

秀丽线虫缺氧相关剪接调节因子的筛查

张继业^{1,2}, 任长虹², 庞剑会¹, 李稚锋², 刘虎岐¹, 张成岗²

(1 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100; 2 军事医学科学院 放射与辐射医学研究所, 蛋白质组学国家重点实验室, 医学神经生物学国家重点实验室, 北京 100850)

【摘要】 【目的】基于 RNA 干涉文库, 寻找与秀丽线虫缺氧损伤表型相关的剪接调节因子。【方法】利用喂饲 RNA 干涉(RNA interference, RNAi)文库筛选技术, 对秀丽线虫基因组中的 351 个 RNA 结合蛋白(RNA binding-protein, RBP)基因进行筛选。【结果】经过 2 次筛选共得到 5 个与缺氧相关的 RBP 编码基因, 其中剪接因子 1 个, 参与 mRNA 翻译过程的基因 4 个。【结论】剪接调节因子可能在 mRNA 的剪接和翻译水平上参与低氧应答。

【关键词】 喂饲 RNAi 文库筛选; 秀丽线虫; 缺氧; RNA 结合蛋白

【中图分类号】 Q527

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)07-0197-06

Screening of the hypoxia-related splicing regulatory factors of *C. elegans*

ZHANG Ji-ye^{1,2}, REN Chang-hong², PANG Jian-hui¹, LI Zhi-feng²,
LIU Hu-qi¹, ZHANG Cheng-gang²

(1 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Beijing Institute of Radiation Medicine, State Key Laboratory of Proteomics, State Key Laboratory of Medical Neurobiology, Beijing 100850, China)

Abstract: 【Objective】 The study was to find the splicing regulatory factors related to hypoxic injury phenotype. 【Method】 RNA-mediated interference (RNAi) library was used to target 351 RNA binding protein (RBP)-coding genes of *C. elegans*. 【Result】 RNAi knockdown of 5 hypoxia-related RBP genes was obtained, with a splicing factor and 4 genes involved in mRNA translation process. 【Conclusion】 Splicing regulatory factors may participate in the process of mRNA splicing and translation in hypoxic response.

Key words: screening of feeding RNAi library; *Caenorhabditis elegans*; hypoxia; RNA-binding protein

氧是机体维持正常生命活动的必要物质。细胞在低氧或严重缺氧条件下会启动低氧应答系统来适应低氧环境和自我保护。细胞的低氧应答受一系列基因调节^[1], 而且部分基因的可变剪接可能以显性负的形式参与低氧应答的调节过程^[2-4], 如缺氧诱导因子 HIF-1 的缺失第 11, 12 号外显子的新剪接异

构体可竞争性的抑制内源性 HIF-1 的转录活性, 导致 HIF-1 下游靶基因 mRNA 的表达水平下调^[3]。可变剪接是基因表达调控的一种重要机制^[5], 需要众多剪接调节因子的参与, 而剪接调节因子及其靶基因的多样性使剪接调节机制变得更为复杂。因此, 从具有能够同时调节多个基因可变剪接能力的

* [收稿日期] 2010-01-03

[基金项目] 国家“973”计划项目(2006CB504100); 国家科技重大专项(2009ZX09103-616, 2009ZX09301-002, 2009ZX09503-002); 国家自然科学基金项目(30900862, 30771230, 30600365); 中国博士后科学基金项目(200801495, 20060400051); 医学神经生物学国家重点实验室开放基金项目(09-02)

[作者简介] 张继业(1983—), 男, 安徽蚌埠人, 在读硕士, 主要从事神经生物学研究。E-mail: zjy0926@sina.com

[通信作者] 刘虎岐(1968—), 男, 陕西岐山人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事分子生物学、动物功能基因研究。

E-mail: liuhuqi@yahoo.com.cn

张成岗(1970—), 男, 陕西白水人, 研究员, 博士生导师, 主要从事神经生物学、生物信息学研究。

E-mail: zhengcg@bmi.ac.cn

剪接调节因子角度进行研究,比以往局限于单一基因和单一蛋白的研究更深一个层次^[6]。

总结近年来缺氧相关的可变剪接调节因子与基因的研究工作,绝大多数研究者都是利用培养细胞等常规方法进行单一基因、单一蛋白的研究,然而利用细胞模型存在一些问题,如细胞模型的稳定性、细胞类型的差异等。秀丽线虫最早被英国科学家 Brenner 作为一种模式生物用于发育学和遗传学研究,近年来已被广泛应用于包括低氧在内的生命科学的多个研究领域,并取得了重大突破^[7-8]。秀丽线虫的低氧应答通路与人类的相关通路之间具有高度的相似性,低氧也可以引发细胞的损伤和死亡,启动一系列细胞应答以减轻缺氧造成的损伤^[9-10];秀丽线虫的多数基因具有可变剪接形式,其可变剪接因子亦与人类具有高度的相似性;此外,相对于脊椎动物,秀丽线虫具有短小的内含子、已知的全基因组序列、高度完善而简单的遗传系统、简单便捷的基因操作,因此其是研究可变剪接调控机制的重要模式生物之一^[11]。据文献报道,秀丽线虫某些基因的可变剪接在低氧应答的调节过程中具有重要作用^[12-13]。以往的研究多局限于单一基因和单一蛋白,而对能够同时调节多个基因可变剪接的剪接调节因子研究较少。本研究以秀丽线虫为模式生物,采用喂饲 RNA 干涉(RNA interference, RNAi)文库筛选技术,以编码 RNA 结合蛋白(RNA-binding protein, RBP)的基因为筛选对象,寻找与秀丽线虫缺氧损伤表型相关,且能够同时调节多个基因可变剪接的剪接调节因子,旨在为可变剪接在低氧应答中的调控作用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物及试剂 野生型秀丽线虫(N2)和突变株系线虫 *eri-1(mg366)*,购自美国秀丽线虫遗传中心(Caenorhabditis genetics center, CGC);大肠杆菌 OP50(*Streptomyces*⁺)、HT115(DE3)和质粒 L4440,由东京女子医科大学 Mitani S 教授惠赠。异丙基-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、羧苄青霉素(Carb)、适合于 *endA*⁺ 菌株的质粒纯化试剂盒,均为天根公司产品;喂饲 RNAi 文库,购自英国 Geneservice Limited 公司。

1.1.2 仪器 主要仪器包括:缺氧小室(美国 COY 公司)、CW-2000ZX 型燃料电池氧分析仪(北京精微恒测氧技术开发中心)、SP-01 型生化培养箱

(湖北省黄石市恒丰医疗器械有限公司)、SMZ1500 型研究级体视显微镜(日本尼康公司)等。

1.2 方法

1.2.1 秀丽线虫的饲养 将秀丽线虫培养在含有线虫生长培养基(Nematode growth medium, NGM)的培养皿中,以 NGM 表面涂有的 OD₆₀₀ 为 1.25 的 850 μ L 新鲜大肠杆菌 OP50 为食物,在 20 $^{\circ}$ C 生化培养箱中常规培养^[14]。

1.2.2 HT115 感受态细胞的制备 利用 CaCl_2 法制备 HT115 感受态细胞,首先取冻存于 -80°C 的 HT115 50 μ L,接种于 5 mL 无抗生素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养过夜。次日,取菌液 2 mL 于 200 mL LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床培养 1.5 h 后测其 OD₆₀₀ 值,当 OD₆₀₀ 值为 0.4 时将菌液于 4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 10 min。然后弃上清液,向菌体中加预冷的 0.1 mol/L CaCl_2 20 mL,再于 4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液后向菌体中加 2 mL 预冷 CaCl_2 并轻轻混匀,然后按 $V(\text{菌液}):V(\text{甘油})=7:3$ 的比例加入甘油混匀, -80°C 保存备用。

1.2.3 用于 RNA 干涉的对照菌液的制备 将 HT115 作为喂饲秀丽线虫 RNAi 用菌株,将质粒 L4440 转化入 HT115 感受态细胞,制成“mock”菌株,喂食秀丽线虫,用于对照试验。

1.2.4 秀丽线虫同步化培养 将 2 皿(直径 9 cm)食物充足的秀丽线虫成虫(约 500 只)收集在离心管中,用 M9 Buffer 洗涤后,加入虫体裂解缓冲液(0.5 mol/L NaOH+5 g/L NaClO+M9 Buffer)获得虫卵,将卵移入不含 OP50 的 NGM 培养皿中,于 20 $^{\circ}$ C 下培养 16 h,使秀丽线虫同步发育到幼虫 1 期(L1)。将 L1 期秀丽线虫移入到涂有新鲜 OP50 的 NGM 培养皿中,于 20 $^{\circ}$ C 下培养,获得不同日龄的秀丽线虫^[15]。

1.2.5 秀丽线虫喂饲 RNAi 的流程 (1)秀丽线虫 RNAi 培养皿的准备。准备好干冰,从 -80°C 冰箱中取出含有干涉菌株的 384 孔板置于干冰上,用灭菌枪头蘸取冷冻的菌液涂于 LB 培养基(Carb⁺)上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。次日,将培养出的菌株种植到加有 500 L 液体 LB(Amp⁺)的 2 mL 96 孔板中,37 $^{\circ}$ C 培养 12 h。吸取 70 μ L OD₆₀₀ 为 1.48 的培养菌液,涂布 NGM(含 25 g/mL Carbenicillin、1 mmol/L IPTG)培养皿,30 $^{\circ}$ C 诱导 12 h 后用于后续的 RNAi 试验。

(2)秀丽线虫的 RNAi 处理。将同步化培养的

3 只 3 日龄年轻成虫放入干涉培养皿中,20 ℃ 培养 24 h,待母虫产卵后将母虫挑走,再继续将卵培养 72 h。之后于显微镜下观察秀丽线虫表型(如有异常表型则不进行缺氧试验),将表型正常的秀丽线虫转移到低氧环境中进行后续试验。

1.2.6 秀丽线虫的物理缺氧处理 将经过 RNAi 处理并培养 72 h 后的秀丽线虫,用 20 ℃ M9 Buffer 冲洗收集到玻璃管中,定容至 0.5 mL,然后将秀丽线虫放入缺氧小室,于 26 ℃ 下培养,向小室中通入

高纯氮气(99.999%),其氧气浓度由氧感知控制仪控制在 $(0.2 \pm 0.02)\%$ 。培养 11 h 后取出秀丽线虫,并将玻璃管中的 M9 Buffer 吸去,将秀丽线虫移入涂有新鲜 OP50 的含 NGM 的培养皿中,于 20 ℃ 生化培养箱中复氧 24 h 后计算死亡率。统计死亡率时,用铂金丝针触碰秀丽线虫,其身体不动即判定为死亡,咽部吞咽泵不动的秀丽线虫亦判定为死亡。具体试验流程见图 1。

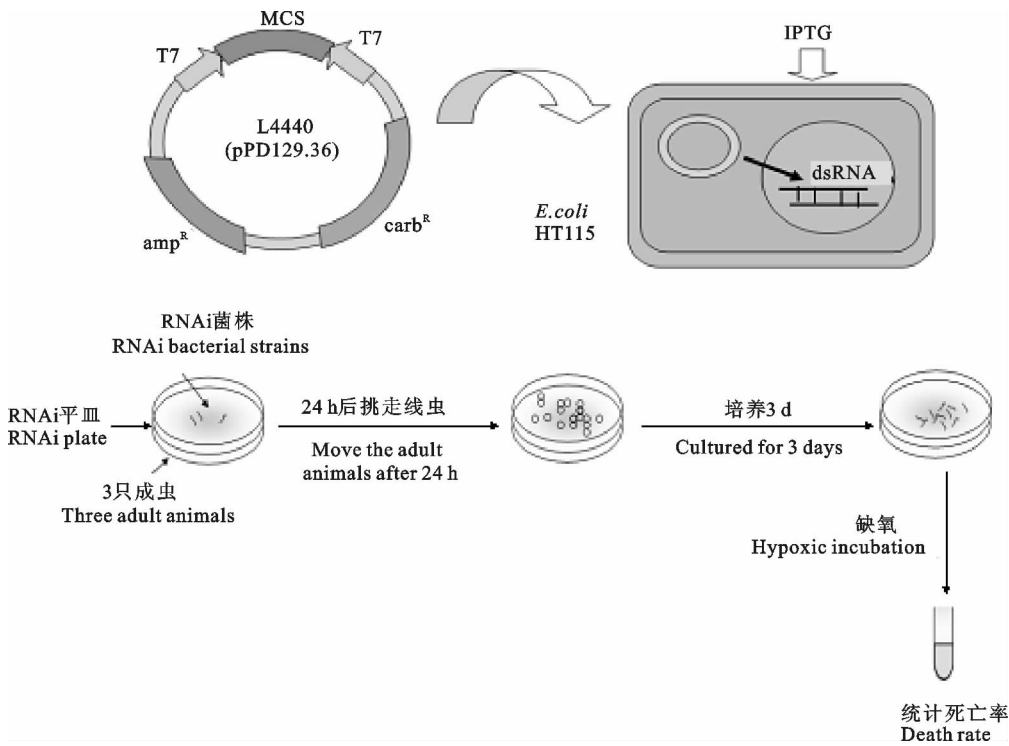


图 1 线虫喂饲 RNAi 的筛选流程

Fig. 1 Screening process of *C. elegans* feeding RNAi

1.2.7 影响秀丽线虫缺氧损伤表型基因的规模化筛选 (1) 第 1 次筛选。从 WormBase 数据库中选 定 500 个 RNA 结合蛋白(RBP)编码基因,选取其中从 feeding RNAi 文库中可查找到的 351 个用于 试验,并根据其在秀丽线虫中表达模式的不同,将其 分为两组:一组为非神经系统表达基因,选取野生型 秀丽线虫株系 N2 进行干涉;另一组为神经系统表 达基因,选取核糖核酸外切酶 *eri-1(mg366)* 突变株 系进行干涉^[16]。从文库中钓取以上基因,并按上述 的干涉筛选流程进行筛选。将 N2/*eri-1(mg366)* 随 机分成 3 组,即常氧干涉组、缺氧干涉组和缺氧空 载干涉组。据文献报道,*dyn-1* 和 *myo-3* 基因干涉 后秀丽线虫发育明显异常^[17-18],因此首先从 RNA 干 涉文库中找到 RNAi(*dyn-1*)和 RNAi(*myo-3*)作为

试验中干涉效果的阳性对照。筛选标准为:基因干 涉组与对照组比较,死亡率差异显著的打分为 A,有 差异但不显著的打分为 B,几乎没有差异的打分为 C。4 次重复试验有 3 次或 3 次以上打分为 C 的基 因,记为阴性基因,其余为阳性基因。

(2) 第 2 次筛选。根据第一次筛选结果,选取 表型有差异的基因进行第二次筛选。此次筛选具 体量化缺氧损伤表现型改变的指标,试验重复 8 次,与 空载干涉组比较有 5 次或 5 次以上打分为 A 的基 因,则记为阳性基因^[19]。利用秀丽线虫喂饲 RNAi 文库筛选缺氧损伤相关基因的流程见图 2。

1.2.8 阳性克隆的测序鉴定 将 1.2.7 节中筛选 的阳性基因的 RNAi 菌液摇菌后提取质粒,然后将 质粒转化到感受态细胞 DH5α 中,再摇菌提取质粒,

送上海英骏公司测序。测序引物序列为：5'-AGGGTTTTCCAGTCACGA-3'，由上海英骏公

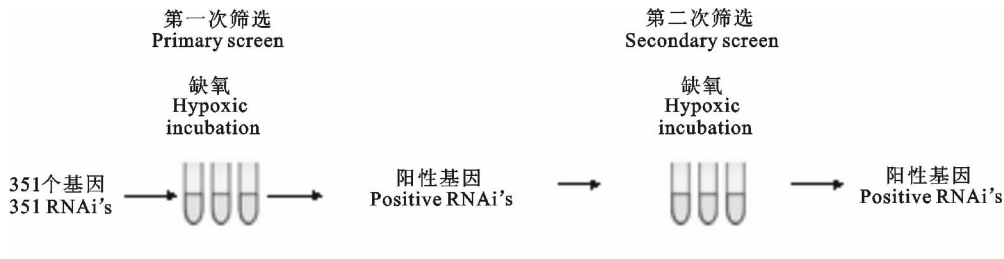


图 2 秀丽线虫喂饲 RNAi 文库筛选缺氧损伤相关 RBP 基因的流程
Fig. 2 Flowchart of the *C. elegans* feeding RNAi library screening hypoxia-related RBP gene

2 结果与分析

2.1 喂饲 RNAi 筛选的有效性检测

为了验证喂饲 RNAi 的效果,在进行大规模干涉筛选之前,本研究选取了文献中报道的在 RNA 干涉后出现明显表型的基因 *dyn-1* 和 *myo-3* 进行 RNAi 预试验^[17-18]。结果显示,2 种基因干涉后秀丽线虫均出现了形态、运动异常的表型(图 3)。在 N2 株系中 *dyn-1* 基因干涉的秀丽线虫出现了排卵障碍,腹中未排出的卵在母体腹中发育为幼虫(图 3B);*dyn-1* 基因在秀丽线虫的神经细胞、肠细胞、肌

细胞等多种类型细胞中表达,其在 *eri-1(mg336)* 株系中的作用尤为明显,表现为发育停滞、运动障碍以及身体不能弯曲,导致“拖尾”样爬行(图 3D)。同时,本研究选择了只在肌细胞表达的肌球蛋白重链编码基因 *myo-3* 进行干涉^[20],结果显示,秀丽线虫出现运动障碍表型,表现为身体不能进行“S”型弯曲(图 3F)。以上结果表明,秀丽线虫喂饲 RNAi 有效。因此,本研究在整个 RNAi 筛选过程中,以 RNAi(*dyn-1*)和 RNAi(*myo-3*)作为 RNAi 效果的阳性对照,以确保 RNAi 的有效性。

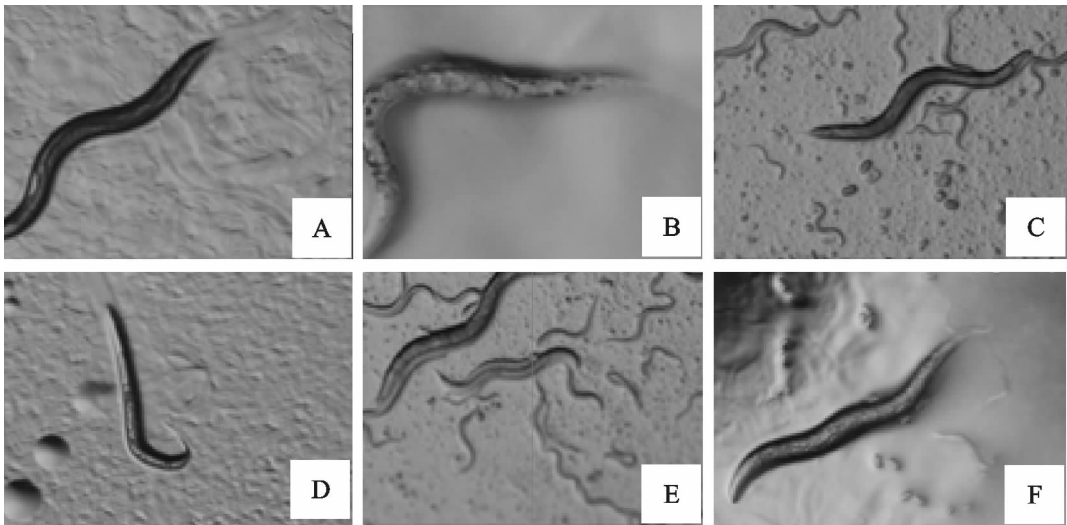


图 3 喂饲 RNAi 后秀丽线虫的表型

A,E. Mock 菌液处理的野生型秀丽线虫(N2);B. RNAi(*dyn-1*)处理的野生型秀丽线虫(N2);C. Mock 菌液处理的 *eri-1(mg336)* 秀丽线虫;D. RNAi(*dyn-1*)处理的 *eri-1(mg336)* 秀丽线虫;F. RNAi(*myo-3*)处理的野生型秀丽线虫(N2)

Fig. 3 Feeding RNAi phenotypes of *C. elegans*

A,E. Mock bacterial strain-treated wild-type (N2);B. RNAi(*dyn-1*)-treated wild-type (N2);C. Mock bacterial strain-treated *eri-1(mg336)*;D. RNAi(*dyn-1*)-treated *eri-1(mg336)*;F. RNAi(*myo-3*)-treated wild-type (N2)

2.2 与缺氧损伤相关 RBP 基因的筛选结果

第一次筛选从秀丽线虫喂饲 RNAi 文库中的 351 个 RNA 结合蛋白的编码基因中,获得了 57 个

阳性基因,占总基因数的 16%,其中包括参与前体 mRNA 剪接和翻译过程的基因,如 W08E3.1 和 R04A9.4 等。第二次筛选到 5 个阳性基因(表 1),

其中剪接因子 1 个(T07D1. 4),参与 mRNA 翻译过程的基因 4 个(T26G10. 1、M03D4. 6、R09A1. 1、F18H3. 3)。此外这 5 个阳性克隆的测序结果均与 RNAi 文库中的基因一致。

表 1 与缺氧损伤相关 RBP 基因的第二次 RNAi 筛选结果

Table 1 Results of secondary RNAi screening hypoxia-related RBP gene

序列名称 Sequence	基因名称 Gene	基因注释 Gene ontology
T26G10. 1		ATP 依赖的 RNA 解旋酶 ATP-dependent RNA helicase
M03D4. 6		翻译起始因子 2C 和相关蛋白 Translation initiation factor 2C (eIF-2C) and related proteins
R09A1. 1	<i>ergo-1</i>	翻译起始因子 2C 和相关蛋白 Translation initiation factor 2C (eIF-2C) and related proteins
T07D1. 4	<i>fox-1</i>	剪接因子 Splicing factor
F18H3. 3	<i>pab-2</i>	多聚腺苷酸结合蛋白 1 同源物 A polyadenylate-binding protein 1 homolog

3 讨 论

本研究通过喂饲 RNAi 的方法在秀丽线虫体内筛选到了 5 个与缺氧相关的剪接调节因子,为阐明可变剪接在缺氧应答中的作用及可能的调节机制奠定了基础。

在整个 RNAi 筛选过程中,需要说明的有如下几点:(1)本研究将缺氧时间定为 11 h,这是根据前期预试验时发现,缺氧 10 h 时秀丽线虫的死亡率为 40%,缺氧 12 h 时秀丽线虫的死亡率增加为 74%而确定的。由于本研究希望筛选出缺氧耐受和缺氧敏感的基因,而缺氧 11 h 时秀丽线虫死亡率为 50%左右,有利于 2 种表型的筛选。(2)第一次筛选的设计适合高通量筛选,且筛选标准比较宽松,这有利于筛选出阳性基因。(3)秀丽线虫 RNAi 的时期选择在卵发育时期,可保证 RNAi 的时间尽可能长,有利于提高干涉效果。在本试验的筛选过程中有些问题是不能避免的,虽然笔者在网站 <http://www.wormbase.org> 上查到秀丽线虫基因组中有 500 个 RBP 基因,然而实际购买的覆盖秀丽线虫全基因组 86%的喂饲 RNAi 文库中只有 351 个,其中有文献报道的剪接因子,如 *rsp-3* 等在基因文库中并不存在^[21],因此本研究筛选时可能会遗漏部分重要基因。根据 RNAi 文库说明书,同时参考张成岗实验室新近完成的对该文库的质量评估分析(<http://biocompute.bmi.ac.cn/CelRNAi/>)可知,文库中菌液克隆的错误率为 10%~20%,这也可能会导致某些关键基因的遗漏。针对这种情况,下一步的研究将自行构建靶基因的 RNAi 载体,制作小规模 RNAi 文库以解决此问题。

在本研究的筛选结果中,*fox-1* 是一个剪接因子编码基因。在脊椎动物中,*fox-1* 表达于心脏、脑和骨骼肌中,而且特异性表达于肌肉发育期间^[22],众多研究证明,*fox-1* 在神经系统中也具有的重要的

剪接调控功能^[23]。由于肌肉和神经组织是功能比较活跃的组织,需要大量的能量,因此也是需氧量较高的组织。*pab-2* 是多聚腺苷酸结合蛋白 1 的同源蛋白,与人体中的 PABP1 具有极高的相似性,其主要功能是通过结合 poly(A)参与 mRNA 的翻译过程。在本研究的筛选结果中,参与蛋白质翻译的还有 R09A1. 1、M03D4. 6 和 T26G10. 1,其均编码翻译起始因子及相关蛋白,其中 T26G10. 1 是一种 ATP-依赖的 RNA 解旋酶,可能是通过参与 rRNA 的加工及核糖体的发生来参与蛋白质翻译(<http://www.wormbase.org>)。综合以上分析可知,剪接调节因子可能在 mRNA 的剪接和翻译水平上参与低氧应答。

由于 RNAi 存在一定的不确定性和效率低的缺陷,故本研究筛选到的与缺氧相关的 RNA 结合蛋白究竟是否参与了缺氧应答,还需进一步利用相应基因丧失型突变株系进行验证^[24]。

[参考文献]

[1] 李佩尧,张成岗. 细胞内低氧感受器: 缺氧诱导因子-1 脯氨酰羟化酶研究进展 [J]. 生理科学进展,2007,38(1):62-64.
Li P Y,Zhang C G. Intracellular hypoxic sensors: Progress in research on hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase-1 [J]. Progress in Physiological Sciences,2007,38(1):62-64. (in Chinese)
[2] Makino Y,Kanopka A,Wilson W J,et al. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus [J]. J Biol Chem, 2002,277(36):32405-32408.
[3] Chun Y S,Choi E,Kim T Y,et al. A dominant-negative isoform lacking exons 11 and 12 of the human hypoxia-inducible factor-1alpha gene [J]. Biochem J,2002,362(1):71-79.
[4] Maynard M A,Evans A,Hara S. et al. Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma [J]. FASEB J, 2005, 19(11): 1396-1406.
[5] 庞剑会,任长虹,李稚锋,等. 动物体内 microRNAs 与转录因子

及剪接因子之间的相互调控 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2009,36(2):151-156.

Pang J H,Ren C H,Li Z F,et al. Gene regulation by transcription factors and splicing factors coupled with microRNAs in animals [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2009, 36 (2):151-156. (in Chinese)

[6] 李稚锋,王正志,张成岗. 真核基因可变剪接研究现状与展望 [J]. 生物信息学,2004,2(2):35-38.

Li Z F,Wang Z Z,Zhang C G. Current progress on alternative pre-mRNA splicing research in eukaryote genes [J]. China Journal of Bioinformatics,2004,2(2):35-38. (in Chinese)

[7] 秦峰松,杨崇林. 小线虫,大发现:*Caenorhabditis elegans* 在生命科学研究中的重要贡献 [J]. 生命科学,2006,18(5):419-424.

Qin F S,Yang C L. Worm into discoveries;*Caenorhabditis elegans* as a model organism of life science research [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences,2006,18(5):419-424. (in Chinese)

[8] 赵娜,任长虹,刘虎岐,等. 秀丽隐杆线虫学习行为研究方法 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2009,37(11):55-61.

Zhao N,Ren C H,Liu H Q,et al. Current progress on the methods for studying learning behavior of *Caenorhabditis elegans* [J]. Journal of Northwest A&F University:Natural Science Edition,2009,37(11):55-61. (in Chinese)

[9] Shen C,Powell-Coffman J A. Genetic analysis of hypoxia signaling and response in *C. elegans* [J]. Ann N Y Acad Sci,2003,995:91-199.

[10] 任长虹,张成岗. 秀丽线虫:低氧应答研究的模式生物 [J]. 生理科学进展,2008,39(1):84-86.

Ren C H,Zhang C G. *Caenorhabditis elegans*: A good model for hypoxia response research [J]. Progress in Physiological Sciences,2008,39(1):84-86. (in Chinese)

[11] Zahler A M. Alternative splicing in *C. elegans* [M]. Worm-Book,2005,26:1-13.

[12] Makino Y,Kanopka A,Wilson W J,et al. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3alpha locus [J]. J Biol Chem, 2002,277(36):32405-32408.

[13] Hirsila M,Koivunen P,Gunzler V,et al. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor [J]. J Biol Chem,2003,278(33):30772-30780.

[14] Brenner S. The genetic of *Caenorhabditis elegans* [J]. Genetics,1974,77(1):71-94.

[15] Appelhoff R J,Tian Y M,Raval R R,et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1,PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor [J]. J Biol Chem, 2004,279(37):38458-38465.

[16] Timmons L. Endogenous inhibitors of RNA interference in *Caenorhabditis elegans* [J]. Bioessays,2004,26(7):715-718.

[17] Thompson H M,Skop A R,Euteneuer U,et al. The large GTPase dynamin associates with the spindle midzone and is required for cytokinesis [J]. Cell Press, 2002, 12 (24): 2111-2117.

[18] Winston W M,Molodowitch C,Hunter C P. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1 [J]. Science,2002,295(5564):2456-2459.

[19] Vashlishan A B,Madison J M,Dybbs M,et al. An RNAi screen identifies genes that regulate GABA synapses [J]. Neuron,2008,58(3):346-361.

[20] Higashibata A,Szewczyk N J,Conley C A,et al. Decreased expression of myogenic transcription factors and myosin heavy chains in *Caenorhabditis elegans* muscles developed during spaceflight [J]. J Exp Biol,2006,209(16):3209-3218.

[21] Mabon M E,Mao X,Jiao Y,et al. Systematic identification of gene activities promoting hypoxic death [J]. Genetics,2009, 181(2):483-496.

[22] Jin Y,Suzuki H,Maegawa S,et al. A vertebrate RNA-binding protein Fox-1 regulates tissue-specific splicing via the pentanucleotide GCAUG [J]. EMBO J,2003,22(4):905-912.

[23] Underwood J G,Boutz P L,Dougherty J D,et al. Homologues of the *Caenorhabditis elegans* Fox-1 protein are neuronal splicing regulators in mammals [J]. Mol Cell Biol,2005,25(22): 10005-10016.

[24] Jansen G,Hazendonk E,Thijssen K L,et al. Reverse genetics by chemical mutagenesis in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nat Genet,1997,17(1):119-121.