



环境昆虫学报

Journal of Environmental Entomology

ISSN 1674-0858, CN 44-1640/Q

《环境昆虫学报》网络首发论文

题目：西方蜜蜂发育基因 *AmWnt1* 的克隆鉴定及时空表达分析
作者：梁立强, 郭永康, 朱雅楠, 李秋方, 李正汉卿, 王若虹, 候梦赏, 龚娇, 李标, 曾何泉, 聂红毅, 苏松坤
收稿日期：2020-09-27
网络首发日期：2021-03-11
引用格式：梁立强, 郭永康, 朱雅楠, 李秋方, 李正汉卿, 王若虹, 候梦赏, 龚娇, 李标, 曾何泉, 聂红毅, 苏松坤. 西方蜜蜂发育基因 *AmWnt1* 的克隆鉴定及时空表达分析. 环境昆虫学报.
<https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1640.Q.20210310.1428.004.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

西方蜜蜂发育基因 *AmWnt1* 的克隆鉴定及时空表达分析

梁立强, 郭永康, 朱雅楠, 李秋方, 李正汉卿, 王若虹, 侯梦赏,

龚 娇, 李 标, 曾何泉, 聂红毅*, 苏松坤*

(福建农林大学动物科学学院(蜂学院), 福州 350002)

摘要: 本研究旨在克隆鉴定西方蜜蜂 *Apis mellifera* 发育相关基因 *AmWnt1*, 分析其在不同发育时期和刚出房工蜂不同组织的表达特征, 为进一步研究 *Wnt1* 基因功能提供理论参考。根据 NCBI 中 *AmWnt1* 基因序列信息, 利用 Primer 6.0 设计引物, RT-PCR 扩增 *AmWnt1* 基因完整的 CDS 序列, 进行生物信息学预测, 用推导的氨基酸序列构建系统进化树; 利用荧光定量 PCR 检测该基因在卵 (1、2 和 3 日龄)、幼虫 (1、3 和 5 日龄)、预蛹 (1 和 3 日龄)、蛹 (0、2、4、6 和 8 日龄)、刚出房工蜂、哺育蜂和采集蜂以及刚出房工蜂 8 个组织中相对表达量。克隆获得西方蜜蜂的 *Wnt1* 基因 CDS 序列, 命名为 *AmWnt1*, 上传 NCBI, 获得 GenBank 登录号 MT993937。全长 1 239 bp, 编码 412 个氨基酸, 预测等电点为 9.48, 相对分子质量为 46.40313KD。序列比对和系统进化树结果表明: *AmWnt1* 蛋白与其他膜翅目昆虫聚为一类, 其中和东方蜜蜂 *Apis cerana* 亲缘关系最近, 序列相似度为 99.50%。时空表达谱结果表明: *AmWnt1* 基因在各个时期中均有表达, 且在胚胎后期表达量最高, 预蛹期和蛹前期表达量相对较高, 其他时期表达量相对较低; *AmWnt1* 基因在刚出房工蜂头、胸、触角表达量高于其他组织。*AmWnt1* 可能参与西方蜜蜂胚胎晚期的神经系统发育和化蛹过程中的四肢发育等关键历程, 为进一步研究 *AmWnt1* 功能提供了理论参考。

关键词: 西方蜜蜂; *AmWnt1*; 基因克隆; 表达谱

中图分类号: Q965;S89

文献标识码: A

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31772684); 国家现代农业产业技术体系(蜜蜂)项目 (CARS-44-KXJ4); 福建省自然科学基金 (2018J05043); 福建省省属高校科研项目 (JK2017014); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202010389014)

作者简介: 梁立强, 男, 1994 年生, 河北石家庄人, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂科学与分子生物学, E-mail: mifengwang122@163.com

*共同通讯作者 Author for correspondence: 聂红毅, E-mail: hnhynie@126.com; 苏松坤, 博士, E-mail: susongkun@fafu.edu.cn.

收稿日期 Received: 2020-09-27; 接受日期 Accepted: 2020-12-22

Cloning and spatio-temporal expression of the developmental gene *AmWnt1* in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apoidea)

LIANG Li-Qiang, GUO Yong-Kang, ZHU Ya-Nan, LI Qiu-Fang, LI Zheng-Han-Qing, WANG Ruo-Hong, HOU Meng-Shang, GONG Jiao, LI Biao, ZENG He-Quan, NIE Hong-Yi*, SU Song-Kun* (College of Animal Sciences (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The objective of this study is to clone and identify the *AmWnt1* gene related to development from *Apis mellifera*, and to analyze its gene expression levels in different developmental stages and tissues in newly emerged workers, which will provide a theoretical reference for further study of the roles of *AmWnt1*. According to the sequence information of *AmWnt1* gene in NCBI, specific primers were designed using Primer 6.0 and the complete CDS sequence of *AmWnt1* gene was amplified via RT-PCR. This sequence was analysed by bioinformatics, and its deduced amino acid sequence was used to construct the phylogenetic tree. The relative expression of this gene was investigated in different development stages and 8 tissues of newly emerged workers by fluorescence quantitative PCR, including eggs (1-day-old, 2-day-old, 3-day-old), larvae (1-day-old, 3-day-old, 5-day-old), pre-pupa (1-day-old and 3-day-old), pupa (0-day-old, 2-day-old, 4-day-old, 6-day-old, 8-day-old), newly emerged workers, nurses, foragers. The *Wnt1* CDS sequence of *A. mellifera*, which was submitted to NCBI (GenBank accession number MT993937), was cloned and named *AmWnt1*. The total length was 1239 bp, encoding 412 amino acids. Predictive analysis showed that the isoelectric point and the relative molecular weight were 9.48 and 46.40313KD, respectively. Sequence alignment and phylogenetic tree analysis showed that *AmWnt1* was clustered into one group with the sequence of other Hymenoptera insects, of which has the closest relationship with *Apis cerana* and the sequence similarity is 99.50%. The spatio-temporal expression profiles of *AmWnt1* showed that it was expressed in all developmental stages, with the highest level in the late embryonic development and a relative higher expression in pre-pupa stage; the expression of *AmWnt1* gene was higher in the head, thorax and antennae than other tissues. *AmWnt1* may play a crucial role in

the nervous system development during the late embryonic stages and limb development during pupation embryogenesis, providing reference for further study on the function of *AmWnt1*.

Key words: *Apis mellifera*; *AmWnt1*; gene cloning; expression profile

Sharma 等 (1976) 发现影响果蝇翅膀发育的关键基因 *wingless*, 由于该基因突变的果蝇成虫表现出翅膀消失的特征, 因此, *wingless* 基因又称为无翅基因。Nusse 等 (1982) 发现了影响癌症的关键基因 *int-1*, 该基因被小鼠乳腺肿瘤病毒激活后可以导致肿瘤。后来研究者发现小鼠 *int-1* 基因在果蝇中的同源基因就是 *wingless*, 因此把这类基因统一命名为 *Wnt* 基因, *int-1* (*wingless*) 基因重新命名为 *Wnt1* 基因 (Rijsewijk *et al.*, 1987; Nusse *et al.*, 1991)。*Wnt* 蛋白结构域为 *Wnt1*, 富含半胱氨酸, 属于分泌型糖蛋白 (Cadigan and Nusse, 1997)。*Wnt* 基因分子功能在生物体中高度保守, 从低等动物的海葵到高等动物的人类, 基因组均存在 *Wnt* 基因 (Miller, 2001; Kusserow *et al.*, 2005)。在人类和小鼠中, *Wnt* 蛋白参与多种肿瘤发生、细胞命运决定和内稳态调节等多种生命活动, 研究 *Wnt* 蛋白有利于人类进一步了解癌症的发生和细胞的生长、分化规律 (Miller, 2001)。与脊椎动物相比, 昆虫中很多 *Wnt* 家族基因发生了丢失 (Murat *et al.*, 2010)。目前已经在鳞翅目、双翅目、鞘翅目、半翅目、膜翅目等多种昆虫中系统的鉴定了 *Wnt* 基因家族成员, 如家蚕 *Bombyx mori*、果蝇 *Drosophila melanogaster*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*、西方蜜蜂基因组鉴定中分别鉴定了 8、7、7、9、6、7 个 *Wnt* 基因 (Anonymous, 2006; Bolognesi *et al.*, 2008; Anonymous, 2010; Murat *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2019)。

在昆虫中, 果蝇的 *Wnt* 基因家族的生理功能研究最为深入。在果蝇中, *Wnt1* 缺失会导致成虫翅膀消失, 还会引起胚胎神经系统发育受阻和胚胎体节分布异常等表型缺陷 (Sharma and Chopra, 1976; Bejsovec, 2006); *DmWnt5* 基因功能较为复杂, 该基因在颚节、腹神经索、上唇、中胚层和肢体原基均有表达, 且参与胚胎唾液腺迁移、中枢神经系统轴突成术等生物学过程 (Murat *et al.*, 2010); *DmWnt7* 调控气管发育、雄性生殖器官形成和唾液腺迁移等重要生理过程 (Kozopas *et al.*, 1998; Llimargas and Lawrence, 2001; Harris and Beckendorf, 2007); 高表达或低表达 *DmWnt8* 均会导致腹侧内凹受阻、背部表皮增加, 并且 *DmWnt8* 突变还会导致免疫功能降低 (Michael *et al.*, 2005); *DmWnt6* 只在胚胎和幼虫肠道微弱表达; *DmWnt10* 主要在三龄幼虫的成虫盘、胚胎的中胚层、中枢神经系统、肠道表达, 且在三龄幼虫的成虫盘

表达量较高(Janson *et al.*, 2001)。其他昆虫关于*Wnt*家族研究主要集中在*Wnt1*基因。在家蚕中,利用CRISPR/Cas9敲除*Wnt1*后,突变体表现出胚胎孵化困难、足发育异常、无法着色和体节缺失等典型表型,并且还会导致*ultrabithorax*、*abdominal-A*、*abdominal-B*等*HOX*家族基因表达量急剧下调;对*HOX*基因进一步敲除后,出现色素沉积和腹节分节异常等相似表型,表明*BmWnt1*可能通过调控家蚕*HOX*基因控制家蚕胚胎时期体节发育和幼虫时期色素沉积(Zhang *et al.*, 2015)。在乳草长蝽*Oncopeltus fasciatus*中,通过RNA干扰敲低*Wnt1*基因的表达量,处理组出现眼睛变小和胚带截断的发育缺陷(Angelini and Kaufman, 2005)。在马尾松毛虫*Dendrolimus punctatus*中,缺失*Wnt1*会导致色素分布异常、四肢缺失和头部发育畸形等与家蚕*BmWnt1*突变体的相似表型(Liu *et al.*, 2017)。在赤拟谷盗*Tribolium castaneum*中,利用RNAi沉默*TcWnt1*基因的表达,导致了胚胎腹节边界线、胸部附节、颌和侧头叶的缺失(Ober and Jockusch, 2006)。迄今为止,虽然已经有研究者成功鉴定了西方蜜蜂的*Wnt*基因家族中的7个基因(*Wnt1*, *Wnt4*, *Wnt5*, *Wnt6*, *Wnt7*, *Wnt10*, *Wnt11*) (Anonymous, 2006),然而这些*Wnt*基因在西方蜜蜂中发挥的生理功能尚未报道。基于*Wnt1*基因在果蝇、家蚕和赤拟古盗等模式昆虫胚胎发育过程中的重要作用,本研究克隆鉴定西方蜜蜂*AmWnt1*基因,并对该蛋白氨基酸序列进行生物信息学预测,同时利用荧光定量PCR检测该基因在不同发育时期和刚出房工蜂不同组织的基因表达量,有利于为后续深入研究蜜蜂和其他膜翅目昆虫*Wnt1*功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料及主要试剂

1.1.1 实验材料

西方蜜蜂样品取自福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)实验蜂场。选择群势强、蜜粉充足且健康的1群作为试验蜂群。为了准确收集不同发育时期的实验材料,利用限王产卵的方法控制蜂王产卵时间,主要步骤如下:利用方形王笼(72 mm × 51 mm)将蜂王控制在一张新巢脾上使之产卵,3 h后,取下限王框,待蜂王爬到巢脾另一处后,再次进行限王产卵,3 h后重复以上步骤,直到收取足够的实验材料。同时,准确记录每处限王的位置与相对应的时间。当胚胎分别发育至第1日龄(24 h)、2日龄(48 h)和3日龄(72 h)时,用小刀割下相对应区域的巢脾,在显微镜下用不锈钢移虫针把卵收集至1.5 mL离心管中,用液氮浸泡20 s后,放置-80℃储存;根据限王产卵时间,准确收集幼虫(1、3和5日龄)、

预蛹（1 和 3 日龄）、蛹（0、2、4、6 和 8 日龄）的材料。将封盖子脾置于 35℃ 培养箱中，每间隔 6 h 收集出房的工蜂作为刚出房蜜蜂。将头部插入幼虫巢房中持续时间超过 10 s 的工蜂作为哺育蜂；在巢门口，抓取后足携带花粉团的返巢工蜂作为采集蜂。在干冰上，分别解剖刚出房工蜂的头、胸部、腹部、肠道、螫针、触角、足和翅膀。每个采样点（或组织）取 3 个实验重复，采集的样本用液氮浸泡 20 s 后，放置 -80℃ 储存，用于后续 RNA 提取。

1.1.2 主要实验仪器和试剂

Trizol 试剂、克隆载体 pEASY-Blunt Zero、大肠杆菌感受态细胞 *Trans1-T1 Phage Resistant Competent cell*、琼脂糖、TAE 缓冲液、*Trans2K*、6x Loading Buffer、GelStain 染色剂购自北京全式金生物技术有限公司；Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase、ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix、HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 购自南京诺维赞生物科技有限公司，切胶回收试剂盒 Gel Extraction 购自 Omega 公司；LB 培养基、氨苄青霉素购自生工生物工程（上海）有限公司；RNA 提取液购自北京索莱宝生物技术有限公司。

1.2 引物设计：

在 NCBI 网站下载西方蜜蜂 *AmWnt1* mRNA 序列（GenBank 登录号：XM_026444306.1），用 Primer 6.0 设计用于克隆 *AmWnt1* CDS 序列和 qRT-PCR 的特异性引物（表 1）。

表 1 用于克隆 *AmWnt1* CDS 序列和 qRT-PCR 的特异性引物

Table 1 Specific primers for cloning *AmWnt1* CDS sequence and qRT-PCR

基因	引物序列 (5'-3')	产物长度 (bp)	用途
Genes	Primer sequences	Product size	Purpose
<i>AmWnt1_c</i>	F: GAATACCGTGTGATGTTCTTCGTAATCC	1 509	基因克隆
	R: CGTTGTATGTGGATCATCGCATGGA		Gene cloning
<i>AmWnt1_q</i>	F: TCGGCAAGATCGTGGACAGAGG	138	荧光定量 PCR
			Fluorescent

quantitative PCR

R: GATTGGTGAGTATAGTCGCAGGAACAG

荧光定量 PCR

Fluorescent

quantitative PCR

AmActin F: CCTAGCACCATCCACCATGAA

87

R: GAAGCAAGAATTGACCCACCAA

1.3 *AmWnt1* 基因的克隆及生物信息学分析

1.3.1 总 RNA 提取和反转录

将不同发育时期样本和刚出房工蜂各组织分别充分研磨，按照 Trizol 试剂盒说明书方法提取 RNA。取 1 μg RNA 为模板，参照 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 说明书，合成 cDNA 的第 1 链。

1.3.2 基因克隆与测序：

将刚出房蜜蜂 cDNA 稀释 3 倍后作为模板，以 *AmWnt1_c* 为引物，扩增获得 *AmWnt1* 基因的 CDS 序列。PCR 反应体系 (50 μL): 2 \times Phanta Max Buffer 25 μL , Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μL , dNTP Mix (10 mmol/L each) 1 μL , 上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 2 μL , cDNA 5 μL , ddH₂O 14 μL 。PCR 反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 循环数 35; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸, 5 min。反应结束后，按照 Gel Extraction 说明书进行胶回收纯化，产物用紫外分光光度计进行定量，调整产物浓度为 50 ng/ μL 。将纯化后的 PCR 产物与 Blunt Zero 载体连接，转化至 *Trans1-T1* 感受态细胞，送生物公司测序。

1.3.3 生物信息学分析

BioEdit 软件预测 *AmWnt1* 基因编码的氨基酸序列，ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白理化性质；分别利用 NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-2.0/>)、NetOGlyc 4.0 Server

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) 和 NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)预测蛋白的 N 磷酸化位点、O 糖基化位点和 N 糖基化位点；TMHMM-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)分析跨膜结构；ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 预测疏水性；SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 预测信号肽；SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测结构域。用 BioEdit 和 GENEDOC 软件进行多序列比对，通过 MEGA 6.0 软件，使用邻接法构建系统进化树。

1.4 西方蜜蜂 *AmWnt1* 基因在不同发育时期和刚出房工蜂各组织中表达量检测

以 1.4.1 节反转录获得的西方蜜蜂不同发育时期和刚出房工蜂各组织的 cDNA 为模板，进行荧光定量 PCR。荧光定量 PCR 反应（10 μ L 体系）：2 \times ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (Low ROX Premixed) 5 μ L，正反向引物各 0.2 μ L，cDNA 1 μ L，ddH₂O 3.6 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 3 min；95 $^{\circ}$ C 10 s，60 $^{\circ}$ C 30 s，39 个循环。按照如下条件测定溶解曲线：65 $^{\circ}$ C 升温到 95 $^{\circ}$ C，每 5 s 升高 0.5 $^{\circ}$ C。反应结束后，统计不同样本的 Ct 值，用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。定量分析均设置 3 个生物学重复和 3 个技术重复。

1.5 数据分析

所有数据用 SPASS 7.0 软件中的单因素方差分析进行实验数据的统计学分析，用 GraphPad Prism 6.0 作图。

2 结果与分析

2.1 *AmWnt1* 基因的扩增、克隆和测序

以刚出房蜜蜂的 cDNA 为模板，扩增包含 *AmWnt1* 基因完整的 CDS 序列。PCR 产物切胶纯化后片段经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测，在约 1 500 bp 处检测到单一条带，扩增片段大小符合预期（图 1）。该产物与 Blunt zero 载体连接，送生物公司测序。利用 BioEdit 软件将测序的序列进行拼接，去除载体序列，预测对应的氨基酸序列（图 2）。与 NCBI 上预测的 *AmWnt1* 序列基本一致，CDS 序列全长为 1 239 bp，编码 412 个氨基酸。序列已上传 NCBI，登录号为 MT993937。

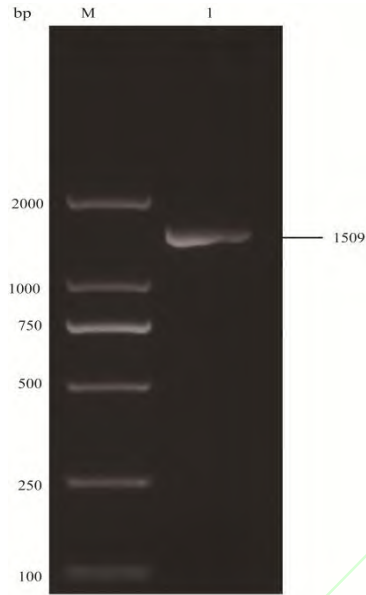


图 1 *AmWnt1* 基因 PCR 产物切胶回收后的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of purified PCR product of *AmWnt1* gene

注:泳道 M 为 DNA Marker DL 2000;泳道 1 为 *AmWnt1* 切胶回收纯化后的 PCR 产物。Note: Lane M was DNA Marker DL 2000; Lane 1 was purified PCR product of *AmWnt1* gene.

2.2 理化特性预测

通过 ProtParam 分析预测, *AmWnt1* 蛋白等电点为 9.48, 分子量为 46.40313KD, 分子式为 C1991H3158N630O579S38, 共 6 396 个原子组成。脂肪指数为 61.31, 不稳定指数为 43.20, 大于 40, 表明该蛋白不稳定(Guruprasad *et al.*, 1990)。不同氨基酸的占比不同, 精氨酸含量最高, 为 9.5%(表 2)。疏水性分析表明: *AmWnt1* 蛋白第 40 位氨基酸得分最低为 -2.978, 第 24 位氨基酸得分最高为 3.533, 属于亲水性蛋白。

1 ATGCACACCACCCCATGATTGCATTGCGATCGTCAACAGAAGATGAGGCTTTGGGTGATTATCTGTGCCCTGGTGGTGGCGATTACCGCG
 1 M H T T P M I A F D R Q Q K M R L W V I I C A L V V A I H A
 91 TCCATCGCCGAAATGCCAAGGAACAAGAATCGTGGTAGAGGATCGATGTGGTGGGAATCGCGAAGGCAGGAGAGCCGAACAATTTTTTG
 31 S I A E M P R N K N R G R G S M W W G I A K A G E P N N F L
 181 CCAATGTCTCCAGCCTCCCTTCACATGGATCCACAGTGTACGCGACCTTGAGGAGAAAGCAACGCAGGTTGGCCAGAGAAAATCCAGGA
 61 P M S P A S L H M D P T V Y A T L R R K Q R R L A R E N P G
 271 GTGTTGATGGCCGTGGCCAGGGGCGGAATCAAGCGATCGCAGAGTGCCAACATCAGTTTCGCAATCGTGCATGGAATTGTTCCACCAAG
 91 V L M A V A R G A N Q A I A E C Q H Q F R N R R W N C S T K
 361 AATTTCTCCGTGGGAAAAATCTGTTCCGCAAGATCGTGGACAGAGTTGTCGAGAGACCCGTTTCATCTACGCCATCACTAGCGCTGCA
 121 N F L R G K N L F G K I V D R G C R E T A F I Y A I T S A A
 451 GTGACTCACAGCATCGGAGAGCGTGCAGCGAAGGCAGCATCCAGTCTGTTCTCCTCGACTATACTACCAATCGCGACCACCGTCCACC
 151 V T H S I A R A C S E G S I Q S C S C D Y T H Q S R P P S T
 541 ACGCGGATTGGGAATGGGGTGGTGTCTCGGACAACATCGGCTACGGTTTCAAATCTCCCGTGAATTCGTGGACACGGGCGAACGTTGGT
 181 T R D W E W G G C S D N I G Y G F K F S R E F V D T G E R G
 631 CGAAATCTACGCGAAAAGATGAATCTTACAATAACGAGGCAGGTAGAGCGCACGTGCTCCTCGGAGATCGCGCAGGAGTCAAGTGTAC
 211 R N L R E K M N L H N N E A G R A H V S S E M R Q E C K C H
 721 GGCATGTCCGGTCTGTCACGGTGAAGACCTGCTGGATGAGGTACCCAACTTTCGCGTGGTCCGGGACAACCTGAAGGACCGATTTCGAC
 241 G M S G S C T V K T C W M R L P N F R V V G D N L K D R F D
 811 GCGCGTCCAGAGTTATGGTGAAGCAACTCGGATCGGGTGGCAATGGGAACGCGATCGTGAGCAATTCGGCGAGCAATTCGGTGCAC
 271 G A S R V M V S N S D R V R G N G N A I V S N S A S N S V H
 901 GGGCATCGGGAAGGTCGGGTGCTGACACCGGTACAACCTTCCAGCTGAAGCCGTACAACCCGGAGCACAAGCCCGCCGACCGAAGGAC
 301 G H R E G L G R R H R Y N F Q L K P Y N P E H K P P G P K D
 991 CTCGTCTACCTGGAACCTCACCCCGTTCGCGAGAAGAACCCGAACTCGGCATTCTCGGCACCCACGGTAGACAGTGAACGACAC
 331 L V Y L E P S P P F C E K N P K L G I L G T H G R Q C N D T
 1081 AGTATCGGTGTGACGGTGTGACCTGATGTGCTGCGGCAGAGGCTACAAAACGCAAGAGGTACCGTGTGTCGAGAGATGCGCCTGCACG
 361 S I G V D G C D L M C C G R G Y K T Q E V T V V E R C A C T
 1171 TTTACTGGTGTGCGAGGTCAAGTGTGACGCTCTGCAAAATCAAGAAGACGATACACAGTGTCTCTAG
 391 F H W C C E V K C Q L C K I K K T I H T C L *

图2 西方蜜蜂 *AmWnt1* 基因及其推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and amino acid sequences of *AmWnt1* of *Apis mellifera*

注：划线部分为 Wnt1 结构域。Note: The Wnt1 domain was underlined.

表2 西方蜜蜂 *AmWnt1* 蛋白的氨基酸种类和数目

Table 2 The variety and number of amino acids of *AmWnt1* protein in *Apis mellifera*

种类	数目	含量(%)	种类	数目	含量(%)
Variety	Amount	Content	Variety	Amount	Content
Ala	27	6.6	Leu	22	5.3
Arg	39	9.5	Lys	22	5.3
Asn	26	6.3	Met	14	3.4
Asp	15	3.6	Phe	14	3.4

Cys	24	5.8	Pro	19	4.6
Gln	13	3.2	Ser	28	6.8
Glu	20	4.9	Thr	21	5.1
Gly	34	8.3	Trp	8	1.9
His	16	3.9	Tyr	8	1.9
Ile	18	4.4	Val	24	5.8

2.3 结构预测

结构域预测表明：AmWnt1 蛋白在第 73 和 412 个氨基酸之间有一个 Wnt1 结构域，属于 Wnt 家族成员。该蛋白无信号肽，共有 1 个跨膜结构，位置为 17-36，N 端在细胞膜内。AmWnt1 蛋白包含 12 个 O 糖基化位点，位置分别为第 6、72、76、172、175、179、180、181、292、294、296 和 298 位氨基酸；共 2 个 N 糖基化位点，位置为第 116、358 位氨基酸；磷酸化位点共有 19 个，其中 1 个酪氨酸位点、7 个苏氨酸位点和 11 个丝氨酸位点。

2.4 序列比对

通过在线软件 NCBI 的 BLASTP 和 BioEdit 比对，与西方蜜蜂 Wnt1 蛋白同源度最高的物种为东方蜜蜂，相似度为 99.50%；其次为小蜜蜂、欧洲熊蜂、切叶蜂、造纸胡蜂，相似度分别为 99.26%、96.56%、97.24%、83.71%，表明 Wnt1 结构域在膜翅目昆虫中进化的较为保守（图 3）。

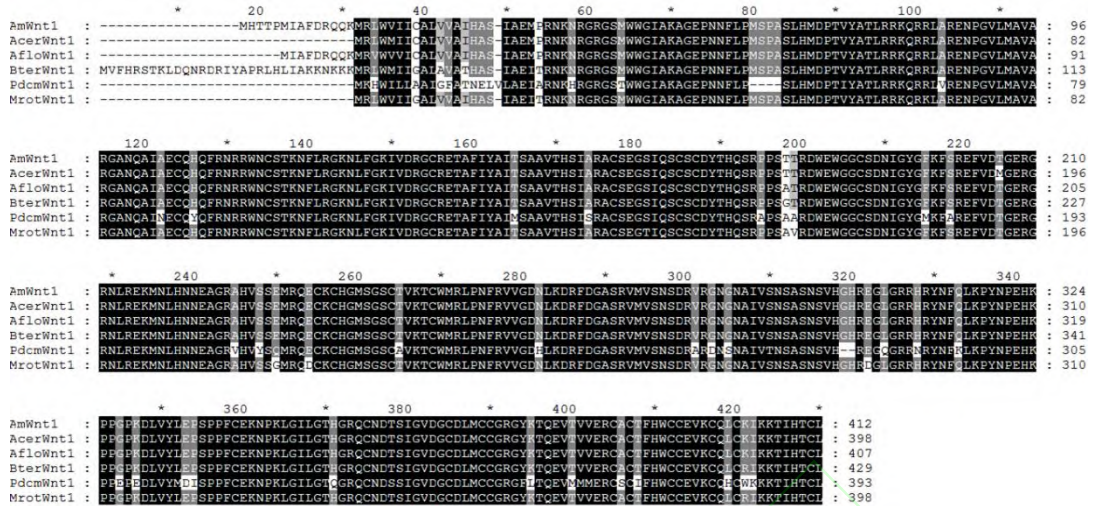


图 3 西方蜜蜂 AmWnt1 氨基酸序列和其他膜翅目昆虫同源序列比对

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of AmWnt1 proteins from *Apis mellifera* and other Hymenoptera insects

注: Wnt1 蛋白来源及 GenBank 登录号。AmWnt1: 西方蜜蜂 *Apis mellifera*, MT993937; AcerWnt1: 东方蜜蜂 *Apis cerana*, XP_016904766.1; AfloWnt1: 小蜜蜂 *Apis florea*, XP_031776435.1; BterWnt1: 欧洲熊蜂 *Bombus terrestris*, XP_003393164.1; MrotWnt1: 切叶蜂 *Megachile rotundata*, XP_003707885.1; PdomWnt1: 造纸胡蜂 *Polistes dominula*, XP_015178534.1。Note: Origin of Wnt1 proteins and their GenBank accession numbers. AmWnt1: *Apis mellifera*, MT993937; AcerWnt1: *Apis cerana*, XP_016904766.1; AfloWnt1: *Apis florea*, XP_031776435.1; BterWnt1: *Bombus terrestris*, XP_003393164.1; MrotWnt1: *Megachile rotundata*, XP_003707885.1; PdomWnt1: *Polistes dominula*, XP_015178534.1.

2.5 系统进化分析

利用西方蜜蜂 Wnt1 蛋白氨基酸序列在 NCBI 上进行 Blast 检索, 得到包括膜翅目、蜚蠊目、双翅目、直翅目、鳞翅目和鞘翅目等 16 种昆虫 Wnt1 蛋白的氨基酸序列, 将各种昆虫的氨基酸序列导入到 MEGA 6.0 进行序列比对, 然后利用邻接法构建系统进化树。系统进化树分析显示: 膜翅目、鞘翅目和鳞翅目分别单独聚为一个分支, 但双翅目的埃及伊蚊和黑腹果蝇, 分别与蜚蠊目的美洲大蠊和直翅目的双蟋蟀聚为一群, 置信度分别为 50 和 38。西方蜜蜂 Wnt1 蛋白与膜翅目东方蜜蜂亲缘关系最近, 与鞘翅目赤拟谷盗亲缘关系最远(图 4)。

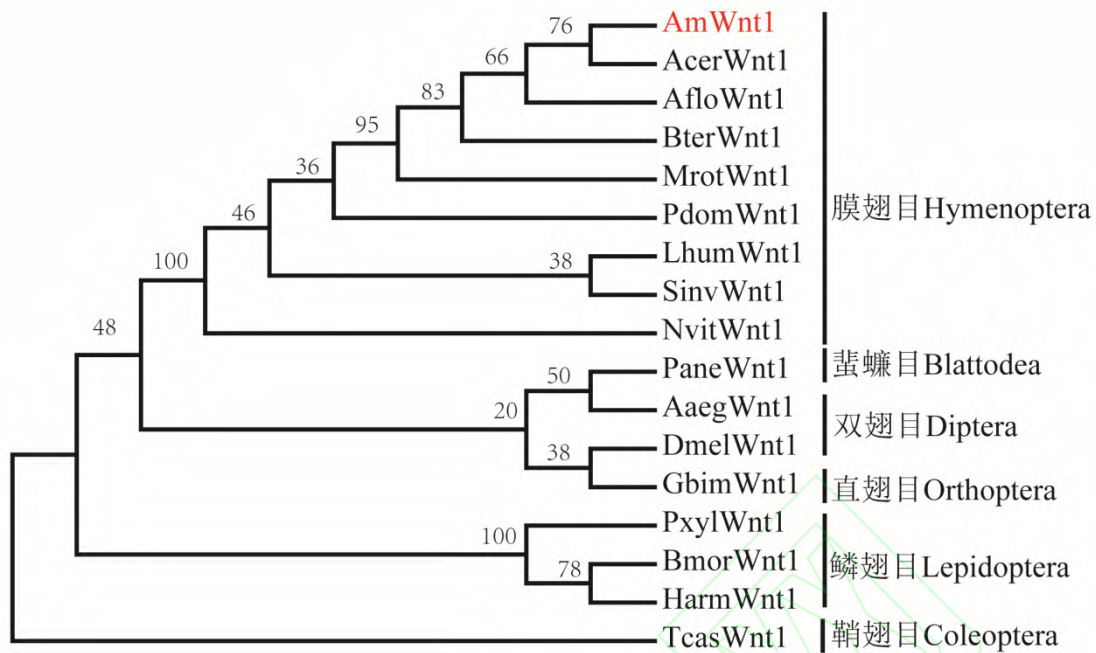


图 4 基于西方蜜蜂和其他昆虫 Wnt1 氨基酸序列构建的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of Wnt1 from *Apis mellifera* and insects reconstructed based on amino acid sequences

注: Wnt1 蛋白来源及对应的 GenBank 登录号 AmWnt1: 西方蜜蜂 *Apis mellifera*, MT993937; AcerWnt1: 东方蜜蜂 *Apis cerana*, XP_016904766.1; AfloWnt1: 小蜜蜂 *Apis florea*, XP_031776435.1; BterWnt1: 欧洲熊蜂 *Bombus terrestris*, XP_003393164.1; MrotWnt1: 切叶蜂 *Megachile rotundata*, XP_003707885.1; PdomWnt1: 造纸胡蜂 *Polistes dominula*, XP_015178534.1; LhumWnt1: 阿根廷蚂蚁 *Linepithema humile*, XP_012229142.1; SinvWnt1: 红火蚁 *Solenopsis invicta*, XP_025994453.1; NvitWnt1: 金小蜂 *Nasonia vitripennis*, XP_001603388.3; PaneWnt1: 美洲大蠊 *Periplaneta Americana*, AGG14205.1; AaegWnt1: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*, XP_021702999.1; DmelWnt1: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, NP_523502.1; GbimWnt1: 双蟋蟀 *Gryllus bimaculatus*, BAB19660.1; TcasWnt1: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*, EFA04660; PxylWnt1: 小菜蛾 *Plutella xylostella*, XP_011568230.1; BmorWnt1: 家蚕 *Bombyx mori*, NP_001037315.1; HarmWnt1: 棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, AHN95659.1。Note: Origin of Wnt1 proteins and their GenBank accession numbers. AmWnt1: *Apis mellifera*, MT993937; AcerWnt1: *Apis cerana*, XP_016904766.1; AfloWnt1: *Apis florea*, XP_031776435.1; BterWnt1: *Bombus terrestris*, XP_003393164.1; MrotWnt1: *Megachile rotundata*, XP_003707885.1; PdomWnt1: *Polistes dominula*, XP_015178534.1; LhumWnt1: *Linepithema humile*, XP_012229142.1; SinvWnt1: *Solenopsis invicta*, XP_025994453.1; NvitWnt1: *Nasonia vitripennis*, XP_001603388.3; PaneWnt1: *Periplaneta Americana*, AGG14205.1; AaegWnt1: *Aedes aegypti*, XP_021702999.1; DmelWnt1: *Drosophila melanogaster*, NP_523502.1; GbimWnt1: *Gryllus bimaculatus*, BAB19660.1; TcasWnt1: *Tribolium castaneum*, EFA04660; PxylWnt1: *Plutella xylostella*, XP_011568230.1; BmorWnt1: *Bombyx mori*, NP_001037315.1; HarmWnt1: *Helicoverpa armigera*, AHN95659.1.

2.6 AmWnt1 基因表达量分析

采用荧光定量 PCR 获得 *AmWnt1* 基因在不同发育时期的相对表达量(图 5)。结果表明:

AmWnt1 基因在西方蜜蜂各个发育时期均有表达。在胚胎期，该基因在 1 日龄胚胎中表达量较低，随着胚胎的发育，表达量持续增加，且在 3 日龄胚胎时该表达量达到整个发育时期的最大值；幼虫阶段，该基因表达量相对较低；在预蛹期，该基因的表达量显著升高；在蛹期，该基因在 0 日龄的蛹的表达量继续增加，呈现第二个峰值的趋势，然后表达量逐渐降低。*AmWnt1* 基因在刚出房蜜蜂不同组织的表达谱表明：*AmWnt1* 基因在刚出房蜜蜂头、胸、腹、肠道、翅膀、蛭针、触角、足中均有表达，其中在胸部、头、触角中高表达（图 6）。

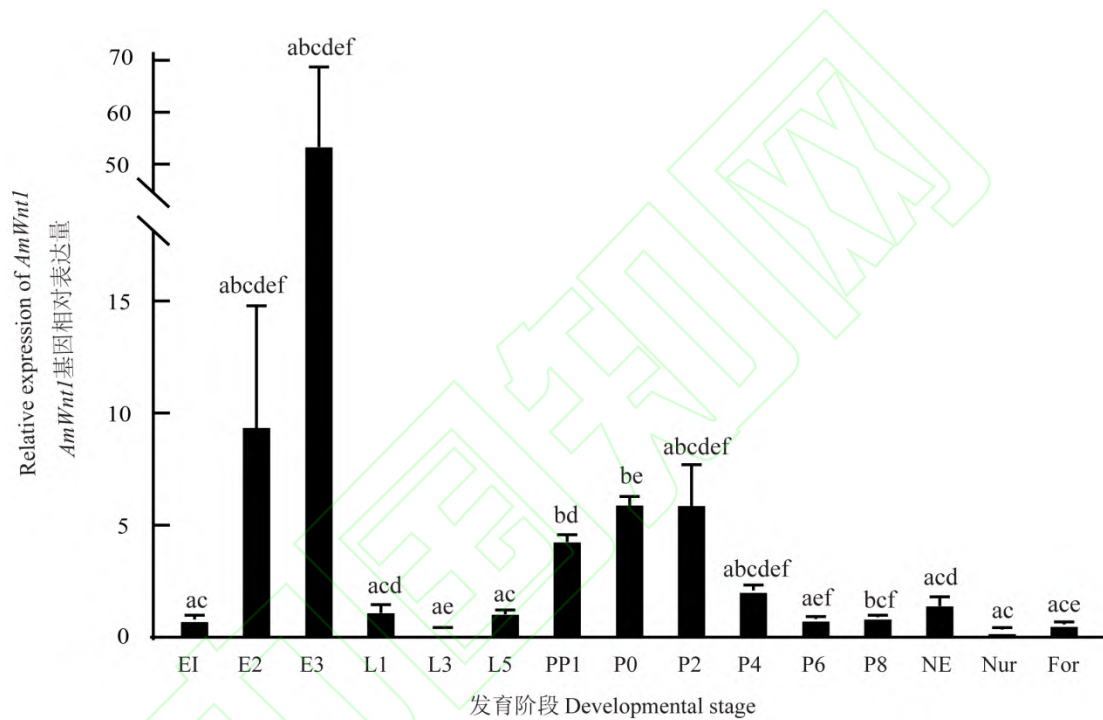


图 5 *AmWnt1* 基因在西方蜜蜂不同发育时期的相对表达量

Fig. 5 Relative expression levels of *AmWnt1* in different developmental stages of *Apis mellifera*

注：E1-3：分别是 1~3 日龄卵；L1, L3, L5 分别为第 1 天、3 天和 5 天的幼虫；PP1：1 日预蛹；P0, P2, P4, P6, P8 分别为第 0, 2, 4, 6, 8 日龄的蛹；NE：刚出房工蜂；Nur：哺育蜂；For：采集蜂。图中数据表示平均值±标准误，不同字母代表不同发育时期 *AmWnt1* 相对表达量具有显著性差异 ($P < 0.05$, Dunnett's T3 检验)。Note: E1-3: 1~3-day-old egg, respectively; L1, L3, L5: larvae of 1-day-old, 3-day-old and 5-day-old, respectively; PP1: 1-day-old pharate pupae; P0, P2, P4, P6, P8: pupae of 0-day-old, 2-day-old, 4-day-old, 6-day-old, 8-day-old, respectively; NE: Newly emerged workers; Nur: Nurse bees; For: Foragers. Data in the figure were mean ±SE, different letters indicated significant differences among different developmental stages ($P < 0.05$, Dunnett's T3 test).

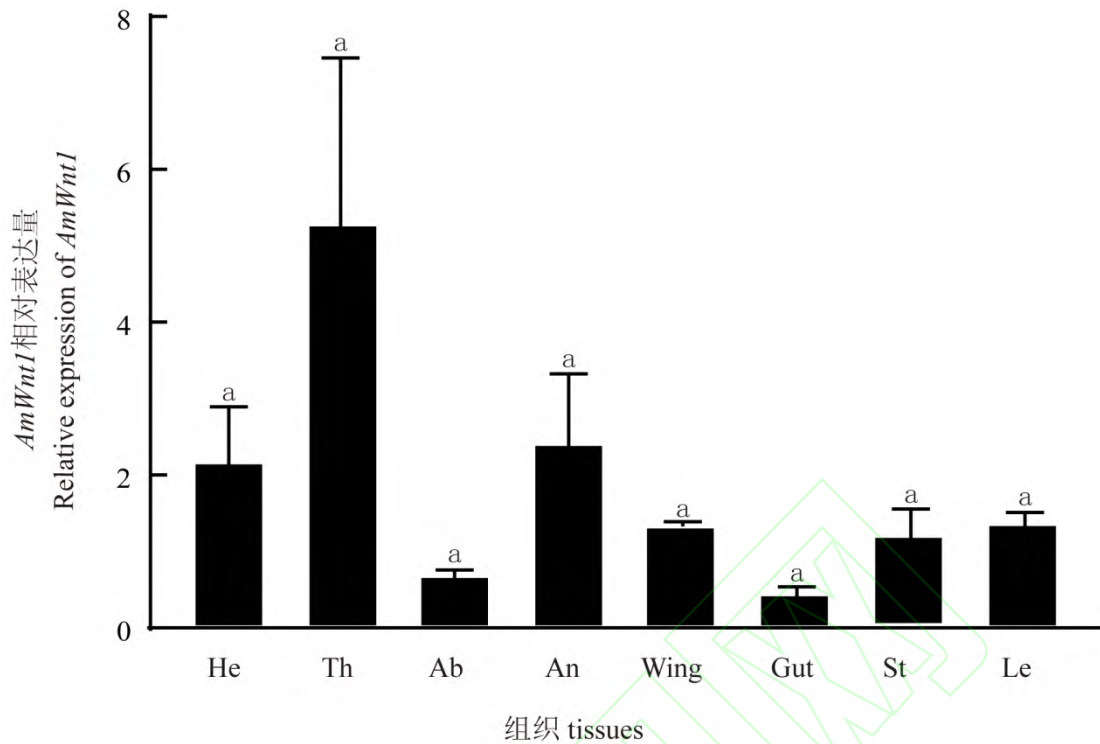


图 6 *AmWnt1* 基因在刚出房工蜂不同组织的相对表达量

Fig. 6 Relative expression levels of *AmWnt1* in different tissues of newly emerged workers

注: He: 头 (去触角); Th: 胸 (去翅膀和足); Ab: 腹 (去肠道); An: 触角; Wing: 翅膀; Gut: 肠道; St: 螫针(带毒腺); Le: 足 leg。不同字母代表不同组织中 *AmWnt1* 相对表达量具有显著性差异 ($P < 0.05$, Dunnett's T3 检验)。Note: He: head (without antenna); Th: thorax (without wing and legs); Ab: abdomen (with gut removed); An: antenna; Wing: wing; Gut: gut; St: sting (with venom gland); Le: leg. Different letters indicated significant differences among different tissues ($P < 0.05$, Dunnett's T3 test).

3 结论与讨论

AmWnt1 蛋白结构预测显示, 与已经报道的 *Wnt* 蛋白一致, *AmWnt1* 蛋白具有保守的 *Wnt1* 结构域 (位于第 73 位到第 412 位氨基酸)。研究者认为, *Wnt* 基因编码分泌型糖蛋白, 而多数分泌型蛋白在 N 端具有信号肽 (Cadigan and Nusse, 1997; Zhao, 2006)。根据 SignalP 4.1 信号肽预测结果, *AmWnt1* 蛋白并未预测到信号肽。Ding 等 (2019) 研究表明, 在果蝇、家蚕、赤拟谷盗、冈比亚按蚊等模式昆虫中均可预测到 *Wnt1* 蛋白的信号肽序列, 在小菜蛾 *Plutella xylostella* 和黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus* 未预测到信号肽; 与此同时, 在这篇文章中, 家蚕 *Wnt8* 和 *Wnt10* 蛋白未检测到信号肽, 作者认为, 可能是这些蛋白包含隐藏部分的信号肽序列, 使得 SignalP 4.1 软件无法识别, 西方蜜蜂 *AmWnt1* 蛋白可能也因此无法检测到信号肽。

AmWnt1 在西方蜜蜂不同发育时期均有表达，在胚胎期、预蛹期、蛹前期表达量高于其他时期，尤其随着胚胎发育的进行，表达量逐渐升高，并达到峰值。Zhang 等（2015）检测了 *BmWnt1* 在家蚕胚胎期的表达量，该基因在胚胎发育前期的表达量高于后期。在西方蜜蜂中，*AmWnt1* 在西方蜜蜂胚胎发育后期表达量最高，暗示 *AmWnt1* 可能主要参与胚胎的晚期发育。西方蜜蜂胚胎发育过程包括卵裂、胚盘形成与发育（7~33 h）、原肠胚形成（33~40 h）、胚带形成（40~55 h）和背部发育等 5 个过程，三日龄卵 *AmWnt1* 基因表达量最高，此时正处于胚带形成阶段，这个阶段主要发生卵膜、羊膜、中肠、神经系统和其他外胚层结构的形成（Fleig and Sander, 1986），*AmWnt1* 可能参与调控其中一种或多种组织的形成，并且已有研究证明在果蝇 *Wnt1* 突变体中，神经系统发育异常（Chu-LaGraff and Doe, 1993）。二日龄卵 *AmWnt1* 基因表达量仅次于三日龄卵，此时处于胚盘形成与发育阶段。敲除家蚕、马尾松毛虫 *Wnt1* 基因，幼虫均会出现四肢和腹节缺失、色素分布异常等发育缺陷（Zhang *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017）；在西方蜜蜂中，四肢出现发生在蛹期前期，此时 *AmWnt1* 表达量处于第二个高峰期，我们猜测可能参与此时的四肢发育过程。荧光定量 PCR 结果表明：*AmWnt1* 基因在刚出房工蜂头部的表达量高于其他组织，这与 *Wnt1* 基因在家蚕 5 龄 3 日幼虫头部高表达的结果是一致的（Ding *et al.*, 2019）。

系统进化分析结果表明，*AmWnt1* 与同属膜翅目昆虫 *Wnt1* 聚为一支，其中与东方蜜蜂亲缘关系最近，表明 *Wnt1* 蛋白在膜翅目昆虫之间进化的较为保守。在双翅目、鳞翅目和鞘翅目中，*Wnt1* 基因功能已经研究的较为明晰，然而目前还没有关于膜翅目昆虫 *Wnt1* 基因相关报道。本研究首次在膜翅目昆虫中克隆鉴定了 *AmWnt1* 基因，明确了该基因在不同发育阶段和刚出房蜜蜂的不同组织的表达特征，推测其可能参与了西方蜜蜂胚胎晚期的神经系统发育和化蛹过程中的四肢发育等关键历程，为膜翅目其他昆虫 *Wnt1* 基因的研究提供了参考。在蜜蜂中研究发育相关基因，也将为膜翅目寄生蜂的生物防控提供理论参考。

近年来，随着 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的日渐成熟，越来越多的运用于昆虫的基因功能研究中。在西方蜜蜂中，已经成功运用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术成功敲除了 *mrjp1*, *mKast*, *pax6*, *doublesex*, *fruitless*, *feminizer* 和 *loc552773* 等 6 个基因（Kohno *et al.*, 2016; Kohno and Kubo, 2018; Hu *et al.*, 2019; Roth *et al.*, 2019）。接下来，我们将会借助于本实验室前期已经建立的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 *AmWnt1* 突变体，进一步验证该基因在蜜蜂发育和行为中的功能，为验证 *Wnt* 家族的其他基因提供技术参考，为研究膜翅目其他昆虫的 *Wnt1* 基因功能奠定基础。

参考文献(References)

- Angelini DR, Kaufman TC. Functional analyses in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera) support a role for Wnt signaling in body segmentation but not appendage development [J]. *Dev. Biol.*, 2005, 283 (2): 409-423.
- Dearden PK, Wilson MJ, Sablan L, *et al.* Patterns of conservation and change in honey bee developmental genes [J]. *Genome Res.*, 2006, 16 (11): 1376.
- Shigenobu S, Bickel RD, Brisson JA, *et al.* Comprehensive survey of developmental genes in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: Frequent lineage-specific duplications and losses of developmental genes [J]. *Insect Mol. Bio.*, 2010, 19 (s2): 47-62.
- Bejsovec A. Flying at the head of the pack: Wnt biology in *Drosophila* [J]. *Oncogene*, 2006, 25 (57): 7442-7449.
- Bolognesi R, Beermann A, Farzana L, *et al.* Tribolium wnts: Evidence for a larger repertoire in insects with overlapping expression patterns that suggest multiple redundant functions in embryogenesis [J]. *Dev. Genes Evol.*, 2008, 218 (3-4): 193-202.
- Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: A common theme in animal development [J]. *Genes & Development*, 1997, 11 (24): 3286-3305.
- Chu-La Graff Q, Doe CQ. Neuroblast specification and formation regulated by wingless in the *Drosophila* CNS [J]. *Science (New York, NY)*, 1993, 261 (5128): 1594-1597.
- Ding X, Liu JX, Zheng L, *et al.* Genome-wide identification and expression profiling of Wnt family genes in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, 20 (5): 1221.
- Fleig R, Sander K. Embryogenesis of the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): An sem study [J]. *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.*, 1986, 15 (5/6): 449-462.
- Guruprasad K, Reddy BVB, Pandit MW. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: A novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence [J]. *Protein Eng.*, 1990, 4 (2): 155-161.
- Harris KE, Beckendorf SK. Different Wnt signals act through the Frizzled and RYK receptors during *Drosophila* salivary gland migration [J]. *Development*, 2007, 134 (11): 2017-2025.
- Hu XF, Zhang B, Liao CH, *et al.* High-efficiency CRISPR/Cas9-mediated gene editing in honeybee (*Apis mellifera*) embryos [J]. *G3 (Bethesda)*, 2019, 9 (5): 1759-1766.
- Janson K, Cohen ED, Wilder EL. Expression of *DWnt6*, *DWnt10*, and *DFz4* during *Drosophila* development [J]. *Mech Dev.*, 2001, 103 (1-2): 117-120.
- Kohno H, Kubo T. *mKast* is dispensable for normal development and sexual maturation of the male European honeybee [J]. *Sci. Rep.*, 2018, 8: 11877.

- Kohno H, Suenami S, Takeuchi H, *et al.* Production of knockout mutants by CRISPR/Cas9 in the European honeybee, *Apis mellifera* L. [J]. *Zool. Sci.*, 2016, 33 (5): 505-512.
- Kozopas KM, Samos CH, Nusse R. DWnt-2, a *Drosophila* Wnt gene required for the development of the male reproductive tract, specifies a sexually dimorphic cell fate [J]. *Genes & Dev.*, 1998, 12 (8): 1155-1165.
- Kusserow A, Pang K, Sturm C, *et al.* Unexpected complexity of the *Wnt* gene family in a sea anemone [J]. *Nature*, 2005, 433 (7022): 156-160.
- Liu HH, Liu Q, Zhou XG, *et al.* Genome editing of Wnt-1, a gene associated with segmentation, via CRISPR/Cas9 in the Pine Caterpillar Moth, *Dendrolimus punctatus* [J]. *Front. Physiol.*, 2017, 7: 666.
- Llimargas M, Lawrence PA. Seven Wnt homologues in *Drosophila*: A case study of the developing tracheae [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2001, 98 (25): 14487-14492.
- Gordon MD, Dionne MS, Schneider DS, *et al.* WntD is a feedback inhibitor of Dorsal/NF- κ B in *Drosophila* development and immunity [J]. *Nature*, 2005, 437 (7059): 746-749.
- Miller JR. The wnts [J]. *Genome Biol.*, 2001, 3 (1): 001.1-3001.15.
- Murat S, Hopfen C, McGregor AP. The function and evolution of Wnt genes in arthropods [J]. *Arthropod Struct & Dev.*, 2010, 39 (6): 446-452.
- Nusse R, Brown A, Papkoff J, *et al.* A new nomenclature for *int-1* and related genes: The *Wnt* gene family [J]. *Cell*, 1991, 64 (2): 231-231.
- Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome [J]. *Cell*, 1982, 31 (1): 99-109.
- Ober KA, Jockusch EL. The roles of wingless and decapentaplegic in axis and appendage development in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* [J]. *Dev. Biol.*, 2006, 294 (2): 391-405.
- Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, *et al.* The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene wingless [J]. *Cell*, 1987, 50 (4): 649-657.
- Roth A, Vleurinck C, Netschitailo O, *et al.* A genetic switch for worker nutrition-mediated traits in honeybees [J]. *PLoS Bio.*, 2019, 17 (3): e3000171
- Sharma RP, Chopra VL. Effect of the *Wingless* (*wg1*) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster* [J]. *Dev. Biol.*, 1976, 48 (2): 461-465.
- Zhang ZJ, Aslam AFM, Liu XJ, *et al.* Functional analysis of *Bombyx Wnt1* during embryogenesis using the CRISPR/Cas9 system [J]. *J.*

Insect Physio., 2015, 79: 73-79.

Zhao YH. Fundamental Molecular Biology Course 2nd ed [M]. Beijing: Science Press, 2006: 351-355. [赵亚华. 基础分子生物学教程 2 版[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 51-355]

