

中华蜜蜂 DNA 甲基化转移酶 Dnmt3 基因 克隆及表达谱分析

刘亭亭, 刘俊峰, 王文祥, 王欢, 王子龙, 曾志将, 颜伟玉*

(江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045)

摘要: 为探究中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 的 DNA 甲基化模式, 本研究采用 RT-PCR 技术克隆了中华蜜蜂 DNA 甲基化转移酶 3 (Dnmt3) 基因 (GenBank 登录号为 JQ740768); 采用荧光定量 PCR 检测不同发育时期工蜂 (4 日龄蛹, 1, 7 和 30 日龄成年蜂及产卵工蜂) 和蜂王 (4 日龄蛹, 1 日龄蜂王和产卵蜂王) 头部的 Dnmt3 基因 mRNA 的表达量。结果表明: 该基因 cDNA 序列全长 2 277 bp, 编码 758 个氨基酸残基, 预测的蛋白分子量为 88.24 kD, 等电点为 7.85。将中华蜜蜂与其他物种的 Dnmt3 基因的结构域进行比对, 同时将该基因推导的氨基酸序列与其他物种的 Dnmt3 氨基酸序列进行同源性比对和系统发育分析, 发现与西方蜜蜂的 Dnmt3 序列一致性高达 99%。该基因在工蜂和蜂王不同发育时期均有表达, 1 日龄工蜂与 7 日龄工蜂中没有显著差异 ($P > 0.05$), 30 日龄工蜂中的表达量显著高于前两者 ($P < 0.05$); 蜂王蛹中的表达量显著高于工蜂蛹 ($P < 0.05$); 1 日龄的蜂王中的表达量显著高于 1 日龄的工蜂 ($P < 0.05$); 产卵工蜂与产卵蜂王中的表达量没有差异 ($P > 0.05$)。这种表达情况提示其可能与工蜂劳动分工及蜜蜂卵巢发育有关。

关键词: 中华蜜蜂; DNA 甲基化; DNA 甲基化转移酶; 基因克隆; 序列分析; 表达谱分析

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2012)03-0284-07

Cloning and expression profiling of the DNA methyltransferase Dnmt3 gene in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae)

LIU Ting-Ting, LIU Jun-Feng, WANG Wen-Xiang, WANG Huan, WANG Zi-Long, ZENG Zhi-Jiang, YAN Wei-Yu* (Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: To explore the pattern of methylation in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*, the DNA methyltransferase 3 (Dnmt3) gene in *A. cerana cerana* was cloned by using RT-PCR, and the quantitative analysis of the expression level of Dnmt3 mRNA in different developmental stages of worker (4 d-old pupa, 1, 7 and 30 d-old workers, and laying worker) and queen (4 d-old pupa, 1 d-old queen and laying queen) were conducted using real-time qPCR. The full-length cDNA of Dnmt3 gene (GenBank accession no. JQ740768) is 2 277 bp, encoding 758 amino acids, and the predicted MW and pI are 88.24 kD and 7.85, respectively. Based on the comparison of the domain and the phylogenetic tree of the amino acids of Dnmt3 in *A. cerana cerana* and other species, the sequence obtained has up to 99% identity with that of *A. mellifera*. The Dnmt3 transcript was clearly detected in different developmental stages of worker and queen, and it was expressed significantly higher in 30 d-old worker than in 1 d- and 7 d-old worker ($P < 0.05$), while no difference existed between 1 d- and 7 d-old worker ($P > 0.05$). The Dnmt3 transcript was expressed higher in queen pupae than in worker pupae ($P < 0.05$), and was higher in 1 d-old queen than in 1 d-old worker ($P < 0.05$). The expression level of Dnmt3 gene between laying worker and laying queen had no significant difference. The results suggested that Dnmt3 may be involved in the division of labor in workers and ovary development in honeybees.

Key words: *Apis cerana cerana*; DNA methylation; DNA methyltransferase; gene cloning; sequence analysis; expression profiling

基金项目: 江西省自然科学基金项目(2010GZN0044); 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20103603110003); 博士后科学基金资助项目(20100481191)

作者简介: 刘亭亭, 女, 1986 年 5 月生, 山东潍坊人, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂分子生物学, E-mail: tingtingnvhai_1@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: 13870083304@163.com

收稿日期 Received: 2012-01-16; 接受日期 Accepted: 2012-03-05

DNA 甲基化 (DNA methylation) 是一种很广泛的遗传学调节机制, 在真核生物体中普遍存在 (Klose and Bird, 2006; Suzuki and Bird, 2008), 它是指在 DNA 甲基化转移酶 (DNA methyltransferases, Dnmts) 的作用下, 将甲基添加在 DNA 分子中的碱基上。通常 DNA 甲基化发生在 DNA 链上的胞嘧啶第 5 位碳原子和甲基间的共价结合, 胞嘧啶由此被修饰成 5 甲基胞嘧啶 (5mC)。胞嘧啶甲基化是一个重要的表观遗传标记, 影响不同类群的基因表达 (Kucharski *et al.*, 2008; Elango *et al.*, 2009; Foret *et al.*, 2009)。在 DNA 胞嘧啶碱基上添加甲基并没有改变 DNA 分子的原有序列, 但是通过 DNA 甲基化的共价修饰作用, 能诱导相同的基因组产生不同的表达模式 (Bird, 2002)。

DNA 甲基化的形成和维持需要 Dnmts 的参与, 该酶家族专一地作用于 CpG 二核苷酸上。随着西方蜜蜂基因组的公布, 科学家首次在昆虫中发现了一个完善的功能性 DNA 甲基化系统 (Wang *et al.*, 2006; Zeng and Soojin, 2010)。蜜蜂拥有 3 种 DNA 甲基化转移酶, 分别是 Dnmt1, Dnmt2 和 Dnmt3, 与哺乳动物的 DNA 甲基化转移酶非常相似, 同源性高 (Wang *et al.*, 2006; Schaefer and Lyko, 2007)。Kucharski 等 (2008) 利用显微注射和 RNA 干扰技术抑制了 Dnmt3 基因的表达, 经 Dnmt3 siRNA 处理过的蜜蜂幼虫大多数发育成具有成熟卵巢的蜂王, 其卵巢管数与蜂群中自然发育的处女蜂王无显著差别。Shi 等 (2011) 通过人工饲喂蜜蜂雌性幼虫, 发现随着蜂王浆饲喂量的增加幼虫头部 Dnmt3 mRNA 相对表达量显著下降, 蜜蜂朝着蜂王方向发育。石元元等 (2011) 通过对 3 日龄的蜜蜂雌性幼虫人工注射 Dnmt3 siRNA, 使其 Dnmt3 表达沉默, 测定出房蜜蜂的形态指标, 发现幼虫也显著朝着蜂王方向发育。这些研究表明, DNA 甲基化与蜜蜂级型分化之间存在紧密的联系。

随着对 DNA 甲基化研究的不断深入, 其重要性也越来越明显。但目前关于蜜蜂 DNA 甲基化的研究主要集中在西方蜜蜂上, 人们对中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 的甲基化模式知之甚少。中华蜜蜂作为我国特有宝贵蜂种资源, 了解它的甲基化模式对于保护和利用中蜂这一宝贵资源具有重要意义。本研究克隆了中华蜜蜂 Dnmt3 基因, 并比较了工蜂和蜂王个体内 Dnmt3 mRNA 表达特征, 分析中华蜜蜂雌性级型分化与 DNA 甲基化联系, 以期揭示中华蜜蜂雌性级型分化的分子机理。

1 材料与方法

1.1 试虫、试剂和仪器

1.1.1 供试昆虫: 取自江西农业大学蜜蜂研究所饲养的中华蜜蜂。

1.1.2 不同处理组蜜蜂样品采集: 选用蜂群群势和蜂种一致的中华蜜蜂 5 群, 随机分为 5 个重复。工蜂和蜂王按以下龄期进行取样。

工蜂 (W): 4 日龄蛹 (蛹期, WP), 1 日龄幼年蜂 (W1d), 7 日龄青年蜂 (W7d), 30 日龄老年蜂 (W30d) 和产卵工蜂 (LW);

蜂王 (Q): 4 日龄蛹 (蛹期, QP), 1 日龄处女王 (Q1d) 和产卵蜂王 (LQ)。

每个龄期每群蜂取 8 头蜜蜂, 取每 4 头蜜蜂头部作为 1 个样品, 用于 Dnmt3 基因 mRNA 表达量的检测, 每个龄期的蜜蜂样品计为 10 个重复。基因克隆所用的 PCR 样品是在巢房口随机取工蜂样。取样后蜜蜂样品立即放入液氮速冻, -80°C 保存, 用于提取总 RNA。

1.1.3 试剂及仪器: 总 RNA 提取试剂盒 Trizol, pEasy-T3 载体, Trans-DH5 α 感受态细胞, X-gal, IPTG, RNA 酶抑制剂购自全式金公司; DNA marker DL2000, M-MLV 反转录酶及 SYBR Green II 荧光定量试剂购自 TaKaRa 公司; dNTP, LA-Taq DNA polymerase 及 DNA 凝胶回收试剂盒购自 PUEX 公司。

普通离心机 (飞鸽 KA-1000 型, 上海安亭科学仪器厂公司产品), 台式冷冻离心机 (Eppendorf 5810R), 移液器 (Eppendorf 公司产品), 普通 PCR 仪 (Eppendorf Mastercycler personal), Real-Time PCR System (Bio-Rad 公司产品)。

1.2 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

每个样品用液氮研磨后, 用 Trizol 试剂盒进行 RNA 的提取。所有操作均按照试剂盒说明书进行, RNA 最后溶于 30 μL RNA-free 的 DEPC 水中, 经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测后, 放入 -80°C 保存。用反转录试剂盒对总 RNA 进行反转录, 反应体系为 50 μL : 8 μL 总 RNA, 10 μL Buffer, 8 μL dNTP, 1.5 μL M-MLV 反转录酶, 3 μL Oligo dT, 1 μL RNA 酶抑制剂, 18.5 μL DEPC 水。反转录反应条件如下: 体系混匀后, 42°C 反应 60 min, 75°C 5 min。反转录产物保存于 -80°C 。

1.3 中华蜜蜂 Dnmt3 引物设计和 PCR 扩增

根据 GenBank 登录的西方蜜蜂 Dnmt3 mRNA 的序列及 EST 序列, 利用 OLIGO 6.0 软件设计 3 对 PCR 扩增引物(表 1), 由上海生工生物工程公司合成。

表 1 中华蜜蜂 Dnmt3 基因引物

Table 1 Primers of Dnmt3 gene of *Apis cerana cerana*

引物功能 Primer function	引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Primer sequence
基因克隆 Gene cloning	Dnmt-F1	ATCTGTCCGTCGGCAAATTGG
	Dnmt-R1	ACCGCTCGTCCAAGGTCCAG
	Dnmt-F2	CAAGGATTATGTCTCCCGTCTA
荧光定量 PCR qRT-PCR	Dnmt-R2	CCACGATGAAGCCCAGTTT
	Dnmt-F3	TCTGTTCGATGGCCTTGGCAC
	Dnmt-R3	CGTTCAGGTTTGATCGGTCCA
	Dnmt-Q-F	CAGATTTCTCGCCCCAGCAT
	Dnmt-Q-R	TCCAGTTCGGTTATCCACAAGG
	Bact-Q-F	GGCTCCCGAAGAACATCC
	Bact-Q-R	TGCGAAACACCGTCACCC

PCR 扩增的反应体系: 反应总体积为 25 μ L, 含 4 μ L cDNA, 2.5 μ L 10 \times PCR buffer, 2 μ L dNTP, 引物各 1 μ L, 0.3 μ L LA-Taq DNA polymerase, 14.2 μ L ddH₂O。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 61 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存待取。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色后, 蒸馏水漂洗, 凝胶成像系统观察分析。

1.4 PCR 产物回收和克隆、鉴定及序列测定

利用 DNA 琼脂糖凝胶试剂盒回收 PCR 产物, PCR 产物经胶回收后连接到 pEasy-T3 载体上(按试剂盒说明操作), 将连接产物转化至 Trans-DH5(感受态细胞, 然后涂布在含有 Ampicillin/X-gal/IPTG 的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 15 h。经蓝白斑筛选后, 挑取 6 个阳性克隆在 LB 液体中(含 Amp⁺), 于 37 $^{\circ}$ C 震荡培养过夜, 对菌落进行 PCR 初步鉴定后, 由上海英骏生物技术有限公司完成测序工作。

1.5 序列的测定和分析

利用 seqMan 软件将测序后获得的小片段序列进行拼接获得完整的 Dnmt3 基因的 mRNA 序列, 采用 NCBI 的 BLAST 软件进行序列相似性比对分析; 采用 Bioedit 对 mRNA 序列进行六读框翻译; 采用 ClustalX 多重序列比较程序将中华蜜蜂与其他已知物种 Dnmt3 基因的 3 个结构域区域进行比对; 采用

Mega4. 1 软件对已报道的物种的 Dnmt3 基因氨基酸序列构建系统进化树。

1.6 荧光定量 PCR

1.6.1 定量引物设计: 在中华蜜蜂 Dnmt3 基因阅读框区设计多对特异引物用于定量 PCR 反应, 根据 Livak 和 Schmittgen (2001) 的方法, 本研究对设计的特异性荧光定量引物进行了筛选, 获得符合要求的特异性引物, 用于后续的实时荧光定量 PCR 反应。同时本研究以 β -Actin 基因作为内参基因(引物为 β act-Q-F 和 β act-Q-R)。荧光定量所用引物序列(表 1)。

1.6.2 荧光定量 PCR 反应: qRT-PCR 反应体系为 20 μ L: 5 μ L 反转录产物, 目的基因上游和下游引物各 0.4 μ L, 4.2 μ L H₂O, 10 μ L SYBR Green II; PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min; 最后以每 5 s 上升 0.5 $^{\circ}$ C 的速度从 61 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C 记录熔解曲线, 每个反转录样品重复 3 次。使用仪器为 Bio-Rad 公司的 MyiQ2。反应结束后收集目的基因与内参基因的 C_T 值, 数据分析方法参考 Liu 和 Saint (2002)。

1.7 数据统计与分析

各基因在不同发育阶段表达量的差异, 采用 SPSS 17.0 软件对原始数据 Sqrt 方法转换后, 再进行 One-way ANOVA 方差分析, 多重比较采用邓肯氏(Duncan)法。

2 结果与分析

2.1 中华蜜蜂 Dnmt3 基因的扩增与鉴定

以第一链 cDNA 为模板, 用 3 对基因特异性引物扩增并拼接获得中华蜜蜂 Dnmt3 基因, 获得了长度为 2 411 bp 的产物。将所得序列在 NCBI 核酸库中进行 Blast 分析, 结果发现该序列与西方蜜蜂 Dnmt3 基因的相似性最高, 推测所获得的片段是中华蜜蜂 Dnmt3 基因 cDNA 片段。

2.2 中华蜜蜂 Dnmt3 基因与其编码蛋白比较分析

中华蜜蜂 Dnmt3 基因 mRNA 序列及编码蛋白质序列如图 1 所示(推测的氨基酸序列位于核苷酸序列之下)。序列测定结果表明得到的中华蜜蜂 Dnmt3 基因开放阅读框 ORF 全长 2 277 bp, 编码 758 个 aa, 预测分子量为 88.24 kD, 等电点为 7.85。在对中华蜜蜂 Dnmt3 基因蛋白序列进行 CDD (Conserved Domain Database, <http://www.ncbi.nlm>.)

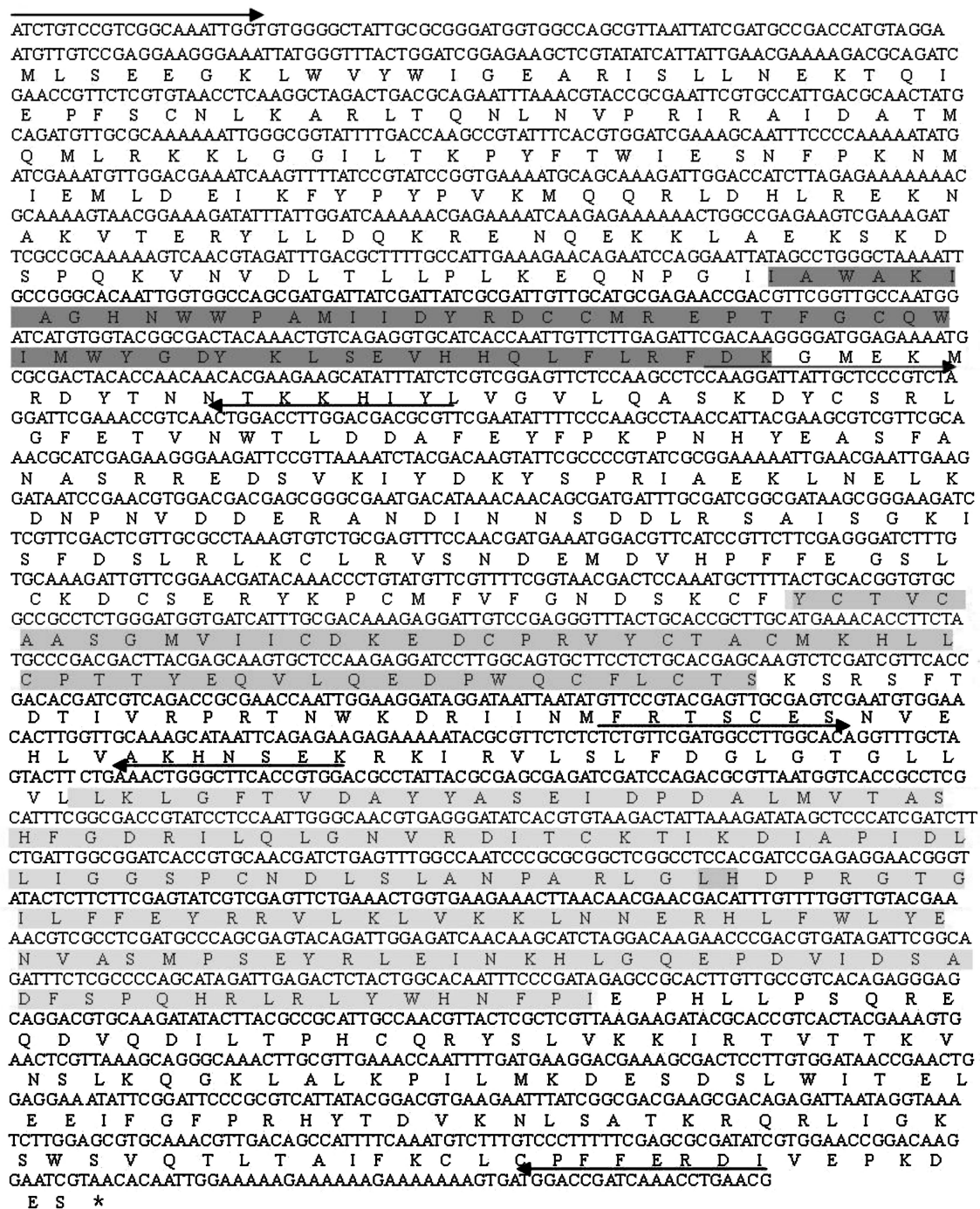


图1 中华蜜蜂 Dnmt3 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of Dnmt3 gene from *Apis cerana cerana*

箭头表示引物序列；灰色阴影表示的保守结构域依次为 PWWP 结构域、半胱氨酸富集的锌结合区域和 C 端的催化活性区；星号表示终止子。The arrow indicates the primer sequence. Conserved domains (PWWP, PHD and Cyt_C5_DNA_methylase) are shaded in grey. Stop codon is indicated by the asterisk.

nih.gov/cdd)分析, 预测得到 3 个保守结构域(图 2), 这是 DNA 甲基化酶所特有的结构域: N 端的可变区, PWWP(proline tryptophan tryptophan proline) 结构域由 58 个氨基酸编码(第 151 ~ 209 位), 其可能与 DNA 非特异性结合有关; 半胱氨酸富集的锌

结合区域由 51 个氨基酸(第 373 ~ 424 位)编码; C 端的催化活性区由 166 个氨基酸(第 471 ~ 637 位)编码。

将中华蜜蜂 Dnmt3 序列与已经报道的其他物种的 Dnmt3 基因蛋白序列进行了同源性比较(图 2)。

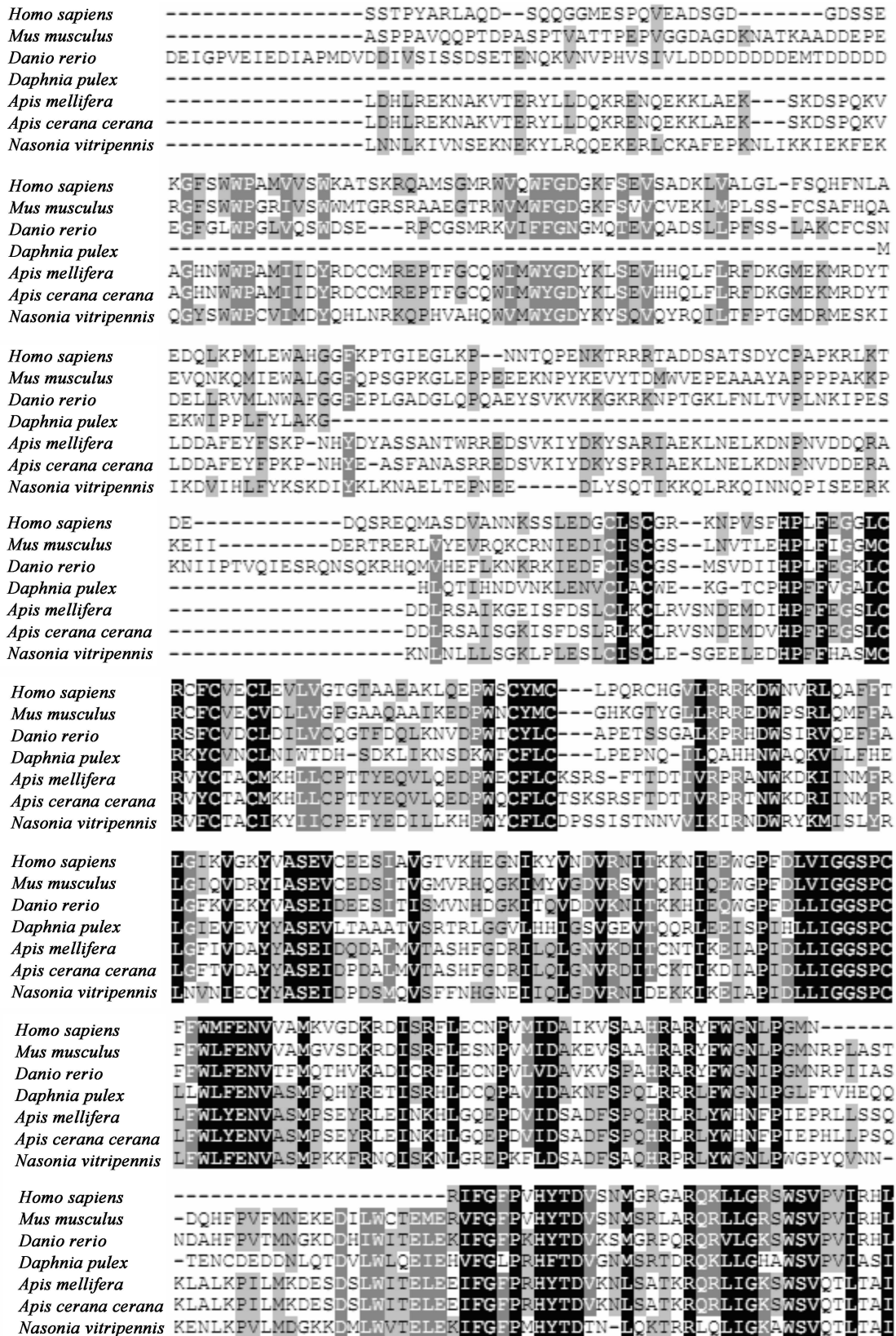


图2 中华蜜蜂与其他物种 Dnmt3 基因 3 个保守结构域区域的比对

Fig. 2 Alignment of three conservative domains of Dnmt3 genetic encoding protein sequence with reported Dnmt3 from other species. 黑色阴影表示保守性极高的残基位点; 灰色阴影表示保守性较高的残基位点; 缺失位点由点代替。Identical amino acids are shaded in black; amino acids with higher identity are shaded in grey; and gaps are indicated by dots.

结果表明这 5 个物种的 Dnmt3 的 3 个结构域区域之间具有较高的一致性。

同时本研究采用 Mega 4. 1 软件对这 5 种已报道的物种的 Dnmt3 基因氨基酸序列构建系统进化树(图 3), 结果表明, 中华蜜蜂与西方蜜蜂序列一致性高达 99%。

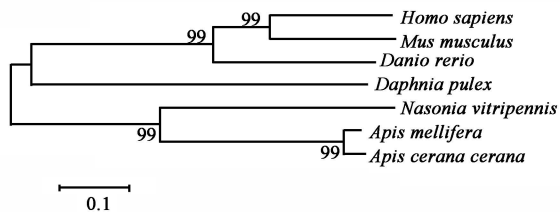


图 3 中华蜜蜂与其他物种 Dnmt3 氨基酸序列的系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of Dnmt3 from *Apis cerana cerana* and other species

2.3 中华蜜蜂 Dnmt3 基因的转录表达

应用荧光定量 RT-PCR 技术分析中华蜜蜂 Dnmt3 基因在工蜂和蜂王不同龄期头部的表达差异(图 4), 结果显示: 1 日龄工蜂与 7 日龄工蜂中没有显著差异($P > 0.05$), 30 日龄工蜂中的表达量显著高于前两者($P < 0.05$) (图 4: A); 蜂王蛹中的表达量显著高于工蜂蛹($P < 0.05$) (图 4: B); 1 日龄的蜂王中的表达量显著高于 1 日龄的工蜂($P < 0.05$) (图 4: C); 产卵工蜂与产卵蜂王中的表达量没有差异($P > 0.05$) (图 4: D)。

由此可见, 在同等营养、环境条件下, 中华蜜蜂的 Dnmt3 基因在各个发育阶段都有表达, 说明在发育和生命活动过程中, 中华蜜蜂体内存在完整的 DNA 甲基化系统。

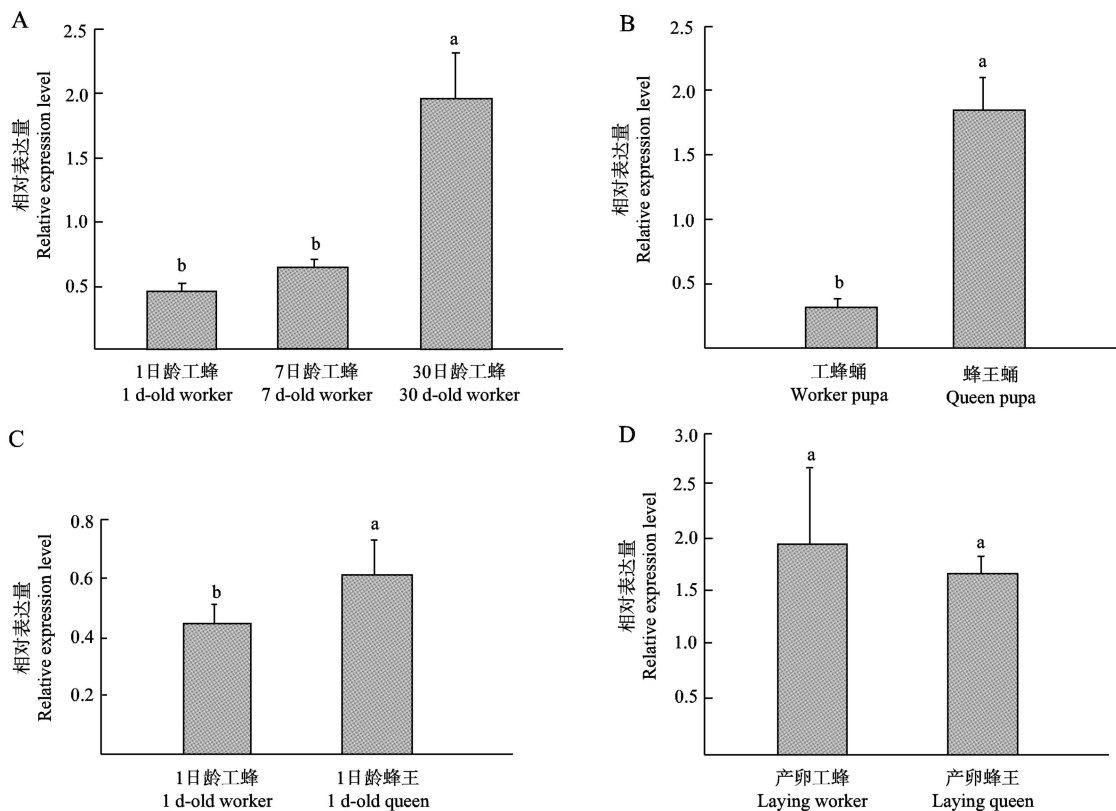


图 4 Dnmt3 在中华蜜蜂工蜂和蜂王各时期的表达量

Fig. 4 Expression level of Dnmt3 in different developmental stages of *Apis cerana cerana* worker and queen

A: 不同日龄工蜂 Different developmental stages of worker; B: 工蜂蛹和蜂王蛹 Worker pupa and queen pupa; C: 1 日龄工蜂和蜂王 1 d-old worker and queen; D: 产卵工蜂和产卵蜂王 Laying worker and laying queen. 柱上不同的字母表示差异显著($P < 0.05$, 单因素方差分析)。Different letters above bars indicate significant difference at the 0.05 level (One-way ANOVA variance analysis).

3 讨论

本研究首次克隆了中华蜜蜂 Dnmt3 基因, 该基

因 cDNA 序列全长 2 277 bp, 推测蛋白质序列为 758 个氨基酸, 等电点为 7.85。序列分析表明, 中华蜜蜂 Dnmt3 基因拥有 DNA 甲基化酶所特有的结

构域: N 端的可变区, PWWP 结构域; 半胱氨酸富集的锌结合区域; C 端的催化活性区。PWWP 结构域可能与 DNA 非特异性结合有关, C 端的催化活性区是催化 DNA 甲基化的酶结构区域。序列比对和氨基酸系统发育树分析表明, 中华蜜蜂的 Dnmt3 基因与西方蜜蜂 Dnmt3 的相似性极高。

在正常蜂群中, 工蜂的生殖功能受到抑制, 而蜂王则能产卵, 这可能是 DNA 甲基化参与调控的结果, 通过抑制工蜂生殖相关基因的表达, 从而导致工蜂不育。近来也有研究表明, 用 RNAi 技术沉默 Dnmt3 基因的表达, 能使刚孵化的幼虫发育成卵巢发育完全的蜂王 (Kucharski *et al.*, 2008)。中华蜜蜂 Dnmt3 基因 mRNA 的表达量在蜂王蛹中显著高于工蜂蛹 ($P < 0.05$), 而该基因在产卵工蜂和产卵王中的 mRNA 表达量差异不显著 ($P > 0.05$)。因此推测 Dnmt3 基因可能参与调控蜜蜂的卵巢发育和繁殖。Dnmt3 基因在蜂王蛹中的高表达可能是蜂王卵巢发育所必需的 (Kucharski *et al.*, 2008)。Dnmt3 基因在不同级型及不同发育阶段有显著的表达差异, 这表明该基因的表达受时间和空间的影响, 这一特性使它能够在不同的阶段调控不同的生理过程。

工蜂在群内担任的工作随着日龄的变化而改变, 从刚出房时的清理巢房到哺育幼虫, 再过渡到泌蜡造脾, 采集食物及蜂群守卫等工作。本研究结果表明, 1 日龄、7 日龄和 30 日龄工蜂的 Dnmt3 基因 mRNA 的相对表达量随着日龄的增加而显著增加, 这意味着 DNA 甲基化可能参与调控了工蜂的分工。随着日龄的增加, 工蜂体内合成了更多的 DNA 甲基转移酶, 来调控整个 DNA 甲基化系统, 进一步调节相关基因的表达。研究表明保幼激素参与调控蜂群内工蜂与日龄相关的劳动分工 (Sullivan *et al.*, 2000), 从事不同工作的工蜂体内保幼激素滴度水平不同, 随着日龄的增加保幼激素滴度也增加 (Huang *et al.*, 2000), 是否工蜂体内的 DNA 甲基化系统调控了与保幼激素相关的基因表达, 使保幼激素滴度上升, 从而促进工蜂行为的改变, 这有待于进一步探讨。

致谢 实验中得到了江西农业大学蜜蜂研究所田柳青、张飞、韩旭、石元元等同学的支持和帮助, 在此表示衷心的感谢。

参考文献 (References)

- Bird A, 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Development*, 16(1): 6.
- Elango G, Rahuman AA, Bagavan A, Kamaraj C, Zahir AA, Venkatesan C, 2009. Laboratory study on larvicidal activity of indigenous plant extracts against *Anopheles subpictus* and *Culex tritaeniorhynchus*. *Parasitology Research*, 104(6): 1381–1388.
- Foret S, Kucharski R, Pittelkow Y, Lockett GA, Maleszka R, 2009. Epigenetic regulation of the honey bee transcriptome: unravelling the nature of methylated genes. *BMC Genomics*, 10(1): 472.
- Huang ZY, Kuang HO, Kuang BY, Qin YC, 2000. Juvenile hormone and division of labour in *Apis cerana*. In: Proceedings of 7th International Bee Research Association Conference and Asian Apicultural Association Conference, Thailand, 2000. 3–6.
- Klose RJ, Bird AP, 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(2): 89–97.
- Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R, 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*, 319(5871): 1827.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $[-\Delta\Delta CT]$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Liu W, Saint DA, 2002. A new quantitative method of real time RT-PCR assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal. Biochem.*, 302(1): 52–59.
- Schaefer M, Lyko F, 2007. DNA methylation with a sting: an active DNA methylation system in the honeybee. *Bioessays*, 29(3): 208–211.
- Shi YY, Huang ZY, Zeng ZJ, Wang ZL, Wu XB, Yan WY, 2011. Diet and cell size both affect queen-worker differentiation through DNA methylation in honey bees (*Apis mellifera*, Apidae). *PLoS ONE*, 6(4): e18808.
- Shi YY, Zeng ZJ, Wu XB, Yan WY, Wang ZL, 2011. Influence of injecting Dnmt3 siRNA on the development of females of the Italian honeybee, *Apis mellifera ligustica*. *Acta Entomologica Sinica*, 54(3): 272–278. [石元元, 曾志将, 吴小波, 颜伟玉, 王子龙, 2011. 人工注射 Dnmt3 siRNA 对意大利蜜蜂雌蜂发育的影响. *昆虫学报*, 54(3): 272–278]
- Sullivan JP, Jassim O, Fahrback SE, Robinson GE, 2000. Juvenile hormone paces behavioral development in the adult worker honey bee. *Hormones and Behavior*, 37: 1–14.
- Suzuki MM, Bird A, 2008. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature Reviews Genetics*, 9(6): 465–476.
- Wang Y, Jorda M, Jones PL, Maleszka R, Ling X, Robertson HM, Mizzen CA, Peinado MA, Robinson GE, 2006. Functional CpG methylation system in a social insect. *Science*, 314(5799): 645.
- Zeng J, Soojin VY, 2010. DNA methylation and genome evolution in honeybee: gene length, expression, functional enrichment covary with the evolutionary signature of DNA methylation. *Genome Biology Evolution*, 2: 770.

(责任编辑: 赵利辉)