

復旦大學

本科毕业论文（设计）



论文题目：*Pristionchus pacificus* 线虫在 *Schizosaccharomyces pombe* 酵母培养条件下的生理特征与基因表达

姓 名：叶臻茂 学 号：21307110053

院 系：生命科学学院

专 业：生物技术

指导教师：石雨江 职 称：教授

单 位：复旦大学生物医学研究院

完成日期： 2025 年 5 月 10 日

Pristionchus pacificus 线虫在
Schizosaccharomyces pombe 酵母培
养条件下的生理特征与基因表达

完成人

叶臻茂

指导小组成员

石雨江 教授

韩冰 教授

目 录

摘 要	I
Abstract	II
一、前 言	1
1.1 研究背景	1
1.1.1 <i>Pristionchus pacificus</i> 的基本特征	1
1.1.2 食物来源变化影响线虫的表型	1
1.2 主要研究内容	2
1.2.1 <i>P. pacificus</i> 的 <i>S. pombe</i> 培养体系	2
1.2.2 <i>P. pacificus</i> 的生理特征与基因表达	2
1.3 研究的意义与目的	3
二、材料与方法	4
2.1 实验材料	4
2.1.1 动物样品	4
2.1.2 菌种	4
2.1.3 载体	4
2.2 试剂	4
2.2.1 培养基	4
2.2.2 缓冲液	6
2.2.3 试剂盒	6
2.3 实验仪器	7
2.4 实验方法	7

2.4.1 线虫和酵母株系维持	7
2.4.2 线虫同步化.....	7
2.4.3 线虫生存测定	8
2.4.4 线虫产卵量测定	8
2.4.5 线虫肠道内荧光测定	8
2.4.6 菌落 PCR	8
2.4.7 质粒构建和转化	9
2.4.8 转录组测序与测序数据分析.....	9
2.4.9 数据分析	10
三、研究结果	11
3.1 <i>Pristionchus pacificus</i> 线虫可以在 <i>S. pombe</i> 酵母中生长	11
3.1.1 <i>Pristionchus pacificus</i> 线虫可以在 <i>S. pombe</i> 酵母中发育	11
3.1.2 NYGM 培养基更适于线虫生长.....	12
3.1.3 在 OP50 中培养至 J4 再转至 <i>S. pombe</i> 中可以使线虫更好地发育	13
3.2 <i>Pristionchus pacificus</i> 线虫的生理特征测定	14
3.2.1 <i>Pristionchus pacificus</i> 线虫的产卵量测定	14
3.2.2 <i>S. pombe</i> 不会定植在 <i>Pristionchus pacificus</i> 线虫的肠道中.....	14
3.2.3 <i>Pristionchus pacificus</i> 线虫的寿命	15
3.3 <i>Pristionchus pacificus</i> 线虫的基因表达特征	16
3.3.1 差异表达基因分析	16
3.3.2 功能注释和富集分析	17
四、讨 论.....	19

参考文献	21
------------	----

致 谢	23
-----------	----

摘 要

饮食模式对宿主的生命健康具有深远影响。本研究通过建立线虫 *Pristionchus pacificus* 在裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 中的培养体系,旨在开发一种以线虫为模式生物的食物-宿主相互作用的研究模型。为此,我们开发了 NYGM 培养基,并在 *S. pombe* 上多代培养 *P. pacificus* 线虫,成功获得了在 *S. pombe* 上具有稳定生理特征的 *P. pacificus* 线虫群体。我们测定了 *P. pacificus* 在 *S. pombe* 培养条件下的生长、发育、产卵量和寿命等生理特征,并通过肠道荧光成像证实 *S. pombe* 仅作为食物,不会定植于 *P. pacificus* 的肠道中。通过转录组分析,我们初步揭示了 *P. pacificus* 在细菌与酵母培养条件下的基因表达差异,发现酵母饮食显著影响 *P. pacificus* 的有机酸代谢和羧酸代谢等生物过程。本研究不仅表明食物来源可显著影响 *P. pacificus* 的生理状态和基因表达,还为探索食物与宿主相互作用提供了新的视角和实验模型。

关键词: 线虫, 裂殖酵母, 生理特征, 基因表达

Abstract

Dietary patterns have a significant impact on host health. In this study, we aimed to develop a food-host interactions research model using the nematode *Pristionchus pacificus* by establishing its culture system on the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. To achieve this, we developed the NYGM medium and successfully cultured *P. pacificus* on *S. pombe* for multiple generations, obtaining a stable population of the nematode. We measured various physiological traits of the nematode cultured in *S. pombe*, including growth, development, reproduction, and lifespan. Furthermore, gut fluorescence imaging confirmed that *S. pombe* only functioned as food and did not colonize the gut. Transcriptomic analysis revealed differences in gene expression between nematodes cultured on bacteria and yeast, indicating that a yeast diet significantly affected biological processes such as organic acid and carboxylic acid metabolism in *P. pacificus*. Overall, our study demonstrates that food sources can significantly influence the physiological state and gene expression of *P. pacificus* and offers a new perspective and experimental model for exploring food-host interactions.

Key words: *Pristionchus pacificus*, *Schizosaccharomyces pombe*, physiological characteristics, gene expression

一、前言

1.1 研究背景

1.1.1 *Pristionchus pacificus* 的基本特征

Pristionchus pacificus (以下简称 *P. pacificus*) 是一种在 1996 年被发现并定义为新种的线虫^[1], 由于其独特的生理特征, 被用作研究线虫进化过程中发育学、行为学和生态学的重要模型生物, 特别是作为秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的卫星模式生物^[2]。 *P. pacificus* 拥有一些优异的性状, 使其非常适合在实验室条件下进行功能和机制研究, 这些性状包括 i) 它是自交雌雄同体的, 尽管偶尔 (约 0.1%) 也会产生自发的雄性个体; ii) 它的世代周期短, 在 20°C 下仅需 3.5 天; iii) 它繁殖量大 (每个雌雄同体能产生大约 200 个后代) 且可以进行冷冻保存^[2]。此外, *P. pacificus* 具有相对完整的基因组注释信息^[3], 并且适合于多种细胞、遗传和分子技术的应用, 例如细胞谱系分析、诱导突变、RNAi、转录组测序以及 ChIP-seq 等^[4-6]。

1.1.2 食物来源变化影响线虫的表型

与 *C. elegans* 不同的是, *P. pacificus* 线虫作为一种杂食性生物, 在自然环境中能够捕食多种微生物, 包括细菌、真菌, 甚至能够捕食其他线虫^[6]。在实验室环境中, *P. pacificus* 通常被饲养在单一的大肠杆菌 OP50 培养基上^[7]。然而, 改变线虫的食物来源, 即改变培养基中的微生物种类, 可能会对其生理特征产生显著影响。Bing Han 等人^[8]通过筛选 3983 个 *E. coli* 基因敲除菌株, 发现有 29 种细菌的单基因敲除能够促进线虫宿主的长寿, 并且其中的十几个还能保护宿主免受与年龄相关的肿瘤生长进展和淀粉样蛋白 β 沉积的影响。Limeng Liu 等人^[9]从土壤根系中分离出 119 种细菌, 并用它们喂养线虫, 结果发现 21 种细菌可以显著延长线虫的寿命。Marina Athanasouli 等人^[10]对在 24 种不同细菌中培养的 *P. pacificus* 进行了转录组分析, 发现超过一半的基因参与响应不同的环境微生物。这些研究表明, 食物来源的变化对线虫的表型有显著影响, 这种影响可能对线虫的疾病模型和衰老模型的相关研究具有重要意义, 而由于营养感知通路在不同物

种之间的保守性,这些研究同样提示了饮食模式的改变对人类的健康具有重要的影响。

特别值得注意的是, *P. pacificus* 的捕食能力可能与其具有两种不同的口器形状有关: Eu 型 (eurystomatous) 宽口器, 由一对相对的牙齿组成, 包括一个灵活且增大的背齿和一个可伸缩的腹齿; St 型 (stenostomatous) 窄口器, 只有一个单一的钝背齿^[11]。研究表明, Eu 型口器对于 *Pristionchus* 属线虫的捕食性摄食行为 (例如捕食其他线虫) 是必需的^[11]。此外, Gaurav V. Sanghvi 等人通过在 *Cryptococcus* 隐球酵母上培养 *P. pacificus* 线虫, 发现经过 50-60 代在隐球酵母上的稳定培养后, Eu 型口器的线虫在群体中的比例发生了显著变化 (在 *C. albidus* 上为 50%, 而在 *C. curvatus* 上为 84%, 相比之下, 在 *E. coli* 上为 89%)^[12,13]。因此, 从发育生物学的角度来看, 观察食物来源变化对线虫口器二态性的影响, 可能有助于我们更深入理解线虫在不同环境下的表型可塑性。

1.2 主要研究内容

1.2.1 *P. pacificus* 的 *S. pombe* 培养体系

在本研究中, 我们计划使用裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 作为模式生物, 以探究食物的变化对线虫宿主的影响。 *S. pombe* 作为一种真核微生物, 其遗传操作便利, 具有成熟的实验室培养体系^[14], 并且与多细胞生物的细胞共享许多分子、遗传和生化特征^[15], 便于开展大规模的遗传筛选以及相关分子机制的研究。此外, 由于 *S. pombe* 菌体体积较大, 它不像细菌那样容易在线虫肠道中定植, 从而减少了定植效应对实验结果的干扰。通过深入研究 *P. pacificus* 与 *S. pombe* 之间的相互作用关系, 我们能够更全面地理解食物来源对线虫生理和发育的影响, 为进一步探索食物与宿主之间复杂的相互关系奠定坚实的基础。

1.2.2 *P. pacificus* 的生理特征与基因表达

在本研究中, 我们计划测定 *P. pacificus* 线虫在 *S. pombe* 培养条件下的体型、产卵量以及寿命等宏观生理指标, 通过这些生理指标的变化来表征线虫在酵母培养条件下的宏观适应性变化。此外, 我们还将对 *P. pacificus* 线虫进行转录组测序, 以获取在不同食物中线虫在基因表达水平上的差异变化情况。通过将宏观生理特

征与基因表达水平的变化进行综合分析，我们旨在建立食物-宿主相互作用的研究模型，并深入研究食物来源的改变会对 *P. pacificus* 线虫产生怎样的影响，从而揭示宿主在不同食物环境下的适应机制，以及不同的饮食模式是否会影响宿主健康。

1.3 研究的目的是与意义

公元前 440 年，希腊的医师希波克拉底曾说过：“让食物成为你的药物，让药物成为你的食物。”这一观点与当前的研究不谋而合。如今，我们认识到，调整食物的摄入量、类型和进食时间对改善健康和延长寿命具有显著作用^[16]。然而，尽管相关研究众多，但对于实现健康长寿的最佳营养物质的种类、数量及其组合，科学界仍存在广泛争议。以生酮饮食和低碳水化合物饮食为例，流行病学研究显示，这些饮食方式在肥胖人群中的效果并不比均衡饮食更显著^[17]。更有大型研究指出，以动物产品为基础的低碳水化合物饮食可能增加男性患癌风险 66%，女性因癌症死亡风险上升 26%，但其背后的机制仍不明确^[18]。

营养物质与生物体反应之间的基本关系，如营养感知相关的信号通路，在不同物种间高度保守^[16]。因此，研究模式生物的健康饮食模式对人类健康饮食具有重要的启示作用。然而，使用哺乳动物模型（如小鼠等）研究饮食对健康的影响存在周期长、成本高和体系复杂等局限性，不利于机制探究和大规模筛选。相比之下，线虫作为短寿模式生物，具有实验周期短、体系简单的优势，有助于揭示不同饮食模式对宿主健康的潜在影响及其背后的机制。

本研究通过建立线虫 *Pristionchus pacificus* 在裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 上的培养体系，为研究饮食模式对健康的影响提供了一个高效的模型。这一模型不仅有助于深入研究饮食模式对健康的影响，还为将来筛选出真正能够促进健康长寿的饮食模式奠定了坚实的基础。

二、材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 动物样品

线虫

Pristionchus pacificus PS312

2.1.2 菌种

细菌

大肠杆菌 *E. coli* OP50、感受态菌株 *E. coli* DH5 α

酵母菌

裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* SP286

2.1.3 载体

mEctrine 质粒 pDB5318

2.2 试剂

2.2.1 培养基

2.2.1.1 LB 培养基

表 1 LB 液体培养基和固体培养基

组成	LB 液体培养基 (1 L)	LB 固体培养基 (1 L)
Tryptone	10 g	10 g
Yeast Extract	5 g	5 g
NaCl	10 g	10 g
Agar	—	20 g
加水定容至	1000 mL	1000 mL

灭菌条件：121℃，高压湿热，20 min。

2.2.1.2 NGM 培养基

表 2 NGM 固体培养基

组成	LB 固体培养基 (1 L)
Peptone	2.3 g
CaCl ₂	0.11 g
MgSO ₄	0.12 g
胆固醇	5 mg
NaCl	2.82 g
K ₂ HPO ₄	0.89 g
KH ₂ PO ₄	2.7 g
Agar	20 g
加水定容至	1000 mL
灭菌条件: 121℃, 高压湿热, 20 min。	

2.2.1.3 YES 培养基

表 3 YES 液体培养基和固体培养基

组成	LB 液体培养基 (1 L)	LB 固体培养基 (1 L)
Yeast Extract	5 g	5 g
Glucose	30 g	30 g
Adenine	0.225 g	0.225 g
Leucine	0.225 g	0.225 g
Lysine	0.225 g	0.225 g
Histidine	0.225 g	0.225 g
Uracil	0.225 g	0.225 g
Agar	—	20 g
加水定容至	1000 mL	1000 mL
灭菌条件: 121℃, 高压湿热, 20 min。		

2.2.1.4 NYGM 培养基

表 4 NGM 固体培养基

组成	LB 固体培养基 (1 L)
Peptone	6 g
Glucose	4 g
CaCl ₂	0.11 g
MgSO ₄	0.12 g
胆固醇	5 mg
NaCl	2.82 g
K ₂ HPO ₄	0.89 g
KH ₂ PO ₄	2.7 g
Agar	20 g
氨苄青霉素	300 mg
链霉素	300 mg
加水定容至	1000 mL
灭菌条件: 121℃, 高压湿热, 20 min。	

2.2.2 缓冲液

2.2.2.1 M9 缓冲液

表 5 M9 缓冲液

组成	M9 缓冲液 (1 L)
NaCl	0.5 g
Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NH ₄ Cl	1 g
加水定容至	1000 mL
灭菌条件: 121℃, 高压湿热, 20 min。	

2.2.2.2 线虫裂解液

30 mL 水、4 mL 5 mol/L 氢氧化钠溶液、5 mL 1 mol/L 次氯酸钠溶液混匀后
避光保存

2.2.3 试剂盒

ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit (Vazyme)

Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 (Takara)

FastPure EndoFree Plasmid Midi Kit (Vazyme)

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase、Buffer (Takara)

2.3 实验仪器

Nanodrop2000 (Thermo)、显微镜 (Olympus)、体式显微镜 (Nikon)、荧光体式显微镜 (Nikon)、生化培养箱 (Bluepard)、电热恒温培养箱 (精宏)、基因扩增仪 (Eppendorf)、离心机 (Eppendorf 5810 R)

2.4 实验方法

2.4.1 线虫和酵母株系维持

野生型 *Pristionchus pacificus* PS312 线虫在 20℃、铺有 *E. coli* OP50 细菌的 NGM(Nematode Growth Media)平板中培养传代。驯化型 *Pristionchus pacificus* PS312 线虫在 20℃下，铺有 *S. pombe* 酵母的 NYGM 平板中培养传代数代（在酵母中传代大于 5 代）。裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* SP286 在 30℃、YES 培养基中培养传代。

2.4.2 线虫同步化

在 20℃下将 *Pristionchus pacificus* 线虫培养数日，至平板中含有较多有卵线虫，通过灭菌水将线虫洗下并转移至 15 mL 离心管中，离心 3000 rpm，1 min，去除上清。用线虫裂解液重悬线虫沉淀，vortex 7 分钟至绝大部分线虫虫体破裂，离心 3000 rpm，1 min，去除上清，可见少许白色沉淀。用 15 mL ddH₂O 重悬清洗沉淀，离心 3000 rpm，1 min，去除上清。再用 15 mL M9 缓冲液重悬清洗沉淀，离心 3000 rpm，1 min，去除上清，用 M9 缓冲液再洗涤三次。最后用 7 mL M9 缓冲液重悬沉淀，放置在摇床中 20℃下缓慢摇晃 48 h。48 h 后离心 3000 rpm，1 min，去除上清，将沉淀用 M9 缓冲液重悬后加入到铺有细菌或酵母的培养基中，得到均处于 J2 时期的 *Pristionchus pacificus* 线虫。

2.4.3 线虫生存测定

同步化的 *Pristionchus pacificus* 线虫在 *E. coli* OP50 中培养至 J4 阶段(约 54h), 用 M9 缓冲液反复冲洗至基本没有细菌残留后再分别转至铺有 *E. coli* OP50 的 NGM 板中和铺有 *S. pombe* 的 NYGM 板中。通过每隔 3-5 天将成虫迁移至新的平板中来将成虫与后代幼虫区分开。通过体式显微镜观察, 每天记录测定线虫的生存情况。经过轻微触碰后没有反应的线虫被认定为死亡 (death), 卵在线虫体内孵化导致死亡或是因为其他意外情况死亡的线虫被认定为缺失 (censored)。统计死亡和缺失情况直至所有线虫全部死去, 进行线虫生存曲线绘制。

2.4.4 线虫产卵量测定

为了评估产卵量, 同步化的 *Pristionchus pacificus* 线虫在 *E. coli* OP50 或裂殖酵母 *S. pombe* 中培养至 J4 阶段 (54h), 将 10 只左右的 J4 线虫转至铺有细菌或铺有酵母的新的 NYGM 培养平板上, 过 48 小时后在体式显微镜下测定平板上的卵的数目, 以评估线虫在细菌或酵母中的产卵量。

2.4.5 线虫肠道内荧光测定

将表达有 mEctrine 的酵母菌株在 30℃ 下, 添加有潮霉素 (hygromycin) 的 YES 液体培养基中培养过夜, 离心 2000 rpm, 2 min, 去除上清, 重悬后铺在 3cm NYGM 平板上, 每个板上铺 100 μ L 浓缩菌液。将按前述步骤同步化后的线虫在 20℃ 下, 铺有 *E. coli* OP50 的 NGM 培养基中培养至 J4 (同步化后 54 h), 用 15mL M9 缓冲液将线虫洗下收集在 15 mL 离心管中, 离心 1600 rpm, 15s, 去除上清, 再按同样步骤加入 15 mL M9 缓冲液洗涤 4-5 次, 离心 1600 rpm, 15s, 去除上清, 将线虫沉淀重悬后加入铺有表达 mEctrine 的酵母的 NYGM 平板中, 每个平板 30 只线虫左右。10 天后在荧光显微镜下观察并拍摄。

2.4.6 菌落 PCR

取少量酵母菌落, 加入 10 μ L 0.2%SDS 重悬, 98 °C 5 min 充分裂解菌体, 再加入 40 μ L 的水稀释, 取 1.5 μ L 稀释液作为模板进行 PCR 反应。

表 5 菌落 PCR 反应体系 (50 μ L)

试剂	使用量
5 $\times$ PrimeSTAR GXL Buffer	10 μ L
dNTP Mixture (2.5mM each)	4 μ L
Primer1/2	1 μ L each
Template	1 μ L
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	2 μ L
ddH ₂ O	31 μ L

2.4.7 质粒构建和转化

使用 Vazyme ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 试剂盒进行 DNA 连接反应构建质粒，从 -80℃ 冰箱中取 100 μ L DH5 α 感受态细胞悬液，解冻后立即置于冰上，加入 50 ng 质粒混合均匀，在冰上放置至少 20 分钟，42℃ 水浴中热激 90 秒，迅速置于冰上冷却 3-5 分钟，加入 1 ml LB 液体培养基，混匀后 37℃ 培养 1 h，涂板（添加有氨苄青霉素的 LB 固体培养基），过夜培养，将得到的单克隆菌落在 37℃ 下，添加有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养过夜，后使用 Vazyme FastPure EndoFree Plasmid Midi Kit 进行质粒抽提，再进行一代测序（铂尚），确保质粒插入序列正确。

2.4.8 转录组测序与数据分析

将同步化后的野生型与驯化型线虫在铺有 *E. coli* OP50 的 NGM 培养基中培养 80h，用灭菌水将线虫洗下收集在 15 mL 离心管中，离心 1600 rpm，15 s，去除上清，再按同样步骤加入 15 mL 灭菌水洗涤 4-5 次，离心 1600 rpm，15 s，去除上清，转移至 EP 管中，保存在 -80℃，用 Trizol 标准方法提取 total RNA，利用 Nanodrop2000 对所提 RNA 的浓度和纯度进行检测，琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性，Agilent2100 测定 RIN 值，之后在 cDNA3' 末端连接 adaptor，片段分选后进行 PCR 扩增，使用华大基因 DNBSEQ-T7 测序仪测序。测序完成后，使用 FastQC 软件对原始测序数据进行质量控制，利用 Trimmomatic 软件对低质量序列和接头序列进行修剪，去除质量低于 20 的碱基以及长度小于 35 bp 的序列片段。过滤后的数据通过 HISAT2 软件比对到 *Pristionchus pacificus* 参考基因组上

(GCA_000180635.4)。比对结果使用 featureCounts 软件进行 counts 计数。基因表达差异分析采用 edgeR 软件包进行，设定 P 值校正后的阈值 (FDR) 小于 0.05 且表达量变化倍数 ($|\log_2\text{FoldChange}|$) 大于 1 为差异表达基因的筛选标准。最后，对差异表达基因进行功能注释和富集分析，包括 Gene Ontology (GO) 和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 分析。

2.4.9 数据分析

数据分析和制图通过 GraphPad Prism 10 (GraphPad Software) 进行，多组数据之间采用 One-way ANOVA 检验，*表示 $p < 0.05$ 。

三、研究结果

3.1 *Pristionchus pacificus* 线虫可以在 *S. pombe* 酵母中生长

3.1.1 *Pristionchus pacificus* 线虫可以在 *S. pombe* 酵母中发育

为了验证 *Pristionchus pacificus* 线虫可以依赖 *S. pombe* 酵母作为食物进行生长,我们将同步化后的线虫加入铺有 *S. pombe* 酵母的 NGM 培养基中,观察线虫的体型与生长状况来评估线虫能否以 *S. pombe* 酵母作为食物并正常发育,发现在酵母平板中线虫的体型与发育水平明显高于阴性对照(在 NGM 培养基上加入 100 μ L YES 培养基),但要低于 *E. coli* OP50 (图 1A, C)。此外,通过显微镜拍摄,我们直接观察到了线虫进食 *S. pombe* 酵母(图 1B),说明 *Pristionchus pacificus* 线虫确实可以以 *S. pombe* 酵母为食,并在 *S. pombe* 酵母中生长。

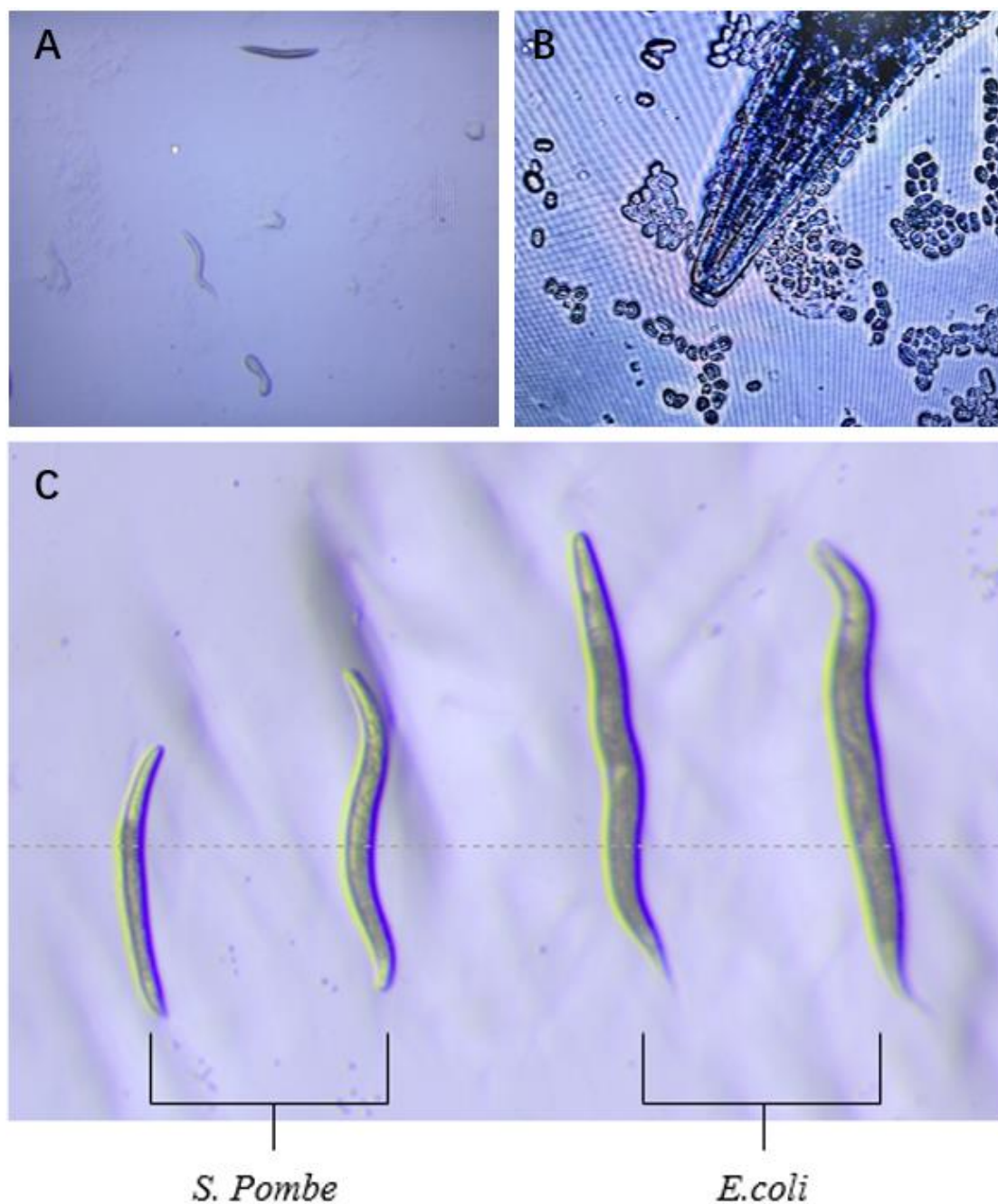


图 1. *Pristionchus pacificus* 线虫在酵母中的发育

同步化的野生型 *Pristionchus pacificus* 线虫在铺有 *E. coli* OP50 或 *S. pombe* (C) 或相同体积的 YES 培养基 (A) 的 NGM 平板中培养 2 天，观察线虫的体型；同步化的野生型 *Pristionchus pacificus* 线虫在铺有 *S. pombe* 的 NGM 平板中培养 5 天(B)，40×物镜下观察线虫和酵母的形态

3.1.2 NYGM 培养基更适于线虫生长

为了探索什么样的培养基组分更适宜线虫与酵母的生长，我们制备了不同浓度梯度的 peptone，glucose 溶液，观察哪种培养条件下线虫与酵母的生存情况最佳（图 2）。考虑到添加 7.2g/L 的 glucose 就足以使线虫受到高糖浓度的影响，我们最终以 6g/L peptone，4g/L glucose（详见材料与方法的 NYGM 培养基）用于后续实验。

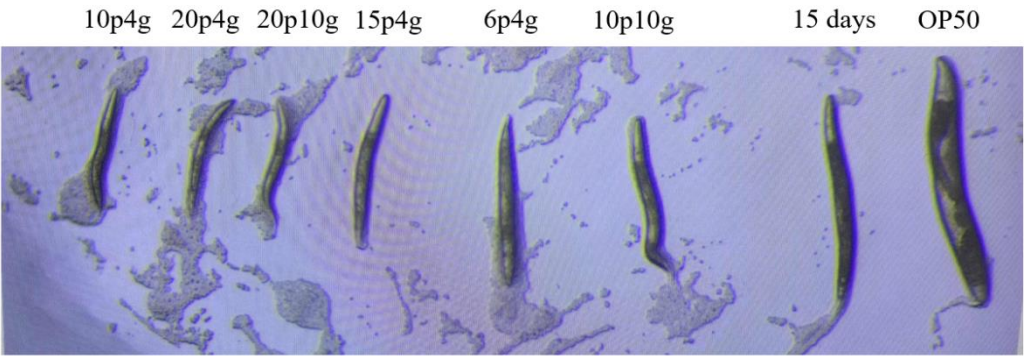


图 2. 不同葡萄糖和蛋白胨浓度下的线虫生长状况示意图

选定 4g/L、10g/L、20g/L 的葡萄糖，6g/L、10g/L、15g/L、20g/L 的蛋白胨作为浓度梯度配置线虫培养基，同步化的野生型线虫在含有不同浓度梯度的葡萄糖/蛋白胨中培养 5 天，观察其在不同培养基中的体型差异

3.1.3 在 OP50 中培养至 J4 再转至 *S. pombe* 中可以使线虫更好地发育

然而，在铺有 *S. pombe* 的 NYGM 平板中同步化的 *Pristionchus pacificus* 线虫体型仍明显小于细菌中同步化的 *Pristionchus pacificus* 线虫，我们推测可能是 *S. pombe* 菌株直径过大，不利于 *Pristionchus pacificus* 线虫幼虫进食，因此我们设计将同步化的 *Pristionchus pacificus* 线虫在细菌 OP50 中培养至 J4 阶段，再转至铺有 *S. pombe* 酵母的 NYGM 平板中，发现 J4 阶段再转至酵母板中的线虫体型与细菌中培养的线虫体型相当（图 3），便于开展后续实验。

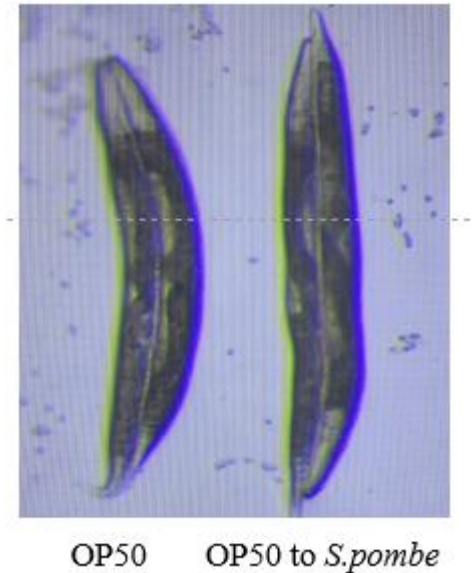


图 3. J4 时期转至酵母中的线虫发育情况示意图

同步化的 *Pristionchus pacificus* 线虫在细菌 OP50 中培养至 J4 阶段（约 54h），用 M9 缓冲液反复冲洗至基本没有细菌残留后再分别转至铺有 *E. coli* OP50 的 NGM 板中和铺有 *S. pombe* 的 NYGM 板中，2 天后观察二者的体型差异

3.2 *Pristionchus pacificus* 线虫的生理特征测定

3.2.1 *Pristionchus pacificus* 线虫的产卵量测定

为了表征在酵母培养条件下线虫的繁殖能力，我们对 *Pristionchus pacificus* 线虫进行了产卵量测定，结果发现 J4 阶段再转至酵母板中的线虫产卵量与细菌中培养的线虫产卵量相当，均显著高于直接在酵母中同步化的线虫（图 4）。

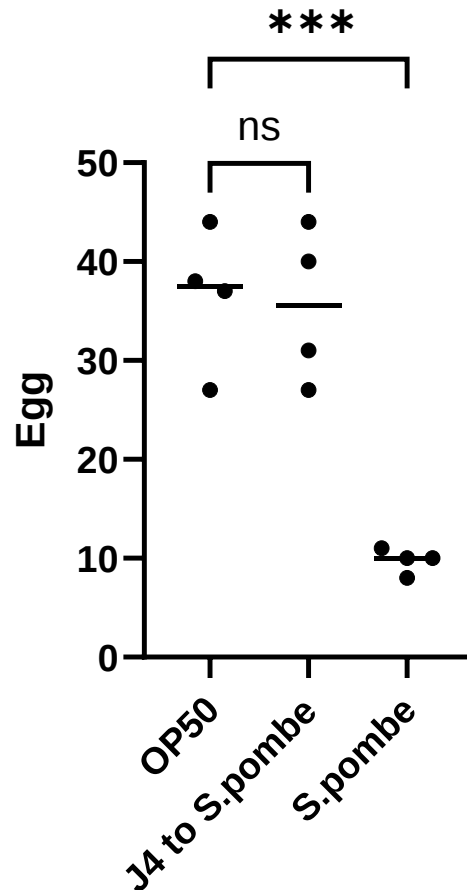


图 4. 在细菌和酵母中培养的线虫的产卵量

同步化的 *Pristionchus pacificus* 线虫在细菌 OP50 或裂殖酵母 *S. pombe* 中培养至 J4 阶段，将 10 只左右的 J4 线虫转至铺有细菌或酵母的新的培养平板上，过 48 小时后在显微镜下测定平板上卵的数目作为线虫初次产卵的数量，通过 One-way ANOVA 的统计方法分析组间的差异

3.2.2 *S. pombe* 不会定植在 *Pristionchus pacificus* 线虫的肠道中

在细菌中培养的线虫的肠道内会有细菌定植^[8]，为了探究酵母是否会同样定植在线虫肠道中，我们通过在 *S. pombe* 中转入 mEctrine 基因，在 *E. coli* 中转入 GFP 基因，使细菌和酵母能够表达荧光，发现在 mEctrine *S. pombe* 中培养的 *P. pacificus* 线虫与在野生型 *S. pombe* 中培养的 *P. pacificus* 线虫一样都无法观察到肠道荧光，而在 GFP *E. coli* 中培养的 *P. pacificus* 线虫能够观察到显著的肠道荧光（图 5）。说明 *S. pombe* 不会定植在 *P. pacificus* 线虫的肠道中，而是单纯作为 *P. pacificus* 线虫的食物。

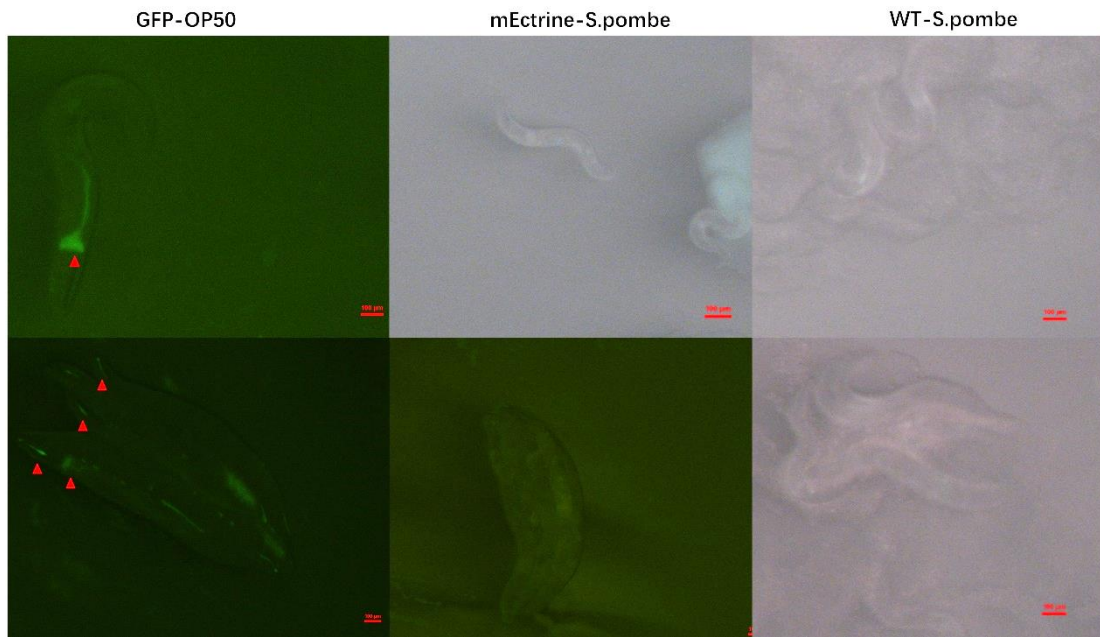


图 5. *Pristionchus pacificus* 线虫的肠道荧光图

将同步化后的线虫在铺有野生型 *E. coli* 的 NGM 平板中培养至 J4，再将线虫转至铺有 WT-*S. pombe*、mEctrine-*S. pombe* 或 GFP-OP50 的 NYGM 或 NGM 平板中，10 天后通过荧光体式显微镜观察线虫的肠道荧光。红色箭头标出的是培养在 GFP-OP50 中的线虫的咽部以及肠道内的绿色荧光信号。

3.2.1 *Pristionchus pacificus* 线虫的寿命

在 *E. coli* OP50 的实验室标准培养环境下，*Pristionchus pacificus* 线虫的寿命在 20 天左右，这与我们得到的数据基本相符。而在 *S. pombe* 中，经过驯化的 *Pristionchus pacificus* 线虫先在细菌中培养至 J4 再转至酵母环境中，发现寿命在 25 天左右，在酵母环境中培养的一线虫寿命较长。

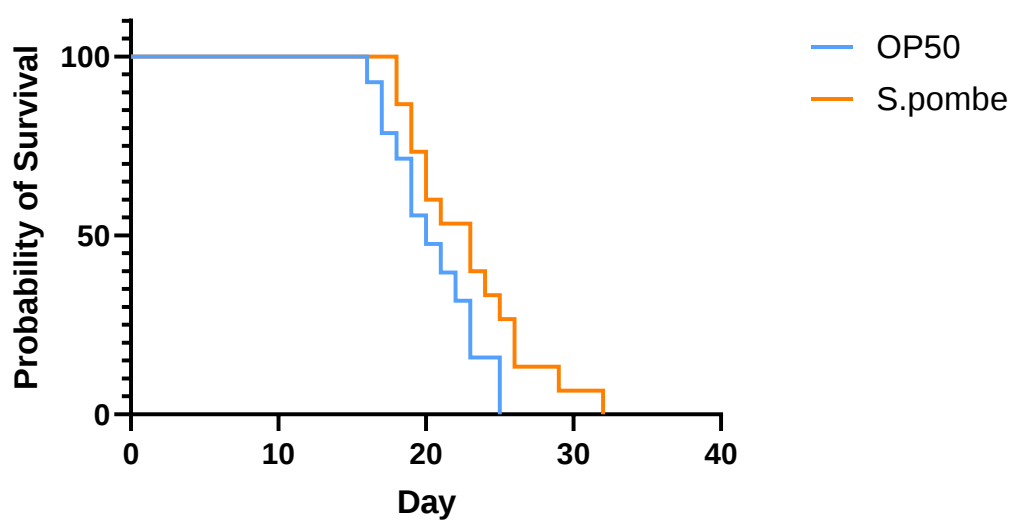


图 6. 在细菌和酵母中培养的线虫的生存曲线

同步化的 *Pristionchus pacificus* 线虫在细菌 OP50 中培养至 J4 阶段（约 54 h），用 M9 缓冲液反复冲洗至基本没有细菌残留后再分别转至铺有 *E. coli* OP50 的 NGM 板中和铺有 *S. pombe* 的 NYGM 板中，每隔 3 天转一次板，通过 Kaplan-Meier 分析绘制生存曲线。

3.3 *Pristionchus pacificus* 线虫的基因表达特征

3.3.1 差异表达基因分析

收集在 *S. pombe* 酵母和 *E.coli* 细菌中培养的线虫，进行转录组测序，寻找差异基因，发现在酵母中培养的线虫比起在细菌中培养的线虫有 127 个基因高表达，82 个基因低表达。

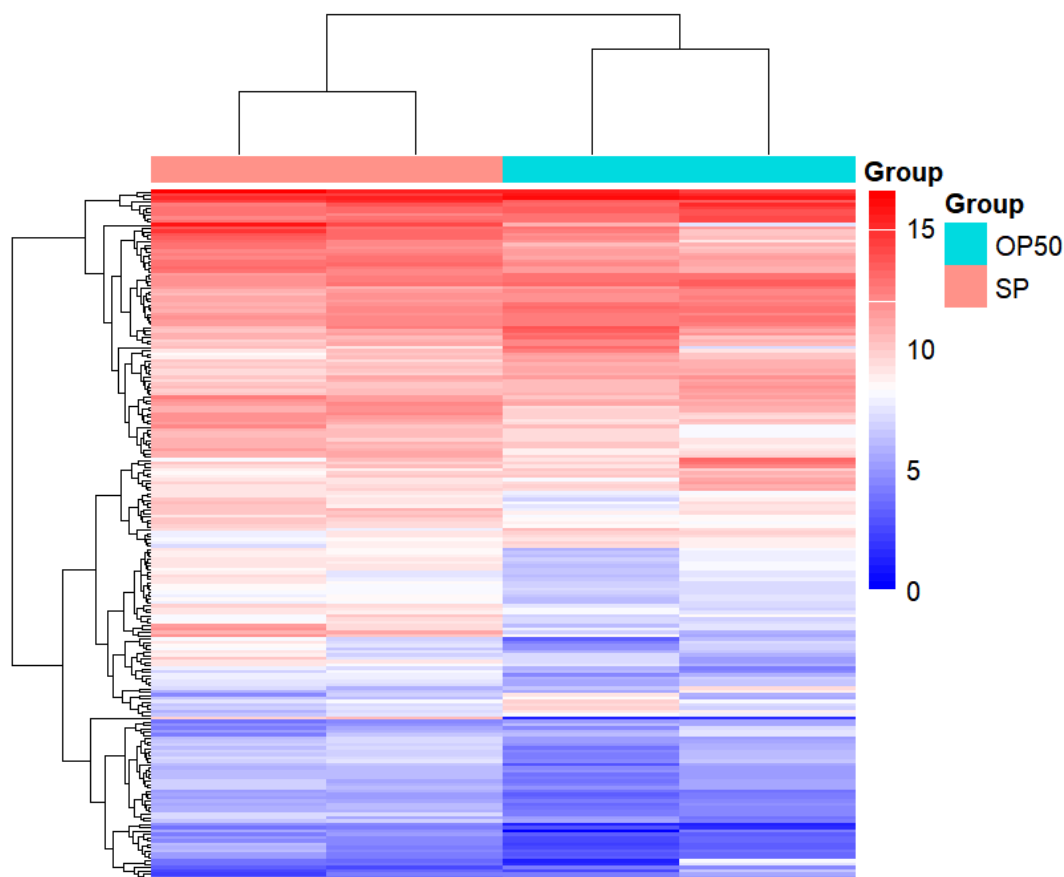


图 7. 在细菌和酵母中培养的线虫转录组差异基因热图

热图的数据基于对原始表达矩阵中对应差异基因的基因表达值进行对数转换后生成。行代表基因，列代表样本。颜色从蓝色到红色表示基因表达水平从低到高的变化，颜色越深表示表达量越高（红色）或越低（蓝色）。聚类分析基于欧几里得距离对行和列分别进行聚类，以便识别相似表达模式的基因和样本。样本的分组信息（OP50 组和 SP 组）在热图上方以颜色条表示

3.2.1 功能注释和富集分析

通过进一步开展基因功能注释和通路富集分析，我们发现在酵母中培养的线虫和在细菌中培养的线虫的差异表达基因在有机酸代谢、羧酸代谢等生物过程富集，在过氧化物酶体、不饱和脂肪酸合成以及氨基酸代谢等通路富集，说明细菌和酵母菌组成的差异，使线虫在对应的环境中产生了适应性的变化。

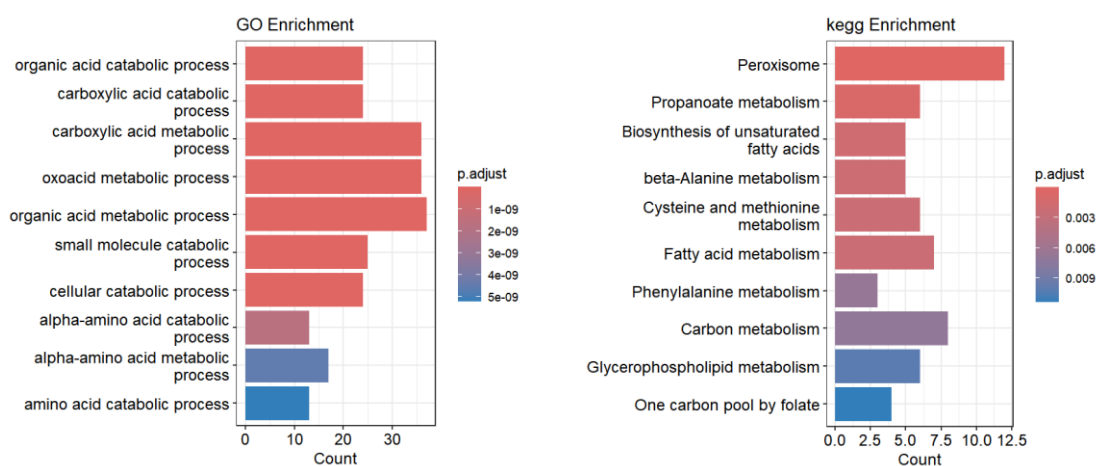


图 8. 在细菌和酵母中培养的线虫转录组差异基因 GO 分析和 KEGG 分析

将在细菌和酵母中培养的线虫转录组测序分析得到的差异基因列表进行 GO 基因功能注释和 KEGG 通路富集分析，取 P.adjust 最小的前十位结果绘制柱形图

四、讨 论

本文重点开发了 *Pristionchus pacificus* 线虫在 *S. pombe* 中的培养体系，验证了 *Pristionchus pacificus* 线虫可以在 *S. pombe* 中生长，并且相比起在细菌中培养，培养在酵母中的线虫产卵量基本不变，寿命更长，且酵母不会定植在肠道中。而基因表达分析表明在酵母中培养的线虫的转录组在有机酸代谢，氨基酸代谢，过氧化物酶体通路等方面富集。

考虑到 *Pristionchus pacificus* 线虫的常规实验室培养体系（培养在 *E. coli* OP50 中），目前有关于线虫培养体系的研究主要集中于原核生物（例如使用其他类型的细菌喂养线虫^[9]），而本文创新性地开发出了 *Pristionchus pacificus* 线虫在真核酵母中的培养体系。裂殖酵母 *S. pombe*，作为一种常用的酵母模式生物，相关的遗传操作与生化手段十分成熟，有利于后续研究酵母的变化对线虫宿主的影响。此外，*S. pombe* 的体积较大，与先前报道的体积较小的酵母不同，*S. pombe* 无法定植在线虫肠道中，对线虫来说只是单纯作为食物的身份，很适宜作为研究食物对宿主的影响的模型。

食物对宿主的生理状态有非常重要的影响。例如在线虫模型中，多项研究表明卡路里限制^[19]（减少食物供应）或对细菌进行特定的基因敲除^[8]（改变食物状态）可以通过胰岛素/IGF-1 信号通路（IIS）^[20]或 mTOR^[21]等信号通路延长 *C.elegans* 线虫的寿命，减缓衰老相关疾病（例如癌症以及阿尔兹海默症）^[20]。而在啮齿动物和人类中，研究表明将卡路里摄入量增加到能量消耗所需的水平以上会增加脂肪生成和储存，促进肥胖，从而导致与年龄相关的疾病^[22]；而流行病学研究指出生酮/低碳水化合物饮食^[23]，素食饮食^[24]，低蛋白模式饮食^[25]等不同的饮食方式对于人类健康有着不可忽视的影响。

然而，究竟哪种饮食模式可以最大程度地促进人类健康，仍存在相当大的争议，考虑到营养感知通路在不同物种之间的保守性^[16]，未来可以利用线虫与酵母食物这一模型开展一系列有关线虫宿主的生理或病理模型与食物的相关性的研究。由于线虫生命周期较短，成本较低，体系更加简单，更有利于开展不同饮食模式的大规模筛选以及深入的分子机制探究。具体来说，例如将酵母中代谢相关基因进行敲除或过表达，改变酵母的代谢状况以模拟不同的饮食模式，探究哪

些基因的变化会影响线虫宿主的寿命，以及这种食物-宿主相互作用背后的具体分子机制。总而言之，本文主要开发了 *Pristionchus pacificus* 线虫在 *S. pombe* 酵母中的培养体系这一食物-宿主相互作用的研究模型，以便于后续探究不同饮食模式对宿主健康的影响，并进一步开发出真正能促进人类健康长寿的饮食。

参考文献

1. Sommer R.J., Carta L.K., Kim S.-Y., Sternberg P.W. Morphological, genetic and molecular description of *Pristionchus pacificus* sp. n. (Nematoda, Diplogastridae)[J]. Fundam. Appl. Nematol., 1996, 19:511-521.
2. Hong R.L., Sommer R.J. *Pristionchus pacificus*: a well-rounded nematode[J]. Bioessays, 2006, 28:651-659.
3. Dieterich C., Clifton S.W., Schuster L.N., et al. The *Pristionchus pacificus* genome provides a unique perspective on nematode lifestyle and parasitism[J]. Nat Genet., 2008, 40(10):1193-1198.
4. Cinkornpumin J.K., Hong R.L. RNAi mediated gene knockdown and transgenesis by microinjection in the necromenic Nematode *Pristionchus pacificus*[J]. J Vis Exp., 2011, (56):e3270.
5. Werner M.S., Sieriebriennikov B., Prabh N., et al. Young genes have distinct gene structure, epigenetic profiles, and transcriptional regulation[J]. Genome Res., 2018, 28(11):1675-1687.
6. Sommer R.J., McGaughran A. The nematode *Pristionchus pacificus* as a model system for integrative studies in evolutionary biology[J]. Mol Ecol., 2013, 22(9):2380-2393.
7. Sommer R.J. *Pristionchus pacificus*[J]. WormBook, 2006, 1-8.
8. Han B., Sivaramakrishnan P., Lin C.J., et al. Microbial Genetic Composition Tunes Host Longevity[J]. Cell, 2018, 173(4):1058.
9. Liu L., Hao X., Bai Y., Tian Y. The soil Mycobacterium sp. promotes health and longevity through different bacteria-derived molecules in *Caenorhabditis elegans*[J]. Aging Cell, 2024, Published online November 19.
10. Athanasouli M., Akduman N., Röseler W., et al. Thousands of *Pristionchus pacificus* orphan genes were integrated into developmental networks that respond to diverse environmental microbiota[J]. PLoS Genet., 2023, 19(7):e1010832.
11. Wilecki M., Lightfoot J.W., Susoy V., Sommer R.J. Predatory feeding behaviour in *Pristionchus* nematodes is dependent on phenotypic plasticity and induced by serotonin[J]. J Exp Biol, 2015, 218(Pt 9):1306-1313.
12. Sanghvi G.V., Baskaran P., Röseler W., et al. Life History Responses and Gene Expression Profiles of the Nematode *Pristionchus pacificus* Cultured on *Cryptococcus* Yeasts[J]. PLoS One, 2016, 11(10):e0164881.
13. WormAtlas. Altun Z.F., Herndon L.A., Wolkow C.A., et al. (eds.) 2002-2024.
14. Zhao Y., Lieberman H.B. *Schizosaccharomyces pombe*: a model for molecular studies of eukaryotic genes[J]. DNA Cell Biol., 1995, 14(5):359-371.
15. Yanagida M. The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*[J]. Genome Biol., 2002, 3(3):COMMENT2003.
16. Longo V.D., Anderson R.M. Nutrition, longevity and disease: From molecular mechanisms to interventions[J]. Cell, 2022, 185(9):1455-1470.

17. López-Espinoza M.Á., Chacón-Moscoso S., Sanduvete-Chaves S., et al. Effect of a Ketogenic Diet on the Nutritional Parameters of Obese Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. *Nutrients*, 2021, 13(9):2946.
18. Fung T.T., van Dam R.M., Hankinson S.E., et al. Low-carbohydrate diets and all-cause and cause-specific mortality: two cohort studies[J]. *Ann Intern Med.*, 2010, 153(5):289-298.
19. Herndon L.A., Schmeissner P.J., Dudaronek J.M., et al. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*[J]. *Nature*, 2002, 419(6909):808-814.
20. Kenyon C.J. The genetics of ageing [published correction appears in *Nature*. 2010 Sep 30;467(7315):622][J]. *Nature*, 2010, 464(7288):504-512.
21. Vellai T., Takacs-Vellai K., Zhang Y., et al. Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*[J]. *Nature*, 2003, 426(6967):620.
22. Janssen J.A.M.J.L. Hyperinsulinemia and Its Pivotal Role in Aging, Obesity, Type 2 Diabetes, Cardiovascular Disease and Cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15):7797.
23. Weber D.D., Aminzadeh-Gohari S., Tulipan J., et al. Ketogenic diet in the treatment of cancer - Where do we stand?[J]. *Mol Metab*, 2020, 33:102-121.
24. Segovia-Siapco G., Sabaté J. Health and sustainability outcomes of vegetarian dietary patterns: a revisit of the EPIC-Oxford and the Adventist Health Study-2 cohorts[J]. *Eur J Clin Nutr*, 2019, 72(Suppl 1):60-70.
25. Levine M.E., Suarez J.A., Brandhorst S., et al. Low protein intake is associated with a major reduction in IGF-1, cancer, and overall mortality in the 65 and younger but not older population[J]. *Cell Metab*, 2014, 19(3):407-417.

致 谢

首先要感谢石雨江老师、韩冰老师对本课题的悉心指导。其次要感谢黄小岚师姐、陈茜茗师姐、陈佳佳师姐、卫江颖师姐在线虫相关的实验方法上给予我许多帮助，感谢郑金鑫师兄在酵母的培养以及遗传操作方面给我许多帮助，感谢石雨江老师和韩冰老师实验室的所有成员对我的帮助。

四年的本科时光一瞬而过，在这四年的时间里，我酣畅淋漓地笑过，痛心疾首地悲伤过，见过光华楼三十楼绝美的夕阳，也见过江湾凌晨四点的星光，那些昨日的记忆仿佛已淹没在了回忆之中，回想起来却又记忆犹新。

在这四年里，与老友常常相聚，也结识了许多新的朋友，感谢你们一直以来的支持与帮助，能够认识你们是我的荣幸。

在这四年里，感谢我的家人们，感谢你们一直以来默默地支持与鼓励，没有你们就没有现在的我。

感谢曾教导过我的老师们，是你们造就了如今的我。

感谢复旦，感谢复旦生科院和生物医学研究院，我在这里有许多的相遇、许多的成长，我想即使毕业之后我也不会忘记，自己曾经是并且将来会继续是复旦人。