

组蛋白 H3Thr3 磷酸化在 Sf9 细胞有丝分裂中的动态定位

张冰, 徐茜, 唐存多, 王姣玲, 吴盼盼, 朱露露, 阚云超*

(南阳师范学院, 河南省伏牛山昆虫生物学重点实验室, 昆虫生物反应器河南省工程实验室,
中英南阳洛桑昆虫生物学联合实验室, 河南南阳 473061)

摘要:【目的】研究组蛋白 H3Thr3 磷酸化这一表观标记在 Sf9 细胞有丝分裂中的功能。【方法】通过固相法合成一段包含组蛋白 H3 第 1–9 位氨基酸的肽段 [ARTKQTARKC], 将第 3 位苏氨酸进行磷酸化修饰 (P-Pep 226555) 或者不修饰 (NP-Pep 080472) 后制备抗体, Western blot 检测抗体的特异性。培养 Sf9 细胞, 通过爬片制备细胞处于有丝分裂不同时期的玻片, 以免疫荧光标记检测磷酸化 H3Thr3 (H3Thr3ph) 抗体在 Sf9 细胞有丝分裂不同时期的定位特点。【结果】在 Sf9 细胞中, 组蛋白 H3Thr3 的磷酸化发生在前期细胞染色体的特定位置; 随着细胞周期的进行, 磷酸化信号逐渐增强, 中期达到最高水平, 有丝分裂后期在形成子细胞的赤道板处均匀分布, 末期仅在赤道板特定位置残留微弱的磷酸化信号。【结论】H3Thr3 的磷酸化与 Sf9 细胞胞质有丝分裂相关。

关键词: Sf9 细胞; 组蛋白 H3; 磷酸化; 有丝分裂; 免疫荧光; 胞质分裂

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2018)11-1247-06

Dynamic localization of histone H3 Thr3 phosphorylation in Sf9 cells during mitosis

ZHANG Bing, XU Qian, TANG Cun-Duo, WANG Jiao-Ling, WU Pan-Pan, ZHU Lu-Lu, KAN Yun-Chao* (Henan Key Laboratory of Insect Biology in Funiu Mountain, Henan Provincial Engineering Laboratory of Insects Bio-reactor, China-UK-NYNU-Res Joint Laboratory of Insect Biology, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473061, China)

Abstract: 【Aim】 To study the function of histone H3 Thr3 phosphorylation, an epigenetic marker, in Sf9 cells during mitosis. 【Methods】 One peptide of ARTKQTARKC containing the 1st–9th amino acids of histone H3 was synthesized by solid phase method, and the antibody was prepared by phosphorylation of H3 at threonine 3 (P-Pep 226555) or non-phosphorylation (NP-Pep 080472). The specificity of the antibody was detected through Western blot. Sf9 cells were cultured, slides of the mitotic cells at different stages were prepared by cell climbing, and the localization characteristics of phosphorylated H3 Thr3 (H3 Thr3ph) antibody at different stages of mitotic Sf9 cells were detected by cytology immunofluorescence. 【Results】 In Sf9 cells, the H3 Thr3 phosphorylation began to appear on chromosomes at the prophase with a specific distribution pattern, and the fluorescent signals of H3 Thr3 phosphorylation gradually increased and reached the maximum in metaphase as the cell cycle went on. At the anaphase, the fluorescent signals of H3 Thr3 phosphorylation were distributed uniformly on the equatorial plate where the new daughter cells form, and only very weak signal vestigial was located at specific places at the

基金项目: 南阳师范学院校级科研项目 (ZX2016001); 河南省高等学校重点科研项目 (17A180009)

作者简介: 张冰, 女, 1987 年 4 月生, 河南南阳人, 博士研究生, 讲师, 研究方向为昆虫细胞生物学, E-mail: 15236029833@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yckan1974@nynu.edu.cn

收稿日期 Received: 2018-05-10; 接受日期 Accepted: 2018-06-19

telophase. 【Conclusion】 Histone H3 Thr3 phosphorylation is associated with cytokinesis in Sf9 cells during mitosis.

Key words: Sf9 cell; histone H3; phosphorylation; mitosis; immunofluorescence; cytokinesis

自从 20 世纪 60 年代 Vincent Allfrey 等阐述了可以通过对组蛋白进行甲基化或乙酰化修饰进而改变核小体的结构及功能的开创性工作以来 (Allfrey *et al.*, 1964), 人们已经知道组蛋白存在翻译后修饰 (post-translational modification, PTM)。这些翻译后修饰可以通过高分辨率的 X-射线衍射进行观察分析 (Luger *et al.*, 1997)。已有的研究表明, 这些组蛋白 N 末端氨基酸残基上的翻译后修饰会改变相邻核小体的相互关系从而影响染色质的结构; 此外, 它们还可以招募染色质重塑酶并利用水解所产生的 ATP 改变核小体的定位进而改变转录、复制、重组和修复过程 (Bannister and Kouzarides, 2011)。早期在研究牛胸腺染色质以一种不依赖 cAMP 的方式催化组蛋白磷酸化时, 根据不同核小体的碱基组成以及所带电荷情况, 推测发生磷酸化的位点位于组蛋白 H3 第 3 位的苏氨酸上 (Shoemaker and Chalkley, 1980)。2005 年 Dai 等人发现单倍体生殖细胞特异性核蛋白激酶 (haploid germ cell-specific nuclear protein kinase, Haspin) 可以催化组蛋白 H3Thr3 的磷酸化修饰 (Dai *et al.*, 2005), 通过与黏连蛋白 (cohesion) 互作影响有丝分裂末期姐妹染色单体的分离, 使其停滞在早前期的状态 (Dai *et al.*, 2009)。

对哺乳动物以及酵母细胞有丝分裂的研究发现, Haspin 催化组蛋白 H3Thr3 磷酸化, 染色体乘客复合体 (chromosomal passenger complex, CPC) 中的 Survivin 亚基通过 BIR 结构域识别磷酸化的 H3Thr3 (Kelly *et al.*, 2010), 从而将 CPC 中的激酶组分 Aurora B 定位到中期染色体的内侧着丝粒区 (Wang *et al.*, 2010), 并激活着丝粒区的 Aurora B 激酶活性, 催化下游的组蛋白磷酸化以调控有丝分裂中期姐妹染色单体的双取向 (Yamagishi *et al.*, 2010)。进一步的研究则表明 Haspin 和 Aurora B 以及 CPC 之间通过组蛋白磷酸化形成一个正反馈回路不断调控有丝分裂周期中的染色体动态变化 (Wang *et al.*, 2011)。此外, Polo 样激酶 1 (polo-like kinase 1, Plk1) 可以通过识别 Haspin 在间期被 CycB 和 Cdk1 磷酸化的位点进而解除它的失活状态 (Combes *et al.*, 2017), 使其在进入分裂期时恢复活性状态, 催化相应的底物 H3Thr3 磷酸化 (H3Thr3ph) 从而调控有丝分裂中的染色体正确分离 (Zhou *et al.*, 2014;

Liang *et al.*, 2018)。

本研究使用特异性抗组蛋白 H3Thr3 磷酸化的抗体, 以草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* Sf9 细胞系为实验材料, 应用免疫荧光技术对其有丝分裂过程中 Thr3 磷酸化组蛋白 H3 的细胞周期动态定位进行研究, 为研究组蛋白翻译后修饰在昆虫弥散型着丝粒染色体中的功能提供基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

细胞: 草地贪夜蛾 Sf9 细胞由华南农业大学惠赠。

抗原: 组蛋白 H3Thr3 磷酸化的肽段 AR (pT) KQTARKC (P-Pep 226555) 以及对照非磷酸化肽段 ARTKQTARKC (NP-Pep 080472) 由上海吉尔生化有限公司通过固相法合成制备。

抗体: 组蛋白 H3Thr3 磷酸化的抗体 (Anti-Histone H3 Thr3 Phosphorylation) 以及非磷酸化的抗体, 由上海吉尔生化有限公司制备; Tubulin 抗体 (Anti-Alpha Tubulin Mouse Monoclonal, 66031-1-Ig) 购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 Sf9 细胞培养

Sf9 细胞用含有 10% 胎牛血清的 TC100 培养基在 28℃ 条件下单层培养。

1.3 斑点杂交 (Dot-Blot) 分析抗体的特异性

蛋白点杂交时, 将合成的肽段 P-Pep 226555 和 NP-Pep 080472 点在 NC 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入组蛋白 H3Thr3 磷酸化的抗体 (1:1 000 稀释, v/v) 和非磷酸化的对照抗体 (1:1 000 稀释, v/v), 4℃ 孵育过夜。二抗使用 HRP 标记的羊抗豚鼠 IgG (1:2 000 稀释, v/v), 室温振荡孵育 1 h, 以 DAB 显色。

1.4 Sf9 细胞系蛋白提取和 Western blot 检测 H3Thr3 磷酸化在 Sf9 细胞系中的定位

收集 1.2 节培养的 Sf9 细胞, 利用凯基核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒 (KGP150, KeyGen Biotech) 进行核蛋白和胞浆蛋白提取。对提取所得蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测, 转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入组蛋白 H3Thr3 磷酸化的抗体 (1:500 稀释, v/v), 4℃ 孵育过夜。二抗使用 HRP 标记的羊

抗豚鼠 IgG(1:2 000 稀释, v/v), 室温振荡孵育 1 h, 以 ECL 化学发光试剂盒(NCI4106, SHHY)显色之后胶片曝光。

1.5 免疫荧光标记分析 H3Thr3 磷酸化在 S9 细胞有丝分裂周期染色体上的定位

参照王姣玲等(2017)方法, 通过细胞爬片制备不同分裂时期的 S9 细胞玻片, 4% 多聚甲醛室温固定 10 min, 1 × PBS 漂洗 3 次, 0.25% 的 Triton X-100 透化 5 min, 1 × PBS 漂洗 3 次, 1% 牛血清蛋白(BSA)室温封闭 30 min, 1 × PBS 漂洗 3 次。组蛋白 H3Thr3 磷酸化的抗体(1:200 稀释, v/v)和 Tubulin 抗体(1:1 000 稀释, v/v)混合后, 37°C 孵育 1 h。Alexa FluorR 594 标记的羊抗豚鼠 IgG (Goat Anti-Guinea Pig IgG, Jackson ImmunoResearch)(1:2 000, v/v)和 FITC 标记的羊抗鼠 IgG (Goat Anti-Mouse IgG, Jackson ImmunoResearch)(1:2 000, v/v), 37°C 孵育 1 h。最后用 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI, 0.01 mg/mL + 90% 甘油)封片固定。细胞免疫荧光标记后, 以 ZEISS 激光共聚焦显微镜观察荧光信号, 识别组蛋白 H3Thr3 磷酸化抗体上结合荧光素 Alexa

Fluor^{GP} 594 偶联的二抗, 使其发出红色荧光; 识别 Tubulin 的抗体上结合荧光素 FITC 标记的二抗, 使其发射绿色荧光; DAPI 嵌入 DNA 中, 使其显示蓝色荧光。DAPI 可以指示染色体的不同凝缩状态, 结合微管蛋白的定位, 标识出有丝分裂的不同时期。

2 结果

2.1 组蛋白 H3Thr3 磷酸化抗体的效价检测

已有的研究表明不同物种中组蛋白 H3 的氨基酸序列高度保守(王姣玲等, 2017), 为了探讨昆虫中组蛋白 H3Thr3 磷酸化的作用机制, 我们通过固相法合成了磷酸化的肽段 AR(pT)KQTARKC (P-Pep 226555) 以及对照的非磷酸化肽段 ARTKQTARKC(NP-Pep 080472) 同时免疫两只豚鼠(GP7277 和 GP7278) 制备抗体。对所得抗体首先进行 ELISA 效价检测, 该部分数据为上海吉尔生化有限公司提供, 结果如图 1 所示。由图 1 可知, 组蛋白 H3Thr3 磷酸化和非磷酸化抗体在稀释倍数为 1:8 000 ~ 1:128 000 范围内线性良好。

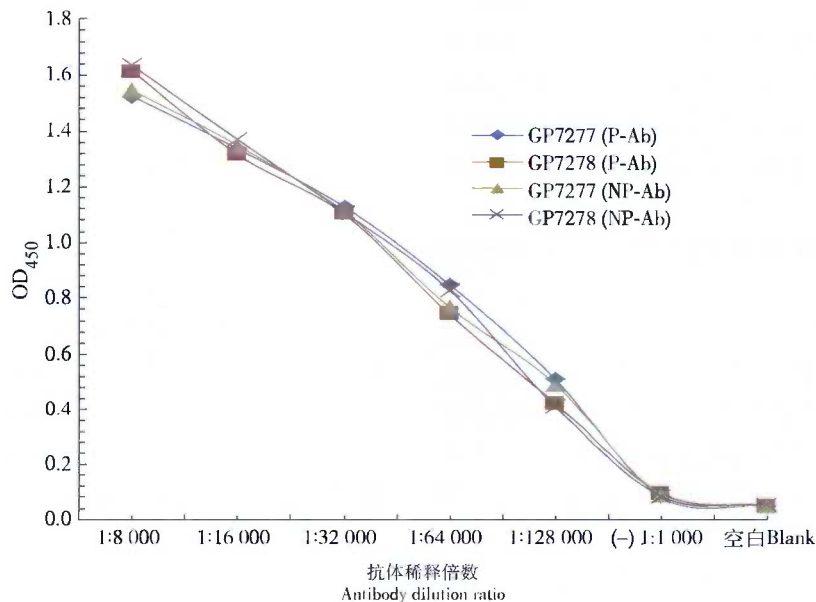


图 1 ELISA 法检测 H3Thr3 磷酸化抗体的效价

Fig. 1 Phosphorylated H3 Thr3 antibody titer detected by ELISA assay

GP7277 (P-Ab), GP7278 (P-Ab): 分别为磷酸化修饰的肽段 AR(pT)KQTARKC 免疫编号为 7277 和 7278 豚鼠所得抗体 Antibodies obtained from guinea pigs No. 7277 and No. 7278 immunized with phosphorylated peptide AR(pT)KQTARKC, respectively; GP7277 (NP-Ab), GP7278 (NP-Ab): 分别为非磷酸化修饰的肽段 ARTKQTARKC 免疫编号为 7277 和 7278 豚鼠所得抗体 Antibodies obtained from guinea pigs No. 7277 and No. 7278 immunized with non-phosphorylated peptide ARTKQTARKC, respectively. 图 2 同 The same for Fig. 2.

2.2 组蛋白 H3Thr3 磷酸化抗体的特异性分析

通过点杂交检测所得组蛋白 H3Thr3 磷酸化抗体的特异性。从图 2(A) 可以看出, 非磷酸化的抗

体 GP7277 (NP-Ab) 和 GP7278 (NP-Ab) 可以同时识别磷酸化和非磷酸化修饰的肽段。磷酸化的抗体 GP7277 (P-Ab) 和 GP7278 (P-Ab) 则只特异地与磷

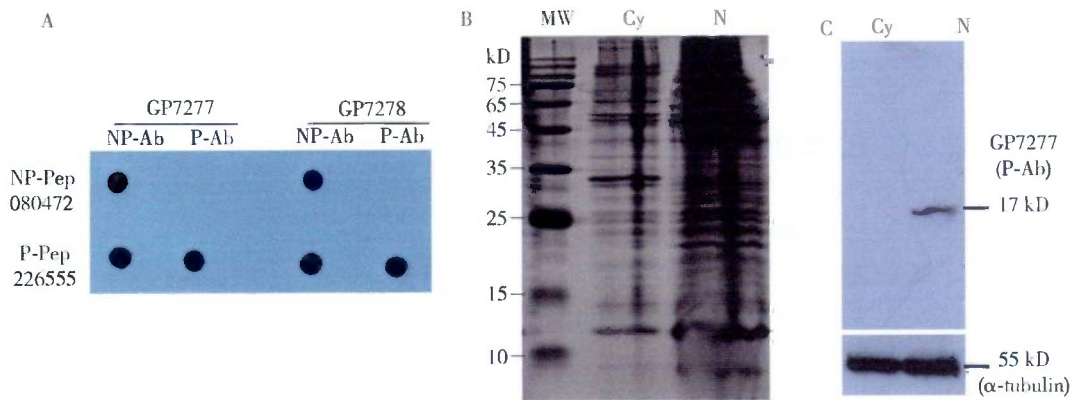


图2 点杂交和 Western blot 检测 H3Thr3 抗体的特异性

Fig. 2 H3 Thr3 antibody specificity detected by dot blot and Western blot

A: 斑点杂交检测 H3Thr3 抗体的特异性 The specificity of H3 Thr3 antibody detected by dot blot (NP-Ab: 非磷酸化抗体 Non-phosphorlated antibody; P-Ab: 磷酸化抗体 Phosphorlated antibody); B: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳之后通过考马斯亮蓝染色检测提取的 S9 细胞系胞浆蛋白 (Cy) 和核蛋白 (N) Detection of cytoplasmic (Cy) and nuclear protein (N) extracted from S9 cell line by Coomassie blue staining after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; C: Western blot 检测 S9 细胞系所提取的胞浆蛋白 (Cy) 和核蛋白 (N) 中磷酸化 H3Thr3 抗体 GP7277 (P-Ab), α -微管蛋白为内参抗体 Detection of phospholated H3 Thr3 antibody GP7277 (P-Ab) in cytoplasmic (Cy) and nuclear protein (N) extracted from S9 cell line by Western blot, and α -tubulin is the internal control antibody.

酸化的肽段杂交。说明我们所制备的组蛋白 H3Thr3 磷酸化抗体是特异识别组蛋白 H3 第 3 位苏氨酸磷酸化修饰的抗体。同时,我们也在 S9 细胞系所提取的胞浆蛋白和核蛋白(图 2: B)中检测了组蛋白 H3Thr3 磷酸化抗体,Western blot 结果显示在 17 kD 处有一条单一的目的条带(图 2: C),表明我们所得到的抗体可以特异识别 S9 细胞系中的对应蛋白,从而可以作为进一步细胞周期定位的抗体进行免疫检测。

2.3 组蛋白 H3Thr3 磷酸化在 S9 细胞有丝分裂中的动态分布

免疫荧光的结果表明,组蛋白 H3Thr3 磷酸化在有丝分裂前期可观察到信号定位在染色体的特定位置(图 3: A),随着细胞进入中期,信号逐渐变多变强,整条染色体上均可以观察到磷酸化信号,不同位置的信号强弱不同(图 3: B),当细胞进入后期时,染色体臂上的信号消失,在胞质分裂的赤道板处有较强的磷酸化信号(图 3: C),末期 H3Thr3 的磷酸化信号仅剩余非常微弱的残留于赤道板的特定位置(图 3: D)。

3 讨论

有丝分裂间期,随着 DNA 完成复制,姐妹染色单体之间通过黏连蛋白 (cohesion) 连接在一起 (Villa-Hernandez and Bermejo, 2018)。随着细胞周期的进行,黏连蛋白会逐渐从染色体上解离,确保有

丝分裂周期的顺利进行 (Dai *et al.*, 2006)。一些保守的组蛋白 N 末端氨基酸残基的翻译后修饰参与染色体动态变化调控。组蛋白 H3 第 3 位的苏氨酸在不同物种中高度保守,它的磷酸化修饰与姐妹染色单体之间的黏连蛋白互作进而保证中期染色体的正确排列以及后期的准确分离 (Dai *et al.*, 2005)。进一步的研究表明,H3Thr3ph 与第 4 位赖氨酸的三甲基化和第 8 位精氨酸的二甲基化修饰协同作用,形成一种新的复合修饰 H3Thr3phK4me3R8me2 (PMM) 标记特定的染色质区域,进而参与特定的生物学功能 (Markaki *et al.*, 2009)。植物中的研究表明组蛋白 H3Thr3 磷酸化修饰定位在功能着丝粒区,并参与有丝分裂后期动力蛋白之间的张力调节,从而影响姐妹染色单体的双取向 (bi-orientation) (Liu *et al.*, 2017)。小鼠卵母细胞减数分裂中的结果表明 H3Thr3ph 对于染色质的凝缩以及减数分裂 I 到减数分裂 II 的转变有重要的调节作用 (Wang *et al.*, 2016)。

对于单着丝粒 (mono-centromere) 染色体而言,H3Thr3ph 在中期定位在内着丝粒区 (inner-centromere), shugoshin 和 prohibitin 2 (PHB2) 蛋白共同参与保护着丝粒区的黏连蛋白不被提前降解 (Takata *et al.*, 2007)。昆虫作为拥有弥散型着丝粒染色体的物种,其有丝分裂周期中染色体的动态变化以及组蛋白磷酸化修饰的变化是否与单着丝粒染色体存在差异? 本研究利用特异制备的识别组蛋白 H3Thr3 磷酸化的抗体,在 S9 细胞系中利用免疫荧

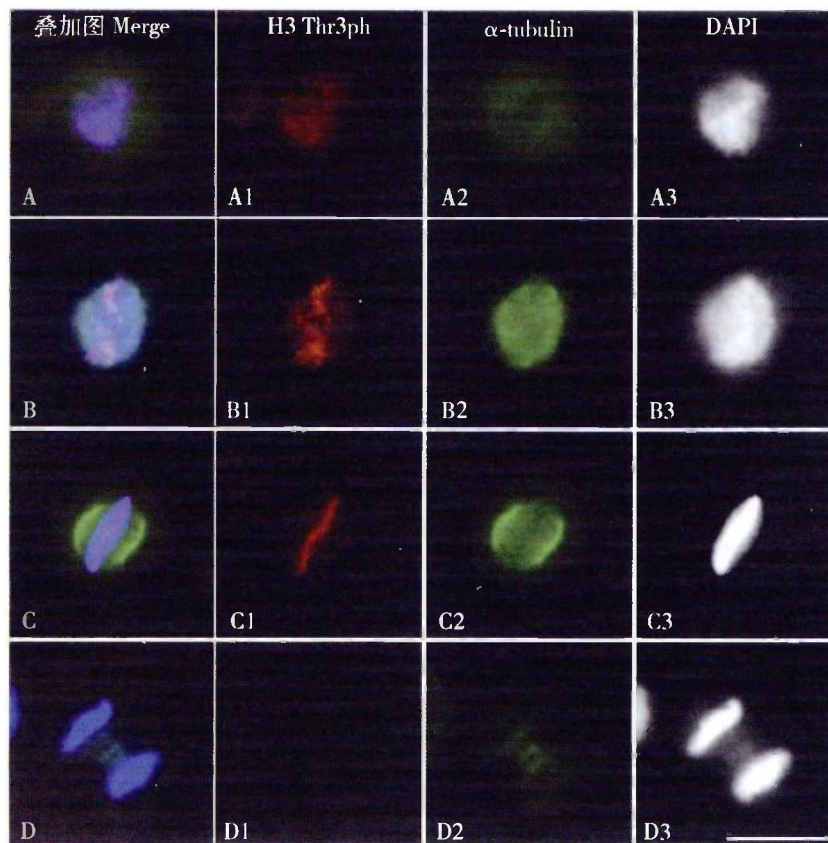


图3 组蛋白 H3Thr3ph 抗体在 Sf9 细胞系有丝分裂周期的定位

Fig. 3 Localization of histone H3 Thr3ph antibody during mitotic cell cycle in Sf9 cell line

前3列中蓝色信号示 DAPI,红色示 H3Thr3 磷酸化抗体的信号,绿色示 α -微管蛋白;最后一列中 DAPI 为灰度图。In the first three columns DAPI is indicated with blue signal, phosphorylated H3 Thr3 antibody with red, and α -Tubulin with green, while in the last column DAPI is the gray scale image. 标尺 Bars = 10 μ m. A: 前期,H3Thr3 磷酸化抗体的信号出现在染色体的一些区域 At the prophase, the phosphorylated H3 Thr3 antibody signals appear in some regions of chromosome; B: 中期,H3Thr3 磷酸化抗体的信号在整条染色体上分布 At the metaphase, the phosphorylated H3 Thr3 antibody signals spread along the whole chromosomes; C: 后期,胞质分裂的赤道板处有均匀的 H3Thr3 磷酸化信号 At the anaphase, there are uniform staining signals of phosphorylated H3 Thr3 antibody on equatorial plate during cytokinesis; D: 末期,在赤道板处仅剩余非常微弱的 H3Thr3 磷酸化抗体的信号 At the telophase, there are very weak staining signals of phosphorylated H3 Thr3 antibody on equatorial plate.

光技术,探讨了这一保守的组蛋白的翻译后修饰在昆虫中的生物学功能。结果表明:组蛋白 H3Thr3 磷酸化在前期在染色质的特定位置出现信号,随着细胞周期的进行,中期磷酸化修饰在整条染色体上分布,后期在胞质分裂的赤道板处可以看到均匀一致的 H3Thr3ph 信号,末期仅残余非常微弱的信号。上述结果说明,在昆虫这一类拥有特殊的弥散型着丝粒的染色体中,组蛋白 H3Thr3ph 参与后期胞质分裂的调节。该结果为进一步探讨组蛋白翻译后修饰在昆虫细胞有丝分裂中的功能提供了前期基础。

参考文献 (References)

- Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE, 1964. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 51(5): 786 - 794.
- Bannister AJ, Kouzarides T, 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.*, 21(3): 381 - 395.
- Combes G, Alharbi I, Braga LG, Elowe S, 2017. Playing polo during mitosis; PLK1 takes the lead. *Oncogene*, 36(34): 4819 - 4827.
- Dai J, Kateneva AV, Higgins JMG, 2009. Studies of haspin-depleted cells reveal that spindle-pole integrity in mitosis requires chromosome cohesion. *J. Cell Sci.*, 122(22): 4168 - 4176.
- Dai J, Sullivan BA, Higgins JMG, 2006. Regulation of mitotic chromosome cohesion by Haspin and Aurora B. *Dev. Cell*, 11(5): 741 - 750.
- Dai J, Sultan S, Taylor SS, Higgins JMG, 2005. The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev.*, 19(4): 472 - 488.
- Kelly AE, Ghenoiu C, Xue JZ, Zierhut C, Kimura H, Funabiki H, 2010. Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B. *Science*, 330(6001): 235 - 239.
- Liang C, Chen QF, Yi Q, Zhang M, Yan HY, Zhang B, Zhou LL,

- Zhang ZL, Qi FF, Ye S, Wang FW, 2018. A kinase-dependent role for Haspin in antagonizing Wapl and protecting mitotic centromere cohesion. *EMBO Rep.*, 19(1): 43–56.
- Liu YL, Su HD, Liu Y, Zhang J, Dong QH, Birchler JA, Han FP, 2017. Cohesion and centromere activity are required for phosphorylation of histone H3 in maize. *Plant J.*, 92(6): 1121–1131.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ, 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648): 251–260.
- Markaki Y, Christogianni A, Politou AS, Georgatos SD, 2009. Phosphorylation of histone H3 at Thr3 is part of a combinatorial pattern that marks and configures mitotic chromatin. *J. Cell Sci.*, 122(16): 2809–2819.
- Shoemaker CB, Chalkley R, 1980. H3-specific nucleohistone kinase of bovine thymus chromatin. Purification, characterization, and specificity for threonine residue 3. *J. Biol. Chem.*, 255(22): 11048–11055.
- Takata H, Matsunaga S, Morimoto A, Ma N, Kurihara D, Ono-Maniwa R, Nakagawa M, Azuma T, Uchiyama S, Fukui K, 2007. PHB2 protects sister-chromatid cohesion in mitosis. *Curr. Biol.*, 17(15): 1356–1361.
- Villa-Hernandez S, Bermejo R, 2018. Cohesin dynamic association to chromatin and interfacing with replication forks in genome integrity maintenance. *Curr. Genet.*, 64(5): 1005–1013.
- Wang FW, Dai J, Daum JR, Niedzialkowska E, Banerjee B, Stukenberg PT, Gorbsky GJ, Higgins JMG, 2010. Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis. *Science*, 330(6648): 231–235.
- Wang FW, Ulyanova NP, van der Waal MS, Patnaik D, Lens SMA, Higgins JMG, 2011. A positive feedback loop involving Haspin and Aurora B promotes CPC accumulation at centromeres in mitosis. *Curr. Biol.*, 21(12): 1061–1069.
- Wang JL, Ma YF, Wang S, Kan YC, Zhang B, 2017. Dynamic distribution of histone H3 Ser10 phosphorylation in *Spodoptera frugiperda* S9 cells during mitosis. *Acta Entomol. Sin.*, 60(11): 1278–1284. [王姣玲, 马亚飞, 王霜, 阚云超, 张冰, 2017. 组蛋白 H3Ser10 磷酸化在草地贪夜蛾 S9 细胞有丝分裂中的动态分布. 昆虫学报, 60(11): 1278–1284]
- Wang Q, Wei HJ, Du J, Cao Y, Zhang NN, Liu XY, Liu XY, Chen DD, Ma W, 2016. H3 Thr3 phosphorylation is crucial for meiotic resumption and anaphase onset in oocyte meiosis. *Cell Cycle*, 15(2): 213–224.
- Yamagishi Y, Honda T, Tanno Y, Watanabe Y, 2010. Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science*, 330(6648): 239–243.
- Zhou LL, Tian XY, Zhu CL, Wang FW, Higgins JMG, 2014. Polo-like kinase-1 triggers histone phosphorylation by Haspin in mitosis. *EMBO Rep.*, 15(3): 273–281.

(责任编辑: 马丽萍)