

硕士学位论文

SAO-1 在第一次细胞分裂中调节细胞骨架  
的基础研究

**BASIC RESEARCH ON SAO-1  
REGULATING CYTOSKELETON IN THE  
FIRST CELL DIVISION**

王梦君

哈尔滨工业大学

2020年6月

国内图书分类号: Q28  
国际图书分类号: QH576

学校代码: 10213  
密级: 公开

## 工程硕士学位论文

# SAO-1 在第一次细胞分裂中调节细胞骨架的 基础研究

硕士研究生: 王梦君

导 师: 谢宇聪副教授

申 请 学 位: 工程硕士

学 科: 生物工程

所 在 单 位: 南方科技大学

答 辩 日 期: 2020 年 6 月

授予学位单位: 哈尔滨工业大学

Classified Index: Q28

U.D.C: QH576

Dissertation for the Master's Degree in Engineering

**BASIC RESEARCH ON SAO-1  
REGULATING CYTOSKELETON IN THE  
FIRST CELL DIVISION**

**Candidate:** Wang Mengjun  
**Supervisor:** Associated Prof. Tse Yu Chung  
**Academic Degree Applied for:** Master's of Engineering  
**Specialty:** Bioengineering  
**Affiliation:** Southern University of Science and  
Technology  
**Date of Refence:** June, 2020  
**Degree-Conferring-Institution:** Harbin Institute of Technology

## 摘 要

SAO-1 蛋白含有高度保守的 GYF 结构域, GYF 结构域蛋白大多数存在于真核生物中, 前人的研究只发现了少数几个包含 GYF 结构域的蛋白质, 且对 SAO-1 蛋白确切作用还知之甚少。本论文通过构建 SAO-1 突变体线虫株, 在秀丽隐杆线虫的胚胎时期, 探讨了 SAO-1 在第一次细胞分裂过程中对细胞骨架的调控作用。

本论文发现, 在秀丽隐杆线虫胚胎第一次细胞分裂过程中, SAO-1 缺失会导致假分裂沟变浅、分裂沟闭合点居中、中心体旋转减弱等一系列表型, 影响了第一次细胞质的分裂, 还影响了胚胎的存活率。同时, 实验结果还表明, SAO-1 缺失会导致细胞皮层蛋白 NMY-2、ANI-1 之间的连接减弱甚至消失, 破坏其网状结构。卵裂沟的形成和内侵与中心纺锤体有关, 这些实验结果在一定程度上表明, SAO-1 缺失破坏了细胞皮层 NMY-2、ANI-1 的网状结构, 使皮层的收缩动力减弱, 中心体旋转减弱, 最终导致假分裂沟变浅和分裂沟的闭合位点异常的表型。

本论文同时还发现在第一次细胞分裂过程中, DLC-1 敲低的表型与 SAO-1 缺失表型一致。DLC-1 的缺失同样可以破坏 NMY-2、ANI-1、Actin 之间的网状结构, 导致细胞皮层的收缩力减弱, 中心体旋转减弱, 中间纺锤体定位异常, 卵裂沟的入侵受到影响, 最终出现假分裂沟变浅和分裂沟闭合点异常的相似表型。此外, 我们发现 SAO-1 缺失可以显著降低 DLC-1 在胚胎细胞质中的表达, 并通过 qPCR 实验证明了 DLC-1 表达量的急剧降低并不是由于 SAO-1 对 DLC-1 转录水平影响造成的, 可能是由于 SAO-1 影响了 DLC-1 的代谢或稳定性造成的。

通过一系列研究发现内质网结构破坏后, SAO-1 在细胞质分布不均; SAO-1 或 DLC-1 缺失后, 内质网蛋白会在胞质和细胞皮层聚集成块。

综上所述, 本论文研究结果表明 SAO-1 参与了细胞分裂过程, 并对细胞骨架调节起到一定作用, 为深入研究 GYF 结构域蛋白功能提供新视角。

**关键词:** 胞质分裂; 细胞骨架; SAO-1; GYF 结构域; 动力蛋

## Abstract

The SAO-1 protein contains a highly conserved GYF domain. Most of the GYF domain proteins are found in eukaryotes. Previous studies have found that only a few which contain the GYF domain, however, the function of GYF domain contained proteins is still unknown. In this thesis, by constructing the SAO-1 mutant *C. elegans*, in the embryo stage of *C. elegans*, we explored the regulatory effect of SAO-1 on the cytoskeleton during the first cell division.

We found that during the first cell division of the embryo, the depletion of SAO-1 will cause a series of phenotypes, that is the pseudo cleavage furrow to become shallow, the furrow close point near the central point and the centrosome rotation weakening, affecting the first cytoplasmic division. And it affects the developmental survival rate of the embryo. At the same time, the experimental results also show that the depletion of SAO-1 will lead to weakened or no connection between the cell cortex proteins NMY-2 and ANI-1, and break the network structure. The formation and ingression of cleavage furrow are related to the central spindle. These experimental results show to a certain extent that the depletion of SAO-1 breaks the network structure of NMY-2 and ANI-1, and weakens the contractile of the cortex. And then the centrosome rotation weakens, which eventually leads to the shallowness of pseudo cleavage and abnormal furrow close point.

Second, we found that during the first cell division, the DLC-1 knockdown phenotype was consistent with the SAO-1 deletion phenotype. Similarly, the knockdown of DLC-1 can break the network structure between NMY-2, ANI-1, and Actin. The contractile force of the cell cortex is weakened, and the centrosome rotation is weakened. A similar phenotype in which the pseudo cleavage becomes shallower and the cleavage closing point is abnormal eventually appears. At the same time, it was found that the depletion of SAO-1 can significantly reduce the expression of DLC-1 in the cytoplasm of embryo, and it was proved by qPCR experiments that the dramatic decrease of DLC-1 expression was not caused by the DLC-1 transcription level. It may be that the degradation or stability of DLC-1 was influenced by SAO-1.

Finally, it was found that the destruction of the endoplasmic reticulum structure would lead to uneven distribution of SAO-1 in the cytoplasm; the deletion of SAO-1 or DLC-1 caused the accumulation of endoplasmic reticulum proteins in the cytoplasm and cell cortex.

In summary, the results of this thesis indicate that SAO-1 participates in the process of cell division and plays a certain role in the regulation of the cytoskeleton, providing a new perspective for further research on the function of GYF domain proteins.

**Keywords:** cytokinesis, cytoskeleton, SAO-1, GYF domain, dynein

# 目 录

摘 要 .....	I
ABSTRACT .....	II
第 1 章 绪 论 .....	1
1.1 秀丽隐杆线虫 .....	1
1.1.1 秀丽隐杆线虫概述 .....	1
1.1.2 秀丽隐杆线虫用于研究细胞分离机制的优势 .....	3
1.2 线虫胞质分裂及细胞骨架研究进展 .....	5
1.2.1 胞质分裂 .....	5
1.2.2 线虫卵裂沟形成与内侵 .....	5
1.2.3 动力蛋白 .....	7
1.3 SAO-1 蛋白 .....	8
1.3.1 GYF 结构域 .....	8
1.3.2 SAO-1 .....	9
1.4 本课题的研究内容 .....	9
第 2 章 实验材料与方法 .....	11
2.1. 实验材料 .....	11
2.1.1 实验动物 .....	11
2.1.2 实验器械与设备 .....	14
2.1.3 实验试剂及耗材 .....	15
2.2. 实验方法 .....	16
2.2.1 RNA 干扰 (RNAi) .....	16
2.2.2 实时荧光定量 PCR (qPCR) .....	17
2.2.3 蛋白质免疫印迹 (WB) .....	19
2.2.4 线粒体红色荧光染色 .....	21
2.2.5 CRISPR/Cas9 构建突变体线虫株 .....	21
第 3 章 SAO-1 对线虫第一次细胞分裂的影响 .....	23
3.1 引言 .....	23
3.2 实验结果与分析 .....	23

3.2.1 SAO-1 缺失导致假分裂沟变浅.....	23
3.2.2 SAO-1 缺失导致分裂沟闭合点居中.....	25
3.2.3 SAO-1 缺失会减弱细胞核中心体复合体的旋转.....	26
3.2.4 SAO-1 缺失会降低胚胎生产率，增加胚胎致死率.....	27
3.3 本章小结.....	28
<b>第 4 章 SAO-1 缺失对细胞皮层蛋白的影响.....</b>	<b>29</b>
4.1 引言.....	29
4.2 实验结果与分析.....	29
4.2.1 SAO-1 缺失对 NMY-2 的影响.....	29
4.2.2 SAO-1 缺失对 ANI-1 的影响.....	32
4.3 本章小结.....	34
<b>第 5 章 动力蛋白缺失对线虫第一次细胞分裂的影响.....</b>	<b>35</b>
5.1 引言.....	35
5.2 实验结果与分析.....	35
5.2.1 DHC-1 缺失导致假分裂沟变浅，减弱中心体的旋转.....	35
5.2.2 DLC-1 缺失导致假分裂沟变浅和分裂沟闭合点居中.....	37
5.2.3 DLC-1 缺失减弱中心体的旋转.....	38
5.3 本章小结.....	39
<b>第 6 章 动力蛋白的缺失对细胞皮层的影响.....</b>	<b>40</b>
6.1 引言.....	40
6.2 实验结果与分析.....	40
6.2.1 DHC-1 缺失对 NMY-2 的影响.....	40
6.2.2 DLC-1 缺失对 NMY-2 的影响.....	42
6.2.3 DLC-1 缺失对 ANI-1 的影响.....	44
6.2.4 DLC-1 缺失对 Actin 的影响.....	45
6.3 本章小结.....	46
<b>第 7 章 SAO-1 影响 DLC-1 在细胞质的表达.....</b>	<b>47</b>
7.1 引言.....	47
7.2 实验结果与分析.....	49
7.2.1 <i>dhc-1(RNAi)</i> 和 <i>dlc-1(RNAi)</i> 对 SAO-1 在细胞质中的影响.....	49
7.2.2 SAO-1 缺失不影响 DHC-1 在纺锤体的荧光强度.....	50
7.2.3 SAO-1 缺失降低 DLC-1 在细胞质中的表达.....	51

---

7.2.4 SAO-1 缺失对 <i>dlc-1</i> 转录水平的影响.....	53
7.2.5 <i>sel-10</i> 、 <i>rpt-4</i> 、 <i>atg-13</i> 干扰不能补救 <i>sao-1</i> 缺失对 <i>dlc-1</i> 的影响.....	54
7.3 本章小结.....	56
第 8 章 SAO-1 亚细胞定位与内质网有关.....	57
8.1 引言.....	57
8.2 实验结果与分析.....	57
8.2.1 SAO-1 的亚细胞定位.....	57
8.2.2 SAO-1 与线粒体不是共定位.....	58
8.2.3 <i>lpin-1(RNAi)</i> 对 SAO-1 在细胞质的分布的影响.....	60
8.2.4 GFP:: <i>SAO-1</i> 与 SP-12:: <i>mCherry</i> 荧光共定位.....	61
8.2.5 SAO-1、DLC-1 缺失对内质网的影响.....	62
8.3 本章小结.....	64
结 论.....	65
参考文献.....	67
哈尔滨工业大学与南方科技大学联合培养研究生学位论文原创性声明和使用权限	74
致 谢.....	75

# 第 1 章 绪 论

## 1.1 秀丽隐杆线虫

### 1.1.1 秀丽隐杆线虫概述

模式生物是生命科学研究的基础，酵母、线虫、果蝇、斑马鱼、拟南芥、小鼠等是目前常见的模式生物。秀丽隐杆线虫（*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*）之所以成为一种模式生物，关键在于它自身的一系列特点。

秀丽隐杆线虫具有完备的形态学特征。以雌雄同体线虫为例，线虫的解剖结构如图 1-1 所示，成虫长约 1 mm，主要有上皮系统、神经系统、外分泌系统、肌肉组织、腔胞、消化系统（包括咽部，肠部，直肠和肛门）、生殖系统等。秀丽隐杆线虫在自然界中存在两种性别：一种为雌雄同体（hermaphrodite; XX），另一种为雄性（male; XO），存在自交和杂交两种生殖方式。我们可以通过线虫的尾部来区分线虫的性别，雄性个体的尾部有尾交钩，平时成锥形，交配时会伸展尾交钩，呈扇形，这便于我们区分雄性并进行后续的雌雄线虫杂交的实验。

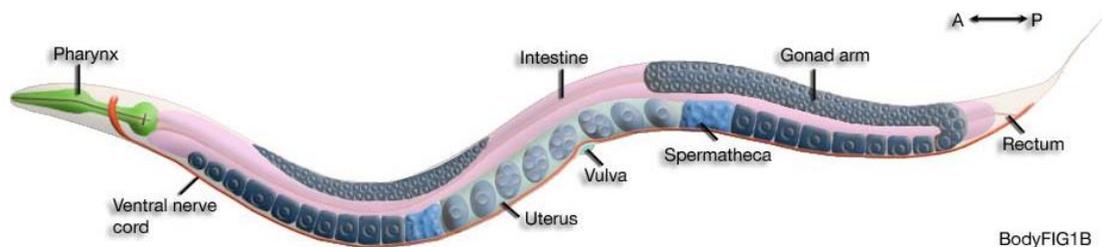


图 1-1 雌雄同体线虫的解剖结构（图片引自 WormBook）

秀丽隐杆线虫的细胞数量有限且有完整的细胞谱系。线虫幼虫有 556 个体细胞和两个原始生殖细胞；雌雄同体的成虫具有 959 个体细胞和 2000 个生殖细胞；雄性成虫具有 1031 个体细胞和 1000 个生殖细胞。由于秀丽隐杆线虫的体细胞数目不变，研究人员已经能够跟踪从受精到成年的活体线虫体内每个细胞的命运，并产生一个完整的细胞谱系。研究人员还通过电子显微照片重建了所有秀丽隐杆线虫细胞的形状，包括成年雌雄同体的 302 个神经元和成年雄性的后交配回路<sup>[1]</sup>。这些重建提供了所有神经系统中最完整的接线图，并有助于解释性别二型性如何影响神经回路。此外，由于秀丽隐杆线虫具有不变的野生型细胞谱系和神经解剖

学特征，因此，在基因筛选中很容易发现导致发育和行为缺陷的突变体。最后，因为秀丽隐杆线虫是第一个具有完整基因组序列的多细胞生物，因此利用正向和反向遗传学可以鉴定出许多在发育及细胞生物学过程中的关键基因。

秀丽隐杆线虫是第一个完成全基因组测序的模式生物，它的基因组序列大约有 100,000,000 个碱基，编码约 20,000 个基因，其中至少 40% 的基因在人基因组中有明显的同源物存在，而且人类蛋白质中所有的结构域几乎都能在线虫中找到<sup>[2]</sup>。秀丽隐杆线虫具有两种性别就，在线虫自然群体中，雄性线虫所占比例约为万分之三，但在实验室等研究领域，可以通过热激（线虫的培养温度约为 22℃，热激为 30℃培养 8~10h）的办法来增加雄性个体产生的比例，用于遗传交配。这样的性别区分和生殖方式，使线虫在遗传研究领域具有绝对优势，一方面我们可以使雌雄同体的线虫以自交的方式进行生殖以保持基因型稳定不变；另一方面我们可以使不同基因型的雌雄同体和雄性线虫进行自交以改变基因型。因此，秀丽隐杆线虫在分子生物学和发育生物学研究领域，是一种很好的模式生物。

秀丽隐杆线虫具有较短的生命周期和易于培养和保存的特点。线虫的生命周期约为 3d，从孵化开始经历的发育阶段分别为：L1、L2、L3、L4、成虫。自体受精后，雌雄同体成虫产卵数约为 300 枚，而异体受精后产卵数会增加，约为 1000 枚，这些生理学基础方便我们研究线虫生产率或胚胎致死率等特征。线虫体积小，以 OP50 大肠杆菌为食（尿嘧啶营养缺陷型菌株，只能在 NGM 平板上生长，这样可以很好的控制大肠杆菌的生长速度和生长总量）。因为是固体培养，需要的空间小，维护费用低，易于培养。秀丽隐杆线虫可以短期存储在 -80℃ 冰箱和长期储存在液氮（-196℃）中，需要使用时，从冰箱和液氮复苏即可。这些特征很大程度上加快了生命科学研究的进度，节省大量时间。

秀丽隐杆线虫的 RNAi（RNA 干扰）效率很高。一方面是由于合胞体生殖系统，雌雄同体的线虫有两个环型管状臂的生殖腺，管状臂的前端为合胞体，每个合胞体内包含约 1000 个生殖细胞。这些生殖细胞在性腺的外周排列，细胞只有部分被质膜包被，中央形成空腔，并且所有的细胞共享中央一个共同的细胞质。线虫的性腺包含一组减数分裂的细胞核，这些细胞核具有转录活性，并产生装载到卵母细胞内的基因产物，RNA 干扰（RNAi）可有效且有选择性地消耗这些基因产物，RNAi 的方法包括饲喂，浸泡，显微注射三种常见方法，并且操作简便，效果显著。这使得我们可以通过各种 RNAi 的手段，探求基因敲低之后对各种生命活动的影响。这样就可以定量地监测在第一次细胞分裂中通常发生的序列中缺陷定型事件<sup>[3, 4]</sup>。例如全基因组的 RNAi 筛选显示，构成秀丽隐杆线虫基因组的 20,000 个

蛋白质编码基因中，有 2500 个对胚胎的产生或生存能力至关重要。通过显微录像进行表型分析已经确定了 600 个对早期胚胎细胞分裂至关重要的基因。

同时，秀丽隐杆线虫具备多样的基因编辑技术和网络资源。秀丽隐杆线虫基因组编辑方法包括 MosSCI<sup>[5]</sup>和 CRISPR Cas9<sup>[6, 7]</sup>结合 RNAi 或 degnon 介导的内源性野生型基因产物的耗竭，已经实现了强大的基因替换策略，这有助于在进化保守蛋白中对特定区域和残基进行功能探测。并且所有关于基因组序列、基因结构和功能、RNAi 表型、温度敏感型（Temperature Sensitive, TS）等位基因的可用性等信息，以及各种实验方法都可以在线虫库（Wormbase）和 Wormbook 中获得<sup>[8]</sup>。

### 1.1.2 秀丽隐杆线虫用于研究细胞分离机制的优势

秀丽隐杆线虫胚胎是研究细胞分裂机制的理想模型。线虫胚胎具有快速且高度定型的有丝分裂过程。从 DNA 开始复制到第一次细胞分裂卵裂沟闭合需要的时间约为 14 分钟。这便于利用光学显微镜的方法，通过延时拍摄有效追踪完整的细胞分裂过程，为深入研究细胞膜的延伸、皮层流动、后期染色体的分离、纺锤体延伸等细胞分裂过程提供便利。

图 1-2 展示了线虫胚胎第一次细胞分裂过程，左栏描述了第一次细胞分裂过程中的关键时期和主要特征；中间栏通过表达微管蛋白和组蛋白同时显示了分裂过程中微管细胞骨架和 DNA 的形态特征；右栏通过表达细胞皮层肌动蛋白观测分裂过程中皮层蛋白的动态过程。

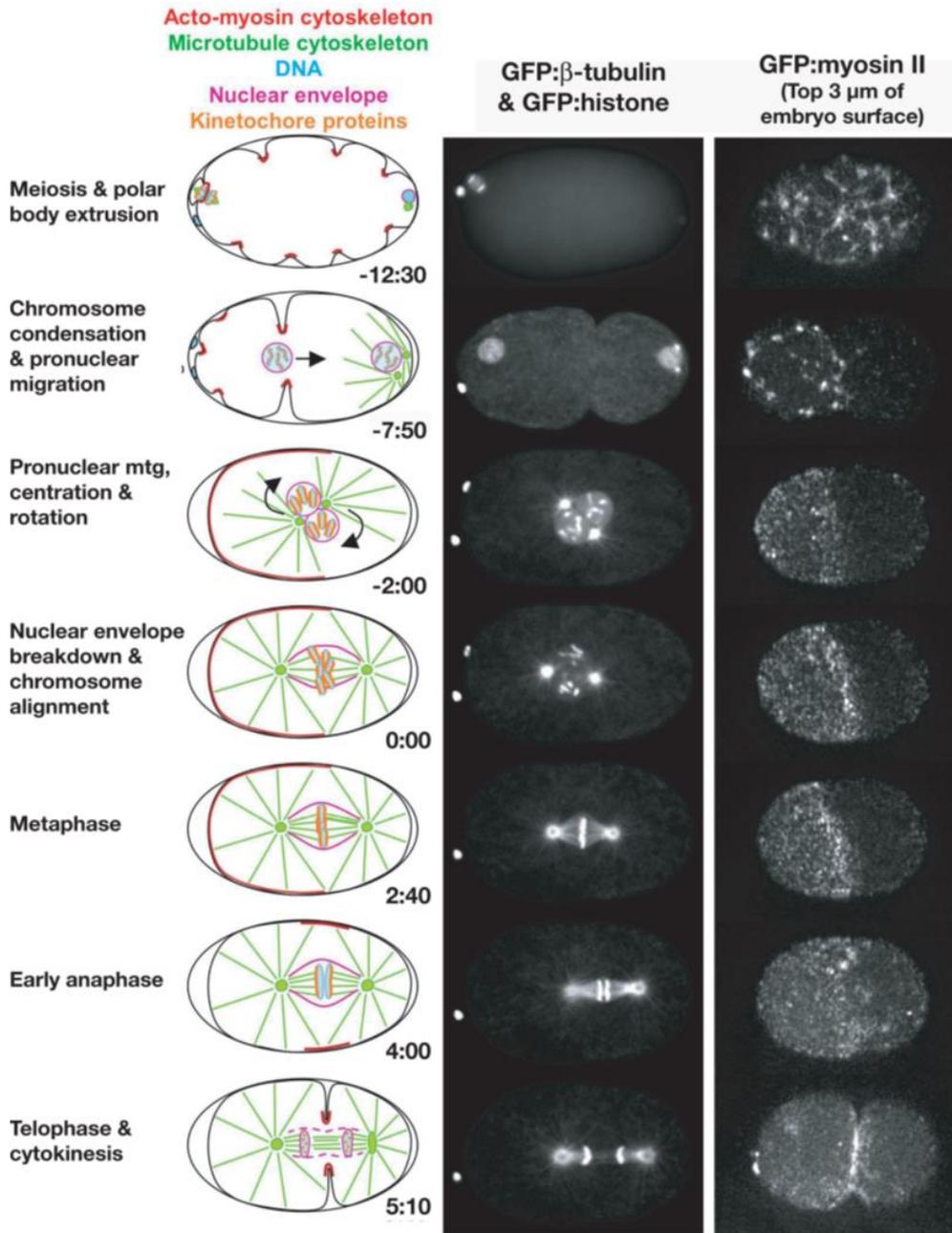


图 1-2 秀丽隐杆线虫胚胎第一次有丝分裂分裂过程的时间轴<sup>[9]</sup>

在受精之前，秀丽隐杆线虫的卵母细胞被迫停留在减数分裂前期，其细胞核中含有两个拷贝的基因组。进入卵母细胞后，精子衍生中心对吸收新近中心体材料并获得使微管成核的能力，随后，两个精子产生的中心粒分离，形成两个定位的中心体分布在原核的两边。精母细胞原核向卵母细胞原核移动，在两者相遇之前，细胞膜会有一定程度内侵，此时细胞还没有进入细胞分裂期，并不是真正的

分裂沟，所以称此时细胞膜的内侵为假分裂沟（Pseudocleavage），随着精母细胞的不断前进，假分裂沟逐渐消失。原核相遇后，细胞核中心体复合体向细胞中心移动并不停旋转，移动到细胞中央时，中心体之间的连线与胚胎的长轴对齐。随后细胞核核膜开始破裂（Nuclear Envelope Break Down, NEBD），染色体排列在赤道板两侧。有丝分裂后期，纺锤体中心体分别向细胞的两极移动，染色体分离，并且纺锤体中心体向两极的移动的幅度并不一致，这种不对称的移动导致纺锤体的位置不对称，最后导致分裂沟的位置偏向一边，最终完成第一次不对称分裂，这种不对称分裂对线虫后期胚胎的发育有至关重要的影响。

## 1.2 线虫胞质分裂及细胞骨架研究进展

### 1.2.1 胞质分裂

一个细胞分裂成两个子细胞是所有生物体的基础。胞质分裂是细胞分裂的最后一步，也是两个子细胞物理分离的最后一步，由于大量研究的目的是了解子细胞分离的精确机制，因此在细胞生物学中仍是一个具有挑战性的前沿课题<sup>[10, 11]</sup>。自从 20 世纪 70 年代发现动物细胞的肌动蛋白丝（Actin）和 NMY-2（Non-muscle MYosin）参与细胞分裂过程中两个子细胞收缩形成分裂沟以来，已经发现了一百多个直接或间接促进细胞分裂的基因<sup>[12, 13]</sup>。虽然许多问题仍然没有答案，但已经证明，细胞骨架元素，如肌动蛋白、微管和隔膜，在细胞分裂过程中协同作用并发挥关键作用。在胞质分裂的早期阶段，卵裂沟的侵入是由肌动球蛋白收缩环与质膜相互作用而引起的，并且导致形成了连接两个子细胞狭窄胞质的桥。这个充满了反平行微管束的细胞间桥最终被切断，这一过程被称为脱落<sup>[14]</sup>，代表了细胞分裂的最后一步。

### 1.2.2 线虫卵裂沟形成与内侵

卵裂沟的形成和内侵是细胞分裂的基础，细胞骨架的溶解和重组在其中起关键作用。其中 RhoA 是 NMY-2 的主要调控因子。RhoA 是小 G 蛋白家族成员，主要参与肌球蛋白激活和肌动蛋白核化，促进肌动蛋白纤维丝的组装。它的功能高度同源，已在人体细胞、线虫及果蝇等研究中得到证实。在细胞分裂后期开始时，CDK-1 会被抑制，防止 RhoGEF（鸟苷酸交换因子）ECT-2 的磷酸化并促进 ECT-2 与 CYK-2 的结合<sup>[15]</sup>。由于中央纺锤体复合体（CYK-4 和 MKLP1/ZEN-4）具有结合微管的功能<sup>[16]</sup>，这也引导了 ECT-2 定位于中心纺锤体上。以此同时，ECT-2 也

同样被定位到中心纺锤体上，并激活 RhoA 以活化下游效应因子，如图 1-3 所示。Formin 能促进激动蛋白的聚合，加速肌动蛋白丝的形成，ROCK 则激活非肌球蛋白（NMY-2），使之能聚合形成非肌球蛋白纤维丝并肌动蛋白丝组装成收缩环；Anilin（Anillin actin binding protein）是锚定蛋白，能固定收缩换组件；Citron K 则能稳定中央纺锤体的微管，促进细胞分裂。

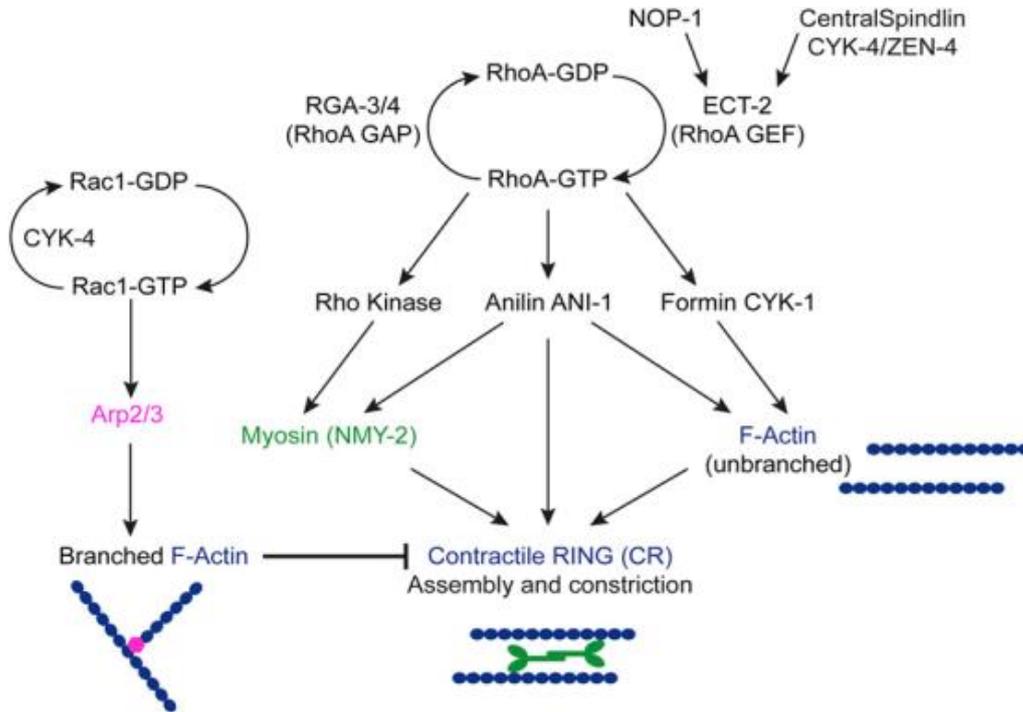


图 1-3 细胞分裂过程中控制皮层活动的信号通路<sup>[17]</sup>

秀丽隐杆线虫早期胚胎卵裂沟的侵入是有两条不同的途径介导，这两条途径可以通过他们依赖的中心纺锤体来区分<sup>[18, 19]</sup>。ANI-1 能促进线虫胚胎中星体依赖分裂沟的形成，ANI-1 缺失时，微管定向 NMY-2 极化异常，最终导致分裂沟对称侵入<sup>[20]</sup>。

在细胞分裂过程中，有丝分裂纺锤体的精确定位对于确保基因组准确无误的分割以及细胞内容物的分割是至关重要的<sup>[21, 22]</sup>。它的位置决定了卵裂沟位置、两个子细胞的相对大小和空间组织。有研究表明，不对称的细胞分裂是细胞命运的决定因素，包括干细胞<sup>[23-27]</sup>。近年来，在多个细胞模型系统的研究中，已经发现了在三维细胞环境中，细胞有丝分裂过程中纺锤体中心体的定位具有一个十分精细的机制。值得注意的是，这些机制主要依赖于从中心体发出的动态星状微管。这些星体微管接触到 Actin-rich 质膜下细胞骨架（称为细胞皮层），通过负极导向的马达蛋白与膜性细胞器交互复杂动力蛋白生成细胞质拉力<sup>[28-30]</sup>，或与皮层下肌

动蛋白结合产生拉力，准确帮助主轴定位<sup>[31, 32]</sup>。根据细胞环境，细胞依靠一个或多个机制来准确定位有丝分裂纺锤体的位置。

### 1.2.3 动力蛋白

动力蛋白（Dynein）是一个高度保守的微管马达分子，分子量为 1600kda，由两条重链（DHC-1）、两条中链、三条不同的轻链（DLC-1）和两条轻中链组成，如图 1-4 所示。胞质动力蛋白是一种负极定向微管运动蛋白，可运输多种物质，包括囊泡、细胞器和信使 RNA<sup>[33, 34]</sup>。动力蛋白也参与细胞核的迁移，并根据细胞结构调整微管的方向。

动力蛋白在细胞内具有多种功能，许多与运输或细胞分裂有关。在秀丽隐杆线虫的生殖细胞系中，动力蛋白重链（DHC-1）在所有生殖细胞的细胞质中均匀分布，在核膜处有很强的聚集。线虫动力蛋白轻链（DLC-1）与人类动力蛋白轻链 DYNLL1 和 DYNLL2 具有 95% 的序列同源性，丧失功能突变的 *dhc-1* 和 *dlc-1* 导致胚胎死亡<sup>[35-38]</sup>。在秀丽隐杆线虫中，DLC-1 参与核迁移，调节生殖细胞分化中的 METT-10，并具有细胞非自发的抗凋亡功能<sup>[39-41]</sup>。有研究表明，温度敏感型突变体 DHC-1(ct42)，高温处理（DHC-1 缺失）会导致假分裂沟减弱甚至消失<sup>[42]</sup>；*dlc-1(RNAi)* 情况下，胚胎的致死率明显升高并且出现假分裂沟减弱现象，细胞质的流动速度明显减慢，胞质的分裂动力减弱<sup>[43, 44]</sup>。

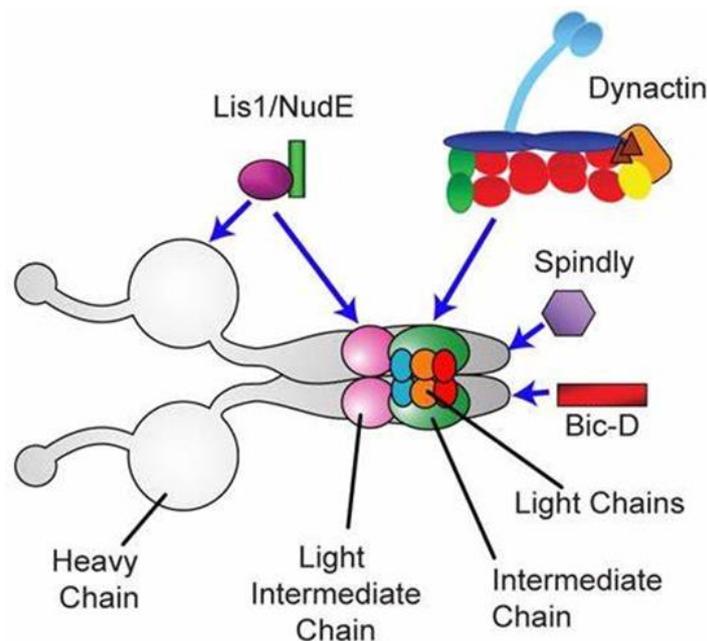


图 1-4 动力蛋白（Dynein）结构<sup>[45]</sup>

## 1.3 SAO-1 蛋白

### 1.3.1 GYF 结构域

GYF 结构域是识别脯氨酸丰富序列 (PRS) 的小型通用适配器结构域。在进化过程中出现了多个识别富脯氨酸序列 (PRS) 的折叠家族, 如 SH3、EVH1、UEV 以及 GYF。到目前的研究为止, GYF 结构域大多数存在于真核生物中, 但是与其他 PRS 识别域 (PRD) 相比, GYF 结构域在进化过程中没有经历后生动物中相同的扩增过程, 相对保守。GYF 结构域的特征是含有一组保守的芳香氨基酸残基, 使其能精准的堆叠在单个  $\alpha$  折叠和单个  $\beta$  片层中间, 如图 1-5 所示。GYF 结构域功能目前分为了两类: SMY2 亚类、CDC2BP 亚类<sup>[46]</sup>。

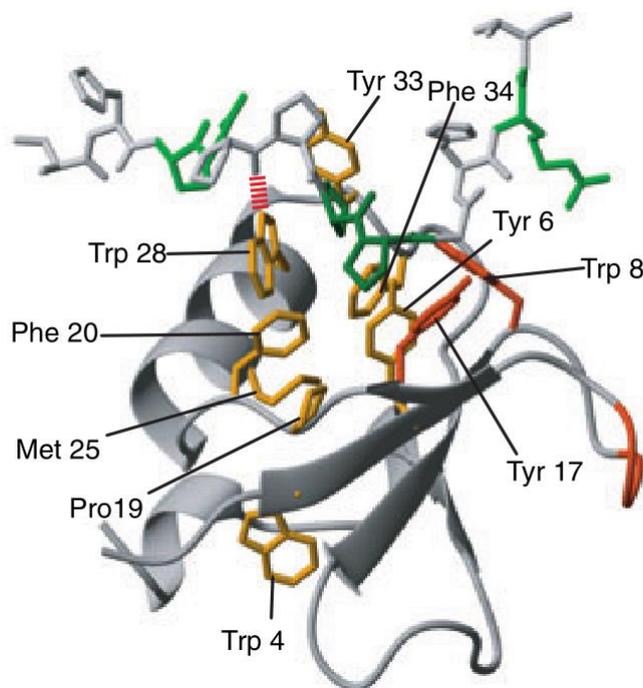


图 1-5 CD2BP2 的 GYF 结构域的保守残基和拓扑结构<sup>[47]</sup>

橙色表示保守残基的侧链; 红橙色表示 GYF 结构域特异性残基; 深绿色表示直接与保守结构域芳香残基相互作用的配体的两条前体, 侧面的精氨酸用浅绿色表示。

GYF 蛋白的研究始于 CD2 结合蛋白 (CDBP2)<sup>[48]</sup>, 该蛋白可通过其保守基序 GP[Y/F]-X4-[M/V]-X2-W-X3-[G/N]YF 与 T 细胞粘连分子 CD2 的 PPPGHR 串联重复区段结合, 促进白细胞介素 IL-2 积累。进一步研究发现 GYF 蛋白广泛存在于大部分真核生物体中, 可通过 GYF 结构域识别富脯氨酸序列 PRS (Proline Rich Sequences) 并与之结合, 并参与多种胞内复合物的形成及下游信号调控<sup>[47]</sup>。例如, 人类 CD2BP2 的 GYF 结构域可介导 CDBP2 与 CD2 蛋白结合, 参与 CD2 介导的 T

淋巴细胞活化<sup>[49]</sup>。在小鼠中，CD2BP2 的 GYF 结构可介导磷酸酶 PP1 向剪接体转运，作为剪接因子参与 mRNA 选择性剪接，参与胚胎发育和足细胞（Podocyte）功能<sup>[50]</sup>。

到目前为止，只有少数几个 GYF 结构域的生理结合伙伴被识别，而包含 GYF 结构域的蛋白质的确切作用还知之甚少。

### 1.3.2 SAO-1

SAO-1（Suppressor of aph-1）是属于 GYF（glycine-tyrosine phenylalanine）蛋白，共有 224 个氨基酸，拥有一个 GYF 结构域，其 GYF 域更类似于 SMY2 亚类，因为第一和第二预测之间的紧密间距的  $\beta$  链是 SMY2 亚型 GYF 结构域的标志<sup>[51]</sup>。

在秀丽隐杆线虫基因组中，编码 GYF 结构域蛋白的基因共有四个，其编码蛋白包括 SAO-1、C18H9.3、K11H3.8 和 T13G4.1。SAO-1 在人类基因组序列中没有同源序列。SAO-1 的研究不多，但有一篇文献研究发现 SAO-1 作用于 Notch 受体信号途径。在不完全渗透（Incompletely Penetrant）APH-1 突变体（*aph-1(zu147)*）中敲低 SAO-1，能降低胚胎的致死率<sup>[51]</sup>。深入的研究显示，SAO-1 可与 SCF-E3 泛素连接酶复合体组成蛋白 SEL-10 相互作用，介导复合体与特异性底物的识别及泛素化修饰，从而负调控 Notch 受体信号途径并调节线虫胚胎的发育。由此可见，GYF 蛋白参与了不同物种、不同细胞生理的分子机理的调控。SAO-1 突变线虫株为体内研究 GYF 结构域蛋白提供了很好的动物模型。虽然 SAO-1 在与人类的基因组没用同源序列，但我们可以通过研究 SAO-1 的功能，来进一步解析 GYF 蛋白的作用，为研究 GYF 结构域的功能提供一种新的思路。

## 1.4 本课题的研究内容

秀丽隐杆线虫身体结构简单，其细胞谱系已经被研究清楚，有快速且高度定型的细胞分裂过程，是研究细胞分离的理想模型。本论文研究的蛋白分子 SAO-1 含有保守的 GYF 结构域，虽然已有研究发现 SAO-1 可与 SCF-E3 泛素连接酶复合体组成蛋白 SEL-10 相互作用，从而负调控 Notch 受体信号途径并调节线虫胚胎的发育，但 SAO-1 的分子结构如何，以及与 SEL-10 相互作用的分子机理是什么并没有解答。

我们早期的实验结果表明，SAO-1 主要集中分布在线虫性腺和胚胎中，结合文献研究，我们大胆猜测 SAO-1 参与线虫的生长发育过程，并聚焦早期胚胎的发育。我们想利用已经构建好的 *sao-1* 突变体线虫株（通过 CRISPR Cas9 将全部

SAO-1 序列用 GFP 荧光蛋白序列替换），通过结合生物学、细胞生物学、生物化学和遗传学相关实验手段以及显微成像技术等，深入研究 SAO-1 在早期细胞分裂过程的作用。

本论文将以 *sao-1* 突变体线虫株为研究对象，通过光学显微镜的方法，探究第一次细胞分裂过程中 SAO-1 的作用。实验发现 SAO-1 缺失会对细胞膜的内侵和中体的旋转产生影响。有研究表明细胞皮层蛋白表达异常会影响分裂沟的形成和内侵<sup>[52, 53]</sup>。因此本论文通过将 *sao-1* 突变体与细胞皮层荧光蛋白杂交（包括 NMY-2、ANI-1、Actin），得到纯合子线虫株并进行实验，探究 SAO-1 对细胞皮层蛋白的影响。同时，本论文还进行了一系列相对应的 *sao-1(RNAi)* 实验，再次验证 *sao-1* 突变体的实验结果。

细胞骨架和细胞核的连接对细胞核的移动和定位非常重要，有文献报道，动力蛋白和其他相关蛋白在细胞核的迁移中起关键作用<sup>[42, 54, 55]</sup>。因此，本论文通过 *dhc-1(RNAi)* 和 *dlc-1(RNAi)* 以及运用温度敏感性突变体 DHC-1 (ct42) 等多种实验方法，研究动力蛋白对细胞分裂过程中卵裂沟延伸，中心体旋转，细胞皮层蛋白结构等的影响，探究动力蛋白缺失与 SAO-1 缺失的表型是否一致，并进一步探究 SAO-1 与动力蛋白之间的关系。

实验室最新研究结果显示，SAO-1 与 DLC-1 相互作用。本论文通过 *sao-1* 突变体实验和 *sao-1(RNAi)* 实验，都发现 SAO-1 缺失会使 DLC-1 在细胞质中的表达显著降低，同时用蛋白质免疫印迹（Western Bolt）实验再次验证该实验结论。这一现象十分有趣，本论文随后通过 qPCR 实验和一系列 RNAi 实验（阻碍蛋白质降解）探究其原因，为进一步解释 SAO-1 与 DLC-1 的共定位提供更多的实验支持。

同时，为了深入研究 SAO-1 在细胞分裂过程中的功能以及解释 SAO-1 与 DLC-1 如何相互作用，本论文通过线粒体活体染色实验以及一系列细胞器 RNAi 实验，研究 SAO-1 的亚细胞定位。实验结果显示 SAO-1 与内质网结构蛋白存在荧光共定位，因此本论文随后探究了 SAO-1、DLC-1 与内质网的相互关系。

## 第 2 章 实验材料与方法

### 2.1. 实验材料

#### 2.1.1 实验动物

##### 线虫培养

秀丽隐杆线虫的培养温度在 16°C 到 25°C 之间, 最适温度为 22°C, 培养在 NGM (Nematode Growth Media) 培养基上, 以 NGM 板上的 OP50 大肠杆菌为食。

(1) NGM 培养基的制备:

(a) 蛋白胨 (Peptone) 2 g, 琼脂 16 g, NaCl 2.4 g, 置于洁净 1000 ml 玻璃三角瓶中, 加入蒸馏水定容至 1000 ml (此混合物为初始培养基)。

(b) 120°C 高压蒸汽灭菌 30 min, 之后置于 65°C 水浴锅中冷却并保温。

(c) 依次加入高压灭菌的 1 M 磷酸缓冲液 25 ml、1 M MgSO<sub>4</sub>、1 M CaCl<sub>2</sub>、5 mg/ml 胆固醇 (乙醇溶解不灭菌) 各 1 ml, 摇匀即得到配置好的培养基, 加胆固醇的温度不宜过高。

(d) 小型培养皿 (直径 3 cm) 倒入培养基 5 ml, 中型培养基 (直径 6 cm) 倒入培养基 7 ml, 冷却凝固即可。配制好的 NGM 平板可以冷库保存 2-3 周。

1M 磷酸钾缓冲液的配置方法为: 称取 108.3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 35.6 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 溶于 1000 ml 蒸馏水中, 混合均匀即可。

(2) NGM 平板接种 OP50 大肠杆菌

秀丽隐杆线虫以 OP50 大肠杆菌作为食物来源, OP50 大肠杆菌是尿嘧啶营养缺陷型菌株, 只能在 NGM 平板上生长, 这样可以很好的控制大肠杆菌的生长速度和生长总量。在超净操作台上, 用移液管将约 0.1 ml 大肠杆菌 OP50 菌液涂在小型 NGM 平板中央, 或 0.2 ml 大肠杆菌 OP50 菌液涂在中型 NGM 平板中央, 轻轻晃动平板, 使菌液可以平铺在平板上, 但尽量避免菌液接触到培养皿边缘。让大肠杆菌 OP50 菌苔在室温或 37°C 下生长 24 h, 菌斑生长至一定的厚度即可以使用。配制好的线虫培养可以存储于 4°C 冷库。

##### 线虫杂交

秀丽隐杆线虫为雌性同体, 雄性 (成虫尾部有三角形的尾交钩) 个体仅群体的 0.3%, 可以进行自交和双性杂交两种生殖方式, 热刺激和双性杂交可以增加雄

性后代的比率。实验中，我们可以通过杂交的方式获得各种基因型的线虫株。

(1) 荧光蛋白标记线虫株杂交

(a) 选择其中的一种基因型线虫株作为父本，将整个平板（尽可能保证食物充足和线虫时期多样）放入 30°C 的培养箱，热激培养 8 h，将平板划分成六份，转入新板中正常培养（一般为 22°C）。同时将另一种基因型的线虫株作为母本，正常培养，准备 L4 时期的线虫。

(b) 准备一个中间只有少量 OP50 菌斑的小板（使线虫可以限制在较小的活动范围，提高线虫杂交成功率），从步骤 1 热激之后的培养板中挑取 10 条雄性线虫；从正常培养的板中挑取 L4 时期雌雄同体线虫 5 条放入板中（杂交中雄虫与雌雄同体的比例约为 2:1，也可以通过适当增大该比例或者重复使用雄性线虫提高杂交成功率）。正常培养 24 h。

(c) 将步骤 2 中 5 条雌雄同体线虫分别转入 5 个新板中，正常培养约 72 h。

(d) 观察步骤 3 中的新板，统计后代中雄性个体所占的比例。比例约为 1/2 则认为交配成功。从交配成功的板中，挑取 6 条雌雄同体的线虫（F<sub>1</sub> 代）分别转入新板中，正常培养约 72 h。

(e) 从步骤 4 的新板中，挑取 50 条雌雄同体的线虫（F<sub>2</sub> 代）分别转入新板中，正常培养约 72 h。

(f) 通过荧光显微镜，筛选上述 50 盘线虫。盘中每条线虫（F<sub>3</sub> 代）都同时表达父本和母本的荧光标记蛋白时，则表明这一盘为杂交之后得到的纯合子。如若没有得到杂交纯合子，则重复步骤 5，直到得到纯合子。

(2) 基因缺失突变体线虫杂交

前期步骤与荧光蛋白标记线虫杂交方法相同。在通过荧光显微镜筛选荧光纯合时，需要同时通过 PCR 筛选基因缺失突变体纯合子。PCR 筛选纯合子的方法如下：

(a~f) 步骤同荧光蛋白标记线虫杂交

(g) 提取线虫总 DNA：从荧光蛋白纯合子的盘中挑取 5 条成虫，放入准备好的装有 10 μl worm lysis buffer 的 PCR 管，N<sub>2</sub> 为正对照，突变体线虫为负对照。将 PCR 管放入 -80°C，15 min。拿出 PCR 管，立即放入 PCR 仪中。PCR 程序为：60°C 1 h，95°C 15 min，4°C 8 min。

(h) PCR 筛选纯合子：10 μl 的 PCR 体系，加入 2 μl DNA 提取物，0.5 μl 的缺失基因引物，根据引物和目的基因设置延伸和退火温度。PCR 之后电泳跑胶，分别以 N<sub>2</sub> 为正对照和突变体为负对照，电泳与突变体一致（即没有电泳条带），

则表明样品线虫中无目的基因序列。可以通过重复 PCR 筛选其样品板中的成虫，进一步确认基因缺失体线虫，直到得到纯合子。

### 线虫冻存

秀丽隐杆线虫可以冷冻并长期储存在液氮 (-196°C) 中。成功冷冻的关键是冻存处于正确发育阶段的线虫，向冷冻培养基中加入甘油，并逐渐冷却至 -80°C，一周之后，再将其放入液氮中。刚刚处于饥饿状态的幼虫 (L1-L2 阶段) 最适合冻存，成虫、和 Dauer 时期的线虫，冻存之后复苏成活率很低，不宜冻存。最好使用刚刚耗尽大肠杆菌 OP50 菌苔并含有大量 L1-L2 时期的线虫培养皿。冷冻溶液中要加入 15% 甘油。在冷冻期间，每分钟温度降低 1°C 是理想的，这可以通过将线虫冻存管放置在 -80°C 的聚苯乙烯泡沫塑料容器中来实现。在 -80°C 下存放 24 小时或更长长时间后，应将冻存管转移到永久冷冻的位置，以便进行长期储存。

线虫冻存试剂：S Buffer (129 ml 0.05 M K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, 871 ml 0.05 M KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, 5.85 g NaCl)；S Buffer+30% 甘油 (高压灭菌 30min)。

### 线虫复苏

从 -80°C 冰箱或液氮罐中取出一管线虫，在室温下静置解冻，直到冻存管中的冰变成液体。静置状态下，用移液枪缓慢吸取管底少量 (约 20 μl) 液体放入有大肠杆菌 OP50 的 NGM 平板表面，重复操作并将冻存管底的线虫尽量吸取干净。等待其干燥。之后观察，可以看到几条线虫在板上蠕动。放入 22°C 培养箱中饲养 2-3 天，将 10 只生长状态正常的成虫移入新的 NGM 板中，繁殖 2 代，检查后代表型是否正确。

表 2-1 本论文中所用到的线虫

Lab strain	Genotype	Source
YC0001	<i>C. elegans</i> wild isolate (N <sub>2</sub> )	CGC
YC0031	mCherry::His	CGC
YC0032	<i>nmy-2</i> ::GFP; mCherry::PH	CGC
YC0154	GFP::H2B; mCherry::PH	CGC
YC0156	GFP::SAO-1	CGC
YC0210	ANI-1::GFP	CGC

表 2-1 (续表)

Lab strain	Genotype	Source
YC0213	<i>sao-1P::GFP</i>	CGC
YC0292	<i>Lifeactin::mKate</i>	CGC
YC0293	<i>sao-1P::GFP; mCherry::His</i>	Mating
YC0298	<i>nmy-2::RFP</i>	CGC
YC0354	<i>sao-1P::GFP; mCherry::PH</i>	Mating
YC0378	<i>sao-1P::GFP; mCherry::dhc-1</i>	Mating
YC0385	<i>GFP::cox5-a</i>	CGC
YC0405	<i>ANI-1::RFP</i>	CGC
YC0474	<i>dlc-1::GFP; SAO-1(C deletion)</i>	Mating
YC0552	<i>GFP::SAO-1; SP-12::mCherry</i>	Mating

注：CGC (The Caenorhabditis Genetics Center)，负责收集、培养和分发秀丽隐杆线虫。

### 2.1.2 实验器械与设备

体式（荧光）显微镜	OLYMPUS
激光共聚焦显微镜	尼康
微分干涉差显微镜（DIC）	OLYMPUS
显微注射显微镜	尼康
常规蛋白质免疫印迹相关设备	雷瑞仪器
普通 PCR 仪	雷瑞仪器
q-PCR 仪	Thermo
常规 DNA 凝胶电泳相关设备	Tanon EPS300
多功能酶标仪	Thermo Fisher
DNA 凝胶成像系统	Tanon 3500
核酸及蛋白浓度测量仪	Thermo

### 2.1.3 实验试剂及耗材

(1) 蛋白质免疫印迹相关试剂

RIPA 裂解液	Beyotime
Protein G	GE Healthcare
蛋白酶抑制剂 (PMSF)	Beyotime
磷酸酶抑制剂 (Cocktail)	Roche
Protein ladders (蛋白 marker)	Thermo Fisher
脱脂牛奶 (封闭用)	BBI Life Sciences
BSA (牛血清白蛋白)	Amresco

(2) 核酸相关实验试剂

DNA ladders (1kb)	Sangon Biotech
2 × SuperReal PreMix Plus (q-PCR)	TaRaBa
RNase-free water	Tiagen

(3) 试剂盒

蛋白质浓度测定试剂盒 (BCA 法)	庄盟生物
ECL 化学发光底物试剂盒	博奥龙免疫
质粒提取试剂盒 (小)	Bio-Tek
琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	生工

(4) 线虫培养试剂及耗材

琼脂	Bio-Froxx
蛋白胨/胰蛋白胨	生工
酵母提取物	OXOID
线虫培养皿	BioFil
载玻片/盖玻片	世泰

(5) 其他试剂与耗材

Mito Tracker red CMX Ros	飞宇生物
FM 4-64	Biotium
Triton X-100	生工
潮霉素	Calbiochem
氨苄青霉素/卡那霉素	源叶生物
IPTG	源叶生物
凡士林	生工
麻醉剂	Calbiochem

## 2.2. 实验方法

### 2.2.1 RNA 干扰 (RNAi)

RNAi (RNA interference) 能够起敲低基因的功能。在秀丽隐杆线虫中, 进行 RNAi 实验有三种方法: 注射、浸泡、饲养。本实验室主要运用饲养的方法进行 RNAi 实验。

(1) RNAi 质粒的构建: 绝大部分的 RNAi 质粒都可以从 RNAi 库里得到, 只有少部分库里没有或者没有效果的 RNAi 质粒需要我们自己构建并完成转化。空载质粒为 L4440, 设计引物, 以野生型线虫 (N<sub>2</sub>) 基因组 DNA 为模板扩增基因序列。然后使用限制性核酸内切酶 (如 HindIII 和 XbaI 等) 同时 37°C 过夜酶切目的基因和空载质粒, 次日回收酶切产物, 用 T4 连接酶 16°C 链接 4 h, 接着将其转化到 DH5 $\alpha$  大肠杆菌中。之后挑取 5~8 个单克隆进行菌液 PCR, 检测是否转化成功。随后将检测阳性的克隆菌液送到生物测序公司检测基因序列, 测序正确后, 则提取质粒保存备用。

(2) RNAi 质粒转化: 从 -80°C 冰箱中取出一管 HT115 置于冰上溶解 10 min, 将构建好的 RNAi 质粒加入到 100 $\mu$ l 的 HT115 感受态中, 冰上静置 30 min。将离心管放入提前预热好的 42°C 水浴锅中, 热激 90 s, 然后迅速将其放在冰上静置 5 min。然后加入 100 $\mu$ l 的液体 LB, 37°C, 100 rpm 摇床上摇 1 h。最后 500 g 离心 1 min, 用移液枪移除上清, 剩下的液体 (大约 50 $\mu$ l) 用移液枪轻轻混匀, 加入到含有氨苄青霉素的固体 LB 平板上, 用玻璃棒轻轻涂匀, 置于 37°C 培养箱过夜培养。绝大部分的 RNAi 质粒都可以从 RNAi 库里得到, 只有少部分库里没有或者没有效果的 RNAi 质粒需要我们自己构建并完成转化。

(3) RNAi 菌的培养: 取 5 ml 液体 LB 加入摇菌管中, 加入 5 $\mu$ l 氨苄青霉素 (100  $\mu$ g/ml), 从过夜培养的氨苄板上挑取一个单克隆加入其中, 37 $^{\circ}$ C, 200 rpm 摇床过夜培养。将摇好的菌液吸取 50 $\mu$ l, 加入到配置好的 RNAi 板上(配制与 NGM 板一样, 混合液中还含有 100 $\mu$ g/ml 氨苄青霉素, 100Mm IPTG)。轻轻晃动培养板铺平 RNAi 菌, 室温过夜培养, 次日将 RNAi 板收入冷库储存备用。

(4) RNAi 实验: 对于不同的 RNAi 实验, 我们选择不同的 RNAi 时间和 RNAi 菌液浓度, L4440 菌液的 RNAi 板作为空白对照。一般情况下, 选择挑取 L3 或 L4 时期的线虫约 20~40 条放入准备好的 RNAi 板中, 饲养 24 h, 再进行后续实验。当 RNAi 的效率比较弱时, 可以通过增加 RNAi 饲养的时间来增强 RNAi 效果, 如 *sao-1(RNAi)* 效率较弱, 我们通过将虫体直接裂解在 RNAi 板上, 线虫胚胎直接从虫体裂解出来, 孵化之后, 使其从 L1 时期就开始干扰, 24 h 换一次板, 增长 RNAi 时间; 当 RNAi 效果比较强时, 一方面可以通过减少 RNAi 饲养的时间来降低干扰效果, 如 *dlc-1(RNAi)* 饲养时间一般为 12 h, 另一个方面可以通过 L4440 菌稀释 RNAi 菌液来降低效率, 如 *lpin-1(RNAi)*。还有实验需要双干扰, 我们将两种菌液按照 OD 值的大小配制均等混合菌液, 最后用来配制双干扰线虫培养板, 如 *sao-1; sel-10(RNAi)* 等。

## 2.2.2 实时荧光定量 PCR (qPCR)

### (1) 总 RNA 提取

(a) 线虫同步化处理。根据不同实验, 分别提取线虫不同时期的总 RNA。本论文中分别提取了线虫 L1、L4、Young adult 三个不同的时期总 RNA。实验中为了使所有的线虫所处的时期一致, 需要进行同步化处理。在新的 EP 管中加入 200 $\mu$ l 现配的裂解液挑取 50 条多卵的成虫放入其中, 涡旋振荡 60 s, 在显微镜下观察虫体, 能看到虫体裂解, 2000 g 离心速度离心 1 min, 弃掉上清。再用 200 $\mu$ l M9 重新悬浮离心清洗, 重复 3 次, 弃掉上清收集虫卵。加入 1 ml M9 重新悬浮, 并将 EP 管放置于转盘上过夜孵化, 次日即可离心收集 L1 时期的线虫。将同步化处理过的 L1 时期的线虫转入到新配的 NGM 板中, 培养约 30 h 达到 L4 时期, 同时还可根据线虫腹部的月牙状的大小判断 L4 时期的早晚。将同一时期的 L4 线虫挑入新的 NGM 板中培养约 24 h 达到成虫时期。正常情况下, 我们可以从一只蠕虫体内获得 35 ng 的总 RNA。

b) 取新的 PCR (50  $\mu$ l), 加入新配的 Worm lysis buffer 10  $\mu$ l, 挑取 10 条同步处理的线虫放入其中 (确保线虫加入液体中, 避免粘壁)。用 PCR 仪完成裂解

过程，程序为：65°C孵育 10 min，85°C加热 1 min。完成后置于冰上。

(c) 基因组 DNA (gDNA) 清除。取新的 PCR 管，按照表 2-2 加入各种试剂。之后将 PCR 管放入 PCR 仪中，完成以下程序：42°C加热 2 min，4°C保持 10 min，4°C保存。

表 2-2 基因组 DNA (gDNA) 清除

Reagent	Amount (μL)
5×gDNA Eraser buffer	2.0
gDNA Eraser	1.0
Total RNA (500ng~1ug)	5.0
RNase free water	2.0
Total volume	10.0

### (2) cDNA 合成

取新的 PCR 管，按照表 2-3 加入各种试剂，此操作在冰上进行。之后将 PCR 管放入 PCR 仪中，完成以下程序：37°C加热 2 min，85°C加热 10 min，4°C保存 10 min。

表 2-3 cDNA 合成

Reagent	Amount (μL)
Reaction solution from above	10.0
Primer Script RT Enzyme Mix	1.0
RT Primer Mix	1.0
5×PrimerScript Buffer 2	4.0
RNase free ddH <sub>2</sub> O	4.0
Total volume	20.0

### (3) 实时荧光定量 PCR (qPCR)

取新的 PCR 管，按照表 2-4 加入各种试剂，每个样品上三个孔，此操作在冰上进行。在 Biorad qPCR CFX 96-111 仪器上进行荧光定量。程序如下：预变性，95°C，60 s；PCR 反应，40 个循环，95°C，10 s，60°C，30 s；溶解曲线，95°C，

15 s, 60°C, 20 s, 95°C, 15 s。将 Actin 的表达水平作为内参水平, 目的基因的相对变化用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  的方法进行计算。

表 2-4 实时荧光定量 PCR (qPCR)

Reagent	Amount ( $\mu\text{L}$ )
2×ChamQ SYBR qPCR Master Mix	10.0
qPCR forward primer(10 $\mu\text{M}$ )	0.4
qPCR reverse primer(10 $\mu\text{M}$ )	0.4
Template DNA or cDNA(500ng)	1.0
ddH <sub>2</sub> O	8.2
Total volume	20.0

### 2.2.3 蛋白质免疫印迹 (WB)

#### (1) 样品蛋白质提取

(a) 线虫卵收集: 将秀丽隐杆线虫培养在大培养皿 (直径 10 cm) 中 6 盘, 直至板中有大量的成虫, 并且线虫没有处于饥饿状态。用 M 9 将板上的成虫冲洗下来, 500 g 离心速度离心 1 min 收集线虫。加入现配的线虫裂解液 5 ml, 涡旋振荡 60 s, 在显微镜下观察虫体, 能看到虫体裂解, 有大量的虫卵悬浮, 2000 g 离心速度离心 1 min, 弃掉上清。将裂解后的虫卵移至新的 1.5 ml EP 管中, 再用 1 ml M 9 重新悬浮离心清洗, 重复 3 次, 弃掉上清收集虫卵。

(b) 样品蛋白质提取: 将收集虫卵的 EP 管置于冰上, 中加入 100 $\mu\text{l}$  RIPA 裂解液, 将 EP 管上系上棉线, 放入液氮中速冻 30 s, 在冰上溶解, 重复操作 3~5 次。置于冰上对样品进行超声处理。处理条件如下: 超声功率为 50%, 超声总时为 10 min, 超声频率为超声时间 3 s, 超声间隔 5 s。超声完毕后, 将样品放入 4°C 离心机, 10000 g 离心速度离心 10 min, 最终将上清移入新的 EP 管中。

#### (2) 蛋白质浓度测定 (BCA 法)

(a) BCA 蛋白标准曲线绘制: 使用的蛋白质标准品牛血清白蛋白 BSA (5mg/ml) 绘制蛋白标准曲线。分别取蛋白质标准品 0、0.5、1、2、4、6、8、1 $\mu\text{l}$  加入到 96 孔板中, 然后每个孔用 ddH<sub>2</sub>O 补齐到 10 $\mu\text{l}$ 。现配 BCA 工作液, 每孔加入 100  $\mu\text{l}$  BCA 工作混合液, 轻轻晃动混匀, 培养箱 37°C 孵育 30 min。孵

育完毕后，用酶标仪检测 570 nm 的吸光值（OD 值）。最后根据配制的蛋白标准液浓度和测定的对应标准蛋白溶液 OD 值，绘制标准曲线，并显示公式和  $R^2$ ， $R^2 \geq 0.995$  时，认为标准曲线的绘制是可行的。

（b）样品蛋白质浓度的测定：用 ddH<sub>2</sub>O 将待测量的蛋白样品溶液稀释 5 倍，取 1 $\mu$ l 稀释后的待测蛋白样品加入到 96 孔板中，然后用 ddH<sub>2</sub>O 补齐到 10 $\mu$ l，加入现配的 BCA 工作混合液 100 $\mu$ l，培养箱 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。孵育结束后，与酶标仪上测定样品蛋白 OD 值，然后将测得的蛋白样品 OD 值代入上述所得的蛋白标准曲线计算稀释后的蛋白样品浓度，最终换算出蛋白样品的浓度。

### （3）SDS-PAGE 电泳分离蛋白质

根据测定好的样品蛋白质浓度，吸取 30  $\mu$ g 总蛋白，与 7.5 $\mu$ l 的 4 $\times$  SDS Loading buffer 混合，将混合样品置于加热器上，95 $^{\circ}$ C 加热变性 10 min。用提前配制好的 10% 浓度的 SDS-PAGE 胶对样品蛋白质进行电泳分离（分离电压为 80 V，90 min）。电泳分离结束后，取下两块胶，其中一块进行考马斯亮蓝染色实验，另一块进行蛋白质免疫印迹实验。

### （4）考马斯亮蓝染色

蛋白质电泳分离结束后，取下其中一块 SDS-PAGE 胶，自来水缓慢冲洗电泳液，然后在通风橱中将胶放入考马斯亮蓝染色液中，室温摇床染色 15 min。染色结束后，回收染色液，自来水缓慢冲洗蛋白胶用洗去染色液的浮色。然后加入自来水，微波炉加热至刚刚沸腾，更换自来水，重复此操作两次。最后室温摇床脱色 1~2 h，每 10 min 更换自来水，直到蛋白胶的背景色脱去，蛋白质条带清晰可见为止，最后用于凝胶成像仪中显影成像。

### （5）蛋白质免疫印迹（Western Blot, WB）

蛋白质电泳分离结束后，直接取下其中一块 SDS-PAGE 胶，放入装有转膜缓冲液的盒子。通过电泳（250 mA，恒流 1.5 h）将胶上的蛋白质转移到 PVDF 膜上。转膜结束后，用镊子取下 PVDF 膜，根据蛋白样品的分子量大小剪膜，然后用 TBST 洗膜两次。接着用现配的 5% 脱脂牛奶封闭液室温封闭 1 h（或者 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜），封闭结束后用对应的一抗在 4 $^{\circ}$ C 摇床过夜孵育（或者室温摇床孵育 2 h）。次日，回收一抗，TBST 摇床洗涤 PVDF 膜 5 次，每次 5 min。然后用二抗室温摇床孵育 1 h。接着回收二抗，TBST 摇床洗涤 PVDF 膜 5 次，每次 5 min。最后室温孵育化学发光物 ECL 1 min 后，于凝胶成像仪中显影成像。

## 2.2.4 线粒体红色荧光染色

### (1) 线粒体染色原理

Mito Tracker Red CMX Ros 是一种细胞渗透型的 X-rsamine 衍生物, 包含标记线粒体的弱巯基反应性的氯甲基官能团。我们实验用的产品是一种氧化型红色荧光染料, 可以通过简单的细胞孵育, 线粒体荧光染料即可通过被动运输, 穿过细胞膜并直接附着在活性线粒体上。

### (2) 染色液的配制

Mito Tracker Red CMX Ros 为粉末, 用 DMSO 将其充分溶解至终浓度为 1 mM 的储存液, 分装后放到-20°C避光保存。使用时, 用 M9 将其稀释成终浓度为 100 nM 的工作液。

### (3) 染色

将 100 $\mu$ l Mito Tracker 工作液滴到新的培养中, 挑取 10 条 Young adult 时期的线虫放入液滴中, 盖上培养皿盖子, 将整个培养面置于盒子中避光培养, 染色 2 h。染色结束后, 将线虫挑出, 放入新配置的 NGM 板中, 使其爬行蠕动清除粘在线虫体表的 Mito Tracker, 30 min 后, 重复此操作。爬行蠕动 1 h 之后, 用共聚焦荧光显微镜拍图。

## 2.2.5 CRISPR/Cas9 构建突变体线虫株

利用CRISPR系统, 将GFP-tag编码基因插入线虫*sao-1*基因启动子下游3'UTR上游取代*sao-1*基因, 获得了融合表达pSAO-1::GFP的转基因线虫。具体实验设计及实验过程如下。

(1) Cas9-sgRNA载体的获得: 选取*sao-1*基因ATG上下游各50 bp的基因组序列, 利用网站<http://crispr.mit.edu>在线筛选该区段内可能的Cas9切割靶点(5' N20-NGG 3'), 根据返回的结果选取5'-GTTCTTGTGCATCGCGCCGT-GGG-3'作为Cas9切割靶点, 设计反向引物5'-CAAGACATCTCGCAATAGG-3'和正向引物5'-GTTCTTGTGCATCGCGCCGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT-, pDD162为模板扩增载体全长序列, 然后利用同源重组获得Peft-3::Cas9-PU6::*sao-1*sgRNA质粒。

(2) GFP-SEC同源重组载体的获得: 选取*sao-1*基因ATG上游和终止密码子下游各500-700 bp的基因组序列, 利用Premier 5设计GFP tag端插入*sao-1*基因敲除的5'和3'同源重组臂引物, 以线虫基因组DNA为模板, 扩增获得*sao-1*基因ATG上

游和终止密码子下游5'和3'同源重组DNA片段。然后利用同源重组法将*sao-1*基因ATG上游和终止密码子下游5'和3'同源重组DNA片段插入pDD282获得GFP-SEC同源重组载体pDD282-N-Psao-1-GFP。

(3) 转基因线虫的获得：将获得的Peft-3::Cas9-PU6::*sao-1*sgRNA质粒，GFP-SEC同源重组载体和荧光共注射标记载体混合（pDD282-Psao-1-GFP(10 ng/ $\mu$ L)，Peft-3::Cas9-PU6::*sao-1*sgRNA(50 ng/ $\mu$ L)，pCFJ90(2.5 ng/ $\mu$ L)，pCFJ140(5 ng/ $\mu$ L)，pGH8(10 ng/ $\mu$ L))并通过显微注射仪将其注射到野生线虫N<sub>2</sub>(年轻成虫)的性腺有丝分裂和减数分裂转换区中，然后通过潮霉素筛选获得Roller表型转基因插入的纯合子或杂合子线虫。最后通过热激(34°C, 4h)去除筛选标记，获得GFP-tag标记的荧光线虫*sao-1P::GFP*，此线虫株为*sao-1*序列全部缺失突变体。

## 第 3 章 SAO-1 对线虫第一次细胞分裂的影响

### 3.1 引言

我们前期的实验结果表明，SAO-1 主要在线虫的性腺和胚胎中表达，并且在受精卵的细胞质中分布广泛，如图 3-1 所示。因此我们想通过显微镜技术，完整观测受精卵第一次细胞分裂过程，进而探究 SAO-1 在细胞分裂和细胞发育过程中的作用。

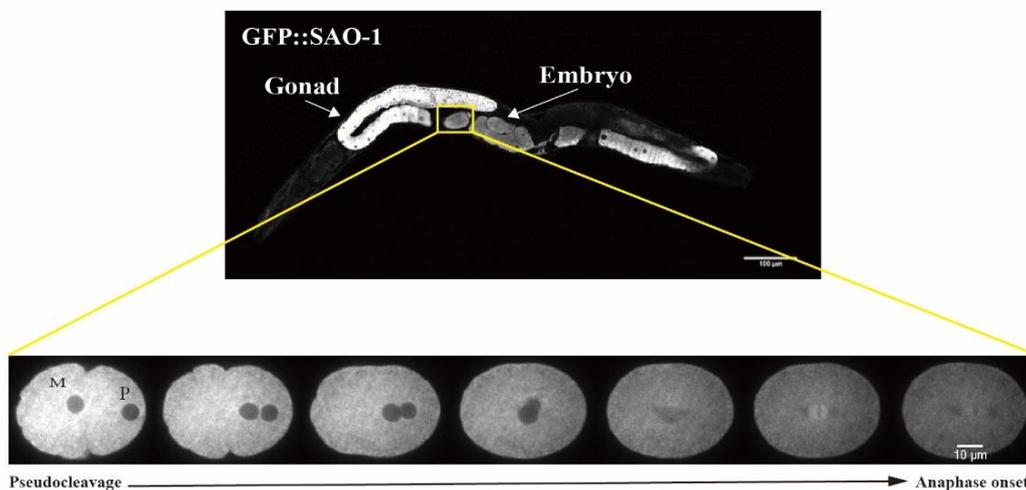


图 3-1 GFP::SAO-1 在秀丽隐杆线虫中的表达

利用共聚焦显微镜拍摄 GFP::SAO-1 在秀丽隐杆线虫中的表达，SAO-1 主要在性腺和胚胎中表达，图中白色标尺表示的长度为 100 $\mu\text{m}$ 。下图为 SAO-1 在线虫 P<sub>0</sub> 细胞时期的表达及细胞第一次细胞分裂过程。“M”表示 maternal，“P”表示 paternal。

### 3.2 实验结果与分析

#### 3.2.1 SAO-1 缺失导致假分裂沟变浅

实验运用两种方法观测线虫第一次细胞分裂过程。*sao-1* 突变体 (*sao-1P::GFP*) 为实验组研究对象，此突变体是利用 CRISPR 基因编辑技术，用 GFP 基因序列替换 *sao-1* 基因全部序列，是 *sao-1* 基因全部缺失突变体。第一种方法是利用微分干涉差显微镜 (Differential Interference Contrast microscope, DIC)，以 N<sub>2</sub> (野生型线虫株) 作为对照组，*sao-1* 突变体 (*sao-1P::GFP*) 为实验组进行延时拍照。第二

种方法是利用转盘式共聚焦显微镜 (Spinning Disk Confocal), 以细胞膜上有红色荧光标记的线虫 (GFP::H2B;PH::mCherry) 作为对照组, *sao-1* 突变体与对照组线虫杂交得到的在细胞膜上有红色荧光标记线虫 (*sao-1P::GFP;PH::mCherry*) 作为实验组进行延时拍照。挑取 Young adult 时期的线虫, 用解剖针解剖出虫卵并制作成玻片, 拍摄受精卵从原核的形成到完成第一次细胞分裂全过程。

实验结果表明, 在线虫胚胎第一次细胞分裂过程中, SAO-1 缺失会导致假分裂沟变浅, 如图 3-2 a) 所示。为了定量表征假分裂沟的深浅, 我们计算了荧光细胞膜假分裂沟侵入的百分比 (假分裂沟侵入深度/受精卵宽度), 数值越大, 假分裂沟侵入越深, 假分裂沟越深, 如图 3-2 b) 所示。数据分析表明, 对照组假分裂沟侵入比例平均约 42%, *sao-1* 突变体平均约 32%, 两者有显著性差异; 并且在分裂早期, *sao-1* 突变体的细胞膜褶皱比较多, 且在假分裂沟处会出现一些泡状结构, 整个细胞膜没有对照组光滑, 如图 3-2 c) 所示。

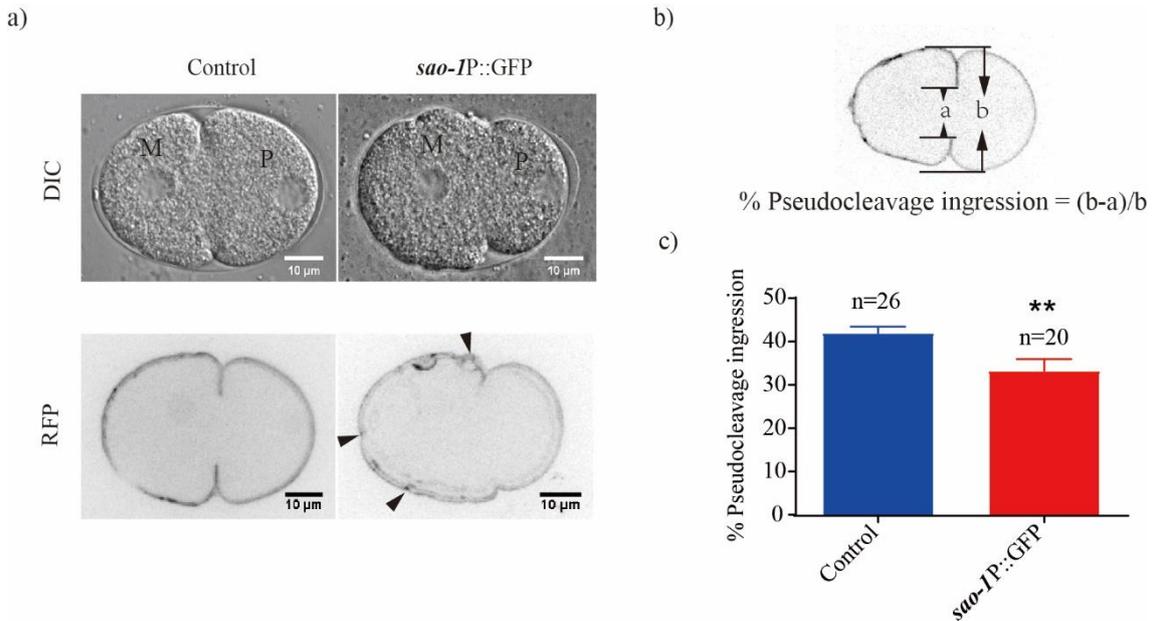


图 3-2 SAO-1 缺失导致假分裂沟变浅

a) 假分裂沟。第一行为微分干涉差显微镜(DIC)延时拍摄图, 时间间隔 10 s。第二行为转盘式共聚焦显微镜延时拍摄图, 拍摄程序为:GFP 通道, 激光输出功率 20%, 曝光时间 500 ms, RFP 通道, 激光输出功率 50%, 曝光时间 800 ms, 时间间隔 10 s。黑色箭头指示 *sao-1* 突变体中细胞膜形成的褶皱和泡状结构。“M”表示 maternal, “P”表示 paternal。图片经过反显处理, 白色和黑色标尺长度为 10  $\mu\text{m}$ 。b) 假分裂沟侵入比例计算公式。b 为受精卵宽度, b-a 为假分裂沟侵入长度。c) 假分裂沟侵入比例统计图。(对照组样本数 26, 实验组样本数 24; \*\* 表示与对照组相比  $p<0.01$ )

### 3.2.2 SAO-1 缺失导致分裂沟闭合点居中

实验利用转盘式共聚焦显微镜（Spinning Disk Confocal），以细胞膜上有红色荧光标记的线虫（GFP::H2B;PH::mCherry）作为对照组，组蛋白用绿色荧光进行标记，这样便于我们通过细胞核和染色体的形态来判断细胞分裂所处的时期。以 *sao-1* 突变体与对照组线虫杂交得到的在细胞膜上有红色荧光标记线虫（*sao-1P::GFP;PH::mCherry*）作为实验组进行延时拍照。

实验结果表明，在线虫胚胎第一次细胞分裂过程中，我们发现实验组和对照组分裂沟闭合点的位置有所差异，SAO-1 缺失会导致分裂沟闭合点居中，如图 3-3 a) 所示。通过 ImageJ 软件处理分析，得到分裂沟闭合的动态过程，发现对照组分裂沟的是一侧先形成，且细胞膜的侵入速度较快；而 *sao-1* 突变体分裂沟的形成同步进行，细胞膜的侵入速度相当，如图 3-3 b) 所示，这就最后导致分裂沟闭合的位点居中，即细胞膜在细胞的中央闭合。为了定量表征分裂沟闭合点的位置，我们计算了分裂沟闭合点的相对位置（分裂沟闭合点侵入深度（长的一侧）/受精卵宽度），数值越大（与 50% 相比），表明分裂沟闭合点越远离中间点，如图 3-3 c) 所示。数据分析表明，对照组分裂沟闭合点平均值约为 62%，*sao-1* 突变体平均值约为 52%，即 *sao-1* 突变体分裂沟从两边侵入，并且最后细胞膜的闭合点基本上在细胞中间，两者有显著性差异，如图 3-3 d) 所示。

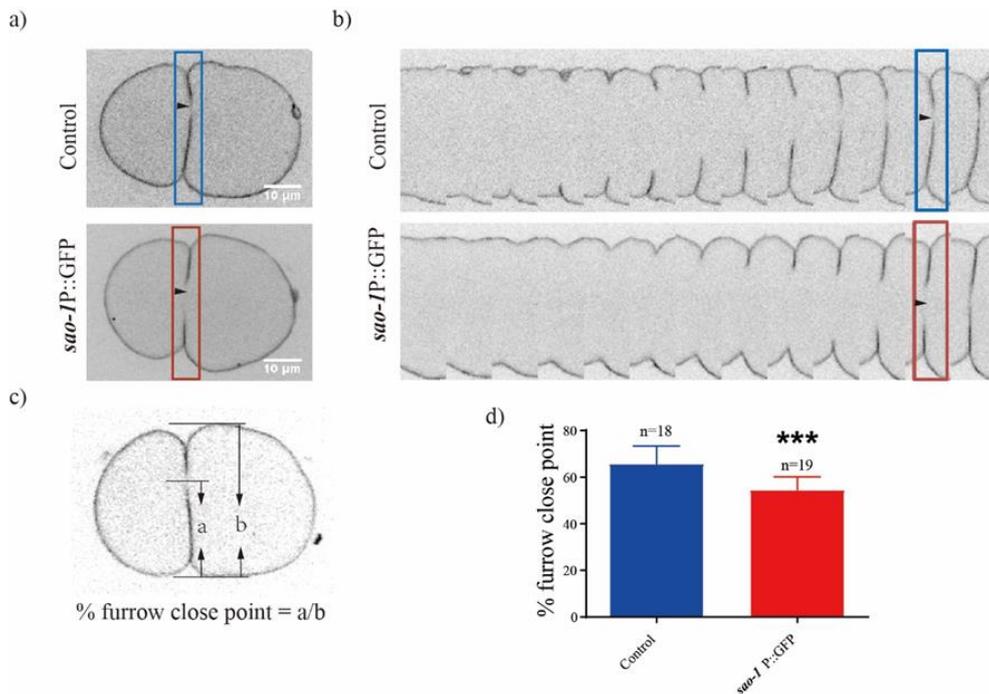


图 3-3. SAO-1 缺失导致分裂闭合点居中

a) 分裂沟闭合点。利用转盘式共聚焦显微镜延时拍摄图，黑色箭头表示指示分裂沟闭合点，蓝色和红色方框指示分裂沟位置，也是 b) 图中 Montage 处理的位置。白色标尺长度为 10  $\mu\text{m}$ 。  
b) 分裂沟闭合动态过程。利用 ImageJ 软件 Montage 软件处理，每张图片间隔为 10 s。蓝色和红色方框指示分裂沟闭合的一张。c) 分裂沟闭合点相对位置计算公式。b 为受精卵宽度，a 为分裂沟闭合时分裂沟侵入长度（长的一侧）。d) 分裂沟闭合点相对位置统计图。(对照组样本数 18，实验组样本数 19；\*\*\* 表示与对照组相比  $p < 0.001$ )

### 3.2.3 SAO-1 缺失会减弱细胞核中心体复合体的旋转

实验利用微分干涉差显微镜 (DIC)，以  $N_2$  (野生型线虫株) 作为对照组，*sao-1* 突变体 (*sao-1P::GFP*) 为实验组进行延时拍照，每张时见间隔为 10 s。通过 ImageJ 软件 Montage 程序处理，分析从两个原核相遇 (PN meeting) 到细胞核破裂 (nuclear envelope breakdown, NEBD) 的动态过程，如图 3-4 所示。母本和父本的原核在胚胎的后端相遇，此时中心体正好位于两个原核之间，中心体之间的连线与胚胎的前后轴垂直。此时细胞核中心体复合体向胚胎中心移动，并旋转  $90^\circ$ ，使中心体之间的连线与胚胎的前后轴平行。

实验发现对照组中，PN meeting 之后，卵细胞核会拉着精细胞核向细胞中间运动，在这个过程中，细胞核中心体复合体会不断旋转，到细胞中间时，旋转约为  $90^\circ$ ，与细胞中轴线垂直，接着 NEBD，完成细胞的第一次分裂；在 *sao-1* 突变体中，PN meeting 之后，向细胞中间移动的过程中，细胞核中心体复合体几乎没有转动，到细胞中央时，中心体之间的连线与线虫胚胎长轴线平行，如图 3-4 所示。为了统计细胞核中心体复合体的旋转情况，通过查阅文献，将旋转情况分为三类：Normal (旋转强，即在 NEBD 之前，细胞核中心体复合体旋转，移动到细胞中央时，中心体之间的连线与胚胎前后长轴垂直)；Middle (旋转较弱，即在 NEBD 之前，细胞核中心体复合体旋转延迟或者旋转较弱，移动到细胞中央时，中心体之间的连线与胚胎之间的夹角较小)；Severe (不旋转，即在 NEBD 之前，细胞核中心体复合体不旋转，到细胞中央时，核膜已经破裂)。统计结果如表 3-1 所示，相比于对照组，*sao-1* 突变体中，细胞核中心体复合体的旋转减弱和不旋转情况所占的比例都有所增加，表明 SAO-1 缺失会减弱细胞核中心体复合体的旋转。

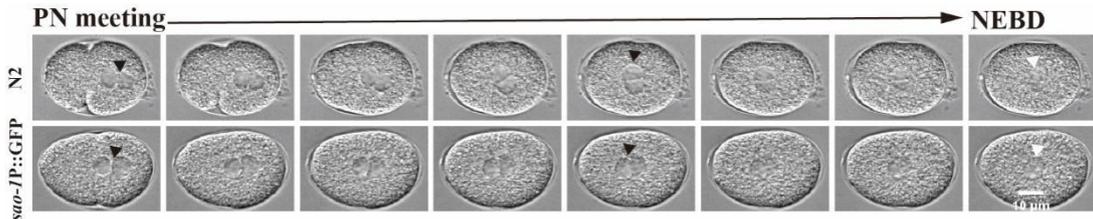


图 3-4 SAO-1 缺失会减弱中心体的旋转

利用 DIC 进行延时拍摄，时间间隔为 10 s，用 ImageJ 软件 Montage 程序处理，每 8 张取一张，即图中两张图片时间间隔为 70 s。NEBD: nuclear envelope breakdown，黑色箭头指示细胞核，白色箭头指示 NEBD，白色标尺表示 10 $\mu$ m。

表 3-1 细胞核中心体复合体中心体旋转

	Normal	Middle	Severe
N <sub>2</sub> (n=21)	72%	14%	14%
<i>sao-1</i> P::GFP (n=22)	59%	23%	18%

### 3.2.4 SAO-1 缺失会降低胚胎生产率，增加胚胎致死率

根据以上实验结果，发现 SAO-1 缺失对线虫受精卵的第一次细胞分裂有较大的影响，包括假分裂沟变浅、分裂沟闭合点居中、中心体旋转减弱等。因此我们进一步探究了线虫胚胎的生产率，胚胎的存活率等，希望从整体的角度研究 *sao-1* 对胚胎发育的影响。

实验以 N<sub>2</sub> 作为对照组，*sao-1* 突变体 (*sao-1*P::GFP) 作为实验组。提配置好小型培养皿，在培养皿的中央接种 5~10  $\mu$ l 的 OP50 大肠杆菌菌液（尽可能的通过食物控住线虫的活动范围，是产卵集中，便于计数）。挑取 L4 时期的雌雄同体线虫各三条，放入小型培养皿培养 24 h，转入新配的 NGM 板，然后每隔 8 h 将成虫转入新配的 NGM 板，一共培养 3 d（线虫的产卵约为 3 d）。每次转完板之后，立刻统计板上线虫卵的个数，计数为 N<sub>0</sub>，然后将这个培养皿培养培养 24 h（正常线虫卵从排出体外到孵化大约 12 h）之后，立刻统计板上剩余线虫卵的个数计数为 N<sub>1</sub>。所用的 N<sub>0</sub> 求和，即为这三条虫的产卵总数，求取平均值即得到每条虫的产卵数；N<sub>1</sub>/N<sub>0</sub> 即为胚胎的致死率。

统计分析如图 3-5 所示，结果表明 N<sub>2</sub> 平均产卵数约为 220 个，胚胎致死率约为 5%；*sao-1* 突变体平均产卵数约为 130 个，产卵率较低 50%，胚胎致死率约为

24%，大约是野生型的 5 倍，存在显著性差异，表明 SAO-1 缺失会降低胚胎生产率，增加胚胎致死率。

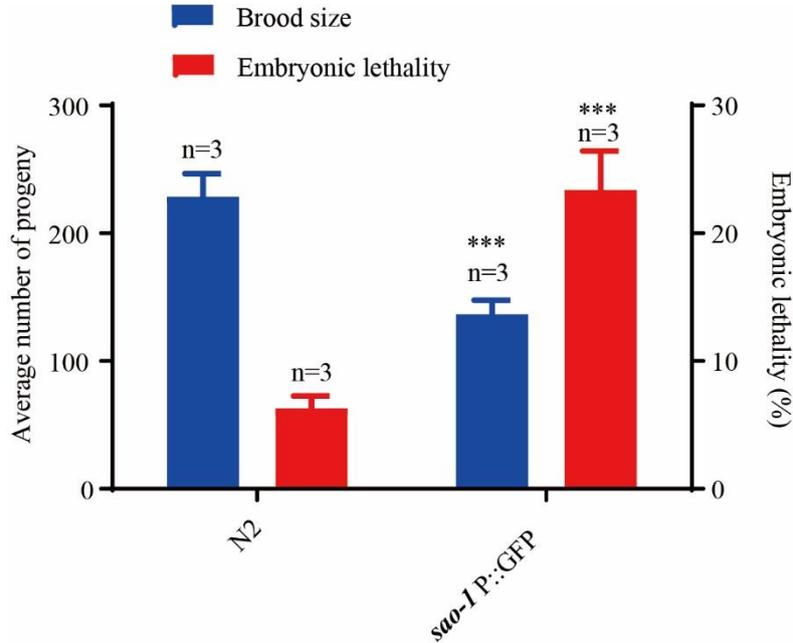


图 3-5 SAO-1 缺失会降低胚胎生产率，增加胚胎致死率

对照组和实验组各 3 组，每组 3 条线虫。\*\*\*表示与对照组 (N<sub>2</sub>) 相比 p<0.001

### 3.3 本章小结

本章我们运用微分干涉差显微镜 (DIC) 和转盘式共聚焦显微镜两种实验方法，通过对延时拍摄，观测和研究了秀丽隐杆线虫受精卵第一次细胞分裂的全过程。我们发现 SAO-1 缺失对细胞的第一次分裂明显的影响。主要表现为以下四个方面：1) SAO-1 缺失导致假分裂沟变浅；2) SAO-1 缺失导致分裂沟闭合点居中；3) SAO-1 缺失会使细胞膜产生褶皱以及出现泡状结构；4) SAO-1 缺失会减弱细胞核中心体复合体的旋转。基于这些影响，我们进一步研究了 SAO-1 缺失对胚胎整体发育的影响，发现 SAO-1 缺失会导致产卵率降低 50%，且胚胎的致死率是野生型的 5 倍。

综合上述实验结论，我们发现 *sao-1* 在秀丽隐杆线虫第一次细胞分裂过程中起到了重要作用，并在线虫的胚胎发育过程中发挥了功能。

## 第 4 章 SAO-1 缺失对细胞皮层蛋白的影响

### 4.1 引言

通过前期实验，我们发现 SAO-1 缺失会影响第一次细胞分裂过程并影响了胚胎的发育。其中最明显的表型为，SAO-1 缺失会导致假分裂沟变浅以及分裂沟闭合位点居中，这两点都与卵裂沟的形成和内侵有关。细胞分裂过程中细胞形状的变化是由富含肌动蛋白丝和非肌球蛋白 II (NMY-2) 的收缩环驱动的。收缩环通过肌动球蛋白收缩和肌动蛋白解聚而闭合，然而收缩环的闭合以及由此产生的沟的侵入在后生动物的分裂平面内是非同心的（非对称的）。ANI-1 (Anillin actin binding protein) 是一种细胞骨架蛋白，能固定收缩环组件。在胞质分裂过程中，它可以与多种参与卵裂沟形成的蛋白相互作用，在胚胎早期协调肌动蛋白的收缩性。秀丽隐杆线虫早期胚胎卵裂沟的侵入是有两条不同的途径介导，这两条途径可以通过他们依赖的中心纺锤体来区分。ANI-1 能促进线虫胚胎中星体依赖分裂沟的形成，ANI-1 缺失时，微管定向 NMY-2 (Non-muscle MYosin) 极化异常；最终导致分裂沟对称侵入。

在第一次细胞分裂早期，NMY-2 和 ANI-1 广泛分布于细胞皮层。在细胞分裂早期，即皮层收缩较弱时，一般在假分裂沟之前，NMY-2 和 ANI-1 均匀分布于整个胚胎细胞皮层；随着细胞分裂中假分裂沟的形成，细胞皮层收缩，细胞皮层蛋白定向移动并聚集到细胞一端，形成细胞极性。为了进一步探究 SAO-1 在胞质分裂过程中的作用，我们将 *sao-1P::GFP* (*sao-1* 突变体) 分别与 *NMY-2::mCherry* 和 *ANI-1::RFP* 进行杂交筛选得到纯合子线虫株，运用光学显微镜技术，研究 SAO-1 缺失对细胞皮层 NMY-2 和 ANI-1 的影响。

### 4.2 实验结果与分析

#### 4.2.1 SAO-1 缺失对 NMY-2 的影响

实验利用转盘式共聚焦显微镜，以 *nmy-2::mCherry* 作为对照组，*nmy-2::mCherry*; *sao-1P::GFP* 突变体作为实验组。通过拍摄细胞分裂早期过程，一般为原核形成附近，假分裂沟之前的时期，研究细胞皮层 NMY-2 的动态变化。

实验结果表明，在细胞分裂过程中，NMY-2 在细胞皮层是一个动态的过程，

会不断的形成与消失，并且会有自己的运动轨迹，直到假分裂沟时期之后，细胞皮层的 NMY-2 消失殆尽，如图 4-1 a) 所示。我们发现 SAO-1 缺失，NMY-2 亮斑的存在更加的稳定，表现为从 NMY-2 亮斑在细胞皮层从出现到消失的时间更久，即 NMY-2 亮斑存在的时间更长；并且发现 NMY-2 在细胞皮层有一定的运动轨迹，在被降解消失的过程中，不断的朝向细胞前端运动，但 SAO-1 缺失时，NMY-2 亮斑的位置很稳定，基本没有运动轨迹，如图 4-1 b) 所示。

基于上述表型，因此我们用 Imaris 软件分析了细胞皮层 NMY-2 亮斑运动速率和持续的时间。运动速度如图 4-1 d) 所示。结果表明，对照组的 60% NMY-2 运动速度在  $0-3\mu\text{m/s}$ ，约 40% 的 NMY-2 运动速度在  $3-6\mu\text{m/s}$ ，还有超过 10% 的 NMY-2 运动速度大于  $4\mu\text{m/s}$ ；而 SAO-1 缺失时，约 75% 的 NMY-2 运动速度在  $0-3\mu\text{m/s}$ ，约 25% 的 NMY-2 运动速度在  $3-6\mu\text{m/s}$ ，还有大约 5% 的 NMY-2 运动速度小于  $1\mu\text{m/s}$ ，基本没有运动。综合结果表明，SAO-1 缺失导致细胞皮层 NMY-2 的运动速度降低。持续时间如图 4-1 e) 所示。结果表明，对照组的 82% 的 NMY-2 持续时间在 20 s-50 s，并且约 45% 的 NMY-2 持续时间小于 30 s；而 SAO-1 缺失时，约 70% 的 NMY-2 持续时间在 20 s-50 s，且约 15% 的 NMY-2 持续时间超过 80 s；综合结果表明，SAO-1 缺失会导致细胞皮层 NMY-2 持续时间增长。

最后我们的实验结果还表明，对照组 NMY-2 之间的网状结构多，之间的联系更加紧密；SAO-1 缺失时，NMY-2 之间的网状结构减少，甚至没有，两者或两者以上的联系不紧密，每个 NMY-2 很独立，如图 4-1 c) 所示。

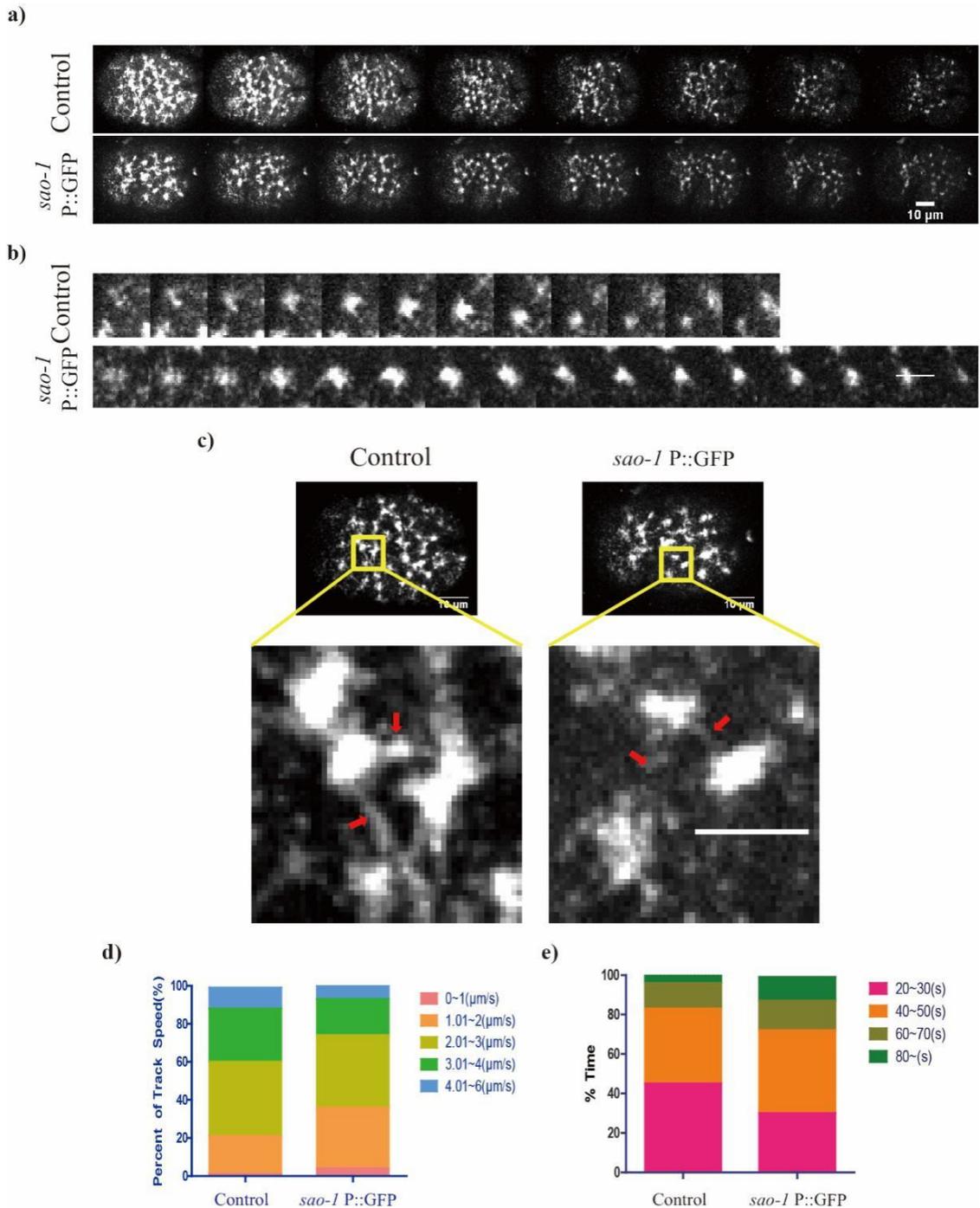


图 4-1 SAO-1 缺失对细胞皮层 NMY-2 的影响

利用转盘式共聚焦显微镜 100X 进行拍摄，程序为 RFP 通道，激光输出功率 50%，曝光时间 800 ms。时间间隔为 5 s。a) NMY-2 在细胞皮层的动态过程。用 ImageJ 软件 Montage 程序处理，每 3 张图片取一张，即图中两张图片时间间隔为 15 s，白色标尺表示长度为 10 $\mu\text{m}$ 。a) 一个 NMY-2 亮斑在细胞皮层的动态过程。用 ImageJ 软件 Montage 程序处理，每两张图片时间

间隔为 5 s, 白色标尺表示长度为 5 $\mu\text{m}$ 。c) NMY-2 之间的网状结构。红色箭头指示 NMY-2 之间的网状结构, 白色标尺表示长度为 5 $\mu\text{m}$ 。d-e) NMY-2 在细胞皮层的运动速度和持续时间统计图。运用 Imaris 软件进行的分析, 每组分析了 10 个以上样品上的 NMY-2 亮斑动态过程。

#### 4.2.2 SAO-1 缺失对 ANI-1 的影响

实验利用转盘式共聚焦显微镜, 以 ANI-1::RFP 作为对照组, ANI-1::RFP; *sao-1P::GFP* 突变体作为实验组。通过拍摄细胞分裂早期过程, 一般为原核形成附近, 假分裂沟之前的时期, 研究细胞皮层 ANI-1 的动态变化。

实验结果表明, 在细胞分裂过程中, ANI-1 在细胞皮层是一个动态的过程, 会不断的形成与消失, 并且会有自己的运动轨迹, 直到假分裂沟时期之后, 细胞皮层的 ANI-1 消失殆尽, 如图 4-2 a) 所示。我们发现, SAO-1 缺失时, ANI-1 亮斑的时间短, 表现为从 ANI-1 亮斑在细胞皮层从出现到消失的时间更短; 并且发现 ANI-1 在细胞皮层有一定的运动轨迹, 在被降解消失的过程中, 会不断的运动, 但 SAO-1 缺失时, ANI-1 亮斑的位置很稳定, 基本没有运动轨迹, 如图 4-2 b) 所示。

基于上述表型, 因此我们用 Imaris 软件分析了细胞皮层 ANI-1 亮斑运动速率和持续的时间。运动速度如图 4-2 d) 所示。结果表明, 对照组的 ANI-1 运动速度超过 4  $\mu\text{m}/\text{s}$ , 超过 20% 的 ANI-1 运动速度小于 3  $\mu\text{m}/\text{s}$ ; 而 SAO-1 缺失时, 约 25% 的 ANI-1 运动速度超过 4  $\mu\text{m}/\text{s}$ , 并且大约 45% 的 ANI-1 运动速度小于 3  $\mu\text{m}/\text{s}$ , 甚至还有大约 10% 的 ANI-1 运动速度小于 1  $\mu\text{m}/\text{s}$ , 基本没有运动。综合结果表明, SAO-1 缺失会导致细胞皮层 ANI-1 的运动速度降低。持续时间如图 4-2 e) 所示。结果表明, 对照组的 ANI-1 持续时间大于 70 s, 约 10% ANI-1 持续时间超过 100 s; 而 SAO-1 缺失时, 只有 25% 的 ANI-1 持续时间大于 70 s, 并且没有 ANI-1 持续时间超过 100 s; 综合结果表明, SAO-1 缺失会导致细胞皮层 ANI-1 持续时间变短。

最后我们的实验结果还表明, 对照组 ANI-1 之间的网状结构多, 之间的联系更加紧密; SAO-1 缺失时, ANI-1 之间的网状结构减少, 甚至没有, 两者或两者以上的联系不紧密, ANI-1 斑点比较独立, 如图 4-2 c) 所示。

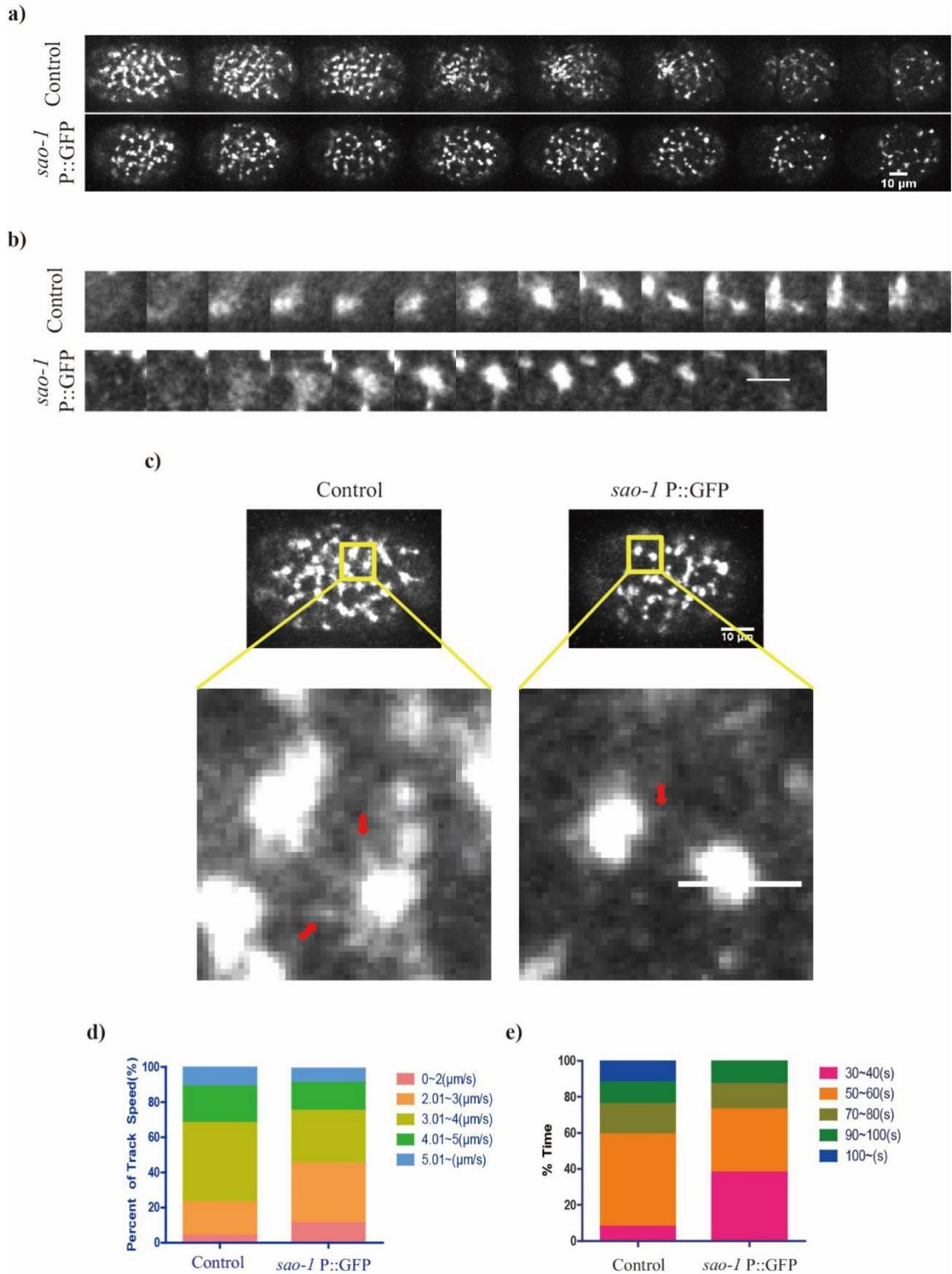


图 4-2 SAO-1 缺失对细胞皮层 ANI-1 的影响

利用转盘式共聚焦显微镜 100X 进行拍摄，程序为 RFP 通道，激光输出功率 30%，曝光时间 500 ms。时间间隔为 5 s。a) ANI-1 在细胞皮层的动态过程。用 ImageJ 软件 Montage 程序处

理，每3张图片取一张，即图中两张图片时间间隔为15 s，白色标尺表示长度为10  $\mu\text{m}$ 。b) 一个 ANI-1 亮斑在细胞皮层的动态过程。用 ImageJ 软件 Montage 程序处理，每两张图片时间间隔为5 s，白色标尺表示长度为5  $\mu\text{m}$ 。c) ANI-1 之间的网状结构。红色箭头指示细胞皮层 ANI-1 之间的网状结构，白色标尺表示长度为5  $\mu\text{m}$ 。d-e) ANI-1 在细胞皮层的运动速度和持续时间统计图。运用 Imaris 软件进行的分析，每组分析了10个以上样品上的 ANI-1 亮斑动态过程。

### 4.3 本章小结

在细胞分裂的早期，NMY-2 和 ANI-1 在细胞皮层是一个动态的过程，都是从胚胎前端向后端运动。SAO-1 缺失会导致 NMY-2 蛋白在细胞皮层的运动速度降低，运动范围缩小，NMY-2 斑点存活的时间延长、NMY-2 之间的连接部分减少甚至没有；SAO-1 缺失也会导致 ANI-1 的速度降低、ANI-1 之间的连接结构减少。

结果表明，SAO-1 缺失对细胞皮层蛋白 NMY-2 和 ANI-1 的影响一致。细胞分裂过程中细胞形状的变化是由富含肌动蛋白丝和非肌球蛋白 II (NMY-2) 的收缩环驱动的。在胞质分裂过程中，ANI-1 它可以与多种参与卵裂沟形成的蛋白相互作用，在胚胎早期协调肌动蛋白的收缩性。我们猜测，SAO-1 缺失，使 NMY-2 和 ANI-1 等细胞皮层蛋白之间的连接减弱，使他们都相对独立，之前完整的网状结构被破坏，从而导致他们的动态过程受到影响（包括速度和降解过程），使得整个网状结构动力不足，从而使得细胞皮层的收缩能力受到影响。这也能很好的解释 SAO-1 缺失导致假分裂沟变浅、中心体的旋转减弱的现象，是由于细胞皮层收缩动力不足导致。但 SAO-1 缺失为何会破坏细胞皮层的网状结构？这还有待进一步的实验探索！

## 第 5 章 动力蛋白缺失对线虫第一次细胞分裂的影响

### 5.1 引言

细胞从一个分裂成两个子细胞的过程是所有生命活动的基础。细胞膜的侵入是细胞分裂中的重要一环，也使得是两个子细胞在生理意义上的分离。细胞膜的侵入主要有两种形态，一种是假分裂沟（Pseudocleavage），也叫前分裂沟，另一种是后期分裂沟（Metaphase furrow）。研究表明，分裂沟的形成包括膜的运送和延伸<sup>[56]</sup>；并且卵裂沟的内侵是由两条不同的途径介导的，这两条途径可以通过依赖中心纺锤体来区分。细胞骨架和细胞核的连接对细胞核的移动和定位非常重要，有文献报道，动力蛋白和其他相关蛋白在细胞核的迁移中其关键作用。细胞质中的动力蛋白（Dynein），是微管负极的马达分子，参与许多细胞的动力学过程，由两条重链（dynein heavy chain, DHC）和两条轻链（dynein light chain, DLC）组成。

上述实验中假分裂沟和分裂沟的异常以及细胞核的迁移都与细胞分裂过程中胞骨架有着密切联系。我们猜想 SAO-1 是否参与了细胞分裂过程中细胞骨架的调控？因此我们探究了动力蛋白 DHC-1 和 DLC-1 在细胞分裂过程中对卵裂沟和细胞核旋转迁移的影响，进而与 SAO-1 进行对比，验证我们的实验猜想。

### 5.2 实验结果与分析

#### 5.2.1 DHC-1 缺失导致假分裂沟变浅，减弱中心体的旋转

实验运用微分干涉差显微镜（Differential Interference Contrast microscope, DIC），以 N<sub>2</sub>（野生型线虫株）作为负对照组，*sao-1* 突变体（*sao-1P::GFP*）为正对照组，*dhc-1(ct42)* 为实验组进行延时拍照。*dhc-1(ct42)* 是一个温度敏感型的杂合子线虫，纯合致死。*ct42* 是显性温度敏感的母亲效应致死因子，正常生长温度为 16°C，当温度升高时，一般培养温度为 25°C，DHC-1 产生突变。准备生长状态良好的 L4 时期线虫，正常组 22°C 培养 24 h，实验组 25°C 培养 24 h，之后用解剖针解剖出虫卵并制作成玻片，拍摄受精卵从原核的形成到完成第一次细胞分裂全过程。

运用 3.2 所述的方法统计假分裂沟的深浅，统计如图 5-1 a) 所示。结果表明，

在线虫胚胎第一次细胞分裂过程中，DHC-1 缺失会导致假分裂沟变浅，产生了与 *sao-1* 突变体一致的表型，且有显著性差异。

同时分析了中心体的旋转过程，发现 DHC-1 缺失时，中心体旋转较弱甚至不旋转，并且其所占比例有所上升，如图 5-1 b) 所示。数据统计方法如 3.2.3 所述，统计结果如表 5-1。结果表明 DHC-1 缺失会减弱中心体旋转的表型与 *sao-1* 突变体一致。并且发现 DHC-1 缺失会导致，会加速核膜破裂的过程。

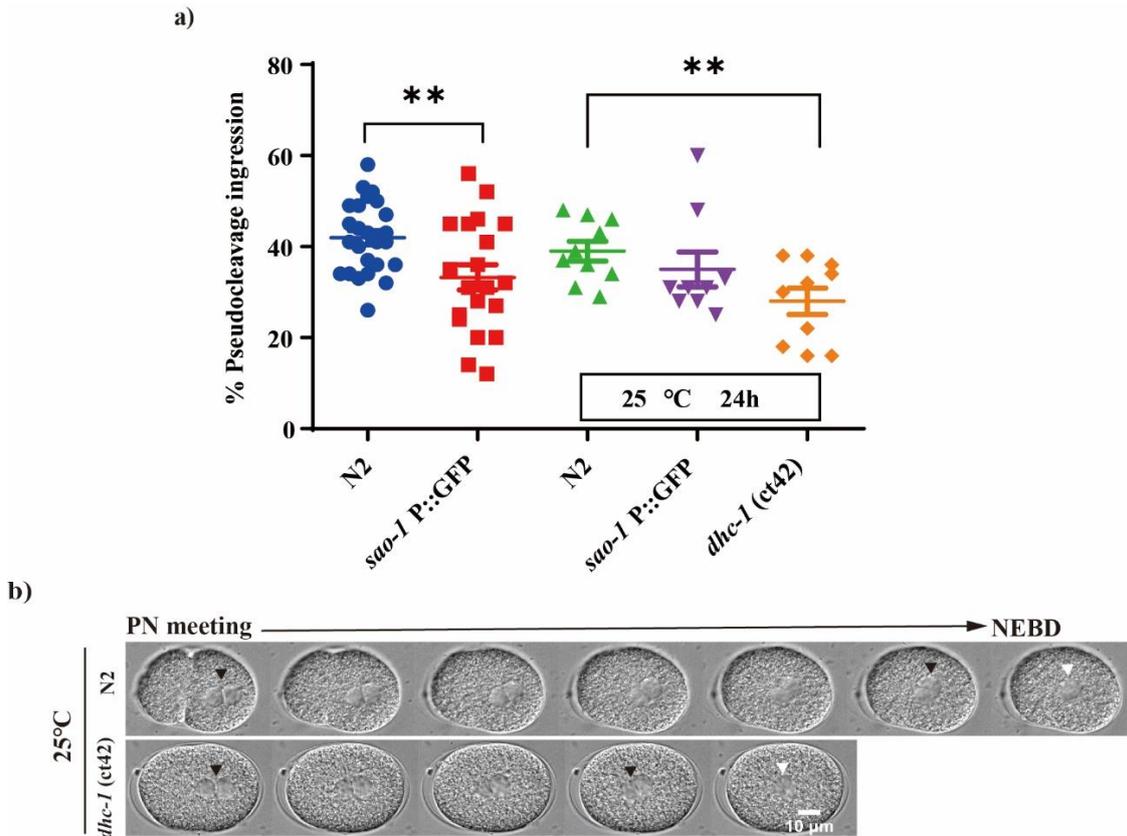


图 5-1 DHC-1 缺失导致假分裂沟变浅，减弱中心体的旋转

a) DHC-1 缺失导致假分裂沟变浅。\*\*表示与对照组相比  $p < 0.01$ 。b) 中心体旋转过程。利用 DIC 进行延时拍摄，时间间隔为 10 s，用 ImageJ 软件 Montage 程序处理，每 5 张取一张，即图中两张图片时间间隔为 40 s。NEBD: nuclear envelope breakdown，黑色箭头指示细胞核，白色箭头指示 NEBD，白色标尺表示 10 $\mu$ m。

表 5-1 细胞核中心体复合体旋转

	Normal	Middle	Severe
N <sub>2</sub> (n=28)	68%	13%	19%
<i>sao-1P::GFP</i> (n=30)	63%	9%	27%
<i>dhc-1(ct42)</i> (n=30)	59%	13%	28%

### 5.2.2 DLC-1 缺失导致假分裂沟变浅和分裂沟闭合点居中

实验利用转盘式共聚焦显微镜 (Spinning Disk Confocal), 以细胞膜上有红色荧光标记的线虫 (GFP::H2B;PH::mCherry) 作为实验对象。以 *L4440(RNAi)* 作为对照组, *dhc-1(RNAi)* 为实验组。挑 L4 时期的线虫, 置于新配置的 RNAi 板上, 干扰 12 h (*dhc-1(RNAi)* 效率较高, 干扰时间过长会导致线虫受精卵不能正常分裂, 为了观测完整的细胞分裂过程, 因此减少了干扰时间), 然后用解剖针解剖出虫卵并制作成玻片, 拍摄受精卵从原核的形成到完成第一次细胞分裂全过程。

运用 3.2.1 和 3.3 所述的方法分析和统计实验数据。数据分析表明, *L4440(RNAi)* 组假分裂沟侵入比例平均约 50%, *dhc-1(RNAi)* 组平均约 32%, 两者有显著性差异, 即 DLC-1 缺失导致假分裂沟变浅, 如图 5-2 a)。另外一组数据分析表明, *L4440(RNAi)* 组分裂沟闭合点平均值约为 62%, *dhc-1(RNAi)* 组平均值约为 56%, 即 DLC-1 缺失导致分裂沟闭合点更加居中, 两者有显著性差异, 如图 5-2 b) 所示。这两个表型与 *sao-1* 突变体一致。

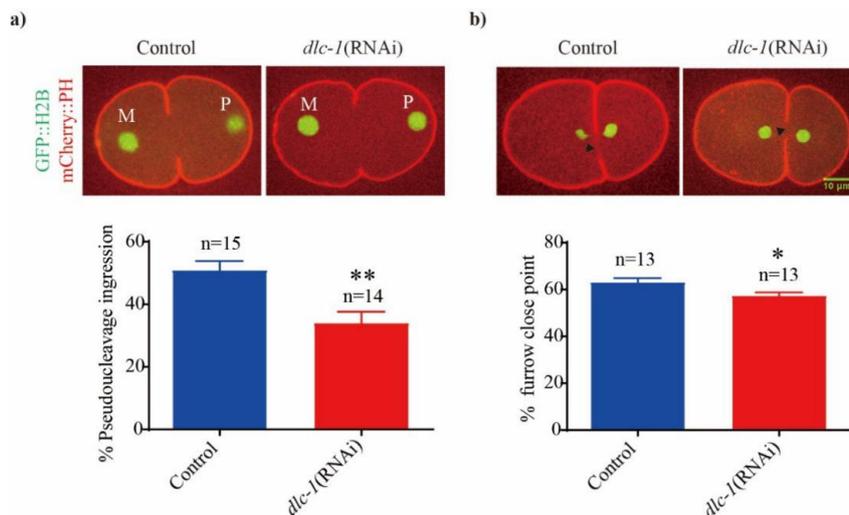


图 5-2. DLC-1 缺失导致假分裂沟变浅和分裂沟闭合点居中

a) 假分裂沟。对照组样本数 15, 实验组样本数 14; \*\*表示与对照组相比  $p < 0.01$ 。“M”表示 maternal, “P”表示 paternal。b) 分裂沟闭合点位置。对照组样本数 13, 实验组样本数 13, \* 表示与对照组相比  $p < 0.05$ 。Ctrl RNAi, L4440 空白质粒干扰, 黑色箭头指示分裂沟闭合点, 绿色标尺代表长度为  $10 \mu\text{m}$ 。

### 5.2.3 DLC-1 缺失减弱中心体的旋转

实验利用线虫 (GFP::H2B;PH::mCherry) 作为实验对象。以 *L4440(RNAi)* 作为对照组, *dlc-1(RNAi)* 为实验组。利用转盘式共聚焦显微镜进行延时拍摄。数据结果显示, DLC-1 缺失会减弱中心体的旋转, 如图 5-3 所示。表型与 *sao-1* 突变体和 DHC-1 缺失一致。并且发现 DHC-1 缺失, 会加速核膜破裂的过程。我们分析统计了细胞核中心体复合体旋转的数据, 统计方法如 3.3.3 所示。结果显示, 对照组正常旋转的比例为 53%, NEBD 之前不旋转占比只有 7%; *dlc-1(RNAi)* 之后, 正常旋转的比例降低至 23%, 而 NEBD 之前不旋转的概率高到 69%, 表明 DLC-1 缺失会减弱, 甚至阻止细胞核中心体复合体的旋转。同时我们还发现 DLC-1 缺失会使细胞核的移动迁徙受到影响, 细胞核没有移动到胚胎中央就进入了 NEBD 过程。

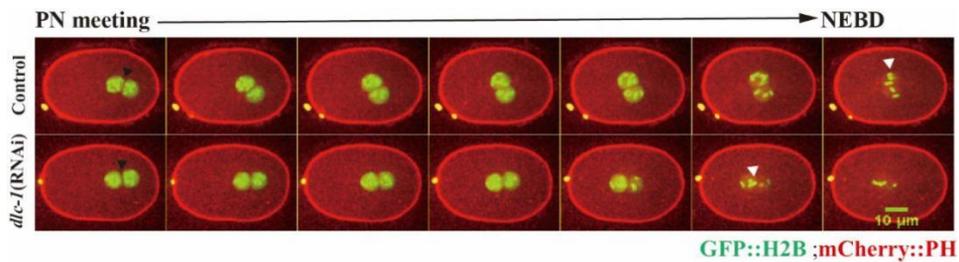


图 5-3 DLC-1 缺失减弱中心体的旋转

中心体旋转过程。利用转盘式共聚焦显微镜进行延时拍摄, 时间间隔为 10 s, 用 ImageJ 软件 Montage 程序处理, 每 2 张图片取一张, 即图中两张图片时间间隔为 20 s, NEBD, nuclear envelope breakdown, 黑色箭头指示细胞核, 白色箭头指示 NEBD, 绿色标尺表示长度为  $10 \mu\text{m}$ 。

表 5-2 DLC-1 缺失对细胞核中心体复合体旋转的影响

	Normal	Middle	Severe
<i>L4440 (RNAi)</i> (n=15)	53%	40%	7%
<i>dlc-1 (RNAi)</i> (n=13)	23%	8%	69%

### 5.3 本章小结

本章我们运用微分干涉差显微镜(DIC)和转盘式共聚焦显微镜两种实验方法,通过对延时拍摄,研究了 DHC-1、DLC-1 缺失对秀丽隐干线虫受精卵第一次细胞分裂的全过程的影响。研究结果表明, DHC-1 突变会导致假分裂沟变浅和中心体旋转减弱; DLC-1 缺失也是导致假分裂沟变浅、分裂沟对称闭合、中心体旋转减弱。这些表象与 *sao-1* 突变体的表型一致。

DHC-1 与 DLC-1 是细胞质动力蛋白的组成部分,动力蛋白是微管负极的马达分子,将微管与细胞膜皮层紧密连接,参与细胞骨架的形成,为细胞分裂提供机械动力。我们的实验结果表明, DHC-1、DLC-1 缺失表型与 SAO-1 缺失表型一致,因此我们猜想, SAO-1 可能参与细胞骨架的调控,进而影响胞质分裂,产生上述突变体表型。

## 第 6 章 动力蛋白的缺失对细胞皮层的影响

### 6.1 引言

上述实验发现细胞质动力蛋白缺失对细胞分裂过程有影响，产生与 SAO-1 缺失相似的表型，包括假分裂沟变浅、分裂沟闭合点居中、中心体旋转减弱等。因此我们想进一步探究 DHC-1、DLC-1 的缺失是否也对细胞皮层蛋白 NMY-2、ANI-1 和 Actin 有影响？本论文使用 Lifeactin::RFP 线虫株为实验对象，Lifeactin 可以标记在 Actin 上面，指示细胞皮层 Actin 蛋白。以及是否会产生和 SAO-1 缺失一致的表型？

### 6.2 实验结果与分析

#### 6.2.1 DHC-1 缺失对 NMY-2 的影响

实验利用转盘式共聚焦显微镜，以 *nmy-2::mCherry* 作为实验对象，*L4440 (RNAi)* 作为对照组，*dhc-1(RNAi)* 处理 24 h 作为实验组。通过拍照，拍摄细胞分裂早期过程，聚焦细胞皮层的 NMY-2，研究 DHC-1 缺失对 NMY-2 在细胞皮层动态过程的影响。

在细胞分裂过程中，NMY-2 斑点在细胞皮层是一个动态的过程，会不断的形成与消失，并且会有自己的运动轨迹，直到假分裂沟时期之后，细胞皮层的 NMY-2 消失殆尽。通过 ImageJ 软件，我们分析了每个受精卵中 NMY-2 在细胞皮层的存活时间，即每个 NMY-2 斑点从出现到消失的时间。结果表明，SAO-1 缺失，NMY-2 在细胞皮层的存活时间约为 70s，与对照最相比具有显著性差异；*dhc-1(RNAi)* 之后，NMY-2 斑点在细胞皮层的存活时间与对照组相比，没有明显变化，如图 6-1 a) 所示。同时我们的实验结果还表明，与对照组相比，NMY-2 的结构与分布没有明显变化，如图 6-1 b) 所示。

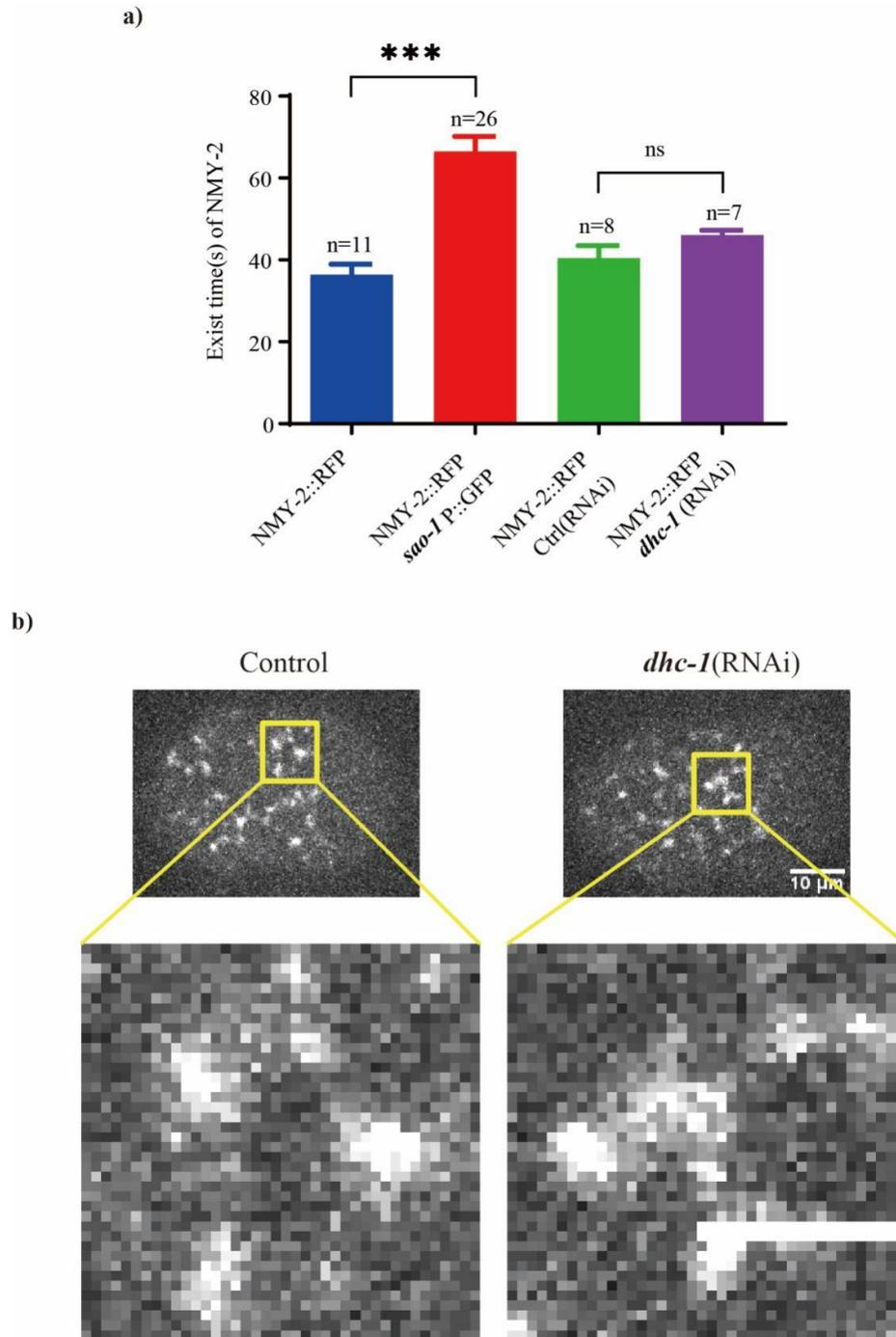


图 6-1 DHC-1 缺失对细胞皮层 NMY-2 的影响

利用转盘式共聚焦显微镜进行拍摄，程序为 RFP 通道，激光输出功率 80%，曝光时间 800 ms。时间间隔为 10 s。a) 每个 NMY-2 在细胞皮层的存在的时间。即 NMY-2 白点从开始出现到消失的总时间。每组数据分析了 8 个受精卵上 NMY-2 斑点的存活时间。白色标尺表示长度为 10  $\mu\text{m}$ ，\*\*\*表示与对照组相比  $p < 0.001$ 。b) NMY-2 之间的网状结构。白色标尺表示长度为 5  $\mu\text{m}$ 。

## 6.2.2 DLC-1 缺失对 NMY-2 的影响

由于 *nmy-2::mCherry* 的红色荧光比较弱, 如实验 6.6.1 所示。因此我们选取 *nmy-2::GFP; mCherry::His* 为实验对象, *L4440 (RNAi)* 作为对照组, *sao-1(RNAi)* 从线虫卵开始; *dlc-1(RNAi)* 处理 24 h 作为实验组。通过拍照, 拍摄受精卵第一次细胞分裂早期过程, 聚焦细胞皮层 NMY-2 荧光蛋白, 研究 SAO-1 缺失、DLC-1 缺失对 NMY-2 在细胞皮层动态过程的影响。

NMY-2 斑点在细胞皮层是一个动态的过程, 并且具有极性, 在细胞质的分裂过程中, 从线虫胚胎的前端移动到后端。因此我们选取细胞中央区域 (图 6-2 a) 中的黄色方框区域), 运用 ImageJ 软件中的 Montage 程序分析了黄色区域中 NMY-2 的动态过程。分析结果如图 6-2 b) 所示, 黄色虚线指示 NMY-2 在细胞皮层的运动轨迹。结果表明, 随着时间的延伸, 对照组中, 会不断重新出现新的 NMY-2, 并且会不断向胚胎后端运动; *sao-1(RNAi)* 实验组中, 出现新的 NMY-2 频率变小, 并且运动轨迹几乎为垂直直线, 表明 NMY-2 位置几乎没有变化, 即没有向胚胎后端运动; *dlc-1(RNAi)* 与 *sao-1(RNAi)* 结果相似, 也几乎没有新的 NMY-2 产生且没有向胚胎后端运动。同时图 6-2 b) 中显示, 与对照组相比, 实验组 *dlc-1(RNAi)* 与 *sao-1(RNAi)* 中, NMY-2 的运动轨迹偏长, 表明多数 NMY-2 蛋白在细胞皮层存活的时间较长, 这与上述实验 4.2.1 中 *sao-1* 突变体的实验结果一致。并且图 6-2 c) 表明, 对照组 NMY-2 之间的网状结构多, 之间的联系更加紧密, *dlc-1(RNAi)* 与 *sao-1(RNAi)* 之后, NMY-2 之间的网状结构减少, 甚至没有, 两者或两者以上的联系不紧密, 每个 NMY-2 相对比较独立。

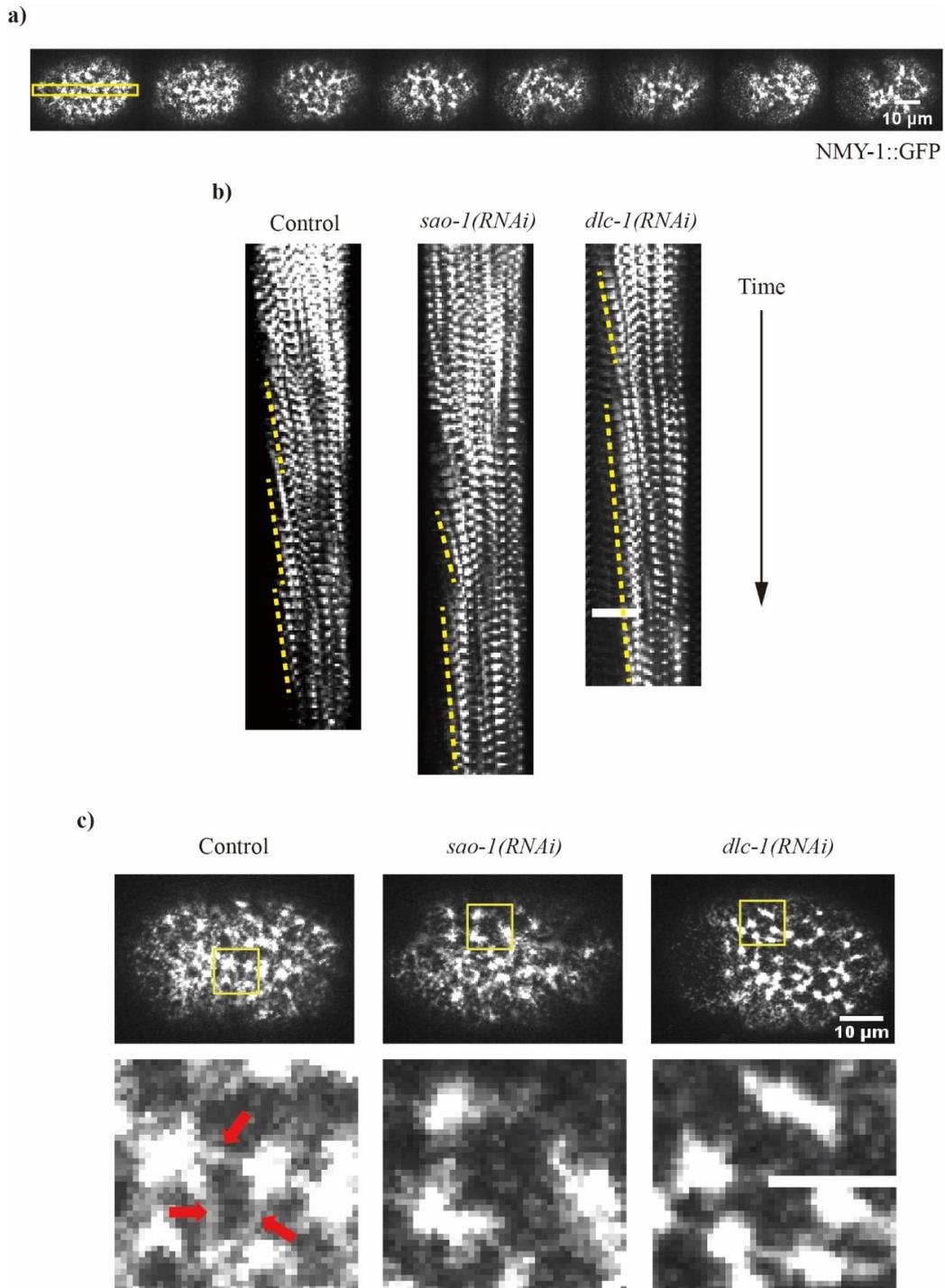


图 6-2 SAO-1、DLC-1 缺失对细胞皮层 NMY-2 的影响

利用转盘式共聚焦显微镜进行拍摄，程序为 GFP 通道，激光输出功率 20%，曝光时间 800 ms。时间间隔为 10 s。a) NMY-2::GFP 在细胞皮层的动态过程。每 10 张图片取一张，即图中两张图片的时间间隔为 100s。黄色方框为图 b) 中用于分析的区域。b) 用 ImageJ 软件 Montage 程

序处理，两张图片时间间隔为 10 s，黄色虚线表示 NMY-2 的运动轨迹，白色标尺表示长度为 5 $\mu\text{m}$ 。c) NMY-2 之间的网状结构。上排为整个受精卵细胞皮层上的网状结构；下排为局部放大结构，红色箭头指示 NMY-2 之间的连接结构，构成网状结构，白色标尺表示长度为 5 $\mu\text{m}$ 。

### 6.2.3 DLC-1 缺失对 ANI-1 的影响

实验以 ANI-1::GFP 为实验对象，*L4440* (*RNAi*) 作为对照组，*sao-1(RNAi)* 从线虫卵开始；*dlc-1(RNAi)* 处理 24 h 作为实验组。通过拍照，拍摄受精卵第一次细胞分裂早期过程，聚焦细胞皮层 ANI-1 荧光蛋白，研究 SAO-1 缺失、DLC-1 缺失对 ANI-1 在细胞皮层动态过程的影响。

如图 6-3 a) 所示，在线虫受精卵的第一次细胞分裂早期，假分裂沟形成之前，ANI-1 分布在整個细胞皮层，随着细胞分裂过程的推进，ANI-1 不断形成与降解，并从胚胎的前端向后端运动。图 6-3 b) 表明，对照组中 ANI-1 在细胞皮层分布均匀，并且 ANI-1 蛋白分子之间有很多丝状结构，联系紧密，进而形成了网状结构；*sao-1(RNAi)* 与 *dlc-1(RNAi)* 实验组中，ANI-1 分布不均，会出现大面积的空缺，ANI-1 蛋白之间丝状连接减少，甚至没有，没有形成良好的网状结构，ANI-1 蛋白之间比较独立。

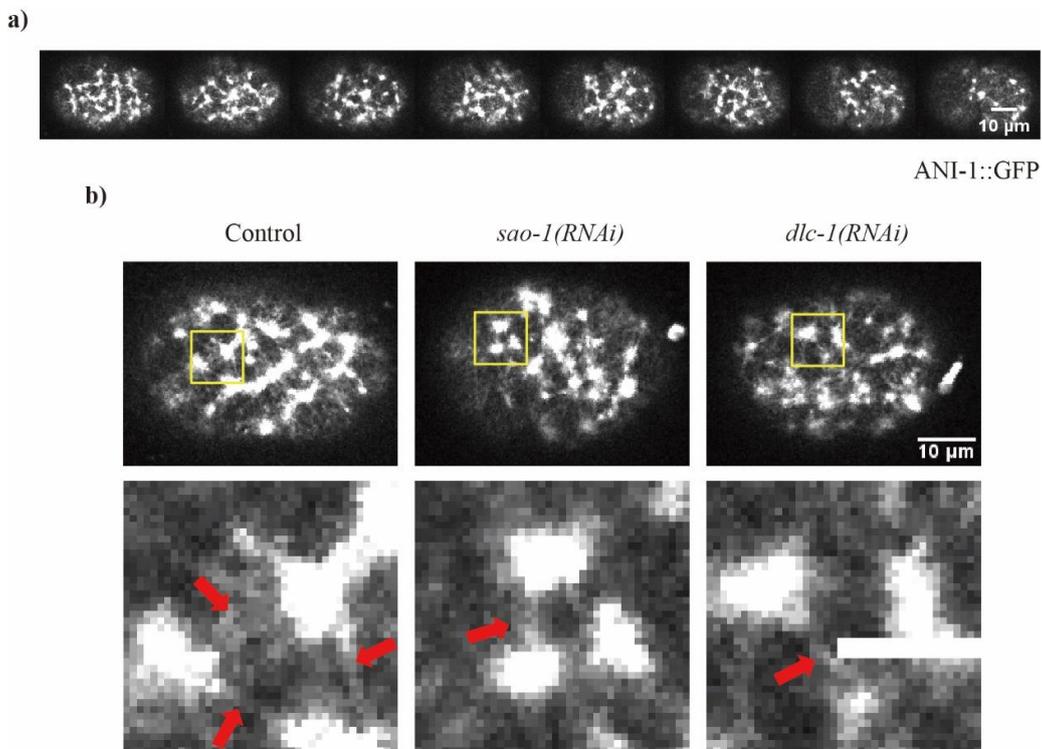


图 6-3 SAO-1、DLC-1 缺失对细胞皮层 ANI-1 的影响

利用转盘式共聚焦显微镜进行拍摄，程序为 GFP 通道，激光输出功率 20%，曝光时间 800 ms。时间间隔为 1 s。a) ANI-1::GFP 在细胞皮层的动态过程。每 20 张图片取一张，即图中两张图片的时间间隔为 20s，白色标尺表示长度为 10 $\mu$ m。b) ANI-1 之间的网状结构。上排为整个受精卵细胞皮层上的网状结构；下排为局部放大结构，红色箭头指示 ANI-1 之间的连接结构，构成网状结构，白色标尺表示长度为 5 $\mu$ m。

#### 6.2.4 DLC-1 缺失对 Actin 的影响

实验利用转盘式共聚焦显微镜，以 Lifeactin::mCherry 作为实验对象（Lifeactin 可以标记在 Actin 上面，可以用来指示细胞皮层 Actin 蛋白），*L4440(RNAi)*作为对照组，*sao-1(RNAi)*从线虫卵开始；*dlc-1(RNAi)*处理 24 h 作为实验组。通过拍照，拍摄细胞分裂早期过程，聚焦细胞皮层 Lifeactin，研究 SAO-1 缺失、DLC-1 缺失对 Lifeactin 在细胞皮层动态过程的影响。

在细胞分裂过程中，Lifeactin 蛋白在细胞皮层是一个动态的过程，有约 5~10 个节点，并且 Lifeactin 蛋白节点之间有丝状结构连接，形成网状结构；在细胞分裂过程中，Lifeactin 蛋白也是一个动态变化的过程，会不断的形成与消失，直到细胞分裂后期，Lifeactin 网状结构消失，形成点状的结构。通过 ImageJ 软件，我们分析了受精卵中 Lifeactin 在细胞皮层的动态过程，结果表明，对照组中 Lifeactin 具有清晰的节点，并且节点之间许多丝状结构相连，构成比较完整的网状结构；*sao-1(RNAi)*实验组中，Lifeactin 节点数量没有明显变化，但节点之间的丝状结构明显减少，并且比较结构迷糊不完整，节点相对独立，网状结构不紧密；*dlc-1(RNAi)*实验组中，Lifeactin 节点数减少，且节点之间的丝状结构明显减少，并且比较结构迷糊不完整，网状结构不紧密，如图 6-4 所示。

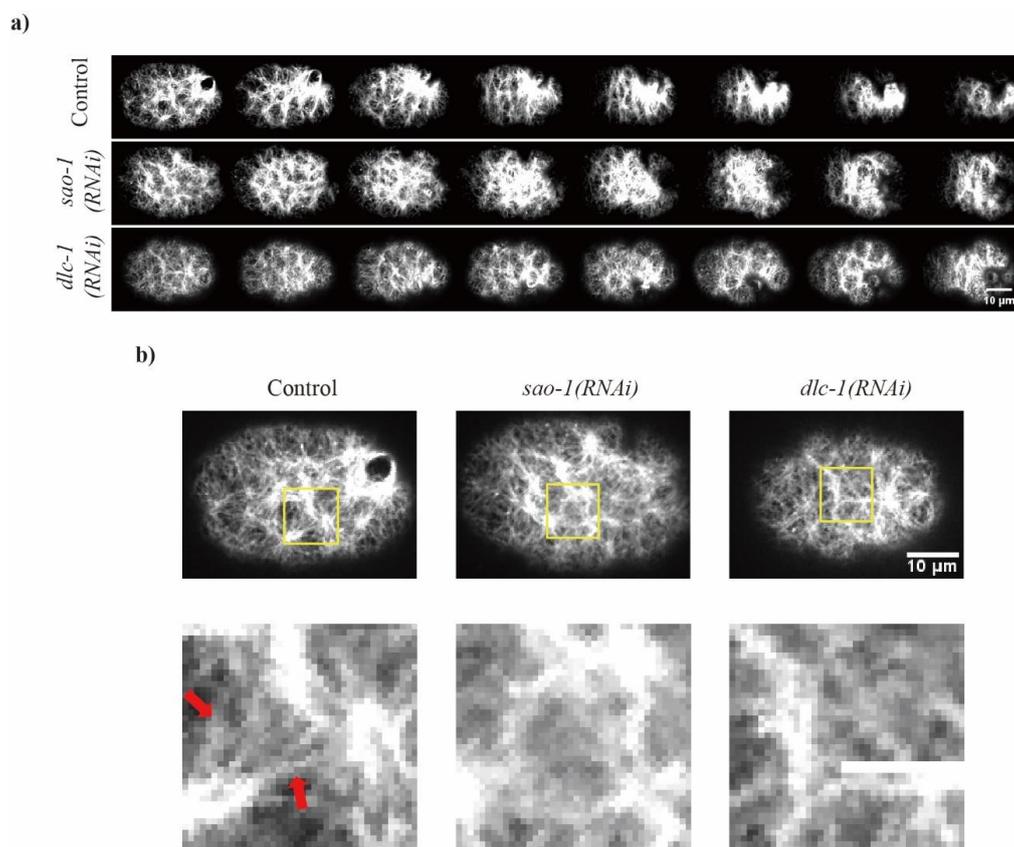


图 6-4 SAO-1、DLC-1 缺失对细胞皮层 Lifeactin 的影响

利用转盘式共聚焦显微镜进行拍摄，程序为 RFP 通道，激光输出功率 30%，曝光时间 800 ms。时间间隔为 10 s。a) Lifeactin 在细胞皮层的动态过程。用 ImageJ 软件 Montage 程序处理，每 17 张图片取一张，即图中两张图片时间间隔为 170 s，白色标尺表示长度为 10μm。c) Lifeactin 之间的网状结构。上排为整个受精卵细胞皮层上的网状结构；下排为局部放大结构，红色箭头指示 Lifeactin 之间的连接结构，构成网状结构，白色标尺表示长度为 5μm。

### 6.3 本章小结

DHC-1 缺失对细胞皮层 NMY-2 的动态过程没有明显影响，并且也没有破坏 NMY-2 的网状结构。DLC-1 缺失使 NMY-2 在细胞皮层的存留时间延长，并且破坏了 NMY-2 的网状结构使其更加独立；也使 ANI-1 和 Lifeactin 蛋白之间的连接减弱，同样也破坏了其完整的网状结构。这也很好的解释了 DLC-1 缺失会导致假分裂沟减弱和中心体旋转减弱的表型。至此，我们发现了 SAO-1 与 DLC-1 在细胞分裂过程中十分类似功能。他们都能影响细胞皮层蛋白 NMY-2、ANI-1、Lifeactin 的网状结构；还能影响细胞分裂过程中卵裂沟的内侵和中心体的旋转。

## 第 7 章 SAO-1 影响 DLC-1 在细胞质的表达

### 7.1 引言

上述实验结果表明 DHC-1、DLC-1 缺失表型与 SAO-1 缺失一致，会影响胞质分裂以及细胞皮层蛋白的网状结构。为了进一步研究 SAO-1 在细胞分裂过程中的功能，我们通过 WormBase 网站预测与 SAO-1 可能存在相互作用的蛋白，预测结果如图 7-1 所示，显示 SAO-1 与 DLC-1 可能存在相互作用关系。

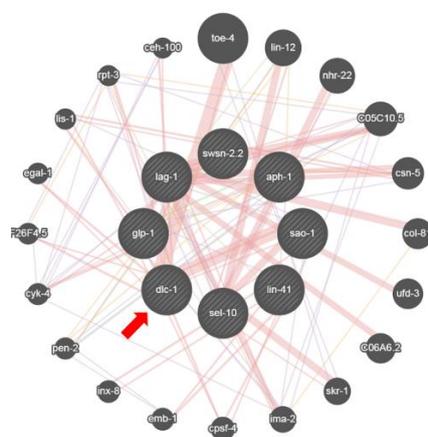


图 7-1 SAO-1 互作蛋白预测图

实验室构建 SAO-1 不同截短突变体，如图 7-2 a) 所示。通过 Pull down 实验发现，SAO-1 缺失 GYF、A、B 结构域均不影响 SAO-1 与 DLC-1 的相互作用。而同时缺失 ABC 三个结构域后，SAO-1 与 DLC-1 的相互作用消失，如图 b) 所示。表明 C 结构域可能是 SAO-1 与 DLC-1 相互作用的关键结构域。通过表达仅有 C 结构域及仅缺失 C 结构域的 SAO-1，再次验证 C 结构域是 SAO-1 与 DLC-1 相互作用的关键，如图 c) 所示。这些实验数据由张丹丹博士师姐提供。

因此我们想通过探究 DHC-1、DLC-1 缺失对 SAO-1 在胞质分裂的影响以及 SAO-1 缺失对 DHC-1、DLC-1 的影响，研究 SAO-1 与动力蛋白 (Dynein) 的关系，进而探究 SAO-1 在细胞分裂过程的作用。

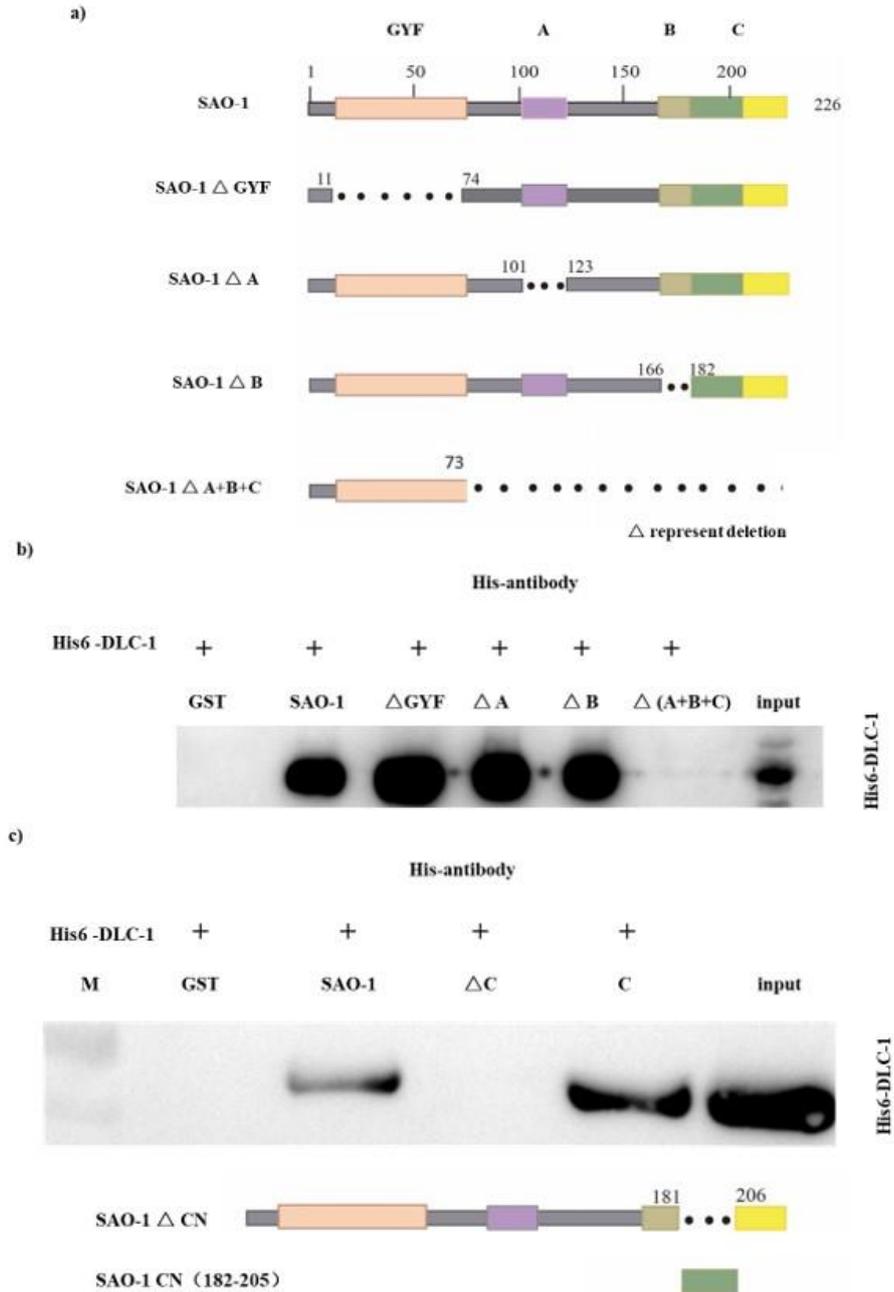


图 7-2 SAO-1 C 端结构域是 SAO-1 与 DLC-1 相互作用所必须的。

实验数据由张丹丹博士师姐提供。a) SAO-1 突变体示意图。b) 体外 Pull down 实验验证 SAO-1 C 端可能参与 SAO-1 与 DLC-1 相互作用。c) 体外 Pull down 实验验证 SAO-1 C 端是 SAO-1 与 DLC-1 相互作用所必须的。

## 7.2 实验结果与分析

### 7.2.1 *dhc-1(RNAi)*和 *dlc-1(RNAi)*对 SAO-1 在细胞质中的影响

实验研究对象为 GFP::*SAO-1* 线虫株,利用转盘式共聚焦显微镜(Spinning Disk Confocal)拍摄受精卵第一次分裂过程。以 *L4440(RNAi)*作为对照组, *dhc-1(RNAi)*和 *dlc-1(RNAi)*为实验组,挑取 L4 时期的线虫开始干扰,干扰时间分别为 *dhc-1(RNAi)* 24 h, *dlc-1(RNAi)* 12 h。

实验数据显示, GFP::*SAO-1* 主要表达在细胞质中,细胞核中几乎没有表达。因此我们 ImageJ 软件分析了干扰试验之后, GFP::*SAO-1* 在细胞质中的荧光强度。试验结果表明 *dhc-1(RNAi)*不影响 SAO-1 在细胞质中的荧光强度,如图 7-3 a) 所示; *dlc-1(RNAi)*之后, SAO-1 在细胞质中的荧光强度有所降低,但降低的程度不大,如图 7-3 b) 所示。

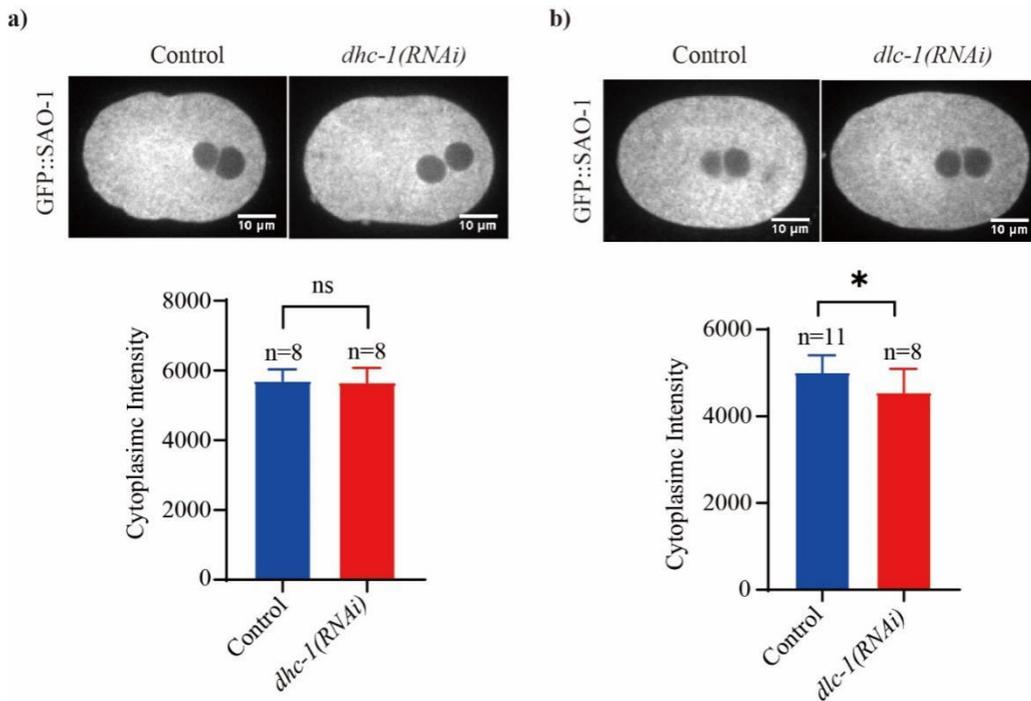


图 7-3 *dhc-1(RNAi)*、*dlc-1(RNAi)*对 SAO-1 的影响

利用转盘式共聚焦显微镜,拍摄程序为: GFP 通道,激光输出功率 30%,曝光时间 800 ms,时间间隔 10 s。 *L4440(RNAi)*表示空白质粒干扰,为试验对照组。白色标尺表示长度为 10  $\mu\text{m}$ 。 a) *dhc-1(RNAi)*试验。对照组样本数 8,实验组样本数 8。 b) *dlc-1(RNAi)*试验。对照组样本数 11,实验组样本数 8, \*表示与对照组相比  $p < 0.05$ 。

## 7.2.2 SAO-1 缺失不影响 DHC-1 在纺锤体的荧光强度

实验首先以 *mCherry::dhc-1* 线虫为研究对象，利用转盘式共聚焦显微镜 拍摄受精卵第一次分裂过程，如图 7-4 a) 所示。发现在线虫受精卵第一次分裂过程中，DHC-1 主要在分裂中期表达，形成纺锤体结构，并且 Anaphase onset 时期纺锤体的结构最清晰，此时染色体排列在赤道板上，染色体分离即将分离。因此在后续研究 *sao-1* 对 *dhc-1* 的影响时，分析了 *sao-1* 缺失对 DHC-1 在纺锤体荧光强度的影响。试验以 *GFP::SAO-1;mCherry::dhc-1* 作为对照组，以 *sao-1P::GFP ; mCherry::dhc-1* (*sao-1* 突变体) 作为实验组，用转盘式共聚焦显微镜拍摄受精卵第一次分裂过程。实验结果表，与对照组相比，SAO-1 缺失不影响 DHC-1 在纺锤体的荧光强度，如图 7-4 b) 所示。

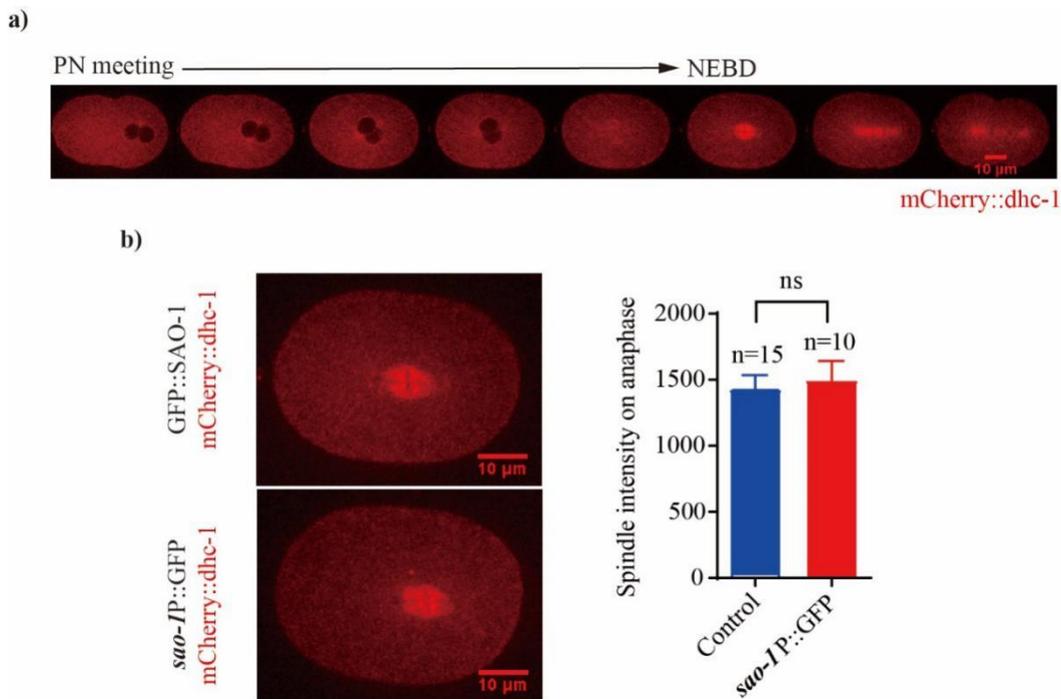


图 7-4 SAO-1 缺失不影响 DHC-1 在纺锤体的荧光强度

利用转盘式共聚焦显微镜，拍摄程序为:RFP 通道激光，输出功率 50%，曝光时间 800 ms，单层，时间间隔 10 s。a) *mCherry::dhc-1* 动态过程。用 ImageJ 软件 Montage 程序处理，每 4 张图片取一张，即图中两张图片时间间隔为 30 s，白色箭头指示 Anaphase onset 时期。b) SAO-1 缺失对 DHC-1 在纺锤体的荧光强度统计图。对照组样本数 15，实验组样本数 10。红色标尺表示长度为 10  $\mu\text{m}$ 。

### 7.2.3 SAO-1 缺失降低 DLC-1 在细胞质中的表达

实验以运用了两种方法发研 *sao-1* 缺失对 *dlc-1* 的影响。一种实验方法是以 *dlc-1::GFP* 为实验对象，以 *L4440(RNAi)* 作为对照组，*sao-1(RNAi)* 作为实验组。由于 *sao-1(RNAi)* 效率较低，因此干扰试验是从虫卵开始的。具体操作为，将生长状态良好的 *dlc-1::GFP* 成虫裂解在新配的 RNAi 板上，每隔 24 h 将线虫挑出转入新的 RNAi 板上，生长到 Young adult 时期则可以用来拍图实验。另一种实验方法是直接以 *dlc-1::GFP* 为对照组，以 SAO-1 $\Delta$ C;*dlc-1::GFP* 突变体线虫株作为实验组进行拍图实验。此 *sao-1* 突变体是利用 CRISPR 基因编辑技术，将 SAO-1 蛋白的 C 结构域敲除，是 *sao-1* 部分缺失突变体。实验结果表明，*sao-1(RNAi)* 与 *sao-1* 突变都会导致 *dlc-1::GFP* 在细胞质中荧光强度显著降低，与对照组相比，有显著性差异，如图 7-5 a-b) 所示。

发现 *sao-1* 缺失会降低 *dlc-1::GFP* 在 1 细胞时期细胞质的表达之后，同时又用 *dlc-1::GFP* 和 SAO-1 $\Delta$ C;*dlc-1::GFP* 研究对象，研究了 *sao-1* 缺失对其他细胞时期的影响。分别包括卵细胞、1 细胞、2 细胞、4 细胞和多细胞时期，实验结果同样表明，*sao-1* 缺失会降低 *dlc-1::GFP* 在其他时期细胞质的表达，并且有显著性差异，如图 7-5 c) 所示。

最后以 *dlc-1::GFP* 和 SAO-1 $\Delta$ C;*dlc-1::GFP* 研究对象，收集线虫卵，进行了蛋白质免疫印迹实验，实验方法如 2.2.3 所述。实验结果表明，SAO-1 缺失会降低 DLC-1 蛋白质在线虫卵中的表达，如图 7-5 d) 所示。

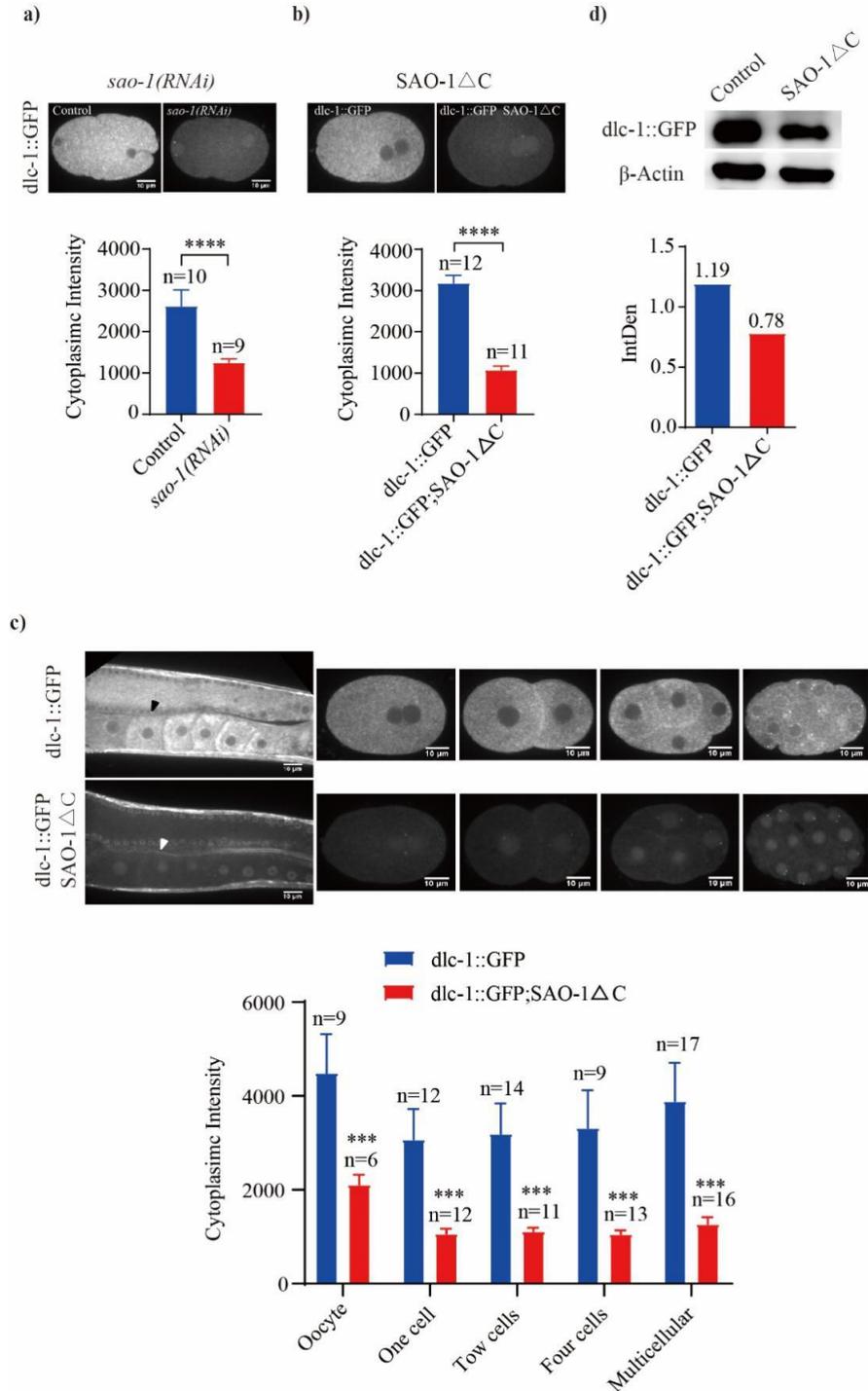


图 7-5 SAO-1 缺失降低 DLC-1 的表达

利用转盘式共聚焦显微镜，拍摄程序为:GFP 通道，激光输出功率 50%，曝光时间 800 ms，单层，时间间隔 10 s。SAO-1ΔC 表示 SAO-1 蛋白的结构域 C 基因序列缺失，是 *sao-1* 部分缺失突变体。a) *sao-1(RNAi)* 实验结果。b) *sao-1* 突变体实验结果。c) SAO-1 缺失对 *dlc-1::GFP*

不同时期细胞的影响。黑色和白色箭头指示卵细胞位置。d) SAO-1 缺失对线虫卵中 *dlc-1::GFP* 蛋白质免疫印迹结果。\*\*\*表示与对照组相比  $p < 0.001$ ，白色标尺表示长度为  $10\mu\text{m}$ 。

#### 7.2.4 SAO-1 缺失对 *dlc-1* 转录水平的影响

上述 7.2.3 实验结果表明，*sao-1* 缺失会降低 *dlc-1* 的表达水平。蛋白表达量的较少一方面可能与蛋白质的转录水平降低有关。因此我们猜想 *sao-1* 缺失可能阻碍了 *dlc-1* 的转录，从而导致 DLC-1 蛋白质的表达减少。

实验以  $N_2$  为对照组，SAO-1 $\Delta$ C; *dlc-1::GFP* 和 *sao-1P::GFP* 为两个实验组，通过实时荧光定量 PCR (qPCR) 实验检测 *dlc-1* mRNA 的水平，来研究 *sao-1* 缺失对 *dlc-1* 转录水平的影响。本实验分别检测了 L1、L4 和 Young adult 三个时期 *dlc-1* mRNA 的表达水平，具体实验操作和流程如 2.2.2 所述。实验结果表明，L1 和 L4 时期的线虫，与  $N_2$  相比，SAO-1 $\Delta$ C 和 *sao-1P::GFP* 体内 *dlc-1* mRNA 的表达水平没有差异；Young adult 时期的线虫，与  $N_2$  相比，SAO-1 $\Delta$ C 突变线虫体内 *dlc-1* mRNA 的表达水平降低，相对表达量为 0.538 倍，*sao-1P::GFP* 体内的表达水平没有差异。实验结果如图 7-6 a) 所示。

同时我们以 *dlc-1::GFP* 和 SAO-1 $\Delta$ C; *dlc-1::GFP* 为实验对象，利用转盘式共聚焦显微镜进行拍图。发现 *dlc-1::GFP* 除了在线虫卵里面表达，还会在线虫肌细胞里面大量表达。实验结果表明，SAO-1 缺失对 *dlc-1::GFP* 在肌细胞里面的表达没有影响，如图 7-6 b) 所示。

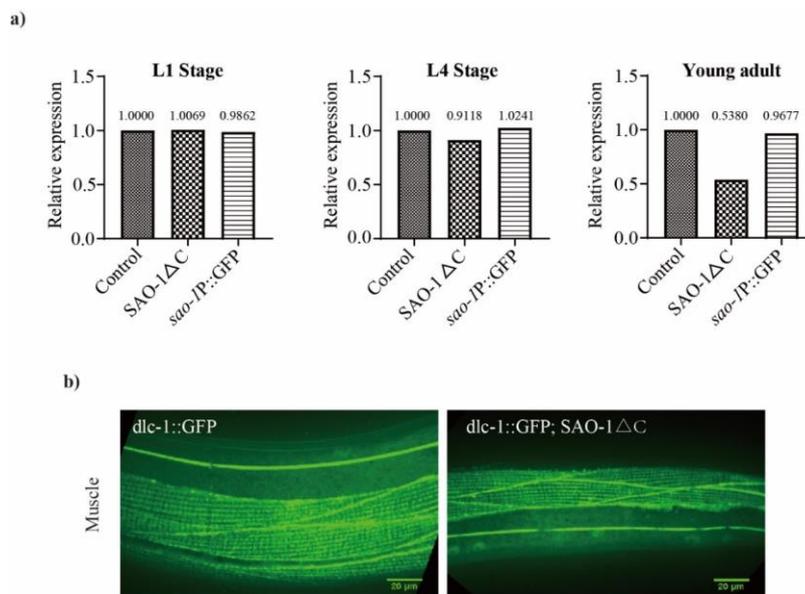


图 7-6 SAO-1 缺失对 *dlc-1* 的转录水平的影响

a) L1、L4 和 Young adult 三个时期 qPCR 实验结果。b) 线虫肌细胞中 *dlc-1::GFP* 的表达。线虫时期为 Young adult, 绿色为 *dlc-1::GFP*, 绿色标尺表示的长度为 20 $\mu$ m。

### 7.2.5 *sel-10*、*rpt-4*、*atg-13* 干扰不能补救 *sao-1* 缺失对 *dlc-1* 的影响

实验以 *dlc-1::GFP* 和 *SAO-1 $\Delta$ C; dlc-1::GFP* 为研究对象, 分别进行 *rpt-4*、*sel-10* 和 *atg-13* 干扰试验。*rpt-4* 是人类 PSMC6 (蛋白酶体 26S 亚基, ATPase 6) 的直系同源物; *sel-10* 表现出蛋白质均二聚活性和蛋白激酶结合活性; *atg-13* 是人类 ATG13 的直系同源物 (与自噬相关)。他们都表现出蛋白质结合活性, 参与蛋白质分解代谢过程和蛋白质稳定性。

结果表明, *rpt-4(RNAi)* 会导致 *dlc-1::GFP* 荧光强度升高, 但 *rpt-4(RNAi)* 不能补救 *sao-1* 缺失导致的 DLC-1 表达量的降低; *sel-10(RNAi)* 和 *atg-13(RNAi)* 都不影响 *dlc-1::GFP* 的荧光强度, 并且也不能补救 *sao-1* 缺失导致的 *dlc-1* 表达量的减少, 实验结果如图 7-7 a) 所示。

同时, 我们单独以 *dlc-1::GFP* 为研究对象, 用双干扰的方法进行了上述研究, 具体操作方法如 2.2.1 所述。实验结果如图 7-7 b) 所示, 与 *sao-1(RNAi)* 对照组相比, *sao-1*、*sel-10(RNAi)* 和 *sao-1*、*rpt-4(RNAi)* 都不能补救 *sao-1* 缺失导致的 *dlc-1* 表达水平的降低。

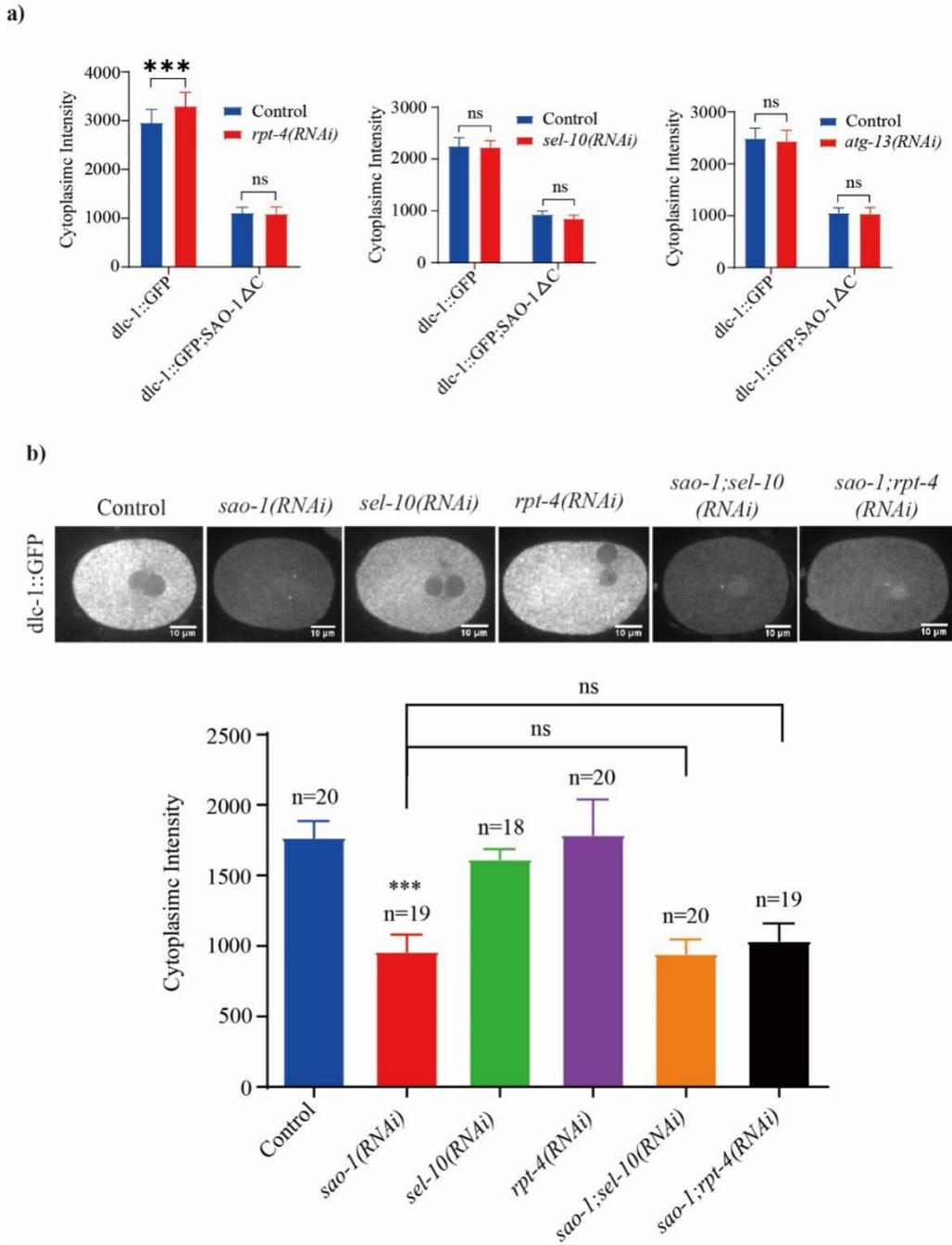


图 7-7 *saO-1* 缺失情况下 *sel-10*、*rpt-4*、*atg-13* 干扰对 *dlc-1* 表达的影响

a) *saO-1* 突变情况下，*rpt-4*、*sel-10*、*atg-13* 干扰结果。每组数据的样品个数均大于 10，\*\*\*表示与对照组相比  $p < 0.001$ 。b) *saO-1* 双干扰情况下，*rpt-4*、*sel-10* 干扰结果。每组数据的样品个数均大于 10，\*\*\*表示与对照组相比  $p < 0.001$ ，白色标尺表示的长度为  $10\mu\text{m}$ 。

### 7.3 本章小结

本章我们探究了 DHC-1、DLC-1 对 SAO-1 在胞质分裂的影响以及 SAO-1 对 DHC-1、DLC-1 的影响。

实验结果表明,1)DHC-1 缺失不会影响 SAO-1 在细胞质中的荧光强度,DLC-1 缺失会降低 SAO-1 在细胞质中的荧光强度,但降低的程度不显著。2)反之,SAO-1 缺失也不影响 DHC-1 在纺锤体中的荧光强度,但 SAO-1 缺失降低 DLC-1 在细胞质中的表达,效果十分显著。3)qPCR 实验结果表明,SAO-1 缺失并没有降低 *dlc-1* 的转录水平,即 SAO-1 缺失并非影响了 *dlc-1* 的转录进而调控 DLC-1 的表达。4)通过各种蛋白质稳定和代谢途径的干扰,我们的结果表明, *atg-13* 可以阻碍细胞质中 DLC-1 的降解,使 DLC-1 积累,从而使我们通过荧光共聚焦显微镜检测到的 *dlc-1::GFP* 信号增加。但这并没挽救 SAO-1 缺失导致的 DLC-1 表达水平的降低。

通过图 7-5 所示,我们发现 SAO-1 缺失之后,DLC-1 在细胞质里面的表达急剧减少,几乎是从有到无,因此我们深入探究了原因。qPCR 实验结果显示,L1、L4 时期,SAO-1 缺失不影响 *dlc-1* 的转录,我们可以推断 SAO-1 缺失导致 DLC-1 表达降低并非通过影响了 *dlc-1* 的转录。我们进一步从 DLC-1 在细胞质中的稳定与代谢进行探究,并发现阻断 DLC-1 蛋白代谢途径 (*atg-13(RNAi)*) 之后,DLC-1 的代谢受到阻碍;但 *sao-1* 突变组的实验数据显示,阻断 DLC-1 的代谢,并不能挽救 SAO-1 缺失导致的 DLC-1 表达水平的急剧减少。我们推断,可能是 SAO-1 缺失对 DLC-1 的表达水平影响太大(几乎从有到无),从而导致无法挽救这种影响或者影响效果甚微。因此为了探究 SAO-1 缺失对 DLC-1 表达水平的影响,需要设计更优的实验来进行研究。

## 第 8 章 SAO-1 亚细胞定位与内质网有关

### 8.1 引言

我们前期的实验结果表明，SAO-1 在细胞质中分布广泛，但并非完全的均质分布，存在一些颗粒结果，如图 8-1 a) 所示。为了进一步探究 SAO-1 在细胞分裂过程中对细胞骨架的影响，以及 SAO-1 与 DLC-1 的关系，因此我们猜想，SAO-1 时候在细胞之中有一些亚细胞结构？或者是否与一些亚细胞器相关进而影响胞质分裂？我们想通过 GFP::SAO-1 为研究对象，探究了 SAO-1 的亚细胞定位。

### 8.2 实验结果与分析

#### 8.2.1 SAO-1 的亚细胞定位

为了研究 SAO-1 在第一次细胞分裂过程中的功能，我们以 GFP::SAO-1 为研究对象，通过利用转盘式共聚焦显微镜 100X 进行拍摄，发现 SAO-1 在细胞质中的分布并不是绝对的均匀，其中存在一些颗粒状的结构，如图 8-1 a) 所示。因此我们猜测 SAO-1 在细胞质中可能有一些亚细胞结构，或者与一些亚细胞器定位有关，进而执行其在细胞分裂过程的功能。实验以 GFP::SAO-1 为研究对象，通过 *drp-1*、*lgg-1*、*atg-7*、*rei-1*、*lpin-1(RNAi)* 干扰，干扰时间都为 24 h，分别破坏线粒体、高尔基体、溶酶体、内质网等亚细胞器，通过转盘式共聚焦显微镜 100X 进行拍摄，分析 GFP::SAO-1 在细胞质中的形态和分布等特征。

实验结果如图 8-1 b) 所示。结果显示，*drp-1*、*lgg-1*、*atg-7*、*rei-1(RNAi)* 对 GFP::SAO-1 在细胞质中的形态和分布没有影响；*lpin-1(RNAi)* 之后，GFP::SAO-1 在细胞质中会出现聚集亮斑，并且有些地方会出现空白片区，结果表明会导致 SAO-1 分布不均的现象。

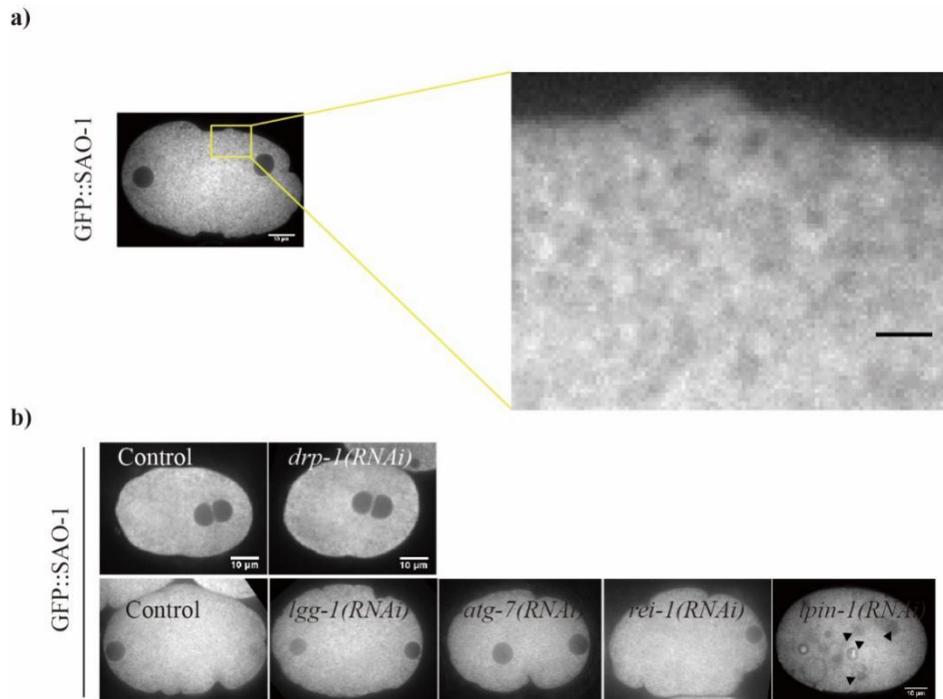


图 8-1 SAO-1 亚细胞定位

SAO-1 颗粒结构。利用转盘式共聚焦显微镜 100X 进行拍摄，程序为 GFP 通道，激光输出功率 10%，曝光时间 800 ms。白色标尺的长度为 10 $\mu$ m，黑色标尺的长度为 2 $\mu$ m。b) *drp-1*、*lgg-1*、*atg-7*、*rei-1*、*lpin-1(RNAi)* 结果。黑色箭头指示 GFP::SAO-1 的异常分布，包括空缺、聚集。白色标尺表示的长度为 10 $\mu$ m。

### 8.2.2 SAO-1 与线粒体不是共定位

为了探究 SAO-1 在细胞质的亚细胞定位是否与线粒体有关，我们还进行了线粒体染色实验。本实验同时进行了 N<sub>2</sub> 的线粒体染色实验，以检测线粒体活体染色剂 (Mito Tracker Red) 是否有效，以及检测共聚焦显微镜的 GFP/RFP 通道是否正常。实验以 GFP::SAO-1 线虫株作为研究对象，M9 处理做为对照组，Mito Tracker Red 处理作为实验组，具体实验原理与步骤见 2.2.4 所述。

如图 8-2 a) 所示，N<sub>2</sub> 的实验结果过证明 Mito Tracker Red 是有效且共聚焦显微镜正常。GFP::SAO-1 的染色结如图中后两排所示。

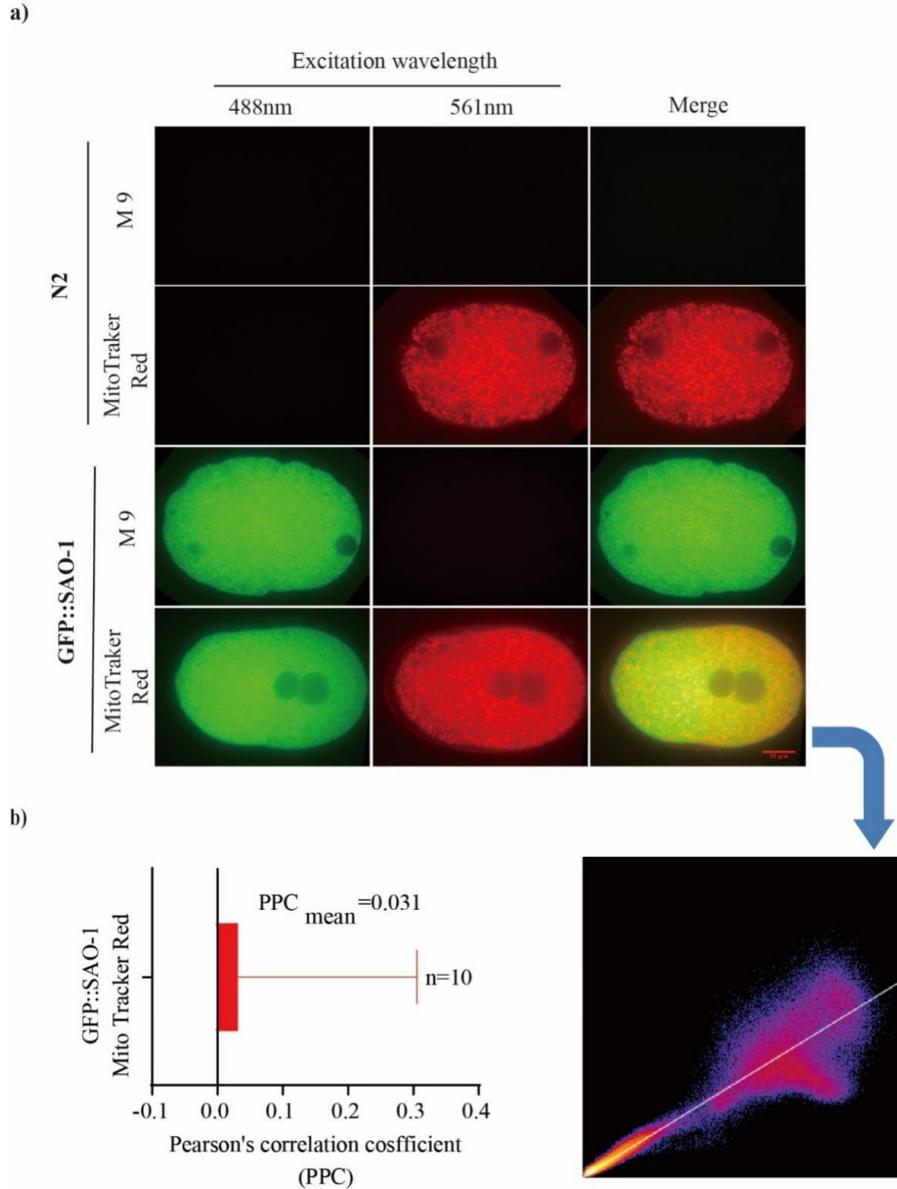


图 8-2 GFP::SAO-1 线虫 Mito Tracker Red 染色实验

a) 利用转盘式共聚焦显微镜 100X 进行拍摄，程序为：GFP 通道，激光输出功率 20%，RFP 通道，激光输出功率 50%，曝光时间 800 ms。红色标尺的长度为 10 $\mu$ m，b) 荧光共定位分析的 PPC 数值统计图（样本数为 10）和散点图。

我们通过 ImageJ 软件中的 Colocalization 程序进行了 GFP::SAO-1 和 Mito Tracker Red 的荧光共定位分析，并通过计算皮尔森相关系数（Pearson's Colocalization coefficient, PPC），定量描述共定位的相关系数。PPC 取值在 -1 到 1 之间，1 表示完美关系（有蛋白 A 的地方一定有蛋白 B）；-1 则表示完全排除（有

蛋白 A 的地方一定没有蛋白 B)；0 则表示随机相关 (蛋白 A 和蛋白 B 随机分布，没有关联)。10 个样品的计算结果显示，PPC 平均值为 0.031，接近 0，表明 SAO-1 和线粒体是随机分布，没有关联。并且散点图如图 8-2 b) 所示，散点图越接近对角线表明共定位程度越高，我们的散点图偏离对角线，并且末端出现分叉，也表明了 SAO-1 和线粒体不是共定位关系，随机分布。

### 8.2.3 *lpin-1(RNAi)*对 SAO-1 在细胞质的分布的影响

实验 8.2.1 表明 *lpin-1(RNAi)*会使 GFP::*SAO-1* 在细胞质中分布不均，包括聚集和空缺等现象。但上述 *lpin-1(RNAi)*较高，对细胞的影响太大，导致不能完成细胞的第一次分裂过程。为了使细胞能够完成分裂过程，我们通过 *L4440* 菌液稀释的方法，*L4440* 与 *lpin-1* 菌液比例分别为 1:1、1:2、1:4 (操作方法如 2.2.1 所述)，最终证明 *L4440* 与 *lpin-1* 菌液比例为 1:2 时，*lpin-1(RNAi)*效率良好且细胞能够完成第一次分裂。为了检测 *lpin-1(RNAi)*的效率，我们选择 SP-12::*GFP* 线虫株作为实验对象，进行 *lpin-1(RNAi)*效率实验。最后通过摸索好的实验条件，以线虫株 GFP::*SAO-1* 为实验对象，进行 *lpin-1(RNAi)*实验。

实验结果表明，与对照组相比，*lpin-1(RNAi)*会使 SP-12::*GFP* 在细胞质内聚集，形成大的大的斑块，改变了内质网的形态。同时，我们也发现，与对照组相比，*lpin-1(RNAi)*会使 SAO-1 在细胞质内的分布不均匀，会出现大片区的空白结构。通过两组实验对比，发现 *lpin-1(RNAi)*情况下，SP-12::*GFP* 聚集形成的内质网大斑块，与 SAO-1 出现大片空白区域形态类似，如图 8-2 所示。

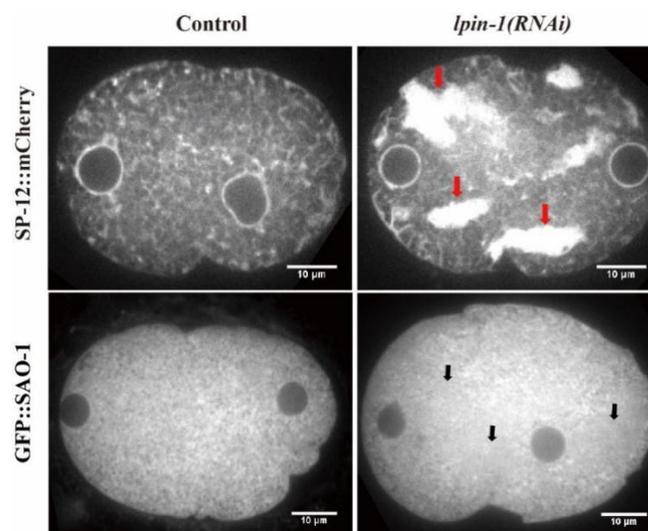


图 8-3 *lpin-1(RNAi)*对 SAO-1 在细胞质的分布的影响

图中上面一行检测了 *lpin(RNAi)* 效果，结果表明干扰有效，红色箭头指示细胞质中 SP-12::GFP 形成的内质网斑块。黑色箭头指示 GFP::SAO-1 分布不均引起的空白区域，两者形态相近。白色标尺的长度为 10 $\mu$ m。

#### 8.2.4 GFP::SAO-1 与 SP-12::mCherry 荧光共定位

上述实验表明 *lpin-1(RNAi)* 之后，SP-12::GFP 在细胞质内聚集，内质网的形态发生变化，此时 SAO-1 在细胞质的分布不均。因此我们想进一步探究 SAO-1 在细胞质的亚细胞定位是否与内质网有关。我们将 GFP::SAO-1 线虫株与 SP-12::mCherry 线虫株进行杂交，筛选得到表达 GFP::SAO-1; SP-12::mCherry 的纯合子，然后利用荧光共聚焦显微镜拍摄受精卵第一次细胞分裂的过程，最后用 ImageJ 进行数据分析。

实验结果表明，Merge 图片显示 SAO-1 与 SP-12 的荧光有一部分是重合形成黄色，如图 8-4 a) 所示。通过 ImageJ 软件中的 Colocalization 程序进行了 GFP::SAO-1 和 SP-12::mCherry 的荧光共定位分析，计算皮尔森相关系数 (Pearson's Colocalization coefficient, PPC)，统计结果为 PPC 平均值为 0.823，接近 1，表明出现 SAO-1 的地方会出现 SP-12，SAO-1 与内质网为荧光共定位关系。同时散点图显示接近对角线，也表明了 SAO-1 与 SP-12 共定位效果较好。

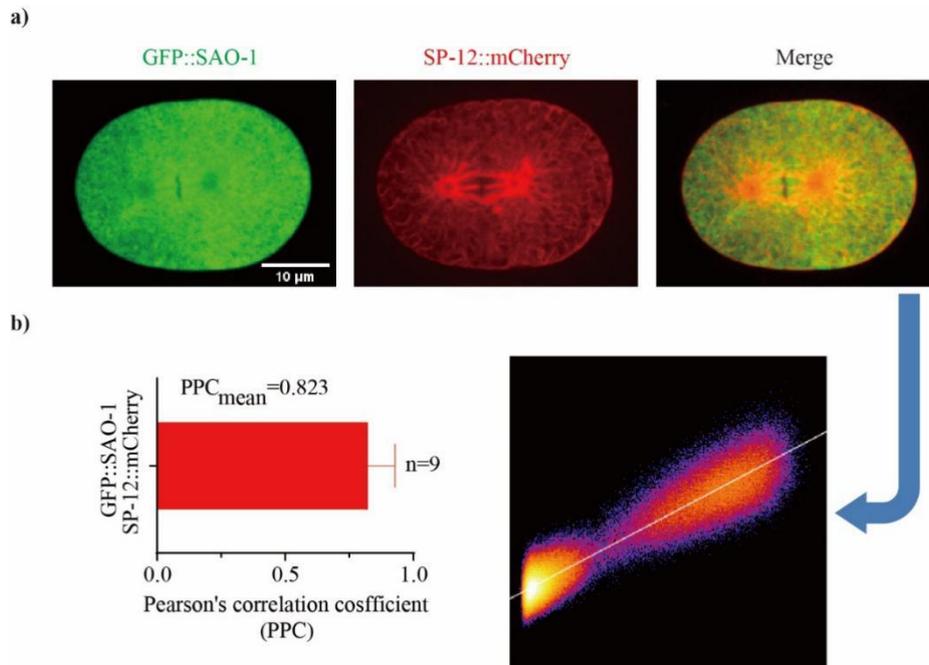


图 8-4 GFP::SAO-1 与 SP-12::mCherry 荧光共定位实验

a) 利用转盘式共聚焦显微镜 100X 进行拍摄，程序为：GFP 通道，激光输出功率 10%，RFP 通道，激光输出功率 50%，曝光时间 800 ms。白色标尺的长度为 10 $\mu$ m。b) 荧光共定位分析的 PPC 数值统计图（样本数为 9）和散点图。

### 8.2.5 SAO-1、DLC-1 缺失对内质网的影响

实验方案以 SP-12::GFP 为研究对象，利用转盘式共聚焦显微镜拍摄整个细胞的分裂过程，探究 *sao-1(RNAi)* 和 *dlc-1(RNAi)* 对内质网的形态和动态过程的影响。

实验结果表明，与对照组相比，*sao-1(RNAi)* 会使 SP-12::GFP 在细胞质内聚集，形成小斑点，严重时形成大的斑块。并且发现这种现象主要发生在细胞分裂再起，多数在分裂后期之前，包括假分裂沟时期，PN meeting 时期等，分裂后期、末期两者差异不明显，因为对照组在分裂后期 SP-12::GFP 也聚集会形成斑点甚至斑块，如图 8-5 a) 所示。基于这个实验结果，我们分别进行了 *sao-1(RNAi)* 和 *dlc-1(RNAi)* 实验，主要关注了 PM meeting 时期 SP-12::GFP 的形态变化。实验结果表明，*dlc-1(RNAi)* 也会导致 SP-12::GFP 在细胞质内聚集，形成小斑点，产生与 *sao-1(RNAi)* 一致的效果，如图 8-5 b) 所示。因为内质网在细胞皮层也会有表达，因此我们同时也探究了 *sao-1(RNAi)* 和 *dlc-1(RNAi)* 对细胞皮层内质网的形态和动态过程的影响。实验结果表明，内质网具有细胞极性，主要集中分布在细胞前端，*sao-1*、*dlc-1* 的缺失也会导致细胞皮层 SP-12::GFP 聚集，形成斑点，与中间层表型一致，如图 8-5 c) 所示。

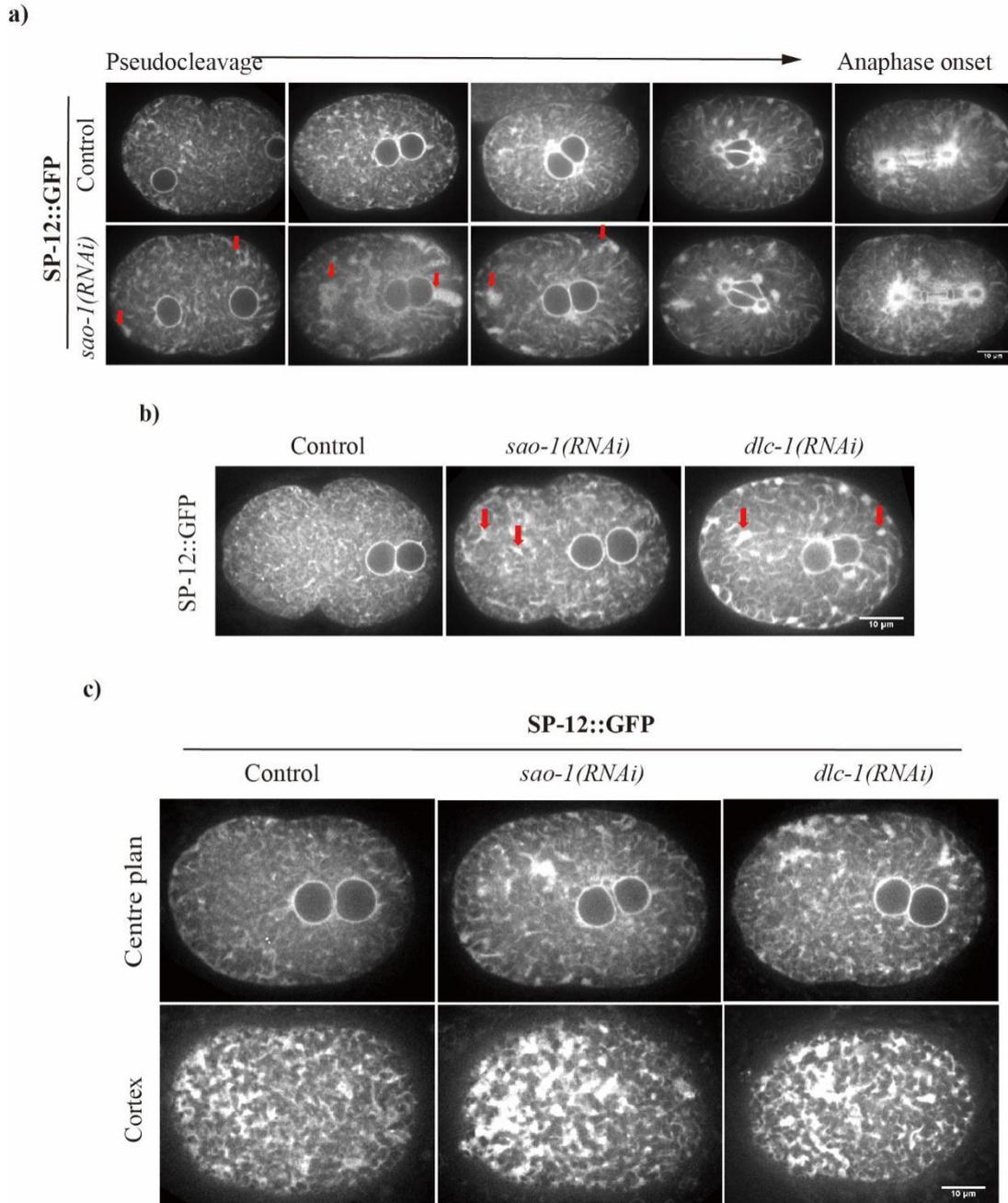


图 8-5 SAO-1、DLC-1 对内质网形态的影响

利用转盘式共聚焦显微镜 100X 进行拍摄，程序为 GFP 通道，激光输出功率 20%，曝光时间 800 ms。a) *sao-1(RNAi)*对不同时期 SP-12::GFP 的影响。b) *sao-1(RNAi)*和 *dlc-1(RNAi)*对 PN metting 时期 SP-12::GFP 的影响。c) *sao-1(RNAi)*和 *dlc-1(RNAi)*对 PN metting 时期细胞皮层 SP-12::GFP 的影响。图中红色箭头指示 SP-12::GFP 聚集会形成的斑点或斑块，白色标尺所指的长度为 10 $\mu$ m。

### 8.3 本章小结

本章我们通过线粒体染色实验和一系列的 RNAi 实验，得出 SAO-1 的亚细胞定位与线粒体、高尔基、溶酶体等无关，并得出 SAO-1 的亚细胞定位可能与内质网有关。随后通过荧光共定位实验，证实了 GFP::SAO-1 与内质网蛋白 SP-12::mCherry 是荧光共定位关系。

进一步实验发现内质网结构破坏之后，会使 SAO-1 在细胞质中分布不均，严重时出现大量聚集；SAO-1 缺失和 DLC-1 缺失对内质网的影响一致，会导致细胞分裂早期 SP-12 聚集形成较大斑块，同时也会是细胞皮层的 SP-12 聚集。

## 结 论

SAO-1 是一种包含 GYF 结构域的新蛋白, GYF 结构域是一种进化保守的蛋白相互作用结构域。由于目前对高等真核生物中 GYF 结构域蛋白的功能分析较少, 本论文作者在突变表型和蛋白相互作用水平上对秀丽隐杆线虫 *sao-1* 基因的研究, 为探讨特定的 GYF 结构域蛋白在多细胞动物中的作用提供了一个背景, 并已经扩展了对 SAO-1 功能的理解。

(1) 秀丽隐杆线虫受精卵是研究细胞分裂的理想模型, 第一次细胞分裂过程中, 我们发现, SAO-1 缺失会导致假分裂沟变浅, 分裂沟闭合点居中、中心体旋转减弱一系列表型, 影响第一次细胞质的分裂进程, 进而影响了胚胎的发育存活率。卵裂沟的形成和内侵与中心纺锤体相关。我们的实验结果表明也表明, SAO-1 缺失会导致细胞皮层蛋白 NMY-2、ANI-1 之间的连接减弱甚至没有, 破坏网状结构。这些实验结果在一定程度上表明, SAO-1 缺失使细胞皮层 NMY-2、ANI-1 的网状结构受到破坏, 使皮层的收缩动力减弱, 中心体旋转减弱, 最终假分裂沟变浅和分裂沟的闭合位点异常。那么 SAO-1 是如何影响 NMY-2、ANI-1 的连接结构? 我们还发现 SAO-1 缺失时, 新 NMY-2 蛋白的出现减少, 那么这种影响是否与蛋白质的生成有关? 这些问题都是研究 SAO-1 如何调节细胞皮层骨架的关键问题, 也是本论文需要进一步深入研究的地方。

(2) 研究结果结果表明, DHC-1 突变会导致假分裂沟变浅和中心体旋转减弱; DHC-1 缺失对细胞皮层 NMY-2 的动态过程没有明显影响, 并且也没有破坏 NMY-2 的网状结构。DHC-1 缺失不会影响 SAO-1 在细胞质中的荧光强度, 反之, SAO-1 缺失也不影响 DHC-1 在纺锤体中的荧光强度。我们实验室的其他成员研究发现 SAO-1 与 DLC-1 存在相互作用关系, 因此我们进行了一系列 DLC-1 敲低实验, 探究 DLC-1 敲低是否产生与 SAO-1 缺失一致的表型。我们的实验结果证明了, 在第一次细胞分裂过程中, DLC-1 敲低表型与 SAO-1 缺失表型一致。同样是 DLC-1 的缺失可以破坏 NMY-2、ANI-1、Aactin 之间的网状结构, 细胞皮层的收缩力减弱, 从而中心体旋转减弱, 中间纺锤体定位异常, 卵裂沟的入侵受到影响, 最终出现假分裂沟变浅和分裂沟闭合点异常的相似表型。那么 SAO-1 和 DLC-1 同时缺失对细胞分裂的影响如何? 我们的实验结果表明 SAO-1 和 DLC-1 在细胞皮层并没有形

成清晰可见的结构（数据未展示），那么 SAO-1 和 DLC-1 是如何影响皮层蛋白的结构？这些科学问题也是我在后续工作中需要探讨和研究的。

（3）发现 SAO-1 和 DLC-1 是相互作用关系之后，我们进一步探究了他们之间是否相互影响。实验结果表明，DLC-1 缺失对 SAO-1 在细胞质中的表达没有影响，但 SAO-1 缺失不影响细胞核中的 DLC-1 的表达量（因为 SAO-1 主要在细胞质中表达），但急剧降低 DLC-1 在细胞质中的表达，这一点非常有趣。qPCR 的实验结果表明，SAO-1 缺失没有影响 DLC-1 的转录水平。但值得注意的，由于实验操作原因，我们检测的时期为 L1、L4、Young adult 时期的线虫，不是直接检测虫卵中 DLC-1 的转录水平，所以需要更多充分的实验数据支持这一结论。那么 SAO-1 缺失是否加速了 DLC-1 蛋白质的降解，从而导致 DLC-1 细胞质表达量急剧降低？我们进行了一系列 RNAi 实验，阻断蛋白质的降解途径，实验结果也没有出现能够补救 SAO-1 缺失导致的细胞质 DLC-1 急剧减少的现象。原因有两种，一种是 RNAi 的选择需要摸索，甚至可能需要同时多项干扰；一种是 SAO-1 缺失对 DLC-1 影响足够大，这一些列的蛋白降解阻碍不足以补救这个影响。后续的研究工作则需要摸索 RNAi 条件，降低 SAO-1(RNAi)的效果和提高蛋白降解阻碍效果，弄清这一关键科学问题对探究 SAO-1 如何调控细胞分裂过程中细胞骨架的作用十分重要。

（4）在探究 SAO-1 在细胞分裂过程中的作用，以及 SAO-1 如何调节 DLC-1 表达的许多问题中，弄清 SAO-1 的亚细胞定位显得至关重要。通过线粒体染色实验和一系列的 RNAi 筛查实验，实验结果表明，GFP::SAO-1 与内质网结构蛋白 SP-12::mCherry 荧光共定位，即 SAO-1 的亚细胞定位与内质网有关。同时由于 SAO-1 在细胞质中的表达十分广泛，因此 SAO-1 的亚细胞定位可能还与其他细胞结构有关，需要我们更深的探求。我们随后探究了 SAO-1 与内质网的关系，实验结果表明，内质网形态结构被破坏之后，SAO-1 在细胞质分布不均；SAO-1 缺失时，细胞分裂早期胞质中 SP-12 聚集成斑块，细胞皮层也会出现同样表型，并且我们发现 DLC-1 缺失表型一致。那么内质网破坏之后，DLC-1 在细胞质的表达量是否会有所变化？内质网的破坏是否能补救 SAO-1 缺失导致的 DLC-1 胞质表达量降低？是否 SAO-1 与 DLC-1 相互作用与内质网，影响内质网形态，影响了细胞皮层蛋白的生成，导致细胞皮层蛋白网状结构破坏，皮层收缩力减弱，导致中心体旋转减弱、假分裂沟变浅、分裂沟闭合位点异常等一系列表型？该推论还需要后续大量的实验进行验证。

## 参考文献

- [1] Jarrell T A, Wang Y, Bloniarz A E, et al. The Connectome of a Decision-Making Neural Network [J]. *Science*, 2012, 337(6093): 437-444.
- [2] Sternberg P W. Working in the Post-genomic *C. elegans* World [J]. *Cell*, 2001, 105(2): 173-176.
- [3] Kamath R S, Martinez-Campos M, Zipperlen P, et al. Effectiveness of Specific RNA-mediated Interference through Ingested Double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genome biology*, 2001, 2(1): 2.
- [4] Sonnichsen B, Koski L B, Walsh A, et al. Full-genome RNAi Profiling of Early Embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2005, 434(7032): 462-469.
- [5] Frokjaer-Jensen C, Davis M W, Hopkins C E, et al. Single-copy Insertion of Transgenes in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(11): 1375-1383.
- [6] Dickinson D J, Goldstein B. CRISPR-Based Methods for *Caenorhabditis elegans* Genome Engineering. [J]. *Genetics*, 2016, 202(3): 885-901.
- [7] Paix A, Schmidt H, Seydoux G. Cas9-assisted Recombineering in *C. elegans*: Genome Editing Using in vivo Assembly of Linear DNAs [J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(15): 128-130
- [8] Redemann S, Baumgart J, Lindow N, et al. *C. elegans* Chromosomes Connect to Centrosomes by Anchoring into the Spindle Network [J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 15288.
- [9] Munro E, Nance J, Priess J R. Cortical Flows Powered by Asymmetrical Contraction Transport PAR Proteins to Establish and Maintain Anterior-posterior

- Polarity in the early *C. elegans* Embryo [J]. *Developmental cell*, 2004, 7(3): 413-424.
- [10] Fededa J P, Gerlich D W. Molecular Control of Animal Cell Cytokinesis [J]. *Nature cell biology*, 2012, 14(5): 440-447.
- [11] Green R A, Paluch E, Oegema K. Cytokinesis in Animal Cells [J]. *Cell Dev Biol*, 2012, 28(1): 29-58.
- [12] Eggert U S, Kiger A A, Richter C, et al. Parallel Chemical Genetic and Genome-Wide Rnai Screens Identify Cytokinesis Inhibitors and Targets [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(12): 2135-2143.
- [13] Skop A R, Liu H, Yates J, 3rd, et al. Dissection of the Mammalian Midbody Proteome Reveals Conserved Cytokinesis Mechanisms [J]. *Science*, 2004, 305(5680): 61-66.
- [14] Mierzwa B, Gerlich D W. Cytokinetic Abscission: Molecular Mechanisms and Temporal Control [J]. *Dev Cell*, 2014, 31(5): 525-538.
- [15] Yuce O, Piekny A, Glotzer M. An ECT2-centralspindlin Complex Regulates the Localization and Function of RhoA [J]. *Cell Biol*, 2005, 170(4): 571-582.
- [16] Hutterer A G M, Mishima M. Clustering of Centralspindlin is Essential for Its Accumulation to the Central Spindle and the Midbody [J]. *Curr Biol*, 2009, 19(25): 2043-2049
- [17] Pintard L, Bowerman B. Mitotic Cell Division in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 2019, 211(1): 35-73.
- [18] Dechant R, Glotzer M. Centrosome Separation and Central Spindle Assembly Act in Redundant Pathways that Regulate Microtubule Density and Trigger Cleavage Furrow Formation [J]. *Developmental cell*, 2003, 4(3): 333-344.

- [19] Bringmann H, Hyman A A. A Cytokinesis Furrow is Positioned by Two Consecutive Signals [J]. *Nature*, 2005, 436(7051): 731-734.
- [20] Piekny A J, Glotzer M. Anillin is a Scaffold Protein that Links RhoA, Actin, and Myosin during Cytokinesis [J]. *Current biology : CB*, 2008, 18(1): 30-36.
- [21] Walczak C E, Heald R. Mechanisms of Mitotic Spindle Assembly and Function [J]. *International review of cytology*, 2008, 265:111-158.
- [22] Jongsma M L, Berlin I, Neefjes J. On the Move: Organelle Dynamics during Mitosis [J]. *Trends in cell biology*, 2015, 25(3): 112-124.
- [23] Morin X, Bellaiche Y. Mitotic Spindle Orientation in Asymmetric and Symmetric Cell Divisions during Animal Development [J]. *Developmental cell*, 2011, 21(1): 102-119.
- [24] Williams S E, Fuchs E. Oriented Divisions, Fate Decisions [J]. *Current opinion in cell biology*, 2013, 25(6): 749-758.
- [25] Di Pietro F, Echard A, Morin X. Regulation of Mitotic Spindle Orientation: an Integrated View [J]. *EMBO reports*, 2016, 17(8): 1106-1130.
- [26] Bergstralh D T, Dawney N S, St Johnston D. Spindle Orientation: A Question of Complex Positioning [J]. *Development*, 2017, 144(7): 1137-1145.
- [27] Seldin L, Macara I. Epithelial Spindle Orientation Diversities and Uncertainties: Recent Developments and Lingered Questions [J]. *F1000Research*, 2017, 6:984.
- [28] Wuhr M, Tan E S, Parker S K, et al. A Model for Cleavage Plane Determination in Early Amphibian and Fish Embryos [J]. *Current biology : CB*, 2010, 20(22): 2040-2045.
- [29] Kimura K, Kimura A. Intracellular Organelles Mediate Cytoplasmic Pulling Force for Centrosome Centration in the *Caenorhabditis elegans* Early Embryo [J].

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(1): 137-142.
- [30] Mitchison T, Wuhr M, Nguyen P, et al. Growth, Interaction, and Positioning of Microtubule Asters in Extremely Large Vertebrate Embryo Cells [J]. Cytoskeleton, 2012, 69(10): 738-750.
- [31] Fink J, Carpi N, Betz T, et al. External Forces Control Mitotic Spindle Positioning [J]. Nature cell biology, 2011, 13(7): 771-778.
- [32] Kwon M, Bagonis M, Danuser G, et al. Direct Microtubule-Binding by Myosin-10 Orients Centrosomes toward Retraction Fibers and Subcortical Actin Clouds [J]. Developmental cell, 2015, 34(3): 323-337.
- [33] Mallik R, Gross S P. Molecular Motors: Strategies to Get Along [J]. Current biology : CB, 2004, 14(22): 971-982.
- [34] Vallee R B, Williams J C, Varma D, et al. Dynein: An Ancient Motor Protein Involved in Multiple Modes of Transport [J]. Journal of neurobiology, 2004, 58(2): 189-200.
- [35] Dick T, Ray K, Salz H K, et al. Cytoplasmic Dynein (ddlc1) Mutations Cause Morphogenetic Defects and Apoptotic Cell Death in *Drosophila Melanogaster* [J]. Molecular and cellular biology, 1996, 16(5): 1966-1977.
- [36] Gonczy P, Echeverri C, Oegema K, et al. Functional Genomic Analysis of Cell Division in *C. elegans* using RNAi of Genes on Chromosome III [J]. Nature, 2000, 408(6810): 331-336.
- [37] O'rourke S M, Dorfman M D, Carter J C, et al. Dynein Modifiers in *C. elegans*: Light Chains Suppress Conditional Heavy Chain Mutants [J]. PLoS genetics, 2007, 3(8): 128.

- [38] Gil-Krzewska A J, Farber E, Buttner E A, et al. Regulators of the Actin Cytoskeleton Mediate Lethality in a *Caenorhabditis elegans dhc-1* mutant [J]. *Molecular biology of the cell*, 2010, 21(15): 2707-2720.
- [39] Dorsett M, Schedl T. A Role for Dynein in the Inhibition of Germ Cell Proliferative Fate [J]. *Molecular and cellular biology*, 2009, 29(22): 6128-6139.
- [40] Fridolfsson H N, Ly N, Meyerzon M, et al. UNC-83 Coordinates Kinesin-1 and Dynein Activities at the Nuclear Envelope during Nuclear Migration [J]. *Developmental biology*, 2010, 338(2): 237-250.
- [41] Morthorst T H, Olsen A. Cell-nonautonomous Inhibition of Radiation-induced Apoptosis by Dynein Light Chain 1 in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Cell death & disease*, 2013, 4:799.
- [42] Schmidt D J, Rose D J, Saxton W M, et al. Functional Analysis of Cytoplasmic Dynein Heavy Chain in *Caenorhabditis elegans* with Fast-acting Temperature-sensitive Mutations [J]. *Molecular biology of the cell*, 2005, 16(3): 1200-1212.
- [43] Gusnowski E M, Srayko M. Visualization of Dynein-dependent Microtubule Gliding at the Cell Cortex: Implications for Spindle Positioning [J]. *The Journal of cell biology*, 2011, 194(3): 377-386.
- [44] Schmidt R, Fielmich L E, Grigoriev I, et al. Two Populations of Cytoplasmic Dynein Contribute to Spindle Positioning in *C. elegans* embryos [J]. *The Journal of cell biology*, 2017, 216(9): 2777-2793.
- [45] Kardon J R, Vale R D. Regulators of the Cytoplasmic Dynein Motor [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2009, 10(12): 854-865.
- [46] Kofler M M, Freund C. The GYF Domain [J]. *The FEBS journal*, 2006, 273(2): 245-256.

- [47] Kofler M, Motzny K, Freund C. GYF Domain Proteomics Reveals Interaction Sites in Known and Novel Target Proteins [J]. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 2005, 4(11): 1797-811.
- [48] Kofler M, Heuer K, Zech T, et al. Recognition Sequences for the GYF Domain Reveal A Possible Spliceosomal Function of CD2BP2 [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2004, 279(27): 28292-28297.
- [49] Nishizawa K, Freund C, Li J, et al. Identification of a Proline-binding Motif Regulating CD2-triggered T Lymphocyte Activation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(25): 14897-14902.
- [50] Albert G I, Schell C, Kirschner K M, et al. The GYF Domain Protein CD2BP2 is Critical for Embryogenesis and Podocyte Function [J]. *Journal of molecular cell biology*, 2015, 7(5): 402-414.
- [51] Hale V A, Guiney E L, Goldberg L Y, et al. Notch Signaling is Antagonized by SAO-1, A Novel GYF-domain Protein that Interacts with the E3 ubiquitin Ligase SEL-10 in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 2012, 190(3): 1043-1057.
- [52] Cao J, Albertson R, Riggs B, et al. Nuf, A Rab11 Effector, Maintains Cytokinetic Furrow Integrity by Promoting Local Actin Polymerization [J]. *Journal of Cell Biology*, 2008, 182(2): 301-313.
- [53] Figard L, Xu H, Garcia H G, et al. The Plasma Membrane Flattens out to Fuel Cell-surface Growth during *Drosophila* Cellularization [J]. *Developmental cell*, 2013, 27(6): 648-655.
- [54] Tsai J W, Bremner K H, Vallee R B. Dual Subcellular roles for LIS1 and Dynein in Radial Neuronal Migration in Live Brain Tissue [J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10(8): 970-979.

- [55] Zhou K, Rolls M M, Hall D H, et al. A ZYG-12-dynein Interaction at the Nuclear Envelope Defines Cytoskeletal Architecture in the *C. elegans* Gonad [J]. *The Journal of cell biology*, 2009, 186(2): 229-241.
- [56] Cao J, Albertson R, Riggs B, et al. Nuf, a Rab11 Effector, Maintains Cytokinetic Furrow Integrity by Promoting Local Actin Polymerization [J]. *J Cell Biol*, 2008, 182(2): 301-313.

# 哈尔滨工业大学与南方科技大学联合培养研究生学位论文原创性声明和使用权限

## 学位论文原创性声明

本人郑重声明：此处所提交的学位论文《SAO-1 在第一次细胞分裂中调节细胞骨架的基础研究》，是本人在导师指导下，在学校攻读学位期间独立进行研究工作所取得的成果，且学位论文中除已标注引用文献的部分外不包含他人完成或已发表的研究成果。对本学位论文的研究工作做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式注明。

作者签名：王梦君 日期：2020年6月8日

## 学位论文使用权限

学位论文是研究生在学校攻读学位期间完成的成果，知识产权归属南方科技大学。学位论文的使用权限如下：

(1) 学校可以采用影印、缩印或其他复制手段保存研究生上交的学位论文，并向国家图书馆报送学位论文；(2) 学校可以将学位论文部分或全部内容编入有关数据库进行检索和提供相应阅览服务；(3) 研究生毕业后发表与此学位论文研究成果相关的学术论文和其他成果时，应征得导师同意，且第一署名单位为南方科技大学。

保密论文在保密期内遵守有关保密规定，解密后适用于此使用权限规定。

本人知悉学位论文的使用权限，并将遵守有关规定。

作者签名：王梦君 日期：2020年6月8日  
导师签名：谢宇聪 日期：2020年6月8日

## 致 谢

随着毕业论文撰写的完成，我的硕士研究生生活即将结束。回顾这两年的研究生生活，感慨良多。从刚入学是的欣喜与期盼到毕业前的不舍与感恩，我无比珍惜这段日子给我带来的收获与成长。这篇毕业论文，承载的不仅是两年的学习和实验时光，更是老师、师兄师姐的指导、帮助和关怀。

首先，要特别感谢我的研究生导师谢宇聪老师。谢老师科研上认真负责，思路严谨。在我研究生课题的选择上提供指导和建议，并会不断的和我分析讨论课题的进展与思路，教我如何设计实验并分析数据，以及如何解决科研中遇到的问题，最后对毕业论文的提供很多的指导并帮助修改和不断完善。在此，我衷心的感谢老师对我的指导和帮助。

其次，要感谢实验的师兄师姐给予的帮助。从我进入实验室，张丹丹师姐教我如何查阅文献，以及许多基本的实验方法。同时非常感谢实验室的其他成员，王鑫焱师姐、郑存妮师姐、王祥川师兄，姜玲师姐、胡博一师兄和黄帅师姐。他们不仅在实验中给予了很多帮助，更重要的是他们给了我继续研究的热情和信心。另外，感谢工程师魏闻捷老师和王益林老师的帮助，他们教会了我如何使用共聚焦显微镜和 Imaris 生物分析软件。研究课题中使用的一些线虫株由 CGC (Caenorhabditis Genetic Center) 提供，在此表示感谢。

最后真诚的感谢南方科技大学生物系，感谢我的导师谢宇聪老师和实验室的所有成员，同时也衷心的感谢我的家人。美好的硕士生涯，有太多的不舍与珍惜。但，路漫漫其修远兮，吾将上下而求索！