

# 果蝇新基因 *CG7609* 的克隆与初步功能研究

邓志伟, 胡君健, 吴秀山\*, 袁婺洲\*

(湖南师范大学 生命科学学院 心脏发育研究中心, 中国湖南 长沙 410081)

**摘要:** 通过生物信息学方法和分子克隆技术克隆了一个果蝇新基因 *CG7609*. 该基因属于 WD40 家族, 具有 7 个典型的 WD40 重复结构域, 与人类 *WDR24* 基因的同源性很高. 胚胎原位杂交和 RT-PCR 显示其在胚胎早期的中胚层有弱表达, 在胚胎晚期主要在肠中表达. 通过心脏特异抗体检测 *CG7609* 突变体的表型, 发现其心脏前体细胞的分化不受影响. 但通过果蝇心力衰竭模型分析该基因在成体心脏中的功能, 发现 *CG7609* 基因缺失后心力衰竭发生率明显高于野生型, 而且在与 *pannier* 基因配对后心力衰竭率发生较大的变化, 这个初步发现推测该基因可能在成体心脏中具有功能.

**关键词:** 果蝇; *CG7609*; 胚胎原位杂交; 心脏前体细胞; 果蝇心力衰竭模型

中图分类号: Q3-3

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2009)05-0388-06

## Cloning and Preliminary Function Study of a Novel Gene *CG7609* in *Drosophila*

DENG Zhi-wei, HU Jun-jian, WU Xiu-shan\*, YUAN Wu-zhou\*

(Center for Heart Development, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

**Abstract:** Through the bioinformatics and molecular biology techniques, a novel *Drosophila* gene *CG7609* was cloned. *CG7609* belongs to WD40 gene family, with 7 WD40 typical repeat motifs, and sharing a high similarity with human gene *WDR24*. The embryo *in situ* hybridization and RT-PCR experiments showed that it was expressed weakly in early mesoderm and mainly in the gut at the later embryo. The mutant phenotype of gene *CG7609* was detected by cardiac specific antibodies, the result showed that the cardiac differentiation of precursor cells was not affected. However, through pacing to analyze the gene in adult cardiac function, the heart failure rate of the null mutant of *CG7609* was found significantly higher than that of wild type, especially when it was interacted with *pannier* gene, which suggested that this gene may have a function in adult heart.

**Key words:** *Drosophila*; *CG7609*; *in situ* hybridization; heart precursor cells; *Drosophila* pacing model

(*Life Science Research*, 2009, 13(5) 388~393)

含有 WD40 重复序列基序的蛋白质组成了一个超大家族, 大家族的成员在真核生物中广泛存在, 影响着细胞生命活动的方方面面, 如 RNA 的加工修饰、基因的表达调控、核小体的重建以及细胞凋亡等. 对 WD40 蛋白家族中的 *WDR1* 和 *WDR26* 的研究表明, 它们与骨骼肌或心脏的

发育密切相关<sup>[1,2]</sup>. WD40 结构域重复区被认为是为蛋白与蛋白之间的相互作用提供作用位点, 如提供蛋白质的结合位点, 或作为大蛋白的相互作用区模块, 甚至于构成蛋白复合物的整合组分等. 本研究室克隆了 WD40 家族的一个人类新基因 *WDR24*, RT-PCR 显示 *WDR24* 在胚胎各个组

收稿日期: 2009-03-17; 修回日期: 2009-04-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30570934, 30671054); 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(NCET-05-0713)

作者简介: 邓志伟 (1979-), 男, 湖南邵阳人, 硕士研究生, 主要从事果蝇遗传学方面的研究, E-mail: Heizi9908@163.com; \*通讯作者: 吴秀山 (1952-), 男, 湖南衡阳人, 湖南师范大学教授, 博士, 博士生导师, 主要从事心脏发育的基因调控研究, E-mail: xiushanwu@yahoo.com; 袁婺洲 (1966-), 女, 湖南衡阳人, 湖南师范大学教授, 博士, 博士生导师, 主要从事心脏发育的基因调控研究, E-mail: yuanwuzhou@yahoo.com.cn.

织都有表达, Northern blot 结果也显示其在大肠、心脏、胃及肺等多种组织表达, 提示 WDR24 基因可能属于管家基因<sup>[3-6]</sup>. 为了全面研究人类新基因 WDR24 的功能, 我们计算机克隆了人类 WDR24 基因在果蝇的同源基因 CG7609. CG7609 是果蝇的一个新基因, 关于其功能目前尚无研究报道. 根据生物信息学软件分析, CG7609 位于 3 号染色体 99B9-99B10 区段, 属于 WD40 蛋白家族, 具有典型的 7 个 WD40 重复结构域, 与人类 WDR24 基因的同源性很高. 为了研究果蝇新基因 CG7609 的功能, 我们利用胚胎原位杂交技术, 免疫组织化学及果蝇心力衰竭模型初步鉴定了该基因在心脏早期发育和后期成体心脏中的功能, 取得了初步的结果<sup>[7-12]</sup>.

## 1 材料和方法

### 1.1 果蝇品系

本实验所使用的果蝇品系包括野生型果蝇 *w<sup>1118</sup>*, *tinman* 突变系 *tin<sup>346</sup>/Tm3*, *ftz LacZ*, *pannier* 突变系 *pnr/Tm3*, *lacZ*, *CG7609* 缺失系 *w[1118]; Df(3R)Exel9025/TM6B*, *Tb[1]*, *CG7609PBac* 品系 *w[1118]; PBac{w[+mC]=WH}CG7609[f06205]*, *CG7609* 缺失系 *2Df(3R)ca[nd1]*, *Sb[1]* *ss[1]* *Ubx [bx-34e] e[s] ncd[1] ca[nd1]/TM3* 及 *CG7609RNAi* 品系. 其中 *CG7609* 的 RNAi 品系来自 VDRC 品系中心, *CG7609* 的缺失系和 PBac 突变系来自美国 Bloomington 品系中心, 野生型及 *tinman*, *panier* 的突变系由 Rolf Bodmer 教授惠赠.

### 1.2 生物信息学软件

果蝇 *CG7609* 基因序列来自(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 蛋白质序列来自果蝇基因数据库(<http://www.flybase.bio.indiana.edu/>). 运用 BLAST Search 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 的“Blast protein-protein”子程序查找基因组 DNA 序列数据库“nr”. 利用 Jellyfish 软件分析真核生物 WD40 蛋白家族的同源性及其进化树.

### 1.3 CG7609 基因保守特异序列的分子克隆

以本实验室提取的野生型果蝇 RNA 反转录所得的 cDNA 为模板, 根据 *CG7609* 基因特点设计出全长的引物 1 (Sense: 5'TGTTTTGCTTTCTGC GGGC-3'; Anti-sense: 5'-GCGGTGGCTAAAAAGA GGA-3'), 95 °C 变性 5 min, 一个循环, (95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 2 min), 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 8 min, 一个循环. 纯化得到

*CG7609* 基因开放阅读框全长, 连 pMD-18T, *EcoR* 和 *Sal* 双酶切检测并测序正确. 再根据该基因保守特异序列的特点设计出引物 2 (Sense: 5' GGACACCTCCACAATCTCG-3'; Anti-sense: 5'-G CAAAGG GGATGTAGGGTC-3'), 经 PCR 扩增, 反应条件为 94 °C 变性 5 min, (94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 45 s), 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 8 min, 一个循环. 所得 PCR 产物纯化后与 pGEM-T 载体连接<sup>[13]</sup>, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ . 转化后提质粒经 *Sal* 和 *Nco* 双酶切鉴定和进一步测序分析.

### 1.4 果蝇胚胎原位杂交

测序正确的连有目的片段的载体分别用 *Sal* 和 *Nco* 单酶切, 酚/氯仿抽提得到适宜浓度的线性片段, 以地高辛标记物分别从 T7 和 SP6 两个方向进行转录<sup>[14]</sup> (其中 SP6 方向为阳性结果, T7 方向为阴性结果), 37 °C 水浴锅中反应 2 h, 得到正确的 RNA 探针, RNA 探针置于杂交液中, -20 °C 冰箱可以保存 1 年. 收集果蝇全时期胚胎, 脱触角、去膜, 室温固定液固定 25 min, 固定后的胚胎加乙醇冲洗几次, 胚胎在乙醇中置于 -20 °C 冰箱中, 至少可以保存 1 年. 胚胎用 PBT 清洗几次再用蛋白酶 K 处理 7 min, 以增加膜的通透性, 再用 PBT 尽快把蛋白酶 K 洗净. 第 1 d 探针 (终浓度为 1:100) 先在 80 °C 水浴锅里变性处理 5 min, 马上在冰上冷却 5 min, 再置于 55 °C 水浴锅中预附 2~3 min, 然后加到装有胚胎的 EP 管里, 55 °C 水浴锅里杂交过夜, 杂交时间一般要求 16~18 h. 第 2 d 用预热的杂交液多次洗胚胎, 再加抗地高辛抗体 (终浓度为 1:2 000) 后 4 °C 过夜 (抗地高辛抗体事先应用同样的方法用固定好的野生型胚胎预吸附, 这样更有利于杂交的成功率), 最后用 BCIP 和 NBT 进行染色. 染色后用乙醇至少漂洗 1 h, 把背景色去掉, 显微镜下观察、拍照. 整个实验的过程都要求在脱色摇床上进行.

### 1.5 果蝇胚胎抗体染色

采用心脏标记基因 *eve* 抗体, 去染野生型及 *CG7609* 基因各品系的胚胎. 收集 9~11 期野生型及 *CG7609* 基因各品系的胚胎, 脱触角、去膜, 室温固定液固定 20 min, 甲醇冲洗几次, 接着 PBT 冲洗 3 次, 然后加 2% BSA/PBT 的温育 2 次, 每次 30 min, 加 1  $\mu$ L anti-*eve* (在 2% BSA/PBT 中稀释使浓度最终为 1:200) 到胚胎中, 室温

2 h 或 4 ℃ 过夜, 第 2 d, 先 PBT 冲洗, 再用 2% BSA/PBT 的温育 2 次, 每次 30 min, 加 1 μL 二抗 (生物素标记的羊抗鼠 IgG, 终浓度为 1:2 000), 室温 1.5 h, PBT 洗几次, 加入 ABC 溶液室温孵育 0.5~1 h, 再用 DAB 显色, 乙醇洗 1 h, 制片、观察. 整个实验的过程都要求在脱色摇床上进行.

### 1.6 成体心脏心力衰竭功能分析 (Pacing)

分别收集 *tin*、*pnr*、*CG7609* 等基因突变系的处女蝇和 *tin*、*pnr*、野生型 *w<sup>1118</sup>* 的雄蝇, 分别配对杂交: ♀ *tin* × *w<sup>1118</sup>* ♂; ♀ *pnr* × *w<sup>1118</sup>* ♂; ♂ *w<sup>1118</sup>* × *df* ♀; ♂ *tin* × *df* ♀; ♂ *pnr* × *df* ♀, 在室温、适宜、相同的条件下培养一个星期 (同时培养 *w<sup>1118</sup>*). 收集杂交后代 F1 长刚毛性状和新出的 *w<sup>1118</sup>*, 培养一个星期, 做心力衰竭功能分析. 即将一周龄的成体果蝇整齐排列在导电的载玻片上, 通过脉冲电激仪 30 s 短暂刺激果蝇, 使之心跳由正常状态下的 3 Hz 增加到 6 Hz (Pacing). 立即停止刺激, 观察果蝇心率恢复正常的情况. Pacing 后心率不能恢复正常或表现震颤的果蝇视为心率衰竭, 记录发生心力衰竭果蝇的百分率 (Heart failure rate).

## 2 结果与分析

### 2.1 *CG7609* 基因分子克隆结果

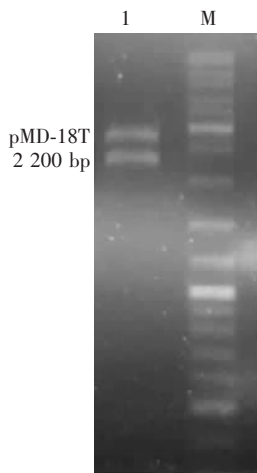


图 1 *CG7609* 基因 ORF 片段

Fig.1 ORF fragment of the *CG7609* gene

PCR 得到目的片段, 连 pMD-T 后, 用 *EcoR*、*Sal* 双酶切检测并测序得到正确的大约为 2 000 bp 的 ORF 全长片段 (图 1). WD40 蛋白家族成员都具有由不同数目的 WD40 重复序列所构成的螺旋推进器样的环状结构, 其外表面构成了 WD 蛋白与其它大分子之间的相互作用平面. 根据生物信息学得知 *CG7609* 基因含有 8 个外显子和 9 个

内含子, 共编码 598 个氨基酸, 其蛋白结构域为含有 7 个 WD40 重复结构域, 还有 4 个未知的结构域 (图 2).

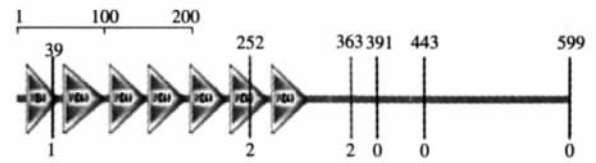


图 2 *CG7609* 基因的 WD40 结构域

Fig.2 WD40 domain of the *CG7609* gene

### 2.2 WD40 蛋白家族进化保守性分析

WD40 蛋白家族中, 人和大鼠的同源性达 95%, 人和狗的同源性达 94%, 人和牛的同源性达 95%, 人和褐鼠的同源性达 96%, 在哺乳动物中, WD40 结构域的同源蛋白同源度达 90% 以上, 人和黑腹果蝇的同源性也达到了 48%, *CG7609* 与其在其它物种中的同源蛋白构成了进化上较为保守的新的 WD40 蛋白亚家族 (图 3, 图 4). 由此可以说明 WD40 蛋白家族在进化上是高度保守的.

### 2.3 原位杂交探针的合成结果

选取特异保守的区段设计引物, PCR 得到目的片段大约为 820 bp, 连 pGEM-T 后, *Sal* 和 *Nco* 双酶切检测并测序正确 (图 5). 同样的条件下, 相同长度的 DNA 和 RNA, RNA 的电泳速度是 DNA 电泳速度的 2 倍左右, 所以得到 RNA 的带长大概为 410 bp, 合成好的探针置于杂交液中, -20 ℃ 储存至少可以保存 1 年, 而且探针可以多次反复利用.

### 2.4 *CG7609* 基因原位杂交结果

为了能够得到 *CG7609* 基因在果蝇体内早期的表达定位, 采用原位杂交的方法来研究它的表达模式. 为了验证实验的准确性, 首先利用 *eve* 基因探针 (*eve* 基因探针由戴琦博士惠赠) 作为阳性对照. 然后自己合成了 *CG7609* 基因特异保守区段的阴性 (T7 方向) 探针和阳性探针 (SP6 方向). 从原位杂交结果图可以知道 *CG7609* 基因在胚胎中、晚期主要在肠中 (前肠、中肠、后肠) 表达, 早期结果显示在中胚层也有弱表达 (图 6).

### 2.5 *CG7609* 基因胚胎抗体染色结果

为了能够分析 *CG7609* 基因与果蝇心脏前体细胞的形成是否相关, 我们购进了多种与果蝇心脏前体细胞形成相关的基因抗体, *Eve* (*Eve-skipped*) 就是其中之一. *eve* 基因是心脏特异表

	1	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101	111	121	131										
Canis famili																								
Bos taurus																								
Homo sapiens																								
Danio rerio																								
Drosophilam																								
Consensus	mekm	rvtt	g	rtm	chldapanaisvcrda	qvvvagsrifkiy	iee	fve	lnlrvgrkpsln	scadv	whqmdenllataatngvvvtwnl	rp	rnkq	qlftehkrtrvkvcfhpte	llsgs									
	141	151	161	171	181	191	201	211	221	231	241	251	261	271										
Canis famili																								
Bos taurus																								
Homo sapiens																								
Danio rerio																								
Drosophilam																								
Consensus	qdgfmkcfdlr	k	svstfsgqsesvrdrvqfsi	rdyft	fastfengnqlwdi	rrpdrce	rmftahngpvc	cdwhpedrgwlatggrdkm	vkvwdm	thrake	hcvqtiasvarvkrp	pecrhhlatcsmm	vdhniyv											
	281	291	301	311	321	331	341	351	361	371	381	391	401	411										
Canis famili																								
Bos taurus																								
Homo sapiens																								
Danio rerio																								
Drosophilam																								
Consensus	wdvrrp	fvpaamfeehrdvt	tgiawrhphdpsfll	sgskdstlyqhlfr	dasqperanpeg	lcyglfgdlafaakeslva	es	grkpy	g	drhrpiffkrkl	dp	epfaglassalsvfe	epgsg	m										
	421	431	441	451	461	471	481	491	501	511	521	531	541	551										
Canis famili																								
Bos taurus																								
Homo sapiens																								
Danio rerio																								
Drosophilam																								
Consensus	wfvdt	aervalagrpaelcdhn	akvarelgrn	vaqwtm	lriiycspgl	p	nlnhs	gkg	scglplm	snfklm	apglgsetr	ldrskgd	rsdtvll	dssatl	tnedneetegsdvp	padyllgdvege	de							
	561	571	581	591	601	611	621	631	641	651	661	671	681	691										
Canis famili																								
Bos taurus																								
Homo sapiens																								
Danio rerio																								
Drosophilam																								
Consensus	lylldpe	hahah	eepeyv	lpgae	flrheiv	tdtppgpehl	qdkadsphvsg	sead	asl	pvds	sfllisvshal	dsrlppdff	lv	dml	fyae	qgdvq	mavsvlivl	gvr	vrk	id	eqt	qehw	tsyidll	lqrf
	701	711	721	731	741	751	761	771	781	791	801	811	821	831										
Canis famili																								
Bos taurus																								
Homo sapiens																								
Danio rerio																								
Drosophilam																								

图 3 CG7609 与同源蛋白的保守区域序列对比图

Fig.3 CG7609 homologous proteins and the conserved region sequence comparison

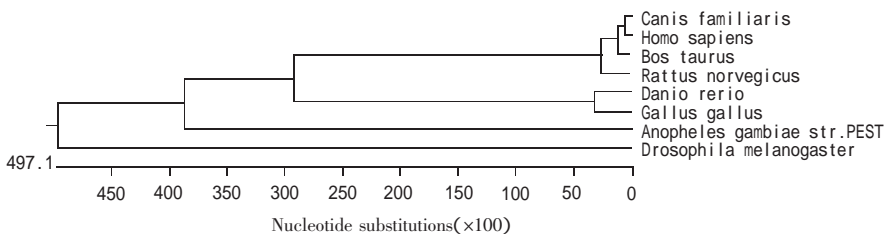


图 4 CG7609 与同源蛋白的进化树分析

Fig.4 CG7609 homologous proteins and evolutionary tree analysis

达的基因,与副心肌细胞的形成密切相关, *eve* 基因功能受阻,心管不能正常形成或不能正常发挥功效. 用 *eve* 抗体去染野生型 9~11 期胚胎,可以清楚的看见 11 个副心肌细胞被染上颜色(图 7A). 采用同样的方法用基因 *eve* 抗体分别去染 9~11 期 *CG7609* 基因各突变品系的胚胎,结果显示 *CG7609* 基因各突变品系(图 7 B、C、D) 的染色结果和野生型一样,副心肌细胞都表现正常,说明 *CG7609* 基因在早期可能与心脏前

体细胞发生无关.

### 2.6 成体心脏功能分析结果

为了分析 *CG7609* 是否在成体果蝇心脏中发挥功能,利用本研究室建立的果蝇心力衰竭模型,分别分析了 *CG7609* 的缺失系及 PBac 插入突变系果蝇的心力衰竭发生率. 首先将 *CG7609* 的缺失系或 PBac 插入突变系分别与野生型果蝇 *w<sup>1118</sup>* 及 *tin* 突变系和 *pnr* 突变系杂交,取杂交后代 100 只一周龄的果蝇整齐排列在导电的玻璃

片上,通过电脉冲刺激 30 s 加速果蝇心跳,停止后检测恢复正常心率的果蝇的百分率,就是心力衰竭率. 从表 1 可以看出,对照品系野生型果蝇心力衰竭率为 24%, *tin* 突变系心力衰竭率为 43%, *pnr* 突变系心力衰竭率为 53%,与多次重复结果一致,说明本次心力衰竭率的检测结果是可靠的. *CG7609* 的缺失系及 PBac 插入突变系与野生型果蝇杂交后代的心力衰竭率比野生型本身要高,尤其是两个 *CG7609* 的缺失系,与野生型杂交后心力衰竭率达到 43% 以上,差异显著.

*CG7609* 的 3 个品系与 *tin* 杂交后代的心率衰竭率与 *tin* 单独突变的差异不明显,但与 *pnr* 的杂交后代得到的心力衰竭率与 *pnr* 单独突变差异显著,尤其是 *CG7609*PBac 插入突变系,与 *pnr* 的杂交后代心力衰竭率为 27%,远远小于 *pnr* 单独突变(53%). 这些结果说明 *CG7609* 可能影响果蝇成体心脏的功能,有可能与 *pnr* 基因相互作用调控心力衰竭的发生. 当然,*CG7609* 在成体心脏中的功能还需要通过进一步其他方面的研究才能确定.

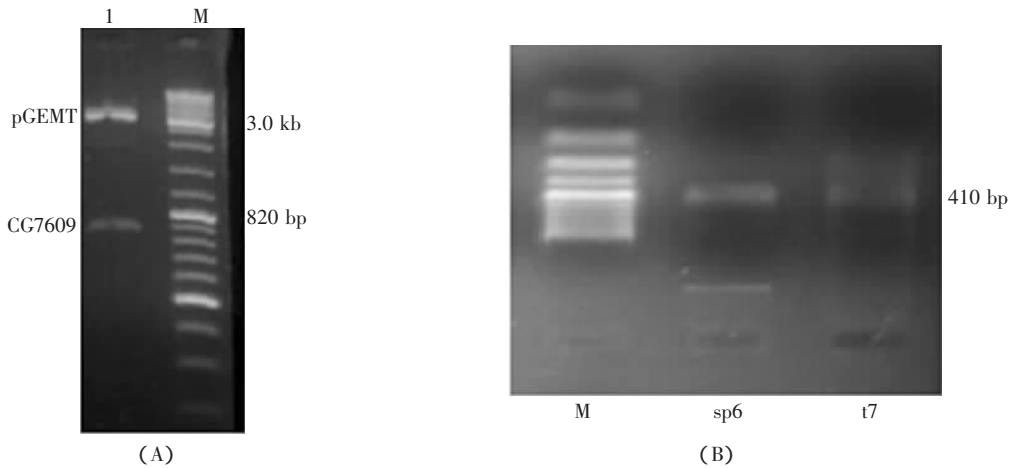


图 5 探针合成结果图  
(A) *CG7609* 基因的原位杂交片段;(B) 转录合成探针结果.

Fig.5 The results of probe synthesis

(A) *CG7609* gene fragment *in situ* hybridization ;(B) Transcription probe synthesis results.

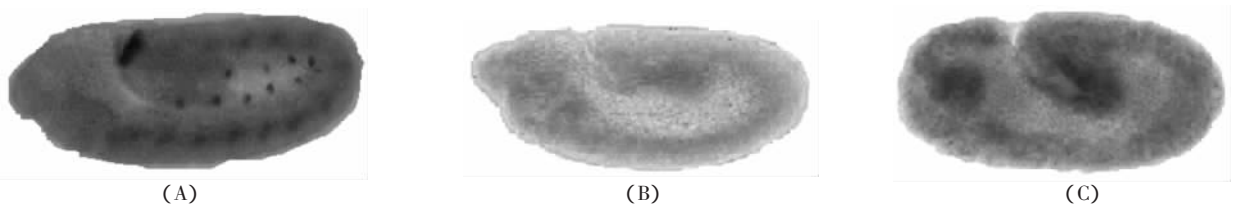


图 6 原位杂交结果  
(A) 心脏特异基因 *eve* 探针染野生型胚胎; (B) 阴性探针结果; (C) 阳性探针结果.

Fig.6 *In situ* hybridization results

(A) Cardiac-specific gene probe *eve* of wild-type embryo stained ;(B) Results of negative probe ;(C) Results of positive probe.

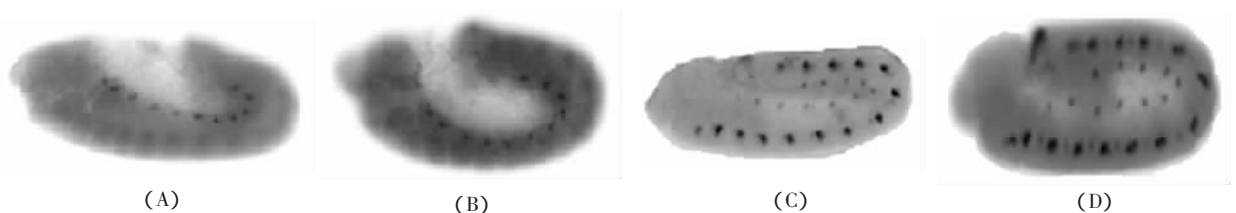


图 7 胚胎抗体染色结果  
(A) 野生型; (B) PBac 因子插入系; (C) 缺失系 7995; (D) 缺失系 1720.

Fig.7 Antibody staining of embryonic

(A) Wild type ;(B) PBac insertion line ;(C) deficiency line 7995 ;(D) deficiency line 1720.

表 1 CG7609 突变或缺失杂合体成体果蝇的心力衰竭发生率

Table 1 CG7609 heterozygote mutation or deletion of the adult fruit fly heart failure rate (%)

Pair of hybrid strains	$w^{1118}$	<i>Tin</i> deficiency line	<i>Pnr</i> deficiency line
CG7609 PBac strain	37	35	27
CG7609 deficiency line 1	43	46	44
CG7609 deficiency line 2	49	41	36
The heart failure rate of control strains	$w^{1118}:24$	$tin \times w^{1118}:43$	$pnr \times w^{1118}:53$

### 3 讨论

WD40 家族是真核生物一类重要的基因,与基因表达的调控、细胞信号转导以及细胞凋亡密切相关。本文克隆了果蝇 WD40 家族的一个新基因 CG7609,生物信息学预测该基因主要在细胞核里表达,其次是线粒体。我们通过胚胎原位杂交结果显示 CG7609 在胚胎早期在中胚层有弱表达,而胚胎后期主要在肠中表达,表现出较强的表达特异性,提示它可能在果蝇胚胎发育中具有重要的作用。通过心脏特异抗体进行突变表型检测,发现 CG7609 缺失或突变后胚胎的心脏前体细胞分化正常,但是成体心脏的心力衰竭发生率较高,初步表明果蝇新基因 CG7609 可能与心脏早期发育关系不大,但在成体心脏中具有重要的功能。至于 CG7609 基因在果蝇肠的形成中是否具有功能还需要进一步证实和研究。

本文在研究 CG7609 基因在果蝇成体心脏中的功能时<sup>[15]</sup>用到了果蝇心力衰竭模型。该模型是我们研究室新近建立的,目前世界上只有我们和美国伯明翰研究所拥有这一技术平台。通过短暂的电场刺激加速成体果蝇的心跳频率(Pacing),停止后检测果蝇心率恢复正常的情况,可以筛选和鉴定影响果蝇心脏应答反应和心力衰竭的各种内外因素。我们的数据表明,随着果蝇年龄的增长,心脏心率恢复正常的比例越来越低,而发生心力衰竭的频率越来越高,与人类心力衰竭和年龄相关数据完全一致。通过心力衰竭模型(Pacing 模型)分别检测果蝇野生型品系和不同突变系的心率恢复情况,发现野生型果蝇的心率恢复较快(一周龄果蝇心力衰竭发生率 25%左右),而同龄的不同突变系差异较大。已知人类钾离子通道基因 *KCNQ*<sup>[16]</sup>异常会导致心律不齐和长 Q-T 综合症。我们用心力衰竭模型检测果蝇 *KCNQ* 的表型,发现 *KCNQ* 突变系的心力衰竭发生率达到 75%~85%,说明果蝇的 *KCNQ* 也是一个心力衰竭的调控基因。果蝇心力衰竭模型的建立,使我们能够在最短的时间内大规模高通量地筛选影

响心力衰竭和成体心脏生理功能的基因。利用该模型,目前我们已经筛选了 300 多个果蝇 1 号和 2 号染色体的缺失系,初步筛选到 36 个候选缺失系。

### 参考文献 (References):

- [1] ZHU Y, WANG Y Q, WU X S, *et al.* WDR26: A novel Gb-Like protein, suppresses MAPK signaling pathway[J]. *BBCR*, 2004, 93: 579-587.
- [2] SUH M W, SHIN D H, LEE H S, *et al.* WDR1 expression in the normal and noise-damaged chick vestibule[J]. *J Vestib Res*, 2007, 17(4): 163-170.
- [3] GERHARD D S, WANGER L, FEINGOLD E A, The status, quality, and expansion of the *NIH* full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC) [J]. *Genome Res*, 2004, 14(10B): 2121-2127.
- [4] HARTLEY J L, TEMPLE G F, BRASCH M A. DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination[J]. *Genome Res*, 2000, 10(11): 1788-1795.
- [5] WIEMANN S, WEIL B, WELLENREUTHER R. Toward a catalog of human genes and proteins: sequencing and analysis of 500 novel complete protein coding human cDNAs [J]. *Genome Res*, 2002, 11(3): 422-435.
- [6] RUAL J F, VENKATESANK. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network[J]. *Nature*, 2005, 4209(10): 1-6.
- [7] WESSELLS R J, BODMER R. Screening assays for heart function mutants in *Drosophila* [J]. *Biotechniques*, 2004, 37(1): 58-60.
- [8] OCORR K, PERRIN L, LIMHY, QIAN L, *et al.* Genetic control of heart function and aging in *Drosophila* [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2007, 17(5): 177-182.
- [9] BIER E, BODMER. *Drosophila*, an emerging model for cardiac disease [J]. *Gene*, 2004, 342(1): 1-11.
- [10] OCORR K, AKASAKA T, BODMER R. Age related cardiac disease model of *Drosophila* [J]. *Mech Ageing Dev*, 2007, 128(1): 112-116.
- [11] 吴秀山,袁葵洲,王跃群,等. 心脏发育研究[M]. 湖南长沙: 湖南科学技术出版社 (WU Xiu-shan, YUAN Wu-zhou, WANG Yue-qun, *et al.* Research on Heart Development [M]. Changsha: Hunan Science and Technology of Society), 2004.
- [12] 蔡振宇,袁葵洲,吴秀山. 心肌内皮信号途径在心脏发育中的作用 [J]. 生命科学研究 (CAI Zhen-yu, YUAN Wu-zhou, WU Xiu-shan. The role of myocardial endothelin signal pathway in heart development [J]. *Life Science Research*), 2003, 7(2)S1: 6-11.
- [13] 刘连,蔡振宇,王跃群,等. 人类高度进化保守基因 *hnulp1* 中转录抑制区段的定位 [J]. 生命科学研究 (LIU Lian, CAI Zhen-yu, WANG Yue-qun, *et al.* Highly conservative evolution of human genes *hnulp1* in transcriptional repression section positioning [J]. *Life Science Research*), 2006, 10(3): 194-199.
- [14] 成迎端,袁葵洲. pQE32-FOXP4 ORF 质粒的构建和诱导表达的研究 [J]. 生命科学研究 (CHENG Ying-duan, YUAN Wu-zhou. QE32-FOXP4 ORF plasmid and inducible expression studies [J]. *Life Science Research*), 2006, 10(3) S1: 51-54.
- [15] WESSELLS R J, FITZGERALD E, BODMER R. Insulin regulation of heart function in aging fruit flies [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(12): 1275-1281.
- [16] OCORR K, REEVES N L, BODMER R. *KCNQ* potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in *Drosophila* that mimic the effects of aging [J]. *PNAS*, 2007b, 104(10): 3943-3948.