

王浆高产蜜蜂和原种意大利蜜蜂咽下腺发育蛋白质组分析

冯 毛, 李建科

(中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093)

摘要: 【目的】对王浆高产蜜蜂(浆蜂)(*A. m. ligustica*)和原种意大利蜜蜂(原意)(*A. m. ligustica*) 1、3、6日龄工蜂咽下腺进行蛋白质组研究,揭示咽下腺在此阶段的发育特征。【方法】采用双向电泳方法对浆蜂和原意咽下腺进行蛋白质组研究,通过与已鉴定蛋白功能的咽下腺和蜂王浆蛋白质组图谱比较,推断部分蛋白的功能。【结果】浆蜂咽下腺在3个日龄表达的蛋白数(210、192、230)分别显著的高于原意(169、188、212),两蜂种均在6日龄表达蛋白最多($P < 0.05$)。浆蜂咽下腺3个日龄表达的共有蛋白数为119个,其中21个蛋白表达量随咽下腺的发育显著上调,14个蛋白显著下调;原意咽下腺3个日龄表达的共有蛋白数为107个,其中15个蛋白表达量随咽下腺的发育显著上调,19个蛋白显著下调($P < 0.05$)。1日龄浆蜂和原意咽下腺共有蛋白为145个,其中28个蛋白点浆蜂表达量显著高于原意,14个蛋白点原意表达量显著高于浆蜂,浆蜂特有蛋白为65个,原意为24个;3日龄浆蜂和原意咽下腺共有蛋白为138个,其中31个蛋白点浆蜂表达量显著高于原意,19个蛋白点原意表达量显著高于浆蜂,浆蜂特有蛋白为54个,原意为50个;6日龄浆蜂和原意咽下腺共有蛋白为175个,其中44个蛋白点浆蜂表达量显著高于原意,25个蛋白点原意表达量显著高于浆蜂,浆蜂特有蛋白为55个,原意为37个($P < 0.05$)。与原意相比,浆蜂咽下腺发育3个日龄特有蛋白点总数为72个。从3日龄开始在浆蜂和原意咽下腺的蛋白表达谱中出现大量的王浆主蛋白点。【结论】从工蜂羽化到6日龄这一阶段内,浆蜂咽下腺蛋白表达明显比原意活跃,6日龄是2蜂种表达最为活跃的阶段。咽下腺发育过程中的共有蛋白为咽下腺发育所必需的管家蛋白,但它们的表达模式存在较大差异。不同日龄的特异蛋白表明咽下腺在不同的发育阶段需要不同的蛋白来调控。两蜂种工蜂咽下腺都从3日龄就开始分泌蜂王浆。

关键词: 王浆高产蜜蜂; 原种意大利蜜蜂; 咽下腺; 双向电泳; 蛋白质组

Proteome Analysis of the Development of Hypopharyngeal Gland of High Royal Jelly Producing Bees and Native Italian Bees

FENG Mao, LI Jian-ke

(Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100093)

Abstract: 【Objective】 The study is to investigate the proteome profile of the hypopharyngeal gland (HG) of high royal jelly producing bees (*A. m. ligustica*) and native Italian bees (*A. m. ligustica*) on day 1, day 3 and day 6. 【Method】 Two-dimensional gel electrophoresis was used in this experiment and parts of proteins were identified by comparison of those proteins already identified in the proteome complement of the HG and royal jelly. 【Result】 The results showed that 210, 192 and 230 proteins were detected in the proteome profile of high royal jelly producing bees on day 1, day 3 and day 6, respectively, which is significantly higher than those detected in native Italian bees, 169, 188 and 212, correspondingly. While 6-day-old HG expressed the significant highest number of proteins in two strains ($P < 0.05$). This indicates the HG of high royal jelly producing bees express more active than that of native Italian bees and day 6 is the most active expressional stage. For high royal jelly producing bees, 119 proteins presented on all images of days 1, 3, and 6, among which 21 proteins were remarkably up-expressed and 14 were significantly down-expressed along

收稿日期: 2008-02-01; 接受日期: 2008-04-01

基金项目: 国家“十一五”国家科技支撑计划重点项目(2006BAD06B04, 2006BAD12B08-06), 现代农业产业技术体系(蜜蜂)项目和公益性行业科研专项(nyhyzx07-041)

作者简介: 冯 毛(1979-), 男, 河南南阳人, 博士研究生, 研究方向为蜜蜂蛋白质组学。Tel: 010-62591449; E-mail: fengm622@163.com. 通信作者李建科(1962-), 男, 北京人, 教授, 研究方向为蜜蜂饲养与生物技术。Tel: 010-62591449; E-mail: apislijk@126.com

with the development of the HG. For the native Italian bees, 107 proteins were consistently resolved to the 3 images, 15 proteins showed significant up-expression and 19 down-expressed significantly ($P < 0.05$). Proteins well resolved to the images on day 1, day 3 and day 6 of high royal jelly producing bees and native Italian bees were 145, 138 and 175, respectively. Among them, 28, 31, 44 proteins showed a significant higher expression in high royal jelly producing bees than those of native Italian bees, while 14, 19, 25 proteins expressed significant higher in native Italian bees than those of high royal jelly producing bee ($P < 0.05$). Proteins specific expressed in the HG of high royal jelly producing bees and native Italian bees were 65, 54, 55 and 24, 50, 37 on day 1, day 3 and day 6, respectively. By comparison of already identified proteins from HG and royal jelly, major royal jelly proteins could be detected in the protein profile of the two honey bee strains starting from day 3. 【Conclusion】 The HG of high royal jelly producing bees express more active than that of Italian bees during 6 days development after eclosion and it has the most expressional activity on day 6. The proteins well resolved to all images are the housekeeping proteins which are indispensable for the development of the HG, but marked difference exists in their expression pattern. The proteins specific expressed on different days indicate that different developing stage of HG need specific proteins to regulate its growth. The 3-day-old HG begins to secrete royal jelly.

Key words: high royal jelly producing bee; native Italian bee; hypopharyngeal gland; two-dimensional gel electrophoresis; proteome

0 引言

【研究意义】咽下腺 (hypopharyngeal gland) 是一对位于工蜂头部的腺体, 是合成、分泌蜂王浆的主要腺体^[1]。每条腺体由一根总导管、数百个小囊和若干个支导管构成, 其分泌的蜂王浆不仅是蜂王、幼虫的主要食物^[2], 对蜜蜂的营养和级型分化有至关重要的作用^[3], 而且也是养蜂业的重要产品之一, 是一种天然的营养食品和保健品^[4]。王浆高产蜜蜂 (浆蜂), 是中国从意大利蜜蜂中培育成功的世界上产浆水平最高的蜂种, 但迄今为止, 蜂王浆高产的机理尚不清楚。通过研究咽下腺发育的蛋白质组, 并将浆蜂与原种意大利蜜蜂 (原意) 的咽下腺发育蛋白质组进行比较, 以期揭示二者咽下腺的发育特征, 这将对揭示王浆高产的分子机理奠定一定理论基础。【前人研究进展】工蜂咽下腺的发育具有两个明显不同的功能阶段, 一是在哺育期分泌王浆饲喂幼虫及蜂王; 二是在采集期间咽下腺分泌王浆的机制被抑制, 转而分泌其它的蛋白质和相关的酶类进行蜂蜜转化^[5-7]。咽下腺随工蜂日龄的增长和职能的改变会发生相应的变化^[5], 在不同发育阶段, 工蜂咽下腺的形态和超微结构表现出较大的差异性^[8], 虽然咽下腺长度和小囊数量随工蜂日龄的增长变化不明显, 但咽下腺宽度随工蜂日龄的不同发生显著的变化^[9]。初羽化的工蜂, 咽下腺小囊及腺泡较小, 无分泌活性。随着日龄的增加, 5~6 日龄的青年工蜂, 咽下腺小囊和腺泡增大饱满, 9 日龄工蜂小囊发育基本成熟, 呈光滑饱满状态, 进入泌浆高峰期。之后随着工蜂蜡腺的发育, 咽下腺开始退化。越冬期工蜂的咽下腺从形态上看较发达, 但

表现出低活性^[10]。肥大的和没有发育的咽下腺合成蛋白的能力低于中等发育程度的咽下腺^[1]。越冬期工蜂的咽下腺具有蛋白储存功能, 在此期间工蜂咽下腺仍然能产生分泌物, 但这些物质并不释放到体外, 而是在体内储存, 为来年春繁时节的哺育工作做准备^[8]。工蜂咽下腺的功能具有一定的灵活性^[11], 当蜂群需要时采集蜂衰退的咽下腺可以重新发育^[12], 同时还发现不论是采集蜂还是青年蜂的咽下腺必须有蜂子的刺激, 而且必须和蜂子有直接的接触, 才能具有分泌活性^[1,13]。研究表明咽下腺的发育同花粉的消耗量呈正相关性, 工蜂头部的鲜重能反映咽下腺的大小^[14]。咽下腺的直径常被用来描述工蜂的生理状况, 腺体的分泌活性和分泌量同腺体的大小呈现出一定的正相关性^[8]。组织学研究证明老龄采集蜂的咽下腺中细胞凋亡和坏死现象很普遍, 但在青年哺育蜂的咽下腺中没有发现这一现象^[15]。咽下腺除了能产生和分泌蜂王浆外, 还能分泌产生诸如 α -葡萄糖苷酶^[7,16]、葡萄糖氧化酶^[6]、半乳糖苷酶、酯酶和脂肪酶等与能量物质代谢相关的酶^[11]。同时咽下腺的基因表达具有一定的特异性^[5], 编码一种 56 kD 蛋白的基因在采集蜂和哺育蜂的咽下腺中均有表达, 而编码 α -葡萄糖苷酶的基因只在采集蜂的咽下腺中有表达^[5], 并且 α -葡萄糖苷酶的量随工蜂日龄的增长而增多^[17]。与其它昆虫产生 β -葡萄糖苷酶^[18]不同, 蜜蜂体内的 β -葡萄糖苷酶只在哺育蜂和采集蜂的咽下腺产生用于蜂蜜转化和碳水化合物的消化^[19], 而在新羽化幼蜂的咽下腺中检测不到。浆蜂作为中国独有的蜂种资源和基因资源, 在表型性状调查^[20-21]、形态学^[22]等方面进行了大量研究, 并利用微卫星 DNA 技术初步找到了浆蜂蜂王浆高产的几

个分子标记^[23-24]。数量遗传学研究表明产浆性状是可遗传的数量性状^[25-26]。蜜蜂基因组测序工作的完成, 为开展蜜蜂蛋白质组的研究奠定了基础^[27]。近年来, 利用蛋白质组技术对蜂王浆^[28-31]、咽下腺分泌物^[16]、毒腺^[32]、蜜蜂血淋巴^[33]和浆蜂工蜂的卵期发育^[34]等进行了研究, 这些都为开展工蜂咽下腺的蛋白质组研究奠定了基础。【本研究切入点】浆蜂是由意大利蜜蜂选育而来的, 以 1、3、6 日龄浆蜂和原意工蜂咽下腺蛋白为材料, 比较它们不同发育阶段咽下腺蛋白质组的异同。【拟解决的关键问题】了解浆蜂和意蜂工蜂咽下腺不同发育阶段蛋白表达调控的特点, 试图找出与调控王浆高产性状相关的功能蛋白, 为揭示王浆高产的分子机理提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 取样

试验所用浆蜂 (*A. m. ligustica*) 和原意 (*A. m. ligustica*) 均饲养于中国农业科学院蜜蜂研究所试验蜂场并进行取样。

分别取浆蜂和原意工蜂即将出房的子脾各 2 张, 放入 34℃ 生化培养箱中培养过夜。然后将新羽化出房的工蜂用不同颜色的染料标记, 标记好的工蜂再放回原来的蜂箱内。刚出房的工蜂为 1 日龄。然后分别取 1、3、6 日龄的工蜂各 60 只, 在实体显微镜下解剖出工蜂的咽下腺, 试验共取 5 批样品, 取样后直接进行蛋白提取或者 -70℃ 储存备用。

1.2 试验

固相 pH 梯度 (IPG) 胶条 (pH 3~10, 线性)、双向凝胶电泳 (2-DE) 蛋白分子量标准、Bio-lyte (pH 3~10)、矿物油均购于伯乐公司。Tris 碱、过硫酸铵 (AP)、十二烷基磺酸钠 (SDS)、甘氨酸、TEMED 均购自 Sigma 公司。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、溴酚兰、考马斯亮蓝 (CBB) G-250、硫脲、CHAPS、牛血清白蛋白 (BSA)、琼脂糖和尿素购于 Amresco 公司。DTT、碘乙酰胺购自 Merck 公司。

1.3 蛋白提取

蛋白提取参照张兰等的方法^[34]。每 1 mg 工蜂咽下腺中加入 10 μ l 磷酸缓冲液 (PB) ($32.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$, $2.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $400 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaCl}$, pH 7.6), 冰浴研磨直至看不到腺体颗粒, 超声处理 2 min。4℃, 12 000 g, 离心 10 min; 接着 4℃, 15 000 g, 再离心 10 min。避开脂肪层取上清液放入另一 Ep 管中, 沉淀中按照每 1 mg 咽下腺加入 2 μ l PB, 4℃,

15 000 g, 离心 10 min。取上清与上步所得上清合并, 作为磷酸易溶性蛋白溶液备用。沉淀中按每 1 mg 咽下腺加入 10 μ l 蛋白裂解缓冲液 (LB) ($8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫脲, 4% CHAPS, $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris 碱, $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT, 2% Bio-lyte pH 3~10), 冰浴研磨 10 min, 超声 2 min。4℃, 15 000 g, 离心 10 min。取上清作为磷酸难溶性蛋白溶液与上述磷酸易溶性蛋白溶液合并, 沉淀弃去。在混合上清液中加入 100% TCA 使其终浓度达到 10%, 冰浴静置 10 min 以上, 以沉淀蛋白并除去样品中的盐份。将此混合液在 4℃, 15 000 g, 离心 10 min, 共离心 2 次。弃去上清液, 沉淀中按每 1 mg 咽下腺加入 5 μ l LB, 冰浴研磨 5 min, 超声 2 min, 使混合液充分溶解, 用 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠调溶液 pH 至中性, 制成蛋白样品溶液, 直接使用或是 -70℃ 冷藏备用。

1.4 蛋白浓度测定

按照 Bradford 介绍的方法^[35]进行测定。用 BSA 做标准曲线, 测定 595 nm 波长处的吸光度 (Beckman, spectrophotometer DU800)。

1.5 双向电泳分析

将提取的蛋白样品用 LB 稀释后再与上样水化液 ($8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, 4% CHAPS, 0.001% 溴酚蓝, $65 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT, 0.2% Bio-lyte pH 3~10) 按照 1:4 的比例充分混合, 取此混合液 420 μ l 上样, 使上样液中的蛋白含量均为 220 μ g。使用 17 cm IPG 胶条 (pH 3~10, 线性), 在 18℃ 按以下程序进行第一向等电聚焦 (Protean IEF Cell system, Bio-Rad Hercules, CA, USA): 50 V, 水化 14 h; 250 V, 30 min 除盐, 共重复 3 次; 1 000 V, 1 h 再次除盐; 9 000 V, 5 h 线性升压; 9 000 V, 最终达到 $60\,000 \text{ V}\cdot\text{h}^{-1}$, 等电聚焦。

第一向聚焦结束后, 将 IPG 胶条分别用含 2% DTT 的平衡缓冲液 1 和 2.5% 碘乙酰胺的平衡缓冲液 2 (平衡缓冲液 1 和 2 均含有 $6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, $0.375 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 8.8, 20% 甘油, 2% SDS) 平衡胶条各 15 min。平衡完成后将胶条转移到聚丙烯酰胺分离胶上 (1.0 mm 厚, 12% T), 15 μ l 2-DE 蛋白分子量标准加到上样滤纸片上后, 放在胶条的酸性端。用 PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad Hercules, CA, USA) 系统, 按 25 mA/gel 的条件开始进行第二向 SDS-PAGE 电泳, 直至溴酚蓝到达胶下缘时结束第二向。后将凝胶浸泡入固定液中 (40% 乙醇, 10% 醋酸) 摇床固定 4 h, 接着将凝胶转入染色液 (CBB G-250 染色母液与甲醇 4:1 混合) 中进行染色 14 h。

1.6 图像分析

染色后凝胶使用透射模式进行扫描，扫描结果直接导入计算机（32 位，300 dpi 分辨率，全彩）。对 5 个样品中具有很好重复性的 5 张凝胶图使用 PDQuest V 7.3.0 (Bio-Rad Hercules, CA, USA) 进行图像扫描、斑点检测和匹配分析。并用总密度方法 (total density in gel image) 标准化处理 (normalization)。采用 ANOVA (Version 6.12, SAS Institute, Cary, N.C., USA) 的邓肯法对数据进行统计检验。

2 结果与分析

2.1 浆蜂和原意 1、3、6 龄工蜂咽下腺蛋白 2-DE 图谱

图 1 是 5 次重复所取咽下腺的 5 个具有良好重复性的浆蜂与原意咽下腺不同发育期蛋白表达图谱之一。结果表明，浆蜂咽下腺发育过程中表达的蛋白数分别为 210、192、230 个，原意所表达的蛋白数分别为 169、188、212 个，蛋白主要集中在分子量 20~100

kD，等电点 5~8 的范围内。

2.2 浆蜂和原意 1、3、6 日龄工蜂咽下腺蛋白表达分析

2.2.1 浆蜂 1、3、6 日龄工蜂咽下腺蛋白表达分析
浆蜂咽下腺 3 个日龄表达的共有蛋白数为 119 个，分子量和等电点分别处于 14.37~107.31 kD 和 4.43~9.74 的范围内，表达量为 203~23 927 mg·L⁻¹，约 77% 的蛋白点主要集中于 5.42~7.88 这个较窄的等电点范围内，其中有 21 个蛋白表达量随咽下腺的发育呈显著的上调趋势，14 个蛋白表达量则呈显著的下调趋势 ($P < 0.05$) (图 1，表 1 和表 2)。

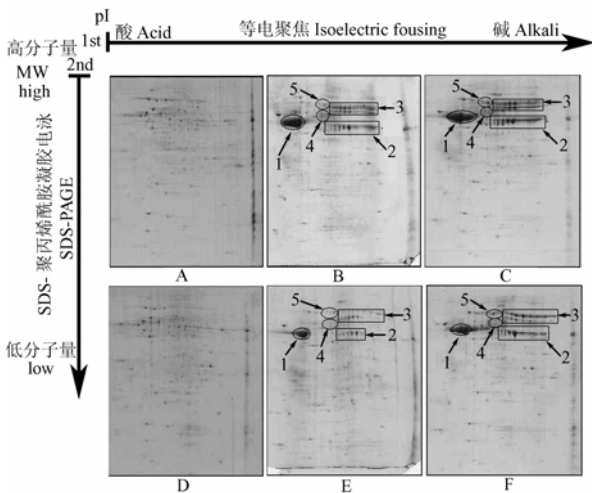
除了共有蛋白外，51 个蛋白 (分子量 19.1~95.55 kD，等电点 4.47~9.78) 为浆蜂 1 日龄工蜂咽下腺所特有。3 日龄咽下腺特有蛋白数为 9 个，分子量和等电点分别为 18.39~82.37 kD 和 4.44~9.71。6 日龄咽下腺特有蛋白数为 31 个，分子量和等电点分别为 17.12~97.85 kD 和 5.44~7.73。

在浆蜂工蜂咽下腺的发育过程中，有 12 个蛋白 (分子量 15.48~63.69 kD，等电点 4.14~9.77) 是在 1、3 日龄表达而在 6 日龄关闭，28 个蛋白 (分子量 20.77~104.61 kD，等电点 5.29~9.28) 在 1、6 日龄表达而在 3 日龄关闭。在 3、6 日龄表达而在 1 日龄关闭的蛋白数为 52 个 (分子量 18.78~108.89 kD，等电点 4.61~8.44)。

2.2.2 原意 1、3、6 日龄工蜂咽下腺蛋白表达分析
原意 3 个日龄咽下腺共有蛋白为 107 个 (分子量 14.37~101.99 kD，等电点 4.3~9.78)，表达量为 216~22 215 mg·L⁻¹，约 72% 的蛋白点主要集中于 5.42~7.88 这个较窄的等电点范围内，其中 15 个蛋白表达量随咽下腺的发育显著上调，19 个蛋白的表达量则表现出显著下调趋势 ($P < 0.05$) (图 1，表 3 和表 4)。

除了共有蛋白外，31 个蛋白 (分子量 17.89~78.1 kD，等电点 4.43~8.50) 为原意 1 日龄工蜂咽下腺所特有。3 日龄咽下腺特有蛋白数为 5 个，分子量和等电点分别为 30.67~53.9 kD 和 4.63~6.75。6 日龄咽下腺特有蛋白数为 29 个，分子量和等电点分别为 13.93~108.89 kD 和 4.14~9.71。

在原意咽下腺的发育过程中，有 11 个蛋白 (分子量 28.02~82.71 kD，等电点 5.82~7.78) 是在 1、3 日龄表达而在 6 日龄关闭，11 个蛋白 (分子量 15.48~99.46 kD，等电点 5.45~9.74) 在 1、6 日龄表达而在 3 日龄关闭，在 3、6 日龄表达而在 1 日龄关闭的蛋白数为 56 个 (分子量 18.78~107.31 kD，等电点 4.34~



A、B、C 分别代表 1 日龄、3 日龄及 6 日龄王浆高产蜂咽下腺蛋白图谱；D、E、F 分别代表 1 日龄、3 日龄及 6 日龄原种意大利蜜蜂咽下腺蛋白图谱。图中 1~5 代表相应的王浆主蛋白 1~5。每个样品上样量 220 μg，CBB G-250 染色
A-F are protein profiles corresponding to day 1, day 3 and day 6 of two honeybee strains, respectively. The numbers labeled represent major royal jelly proteins 1 to 5, respectively. A 220 μg of each sample was subjected to 2-DE and stained by CBB G-250

图 1 王浆高产蜜蜂 (*A. m. ligustica*) 和原种意大利蜜蜂 (*A. m. ligustica*) 工蜂咽下腺发育 2-DE 蛋白图谱

Fig. 1 2-DE profile of worker bees hypopharyngeal gland of high royal jelly producing honeybees (*A. m. ligustica*) and native Italian honeybees (*A. m. ligustica*) on the different development days

表 1 王浆高产蜜蜂(*A. m. ligustica*)咽下腺发育过程中蛋白表达量呈显著上调趋势的蛋白的表达量、分子量及等电点($P<0.05$)
Table 1 Mr, pI and the protein abundance of the significantly up-regulated expressed proteins in the development of the hypopharyngeal gland of high royal jelly producing bees (*A. m. ligustica*) on day 1, day 3 and day 6 ($P<0.05$)

点编号 Spot No. (SSP)	分子量 Mr (kD)	等电点 pI	表达量 Protein abundance (mg·L ⁻¹)		
			1 日龄 Day 1	3 日龄 Day 3	6 日龄 Day 6
0002	20.58	4.43	1119±120 c	1300±89b	2120±159a
1903	101.99	5.42	365±73c	447±48b	626±70a
3211	44.87	6.56	749±53c	800±56b	957±98a
3903	107.31	6.37	197±41c	245±43b	536±77a
4620	71.48	6.87	501±73c	934±87b	1226±114a
4708	81.12	6.64	1014±100c	2926±125b	4420±236a
4712	78.10	6.88	280±55c	763±88b	1517±105a
4908	94.86	6.95	656±79c	857±81b	2840±142a
5306	57.61	7.17	299±64c	2071±117b	4950±141b
5401	59.83	7.05	2459±116c	2735±102b	3701±115a
5402	60.33	7.16	405±58c	4779±161b	8873±1206a
5404	57.77	7.05	919±102c	1761±109b	5700±367a
5902	94.81	7.06	399±61c	1645±101b	2116±117a
6301	58.25	7.40	553±87c	2466±112b	5234±247a
6305	57.23	7.61	1550±100c	4759±183b	10993±1647a
6602	70.69	7.46	617±79c	5291±283b	6263±278a
6603	70.25	7.64	1084±106c	4227±184b	6394±290a
6604	76.85	7.64	741±94c	1593±112b	2534±119a
7207	41.92	8.19	2520±113c	3159±153b	3427±133a
7402	59.72	7.86	859c±101	5237±185b	9438±1178a
7407	59.52	8.12	519±94c	5495±192b	6462±235a

不同字母表示差异显著 ($P<0.05$), 置信区间的显著性水平为 95%。下同

Numbers with different superscript means difference significantly ($P<0.05$), the confidence interval was calculated with a confidence level of 95%. The same as below

表 2 王浆高产蜜蜂(*A. m. ligustica*)咽下腺发育过程中蛋白表达量呈显著下调趋势的蛋白的表达量、分子量及等电点($P<0.05$)
Table 2 Mr, pI and the protein abundance of the significantly down-regulated expressed proteins in the development of the hypopharyngeal gland of high royal jelly producing bees (*A. m. ligustica*) on day 1, day 3 and day 6 ($P<0.05$)

点编号 Spot No. (SSP)	分子量 Mr (kD)	等电点 pI	表达量 Protein abundance (mg·L ⁻¹)		
			1 日龄 Day 1	3 日龄 Day 3	6 日龄 Day 6
0104	33.39	4.54	886±36a	837±59b	526±78c
0202	44.1	4.62	1112±143a	764±151b	347±91c
1101	33.51	5.62	797±84a	612±72b	315±99b
1606	69.03	5.73	1033±133a	287±63b	204±49c
2102	34.37	5.82	1201±75a	395±56b	297±49c
2704	80.69	5.98	2631±177a	1193±154b	1088±147c
3403	60.43	6.57	1554±139a	757±106b	619±68c
3610	66.81	6.28	875±108a	306±80b	188±59c
4103	35.92	6.98	1037±125a	405±82b	275±63c
4201	42.21	6.79	464±97a	296±65b	192±54c
4506	65.19	6.91	887±105a	390±72b	350±53c
5206	45.02	7.12	781±95a	455±77b	395±105c
8106	38.08	9.21	2865±177a	1736±136b	850±99c
8208	46.87	8.71	1705±124a	1416±130b	870±100c

表 3 原种意大利蜜蜂 (*A. m. ligustica*) 咽下腺发育过程中蛋白表达量呈显著上调趋势的蛋白的表达量、分子量及等电点 ($P < 0.05$)
 Table 3 Mr, pI and the protein abundance of the significantly up-regulated expressed proteins in the development of the hypopharyngeal gland of native Italian bees (*A. m. ligustica*) on day 1, day 3 and day 6 ($P < 0.05$)

点编号 Spot No. (SSP)	分子量 Mr (kD)	等电点 pI	表达量 Protein abundance ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		
			1 日龄 Day 1	3 日龄 Day 3	6 日龄 Day 6
0004	28.5	4.76	1521±116c	2432±129b	3058±147a
1903	101.99	5.42	327±72c	584±77b	683±81a
4404	60.19	6.84	729±97c	1174±112b	2077±122a
4708	81.12	6.64	816±100c	2650±134b	4201±147a
4709	81.72	6.88	428±88c	911±111b	1577±119a
5206	45.02	7.12	1163±112c	1302±116b	2043±121a
5401	59.83	7.05	2006c±123	2416±135b	3451±151a
5402	60.33	7.16	598±72c	2867±137b	5621±292a
5503	65.39	7.21	913±98c	1099±108b	3679±145a
6305	57.23	7.61	1102±113c	3571±156b	8537±1124a
6603	70.25	7.64	676±79c	2595±139b	5632±382a
7402	59.72	7.86	1306±109c	4639±227b	7287±1057a
7606	71.55	8.28	468±90c	797±102b	842±106a
7703	79.98	7.88	724±100c	3707±162b	8639±1133a

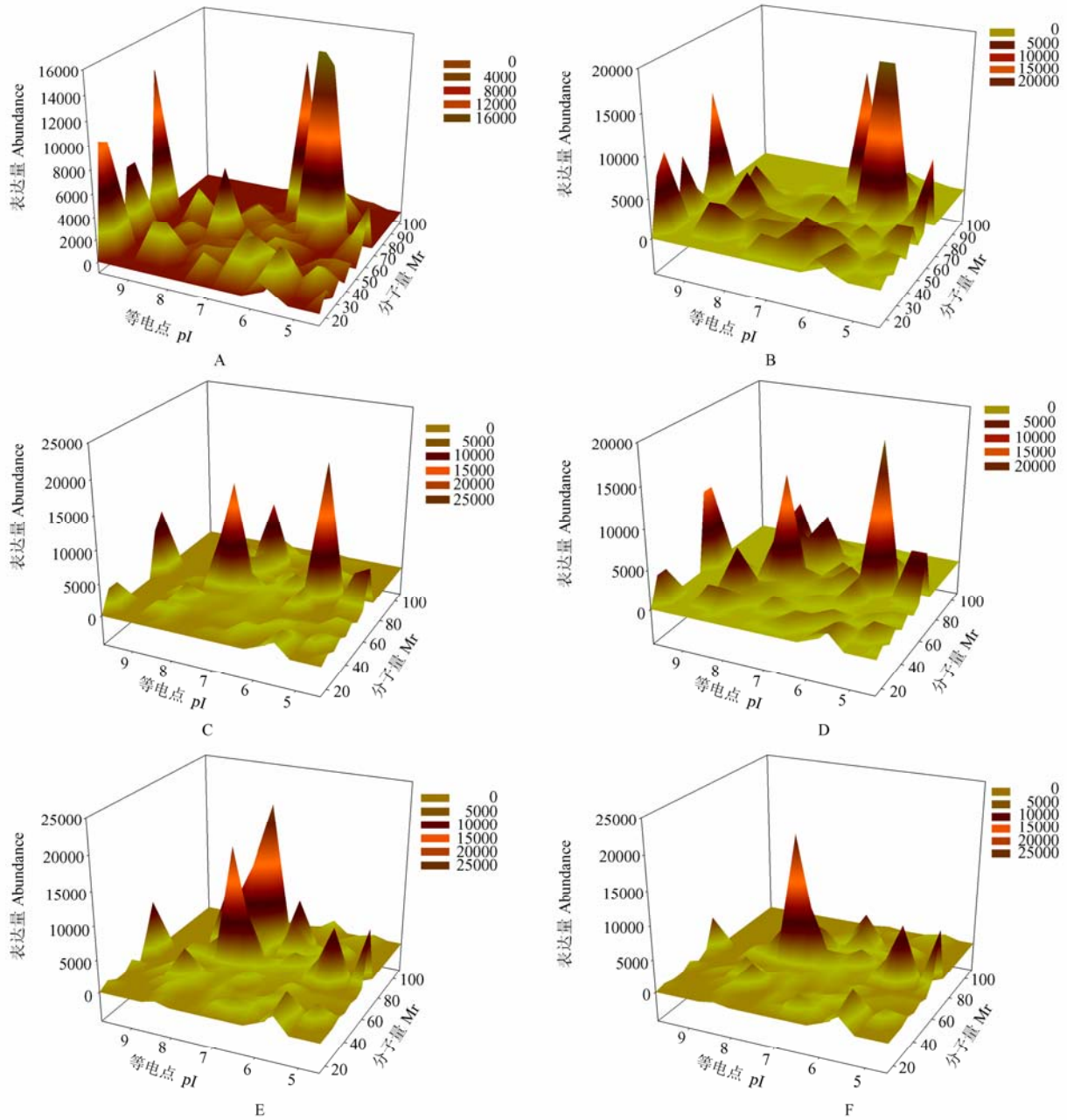
表 4 原种意大利蜜蜂 (*A. m. ligustica*) 咽下腺发育过程中蛋白表达量呈显著下调趋势的蛋白的表达量、分子量及等电点 ($P < 0.05$)
 Table 4 Mr, pI and the protein abundance of the significantly down-regulated expressed proteins in the development of the hypopharyngeal gland of native Italian bees (*A. m. ligustica*) on day 1, day 3 and day 6 ($P < 0.05$)

点编号 Spot No. (SSP)	分子量 Mr (kD)	等电点 pI	表达量 Protein abundance ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		
			1 日龄 Day 1	3 日龄 Day 3	6 日龄 Day 6
0006	20.00	4.44	1348±110a	920±104b	611±73c
0101	37.75	5.00	1176±105a	894±89b	528±77c
0102	40.82	5.01	2436±142a	1689±115b	1579±116c
0103	36.21	4.96	810±90a	533±77b	247±57c
0104	33.39	4.54	1431±112a	1113±101b	306±73c
0202	44.10	4.62	3109±146a	915±104b	197±63c
0305	57.63	4.66	780±93a	658±76b	525±74c
2102	34.37	5.82	1573±108a	582±75b	466±63c
2202	52.82	5.86	1019±99a	568±77b	412±59c
2603	67.20	5.82	3329±144a	1457±111b	1335±102c
2901	99.56	5.75	919±97a	525b±70	439±61c
3001	29.09	6.39	3825±163a	1756±128b	1304±106c
3305	57.05	6.56	2568±149a	2335±138b	1418±112c
3704	81.48	6.37	2352±131a	2003±123b	1702±107c
4101	35.34	6.63	1729±112a	1610±114b	920±95c
4308	56.72	6.98	784±91a	548±73b	257±66c
4506	65.19	6.91	1325±100a	556±78b	466±59c
7001	25.45	8.51	4181±252a	2778±147b	1717±105c
7105	35.74	8.05	2036±133a	1149±112b	329±76c

8.64)。

2.2.3 浆蜂和原意 1、3、6 日龄工蜂咽下腺蛋白表达的比较 浆蜂咽下腺在 3 个日龄所表达的蛋白数(210、192 和 230 个)均显著的高于对应日龄原意咽下腺所表达的蛋白数(169、188 和 212 个)($P < 0.05$)。

浆蜂和原意 1 日龄咽下腺共同表达的蛋白数为 145 个(分子量 14.37~101.99 kD, 等电点 4.43~9.78) (图 2-A 和图 2-B), 其中 28 个蛋白点浆蜂的表达量显著高于原意, 14 个蛋白点原意的表达量显著高于浆蜂 ($P < 0.05$), 浆蜂特异表达的蛋白数为 65 个(分

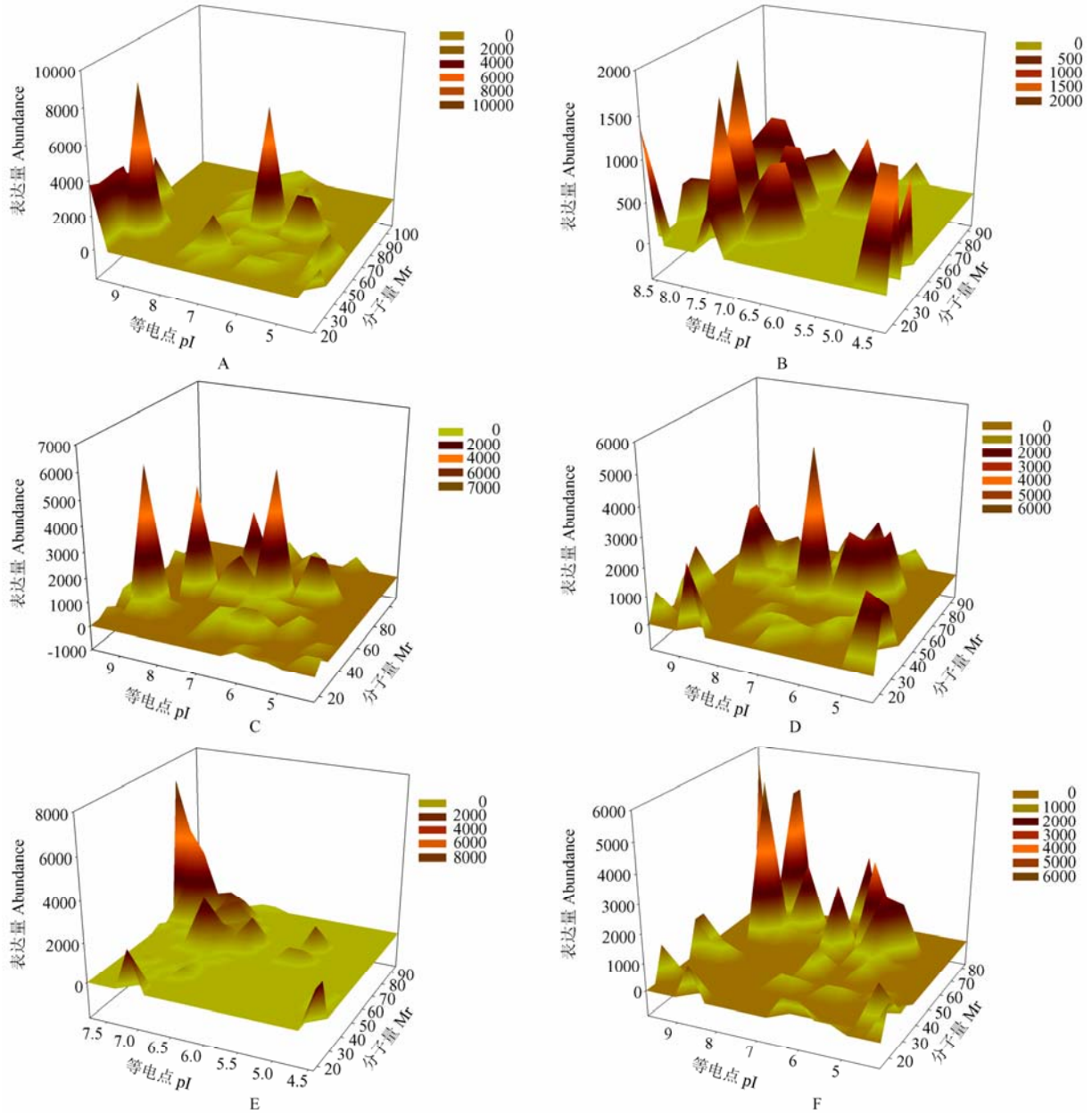


A 和 B、C 和 D、E 和 F 分别代表 1、3 和 6 日龄王浆高产蜜蜂和原种意大利蜜蜂咽下腺共有蛋白三维图谱
A and B, C and D, E and F represent the proteins both in the high royal jelly producing bees and native Italian bees on day 1, day 3 and day 6, respectively

图 2 王浆高产蜜蜂 (*A. m. ligustica*) 与原种意大利蜜蜂 (*A. m. ligustica*) 工蜂咽下腺发育表达的共有蛋白的三维图谱
Fig. 2 Three dimensional views of protein expression both in the hypopharyngeal gland of high royal jelly producing honey bees (*A. m. ligustica*) and native Italian honey bees (*A. m. ligustica*)

子量 19.1~107.31 kD, 等电点 4.14~9.78) (图 3-A), 原意为 24 个(分子量 14.40~94.35 kD, 等电点 4.30~8.60) (图 3-B); 3 日龄咽下腺共同表达的蛋白数为 138 个(分子量 14.37~107.31 kD, 等电点 4.44~9.77)

(图 2-C, 2-D), 其中 31 个蛋白点浆蜂表达量显著高于原意, 19 个蛋白点原意表达量显著高于浆蜂 ($P < 0.05$), 浆蜂特异表达的蛋白数为 54 个(分子量 15.48~108.89 kD, 等电点 4.14~9.77) (图 3-C),



A 和 B、C 和 D、E 和 F 分别代表 1、3 和 6 日龄王浆高产蜜蜂和原种意大利蜜蜂咽下腺特有蛋白三维图谱
A and B, C and D, E and F represent the proteins specially expressed in the high royal jelly producing bees and native Italian bees on day 1, day 3 and day 6, respectively

图 3 王浆高产蜜蜂 (*A. m. ligustica*) 与原种意大利蜜蜂 (*A. m. ligustica*) 工蜂咽下腺发育表达的蛋白质组三维图谱

Fig. 3 Three dimensional views of protein specially expression in the hypopharyngeal gland of high royal jelly producing honey bees (*A. m. ligustica*) and native Italian honey bees (*A. m. ligustica*), respectively

原意为 50 个(分子量 14.4~94.78 kD, 等电点 4.30~9.78) (图 3-D); 6 日龄咽下腺共同表达的蛋白数为 175 个(分子量 14.37~108.89 kD, 等电点 4.54~9.78) (图 2-E, 图 2-F), 其中 44 个蛋白点浆蜂的表达量显著高于原意, 25 个蛋白点原意的表达量显著高于浆蜂 ($P<0.05$), 浆蜂特异表达的蛋白数为 55 个(分子量 17.12~95.39 kD, 等电点 4.30~7.78) (图 3-E), 原意为 37 个(分子量 13.93~83.18 kD, 等电点 4.14~9.75) (图 3-F)。两蜂种在 3 个日龄均有表达的蛋白数为 85 个(分子量 14.37~101.99 kD, 等电点 4.54~9.72)。

通过与已鉴定蛋白功能的咽下腺和蜂王浆蛋白质组图谱比较^[31,36], 发现从 3 日龄开始咽下腺蛋白表达谱中开始大量出现王浆的特征蛋白点——王浆主蛋白, 而且数目随日龄的增长而增加(图 1, 其中 1~5 分别代表王浆主蛋白 1, 2, 3, 4 和 5)。

与原意相比, 浆蜂咽下腺发育 3 个日龄特有蛋白点数为 72 个(分子量 17.12~95.55 kD, 等电点 4.47~9.78)。其中, 只在 1 日龄表达的蛋白数为 25 个, 只在 3 日龄表达的蛋白数为 3 个, 只在 6 日龄表达的蛋白数为 18 个, 在 1 和 3 日龄表达而在 6 日龄关闭的蛋白点数为 2 个, 在 1 和 6 日龄表达而在 3 日龄关闭的蛋白点数为 5 个, 在 3 和 6 日龄表达而在 1 日龄关闭的蛋白数为 15, 在 3 个日龄都有表达的蛋白点数为 5 个。

3 讨论

咽下腺是蜂王浆合成和分泌的主要场所, 研究浆蜂和原意咽下腺发育的蛋白组, 揭示咽下腺蛋白的时空表达差异, 为探明浆蜂王浆高产机理提供一定理论依据。

研究表明, 浆蜂咽下腺在 3 个日龄表达的蛋白数均显著的高于原意对应日龄的蛋白数, 说明浆蜂咽下腺的活性高于原意, 这与浆蜂咽下腺活性高于本地意大利蜜蜂相一致^[9], 也与浆蜂咽下腺具有细胞核大、线粒体和高尔基体丰富、内质网发达, 细胞能量供应充足、蛋白合成能力强^[37]的论述一致。

从结果可以清楚看到 3 日龄浆蜂和原意工蜂的咽下腺图谱中就有大量王浆主蛋白点(图 1-B, 图 1-E), 这说明咽下腺的分泌细胞在此时已经具备了产生王浆的能力, 这与 3 日龄工蜂的咽下腺具有发育充分的微绒毛结构和分泌泡等分泌细胞的特征结构相符^[8,38]。是否 3 日龄的工蜂此时就开始分泌王浆哺育幼蜂还需

要进一步从行为学上进行验证, 但 3 日龄工蜂咽下腺就能产生王浆, 这是对前人形态学研究结果的补充和工蜂 6 日龄才开始泌浆理论的发展。

两个蜂种咽下腺均在 6 日龄表达蛋白最多, 说明在这 3 个日龄内以 6 日龄咽下腺发育最旺盛, 基因表达最活跃, 结果也验证了 6 日龄工蜂的咽下腺发达、活性高这一论断^[9], 也与 6 日龄工蜂的咽下腺分泌细胞的直径达到最大, 内质网由刚羽化时较少且不发达的泡状逐渐发育成为较多且发达的片层状, 线粒体逐渐变得发达且数目增多, 咽下腺细胞中具有清晰可见的溶酶体结构, 供给细胞的各种营养物质和能量增多, 合成蛋白质的主要场所增大, 腺体的合成和分泌能力增强, 分泌活动比较活跃, 细胞中出现丰富的内容物等^[8]特征相吻合。

咽下腺发育过程是一个多基因表达调控的动态有序过程, 浆蜂和原意咽下腺在 1、3 和 6 日龄表达的共有蛋白是咽下腺发育过程中所必需的管家蛋白, 而不同日龄表达的特异蛋白说明不同发育阶段的咽下腺需要不同的特异蛋白来调控其发育。

与原意相比, 从 3 日龄开始浆蜂咽下腺蛋白表达出更多的王浆主蛋白, 而且浆蜂咽下腺在 3 个日龄表达的特有蛋白为 72 个, 这些是否与浆蜂王浆高产性状有关, 还需要做进一步的研究。本研究仅从浆蜂和原意工蜂咽下腺的发育图谱进行了初步分析, 但发育谱中所表达蛋白的功能还有待利用质谱和生物信息学进一步鉴定, 以便更深入的对发育机理进行研究。

4 结论

初步分析结果表明, 从工蜂羽化到 6 日龄这一阶段内, 浆蜂咽下腺蛋白表达显著比原意活跃, 6 日龄是 2 蜂种表达最为活跃的阶段。咽下腺发育过程中的共有蛋白为咽下腺发育所必需的管家蛋白, 但这些蛋白的表达模式存在较大差异。那些不同日龄的特异蛋白表明咽下腺在不同的发育阶段需要不同的蛋白来调控。浆蜂和原意咽下腺发育的调控具有一定的差异性, 与原意相比, 浆蜂咽下腺调控更为复杂。但浆蜂和原意工蜂均从 3 日龄就开始分泌王浆。浆蜂咽下腺与原意相比, 表达的特异蛋白是否是浆蜂王浆高产相关的功能蛋白, 还需要做更深入的研究。

References

- [1] Huang Z Y, Otis G W, Teal P E A. Nature of brood signal activating the protein synthesis of hypopharyngeal gland in honey bees *Apis*

- mellifera* (Apidae: Hymenoptera). *Apidologie*, 1989, 20(6): 455-464.
- [2] Crailsheim, K. The flow of jelly within a honeybee colony. *Journal of Comparative Physiology Biochemical, Systemic and Environmental Physiology*, 1992, 162(8): 681-689.
- [3] Evans J D, Wheeler D E. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1999, 96: 5575-5580.
- [4] Li J K, Chen S L. Royal jelly and human health. *American Bee Journal*, 2003, 143: 398-402.
- [5] Ohashi K, Natori S, Kubo T. Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 249: 797-802.
- [6] Ohashi K, Natori S, Kubo T. Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *European Journal of Biochemistry*, 1999, 265: 127-133.
- [7] Kuho T, Sasaki M, Nakamura J, Sasagawa H, Ohashi K, Takeuchi H. Change in the expression of hypopharyngeal-gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. *Journal of Biochemistry*, 1996, 119(2): 291-295.
- [8] Deseyn J, Billen J. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*, 2005, 36(1): 49-57.
- [9] 陈盛禄. 中国蜜蜂学. 北京: 中国农业出版社, 2001: 136-138.
Chen S L. *The Apicultural Science in China*. Beijing: China Agricultural Press, 2001: 136-138. (in Chinese)
- [10] Brouwers E V M. Measurement of hypopharyngeal gland activity in the honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 1982, 21: 193-198.
- [11] Ohashi K, Sasaki M, Sasagawa H, Nakamura J, Natori S, Kubo T. Functional flexibility of the honey bee hypopharyngeal gland in a dequeened colony. *Zoological Science*, 2000, 17: 1089-1094.
- [12] Huang Z Y, Robinson G E. Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behavioral Ecology and Sociology*, 1996, 39: 147-158.
- [13] 王瑞武, 杨冠煌, 匡云华, 杜芝兰. 影响中华蜜蜂工蜂王浆腺活性的因素. *昆虫学报*, 1992, 35(4): 500-502.
Wang R W, Yang G H, Kuang Y H, Du Z L. Factors influencing the hypopharyngeal gland activity in the workers of *Apis cerana*. *Acta Entomologica Sinica*, 1992, 35(4): 500-502. (in Chinese)
- [14] Hrasnigg N, Crailsheim K. Adaptation of hypopharyngeal gland development to the brood status of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Insect Physiology*, 1998, 44: 929-939.
- [15] Silva de Moraes R L, Bowen I D. Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Cell Biology International*, 2000, 24(10): 737-743.
- [16] Santos K S, dos Santos L D, Mendes M A, de Souza B M, Malaspina O, Palma M S. Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 35: 85-91.
- [17] Tsuchimoto M, Aoki M, Takada M, Kanou Y, Sasagawa H, Kitagawa Y, Kadowaki T. The changes of the gene expression in honeybee (*Apis mellifera*) brains associated with ages. *Zoological Science*, 2004, 21: 23-28.
- [18] Terra W R, Ferreira C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comprehensive Biochemistry and Physiology*, 1994, 109B: 1-62.
- [19] Pontoh J, Low N H. Purification and characterization of β -glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 32: 679-690.
- [20] 陈盛禄, 林雪珍, 胡福良, 苏松坤, 方章明. 浙农大 A 系意蜂王浆高产实验. *中国农业科学*, 1995, 28(5): 89-93.
Chen S L, Lin X Z, Hu F L, Su S K, Fang Z M. Experiment on the higher production royal jelly bee. *Scientia Agricultura Sinica*, 1995, 28(5): 89-93. (in Chinese)
- [21] 刘艳荷, 陈盛禄, 钟伯雄. 西方蜜蜂王浆产量与品质性状的配合力和杂种优势分析. *遗传学报*, 2001, 28(10): 926-932.
Liu Y H, Chen S L, Zhong B X. The combining ability and heterosis analysis of royal jelly yield and quality properties in western honeybees. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(10): 926-932. (in Chinese)
- [22] 苏松坤, 陈盛禄. 意蜂王浆生产性能形态学遗传标记的研究. *遗传*, 2003, 25(6): 677-680
Su S K, Chen S L. Research on morphological genetic marker of honeybee (*Apis mellifera ligustica*) in royal jelly production performance. *Hereditas*, 2003, 25(6): 677-680. (in Chinese)
- [23] 王尉平, 蒋 滢, 张雅娟, 汪成富, 黄超群. 高产王浆西蜂 DNA 分子中的相关基因标志筛选及其鉴定. *中国生物化学与分子生物学报*, 2002, 18(2): 161-164.
Wang W P, Jiang Y, Zhang Y J, Wang C F, Huang C Q. Selection and checking of the gene marker related to the high royal jelly quantity trait of *Apis mellifera* Lindauer. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 18(2): 161-164. (in Chinese)
- [24] Chen S L, Li J K, Zhong B X, Su S K. Microsatellite analysis of royal jelly producing traits of Italian honeybee (*Apis mellifera ligustica*).

- Acta Genetica Sinica*, 2005, 32(10): 1037-1044.
- [25] 李建科, 陈盛禄, 钟伯雄, 苏松坤. 西方蜜蜂咽下腺与繁殖力的发育遗传研究. 中国畜牧杂志, 2003, 39(6): 9-11.
- Li J K, Chen S L, Zhong B X, Su S K. Genetic analysis for developmental behavior of reproductive ability and hypopharyngeal gland in western honey bees (*Apis mellifera* L.). *Chinese Journal of Animal Science*, 2003, 39(6): 9-11. (in Chinese)
- [26] 李建科, 陈盛禄, 钟伯雄, 苏松坤. 西方蜜蜂产浆量的动态遗传研究. 遗传学报, 2003, 30(6): 547-554.
- Li J K, Chen S L, Zhong B X, Su S K. Genetic analysis for developmental behavior of honeybee colony's royal jelly production traits in western honeybees. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(6): 547-554. (in Chinese)
- [27] The Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 2006, 443(26): 931-949.
- [28] Scarselli R, Donadio E, Giuffrida M G, Fortunato D, Conti A, Balestreri E, Felicioli R, Pinzauti M, Sabatini A G, Felicioli A. Towards royal jelly proteome. *Proteomics*, 2005, 5: 769-776.
- [29] Sano O, Kunikata T, Kohno K, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. Characterization of royal jelly proteins in both Africanized and European honeybees (*Apis mellifera*) by two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52: 15-20.
- [30] Li J K, Wang T, Peng W J. Comparative analysis of the effects of different storage conditions on major royal jelly proteins. *Journal of Apicultural Research*, 2007, 46(2): 73-81.
- [31] Li J K, Wang T, Zhang Z H, Pan Y H. Proteomic analysis of royal jelly from three strains of western honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55: 8411-8422.
- [32] Peiren N, Vanrobaeys F, de Graaf D C, Devreese B, Van Beeumen J, Jacobs F J. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1752: 1-5.
- [33] Chan Q W, Howes C G, Foster L J. Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2006, 5: 2252-2262.
- [34] 张 兰, 李建科, 吴黎明. 王浆高产蜜蜂(*Apis mellifera* L.)卵期发育蛋白质组分析. 中国农业科学, 2007, 40(6): 1276-1287.
- Zhang L, Li J K, Wu L M. Profile analysis of the proteome of the eggs of the higher royal jelly producing bees (*Apis mellifera* L.). *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(6): 1276-1287. (in Chinese)
- [35] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(5): 248-254.
- [36] Li J K, Feng M, Zhang Z H, Pan Y H. Identification of the proteome complement of hypopharyngeal glands from two strains of honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 2008, 39: 199-214.
- [37] 胡福良, 陈盛禄, 林雪珍, 苏松坤, 杜芝兰. 意大利工蜂咽下腺细胞超微结构与分泌性. 浙江农业大学学报, 1997, 23(1): 75-80.
- Hu F L, Chen S L, Lin X Z, Su S K, Du Z L. Study on the structure of hypopharyngeal gland cells and secretory activity of worker honey bee (*Apis mellifera ligustica*). *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 1997, 23(1): 75-80. (in Chinese)
- [38] 张翠红, 崔为正, 郭延奎, 王彦文, 牟志美. 家蚕蛹-成虫变态期中肠和涎腺超微结构变化与功能. 昆虫学报, 2007, 50(8): 769-774.
- Zhang C H, Cui W Z, Guo Y K, Wang Y W, Mu Z M. Ultrastructure change and function of the midgut and salivary glands in *Bombyx mori* during the pupal-adult metamorphosis. *Acta Entomologica Sinica*, 2007, 50(8): 769-774. (in Chinese)

(责任编辑 毕京翠)