



## 研究报告

## 沉默里氏木霉组蛋白赖氨酸甲基转移酶基因对纤维素酶表达的影响

钟路遥<sup>△</sup> 余炜怡<sup>△</sup> 周娇娇 高云雨 邓嘉雯 田生礼<sup>\*</sup>

深圳大学生命科学与海洋学院 深圳市微生物基因工程重点实验室 广东 深圳 518060

**摘要:**【背景】里氏木霉(*Trichoderma reesei*)是一种比其他真菌小很多的多细胞真核微生物,在工业上受到广泛应用,而里氏木霉 QM9414 是目前研究最多基因产纤维素酶丰富的突变菌株。【目的】构建里氏木霉中组蛋白赖氨酸甲基化酶(Histone Lysine Methyltransferase)基因 *hkmt* 的 siRNA 沉默载体和过表达载体来降低或者增强 *hkmt* 在里氏木霉 QM9414 中的表达量,以分析其对里氏木霉纤维素代谢的调控作用。【方法】根据里氏木霉 *hkmt* 序列设计 siRNA 沉默片段并用反转录的方法获得过表达 *hkmt* 片段。将沉默片段和过表达片段克隆至里氏木霉组成型表达载体中,构建沉默 *hkmt* 的载体和过表达 *hkmt* 的载体,并将其转化里氏木霉 QM9414。通过荧光显微镜观察重组菌的菌丝生长情况,此外对各重组菌进行纤维素酶的滤纸酶活性(Filter Paper Enzyme Activity, FPA)和羧甲基纤维素钠酶活性(Carboxymethyl Cellulose Enzyme Activity, CMCA)的测试;利用荧光定量 PCR 的方法检测 *hkmt*、纤维素酶基因 *cbh1*、*egl1* 及木聚糖酶激活因子 *xyl1* 的表达量变化。【结果】通过使用荧光显微镜观察,发现沉默、过表达 *hkmt* 重组菌的菌丝形态均与出发菌株无明显差异。荧光定量 PCR 测定结果表明,沉默载体和过表达载体可以分别沉默和促进 *hkmt* 的表达。沉默 *hkmt* 重组菌株中 FPA 和 CMC 酶活力相比出发菌平均升高 2.5 倍。此外,纤维素酶相关基因和激活因子在沉默 *hkmt* 重组菌中的表达量均有所增加,但是在过表达 *hkmt* 重组菌株中以上相应指标均呈现相反的趋势。【结论】组蛋白赖氨酸甲基转移酶基因表达产物负调控里氏木霉产纤维素酶基因的表达,这为提高里氏木霉产纤维素酶水平提供了参考,并为里氏木霉产纤维素酶的表现遗传调控研究提供了新的证据。

**关键词:** 组蛋白赖氨酸甲基转移酶, siRNA, 纤维素酶活性, 里氏木霉

**Foundation items:** Shenzhen Science and Technology Basic Research Development Plan (ZYC201105130092A); National Key Research and Development Program of China (2018YFA0902500)

<sup>△</sup>These authors equally contributed to this work

**\*Corresponding author:** Tel: 86-755-26534149; E-mail: sltian@szu.edu.cn

**Received:** 10-09-2020; **Accepted:** 15-11-2020; **Published online:** 15-03-2021

**基金项目:** 深圳市科技基础研究发展规划(ZYC201105130092A); 国家重点研发计划(2018YFA0902500)

<sup>△</sup>对本文贡献相同

**\*通信作者:** Tel: 0755-26534149; E-mail: sltian@szu.edu.cn

**收稿日期:** 2020-09-10; **接受日期:** 2020-11-15; **网络首发日期:** 2021-03-15

## Effects of silencing histone lysine methyltransferase gene on cellulase expression in *Trichoderma reesei*

ZHONG Luyao<sup>△</sup> SHE Weiyi<sup>△</sup> ZHOU Jiaojiao GAO Yunyu DENG Jiawen  
TIAN Shengli\*

Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering, College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China

**Abstract: [Background]** The filamentous fungus *Trichoderma reesei* is a eukaryotic microorganism and smaller than any other multicellular, which is widely used in industry, and *T. reesei* QM9414 were one of the most abundant cellulase producing mutant. **[Objective]** In order to study cellulase activities and expression regulation in *T. reesei*, we constructed siRNA interfered vectors and overexpressed vectors to inhibit and enhance HKMT expression in *T. reesei* QM9414, respectively. **[Methods]** The siRNA interference fragment was designed according to the *hkmt* gene sequence of *T. reesei* and the overexpressed *hkmt* gene fragment was obtained by reverse transcription. The two fragments were cloned into the constitutive expression vector and the two vectors were transformed the protoplasm of *T. reesei* QM9414. The hyphae growth of the recombinant strains was observed through a fluorescence microscope. In addition, cellulase activities (CMC enzyme activity and filter paper enzyme activity) of recombinant strains were detected and related gene expressions were also detected by quantitative PCR. **[Results]** The mycelial morphology of the interfered and the overexpressed recombinant strains were not significantly different from the original strain. Quantitative PCR results showed that the interfered vector and the overexpressed vector can silence and promote the expression of *hkmt* gene, respectively. The enzyme activities of FPA and CMC in the interfered recombinant strains were increased by an average of 2.5 times compared with the original strain. In addition, the expression levels of cellulase-related genes and activators in interfered recombinant strains increased. However, the recombinant strains for overexpressing HKMT showed the opposite patterns in the genes' expression levels and enzymatic activities. **[Conclusion]** These findings indicate that HKMT in *T. reesei* is involved in the negative regulation of cellulase expression and production.

**Keywords:** histone lysine methyltransferase, siRNA, cellulase enzymatic activities, *Trichoderma reesei*

里氏木霉(*Trichoderma reesei*)是丝状真菌中能高效降解纤维素的典型代表,具有很高的工业利用价值。里氏木霉已完成基因组测序,其中里氏木霉 QM9414 是研究最多的突变菌株<sup>[1]</sup>。里氏木霉的纤维素酶由一个复杂的协同酶系统组成,该系统主要含有 3 个胞外酶:β-葡萄糖苷酶、外切葡聚糖酶和内切葡聚糖酶,它们能将纤维素转化为可利用的葡萄糖<sup>[2-3]</sup>。因此,在工业生产中广泛应用里氏木霉 QM9414 分泌大量水解酶的能力来转化葡萄糖。

在真菌中,RNA 干扰(RNAi)不仅可以有效地沉默基因表达,并且还具有同源重组率低的特点<sup>[4]</sup>。前人的研究多集中于纤维素酶的生产方面,Wang

等利用 RNAi 敲除康氏木霉中的碳分解代谢抑制剂来提高纤维素酶的产生<sup>[5]</sup>。Hayata 等通过敲除蓝状菌中 DNA 连接酶 IV 的同源物,从而促进菌株生产纤维素酶<sup>[6]</sup>。研究也发现将里氏木霉中甲基转移酶基因 *lae1* 突变后,*lae1* 突变体中 7 种纤维素酶完全丧失活性;相反地,增强 *lae1* 的表达则会显著提高纤维素酶基因转录水平;此外,研究还发现这一过程与纤维素酶调节因子木聚糖酶激活因子 *xyl1* 关系密切<sup>[7]</sup>。近几年的研究鉴定了几种影响纤维素酶活性的转录因子如 MHR1 和 RXE1。这些研究表明,嗜热果蝇的 MHR1 可以抑制纤维素酶和木聚糖酶的活性<sup>[8]</sup>,而 RXE1 与 *xyl1* 启动子较强的结合活性使纤维素酶基因表达增加<sup>[9]</sup>。

染色体结构的改变在真核基因转录调控中起着关键作用<sup>[10]</sup>。虽然里氏木霉纤维素酶降解纤维素的机理以及阻遏基因对纤维素酶活性的研究较为透彻,但纤维素酶表达在里氏木霉表观遗传中的机制仍处于探索阶段。组蛋白经甲基化、乙酰化、磷酸化和泛素化等表观遗传途径修饰可以直接影响核小体的结构或者成为 DNA 甲基化蛋白的结合位点<sup>[11]</sup>。组蛋白甲基化普遍存在于真菌、植物和动物中,组蛋白甲基化修饰通常发生在精氨酸和赖氨酸的侧链上,其中组蛋白赖氨酸甲基转移酶(HKMT)作用于 H3 和 H4 组蛋白赖氨酸残基。目前已经发现组蛋白 H3 第 9 赖氨酸甲基化(H3K9)可引发基因沉默<sup>[12]</sup>。前人研究发现, H3K9 甲基化是一个可遗传的表观遗传标记<sup>[13]</sup>,并且 H3K9 的正反馈回路可以保护表观遗传的等位基因<sup>[14]</sup>。然而,组蛋白甲基化在真菌中的作用以及 H3K9 对里氏木霉的影响尚不清楚。因此,为了提高纤维素酶在工业生产中的应用效率,从表观遗传方面来研究纤维素酶表达的调控机制是十分必要的。

本研究选择里氏木霉的组蛋白赖氨酸甲基转移酶作为研究对象,通过构建沉默和过表达 *hkmt* 的重组菌株来分别沉默和增强里氏木霉中 *hkmt* 的表达,研究 HKMT 对纤维素酶表达、活性和纤维素相关基因表达的影响,以期探究 HKMT 对纤维素酶基因的表达与调控网络的影响提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株及质粒

里氏木霉 QM9414, 美国模式菌种收藏中心(American Model Species Collection Center, ATCC); 大肠杆菌 *Escherichia coli* Top10F, Invitrogen 公司; pLXT 载体由本实验室构建(图 1), 含卡那霉素抗性基因 *kan<sup>r</sup>* 和在里氏木霉中表达的潮霉素抗性基因 *hph*。本实验将载体 *Afl* II 和 *Not* I 酶切位点中 *ZsGreen* 进行双酶切切除后, 分别连接 *hkmt* 过表达片段(923 bp)和沉默片段(60 bp)构成重组质粒。

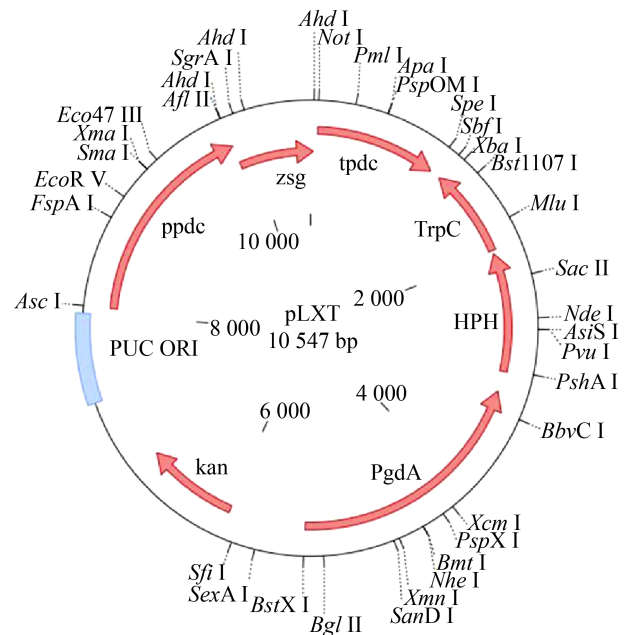


图 1 pLXT 质粒图谱

Figure 1 Map of pLXT vector

#### 1.1.2 培养基

*T. reesei* 液体基本培养基与里氏木霉产酶培养基的配制参考文献[15]。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

*T. premix Taq*<sup>TM</sup>, SYBR Premix Ex Taq, TaKaRa 公司; Plasmid Mini Kit, Gel Extraction Kit, Fungal DNA Maxi Kit, Omega 公司; 限制性核酸内切酶 *Afl* II、*Not* I、*Asc* I, Fermentas 公司; 卡那霉素与潮霉素, Invitrogen 公司; 溶壁酶, Sigma 公司; T4 DNA 连接酶, NEB 公司; 其他试剂, 生工生物工程(上海)股份有限公司。荧光定量 PCR 仪, Applied Biosystems 公司; 正置荧光显微镜, Olympus 公司。

#### 1.2 设计 siRNA 沉默 *hkmt* 序列以及过表达 *hkmt* 片段

根据 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上公布的 *hkmt* 的 ID 号(18482291), 并利用里氏木霉基因组网站(<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>)进行搜索。*hkmt* 全长 1 298 bp, 其中包含 4 个外显子及 3 个内含子, 位于 Scaffold 25 中 165 779–167 076 bp。依据 siRNA 靶序列在 mRNA 上的先后位置顺序, 将 3 条沉默片段依次命名为

HKMT-T1、HKMT-T3 和 HKMT-T5；再选择一条 siRNA 片段进行乱序处理后作为阴性对照,将其命名为 HKMT-Neg。将上述人工设计的沉默片段按照表 1 中的序列进行合成,中间使用 9 nt 核酸作为 Loop 连接单链 siRNA。由 Invitrogen 公司合成寡核苷酸链后用双蒸水将寡核苷酸链浓度定为 100 μmol/L,将对应的寡核苷酸序列退火后形成带有 *Afl* II 和 *Not* I 酶切位点的双链 shRNA 干扰片段。

在 NCBI 上同时也可获得 *hkmt* 的 mRNA 序列,其全长为 909 bp。运用 Primer Premier 软件设计引物,并在上、下游引物前分别加上 *Afl* II 和 *Not* I 酶切位点以及保护碱基,将其命名为 H3-F3/H3-R3,引物序列见表 2。

1.3 构建 pLXT-HKMT-siRNA 沉默载体和 pLXT-HKMT 过表达载体

将退火双链 shRNA 沉默片段 HKMT-T1、HKMT-T3、HKMT-T5、HKMT-NEG 以及过表达

HKMT 片段连接到用内切酶 *Afl* II 和 *Not* I 酶切后的 pLXT 载体中,将连接产物转化至大肠杆菌 Top10 感受态细胞,涂布至终浓度为 50 μg/mL 卡那霉素抗性的 LB 固体培养基上,37 °C 培养 12–16 h,对平板上长出的抗性菌落进行酶切鉴定和 DNA 测序,分别得到 4 种构建成功的含有不同沉默片段和含过表达片段的重组子,分别命名为 pHKMT-T1、pHKMT-T3、pHKMT-T5、pHKMT-Neg 和 pLXT-HKMT。

1.4 里氏木霉原生质体转化方法

参考 Penttilä 等<sup>[16]</sup>的实验方法制备里氏木霉原生质体。参考高云雨等<sup>[17]</sup>的转化、筛选方法进行实验,将 10 μg 质粒 DNA (pHKMT-T1、pHKMT-T3、pHKMT-T5、pHKMT-Neg 和 pLXT-HKMT)和 200 μL PEG Buffer 涂布至含潮霉素 B 的 PDA 平板,培养 2–3 d 以筛选重组菌株;用牙签挑取重组菌株接种至新的筛选培养基上,连续进行 6 代的筛选培养。

表 1 siRNA 作用于 HKMT 基因的靶序列  
Table 1 Sequences of siRNA targeting on HKMT gene

siRNA 名称 siRNA name	寡核苷酸序列 Sequence of oligonucleotide (5'→3')	产物大小 Product size (bp)
HKMT-T1-F	ttaagGCTGCCTGACGAAGAGAAATTCAAGAGATTTCTCTTCGTCAGGCAGCttttttgc	58
HKMT-T1-R	ggccgcataaaaaGCTGCCTGACGAAGAGAAATCTCTTGAATTTCTCTTCGTCAGGCAGCc	
HKMT-T3-F	ttaagCCAAGATGCTCAACTCCAATTCAAGAGATTGGAGTTGAGCATCTTGttttttgc	58
HKMT-T3-R	ggccgcataaaaaCCAAGATGCTCAACTCCAATCTCTTGAAATTGGAGTTGAGCATCTTGc	
HKMT-T5-F	ttaagGCAAGGACGTCTACCTCTTTTCAAGAGAAAGAGGTAGACGTCCTTGctttttgc	58
HKMT-T5-R	ggccgcataaaaaGCAAGGACGTCTACCTCTTTCTCTTGAAAAGAGGTAGACGTCCTTGc	
HKMT-Neg-F	ttaagCCATGATGTACCCTACCGTTTCAAGAGAACGGTAGGGTACATCATGttttttgc	58
HKMT-Neg-R	ggccgcataaaaaCCATGATGTACCCTACCGTTCTCTTGAAACGGTAGGGTACATCATGGc	

注: 下划线处为茎环  
Note: The single underlines are loops

表 2 PCR 扩增 *hkmt* 所用的引物  
Table 2 Primers used in PCR of *hkmt*

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'→3')
H3-F3	TCAC <u>TTAAG</u> CGTCACGAGACAGCACTTTTT
H3-R3	ATAAGAATGCGGCCGCCACAGATATCCCCTGCACTT

注: 下划线处为酶切位点  
Note: The single underlines are restriction sites

1.5 里氏木霉基因组 DNA 提取

参考高云雨等<sup>[17]</sup>的实验方法进行里氏木霉基因组 DNA 的提取, 经 PCR 鉴定确认沉默表达盒与过表达盒均完整插入到重组菌株的基因组后, 将重组菌株接种于里氏木霉液体基本培养基中, 28 °C、250 r/min 条件下培养 2 d; 在真空抽滤菌丝体并用液氮研磨后, 使用 Fungal DNA Maxi Kit 提取基因组 DNA。

1.6 RNA 提取

为了分析 siRNA 沉默片段对纤维素酶活力的影响, 将重组菌 *T. reesei*-HKMT-T1、*T. reesei*-HKMT-T3、*T. reesei*-HKMT-T5、*T. reesei*-HKMT-Neg、*T. reesei*-HKMT 和出发菌株 *T. reesei* QM9414 分别接种于 10 mL 基本培养基中, 参考张珂珂等的实验方法<sup>[18]</sup>, 对每个菌株分别做 3 个平行样品, 并提取 RNA。

1.7 RNA 反转录和荧光定量 PCR

参考高云雨等的反转录及荧光定量 PCR 方法进行实验, 实验中所需的引物见表 3<sup>[17]</sup>。

1.8 酶活测定

为了分析 siRNA 沉默 *hkmt* 和过表达 *hkmt* 对纤维素酶活力的影响, 参考张珂珂等<sup>[18]</sup>的酶活测定方法将重组菌 *T. reesei*-HKMT-T1、*T. reesei*-HKMT-T3、*T. reesei*-HKMT-T5、*T. reesei*-HKMT-

Neg、*T. reesei*-HKMT 和出发菌株 *T. reesei* QM9414 分别接种于 30 mL 基本培养基中, 取每个菌株的培养液做 3 个平行样品测定, 测定结果取平均值和标准差<sup>[18]</sup>。

2 结果与分析

2.1 沉默和过表达 *hkmt* 载体的构建与鉴定

用限制性内切酶鉴定 3 个 siRNA 沉默载体 pLXT-HKMT-T1、pLXT-HKMT-T3 和 pLXT-HKMT-T5 以及 1 个阴性对照 pLXT-HKMT-Neg (图 2)。4 个重组质粒经双酶切后均显示约 1 800 bp 的片段(理论大小为 1 855 bp) (泳道 5、7、9 和 11), 该片段包含部分启动子 Ppdc (1 795 bp)和 siRNA 寡核苷酸(60 bp)。pLXT 载体经 *Asc* I 单酶切后的片段约 1 700 bp (理论大小为 1 795 bp), 该片段为部分启动子 Ppdc 的大小(泳道 3)。根据电泳结果初步判断 4 条 siRNA 均连接到载体上, 进一步通过 DNA 测序结果表明, 60 bp 的沉默片段已插入到 pLXT 载体中, 表明成功构建 siRNA 沉默载体。

为了研究 *T. reesei* QM9414 中 *hkmt* 的功能, 通过反转录的方法从 *T. reesei* QM9414 中扩增出 *hkmt* 片段。该片段经 *Afl* II 和 *Not* I 双酶切后与 pLXT 载体相连, 获得 pLXT-HKMT 质粒, 通过限制性内切酶酶切和 DNA 测序鉴定质粒(图 3A、3B)。

表 3 荧光定量 PCR 所用引物<sup>[17]</sup>  
Table 3 Primers used in qPCR<sup>[17]</sup>

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	用途 Purpose
<i>sar1</i> -F	TGGATCGTCAACTGGTTCTACGA	Internal reference
<i>sar1</i> -R	GCATGTGTAGCAACGTGGTCTTT	
HKMT-F	CTTTCACATCGCCAACCA	HKMT qPCR
HKMT-R	TCCTTCTTCTTCATCTTCTTCTT	
<i>cbh1</i> -F	CCGAGCTTGGTAGTTACTCTG	<i>cbh1</i> qPCR
<i>cbh1</i> -R	GGTAGCCTTCTTGAAGTGAAGT	
<i>egl1</i> -F	CGGCTACAAAAGCTACTACG	<i>egl1</i> qPCR
<i>egl1</i> -R	CTGGTACTTGCGGGTGAT	
<i>xyl1</i> -F	CCCATTGCGCGGAGGATCAG	<i>xyl1</i> qPCR
<i>xyl1</i> -R	CGAATTCTATACAATGGGCACATGGG	

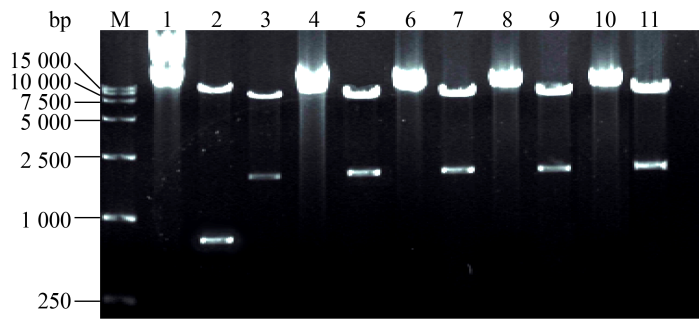


图 2 沉默 *hkmt* 载体 pLXT-siRNAs 的双酶切鉴定  
**Figure 2 Identification of silencing *hkmt* vector pLXT-siRNAs by double enzyme digestion**  
Note: M: DL10000 DNA Marker; 1: pLXT plasmid; 2: pLXT/*Not* I+*Afl* II; 3: pLXT vector/*Asc* I; 4: pLXT-HKMT-T1; 5: pLXT-HKMT-T1/*Not* I+*Asc* I; 6: pLXT-HKMT-T3; 7: pLXT-HKMT-T3/*Not* I+*Asc* I; 8: pLXT-HKMT-T5; 9: pLXT-HKMT-T5/*Not* I+*Asc* I; 10: pLXT-HKMT-Neg; 11: pLXT-HKMT-Neg/*Not* I+*Asc* I

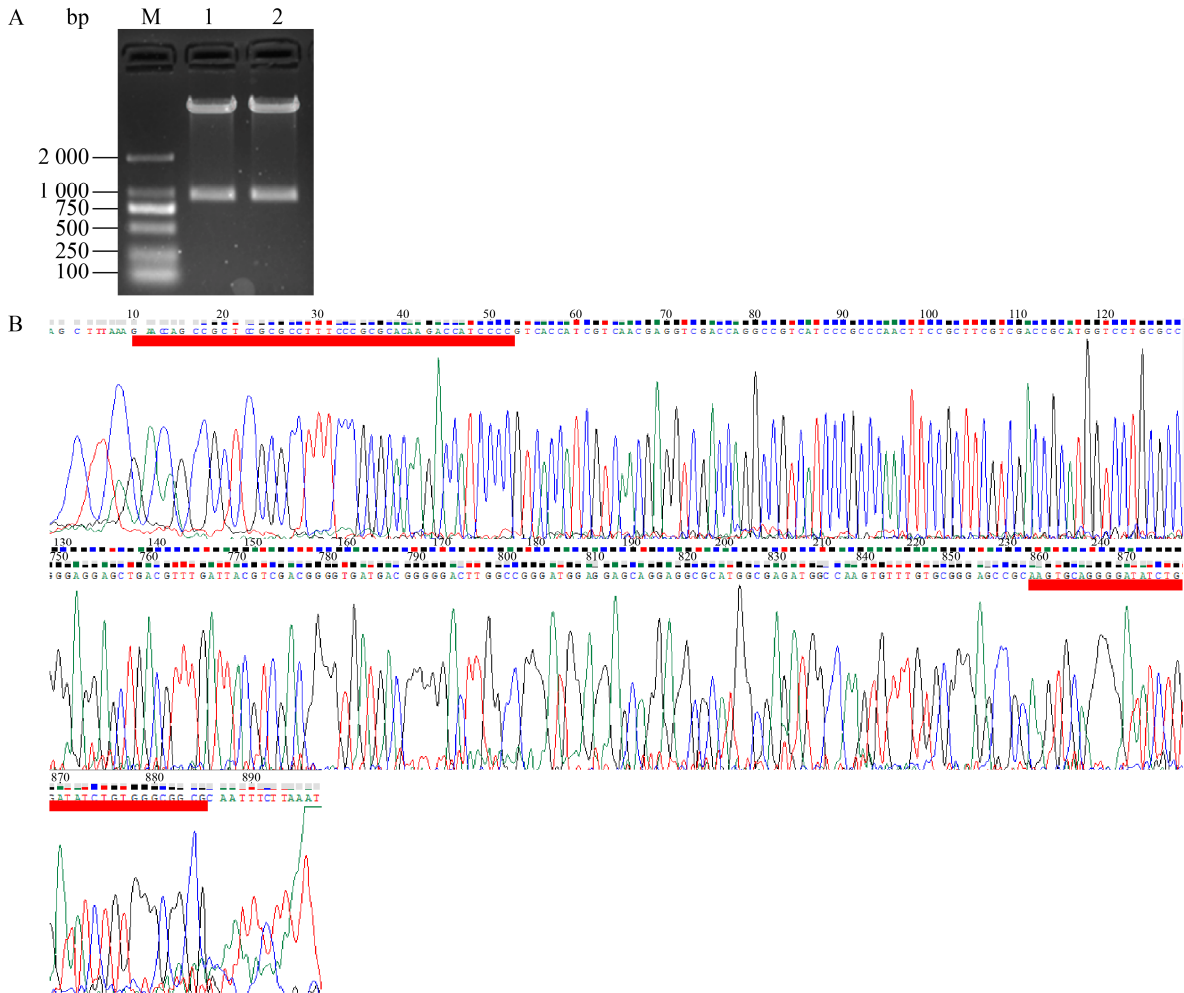


图 3 过表达载体 pLXT-HKMT 的双酶切鉴定、DNA 测序  
**Figure 3 Verification of *hkmt* expression vector pLXT-HKMT digested by endonuclease, DNA sequencing**  
注: A: M: DL2000 DNA Marker; 1: 过表达载体 pLXT-HKMT; 2: pLXT-HKMT/*Not* I+*Afl* II。B: pLXT-HKMT 中 *hkmt* 上、下游部分 DNA 测序(红色下划线处为 H3-F3/H3-R3 引物位置)  
Note: A: M: DL2000 DNA Marker; 1: pLXT-HKMT; 2: pLXT-HKMT/*Not* I+*Afl* II. B: The upstream and downstream partial DNA sequencing of the *hkmt* in the vector pLXT-HKMT (the primers were underlined with red)

## 2.2 沉默和过表达 *hkmt* 重组菌株的鉴定

将构建成功的沉默、过表达 5 个质粒转至 *T. reesei* QM9414 原生质体中,利用含有 100  $\mu\text{g/mL}$  潮霉素抗性的 PDA 平板进行筛选,同时也将 *T. reesei* QM9414 出发菌株按上述操作涂布于含 100  $\mu\text{g/mL}$  潮霉素抗性的平板中作为阴性对照,在 28  $^{\circ}\text{C}$ 、湿度为 37% 的恒温箱中培养 72 h。生长在潮霉素抗性平板上的沉默、过表达 *hkmt* 里氏木霉重组菌株的代谢产物在 PDA 平板上呈现亮黄色。

为了进一步鉴定 *hkmt* 沉默重组菌株中 siRNA 表达盒的完整性,将 4 种不同的沉默 *hkmt* 重组菌株接种到 20 mL 的基础培养基中,在 28  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培养 48 h 后提取基因组 DNA 并稀释成 100 ng/ $\mu\text{L}$  溶液。用 pLXT 载体通用引物 LXT-F (5'-CCTGCAA GTCTCCATCACAAG-3')和 LXT-R (5'-TTCATAG TCCATTGTCAGCA-3')对提取的基因组 DNA 进行 PCR<sup>[17]</sup>。结果如图 4A 所示,PCR 产物约 1 000 bp,与预期一致。PCR 产物的 DNA 测序结果与质粒测

序结果一致,表明 siRNA 表达盒已成功整合到 *T. reesei* QM9414 的基因组中。

鉴定过表达 *hkmt* 重组菌株时使用的载体通用引物 LXT-F/R 可扩增出大小约 1 800 bp 的条带,利用鉴定 *hkmt* 的特异性引物对 H3-F (5'-TCACTT AAGCGTCACGAGACAGCACTTTT-3')和 H3-R (5'-ATAAGAATGCGCCCCCTGCACTT-3')可扩增出大小为 1 000 bp 左右的条带,与预期相符(图 4B)。这些结果表明无论是沉默 *hkmt* 表达盒还是过表达 *hkmt* 表达盒均已成功整合到 *T. reesei* QM9414 基因组中。

## 2.3 沉默、过表达 *hkmt* 重组菌株的孢子和菌丝生长

将沉默 *hkmt* 重组菌株的孢子接种到 PDA 平板上培养 7 d,重组菌 *T. reesei*-HKMT-T1、*T. reesei*-HKMT-T3、*T. reesei*-HKMT-T5 在 PDA 平板上的孢子生长情况与出发菌株 *T. reesei* QM9414 和对照菌 *T. reesei*-HKMT-Neg 大致相同,培养 5 d 时可观

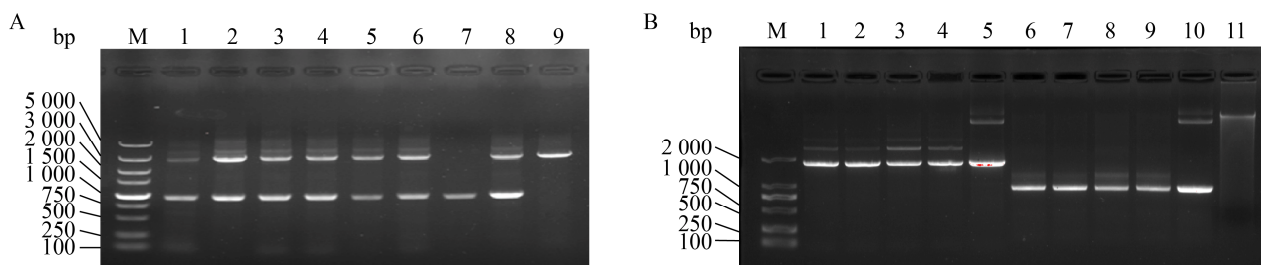


图 4 PCR 鉴定沉默和过表达 *hkmt* 重组菌株中 siRNA、*hkmt* 表达盒

**Figure 4 Identification of siRNA expression cassette in the *hkmt* silenced and overexpressed recombinant strains by PCR**  
注: A: 基因组 DNA 进行 PCR 扩增出 siRNA 表达盒; M: DL5000 DNA Marker; 1-8: 分别从重组菌 *T. reesei*-HKMT-T1-1、*T. reesei*-HKMT-T1-2、*T. reesei*-HKMT-T3-1、*T. reesei*-HKMT-T3-2、*T. reesei*-HKMT-T5-1、*T. reesei*-HKMT-T5-2、*T. reesei*-HKMT-Neg-1、*T. reesei*-HKMT-Neg-2 的基因组中扩增出来的 siRNA 沉默表达盒; 9: 从 *T. reesei* QM9414 扩增出的条带。B: 基因组 DNA 进行 PCR 扩增出 *hkmt* 表达盒; M: DL2000 DNA Marker; 1-4: 以 pLXT 载体通用测序引物扩增,依次为 4 个含 *hkmt* 表达盒的重组菌株和过表达质粒; 5: 以 pLXT 载体通用测序引物扩增,依次为 4 个含 *hkmt* 表达盒的重组菌株、过表达质粒和里氏木霉 QM9414 出发菌株基因组

Note: A: The siRNA expression cassette was amplified from the genomic DNA by PCR. M: DL5000 DNA Marker; 1-8: The products amplified for the siRNA expression cassette from the *hkmt* interfered recombinant strains *T. reesei*-HKMT-T1-1, *T. reesei*-HKMT-T1-2, *T. reesei*-HKMT-T3-1, *T. reesei*-HKMT-T3-2, *T. reesei*-HKMT-T5-1, *T. reesei*-HKMT-T5-2, *T. reesei*-HKMT-Neg-1 and *T. reesei*-HKMT-Neg-2 respectively by PCR; 9: The product amplified from *T. reesei* QM9414 by PCR. B: The *hkmt* gene expression cassette was amplified from the genomic DNA by PCR. M: DL2000 DNA Marker; 1-4: Products for *hkmt* expression cassette amplified from the *hkmt* overexpressed recombinant strains; 5: Product amplified from *hkmt* overexpressed plasmid pLXT-*hkmt* by PCR; 6-9: Products for *hkmt* amplified from the *hkmt* overexpressed recombinant strains by PCR; 10: Product amplified from *hkmt* overexpressed plasmid pLXT-*hkmt* by PCR; 11: Product amplified from the *T. reesei* QM9414 by PCR

观察到明显的绿色孢子(图 5A-5E)。将各重组菌的菌丝稀释 100 倍后置于荧光显微镜下观察,发现重组菌 *T. reesei*-HKMT-T1、*T. reesei*-HKMT-T3、*T. reesei*-HKMT-T5 的菌丝相较于 *T. reesei* QM9414 与 *T. reesei* QM9414 较为细长、密集,但变化不明

显(图 5F-5J)。

将过表达 *hkmt* 重组菌株在 PDA 平板上培养 2-5 d 并观察,过表达重组菌株与 *T. reesei* QM9414 产生孢子的速度方面无明显差异(图 6A-6H)。在荧光显微镜下观察培养 3 d 的表达重组菌株与 *T. reesei*

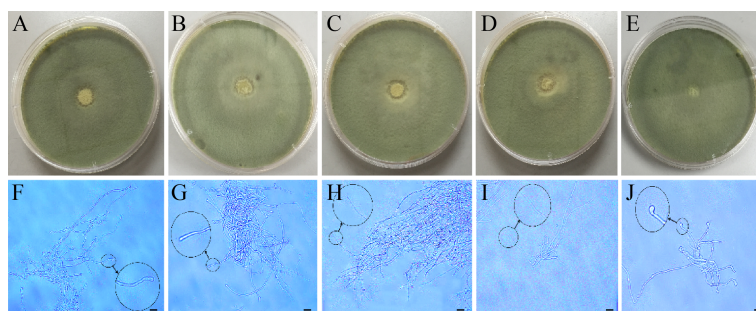


图 5 *hkmt* 沉默重组菌株在 PDA 平板上的孢子生长情况和荧光显微镜下菌丝形态

**Figure 5 The spores and morphology of hypha of the *hkmt* silenced recombinant strains on the PDA plates**

Note: A, F: *T. reesei*-HKMT-T1; B, G: *T. reesei*-HKMT-T3; C, H: *T. reesei*-HKMT-T5; D, I: *T. reesei*-HKMT-Neg; E, J: *T. reesei* QM9414. Scale bar: 20  $\mu$ m

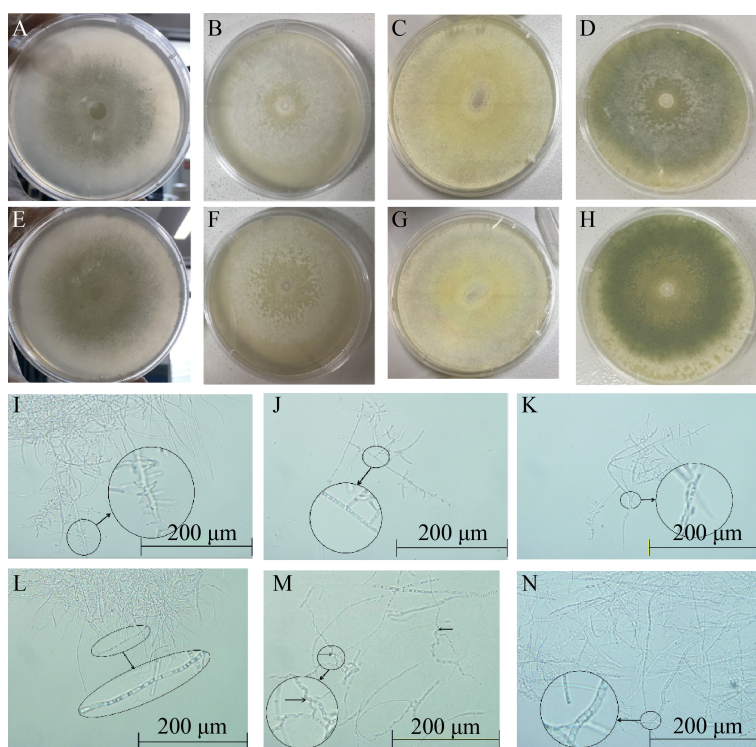


图 6 过表达 *hkmt* 重组菌株在 PDA 平板上的孢子生长情况和荧光显微镜下菌丝形态

**Figure 6 The spores and morphology of hypha of the *hkmt* overexpressed recombinant strains on the PDA plates**

注: 在 PDA 平板上生长 2、3、4 和 5 d 的 *T. reesei* QM9414 (A-D) 和过表达的 *hkmt* 重组菌株(E-H)的孢子生长情况; 在 PDA 平板上生长 3 d 的 *T. reesei* QM9414 (I-K) 和过表达 *hkmt* 重组菌株(L-N)的菌丝形态

Note: The spores of the *T. reesei* QM9414 (A-D) and the *hkmt* overexpressed recombinant strains (E-H) growing on PDA plates for 2, 3, 4 and 5 d respectively. The morphology of hypha of *T. reesei* QM9414 (I-K) and the *hkmt* overexpressed recombinant strains growing on PDA plates for 3 d respectively (L-N)

QM9414 的菌丝体, 结果发现, 与 *T. reesei* QM9414 相比, *T. reesei*-HKMT 的菌丝更短、更宽, 更容易在单个菌丝中产生“S”型弯曲(图 6I–6N)。上述结果说明沉默、过表达 HKMT 会轻微影响菌丝的表型变化。

## 2.4 沉默和过表达 *hkmt* 对纤维素酶活性的影响

利用测酶活方法滤纸酶活 (Filter Paper Enzyme Activity, FPA) 和羧甲基纤维素酶活 (Carboxymethyl Cellulose Enzyme Activity, CMCA) 对重组菌进行酶活性测定。FPA 以滤纸作为底物, 表示纤维素酶的 3 种水解酶(内切纤维素酶、外切纤维素酶、 $\beta$ -葡聚糖苷酶)共同作用后的总酶活性, 可反映里氏木霉纤维素酶活力的综合水平。CMC 以羧甲基纤维素钠为底物, 主要代表内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶的活力。

在沉默 *hkmt* 的重组菌中, 诱导培养第 2–4 天期间酶活性有显著的上升趋势, FPA 酶活与 CMC 酶活性均在 4 d 时达到顶峰, FPA 酶活的最高活性为 14 个单位, CMC 酶活最高可达 40 个单位; 随着培养时间的增加, 酶活性在 8 d 逐渐下降到最低值; 3 种沉默重组菌株 *T. reesei*-HKMT-T1、*T. reesei*-HKMT-T3 和 *T. reesei*-HKMT-T5 的 CMC 酶活是阴性对照菌株的 2–3 倍, 平均差异约为 20 个单位 ( $P < 0.001$ ), 而起始菌株和阴性对照菌株的酶活性趋势几乎相同(图 7A、7B)。在过表达 *hkmt* 重组菌株中, FPA 酶活和 CMC 酶活与原始菌株相比显著降低, 酶活性均在诱导培养至 4 d 时差异最大(图 7C、7D)。上述结果表明沉默 *hkmt* 的表达可以提高 FPA 和 CMC 酶活性, 反之则会抑制酶活性。

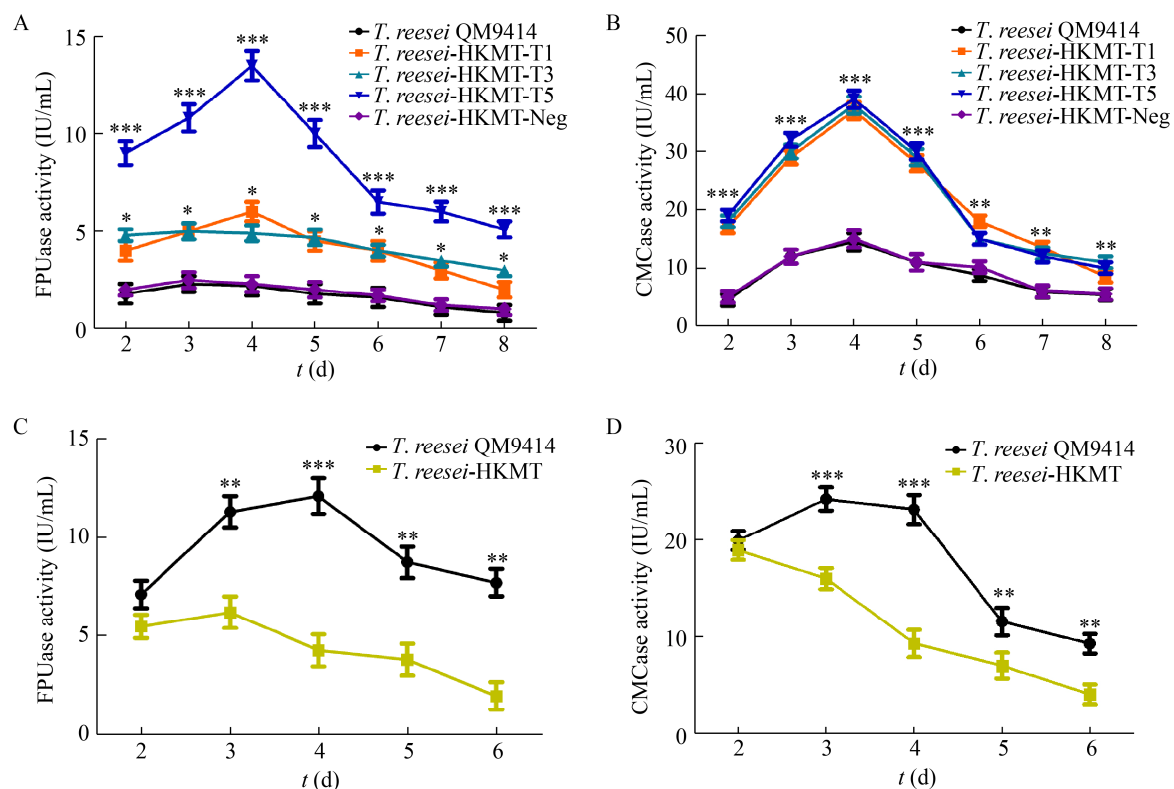


图 7 诱导培养基中沉默和过表达 *hkmt* 重组菌株 FPA 和 CMC 酶活性

Figure 7 FPA and CMCA of the *hkmt* silenced and overexpressed recombinant strains

注: A: 沉默 *hkmt* 重组菌 FPA 酶活性; B: 沉默 *hkmt* 重组菌 CMC 酶活性; C: 过表达 *hkmt* 重组菌 FPA 酶活性; D: 过表达 *hkmt* 重组菌 CMC 酶活性 ( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ ; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ )

Note: A and B: FPA and CMCA in the *hkmt* interfered recombinant strains respectively; C and D: FPA and CMCA in the *hkmt* overexpressed recombinant strains respectively ( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ ; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ )

## 2.5 沉默和过表达 *hkmt* 重组菌株中 *hkmt* 表达的 RT-qPCR 分析

通过反转录获得沉默和过表达 *hkmt* 重组菌的 cDNA, 稀释 10 倍作为荧光定量 PCR 模板。以 *T. reesei* QM9414 菌株中 *hkmt* 的表达量为 1, 并选择 *sar1* 作为内参基因进行校正, 研究各重组菌株在不同培养时间下 *hkmt* 的相对表达量。

在 *hkmt* 沉默重组菌株中检测诱导培养 72、96 h 时 *hkmt* 的相对表达量。96 h 时, 重组菌株 *T. reesei*-HKMT-T1、*T. reesei*-HKMT-T3、*T. reesei*-HKMT-T5 的 *hkmt* 相对表达量分别下降到了 *T. reesei* QM9414 表达量的 62%、58% 和 42%; 在 *T. reesei*-HKMT-Neg 中, *hkmt* 的相对表达量与起始菌株几乎相同(图 8A), 这些结果表明 siRNAs 显著沉默 *hkmt* 的表达。过表达 *hkmt* 在重组菌株诱导培养 24 h 时 *hkmt* 的相对表达量为出发菌株的 2.5 倍(图 8B), 这说明已成功在里氏木霉中过表达 *hkmt*。另外, 在诱导培养 96 h 时过表达重组菌株 *hkmt* 的相对表达量与原始菌株无明显差异(图 8B), 这可能是由于里氏木霉还存在其他调控机制以适应环境的变化。

## 2.6 RT-qPCR 检测纤维素酶基因 *cbh1*、*egl1* 和激活因子 *xyl1* 的表达水平

利用荧光定量 PCR 技术研究沉默和过表达 *hkmt* 对纤维素酶基因或其激活因子表达的影响, 使用表 3 所列引物 *cbh1*-F/*cbh1*-R、*egl1*-F/*egl1*-R、*xyl1*-F/*xyl1*-R 分析纤维素酶基因 *cbh1*、*egl1* 和木聚糖酶激活因子 *xyl1* 的相对表达水平。以原始菌株 *T. reesei* QM9414 作为参考菌株, 并将其基因表达水平设置为单位 1。

诱导培养 96 h 时, 与 *T. reesei* QM9414 相比, 沉默重组菌株 *T. reesei*-HKMT-T1、*T. reesei*-HKMT-T3 和 *T. reesei*-HKMT-T5 的 *xyl1* 表达量分别为其 231%、235% 和 349%, 而 *cbh1* 的基因表达量分别为其 321%、376% 和 524%, *egl1* 的表达量分别为其 392%、395% 和 489% (图 9A)。在过表达重组菌株中, 上述 3 个基因的表达水平均在培养 24 h 时降低, 其中 *xyl1* 只有原始菌株表达量的 47%, *cbh1*、*egl1* 也呈现出下降的趋势; 96 h 时, *cbh1*、*egl1* 的基因表达水平仍旧较原始菌株低, *cbh1* 表达水平降至原株的 1/5, *egl1* 表达水平也从

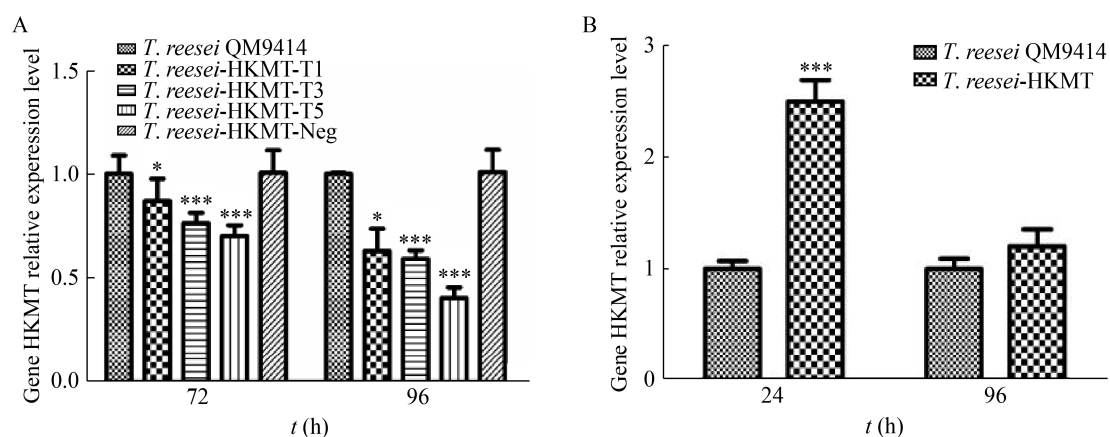


图 8 沉默和过表达 *hkmt* 重组菌株中 *hkmt* 的相对表达量

Figure 8 The *hkmt* relative expressions of silenced and overexpressed *hkmt* recombinant strains

注: A: 诱导培养 72 h 和 96 h 时 *hkmt* 沉默重组菌株中 *hkmt* 的相对表达量; B: 诱导培养 24 h 和 96 h 时过表达 *hkmt* 重组菌株中 *hkmt* 的相对表达量( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ,  $n=3$ ; \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ )

Note: A: The *hkmt* relative expressions in the *hkmt* interfered recombinant strains for induced culturing for 72 and 96 h respectively. B: The *hkmt* relative expressions in the *hkmt* overexpressed recombinant strains induced culturing for 24 and 96 h respectively ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ,  $n=3$ ; \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ )

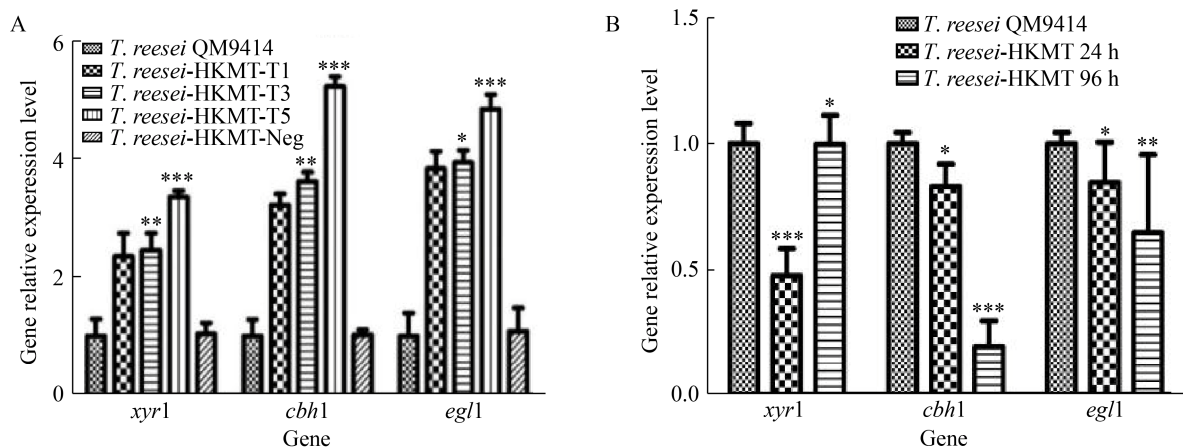


图9 纤维素酶基因和激活因子在沉默和过表达 *hkmt* 重组菌株中的相对表达量

**Figure 9** The relative expressions of cellulase genes and activator in the *hkmt* silenced and overexpressed recombinant strains

注: A: 培养 96 h *hkmt* 沉默重组菌株中纤维素酶基因和激活因子的相对表达量; B: 培养 24、96 h 过表达 *hkmt* 重组菌株中纤维素酶基因和激活因子的相对表达量 ( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ ; \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ )

Note: A: The relative expressions of cellulase genes and activator in the *hkmt* interfered recombinant strains for 96 h induced culturing; B: The relative expressions of cellulase genes and activator in the overexpressed *hkmt* recombinant strains for 24 and 96 h induced culturing ( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ ; \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ )

84%下降到64%, 但 $xyl1$ 表达量反而有所上升。上述结果表明, *hkmt* 过表达可显著降低纤维素酶基因 *cbh1*、*eg1* 和 *xyl1* 的表达(图 9B)。

### 3 讨论与结论

虽然里氏木霉能分泌大量纤维素酶并将其转化为葡萄糖,但是纤维素酶的合成受到多种因素的影响。例如当碳源充足时,里氏木霉分解抑制剂 CRE1、CRE2 和 CRE4 会抑制纤维素酶合成<sup>[19]</sup>。因此,本研究重点探究如何增强里氏木霉的纤维素酶活性,以提高里氏木霉纤维素酶在工业中将纤维素转化为葡萄糖的效率。

有研究表明,组蛋白甲基化既能抑制基因表达,又能促进基因表达。在灰霉菌中敲除 H3K9 甲基转移酶基因 *BcDIM5* 会降低分生孢子的菌丝生长速率和产量<sup>[20]</sup>。类似地,镰刀菌缺失 *FvDIM5* (赖氨酸组蛋白甲基转移酶)后有明显的表型缺陷<sup>[21]</sup>。在人体中,将 H3K9 去甲基化后能与 Sox2 共同维持软纤维蛋白基质细胞的生长<sup>[22]</sup>。使用正置荧光显微镜观察沉默重组菌株孢子的形态变化,虽然沉默重组菌株的菌丝体稍长,但与起始菌株的菌丝体

相比形态无明显差异。这表明沉默 *hkmt* 不会严重影响菌丝体的表型。这一结果与草酸青霉中缺失 *laeA* 后的表型变化和我们敲除 *hkmt* 的表型变化类似<sup>[18,23]</sup>。然而,在过表达的重组菌株中单个菌丝内部出现连续弯曲呈“S”的表型,这表明过表达 *hkmt* 可能与菌丝的生长发育相关。

在里氏木霉中有许多与纤维素酶相关的因子,其中 *xyl1* 是里氏木霉纤维素酶和半纤维素酶生产中重要的调节激活因子。*cbh1* 和 *eg1* 是参与里氏木霉纤维素降解、编码纤维素酶的重要基因<sup>[24]</sup>。根据 *cbh1*、*eg1*、*xyl1* 的 RT-qPCR 结果,我们发现 *xyl1* 是表达量变化最显著的基因,因此认为 *xyl1* 是调节纤维素酶活性的必需基因之一。另外,这 3 个基因的表达水平在过表达重组菌株中诱导 24 h 内如预期下降,但是在诱导培养 96 h 后 *xyl1* 的表达水平恢复至原始菌株表达水平,并非像 *cbh1* 和 *eg1* 一样继续保持降低的趋势。前人研究表明,转录激活剂 XRY1 在 *cbh1* 上游约 800 bp 处结合<sup>[25]</sup>。因此,我们更加相信 *xyl1* 表达量的变化会影响纤维素酶基因 *cbh1* 和 *eg1* 的表达量。值得注意的是,

诱导培养 96 h 时过表达重组菌株的 HKMT 表达量也恢复至起始菌株表达水平, 因此对 XYR1 没有明显的抑制作用, 这表明过表达 HKMT 通过抑制 XYR1 从而调节纤维素酶的活性。

有研究发现组蛋白 H3 甲基化可导致里氏木霉中基因的沉默<sup>[26]</sup>, 这与我们的实验数据一致, 表明沉默 HKMT 可以增加里氏木霉中纤维素酶的表达。综合上述结果, 沉默里氏木霉中 *hkmt* 可显著增加 *xyr1* 的表达, 从而促进纤维素酶相关基因 *cbh1* 和 *egl1* 的表达。结合我们的研究结果, 推测沉默里氏木霉组蛋白赖氨酸甲基转移酶基因的表达可能影响组蛋白的甲基化修饰, 这种表观修饰进而可提高纤维素酶基因及相关激活因子的表达, 促进纤维素酶活性的提高, 这也进一步证明了组蛋白甲基化修饰在里氏木霉表观遗传中具有重要的调控作用。

## REFERENCES

- [1] Diener SE, Chellappan MK, Mitchell TK, Dunn-Coleman N, Ward M, Dean RA. Insight into *Trichoderma reesei*'s genome content, organization and evolution revealed through BAC library characterization[J]. Fungal Genetics and Biology, 2004, 41(12): 1077-1087
  - [2] Okada H, Tada K, Sekiya T, Yokoyama K, Takahashi A, Tohda H, Kumagai H, Morikawa Y. Molecular characterization and heterologous expression of the gene encoding a low-molecular-mass endoglucanase from *Trichoderma reesei* QM9414[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(2): 555-563
  - [3] Okada H, Sekiya T, Yokoyama K, Tohda H, Kumagai H, Morikawa Y. Efficient secretion of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II in *Schizosaccharomyces pombe* and characterization of its products[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 49(3): 301-308
  - [4] Asada S, Watanabe S, Fujii T, Inoue H, Ishikawa K, Sawayama S. RNAi knockdown of potent sugar sensor in cellulase-producing fungus *Acremonium cellulolyticus*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(6): 3009-3015
  - [5] Wang SW, Liu G, Yu JT, Tian SL, Huang BQ, Xing M. RNA interference with carbon catabolite repression in *Trichoderma koningii* for enhancing cellulase production[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2013, 53(2): 104-109
  - [6] Hayata K, Asada S, Fujii T, Inoue H, Ishikawa K, Sawayama S. Gene targeting by RNAi-mediated knockdown of potent DNA ligase IV homologue in the cellulase-producing fungus *Talaromyces cellulolyticus*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 174(5): 1697-1704
  - [7] Seiboth B, Karimi RA, Phatale PA, Linke R, Hartl L, Sauer DG, Smith KM, Baker SE, Freitag M, Kubicek CP. The putative protein methyltransferase LAE1 controls cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*[J]. Molecular Microbiology, 2012, 84(6): 1150-1164
  - [8] Wang J, Gong YF, Zhao SM, Liu G. A new regulator of cellulase and xylanase in the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* strain ATCC 42464[J]. 3 Biotech, 2018, 8(3): 160
  - [9] Wang L, Lv XX, Cao YL, Zheng FL, Meng XF, Shen Y, Chen GJ, Liu WF, Zhang WX. A novel transcriptional regulator RXE1 modulates the essential transactivator XYR1 and cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(11): 4511-4523
  - [10] Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code[J]. Science, 2001, 293(5532): 1074-1080
  - [11] Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications[J]. Current Biology, 2004, 14(14): R546-R551
  - [12] Wang XY, Moazed D. DNA sequence-dependent epigenetic inheritance of gene silencing and histone H3K9 methylation[J]. Science, 2017, 356(6333): 88-91
  - [13] Audergon PNCB, Catania S, Kagansky A, Tong P, Shukla M, Pidoux AL, Allshire RC. Restricted epigenetic inheritance of H3K9 methylation[J]. Science, 2015, 348(6230): 132-135
  - [14] Yu R, Wang XY, Moazed D. Epigenetic inheritance mediated by coupling of RNAi and histone H3K9 methylation[J]. Nature, 2018, 558(7711): 615-619
  - [15] Deng JW, Gao YY, Liu XK, Zhang KK, Zhong LY, Tian SL. Cellulase activities and expression regulation by multiple targeted silencing carbon catabolic repressors in *Trichoderma reesei*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(4): 730-743 (in Chinese)
- 邓嘉雯, 高云雨, 刘旭坤, 张珂珂, 钟路遥, 田生礼. 多靶向沉默里氏木霉碳代谢阻遏物对纤维素酶活性和表达的调控研究[J]. 微生物学报, 2019, 59(4): 730-743
- [16] Penttilä M, Nevalainen H, Rättö M, Salminen E, Knowles J. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*[J]. Gene, 1987, 61(2): 155-164
  - [17] Gao YY, Zhong LY, Dong GY, She WY, Zhou JJ, Liu SY, Tian SL. *Trichoderma reesei* constitutive type of expression vector siRNA interfering *cre1* gene on cellulases expression regulation[J]. Journal of Microbiology, 2018, 38(1): 12-19 (in Chinese)
- 高云雨, 钟路遥, 董冠园, 余伟怡, 周娇娇, 刘思远, 田生礼. 里氏木霉组成型表达 siRNA 干扰 *cre1* 基因对纤维素酶表达的调控作用[J]. 微生物学杂志, 2018, 38(1): 12-19

- [18] Zhang KK, Zhou JJ, She WY, Gao YY, Deng JW, Xie N, Tian SL. Effects of knocking-out histone H3 lysine methyltransferase on cellulase expression in *Trichoderma reesei*[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2020, 36(2): 174-181 (in Chinese)  
张珂珂, 周娇娇, 余炜怡, 高云雨, 邓嘉雯, 谢宁, 田生礼. 敲除里氏木霉 *hkmt* 基因可增强纤维素酶的酶活性和表达水平[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2020, 36(2): 174-181
- [19] Hynes MJ, Kelly JM. Pleiotropic mutants of *Aspergillus nidulans* altered in carbon metabolism[J]. Molecular and General Genetics, 1977, 150(2): 193-204
- [20] Zhang XL, Liu XQ, Zhao YL, Cheng JS, Xie JT, Fu YP, Jiang DH, Chen T. Histone H3 lysine 9 methyltransferase DIM5 is required for the development and virulence of *Botrytis cinerea*[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1289
- [21] Gu Q, Ji TT, Sun X, Huang H, Zhang H, Lu X, Wu LM, Huo R, Wu HJ, Gao XW. Histone H3 lysine 9 methyltransferase FvDim5 regulates fungal development, pathogenicity and osmotic stress responses in *Fusarium verticillioides*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2017, 364(19): fnx184
- [22] Tan YH, Wood AR, Jia Q, Zhou WW, Luo JY, Yang F, Chen JW, Chen JJ, Sun J, Seong J, et al. Soft matrices downregulate FAK activity to promote growth of tumor-repopulating cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 483(1): 456-462
- [23] Li YN, Zheng XJ, Zhang XJ, Bao LF, Zhu YY, Qu YB, Zhao J, Qin YQ. The different roles of *Penicillium oxalicum* LaeA in the production of extracellular cellulase and  $\beta$ -xylosidase[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 2091
- [24] Seiboth B, Hakola S, Mach RL, Suominen PL, Kubicek CP. Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(17): 5318-5320
- [25] Furukawa T, Shida Y, Kitagami N, Mori K, Kato M, Kobayashi T, Okada H, Ogasawara W, Morikawa Y. Identification of specific binding sites for XYR1, a transcriptional activator of cellulolytic and xylanolytic genes in *Trichoderma reesei*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2009, 46(8): 564-574
- [26] Tachibana M, Ueda J, Fukuda M, Takeda N, Ohta T, Iwanari H, Sakihama T, Kodama T, Hamakubo T, Shinkai Y. Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9[J]. Genes and Development, 2005, 19(7): 815-826