

復旦大學

本科毕业论文（设计）



论文题目：墨西哥钝口螈再生芽基单细胞组学联合实验方法优化

姓 名： 王宇晗 学 号： 21300700015

院 系： 复旦大学生命科学学院

专 业： 生物科学（强基计划）

指导教师： 于淼 职 称： 青年研究员

单 位： 复旦大学

完成日期： 2025 年 5 月 11 日

墨西哥钝口螈再生芽基单细胞组学 联合实验方法优化

完成人

王宇晗

指导小组成员

于淼 青年研究员

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
一、前 言.....	1
1.1 墨西哥钝口螈是再生生物学研究的经典模型.....	1
1.2 墨西哥钝口螈肢体再生过程部分依赖表观遗传调控.....	2
1.3 Paired-Tag 可联合分析单细胞转录组与组蛋白修饰.....	3
二、材料与方法.....	5
2.1 材料.....	5
2.1.1 墨西哥钝口螈.....	5
2.1.2 试剂.....	5
2.1.3 实验仪器.....	6
2.2 常用溶液配方.....	7
2.3 实验方法.....	12
2.3.1 组织消化.....	12
2.3.2 CUT&Tag 文库制备与测序	13
2.3.3 CUT&Tag 数据处理	15
2.3.4 Pseudobulk Paired-Tag 文库制备	16
三、研究结果.....	19
3.1 墨西哥钝口螈肢体及再生芽基消化条件的探索.....	19
3.2 墨西哥钝口螈再生芽基的 CUT&Tag 实验	21
3.2.1 墨西哥钝口螈再生芽基的 CUT&Tag 文库构建	21

3.2.2 CUT&Tag 数据分析	22
3.2.3 墨西哥钝口螈再生芽基的 pseudobulk Paired-Tag 实验	27
四、讨 论.....	29
参考文献.....	30
致 谢.....	32

摘要

墨西哥钝口螈 (*Ambystoma mexicanum*) 能再生完整的肢体,这一过程需要特定的表观遗传机制来指导细胞重新分化并形成正确的空间结构。已有研究表明,组蛋白修饰 H3K27me3 通过维持成纤维细胞“位置信息”抑制异常分化,而 H3K4me3 则通过激活再生相关基因促进再生进程。为探索再生过程中组蛋白修饰与基因表达的协同机制,本课题尝试对已发表的单细胞联合组学实验方法 Paired-Tag 进行优化,使其适用于墨西哥钝口螈的肢体再生研究。我们首先优化了对于再生芽基的消化条件,在保证细胞活性的同时,提高了细胞核的提取产量。随后,我们尝试利用提取的细胞核进行了 CUT&Tag 实验并获取了较高质量的文库,说明了该提核方法能够用于组蛋白修饰的检测。最后,我们测试了细胞核对 pseudobulk Paired-Tag 流程的耐受性,结果显示在经过完整流程处理后细胞核仍然保持形态完整,边界清晰,可用于文库构建。pseudobulk Paired-Tag 测序结果显示,RNA 文库标签连接效率良好,有效读段比例较高,具备下游分析价值;但 DNA 文库标签连接效率偏低,提示仍尚需在投入细胞数、pA-Tn5 酶浓度等方面进一步优化。本研究为后续解析墨西哥钝口螈肢体再生中的表观遗传调控机制奠定了方法学基础。

关键词: 墨西哥钝口螈, 再生, 单细胞组学, 实验方法优化

Abstract

The Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*) possesses the remarkable ability to regenerate complete limbs, a process that requires specific epigenetic mechanisms to guide cellular reprogramming and the re-establishment of correct spatial patterning. Previous studies have demonstrated that histone modifications such as H3K27me3 suppresses aberrant differentiation by preserving the positional identity of fibroblasts, while the H3K4me3 facilitates regeneration by activating regeneration-associated genes. To investigate the coordinated mechanisms between histone modifications and gene expression during regeneration, this study aimed to optimize the published single-cell multi-omics method Paired-Tag for its application in the regenerating blastema of *A. mexicanum*. We first optimized the tissue digestion conditions for the blastema to improve nuclear yield while maintaining cell viability. Using the extracted nuclei, we performed CUT&Tag experiments and successfully obtained high-quality libraries, indicating the feasibility of this nuclear extraction protocol for histone modification profiling. Subsequently, we assessed the tolerance of axolotl nuclei to the multi-step high-intensity processing involved in pseudobulk Paired-Tag. The nuclei retained intact morphology and clear boundaries throughout the process, supporting the continuation of library construction. Sequencing results from the pseudobulk Paired-Tag libraries showed that the RNA component exhibited adequate barcode ligation and a relatively high proportion of useful reads, indicating its suitability for downstream analysis. In contrast, the DNA component showed low barcode ligation efficiency and mapping rates, suggesting the need for further optimization in aspects such as cell input and pA-Tn5 enzyme concentration. Overall, this study establishes a methodological foundation for future investigations into the epigenetic regulation underlying limb regeneration in *Ambystoma mexicanum*.

Keywords : *Ambystoma mexicanum*, Regeneration, Single-cell omics, Method optimization

一、前言

1.1 墨西哥钝口螈是再生生物学研究的经典模型

再生可帮助多细胞生物体在自身损伤后恢复功能，而再生能力因物种、器官和损伤情况而异^[1]。墨西哥钝口螈 (*Ambystoma mexicanum*) 是脊椎动物中再生能力最强的物种之一，能够再生多种复杂组织，如四肢、心脏、尾、大脑、晶状体和脊髓^[2-5]。因此，它成为研究脊椎动物再生、比较基因组学和进化的理想模型^[6]。

针对墨西哥钝口螈肢体再生的研究最为充分。该过程主要分为三个阶段：伤口愈合、芽基 (blastema) 形成、肢体再发育 (图 1)。受伤后，邻近的上皮细胞迅速覆盖暴露区域，形成伤口表皮 (wound epidermis, WE)^[7]；在 WE 下方，多种祖细胞聚集并形成芽基^[8]。芽基具有极强的再生能力，可以在后续再生过程中重新分化、增殖并形成新的肢体，许多参与四肢发育的基因在再生过程中会再度表达^[9]。该过程伴随着复杂的细胞状态转变和基因表达重编程。

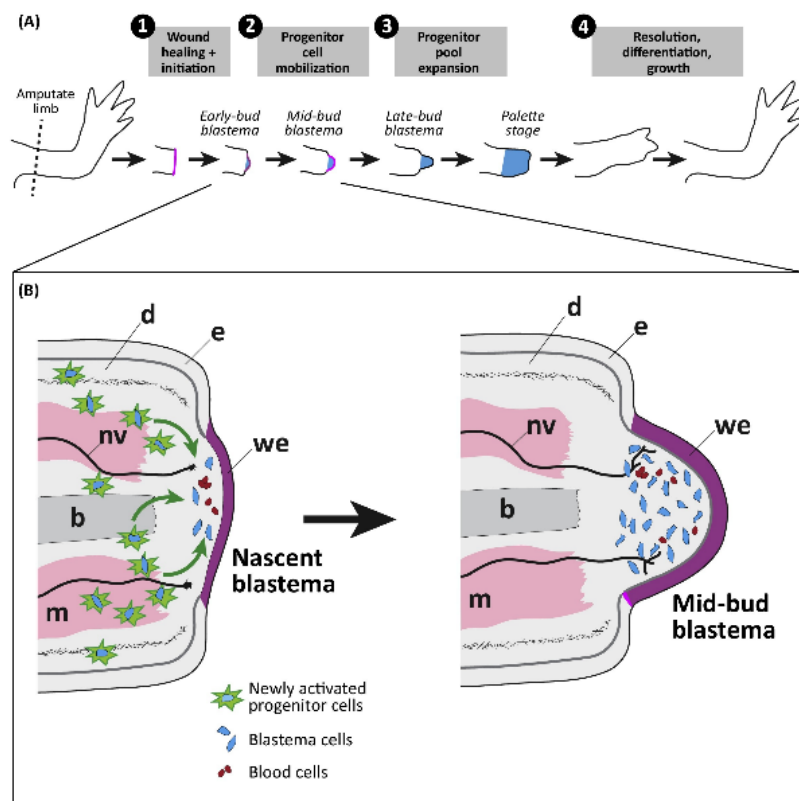


图 1 墨西哥钝口螈的肢体再生过程^[9]

(A) 从截肢到完全再生过程的四个阶段。包括伤口愈合与再生机制的启动，祖细胞动员、祖细胞扩增，初始再生反应的消退与细胞的再分化；(B) 详细展示再生早期芽基结构。新激活的祖细胞将被重新诱导进入细胞周期，部分回迁移到伤口表皮正下方（用箭头指出），并增殖产生未来的芽基细胞。其余结构：表皮 (e)、伤口表皮 (we)、真皮 (d)、骨骼 (b)、肌肉 (m)、神经 (nv)

1.2 墨西哥钝口螈肢体再生过程部分依赖表观遗传调控

尽管墨西哥钝口螈的再生过程涉及复杂的调控机制，但其再生组织能够精确重建原有的细胞类型组成和空间分布模式。先前研究显示，该过程部分依赖于结缔组织细胞的特定身份，称为“位置信息”^[10]。位置信息不仅存在于各个肢体节段（如上肢、下肢及手足），还体现在前后轴（拇指至小指）和背腹轴（手掌至手背）等空间维度中^[11]。不同位置来源的成纤维细胞保留稳定的位置信息，依赖特定同源域转录因子的调控网络，限制跨节段分化，从而精确引导组织再生。

有研究证实，上述调控机制部分由抑制性的组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸三甲基化 (Histone H3 Lysine 27 trimethylation, H3K27me3) 介导 (图 2)。该标记在不同肢节的成纤维细胞中呈现特异性分布，并与相应同源异型盒基因 (homeobox genes, *Hox*) 的沉默状态密切相关。之后，一系列信号促进芽基细胞的生长和模式形成，进一步完成肢体再生。

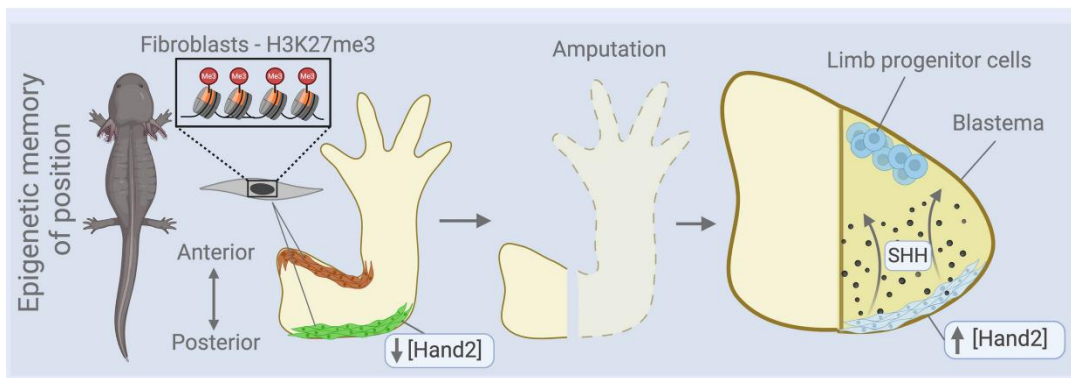


图 2 墨西哥钝口螈肢体的有序再生部分依赖表观遗传调控^[1]

成纤维细胞的表观遗传记忆部分源于不同肢体节段的成纤维细胞中的抑制性组蛋白标记 H3K27me3。芽基内的后部成纤维细胞表达了转录因子 Hand2，该转录因子启动 SHH 信号向位于前肢的祖细胞传递，引导再生的正确进行

除了 H3K27me3，激活性的组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸三甲基化(Histone

H3 Lysine 4 trimethylation, H3K4me3) 也与再生过程相关。有研究报道, 在特定的发育阶段或再生微环境中, 某些基因启动子区域会同时携带 H3K4me3 和 H3K27me3 修饰, 形成“双价染色质标记” (bivalent chromatin mark), 使得相关基因处于“预激活”但暂时沉默的状态^[12]。该表观遗传机制有助于维持细胞可塑性, 还可在接收到外部信号后迅速激活再生相关基因表达^[13]。因此, 本研究聚焦于 H3K27me3 和 H3K4me3, 旨在初步解析墨西哥钝口螈肢体再生过程中的表观调控机制。

目前, 我们对 H3K27me3 和 H3K4me3 在墨西哥钝口螈肢体再生中的作用已有初步认识, 但对其他组蛋白修饰仍缺乏系统性研究, 且目前尚无任何组蛋白修饰的单细胞分辨率数据。因此, 迫切需要应用先进的单细胞组蛋白修饰分析技术, 结合转录组数据, 鉴定不同细胞谱系中组蛋白标记相关的潜在调控元件, 从而为解析墨西哥钝口螈肢体再生中的细胞谱系调控机制提供理论基础。

1.3 Paired-Tag 可联合分析单细胞转录组与组蛋白修饰

基于靶向转座酶标记测序的单细胞 RNA 表达与 DNA 平行分析技术 (Parallel analysis of individual cells for RNA expression and DNA from targeted tagmentation by sequencing, Paired-Tag) 是一种可联合分析组蛋白修饰和转录组的单细胞多组学技术。该技术由任兵课题组在 2021 年发表于 *Nature Methods* 的文章中介绍^[14]。

Paired-Tag 主要由以下步骤组成 (图 3): 首先将提取出的细胞核与特定组蛋白修饰抗体孵育; 随后使蛋白 A 融合的 Tn5 转座酶与染色质结合, 依次进行标记与逆转录, 并添加样品条形码; 接着在 96 孔板中, 将独特的 DNA 条形码顺序连接到染色质 DNA 片段的 5'端和逆转录产生的互补 DNA (cDNA) 上, 引入第二和第三轮条形码。之后将条形码标记的细胞核分裂成子库并裂解, 提取和纯化染色质 DNA 和 cDNA; 最后扩增并分成两个测序文库, 分别用于染色质 DNA 测序和 cDNA 测序^[14]。对测序数据进行分析, 可以得到转录组和组蛋白修饰的高质量单细胞联合图谱^[15]。

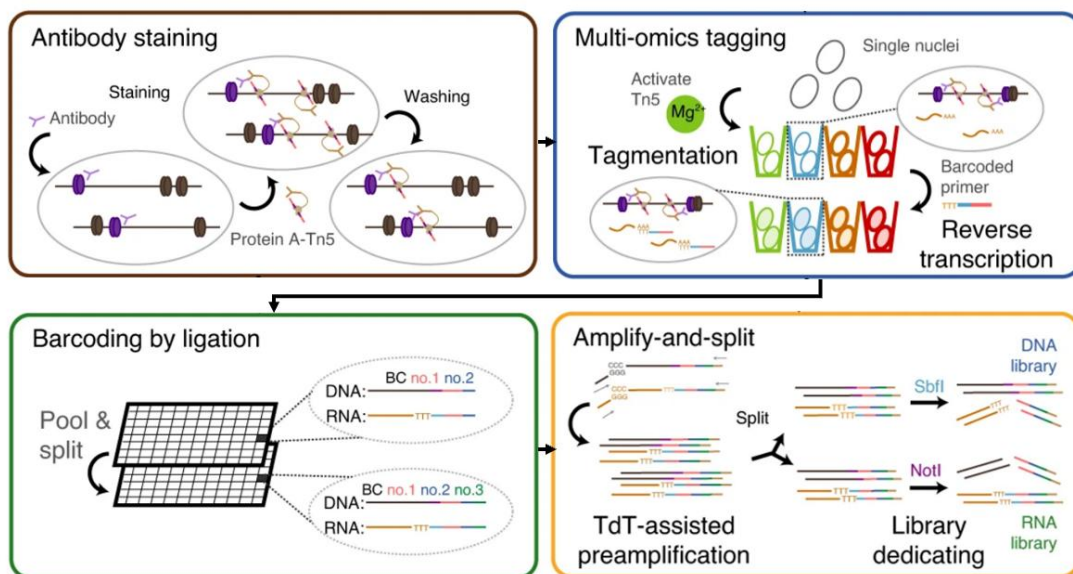


图 3 Paired-Tag 技术工作流程^[14]

尽管 Paired-Tag 技术具有高通量、低成本及多组学整合等优势，但其依赖组合索引 (split-and-pool) 方式对单个细胞核进行条形码标记，实验步骤相对繁琐，总体处理时间较长，且对细胞核的完整性要求较高。为将 Paired-Tag 技术应用于再生研究，我们首先需要确认墨西哥钝口螈细胞核能否耐受该技术涉及的多步骤处理。为此，我们优化了组织消化与细胞核提取条件，并开展 bulk CUT&Tag 预实验。我们成功绘制了再生组织中两种关键组蛋白修饰 (H3K27me3, H3K4me3) 的 CUT&Tag 图谱，明确了其在转录起始区附近的分布特征与共修饰模式。本研究为后续使用完整 Paired-Tag 流程解析墨西哥钝口螈肢体再生过程，提供了理论基础与技术支持。

二、材料与方法

2.1 材料

2.1.1 墨西哥钝口螈

研究中组织消化条件探索使用墨西哥钝口螈幼体，鼻至尾长度 7~13 cm，a/a 品系（黄色）和 d/d 品系（白色）均有；CUT&Tag 实验使用墨西哥钝口螈（幼体，鼻至尾长度约 12 cm）的 a/a 品系。实验动物饲养在新鲜脱氯自来水中，水温保持 18~20°C。

2.1.2 试剂

表 1 实验试剂来源

试剂名称	购买来源	货号
苯佐卡因 (Benzocaine)	Sigma-Aldrich	E1501
PBS 缓冲液 (Phosphate Buffered Solution, PBS)	Biosharp	BL302A
牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)	New England Biolabs	B9200
青霉素-链霉素 (Penicillin-Streptomycin)	Thermo Fisher Scientific	15140122
TrypEL 重组胰蛋白酶 (TrypEL Express Enzyme)	Thermo Fisher Scientific	12605028
分散酶 (Dispase)	上海源叶生物科技有限公司	S10013
Liberase	Sigma	TM 5401119001
台盼蓝溶液 (Trypan blue solution)	Thermo Fisher Scientific	15250061
IGEPAL CA-630	Sigma	18896
蛋白酶抑制剂 (Protease Inhibitor)	Roche	5056489001
pA-Tn5 转座酶 (Protein A-Tn5 Transposome)	ABclonal	RM21303
退火缓冲液 (Annealing Buffer)	Vazyme	S603-01
毛地黄皂苷 (Digitonin)	Sigma	D141
二甲基亚砷 (Dimethyl sulfoxide, DMSO)	Sigma	D8418
亚精胺 (Spermidine)	Sigma	85558
4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-Ethane Sulfonic Acid, HEPES)	Invitrogen	15630106
1M 丁酸钠 (Sodium Butyrate)	生工 Sangon Biotech	A510838-0005
H3K27me3 抗体 (Anti-Histone H3 trimethylated at lysine 27 antibody)	Abcam	ab195477
H3K4me3 抗体 (Anti-Histone H3	Cell Signaling Technology	9751S

trimethylated at lysine 4 antibody)		
MgCl ₂	Sigma	63069
EDTA	Invitrogen	AM9261
10% SDS	Invitrogen	15553-035
ProteaseK	Invitrogen	EO0491
NaCl (5 M)	Invitrogen	AM9759
DNA 提取液 (Tris-饱和酚:氯仿:异戊醇 = 25:24:1 (v/v/v) , pH>7.8)	索莱宝	P1012
三氯甲烷	国药沪试	10006818
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	10009228
SUPERase IN	Invitrogen	AM2694
RNase OUT	Invitrogen	10777-019
Maxima H-Reverse Transcriptase	Invitrogen	EP0751
TritonX-100	Sigma	T9823
10×NEBuffer3.1	New England Biolabs	B6003S
T4 DNA Ligase 和 10×T4 Buffer	New England Biolabs	M0569S
dNTP	New England Biolabs	N0447S
TdT 和 10× TdT Buffer	New England Biolabs	M0315S
2× KAPA Taq ReadyMix	Sigma	KK1006
10×rCutSmart Buffer	New England Biolabs	B6004S
i5/i7 index primer	NextEra	53155
Q5 DNA Polymerase	New England Biolabs	M0491
Q5 High-Fidelity 2X Master Mix	New England Biolabs	M0492S
VAHTS 磁珠 (VAHTS DNA Clean Beads)	Vazyme	N411-01
链霉亲和素磁珠 (Dynabeads MyOne Streptavidin C1)	Thermo Fisher Scientific	65002
Tween 20	Sigma	93773
SbfI 高保真限制性内切酶 (SbfI High-Fidelity restriction enzymes, SbfI-HF)	New England Biolabs	R3642
FokI	New England Biolabs	R0109S
NotI 高保真限制性内切酶 (NotI High-Fidelity restriction enzymes, NotI-HF)	New England Biolabs	R3189
DNA Clean & Concentrator-5	Zymo	D4014
5×DNA Tag Buffer	ABclonal	RM20250

2.1.3 实验仪器

表 2 实验仪器来源

仪器名称	购买来源
ThermoMixer C	Eppendorf
TC20 automated cell counter	Bio-Rad
血细胞计数板	Improved Neubauer CHINA
T100 PCR 仪	Bio-Rad

NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific
Qubit 4 Fluorometer	Invitrogen
Centrifuge 5424 R	Eppendorf
Centrifuge 5810 R	Eppendorf
Centrifuge 5425	Eppendorf
研究型倒置显微镜	Olympus Corporation

2.2 常用溶液配方

1. 0.7×磷酸缓冲液 (0.7× Phosphate buffered solution, 0.7× PBS)

配方：取 15mL 离心管，加入 7 mL 1×PBS，加入 3mL H₂O 补至 10 mL

2. 粗制分散酶 (Dispase)

取粗制分散酶 0.5g 加入 10 mL PBS 中，置于室温摇床上 4~5 小时。不会完全溶解，4000 rpm 离心 10 分钟后使用 0.22 μm 筛网过滤，呈黄褐色透明液体。

3. Liberase 储备液

Liberase 为包含精确比例胶原酶 I、胶原酶 II 及热溶酶的组织消化酶混合物。根据说明书，推荐的工作浓度约为 0.08~0.28 Wünsch units (WU) /mL。

Liberase 储备液配方：向管中加入 2mL 注射用无菌水复溶整管冻干酶，将冻干酶置于冰上进行复水。在 2~8 °C 条件下轻柔摇晃，直到酶完全溶解。储备液分装成一次性用量，于-15~-25 °C保存，避免反复冻融。后续使用时按 1:100 稀释至工作浓度（约 0.13 WU/mL，称为“1×”），位于推荐范围的中间值，适用于常规组织消化实验。

4. 0% 核分离缓冲液 (0% Nuclei isolation buffer, 0% NIB)

成分：

试剂	质量或体积	终浓度
PBS	9.8 mL	—
BSA	0.49 g	4.9%
50× 蛋白酶抑制剂	200 μL	1×

配制方法：配制 10% BSA：称取 1g BSA，用 10mL PBS 稀释；配制 0% NIB：200 μL 50× 蛋白酶抑制剂、 4.8 mL 10% BSA，并加入 4.8 mL PBS 至 10 mL。

5. 0.2% 核分离缓冲液 (0.2% Nuclei isolation buffer, 0.2% NIB)

成分：

试剂	质量或体积	终浓度
----	-------	-----

PBS	9.6 mL	—
BSA	0.48 g	4.8%
IGEPAL CA-630	20 μ L	0.2%
50 $\times$ 蛋白酶抑制剂	200 μ L	1 $\times$

配制方法：配制 10% BSA：称取 1g BSA，用 10mL PBS 稀释；配制 10% IGEPAL CA-630：用 PBS 以 1:10 的比例稀释 IGEPAL CA-630；将上述溶液按比例混合：200 μ L 10% IGEPAL CA-630、200 μ L 50 $\times$ 蛋白酶抑制剂、4.8 mL 10% BSA，并加入 4.8 mL PBS 至 10 mL。

6. pA-Tn5-Adaptor A/B

(1) DNA 接头的溶解

将引物 a (MENTS, 5'-phos-CTGTCTCTTATACACATCT-3')、引物 b (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3')、引物 c (5'-GTCTCGTGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3') 溶解进 Annealing Buffer 中，使其浓度为 100 μ M；使用 Nanodrop 确认浓度。

(2) 配制退火反应体系

向管 1 中加入 10 μ L 引物 a (100 μ M) + 10 μ L 引物 b (100 μ M) 共计 20 μ L。向管 2 中加入 10 μ L 引物 a (100 μ M) + 10 μ L 引物 c (100 μ M) 共计 20 μ L。涡旋振荡混匀并短暂离心，放入 PCR 仪，运行程序（热盖 105 $^{\circ}$ C）：① 75 $^{\circ}$ C 15 分钟；② 60 $^{\circ}$ C 10 分钟；③ 50 $^{\circ}$ C 10 分钟；④ 40 $^{\circ}$ C 10 分钟；⑤ 25 $^{\circ}$ C 30 分钟。获得的接头混合液需在 -20 $^{\circ}$ C 保存。

(3) pA-Tn5-Adaptor 的组装

将退火后的两种转座体 DNA 1 μ L 与 6 μ L 未加载的 pA-Tn5 (0.5 mg/mL) 混合，短暂涡旋并快速离心。室温孵育 30 分钟，在 4 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟。得到组装好的 pA-Tn5-Adaptor A/B。

7. Med1 缓冲液

成分：

试剂	质量或体积	终浓度
H ₂ O	679.5 μ L	—
PBS	200 μ L	—
BSA	0.02g	2%
NaCl (5 M)	60 μ L	300 mM
HEPES (pH 7.5, 1 M)	20 μ L	20 mM
50 $\times$ 蛋白酶抑制剂	20 μ L	1 $\times$

丁酸钠 (1 M)	10 μ L	10 mM
毛地黄皂苷 (2%)	5 μ L	0.01%
EDTA (500 mM)	4 μ L	2 mM
IGEPAL CA-630	1 μ L	0.01%
亚精胺 (1 M)	0.5 μ L	0.5mM

配制方法：（1）配制 2% 毛地黄皂苷：称取 20 mg 毛地黄皂苷，溶解于 1 mL DMSO 中；（2）配制 Med1 缓冲液：200 μ L 10% BSA、 20 μ L HEPES (pH 7.5, 1 M)、 60 μ L NaCl (5 M)、 0.5 μ L 亚精胺 (1 M)、 20 μ L 蛋白酶抑制剂 (50 $\times$)、 10 μ L 丁酸钠 (1 M)、 1 μ L IGEPAL-CA630 (10%)、 5 μ L 毛地黄皂苷 (2%)、 4 μ L EDTA (500 mM)， 加入 679.5 μ L H₂O 至 1mL。

8. Med2 缓冲液

成分：

试剂	质量或体积	终浓度
H ₂ O	683.5 μ L	—
PBS	200 μ L	—
BSA	0.02g	2%
NaCl (5 M)	60 μ L	300 mM
HEPES (pH 7.5, 1 M)	20 μ L	20 mM
50 $\times$ 蛋白酶抑制剂	20 μ L	1 $\times$
丁酸钠 (1 M)	10 μ L	10 mM
毛地黄皂苷 (2%)	5 μ L	0.01%
IGEPAL CA-630	1 μ L	0.01%
亚精胺 (1 M)	0.5 μ L	0.5mM

配制方法：200 μ L 10% BSA、 20 μ L HEPES (pH 7.5, 1 M)、 60 μ L NaCl (5 M)、 0.5 μ L 亚精胺 (1 M)、 20 μ L 蛋白酶抑制剂 (50 $\times$)、 10 μ L 丁酸钠 (1M)、 1 μ L IGEPAL-CA630 (10%)、 5 μ L 毛地黄皂苷 (2%)，加入 683.5 μ L H₂O 至 1mL。

9. 250mM MgCl₂

配制方法：取 250 μ L MgCl₂ (1 M) 加入到 750 μ L 超纯水中。

10. 40.4mM EDTA

配制方法：取 80.8 μ L EDTA (500 mM) 加入到 919.2 μ L 超纯水中。

11. Lysis buffer

配制方法：30 μ L SDS (10%)， 30 μ L ProteaseK， 30 μ L NaCl (4M)，加 10 μ L H₂O 补全至 100 μ L。

12. Bulk CUT&Tag 索引 PCR 体系

成分：

成分	体积
DNA 模板	5 μ L
i5 引物 (25 μ M)	2.5 μ L
i7 引物 (25 μ M)	2.5 μ L
Q5 High-Fidelity 2X Master Mix	25 μ L

引物序列：H3K4me3 组使用的 i5 引物为 X517(5'- AATGATACGGCGACC ACCGAGATCTACACGAGCCTTATCGTCGGCAGCGTC-3')，i7 引物为 N707 (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCATGCCTAGTCTCGTGGGCTCGG-3')；H3K27me3 组使用的 i5 引物为 X517，i7 引物 为 N706 (5'-CAAGCAGAAG ACGGCATACGAGATGTAGAGAGGTCTCGTGGGCTCGG-3')。

13. Barcode RT primer mix

配方：将 RNA 条形码 R01 (5'-phos-AGGCCAGAGCATTCGTC[3-bp BC#01]CCTGCAGGTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3') 分别在 12 个 1.5 mL 低吸附离心管中混合：12.5 μ L RNA_RE (12 个管中编号 01 至 12, 100 μ M)，12.5 μ L RNA_NRE (编号 01 至 12 与 RNA_RE 匹配, 100 μ M)，以及 75 μ L H₂O, -20 °C 保存。

14. RT Mixture

配方：17.6 μ L 5 $\times$ RT Buffer, 20 μ L H₂O, 17.6 μ L PBS, 4.4 μ L dNTP, 1.1 μ L SUPERase IN and 0.55 μ L RNase OUT, 共 61.2 μ L (每个样品加入 15.3 μ L)。

15. 连接混合物 (Ligation Mixture)

配方：在 15 mL 管中制备连接混合物，如下：2,260 μ L H₂O、500 μ L 10 $\times$ T4 DNA 连接酶缓冲液、50 μ L BSA (20 mg/mL)、100 μ L 10 $\times$ NEBuffer 3.1。每个样品需要 242.5 μ L。

16. R02 Barcode Plates

R02#03 (5'-phos-GTGCGAACTCAGACCAAAGATGATCCACGTGCTTGAG -3') 和 Linker-R02 (5'- CGAATGCTCTGGCCTCTCAAGCACGTGGAT -3') 稀释到 100 μ M, 600 μ L R02#03 + 550 μ L Linker-R02 + 3850 μ L H₂O, 混合均匀后加到 96 孔板中，每个孔 50 μ L，以 0.1°C/s 的速度降到 12°C。合并所有 96 孔到 1.5mL 离心管中，标记为“R02#03 Barcode Plates”。

17. R02 Blocking Solution

配方：264 μ L R02 Blocker (100 μ M, 5'-ATCCACGTGCTTGAGAGGCCA

GAGCATTCG -3'), 250 μ L 10X T4 DNA Ligase Buffer, 加入 486 μ L H₂O 补至 1mL。

18. R03 Barcode plates

R03#08 (5'-phos-GTGCGAACTCAGACCAAGAAGCATCCACGTGCTTGA G-3') 和 Linker-R02 (5'- GGTCTGAGTTCGCACACGCTCCTCGAATCC -3') 稀释到 100 μ M, 600 μ L R03#08+550 μ L Linker-R03 + 3850 μ L H₂O, 混合均匀后加到 96 孔板中, 每个孔 50u, 以 0.1°C/s 的速度降到 12°C。合并所有 96 孔到 1.5mL 离心管中, 标记为 “R03#08 Barcode Plates”。

19. R03 Termination Solution

配方: 264 μ L R03 Quencher (100 μ M, 5'-GGATTCGAGGAGCGTGTGCG AACTCAGACC-3') , 500 μ L EDTA (500 mM) , 加入 236 μ L H₂O 补至 1mL。

20. Anchor Mix

配方: 15 μ L 2 $\times$ KAPA Taq ReadyMix, 0.6 μ L Anchor-FoKI-GH (10 μ M, 5'- AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGAATGGGGGGGGGH -3') 。

21. Preamp Mix

配方: 6 μ L H₂O, 10 μ L 2 $\times$ KAPA Taq ReadyMix, 4 μ L PA-mix (10 μ M)。PA-mix (10 μ M) 成分: PA-F (5'-Biotin-CAGACGTGTGCTCTTCCGATCT -3') 、 PA-R (5'- AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT -3') 。

22. DNA Ligase buffer

配方: 13.5 纯化后 DNA 模板, 1.5 μ L H₂O, 2 μ L 10 $\times$ T4 DNA Ligase Buffer, 1.5 μ L P5 Adaptor Mix, 1.5 μ L T4 Ligase。P5 Adaptor Mix 成分: P5-FokI (5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3') 、 P5c-NNDC-FokI (5'-phos-NNDCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTG-3') 、 P5H-FokI (5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTH-3') 、 P5Hc-NNDC-FokI (5'-phos-NNDCDAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTG-3') 。

23. Pseudobulk Paired-Tag 索引 PCR 体系

RNA 文库索引 PCR 体系:

成分	体积
模板	21 μ L
TruSeq i7 indices (10 μ M)	2 μ L
NextEra N5 primer (10 μ M)	2 μ L

Q5 High-Fidelity 2X Master Mix	25 μ L
DNA 文库索引 PCR 体系:	
成分	体积
模板	21 μ L
TruSeq i7 indices (10 μ M)	2 μ L
Universal P5 primer (10 μ M)	2 μ L
Q5 High-Fidelity 2X Master Mix	25 μ L

引物序列: NextEra N5 primer (S507): 5'-AATGATACGGCGACCACCGA
GATCTACACAAGGAGTATCGTCGGCAGCGTC-3'; Universal P5 primer (D501)
: 5'- AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTTCC
CTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'; TruSeq i7 indices (NEBNext Index 37 Pri
mer for Illumina): 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATTCCGGTGACTG
GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'; TruSeq i7 indices (NEBNext In
dex 38 Primer for Illumina): 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAGCTAG
GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'; TruSeq i7 indices (N
EBNext Index 39 Primer for Illumina): 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGA
TGTATAGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T-3'; TruSeq i7
indices (NEBNext Index 40 Primer for Illumina): 5'-CAAGCAGAAGACGGCA
TACGAGATTGGATCACGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATC-s-T
-3';

2.3 实验方法

2.3.1 组织消化

1. 截肢

取 1 mL 1.2% 苯佐卡因稀释至 160mL 水中, 放入墨西哥钝口螈, 直至墨西哥钝口螈完全麻醉 (镊子夹尾无反应)。对于鼻至尾 9~13 cm 的墨西哥钝口螈, 将吸水纸润湿置于泡沫板上, 麻醉好的墨西哥钝口螈置于其上, 使用镊子夹住其上肢, 用剪刀在前臂中部 (肘关节与手腕处) 剪断, 尽可能保证切面平整。对于鼻至尾 7~9 cm 的墨西哥钝口螈, 将其置于干净培养皿盖上, 在解剖镜下用镊子和剪刀在相同位置剪断, 尽可能保证切面平整。取下的断肢在 0.7 $\times$ PBS 中涮洗数次后放入 EP 管中。麻醉并截肢后的墨西哥钝口螈用水涮洗数次, 置于 1% 青霉素-链霉素双抗溶液中浸泡过夜。

2. 消化

探索过程中对不同组织四种消化条件，具体操作如下：

(1) 剪碎组织，在 37°C 下用 0.5×重组胰蛋白酶 TrypEL (1:1 稀释在 0.7×PBS 中) 消化 5 分钟，每 2.5 分钟从摇床取下吹匀一次。将消化后的液体经过 70 μm 细胞筛获得细胞悬液。

(2) 剪碎组织，在室温（约 25°C）下用 0.5×重组胰蛋白酶 TrypEL (1:1 稀释在 0.7×PBS 中) 消化 5 分钟，每 2.5 分钟从摇床取下吹匀一次。将消化后的液体经过 70 μm 细胞筛获得细胞悬液。

(3) 剪碎组织，在室温下，用 80%粗制分散酶 (Dispase) 和 4×Liberase (稀释在 0.7×PBS 中) 消化。5 分钟后从摇床取下吹匀。

(4) 剪碎组织，在室温下用 1×Liberase (稀释在 0.7×PBS 中) 消化 45 分钟，每隔 5 分钟从摇床取下吹匀。将消化后的液体经过 70 μm 细胞筛获得细胞悬液。

3. 细胞计数

(1) 自动细胞计数

取过筛后的细胞悬液 10 μL 与 10 μL 台盼蓝溶液混匀，吸出 10 μL 加入细胞计数片中，使用细胞计数仪进行计数。从计数仪屏幕上可以得到细胞浓度、细胞活率、细胞大小、数量曲线等。

(2) 手动细胞计数

在血细胞计数板上放置一片盖玻片，吸取 10 μL 与台盼蓝溶液 1 : 1 混合的细胞悬液，将液体从盖玻片边缘打入盖玻片与血细胞计数板之间。在显微镜下观察并分别计数 4 个中方格（计数板为 1mm² 规格，中方格内有 16 个小方格）中的细胞数量。

2.3.2 CUT&Tag 文库制备与测序

1. 细胞核制备

消化步骤与 2.3.1 同，获得的单细胞悬液按每 7.5 万个细胞加 200 μL 0.2% NIB 重悬，冰上静置 5 分钟，70 μm 滤膜过滤，用细胞计数器计数细胞核。等分样品成 2 个管，总约 15 万个细胞核。1000 g 离心 10 分钟，重悬于 50 μL 0%NIB 中，对细胞核进行计数与镜检。再次 1000 g 离心 10 分钟，重悬于 50 μL Med1 缓冲液中。后向两个管中加 pA-Tn5-AdaptorA/B 1.5 μL，分别加入 2 μg H3K27me3

抗体与 0.83 μg H3K4me3 抗体，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。

2. Tn5 酶切

将细胞核在 250g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 分钟，用 70 μL Med2 buffer 重悬。重复上述步骤两次。用 50 μL Med2 buffer 重悬，加 2 μL 250mM MgCl_2 ，在 ThermoMixer 恒温混匀仪中以 550 rpm 转速在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 小时。每管加入 16.5 μL EDTA (40.4mM) 混匀，350g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 分钟，去上清。

3. 裂解与 DNA 纯化

配制 Lysis buffer，每个孔添加 300 μL ，55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 小时。加入 300 μL DNA 提取液，剧烈摇晃。加入 300 μL 氯仿，上下颠倒 10 次，室温 16000 g 离心 5 分钟。将水相层转移到新的 1.5mL EP 管，加入 750 μL 无水乙醇，-20 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜。

过夜后，4 $^{\circ}\text{C}$ 16000 g 离心 15 分钟，小心移除上清，用 1 mL 无水乙醇漂洗沉淀，16000 g 离心 5 分钟。重复该步骤一次。移除所有乙醇，风干后加 25 μL 水重悬。用 Qubit 4 Fluorometer 测浓度。

4. 索引聚合酶链式反应 (Indexing Polymerase Chain Reaction, Indexing PCR)

低吸附八联排 PCR 管，在每个孔中配制 PCR 体系（见 2.2 常用溶液配方 “Bulk CUT&Tag 索引 PCR 体系”）。运行 PCR 程序：① 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 分钟；② 98 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒；③ 温度循环（14 个周期）：98 $^{\circ}\text{C}$ （15 秒） $\rightarrow$ 63 $^{\circ}\text{C}$ （30 秒） $\rightarrow$ 72 $^{\circ}\text{C}$ （60 秒）；④ 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 秒；⑤ 12 $^{\circ}\text{C}$ ∞ 。

将 VAHTS 磁珠从 4 $^{\circ}\text{C}$ 的环境中取出，在室温下放置 30 分钟。之后涡旋磁珠以充分混匀。向每孔 PCR 产物中加入 28 μL VAHTS 磁珠（比率为 0.8 $\times$ ），用移液器吹打以充分混匀。室温下孵育 10 分钟以结合 DNA，将八联排管放在磁力架上约 5 分钟，直至上清液澄清，小心弃去上清液。将八联排管放在磁力架上，用 200 μL 新鲜配制的 80% 乙醇清洗磁珠。在室温下孵育 30 秒，小心弃去上清液。重复乙醇清洗步骤，共清洗两次。将八联排管始终放在磁力架上，并将磁珠风干 5~10 分钟。从磁力架上取管子，加入 15~30 μL H_2O 洗脱。用移液器吹打或涡旋重悬磁珠，在室温下孵育 2 分钟。将管子放在磁力架上，直至上清液澄清（约 5 分钟）。将上清液转移到新的 PCR 管中。

CUT&Tag 文库交付南京江北新区生物医药公共服务平台有限公司，使用

Illumina NovaSeq X Plus 系列 PE150 序列分析仪测序。

2.3.3 CUT&Tag 数据处理

1. 原始数据处理

首先，使用 FastQC (v0.1.0) 对原始数据进行质量评估。随后用 Cutadapt 对双端测序数据 (R1 和 R2) 进行质量控制，去除测序接头并修剪质量得分低于 20 的碱基，仅保留修剪后长度不小于 20 bp 的高质量读段。之后，使用 Bowtie2 将筛选后的读段与墨西哥钝口螈参考基因组 AmexG_v6.0-DD 比对 (<https://www.axolotl-omics.org/assemblies>)^[16]，并使用 bamCoverage 转换为 bigWig 文件进行可视化。

2. 峰值调用

首先利用基于模型的 ChIP-seq 分析 (Model-based analysis of ChIP-seq, MACS2)^[17] (<https://github.com/hbctraining/Intro-to-ChIPseq>) 的 callpeak 命令 (参数: genomeSize = 2,782,028,915, pValue = $1e^{-4}$)，对修剪完成的数据进行峰值调用。再使用 bamCoverage 将 BAM 文件中的读段覆盖度归一化为 CMP (每百万映射读段的计数)。

3. 下游分析质量评估 (Quality Control, QC)

用 computeMatrix reference-point^[18] 命令生成 TSS 前后 5,000bp 的信号矩阵，使用 plotHeatmap 绘制 TSS 富集的热图。之后利用 R 包 “rtracklayer”^[19] 提取 TSS 前后 3,000bp 的区域，用于计算启动子区域峰区间读数占比 (Fraction of Reads in Peaks, FRiP)。使用 bedtools 软件 (v2.31.1) 的 intersect 功能，统计信号峰在启动子区域、基因本体及基因间区的分布频率。

4. 基因本体 (Gene Ontology, GO) 富集分析

首先使用 bedtools intersect 定义 bivalent，利用先前得到的 TSS $\pm$ 3kb 的 BED 文件以及得到两种组蛋白修饰的峰值调用文件，三者重合 $\geq$ 10%的 TSS $\pm$ 3,000bp 区段定义为双价启动子区域，获得 2457 个双价启动子关联基因。使用在线基因本体富集分析网站 DAVID (<https://davidbioinformatics.nih.gov/home.jsp>) 对获得的基因名称列表进行分析^[20,21]。由于墨西哥钝口螈 GO 数据库尚不完善，因此选择将墨西哥钝口螈的基因映射到人类 (*Homo sapiens*) 基因组中 (格式 Entrez Gene_ID)。从墨西哥钝口螈注释文件中提取全部基因共 81499 个，使用 DAVID

映射工具映射到人类基因组, 获得 12242 条映射数据, 将上述数据作为背景提交。将双价启动子区域关联的基因进行相同的映射操作, 获得的 1850 个映射基因, 进行 GO 富集分析。所有图表使用 R 包 “ggplot2” 进行可视化绘制。

2.3.4 Pseudobulk Paired-Tag 文库制备

1. 细胞核制备

同 2.3.2 CUT&Tag 文库制备与测序中 “细胞核制备” 部分。

2. Tn5 酶切

同 2.3.2 CUT&Tag 文库制备与测序中 “Tn5 酶切” 部分。

3. 逆转录

(1) 取低吸附八联排 PCR 管, 每管分别加入 4 μ L RT primer mix (R01) 。

(2) 配 RT Mixture, 用 14 μ L RT Mixture 重悬细胞核, 分别加到 4 μ L RT primers mix 里面, 分别每管加入 2 μ L Maxima H-Reverse Transcriptase。

(3) 运行逆转录程序: ① 50°C 10 分钟; ② 温度循环 (2 个周期): 8°C (12 秒) $\rightarrow$ 15°C (45 秒) $\rightarrow$ 20°C (45 秒) $\rightarrow$ 30°C (45 秒) $\rightarrow$ 42°C (2 分钟) $\rightarrow$ 50°C (5 分钟); ③ 50°C 10 分钟; ④ 12°C ∞ 。

(4) 合并所有细胞, 加 4.8 μ L TritonX-100, 轻轻吹匀后 1000 g 10 分钟离心。沉淀用 1 mL 1 $\times$ NEBuffer 3.1 重悬。

4. 条形码连接

取 242.5 μ L Ligation Mixture 加 33.33 μ L T4 DNA Ligase (100 μ L 12 个样品), 混合均匀后每管加 236.7 μ L。每个管中加 80 μ L R02 Barcode Plates, 37°C 孵育 30 分钟。每个管中加入 80 μ L R02 Blocking Solution, 37°C 孵育 30 分钟。

再取 242.5 μ L Ligation Mixture 加 33.33 μ L T4 DNA Ligase (100 μ L 12 个样品) 混合均匀。500 g 离心, 去上清, 加入 83.3 μ L 1 $\times$ NEBuffer3.1、236.7 μ L Ligation Mixture 和 80 μ L R03 Barcode plates。37°C 孵育 30 分钟。每个管中加 80 μ L R03 Termination Solution, 37°C 孵育 30 分钟。

500g 4°C 5 分钟 离心, 去上清。用 200 μ L 1 $\times$ NEBuffer 3.1 洗一遍并重悬, 测细胞密度。500g 4°C 5 分钟 离心, 去上清。加 NEBuffer 3.1 至每个样品 500 细胞/mL, 准备进行裂解。

5. 裂解与 DNA 纯化

每孔加入 3 μ L 10% SDS, 3 μ L Protease K, 3 μ L NaCl (4M), 加 PBS 补全至总体积 30 μ L。55°C 孵育 2 小时。冷却至室温后, 用 1 $\times$ VAHTS 磁珠纯化, 最后用 13.8 μ L H₂O 洗脱。

6. TdT 加尾和预扩增

(1) 每个孔加 1 μ L 10 $\times$ TdT Buffer、0.5 μ L 1 mM dCTP 95°C 孵育 5 分钟。迅速插入冰上 5 分钟。每个孔加 0.1 μ L TdT, 25 μ M Co²⁺, 37°C 30 分钟, 65°C 10 分钟。加 15.6 μ L Anchor Mix 到每个孔中混匀。运行线性扩增程序: ① 95°C 3 分钟; ② 温度循环 (15 个周期): 95°C (15 秒) $\rightarrow$ 68°C (120 秒) $\rightarrow$ 47°C (60 秒); ③ 72°C 10 分钟; ④ 12°C ∞ 。

(2) 每个孔加 20 μ L Preamp Mix。运行 PCR 程序: ① 95°C 3 分钟; ② 温度循环 (9 个周期): 98°C (20 秒) $\rightarrow$ 62°C (20 秒) $\rightarrow$ 72°C (150 秒); ③ 72°C 120 分钟; ④ 12°C ∞ 。

(3) 双筛: 0.2 $\times$ + 0.6 $\times$ VAHTS 磁珠纯化, 用 35.5 μ L H₂O 洗脱。分成 17 μ L DNA 部分和 17 μ L RNA 部分。

7. 限制酶切与接头标记

(1) 限制酶切

DNA 部分: 每个孔加入 2.5 μ L 10 $\times$ rCutSmart Buffer 与 3.5 μ L ddH₂O, 1 μ L SbfI-HF (可切割 CCTGCAGG), 1 μ L FokI, 混合均匀。RNA 部分: 每个孔加入 2 μ L 10 $\times$ rCutSmart Buffer, 1 μ L NotI-HF (可切割 GCGGCCGC), 混合均匀。37°C 孵育 60 分钟。

(2) 柱纯化

DNA、RNA 部分均使用 Zymo DNA Clean & Concentrator-5 进行柱纯化。向样品中以 1 : 5 的比例加入 Binding Buffer, 即 DNA 部分每个样品加 125 μ L Binding Buffer, RNA 部分每个样品加 100 μ L, 混匀。将混合物转移到色谱柱 (Zymo-Spin Column) 中, 色谱柱应套在收集管 (Collection Tube) 中。室温 10000g 离心 30 秒, 弃废液。加入无水乙醇 200 μ L, 室温 10000g 离心 30 秒, 弃废液。重复洗涤步骤 1 次。弃收集管, 将色谱柱转移到新的 1.5 mL 离心管中, DNA 部分加入 14 μ L H₂O, RNA 部分加入 17.5 μ L H₂O, 在室温下孵育一分钟。室温 10000g 离心 30 秒以洗脱 DNA。

(3) DNA 部分的连接

配制 DNA Ligase buffer, 每个样品中加入 10 μL 。运行程序: 4°C 10 分钟, 10°C 15 分钟, 16°C 15 分钟, 25°C 45 分钟。等待时进行步骤 (5) 对 RNA 进行操作。

(4) DNA 部分的链霉亲和素磁珠纯化

DNA 部分连接结束后, 加入溶 (9.6% SDS + 20mM EDTA) 1 μL 以终止连接反应。得到的产物用链霉亲和素磁珠纯化。将磁珠置于涡旋仪上充分混匀, 取 32 μL 磁珠加入 1.5mL EP 管中, 置于磁力架上, 静置 2 分钟使磁珠分离, 弃上清。将管从磁力架上取下, 加入和初始磁珠量等体积的 1× B&W Buffer 重悬磁珠, 涡旋以充分混匀, 短暂离心后, 将管置于磁力架上, 静置 1 分钟, 弃上清。重复上述步骤 2 次, 共洗涤 3 次。每个样品加入 21 μL 的 2× B&W Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 2 M NaCl, 0.1% Tween 20) 重悬磁珠, 再加入 21 μL 步骤 (3) 中得到的 DNA 连接产物 (样品不足 21 μL 的用), 涡旋以充分混匀。室温摇床孵育 15~30 分钟, 短暂离心后, 将 EP 管置于磁力架上, 静置 2~3 分钟使磁珠分离, 弃上清。结合完成后, 加入和初始磁珠量等体积的 1× B&W Buffer 重悬磁珠, 涡旋以充分混匀, 短暂离心后, 将 EP 管置于磁力架上, 静置 2 分钟使磁珠分离, 弃上清。重复该步骤 2 次。重悬于 22 μL H_2O 中, 供后续使用。

(5) RNA 部分的酶切与磁珠纯化

在每个样品中加入 4 μL 5× DNA Tag Buffer, 0.9 μL Tn5-AdaptorA (5 μM)。37°C 孵育 30 分钟, 用链霉亲和素磁珠纯化, 重悬于 22 μL H_2O 中。

8. 索引 PCR

配制 PCR 体系 (见 2.2 常用溶液配方 “Pseudobulk Paired-Tag 索引 PCR 体系”), 运行 PCR 程序。DNA 部分: ① 98°C 3 分钟; ② 98°C 10 秒; ③温度循环 (11 个周期): 63°C (30 秒) → 72°C (60 秒); ④ 72°C 60 秒; ⑤ 12°C ∞ 。RNA 部分: ① 72°C 5 分钟; ② 98°C 30 秒; ③温度循环 (11 个周期): 98°C (10 秒) → 63°C (30 秒) → 72°C (60 秒); ④ 72°C 60 秒; ⑤ 12°C ∞ 。

使用 0.8×VAHTS 磁珠纯化, 用 15~30 μL H_2O 洗脱。

三、研究结果

3.1 墨西哥钝口螈肢体及再生芽基消化条件的探索

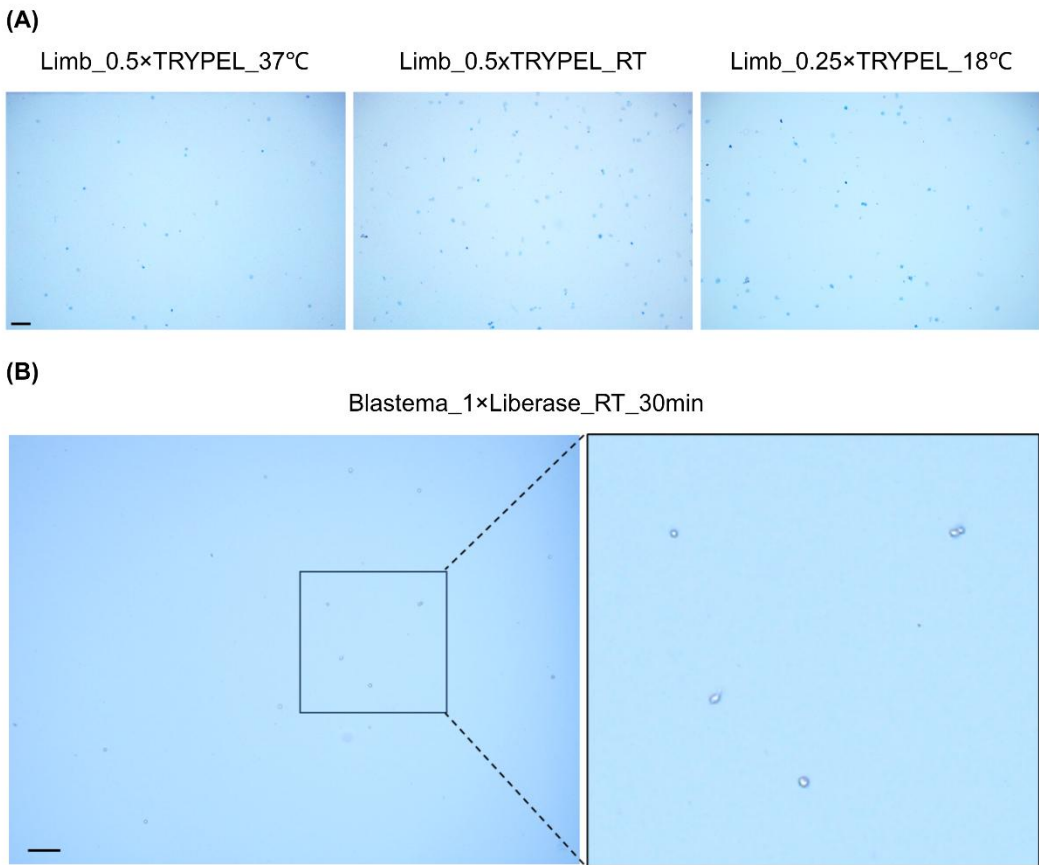
Paired-Tag 文库构建需要一定数量（每样品 500,000 个）的高质量细胞核。因此，组织消化需要尽可能获取活率更高的单细胞悬液，并满足起始细胞数。

目前，已有多篇研究报道墨西哥钝口螈的组织消化方式，如使用 0.2% 胶原酶混合物在 25°C 消化再改用分散酶 II (Diapase II) 和胰酶再次消化^[22]、直接使用 1×Liberase 室温消化^[23]等。然而，上述消化方式获取的细胞核能否用于 Paired-Tag 的后续处理以及建库流程还有待验证。为了验证已发表的消化条件，并优化出产量高、活率高的消化条件，我们使用不同大小、不同品系、不同质量的墨西哥钝口螈肢体以及再生芽基组织进行消化，并测试了 3 种酶组合 (TrypEL、Liberase+Dispase、Liberase)。鉴于墨西哥钝口螈是一种变温两栖动物，且原产于不高于 20°C 的淡水湖中，我们测试了几种不同的温度下的消化效果 (37°C、室温、18°C)。

首先，我们尝试了消化哺乳动物组织常用的重组胰蛋白酶 TrypEL。尽管使用 0.5×TrypEL 在 37°C 或室温下的消化能够获得细胞悬液，但经过自动计数以及镜检发现，此条件消化得到细胞的活率很低 (10~20%)，在镜检时视野中几乎无法观察到活细胞。我们推测细胞的大量死亡可能源于 TrypEL 浓度过高，消化条件过于剧烈。即使通过减半 TrypEL 浓度来弱化消化强度，并适当延长消化时间保证细胞产率，所获取的细胞活率仍然很低（图 4A）。该结果说明 TrypEL 消化能力过强，不适合墨西哥钝口螈的组织消化，需要探索更温和的消化条件。之后，我们尝试使用 80% 粗制分散酶和 4×Liberase 的组合在室温进行消化。然而，两种酶联合消化的条件较 TrypEL 更加剧烈，消化 2 分钟反应体系已经变粘稠，说明细胞已经破裂且基因组 DNA 流出。因此想要获取完整的、高质量的细胞核，仍需更温和的消化条件。最后，我们参考已发表文章使用的方法^[23]，使用 1×Liberase 在室温进行消化。实验结果显示在消化较小型墨西哥钝口螈（鼻至尾 7~9 cm）再生芽基约 45 分钟后，自动计数仪与镜检均显示，经过此消化方法获得的细胞活率较高（大于 70%，图 4B）、细胞大小正常。之后，我们再用较大墨西哥钝口螈（鼻至尾 10~13 cm）的肢体和再生芽基进行此条件的重复性测试，

自动计数得到的平均活率达 60%~70%。

除了保证细胞活率，我们还测试了采取上述消化条件能够获得的细胞数量。使用分析天平对墨西哥钝口螈组织质量进行控制，使用上述条件（1×Liberase，室温）分别测试了针对质量为 1 mg、10 mg 的组织的细胞得率，消化时间根据消化状态进行调整。结果显示，在该条件下仍可成功分离出活率较高且形态完整的单细胞（图 4C）。经过该条件消化的墨西哥钝口螈肢体和再生芽基单位质量细胞数约为每毫克组织 10,000 个，满足 Paired-Tag 实验对起始细胞量的要求。因此，我们认为室温下使用 1×Liberase 来消化墨西哥钝口螈肢体和再生芽基相对适宜。



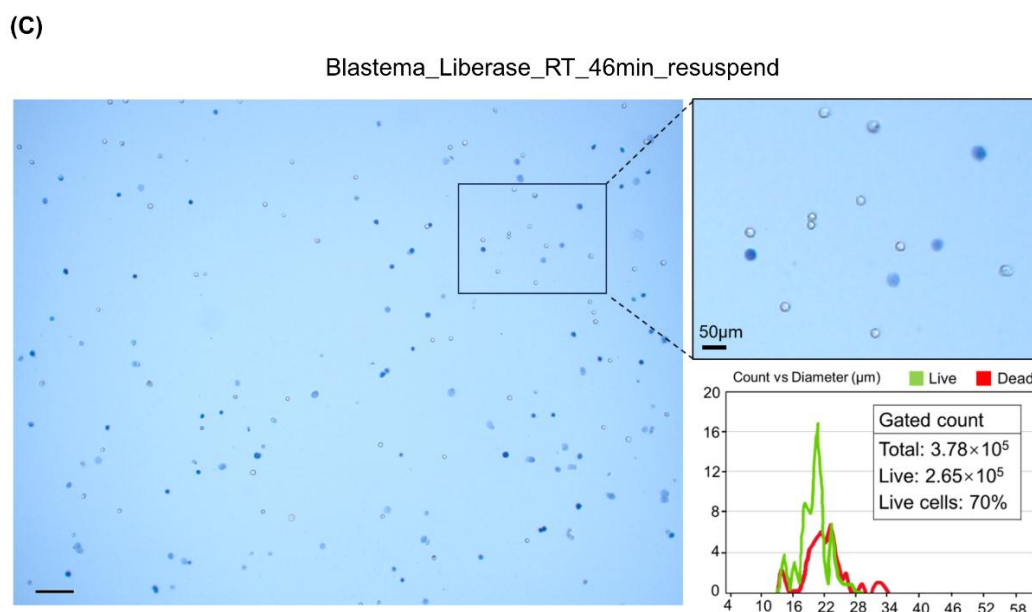


图 4 墨西哥钝口螈组织消化条件

(A) 使用重组胰蛋白酶对蝾螈肢体芽基进行不同温度下消化后的镜检图像。尽管细胞数量正常，但细胞边界模糊、难以对焦、大部分可以被台盼蓝染色，提示细胞活率不高；(B) 使用 $1 \times$ Liberase 在室温（约 25°C ）消化芽基 30 分钟后镜检照片。视野内约 90% 细胞是未被台盼蓝染色，显示细胞活性较高，细胞外形完整、大小均一。 $n=2$ ，个体体长约 7~9 cm；(C) 在相同消化条件下处理更大体积的芽基组织，重悬后进行镜检与自动计数。视野内细胞数量明显增多，约 50%~70% 的细胞为活细胞，证明此消化条件稳定，能适用不同质量的芽基。 $n=2$ ，个体体长约 7~9 cm。比例尺均为 $200 \mu\text{m}$

3.2 墨西哥钝口螈再生芽基的 CUT&Tag 实验

3.2.1 墨西哥钝口螈再生芽基的 CUT&Tag 文库构建

探索出适宜消化条件后，我们首先尝试利用得到的单细胞进行 bulk CUT&Tag 实验。组织来自鼻至尾长 12 cm 的墨西哥钝口螈，a/a 品系与 d/d 品系各一，分别截取右上肢第 10 天再生芽基。在室温下用 3.1 中最适条件消化约 41 分钟，获得总计约 15 万个细胞、活率约 60% 的细胞悬液。常规 CUT&Tag 实验对小鼠细胞进行细胞核提取操作时使用的标准条件为：每 50 万个细胞加入 $200 \mu\text{L}$ 的 0.2% IGEPAL CA630，冰上孵育 5 分钟。考虑到墨西哥钝口螈细胞核直径约为 $20 \mu\text{m}$ ，DNA 含量也更高。为了适应此差异，我们调整操作方案，在较低细胞输入量下，每 7.5 万个细胞加入 $200 \mu\text{L}$ 0.2% NIB 重悬，冰上静置 5 分钟。显微镜观察显示，细胞核边界清晰，形状完整，粘连较少，大部分为单个细胞（图 5）。上述结果说明该提核条件适宜。随后，我们将获得的细胞核悬液平均分成两

份，分别检测 H3K4me3、H3K27me3 组蛋白修饰位点。

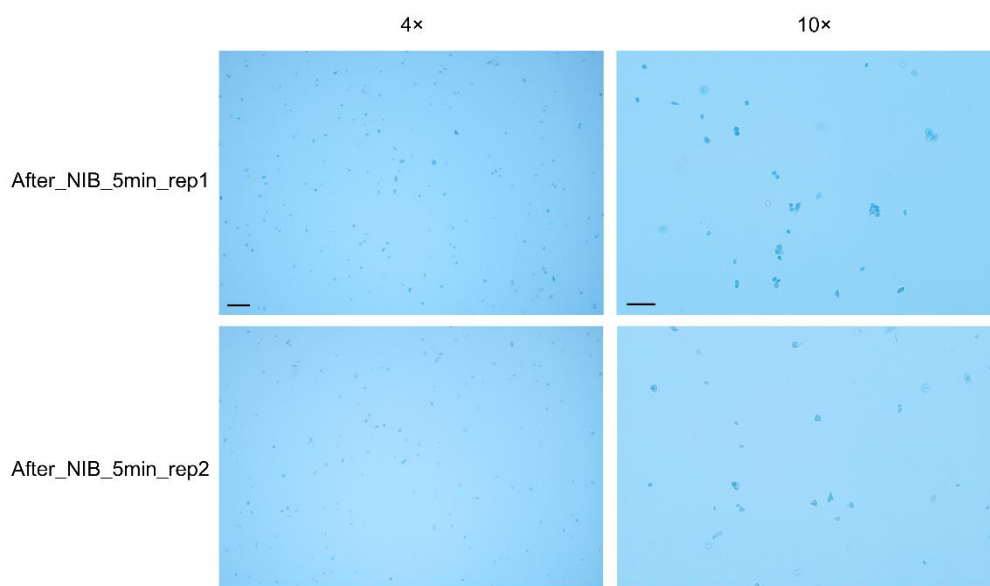


图 5 墨西哥钝口蛭第十天芽基的 CUT&Tag 提核条件评估

分别于 4× 和 10× 镜下观察提核后细胞状态。结果显示细胞核数量较多，轮廓清晰，形态完整，表明提核条件合适。n = 2；第一列图像比例尺为 200μm，第二列为 100 μm

此后，加入 Med2 buffer 进行 Tn5 酶切，并使用 DNA 提取液提纯 DNA。DNA 提纯过程中，DNA 沉淀清晰可见，提示提纯获得的 DNA 浓度较高。测量得到两个样品的 DNA 浓度分别为 187.8 ng/μL、179.1 ng/μL，其 DNA 回收量与我们投入的总细胞数基本相符。最后，我们以提纯后的 DNA 作为 PCR 模板，扩增包含 Tn5 接头的片段，之后使用 0.8×VAHTS 磁珠纯化 DNA，获得 H3K4me3 和 H3K27me3 的 CUT&Tag 文库，经 Illumina 平台进行 PE150 测序后获得总计约 7.61GB 的双端测序数据。

3.2.2 CUT&Tag 数据分析

完成文库测序后，我们首先对数据质量进行了整体评估。使用 Cutadapt 去除测序接头并修剪质量较差的碱基。并使用 Bowtie2 将筛选后读段与墨西哥钝口蛭参考基因组 AmexG_v6.0-DD^[16] 比对。之后使用 MASC2 软件进行峰值识别，共检测到 29096 个 H3K4me3 信号峰和 16458 个 H3K27me3 信号峰。然后，我们以转录起始位点 (Transcription Start Site, TSS) 为中心绘制了修饰信号热图(图 6A)。

结果显示 H3K4me3 信号在 TSS 附近呈现对称尖锐单峰，符合其活性启动子标记的特征。H3K27me3 信号在 TSS 附近呈现较低的宽峰，两侧信号强度缓慢衰减，也符合抑制性修饰的特征。峰注释分析验证了上述趋势（图 6B）。H3K4me3 峰有 46.2% 富集在启动子区域，30.6% 富集在基因体区域，23.2% 分布在基因间区；H3K27me3 峰分别有 29.7%、42.5%、27.7% 富集于上述区域。峰区间读数占比 (Fraction of Reads in Peaks, FRiP) 进一步验证数据质量，H3K4me3 与 H3K27me3 的 FRiP 值分别为 25.42% 和 13.68%，均处于 CUT&Tag 实验的可接受范围，说明我们获取了质量良好的组蛋白修饰数据。

通过 IGV 可视化分析^[24]，我们观察到了 H3K4me3 和 H3K27me3 在多个再生相关基因区域的典型分布模式与已有研究结果一致，如 *Shox2* 和 *Meis* ^[25]，进一步说明文库质量良好且具有生物学意义（图 6C）。

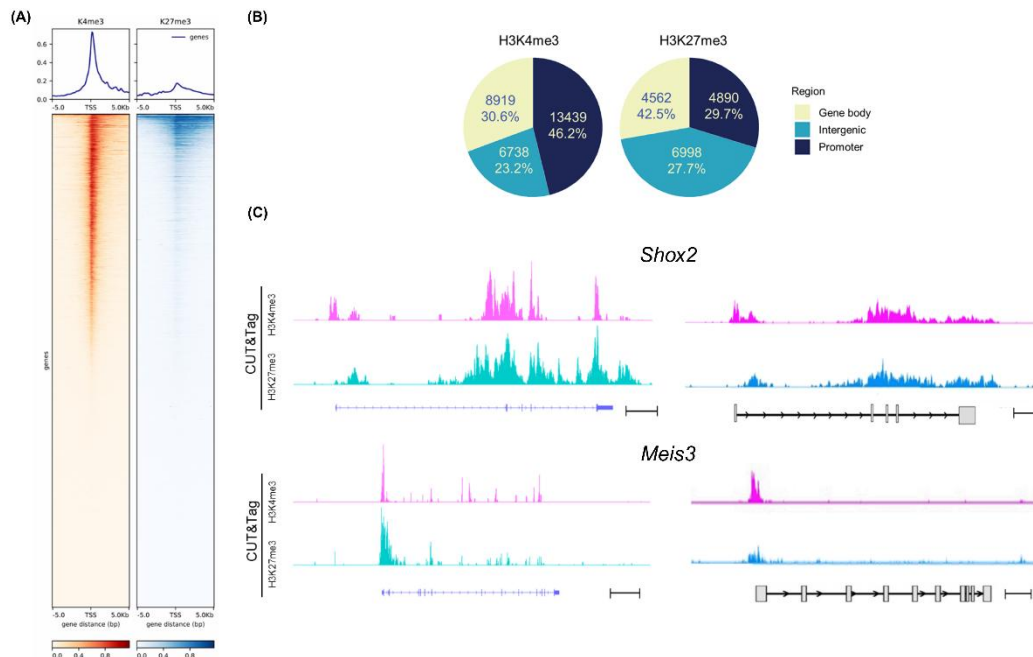
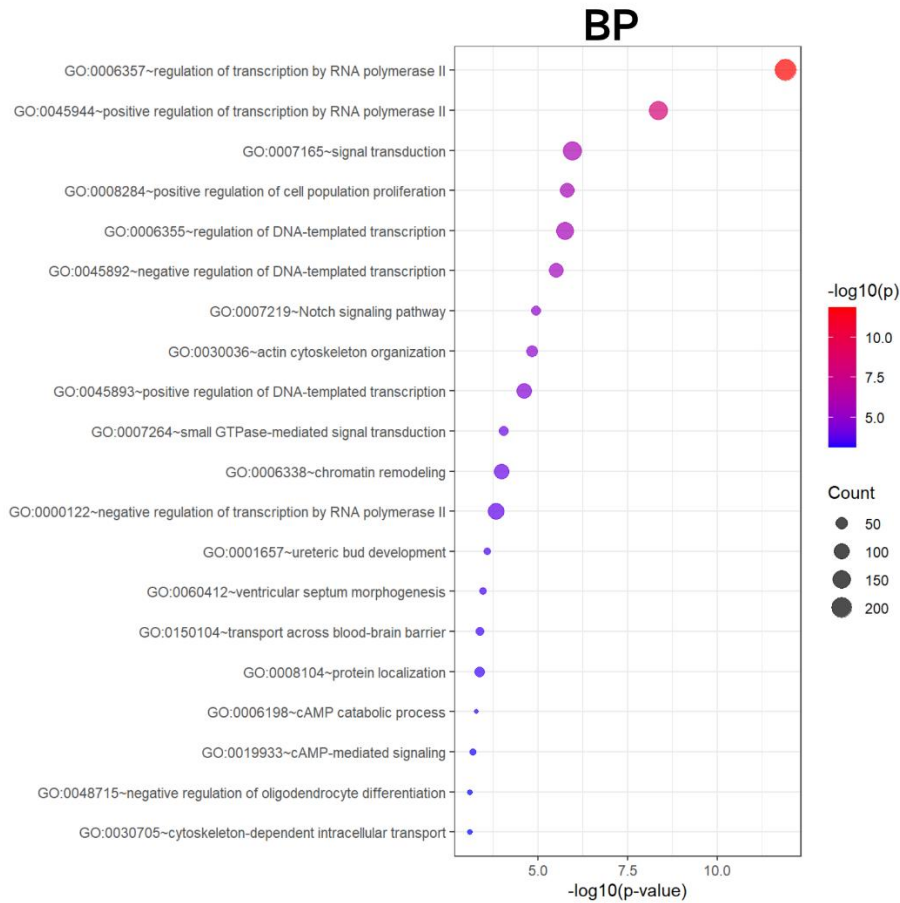


图 6 再生芽基中 H3K4me3 与 H3K27me3 的 CUT&Tag 信号分布特征

(A) H3K4me3 与 H3K27me3 信号在 TSS 附近的富集图。上方为平均信号强度分布曲线，下方为以 TSS 为中心 ±5,000 bp 范围内的热图，按基因排列。H3K4me3 显示出典型的 TSS 单峰特征，H3K27me3 信号分布较广、峰值较低；**(B)** 两类组蛋白修饰的信号峰在不同基因组功能区域的分布比例。H3K4me3 峰主要富集于启动子区域（46.2%），而 H3K27me3 更常分布于基因体区域（42.5%）；**(C)** 代表性基因 *Shox2* 与 *Meis3* 区域的 CUT&Tag 信号可视化结果（左），与已有文献报道结果（右）对比。展示了 H3K4me3（品红色）与 H3K27me3（青色）在同一基因启动子附近的共定位，提示上述位点可能存在双价染色质调控机制。已有研究结果引自^[25]

为了识别再生过程中可能处于“待激活状态”的调控区域，我们定义双价启动子 (bivalent promoter) 为 TSS $\pm$ 3,000 bp 区域内 H3K4me3 和 H3K27me3 信号至少重叠 10%区域的位置。利用 bedtools intersect、DAVID 等工具进行了 GO 分析。

结果显示在三个子类中（生物学过程，biological process, BP；分子功能，molecular function, MF；细胞成分，cellular component, CC）分别富集到 223 条、81 条和 105 条显著富集通路 ($P < 0.05$)。全部富集结果覆盖了超过 90% 的输入基因，表明同源注释的完整性较高。富集条目主要与转录调控、组织发育、细胞分化等过程密切相关，提示上述双价调控元件可能在调控再生过程中的发育程序中发挥重要作用（图 7）。



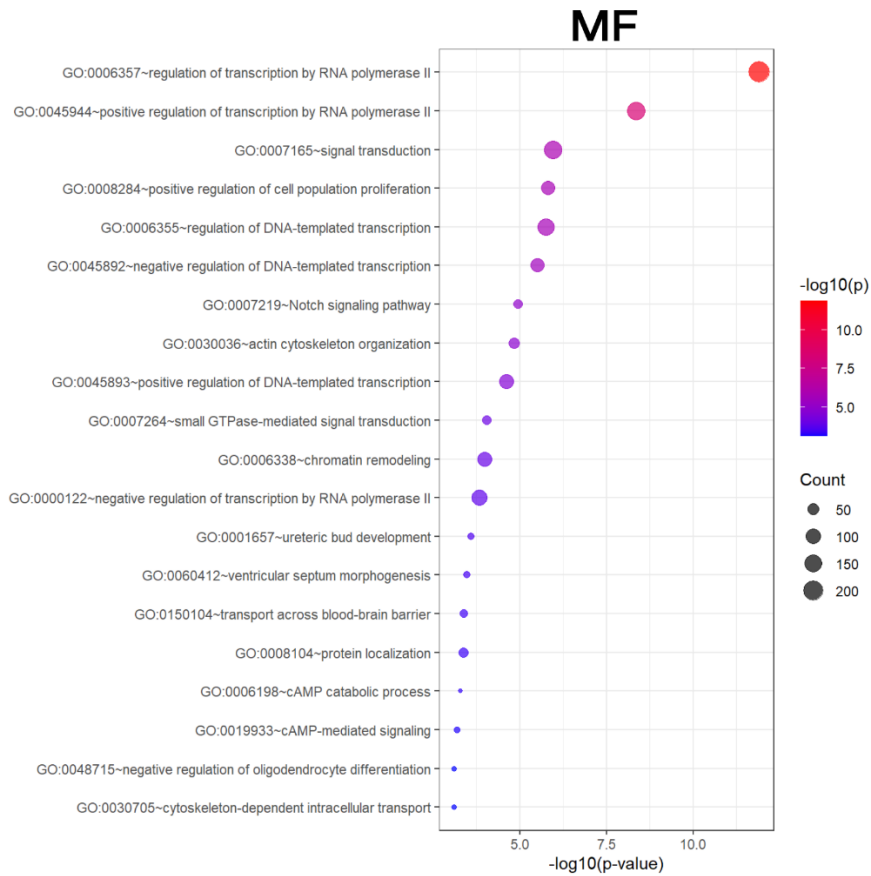
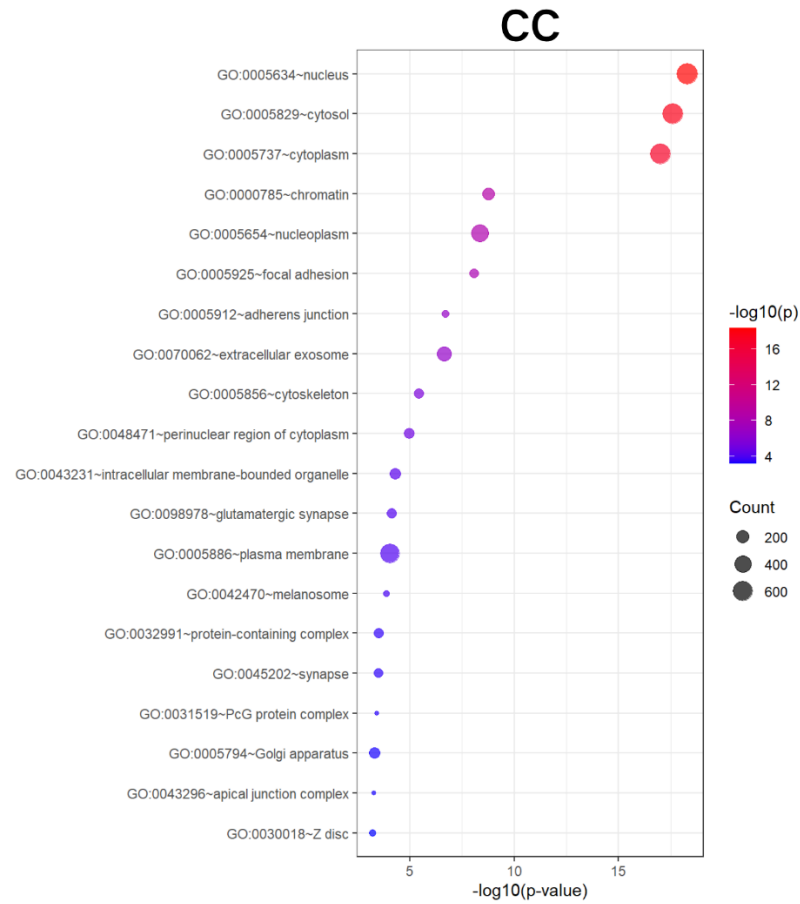


图 7 双价启动子相关基因的 GO 富集分析

对 bulk CUT&Tag 实验后得到的双价启动子关联基因进行 GO 注释与功能富集，包括三个直接注释的子类 (BP、CC、MF)。横坐标为富集显著性 ($-\log_{10}P$)，气泡大小代表相关基因数，颜色表示 P 值

进一步，京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway analysis, KEGG) 通路分析表明，共有 859 个基因被富集至 85 条通路中，其中 58 条通路达到显著水平。富集最显著的三个通路为 Hippo 信号通路(hsa04390)、癌症中的蛋白聚糖通路 (hsa05205)、调控干细胞多能性的通路 (hsa04550)，与组织生长、细胞命运调控密切相关，提示上述调控网络可能在墨西哥钝口螈的再生过程中发挥重要作用（图 8）。

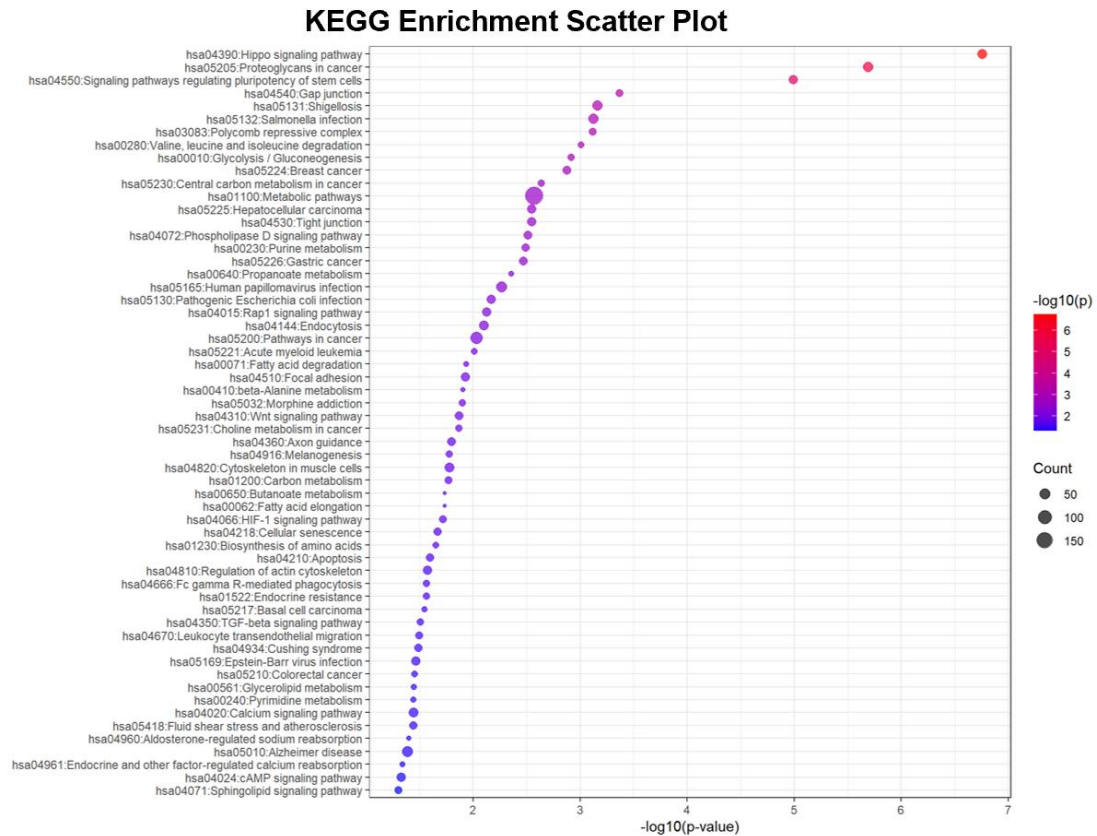


图 8 KEGG 通路富集气泡图

对 bulk CUT&Tag 实验后得到的双价启动子关联基因进行 KEGG 富集分析，展示具有显著性的前 50 个条目。横坐标为富集显著性 ($-\log_{10}P$)，气泡大小代表相关基因数，颜色表示 P 值

3.2.3 墨西哥钝口螈再生芽基的 pseudobulk Paired-Tag 实验

尽管我们成功完成了 bulk CUT&Tag 实验，并获得高质量墨西哥钝口螈再生芽基的 CUT&Tag 文库，想要将 Paired-Tag 应用于墨西哥钝口螈再生芽基细胞还有诸多挑战。与 CUT&Tag 相比，Paired-Tag 流程更加复杂，增加了逆转录、条形码连接步骤等多个步骤。此外，为了获取高质量的单细胞数据，在 Paired-Tag 的前期实验流程中应尽可能的保持细胞核完整。为了评估墨西哥钝口螈细胞核能否耐受 Paired-Tag 中一系列高强度处理步骤，我们进行了 pseudobulk Paired-Tag 实验。组织来自鼻至尾长 12 cm 的 a/a 品系墨西哥钝口螈，分别截取其原生左上臂与第 35 天再生芽基，原生组织视为第 0 天。我们依次进行了组织消化、细胞核制备、Tn5 酶切、逆转录、条形码连接，在连接完条形码之后，我们对细胞核进行自动计数与镜检，发现细胞核数量正常、边界清晰、形状饱满完整，说明墨西哥钝口螈细胞核结构稳定，能够耐受 Paired-Tag 处理步骤，可用于后续文库构建与测序。我们之后继续进行了 DNA 纯化、TdT 加尾和预扩增、索引 PCR 扩增，并获得了约 3.5 GB 的 DNA 测序数据与 3.34 GB 的 RNA 测序数据。

首先，我们对 Paired-Tag 数据进行初步质控（图 6）。考虑到墨西哥钝口螈的注释文件存在部分基因错误连接的问题，我们在初步质控中采用小鼠参考基因组进行比对。受此限制，部分已完成条形码连接的读段未能正确比对，从而导致无用全长连接读段 (Useless Full-ligated reads) 的比例偏高。我们将有用读段 (Useful reads) 与 无用全长连接读段合并统计，作为评估条形码完整连接效率的理论上限。

RNA 文库部分，成功连接所有标签的读段比例 (Full-ligated rate)均值为 48.4%，条形码匹配率在 41.4%~50.0% 之间，说明大部分测序接头成功连接，文库构建效率较好。相比之下，DNA 文库整体质量较差，成功连接所有标签的读段比例极低 (1.6%~3.3%)，条形码匹配率普遍不足 3%，说明文库构建效率有限。我们注意到 pseudobulk Paired-Tag 裂解提取 DNA 时出现磁珠大片贴壁的异常现象，提示提纯出的 DNA 可能过长或浓度过高，进而影响建库质量。后续仍需在 DNA 长度控制方面进一步优化 Paired-Tag 建库条件。

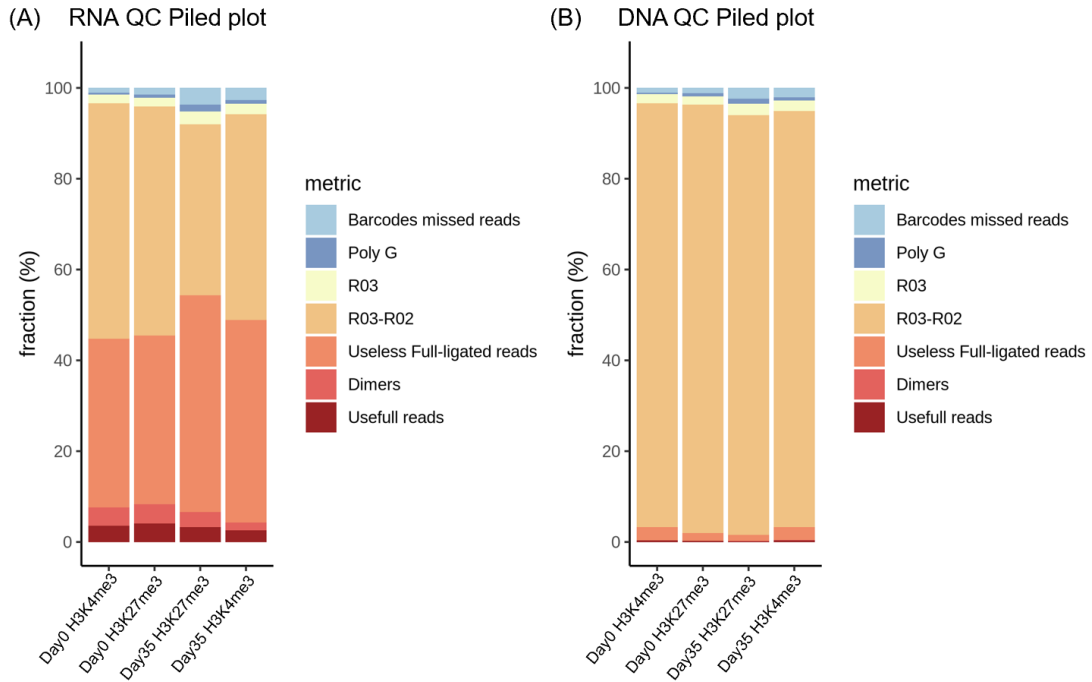


图 6 Paired-tag 数据质检堆积图

(A) RNA 数据质检结果：堆积图显示不同质检指标的百分比分布，包括有用读段 (Useful reads)、无用全长连接读段 (Useless Full-ligated reads)、二聚体 (Dimers)、R03、R03-R02、Poly G 及未匹配条形码的读段 (Barcodes missed reads)；(B) DNA 数据质检结果：堆积图展示与 RNA 质检相同的指标分类，对比 DNA 数据的质量分布情况。图中百分比 (%) 表示各指标在总读段中的占比

四、讨 论

本研究针对墨西哥钝口螈再生芽基组织，通过系统优化组织消化方案，成功获得足量、结构完整、活率较高的单细胞悬液。研究进一步优化了适宜的细胞核提取条件，并利用所获细胞核开展 CUT&Tag 实验。

通过 CUT&Tag 实验，我们获得了高质量的组蛋白修饰文库，并对 H3K4me3 和 H3K27me3 的分布进行了分析。两种组蛋白峰的富集区域符合标准，且在多个再生相关基因区域的分布模式与已有研究结果一致，表明本次结果能够用于进一步分析。GO 富集分析显示，双价启动子关联基因显著富集于与再生相关的生物过程，包括组织发育、细胞迁移、器官形成等功能，符合中期再生芽基的生物学特征。KEGG 通路分析显著富集的通路包括 Hippo 信号通路、癌症相关的蛋白聚糖通路及调控干细胞多能性的信号通路，其功能高度集中于细胞增殖调控、命运决定及组织重建的生物学过程。上述结果表明，我们建立的 CUT&Tag 实验体系可行，所得数据具有生物学意义。

为进一步探索再生过程中组蛋白修饰与转录活动的协同机制，我们开展了 pseudobulk Paired-Tag，以评估蝾螈细胞核对复杂建库流程的耐受性。实验结果显示，条形码连接后细胞核形态仍保持完整，具备建库的基本条件。建库结果显示，RNA 文库的细胞条形码连接效率较高，成功连接三段标签的读段平均超过 45%。相比之下，DNA 文库的细胞条形码连接效率明显偏低，可能原因包括墨西哥钝口螈细胞核大（直径约 20 μ m）、DNA 含量高，导致常规投加量的 pA-Tn5 难以充分作用于所有染色质区域。为此，后续实验可适当增加 Tn5 用量以提升插入效率。此外，本次 Paired-Tag 实验在 Tn5 酶切后采用磁珠纯化提取 DNA，可能无法完全去除大段基因组 DNA，进而影响后续建库效率。为改善该问题，可考虑改用柱纯化方法以去除过长 DNA。

综上所述，该体系在 RNA 维度已获得较高质量文库，为后续开展单细胞 Paired-Tag 实验奠定了良好的技术基础，但整体流程仍有优化空间，下一步将继续对该流程进行完善和优化。

参考文献

1. Poss, K.D. and E.M. Tanaka. Hallmarks of regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2024, 31(9): 1244-61.
2. Brockes, J.P. and A. Kumar. Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine [J]. *Science*, 2005, 310(5756): 1919-23.
3. Simon, A. and E.M. Tanaka. Limb regeneration [J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 2013, 2(2): 291-300.
4. Mchedlishvili, L., et al. Reconstitution of the central and peripheral nervous system during salamander tail regeneration [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(34): E2258-E66.
5. Farkas, J.E., et al. Organ and Appendage Regeneration in the Axolotl [M]. *Regenerative Medicine - from Protocol to Patient: 1 Biology of Tissue Regeneration*. Cham; Springer International Publishing. 2016: 223-47.
6. Feng, W., et al. A scATAC-seq atlas of chromatin accessibility in axolotl brain regions [J]. *Scientific Data*, 2023, 10(1): 627.
7. Campbell, L.J. and C.M. Crews. Wound epidermis formation and function in urodele amphibian limb regeneration [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(1): 73-9.
8. Leigh, N.D., et al. Transcriptomic landscape of the blastema niche in regenerating adult axolotl limbs at single-cell resolution [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 5153.
9. Haas, B.J. and J.L. Whited. Advances in Decoding Axolotl Limb Regeneration [J]. *Trends in Genetics*, 2017, 33(8): 553-65.
10. Kawaguchi, A., et al. A chromatin code for limb segment identity in axolotl limb regeneration [J]. *Developmental Cell*, 2024, 59(16): 2239-53.e9.
11. Otsuki, L. and E.M. Tanaka. Positional Memory in Vertebrate Regeneration: A Century's Insights from the Salamander Limb [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2022, 14(6).
12. Bernstein, B.E., et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells [J]. *Cell*, 2006, 125(2): 315-26.
13. Voigt, P., W.W. Tee, and D. Reinberg. A double take on bivalent promoters [J]. *Genes Dev*, 2013, 27(12): 1318-38.
14. Zhu, C., et al. Joint profiling of histone modifications and transcriptome in single cells from mouse brain [J]. *Nat Methods*, 2021, 18(3): 283-92.
15. Single-cell joint analysis of gene expression and histone modifications in droplets [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2023, 30(10): 1407-8.
16. Schloissnig, S., et al. The giant axolotl genome uncovers the evolution, scaling, and transcriptional control of complex gene loci [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(15).
17. Zhang, Y., et al. Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS) [J]. *Genome Biology*, 2008, 9(9): R137.
18. Ramírez, F., et al. deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis [J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): W160-W5.

19. Lawrence, M., R. Gentleman, and V. Carey. rtracklayer: an R package for interfacing with genome browsers [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1841-2.
20. Sherman, B.T., et al. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update) [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(W1): W216-w21.
21. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44-57.
22. Li, H., et al. Dynamic cell transition and immune response landscapes of axolotl limb regeneration revealed by single-cell analysis [J]. *Protein Cell*, 2021, 12(1): 57-66.
23. Gerber, T., et al. Single-cell analysis uncovers convergence of cell identities during axolotl limb regeneration [J]. *Science*, 2018, 362(6413): eaaq0681.
24. Robinson, J.T., et al. igv.js: an embeddable JavaScript implementation of the Integrative Genomics Viewer (IGV) [J]. *Bioinformatics*, 2023, 39(1): btac830.
25. Kawaguchi, A., et al. A chromatin code for limb segment identity in axolotl limb regeneration [J]. *Dev Cell*, 2024, 59(16): 2239-53.e9.

致 谢

本课题的顺利开展与论文的完成,离不开于淼老师在科研方向和思路上的指导,也得益于郑渊明、邵凯雯、夏敏会、戴云鹏、王决恒、臧怡飞、厉轩等师兄师姐在实验、数据分析及写作过程中给予的耐心帮助与宝贵建议。同时,也感谢实验室其他成员在日常工作中的支持与协助。在此一并致以诚挚的谢意。