



刘小玉, 刘治滩, 荆欣, 冯佩林, 高旭泽, 吴鹰, 李琪明, 樊念, 陈大福, 付中民, 郭睿. 意大利蜜蜂 *AmMETTL3* 基因的分子克隆与表达模式[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(01):99-108.

LIU Xiaoyu, LIU Zhitan, JING Xin, FENG Peilin, GAO Xuze, WU Ying, LI Qiming, FAN Nian, CHEN Dafu, FU Zhongmin, GUO Rui. Molecular cloning and expression pattern determination of *AmMETTL3* gene in *Apis mellifera ligustica*[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(01):99-108.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.01.09

意大利蜜蜂 *AmMETTL3* 基因的分子克隆与表达模式

刘小玉¹ 刘治滩¹ 荆欣¹ 冯佩林¹ 高旭泽¹ 吴鹰¹ 李琪明¹ 樊念¹
陈大福^{1,2} 付中民^{1,2} 郭睿^{1,2*}

(1. 福建农林大学 动物科学学院(蜂学学院), 福州 350002;

2. 福建省蜂疗研究所, 福州 350002)

摘要 为克隆意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)的 *AmMETTL3* 基因, 解析 *AmMETTL3* 蛋白的分子特性, 并测定 *AmMETTL3* 在工蜂不同组织及发育时期的表达谱。通过 PCR 扩增 *AmMETTL3* 的 CDS 并进行 Sanger 测序验证; 使用相关生物信息学软件预测 *AmMETTL3* 的理化性质和分子特性, 鉴定 *METTL3* 的结构域和保守基序, 并构建系统进化树; 采用 RT-qPCR 检测 *AmMETTL3* 在工蜂 7 个组织及 5 个不同发育时期的相对表达量。结果表明: 成功克隆到 *AmMETTL3* 的 CDS 并发现 *AmMETTL3* 不含典型的跨膜结构域和信号肽; *METTL3* 在各种昆虫中高度保守且含 1 个 MT-A70 结构域和 3 个相同的保守基序; *AmMETTL3* 与东方蜜蜂 *METTL3* 的亲缘关系最近; 相较于触角中的表达量, *AmMETTL3* 的表达量在咽下腺中极显著上调 ($P < 0.01$), 在中肠中极显著下调 ($P < 0.01$); *AmMETTL3* 在 3 日龄幼虫中的表达量极显著 ($P < 0.01$) 低于卵中的表达量, 在 12 日龄蛹中的表达量极显著 ($P < 0.01$) 高于卵中的表达量, 在 2、6、12、15 和 18 日龄工蜂体内的表达量极显著 ($P < 0.01$) 低于 1 日龄工蜂体内的表达量。研究结果为深入探究 *AmMETTL3* 的功能及其参与的表现调控机制提供了参考和依据。

关键词 意大利蜜蜂; N^6 -甲基腺苷; 甲基化转移酶 3; MT-A70; 分子特性; 表达模式

中图分类号 S891

文章编号 1007-4333(2024)01-0099-10

文献标志码 A

Molecular cloning and expression pattern determination of *AmMETTL3* gene in *Apis mellifera ligustica*

LIU Xiaoyu¹, LIU Zhitan¹, JING Xin¹, FENG Peilin¹, GAO Xuze¹, WU Ying¹, LI Qiming¹,
FAN Nian¹, CHEN Dafu^{1,2}, FU Zhongmin^{1,2}, GUO Rui^{1,2*}

(1. College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University (College of Bee Science), Fuzhou 350002, China;

2. Institute of Apitherapy of Fujian Province, Fuzhou 350002, China)

Abstract To clone the *AmMETTL3* gene in *Apis mellifera ligustica*, analyze the physicochemical property and molecular characteristics of *AmMETTL3* protein and determine the expression pattern of *AmMETTL3* in different tissues and developmental stages of worker bees. *AmMETTL3* CDS was amplified by PCR and then verified using Sanger sequencing. Related bioinformatic software were used to predict physicochemical property and molecular characteristics, identify structural domains and conserved motifs and construct phylogenetic tree of *AmMETTL3*. RT-qPCR was employed to detect the relative expression

收稿日期: 2023-02-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172792, 31702190); 国家现代农业产业技术体系专项资金项目(CARS-44-KXJ7); 福建省自然科学基金面上项目(2022J01131334); 福建农林大学科技创新专项基金项目(KFb22060XA); 福建农林大学硕士生导师团队项目; 福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)科研扶持项目

第一作者: 刘小玉(ORCID: 0009-0002-0298-2370), 硕士研究生, E-mail: liuxiaoyu2000@163.com

通讯作者: 郭睿(ORCID: 0000-0002-9500-9424), 副教授, 主要从事昆虫-病原互作研究, E-mail: ruiguo@fafu.edu.cn

levels of *AmMETTL3* in seven different tissues and five various developmental stages. The results indicated that the CDS of *AmMETTL3* was successfully cloned, *AmMETTL3* protein do not have typical transmembrane domain and signal peptide, and *METTL3* is highly conserved in various insects including one structure domain MT-A70 and three same conserved motifs. *AmMETTL3* and *A. cerana* *METTL3* were clustered into one group in the phylogenetic tree. The expression level of *AmMETTL3* was significantly up-regulated in hypopharyngeal gland ($P<0.01$), significantly down-regulated in midgut ($P<0.01$) compared with that in antennae. The expression level of *AmMETTL3* in 3-day-old larvae ($P<0.01$) was significantly lower than that in eggs. The expression level of *AmMETTL3* in 12-day-old pupa ($P<0.01$) was significantly higher than that in eggs; the expression level of *AmMETTL3* in workers at 2, 6, 12, 15 and 18 day-old ($P<0.01$) was significantly lower than that in workers at 1 day-old. This study provides references and a basis for further investigating the function of *AmMETTL3* and its role in epigenetic regulatory mechanisms.

Keywords *Apis mellifera ligustica*; N^6 -methyladenosine; methyltransferase 3; MT-A70; molecular characteristics; expression pattern

意大利蜜蜂 (*Apis mellifera ligustica*, 简称意蜂) 不仅为众多野生植物和农作物授粉, 而且因性情温顺、产卵力强和分蜂性弱等优点在世界范围内被广泛饲养^[1], 同时其能生产蜂王浆和蜂蜜等营养保健品, 具有重要的生态、经济和研究价值。

作为一种真核生物中普遍存在且作用关键的表观调控方式, RNA 甲基化修饰已成为国内外各种生物过程和疾病发病机制的研究热点。 N^6 -甲基腺苷 (N^6 -methyladenosine, m^6A) 是真核生物中最丰富的一类 RNA 修饰, 在 RNA 的剪接、翻译和稳定性^[2], 以及细胞生长发育、新陈代谢和免疫防御等诸多生命活动中发挥重要的调控作用^[3]。目前, m^6A 介导的表观调控已被证实与阿尔茨海默病、肝癌、肺癌和食管癌等人类重大疾病密切相关^[4]。甲基化转移酶、去甲基化酶和甲基化阅读蛋白共同决定 RNA m^6A 修饰的动态过程^[5]。 m^6A 甲基转移酶是一个由甲基转移酶 3 (Methyltransferase 3, *METTL3*)、甲基转移酶 14 (Methyltransferase 14, *METTL14*) 和 Wilms 肿瘤 1 相关蛋白 (Wilms' tumor 1-associated protein, WTAP) 等亚基有序组成的蛋白复合物^[6]。其中 *METTL3* 能与 *METTL14* 形成稳定的 *METTL3*-*METTL14* 异二聚体核心复合物^[2], 也能与 WTAP 形成一种影响 m^6A 修饰的复合体^[7], 进而在靶 RNA 的 m^6A 修饰中起到关键作用^[6]。目前, 关于 RNA m^6A 甲基转移酶结构和功能方面的研究主要集中在人类 (*Homo sapiens*)、拟南芥 (*Arabidopsis*)、家蚕 (*Bombyx mori*)、小鼠 (*Mus musculus*) 和 水稻 (*Oryza sativa* L.) 等少数模式生物上^[8-10]。果蝇的甲基转移酶 3 基因 (*Dm ime4*) 被证实可诱导卵子的发

生。在家蚕中, 甲基转移酶 3 基因 (*BmMETTL3*) 能导致细胞周期进程停滞、染色体排列和分离缺陷。Zhang 等^[11] 利用 RNAi 对在家蚕细胞中的 *BmMETTL3* 进行干扰, 发现细胞内的家蚕核多角体病毒蛋白 VP39 的含量增加, 而过表达 *BmMETTL3* 后病毒 VP39 含量下降。Tian 等^[12] 研究发现, 对灰飞虱 (*Laodelphax striatellus*) 的 m^6A 甲基转移酶基因 (*LsMETTL3* 和 *LsMETTL14*) 进行干扰后, 灰飞虱中肠细胞中水稻黑条纹矮缩病毒 (Rice black-streaked dwarf virus, RBSDV) 的含量显著升高, 说明 m^6A 水平与病毒复制之间存在潜在的负调控关系。蜜蜂上 RNA m^6A 的相关研究较为滞后, 迄今仅有 2 例^[13-14]。Bataglia 等^[13] 通过 RT-PCR 实验证实甲基转移酶基因在意大利蜜蜂工蜂脂肪体中表达, 并发现 m^6A 的总体水平在工蜂大脑和脂肪体、蜂王和工蜂 4 日龄幼虫之间均差异显著。

目前, 关于意蜂的 *METTL3* 研究仍然缺失, 相关信息匮乏。本研究拟对意蜂的 *AmMETTL3* 基因进行分子克隆, 通过生物信息学预测 *AmMETTL3* 蛋白的理化性质和分子特性并进行系统进化分析, 检测 *AmMETTL3* 在意蜂工蜂不同组织、器官及不同发育时期的表达谱, 旨在丰富意蜂 *AmMETTL3* 的基本信息, 为进一步探究 *AmMETTL3* 的功能及其参与的表观调控机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 供试生物材料

意蜂工蜂及幼虫取自福建农林大学动物科学学院 (蜂学学院) 教学蜂场的饲养蜂群。

1.2 *AmMETTL3* 基因编码区(CDS)的PCR扩增和Sanger测序

根据前人的研究报道^[14],从GenBank数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/551911>)中查询和下载预测的意蜂 *AmMETTL3* (GenBank ID: 551911)核苷酸序列。采用Primer Premier 5.0软件设计合成特异性PCR引物(*AmMETTL3*-F1: ATGTCAGACGCTTTTGAAGAGATAC和*AmMETTL3*-R1: TTATGATTTACTAGGTTTCA TTGAG)及RT-qPCR引物(*AmMETTL3*-F2: ACAGACGAATCCTTGGGTGACT和*AmMETTL3*-R2: TGGTTGAGTTGTTGGTCCATCC),委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。使用RNA抽提试剂盒(Promega公司,中国)提取意蜂7日龄工蜂中肠样品的总RNA,再利用Oligo DT引物(诺唯赞公司,中国)进行反转录得到相应的cDNA,作为模板进行PCR扩增。反应在PCR仪(Bio-rad公司,美国)上进行,体系和程序均按照郭意龙等^[15]的研究设置。产物经1.5%的琼脂糖凝胶电泳,然后在凝胶成像仪(培清公司,中国)下进行观察和拍照。参照吴鹰等^[16]的方法进行目的片段回收和TA克隆,取少量PCR结果为阳性的菌液送至上海生工进行Sanger测序。将Sanger测序结果与GenBank数据库下载的序列进行比对,完全比对正确的质粒保存于-20℃冰箱。

1.3 *AmMETTL3* 蛋白的生物信息学分析

根据王紫馨等^[17]的方法,使用NCBI网站上的ORF工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)预测*AmMETTL3*的氨基酸序列,采用Expasy网站(<https://www.expasy.org/resources>)上的Protparam、ProtScale和SWISS-model等软件预测和分析*AmMETTL3*的理化性质、亲水性和三级结构,通过NetPhos 3.1 Server、TMHMM、SOPMA和SignalP 4.1 Server等软件进行磷酸化位点、跨膜结构域、二级结构和信号肽的预测和分析,利用PSORTII软件预测亚细胞定位。

1.4 *AmMETTL3* 蛋白的结构域与保守基序预测

按照郭意龙等^[15]的方法,使用Blast的CD-search工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测和分析*AmMETTL3*中的结构域。从NCBI Protein数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>)中查询和下载意

蜂、火红熊蜂(*Bombus pyrosoma*)、黑大蜜蜂(*Apis laboriosa*)、东方蜜蜂(*Apis cerana*)、大蜜蜂(*Apis dorsata*)、小蜜蜂(*Apis florea*)、欧洲熊蜂(*Bombus terrestris*)、美洲东部熊蜂(*Bombus impatiens*)和黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)的METTL3氨基酸序列,通过TBtools软件预测上述9个物种的METTL3中的结构域,采用默认参数。参照孙明会等^[18]的方法预测上述9个物种METTL3包含的保守基序,参数为软件默认。

1.5 *AmMETTL3* 蛋白的系统进化分析

使用Blast工具将意蜂*AmMETTL3*蛋白氨基酸序列比对到NCBI GenBank数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),搜索序列相似性较高的其他物种METTL3蛋白并下载相应的氨基酸序列。通过DNAMAN 8.0软件(LynnonBiosoft公司,加拿大)对智人、家鼠(*Mus musculus*)、意蜂、火红熊蜂、黑大蜜蜂、东方蜜蜂、大蜜蜂、小蜜蜂、欧洲熊蜂、美洲东部熊蜂和黑腹果蝇的METTL3蛋白进行氨基酸序列多重比对。采用Mega 11.0软件的邻接法(Neighbor-Joining)进行1 000次重复计算后构建METTL3的系统进化树。

1.6 *AmMETTL3* 的时空表达谱测定

1.6.1 生物样品制备

挑选群势较强的3群意蜂蜂群作为实验蜂群,利用蜂王产卵控制器将蜂王限制于空脾上,自然产卵12 h后取出蜂王。将巢脾迅速提至实验室,在解剖镜(萨伽公司,中国)下用干净的移虫针将卵($n=50$)收集至干净的离心管,经液氮速冻后保存于-80℃冰箱;取完卵后迅速将巢脾放回原蜂箱。5 d后从实验蜂群中提取巢脾,按照本课题组已建立的方法^[15-19]进行幼虫饲养和取样:1)将2日龄幼虫移至预置饲料的48孔培养板,置于(35±0.5)℃,70%相对湿度(RH)的恒温恒湿箱(精科公司,中国)中饲养,每24 h更换新鲜饲料。2)分别取3日龄幼虫($n=3$)、7和8日龄预蛹($n=3$)和12日龄蛹($n=3$)样品,经液氮速冻后转移至-80℃超低温冰箱保存备用。3)另选取一张成熟封盖子脾,放入恒温恒湿培养箱((35±0.5)℃)培养;收集1 500只刚羽化出房的幼蜂,然后按照杜亚丽等^[20]的方法用无味无油的油漆在每只成蜂的背部进行标记(记为0 d)后放回原蜂群;分别在1、2、6、12、15和18日龄时收集工蜂样品,每个日龄收集3只工蜂,经液氮速冻后保存

于 -80°C 冰箱。

参照张莉等^[21]的方法,收集刚出房的工蜂并置于冰上麻醉,在超净工作台中用干净的眼科镊和眼科剪小心剖取触角、脑、咽下腺、中肠、脂肪体毒囊和表皮,在冰上完成剖取过程以最大限度防止组织RNA降解。剖取的器官或组织分别放入干净的RNA-Free离心管,经液氮速冻后转移至 -80°C 超低温冰箱保存备用。上述试验均进行3次生物学重复。

1.6.2 RNA提取、cDNA合成及RT-qPCR检测

利用RNA抽提试剂盒(Promega公司,美国)分别提取上述样品的总RNA,通过反转录后得到相应的cDNA,作为qPCR反应的模板。以肌动蛋白基因 *actin* (GenBank ID: 406122) 作为内参(*actin*-F: CCTAGCACCATCCACCATGAA和*actin*-R: GAAGCAAGAATTGACCCACCAA)。通过ABI Quant Studio 3荧光定量PCR系统(ABI公司,美国)检测 *AmMETTL3* 在不同组织或器官中的相对表达量。按照郭意龙等^[15]的方法设置反应体系和条件,每个反应均进行3次平行重复和3次技术重复。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *AmMETTL3* 的相对表达量。采用GraphPad Prism 7软件进行数据分析和绘图,并利用SPSS Statistics 23软件进行单因素方差分析(ANOVA),以 $P<0.05$ 为显著性阈值。使用Tukey检验法和字母显著标记法两两比较分析实验数据。

2 结果与分析

2.1 *AmMETTL3* CDS的克隆

琼脂糖凝胶电泳结果显示,PCR扩增片段大小约1700 bp,符合预期(图1)。Sanger测序结果显示,目的片段序列与GenBank数据库收录的序列一致。上述结果说明成功克隆到 *AmMETTL3* 基因的CDS。

2.2 *AmMETTL3*的理化性质与分子特性

AmMETTL3 的CDS含1671个核苷酸,编码的 *AmMETTL3* 含556个氨基酸,其中负电荷和正电荷氨基酸的数目分别为79和68个,含量最高和最低的氨基酸分别为Leu(51, 9.20%)和Trp(7, 1.30%)。 *AmMETTL3* 的分子量约为62.61 ku,分子式为 $\text{C}_{2728}\text{H}_{4349}\text{N}_{775}\text{O}_{861}\text{S}_{26}$,理论等电点为5.95,脂溶系数为78.72,平均亲水系数为 -0.61 ,亲水氨基

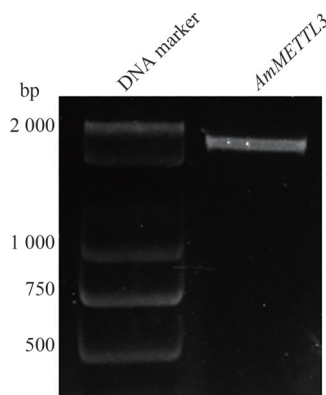


图1 *AmMETTL3* 基因扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis for the amplification product from *AmMETTL3* gene

酸数量多于疏水氨基酸(图2(a));用TMHMM和SignalP 4.1 Server程序没有预测到 *AmMETTL3* 含有任何典型的跨膜结构域和信号肽(图2(b)和(c));PSORT II预测结果显示, *AmMETTL3* 可同时定位于细胞核、细胞质、线粒体和过氧化物酶体,分布概率分别为73.90%、8.70%、13.00%和4.30%;此外,预测到 *AmMETTL3* 蛋白含有35个丝氨酸磷酸化位点,20个苏氨酸磷酸化位点,8个酪氨酸磷酸化位点(图2(d))。

SOPMA程序预测到 *AmMETTL3* 含有261个(46.94%)无规则卷曲、195个(35.07%) α -螺旋,73个(13.13%)延长链和27个(4.86%) β -转角(图3(a));三维结果显示, *AmMETTL3* 与模板5tey. 1. A之间的相似性为58.42%,且C端的起始位置由 α -螺旋构成(图3(b))。

2.3 *AmMETTL3*的结构域与保守基序分析

预测结果显示 *AmMETTL3* 含1个MT-A70(图4(a)),该结构域是cl01947超家族的成员,位于第366~526位氨基酸之间;火红熊蜂、黑大蜜蜂、东方蜜蜂、大蜜蜂、小蜜蜂、欧洲熊蜂和美洲东部熊蜂的 *METTL3* 也均含1个MT-A70,而黑腹果蝇 *METTL3* 同时含1个MT-A70和1个MDN1(图4(b))。另外,在 *AmMETTL3* 中鉴定到3个保守基序: Motif 1、Motif 2和Motif 3;类似地,在火红熊蜂、黑大蜜蜂、东方蜜蜂、大蜜蜂、小蜜蜂、欧洲熊蜂、美洲东部熊蜂和黑腹果蝇的 *METTL3* 蛋白中同样鉴定到上述3个保守基序(图4(c))。

2.4 *AmMETTL3*蛋白的系统进化分析

搜索结果显示意蜂含2个 *METTL3*,而火红熊

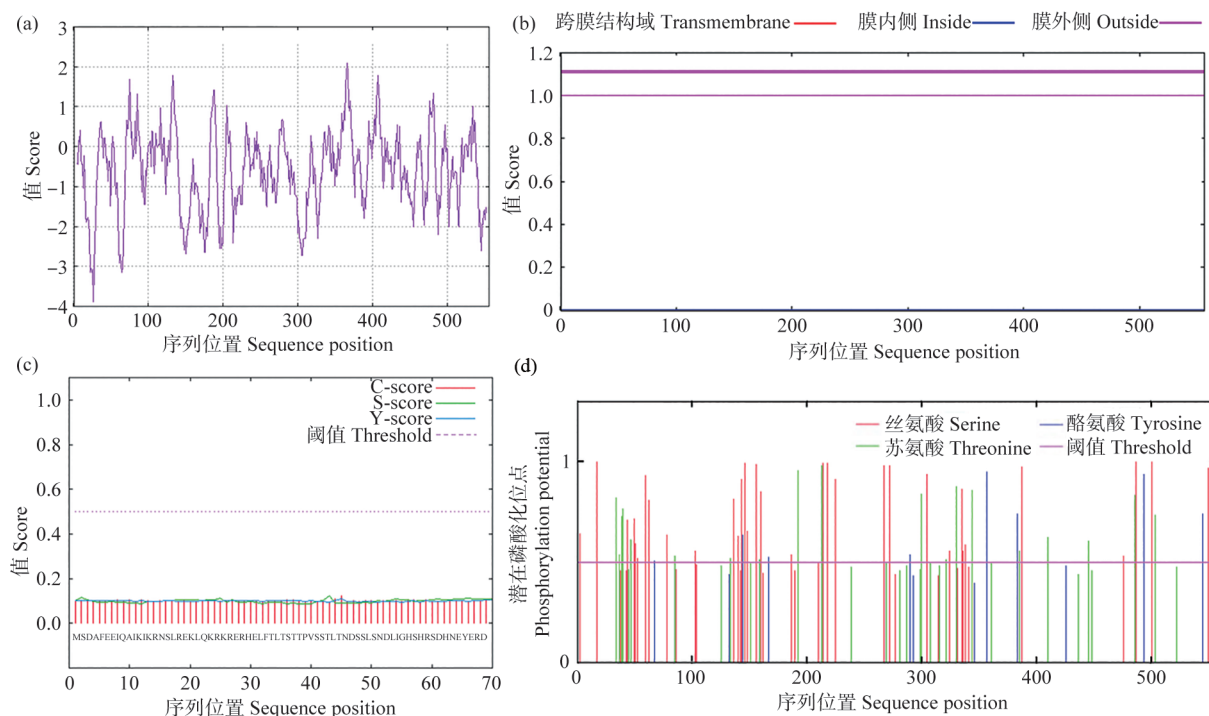


图 2 *AmMETTL3* 蛋白的亲水性(a)、跨膜螺旋域(b)、信号肽(c)和磷酸化位点(d)

Fig. 2 Hydrophilia (a), transmembrane domain (b), signal peptide (c) and phosphorylation sites (d) of *AmMETTL3* protein

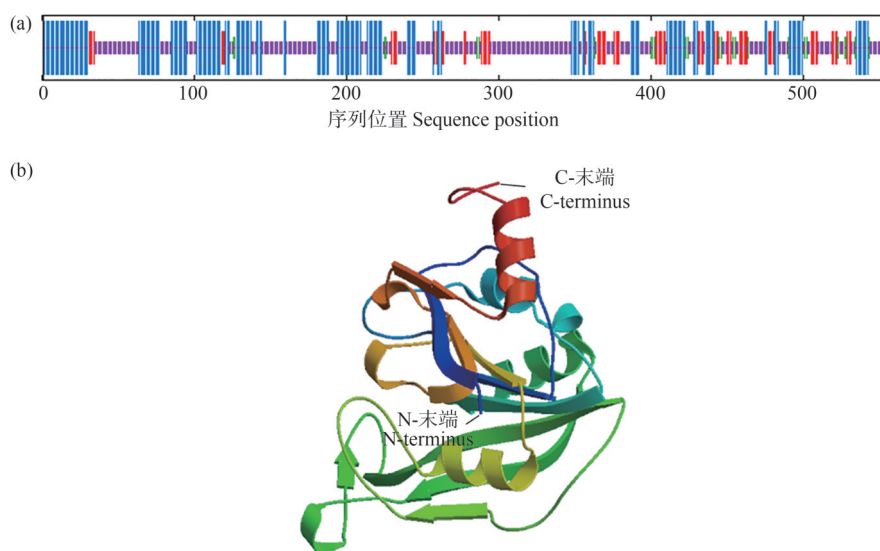


图 3 *AmMETTL3* 蛋白的二级结构(a)和三级结构(b)

Fig. 3 Secondary structure (a) and tertiary structure (b) of *AmMETTL3* protein

蜂、黑大蜜蜂、东方蜜蜂、大蜜蜂、小蜜蜂、欧洲熊蜂、美洲东部熊蜂和黑腹果蝇均仅含有 1 个 *METTL3*, 智人和家鼠分别含有 4 个和 3 个 *METTL3*。氨基酸序列多重比对结果显示, *AmMETTL3* 与上述 7 个膜翅目昆虫的 *METTL3* 氨基酸序列相似性较高, 介于 84.09%~87.40%;

AmMETTL3 与东方蜜蜂 *METTL3* 的氨基酸序列一致性最高(87.40%), 而与智人 *METTL3* 的氨基酸序列一致性较低(33.39%、35.91%、33.39% 和 3.15%)。系统进化分析结果显示, 意蜂、火红熊蜂、黑大蜜蜂、东方蜜蜂、大蜜蜂、小蜜蜂、欧洲熊蜂、美洲东部熊蜂和黑腹果蝇的 *METTL3* 聚为一

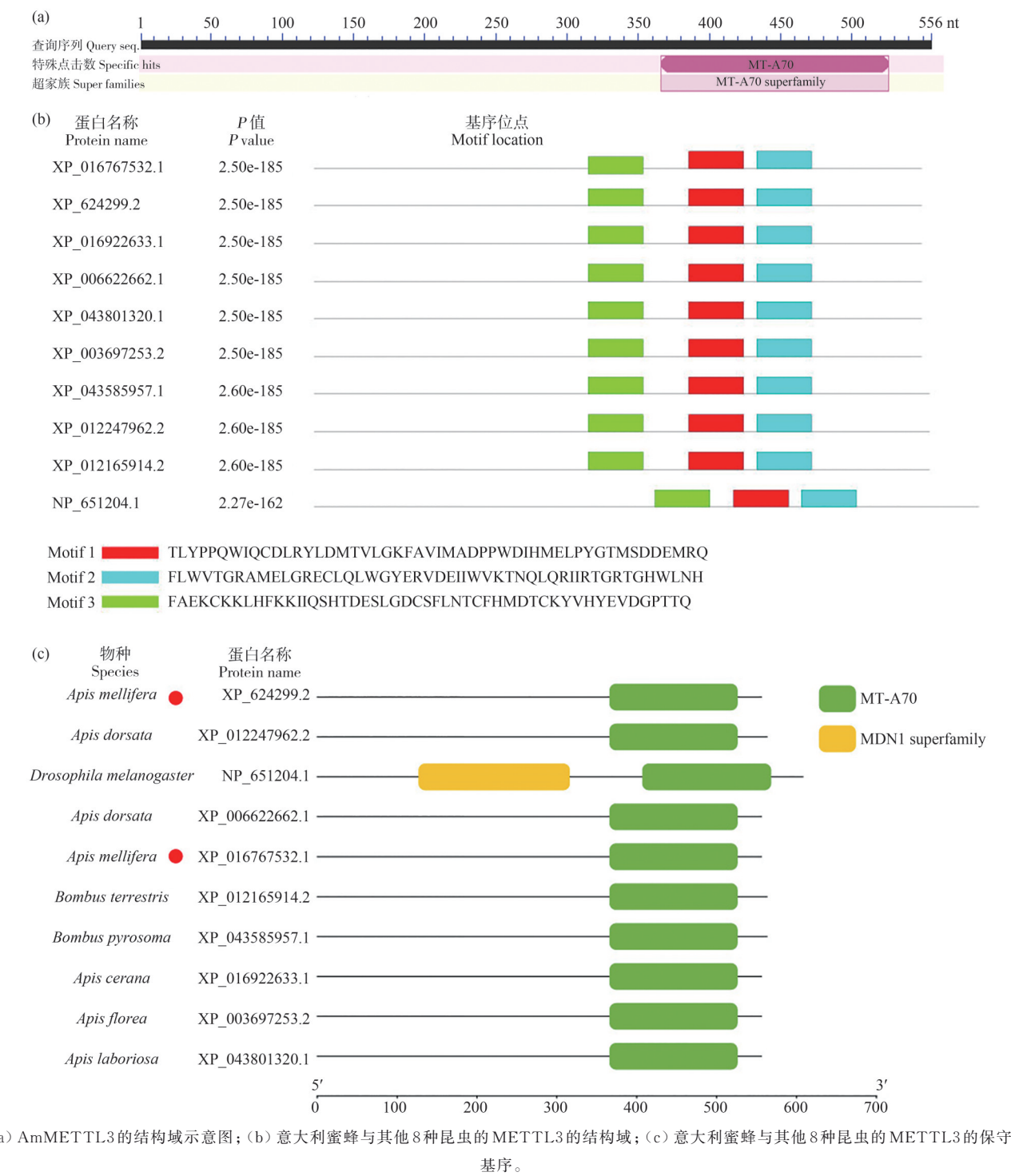
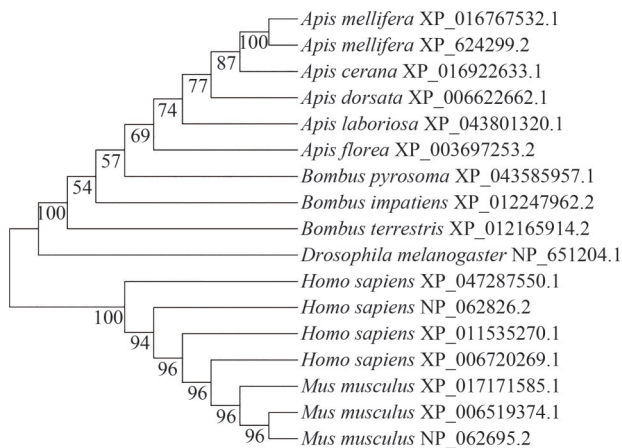


图 4 意大利蜜蜂与其他 8 种昆虫的 METTL3 蛋白含有的结构域和保守基序比较

Fig. 4 Comparison of structural domains and conserved motifs included in METTL3 proteins between *A. m. ligustica* and other eight insects

支，而智人和家鼠的 METTL 聚为另一支；离最近，与大蜜蜂的 METTL3 之间的进化距离次之(图 5)。

AmMETTL3 与东方蜜蜂 METTL3 的直接进化距



各分支上的数字为自举值(1 000次重复抽样检验)。

Numerals on each node represent bootstrap values from 1 000 replicates.

图 5 邻接法构建基于 *METTL3* 的意大利蜜蜂与其他 10 个物种的系统进化树

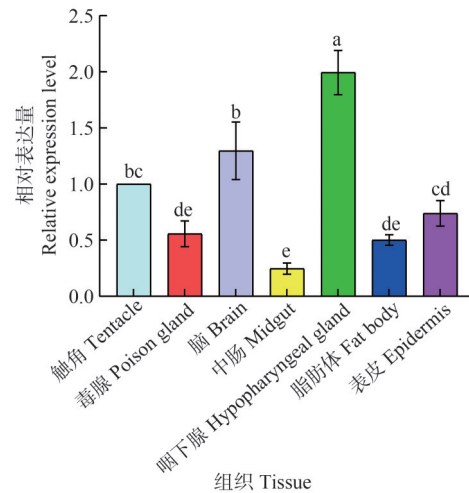
Fig. 5 Phylogenetic tree of *A. m. ligustica* and other ten species based on *METTL3* by neighbor-joining method

2.5 意大利蜜蜂工蜂不同器官或组织中 *AmMETTL3* 的相对表达量测定

RT-qPCR 结果显示, *AmMETTL3* 在刚出房意蜂工蜂的触角、脑、咽下腺、中肠、脂肪体、毒囊和表皮中均有表达, 但表达水平存在差异。相较于触角中的表达量, *AmMETTL3* 的表达量在咽下腺中极显著上调 ($P < 0.01$), 在脑中上调但差异不显著 ($P > 0.05$), 在中肠中极显著下调 ($P < 0.01$), 在毒腺中显著下调 ($P < 0.05$), 在表皮中下调但不显著 ($P > 0.05$); *AmMETTL3* 在咽下腺中的表达量最高, 在中肠中的表达量最低(图 6)。

2.6 意大利蜜蜂工蜂不同发育时期 *AmMETTL3* 的相对表达量测定

AmMETTL3 在意蜂工蜂的卵、3 日龄幼虫、7 和 8 日龄预蛹及 12 日龄蛹中均有表达, 但表达水平存在差异。 *AmMETTL3* 在 7 和 8 日龄预蛹中的表达量与 3 日龄幼虫差异不显著, 均极显著 ($P < 0.01$) 低于卵中的表达量; 在 12 日龄蛹中的表达量极显著 ($P < 0.01$) 高于卵中的表达量(图 7(a))。 *AmMETTL3* 在意蜂 1、2、6、12、15 和 18 日龄工蜂体内均有表达, 但表达水平同样存在差异; 相较于 1 日龄工蜂体内的表达量, *AmMETTL3* 的表达量在 2、6、12、15 和 18 日龄工蜂体内均极显著 ($P < 0.01$) 下调, 在 18 日龄工蜂体内达到最低(图 7(b))。



图中数据为平均值±标准误; 柱上不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Data in the figure are mean±SE. Different letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$). The same below.

图 6 *AmMETTL3* 在意大利蜜蜂工蜂不同器官或组织中的相对表达量

Fig. 6 Relative expression level of *AmMETTL3* in various organs or tissues of *A. m. ligustica* workers

3 讨论

本研究首次对 *AmMETTL3* 进行分子克隆, PCR 和 Sanger 测序结果表明成功克隆到意蜂 *AmMETTL3* 的 CDS, 为进一步开展 *AmMETTL3* 的功能研究奠定了基础。 *AmMETTL3* 的分子量约为 62.61 ku, 分子式为 $C_{2728}H_{4349}N_{775}O_{861}S_{26}$, 理论等电点为 5.95, 脂溶系数为 78.72, 含有 79 个负电荷氨基酸, 68 个正电荷氨基酸及 63 个磷酸化位点; 平均亲水系数为 -0.61, 不含典型的跨膜结构域和信号肽。上述预测结果表明 *AmMETTL3* 可能为亲水性蛋白、非跨膜蛋白和胞内蛋白。此外, 亚细胞定位预测到 *AmMETTL3* 主要分布于细胞核, 这与甲基转移酶机制主要发生在核斑点的实际情况^[22]相符。上述结果丰富了意蜂 *AmMETTL3* 的基本信息, 为进一步开展相关研究提供了参考和依据。

MT-A70 结构域含有甲基转移酶复合物的 *METTL3/14/16* 亚基的催化位点^[23], 可使前体 mRNA 中的腺嘌呤发生序列特异性甲基化^[24]。 Bokar 等^[22]通过 Northern blot 检测人体脾脏、胸腺和卵巢等多种组织的 mRNA 鉴定到 MT-A70 结构域。 Rockwell 等^[23]研究发现 *METTL3* 在进化上较为保

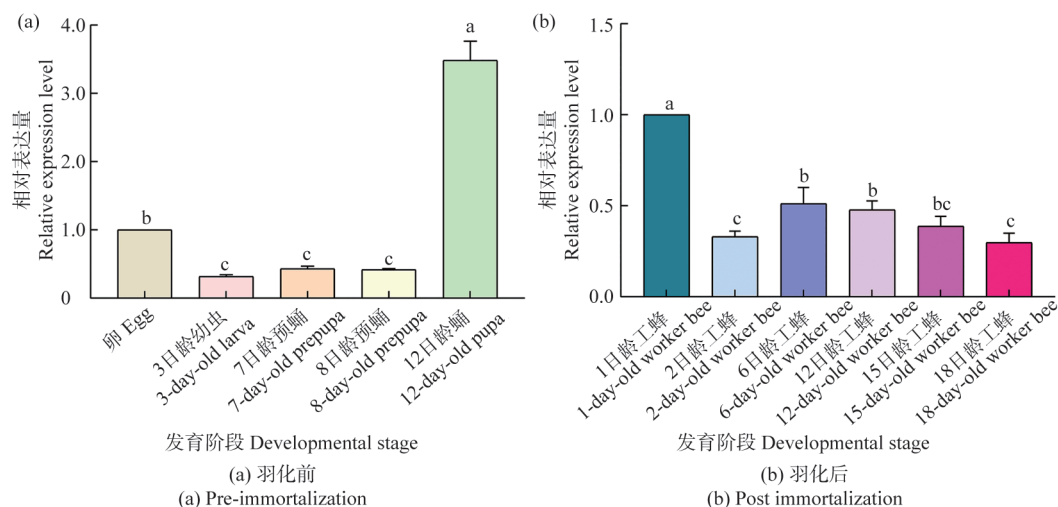


图7 *AmMETTL3*在意大利蜜蜂工蜂不同发育阶段中的相对表达量

Fig. 7 Relative expression level of *AmMETTL3* in different developmental stages of *A. m. ligustica* workers

守且对多细胞生物发育十分重要。在小鼠中, *METTL3*和*METTL14*均被证实与精子发生密切相关^[25]。本研究发现, *AmMETTL3*含有1个MT-A70, 火红熊蜂、黑大蜜蜂、东方蜜蜂、大蜜蜂、小蜜蜂、欧洲熊蜂、美洲东部熊蜂和黑腹果蝇的*METTL3*中同样含有1个MT-A70。此外, 上述9种昆虫的*METTL3*均含有3个相同保守基序(Motif 1、Motif 2和Motif 3)。以上结果表明*METTL3*在这些昆虫中具有较高的保守性, 推测意蜂*AmMETTL3*与果蝇和家蚕等昆虫的*METTL3*具有类似的功能。目前, 人类和小鼠等模式生物的*METTL3*研究较为深入^[26], 未来可借鉴相关报道探究意蜂*METTL3*的功能。

本研究发现, *AmMETTL3*与上述7种膜翅目昆虫, 即火红熊蜂、黑大蜜蜂、东方蜜蜂、大蜜蜂、小蜜蜂、欧洲熊蜂和美洲东部熊蜂的*METTL3*氨基酸序列一致性较高, 意蜂与火红熊蜂、黑大蜜蜂、东方蜜蜂、大蜜蜂、小蜜蜂、欧洲熊蜂、美洲东部熊蜂以及黑腹果蝇这8种昆虫的*METTL3*在进化树上聚为一个支且进化距离较近, 进一步表明蜜蜂属不同蜂种的*METTL3*高度保守。因此, 可参考意蜂*AmMETTL3*序列尝试克隆其他蜂种的*METTL3* CDS区, 进而开展相关功能研究。另外, 还发现意蜂*AmMETTL3*(XP_016767532.1和XP_624299.2)与东方蜜蜂*METTL3*(XP_016922633.1)之间的进化距离最近, 符合西方蜜蜂与东方蜜蜂的互为姐妹种的客观事实^[27]。

*METTL3*表达在牛的心、肝、脾和肾等组织上具有组织特异性^[28]。本研究发现, *AmMETTL3*在意蜂工蜂的触角、脑、咽下腺、中肠、脂肪体、毒囊和表皮中均有表达但表达量存在差异, 这符合*METTL3*组织特异性表达的特点, 同时也暗示*AmMETTL3*功能的广泛性和重要性。推测RNA m⁶A修饰广泛参与意蜂工蜂的消化吸收、新陈代谢和免疫防御等诸多方面的调控。蜂王浆具有丰富的营养, 不仅是蜂王终身的食物, 也是工蜂幼虫早期的食物, 蜜蜂咽下腺是合成和分泌蜂王浆的主要腺体^[29]。本研究中, *AmMETTL3*在咽下腺中的表达水平最高, 表明*AmMETTL3*及其调控的RNA m⁶A修饰可能在蜂王浆的合成与分泌过程中起到重要调控作用, 值得进一步深入研究。

作为一种完全变态昆虫, 蜜蜂的生活史包括卵、幼虫、预蛹、蛹和成虫^[30]。研究表明*METTL3*表达具有发育时期特异性^[13-14]。本研究中, *AmMETTL3*在意蜂工蜂的卵、3日龄幼虫、7和8日龄预蛹及12日龄蛹中均有表达但表达量存在差异, 说明*AmMETTL3*在意蜂工蜂卵、幼虫、预蛹和蛹的发育过程发挥功能。进一步分析发现, *AmMETTL3*在12日龄蛹中的表达量极显著($P < 0.01$)高于卵中的表达量, 且表达水平达到最高。*AmMETTL3*在蛹期被显著激活, 表明*AmMETTL3*在蛹期组织的分解与重组中发挥作用。鉴于RNA m⁶A参与人类等哺乳动物的细胞分化、发育和代谢等过程^[31], m⁶A调控意蜂工蜂蛹期发育的作用及机制值得进一步

深入研究。另外,还发现 *AmMETTL3* 在意蜂 1、2、6、12、15 和 18 日龄工蜂体内均有表达但表达水平同样存在差异,表明 *AmMETTL3* 及其参与的 RNA m⁶A 修饰可能在成年蜜蜂的发育过程发挥重要的调节作用。目前,本课题组已建立蜜蜂基因的 RNAi 及功能研究技术体系,下一步的工作重点是通过饲喂或注射 dsRNA(或 siRNA)对 *AmMETTL3* 进行沉默以明确其在意蜂变态发育中的分子功能。

4 结 论

本研究成功克隆到 *AmMETTL3* 基因的 CDS,明确了 AmMETTL3 蛋白的理化性质和分子特性,发现 METTL3 蛋白在意蜂、东方蜜蜂、大蜜蜂、小蜜蜂、黑大蜜蜂、欧洲熊蜂、金环胡蜂、美洲东部熊蜂和黑腹果蝇中具有高度保守性,并揭示了 *AmMETTL3* 在意蜂工蜂不同组织及发育时期的动态表达规律。

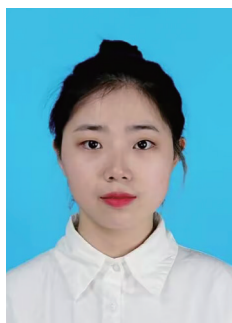
参考文献 References

- [1] 秦秋红. 东方蜜蜂与西方蜜蜂学习记忆比较及蜜蜂学习记忆相关分子机理分析[D]. 南昌: 江西农业大学, 2013
- [2] Qin Q H. Comparison of learning and memory of *Apis cerana* and *Apis mellifera* and analysis of related molecular mechanism of learning and memory in honeybee [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2013 (in Chinese)
- [3] Li F L, Kennedy S, Hajian T, Gibson E, Seitova A, Xu C, Arrowsmith C H, Vedadi M. A radioactivity-based assay for screening human m⁶A-RNA methyltransferase, METTL3-METTL14 complex, and demethylase ALKBH5[J]. *Journal of Biomolecular Screening*, 2016, 21(3): 290-297
- [4] Zhao B S, Roundtree I A, He C. Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, 18(1): 31-42
- [5] Han M, Liu Z, Xu Y Y, Liu X T, Wang D W, Li F, Wang Y, Bi J Z. Abnormality of m⁶A mRNA methylation is involved in Alzheimer's disease [J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2020, 14: 98
- [6] Meyer K D, Jaffrey S R. Rethinking m⁶A readers, writers, and erasers[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2017, 33: 319-342
- [7] Liu S P, Zhuo L J, Wang J J, Zhang Q, Li Q J, Li G H, Yan L L, Jin T, Pan T, Sui X B, Lv Q, Xie T. METTL3 plays multiple functions in biological processes[J]. *American Journal of Cancer Research*, 2020, 10(6): 1631-1646
- [8] Agarwala S D, Blitzblau H G, Hochwagen A, Fink G R. RNA methylation by the MIS complex regulates a cell fate decision in yeast[J]. *PLoS Genetics*, 2012, 8(6): e1002732
- [9] Zhang H, Shi X R, Huang T, Zhao X N, Chen W Y, Gu N N, Zhang R. Dynamic landscape and evolution of m⁶A methylation in human [J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(11): 6251-6264
- [10] Wang X, Jiang B C, Gu L F, Chen Y D, Mora M, Zhu M, Noory E, Wang Q, Lin C T. A photoregulatory mechanism of the circadian clock in *Arabidopsis*[J]. *Nature Plants*, 2021, 7(10): 1397-1408
- [11] Li B, Wang X, Li Z, Lu C, Zhang Q, Chang L, Li W, Cheng T, Xia Q,

- Zhao P. Transcriptome-wide analysis of N⁶-methyladenosine uncovers its regulatory role in gene expression in the lepidopteran *Bombyx mori* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2019, 28(5): 703-715
- [12] Zhang X, Zhang Y S, Dai K, Liang Z, Zhu M, Pan J, Zhang M T, Yan B Y, Zhu H X, Zhang Z Y, Dai Y P, Cao M M, Gu Y C, Xue R Y, Cao G L, Hu X L, Gong C L. N⁶-methyladenosine level in silkworm midgut/ovary cell line is associated with *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 10: 2988
- [13] Tian S P, Wu N, Zhang L, Wang X F. RNA N⁶-methyladenosine modification suppresses replication of rice black streaked dwarf virus and is associated with virus persistence in its insect vector [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2021, 22(9): 1070-1081
- [14] Bataglia L, Simões Z L P, Nunes F M F. Active genic machinery for epigenetic RNA modifications in bees [J]. *Insect Molecular Biology*, 2021, 30(6): 566-579
- [15] Wang M, Xiao Y, Li Y, Wang X Y, Qi S Z, Wang Y, Zhao L W, Wang K, Peng W, Luo G Z, Xue X, Jia G, Wu L M. RNA m⁶A modification functions in larval development and caste differentiation in honeybee (*Apis mellifera*) [J]. *Cell Reports*, 2021, 34(1): 108580
- [16] 郭意龙, 余苛骏, 赵萧, 钱加瑞, 赵浩东, 张婕, 张杨, 赵红霞, 徐细建, 骆群, 陈大福, 郭睿. 意大利蜜蜂工蜂幼虫 *nkd* 基因的生物信息学分析及功能研究[J]. *微生物学报*, 2022, 62(12): 5005-5017
- [17] Guo Y L, Yu K J, Zhao X, Qian J J, Zhao H D, Zhang J, Zhang Y, Zhao H X, Xu X J, Luo Q, Chen D F, Guo R. Bioinformatic analysis and functional study of *nkd* gene in larvae of *Apis mellifera* ligustica workers [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 5005-5017 (in Chinese)
- [18] 吴鹰, 叶亚萍, 张佳欣, 钱加瑞, 张文德, 余苛骏, 吉挺, 蔺哲广, 赵红霞, 陈大福, 郭睿. 东方蜜蜂微孢子虫感染意大利蜜蜂工蜂过程中 nce-miR-12220 及其靶基因的表达谱 [J]. *菌物学报*, 2022, 41(10): 1546-1557
- [19] Wu Y, Ye Y P, Zhang J X, Qian J J, Zhang W D, Yu K J, Ji T, Lin Z G, Zhao H X, Chen D F, Guo R. Expression profiles of nce-miR-12220 and its target genes during the *Nosema ceranae* infection process of *Apis mellifera* ligustica workers [J]. *Mycosystema*, 2022, 41(10): 1546-1557 (in Chinese)
- [20] 王紫馨, 张文德, 张佳欣, 赵萧, 范小雪, 荆欣, 高旭泽, 陈大福, 郭睿. 东方蜜蜂微孢子虫感染过程中 nce-miR-34537 和靶基因 *PIP5KI* 的表达谱 [J]. *微生物学报*, 2023, 63(2): 731-744
- [21] Wang Z X, Zhang W D, Zhang J X, Zhao X, Fan X X, Jing X, Gao X Z, Chen D F, Guo R. Expression profiles of nce-miR-34537 and the target gene *PIP5KI* during the infection process of *Nosema ceranae* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(2): 731-744 (in Chinese)
- [22] 孙明会, 张佳欣, 张艺琼, 赵浩东, 荆欣, 高旭泽, 郭思佳, 冯佩林, 刘小玉, 陈大福, 付中民, 郭睿. 东方蜜蜂微孢子虫 N⁶-腺苷特异性甲基化转移酶基因的克隆、分子特性及表达模式 [J]. *微生物学报*, 2023, 63(8): 3279-3291
- [23] Sum M H, Zhang J X, Zhang Y Q, Zhao H D, Jing X, Gao X Z, Guo S J, Feng P L, Liu X Y, Chen D F, Fu Z M, Guo R. Cloning, molecular characteristics and expression pattern of N⁶-adenine-specific DNA methyltransferase gene in *Nosema ceranae* [J]. *Journal of Microbiology*, 2023, 63(8): 3279-3291 (in Chinese)
- [24] 叶亚萍, 王杰, 张佳欣, 张凯遥, 顾小雨, 姚雨彤, 任中民, 张杨, 陈大福, 郭睿. 环状 RNA ame_circ_000115 调节蜜蜂球囊菌胁迫下意大利蜜蜂幼虫肠道基因表达 [J]. *生物工程学报*, 2023, 39(1): 217-230
- [25] Ye Y P, Wang J, Zhang J X, Zhang K Y, Gu X Y, Yao Y T, Ren Z M, Zhang Y, Chen D F, Guo R. Circular RNA ame_circ_000115 regulates expression of genes in larval guts of *Apis mellifera* ligustica stressed by *Ascosphaera apis* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(1): 217-230 (in Chinese)
- [26] 杜亚丽, 张中印, 潘建芳, 王树杰, 杨爽, 赵慧婷, 姜玉锁. 中华蜜蜂气味结合蛋白基因 *AcerOBPI4* 的克隆及时空表达 [J]. *中国农业科学*, 2016, 49(19): 3852-3862

- Du Y L, Zhang Z Y, Pan J F, Wang S J, Yang S, Zhao H T, Jiang Y S. Cloning and expression analysis of odorant binding protein gene *AcerOBP14* from *Apis cerana cerana* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(19): 3852-3862 (in Chinese)
- [21] 张莉, 张楠, 江虎强, 吴帆, 李红亮. 中华蜜蜂 NPC2 基因家族克隆及表达模式分析[J]. *中国农业科学*, 2022, 55(12): 2461-2471
- Zhang L, Zhang N, Jiang H Q, Wu F, Li H L. Molecular cloning and expression pattern analysis of NPC2 gene family of *Apis cerana cerana* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2022, 55(12): 2461-2471 (in Chinese)
- [22] Bokar J A, Shambaugh M E, Polayes D, Matera A G, Rottman F M. Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N^6 -adenosine)-methyltransferase [J]. *RNA (New York, N Y.)*, 1997, 3(11): 1233-1247
- [23] Rockwell A L, Hongay C F. The m^6A dynamics of *Profilin* in neurogenesis [J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 987
- [24] Bujnicki J M, Feder M, Radlinska M, Blumenthal R M. Structure prediction and phylogenetic analysis of a functionally diverse family of proteins homologous to the MT-A70 subunit of the human mRNA: M^6A methyltransferase [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2002, 55(4): 431-444
- [25] Lin Z, Hsu P J, Xing X, Fang J, Lu Z, Zou Q, Zhang K J, Zhang X, Zhou Y, Zhang T, Zhang Y, Song W, Jia G, Yang X, He C, Tong M H. Mettl3-/Mettl14-mediated mRNA N^6 -methyladenosine modulates murine spermatogenesis [J]. *Cell Research*, 2017, 27(10): 1216-1230
- [26] Luo Y, Sun Y A, Li L, Mao Y L. METTL3 may regulate testicular germ cell tumors through EMT and immune pathways [J]. *Cell Transplantation*, 2020, 29: 096368972094665
- [27] Kohl P L, Thulasi N, Rutschmann B, George E A, Steffan-Dewenter I, Brockmann A. Adaptive evolution of honeybee dance dialects [J]. *Proceedings. Biological Sciences*, 2020, 287(1922): 20200190
- [28] 杨昕冉, 王建芳, 马鑫浩, 曾林森. m^6A 甲基化修饰相关酶基因在牛脂肪生成中的表达分析[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(7): 70-79
- Yang X R, Wang J F, Ma X H, Zan L S. Expression analyses of m^6A methylase genes in bovine adipogenesis [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(7): 70-79 (in Chinese)
- [29] 黄少康. 蜜蜂生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011
- Huang S K. *Bee Physiology* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2011 (in Chinese)
- [30] 曾志将. 蜜蜂生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007
- Zeng Z J. *Bee Biology* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007 (in Chinese)
- [31] Zhao B S, Roundtree I A, He C. Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, 18(1): 31-42

责任编辑: 董金波



第一作者简介: 刘小玉,女,2000年3月生,湖南耒阳人,福建农林大学在读硕士研究生,主要研究方向为蜜蜂分子生物学。参与福建农林大学硕士生导师团队项目、福建农林大学科技创新专项基金项目 and 福建农林大学动物科学学院(蜂学院)科研扶持项目等。曾获省级优秀毕业生、校三好学生、校优秀共青团员、国家励志奖学金和校级二等奖学金等奖项。



通讯作者简介: 郭睿,副教授,硕士生导师,天然生物毒素国家地方联合工程实验室副主任,福建省蜂疗研究所副所长,福建农林大学杰出青年科研人才、硕士生导师团队带头人、“百人攀登计划”入选者。研究方向为昆虫-病原互作、蜜蜂疾病综合防控。主持国家自然科学基金面上项目、国家自然科学基金青年项目、福建省自然科学基金面上项目和福建省教育厅中青年教师教育科研项目等20余项。荣获福建农林大学优秀教师、优秀班主任、青年五四奖章、校代表性科研成果与重大社会服务贡献奖二等奖、院科研成果与社会服务贡献奖一等奖及博士研究生国家奖学金。作为通讯作者或第一作者在 *Antioxidants*、*International Journal of Molecular Sciences*、*Applied Microbiology and Biotechnology*、《生物工程学报》、《微生物学报》和《昆虫学报》等国内外权威刊物发表论文100余篇;获授权的发明专利4项、新型实用专利3项。担任蜂学领域专业期刊 *Frontiers in Bee Science* 编委,SCI 期刊 *Frontiers in Physiology*、*Frontiers in Genetics*、*Veterinary Sciences* 和 *Life* 的客座主编及 *Journal of Hazardous Material*、*International Journal of Biological Macromolecules*、*RNA Biology*、《微生物学报》、《畜牧兽医学报》和《昆虫学报》等30余本期刊的特约审稿人。