

西方蜜蜂泛素结合酶基因 *AmUBCD4* 的生物信息学分析和表达模式测定*

吴伯文^{1**} 臧贺^{2,3,4**} 刘彩珍¹ 冯睿蓉¹ 吴杨¹
付志英¹ 付中民^{2,3,4} 郭睿^{2,3,4***}

(1. 福建农业职业技术学院, 福州 350000; 2. 福建农林大学蜂学与生物医药学院, 福州 350002;
3. 天然生物毒素国家地方联合工程实验室, 福州 350002; 4. 福建农林大学蜂疗研究所, 福州 350002)

摘要 【目的】本研究对西方蜜蜂 *Apis mellifera* 泛素结合酶 E2-22 kD (*AmUBCD4*) 开展生物信息学解析, 系统检测该基因在工蜂不同组织及发育阶段的表达特征, 为深入探索其生物学功能提供理论基础。【方法】使用相关生物信息学软件预测和分析 *AmUBCD4* 的理化性质、分子特性、二级结构、三级结构和蛋白互作网络, 并进行西方蜜蜂和其他昆虫 *UBCD4* 的保守基序和结构域鉴定和比较。通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 鉴定 *AmUBCD4* 在西方蜜蜂工蜂脑、咽下腺、中肠、触角、毒腺、表皮和脂肪体各不同组织及卵、幼虫、预蛹和蛹各发育阶段的相对表达量。【结果】*AmUBCD4* 含 199 个氨基酸, 分子式为 $C_{1010}H_{1584}N_{270}O_{298}S_7$, 分子量约为 22.50 kD, 理论等电点为 5.31, 不稳定指数为 45.22, 半衰期为 30 h, 脂肪系数为 88.29, 平均亲水系数为 -0.303。*AmUBCD4* 含 25 个磷酸化位点, 不含跨膜结构域和信号肽。*AmUBCD4* 与 Uba1 和 Rpl40 等 10 个蛋白构成 1 个互作网络。西方蜜蜂和其他 9 种昆虫的 *UBCD4* 均包含 5 个相同保守基序。西方蜜蜂、切叶蜂 *Megachile rotundata*、金小蜂 *Nasonia vitripennis*、造纸胡蜂 *Polistes dominula*、东方蜜蜂 *Apis cerana*、欧洲熊蜂 *Bombus terrestris*、小蜜蜂 *Apis florea* 和家蚕 *Bombyx mori* 的 *UBCD4* 皆包含 UBA_II_E2_UBCD4 和 UBCc 结构域。*AmUBCD4* 在工蜂的触角、脑、中肠、毒腺、脂肪体、表皮和咽下腺中表现出差异表达。其中, 表皮中的表达量最高, 而中肠中的表达量最低。*AmUBCD4* 的表达量在卵中最高, 随后逐渐下降, 至 12 日龄蛹时达到最低。【结论】*AmUBCD4* 可能是亲水蛋白和胞内蛋白, *AmUBCD4* 在西方蜜蜂工蜂的表皮和咽下腺及卵和 3 日龄幼虫中特异性高表达。

关键词 西方蜜蜂; 泛素结合酶 E2-22 kD; 生物信息学; 结构域; 表达模式

Bioinformatic investigation and expression of the *UBCD4* gene in *Apis mellifera*

WU Bo-Wen^{1**} ZANG He^{2,3,4**} LIU Cai-Zhen¹ FENG Rui-Rong¹ WU Yang¹
FU Zhi-Ying¹ FU Zhong-Min^{2,3,4} GUO Rui^{2,3,4***}

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

Abstract [Aim] This study aims to perform bioinformatic analysis of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-22 kD (*AmUBCD4*) in *Apis mellifera* and determine its expression patterns in various tissues and developmental stages of worker bees, providing a basis for exploring its functional roles. Bioinformatic tools were employed to analyze the physicochemical properties, molecular structures (including secondary and tertiary structures), and protein interaction network of *AmUBCD4*.

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金面上项目 (32172792); 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 (JAT231226); 福建农业职业技术学院科技研究项目 (2023JS011)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: wubowen@fjny.edu.cn; zanghe321@163.com

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

收稿日期 Received: 2024-03-08; 接受日期 Accepted: 2025-05-10

Meanwhile, a comparative study was conducted on the conserved motifs and domains of UBCD4 between *A. mellifera* and other insects. A comparison of conserved motifs and structural domains in UBCD4 in *A. mellifera* and other insects was also conducted. RT-qPCR was used to evaluate the relative expression of *AmUBCD4* in different worker tissues, including the brain, hypopharyngeal gland, midgut, antenna, venom gland, cuticle, and fat body, as well as in different developmental stages, including eggs, larvae, pre-pupae, and pupae. **[Results]** *AmUBCD4* consists of 199 amino acids, with a molecular formula of $C_{1010}H_{1584}N_{270}O_{298}S_7$. Its molecular weight is approximately 22.50 kD, and the theoretical isoelectric point is 5.31. The instability index of *AmUBCD4* is 45.22, the half-life is 30 h, the lipid coefficient is 88.29, and the average hydrophilicity coefficient is - 0.303. Additionally, *AmUBCD4* contains 25 phosphorylation sites, while it lacks a transmembrane domain and a signal peptide. *AmUBCD4* putatively interacts with 10 proteins, including Uba1 and RpL40. *UBCD4* has 5 conserved motifs common to *A. mellifera* and other nine insects. Both the UBA_II_E2_UBCD4 and the UBCc structural domains are present in *UBCD4* in *A. mellifera*, *Megachile rotundata*, *Nasonia vitripennis*, *Polistes dominula*, *A. cerana*, *Bombus terrestris*, *A. florea* and *Bombyx mori*. *AmUBCD4* was differentially expressed in the antennae, brain, midgut, venom gland, fat body, cuticle and hypopharyngeal gland, with the highest expression in the cuticle and the lowest in the midgut. With respect to developmental stages, expression was highest in eggs, and progressively decreased in subsequent developmental stages, being lowest in 12-day-old pupae. **[Conclusion]** *AmUBCD4* is a potential hydrophilic, intracellular protein that is most highly expressed in the cuticle and hypopharyngeal gland, and in egg stage, of *A. mellifera* workers.

Key words *Apis mellifera*; ubiquitin-conjugating enzyme E2-22 kD; bioinformatics; structural domain; expression profile

西方蜜蜂 *Apis mellifera* 是一种真社会性昆虫和授粉昆虫, 因具有采集力强、兼采粉蜜和不易逃群等优点而广泛应用于我国和其他国家的养蜂生产(曾志将, 2017)。泛素化(Ubiquitination)是蛋白质的一种关键翻译后修饰类型(Post-translational modifications, PTMs)(Nakamura, 2018)。较多的研究表明泛素化不仅在调控蛋白酶体与溶酶体的降解、蛋白质质量控制、细胞运输及定位、蛋白互作及诸多细胞生命活动方面起到核心作用(Pohl and Dikic, 2019)。此外, 泛素化还紧密联系于胰岛素水平调节、核糖体功能维持、氧化应激、DNA 损伤修复、生长发育等多种重要的生物学过程(Kerscher *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2015)。

泛素化的修饰过程主要涉及 3 种类型的酶(Kwon and Ciechanover, 2017)。泛素结合酶(Ubiquitin-conjugating enzyme, E2)是一个由多个成员构成的家族, 各成员的分子量、结构和功能都表现出高度的多样性(Maxwell Burroughs *et al.*, 2008), 是泛素化修饰级联反应的核心催化元件, 负责将活化的泛素从泛素激活酶(Ubiquitin-activating enzyme, E1)转移到泛素连接酶(Ubiquitin ligase, E3)或直接传递给底物蛋白, 最终介导泛素或其聚合物在靶蛋白上的

共价结合。例如, Cdc34/UBE2R 类 E2 通过动态的 C 端延伸区与 CRL (Cullin-RING ligase) E3 结合, 实现 K48 连接泛素链的快速组装, 从而调控底物的蛋白酶体降解(Liwocha *et al.*, 2024)。泛素结合酶 E2-22 kD (Ubiquitin-conjugating enzyme E2-22 kD, UBCD4) 是 E2 家族的成员之一, 其研究主要集中在果蝇 *Drosophila* 上。但对于果蝇外的多数昆虫, UBCD4 相关研究匮乏。Canning 等(2002)研究发现 UBCD4 在果蝇胚胎中特异性表达, 并通过与蛋白酶体的多泛素结合亚基相互作用而在胚胎细胞发育中发挥重要功能。Park 等(2016)发现泛素化是果蝇免疫缺陷(Immune deficiency pathway, IMD)通路的关键调节机制, 且 UBCD4 为 IMD 通路激活所必需。到目前为止, 西方蜜蜂 UBCD4 (*AmUBCD4*) 的研究仍然缺失, 极大地限制了对 *AmUBCD4* 功能的深入理解。

本研究通过生物信息学方法系统解析 *AmUBCD4* 的物理化学特性和分子特征, 比对西方蜜蜂与其他昆虫 UBCD4 的保守结构域及基序以揭示其进化保守性, 同时测定该基因在工蜂不同组织及发育阶段的表达模式, 为丰富 *AmUBCD4* 的基础数据及探究其在西方蜜蜂中的生物学功能提供支撑。

1 材料与方法

1.1 生物材料

实验所用西方蜜蜂工蜂取自福建农林大学蜂学与生物医药学院。蜂群由宿主-病原互作机制及精准医学团队进行饲养。

1.2 样品制备

从健康蜂群中快速取出卵虫巢脾并转移至实验室, 在显微镜下用无菌移虫针收集 50 枚卵至无菌离心管; 将 2 日龄幼虫转移至预置饲料(黄枳腱, 2019)的 48 孔培养板, 置于上海精科生产的恒温恒湿箱中培养[温度(35 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 70%], 每 24 h 更换新鲜饲料, 分别收集 3 日龄幼虫($n=3$)、7-8 日龄预蛹($n=3$)及 12 日龄蛹($n=3$)。另取成熟封盖子脾置于恒温恒湿培养箱, 待工蜂羽化出房后立即收集($n=1\ 500$), 冰浴麻醉后在超净工作台解剖, 分离触角、毒腺、脑、中肠、脂肪体、表皮和咽下腺, 各组织样本均放入无 RNase 的无菌离心管。所有制备完成的生物样品经过液氮速冻处理, 以迅速降低温度, 防止蛋白质降解和 RNA 降解。处理后的样本被保存于 $-80\ ^{\circ}\text{C}$ 的超低温冰箱中, 以备后续实验使用。为了提高实验的可重复性和结果的可靠性, 以上所有实验步骤均进行了 3 次独立的生物学重复。

1.3 生物信息学分析

参照课题组前期方法(邹培缘等, 2024)进行以下分析:

(1) 序列获取与预测: 从 NCBI GeneBank 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取 *AmUBCD4* 的核苷酸序列, 利用 ORF 工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)预测其开放阅读框并推导氨基酸序列。

(2) 理化性质及结构预测: 通过 ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析 *AmUBCD4* 的基本理化参数(分子量、等电点等); 利用 ProtScale(<https://web.expasy.org/protscale/>)评估亲水性; 借助 SWISS-model(<https://swissmodel.expasy.org/>)构建三级结构模型。

(3) 功能位点预测: 采用 SignalP 4.1 Server(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)预测信号肽; 通过 NetPhos 3.1 Server(<https://www.healthtech.dtu.dk/>)分析磷酸化位点; 利用 TMHMM 在线软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)进行蛋白的跨膜结构域预测; 通过 SOPMA(https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)预测二级结构。

(4) 互作网络分析: 利用 STRING 软件(<https://string-db.org/>)构建并分析西方蜜蜂及其他昆虫中 UBCD4 的互作网络, 以揭示其潜在的生物学功能和交互关系。

以上所有生物信息学分析均采用默认参数进行设置, 确保分析结果的标准化和可重复性。

自 NCBI Protein 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>)下载以下物种的 UBCD4 氨基酸序列: 东方蜜蜂(*Apis cerana*, XP_016904346.1)、小蜜蜂(*Apis florea*, XP_003690517.1)、欧洲熊蜂(*Bombus terrestris*, XP_003396259.1)、切叶蜂(*Megachile rotundata*, XP_003702104.1)、造纸胡蜂(*Polistes dominula*, XP_015191101.1)、阿根廷蚂蚁(*Linepithema humile*, XP_012223726.1)、红火蚁(*Solenopsis invicta*, XP_011168351.1)、金小蜂(*Nasonia vitripennis*, XP_031782097.1)以及家蚕(*Bombyx mori*, NP_001108475.1)。使用 MEME Suite(<https://meme-suite.org/meme>)鉴定上述物种 UBCD4 蛋白的保守基序。通过 NCBI CD-search 工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析保守结构域, 结果用 TBtools 软件(Chen *et al.*, 2020a)可视化。基于上述物种的 UBCD4 氨基酸序列, 使用 MEGA 11.0 软件(Tamura *et al.*, 2021)构建系统进化树。分析方法采用邻接法(Neighbor-joining), 设置 1 000 个 bootstrap 重复以评估分支支持率, 并指定家蚕序列作为外类群(Outgroup)。上述所有生物信息学分析(MEME, CD-search, TBtools, MEGA 11.0)均使用软件默认参数执行。

1.4 时空表达谱检测

利用 Primer Premier 6 软件设计 *AmUBCD4* 特

异性引物(正向: 5'-CCACCAGATACACCATACG-3', 反向: 5'-TATATTGCCTAGCCACTACTG-3')及内参基因 β -actin 引物(GenBank 登录号: 406122; 正向: 5'-CCTAGCACCATCCACCATGAA-3', 反向: 5'-GAAGCAAGAATTGACCCACCAA-3')。采用 Promega (美国) RNA 抽提试剂盒提取 1.2 节样品的总 RNA, 反转录为 cDNA 作为 qPCR 模板。RT-qPCR 在 ABI QuantStudio 3 荧光定量系统 (Applied Biosystems, 美国) 上进行, 反应体系及程序参照叶亚萍等 (2024) 的方法设置。每个样本的 *AmUBCD4* 和 β -actin 基因均设 3 次技术重复和 3 次生物学重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法 (Livak and Schmittgen, 2001) 计算相对表达量, 以 β -actin 标准化。使用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 7.0 软件进行单因素方差分析 (One-way

ANOVA) 及可视化, 组间差异显著性采用 Tukey 检验。

2 结果与分析

2.1 *AmUBCD4* 蛋白的理化性质和分子特征

生物信息学分析显示, *AmUBCD4* 由 199 个氨基酸组成, 分子式为 $C_{1010}H_{1584}N_{270}O_{298}S_7$, 分子量约 22.50 kD, 理论等电点 5.31, 不稳定指数 45.22, 预测半衰期 30 h, 脂溶性指数 88.29, 平均亲水系数 -0.303 (图 1: A), 整体呈疏水性。预测到 25 个磷酸化位点, 其中包括苏氨酸 (Thr), 丝氨酸 (Ser) 和酪氨酸 (Tyr), 分别有 11 个、8 个和 6 个位点 (图 1: B)。跨膜结构域及信号肽预测表明该蛋白无跨膜区和信号肽序列 (图 1: C, D)。

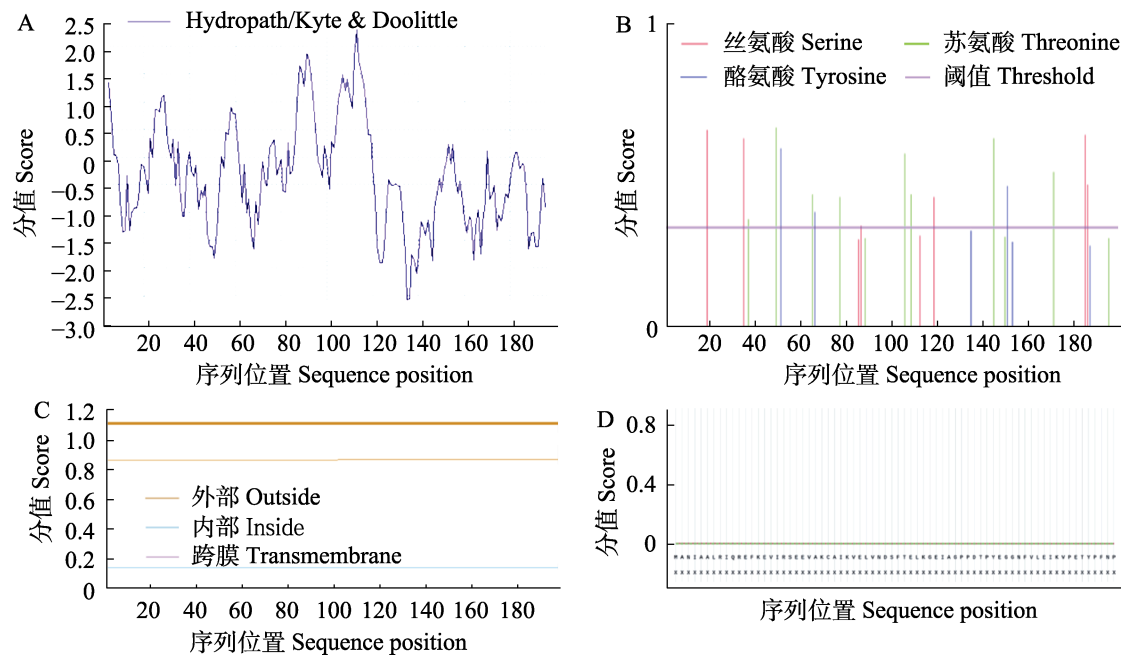


图 1 *AmUBCD4* 的理化性质分析

Fig. 1 Analysis of the physicochemical properties of *AmUBCD4*

A. 蛋白的亲水性; B. 磷酸化位点; C. 跨膜结构域; D. 信号肽。

A. Hydrophobicity of the protein; B. Phosphorylation sites; C. Transmembrane domains; D. Signal peptide.

2.2 *AmUBCD4* 蛋白的二级结构、三级结构和蛋白互作网络

二级结构预测显示 *AmUBCD4* 二级结构以 α -螺旋为主 (99 个, 占 49.75%), 其次为随机卷曲 (69 个, 34.67%)、延伸链 (24 个, 12.06%)

和 β -转角 (7 个, 3.52%) (图 2: A)。基于同源建模获得的三级结构与模板蛋白 (A0A2J7PHJ2.1.A) 序列同源性达 88.44% (图 2: B)。STRING 分析显示 *AmUBCD4* 与 Uba1、RpL40 等 10 个蛋白形成互作网络 (节点数: 11, 边数: 52), 网络平均节点度为 9.45, 平均局

部聚类系数为 0.945 (图 2: C)。

2.3 *AmUBCD4* 和其他昆虫的 UBCD4 蛋白的保守基序和结构域的比较分析

MEME 分析在 *AmUBCD4* 中鉴定出 5 个保守基序 (Motif 1- Motif 5), 这些基序在东方蜜

蜂、小蜜蜂等 9 种昆虫的 UBCD4 蛋白中均保守存在 (图 3: A)。UBCc 结构域在西方蜜蜂及其他 9 种昆虫 (包括东方蜜蜂、家蚕等) 中普遍存在。UBA_II_E2_UBCD4 结构域存在于西方蜜蜂、切叶蜂、金小蜂等 8 种昆虫中。UQ_con 结构域仅分布于阿根廷蚂蚁与红火蚁 (图 3: B)。

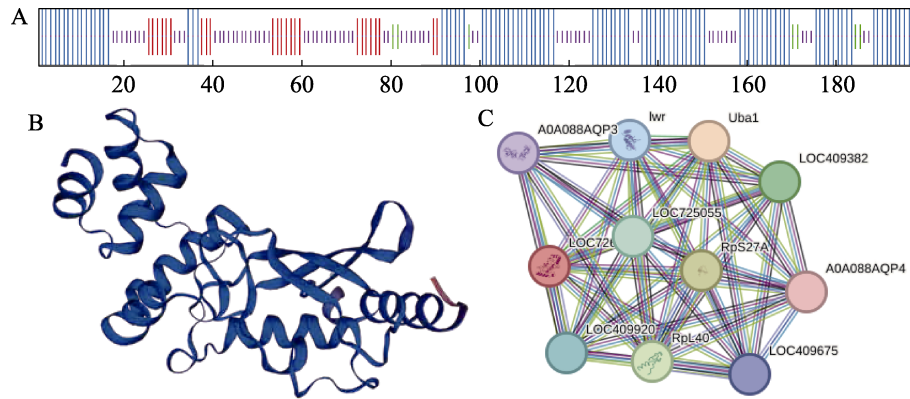


图 2 *AmUBCD4* 的蛋白结构和互作网络分析

Fig. 2 Analysis of protein structure and interaction network of *AmUBCD4*

A. 二级结构; B. 三级结构; C. 蛋白互作网络。

A. Secondary structure; B. Tertiary structure; C: Protein interaction network.

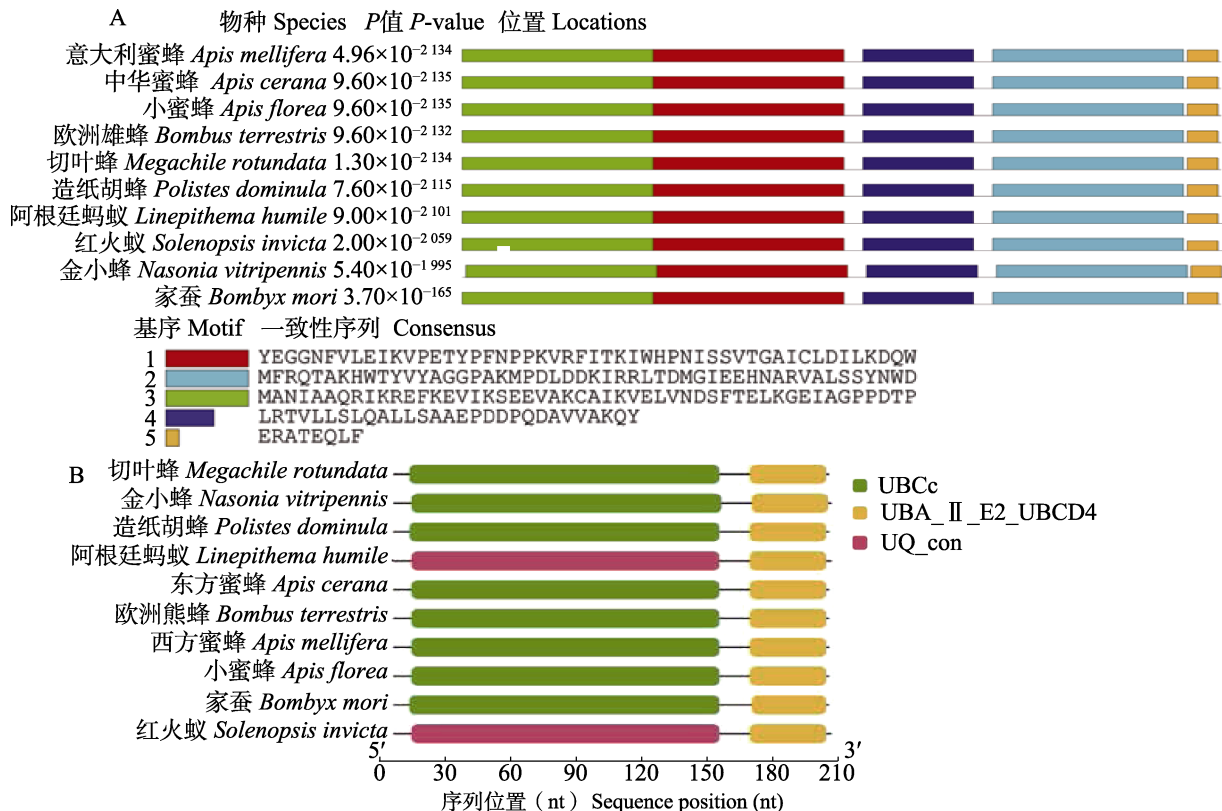


图 3 西方蜜蜂和其他 9 种昆虫的 UBCD4 蛋白的保守基序 (A) 和结构域 (B) 比较

Fig. 3 Comparison of conserved motifs (A) and structural domains (B) in UBCD4 proteins between *Apis mellifera* and nine other species

2.4 西方蜜蜂和其他昆虫 UBCD4 蛋白的系统进化分析

基于 UBCD4 氨基酸序列的系统进化树显示 (图 4), 西方蜜蜂 *AmUBCD4* 单独成支, 与其他膜翅目物种差异显著; 欧洲熊蜂与小蜜蜂的 UBCD4 聚为一支, 亲缘关系较近; 西方蜜蜂与东方蜜蜂的 UBCD4 序列同源性最高。

2.5 西方蜜蜂工蜂不同组织及不同发育阶段中 *AmUBCD4* 的表达模式

AmUBCD4 在工蜂触角、脑、中肠、毒腺、脂肪体、表皮及咽下腺中均有表达 (图 5: A), 其中表皮表达量显著高于触角、脑、中肠、毒腺和脂肪体 ($P<0.05$), 提示其可能在表皮功能中起关键作用。发育阶段表达分析显示, *AmUBCD4* 在卵期表达量最高, 3 日龄幼虫期维持相近水平, 二者均显著高于 8 日龄预蛹和 12 日龄蛹 ($P<0.05$); 7 日龄预蛹期表达量显

著高于 12 日龄蛹 ($P<0.05$), 整体呈现从卵期到蛹期的梯度下降趋势, 12 日龄蛹期达最低 (图 5: B)。

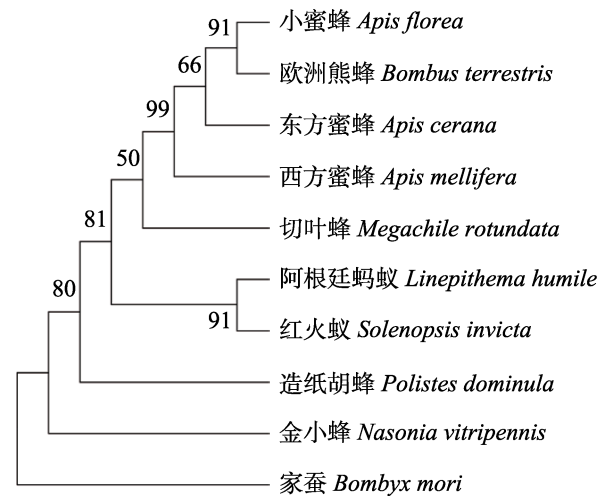


图 4 基于 UBCD4 氨基酸序列的西方蜜蜂与其他 9 种昆虫的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *Apis mellifera* and other nine species based on UBCD4 amino acid sequences

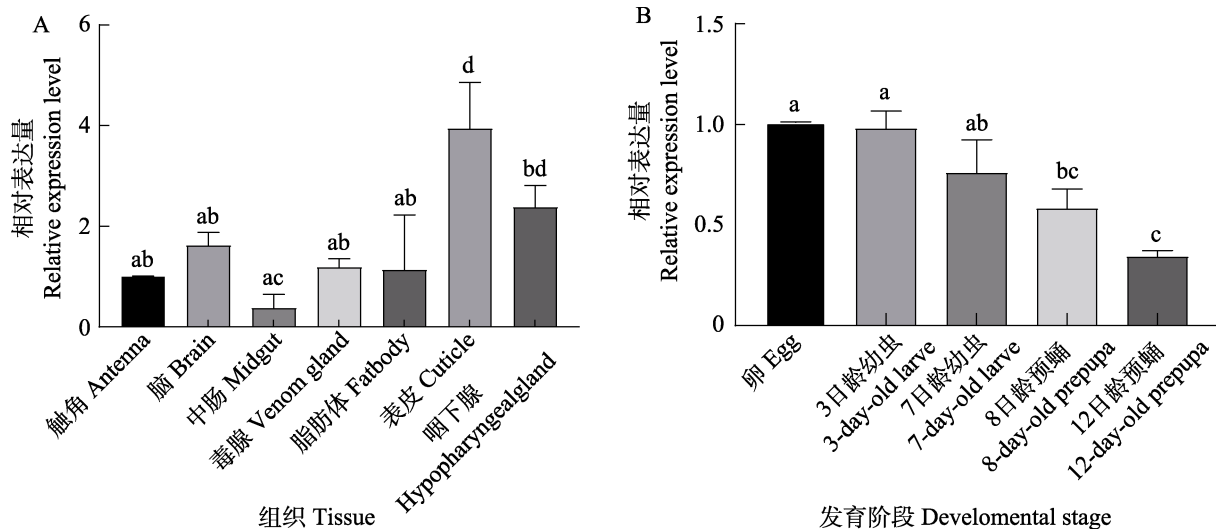


图 5 西方蜜蜂工蜂中 *AmUBCD4* 不同组织 (A) 和发育阶段 (B) 的相对表达量

Fig. 5 Relative expression levels of *AmUBCD4* in different tissues (A) and different developmental stages (B) in worker bees of *Apis mellifera*

数据为平均值 $\pm$ 标准误, 柱上不同字母表示差异显著 ($P<0.05$, Tukey 检验)。

Data are mean $\pm$ SE. Different letters above bars indicate significant difference ($P<0.05$, Tukey test).

3 讨论

周泽 (2020) 研究发现灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 体内的 E2 通过激活灰飞虱体内的抗病

毒免疫应答潜在抑制水稻条纹病毒的复制和积累。杨昕鑫 (2019) 发现中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* E2 家族成员 UBE2N 编码基因启动子序列中存在氧化应激相关的转录因子结合位点, 暗

示 E2 参与对中华蜜蜂抗氧化反应的调节。本研究首次对 *AmUBCD4* 进行生物信息学分析。*AmUBCD4* 由 199 个氨基酸组成, 分子式为 C1010H1584N270O298S7, 分子量约 22.50 kD, 理论等电点 5.31, 不稳定指数 45.22, 预测半衰期 30 h, 脂溶性指数 88.29, 平均亲水系数为 -0.303, 说明 *AmUBCD4* 可能为酸性蛋白和亲水性蛋白; 此外, 发现 *AmUBCD4* 包含 25 个磷酸化位点, 但缺少跨膜结构域和信号肽, 说明 *AmUBCD4* 是潜在的胞内蛋白。上述研究结果为深入解析 *AmUBCD4* 的理化特性与分子功能提供了重要依据。

蛋白质基序 (Motif) 作为进化保守的氨基酸序列片段, 通常承担关键的结构与功能角色 (Semwal *et al.*, 2022); 而蛋白质结构域 (Domain) 作为独立的功能单元, 一般由 30-100 个氨基酸构成, 其不同蛋白质间的保守性往往关联着相似的功能机制 (Chen *et al.*, 2020b)。本研究在 *AmUBCD4* 及蜜蜂科 (东方蜜蜂、小蜜蜂)、欧洲熊蜂、切叶蜂、造纸胡蜂、金小蜂、家蚕的 *UBCD4* 中均鉴定到 5 个保守基序; 同时在这些物种的 *UBCD4* 中也鉴定到了 3 个结构域。以上结果表明, *UBCD4* 在这些物种中保守性较高。进一步分析发现, *UBCc* 结构域为西方蜜蜂、切叶蜂、金小蜂、造纸胡蜂、东方蜜蜂、欧洲熊蜂和小蜜蜂及家蚕所特有, 而 *UQ_con* 结构域仅存在于阿根廷蚂蚁和红火蚁。推测说明在漫长的进化过程中西方蜜蜂与切叶蜂、金小蜂、造纸胡蜂、东方蜜蜂、欧洲熊蜂和小蜜蜂及家蚕的 *UBCD4* 保留了类似功能, 而与阿根廷蚂蚁和红火蚁的 *UBCD4* 产生了功能差异, 值得进一步深入探究。本研究系统进化分析结果进一步支持了上述推测: 西方蜜蜂 *AmUBCD4* 基因与东方蜜蜂、切叶蜂、小蜜蜂及欧洲熊蜂的进化距离较近, 金小蜂、造纸胡蜂与家蚕的 *UBCD4* 聚类紧密, 而阿根廷蚂蚁和红火蚁则表现出高度相近的进化关系。

昆虫表皮是表皮细胞分泌的层状结构, 作为保护屏障应对各种外部环境压力 (Yan *et al.*, 2022)。研究表明泛素化参与家蚕 *Bombyx mori* 幼虫发育期间表皮的发育, 诱导 (抑制) 泛素化

连接体系相关基因 (E1、E2 和 E3) 高表达会使蜕皮提前 (延迟) (Kitagawa and Takiya, 2020)。本研究揭示 *AmUBCD4* 在西方蜜蜂工蜂表皮组织中的表达水平显著高于触角、脑、中肠、毒腺及脂肪体 ($P < 0.05$), 表明该基因可能在表皮发育过程中发挥关键调控作用。为验证这一功能假设, 后续研究拟通过 RNA 干扰 (RNAi) 技术特异性敲低工蜂体内 *AmUBCD4* 的表达, 进而系统解析其对表皮发育的影响。

西方蜜蜂作为完全变态昆虫, 生活史包括卵、幼虫、预蛹、蛹和成虫 5 个阶段 (曾志将, 2007)。在果蝇中, 泛素化修饰对胚胎发育和变态发育至关重要, 敲低胸腺中的泛素化修饰基因会延长幼虫寿命, 并阻止从幼虫期到蛹期的转变 (Li *et al.*, 2012)。本研究证实, *AmUBCD4* 在西方蜜蜂工蜂卵期的表达水平达峰值, 与 3 日龄幼虫期无显著差异, 但显著高于 8 日龄预蛹期及 12 日龄蛹期 ($P < 0.05$); 其表达量在发育过程中呈现从卵期至蛹期的持续下调趋势。这一动态表达模式提示 *AmUBCD4* 可能在发育过程 (卵、幼虫、预蛹、蛹) 中发挥重要调控功能。泛素-蛋白酶体系统是真核细胞降解蛋白质的主要途径 (孙熙, 2021)。在蜜蜂的发育过程中, 组织和器官会发生剧烈的消解与形成 (曾志将, 2017)。推测 *AmUBCD4* 通过在工蜂卵、幼虫、预蛹、蛹和成虫的发育阶段差异表达调节泛素-蛋白酶体系统, 进而影响不同虫态的蛋白质降解, 并参与组织和器官的消解与形成。

参考文献 (References)

- Canning M, Kirby R, Finnegan D, 2002. UbcD4, a ubiquitin-conjugating enzyme in *Drosophila melanogaster* expressed in pole cells. *Molecular Genetics and Genomics*, 266(6): 907-913.
- Chen CJ, Chen H, Zhang Y, Thomas HR, Frank MH, He YH, Xia R, 2020a. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 13(8): 1194-1202.
- Chen JJ, Sagum C, Bedford MT, 2020b. Protein domain microarrays as a platform to decipher signaling pathways and the histone code. *Methods*, 184: 4-12.
- Huang ZJ, 2019. A Study on the immune response of larvae and prepupae of *Apis mellifera ligustica* to *Nosema ceranae* stress. Master dissertation. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry

- University. [黄枳隼, 2019. 意大利蜜蜂幼虫及预蛹响应东方蜜蜂微孢子虫胁迫的免疫应答研究. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学.]
- Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M, 2006. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22: 159–180.
- Kitagawa T, Takiya S, 2020. Regulation of genes for ubiquitination and SUMO-specific protease involved in larval development of the silkworm, *Bombyx mori*. *Development, Growth & Differentiation*, 62(6): 438–449.
- Kwon YT, Ciechanover A, 2017. The ubiquitin code in the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(11): 873–886.
- Li S, Chen YB, Shi Q, Yue T, Wang B, Jiang J, 2012. Hedgehog-regulated ubiquitination controls smoothened trafficking and cell surface expression in *Drosophila*. *PLoS Biology*, 10(1): e1001239.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Liwocha J, Li J, Purser N, Rattanasopa C, Maiwald S, Krist DT, Scott DC, Steigenberger B, Rajan Prabu J, Schulman BA, Kleiger G, 2024. Mechanism of millisecond Lys48-linked poly-ubiquitin chain formation by cullin-RING ligases. *Nature Structural & Molecular Biology*, 31(2): 378–389.
- Maxwell Burroughs A, Jaffee M, Iyer LM, Aravind L, 2008. Anatomy of the E2 ligase fold: Implications for enzymology and evolution of ubiquitin/ub-like protein conjugation. *Journal of Structural Biology*, 162(2): 205–218.
- Nakamura N, 2018. Ubiquitin system. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4): 1080.
- Park ES, Elangovan M, Kim YJ, Yoo YJ, 2016. UbcD4, an ortholog of E2-25K/Ube2K, is essential for activation of the immune deficiency pathway in *Drosophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469(4): 891–896.
- Pohl C, Dikic I, 2019. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Science*, 366(6467): 818–822.
- Semwal R, Aier I, Raj U, Varadwaj PK, 2022. Pr [m]: An algorithm for protein motif discovery. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*, 19(1): 585–592.
- Silva GM, Finley D, Vogel C, 2015. K63 polyubiquitination is a new modulator of the oxidative stress response. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(2): 116–123.
- Sun X, 2021. Inhibitory effect of ubiquitin degradation system on the proliferation of silkworm, *Bombyx mori*. Master dissertation. Chongqing: Southwest University. [孙熙, 2021. 利用泛素化降解系统抑制家蚕微孢子虫增殖的研究. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学.]
- Tamura K, Stecher G, Kumar S, 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7): 3022–3027.
- Yan ZW, Tong XL, Xiong G, Yang WK, Lu KP, Yuan YJ, Han MJ, Hu H, Wei W, Dai FY, 2022. A blueprint of microstructures and stage-specific transcriptome dynamics of cuticle formation in *Bombyx mori*. In *Semwal Ternational Journal of Molecular Sciences*, 23(9): 5155.
- Yang XX, 2019. Expression characteristics and functional analysis of AccUBE2N and AccUBE2G1 genes in *Apis cerana cerana*. Master dissertation. Tai'an: Shandong Agricultural University. [杨昕鑫, 2019. 中华蜜蜂泛素结合酶基因 AccUBE2N 和 AccUBE2G1 的表达特性与功能分析. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学.]
- 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, 黄枳隼, 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. Honeybee Biology. Beijing: China Agriculture Press. 10–15. [曾志将, 2007. 蜜蜂生物学. 北京: 中国农业出版社. 10–15.]
- Zeng ZJ, 2017. Apiculture (The Third Edition). Beijing: China Agriculture Press. 10–12. [曾志将, 2017. 养蜂学 (第三版). 北京: 中国农业出版社. 10–12.]
- Zhou Z, 2020. The effect of *Laodelphax striatellus* ubiquitin-conjugating enzyme E2 on the accumulation of rice stripe virus and its mechanism. Master dissertation. Yangzhou: Yangzhou University. [周泽, 2020. 灰飞虱泛素结合酶 E2 对水稻条纹病毒积累的影响及机制探索. 硕士学位论文. 扬州: 扬州大学.]
- 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* CK1I protein. *Journal of Environmental Entomology*, 2024(7): 1–10. [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 CK1I 蛋白的分子特征和基因时空表达谱. 环境昆虫学报, 2024(7): 1–10.]