

# 人工注射 Dnmt3 siRNA 对意大利蜜蜂雌蜂发育的影响

石元元, 曾志将\*, 吴小波, 颜伟玉, 王子龙

(江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045)

**摘要:** 为了研究人工注射 DNA 甲基化转移酶 3 (DNA methyltransferase3, Dnmt3) siRNA 对意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 雌蜂的 Dnmt3 酶活性、Dnmt3 mRNA 表达量、*dynactin p62* 基因甲基化水平以及蜜蜂形态指标之间的影响和关系, 分别给 3 组 3 日龄的意大利蜜蜂幼虫人工注射 50 ng Ringer, *uth* siRNA 和 Dnmt3 siRNA 溶液。在幼虫的发育过程中, 测定每组幼虫头部的 Dnmt3 酶活性、Dnmt3 mRNA 表达量、*dynactin p62* 基因甲基化水平以及刚羽化雌性蜜蜂的初生重、体长、前翅长、前翅宽、吻长、第 3 背板长等形态指标。结果表明: 人工注射 Dnmt3 siRNA 不仅可以显著降低意大利蜜蜂幼虫头部 Dnmt3 酶活性、Dnmt3 mRNA 表达量和 *dynactin p62* 基因整体甲基化水平, 同时显著提高了刚羽化雌性蜜蜂的初生重、体长、第 3 背板长。结果说明 Dnmt3 的改变可以影响雌性意蜂幼虫的发育。

**关键词:** 意大利蜜蜂; 蜂王; 工蜂; siRNA; Dnmt3; *dynactin p62*

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2011)03-0272-07

## Influence of injecting Dnmt3 siRNA on the development of females of the Italian honeybee, *Apis mellifera ligustica*

SHI Yuan-Yuan, ZENG Zhi-Jiang\*, WU Xiao-Bo, YAN Wei-Yu, WANG Zi-Long (Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** In order to investigate the effects of injecting Dnmt3 siRNA on Dnmt3 activity, Dnmt3 mRNA expression level, methylation status of the *dynactin p62* gene and the morphological characters in female *Apis mellifera ligustica*, 50 ng Ringer, *uth* siRNA and Dnmt3 siRNA were injected into 3 d old female larvae of *A. mellifera ligustica* reared in an incubator, respectively. Dnmt3 activity, Dnmt3 mRNA expression level, and *dynactin p62* methylation level in larval head and the morphological characters including body weight, body length, forewing length, forewing width, proboscis length and 3rd tergum length of newly emerged female adults were examined. The results showed that Dnmt3 activity, the Dnmt3 expression level and the methylation level of *dynactin p62* in larval head were significantly inhibited after the larvae were injected with Dnmt3 siRNA, while the body weight, body length and 3rd tergum length of newly emerged female adults increased, indicating that the changes of Dnmt3 have an effect on female larvae of *A. mellifera ligustica* during their development.

**Key words:** *Apis mellifera ligustica*; queen; worker; siRNA; Dnmt3; *dynactin p62*

蜜蜂是一种资源共享、精确分工和相互交流的高度结构化的社会群体。在正常的蜂群中, 通常有一头蜂王, 数百至上千头雄蜂(季节性出现)和数千至数万头工蜂, 它们不是简单的组合, 而是一个高效、有序的整体。蜂王和工蜂都是由受精卵发育而成, 它们的遗传物质完全相同, 但由于发育期间营养和空间因素不同, 导致了雌性幼虫的发育逐渐向蜂王和工蜂两个不同级型方向分化, 并且蜂王和工

蜂在个体形态结构、寿命、繁殖性能等方面都存在显著差异。

到目前为止, 雌性蜜蜂级型分化机制还不清楚, 但存在若干假说: 如食物数量与质量(成分)差异假说、“蜂王决定因子”假说、糖含量调节食物吸收率假说及性激素与促性腺激素决定假说等(曾志将, 2007)。随着西方蜜蜂 *Apis mellifera* 基因组测序的完成(The Honeybee Genome Sequencing

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060327); 国家现代蜂产业技术体系项目(nycytx-43)

作者简介: 石元元, 女, 1986年1月生, 山西阳泉人, 硕士, 主要从事蜜蜂分子生物学研究工作, E-mail: shiyuanyuan7046@163.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: bees1965@sina.com

收稿日期 Received: 2010-11-01; 接受日期 Accepted: 2010-12-19

Consortium, 2006), 澳大利亚国立大学科学家发现雌性蜜蜂级型分化与 DNA 甲基化水平相关 (Kucharski *et al.*, 2008)。蜜蜂幼虫级型分化也与蛋白质差异表达有关(吴静和李建科, 2010)。

DNA 甲基化是生物普遍存在的表观遗传现象之一, 即在不改变基因组序列的前提下, 通过 DNA 和组蛋白的修饰来调控基因表达 (Wu and Morris, 2001)。DNA 甲基化是在 DNA 甲基化转移酶 (DNA methyltransferase, Dnmt) 的作用下使 CpG 双核苷酸 5' 端的胞嘧啶转变为甲基胞嘧啶。这种 DNA 修饰方式并没有改变基因序列, 但是它调控了基因的表达 (Dahl and Guldberg, 2003)。

蜜蜂拥有 3 种 DNA 甲基化转移酶, 分别是 Dnmt1, Dnmt2 和 Dnmt3, 与哺乳动物特别是人类的 DNA 甲基化转移酶非常相似, 同源性极高 (Wang *et al.*, 2006; Schaefer and Lyko, 2007)。蜜蜂体内发生 DNA 甲基化基因与果蝇、蚊子、蕨类植物存在着明显差异, 分为两类: 一类是 CpG 含量很高, 即 high-CpG 基因, 参与生物体的个体发育; 另一类是 CpG 含量很低, 即 low-CpG 基因, 与代谢和核酸加工有关 (Elango *et al.*, 2009; Foret *et al.*, 2009)。DNA 甲基化的发生具有很强的特异性, 当环境因素激活或抑制控制级型分化的基因表达时, 幼虫的发育方向就受到了调控。蜜蜂基因组中富含 CpG, 因此为 DNA 甲基化的发生提供了有利条件。

Kucharski 等 (2008) 利用显微注射和 RNA 干扰技术抑制了 DNA 甲基化酶 Dnmt3 基因的表达, 进一步影响雌性蜜蜂的级型分化, 但还未见人工注射 Dnmt3 siRNA 对雌性蜜蜂的 Dnmt3 酶活性、Dnmt3 mRNA 表达量、*dynactin p62* 基因甲基化水平以及蜜蜂形态指标四者影响和关系的报道。鉴于此, 我们参照 Kucharski 等 (2008) 研究方法, 分别给 3 组 3 日龄的意大利蜜蜂幼虫人工注射 Ringer、*uth* siRNA、Dnmt3 siRNA 溶液, 系统研究了 Dnmt3 酶活性、Dnmt3 mRNA 表达量、*dynactin p62* 基因甲基化水平以及蜜蜂形态指标之间的联系, 现报道如下。

## 1 材料和方法

### 1 实验材料

#### 1.1 试虫来源

实验蜂群: 江西农业大学蜜蜂研究所自然条件下饲养的意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spin.

(简称意蜂) 1 群, 实验时间为 2010 年 3 - 8 月。

#### 1.2 主要试剂与仪器

人工饲喂的幼虫食物: 2% 酵母抽提物、12% 果糖、12% 葡萄糖、52% 蜂王浆和 22% 蒸馏水。将酵母抽提物和蜂王浆溶于果糖和葡萄糖的混合液中, 过滤, 混合搅拌器震荡 5 min。使用前先在 32℃ 条件下, 预热 5 ~ 10 min。

细胞核抽提液试剂盒 (EpiQuik™ Nuclear Extraction Kit I, NY, USA); Dnmt3 活性测定试剂盒 (EpiQuik™ DNA Methyltransferase Activity/Inhibition Assay Kit, NY, USA); Trizol 裂解液 (QiaGen, USA); 反转录试剂盒 (Revertra Ace, Toyobo, Japan); RT-PCR 试剂盒 (SYBR qPCR mix, Toyobo, Japan); Ringer 溶液、*uth* siRNA 溶液和 Dnmt3 siRNA 溶液 (上海吉凯基因技术有限公司); 动物基因组 DNA 提取试剂盒 (PUEX, 北京); EZ 96 DNA Methylation Kit (Zymo Research)。

MK3 型酶标仪 (Thermo Fisher Scientific Shanghai Instruments Co., Ltd.); 超净工作台 (苏净集团安泰公司); Anke TGL-16G-A 型高速冷冻离心机 (上海嘉鹏科技有限公司); DYY-4C 型电泳仪 (北京六一科技有限公司); XTL-1 型摄影体视显微镜 (WV-GP240, Suzhou Co., Ltd.); DK1-700c 型显微注射器 (澳大利亚); SLAN® 实时荧光定量 PCR 系统 (上海宏石医疗科技有限公司) 等。

#### 1.3 蜜蜂的饲养与取样

实验所用意蜂幼虫均孵化于同一头蜂王产的卵, 保证幼虫的遗传物质基本相同。

实验幼虫的注射和饲养: 控制蜂王产卵, 标记产卵巢脾。在蜂王产卵后第 7 天, 从蜂箱内提出标记好的巢脾, 放在温度为 35℃, 相对湿度为 85% 的人工注射室。用移虫针从巢房中移出 3 日龄幼虫, 放在含有小剂量人工配置的幼虫食物的培养皿里。在双目显微镜的 40 倍镜下, 利用显微注射器分别给 3 组 3 日龄幼虫人工注射 Ringer、*uth* siRNA 和 Dnmt3 siRNA 溶液, 其中把注射缓冲溶液 Ringer 和非幼虫基因 *uth* 的 siRNA 溶液作为对照组 (Ringer 液和 *uth* 在幼虫发育的早期不会发挥主要作用), 注射 Dnmt3 的 siRNA 溶液作为实验组。每头幼虫人工注射 30 ~ 50 ng, 并将注射后的 3 组幼虫转移到 24 孔的孵化箱中孵育 (每孔含 200 μL 的人工配置的幼虫食物), 温度和相对湿度分别控制在 35.5 ± 1.0℃ 和 85% ± 5%。早晚各饲喂 80 ~ 100 μL 人工配制的幼虫食物, 连续饲喂 2 d。实验共饲养 3 770

头幼虫, 分成 2 批, 每批 1 885 头。在实验过程中, 共有 1 050 头幼虫注射 Ringer 溶液, 1 305 头幼虫注射 *uth* siRNA 溶液, 1 415 头幼虫注射 Dnmt3 siRNA 溶液。

实验的取样: 人工注射 Ringer、*uth* siRNA 和 Dnmt3 siRNA 溶液 24 h, 48 h 和 72 h 后, 选成活的意蜂幼虫, 分别测定幼虫头部 Dnmt3 酶活性, Dnmt3 mRNA 含量, *dynactin p62* 基因甲基化水平, 待实验个体出房后, 测量其形态学指标。

#### 1.4 意大利蜜蜂幼虫头部 Dnmt3 酶活性的测定

每组随机取 10 头 6 日龄意蜂幼虫头部, 称取 70 ~ 90 mg 组织, 在匀浆器中磨成粉末状, 按照细胞核抽提液试剂盒的操作说明提取幼虫的细胞核物质。然后按照 Dnmt3 酶活性测定试剂盒的操作说明测定其 Dnmt3 酶活性。以上实验重复 8 次。

#### 1.5 意大利蜜蜂幼虫头部 Dnmt3 mRNA 相对表达量的测定

**1.5.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成 (4℃ 下进行):** 每组随机取 10 头意蜂幼虫头部, 将 80 ~ 100 mg 组织在匀浆器中磨成粉末, 按照 Trizol 试剂盒的操作说明提取 RNA。以幼虫总 RNA 为模板为逆转录引物, 合成 cDNA 的第一链。

**1.5.2 实时定量 PCR:** 以合成的 cDNA 作为模板, 各样品的 Calmodulin 和 Dnmt3 用 SLAN<sup>®</sup> 实时荧光定量 PCR 系统分别进行 RT-PCR 反应。

Calmodulin 引物为 F: 5'-GGTCAAATCCCACA GAAGC-3'; R: 5'-TCAATGTCAGCCTCCCGAA-3'; Dnmt3 引物为 F: 5'-CAGCGATGACCTGCCGATCGGC GATA-3'; R: 5'-CATGCAGGCGGTGCAGTA-3'; 扩增条件: 95℃, 5 min; 94℃, 2 min; 40 轮循环 (95℃, 10 s, 60℃, 15 s, 72℃, 15 s); 72℃, 10 min。为了建立 PCR 产物的熔解曲线, 扩增反应结束后继续从 72℃ 缓慢加热到 99℃ (每 5 s 升高 1℃)。

数据采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法进行分析。以上实验重复 8 次。

#### 1.6 意大利蜜蜂幼虫头部 *dynactin p62* 基因甲基化水平的测定

委托北京博奥生物有限公司评估 *dynactin p62* 基因甲基化水平, 并设计 3 对引物进行扩增 (图 1)。

引物序列:

*dynactin\_1*-10F: 5'-aggaagagagGAAGATTTATTT TTGTAGGTATTGTT-3'

*dynactin\_1*-T7R: 5'-cagtaatacactactataggagaag

gctTTACTCTTAAAAATACATATCCAACCTC-3'

*dynactin\_2*-10F: 5'-aggaagagagAATTAGTTATAG GAGGTTGGTTTGAA-3'

*dynactin\_2*-T7R: 5'-cagtaatacactactataggagaag gctAATTCCTCTACTTCTATACTAACAACAA-3'

*dynactin\_3*-10F: 5'-aggaagagagATTAGAAGTAAG GATTGTTATTTGTCAA-3'

*dynactin\_3*-T7R: 5'-cagtaatacactactataggagaag gctTCATCATATTCAACAACATCATCTCT-3'

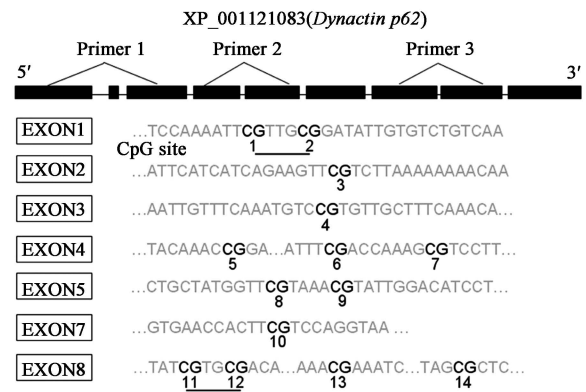


图 1 意大利蜜蜂幼虫体内 *dynactin p62* 基因甲基化位点

Fig. 1 The methylated sites of *dynactin p62* in *Apis mellifera ligustica* larva

*Dynactin p62* 基因共有 9 个外显子, 14 个 CpG 双核苷酸发生甲基化反应。由于 CpG-1 和 CpG-2, CpG-11 和 CpG-12 位点相距太近, 使用的 RNase A 内切酶无法单独测定每个位点的甲基化, 因此 CpG-1 和 CpG-2 以及 CpG-11 和 CpG-12 位点分别一起测定甲基化。There are 9 exons in *dynactin p62*, in which 14 CpG dinucleotides are methylated. Because of minute distance both between CpG-1 and CpG-2 sites and between CpG-11 and CpG-12 sites, RNase A could not measure the methylation level of every site, respectively, so that the methylation level was measured together in CpG-1 and CpG-2 sites and in CpG-11 and CpG-12 sites, respectively.

每组随机取 10 头 6 日龄意蜂幼虫头部, 将 80 ~ 100 mg 组织在匀浆器中磨成粉末, 按照 PUEX Animal Genomic DNA Extraction Kit 操作说明提取 DNA。委托北京博奥生物有限公司利用 Sequenom MassARRAY 检测幼虫 *dynactin p62* 基因甲基化水平。

用 EZ 96 DNA Methylation Kit 转化提取的 DNA。以亚硫酸氢盐转化后的 DNA 为模板, 在 384 孔板进行 PCR 扩增反应: 每个反应总体积 5  $\mu$ L, 包含模板 DNA 1  $\mu$ L (DNA 浓度 > 5 ng/ $\mu$ L), 5 U/ $\mu$ L Hotstar Taq 0.2 U, 引物每条 1  $\mu$ mol, 25 mmol/L dNTP; 0.04  $\mu$ L, 反应条件为 94℃, 15 min; 45 轮循环 (94℃, 20 s; 62℃, 30 s; 72℃, 1 min); 72℃,

3 min。PCR 反应产物使用 2  $\mu$ L SAP (shrimp alkaline phosphatase) 处理, 去除体系中游离的 dNTP。反应体系 7  $\mu$ L, 其中 PCR 产物 5  $\mu$ L, SAP 混合液 2  $\mu$ L (SAP 0.3  $\mu$ L, RNase-free ddH<sub>2</sub>O 0.17  $\mu$ L)。反应程序为 37 $^{\circ}$ C, 20 min; 85 $^{\circ}$ C, 5 min。RNase A 特异性酶切反应分为 T 切与 C 切两种, 本实验中使用 T 切反应。体外转录与酶切反应同时进行, 总体积 7  $\mu$ L 反应体系包含 SAP 处理后 PCR 产物 2  $\mu$ L, RNase-free ddH<sub>2</sub>O 3.15  $\mu$ L, 5  $\times$  T7 Polymerase Buffer 0.89  $\mu$ L, T Cleavage Mix 0.24  $\mu$ L, 100 mmol/L DTT, 0.22  $\mu$ L, T7 RNA & DNAPolymerase 0.44  $\mu$ L, RNase A 0.06  $\mu$ L。反应程序为 37 $^{\circ}$ C, 3 h。每个样品中加水 20  $\mu$ L 稀释, 震荡混匀, 加入 6 mg Clean Resin 树脂纯化 10 min, 3 200 g 离心 5 min。使用 MassARRAY Nanodispenser RS1000 点样仪 (SEQUENOM) 将纯化后产物点至 384 孔 SpectroCHIP (SEQUENOM) 芯片上, 将点制好的芯片放入 MassARRAY Compact System (SEQUENOM) 进行检测。SpectroCHIP 芯片使用 MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight) 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析技术, 检测数据通过 EpiTYPER 软件 (SEQUENOM) 分析并输出结果。

$$\text{甲基化水平} = \text{mC}/\text{C} \times 100\%$$

其中 mC 表示发生甲基化胞嘧啶的个数, C 表示所有胞嘧啶碱基的个数。以上试验重复 8 次。

### 1.7 雌性蜜蜂个体形态指标的测定

初生重测量: 待实验个体出房后, 每实验组随机采集 80 头意蜂 (禁止进食), 用电子天平分别称其重量。

体长测量: 游标卡尺测量上述 3 组各 80 头意蜂的体长。

观察各实验组意蜂的腹部大小、螫针长短、

花粉筐有无等, 将发育的意蜂分为工蜂, 或者是蜂王和蜂王过渡型 (由于蜂王和蜂王过渡型很难有明显的指标进行区分, 因此统称为蜂王和蜂王过渡型)。我们把同时具备卵巢管数小于 20, 腿部有花粉筐的蜜蜂定义为工蜂, 其余的均为蜂王和蜂王过渡型。

形态学指标测量: 用镊子将蜜蜂各器官上的附属软组织等杂物拨离干净。在玻片上面涂上一层白凡士林, 使各解剖部位规则平整地粘附于玻片上待测。用光学显微镜和读数显微镜测量意蜂的吻长、前翅长、前翅宽、第 3 背板长。

### 1.8 数据统计与分析

Dnmt3 活性数据利用 StatView 软件“ANOVA and *t*-test”中的“ANOVA or ANCOVA”进行统计分析; Dnmt3 mRNA 表达数据先经过开方转换, 再使用“ANOVA or ANCOVA”进行统计分析; *dynactin p62* 基因甲基化水平数据先进行 arcsin 转换, 再使用“ANOVA or ANCOVA”进行统计分析; 雌性意蜂个体形态指标的实验数据利用“ANOVA or ANCOVA”进行统计分析; 雌性意蜂发育个体的数目用 StatView 软件“Correlations”进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 人工注射 Dnmt3 siRNA 对意大利蜜蜂幼虫头部 Dnmt3 酶活性影响

由表 1 可知, 人工注射 50 ng Ringer, *uth* siRNA 和 Dnmt3 siRNA 溶液 24 h, 48 h 和 72 h 后, 意蜂幼虫头部 Dnmt3 酶活性均表现为注射 Dnmt3 siRNA 组显著低于其他两组 ( $P < 0.05$ )。在 Dnmt3 siRNA 实验组中, 注射 48 h 和 72 h 后, 幼虫头部 Dnmt3 酶活性分别比注射 24 h 下降了 57.2% 和 90.9%, 这说明注射 Dnmt3 siRNA 后, 能显著降低幼虫体内 Dnmt3 酶活性。

表 1 人工注射 Dnmt3 siRNA 对意大利蜜蜂幼虫头部 Dnmt3 酶活性 (mmol/min) 的影响

Table 1 Influence of injecting Dnmt3 siRNA on Dnmt3 activity (mmol/min) in larval head of *Apis mellifera ligustica*

实验组 Experimental groups	24 h	48 h	72 h
Ringer	0.398 $\pm$ 0.025 a	0.378 $\pm$ 0.020 a	0.357 $\pm$ 0.011 a
<i>uth</i> siRNA	0.405 $\pm$ 0.023 a	0.392 $\pm$ 0.022 a	0.362 $\pm$ 0.015 a
Dnmt3 siRNA	0.264 $\pm$ 0.026 b	0.113 $\pm$ 0.019 b	0.024 $\pm$ 0.015 b

表中数据为 8 次重复的平均值  $\pm$  标准误 (Mean  $\pm$  SE), 同列数据后具不同小写字母表示在 5% 水平上存在差异显著性, 下同。The data in the table are mean  $\pm$  SE of 8 replicates, and those in the same column with different small letters are significantly different at the 5% level. The same below.

2.2 人工注射 Dnmt3 siRNA 对意大利蜜蜂幼虫头部 Dnmt3 mRNA 相对表达量影响

采用比较  $C_T$  值的相对定量法 ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法) 计算了人工注射 24 h, 48 h 和 72 h 后, 意蜂幼虫头部 Dnmt3 mRNA 相对表达量 (表 2)。结果表明 Dnmt3

siRNA 组显著低于其他两组 ( $P < 0.05$ )。在 Dnmt3 siRNA 实验组中, 注射 48 h 和 72 h 后, 幼虫头部 Dnmt3 mRNA 表达量分别比注射 24 h 下降了 45.3% 和 80.0%, 这说明注射 Dnmt3 siRNA 后, 可以显著降低幼虫体内 Dnmt3 mRNA 表达。

表 2 人工注射 Dnmt3 siRNA 对意大利蜜蜂幼虫头部 Dnmt3 mRNA 表达量影响

Table 2 Influence of injecting Dnmt3 siRNA on Dnmt3 mRNA expression in larval head of *Apis mellifera ligustica*

实验组 Experimental groups	24 h	48 h	72 h
Ringer	35.336 ± 0.079 a	33.299 ± 0.059 a	30.157 ± 0.031 a
uth siRNA	35.820 ± 0.081 a	32.852 ± 0.061 a	29.879 ± 0.033 a
Dnmt3 siRNA	28.299 ± 0.078 b	15.386 ± 0.060 b	5.669 ± 0.032 b

Dnmt3 mRNA 的相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法所得, 其中 Dnmt3 基因作为目的基因, Calmodulin 基因作为内参基因。按照下列公式计算实验样品中目的基因 Dnmt3 mRNA 相对表达量:  $\Delta C_{T(Dnmt3)} = C_{T(Dnmt3)} - C_{T(Calmodulin)}$ ,  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(Dnmt3)} - \Delta C_{T(标准值)}$ ,  $\Delta C_{T(标准值)} = 1.00$ 。Dnmt3 mRNA 相对表达量 =  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 。The relative expression level of genes is determined by evaluating  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , where Dnmt3 gene is the target gene, and Calmodulin gene is the internal control. The formula for relative expression level of Dnmt3 mRNA is  $\Delta C_{T(Dnmt3)} = C_{T(Dnmt3)} - C_{T(Calmodulin)}$ , where  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(Dnmt3)} - \Delta C_{T(standard value)}$ ,  $\Delta C_{T(standard value)} = 1.00$ , and the relative expression level of Dnmt3 mRNA =  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ .

2.3 人工注射 Dnmt3 siRNA 对 6 日龄意大利蜜蜂幼虫头部 *dynactin p62* 基因甲基化水平影响

由表 3 可知, 虽然 3 组意蜂幼虫遗传物质和发育环境相同, 但是人工注射 Dnmt3 siRNA 后, 阻断了 Dnmt3 mRNA 的表达, 降低了 Dnmt3 酶活性。

Dnmt3 siRNA 组 *dynactin p62* 基因整体甲基化水平显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 特别体现在 CpG-4, CpG-6, CpG-7, CpG-8, CpG-10, CpG-11, CpG-12 和 CpG-14 位点上。

表 3 人工注射 Dnmt3 siRNA 对 6 日龄意大利蜜蜂幼虫头部 *dynactin p62* 基因甲基化水平 (%) 的影响

Table 3 Influence of injecting Dnmt3 siRNA on methylation level (%) of *dynactin p62* in larval head of *Apis mellifera ligustica*

实验组 Experimental groups	整体水平 Whole level	CpG 位点									
		CpG-1, 2	CpG-3	CpG-4	CpG-5	CpG-6	CpG-7	CpG-8	CpG-10	CpG-11, 12	CpG-14
Ringer	50.7 ± 3.4 a	1.4 ± 0.7 a	1.6 ± 0.4 a	82.0 ± 0.9 a	85.7 ± 3.1 a	26.9 ± 1.7 a	25.8 ± 1.1 a	89.6 ± 0.5 a	80.9 ± 1.6 a	27.3 ± 4.7 a	76.1 ± 4.2 a
uth siRNA	49.9 ± 4.4 a	1.5 ± 0.5 a	2.0 ± 0.6 a	89.9 ± 0.8 a	89.1 ± 3.2 a	28.6 ± 2.0 a	28.8 ± 1.0 a	87.9 ± 0.4 a	82.7 ± 1.7 a	27.7 ± 4.7 a	78.8 ± 4.6 a
Dnmt3 siRNA	41.4 ± 3.6 b	1.3 ± 0.4 a	1.5 ± 0.6 a	68.1 ± 0 b	81.9 ± 3.0 a	19.4 ± 2.1 b	15.6 ± 1.1 b	80.7 ± 0.6 b	72.4 ± 2.0 b	19.2 ± 4.2 b	61.8 ± 4.3 b

*dynactin p62* 基因的甲基化水平采用公式: 甲基化水平 =  $mC/C \times 100\%$  所得, 其中 mC 表示发生甲基化胞嘧啶的个数, C 表示所有胞嘧啶碱基的个数。The formula for methylation level of *dynactin p62* is  $mC/C \times 100\%$ , where mC represents the number of methylated cytosine, and C represents the number of all cytosine.

2.4 人工注射 Dnmt3 siRNA 对雌性意大利蜜蜂形态指标发育影响

由表 4 可知, 就初生重、体长和第 3 背板长度这 3 个形态而言, Dnmt3 siRNA 组显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 就前翅长、前翅宽、吻长 3 个形态而言, Dnmt3 siRNA 组显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。

依据各实验组意蜂的腹部大小、螫针长短、花粉筐有无等形态学指标, Dnmt3 siRNA 组 65% 意蜂发育为蜂王和蜂王过渡型, 35% 意蜂发育为工蜂; 对照组均有 23% 意蜂发育为蜂王和蜂王过渡型, 77% 意蜂发育为工蜂。这说明阻断 Dnmt3 mRNA 表达可以促进意蜂雌性幼虫朝着蜂王的方向发育。

表 4 人工注射 Dnmt3 siRNA 对意大利蜜蜂雌性个体形态指标的影响

Table 4 Influence of injecting Dnmt3 siRNA on morphological indexes of female adults of *Apis mellifera ligustica*

实验组 Experimental groups	初生重(g) Weight of newly emerged adult	体长(mm) Body length	前翅长(mm) Forewing length	前翅宽(mm) Forewing width	吻长(mm) Length of beak	第3背板长(mm) 3rd tergum length
Ringer	0.095 ± 0.001 a	10.100 ± 0.002 a	9.129 ± 0.091 a	3.811 ± 0.050 a	6.158 ± 0.034 a	2.084 ± 0.080 a
<i>uth</i> siRNA	0.100 ± 0.006 a	10.700 ± 0.011 a	9.142 ± 0.089 a	3.828 ± 0.056 a	6.011 ± 0.040 a	2.049 ± 0.076 a
Dnmt3 siRNA	0.162 ± 0.004 b	16.500 ± 0.006 b	9.267 ± 0.088 b	3.293 ± 0.055 b	5.621 ± 0.035 b	3.099 ± 0.082 b

### 3 讨论

在空间因素不变的条件下, 改变营养因素可以影响雌性蜜蜂的发育。澳大利亚国立大学 Kucharski 等(2008)通过抑制 Dnmt3 基因的表达, 可以影响蜜蜂幼虫后天的发育。在 Dnmt3 siRNA 处理过的幼虫中, 72% 发育成具有成熟卵巢的蜂王, 28% 发育成工蜂; 在注射 *uth* siRNA 的对照组中, 77% 发育成工蜂, 23% 发育成蜂王的过渡型。本实验利用 RNA 干扰(RNAi)技术抑制蜜蜂幼虫 Dnmt3 mRNA 表达, 不仅可以降低 Dnmt3 酶活性, 而且也影响 *dynactin p62* 基因甲基化水平。在 Dnmt3 siRNA 处理过的幼虫中, 65% 蜜蜂发育为蜂王和蜂王过渡型, 35% 蜜蜂发育为工蜂; 而对照组中有 23% 蜜蜂发育为蜂王和蜂王过渡型, 77% 蜜蜂发育为工蜂。可见, 降低 Dnmt3 活性和抑制 Dnmt3 mRNA 的表达, 可以共同影响 *dynactin p62* 基因的甲基化水平, 进一步影响雌性蜜蜂个体的级型分化。随着雌性蜜蜂个体内 Dnmt3 酶活性的降低和 Dnmt3 mRNA 表达的下降, 幼虫体内 *dynactin p62* 基因甲基化水平也会下降, 幼虫会朝着蜂王方向发育, 这与 Kucharski 等(2008)结果一致。

与 Kucharski 等(2008)的实验比较, 本研究检测了 *dynactin p62* 基因 7 个外显子区域的 14 个 CpG 位点的甲基化水平, 几乎涵盖了整个 *dynactin p62* 基因。在检测甲基化水平的过程中, 由于使用内切酶的特异性导致 CpG-1 和 CpG-2, CpG-11 和 CpG-12 位点的无法单独测定。在 Dnmt3 siRNA 处理过的幼虫中, *dynactin p62* 基因整体甲基化水平比对照组降低了 8.9%。 *Dynactin p62* 基因甲基化中, 部分 CpG 位点表现出较大的差异, 例如在 CpG-4, CpG-6, CpG-7, CpG-8, CpG-10, CpG-11, CpG-12 和 CpG-14 位点上, 实验组和对照组的胞嘧啶甲基化水平至少相差 10%。特定 CpG 位点可能被优先

甲基化, 但单个 CpG 位点甲基化水平的下降是否与表型有关, 需要进一步的研究。

Wang 等(2006)研究表明蜜蜂体内有同源性很高的 3 种 DNA 甲基化酶, 分别是 Dnmt1, Dnmt2 和 Dnmt3, 通过荧光定量 PCR 技术, 他们分离到了这 3 种酶, 其中 Dnmt1 在雌性蜜蜂后天发育过程中起重要作用, Dnmt2 在转移甲基的过程中发挥主要作用, 但是有关 Dnmt3 的作用没有明确说明。我们的实验结果表明, 通过 RNA 干扰技术, 在雌性幼虫发育的早期抑制 Dnmt3 mRNA 的表达, 不仅可以降低 Dnmt3 活性, 而且可以影响 *dynactin p62* 基因的甲基化水平, 进一步影响幼虫的发育。可见, Dnmt3 对幼虫早期的发育调控起着非常重要的作用。在蜂群中, 蜂王和工蜂都是由受精的二倍体卵发育而成, 虽然它们的遗传物质相同, 但是由于发育环境的不同, 使得雌性蜜蜂产生了两种级型。Wang 和 Leung (2009) 研究表明蜜蜂基因组比果蝇等社会性昆虫含更多的 (A + T) 区域和 CpG 结构, 蜜蜂体内至少有 39% 的基因可能发生 DNA 甲基化。Lyko 等(2010)通过基因芯片技术检测到蜂王和工蜂头部有 550 个基因都发生了 DNA 甲基化反应, 其中大多数基因富含 CpG 结构。蜜蜂体内 DNA 甲基化酶的多样性为 DNA 甲基化反应的发生提供了有利条件, 雌性蜜蜂的级型分化与 DNA 甲基化有着十分密切的联系。通过影响 DNA 甲基化酶的活性和相关基因的表达, 可以调控雌性蜜蜂的级型分化。

**致谢** 实验中得到了江西农业大学蜜蜂研究所刘光楠、何旭江、张飞等同学的支持和帮助, 在此表示衷心的感谢。

### 参考文献 (References)

- Dahl C, Guldberg P, 2003. DNA methylation analysis techniques. *Biogerontology*, 4(4): 233 - 250.
- Elango N, Hunt BG, Goodisman MAD, Yi SV, 2009. DNA methylation

- is widespread and associated with differential gene expression in castes of the honeybee, *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 11206 – 11211.
- 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: 472.
- Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R, 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*, 319: 1827 – 1830.
- Lyko F, Foret S, Kucharski R, Wolf S, Falckenhayn C, Maleszka R, 2010. The honey bee epigenomes; differential methylation of brain DNA in queens and workers. *PLoS Biol.*, 8(11): e1000506.
- Schaefer M, Lyko F, 2007. DNA methylation with a sting: an active DNA methylation system in the honeybee. *Bioessays*, 29: 208 – 211.
- The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443: 931 – 949.
- Wang Y, Jorda M, Jones PL, Maleszka R, Ling X, Robertson HM, Mizzen CA, Peinado M, Robinson GE, 2006. Functional CpG methylation system in a social insect. *Science*, 314: 645 – 647.
- Wang Y, Leung FCC, 2009. In silico prediction of two classes of honeybee genes with CpG deficiency or CpG enrichment and sorting according to gene ontology classes. *J. Mol. Evol.*, 68: 700 – 705
- Wu CT, Morris JR, 2001. Genes, genetics and epigenetics; a correspondence. *Science*, 293: 1103 – 1105.
- Wu J, Li JK, 2010. Proteomic analysis of the honeybee (*Apis mellifera* L.) caste differentiation between worker and queens larvae. *Scientia Agricultura Sinica*, 43(1): 176 – 184. [吴静, 李建科, 2010. 蜜蜂(*Apis mellifera* L.)幼虫级型分化差异蛋白质组分析. 中国农业科学, 43(1): 176 – 184]
- Zeng ZJ, 2007. Biology of Honeybee. China Agriculture Press, Beijing. 33 – 36. [曾志将, 2007. 蜜蜂生物学. 北京: 中国农业出版社. 33 – 36]

(责任编辑: 赵利辉)