



# 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

孙明会<sup>1#</sup>, 张佳欣<sup>1#</sup>, 张艺琼<sup>1</sup>, 赵浩东<sup>1</sup>, 荆欣<sup>1</sup>, 高旭泽<sup>1</sup>, 郭思佳<sup>1</sup>, 冯佩林<sup>1</sup>, 刘小玉<sup>1</sup>, 陈大福<sup>1,2</sup>, 付中民<sup>1,2\*</sup>, 郭睿<sup>1,2\*</sup>

1 福建农林大学动物科学学院(蜂学学院), 福建 福州 350002

2 福建省蜂疗研究所, 福建 福州 350002

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.

SUN Minghui, ZHANG Jiaxin, ZHANG Yiqiong, ZHAO Haodong, JING Xin, GAO Xuze, GUO Sijia, FENG Peilin, LIU Xiaoyu, CHEN Dafu, FU Zhongmin, GUO Rui. Cloning, molecular characterization, and expression pattern of N6-adenine-specific DNA methyltransferase gene in *Nosema ceranae*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 3279-3291.

**摘要:** 【目的】东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)专性感染成年蜜蜂导致微孢子虫病, 给养蜂生产造成很大损失。目前, 东方蜜蜂微孢子虫的 N6-腺苷特异性甲基化转移酶(N6-adenine-specific methyltransferase, N6AMT)基因 *NcN6AMT* 的研究仍然缺失。本研究对 *NcN6AMT* 的编码序列(coding sequence, CDS)区进行克隆, 并解析 *NcN6AMT* 蛋白的理化性质和分子特性, 进而测定东方蜜蜂微孢子虫感染意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)和中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)工蜂过程中 *NcN6AMT* 的相对表达量, 以期丰富 *NcN6AMT* 的信息, 并为探究东方蜜蜂微孢子虫感染过程 *NcN6AMT* 的功能及表观调控机制提供基础。【方法】采用 ProtParam 和 ProtScale 软件对 *NcN6AMT* 进行等电点和亲水性分析。

资助项目: 国家自然科学基金面上项目(32172792); 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(2022J01131334); 福建农林大学硕士生导师团队项目(郭睿); 福建农林大学科技创新专项基金项目(KFb22060XA); 福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)科研扶持项目(郭睿); 国家级大学生创新创业训练计划(202110389027); 福建省大学生创新创业训练计划(202210389121, 202210389126)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32172792), the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-44-KXJ7), the Natural Science Foundation of Fujian Province (2022J01131334), the Master Supervisor Team Fund of Fujian Agriculture and Forestry University (Guo Rui), the Scientific and Technical Innovation Fund of Fujian Agriculture and Forestry University (KFb22060XA), the Scientific Research Project of College of Animal Sciences (College of Bee Science) of Fujian Agriculture and Forestry University (Guo Rui), the National Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program (202110389027), and the Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program of Fujian Province (202210389121, 202210389126).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding authors. GUO Rui, Tel/Fax: +86-591-87640197, E-mail: ruiguo@fafu.edu.cn;

FU Zhongmin, E-mail: zmf@fafu.edu.cn

Received: 2022-12-08; Accepted: 2023-02-10; Published online: 2023-02-16

通过 SignalP 5.0、NetPhos 3.1、TMHMM-2.0、SOPMA 和 SWISS-MODEL 等软件分别预测 NcN6AMT 的信号肽、磷酸化位点、跨膜结构域、二级结构和三级结构。使用 WoLF PSORT II 软件预测 NcN6AMT 的亚细胞定位。根据 N6AMT 氨基酸序列,通过 TBtools 软件对智人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)、兔脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon cuniculi*)、肠脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon intestinalis* ATCC 50506)、蚱蜢脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon romaleae* SJ-2008)、美洲思普雷格孢虫(*Spraguea lophii* 42\_110)、家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis* CQ1)、隐生菱形藻(*Nitzschia inconspicua*)和东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)的 N6AMT 进行结构域预测和分析。利用 MEME 软件和 MEGA 11.0 软件进行东方蜜蜂微孢子虫和其他物种 N6AMT 的保守基序预测及进化树构建。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测 NcN6AMT 在东方蜜蜂微孢子虫感染意大利蜜蜂和中华蜜蜂工蜂过程的相对表达量。【结果】通过 PCR 扩增出大小约 500 bp 的目的片段,克隆测序结果显示其与 GenBank 数据库收录的预测序列一致; NcN6AMT 蛋白的分子量约为 18.7 kDa,分子式为  $C_{845}H_{1374}N_{214}O_{249}S_6$ ,理论等电点为 5.88,脂溶系数是 119.76,不稳定系数为 37.47,平均亲水系数为 0.025,含 166 个氨基酸和 15 个磷酸化位点,不含典型的跨膜结构域和信号肽,可同时定位于细胞质、线粒体、细胞核和液泡膜; NcN6AMT 含 1 个甲基转移酶小结构域(methyltransferase small domain, MTS),该结构域同样存在于家蚕微孢子虫和兔脑炎微孢子虫等 8 个其他物种的 N6AMT; 在东方蜜蜂微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、肠脑炎微孢子虫和蚱蜢脑炎微孢子虫的 N6AMT 中均预测到 5 个相同的保守基序; NcN6AMT 与家蚕微孢子虫、肠脑炎微孢子虫、兔脑炎微孢子虫和蚱蜢脑炎微孢子虫的 N6AMT 序列一致性达到 70.92%; 东方蜜蜂微孢子虫和家蚕微孢子虫的 N6AMT 在系统进化树上聚为一支; 东方蜜蜂微孢子虫接种后 1–4 d, NcN6AMT 在意大利蜜蜂和中华蜜蜂工蜂中肠内均呈现先上升后下降的表达趋势。【结论】成功克隆到 NcN6AMT 基因的 CDS 区,明确了 NcN6AMT 蛋白的理化性质和分子特性,并揭示东方蜜蜂微孢子虫和家蚕微孢子虫的 N6AMT 蛋白具有较高的保守性, NcN6AMT 在东方蜜蜂微孢子虫感染意大利蜜蜂和中华蜜蜂工蜂的第一个增殖周期(1–4 dpi)内动态表达且均呈上升-下降的表达模式。

关键词: 微孢子虫; 东方蜜蜂微孢子虫; DNA 甲基化; N6-腺苷特异性甲基化转移酶; 克隆; 分子特性; 表达模式

## Cloning, molecular characterization, and expression pattern of N6-adenine-specific DNA methyltransferase gene in *Nosema ceranae*

SUN Minghui<sup>1#</sup>, ZHANG Jiabin<sup>1#</sup>, ZHANG Yiqiong<sup>1</sup>, ZHAO Haodong<sup>1</sup>, JING Xin<sup>1</sup>, GAO Xuze<sup>1</sup>, GUO Sijia<sup>1</sup>, FENG Peilin<sup>1</sup>, LIU Xiaoyu<sup>1</sup>, CHEN Dafu<sup>1,2</sup>, FU Zhongmin<sup>1,2\*</sup>, GUO Rui<sup>1,2\*</sup>

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

2 Apitherapy Research Institute of Fujian Province, Fuzhou 350002, Fujian, China

**Abstract:** [Objective] *Nosema ceranae* exclusively infects adult honey bees and causes

nosemosis, resulting in great losses for the beekeeping industry. Little is known about the *N. ceranae* N6-adenine-specific methyltransferase gene *NcN6AMT*. This study cloned the coding sequence (CDS) region of *NcN6AMT*, investigated the physicochemical properties and molecular characteristics of NcN6AMT, and then determined the relative expression level of *NcN6AMT* during the infection process of *N. ceranae* in *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana* workers. This study aims to enrich the information about *NcN6AMT* and lay a foundation for exploring the function and epigenetic regulation mechanism of *NcN6AMT* during the infection process of *N. ceranae*. **[Methods]** ProtParam and ProtScale were used to analyze the isoelectric point and hydrophilia of NcN6AMT. The signal peptide, phosphorylation site, transmembrane domain, secondary structure, and tertiary structure of NcN6AMT were predicted by SignalP 5.0, NetPhos 3.1, TMHMM-2.0, SOPMA, and SWISS-MODEL, respectively. WoLF PSORT II was employed to predict the subcellular localization of NcN6AMT. TBtools was employed to predict the domains in the amino acid sequences of N6AMTs in *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Nilaparvata lugens*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon intestinalis* ATCC 50506, *Encephalitozoon Romaleae* SJ-2008, *Spraguea lophii* 42\_110, *Nosema bombycis* CQ1, *Nitzschia inconspicua*, and *N. ceranae*. MEME and MEGA 11.0 were employed to predict the conserved motifs and build the phylogenetic tree of N6AMTs. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed to determine the relative expression level of *NcN6AMT* during the *N. ceranae* infection of *A. m. ligustica* and *A. c. cerana* workers. **[Results]** The target fragment with a size of about 500 bp was amplified via PCR, and the cloning and sequencing results showed that it was consistent with the predicted sequence in GenBank. The deduced NcN6AMT protein was composed of 166 residues and had the molecular weight of 18.7 kDa, the formula of C<sub>845</sub>H<sub>1374</sub>N<sub>214</sub>O<sub>249</sub>S<sub>6</sub>, the theoretical isoelectric point of 5.88, the lipid solubility coefficient of 119.76, the instability coefficient of 37.47, the average hydrophilic coefficient of 0.025, and 15 phosphorylation sites, with no typical transmembrane domain or signal peptide. NcN6AMT was located in cytoplasm, mitochondria, nucleus, and vacuole membrane. It had one structural domain MTS, which also existed in the N6AMTs of other eight species such as *N. bombycis* CQ1 and *E. cuniculi*. Five same conserved motifs were predicted in the N6AMTs of *N. ceranae*, *E. cuniculi*, *E. intestinalis* ATCC 50506, and *E. romaleae* SJ-2008. The sequence identity of N6AMTs in *N. ceranae*, *N. bombycis* CQ1, *E. cuniculi*, *E. intestinalis* ATCC 50506, and *E. romaleae* SJ-2008 was 70.92%. The N6AMTs in *N. ceranae* and *N. bombycis* CQ1 were grouped into one clade. The expression of *NcN6AMT* was first up-regulated and then down-regulated within 1–4 days post inoculation (dpi) of *N. ceranae* in *A. m. ligustica* and *A. c. cerana* workers. **[Conclusion]** The CDS region of *NcN6AMT* was successfully cloned, and the physicochemical properties and molecular characteristics of NcN6AMT protein were clarified. The N6AMT proteins in *N. ceranae* and *N. bombycis* were highly conserved. During the first proliferation cycle (1–4 dpi) of *N. ceranae* in *A. m. ligustica* and *A. c. cerana* workers, the expression of *NcN6AMT* exhibited a bell-shaped pattern.

**Keywords:** *Microsporidia*; *Nosema ceranae*; DNA methylation; N6-adenine-specific methyltransferase; cloning; molecular characteristics; expression pattern

微孢子虫是一类广泛感染脊椎动物和无脊椎动物的真菌寄生虫,已报道的种类超过1400种,宿主范围包括人类、鱼类、蜜蜂和家蚕(*Bombyx mori*)等<sup>[1]</sup>。东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)专性感染成年蜜蜂中肠上皮细胞,不仅对蜜蜂宿主造成诸多不良影响,如寿命缩短<sup>[2]</sup>、能量胁迫<sup>[3]</sup>、免疫抑制、凋亡抑制和生理行为变化<sup>[4]</sup>等,还能与其他生物或非生物因子共同胁迫宿主,进而引起蜂群群势和生产力的严重下降,给养蜂业造成很大损失<sup>[5]</sup>。东方蜜蜂微孢子虫的原始寄主是东方蜜蜂(*Apis cerana*),后跨种感染西方蜜蜂(*Apis mellifera*),目前广泛感染世界各地的饲养蜂群。中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*,简称中蜂)和意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*,简称意蜂)是国内养蜂生产使用的2个主要蜂种。

DNA甲基化是由DNA甲基化转移酶(methyltransferase)、去甲基化转移酶(demethyltransferase)和阅读蛋白(reader protein)共同作用完成的动态过程<sup>[6]</sup>。作为一种重要的表观调控方式,DNA甲基化包括5mC、4mC和6mA等诸多类型<sup>[7]</sup>。研究表明DNA甲基化在智人(*Homo sapiens*)<sup>[8]</sup>、小鼠(*Mus musculus*)<sup>[9]</sup>、水稻(*Oryza sativa* L.)<sup>[10]</sup>、梨形四膜虫(*Tetrahymena pyriformis*)和致病疫霉(*Phytophthora infestans*)<sup>[11]</sup>等动植物和微生物中广泛存在。Dunn等<sup>[12]</sup>在大肠埃希菌(*Bacterium coli*)DNA中首次鉴定到6mA修饰碱基。此后,人们陆续在辣椒疮痂病菌(*Xanthomonas euvesicatoria*)、脑膜炎双球菌(*Neisseria meningitidis*)和肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)等原核生物中鉴定和发现较多DNA的6mA修饰<sup>[13-15]</sup>。借助深度测序技术这一强大工具,6mA修饰被发现同样广泛存在于人类、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)等真核生物<sup>[16-19]</sup>,并且

在基因表达调控、逆转录转座子抑制、应激反应、染色质组织、早期胚胎发育及肿瘤发生等众多生物学过程中起到关键作用<sup>[20]</sup>。6mA通常被认为通过宿主特异性限制性修饰系统保护DNA免受限制性内切酶的作用,N6-腺嘌呤特异性DNA甲基转移酶(N6-adenine-specific DNA methyltransferase, N6AMT)是催化腺嘌呤碱基甲基化的关键酶。哺乳动物中有2种N6AMT,分别为N6AMT1和N6AMT2<sup>[21]</sup>。延伸因子甲基转移酶5(elongation factor methyltransferases 5, Efm5)最早被归属于N6腺嘌呤DNA甲基转移酶样,在脊椎动物、无脊椎动物和植物中均发现与Efm5密切相关的同源物<sup>[22]</sup>。人类N6AMT2被证实是酵母Efm5的直系同源物,可使真核延伸因子1A(eukaryotic elongation factor 1A, eEF1A)中的单甲基组蛋白H3(Lys79)发生甲基化,N6AMT2与Efm5可在体外甲基化任何一个物种的eEF1A<sup>[23]</sup>。

相比于动植物,真菌的N6AMT研究非常滞后。目前,东方蜜蜂微孢子虫的N6AMT和DNA甲基化研究仍然缺失,DNA甲基化是否及如何影响东方蜜蜂微孢子虫的增殖和感染过程尚不清楚。因此,本研究对东方蜜蜂微孢子虫的N6AMT基因(命名为NcN6AMT)进行克隆,通过生物信息学方法解析NcN6AMT蛋白的理化性质和分子特性,并测定NcN6AMT在东方蜜蜂微孢子虫感染意蜂和中蜂工蜂过程中的表达模式,以期丰富NcN6AMT的基本信息,为其他真菌的N6AMT研究提供参考,并为进一步开展相关功能研究打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试生物材料

未受东方蜜蜂微孢子虫感染的意蜂和中蜂工蜂取自福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)蜜蜂保护课题组饲养的实验蜂群。东方蜜蜂

微孢子虫孢子由蜜蜂保护课题组前期制备和保存<sup>[24-25]</sup>。

## 1.2 *NcN6AMT* 基因 CDS 区的 PCR 扩增和 Sanger 测序

利用 SteadyPure Quick RNA Extraction Kit 试剂盒(Accurate Biology)提取东方蜜蜂微孢子虫孢子样品的总 RNA 作为模板, 再通过 Evo M-MLV 反转录试剂盒(Accurate Biology)合成 cDNA 第 1 链。根据 GenBank 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)收录的 *NcN6AMT* 基因(GenBank ID: NW\_020169305.1)预测序列, 采用 Primer Premier 6.0 软件设计扩增编码序列(coding sequence, CDS)区的上下游引物(*NcN6AMT*-F1, *NcN6AMT*-R1), 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。参照实验室前期文献报道<sup>[26]</sup>设置 PCR 反应体系和条件。产物经 1.8%的琼脂糖凝胶电泳检测后在凝胶图像成像分析系统(上海培清)下进行观察和拍照。按照范元婵等<sup>[27]</sup>报道的方法进行目的片段的纯化与 TA 克隆, 取少量菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行 Sanger 测序。

## 1.3 *NcN6AMT* 蛋白的理化性质和分子特性分析

使用 ExPASy 网站(<http://www.expasy.org>)的 ProtParam 和 ProtScale 软件分别对 *NcN6AMT* 进行等电点和亲疏水性分析, 均采用默认参数。通过 SignalP 5.0、NetPhos 3.1、TMHMM-2.0、

SOPMA 和 SWISS-MODEL 等软件分别预测 *NcN6AMT* 的信号肽、磷酸化位点、跨膜结构域、二级结构和三级结构。从 NCBI Protein 数据库下载东方蜜蜂微孢子虫、人类、小鼠、褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)、兔脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon cuniculi*)、肠脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon intestinalis* ATCC 50506)、蛭蝓脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon romaleae* SJ-2008)、美洲思普雷格孢虫(*Spraguea lophii* 42\_110)、家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis* CQ1)、隐生菱形藻(*Nitzschia inconspicua*)的 *N6AMT* 氨基酸序列, 通过 TBtools 软件中的 Visualize Pfam Domain Pattern 对上述 10 个物种的 *N6AMT* 进行结构域预测和分析。使用 WoLF PSORT II 软件<sup>[28]</sup>预测 *NcN6AMT* 的亚细胞定位。

## 1.4 *NcN6AMT* 蛋白的保守基序预测

参照陈华枝等<sup>[29]</sup>报道的方法, 根据 *NcN6AMT* 氨基酸序列, 使用 MEME 软件(<https://meme-suite.org/>)预测东方蜜蜂微孢子虫和其他物种 *N6AMT* 的保守基序, 参数设置为: 不同结构域的数量为 10, 结构域最大和最小氨基酸残基数分别为 50 aa 和 6 aa, 其余为默认参数。

## 1.5 *NcN6AMT* 蛋白的系统进化分析

通过 DNAMAN 软件(Version 8.0.8.789)对人类、小鼠、褐飞虱、兔脑炎微孢子虫、肠脑炎微孢子虫、蛭蝓脑炎微孢子虫、美洲思普雷格

表 1 本研究使用的引物信息

Table 1 Information about primers used in this study

Name	Sequence (5'→3')	Purpose
<i>NcN6AMT</i> -F1	ATGAATTCTTTTGATTGG	PCR
<i>NcN6AMT</i> -R1	TTATTTTTTTCCTTTTAA	
<i>NcN6AMT</i> -F2	GGGTAGATGGATGTGCTATCAT	qPCR
<i>NcN6AMT</i> -R2	TGAACTGTATATCCCTTTGCCT	
<i>actin</i> -F	ACAATGGTTCAGGTATCGTA	Internal reference for qPCR
<i>actin</i> -R	GTGCCTCATCTCCTACATAA	

孢子虫、家蚕微孢子虫、隐生菱形藻和东方蜜蜂微孢子虫的 *N6AMT* 进行氨基酸序列多重比对。利用 MEGA 11.0 软件构建邻接(neighbor-joining, NJ)树, 采用 1 000 次重复抽样。

### 1.6 孢子接种和中肠样品制备

按照本课题组已建立的技术流程<sup>[24]</sup>进行东方蜜蜂微孢子虫孢子接种、工蜂饲养及中肠样品制备。从外观健康、群势较强且未受东方蜜蜂微孢子虫感染(PCR 鉴定结果为阴性)的意蜂或中蜂蜂群中将封盖子脾迅速提至实验室, 放入  $(34\pm 0.5)$  °C 培养箱; 收集刚出房蜜蜂工蜂, 记为 1 日龄, 饥饿处理 2 h 后单头固定并饲喂 5  $\mu$ L 含  $10^6$  个东方蜜蜂微孢子虫孢子的 50% (质量体积分数) 蔗糖溶液, 待食尽后放入干净的塑料盒 (35 头/盒), 每个塑料盒上方插入一支装有 2 mL 50% (质量体积分数) 蔗糖溶液的饲喂器; 此后每 24 h 更换一支饲喂器, 内装有 2 mL 蔗糖溶液(不含孢子); 分别于接种后 1 day post inoculation (dpi)、2 dpi、3 dpi 和 4 dpi 在超净台中小心拉取工蜂中肠, 每 3 只中肠样品放入 1 个 RNA-Free 离心管, 液氮速冻后立即放入  $-80$  °C 超低温冰箱保存备用。上述实验进行 3 次生物学重复。

### 1.7 东方蜜蜂微孢子虫侵染过程中 *NcN6AMT* 基因的 RT-qPCR 检测

使用 RNA 抽提试剂盒(Promega)分别提取上述 4 个时间点中肠样品的总 RNA。参照 Hifair<sup>®</sup> V one-step RT-gDNA Digestion SuperMix 试剂盒(翌圣)说明书, 通过反转录得到相应的 cDNA 模板。采用 Primer Premier 6.0 软件设计 *NcN6AMT* 的 RT-PCR 及荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 基因表达引物(*NcN6AMT*-F2 和 *NcN6AMT*-R2)。以东方蜜蜂微孢子虫的 *actin* 基因(GenBank ID: NW\_020169300)作为内参。

通过 RT-qPCR 检测东方蜜蜂微孢子虫侵染意蜂或中蜂工蜂过程中 *NcN6AMT* 的相对表达量。反应在 Gentier 96R 全自动 PCR 分析系统(天隆科技有限公司)中进行。反应体系为: Hieff<sup>®</sup> qPCR SYBR Green Master Mix (翌圣) 10  $\mu$ L, 上下游引物(2.5  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, cDNA 模板 1  $\mu$ L, DEPC 水 7  $\mu$ L。qPCR 程序为: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 58 °C 30 s, 72 °C 20 s, 42 个循环; 熔解曲线程序为系统默认设置。以 1 dpi 为对照, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 *NcN6AMT* 在 2 dpi、3 dpi 和 4 dpi 的相对表达量。利用 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析及绘图。采用 SPSS statistics 进行相对表达量的单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA), 以  $P < 0.05$  为显著性阈值。通过 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 *NcN6AMT* 基因 CDS 区的分子克隆

琼脂糖凝胶电泳结果显示, 通过 PCR 能扩增出符合预期大小(约 500 bp)的目的片段(图 1)。Sanger 测序结果显示目的片段与 GenBank 数据库收录的 *NcN6AMT* 的 CDS 区序列一致(NMDCX0000161)。以上结果说明成功克隆出 *NcN6AMT* 的 CDS 区。

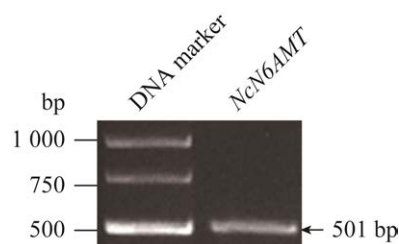


图 1 *NcN6AMT* 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳  
Figure 1 Agarose gel electrophoresis for the amplification product from *NcN6AMT*.

## 2.2 NcN6AMT 蛋白的理化性质与分子特性

NcN6AMT 共含有 501 个核苷酸, 编码的 NcN6AMT 含 166 个氨基酸。NcN6AMT 的分子式为  $C_{845}H_{1374}N_{214}O_{249}S_6$ 。分子量约为 18.7 kDa, 脂溶系数为 119.76, 理论等电点为 5.88。NcN6AMT 包含 21 个负电荷氨基酸和 20 个正电荷氨基酸, 含量最高的氨基酸为异亮氨酸, 含量最低的氨基酸为组氨酸和色氨酸(NMDCX0000160)。NcN6AMT 的平均亲水系数为 0.025, 疏水氨基酸数量比亲水氨基酸多(图 2A), 说明该蛋白可能为疏水性蛋白。NcN6AMT 含 8 个丝氨酸磷酸化位点, 5 个酪氨酸磷酸化位点和 2 个苏氨酸磷酸化位点(图 2B)。另外, NcN6AMT 不含典型的跨膜结构域和信号肽, 说明该蛋白可能为非跨膜蛋白和胞内蛋白(图 2C、2D)。

NcN6AMT 含有 68 个(40.96%)  $\alpha$ -螺旋, 40 个(24.10%) 延长链, 14 个(8.43%)  $\beta$ -转角, 44 个

(26.51%) 无规则卷曲(图 3A); 含有 1 个甲基转移酶小结构域(methyltransferase small domain, MTS)结构域, 位于第 4–92 位氨基酸之间; 家蚕微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、肠脑炎微孢子虫、蚱蜢脑炎微孢子虫、人类、小鼠、褐飞虱、美洲思普雷格孢虫的 N6AMT 也含有 1 个 MTS 结构域(图 3B); 如图 3C 所示, NcN6AMT 的三级结构模板为 3q87.1.B, 二者之间的同源性的为 49.69%。此外, NcN6AMT 同时定位于细胞质(47.80%)、线粒体(30.40%)、细胞核(17.40%)和液泡膜(4.30%)。

## 2.3 NcN6AMT 蛋白的保守基序分析

在 NcN6AMT 中鉴定到 5 个保守基序, 分别为 motif 1、motif 2、motif 3、motif 5 和 motif 6; 类似地, 在兔脑炎微孢子虫、肠脑炎微孢子虫、蚱蜢脑炎微孢子虫的 N6AMT 蛋白中也预测到上述 5 个保守基序(图 4)。

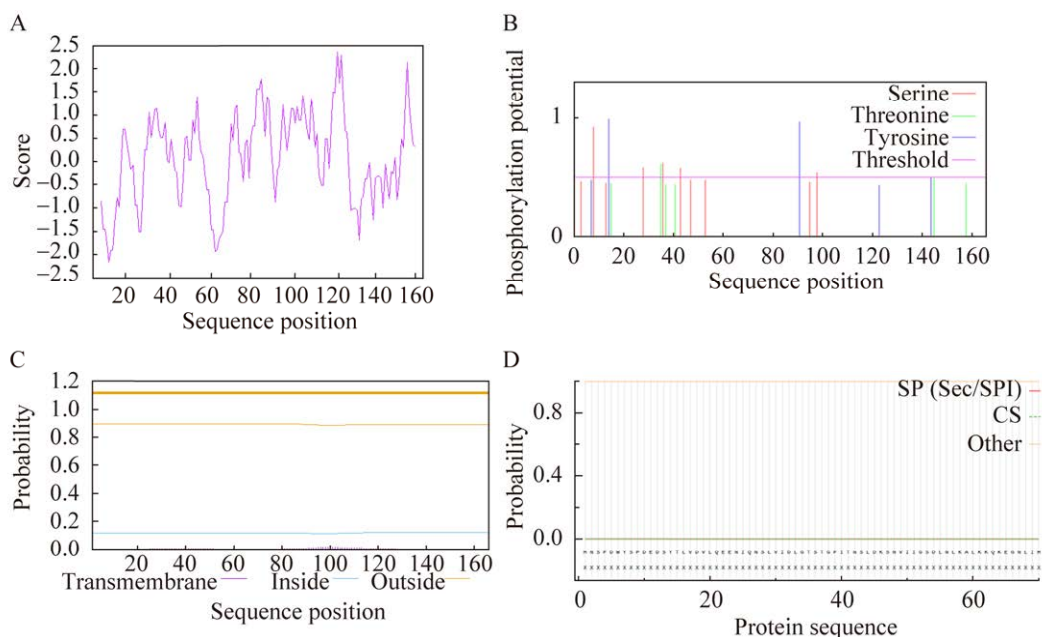


图 2 NcN6AMT 的分子特性

Figure 2 Molecular characteristics of NcN6AMT. A: Hydrophilicity. B: Phosphorylation site. C: Transmembrane domain. D: Signal peptide.

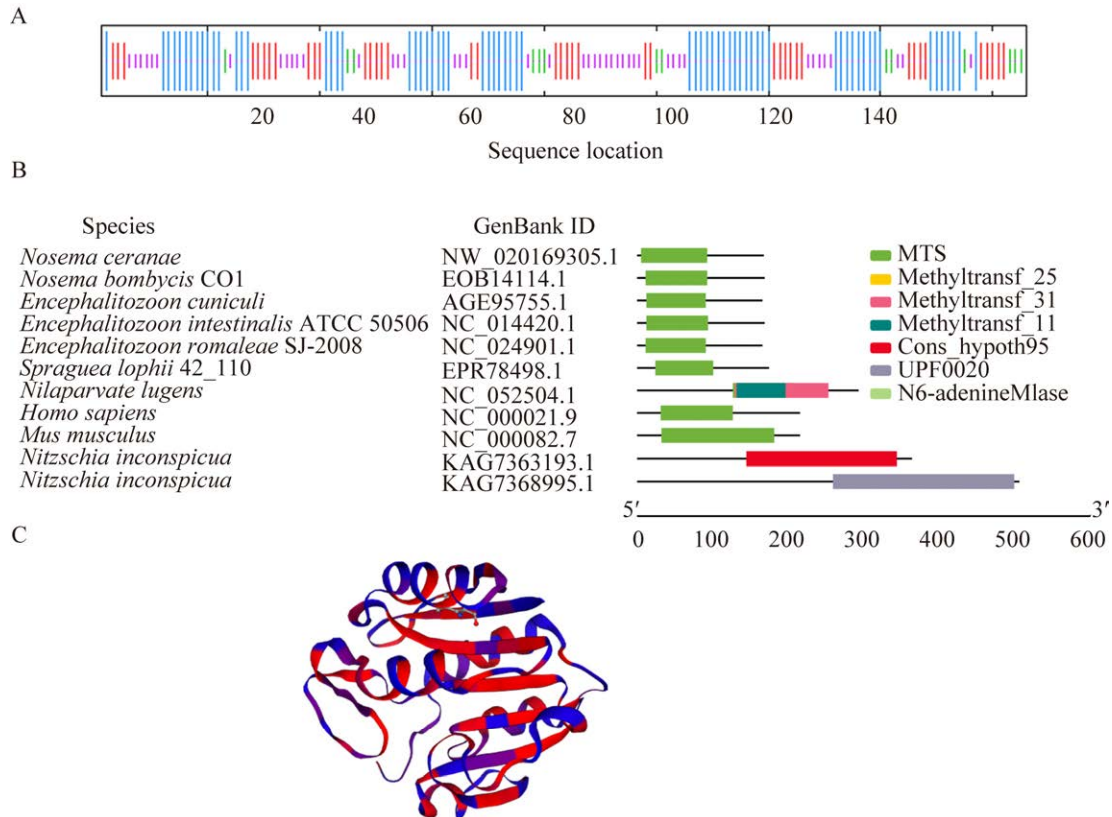


图 3 NcN6AMT 的二级结构(A)、结构域(B)和三级结构(C)

Figure 3 Secondary structure (A), structural domain (B) and tertiary structure (C) of NcN6AMT.

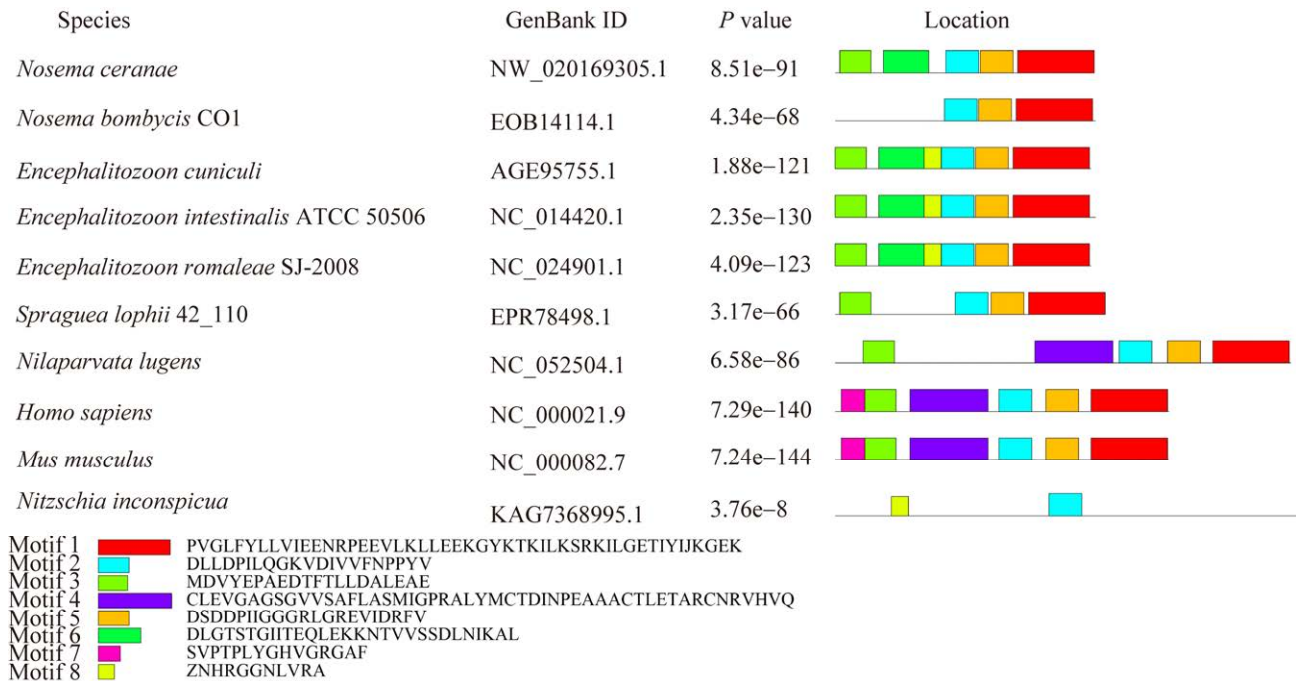


图 4 东方蜜蜂微孢子虫和其他 9 个物种的 N6AMT 蛋白含有的保守基序

Figure 4 Conserved motifs in NcN6AMT proteins in *Nosme ceranae* and other nine species.



## 2.4 N6AMT 蛋白的系统进化分析

NcN6AMT 与上述 9 个物种的 N6AMT 的氨基酸序列一致性介于 16.91%–70.92%，存在明显差异(NMDCX0000162)；NcN6AMT 与家蚕微孢子虫、肠脑炎微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、蚱蜢脑炎微孢子虫的序列一致性最高(70.92%)，其次，与人类和小鼠的 N6AMT 氨基酸序列一致性为 66.04% (NMDCX0000162)。系统进化分析结果显示，兔脑炎微孢子虫、肠脑炎微孢子虫和蚱蜢脑炎微孢子虫的 N6AMT 聚

为一支，东方蜜蜂微孢子虫和家蚕微孢子虫的 N6AMT 聚为一支，进化距离最近(图 5)。

## 2.5 NcN6AMT 基因在东方蜜蜂微孢子虫感染意蜂和中蜂工蜂过程的表达谱

RT-qPCR 结果显示接种东方蜜蜂微孢子虫后，相较于 1 dpi，意蜂工蜂中肠内 NcN6AMT 的表达量在 2 dpi 显著上调( $P<0.5$ )，在 3 dpi 上调，在 4 dpi 下调，总体呈现出上升-下降的表达趋势(图 6A)；中蜂工蜂中肠内 NcN6AMT 的表达量在 2 dpi 显著上调( $P<0.5$ )，在 3 dpi 下调，在 4 dpi 显

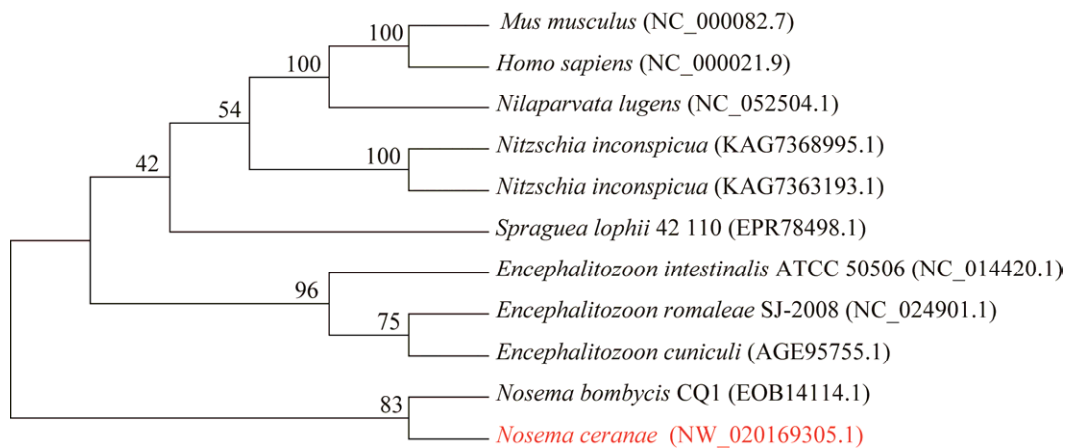


图 5 邻接法构建基于 N6AMT 氨基酸序列的东方蜜蜂微孢子虫与其他 9 个物种的系统进化树

Figure 5 Phelogenetic tree of *Nosme ceranae* and other nine species based on amino acid sequence N6AMT by neighbor-joining method. *N. ceranae* NW\_020169305.1 was showed in red font. The sequence numbers in brackets represent the GenBank accession numbers of N6AMT proteins in every species. The values at the nodes indicate bootstrap test confidence values (1 000 replicas).

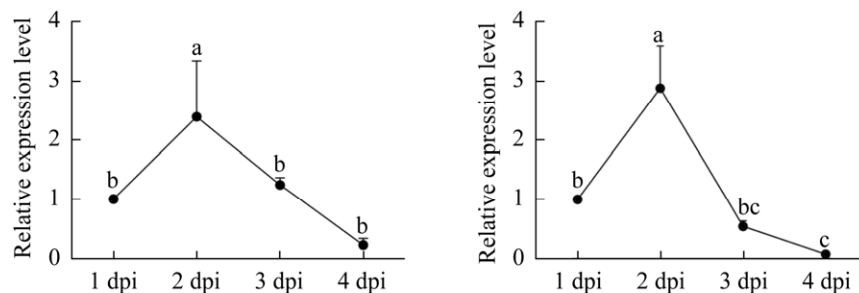


图 6 东方蜜蜂微孢子虫感染意蜂(A)和中蜂(B)工蜂过程中 NcN6AMT 的表达谱

Figure 6 Expression patterns of *NcN6AMT* during the *Nosme ceranae* infection of *Apis mellifera ligustica* (A) and *Apis cerana cerana* (B) workers. Data are presented as mean±SE. The same lowercase letters above the curve indicate non-significant difference ( $P>0.05$ ), while the different lowercase letters above the curve indicate significant difference ( $P<0.05$ ) (Tukey test).

显著下调( $P < 0.05$ ), 总体也表现为上升-下降的表达趋势(图 6B)。

### 3 讨论与结论

此前, N6AMT1 在人类、小鼠中被鉴定到, 且通过研究证实 N6AMT1 对抑制肿瘤细胞生长、胚胎的早期发育至关重要<sup>[30-31]</sup>, Ashapkin 等<sup>[32]</sup>发现植物拟南芥(*Arabidopsis*) N6AMT 突变体中开花时间的提前。在哺乳动物中, N6AMT1 被认为是细菌 N6-腺嘌呤 DNA 甲基转移酶的同源物<sup>[31]</sup>, N6AMT1 可作为三阴性乳腺癌治疗药物奥拉帕尼的应激蛋白参与调节 6mA 的修饰, 从而影响癌细胞的耐药性<sup>[33]</sup>。然而对于真菌 N6AMT 的了解还十分有限, 东方蜜蜂微孢子虫的 N6AMT 研究至今仍未见报道。本研究首次对 *NcN6AMT* 基因进行分子生物学研究, PCR 鉴定(图 1)和 Sanger 测序结果表明 *NcN6AMT* 在东方蜜蜂微孢子虫孢子中真实存在和表达, 为深入开展相关研究提供了实验依据。生物信息学分析结果显示, *NcN6AMT* 蛋白含 166 个氨基酸, 分子量约为 18.7 kDa, 分子式为  $C_{845}H_{1374}N_{214}O_{249}S_6$ , 理论等电点是 5.88, 脂肪系数是 119.76, 平均亲水系数是 0.025; 含有 15 个磷酸化位点, 不含跨膜结构域和信号肽, 且可同时定位细胞质、线粒体、细胞核和液泡膜, 说明 *NcN6AMT* 可能是疏水性蛋白、非跨膜蛋白和胞内蛋白。以上结果丰富了 *NcN6AMT* 的信息, 为进一步开展功能研究提供了参考信息。

Sergiev 等<sup>[34]</sup>在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中鉴定到 4 个鸟嘌呤-(N2)-甲基转移酶中, 通过 X 射线结构分析发现其中的核糖体小亚基甲基转移酶 D (ribosome small subunit methyltransferase D, RsmD)由单个罗兹曼折叠结构域, 即单个甲基化转移酶结构域(methyltransferase domain, MT)构成。Weitzmann 等<sup>[35]</sup>纯化出大肠杆菌的 2 种

16S rRNA 特异性甲基转移酶, 分别为 m<sup>2</sup>G966 (m<sup>2</sup>G MT)和 m5C967 (m5C MT), 并发现二者对微小但具有重要功能的结构变化均非常敏感。本研究发现 *NcN6AMT* 的第 4-92 位氨基酸之间含有甲基转移酶小结构域(methyltransferase small domain, MTS), 暗示 *NcN6AMT* 具有与其他物种 N6AMT 类似的生物学功能。此外, 在 *Nosema* 属的家蚕微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、肠脑炎微孢子虫、蚱蜢脑炎微孢子虫、美洲思普雷格孢虫以及人类、小鼠和褐飞虱的 N6AMT 中也预测到 MTS 结构域, 说明 MTS 广泛存在于微孢子虫和哺乳动物的 N6AMT, 上述不同物种的 N6AMT 具有较高的保守性。

本研究在 *NcN6AMT* 中预测出 5 个保守基序, 这 5 个保守基序同样存在于兔脑炎微孢子虫、肠脑炎微孢子虫和蚱蜢脑炎微孢子虫的 N6AMT, 进一步表明 N6AMT 在上述 *Nosema* 属的 4 种微孢子虫中高度保守, 可能发挥相同或相近的功能。此外, motif 6 存在于东方蜜蜂微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、肠脑炎微孢子虫和蚱蜢脑炎微孢子虫的 N6AMT, 但不存在于家蚕微孢子虫和美洲思普雷格孢虫, 说明 N6AMT 在不同的微孢子虫中具有一定的种属特异性, 值得进一步探究。推测 motif 6 对于东方蜜蜂微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、肠脑炎微孢子虫和蚱蜢脑炎微孢子虫的 N6AMT 功能具有特定作用。

本研究发现, 东方蜜蜂微孢子虫与家蚕微孢子虫、兔脑炎微孢子虫、肠脑炎微孢子虫、蚱蜢脑炎微孢子虫的 N6AMT 氨基酸序列(NMDCX0000162)一致性达到 70.92%, 表明上述 4 种微孢子虫的 N6AMT 序列较为保守。此外, 在进化树中东方蜜蜂微孢子虫与家蚕微孢子虫的 N6AMT 聚为一支(图 5), 表明 *Nosema* 属的这 2 种微孢子虫的 N6AMT 在进化过程中具有较高保守性; 东方蜜蜂微孢子虫、人类和小鼠的

N6AMT 序列一致性达到 66.04%, 说明东方蜜蜂微孢子虫与哺乳动物的 N6AMT 之间也具有一定的保守性, 暗示 NcN6AMT 与哺乳动物的 N6AMT 具有类似的功能。目前, 人类和小鼠等哺乳动物的 N6AMT 被研究的较为深入<sup>[33,36]</sup>, 未来可借鉴相关报道进一步开展 NcN6AMT 的功能研究。

东方蜜蜂微孢子虫特异性侵染成年蜜蜂中肠上皮细胞, 具有感染性的孢原质进入宿主细胞后完全依赖宿主细胞的物质和能量进行增殖<sup>[37]</sup>。研究表明东方蜜蜂微孢子虫在西方蜜蜂工蜂中肠内的增殖周期约为 4 d<sup>[38]</sup>。本研究中, 在东方蜜蜂微孢子虫的第一个增殖周期(1–4 dpi)内, 相较于 1 dpi, NcN6AMT 在意蜂工蜂中肠内表现为上升-下降的动态表达趋势(图 6A), 在中蜂工蜂中肠内也呈现出类似的上升-下降的动态表达趋势, 说明 NcN6AMT 可能通过动态调节 DNA 甲基化参与东方蜜蜂微孢子虫的侵染过程, NcN6AMT 在东方蜜蜂微孢子虫侵染不同蜜蜂宿主的过程中发挥相同或相似的功能。目前, 本实验室已建立东方蜜蜂微孢子虫侵染意蜂和中蜂的模型及 RNAi 技术体系<sup>[39]</sup>, 下一步的工作重点是通过饲喂 dsRNA 或 siRNA 对 NcN6AMT 进行 RNAi, 进而探究 NcN6AMT 在东方蜜蜂微孢子虫侵染过程中的功能及背后的表观调控机制。

## 参考文献

- [1] SZUMOWSKI SC, TROEMEL ER. Microsporidia-host interactions[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2015, 26: 10-16.
- [2] VALIZADEH P, GUZMAN-NOVOA E, GOODWIN PH. Effect of immune inducers on *Nosema ceranae* multiplication and their impact on honey bee (*Apis mellifera* L.) survivorship and behaviors[J]. *Insects*, 2020, 11(9): 572.
- [3] MAYACK C, NAUG D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 100(3): 185-188.
- [4] PARIS L, EL ALAOUI H, DELBAC F, DIOGON M. Effects of the gut parasite *Nosema ceranae* on honey bee physiology and behavior[J]. *Current Opinion in Insect Science*, 2018, 26: 149-154.
- [5] 梁勤, 陈大福. 蜜蜂保护学[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2009.  
LIANG Q, CHEN DF. *Bee Protection*[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2009 (in Chinese).
- [6] BISWAS S, RAO CM. Epigenetic tools (the Writers, the Readers and the Erasers) and their implications in cancer therapy[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2018, 837: 8-24.
- [7] TECHNAU GM. Advances in experimental medicine and biology. Brain development in *Drosophila melanogaster*. Preface[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2008, 628: v-vi.
- [8] WANG SM, WU WY, CLARET FX. Mutual regulation of microRNAs and DNA methylation in human cancers[J]. *Epigenetics*, 2017, 12(3): 187-197.
- [9] DAHLET T, ARGÜESO LLEIDA A, AL ADHAMI H, DUMAS M, BENDER A, NGONDO RP, TANGUY M, VALLET J, AUCLAIR G, BARDET AF, WEBER M. Genome-wide analysis in the mouse embryo reveals the importance of DNA methylation for transcription integrity[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 3153.
- [10] LI P, YANG H, WANG L, LIU HJ, HUO HQ, ZHANG CJ, LIU AZ, ZHU AD, HU JY, LIN YJ, LIU L. Physiological and transcriptome analyses reveal short-term responses and formation of memory under drought stress in rice[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 55.
- [11] CHEN H, SHU HD, WANG LY, ZHANG F, LI X, OCHOLA SO, MAO F, MA HY, YE WW, GU TT, JIANG LB, WU YF, WANG YC, KAMOUN S, DONG SM. *Phytophthora* methylomes are modulated by 6mA methyltransferases and associated with adaptive genome regions[J]. *Genome Biology*, 2018, 19(1): 181.
- [12] DUNN DB, SMITH JD. Occurrence of a new base in the deoxyribonucleic acid of a strain of *Bacterium coli*[J]. *Nature*, 1955, 175(4451): 336-337.
- [13] PARK HJ, SEONG HJ, LEE J, HEO L, SUL WJ, HAN SW. Two DNA methyltransferases for site-specific 6mA and 5mC DNA modification in *Xanthomonas euvesicatoria*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 621466.
- [14] SATER MR, LAMELAS A, WANG GL, CLARK TA, RÖLTGEN K, MANE S, KORLACH J, PLUSCHKE G,

- SCHMID CD. DNA methylation assessed by SMRT sequencing is linked to mutations in *Neisseria meningitidis* isolates[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144612.
- [15] WU XL, CAO B, AQUINO P, CHIU TP, CHEN C, JIANG SS, DENG ZX, CHEN S, ROHS R, WANG LR, GALAGAN JE, DEDON PC. Epigenetic competition reveals density-dependent regulation and target site plasticity of phosphorothioate epigenetics in bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(25): 14322-14330.
- [16] XIAO CL, ZHU S, HE MH, CHEN D, ZHANG Q, CHEN Y, YU GL, LIU JB, XIE SQ, LUO F, LIANG Z, WANG DP, BO XC, GU XF, WANG K, YAN GR. N6-methyladenine DNA modification in the human genome[J]. *Molecular Cell*, 2018, 71(2): 306-318.e7.
- [17] ZHANG GQ, HUANG H, LIU D, CHENG Y, LIU XL, ZHANG WX, YIN RC, ZHANG DP, ZHANG P, LIU JZ, LI CY, LIU BD, LUO YW, ZHU YX, ZHANG N, HE SM, HE C, WANG HL, CHEN DH. N6-methyladenine DNA modification in *Drosophila*[J]. *Cell*, 2015, 161(4): 893-906.
- [18] GREER EL, BLANCO MA, GU L, SENDINC E, LIU JZ, ARISTIZÁBAL-CORRALES D, HSU CH, ARAVIND L, HE C, SHI Y. DNA methylation on N6-adenine in *C. elegans*[J]. *Cell*, 2015, 161(4): 868-878.
- [19] LIANG Z, SHEN LS, CUI XA, BAO SJ, GENG YK, YU GL, LIANG F, XIE S, LU TG, GU XF, YU H. DNA N6-adenine methylation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Developmental Cell*, 2018, 45(3): 406-416.e3.
- [20] LI XW, ZHANG ZJ, LUO XL, SCHRIER J, YANG AD, WU TP. The exploration of N6-deoxyadenosine methylation in mammalian genomes[J]. *Protein & Cell*, 2021, 12(10): 756-768.
- [21] ZHANG J, XING YR, HOU BF, YUAN ZT, LI Y, JIE WC, SUN Y, LI F. Amplification and function analysis of N6-adenine-specific DNA methyltransferase gene in *Nilaparvata lugens*[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2016, 15(3): 591-599.
- [22] DZIALO MC, TRAVAGLINI KJ, SHEN SA, LOO JA, CLARKE SG. A new type of protein lysine methyltransferase trimethylates Lys-79 of elongation factor 1A[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 455(3/4): 382-389.
- [23] HAMEY JJ, WINTER DL, YAGOUB D, OVERALL CM, HART-SMITH G, WILKINS MR. Novel N-terminal and lysine methyltransferases that target translation elongation factor 1A in yeast and human[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2016, 15(1): 164-176.
- [24] 吴鹰, 叶亚萍, 张佳欣, 钱加珺, 张文德, 余岢骏, 吉挺, 蔺哲广, 赵红霞, 陈大福, 郭睿. 东方蜜蜂微孢子虫侵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.
- WU Y, YE YP, ZHANG JX, QIAN JJ, ZHANG WD, YU KJ, JI T, LIN ZG, ZHAO HX, CHEN DF, 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).
- [25] 王紫馨, 张文德, 张佳欣, 赵萧, 范小雪, 荆欣, 高旭泽, 陈大福, 郭睿. 东方蜜蜂微孢子虫侵染过程中 nce-miR-34537 和靶基因 *PIP5KI* 的表达谱. *微生物学报*, 2023, 63(2): 731-744.
- WANG ZX, ZHANG WD, ZHANG JX, ZHAO X, FAN XX, JING X, GAO XZ, CHEN DF, 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).
- [26] 付中民, 周丁丁, 陈华枝, 耿四海, 陈大福, 郑燕珍, 熊翠玲, 徐国钧, 张曦, 郭睿. 中华蜜蜂工蜂中肠响应东方蜜蜂微孢子虫胁迫的高表达基因分析[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2020, 57(1): 191-198.
- FU ZM, ZHOU DD, CHEN HZ, GENG SH, CHEN DF, ZHENG YZ, XIONG CL, XU GJ, ZHANG X, GUO R. Analysis of highly expressed genes in midgut of worker bees of *Apis cerana cerana* in response to microsporidia stress in *Apis cerana cerana*[J]. *Journal of Sichuan University (Natural Science Edition)*, 2020, 57(1): 191-198 (in Chinese).
- [27] 范元婵, 王杰, 孙明会, 吴鹰, 余岢骏, 王心蕊, 叶亚萍, 钱加珺, 张凯遥, 王思懿, 陈大福, 郭睿. 东方蜜蜂微孢子虫蓖麻毒素 B 凝集素基因的分子克隆及生物信息学分析[J]. *中国农业大学学报*, 2022, 27(3): 138-145.
- FAN YC, WANG J, SUN MH, WU Y, YU KJ, WANG XR, YE YP, QIAN JJ, ZHANG KY, WANG SY, CHEN DF, GUO R. Molecular cloning and bioinformatic analysis of *Nosema ceranae* ricin B-lectin gene[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2022, 27(3): 138-145 (in Chinese).

- [28] SEDAGHAT-NEJAD E, FAKHARIAN MA, PI J, HAGE P, KOJIMA Y, SOETEDJO R, OHMAE S, MEDINA JF, SHADMEHR R. P-sort: an open-source software for cerebellar neurophysiology[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2021, 126(4): 1055-1075.
- [29] 陈华枝, 范小雪, 范元婵, 王杰, 祝智威, 蒋海宾, 张文德, 隆琦, 熊翠玲, 郑燕珍, 付中民, 徐国钧, 陈大福, 郭睿. 东方蜜蜂微孢子虫基因的可变剪接及可变腺苷酸化解析[J]. *菌物学报*, 2021, 40(1): 161-173.  
CHEN HZ, FAN XX, FAN YC, WANG J, ZHU ZW, JIANG HB, ZHANG WD, LONG Q, XIONG CL, ZHENG YZ, FU ZM, XU GJ, CHEN DF, GUO R. Analysis of alternative splicing and alternative polyadenylation of *Nosema ceranae* genes[J]. *Mycosystema*, 2021, 40(1): 161-173 (in Chinese).
- [30] CHEN JY, ZHUANG YX, WANG P, NING JF, LIU W, HUANG YT, LIN XQ, PENG L, ZHANG DH. Reducing N6AMT1-mediated 6mA DNA modification promotes breast tumor progression via transcriptional repressing cell cycle inhibitors[J]. *Cell Death & Disease*, 2022, 13: 216.
- [31] LIU P, NIE S, LI B, YANG ZQ, XU ZM, FEI J, LIN C, ZENG R, XU GL. Deficiency in a glutamine-specific methyltransferase for release factor causes mouse embryonic lethality[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2010, 30(17): 4245-4253.
- [32] ASHAPKIN VV, KUTUEVA LI, VANYUSHIN BF. Plant DNA methyltransferase genes: multiplicity, expression, methylation patterns[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2016, 81(2): 141-151.
- [33] SHENG XN, WANG JQ, GUO Y, ZHANG JB, LUO J. DNA N6-methyladenine (6mA) modification regulates drug resistance in triple negative breast cancer[J]. *Frontiers in Oncology*, 2021, 10: 616098.
- [34] SERGIEV PV, BOGDANOV AA, DONTSOVA OA. Ribosomal RNA guanine-(N<sub>2</sub>)-methyltransferases and their targets[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(7): 2295-2301.
- [35] WEITZMANN C, TUMMINIA SJ, BOUBLIK M, OFENGAND J. A paradigm for local conformational control of function in the ribosome: binding of ribosomal protein S19 to *Escherichia coli* 16S rRNA in the presence of S7 is required for methylation of m<sup>2</sup>G966 and blocks methylation of m<sup>5</sup>C967 by their respective methyltransferases[J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(25): 7089-7095.
- [36] METZGER E, WANG S, URBAN S, WILLMANN D, SCHMIDT A, OFFERMANN A, ALLEN A, SUM M, OBIER N, COTTARD F, ULFERTS S, PRECA BT, HERMANN B, MAURER J, GRESCHIK H, HORNING V, EINSLE O, PERNER S, IMHOF A, JUNG M, et al. KMT9 monomethylates histone H4 lysine 12 and controls proliferation of prostate cancer cells[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2019, 26(5): 361-371.
- [37] 陈华枝, 熊翠玲, 祝智威, 王杰, 范小雪, 蒋海宾, 范元婵, 万洁琦, 卢家轩, 郑燕珍, 付中民, 徐国钧, 陈大福, 郭睿. 基于 small RNA 组学分析揭示意大利蜜蜂响应东方蜜蜂微孢子虫胁迫的免疫应答机制[J]. *微生物学报*, 2020, 60(7): 1458-1478.  
CHEN HZ, XIONG CL, ZHU ZW, WANG J, FAN XX, JIANG HB, FAN YC, WAN JQ, LU JX, ZHENG YZ, FU ZM, XU GJ, CHEN DF, GUO R. Unraveling the mechanism underlying the immune responses of *Apis mellifera ligustica* to *Nosema ceranae* stress based on small RNA omics analyses[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(7): 1458-1478 (in Chinese).
- [38] GISDER S, MÖCKEL N, LINDE A, GENERSCH E. A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(2): 404-413.
- [39] 郭意龙, 余崑骏, 赵萧, 钱加珺, 赵浩东, 张婕, 张扬, 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. *微生物学报*, 2022, 62(12):5005-5017.  
Guo YL, Yu KJ, Zhao X, Qian JJ, Zhao HD, Zhang J, ZHANG Y, ZHAO HX, XU XJ, LUO Q, CHEN DF, 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).