

●实验研究报告

中华蜜蜂 DnaJB6 的生物信息学分析与功能预测

赵航, 张文豹, 张淑欣, 何学梅, 梁丽

(曲阜师范大学生命科学学院, 山东 曲阜 273165)

摘要: DnaJB6 是重要的辅助伴侣分子, 与多聚谷氨酰胺疾病、亨廷顿舞蹈症等多种人类重大疾病的发生密切相关。以往的研究不仅解析了人 DnaJB6 的结构, 而且揭示了它在疾病发生中的作用。但是, 作为热激蛋白家族的成员之一, 在其他物种中的结构及功能却少有报道。旨在利用生物信息学软件分析中华蜜蜂 DnaJB6 的理化性质、保守结构域、跨膜结构、亚细胞定位、信号序列、修饰位点、亲缘关系、高级结构和互作蛋白。理化性质分析显示: DnaJB6 由 327 个氨基酸残基组成带正电的不稳定亲水蛋白; 结构域分析结果表明: DnaJB6 具有保守的 J 结构域, 但是没有跨膜结构域; 亚细胞定位和信号序列分析发现: 它由核定位信号序列介导定位于细胞核, 同时, 修饰位点预测显示 DnaJB6 一共有 15 个糖基化和 49 个磷酸化修饰位点; 预测的二级结构主要为 α 螺旋、 β 折叠和无规卷曲; 构建的系统进化树显示: 蜜蜂属的中华蜜蜂 DnaJB6 与熊蜂属进化关系较近; 蛋白质互作分析发现: DnaJB6 与多个热激蛋白相互作用, 特别是 Hsp70 家族的蛋白。可为进一步研究中华蜜蜂 DnaJB6 的结构与功能提供理论依据。

关键词: 中华蜜蜂; DnaJB6; 生物信息学; 热激胁迫

中图分类号: S891⁺.1 文献标识码: A

文章编号: 1003-9139 (2021) 07-0010-10

Bioinformatics Analysis and Functional prediction of DnaJB6 from *Apis cerana cerana*

ZHAO Hang, ZHANG Wen-bao, ZHANG Shu-xin, HE Xue-mei, LIANG Li

(College of Life Sciences, Qufu Normal University, Qufu 273165, China)

Abstract: DnaJB6 is an important co-chaperone molecule that has been implicated in the development of many major human diseases such as polyglutamine disease and Huntington's chorea. Previous studies have not only determined the structure of human DnaJB6, but also revealed its role in the pathogenesis of disease. However, as a member of the heat shock protein family, its structure and function have been rarely reported. In this work, we aim to analyze the physicochemical properties, conserved structural domains, transmembrane structures, subcellular localization, signal sequences, modification sites, genetic relationship, spatial structures and interacting proteins of *Apis cerana cerana* DnaJB6 using bioinformatics software. Physicochemical properties results showed that DnaJB6 is a positively charged unstable hydrophilic protein consisting of 327 amino acid residues. The results of domain analysis demonstrated that DnaJB6 has a conserved J domain but no transmembrane structural domain. Subcellular localization and signal sequence analysis revealed that it is located in the nucleus mediated by nuclear localization signal sequences. In the meantime, the prediction of modification sites manifested a total of 15 glycosylation and 49 phosphorylation modification sites for DnaJB6. The predicted secondary structures are mainly α -helix, β -fold and random coiling. A phylogenetic tree was constructed showing that DnaJB6 of the *Apis* is evolutionarily related to the *Bombus*.

收稿日期: 2021-05-14

作者简介: 赵航 (1990-), 男, 主要从事蜜蜂分子生物学研究。E-mail: hangzhao1990@163.com。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

Protein-protein interaction analysis manifested that DnaJB6 interacted with several heat shock proteins, especially Hsp70 family proteins. This study can provide theoretical basis for further research on the structure and function of DnaJB6 in *Apis cerana cerana*.

Key words: *Apis cerana cerana*; DnaJB6; bioinformatics; heat stress; expression analysis

昆虫授粉是一项重要的生态系统服务,不仅在野生植物的发育与繁衍中发挥重要作用,而且保证了农作物的产量和品质^[1]。据统计,大约有 65% 的被子植物和 86% 的农作物需要昆虫授粉^[2]。蜜蜂是最主要的授粉昆虫,大约有 40% 的昆虫授粉由蜜蜂完成。蜜蜂授粉可以大幅提升农作物收益,我国每年由蜜蜂授粉促进的农作物增产产值超过 500 亿^[3,4]。蜜蜂种类繁多,其中意大利蜜蜂 (*Apis mellifera ligustica*) 和中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*) 是我国 2 个主要养殖品种^[5]。中华蜜蜂具有多种优良特性,如相较于意大利蜜蜂,中华蜜蜂具有更好的抗螨能力^[6]。然而,从 1896 年至今,中华蜜蜂种群数量至少下降了 40%^[7,8]。近年气候变化、农药滥用、病虫害频发是中华蜜蜂种群数量快速下降的主要驱动力^[7,9,10]。

热激胁迫是环境胁迫的一种,它不仅扰乱线粒体稳态、破坏细胞功能,导致细胞的氧化损伤^[11]。对蜜蜂而言,热激胁迫虽然很少直接杀死蜜蜂,但是会影响蜜蜂的分布、行为和生理状态^[12-14]。研究表明,热激胁迫对蜜蜂的身体形态、生长发育和生殖功能产生不利影响^[15-18]。同时,热激胁迫还可以与其它胁迫协同作用,降低蜜蜂对其它胁迫的耐受能力^[12,19]。综上所述,热激胁迫对蜜蜂的生命活动产生不可忽视的影响。

在进化过程中,蜜蜂获得了许多热激胁迫防御机制,以减轻热激胁迫对自身的伤害^[20]。在行为水平上,当蜂巢温度过高时,工蜂会煽动翅膀增加散热。同时,增加负责采水蜜蜂的数量,并将采集到的水洒在蜂巢上,以降低蜂巢温度^[21-23]。在分子水平上,蜜蜂通过上调多种基因和蛋白的表达来抵御热激胁迫,如热激蛋白家族 (Heat shock protein, Hsp)、核因子

Y (Nuclear factor Y, NF-Y)、乙酰胆碱酯酶 1 (Acetylcholinesterase 1, AchE1)^[24-26]。其中, Hsp 家族是热激胁迫诱导表达的一类保守蛋白质,能帮助蛋白质保持正确的构象,防止蛋白质错误折叠和聚集^[27]。研究发现,发挥分子伴侣功能的 Hsp 家族是蜜蜂抵御热激胁迫的关键蛋白。在热激胁迫条件下,蜜蜂的 sHsp22.6、Hsp60、Hsp70ab、Hsp90 均诱导表达,帮助蜜蜂抵御热激胁迫^[28-30]。这些结果表明 Hsp 家族在抵御热激胁迫中发挥重要作用。

DnaJ 家族也称 Hsp40 家族,因具有高度保守的 J 结构域而得名。蜜蜂 DnaJ 家族有二十多个成员,依据结构特点分为 DnaJA、DnaJB、DnaJC 3 个亚家族^[31]。DnaJ 作为辅助伴侣蛋白,激活分子伴侣蛋白 Hsp70 的 ATP 酶活性,参与蛋白质的翻译、折叠、去折叠、转位和降解过程^[32]。DnaJB6 是广泛表达、功能多样的 1 个 J 结构域蛋白^[34]。它具有 3 个保守结构域,分别为 N 端的 J 结构域、G/F 富集区和 C 端的丝氨酸富集区域^[35,36,37]。由于选择性剪接,人的 DnaJB6 具有 2 个不同长度的 cDNA,它们编码 2 种不同的蛋白质,分别称为 DnaJB6a 和 DnaJB6b^[38]。它们的 N 端氨基酸残基相同,但是 DnaJB6a 的 C 端有 105 个氨基酸残基而 DnaJB6b 的 C 端仅有 10 个氨基酸残基^[39]。C 端氨基酸的差异使二者具有不同的亚细胞定位。DnaJB6a 具有核定位信号序列,定位于细胞核; DnaJB6b 则缺少核定位信号序列,主要定位于细胞质^[40]。在哺乳动物中, DnaJB6 参与多种生命活动,如小鼠胎盘发育、疾病、神经干细胞的自我更新等^[41-45]。但是,作为热激蛋白家族的成员之一, DnaJB6 在中华蜜蜂中的结构以及在热激胁迫中的作用却少有报道。

本研究主要对中华蜜蜂 DnaJB6 进行生物信息学分析,并检测其在热激胁迫下的表达模式,从而阐明 DnaJB6 在中华蜜蜂抵御热激胁迫中的可能作用。本研究可为进一步研究中华蜜蜂 DnaJB6 的结构与功能提供理论依据。同时,还丰富了蜜蜂热激胁迫响应机制的理论知识,对蜜蜂的育种工作有一定的指导作用。

1 材料与amp;方法

1.1 核酸和氨基酸序列

先前实验室同学克隆得到的中华蜜蜂 DnaJB6 的编码区 (Coding sequence, CDS)。其他 10 种昆虫的 DnaJB6 氨基酸序列是从 NCBI 数据库下载的, 它们的登录号及物种名分别为 XP_006564598 (*Apis mellifera*)、XP_006619442 (*Apis dorsata*)、XP_012342620 (*Apis florea*)、XP_016919326 (*Apis cerana*)、XP_033185595 (*Bombus vancouverensis nearcticus*)、XP_012135622 (*Megachile rotundata*)、XP_011138491 (*Harpegnathos saltator*)、XP_029665386 (*Formica exsecta*)、XP_035726509 (*Vespa mandarinia*)、

XP_015182179 (*Polistes dominula*)。

1.2 生物信息学分析

首先依据标准密码子表, 计算 DnaJB6 的 CDS 编码的氨基酸序列。然后, 进入 Blastx 分析界面, 选择默认数据库、物种 insects (taxid: 6960), 对 DnaJB6 的 CDS 进行比对, 寻找与其编码相似蛋白质的基因, 初步预测 DnaJB6 的功能。再利用多种生物信息学软件分析 DnaJB6 的理化性质、保守结构域、跨膜结构、亚细胞定位、信号序列、蛋白质修饰位点、蛋白质同源性、二级结构、三级结构、相互作用的蛋白。本文使用的各种生物信息学分析软件详见表 1, 未特殊说明的生物信息学软件, 均使用默认参数进行分析预测。

表 1 本文使用的多个生物信息学分析软件

软件	功能	网址 / 下载地址	软件	功能	网址 / 下载地址
DNAMAN 7.0	氨基酸序列计算与多序列比对	https://www.lynonn.com/	NLStradamus 1.8	核定位信号序列分析	http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/
Blast	多序列比对	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	NetOGlyc 4.0 Server	糖基化位点修饰分析	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/
ProtParam	理化性质计算	https://web.expasy.org/protparam/	NetPhos 3.1 Server	磷酸化位点修饰分析	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/
ProtScale	亲疏水性分析	https://web.expasy.org/protscale/	Mega 7	系统进化树构建	https://megasoftware.net/
CD-Search	保守结构域检索	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi	Psipred 4.0	二级结构预测	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/
TMHMM Server v. 2.0	跨膜螺旋预测	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	Swiss-model	三级结构预测	https://swissmodel.expasy.org/
PSORT II Prediction	亚细胞定位分析	https://psort.hgc.jp/form2.html	Pymol 2.4.1	三维结构可视化	https://pymol.org/2/
SignalP-5.0 Server	信号肽分析	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	String 11.0	蛋白质互作分析	https://string-db.org/

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析结果

2.1.1 理化性质分析结果

为了确定中华蜜蜂 DnaJB6 的各种理化性质, 我们利用 ProtParam 计算了它的多个参数, 结果如表 2 所示。表 2 显示, DnaJB6 相对分子质量为 37.21 kD, 分子式为

$C_{1647}H_{2527}N_{479}O_{501}S_5$ 。在所有氨基酸残基中, 带负电荷的氨基酸残基有 39 个, 带正电荷的氨基酸残基 54 个, 理论等电点为 9.71。DnaJB6 的不稳定系数为 45.83, 大于 40 表示蛋白质不稳定。同时, 该蛋白质的脂溶系数为 47.09, 总的亲水性平均系数为 -0.913。上述结果表明, DnaJB6 是一个带正电的不稳定的亲水性蛋白。

表 2 中华蜜蜂 DnaJB6 的多种理化性质

Molecular weight	Molecular Formula	Theoretical pI	Asp+Glu	Arg+Lys	Instability index	Aliphatic index	GRAVY
37 214.39	C1647H2527N479O501S5	9.71	39	54	45.83	47.09	-0.913

为了进一步掌握中华蜜蜂 DnaJB6 的亲水性, 我们使用 ProtScale 进行更加准确的亲疏

水性分析, 结果如图 1 和表 3 所示。图 1 和表 3 显示, 在所有氨基酸中, 疏水性最强的

是第 160 位的甘氨酸残基, 其得分为 1.344; 亲水性最强的是 323 位的赖氨酸残基, 其得分为 -3.500。并且该蛋白质 83% 的氨基酸残基得分为负数, 负数表示亲水性。该结果进一步验证了中华蜜蜂 DnaJB6 的亲水性。

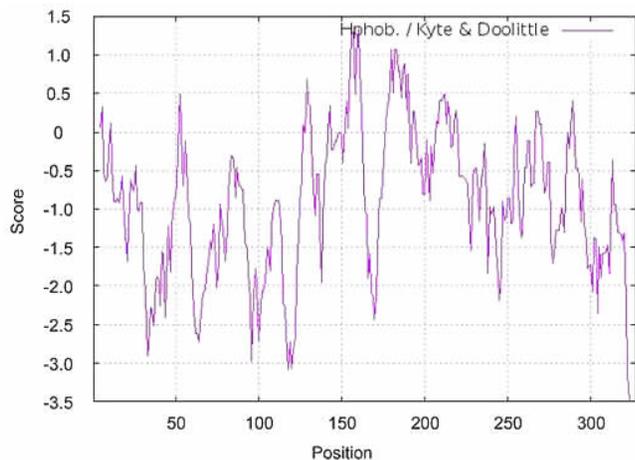


图 1 中华蜜蜂 DnaJB6 亲疏水性分析结果

表 3 中华蜜蜂 DnaJB6 的亲疏水分析结果

Site	Amino acid type	Score	Site	Amino acid type	Score
160	G	1.344	323	K	-3.500

2.1.3 保守结构域分析结果

为了确定中华蜜蜂 DnaJB6 的保守结构域, 我们利用 CD-Search 分析它的氨基酸序列, 从而找到保守结构域, 结果如图 2 所示。图 2 显示, DnaJB6 的 3-66 位氨基酸构成 Pfam 序号为 PF00226 的 J 结构域。并且 HPD 基序与其它的 5 个氨基酸残基构成保守的 Hsp70 相互作用位点, 介导 DnaJB6 与 Hsp70 的相互作用。这结果表明, 中华蜜蜂 DnaJB6 具有保守的 J 结构域, 属于 DnaJ 超家族。

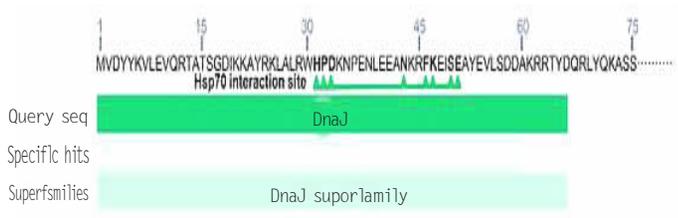


图 2 中华蜜蜂 DnaJB6 保守结构域分析结果

2.1.4 跨膜结构分析结果

为了获知中华蜜蜂 DnaJB6 是否具有跨膜结

构, 我们使用 TMHMM Server v.2.0 分析其氨基酸序列, 确定其是否具有可形成跨膜结构的 α -螺旋, 结果如图 3 所示, DnaJB6 蛋白不仅跨膜螺旋数为零, 而且没有跨膜信号。由此可推测中华蜜蜂 DnaJB6 不具有跨膜结构, 不属于膜蛋白。

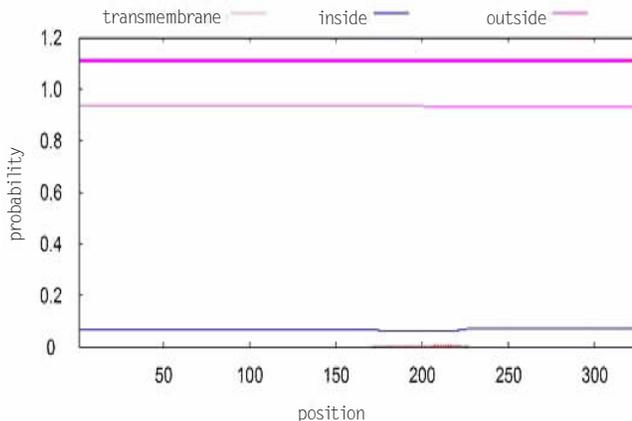


图 3 中华蜜蜂 DnaJB6 跨膜结构分析结果

2.1.5 亚细胞定位分析结果

为了确定中华蜜蜂 DnaJB6 的亚细胞定位, 我们采用 PSORT II Prediction 预测其亚细胞定位, 结果如表 4 所示。从表 4 可以看出, DnaJB6 有 73.9% 的可能定位于细胞核, 14.4% 的可能定位在细胞质, 定位线粒体和细胞骨架的概率均为 4.3%。通过上述结果可知中华蜜蜂 DnaJB6 很可能是定位于细胞核的核蛋白。

表 4 中华蜜蜂 DnaJB6 亚细胞定位预测结果

Subcellular localization	Likelihood
Nuclear	73.9%
Cytoplasmic	14.4%
Mitochondrial	4.3%
Cytoskeletal	4.3%

2.1.6 信号序列分析结果

为了确定中华蜜蜂 DnaJB6 是否具有信号序列。如果有, 有的又是哪类信号序列。我们使用 SignalP-5.0 Server 分析其是否具有信号肽, 结果如表 5 所示, DnaJB6 具有信号肽的可能性仅为 0.06%, 无信号肽的概率为 99.94%。由此可断定, 中华蜜蜂 DnaJB6 无信号肽。

表 5 中华蜜蜂 DnaJB6 信号肽分析结果

Protein type	Likelihood
Signal peptide (Sec/SPI)	0.06%
Other (No signal peptide)	99.94%

为了确定中华蜜蜂是否具有核定位信号, 我们使用 NLStradamus 1.8 分析其可能具有的核定位信号, 结果如图 4 所示。图 4 显示, DnaJB6 有 86.7% 的可能性具有核定位信号, 核定位序列为 318-327 位的 TKKHDKSKRK。该结果表明, 中华蜜蜂 DnaJB6 很可能具有核定位信号序列。

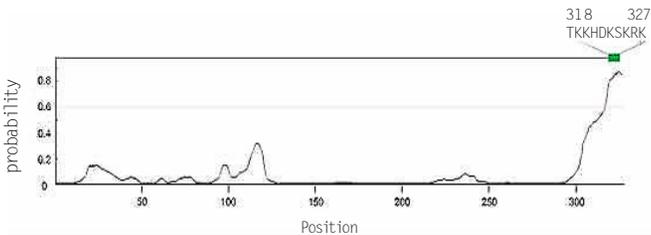


图 4 中华蜜蜂 DnaJB6 核定位信号序列分析结果

2.1.7 蛋白质修饰位点分析结果

为了解中华蜜蜂 DnaJB 的肽链合成后加工情况, 我们使用 NetPhos 3.1 Server 分析磷酸化修饰位点, 结果如图 5。图 5 显示, DnaJB6 具有 49 个可能的磷酸化修饰位点。在这些磷酸化位点中, 丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸位点分别为 30、15、4 个。并且, 不同位点的氨基酸残基由不同的蛋白质激酶磷酸化。

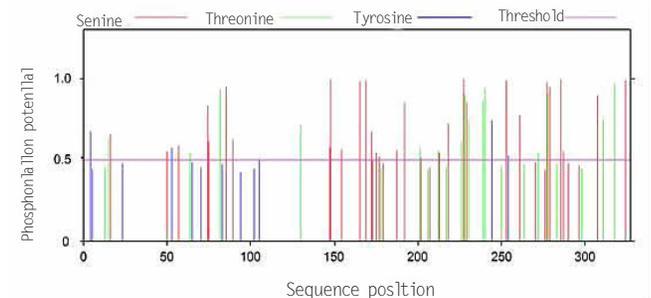


图 5 中华蜜蜂 DnaJB6 磷酸化修饰位点分析结果

为了解中华蜜蜂 DnaJB 的糖基化修饰情况, 我们使用 NetOGlyc 4.0 Server 分析 DnaJB6 的糖基化修饰位点, 结果如图 6 所示。图 6 显示, DnaJB6 具有 15 个潜在的糖基化修饰位点, 分别是 15、16、74、165、169、172、173、175、177、227、229、240、307、311、318 位氨基酸。在这些糖基化修饰位点中, 丝氨酸有 11 个、苏氨酸为 4 个。综合磷酸化修饰位点结果可知, 中华蜜蜂 DnaJB6 肽链合成后, 需要进行糖基化和磷酸化修饰才能形成成熟的蛋白质。

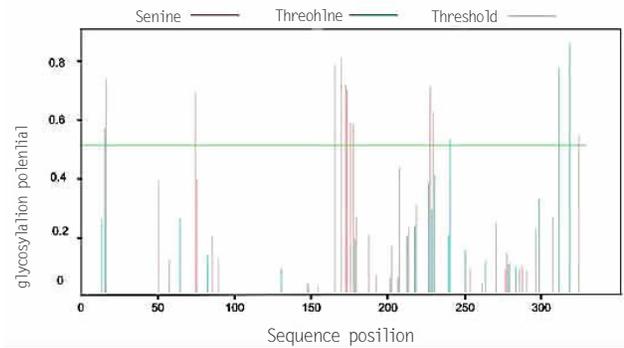


图 6 中华蜜蜂 DnaJB6 糖基化修饰位点分析结果

2.1.8 蛋白质同源性分析结果

为了研究中华蜜蜂 DnaJB6 在进化过程中的保守性, 我们下载了中华蜜蜂 DnaJB6 的 Blastp 序列比对结果中的蜜蜂科 6 个物种、蚁科 2 个物种和胡蜂科 2 个物种的氨基酸序列。在 DNAMAN 软件中, 利用全局比对算法进行多序列比对, 计算这 11 条序列的总体相似度, 结果如图 7 所示, 黑色标记的是相同的氨基酸位点, 粉色标记的是 75% 相似度以上的氨基酸位点, 蓝色标记的是 50% 相似度以上的氨基酸位点, 未标记的为 50% 以下的氨基酸位点, 短横线为插入的空位。这 11 条氨基酸的总相似度达到 86.73%。由此可知, DnaJB6 在进化过程中较为保守。

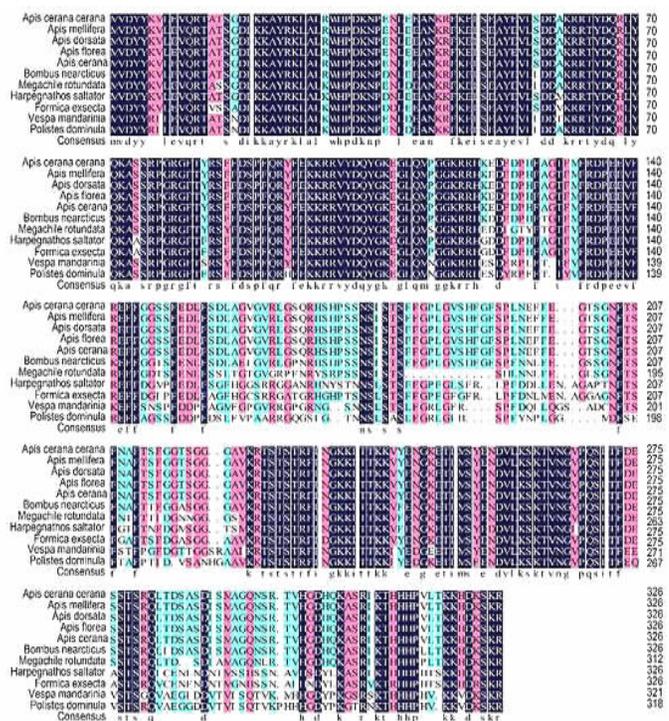


图 7 11 种膜翅目昆虫 DnaJB6 的多序列比对结果

为了探究膜翅目 DnaJB6 之间的亲缘关系, 我们使用 Mega7 软件中的最大简约法构建蜜蜂科中蜜蜂属的 *Apis mellifera*、*Apis dorsata*、*Apis florea*、*Apis cerana*、*Apis cerana cerana*、熊蜂属的 *Bombus nearcticus*、切叶蜂属的 *Megachile rotundata*; 蚁科的 *Harpegnathos saltator*、*Formica exsecta* 和胡蜂科 *Vespa mandarinia*、*Polistes dominula* 的系统进化树, 结果如图 8 所示。从图 8 可以看出, 蚁科和胡蜂科聚为一类, 再与 *Megachile rotundata* 和 *Bombus nearcticus* 聚成大类。在自展检验值高于 70 的分支中, 蚁科的两个物种离中华蜜蜂的遗传距离最远, 熊蜂属的 *Bombus nearcticus* 遗传距离最近。由此推测, 在膜翅目 DnaJB6 的遗传进化上, 相较于蚁科, 中华蜜蜂与胡蜂科亲缘关系更近; 在蜜蜂科中, 熊蜂属与中华蜜蜂的亲缘关系更近, 切叶蜂属较远。

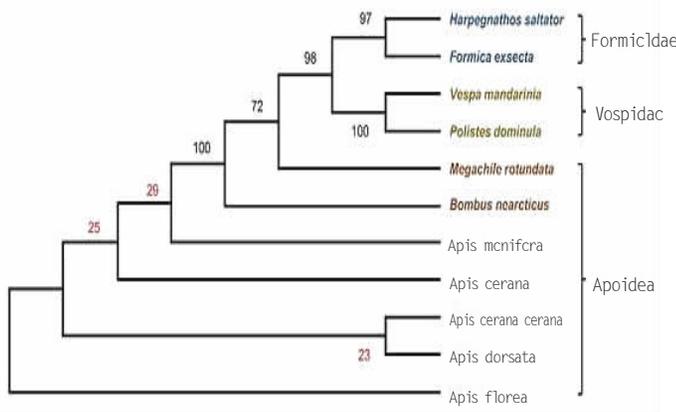


图 8 最大简约法构建的 DnaJB6 系统进化树

2.1.9 蛋白质结构预测结果

为了解中华蜜蜂 DnaJB6 的二级结构, 我们利用 Psipred 4.0 预测它的二级结构, 结果如图 9 所示。图 9 显示, DnaJB 的二级结构主要包括 7 个 α 螺旋 (粉红色)、6 个 β 叠片 (黄色) 和多个无规卷曲 (灰色)。其中, DnaJB6 的 4-7、16-30、39-55、59-73 位的 4 个 α 螺旋构成保守 J 结构域。并且, 第二个和第三个螺旋之间包含一个保守的 HPD 基序。由此可知, 中华蜜蜂 DnaJB6 的二级结构主要为 α 螺旋、 β 折叠和无规卷曲。

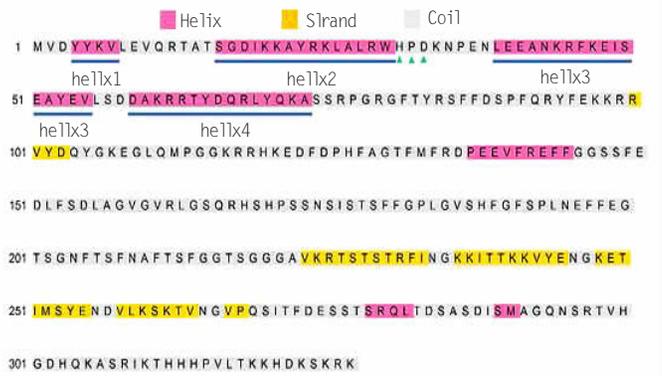


图 9 中华蜜蜂 DnaJB6 二级结构预测结果

为了探究中华蜜蜂 DnaJB6 的三维结构, 我们采用同源建模的方法, 对中华蜜蜂 DnaJB6 的三维结构进行预测, 结果如表 6 和图 10A 所示。表 6 和图 10A 显示, Swiss-model 软件以 PDB 数据库中序号为 6u3r.1 的蛋白为模板。它与中华蜜蜂 DnaJB6 的序列相似度为 52.69%。该三维结构预测的 GMQE 值为 0.4, QMEAN 为 -4.13, 存在形式为单体。并且, 为了更好的展示中华蜜蜂 DnaJB6 的三维结构, 我们利用 Pymol 2.4.1 软件对其三维结构进行可视化。同时, 计算 DnaJB6 三维结构的表面静电势分布, 显示最保守的 HPD 基序的棒状结构, 可视化结果如图 10B 所示。

表 6 同源建模结果的参数

Template	Sequence identity	GMQE	QMEAN	Oligo- State
6u3r.1.A	52.69%	0.4	-4.13	Monomer

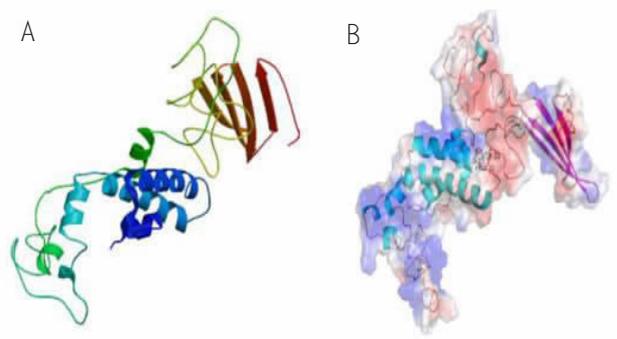


图 10 中华蜜蜂 DnaJB6 的三维结构预测及其可视化结果

在 A 和 B 图卡通模式的三维结构中, 不同颜色代表不同的二级结构。B 图的表面静电势分布图中的红色代表负的静电势, 蓝色代表正的静电势。

2.1.10 蛋白质互作分析结果

为了研究与中华蜜蜂 DnaJB6 相互作用的蛋白质, 我们使用 String11.0 软件分析与其相互作用的蛋白质。String11.0 自动匹配 LOC408966 蛋白质作为相似蛋白质, 并依此进行蛋白质互作分析, 得到的结果如图 11 所示。图 11 显示, 高度可信(得分高于 0.7)的相互作用蛋白质有 7 个, 其中有 4 个 Hsc70 蛋白质家族蛋白, 分别为 Hsc70-3、Hsp70cb、Hsc70-4 和 Hsc70-5。Hsc70 是 Hsp70 家族的成员。这些结果表明, 中华蜜蜂 DnaJB6 与多种热激蛋白家族蛋白质相互作用, 特别是 Hsc70 蛋白家族。并且, 很可能作为辅助伴侣分子, 与 Hsp70 相互作用, 从而发挥生物功能。

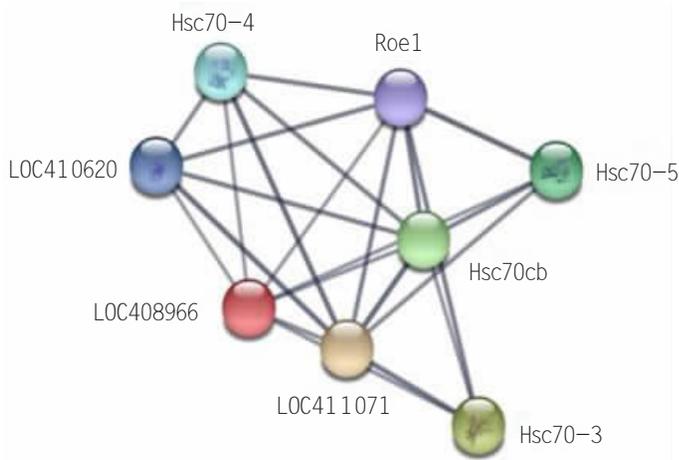


图 11 中华蜜蜂 DnaJB6 相互作用蛋白质的预测结果

2.2 讨论

由于选择性剪接, DnaJB6 具有多个亚型。在东方蜜蜂中, DnaJB6 具有 2 个亚型, 分别为长 327 bp 的亚型 1 (XP_016919326) 和 290 bp 的亚型 2 (XP_016919327)^[46]。通过序列比对发现, 克隆得到中华蜜蜂 DnaJB6 与东方蜜蜂的 DnaJB6 亚型 1 完全相同, 亚型 2 缺少的 59-95 位氨基酸残基。中华蜜蜂 DnaJB6 的 59-73 位氨基酸构成 J 结构域的第四个 α -螺旋(图 9)。但是, 利用 Psipred 4.0 对东方蜜蜂 DnaJB6 亚型 2 进行二级结构预测却发现其 59-69 位仍可以形成 α -螺旋, 即其仍具有 4 个 α -螺旋组成的 J 结构域。尽管在哺乳动物中, DnaJB6 的部分亚型可能会因为缺少 C 端

的核定位信号序列而分布于细胞质, 这可能会造成二者功能上的差异^[40]。但同时, 也有研究报告, 在热胁迫条件下, 定位于细胞质的亚型可以转移至细胞核^[47]。这些结果表明, 由于选择性剪接形成的中华蜜蜂 DnaJB6 的两个亚型在功能上很可能相同。

蛋白质由 20 种常见氨基酸连接而成。由于不同氨基酸侧链残基的性质差异, 氨基酸的组成、排列赋予了蛋白质特性, 如等电点、半衰期、亲/疏水性、稳定性等。预先掌握蛋白质这些特征参数, 有利于开展后续的生化实验。中华蜜蜂 DnaJB6 总的亲水性平均系数为 -0.913, 并且 83% 的氨基酸表现为亲水性(表 3 和图 1)。这些结果表明, 该蛋白质很可能易溶于水。同时, DnaJB6 含有的带正电的残基明显多于带负电的残基, 说明中华蜜蜂 DnaJB6 带正电。

结构域是在二级结构基础上形成的三级结构局部折叠区, 是相对独立的稳定的紧密球状实体。在进化过程中, 相对保守的结构域称为保守结构域。并且保守结构域多为蛋白质的功能结构域。DnaJ 蛋白家族的保守结构域为 J 结构域。并且, J 结构域包含 4 个 α -螺旋, 其中螺旋 II 和螺旋 III 反向平行, 通过含 HPD 基序的柔性环相连, 两端的短螺旋 I、IV 则稳定反向平行螺旋间的相互作用^[48]。其中的 HPD 是 DnaJ 蛋白最保守的基序, 同时也是激活 Hsp70 的 ATP 酶活性所必须的^[49]。中华蜜蜂 DnaJB6 具有较为保守的由 4 个 α -螺旋构成的 J 结构域(图 9)。并且, 具有保守的 HPD 基序。DnaJB6 作为 DnaJ 蛋白质家族的一员, 可能参与蛋白质的翻译、折叠、去折叠、转位和降解过程^[32]。

蛋白质磷酸化修饰是指肽链合成后加工过程中, 在各种蛋白激酶的作用下, 将 ATP 的 γ -磷酸基转移到蛋白质的 Ser、Thr、Tyr 残基的羟基上的过程, 是存在于各类生物中调节蛋白质活性的一种基本的、普遍的机制。并且, 蛋白质的磷酸化修饰也影响蛋白质的高级结构的形成。糖基化修饰能够改变蛋白质的构象, 提高蛋白质的稳定性。中华蜜蜂 DnaJB6 具有 15 个糖基化与 49 个磷酸化修饰位点

(图5和图6)。并且, DnaJB6蛋白为不稳定蛋白(表2)。综上可推测, 磷酸化与糖基化修饰可能是维持DnaJB6稳定的重要原因。

同源建模指在已经通过实验方法测定三级结构的蛋白质的数据库中, 选取与待测蛋白质同源性较高的蛋白质作为模板, 再利用计算机模拟和计算预测其三维空间结构。模板与中华蜜蜂DnaJB6的序列相似度为52.69%。并且, 同源建模的GMQE值为0.4, QMEAN为-4.13(表6)。这些结果表明, 预测获得的三维结构模型的可信度一般, 需要进一步的实验验证与调整。

参考文献:

- [1] 欧阳芳, 王丽娜, 闫卓, 等. 中国农业生态系统昆虫授粉功能与服务价值评估[J]. 生态学报, 2019, 39 (01): 131-145.
- [2] KLEIN A M, VAISSIERE B E, CANE J H, et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops[J]. Proceedings Biological Sciences, 2007, 274 (1608): 303-313.
- [3] 黄家兴, 吴杰, 高丽娇. 蜜蜂为农作物授粉的优越性及经济贡献[J]. 中国蜂业, 2013, 64 (30): 26-29.
- [4] 安建东, 陈文锋. 全球农作物蜜蜂授粉概况[J]. 中国农学通报, 2011, 27 (01): 374-382.
- [5] JI Yk, LI Xg, JI T, et al. Gene reuse facilitates rapid radiation and independent adaptation to diverse habitats in the Asian honeybee[J]. Science advances, 2020, 6 (51): eabd3590.
- [6] DIAO Q, SUN L, ZHENG H, et al. Genomic and transcriptomic analysis of the Asian honeybee *Apis cerana* provides novel insights into honeybee biology[J]. Scientific Reports, 2018, 8 (1): 822.
- [7] 何旭, 刘新宇. 中华蜜蜂种群数量下降的成因分析[J]. 中国蜂业, 2011, 62 (05): 21-23.
- [8] 杜夏, 曾志将, 吴杰. 蜂产业现状、发展趋势与建议[J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57 (03): 252-257.
- [9] POTTS S, BIESMEIJER J, KREMEN C, et al. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers[J]. Trends in ecology and evolution, 2010, 25 (6): 345-353.
- [10] GOULSON D, NICHOLLS E, BOTIAS C, et al. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers[J]. Science, 2015, 347 (6229): 1255957.
- [11] SLIMEN I B, NAJAR T, GHRAM A, et al. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review[J]. International Journal of Hyperthermia, 2014, 30 (7): 513-523.
- [12] LI G, ZHAO H, LIU Z G, et al. The Wisdom of Honeybee Defenses Against Environmental Stresses[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9.
- [13] CONTE Y L, NAVAJAS M. Climate change: impact on honey bee populations and diseases[J]. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), 2008, 27 (2): 485-497, 499-510.
- [14] WILLIAMS P H. Environmental Change and the Distributions of British Bumble Bees (*Bombus Latr.*) [J]. Bee World, 1986, 67 (2): 50-61.
- [15] GROH C, TAUTZ J, ROSSLER W. Synaptic organization in the adult honey bee brain is influenced by brood-temperature control during pupal development[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101: 4268-4273.
- [16] MEDINA R G, PAXTON R, LUNA E D, et al. Developmental stability, age at onset of foraging and longevity of Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) under heat stress (Hymenoptera: Apidae) [J]. Journal of thermal biology, 2018, 74: 214-225.
- [17] MEDINA R G, PAXTON R, HERNÁNDEZ-SOTOMAYOR S M T, et al. Heat stress during development affects immunocompetence in workers, queens and drones of Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae) [J]. Journal of thermal biology, 2020, 89: 102541.
- [18] PETTIS J S, RICE N, JOSELOW K, et al.

- Colony Failure Linked to Low Sperm Viability in Honey Bee (*Apis mellifera*) Queens and an Exploration of Potential Causative Factors[J]. PLoS One, 2016, 11 (2): 0147220.
- [19] VANDERPLANCK M, MARTINET B, CARVALHEIRO L G, et al. Ensuring access to high-quality resources reduces the impacts of heat stress on bees[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 12596.
- [20] ZHAO H, LI G, GUO D, et al. Response mechanisms to heat stress in bees[J]. Apidologie, 2021.
- [21] LINDAUER M. Temperaturregulierung und Wasserhaushalt im Bienenstaat[J]. Zeitschrift für vergleichende Physiologie, 1954, 36: 391–432.
- [22] KRONENBERG F, HELLER H. Colonial thermoregulation in honey bees (*Apis mellifera*) [J]. Journal of comparative physiology, 1982, 148: 65–76.
- [23] SOUTHWICK E, MORITZ R F. Social control of air ventilation in colonies of honey bees, *Apis mellifera*[J]. Journal Insect Physiology, 1987, 33: 623–626.
- [24] KIM S, KIM K, LEE J H, et al. Differential expression of acetylcholinesterase 1 in response to various stress factors in honey bee workers[J]. Scientific Reports, 2019, 9 (1): 10342.
- [25] MA W, LI X, SHEN J, et al. Transcriptomic analysis reveals *Apis mellifera* adaptations to high temperature and high humidity[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 184: 109599.
- [26] LI G, ZHAO H, GUO H, et al. Functional and transcriptomic analyses of the NF- κ B family provide insights into the defense mechanisms of honeybees under adverse circumstances[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2020, 77 (23): 4977–4995.
- [27] KING A M, MACRAE T H. Insect heat shock proteins during stress and diapause[J]. The Annual Review of Entomology, 2015, 60: 59–75.
- [28] SEVERSON D, ERICKSON E, WILLIAMSON J, et al. Heat stress induced enhancement of heat shock protein gene activity in the honey bee (*Apis mellifera*) [J]. Experientia, 1990, 46: 737–739.
- [29] ZHANG Y, LIU Y, GUO X, et al. sHsp22.6, an intronless small heat shock protein gene, is involved in stress defence and development in *Apis cerana cerana*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 53: 1–12.
- [30] MCKINSTRY M, CHUNG C, TRUONG H, et al. The heat shock response and humoral immune response are mutually antagonistic in honey bees[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 8850.
- [31] WEINSTOCK G, ROBINSON G, GIBBS R, et al. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*[J]. Nature, 2006, 443: 931–949.
- [32] QIU X, SHAO Y, MIAO S, et al. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2006, 63: 2560–2570.
- [33] LI G, ZHAO H, GUO H, et al. Analyses of the function of DnaJ family proteins reveal an underlying regulatory mechanism of heat tolerance in honeybee[J]. Science of the Total Environment, 2020, 716: 137036.
- [34] CHUANG J, ZHOU H, ZHU M, et al. Characterization of a Brain-enriched Chaperone, MRJ, That Inhibits Huntingtin Aggregation and Toxicity Independently[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277: 19831–19838.
- [35] KAMPINGA H H, CRAIG E A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity[J]. Nature Review Molecular Cell Biology, 2010, 11 (8): 579–592.
- [36] HAGEMAN J, RUJANO M A, WAARDE M, et al. A DNAJB chaperone subfamily with HDAC-dependent activities suppresses toxic protein aggregation[J]. Molecular Cell, 2010, 37 (3): 355–369.

- [37] PERALES-CALVO J, MUGA A, MORO F. Role of DnaJ G/F-rich Domain in Conformational Recognition and Binding of Protein Substrates[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285: 34231-34239.
- [38] HANAI R, MASHIMA K. Characterization of two isoforms of a human DnaJ homologue, HSJ2[J]. Molecular Biology Reports, 2003, 30 (3): 149-153.
- [39] CHENG X, BELSHAN M, RATNER L. Hsp40 Facilitates Nuclear Import of the Human Immunodeficiency Virus Type 2 Vpx-Mediated Preintegration Complex[J]. Journal of Virology, 2007, 82 (3): 1229-1237.
- [40] SARPARANTA J, JONSON P, GOLZIO C, et al. Mutations affecting the cytoplasmic functions of the co-chaperone DNAJB6 cause limb-girdle muscular dystrophy[J]. Nature Genetics, 2012, 44 (4): 450-458.
- [41] HUNTER P, SWANSON B, HAENDEL M, et al. Mrj encodes a DnaJ-related co-chaperone that is essential for murine placental development[J]. Development, 1999, 126 (6): 1247-1258.
- [42] WATSON E, MATTAR P, SCHUURMANS C, et al. Neural stem cell self-renewal requires the Mrj co-chaperone[J]. Developmental Dynamics, 2009, 238 (10): 2564-2574.
- [43] WATSON E, GEARY-JOO C, HUGHES M, et al. The Mrj co-chaperone mediates keratin turnover and prevents the formation of toxic inclusion bodies in trophoblast cells of the placenta[J]. Development, 2007, 134 (9): 1809-1817.
- [44] DEY S, BANERJEE P, SAHA P. Cell cycle specific expression and nucleolar localization of human J-domain containing co-chaperon Mrj[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2008, 322 (1-2): 137-142.
- [45] MENG E H, SHEVDE L A, SAMANT R S. Emerging roles and underlying molecular mechanisms of DNAJB6 in cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7 (33): 53984-53996.
- [46] PARK D, JUNG J W, CHOI B, et al. Uncovering the novel characteristics of Asian honey bee, *Apis cerana*, by whole genome sequencing[J]. BMC Genomics, 2014, 16 (1): 1-16.
- [47] ANDREWS J, SYKORA L J, LETOSTAK T B, et al. Cellular stress stimulates nuclear localization signal (NLS) independent nuclear transport of MRJ[J]. Experimental cell research, 2012, 318 (10): 1086-1093.
- [48] SZYPERSKI T, PELLECCCHIA M, WALL D, et al. NMR structure determination of the Escherichia coli DnaJ molecular chaperone: secondary structure and backbone fold of the N-terminal region (residues 2-108) containing the highly conserved J domain[J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 1994, 91 (24): 11343-11347.
- [49] TSAI J, DOUGLAS M G. A Conserved HPD Sequence of the J-domain Is Necessary for YDJ1 Stimulation of Hsp70 ATPase Activity at a Site Distinct from Substrate Binding[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271: 9347-9354.

