

# 原种意大利蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 与其王浆高产品系工蜂蛹期头部发育差异蛋白质组分析

郑爱娟<sup>1,2</sup>, 房宇<sup>1</sup>, 冯毛<sup>1</sup>, 吴静<sup>1</sup>, 宋飞飞<sup>1</sup>, 李建科<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093; <sup>2</sup>中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081)

**摘要:** 【目的】对原种意大利蜜蜂(意蜂)和原种意大利蜜蜂的王浆高产品系(浆蜂)工蜂蛹期头部的蛋白质组进行比较,以探明浆蜂和意蜂3个日龄(13、15、17日龄)蛋白质表达调控方面的差异,为阐明蜜蜂发育生物学提供一定理论基础。【方法】采用双向电泳建立浆蜂和意蜂3个日龄蛹期头部蛋白质组表达谱,获得图谱中蛋白质的种类、表达量、等电点和分子量等信息,并通过质谱分析、数据库检索,鉴定部分差异蛋白。【结果】在13日龄蛹头部,浆蜂表达279个蛋白,意蜂表达268个蛋白,浆蜂和意蜂共有蛋白为212个,而浆蜂和意蜂的特异蛋白分别为67个和56个;到15日龄时,浆蜂表达296个蛋白,意蜂为277个,浆蜂和意蜂共有蛋白点为203个,浆蜂特异蛋白点为93个,意蜂特异蛋白点为74个;到17日龄蛹时,浆蜂蛋白质组有340个蛋白点,而意蜂则有279个蛋白点,浆蜂和意蜂共有蛋白点为246个,浆蜂的特异蛋白点为94个,意蜂特异蛋白点为33个。对部分差异蛋白质进行质谱分析后,鉴定出11个蛋白质。对已鉴定蛋白质表达量聚类分析,结果聚为2类:表达量上调的分别是微管蛋白、肌动蛋白88F、ATP合成酶、谷胱甘肽S-转移酶S1、精氨酸激酶、热激蛋白、蛋白酶体2亚基、泡液ATP合成酶催化亚基和转录起始因子5A;表达量下调的蛋白质为过氧化物氧化还原酶2.540。【结论】浆蜂经过蜂王浆高产的选育,表达的蛋白质种类比意蜂增加。随着日龄的增长,大多数与细胞骨架、抗氧化相关和代谢相关的蛋白质显著上调表达,表明工蜂蛹头部的王浆腺和唾液腺等组织在生长发育,新陈代谢加强以及神经系统逐渐重塑。这将对全面理解浆蜂和意蜂蛹期发育规律奠定基础。

**关键词:** 原种意大利蜜蜂; 王浆高产蜜蜂; 双向电泳; 蛋白质组; 蛹期

## Proteome Comparison Between Worker Pupal Head of Native Italian Honeybee (*Apis mellifera* L.) and Higher Royal Jelly Producing Strain

ZHENG Ai-juan<sup>1,2</sup>, FANG Yu<sup>1</sup>, FENG Mao<sup>1</sup>, WU Jing<sup>1</sup>, SONG Fei-fei<sup>1</sup>, LI Jian-ke<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093; <sup>2</sup>Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** 【Objective】To investigation into the differentially expressed proteins between the higher royal jelly producing (HRJB) and the native Italian honeybee (NIB) (*Apis mellifera* L.), the proteome profilings of the worker pupal head of the two honeybee strains were compared on 3 time-points (day 13, 15, 17) for providing a theoretical principle of clarifying honeybee developmental biology. 【Method】Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was employed to establish the proteomic map of the worker pupal head of the two honeybee strains on 13, 15 and 17 days, then the protein expression abundance, molecular weight and pI was obtained. Part of differentially expressed proteins was identified by analysis of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) and database research. 【Result】A total of 279, 296 and 340 proteins were detected on 3 time-points in HRJB, and 268, 277 and 279 were observed in NIB, respectively. A significantly

收稿日期: 2009-11-11; 接受日期: 2010-01-15

基金项目: 国家蜜蜂产业技术体系(NYCYTX-43)、公益性行业科研专项(nyhyzx07-041)、国家自然科学基金(30972148)

作者简介: 郑爱娟, 助理研究员, 博士研究生。Tel: 010-62591449; E-mail: zhengaijuan@caas.net.cn。通信作者李建科, 教授, 博士。Tel: 010-62591449; E-mail: apislijk@126.com

higher protein spot numbers were observed in HRJB than those in NIB. Two hundred and twelve proteins were presented in the worker pupal head of these two bees on day 13, 67 proteins were specific in the worker pupal head of HRJB and 56 proteins were exclusive to NIB. While on day 15, 203 shared proteins and 93, 74 unique proteins were detected in HRJB, NIB, respectively. Until day 17, 246 proteins were resolved in the head of both bees strains in the pupal period, 94 and 33 proteins were found unique to the worker pupal head of the HRJB and NIB, respectively. During the determination of PMF, 11 proteins were unambiguously identified. Hierarchical cluster analysis divided the 11 proteins into two categories, i. g. tubulin, actin 88F, ATP synthase, glutathione S transferase S1, arginine kinase, heat shock protein, proteasome 2 subunit, vacuolar ATP synthase catalytic subunit A and eukaryotic translation initiation factor 5A were up-regulated their expression, while only peroxiredoxin 2 540 was down-regulated in the head during the pupal period in both strains. 【Conclusion】 The HRJB and NIB have significant differences in protein expression in the head during the pupal development. The increased numbers of total and specific proteins expressed in the HRJB compared with that in the NIB suggested the significant change in the pupal development in the two bee strains. Furthermore, altered expression of antioxidant, metabolism and cytoskeleton confirmed that the development and metabolism of salivary gland and hypopharyngeal gland are accelerated and the nervous system is restructured during the pupal period. Finally, the data of proteomic analysis have contributed to the well understanding of the function or roles of proteins towards the development of honeybee worker pupal head of each type.

**Key words:** native Italian honeybee; higher royal jelly producing honeybee; two-dimensional gel electrophoresis; proteome; pupae

## 0 引言

【研究意义】原种意大利蜜蜂的王浆高产品系（浆蜂）的培育成功对中国和世界的蜂王浆产业做出了很大贡献，它由原种意大利蜜蜂（*Apis mellifera* L.）（意蜂）经系统选育后在蜂王浆生产能力上表现出独特的优势<sup>[1-3]</sup>。浆蜂和意蜂在体形、体色、卵重、形态结构及蜂蜜产量等各方面都具有相同的特性，仅在蜂王浆产量上具有明显差异<sup>[4-6]</sup>，但国内外关于浆蜂蛹期生长发育研究的报道较少。通过分析浆蜂和意蜂工蜂蛹期头部不同日龄发育蛋白质组的特点，比较其蛋白质表达谱的时空差异，寻找浆蜂和意蜂在 3 个日龄间的差异蛋白，并分析这些特异蛋白在浆蜂和意蜂不同日龄发育过程中的功能，可为进一步认识蛹期发育的分子机理提供参考。【前人研究进展】蜜蜂以群体为单位生存、发展，有蜂王、雄蜂和工蜂三种级型，其发育均经历卵、幼虫、蛹及成虫 4 个阶段<sup>[7]</sup>。在蛹期，蜜蜂进行内部器官改造和分化，形成成虫器官<sup>[8]</sup>，在此变态阶段为了适应从幼虫期到成虫期的感官和运动系统的变化，幼虫的神经系统将完全重新“塑造”<sup>[9]</sup>。蛹期中肠内酸性磷酸酶能促进幼虫上皮细胞组织解体，即在幼虫后期酸性磷酸酶活性最高，而白色复眼蛹期活性最低，从而调控幼虫向蛹的分化<sup>[10]</sup>。随着蛹的发育，蜜蜂复眼和身体表皮着色由浅及深，由白色变成棕色，最后发育成黑色。在此过程中，酚氧化酶原随发育表达逐渐升高，以满足骨骼的黑化和分化

的需要<sup>[11]</sup>。对蛹期激素分泌和调控机理的研究表明，蛹期的主要蜕变激素为蜕皮类固醇 Makisterone A，它在蜂王产卵后 15 天分泌量达到高峰期<sup>[12]</sup>。蜕皮类固醇通过调控表皮蛋白 AmelCPR14 基因的转录与表达，以满足分化和羽化成虫表皮的需要，从而调控蛹期的发育<sup>[13]</sup>。此外，外界环境对蛹期发育也有较大影响。温度会影响蜂蛹的发育，最终导致其成年蜂的社会性行为发生变化<sup>[14-15]</sup>，而温度为 34.5℃（±0.5℃），相对湿度为 40%—85%时对意蜂蛹发育历期无显著影响<sup>[16]</sup>。【本研究切入点】对于蛋白质的研究，国内外大多是对单一某种活性蛋白的研究，尚未见文献报道采用蛋白质组学方法对蜜蜂蛹期发育规律的研究。而蛋白质组学是对有机体或细胞中的蛋白质进行全方位研究，通过两蜂种蛹期发育蛋白质组学和差异蛋白质组学，以整体的视角阐述蜜蜂生命活动的分子机制。

【拟解决的关键问题】对浆蜂和意蜂在 3 个日龄工蜂蛹期头部蛋白质组进行比较，探索浆蜂和意蜂在不同日龄工蜂蛹期头部蛋白质表达差异，进一步分析这些差异蛋白质在蛹期发育过程所行使的生物学功能，以为阐明蜜蜂工蜂蛹期发育分子机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 化学试剂

固相 pH 梯度（IPG）胶条（pH4—7 线性）、蛋白分子量标准、Bio-lyte（pH4—8）、矿物油均为伯乐公司产品。十二烷基硫酸钠（SDS）、甘油均为 Sigma

公司产品。Tris 碱、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、溴酚兰、考马斯亮兰 (CBB) G-250、尿素、硫脲、过硫酸铵 (AP)、CHAPS、牛血清白蛋白 (BSA)、DTT、甘氨酸为 Amresco 公司产品。琼脂糖为 Solarbio 公司产品。碘乙酰胺购自 Applichem 公司。

## 1.2 取样

2008 年 6—9 月, 选择产卵盛期的意蜂和浆蜂各 3 群, 适当紧缩群势, 并进行奖励饲喂, 上午 9 点分别将蜂王放在蜂王控制器中的空脾上, 6 h 后放出蜂王, 将产卵的工蜂脾放在蜂群中孵化。每群蜂分别重复控制蜂王 3 次, 分别在第 13、15、17 日龄取其头部立即放入  $-70^{\circ}\text{C}$  备用。

## 1.3 蛋白提取, 蛋白浓度测定及双向电泳 (2-DE)

蛋白提取和双向电泳方法根据 Li 等<sup>[17]</sup>报道的方法。制成的蛋白样品溶液, 直接使用或是  $-70^{\circ}\text{C}$  冷藏备用。蛋白浓度按照 Bradford<sup>[18]</sup>方法进行测定。使用 BSA 做标准曲线, 595 nm 波长处测定吸收值 (Beckman, spectrophotometer DU800)。

## 1.4 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, 500 dpi 分辨率, 全彩)。浆蜂和意蜂每个日龄的双向电泳凝胶图谱, 选 3 张重复性好的逐一扫描得 3 次重复, 之后利用 PDQuest V 8.0.1 (Bio-Rad Hercules, CA, USA) 进行图像扫描、斑点检测和匹配分析。并用所有检出点的总浓度方法 (total quantity in valid spots) 对蛋白表达量进行均一化处理 (normalization)。用 SAS 软件 (Version 6.12, SAS Institute, Cary, NC, USA) 对数据进行统计分析, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和邓肯氏多重比较, 显著水平为  $P < 0.05$ 。共有点和特有点表达量总体分布趋势三维图, 采用 SIGMA plot 软件分析。

## 1.5 质谱鉴定与蛋白质分类

切割蛋白质点置于 Eppendorf 管中, 进行胶内蛋白质酶解后, 所得的肽段通过 Bruker 质谱仪进行分析, 获取蛋白样品的肽质量指纹图, 最后通过在线 MASCOT ([http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)) 软件进行蛋白质功能鉴定。鉴定参数为: 数据库 (database) 为 [NCBI, SWISS-PROT]; 未水解的酶切位点数 (max missed cleavages) 允许有 1 个不完全裂解位点; 固定修饰 (fixed modifications) 为 [carboxymethyl(C)]; 可变修饰 (variable modifications) 是氧化形式 [oxidation (M)]; 离子选择 (mass values) MH+ 和单同位素 (monoisotopic); 肽片段质量数最

大容许误差范围 (peptide mass tolerance)  $\pm 0.2$  Da, 被鉴定蛋白质得分大于 82 分者 ( $P < 0.05$ ), 该蛋白质才算鉴定。搜索 UniProt 数据库 (<http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>) 查出已鉴定蛋白质功能, 并根据生物功能分类。

## 1.6 聚类分析

采用 Cluster 3.0 对已鉴定的差异蛋白质表达量进行层次聚类分析, 应用 TreeView 软件将聚类结果转化为图像文件。

# 2 结果

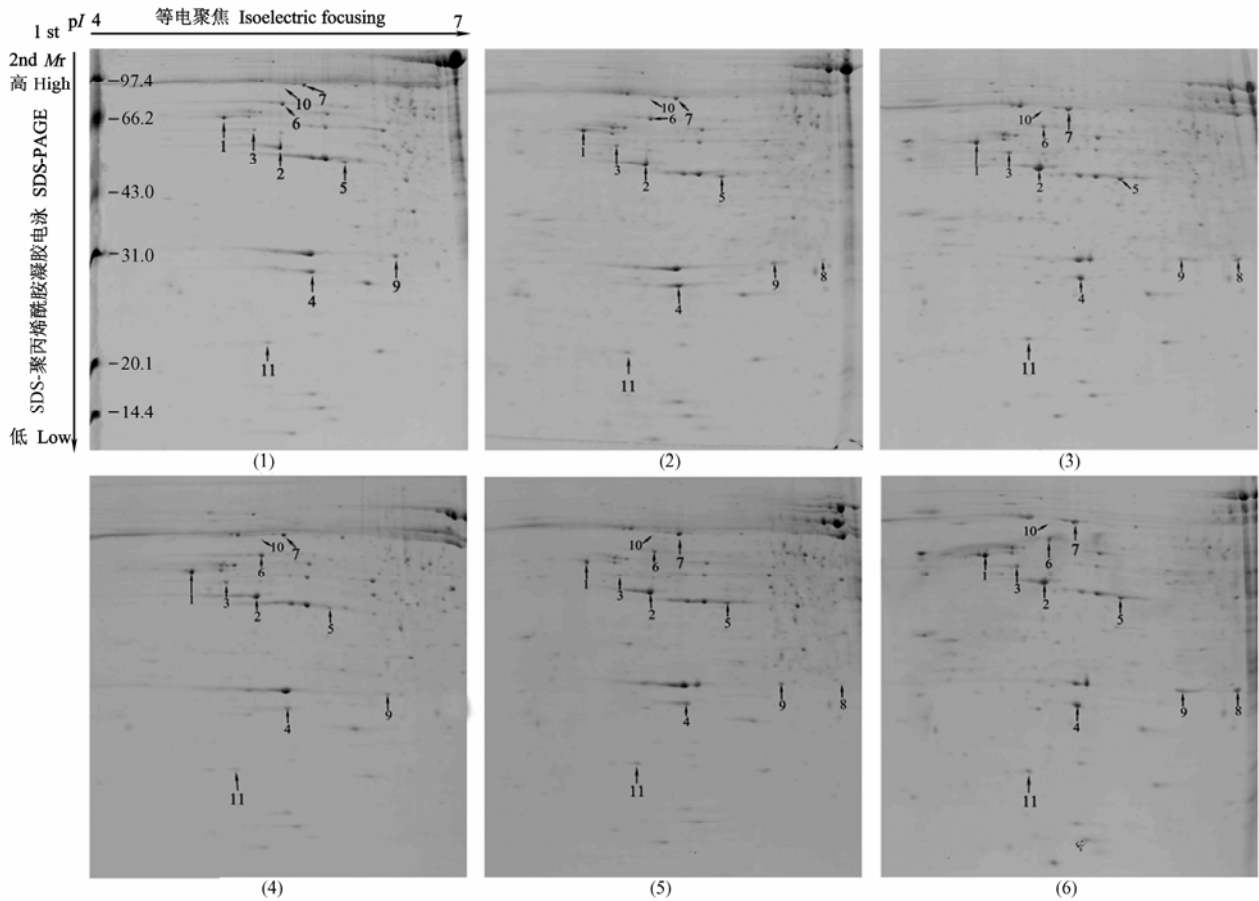
## 2.1 浆蜂和意蜂工蜂蛹期头部蛋白质表达图谱分析

图 1 是 3 次具有很好重复性的浆蜂和意蜂工蜂蛹在 13、15、17 日龄时头部蛋白质组代表图谱之一, 每张图谱用 PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad Hercules, CA, USA) 采用相同的参数 (灵敏度 10.04, 尺寸比例 6) 分析, 结果显示, 两蜂种不同日龄可检测到的蛋白具有相似的分子量 (12.3—102.84 kD) 和等电点 (4.07—6.8) 范围。浆蜂在 3 个日龄分别检测到的蛋白点数为 279、296、340 个, 3 个日龄共有蛋白点数为 189 个; 而意蜂在 3 个相应日龄分别检测到的蛋白点数为 268、277、279 个, 3 个日龄共有蛋白点数为 164。浆蜂和意蜂 3 个日龄共有表达蛋白点数为 136 个, 这些蛋白的分子量范围为 12.3—93.54 kD, 等电点范围为 4.21—6.8。

每个日龄浆蜂表达的蛋白总数均显著高于意蜂相应日龄表达的蛋白点总数 (图 2); 从 3 个日龄表达共有蛋白点数来看, 浆蜂也显著高于意蜂; 无论是浆蜂还是意蜂表达蛋白点数均随着日龄增长而增加, 但是 136 个蛋白在两蜂种和不同日龄均稳定表达。

## 2.2 浆蜂和意蜂工蜂 13 日龄蛹头部蛋白质组比较

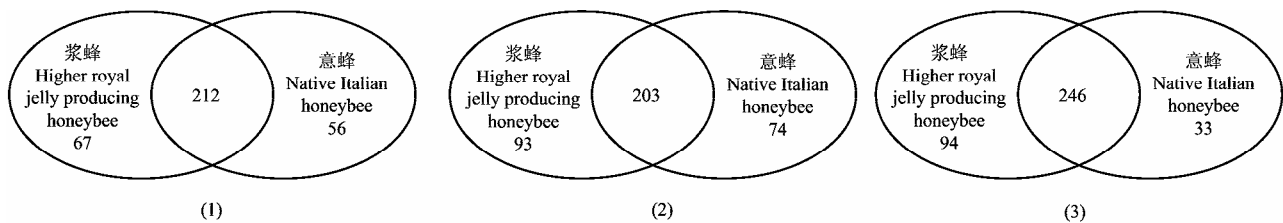
13 日龄时, 浆蜂和意蜂的共有蛋白点数为 212 个 (分子量范围为 15.61—94 kD, 等电点范围为 3—6.82) (图 3-A, 图 3-B), 共有蛋白点占浆蜂所表达蛋白点总数的 75.99%, 占意蜂所表达蛋白点总数的 79.10%。其中 16 个蛋白点浆蜂的表达量显著高于意蜂, 48 个蛋白点意蜂的表达量显著高于浆蜂 ( $P < 0.05$ )。浆蜂特异表达的蛋白数为 67 个, 主要分布在分子量 15.32—87.17 kD 和等电点 4.01—6.73 范围内 (图 4-A), 这些点表达量为  $(104-4\ 844.1) \times 10^{-6}$  (图 3-C); 而意蜂 13 日龄所表达的 56 个特异蛋白分子量为 16—102.84 kD, 等电点为 4.16—6.78 (图 4-B), 表达量在  $(195.5-7\ 711) \times 10^{-6}$  范围内 (图 3-D)。



(1)、(2)、(3) 分别代表 13 日龄、15 日龄、17 日龄浆蜂工蜂蛹头部蛋白图谱；(4)、(5)、(6) 分别代表 13 日龄、15 日龄、17 日龄意蜂工蜂蛹头部蛋白图谱。每个样品上样量 450 μg, CBB G-250 染色。点 1-11 为已鉴定的蛋白点  
 (1), (2) and (3) are protein profiles of the worker pupal head of the higher royal jelly producing honeybee on day13, 15 and 17, respectively. (4), (5), (6) are protein profiles of the worker pupal head of the native Italian honeybee on day13, 15 and 17, respectively. 450 μg each sample was subjected to 2-DE and stained by CBB G-250. Spot 1-11 are protein spots subjected to functional identification

图 1 3 个日龄浆蜂和意蜂工蜂蛹期头部 2-DE 蛋白图谱

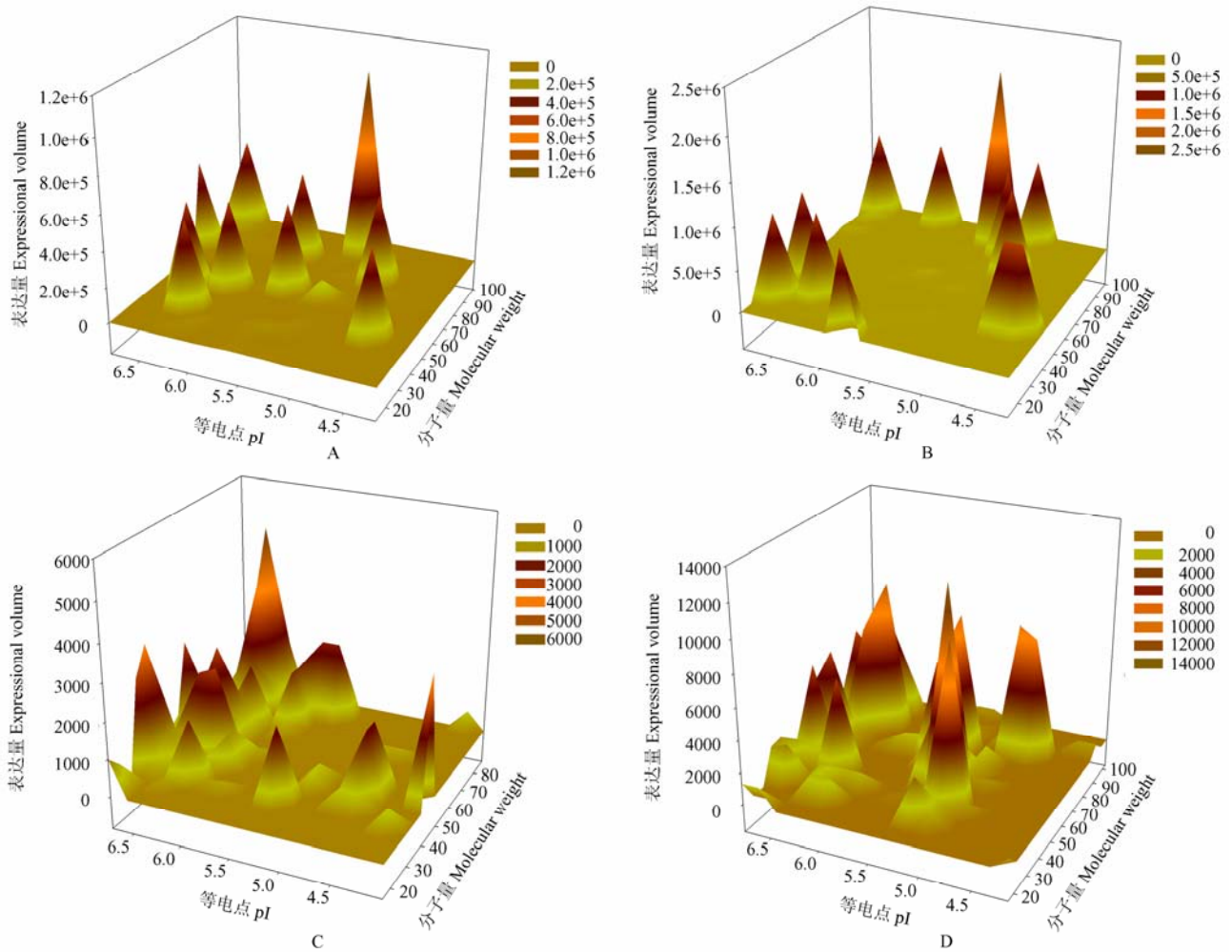
Fig. 1 2-DE proteome profile of the worker pupal heads of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee on day 13, 15 and 17



(1)、(2) 和 (3) 分别是浆蜂与意蜂在 13 日龄, 15 日龄和 17 日龄共有和特异表达蛋白数目  
 (1), (2) and (3) show the number of shared proteins and unique proteins of the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee on day13, 15 and 17, respectively

图 2 3 个日龄浆蜂与意蜂工蜂蛹期头部共有蛋白和特异蛋白数文氏图

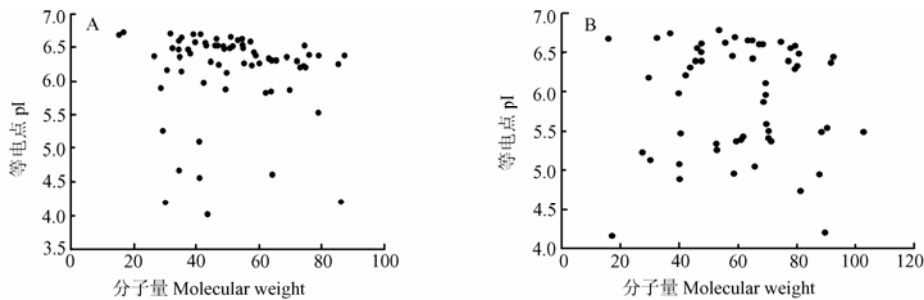
Fig. 2 Venn diagrams of shared proteins and unique proteins of the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee on day 13, 15 and 17



A 和 B 分别代表浆蜂与意蜂 13 日龄共有蛋白三维图谱，C 和 D 分别代表浆蜂与意蜂 13 日龄特异蛋白三维图谱。三坐标轴分别代表等电点、分子量和蛋白表达量  
 A and B represent the shared proteins expressed both in the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee on day 13, respectively. C and D represent the unique proteins expressed in the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee on day 13, respectively. Three axes refer to pI, molecular weight and expression abundance, respectively

图 3 浆蜂与意蜂工蜂蛹期头部 13 日龄蛋白质组三维图谱

Fig. 3 Three dimensional views of protein expression in the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee on day 13



A 和 B 分别代表浆蜂与意蜂 13 日龄特异蛋白散点图，x 轴代表分子量，y 轴代表等电点  
 A and B represent the unique proteins expressed in the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee on day 13, respectively. Two axes refer to pI and molecular weight, respectively

图 4 浆蜂与意蜂工蜂蛹期头部 13 日龄表达的特异蛋白质散点图

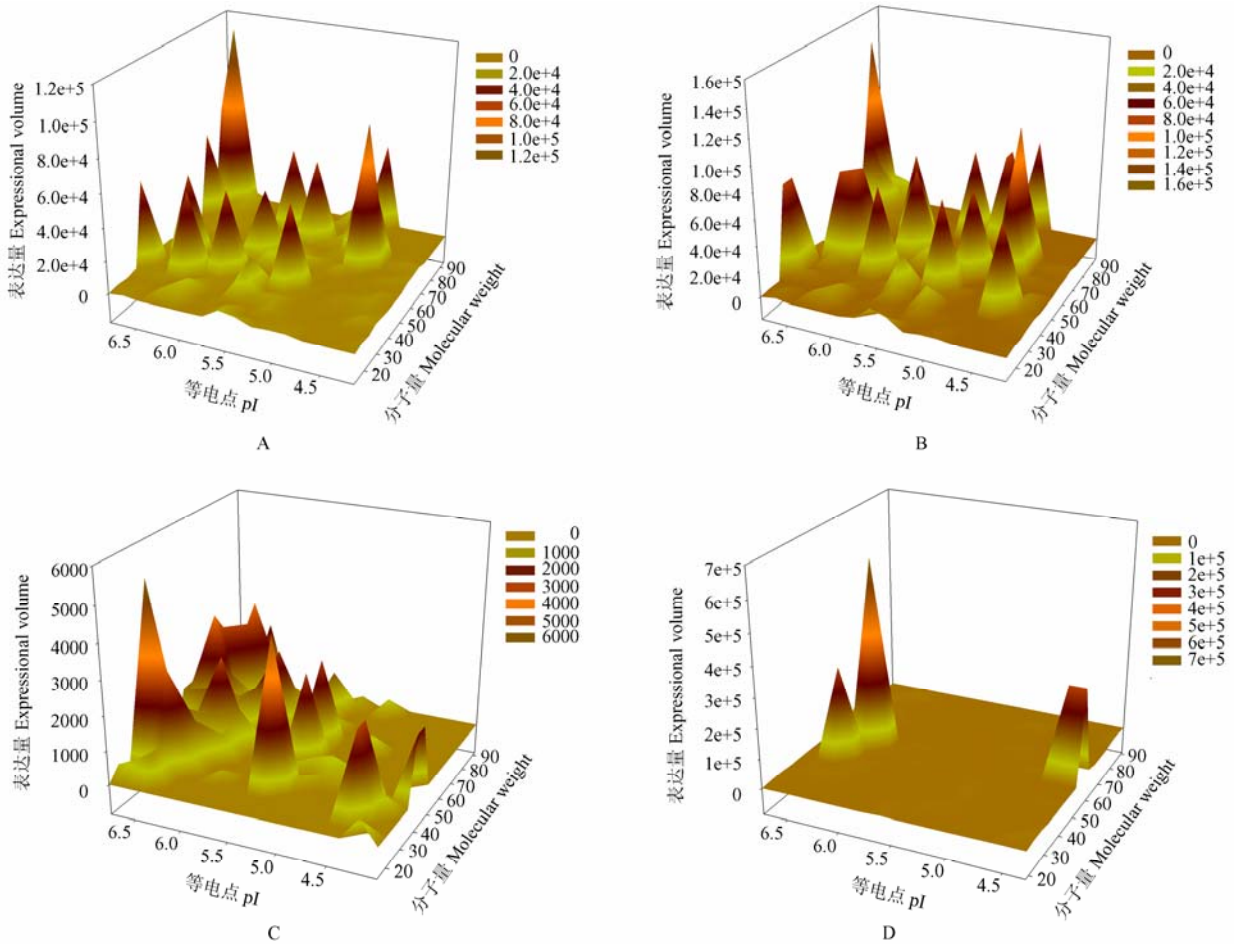
Fig. 4 Scatter plots on unique proteins expressed in the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee on day 13

2.3 浆蜂和意蜂工蜂 15 日龄蛹头部蛋白组比较

15 日龄时,浆蜂和意蜂共有蛋白点数为 203 个(分子量为 12.3—93.76 kD, 等电点为 4.16—6.8)(图 5-A, 图 5-B)。共有蛋白占浆蜂所表达蛋白点总数的 68.58%, 占意蜂所表达蛋白点总数的 73.29%。其中 14 个蛋白点浆蜂的表达量显著高于意蜂, 54 个蛋白点意蜂的表达量显著高于浆蜂 ( $P<0.05$ )。浆蜂在 15 日龄表达 93 个特异蛋白, 分子量为 14.44—91.76 kD, 等电点为 4.01—6.77 (图 6-A), 表达量为  $(82.2—10\ 608.1) \times 10^{-6}$  (图 5-C)。意蜂在 15 日龄所表达的 74 个特异蛋白分子量为 18.26—90.83 kD, 等电点为 4.3—6.74(图 6-B), 表达量在  $(104.9—7\ 788.5) \times 10^{-6}$  范围内 (图 5-D)。

2.4 浆蜂和意蜂工蜂 17 日龄蛹头部蛋白组比较

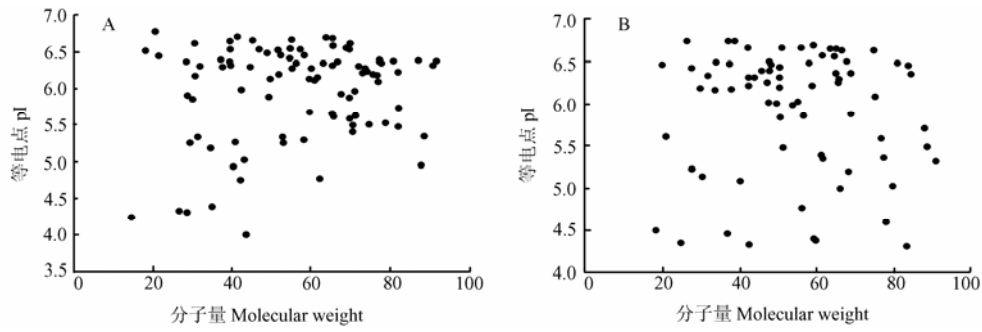
17 日龄时,浆蜂和意蜂共有蛋白点数为 246 个(分子量为 12.3—93.54 kD, 等电点为 4.07—6.8)(图 7-A, 图 7-B)。共有蛋白占浆蜂所表达蛋白点总数的 72.35%, 占意蜂所表达蛋白点总数的 88.17%。其中 30 个蛋白点浆蜂的表达量显著高于意蜂, 40 个蛋白点意蜂的表达量显著高于浆蜂 ( $P<0.05$ )。浆蜂在 17 日龄表达 94 个特异蛋白, 分子量为 17.73—102.84 kD, 等电点为 4.24—6.77 (图 8-A), 表达量为  $(160.7—7\ 141.2) \times 10^{-6}$  (图 7-C)。意蜂在 17 日龄所表达的 33 个特异蛋白分子量为 16—100.22 kD, 等电点为 4.28—6.69 (图 8-B), 表达量在  $(36—11\ 755) \times 10^{-6}$  范围内 (图 7-C)。



A 和 B 分别代表浆蜂与意蜂 15 日龄共有蛋白三维图谱, C 和 D 分别代表浆蜂与意蜂 15 日龄特异蛋白三维图谱, 三坐标轴分别代表等电点、分子量和蛋白表达量  
A and B represent the shared proteins expressed both in the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee on day 15, respectively. C and D represent the unique proteins expressed in the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee on day 15, respectively. Three axes refer to pI, molecular weight and expression abundance, respectively

图 5 浆蜂与意蜂头部 15 日龄表达的蛋白质组三维图谱

Fig. 5 Three dimensional views of protein expression in the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee on day15

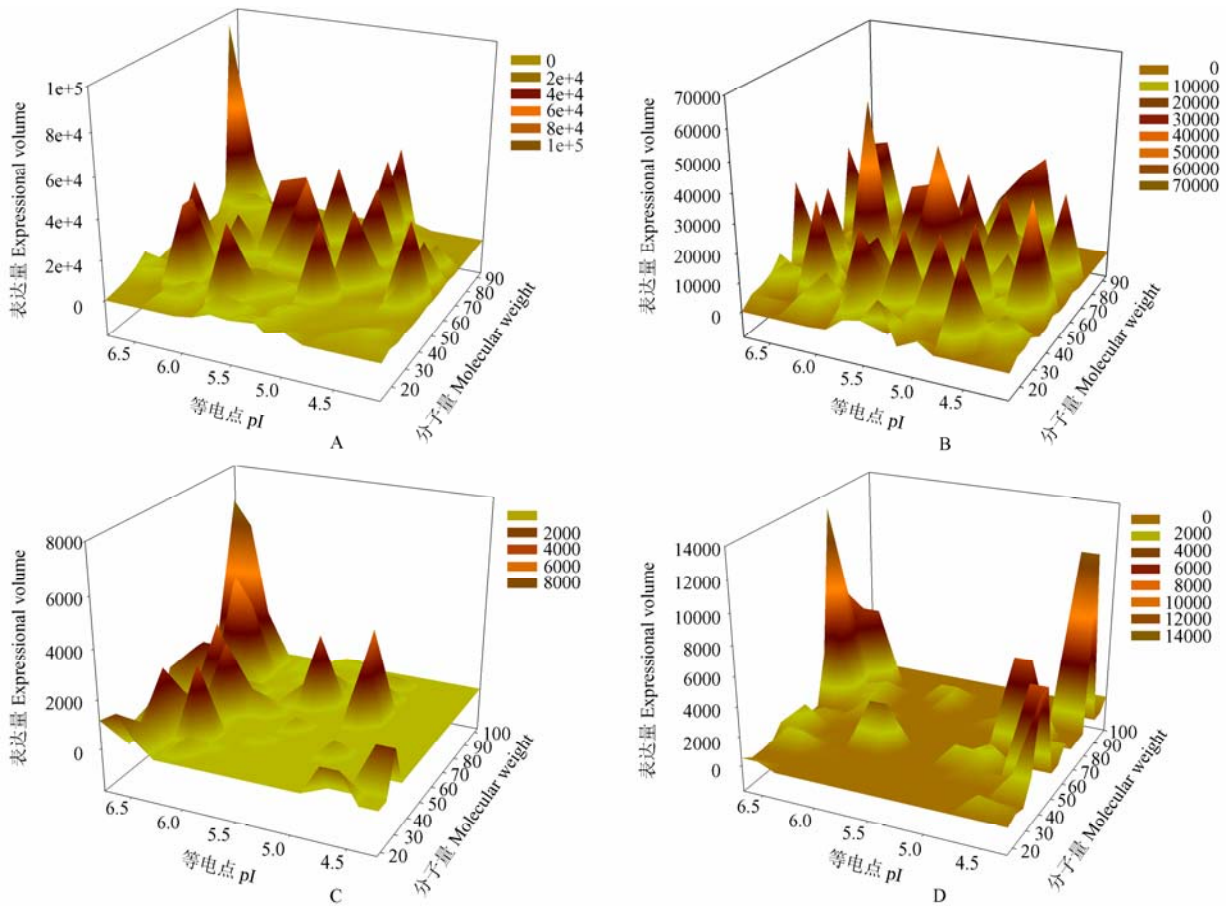


A 和 B 分别代表浆蜂与意蜂 15 日龄特异蛋白散点图

A and B represent the unique proteins expressed in the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee on day 15, respectively. Two axes refer to pI and molecular weight, respectively

图 6 浆蜂与意蜂头部 15 日龄表达的特异蛋白质散点图

Fig. 6 Scatter plots on unique proteins expressed in the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee on day15

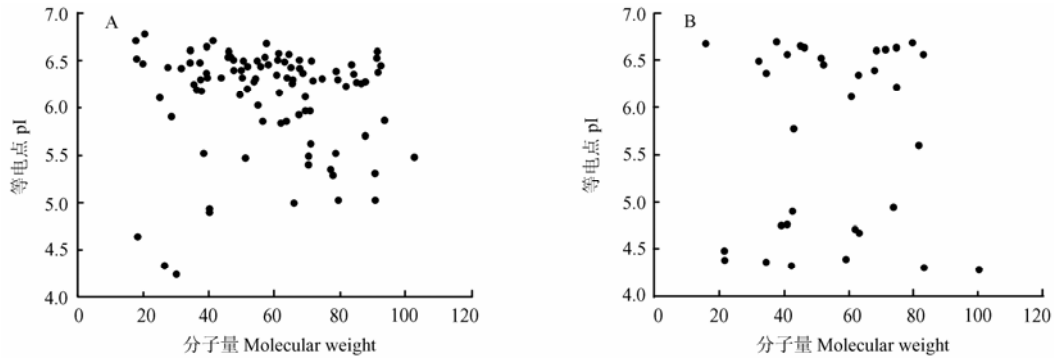


A 和 B 分别代表浆蜂与意蜂 17 日龄共有蛋白三维图谱, C 和 D 分别代表浆蜂与意蜂 17 日龄特异蛋白三维图谱, 三坐标轴分别代表等电点、分子量和蛋白表达量

A and B represent the shared proteins expressed both in the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee on day 17, respectively. C and D represent the unique proteins expressed in the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee on day 17, respectively. Three axes refer to pI, molecular weight and expression abundance, respectively

图 7 浆蜂与意蜂头部 17 日龄表达的蛋白质组三维图谱

Fig. 7 Three dimensional views of protein expression in the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee on day17



A 和 B 分别代表浆蜂与意蜂 17 日龄特异蛋白散点图  
 A and B represent the unique proteins expressed in the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee on day 17, respectively. Two axes refer to pI and molecular weight, respectively

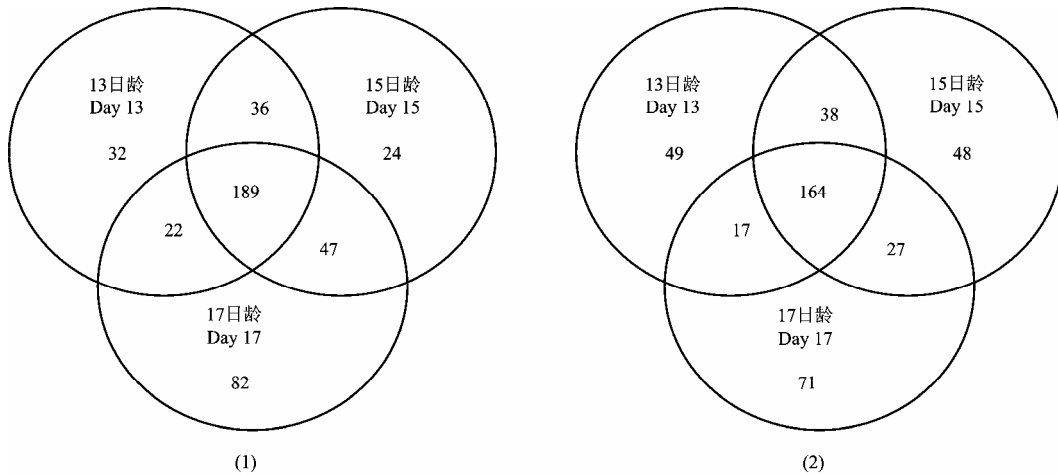
图 8 浆蜂与意蜂头部 17 日龄表达的特异蛋白质散点图

Fig. 8 Scatter plots on unique proteins expressed in the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee on day17

2.5 浆蜂和意蜂工蜂不同日龄间蛹头部蛋白组比较

浆蜂 13 日龄和 15 日龄表达共有蛋白有 225 个(图 9), 这些蛋白的分子量范围为 12.3—93.76 kD, 等电点范围为 4.01—6.8, 占浆蜂 15 日龄所表达蛋白的 76.01%; 其中 13 日龄有 38 个蛋白点表达量显著高于 15 日龄, 13 个蛋白点表达量显著低于 15 日龄 ( $P < 0.05$ )。13 日龄和 17 日龄表达共有蛋白数为 211 个, 这些蛋白的分子量范围为 12.3—93.76 kD, 等电点范

围为 4.19—6.8, 占浆蜂 17 日龄表达蛋白数的 62.06%; 其中 13 日龄有 40 个蛋白点表达量显著高于 17 日龄, 35 个蛋白点表达量显著低于 17 日龄 ( $P < 0.05$ )。15 日龄和 17 日龄表达共有蛋白为 236 个, 这些蛋白的分子量范围为 12.3—93.76 kD, 等电点范围为 4.16—6.8, 占浆蜂 17 日龄所表达蛋白总数的 69.41%。其中 15 日龄有 17 个蛋白点表达量显著高于 17 日龄, 56 个蛋白点表达量显著低于 17 日龄 ( $P < 0.05$ )。



(1)、(2) 分别是浆蜂和意蜂在 13、15 和 17 日龄共有和特异蛋白数目的比较  
 (1)、(2) show the number of the unique and shared proteins in the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee on day 13, 15 and 17, respectively

图 9 浆蜂与意蜂在 3 个日龄表达的共有蛋白和特异蛋白数文氏图

Fig. 9 Venn diagrams of the number of protein spot in the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee on day 13, 15 and 17



意蜂 13 日龄和 15 日龄表达共有蛋白有 202 个(图 9)，这些蛋白的分子量范围为 12.3—93.76 kD，等电点范围为 4.16—6.8，占意蜂 15 日龄所表达蛋白的 72.92%；其中 13 日龄有 43 个蛋白点表达量显著高于 15 日龄，23 个蛋白点表达量显著低于 15 日龄 ( $P < 0.05$ )。13 日龄和 17 日龄表达共有蛋白数为 181 个，这些蛋白的分子量范围为 12.3—100.22 kD，等电点范围为 4.16—6.8，占意蜂 17 日龄表达蛋白数的 64.87%；其中 13 日龄有 46 个蛋白点表达量显著高于 15 日龄，31 个蛋白点表达量显著低于 17 日龄 ( $P < 0.05$ )。15 日龄和 17 日龄表达共有蛋白为 191 个，这些蛋白的分子量范围为 12.3—93.54 kD，等电点范围为 4.16—6.8，占意蜂 17 日龄所表达蛋白总数的 68.46%。其中 15 日龄有 36 个蛋白点表达量显著高于 17 日龄，50 个蛋白点表达量显著低于 17 日龄 ( $P < 0.05$ )。27 个蛋白表达量随着日龄增长显著上调，29 个蛋白表达量随着日龄增长显著下调 ( $P < 0.05$ )。

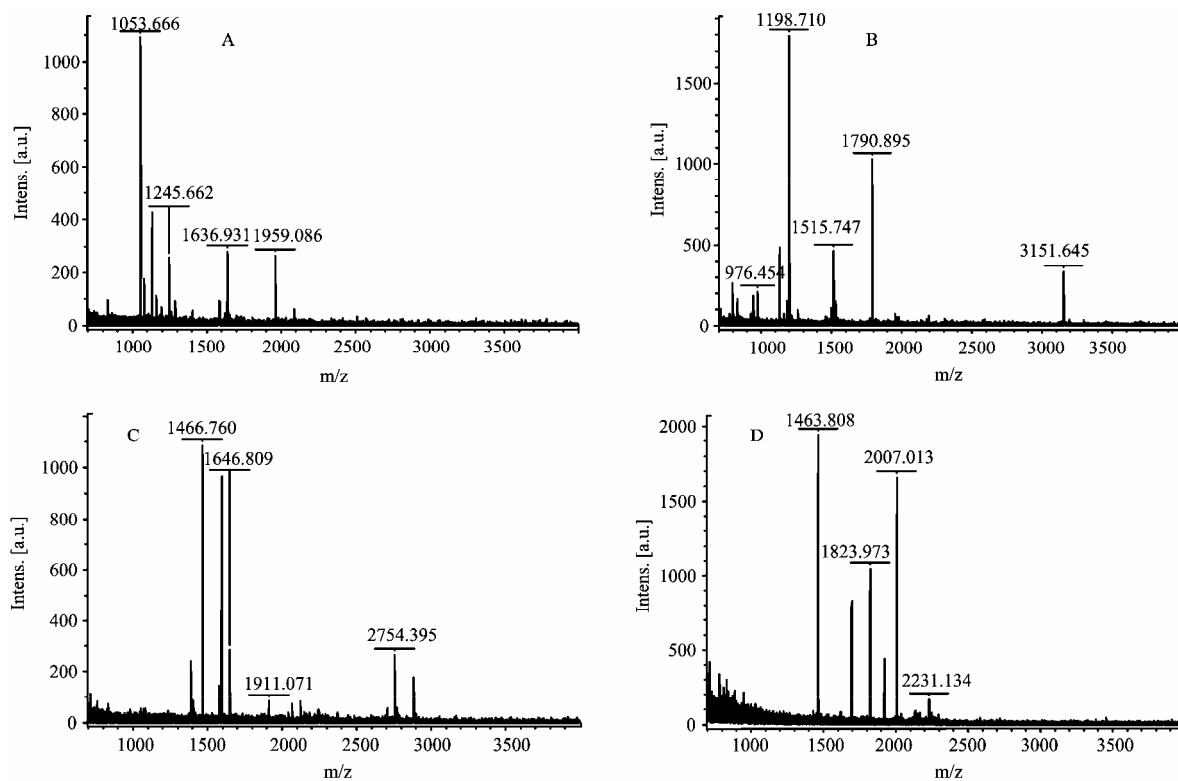
2.6 浆蜂和意蜂表达蛋白质质谱鉴定与分类

通过对差异蛋白质进行酶解、质谱分析，11 个蛋

白质得到鉴定，如表所示。图 10 是部分已鉴定出蛋白点的肽质量指纹图谱。这些蛋白质根据功能分为 6 类。与代谢相关蛋白为精氨酸激酶(Arginine kinase, 点 5)、蛋白酶体 2 亚基 (Proteasome 2 subunit, 点 8)、泡液 ATP 合成酶催化亚基 (Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A, osteoclast isoform, 点 10)、ATP 合成酶(ATP synthase, isoform A, 点 3)；与机体抗氧化功能相关的蛋白分别为过氧化物氧化还原酶 2540 (Peroxioredoxin 2540, 点 9) 和谷胱甘肽 S-转移酶 S1 (Glutathione S transferase S1, 点 4)；细胞骨架蛋白为微管蛋白(Tubulin, 点 1)和肌动蛋白 88F(Actin88F, 点 2)；调控蛋白为真核细胞转录起始因子 (eukaryotic translation initiation factor, 点 11)；热激蛋白家族的热激蛋白 (heat shock protein, 点 7)，此外还有 1 个未知功能蛋白 (点 6)。

2.7 差异蛋白质表达量聚类分析

已鉴定的蛋白质聚为两类(图 11)：一类是在工蜂蛹头部的发育过程中表达量上调的蛋白质，分别是微管蛋白(点 1)、肌动蛋白 88F(点 2)、ATP 合成



A、B、C、D 分别代表点 1、2、4 和 8 的肽指纹图谱 A, B, C and D represent peptide mass fingerprintings of spot 1, 2, 4 and 8

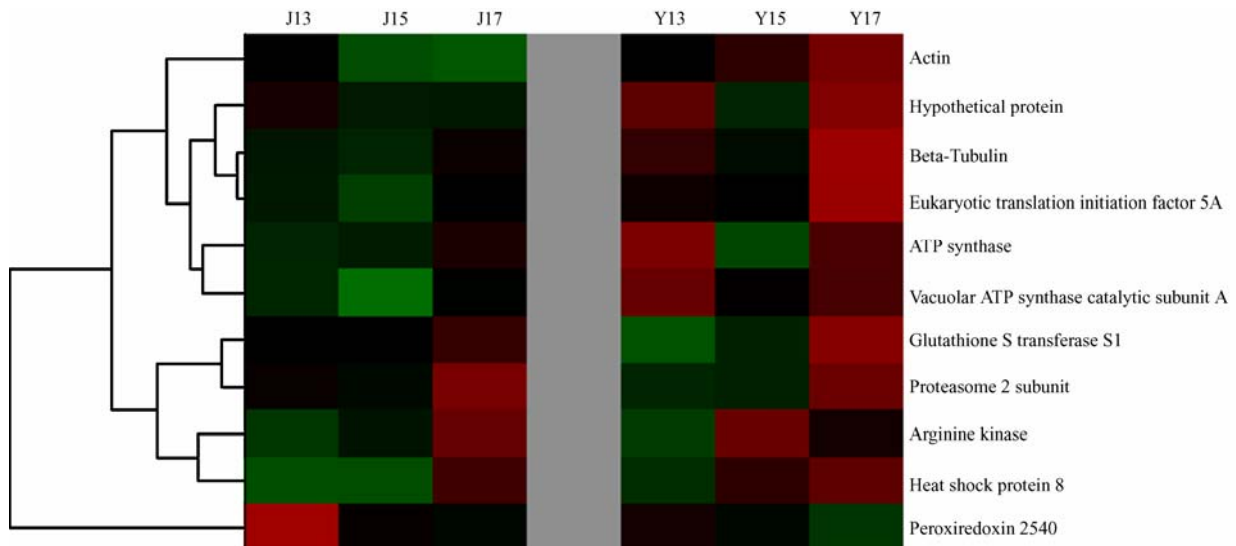
图 10 鉴定蛋白质的肽质量指纹图谱

Fig. 10 Representative peptide mass fingerprintings of identified proteins

表 已鉴定的 11 个蛋白点基本信息

Table Basic information of eleven identified proteins

点号 Spot number	蛋白质名称 Protein name	登录号 Accession number	分子量/等电点 Mr(kD)/pI	蛋白质得分 Score	覆盖率 Sequence coverage (%)
1	微管蛋白 Tubulin	gi 48095525	50.60/4.75	98	18
2	肌动蛋白 Actin 88F	gi 66509789	41.39/5.56	101	25
3	ATP 合成酶 ATP synthase, isoform A	gi 110762902	55.10/5.25	121	24
4	谷胱甘肽 S-转移酶 S1 Glutathione S transferase S1	gi 66534655	17.69/5.40	89	39
5	精氨酸激酶 Arginine kinase	gi 58585146	40.33/5.66	81	22
6	未知功能蛋白 Protein of unknown function	gi 254438470	4.22/5.91	84	97
7	热激蛋白 Heat shock protein	gi 66537940	72.07/5.43	88	29
8	蛋白酶体 2 亚基 Proteasome 2 subunit	gi 66519842	30.69/7.03	82	24
9	过氧化物氧化还原酶 2540 Peroxiredoxin 2540	gi 66535082	25.12/5.88	84	32
10	泡液 ATP 合成酶催化亚基 Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	gi 66515272	68.33/5.30	82	12
11	真核细胞转录起始因子 Eukaryotic translation initiation factor	gi 110767655	17.58/5.19	99	34



6 个柱子分别代表浆蜂 13 日龄 (J13)、15 日龄 (J15)、17 日龄 (J17) 和意蜂 13 日龄 (Y13)、15 日龄 (Y15)、17 日龄 (Y17) 工蜂蛹期头部表达的蛋白质。横行代表单个蛋白质。左边对蛋白质聚类。红色和绿色条带分别代表上调表达和下调表达蛋白质

Six columns represent proteins expressed in the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee (13, 15 and 17 day, respectively) on different days. The rows represent the individual protein. The protein cluster is on the left side. The up- or down-regulated proteins are indicated in red or green, respectively

图 11 浆蜂和意蜂工蜂蛹头部表达谱中已鉴定的 11 个蛋白质聚类分析

Fig. 11 Hierarchical cluster analysis of 11 identified proteins in the worker pupal head of the higher royal jelly producing and the native Italian honeybee

酶 (点 3)、谷胱甘肽 S-转移酶 S1 (点 4)、精氨酸激酶 (点 5)、未知功能蛋白 (点 6)、热激蛋白 (点 7)、蛋白酶体 2 亚基 (点 8)、泡液 ATP 合成酶催化亚基 (点 10) 和真核细胞转录起始因子 (点 11) ;

另一类是在工蜂蛹头部的发育阶段中表达量下调的蛋白质——过氧化物氧化还原酶 2540 (点 9)。在表达量上调一类中, 微管蛋白 (点 1)、肌动蛋白 88F (点 2)、谷胱甘肽 S-转移酶 S1 (点 4)、蛋白酶体 2 亚

基(点8)、真核细胞转录起始因子(点11)、热激蛋白(点7)和未知功能蛋白(点6)在意蜂工蜂蛹发育中期(Y17)表达量显著上调;精氨酸激酶(点5)、谷胱甘肽 S-转移酶 S1(点4)、蛋白酶体 2 亚基(点8)和热激蛋白(点7)在浆蜂工蜂蛹发育中期(J17)表达量显著上调。然而 ATP 合成酶(点3)、泡液 ATP 合成酶催化亚基(点10)在意蜂工蜂蛹发育早期(Y13)大量表达。过氧化物氧化还原酶 2540(点9)在浆蜂蛹发育早期(J13)高表达。

### 3 讨论

蜂群产浆量是由工蜂表达的群体性状<sup>[7]</sup>。尽管浆蜂在我国选育成功已有近 30 年的历史,已证明了蜂群产浆量是可遗传的性状<sup>[19-21]</sup>,一些与蜂王浆高产相关的 DNA 标记也相继报道<sup>[22]</sup>,并初步表明在蛹期浆蜂工蜂头部重量大于意蜂<sup>[23]</sup>,但从不同发育阶段头部蛋白质组表达水平探讨浆蜂和意蜂的差异还未见报道。本研究采用蛋白质组学方法对浆蜂和意蜂工蜂蛹期 13、15 和 17 日龄头部蛋白质进行了定性和定量分析,并对 11 个蛋白质进行功能鉴定和生物信息学分析,初步了解了两个蜂种工蜂蛹头部蛋白质表达的特征,这对进一步从分子水平上认识蜜蜂发育生物学具有一定意义。

浆蜂和意蜂工蜂蛹头部表达蛋白点数均随着日龄增长而增加,这说明随着蛹的发育,头部的王浆腺和唾液腺以及其它组织开始逐渐发育和分化,从而使得其表达的蛋白种类增加,这与蜜蜂特定器官的发育相关,为羽化出房后哺育、清洁、采集等社会行为做准备。在 3 个日龄中浆蜂表达的蛋白数量和特有蛋白数均显著大于意蜂,表明浆蜂蛹期的蛋白质表达更为活跃,这可能是浆蜂经过选育后蜂王浆生产能力提高,伴随着相应的蛋白质表达也随之提高。这与浆蜂工蜂卵<sup>[24]</sup>和雄蜂卵<sup>[25]</sup>以及咽下腺<sup>[26]</sup>表达的蛋白质总数均大于意蜂的结果一致。然而,在 13、15、17 日龄时,浆蜂和意蜂共有蛋白占各自表达蛋白的 60%以上,说明尽管浆蜂和意蜂蛹期头部蛋白质组出现一些差异,但大多数蛋白质还是保守表达的。

在鉴定的差异蛋白质中,随着浆蜂和意蜂工蜂蛹头部的发育,大部分与代谢相关(点3、点5、点8、点10)、抗氧化相关(点4)和细胞骨架相关的蛋白质(点1、点2)显著上调(图1,11)。随着蛹的生长和分化,机体新陈代谢加强,可能需要表达大量代谢相关蛋白质和细胞骨架蛋白质;同时需氧量增加,

活性氧的量也相应的增加,造成的氧化损伤也会随之增加<sup>[27-28]</sup>,需要更多的抗氧化蛋白去抵御活性氧对组织造成的氧化伤害,从而上调表达了与抗氧化相关的蛋白。由于肌动蛋白构成的细胞骨架对于神经突触囊泡动力学具有调控作用<sup>[29]</sup>,肌动蛋白微丝在神经元的生长与发育起着重要作用,浆蜂和意蜂在 13、15 和 17 日龄均表达大量肌动蛋白。因为在蛹发育初期,为了适应从幼虫期到成虫期的感官和运动系统的变化,幼虫的神经系统将完全重新“塑造”,机体可能通过上调肌动蛋白表达,从而促进神经细胞生长与分化。特别是,在意蜂工蜂蛹期头部表达的肌动蛋白随着日龄增长,表达量提高,这与蜜蜂胸肌表达的肌球蛋白水平随着蛹的发育显著升高相一致<sup>[30]</sup>。

尽管本研究首次对浆蜂与意蜂工蜂蛹期头部蛋白质组表达谱进行了分析,对全面了解蜜蜂蛹期头部发育的蛋白质组表达特点具有一定帮助,但对表达谱中蛋白质功能鉴定的数目较少。因此,继续鉴定和分析两蜂种工蜂蛹期头部发育期的其它差异蛋白质对深入了解蜜蜂生物学具有重要意义。

### 4 结论

大多数与细胞骨架、抗氧化相关和代谢相关的蛋白质表达量随着工蜂蛹日龄的增长显著上调,表明工蜂蛹头部的王浆腺和唾液腺等组织逐步生长发育,新陈代谢加强以及神经系统逐渐重塑。浆蜂经过蜂王浆高产的选育,其工蜂蛹期头部表达的蛋白质种类和蛋白质的表达量方面都与意蜂存在明显差异。一方面浆蜂比意蜂表达的蛋白质种类增加,另一方面在蛹发育初期,两者的蛋白质表达模式差异较大,而在中期差异变小。

### References

- [1] Li J K, Wang A P. Comprehensive technology for maximizing royal jelly production. *American Bee Journal*, 2005, 145(8): 661-664.
- [2] 金水华. 平湖王浆高产蜂种介绍. *中国养蜂*, 2003, 54(1): 25.  
Jin S H. Introduction on high royal jelly products bee (*Apis mellifera* L.). *Apiculture of China*, 2003, 54(1): 25. (in Chinese)
- [3] 黄文诚, 谢代葵, 沈基楷, 陈世壁, 陈盛禄, 林雪珍, 徐春明, 陆引法. 平湖意蜂王浆高产蜂群生产王浆性能的研究. *中国养蜂*, 1989(1): 3-5.  
Huang W C, Xie D K, Shen J K, Chen S B, Chen S L, Lin X Z, Xu C M, Lu Y F. Study on the production capacity of the high royal jelly producing bee. *Apiculture of China*, 1989(1): 3-5. (in Chinese)

- [4] 陈世壁, 韩胜明, 刘富海, 刘甫秀. “浆蜂”生产性能考察实验总结. 中国养蜂, 1992, 43(3): 2-5.  
Chen S B, Han S M, Liu F H, Liu F X. Summary of the production capacity of the high royal jelly producing bee. *Apiculture of China*, 1992, 43(3): 2-5. (in Chinese)
- [5] 陈盛禄, 林雪珍, 胡福良, 苏松坤. 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. Experiment on the higher production royal jelly bee. *Scientia Agricultura Sinica*, 1995, 28(5): 89-93. (in Chinese)
- [6] 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)
- [7] Graham J M. *The Hive and the Honey Bee*. Illinois: Dadant & Sons, INC., 1992: 69-72.
- [8] 陈盛禄. 中国蜜蜂学. 北京: 中国农业出版社, 2001: 108-146.  
Chen S L. *The Apicultural Science in China*. Beijing: China Agricultural Press, 2001: 108-146. (in Chinese)
- [9] Levine R B, Morton D B, Restifo L L. Remodeling of the insect nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, 1995, 5(1): 28-35.
- [10] Cavalcante V M, Da Cruz-Landim C. Electrophoretic protein pattern and acid phosphatase activity in the midgut extracts of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) during metamorphosis. *Neotropical Entomology*, 2004, 33(2): 169-172.
- [11] Zufelato M S, Lourenço A P, Simões Z L P, Jorge J A, Bitondi M M G. Phenoloxidase activity in *Apis mellifera* honey bee pupae, and ecdysteroid-dependent expression of the prophenoloxidase mRNA. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 34(12): 1257-1268.
- [12] Feldlaufer M F, Herbert Jr E W, Svoboda J A, Thompson M J, Lusby W R. Makisterone A: the major ecdysteroid from the pupae of the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry*, 1985, 15(5): 597-600.
- [13] Soares M P M, Elias-Neto M, Simões Z L P, Bitondi M M G. A cuticle protein gene in the honeybee: expression during development and in relation to the ecdysteroid titer. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 37(12): 1272-1282.
- [14] Tautz J, Maier S, Groh C, Rössler W, Brockmann A. Behavioral performance in adult honey bees is influenced by the temperature experienced during their pupal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(12): 7343-7347.
- [15] 周冰峰, 林世煌, 苏静, 薛奋勤, 江天宝. 温度对蜜蜂受精卵和封盖王蛹发育的影响. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2002, 31(4): 511-513.  
Zhou B F, Lin S H, Su J, Xue F Q, Jiang T B. Effects of temperature on the developments of honeybee oosperms and queen pupae. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Natural Science Edition*, 2002, 31(4): 511-513. (in Chinese)
- [16] 方文富, 陈镇平, 黄其忠. 湿度对意蜂受精卵孵化率和发育历期的影响. 中国养蜂, 2005, 56(7): 4-5.  
Fang W F, Chen Z P, Huang Q Z. The effect of relative humidity on the hatchability and developmental phase of *A. m. Ligustica* fertilized eggs. *Apiculture of China*, 2005, 56(7): 4-5. (in Chinese)
- [17] Li J K, Li H W, Zhang Z H, Pan Y H. Identification of the proteome complement of high royal jelly producing bees(*Apis mellifera*) during worker larval development. *Apidologie*, 2007, 38: 545-557.
- [18] 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.
- [19] 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)
- [20] Chen S L, Li J K, Zhong B X, Su S K. Microsatellite analysis of royal jelly producing traits of Italian honeybee (*Apis mellifera* L.). *Acta Genetica Sinica*, 2005, 32(10): 1037-1044.
- [21] 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)
- [22] 戴英, 徐霞, 汪成富, 蒋滢. 一种新型的分子标记-SCARs 验证王浆高产蜜蜂的 RAPD 分子标记-W316bp 的研究. 中国养蜂, 2003, 54(3): 7-8.  
Dai Y, Xu X, Wang C F, Jiang Y. Study on transforming from RAPD molecular marker-W 316bp of high royal jelly products into a new SCARs molecular marker. *Apiculture of China*, 2003, 54(3): 7-8. (in Chinese)
- [23] 郑爱娟, 房宇, 陈建, 冯毛, 刘国华, 李建科. 王浆高产蜜蜂和意大利蜜蜂工蜂蛹期生长发育研究. 中国蜂业, 2008, 59(12): 7-10.  
Zheng A J, Fang Y, Chen J, Feng M, Liu G H, Li J K. Research on worker bees' pupae development of high royal jelly producing bees(A.

- m. ligustica*) and Italian honey bees (*A. m. ligustica*). *Apiculture of China*, 2008, 59(12): 7-10. (in Chinese)
- [24] 李建科, 张 兰. 王浆高产蜜蜂与意大利蜜蜂卵期蛋白质组比较. 中国农业科学, 2007, 40(11): 2632-2636.
- Li J K, Zhang L. Comparative analysis of the proteome of the egg of the higher royal jelly producing bees (*Apis mellifera* L.) and Italian bees (*Apis mellifera* L.). *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(11): 2632-2636. (in Chinese)
- [25] 房 宇, 李建科. 王浆高产蜜蜂与原种意大利蜜蜂雄蜂卵期发育蛋白质组分析. 中国农业科学, 2009, 42(7): 2552-2563.
- Fang Y, Li J K. Comparative analysis of proteome between drone eggs of high royal jelly producing bees (*Apis mellifera* L.) and native Italian bees (*Apis mellifera* L.). *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(7): 2552-2563. (in Chinese)
- [26] 冯 毛, 李建科. 王浆高产蜜蜂与意大利蜜蜂咽下腺发育蛋白质组分析. 中国农业科学, 2009, 42(2): 677-687.
- Feng M, Li J K. Proteome analysis of the development of hypopharyngeal gland of high royal jelly producing bees and native Italian bees. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(2): 677-687. (in Chinese)
- [27] Seehuus S C, Norberg K, Gimsa U, Krekling T, Amdam G V. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(4): 962-967.
- [28] Corona M, Robinson G E. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Molecular Biology*, 2006, 15(5): 687-701.
- [29] Morales M, Colicos M A, Goda Y. Actin-dependent regulation of neurotransmitter release at central synapses. *Neuron*, 2000, 27: 539-550.
- [30] Maruyama K. Interaction between ATP and actomyosins from honeybee muscles during pupal development. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie, Bd.* 1957, 40: 451-453.

(责任编辑 岳 梅)