

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.06.031

中华蜜蜂幼虫肠道响应球囊菌胁迫的可变剪切基因分析

郭睿¹, 李龙¹, 熊翠玲¹, 郑燕珍¹, 付中民¹, 王海朋¹, 赵红霞², 陈大福¹

(1. 福建农林大学蜂学学院, 福州 350002; 2. 广东省生物资源应用研究所, 广州 510260)

摘要: 基于前期已获得的中华蜜蜂(简称中蜂)幼虫肠道转录组数据,利用 TopHat2 软件在正常(AcCK)及球囊菌胁迫的中蜂幼虫肠道样品(AcT1、AcT2、AcT3)中共鉴定出发生于 9124 个基因的 57327 个可变剪切事件,其中以基因间(17.68%)、可变 3'端剪切(15.32%)、外显子跨越(14.12%)和可变 5'端剪切(12.81%)类型为主. Venn 分析结果显示 4 个肠道样品的共有可变剪切基因数为 8111 个,特有可变剪切基因数分别为 272、189 和 385 个. GO 分类结果显示共有可变剪切基因涉及 47 个条目,AcT1、AcT2、AcT3 的特有可变剪切基因分别富集于 24、20 和 34 个条目. KEGG 代谢通路富集分析结果显示,共有可变剪切基因富集在 327 个代谢通路,基因富集数最多的是 RNA 转运、内质网蛋白加工及核糖体;AcT1、AcT2、AcT3 的特有可变剪切基因分别富集在 22、46 和 83 个代谢通路. 结果揭示了可变剪切基因在宿主的胁迫响应过程中的重要作用.

关键词: 中华蜜蜂; 幼虫肠道; 球囊菌; 胁迫; 可变剪切

中图分类号: S891 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2018)06-1313-06

Analysis of the alternatively spliced genes in *Apis cerana cerana* larval gut under the *Ascospaera apis* stress

GUORui¹, LILong¹, XIONGCui-Ling¹, ZHENG Yan-Zhen¹, FU Zhong-Min¹,
WANG Hai-Peng¹, ZHAO Hong-Xia², CHEN Da-Fu¹

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

2. Guangdong Institute of Applied Biological Resources, Guangzhou 510260, China)

Abstract: Based on previous obtained transcriptome data of the larval gut of *Apis cerana cerana*, a total of 57327 alternative splicing events occurred in 9124 genes were identified in normal guts (AcCK) and *Ascospaera apis* infected guts (AcT1, AcT2 and AcT3). among them, intergenic(17.68%), p3 splice (15.32%), exon span (ES) (14.12%) and p5 splice (12.81%) were main kinds of alternative splicing. Venn analysis showed 8111 alternatively spliced genes were shared in these four samples, and the number of unique alternatively spliced genes in AcT1, AcT2 and AcT3 are 272, 189 and 385, respectively. GO categorization demonstrated the shared alternatively spliced genes were engaged in 47 GO terms, and the unique alternatively spliced genes in AcT1, AcT2 and AcT3 were related to 24, 20 and 34 GO terms. KEGG pathway enrichment analysis displayed the shared alternatively spliced genes were en-

收稿日期: 2017-11-09

基金项目: 国家自然科学基金(31702190); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-44-KXJ7); 福建省教育厅中青年教师教育科研项目(JAT170158); 福建农林大学科技创新专项基金项目(CXZX2017343)

作者简介: 郭睿(1987-), 男, 安徽六安人, 讲师, 研究方向为蜜蜂分子生物学及组学. E-mail: ruiguo@fafu.edu.cn.

通讯作者: 陈大福. E-mail: dfchen826@fafu.edu.cn

riched in 327 pathways, and the largest ones were RNA transport, protein processing in endoplasmic reticulum and ribosome; the unique alternatively spliced genes of AcT1, AcT2 and AcT3 were enriched in 22, 46 and 83 pathways, respectively.

Keywords: *Apis cerana cerana*; Larval gut, *Ascospaera apis*; Stress; Alternative splicing

1 引言

中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*, 简称中蜂)和意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*, 简称意蜂)是我国养蜂生产中使用的主要蜂种,较之意蜂,中蜂在漫长的进化过程中已适应本土环境,具有抗螨能力强、耐低温、善采集零星蜜粉源等优势^[1-5]. 蜜蜂白垩病是一种常见的蜜蜂真菌病,常发生于意蜂蜂群. 该病病原球囊菌(*Ascospaera apis*)特异性侵染蜜蜂幼虫. 目前,还没有防治白垩病的有效方法. 白垩病的相关研究主要集中在西方蜜蜂(*Apis mellifera*),有关球囊菌侵染东方蜜蜂(*Apis cerana*)的研究报道极少. 球囊菌和东方蜜蜂的基因组的公布为二者的分子及组学研究奠定了基础^[6, 7].

Gilbert 于 1978 年首次发现基因的可变剪切(alternative splicing, AS)现象,即指基因的 mRNA 前体在剪切内含子过程中以不同的方式剪切成超过一种 mRNA 成熟体的过程^[8]. 同一基因的不同可变剪切体可能具有相同、相似甚至相反的生物功能. 相比基因表达差异,可变剪切可能是造成物种之间、器官之间、生理与病理之间差异的更重要因素,复杂性表现在剪切调控的物种特异性^[9]、组织特异性^[10]、发育特异性^[11]等方面. 同一个基因通过可变剪切后形成多种 mRNA 成熟体,经翻译产生结构和功能不同的蛋白质,被认为是形成基因组和蛋白组多样性的一种重要机制^[12, 13]. Sultan 等人^[14]通过 RNA-seq 技术发现 94241 个人类 mRNA 剪切形式,其中 4096 个为新的剪切形式;Pan 等人^[15]基于 RNA-seq 数据,在约 20% 的人类多外显子基因中识别出新的剪切形式,并推测高达 95% 的人类多外显子基因均发生可变剪切;Mortazavi 等人^[16]通过 RNA-seq 技术检测到 145000 个小鼠 mRNA 剪切形式,共有 3500 个基因发生了可变剪切;Ramani 等人^[17]从线虫 RNA-seq 数据中识别出 71% 的已标注剪切位点,并发现上千个新的剪切位点和几百个受发育时序调控的可变剪切事件. 可变剪切在果蝇的性别决定、神经分布和眼睛发育等诸多方面也发挥着重要作用^[18]. 迄今,有关中蜂及其幼虫的可变剪切基因

(alternatively spliced gene, ASG)的研究未见报道.

本课题组前期已对正常及球囊菌胁迫的中蜂幼虫肠道进行转录组测序,获得了高质量的 RNA-seq 数据,并在转录组水平对中蜂幼虫肠道响应球囊菌的胁迫应答进行了解析^[19, 20]. 本研究在前期研究基础上进一步对球囊菌胁迫过程中的中蜂幼虫肠道的 ASG 进行深入分析,旨在揭示 ASG 在宿主的胁迫应答过程中的作用,为 ASG 的功能研究打下基础.

2 材料与方法

2.1 转录组数据来源

转录组数据来源源于 NCBI SRA 数据库, SRA 号: SRA456721^[21].

2.2 方法

2.2.1 可变剪切类型分析 利用 TopHat2 软件^[22]将 topha 比对结果中所有剪切位点信息按不低于 5 个 reads 过滤掉大部分偶然事件造成的噪音,再与参考的已知剪切位点进行比较(允许 1bp 的误差),找出已知的剪切位点. 对剩下的新剪切位点进行可变剪切事件分类统计主要类型包括基因间区剪切(剪切位点的起始和终止都位于基因区间)、可变 5'端剪切(剪切位点起始于某一外显子内,终止位于某一外显子起始位点)、可变 3'端剪切(剪切位点起始位于某一外显子终止位点,终止位于某一外显子内)、外显子跨越(剪切位点起始位于某一外显子终止位点,终止位于某一外显子起始位点)、内含子保留(剪切位点起始终止位于同一外显子内)、可变起始外显子剪切(剪切位点起始位于第一个外显子起始位点的 5'端,终止位于其他外显子内)及可变终止外显子剪切(剪切位点终止位于最后一个外显子终止位点的 3'端,终止位于其他外显子内).

2.2.2 共有与特有 ASG 的 GO 分类及 KEGG 代谢通路富集分析 利用 Omics Share 在线工具集合(<http://www.omicsshare.com/tools/Home/Soft/venn>)进行 ASG 的 Venn 分析. 将共有及特有 ASG 向 GO 数据库(<http://www.geneontology.org/>)的各 term 映射,并计算每个 term 的基因

数,从而得到具有某个 GO 功能的基因列表及基因数目统计. KEGG 代谢通路显著性富集分析以 KEGG 代谢通路为单位,应用超几何检验,找出与整个基因组背景相比,在共有及特有 ASG 中显著性富集的代谢通路.

3 结果与分析

3.1 中蜂幼虫肠道的 ASG 类型

从 4 个中蜂幼虫肠道样品中共鉴定出 57327 个可变剪切事件,发生于 9124 个基因,每个 ASG 上平均发生可变剪切的数量为 6.28 次.在 AcCK、AcT1、AcT2 和 AcT3 样品中检测到的可变剪切事件总数分别为 15432、14769、13683 和 13443 个,对应的 ASG 数分别为 8583、8628、8456 和 8768 个.在所有的可变剪切事件中,以基因间、可变 3'端剪切、外显子跨越、可变 5'端剪切、内含子保留、可变起始外显子剪切和可变终止外显子剪切 7 种类型为主,数量分别为 10133、8783、8096、7341、4740、3154 和 1827 个,分别占可变剪切事件总数的 17.68%、15.32%、14.12%、12.81%、8.27%、5.50%和 3.19%.

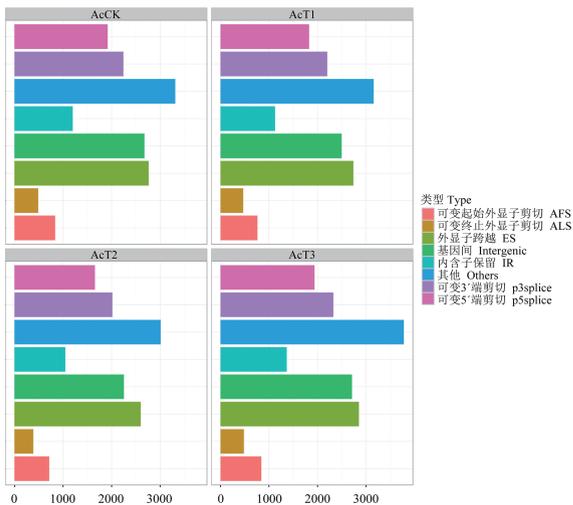


图 1 中蜂幼虫肠道的基因的可变剪切类型统计
Fig. 1 Summary of variety of ASG in *Apis cerana cerana* larval gut

3.2 各中蜂幼虫肠道样品的共有和特有 ASG 的 GO 分类

Venn 分析结果显示,AcCK、AcT1、AcT2 和 AcT3 样品的共有 ASG 数为 8111 个(图 2A),占 ASG 总数的 88.9%.此外,AcCK VS AcT1、AcCK VS AcT2 和 AcCK VS AcT3 比较组的共有 ASG 数分别为 8356、8627 和 8383 个,AcT1、AcT2 和 AcT3

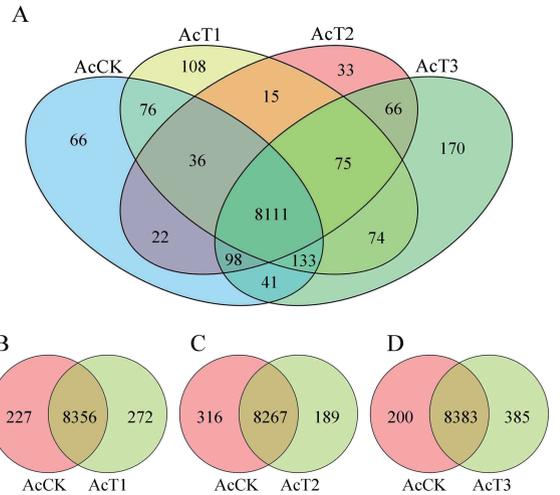


图 2 AcCK、AcT1、AcT2 和 AcT3 的 ASG 的 Venn 分析

Fig. 2 Venn analyses of ASG in AcCK, AcT1, AcT2 and AcT3 samples

的特有 ASG 数分别为 272、189 和 385 个(图 2B-D).

对 AcCK、AcT1、AcT2 和 AcT3 的共有 ASG 进行 GO 分类,发现这些 ASG 主要分为三大类:即生物进程、细胞过程和分子功能,分布在 47 个条目,基因富集数最多的前 10 位条目分别是粘合物(2619)、催化活性(2266)、细胞进程(2246)、代谢进程(2243)、单组织进程(1614)、细胞(1438)、细胞组分(1438)、细胞器(929)、细胞膜(882)和生物调控(841)(图 3).

AcT1 的特有 ASG 分布于 24 个条目,其中富集基因数最多的是生物调控、细胞进程和代谢进程;AcT2 的特有 ASG 分布于 20 个条目,其中富集基因数最多的是细胞进程、单组织进程和粘合物;AcT3 的特有 ASG 分布于 34 个条目,其中富集基因数最多的是细胞进程、单组织进程和粘合物.

3.3 各中蜂幼虫肠道样品的共有和特有 ASG 的 KEGG 代谢通路富集分析

KEGG 代谢通路富集分析结果显示,AcCK、AcT1、AcT2 和 AcT3 的共有 ASG 富集在 327 个代谢通路,其中基因富集数前 10 位分别是 RNA 转运、内质网蛋白加工、核糖体、内吞作用、嘌呤代谢、癌症路径、剪接体、亨廷顿氏舞蹈症、泛素介导蛋白水解作用和碳代谢(图 4).

AcT1 的特有 ASG 富集在 22 个代谢通路,基因富集数最多的是氮代谢、甲型流感和神经活跃的配体受体相互作用. AcT2 的特有 ASG 富集在 46 个代谢通路,基因富集数最多的是生物的周期转换节律、cAMP 信号通路和嘌呤代谢. AcT3 的特有 ASG

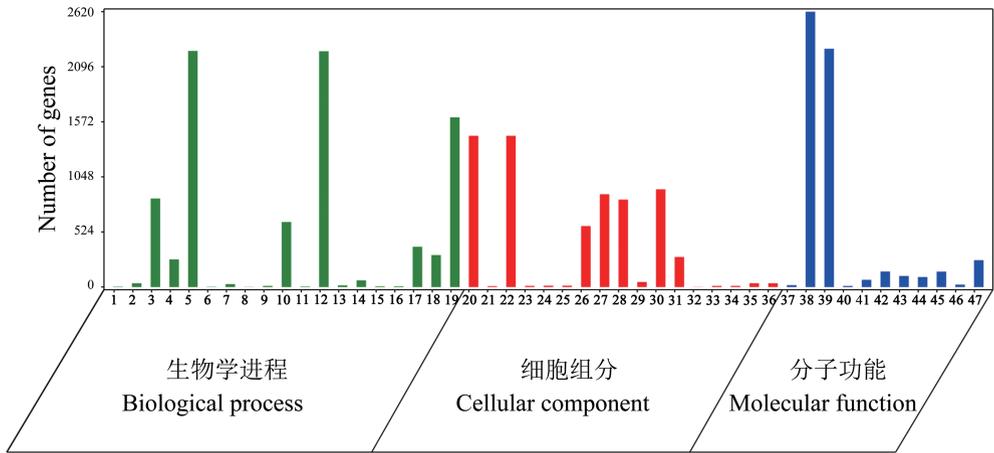


图 3 AcCK、AcT1、AcT2 和 AcT3 的共有 ASG 的 GO 分类

1:行为 Behavior;2:生物附着 Biological adhesion;3:生物调控 Biological regulation;4:细胞成分组织或生物合成 Cellular component organization or biogenesis;5:细胞进程 Cellular process;6:解毒作用 Detoxification;7:发育进程 Developmental process;8:生长 Growth;9:免疫系统进程 Immune system process;10:定位 Localization;11:运动 Locomotion;12:代谢进程 Metabolic process;13:多组织进程 Multi-organism process;14:多细胞生物进程 Multicellular organismal process;15:生殖 Reproduction;16:生殖进程 Reproductive process;17:应激反应 Response to stimulus;18:信号 Signaling;19:单组织进程 Single-organism process;20:细胞 Cell;21:细胞接合 Cell junction;22:细胞组分 Cell part;23:细胞外基质 Extracellular matrix;24:胞外区 Extracellular region;25:细胞外区域 Extracellular region part;26:大分子复合物 Macromolecular complex;27:细胞膜 Membrane;28:细胞膜组件 Membrane part;29:细胞膜内腔 Membrane-enclosed lumen;30:细胞器 Organelle;31:细胞器组件 Organelle part;32:超分子纤维 Supermolecular fiber;33:突触 Synapse;34:突触组件 Synapse part;35:病毒 Virion;36:病毒组件 Virion part;37:抗氧化活性 Antioxidant activity;38:粘合物 Binding;39:催化活性 Catalytic activity;40:电子载体活性 Electron carrier activity;41:分子功能调节器 Molecular function regulator;42:分子转换器活性 Molecular transducer activity;43:核酸结合转录因子活性 Nucleic acid binding transcription factor activity;44:信号传感器活性 Signal transducer activity;45:结构分子活性 Structural molecule activity;46:转录因子活性,蛋白质结合; Transcription factor activity, protein binding;47:转运器活性 Transporter activity.

Fig. 3 GO classification of the shared ASG genes in AcCK, AcT1, AcT2 and AcT3

富集在 83 个代谢通路,基因富集数最多的是癌症路径、细胞间隙连接和黑素生成。

4 讨论

养蜂生产中,意蜂幼虫易受球囊菌感染而爆发白垩病,但中蜂幼虫偶尔可见该病发生。目前,白垩病的相关研究主要集中在西方蜜蜂,有关球囊菌感染东方蜜蜂的报道极为有限。前期研究中,本课题组从中蜂白垩状幼虫尸体上分离得到球囊菌,并通过形态学和分子生物学手段对其进行了鉴定(未发表数据)。为对中蜂幼虫响应球囊菌胁迫进行转录组学研究,我们首先组装并注释了中蜂幼虫肠道和球囊菌的参考转录组^[21, 23],并在此基础上对球囊菌胁迫中蜂幼虫肠道过程中的病原-宿主互作进行了较为系统的转录组学研究^[19, 24]。本研究在前期研究基础上进一步对中蜂幼虫肠道响应球囊菌胁迫的 ASG 进行深入分析,发现多达 9124 个 ASG 参与了中蜂幼虫肠道对球囊菌的胁迫应答,这些基因的可变剪切类型以基因间、可变 3'端剪切、外显子跨越和可变 5'端剪切为主。

同一个基因通过可变剪切后形成多种 mRNA 成熟体,经翻译产生结构和功能不同的蛋白质,被

认为是形成基因组和蛋白组多样性的一种重要机制^[12, 13]。目前的研究表明,可变剪切在动物、植物和微生物的基因中广泛发生^[25-27]。本研究发现正常及球囊菌胁迫的中蜂幼虫肠道的共有 ASG 富集在多达 47 个 GO 条目,涉及生物进程、细胞过程和分子功能的诸多方面,说明这些 ASG 在中蜂幼虫肠道的生长发育过程中发挥重要作用。本研究还发现共有 ASG 富集在多达 327 个代谢通路,包括碳代谢、嘌呤代谢和三羧酸循环等物质代谢通路,氮代谢、硫代谢和氧化磷酸化等能量代谢通路,再次表明这些 ASG 在中蜂幼虫肠道的新陈代谢方面具有重要功能。此外,还发现富集在内吞作用、泛素介导的蛋白水解、溶酶体以及和 MAPK 信号通路等免疫通路上的共有 ASG 数分别为 113、88、13 和 55 个,推测这些 ASG 对中蜂幼虫肠道的免疫防御至关重要。

球囊菌在胁迫前期寄生于幼虫中肠,此时球囊菌处于低水平萌发状态,至球囊菌胁迫后期,即由幼虫期过渡为蛹期间的预蛹期,中肠和后肠连通,孢子遇氧气而快速萌发。菌丝不断生长、穿透肠壁,继而穿透体壁导致蜜蜂幼虫死亡^[28]。AcT1、AcT2 和 AcT3 的特有 ASG 数分别为 272、189 和 385 个,ASG 的数量先下降再上升,至 6 日龄达到最

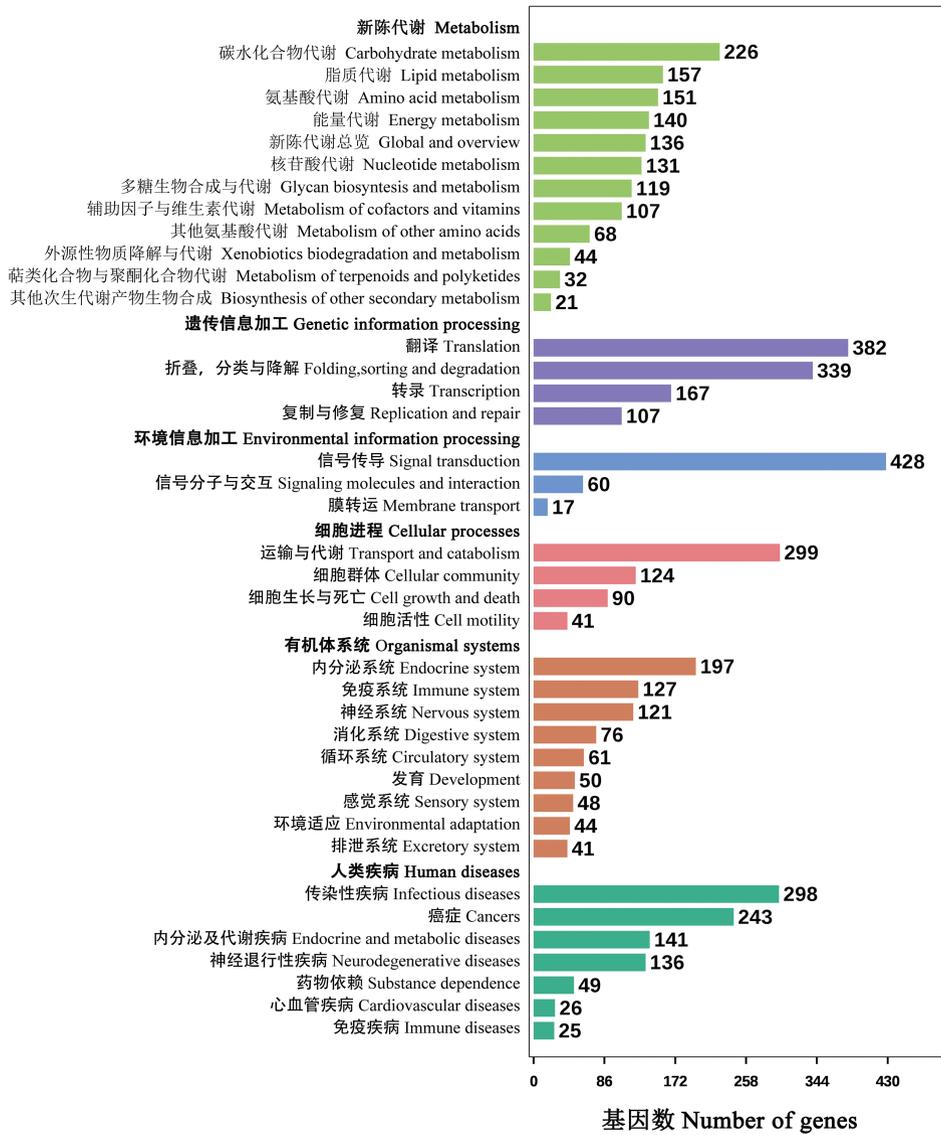


图 4 AcCK、AcT1、AcT2 和 AcT3 的共有 ASG 的 KEGG 代谢通路富集分析
 Fig. 4 KEGG pathway enrichment analyses of the shared ASG in AcCK, AcT1, AcT2 and AcT3 samples

高,表明宿主的 ASG 在胁迫后期的应答活跃,推测上述 ASG 在球囊菌胁迫的不同阶段发挥特殊作用。本研究中,1 个 AcT2 的特有 ASG 富集在黑化作用,3、3、2、2 和 1 个 AcT3 的特有 ASG 分别富集在黑化作用、溶酶体、吞噬体、泛素介导的蛋白水解作用、内吞作用,推测这些 ASG 在中蜂幼虫对球囊菌的免疫防御方面扮演着特殊角色。下一步将针对部分特有 ASG 的不同剪切异构体设计特异性引物,结合 5'和 3'RACE 技术扩增得到其 cDNA 序列全长,进而在核酸和蛋白水平深入研究其功能。

本研究基于前期获得的转录组数据对中蜂幼虫肠道响应球囊菌胁迫的 ASG 进行转录组分析,研究结果揭示了 ASG 在中蜂幼虫肠道的球囊菌胁迫响应过程中的作用,为深入研究 ASG 的功能提

供了重要信息和线索。

参考文献:

[1] Fries I, Wei H, Wei S, et al. Grooming behavior and damaged mites (*Varroa jacobsoni*) in *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* [J]. Apidologie, 1996, 27: 3.

[2] 周冰峰, 朱翔杰. 论中华蜜蜂种质资源的保护 [C]//中国蜂业科技可持续发展学术研讨会暨蜂业科技与生态研讨会, 2008.

[3] Rath W. Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud [J]. Apidologie, 1999, 30: 97.

[4] Peng Y S, Fang Y, Xu S, et al. The resistance mechanism of the Asian honey bee, Fabr. to an ec-

- toparasitic mite, Oudemans [J]. J Invertebr Pathol, 1987, 49: 54.
- [5] 龚一飞, 张其康. 蜜蜂分类与进化[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2000: 21.
- [6] Qin X, Evans J D, Aronstein K A, *et al.* Genome sequences of the honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis* [J]. Insect Biochem Molec, 2006, 15: 715.
- [7] Park D, Jung J W, Choi B S, *et al.* Uncovering the novel characteristics of Asian honey bee, *Apis cerana*, by whole genome sequencing [J]. BMC Genomics, 2015, 16: 1.
- [8] Gilbert W. Why genes in pieces [J]. Nature, 1978, 271: 501.
- [9] Merkin J, Russell C, Chen P, *et al.* Evolutionary dynamics of gene and isoform regulation in mammalian tissues [J]. Science, 2012, 338: 1593.
- [10] Wang E T, Sandberg R, Luo S, *et al.* Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes [J]. Nature, 2008, 456: 470.
- [11] Kalsotra A, Cooper T A. Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing [J]. Nat Rev Genet, 2011, 12: 715.
- [12] Excoffon K J, Bowers J R, Sharma P. 1. Alternative splicing of viral receptors; A review of the diverse morphologies and physiologies of adenoviral receptors [J]. Recent Res Dev Virol, 2013, 9: 1.
- [13] Hamid F M, Makeyev E V. Emerging functions of alternative splicing coupled with nonsense-mediated decay [J]. Biochem Soc T, 2014, 42: 1168.
- [14] Sultan M, Schulz M H, Richard H, *et al.* A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome [J]. Science, 2008, 321: 956.
- [15] Pan Q, Shai O, Lee L J, *et al.* Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing [J]. Nat Genet, 2008, 40: 1413.
- [16] Mortazavi A, Williams B A, Mccue K, *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq [J]. Nat Methods, 2008, 5: 621.
- [17] Ramani A K, Calarco J A, Pan Q, *et al.* Genome-wide analysis of alternative splicing in *Caenorhabditis elegans* [J]. BMC Genomics, 2014, 15: 1117.
- [18] Black D L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing [J]. Annu Rev Biochem, 2003, 72: 291.
- [19] 陈大福, 郭睿, 熊翠玲, 等. 中华蜜蜂幼虫肠道响应球囊菌早期胁迫的转录组学 [J]. 中国农业科学, 2017, 50: 2614.
- [20] 郭睿, 张璐, 徐细建, 等. 中华蜜蜂 6 日龄幼虫肠道响应球囊菌胁迫的差异表达基因分析 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39: 539.
- [21] 徐细建, 郭睿, 骆群, 等. 中华蜜蜂幼虫肠道参考转录组的 *de novo* 组装及 SSR 分子标记鉴定 [J]. 中国农业科学, 2017, 50: 1157.
- [22] Kim D, Pertea G, Trapnell C, *et al.* TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions [J]. Genome Biol, 2013, 14: R36.
- [23] 张昱楠, 熊翠玲, 徐细建, 等. 蜜蜂球囊菌的参考转录组 *de novo* 组装及 SSR 分子标记开发 [J]. 昆虫学报, 2017, 60: 34.
- [24] 郭睿, 陈大福, 黄积健, 等. 球囊菌胁迫中华蜜蜂幼虫肠道过程中病原的转录组学研究 [J]. 微生物学报, 2017, 57: 1865.
- [25] Graveley B R, Brooks A N, Carlson J W, *et al.* The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster* [J]. Nature, 2011, 471: 473.
- [26] Marquez Y, Brown J W, Simpson C, *et al.* Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in *Arabidopsis* [J]. Genome Res, 2012, 22: 1184.
- [27] De K E, t Hoen P A. Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing [J]. Trends in Genetics Tig, 2015, 31: 128.
- [28] 李江红, 郑志阳, 陈大福, 等. 影响蜜蜂球囊菌感染蜜蜂幼虫的因素及感染过程观察 [J]. 昆虫学报, 2012, 55: 790.

引用本文格式:

中文: 郭睿, 李龙, 熊翠玲, 等. 中华蜜蜂幼虫肠道响应球囊菌胁迫的可变剪切基因分析 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2018, 55: 1313.

英文: Guo R, Li L, Xiong C L, *et al.* Analysis of the alternatively spliced genes in *Apis cerana cerana* larval gut under the *Ascosphaera apis* stress [J]. J Sichuan Univ; Nat Sci Ed, 2018, 55: 1313.