

意大利蜜蜂 *amPGAM2* 基因的克隆、 序列特征及表达分析*

欧阳霞辉^{**,***} 彭 帅^{**} 徐文凯 朱雪蕾 郑相相 陈 红

(西北民族大学生命科学与工程学院, 兰州 730030)

摘 要 【目的】磷酸甘油酸变位酶 (PGAM) 是糖酵解和葡萄糖异生途径中一种发挥重要作用的蛋白酶, 本研究拟明确 *amPGAM2* 基因的序列特征及表达模式。【方法】以意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 为研究对象, 克隆了 *amPGAM2* 基因的 cDNA 序列, 分析了其序列特征及其在工蜂、雄蜂、蜂王的不同发育时期的表达模式。【结果】序列特征分析表明, 克隆所得序列全长 976 bp, 包含 1 个完整的开放阅读框, 共编码 254 个氨基酸。该基因核苷酸序列与中华蜜蜂 *Apis cerana* (98.4%) 高度相似, 并存在 15 个潜在抗原表位、9 个磷酸化位点和 5 个组氨酸磷酸酶活性部位, 属于组氨酸磷酸酶超家族, 是一种二磷酸甘油酸依赖性的可溶中性稳定蛋白。荧光定量 PCR 结果表明, *amPGAM2* 基因在不同品级、不同发育时期的表达差异显著 ($P < 0.05$)。工蜂卵期 3 日龄、幼虫期 5 日龄表达最高, 雄蜂成虫期表达最高, 蜂王幼虫期 4 日龄表达最高, 且工蜂、雄蜂及蜂王由卵孵化成幼虫阶段和由红眼蛹羽化至成虫阶段, 其表达都呈上升趋势。【结论】本研究结果推测 *amPGAM2* 基因在卵的孵化及精卵发生过程中具有重要作用, 为进一步认识意大利蜜蜂生殖发育过程中的能量代谢提供理论基础。

关键词 意大利蜜蜂; *PGAM2* 基因; 糖酵解; 序列特征; 荧光定量

Cloning, sequence characterization and expression of the *Apis mellifera amPGAM2* gene

OUYANG Xia-Hui^{**,***} PENG Shuai^{**} XU Wen-Kai ZHU Xue-Lei
ZHENG Xiang-Xiang CHEN Hong

(College of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China)

Abstract [Objectives] Phosphoglycerate mutase (PGAM) plays an important role in the glycolysis and gluconeogenesis of protease. This study intends to clarify the sequence characteristics and expression patterns of the *amPGAM2* gene. [Methods] The cDNA sequence of the *Apis mellifera amPGAM2* gene was cloned, and its sequence characteristics and expression in different castes and developmental stages; workers, drones and queens, analyzed. [Results] Sequence analysis indicates that the full length of the cloned sequence is 976 bp, and contains a complete open reading frame encoding 254 amino acids. The nucleotide sequence of the gene is highly homologous to that of *Apis cerana* (98.4%). The gene has 15 potential antigen epitopes, 9 phosphorylation sites and 5 histidine phosphatase domain active sites and encodes a glycerol diphosphate-dependent soluble neutral stable protein that belongs to the histidine phosphatase superfamily. The results of RT-qPCR indicate that expression of *amPGAM2* is significantly different in different castes and developmental stages. Expression in workers was highest at 3 days of age in the egg stage and at 5 days in the larval stage. The highest expression in drones and queens was in the adult stage and in 4 day-old larvae, respectively. Expression in workers, drones and queens increased from hatching to the larval stage, and from the red-eye pupal eclosion to the adult stage. [Conclusion] The results

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31660628); 甘肃省自然科学基金项目 (1606RJZA058); 西北民族大学中央高校项目 (31920180025)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: oyxhui316@126.com; 1609409157@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: oyxhui316@126.com

收稿日期 Received: 2019-07-18; 接受日期 Accepted: 2019-08-05

suggest that the *amPGAM2* gene plays an important role in hatching and spermatogenesis. This paper provides a theoretical basis for improving understanding of the energy metabolism during reproductive development in *Apis mellifera*.

Key words *Apis mellifera*; *PGAM2* gene; glycolysis; sequence characteristics; fluorescence quantification

磷酸甘油酸变位酶 (Phosphoglycerate mutase, PGAM) 是糖酵解和葡萄糖异生途径中一种发挥重要作用的蛋白酶,可催化 3-磷酸甘油酸盐 (3-phospho-glycerate, 3-PGA) 转化为 2-磷酸甘油酸盐 (2-PGA), 最终形成磷酸烯醇式丙酮酸进入线粒体参与三羧酸循环 (孙晓妮, 2016)。PGAM2 属于 PGAM 家族成员,主要存在于成熟的骨骼肌和心肌组织中,编码蛋白参与糖降解过程,并与横纹肌的收缩有关 (DiMauro *et al.*, 1981; Sakoda *et al.*, 1988)。

Fothergill 和 Harkins (1982) 首次在酵母中发现了 PGAM, 随着 PGAM 氨基酸序列和晶体结构的发现,人们已经在多种不同生物中发现了此蛋白。目前已经在人 (Shanske *et al.*, 1987)、大鼠 (Zhang *et al.*, 2001)、小鼠 (Castellà-Escola *et al.*, 1989; Ruiz-Lozano *et al.*, 1994; Szpirer *et al.*, 1999)、猪 (Qiu *et al.*, 2008; 伍晓雄等, 2008) 和斑马鱼 (Woods *et al.*, 2005) 等物种上克隆并定位了 *PGAM2* 基因。DiMauro 等 (1981) 研究表明, X 型糖原积累病是由于 *PGAM* 基因的缺失或突变使 PGAM 酶活性降低,造成在肝脏和肌肉中储存的糖原无法分解引起糖原的积累,同时不能给肌肉提供足够能量,从而出现肌肉运动不耐症和痉挛等症状。Hannaert 等 (2000) 证实通过日本血吸虫 PGAM 和 Enol 的重组蛋白免疫小鼠,可对血吸虫感染产生一定免疫力。Kondoh 等 (2005) 通过增加小鼠胚胎成纤维细胞的磷酸甘油酸变位酶活性,表明其可增强糖酵解通量,并使细胞寿命延长。Okomo-Adhiambo 等 (2006) 应用猪的表达序列标签对感染弓形虫的猪肾上皮细胞进行 cDNA 微阵分析,结果表明在弓形虫感染过程中 PGAM2 表达上调。Gizak 等 (2015) 研究表明核仁中存在 PGAM 是合成和初步组装新的前核糖体亚单位的先决条件。*PGAM2* 基因在糖酵解过程中起着重要作用,决

定了它对动物机体生长速率、营养转化率以及脂肪沉积等方面的重要作用。

本研究克隆了意大利蜜蜂 *Apis mellifera* *PGAM2* 基因,并命名为 *amPGAM2*。利用生物信息学方法分析了 *amPGAM2* 基因及编码蛋白的序列特征及功能,并通过荧光定量 PCR 检测 *amPGAM2* 基因在不同品级、不同发育时期的表达情况,为深入研究意大利蜜蜂生殖发育过程中的能量代谢机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集与 RNA 提取

实验所用意大利蜜蜂采自甘肃省兰州市五泉王氏养蜂场,组织放于液氮速冻后 - 80 °C 冻存,以 Trizol 试剂盒提取总 RNA。总 RNA 以 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2 反转录合成 cDNA

根据 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒操作说明,并结合 Nanodrop 仪器测得的 RNA 浓度,以 1 µg RNA 进行 cDNA 的合成。反转录条件为: 37 °C, 15 min (反转录反应), 85 °C 5 s (反转录酶的失活反应), 反应完成后取出放入 - 20 °C 冰箱保存。

1.3 引物设计与合成

参照 GenBank 中已公布的 *PGAM2* 基因同源序列 (登录号: XM_625111.4) 以及意大利蜜蜂 *β-actin* 基因 (登陆号: NM_001185146.1), 利用 Primer 5.0 软件设计特异性扩增引物 (976 bp), 并使用 Primer 6.0 软件设计荧光定量 PCR 引物 (表 1)。引物由上海生工生物股份有限公司合成。

1.4 *PGAM2* 基因 PCR 扩增

以 cDNA 为模板,扩增意大利蜜蜂 *amPGAM2*

表 1 本研究所用引物信息
Table 1 Primers used in this study

引物 Primers	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	引物用途 Use of primers
PGAM2-F	AATACGATAGGTGGTGGGGG	扩增引物 Amplified primers
PGAM2-R	TGAAACACATCTCTAGAAAAACATC	
q-pgam2(s)	TCCGATAAAGGTAAGATTGAAGCA	
q-pgam2(a)	ACGTTCAATTTAATCGCCATGTCTTT	实时荧光定量 PCR RT-qPCR
qβ-actin-2F	TGCCAACACTGTCCTTTCTG	
qβ-actin-2R	AGAATTGACCCACCAATCCA	

基因序列, 其 PCR 扩增体系为: cDNA 模板 0.5 μL, 上下游引物各 0.2 μL, EX *Taq* 酶 5 μL, 加 ddH₂O 到 10 μL; PCR 反应过程: 95 °C 预变性 5 min, 98 °C 变性 10 s, 50 °C 退火 30 s, 延伸 72 °C 90 s, 循环 30 次, 最后延伸 72 °C 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 克隆及测序

所得 PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后, 以胶回收试剂盒回收目的片段, 将目的片段与 pMD18-T 载体连接并转化入 DH5α 感受态细胞, 并涂布于 LB 固体培养基进行培养 (含 amp⁺), 12 h 后挑取阳性克隆菌落进行扩繁, 震荡过夜培养。通过菌液 PCR 验证后送上海生工生物股份有限公司测序。

1.6 生物信息学分析

将所得序列在 NCBI 中用 BLAST 工具 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行序列比对分析, 利用 ORF Finder 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 对开放阅读框进行分析; 利用 DNASTAR 软件进行同源物种氨基酸序列同源性分析, 并使用 MAGE6.0 软件的邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树; 采用 ExPASy 的在线程序 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测意大利蜜蜂 PGAM 蛋白分子量、分子组成、氨基酸组成及等电点等理化性质; 利用 PredictProtein 在线工具 (<https://www.predictprotein.org/>) 和 SWISS MODEL 在线工具 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白质二、

三级结构, 并使用 Rasmol 软件处理三级结构; 采用 IEDB Analysis Resource 在线程序 (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>) 预测 B 细胞抗原表位; Motif Scan 在线程序 (https://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) 预测翻译后修饰位点。

1.7 *amPGAM2* 基因表达分析

将意大利蜜蜂不同品级、不同发育时期 cDNA 样品梯度稀释 100 倍作为模板, 意大利蜜蜂 *β-actin* 基因为内参基因, 使用伯乐荧光定量 PCR 仪进行 RT-qPCR 检测。反应体系 (20 μL): 2×TB Green Premix Ex Taq II 10 μL; 上下游引物各 0.8 μL; cDNA 模板 2 μL, ddH₂O 6.4 μL。反应过程: 95 °C 预变性 1 min; 95 °C 变性 10 s; 60 °C 退火 30 s。每个样品进行 3 个平行重复, 采用 2^{-ΔΔCT} 法计算相对表达量。用 SPSS 21.0 软件进行单因素方差分析和多重比较, 并使用 GraphPad Prism 软件进行图像处理。

2 结果与分析

2.1 *PGAM2* 基因 PCR 扩增结果

PCR 扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 1), 结果表明引物特异性良好, 目的条带单一, 且与预期扩增大小符合。

2.2 意大利蜜蜂 *amPGAM2* 基因序列分析

通过 NCBI 的 BLAST 序列比对分析, 确定所得序列是意大利蜜蜂 *PGAM2* 序列, 并命名为 *amPGAM2*。将 *amPGAM2* 基因序列提交至 GenBank, 其登录号为: MK713968。利用 NCBI

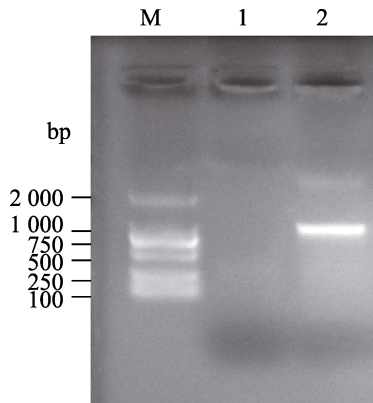


图 1 意大利蜜蜂 *amPGAM2* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of *amPGAM2* gene in *Apis mellifera*

M: DL2000DNA Marker; 1: 阴性对照;
2: *amPGAM2* 基因 PCR 扩增产物。
M: DL2000DNA Marker; 2: Negative control;
2: PCR product of *amPGAM2* gene.

的 ORF Finder 分析后发现, 该序列包含一个 765 bp 的开放阅读框, 编码一个由 254 个氨基酸

组成的蛋白质。

2.3 同源性比对与系统进化树构建

利用 DNASTar 软件将 *amPGAM2* 基因核苷酸序列与其他同源物种核苷酸序列进行同源性分析, 发现其与中华蜜蜂 *Apis cerana*、大蜜蜂 *Apis dorsata*、小蜜蜂 *Apis florea*、美洲熊蜂 *Bombus impatiens*、欧洲熊蜂 *Bombus terrestris*、苜蓿切叶蜂 *Megachile rotundata*、墨西哥兰花蜂 *Eufriesea mexicana*、回条蜂 *Habropoda laboriosa* 和梭鱼草蜂 *Dufourea novaeangliae* 等物种的序列相似度分别为 98.4%、97.6%、96.1%、88.1%、87.8%、87.5%、86.8%、85.9%和 83.7%, 将各个物种的 *PGAM2* 基因核苷酸序列进行多序列比对, 并使用 MEGA6.0 软件构建系统进化树, 发现 *amPGAM2* 基因在分子进化上首先与中华蜜蜂聚为一支, 然后与大蜜蜂和小蜜蜂聚在一起 (图 2)。

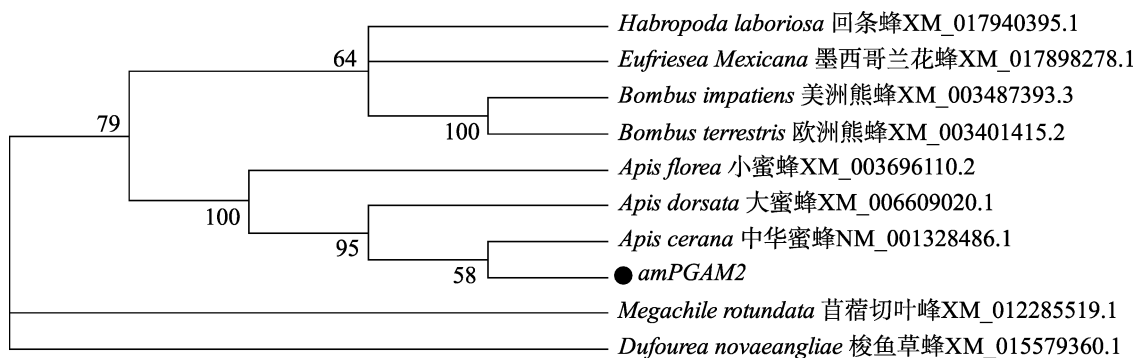


图 2 采用 NJ 法构建的 *PGAM2* 基因系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *PGAM2* gene based on NJ method

2.4 意大利蜜蜂 *amPGAM2* 理化性质分析

利用 ExPASy 的在线程序 Protparam 分析 *amPGAM2* 蛋白质的分子量、分子组成、氨基酸组成及等电点等理化性质。结果显示 (表 2), *amPGAM2* 蛋白分子量为 28.99 ku, 等电点为 7.07, 表明其为一种中性蛋白; 不稳定指数小于 40, 表明其为稳定蛋白; 总平均亲水系数 - 0.505, 为可溶性蛋白。20 种氨基酸占比中, 赖氨酸 (Lys) 占比最高, 占总氨基酸的 9.45%, 半胱氨酸 (Cys) 占比最低, 仅占总氨基酸的 0.39%。

2.5 意大利蜜蜂 *amPGAM2* 结构域分析

利用 ExPASy 的 InterPro 在线程序预测结构域, 结果显示 *amPGAM2* 蛋白属于组氨酸磷酸酶超家族 (Histidine phosphatase superfamily), 且含有 5 个催化核心的活性部位 (组氨酸磷酸酶域 Histidine phosphatase domain), 氨基酸位置分别为 10R、11H、62R、187H、188G。

2.6 意大利蜜蜂 *amPGAM2* 二级、三级结构分析

利用 PredictProtein 程序分析 *amPGAM2* 蛋

表 2 意大利蜜蜂 *amPGAM2* 蛋白理化性质
Table 2 Physicochemical properties of *amPGAM2* in *Apis mellifera*

蛋白质理化特性 Physicochemical properties of proteins	预测结果 Prediction results
分子式 Molecular formula	C ₁₃₀₆ H ₂₀₅₀ N ₃₅₀ O ₃₈₀ S ₈
等电点 Isoelectric point	7.07
负电荷氨基酸残基总数(Asp + Glu)Total disability of negatively charged amino acids (Asp + Glu)	35
正电荷氨基酸残基总数 (Arg + Lys) Total disability of positive charge amino acids (Arg + Lys)	35
不稳定指数 Instability index	39.24
总平均亲水性系数 Total average hydrophilicity coefficient	- 0.505
半衰期 Half life	30 h

白的二级结构,结果显示该蛋白可能存在 α -螺旋 (H)10 个(42.13%), β -折叠(E)5 个(11.02%), 无规则卷曲(L)占 46.85%, 为混合组成型。通过 SWISS-MODEL 程序同源建模(模板: 4emb.1.A; 同源率 55.56) 预测蛋白三级结构, 再经 Rasmol 软件处理, 得出该蛋白三级结构(图 3), 图 3 中 3 个绿色区域为组氨酸磷酸酶催化核心活性部位(10R、11H、62R、187H、188G), 且三级结构与二级结构预测结果相符。

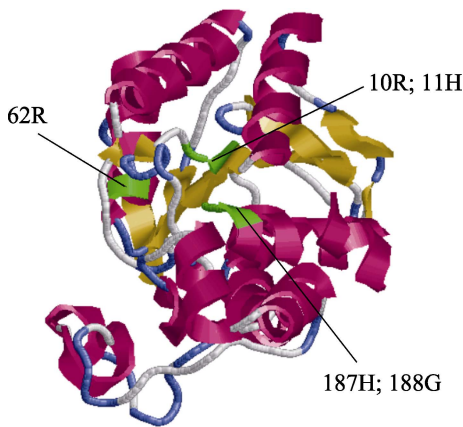


图 3 意大利蜜蜂 *amPGAM2* 蛋白三级结构
Fig. 3 Tertiary structure of *amPGAM2* protein in *Apis mellifera*

2.7 意大利蜜蜂 *amPGAM2* 蛋白 B 细胞抗原表位分析

采用 IEDB Analysis Resource 程序分析 *amPGAM2* 蛋白的 B 细胞抗原表位, 结果显示该蛋白具有较强的抗原性(图 4), 并存在 15 个潜在抗原表位(表 3)。

表 3 意大利蜜蜂 *amPGAM2* 氨基酸序列中潜在抗原表位
Table 3 Potential antigenic epitopes in the amino acid sequence of *amPGAM2* in *Apis mellifera*

顺序 Order	氨基酸位置 Amino acid position	潜在抗原表位序列 Potential epitope sequence	得分 Score
1	13-16	ESEW	0.915
2	29-38	HLSDKGKIEA	0.860
3	43-45	KAI	0.530
4	76	Q	0.400
5	79-80	IT	0.580
6	92-93	YG	0.403
7	98-110	LNKAETAAKYGEE	1.259
8	118-131	SFDTPPPMEPDHK	2.850
9	140-153	PRYANDPKPEEFPK	2.269
10	166	P	0.350
11	177	K	0.404
12	200-203	EMSN	0.556
13	224	N	0.353
14	226	K	0.406
15	237-241	EETVK	0.935

2.8 意大利蜜蜂 *amPGAM2* 蛋白的翻译后修饰位点

通过翻译后修饰位点分析, 推测 *amPGAM2* 蛋白含有的翻译后修饰位点分别为: 1 个酰胺化位点(178aa-181aa); 2 个糖基化位点(78aa-81aa、169aa-172aa); 1 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(202aa-205aa); 1 个肉豆蔻酰化位点

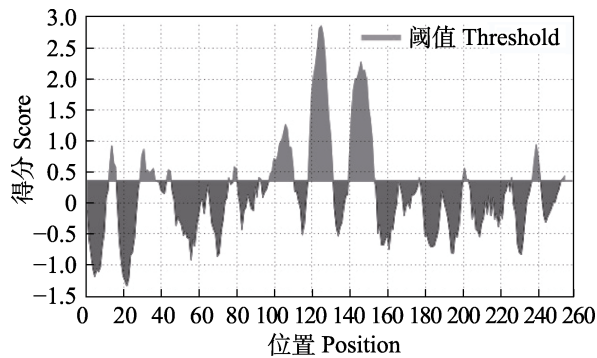


图4 意大利蜜蜂 *amPGAM2* 蛋白 B 细胞抗原表位分析
Fig. 4 Analysis of B cell antigen epitopes of *amPGAM2* protein in *Apis mellifera*

横轴为蛋白质的氨基酸序列, 纵轴为抗原指数。

位于临界值以上的峰值区间为潜在抗原表位。

The transverse axis is the amino acid sequence of protein and the longitudinal axis is the antigen index.

The peak interval above the critical value is the potential antigen epitope.

(93aa-98aa), 7 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (31aa-33aa、66aa-68aa、84aa-86aa、156aa-158aa、190aa-192aa、230aa-232aa、239aa-241aa); 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点 (68aa-92aa), 且 *amPGAM2* 蛋白为二磷酸甘油酸依赖性的磷酸甘油酸变位酶。

2.9 意大利蜜蜂 *amPGAM2* 基因表达模式分析

通过荧光定量 PCR 检测了 *amPGAM2* 基因在不同品级、不同发育时期的表达情况。结果显示 (图 5), *amPGAM2* 基因在不同品级、不同发育时期的表达差异显著 ($P < 0.05$)。在工蜂发育的各个阶段中 (图 5: A), 卵期 3 日龄、幼虫期 5 日龄表达量最高, 且在随后的各个发育阶段中其表达量整体降低; 在幼虫期 7-11 日龄、预蛹期、白眼蛹期、红眼蛹期、成虫期, 表达量无差

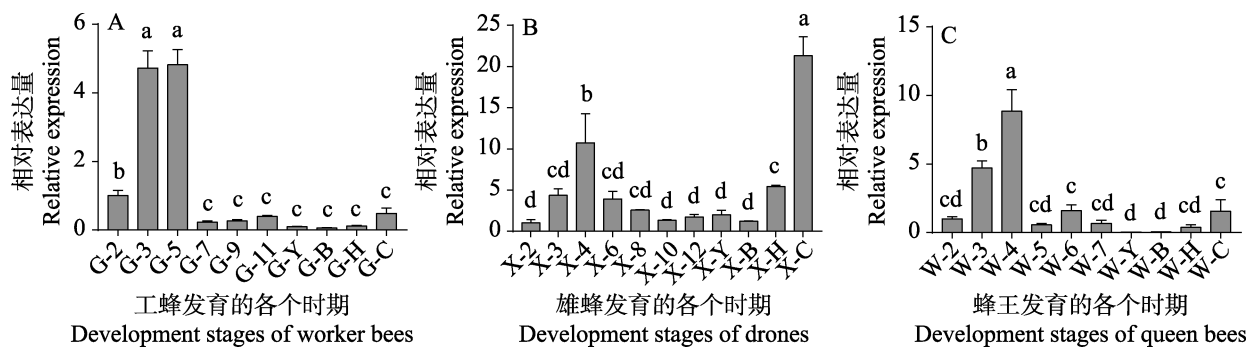


图5 *amPGAM2* 基因在意大利蜜蜂不同品级、不同发育时期的表达情况

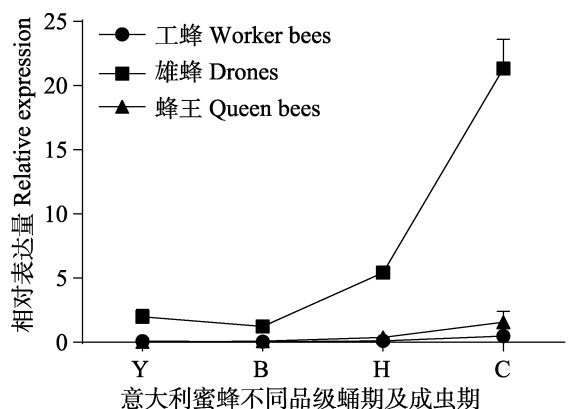
Fig. 5 Expression of *amPGAM2* gene in different grades and developmental stages of *Apis mellifera*

G-2: 工蜂卵期 2 日龄; G-3: 工蜂卵期 3 日龄; G-5: 工蜂幼虫期 5 日龄; G-7: 工蜂幼虫期 7 日龄; G-9: 工蜂幼虫期 9 日龄; G-11: 工蜂幼虫期 11 日龄; G-Y: 工蜂预蛹期; G-B: 工蜂白眼蛹期; G-H: 工蜂红眼蛹期; G-C: 工蜂成虫期。X-2: 雄蜂卵期 2 日龄; X-3: 雄蜂卵期 3 日龄; X-4: 雄蜂幼虫期 4 日龄; X-6: 雄蜂幼虫期 6 日龄; X-8: 雄蜂幼虫期 8 日龄; X-10: 雄蜂幼虫期 10 日龄; X-12: 雄蜂幼虫期 12 日龄; X-Y: 雄蜂预蛹期; X-B: 雄蜂白眼蛹期; X-H: 雄蜂红眼蛹期; X-C: 雄蜂成虫期。W-2: 蜂王卵期 2 日龄; W-3: 蜂王卵期 3 日龄; W-4: 蜂王幼虫期 4 日龄; W-5: 蜂王幼虫期 5 日龄; W-6: 蜂王幼虫期 6 日龄; W-7: 蜂王幼虫期 7 日龄; W-Y: 蜂王预蛹期; W-B: 蜂王白眼蛹期; W-H: 蜂王红眼蛹期; W-C: 蜂王成虫期。柱上标有不同字母表示经单因素方差分析差异显著 ($P < 0.05$, Duncan 氏多重比较法)。

G-2: Egg stage of worker bees 2 days old; G-3: Egg stage of worker bees 3 days old; G-5: Larval stage of worker bees 5 days old; G-7: Larval stage of worker bees 7 days old; G-9: Larval stage of worker bees 9 days old; G-11: Larval stage of worker bees 11 days old; G-Y: Worker bees prepupa; G-B: Worker bees white eye pupa; G-H: Worker bees red eye pupa; G-C: Worker bees adult. X-2: Egg stage of drones 2 days old; X-3: Egg stage of drones 3 days old; X-4: Larva stage of drones 4 years old; X-6: Larva stage of drones 6 years old; X-8: Larva stage of drones 8 years old; X-10: Larva stage of drones 10 years old; X-12: Larva stage of drones 12 years old; X-Y: Drones prepupa; X-B: Drones white eye pupa; X-H: Drones red eye pupa; X-C: Drones adult. W-2: Egg stage of queen bees 2 days old; W-3: Egg stage of Queen bees 3 days old; W-4: Larva stage of queen bees 4 days old; W-5: Larva stage of queen bees 5 days old; W-6: Larva stage of queen bees 6 days old; W-7: Larva stage of queen bees 7 days old; W-Y: Queen bees pre-pupa; W-B: Queen bees white eye pupa; W-H: Queen bees red eye pupa; W-C: Queen bees adult. Histograms with different letters indicate significant difference in variance analysis of single factors ($P < 0.05$, Duncan's multiple comparison).

异。在雄蜂发育的各个阶段中(图 5: B), 成虫期表达量最高; 从卵期 2 日龄到幼虫期 4 日龄其表达量逐渐升高, 从幼虫期 4 日龄到白眼蛹期其表达量逐渐降低; 在幼虫期 10-12 日龄、预蛹期、白眼蛹期, 表达量无差异。在蜂王发育的各个阶段中(图 5: C), 幼虫期 4 日龄表达量最高; 从卵期 2 日龄到幼虫期 4 日龄其表达量逐渐升高, 且在随后的各个发育阶段中其表达量整体降低。

通过折线图对不同品级蛹期及成虫期表达情况进行对比分析(图 6), 结果显示雄蜂蛹期及成虫期该基因的表达量最高, 蜂王成虫期该基因的表达量次之, 且工蜂、蜂王蛹期该基因的表达量无差异, 但工蜂成虫期该基因的表达量最低。



意大利蜜蜂不同品级蛹期及成虫期

Pupal and adult stages in different grades of *Apis mellifera*
图 6 *amPGAM2* 基因在意大利蜜蜂不同品级蛹期及成虫表达情况折线图

Fig. 6 Expression of *amPGAM2* gene in pupal and adult stages of *Apis mellifera*

Y: 预蛹; B: 白眼蛹; H: 红眼蛹; C: 成虫。

Y: Prepupa; B: White-eyed pupa;

H: Red-eyed pupa; C: Adult.

3 讨论

PGAM2 是一种极为重要的糖酵解酶, 具有分子内转移酶活性, 与碳水化合物转运、新陈代谢、生长发育等密切相关(吴周林, 2015), 并在肿瘤细胞中, PGAM 活性进一步增强, 从而可调节糖酵解与其他 ATP 产生通路以及糖异生之间的平衡(Turhani *et al.*, 2006)。在人、小鼠、寄生虫和猪等物种中, 关于该基因的研究已有

不少报道, 主要集中于肌疾病相关研究方面(Hadjigeorgiou *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2006), 而关于蜜蜂等昆虫类动物还鲜见报道。

鉴于 PGAM2 在骨骼肌糖代谢中的重要作用和生物学效应, 在意大利蜜蜂中研究该基因非常必要。本研究克隆得到意大利蜜蜂 *amPGAM2* 基因长 976 bp, 其中包含一个长为 765 bp 的开放阅读框, 共编码 254 个氨基酸, 核苷酸序列与中华蜜蜂(98.4%)高度相似, 系统进化树分析发现, 意大利蜜蜂首先与中华蜜蜂聚为一支, 再与大蜜蜂和小蜜蜂聚在一起。半衰期越长则蛋白质结构越稳定(李强子等, 2016), 意大利蜜蜂 *amPGAM2* 半衰期为 30 h, 且不稳定指数小于 40(Guruprasad *et al.*, 1990), 说明 *amPGAM2* 较稳定。 α -螺旋和 β -折叠结构规则、整齐, 不易扭曲、变形, 且难与抗体嵌合, 可作为蛋白质骨架发挥稳定作用(吕燕波等, 2003), 意大利蜜蜂 *amPGAM2* 二级结构组成中 α -螺旋和 β -折叠占比达 53.15%, 综合其上两点说明 *amPGAM2* 结构极其稳定。蛋白质的无规卷曲则比较松散, 易发生扭曲、折叠及盘旋并暴露在蛋白的表面, 极可能成为抗原表位(吕燕波等, 2003), 意大利蜜蜂 *amPGAM2* 的二级结构组成中, 无规卷曲所占比达 46.85%, 提示可能具有多个抗原表位, 同 B 细胞抗原表位预测结果相一致。B 细胞抗原表位是抗原分子中与抗体特异性结合的位点, 通常由 5-15 个氨基酸组成, 可针对特定抗原研制特定抗体或疫苗(王芬, 2011)。

已有研究证实能量代谢基因与肌肉的生长密切相关(伍晓雄等, 2008), 且丧失磷酸甘油酸变位酶活性时, 机体的运动及生长发育受到严重影响(Zhao and Assmann, 2011)。现在已知晓的翻译后修饰位点有 400 余种(Garavelli, 2004), 磷酸化则是蛋白翻译后修饰中普遍存在的共价修饰模式, 蛋白的磷酸化和去磷酸化这一可逆过程, 调节着包括细胞的增殖、发育、新陈代谢等几乎整个生命活动过程(Delom and Chevet, 2006)。预测结果显示意大利蜜蜂 *amPGAM2* 存在 9 个磷酸化, 且含有五个组氨酸磷酸酶催化核心活性部位, 表明其在意大利蜜蜂的运动、营养

转化及生长发育过程中可能发挥重要作用。

为进一步研究 *amPGAM2* 基因的功能,对意大利蜜蜂不同品级、不同发育时期 *PGAM2* 基因的表达情况进行了检测分析。不同品级卵期及刚孵化至幼虫阶段该基因表达整体活跃,可能由于该基因参与糖酵解过程为卵的生长发育提供大量能量,并为孵化提供更多的生物量(如核苷酸、氨基酸等),这与 Tennessen 等(2011)研究糖酵解相关基因的表达结果相似。工蜂、雄蜂及蜂王由卵孵化至幼虫阶段和由红眼蛹羽化至成虫阶段,其表达都呈上升趋势,可能由于不同发育时期转变时其细胞活力增强所导致(Liu *et al.*, 2015),对 ATP 及生物量(如核苷酸、氨基酸等)的需求量增加,从而提高糖酵解速率以满足细胞快速增殖的代谢需求。抑制糖酵解途径会限制雄性原始生殖细胞的增殖(徐瑜珊等, 2019),糖酵解相关酶的缺失会导致精子功能受损(如运动能力降低、顶体反应异常等)(Ferramosca and Zara, 2014),且通过糖酵解途径有助于精子的超活化和精卵结合(Hereng *et al.*, 2011),雄蜂成虫中 *amPGAM2* 基因表达量最高,由此可知雄蜂成虫生殖细胞和精子的增殖过程依赖糖酵解途径,且该基因发挥着重要作用。卵丘细胞糖酵解产生的丙酮酸可被卵母细胞吸收,为卵母细胞的成熟和卵子的生长提供能源物质以保证其正常生长发育(Su *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; 王彦博, 2011),且体外培养研究发现高表达糖酵解相关基因的卵子质量更佳优越(Krisher and Prather, 2012),蜂王成虫中该基因的表达量较高,而工蜂的相对较低,可知该基因在蜂王卵巢及卵子的发育过程中发挥重要作用。可能由于使用刚羽化蜂王成虫,其卵巢没有发育成熟,相对其它阶段的表达没有雄蜂那么显著。

本研究系统地对意大利蜜蜂 *amPGAM2* 蛋白的理化性质和结构功能进行了预测分析,并通过荧光定量 PCR 技术分析了不同品级、不同发育时期 *amPGAM2* 基因表达模式,为深入研究该基因在意大利蜜蜂生长发育过程中的作用机理奠定基础,为糖酵解等相关通路的研究提供理论依据。

参考文献 (References)

- Castellà-Escolà J, Montoliu L, Pons G, Puigdomènech P, Cohen-Solal M, Carreras J, Rigau J, Climent F, 1989. Sequence of rat skeletal muscle phosphoglycerate mutase cDNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 165(3): 1345–1351.
- Delom F, Chevet E, 2006. Phosphoprotein analysis: From proteins to proteomes. *Proteome Science*, 4: 15.
- DiMauro S, Miranda AF, Khan S, Gitlin K, Friedman R, 1981. Human muscle phosphoglycerate mutase deficiency: Newly discovered metabolic myopathy. *Science*, 212(4500): 1277–1279.
- Ferramosca A, Zara V, 2014. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. *BioMed Research International*, 2014: 902953.
- Fothergill LA, Harkins RN, 1982. The amino acid sequence of yeast phosphoglycerate mutase. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 215(1198): 19–44.
- Gizak A, Grenda M, Mamczur P, Wisniewski J, Sucharski F, Silberring J, McCubrey JA, Wisniewski JR, Rakus D, 2015. Insulin/IGF1-PI3K-dependent nucleolar localization of a glycolytic enzyme--phosphoglycerate mutase 2, is necessary for proper structure of nucleolus and RNA synthesis. *Oncotarget*, 6(19): 17237–17250.
- Guruprasad K, Reddy BV, Pandit MW, 1990. 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. *Protein Engineering*, 4(2): 155–161.
- Garavelli JS, 2004. The RESID database of protein modifications as a resource and annotation tool. *Proteomics*, 4(6): 1527–1533.
- Hannaert V, Brinkmann H, Nowitzki U, Lee JA, Albert MA, Sensen CW, Gaasterland T, Müller M, Michels P, Martin W, 2000. Enolase from *Trypanosoma brucei*, from the amitochondriate protist *Mastigamoeba balamuthi*, and from the chloroplast and cytosol of *Euglena gracilis*: Pieces in the evolutionary puzzle of the eukaryotic glycolytic pathway. *Molecular Biology and Evolution*, 17(7): 989–1000.
- Hereng TH, Elgstoen KB, Cederkvist FH, Eide L, Jahnsen T, Skålhegg BS, Rosendal KR, 2011. Exogenous pyruvate accelerates glycolysis and promotes capacitation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 26(12): 3249–3263.
- Hadjigeorgiou GM, Kawashima N, Bruno C, Andreu AL, Sue CM, Rigden DJ, Kawashima A, Shanske S, DiMauro S, 1999. Manifesting heterozygotes in a Japanese family with a novel mutation in the muscle-specific phosphoglycerate mutase (PGAM-M) gene. *Neuromuscul Disord*, 9(6/7): 399–402.
- Krisher RL, Prather RS, 2012. A role for the warburg effect in preimplantation embryo development: Metabolic modification to support rapid cell proliferation. *Molecular Reproduction & Development*, 79(5): 311–320.
- Kondoh H, Lleonart ME, Gil J, Wang J, Degan P, Peters G, Martinez D, Carnero A, Beach D, 2005. Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Research*, 65(1): 177–185.
- Li QZ, Zhu GQ, Liu WX, Liu LX, Zhang L, 2016. Bioinformatics analysis of CDS of TLR6 gene in Holstein cattle. *Jiangsu*

- Journal of Agricultural Sciences*, 32(3): 608–614. [李强子, 朱国强, 刘吴鑫, 刘丽霞, 张丽, 2016. 荷斯坦牛 TLR6 基因 CDS 区的生物信息学分析. *江苏农业学报*, 32(3): 608–614.]
- Lu YB, Wan Y, Wu YZ, 2003. Prediction of the secondary structure and B cell epitope for the E protein of SARS coronavirus. *Immunological Journal*, (6): 407–410. [吕燕波, 万瑛, 吴玉章, 2003. SARS 病毒基因组所编码的 E 蛋白的二级结构和 B 细胞表位预测. *免疫学杂志*, (6): 407–410.]
- Liu F, Gong ZH, Zhang WX, Wang Y, Ma LT, Wang HF, Guo XQ, Xu BH, 2015. Identification and characterization of a novel methionine sulfoxide reductase B gene (*AccMsrB*) from *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 108(4): 575–584.
- Li Q, Miao DQ, Zhou P, Wu YG, Gao D, Wei DL, Cui W, Tan JH, 2011. Glucose metabolism in mouse cumulus cells prevents oocyte aging by maintaining both energy supply and the intracellular redox potential. *Biology of Reproduction*, 84(6): 1111–1118.
- Oh SJ, Park KS, Ryan HF Jr, Danon MJ, Lu J, Naini AB, DiMauro S, 2006. Exercise-induced cramp, myoglobinuria, and tubular aggregates in phosphoglycerate mutase deficiency. *Muscle & Nerve*, 34(5): 572–576.
- Okomo-Adhiambo M, Beattie C, Rink A, 2006. cDNA microarray analysis of host-pathogen interactions in a porcine in vitro model for *Toxoplasma gondii* infection. *Infection and Immunity*, 74(7): 4254–4265.
- Qiu HF, Zhao SH, Xu XW, Yerle M, Liu B, 2008. Assignment and expression patterns of porcine muscle-specific isoform of phosphoglycerate mutase gene. *Journal of Genetics and Genomics*, 35(5): 257–260.
- Ruiz-Lozano P, de Lecea L, Buesa C, Pérez de la Osa P, LePage D, Gualberto A, Walsh K, Pons G, 1994. The gene encoding rat phosphoglycerate mutase subunit M: Cloning and promoter analysis in skeletal muscle cells. *Gene*, 147(2): 243–248.
- Sun XN, 2016. *Toxoplasma gondii*: The cloning and expression of enzymes related with energy metabolism and functional regulation study of mouse macrophages. Master dissertation. Nanjing: Nanjing Agricultural University. [孙晓妮, 2016. 刚地弓形虫 4 种能量代谢相关酶基因的克隆表达及对小鼠巨噬细胞功能的调节. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学.]
- Sakoda S, Shanske S, DiMauro S, DiMauro EA, 1988. Isolation of a cDNA encoding the B isozyme of human phosphoglycerate mutase (PGAM) and characterization of the PGAM family. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(32): 16899–16905.
- Shanske S, Sakoda S, Hermanson MA, DiMauro S, Schon EA, 1987. Isolation of a cDNA encoding the muscle-specific subunit of human phosphoglycerate mutase. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(30): 14612–14617.
- Szipirer C, Szipirer J, Van Vooren P, Tissir F, Simon JS, Koike G, Jacob HJ, Lander ES, Helou K, Klinga-Levan K, Levan G, 1999. Gene-based anchoring of the rat genetic linkage and cytogenetic maps. *Transplantation Proceedings*, 31(3): 1541–1543.
- Su YQ, Sugiura K, Eppig JJ, 2009. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: Paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Seminars in Reproductive Medicine*, 27(1): 32–42.
- Tennessen JM, Baker KD, Lam G, Evans J, Thummel CS, 2011. The drosophila estrogen-related receptor directs a metabolic switch that supports developmental growth. *Cell Metabolism*, 13(2): 139–148.
- Turhani D, Krapfenbauer K, Thurnher D, Langen H, Fountoulakis M, 2006. Identification of differentially expressed, tumor-associated proteins in oral squamous cell carcinoma by proteomic analysis. *Electrophoresis*, 27(7): 1417–1423.
- Wu XX, Tang ZL, Li Y, Yang SL, Chu MX, Ma YH, Li K, 2008. Cloning, Sequence characteristics and expression analysis of PGAM2 gene. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 35(5): 1183–1189. [伍晓雄, 唐中林, 李勇, 杨述林, 储明星, 马月辉, 李奎, 2008. 猪 PGAM2 基因的克隆、序列特征及表达分析. *畜牧兽医学报*, 39(9): 1183–1189.]
- Woods IG, Wilson C, Friedlander B, Chang P, Reyes DK, Nix R, Kelly PD, Chu F, Postlethwait JH, Talbot WS, 2005. The zebrafish gene map defines ancestral vertebrate chromosomes. *Genome Research*, 15(9): 1307–1314.
- Wu ZL, 2015. Effect of MSTN, Ankrd2 on cell differentiation of SCs and association analysis of PGAM2, XKR4 polymorphisms on growth traits in rabbits. Master dissertation. Chengdu: Sichuan Agricultural University. [吴周林, 2015. 兔 MSTN, Ankrd2 对骨骼肌卫星细胞分化影响及 PGAM2, XKR4 基因与家兔生长性状关联分析. 硕士学位论文. 成都: 四川农业大学.]
- Wang F, 2011. Bioinformatics analysis, cloning, expression of PGAM2 gene of *Toxoplasma gondii* and immunoprotection of rTgPGAM2. Master dissertation. Taiyuan: Shanxi Medical University. [王芬, 2011. 刚地弓形虫磷酸甘油酸变位酶 2 基因的生物信息学分析、克隆表达及免疫保护性研究. 硕士学位论文. 太原: 山西医科大学.]
- Wang YB, 2011. Effects of glycometabolism during maturation on the cytoplasm of goat oocytes. Master dissertation. Taian: Shandong Agricultural University. [王彦博, 2011. 山羊卵母细胞成熟期间葡萄糖代谢作用对卵母细胞胞质成熟的影响. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学.]
- Xu YS, Chen L, Wang N, Zang CY, Peng FK, Zhang J, 2019. Inhibition of glycolysis activity limits the proliferation of male primordial germ cells. *Progress in Modern Biomedicine*, 19(10): 1823–1828. [徐瑜珊, 陈丽, 王娜, 臧春燕, 彭凡珂, 张军, 2019. 抑制糖酵解活性限制雄性原始生殖细胞的增殖. *现代生物医学进展*, 19(10): 1823–1828.]
- Zhang J, Yu L, Fu Q, Gao J, Xie Y, Chen J, Zhang P, Liu Q, Zhao S, 2001. Mouse phosphoglycerate mutase M and B isozymes: cDNA cloning, enzyme activity assay and mapping. *Gene*, 264(2): 273–279.
- Zhao Z, Assmann SM, 2011. The glycolytic enzyme, phosphoglycerate mutase, has critical roles in stomatal movement, vegetative growth, and pollen production in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 62(14): 5179–5189.