东方蜜蜂微孢子虫侵染过程中 nce-miR-15325 及其靶基因 *NCCS* 和 *DTIII* 分析*

钱加珺[1**] 荆 欣[1**] 张佳欣[1] 范小雪[1] 张文德[1]
吉 挺[3] 蔺哲广[3] 陈大福[1, 2***] 郭 睿[1, 2***]

（1. 福建农林大学动物科学学院（蜂学学院），福州 350002；2. 福建省蜂疗研究所，福州 350002；
3. 扬州大学动物科学与技术学院，扬州 225000）

摘 要 **【目的】** 东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* 侵染蜜蜂导致微孢子虫病，但侵染机制未明。本研究拟在前期工作基础上，验证 nce-miR-15325 的相对表达量及序列信息，并进一步检测 nce-miR-15325 及其靶基因在东方蜜蜂微孢子虫侵染意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 工蜂过程的相对表达量，为进一步探究 nce-miR-15325 调控侵染的功能和机制提供依据。**【方法】** 利用 Stem-loop RT-PCR 和 Sanger 测序对 nce-miR-15325 进行相对表达量及序列信息验证。利用相关生物信息学软件对 nce-miR-15325 的靶基因进行信息预测及分析。通过 RT-qPCR 检测 nce-miR-15325 及其靶基因的相对表达量。**【结果】** 鉴定到在东方蜜蜂微孢子虫孢子中 nce-miR-15325 真实存在并表达。预测到 nce-miR-15325 的 11 个靶基因，其中分别有 3、4、7 和 4 个靶基因可注释到 KEGG、GO、Nr 和 Swissprot 数据库。与接种后 1 d 相比，nce-miR-15325 在 2 dpi（day post inoculation, dpi）的表达量变化不显著，而在 4、6 和 8 dpi 时，相对表达量均显著下调（P<0.05），总体表达趋势呈下调。相较于 1 dpi，靶基因 *NCSS* 在 2、4、6 和 8 dpi 的表达量均显著下调（P<0.05）；类似的，靶基因 *DTIII* 在 2、4、6 和 8 dpi 的表达量均显著下调（P<0.05），总体上表现出下降的表达趋势。**【结论】** 证实了东方蜜蜂微孢子虫孢子中 nce-miR-15325 存在和表达的真实性，明确了在东方蜜蜂微孢子虫侵染过程的 nce-miR-15325 及其靶基因的动态表达模式，揭示 nce-miR-15325 通过正调控 *NCSS* 和 *DTIII* 表达潜在调节侵染过程。

关键词 蜜蜂；意大利蜜蜂；东方蜜蜂微孢子虫；nce-miR-15325；靶基因；相对表达量

Analysis of the nce-miR-15325 and its target genes *NCCS* and *DTIII* during the process of infection by *Nosema ceranae*

QIAN Jia-Jun[1**] JING Xin[1**] ZHANG Jia-Xin[1] FAN Xiao-Xue[1] ZHANG Wen-De[1]
JI Ting[3] LIN Zhe-Guang[3] CHEN Da-Fu[1, 2***] GUO Rui[1, 2***]

(1. College of Animal Sciences (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
2. Apitherapy Institute of Fujian Province, Fuzhou 350002, China; 3. College of Animal Science and Technology,
Yangzhou University, Yangzhou 225000, China)

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金面上项目（32172792）；福建省自然科学基金面上项目（2022J01131334）；国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目（CARS-44-KXJ7）；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）；福建农林大学动物科学学院（蜂学学院）科研扶持项目（郭睿）；福建省大学生创新创业训练计划项目（S202310389082, X202310389082）

**共同第一作者 Co-first authors，E-mail：18900297790@163.com；jingxin6662022@163.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors，E-mail：ruiguo@fafu.edu.cn；dfchen826@fafu.edu.cn

收稿日期 Received：2022-05-26；接受日期 Accepted：2023-04-14

Abstract **[Objectives]** The infection of *Nosema ceranae* caused nosemiosis, but the mechanism of infection was unknown. Based on the previous work, this study was intended to further verify the expression level and sequencing results of nce-miR-15325, and to detect the relative expression levels of nce-miR-15325 and its target genes during the infection of *Apis mellifera ligustica* by *Nosema ceranae*. This study provided the basis for further exploring the function and mechanism of nce-miR-15325 in regulating infection **[Methods]** Stem-loop RT-PCR and Sanger sequencing were employed to confirm the expression of, and to sequence, nce-miR-15325. Related software was used to predict and analyze relevant target genes. The expression profiles of nce-miR-15325 and its target genes were determined using RT-qPCR. **[Results]** nce-miR-15325 was present and expressed in *Nosema ceranae* spores. Eleven target genes were predicted, of these, three, four, seven and four, respectively, were annotated to the KEGG, GO, Nr, and Swissprot databases. Compared to its expression at 1 dpi (1 day post-inoculation), the expression of nce-miR-23928 was unchanged at 2 dpi, but was progressively less at 4, 6, and 8 dpi (P<0.05). Compared to its expression at 1 dpi, the expression of the target gene *NCCS* was also progressively less (P<0.05) at 2, 4, 6 and 8 dpi, as was that of the target gene *DTIII*. **[Conclusion]** These results confirm the existence and expression of nce-miR-15325 in *Nosema ceranae* spores, reveal its expression dynamics and that of its target genes during *Nosema ceranae* infection, and suggest that nce-miR-15325 potentially regulates the infection process via positive modulation of the expression of *NCSS* and *DTIII*.

Key words honey bee; *Apis mellifera ligustica*; *Nosema ceranae*; nce-miR-15325; target gene; relative expression

东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae*，专性寄生蜜蜂肠道上皮细胞的单细胞真菌病原，能够侵染蜂王、工蜂、雄蜂和幼虫（梁勤和陈大福，2009），其始寄主是东方蜜蜂，后跨种传播至西方蜜蜂 *Apis mellifera*，目前已广泛感染世界各国饲养的西方蜜蜂蜂群（Fries *et al.*，1996；Chen *et al.*，2008）。微小 RNA（microRNA, miRNA）是一类长度介于 17-24 nt 且进化上高度保守的非编码 RNA（non-coding RNA, ncRNA），其种子区与 mRNA 的 3′ UTR 结合从而导致 mRNA 降解或抑制其翻译，从而在转录后水平调控基因表达（梁沛等，2012）。miRNA 一般发挥基因表达的负调控作用（Von Born *et al.*，2018），但近期的研究证实一些 miRNA 也能正调控基因表达（Xiao *et al.*，2017）。借助二代测序技术，人们在粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* 等真菌中陆续鉴定到丰富表达的 miRNA（Lee *et al.*，2010；Zhou *et al.*，2012；Lau *et al.*，2013）。目前，东方蜜蜂微孢子虫的 miRNA 研究有限(Huang *et al.*，2015；Huang and Evans，2016）。Huang 和 Evans（2016）通过对接种了东方蜜蜂微孢子虫的西方蜜蜂 6 日龄工蜂中肠进行高通量测序，预测到东方蜜蜂微孢子虫的 6 个类 miRNA 的 RNA（miRNA-like RNA，milRNA）。随后，Shao 等（2021）基于重新组装和注释的东方蜜蜂微孢子虫基因组又发掘出 3 个 miRNA。验证东方蜜蜂微孢子虫 miRNA 的存在和表达真实性，并检测 miRNA 及其靶基因在病原侵染宿主过程的相对表达量，可为进一步探究 miRNA 调控侵染的功能及作用机制提供依据。

本研究通过分子生物学方法对前期预测到的 nce-miR-15325（张文德等，2022）进行验证，拟通过对东方蜜蜂微孢子虫感染意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica*（简称意蜂）工蜂的过程中 nce-miR-15325 及其靶基因 *NCCS*、*DTIII* 的表达水平进行分析，阐明中华蜜蜂 nce-miR-15325 在微孢子虫感染中的作用，为阐明中华蜜蜂 nce-miR-15325 在微孢子虫感染中的作用和机理提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试蜜蜂与病原

未受东方蜜蜂微孢子虫感染的意蜂工蜂取自福建农林大学动物科学学院（蜂学学院）教学蜂场的饲养蜂群（Chen *et al.*，2019；）。东方蜜蜂微孢子虫侵染的意蜂工蜂试验样品取样于福州市闽侯县荆溪源安养蜂场的饲养蜂群。东方蜜蜂微孢子虫纯净试验孢子由福建农林大学蜜蜂保护实验室制备并保存（张文德等，2022）。

1.2 东方蜜蜂微孢子虫侵染的意蜂工蜂中肠样品制备

按照 Chen 等（2019）建立的技术流程进行东方蜜蜂微孢子虫孢子的粗提和纯化。将群势较强、外观健康，在没有被东方蜜蜂微孢子虫感染的意大利蜜蜂蜂群中即将要出房的封盖子脾快速地提到实验室中，然后放在（34 ± 0.5）℃的恒温培养箱中，采集 1 日龄的工蜂进行饥饿处理，持续 2 h。固定工蜂后进行饲喂法接种 5 μL 50%（w/v）的蔗糖溶液（含有 10^6 个东方蜜蜂微孢子虫孢子），在蔗糖溶液被吃完之后，把上述的工蜂放进一个干净的塑料盒（35 头/盒），将盛有 2 mL 50%（W/V）蔗糖溶液的饲喂器插入顶部，并每 24 h 更换一只饲喂器（盛有 2 mL 蔗糖溶液）；接种后第 1、2、4、6 和 8 dpi 时，于超净工作台上取出工蜂中肠，将其置于清洁的 RNA-Free 离心管内（每 3 只中肠一管），于液氮冷冻后移至 ± 80 ℃冷藏保存。上述实验设置 3 个生物学重复。

1.3 nce-miR-15325 的分子生物学验证

根据 nce-miR-15325 的核苷酸序列，利用 Primer Premier 5 软件设计特异性茎环（Stem-loop）引物和上游引物（F）及通用下游引物（R），由上海生工生物工程公司进行合成。引物序列信息见表 1。利用 RNA 抽提试剂盒（Promega，美国）提取东方蜜蜂微孢子虫孢子样品的总 RNA，按照 cDNA 第 1 链合成试剂盒（诺唯赞，中国）说明书进行反转录，得到的 cDNA 作为模板进行常规 PCR。反应体系和条件按照吴鹰等（2022）和张凯遥等（2023）方法进行设置。产物经 1.8% 的琼脂糖凝胶电泳。切胶回收目的片段，然后连接转化大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α（唯地，中国），取 100 μL 置于固体培养基（氨苄抗性）培养箱过夜，挑单菌落置于 LB 液体培养基（氨苄抗性）振荡培养 12 h，菌液送至上海生工进行 Sanger 测序（单端测序，M13 引物）。

1.4 nce-miR-15325 相对表达量的检测

参照前人建立流程提取 RNA，进行反转录，并进行 RT-qPCR 实验（王紫馨等，2023）。参照 SYBR Green 试剂盒（翌圣，中国）说明书，通过 ABI QuantStudio 3 荧光定量 PCR 系统（ABI 公司，美国）检测 nce-miR-15325 的相对表达量。反应体系和程序按照吴鹰等（2022）的方法设置。每个反应均进行 3 次技术重复。以 1 dpi 为参照，采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算 nce-miR-15325 在 2、4、6 和 8 dpi 的相对表达量。通过 GraphPad Prism 7 软件进行数据分析并绘图。采用 SPSS Statistics 软件对 nce-miR-15325 在各时间点的相对表达量进

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Sequences of primers for RT-qPCR

引物名称 Primer	序列（5′-3′）Sequence (5′-3′)	用途 Purpose
nce-miR-15325-Loop	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTGTAGAAT	PCR
nce-miR-15325-F	CGCGTAGCAAAAAAGACTC	
nce-miR-15325-R	CTCAACTGGTGTCGTGGA	
DTIII-F	TGTGATAGGGAAGGTGAA	PCR, RT-qPCR
DTIII-R	TGACAAGGACCGAAACTA	
NCCS-F	TTGAAAGGGTTGACTGAT	
NCCS-R	GCAACTCATACTGCGTCT	
5s rRNA-F	CGAGCGGTTTCCCATCTCAGTA	RT-qPCR
5s rRNA-R	AAAACACCGGAACTCGTCAGCT	
actin-F	ACAATGGTTCAGGTATCGTA	
actin-R	GTGCCTCATCTCCTACATAA	

行单因素方差分析（ANOVA），以 $P<0.05$ 为显著性阈值。采用 Tukey 检验法和字母显著标记法两两比较分析实验数据。

1.5　nce-miR-15325 的靶基因预测与分析

参照吴鹰等(2022)的方法，联用 TargetScan、miRanda 与 RNAhybrid 软件预测 nce-miR-15325 的靶基因，3 种软件均采用默认参数。通过 Blast 工具将靶基因序列分别比对到 KEGG 数据库（https://www.omicshare.com/tools/Home/Soft/pathwaygsea）、GO 数据库（https://www.omicshare.com/tools/Home/Soft/gogsea）、Nr 数据库（https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/FASTA）和 Swiss-Prot 数据库（http://www.uniprot.org/uniprot/?query=*&fil=reviewed%3Ayes），从而获得相应的注释信息。根据预测到的靶向结合关系构建 nce-miR-15325 与靶基因之间的调控网络，进而通过 Cytoscape 软件进行可视化。

1.6　nce-miR-15325 的靶基因相对表达量的检测

根据 1.5 节 nce-miR-15325 的靶向预测结果，结合东方蜜蜂微孢子虫的生物学背景，同时参考前人相关研究报道（梁勤和陈大福，2009；范小雪等，2021），筛选出 2 个关键靶基因进行相对表达量检测，分别为核凝聚复合体亚基（Nuclear condensin complex subunit）编码基因 *NCSS*（Gene ID: 36320507）和 DNA 拓扑异构酶 3（DNA topoisomerase iii）编码基因 *DTIII*（Gene ID: 36321483）。将 Oligo dT 引物和 Random 6 mer 引物按 1∶1 比例混合后进行反转录获得模板 cDNA，进而采用 RT-qPCR 检测上述 2 个靶基因在各时间点的相对表达量进行检测。以肌动蛋白基因 *actin*（Gene ID: AB023025.1）作为内参。参照 1.4 节的内容设置反应体系和条件。每个反应均设置 3 个技术重复。以 1 dpi 为参照，通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算靶基因在 2、4、6 和 8 dpi 的相对表达量，通过 GraphPad Prism 7 软件进行数据分析并绘图，使用 SPSS Statistics 软件对靶基因在各时间点的相对表达量进行单因素方差分析（ANOVA），以 $P<0.05$ 为显著性阈值。利用 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　nce-miR-15325 的分子生物学验证

Stem-loop RT-PCR 后，琼脂糖凝胶电泳结果显示，从东方蜜蜂微孢子虫孢子中扩增出符合预期大小（约 70 bp）的目的片段（图 1：A）。目的片段的 Sanger 测序结果表明，nce-miR-15325 目的片段的测序序列与基于转录组数据的预测序列（AAGAUGUGUAUCUAAAAUUCUACA）完全一致（图 1：B）。

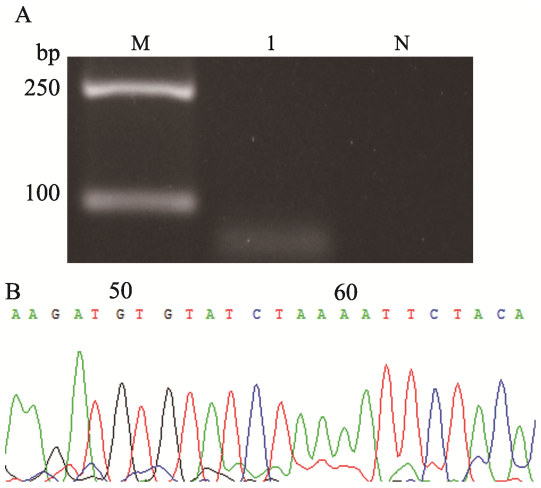


图 1　nce-miR-15325 的 Stem-loop RT-PCR 与 Sanger 测序验证

Fig. 1　Confirmation of nce-miR-15325 by Stem-loop RT-PCR and Sanger sequencing

A.Stem-loop RT-PCR 扩增产物的琼脂糖凝聚电泳；泳道 M: DNA marker；泳道 1：nce-miR-15325 的扩增产物；泳道 N：阴性对照（无菌水）；B. nce-miR-15325 扩增片段的 Sanger 测序峰图。

A. Agarose gel electrophoresis for the amplified product from Stem-loop RT-PCR; Lane M: DNA marker; Lane 1: Amplified product from nce-miR-15325; Lane N: Negative control (sterile water); B. Peak map of Sanger sequencing of the amplified segment from nce-miR-15325.

2.2　东方蜜蜂微孢子虫侵染过程中 nce-miR-15325 的相对表达量

nce-miR-15325 的 RT-qPCR 结果分析表明，与 1 dpi 相比，2 dpi 的表达水平变化不显著；表达水平在 4、6、8 dpi 处呈显著下降趋势（$P<0.05$），分别下调 2.80、67.11 和 34.48 倍（图

2）；nce-miR-15325 总体表现出下降的表达趋势（图 2）。

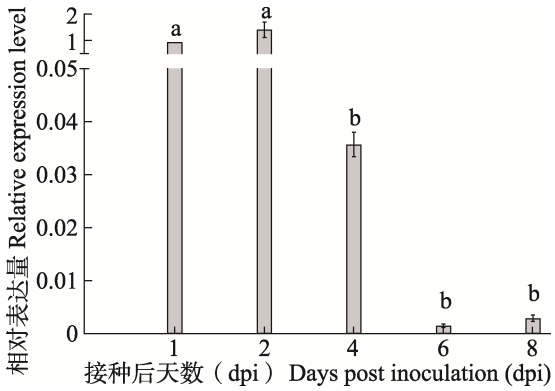


图 2　东方蜜蜂微孢子虫侵染意蜂工蜂过程中 nce-miR-15325 的相对表达量检测

Fig. 2　Determination of relative expression level of nce-miR-15325 in the *Nosema ceranae* infection of *Apis mellifera ligustica* workers

利用 SPSS 统计软件，对各日龄 nce-miR-15325 的表达水平进行 ANOVA 分析，以 $P<0.05$ 为显著性阈值。通过 Tukey 检验、字母显著标记法等方法，对试验结果进行两两比较。图中的数据为平均值 ± 标准误差。柱上标有不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。下图同。

SPSS statistics software was used to conduct one-way analysis of variance (ANOVA) for the relative expression level of nce-miR-15325 at each day-old, with $P<0.05$ as the significance threshold. Experimental data were compared and analyzed by the Tukey test and the letter significance labeling methods. Data are mean±SE, histograms with the different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$). The same below.

2.3　nce-miR-15325 的靶基因分析

nce-miR-15325 共靶向 11 个基因，nce-miR-15325 与靶基因之间可形成 1 个调控网络（图 3）。其中有 3 个靶基因可注释到 KEGG 数据库中的 3 条通路，包括 RNA 聚合酶（ko03020）、同源重组（ko03440）和细胞周期-酵母（ko04111）；有 4 个靶基因可注释到 GO 数据库中的分子功能、生物学过程和细胞组分相关等 22 个功能条目，分别有 7 和 4 个靶基因可注释到 Nr 和 Swissprot 数据库（表 2）。

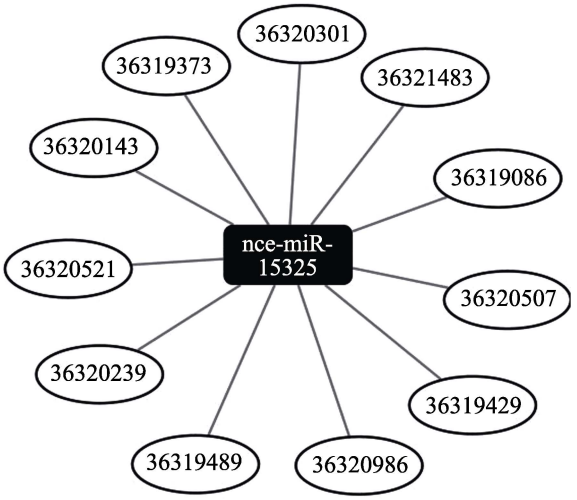


图 3　nce-miR-15325 及其靶基因之间靶向调控网络

Fig. 3　Regulatory network between nce-miR-15325 and its target genes

表 2　nce-miR-15325 的靶基因的 Nr 和 Swissprot 数据库注释

Table 2　Annotations of nce-miR-15325 targeted genes in Nr and Swissprot databases

基因 ID Gene ID	Nr 数据库注释 Nr database annotation	Swissprot 数据库注释 Swissprot database annotation
36319489	DNA-directed rna polymerase subunit b	Probable DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA2
36320507	Nuclear condensin complex subunit	Structural maintenance of chromosomes protein 4
36321483	DNA topoisomerase 3	DNA topoisomerase 3
36319373	DNA repair protein rad4	—
36320239	Dopey-like leucine zipper transcription factor	—
36320301	Threonyl-tRNA synthetase	—
36320521	Transposase	—
36320143	—	Protein dopey
36319086	—	—
36319429	—	—
36320986	—	—

2.4　东方蜜蜂微孢子虫侵染过程中靶基因 *NCCS* 的相对表达量

如图 4（A）所示，NCCS 与 nce-miR-15325 间存在潜在的靶向关系。RT-qPCR 的结果表明，与 1 dpi 相比，NCCS 在 2、4、6、8 dpi 的表达水平明显下降，分别下调 11.38、3.27、5.49 和 7.24 倍（图 4：B）；*NCCS* 总体上呈现下降的表达趋势（图 4：B）。

2.5　东方蜜蜂微孢子虫侵染过程中靶基因 *DTIII* 的相对表达量

如图 5（A）所示，*DTIII* 与 nce-miR-15325 间存在潜在的靶向关系。RT-qPCR 结果显示，相较于 1 dpi，靶基因 *DTIII* 在 2、4、6 和 8 dpi 的表达量均为显著下调（$P<0.05$），分别下调 1.72、2.39、2.40 和 2.05 倍（图 5：B）；*DTIII* 的表达总体上表现出下降趋势（图 5：B）。

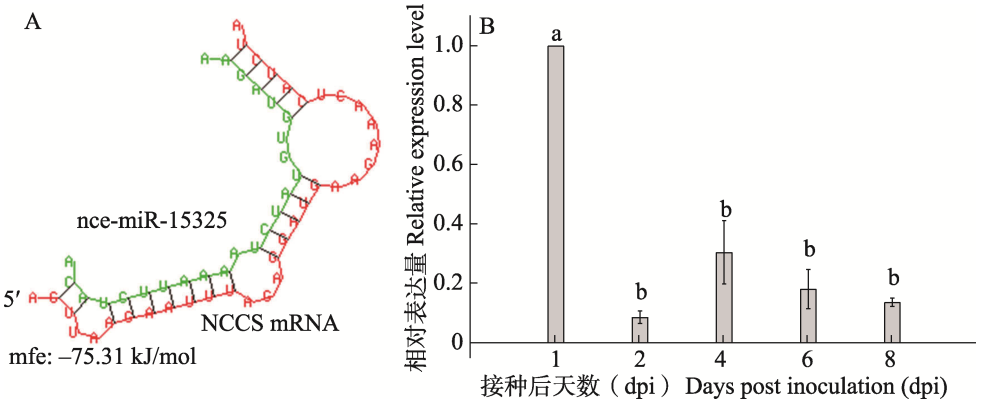


图 4　东方蜜蜂微孢子虫侵染意蜂工蜂过程中靶基因 *NCCS* 的相对表达量检测

Fig. 4　Determination of relative expression level of target gene *NCCS* in the *Nosema ceranae* infection of *Apis mellifera ligustica* workers

A. nce-miR-15325 与 *NCCS* 的靶向结合关系示意图；B. *NCCS* 在东方蜜蜂微孢子虫侵染过程的相对表达量。

A. Schematic diagram of target binding relationship between nce-miR-15325 and *NCCS*; B.The relative expression level of *NCCS* during the infection process of *Nosema ceranae*.

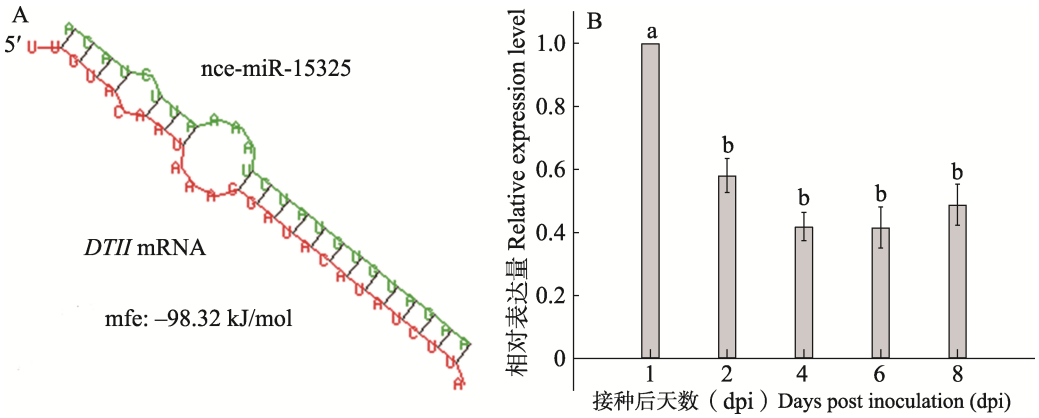


图 5　东方蜜蜂微孢子虫侵染意蜂工蜂过程中 *DTIII* 的相对表达量检测

Fig. 5　Determination of relative expression level of target gene *DTIII* during the *Nosema ceranae* infection of *Apis mellifera ligustica* workers

A. nce-miR-15325 与 *DTIII* 的靶向结合关系示意图；B. *DTIII* 在东方蜜蜂微孢子虫侵染过程的相对表达量。

A. Schematic diagram of target binding relationship between nce-miR-15325 and *DTIII*; B. The relative expression level of *DTIII* during the infection process of *Nosema ceranae*.

3 讨论

张文德等（2022）结合深度测序以及生物信息学在东方蜜蜂微孢子虫孢子中预测到 10 个 miRNA，并进一步利用分子生物学手段证实其中 nce-miR-26675 和 nce-miR-23928 表达模式和序列的真实性。近期，吴鹰等（2022）、王紫馨等（2023）和张凯遥等（2023）分别证实了 nce-miR-10660、nce-miR-34537 和 nce-miR-12220 在东方蜜蜂微孢子虫孢子中真实性和表达特性。本研究中，通过分析 Stem-loop RT-PCR 以及 Sanger 测序结果证实 nce-miR-15325 序列真实性。鉴于目前已报道的东方蜜蜂微孢子虫 miRNA 仅有 19 个且多为生物学预测，上述经分子生物学验证的 miRNA 为东方蜜蜂微孢子虫 miRNA 提供了重要补充，也为后续功能研究提供了候选分子。相对表达量检测结果显示，相较于 1 dpi，nce-miR-15325 在 2 dpi 的表达量基本不变，在 4、6 和 8 dpi 的表达量分别显著下调 2.80、67.11 和 34.48 倍（$P<0.05$）（图 2），表现出下降的表达趋势。这表明东方蜜蜂微孢子虫侵染意蜂工蜂的过程伴随着 nce-miR- 15325 表达水平的持续下降，推测 nce-miR-15325 可能参与对侵染过程的调控。另外，预测结果显示 nce-miR-15325 靶向 *NCSS* 和 *DTIII* 等 11 个基因（图 3），其中可注释到 KEGG、GO、Nr 和 Swiss-prot 数据库的靶基因数目仅有 3、4、7 和 4 个。注释信息的缺乏由于东方蜜蜂微孢子虫孢子外被一层坚硬的孢壁，常规的转基因手段无法将外源基因导入孢子，导致东方蜜蜂微孢子虫的绝大多数基因功能未明。下一步可参考其他微孢子虫如家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis* 的转基因策略（Guo *et al.*，2016）尝试建立东方蜜蜂微孢子虫的连续细胞感染系和转基因操作平台，为持续深入开展基因功能研究提供基础。

研究表明，一些 miRNA 能通过正调控基因表达影响发育、免疫和侵染等重要生物学过程（Huang et al.，2010）。SMC 蛋白主要包括凝聚素、粘附蛋白和 SMC5-SMC6 复合物，在有丝分裂染色体的集缩和分离、遗传重组和 DNA 修复方面起到重要作用（Uhlmann，2016）。在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中，SMC 蛋白可在有丝分裂过程中结合微管蛋白进而影响细胞增殖，缺少该结合体将导致细胞有丝分裂阻滞，纺锤体结构异常及染色体分离缺陷（Laflamme et al.，2014）。在枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 中，SMC 蛋白基因突变体表现出生长缺陷和无核细胞频率增加等特征（Mascarenhas et al.，2002）。本研究发现，可编码 SMC 蛋白的 *NCCS* 与 nce-miR-15325 之间存在潜在靶向结合关系（图 4：A），*NCCS* 在 2、4、6 和 8 dpi 的表达量较 1 dpi 分别显著下调 11.38、3.27、5.49 和 7.24 倍（$P<0.05$），总体呈现下降的表达趋势（图 4：B）。*NCCS* 在 4、6 和 8 dpi 的表达趋势与 nce-miR-15325 一致，说明二者间存在潜在的正调控关系；因此，我们推测东方蜜蜂微孢子虫在感染意蜂工蜂时，可能是通过 nce-miR-15325 正调控 *NCSS* 表达潜在影响 SMC 蛋白合成，进而调节自身增殖。

DNA 拓扑异构酶在转录过程中起到维持染色质构象的作用，真核生物中的 DNA 拓扑异构酶可产生短暂的单链 DNA 断裂以减轻转录和其他过程中产生的核苷酸链扭转。这种酶以高度保守的真核形式存在，如受到抑制会导致细胞死亡（Pommier，1996）。Sloan 等（2017）研究发现过表达和敲减 DNA 拓扑异构酶编码基因，会导致酿酒酵母的基因突变频率显著升高，表明 DNA 拓扑异构酶对酿酒酵母的遗传稳定性至关重要。本研究中，可编码 DNA 拓扑异构酶的 *DTIII* 与 nce-miR-15325 之间存在潜在靶向结合关系（图 5：A），*DTIII* 在 2、4、6 和 8 dpi 的表达量较 1 dpi 分别显著下调 1.72、2.39、2.40 和 2.05 倍（图 5：B）。*DTIII* 在 4、6 和 8 dpi 的表达趋势与 nce-miR-15325 一致，表明二者间也存在潜在正调控关系；东方蜜蜂微孢子虫通过 nce-miR-15325 正调控 *DTIII* 表达潜在影响 DNA 拓扑异构酶编码基因蛋白合成，进而调节侵染过程。

目前，养蜂生产中治疗蜜蜂微孢子虫病药物匮乏，相关诊断技术体系尚未完全建立。miRNA

作为新型生物标志物和分子靶点已成功应用于肿瘤等人类疾病的诊疗（何恒正等，2022）。在本研究的基础上，下一步拟对 nce-miR-15325 进行过表达和敲减研究，同时对 NCCS 和 DTIII 进行 RNAi 研究，以明确它们在东方蜜蜂微孢子虫侵染中的功能，进而开发基于 nce-miR-15325、*NCCS* 和 *DTIII* 的诊断技术体系和治疗药物。

本研究证实 nce-miR-15325 在东方蜜蜂微孢子虫孢子中真实存在和表达，明确了 nce-miR-15325 及靶基因 *NCCS* 和 *DTIII* 在东方蜜蜂微孢子虫侵染意蜂工蜂过程的相对表达量，揭示东方蜜蜂微孢子虫通过正调控 *NCCS* 和 *DTIII* 潜在调节侵染过程。

参考文献 (References)

Chen DF, Chen HZ, Du Y, Zhou DD, Geng SH, Wang HP, Wan JQ, Xiong CL, Zheng YZ, Guo R, 2019. Genome-wide identification of long non-coding RNAs and their regulatory networks involved in *Apis mellifera ligustica* response to *Nosema ceranae* infection. *Insects*, 10(8): 245.

Chen Y, Evans JD, Smith IB, Pettis JS, 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97(2): 186–188.

Fan XX, Du Y, Zhang WD, Wang J, Jiang HB, Fan YC, Feng RR, Wan JQ, Zhou ZY, Xiong CL, Zhen YZ, Chen DF, Guo R, 2021. Omics analysis of *Nosema ceranae* miRNAs involved in gene expression regulation in the midgut of *Apis mellifera ligustica* workers and their regulatory networks. *Acta Entomologica Sinica*, 64(2): 187–204. [范小雪, 杜宇, 张文德, 王杰, 蒋海宾, 范元婵, 冯睿蓉, 万洁琦, 周紫彧, 熊翠玲, 郑燕珍, 陈大福, 郭睿, 2021. 参与调控意蜂工蜂中肠基因表达的东方蜜蜂微孢子虫 miRNA 的组学解析及其调控网络. 昆虫学报, 64(2): 187–204.]

Fries I, Feng F, Da Silva A, Slemenda SB, Pieniazek NJ, 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Europeam Journal of Protistology*, 32(3): 356–365.

Guo R, Cao G, Lu Y, Xue R, Kumar D, Hu X, Gong C, 2016. Exogenous gene can be integrated into *Nosema bombycis* genome by mediating with a non-transposon vector. *Parasitology Research*, 115(8): 3093–3098.

He HZ, Quan YY, Cheng FH, Li HJ, Zhou J, 2022. Study on the mechanism of miRNA-3677-3p mediating HBx to promote hepatocellular carcinoma tumor dryness and chemotherapy resistance. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine Digestion*, 30(8): 565–572. [何恒正, 全养雅, 程发辉, 黎慧娟, 周坚, 2022. miRNA-3677-3p 介导 HBx 促肝癌肿瘤干性和化疗抵抗的机制研究. 中国中西医结合消化杂志, 30(8): 565–572.]

Huang Q, Chen Y, Wang RW, Schwarz RS, Evans JD, 2015. Honey bee microRNAs respond to infection by the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Scientific Reports*, 5: 17494.

Huang Q, Evans JD, 2016. Identification of microRNA-like small RNAs from fungal parasite *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 133: 107–109.

Huang S, Wu S, Ding J, Lin J, Wei L, Gu J, He X, 2010. MicroRNA-181a modulates gene expression of zinc finger family members by directly targeting their coding regions. *Nucleic Acids Research*, 38(20): 7211–7208.

Laflamme G, Tremblay-Boudreault T, Roy MA, Andersen P, Bonneil É, Atchia K, Thibault P, D'Amours D, Kwok BH, 2014. Structural maintenance of chromosome (SMC) proteins link microtubule stability to genome integrity. *Journal of Biological Chemistry*, 289(40): 27418–27431.

Lau SK, Chow WN, Wong AY, Yeung JM, Bao J, Zhang N, Lok S, Woo PC, Yuen KY, 2013. Identification of microRNA-like RNAs in mycelial and yeast phases of the thermal dimorphic fungus *Penicillium marneffei*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(8): e2398.

Lee HC, Li L, Gu W, Xue Z, Crosthwaite SK, Pertsemlidis A, Lewis ZA, Freitag M, Selker EU, Mello CC, Liu Y, 2010. Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. *Molecular Cell*, 38(6): 803–814.

Liang P, Gao XW, 2012. Progress in research on the application of microRNA in entomology. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(2): 533–542. [梁沛, 高希武, 2012. MicroRNA 及其在昆虫学中的研究进展. 应用昆虫学报, 49(2): 533–542.]

Liang Q, Chen DF, 2009. Honeybee Protection. Beijing: China Agriculture Press. 5–7. [梁勤, 陈大福, 2009. 蜜蜂保护学. 北京: 中国农业出版社. 5–7.]

Mascarenhas J, Soppa J, Strunnikov AV, Graumann PL, 2002. Cell cycle-dependent localization of two novel prokaryotic chromosome segregation and condensation proteins in Bacillus subtilis that interact with SMC protein. *EMBO Journal*, 21(12): 3108–3118.

Pommier Y, 1996. Eukaryotic DNA topoisomerase I: Genome

gatekeeper and its intruders, camptothecins. *Smeinars in Radiation Oncology*, 23(1 Suppl. 3): 3–10.

Shao SS, Yan WY, Huang Q, 2021. Identification of novel miRNAs from the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infection Genetics and Evolution*, 93: 104930.

Sloan R, Huang SN, Pommier Y, Jinks-Robertson S, 2017. Effects of camptothecin or TOP1 overexpression on genetic stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*, 59: 69–75.

Uhlmann F, 2016. SMC complexes: From DNA to chromosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(7): 399–412.

Von Born P, Bernardo-Faura M, Rubio-Somoza I, 2018. An artificial miRNA system reveals that relative contribution of translational inhibition to miRNA-mediated regulation depends on environmental and developmental factors in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 13(2): e0192984.

Wang ZX, Zhang WD, Zhang JX, Zhao X, Fan XX, Jin X, Gao XZ, Chen DF, Guo R, 2023. Expression profiles of nce-miR-34537 and the target gene *PIP5KI* during the infection process of *Nosema ceranae*. *Acta Microbiologica Sinica*, 63(2): 731–744. [王紫馨, 张文德, 张佳欣, 赵萧, 范小雪, 荆欣, 高旭泽, 陈大福, 郭睿, 2023. 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, 63(2): 731–744.]

Wu Y, Ye YP, Zhang JX, Qian JJ, Zhang WD, Yu KJ, Ji T, Lin ZG, Zhao HX, Chen DF, Guo R, 2022. Expression profile of nce-miR-12220 during the *Nosema ceranae* infection process of *Apis mellifera ligustica* workers. *Mycosystema*, 41(10): 1546–1557. [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, 2022. 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. 菌物学报, 41(10): 1546–1557.]

Xiao M, Li J, Li W, Wang Y, Wu F, Xi Y, Zhang L, Ding C, Luo H, Li Y, Peng L, Zhao L, Peng S, Xiao Y, Dong S, Cao J, Yu W, 2017. microRNAs activate gene transcription epigenetically as an enhancer trigger. *RNA Biology*, 14(10): 1326–1334.

Zhang KY, Zhang WD, Wang ZX, Hu Y, Qian JJ, Wang SY, Zhao HD, Gu XY, Niu QS, Fu ZM, Chen DF, Guo R, 2023. Expression profiles of nce-miR-10660 and its target gene in *Apis mellifera ligustica* workers during the infection of *Nosema ceranae*. *Acta Entomologica Sinica*, 66(2): 181–189. [张凯遥, 张文德, 王紫馨, 胡颖, 钱加珺, 王思懿, 赵浩东, 顾小雨, 牛庆生, 付中民, 陈大福, 郭睿, 2023. 东方蜜蜂微孢子虫侵染意大利蜜蜂工蜂过程中 nce-miR-10660 及其靶基因表达谱. 昆虫学报, 66(2): 181–189.]

Zhang WD, Zhao HD, Sun MH, Yu KJ, Guo YL, Zhu LR, Hu Y, Zhao X, Ye YP, Chen DF, Guo R, 2022. Identification and analysis of microRNAs in *Nosema ceranae* spores. *Acta Entomologica Sinica*, 65(6): 708–717. [张文德, 赵浩东, 孙明会, 余岢骏, 郭意龙, 朱乐冉, 胡颖, 赵萧, 叶亚萍, 陈大福, 郭睿, 2022. 东方蜜蜂微孢子虫孢子中 microRNA 的鉴定与分析. 昆虫学报, 65(6): 708–717.]

Zhou Q, Wang Z, Zhang J, Meng H, Huang B, 2012. Genome-wide identification and profiling of microRNA-like RNAs from *Metarhizium anisopliae* during development. *Fungal Biology*, 116(11): 1156–1162.