

棉铃虫 *YTHDF1* 基因的表达模式 及在核型多角体病毒感染中的作用

申忠健 刘彦君 祝琳 田志强 刘孝明 刘小侠*

(中国农业大学植物保护学院昆虫学系, 北京 100193)

摘要: 为明确 N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m⁶A)修饰在棉铃虫核型多角体病毒(*Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus, HearNPV)感染棉铃虫中的作用,根据基因组和转录组数据,对棉铃虫 m⁶A 结合蛋白基因 *YTHDF1* (YTH domain-containing family protein 1) 进行鉴定和分析,利用实时荧光定量 PCR 技术检测棉铃虫 *YTHDF1* 基因的时空表达模式、HearNPV 处理后的表达变化情况以及 RNA 干扰效率,并调查该基因下调后对 HearNPV 复制及感染 HearNPV 棉铃虫死亡情况的影响。结果显示,棉铃虫 *YTHDF1* 基因开放阅读框全长为 2 019 bp,编码 672 个氨基酸,含有 1 个保守的 YTH 结构域,其氨基酸序列与斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 同源物序列一致性达 87.52%。*YTHDF1* 基因在棉铃虫不同发育阶段均有表达,其中在进入 5 龄期 24 h 幼虫中的表达量最高,在 2 龄取食期幼虫中的表达量最低。*YTHDF1* 基因的空间表达谱呈现一定的组织特异性,在幼虫血细胞和成虫头部的表达量最高。HearNPV 感染棉铃虫后 *YTHDF1* 基因上调表达,经 RNA 干扰使该基因下调后显著抑制了 HearNPV 多角体蛋白基因 *polyhedrin* 的表达并延迟了感染 HearNPV 棉铃虫的死亡时间。表明 *YTHDF1* 基因在 HearNPV 感染棉铃虫的过程中发挥着重要作用。

关键词: 棉铃虫; m⁶A; RNA 干扰; 功能分析

The expression pattern of *YTHDF1* in cotton bollworm *Helicoverpa armigera* and its role in the infection of nucleopolyhedrovirus

Shen Zhongjian Liu Yanjun Zhu Lin Tian Zhiqiang Liu Xiaoming Liu Xiaoxia*

(Department of Entomology, College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: In order to investigate the function of N6-methyladenosine (m⁶A) modification in cotton bollworm *Helicoverpa armigera* infected by *H. armigera* nucleopolyhedrovirus (HearNPV), YTH domain-containing family protein 1 (*YTHDF1*), a m⁶A binding protein, was identified and analyzed based on genome and transcriptome data. Quantitative real-time PCR was used to detect the temporal and spatial expression patterns, the expression level changes after HearNPV treatment, and the RNA interference efficiency of *YTHDF1* gene in *H. armigera*. Furthermore, the effects of *YTHDF1* knockdown on HearNPV replication and mortality of *H. armigera* infected by HearNPV were investigated. The results showed that the open reading frame of *YTHDF1* gene in *H. armigera* was 2 019 bp, encoding 672 amino acids, which contained a conserved YTH domain. Homology and phylogenetic analyses showed that the amino acid sequence of *YTHDF1* had the highest identity (87.52%) with that of *Spodoptera litura*. The results of temporal transcript profiling indicated that the *YTHDF1* gene was expressed in different developmental stages of *H. armigera*, and the expression level was the highest at 24 h after entering the 5th

instar, while the expression level was the lowest in the feeding period of the 2nd instar larvae. *YTHDF1* was specifically expressed in different tissues of *H. armigera*, mainly in larval hemocytes and adult heads. In addition, the expression of the *YTHDF1* gene in *H. armigera* was upregulated by HearNPV infection; the expression of *polyhedrin* was inhibited, and the death time of *H. armigera* infected by HearNPV was delayed after knockdown of the gene. These results confirmed that *YTHDF1* plays an important role in the process of HearNPV infecting *H. armigera*.

Key words: *Helicoverpa armigera*; m⁶A; RNA interference; function analysis

目前已知的RNA修饰超过100多种,化学修饰在真核生物转录后调控中起着至关重要的作用(Nachtergaele & He, 2018)。N⁶-甲基腺苷(N⁶-methyladenosine, m⁶A)被认为是真核生物mRNA、长链非编码RNA以及病毒RNA中最常见的内部修饰形式(Roundtree et al., 2017; Coker et al., 2019)。m⁶A功能的行使由甲基转移酶、去甲基化酶以及结合蛋白所决定。目前发现的甲基转移酶复合物主要成分包括METTL3(methyltransferase like 3)(Liu et al., 2014)、METTL14(methyltransferase like 14)(Liu et al., 2014)、WTAP(Wilms' tumor 1-associated protein)(Ping et al., 2014)和KIAA1429(vir-like m⁶A methyltransferase-associated protein)(Schwartz et al., 2014)等;去甲基化酶主要为FTO(fat mass and obesity-associated protein)和ALKBH5(α -ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog 5)(Zheng et al., 2013);而实现m⁶A生物学功能的结合蛋白主要是YTHDF1-3(YTH N⁶-methyladenosine RNA binding protein 1-3)和YTHDC1-2(YTH domain containing 1-2)等含有YT521-B同源结构域蛋白(Meyer & Jaffrey, 2017; Li et al., 2020a)。研究发现,在RNA病毒的基因组和DNA病毒的转录物中存在m⁶A修饰,并且在病毒感染中起着至关重要的作用(Tan & Gao, 2018),m⁶A修饰能够增强人体免疫缺陷病毒1型(human immunodeficiency virus 1, HIV-1)本身的复制和出核能力(Lichinchi et al., 2016)。在拟南芥中,抑制*ALKBH9B*的表达增加了苜蓿花叶病毒(alfalfa mosaic virus, AMV)的m⁶A水平,加剧了AMV的入侵能力(Martínez-Pérez et al., 2017)。表明m⁶A可以影响病毒的侵染能力。

棉铃虫*Helicoverpa armigera*属鳞翅目夜蛾科,是广泛分布在世界各地的杂食性害虫,对棉花、玉米和蔬菜等多种农作物的生产,造成了巨大的经济损失(Wu et al., 2008)。自1997年以来,转Bt棉花的种植有效控制了棉铃虫种群数量,但Cao et al.(2014)研究发现棉铃虫可以通过遗传变异对Bt产生抗性。

此外,随着内陆转基因棉花种植数量的减少,棉铃虫对小麦和玉米等作物的为害逐渐加重(Li et al., 2020b),亟需一种安全、高效的绿色防控方法。棉铃虫核型多角体病毒(*Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus, HearNPV)是防治棉铃虫的专性生物杀虫剂,虽对环境友好但杀虫效果缓慢。因此,了解HearNPV的侵染机制,对研究提升HearNPV杀虫效果有着重要意义。

为揭示m⁶A在HearNPV侵染棉铃虫中的功能,本研究结合棉铃虫基因组和本实验室已有的转录组数据,获得棉铃虫*YTHDF1*基因序列,利用实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)技术测定该基因的时空表达模式和在HearNPV侵染后的表达变化情况,并利用RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术使该基因下调后检测其对HearNPV侵染棉铃虫的影响,以期为进一步研究m⁶A调控HearNPV侵染棉铃虫的机制提供基础依据,同时为开发病毒杀虫辅助剂提供素材。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫及病毒:棉铃虫由中国农业大学害虫综合治理实验室采用人工饲料(Zhao et al., 1998)长期饲养,饲养条件为温度(26±1)℃、光周期16 L:8 D、相对湿度(75±10)%,从3龄起单头饲养在5.5 cm×2.0 cm玻璃管中。5×10¹¹ OBs/g棉铃虫核型多角体病毒原粉购自河南济源白云实业有限公司,用ddH₂O稀释至1×10⁸ OBs/mL,于4℃储存备用。

试剂及仪器:RNA抽提试剂TRIzol reagent、Taq DNA聚合酶、DL2000 Marker、SYBR Primer Script RT-PCR Kit荧光定量试剂盒、PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser反转录试剂盒,日本TaKaRa公司;MEGAscript™ T7 Kit试剂盒,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;PCR产物纯化试剂盒,美国Axygen公司;其他试剂均为国产或进口分析纯。T100™热循环PCR仪、CFX Connect Real Time Sys-

tem, 美国 Bio-Rad 公司; Nanodrop 2000 核酸蛋白浓度检测仪、Thermal Cycler ST17R 台式冷冻离心机, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; DYY-6C 型电泳仪, 北京六一科技生物有限公司; 1600 凝胶图像处理系统, 上海天能生命科学有限公司。

1.2 方法

1.2.1 棉铃虫 *YTHDF1* 基因的鉴定与序列分析

根据 NCBI 数据库中棉铃虫基因组数据(登录号为 LOC110371141)和本实验已有的转录组数据筛选出棉铃虫 *YTHDF1* 基因序列。利用 DNAClub 软件将棉铃虫 *YTHDF1* 基因序列翻译成氨基酸序列, 借助 NCBI 数据库中的 BLASTP 程序进行比对, 根据比对结果对获得的序列进行初步鉴定, 同时获取其他同源物蛋白序列。利用 DNAMAN 软件进行氨基酸多重联配分析, 采用 MAGE 5.10 软件对棉铃虫 *YTHDF1* 基因序列和其他下载的相关序列以邻接法构建系统进化树, 1 000 次 bootstrap 检测。棉铃虫 *YTHDF1* 基因编码蛋白的其他理化性质利用 ProtParam tool 在线程序(<http://web.expasy.org/protparam/>)进行分析。

1.2.2 棉铃虫 *YTHDF1* 基因的时空表达谱分析

为检测 *YTHDF1* 基因在棉铃虫不同发育时期的表达情况, 分别收集卵、1~4 龄取食期幼虫、1~4 龄蜕皮期幼虫、进入 5 龄期不同时间(0、24、48、72、96、120 h)幼虫、进入蛹期不同时间(0、1、3、5、7、9 d)蛹以及羽化第 1 天成虫, 每个样品取 3 次生物学重复。为检测 *YTHDF1* 基因在幼虫和成虫不同组织中的表达情况, 解剖进入 5 龄期 48 h 的幼虫取中肠、表皮、血细胞、脂肪体、马氏管、唾液腺, 再选择羽化第 2 天未交配的棉铃虫雌雄成虫, 分别解剖获得头、胸、腹、足、翅, 每个样品取 3 次生物学重复。所取样品用液氮速冻后, 于 -80℃ 保存备用。

将收集的棉铃虫样品加入高温灭菌的均浆研磨器中, 分别加入适量 TRIzol 进行研磨, 参照 TRIzol 试剂说明书提取样品的 RNA。用核酸蛋白浓度检测仪测定 RNA 浓度及纯度, 要求 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 的值在 1.9~2.0 之间为合格。根据 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒说明书, 以提取的各样品 1 μg RNA 为模板合成 cDNA 第一链, 并于 -80℃ 储存备用。

根据 *YTHDF1* 基因序列, 利用 Primer 3 Input 在线软件和 DNAMAN 软件设计特异性引物 *HaYTHDF1*-F (5'-CGATTTAGAGGATGACGG-3')/*HaYTHDF1*-R (5'-GGTCTGTTGTAATCACGG-3'), 采用

qPCR 技术分析 *YTHDF1* 基因在棉铃虫不同发育时期和不同组织中的表达水平, 以棉铃虫 *RPL32* 基因作为内参基因, 引物为 *RPL32*-F (5'-CATCAATCGGATCGCTATG-3')/*RPL32*-R (5'-CCATTGGGTAGCATGTGAC-3')。所有引物均由北京擎科生物技术有限公司合成。20 μL qPCR 反应体系: 2 $\times$ SYBR Green Supermix 10 μL 、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 正反向引物各 1 μL 、50 ng/ μL cDNA 模板 1 μL 、RNase-Free ddH₂O 7 μL 。反应条件: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火和延伸 30 s, 共 40 个循环。每个处理重复 3 次。*YTHDF1* 基因的荧光定量结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析。

1.2.3 HearNPV 侵染棉铃虫后 *YTHDF1* 基因表达测定

选用大小一致的棉铃虫 3 龄末幼虫, 经饥饿过夜处理后, 按照 Zhang et al. (2015) 喂毒方法, 将蜕皮至 4 龄第 1 天的幼虫接种 5 μL 浓度为 1×10^8 OBs/mL 的 HearNPV, 以接种等量无菌水的棉铃虫为对照。分别于接种后 48 h 和 72 h 进行取样, 每个样品至少取样 8 头, 3 次生物学重复。所有样品经液氮速冻后, 于 -80℃ 保存备用。RNA 提取、cDNA 合成以及 qPCR 检测方法同 1.2.2。

1.2.4 *YTHDF1* 基因对 HearNPV 侵染棉铃虫的作用分析

RNA 干扰效率测定: 根据 *YTHDF1* 基因序列设计 5' 端含 T7 启动子的 dsRNA 引物 *dsHaYTHDF1*-F (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTTCGTGTAAGGTGGATCT-3')/*dsHaYTHDF1*-R (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAATAGTTGCGTGAGTCCCGAT-3')。经 PCR 扩增和 PCR 产物纯化后获得合成 dsRNA 的模板, 20 μL PCR 反应体系: PCR Master Mix 10 μL 、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 正反向引物各 1 μL 、50 ng/ μL cDNA 模板 1 μL 、RNase-Free ddH₂O 7 μL 。反应条件: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 共 35 个循环。按照 PCR 产物纯化试剂盒中说明书进行产物纯化。*YTHDF1* 的 dsRNA 合成按照 MEGAScript™ T7 Kit 试剂盒说明书进行, 40 μL 反应体系: 10 $\times$ T7 Reaction Buffer 4 μL 、ATP Solution 4 μL 、CTP Solution 4 μL 、GTP Solution 4 μL 、UTP Solution 4 μL 、T7 Enzyme Mix 4 μL 、Linear Template DNA 1~2 μg 、Nuclease-free Water 补足 40 μL 。反应条件: 37℃ 反应 12 h, 75℃ 孵育 5 min, 然后自然冷却至室温。合成的 *YTHDF1* dsRNA 用核酸蛋白浓度检测仪测定浓度, 并通过 2% 琼脂糖凝胶电泳验证其特异性。挑选大小一致的进入 5 龄期 24 h 幼虫, 利用显微注射器从第 1 对腹足向虫体内

注射 15 μg *YTHDF1* 的 dsRNA, 以注射等量 *EGFP* 的 dsRNA 为对照, 扩增引物为 dsEGFP-F (5'-TAATAC-GACTCACTATAGGGAGACCTGAAGTTCATCTG-CACCAC-3')/dsEGFP-R (5'-TAATACGACTCACTA-TAGGGAGACTCCAGCAGGACCATGTGATC-3'), 反应体系和反应程序同 *YTHDF1* 的 dsRNA 合成。分别于注射后 24、48 和 72 h 收集样品, 经液氮速冻后于 -80°C 保存, 用于 qPCR 检测 RNA 干扰效率。棉铃虫 RNA 提取、cDNA 合成及 qPCR 检测方法同 1.2.2。

YTHDF1 基因对 HearNPV 复制的影响: 采用 HearNPV 编码的多角体蛋白基因 *polyhedrin* 的表达来反应 HearNPV 的复制情况, *polyhedrin* 基因扩增引物为 F (5'-CAAACCGAACC GTTGTACC-3')/R (5'-TGCAAGTTCATAACGGGAC-3')。首先挑选大小一致的棉铃虫 4 龄幼虫, 接种 HearNPV, 方法同 1.2.3, 然后加入正常人工饲料并在幼虫生长至 5 龄第 1 天后, 注射 15 μg *YTHDF1* 基因的 dsRNA, 48 h 后收集样品, 经液氮速冻后于 -80°C 保存, 用于 *polyhedrin* 基因的 qPCR 检测。棉铃虫 RNA 提取、cDNA 合成及 qPCR 检测方法同 1.2.2。

YTHDF1 基因干扰后对感染 HearNPV 棉铃虫死亡率的影响: 首先挑选大小一致的棉铃虫 4 龄幼虫, 接种 HearNPV, 方法同 1.2.3, 接种 6 h 后再注射约 10 μg *YTHDF1* 的 dsRNA, 然后待感病棉铃虫长至 5 龄期第 1 天后再注射 15 μg *YTHDF1* 的 dsRNA, 并每天观察感染 HearNPV 棉铃虫的死亡情况并统计存活数, 以注射等量 *EGFP* 的 dsRNA 为对照, 每个处理至少 30 头幼虫。通过 *polyhedrin* 基因的表达水平和感染 HearNPV 棉铃虫的存活曲线来明确 *YTHDF1* 基因在 HearNPV 侵染棉铃虫中的作用。

1.3 数据分析

利用 SPSS 21.0 软件对试验数据进行统计分析, 应用 Tukey's HSD 法检验 *YTHDF1* 基因在棉铃虫不同发育阶段和不同组织中相对表达量的差异显著性, 使用 *t* 测验法对 *YTHDF1* 基因在 HearNPV 处理后的相对表达量、RNA 干扰效率以及 *polyhedrin* 基因相对表达量进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫 *YTHDF1* 基因序列分析

根据棉铃虫基因组数据, 结合本实验室的转录组数据比对得到棉铃虫 *YTHDF1* 基因序列, 其开放阅读框全长为 2 019 bp, 编码 672 个氨基酸, 预测的

蛋白分子质量为 74.9 kD。除包含 1 个 YTH 功能结构域外, 剩余的为富含 Q、N、P 氨基酸残基的结构简单的大分子蛋白质(图 1-A)。氨基酸多重联配的结果显示, *YTHDF1* 基因编码的氨基酸序列与斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*、烟草天蛾 *Manduca sexta*、粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 的相关序列的相似度分别为 87.52%、77.6% 和 77.45% (图 1-B)。基于不同种昆虫 YTHDF 的氨基酸同源序列构建系统发育树, 发现棉铃虫 *YTHDF1* 基因与斜纹夜蛾相关序列亲缘关系较近, 并与所选的鳞翅目昆虫 YTHDF 聚为一支, 与鞘翅目赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的 YTHDF 亲缘关系较远(图 2)。

2.2 *YTHDF1* 基因在棉铃虫不同发育阶段的表达

YTHDF1 基因在棉铃虫不同发育阶段均有表达, 其中在进入 5 龄期 24 h 幼虫中的相对表达量最高, 在卵、4 龄取食期幼虫、进入 5 龄期 96 h 幼虫、进入蛹期第 1 天和第 9 天蛹中的相对表达量次之, 而在 2 龄取食期幼虫中的相对表达量最低(图 3)。

2.3 *YTHDF1* 基因在棉铃虫幼虫和成虫组织内的表达

YTHDF1 基因在棉铃虫幼虫和雌雄成虫各组织中均有表达, 在幼虫血细胞中的相对表达量最高, 显著高于其他幼虫组织中的相对表达量(图 4-A)。*YTHDF1* 基因在雌、雄成虫各组织中的表达模式基本一致, 在头和胸部的相对表达量最高, 显著高于其他成虫组织中的相对表达量(图 4-B~C), 而在雄成虫腹部的相对表达量最低(图 4-C)。

2.4 HearNPV 侵染对 *YTHDF1* 基因表达的影响

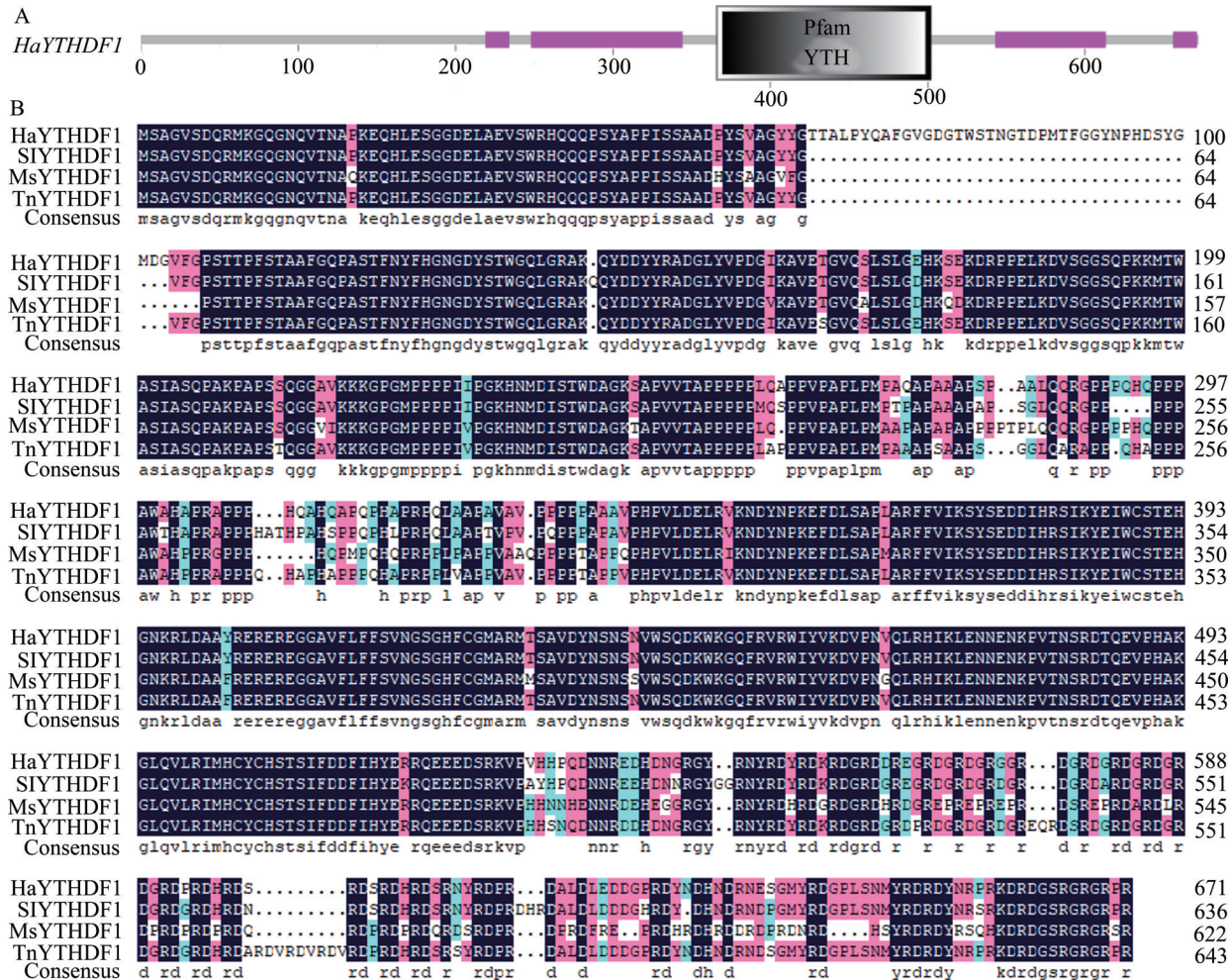
qPCR 检测结果表明, *YTHDF1* 基因在棉铃虫接种 HearNPV 后 48 h 和 72 h 的相对表达量显著升高, 表明 HearNPV 侵染棉铃虫后 *YTHDF1* 基因上调表达, 表明该基因可能在 HearNPV 侵染棉铃虫过程中发挥着重要作用(图 5)。

2.5 RNA 干扰 *YTHDF1* 基因对 HearNPV 侵染的影响

棉铃虫 *YTHDF1* 基因在注射 dsRNA 后 24 h 和 48 h 的相对表达量显著降低, RNA 干扰的抑制率分别为 39.25% 和 21.1% (图 6-A)。进一步检测感染 HearNPV 棉铃虫注射 dsRNA 后的 *YTHDF1* 基因干扰效率及基因下调后对 HearNPV 复制的影响, 发现 *YTHDF1* 基因的相对表达量在注射 dsRNA 48 h 后显著下调, 并且 *YTHDF1* 基因下调显著抑制了 *polyhedrin* 基因的表达, 表明 *YTHDF1* 基因可能影响 HearNPV 的复制(图 6-B)。幼虫存活曲线显示, 当 *YTHDF1* 基因下调后, 感染 HearNPV 棉铃虫前 5 d 的存活率几乎未变, 维持在较高水平, 而对照组感染

HearNPV 棉铃虫的存活率随着时间推移而不断下降。虽然感染 HearNPV 棉铃虫的最终存活率与对

照无显著差异,但 *YTHDF1* 基因下调推迟了感染 HearNPV 棉铃虫的死亡时间(图 6-C)。



HaYTHDF1: 棉铃虫 *YTHDF1* (XP_021182967.1); *SIYTHDF1*: 斜纹夜蛾 *YTHDF1* (XP_022818626.1); *MsYTHDF1*: 烟草天蛾 *YTHDF1* (XP_030027673.1); *TnYTHDF1*: 粉纹夜蛾 (XP_026726300.1); Consensus: 共有序列。黑色区域代表相似度为 100%, 粉红色区域代表相似度大于 75%, 浅蓝色区域代表相似度大于 50%。HaYTHDF1: *YTHDF1* of *Helicoverpa armigera* (XP_021182967.1); *SIYTHDF1*: *YTHDF1* of *Spodoptera litura* (XP_022818626.1); *MsYTHDF1*: *YTHDF1* of *Manduca sexta* (XP_030027673.1); *TnYTHDF1*: *YTHDF1* of *Trichoplusia ni* (XP_026726300.1); Consensus: consensus sequence. Black areas indicate 100% similarity; pink areas indicate more than 75% similarity, and blue areas indicate 50% similarity.

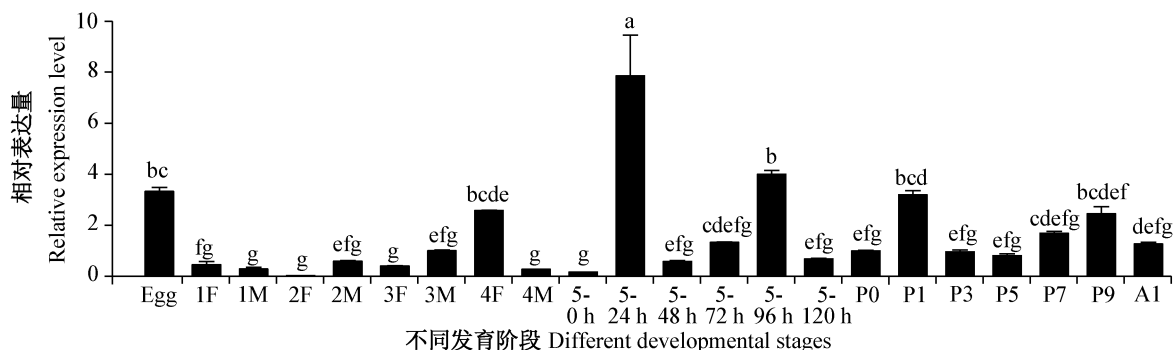
图 1 棉铃虫 *YTHDF1* 基因结构域分析(A)及与其他昆虫同源物的氨基酸序列多重联配分析(B)

Fig. 1 Analysis of conserved domains of *YTHDF1* (A), and amino acid sequence multiple alignment of *YTHDF1* with other insect homologs (B)



图 2 基于 *YTHDF1* 基因氨基酸序列构建棉铃虫和其他昆虫的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Helicoverpa armigera* and other insects based on *YTHDF1* amino acid sequences

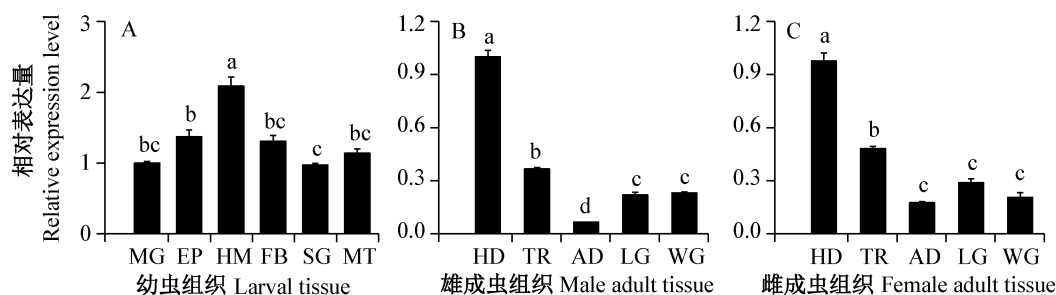


Egg: 卵; 1F~4F: 1~4龄取食期幼虫; 1M~4M: 1~4龄蜕皮期幼虫; 5-0 h~5-120 h: 进入5龄期0、24、48、72、96、120 h 幼虫; P0~P9: 进入蛹期0、1、3、5、7、9 d 蛹; A1: 羽化第1天成虫。Egg: Egg; 1F~4F: feeding stages of 1st-, 2nd-, 3rd-, 4th-instar larvae; 1M~4M: molting stages of 1st-, 2nd-, 3rd-, 4th-instar larvae; 5-0 h~5-120 h: 5th instar larvae at 0, 24, 48, 72, 96, and 120 h, respectively; P0~P9: 0-, 1-, 3-, 5-, 7-, and 9-day-old pupae, respectively; A1: 1-day-old adult.

图3 *YTHDF1* 基因在棉铃虫不同发育阶段的表达谱

Fig. 3 Expression profiles of *YTHDF1* in different developmental stages of *Helicoverpa armigera*

图中数据均为平均数±标准误。柱上不同字母表示经 Tukey's HSD 法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters on the bars indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Tukey's HSD test.



MG: 中肠; EP: 表皮; HM: 血细胞; FB: 脂肪体; SG: 唾液腺; MT: 马氏管; HD: 头; TR: 胸; AD: 腹; LG: 足; WG: 翅。MG: Midgut; EP: epidermis; HM: hemocyte; FB: fat body; SG: salivary gland; MT: Malpighian tube; HD: head; TR: thorax; AD: abdomen; LG: leg; WG: wing.

图4 *YTHDF1* 基因在棉铃虫幼虫(A)、雄成虫(B)和雌成虫(C)各组织内的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of *YTHDF1* in different larval tissues (A), male adult tissues (B), female adult tissues (C) of *Helicoverpa armigera*

图中数据均为平均数±标准误。柱上不同字母表示经 Tukey's HSD 法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters on the bars indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Tukey's HSD test.

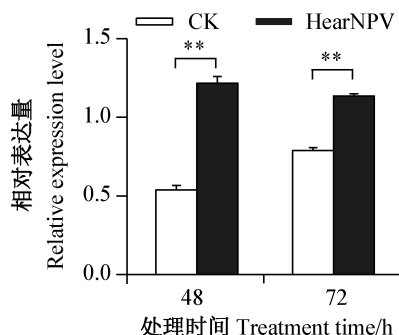


图5 HearNPV 处理对棉铃虫 *YTHDF1* 基因表达的影响

Fig. 5 Effects of HearNPV treatment on *YTHDF1* gene expression in *Helicoverpa armigera*

图中数据为平均数±标准误。**表示处理和对照之间经 t 测验法检验在 $P < 0.01$ 水平差异显著。Data are mean±SE. ** indicates significant difference at $P < 0.01$ level by t test.

3 讨论

m⁶A 甲基化是一种转录后修饰, 招募 m⁶A 结合蛋白是其发挥作用的主要机制。在哺乳动物基因组中已鉴定出 5 个含 YTH 结构域的蛋白, 分别为 YTHDC1、YTHDC2、YTHDF1、YTHDF2 和 YTHDF3, 基于序列特点又可以分为 DC1、DC2 和 DF 家族 (Meyer & Jaffrey, 2017)。本研究根据棉铃虫基因组数据和本实验室已有转录组数据获得了棉铃虫 *YTHDF1* 基因序列, 序列分析发现其编码蛋白含有 1 个典型的 YTH 结构域, 其他为富含 Q、N、P 氨基酸的简单蛋白, 符合 DF 家族的特点, BLASTP 分析显示该蛋白为含 YTH 结构域的蛋白 1, 因此命名为 YTHDF1。氨基酸多重联配和系统进化分析结果显示棉铃虫

YTHDF1 基因的氨基酸序列在进化上非常保守,与斜纹夜蛾的序列一致性最高,亲缘关系最近。

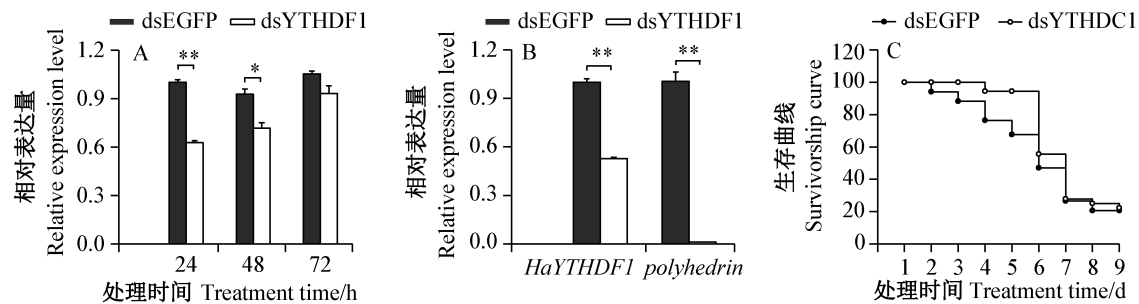


图6 RNA干扰效率(A)及 *YTHDF1* 基因下调后对 HearNPV 复制(B)、感染 HearNPV 棉铃虫生存曲线(C)的影响

Fig. 6 RNA interference efficiency of *YTHDF1* (A) and effects of *YTHDF1* knockdown on HearNPV replication (B) and the survival curve of the cotton bollworm infected with HearNPV (C)

图中数据为平均数±标准误。*和**表示处理和对照之间经 *t* 测验法检验在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平差异显著。Data are mean±SE. * or ** indicates significant difference at $P<0.05$ or $P<0.01$ level by *t* test.

m⁶A 是 mRNA 和非编码 RNA 中非常普遍的修饰,影响着 RNA 的剪接、翻译和稳定性,以及某些非编码 RNA 的表观遗传效应(Meyer et al., 2012; Patil et al., 2016; Xiao et al., 2016)。在斑马鱼 *Danio rerio* 中有超过 1/3 的 mRNA 被鉴定为 m⁶A 修饰(Zhao et al., 2017)。本研究中 *YTHDF1* 基因在棉铃虫整个发育期均有表达,并在蜕皮和变态前后呈现一定的高表达趋势,可能与变态期棉铃虫体内复杂的生理活动有关。另外, *YTHDF1* 基因在棉铃虫幼虫血细胞和成虫头、胸部的表达量高,呈现组织特异性表达,该结果与在小鼠 *Mus musculus* 中发现的 m⁶A 修饰的组织特异性调控一致(Chang et al., 2017)。

此外,大部分的 m⁶A 位点都能对各种刺激做出动态响应(Dominissini et al., 2012)。如 Zhang et al. (2020) 研究发现家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV) 感染能诱导家蚕中肠 mRNA 的 m⁶A 位点发生动态反应。本研究中 HearNPV 感染棉铃虫后显著提高了 *YTHDF1* 基因的表达水平,进一步研究发现 *YTHDF1* 基因下调后显著抑制了 HearNPV 的复制,推迟了感染 HearNPV 棉铃虫的死亡时间,表明 *YTHDF1* 基因在 HearNPV 感染棉铃虫的过程中发挥着重要作用。然而家蚕细胞中 *BmYTHDF3* 基因下调促进了 BmNPV 的复制,而 *BmYTHDF3* 基因的过表达抑制了 BmNPV 的复制(Zhang et al., 2020)。虽然结合 m⁶A 的氨基酸在 *YTHDF1*、*YTHDF2* 和 *YTHDF3* 中较为保守,暗示 m⁶A 与这 3 种 DF 蛋白结合的结构机制相似,但 YTH 结构域之间有少数氨基酸不同,可能会影响 RNA 结合(Zaccara & Jaffrey, 2020)。李晓晗等(2021)综述 m⁶A 修饰水平降低后显著抑制了 HIV-1 和甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)的复制,但促进了丙型肝炎

炎病毒(hepatitis C virus, HCV)的复制。同样是 RNA 病毒,但 m⁶A 对不同病毒的调控存在差异,可能受诸多因素影响(Tirumuru & Wu, 2019)。如在 HIV-1 的复制过程中发现 3 种 m⁶A 解读蛋白 *YTHDF1*、*YTHDF2* 和 *YTHDF3* 既发挥了抑制作用,也发挥了促进作用,这可能与病毒侵染时期以及再侵染有关(Kennedy et al., 2016; Tirumuru et al., 2017; Lu et al., 2018)。m⁶A 通过调节特定的 RNA 来多方面调节病毒复制,有时依赖于组织或细胞类型(Tan et al., 2018)。有关棉铃虫 *YTHDF1* 基因在 HearNPV 侵染过程中的作用还需要进一步研究。

本研究鉴定了 1 个 m⁶A 阅读蛋白 *YTHDF1*, 分析了该蛋白的基因序列特征、时空表达谱以及对 HearNPV 感染棉铃虫的影响,初步了解了 *YTHDF1* 基因的分子特征以及在 HearNPV 感染棉铃虫中的功能。下一步将对 *YTHDF1* 基因敲低后的棉铃虫进行 RNA m⁶A 甲基化测序(MeRIP Seq),筛选和分析甲基化水平改变的基因并进行功能验证,从而揭示 *YTHDF1* 基因调控 HearNPV 复制的分子机制。

参考文献 (References)

- Cao GC, Feng HQ, Guo F, Wu KM, Li XC, Liang GM, Desneux N. 2014. Quantitative analysis of fitness costs associated with the development of resistance to the Bt toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. *Scientific Reports*, 4: 5629
- Chang MQ, Lv H, Zhang WL, Ma CH, He X, Zhao SL, Zhang ZW, Zeng YX, Song SH, Niu YM, et al. 2017. Region-specific RNA m⁶A methylation represents a new layer of control in the gene regulatory network in the mouse brain. *Open Biology*, 7(9): 170166
- Coker H, Wei GF, Brockdorff N. 2019. m⁶A modification of non-coding RNA and the control of mammalian gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta: Gene Regulatory Mechanisms*, 1862 (3): 310–318

- Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, Salmon-Divon M, Ungar L, Osenberg S, Cesarkas K, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Kupiec M, et al. 2012. Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq. *Nature*, 485 (7397): 201–206
- Kennedy EM, Bogerd HP, Kornepati AVR, Kang D, Ghoshal D, Marshall JB, Poling BC, Tsai K, Gokhale NS, Horner SM, et al. 2016. Posttranscriptional m⁶A editing of HIV-1 mRNAs enhances viral gene expression. *Cell Host & Microbe*, 19(5): 675–685
- Li XH, Chen J, Zhong X, Zhou B. 2021. The role of m⁶A methylation in virus infection. *Journal of Nanjing Agricultural University*, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1148.S.20210611.1604.004.html> (in Chinese) [李晓晗, 陈婧, 钟翔, 周斌. 2021. m⁶A 甲基化在病毒感染中的作用研究进展. 南京农业大学学报, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1148.S.20210611.1604.004.html>]
- Li Y, Zheng JN, Wang EH, Gong CJ, Lan KF, Ding XJ. 2020a. The m⁶A reader protein YTHDC2 is a potential biomarker and associated with immune infiltration in head and neck squamous cell carcinoma. *PeerJ*, 8: e10385
- Li YH, Hallerman EM, Wu KM, Peng YF. 2020b. Insect-resistant genetically engineered crops in China: development, application, and prospects for use. *Annual Review of Entomology*, 65(1): 273–292
- Lichinchi G, Gao S, Saletore Y, Gonzalez GM, Bansal V, Wang YS, Mason CE, Rana TM. 2016. Dynamics of the human and viral m⁶A RNA methylomes during HIV-1 infection of T cells. *Nature Microbiology*, 1: 16011
- Liu JZ, Yue YN, Han DL, Wang X, Fu Y, Zhang L, Jia GF, Yu M, Lu ZK, Deng X, et al. 2014. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N⁶-adenosine methylation. *Nature Chemical Biology*, 10(2): 93–95
- Lu WX, Tirumuru N, St Gelais C, Koneru PC, Liu C, Kvaratskhelia M, He C, Wu L. 2018. N⁶-methyladenosine-binding proteins suppress HIV-1 infectivity and viral production. *Journal of Biological Chemistry*, 293(34): 12992–13005
- Martínez-Pérez M, Aparicio F, López-Gresa MP, Bellés JM, Sánchez-Navarro JA, Pallás V. 2017. *Arabidopsis* m⁶A demethylase activity modulates viral infection of a plant virus and the m⁶A abundance in its genomic RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(40): 10755–10760
- Meyer KD, Jaffrey SR. 2017. Rethinking m⁶A readers, writers, and erasers. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 33: 319–342
- Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, Elemento O, Mason CE, Jaffrey SR. 2012. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, 149(7): 1635–1646
- Nachtergaele S, He C. 2018. Chemical modifications in the life of an mRNA transcript. *Annual Review of Genetics*, 52: 349–372
- Patil DP, Chen CK, Pickering BF, Chow A, Jackson C, Guttman M, Jaffrey SR. 2016. m⁶A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 537(7620): 369–373
- Ping XL, Sun BF, Wang L, Xiao W, Yang X, Wang WJ, Adhikari S, Shi Y, Lv Y, Chen YS, et al. 2014. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase. *Cell Research*, 24(2): 177–189
- Roundtree IA, Evans ME, Pan T, He C. 2017. Dynamic RNA modifications in gene expression regulation. *Cell*, 169(7): 1187–1200
- Schwartz S, Mumbach MR, Jovanovic M, Wang T, Maciag K, Bushkin GG, Mertins P, Ter-Ovanesyan D, Habib N, de Cacchiarelli D, et al. 2014. Perturbation of m⁶A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites. *Cell Reports*, 8(1): 284–296
- Tan B, Gao SJ. 2018. RNA epitranscriptomics: regulation of infection of RNA and DNA viruses by N⁶-methyladenosine (m⁶A). *Reviews in Medical Virology*, 28(4): e1983
- Tan B, Liu H, Zhang SY, da Silva SR, Zhang L, Meng J, Cui XD, Yuan HF, Sorel O, Zhang SW, et al. 2018. Viral and cellular N⁶-methyladenosine and N⁶, 2'-O-dimethyladenosine epitranscriptomes in the KSHV life cycle. *Nature Microbiology*, 3(1): 108–120
- Tirumuru N, Wu L. 2019. HIV-1 envelope proteins up-regulate N⁶-methyladenosine levels of cellular RNA independently of viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, 294(9): 3249–3260
- Tirumuru N, Zhao BS, Lu WX, Lu ZK, He C, Wu L. 2017. Correction: N⁶-methyladenosine of HIV-1 RNA regulates viral infection and HIV-1 Gag protein expression. *eLife*, 6: e31482
- Wu KM, Lu YH, Feng HQ, Jiang YY, Zhao JZ. 2008. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science*, 321(5896): 1676–1678
- Xiao W, Adhikari S, Dahal U, Chen YS, Hao YJ, Sun BF, Sun HY, Li A, Ping XL, Lai WY, et al. 2016. Nuclear m⁶A reader YTHDC1 regulates mRNA splicing. *Molecular Cell*, 61(4): 507–519
- Zaccara S, Jaffrey SR. 2020. A unified model for the function of YTHDF proteins in regulating m⁶A-modified mRNA. *Cell*, 181(7): 1582–1595
- Zhang SD, An SH, Li Z, Wu FM, Yang QP, Liu YC, Cao JJ, Zhang HJ, Zhang QW, Liu XX. 2015. Identification and validation of reference genes for normalization of gene expression analysis using qRT-PCR in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Gene*, 555(2): 393–402
- Zhang X, Zhang YS, Dai K, Liang Z, Zhu M, Pan J, Zhang MT, Yan BY, Zhu HX, Zhang ZY, et al. 2020. N⁶-methyladenosine level in silkworm midgut/ovary cell line is associated with *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection. *Frontiers in Microbiology*, 10: 2988
- Zhao BS, Wang X, Beadell AV, Lu ZK, Shi HL, Kuuspalu A, Ho RK, He C. 2017. m⁶A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Nature*, 542(7642): 475–478
- Zhao XF, Wang JX, Wang YC. 1998. Purification and characterization of a cysteine proteinase from eggs of the cotton boll worm, *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28: 259–264
- Zheng GQ, Dahl JA, Niu YM, Fedorcsak P, Huang CM, Li CJ, Vågbo CB, Shi Y, Wang WL, Song SH, et al. 2013. ALKBH₅ is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Molecular Cell*, 49(1): 18–29

(责任编辑:李美娟)