西方蜜蜂 *ATG5* 基因的克隆、分析及时空表达谱测定*

吴伯文[1**] 范小雪[2, 3, 4**] 刘彩珍[1] 冯睿蓉[1]
付志英[1] 吴 杨[1] 郭 睿[2, 3, 4***]

（1. 福建农业职业技术学院，福州 350000；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. 福建农林大学蜂学与生物医药学院，福州 350002）

摘 要 **【目的】** 对西方蜜蜂 *Apis mellifera* 自噬相关基因 5（Autophagy related gene 5，*AmATG5*）进行分子克隆和生物信息学分析，并检测 *AmATG5* 在工蜂 7 个组织和 7 个发育时间的表达谱，为进一步探究 *AmATG5* 的功能提供详实的参考依据。**【方法】** 通过 PCR 扩增 *AmATG5* 的编码序列（Coding sequence，CDS）并进行 Sanger 测序验证。使用相关软件预测和分析 AmATG5 蛋白的理化性质、分子特征、保守基序、高级结构和蛋白互作网络。通过核质分离与 RT-qPCR 验证 AmATG5 的亚细胞定位。采用 RT-qPCR 检测 *AmATG5* 的相对表达水平。**【结果】** 成功克隆到 *AmATG5* 的 CDS；AmATG5 含 265 个氨基酸，相对分子量约为 31.41 kD，分子式为 $C_{1428}H_{2168}N_{372}O_{403}S_{13}$，含 31 个磷酸化位点和 7 个保守基序，不含跨膜结构域和信号肽；*AmATG5* mRNA 主要分布于细胞质；AmATG5 与小蜜蜂 *Apis florea* 的 ATG5 在进化树上聚为一支；AmATG5 包含 110 个无规则卷曲，93 个 α-螺旋，48 条延伸链和 14 个 β-转角；AmATG5 与自噬相关蛋白 1 和自噬相关蛋白 6 等 9 个蛋白构成 1 个互作网络；*AmATG5* 在工蜂的毒腺、中肠、咽下腺、脂肪体、脑、触角和表皮 7 个组织中差异表达，在脑中的表达量最高，而在表皮中的表达量最低；*AmATG5* 的表达量在卵、1、3 和 5 日龄幼虫阶段持续下降，在 8 日龄预蛹、11 和 16 日龄蛹阶段持续上升，至 16 日龄蛹时达到最高。**【结论】** AmATG5 为疏水性蛋白和胞内蛋白，通过与 ATG6 等 9 个蛋白潜在互作发挥作用；*AmATG5* 在西方蜜蜂工蜂的不同组织和不同发育阶段动态差异表达，在脑和 16 日龄蛹中特异性高表达。

关键词 西方蜜蜂；自噬；自噬相关基因 5；分子特征；系统进化；表达谱

Cloning, analysis, and expression, of the *Apis mellifera ATG5* gene

WU Bo-Wen[1**] FAN Xiao-Xue[2, 3, 4**] LIU Cai-Zhen[1]
FENG Rui-Rong[1] FU Zhi-Ying[1] WU Yang[1] GUO Rui[2, 3, 4***]

(1. Fujian Vocational College of Agriculture, Fuzhou 350000, China; 2. National & Local United Engineering Laboratory of Natural Biotoxin, Fuzhou 350002, China; 3. Apitherapy Research Institute of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 4. College of Bee Science and Biomedicine, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract **[Aim]** To successfully clone, and then determine the function and expression of the autophagy related gene 5 (*AmATG5*) in different tissues and developmental stages of *Apis mellifera*, thereby providing a basis for further investigation of the function of this gene. **[Methods]** The CDS of *AmATG5* was amplified by PCR followed by Sanger sequencing. Relevant software was used to predict and analyze its physicochemical properties, molecular characteristics and protein interaction network. RT-qPCR was used to ascertain the relative expression of *AmATG5* in seven diverse tissue types and seven

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金项目（32372943）；福建省自然科学基金面上项目（2022J01133）；福建省教育厅中青年教师教育科研项目（JAT2312）

**共同第一作者 Co-first authors，E-mail：wubowen@fjny.edu.cn；imfanxx@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：ruiguo@fafu.edu.cn

收稿日期 Received：2024-02-27；接受日期 Accepted：2024-05-21

developmental stages. **[Results]** The CDS of *AmATG5* was successfully cloned. AmATG5 contains 265 amino acids, has a molecular weight of approximately 31.41 kD, and a molecular formula of $C_{1428}H_{2168}N_{372}O_{403}S_{13}$. AmATG5 includes 31 phosphorylation modification sites and 7 conserved motifs, but there is no transmembrane structure and signal peptide. *AmATG5* mRNA was mainly distributed in the cytoplasm. AmATG5 and ATG5 in *Apis florea* clustered into a single phylogenetic clade. AmATG5 contains 110 random coils, 93 alpha helices, 48 extended strands, and 14 beta turns. AmATG5 has an interaction network with 9 other proteins, such as ATG1 and ATG6. AmATG5 was differentially expressed in 7 different tissues of *A. mellifera* workers, including the venom gland, midgut, hypopharyngeal gland, fat body, brain, antenna and cuticle. Its expression level was highest in the brain and lowest in the cuticle. *AmATG5* was continuously down-regulated in eggs, 1-day-old larvae, 3-day-old larvae and 5-day-old larvae, but continuously up-regulated in 8-day-old prepupae, 11-day-old pupae and 16-day-old pupae. Its expression peaked in 16-day-old pupae. **[Conclusion]** AmATG5 is a hydrophobic, intracellular protein that potentially functions by interacting with nine other proteins, including ATG6. Its expression varies in different tissues and developmental stages of *A. mellifera* workers, and it appears to be most highly expressed in the brain and in 16-day-old pupae.

Key words *Apis mellifera*; autophagy; autophagy related gene 5; molecular characteristics; phyletic evolution; expression pattern

蜜蜂是一种授粉昆虫，对于确保粮食供应安全以及推动植物多样性发展发挥着至关重要的作用，西方蜜蜂 *Apis mellifera* 是世界范围内饲养规模最大的蜂种，具有采集能力强、生产效率高和管理容易等诸多优点（Papa *et al.*，2022）。此外，西方蜜蜂作为一种模式昆虫，广泛应用于神经生物学、社会行为学和生态学等研究领域（Dong *et al.*，2023）。西方蜜蜂属于完全变态昆虫，其生命周期涵盖了从卵孵化、幼虫成长、预蛹过渡、蛹期蜕变至成虫等一系列发育阶段（曾志将，2007）。昆虫在蜕皮、化蛹和羽化等过程中受到生长激素的调节，中肠和表皮角质层经历消解和重建以维持正常的生理活动（Parthasarathy and Palli，2007；Noh *et al.*，2018），上述过程伴随着活跃的细胞自噬和凋亡（Zhang *et al.*，2009；Tian *et al.*，2013；Asano *et al.*，2017）。

细胞自噬包括自噬体形成和自噬体降解，通过清除错误折叠蛋白和受损细胞器来影响细胞存活和维持细胞生物学功能（Schulze *et al.*，2013）。自噬相关蛋白 5（Autophagy related gene 5，*ATG5*）基因广泛存在于真核生物，且具有较为保守的理化性质，已被证实是自噬通路中的重要成员，参与自噬泡（Autophagic vacuole，AV）的延伸，自噬体的形成、成熟与降解及自噬体与溶酶体的融合与降解等过程（Mizushima *et al.*，2001）。果蝇 *Drosophila melanogaster*（Ren *et al.*，2009）和家蚕 *Bombyx mori*（谢昆等，2018；Mao *et al.*，2022）等少数昆虫的 *ATG5* 基因进行了较为深入的研究，发现注射大肠杆菌 *Escherichia coli* 的成年果蝇在敲减 *ATG5* 基因表达后寿命显著减少约 9%。然而，西方蜜蜂 *ATG5* 基因（*AmATG5*）的研究十分滞后，相关信息匮乏。

本研究对 *AmATG5* 的编码序列（Coding sequence，CDS）进行分子克隆，深入分析 AmATG5 的物理化学性质、分子结构特性以及蛋白质相互作用网络，并通过实验手段验证 *AmATG5* 的亚细胞定位，进而检测 *AmATG5* 在西方蜜蜂工蜂不同组织及发育时期的表达模式。研究结果可为 *AmATG5* 的功能研究提供参考和依据。

1 材料与方法

1.1 生物实验材料

用于该研究的工蜂幼虫及成虫均来自福建农林大学蜂学与生物医药学院宿主-病原互作机制及精准医学团队的实验蜂群。

1.2 PCR 扩增

依据 GeneBank 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/）收录的 *AmATG5* 核苷酸序列（登录号：XM_623453.4），利用 Primer-BLAST 在

线工具设计针对其编码序列（CDS）扩增的特异性引物（表 1）。采用 RNA 提取试剂盒（艾科瑞公司，中国），将 3 头西方蜜蜂工蜂 6 日龄幼虫的肠道组织混合后提取总 RNA。随后，将样本进行反转录处理，从而获得 cDNA，用作后续 PCR 扩增的模板。扩增反应所采用的条件与体系参照叶亚萍等（2024）报道的方法。该实验设置 3 次生物学重复。扩增产物通过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行检测，随后回收目标条带，并将其连接到 pMD19-T 载体上。接着，把连接产物导入处于感受态的大肠杆菌 DH5α 细胞内。次日从培养板上挑取单菌落，并送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行 Sanger 测序。

1.3　理化性质、分子特征、高级结构和蛋白互作网络预测及分析

利用 Expasy 网站（https://web.expasy.org/）上的相关工具预测理化性质、亲/疏水性、磷酸化位点和信号肽。使用 TMHMM 2.0 软件（https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/）预测跨膜结构域。采用 SOPMA 在线工具（https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html），对二级结构预测进行预测，采用软件的默认参数。利用 Expasy 网站（https://web.expasy.org/）上的相关工具预测三级结构。通过 STRING 数据库（https://cn.string-db.org/cgi/input.pl）进行蛋白互作网络分析，设置最低互动分数为 0.400，控制在 10 个以内的最大交互蛋白数量。

1.4　保守基序鉴定和分析

从 GeneBank 数据库中查询和下载西方蜜蜂、火红熊蜂 *Bombus pyrosoma*、小蜜蜂 *Apis florea*、欧洲熊蜂 *Bombus terrestris*、美洲东部熊蜂 *Bombus impatiens*、牧犬熊蜂 *Bombus pascuorum*、梭鱼草蜂 *Dufourea novaeangliae*、墨西哥兰花蜂 *Eufriesea mexicana* 和回条蜂 *Habropoda laboriosa* 的 ATG5 蛋白的氨基酸序列。使用 MEME 软件（Bailey and Elkan，1994）鉴定上述蛋白的保守基序，查找基序数量设为 10，其他参数为默认设置。

1.5　系统进化树分析

针对 AmATG5 与上述其他物种的 ATG5，使用 NCBI 网站提供的 BLAST 工具进行同源性分析。利用 MEGA 7.0 软件中内置的 CLUSTAL W 工具（Kumar *et al.*，2016）进行多重序列比对，进而运用 Bootstrap Neighbor-Joining 方法构建系统进化树。在构建过程中，设置 1 000 次重复，以确保进化树的稳定性和可靠性。

1.6　AmATG5 亚细胞定位预测与验证

采用 CELLO 2.5 在线工具（网址：http://cello.life.nctu.edu.tw/）对 AmATG5 蛋白进行亚细胞定位预测分析。按照细胞质和细胞核 RNA 提取试剂盒（Norgen Biotek，加拿大）的说明书，提取 1 头 6 日龄幼虫的细胞质 RNA 和细胞核 RNA，作为模板进行反转录，得到相应的 cDNA 作为模板进行 qPCR 以检测 *AmATG5* 在细胞质和细胞核中的相对表达量。参照 Liu 等（2022）的报道，以 *GAPDH*（GeneBank 登录号：XM_393605.7）和 *U6*（GeneBank 登录号：XM_001120607.5）基因分别作为细胞质、细胞核中 *AmATG5* 相对表达量检测的阳性对照。该实验设置 3 次生物学重复。引物序列详见表 1。

1.7　RT-qPCR 检测

参考刘彩珍等（2024）和叶亚萍等（2024）的研究方法，将新出房的工蜂成虫置于冰上以进行麻痹，随后在超净工作台上，使用清洁的眼科镊子和剪刀，仔细分离出触角、脂肪体、脑部、咽下腺、中肠以及毒腺 7 个组织。此实验设置了 3 次重复，每重复均选用 3 头健康的西方蜜蜂工蜂成虫作为实验对象。

另外，从群势旺盛的西方蜜蜂群体挑选出合适的蜂群，在蜂群中心安置空巢础，待工蜂筑巢满 24 h 后，使用蜂王产卵限制器引导蜂王在新巢脾上进行产卵，24 h 后确认蜂王已产卵并将其移出。随后在以下不同发育时期进行取样：第 2 天（卵阶段）、第 4 天（1 日龄幼虫）、第 6 天（3 日龄幼虫）、第 8 天（5 日龄幼虫）、第 11 天（8 日龄预蛹期）、第 14 天（11 日龄蛹期）以及第 19 天（16 日龄蛹期）。此实验设计了 3

组重复，每重复包含 30 粒卵、3 头 1 日龄幼虫、1 头 5 日龄幼虫、1 头 8 日龄预蛹、1 头 11 日龄蛹和 1 头 16 日龄蛹。

利用 Primer-BLAST 在线软件（http://www.ncbi.nlm./tools/primer-blast/）设计 *AmATG5* 的 RT-qPCR 引物（表 1）。以 *GAPDH* 基因作为内参。使用艾科瑞（中国）RNA 提取试剂盒，从 7 个组织及卵、不同日龄幼虫、预蛹和蛹中提取总 RNA，并反转录为 cDNA 模板。参照宋宇轩等（2024）和邹培缘等（2024）报道的方法，建立 qPCR 反应体系并设定相应的程序，每个反应均进行 3 次重复以确保数据的可靠性。相对表达量的计算采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法，并利用 GraphPad Prism 8 软件（https:// www.graphpad.com/）生成图表。为了评估数据间的显著性差异，数据分析方法为单因素方差分析（One-way ANOVA），采用 Tukey 检验法对试验数据进行两两比较，并通过字母标记法展示各组之间的差异情况。显著性水平设定为 $P < 0.05$，数据分析软件为 SPSS 26.0（www.spss.com/）。

表 1 引物信息

Table 1 Information of primers

引物名称 Primer name	序列（5′-3′） Sequence (5′-3′)	用途 Purpose
AmATG5-F	CACTATTTGCCGTTGTAT	CDS 的扩增 Amplification of CDS
AmATG5-R	GGATCTTAATAATAAAGCCAGT	
U6-F	CCAGGAGATGAAGTGGATACTC	亚细胞定位的阳性对照 Positive control for subcellular localization
U6-R	CTTGCTTGAACTGCTGCTT	
GAPDH-F	CACCTTCTGCAAAATTATGGCG	亚细胞定位的阳性对照、RT-qPCR 的内参 Positive control for subcellular localization, reference gene for RT-qPCR
GAPDH-R	ACCTTTGCCAAGTCTAACTGTTAA	
AmATG5-F	TTTCGATGTTATACAAGTGAGG	RT-qPCR 的定量 Quantitation by RT-qPCR
AmATG5-R	GGTGTTTCCAAAGGTGGG	

2 结果与分析

2.1 *AmATG5* 基因 CDS 区序列的 PCR 扩增

PCR 扩增成功获得了单一的目标片段，其大小约为 929 bp（图 1：A），与预期结果相符。Sanger 测序（图 1：B）进一步证实该片段与 GeneBank 数据库中的预测序列一致，表明 *AmATG5* 的 CDS 已被成功克隆。

2.2 AmATG5 蛋白的性质与结构特性研究

AmATG5 由 265 个氨基酸构成，分子量大小预测为 31.41 kD，分子式预测为 $C_{1428}H_{2168}N_{372}O_{403}S_{13}$，预测结果显示脂溶系数为 86.30，平均疏水系数为 - 0.420，不稳定系数为 48.78，理论等电点为 5.54；磷酸化位点预测结果显示 AmATG5 含 31 个位点（图 2：A），但缺乏跨膜结构域和信号肽（图 2：B，C）。定位预测显示，AmATG5 可能同时定位于细胞质（预测值 4.635）、周质（0.120）、胞外区（0.112）、内膜（0.092）和外膜（0.040），括号为定位预测数值。

2.3 AmATG5 蛋白的保守基序

在 AmATG5 中鉴定到 7 个保守基序，分别是 Motif 1、Motif 2、Motif 3、Motif 4、Motif 5、Motif 6 和 Motif 7（图 3）；上述 7 个保守基序同样在小蜜蜂、火红熊蜂、牧犬熊蜂、美国东部熊蜂、欧洲熊蜂、墨西哥兰花蜂、回条蜂和梭鱼草蜂的 ATG5 中鉴定到（图 3）。

2.4 ATG5 蛋白的系统进化分析

系统进化分析结果显示，美国东部熊蜂、欧洲熊蜂以及火红熊蜂的 ATG5 序列被归为一个分支（图 4），而西方蜜蜂与小蜜蜂的 ATG5 序列归为另一个分支（图 4），二者之间具有较高的同源性。

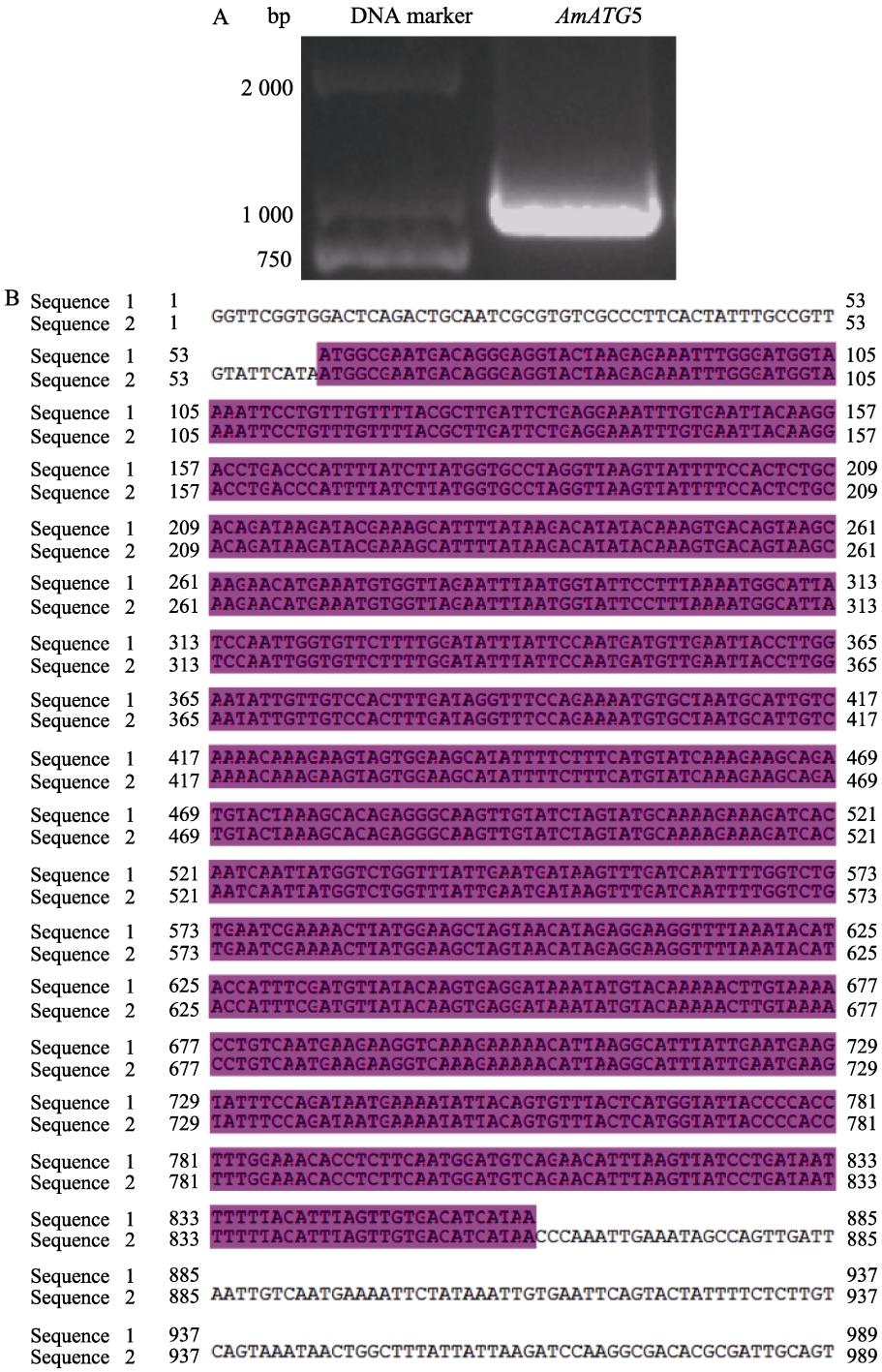

图 1　扩增 *AmATG5* 基因 CDS 区的琼脂糖凝胶电泳（A）和 Sanger 测序（B）

Fig. 1　Agarose gel electrophoresis (A) and Sanger sequencing (B) of the amplified product from CDS of *AmATG5* gene

2.5　*AmATG5* mRNA 的亚细胞定位

核质分离后进行 RT-qPCR 检测，结果显示阳性参照 *GAPDH* 主要分布于细胞质，*U6* 主要分布于细胞核，*AmATG5* 在细胞核与细胞质中均有表达，且主要分布于细胞质（图 5）。

2.6　AmATG5 的高级结构及互作网络

二级结构预测结果显示，AmATG5 包含 93（35.09%）个 α-螺旋，48（18.11%）个延伸链，14（5.28%）个 β 转角和 110（41.51%）个无规卷曲（图 6：A）。三级结构预测结果显示，

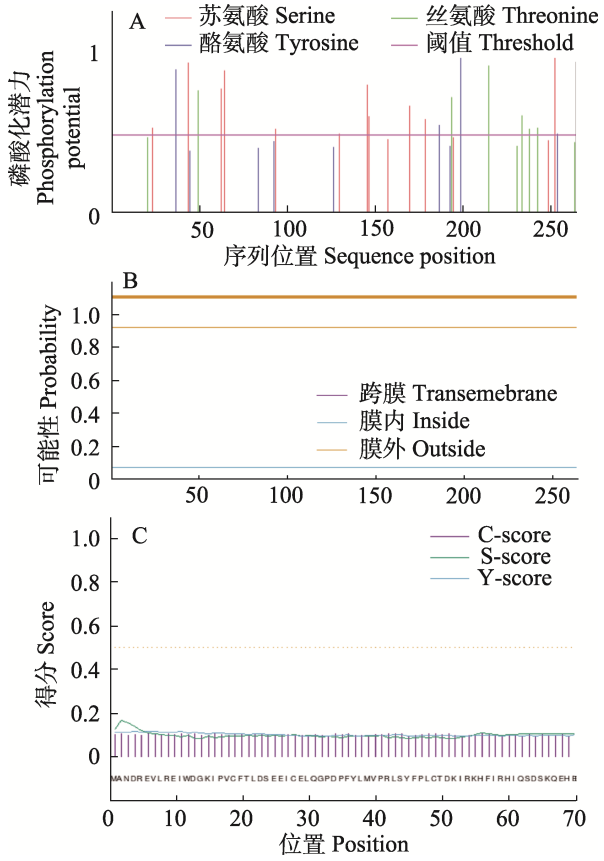

图 2　AmATG5 蛋白包含的磷酸化修饰位点（A）、跨膜结构域（B）及信号序列（C）

Fig. 2　Phosphorylation sites (A), transmembrane domain (B) and signal peptide (C) present in the AmATG5 protein

AmATG5 与其模板 4gdk.1.B 的相似性为 57.31%（图 6：B）。另外，AmATG5 与 STRING 数据库已注释的 ATG1、AUT1（Autophagy-related protein 3）和 ATG8a 蛋白、ATG6 及未注释的 IRD1、LOC726637、A0A087ZXY6、A0A088AER0、A0A087ZXZ0 和 LOC413467 蛋白参与形成了 1 个互作网络，该互作网络平均节点度为 9.82，包含 11 个节点，边数为 54 条，平均局部聚类系数为 0.982（图 6：C）。

2.7　西方蜜蜂工蜂不同组织中 *AmATG5* 基因的表达谱

RT-qPCR 检测表明，*AmATG5* 广泛分布于工蜂多个组织中，但表达水平存在差异。具体而言，与毒腺相比，触角、脑和中肠中的 *AmATG5* 表达量呈现显著上升趋势（$P < 0.05$）；其中，脑组织的表达量达到最高，而表皮组织的表达量最低（图 7）。

2.8　西方蜜蜂工蜂不同发育阶段 *AmATG5* 的表达谱

AmATG5 在工蜂的卵、1 日龄幼虫、3 日龄幼虫、5 日龄幼虫、8 日龄预蛹、11 日龄蛹和 16 日龄蛹中差异表达；*AmATG5* 的表达量在卵、1

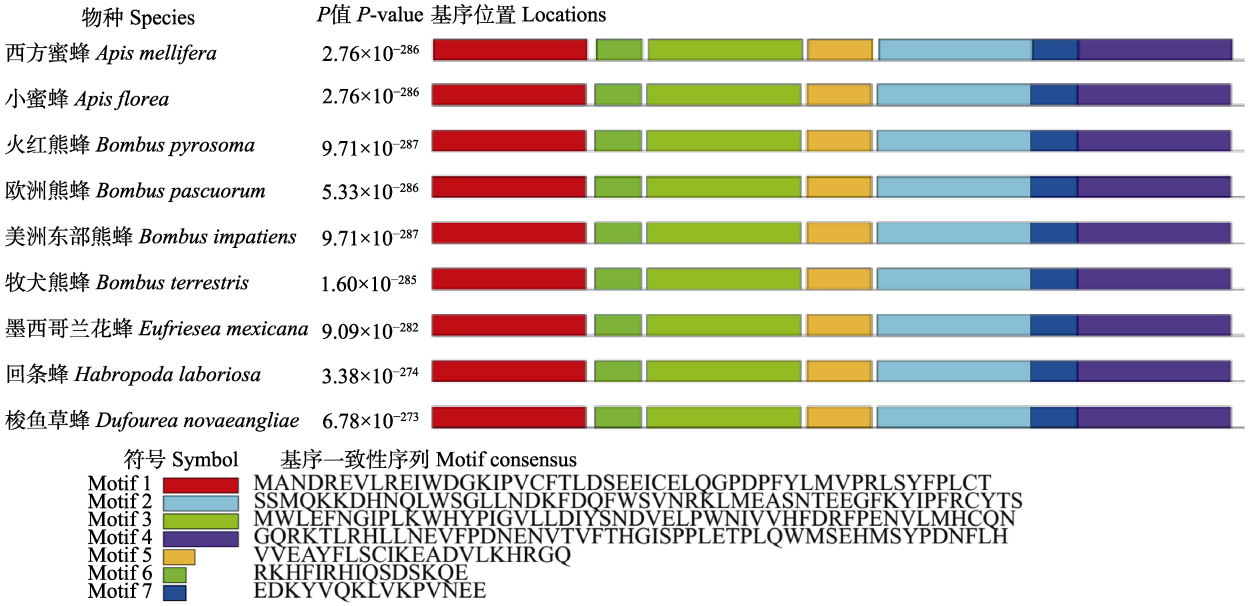

图 3　比较分析西方蜜蜂与其他物种 ATG5 的保守基序

Fig. 3　Conserved motifs in ATG5 across *Apis mellifera* and additional species

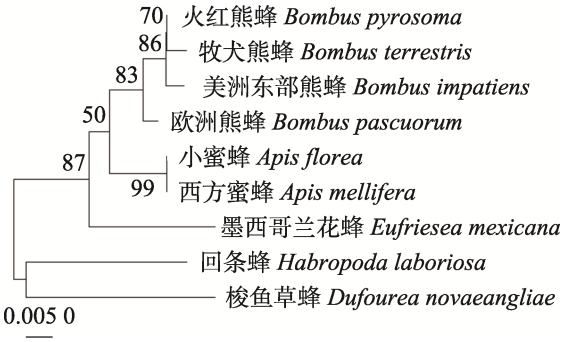

图 4　邻接法构建的系统进化树
（1 000 次重复）

Fig. 4　Phylogenetic tree utilizing neighbor-joining method (1 000 replicates)

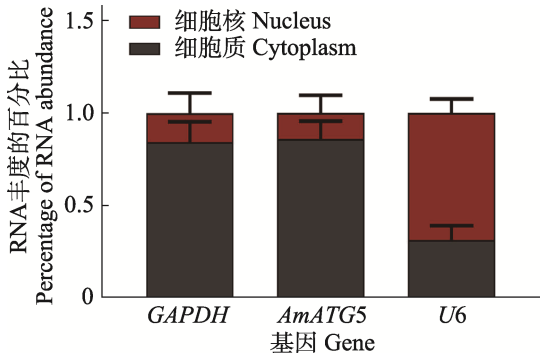

图 5　西方蜜蜂 *AmATG5* 在细胞质和细胞核中的相对表达水平

Fig. 5　Relative expression levels of *AmATG5* in the cytoplasm and nucleus of the *Apis mellifera*

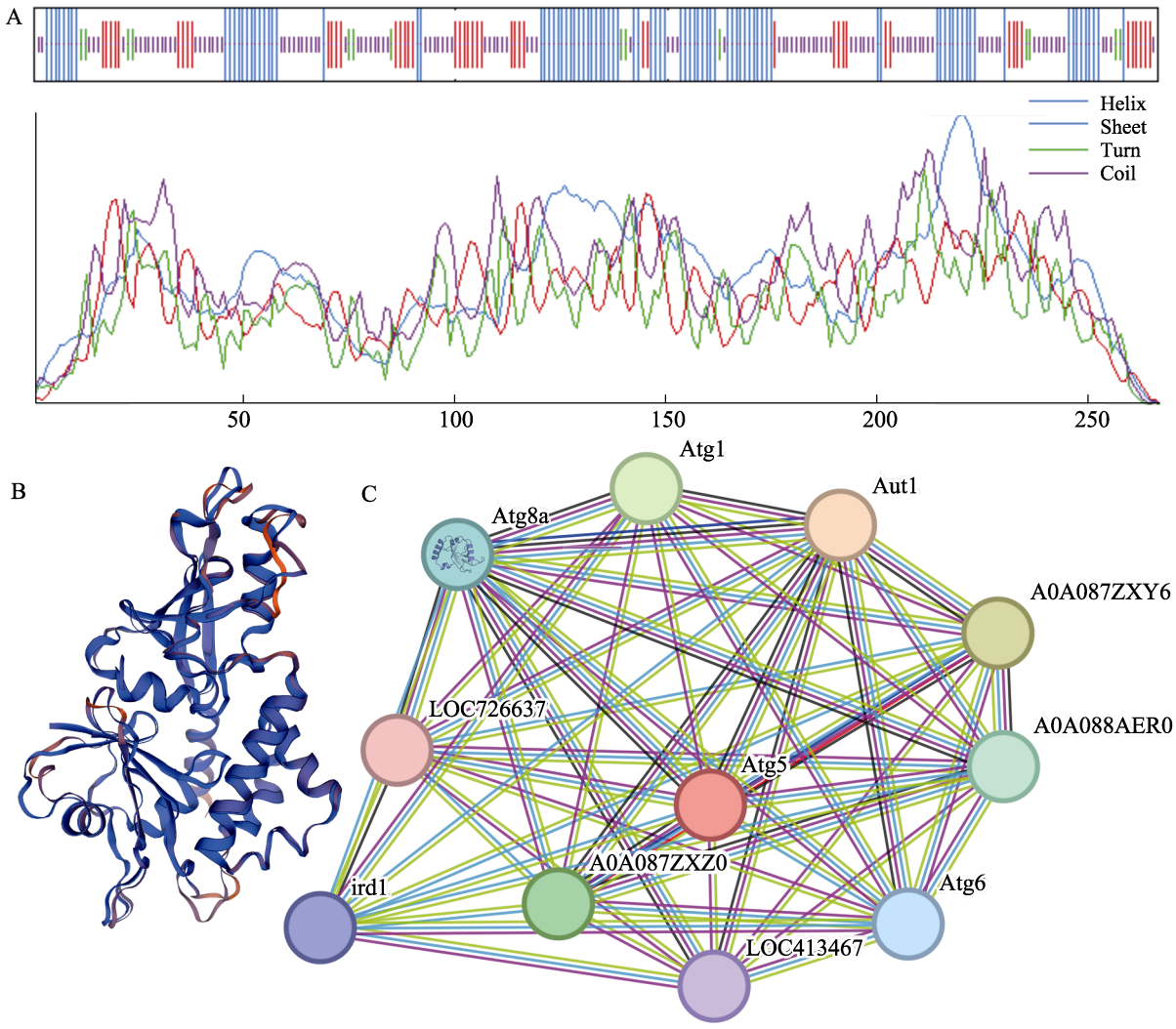

图 6　AmATG5 蛋白的高级结构和互作网络

Fig. 6　Structure and interaction network of AmATG5 protein

A. 二级结构；B. 三级结构；C. 蛋白互作网络。

A. Secondary structural elements; B. Three-dimensional structure; C. Protein interaction map.

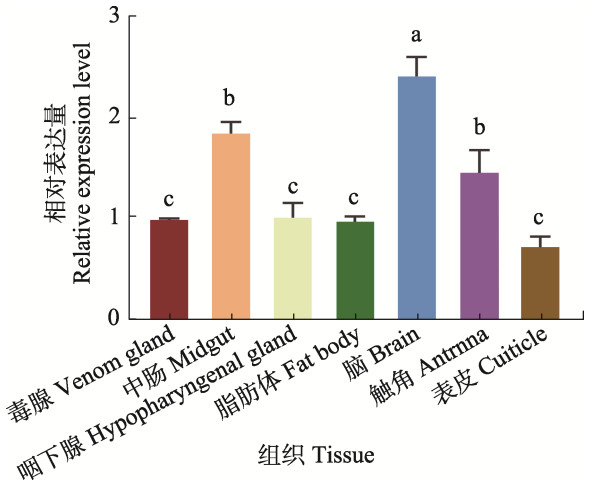

图 7　西方蜜蜂工蜂 7 个不同组织中 *AmATG5* 的相对表达量

Fig. 7　Relative expression levels of *AmATG5* in 7 different tissues of worker bees from *Apis mellifera*

图中数据为平均值±标准误，柱上不同小写字母表示差异显著（$P < 0.05$，Tukey 检验）。下图同。

Data in the figure are mean±SE. Different lowercase letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$, Tukey's test). The same below.

日龄幼虫、3 日龄幼虫和 5 日龄幼虫阶段持续下降，在 8 日龄预蛹、11 日龄蛹和 16 日龄蛹阶段持续上升；*AmATG5* 在 5 日龄幼虫中的表达量最低，而在 16 日龄蛹中的表达量最高，且显著高于卵、1 日龄幼虫、3 日龄幼虫、5 日龄幼虫、8 日龄预蛹和 11 日龄蛹在内的其他发育阶段的表达量（$P < 0.05$）（图 8）。

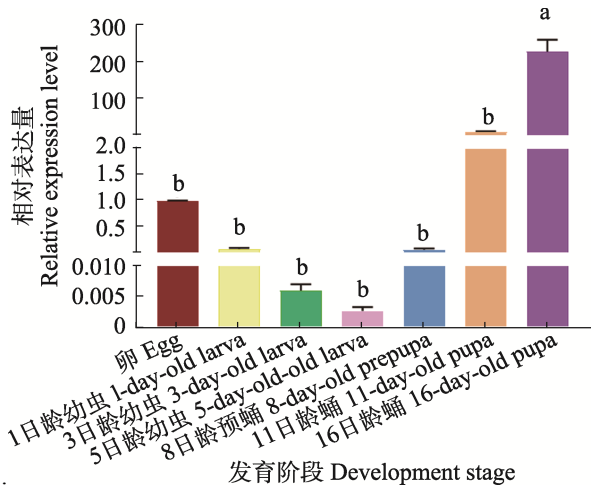

图 8　西方蜜蜂工蜂不同发育阶段 *AmATG5* 的相对表达量

Fig. 8　Relative expression level of *AmATG5* in various developmental stages of *Apis mellifera* worker

3　结论与讨论

本研究中，预测结果显示 AmATG5 的分子量约为 31.41 kD，分子式为 $C_{1428}H_{2168}N_{372}O_{403}S_{13}$，理论等电点为 5.54，不稳定系数 48.78，脂溶系数为 86.30，平均疏水系数为 - 0.420，缺乏信号肽，暗示 AmATG5 是一种具有疏水性质的胞内蛋白。AmATG5 可同时定位于细胞质、周质、胞外、内膜和外膜，显示出 AmATG5 分布的广泛性；AmATG5 主要分布在细胞质，进一步的核质分离和 RT-qPCR 检测结果证实 *AmATG5* mRNA 主要分布于细胞质，表明 AmATG5 是一种胞内蛋白。鉴于真核细胞中翻译出的蛋白通常还需进一步的加工和修饰，并被运输到其他亚细胞结构。接下来，将利用原核表达体系来合成 AmATG5 的融合蛋白，并据此制备多克隆抗体。随后，通过 Western blot 技术，在蛋白质层面上确定 AmATG5 的亚细胞定位。

蛋白质能通过氨基酸残基之间、氨基酸残基与水分子之间的相互作用形成具有特定功能的空间结构，进而影响自身的活性、功能及稳定性（Choudhary *et al.*，2009）。二级结构，包括 α 螺旋、β 折叠、β 转角及无规则卷曲，经由侧链基团间的相互作用进一步盘绕折叠，最终依靠次级键的稳固连接，构建出三级结构（朱玉贤等，2019）。本研究发现，AmATG5 包含 110 个无规则卷曲，93 个 α-螺旋，48 条延伸链和 14 个 β-转角；此外，AmATG5 的三级结构符合二级结构特征，AmATG5 与其模板 4gdk.1.B 蛋白的相似性 57.31%。在昆虫的发育和胁迫响应过程中，自噬相关基因 *ATG1*、*ATG5* 和 *ATG8* 共同发挥作用，例如农药克安勃暴露 96 h 后，家蚕体内的 *ATG1*, *ATG5* 和 *ATG8* 皆显著上调表达，且丝腺中自噬加剧。在褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 中研究发现，沉默 *NlATG3* 后若虫新角质层变得松散弯曲，表皮细胞内囊泡消失，且产卵总数和孵化率均显著降低（Ye *et al.*，2021）。本研究发现，AmATG5 与 AmATG8a、AmATG1 和 AmATG3 等 10 个蛋白之间存在潜在的相互作用，暗示 AmATG5 可通过与上述其他蛋白互作参与西方蜜蜂的发育和抗逆等过程，值得进一步深入探究。

自噬在中枢神经系统疾病中扮演着双重角色，自噬在神经元中通过清除错误折叠的蛋白质和受损的细胞器来维持细胞稳态和功能，失调的自噬与神经退行性疾病和精神疾病如精神分裂症和躁郁症有关（Kuijpers *et al.*，2021）。吴建艮（2022）发现 *NlATG*13 在褐飞虱头部的表达水平高于胸部、中肠和卵巢等其他组织。本研究中，*AmATG5* 在西方蜜蜂工蜂的脑和中肠等 7 个组织中差异表达，但在脑中的表达量最高，表明 *AmATG5* 与褐飞虱 *NlATG*13 的表达特点类似。需要进一步研究以全面了解昆虫大脑中自噬的潜在机制及其对神经系统健康的潜在影响。

肠道组织的细胞更新十分活跃，敲除 *ATG5* 引起小鼠的肠道干细胞中活性氧水平上升，进而损害肠道干细胞的再生能力。研究表明自噬在果蝇和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中肠的程序性细胞死亡过程中起到关键作用（Denton *et al.*，2009；杨婷，2017）。本研究发现 *AmATG5* 在中肠的表达水平低于脑，但高于毒腺、咽下腺、脂肪体、触角及表皮等其他组织。推测 *AmATG5* 在西方蜜蜂工蜂中肠的发育和稳态中发挥功能，下一步拟通过 RNAi 等分子生物学手段加以探究。

细胞自噬和凋亡通过控制组织或器官的消解和重建参与昆虫的变态发育过程（Qu *et al.*，2007）。在甜菜夜蛾 *Laphygma exigua* 和二化螟 *Chilo suppressalis* 的幼虫阶段，*ATG5* 维持较低的表达水平，当进入预蛹期，随着体内蜕皮激素合成与分泌的增加，化蛹 0 和 1 d 时 *ATG5* 的表达量上调，自噬由低水平转变为高水平（夏誉乾，2015）。本研究发现在卵、1 日龄幼虫、3 日龄幼虫和 5 日龄幼虫阶段，*AmATG5* 的表达量持续下降，到 5 日龄幼虫时达到最低，然后逐渐上升，至 16 日龄蛹时达到最高，表现为先上升后下降的表达规律。这可能与西方蜜蜂工蜂不同虫态的组织或器官消解与重建过程有关，但具体机制仍需进一步的研究。

参考文献 (References)

Asano J, Sato T, Ichinose S, Kajita M, Onai N, Shimizu S, Ohteki T, 2017. Intrinsic autophagy is required for the maintenance of intestinal stem cells and for irradiation-induced intestinal regeneration. *Cell Reports*, 20(5): 1050–1060.

Bailey TL, Elkan C, 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 2: 28–36.

Choudhary A, Gandla D, Krow GR, Raines RT, 2009. Nature of amide carbonyl-carbonyl interactions in proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 131(21): 7244–7256.

Denton D, Shravage B, Simin R, Mills K, Berry DL, Baehrecke EH, Kumar S, 2009. Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Current Biology*, 19(20): 1741–1746.

Dong SH, Lin T, Nieh JC, Tan K, 2023. Social signal learning of the waggle dance in honey bees. *Science*, 379(6636): 1015–1018.

Kuijpers M, Kochlamazashvili G, Stumpf A, Puchkov D, Swaminathan A, Lucht MT, Krause E, Maritzen T, Schmitz D, Haucke V, 2021. Neuronal autophagy regulates presynaptic neurotransmission by controlling the axonal endoplasmic reticulum. *Neuron*, 109(2): 299–313.

Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870–1874.

Liu CZ, Fan XX, Wu BW, Wu Y, Fu ZY, Chen DF, Guo R, 2024. Analysis of bioinformatic and expression pattern of *Apis mellifera* AKHR gene. *Journal of Environmental Entomology*, 46(5): 1193–1200. [刘彩珍, 范小雪, 吴伯文, 吴杨, 付志英, 陈大福, 郭睿, 2024. 西方蜜蜂 AKHR 基因的生物信息学及表达模式分析. 环境昆虫学报, 46(5): 1193–1200.]

Liu YH, Shi MM, He XF, Cao YZ, Liu PY, Li FL, Zou SY, Wen CL, Zhan Q, Xu ZW, Wang JC, Sun BF, Shen BY, 2022. LncRNA-PACERR induces pro-tumour macrophages via interacting with miR-671-3p and m6A-reader IGF_2BP_2 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Hematology & Oncology*, 15(1): 52.

Mao TT, Ye WT, Dai ML, Bian DD, Zhu QY, Feng P, Ren YY, Li FC, Li B, 2022. Mechanism of autophagy induced by low concentrations of chlorantraniliprole in silk gland, *Bombyx mori*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 188: 105223.

Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhisa T, Ohsumi Y, Yoshimori T, 2001. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *Journal of Cell Biology*, 152(4): 657–668.

Noh MY, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Arakane Y, 2018. Group Ⅰ chitin deacetylases are essential for higher order organization of chitin fibers in beetle cuticle. *Journal of Chemical Biology*,

293(18): 6985–6995.

Papa G, Maier R, Durazzo A, Lucarini M, Karabagias IK, Plutino M, Bianchetto E, Aromolo R, Pignatti G, Ambrogio A, Pellecchia M, Negri I, 2022. The honey bee *Apis mellifera*: An insect at the interface between human and ecosystem health. *Biology*, 11(2): 233.

Parthasarathy R, Palli SR, 2007. Developmental and hormonal regulation of midgut remodeling in a lepidopteran insect, *Heliothis virescens*. *Mechanisms of Development*, 124(1): 23–34.

Qu XP, Zou ZJ, Sun QH, Luby-Phelps K, Cheng PF, Hogan RN, Gilpin C, Levine B, 2007. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell*, 128(5): 931–946.

Ren CL, Finkel SE, Tower J, 2009. Conditional inhibition of autophagy genes in adult *Drosophila* impairs immunity without compromising longevity. *Experimental Gerontology*, 44(3): 228–235.

Schulze RJ, Weller SG, Schroeder B, Krueger EW, Chi SS, Casey CA, McNiven MA, 2013. Lipid droplet breakdown requires dynamin 2 for vesiculation of autolysosomal tubules in hepatocytes. *Journal of Cell Biology*, 203(2): 315–326.

Song YX, Dong SN, Ye DY, Zang H, Fan XX, Qiu JF, Chen DF, Yan TZ, Guo R, 2024. Investigation of bioinformaties and expression pattern of synaptic vesicle glycoprotein 2B gene in *Apis cerana*. *Journal of Environmental Entomology*, https://link.cnki.net/urlid/44.1640.Q.20241213.1653.008. [宋宇轩, 董舒楠, 叶道有, 臧贺, 范小雪, 邱剑丰, 陈大福, 严提珍, 郭睿, 2024. 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. 环境昆虫学报, https://link.cnki.net/urlid/44.1640.Q.20241213.1653.008.]

Tian L, Ma L, Guo EN, Deng XJ, Ma SY, Xia QY, Cao Y, Li S, 2013. 20-Hydroxyecdysone upregulates Atg genes to induce autophagy in the *Bombyx* fat body. *Autophagy*, 9(8): 1172–1187.

Wu JG, Jiao QQ, Yu FF, Zheng YY, Chen TT, Hao PY, Yu XP, 2022. Expression and functional analysis of the autophagy-related gene NlATG13 in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 65(8): 967–976. [吴建艮, 矫启启, 俞飞飞, 郑园园, 陈桐桐, 郝培应, 俞晓平, 2022. 褐飞虱自噬相关基因 NlATG13 的表达与功能分析. 昆虫学报, 65(8): 967–976.]

Xia YQ, 2015. Molecular cloning and functional analysis of an autophagy-related gene Atg5 from *Spodoptera exigua* and *Chilo suppressal*. Master dissertation. Wuhan: Central China Normal University. [夏誉乾, 2015. 甜菜夜蛾和二化螟 Atg5 基因的克隆表达及功能分析. 硕士学位论文. 武汉: 华中师范大学.]

Xie K, Li MJ, Jiang CY, Lu HJ, Kong Q, Gao B, Yang WY, 2018. Research advances on BmATG5 protein as a molecule triggering cell autophagy and apoptosis during metamorphosis of silkworm. *Acta Sericologica Sinica*, 44(2): 315–320. [谢昆, 李密杰, 蒋成砚, 鲁海菊, 孔琼, 高波, 杨婉莹, 2018. BmATG5 蛋白作为分子开关调控家蚕细胞自噬和凋亡关系的研究进展. 蚕业科学, 44(2): 315–320.]

Yang T, 2017. Steroid hormone 20-hydroxyecdysone promotes autophagy associated gene 12 expression for insect midgut programmed cell death. Master dissertation. Jinan: Shandong University. [杨婷, 2017. 蜕皮激素通过上调自噬相关基因 12 的表达来促进中肠程序性细胞死亡. 硕士学位论文. 济南: 山东大学.]

Ye CL, Feng YL, Yu FF, Jiao QQ, Wu JG, Ye ZH, Zhang PJ, Sun CX, Pang K, Hao PY, Yu XP, 2021. RNAi-mediated silencing of the autophagy-related gene NlATG3 inhibits survival and fecundity of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Pest Management Science*, 77(10): 4658–4668.

Ye YP, Liu ZT, Li QM, Zang H, Feng PL, Wang N, Wang J, Huang ZJ, Chen DF, Guo R, 2024. Molecular properties, spatio-temporal expression profiles and antibody preparation of AmAGO1 protein of *Apis mellifera*. *Acta Entomologica Sinica*, 67(1): 18–28. [叶亚萍, 刘治滩, 李琪明, 臧贺, 冯佩林, 王宁, 王杰, 黄枳腱, 陈大福, 郭睿, 2024. 西方蜜蜂 AmAGO1 蛋白的分子特性、时空表达谱及抗体制备. 昆虫学报, 67(1): 18–28.]

Zeng ZJ, 2007. Bee Biology. Beijing: China Agriculture Press. 30–33. [曾志将, 2007. 蜜蜂生物学. 北京: 中国农业出版社. 30–33.]

Zhang X, Hu ZY, Li WF, Li QR, Deng XJ, Yang WY, Cao Y, Zhou CZ, 2009. Systematic cloning and analysis of autophagy-related genes from the silkworm *Bombyx mori*. *BMC Molecular Biology*, 10: 50.

Zhu YX, 2019. Mordern Molecular Biology, Fifth Edition. Beijing: Higher Education Press. 146–147. [朱玉贤, 2019. 现代分子生物学(第五版). 北京: 高等教育出版社. 146–147.]

Zou PY, Zang H, Dong SN, Ye DY, Du LT, Qiu JF, Fu ZM, Chen DF, Guo R, 2024. Molecular feature and gene spatio-temporal expression profile of *Apis mellifera* CKl1 protein. *Journal of Environmental Entomology*, http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1640.Q.20241213.1653.008.html. [邹培缘, 臧贺, 董舒楠, 叶道有, 杜丽婷, 邱剑丰, 付中民, 陈大福, 郭睿, 2024. 西方蜜蜂 CKI1 蛋白的分子特征和基因时空表达谱. 环境昆虫学报, http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1640.Q.20241213.1653.008.html.]