



同濟大學 1907-2017
Tongji University



同濟博士論叢
TONGJI Dissertation Series

总主编 伍江 副总主编 雷星晖

刘海亮 祝建 朱健康 著

拟南芥中RNA指导的 DNA甲基化

RNA-directed DNA Methylation in
Arabidopsis Thaliana



同濟大學出版社
TONGJI UNIVERSITY PRESS



同济博士论丛
TONGJI Dissertation Series

总主编 伍江 副总主编 雷星晖

刘海亮 祝建 朱健康 著

拟南芥中RNA指导的 DNA甲基化

RNA-directed DNA Methylation in
Arabidopsis Thaliana



同济大学出版社
TONGJI UNIVERSITY PRESS

内 容 提 要

DNA 甲基化是一个保守的表观机理,在维持基因组稳定和器官发育方面起到非常重要的作用。本书通过实验得到了部分数据,通过筛选 *ros1* 的抑制子,确定了 RDM1、RDM3、RDM4 是 RdDM 受体复合体中的新成员,在连接与沉默复合体相关联的小 RNA 功能与先前存在或者重新胞嘧啶甲基化中起到至关重要的作用。

图书在版编目(CIP)数据

拟南芥中 RNA 指导的 DNA 甲基化 / 刘海亮,祝建,朱健康著. —上海:同济大学出版社,2017.8

(同济博士论丛 / 伍江总主编)

ISBN 978-7-5608-7024-3

I. ①拟… II. ①刘… ②祝… ③朱… III. ①脱氧核
糖核酸—甲基化—研究 IV. ①Q523

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 093849 号

拟南芥中 RNA 指导的 DNA 甲基化

刘海亮 祝 建 朱健康 著

出 品 人 华春荣 责任编辑 陈红梅 胡晗欣

责任校对 徐春莲 封面设计 陈益平

出版发行 同济大学出版社 www.tongjipress.com.cn

(地址:上海市四平路 1239 号 邮编:200092 电话:021-65985622)

经 销 全国各地新华书店

排版制作 南京展望文化发展有限公司

印 刷 浙江广育爱多印务有限公司

开 本 787 mm×1092 mm 1/16

印 张 7.25

字 数 145 000

版 次 2017 年 8 月第 1 版 2017 年 8 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-5608-7024-3

定 价 42.00 元

本书若有印装质量问题,请向本社发行部调换 版权所有 侵权必究

“同济博士论丛”编写领导小组

组 长：杨贤金 钟志华

副 组 长：伍 江 江 波

成 员：方守恩 蔡达峰 马锦明 姜富明 吴志强
徐建平 吕培明 顾祥林 雷星晖

办公室成员：李 兰 华春荣 段存广 姚建中

“同济博士论丛”编辑委员会

总 主 编：伍 江

副 总 主 编：雷星晖

编委会委员：（按姓氏笔画顺序排列）

丁晓强	万 钢	马卫民	马在田	马秋武	马建新
王 磊	王占山	王华忠	王国建	王洪伟	王雪峰
尤建新	甘礼华	左曙光	石来德	卢永毅	田 阳
白云霞	冯 俊	吕西林	朱合华	朱经浩	任 杰
任 浩	刘 春	刘玉擎	刘滨谊	闫 冰	关侗红
江景波	孙立军	孙继涛	严国泰	严海东	苏 强
李 杰	李 斌	李风亭	李光耀	李宏强	李国正
李国强	李前裕	李振宇	李爱平	李理光	李新贵
李德华	杨 敏	杨东援	杨守业	杨晓光	肖汝诚
吴广明	吴长福	吴庆生	吴志强	吴承照	何品晶
何敏娟	何清华	汪世龙	汪光焘	沈明荣	宋小冬
张 旭	张亚雷	张庆贺	陈 鸿	陈小鸿	陈义汉
陈飞翔	陈以一	陈世鸣	陈艾荣	陈伟忠	陈志华
邵嘉裕	苗夺谦	林建平	周 苏	周 琪	郑军华
郑时龄	赵 民	赵由才	荆志成	钟再敏	施 骞
施卫星	施建刚	施惠生	祝 建	姚 熹	姚连璧

袁万城	莫天伟	夏四清	顾 明	顾祥林	钱梦騄
徐 政	徐 鉴	徐立鸿	徐亚伟	凌建明	高乃云
郭忠印	唐子来	閻耀保	黄一如	黄宏伟	黄茂松
戚正武	彭正龙	葛耀君	董德存	蒋昌俊	韩传峰
童小华	曾国荪	楼梦麟	路秉杰	蔡永洁	蔡克峰
薛 雷	霍佳震				

秘书组成员：谢永生 赵泽毓 熊磊丽 胡晗欣 卢元姍 蒋卓文

总序

在同济大学 110 周年华诞之际，喜闻“同济博士论丛”将正式出版发行，倍感欣慰。记得在 100 周年校庆时，我曾以《百年同济，大学对社会的承诺》为题作了演讲，如今看到付梓的“同济博士论丛”，我想这就是大学对社会承诺的一种体现。这 110 部学术著作不仅包含了同济大学近 10 年 100 多位优秀博士研究生的学术科研成果，也展现了同济大学围绕国家战略开展学科建设、发展自我特色，向建设世界一流大学的目标迈出的坚实步伐。

坐落于东海之滨的同济大学，历经 110 年历史风云，承古续今、汇聚东西，秉持“与祖国同行、以科教济世”的理念，发扬自强不息、追求卓越的精神，在复兴中华的征程中同舟共济、砥砺前行，谱写了一幅幅辉煌壮美的篇章。创校至今，同济大学培养了数十万工作在祖国各条战线上的人才，包括人们常提到的贝时璋、李国豪、裘法祖、吴孟超等一批著名教授。正是这些专家学者培养了一代又一代的博士研究生，薪火相传，将同济大学的科学研究和学科建设一步步推向高峰。

大学有其社会责任，她的社会责任就是融入国家的创新体系之中，成为国家创新战略的实践者。党的十八大以来，以习近平同志为核心的党中央高度重视科技创新，对实施创新驱动发展战略作出一系列重大决策部署。党的十八届五中全会把创新发展作为五大发展理念之首，强调创新是引领发展的第一动力，要求充分发挥科技创新在全面创新中的引领作用。要把创新驱动发展作为国家的优先战略，以科技创新为核心带动全面创新，以体制机制改

革激发创新活力,以高效率的创新体系支撑高水平的创新型国家建设。作为人才培养和科技创新的重要平台,大学是国家创新体系的重要组成部分。同济大学理当围绕国家战略目标的实现,作出更大的贡献。

大学的根本任务是培养人才,同济大学走出了一条特色鲜明的道路。无论是本科教育、研究生教育,还是这些年摸索总结出的导师制、人才培养特区,“卓越人才培养”的做法取得了很好的成绩。聚焦创新驱动转型发展战略,同济大学推进科研管理体系改革和重大科研基地平台建设。以贯穿人才培养全过程的一流创新创业教育助力创新驱动发展战略,实现创新创业教育的全覆盖,培养具有一流创新力、组织力和行动力的卓越人才。“同济博士论丛”的出版不仅是对同济大学人才培养成果的集中展示,更将进一步推动同济大学围绕国家战略开展学科建设、发展自我特色、明确大学定位、培养创新人才。

面对新形势、新任务、新挑战,我们必须增强忧患意识,扎根中国大地,朝着建设世界一流大学的目标,深化改革,勠力前行!

万 钢

2017年5月

论丛前言

承古续今,汇聚东西,百年同济秉持“与祖国同行、以科教济世”的理念,注重人才培养、科学研究、社会服务、文化传承创新和国际合作交流,自强不息,追求卓越。特别是近20年来,同济大学坚持把论文写在祖国的大地上,各学科都培养了一大批博士优秀人才,发表了数以千计的学术研究论文。这些论文不但反映了同济大学培养人才能力和学术研究的水平,而且也促进了学科的发展和国家的建设。多年来,我一直希望能有机会将我们同济大学的优秀博士论文集中整理,分类出版,让更多的读者获得分享。值此同济大学110周年校庆之际,在学校的支持下,“同济博士论丛”得以顺利出版。

“同济博士论丛”的出版组织工作启动于2016年9月,计划在同济大学110周年校庆之际出版110部同济大学的优秀博士论文。我们在数千篇博士论文中,聚焦于2005—2016年十多年间的优秀博士学位论文430余篇,经各院系征询,导师和博士积极响应并同意,遴选出近170篇,涵盖了同济的大部分学科:土木工程、城乡规划学(含建筑、风景园林)、海洋科学、交通运输工程、车辆工程、环境科学与工程、数学、材料工程、测绘科学与工程、机械工程、计算机科学与技术、医学、工程管理、哲学等。作为“同济博士论丛”出版工程的开端,在校庆之际首批集中出版110余部,其余也将陆续出版。

博士学位论文是反映博士研究生培养质量的重要方面。同济大学一直将立德树人作为根本任务,把培养高素质人才摆在首位,认真探索全面提高博士研究生质量的有效途径和机制。因此,“同济博士论丛”的出版集中展示同济大

学博士研究生培养与科研成果,体现对同济大学学术文化的传承。

“同济博士论丛”作为重要的科研文献资源,系统、全面、具体地反映了同济大学各学科专业前沿领域的科研成果和发展状况。它的出版是扩大传播同济科研成果和学术影响力的重要途径。博士论文的研究对象中不少是“国家自然科学基金”等科研基金资助的项目,具有明确的创新性和学术性,具有极高的学术价值,对我国的经济、文化、社会发展具有一定的理论和实践指导意义。

“同济博士论丛”的出版,将会调动同济广大科研人员的积极性,促进多学科学术交流、加速人才的发掘和人才的成长,有助于提高同济在国内外的竞争力,为实现同济大学扎根中国大地,建设世界一流大学的目标愿景做好基础性工作。

虽然同济已经发展成为一所特色鲜明、具有国际影响力的综合性、研究型大学,但与世界一流大学之间仍然存在着一定差距。“同济博士论丛”所反映的学术水平需要不断提高,同时在很短的时间内编辑出版 110 余部著作,必然存在一些不足之处,恳请广大学者,特别是有关专家提出批评,为提高同济人才培养质量和同济的学科建设提供宝贵意见。

最后感谢研究生院、出版社以及各院系的协作与支持。希望“同济博士论丛”能持续出版,并借助新媒体以电子书、知识库等多种方式呈现,以期成为展现同济学术成果、服务社会的一个可持续的出版品牌。为继续扎根中国大地,培育卓越英才,建设世界一流大学服务。

伍 江

2017 年 5 月

前言

DNA 甲基化是一个保守的表观机制,在维持基因组稳定和器官发育方面起到非常重要的作用。在植物体中,24 nt 的 siRNAs 结合到受体蛋白 Argonaute 4(AGO4)可以指导通过甲基化酶 DRM2 重新 DNA 甲基化。大部分 siRNAs 是在甲基化的基因组区域产生的,并且 DNA 甲基化是许多的小 RNAs 产生的条件,这就揭示了甲基化 DNA 和小 RNA 的产生是相互关联的。然而,siRNAs 产生的分子机制仍然不清楚。我们在拟南芥的相关研究中发现了一个新的 RNA 指导的 DNA 甲基化(RdDM)的调节因子: RDM1。RDM1 编码一个小蛋白,可以结合单链甲基化的 DNA,与 AGO4、Pol II 和 DRM2 在细胞核共定位。失去 RDM1 基因功能的突变体在 RdDM 目标位点区域影响小 RNA 的产生,减少了 DNA 甲基化,解除了这些位点的转录基因沉默。我们的研究表明 RDM1 是 RdDM 受体复合体中的一个成员,在连接与沉默复合体相关联的小 RNA 功能与先前存在或者重新胞嘧啶甲基化中起至关重要的作用。尽管 RDM1 和 Pol V 在许多核仁周围 siRNA 过程中心的 RdDM 途径目标位点上一起起作用,但是 Pol II 是与 RdDM 受体复合体在核质中的目标位点相互起作用,而不是 Pol V。

目 录

总序

论丛前言

前言

第 1 章 绪论	1
1.1 RNA 指导的 DNA 甲基化	1
1.2 siRNA 的产生	1
1.3 DNA 甲基转移酶	4
1.3.1 MET1	4
1.3.2 CMT3	4
1.3.3 重新甲基化酶 DRM 及不对称甲基化	6
1.3.4 DNA 甲基化复合体	7
第 2 章 材料与方法	12
2.1 实验材料	12
2.2 方法	13

2.2.1	植物总 DNA 的提取(CTAB 法)	13
2.2.2	植物总 RNA 提取(RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN)	13
2.2.3	cDNA 合成(SuperScript.Ⅲ First-Strand Synthesis System, Invitrogen)	14
2.2.4	感受态的制备与转化	15
2.2.5	DNA 的回收(离心柱型普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 QIAGEN)	17
2.2.6	RNA 分析	18
2.2.7	DNA 甲基化分析	19
2.2.8	6xHis-tagged 蛋白质纯化(Ni-NTA Fast Start Kit, QIAGEN)	19
2.2.9	位点突变(QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene)	20
2.2.10	凝胶阻滞分析(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)	22
2.2.11	免疫共沉淀	24
2.2.12	免疫荧光法和显微镜	25
2.2.13	植物染色体蛋白的免疫染色	27
2.2.14	染色质免疫沉淀	28

第 3 章 结果与分析 32

3.1	通过筛选 ros1 的抑制子,确定了 RDM1 是转录基因沉默 途径中的一个新成员	32
3.1.1	ROS1: 植物中去甲基化酶的发现	32

3.1.2	在 <i>ros1</i> 突变体背景下, <i>rdm1</i> 突变体抑制了 转基因以及其内源基因的转录基因沉默	34
3.1.3	<i>rdm1-1</i> 突变体阻止了 RD29A 启动子 24 nt siRNAs 的产生以及抑制了启动子的 超甲基化	37
3.1.4	<i>rdm1</i> 突变体减少了 siRNAs 的产生, 提高了 RdDM 途径内源基因的表达水平	39
3.1.5	<i>rdm1</i> 突变体减少了 RdDM 途径内源基因的 非 CG 甲基化水平	41
3.2	RDM1 基因的分离和功能分析	45
3.2.1	RDM1 编码一个小的核蛋白	45
3.2.2	RDM1 结合单链甲基化的 DNA	49
3.3	RDM1 是 RdDM 受体复合体蛋白中的一个组成部分	53
3.3.1	RDM1 与 AGO4, Pol II 和 DRM2 相关联	53
3.3.2	RDM1 与 AGO4, Pol II 和 DRM2 共定位	55
第 4 章	RDM3 和 RDM4	61
4.1	通过筛选 <i>ros1</i> 的抑制子, 确定了 RDM3, RDM4 是 转录基因沉默途径中的另外两个新成员	61
4.2	RDM3 与 AGO4, NRPE1 相关联, 共定位	65
4.3	RDM4 与 Pol II, Pol V 相关联, 共定位	66
第 5 章	结论与讨论	69
5.1	<i>rdm1</i> 突变体对于重新甲基化和 siRNAs 的影响	69

5.2 RDM1 是 RdDM 受体复合物中的一员及其可能的 功能模式	70
5.3 RDM3 和 RDM4	72
参考文献	73
附录 A RDM1 的同源二聚体和 <i>rdm1-4</i> 突变体的特性	84
附录 B DNA 探针和引物	87
附录 C 彩图	91
后记	97

第 1 章

绪 论

1.1 RNA 指导的 DNA 甲基化

RNA 指导的 DNA 甲基化(RNA-directed DNA methylation, RdDM)途径是在 1994 年类病毒感染的烟草植物中发现的。转烟草马铃薯纺锤状块茎类病毒基因的烟草在类病毒 RNA-RNA 自我复制以后表现出类病毒甲基化^[92]。转录基因沉默是由序列同源于转基因启动子而诱导 DNA 甲基化进而被发现的^[70]。在烟草里,这些双链 RNA 被剪切成 23 nt 的小 RNA,指导着这些可遗传的启动子甲基化^[64]。在植物中,小 RNA 参与到转录基因沉默(TGS),类似于小 RNA 诱导的转录后基因沉默(PTGS)。通过正向和反向遗传学分析已经知道了许多参与 siRNA 合成的环节和 RdDM 途径中的成分。

1.2 siRNA 的产生

植物中有 3 类内源 siRNAs,异染色质的 siRNAs(也叫作染色质相

关联的 siRNAs 或者重复相关联的 siRNAs), 反式作用 siRNAs 和天然的反义转录的 siRNAs。前者主要启动 TGS, 后两者是诱导 PTGS。重复序列, 假基因的转录和天然的反义转录本可以通过序列互补形成 dsRNA, 而从异染色质位点形成的转录本可以被 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RDRs)转换成 dsRNA。dsRNAs 被核糖核苷酸酶Ⅲ Dicer-like 家族中的酶剪切生成 20~24 nt 的 siRNAs。这些 siRNAs 被注入 Argonaute (AGO)蛋白包含的 RNA 诱导的沉默复合体中(RISC)^[34, 45, 61]。通过对拟南芥 rdr 突变体中 SINE 反转座元件 AtSN1 内源 siRNA 产生的分析, 表明 siRNA 产生, RDR2 的存在是必需的。rdr2-1 突变体表现出在 AtSN1 位点, CHG 和 CHH 甲基化有明显的减少。而且, 内源的重复序列相关联的 siRNAs 产生依赖于 DCL3, 但是并不依赖于 DCL1 或者 DCL2。因此, RDR2 和 DCL3 是在 RdDM 途径中产生内源 siRNAs 所必需的^[101]。

直到两个植物特异性的 DNA 依赖的 RNA 聚合酶, Pol IV 和 Pol V 在拟南芥中被发现时, 对于 siRNA 的生物合成, 从高度甲基化的异染色质区域转录产生 RNA 转录本是必需的, 但是其详细机制仍然不清楚。这些聚合酶是由同 Pol II 构成相同或相似的 12 个亚基组成。NRPD1 和 NRPE1 分别是 Pol IV 和 Pol V 的最大的亚基。这两个聚合酶分享相同的第二个大亚基 NRPD2/NRPE2^[72, 77]。通过一个正向遗传学筛选转基因沉默突变体, 我们发现了 silencing defective 4 (sde4) 突变体, 在 AtSN1 位点, 不但 siRNA 生成减少, 而且 DNA 甲基化也减少了。SDE4/NRPD1A 编码 Pol IV 的最大亚基^[31]。通过用另外的筛选系统筛选到 defective in RNA-directed DNA methylation (drd 突变体)^[48]。drd2(nrpd2/nrpe2) 突变体在 AtSN1 和 5S 位点上 siRNA 和甲基化都减少了^[49]。NRPD1 和 NRPD2 是产生 siRNA 和特定转座子, 重复 DNA 沉默所必需的^[36]。nrpd1nrpe 双突变表现出 AtSN1 和 5S 位点上甲基