

项目编号：

“ 箬政基金 ”

大学生见习研修计划申请书

课题名称： DNA 聚合酶 ϵ 催化亚基 Cdc20

在裂殖酵母减数分裂中的功能研究

申请人： 徐成

院 系： 生命科学学院

指导教师： 马红

填表日期： 2014.3.10

复旦大学教务处制表

二、 导师信息

姓名	马红	工号	08240
出生年月	1960.10	职称	教授
单位	复旦大学生命科学学院		
办公室电话	021-65642800	手机	13917736580
电子邮箱	hongma@fudan.edu.cn		
个人主页（或个人介绍网页链接）	http://life.fudan.edu.cn/s/84/t/296/3e/ce/info16078.htm		
导师简介 （包括研究方向、成果、论文等）	研究方向：用分子遗传学、基因组学和进化生物学、和生物信息学等手段，研究花发育分子机理及进化、雄性育性的分子调控、减数分裂基因功能、基因家族进化及其和功能、基因复制及物种进化的关系。 代表性论文和专著： [Selected Publications; total 200] 1. Ma, H.* (2013). A battle between genomes in plant male fertility. Nat. Genet. 45: 472-473. 2. Wang, Y., Cheng, Z., Huang, J., Hong, Y., Gong, Z., Copenhaver, G., Ma, H.* (2012). The DNA replication factor RFC1 gene is required for interference-sensitive meiotic crossover in Arabidopsis thaliana. PLoS Genet. 3. Lu, P.#, Han, H.#, Qi, J.#, Jiang J., Wijeratne, A., Li, T.*, Ma, H.* (2012). Analysis of Arabidopsis genome-wide variations before and after meiosis and meiotic recombination by re-sequencing Landsberg erecta and all four products of single meiosis. Genome Res, 22: 508-518. (# co-first authors).		
导师所在 实验室/教研室/ 课题组介绍	马老师实验室主要从事植物生殖发育生物学研究，研究方向包括：（1）植物减数分裂的重要基因功能和调控网络的分析；（2）花药早期细胞分裂分化的信号传导和转录调控的分子遗传和组学研究；（3）植物抗逆机制和重要基因的研究。		
简述选择该导师的 理由	马老师实验室有专门研究减数分裂分子机制的课题组，对于该课题无论在研究内容，还是实验技术方面都能提供全面的支持。马老师思维严谨、视野开阔，同时和蔼可亲，通过马老师的交流，我在研究思想、实验方法、科研规范等方面都受益匪浅。此外，在“拔尖人才计划”中，马老师是我的导师；通过在马老师实验室一年多的实习经历，我对实验室的基本科研环境也适应良好。		
备注	无		

注：1. 以上内容需请导师过目并确认无误。

2. 页面不足可加页填写。

三、 课题开题报告

一、课题目的与意义

本课题计划通过反向遗传学的方法研究 DNA 聚合酶 ϵ 催化亚基 Cdc20 在裂殖酵母减数分裂中的功能，探究 Cdc20 通过促进异染色质沉默影响减数分裂的猜想，并以 *cdc20⁺* 的突变体为载体，尝试研究异染色质对于减数分裂正常进行的作用和意义。

本课题的研究将使我们对于减数分裂过程分子机制的认识更加全面、深刻，并丰富 Pol ϵ 表观遗传功能方面的研究。此外，本课题还可为以后在酵母中研究其他减数分裂相关基因的功能建立一套可行的体系。

二、课题研究状况

1、减数分裂概述

减数分裂 (meiosis) 是真核生物特有的细胞分裂过程，同时又是真核生物有性生殖的必经之路。减数分裂过程中，DNA 复制 1 次，细胞连续分裂 2 次，最终获得染色体数目减半的配子细胞。其中，减数第一次分裂伴随着同源染色体的配对、联会、重组等重要事件，最终导致同源染色体的分离；减数第二次分裂是与有丝分裂类似的均等分裂，导致姐妹染色单体的分离。通过减数分裂形成配子，是产生有性生殖后代的先决条件；而非同源染色体以及同源染色体的非姐妹染色单体间的重组，则对于生物多样性和进化有着重要意义 (Ma 2006; Kleckner 1996)。

减数分裂过程在从低等到高等的真核生物中都是高度保守的 (Yamamoto 1996)。在裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 中，减数分裂除了具有以上的共同特征外，还在生理过程、细胞周期调控等方面具有一些独特的特点。裂殖酵母在营养生长中多以单倍体的形式存在 (Asakawa et al. 2001)。在缺乏氮元素的条件下 (Nitrogen starvation) 下，细胞周期会在 G1 期停滞，继而两个不同交配型 (h^+ 和 h^-) 单倍体酵母发生交配 (mating)，产生合子。合子在缺氮的条件下会启动 DNA 复制，直接进入减数分裂，产生四个并排的单倍体细胞核。接着，通过孢子形成 (sporulation) 的过程，每个子细胞核均被孢囊壁包裹，形成带有四个子囊孢子 (ascospore) 的子囊 (ascus) (Yamamoto 1996; Asakawa et al. 2001; Mata et al. 2002)。该过程如图 1 所示。

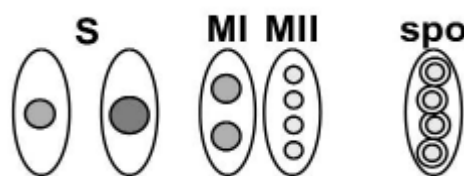


图 1 裂殖酵母减数分裂和孢子形成过程
(引自 Mata et al. 2002)

2、DNA 聚合酶 ϵ 的研究现状

目前已知真核生物中存在 Pol α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 θ 等多种 DNA 聚合酶 (Hubscher et al. 2000)。其中，DNA 聚合酶 α 、 δ 、 ϵ 由于其聚合酶活性位点具有保守的氨基酸基序 (motif) 而被归入 DNA 聚合酶 B 家族，它们是真核细胞基因组 DNA 复制的主要参与者 (Walsh and Eckert 2014)。

DNA 聚合酶 ϵ (Pol ϵ) 的全酶在所有已研究的真核生物中均以异源四聚体蛋白的形式存在，包含一个最大的催化亚基和 B、C、D 三个小亚基 (Walsh and Eckert 2014)。其中，最大的催化亚基 Pol2 (in *Saccharomyces cerevisiae*)，在真核生物中高度保守。其 N 端包含一个保守的聚合酶结构域和一个 3'-5' 核酸外切酶结构域，与 DNA 复制和校对 (proofreading) 有关；C 端则是一段在其他 B 家族聚合酶中不存在、却在所有已知的 Pol ϵ 中高度保守的区域，其末端富含半胱氨酸

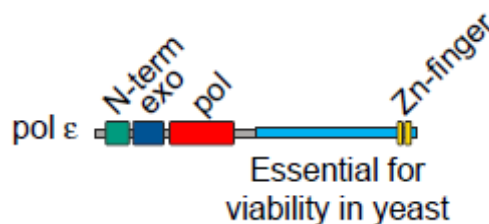


图 2 Pol ϵ 催化亚基的结构示意图
(引自 Hubscher et al. 2000)

(Cys)，可能形成两个锌指结构 (zinc finger)，认为可能负责与其他蛋白质以及复合物中的其他亚基结合，并稳定 Pol ϵ 复合物的结构 (Walsh and Eckert 2014; Dua et al. 1999; Kesti et al. 1999)。Pol2 的结构如图 2 所示。

根据目前公认的真核生物 DNA 复制模型，Pol ϵ 在复制叉处主要参与前导链 (leading strand) 的合成 (Walsh and Eckert 2014)，这一理论已获得了强有力的实验证据支持 (Pursell et al. 2007)。Pol ϵ 对于 DNA 合成的催化是极其高效、持续的，不依赖于增殖细胞核抗原 (PCNA) 的滑动夹 (sliding clamp)，并且具有很高的保真性 (在 B 家族 DNA 聚合酶中最高) (Walsh and Eckert 2014; Ohya, Kawasaki and Hiraga et al. 2002)。不久前，酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中 Pol ϵ 催化核心的晶体结构首次获得解析 (Hogg et al. 2014)。与已知 Pol δ 的结构相比，Pol ϵ 的催化核心具有一个独特的 P 结构域 (P domain)，其功能为 Pol ϵ 的持续合成能力和高保真性提供了一个较可靠的解释 (Hogg et al. 2014; Zahn and Doublié 2014)。

除此之外，Pol ϵ 在 DNA 复制起始、碱基切除修复、细胞周期调控等重要细胞过程中的功能 (Zegerman 2013; Hubscher et al. 2000; Walsh and Eckert 2014)、Pol ϵ 的分子进化过程 (Tahirov et al. 2009) 以及 POL2 在哺乳动物中同源基因 POLE1 突变与人类疾病的关系 (Schmid et al. 2012) 等诸多研究领域，也都有大量文献报道，在此不一一赘述。

POL2 在裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 中的同源基因 *cdc20⁺* 同样编码 Pol ϵ 的催化亚基 Cdc20 (D'Urso and Nurse 1997)。*cdc20⁺* 的开放阅读框 (ORF) 全长 6600bp，编码蛋白质 Cdc20 共 2199 个氨基酸，其主要结构与 Pol2 基本相同 (D'Urso and Nurse 1997; Sugino et al. 1998)。目前已报道裂殖酵母中 Cdc20 的功能，如参与染色体 DNA 复制过程 (D'Urso and Nurse 1997; Sugino et al. 1998)、介导 DNA 复制起始 (D'Urso and Nurse 1997; Feng and D'Urso 2001) 等，也大致与其他物种中的研究相似。裂殖酵母中全基因组缺失突变库的构建结果显示，*cdc20⁺* 缺失会造成致死的表型 (Kim et al. 2010)。另一方面，对 Cdc20 不同结构域缺失的研究则表明，包含高度保守的聚合酶和外切酶结构域的 N 端对于裂殖酵母的生存并不是必须的，而 C 端则不可或缺 (Feng and D'Urso 2001)。这与酿酒酵母中 Pol2 的实验结果一致 (Kesti et al. 1999)。

近年来的研究逐渐表明，Pol ϵ 在表观遗传上具有重要的作用。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中，POL2 同源基因之一 *POL2a* 的突变导致了染色质部分区域组蛋白 H3 第 4 位亮氨酸 (H3K4) 甲基化和 H3K27 甲基化的改变，进一步影响了基因的表达，说明 Pol ϵ 与组蛋白修饰化和异染色质的基因沉默有关 (Yin et al. 2009)。而 Li 等在裂殖酵母中的研究则表明，Cdc20 参与形成了与基因沉默相关的 Rik1-Dos2 复合体，促进了 siRNA 的生成和异染色质组蛋白 H3K9 的甲基化修饰，从而使异染色质沉默 (具体机制将在下文详述) (Li et al. 2011)。但是，相比于 DNA 复制中的功能研究，对于 Pol ϵ 在表观遗传中作用的揭示才刚刚

起步，现有的成果，尤其是 Pol ϵ 通过表观遗传影响细胞与个体生理过程的研究，还很不深入。其中，Pol ϵ 的这一功能对减数分裂的可能意义并不清楚，而在裂殖酵母中，迄今对于 Cdc20 在减数分裂中的作用机制尚无报道。

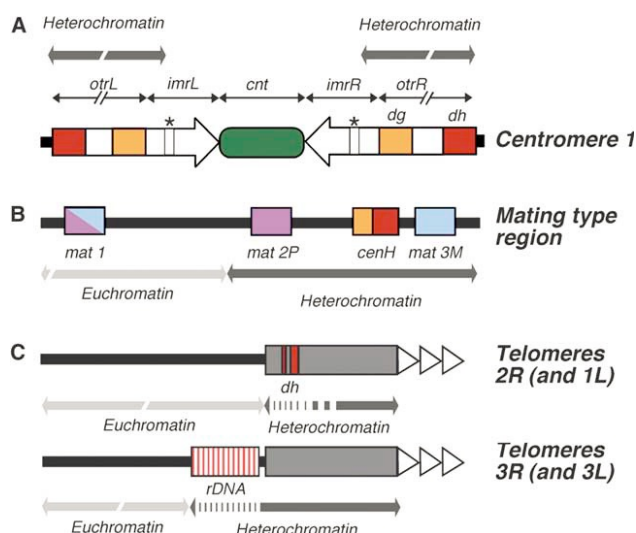


图 3 裂殖酵母异染色质三个主要分布区示意图
(引自 Verdel and Moazed 2005)

3、裂殖酵母中的异染色质

异染色质是更高级的染色质结构，对于遗传信息的调控、传递有着至关重要的作用。裂殖酵母中，异染色质主要由串联的 DNA 重复序列构成，存在于近着丝粒区（pericentromere）、端粒区（telomere）、交配型区域（mating-type region）以及部分独立的基因区域（Cam et al. 2005; Gonzalez and Li 2012）。前三处区域的结构及异染色质分布情况如图 3 所示。这些异染色质区的主要特征是包括组蛋白低乙酰化（*hypoacetylation*）以及组蛋白 H3 第 9 位亮氨酸甲基化修饰（H3K9me）（Reyes-Turcu and Grewal 2012），而异染色质的形成则涉及了组蛋白去乙酰化、H3K9 甲基化和组蛋白结合蛋白招募等一系列过程（Verdel and Moazed 2005）。

根据裂殖酵母中的研究，异染色质形成中的 H3K9 甲基化存在多种分子机制（Reyes-Turcu and Grewal 2012），其中依赖于 RNA 干扰（RNAi-dependent）的机制最为普遍。在三处主要异染色质区中，端粒和交配型区域都通过 RNAi 和另一套可替代的机制形成异染色质，而近着丝粒区的异染色质仅通过 RNAi 形成（Verdel and Moazed 2005）。依赖于 RNAi 的异染色质形成机制在植物、果蝇、线虫和哺乳动物中都较为保守（Gonzalez and Li 2012），其在裂殖酵母中的分子机制，在最近十余年的研究中已获得了较清晰地揭示，可以概述如下：

首先，RNA 聚合酶 PolIII 从染色质的近着丝粒、端粒和交配型区域的异染色质区转录出 *dg* 和 *dh* 重复序列（参见图 3）。随后，转录得到的 RNA 在 RITS（RNA-induced transcriptional silence）复合体、RDRC（RNA-directed RNA polymerase complex）复合体和 Dcr1（Dicer）的共同作用下被处理为 siRNA。三者处理的可能机制是：RDRC 复合体（包含 Rdp1、Cid1 和 Hrr1）通过其 RNA 聚合酶的活性（主要来自 Rdp1）将单链的异染色质转录产物转变为双链 RNA（dsRNA），新合成的 dsRNA 随后被 Dcr1 切割成 siRNA。产生的 siRNA 结合至 RITS 复合体（包含 Ago1、Chp1 和 Tas3）的 Ago1

上，在其引导下 RITS 复合体定位至新合成的异染色质转录片段，并通过 Chp1 与异染色质上的 H3K9 甲基化位点结合。结合后的 RITS 复合体可以招募 RDRC 复合体，协调转录 RNA 的处理，更高效的产生 dsRNA 和 siRNA，促进更多 RITS 复合体的结合。与此同时，RITS 复合体通过衔接蛋白 Stc1 与 ClrC 复合体（即上文提到的 Rik1-Dos2 复合体）相互作用，使其定位于异染色质区。ClrC 复合体由甲基转移酶 Clr4 和 Rik1、Dos1、Dos2、Cul4 等蛋白组成，其正确定位后最终得以催化异染色质区组蛋白 H3K9 的甲基化修饰。甲基化后的 H3K9，为异染色质蛋白 HP1（heterochromatin protein 1）在裂殖酵母中的同源蛋白 Swi6 提供了结合位点，并可以进一步招募其他沉默因子，最终导致异染色质沉默（Verdel and Moazed 2005; Grewal 2010; Reyes-Turcu and Grewal 2012; Gonzalez and Li 2012）。该过程如图 4 所示。

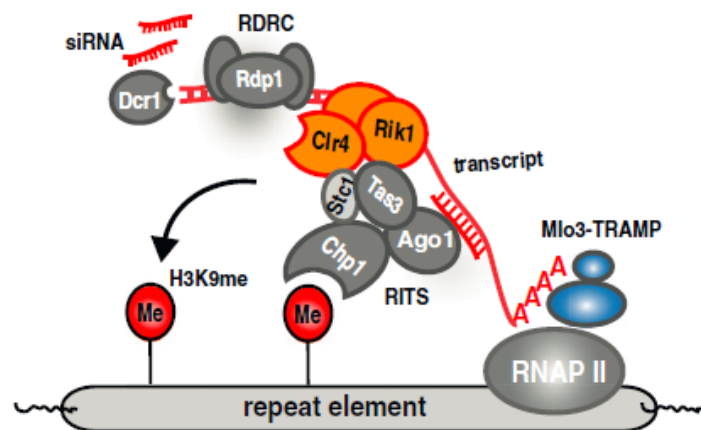


图 4 裂殖酵母中依赖于 RNAi 的异染色质形成机制
（引自 Reyes-Turcu and Grewal 2012）

如上文所述，我们所关心的裂殖酵母中 DNA 聚合酶 ϵ 的催化亚基 Cdc20 参与了 H3K9 甲基化和异染色质沉默的过程。根据 Li 等的研究，Cdc20 参与形成的途径即为依赖于 RNAi 的途径，并且在其中扮演关键角色（Li et al. 2011）。在他们提出的模型中，Cdc20 主要有以

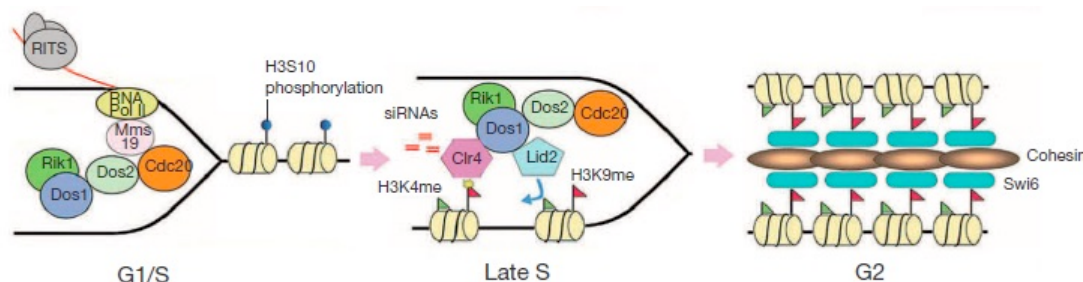


图 5 Cdc20 在裂殖酵母异染色质形成中的作用过程示意图

（引自 Li et al. 2011）

下几方面作用：（1）与蛋白 Mms19 相结合，通过其调控 RNA 聚合酶 PolII 的活性，促进其对异染色质区重复序列的转录；（2）在（1）的同时招募 Dos2 和 Rik1 至异染色质区；（3）在此之后作为 Rik1-Dos2 复合体（即 ClrC 复合体）的组成部分参与介导组蛋白 H3K9 甲基化（Li et al. 2011; Gonzalez and Li 2012）。这些作用过程如图 5 所示。另一个值得注意的问题是，裂殖酵母中异染色质的形成并不是一个孤立的过程，而是伴随着 DNA 复制、细胞分裂而发生的：DNA 复制时，染色体上的原有的组蛋白修饰均被破坏，因此复制获得的子代染色体上就必须正确地形成常染色质和异染色质（Li et al. 2011）。细胞周期方面的研究证据进一步显示，这两个过程之间不是前后交替、相互独立的，S 期早期是染色体着丝粒复制发生的时期，但同时也是着丝粒异染色质区重复片段转录产物和 siRNA 出现的时期（Kloc et al. 2008），这种时间上的关联性让我们有理由相信，这两者很可能是相互偶联的。而 Cdc20 在异染色质形成中作用的报道，则为这一猜想提供了直接的证据：根据上述模型，作为 DNA 聚合酶的催化亚基，Cdc20 对异染色质形成的（1）（2）两方面功能正是在其合成 DNA 前导链的同时实现的（Li et al. 2011）。由此，Cdc20 在裂殖酵母异染色质形成中的作用不仅仅是参与者，更可能是联系、协调 DNA 复制和异染色质形成的桥梁，其重要性可见一斑。

作为比染色质更高级的结构，异染色质形成中的缺陷势必会对染色体的行为产生较大的影响。有丝分裂和减数分裂是细胞中涉及染色体行为的两个重要生理过程。在鼠、果蝇等模式生物中，异染色质异常在有丝分裂和减数分裂产生的缺陷表型已有一些报道（Peters and O'Carroll 2001; Hayashi et al. 2005; McKee et al. 2000）。而在裂殖酵母中，该方面的研究相对丰富。根据 *ago1*⁺、*dos1*⁺、*rik1*⁺ 等基因突变体有丝分裂和减数分裂表型的观察结果，异染色质的破坏在两种分裂过程中都会导致染色体的错误分离；有丝分裂中染色体的错误分离与近着丝粒区黏连蛋白（cohesin）的破坏有较大关系（Hall et al. 2002; Li and Goto et al. 2005）；而减数分裂中的表型产生的机制则较为复杂。目前已知，作为同源染色体配对前奏的端粒聚集（telomere clustering）现象（Ma 2006），在这些突变体中存在一定缺陷（Hall et al. 2002; Tuzon et al. 2004）；除此之外，异染色质在抑制着丝粒区重组（Ellermeier et al. 2010）、招募着丝粒保护蛋白（Yamagishi et al. 2008）等方面的功能也都有报道。根据现有研究成果，异染色质在有丝分裂和减数分裂中的重要作用是毋庸置疑的。但是相比于有丝分裂，减数分裂中的研究还很不深入和系统。减数分裂中染色体行为的复杂性，同时意味着异染色质在其中功能的复杂性，因此，仍有众多可能的影响因素仍留待揭示。

三、课题主要内容与基本思路，难点与创新点分析

（一）课题基本思路

1、课题提出

本课题的提出主要基于以下几方面：

（1）根据多个相关领域的文献（参见上文）：Pol ϵ 的催化亚基在异染色质形成和基因

沉默等表观遗传方面具有关键的作用；异染色质对于染色体行为有重要调控作用，而减数分裂的过程中包含了染色体浓缩、配对、联会、重组以及两次差别很大的染色体分离等多种染色体行为，异染色质异常会对其正常进行产生严重的影响。因此，认为 Pol ϵ 的催化亚基在减数分裂中可能具有十分重要的功能。

(2) 作为在真核生物中高度保守的 DNA 聚合酶，Pol ϵ 在减数分裂中的功能缺乏系统研究；而由于现有报道较少，Pol ϵ 参与异染色质形成这一功能也需要在更多相关领域进一步的研究和探索。此外，目前对于异染色质在减数分裂中的作用的机制研究还很不深入，以 Pol ϵ 的研究为载体，有望在这一问题上获得更深层次的认识。因此，本课题具有一定意义。

(3) 作为单细胞的真核模式生物，酵母在遗传分析、生化实验方面具有明显的优势，是研究具体分子机制的良好实验材料。而对比酿酒酵母和裂殖酵母，裂殖酵母拥有与高等动物相似的 RNAi 机制和异染色质，而酿酒酵母中的异染色质则相对简单 (Grunstein et al. 2007)；此外，裂殖酵母更适合研究染色体行为 (Forsburg and Rhind 2006)。这些都与本课题需要研究的问题相契合。因此，研究对象选择裂殖酵母。

2、研究基本思路

本课题的研究工作主要将从以下四方面开展：(1) 构建 *cdc20*⁺ 的突变体；(2) 观察突变体的产孢表型（即减数分裂的最后结果）；(3) 证明 Cdc20 在减数分裂中同样参与了异染色质形成；(4) 研究突变体减数分裂过程中的染色体行为异常。这四方面工作与本课题研究内容的关系如图 6 所示。

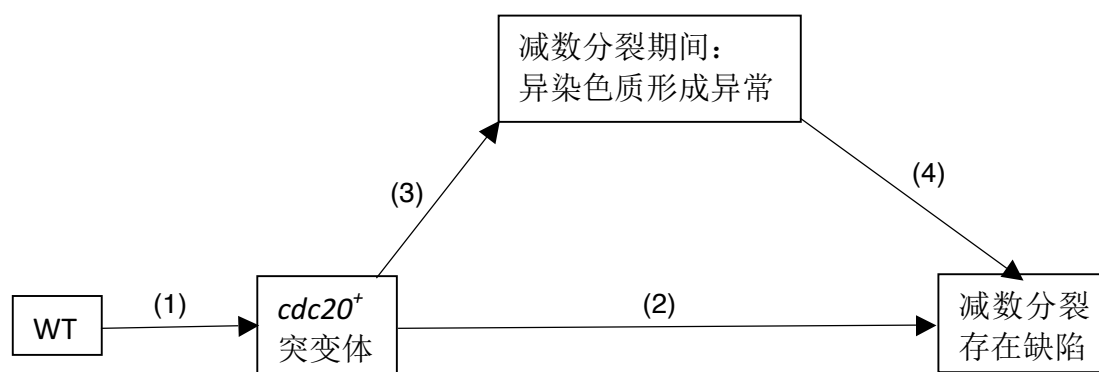


图 6 课题基本思路示意图

四方面的工作都以实验为主，具体的实验设计将在下文详细叙述。通过这四方面的实验工作，将较完整和系统地解决课题中所提出的问题。

(二) 课题主要内容

下面对四大方面工作的实验内容一一详述：

1、构建 *cdc20*⁺ 突变体

如“课题现状”中所述，裂殖酵母中 *cdc20*⁺ 缺失会产生致死的表型，而 Cdc20 的 C 端对于酵母生存同样不可或缺。根据 Li 等 (2011) 和 Yin 等 (2009) 研究中所用的突变体，推测 Cdc20 的 N 端结构域可能参与异染色质的形成；根据文献报道，Cdc20 的 N 端对于裂殖酵母的生存是非必需的 (Feng and D'Urso 2001)，因而决定构建编码 N 端缺失 Cdc20 蛋白的突变体。具体流程如下：

(1) 通过分子克隆构建所需质粒：

(i) 对 pDUAL-FFH1-CDC20(*Ura4*⁺) 质粒测序。

注：该质粒由吕红老师组的余垚老师直接提供，转入裂殖酵母中后可以表达正常的 Cdc20 蛋白 (Matsuyama et al. 2006)。

(ii) 利用 pClone-Hyg1 质粒构建 *cdc20*⁺ 的敲除质粒。

注：pClone-Hyg1 质粒由余垚老师提供，构建方法是将 *cdc20*⁺ 的 5'-UTR 和 3'-UTR 分别克隆至质粒上的同一位点 (Gegan et al. 2006)。

(iii) 利用 pFA6a-3FLAG-KanMX6 质粒构建 *cdc20^{mt}* 的替换质粒。

注: pFA6a-3FLAG-KanMX6 质粒同样由余垚老师提供, 构建方法是将 *cdc20⁺* 缺失 N 端编码序列后的突变序列 *cdc20^{mt}* 和 3'-UTR 分别克隆至质粒上的同一位点。

(2) 构建突变菌株

(i) 将 pDUAL-FFH1-CDC20 质粒转入 h90 菌株的野生型裂殖酵母, 菌株命名为 XC1。

(ii) 在 XC1 中转入酶切后的敲除质粒, 将 *cdc20⁺* 基因用潮霉素 (Hygromycin) 抗性敲除, 菌株命名为 XC2。

(iii) 在 XC2 中转入酶切后的替换质粒, 在已敲除 *cdc20⁺* 的原 *cdc20* 的基因座区整合入突变后的 *cdc20^{mt}* 序列, 菌株命名为 XC3。

(iv) 将 XC3 在 5-FOA 的平板上生长, 踢除 pDUAL-FFH1-CDC20 质粒, 获得最终的突变菌株, 命名为 XC4。

(3) 对获得的突变菌株 XC4 测序鉴定。

2、观察突变体的产孢表型

孢子形成 (sporulation) 是减数分裂的最终结果, 减数分裂各环节中出现的错误一般会在最后的产孢结果中得到体现。因此观察产孢是检查减数分裂表型的基础。方法如下:

以野生型 h90 菌株为对照, 将生长至对数生长期的单倍体突变菌株涂布于至 SPAS 平板, 于 25℃ 培养 2~4 天 (Forsburg and Rhind 2006)。取菌体用微分干涉 (DIC) 或相差 (Phase) 显微镜, 配合 DAPI 染色观察产孢表型。与野生型相对照, 主要关注以下几点:

- (1) 产生子囊和子囊孢子的形态、细胞核的分布是否异常;
- (2) 统计分析出孢率 (sporulation efficiency) 是否显著降低;
- (3) 分别统计分析内部含有 1~4 个子囊孢子的子囊比例。

注: h90 菌株为同宗配合菌株, 不需要 *h⁺*、*h⁻* 交配型的混合。

3、证明 Cdc20 在减数分裂中参与异染色质形成

此前关于 Cdc20 参与异染色质形成的研究均在酵母的营养生长过程中进行。由于有性生殖和无性生殖的细胞在培养条件、细胞生理过程等方面有明显差异, 因此 Cdc20 在减数分裂中是否参与异染色质形成仍需要研究。主要有以下两个实验:

(1) 定量反转录 PCR (qRT-PCR)

使用一种特殊菌株: 在近着丝粒的 *otr* 区 (属于异染色质) 插入了 *ura4⁺* 基因 (Li et al. 2011; Yamagishi et al. 2008)。在该菌株中构建 *cdc20⁺* 的突变体 (方法同 1, 但可以直接使用 1 中已经构建好的质粒, 故只要做几次转化即可)。

以野生型的该菌株为对照, 用 2 中的方法诱导突变菌株减数分裂, 获取减数分裂前期的细胞, 提取 RNA, 用 qRT-PCR 检测 *ura4⁺* 基因的表达量, 与野生型对比, 确定其基因沉默状况。

(2) 免疫共沉淀 (Co-IP)

使用野生型 *pat1-114* 温度敏感型二倍体菌株, 利用标准方法诱导其发生同步减数分裂 (synchronized meiosis) (Bahler et al. 1991; Cipak et al. 2014)。分别获取处于减数分裂 S 期、M 期的细胞, 提取总蛋白, 利用 Co-IP 的实验技术寻找 Cdc20 的相互作用蛋白, 考察其是否与异染色质形成和基因沉默的功能相关。

4、研究突变体减数分裂过程中的染色体行为异常

cdc20⁺ 突变体中异染色质被破坏, 由此产生的减数分裂染色体行为异常是多方面的。由于研究周期的限制, 本课题中只利用以下的实验较系统地研究部分的异常行为:

(1) 使用一种特殊菌株: 在 1 号染色体的着丝粒区 (*cen1*) 的 *lys1⁺* 位点插入了一段 LacO 重复序列, 同时该菌株表达 LacI-GFP 融合蛋白, 可以结合到 LacO 重复序列上, 使 *cen1* 发出绿色荧光 (Hall et al. 2002; Asakawa et al. 2001)。在该菌株中构建 *cdc20⁺* 的突变体。

(2) 以野生型的该菌株为对照, 用 2 中的方法诱导突变菌株减数分裂, 用荧光显微镜观察产生的子囊和子囊孢子。可能有图 7 中的四种情况。其中第一种对应正常的染色体分离, 第二种说明减数第二次分裂出现了一次染色体错误分离, 第三种来源于两次减数第二次分裂中的染色体错分, 而第四种则是减数第一次分裂中同源染色体分离错误造成的。对四种可能的表型进行统计分析, 由此考察两次分裂过程中染色体的错误分离状况。

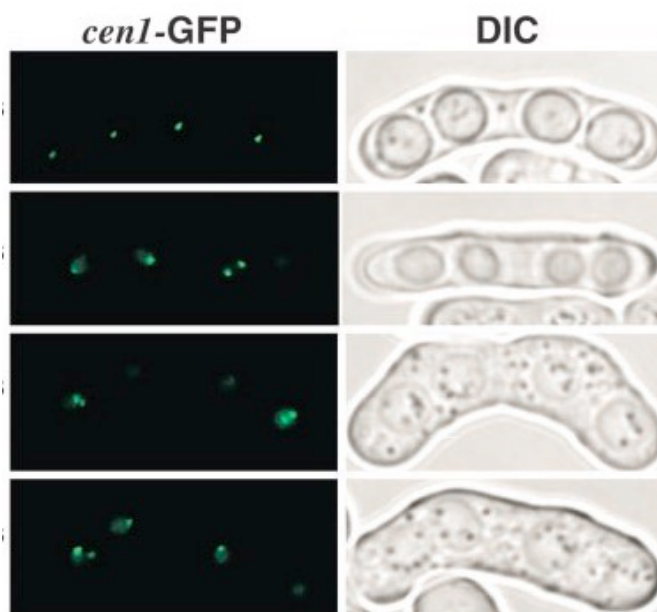


图 7 突变体产生子囊的四种可能表型
(引自 Hall et al. 2002)

(3) 仍运用该菌株的 *cdc20*⁺ 突变体, 以野生型为对照, 诱导减数分裂后, 观察其减数分裂各重要时期 *cen1*-GFP 的信号分布是否异常 (有条件可以尝试活体动态观察), 由此考察以下的减数分裂重要事件是否异常:

(i) 减数分裂 S 期后姐妹染色单体通过黏连蛋白 (cohesin) 紧密相连; (ii) 减数第一次分裂前期同源染色体配对; (iii) 第一次染色体分离; (iv) 第一次分离后姐妹染色单体仍通过黏连蛋白紧密相连; (v) 第二次染色体分离。

据此分析异染色质破坏对减数分裂中染色体行为的影响。

5、选做实验

注: 该部分实验内容所需解决的问题, 仍属于前四方面的框架中。通过这些实验, 可以对 *Cdc20* 在减数分裂中的功能获得更细致、深入的认识。

(1) 运用 1 中的方法分别构建 *Cdc20* 蛋白 N 段外切酶结构域 (Exo) 和聚合酶结构域 (Pol) 缺失的突变体菌株, 观察产孢表型, 探究参与 *Cdc20* 表观遗传功能的结构域。

(2) 通过染色质免疫共沉淀测序 (ChIP-Seq) 的技术, 在野生型和突变体中分别考察基因沉默相关组蛋白结合的 DNA 序列, 系统研究 *Cdc20* 影响的异染色质区域, 以及它们在基因组水平的分布规律。

(3) 观察突变体减数分裂过程中的染色体行为, 可以结合端粒的荧光原位杂交 (FISH)、黏连蛋白、纺锤体 (spindle) 等结构的免疫荧光染色等方法, 对减数分裂中重要事件和结构发生的变化获得更细致的结果, 从而使对异染色质的功能、作用机制的研究更深入。

(三) 难点分析

1、需要利用多种菌株构建突变体

在多个菌株中构建 *cdc20*⁺ 的突变体是本课题研究的前提和基础。而由于单纯敲除 *cdc20*⁺ 会致死, 必须采用先敲除再替换的方式构建部分缺失的突变体。由于酵母基因操作技术的成熟、快捷, 敲除和替换基因的操作本身难度不大, 耗时不多; 构建突变体实验主要的难度可能来源于构建敲除质粒和替换质粒。由于 *cdc20*⁺ 的编码序列 (CDS) 本身较长, 获得突变序列 *cdc20*^{mt} 并将其克隆质粒中, 可能会耗费较多时间, 并遇到一些困难。需要注意的是, 本课题中构建的多个菌株都可以使用相同的敲除和替换质粒, 只需做三次转化即可。因此, 这一实验内容是可行的。

2、需要摸清野生型和突变体酵母减数分裂的细胞周期

本课题中 (3)、(4) 部分的许多实验需要定位于研究酵母减数分裂的某一时期。由于不同菌株细胞周期存在差异, 突变体也可能改变其分裂过程, 因此需要事先摸清减数分裂中

的细胞周期。这里可以模仿 Li 等（2011）在有丝分裂中所做的工作，将减数分裂过程中的一些指标变化与时间进程联系起来。另外，也可以尝试用药物将减数分裂的过程阻断在某一时期。

3、免疫共沉淀结果不确定性较大

作为蛋白质生化方面的实验，免疫共沉淀实验存在不确定性，要想获得理想的实验结果会遇到一些困难。

（四）创新点分析

1、对于 Pol ϵ 在减数分裂中的功能获得新的、系统的认识

如上文所述，作为在真核生物中高度保守的 DNA 聚合酶，Pol ϵ 在减数分裂中的功能缺乏系统研究；而 Pol ϵ 参与异染色质形成这一功能发现不久，缺乏深入研究。揭示 Pol ϵ 催化亚基通过促进异染色质沉默影响减数分裂的机制，对于减数分裂分子调控和 Pol ϵ 表观遗传功能意义的研究都具有创新意义。

2、对于异染色质沉默在减数分裂中的作用有更深入的了解

异染色质沉默在减数分裂中的作用是重要且多方面的，但目前的研究却很不深入，对作用机制的了解不够清晰。本课题将裂殖酵母作为实验对象，以 *cdc20⁺* 的突变体为载体，有望在这一问题上获得更深层次的认识。

3、选做实验部分的结果将在一些具体的问题上有新的发现

四、课题研究计划

日程表如下：

2014.3~2014.5：在 h90 菌株中构建 *cdc20⁺* 突变体；

2014.6：观察突变体产孢表型；

2014.7：在其他几个特殊菌株中构建 *cdc20⁺* 突变体，摸清酵母减数分裂的细胞周期；

2014.8：qRT-PCR 实验，免疫共沉淀实验；准备中期汇报；

2014.9~2014.10：研究突变体减数分裂过程中的染色体行为异常；

2014.11~2015.1：机动时间和选做实验；

2015.2~2015.3：总结和准备结题。

五、课题预期结果

- 1、构建出 Cdc20 蛋白 N 端缺失的 *cdc20⁺* 突变体；
- 2、确认突变体在减数分裂过程中存在明显的缺陷；
- 3、证明 Cdc20 在减数分裂中同样参与了异染色质形成的过程；
- 4、对于异染色质破坏后减数分裂过程中染色体行为的异常有相对系统的了解；
- 5、选做部分的预期结果见“选做实验”。

参考文献：

- [1] Kleckner N. Meiosis: how could it work?[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93(16): 8167-8174.
- [2] Ma H. A molecular portrait of Arabidopsis meiosis[J]. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 2006, 4.
- [3] Yamamoto M. Regulation of meiosis in fission yeast[J]. *Cell structure and function*, 1996, 21(5): 431-436.
- [4] Asakawa H, Kitamura K, Shimoda C. A novel Cdc20-related WD-repeat protein, Fzr1, is required for spore formation in *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2001, 265(3): 424-435.
- [5] Mata J, Lyne R, Burns G, et al. The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast[J]. *Nature genetics*, 2002, 32(1): 143-147.
- [6] Hübscher U, Nasheuer H P, Syväoja J E. Eukaryotic DNA polymerases, a growing family[J].

Trends in biochemical sciences, 2000, 25(3): 143-147.

[7] Walsh E, Eckert K A. Eukaryotic Replicative DNA Polymerases[M]//*Nucleic Acid Polymerases*. Springer Berlin Heidelberg, 2014: 17-41.

[8] Dua R, Levy D L, Campbell J L. Analysis of the essential functions of the C-terminal protein/protein interaction domain of *Saccharomyces cerevisiae* pol ϵ and its unexpected ability to support growth in the absence of the DNA polymerase domain[J]. *Journal of biological chemistry*, 1999, 274(32): 22283-22288.

[9] Kesti T, Flick K, Keränen S, et al. DNA polymerase ϵ catalytic domains are dispensable for DNA replication, DNA repair, and cell viability[J]. *Molecular cell*, 1999, 3(5): 679-685.

[10] Pursell Z F, Isoz I, Lundström E B, et al. Yeast DNA polymerase ϵ participates in leading-strand DNA replication[J]. *Science*, 2007, 317(5834): 127-130.

[11] Ohya T, Kawasaki Y, Hiraga S I, et al. The DNA polymerase domain of pol ϵ is required for rapid, efficient, and highly accurate chromosomal DNA replication, telomere length maintenance, and normal cell senescence in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(31): 28099-28108.

[12] Hogg M, Osterman P, Bylund G O, et al. Structural basis for processive DNA synthesis by yeast DNA polymerase ϵ [J]. *Nature structural & molecular biology*, 2014, 21(1): 49-55.

[13] Zahn K E, Doublé S. Look Ma, no PCNA: how DNA polymerase epsilon synthesizes long stretches of DNA without a processivity factor[J]. *Nature structural & molecular biology*, 2014, 21(1): 12-14.

[14] Zegerman P. DNA Replication: Polymerase Epsilon as a Non-catalytic Converter of the Helicase[J]. *Current Biology*, 2013, 23(7): R273-R276.

[15] Tahirov T H, Makarova K S, Rogozin I B, et al. Evolution of DNA polymerases: an inactivated polymerase-exonuclease module in Pol epsilon and a chimeric origin of eukaryotic polymerases from two classes of archaeal ancestors[J]. *Biol Direct*, 2009, 4(11).

[16] Schmid J P, Lemoine R, Nehme N, et al. Polymerase ϵ 1 mutation in a human syndrome with facial dysmorphism, immunodeficiency, livedo, and short stature ("FILS syndrome")[J]. *The Journal of experimental medicine*, 2012, 209(13): 2323-2330.

[17] D'Urso G, Nurse P. *Schizosaccharomyces pombe* cdc20+ encodes DNA polymerase ϵ and is required for chromosomal replication but not for the S phase checkpoint[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94(23): 12491-12496.

[18] Sugino A, Ohara T, Sebastian J, et al. DNA polymerase ϵ encoded by cdc20+ is required for chromosomal DNA replication in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Genes to Cells*, 1998, 3(2): 99-110.

[19] Feng W, D'Urso G. *Schizosaccharomyces pombe* cells lacking the amino-terminal catalytic domains of DNA polymerase epsilon are viable but require the DNA damage checkpoint control[J]. *Molecular and cellular biology*, 2001, 21(14): 4495-4504.

[20] Kim D U, Hayles J, Kim D, et al. Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Nature biotechnology*, 2010, 28(6): 617-623.

[21] Yin H, Zhang X, Liu J, et al. Epigenetic regulation, somatic homologous recombination, and abscisic acid signaling are influenced by DNA polymerase ϵ mutation in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(2): 386-402.

[22] Li F, Martienssen R, Cande W Z. Coordination of DNA replication and histone modification by the Rik1-Dos2 complex[J]. *Nature*, 2011, 475(7355): 244-248.

[23] Cam H P, Sugiyama T, Chen E S, et al. Comprehensive analysis of heterochromatin-and RNAi-mediated epigenetic control of the fission yeast genome[J]. *Nature genetics*, 2005, 37(8):

809-819.

- [24] Gonzalez M, Li F. DNA replication, RNAi and epigenetic inheritance[J]. *Epigenetics*, 2012, 7(1): 14-19.
- [25] Reyes-Turcu F E, Grewal S I S. Different means, same end—heterochromatin formation by RNAi and RNAi-independent RNA processing factors in fission yeast[J]. *Current opinion in genetics & development*, 2012, 22(2): 156-163.
- [26] Verdel A, Moazed D. RNAi-directed assembly of heterochromatin in fission yeast[J]. *FEBS letters*, 2005, 579(26): 5872-5878.
- [27] Grewal S I S. RNAi-dependent formation of heterochromatin and its diverse functions[J]. *Current opinion in genetics & development*, 2010, 20(2): 134-141.
- [28] Kloc A, Zaratiegui M, Nora E, et al. RNA interference guides histone modification during the S phase of chromosomal replication[J]. *Current Biology*, 2008, 18(7): 490-495.
- [29] Peters A H F M, O'Carroll D, Scherthan H, et al. Loss of the Suv39h Histone Methyltransferases Impairs Mammalian Heterochromatin and Genome Stability[J]. *Cell*, 2001, 107(3): 323-337.
- [30] Hayashi K, Yoshida K, Matsui Y. A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase[J]. *Nature*, 2005, 438(7066): 374-378.
- [31] McKee B D, Hong C, Das S. On the roles of heterochromatin and euchromatin in meiosis in Drosophila: mapping chromosomal pairing sites and testing candidate mutations for effects on X–Y nondisjunction and meiotic drive in male meiosis[J]. *Genetica*, 2000, 109(1-2): 77-93.
- [32] Hall I M, Noma K, Grewal S I S. RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(1): 193-198.
- [33] Li F, Goto D B, Zaratiegui M, et al. Two novel proteins, dos1 and dos2, interact with rik1 to regulate heterochromatic RNA interference and histone modification[J]. *Current biology*, 2005, 15(16): 1448-1457.
- [34] Tuzon C T, Borgstrom B, Weilguny D, et al. The fission yeast heterochromatin protein Rik1 is required for telomere clustering during meiosis[J]. *The Journal of cell biology*, 2004, 165(6): 759-765.
- [35] Ellormeier C, Higuchi E C, Phadnis N, et al. RNAi and heterochromatin repress centromeric meiotic recombination[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(19): 8701-8705.
- [36] Yamagishi Y, Sakuno T, Shimura M, et al. Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin[J]. *Nature*, 2008, 455(7210): 251-255.
- [37] Grunstein M, Gasser S M. Epigenetics in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2013, 5(7): a017491.
- [38] Forsburg S L, Rhind N. Basic methods for fission yeast[J]. *Yeast*, 2006, 23(3): 173-183.
- [39] Matsuyama A, Arai R, Yashiroda Y, et al. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Nature biotechnology*, 2006, 24(7): 841-847.
- [40] Gegan J, Rabitsch P K, Rumpf C, et al. High-throughput knockout screen in fission yeast[J]. *Nature protocols*, 2006, 1(5): 2457-2464.
- [41] Bähler J, Schuchert P, Grimm C, et al. Synchronized meiosis and recombination in fission yeast: observations with pat1-114 diploid cells[J]. *Current genetics*, 1991, 19(6): 445-451.
- [42] Cipak L, Polakova S, Hyppa R W, et al. Synchronized fission yeast meiosis using an ATP analog-sensitive Pat1 protein kinase[J]. *Nature protocols*, 2014, 9(1): 223-231.

本人郑重声明：所呈交的申请报告是本人在导师指导下独立工作所取得的成果。除加注说明的引用内容外，本文不包含任何其他个人或集体的研究成果。

学生签名：徐成

日期：2014 年 3 月 15 日

四、 课题经费预算

FDUROP 课题预算表			
项目类型： ☒ 蓉政 ☐ 望道 ☐ 曦源 ☐ 上海大学生创新活动计划 ☐ 国家大学生创新性实验计划			学生姓名 徐成
序号	费用事项	费用信息	费用预算（元）
1	实验试剂	培养基基本化学成分、DNA 聚合酶、限制性内切酶、连接酶，分子克隆相关试剂盒	3000
2	实验耗材	离心管、枪头、PCR 管、培养皿、其他一次性用品	500
3	实验材料	感受态大肠杆菌、酵母、质粒	500
合计			4000

注：填写办法请参照附件《FDUROP 项目财务制度》，不够可加页。

五、 推荐意见

I 导师推荐意见（请您在写推荐意见之前阅读《致导师函》，并手写意见。）

徐成同学学习努力，成绩优秀。在实验室积极开展研究，表现出对减数分裂的浓厚兴趣。他的思维和动手能力都比较强，具有很好的科研潜力。

本课题利用裂殖酵母的优势，探索减数分裂的调控机制，具有较重要的意义。课题的时间周期和工作量比较适合本科生完成。对徐成同学是一个很好地学习机会，有望取得一些有意义的结果。

他为准备这一课题，阅读了相关文献，并向其他老师请教，制定了实验方案。希望支持徐成的申请。

导师：马红

2014 年 3 月 17 日

II. 推荐教师意见（请您手写）

徐成同学在我们实验室有较长的实习经历。期间，他全面学习了减数分裂分析的细胞学方法和分子生物学方法，在研究工作中细致认真，大胆设想，细心验证，进步明显。

在提出和完善这一课题的过程中，徐成同学思想活跃，自主查阅了大量文献，再对相关领域广泛了解的基础上，提出了很多新的想法。制定总体方案后，又对第一阶段的实验写了一份十分详尽的计划。

这种主动性和热情，让我相信，徐成同学一定能完成该项目的研究工作。

推荐老师：陆平利

2014 年 3 月 16 日

六、 评审意见

基本 评 定	课题意义: ☐ 具有理论和实际意义 ☐ 具有理论意义 ☐ 具有实际意义 ☐ 意义不大	创新性: ☐ 很好 ☐ 较好 ☐ 一般 ☐ 没有创新之处
	独立性: ☐ 自己提出课题方向, 在导师指导下独立完成 ☐ 参加导师课题组, 但是相对独立的子课题 ☐ 没有独立的想法和课题	可行性: ☐ 选题大小适中, 研究方案设计合理, 切实可行 ☐ 选题和研究方案尚可, 但需要改进或细化 ☐ 题目和研究方案需要有较大调整或改进 ☐ 选题不合理, 研究方案不可行
	资料准备: ☐ 完成资料综述或前期调研, 包括第一手资料在内的材料充分 ☐ 资料准备或调研稍显不足 ☐ 资料准备有较大缺陷	书写规范性: ☐ 符合学术规范 ☐ 规范稍显不足 ☐ 与学术规范有较大差距 ☐ 完全不符合学术规范
综合 评价 与 建议	您给学生的评审意见及修改建议:	

您对该课题的熟悉程度：☐非常熟悉 ☐熟悉 ☐一般 ☐了解 ☐不了解

您对该课题的评分：☐优秀 ☐良好 ☐一般 ☐很差 ☐非常糟糕

关于该课题您还有特别需对 **FDUROP** 管委会说明的吗？

立项建议：☐同意资助 ☐小修改后重新申请 ☐大修改后重新申请 ☐不同意资助

评审老师：

日期： 年 月 日

以下部分仅供 **FDUROP** 管委会决策立项时参考：

=====

=

以下信息由 **FDUROP** 管委会填写：

是否决定立项：☐是 ☐否

立项时间： 年 月

=====

以 下 附 件 均 不 交

=====

