

# 用 5' LongSAGE 标签产生的长 cDNA 片段 分析西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 基因座 LOC727225 的选择性剪接

孙亮先<sup>1</sup> 欧阳昊<sup>1</sup> 郑华军<sup>2</sup> 黄周英<sup>1</sup>

(1. 福建省高校分子生物学与药物化学重点实验室/泉州师范学院, 福建 泉州 362000; 2. 国家人类基因组南方研究中心, 上海 201203)

**摘要:** 选择性剪接是真核生物产生蛋白多样性的一个重要机制, 并能通过产生不同的剪接本来调节基因在不同组织或发育阶段的表达而发挥其作用。本研究采用 3 条 5' LongSAGE 标签序列作为上游引物, 通过 RT-PCR 克隆了西方蜜蜂 (*Apis mellifera*) 的一个预测基因座 LOC727225 的 4 条 cDNA 序列 (GenBank 登录号: JN627500 至 JN627503)。将 cDNA 序列对蜜蜂基因组作图发现, 雄蜂头部中该基因的 mRNA 前体经由两种不同的剪接方式产生的 2 个长度不同的剪接本, 其中较短的剪接本编码一个功能未知的新蛋白, 而较大剪接本的推导产物蛋白与分支酸合酶和神经胰蛋白酶具有序列相似性。5' LongSAGE 标签数据显示, LOC727225 在成年雄蜂头部的表达水平非常高, RNA Pol II 可从该基因的 6 个不同的转录起始位点 (TSS) 上以不同效率起始转录, 其中在 2 个优势 TSS 上所起始的 pre-mRNA 被剪接成较小的剪接本, 其数量占该基因成熟 mRNA 分子总量的 90%。启动子序列分析显示, LOC727225 是受细胞周期转录因子 E2F 和 StuAP 调控的靶基因, 该基因可能在蜜蜂的细胞增殖中起重要作用。研究首次证实了基因座 LOC727225 的选择性剪接和选择性起始, 结果为深入探索该基因的功能奠定了基础。

**关键词:** 西方蜜蜂; 转录起始位点; 选择性剪接; 启动子; 基因座; 5' LongSAGE

中图分类号: Q756; S891 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)06-1181-06

## Alternative Splicing Pattern of *Apis mellifera* Gene Locus LOC727225 Revealed by 5' LongSAGE Tag-generated cDNA Fragments

SUN Liang-xian<sup>1</sup>, OUYANG-hao<sup>1</sup>, ZHENG Hua-jun<sup>2</sup>, HUANG Zhou-ying<sup>1</sup>

(1. The Higher Educational Key Laboratory for Molecular Biology and Pharmacology of Fujian Province, Quanzhou Normal University, Quanzhou, Fujian 362000, China; 2. Chinese National Human Genome Center at Shanghai, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** Alternative splicing is an important mechanism to increase diversity of protein in eukaryotic cell, and can modulate how a gene acts in different tissues or developmental stages by generating distinct splicing variant. In this study, four cDNA sequences of a hypothetical gene locus (LOC727225) on genome sequence of *Apis mellifera* through RT-PCR were cloned by using three different 5' LongSAGE tag sequences as up-stream primers, and the cDNA sequences were submitted to GenBank under the accession numbers JN627500, JN627501, JN627502 and JN627503. According to the mapping result of cDNA sequences on *Apis*

收稿日期: 2011-09-06 修回日期: 2011-09-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31072095) 和福建省教育厅省属高校项目 (JA09214)

作者简介: 孙亮先 (1970—), 副教授, 博士, 主要从事蜜蜂功能基因组学研究, E-mail: lxsunbee@163.com。

*mellifera* genome, it was observed that the pre-mRNA of LOC727225 alternatively spliced into two transcript variants. Protein analysis revealed that the smaller splicing variant encoded an unknown protein, while the deduced polypeptide from the larger variant had sequence similarity with chorismate lyase and neurotrypsin. The mapping result of 5' LongSAGE tag sequences on genome sequence showed that LOC727225 was highly expressed in drone head, and RNA Pol II initiated transcription of this gene at six alternative TSS with different efficiency. It was observed that the pre-mRNAs from two dominant TSSs were processed into the smaller splicing variant, which accounted for 90% of the total mature mRNA molecules from this gene. Promoter analysis revealed that LOC727225 was a target gene of transcription factor E2F and StuAp, which were regulators of cell proliferation. These results suggested that LOC727225 plays an important role in development or cell cycle. This analysis might be helpful to function study of this honeybee gene.

**Key words:** *Apis mellifera*; transcription start site (TSS); alternative splicing; promoter; 5'LongSAGE

真核细胞 mRNA 前体经过剪接,成为成熟的 mRNA,而 mRNA 前体的选择性剪接(alternative splicing)不仅极大地增加了基因组所编码的蛋白多样性,而且可以通过产生不同的 mRNA 异构体来调节一个基因在不同组织或发育时期中的作用<sup>[1-2]</sup>。现已证实选择性剪接是真核生物基因 RNA 加工的重要机制,通过选择性剪接机制,基因组中的有限数量的基因能产生数量众多的蛋白异构体。以人类基因为例,Modrek 等<sup>[2-3]</sup>通过大规模表达序列标签(EST)分析发现人类基因组的 35%~59%的基因存在选择性剪接,而且 70%~80%的选择性剪接导致了产物蛋白结构和功能的改变,Pan 等<sup>[4]</sup>报道多达 95%的人类多外显子基因存在选择性剪接现象。因此该领域已成为现代分子生物学研究的一个经久不衰的研究热点。根据外显子剪接方式,选择性剪接可分为盒式(cassette)、5'外显子剪接(5'exon splicing)、3'外显子剪接(3'exon splicing)、相互排斥(mutually exclusive)、内含子保留(intron retained)、巢式(nested)和桥式(bringed)等 7 个类别<sup>[5-6]</sup>。

研究选择性剪接的主要方法是比较转录本的序列。由于表达序列标签(EST)和 cDNA 序列可代表基因的完整转录本序列,因此长期被作为研究选择性剪接的主要技术手段<sup>[7-10]</sup>。近年来,随着西方蜜蜂(*Apis mellifera*)全基因组的测序和 cDNA 序列的积累,研究人员发现 *doublesex* (*dsx*), *transformer* (*tra*), *feminizer* (*fem*) 等 3 个基因的选择性剪接在西方蜜蜂的性别决定中起着重要作用<sup>[11-12]</sup>,此外蜜蜂的 *Dscam*, *Hsp90*, *AmCREB* 等基因也存在选择性剪接现象<sup>[13-15]</sup>。本研究利用 *Apis mellifera* 雄蜂 5'LongSAGE 文库<sup>[16]</sup>中的一组标签序列在蜜蜂基因组序列上定位了预测基因座 LOC727225 的转录起始位点,并用其中的 3 条 5'LongSAGE 标签序列作为 PCR 上游引物,通过 RT-PCR 克隆了该基因的 cDNA 序列。我们的实验结果显示基因座 LOC727225 不仅存在 6 个不同的选择性转录起始位点,而且还存在 2 种选择性剪接方式。

## 1 材料与方法

### 1.1 蜜蜂样品及总 RNA 的提取

意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)蜂群饲养在泉州师范学院实验蜂场。随机取雄蜂,切取头部,液氮研磨后 TRIzol(Gibco BRL 公司)法提取总 RNA。

### 1.2 反转录合成一链 cDNA

取 1 mg 总 RNA,以逆转录酶 StrataScript Reverse Transcriptase(Stratagen 公司)合成第一链 cDNA,具体操作参照文献[17]。

### 1.3 PCR 反应及 PCR 产物的克隆

引物设计:以西方蜜蜂雄蜂 5'LongSAGE 文库(GEO 编号:GSE19555)中的 3 条标签序列(序列见图 1 中下划线标注的标签)作为 PCR 上游引物序列;下游引物根据这 3 条标签所定位的预测基因座 LOC727225 最后一个外显子序列设计,序列为 5'TCCTACATTTACAAAAGCT3',引物委托上海生工合成。取第一链 cDNA 为模板,以 *LA Taq* 酶(TaKaRa 公司)进行 PCR,反应经 35 轮扩增后,取 5  $\mu$ L PCR 产物于  $\rho = 1.5\%$  琼脂糖凝胶电泳检测,其余 PCR 产物在  $\rho = 1.5\%$  琼脂糖凝胶电泳后,于紫外灯下切取含目

的 DNA 条带的琼脂糖胶块,以凝胶回收试剂盒(Qiagen 公司)纯化目的 DNA 片段,并用 pMD18-T 试剂盒(TaKaRa 公司)克隆 PCR 产物。重组子经菌落 PCR 鉴定后,以质粒小提试剂盒(Tiangen 公司)抽提质粒,以 pMD18-T 载体上的测序通用引物 P<sub>2</sub> 和 P<sub>4</sub> 对所克隆的 PCR 产物进行双向测序。具体实验步骤参照文献[17]。

#### 1.4 生物信息学分析

1.4.1 基因座 LOC727225 转录起始位点和表达丰度的分析 用于定位 LOC727225 转录起始位点的 5' LongSAGE 标签来自于 NCBI 的雄蜂 5' LongSAGE 文库,标签序列见图 1。5' LongSAGE 标签序列的 5' 端第一个碱基在基因组上的位置代表基因的一个 TSS,各标签序列的拷贝数代表 RNA Pol II 由该 TSS 起始转录的频率<sup>[16]</sup>。基因座 LOC727225 所在的连锁群序列(GenBank 登录号: NW\_003378081) 及该基因的参考 RNA 序列(GenBank 登录号: XM\_001122935) 从 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 下载。

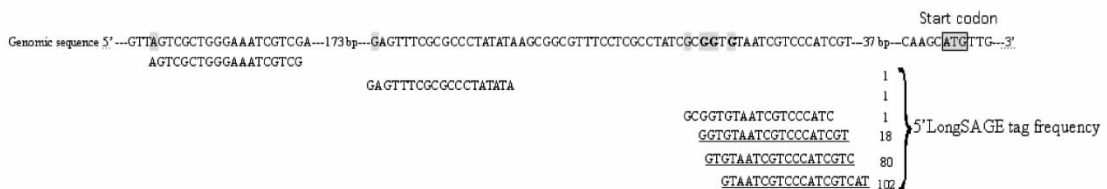
1.4.2 启动子分析 在用 5' LongSAGE 标签在连锁群 NW\_003378081 中定位 LOC727225 的 TSS 后,在线进行启动子预测([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)),并以 DNASTAR 软件截取 TSS 上游 300 bp 至下游 100 bp 的序列,在 TFSEARCH server 网站上在线分析启动子区所含有的转录因子结合位点(<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH>)。

1.4.3 基因结构分析 在 NCBI 网站上使用 BLAST 软件将西方蜜蜂基因座 LOC727225 的 cDNA 序列与其基因组序列比对,获得其外显子和内含子结构。

## 2 结果与分析

### 2.1 西方蜜蜂基因组序列上基因座 LOC727225 的转录起始位点

在西方蜜蜂雄蜂头部 5' LongSAGE 文库<sup>[16]</sup>中,有 6 条标签序列可以定位在蜜蜂基因组预测基因座 LOC727225 的起始密码子上游(图 1),表明此位点确实存在一个编码蛋白质的基因。由于 5' LongSAGE 标签序列来自于完整 mRNA 序列 5' 末端的 19 nt,所以标签序列在基因组上的位置可代表基因的转录起始位点(TSS),而标签的数量代表某组织中 RNA Pol II 由该 TSS 起始转录的频率<sup>[18]</sup>。5' LongSAGE 标签序列的基因组定位结果显示(图 1),在成年雄蜂头部中基因座 LOC727225 可由 6 个不同的 TSS 上以不同效率起始转录,其中在距离起始密码子约 60 bp 的 3 个 TSS 上起始的 5' LongSAGE 标签数量(tag counts)分别为 18、80 和 102 个,为该基因的优势 TSS;而另外 3 个 TSS 分布在一段约 250 bp 的序列内,为次要 TSS。图 1 显示定位在 LOC727225 的标签数量总计为 303 个,而 Zheng 和 Sun 报道此 5' LongSAGE 文库中的 3 655 个有功能注释的基因的平均标签量为 4.5 个<sup>[16]</sup>,因此此基因在雄蜂头部中的表达水平非常高。



标签来自于西方蜜蜂成年雄蜂头部的 5' LongSAGE 文库,标签数量代表 mRNA 由该位点起始转录的频率,编码序列的起始密码子 ATG 用方框黑体标志,用作 RT-PCR 引物序列的 5' LongSAGE 标签用下划线标志。

The tag sequences come from a 5' LongSAGE library of adult drone head. The number of tags indicates initiation efficiency. The start codon is marked with boxed - bold letter. The sequences used for designing PCR primers are underlined.

图 1 5' LongSAGE 标签在西方蜜蜂基因组序列上定位的基因座 LOC727225 的转录起始位点

Fig. 1 The 5' LongSAGE tag - mapped transcription start sites of the hypothetical locus LOC727225 on genomic sequence of *Apis mellifera*

### 2.2 根据定位在基因座 LOC727225 上的 5' LongSAGE 标签克隆 cDNA 序列

根据 5' LongSAGE 标签来自于完整 mRNA 分子的特点,本研究利用图 1 中拷贝数为 18、80 和 102 的 3 条 5' LongSAGE 标签序列作为 PCR 的上游引物,下游引物序列根据基因座 LOC727225 的最后一个外显子设计,以雄蜂头部的总 RNA 为模板,通过 RT-PCR 对该基因的 cDNA 进行了克隆。PCR

产物的电泳结果显示(图 2),用标签序列“80”和“102”作为上游引物能获得了一条长约 350 bp 的 cDNA 片段,但用标签序列“18”作引物扩增出 3 条片段。将 PCR 产物克隆测序后,发现用引物“80”和“102”所克隆的 cDNA 序列分别长 319 bp 和 317 bp (GenBank 登录号: JN627502, JN627503),而将用引物“18”扩增出 3 条带,其中 2 条长约 350 ~ 400 bp 的片段经克隆测序后得到 2 条长 405 bp 和 320 bp 的序列(GenBank 登录号: JN627500, JN627501),而长度约为 800 bp 的片段虽然未能成功克隆。对 cDNA 序列的碱基组成和开放阅读框(ORF)进行分析发现,3 条长约 320 bp 的 cDNA 序列中 A + T 占 40.7%, G + C 占 59.3%,其产物蛋白为一条长 86 aa 的新蛋白。而长度为 405 bp 的 cDNA 序列中 A + T 和 G + C 的含量分别为 37.2% 和 62.8%,此 cDNA 序列编码一个长 96 aa 的蛋白,该蛋白与大鼠(*Rattus norvegicus*)的神经胰蛋白酶(neurotrypsin)和缠绕纤发菌(*Gallionella ferruginea*)的分支酸裂合酶(chorismate lyase)具有序列相似性,但尚不明确此蛋白的具体功能。

2.3 基因座 LOC727225 的选择性剪接

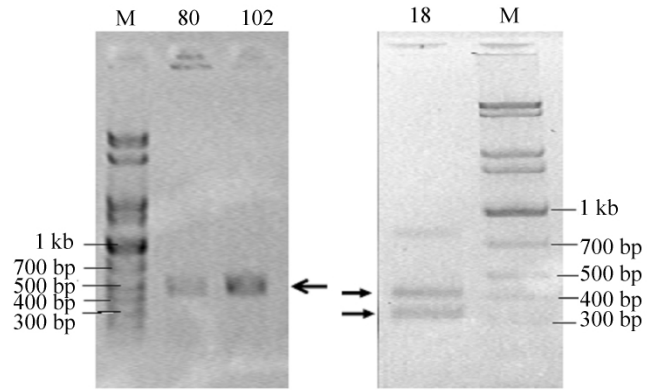
为了揭示基因座 LOC727225 如何产生可编码不同蛋白的转录本的分子机理,本研究将所克隆的 4 条 cDNA 序列对的基因组 DNA 序列进行了 BLAST 作图(图 3 A)。图 3 可见,基因座 LOC727225 在成年雄蜂头部中存在两种剪接方式。第一种剪接是从其 pre-mRNA 前体中切除一个 85 bp 的小内含子,然后将外显子 1 和 2 连接。而在第二种剪接方式中,此小内含子序列仍会保留在成熟 mRNA 分子中。



图 4 基因座 LOC727225 在雄蜂头部的选择性剪接位点和起始密码子

Fig. 4 Alternative splicing site and start codon of LOC727225 in *Apis mellifera* drone head

根据 LOC727225 的 6 个 TSS 的转录起始频率(图 4),可计算出该基因在雄蜂头部转录的 mRNA 分子中 90% 以上是切除 1 号内含子后的剪接产物,另有少量 mRNA 序列中保留着内含子序列。从图 4 可见,基



M: DNA ladder. ‘80’, ‘102’ 和 ‘8’ 表示用作 PCR 上游引物的 3 条不同 5’LongSAGE 标签序列的拷贝数。

The number ‘80’, ‘102’ and ‘18’ indicated tag counts of three different 5’LongSAGE tag sequences that were used for up-stream PCR primers.

图 2 西方蜜蜂基因组上基因座 LOC727225 的 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis result of RT-PCR product of locus LOC727225 on *Apis mellifera* genome

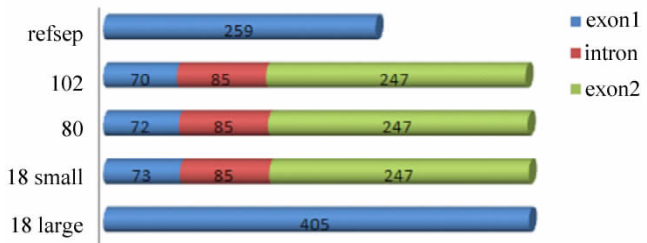


图 3 西方蜜蜂基因组上基因座 LOC727225 的内含子/外显子结构

Fig. 3 Intron/exon structure of LOC727225 on genomic sequence of *Apis mellifera*



因座 LOC727225 的编码序列(CDS)具有2个翻译起始密码子。其中第一个起始密码子位于选择性外显子(指的是第一种剪接方式中的内含子)上游,负责经剪接而产生的短 mRNA 分子的翻译起始;第二个起始密码子位于选择性外显子内部,负责起始那个保留有内含子序列的 mRNA 分子的翻译。由于这种剪接产物使用相同的终止密码子和不同的起始密码子,所以它们编码不同的多肽序列。

#### 2.4 基因座 LOC727225 启动子序列中的顺式作用元件

准确定位基因的 TSS 有助于启动子分析。为了探索基因座 LOC727225 的表达调控途径,本研究对该基因启动子序列中所含有的转录因子结合位点进行了预测(图5)。分析结果显示,在该基因优势 TSS 上游 200 bp 的范围内5个顺式作用元件,包括一个典型的 TATA 框 2 个热激因子结合元件(HSE)以及转录因子 Stu-AP 和 E2F 结合位点。

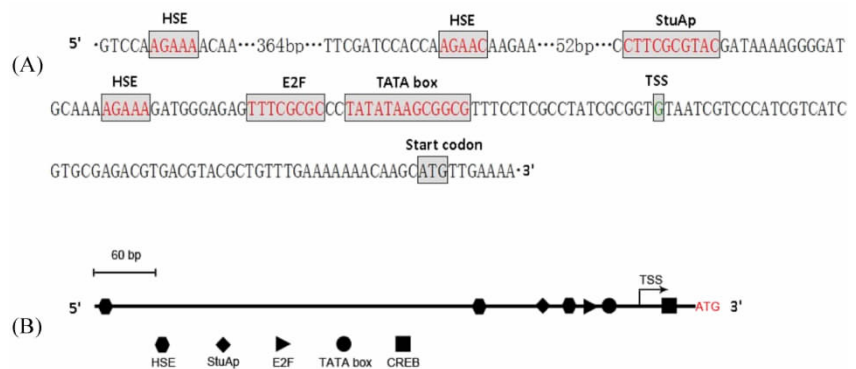
StuAP 和 E2F 是调控细胞增殖和细胞周期的2个重要蛋白<sup>[19-20]</sup>而基因座 LOC727225 的启动子区含有这2个转录因子的结合位点,意味着该基因的表达受 StuAP 和 E2F 的调控。由于 LOC727225 在雄蜂头部中的表达丰度非常高,因此该基因很可能在蜜蜂发育和细胞增殖中起重要作用。

### 3 讨论

蜜蜂基因组测序联盟在西方蜜蜂基因组序列中注释了 10 157 个基因,但其中仅约 6 600 个基因有 cDNA 序列数据支持<sup>[21]</sup>。最近,Zheng 和 Sun 等<sup>[16]</sup>在用雄蜂头部 5'LongSAGE 文库中的标签序列在全基因组水平上定位 3 966 个预测基因的 TSS 位点。在此 5'LongSAGE 文库的标签序列数据中,有 6 条不同的标签定位在连锁群 14.15 上的预测基因座 LOC727225 的 CDS 序列上游,并且该基因座的转录水平非常高(未发表数据)。为了探索该预测基因座是否真实存在,本研究根据 5'LongSAGE 来自于 mRNA 分子 5'末端序列的特点,用定位在 LOC727225 的 3 条标签序列作为 PCR 上游引物,用预测基因的最后一个外显子序列设计下游引物,通过 RT-PCR 克隆了该基因的 cDNA 序列。有趣的是,本研究用拷贝数为 18 的 5'LongSAGE 标签作为 RT-PCR 的上游引物扩增出 3 条 cDNA 片段,其中的 2 条为该基因的选择性剪接产物,而另外一条长约 800 bp 的 cDNA 尚未克隆,但它很可能是另外一个剪接本。对所克隆的 4 条 cDNA 序列进行分析发现,雄蜂头部中基因座 LOC727225 的成熟 mRNA 是其 pre-mRNA 分子经过两种不同的剪接方式产生的,其中超过 90% 的 mRNA 分子是 pre-mRNA 剪除一个小内含子后产生的,这类剪接本编码一个功能未知的蛋白。但有一小部 mRNA 的序列中仍旧保留着这个小内含子序列,并且其 CDS 序列的起始密码子位于这个小内含子序列内,这个较大的剪接本的产物蛋白与分支酸裂解酶和神经胰蛋白酶都具有序列相似性,因此有理由推测该蛋白为一个酶蛋白。需要说明的是,基因座 LOC727225 在雄蜂头部可由 6 个不同的 TSS 上起始转录,但本研究仅对其中 3 个起始频率较高的 mRNA 序列进行了克隆和分析,由于未获得由其他 3 个 TSS 上起始的 mRNA 序列所以尚不能确定该基因是否存在其他的剪接方式。此外,本研究在基因座 LOC727225 的启动子区发现存在细胞周期转录因子 E2F 和 StuAP 的结合位点,因此我们推断该基因可能参与发育和细胞增殖。

参考文献:

[1]Pennisi E. Human genome project and the gene number is? [J]. Science 2000 288(5469):1146-1147.



箭头表示优势转录起始位点,ATG 表示起始密码子。

The dominant transcription start site is indicated with arrow, and ATG is the start codon.

图5 西方蜜蜂基因座 LOC727225 启动子序列含有的预测转录因子结合位点

Fig. 5 Scheme of putative transcription factor binding sites in promoter region of LOC727225 on *Apis mellifera* genome sequence

- [2] Modrek B , Resch A , Grasso C , et al. Genome – wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes [J]. *Nucleic Acids Res* 2001 29( 13 ) : 2850-2859.
- [3] Modrek B , Lee C. A genomic view of alternative splicing [J]. *Nat Genet* 2002 30( 1 ) : 13-19.
- [4] Pan Q , Shai O , Lee L J , et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high – throughput sequencing [J]. *Nat Genet* 2008 40( 12 ) : 1413-1415.
- [5] Ladd A N , Cooper T A. Finding signals that regulate alternative splicing in the post – genomic era [J]. *Genome biology* , 2002 , 3( 11 ) : reviews0008.
- [6] Nilsen T W , Graveley B R. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing [J]. *Nature* 2010 463( 7280 ) : 457-463.
- [7] Burset M , Seledtsov I A , Solovyev V V. Analysis of canonical and non – canonical splice sites in mammalian genomes [J]. *Nucleic Acids Res* , 2000 28( 21 ) : 4364-4375.
- [8] Burset M , Seledtsov I A , Solovyev V V. SpliceDB: database of canonical and non – canonical mammalian splice sites [J]. *Nucleic Acids Res* , 2001 29( 1 ) : 255-259.
- [9] Zavolan M , Kondo S , Schonbach C , et al. Impact of alternative initiation , splicing , and termination on the diversity of the mRNA transcripts encoded by the mouse transcriptome [J]. *Genome Res* , 2003 , 13( 6B ) : 1290-1300.
- [10] Takeda J , Suzuki Y , Nakao M , et al. Large – scale identification and characterization of alternative splicing variants of human gene transcripts using 56 419 completely sequenced and manually annotated full – length cDNAs [J]. *Nucleic Acids Res* 2006 34( 14 ) : 3917-3928.
- [11] Hasselmann M , Gempe T , SchiΦtt M et al. Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees [J]. *Nature* , 2008 454( 7203 ) : 519-522.
- [12] Cho S , Huang Z Y , Zhang J. Sex – specific splicing of the honeybee doublesex gene reveals 300 million years of evolution at the bottom of the insect sex – determination pathway [J]. *Genetics* , 2007 177( 3 ) : 1733-1741.
- [13] Aamodt R M. The caste – and age – specific expression signature of honeybee heat shock genes shows an alternative splicing – dependent regulation of Hsp90 [J]. *Mech Ageing Dev* , 2008 129( 11 ) : 632-637.
- [14] Crayton M E 3rd , Powell B C , Vision T J et al. Tracking the evolution of alternatively spliced exons within the Dscam family [J]. *BMC Evol Biol* , 2006 6: 1-15.
- [15] Eisenhardt D , Friedrich A , Stollhoff N , et al. The AmCREB gene is an ortholog of the mammalian CREB/CREM family of transcription factors and encodes several splice variants in the honeybee brain [J]. *Insect Mol Biol* , 2003 12( 4 ) : 373-382.
- [16] Zheng H , Sun L , Peng W , et al. Global identification of transcription start sites in the genome of *Apis mellifera* using 5' LongSAGE [J]. *J Exp Zool ( Mol Dev Evol)* , 2011 , doi: 10.1002/jez. b. 21421.
- [17] 孙亮先 , 黄周英 , 郑华军 等. 西方蜜蜂表皮蛋白基因 apd – like 转录起始位点的定位及 cDNA 序列的分析 [J]. *昆虫学报* 2011 54( 2 ) : 224-231.
- [18] Wei C L , Ng P , Chiu K P et al. 5' Long serial analysis of gene expression ( LongSAGE) and 3' LongSAGE for transcriptome characterization and genome annotation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2004 101( 32 ) : 11701-11706.
- [19] Müller H , Helin K. The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation [J]. *Biochim Biophys Acta* , 2000 , 1470( 1 ) : M1-12.
- [20] Dutton J R , Johns S , Miller B L. StuAP is a sequence – specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans* [J]. *EMBO J* , 1997 16( 18 ) : 5710-5721.
- [21] The Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera* [J]. *Nature* , 2006 443( 7114 ) : 931-949.