

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 21620121152436

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

裂殖酵母热激蛋白 Hsp90 参与着丝粒区  
基因沉默机制的研究

Studies on the effect of heat shock protein 90 (Hsp90) on  
centromeric region gene silencing in fission yeast

许丹

指导教师姓名: 靳全文 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2015 年 5 月

论文答辩时间: 2015 年 5 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2015 年 5 月

## 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

## 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

## 目 录

目 录.....	I
Content.....	IV
缩写词.....	VII
摘要.....	IX
Abstract.....	XI
<b>一、前言.....</b>	<b>1</b>
1.1 裂殖酵母简介.....	1
1.2 RNA 干扰及其主要机制.....	1
1.3 裂殖酵母中的 RNAi.....	3
1.3.1 RITS 复合物.....	4
1.3.2 RDRC 复合物.....	6
1.3.3 CLRC 复合物.....	6
1.3.4 Dcr1.....	6
1.4 RNAi 介导的异染色质形成与基因沉默.....	8
1.4.1 异染色质(Heterochromatin).....	8
1.4.2 RNAi 介导的异染色质形成机制.....	8
1.4.3 RNAi 介导的着丝粒区的基因沉默.....	9
1.5 裂殖酵母 Hsp90 (Heat shock protein) 蛋白.....	13
1.6 Hsp90 蛋白对 RNAi 途径的影响.....	14
1.7 RNAi 研究进展.....	15
1.7.1 RNAi 与核组织(Nuclear organization).....	15
1.7.2 RNAi 与热激蛋白.....	15
1.7.3 RNAi 与人类疾病.....	16
1.8 本部分的研究内容和意义.....	17
<b>二、材料和方法.....</b>	<b>19</b>

1. 材料.....	19
1.1 感受态细胞.....	19
1.2 酵母菌株.....	19
1.3 质粒.....	22
1.4 引物.....	22
1.5 工具酶.....	24
1.6 主要试剂.....	24
1.7 主要仪器设备.....	25
1.8 常用培养基和缓冲溶液的配制.....	26
1.8.1 常用培养基的配制.....	26
1.8.2 常用缓冲溶液的配制.....	29
2. 方法.....	31
2.1 酵母菌株构建.....	31
2.1.1 杂交.....	31
2.1.2 镜检.....	31
2.1.3 酶解.....	31
2.1.4 涂布法.....	31
2.1.5 解剖法.....	32
2.1.6 筛选目的菌株—影印法.....	32
2.2 Drop Test.....	32
2.3 酵母基因组 DNA 提取.....	33
2.4 酵母转化实验—LiAc 法.....	33
2.5 质粒 DNA 的制备.....	34
2.5.1 试剂盒提取质粒 DNA.....	34
2.5.2 手提质粒 DNA.....	35
2.6 琼脂糖胶回收 DNA.....	35
2.7 试剂盒回收 PCR 产物.....	36
2.8 感受态细胞的制备.....	36
2.9 DNA 的细菌转化.....	36

2.10 常规 PCR.....	37
2.11 定点突变 PCR.....	38
2.12 DNA 限制性内切酶的酶切反应.....	38
2.13 DNA 连接.....	39
2.14 酵母细胞 DAPI 染色.....	39
2.15 实时定量 PCR.....	39
2.15.1 酵母总 RNA 提取—TRIZOL 法.....	39
2.15.2 RNA 反转录与 cDNA 制备.....	41
2.15.3 qPCR.....	42
<b>三、结果与分析.....</b>	<b>44</b>
1. 裂殖酵母 Hsp90 蛋白对着丝粒 otr 区基因沉默的影响.....	44
2. 裂殖酵母 Hsp90 蛋白对着丝粒 imr 区基因沉默的影响.....	50
3. 裂殖酵母 Hsp90 蛋白对着丝粒 cnt 区基因沉默的影响.....	52
4. 裂殖酵母 Hsp90 蛋白对人工异染色质区基因沉默的影响.....	54
5. 裂殖酵母 Hsp90 蛋白功能域缺陷对着丝粒 otr 区基因沉默的影响.....	56
<b>四、讨论.....</b>	<b>61</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>65</b>
<b>附录.....</b>	<b>71</b>
<b>致谢.....</b>	<b>73</b>

## Content

<b>Content (Chinese)</b> .....	<b>I</b>
<b>Content (English)</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abbreviations</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abstract (Chinese)</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abstract (English)</b> .....	<b>XI</b>
<b>Part I : Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Introduction of fission yeast</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 RNA interference</b> .....	<b>1</b>
<b>1.3 RNA interference in fission yeast</b> .....	<b>3</b>
1.3.1 RITS complex.....	4
1.3.2 RDRC complex.....	6
1.3.3 CLRC complex.....	6
1.3.4 Dcr1.....	6
<b>1.4 RNAi mediated heterochromatin formation and gene silencing</b> .....	<b>8</b>
1.4.1 Heterochromatin.....	8
1.4.2 The mechanism of heterochromatin formation mediated by RNAi.....	8
1.4.3 RNAi mediated gene silencing in centromere.....	9
<b>1.5 Heat shock protein 90 in fission yeast</b> .....	<b>13</b>
<b>1.6 The influence of Hsp90 in RNAi pathway</b> .....	<b>14</b>
<b>1.7 The research progress of RNAi</b> .....	<b>15</b>
1.7.1 RNAi and Nuclear Organization.....	15
1.7.2 RNAi and Heat Shock Proteins.....	15
1.7.3 RNAi and human disease.....	16
<b>1.8 Research content and significance</b> .....	<b>17</b>
<b>Part II : Materials and Methods</b> .....	<b>19</b>

<b>1. Materials.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 <i>E.coli</i> DH5<math>\alpha</math> and Trans1-T1 competent cell.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Yeast strains.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3 Plasmids.....</b>	<b>22</b>
<b>1.4 Primers.....</b>	<b>22</b>
<b>1.5 The tools of molecular biology enzyme.....</b>	<b>24</b>
<b>1.6 Reagents.....</b>	<b>24</b>
<b>1.7 Instruments and Equipments.....</b>	<b>25</b>
<b>1.8 Mediums and buffers.....</b>	<b>26</b>
1.8.1 Preparation of mediums.....	26
1.8.2 Preparation of buffer solutions.....	29
<b>2. Methods.....</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Contrusion of fission yeast strains.....</b>	<b>31</b>
2.1.1 Strains cross.....	31
2.1.2 Microscopic examination.....	31
2.1.3 Enzymolysis.....	31
2.1.4 Spores spreading on plates.....	31
2.1.5 Dissection.....	32
2.1.6 Desired strain selection.....	32
<b>2.2 Drop Test.....</b>	<b>32</b>
<b>2.3 Fission yeast genomic DNA isolation -mechanical disruption.....</b>	<b>33</b>
<b>2.4 Transformation in fission yeast.....</b>	<b>33</b>
<b>2.5 Preparation of plasmid DNA.....</b>	<b>34</b>
2.5.1 Preparation of plasmid DNA using Kit.....	34
2.5.2 Mini-preparation of plasmid DNA.....	35
<b>2.6 Gel extraction of DNA.....</b>	<b>35</b>
<b>2.7 Recycling of PCR productsby Kit.....</b>	<b>36</b>
<b>2.8 Preparation of competent cells for transformation.....</b>	<b>36</b>
<b>2.9 DNA transformation.....</b>	<b>36</b>
<b>2.10 Common PCR.....</b>	<b>37</b>



2.11 Site-directed mutagenesis.....	38
2.12 Restriction endonuclease digestion of DNA.....	38
2.13 DNA ligation.....	39
2.14 DAPI staining.....	39
2.15 Real Time PCR.....	39
2.15.1 The extraction of total RNA by TRIZOL method.....	39
2.15.2 RNA reverse transcription and cDNA preparation.....	41
2.15.3 qPCR.....	42
<b>PartIII: Results and analysis.....</b>	<b>44</b>
1. The effect of <i>swi1-26</i> on the gene silencing of centromere otr region in fission yeast.....	44
2. The effect of <i>swi1-26</i> on the gene silencing of centromere imr region in fission yeast.....	50
3. The effect of <i>swi1-26</i> on the gene silencing of centromere cnt region in fission yeast.....	52
4. The effect of <i>swi1-26</i> on the gene silencing of artificial heterochromatin region in fission yeast.....	54
5. The effect of Hsp90's functional domain defects on the gene silencing of centromere otr region in fission yeast.....	56
<b>PartIV: Discussion.....</b>	<b>61</b>
<b>References.....</b>	<b>65</b>
<b>Appendix.....</b>	<b>71</b>
<b>Acknowledgements.....</b>	<b>73</b>

## 缩写词

cnt	The central core	中央核心
CLRC	Clr4 methyl transferase complex	Clr4 甲基化转移酶复合物
CD	Chromo domain	染色质域
dsRBD	Double stranded RNA binding domain	双链 RNA 结合结构域
dsRNA	Double stranded RNA	双链 RNA
Hsp90	Heat shock protein 90	热激蛋白 90
H3K9	The ninth Lysine of Histone 3	组蛋白 3 的第 9 位赖氨酸
imr	The innermost repeats	内部重复序列
IP	Immunoprecipitation	免疫沉淀反应
NPC	Nuclear pore complex	核孔复合物
otr	The outer repeats	外部重复序列
piRNA	PIWI interacting RNA	PIWI 相互作用的 RNA
PTGS	Post transcriptional gene silencing	转录后基因沉默
PIKK	phosphatidylinositol 3-kinase-like protein kinase	磷脂酰肌醇-3-激酶样蛋白激酶
RNAi	RNA interference	RNA 干扰
Rdp1	RNA dependent RNA polymerase 1	RNA 依赖的 RNA 聚合酶 1
RDRC	RNA directed RNA Polymerase Complex	RNA 介导的 RNA 聚合酶复合物
RNase III	Ribonuclease III	核糖核酸酶 III
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	逆转录聚合酶链式反应
Real-Time PCR (qPCR)	Real Time Polymerase Chain Reaction	实时定量聚合酶链反应
ssRNA	Single Stranded RNA	单链 RNA

TGS	Transcriptional gene silencing	转录基因沉默
TEV <sub>P</sub>	Tobacco Etch Virus Protease	烟草蚀纹病毒蛋白酶
TPR	Tetratricopeptide Repeats	三十四肽重复序列结构域

厦门大学博硕士论文摘要库

## 摘要

基因沉默(Gene silencing)作为一项保守的进化机制普遍存在于生物界中，主要是因为它可以保护生物体抵抗病毒、外来核酸的入侵和维持自身遗传稳定性等功能。我们通常所说的基因沉默发生在两种水平上：一是转录水平的基因沉默(Transcriptional gene silencing, TGS)，它是由于 DNA 甲基化、异染色质化及位置效应引起的；二是转录后基因沉默(Post transcriptional gene silencing, PTGS)，它是指在基因发生转录后通过对靶 RNA 特异性的降解从而让基因失活不能翻译成蛋白的过程。RNAi 是一种基于转录与转录后水平的基因沉默机制，因此备受关注。裂殖酵母主要的四个异染色质区之一着丝粒区的基因沉默是 RNAi 依赖的。Hsp90 作为细胞中重要的分子伴侣，它的表达和分布十分广泛并且功能多样化。哺乳动物中研究表明 Hsp90 蛋白可以调控 PAZ 蛋白家族，RNAi 途径中的 Argonaute 蛋白就属于此家族。因此，我们猜测裂殖酵母的 Hsp90 蛋白(裂殖酵母中由 *swol*<sup>+</sup>基因编码)可能也具有调控 Ago1 蛋白的功能进而参与 RNAi 途径。

我们实验室前期通过生化实验发现 Hsp90 蛋白和 Ago1 蛋白之间确实存在相互作用。当 Hsp90 编码基因 *swol*<sup>+</sup>突变时，即在 *swol-26* 背景下菌株中 Ago1 的蛋白含量与野生型菌株相比有所下降，说明 Hsp90 蛋白具有维持 Ago1 蛋白稳定性的功能。为了探究 Hsp90 与基因沉默途径 RNAi 的关系，我们以裂殖酵母典型的异染色质—着丝粒区为基础，在带有 *ura4*<sup>+</sup>或者 *ade6*<sup>+</sup>报道基因的菌株背景下，构建了 *swol-26* 和 RNAi 关键组分的单突变以及 *swol-26* 和 RNAi 关键组分的双突变菌株，观察着丝粒 *otr* 区、*imr* 区和 *cnt* 区基因沉默解除情况。裂殖酵母着丝粒 *otr* 区和部分的 *imr* 区是强烈的基因沉默区域，而 *cnt* 区则是基因沉默较弱的区域，主要是因为它们在结构组成上的差别造成的。观察结果发现 *swol-26* 单突变菌株可以明显解除着丝粒 *otr* 区的基因沉默，而对着丝粒 *imr* 区和 *cnt* 区基因沉默解除效应则不是那么明显；*swol-26* 和 RNAi 关键组分的双突变菌株在着丝粒区基因沉默解除效应比任何单突变菌株都更强烈。本研究除了研究 *swol-26* 对着丝粒这一组成型异染色质基因沉默影响外，我们还研究了 *swol-26* 对人工异染色质基因沉默的影响。通过人为地将 Tas3 带到常染色质的 *ura4*<sup>+</sup>基因位点，可以

让此区域异染色质化，使表达活跃的 *ura4<sup>+</sup>* 基因沉默，这种由 Tas3 引起的基因沉默现象是与 RNAi 相关的。同样地我们发现 *swol-26* 可以解除人工异染色质的基因沉默，说明 Hsp90 蛋白可能在维持异染色质结构的稳定性中发挥作用。

综上所述，我们发现了裂殖酵母 Hsp90 蛋白参与异染色质的基因沉默这一新功能，我们的研究结果为 RNAi 途径的完善和基于 RNAi 途径的人类相关疾病的治疗奠定了基础。

关键词：基因沉默；RNA 干扰；热激蛋白 90

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

Gene silencing as an evolutionary conserved mechanism exists in the biological world, mainly because it can protect the organism against viruses, the invasion of foreign nucleic acid and maintain its genetic stability. Gene silencing we usually refers to occurs on two levels: first, transcriptional gene silencing (TGS), which is due to DNA methylation, formation of heterochromatin and position effect. Second, post-transcriptional gene silencing (PTGS), which refers to the degradation of the special target RNA after transcription so that the inactivation gene cannot be translated into protein. RNAi is a kind of gene silencing mechanism and which is based on both transcriptional and post-transcriptional level, so it has caused widely attention. One of the main four heterochromatin regions in fission yeast, the gene silencing of centromere region is depends on RNAi. Hsp90, as an important molecular chaperone in cells, its expression and distribution is very extensive and have all kinds of function. Studies in mammalian have shown that Hsp90 can regulate PAZ family of proteins, and Argonaute protein in the RNAi pathway belongs to this family. Therefore, we speculate that Hsp90 protein of fission yeast (encoding by *swol*<sup>+</sup> in fission yeast) may also have the function of regulating Ago1 protein and thus participating RNAi pathway.

By the early biochemical laboratory experiments and we found that Hsp90 protein can exactly interact with Ago1 protein in vitro. When the encoding gene of Hsp90 mutate, the protein level of Ago1 comparing with wild-type strain decreased in *swol-26* background strain, indicating that Hsp90 protein have the function of maintaining Ago1 protein stability. In order to explore the relationship between Hsp90 protein and gene silencing pathways of RNAi, we use the typical heterochromatin centromere region in fission yeast and strains on the back ground of the *ura4*<sup>+</sup> or *ade6*<sup>+</sup> as reporter gene, which was inserted into the centromere otr region, imr region and cnt region, and Construction of *swol-26* or RNAi main components single mutations and *swol-26* and RNAi components double mutant strains, observe

centromere otr region, imr region and cnt region gene silencing unlocking. Centromere otr region and part of imr region in fission yeast has been recognized as a strong gene silencing region, while the cnt region is a weak gene silencing region, mainly because they are different in structure and composition. The results show *swol-26* single mutant strains can relieve centromere otr region gene silencing significantly, while the relieving effect of gene silencing in the centromere imr region and cnt region is not so obvious; the *swol-26* and RNAi components double mutant strains in the centromere region gene silencing relieving effect is stronger than any of the single mutant strains. In this research, we are not only study the gene silencing effect of *swol-26* on the centromeric constitutive heterochromatin, but also study the gene silencing effect of *swol-26* on artificial heterochromatin. By artificially brought Tas3 to euchromatin *ura4<sup>+</sup>* locus, it can make this region to be heterochromatin, the actively expressing *ura4<sup>+</sup>* gene get silencing and do not express, this kind of gene silencing phenomenon mediated by Tas3 is related to RNAi. Similarly, we find *swol-26* can relieve the silencing of artificial heterochromatin, indicating that Hsp90 protein may play a role in maintaining the structure stability of the heterochromatin.

In summary, we found that the fission yeast Hsp90 protein is involved in heterochromatin silencing as a new function, our findings can not only complete RNAi pathway but also make foundation for approaches to treat human disease based on RNAi.

Key words: gene silencing; RNA interfering; Hsp90

## 一、前言

### 1.1 裂殖酵母简介

粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)最早是在 1893 年由 Paul Lindner 从东非粟啤酒中分离出来的,它是一种单细胞的真核生物,俗称裂殖酵母(Fission yeast)。其基因组大小为 13.8Mb,包含三条染色体,大约 5000 个基因,其中 10% 是孤儿基因(Orphans),在进化上与芽殖酵母(Budding yeast, *Saccharomyces cerevisia*)亲缘关系较远<sup>[1]</sup>。

裂殖酵母在 1950 年已经成为一种实验模式生物,主要应用: Urs Leupold 的遗传学研究和 Murdoch Mitchison 的细胞周期研究。科学家们热衷于裂殖酵母的研究,是因为它可用于药物分析<sup>[2, 3]</sup>和近年来生物医药的快速发展<sup>[4, 5]</sup>。作为经典的模式生物裂殖酵母拥有以下优点:分裂周期快,繁殖一代的时间为 2-4h;容易培养且费用低;易分离突变体<sup>[6]</sup>;容易进行遗传学的操作等。因此,裂殖酵母常用来研究细胞周期调控、DNA 损伤修复、DNA 重组和 RNAi 介导的异染色质形成与染色体分离等细胞进程。2002 年完成了裂殖酵母基因组的测序,发现它存在很多与人类疾病相关基因的同源基因<sup>[7]</sup>。研究裂殖酵母这一简单的真核生物有助于了解哺乳动物等高等生物尤其是人类疾病相关基因<sup>[8, 9]</sup>。

### 1.2 RNA 干扰及其主要机制

RNA 干扰(RNA interference; RNAi)是指 RNA 分子抑制基因表达这一自然发生的过程。1998 年 Andrew Fire 和 Craig Mello 因在秀丽隐杆线虫(*C.elegans*)中发现 RNAi 现象而获得 2006 年诺贝尔物理或者医学奖<sup>[10]</sup>。

RNAi 在机制上与许多保守的 RNA 沉默途径相通,它们控制细胞内基因表达,保护基因组不受外来重复 DNA 序列、逆转录因子和转座子的干扰。这些 RNA 沉默途径都与 small RNAs (20-30nucleotides)有关,它通过一系列机制使同源靶序列失活。生物体内主要有三类 small RNAs: short interfering RNAs(siRNAs)<sup>[11]</sup>、microRNAs(miRNAs)和 PIWI-interfering RNAs(pi-RNAs)<sup>[12]</sup>。siRNA 和 miRNAs 是长的 dsRNA 前体经核糖核酸酶 III Dicer 酶切产生的 21-25 个核苷酸序列,主要在植物和动物中参与转录后基因沉默。miRNA 介导的 RNA 沉默途径几乎在所有的真核生物中都存在,人类中多达 90% 的基因受 miRNAs 的调节并且一些蛋白



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.