

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 21720061152123

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

异时性基因在*Caenorhabditis elegans*寿命调  
控中的作用及在小鼠发育中的表达研究

Heterochronic genes regulate the lifespan of *Caenorhabditis*  
*elegans* and the expression in the development of mouse

余 刚

指导老师姓名: 杨玉荣

专业名称: 动 物 学

论文提交时间: 2009 年 7 月

论文答辩时间: 2009 年 7 月

学位授予时间: 2009 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2009 年 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

# 目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
第 1 章 前言.....	1
1 异时性基因概述.....	1
1.1 异时性基因 <i>lin-28</i> 的研究进展.....	3
1.2 <i>C.elegans</i> 异时性基因 <i>lin-14</i> 的研究进展.....	8
1.3 MicroRNA 的研究进展.....	11
1.4 其他异时性基因的研究进展.....	14
1.5 异时性基因的调控通路.....	15
2 异时性基因与寿命的关系.....	17
2.1 寿命的研究进展.....	17
2.2 异时性基因与寿命的关系.....	20
3 异时性基因在脊椎动物中的研究进展.....	21
4 本论文研究目的及意义.....	22
第 2 章 材料与仪器.....	24
2.1 材料.....	24
2.1.1 实验所使用的虫株.....	24
2.1.2 小鼠组织及胚胎.....	24
2.1.3 质粒与菌株.....	25
2.2 实验仪器.....	25
2.3 常用药品与试剂.....	25
2.3.1 药品.....	25
2.3.2 引物.....	26
2.3.3 试剂与培养基的配制.....	26
2.3.4 染液配方.....	28
2.3.5 试剂盒.....	29
第 3 章 异时性基因突变体的寿命.....	30
3.1 实验方法.....	30

---

3.2 结果 .....	31
3.3 讨论 .....	40
<b>第 4 章 LIN-28 在寿命调控中的作用 .....</b>	<b>41</b>
4.1 实验方法 .....	41
4.2 实验结果 .....	48
4.3 讨论与展望 .....	68
<b>第 5 章 LIN-14 在寿命调控中的作用 .....</b>	<b>71</b>
5.1 实验方法 .....	71
5.2 实验结果 .....	73
5.3 讨论与展望 .....	88
<b>第 6 章 <i>C.elegans</i> 异时性基因 <i>lin-28</i> 和 <i>lin-41</i> homologus 在小鼠中的研究 .....</b>	<b>90</b>
6.1 实验方法 .....	90
6.2 Mouse <i>lin-28</i> 在胚胎和组织中的表达 .....	92
6.3 Mouse <i>lin-41</i> 在胚胎和组织中的表达 .....	95
6.4 讨论与展望 .....	105
参考文献 .....	108
致 谢 .....	117

---

## Content

<b>Abstract in Chinese</b> .....	I
<b>Abstract in English</b> .....	III
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	1
<b>1 Brief introduction of heterochronic genes</b> .....	1
<b>1.1 Recent research on <i>C.elegans lin-28</i></b> .....	3
<b>1.2 Recent research on <i>C.elegans lin-14</i></b> .....	8
<b>1.3 Recent research on microRNA</b> .....	11
<b>1.4 Other heterochronic genes</b> .....	14
<b>1.5 Regulating pathway of heterochronic genes</b> .....	15
<b>2 Heterochronic genes and lifespan</b> .....	17
<b>2.1 Recent research on lifespan</b> .....	17
<b>2.2 Heterochronic genes and lifespan</b> .....	20
<b>3 Recent research on homologous of heterochronic gene in vertebrate</b> .....	21
<b>4 The aim and purpose of this paper</b> .....	22
<b>Chapter 2 Materials and instruments</b> .....	24
<b>2.1 Materials</b> .....	24
<b>2.1.1 Worms</b> .....	24
<b>2.1.2 Embryos and tissues of mouse</b> .....	24
<b>2.1.3 Plasmids and strains</b> .....	25
<b>2.2 Instruments</b> .....	25
<b>2.3 Reagents</b> .....	25
<b>2.3.1 Reagents</b> .....	25
<b>2.3.2 Primers</b> .....	26
<b>2.3.3 Preparation of reagents and culture media</b> .....	26
<b>2.3.4 Preparation of staining solution</b> .....	28
<b>2.3.5 Kits</b> .....	29
<b>Chapter 3 The lifespan of heterochronic gene mutations</b> .....	30
<b>3.1 Method</b> .....	30
<b>3.2 Results</b> .....	31
<b>3.3 Discussion</b> .....	40

---

<b>Chapter 4 The function of LIN-28 in regulating the lifespan of</b>	
<b><i>C.elegans</i></b> .....	41
4.1 Method .....	41
4.2 Results .....	48
4.3 Discussion.....	68
<b>Chapter 5 The function of LIN-14 in regulating the lifespan of</b>	
<b><i>C.elegans</i></b> .....	71
5.1 Method .....	71
5.2 Results .....	73
5.3 Discussion.....	88
<b>Chapter 6 <i>C.elegans</i> heterochronic gene homologus <i>lin-28</i> and <i>lin-41</i></b>	
<b>in mouse</b> .....	90
6.1 Method .....	90
6.2 The expression of mouse <i>lin-28</i> in embryo and tissue.....	92
6.3 The expression of mouse <i>lin-41</i> in embryo and tissue.....	95
6.4 Discussion.....	105
<b>Reference</b> .....	108
<b>Acknowledgements</b> .....	117



## 摘要

异时性基因控制着整个发育过程的时间性和空间性，确定细胞的命运，从而保证各种器官的准确定位和适时发育。异时性基因发生突变，会造成整个发育过程提前或推后。在 *C.elegans* 中研究最多的异时性基因有：*lin-14*、*lin-28*、*lin-41*、*hbl-1*、*lin-29*、MicroRNA *lin-4* 和 *let-7* 等。异时性基因在调控细胞的增殖、发育及凋亡中有重要作用，在寿命调控、肿瘤发生以及其他生理病变中也起着关键的作用。本文主要通过 RNAi、寿命分析、Western Blot、免疫共沉淀、质谱分析和 RT-PCR 等方法来研究异时性基因在寿命调控中的作用，并对脊椎动物中与肿瘤发生相关的异时性同源基因 *lin-28* 和 *lin-41* 进行了初步研究。

我们首先对各种异时性基因突变体的寿命和温度耐受性进行分析，首次发现了 *lin-28* 突变体的寿命是延长的，而 *let-7* 和 *lin-41* 突变体的寿命则是缩短的，*lin-29* 突变体的寿命与 N2 相比没有明显的差异。用 *lin-28* RNAi 长寿型虫株 *daf-2(-)* 和寿命缩短型虫株 *daf-16(-)* 观察寿命的变化。结果发现：*daf-2*、*lin-28* 双突变时平均寿命与 *daf-2* 单突变相比延长。而 *daf-16*、*lin-28* 双突变时与 *daf-16* 单突变相比平均寿命没有显著性差异。RNA 干扰 *lin-28* 后观察 DAF-16::GFP 荧光分布的变化，发现 DAF-16::GFP 的核定位并没有发生明显改变。

我们用 western blot 检测 LIN-28 在长寿虫株体内和寿命缩短虫株体内的表达，结果发现：除了 *lin-14* 突变体和 *lin-4*、*lin-14* 双突变之外，在包括 *daf-2(-)* 的长寿型的突变体中，LIN-28 的表达含量都很低。而在包括 *daf-16(-)* 的寿命缩短型虫株体内，LIN-28 的表达含量都非常高。免疫共沉淀和 RNAi 结果显示：LIN-28 和寿命相关基因 DAF-16 是相互抑制的。*lin-28* 过表达可以抑制 *daf-16* 的表达，而 *daf-16* 突变后，*lin-28* 的表达丰度又很高。

通过免疫共沉淀和 MALDI-TOF-MS 质谱技术，我们初步确定了和 LIN-28 相互作用的几种蛋白。这些蛋白包括：T22H9.3 翻译起始因子 2C (eIF-2C)；在线虫生殖系发育中起主要作用的 P 颗粒蛋白 PGL-2、R13A1.10 和 Aff\_ZK484.8。

在本次实验中，我们还研究了通过胰岛素/IGF-1 途径影响寿命的异时性基因 *lin-14* 在生化水平上和 *daf-16* 的相互关系。实验研究表明，在 *daf-2* 突变的背景下，*lin-14* 突变后，DAF-16 的表达有所增加；免疫共沉淀后 western blot 检测实验显示 *lin-14* 和 *daf-16* 有直接的微弱相互作用；通过质谱分析方法我们初步确定

了和 LIN-14 相互作用的四种蛋白：Y55F3C.9、R12E2.1、C50C3.7 和线粒体 ATP 酶抑制子家族-2(mai-2)。

在脊椎动物中，我们从小鼠的第九天胚胎中成功得到了 *C.elegans lin-28* 和 *lin-41* 同源基因的部分 cDNA 片段，在小鼠胚胎和组织中分别通过 western blot 和 RT-PCR 检测 *lin-28* 和 *lin-41* 的表达。Western blot 结果显示：LIN-28 在第 9 天、第 10.5 天和第 12 天的胚胎中有表达，但在第 9 天的胚胎中表达含量较低；在成体组织的心脏和小肠中表达含量最高，其次是肾脏，在其他组织如肝脏、肌肉和脑中也有表达，但含量很低；LIN-41 在小鼠胚胎第 9 天、第 10.5 和第 12 天有特异性的表达，而在第 13 天的胚胎中几乎没有表达，另外 LIN-41 在成体心脏、肌肉和小肠组织中有特异性表达。RT-PCR 结果显示：*lin-41*mRNA 在胚胎的第 9 天、第 10.5 天和第 12 天有特异性的表达；*lin-28* 在第 9 天和第 10.5 天有特异性的表达。Co-IP 和质谱的分析结果显示：与 LIN-41 相互作用的蛋白主要包括亮氨酸拉链转录调控因子、表皮生长因子受体、血凝素-4 (Galectin-4)、线粒体和 Ras 相关蛋白 Rab-13。

关键词：*Caenorhabditis elegans*；异时性基因；寿命；小鼠

## Abstract

Heterochronic genes control the temporal and spatial pattern of entire development process and specify the cell fate to ensure accurate position of the various organs and developmental time. In heterochronic genes mutation, stage-specific developmental events occur at earlier or later stages than they would normally. MicroRNAs and other heterochronic genes play key roles in regulating cell proliferation, cell development and apoptosis, as well as in controlling lifespan, tumor genesis and other diseases. In this paper, we used RNAi, lifespan analysis, western blot, immunoprecipitation and RT-PCR to study heterochronic genes in regulating *C.elegans* lifespan, and the expression pattern of the homologous genes *lin-28* and *lin-41* in vertebrate.

First, the lifespan and temperature tolerance of different heterochronic genes mutations were analysed and found that the *lin-28* mutant lived longer than N2 wild type. The mutants of *let-7* and *lin-41* lived shorter than N2 wild type. There was no significant difference in the lifespan of *lin-29* mutant compared with N2 wild type.

The lifespan of *daf-2(-)* and *daf-16(-)* were analysed after *lin-28* RNAi. The results showed that the lifespan of *daf-2*, *lin-28* double mutant lived longer than a single mutant of *daf-2*, and there was no significant difference in *daf-16(-)*, *lin-28(-)* double mutant compared with *daf-16* single mutant, also the nuclear localization of DAF-16::GFP did not change significantly after *lin-28* RNA interference.

The expression of LIN-28 in short and long lifespan of worms was detected by western blot. The data showed that long lifespan of worms, including *daf-2* mutant, the expression level of LIN-28 was low. In short lifespan of worms, including *daf-16* mutant, expression level of LIN-28 was higher. In addition, Co-IP and RNAi were used to detect the interaction between *daf-16* and *lin-28*. The results implied that *lin-28* may perform a new function in regulating the lifespan of *C.elegans* by affecting *daf-16*. LIN-28 and DAF-16 could interact with each other. Over-expression of LIN-28 may inhibit the expression of DAF-16, and LIN-28 had abundance expression in *daf-16(-)* mutant.

Immunoprecipitation and MALDI-TOF-MS were used to identify the proteins that interact with LIN-28. The results showed that the proteins may interact with

LIN-28, including T22H9.3, a translation initiation factor 2C (eIF-2C), P granule protein PGL-2, hypothetical protein R13A1.10 and Aff\_ZK484.8.

The interaction between DAF-16 and LIN-14 which related to the lifespan regulation through the insulin/IGF-1 pathway was detected in the experiments. The study showed that in the background of *daf-2* mutation, if *lin-14* was loss of function, the expression of DAF-16 was increased; using immunoprecipitation and western blot, we found *lin-14* could interact with *daf-16*; four proteins were identified which may interacted with LIN-14, including Y55-F3C.9, R12E2.1, C50C3.7 and mitochondrial ATP-inhibitor.

In vertebrates, mouse *lin-41* and *lin-28* partial cDNA fragments were successfully amplified from the mouse embryonic day 9(E9.0) mRNA by RT-PCR. *lin-28* and *lin-41* cDNA were cloned into expression vector PET-32M for prokaryotic expression. The expression of LIN-41 and LIN-28 in mouse tissues and embryos from day 9 to 13 were detected by using RT-PCR and western blot. RT-PCR results showed that: *lin-41* mRNA was firstly detected in the embryo of day 9, then in day 10.5 and day 12 respectively, *lin-28* mRNA was firstly detected in the embryo of day 9 and day 10.5. Western blot results showed that the specific expression of LIN-41 were in the mouse heart, muscle, small intestine and day 9 to 12 embryo. LIN-28 was detected in the embryo of day 9, 10.5 and 12, also in the adult mouse heart, kidney, liver, muscle, small intestine and brain. In addition, more abundant expression of LIN-28 was detected in mouse heart and small intestine than in other tissues. Finally, Co-Immunoprecipitation combine MALDI-TOF-MASS was used to identify the potential proteins interacting with LIN-41, the results showed that several proteins may interact with LIN-41 in mouse, including leucine zipper transcription factor, epidermal growth factor receptor, hemagglutinin-4 (Galectin-4), mitochondria and Ras-related protein Rab-13.

Key words: *Caenorhabditis elegans*; heterochronic gene; lifespan; mouse

# 第1章 前言

## 1 异时性基因概述

异时性(heterochrony)是发育生物学中的一个重要概念<sup>[1, 2]</sup>, 简单来说异时性指个体发育事件的相对时序性在进化中可以改变。一直以来, 人们都认为发育时序性的改变是形态进化的主要力量<sup>[2, 3]</sup>。异时性的经典例子是蝾螈<sup>[4]</sup>。这种蝾螈(salamanders)不经历变态就达到性成熟, 以至于它的非生殖腺组织仍然保留其他蝾螈种类幼虫的特征。不同的蝾螈物种在甲状腺激素的产生或活性上显示出遗传学差异, 而甲状腺激素是诱导蝾螈从幼年期水栖状态过渡到成年期陆生状态的主要因素。

Smith 等<sup>[5]</sup>2003 已经证明关于异时性在进化特别是发育顺序的重要性。这些顺序包括在形态发生下组织内已经安排好的事件、细胞的增殖、分化、结构的出现, 甚至特定基因的产生。分析这些顺序的改变对异时性基因有着重要的意义。因为这些顺序可能独立于特定发育阶段包括胚胎的大小, 甚至整个发育速率。最重要的是这些改变可能反映了在细胞水平上发育调控机制的不连续性。

异时性基因的研究必须结合遗传学、分子生物学、细胞学和形态学方法<sup>[1, 6]</sup>。目前关于异时性基因的研究主要集中在果蝇、*Caenorhabditis elegans* (秀丽小杆线虫) 和脊椎动物等模式生物中。*C.elegans* 是一种自由生活线虫, 在实验室易于培养和观察, 生活周期短, 发育模式沿固定的细胞谱系 (cell lineage) 进行, 在胚胎发育和幼虫发育的不同阶段有典型的形态特征, 是发育生物学和遗传学研究的重要模式生物, 更是研究异时性的理想生物。

多细胞生物是由一个受精卵发育而来, 每一种发育, 包括细胞分裂周期、组织的生长、模式的出现、器官的形成, 甚至胚胎后期的发育都需要适当的时机<sup>[2, 6]</sup>。这些时序性都出现在哪些地方, 是否和空间调控机制一样, 还是需要特定的调控因子, 这些调控因子是如何组织起来形成调控网络来完成同步性和发育事件的? 科学家通过不同的研究, 包括实验遗传学去寻求答案。通过研究人们发现了 *C.elegans* 中的异时性途径<sup>[7]</sup>。这条途径有很多保守性组分, 使科学家们看到了解决这些问题的曙光。

*C.elegans* 的遗传学和分子生物学研究显示: 异时性基因控制着整个发育过

程的时间性和空间性，决定细胞的命运，从而保证各种器官的准确定位和适时发育，这包括细胞的分裂、分化、转化和部分组织细胞的凋亡<sup>[6]</sup>。在 *C.elegans* 中异时性基因编码调控发育时序性分子机制的组分，这种机制在动物不同类型的细胞到每一个幼虫阶段的特定细胞命运中都起作用。如果一个异时性基因发生突变，发育过程或者提前，或者推后<sup>[1, 6, 8]</sup>。异时性基因在特定时期的启动或者抑制，是发育时间性调控中的重要内容。异时性基因编码的各种调节因子，在 mRNA 翻译水平进行特异性地调节<sup>[9-11]</sup>，MicroRNAs 通过阶段特异性地抑制这些细胞命运调控子，在这种调节中也扮演着重要角色。最近的研究揭示了这种调控的复杂性。例如：激活一个正反馈回路可能使调控更强烈些，而且这种机制中一些组分在每一个阶段短时间地表达。异时性基因的研究揭示了这个机制是由控制不连续发育阶段的精确时间开关所组成的。

时序性在脊椎动物发育中很难看见<sup>[1, 4]</sup>，因为其发育阶段没有像在 *C.elegans* 中的不连续性，每一种组织可能被独立调控。脊椎动物的一些异时性同源基因也显示出时空性调控表达模式，可能会最终揭示出以前未曾了解的时序性机制。

目前在 *C.elegans* 中研究最多的异时性基因有：*lin-14*<sup>[12]</sup>、*lin-28*<sup>[13]</sup>、*lin-41*<sup>[14]</sup>、*lin-66*<sup>[15]</sup>、*hbl-1*<sup>[16-18]</sup>、*lin-42*<sup>[19]</sup>、*lin-29*<sup>[6, 14, 19-22]</sup>和 MicroRNA *lin-4*，*let-7*<sup>[23, 24]</sup>等。*C.elegans* 从幼虫发育到成虫要经历 4 个幼虫阶段，从 L1-L4 都要经历蜕皮。每个幼虫阶段都包括特定类型的细胞分裂，形成阶段特异性细胞类型。研究显示：*lin-14* 主要控制 L1/L2 的命运，*lin-28* 控制 L2/L3 的命运，*lin-41* 控制 L3/L4 的命运，*lin-29* 控制着成虫细胞命运。MicroRNA 通过结合在靶目标 mRNA 的 3'UTR 来抑制基因的表达，从而决定细胞的命运。

研究异时性基因的表达及在发育中的作用对了解生物的遗传发育规律、生理与发病机制有着重要的作用。最新的研究<sup>[25]</sup>发现异时性基因 *lin-28*、*lin-41*、*let-7* 和 *lin-4/mir-125* 在干细胞的分化中起着开关作用，证明了在线虫缝合细胞中的 miRNA 调控网络同样存在于哺乳动物正常和癌变的干细胞中。因此了解这些基因的功能有着重要的意义。以下是这些基因的详细介绍。

## 1.1 异时性基因 *lin-28* 的研究进展

### 1.1.1 *lin-28* 的结构

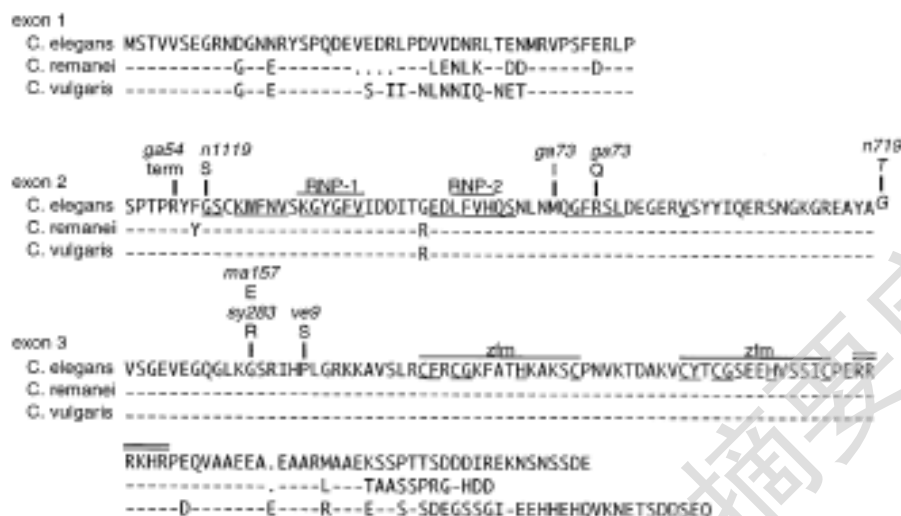
*C.elegans* 异时性基因 *lin-28* 是一种重要的细胞调控因子，含有 CSD (cold shock domain) 和 CCHC 锌指结构 (Retroviral-Type) [20, 30, 35]。*lin-28* 基因有三个外显子，OFR 含有 227 个氨基酸，在 3'UTR 含有 529 个核苷酸，外显子 2 编码与细菌同源的 CSD 蛋白域，CSD 蛋白是真核生物 Y-box 家族蛋白的一员。外显子 3 编码锌指结构的两个 RNA 结合域。与其他两物种 *C.remanei* 和 *C.vulgaris* 相比分别有 85%和 77%的相似性。外显子 2 在这些物种有 97%的相似性(图 1-3)。*lin-28* CSD 和其他家族成员相比有 45%相似性。在细菌和植物蛋白中比在脊椎动物中 Y-box 因子更相似。CSD 包含 RNP-1 和 RNP-2 结构域，RNP-1 和 RNP-2 结构域是 RNA 结合蛋白 RRM 家族的典型特征[36]。

LIN-28 类似于别的真核生物的 CSD 蛋白，因此它的 N 端 CSD 和 C 端结构域连在一起，C 端结构域包含有 RNA 结合位点。LIN-28 的 C 端区域有两个锌指结构域[13, 20]，每一个锌指结构都包含隔开的半胱氨酸和组氨酸残基[37]。和逆转录酶蛋白相似，每一个锌指结构包含有特异性结合位点和病毒基因组 RNA 的衣壳。逆转录酶形式的锌指结构在不同的细胞蛋白中都有发现，它通过结合单链的核酸起作用。

目前唯一已知的含有 CSD 和逆转录酶形式的锌指结构的蛋白是植物中的 GRP2 蛋白，这种蛋白和 LIN-28 不同，但是功能还不清楚。结构分析显示：CSD 和 RRM 蛋白可能以相同的方式与核酸相互作用。CSD 蛋白 FRGY2 是信使核蛋白(mRNPs)的主要的组分[38]，在爪蟾卵母细胞已经被证明是一种序列特异性 RNA 结合蛋白。CSD 蛋白 p50 是细胞质 mRNPs 的主要组分。在兔网状细胞中，这些蛋白结合形成 mRNPs，通过高比率蛋白-RNA 来结合 mRNAs，从而使 mRNA 不能翻译。

*lin-28* 的 3'UTR 含有 15nt 的互补序列(LCE)，这些位点都是转录后调控所必须的[13]。类似于 *lin-14* 的 3'UTR 的 7 个位点[39]，*lin-4* 的活性和 *lin-4* 的 LCE 都是 *lin-28* 阶段性调控所必须的，去除 LCE 就会产生 *lin-28* 功能加强型，此时突变体表现出延迟的表型。除了 LCE 之外，*lin-14* 和 *lin-28* 的 3'UTR 没有其他明显的相似性。一般来说前体 *lin-14* 的 3'UTR 有 1600nt，*lin-28* 的 3'UTR 有 529nt，

每一种的序列在同源基因间都很保守，但是在另种基因间并不相似。



(引自 Eric G. Moss and Victor Ambro 1997)

图 1-1 *lin-28* 基因锌指结构和 CSD 结构域

Fig. 1-1 CSD and CCH C of *lin-28*

*C. elegans*、*C. remanei* 和 *C. vulgaris* 的氨基酸序列比对。外显子 2 含有 CSD 保守的氨基酸，外显子 3 含有锌指结构。下划线的为 CSD 的 RNP1、RNP2 和锌指结构 ZFM。

### 1.1.2 *lin-28* 功能

异时性基因 *lin-28* 在 *C. elegans* 中编码三种细胞质蛋白，一对大约 36KDa，一个 26KDa，主要在 L1 期和 L2 期表达<sup>[30]</sup>。Moss 等<sup>[20]</sup>用转基因虫株 LIN-28::GFP 发现在 L1 期，*lin-28* 荧光主要分布在皮下细胞、肌肉和神经元细胞，但是在生殖系中没有表达。其他的细胞类型如侧部和腹部的皮下细胞、头部神经细胞、体壁肌肉等也有表达。这些荧光在神经元细胞和皮下细胞中很强烈，有时在肠道内有微弱的表达。

LIN-28::GFP 在胚胎晚期和 L1 阶段表达量最丰富，在 L2 期也可以检测到，但是表达量减少很多。在 L3 期和 L4 期几乎没有表达。Northern 和 RNase 保护实验显示：*lin-28* mRNA 在整个胚后发育阶段都有表达。荧光定位实验发现 *lin-28* 在所有这些细胞的细胞质中有表达，偶尔在细胞核中也可以检测到。

在成虫中 *lin-28* 主要分布在生殖系统、阴门肌肉和体壁肌肉中，在一些不确定的细胞核中也有表达。LIN-28 在 L1 阶段表达含量丰富，随后表达量减少，在



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