

冠菌素诱导橡胶树次生乳管分化的形成层细胞 CUT&Tag 文库构建和初步分析

张世鑫¹, 葛立鑫^{1,2}, 吴绍华¹, 晁金泉¹, 杨署光¹, 史敏晶¹, 张 华², 田维敏^{3*}

1. 中国热带农业科学院橡胶研究所/热带作物生物育种全国重点实验室/农业农村部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室/海南省热带作物栽培生理学重点实验室, 海南海口 571101; 2. 西藏农牧学院, 西藏林芝 860000; 3. 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南勐腊 666303

摘 要: CUT&Tag 技术是一种研究蛋白质-DNA 互作的新方法, 使用超高活性的新型 pG-Tn5 转座酶, 在抗体引导下精准靶向切割目的蛋白附近的 DNA 序列, 从而进行 cDNA 建库和测序分析。此技术在人类和动物研究中应用广泛, 由于植物细胞结构特殊, 该技术在植物研究中应用较少。在前期研究中, 我们发现组蛋白乙酰化修饰参与茉莉酸诱导橡胶树次生乳管分化的调控, 但其分子机制尚未阐明。本研究利用冠菌素 (COR) 诱导橡胶树萌条维管形成层分化次生乳管的实验系统, 通过酶解法获取高质量的形成层区细胞原生质体, 使用组蛋白 H3 乙酰化修饰抗体对次生乳管分化过程中发生组蛋白乙酰化修饰的区域进行原位识别, 采用 CUT&Tag 技术成功构建 COR 处理橡胶树树皮形成层细胞的 cDNA 文库。对构建 cDNA 文库进行质检和测序分析, 发现文库质量较好, 并通过差异基因的 GO 和 KEGG 富集分析, 发现生长素、类黄酮代谢和蛋白质泛素化等相关基因得到富集。本研究结果为使用 CUT&Tag 技术构建植物组织的 cDNA 文库提供操作方法, 为解析组蛋白乙酰化修饰调控橡胶树次生乳管分化的分子机制提供理论基础。

关键词: 巴西橡胶树; 次生乳管分化; 维管形成层; 原生质体; 组蛋白乙酰化; CUT&Tag

中图分类号: S576; S59

文献标志码: A

Construction and Preliminary Analysis of CUT&Tag Library of Cambium Cells Treatment by Coronatine Induced Secondary Laticifer Differentiation in *Hevea brasiliensis*

ZHANG Shixin¹, GE Lixin^{1,2}, WU Shaohua¹, CHAO Jinquan¹, YANG Shuguang¹, SHI Minjing¹, ZHANG Hua², TIAN Weimin^{3*}

1. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding / Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Key Laboratory for Cultivation & Physiology of Tropical Crops, Haikou, Hainan 571101, China; 2. Tibet Agricultural and Animal Husbandry University, Nyingchi, Tibet 860000, China; 3. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla, Yunnan 666303, China

Abstract: The CUT&Tag technology is a new method for protein-DNA interactions, which uses a novel pG-Tn5 transposase with ultra-high activity, to precisely target and cleave DNA sequences near the target protein under antibody guidance, thus enabling cDNA library construction and sequencing analysis. This technology is widely used in human and animal research, but due to the unique structure of plant cells, its application in plant research is relatively limited. In previous studies, we found histone acetylation can participate in the regulation of jasmonic acid induced secondary

收稿日期 2024-03-07; 修回日期 2024-04-07

基金项目 海南省自然科学基金高层次人才项目 (No. 322RC781); 国家自然科学基金项目 (No. 31800577); 海南省重点研发专项 (No. ZDYF2024XDNY224)。

作者简介 张世鑫 (1986—), 博士, 副研究员, 研究方向: 橡胶树乳管发育和分子育种。*通信作者 (Corresponding author): 田维敏 (TIAN Weimin), E-mail: wmtian@163.com。

laticifer differentiation, but the molecular mechanism of histone acetylation modification regulating secondary laticifer differentiation has not been elucidated in rubber tree. In this article, we used the experimental system of secondary laticifer differentiation induced by coronatin (COR) in the vascular cambium by the CUT&Tag technology, and the high quality protoplasts of cambium cells were obtained by enzymolysis, and the Histone H3 acetylation modified antibody was used to identify *in situ* the region of histone acetylation modification during secondary laticifer differentiation. A cDNA library of cambium cells treatment by COR was successfully constructed using CUT&Tag technology in rubber tree bark. Quality inspection and sequencing analysis were conducted on the construction of cDNA libraries, and found that the quality of libraries were good. And GO and KEGG enrichment analysis of differential genes found the genes related to auxin, flavonoid metabolism, and protein ubiquitination were enriched. The results would provide an operational method for constructing cDNA libraries of plant tissues using CUT&Tag technology, and provide a theoretical basis for elucidating the molecular mechanism of histone acetylation modification regulating secondary laticifer differentiation in rubber tree.

Keywords: *Hevea brasiliensis*; secondary laticifer differentiation; vascular cambium; protoplast; histone acetylation; CUT&Tag

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.10.002

2019 年 4 月 29 日, 美国西雅图 HENIKOFF 博士在《Nature Communications》上首次发布 Cleavage Under Targets and Tagmentation (CUT&Tag) 技术^[1]。CUT&Tag 技术是利用超高活性的新型 pG-Tn5 转座酶, 在特异抗体引导下精准靶向切割目的蛋白附近的 DNA 序列。在进行 CUT&Tag 实验时, 首先进行靶蛋白特异性抗体 (一抗) 孵育, 使抗体进入细胞与靶蛋白结合, 为了放大信号, 同理接着进行二抗孵育, 最后孵育 pAG-Tn5 转座体, 使得转座体进入细胞并与抗体结合, 这样就把转座体间接地固定在靶蛋白上, 随后加入 Mg^{2+} , 激活 Tn5 酶的切割活性, 切断靶蛋白结合的 DNA 区域。由于 Tn5 连有测序接头, 在打断的同时直接在片段化的 DNA 上加接头, 然后提取 DNA, 进行 PCR 扩增构建文库。在传统的染色质免疫共沉淀 (ChIP-Seq) 试验中, 使用超声波随机打断染色质, 经过抗体免疫沉淀 DNA, 通常得到 DNA 长度均一性差。然而, 在 CUT&Tag 中, 转座子只在接近蛋白质结合位点的附近切割染色质, 从而使 DNA 序列长度缩短^[2]。因此即使较低的测序深度 (3~5 M reads) 也能得到高质量的数据。与传统的 ChIP-Seq 相比, CUT&Tag 技术具有细胞投入量低、信噪比高、可重复性好等优势, 尤其适用于早期胚胎发育、干细胞、肿瘤以及表观遗传学等研究领域^[1-3]。目前, CUT&Tag 在组蛋白修饰方面的研究已经在动物细胞和植物中都有成功应用^[3-4], 甚至利用 CUT&Tag 进行组蛋白修饰的研究已经发展到了单细胞水平^[1, 3, 5]。然而, 植物细胞存在细胞壁、大液泡和复杂的次生代谢产物, 对抗体和

pG-Tn5 转座酶进入到植物细胞内有阻碍作用, CUT&Tag 技术应用于植物蛋白质修饰的研究较成熟, 而针对植物的转录因子与染色质结合研究的 CUT&Tag 试验仍然是个挑战, 试验成功案例还很少^[6]。

天然橡胶与石油、煤炭、钢铁并称四大工业原料, 是国防和经济建设的重要战略物资。世界所需的天然橡胶, 98% 以上是来自巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)^[7]。橡胶树树干树皮中的次生乳管是天然橡胶合成和贮存的场所, 由维管形成层纺锤状原始细胞分化而来^[8-9]。割胶生产上, 通过切断树皮中的乳管, 收集从乳管排出的胶乳, 加工成天然橡胶。维管形成层细胞分化次生乳管后, 会不断向树皮外侧推移, 乳管细胞要经过发生-幼嫩-成熟-衰老-死亡的过程。为维持橡胶树树皮产胶部位的乳管数量, 需要维管形成层不断分化出新的次生乳管进行补充。而这些次生乳管的数量与天然橡胶产量直接相关, 次生乳管数量取决于维管形成层分化成次生乳管的频率, 即次生乳管分化能力, 这是橡胶树产量育种的主要指标^[7]。前期研究中, 我们团队最早发现外施茉莉酸 (jasmonic, JA) 及其前体亚麻酸 (LA) 能诱导维管形成层细胞分化成次生乳管^[9-11]。后续我们又发现使用活性形式的茉莉酸 (JA-Ile) 结构类似物冠菌素 (coronatine, COR)^[12], 在诱导橡胶树次生乳管分化的效应方面比茉莉酸甲酯 (MeJA) 更好^[13], 并建立了一种稳定的 COR 诱导橡胶树萌条次生乳管分化的实验系统^[14-19]。最近, 我们发现组蛋白去乙酰化酶 (HDACs) 的抑制剂曲古

抑菌素 A (trichostatin A, TSA) 也能够高效诱导橡胶树次生乳管分化^[16]。使用 COR 处理, 能显著提高维管形成层区的组蛋白乙酰化程度, 而且 HDA 活性和含量也受到影响。基于这些研究基础, 以及组蛋白乙酰化修饰作为基因转录调控的重要方式, 推测 JA 诱导橡胶树次生乳管分化, 可能是通过组蛋白乙酰化修饰调控橡胶树次生乳管分化相关基因转录而实现。

本研究利用 COR 诱导橡胶树萌条次生乳管分化的实验系统, 通过分离 COR 诱导橡胶树次生乳管分化的树皮样品, 使用酶解法分离形成层区细胞的原生质体。采用 CUT&Tag 技术, 通过组蛋白 H3 乙酰化抗体引导下精准靶向切割组蛋白乙酰化修饰区域附近的 DNA 序列, 进行 CUT&Tag 试验, 构建 cDNA 文库并质检和测序。研究结果为使用 CUT&Tag 技术构建植物组织 cDNA 文库提供操作方法, 为解析组蛋白乙酰化修饰调控橡胶树乳管分化的分子机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料为巴西橡胶树无性系热研 7-33-97 的 1 年生萌条, 种植在中国热带农业科学院橡胶研究所的五队增殖苗圃, 这些萌条每年都经过锯杆, 并通过基部的潜伏芽重新生长新的萌条, 并在 1 年内生长 5~6 个伸长单位 (extension unit, EU)^[9, 13]。

1.2 方法

1.2.1 冠菌素 (COR) 处理橡胶树萌条 选取一年生橡胶树萌条的第 2 伸长单位 (EU2), 节间长且健壮的树干作为实验材料, 在 EU2 树干中部, 使用单面刀片刮去面积为 $2\text{ cm} \times 4\text{ cm}$ 的茎表皮及部分皮层, 用面积略大的灭菌无尘纸包裹处理部位, 施加含有 $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ COR 溶液, 然后用塑料封口膜缠绕并密封包裹。处理时间为 1 d。然后拆去塑料封口膜和无尘纸, 剥取处理部位的树皮 (不带部分木质部), 并立即置于冰水中, 带回实验室。COR 处理橡胶树萌条, 取 3 组生物学重复, 每组生物学重复取自 5 株橡胶树萌条树皮进行混合。

选取与 COR 处理相同状态的橡胶树萌条, 不做任何处理。在 COR 处理剥取树皮样品的同时, 剥取未处理的萌条树皮 (不带部分木质部), 即为对照处理 (CK) 胶树萌条。对 CK 的树皮样品, 同样取 3 组生物学重复, 每组生物学重复取自 5

株橡胶树萌条树皮进行混合。

1.2.2 橡胶树萌条树皮形成层细胞的原生质体制备 将取回的 COR 和对照处理橡胶树萌条的树皮样品, 立即置于一次性塑料培养皿内, 分割成约 $0.5\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 的小块, 并立即置于冰水中, 充分洗涤, 洗掉胶乳和细小的杂质。再通过酶解法从新鲜树皮中制备原生质体, 参考拟南芥和杨树^[20-21]的实验方案加以改进, 分离橡胶树萌条树皮形成层区域的原生质体。针对橡胶树树皮中存在大量胶乳, 相应地增加洗涤步骤和树皮材料酶解时间。将得到的原生质体悬浮液添加到含有 0.01 mg/mL 双醋酸荧光素 (fluorescein diacetate, FDA) 和 $2.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 碘化锭 (propidium iodide, PI) 缓冲液中, 使用 FDA 和 PI 双重染色法测定原生质体活力, 并使用血细胞计数板进行计数。

1.2.3 CUT&Tag 实验 使用南京诺唯赞公司的 Hyperactive Universal CUT&Tag Assay Kit for Illumina 试剂盒进行 cDNA 文库构建, 针对本研究的植物细胞原生质体, 对实验步骤进行优化, 详情如下:

(1) 缓冲液 (Buffer) 配制。①Binding Buffer: 取 $30\text{ }\mu\text{L}$ $10\times$ Binding Buffer, 加无酶水至 $300\text{ }\mu\text{L}$, 混匀。②Wash Buffer: 取 $150\text{ }\mu\text{L}$ $10\times$ Wash Buffer, 加入 $30\text{ }\mu\text{L}$ $50\times$ 蛋白酶抑制剂, 加入 $1320\text{ }\mu\text{L}$ 无酶水, 混匀。③ $50\times$ 蛋白酶抑制剂: 取 1 片蛋白酶抑制剂混合片剂 (Roche, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, 11873580001) 溶于 1 mL 无酶水中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。④Antibody Buffer: 取 $50\text{ }\mu\text{L}$ Antibody Buffer(-), 加入 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 5% Digitonin, 混匀后置于冰上预冷。⑤Dig-wash Buffer: 取 $792\text{ }\mu\text{L}$ 步骤②中配制的 Wash Buffer, 加入 $8\text{ }\mu\text{L}$ 5% Digitonin, 混匀。⑥Dig-300 Buffer: 取 $100\text{ }\mu\text{L}$ $10\times$ Dig-300 Buffer, 加 $2\text{ }\mu\text{L}$ 5% Digitonin 和 $20\text{ }\mu\text{L}$ $50\times$ 蛋白酶抑制剂, 加入 $878\text{ }\mu\text{L}$ 无酶水, 混匀。⑦试剂盒中的 Buffer WA 和 Buffer WB, 在首次使用时, 加入试剂盒说明书要求的无水乙醇。

(2) ConA Beads 处理。取 1 支 $200\text{ }\mu\text{L}$ 的 8 连管, 每个样本加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ Binding Buffer。使用移液枪吹打充分重悬 ConA Beads, 取出 $10\text{ }\mu\text{L}$ ConA Beads 加到 Binding Buffer 中, 混合均匀, 置于磁力架上, 待溶液澄清后 (约 2 min), 用移液枪吸弃上清。将 8 连管从磁力架上取下, 加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ Binding Buffer, 用移液枪轻轻吹打混匀 (请勿振荡混匀)。将 8 连管置于磁力架上, 待液

体澄清后(约 2 min),用移液枪吸尽上清。再加入 10 μL Binding Buffer 重悬 ConA Beads。

(3) 细胞原生质体收集。在细胞原生质体通透之前的所有步骤都在室温下进行,使细胞受到的应力最小化。操作过程中,避免剧烈的涡旋振荡,造成细胞原生质体破裂。在室温条件下收集原生质体,并用血细胞计数板计数。重悬原生质体,取所需数量的原生质体(约 150 000 个)于 1.5 mL EP 管中,室温下 2500 r/min ($600\times g$) 低速离心 5 min,用移液枪吸尽上清。在室温条件下,加入 500 μL Wash Buffer 重悬细胞,2500 r/min ($600\times g$) 低速离心 5 min,用移液枪吸尽上清。在每个样本中,加入 100 μL Wash Buffer 重悬原生质体。

(4) 一抗孵育。在每个样本中,加入 50 μL 预冷的 Antibody Buffer 重悬细胞(细胞核)-磁珠复合物。使用 Merck 公司的组蛋白 H3 乙酰化修饰抗体(Anti-acetyl-Histone H3 Antibody, 06-599)作为一抗,进行 COR 诱导橡胶树萌条次生乳管分化形成层区样品和对照的 CUT&Tag 文库构建。CUT&Tag 文库需要设置阳性对照和阴性对照,其中阳性对照使用细胞内高表达的 H3K27me3 抗体,阴性对照使用结合能力强的 IgG 抗体。参照抗体说明书推荐的免疫浓度,按照 1:50 的浓度,将抗体加入 8 连管中,上下颠倒混匀。瞬时离心,收集液体于管底(切忌因离心时间过长,导致磁珠聚集在管底),将 8 连管置于冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$,静置孵育过夜。

(5) 二抗孵育。二抗为羊抗兔 CI,用 Dig-wash Buffer 按照一定的比例,预先稀释好二抗(常规推荐使用 1:100 比例稀释,二抗浓度为 1:50),每个样本的二抗工作液用量为 50 μL 。从冰箱取出孵育过夜的 8 连管,瞬时离心收集反应液,将 8 连管置于磁力架上,待溶液澄清后(2 min),用移液枪吸弃上清。加入稀释好的二抗工作液,上下颠倒数次,使抗体与细胞(细胞核)-磁珠复合物混合均匀,室温下旋转孵育 1 h,由于溶液较少,旋转孵育期间每 15 min 取下 8 连管,轻弹混匀 1 次。二抗孵育完成后,将 8 连管置于磁力架上,待溶液澄清后(2 min),用移液枪吸尽上清。向 8 连管中加入 200 μL Dig-wash Buffer,上下颠倒数次,确保 Buffer 与细胞(细胞核)-磁珠复合物充分混合。重复上述的 Dig-wash Buffer 洗涤步骤 2 次。

(6) pA/G-Tnp 转座子孵育。取 2 μL pA/G-Tnp 加入 98 μL Dig-300 Buffer 混合,预先稀释好 pA/G-Tnp,使其终浓度为 0.04 $\mu\text{mol/L}$,每个样本 pA/G-Tnp 转座子工作液用量为 100 μL 。取 Dig-wash Buffer 洗涤的 8 连管,瞬时离心,将 8 连管置于磁力架上,待溶液澄清后(2 min),用移液枪吸尽上清。每个样本加入 100 μL 稀释的 pA/G-Tnp 转座子工作液,上下颠倒数次,使转座子与细胞(细胞核)-磁珠复合物混合均匀。室温下旋转孵育 1 h,由于溶液较少,旋转孵育期间每 10 min 取下 8 连管,轻弹混匀 1 次。pA/G-Tnp 转座子孵育完成后,瞬时离心,将 8 连管置于磁力架上,待液体澄清后(30~120 s),用移液枪吸尽上清。向 8 连管中加入 200 μL Dig-300 Buffer,上下颠倒数次,确保 Buffer 与原生质体-磁珠复合物充分混合均匀。重复上述的 Dig-wash Buffer 洗涤步骤 3 次。

(7) DNA 片段化。取 40 μL Dig-300 Buffer,加入 10 μL 5 $\times$ TTBL,混合均匀,预先稀释 TTBL,每个样本 TTBL 工作液用量为 50 μL 。取下 pA/G-Tnp 转座子孵育的 8 连管,瞬时离心,将 8 连管置于磁力架上,待液体澄清后(2 min),用移液枪吸尽上清。向每个样本中加入 50 μL 稀释的 TTBL 工作液,混合均匀。将 8 连管置于 PCR 仪中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h(可不设置热盖,使 PCR 仪保持开盖状态进行 PCR 反应,期间每 20 min 取下 8 连管,轻弹混匀 1 次)。

(8) DNA 提取。向 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育完成的每个 DNA 片段化样本中,加入 5 μL Proteinase K、100 μL Buffer L/B 和 20 μL DNA Extract Beads,充分涡旋混匀。将 8 连管置于 PCR 仪中,55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min,其间颠倒混匀 2~3 次。瞬时离心,将 8 连管置于磁力架上,静置约 2~3 min,小心移除上清(切勿吸走磁珠,用 10 μL 枪头尽量将上清吸除干净)。将上述样本取下磁力架,每个样本中加入 200 μL Buffer WA(使用前要加入无水乙醇),充分涡旋混匀。瞬时离心收集反应液,将 8 连管置于磁力架上,静置 2 min,用移液枪吸尽上清。重复上述的 Buffer WB 洗涤步骤 2 次。开盖室温晾置约 10 min,直至管内无液体残留,磁珠表面无反光(为保证 DNA 纯度,Buffer WB 要充分晾干挥发乙醇,但不宜过度干燥而导致磁珠龟裂)。将上述样本取下磁力架,加入 22 μL 灭菌超纯水,用移液枪吹打混匀,室温洗脱 5 min,其间轻轻振

荡 2~3 次。将 8 连管置于磁力架上,待溶液澄清后(约 1 min),吸取 20 μL 上清至新的 8 连管中,得到提取的 DNA 样本。该 DNA 样本即为 CUT&Tag 文库模版,可置于 -20°C 长期保存,避免反复冻融。

(9) 文库 PCR 扩增。在 PCR 管中配制文库 PCR 扩增的反应体系:纯化后的片段化 DNA 15 μL , 2 $\times$ CAM 25 μL , N5XX 5 μL , N7XX 5 μL , 总体积 50 μL , 使用移液枪轻轻吹打混匀。在 PCR 仪中,进行如下反应: 72°C 链置换反应 3 min; 95°C 预变性 3 min; 98°C 变性 10 s, 60°C 退火延伸 7 s, 共 12 个循环; 72°C DNA 合成 1 min; 4°C 终止反应。

(10) PCR 产物纯化。使用磁珠法对 PCR 产物进行纯化,将 VAHTS DNA Clean Beads (Vazyme # N411) 回温并涡旋振荡混匀,缓慢吸取 100 μL 加到文库的 PCR 反应产物中,使用移液枪轻轻吹打 10 次,保证整个体系均匀,室温孵育 5 min。将反应管瞬时离心并置于磁力架上分离磁珠和液体,待溶液澄清后(约 5 min),小心用移液枪吸尽上清,注意不要扰动到磁珠。保持 PCR 管始终在磁力架上,加入 400 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠,室温孵育 30 s,用移液枪吸尽上清。重复乙醇漂洗步骤 2 次。保持 PCR 管始终处于磁力架上,开盖空气干燥 5 min。磁珠晾干后,将 PCR 管从磁力架上取出,加入 22 μL 灭菌超纯水洗脱,使用移液枪轻轻吹打 10 次充分混匀磁珠,室温孵育 5 min。将 PCR 管瞬时离心,置于磁力架上分离磁珠和液体,待溶液澄清后(约 5 min),小心吸取 20 μL 上清转移到新的 EP 管中,该纯化的 PCR 产物样本即为 CUT&Tag 文库,置于 -20°C 长期保存,避免反复冻融。

(11) 文库质量检测 and 长度分布检测。对构建好的 CUT&Tag 文库,通过浓度检测和长度分布检测进行质量评价。使用 Agilent Fragment Analyzer 5400 全自动毛细管电泳系统进行文库质量和长度分布检测。

1.2.4 CUT&Tag 文库测序和分析 使用 Illumina novaseq 6000 对构建的 CUT&Tag 文库进行测序。首先对 Illumina 测序获得的 CUT&Tag 文库原始数据,采用剪切方式截去测序数据的测序接头和低质量片段,去除低质量的数据和保证 clean reads 的质量,具体步骤如下:①删掉质量值小于 15 的碱基超过该 reads 碱基数的 40%的 reads;②截去

碱基为 N 的超过 6 个的 reads,③去除带接头的 reads;④舍弃修剪后短于 50 bp 的 reads。得到的 clean reads 将通过以下的生物信息学软件进行分析,分别使用 BWA 软件进行 Mapping 分析,使用 DeepTools 软件进行样本间相关性分析,使用 MACS2 软件进行 peak calling 分析,使用 Homer findMotifsGenome.pl 进行 motif 识别,使用 Goseq、TopGO 和 Bioconductor (2.13) 软件进行 GO 富集分析,使用 KOBAS 软件进行 KEGG 富集分析。

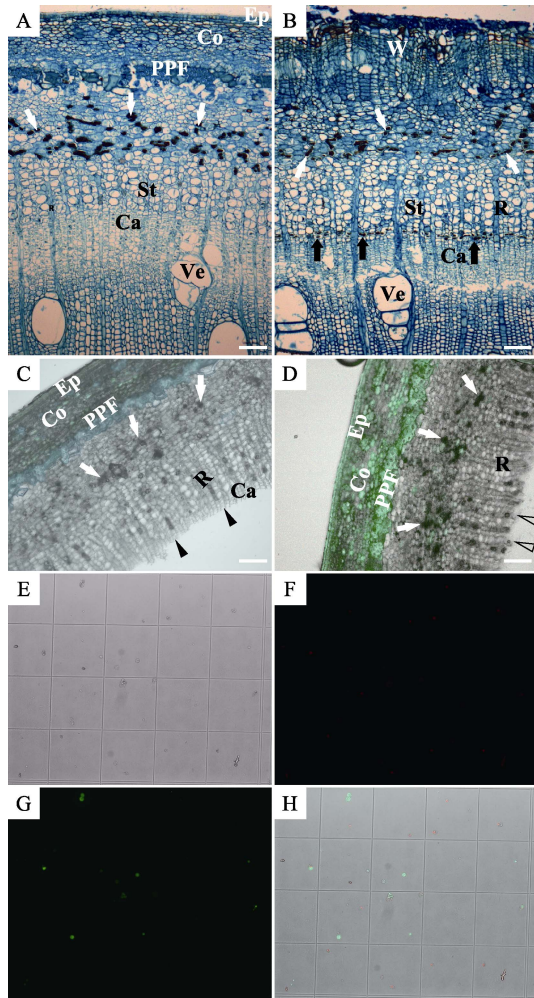
2 结果与分析

2.1 COR 诱导橡胶树萌条次生乳管分化和树皮形成层细胞的原生质体分离

使用 COR 诱导橡胶树萌条次生乳管分化实验系统,自然状态下橡胶树 EU2 树皮的横切面见图 1A。在 20 $\mu\text{mol/L}$ COR 诱导处理 7 d 的橡胶树树皮中可观察 COR 诱导产生的次生乳管(图 1B)。采集 COR 诱导处理 1 d 的橡胶树萌条树皮样品,使用酶解法分离橡胶树萌条树皮形成层细胞的原生质体。使用徒手切片的方法对酶解前后的树皮进行横切,可以通过光学显微镜快速地观察到树皮的结构变化。结果发现酶解前的橡胶树树皮从外到内分别为表皮、皮层、初生韧皮纤维、初生韧皮部、次生韧皮部和形成层区,各部分组织都很完整,且形成层区约有 7~11 层形成层细胞(黑色三角所示),无其他杂质(图 1C);而酶解后的橡胶树树皮,表皮、皮层、初生韧皮纤维、初生韧皮部和次生韧皮部等组织都很完整,而形成层区细胞已经完全酶解(空心三角所示)(图 1D)。对酶解法获得的树皮形成层区细胞原生质体(图 1E)进行 FDA-PI 染色和荧光显微镜镜检,发现在原生质体悬浊液中,被 PI 染色呈红色的死细胞和杂质较少(图 1F),而被 FDA 染色发绿色荧光的具有活性的原生质体数量较多(图 1G);再使用血细胞计数板计数法对具有活性的原生质体进行计数,发现 COR 处理得到具有活性原生质体数量约为 3750 个/ μL ,总数约为 3.75×10^5 个,CK 样品中具有活性原生质体数量约为 3850 个/ μL ,总数约为 3.85×10^5 个。可见使用酶解法获得橡胶树树皮形成层区的有活性的原生质体,质量较好、数量较多,能满足后续 CUT&Tag 文库构建的要求。

2.2 CUT&Tag 文库构建和质量检测

对酶解法获得的原生质体进行重悬,按照原



A: 自然状态下橡胶树 EU2 树皮的横切面; B: COR 处理 7 d 的橡胶树 EU2 树皮的横切面; C: 酶解前橡胶树 EU2 树皮横切面; D: 酶解后橡胶树 EU2 树皮的横切面; E~H: COR 处理 1 d 的橡胶树 EU2 树皮的原生质体镜检; E: 原生质体明场图; F: 被 PI 染色呈红色的死细胞和杂质; G: FDA 染色呈绿色的活性原生质体; H: E、F、G 的组合图。白色箭头: 初生乳管; 黑色箭头: 次生乳管; 黑色三角形: 形成层区; 黑色空心三角形: 酶解后形成层区; Ca: 形成层; Co: 皮层; Ep: 表皮; PPF: 初生韧皮纤维; R: 射线; St: 筛管细胞; Ve: 导管细胞; W: 愈伤周皮。

A: Cross section of the EU2 bark in natural state; B: Cross section of the EU2 bark treated with COR for 7 days; C: Cross section of the EU2 bark before enzymatic hydrolysis; D: Cross section of the EU2 bark after enzymatic hydrolysis; E~H: Microscopic examination of protoplasts dissociated from EU2 bark treated with COR for one day; E: The bright field image of the separated protoplasts; F: The dead cells and impurities stained red by PI; G: The active protoplasts stained green by FDA; H: A merge image of E, F and G. White arrow: Primary laticifer; Black arrow: Secondary laticifer; Black triangle: The cambium area of bark; Black hollow triangle: The cambium area after enzymatic hydrolysis; Ca: Cambium; Co: Cortex; Ep: Epidermis; PPF: Primary phloem fiber; R: Ray; St: Sieve tube cells; Ve: Ductal cells; W: Wound the foreskin.

图 1 COR 诱导橡胶树次生乳管分化的形成层细胞原生质体分离及鉴定

Fig. 1 Isolation and identification of protoplasts from cambium area of secondary laticifer differentiation induced by COR in *H. brasiliensis*

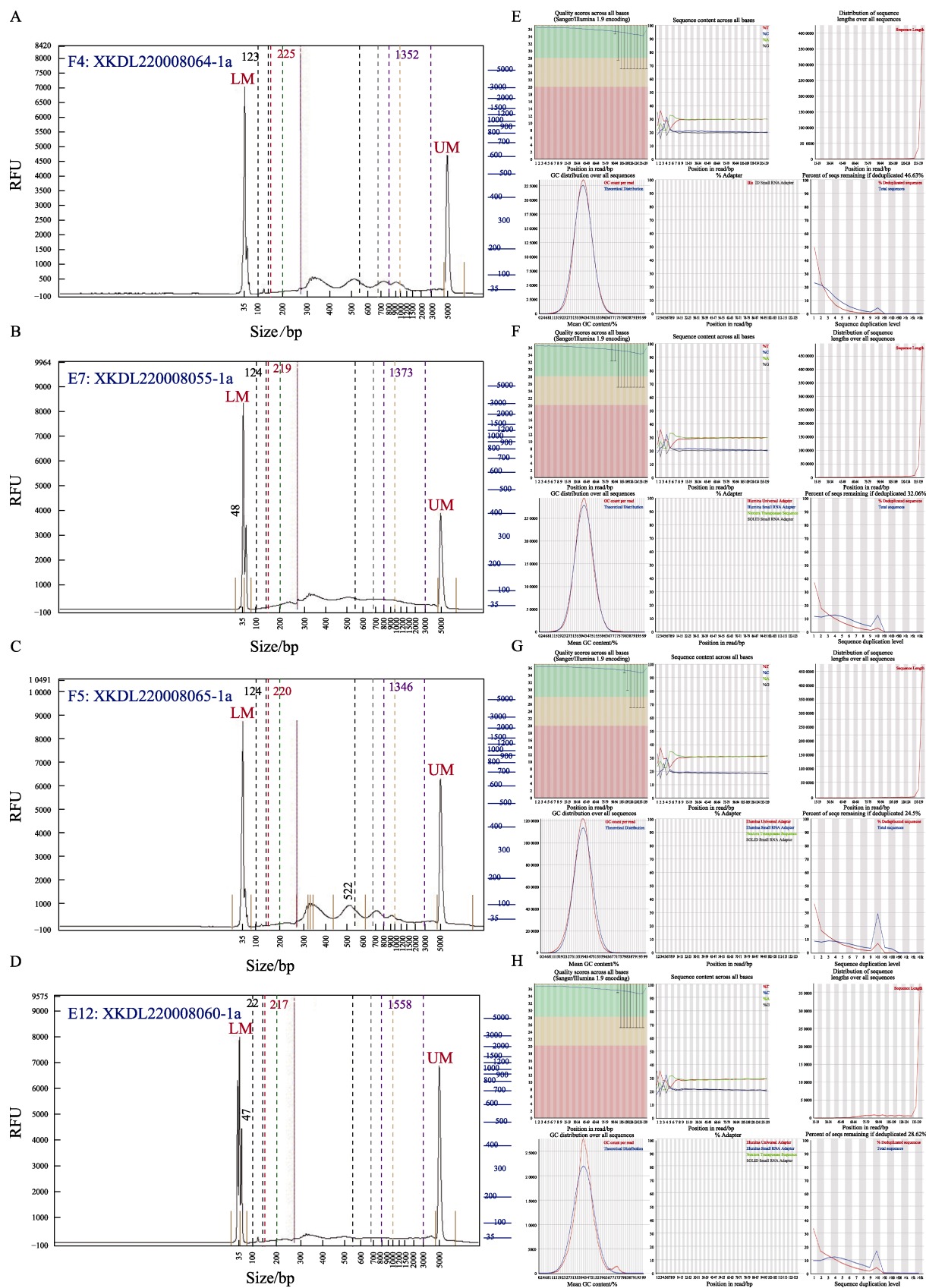
生质体的浓度吸取约 150 000 个原生质体, 分别使用组蛋白 H3 乙酰化修饰抗体 (COR 处理和 CK)、H3K27me3 抗体 (阳性对照) 和 IgG 抗体 (阴性对照), 构建 COR 处理组、CK、阳性对照和阴性对照的 CUT&Tag 文库。通过文库质量检测, 发现获得的各 CUT&Tag 文库的 DNA 片段长度大致在 250~1000 bp (图 2A~图 2D), 符合 CUT&Tag 文库要求。通过 Illumina 测序获得 CUT&Tag 文库的数据信息, 使用 FastQC 软件对测序数据的质量进行评估, 数据质量较好 (图 2E~图 2H)。

2.3 CUT&Tag 文库的数据质控和参考基因组比对

通过对 Illumina 测序获得的 CUT&Tag 文库的数据进行过滤, 采用剪切方式截去测序数据的测序接头和低质量片段, 去除低质量的数据, 保证 clean reads 的质量。修剪之后剩余 reads 长度足够长, 依然可以用于后续生物信息学分析, 从而较高效地利用测序数据。

获得的 COR 处理、CK、阳性对照和阴性对照 4 个 CUT&Tag 文库: clean reads 数量分别为 4 782 119、5 926 919、24 499 257 和 512 401, 除了阴性对照的数据量较少以外, 其他 3 个文库的 clean reads 数据量均较好。碱基 G 和 C 的数量总和占总碱基数量的百分比分别为 40.72%、41.17%、37.86% 和 42.68%, 均在正常水平。判断文库质量的关键指标, 即 Q₂₀ clean 分别为 96.13%、96.20%、96.57% 和 96.39%, Q₃₀ clean 分别为 89.73%、89.95%、90.56% 和 90.44%, 均属于同类测序数据的较高水平 (表 1)。

利用 Burrows Wheeler Aligner (BWA) 对 4 个 CUT&Tag 数据与巴西橡胶树高产无性系 RY8-79 参考基因组^[22]的比对分析。COR 处理、CK、阳性对照和阴性对照 4 个 CUT&Tag 文库的序列比对上 RY8-79 参考基因组的 reads 数量和百分比, 分别为 4 645 819 (97.15%)、5 698 271 (96.14%)、23 073 516 (94.18%) 和 340 394 (66.43%), 除了阴性对照比对上数据量较少以外, 其他 3 个文库的比对上的 reads 数量和百分比均较高。在 CUT&Tag 的分析中, 唯一比对且非重复比对的 reads 数量是关注的重点, 4 个文库数据 unique mapped dedup 分别为 2 224 053 (46.51%)、1 686 302 (28.45%)、6 707 253 (27.38%) 和 84 869 (16.56%), 此项指标属于较好水平 (表 2)。



A、E: COR 处理; B、F: CK; C、G: 阳性对照; D、H: 阴性对照。

A, E: COR treatment; B, F: CK; C, G: Positive control; D, H: Negative control.

图 2 CUT&Tag 文库的 DNA 序列长度 (A~D) 和下机数据的 FastQC 质量统计 (E~H)

Fig. 2 DNA sequence length (A~D) and FastQC quality statistics (E~H) of offline data of four CUT&Tag libraries

表 1 CUT&Tag 文库原始数据质控统计
Tab. 1 Quality control statistics of raw data in CUT&Tag library

样本 Sample	Raw read	Raw base (G)	Clean read	Clean base (G)	Clean ratio/%	GC content/%	Q ₂₀ raw/%	Q ₃₀ raw/%	Q ₂₀ clean/%	Q ₃₀ clean/%	Low quality	Too many N	Too short	Trimmed with adapter
COR 处理	4 833 327	1.45	4 782 119	1.33	91.72	40.72	95.92	89.63	96.13	89.73	99 546	0	2870	572 202
CK	5 973 829	1.79	5 926 919	1.62	90.50	41.17	95.90	89.78	96.20	89.95	91 620	10	2190	1 549 668
阳性对照	24 645 944	7.39	24 499 257	6.71	90.80	37.86	96.41	90.50	96.57	90.56	280 638	2116	10 620	5 844 753
阴性对照	518 014	0.16	512 401	0.13	81.25	42.68	95.79	89.82	96.39	90.44	10 866	0	360	254 420

注：Raw reads 为统计原始序列数据，以 4 行为 1 个单位，统计每个文件的测序序列的个数；Raw bases 为统计原始序列数据总碱基数；Clean reads 为经过修剪后被保留的 reads 的数目；Clean bases 为经过修剪后被保留的 reads 的总碱基数；Clean ratio 为 Clean bases 的数目占 Raw bases 数目的百分比；GC content 为碱基 G 和 C 的数量总和占总的碱基数量的百分比；Q₂₀ raw 为原始数据中 Phred 数值大于 20 的碱基占总体碱基的百分比；Q₃₀ raw 为原始数据中 Phred 数值大于 30 的碱基占总体碱基的百分比；Q₂₀ clean 为过滤后的数据中 Phred 数值大于 20 的碱基占总体碱基的百分比；Q₃₀ clean 为过滤后的数据中 Phred 数值大于 30 的碱基占总体碱基的百分比；Low quality 为 Phred 数值小于 15 的碱基超过该 reads 碱基数的 40%；Too many N 为碱基 N 超过 6 个的 reads 数目；Too short 为剪切之后长度短于 50bp 而被舍弃的 reads 的数目；Trimmed with adapter 为修剪后长度不短于 50 bp 而被保留 reads 的数目。

Note: Raw reads are used to count the number of sequencing sequences in each file, with four rows per unit. Raw bases are used to calculate the total base number of raw sequence data. Clean reads are the number of reads that have been trimmed and retained. Clean bases are the total base number of reads that have been trimmed and retained. Clean ratio is the percentage of Clean bases to Raw bases. GC content is the percentage of the total number of bases G and C to the total number of bases. Q₂₀ raw is the percentage of bases with Phred values more than 20 in the original data to the total number of bases. Q₃₀ raw is the percentage of bases with Phred values more than 30 in the original data to the total number of bases. Q₂₀ clean is the percentage of bases with Phred values more than 20 in the filtered data compared to the total number of bases. Q₃₀ clean is the percentage of bases with Phred values more than 30 in the filtered data to the total number of bases. Low quality refers to bases with Phred values less than 15 exceeding 40% of the number of bases in the reads. Too many N is the number of reads with more than six. Too short is the number of reads that were discarded due to their length being less than 50 bp after cutting. Trimmed with adapter is the number of reads that were retained due to their length more than 50 bp after trimming.

表 2 CUT&Tag 文库 Reads 与参考基因组比对情况表
Tab. 2 Comparison between CUT& Tag library reads and genome of *H. brasiliense*

样本 Sample	Clean read	Mapped	Mapped/ Clean read×100%	Unique mapped	Unique mapped/ Mapped× 100%	Dup Unique mapped	Dup Unique mapped/Unique mapped×100%	Unique mapped de- dup	Unique mapped dedup/Clean read×100%
COR 处理	4 782 119	4 645 819	97.15	4 549 021	97.92	2 324 968	51.11	2 224 053	46.51
CK	5 926 919	5 698 271	96.14	5 529 758	97.04	3 843 456	69.50	1 686 302	28.45
阳性对照	24 499 257	23 073 516	94.18	20 755 486	89.95	14 048 233	67.68	6 707 253	27.38
阴性对照	512 401	340 394	66.43	286 622	84.20	201 753	70.39	84 869	16.56

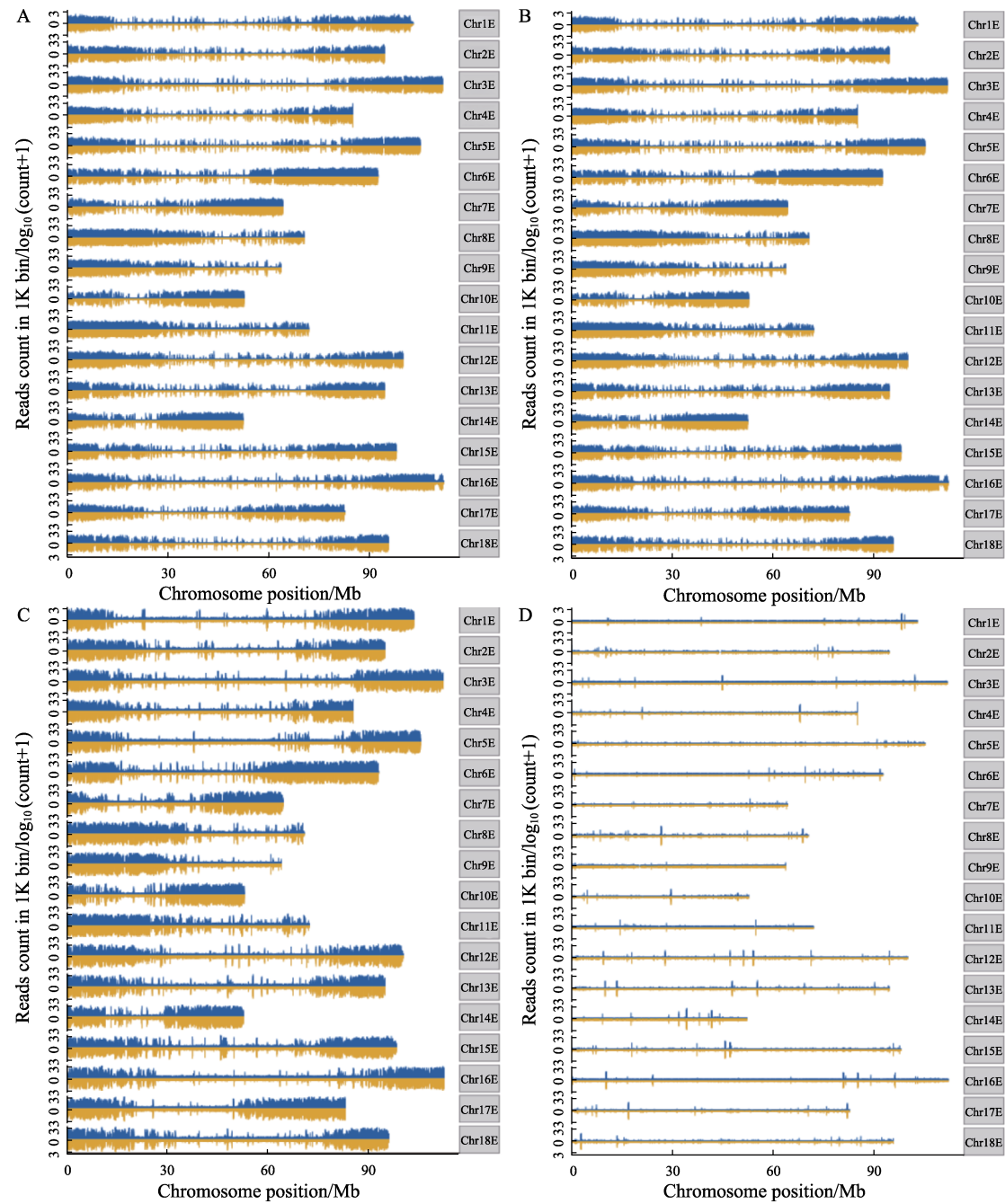
注：Clean reads 为经过修剪之后被保留的 reads 数目；Mapped 为比对上的 reads 数；Unique mapped 为在参考序列上有唯一比对位置的 reads 的数目，括号中的比例是 Unique mapped reads 相对于 Mapped reads 的百分比；Dup Unique mapped 为多个 reads 同时唯一比对到参考序列上，这样的 reads 的数目，括号中的比例是 Dup Unique mapped reads 相对于 Unique mapped reads 的百分比；Unique mapped dedup 为去除 Unique mapped reads 中多个 reads 同时唯一比对到参考序列上 reads 后的 reads 数目，括号中的比例是 Dedup Unique mapped reads 相对于 Clean reads 的百分比。

Note: Clean reads are the number of reads that have been trimmed and retained. Mapped is the number of reads on the comparison. Unique mapped is the number of reads with unique alignment positions on the reference sequence, and the ratio in parentheses is the percentage of Unique mapped reads relative to Mapped reads. Dup Unique mapped refers to the number of reads that were simultaneously and uniquely aligned to a reference sequence. The ratio in parentheses is the percentage of Dup Unique mapped reads relative to Unique mapped reads. Unique mapped dedup is the number of reads that have been uniquely aligned to the reference sequence after removing multiple reads from Unique mapped reads. The ratio in parentheses are the percentage of Dedup Unique mapped reads relative to Clean reads.

2.4 reads 在基因组上的分布统计

对 4 个 CUT&Tag 文库的 Total mapped reads 数据比对到巴西橡胶树高产无性系 RY8-79 参考基因组的各个染色体的密度进行统计。正常情况下，整个染色体长度越长，该染色体内部定位的 reads 总数越多。从定位到染色体上的 reads 数与染色体长度的关系图中，可以更加直观看出染色

体长度和 reads 总数的关系。如图 3 所示，阴性对照比对上基因组各染色体的 reads 数量较少（图 3D），COR 处理、CK 和阳性对照 3 个文库数据比对上基因组各染色体的 reads 数量较多，且三者之间的丰富程度相差不大（图 3A~图 3C）。可见本次构建的 COR 处理和 CK 的 CUT&Tag 的数据质量较好。



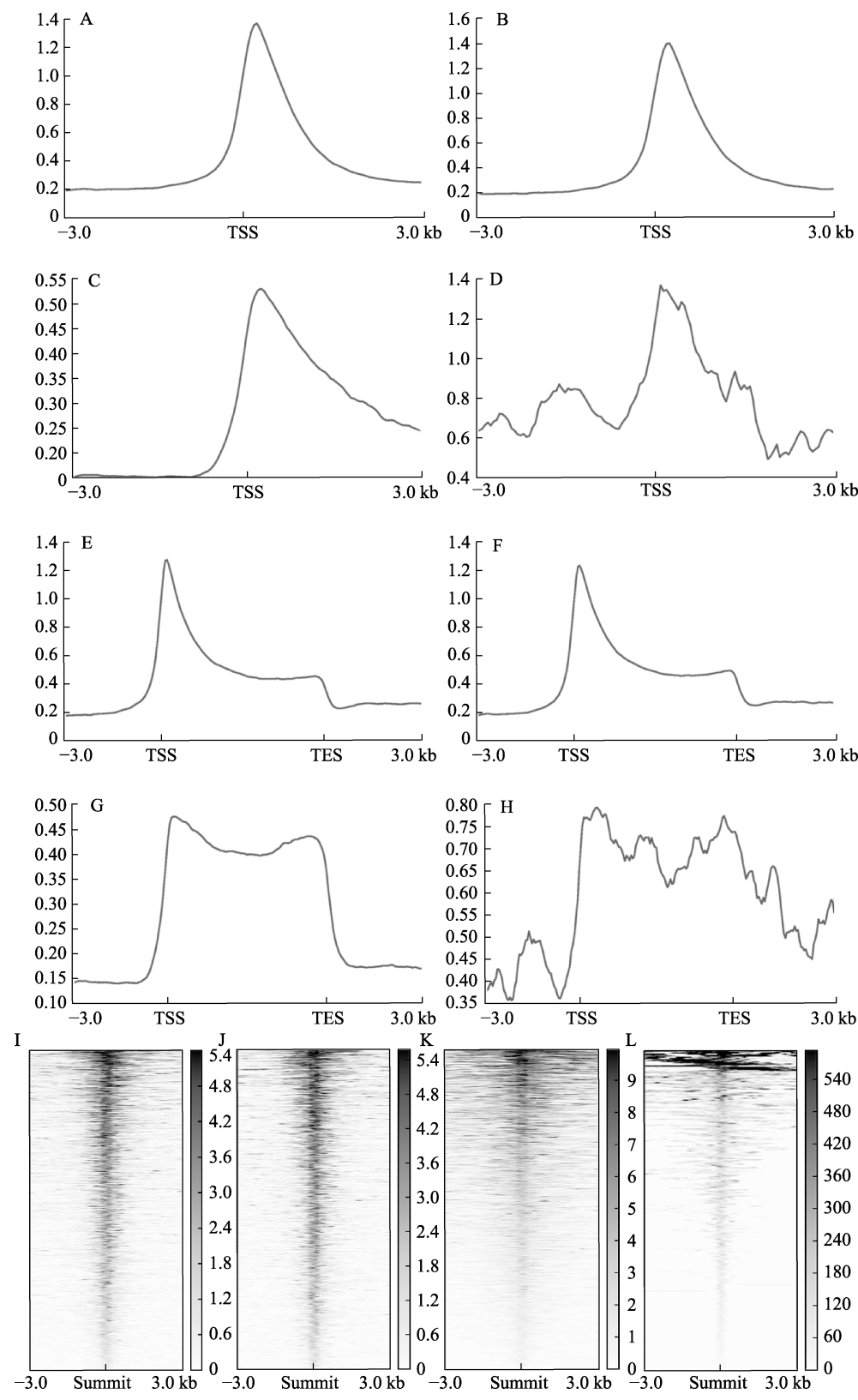
A: COR 处理; B: CK; C: 阳性对照; D: 阴性对照。
A: COR treatment; B: CK; C: Positive control; D: Negative control.

图 3 CUT&Tag 文库的 reads 在巴西橡胶树高产无性系 RY8-79 基因组上的分布统计

Fig. 3 Statistical distribution of reads from CUT&Tag libraries on genome of *H. brasiliensis* RY8-79

利用 deepTools 软件的 computeMatrix 模块对转录起始位点(TSS)上下游 3 kb 区域的 CUT&Tag 信号进行统计,是将整个区域按照 50 bp 的窗口大小划分成 bin,然后计算每个 bin 中的平均信号强度,可以获得每个样本的 TSS 上游和下游 3 kb 区域上的平均信号分布(图 4A~图 4D),COR 处理、CK 和阳性对照的结果在 TSS 处均有显著的高峰,而且 TSS 上游和下游的曲线很均匀;虽然

阴性对照在 TSS 处也有显著的高峰,但 TSS 上游和下游的曲线比较杂乱。同理,利用 deepTools 软件的 plotProfile 模块对 gene body 上下游 3 kb 区域的 CUT&Tag 信号进行统计,得到每个样本的 gene body 上下游 3 kb 区域上的平均信号分布(图 4E~图 4H),COR 处理、CK 和阳性对照的结果在 TSS 和 TES 处均有显著的高峰,TES-TSS 连接的曲线很均匀,显著高于 TSS 和 TES 之外的



A、E、I：COR 处理；B、F、J：CK；C、G、K：阳性对照；D、H、L：阴性对照。
A, E, I: COR treatment; B, F, J: CK; C, G, K: Positive control; D, H, L: Negative control.

图 4 CUT&Tag 文库的 reads 相对 TSS 位置 (A~D)、gene body 的分布 (E~H) 和贯穿基因组的 TSS 两侧的分布 (I~K) 图

Fig. 4 Distribution map of reads relative to TSS position (A~D), gene body (E~H), and the TSS on both sides of the genome (I~K) in CUT&Tag library

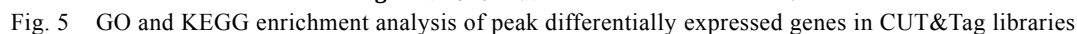
区域;虽然阴性对照在 TSS 和 TES 处也有显著的高峰,但 TES-TSS 连接的曲线比较杂乱,也是显著高于 TSS 和 TES 之外的区域曲线。同理,利用 deepTools 软件的 computeMatrix 模块对 peak 峰顶上下游 3 kb 区域的 CUT&Tag 信号进行统计,得到每个样本 CUT&Tag 信号贯穿基因组的 TSS 两侧的分佈图(图 4I~图 4L),横坐标表示 reads 相对于 peak summit 的位置信息,纵坐标表示每一个区域的 reads 信号的聚类结果,可以看出 COR 处理、CK 和阳性对照的 3 个文库的 reads 集中在 peak summit 的位置,但漂移出 peak summit 的也较多,且上下游的富集 reads 信号较少。从以上结果可知,引起阴性对照曲线杂乱的原因可能是阴性对照的数据量少、比对的结果少造成的。

2.5 差异基因的 GO 和 KEGG 分析

峰最邻近的 TSS 所对应的基因被认为是峰相关基因。使用 Goseq 软件对各 CUT&Tag 文库的峰相关基因进行 GO 富集分析,根据 GO 富集的生物过程(biological process)、细胞组分(cellular component)和分子功能(molecular function)3 个类别,对过度呈现 P 值(over represented P value)最小的 30 项中具有峰值项的基因数量(gene with peak item)最多的几项进行筛选。如图 5A~图 5D 所示:(1) COR 处理的 CUT&Tag 文库差异峰对应基因,在 GO 富集的 3 个类别中,分别是生物过程 6 项,其中 DNA 整合相关基因 220 个;细胞组分 12 项,其中泛素化连接酶复合体相关基因 130 个、泛素化-蛋白转移酶相关基因 128 个;分子功能 12 项,其中泛素化连接酶复合体相关基因 178 个、泛素化-蛋白转移酶相关基因 178 个和 ADP 结合相关基因 166 个等。(2) CK 的 CUT&Tag 文库差异峰对应基因,在 GO 富集的 3 个类别中,分别是生物过程 2 项,其中对生长素的反应相关基因 33 个;细胞组分 12 项,其中泛素化连接酶复合体相关基因 117 个和核泛素连接酶复合物相关基因 115 个;分子功能 16 项,其中 ADP 结合相关基因 170 个、泛素蛋白转移酶活性相关基因 165 个和泛素样蛋白转移酶活性相关基因 165 个等。(3) 组蛋白 H3K27m3 抗体对应的阳性对照的 CUT&Tag 文库差异峰对应基因,在 GO 富集的 3 个类别中,分别是生物过程 10 项,其中对蛋白质磷酸化相关基因 338 个和 DNA 整合相关基因 144 个;细胞组分 2 项,其中细胞外基质相关基因 18 个;分子功能 15 项,其中氧化

还原酶活性相关基因 165 个和铁离子结合相关基因 155 个等。(4) 阴性对照的 CUT&Tag 文库差异峰对应基因,在 GO 富集的 3 个类别中,分别是生物过程 14 项,其中光合作用相关基因 13 个;细胞组分 7 项,其中含蛋白质复合物相关基因 25 个和膜蛋白复合体相关基因 13 个;分子功能 9 项,其中叶绿素结合相关基因 3 个和脱氧核糖核酸酶活性相关基因 3 个等。可见 COR 处理、CK 与阳性和阴性对照文库的 GO 富集结果之间存在巨大差异。

使用 KOBAS 软件进行峰差异基因 KEGG 富集分析,对 P 值和校正后的 P 值的最小 20 项中,具有输入的基因数量(input gene number)较多的几项进行筛选。如图 5E~图 5H 所示,(1) COR 处理的 CUT&Tag 文库的差异峰对应的基因校正 P 值最低且富集数量较多的 KEGG 通路,依次为植物病原体相互作用($P=0.1288$, 110 个基因)、类黄酮生物合成($P=0.1631$, 35 个基因)、光合作用($P=0.0553$, 36 个基因)、氨基糖和核苷酸糖代谢($P=0.6543$, 71 个基因)、核糖体($P=0.6543$, 156 个基因)等;(2) COR 处理对照的 CUT&Tag 文库的差异峰对应的基因校正 P 值最低且富集数量较多的 KEGG 通路,依次为植物病原体相互作用($P=0.0553$, 107 个基因)、类黄酮生物合成($P=0.1631$, 36 个基因)、光合作用($P=0.12$, 44 个基因)、昼夜节律-植物($P=0.3826$, 28 个基因)、核糖体($P=0.3826$, 156 个基因)等;(3) 组蛋白 H3K27m3 抗体对应的阳性对照的 CUT&Tag 文库的差异峰对应的基因校正 P 值最低且富集数量较多的 KEGG 通路,依次为类黄酮生物合成($P=7.12E-06$, 33 个基因)、植物病原体相互作用($P=0.0067$, 66 个基因)、次生代谢产物的生物合成($P=0.0067$, 297 个基因)、倍半萜和三萜生物合成($P=0.0069$, 16 个基因)、光合作用($P=0.0126$, 29 个基因)等;(4) 阴性对照的 CUT&Tag 文库的差异峰对应的基因校正 P 值最低且富集数量较多的 KEGG 通路,依次为光合作用($P=1.68E-14$, 15 个基因)、氧化磷酸化($P=2.8E-06$, 11 个基因)、萜、嘧啶和吡啶生物碱的生物合成($P=0.0219$, 3 个基因)、RNA 聚合酶($P=0.0459$, 3 个基因)、代谢途径($P=0.1366$, 31 个基因)等。可见 COR 处理、CK 与阳性对照和阴性对照文库的 KEGG 富集结果之间也存在较大差异。



3 讨论

3.1 CUT&Tag 技术为解析橡胶树维管形成层分化成次生乳管的分子机制提供了契机

橡胶树树干树皮中的次生乳管是天然橡胶合成和贮存的场所,是由维管形成层纺锤状原始细胞分化而来的^[7,9]。形成层细胞分化成次生乳管后,会不断向树皮外侧推移,乳管细胞要经过发生-幼嫩-成熟-衰老-死亡的过程。按照橡胶树树皮从里向外依次分布形成层区(乳管发生)、水囊皮(幼嫩乳管)、黄皮和砂皮内层(成熟乳管)以及砂皮外层和粗皮(衰老和死亡的乳管)^[7]。由于天然橡胶生产中的割胶部位主要是形成层和水囊皮以外的组织——黄皮和砂皮内层,其中分布有大量的成熟乳管,故称之为有效产胶部位。只有形成层不断分化新的次生乳管,才能保障有效产胶部位中成熟乳管的数量^[7]。橡胶树树干树皮中的次生乳管细胞的命运决定发生在形成层区。最适合观察此过程的时间为每年的春季新梢生长期(3—4月),此时树干的形成层区开始分裂分化活动,形成层的细胞层数最少(约4层)^[13,23],可以在原位跟踪到形成层分化成次生乳管的过程。所以研究 COR 诱导橡胶树维管形成层分化成次生乳管的分子机制,其植物材料仅限于 COR 诱导处理的橡胶树树皮的形成层区,形成层细胞且细胞位于木质部和韧皮部之间,难以分离到具有活性且数量较多的形成层细胞,也难以获得足够量的原生质体来满足 ChIP-Seq 实验要求,故我们选择起始量更低且效率更高的 CUT&Tag 技术来研究 COR 处理的橡胶树树皮形成层区的组蛋白乙酰化修饰对次生乳管分化的调控。目前, CUT&Tag 技术已经广泛应用于组蛋白修饰/染色质结合蛋白分析、开放染色质分析、单细胞组学、DNA 和蛋白质修饰分析、空间生物学和染色质构象捕获(3C)等多种研究方向,并且适用于植物和动物的多种模式物种。橡胶树维管形成层在分化成次生乳管细胞的特点,结合 CUT&Tag 技术能够达到单细胞级别的分析,能够充分还原形成层细胞发生的特异性修饰和基因表达,为解析橡胶树形成层分化成次生乳管细胞的机制提供了良好的契机。

3.2 橡胶树维管形成层分化成次生乳管过程,可能受到 JA 信号、组蛋白乙酰化和泛素化协同调控

通过对 COR 处理橡胶树树皮 CUT&Tag 文库

的峰相关基因进行 GO 和 KEGG 富集分析,发现很多生长素、类黄酮代谢相关的基因, COR 和对照处理的文库还发现了大量的蛋白质泛素化修饰相关的基因,如泛素化连接酶复合体、泛素化-蛋白转移酶。这说明 COR 诱导橡胶树次生乳管分化过程中,形成层发生了蛋白质乙酰化修饰,而且有蛋白质泛素化修饰参与其调控过程。

蛋白质乙酰化是在乙酰基转移酶的作用下,在蛋白质赖氨酸残基上添加乙酰基的过程,是细胞控制基因表达,蛋白质活性或生理过程的一种机制。组蛋白乙酰化多发生在核小体的组蛋白 N 端碱性氨基酸集中区的特定赖氨酸残基上。组蛋白乙酰化水平是由组蛋白乙酰基转移酶(HATs)和组蛋白去乙酰化酶(HDAs)共同决定。在细胞核内,组蛋白乙酰化与组蛋白去乙酰化过程处于动态平衡,进而调控基因的转录和表达。蛋白质泛素化,是蛋白质的赖氨酸残基位点与泛素分子的羧基端相互结合的过程,可改变底物蛋白的稳定性、定位、活性和复合物形成,参与蛋白质降解过程。泛素化调节途径共有 3 类酶催化:泛素激活酶(E1)、泛素接合酶(E2)、泛素-蛋白质连接酶(E3)。与组蛋白乙酰化类似,组蛋白泛素化也是可逆转的调控,组蛋白泛素化的动态平衡过程由 2 个因素决定:分别是细胞内可以利用的游离泛素,以及组蛋白泛素化或去泛素化酶的活性。同样是发生在蛋白质赖氨酸残基位点上的蛋白质修饰,2 种修饰方式之间必然存在一些联系。目前,关于乙酰化和泛素化二者的相互作用的研究还很少。最新的研究证明,泛素化和乙酰化能够共同调控植物中蛋白质稳定性变化^[24]。研究发现依赖于 NatA 的 NTA 损伤会导致拟南芥蛋白质组的整体不稳定,并发现了一个新的降解决定子(degron),该 degron 标记了大多数非乙酰化的胞质蛋白并可通过泛素系统降解^[24]。在人类疾病研究中,发现组蛋白泛素化与乙酰化协同作用可以实现染色质酶活性的精细调控^[25]。甲基转移酶 Dot1 的活性可由 H4K16(H4K16ac)特异性激活,H4K16ac 直接激活 Dot1 的活性,H2B 的泛素化(H2BUb)进一步增强了这种效果,从而获得了 Dot1 的最佳催化速率。并通过冷冻电镜结构对比分析和定点突变结合核小体的酶分析,证实了 H4K16ac 乙酰化和 H2BUb 泛素化对 Dot1 甲基化的变构刺激在 H3K79 甲基化反应中起关键作用^[25]。

而在 JA 信号途径起主导作用的 COR 诱导橡

胶树次生乳管分化过程中, 不仅有组蛋白乙酰化修饰参与, 也有 E3 泛素连接酶参与。经典的 JA 信号途径: 茉莉酸异亮氨酸 (JA-Ile) 是植物激素茉莉酸的活性形式, 植物对茉莉酸的应答依赖 SCF^{COI1} 复合物^[26-27], 该复合物具有 E3 泛素化连接酶活性^[28]。关键的调控环节为 COI-JAZ-MYC, 其中 JAZ 蛋白是茉莉酸信号途径的负调控因子, 通过抑制 MYC 类转录因子对下游茉莉酸应答基因的转录激活活性, 阻断 JA 信号传导。当 JA-Ile 与其受体 COI1 结合后, SCF^{COI1} 复合物与 JAZ 蛋白结合, 使 JAZ 蛋白发生泛素化而被 26 S 蛋白酶体降解, 从而解除 JAZ 对 MYC 转录因子的抑制作用, 启动 JA 下游响应基因的转录^[29-30]。据报道, 植物转录共激活因子复合体 Mediator 的一个亚基 MED25, 可将 COI1 引导至 MYC2 靶启动子上, 并促进 JAZ 蛋白通过泛素化, 被 26 S 蛋白酶体降解; 此外, MED25 可与组蛋白乙酰基转移酶 1 (HAC1) 相互作用, 此互作可选择性调节 MYC2 靶启动子 H3K9 乙酰化, 从而在 JA 信号转导中发挥重要作用^[31-34]。HAC1 在 MYC2 靶启动子上的富集与活性依赖于 COI1 和 MED25。因此, MED25 将 COI1 与 HAC1 依赖的 H3K9 乙酰化联系起来, 以激活 MYC2 对 JA 响应基因的转录调控^[31-34]。由此可见, 组蛋白乙酰化修饰和泛素化修饰在 JA 信号途径中起很重要的调控作用。近期, 我们发现 HDA 的抑制剂 TSA 也能诱导次生乳管分化^[16], 且 COR 处理显著提高形成层区的组蛋白乙酰化程度, 且 HDA 活性, 尤其是 HDA6 的含量和 HDA/HAT 基因的表达均受到 JA 的影响 (未发表资料)。据此, 我们推测橡胶树维管形成层分化次生乳管过程, 可能是通过 JA 信号途径、组蛋白乙酰化修饰和蛋白质泛素化修饰来共同调控乳管分化相关基因的转录而实现。

参考文献

- [1] KAYA OKUR H S, WU S J, CODOMO C A, PLEDGER E S, BRYSON T D, HENIKOFF J G, AHMAD K, HENIKOFF S. CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1930.
- [2] KAYA OKUR H S, DEREK H J, JORJA G H, KAMI A, STEVEN H. Efficient low-cost chromatin profiling with CUT&Tag[J]. *Nature Protocols*, 2020, 15(10): 3264-3283.
- [3] OUYANG W Z, ZHANG X W, PENG Y, ZHANG Q, CAO Z L, LI G L, LI X W. Rapid and low-input profiling of histone marks in plants using nucleus CUT&Tag[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 634679.
- [4] TAO X Y, FENG S L, ZHAO T, GUAN X Y. Efficient chromatin profiling of H3K4me3 modification in cotton using CUT&Tag[J]. *Plant Methods*, 2020, 16: 120.
- [5] BARTOSOVIC M, KABBE M, CASTELO BRANCO G. Single-cell CUT&Tag profiles histone modifications and transcription factors in complex tissues[J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(7): 825-835.
- [6] WU L M, LUO Z, SHI Y N, JIANG Y Z, LI R N, MIAO X X, YANG F, LI Q, ZHAO H, XUE J Q, XU S T, ZHANG T F, LI L. A cost-effective tsCUT&Tag method for profiling transcription factor binding landscape[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(11): 2033-2038.
- [7] 田维敏, 史敏晶, 谭海燕, 吴继林, 郝秉中. 橡胶树树皮结构与发育[M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- [8] TIAN W M, SHI M J, TAN H Y, WU J L, HAO B Z. Structure and development of bark in *Hevea brasiliensis*[M]. Beijing: Science Press, 2015. (in Chinese)
- [9] GOMEZ J B. Anatomy of *Hevea* and its influence on latex production[M]. Kuala Lumpur: Malaysia Rubber Research and Development Board, 1982.
- [10] HAO B Z, WU J L. Laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*: induction by exogenous jasmonic acid and linolenic acid[J]. *Annals of Botany*, 2000, 85(1): 37-43.
- [11] 刘惠芳, 吴继林, 郝秉中. 茉莉酸和其他激素对巴西橡胶树乳管分化的协同作用[J]. *热带作物学报*, 2001, 22(3): 6-16.
- [12] LIU H F, WU J L, HAO B Z. Effect of jasmonic acid and other plant growth regulators on laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2001, 22(3): 6-16. (in Chinese)
- [13] TIAN W M, SHI M J, YU F Y, WU J L, HAO B Z, CUI K M. Localized effects of mechanical wounding and exogenous jasmonic acid on the induction of secondary laticifer differentiation in relation to the distribution of jasmonic acid in *Hevea brasiliensis*[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(11): 1366-1372.
- [14] ICHIHARA A, SHIRAIISHI K, SATO H, SADA O S. The structure of coronatine[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1977, 99(2): 636-637.
- [15] 张世鑫, 刘世彪, 田维敏. 形成层活动对机械伤害诱导巴西橡胶树次生乳管分化的影响[J]. *热带作物学报*, 2011, 32(6): 1037-1041.
- [16] ZHANG S X, LIU S B, TIAN W M. Effect of vascular cambium activity on secondary laticifer differentiation induced by mechanical wounding in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2011, 32(6): 1037-1041. (in Chinese)

- [14] ZHANG S X, TIAN W M. Cross talk between cytokinin and jasmonates in regulating the secondary laticifer differentiation in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)[J]. Journal of Rubber Research, 2015, 18(1): 38-48.
- [15] ZHANG S X, WU S H, CHEN Y Y, TIAN W M. Analysis of differentially expressed genes associated with coronatine-induced laticifer differentiation in the rubber tree by subtractive hybridization suppression[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0132070.
- [16] ZHANG S X, WU S H, TIAN W M. The secondary laticifer differentiation in rubber tree is induced by trichostatin A, an inhibitor of histone acetylation[J]. Frontiers of Agricultural Science and Engineering, 2016, 3(4): 357-362.
- [17] 张世鑫, 刘宁涛, 杨署光, 陈月异, 晁金泉, 田维敏. 巴西橡胶树次生乳管分化能力的早期评价方法研究[J]. 热带作物学报, 2018, 39(7): 1266-1275.
ZHANG S X, LIU N T, YANG S G, CHEN Y Y, CHAO J Q, TIAN W M. Early evaluation method of secondary laticifer differentiation ability in *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 39(7): 1266-1275. (in Chinese)
- [18] WU S H, ZHANG S X, CHAO J Q, LI Y, YANG S G, DENG X M, SHI M J, TIAN W M. Differential miRNA expression profiling reveals a correlation between *hbr-miR156* and laticifer differentiation in rubber trees[J]. Industrial Crops and Products, 2023, 192: 116067.
- [19] WU S H, ZHANG S X, CHAO J Q, DENG X M, CHEN Y Y, SHI M J, TIAN W M. Transcriptome analysis of the signalling networks in coronatine-induced secondary laticifer differentiation from vascular cambia in rubber trees[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 36384.
- [20] YOO S D, CHO Y H, SHEEN J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis[J]. Nature Protocol, 2007, 2(7): 1565-1572.
- [21] LIN Y C, LI W, CHEN H, LI Q Z, SUN Y H, SHI R, LIN C Y, WANG J P, CHEN H C, CHUANG L, QU G Z, SEDEROFF R R, CHIANG V L. A simple improved-throughput xylem protoplast system for studying wood formation[J]. Nature Protocol, 2014, 9(9): 2194-2205.
- [22] CHAO J Q, WU S H, SHI M J, XU X, GAO Q, DU H L, GAO B, GUO D, YANG S G, ZHANG S X, LI Y, FAN X L, HAI C Y, KOU L Q, ZHANG J, WANG Z W, LI Y, XUE W B, XU J, DENG X M, HUANG X, GAO X S, ZHANG X F, HU Y S, ZENG X, LI W G, ZHANG L S, PENG S Q, WU J L, HAO B Z, WANG X C, YU H, LI J Y, LIANG C Z, TIAN W M. Genomic insight into domestication of rubber tree[J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 4651.
- [23] WU J L, HAO B Z, TAN H Y. Wound-induced differentiation in *Hevea brasiliensis* shoots mediated by jasmonic acid[J]. Journal of Rubber Research, 2002, 5(1): 53-63.
- [24] LINTER E, FORERO RUIZ F L, MIKLANKOVA P, RUPPERT T, MUELLER J, ARMBRUSTER L, GONG X, SERINO G, MANN M, HELL R, WIRTZ M. Cotranslational N-degron masking by acetylation promotes proteome stability in plants[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 810.
- [25] VALENCIA SANCHEZ M I, DE IOANNES P, WANG M, TROUNG D M, LEE R, ARMACHE J P, BOEKE J D, ARMACHE K J. Regulation of the Dot1 histone H3K79 methyltransferase by histone H4K16 acetylation[J]. Science, 2021, 371(6527): eabc6663.
- [26] XU L H, LIU F Q, LECHNER E, GENSCHIK P, CROSBY W L, MA H, PENG W, HUANG D F, XIE D X. The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2002, 14(8): 1919-1935.
- [27] DEVOTO A, NIETO ROSTRO M, XIE D X, EILLS C, HARMSTON R, PATRICK E, DAVIS J, SHERRATT L, COLEMAN M, TURNER J G. COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*[J]. Plant Journal, 2002, 32(4): 457-466.
- [28] XIE D X, FEYS B F, JAMES S, NIETO ROSTRO M, TURNER J G. COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility[J]. Science, 1998, 280(5366): 1091-1094.
- [29] THINES B, KATSIR L, MELOTTO M, NIU Y, MANDAOKAR A, LIU G, NOMURA K, HE S Y, HOWE G A, BROWSE J. JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling[J]. Nature, 2007, 448(7154): 661-665.
- [30] KATSIR L, SCHILLMILLER A L, STASWICK P E, HE S Y, HOWE G A. COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(19): 7100-7105.
- [31] AN C P, LI L, ZHAI Q Z, YOU Y R, DENG L, WU F M, CHEN R, JIANG H L, WANG H, CHEN Q, LI C Y. Mediator subunit MED25 links the jasmonate receptor to transcriptionally active chromatin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017, 114(42): E8930-E8939.
- [32] WU F M, DENG L, ZHAI Q Z, ZHAO J H, CHEN Q, LI C Y. Mediator subunit MED25 couples alternative splicing of JAZ genes with fine-tuning of jasmonate signaling [J]. Plant Cell, 2020, 32(2): 429-448.
- [33] WANG H, LI S Y, LI Y N, XU Y R, WANG Y H, ZHANG R X, SUN W J, CHEN Q, WANG X J, LI C Y, ZHAO J H. MED25 connects enhancer-promoter looping and MYC2-dependent activation of jasmonate signalling[J]. Nature Plants, 2019, 5(6): 616-625.
- [34] ZHAI Q Z, DENG L, LI C Y. Mediator subunit MED25: at the nexus of jasmonate signaling[J]. Current Opinion In Plant Biology, 2020, 57: 78-86.