

东方蜜蜂突触囊泡糖蛋白 2B 基因的生物信息学和表达模式分析

宋宇轩¹, 董舒楠¹, 叶道有¹, 臧贺^{1,2,3}, 范小雪^{1,2,3}, 邱剑丰^{1,2,3},
陈大福^{1,2,3}, 严提珍^{2,4*}, 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; 4. 东莞市妇幼保健院生殖与遗传研究所, 广东东莞 523000)

摘要: 解析东方蜜蜂 *Apis cerana* 突触囊泡糖蛋白 2B (Synaptic vesicle glycoprotein 2B, AcSV2B) 的理化性质和分子特征, 检测 *AcSV2B* 基因在东方蜜蜂工蜂不同组织和发育阶段的表达模式, 丰富 *AcSV2B* 信息并为进一步的功能研究提供基础。通过 Stem-loop RT-PCR 和 Sanger 测序验证 *AcSV2B* 在东方蜜蜂工蜂的表达和序列真实性。通过相关生物信息学软件预测 AcSV2B 的理化性质、信号肽、磷酸化位点、二级结构及三级结构, 鉴定和比较东方蜜蜂和其他物种 SV2B 的结构域及保守基序, 并进行系统进化树的构建和分析。采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 *AcSV2B* 在工蜂的触角、中肠、脑、毒腺、表皮、咽下腺和脂肪体等不同组织, 卵、幼虫、预蛹、蛹和成虫, 以及不同日龄工蜂成虫中的相对表达量。*AcSV2B* 在东方蜜蜂工蜂体内真实存在, 符合预测结果。*AcSV2B* 含 3 814 个核苷酸, 编码 671 个氨基酸; AcSV2B 的分子量约为 72.87 ku, 分子式为 C₃₃₁₇H₅₁₆₂N₈₄₂O₉₄₀S₃₁, 脂溶系数为 102.32, 等电点为 6.02, 包含 24 个丝氨酸磷酸化位点和 11 个跨膜结构域, 不含典型的信号肽, 主要分布于内质网。AcSV2B 含 6 个结构域和 5 个保守基序。东方蜜蜂、小蜜蜂 *Apis florea* 和西方蜜蜂 *Apis mellifera* 的 SV2B 在进化树上聚为一支。*AcSV2B* 的表达量在脑中最高且显著高于触角、中肠、毒腺、表皮、咽下腺和脂肪体中的表达量 ($P < 0.05$); *AcSV2B* 在 8 日龄预蛹中的表达量最高且显著高于卵、3 日龄幼虫和 7 日龄预蛹中的表达量 ($P < 0.05$); *AcSV2B* 在 18 日龄成虫中的表达量最高且显著高于 1 日龄、2 日龄、6 日龄和 12 日龄成虫中的表达量 ($P < 0.05$)。AcSV2B 可能是一种亲水性蛋白、跨膜蛋白和胞内蛋白, 东方蜜蜂、小蜜蜂和西方蜜蜂的 SV2B 保守性和同源性较高, *AcSV2B* 在脑、8 日龄预蛹和 18 日龄成虫中特异性高表达。

关键词: 东方蜜蜂; 突触囊泡糖蛋白; 分子特征; 系统进化; 表达模式

中图分类号: Q963 文献标识码: A

Investigation of bioinformatics and expression pattern of synaptic vesicle

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 (CARS-44-KXJ7); 福建农林大学硕士生导师团队项目 (郭睿); 福建省自然科学基金面上项目 (2022J01131334, 2023J01133656); 福建农林大学科技创新专项基金 (KFb22060XA)

作者简介: 宋宇轩, 男, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂分子生物学, E-mail: 15757057565@163.com

*通讯作者 Author for correspondence: 郭睿, 男, 副教授, 主要从事昆虫-病原互作研究, E-mail: ruiguog@fafu.edu.cn, 严提珍, 女, 主任医师, 主要从事生殖与遗传病研究, E-mail: yantizhen@gdmu.edu.cn

收稿日期 Received: 2024-06-28; 修回日期 Revision received: 2024-10-05; 接受日期 Accepted: 2024-10-09

glycoprotein 2B gene in *Apis cerana*

SONG Yu-Xuan¹, DONG Shu-Nan¹, YE Dao-You¹, ZANG He^{1,2,3}, FAN Xiao-Xue^{1,2,3}, QIU Jian-Feng^{1,2,3}, CHEN Da-Fu^{1,2,3}, YAN TI-Zheng^{2,4*}, 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; 4. Institute of Reproduction and Genetics, Dongguan Maternal and Child Health Hospital, Dongguan 523000, China)

Abstract: The objective of this work is to enrich the information about *AcSV2B* and provide a basis for further functional dissection, by analyzing the physicochemical property and molecular characteristics of the *Apis cerana* synaptic vesicle glycoprotein 2B protein (AcSV2B) and detecting the expression profile of *AcSV2B* gene in different tissues and developmental stages of worker. The expression and sequence authenticity of *AcSV2B* in *A. cerana* worker bees were verified by Stem-loop RT-PCR and Sanger sequencing. Relevant bioinformatic software were employed to predict the physicochemical property, signal peptide, phosphorylation site, secondary structure and tertiary structure of AcSV2B, to identify and compare structural domains and conserved motifs in SV2B among *A. cerana* and other species followed by construction and investigation of the phylogenetic tree. RT-qPCR was utilized to detect the relative expression level of *AcSV2B* in various tissues of worker including antenna, midgut, brain, venom gland, epidermis, hypopharyngeal gland and fat body, in egg, larva, prepupa, pupa and adult of worker, and worker adults at different day-old. *AcSV2B* was really present in the worker bees of *A. cerana*, which was consistent with the predicted results. *AcSV2B* contained 3 814 nucleotides, encoding 671 amino acids. The molecular weight of AcSV2B was approximately 72.87 ku, the molecular formula was C₃₃₁₇H₅₁₆₂N₈₄₂O₉₄₀S₃₁, the aliphatic index was 102.32, and the theoretical pI was 6.02. AcSV2B included 24 serine phosphorylation sites and 11 transmembrane domains, but there were no typical signal peptides. AcSV2B was mainly distributed in the endoplasmic reticulum. Additionally, AcSV2B included 6 structural domains and 5 conserved motifs. SV2B from *A. cerana*, *Apis florea* and *Apis mellifera* were clustered into a clade on the phylogenetic tree. Furthermore, the relative expression level of *AcSV2B* was the highest in brain and significantly higher ($P < 0.05$) than that in antenna, midgut, venomous gland, epididymis, hypopharyngeal gland and fat body; the relative expression level of *AcSV2B* was the highest in 8-day-old prepupa and significantly higher ($P < 0.05$) than that in egg, the 3-day-old larva, and the 7-day-old prepupa;

the relative expression level of *AcSV2B* was the highest in 18-day-old adult and significantly higher ($P < 0.05$) than that in 1-, 2-, 6- and 12-day-old adults. *AcSV2B* may be a hydrophilic protein, transmembrane protein and intracellular protein, The SV2B of *A. cerana*, *A. florea* and *A. mellifera* were highly conserved and homologous, and *AcSV2B* was highly expressed in brain, 8-day-old prepupal and 18-day-old adult.

Key words: *Apis cerana*; synaptic vesicle glycoprotein 2B; molecular characteristics; phylogenetic tree; conserved sequence motifs

突触囊泡糖蛋白 2B (synaptic vesicle glycoprotein 2B, SV2B) 是突触囊泡蛋白 2 (synaptic vesicle glycoprotein 2, SV2) 家族的一种同工型蛋白 (Stout *et al.*, 2019), 也是存在于分泌囊泡 (包括突触囊泡) 上的跨膜蛋白, 在神经传递过程中具有重要作用 (Heese *et al.*, 2001)。近年来的研究表明, SV2B 参与胞吐作用 (Paulussen *et al.*, 2023)、生长发育 (Lopez *et al.*, 2023) 和氧化应激 (Cheng *et al.*, 2022) 等多个方面的调控。Lazzell (2004) 等研究发现, SV2B 可以与突触结合蛋白 1 (synaptotagmin 1, SYT1) 直接相互作用调控 SYT1 的稳定性和转运, 参与胞吐作用。Duan 等 (2021) 发现, SV2B 家族的过表达会导致人的神经胶质瘤细胞增殖、侵袭和迁移能力增强。Detrait 等 (2014) 发现, SV2B 的缺失对 β -淀粉样蛋白诱导的小鼠 *Mus musculus* 氧化应激、胆碱能缺陷和认知障碍具有保护作用, 说明 SV2B 是 β -淀粉样蛋白对突触功能有害作用的潜在关键参与者。

前人对智人 *Homo sapiens* (Zhang *et al.*, 2020)、小鼠 (Detrait *et al.*, 2014) 和肉毒杆菌 *Botulinum* (Dong *et al.*, 2008) 等动物与微生物的 SV2B 进行了较多研究, 例如马登镇 (2023) 依据癌症基因组图谱数据库, 对在胶质瘤组织中 SV2B 进行了生物信息学分析, 发现 SV2B 在胶质瘤组织中的表达量显著低于在正常脑组织中的表达量。Requena (2020) 研究发现, SV2B 在雪貂 *Mustela putorius furo* 大脑皮层的发育过程中参与调节顶端放射状胶质细胞的增殖活性和基底放射状胶质细胞的生成。昆虫 SV2 蛋白家族研究起步较晚且进展缓慢。在果蝇中, 突触囊泡糖蛋白同源物 SV2L1 和 SV2L2 在尼古丁对神经退行性病变的保护作用中起重要作用, 当这两个基因被敲降时, 尼古丁无法挽救神经退行性病变 (Olsen *et al.*, 2023)。在家蚕中, *SV2B* 可能介导家蚕神经递质的释放, 并调节丝腺中丝蛋白的分泌 (Fang *et al.*, 2015)。

东方蜜蜂 *Apis cerana* 主要分布于亚洲的中国、伊朗、日本和朝鲜等国家及俄罗斯远东地区, 具有较强的耐低温、抗病性和适应性, 是当地的重要授粉昆虫和生产用蜂种 (Zeng *et al.*, 2017)。目前, 东方蜜蜂 *SV2B* (*AcSV2B*) 的研究处于起步阶段。为此, 本研究在 GeneBank 数据库 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/XM_017049040.1/) 中查询 *AcSV2B* 基因的预测序列, 利用分子克隆和 Sanger 测序验证其真实性, 通过生物信息学解析的 *AcSV2B* 蛋白的理化性质和分子特征, 鉴定和比较东方蜜蜂和其他昆虫 SV2B 蛋白的保守基序和结构域并进行系统进化分析, 进而检测

AcSV2B 在东方蜜蜂工蜂不同组织和发育阶段的表达模式，旨在丰富 *AcSV2B* 的基本信息，并为进一步的功能研究提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 供试生物材料

东方蜜蜂工蜂及幼虫，取自福建农林大学蜂学与生物医药学院蜜蜂保护课题组饲养的实验蜂群。

1.2 样品制备

(1) 从群势较强的蜂群中提取一张卵虫巢至实验室，在解剖镜下用干净的移虫针将卵 ($n=50$) 收集至干净的离心管；(2) 根据本实验室已建立的技术流程 (Chen *et al.*, 2017) 进行幼虫饲养和取样：用移虫针将 2 日龄幼虫移至预置饲料的 48 孔培养板，置于恒温恒湿箱 (精科，上海) 在温度 $35^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 70% 的条件下饲养，每 24 h 更换 1 次新鲜饲料，分别收集 3 日龄幼虫 ($n=3$)、7 日龄预蛹 ($n=3$)、8 日龄预蛹 ($n=3$) 和 12 日龄蛹 ($n=3$)。(3) 另选取一张将要出房的成熟封盖子脾，放入恒温恒湿培养箱，待其羽化出房后用无味无毒的油漆在背部进行标记 (记为 0 d) 后放回原蜂群 (约 1 500 头)，分别在 1 日龄、2 日龄、6 日龄、12 日龄、15 日龄和 18 日龄时进行收集工蜂成虫样品 ($n=3$)；(4) 收集刚出房工蜂并置于冰上麻醉，在超净工作台中用干净的眼科镊和眼科剪小心剖取触角、咽下腺、脑、表皮、中肠、脂肪体和毒腺 ($n=6$)，整个过程均在冰上完成，以最大限度防止组织 RNA 降解；剖取的组织放入 RNA-free 离心管，经液氮速冻后转移至 -80°C 超低温冰箱保存备用。

1.3 *AcSV2B* 的基因的分子克隆和 Sanger 测序验证

在 GeneBank 数据库 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_017049040.1/) 中查询 *AcSV2B* 基因的预测序列 (Gene Bank 登录号: LOC107992917)，根据 *AcSV2B* 的核酸序列设计正向引物及反向引物 (F: 5'-TCTAGTTGTTTAAACGAGCTCTTTCTAACACTTTCAAACG-3', R: 5'-CAGGTCGACTCTAGACTCGAGGCCTAAAAATAGTCATCCG-3')，委托上海生工生物工程公司进行合成。使用 RNA 抽提试剂盒 (Promega, 美国) 提取中华蜜蜂工蜂样品的总 RNA，用 stem-loop 引物进行反转录，得到的 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增。反应体系 (20 μL)：PCR mix (诺唯赞，南京) 10 μL ，上下游引物各 1 μL ，cDNA 模板 1 μL DEPC 处理水 7 μL 。反应条件： 95°C 5 min； 95°C 50 s， 55°C 30 s， 72°C 60 s，34 个循环； 72°C 5 min。PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测，切胶回收目的片段，连接 pMD-19T 载体 (TaKaRa, 日本)，转化大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 涂于含氨苄抗生素的 LB 固体培养基，置于 37°C 生化箱培养过夜。第 2 天挑取单菌落置于 LB 液体培养基 (含氨苄抗生素) 中振荡培养 12 h，取少量菌液进行 PCR 鉴定，结果为阳性的菌液送至上海

生工生物工程股份有限公司进行 Sanger 测序。

1.4 AcSV2B 理化性质与分子特征分析

使用 NCBI 网站上的 ORF 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 预测 *AcSV2B* 编码的氨基酸序列。采用 Expasy 网站 (<https://www.expasy.org/resources>) 上的 SWISS-model, Protparam 和 ProtScale 等软件预测和分析 *AcSV2B* 的三级结构、理化性质和亲水性。分别利用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)、TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)、SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)、NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 软件预测和分析 *AcSV2B* 的二级结构、磷酸化位点、信号肽和跨膜结构域。通过 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 软件预测 *AcSV2B* 蛋白的亚细胞定位。以上软件均采用默认参数。

1.5 结构域和保守基序鉴定

采用 Pfam 网站上的 Search 工具 (<http://pfam.xfam.org/>) 鉴定东方蜜蜂等 9 个物种 SV2B 的结构域, 然后使用 TBtools 软件 (Chen *et al.*, 2020) 进行分析, 采用软件默认参数。通过 MEME 软件 (Bailey *et al.*, 2009) 鉴定和分析东方蜜蜂和上述其他物种 SV2B 的保守基序, 设置不同结构域的数量为 6, 最小氨基酸残基数为 6 aa, 最大氨基酸残基数为 50 aa, 其余为默认参数。

1.6 系统进化分析

利用 Blast 工具将 *AcSV2B* 的氨基酸序列比对到 GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), 从搜索结果中选择序列相似性最高的 7 种蜂以及海德果蝇 *Drosophila hydei* 和家蚕 *Bombyx mori* 的 SV2B 氨基酸序列。通过 Mega 11.0 软件 (Tamura *et al.*, 2021) 进行 *AcSV2B* 氨基酸序列的多重比对, 将海德果蝇和家蚕设为外群, 进而采用邻接法构建系统进化树, 重复设为 1 000 次。

1.7 表达模式检测

利用 RNA 抽提试剂盒 (Promega 公司, 美国) 分别提取 1.1 节制备的工蜂不同组织样品和不同发育阶段样品的总 RNA, 作为模板进行反转录, 得到的 cDNA 作为模板进行实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)。反应在 Quant Studio 3 荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司, 美国) 上进行。以肌动蛋白基因 actin (GenBank 登录号: XM_017059068.2) 作为内参。反应体系和条件参照郭意龙等 (2022) 的报道进行设置。每个反应均进行 3 次技术重复和 3 次平行重复。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *AcSV2B* 的相对表达量。通过 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析和绘图, 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。使用 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 *AcSV2B* 的表达和序列验证

琼脂糖凝胶电泳结果显示，通过 Stem-loop RT-PCR 扩增出单一且大小符合预期产物大小（约 250 bp）的目的片段（图 1-a），说明 *AcSV2B* 在东方蜜蜂工蜂中真实表达。Sanger 测序结果显示，PCR 扩增片段的序列与前期预测的 *AcSV2B* 序列一致（图 1-b），表明 *AcSV2B* 在意大利蜜蜂工蜂幼虫中真实表达。

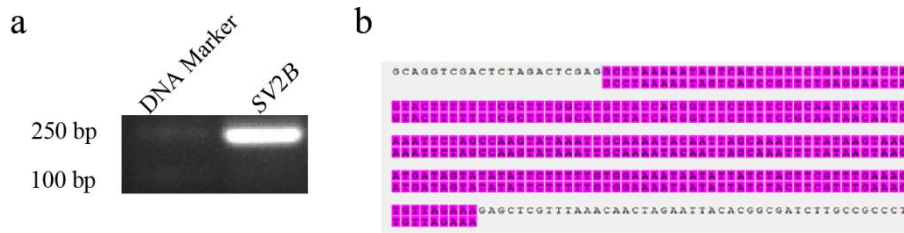


图 1 *AcSV2B* 的琼脂糖凝胶电泳结果 (a) 和序列验证 (b)

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis results (a) and sequence verification (b) of *AcSV2B*

2.2 *AcSV2B* 蛋白的理化性质和分子特征

AcSV2B 共含有 3 814 个核苷酸，可编码 671 个氨基酸。*AcSV2B* 的分子量约为 72.87 ku，分子式为 $C_{3317}H_{5162}N_{842}O_{940}S_{31}$ ，脂溶系数为 102.32，等电点为 6.02，不稳定系数为 40.14。*AcSV2B* 含有 53 个负电荷氨基酸，包括 18 个天冬氨酸 (Asp) 和 35 个谷氨酸 (Gly)；43 个正电荷氨基酸，包括 22 个精氨酸 (Arg) 和 21 个赖氨酸 (Lys)；含量最高和最低的氨基酸分别是亮氨酸 (Leu) 和色氨酸 (Trp)。

AcSV2B 的平均亲水系数为 0.386，亲水氨基酸数量多于疏水氨基酸数量（图 2-a）；*AcSV2B* 含有 11 个跨膜结构域（图 2-b），但不含典型的信号肽（图 2-c）；*AcSV2B* 包含 7 个酪氨酸磷酸化位点，24 个丝氨酸磷酸化位点及 37 个苏氨酸磷酸化位点（图 2-d）；*AcSV2B* 中含有 275 个 α 螺旋（占比 40.98%），22 个 β 折叠（占比 3.28%），237 个无规则卷曲（占比 35.32%），137 个延长链（占比 20.42%）（图 2-e）；*AcSV2B* 的三级结构与其模板 A0A3L8DRS8.1.A 的同源性达 84.16%，且含较多 α -螺旋和无规则卷曲，与二级结构预测结果相符（图 2-f）；另外，*AcSV2B* 可同时定位于内质网、线粒体和细胞核，可能性占比分别为 66.7%、22.2%和 11.1%。

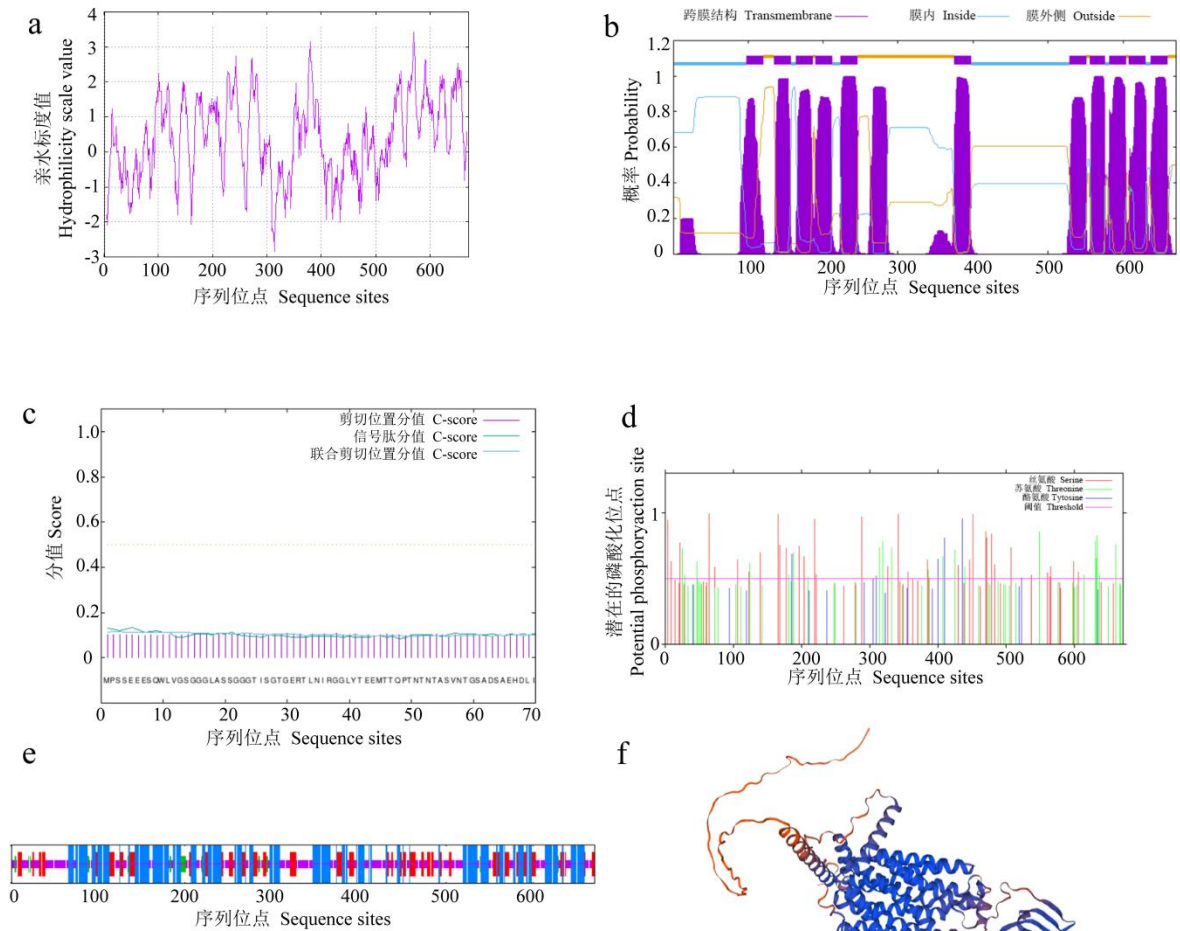


图 2 AcSV2B 蛋白的理化性质和分子特征

Fig. 2 Physicochemical property and molecular feature of AcSV2B protein

注：a, 亲水性；b, 跨膜结构域；c, 信号肽；d, 磷酸化位点；e, 二级结构（红色，延长链；蓝色， α 螺旋；紫色，无规则卷曲；绿色， β 折叠）；f, 三级结构。Note: a, Hydrophilia; b, Transmembrane domain; c, Signal peptide; d, Phosphorylation site; e, Secondary structure (Red, Extended strand; Blue, α helix; Purple, Random coil; Green, β turn); f, Tertiary structure.

2.3 AcSV2B 的结构域和保守基序分析

在 AcSV2B 中鉴定到 1 个结构域 *synapt_SV2 superfamily*；在其他 8 种昆虫的 SV2B 中也鉴定到结构域 *synapt_SV2 superfamily*（图 3-A）。但在家蚕中鉴定到 2 个结构域：*MFS superfamily* 和 *synapt_SV2 superfamily*。此外，在 AcSV2B 和上述其他 6 种蜜蜂的 SV2B 中都鉴定到 3 个相同的保守基序：Motif 1、Motif 2 和 Motif 3（图 3-B），而在家蚕的 SV2B 中只鉴定到 1 个保守基序（Motif 1），在海德果蝇的 SV2B 中仅鉴定到 2 个相同保守基序（Motif 3）。



图3 东方蜜蜂和其他8个物种SV2B蛋白所含结构域(a)和保守基序(b)比较

Fig. 3 Comparison of structural domains (a) and conserved motifs (b) included in SV2B proteins from *Apis cerana* and other eight species

2.4 AcSV2B 的系统进化分析

东方蜜蜂、小蜜蜂和西方蜜蜂聚为一支，锈斑熊蜂和火红熊蜂聚为一支；红色石巢蜂和果园石蜂聚为一支，而家蚕和海德果蝇分别单独聚为一支（图4）。

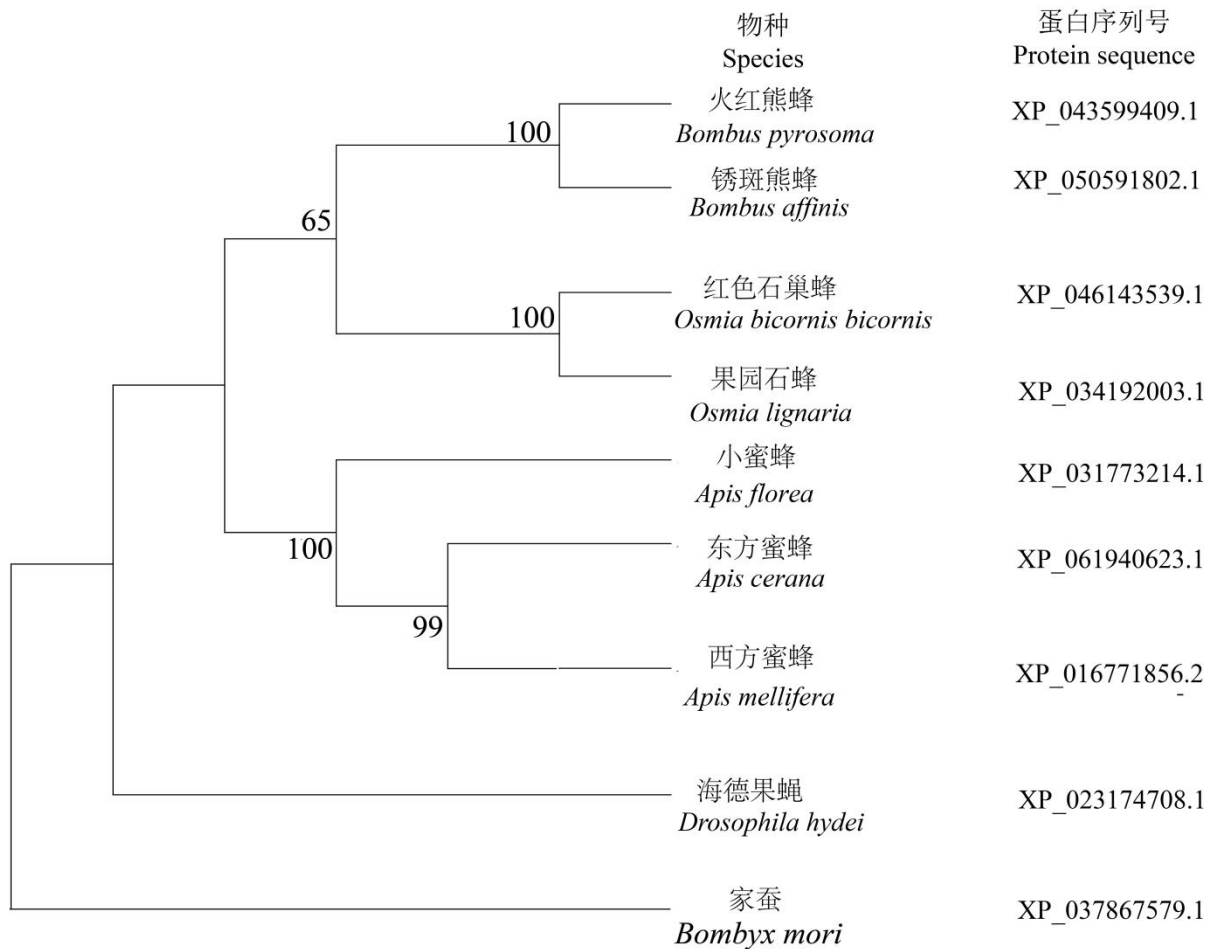


图 4 邻接法构建基于 SV2B 蛋白的东方蜜蜂与其他 8 个物种的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *Apis cerana* and eight other species on basis of SV2B proteins by neighbor-joining method

2.5 *AcSV2B* 在东方蜜蜂工蜂不同组织中的表达模式

RT-qPCR 检测结果显示, *AcSV2B* 在触角、中肠、脑、毒腺、表皮、咽下腺和脂肪体等 7 个组织中均有表达, 但表达水平存在差异; *AcSV2B* 的表达量在脑中最高且显著高于其他 6 个组织中的表达量 ($P < 0.05$); 脂肪体中的 *AcSV2B* 的表达量最低且显著低于脑、中肠和触角中的表达量 ($P < 0.05$) (图 5)。

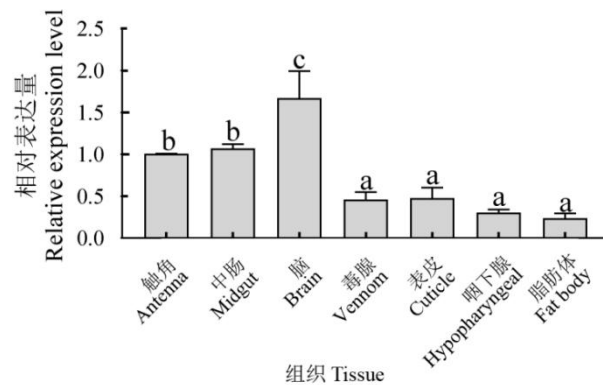


图 5 东方蜜蜂工蜂 7 个不同组织中 *AcSV2B* 的相对表达量

Fig. 5 Relative expression level of *AcSV2B* in 7 various tissues of *Apis cerana* worker

注：图中数据为平均值±标准误；柱上标不同字母表示 Tukey 氏检验差异显著 ($P<0.05$)。下同。Note: Data in the figure were mean±SE. Different letters above bars indicated significant difference ($P<0.05$, Tukey's test). The same below

2.6 *AcSV2B* 在东方蜜蜂工蜂不同发育阶段的表达模式

RT-qPCR 检测结果显示 *AcSV2B* 在东方蜜蜂工蜂卵、幼虫、预蛹、蛹和成虫中均有表达，但表达量存在差异（图 6）；*AcSV2B* 在 8 日龄预蛹中的表达量最高且显著高于卵 ($n=50$)，3 日龄幼虫 ($n=3$) 和 7 日龄预蛹 ($n=3$) 中的表达量 ($P<0.05$)；*AcSV2B* 在卵中的表达量最低且显著低于 8 日龄预蛹 ($n=3$) 和 12 日龄蛹 ($n=3$) 中的表达量。另外，*AcSV2B* 在 6 日龄、12 日龄、15 日龄和 18 日龄成虫体内均有表达，但表达水平也存在差异；*AcSV2B* 在 18 日龄成虫中的表达量最高且显著高于 1 日龄、2 日龄、6 日龄和 12 日龄成虫中的表达量 ($P<0.05$)；*AcSV2B* 在 2 日龄成虫中的表达量最低且显著低于 6 日龄、12 日龄、15 日龄和 18 日龄成虫中的表达量（图 6）。

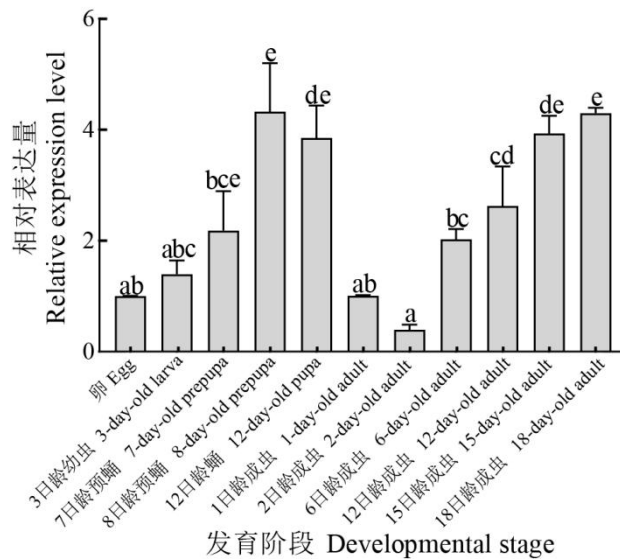


图 6 东方蜜蜂不同发育阶段 *AcSV2B* 的相对表达量检测

Fig. 6 Determination of relative expression level of *AcSV2B* in various developmental stages of *Apis cerana* worker

3 结论与讨论

前人研究表明，*SV2B* 在昆虫的神经传导、内分泌调控 (Kolosov *et al.*, 2019) 和生殖发育 (Jones *et al.*, 2020) 等过程中发挥重要功能。Jones 等 (2020) 发现，*SV2B* 参与蝇蛹金小蜂 *Nasonia vitripennis* 突触和神经元的传递，进而影响精子的活力，暗示 *SV2B* 可能参与蝇蛹金小蜂的生殖发育过程。本研究结果显示，*AcSV2B* 含 671 个氨基酸，分子式为 $C_{3317}H_{5162}N_{842}O_{940}S_{31}$ ，分子量约为 72.87 ku，脂溶系数为 102.32，等电点为 6.02，不稳定系数为 40.14，说明 *AcSV2B* 蛋白可

能是酸性蛋白。另外，AcSV2B的平均亲水系数为0.386，亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸，含有11个跨膜结构域但不含典型信号肽，暗示AcSV2B可能为亲水性蛋白、胞内蛋白和膜蛋白。本研究还发现，多达66.7%的AcSV2B潜在定位于内质网，而内质网是蛋白质加工和修饰的主要场所，因此推测AcSV2B在东方蜜蜂的蛋白加工和修饰中起到重要作用。上述结果丰富了AcSV2B的理化性质和分子特征信息，为相关研究提供了有益参考。

作为蛋白质结构中介于二级和三级结构之间的区域性功能单位，结构域是蛋白质结构、功能与进化的基本单位（Zeng *et al.*, 2007）。本研究发现，在东方蜜蜂和其他8种昆虫SV2B中均存在synapt_SV2 superfamily结构域，而在家蚕中鉴定到2个不同的结构域：synapt_SV2 superfamily和MFS superfamily。这表明SV2B在上述昆虫中的功能较为保守。synapt_SV2 superfamily是糖转运蛋白大家族中一个紧密保守的亚家族，成员包括SV2A和SV2B（Feany *et al.*, 1992）。MFS superfamily是一类膜转运蛋白超家族，能够响应化学渗透压梯度促进小分子溶质跨膜转运（Pao *et al.*, 1998），在家蚕中通过RNA干扰*MucK*基因证实了MFS蛋白参与昆虫的色素沉着（Osanai-futahashi *et al.*, 2012）。以上结果暗示，东方蜜蜂SV2B在糖转运进程中发挥重要作用，与家蚕SV2B功能有差异。保守基序是指具有特定功能的蛋白结构，含有相同或相似保守基序的蛋白可以发挥类似的功能（Zeng *et al.*, 2007）。本研究中，东方蜜蜂和其他6种蜂的SV2B蛋白均含有3个保守基序（Motif 1、Motif 2、和 Motif 3），而家蚕的SV2B蛋白只含有1个 Motif 1，海德果蝇的SV2B蛋白仅含有2个 Motif 3，说明SV2B蛋白在蜜蜂中具有较高的保守性。系统进化分析发现，东方蜜蜂、小蜜蜂和西方蜜蜂的SV2B聚为一支，锈斑熊蜂和火红熊蜂聚为一支，而红色石巢蜂和果园石蜂的SV2B聚为一支，表明同属于蜜蜂科的东方蜜蜂、小蜜蜂和西方蜜蜂的SV2B同源性最高，符合客观实际。

蜜蜂脑是与学习、记忆和行为密切相关的神经区域，整个脑的外层由神经细胞组成，其内包裹着大量神经纤维（Chen *et al.*, 2017）。本研究通过RT-PCR技术和分子克隆验证了*AcSV2B*的真实性并且发现，*AcSV2B*在脑中的表达量最高且显著高于触角、中肠、毒腺、表皮、咽下腺和脂肪体中的表达量，暗示*AcSV2B*在西方蜜蜂工蜂脑的发育和神经传导中扮演重要角色，*AcSV2B*潜在参与调节工蜂的学习、记忆和行为。另外，还发现中肠中*AcSV2B*的表达量仅次于脑中的表达量，显著高于毒腺、表皮、咽下腺和脂肪体中的表达量。考虑到蜜蜂中肠是食物消化、营养吸收和免疫防御的主要器官（Chen *et al.*, 2017），推测*AcSV2B*在上述过程中发挥功能。下一步拟饲喂dsRNA或siRNA并检测上述7个不同组织中*AcSV2B*的沉默效率，进而开展功能研究。

蜜蜂是一种完全变态昆虫，其发育过程历经卵、幼虫、预蛹、蛹和成虫等5个阶段（Chen *et al.*, 2017）。本研究发现，*AcSV2B*在卵、3日龄幼虫、7和8日龄预蛹、12日龄蛹及1日龄、2日

龄、6日龄、12日龄和15日龄工蜂成虫体内差异表达,暗示 *AcSV2B* 潜在参与工蜂的变态发育。预蛹是蜜蜂幼虫和蛹的过渡阶段。本研究中, *AcSV2B* 在8日龄预蛹中的表达量最高且显著高于卵、3日龄幼虫、7日龄预蛹和12日龄蛹中的表达量,推测 *AcSV2B* 在东方蜜蜂工蜂幼虫期到蛹期的过渡中起到重要作用,值得进一步深入探究。此外, *AcSV2B* 的表达量在18日龄成虫体内最高,且在2日龄到18日龄阶段的表达量持续上升,表明 *AcSV2B* 在东方蜜蜂工蜂成虫的发育阶段被激活表达,通过持续上调表达水平参与成虫发育。

参考文献 (References)

- Bailey TL, Boden M, Buske FA, *et al.* MEME SUITE: Tools for motif discovery and searching [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37 (suppl_2): W202-W208.
- Chen C, Chen H, Zhang Y, *et al.* TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Mol. Plant*, 2020, 13 (8): 1194-1202.
- Chen DF, Guo R, Xiong CL, *et al.* Transcriptomic analysis of *Ascosphaera apis* stressing larval gut of *Apis mellifera ligustica* (Hymenoptera: Apidae) [J]. *Acta. Entomol. Sin.*, 2017, 60 (4): 401-411. [陈大福, 郭睿, 熊翠玲, 等. 胁迫意大利蜜蜂幼虫肠道的球囊菌的转录组分析 [J]. 昆虫学报, 2017, 60 (4): 401-411]
- Cheng QC, Wang JW, LI M, *et al.* CircSV2b participates in oxidative stress regulation through miR-5107-5p-Foxk1-Akt1 axis in Parkinson's disease [J]. *Redox Biol.*, 2022, 56: 102430.
- Detrait E, Maurice T, Hanon E, *et al.* Lack of synaptic vesicle protein SV2B protects against amyloid- β 25-35-induced oxidative stress, cholinergic deficit and cognitive impairment in mice [J]. *Behav. Brain Res.*, 2014, 271: 277-285.
- Dong M, Liu H, Tepp WH, *et al.* Glycosylated SV2A and SV2B mediate the entry of botulinum neurotoxin E into neurons [J]. *Mol. Biol. Cell.*, 2008, 19 (12): 5226-5237.
- Duan H, Hao C, Xue W, *et al.* Effects of SV2B on proliferation, invasion and migration of human glioma cells [J]. *The FASEB Journal*, 2021, 35 (S1): 04895.
- Fang SM, Hu BL, Zhou QZ, *et al.* Comparative analysis of the silk gland transcriptomes between the domestic and wild silkworms [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 1-12.
- Feany MB, Lee S, Edwards RH, *et al.* The synaptic vesicle protein SV2 is a novel type of transmembrane transporter [J]. *Cell*, 1992, 70 (5): 861-867.
- Guo YL, Yu KJ, Zhao X, *et al.* Bioinformatic analysis and functional study of *nkd* gene in larvae of *Apis mellifera ligustica* workers [J]. *Acta Microbiol Sin.*, 2022, 62 (12): 5005-5017. [郭意龙, 余崑骏, 赵萧, 等. 意大利蜜蜂工蜂幼虫 *nkd* 基因的生物信息学分析及功能研究 [J]. 微生物学报, 2022, 62 (12): 5005-5017]
- Heese K, Nagai Y, Sawada T. Identification of a new synaptic vesicle protein 2B mRNA transcript which is up-regulated in neurons by amyloid β peptide fragment [J]. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 2001, 289 (5): 924-928.

Jones ARC, Mallon EB. Evidence of capacitation in the parasitoid wasp, *Nasonia vitripennis*, and its potential role in sex allocation [J]. *Ecol. Evol.*, 2020, 10 (14): 7212-7220.

Kolosov D, O'donnell MJ. Malpighian tubules of caterpillars: Blending RNAseq and physiology to reveal regional functional diversity and novel epithelial ion transport control mechanisms [J]. *J. Exp. Biol.*, 2019, 222 (22): jeb211623.

Lazzell DR, Belizaire R, Thakur P, *et al.* SV2B regulates synaptotagmin 1 by direct interaction [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (50): 52124-52131.

Lopez TJ, Sferruzzi PAN. Characterization of placental endocrine function and fetal brain development in a mouse model of small for gestational age [J]. *Front. Endocrinol.*, 2023, 14: 1116770.

Ma DZ. The Role and Mechanism of SV2B in Inhibiting Glioma Progression Through FAK/ PI3K/ AKT Signaling Pathway [D]. Jinan: Shandong University Master Thesis, 2023. [马登镇. SV2B 通过 FAK/PI3K/AKT 信号通路抑制胶质瘤进展的作用及机制研究 [D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2023]

Naik KST, Ismail S, Pradeep AR, *et al.* Molecular characterization of the functional genes associated with silk assembly, transport, and protection in the silk glands of popular multivoltine breeds of silkworm *Bombyx mori*. L [J]. *Appl. Biochem. Biotech.*, 2023, 195 (4): 2371-2394.

Olsen AL, Clemens SG, Feany MB. Nicotine-mediated rescue of α -synuclein toxicity requires synaptic vesicle glycoprotein 2 in *Drosophila* [J]. *Movement Disorders*, 2023, 38 (2): 244-255.

Osanai-futahashi M, Tatematsu KI, Yamamoto K, *et al.* Identification of the *Bombyx* red egg gene reveals the involvement of a novel transporter family gene in the late steps of the insect ommochrome biosynthesis pathway [J]. *J. Biol. Chem.*, 2012, 287 (21): 17706-17714.

Pao SS, Paulsen IT, Saier JMH. Major facilitator superfamily [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62 (1): 1-34.

Paulussen I, Beckert H, Musial TF, *et al.* SV2B defines a subpopulation of synaptic vesicles [J]. *J. Mol. Struct.*, 2024, 15 (9): 54.

Requena AV. The Role of the Synaptic Protein sv2b in Embryonic Development of the Cerebral Cortex [D]. Comunitat Valenciana: Universidad Miguel Hernández Doctoral Dissertation, 2020.

Stout k A, Dunn AR, Hoffman C, *et al.* The synaptic vesicle glycoprotein 2: Structure, function, and disease relevance [J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2019, 10 (9): 3927-3938.

Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38 (7): 3022-3027.

Zeng ZJ. Apiculture (The Third Edition) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017: 7, 21. [曾志将. 养蜂学 (第三版) [M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 7, 21]

Zeng ZJ. Bee Biology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007: 96. [曾志将. 蜜蜂生物学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 96]

Zhang Y, Yang X, Zhu XL, *et al.* Bioinformatics analysis of potential core genes for glioblastoma [J]. *Biosci. Rep.*, 2020, 40 (7): BSR20201625.