

# 拟南芥中组蛋白 H2A.W 与 AGO2 蛋白的互作研究

杨献光<sup>1</sup>,徐珑倩<sup>1,2</sup>,刘洋<sup>2</sup>

(1.河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007;

2.中国科学院 动物研究所;农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室,北京 100101)

**摘要:**以拟南芥 AGO2 为研究对象,通过免疫共沉淀质谱联用技术(IP-MS),发现了 HTA6 和 HTA7 可能与 AGO2 蛋白互作,并通过亚细胞定位、双分子荧光互补技术以及免疫共沉淀(Co-IP)实验,进一步研究了 H2A.W 家族蛋白 HTA6 和 HTA7 与 AGO2 蛋白的定位和相互作用关系.结果显示 HTA6、HTA7 和 AGO2 在细胞核内有共定位,且 HTA6、HTA7 分别与 AGO2 在细胞核内存在相互作用,体内 Co-IP 实验也进一步证明了 HTA6、HTA7 和 AGO2 的互作关系,为后续研究 AGO2 蛋白与异染色质之间的调控关系奠定了基础.

**关键词:**组蛋白;H2A;AGO2;互作

**中图分类号:**Q71

**文献标志码:**A

**文章编号:**1000-2367(2026)03-0136-07

染色质的基本单位是核小体,核小体由大约 150 bp 的 DNA 包裹在一个由核心组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 各 2 个分子组成的单链八聚体上<sup>[1-2]</sup>.其中,H2A 的变体被选择性地整合到染色质的不同功能域中,每种变体都赋予核小体特定的特性.拟南芥的 H2A 变体主要包括 4 种主要类型的同型核小体,分别为 H2A、H2A.Z、H2A.X 和 H2A.W<sup>[3]</sup>.不同于其他的变体,H2A.W 主要特异性定位于异染色质<sup>[4]</sup>.据报道,H2A.W 可以和 H1 共同调控异染色质特征,维持异染色质的可及性和影响 DNA 甲基化<sup>[5]</sup>.在拟南芥中,H2A.W 由 3 个亚基组成(H2A.W.6、H2A.W.7、H2A.W.12),HTA6(H2A.W.6)和 HTA7(H2A.W.7)在异染色质上普遍表达,且 HTA7 的表达量更为丰富<sup>[6]</sup>.

RNA 沉默机制是一种广泛存在于真核生物中的基因调控系统,是植物中重要的抗病毒防御策略<sup>[7-9]</sup>.AGO 蛋白(AGO)是 RNA 沉默关键效应蛋白,在功能和结构上高度保守<sup>[10]</sup>.AGO 蛋白通过结合不同小 RNA(small RNA,sRNA)介导转录水平基因沉默(TGS)和转录后水平基因沉默(PTGS)调节生物体生长发育和响应胁迫.拟南芥中 AGO4 蛋白结合 24-nt 小 RNA 介导染色质甲基化修饰<sup>[11-13]</sup>.在酵母中,AGO1 通过招募甲基转移酶促进组蛋白 H3K9 甲基化<sup>[14]</sup>.在拟南芥中,AGO 蛋白有 10 种,根据其进化和功能上的差异可以分为 3 组:1)AtAGO1、AtAGO5 和 AtAGO10;2)AtAGO2、AtAGO3 和 AtAGO7;3)AtAGO4、AtAGO6、AtAGO8 和 AtAGO9.AGO2 通过结合 sRNA 从 PTGS 水平在细胞质中介导植物抗性参与抗病毒和抗细菌反应<sup>[15-17]</sup>.同时有研究发现,AGO2 可以通过招募 DNA 双链断裂诱导的 sRNA(diRNA)在细胞核中参与 DNA 双链修复介导染色质修饰<sup>[18]</sup>.这些研究显示了 AGO2 不仅可以在细胞质中通过介导 RNA 沉默调控基因表达,还可以在细胞核内通过介导染色质修复、修饰等机制参与基因调控.

本研究利用免疫共沉淀质谱联用技术(IP-MS),分析了可能与 AGO2 蛋白具有相互作用的蛋白,并利用

**收稿日期:**2024-02-21;**修回日期:**2024-04-23.

**基金项目:**国家自然科学基金(U1704182).

**作者简介(通信作者):**杨献光(1980-),男,河北邯郸人,河南师范大学教授,主要研究方向为分子细胞生物学,E-mail: yangxg@htu.edu.cn.

**引用本文:**杨献光,徐珑倩,刘洋.拟南芥中组蛋白 H2A.W 与 AGO2 蛋白的互作研究[J].河南师范大学学报(自然科学版),2026,54(3):136-142.(Yang Xianguang,Xu Longqian,Liu Yang.The interaction of histone H2A.W and AGO2 in *Arabidopsis thaliana*[J].Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition),2026,54(3):136-142.DOI:10.16366/j.cnki.1000-2367.2024.02.21.0003.)

亚细胞定位和双分子荧光互补技术(BiFC)、体内免疫共沉淀等实验技术验证组蛋白 H2A.W 同源蛋白 HTA6、HTA7 与 AGO2 蛋白的相互作用,为后续研究 HTA6、HTA7 和 AGO2 蛋白相互作用机制及功能提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)种植于 23 °C 温室中,光照 12 h/黑暗 12 h 交替培养。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞(TSC01)购于北京擎科生物科技公司;农杆菌感受态细胞 GV3101(SGn301)购于上海士锋生物科技有限公司。组蛋白 H2A.W 家族蛋白 HTA6、HTA7 的亚细胞定位载体 pEarleyGate102-HTA6-CFP-HA 和 pEarleyGate102-HTA7-CFP-HA, BiFC 实验荧光载体 pSite-HTA6-cYFP、pSite-HTA7-cYFP 和 pSite-GST-cYFP 为本文第三作者构建。AGO2 荧光表达载体 pEarleyGate104-YFP-AGO2 载体,烟草瞬时表达载体 pDC32-HA-AGO2 和 BiFC 荧光载体 pSite-nYFP-AGO2 为实验室保存载体。本研究设计的引物见附录表 S1。

### 1.2 实验方法

AGO2 互作蛋白质谱实验。将培养 4 周龄的 p AGO2::HA-AGO2 和 pEarleyGate-104(104 Empty Vector, 104 EV)转基因植物各收集约 5 g,充分研磨;按照 1 g 材料加 5 mL 蛋白提取缓冲液(50 mL 体系: 5 mol/L NaCl 500  $\mu$ L, 1 mol/L MgCl<sub>2</sub> 300  $\mu$ L, 1 mol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mL, 1 mol/L DTT 250  $\mu$ L, 10% Tween-20 1.5 mL, 10 $\times$ Protease inhibitor 500  $\mu$ L, 灭菌水补齐至 50 mL)的比例提取总蛋白;4 °C 低速摇 30 min,然后 4 °C, 5 000 r/min 离心 15 min。将上清用 miracloth 滤布过滤后,4 °C, 5 000 r/min 离心 5 min,收集上清;按照 1 g 材料 15  $\mu$ L 的比例向上清中加入 HA-beads(兰博利德, HNM-50-2000),4 °C 孵育 3 h;1 000 r/min 离心 5 min,加入 1 mL 洗涤缓冲液(50 mL 体系: 5 mol/L NaCl 1.5 mL, 1 mol/L MgCl<sub>2</sub> 250  $\mu$ L, 1 mol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mL, 1 mol/L DTT 250  $\mu$ L, 体积分数 10% Triton-X-100 1.5 mL, 10 $\times$  Protease inhibitor 500  $\mu$ L, 灭菌水补齐至 50 mL),轻柔晃动 3 min,1 000 r/min 离心 1 min,重复 3~4 次;收取 beads 后,加入 300  $\mu$ L 洗涤缓冲液和 60  $\mu$ L 6 $\times$ loading dye,煮沸 10 min 后进行跑胶和考马斯亮蓝染色,对染色后的蛋白泳道全切胶后送往北京大学质谱中心进行蛋白质谱鉴定。

烟草瞬时表达实验。将培养好的阳性农杆菌菌体沉淀重悬于 MMA 溶液(50 mL 体系: 1 mol/L MgCl<sub>2</sub> 500  $\mu$ L, 1 mol/L MES 溶液 500  $\mu$ L, AS 溶液 50  $\mu$ L, 灭菌水补齐至 50 mL);用分光光度计检测菌液 OD<sub>600</sub> = 1.2;再选取 4 周左右的本氏烟草作为材料,用注射器把菌液注射至烟草中间的 3 片叶子。第 1 天避光培养,第 2 天正常光照培养,第 3 天收取注射过的烟草叶片做后续实验。

激光共聚焦显微镜观察蛋白细胞定位实验。取注射了含有对应质粒的农杆菌的烟草叶片,将叶片反面朝上,放于载玻片上,盖好盖玻片,将做好的玻片放于激光共聚焦显微镜的载物台上,先使用明场调整焦距并将较好的视野置于视野中心位置。然后选择对应的激光激发波长观察不同荧光蛋白的荧光,CFP 的激发波长为 470 nm, YFP 的激发波长为 510 nm, mcherry 的激发波长为 633 nm。

烟草体内 Co-IP 实验。取 1 g 左右的材料,充分研磨;按照 1 g 材料加 5 mL 蛋白提取缓冲液(50 mL 体系: 5 mol/L NaCl 500  $\mu$ L, 1 mol/L MgCl<sub>2</sub> 300  $\mu$ L, 1 mol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mL, 1 mol/L DTT 250  $\mu$ L, 10% Tween-20 1.5 mL, 10 $\times$ Protease inhibitor 500  $\mu$ L)的比例加入适量的提取缓冲液;4 °C 低速摇晃 30 min,然后 4 °C, 5 000 g 离心 15 min。将上清用 miracloth 滤布过滤后,4 °C, 5 000 r/min 离心 5 min,收集上清;取 100  $\mu$ L 上清作为 input,管中其余的蛋白样品加入对应的 beads,4 °C 孵育 6 h 后 4 °C 1 000 r/min 离心 2 min;移除所有液体后加入 6~8 mL 的洗涤缓冲液,洗涤 2~4 次;洗涤完毕后加入 1 mL 洗涤缓冲液轻轻混匀;4 °C, 1 000 r/min 离心 3 min,吸走上清,留大约 200  $\mu$ L 液体,加入蛋白 loading buffer,进行煮样;与 input 样品一起,进行 Western Blot 实验,检测目的蛋白。

Western Blot 实验。将蛋白样品与 5 $\times$ SDS loading buffer 混匀后,沸水煮样 7 min 后立即放于冰上,待冷却后取适量样品加入胶孔中进行电泳。120 V 电泳 1 h 左右,待溴酚蓝跑至胶的最底部时,停止电泳。将胶

转膜至 PVDF 膜上,200 mA 恒流转膜 120 min,待转膜结束后,将 PVDF 膜置于质量分数 5% 的脱脂奶粉中,常温封闭 40 min.最后分别使用 HA(Easybio, BE-2008)、FLAG(Easybio, BE2005)和 Tubulin(Easybio, BE4006)一抗抗体和鼠(Easybio, BE0132)、兔(Easybio, BE0131)二抗抗体孵育显影.

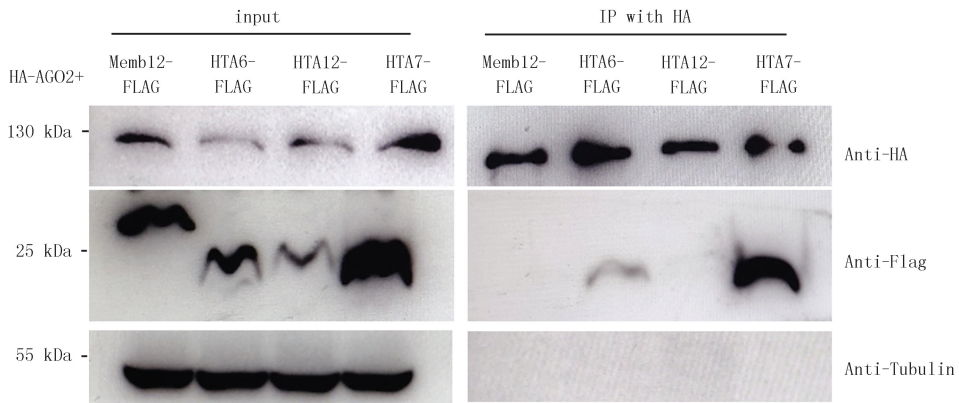
## 2 结果与分析

### 2.1 AGO2 互作蛋白 IP-MS 文库分析

通过对拟南芥 AGO2 互作蛋白的质谱文库分析(附录表 S2),发现 HTA7(H2A5\_ARATH)、HTA6(H2A7\_ARATH)、HTA12(H2A4\_ARATH)与 AGO2 蛋白可能存在相互作用,且与对照 104 EV 样品相比,HA-AGO2 实验组中打到的与 AGO2 互作的 HTA6、HTA7 蛋白肽段数目较多且序列较为特异(附录图 S1),因此我们判断 H2A.W 家族蛋白 HTA6 和 HTA7 可能与 AGO2 互作.

### 2.2 体内免疫共沉淀实验验证 HTA6、HTA7 与 AGO2 的相互作用

为了明确 AGO2 蛋白与 HTA6、HTA7 和 HTA12 之间是否相互作用,通过体内 Co-IP 实验,用 HA beads 下拉带有 HA 标签的 AGO2 蛋白,再利用 FLAG 抗体检测与 AGO2 互作蛋白.结果显示,HTA6 和 HTA7 与 AGO2 都存在相互作用,且 HTA7 与 AGO2 的相互作用较强(图 1).



注:在烟草中通过Co-IP实验检测AGO2和HTA6、HTA7和HTA12的互作.用HA免疫磁珠做IP. input和IP产物分别用HA和FLAG抗体检测. Tubulin为内参. 左半部分为input,右半部分为IP样品, memb12为负对照,为已确认的不与AGO2互作的蛋白<sup>[9]</sup>.

图1 Co-IP证明HTA6、HTA7与AGO2蛋白的相互作用

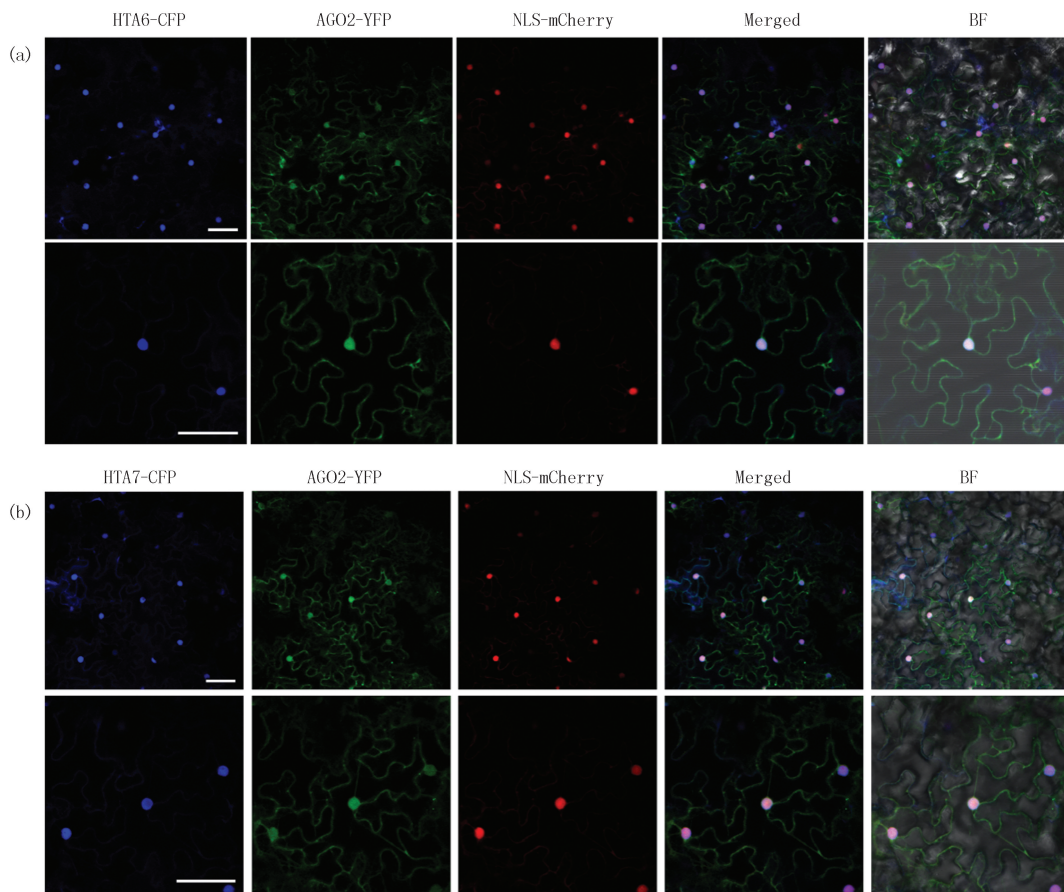
Fig.1 Co-IP verifies the interaction between HTA6, HTA7 and AGO2 proteins

### 2.3 HTA6、HTA7 与 AGO2 在细胞核中具有共定位

为了明确 HTA6、HTA7 以及 AGO2 蛋白的亚细胞定位,本研究分别构建了 HTA6、HTA7 的荧光表达载体 pEarleyGate102-HTA6-CFP-HA 和 pEarleyGate102-HTA7-CFP-HA,将 HTA6、HTA7 以及 AGO2 荧光表达载体 pEarleyGate104-YFP-AGO2 转入农杆菌中,选择阳性菌,摇菌,并和含有核定位信号(NLS)和 mcherry 荧光的 pCAM1300-NLS-mcherry 质粒农杆菌菌液共注射本氏烟叶片,其中 NLS 的主要作用为细胞核红色荧光标记.共注射 2 d 后,通过激光共聚焦显微镜观察荧光.实验结果显示,HTA6、HTA7 定位于细胞核中,且分别与 AGO2 在细胞核内有共定位(图 2).

### 2.4 HTA6、HTA7 与 AGO2 在细胞核内具有相互作用

为了进一步确定 HTA6、HTA7 与 AGO2 蛋白是否具有相互作用,本研究构建了 HTA6、HTA7 的 BiFC 表达载体 pSite-HTA6-cYFP、pSite-HTA7-cYFP,并通过农杆菌转化与 pSite-nYFP-AGO2、pCAM1300-NLS-mCherry 共注射本氏烟叶片.共注射 2 d 后,通过激光共聚焦显微镜观察荧光.实验结果显示,与 HTA6 和 GST 蛋白共注射的对照相比,HTA6 与 AGO2、HTA7 与 AGO2 可以产生互作荧光,且荧光定位于细胞核中(图 3),证明 HTA6、HTA7 分别与 AGO2 蛋白在细胞核内具有相互作用.



注: (a)为HTA6与AGO2蛋白的亚细胞定位; (b)为HTA7与AGO2蛋白的亚细胞定位. 其中, 蓝色荧光为HTA6-CFP、HTA7-CFP定位荧光, 绿色荧光为AGO2-YFP定位荧光, 红色荧光为核定位信号NLS-mCherry荧光. 比例尺=100  $\mu\text{m}$ .

图2 HTA6、HTA7与AGO2存在共定位  
Fig.2 HTA6 and HTA7 co-localize with AGO2

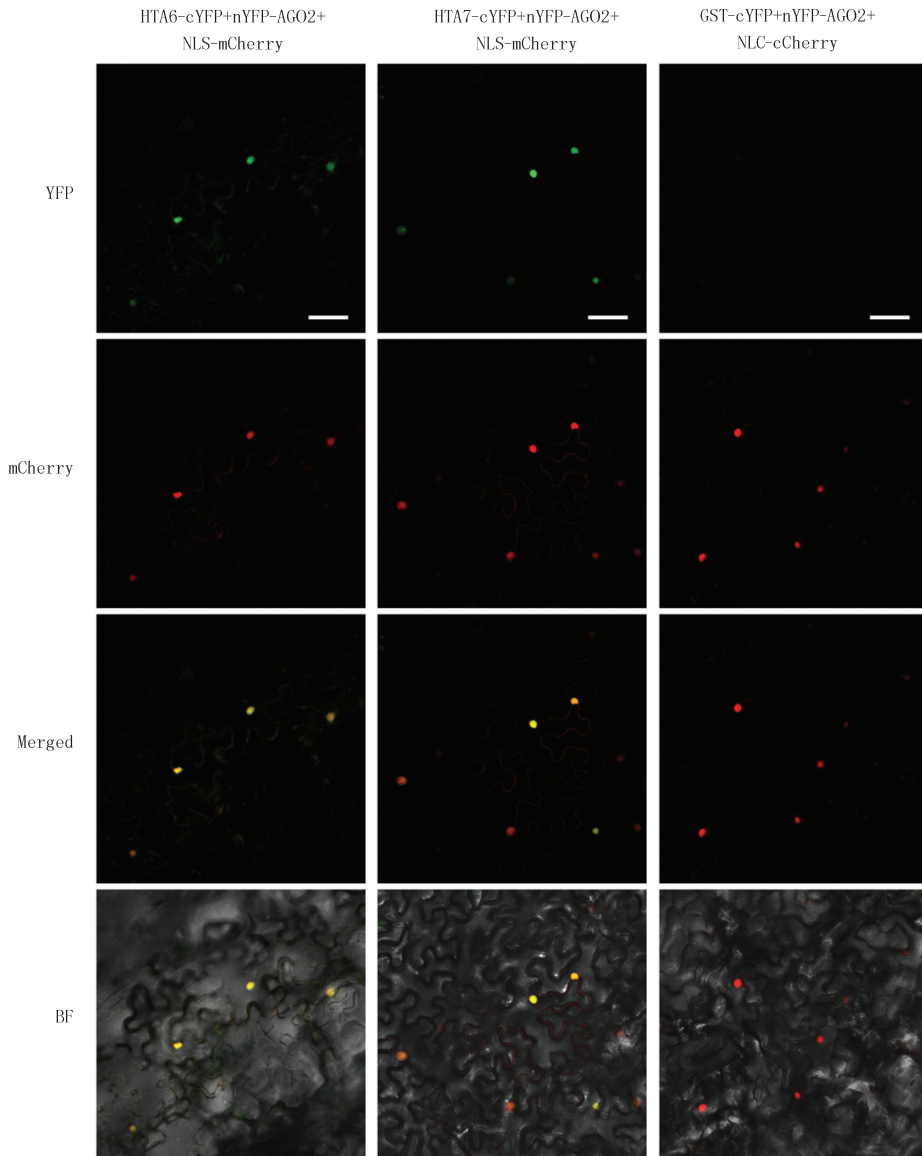
### 3 讨 论

不同类型的 H2A 变体会对染色质状态产生不同的影响<sup>[20]</sup>.组蛋白变体的沉积和排出决定了植物中染色质的功能状态.H2A.W 能够与染色质重塑因子(DDM1)相互作用,参与并影响异染色质的形成和 TE 沉默<sup>[21-22]</sup>.也与染色质的可及性以及 DNA 的甲基化相关<sup>[23]</sup>.DDM1 是 H2A.W 向中心外异染色质沉积所必需的<sup>[24]</sup>.异染色质序列优先需要 DDM1 进行 DNA 甲基化,这种偏好取决于 H1<sup>[25]</sup>.H1 通常富集于异染色质区域,是一种关键的染色质结构蛋白,它与核小体核心颗粒表面 DNA 的进入和退出位点结合,以稳定核小体结构并凝聚染色质<sup>[26]</sup>.H1 通过增强拟南芥基因组异染色质区域之间和内部的染色体间以及染色体内相互作用来促进异染色质凝聚<sup>[18]</sup>,通过从非 cg 甲基化的异染色质中排除 RdDM(RNA 介导的 DNA 甲基化)的 sRNA 生成分支,加强正染色质和异染色质 DNA 甲基化途径的分离<sup>[27]</sup>.

普遍认为,AGO 蛋白起源于宿主防御入侵核酸的防御系统<sup>[28]</sup>,其中,AGO2 可以富集在 BIG GRAIN3 (BG3)位点上,从而改变其组蛋白甲基化水平,促进 BG3 的表达,使植物的细胞分裂素表达水平发生变化,最终影响植株粒长和耐盐性<sup>[29]</sup>,同时,AGO2 蛋白也参与 DNA 损伤应答的过程中<sup>[30]</sup>.研究证明 AGO2 可以由细菌感染诱导,并对免疫起到正向调节作用<sup>[31]</sup>.在拟南芥中,作为 H2A.W 的同源蛋白的 HTA7 是 DNA 损伤应答所必需的<sup>[22-23]</sup>.本研究发现并证明了 H2A.W 家族蛋白 HTA6、HTA7 与 AGO2 蛋白的相互作用,表明 AGO2 蛋白可能在异染色质的形成、可及性等方面发挥重要功能.

本研究基于实验室现有的 AGO2 的 IP-MS 质谱文库找到了可能与其互作的蛋白 HTA6、HTA7,首先

通过亚细胞共定位实验证明了拟南芥 H2A.W 家族蛋白 HTA6、HTA7 与 AGO2 在细胞核中具有共定位, 并通过 BiFC 和 Co-IP 实验证明了 HTA6、HTA7 与 AGO2 蛋白之间存在的相互作用. 在拟南芥中首次证明了 AGO2 蛋白与组蛋白 H2A.W 家族蛋白 HTA6、HTA7 中的互作关系, 为后续研究 AGO2 与 H2A.W 家族蛋白之间的调控关系奠定了基础.



注: 双分子荧光互实验验证 HTA6 和 HTA7 与 AGO2 蛋白在细胞核内具有互作荧光, 其中, NLS-mcherry 为细胞核定位信号, 比例尺=100  $\mu\text{m}$ .

图3 HTA6、HTA7 分别与 AGO2 蛋白在细胞核内互作

Fig.3 HTA6 and HTA7 respectively interact with AGO2 in the nucleus

附录见电子版(DOI:10.16366/j.cnki.1000-2367.2024.02.21.0003).

### 参 考 文 献

- [1] KAWASHIMA T, LORKOVIČ J, NISHIHAMA R, et al. Diversification of histone H2A variants during plant evolution[J]. Trends in Plant Science, 2015, 20(7): 419-425.
- [2] XIE Y M, HU H X, LIU M T, et al. The role and mechanism of histone lactylation in health and diseases[J]. Frontiers in Genetics, 2022,

- 13:949252.
- [3] OSAKABE A, LORKOVIC Z J, KOBAYASHI W, et al. Histone H2A variants confer specific properties to nucleosomes and impact on chromatin accessibility[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(15):7675-7685.
- [4] YELAGANDULA R, STROUD H, HOLEC S, et al. The histone variant H2A.W defines heterochromatin and promotes chromatin condensation in *Arabidopsis*[J]. *Cell*, 2014, 158(1):98-109.
- [5] BOURGUET P, PICARD C L, YELAGANDULA R, et al. The histone variant H2A.W and linker histone H1 co-regulate heterochromatin accessibility and DNA methylation[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1):2683.
- [6] LORKOVIČ J, PARK C, GOISER M, et al. Compartmentalization of DNA damage response between heterochromatin and euchromatin is mediated by distinct H2A histone variants[J]. *Current Biology*, 2017, 27(8):1192-1199.
- [7] NARESH M, PURKAYASTHA A, DASGUPTA I. P4 protein of an Indian isolate of rice tungro bacilliform virus modulates gene silencing[J]. *Virus Genes*, 2024, 60(1):55-64.
- [8] IVANOV A A, GOLUBEVA T S, IVANOV A A, et al. Exogenous dsRNA-Induced silencing of the *Phytophthora infestans* elicitor genes *inf1* and *inf4* suppresses its pathogenicity on potato plants[J]. *Journal of Fungi*, 2023, 9(11):1100.
- [9] BERBATI M, KALDIS A, VOLOUDAKIS A. Efficient artificial microRNA-mediated resistance against zucchini yellow mosaic virus in zucchini via agroinfiltration[J]. *Journal of Virological Methods*, 2023, 321:114805.
- [10] JIN S J, ZHAN J, ZHOU Y Q. Argonaute proteins: structures and their endonuclease activity[J]. *Molecular Biology Reports*, 2021, 48(5):4837-4849.
- [11] LAW J A, JACOBSEN S E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(3):204-220.
- [12] MATZKE M A, MOSHER R A. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15(6):394-408.
- [13] WENDTE J M, PIKAARD C S. The RNAs of rna-directed DNA methylation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 2017, 1860(1):140-148.
- [14] VOLPE T, MARTIENSSEN R A. RNA interference and heterochromatin assembly[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2011, 3(9):a003731.
- [15] BRAUN T, KLEPZIG H, HERLING M. AGO2 in T-prolymphocytic leukemia: its canonical and non-canonical deregulation and function[J]. *Oncotarget*, 2023, 14:395-397.
- [16] ANDO S, JASKIEWICZ M, MOCHIZUKI S, et al. Priming for enhanced ARGONAUTE2 activation accompanies induced resistance to cucumber mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2021, 22(1):19-30.
- [17] LUDMAN M, SZALAI G, JANDA T, et al. Hierarchical contribution of Argonaute proteins to antiviral protection[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2023, 74(21):6760-6772.
- [18] WEI W, BA Z Q, GAO M, et al. A role for small RNAs in DNA double-strand break repair[J]. *Cell*, 2012, 149(1):101-112.
- [19] ZHANG X M, ZHAO H W, GAO S, et al. *Arabidopsis argonaute 2* regulates innate immunity via miRNA393-mediated silencing of a Golgi-localized SNARE gene, MEMB12[J]. *Molecular Cell*, 2011, 42(3):356-366.
- [20] JAMGE B, LORKOVIČ J, AXELSSON E, et al. Histone variants shape chromatin states in *Arabidopsis*[J]. *eLife*, 2023, 12:RP87714.
- [21] ZHOU J C, LEI X, SHAFIQ S, et al. DDM1-mediated R-loop resolution and H2A.Z exclusion facilitates heterochromatin formation in *Arabidopsis*[J]. *Science Advances*, 2023, 9(32):eadg2699.
- [22] AKINMUSOLA R Y, WILKINS C A, DOUGHTY J, et al. DDM1-mediated TE silencing in plants[J]. *Plants*, 2023, 12(3):437..
- [23] BOURGUET P, PICARD C L, YELAGANDULA R, et al. The histone variant H2A.W and linker histone H1 co-regulate heterochromatin accessibility and DNA methylation[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1):2683.
- [24] HE S B, YU Y M, WANG L, et al. Linker histone H1 drives heterochromatin condensation via phase separation in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2024, 36(5):1829-1843.
- [25] ZEMACH A, KIM M Y, HSIEH P H, et al. The *Arabidopsis* nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin[J]. *Cell*, 2013, 153(1):193-205.
- [26] HE S B, VICKERS M, ZHANG J Y, et al. Natural depletion of histone H1 in sex cells causes DNA demethylation, heterochromatin decondensation and transposon activation[J]. *eLife*, 2019, 8:e42530.
- [27] CHOI J, LYONS D B, ZILBERMAN D. Histone H1 prevents non-CG methylation-mediated small RNA biogenesis in *Arabidopsis* heterochromatin[J]. *eLife*, 2021, 10:e72676.
- [28] CERUTTI L, MIAN N, BATEMAN A. Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2000, 25(10):481-482.
- [29] YIN W C, XIAO Y H, NIU M, et al. ARGONAUTE2 enhances grain length and salt tolerance by activating BIG GRAIN3 to modulate cytokinin distribution in rice[J]. *The Plant Cell*, 2020, 32(7):2292-2306.

- [30] BANERJEE S, ROY S. An insight into understanding the coupling between homologous recombination mediated DNA repair and chromatin remodeling mechanisms in plant genome: an update[J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(18): 1760-1784.
- [31] HU P, ZHAO H W, ZHU P, et al. Dual regulation of Arabidopsis AGO2 by arginine methylation[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 844.
- [32] LORKOVIČ J, BERGER F. Heterochromatin and DNA damage repair: use different histone variants and relax[J]. *Nucleus*, 2017, 8(6): 583-588.
- [33] LORKOVIČ J, PARK C, GOISER M, et al. Compartmentalization of DNA damage response between heterochromatin and euchromatin is mediated by distinct H2A histone variants[J]. *Current Biology*, 2017, 27(8): 1192-1199.

## The interaction of histone H2A.W and AGO2 in *Arabidopsis thaliana*

Yang Xianguang<sup>1</sup>, Xu Longqian<sup>1,2</sup>, Liu Yang<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xixiang 453007, China; 2. Institute of Zoology; State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** Taking *Arabidopsis thaliana* AGO2 as the research object, through the immunoprecipitation-mass spectrometry (IP-MS) technique, HTA6 and HTA7 were found to potentially interact with AGO2 protein. Further studies on the localization and interaction relationship between H2A.W family proteins HTA6 and HTA7 and AGO2 protein were conducted using subcellular localization, bimolecular fluorescence complementation technology and co-immunoprecipitation (Co-IP) experiments. The results showed that HTA6, HTA7 and AGO2 were co-localized in the nucleus, and HTA6 and HTA7 respectively interacted with AGO2 in the nucleus. The *in vivo* Co-IP experiment further confirmed the interaction relationship among HTA6, HTA7 and AGO2, laying a foundation for subsequent research on the regulatory relationship between AGO2 protein and heterochromatin.

**Keywords:** histone; H2A; AGO2; interaction

[责任编辑 刘洋 赵晓华]

附录

表 S1 HTA6、HTA7、HTA12 基因克隆引物列表

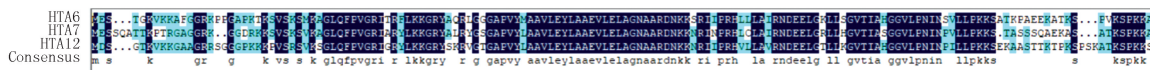
Tab. S1 List of HTA6, HTA7, HTA12 gene cloning primers

引物名称	引物序列	用途
HTA6-TOPO-F	CACCATGGAATCCACCGGAAAAGT	片段扩增
HTA6-no stop-R	AGCTTTCTTTGGAGACTTG	片段扩增
HTA7-TOPO-F	CACCATGGAGTCATCACAAGCAAC	片段扩增
HTA7-no stop-R	AGCCTTCTTAGGAGATTTG	片段扩增
HTA12-TOPO-F	CACCATGGATTCCGGAACCAAAGT	片段扩增
HTA12-no stop-R	AGATTTCTTAGGGGATTTG	片段扩增

表 S2 AGO2 互作蛋白的 IP-MS 分析

Tab. S2 The IP-MS of interacting protein of AGO2

Gene name	HA-AGO2 peptides	HA-AGO2 peptides matches	104EV peptides matches
H2AXA_ARATH	HIQLAVR	1	2
	AGLQFPVGR	4	3
	NKGDIGSASQEF	2	5
	LLGSVTIANGGVLPNIHQTLPSK	1	—
H2AV1_ARATH	HLQLAIR	1	1
	AGIQFPVGR	4	—
	GDEELDTLIK	1	—
	GTIAGGGVIPHIHK	2	1
H2A5_ARATH	AGLQFPVGR	4	—
	LLHGVTIASGGVLPNINPVLLPK	1	—
H2A7_ARATH	AGLQFPVGR	4	—
	LLSGVTIAHGGVLPNINSVLLPK	1	—
H2A4_ARATH	SGLQFPVGR	1	1
	NDEELGTLLK	1	—



图S1 HTA6、HTA7、HTA12序列对比图

Fig. S1 HTA6, HTA7, HTA12 sequence comparison