

# 东方蜜蜂微孢子虫 KRAB-A 蛋白的分子特性及系统进化分析

叶亚萍<sup>1</sup>, 吴 鹰<sup>1</sup>, 钱加琚<sup>1</sup>, 赵浩东<sup>1</sup>, 吉 挺<sup>3</sup>, 蔺哲广<sup>3</sup>, 徐细建<sup>4</sup>, 陈大福<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), 福州 350002; 2. 福建农林大学蜂疗研究所, 福州 350002; 3. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 4. 江西省养蜂研究所, 南昌 330201)

**摘 要:** 为明确 *KRAB-A* 的分子特性并进行东方蜜蜂微孢子虫与其他物种 *KRAB-A* 蛋白的系统进化分析, 以期丰富 *KRAB-A* 的基本信息, 使用 NCBI 数据库中的 ORF 工具预测 *KRAB-A* 蛋白的氨基酸序列。利用 ExPASy 网站上的相关软件预测和分析 *KRAB-A* 蛋白的亲水性、信号肽、磷酸化位点、二级结构及三级结构。通过 Mega11.0 软件采用邻接法构建基于 *KRAB-A* 蛋白的系统进化树。结果显示, *KRAB-A* 基因可编码 1 018 个氨基酸; *KRAB-A* 蛋白的分子式为 C<sub>5314</sub>H<sub>8526</sub>N<sub>1522</sub>O<sub>1556</sub>S<sub>43</sub>, 分子量约为 120.00 kDa, 等电点为 9.33, 脂溶系数为 79.20, 亲水性为 -0.75; *KRAB-A* 含有 41 个丝氨酸、21 个酪氨酸和 16 个苏氨酸磷酸化位点, 1 个 H2C2 模体, 但不含有信号肽; *KRAB-A* 含 44.40% 的  $\alpha$ -螺旋, 5.40% 的  $\beta$ -转角, 16.50% 的延伸及 33.69% 的无规卷曲; 蜜蜂微孢子虫的 1 个 *KRAB-A* 蛋白 (NAPIS\_ORF00138) 与明球囊霉的 2 个 *KRAB-A* 蛋白 (RCL2\_000589200 和 RCL2\_003114000) 中存在与东方蜜蜂微孢子虫 *KRAB-A* 蛋白中相同的 H2C2 模体; 东方蜜蜂微孢子虫 *KRAB-A* (AAJ76\_2380003054) 与其姐妹种蜜蜂微孢子虫 *KRAB-A* (NAPIS\_ORF01514) 聚为一支。研究结果明确了东方蜜蜂微孢子虫 *KRAB-A* 基因的分子特性, 揭示 *KRAB-A* 可能是一种亲水性蛋白和胞内蛋白, 东方蜜蜂微孢子虫 *KRAB-A* (AAJ76\_2380003054) 与蜜蜂微孢子虫 *KRAB-A* (NAPIS\_ORF01514) 间具有很高的保守性, 为进一步的功能研究提供依据。

**关键词:** 东方蜜蜂微孢子虫; 锌指蛋白 *krab-a* 结构域; *KRAB-A* 基因; 生物信息学分析

中图分类号: S895.236

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2023)04-0632-06

## Analysis of molecular characteristics and phyletic evolution of *Nosema ceranae* KRAB-A protein

YE Yaping<sup>1</sup>, WU Ying<sup>1</sup>, QIAN Jiajun<sup>1</sup>, ZHAO Haodong<sup>1</sup>, JI Ting<sup>3</sup>,  
LIN Zheguang<sup>3</sup>, XU Xijian<sup>4</sup>, CHEN Dafu<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;

2. Apitherapy Research Institute, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002;

3. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009;

4. Apicultural Research Institute of Jiangxi Province, Nanchang 330201)

**Abstract:** To enrich the basic information of *KRAB-A* gene by analyzing the molecular characteristics of *KRAB-A* and performing phylogenetic analysis of *KRAB* proteins in *N. ceranae* and other species, the amino acids sequence of *KRAB-A* was predicted using ORF tool in NCBI database. Related software in ExPASy website were employed to predict and analyze the hydrophilicity, signal peptide, phosphorylation site, secondary structure and tertiary structure of *KRAB-A*. Phylogenetic tree based on *KRAB-A* protein was constructed by Mega 11.0 software using Neighbor-joining method. The results demonstrated that *KRAB-A* gene can encode 1018 amino acids; the molecular formula of *KRAB-A* protein was C<sub>5314</sub>H<sub>8526</sub>N<sub>1522</sub>O<sub>1556</sub>S<sub>43</sub>, the molecular weight was 120.00 kDa, the hydrophilic point was 9.33, the lipid solubility coefficient was 79.20, and the hydrophilicity was -0.75; *KRAB-A* contained 41 serine phosphorylation sites, 21 tyrosine phosphorylation sites, 16 threonine phosphorylation sites, one H2C2 motif, and no

收稿日期: 2022-09-14

基金项目: 国家自然科学基金(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(郭睿), 福建省大学生创新创业训练计划项目(X202310389074, X202310389077)共同资助。

作者简介: 叶亚萍, 硕士研究生。E-mail: 15259907927@163.com

\* 通信作者: 郭 睿, 博士, 副教授。E-mail: fafu\_ruiguao@126.com

signal peptide; additionally, *KRAB-A* included 44.40%  $\alpha$ -helix, 5.40%  $\beta$ -turn, 16.50% extension and 33.69% random coil; *N. ceranae* *KRAB-A* (AAJ76\_2380003054), *Nosema apis* *KRAB-A* (NAPIS\_ORF00138) and *Rhizophagus clarus* *KRAB-A* (RCL2\_000589200 and RCL2\_003114000) contained the same one H2C2 motif; *N. ceranae* *KRAB-A* (AAJ76\_2380003054) and one *N. apis* *KRAB-A* (NAPIS\_ORF01514) was clustered into one clade. Our results clarified the molecular characteristics of *KRAB-A* gene in *N. ceranae*, and revealed that *N. ceranae* *KRAB-A* may be a and hydrophilic and intracellular protein and *N. ceranae* *KRAB-A* (AAJ76\_2380003054) and *N. apis* *KRAB-A* (NAPIS\_ORF01514) was highly conservative, and provide a basis for further functional study.

**Key words:** *Nosema ceranae*; zinc finger protein *krab-a* domain; *KRAB-A* gene; bioinformatic analysis

东方蜜蜂微孢子虫 (*Nosema ceranae*) 是特异性寄生成年蜜蜂中肠上皮细胞的单细胞真菌病原, 导致的蜜蜂微孢子虫病严重危害蜜蜂健康和养蜂生产<sup>[1]</sup>。东方蜜蜂微孢子虫在体外以休眠体的孢子形式存在, 一旦被蜜蜂宿主摄入体内, 孢子在中肠内特殊理化环境的刺激下迅速弹射出高度压缩的极丝, 具有感染性的孢原质通过中空的极管注入宿主细胞内, 进而利用宿主细胞内的物质和能量进行增殖<sup>[2]</sup>。微孢子虫的孢子外被一层坚硬的孢子壁, 常规的转基因技术无法突破, 导致微孢子虫的基因功能研究举步维艰<sup>[3]</sup>。东方蜜蜂微孢子虫参考基因组大小为 5.70 Mb, 含有 3 264 个蛋白编码基因<sup>[4]</sup>。到目前为止, 对于东方蜜蜂微孢子虫的基因功能仅有较少的研究报道<sup>[5-6]</sup>。

锌指蛋白 *krab-a* 结构域 (Zinc finger protein *krab-a* domain) 基因 *KRAB-A* 与锌指基序密切相关, 在真核生物的转录调控中发挥抑制作用<sup>[7]</sup>。*KRAB-A* 基因的有限研究主要集中在人类和小鼠等少数哺乳动物, 例如 Yin 等<sup>[8]</sup>在胎儿脑中鉴定到了一种包含 1 个 *KRAB A+b* 盒和 11 个 *C2H2* 的锌指基序新型人类锌指蛋白 *ZNF284L*, 并发现编码该蛋白的基因在人体的多个器官中表达; Yi 等<sup>[9]</sup>曾在人类心脏 cDNA 文库中鉴定出一个新的 *KRAB* 锌指蛋白基因 *ZNF480*, 并发现其在心脏、骨骼肌、胰腺和胎盘等器官和组织中广泛存在与表达; Kim 等<sup>[10]</sup>利用酵母双杂交系统鉴定到小鼠的 1 个新蛋白并命名为 *KRAB-A* 互作蛋白 1 (*KRAB-A* interacting protein 1, *KRIP-1*), 进一步通过印迹杂交发现 *KRIP-1* 基因在小鼠的心脏、大脑、骨骼肌和肾脏等器官和组织中均有表达, 但在睾丸中表达量最高。真菌的 *KRAB-A* 基因研究较为滞后。目前, 东方蜜蜂微孢子虫的 *KRAB-A* 研究仍然缺失。前期研究中, 笔者团队发现在侵染意大利蜜蜂 (*Apis mellifera ligustica*, 简称意蜂) 工蜂的过程中东方蜜蜂微孢子虫 *KRAB-A*, *nce-miR-12220* 通过正调控 *KRAB-A* 基因表达潜在参与调节东方蜜蜂微孢子虫侵染<sup>[11]</sup>。明确东方蜜蜂微孢子虫 *KRAB-A* 基因的分子特性并进行系统进化

分析可为深入开展 *KRAB-A* 的功能研究提供有价值的参考信息。

本研究通过生物信息学预测和分析东方蜜蜂微孢子虫 *KRAB-A* 基因的分子特性, 并对东方蜜蜂微孢子虫和其他物种的 *KRAB-A* 蛋白进行系统进化分析, 以期丰富东方蜜蜂微孢子虫 *KRAB-A* 基因的信息, 为进一步开展 *KRAB-A* 基因的功能研究提供参考信息和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

本试验于 2021 年 4 月在福建农林大学动物科学学院 (蜂学学院) 蜜蜂保护实验室进行, 东方蜜蜂微孢子虫的纯净孢子由福建农林大学动物科学学院 (蜂学学院) 蜜蜂保护实验室制备<sup>[12]</sup>。

### 1.2 *KRAB-A* 基因的 PCR 扩增及电泳

根据 *KRAB-A* 序列设计合成特异性扩增引物 (F: 5'-ATGTTAAGCACTAATATGGG-3', R: 5'-AC CATAATTTAAGACACCAA-3')。利用 Trizol 法提取东方蜜蜂微孢子虫孢子样品的总 RNA 作为模板, 利用 Oligo dT 引物及随机引物进行反转录得到 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增。反应体系 (50  $\mu$ L) 为: PCR mix 45  $\mu$ L, cDNA 模板 1  $\mu$ L, 上下游引物各 2  $\mu$ L。反应程序为: 98  $^{\circ}$ C 2 min; 98  $^{\circ}$ C 30 s, 47  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 34 个循环; 72  $^{\circ}$ C 3 min。PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像仪 (上海培清, 中国) 进行观察和拍照。

### 1.3 *KRAB-A* 基因的生物信息学分析

根据 NCBI GeneBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/36319664>) 收录的 *KRAB-A* 基因 (GeneBank 登录号: 36319664) 序列, 利用 NCBI 数据库中的 ORF 工具 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP\\_024329514.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_024329514.1)) 预测 *KRAB-A* 蛋白的氨基酸序列。通过 ExPASy 网站 (<https://www.expasy.org/resources>) 上的 ProtParam (<https://www.expasy.org/resources/protparam>)、ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>)、SignalP 4.1 Server (

cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/)、NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)和 TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)、SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html))及 SWISS-model (<https://swissmodel.expasy.org/>)等软件<sup>[13-14]</sup>预测和分析 KRAB-A 蛋白的亲水性、信号肽、磷酸化位点、二级结构及三级结构。

#### 1.4 KRAB-A 蛋白的系统进化树分析

利用 Blast 工具将 KRAB-A 氨基酸序列比对至 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 和 Uniport (<https://www.uniprot.org>) 数据库以查询和下载东方蜜蜂微孢子虫、蜜蜂微孢子虫 (*Nosema apis*)、斑马鱼微孢子虫 (*Pseudoloma neurophilia*)、明球囊霉 (*Rhizophagus clarus*)、曼氏血吸虫 (*Schistosoma mansoni*)、家鼠 (*Mus musculus*) 和人类 (*Homo sapiens*) 的 KRAB-A。采用 clustalX 软件<sup>[15]</sup>进行上述 7 个物种的 KRAB-A 蛋白氨基酸序列的多重比对, 再通过 Mega11.0 软件<sup>[16]</sup>使用邻接法构建基于 KRAB-A 蛋白的系统进化树, 采用软件默认参数。

## 2 结果与分析

### 2.1 KRAB-A 基因的表达验证

琼脂糖凝胶电泳结果显示, 通过 PCR 扩增出符合预期大小 (约 3 000 bp) 的目的片段 (图 1), 表明 KRAB-A 在东方蜜蜂微孢子虫孢子中真实表达。Sanger 测序结果显示目的片段序列与 GeneBank 数据库收录的预测出的 KRAB-A 序列完全一致。

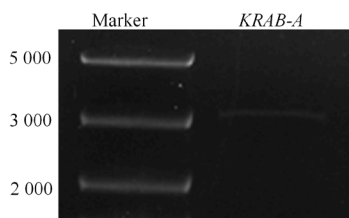


图 1 KRAB-A 扩增产物的琼脂糖电泳

Figure 1 Agarose gel electrophoresis for the amplified product from KRAB-A

### 2.2 KRAB-A 蛋白的预测和分析

KRAB-A 包含 3 054 个核苷酸, 可编码 1 018 个氨基酸:

MLSTNMGAILKTELSSDDCGQEVRIILEEILEIIM  
YTLELYEVEKEEWRREIFDRASKDLKIFIIRNTSK  
EEEIIVEIRKKLIMRVRESEEKRRKENEFKELTQM  
VVQTVQEAMRVNKGVGNERRSIRCFYCDKEGH  
VVRRCYLRRSKEGYNNSNKGNLNYLRVGFENS  
SDSETVQERGYRRSCKGSRIKIESKEKEYEPKEG  
NKRKRLNLERYVEKFSGVFNNGKEEVKYCKIEK

CKIITEEGKKIYKKGQMPVQSLIRDTEKHLEDLM  
NRKVIRESNSEWRNPICALRKPNGDIRLVSNLIAL  
NDIVEKDNYKLANIRDVIRATQGANMTVFDLK  
EGFYSEIEEEKDKHKTAFEFNGKAYEWNMVMG  
YKNSPQILQRIMDRVFRDLKGGKGVIEYMDDIVV  
YSKSIDHDKIVNEVLRRLSENMMKLVNKNIQF  
CQQEVKLLGVTLNGCEIVPSEIKKNEALEFPIPTC  
VSEVRRFLGMTGWRDFIKNYAGLTINLTDLSLKG  
KNNNWKWTKEMNAEFDNLKKVLRELGLKIA  
DYDKEFLLRTDASDLGMGAVLLQKNSKEEWVP  
VQWASKKFTPTEVRYGISEKEMYAVFWGVKKFE  
YELRGRKFKIETDHALAEIRKKSDFNARINR  
WVEKIQEFDFEIRYIPGDEMVPDALSRYVTNKE  
DHKRRVIKERRDKQIEGKRKKHVKIIDGQEFWV  
FDDGKEQTMPPANERDKLIMDCHLQLSHRGRTS  
VYYEIRKQFYWPGVKDQIERVLKNCETCQKFNR  
KTSGGTFVSTTRYLEKVGDLIEFREEKAFIVV  
AIDYFTRRAWARVVEKSHATAIVSLIKELCSQK  
KPEEITDNGKEFCNEQLRELCSTMNIEHRKGVV  
ESHRSNGRVERIIRTLREGMLKSKEVEFKDKVYE  
AIETYNLSFHVGLGCTPIEAVNDDTGKVMLENSP  
QGRYARRFRRWYREKFKKNQIVRVAKRENLTGC  
SKYSKGRFLGMGKVIELCLGDSYIVRLENGRFV  
KKRHYDLKGIGVLNYG。进一步分析发现, KRAB-A 中含量最高的氨基酸为赖氨酸 (11.20%), 含量最低的氨基酸为色氨酸和组氨酸 (均为 1.40%); KRAB-A 含 161 个负电荷氨基酸, 其中天冬氨酸和谷氨酸分别有 49 和 112 个; 含 201 个正电荷氨基酸, 其中赖氨酸和精氨酸分别有 114 和 87 个。KRAB-A 的氨基酸含量详见表 1。此外, 在东方 KRAB-A 中鉴定到 1 个可能结合锌指结构域的 H2C2 模体: PAPANERDKLIMDCHLQLSHRGRTSVY YEIRKQFYWPGVKDQIERVLKNCETCQKFNR。

KRAB-A 的分子量约为 120.00 kDa, 等电点为 9.33, 分子式为 C<sub>5314</sub>H<sub>8526</sub>N<sub>1522</sub>O<sub>1556</sub>S<sub>43</sub>; 脂溶系数为 79.20, 亲水性为 -0.75, 亲水氨基酸数量多于疏水氨基酸, 说明 KRAB-A 为亲水性蛋白, 见图 2 (a)。KRAB-A 中不含有信号肽, 说明其为胞内蛋白, 见图 2 (b)。此外, KRAB-A 含 41 个丝氨酸、21 个酪氨酸和 16 个苏氨酸磷酸化位点, 见图 2 (c)。

二级结构预测结果显示, KRAB-A 含 44.40% 的  $\alpha$ -螺旋, 5.40% 的  $\beta$ -转角, 16.50% 的延伸及 33.69% 的无规卷曲, 见图 3 (a)。KRAB-A 的三级结构如图 3 (b) 所示。

### 2.3 KRAB-A 蛋白的系统进化分析

搜索结果显示东方蜜蜂微孢子虫和家鼠均仅含有 1 个 KRAB-A, 人类、蜜蜂微孢子虫和明球囊霉

表 1 KRAB-A 蛋白的氨基酸组成及含量

Table 1 Amino acid composition and number of KRAB-A protein

氨基酸	数量	占比/%	氨基酸	数量	占比/%
Ala (A)	33	3.2	Leu (L)	73	7.2
Arg (R)	87	8.5	Lys (K)	114	11.2
Asn (N)	60	5.9	Met (M)	25	2.5
Asp (D)	49	4.8	Phe (F)	41	4.0
Cys (C)	18	1.8	Pro (P)	18	1.8
Gln (Q)	27	2.7	Ser (S)	51	5.0
Glu (E)	112	11.0	Thr (T)	39	3.8
Gly (G)	61	6.0	Trp (W)	14	1.4
His (H)	14	1.4	Tyr (Y)	38	3.7
Ile (I)	71	7.0	Val (V)	73	7.2

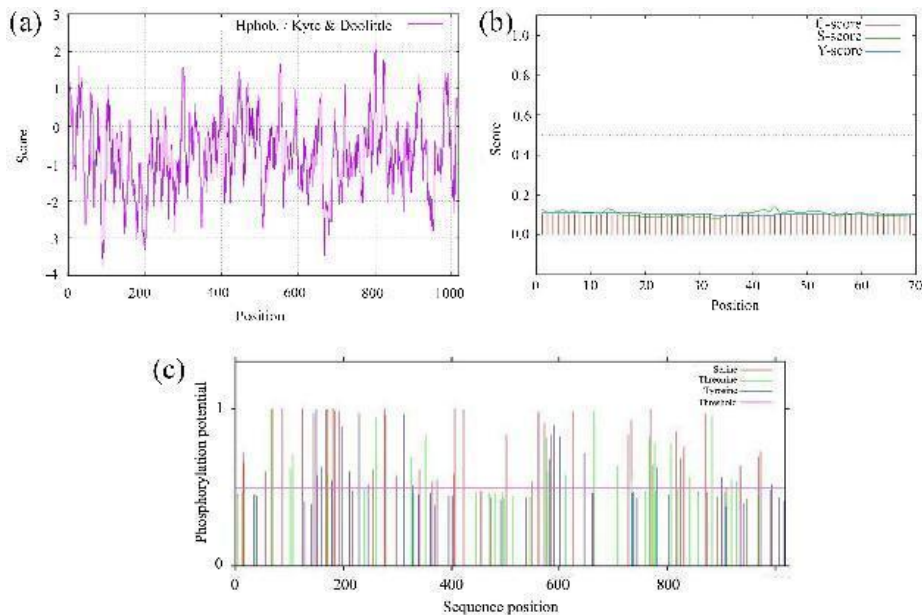


图 2 KRAB-A 的亲水/疏水性(a)、信号肽(b)和磷酸化位点(c)

Figure 2 Hydrophilic/hydrophobic property (a), signal peptide (b) and phosphorylation site (c) of KRAB-A

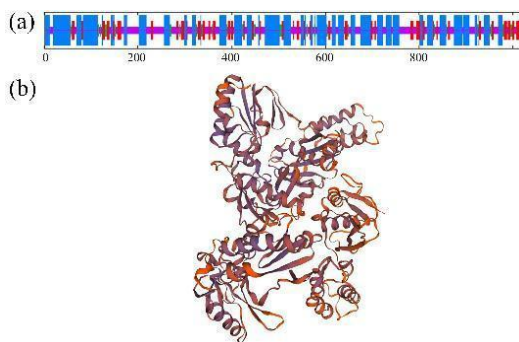


图 3 KRAB-A 的二级结构(a)和三级结构(b)

Figure 3 Secondary structure (a) and tertiary structure (b) of KRAB-A

均含有 2 个 KRAB-A, 而斑马鱼微孢子虫和曼氏血吸虫均含有 3 个 KRAB-A (表 2)。系统进化分析结果显示, 东方蜜蜂微孢子虫的 KRAB-A (AAJ76\_2380003054) 与斑马鱼微孢子虫 1 个

KRAB-A (M153\_2380002824), 明球囊霉的 2 个 KRAB-A (RCL2\_000589200 和 RCL2\_003114000), 曼氏血吸虫的 3 个 KRAB-A (Smp\_195120, Smp\_195150 和 Smp\_195160) 的 KRAB-A 蛋白及蜜蜂微孢子虫的 1 个 KRAB-A (NAPIS\_ORF01514) 聚为一个大支 (图 4)。另外, 在蜜蜂微孢子虫 KRAB-A (NAPIS\_ORF00138) 与明球囊霉 KRAB-A (RCL2\_000589200 和 RCL2\_003114000) 中同样鉴定到 1 个 H2C2 模体。进一步分析发现, 东方蜜蜂微孢子虫 KRAB-A (AAJ76\_2380003054) 与蜜蜂微孢子虫 KRAB-A (NAPIS\_ORF01514) 聚为一支, 而蜜蜂微孢子虫 KRAB-A (NAPIS\_ORF00138) 与斑马鱼微孢子虫 KRAB-A (M153\_10450003410) 聚为一支。以上结果说明东方蜜蜂微孢子虫 KRAB-A (AAJ76\_2380003054) 与蜜蜂微孢子虫的 KRAB-A (NAPIS\_ORF01514) 间的亲缘关系最近 (图 4)。

表 2 东方蜜蜂微孢子虫和其他 6 个物种的 KRAB-A 蛋白概要  
Table 2 Summary of KRAB-A proteins in *Nosema ceranae* and other six specie

物种	数量	NCBI GeneBank 数据库登录号
东方蜜蜂微孢子虫 <i>Nosema ceranae</i>	1	AAJ76_2380003054
人类 <i>Homo sapiens</i>	2	NM_001304947.3, NM_001242680.2
家鼠 <i>Mus musculus</i>	1	NM_133228.3
蜜蜂微孢子虫 <i>Nosema apis</i>	2	NAPIS_ORF01514, NAPIS_ORF00138
斑马鱼微孢子虫 <i>Pseudoloma neurophilia</i>	3	M153_2380002824, M153_2940004112, M153_10450003410
明球囊霉 <i>Rhizophagus clarus</i>	2	RCL2_000589200, RCL2_003114000
曼氏血吸虫 <i>Schistosoma mansoni</i>	3	Smp_195120, Smp_195150, Smp_195160

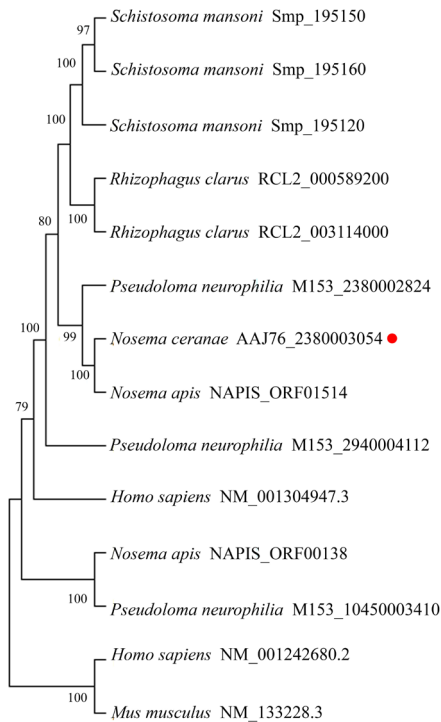


图 4 邻接法构建的基于 KRAB-A 蛋白的系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree based on KRAB-A proteins constructed using Neighbor-joining method

### 3 讨论与结论

KRAB 结构域具有高度保守和分布广泛的特性,可细分为 A 结构域和 B 结构域,在基因转录的过程中发挥着重要的调控作用<sup>[17]</sup>。人类基因组可编码约 350 个含 KRAB 结构域的锌指蛋白,其中部分锌指蛋白已被证实对胚胎干细胞中的转座因子有抑制作用<sup>[18]</sup>。本研究首次对东方蜜蜂微孢子虫的 KRAB-A 基因进行了分子验证,并证实了该基因在孢子中的真实存在和表达(图 1),暗示 KRAB-A 在孢子中发挥功能,值得进一步研究。这为进一步开展相关功能研究提供了基础。本研究发现, KRAB-A 蛋白含有 1 018 个氨基酸,分子式为  $C_{5314}H_{8526}N_{1522}O_{1556}S_{43}$ ,分子量约为 120.00 kDa;脂

溶系数为 79.20,亲水性为-0.75(图 2),亲水氨基酸数量多于疏水氨基酸,说明 KRAB-A 蛋白为亲水性蛋白。前人研究结果表明东方蜜蜂微孢子虫能够对蜜蜂宿主的细胞活动、生理及行为进行操纵,包括抑制细胞凋亡,抑制免疫应答,破坏中肠上皮细胞结构及导致采集日龄提前等<sup>[19-20]</sup>。本研究发现,东方蜜蜂微孢子虫的 KRAB-A 蛋白不含信号肽(图 2),说明其为胞内蛋白,不能分泌到胞外发挥作用。因此,推测 KRAB-A 蛋白在东方蜜蜂微孢子虫增殖中发挥功能,但不参与对蜜蜂宿主的操纵。

本研究还发现,东方蜜蜂微孢子虫仅含有 1 个 KRAB-A,而其姐妹种蜜蜂微孢子虫含有 2 个 KRAB-A(表 2),明球囊霉、斑马鱼微孢子虫和曼氏血吸虫分别含有 2、3 和 3 个 KRAB-A(表 2),均多于东方蜜蜂微孢子虫。鉴于东方蜜蜂微孢子虫作为最简单的单细胞真核生物,其基因组高度简化,大小仅约 5.70 Mb<sup>[4]</sup>,而蜜蜂微孢子虫、明球囊霉、斑马鱼微孢子虫和曼氏血吸虫的基因组大小分别为 8.80 Mb<sup>[21]</sup>、146.40 Mb<sup>[22]</sup>、30.00 Mb<sup>[23]</sup>和 270.00 Mb<sup>[24]</sup>。上述 5 个物种含有的 KRAB-A 基因数目与基因组大小呈正相关关系,推测东方蜜蜂微孢子虫基因组在长期进化过程中发生了 KRAB-A 的丢失。东方蜜蜂微孢子虫和蜜蜂微孢子虫是专性感染蜜蜂的两种微孢子虫<sup>[1]</sup>。系统进化分析结果显示,东方蜜蜂微孢子虫 KRAB-A(AAJ76\_2380003054)与蜜蜂微孢子虫 KRAB-A(NAPIS\_ORF01514)聚为一支(图 4),说明二者具有最近的亲缘关系。但值得注意的是,蜜蜂微孢子虫的另 1 个 KRAB-A(NAPIS\_ORF00138)与斑马鱼微孢子虫 KRAB-A(M153\_10450003410)聚为一支(图 4),而与东方蜜蜂微孢子虫 KRAB-A(AAJ76\_2380003054)的进化距离较远,说明 NAPIS\_ORF00138 在蜜蜂微孢子虫的进化过程中可能发生种系特异性分歧。此外,东方蜜蜂微孢子虫 KRAB-A(AAJ76\_2380003054)

与蜜蜂微孢子虫 KRAB-A (NAPIS\_ORF01514)、明球囊霉 KRAB-A(RCL2\_000589200, RCL2\_003114000) 之间的进化距离较近(图 4), 且上述 3 种真菌的 KRAB-A 均含有 1 个 H2C2 模体, 说明 KRAB-A 蛋白在上述 3 种真菌中较为保守, 可能发挥相同或相似的功能。目前, 利用东方蜜蜂微孢子虫感染蜜蜂个体的研究模型进行东方蜜蜂微孢子虫基因的 RNAi 已见诸报道<sup>[25-26]</sup>, 下一步的工作重点是设计合成特异性 siRNA 或体外转录合成 dsRNA, 并通过饲喂东方蜜蜂微孢子虫感染的蜜蜂宿主对病原的 KRAB-A 进行干扰, 进而探究 KRAB-A 在东方蜜蜂微孢子虫感染中的功能。

综上, 研究结果明确了东方蜜蜂微孢子虫 KRAB-A 基因和 KRAB-A 蛋白的分子特性, 并揭示 KRAB-A 可能是一种亲水性蛋白和胞内蛋白, 东方蜜蜂微孢子虫 KRAB-A (AAJ76\_2380003054) 与蜜蜂微孢子虫 KRAB-A (NAPIS\_ORF01514) 间具有很高的保守性。

## 参考文献:

- [1] 梁勤, 陈大福. 蜜蜂保护学[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2009.
- [2] 陈华枝, 范小雪, 范元婵, 等. 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.
- [3] GUO R, CAO G L, LU Y H, et al. Exogenous gene can be integrated into *Nosema bombycis* genome by mediating with a non-transposon vector[J]. Parasitol Res, 2016, 115(8): 3093-3098.
- [4] PELIN A, SELMAN M, ARIS-BROUSO S, et al. Genome analyses suggest the presence of polyploidy and recent human-driven expansions in eight global populations of the honeybee pathogen *Nosema ceranae*[J]. Environ Microbiol, 2015, 17(11): 4443-4458.
- [5] KIM I H, KIM D J, GWAK W S, et al. Increased survival of the honey bee *Apis mellifera* infected with the microsporidian *Nosema ceranae* by effective gene silencing[J]. Arch Insect Biochem Physiol, 2020, 105(4): e21734.
- [6] HUANG Q, LI W, CHEN Y, et al. Dicer regulates *Nosema ceranae* proliferation in honeybees[J]. Insect Mol Biol, 2019, 28(1): 74-85.
- [7] VISSING H, MEYER W K H, AAGAARD L, et al. Repression of transcriptional activity by heterologous KRAB domains present in zinc finger proteins[J]. FEBS Lett, 1995, 369(2/3): 153-157.
- [8] YIN G, JI C N, ZENG L, et al. Cloning and characterization of a novel KRAB-domain-containing zinc finger gene (ZNF284L)[J]. Mol Biol Rep, 2006, 33(2): 137-144.
- [9] YI Z F, LI Y Q, MA W B, et al. A novel KRAB zinc-finger protein, ZNF480, expresses in human heart and activates transcriptional activities of AP-1 and SRE[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 320(2): 409-415.
- [10] KIM S S, CHEN Y M, O'LEARY E, et al. A novel member of the RING finger family, KRIP-1, associates with the KRAB-a transcriptional repressor domain of zinc finger proteins[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(26): 15299-15304.
- [11] 吴鹰, 叶亚萍, 张佳欣, 等. 东方蜜蜂微孢子虫感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.
- [12] 张文德, 赵浩东, 孙明会, 等. 东方蜜蜂微孢子虫孢子中微小 RNA 的鉴定与分析[J]. 昆虫学报, 2022, 65(6): 708-717.
- [13] ISON J, KALAS M, JONASSEN I, et al. EDAM: an ontology of bioinformatics operations, types of data and identifiers, topics and formats[J]. Bioinformatics, 2013, 29(10): 1325-1332.
- [14] NIELSEN H. Predicting secretory proteins with SignalP[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1611: 59-73.
- [15] THOMPSON J D, GIBSON T J, HIGGINS D G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX[J]. Curr Protoc Bioinform, 2003, 00(1): 2.3.1-2.3.22.
- [16] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Mol Biol Evol, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [17] WITZGALL R, O'LEARY E, LEAF A, et al. The Krüppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(10): 4514-4518.
- [18] IMBEAULT M, HELLEBOID P Y, TRONO D. KRAB zinc-finger proteins contribute to the evolution of gene regulatory networks[J]. Nature, 2017, 543(7646): 550-554.
- [19] MAYACK C, NAUG D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection[J]. J Invertebr Pathol, 2009, 100(3): 185-188.
- [20] 耿四海, 周丁丁, 范小雪, 等. 转录组分析揭示东方蜜蜂微孢子虫感染意大利蜜蜂的分子机制[J]. 昆虫学报, 2020, 63(3): 294-308.
- [21] HUANG Q, WU Z H, LI W F, et al. Genome and evolutionary analysis of *Nosema ceranae*: a microsporidian parasite of honey bees[J]. Front Microbiol, 2021, 12: 645353.
- [22] KOBAYASHI Y, MAEDA T, YAMAGUCHI K, et al. The genome of *Rhizophagus clarus* HR1 reveals a common genetic basis for auxotrophy among arbuscular mycorrhizal fungi[J]. BMC Genom, 2018, 19(1): 1-11.
- [23] NDIKUMANA S, PELIN A, WILLIOT A, et al. Genome analysis of *Pseudoloma neurophilia*: a microsporidian parasite of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. J Eukaryot Microbiol, 2017, 64(1): 18-30.
- [24] LOVERDE P T, HIRAI H, MERRICK J M, et al. *Schistosoma mansoni* genome project: an update[J]. Parasitol Int, 2004, 53(2): 183-192.
- [25] LI W F, EVANS J D, HUANG Q, et al. Silencing the honey bee (*Apis mellifera*) naked cuticle gene (nkd) improves host immune function and reduces *Nosema ceranae* infections[J]. Appl Environ Microbiol, 2016, 82(22): 6779-6787.
- [26] KIM I H, KIM D J, GWAK W S, et al. Increased survival of the honey bee *Apis mellifera* infected with the microsporidian *Nosema ceranae* by effective gene silencing[J]. Arch Insect Biochem Physiol, 2020, 105(4): e21734.