

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 200326017

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

爪哇根结线虫(*Meloidogyne javanica*)

rDNA-ITS 的分子鉴定及异时性基

因在早期发育中的定位

The Identification of rDNA-ITS and  
Localization of heterochronic gene In

*Meloidogyne javanica*

任 芳

指导教师姓名: 杨玉荣 副教授

专业名称: 动物学

论文提交日期: 2007年6月

论文答辩时间: 2007年7月

学位授予日期: 2007年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2007年 7 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密 ( ), 在年解密后适用本授权书。
2. 不保密 ( )

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名: 日期: 年 月 日

导师签名: 日期: 年 月 日

## 目 录

中文摘要.....	5
英文摘要.....	6
前言.....	8
1 rDNA-ITS技术在植物寄生线虫分子诊断中的应用.....	8
2 异时性基因在线虫中的研究.....	11
3 论文的研究目的和意义.....	15
第一章 爪哇根结线虫生活史的观察.....	16
1 材料和方法.....	16
1.1 材料.....	16
1.2 方法.....	17
1.2.1 室内番茄的种植和人工感染实验.....	17
1.2.2 两种根结线虫不同发育时期虫体形态的观察.....	17
2 结果.....	17
2.1 爪哇根结线虫胚胎发育和各期虫体形态观察.....	17
2.2 荧光染料处理爪哇根结线虫胚胎并观察其发育.....	20
2.3 南方根结线虫的形态观察.....	21
3 讨论.....	22
第二章 植物根结线虫 rDNA-ITS1 和 rDNA-ITS2+序列分析.....	24
1 材料和方法.....	24
1.1 材料.....	24
1.2 方法.....	26
1.2.1 rDNA-ITS1和rDNA-ITS2+的克隆和测序.....	26
2 结果.....	31
2.1 根结线虫rDNA-ITS1和rDNA-ITS2+目的片段的克隆.....	31
2.2 根结线虫rDNA-ITS1和rDNA-ITS2+序列分析.....	34
2.3 三种根结线虫系统发生树及亲缘关系分析.....	41
3 讨论.....	43

第三章 原位杂交检测异时性基因在爪哇根结线虫胚胎及幼虫体内的分布.....	46
1 材料和方法.....	46
1.1 材料.....	46
1.2 主要试剂和仪器.....	46
1.3 方法.....	47
1.3.1 探针点杂交.....	47
1.3.2 整体原位杂交.....	48
2 结果.....	49
2.1 <i>let-7</i> 在爪哇根结线虫早期发育中的分布.....	49
2.2 <i>lin-28</i> 在爪哇根结线虫早期发育中的分布.....	51
2.3 <i>lin-4</i> 在爪哇根结线虫早期发育中的分布.....	54
2.4 <i>lin-14</i> 在爪哇根结线虫早期发育中的分布.....	57
3 讨论.....	60
第四章 爪哇根结线虫中 <i>C. elegans lin-28</i> 同源基因的克隆和序列分析.....	62
1 材料与方法.....	62
1.1 材料和试剂.....	62
1.2 方法.....	62
1.2.1 爪哇根结线虫总RNA的提取和cDNA的合成.....	62
1.2.2 爪哇根结线虫中 <i>lin-28</i> 同源性片段的克隆和酶切鉴定.....	63
1.2.3 目的基因的序列分析.....	64
2 结果.....	64
2.1 爪哇根结线虫中 <i>lin-28</i> 同源性片段的克隆和酶切鉴定.....	64
2.2 <i>lin-28</i> 同源性序列的分析.....	66
3 讨论.....	72
总结.....	73
参考文献.....	74
致谢.....	81

## CONTENTS

<b>Abstract in Chinese</b> .....	5
<b>Abstract in English</b> .....	6
<b>Forward</b> .....	8
<b>1 Application of rDNA-ITS in plant parasite nematodes</b> .....	8
<b>2 Heterochronic genes in nematodes</b> .....	11
<b>3 Purpose and significance of this thesis</b> .....	15
<b>Chapter 1 The observation of the life cycle of root-knot nematodes</b> ..	16
<b>1 Materials and methods</b> .....	16
<b>1.1 Materials</b> .....	16
<b>1.2 Methods</b> .....	17
<b>1.2.1 The tomatoes planting and root-knot nematodes infection</b> .....	17
<b>1.2.2 The observation of the life cycle of two species of root-knot nematodes</b> .....	17
<b>2 Results</b> .....	17
<b>2.1 Observation of the embryo development and different stages of <i>M. javanica</i></b> ..	17
<b>2.2 Observation of the embryo development with fluorescence dye</b> .....	20
<b>2.3 Observation of different stages of life cycle of <i>M. incognita</i></b> .....	21
<b>3 Discussion</b> .....	22
<b>Chapter 2 Analysis of rDNA-ITS1 and rDNA-ITS2+ in root-knot nematode</b> .....	24
<b>1 Materials and methods</b> .....	24
<b>1.1 Materials</b> .....	24
<b>1.2 Methods</b> .....	26
<b>1.2.1 The cloning of rDNA-ITS1 and rDNA-ITS2+</b> .....	26
<b>2 Results</b> .....	31
<b>2.1 The cloning of rDNA-ITS1 and rDNA-ITS2+ of root-knot nematodes</b> .....	31
<b>2.2 Analysis of rDNA-ITS1 and rDNA-ITS2+ of root-knot nematodes</b> .....	34
<b>2.3 The construction of phylogenetic trees and analysis of the relationship</b> .....	41
<b>3 Discussion</b> .....	43

---

<b>Chapter 3 The distribution of heterochronic genes in the embryos and larvae of <i>M. javanica</i></b> .....	<b>46</b>
<b>1 Materials and methods</b> .....	<b>46</b>
1.1 Materials.....	46
1.2 Apparatus and reagents.....	46
1.3 Methods.....	47
1.3.1 Dot blot of the probe.....	47
1.3.2 The whole-mount in situ hybridization.....	48
<b>2 Results</b> .....	<b>49</b>
2.1 The distribution of <i>let-7</i> in the embryos and larvae of <i>M. javanica</i> .....	49
2.2 The distribution of <i>lin-28</i> in the embryos and larvae of <i>M. javanica</i> .....	51
2.3 The distribution of <i>lin-4</i> in the embryos and larvae of <i>M. javanica</i> .....	54
2.4 The distribution of <i>lin-14</i> in the embryos and larvae of <i>M. javanica</i> .....	57
<b>3 Discussion</b> .....	<b>60</b>
<b>Chapter 4 The cloning and analysis of <i>C. elegans lin-28</i> homologous gene in <i>M. javanica</i></b> .....	<b>62</b>
<b>1 Materials and methods</b> .....	<b>62</b>
1.1 Materials and reagents.....	62
1.2 Methods.....	62
1.2.1 The extraction of total RNA and reverse transcription of cDNA of <i>M. javanica</i> .....	62
1.2.2 The cloning and identification of <i>lin-28</i> homologous gene in <i>M. javanica</i> .....	63
1.2.3 The analysis of the sequence.....	64
<b>2 Results</b> .....	<b>64</b>
2.1 The cloning and identification of <i>lin-28</i> homologous gene in <i>M. javanica</i> ....	64
2.2 The analysis of <i>lin-28</i> homologous sequence.....	66
<b>3 Discussion</b> .....	<b>72</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>73</b>
<b>Reference</b> .....	<b>74</b>
<b>Acknowledgements</b> .....	<b>81</b>

## 中文摘要

根结线虫是重要的植物内寄生线虫。本论文以同安农田采集的番茄病根中爪哇根结线虫为实验材料,对病根进行解剖,收集成虫、二期幼虫和卵块。通过对根结线虫胚胎发育和生活史中各期虫体形态的观察,进一步定种为爪哇根结线虫。通过感染室内土培番茄,使得爪哇根结线虫在实验室得到进一步的扩大培养,为后续实验的进行提供了材料。

利用rRNA基因间隔序列的保守性引物对来自不同宿主的爪哇根结线虫和南方根结线虫的rDNA-ITS1和rDNA-ITS2序列进行了扩增,与Genebank中根结线虫的ITS1序列在clustalX软件中进行了分析,构建系统发生树和遗传距离矩阵。分析可知,来源于番茄根内和蒲公英根内的爪哇根结线虫rDNA-ITS1序列,仅存在1个碱基的差异,与南方根结线虫间存在187个碱基的差异。爪哇根结线虫种内不同个体间的遗传距离小于与南方根结线虫的种间遗传距离,表明来自不同宿主的爪哇根结线虫的亲缘关系很近,而与南方根结线虫亲缘关系较远。因此ITS序列可作为鉴定根结线虫亲缘关系远近的有效工具。

利用合成的*C. elegans*异时性基因*let-7*、*lin-28*、*lin-4*和*lin-14*的探针,通过整体原位杂交的方法,在爪哇根结线虫胚胎发育的不同阶段及早期幼虫体内检测异时性基因的分布。在胚胎、L1和L2期幼虫体内都检测到*let-7*mRNA的存在,在胚胎发育中主要分布于胚胎的两端和靠近卵壳的细胞中,在幼虫期分布于虫体的头部、食道球、消化道和尾部;*lin-28*mRNA在胚胎中的分布与*let-7*mRNA的分布相同,在幼虫中主要分布于头部、消化道和尾部;在L2期的分布范围比L1期有所减小,推测可能*lin-28*mRNA在L2期的下调与*C. elegans*中*lin-28*在L2期的表达受到*lin-4*和*lin-14*的双重调控作用相同;*lin-4*主要在L1期和L2期幼虫体内检测到了mRNA的分布,且在体壁和消化道内染色较深;*lin-14*mRNA在胚胎内分布于胚胎外胚层细胞中,幼虫中也多位于体壁细胞、食道球和消化道内。

以爪哇根结线虫基因组DNA和cDNA为模板,扩增*C. elegans*的*lin-28*同源性片段,将扩增片段构建到pMD18-T载体上,酶切鉴定后测序,所得序列与*C. elegans*中*lin-28*的序列在Genedoc软件中进行比对和分析,同源性达到83%。为进一步研究爪哇根结线虫中*lin-28*同源性基因的功能提供了基础。

**关键词:** 爪哇根结线虫; 核糖体DNA-ITS序列; 异时性基因;

## Abstract

Root-knot nematodes are important endo-parasites in economic plants. The roots of tomatoes infected with *M. javanica* were got from the field of Tong'an rural area and roots were dissected. The egg masses, pre-parasitic juveniles and female adults of *M. javanica* were collected in the lab. The embryo development and different stages of life cycle of root-knot nematode were observed. In order to obtain a large number of nematodes in the lab, the tomatoes were planted in the laboratory and infected with the L2 stage for the further study.

The rDNA-ITS1 and rDNA-ITS2 of *M. javanica* from different hosts and *M. incognita* were amplified in this study. The rDNA-ITS1 sequences from Genebank were used to compare the sequences by software clustalX and the phylogenetic trees was constructed. The results showed that the rDNA-ITS1 sequences of *M. javanica* from tomato and taraxacum are very similar to them. There is only 1bp difference between them. The rDNA-ITS1 sequences of *M. javanica* and *M. incognita* have 187bp differences from each other. Comparing the genetic distance of the root-knot nematodes, the average genetic distance of the *M. javanica* among innerspecies is closer than that of interspecies (between *M. javanica* and *M. incognita*). It might inform that *M. javanica* from tomato and taraxacum have evolutionarily closer relationship than that between *M. javanica* and *M. incognita*. ITS sequence can be a useful method to identify different species of root-knot nematodes.

Whole-mount in situ hybridization was used to detect the distribution of the heterochronic genes in the embryo, L1 and L2 stage of *M. javanica*. The heterochronic gene *let-7* mRNA exists in the two poles of the embryo, epidermic cells of the embryo and also presents in the head, esophageal bulb, intestine and tail of the L1 and L2 stage of *M. javanica*. The distribution of *lin-28* mRNA in the embryo is same as that of the *let-7* mRNA. The *lin-28* mRNA presents mostly in the head, intestine and tail. The distribution of the *lin-28* mRNA in L2 stage is not as broad as it in L1 stage. It might have the similar mechanism which the expression of *lin-28* in L2 stage of *C. elegans* is inhibited by *lin-4* and *lin-14*. The distribution of the

*lin-4* mRNA is in the body wall of the early development of the juvenile. The *lin-14* mRNA distributes in the cells of ectoderm of the embryo and body wall 、 esophageal bulb and intestine of L1 and L2 stage.

The genomic DNA and cDNA of *M. javanica* were used as template, and specific primers were designed to amplify a homologus of *C.elegans lin-28*. Then the fragments were subcloned in the plasmid pMD18-T, and transformed into the bacteria DH5 $\alpha$ . The plasmids were digested by the restrictive enzymes. The sequence of *C.elegans lin-28* homologus in *M. javanica* is very similar to the sequence of *C.elegans lin-28*. After compare the sequence in the Genedoc software , the similarity of three sequences was about 83%. The results provided the basic information for the further study of the function of *lin-28* homologus in *M. javanica*.

**Key:** *Meloidogyne javanica*; rDNA-ITS ; heterochronic gene;

## 前 言

植物寄生线虫严重危害农作物，每年造成世界农业将近 1250 亿美元的损失<sup>[1]</sup>。根结线虫属于线虫纲 (Secernentea)、垫刃目 (Tylenchida)、垫刃超科 (Tylenchoidea)、根结线虫科(Meloidogynidae)、根结线虫属 (*Meloidogyne*)<sup>[2-3]</sup>。它们寄生在植物根部，造成植物根组织病变，从而达到寄生取食及繁衍后代的目的。爪哇根结线虫 (*M. javanica*)、南方根结线虫 (*M. incognita*)、北方根结线虫 (*M. hapla*) 和花生根结线虫 (*M. arenaria*) 是世界性分布的 4 种植物根结线虫，也是危害我国烟草、蔬菜、花生、茶、桑和麻类等多种重要经济作物的植物寄生线虫<sup>[4-5]</sup>。据 FAO 保守估计，全世界每年因线虫危害对粮食和纤维作物造成的损失大约为 12%，对蔬菜、花生、烟草和某些果树造成的损失要超过 20%<sup>[6]</sup>。

根结线虫雌雄异形，生活史简单。产卵后，卵在壳内发育成一期幼虫，并在卵壳内蜕皮一次，孵化为二期幼虫，二期幼虫栖息在土壤内伺机侵染植物，通常从植物根尖侵入根内，在根内定居和生长，再经两次蜕皮变成四期幼虫。在第四次脱皮前，雄幼虫变为细长形，雌幼虫膨大为长梨形，最后一次蜕皮后，分别发育成雌、雄成虫。雄虫离开根在土壤中活动，雌虫留在根内，可以不经交配而产卵，卵产在胶质的卵囊内。根结线虫完成上述生活周期约需一个月左右<sup>[7-9]</sup>。因此在温暖的环境条件下，每年可完成5-10世代。

根结线虫常通过孤雌生殖方式繁殖，其中又分为减数分裂的孤雌生殖和有丝分裂的孤雌生殖两类。在根结线虫的群体内，特别是在高密度侵染的情况下，可以检测到大量的雄虫，但雄虫在生殖上的作用尚不清楚。根结线虫没有明显的休眠机制，发育过程中的性别决定也几乎完全取决于环境条件，如侵染密度、营养、温度等。在侵染密度较低、营养条件较好的情况下，雌虫较多；相反条件下，则雄虫比例明显增加<sup>[10-11]</sup>。

### 1 rDNA-ITS技术在植物寄生线虫分子诊断中的应用

传统的根结线虫分类鉴定主要是根据形态测量值、会阴花纹、鉴别寄主反应和细胞遗传学等方法。1949年 Chitwood发表的名为“Revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887”的论文，成为根结线虫鉴定和分类的转折点<sup>[12]</sup>。他将

根结线虫从胞囊线虫中独立出来,建立了根结线虫属,并提出了此属的鉴别特征。此后的一段时期,根结线虫的分类鉴定主要是以Chitwood所提出的形态特征和一些寄生习性差异为依据。目前这些特征包括会阴花纹的形态,雌虫、雄虫和二龄幼虫的头部形态,以及雌虫和雄虫的口针形态。但要鉴定一个种群决不能单单依靠形态测量值,因为种群的变异大,测量值有重叠现象。会阴花纹被认为是根结线虫形态分类中最重要的形态特征,但最近的一些研究表明会阴花纹有种内变异现象<sup>[13-17]</sup>,且只能鉴定比较熟悉的种,难以解决生理小种的问题。

1977年,Spauli<sup>[18]</sup>在国际上首次利用扫描电镜研究*M. propora*的形态特征后,扫描电镜特征成为根结线虫研究必不可少的重要内容。1952年, Sasser<sup>[19]</sup>提出用寄主反应来鉴定根结线虫,后发展为“北卡罗纳鉴别寄主试验(North Carolina Differential Host Test)。根据典型的寄主反应,可初步指明根结线虫的种,并且探知种的致病性特点。利用这种方法可以鉴定4种最常见根结线虫的种和生理小种,还可鉴定新地区或新寄主上发现的新根结线虫群体,通常情况下结合形态学特征观察可得到更准确的结果。虽然鉴别寄主反应对鉴定四种常见的根结线虫十分可靠,但鉴别寄主试验周期长,且不能对混合种群作出直接的判断。

分子生物学技术的发展为寄生线虫的分类学和流行病学的研究提供了新的途径。直接测定线虫的遗传物质(DNA)是潜在的最有力的线虫诊断工具。在植物线虫的分子诊断和鉴定中,核糖体DNA编码和非编码区的比较分析成为许多生物种和亚种理想的鉴定工具。利用PCR技术扩增核糖体基因的内转录间隔区(ITS)对植物线虫进行分类鉴定的方法已越来越多的受到线虫学家的高度重视,从而合成了一些扩增rDNA的通用引物和特异性引物。

在植物线虫的分子诊断和鉴定中,核糖体DNA(ribosomal DNA, rDNA)重复单元是最有价值的基因组区域之一,它在基因组中有100-500个拷贝,总长度为7-13kb。在真核生物中,rDNA由外转录间隔区(External Transcribed Spacer, ETS)、18S基因、内转录间隔区(Internal Transcribed Spacer Region, ITS)、5.8S基因、28S基因和基因间隔区(Intergenic Spacer, IGS)6部分组成,其中18S、5.8S和28S基因组序列在大多数生物中趋于保守,在生物种间变化很小,而内转录间隔区ITS1和ITS2变化较大,基因间隔区IGS的序列变化最大<sup>[20]</sup>。

ITS在真核生物包括原生动物、植物、脊椎动物、无脊椎动物和真菌中,还

被用于构建系统发生树(Phylogetic trees)、估计群体遗传结构、评价群体水平进化过程和分类鉴定。这样就使得PCR很容易扩增更多变异性和分类学上有价值的ITS区域的片段,使从单条线虫和成熟雌虫中进行PCR扩增变得容易<sup>[21]</sup>。

ITS在植物寄生线虫、动物寄生线虫和昆虫寄生线虫中的鉴定受到线虫学家的高度重视。当用“通用”PCR系列引物扩增时,任何单一线虫种都能提供ITS区域的扩增产物。因而,任何线虫种、线虫群体和线虫群落生态演替都能用基于rDNA-ITS 区域的分子途径来进行分析。当土壤混合群落中含有大量的幼虫或当遇到不熟悉的线虫时,标准的分子标记对于线虫识别特别有用<sup>[22-23]</sup>。

国外已应用rDNA-ITS区进行根结线虫的快速分子诊断和从混合种群中识别不同种的根结线虫。胞囊线虫的rDNA-ITS序列在种内个体间差异较小,而在不同种间有较高的变异水平,从而ITS区域可作为区分不同种胞囊线虫的分子依据。Power等<sup>[24]</sup>用PCR扩增的方法成功的区分了4种常见根结线虫和奇特伍德根结线虫。Fabienne Audebert<sup>[25]</sup>等人提供的4种细颈属线虫ITS1和ITS2序列,为进一步确定该4种线虫在系统发生树中的亲缘关系提供了基础。L. A. Newton<sup>[26]</sup>等人对有齿食道口线虫和粗头食道口线虫的rDNA-ITS2区域设计特定的引物,利用PCR扩增产物来对这两种线虫进行分类鉴定,并将这一方法用于幼虫的纯培养鉴定中。Zijlstra<sup>[27]</sup>等人利用rDNA-ITS-RFLP技术可将来自寒冷地区的2种根结线虫*M.hapla* 和 *M.chitwood* 区分开。

Piotte C<sup>[28]</sup>成功地用根结线虫卫星DNA 的PCR 引物把北方根结线虫*M.hapla*、*M.arenaria* 及*M.ingonita* 区分开,而且还可区分北方根结线虫的3个地理小种“England”、“Frontignan”及“Lamole”小种。Uehara T<sup>[29]</sup>等成功地用ITS特异性引物区分了2种短体线虫 *P. coffeae* 和 *P. Loosi*。Waeyenberge等<sup>[30]</sup>用Tru91酶切比利时根结线虫群体的ITS扩增产物,成功区分了*M. chitwood*、*M. fallax*和*M. hapla*,并用RAPD技术检测了这些根结线虫群体的遗传距离,构建了系统发生树。他还用保守性引物扩增了18种根腐线虫的rDNA-ITS片段,得到约900-1250 bp的DNA片段,揭示根腐线虫ITS的长度和大小在种间差别较大。用5种限制性内切酶*Cfol*、*Ddel*、*HindIII*、*HpaII*、*Pst I* 酶切ITS扩增产物,至少使用两种酶可将这18种根腐线虫相互区别开。

国内已开展了胞囊线虫和松材线虫的rDNA-ITS区的研究。张立海等<sup>[31]</sup>用两

个引物扩增松材线虫和拟松材线虫的rDNA-ITS 区, 得到ITS1区的扩增产物大小为308bp, 发现ITS1序列在松材线虫种内区别很小, 不超过1 bp; 在拟松材线虫种内区别较大, 最大达7 bp; 而在这2种线虫的种间区别为32-39 bp。进一步结合单条线虫DNA 的提取技术, 对14个松材线虫和拟松材线虫样本进行了单链构象多态性(PCR-SSCP) 分析, 结果表明PCR-SSCP 分析技术可明确区分这2种线虫。廖金玲等<sup>[32]</sup>用 rDNA-ITS-PCR 扩增松材线虫和拟松材线虫的rDNA 的ITS 区, 分别得到大小约为220bp 和330bp 的DNA 片段,有效揭示了这两种线虫ITS 的大小和变异。王新荣等<sup>[33]</sup>成功地用ITS 的特异性引物鉴定了3 种剑线虫*X. index*、*X. diversicaudatum*、*X. viuttenezi* 等。郑经武等人<sup>[34]</sup>用通用引物扩增中国大豆胞囊线虫群体的rDNA-ITS, PCR扩增出1060 bp 的DNA片段, ITS区PCR-RFLP 研究表明ITS区在大豆胞囊线虫种间是稳定的。彭德良等用PCR技术对来自中国的10个根结线虫群体进行rDNA-ITS-RFLP及其序列的研究, 应用通用引物扩增出一条约700 bp的DNA片段, 结合形态学特征和形态测量值将这些群体诊断为4个常见种和象耳豆根结线虫(*M. enterolobii*)<sup>[35]</sup>。

## 2 异时性基因在线虫中的研究

在多细胞生物中, 整个发育过程起始于受精卵的发育, 这就要求细胞分裂、死亡、分化具有时空一致性。各种器官的准确定位和适时发育反映了基因调控的时间性和空间性。一般说来, 在胚胎发育过程中, 基因时空性表达的控制是由一些关键调控因子的时空性梯度造成的<sup>[36-38]</sup>。调节时间性发育的基因称为异时性基因<sup>[36]</sup>。

在模式生物 *Caenorhabditis elegans* 中, 异时性基因控制着整个发育过程的时间性, 包括细胞的分裂、分化和部分组织中细胞的凋亡<sup>[39-41]</sup>。异时性基因的突变导致发育过程中时间性的改变, 在细胞发育过程中, 细胞命运的决定被提早或是推迟发生<sup>[42]</sup>。

三个异时性基因 *lin-4*、*lin-14* 和 *lin-28* 组成的调控网络在控制幼虫发育初期的三个阶段起着重要的作用<sup>[43]</sup>。*lin-14* 的活性决定了 L1 期细胞的命运。在 *lin-14* 缺失的突变型中, L1 期的发育事件消失了, 而发生 L2 期的早熟事件<sup>[44]</sup>。L2 期的特异性发育过程要求 *lin-14* 和 *lin-28* 同时有活性。它们的功能由于 *lin-4* 的表

达而受到抑制，决定了后来细胞的发育命运<sup>[45-46]</sup>。

*lin-4* 最早是在 1993 年由 Ambros 等人在 *C. elegans* 中意外发现了一种与发育时空调控相关的 miRNA。异时性基因 *lin-4* 编码一个 22-nt 的 RNA<sup>[45]</sup>，被认为是通过和 *lin-14* mRNA 的 3' 非编码区 (UTR) 互补结合实现调节功能的<sup>[47-49]</sup>。它在幼虫发育的 L1 期抑制另外两个异时性基因 *lin-14* 和 *lin-28*<sup>[50-51]</sup>。*lin-4* RNA 首先出现在野生型 L1 期幼虫发育 12 h 的阶段，积累到 16 h 时达到最大。*lin-4* RNA 积累的时间与 LIN-14 蛋白表达下降的时间相一致。研究转基因虫体发现，在发育的 12 h 前提高 *lin-4* RNA 的水平，LIN-14 蛋白的水平会降低，并出现了和早期 *lin-14* 失活个体相同的早熟表型。由此可知，时间调控基因 *lin-4* 的积累导致 LIN-14 蛋白的时间性下降，因此控制了胚胎后期发育的时间性<sup>[52-53]</sup>。

*lin-4* 编码两个转录物，较多的是 22nt 的 *lin-4S* 和较少的 61nt 的 *lin-4L*。*lin-4S* 在胚胎期和 L1 期幼虫中检测不到，它最早在 L1 期晚期幼虫中出现，即幼虫开始发育 12 h 以后。*lin-4S* 的水平在整个幼虫发育过程中持续增加，可以在成虫中检测到<sup>[54-55]</sup>。*lin-4L* 的表达量很少，几乎难以用 Northern blot 检测。野生型中 *lin-4S* RNA 的表达与 LIN-14 蛋白量的下降相一致，都是从 L1 期开始直到整个幼虫期。

在野生型 *C. elegans* 中过早过量地表达 *lin-4* RNA 将导致 LIN-14 蛋白的减少，这意味着它们会像 *lin-14(lf)* 突变体一样表现出早熟性状<sup>[56]</sup>。主要表现为：产卵减少、形体短胖、尾巴弯曲、生殖孔畸形。Rhonda Feinbaum 等人进一步检测 *lin-4* RNA 超表达个体几个时期细胞的命运，其早熟缺陷细胞谱系是和 *lin-14(lf)* 的突变体一样。*lin-4* RNA 的过量表达影响休眠态幼虫的形成。休眠态幼虫是指幼虫进入 L3 期时，由于生活条件恶劣，选择性地进入一个发育停滞阶段，这样可以延长幼虫的存活时间。当生活空间过于拥挤，或温度提高时，幼虫则在 L2 期蜕皮后停止发育进入休眠态幼虫<sup>[57-59]</sup>。在野生型中，幼虫进入休眠态的调控是在 L2 期进行的，*lin-14* 是进入休眠态时间性调控所必需的。*lin-14(lf)* 的突变体会提早一个时期即在 L1 期进入休眠态，而在 *lin-4* RNA 过量表达的个体中，休眠态也发生在 L1 期<sup>[60-61]</sup>。

*let-7* 是一个高度保守的 stRNA (small temporal RNA)，也是 miRNA 家族中的成员之一。*let-7* 在 *C. elegans* 幼虫到成虫的细胞命运决定过程中起时间性调节作

用, 是调控晚期发育的一个基因<sup>[62]</sup>。*let-7*编码一个21-nt的非编码RNA。Northern blot分析显示, *let-7*是时间性表达的, 这个21-nt 的RNA在L3期开始出现, 并且不断增加, 到L4期和成虫时达到最大<sup>[63]</sup>。*let-7*从线虫到人类都很保守, 线虫中*let-7*保守的时间性调节在其它物种中也表现出来, 如果蝇和斑马鱼。Steven M. Johnson等认为, *let-7*也是这些物种中的时间性调节基因<sup>[64-67]</sup>。

miRNA 是一类不编码蛋白质, 但编码 20-24nt 的 RNA 产物。与其余的 miRNA 一样, *let-7* 和 *lin-4* 都转录产生 60- 70nt 的 RNAs 前体, 并折叠成一个茎环结构。前体 RNA 经 RNase Dicer 加工, 在最接近茎的部分裂解产生成熟的 *lin-4* 和 *let-7* 的 stRNAs。*lin-4* 和 *let-7* 的 RNAs 最早分别在幼虫的 L1 期和 L4 期开始积累, 它们在时间上抑制一系列的发育过程, *lin-4* 影响 L1 和 L2 期, *let-7* 则影响 L4 期和成虫阶段。*let-7* 的时间性调节对于侧线细胞从 L4 期到成虫期的细胞决定有重要的作用, 但目前机理却不清楚<sup>[68-69]</sup>。

研究 *C. elegans* 异时性基因在发育过程中的调控作用发现, *lin-14* 缺失性突变体发育早熟, 而获得性突变体则发育晚熟<sup>[70]</sup>。很多实验证明, *lin-14* 在 L1 期的早期激活, 决定早期细胞的命运; 在 L1 晚期开始下降, 影响 L2 期细胞的命运。LIN-14 蛋白水平在 L1 和 L2 期下降, 而 *lin-14* mRNA 的水平则不发生变化。研究 *lin-14* 在 L1 和 L2 期的转录表达, 发现从 L1 到 L2 期幼虫的发育过程中, *lin-14* RNA 的含量非常接近<sup>[71-72]</sup>。

异时性基因 *lin-28* 在 *C. elegans* 的发育过程中控制时间空间发育的多样性, 在正常发育过程中, *lin-28* 在 L1 期幼虫体内大量表达, 是决定 L2 期特定细胞的命运所必需的。在 *lin-28* 缺失的突变体中, L2 期大量细胞的特异性分化会消失, L3 期和后期细胞的发育出现早熟。*lin-28* 的阶段特异性是由两个遗传通路所调节<sup>[73]</sup>。Kathy Seggerson 等人在研究 *lin-28* 的天然特异性抑制时发现, 和 *lin-14* 一样, *lin-28* 也是在翻译起始后一段时间内受抑制。可以肯定 *lin-14* 对 *lin-28* 的抑制是独立于 *lin-4* 的抑制过程, 它通过 *lin-28* 的 3'-UTR 起作用。研究发现, *lin-4* 对 *lin-28* 表达的独立性抑制是发生在转录起始之后。Kathy Seggerson 等人的实验证明了如果没有 *lin-14* 独立性通路, *lin-4* 是不能完全抑制 *lin-28* 的活性。因此推断 *lin-4* 独立性通路对 *lin-28* 的抑制发挥着重要的作用, 同样对于 *lin-14* 也存在着同样的通路<sup>[74]</sup>。

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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库