

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00035

## 秀丽隐杆线虫经福尔马林处理后上调表达基因的分析

陈星桃<sup>1,2</sup> 王桂堂<sup>1</sup>

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:**秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)是一种重要的模式生物, 目前已经被广泛应用到生物对各种驱虫剂抗性机制的研究中。福尔马林被普遍用于鱼类寄生虫病的防治中, 但是由于长期的应用, 许多寄生虫对它产生了一定的抗药性。研究以秀丽隐杆线虫为研究对象, 分析了它在福尔马林刺激下基因表达的改变情况。结果显示, 经福尔马林处理后差异表达的有 676 个克隆, 通过斑点杂交技术进一步筛选, 对其中差异显著的 161 个克隆进行了测序分析。测序结果经 BLAST 分析发现: (1)细胞凋亡相关基因的表达发生上调, 这些基因编码包括线粒体呼吸链相关蛋白、含 TPR 序列的蛋白 SGT-1、热休克蛋白、氧化应激相关蛋白、胞吞过程相关蛋白、DNA 复制和修复相关蛋白以及其他一些重要的凋亡相关蛋白; (2)编码重要的转录调节因子和信号转导相关蛋白如转录激活因子 FosB/c-Fos、G 蛋白、细胞周期蛋白 B、钙结合蛋白、核小体装配蛋白 NAP-1 等的基因的表达发生上调; (3)能量代谢和蛋白质、脂肪、氨基酸代谢途径中的有些基因的表达也发生上调; (4)除了以上已知功能的基因外, 还有一些未命名蛋白质基因。这说明福尔马林对秀丽隐杆线虫的影响除了诱导细胞凋亡之外, 还影响其他细胞代谢活动的改变。实验为进一步研究生物体对福尔马林的抗性机制奠定了一定的基础。

**关键词:**秀丽隐杆线虫; 福尔马林; 抑制性差减杂交; 斑点杂交

中图分类号: Q344<sup>+</sup>.13 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)01-0035-08

秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)作为重要的模式生物, 广泛应用于寄生虫对各种驱虫剂抗性机制的研究中。筛选抗苯并咪唑的秀丽隐杆线虫突变体, 发现突变体中 *ben-1* 基因编码的  $\beta$ -微管蛋白发挥重要作用, 其下调表达或药物结合位点的改变都赋予秀丽隐杆线虫抗药性<sup>[1]</sup>。在研究驱虫剂如左旋咪唑、噻嘧啶的作用机制时, 发现了秀丽隐杆线虫的 L 型和 N 型两类烟碱乙酰胆碱受体 nAChRs 及其亚基组成<sup>[2]</sup>。

福尔马林是一种常见的灭虫药物, 对体外寄生虫与真菌、细菌甚至病毒的感染, 都有不错的治疗效果。鱼类体外寄生虫包括车轮虫(*Trichodina*)、小瓜虫(*Ichthyophthirius*)、隐鞭虫(*Cryptobia*)、斜管虫(*Chilodonella*)、口丝虫(*Costia*)、指环虫(*Dactylogyrus*)

等许多种。但是, 由于长期地应用, 许多寄生虫对福尔马林产生了一定的抗药性<sup>[3]</sup>。本研究就是通过福尔马林反复刺激秀丽隐杆线虫, 运用抑制性差减杂交技术分析其基因表达的改变, 从而了解低等无脊椎动物(包括寄生虫)对福尔马林产生抗性的机理。

抑制性差减杂交技术(Suppression subtractive hybridization, SSH)是一种筛选差异表达基因的简单而高效的方法, 它将抑制 PCR 和差减杂交结合, 富集差异表达的基因<sup>[4]</sup>, 被用于发育、疾病、组织特异性等各种差异表达基因的筛选<sup>[5]</sup>。此外, SSH 技术还应用于寻找与寄生虫不同发育阶段相关的差异表达基因、与寄生虫抗药性相关的差异表达基因以及其他相关基因的研究<sup>[6]</sup>。地高辛探针标记系统是基于 ELISA 原理的高敏感性的非放射性 DNA 标记检测

收稿日期: 2008-05-05, 修订日期: 2009-01-30

基金项目: 湖北省科技攻关项目(2007AA203A01)资助

作者简介: 陈星桃(1982—), 女, 汉族, 湖北荆州人; 硕士研究生; 研究方向为寄生虫学。E-mail: free--9@tom.com

通讯作者: 王桂堂, E-mail: gtwang@ihb.ac.cn

系统, 广泛应用于斑点杂交、Northern blot 杂交、蛋白质印迹、菌落或噬菌斑筛选、原位杂交等多方面<sup>[7]</sup>。本研究以秀丽隐杆线虫为对象, 利用抑制性差减杂交技术和斑点杂交技术构建了福尔马林刺激下差异表达的 cDNA 文库, 为进一步研究秀丽隐杆线虫对福尔马林的抗性机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 秀丽隐杆线虫的收集

将秀丽隐杆线虫接种到含福尔马林为 0.2‰、0.4‰、0.6‰、0.8‰和 1‰的 NGM 培养基中(参考相关文献<sup>[8]</sup>浓度), 发现在 0.2‰的培养条件下秀丽隐杆线虫不受到任何影响, 而在 1‰的培养条件下秀丽隐杆线虫全部死亡。在 0.8‰的培养条件下, 接种的秀丽隐杆线虫在最初大部分死亡之后, 有少数存活, 一周之后长满整个平板, 传代发现其后代在含 0.8‰福尔马林的培养基中能正常生活。实验组: 将秀丽隐杆线虫接种到添加 0.8‰福尔马林的 NGM 培养基上进行培养, 传代一个月。对照组: 将秀丽隐杆线虫接种到涂有大肠杆菌 OP<sub>50</sub> 株系的 NGM 培养基上进行培养。

### 1.2 抑制性差减文库的构建

按照总 RNA 提取试剂盒(TRIZOL® Reagent, MRC 公司)的操作说明, 分别提取实验组和对照组线虫的总 RNA, 并用分光光度计和凝胶电泳检测 RNA 的提取质量。按 mRNA 纯化试剂盒(PolyATtract mRNA Isolation Systems, Promage 公司)的操作说明纯化 mRNA, 并用分光光度计和凝胶电泳检测 mRNA 纯化质量。分别取实验组和对照组 mRNA 2 µg, 按抑制性差减杂交试剂盒(BD PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit User Manual, Clontech 公司)的操作说明, 将 mRNA 反转录、合成双链 cDNA、*Rsa* I 酶切。实验组和对照组酶切后的 cDNA 分别作为 tester 和 driver, 将 tester 分成两份后分别加上接头 Adaptor 1 和 Adaptor 2R, 经 68℃与 driver 两轮杂交, 富集与对照组相比表达差异的实验组 cDNA 片段, 得到抑制性差减杂交 cDNA 文库。

### 1.3 差异表达片段的扩增

差减杂交 cDNA 经 PCR 两轮扩增, 第二次 PCR 产物连接到 pTA2 载体上, 转化大肠杆菌 DH5α, 涂于 Amp<sup>r</sup>/X-Gal/LB 平板, 挑选白斑克隆。利用接头引物对克隆进行扩增, 电泳筛选阳性单克隆。

### 1.4 斑点杂交

按照地高辛标记试剂盒(DIG High Primer DNA Labeling and Detection Kit I, Roche 公司)的操作说明, 将酶切后的 driver 双链 cDNA 和第二次 PCR 产物分别标记 DIG-High Primer 探针, 于 37℃孵育 20h, 检测探针标记效率。将阳性单克隆的 PCR 产物变性后分别点在两张尼龙膜上, 烤膜后加入制备的地高辛标记探针, 42℃杂交过夜, 显色。筛选在两张膜上有显著差异的阳性克隆, 进行测序分析。

### 1.5 表达差异基因的检测与生物信息学分析

对差异水平 3 倍以上的基因进行测序, 在秀丽隐杆线虫的网站(<http://www.wormbase.org/>)中进行 BLAST 比对分析。

## 2 结果

### 2.1 总 RNA 的提取和 mRNA 的纯化

正常线虫与福尔马林处理线虫的总 RNA 的  $A_{260}/A_{280}$  值在 1.8—2.0 之间, 经 0.7%琼脂糖凝胶电泳分析, 18S 和 28S rRNA 两条带清晰(图 1), 表明总 RNA 未降解。经试剂盒纯化的 mRNA 的  $A_{260}/A_{280}$  值在 1.8—2.0 之间, 电泳弥散带在 750 bp—2 kb 之间(图 2)。分子量标准从大到小分别为 2 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp(下同)。

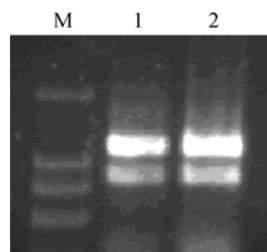


图 1 对照组和实验组总 RNA 电泳图

Fig. 1 Total RNA isolated from the control and test groups  
M 为 DL2000 Marker; 1 和 2 分别是对照组和实验组的 rRNA  
M. DL2000 DNA molecular weight marker; Lanes 1 and 2 represent the control and test group, respectively

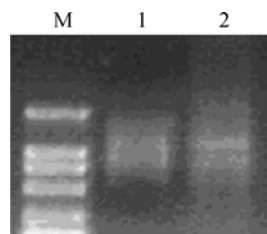


图 2 mRNA 纯化电泳图

Fig. 2 mRNA purified from the control and test groups  
M 为 DL2000 Marker; 1 和 2 分别是对照组和实验组 mRNA  
M. DL2000 DNA molecular weight marker; Lanes 1 and 2 represent the control and test group, respectively

## 2.2 差减文库的构建

分别取正常组和实验组 mRNA 2  $\mu$ g 进行反转录, 合成双链 cDNA。以 *Rsa* I 酶切, 核酸电泳分析酶切结果, 片段大小集中在 500 bp 左右(图 3), 说明酶切效果较好。将实验组酶切后产物加上特异性接头, 用特异性引物 tub-F/tub-R 和试剂盒提供的 PCR Primer1 引物检测接头连接效率, 电泳分析结果(图 4), 表明实验组 cDNA 有 25% 以上接上了接头。以对照组作 driver 进行两轮差减杂交, PCR 及电泳分析差减杂交效率(图 5), 说明差减效果较好。收集白色菌落, 利用接头两侧的通用序列作引物进行 PCR 扩增, 共得到 676 个阳性单克隆, 阳性率为 78%, 80% 的片段分布在 150—500 bp 之间(图 6)。

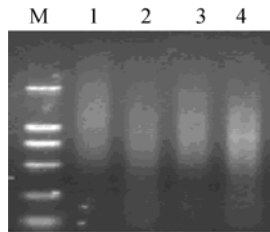


图 3 *Rsa* I 酶切电泳图

Fig. 3 cDNA synthesis before (lanes 1,3) and after (lanes 2,4) *Rsa* I digestion of the control (lanes 1,2) and test (lanes 3,4) groups  
M 为 DL2000 Marker; 1 和 2 是酶切前后对照组 cDNA; 3 和 4 是酶切前后实验组 cDNA

M. DL2000 DNA molecular weight marker

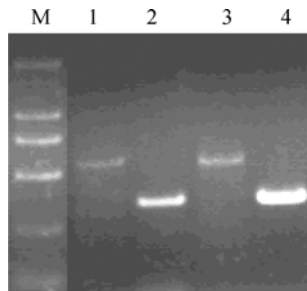


图 4 Tester-1 cDNA 和 Tester-2 cDNA 的接头连接效率检测

Fig. 4 Results of the adaptor ligation efficiency analyzed by PCR using Tester-1 cDNA and Tester-2 cDNA as templates

M 为 DL2000 Marker; 1 和 3: 用 PCR Primer 1 和 tub-R 引物做的 PCR 产物; 2 和 4: 用 tub-F 和 tub-R 作引物的 PCR 产物

M. DL 2000 marker; 1 and 3. PCR products generated by PCR Primer 1 and tub-R; 2 and 4. PCR products generated by tub-F and tub-R

## 2.3 斑点杂交

将获得的 676 个阳性单克隆分别点在两张尼龙膜上, 用对照组酶切后的双链 cDNA 和差减杂交产物作探针进行杂交, 显色检测阳性克隆(图 7)。

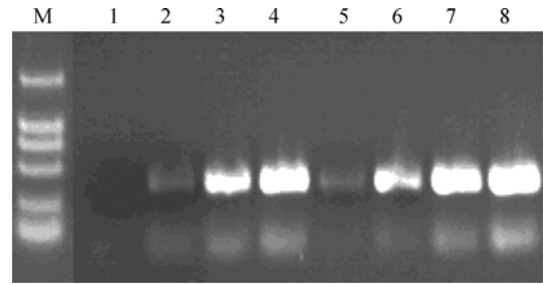


图 5 差减杂交效率检测

Fig. 5 Reduction of tubulin abundance by suppression subtraction hybridization

M 为 DL2000 Marker; 1、2、3、4 和 5、6、7、8 分别为差减后和差减前 18、23、28、33 个循环后的产物

M. DL2000 DNA molecular weight marker; Lanes 1—4. subtracted secondary PCR products; lanes 5—8. unsubtracted secondary PCR products; Lanes 1 and 5. 18 cycles; Lanes 2 and 6. 23 cycles; Lanes 3 and 7. 28 cycles; Lanes 4 and 8. 33 cycles

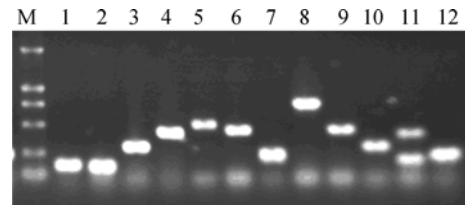


图 6 PCR 检测差减文库的克隆

Fig. 6 Identification of inserted cDNA fragments in the subtractive library

M 为 DL2000 Marker; 1—12 为随机克隆

M. DL2000 DNA molecular weight marker; Lanes. 12 randomly picked clones from the subtractive library

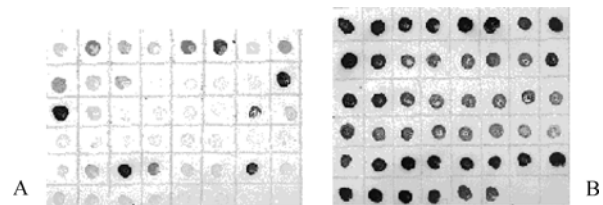


图 7 斑点杂交筛选含有差异 cDNA 片段的克隆

Fig. 7 Screening of colonies with differential cDNA fragments from subtractive cDNA library by dot blot analysis

分别用 Driver cDNA(A)和差减 cDNA 的第二次 PCR 产物(B)做探针进行杂交

Hybridized with control cDNA library probes (A) and subtractive cDNA library probes (B), respectively

对差异明显的 161 个克隆进行测序分析。测序结果经 BLAST 比对发现, 这些基因编码的蛋白质包括细胞凋亡相关的蛋白如线粒体呼吸链蛋白、含 TPR 区蛋白 SGT-1、热休克蛋白、氧化应激蛋白、胞吞相关蛋白、DNA 复制和修复相关蛋白, 转录调节因子和信号转导途径相关蛋白, 参与细胞物质和能量代谢相关蛋白。此外, 实验还筛选到 18 个核糖体蛋

白大小亚基基因、24 个假定蛋白、9 个假定未命名蛋白及 13 个假定保守蛋白。部分结果如表 1 所示。

表 1 部分阳性克隆序列比对结果  
Tab. 1 Results of some sequence by Blast analysis

| 序 号<br>Number | 保守同源基因族<br>NCBI KOG                                                         | 功能<br>Function | 同源性<br>Homology | E 值<br>E value |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------|----------------|
| 583           | NADH-ubiquinone oxidoreductase                                              | 细胞凋亡           | 100%            | 1e-17          |
| 794           | Cytochrome <i>c</i> oxidase, subunit IV                                     | 细胞凋亡           | 100%            | 2e-17          |
| 529           | Cytochrome <i>c</i>                                                         | 细胞凋亡           | 96%             | 4e-08          |
| 380           | TPR repeat-containing protein SGT-1                                         | 细胞凋亡           | 100%            | 2e-60          |
| 707           | Endoplasmic reticulum glucose-regulated protein (GRP94/endoplasmic)         | 细胞凋亡           | 99%             | 2e-52          |
| 528           | Molecular chaperone (DnaJ superfamily)                                      | 细胞凋亡           | 97%             | 2e-14          |
| 607           | MAP kinase-activated protein kinase 2                                       | 细胞免疫           | 100%            | 2e-05          |
| 132           | Thioredoxin, nucleoredoxin and related proteins                             | 氧化应激           | 100%            | 5e-19          |
| 517           | Medium subunit of clathrin adaptor complex                                  | 细胞胞吞           | 100%            | 1e-23          |
| 284           | CDC42 Rho GTPase-activating protein                                         | 细胞凋亡           | 100%            | 3e-34          |
| 508           | Deoxyribonuclease II                                                        | 细胞凋亡           | 100%            | 5e-12          |
| 431           | Transcriptional activator FOSB/c-Fos and related bZIP transcription factors | 基因转录           | 99%             | 3e-136         |
| 271           | G protein beta subunit-like protein(RACK1)                                  | 信号转导           | 98%             | 2e-17          |
| 737           | Carnitine O-acyltransferase CPTI                                            | 能量代谢           | 100%            | 3e-16          |
| 455           | Ubiquitin-protein ligase                                                    | 蛋白降解           | 100%            | 5e-48          |
| 566           | Predicted lipase                                                            | 脂肪代谢           | 97%             | 2e-52          |
| 117           | 40s ribosomal protein s10                                                   | 核糖体            | 100%            | 5e-24          |
| 129           | Hypothetical protein Y65B4BL.1                                              | 未知蛋白           | 100%            | 2e-32          |

### 3 讨 论

本实验以秀丽隐杆线虫为研究对象,应用抑制差减杂交技术和斑点杂交技术,筛选经福尔马林处理后与正常培养线虫相比上调表达的基因,这些基因编码的蛋白涉及细胞凋亡、基因转录、信号转导及细胞代谢等生命活动过程,主要分为以下几类:

#### 3.1 细胞凋亡相关蛋白

细胞凋亡是多细胞生物在发育过程中,一种由基因控制的主动的细胞生理性自杀行为。秀丽隐杆线虫是最早用于分析细胞凋亡的模式生物,它在个体发育过程中产生的 1090 个细胞就有 131 个细胞发生凋亡。分子生物学研究表明,在秀丽隐杆线虫细胞凋亡过程中,抑制细胞凋亡的基因 *ced-9* 和促进细胞凋亡的基因 *ced-3/ced-4* 发挥着重要作用<sup>[9]</sup>。

**线粒体呼吸链蛋白** 本实验筛选到 NADH-辅酶 Q 氧化还原酶、琥珀酸脱氢酶-辅酶 Q 氧化还原酶、细胞色素 *c* 氧化酶等相关蛋白及细胞色素 *c*; 还有  $F_0F_1$ -ATP 合成酶参与线粒体中 ATP 的合成。细胞色素 *c* 在介导细胞内凋亡途径中发挥重要作用,

它通过与接头蛋白 Apaf-1(Apoptotic protease activating factor-1)结合,激活 caspase-9,活化的 caspase-9 起始 caspase 级联反应,最终导致 caspase-3 的激活,促进细胞凋亡<sup>[10]</sup>。

**含 TPR(Tetratricopeptide repeats)序列蛋白 SGT-1(Small glutamine-rich TPR-containing protein)** 含有 TPR 结构域的蛋白如 CHIP(C-terminus of Hsp70 interacting protein)、TPR2 等均以不同的方式参与细胞凋亡,TRP 基序在抗凋亡蛋白 Hsp70 和 Hsc70 相互作用及其分子伴侣活性调节方面具有重要作用<sup>[11]</sup>。SGT 介导多种生物学过程如细胞周期控制、转录抑制、蛋白质折叠及运输和神经发生。同时,SGT 可促进 Caspase 家族蛋白的活化并将其底物多聚腺苷聚合酶(Poly ADP-ribose polymerase, PARP)裂解,而且促进细胞色素 *c* 的释放,具有促凋亡功能<sup>[12]</sup>。

**热休克蛋白** 细胞凋亡往往伴随着热休克蛋白基因的上调表达,GRP94(Glucose-regulated protein)是内质网分子伴侣,属于 HSP90 家族,参与 RhoA 和 caspases 激活的上皮细胞凋亡<sup>[13]</sup>; 伴侣素

(Hsp60)复合物组分 TCP-1 亚基, 属真核细胞胞质中的分子伴侣系统, 细胞凋亡诱导其在细胞质中聚集, 促进或抑制细胞凋亡<sup>[14]</sup>; 热休克蛋白基因 hsp-2.1 编码  $\alpha$ -crystallins, 属于 stress-70 家族成员, 具有协助蛋白折叠和调节蛋白间相互作用的功能, 参与各种环境诱导的氧化应激<sup>[15]</sup>; DnaJ(Hsp40)分子伴侣, 作为 DnaK(Hsp70)的辅助因子, 参与蛋白质的折叠<sup>[16]</sup>。

**氧化应激相关蛋白** 细胞凋亡会引起 DNA 的降解和高钙离子流, 同时会导致氧化应激反应。促分裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)免疫途径是秀丽线虫先天性免疫的重要组成部分, 本实验筛选到该途径上游的蛋白 Ras 抑制蛋白和 MAPKK2 蛋白, Ras 蛋白主要传递生长分化信号, 激活 MAPK 信号通路, Ras/MAPK 途径还参与生殖细胞的凋亡过程<sup>[17]</sup>。除此之外, 本实验还筛选到硫氧还蛋白, 与硫氧还蛋白还原酶、NADPH 一起构成硫氧还蛋白系统, 通过修复蛋白二硫键或清除活性氧(ROS)来维持细胞内氧化还原平衡; 硫氧还蛋白还参与调节 ASK-1(Apoptosis signal-regulating kinase-1)的活性, 抑制细胞凋亡<sup>[18]</sup>; 胱氨酸运载体基因在胱氨酸的供应和谷胱甘肽的合成中起着关键作用, 抑制胱氨酸的吸收会引起 caspase 诱导的细胞凋亡<sup>[19]</sup>; 精氨酸 N-甲基转移酶(PRMT)能水解含甲基化精氨酸的蛋白, 生成非对称性二甲基精氨酸, 后者通过抑制一氧化氮合酶减少 NO 含量, 而 NO 在免疫系统、神经系统中均发挥重要作用。

**胞吞过程相关蛋白** 细胞凋亡除了 caspase 途径外, 还有不依赖 caspase 途径的自噬途径<sup>[20]</sup>, 就是凋亡小体形成之后, 被吞噬细胞识别、吞噬、运输。本实验筛选到几种胞吞相关蛋白: 磷脂酶 D(PLD), PLD 水解磷脂酰胆碱产生磷脂酸、二脂酰甘油与溶血磷脂酸是细胞信号转导的重要途径之一, PLD 激活是受体介导的胞吞和胞吐过程的关键步骤; 网格蛋白, 是囊泡表面覆盖的一层纤维丝状蛋白, 在内吞过程中促进有被小窝的下凹。

**DNA 复制和修复相关蛋白**  $\alpha$ -螺旋蛋白, 属于 DNA 复制复合体蛋白, 参与 DNA 的复制和修复; RNA 结合蛋白 SART3(RRM 超家族), 其中 RRM 基序是 DNA 修复基因家族成员; 脱氧尿苷三磷酸酶(dUTPase), 是生物体遗传和基因复制的重要水解酶, 它可以防止 dUTP 在 DNA 合成中的插入和错配, 维

护 DNA 复制的保真性和降低生体发生突变的频率, 同时也是凋亡相关的蛋白<sup>[21]</sup>。这些 DNA 复制、修复蛋白基因的上调表达可能与凋亡引起的 DNA 的损伤有关。

**其他凋亡相关蛋白** CDC42 Rho GTPase 及其活化蛋白, CDC42 除了调节白细胞的极化性、抑制 ROS 的产生外, 还在 Fas 途径的下游, 受 caspase-3 和 caspase-7 的剪接, 可能参与细胞凋亡速率的调节<sup>[22]</sup>; 半乳凝素(Galectin)和凝集素(Lectin), 半乳凝素参与免疫调节、细胞黏附、细胞增殖、细胞凋亡、信号转导等一系列生物学功能, 还参与 Fas 凋亡途径, 激活 caspase-8<sup>[23]</sup>, 而 LEC-2 在细胞增殖、细胞凋亡、细胞黏附方面发挥重要作用; 与脊椎动物肿瘤坏死因子受体(Tumor necrosis factor receptor, TNFR)相似蛋白, 这类受体与细胞外相应的配体结合后即可激活 caspases, 可能参与 K 淋巴细胞介导的细胞外凋亡途径<sup>[24]</sup>; DNA 酶 II, 由秀丽隐杆线虫的 *nuc-1* 基因编码, 参与细胞凋亡过程中 DNA 的降解<sup>[9]</sup>; 核纤层蛋白, 虽然在秀丽线虫中核纤层蛋白的降解不是凋亡必需, 但细胞凋亡往往伴随着核纤层蛋白的失活和降解, 导致细胞形状的改变, 从而促进细胞凋亡; 组蛋白 H1 结合蛋白, 可能通过识别染色质构象信息参与线粒体诱导的细胞凋亡途径。

细胞凋亡及免疫应激相关基因的表达可能与福尔马林对生物体的毒害作用以及生物体对外界刺激的免疫防御相关。

### 3.2 基因转录和信号转导相关蛋白

在福尔马林的刺激作用下, 一些基因转录和信号转导基因的上调表达。

**转录调节因子** 转录激活因子 FosB/c-Fos 及相关 bZIP 转录因子, 转录因子 c-Fos 的表达受 MAPK 的调节, 与 ATF(Activating transcription factor)、Jun 等构成转录活化蛋白 AP-1(Activating Protein 1), 调节基因转录<sup>[25]</sup>; 翻译抑制物及相关 RNA 结合蛋白 PuF(Pumilio and FBF [fem-3 binding factor]), Puf 蛋白是 3'-UTRs 的反式作用因子, 具有下调 MAPK mRNA 表达的功能<sup>[26]</sup>; RNA 结合蛋白 SART3(RNA recognition motif, RRM 超家族), 参与 RNA 前体的剪接、RNA 的细胞定位、RNA 的稳定性等多种转录后调控过程; 鸟苷酸转移酶(mRNA 加帽酶), 与 RNA/RNP 相互作用, 参与 mRNA 的成熟。

此外, 本实验还筛选到  $C_2H_2$  锌指转录因子, 作为 TATA 盒结合蛋白, 参与转录激活及 DNA 结合活性的修饰; RNA 聚合酶 II, 通过“TATA”框转录大多数基因; 肽酰-脯氨酰-顺反式异构酶则参与转录因子的活化; 非组蛋白 HMG 盒蛋白、核小体改造因子亚基、核小体装配蛋白 NAP-1 可能通过调节核小体构象调节基因的表达。

**信号转导途径蛋白** G 蛋白、蛋白激酶 C 和 RACK1(Receptor of Activated C Kinase), RACK1 与 G 蛋白  $\beta$  样蛋白同源, 通过稳定 PKC 的活性提高底物的磷酸化水平, 三者在各种信号转导中发挥重要作用<sup>[27]</sup>; 含 WD40 区蛋白 DMR-N9, 对小鼠中该蛋白氨基酸序列研究发现, 可能在信号转导、细胞调控方面发挥重要功能<sup>[28]</sup>; 细胞周期蛋白 B, 与细胞周期蛋白依赖性激酶(Cyclin-dependent kinase, CDK)组成 CDK1, 通过使底物蛋白磷酸化(如将组蛋白 H<sub>1</sub> 磷酸化导致染色体凝缩、核纤层蛋白磷酸化使核膜解体)等调节下游细胞周期事件; 蛋白磷酸酶催化蛋白质的磷酸化, 参与信号传导和细胞周期调控; 主要精子蛋白(Major Sperm Protein, MSP)参与卵子成熟信号传递。氯离子流诱导蛋白, 氯离子在 GABA 神经信号传导中发挥重要作用, 能降低细胞膜阻抗, 引起突触后细胞静息电位轻微的去极化, 干扰神经信号传递<sup>[29]</sup>; 神经生长因子受体 TRKA, 属于免疫球蛋白家族, 定位于胆碱能突触, TrkA 作为神经生长因子的功能性受体, 激活酪氨酸激酶信号传递系统<sup>[30]</sup>; 钙结合蛋白和肌钙蛋白参与钙离子的信号传导。

### 3.3 细胞代谢相关蛋白

**能量代谢** 细胞凋亡和能量代谢是细胞存活的关键决定因素, 生长因子如 IGF-1、IL-3 等能刺激葡萄糖转换和己糖激酶转移到线粒体, 从而促进糖酵解, 同时抑制细胞凋亡<sup>[31]</sup>。而且, 糖酵解、耗氧量和 ATP 水平等新陈代谢活动的降低都会减少蛋白质的合成, 导致细胞凋亡。本实验筛选到肌酸激酶、肉毒碱 O-酰基转移酶、酰基辅酶 A 合成酶、NADP 依赖的异柠檬酸脱氢酶、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶、甲基丙二酸单酰辅酶 A 变位酶、苹果酸合酶/异柠檬酸裂解酶、转酮醇酶、肌-肌醇-1-磷酸合酶、糖转运体、O- N-乙酰葡萄糖胺转移酶(OGT)等参与不同途径的能量代谢过程。

**蛋白质代谢** 翻译起始因子、翻译延伸因子、

丝氨酰-tRNA 合成酶、糖基转移酶、半乳糖基转移酶、多核苷酸甘露糖转移酶等参与蛋白质的合成和修饰。泛素、泛素 C-末端水解酶、泛素蛋白连接酶、金属肽酶、26S 蛋白酶体调节复合物、空泡分选蛋白则参与蛋白质的降解过程。

**脂肪与氨基酸代谢** 长链脂肪酸延伸酶、醛酮还原酶、脂肪酶参与脂肪酸的代谢。氧固醇结合蛋白参与甾醇转运及其信号传导。鸟氨酸转氨酶、犬尿素水解酶、谷氨酸脱氢酶分别参与脯氨酸、色氨酸、谷氨酸的代谢。

**其他相关蛋白** 本实验还筛选到玻璃酸酶、半胱氨酸蛋白酶、膜转运复合体 Retromer、 $Na^+/K^+$  ATPase、空泡  $H^+$ -ATPase、胶原、软骨素蛋白多糖、膜蛋白、RNA 解旋酶、卵黄蛋白及一些未命名蛋白。

福尔马林除了用于防治鱼类寄生虫病之外, 还用于标本的固定, 但由于它能引起 DNA 与 DNA、DNA 与蛋白质、蛋白质与蛋白质之间的交联, 所以会影响所提取标本 DNA 的质量<sup>[32]</sup>。本研究中, 福尔马林对秀丽线虫的影响除了诱导细胞凋亡、基因转录之外, 包括对 DNA 和蛋白质等相关基因表达的影响, 还伴随着能量代谢、营养物质合成等改变。在实际应用过程中, 福尔马林在用于治疗寄生虫病的同时, 往往也会影响到宿主本身的生长发育<sup>[33]</sup>。所以, 要控制福尔马林的用量, 达到安全指标, 减少福尔马林对宿主的损伤及环境的危害。

### 参考文献:

- [1] Driscoll M, Dean E, Reilly E, *et al.* Genetic and molecular analysis of a *Caenorhabditis elegans* beta-tubulin that conveys benzimidazole sensitivity [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1989, **109**: 2993—3003
- [2] Fleming J T, Squire M D, Barnes T M, *et al.* *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes lev-1, unc-29, and unc-38 encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits [J]. *The Journal of Neuroscience*, 1997, **17**: 5843—5857
- [3] You B, Bai Y. Treatment of freshwater fish Ichthyophthiriasis [J]. *China Fisheries*, 2007, **91**: 81 [尤斌, 白燕. 淡水鱼小瓜虫病的治疗. 中国水产, 2007, **91**: 81]
- [4] Patel M, Sive H. PCR-based subtractive cDNA cloning [J]. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2001, **25**: Unit 25B 2
- [5] Diatchenko L, Lukyanov S, Lau Y F, *et al.* Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes [J]. *Methods in Enzymology*,

- 1999, **303**: 349—380
- [6] Han H Y, Lin J J, Huang B. The application of suppression subtractive hybridization in parasitology [J]. *Letters in Biotechnology*, 2006, **50**—55 [韩红玉, 林矫矫, 黄兵. 抑制性消减杂交技术在寄生虫学研究中的应用. *生物技术通报*, 2006, **50**—55]
- [7] Holtke H J, Ankenbauer W, Muhlegger K, *et al.* The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids—an overview [J]. *Cellular and Molecular Biology* (Noisy-le-Grand, France), 1995, **41**: 883—905
- [8] Robert C J, David L B. Formaldehyde mutagenesis of the eT1 balanced region in *Caenorhabditis elegans*: Dose-response curve and the analysis of mutational events [J]. *Mutation Research*, 1988, **201**: 137—147
- [9] Ranganath R M, Nagashree N R. Role of programmed cell death in development [J]. *International Review of Cytology*, 2001, **202**: 159—242
- [10] Zou H, Li Y, Liu X, *et al.* An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9 [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**: 11549—11556
- [11] Angeletti P C, Walker D, Panganiban A T. Small glutamine-rich protein/viral protein U-binding protein is a novel cochaperone that affects heat shock protein 70 activity [J]. *Cell Stress & Chaperones*, 2002, **7**: 258—268
- [12] Wang H, Shen H, Wang Y, *et al.* Overexpression of small glutamine-rich TPR-containing protein promotes apoptosis in 7721 cells [J]. *FEBS Letters*, 2005, **579**: 1279—1284
- [13] Lu Q, Harrington E O, Newton J, *et al.* Inhibition of ICMT induces endothelial cell apoptosis through GRP94 [J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2007, **37**: 20—30
- [14] Chandra D, Choy G, Tang D G. Cytosolic accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release: evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3 [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**: 31289—31301
- [15] Hamer B, Hamer D P, Muller W E, *et al.* Stress-70 proteins in marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of environmental pollution: a field study [J]. *Environment International*, 2004, **30**: 873—882
- [16] Houry W A. Chaperone-assisted protein folding in the cell cytoplasm [J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2001, **2**: 227—244
- [17] Gumienny T L, Lambie E, Hartwig E, *et al.* Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline [J]. *Development* (Cambridge, England), 1999, **126**: 1011—1022
- [18] Kondo N, Ishii Y, Kwon Y W, *et al.* Lipid raft-mediated uptake of cysteine-modified thioredoxin-1: apoptosis enhancement by inhibiting the endogenous thioredoxin-1 [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2007, **9**: 1439—1448
- [19] Chung W J, Lyons S A, Nelson G M, *et al.* Inhibition of cystine uptake disrupts the growth of primary brain tumors [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2005, **25**: 7101—7110
- [20] Samara C, Tavernarakis N. Autophagy and cell death in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2008, **14**: 97—115
- [21] Brockstedt E, Rickers A, Kostka S, *et al.* Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line. Cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by caspase 3 [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, **273**: 28057—28064
- [22] Tu S, Cerione R A. Cdc42 is a substrate for caspases and influences Fas-induced apoptosis [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**: 19656—19663
- [23] Brandt B, Buchse T, Abou-Eladab E F, *et al.* Galectin-1 induced activation of the apoptotic death-receptor pathway in human Jurkat T lymphocytes [J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2008, **129**: 599—609
- [24] Muzio M, Salvesen G S, Dixit V M. FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**: 2952—2956
- [25] Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 1997, **9**: 240—246
- [26] Lee M H, Hook B, Pan G, *et al.* Conserved regulation of MAP kinase expression by PUF RNA-binding proteins [J]. *PLoS Genetics*, 2007, **3**: 233
- [27] Cox E A, Bennin D, Doan A T, *et al.* RACK1 regulates integrin-mediated adhesion, protrusion, and chemotactic cell migration via its Src-binding site [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2003, **14**: 658—669
- [28] Jansen G, Bachner D, Coerwinkel M, *et al.* Structural organization and developmental expression pattern of the mouse WD-repeat gene DMR-N9 immediately upstream of the myotonic dystrophy locus [J]. *Human Molecular Genetics*, 1995, **4**: 843—852
- [29] Al-Jumaily M, Kozlenkov A, Mechaly I, *et al.* Expression of three distinct families of calcium-activated chloride channel genes in the mouse dorsal root ganglion [J]. *Neuroscience Bulletin* 2007, **23**: 293—299
- [30] Xie Y, Massa S M, Ensslen-Craig S E, *et al.* Protein-tyrosine phosphatase (PTP) wedge domain peptides: a novel approach for inhibition of PTP function and augmentation of protein-tyrosine kinase function [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, **281**: 16482—16492
- [31] Vander Heiden M G, Plas D R, Rathmell J C, *et al.* Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2001, **21**: 5899—5912
- [32] Xia Y Z, Zhang C G, Chen Y Y, *et al.* Discussing on the

feasibility of large fragments DNA extraction from formalin-fixed fish specimens [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**: 485—491 [夏颖哲, 张春光, 陈宜瑜, 等. 福尔马林保存鱼类标本中大片段 DNA 的提取. 水生生物学报. 2007, **31**: 485—491]

[33] Shao X B, Yan M C, Shan L Z *et al.* Tolerance research of *Nibea albiflora* to two kinds of insecticides [J]. *Reservoir Fisheries*, 2006, **26**: 94—96 [邵鑫斌, 闫茂仓, 单乐州, 等. 黄姑鱼对 2 种驱虫药物的耐受性研究. 水利渔业. 2006, **26**: 94—96]

## ANALYSIS OF UP-REGULATED GENES IN *CAENORHABDITIS ELEGANS* TREATED WITH FORMALIN

CHEN Xing-Tao<sup>1,2</sup> and WANG Gui-Tang<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

**Abstract:** *Caenorhabditis elegans*, as a good model organism, has been used in the study of resistant mechanism against anthelmintics. On the other hand, formalin has been widely used in prevention and cure of fish parasites. However, many parasites generate resistance to formalin because of long term application. In the present study, techniques of suppression subtractive hybridization and dot blot hybridization were applied to analyze the gene expression alteration in *C. elegans* after formalin stimulation. *C. elegans* was serially cultivated in medium containing 800ppm formalin for one month. The worms growing in medium containing formalin was served as experimental group while those growing in normal medium as control group. Total RNA was extracted; mRNA was purified and reversely transcribed into cDNA. Forward suppression subtractive hybridization was used to deduct the cDNA contained in the control group out of the experimental group to enrich differential expression genes. Then, dot blot hybridization was used to further screen the up-regulation genes after formalin stimulation. The control cDNA and subtractive cDNA libraries were employed as probes, respectively, to hybridize with PCR product of the subtractive clones. It was found that 161 out of 676 gene clones showed evident expression discrepancy, and then they were sequenced after dot blot hybridization. BLAST analyses indicated the following genes up-regulated: (1) apoptosis related genes, encoding mitochondrial respiratory chain related proteins, protein SGT-1 containing TPR motif, heat shock proteins, oxidative stress related proteins, endocytosis related proteins, DNA duplication and reparation related proteins and other important apoptosis related proteins; (2) genes encoding important transcription regulation factor and signal transduction related proteins, for example, transcriptional activation factor FosB/c-Fos, G protein, cyclin B, Ca-binding protein, and nucleosome assembly protein NAP-1; (3) genes participating in energy, protein, fat and amino acid metabolisms; and (4) some genes encoding unnamed proteins. It indicates that, besides inducing apoptosis, formalin also impacts *C. elegans*' cell metabolism.

**Key words:** *Caenorhabditis elegans*; Formalin; Suppression subtractive hybridization; Dot blot hybridization