获得了 *taz* 突变体 *taz*<sup>-/-</sup>。结果显示, 基因敲除产生了在靶点处增加 2 个碱基的突变体类型。通过对比野生型和突变体斑马鱼的 *taz* 基因的氨基酸序列 (图 1b), 野生型斑马鱼 *taz* 基因正常编码 262 个氨基酸。而突变体的 *taz* 基因序列由于靶点位置增加 2 bp 后, 发生了无义突变, 使氨基酸的编码提前终止, 突变体编码 17 个氨基酸。将验证有效的 F<sub>0</sub> 与野生型外交产生的 F<sub>1</sub> 鱼系养至 3 月龄, 剪取 3 月龄 F<sub>1</sub> 尾鳍, 使用碱裂解法提取基因组, 经 PCR 测序、比对确定 F<sub>1</sub> 突变类型。将筛选出的 F<sub>1</sub> 杂合品系内交后获得 F<sub>2</sub> 纯合品系。

## 2.3 斑马鱼 *taz* 基因突变后对生长发育的影响

对野生型和 *taz*<sup>-/-</sup> 发育不同时期: 受精后 48 h (48 hpf)、72 hpf 及 3 月龄的个体发育进行观察 (图版 II)。对比发现, 48 hpf 时, 野生型斑马鱼体表被较多黑色素细胞、体节明显; *taz*<sup>-/-</sup> 突变体斑马鱼黑色素细胞且体节发育不明显。至 72 hpf, *taz*<sup>-/-</sup> 黑色素细胞开始增加, 但数量仍少于野生型斑马鱼。斑马鱼发育至 3 个月时, 无论雌鱼还是雄鱼, *taz*<sup>-/-</sup> 的体型都远小于野生型。但幼鱼及成鱼突变体均未出现畸形。对 *taz*<sup>-/-</sup> 的生长周期进行统计, 并绘制生长曲线 (图 2)。对比突变体及野生型斑马鱼发育至不同时期的体质量、体长、体宽、体高, 结果显示除了 1 个月的斑马鱼没有显著差异外, 从 2 月龄至 4 月龄, *taz*<sup>-/-</sup> 均显著小于野生型斑马鱼 ( $P < 0.01$ )。结果表明, 在斑马鱼中, *taz* 基因突变后, 斑马鱼的生长发育受到抑制, 呈现发育迟缓的现象。

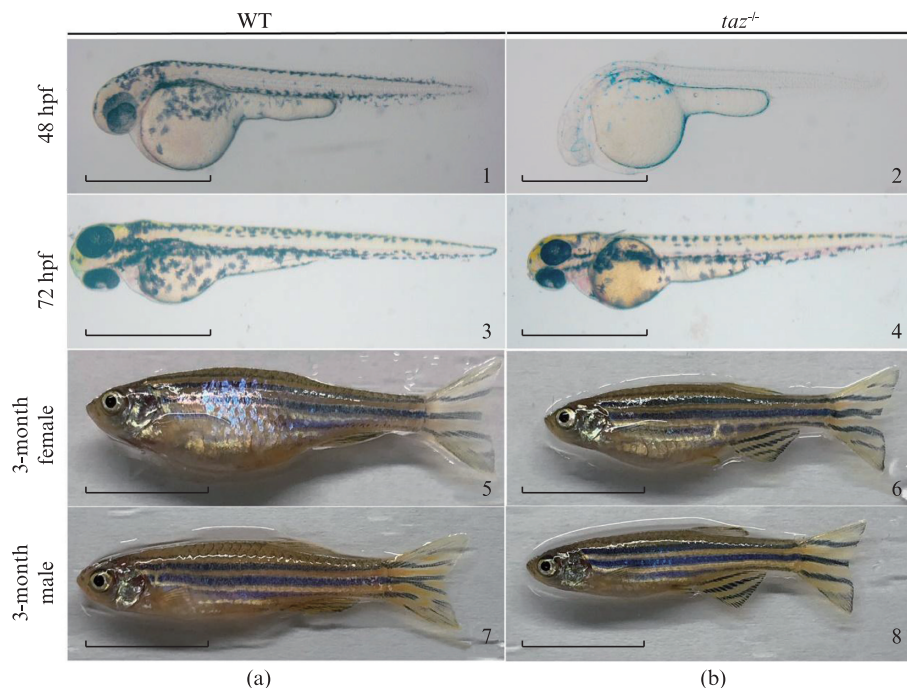


(a) *taz* 基因结构及基因敲除靶位点, E1-E4 分别为 *taz* 基因的 4 个外显子, ATG 为起始密码子, 红色下划线区域为基因敲除靶点序列; (b) *taz* 突变体的核苷酸序列及 *taz* 突变后编码的氨基酸序列; M 为起始甲硫氨酸; 绿色碱基为基因敲除后靶点区发生变化的碱基, 红色下划线部分的氨基酸为无义突变后提前终止编码的氨基酸。

(a) *taz* gene structure and gene knockout target site, E1-E4 are the 4 exons of *taz* gene respectively, ATG is the start codon, the red underlined area is the gene knockout target sequence; (b) The nucleotide sequence of *taz*<sup>-/-</sup> and the amino acid sequence encoded by *taz*<sup>-/-</sup>, the green base is the change of the target region base after gene knockout, and the amino acid underlined in red is the amino acid whose encoding is terminated prematurely after nonsense mutation.

图 1 CRISPR/Cas9 构建的 *taz* 基因突变类型

Fig. 1 *taz* mutant type constructed by CRISPR/Cas9

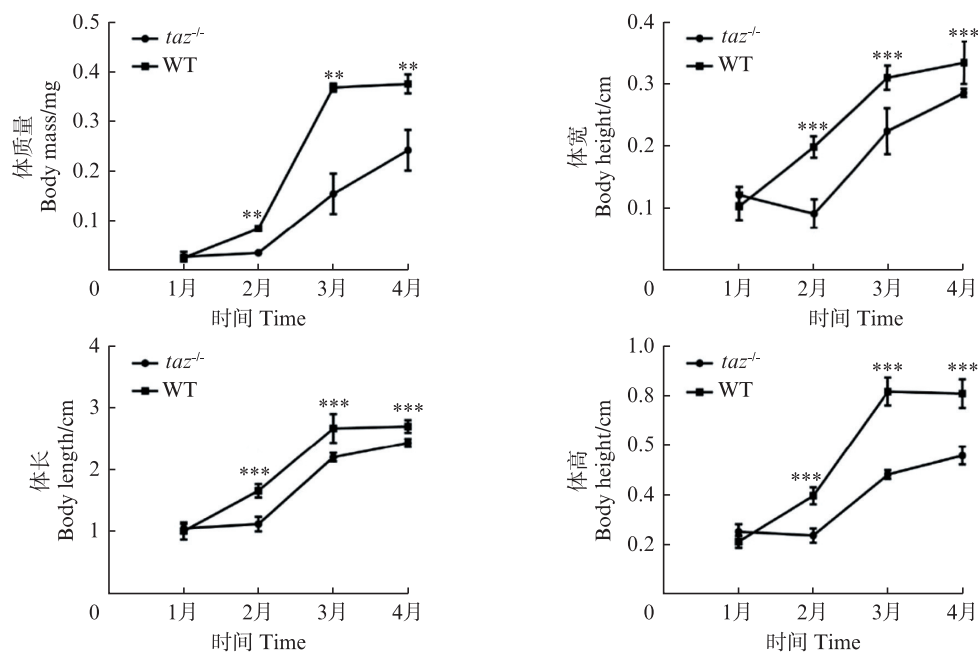


(a) 野生型斑马鱼发育不同时期的整体图,  $n=20$ ; (b)  $taz^{-/-}$  斑马鱼发育不同时期整体图,  $n=20$ 。48 hpf, 72 hpf 标尺为 100  $\mu\text{m}$ ; 3 月龄标尺为 1 cm。

(a) The whole observations of wild-type zebrafish at different stages of development,  $n=20$ ; (b) The whole observation of  $taz^{-/-}$  at different development stages,  $n=20$ . Scale bar: 48 hpf and 72 hpf are 100  $\mu\text{m}$ , 3-month are 1 cm.

图版 II 发育不同时期  $taz^{-/-}$  与野生型斑马鱼对比图

Plate II Whole observation of  $taz^{-/-}$  and WT zebrafish in different development stages



\* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ 。

图2  $taz$  突变体和野生斑马鱼的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of  $taz$  mutant and WT zebrafish

## 2.4 *taz* 基因缺失影响骨骼肌纤维收缩

利用肌动蛋白抗体(鬼笔环肽)对野生型和 *taz*<sup>-/-</sup> 斑马鱼(48 hpf)进行整体荧光染色。结果发现,与野生型斑马鱼相比,*taz*<sup>-/-</sup> 的肌纤维排列明显疏松(图 3a)。肌纤维染色分析发现 *taz*<sup>-/-</sup> 肌纤维的肌动蛋白长度相比野生型明显变宽。进一步对野生型及突变体斑马鱼经过麻醉后并用 4% PFA 固定,进行鬼笔环肽染色分析。在肌原纤维中,肌动蛋白染色标记的位置位于 H 带到 H 带之间(H-H)。对肌动蛋白长度(即 H-H 距离)进行统计分析,结果显示野生型斑马鱼与 *taz*<sup>-/-</sup> 经过麻醉处理后,*taz*<sup>-/-</sup> 的 H-H 长度为(1.12±0.03)μm,而野生型斑马鱼 H-H 长度为(0.59±0.01)μm,说明 *taz*<sup>-/-</sup> 的肌动蛋白长度显著大于野生型(图 3b)。结果表明,*taz* 具有调节肌纤维分化的能力,并且参与调控肌动蛋白丝的收缩。

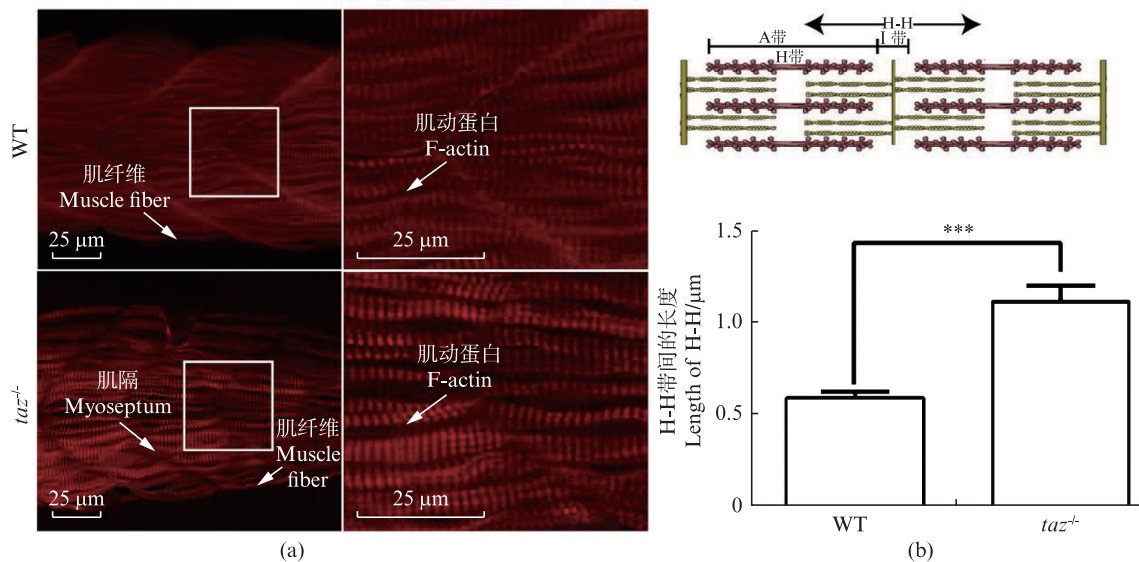
## 2.5 *taz* 基因缺失影响肌间骨发育

对 3 月龄的 *taz*<sup>-/-</sup> 及野生型斑马鱼进行整体骨骼染色,结果显示,*taz*<sup>-/-</sup> 的髓弓小骨和脉弓小骨在肌隔位置正常骨化,且钙化程度未见明显变化(图 4a)。值得注意的是,相比野生型斑马鱼,*taz*<sup>-/-</sup> 的髓弓小骨和脉弓小骨的长度明显变短。体外分离单根肌间骨并依次排序,形成肌间骨序列

(图 4b)。在 *taz*<sup>-/-</sup> 中,几乎所有的髓弓小骨骨化明显小于同一位置野生型的髓弓小骨。*taz*<sup>-/-</sup> 的脉弓小骨也明显小于野生型斑马鱼的脉弓小骨。结果说明,*taz* 基因突变后,脉弓小骨和髓弓小骨骨化长度变短,肌间骨的骨化受到一定的影响。

## 3 讨论

骨骼肌富含线粒体,线粒体是骨骼肌功能的决定性因素之一。线粒体代谢生成 ATP 为肌纤维收缩提供能量,这对于骨骼肌的功能维持至关重要。为明确 *taz* 基因在斑马鱼骨骼肌发育中的作用,通过切片原位杂交,发现 *taz* 基因在斑马鱼骨骼肌纤维中有大量表达,且骨骼肌纤维中的 *taz* 基因主要表达于肌小节中 I 带(明带)位置。线粒体位于骨骼肌纤维的 I 带,负责提供肌肉收缩过程中肌动蛋白丝滑动所需要的 ATP<sup>[6,18]</sup>。作为线粒体酶酰基转移酶的合成基因 *taz*,在斑马鱼骨骼肌纤维中的定位与 *taz* 行使的功能一致。说明 *taz* 在骨骼肌纤维中 ATP 合成细胞器线粒体时也发挥重要作用。除此以外,本研究还发现,*taz* 在斑马鱼中突变后,肌间骨骨化程度变小,说明 *taz* 基因在斑马鱼的骨组织发育中也发挥作用。



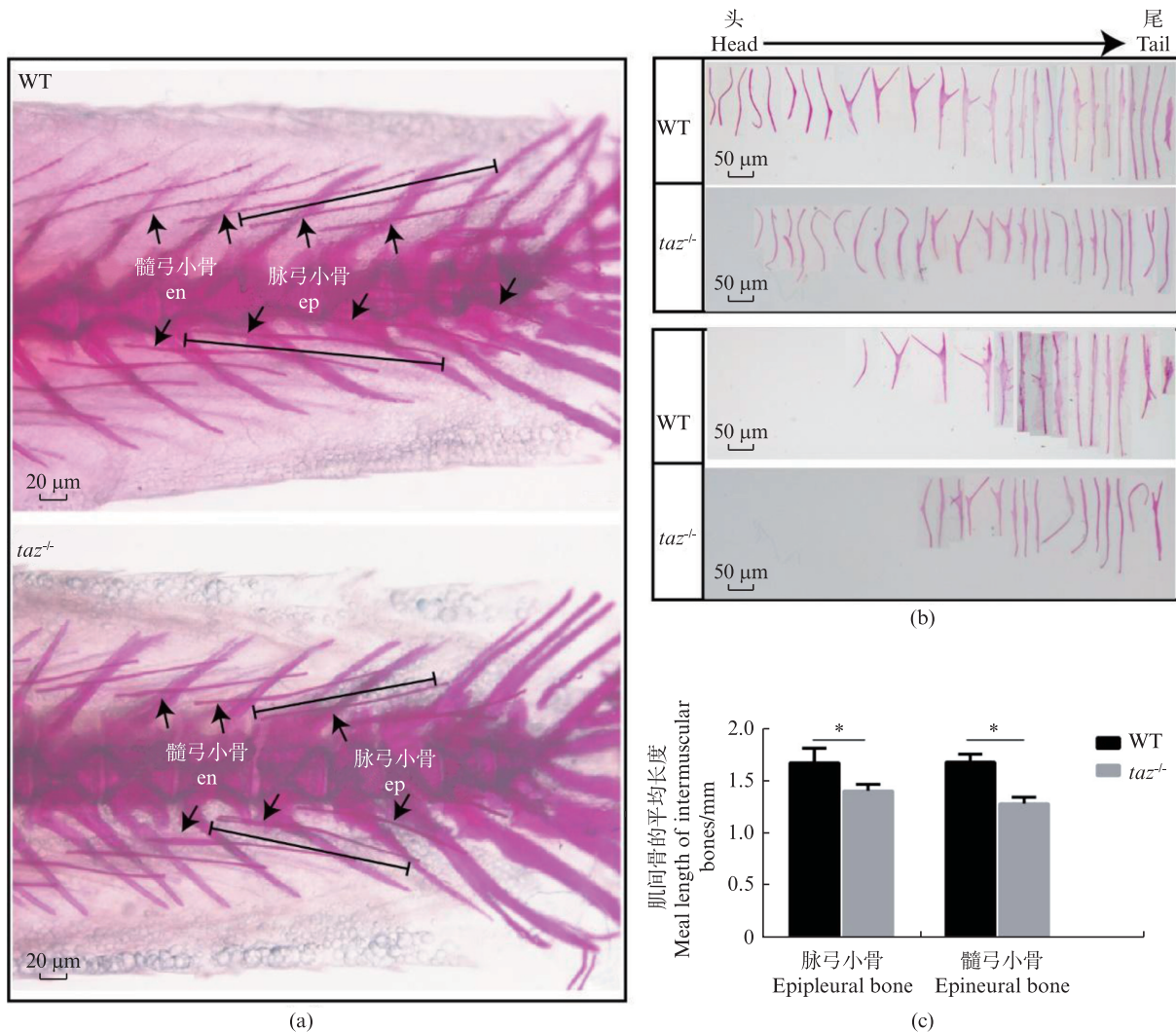
(a) 斑马鱼整体荧光染色,红色为被鬼笔环肽标记的肌动蛋白;(b) 肌动蛋白宽度统计, $n=10$ ;\*\*\* $P<0.001$ 。

(a) Whole immunofluorescence stain for actin, the red color marked the actin stained by phalloidin; (b) Statistical analysis for the width of actin,  $n=10$ ; \*\*\* $P<0.001$ .

图3 *taz*<sup>-/-</sup>和野生斑马鱼肌纤维中肌动蛋白染色分析

Fig. 3 F-actin staining analysis of muscle fibers in *taz*<sup>-/-</sup> and WT zebrafish





(a) 斑马鱼整体骨骼染色示意图,黑色箭头指示分别为髓弓小骨和脉弓小骨;黑色实线代表指示整个肌间骨的长度;(b) 体外分离的 *taz*<sup>-/-</sup> 及 WT 斑马鱼髓弓小骨、脉弓小骨序列;(c) 髓弓小骨和脉弓小骨的平均长度,  $n=3$ ,  $*P<0.05$ 。

(a) The whole bone stain of *taz*<sup>-/-</sup> and WT zebrafish. The black arrows indicate epineural bones and epipleural bones respectively; The black solid line indicates the whole length of intermuscular bone; (b) The single epineural bones and epipleural bones sequence from tail to head from *taz*<sup>-/-</sup> and WT zebrafish isolated in vitro; (c) The mean length of epineural bones and epipleural bones in *taz*<sup>-/-</sup> and WT,  $n=3$ ,  $*P<0.05$ .

图4 *taz*<sup>-/-</sup> 和野生斑马鱼整体骨骼染色及单根肌间骨序列

Fig. 4 Whole Alizarin stain and single intermuscular bone sequence in *taz*<sup>-/-</sup> and WT zebrafish

*Taz* 调控一种线粒体酶:酰基转移酶的合成,是合成成熟形式的心磷脂所必需的<sup>[18]</sup>。心磷脂(Cardiolipin, CL)是一种特异的线粒体磷脂,有助于维持线粒体内膜的正常结构,促进 ATP 的高效合成<sup>[10,19]</sup>。在 *taz* 敲除的小鼠骨骼肌来源的 C2C12 成肌细胞系中,肌细胞分化受影响,表明 *taz* 对肌细胞分化具有重要作用<sup>[20]</sup>。为了明确 *taz* 基因与斑马鱼骨骼肌发育的相关性,利用荧光染色标记肌动蛋白方法检测了野生型和 *taz*<sup>-/-</sup> 突变体斑马鱼 48 hpf 时期肌纤维的变化。结果显示, *taz*<sup>-/-</sup> 突变体的肌纤维相比同时期的野生型明显疏松,说明 *taz* 参与了斑马鱼肌纤维的分化

与增殖。本研究结果表明,骨骼肌的 I 带中 *taz* 基因高表达。I 带(肌动蛋白)、A 带(肌球蛋白)、H 带组成了肌纤维的功能单位肌小节,是肌肉收缩的基本单位<sup>[21]</sup>。通过计算肌动蛋白的长度(H-H 带间的长度)来衡量肌动蛋白收缩能力<sup>[22]</sup>。结果表明,经过同样麻醉处理后, *taz*<sup>-/-</sup> 的肌动蛋白的长度显著增加。说明 *taz* 突变后,肌动蛋白的收缩能力受抑制。*taz* 催化合成的心磷脂是线粒体 ATP 合成的重要分子。骨骼肌运动主要靠肌纤维的收缩,而肌纤维收缩需要肌球蛋白水解 ATP 释放能量来完成肌动蛋白的移动<sup>[23]</sup>。在斑马鱼中, *taz* 缺失后导致的肌动

蛋白长度增加,推测与线粒体的 ATP 合成下降后造成肌球蛋白水解 ATP 释放能量减少,肌动蛋白的移动受到影响有关。此外,本研究发现 *taz* 基因突变后,由肌隔骨化而来的肌间骨的发育受到抑制,表明 *taz* 基因也参与斑马鱼肌间骨的发育。原位杂交结果显示,*taz* 基因在斑马鱼肌隔中有表达。文献表明肌间骨由肌隔结缔组织分化而来<sup>[24-27]</sup>,说明 *taz* 可能通过调控肌隔的发育来抑制肌间骨的发育。

通过在斑马鱼中构建 *taz*<sup>-/-</sup>,并对 *taz*<sup>-/-</sup> 进行生长曲线统计分析,发现 *taz* 基因的缺失,虽然不会导致鱼体出现畸形等情况,但会导致斑马鱼生长缓慢。*taz* 基因突变后引起的人、老鼠、酵母等 Barth 综合征,表现出身材矮小、心肌病变、发育迟缓等<sup>[7,9,11]</sup>。在斑马鱼中 *taz* 基因缺失后引起的体长缩短、体质量下降、生长缓慢的现象与 Barth 综合征表型一致,说明 *taz* 在斑马鱼中也会引起 Barth 综合征样表型。

综上,本研究通过切片原位杂交分析了 *taz* 基因在斑马鱼躯干大侧肌组织的表达位置。原位杂交显示 *taz* 基因在斑马鱼的肌肉组织中的表达呈现组织特异性,主要表达在肌原纤维的 I 带。通过构建 *taz* 缺失突变体,发现 *taz* 基因突变后在斑马鱼中会引起 Barth 综合征表型,且会影响肌动蛋白的收缩。研究结果将为进一步了解 *taz* 基因在鱼类中的功能提供理论依据。

作者声明本文无利益冲突。

## 参考文献:

- [1] WESTERBLAD H, BRUTON J D, KATZ A. Skeletal muscle: energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability[J]. *Experimental Cell Research*, 2010, 316(18): 3093-3099.
- [2] KIESSLING A, RUOHONEN K, BJØRNEVIK M. Muscle fibre growth and quality in fish[J]. *Archiv für Tierzucht*, 2006, 49: 137-146.
- [3] HAWLEY J A, ZIERATH J R. Integration of metabolic and mitogenic signal transduction in skeletal muscle[J]. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 2004, 32(1): 4-8.
- [4] PETTE D, STARON R S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions[J]. *Microscopy Research and Technique*, 2000, 50(6): 500-509.
- [5] SCHIAFFINO S, REGGIANI C. Fiber types in mammalian skeletal muscles[J]. *Physiological Reviews*, 2011, 91(4): 1447-1531.
- [6] FILIPE A, CHERNORUDSKIY A, ARBOGAST S, et al. Defective endoplasmic reticulum-mitochondria contacts and bioenergetics in SEPNI-related myopathy[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2021, 28(1): 123-138.
- [7] GU Z M, VALIANPOUR F, CHEN S L, et al. Aberrant cardiolipin metabolism in the yeast *taz1* mutant: a model for Barth syndrome[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 51(1): 149-158.
- [8] KHUCHUA Z, YUE Z, BATTIS L, et al. A zebrafish model of human Barth syndrome reveals the essential role of tafazzin in cardiac development and function[J]. *Circulation Research*, 2006, 99(2): 201-208.
- [9] MA L N, VAZ F M, GU Z M, et al. The human *TAZ* gene complements mitochondrial dysfunction in the yeast *taz1Δ* mutant: implications for Barth syndrome[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(43): 44394-44399.
- [10] SAINI-CHOHAN H K, HOLMES M G, CHICCO A J, et al. Cardiolipin biosynthesis and remodeling enzymes are altered during development of heart failure[J]. *Journal of Lipid Research*, 2009, 50(8): 1600-1608.
- [11] XU Y, CONDELL M, PLESKEN H, et al. A *Drosophila* model of Barth syndrome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(31): 11584-11588.
- [12] BIONE S, D'ADAMO P, MAESTRINI E, et al. A novel X-linked gene, *G4.5*, is responsible for Barth syndrome[J]. *Nature Genetics*, 1996, 12(4): 385-389.
- [13] SCHLAME M, REN M D. The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2009, 1788(10): 2080-2083.
- [14] SCHLAME M, XU Y. The function of tafazzin, a mitochondrial phospholipid-lysophospholipid acyltransferase[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2020, 432(18): 5043-5051.
- [15] 赵成伟,王大维,王浩. *Tafazzin* 基因在 Barth 综合征及肿瘤中的研究进展[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2017, 33(1): 78-80.
- [16] ZHAO C W, WANG D W, WANG H. Research progress of *Tafazzin* gene in Barth syndrome and tumor[J]. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2017, 33(1): 78-80.
- [17] CHEN S L, HE Q, GREENBERG M L. Loss of tafazzin in yeast leads to increased oxidative stress during respiratory growth[J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 68(4): 1061-1072.
- [18] PHOON C K L, ACEHAN D, SCHLAME M, et al. Tafazzin knockdown in mice leads to a developmental cardiomyopathy with early diastolic dysfunction preceding



- myocardial noncompaction [J]. *Journal of the American Heart Association*, 2012, 1(2): e000455.
- [18] AINBINDER A, BONCOMPAGNI S, PROTASI F, et al. Role of Mitofusin-2 in mitochondrial localization and calcium uptake in skeletal muscle [J]. *Cell Calcium*, 2015, 57(1): 14-24.
- [19] CHIN M T, CONWAY S J. Role of *Tafazzin* in mitochondrial function, development and disease [J]. *Journal of Developmental Biology*, 2020, 8(2): 10.
- [20] LOU W J, REYNOLDS C A, LI Y R, et al. Loss of tafazzin results in decreased myoblast differentiation in C2C12 cells: a myoblast model of Barth syndrome and cardiolipin deficiency [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2018, 1863(8): 857-865.
- [21] WRÓBLEWSKI R, EDSTRÖM L. Distribution of sodium, magnesium, chlorine, calcium, potassium, phosphorus and sulphur in Z-, I- and A-bands in mammalian striated muscle [J]. *Scanning Microscopy*, 1994, 8(3): 601-610.
- [22] MAZELET L, PARKER M O, LI M, et al. Role of active contraction and tropomodulins in regulating actin filament length and sarcomere structure in developing zebrafish skeletal muscle [J]. *Frontiers in Physiology*, 2016, 7: 91.
- [23] MANDELKERN L, POSNER A S, DIORIO A F, et al. Mechanism of contraction in the muscle fiber—ATP system [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1959, 45(6): 814-819.
- [24] 蒋燕, 杨琳琳, 鲍宝龙. 几种低等真骨鱼类的椎体小骨 [J]. *上海水产大学学报*, 2008, 17(4): 493-496.
- JIANG Y, YANG L L, BAO B L. The epicentrals in several lower teleosts [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2008, 17(4): 493-496.
- [25] 吕耀平, 鲍宝龙, 蒋燕, 等. 低等真骨鱼类肌间骨的比较分析 [J]. *水产学报*, 2007, 31(5): 661-668.
- LYU Y P, BAO B L, JIANG Y, et al. Comparative analysis of intermuscular bones in lower teleosts [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(5): 661-668.
- [26] 吕耀平, 陈洁, 鲍宝龙, 等. 唇鲷肌间小骨的骨化过程 [J]. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(4): 549-553.
- LYU Y P, CHEN J, BAO B L, et al. The ossificational process of the intermuscular bones in *Hemibarbus labeo* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(4): 549-553.
- [27] 姚文杰, 龚小玲, 吕耀平, 等. 日本鳗鲡肌间小骨的骨化过程 [J]. *上海海洋大学学报*, 2014, 23(6): 810-813.
- YAO W J, GONG X L, LYU Y P, et al. The ossificational process of the intermuscular bones in *Anguilla japonica* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(6): 810-813.

## Effects of the loss of *tafazzin* on growth and muscle fiber contraction in zebrafish

CHE Jinyuan<sup>1,2</sup>, HU Cunjie<sup>1,2</sup>, WANG Qi<sup>1,2</sup>, BAO Baolong<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Fish skeletal muscle is rich in mitochondria, especially in red muscle fibers. Mitochondria play an important role in maintaining the contraction of fish skeletal muscle. *Tafazzin* (*taz*) gene, as an important gene for the synthesis of mitochondrial-specific phospholipid cardiolipin, plays a key role in the production of mitochondrial ATP. Through in situ hybridization of zebrafish muscle tissue sections, the results showed the *taz* gene was expressed in zebrafish skeletal muscle, and specifically expressed in the I zone of myofibrils. The *taz*<sup>-/-</sup> mutant was further constructed in zebrafish by CRISPR/Cas9 technology, and it was found that after *taz* deletion, the body length, weight, body width, and height of *taz*<sup>-/-</sup> were significantly smaller than wild-type zebrafish ( $P < 0.05$ ). It shows that mutation of *taz* gene lead to growth and developmental delay in zebrafish. The fluorescence staining of 48 hpf embryos showed that the muscle fibers from the *taz*<sup>-/-</sup> mutant was looser than WT. Statistical analysis of F-actin length showed that the H-H length of *taz*<sup>-/-</sup> was  $(1.12 \pm 0.03) \mu\text{m}$ , while the wild-type zebrafish H-H length was  $(0.59 \pm 0.01) \mu\text{m}$ , indicating that the length of actin was significantly longer ( $P < 0.05$ ). Whole Alizarin stain of zebrafish showed the length of intermuscular bones became smaller in *taz*<sup>-/-</sup> than WT. The above results indicate that *taz* affects the growth, actin contraction and ossification of intermuscular bones.

**Key words:** *tafazzin* gene; zebrafish; skeletal muscle; F-actin; intermuscular bone