

# 王浆高产蜜蜂 (*A. m. ligustica*) 与喀尼鄂拉蜂 (*A. m. carnica*) 幼虫期蛋白质组比较

陈 健<sup>1,2</sup>, 李建科<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>郑州大学生物工程系, 郑州 450001; <sup>2</sup>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 (*A. m. ligustica*, 浆蜂) 与喀尼鄂拉蜂 (*A. m. carnica*, 喀蜂) 工蜂幼虫期进行蛋白质组比较, 以探明两蜂种幼虫期不同日龄蛋白质表达调控方面的异同。【方法】采用双向电泳对浆蜂与喀蜂工蜂幼虫期蛋白质组进行研究。【结果】在幼虫期 2 日龄, 浆蜂的蛋白表达谱为 283 个蛋白, 喀蜂为 152 个蛋白, 两蜂种共有蛋白点为 110 个, 其中 24 个点浆蜂表达量显著大于喀蜂, 15 个蛋白喀蜂表达量显著大于浆蜂, 而浆蜂特异蛋白为 173 个, 而喀蜂特异蛋白为 42 个; 幼虫 4 日龄时, 浆蜂总蛋白点数为 290 个, 喀蜂总蛋白点数为 240 个蛋白, 两蜂种共有蛋白点为 163 个, 其中 24 个点浆蜂表达量显著大于喀蜂, 15 个蛋白喀蜂表达量显著大于浆蜂, 而浆蜂特异蛋白为 126 个, 喀蜂特异蛋白为 77 个; 到达幼虫 6 日龄时, 浆蜂蛋白组含 236 个蛋白, 喀蜂蛋白质组含 180 个蛋白, 两蜂种共有蛋白点为 132 个, 其中 22 个点显示浆蜂表达量显著大于喀蜂, 11 个蛋白喀蜂表达量显著大于浆蜂, 而浆蜂特异蛋白为 104 个, 喀蜂特异蛋白为 48 个。【结论】在蜜蜂幼虫期浆蜂较喀蜂表达的蛋白总数和特有蛋白多, 说明浆蜂较喀蜂幼虫的基因表达和代谢更加旺盛。在 2 蜂种幼虫期表达的共有蛋白中, 其中一些蛋白的表达量存在差异, 而 2 蜂种在 3 个日龄所表达的特有蛋白的数和量也存在一定差异, 这些说明幼虫发育需要管家蛋白和不同发育阶段相应的特定蛋白来调控, 但管家蛋白和特有蛋白在 2 蜂种的表达模式存在差异。

**关键词:** 蜜蜂; 工蜂幼虫; 双向电泳; 蛋白质组

## Comparative Analysis of Proteome Complement between Worker Bee Larvae of High Royal Jelly Producing Bees (*A. m. ligustica*) and Carniolians (*A. m. carnica*) Bees

CHEN Jian<sup>1,2</sup>, LI Jian-ke<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001; <sup>2</sup>Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100093)

**Abstract:** 【Objective】This study is to compare the protein composition of the high royal jelly producing bee (*A. m. ligustica*) with that of carniolians (*A. m. carnica*) during their worker larval developmental stage. 【Method】The experiment was carried out by two-dimensional gel electrophoresis. 【Result】The results showed that significant higher number of total proteins (283) were detected in larvae of high royal jelly producing bees (Jelly bee) than those of carniolian bees (152) in 2-day old larvae. Among them 110 proteins were presented in both of the bee strains larvae, while 173 proteins were specific to larvae of Jelly bees, and 42 proteins were exclusive to carniolian larvae. While on the fourth day, a significant higher number of total proteins (290) were detected in larvae of Jelly bees than those of carniolian bees (240), 163 proteins resolved to both bees larvae, and 127 proteins were specific to Jelly bees and 77 proteins to carniolian bees. Until the sixth day, also a significant higher number of total proteins (236) were detected in larvae of Jelly bees than those of carniolian bees (180), 132 proteins were constantly expressed in two bees larvae, while

收稿日期: 2007-10-01; 接受日期: 2007-11-22

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重点项目 (2006BAD06B04, 2006BAD12B08-06) 和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (JBKY 0032007016CAAS) 和公益性行业科研专项 (nyhyzx07-041)

作者简介: 陈 健 (1982-), 男, 河南开封人, 硕士研究生, 研究方向为细胞生物学。Tel: 010-62591449; E-mail: chenjian815626@163.com。通讯作者李建科 (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

104 and 48 proteins are unique to Jelly bees and carniolian larvae, respectively. 【Conclusions】 It is tentatively concluded that the metabolic rate and gene expression of Jelly bees larvae is more higher than those of carniolian bees based proteins detected as total proteins and proteins specific to each stage of two strains of bee larvae. Proteins constantly expressed on 3 stages of larval development with some significant differences between two bee strains and, proteins unique to each stage expressed differently in term of quality and quantity, indicating that larval development need house keeping and specific proteins to regulate its growth at different development phages, but the expression mold is different between two strains in larval development.

Key words: Honeybee (*Apis mellifera*); Worker bees larva; Two-dimensional gel electrophoresis; Proteome

## 0 引言

【研究意义】王浆高产蜜蜂(浆蜂)是中国 20 世纪 90 年代成功培育的新蜂种,具有繁殖速度快,产浆能力强等优点,表型研究证明了浆蜂的产浆量明显高于普通未经选育的意大利蜜蜂(意蜂)<sup>[1-6]</sup>,并已证明蜂王浆高产显著是受遗传因素决定的。通过分析两个西方蜜蜂幼虫期发育蛋白质组的特点,比较其蛋白质表达谱的时空差异,对揭示不同蜂种幼虫发育生物学和揭示蜂王浆高产机理具有一定意义。【前人研究进展】在所有社会性膜翅目昆虫中,蜜蜂发育周期历时最短,对于工蜂来说,经历了 3 d 卵期,5.5 d 幼虫期,3 d 预蛹期,8~9 d 蛹期<sup>[7]</sup>。从孵化到化蛹,在短短不到 6 天内,幼虫体重能从大约 0.15 mg 增至 150 mg<sup>[8]</sup>,是蜜蜂发育的重要阶段。18 世纪以来,科学家们利用蜜蜂这个模式生物对社会性昆虫的极型分化现象进行了研究,发现同为受精卵的幼虫发育成蜂王或是工蜂不是由于遗传上原因造成的,而是营养调控的结果<sup>[9]</sup>。蜜蜂受精卵发育的幼虫摄取营养物质不同决定了它发育成工蜂还是蜂王,受精卵孵化成雌性幼虫后由工蜂饲喂,2.5~3.5 日龄(4 龄期)幼虫的发育处于极型分化阶段,如果此时幼虫被大量饲喂蜂王浆,则发育成为蜂王<sup>[10,11]</sup>,如果饲喂蜂蜜和花粉的混合物(蜂粮),它们就发育成工蜂;同样的雌性幼虫,如果被不间断地饲喂大量蜂王浆,就将发育成蜂王<sup>[11,12]</sup>。但到 5 龄期后极型分化过程不再逆转<sup>[9]</sup>。工蜂浆与王浆最重要的差别<sup>[13]</sup>之一是含糖量,王浆含糖量是 12%,而工蜂浆含糖量仅为 4%<sup>[9,14]</sup>;而且蜂王幼虫和工蜂幼虫被饲喂的次数也有着显著差异,蜂王幼虫被饲喂 1 600 次而工蜂幼虫仅被饲喂 150 次<sup>[15]</sup>。因此,蜂王与工蜂幼虫被饲喂的营养物质在质上与量上均存在差异,这对幼虫发育存在着一定程度的影响。蜜蜂作为有着社会行为的模式生物已经众所周知,近年来在分子水平上也有着大规模的研究。Chan 等<sup>[16]</sup>利用蛋白质的技术手段对血淋巴在蜜蜂发育期以及蜜蜂幼虫极型分化的关键期的变化进行研究,发现在幼虫阶段

和成蜂阶段、雄蜂和雌蜂以及工蜂和蜂王的血淋巴免疫蛋白组成含量有显著差异。蜜蜂幼虫发育时期,伴随者被饲喂碳水化合物化合物的增加,肝糖原的含量快速且大量的增加,结合在肝糖原上肝糖原合成酶也随之增加<sup>[17]</sup>。蜜蜂幼虫保持如此高的发育速度需要大量能量<sup>[18,19]</sup>;Shuel 等<sup>[20]</sup>测量了工蜂和蜂王幼虫在发育时期的耗氧量, Petz 等<sup>[21]</sup>用比较了不同日龄不同环境温度中的幼虫 CO<sub>2</sub> 代谢量,发现在温度升高时低日龄幼虫 CO<sub>2</sub> 产出较多,说明此时代谢率较高。蛋白质是一切生命活动的执行体<sup>[22,23]</sup>,近年来运用蛋白质组学方法研究蜜蜂也已兴起, Peiren 等<sup>[24]</sup>对蜜蜂毒液蛋白质组研究发现了 3 个新的蜂毒蛋白; Li 等<sup>[25]</sup>利用双向电泳技术研究了王浆储存期蛋白质组的变化;张兰等<sup>[26]</sup>对浆蜂卵期发育的蛋白质组进行了分析; Klenk 等<sup>[27]</sup>比较了不同日龄蜂王的受精囊腺蛋白质组得出不同蛋白浓度组成; Santos 等<sup>[28]</sup>通过研究哺育蜂的咽下腺分泌物蛋白质组,结果支持了分泌物中大多数蛋白都能在王浆中发现这一假说。【本研究切入点】尽管张兰等<sup>[26]</sup>对浆蜂工蜂卵期发育的蛋白质组进行了研究,但目前关于蜜蜂不同亚种间的幼虫期发育比较蛋白组研究的相关文献尚未见到。而蜜蜂基因组测序工作的完成,为蜜蜂蛋白质组学研究奠定了基础<sup>[29]</sup>。西方蜜蜂根据其 mtDNA 多态性可分为 3 种类型,而浆蜂 (*A. m. ligustica*) 与喀蜂 (*A. m. carnica*) 同属于北地中海及高加索型<sup>[30]</sup>,本研究则通过双向电泳(2-DE)方法比较两蜂种工蜂幼虫期不同日龄蛋白质组成差异。【拟解决的关键问题】对比同日龄不同蜂种间蛋白质组,探索蛋白质时空表达差异,以期阐明蜜蜂幼虫发育及王浆高产分子机理予以启示。

## 1 材料与方法

### 1.1 取样

浆蜂 (*A. m. ligustica*) 蜂王来自中国浙江省平湖。喀蜂 (*A. m. carnica*) 蜂王引自德国,并在中国农业科学院蜜蜂研究所饲养。

所有试验蜜蜂饲养在中国农业科学院蜜蜂研究所

实验蜂场。将蜂王连同一张空巢脾一同放入蜂王产卵控制器（仅能放 1 张巢脾，工蜂可以自由出入而蜂王无法通过的一种塑料框）中，使蜂王在巢脾上产卵 10 h 以供发育到 2 日、4 日、6 日工蜂幼虫时取样。10 h 时将巢脾由控制器中提出，蜂王置于其它巢脾上，再将已经产有蜂卵的巢脾（不含蜂王）放回控制器，一同放入蜂箱。蜂卵 3 d 后发育成为幼虫，幼虫发育到第 2、4、6 日龄时，分别取 60 只幼虫经生理盐水洗涤 3 次后立即放入  $-70^{\circ}\text{C}$  备用。

### 1.2 试剂

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)、十二烷基硫酸钠 (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、考马斯亮兰 (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、碘乙酰胺来自 Merck 公司。

### 1.3 蛋白提取

蛋白提取方法根据张兰等<sup>[28]</sup>的方法。每 1 mg 蜂幼虫中加入 10  $\mu\text{l}$  磷酸缓冲液 ( $32.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $2.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $400 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NaCl}$ , pH 7.6), 冰上研磨 20 min, 超声处理 2 min。 $4^{\circ}\text{C}$ , 12 000 g, 离心 10 min;  $4^{\circ}\text{C}$ , 15 000 g, 再离心 10 min。避开脂肪层取上清液放入另一离心管中, 沉淀中按照每 1 mg 幼虫加入 2  $\mu\text{l}$  上述磷酸缓冲液,  $4^{\circ}\text{C}$ , 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 幼虫加入 10  $\mu\text{l}$  蛋白裂解缓冲液 ( $8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  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), 冰上研磨 10 min, 超声 2 min。 $4^{\circ}\text{C}$ , 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%, 冰上静置 10 min 以上, 以沉淀蛋白并除去样品中的盐分。将此混合液在  $4^{\circ}\text{C}$ , 15 000 g, 离心 10 min, 共离心 2 次。弃去上清液, 沉淀中按每 1 mg 蜂幼虫加入 3.5  $\mu\text{l}$  上述的蛋白裂解缓冲液, 冰上研磨 5 min, 超声 2 min, 使混合液充分溶解, 用  $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH 调溶液 pH 至中性, 制成蛋白样品溶液, 直接使用或是一  $70^{\circ}\text{C}$  冷藏备用。

### 1.4 蛋白浓度测定

蛋白浓度按照 Bradford<sup>[31]</sup>改进法进行测定。使用

BSA 做标准曲线, 595 nm 波长处测定吸收值 (Beckman, spectrophotometer DU800)。

### 1.5 双向电泳 (2-DE)

将不同浓度的蛋白样品用蛋白裂解缓冲液 ( $8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  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) 稀释后再与上样水化液 ( $8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  尿素, 4% CHAPS, 0.001% 溴酚兰,  $65 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  DTT, 0.2% Bio-lyte pH 3~10) 按照 1:4 的比例充分混合, 取此混合液 410~420  $\mu\text{l}$  上样, 使得 3 个样品的上样量均为 420  $\mu\text{g}$ 。使用 17 cm IPG 胶条 (pH 3~10 线性), 在  $18^{\circ}\text{C}$  按以下程序进行第一向等电聚焦 (Protean IEF Cell system, Bio-Rad Hercules, CA, USA): 50V, 水化 14 h; 250V, 30 min 除盐 2 次; 1 000 V, 1 h 再次除盐; 9 000 V, 5 h 线性升压; 9 000 V, 60 000  $\text{V}\cdot\text{h}^{-1}$  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。平衡后 IPG 胶条转移到 1.0 mm 厚 12% T 的聚丙烯酰胺分离胶上, 15  $\mu\text{l}$  2-DE 蛋白分子量标准加在胶条的酸性端, 开始进行第二向 SDS-PAGE 电泳。第二向电泳采用 PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad Hercules, CA, USA) 恒流 25 mA/gel 进行。第二向电泳结束后, 浸泡入固定液中 (40% 乙醇, 10% 醋酸) 摇床固定 4 h 以上。然后将凝胶转入染色液 (CBB G-250 染色母液与甲醇 4:1 混合) 中进行染色 14 h 以上。

### 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)。每个蜂种同一日龄的双向电泳凝胶图谱, 选取 3 张重复性好的图谱逐一扫描得 3 次重复, 利用 PDQuest V 7.3.0 (Bio-Rad Hercules, CA, USA) 进行图象扫描、斑点检测和匹配分析。并用总密度方法 (total density in gel image) 对蛋白表达量进行均一化处理 (normalization)。对两个蜂种同一日龄根据 3 个重复凝胶上分别得出的两组蛋白表达量, 采用 ANOVA (Version 6.12, SAS Institute, Cary, N.C., USA) 的有参数邓肯法对表达量进行统计检验, 所有  $P < 0.05$  的为显著。

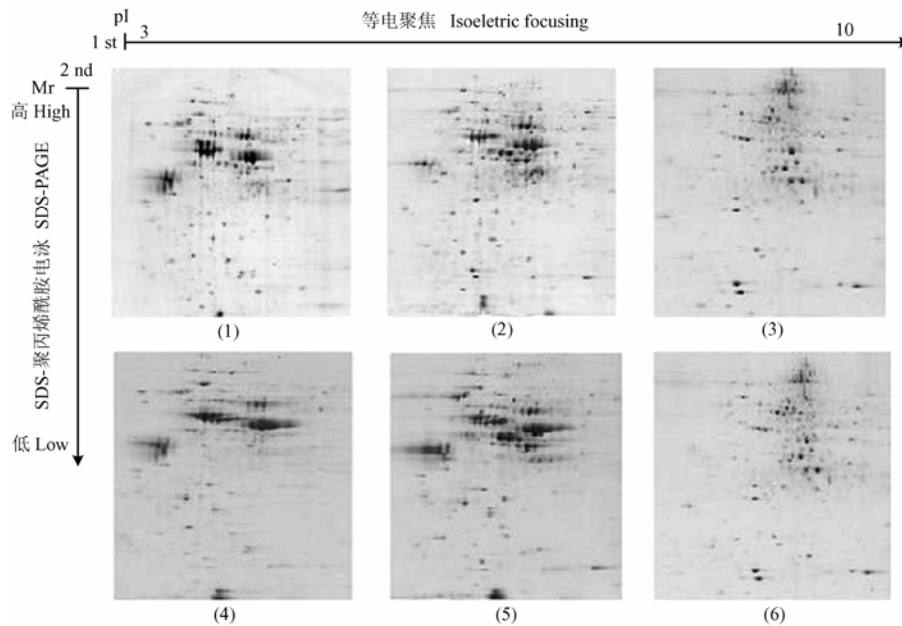
## 2 结果与分析

### 2.1 浆蜂与喀蜂工蜂幼虫期 2-DE 电泳图谱

对两蜂种幼虫期 2、4、6 日龄全蛋白质组表达谱

的分析, 浆蜂在 3 个发育阶段分别检测到的蛋白点数为 283、290、236 个, 而喀蜂 3 个相应日龄检测到的蛋白点数分别为 152、240、180 个。浆蜂在这 3 个发

育阶段所表达的蛋白质数量分别显著高于喀蜂相应的发育阶段 ( $P < 0.05$ ) (图 1)。这些蛋白的分子量在 12.2~88.2 kD, 等电点在 pI 4.00~9.24。



(1)、(2)、(3) 分别代表浆蜂 (*A. m. ligustica*) 幼虫期 2 日龄、4 日龄及 6 日龄蛋白表达图谱; 而 (4)、(5)、(6) 分别代表喀蜂 (*A. m. Carnica*) 幼虫期 2 日龄、4 日龄及 6 日龄蛋白表达图谱。每个样品上样 420  $\mu\text{g}$ , CBB G-250 染色  
(1)-(6) are protein profile corresponding to day 2, day 4 and day 6 of two honeybee strains, respectively. A 420  $\mu\text{g}$  of each sample were subjected to 2-DE and stained by CBB G-250

图 1 浆蜂 (*A. m. ligustica*) 与喀蜂 (*A. m. carnica*) 幼虫期发育 2-DE 蛋白表达图谱

Fig. 1 2-DE profile of worker bees larvae of high royal jelly producing honeybees (*A. m. ligustica*) and carniolian bees (*A. m. Carnica*) on the different development days

## 2.2 浆蜂与喀蜂工蜂 2 日龄幼虫期蛋白比较

在幼虫期 2 日龄时, 浆蜂和喀蜂幼虫的共有蛋白点数为 110 个, 分子量和等电范围分别为 13.14~94.00 kD 和 4.59~8.33 (图 2-A, 图 2-B)。共有点中有 24 个蛋白浆蜂的表达量显著大于喀蜂, 15 个蛋白的表达量为喀蜂显著高于浆蜂 ( $P < 0.05$ )。喀蜂的特异蛋白点 (42 个) 主要分布在分子量 20.00~132.6 kD 和等电点 4.70~7.60 的范围内, 其中有 37 个点集中在 35.00~60.00 kD; 而浆蜂幼虫 2 日龄特异蛋白点 (173 个) 的分子量为 12.16~93.72 kD, 等电点为 4.31~8.92。喀蜂特异蛋白点的表达量为 209.1~46 167.8  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (图 2-C), 浆蜂的表达量为 175.6~18 190.5.1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 其中 160 个点表达量集中在 175.6~4 475.6  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (图 2-D)。

## 2.3 浆蜂与喀蜂工蜂 4 日龄幼虫期蛋白比较

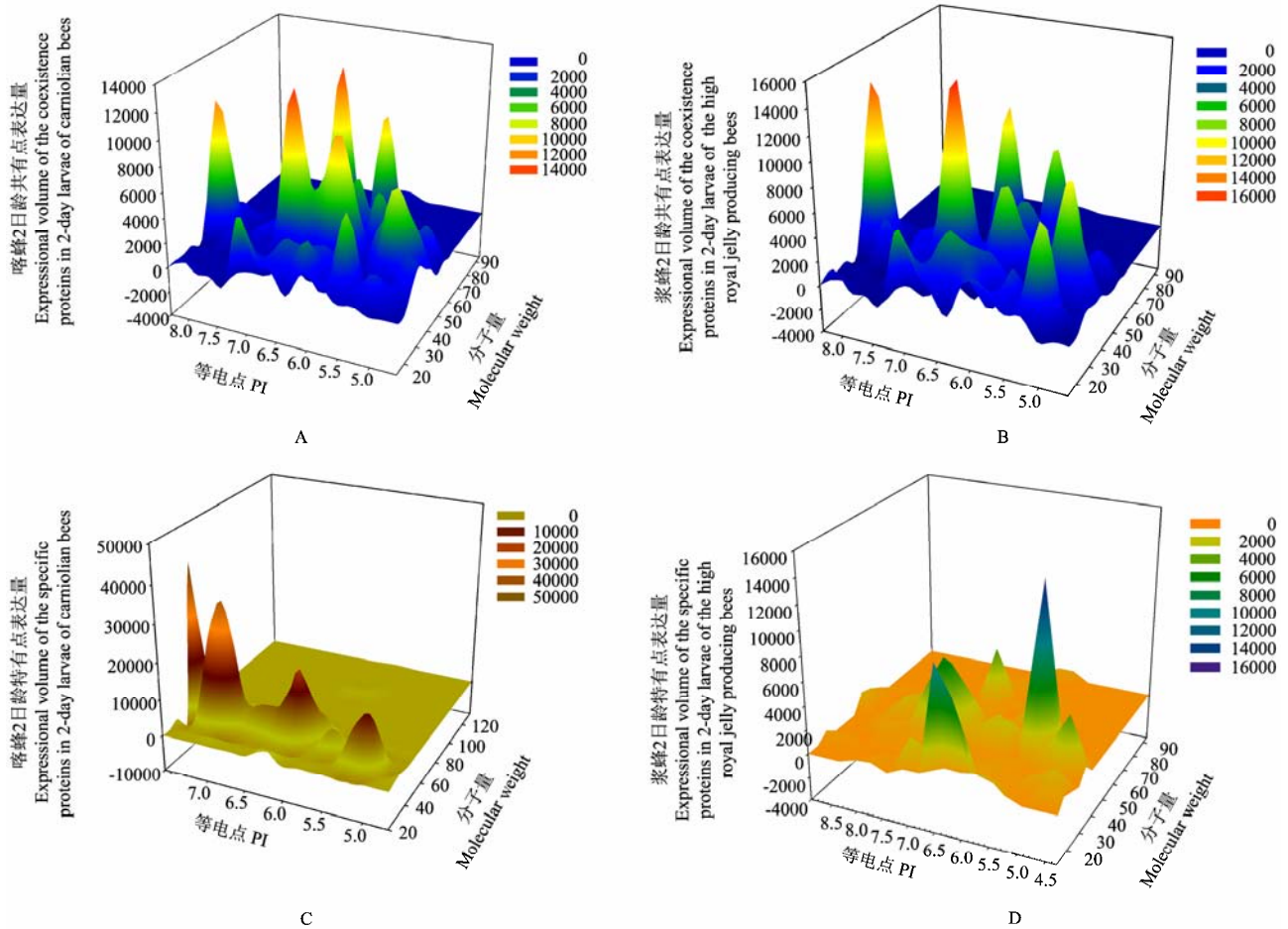
在幼虫 4 日龄时, 两蜂种共有的蛋白点数为 163 个 (分子量范围为 14.40~94.00 kD, 等电点为 4.73~9.33), 24 个点显示浆蜂表达量显著大于喀蜂, 15 个蛋白喀蜂表达量显著大于浆蜂 ( $P < 0.05$ , 图 3-A, B)。喀蜂在 4 日龄所表达的 77 个特异蛋白分子量为 14.15~132.60 kD, 等电点为 pH 4.55~9.02, 表达量为 85.8~9 519.7  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 其中 75 个点表达量集中在 110.6~4 800.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (图 3-C)。浆蜂在 4 日龄所表达的 126 个特异蛋白, 分子量为 12.16~95.85 kD, 等电点为 pH 4.36~9.55, 表达量为 80.9~13 774.9  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 其中 125 个点表达量集中在 170.2~6 372.3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (图 3-D)。

## 2.4 浆蜂与喀蜂工蜂 6 月龄幼虫期蛋白比较

在幼虫 6 日龄两蜂种共有的 132 个蛋白点中, 分子量为 14.40~94.00 kD, 等电点为 4.73~9.33, 其中

22 个点显示浆蜂表达量显著大于喀蜂, 11 个蛋白喀蜂表达量显著大于浆蜂 ( $P < 0.05$ , 图 4-A, B)。喀蜂在 6 日龄所表达的 48 个特异蛋白中, 分子量为 16.55~89.14 kD, 等电点为 4.41~8.29, 表达量为 171.5~

10 003.6  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 其中 45 个点表达量集中在 271.5~2 996.3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (图 4-C)。浆蜂在 6 日龄所表达的 104 个特异蛋白中, 分子量为 13.01~103.58 kD, 等电点为 4.36~9.80, 表达量为 181.5~4 020.4  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (图 4-D)。



A 和 B 分别代表喀蜂和浆蜂幼虫 2 日龄共有蛋白点表达量, C 和 D 分别代表喀蜂和浆蜂幼虫 2 日龄特有蛋白点表达量

A and B show well resolved proteins in both two subspecies 2-day old larvae, respectively; C and D show the specific proteins in 2-day old larvae of carniolian bees and the high royal jelly producing bees, respectively

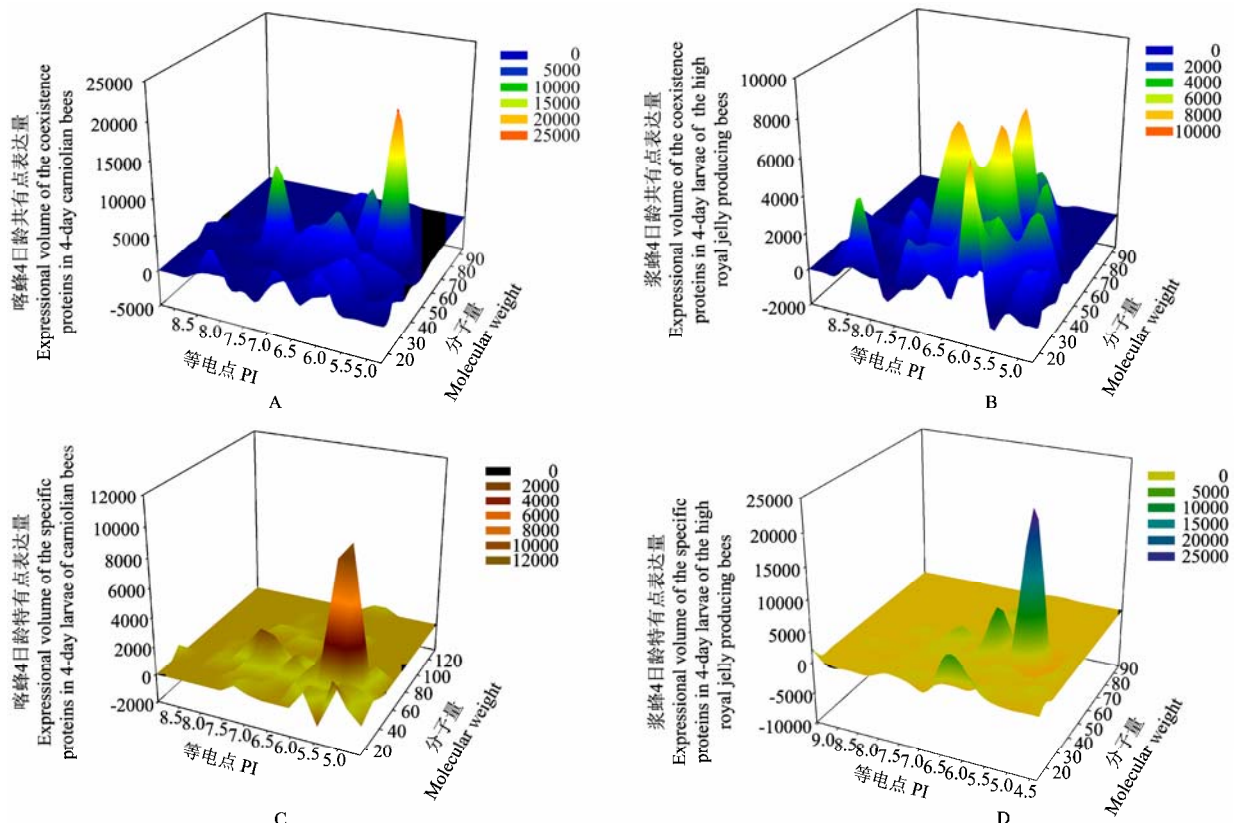
图 2 浆蜂 (*A. m. ligustica*) 与喀蜂 (*A. m. carnica*) 幼虫 2 日龄表达的蛋白质组三维图谱

Fig. 2 Three dimensional views of protein expression between two honeybee strains on 2-day old larvae

### 3 讨论

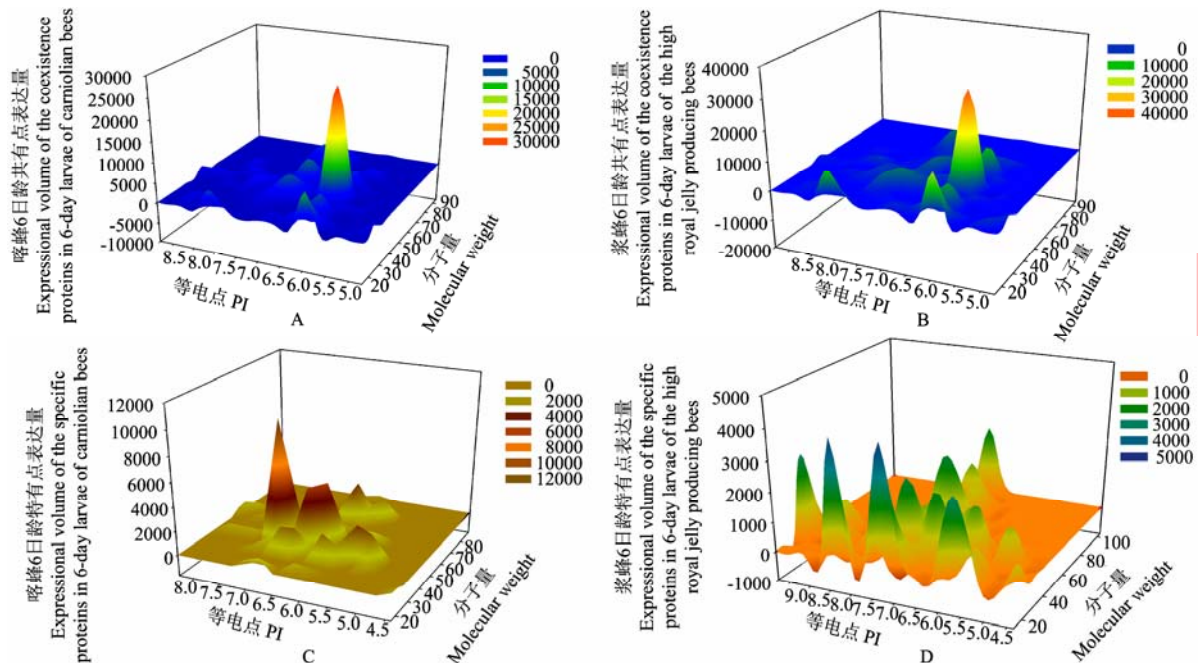
本研究旨在研究浆蜂和喀蜂两个西方蜜蜂品种不同幼虫发育期的蛋白质组的异同。结果表明, 浆蜂和喀蜂在 3 个发育日龄均表达一些共有蛋白, 这些蛋白可能是其发育所必需的管家蛋白, 而这些管家蛋白的表达模式也存在一定差异 (图 2-A, B)。遗传研究显示蜂群的产浆性状是可遗传的<sup>[32,33]</sup>, 浆蜂在 3 个日龄所表达的蛋白数量均较喀蜂显著增加, 表明浆蜂在幼

虫期的基因表达更为活跃。尽管浆蜂和喀蜂同属西方蜜蜂, 但其幼虫发育期的基因表达存在一定差异。两蜂种均在幼虫 4 日龄表达蛋白最多, 说明蜜蜂生长发育此阶段最旺盛, 基因表达最活跃, 代谢率、呼吸率和耗氧率较高, 这与工蜂幼虫在 48~96 h 时发育速度最快相一致<sup>[8]</sup>, 此时也正处在极型分化的逆转与不可逆转的过渡时期<sup>[11,12]</sup>, 此时所表达的某些蛋白也可能与其有关; 2 日龄表达的蛋白较少可能是与刚从卵孵化成幼虫, 此时的发育代谢速度较慢, 基因表达较少



A 和 B 分别代表喀蜂和浆蜂幼虫 4 日龄共有蛋白点表达量, C 和 D 分别代表喀蜂和浆蜂幼虫 4 日龄特有蛋白点表达量  
 A and B show well resolved proteins in both two subspecies 4-day old larvae, respectively; C and D show the specific proteins in 4-day old larvae of carniolian bees and the high royal jelly producing bees, respectively

图 3 浆蜂 (*A. m. ligustica*) 与喀蜂 (*A. m. carnica*) 幼虫 4 日龄表达的蛋白质组三维图谱  
 Fig. 3 Three dimensional views of protein expression of 4-day old larvae of two honeybee strains



A 和 B 分别代表喀蜂和浆蜂幼虫 6 日龄共有蛋白点表达量, C 和 D 分别代表喀蜂和浆蜂幼虫 6 日龄特有蛋白点表达量 A 和 B show well resolved proteins in both two subspecies 6-day old larvae, respectively; C and D show the specific proteins in 6-day old larvae of carniolian bees and the high royal jelly producing bees, respectively

图 4 浆蜂 (*A. m. ligustica*) 与喀蜂 (*A. m. carnica*) 幼虫 6 日龄表达的蛋白质组三维图谱  
 Fig. 4 Three dimensional views of protein expression of 6-day old larvae of two honeybee strains

有关；而 6 日龄工蜂幼虫即将进入蛹期，体型肥大，脂肪含量高，生长缓慢，血淋巴中的一些血蛋白和酶<sup>[34]</sup>，RNA 加工相关蛋白如一些 RNA 解旋酶、RNA 结合蛋白<sup>[35]</sup>，翻译相关的延伸因子-2、核糖体蛋白<sup>[35]</sup>，编码细胞色素氧化酶亚基的 *cox-I* 基因其 mRNA 等含量都较低<sup>[36]</sup>，这些生理生化特征与本研究结果 6 日龄蛋白数表达较少、代谢相对较不活跃相符合。而一些蛋白如载脂蛋白则可大量表达作为营养的储存库<sup>[37]</sup>，此期间成虫盘的形成也要表达大量蛋白<sup>[38,39]</sup>，上述情况都可能为幼虫化蛹提供了必要条件。

除此之外，浆蜂在 2 日龄，4 日龄，6 日龄所表达的特异蛋白点分别为 173，126，104 个（图 2-D，图 3-D，图 4-D）；喀蜂同日龄表达的特异蛋白点分别为 42，77，48 个（图 2-C，图 3-C，图 4-C）。由此看出浆蜂和喀蜂除管家蛋白之外，还需要一些特异蛋白来调控幼虫的发育，那么这些蛋白究竟与那些生物学特征有关，如蜂王浆高产，还待进一步研究。

目前国内外关于蜜蜂幼虫期蛋白质组的研究报道较少，本研究也只是初步对浆蜂与喀蜂幼虫发育期的蛋白质组对比分析，后期工作可以将两蜂种幼虫期发育期的蛋白利用质谱技术和数据库序列查询对蛋白表达谱中的蛋白进行功能鉴定，从而比较两蜂种在蛋白质表达方面的一些差异，为深入探明蜜蜂幼虫发育机理和解释蜂王浆高产的分子机理奠定基础。

## 4 结 论

幼虫期是蜜蜂生长发育的关键阶段，通过浆蜂与喀蜂不同发育日龄蛋白质组比较，浆蜂幼虫期的基因表达较喀蜂更加活跃，其中两蜂种都是 4 日龄表达蛋白最多。这些蛋白中共有蛋白为一些管家蛋白，它们是蜜蜂生长发育过程中所必需的，而在不同日龄所表达的特有蛋白表明不同发育时期的幼虫需要特定的蛋白来调控发育，而那些蛋白与蜂王浆高产性状有关还有待进一步研究。

## References

- [1] 陈世壁, 韩胜名. “浆蜂”生产性能考察试验总结. 中国养蜂, 1992, 43(3): 2-5.  
Chen S B, Han S M. Summary of the production capacity of the high royal jelly producing bee. *Apiculture of China*, 1992, 43(3): 2-5. (in Chinese)
- [2] 沈基楷, 肖体元. 浙农大 A 系意蜂生产性能考察试验报告. 中国养蜂, 1993, 44(1): 4-6.

- Shen J K, Xiao T Y. Experimental report on the production performance of the high royal jelly producing bee. *Apiculture of China*, 1993, 44(1): 4-6. (in Chinese)
- [3] 陈盛禄, 林雪珍. 浙农大 A 系意蜂王浆高产试验. 中国农业科学, 1995, 28(5): 89-93.  
Chen S L, Lin X Z. Experiment on the higher production royal jelly bee. *Scientia Agricultura Sinica*, 1995, 28(5): 89-93. (in Chinese)
- [4] 徐祖荫, 邵峰泉, 李上星, 陈学晴. 西方蜜蜂蜜浆高产杂交优势利用研究. 中国养蜂, 2000, 51(1): 10-12, 18.  
Xu Z Y, Shao F Q, Li S X, Chen X Q. Study on utilizing of the cross-breed in higher honey and royal jelly production western honeybees (*Apis mellifera* L.) (I). *Apiculture of China*, 2000, 51(1): 10-12, 18. (in Chinese)
- [5] 徐祖荫, 邵峰泉, 张瑞文, 李江生, 李宏清, 赵伟亚, 陈学晴. 西方蜜蜂蜜浆高产杂交优势利用研究(二). 中国养蜂, 2001, 52(2): 9-11.  
Xu Z Y, Shao F Q, Zhang R W, Li J S, Li H Q, Zhao W Y, Chen X Q. Study on utilizing of the cross-breed in higher honey and royal jelly production western honeybees (*Apis mellifera* L.) (II). *Apiculture of China*, 2001, 52(2): 9-11. (in Chinese)
- [6] 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: 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: 926-932. (in Chinese)
- [7] Wheeler G C, Wheeler J. Larvae of the social hymenoptera. In: Hermann H R. *Social Insects*. Vol 1. New York: Academic Press, 1979: 287-338.
- [8] Wang D I. Growth rates of young queen and worker honeybee larvae. *Journal of Apicultural Research*, 1965, 4: 3-6.
- [9] Barchuk A R, Cristino A S, Kucharski R, Costa L F, Simões Z L P, Maleszka R. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Developmental Biology*, 2007, 7: 70-88.
- [10] Woyke J. Correlations between the age at which honeybee rood was grafted, characteristics of the resultant queens and results of insemination. *Journal of Apicultural Research*, 1971, 10: 455-465.
- [11] Jung-Hoffman I. Die determination von Köningin und Arbeiterin der Honigbiene. *Zoologie Bienenforsch*, 1966, 8: 296-322.
- [12] Page R, Peng C. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology*, 2001, 36: 695-711.
- [13] Rembold H. Biologically active substances in royal jelly. *Vitamins & Hormones*, 1965, 23: 359-382.

- [14] Pereboom J J M. The composition of larval food and the significance of exocrine secretions in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Insectes Sociaux*, 2000, 47: 11-20.
- [15] Lindauer M. Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 1952, 34: 299-345.
- [16] Chan Q W, Howes C G, Foster L J. Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2006, 5: 2252-2262.
- [17] Vardanis A. Glycogen synthetase of bee larvae utilization of native primer and the effect of glucose 6-phosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, 1967, 242(10): 2306-2311.
- [18] Stern D L, Emlen D J. The developmental basis for allometry in insects. *Development*, 1999, 126: 1091-1101.
- [19] Kleinhenz M, Bujok B, Fuchs S, Tautz J. Hot bees in empty broodnest cells: heating from within. *Journal of Experimental Biology*, 2003, 206: 4217-4231.
- [20] Shuel R W, Dixon S E. Respiration in developing honeybee larvae. *Journal of Apicultural Research*, 1968, 7: 11-19.
- [21] Petz M, Stabentheiner A, Crailsheim K. Respiration of individual honeybee larvae in relation to age and ambient temperature. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic and Environmental Physiology*, 2004, 174: 511-518.
- [22] Nowak R. Entering the postgenome era. *Science*, 1995, 270: 368-369.
- [23] Chait B T. Trawling for proteins in the post-genome era. *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 1544.
- [24] 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): 1-5.
- [25] 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): 73-80.
- [26] 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)
- [27] Klenk M, Koeniger G, Koenige N, Fasold H. Proteins in spermathecal gland secretion and spermathecal fluid and the properties of a 29 kD a protein in queens of *Apis mellifera*. *Apidologie*, 2004, 35: 371-381.
- [28] 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(1): 85-91.
- [29] The Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 2006, 443: 931-949.
- [30] Franck P, Garnery L, Solignac M, Cornuet J-M. The origin of West European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*) new insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution*, 1998, 52, 1119-1134.
- [31] 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.
- [32] 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)
- [33] 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: 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: 547-554.
- [34] Elekonich M M, Jez K, Ross A J, Robinson G E. Larval juvenile hormone treatment affects pre-adult development, but not adult age at onset of foraging in worker honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 2003, 49: 359-366.
- [35] Evans J D, Wheeler D E. Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biology*, 2000, 2(1): 1-6.
- [36] Corona M, Estrada E, Zurita M. Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*, 1999, 202: 929-938.
- [37] Robbs S L, Ryan R O, Schmidt J O, Keim P S, Law J H. Lipophorin of the larval honeybee, *Apis mellifera* L. *Journal of Lipid Research*, 1985, 26: 241-247.
- [38] Truman J W, Riddiford L M. The origins of insect metamorphosis. *Nature*, 1999, 410: 447-52.
- [39] Truman J W, Riddiford L M. Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects. *Annual Review of Entomology*, 2002, 47: 467-500.