



# 东方蜜蜂死亡捕手蛋白的分子特征及基因表达模式

杜丽婷<sup>1\*</sup>, 王梦怡<sup>1\*</sup>, 樊念<sup>1</sup>, 吴陶<sup>1</sup>, 张荣华<sup>4</sup>, 谢润桂<sup>4</sup>, 严提珍<sup>2,4</sup>,  
付中民<sup>1,2,3</sup>, 陈大福<sup>1,2,3</sup>, 郭睿<sup>1,2,3\*\*</sup>, 邱剑丰<sup>1,2,3\*\*</sup>

(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. 福建农林大学蜂疗研究所, 福州 350002; 4. 东莞市妇幼保健院, 广东东莞 523000)

**摘要:** 本研究旨在通过检测东方蜜蜂 *Apis cerana* 的 *croquemort* 基因 *AcCrq* 的时空表达谱并解析 AcCRQ 蛋白理化性质和分子特性, 为 AcCRQ 的功能研究提供参考和基础。RT-PCR 扩增 *AcCrq* 的编码序列 (coding sequence, CDS)。利用相关软件预测 AcCRQ 蛋白的理化性质和分子特性, 鉴定东方蜜蜂和其他物种 *AcCrq* 的保守基序和结构域, 并对氨基酸序列和构建系统进化树。RT-qPCR 检测 *AcCrq* 在东方蜜蜂工蜂的触角、中肠、脑、咽下腺、脂肪体、毒腺和表皮组织, 以及卵、幼虫、预蛹、蛹和不同日龄工蜂成虫中的相对表达量。成功验证到 *AcCrq*, CDS 含有 1 719 个核苷酸, 可编码 572 个氨基酸。AcCRQ 蛋白的分子量约为 65.44 kDa, 分子式为 C<sub>2969</sub>H<sub>45540</sub>N<sub>764</sub>O<sub>864</sub>S<sub>21</sub>, 等电点为 5.96, 平均亲水系数为-0.30, 含 23 个丝氨酸磷酸化位点, 9 个酪氨酸磷酸化位点和 17 个苏氨酸磷酸化位点, 但不存在典型的信号肽。AcCRQ 在黑大蜜蜂 *Apis laboriosa*、小蜜蜂 *Apis florea*、西方蜜蜂 *Apis mellifera*、兰花蜂 *Eufriesea mexicana*、东南蓝莓蜂 *Habropoda laboriosa*、红壁蜂 *Osmia bicornis bicornis* 和蓝果园壁蜂 *Osmia lignaria* 中具有较高的氨基酸序列一致性; 东方蜜蜂与小蜜蜂和西方蜜蜂的 CRQ 进化距离最近。*AcCrq* 在工蜂成虫触角、中肠、脑、咽下腺、脂肪体、毒腺和表皮中均有表达, 但表达量存在差异, 触角中 *AcCrq* 的表达量显著高于其他组织的表达; *AcCrq* 在东方蜜蜂工蜂卵、幼虫、预蛹和蛹中均有表达, 但表达量存在差异, 相较于在卵中的表达量, 3 日龄幼虫和 8 日龄预蛹中 *AcCrq* 的表达量显著降低, 而 7 日龄预蛹和 12 日龄蛹中 *AcCrq* 的表达量下调但不显著; *AcCrq* 在 1、

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32172792, 32372943); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-44-KXJ7); 福建省自然科学基金面上项目 (2023J01133); 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); 福建省大学生创新创业训练计划项目 (S202410389065, S202410389062)

\*共同第一作者: 杜丽婷, 女, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂分子生物学, E-mail: d15137132231@163.com; 王梦怡, 女, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂分子生物学, E-mail: 13277017210@163.com

\*\*通讯作者 Author of corresponding: 邱剑丰, 男, 讲师, 主要研究方向昆虫-病原互作, E-mail: jfqiu@fafu.edu.cn; 郭睿, 男, 副教授, 主要研究方向昆虫-病原互作, E-mail: ruiguo@fafu.edu.cn

收稿日期 Received: 2024-08-16; 修回日期 Revision received: 2024-10-18; 接受日期 Accepted: 2024-10-21

2、6、12、15 和 17 日龄工蜂体内均有表达，但表达量也存在差异，1 日龄成虫体内 *AcCrq* 的表达量均显著高于其他日龄成虫体内的表达量，2 和 17 日龄成虫体内的表达量均低于其他日龄成虫体内的表达量。AcCRQ 是潜在的亲水性蛋白但不具分泌功能；东方蜜蜂和其他 8 个物种的 CRQ 具有较高的保守性；东方蜜蜂与小蜜蜂和西方蜜蜂的 CRQ 进化距离最近。*AcCrq* 在东方蜜蜂工蜂的不同组织和发育阶段动态差异表达。

**关键词：**东方蜜蜂；时空表达谱；分子特性；CRQ；理化性质；系统进化

中图分类号：Q963

文献标识码：A

## **Molecular characterization and gene expression pattern of CRQ in *Apis cerana***

DU Li-Ting<sup>1\*</sup>, WANG Meng-Yi<sup>1\*</sup>, FAN Nian<sup>1</sup>, WU Tao<sup>1</sup>, ZHANG Rong-Hua<sup>4</sup>, XIE Run-Gui<sup>4</sup>, YAN Ti-Zheng<sup>2,4</sup>, FU Zhong-Ming<sup>1,2,3</sup>, CHEN Da-Fu<sup>1,2,3</sup>, GUO Rui<sup>1,2,3\*\*</sup>, QIU Jian-Feng<sup>1,2,3\*\*</sup> (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 Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 4. Dongguan Maternal and Children Health Hospital, Dongguan 523000, China)

**Abstract:** The aim of this study is to provide a reference and basis for the functional study of *croquemort* gene in *Apis cerana* (*AcCrq*) by examining the spatiotemporal expression profile of *AcCrq* gene and analyzing the physicochemical property and molecular characteristics of AcCRQ protein. The coding sequence (CDS) of AcCRQ was amplified by RT-PCR. The physicochemical and molecular properties of the AcCRQ protein were predicted using the relevant software, and the conserved motifs and structural domains of *AcCrq* from *A. cerana* and other species were identified, and the amino acid sequences were compared and a phylogenetic tree was constructed. RT-qPCR was performed to detect the relative expression of *AcCrq* in the antennae, midgut, brain, hypopharyngeal glands, fat bodies, venom glands and epidermal tissues, as well as in eggs, larvae, pre-pupae, pupae and adults of different day-old worker bees of *A. cerana*. Successfully validated to *AcCrq* CDS contained 1 719 nucleotides, encoding a total of 572 amino acids. AcCRQ protein has a molecular weight of about 65.44 kDa, a molecular formula of C<sub>2969</sub>H<sub>45540</sub>N<sub>764</sub>O<sub>864</sub>S<sub>21</sub>, an isoelectric point of 5.96, an average hydrophilicity coefficient of -0.30, and contains 23 serine phosphorylation sites, 9 tyrosine phosphorylation sites, and 17 threonine phosphorylation sites, but does not have a typical signal peptide. AcCRQ has high amino acid sequence in *Apis laboriosa*, *Apis florea*, *Apis mellifera*, *Eufriesea mexicana*, *Habropoda laboriosa*, *Osmia bicornis*

*bicornis* and *Osmia lignaria* consistency; *A. cerana* has the closest CRQ evolutionary distance from *A. florea* and *A. mellifera*. *AcCrq* was expressed in the antennae, midgut, brain, hypopharyngeal glands, fat body, venom glands and epidermis of adult worker bees, but there were differences in the amount of expression, and the amount of expression in the antennae was significantly higher than that in other tissues; *AcCrq* was expressed in the eggs, larvae, prepupae and pupae of *A. cerana* workers, but there were differences in the amount of expression. Compared with the expression in eggs, the expression of *AcCrq* in 3-day-old larvae and 8-day-old prepupae was significantly lower, while the expression of *AcCrq* in 7-day-old prepupae and 12-day-old pupae was down-regulated, but not significantly; *AcCrq* was expressed in 1-, 2-, 6-, 12-, 15-, and 17-day-old workers but there were differences in the amount of expression. The expression of *AcCrq* in 1-day-old adult was significantly higher than that in other day-old adults, and the expression level of *AcCrq* in 2 and 17-day-old adults was lower than that in other day-old adults. AcCRQ is a putative hydrophilic but not secretory, AcCRQ among *A. cerana* and 8 other bees are highly conservative. *A. cerana*, *A. florea* and *A. mellifera* have the closet phyletic evolution of CRQ. *AcCrq* was dynamically and differentially expressed in different tissues and developmental stages of *A. cerana*.

**Key words:** *Apis cerana*; spatiotemporal expression pattern; molecular characteristics; CRQ; physicochemical property; phyletic evolution

真核生物中，死亡捕手 croquemort (CRQ) 蛋白是 CD36 超家族成员之一，也是一种 B 类清道夫受体 (Scavenger receptors, SR)，具有捕获凋亡细胞的能力 (Franc *et al.*, 1996)。CD36 超家族是由十余种结构和功能不同的模式识别受体蛋白家族组成，不仅可以识别“异己”成分，诱发免疫应答，还参与多种生理、病理过程 (杨晓茹, 2019)。目前，动物的 *Crq* 研究总体较为滞后且进展缓慢。蜱虫 *Ixodes scapularis* 的 CRQ 能够激活 IMD 和 jun 氨基末端激酶 (JNK) 信号通路，并限制蜱体内伯氏螺旋体 *Borrelia burgdorferi* 的增殖 (O'Neal *et al.*, 2023)。日本囊对虾 *Marsupenaeus japonicus* 清道夫受体 *MjSCRQBQ* 在鳃、心脏、血淋巴、肝胰腺、肠、淋巴器官等组织中表达，且在大脑中含量较高 (Mekata *et al.*, 2011)。

在昆虫中，*Crq* 的相关研究仅局限于果蝇 *Drosophila* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*。例如，果蝇的 CRQ 被证实参与胚胎发生过程中凋亡细胞的移除 (Franc *et al.*, 1999)；在果蝇胚胎中，巨噬细胞的一个主要功能是消除凋亡细胞，果蝇浆细胞的吞噬作用需要清道夫受体 CRQ，在胚胎气管系统中，巨噬细胞的 CRQ 在组织重塑过程中消除凋亡细胞方面具有类似的作用 (Gold *et al.*, 2015)；此外，果蝇的 CRQ 在发育和衰老过程中对于维持免疫和肠道稳态也至关重要 (Guillou *et al.*, 2016)。González-Lázaro 等 (2009) 发现通过注射 dsRNA 敲降冈比亚按蚊的 *Crq2* 表达，可显著抑制疟原虫

*Plasmodium* 的卵囊形成, 表明 *Crq2* 在疟原虫与冈比亚按蚊的相互作用中起到重要作用。

东方蜜蜂主要分布于南亚及东亚, 涵盖热带、亚热带、温带与寒带地区, 在各地形成不同的亚种。到目前为止, 东方蜜蜂 *Crq* (*AcCrq*) 的相关研究至今仍然缺失。基于此, 本研究对 *AcCrq* 的理化性质与分子特征进行预测和分析, 并鉴定和比较东方蜜蜂和其他物种 CRQ 所含结构域与保守基序, 并进行 *Crq* 的系统进化分析, 进而检测 *AcCrq* 在东方蜜蜂工蜂不同组织和发育阶段的表达模式, 旨在为深入开展 *AcCrq* 的功能研究提供参考和依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 生物材料

东方蜜蜂工蜂卵、3 日龄幼虫、7 日龄预蛹、8 日龄预蛹、12 日龄蛹以及 1、2、6、12、15 和 17 日龄成虫均取自福建农林大学蜂学与生物医药学院教学蜂场的饲养蜂群。

### 1.2 *AcCrq* 基因的 PCR 扩增及电泳

根据 *AcCrq* (GenBank 登录号: XM\_017061510.3) 序列设计合成特异性扩增引物 (F: 5'-GACGAATACACCGCCATT-3'; R: 5'-CGAGCATAGACATCCGATC-3') 使用高保真酶 PCR Mix (擎科生物技术有限公司, 北京) 进行 PCR 扩增, 反应在梯度 PCR 仪 (Bio-Rad 公司, 美国) 上进行, 反应体系 (20  $\mu$ L): PCR mix 10  $\mu$ L, 无菌水 7  $\mu$ L, 上下游引物 (2.5 pmol/ $\mu$ L) 各 1  $\mu$ L, cDNA 模板 1  $\mu$ L。反应程序: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min, 共 34 个循环。产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后在紫外凝胶成像仪 (上海培清科技有限公司, 上海) 下观察 (郭意龙, 2022)。

### 1.3 *AcCRQ* 蛋白的生物信息学分析

根据 *AcCrq* (GenBank 登录号: XM\_017061510.3) 的核苷酸序列, 利用 NCBI ORF 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测 *AcCRQ* 蛋白的氨基酸序列。通过 ExPASy 网站 (<https://www.expasy.org/resources>) 上的 ProtParam、ProtScale 和 SWISS-model 等软件对 *AcCRQ* 蛋白的理化性质、亲水性以及三级结构进行分析 (Ison *et al.*, 2013; Nielsen *et al.*, 2017), 使用 SignalP 4.1 Server、NetPhos 3.1 Server、SOPMA、WoLF PSORT 等软件预测分析 *AcCRQ* 蛋白的信号肽、磷酸化位点、二级结构以及亚细胞定位, 软件均采用默认参数。

### 1.4 *AcCRQ* 蛋白的保守基序比较

使用 MEME Suite 5.5.7 软件 (Bailey *et al.*, 1994) 预测东方蜜蜂和黑大蜜蜂 *Apis laboriosa*、小蜜蜂 *Apis florea*、西方蜜蜂 *Apis mellifera*、兰花蜂 *Eufriesea mexicana*、苜蓿切叶蜂 *Megachile rotundata*、东南蓝莓蜂 *Habropoda laboriosa*、红壁蜂 *Osmia bicornis bicornis* 和、蓝果园壁蜂 *Osmia lignaria*、嗜

凤梨果蝇 *Drosophilidae ananassae* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 的 CRQ 的保守基序, 参数设置为: 结构域最大和最小氨基酸残基数分别为 50 aa 和 6 aa, 不同结构域的数量为 5, 其余为默认参数。

### 1.5 AcCRQ 蛋白的系统进化分析

利用 Blast 工具将 AcCRQ 蛋白的氨基酸序列比对到 NCBI GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 以搜索序列相似性较高的其他物种的 CRQ。通过 Mega11.0 软件 (Thompson *et al.*, 2003) 对东方蜜蜂和黑大蜜蜂、小蜜蜂、西方蜜蜂、兰花蜂、东南蓝莓蜂、红壁蜂、蓝果园壁蜂、苜蓿切叶蜂、嗜凤梨果蝇和冈比亚按蚊的 CRQ 进行氨基酸序列多重比对, 并采用邻接法构建基于 CRQ 的系统进化树, 选择默认参数。

### 1.6 *AcCrq* 基因的时空表达谱检测

利用 Primer Premier 5 软件设计 *AcCrq* 的 qPCR 引物 (*Crq*-F: 5'-CGGCTTACTTCTCATCGT-3', *Crq*-R: 5'-GCGTCTTCAACTCCTCTG-3') 和内参基因 *actin* 引物 (*actin*-F: TTATATGCCAACACTGTCCTTT, *actin*-R: AGAATTGATCCACCAATCCA)。参照吴鹰等 (2023) 的方法, 收集刚出房的工蜂成虫并置于冰上麻醉, 利用干净的眼科镊和眼科剪在超净工作台上小心剖取触角、咽下腺、脑、表皮、中肠、脂肪体和毒腺等组织, 3 次生物学重复, 每次生物学重复含 3 头工蜂成虫。分别提取上述 7 种组织的总 RNA。同时收集工蜂卵、3 日龄幼虫、7 日龄预蛹、8 日龄预蛹和 12 日龄蛹以及 1、2、6、12、15 和 17 日龄工蜂成虫的总 RNA。同时收集工蜂卵 (n=50)、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) 以及 1、2、6、12、15 和 17 日龄工蜂成虫 (n=3) 的总 RNA。以 RNA 作为模板反转录的 cDNA 进行 qPCR, 以检测时空表达谱。反应体系和程序均按照吴鹰等 (2023) 的报道设置。每个反应进行 3 次生物学重复。使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法 (Livak and Schmittgen, 2001) 计算 *AcCrq* 的相对表达量, 并采用 GraphPad Prism 8 软件对数据进行分析 and 绘图。

### 1.7 数据分析

采用 SPSS Statistics 软件 (Steinley, 2006) 对 *AcCrq* 基因在不同组织和虫态及工蜂不同日龄成虫中的相对表达量进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 以  $P < 0.05$  为显著性阈值, 采用 Tukey 氏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 *AcCrq* 基因的 CDS 扩增

通过 PCR 扩增出符合长度约 1 719 bp 的目的片段 (图 1), 符合 *AcCrq* 的 CDS 预期大小。

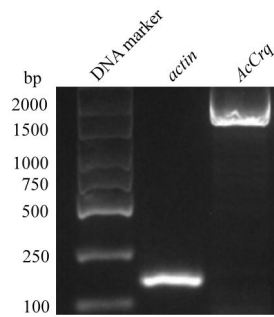


图1 *AcCrq* 基因扩增产物的琼脂糖凝胶检测

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis for the amplification product from *AcCrq* gene

## 2.2 AcCRQ 蛋白的理化性质和分子特性分析

*AcCrq* 含有 3 420 个核苷酸，编码 572 个氨基酸。*AcCRQ* 的分子式为  $C_{2969}H_{45540}N_{764}O_{864}S_{21}$ ，分子量约为 65.44 kDa，脂溶系数为 80.23，等电点为 5.96。*AcCRQ* 中含量最高和最低的氨基酸分别是亮氨酸和半胱氨酸，占比分别为 9.3%和 1.4%。另外，*AcCRQ* 包含 67 个负电荷氨基酸（29 个天冬氨酸和 38 个谷氨酸）与 60 个正电荷氨基酸（26 个精氨酸和 34 个赖氨酸）。

*AcCRQ* 的平均亲水系数为-0.30（图 2-A），不含信号肽（图 2-B）。二级结构分析显示，*AcCRQ* 含有 164 个（28.85%） $\alpha$ -螺旋，25（4.37%）个 $\beta$ -折叠，133（23.25%）条延长链和 249（43.53%）个无规则卷曲（图 2-C）。三级结构分析显示，*AcCRQ* 的模板为 A0A2A3EJJ7.1.A，二者之间同源率为 100%（图 2-D）。如图 2-E 所示，在 *AcCRQ* 中预测到 9 个酪氨酸磷酸化位点和 17 个苏氨酸磷酸化位点。此外，*AcCRQ* 可能同时定位于内质网、高尔基体和细胞质膜，占比分别为 55.6%、22.2%和 11.1%。

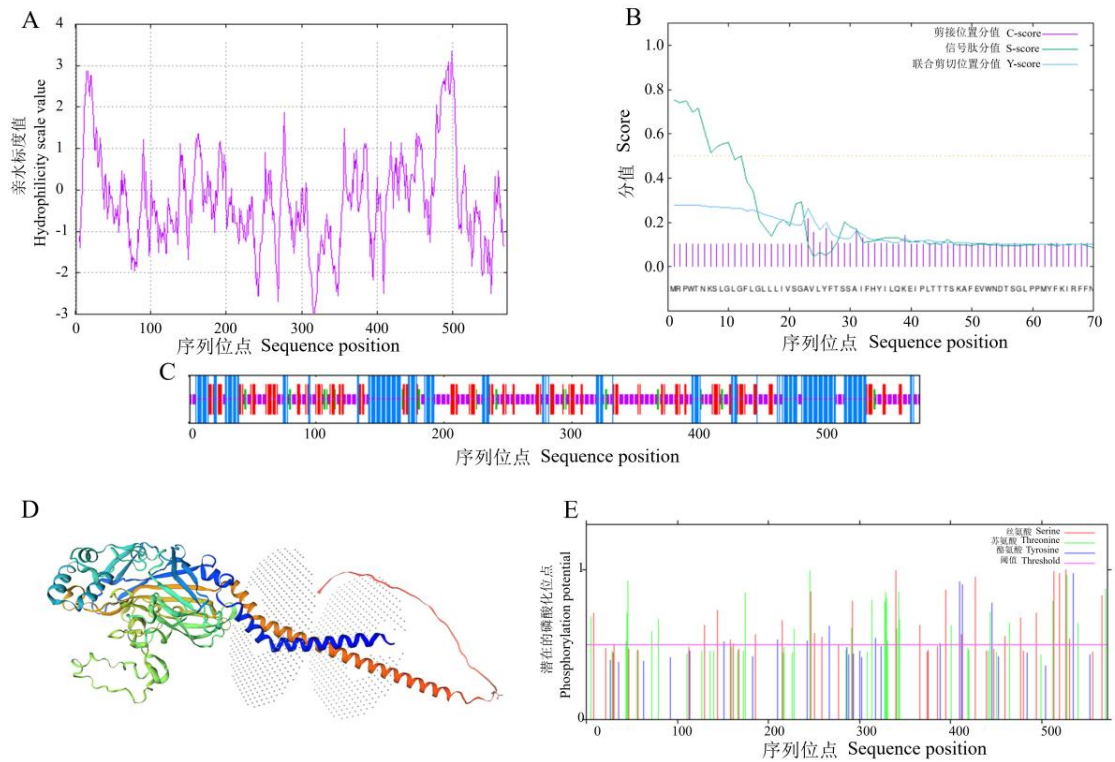


图2 AcCRQ 蛋白的理化性质和分子特征

Fig. 2 Physicochemical property and molecular characteristics of AcCRQ protein

注：A，亲水性；B，信号肽；C，二级结构；D，三级结构；E，磷酸化位点。Note: A, Hydrophilia; B, Signal peptide; C, Secondary structure; D, Tertiary structure; E, Phosphorylation site.

### 2.3 东方蜜蜂和其他昆虫的 CRQ 保守基序分析

AcCRQ 含 1 个 CD36 结构域，在黑大蜜蜂、西方蜜蜂、兰花蜂、东南蓝莓蜂、苜蓿切叶蜂、红壁蜂、冈比亚按蚊、蓝果园壁蜂、东方蜜蜂、小蜜蜂和嗜凤梨果蝇的 CRQ 中同样鉴定到 CD36 结构域（图 3-A）。AcCRQ 包含 6 个保守基序，分别是：Motif1、Motif2、Motif3、Motif4、Motif5 和 Motif6。同时，在黑大蜜蜂、小蜜蜂、西方蜜蜂、兰花蜂、苜蓿切叶蜂、东南蓝莓蜂和红壁蜂 7 种蜂的 CRQ 中也都预测到上述 6 个 Motif。相比于东方蜜蜂，在嗜凤梨果蝇中预测到 4 个 Motif，冈比亚按蚊仅预测到 3 个 Motif（图 3-B）。

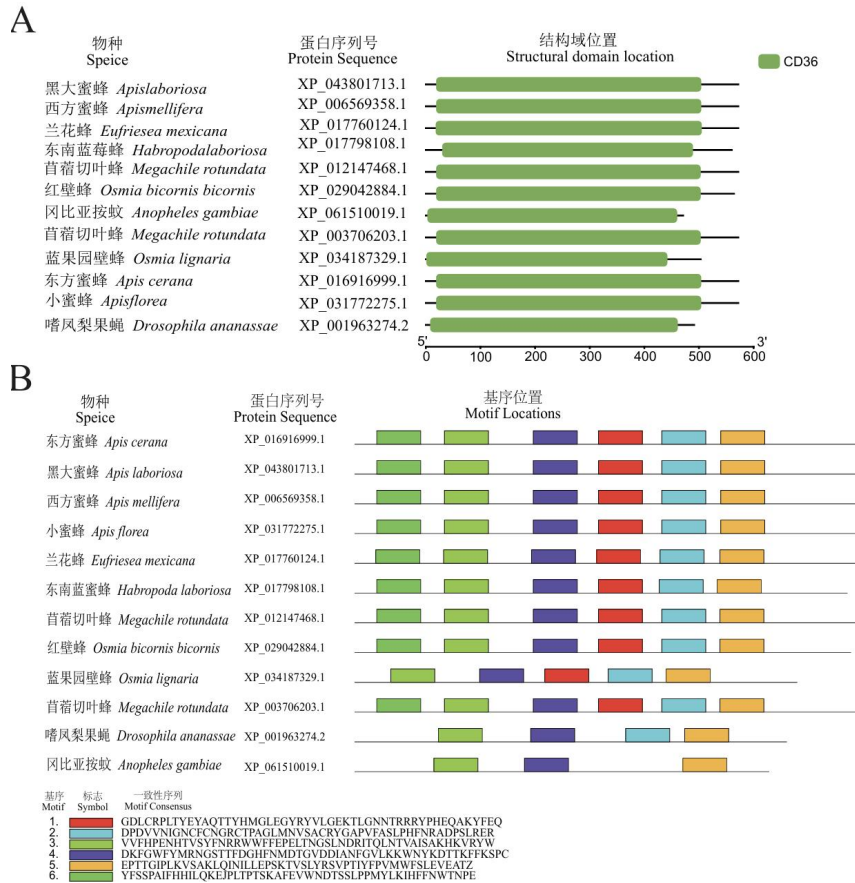


图3 东方蜜蜂和其他昆虫 CRQ 蛋白的结构域 (A) 和保守基序 (B) 比较

Fig. 3 Comparison of structural domains (A) and conservative motifs (B) in CRQ proteins between *Apis cerana* and other insects

## 2.4 东方蜜蜂和其他昆虫的 CRQ 蛋白系统进化分析

东方蜜蜂 (XM\_017061510.3) 含有 1 个 CRQ, 黑大蜜蜂 (XM\_043945778.1)、小蜜蜂 (XM\_031916415.1)、西方蜜蜂 (XM\_006569295.3)、兰花蜂 (XM\_017904635.1)、东南蓝莓蜂 (XM\_017942619.1)、红壁蜂 (XM\_029187051.2)、蓝果园壁蜂 (XM\_034331438.1)、嗜凤梨果蝇 (XP\_001963274.2) 和冈比亚按蚊 (XP\_061510019.1) 也只含 1 个 CRQ, 而苜蓿切叶蜂 (XM\_012292078.1, XM\_003706155.2) 含有 2 个 CRQ。东方蜜蜂与其他 8 种蜂的 CRQ 氨基酸序列一致性较高。括号内为该物种 CRQ 对应的 GeneBank 登录号。

东方蜜蜂、黑大蜜蜂、小蜜蜂和西方蜜蜂的 CRQ 在进化树上聚为一大支, 而苜蓿切叶蜂和红壁蜂聚为另一支, 蓝果园壁蜂和兰花蜂的 CRQ 分别各聚一支, 嗜凤梨果蝇和冈比亚按蚊各聚一支; 东方蜜蜂与黑大蜜蜂的 CRQ 同源性最高, 与西方蜜蜂和小蜜蜂的 CRQ 的同源性次之 (图 4)。



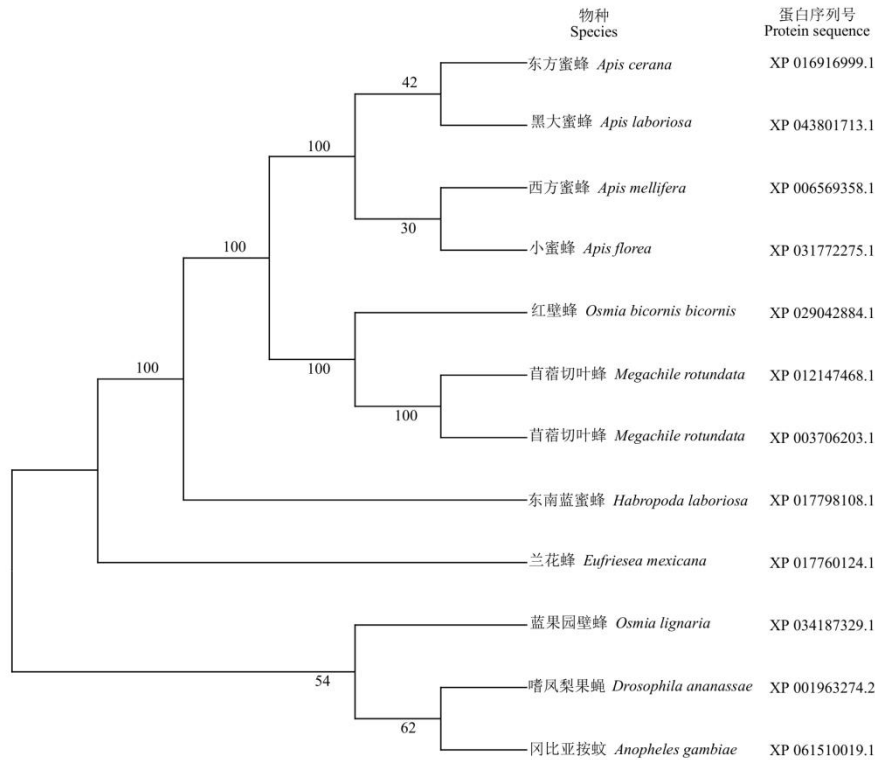


图 4 邻接法构建基于 CRQ 蛋白氨基酸序列的东方蜜蜂与其他昆虫的系统进化树（1 000 次重复）

Fig. 4 Phelogetic tree of *Apis cerana* and other insects based on amino acid sequences of CRQ proteins by neighbor-joining method (1 000 replicates)

## 2.5 *AcCrq* 基因的时空表达谱分析

*AcCrq* 在工蜂成虫的触角、中肠、脑、咽下腺、脂肪体、毒腺和表皮等 7 个组织中差异表达；*AcCrq* 的表达量在触角中最高且显著高于中肠、脑、咽下腺、脂肪体、毒腺和表皮中的表达量 ( $P < 0.05$ )；*AcCrq* 在中肠、毒腺和表皮的表达量最低（图 5）。*AcCrq* 在工蜂的卵、幼虫、预蛹、蛹和成虫中同样差异表达；*AcCrq* 在卵中的表达水平最高且显著高于 3 日龄幼虫和 8 日龄预蛹中的表达量水平 ( $P < 0.05$ )，与 7 日龄预蛹和 12 日龄蛹期的 *AcCrq* 表达水平无明显差异（图 6）。*AcCRQ* 在东方蜜蜂 1、2、6、12、15 和 17 日龄工蜂成虫体内均有表达，但表达水平也存在差异；*AcCrq* 在 1 日龄成虫体内的表达量最高且显著高于 2、6、12、15 和 17 日龄成虫体内的表达量，其中在 2 和 17 日龄成虫中的表达量最低 ( $P < 0.05$ )（图 6）。

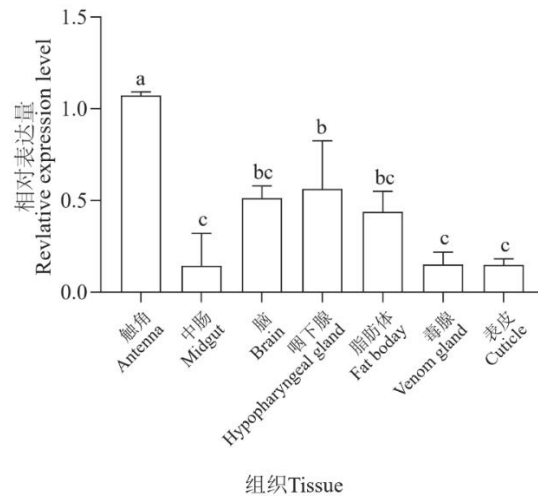


图5 *AcCRQ* 在工蜂成虫不同组织的相对表达量

Fig. 5 Relative expression level of *AcCRQ* in different tissues of worker adult

注：图中数据为平均值±标准误差；柱上相同小写字母表述差异不显著 ( $P>0.05$ )，不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ) (单因素方差分析)。Note: Data in the figure were mean ± SE. The same lowercase letters above bars indicated non-significant difference ( $P>0.05$ ), whereas the different lowercase letters indicated significant difference ( $P<0.05$ ) (one-way ANOVA).

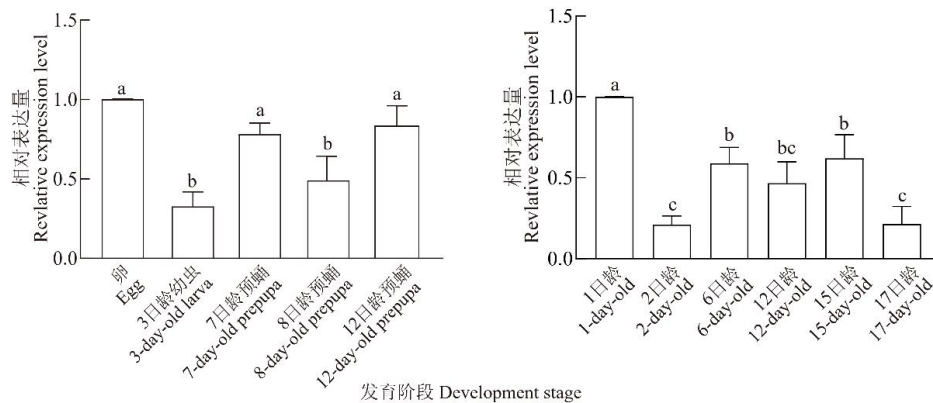


图6 *AcCRQ* 在工蜂不同发育阶段的相对表达量

Fig. 6 Relative expression level of *AcCRQ* in different developmental stages of worker

注：图中数据为平均值±标准误差；柱上相同小写字母表述差异不显著 ( $P>0.05$ )，不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ) (单因素方差分析)。Note: Data in the figure were mean ± SE. The same lowercase letters above bars indicated non-significant difference ( $P>0.05$ ), whereas the different lowercase letters indicated significant difference ( $P<0.05$ ) (one-way ANOVA).

### 3 结论与讨论

此前，东方蜜蜂 *Crq* 基因的研究未见报道。本研究成功克隆到 *AcCrq* 的 CDS (图 1)，编码蛋白的分子量约为 65.44 kD，分子式为  $C_{2969}H_{45540}N_{764}O_{864}S_{21}$ ，等电点为 5.96，含 49 个磷酸化位点，平均亲水系数为 -0.30，亲水氨基酸数量多于疏水氨基酸，暗示 *AcCRQ* 是一种潜在的亲水性蛋白；

另外, AcCRQ 中不存在典型的信号肽, 说明其可能是一种胞内蛋白(图 2)。以上结果丰富了 *AcCrq* 的理化性质和分子特征信息, 为进一步的功能研究提供了参考和依据。

保守序列是指代发生在不同或相同物种中的相同或相似的 DNA 或 RNA 或氨基酸(蛋白质)序列。本研究通过 MEME 保守基序分析不同物种之间的 CRQ 出现相同或相似的保守序列, 结果显示在东方蜜蜂、黑大蜜蜂、小蜜蜂、西方蜜蜂、兰花蜂、苜蓿切叶蜂、东南蓝莓蜂、红壁蜂和蓝果园壁蜂的 CRQ 中均鉴定到 5 个相同的 Motif 和 1 个相同的结构域(CD36 家族), 说明上述不同蜂的 CRQ 高度保守(图 3)。有趣的是, 东方蜜蜂 CD36 结构域同样存在于果蝇和按蚊的 CRQ 中(Franc *et al.*, 1996)。表明膜翅目不同蜂的 CRQ 具有较高的保守性, 可能发挥类似的功能。清道夫受体是一类位于细胞表面的跨膜受体, 也是一类参与无脊椎动物天然免疫反应的重要模式识别受体(韩兆阳, 2023)。有研究表明清道夫受体能够与多种阴离子配体结合(McGuinness *et al.*, 2003), 特别是经修饰的低密度脂蛋白(low density lipoproteins, LDL)。CRQ 等含有 CD36 结构域的蛋白具有非常广泛的功能。研究表明在脊椎动物中, CD36 能结合多种配体, 包括化学修饰的脂蛋白、长链脂肪酸和多聚阴离子磷脂等(Podrez *et al.*, 2000)。CD36 作为一个多配体受体, 参与细胞粘附, 脂肪酸和脂质的运输, 利用和储存(Feng *et al.*, 2023), 抗原呈递以及清除凋亡细胞和脱落的光感受器(Savill *et al.*, 1992)。

有研究表明 *Crq* 在日本对虾(Mekata *et al.*, 2011)的不同组织中广泛表达, 但在大脑中的表达水平最高。冈比亚按蚊的 *Crq* 形成的 4 条剪接体在不同组织中的表达具有广泛性和差异性, 其中 *SCRBQ1* 主要在中肠中表达, 而 *SCRBQ4* 主要在卵巢中表达(González-Lázaro *et al.*, 2009)。本研究发现, *AcCrq* 在工蜂成虫的触角、中肠、脑、咽下腺、脂肪体、毒腺和表皮中均有表达, 体现出 *AcCrq* 在上述不同组织中表达的广泛性(图 5)。此外, *AcCrq* 在触角中的表达量最高且显著高于中肠、脑、咽下腺、脂肪体、毒腺和表皮中的表达量。鉴于触角上密布听觉和嗅觉的感受器, 能够灵敏识别嗅觉、味觉和机械感觉, 对 CO<sub>2</sub>、湿度和温度等具有高度敏感性(张娟, 2023), 推测 *AcCrq* 在东方蜜蜂工蜂的嗅觉、味觉和机械感觉识别中发挥重要作用。在冈比亚按蚊中, *Crq* 的 4 条剪接体在不同的发育阶段 表现为动态差异表达, 其中 *SCRBQ1* 在 3 龄幼虫体内特异性高表达, 而 *SCRBQ2* 的表达水平在蛹期达到峰值(González-Lázaro *et al.*, 2009)。本研究中, *AcCrq* 不仅在卵、3 日龄幼虫、7 日龄和 8 日龄预蛹及 12 日龄蛹中差异表达, 而且在和不同日龄工蜂成虫体内差异表达, 表明 *AcCrq* 参与东方蜜蜂工蜂的变态发育过程。特别的, 在发育的同一阶段 7 日龄和 8 日龄预蛹中的表达有显著差异。由于 CRQ 在清除凋亡细胞方面发挥了重要作用(Febbraio *et al.*, 2001), 相比于 8 日龄预蛹, 7 日龄预蛹是蜜蜂变态转变的起始期。因此其表达量更高, 以清除凋亡的细胞。另外, *AcCrq* 在卵和 1 日龄成虫中特异性高表达, 暗示 *AcCrq* 在卵期发育和成虫发育初期的重要性

(图6)。在未来的研究中,我们将基于 RNAi 等技术手段探究 *AcCrq* 在中华蜜蜂表达量最高的触角组织以及各个发育阶段的功能。

### 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.
- Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: A class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2001, 108 (6): 785-791.
- Feng WW, Zuppe HT, Kurokawa M. The Role of CD36 in Cancer Progression and Its Value as a Therapeutic Target [J]. *Cells*, 2023, 12 (12): 1605.
- Franc NC, Dimarcq JL, Lagueux M, *et al.* Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells [J]. *Immunity*, 1996, 4 (5): 431-443.
- Franc NC, Heitzler P, Ezekowitz RA, *et al.* Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila* [J]. *Science*, 1999, 284 (5422): 1991-1994.
- Gold KS, Brückner K. Macrophages and cellular immunity in *Drosophila melanogaster* [J]. *Seminars in Immunology*, 2015, 27 (6): 357-368.
- González-Lázaro M, Dinglasan RR, Hernández-Hernández Fde L, *et al.* Anopheles gambiae Croquemort SCRBQ2, expression profile in the mosquito and its potential interaction with the malaria parasite Plasmodium berghei [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 39 (5-6): 395-402.
- Guillou A, Troha K, Wang H, *et al.* The drosophila CD36 homologue croquemort is required to maintain immune and gut homeostasis during development and aging [J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12 (10): e1005961.
- 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 Microbiologica Sinica*, 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]
- Han ZY, Lu SQ, Hu DC, *et al.* Immune regulation of scavenger receptors in invertebrates [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2023, 58 (5): 800-810. [韩兆阳, 卢诗琦, 胡冬春, 等. 无脊椎动物清道夫受体的免疫调控 [J]. 动物学杂志, 2023, 58 (5): 800-810]
- Ison J, Kalas M, Jonassen I, *et al.* EDAM: An ontology of bioinformatics operations, types of data and identifiers, topics and formats [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29 (10): 1325-1332.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402-408.
- McGuinness DH, Dehal PK, Pleass RJ. Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites [J]. *Trends in Parasitology*, 2003, 19 (17): 312-319.
- Mekata T, Okugawa S, Inada M, *et al.* Class B scavenger receptor, Croquemort from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*: Molecular cloning

- and characterization [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2011, 25 (2-3): 94-100.
- Nielsen H. Predicting secretory proteins with SignalP [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1611: 59-73.
- O'Neal AJ, Singh N, Rolandelli A, *et al.* Croquemort elicits activation of the immune deficiency pathway in ticks [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120 (20): e2208673120.
- Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, *et al.* Macrophage scavenger receptors CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2000, 105 (10): 1483-1483.
- Savill J, Hogg N, Ren Y, *et al.* Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1992, 90 (4): 1513-1522.
- Steinley D. Categorical data analysis with SAS and SPSS applications, categorical data analysis using the SAS system [J]. *Journal of the American Statistical Association*, 2006, 101 (473): 400.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38 (7): 3022-3027.
- Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX [J]. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2003, 1.
- Wu Y, Liu ZT, Zhao HD, *et al.* Gene cloning, polyclonal antibody preparation, and expression pattern of m<sup>6</sup>A methyltransferase in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2023, 66 (7): 885-895. [吴鹰, 刘治滩, 赵浩东, 等. 西方蜜蜂 m<sup>6</sup>A 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]
- Yang XR, Chen YH, Hao HF. The role of CD36 in inflammatory response and lipid metabolism [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2019, 31 (11): 1192-1199. [杨晓茹, 陈宇浩, 郝慧芳. CD36 在炎症反应和脂质代谢中的作用 [J]. 生命科学, 2019, 31 (11): 1192-1199]
- Zhang J, Gao Y, Wang RH, *et al.* Screening and expression profiling of highly expressed genes in the hypopharyngeal glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) foragers [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2023, 66 (7): 896-908. [张娟, 高艳, 王若虹, 等. 西方蜜蜂采集蜂咽下腺中高表达基因的筛选及表达分析 [J]. 昆虫学报, 2023, 66 (7): 896-908]