

学校编码：10384
学号：21620130154141

分类号_____密级_____
UDC_____

廈門大學

博 士 学 位 论 文

广州管圆线虫第五期幼虫与雌虫的比
较转录组学分析及 *AC-14-3-3* 表达模式分析

Comparative transcriptomics analysis between the fifth
larvae and females of *Angiostrongylus cantonensis* and the
expression pattern analysis of *AC-14-3-3*

余 良

指导教师姓名：罗大民 教授

专 业 名 称：生物化学与分子生物学

论文提交日期：2016 年 11 月

论文答辩时间：2016 年 11 月

学位授予日期：2016 年 月

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

2016 年 11 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

目 录	I
Content.....	IV
摘要	VI
Abstract.....	VIII
第一章 前言	1
1.1 广州管圆线虫	1
1.1.1 广州管圆线虫的发现及命名.....	1
1.1.2 广州管圆线虫的生活史.....	1
1.1.3 广州管圆线虫虫体结构概述.....	3
1.1.4 广州管圆线虫病及其流行与分布.....	5
1.1.5 广州管圆线虫病的传播方式、诊断与治疗.....	7
1.1.6 寄生虫分泌型蛋白的研究意义.....	8
1.2 转录组测序技术在寄生虫研究中的应用	8
1.3 NCBI 数据库中可用资源现状	9
1.4 本文的研究目的及意义	11
第二章 广州管圆线虫第五期幼虫和雌虫的转录组测序及其数据分析	12
2.1 材料与方法	12
2.1.1 材料.....	12
2.1.2 方法.....	14
2.2 结果	24
2.2.1 总 RNA 质量检测	24
2.2.2 参考转录组的数据分析结果.....	25
2.3 讨论	49
2.3.1 参考转录组组装.....	49
2.3.2 潜在的药物靶标基因.....	51
2.4 小结	57
第三章 L5 与 F 差异基因的筛选及分析	59

3.1 材料与方法	59
3.1.1 材料.....	59
3.1.2 方法.....	61
3.2 结果	69
3.2.1 差异表达基因的筛选及分析.....	69
3.2.2 差异表达基因的 GO 富集分析.....	73
3.2.3 差异表达基因的 KEGG 富集分析	74
3.2.4 差异表达基因的验证.....	76
3.2.5 含信号肽的差异基因分析.....	82
3.2.6 跨膜蛋白差异基因分析.....	88
3.3 讨论	94
3.3.1 部分差异表达倍数较大基因的功能解读.....	94
3.3.2 差异基因综合分析.....	97
3.4 小结	100
第四章 广州管圆线虫 14-3-3 基因的克隆及表达定位分析	101
4.1 材料与方法	102
4.1.1 材料.....	102
4.1.2 方法.....	104
4.2 结果	114
4.2.1 广州管圆线虫 14-3-3 基因克隆及表达载体的构建.....	114
4.2.2 rAC-14-3-3 的小量诱导表达.....	114
4.2.3 rAC-14-3-3 的大量表达及纯化.....	115
4.2.4 rAC-14-3-3 的蛋白浓度测定.....	116
4.2.5 rAC-14-3-3 抗血清的纯化及特异性检验.....	117
4.2.6 ESP 中 AC-14-3-3 蛋白的检测	117
4.2.6 AC-14-3-3 基因表达量在不同时期的变化情况	118
4.2.7 AC-14-3-3 在广州管圆线虫中的定位结果	118
4.3 讨论	125
4.4 小结	127
总结与展望	128

参考文献	130
攻读学位期间参与发表的论文	145
致 谢	146

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Content

Content	I
Abstract in Chinese	VI
Abstract in English	VIII
Chapter I Introduction	1
1.1 Angiostrongylus cantonensis	1
1.1.1 The discovery and definition of Angiostrongylus cantonensis.....	1
1.1.2 Life cycle of Angiostrongylus cantonensis.....	1
1.1.3 Structure of Angiostrongylus cantonensis	3
1.1.4 Angiostrongyliasis and the endemic distribution.....	5
1.1.5 Transmission, diagnosis and treatment of angiostrongyliasis.....	7
1.1.6 The research significance of parasite secretory proteins	8
1.2 Transcriptome sequencing technologies applied in parasite researches ..	8
1.3 The present situation of available resources in the NCBI database	9
1.4 The goal and meaning of our research	11
Chapter II Transcriptome sequencing and analysis of Angiostrongylus cantonensis fifth larvae and female	12
2.1 Materials and methods	12
2.1.1 Materials	12
2.1.2 Methods.....	14
2.2 Results	24
2.2.1 Quality inspection of total RNA	24
2.2.2 Data analysis results of the reference transcriptome.....	25
2.3 Discussion	49
2.3.1 Assembly of the reference transcriptome	49
2.3.2 Potential drug target genes.....	51
2.4 Summary	57
Chapter III Selection and analysis of differentially expressed genes between L5 and F	59
3.1 Materials and methods	59
3.1.1 Materials	59

3.1.2 Methods.....	61
3.2 Result.....	69
3.2.1 Screening and analysis of differentially expressed genes.....	69
3.2.2 GO enrichment analysis of differentially expressed genes.....	73
3.2.3 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes	74
3.2.4 Validation of the differentially expressed genes.....	76
3.2.5 Analysis of differentially expressed signal peptide contained proteins	82
3.2.6 Analysis of differentially expressed transmembrane proteins	88
3.3 Discussion	94
3.3.1 Interpretation of some differentially expressed genes	94
3.3.2 Comprehensive analysis of the differentially expressed genes.....	97
3.4 Summary.....	100
Chapter IV The cloning and express positioning analysis of Angiostrongylus cantonensis 14-3-3	101
4.1 Materials and methods	102
4.1.1 Materials	102
4.1.2 Methods.....	104
4.2 Result.....	114
4.2.1 Clone of AC-14-3-3 and expression vector construction	114
4.2.2 Small amounts induced expression of rAC-14-3-3.....	114
4.2.3 Expression and purification of rAC-14-3-3	115
4.2.4 Determination of rAC-14-3-3 concentration	116
4.2.5 Purification and specificity test of rAC-14-3-3 antiserum.....	117
4.2.6 Detect whether there is 14-3-3 in ESPs	117
4.2.7 Expression of 14-3-3 in different life stages.....	118
4.2.8 Immunofluorescence location result of AC-14-3-3	118
4.3 Discussion	125
4.4 Summary.....	127
Summarization and prospect	128
References	130
Publication	145
Acknowledgement.....	146

摘要

广州管圆线虫 (*Angiostrongylus cantonensis*) 是一种非常重要的人畜共患病病原寄生虫,近年来已在更广的宿主和地理分布范围内发现了该寄生虫感染的存在。然而,在公共数据库中可获得的相关资源信息非常有限,这极大地限制了人们对该寄生虫在入侵宿主、寄生生活和免疫逃避等方面机制的深入研究,也严重影响了在该病诊断、治疗和抗虫疫苗研制等领域的发展。

广州管圆线虫第五期幼虫 (L5) 既是可以在人和小鼠等偶然宿主脑内长期存活并引起嗜酸性脑膜脑炎的时期,又是在天然宿主体内可以突破血脑屏障进入肺动脉的时期;此外,从 L5 到成虫阶段,尤其是 L5 到雌虫 (F) 的发育阶段中虫体增长速度非常快,体积增幅异常明显,所以本文试图通过对 L5 和 F 这两个时期的转录组进行比较分析,以期找到在该过程中发挥决定作用的因子。

首先,利用 Illumina HiSeq 2500 测序平台分别对 L5 和 F 时期的转录组进行高通量测序,借助 Trinity 对所有过滤后的 clean reads (12.66 GB) 进行了参考转录本的从头组装,再用 Nr、Nt、SwissProt、Pfam、KOG、GO 和 KEGG 数据库对参考转录本中的 82769 条 Unigenes 进行注释分析,其中在 Nr 库中的注释率高达 20.19%。然后,对 KOG、GO 和 KEGG 的注释结果进行聚类分析,发现广州管圆线虫参考转录本中存在 225 个的与赖氨酸降解通路相关的基因,推测这可能是 *A. cantonensis* 通过过度消耗宿主的赖氨酸以削弱其免疫系统,进而成为有利于 *A. cantonensis* 寄生生活的策略之一。

随后,以参考转录本为参考分别组装 L5 和 F 时期的转录本,并通过比较筛选出 1346 个差异表达基因,其中 418 个在 F 中上调表达,另外的 928 个下调表达。通过 GO 分析发现,928 个中的大多数都与金属离子转运、角质层合成、金属肽酶活性和细胞外基质相关,而这些又都和角质层的形成有密切的联系。另一方面,溶酶体是唯一一个由这些下调表达差异基因显著富集得到的通路,对 418 个上调表达基因进行富集分析没有得到任何显著的通路和 GO terms。

综上所述,我们推测 *A. cantonensis* 会在 L5 时期就开始大量合成充足的角质层以满足虫体急剧增长的需要,溶酶体不仅通过降解代谢为角质层的合成提供充足的原料,还可能在促进旧角质层的降解过程中发挥这一作用。此外,金属蛋白

酶可能参与了协助 L5 突破血脑屏障的过程。总之，此次转录组数据分析中的差异基因与 *A. cantonensis* 不同时期的生存与生长发育需求是一致的。同时本次分析发现了大量的新转录本，其中不少基因编码的蛋白有作为抗虫药物靶标及疫苗研制的巨大潜能。

最后，通过 RT-PCR 与免疫组化对 *AC-14-3-3* 基因的表达模式进行了初步研究。综合蛋白定位结果和其他研究的结果我们认为 14-3-3 在成虫中主要是与生殖细胞的形成有关，在 L5 可能通过干扰宿主免疫反应而利于寄生虫的生存。

关键词：广州管圆线虫；比较转录组；角质层；血脑屏障；14-3-3

Abstract

The rat lung worm, *Angiostrongylus cantonensis*, is an important zoonotic parasite which has been found in a wider hosts and geographical distribution than ever before in recent years. However, the available information in the public databases is indeed limited for deep researches on mechanisms of the host invasion, parasitism and immune escape, which also have greatly restricted the development of disease diagnosis, treatment and anti-parasitic vaccine design.

The fifth larva of *A. cantonensis* (L5) is not only the period can long-term survival and cause the eosinophilic meningoencephalitis in brain of accidental host, such as human and mice, but also can break through the blood brain barrier and move into the pulmonary artery when in the natural host. In addition, from L5 to adult, especially to the female life stage, the nematode body grows very fast and body volume increasing abnormal obviously. So this article attempts to find factors play a decisive role in these processes through the transcriptome comparison analysis of L5 and F.

First, the transcriptome of L5 and F were sequenced with Illumina HiSeq 2500 sequencing platforms respectively. De novo assembly of reference transcript was performed by Trinity with all filtered clean reads (12.66 G). Then 82769 Unigenes of the transcription were annotation with Nr, Nt, SwissProt and Pfam, KOG, GO and KEGG databases and 20.19% of them obtained corresponding annotation results in Nr. After clustering analysis of KOG, GO and KEGG annotation results, we found 225 genes in the *A. cantonensis* reference transcript were associated with lysine degradation pathway. So we speculated that this may be one of the strategies of *A. cantonensis* by excessive consumption host lysine to weaken the immune system and conducive to parasitism.

Then the reference transcript was setted as a reference for the assembled of transcripts of L5 and F. 1346 differentially expressed genes (DEGs) were picked out. 418 of them were up-regulated and 928 were down-regulated in F. Most of the 928 were related to ion transport, cuticles synthesis, metallopeptidase activity and extracellular matrix by GO analysis. And most of these had closely relationship with cuticles formation. On the other hand, lysosome was the only one significantly

enriched pathway of these down-regulated DEGs and no any significant pathway or GO terms generated with the analysis of 418 up-regulated DEGs.

Based on the analysis of these results we suggested that *A. cantonensis* will synthesize a large amount of cuticles to satisfy the body dilatation in the early adult stage, lysosome pathway not only provided enough raw material for cuticle synthesis by degradation metabolism, which may also play the certain role in the process of promote the degradation of old cuticle. In addition, metallopeptidases may assist the parasite to break through the blood-brain barrier during their migration from brains to their destination. Therefore, taken together, all data of the present work indicate that the profiles of DEGs are in accordance with the needs of survival and development of different stages. At the same time, a lot of new transcript found in the analysis, many genes of them encode proteins have tremendous potential as anti-parasitic drug targets and for vaccine development.

Finally, the expression pattern of *AC-14-3-3* were studied by RT-PCR and immunohistochemical. Comprehensive protein localization results and the results of other studies we speculated that the *AC-14-3-3* in the adult is mainly related to the formation of reproductive cells, while it may conducive to the parasites survival by interfering the host immune response in L5.

Keywords: *Angiostrongylus cantonensis*; comparative transcriptome; cuticle; the blood brain barrier; 14-3-3

第一章 前言

1.1 广州管圆线虫

1.1.1 广州管圆线虫的发现及命名

广州管圆线虫 (*Angiostrongylus cantonensis*) 是我国著名学者陈心陶教授在 1935 年首次发现的, 由于 *A. cantonensis* 是在广州的家鼠及褐家鼠肺动脉中解剖得到, 故当时称该寄生线虫为广州肺线虫^[1, 2], 一直沿用到 1946 年才被 Dougherty 定名为广州管圆线虫, 并将其归为圆线虫目, 后圆线虫科, 后圆线虫亚科, 管圆线虫属^[3, 4]。 *A. cantonensis* 成虫虫体呈丝状, 口与交合伞结构简单, 表皮的被鞘是其比较明显的形态学特征之一。

1.1.2 广州管圆线虫的生活史

广州管圆线虫有着比较复杂的生活史, 一个完整的生活史常常要涉及多个宿主 (图 1-1) ^[5-7]。福寿螺及蛞蝓等软体动物和褐家鼠等啮齿类动物是广州管圆线虫最常见的中间宿主和终末宿主。广州管圆线虫是雌雄异体的, 以有性生殖的方式进行繁殖的。寄生在终末宿主体内的雌、雄虫成功交配后, 由雌虫产卵于肺动脉, 虫卵随即在血液的协助下达到肺毛细血管, 并在此发育直至孵化出一期幼虫 (L1), 接着 L1 会穿过血管和肺泡壁向上逆行至气管, 然后随宿主吞咽进入消化道, 最终随粪便排出。到达自然环境中的 L1 在潮湿或有水的条件下可存活 3 周或者更长的时间, 直至死亡或者随食物进入中间宿主 (福寿螺、非洲大蜗牛和蛞蝓等) 体内。成功进入中间宿主体内的 L1 经大约一周的生长便开始第一次蜕皮, 并发育至第二期幼虫 (L2), 再经过约一周的时间广州管圆线虫又蜕皮一次, 最终发育为第三期幼虫 (L3)。另外, 研究发现, L1 和 L2 在中间宿主体内的生长发育速度受环境温度影响较大。L3 是广州管圆线虫比较重要的一个阶段, 其具有较强的感染性, 也是相关研究中常常考察的对象。鼠类等终末宿主会因吞食含感染期幼虫的中间宿主、转续宿主或者饮用受 L3 污染的水后被感染。成功进入宿主体内的 L3 在胃内脱鞘后穿肠壁进入血管, 再经肝脏、肺等组织后沿颈动脉进入脑部。同样的, L3 也是要先后经过两次蜕皮以达到后面的发育过程

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库