



李新宇, 马卫华, 杜亚丽, 徐凯, 姜玉锁. 中华蜜蜂 *ZFP37* 基因的生物信息学分析及高温下表达特性的研究 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (4): 986–993.

# 中华蜜蜂 *ZFP37* 基因的生物信息学分析及高温下表达特性的研究

李新宇<sup>1\*</sup>, 马卫华<sup>2\*</sup>, 杜亚丽<sup>3</sup>, 徐凯<sup>4</sup>, 姜玉锁<sup>5\*\*</sup>

(1. 山东轻工职业学院, 山东淄博 255300; 2. 山西农业大学园艺学院, 山西太原 030031; 3. 山西农业大学动物医学学院, 山西太谷 030801; 4. 吉林省养蜂研究所, 吉林吉林 132001; 5. 山西农业大学动物科学学院, 山西太谷 030801)

**摘要:** 锌指蛋白 (Zinc finger proteins, ZFPs) 是一类在真核生物体内广泛分布的蛋白质。锌指蛋白作为一类转录因子, 它能够调控基因的表达和细胞的分化, 最近的研究显示其在动植物抗逆方面也发挥着重要作用。本研究对中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* *ZFP37* 的蛋白结构进行了预测分析, 并通过 qRT-PCR 分析了中华蜜蜂在遭受高温胁迫时 *ZFP37* 的表达情况, 进一步了解锌指蛋白在中华蜜蜂应对热胁迫过程中的作用。结果显示, 中华蜜蜂 *ZFP37* 可编码 123 个氨基酸, 蛋白分子量为 13.7 kDa, 无跨膜结构。氨基酸同源序列比对结果表明, 中华蜜蜂 *ZFP37* 序列与蜜蜂科昆虫的相似性最高, 与其他膜翅目昆虫的相似性存在差异。基因的表达模式显示, *ZFP37* 在高温下表达升高, 此外, 胁迫时间的增加也可导致 *ZFP37* 表达的升高。这些结果表明 *ZFP37* 对于中华蜜蜂应对热应激有重要的生物学意义。

**关键词:** *ZFP37*; 中华蜜蜂; 高温胁迫; 生物信息; 表达模式

中图分类号: Q963; S489

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 04-0986-08

## Bioinformatics analysis of *ZFP37* gene and expression characteristics in high temperature stress in *Apis cerana cerana*

LI Xin-Yu<sup>1\*</sup>, MA Wei-Hua<sup>2\*</sup>, DU Ya-Li<sup>3</sup>, XU Kai<sup>4</sup>, JIANG Yu-Suo<sup>5\*\*</sup> (1. Shandong Vocational College of Light Industry, Zibo 255300, Shandong Province, China; 2. College of Horticulture, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030031, Shanxi Province, China; 3. College of Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China; 4. Apiculture Science Institute of Jilin Province, Jilin 132001, Jilin Province, China; 5. College of Animal Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China)

**Abstract:** ZFPs (zinc finger protein) are a class of proteins widely distributed in eukaryotic organisms. As a type of transcription factor, ZFPs can regulate gene expression and cell differentiation. Recent studies had shown that it also played an important role in the resistance of animals and plants. In this study, the protein structure of *Apis cerana cerana* *ZFP37* was predicted and analyzed, and the expression of *ZFP37* of the *A. cerana cerana* under heat stress was analyzed by qRT-PCR to further understand the zinc finger protein in the *A. cerana cerana* in response to heat the role of stress in the process. The results showed that the *AcerZFP37* could encode 123 amino acids, with a protein molecular weight of 13.7 kDa,

基金项目: 现代农业产业技术 (蜜蜂) 体系建设专项 (CARS-44-KXJ22)

\* 共同第一作者: 李新宇, 男, 博士, 讲师, 研究方向为蜜蜂生物学, E-mail: lixinyu0019@163.com; 马卫华, 女, 博士, 研究员, 研究方向为蜜蜂生物学, E-mail: mawh1997@163.com

\*\* 通讯作者 Author for correspondence: 姜玉锁, 男, 博士, 教授, 研究方向为蜜蜂生物学, E-mail: jiangys-001@163.com

收稿日期 Received: 2021-05-06; 接受日期 Accepted: 2021-06-21

and no transmembrane structure. The result of amino acid homologous sequence alignment showed that the *AcerZFP37* sequence had the highest similarity with Apidae insects, and there were differences in similarity with other Hymenoptera insects. The gene expression pattern showed that the expression of *ZFP37* increases at high temperature. In addition, the increase of stress time could also lead to the increase of *ZFP37* expression. These results indicated that *ZFP37* had important biological significance for *A. cerana cerana* to cope with heat stress.

**Key words:** *ZFP37*; *Apis cerana cerana*; heat stress; bioinformatics; expression characteristics

温度是影响昆虫生理状况和生存状态的重要非生物因素。蜜蜂属于变温动物,其个体保持和调节体温的能力不强,外界环境温度的变化会对蜜蜂生理代谢产生影响,如导致蜜蜂的应激反应、改变生理代谢、影响成虫的存活、幼虫的发育等 (Kiuchi *et al.*, 2008; Bauerfeind and Fischer, 2013; Colinet *et al.*, 2018)。当外界环境温度超过蜜蜂所能承受的范围时,蜜蜂的各项生命活动和体内的生理代谢都会受到严重的干扰。

高温可以改变细胞的内环境,对细胞骨架造成损伤,还会影响蛋白质的合成过程 (杜尧等, 2007)。蜜蜂在长期的进化过程中进化出了一系列措施来应对温度胁迫,如调整自身代谢,合成保护蛋白等,以减缓或者修复高温胁迫对机体造成的伤害。其中最显著的机体响应就是抗逆蛋白的诱导产生,目前来说,在众多抗逆基因中,热激蛋白基因家族发挥着极其重要的作用,它是生物细胞在面临多种应激条件下所产生的一类维持细胞内蛋白质平衡的蛋白 (Feder and Hofmann, 1999)。热激蛋白具有能够维持细胞骨架稳定、抑制蛋白质变性、恢复变性蛋白原有的空间结构和生物活性的生物功能。目前的研究发现了很多参与昆虫抗逆的基因,其中以热激蛋白基因为主 (Huang *et al.*, 2007), 其次还包括锌指蛋白、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶等 (Krupa *et al.*, 2004; Duan *et al.*, 2008)。

锌指蛋白 (Zinc finger proteins, ZFPs) 通常是指蛋白结构中含有一段自身折叠形成的手指状结构,且常与  $Zn^{2+}$  结合的一类蛋白质。最早的锌指蛋白是在非洲爪蟾卵母细胞中发现的 (Frankel and Pabo, 1988), 之后,许多其他锌指蛋白又被陆续鉴定出来。锌指蛋白在真核生物中广泛分布,通常由半胱氨酸和组氨酸组成,通过与  $Zn^{2+}$  结合来维持结构的稳定性;其结构非常多样,其中绝大多数锌指蛋白为类  $C_2H_2$  锌指、高音谱号锌指、钢卷尺状锌指 (赵楠等, 2009)。锌指蛋白具有许多

不同的功能,包括转录的调节、细胞凋亡的调控、蛋白质折叠和组装以及脂质结合等。随着对锌指结构研究的深入,许多具有新型拓扑结构的锌指蛋白逐渐被人们认识到,这些发现可帮助进一步了解锌指蛋白的生物学功能。例如,通过对经典的  $C_2H_2$  结构的锌指蛋白的深入研究使人们对其与 DNA 结合的机制有了新的认识 (John *et al.*, 2001)。锌指蛋白作为一类转录因子,不仅可以调控基因的表达和细胞的分化,还在动植物抗逆方面发挥重要作用。锌指蛋白能在转录水平上调控,是由于它能与生物大分子结合,或者通过锌指蛋白间的结合,调控基因转录。 $Zn^{2+}$  是影响锌指蛋白功能的关键因素,可以通过锌指结构,使激活子蛋白与增强子序列特异性结合而调节基因的表达。锌指蛋白参与生物体应对多种生物或非生物因素胁迫的抗逆机制 (Giri *et al.*, 2011), 在机体应对高温胁迫时,多个锌指蛋白基因在其转录后调控机制中发挥着重要的作用 (Droll *et al.*, 2013)。

*ZFP37* 是  $C_2H_2$  型锌指蛋白家族中的一员,被认为在转录调控中发挥重要作用。有研究显示,*ZFP37* 主要在成年小鼠睾丸和大脑中表达,这表明其可能在控制小鼠精子生成中发挥潜在的作用 (Payen *et al.*, 1998)。同样的,*ZFP37* 也被发现参与调控猪子宫内膜上皮细胞的凋亡 (Zhang *et al.*, 2019)。现阶段,对于 *ZFP37* 的生物功能的研究多集中在小鼠和哺乳动物的生殖代谢上,在昆虫中的作用鲜见报道。

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 是我国本土蜂种,其生活习性适应了我国多变的自然环境,对于维持我国生态平衡起着重要作用 (Zhang *et al.*, 2014), 相比其他常见蜂种,中华蜜蜂具有抗逆性和抗螨能力强等优势 (曾志将等, 2002; Yang, 2005)。本试验根据之前的研究结果,选取中华蜜蜂在高温胁迫下响应较强的一个基因 *ZFP37*, 对其蛋白结构进行预测分析,研究胁迫温度和胁迫

时间对其表达的影响,以探究中华蜜蜂在遭受热胁迫时 ZFP37 可能发挥的生理功能,为蜜蜂抗热机制的研究提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

试验所需中华蜜蜂由山西农业大学动物科技学院实验蜂场提供,选取健康无病蜂群 3 群。每群各选取 1~2 张老熟的封盖子脾,置于  $34^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  和 RH 75%~80% 条件下孵育。待幼蜂大量出房后,收集出房幼蜂并标记 ( $N=500/\text{群}$ ),将标记的幼蜂放回原蜂群饲养,采集 20 日龄的标记蜜蜂作为试验样品。

### 1.2 温度胁迫

从每群随机选取 300 头标记的 20 日龄工蜂,将蜜蜂随机分为若干组,置于 15 mL 离心管中,每管放置 1 头蜜蜂,离心管上扎有小孔,确保蜜蜂处于设置的温湿度条件下,之后将试验蜜蜂放入恒温恒湿箱中,湿度设置为 RH 30%,温度分别为  $25^{\circ}\text{C}$ 、 $30^{\circ}\text{C}$ 、 $35^{\circ}\text{C}$ 、 $40^{\circ}\text{C}$  和  $45^{\circ}\text{C}$ ,胁迫 2 h。高温不同胁迫时间的处理为:在  $45^{\circ}\text{C}$ , RH 30% 条件下分别胁迫处理 0.5 h、1 h、1.5 h 和 2 h,其中 0 h 处理组的蜜蜂直接采自蜂箱中的标记蜜蜂。处理完成后,随机选择 5 头蜜蜂作为 1 个生物学重复用于提取 RNA,每个处理组包括 3 个生物学重复,立即将蜜蜂投入液氮中,于  $-80^{\circ}\text{C}$  下保存备用。

### 1.3 主要试剂与仪器

Trizol 试剂盒 (Ambion), PrimeScript<sup>TM</sup> RT-PCR reagent Kit 试剂盒 (TaKaRa), SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 试剂盒 (TaKaRa), HWS0358 恒温恒湿箱 (江南仪器厂), Veriti<sup>®</sup> 96 well 梯度 PCR 仪 (ABI), 7500 荧光定量 PCR 仪 (ABI), ND-1000 核酸蛋白测定仪 (Nanodrop), 紫外凝胶成像仪 (BIO-RAD), DYCP-31DN 琼脂糖水平电泳仪, 5810R 高速冷冻离心机 (Eppendorf)。

### 1.4 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

使用 Trizol 试剂盒提取不同样品总 RNA,通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析提取的 RNA 质量,最后将提取的 RNA 反转录为 cDNA。

### 1.5 引物设计

通过东方蜜蜂全基因组测序数据 (NC\_

014295.1), 查找中华蜜蜂 ZFP37 基因序列,根据所得序列的 CDS 区使用 Primer 3 软件设计 RT-qPCR 引物。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因 Gene	引物序列 Primer sequence
ZFP37	F: GCGGATAAGTTGGCTATGGA
	R: CGAGTGAGGCCTCGAATAAG
$\beta$ -actin	F: ACTACGGCCGAACGTGAAAT
	R: GGAAAAGAGCCTCGGGACAA

### 1.6 RT-qPCR 反应

将 cDNA 模板稀释备用,使用 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 试剂盒进行 RT-qPCR 反应。反应体系总体积为 10  $\mu\text{L}$ ,其中包括 5  $\mu\text{L}$  SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II, 1  $\mu\text{L}$  cDNA, 0.2  $\mu\text{L}$  ROX Reference Dye II (50 $\times$ ), 上、下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ , 无菌水 3  $\mu\text{L}$ 。qRT-PCR 热循环程序如下:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s,  $95^{\circ}\text{C}$  变性 5 s,  $60^{\circ}\text{C}$  退火及延伸 34 s, 45 个循环。用  $\beta$ -actin 作为内标基因,每个组织样本重复测定 3 次。

### 1.7 序列分析

通过多种生物信息学软件对中华蜜蜂 ZFP37 的序列进行预测分析,所用各软件如表 2。

### 1.8 数据统计与分析

对于 qRT-PCR 试验结果,根据标准曲线以及荧光曲线的 Ct 值,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法进行数据分析。运用 SPSS 21 软件中的单因素 ANOVA 方法进行数据分析 ( $P < 0.05$ ),正态性检验,方差齐性检验,对于未通过这些检验的数据,使用 Kruskal-Wallis H 检验 ( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 中华蜜蜂 ZFP37 编码蛋白分析

分析中华蜜蜂 ZFP37 基因序列后发现,其开放阅读框 (ORF) 全长 1 413 bp。该基因编码 123 个氨基酸,分子量为 13.7 kDa,其中包含 19 种常见氨基酸,不含 Trp; Lys 含量最高 (8.1%), Tyr 含量最低 (1.6%),等电点为 8.72,脂溶指数为 53.09,平均亲水力为 -0.737,不稳定系数为 39.41。

表 2 生物信息学分析所用软件  
Table 2 Software for bioinformatics analysis

序列性质 Sequence properties	工具 Tool
同源序列比对 Homologous sequence alignment	NCBI
蛋白理化性质 Protein physicochemical properties	Protparam
信号肽结构预测 Signal peptide prediction	SignalP 4.1
跨膜区预测 Transmembrane area prediction	TMHMM 2.0
糖基化位点预测 Glycosylation site prediction	NetNGlyc 1.0
磷酸化位点预测 Phosphorylation site prediction	NetPhos 3.1
蛋白二级结构预测 Protein secondary structure prediction	Predictprotein
蛋白三级结构预测 Protein tertiary structure prediction	Swiss model
进化树构建 Evolutionary tree construction	MEGA 6

## 2.2 中华蜜蜂 ZFP37 的信号肽、跨膜结构、糖基化位点、磷酸化位点预测

中华蜜蜂 ZFP37 信号肽预测结果显示, 其全部氨基酸的 S 值均在阈值以下, 表明其无信号肽区域 (图 1)。跨膜结构预测结果显示中华蜜蜂 ZFP37 各氨基酸的预测值均大于阈值 1, 说明蛋白全部在膜外, 无跨膜结构, 不属于膜蛋白 (图 2)。

蛋白糖基化位点预测结果表明, 该蛋白 Thr<sup>60</sup> 的 O 糖基潜力值高于阈值 0.5 达到 0.756, 说明中华蜜蜂 ZFP37 存在 O 糖基化位点; N-糖基化位点预测显示所有位点潜力值均小于阈值, 未预测到带相应的 N 糖基化位点 (图 3)。蛋白磷酸化位点预测结果表明: 中华蜜蜂 ZFP37 存在磷酸化位点, 且出现在丝氨酸 Ser、苏氨酸 Thr 以及酪氨酸 Tyr 这 3 种氨基酸残基上。包含 12 个磷酸化位点, 分别是 Ser<sup>20</sup>、Thr<sup>21</sup>、Ser<sup>29</sup>、Thr<sup>39</sup>、Thr<sup>60</sup>、Ser<sup>67</sup>、Ser<sup>68</sup>、Tyr<sup>69</sup>、Ser<sup>70</sup>、Tyr<sup>78</sup>、Ser<sup>83</sup>、Ser<sup>107</sup> (图 4)。

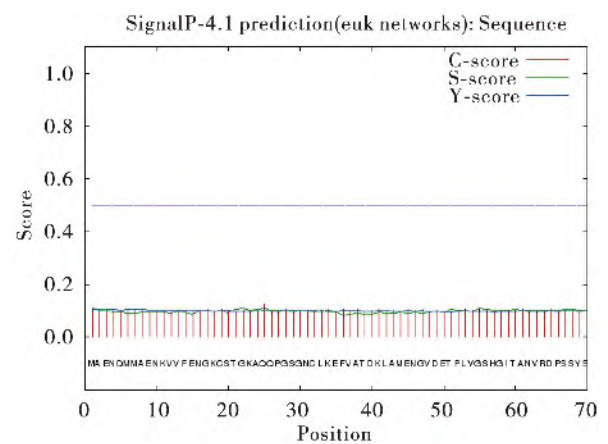


图 1 中蜂 ZFP37 信号肽结构的预测

Fig. 1 Predicted signal peptide of AcerZFP37

## 2.3 中华蜜蜂 ZFP37 蛋白二级结构和三级结构预测

中华蜜蜂 ZFP37 蛋白二级结构的预测结果显示: 中华蜜蜂 ZFP37 的二级结构主要包括 3 种结构:  $\alpha$ 螺旋、股和环, 所占比例分别为 8.13%、10.57% 和 81.3%。而三级结构中主要包括  $\alpha$ 螺旋和  $\beta$  折叠 (图 5)。

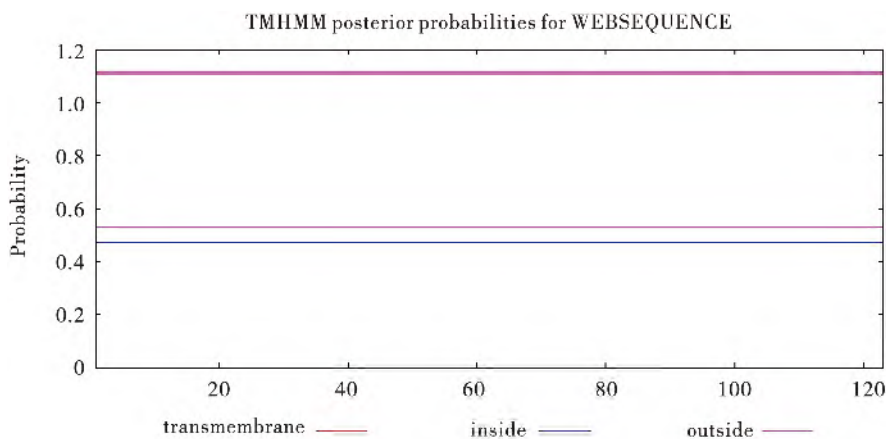


图 2 中蜂 ZFP37 跨膜结构的预测

Fig. 2 Predicted transmembrane regions of AcerZFP37

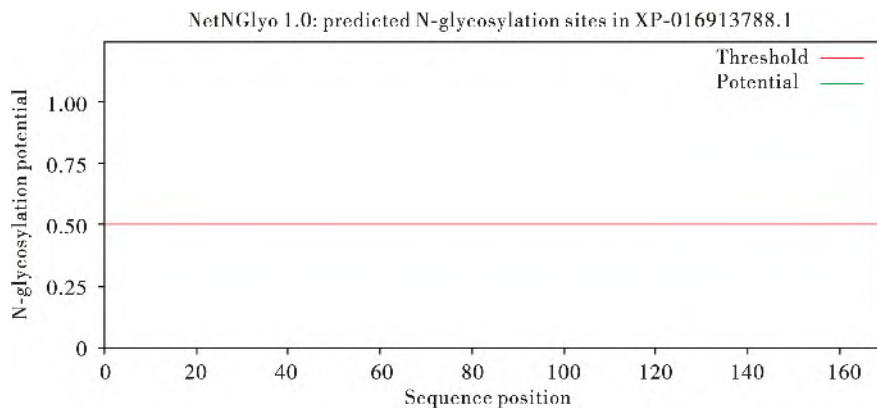


图 3 中蜂 ZFP37 糖基化位点的预测

Fig. 3 Predicted glycosylation of AcerZFP37

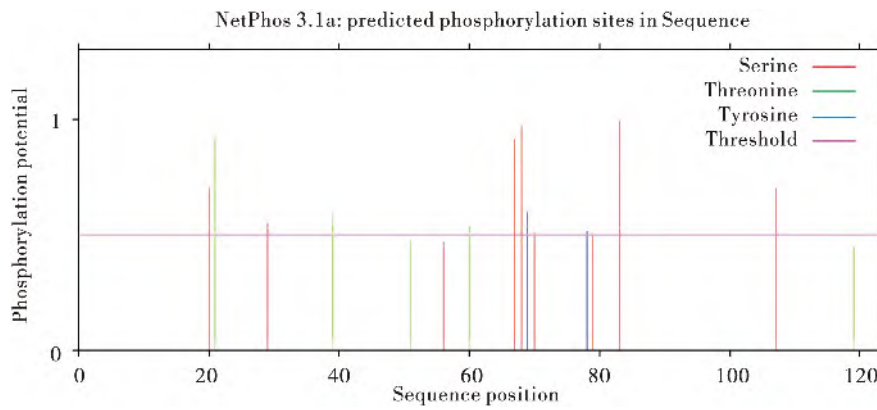


图 4 中蜂 ZFP37 磷酸化位点的预测

Fig. 4 Predicted phosphorylation sites of AcerZFP37

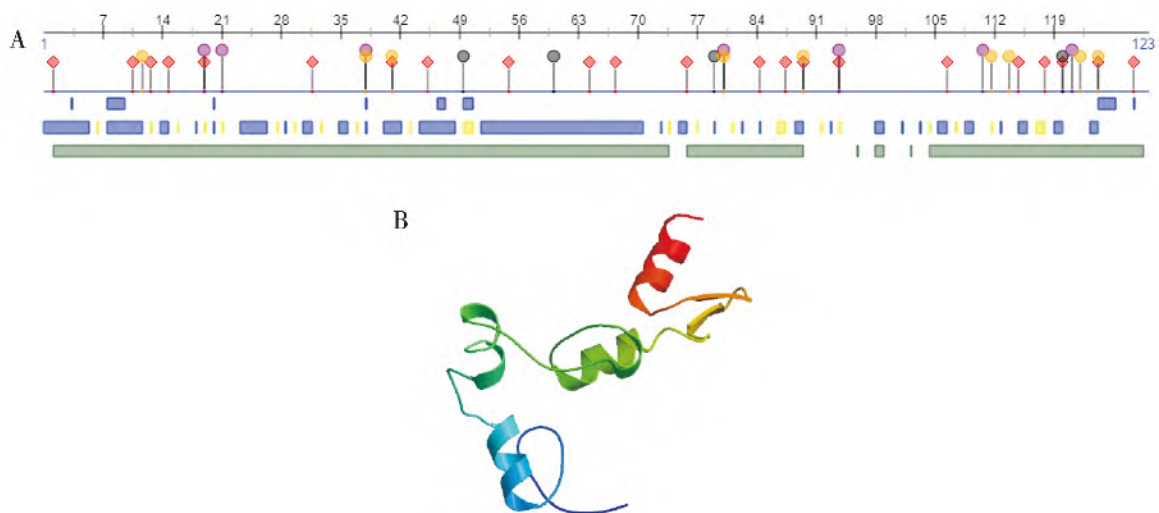


图 5 中蜂 ZFP37 二级结构和三级结构的预测

Fig. 5 Predicted secondary and tertiary structure of AcerZFP37

注: A, 中蜂 ZFP37 的二级结构; B, 中蜂 ZFP37 的三级结构。Note: A, Secondary structure of AcerZFP37; B, Tertiary structure of the AcerZFP37.

## 2.4 中华蜜蜂 *ZFP37* 的进化树分析

根据 NCBI Blast 检索到若干膜翅目昆虫 *ZFP37* 氨基酸序列, 并利用 MEGA 7.0 软件构建包含中蜂在内的系统进化树, 系统进化树结果如图 6, 结果显示: 构建系统进化树所用的昆虫聚类主要分为 3 个分支, 第一分支由中华蜜蜂、大蜜蜂 *Apis dorsata*、迴条蜂 *Habropoda laboriosa*、驼切叶蚁 *Cyphomyrmex costatus* 和切叶蚁 *Acromyrmex echinator* 组成, 第二分支为小蜜蜂 *Apis florea* 和美洲东部熊蜂 *Bombus impatiens*, 而第三分支则为佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus*、欧洲熊蜂 *Bombus terrestris* 和西方蜜蜂 *Apis mellifera*。其中, 中华蜜蜂 *ZFP37* 序列与大蜜蜂的相似性最高, 而与其他膜翅目昆虫的相似性存在差异, 表明其具有较高的变异性。

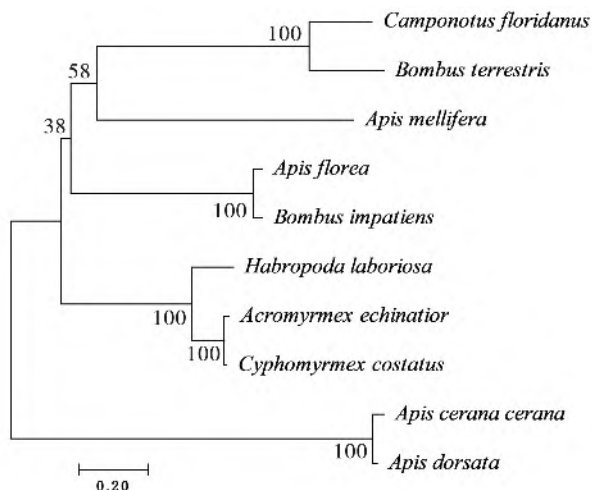


图 6 不同昆虫 *ZFP37* 氨基酸序列所构建的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of *ZFP37* from different insect species based on amino acid sequences

注: 中华蜜蜂, *Apis cerana cerana*, PBC34093. 1; 西方蜜蜂, *Apis mellifera*, XP 006562781. 1; 小蜜蜂, *Apis florea*, XP 003694613. 1; 大蜜蜂, *Apis dorsata*, XP 031367390. 1; 欧洲熊蜂, *Bombus terrestris*, XP 012166515. 1; 美洲东部熊蜂, *Bombus impatiens*, XP 003492637. 1; 佛罗里达弓背蚁, *Camponotus floridanus*, XP 025268432. 1; 迴条蜂, *Habropoda laboriosa*, KOC69890. 1; 驼切叶蚁, *Cyphomyrmex costatus*, KYN01212. 1; 切叶蚁, *Acromyrmex echinator*, EGI62930. 1。

## 2.5 不同温度胁迫对中华蜜蜂 *ZFP37* 表达的影响

中华蜜蜂 (20 日龄成蜂) 暴露于不同温度下

(25℃、30℃、35℃、40℃ 和 45℃) 2 h, *ZFP37* 在不同温度下的 mRNA 相对表达量会受高温胁迫的影响, 不同温度处理间的表达存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), *ZFP37* 的表达模式, 从 25℃ 至 45℃ 间总体上表现出前低后高的趋势, 高温处理能使 *ZFP37* 表达上调, 尤其是 45℃ 处理组。 *ZFP37* 在 45℃ 时表达量最高, 且显著高于其他处理组 ( $P < 0.05$ )。

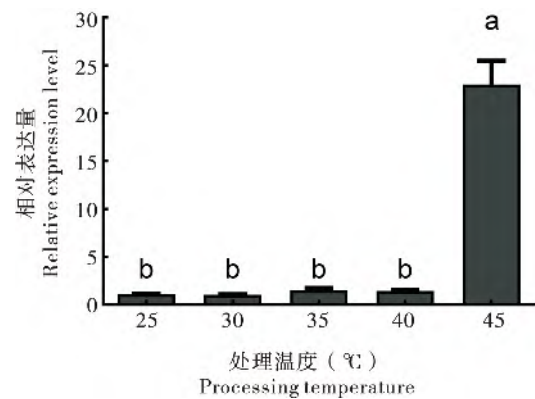


图 7 中华蜜蜂 *ZFP37* 在不同温度下的 mRNA 相对表达量

Fig. 7 Relative expression levels of *ZFP37* mRNA

in response to different temperature treatments

注: 图中数据为平均值 ± 标准误; 柱上不同的字母表示不同温度处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。Note: Data were mean ± SE. Different letters above bars indicated significant difference at the 0.05 level between different temperature treatments. Same below.

## 2.6 不同胁迫时间对中华蜜蜂 *ZFP37* 表达的影响

中华蜜蜂 (20 日龄成蜂) 暴露于 45℃ 不同处理时间下 (0 h、0.5 h、1 h、1.5 h 和 2 h), *ZFP37* 在不同处理时间下的 mRNA 相对表达量会受高温胁迫时间的影响, 不同胁迫时间处理组的表达存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), *ZFP37* 的表达模式从 0 h 至 2 h 间总体上表现出前低后高的趋势, 说明处理时间的延长能使 *ZFP37* 表达上调。 *ZFP37* 在 1.5 h 表达水平最高, 显著高于 0 h 和 1 h 处理组 ( $P < 0.05$ ), 0 h 表达量最低, 且显著低于其他处理组 ( $P < 0.05$ )。

## 3 结论与讨论

锌指蛋白作为一类具有锌指结构的转录因子在真核生物中分布十分广泛, 在动植物、酵母等

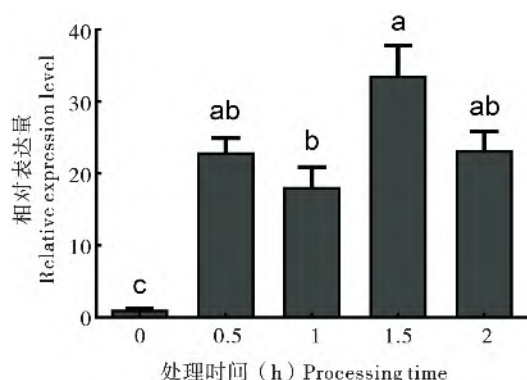


图8 中华蜜蜂 *ZFP37* 在不同胁迫时间下的 mRNA 相对表达量

Fig. 8 Relative expression levels of *ZFP37* mRNA in response to different process time

真菌中都有发现 (Cao *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2018)。锌指蛋白参与生命调控的方式主要是与 DNA、RNA 或蛋白质进行结合, 之后在转录水平或翻译水平上对相关生命活动进行调控。研究发现锌指蛋白能够参与到生物的基因调控、细胞分化、胚胎发育、应激反应等生命过程 (Nakashima *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2016; Imbeault *et al.*, 2017)。动植物在环境压力胁迫下, 其体内多个调控蛋白的基因会表达增加, 进而调控下游效应基因, 改变机体的生理代谢并引发相应的应激反应, 帮助生物体应对环境胁迫 (Hranitz *et al.*, 2010; Škerl *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; Guan *et al.*, 2016)。本研究发现中华蜜蜂 *ZFP37* 无跨膜结构域, 不属于膜蛋白, 这一结果也与其转录因子的身份相对应。通过序列比对发现中华蜜蜂 *ZFP37* 的序列与蜜蜂科昆虫的相似性最高, 而与其他膜翅目昆虫相似性存在差异, 这可能与昆虫的生活环境和习性有关。

蜜蜂在面对各种环境胁迫时会作出相应的应激反应, 其中合成抗逆蛋白是最主要的抗逆方式, 常见的抗逆蛋白主要有热激蛋白和锌指蛋白等。而研究发现, 昆虫遭受温度胁迫后, 一些抗逆基因的高表达能提高昆虫耐受性, 在众多抗逆基因中, 热激蛋白基因家族发挥着极其重要的作用, 在多种应激条件下机体产生的热激蛋白可以显著提高生物的耐受性 (Huang *et al.*, 2007)。锌指蛋白的转录调控作用在昆虫响应环境胁迫中发挥重要作用 (Andrew *et al.*, 2006), 因此, 锌指蛋白是帮助生物体应对各类胁迫的重要抗逆蛋白, 在生物体抗逆过程中的调控作用一直受到研究者的关注。

本研究结果表明 *ZFP37* 在不同温度下的表达模式存在显著差异, 在 45℃ 处理下表达水平最高, 说明高温能显著提高 *ZFP37* 的表达水平, 中华蜜蜂 *ZFP37* 的表达受高温胁迫的诱导, *ZFP37* 能对高温胁迫做出快速的响应。同样的, 高温下不同胁迫时间的处理结果显示, 中华蜜蜂 *ZFP37* 的表达受胁迫时间的诱导, 长时间的高温胁迫可以导致 *ZFP37* 表达增加。因此在高温胁迫下, 多个锌指蛋白基因被激活, 其中既有表达上调的, 也有表达下调的, 推断 *ZFP37* 的活化可能是蜜蜂调节耐受性的一项重要机制。参考对意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* *ZFP37* 的研究结果, 发现两者 *ZFP37* 的氨基酸组成及蛋白各项理化性质非常相似, 中华蜜蜂和意大利蜜蜂的 *ZFP37* 均无信号肽区域, 都属于无跨膜结构的膜外蛋白, 都含有相应的 O 糖基化位点和磷酸化位点, 且两者的二、三级结构也较为相似, 这一结果也与两者亲缘关系较近这一情况相对应。本研究认为 *ZFP37* 在中华蜜蜂和意大利蜜蜂体内的作用是相似的, 都可能参与了蜜蜂抗逆过程的代谢调节。蜜蜂调节耐受性的一项重要机制锌指蛋白对蜜蜂的耐热性具有重要的调节作用, 但其具体的调节机制仍不清楚, 还需要进一步的深入研究。

#### 参考文献 (References)

- Andrew CJ, Bo G, Thomas JC, *et al.* Controlling gene expression in *Drosophila* using engineered zinc finger protein transcription factors [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 348 (3): 873–879.
- Bauerfeind SS, Fischer K. Simulating climate change: Temperature extremes but not means diminish performance in a widespread butterfly [J]. *Population Ecology*, 2013, 56 (1): 239–250.
- Cao H, Huang P, Zhang L, *et al.* Characterization of 47 Cys2His2 zinc finger proteins required for the development and pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. *New Phytologist*, 2016, 211 (3): 1035–1051.
- Colinet H, Rinehart JP, Yocum GD, *et al.* Mechanisms underpinning the beneficial effects of fluctuating thermal regimes in insect cold tolerance [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2018, 221 (14): jeb164806.
- Droll D, Minia I, Fadda A, *et al.* Post-transcriptional regulation of the trypanosome heat shock response by a zinc finger protein [J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9 (4): e1003286.
- Du Y, Ma CS, Zhao QH, *et al.* Effects of heat stress on physiological and biochemical mechanisms of insects: A literature review [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27 (4): 1565–1572. [杜尧, 马春森, 赵清华, 等. 高温对昆虫影响的生理生化作用机理研究进

- 展 [J]. 生态学报, 2007, 27 (4): 1565 - 1572]
- Duan J, Xia QY, Cheng DJ, et al. Species - specific expansion of C2H2 zinc - finger genes and their expression profiles in silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 38 (12): 1121 - 1129.
- Feder ME, Hofmann GE. Heat - shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology [J]. *Annual Review of Physiology*, 1999, 61 (1): 243 - 282.
- Frankel AD, Pabo CO. Fingering too many proteins [J]. *Cell*, 1988, 53 (5): 675.
- Giri J, Vij S, Dansana PK, et al. Rice A20/AN1 zinc-finger containing stress-associated proteins (SAP1/11) and a receptor-like cytoplasmic kinase (OsRLCK253) interact via A20 zinc-finger and confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *New Phytologist*, 2011, 191 (3): 721 - 732.
- Guan QJ, Ma HY, Wang ZJ, et al. A rice LSD1-like-type ZFP gene OsLLO5 enhances saline-alkaline tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*, yeast and rice [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17 (1): 142.
- Hranitz JM, Abramson CI, Carter RP. Ethanol increases HSP70 concentrations in honeybee (*Apis mellifera* L.) brain tissue [J]. *Alcohol*, 2010, 44 (3): 275 - 282.
- Huang LH, Chen B, Kang L. Impact of mild temperature hardening on thermotolerance, fecundity, and Hsp gene expression in *Liriomyza huidobrensis* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2007, 53 (12): 1199 - 1205.
- Imbeault M, Helleboid PY, Trono D. Krab zinc-finger proteins contribute to the evolution of gene regulatory networks [J]. *Nature*, 2017, 543 (7646): 550 - 554.
- Jang JC. Arginine-rich motif-tandem CCCH zinc finger proteins in plant stress responses and post-transcriptional regulation of gene expression [J]. *Plant Science*, 2016, 252: 118 - 124.
- John HL, Brian ML, Peter EW. Zinc finger proteins: New insights into structural and functional diversity [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 11 (1): 39 - 46.
- Kiuchi T, Aoki F, Nagata M. Effects of high temperature on the hemocyte cell cycle in silkworm larvae [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2008, 54 (2): 454 - 461.
- Krupa A, Preethi G, Srinivasan N. Structural modes of stabilization of permissive phosphorylation sites in protein kinases: Distinct strategies in Ser/Thr and Tyr kinases [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 339 (5): 1025 - 1039.
- Liu ZH, Xi DM, Kang MJ, et al. Molecular cloning and characterization of Hsp27.6: The first reported small heat shock protein from *Apis cerana cerana* [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2012, 17 (5): 539 - 551.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation [J]. *Cell*, 2002, 108 (1): 17 - 29.
- Payen E, Verkerk T, Michalovich D, et al. The centromeric/nucleolar chromatin protein ZFP-37 may function to specify neuronal nuclear domains [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273 (15): 9099 - 9109.
- Škerl MIS, Gregorc A. Heat shock proteins and cell death in situ localization in hypopharyngeal glands of honeybee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment [J]. *Apidologie*, 2010, 41 (1): 73 - 86.
- Yang GH. Harm of introducing the western honeybee *Apis mellifera* L. to the Chinese honeybee *Apis cerana* F. and its ecological impact [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2005, 48 (3): 401 - 406.
- Yuan S, Li X, Li R, et al. Genome-wide identification and classification of soybean C2H2 zinc finger proteins and their expression analysis in legume-rhizobium symbiosis [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 126.
- Zeng ZJ. Beekeeping [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002. [曾志将. 养蜂学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002]
- Zhang K, Ge L, Dong S, et al. Global miRNA, lncRNA, and mRNA transcriptome profiling of endometrial epithelial cells reveals genes related to porcine reproductive failure caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1221.
- Zhang Y, Liu Y, Guo X, et al. sHsp22.6, an intronless small heat shock protein gene, is involved in stress defence and development in *Apis cerana cerana* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 53: 1 - 12.
- Zhao N, Zhao F, Li YH. Advances in research on zinc finger protein [J]. *Letters in Biotechnology*, 2009, 20 (1): 131 - 134. [赵楠, 赵飞, 李玉花. 锌指蛋白结构及功能研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2009, 20 (1): 131 - 134]