

西方蜜蜂 CKI1 蛋白的分子特征和基因时空表达谱

邹培缘^{1*}, 臧贺^{1,2,3*}, 董舒楠¹, 叶道有¹, 杜丽婷¹, 邱剑丰^{1,2,3},
付中民^{1,2,3}, 陈大福^{1,2,3**}, 郭睿^{1,2,3**}

(1. 福建农林大学蜂学与生物医药学院, 福州 350002; 2. 天然生物毒素国家地方联合工程实验室, 福州 350002; 3. 福建省蜂疗研究所, 福州 350002)

摘要: 本研究对西方蜜蜂 *Apis mellifera* 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 1 (Cyclin dependent kinase inhibitor1, CKI1) 基因 *AmCKI1* 进行表达验证, 并解析 AmCKI1 蛋白的理化性质和分子特征, 进而测定工蜂不同组织和发育阶段 *AmCKI1* 的表达谱, 旨在为进一步的功能研究提供参考和基础。通过 PCR 和 Sanger 测序验证 *AmCKI1* 的表达。使用相关软件预测 AmCKI1 的理化性质和分子特征, 并进行系统进化分析。采用 RT-qPCR 检测 *AmCKI1* 在工蜂的触角、脑、咽下腺、中肠、毒腺、表皮和脂肪体等 7 个不同组织, 卵、幼虫、预蛹、蛹和 1、2、6、12、15 和 17 日龄成虫中的相对表达量。结果显示, *AmCKI1* 在工蜂中真实表达。AmCKI1 的分子式为 C₁₁₀₄H₁₇₉₃N₃₃₃O₃₃₁S₇, 分子量约为 25.26 kD, 脂溶系数为 71.88, 等电点为 10.18, 平均亲水系数为 -0.674, 可同时定位于细胞核、线粒体和细胞质; AmCKI1 含 32 个磷酸化位点, 但不含典型的跨膜结构域和信号肽; 西方蜜蜂和其他 6 种蜂的 CKI1 蛋白均包含 1 个 CDI 结构域和 3 个相同的保守基序; 西方蜜蜂与小蜜蜂 *Apis florea* 的 CKI1 同源性最高。*AmCKI1* 在西方蜜蜂工蜂的脑、咽下腺、中肠、触角、毒腺、表皮和脂肪体中均有表达但表达量无显著差异 ($P>0.05$); *AmCKI1* 在卵、3 日龄幼虫、7 和 8 日龄预蛹及 12 日龄蛹中差异表达, 在卵和预蛹中的表达量显著高于 3 日龄幼虫和 12 日龄蛹中的表达量 ($P<0.05$); *AmCKI1* 在工蜂的 1、2、6、12、15 和 17 日龄成虫体内差异表达, 在 17 日龄成虫中的表达量最高且显著高于 1、2、6、12 和 15 日龄成虫体内的表达量。AmCKI1 是潜在的胞内蛋白和亲水性蛋白, CKI1 在西方蜜蜂、小蜜蜂、欧洲熊蜂 *Bombus terrestris*、美洲东部熊蜂 *Bombus impatiens*、黑大蜜蜂 *Apis laboriosa*、东方蜜蜂 *Apis ceranae* 和大蜜蜂 *Apis dorsata* 中高度保守, 西方蜜蜂与小蜜蜂的 CKI1 同源性最高, *AmCKI1* 在工蜂卵和 17 日龄成虫中特异性高表达。

关键词: 西方蜜蜂; 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 1; 分子特征; 系统进化; 表达谱

中图分类号: Q968.1;S433 文献标识码: A

Molecular feature and gene spatio-temporal expression profile of *Apis mellifera* CKI1 protein

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32372943,32172792); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-44-KXJ7); 福建省自然科学基金面上项目 (2022J01131334); 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 (KFb22060XA)

*共同第一作者简介: 邹培缘, 女, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂分子生物学, E-mail: zoupeiyan2216@163.com; 臧贺, 男, 博士研究生, 研究方向为蜜蜂分子生物学, E-mail: zanghe321@163.com

**共同通讯作者 Author for correspondence: 郭睿, 男, 博士, 副教授, 主要研究方向昆虫-病原互作, E-mail: ruiguo@fafu.edu.cn;

陈大福, 男, 博士, 教授, 主要研究方向蜜蜂保护学, E-mail: dfchen826@fafu.edu.cn

收稿日期 Received: 2024-03-25; 接受日期 Accepted: 2023-06-03

ZOU Pei-Yuan^{1*}, ZANG He^{1,2,3*}, DONG Shu-Nan¹, YE Dao-You¹, DU Li-Ting¹, QIU Jian-Feng^{1,2,3}, FU Zhong-Min^{1,2,3}, CHEN Da-Fu^{1,2,3**}, GUO Rui^{1,2,3**} (1. College of Bee Science and Biomedicine, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. National & Local United Engineering Laboratory of Natural Biotxin, Fuzhou 350002, China; 3. Apitherapy Research Institute of Fujian Province, Fuzhou 350002, China)

Abstract: In this study, the expression of *Apis mellifera* Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (*CKII*) gene *AmCKII* was validated, and the physicochemical property and molecular feature of the AmCKII protein were investigated, followed by determination of the expression profile of *AmCKII* in various tissues and developmental stages of worker bees, aiming to provide reference and foundation for further functional research. PCR and Sanger sequencing were performed to verify the expression of *AmCKII*. Relative software were employed to predict the physicochemical property and molecular feature of AmCKII and conduct phylogenetic analysis. RT-qPCR was utilized to detect the relative expression level of *AmCKII* in seven different tissues of the workers (tentacle, brain, hypopharyngeal gland, midgut, posion gland, cuticle and fat body), in various developmental stages (egg, larva, pre-pupa, pupa and adult), and in adult workers of 1, 2, 6, 12, 15 and 17 days-old. The *AmCKII* was truly expressed in the midgut of worker. The molecular formula of AmCKII was C₁₁₀₄H₁₇₉₃N₃₃₃O₃₃₁S₇, and the molecular weight was about 25.26 kD, and the lipophilicity coefficient, isoelectric point and the average hydrophilicity index were 71.88, 10.18 and -0.674, respectively. AmCKII were potentially localized in the nucleus, mitochondria and cytoplasm. AmCKII included 32 phosphorylation sites but lacked typical transmembrane domain and signal peptide. One CDI structural domain and three same conserved motifs were included in CKII proteins from *A. mellifera* and six other bee species. The highest homology was found in CKII between *A. mellifera* and *Apis florea*. *AmCKII* was expressed in the tentacle, brain, hypopharyngeal gland, midgut, posion gland, cuticle and fat body of workers, without significant difference in expression levels ($P>0.05$). *AmCKII* was differentially expressed oin egg, 3-day-old larva, 7- and 8-day-old pre-pupae and 12-day-old pupa, the expression level in egg and pre-pupae was significantly higher than that in 3-day-old larva and 12-day-old pupa ($P<0.05$). *AmCKII* was also differentially expressed in 1, 2, 6, 12, 15 and 17-day-old adults, the expression level was the highest in 17-day-old adult and significantly higher than that in 1, 2, 6, 12 and 15-day-old adults. AmCKII was a putative intracellular and hydrophilic protein. CKII was highly conserved among *A. mellifera*, *A. florea*, *Bombus terrestris*, *Bombus impatiens*, *Apis laboriosa*, *Apis ceranae*, and *Apis dorsata*. The homology of CKII between *A. mellifera* and *A. florea* was the highest. *AmCKII* was specifically and highly expressed in the egg and 17-day-old adult.

Key words: *Apis mellifera*; Cyclin-dependent kinase inhibitor 1; molecular characteristics; phylogenetic evolution; expression profile

细胞周期 (Cell cycle) 是指细胞在间期和有丝分裂期发生的一系列事件, 受到若干细胞周期调控蛋白的调节 (Zhang and Li, 2021)。细胞周期蛋白 (Cyclin)、细胞周期蛋白依赖

性激酶（Cyclin dependent kinase, CDK）和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子（Cyclin dependent kinase inhibitor, CKI）是最重要的3种细胞周期调控蛋白，它们之间的相互作用和紧密配合对于完整细胞周期的有序进行至关重要（Gao and Liu, 2019）。CKI通过与CDK或Cyclin-CDK复合物结合，阻止CDK的激活或抑制其激酶活性，进而调控细胞周期的进程（彭洪艳, 2023）。

目前，仅人类和少数模式生物如家鼠 *Mus musculus* 和秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 中CKI被研究地较多且较为深入（曹旭峰, 2016），对于包括蜜蜂在内的绝大多数昆虫，相关研究仍比较滞后。在秀丽隐杆线虫中，CKI家族成员CKI1已被证实是细胞周期启动的关键负调控因子（Buck *et al.*, 2009）。Foley和Sprenger（2001）研究发现果蝇 *Drosophila* CKI (*Rux*)突变体的细胞周期中期阶段明显长于野生型，过表达 *Rux* 可以将停滞的细胞周期中期转为间期。西方蜜蜂 *Apis mellifera* 是一种重要的授粉昆虫和经济昆虫，在维持生态平衡、促进农业生产和推动经济发展等方面都起到不可替代的作用（Sun *et al.*, 2023）。但由于相关研究的缺失，西方蜜蜂CKI的信息匮乏，功能迄今不明。

本研究对西方蜜蜂 *CKII* 基因 (*AmCKII*) 片段进行分子克隆，通过生物信息学方法解析 *AmCKII* 蛋白的理化性质和分子特征，并进行 *AmCKII* 和其他物种CKI1的保守基序和结构域鉴定及系统进化分析，进而测定 *AmCKII* 的时空表达谱，旨在为探究 *AmCKII* 在西方蜜蜂细胞周期调控中的功能研究提供参考与依据。

1 材料与方法

1.1 生物材料

西方蜜蜂工蜂取自福建农林大学蜂学与生物医药学院蜜蜂-病原互作机制研究团队的饲养蜂群。前期研究中，已按照本团队建立的技术流程（吴鹰等, 2023）制备卵、幼虫、7和8日龄预蛹及12日龄蛹的样品；1、2、6、12、15和17日龄工蜂成虫样品；脑、咽下腺、中肠、触角、毒腺、表皮和脂肪体等7个组织的样品。

1.2 PCR扩增与Sanger测序

从GenBank数据库（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/409900>）中下载 *AmCKII*（登录号：XM_006568899.3）的核苷酸序列，利用在线软件（<https://crm.vazyme.com/cetool/singlefragment.html>）在编码区设计上下游扩增引物（F: 5'-GCAGGAATTTGGGTGGAG-3', R: 5'-GGGCATAGGGTTCGGGTA-3'），用于后续PCR扩增。利用RNA抽提试剂盒（Promega, 美国）提取8日龄工蜂（n=3）中肠样品的总RNA，再利用Oligo（dT）引物进行反转录，得到的cDNA作为模板进行PCR扩增。按照吴鹰等（2023）的报道设置反应体系和程序。产物经1.5%的琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像仪（培清, 上海）下进行观察和拍照，并利用产物纯化试剂盒（诺唯赞, 中国）回收目的片段，然

后连接 pMD-19T 载体 (TaKaRa, 中国), 转化大肠杆菌 DH5 α (擎科, 中国), 挑单菌落置于 LB 液体培养基 (氨苄抗性) 振荡培养 12 h, 取少量菌液进行 PCR 鉴定, 结果为阳性的菌液送至上海生工生物工程有限公司进行 Sanger 测序。

1.3 生物信息学分析

利用 NCBI 网站上的 ORF 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测 AmCKII 的氨基酸序列。通过 PSORTII 软件 (Sedaghat-Nejad *et al.*, 2021) 进行 AmCKII 的亚细胞定位预测。使用 ExPASy 网站 (<https://www.expasy.org/resources>) 上的 ProtParam 和 ProtScale 软件分别预测 AmCKI 的理化性质和亲水性。采用 SignalP 5.0 Server, TMHMM, NetPhos 3.1 Server, SOPMA 和 ExPASy 网站的 SWISS-model 软件分别预测磷酸化位点、信号肽、跨膜结构域、二级结构和三级结构。使用 STRING 程序 (<https://string-db.org/>) 分析蛋白质的互作网络。

从 NCBI Protein 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) 中查询和下载东方蜜蜂 *Apis cerana*、黑大蜜蜂 *Apis laboriosa*、大蜜蜂 *Apis dorsata*、小蜜蜂 *Apis florea*、欧洲熊蜂 *Bombus terrestris*、美洲东部熊蜂 *Bombus impatiens*、家鼠和智人 *Homo sapiens* 的 CKII 氨基酸序列, 再利用 Blast 的 CD-search 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 和 MEME 软件 (Bailey and Elkan, 1994) 分别鉴定上述各物种 CKII 的结构域与保守基序。以上软件均采用默认参数。

通过 DNAMAN 8.0 软件 (LynnonBiosoft, Quebec, Canada) 对西方蜜蜂、小蜜蜂、欧洲熊蜂、美洲东部熊蜂、黑大蜜蜂、东方蜜蜂、大蜜蜂、智人和小鼠的 CKII 进行氨基酸序列多重比对。采用 Mega 11.0 软件 (Tamura *et al.*, 2021) 的邻接法 (neighbor-joining) 构建基于上述物种 CKII 氨基酸序列的系统进化树, 设置 1 000 次重复, 其他参数均为软件默认。

1.4 RT-qPCR 检测

设计并合成 AmCKII 的 qPCR 引物 (F: 5'-CCTAGCACCATCCACCATGAA-3'; R: 5'-GAAGCAAGAATTGACCCACCAA-3')。使用 RNA 抽提试剂盒 (Promega, 美国) 分别提取 1.1 节所述不同组织样品、不同发育阶段样品的总 RNA, 反转录合成相应的 cDNA。通过 ABI Quant Studio 3 荧光定量 PCR 系统 (ABI 公司, 美国) 检测 AmCKII 在不同组织和不同发育阶段的相对表达量。以 *actin* 基因 (GenBank 登录号: 406122) 作为内参。每个反应均进行 3 次技术重复和 3 次平行重复。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 AmCKII 的相对表达量, 并利用 SPSS Statistics 20 软件进行单因素方差分析 (ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为显著性阈值并绘图, 利用字母显著标记法对实验数据进行两两比较分析。

2 结果与分析

2.1 AmCKII 蛋白的分子克隆、理化性质和分子特征

通过 PCR 扩增得到符合预期大小（约 250 bp）的目的片段（图 1）。生物信息学分析结果显示，AmCKI1 含 224 个氨基酸，分子式为 $C_{1104}H_{1793}N_{333}O_{331}S_7$ ，分子量约为 25.25 kD，脂溶系数为 71.88，等电点为 10.18，可同时定位于细胞核（47.8%）、线粒体（47.8%）和细胞质（4.3%）；AmCKI1 的平均亲水系数为-0.674，亲水氨基酸数量多于疏水氨基酸（图 2-A）；AmCKI1 含 240 个正电荷氨基酸（139 个 Arg 和 101 个 Lys）和 234 个负电荷氨基酸（151 个 Glu 和 83 个 Asp），以及 16 个丝氨酸磷酸化位点，13 个苏氨酸磷酸化位点和 3 个酪氨酸磷酸化位点（图 2-B），但不含典型信号肽和跨膜结构域（图 2-C、D）。

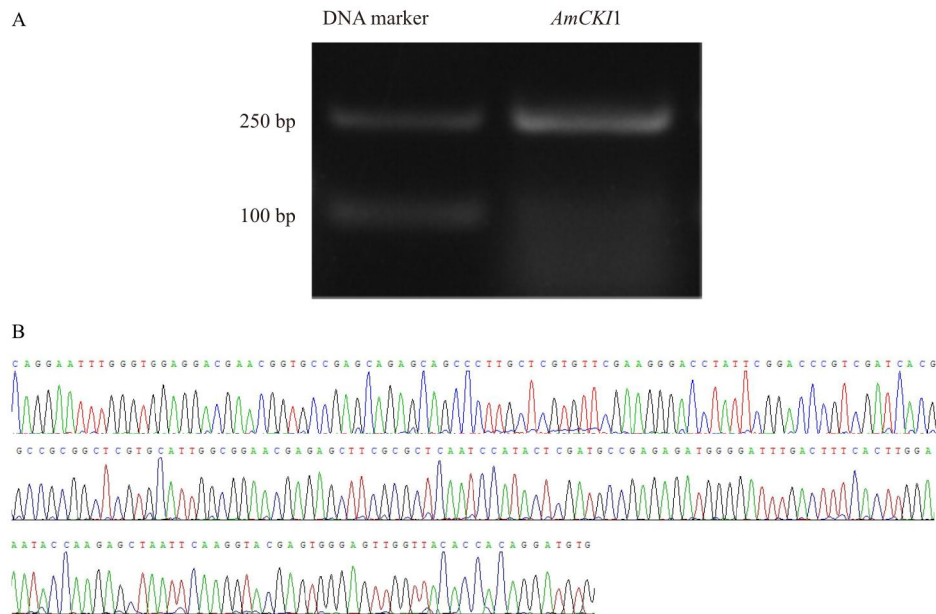


图 1 *AmCKI1* 基因片段的分子克隆

Fig. 1 Molecular cloning of *AmCKI1* gene's fragment

注：A，*AmCKI1* 片段扩增产物的电泳；B，目的片段的 Sanger 测序峰图。Note: A, Electrophoresis for the amplified fragment from *AmCKI1*; B, Peak diagram of Sanger sequencing of target fragment.

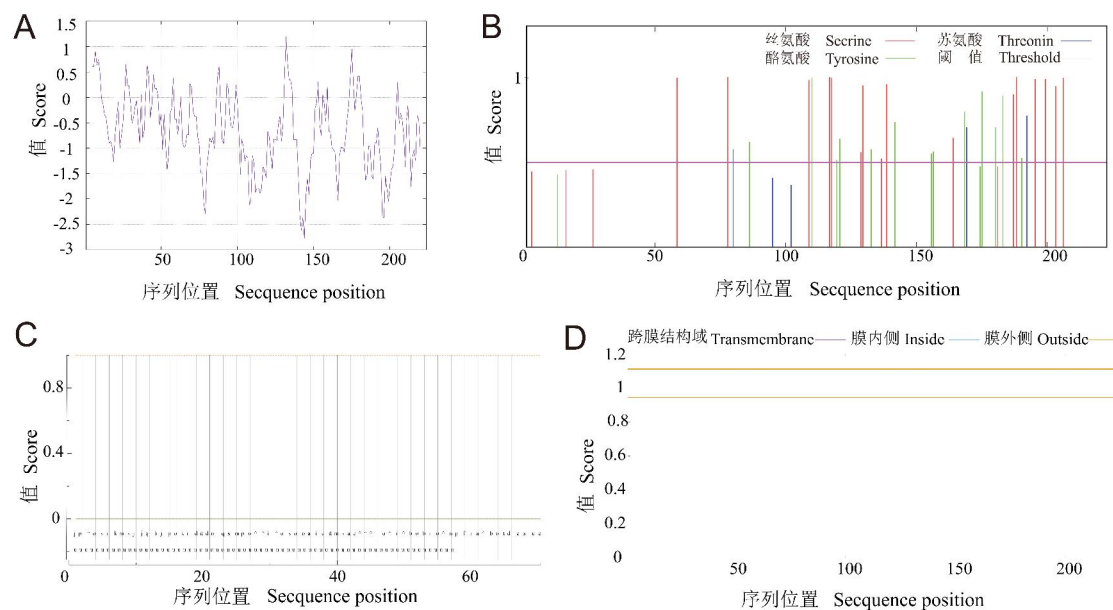


图 2 *AmCKI1* 蛋白的亲水性 (A)、磷酸化位点 (B)、信号肽 (C) 和跨膜结构域 (D)

Fig. 2 Hydrophilia (A), phosphorylation site (B), signal peptid (C) and transmembrane domain (D) of AmCKI1 protein

2.2 AmCKI1 蛋白的二级结构、三级结构和互作网络

AmCKI1 含 127 个 (56.70%) 无规则卷曲, 75 个 (33.48%) α -螺旋, 15 个 (6.70%) 延长链和 7 个 (3.12%) β -转角 (图 3-A)。三级结构分析结果显示 AmCKI1 中无规则卷曲和 α -螺旋构成最为丰富, 与二级结构分析结果一致 (图 3-B)。AmCKI1 与 CycE 等 10 种蛋白潜在互作, 构成 1 个蛋白互作网络, 节点数为 11 个, 边数为 42 个, 平均节点数 7.64, 平均局部聚类系数 0.767 (图 3-C)。

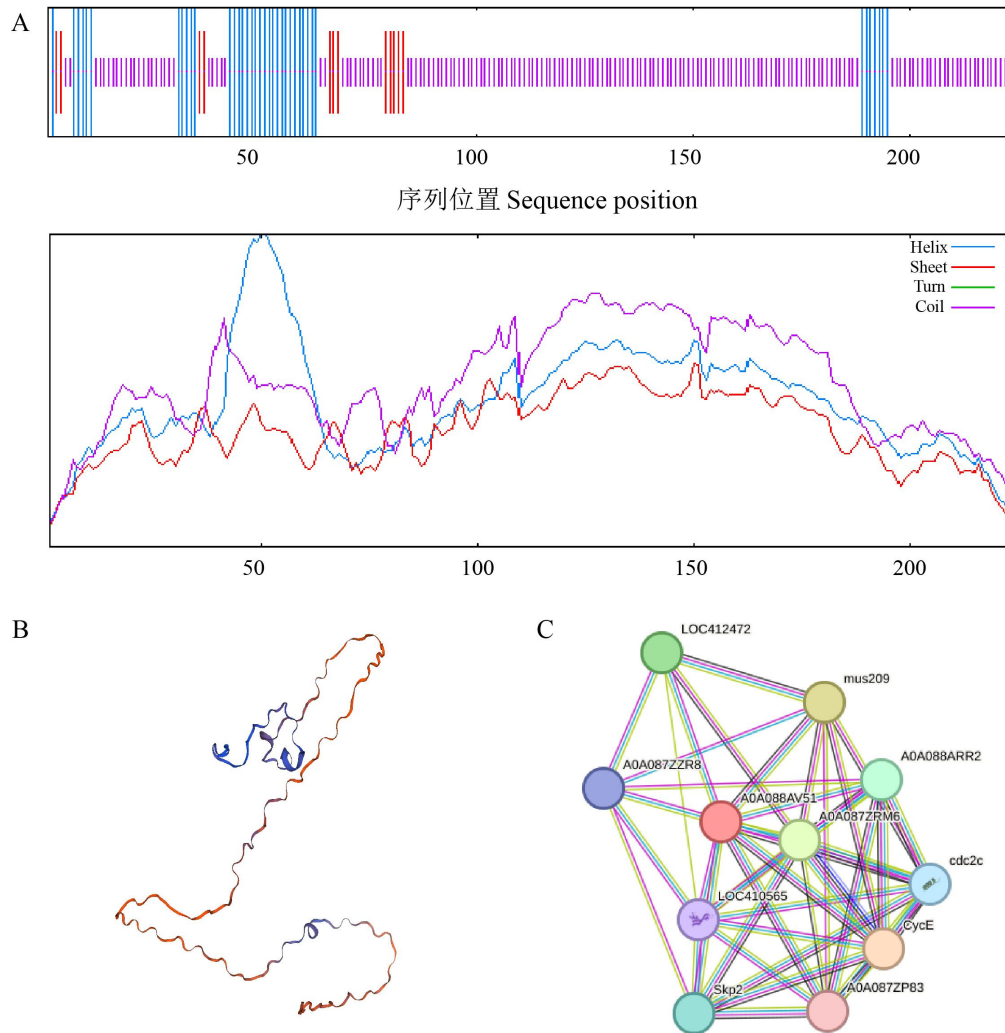


图 3 AmCKI1 蛋白的二级结构(A)、三级结构(B)和蛋白互作网络(C)

Fig. 3 Secondary structure (A), tertiary structure (B) and protein interaction network (C) of AmCKI1 protein

2.3 AmCKI1 和其他物种 CKI1 包含的结构域及保守基序

AmCKI1 含 1 个 CDI 结构域, 位于第 37~83 位氨基酸之间, 属于 cl03494 超家族成员, 在小蜜蜂、欧洲熊蜂 *Bombus terrestris*、美洲东部熊蜂、黑大蜜蜂、东方蜜蜂和大蜜蜂的 CKI1 中同样鉴定到该结构域 (图 4-A)。此外, 在 AmCKI1 中鉴定到 3 个保守基序: Motif 1、Motif 2 和 Motif 3, 上述 3 个保守基序也存在于其他 6 个物种的 CKI1 (图 4-B)。

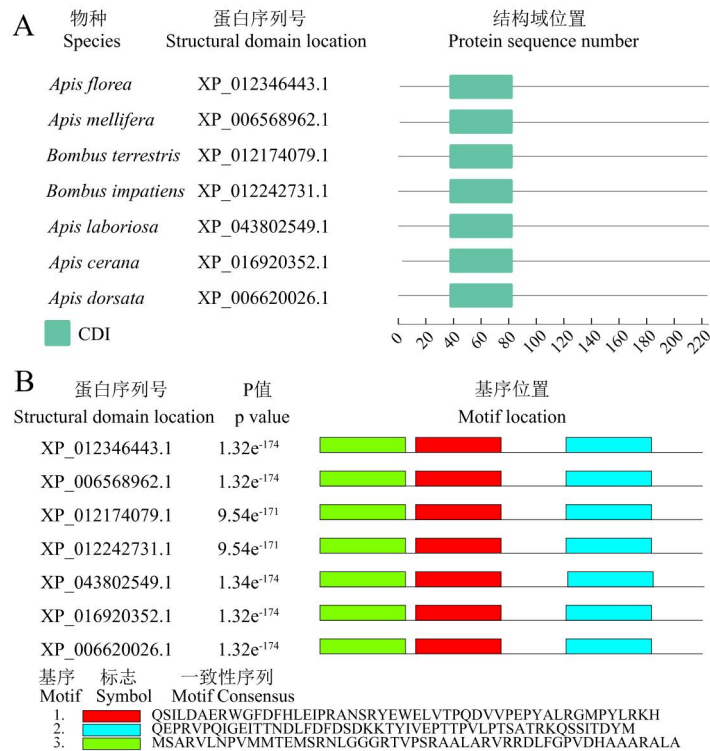


图 4 西方蜜蜂与其他 6 个物种 CKII 的结构域 (A) 和保守基序 (B) 比较

Fig. 4 Comparison of structural domains (A) and conservative motifs (B) in CKII between *Apis mellifera* and other 6 species

系统进化分析显示, *AmCKII* 与东方蜜蜂、大蜜蜂、黑大蜜蜂、小蜜蜂、欧洲熊蜂、美洲东部熊蜂的 CKII 聚为一支, 而智人与小鼠的 CKII 聚为另一支; 西方蜜蜂与小蜜蜂的 CKII 同源性最高 (图 5)。

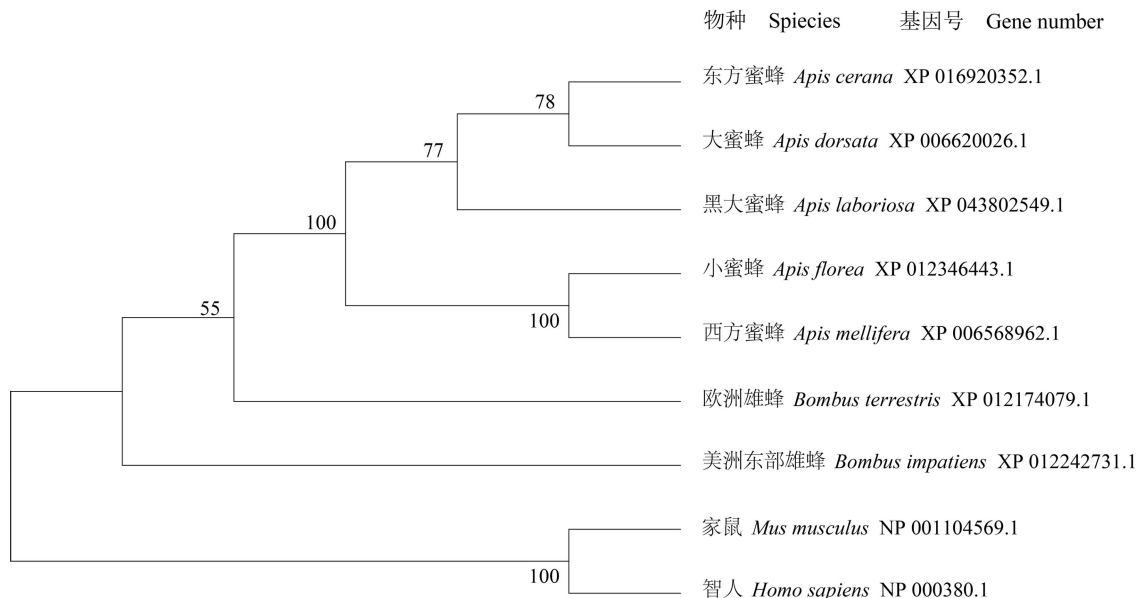


图 5 西方蜜蜂与其他 8 个物种基于 CKII 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of *Apis mellifera* and other 8 species based on CKII amino acid sequence

2.4 *AmCKII* 基因的时空表达谱分析

RT-qPCR 结果显示, *AmCKII* 在西方蜜蜂工蜂的脑、咽下腺、中肠、触角、毒腺、表皮

和脂肪体中均有表达，但表达量无显著差异 ($P>0.05$) (图 6)。

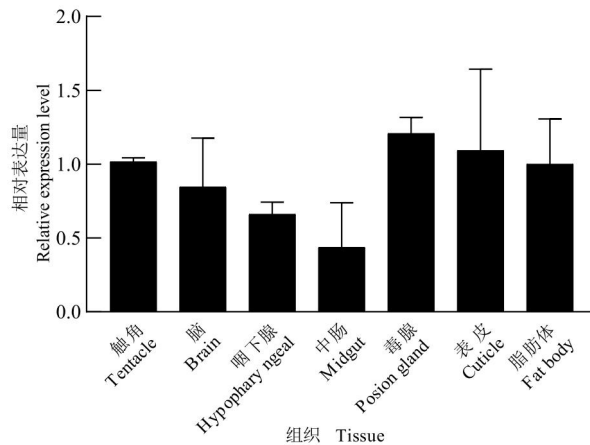


图 6 西方蜜蜂工蜂 7 个不同组织中 *AmCKII* 的相对表达量

Fig. 6 Relative expression level of *AmCKII* in 7 different tissues of *Apis mellifera* worker

注：图中数据为平均值±标准差；柱上不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下同。Note: Data in the figure were Mean±SD. Different letters above bars indicated significant difference ($P<0.05$). The same below.

AmCKII 在卵、3 日龄幼虫、7 和 8 日龄预蛹及 12 日龄蛹中差异表达，在卵中的表达量最高且显著高于 3 日龄幼虫和 12 日龄蛹中的表达量 ($P<0.05$)，而在 3 日龄幼虫中的表达量最低且显著低于卵、7 和 8 日龄预蛹及 12 日龄蛹中的表达量 (图 7-A)。另外，*AmCKII* 在工蜂的 1、2、6、12、15 和 17 日龄成虫体内差异表达，在 17 日龄成虫中的表达量最高且显著高于 1、2、6、12 和 15 日龄成虫体内的表达量，而在 1 日龄成虫体内表达量最低且显著低于 15 和 17 日龄成虫体内的表达量；*AmCKII* 在工蜂成虫体内的表达水平总体表现为持续上升趋势 (图 7-B)。

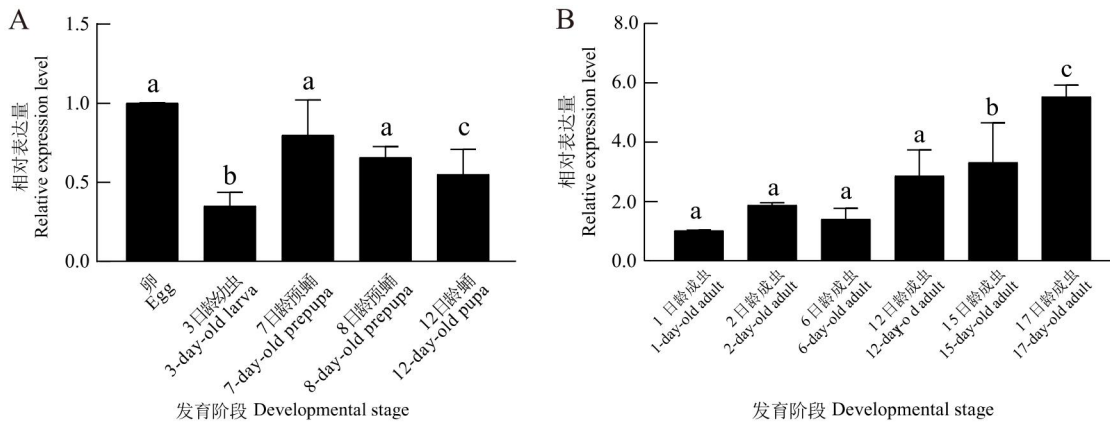


图 7 西方蜜蜂工蜂幼虫 (A) 和成虫 (B) 发育阶段 *AmCKII* 的相对表达量

Fig. 7 Relative expression level of *AmCKII* in larval (A) and adult (B) developmental stages of *Apis mellifera* worker

3 结论与讨论

有研究表明 CKI 在家蚕 *Bombyx mori*、果蝇等昆虫的细胞增殖 (Wei *et al.*, 2022)、周期 (De Nooij *et al.*, 1996) 和分裂 (Foley and Sprenger, 2001) 等活动中起到重要功能。但蜜

蜂的 CKI 研究此前未见报道。本研究中, PCR 扩增和 Sanger 测序结果(图 1)表明成功克隆到 *AmCKII* 的基因片段, 证明该基因在西方蜜蜂工蜂中肠中真实表达。生物信息学分析结果显示, *AmCKII* 的分子式为 $C_{1104}H_{1793}N_{333}O_{331}S_7$, 分子量约为 25.25 kD, 脂溶系数为 71.88, 等电点为 10.18, 可同时定位于细胞核、线粒体和细胞质且不含典型信号肽和跨膜结构域(图 2-C、D), 说明 *AmCKII* 是潜在的胞内蛋白; *AmCKII* 的平均亲水系数为-0.674, 亲水氨基酸数量多于疏水氨基酸(图 2-A), 说明其可能是亲水性蛋白。前人研究发现 *CycE* 直接调节果蝇神经母细胞增殖(Shen *et al.*, 2018)。本研究中, *AmCKII* 与 *CycE* 和 *Skp2* 等 10 种蛋白潜在互作(图 3), 暗示 *AmCKII* 通过与上述蛋白互作在细胞增殖和神经调节等方面发挥潜在的功能。以上结果明确了 *AmCKI* 的理化性质和分子特征, 为进一步的功能研究提供了重要的参考信息。

蛋白质具有复杂的空间构象, 基序是氨基酸序列中具有相同序列的区域, 通常具有一定的功能作用(Kitagawa *et al.*, 2022)。蛋白质结构域是蛋白质的最小功能和结构单位, 通常由 30~100 个氨基酸组成。不同的蛋白质可能共享相同的结构域, 这些共享的结构域通常具有相似的功能(Chen *et al.*, 2020)。本研究在西方蜜蜂和其他 6 种蜂的 CKII 中均鉴定到 1 个相同的结构域(CDI)和 3 个相同的保守基序(Motif 1、Motif 2 和 Motif 3)(图 4), 说明 CKII 在上述 7 种蜂中高度保守。本研究中, 系统进化分析结果西方蜜蜂和小蜜蜂的 CKII 聚为一支, 同源性最高。推测在长期的进化过程中西方蜜蜂和小蜜蜂的 CKII 仍保留着相似的功能。

在有丝分裂期, CKI 对于 DNA 精确复制, 细胞周期正常进行及细胞分化调控等均至关重要(Narbonne-Reveau and Lilly, 2016)。Deng 等(2010)曾对拟南芥 *Arabidopsis thaliana* *CKII* 的表达模式进行测定, 发现 *CKII* 主要在花朵、角果和花蕾中表达。但此前动物 *CKII* 表达模式的研究缺失。本研究发现, *AmCKII* 在西方蜜蜂 7 个不同组织, 不同虫态及不同发育阶段中均有表达, 体现出 *AmCKII* 分布和表达的广泛性及功能的重要性。此外, 还发现 *AmCKII* 在西方蜜蜂工蜂的卵和 7、8 日龄预蛹的表达量较高, 并显著高于 3 日龄幼虫和 12 日龄蛹(图 7-A), 暗示其在卵期和预蛹期发挥重要的功能, 值得进一步探究。作为一种真社会性昆虫, 西方蜜蜂工蜂随日龄增长而表现出明确的职能分工。刚出房的工蜂主要承担清理巢房和保温工作; 5~12 日龄的工蜂主要承担哺育小幼虫的工作; 12~18 日龄则主要承担筑巢、保卫等工作; 18 日龄后进入采集阶段(曾志将, 2007)。本研究中, *AmCKII* 的表达量随着日龄的增加而逐渐上升, 至 17 日龄达到最高(图 7-B)。推测 *AmCKII* 参与西方蜜蜂工蜂的职能分工, 但需要进一步的研究证实。

参考文献 (References)

- Bailey TL, Elkan C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers [J]. *Proceedings International Conference Intelligent Systems for Molecular Biology*, 1994, 2: 28-36.
- Buck SH, Chiu D, Saito RM. The cyclin-dependent kinase inhibitors, cki-1 and cki-2, act in overlapping but distinct pathways to control cell cycle quiescence during *C. elegans* development [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8 (16): 2613-2620.
- Bury M. New insights into CDK regulators: Novel opportunities for cancer therapy [J]. *Trends in Cell Biology*, 2021, 31 (5): 331-344.

- Cao XF. Cloning and Analysis of Cyclin-dependent Kinase Inhibitor *OsCKI* Gene in Rice [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University Master Thesis, 2016. [曹旭峰. 水稻细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 *OsCKI* 基因的克隆与分析 [D]. 成都: 四川农业大学硕士学位论文, 2016]
- Chen J, Sagum C, Bedford MT. Protein domain microarrays as a platform to decipher signaling pathways and the histone code [J]. *Methods*, 2020, 184: 4-12.
- De Nooij JC, Letendre MA, Hariharan IK. A cyclin-dependent kinase inhibitor, Dacapo, is necessary for timely exit from the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis [J]. *Cell*, 1996, 87 (7): 1237-1247.
- Deng Y, Dong H, Mu J, *et al.* Arabidopsis histidine kinase *CKII* acts upstream of histidine phosphotransfer proteins to regulate female gametophyte development and vegetative growth [J]. *The Plant Cell*, 2010, 22 (4): 1232-1248.
- Foley E, Sprenger, F. The cyclin-dependent kinase inhibitor Roughex is involved in mitotic exit in *Drosophila* [J]. *Current Biology*, 2001, 11 (3): 151-160.
- Gao S, Liu F. Novel insights into cell cycle regulation of cell fate determination [J]. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 2019, 20 (6): 467.
- Kitagawa R, Aier I, Raj U, *et al.* Pr [m]: An algorithm for protein motif discovery [J]. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, 2022, 19 (1): 585-592.
- Narbonne-Reveau K, Lilly M. The Cyclin-dependent kinase inhibitor Dacapo promotes genomic stability during premeiotic S phase [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2016, 20 (7): 1960-1969.
- Peng HY. Functional Analysis of Cyclin-dependent Kinase Genes *AccCDK7* and *AccCDK9* in *Apis cerana* [D]. Taian: Shandong Agricultural University Master Thesis, 2023. [彭洪艳. 中华蜜蜂细胞周期蛋白依赖性激酶基因 *AccCDK7* 和 *AccCDK9* 的功能分析 [D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2023]
- Sedaghat-Nejad E, Fakharian MA, Pi J, *et al.* P-sort: An open-source software for cerebellar neurophysiology [J]. *Neurophysiol*, 2021, 126 (4): 1055-1075.
- Shen Y, Wang LW, Hirose S, *et al.* The transcriptional factor Apt regulates neuroblast differentiation through activating CycE expression [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 499 (4): 889-894.
- Sun MH, Fan XX, Long Q, *et al.* First characterization and regulatory function of piRNAs in the *Apis mellifera* larval response to *Ascosphaera apis* invasion [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24 (22): 16358.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38 (7): 3022-3027.
- Wei Y, Zhou XL, Chen P, *et al.* BmCDK5 affects cell proliferation and cytoskeleton morphology by interacting with BmCNN in *Bombyx mori* [J]. *Insects*, 2022, 13 (7): 609.
- Wu Y, Liu ZT, Zhao HD, *et al.* Gene cloning, polyclonal antibody preparation and expression pattern of m⁶A methyltransferase from the western honeybee [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2023, 66 (7): 885-895. [吴鹰, 刘治滩, 赵浩东, 等. 西方蜜蜂 m⁶A 甲基转移酶的基因克隆、多克隆抗体制备及表达模式 [J]. 昆虫学报, 2023, 66 (7): 885-895]
- Zeng ZJ. Honeybee Biology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007: 65-84. [曾志将. 蜜蜂生物学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 65-84]
- Zhang L, Li X. DEAD-Box RNA helicases in cell cycle control and clinical therapy [J]. *Cells*, 2021, 10 (6): 1540.