

# 意大利蜜蜂 (*A.m.ligustica*) 雄蜂卵期发育蛋白质组分析

房宇<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】对原种意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica* Spinola, 1806) (意蜂) 雄蜂的 3 d 卵期发育进行蛋白质组研究, 以探明该蜂种雄蜂卵期蛋白质表达调控方面的一些特点, 从而揭示其发育的分子机理。【方法】采用双向电泳法对意蜂雄蜂卵期蛋白质组进行研究。【结果】3 d 的卵期发育中, 按顺序分别检测到 200、242、233 个蛋白, 这些蛋白的分子量在 12.42~169.60 kD, 等电点为 4.50~9.00。164 个蛋白在 3 d 卵期发育过程中均有表达, 其中 79 个蛋白在 3 个日龄的表达量无显著差异 ( $P>0.05$ ), 7 个共有蛋白表达量随卵期发育呈显著上调 ( $P<0.05$ ) 趋势, 而 4 个共有蛋白呈显著下调 ( $P<0.05$ ) 趋势。同时卵期 3 d 分别有 11、18 和 18 个特异的蛋白表达。除共有及特有蛋白外, 还有 17 个蛋白在第 1 日龄和第 2 日龄表达而在第 3 日龄关闭; 43 个蛋白在第 2 日龄和第 3 日龄表达而在第 1 日龄关闭; 仅有 8 个蛋白在第 2 日龄关闭, 而在第 1 日龄和第 3 日龄表达。【结论】结果初步表明意蜂雄蜂卵期发育过程中第 2 日龄蛋白表达最为活跃; 卵期 3 d 所表达的共有蛋白, 可能是调控意蜂雄蜂卵期发育所必需的保守蛋白, 这些蛋白的表达模式存在一定的差异; 不同日龄表达的特异性蛋白, 表明不同发育阶段的卵需要不同的特异性蛋白来调控。同时也表明雄蜂卵期发育较工蜂卵表达的保守蛋白更多, 这将给蜜蜂的基因改良带来便利。

**关键词:** 蜜蜂; 雄蜂卵; 双向电泳; 蛋白质组

## Analysis of Developmental Proteome at Egg Stage of Drone Honeybees (*A. m. ligustica*)

FANG Yu<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】An investigation on the proteome of drone egg development of native Italian bee (*Apis mellifera ligustica* Spinola, 1806) in order to prove the characteristics in protein expression and regulation at egg stage and understand the molecular mechanism of development. 【Method】The experiment was carried out by two-dimensional gel electrophoresis. 【Result】The results showed that there were 200, 242 and 233 proteins with wide range of molecular weight (12.42-169.60 kD) and relatively narrow scope of pI (4.50-9.00) were detected on day 1, day 2 and day 3, respectively, during the developmental process of the drone egg. Meanwhile, 164 protein spots were resolved at all the images (i.e. the protein was consistently expressed) along with the egg development, among which 7 were significantly up-expressed ( $P<0.05$ ) and 4 were significantly down-expressed ( $P<0.05$ ), while seventy-nine had no significant difference ( $P>0.05$ ). In addition, the specific proteins expressed proteins on day 1, day 2 and day 3 were 11, 18, 18, respectively. Besides, seventeen proteins expressed both on day 1 and day 2, but silenced on day 3, and forty-three proteins expressed both on day 2 and day 3, but silenced on day 1, while only eight proteins expressed both on day 1 and day 3, but silenced on day 2. 【Conclusion】The results indicate that 2 day-old eggs is the most active expressional stage in the development of drone egg. The protein expressed at all images suggests that it should be indispensable for drone egg development,

收稿日期: 2007-11-15; 接受日期: 2008-01-07

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划重点项目 (2006BAD06B04, 2006BAD12B08-06, 2006BAD14B07-5-7), 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (JBKY0032007016CAAS) 和行业公益性科研专项 (nyhyzx07-041)

作者简介: 房宇 (1981-), 男, 河南南阳人, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学。Tel: 010-62591449; E-mail: jskyp@sohu.com。通讯作者李建科 (1962-), 男, 北京人, 教授、博士, 研究方向为蜜蜂饲养与生物技术。Tel: 010-62591449; E-mail: apislijk@126.com

but their expression pattern is different. The proteins expressed at a specific age of egg suggest that different developmental stages need specific proteins to regulate. And there are more house-keeping proteins in the developmental process of the drone egg than that of worker egg, it will provide more target for gene improvement.

**Key words:** Honeybees; Drone egg; Two-dimensional gel electrophoresis; Proteome

## 0 引言

【研究意义】蜜蜂是高度社会化全变态发育的膜翅目昆虫，以群体生存、发展，其群体有蜂王、雄蜂和工蜂 3 种分化级型。雄蜂和蜂王、工蜂一样，其发育经历卵、幼虫、蛹及成虫 4 个阶段<sup>[1]</sup>。卵期发育包括从卵产入巢房至孵化出幼虫这一阶段，约 72 h，历经 10 个发育阶段<sup>[2]</sup>。雄蜂的主要职能是在空中与处女王交配，此外，不承担蜂群的任何工作。在低温季节，雄蜂仅能起到一定的产热保温、维持巢温的作用，但是，在高温季节，会加剧巢内闷热，增加蜂群的散热负担和促使分蜂热的发生。雄蜂在蜜蜂育种方面非常重要，因蜜蜂后代一半的遗传来自雄蜂，从而直接影响蜂群的增殖力、生产力、抗逆力等性状<sup>[3]</sup>。雄蜂的数量和质量与蜂王质量关系密切，即蜂王在短时间婚飞交配后，其受精囊必须贮存 500 万~700 万精子<sup>[4-6]</sup>才能保证蜂王一生产受精卵的需要。当蜂王在一次婚飞中，如果受精不足，就要进行第 2 次、第 3 次甚至第 4 次婚飞，这就会增加蜂王伤亡的危险，如果由于雄蜂少，蜂王达不到充分受精时，这样的蜂王往往较早被更替，因此，蜂群的遗传结构与雄蜂有着密切关系。雄蜂是由未受精的卵细胞经孤雌生殖而产生的单倍体 ( $N=16$ )<sup>[7,8]</sup>，它的基因组实际上就是蜜蜂基因组的体现。利用单倍体雄蜂进行遗传改良较利用二倍体蜂王和工蜂的速度快 33%<sup>[7,9,10]</sup>，因为在二倍杂合体中含有优良性状的隐性等位基因会受显性等位基因的制约而不能表达，相反，雄蜂的每个基因仅有一个拷贝，不存在显隐性关系，无论是显性还是隐性基因都可直接选择<sup>[11]</sup>。有益性状在雄蜂上表达频率高于双倍体的蜂王和工蜂<sup>[7]</sup>，因此，雄蜂在育种方面具有独特的优越性。【前人研究进展】蜜蜂作为基本的模式生物，在社会行为学<sup>[12]</sup>、神经学<sup>[13]</sup>和遗传学<sup>[14]</sup>等方面有大量的研究。但是对卵的研究，无论是工蜂还是雄蜂都相对较少。卵的生理学研究表明，未受精卵在蜂王输卵管中被挤压扭曲以具有与精子结合的活性<sup>[15]</sup>，体外环境下经过玻璃毛细管扭曲处理的未受精卵，在 15 min 后进入了第一次减数分裂后期，而未经处理的仍处于第一次减数分裂的中期；并且这些处理过的卵在 30 s

内具有结合精子活性，进而发育成二倍体胚胎，但在 30 min 后丧失活性<sup>[16]</sup>；对雄蜂和工蜂从卵发育到成虫的不同阶段，在形态、生理和行为等方面的分析表明，雄蜂幼虫期对糖的总需求量显著高于工蜂，并且在发育的各个阶段其糖原、脂肪和蛋白的组成比例都有很大的差异<sup>[17]</sup>。最近，有关学者发现一种可以在体外长期培养蜜蜂胚胎细胞的方法，成功地利用添加有胎牛血清的昆虫培养液，将蜜蜂前肠期胚胎细胞体外进行培养，并维持有丝分裂活性达 3 个多月<sup>[18]</sup>。分子遗传学研究表明，将外源 DNA 线性化后导入雄蜂的精子，之后对处女蜂王进行人工授精，在下一代的幼虫中发现有外源 DNA 的表达，并且这种表达是可遗传的<sup>[19]</sup>。利用显微注射技术，将一段长 504 bp 编码卵黄蛋白原的 dsRNA 注入蜂卵，在由此发育而成的工蜂中，检测到卵黄蛋白原 mRNA 表达水平降低了 15%，在卵发育的前胚期进行 RNA 干扰能有效阻断一些基因的表达<sup>[20]</sup>。RNA 分析显示，*vasa* 和 *nanos*RNA 在蜜蜂胚胎发育的前 2 个阶段表达之后很快就消失，但在胚胎期的第 9 阶段在背索闭合后的生殖隆起处又发现这两个 RNA 的再次表达<sup>[21]</sup>。张兰等<sup>[22]</sup>用双向电泳的方法，对王浆高产蜜蜂工蜂卵期蛋白组的分析发现，第 2 日龄卵蛋白表达最为活跃，并且 44 个管家蛋白调控王浆高产蜜蜂卵期发育。Collins 等<sup>[23]</sup>用双向电泳的方法分离成熟雄蜂的精子 and 精囊蛋白，对蛋白点进行肽质量指纹图谱分析，发现精囊和精子蛋白中有 18 个是相同的，69 个蜜蜂蛋白中有 66 个存在于果蝇中，显示出了高度的保守性。随着蜜蜂基因组测序的完成<sup>[24]</sup>，蜜蜂作为模式生物在分子水平的研究越来越受到重视，近年来相继开发了一些通过获取<sup>[25]</sup>和改造蜜蜂卵的遗传物质来实现基因操作的新方法<sup>[26]</sup>，由于通过饲养幼虫和成年蜜蜂进行分子改造存在许多限制，因此，利用蛋白质组学方法研究雄蜂卵的发育特点对蜜蜂的分子遗传学和蜜蜂育种学具有重要意义。【本研究切入点】本研究旨在通过双向电泳 (2-DE) 方法，分析、比较意蜂雄蜂卵期不同发育日龄蛋白质组成的特征，从而揭示雄蜂卵期发育的分子机理。【拟解决的关键问题】探明意蜂雄蜂卵期不同发育阶段蛋白质表达调控方面的特点。

## 1 材料与方法

### 1.1 化学试剂

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) 和矿物油均购于 Bio-Rad 公司。Tris 碱、过硫酸铵 (AP)、十二烷基磺酸钠 (SDS)、甘氨酸和尿素, 均购自 Sigma 公司。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、溴酚蓝、考马斯亮蓝 (CBB) G-250、硫脲、CHAPS、牛血清白蛋白 (BSA) 和琼脂糖均购于 Amresco 公司。DTT、碘乙酰胺, 来自 Merck 公司。

### 1.2 取样

意蜂从意大利比萨引进并饲养于中国农业科学院蜜蜂研究所实验蜂场。将蜂王连同一张空雄蜂巢脾放入蜂王控制器 (仅能放一张巢脾, 工蜂可以自由出入而蜂王无法通过的一种塑料盒子) 中, 使蜂王在巢脾上产卵 5 h 以供取样。24 h 时将巢脾由控制器中提出, 蜂王置于其它巢脾上, 随即取 1 日龄雄蜂卵放入 1.5 ml Ep 管 (置冰浴中)。已取过 1 日龄雄蜂卵的巢脾 (不含蜂王) 重新放回蜂王控制器, 分别于 48、72 h 取 2 日龄、3 日龄雄蜂卵。每次取样量为 300 粒雄蜂卵, 共取 5 次。

### 1.3 蛋白提取

蛋白提取方法根据张兰等<sup>[22]</sup>的方法。每 1 mg 雄蜂卵加入 10  $\mu$ l 磷酸缓冲液 (pH 7.6, 含 32.5 mmol·L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.6 mmol·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 400 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl), 冰浴研磨 20 min, 超声 2 min。然后 4°C, 12 000 g, 离心 10 min; 4°C, 15 000 g, 再离心 10 min。取上清液放入另一 Ep 管中, 沉淀中按照每 1 mg 雄蜂卵加入 2  $\mu$ l 上述的磷酸缓冲液, 4°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 雄蜂卵加入 10  $\mu$ l 蛋白裂解缓冲液 (8 mmol·L<sup>-1</sup> 尿素, 2 mmol·L<sup>-1</sup> 硫脲, 4% CHAPS, 20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 碱, 30 mmol·L<sup>-1</sup> DTT, 2% Bio-lyte pH 3~10), 冰浴研磨 10 min, 超声 2 min。4°C, 15 000 g, 离心 10 min, 共离心 2 次。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, 以沉淀蛋白并除去样品中的盐分。将此混合液在 4°C, 15 000 g, 每次 10 min, 离心 2 次。弃去上清液, 沉淀中按每 1 mg 雄蜂卵加入 5  $\mu$ l 上述的蛋白裂解缓冲液, 冰浴研磨 5 min, 超声 2 min, 使混合液充分溶解, 用 2 mol·L<sup>-1</sup> 氢

氧化钠调溶液 pH 至中性, 制成蛋白样品溶液, 直接使用或是一 70°C 冷藏备用。

### 1.4 蛋白浓度测定

蛋白浓度按照 Bradford<sup>[27]</sup>介绍的方法进行测定。使用 BSA 做标准曲线, 595 nm 波长处测定吸收值 (Beckman, spectrophotometer DU800)。

### 1.5 双向电泳 (2-DE) 分析

将不同浓度的蛋白样品用蛋白裂解缓冲液 (8 mol·L<sup>-1</sup> 尿素, 2 mol·L<sup>-1</sup> 硫脲, 4% CHAPS, 20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris 碱, 30 mmol·L<sup>-1</sup> DTT, 2% Bio-lyte pH 3~10) 稀释后再与上样水化液 (8 mol·L<sup>-1</sup> 尿素, 4% CHAPS, 0.001% 溴酚蓝, 65 mmol·L<sup>-1</sup> 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  $\mu$ l 上样, 使得 3 个样品的上样量均为 280  $\mu$ g。使用 17 cm IPG 胶条 (pH 3~10, 线性), 在 18°C 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 4 次; 1 000 V, 1 h 再次除盐; 9 000 V, 5 h 线性升压; 9 000 V, 60 000 V·h<sup>-1</sup> 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 mol·L<sup>-1</sup> 尿素, 0.375 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.8, 20% 甘油, 2% SDS) 平衡胶条各 15 min。平衡后, 将 IPG 胶条转移到 1.0 mm 厚 12% T 的聚丙烯酰胺分离胶上, 20  $\mu$ l 2-DE 蛋白分子量标准加到上样滤纸上后, 放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

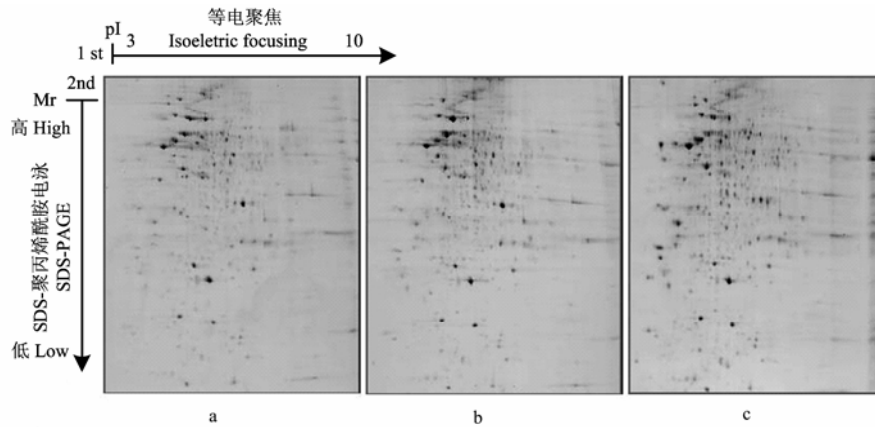
染色后凝胶使用透射模式进行扫描, 扫描结果直接导入计算机 (32 位, 300 dpi 分辨率, 全彩)。对 5 个样品中具有很好重复性的 5 张凝胶图使用 PDQuest V 7.3.0 (Bio-Rad Hercules, CA, USA) 进行斑点检测和匹配分析。用总密度方法 (Total Density in Gel Image) 标准化处理 (Normalization)。采用 ANOVA (Version 6.12, SAS Institute, Cary, N.C., USA) 的有参数 (邓肯) 法对表达量进行统计检验。

## 2 结果与分析

2.1 意蜂雄蜂卵期蛋白质组图谱

图 1 是 5 次具有很好重复性的代表图谱之一。图

谱分析使用相同的参数（灵敏度 10.00，尺寸比例 7，PDQuest 7.3.0，Bio-Rad Hercules，CA，USA）。



a, b, c 分别对应 1 日龄、2 龄、3 日龄。卵期发育 3 个日龄分别检测到 200、242、233 个蛋白。每个样品上样 280 μg，CBB G-250 染色  
a, b, c, are the protein profile corresponding to day 1, day 2 and day 3, respectively. There are 200, 242 and 233 proteins to have been detected on day1, day2 and day3, respectively. 280 μg per each sample were subjected to 2-DE and stained by CBB G-250

图 1 原种意大利蜜蜂雄蜂卵期发育不同日龄 2-DE 蛋白质表达图谱

Fig. 1 Profile of the 2-DE analysis of the eggs of native Italian drones on the different days

第 1 日龄雄蜂卵检测到的总蛋白斑点数为 200 个（图 1-a），分子量范围为 12.42~154.70 kD，等电点范围为 4.63~9.00；第 2 日龄雄蜂卵总的蛋白斑点数为 242 个（图 1-b），分子量范围为 12.42~169.60 kD，等电点范围为 4.63~9.00；而第 3 日龄雄蜂卵总的蛋白斑点数为 233 个（图 1-c），分子量范围为 12.42~169.60 kD，等电点范围为 4.50~9.00。

13.35~136.48 kD，等电点在 4.50~7.78，表达量为 303.9~5 599.5 mg·ml<sup>-1</sup>（表 3）。

2.2 意蜂不同日龄雄蜂卵蛋白表达分析

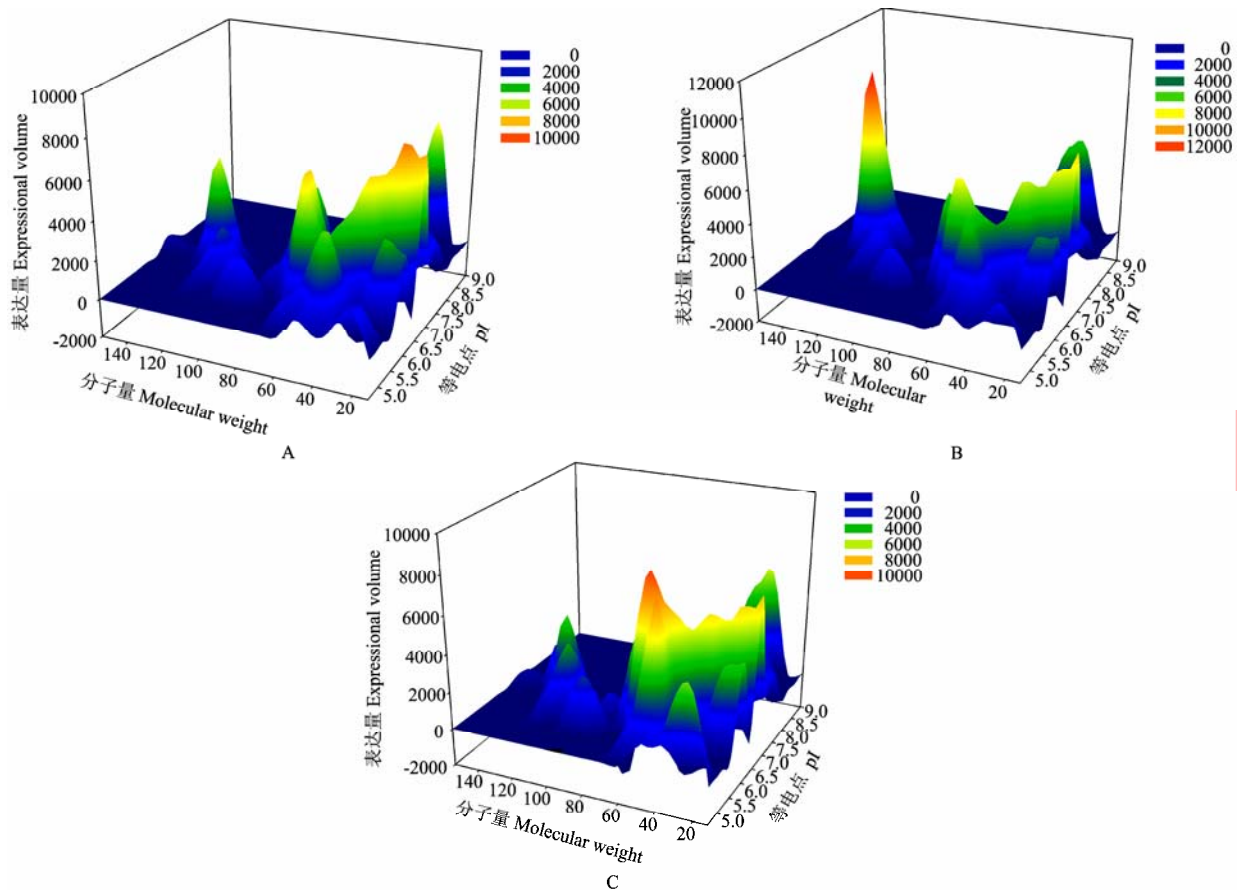
意蜂雄蜂卵期 3 d 有 164 个共有蛋白点（分子量范围为 12.42~154.70 kD，等电点范围为 4.63~9.00）。这些蛋白中，有 39 个在 1 日龄表达量达最大，65 个点在 2 日龄表达量最大，60 个在 3 日龄表达达到峰值。17 个共有蛋白在 3 个日龄的表达量差异显著（*P* < 0.05），79 个蛋白表达量无显著差异（*P* > 0.05，图 2）。

表 1 原种意大利蜜蜂雄蜂卵期 1 日龄特有蛋白分子量、等电点及表达量

Table 1 MW, pI and expressional volume of the specific proteins of the eggs of the native Italian drones on day 1

点编号 Spot No. (SSP)	分子量 MW (kD)	等电点 pI	表达量 Expressional volume (mg·ml <sup>-1</sup> )
1610	53.66	5.60	4059.6
2903	146.37	5.99	394.5
3608	53.65	6.31	1035.2
5308	36.48	6.79	912.1
5506	48.01	6.81	674.8
6407	43.98	7.03	1333.4
7309	40.03	7.64	740.7
7408	45.41	7.66	927.1
7704	62.76	7.54	783.1
7705	62.53	7.71	894.8
7706	58.42	7.54	642.4

对意蜂雄蜂卵各日龄的特异性蛋白斑点比较分析发现，第 1 日龄有 11 个特有的蛋白斑点，这些蛋白的分子量范围是 36.48~146.37 kD，等电点范围是 5.60~7.71，表达量范围是 394.5~4 059.6 mg·ml<sup>-1</sup>（表 1）；第 2 日龄特有表达 18 个蛋白斑点，这些蛋白分子量大约在 12.81~58.01 kD，等电点在 5.61~8.71，表达量是 346.7~3 273.7 mg·ml<sup>-1</sup>（表 2）；第 3 日龄有 18 个特有的蛋白斑点，这些蛋白分子量位于



A、B、C 分别代表卵期 1 日龄、2 日龄和 3 日龄共有蛋白的表达量

A, B and C show MW, pI and expressional volume of the coexistent proteins of the native Italian honeybee drone Eggs on different days, respectively

图 2 原种意大利蜜蜂雄蜂卵期发育 2-DE 蛋白质表达三维图谱

Fig. 2 Three dimensional views of protein expression of the native Italian honeybee drone eggs

除了这些共有点和特异点之外, 有 17 个蛋白(分子量 30.62~76.49 kD, 等电点 5.45~8.15) 在第 1 日龄和第 2 日龄表达而在 3 日龄关闭。其中, 有 4 个蛋白在第 1 日龄的表达量显著大于在第 2 日龄的, 只有 2 个蛋白在第 2 日龄的表达量显著大于第 1 日龄的 ( $P < 0.05$ , 表 4)。

有 43 个蛋白(分子量 13.34~169.60 kD, 等电点 4.67~8.89) 在第 2 日龄和第 3 日龄表达而在第 1 日龄关闭。其中, 有 7 个蛋白在第 2 日龄的表达量显著大于第 3 日龄的, 有 6 个在第 3 日龄的表达量显著大于第 2 日龄的 ( $P < 0.05$ , 表 5)。

另外, 有 8 个蛋白(分子量 28.27~59.02 kD, 等电点 5.23~8.86) 在第 1 日龄和第 3 日龄表达而在第 2 日龄关闭。其中, 只有 1 个蛋白(分子量 45.39 kD, 等电点 5.79) 在第 1 日龄和第 3 日龄的表达量差异显

著 ( $P < 0.05$ , 表 6)。

### 3 讨论

本研究旨在研究意蜂雄蜂卵期不同日龄表达蛋白的特点。经过对意蜂雄蜂卵期发育不同日龄的表达蛋白组研究发现, 意蜂雄蜂 3 日卵期发育分别表达了 200、242 和 233 个蛋白, 以第 2 天的基因表达最活跃, 生长发育最旺盛。这与张兰等<sup>[22]</sup>对工蜂的卵期发育研究结果相一致。雄蜂卵一经产出, 在 34℃ 的巢温下开始发育, 1 日龄卵核分裂, 形成胚盘, 第 2、3 日龄是蜜蜂胚层分化和器官系统形成的时期<sup>[3]</sup>, 这与在第 2、3 日龄表达的蛋白总数多、第 2 日龄和 3 日龄表达的特异蛋白多(表 2、表 3、表 5) 是吻合的。

在卵期 3 个发育日龄均表达的共有蛋白有 164 个(图 1), 这些蛋白可能是其发育所必需的管家蛋白,

表 2 原种意大利蜜蜂雄蜂卵期 2 日龄特有蛋白分子量、等电点及表达量

Table 2 MW, pI and expressional volume of the specific proteins of the eggs of the native Italian drones on day 2

点编号	分子量	等电点	表达量
Spot No. (SSP)	MW (kD)	pI	Expressional volume (mg·ml <sup>-1</sup> )
1008	18.65	5.61	810.7
2207	33.97	6.00	396.4
3305	38.25	6.29	530.3
3306	38.12	6.35	518.9
3407	43.87	6.17	2168.5
4205	34.45	6.60	393.3
4406	47.58	6.40	814.4
4407	43.42	6.45	2141.3
4503	52.42	6.46	952.9
4609	56.02	6.62	915
5204	34.31	6.71	541.6
5205	35.38	6.77	346.7
5306	41.02	6.89	697
5406	45.24	6.76	429
5505	50.29	6.74	711.3
6406	46.99	7.31	499.9
6606	58.01	7.36	549.2
7003	12.81	8.71	3273.7

表 3 原种意大利蜜蜂雄蜂卵期 3 日龄特有蛋白分子量、等电点及表达量

Table 3 MW, pI and expressional volume of the specific proteins of the eggs of the native Italian drones on day 3

点编号	分子量	等电点	表达量
Spot No. (SSP)	MW (kD)	pI	Expressional volume (mg·ml <sup>-1</sup> )
2	17.91	4.51	2489.6
7	13.35	5.36	849.7
11	17.27	4.61	781.3
101	24.87	4.50	1899.1
305	36.54	4.84	1371.1
1204	31.35	5.72	746.7
1302	36.58	5.48	1037.4
2102	29.14	5.93	525
2201	31.43	5.80	925.9
2305	38.63	5.84	888.5
3003	14.7	6.27	1221
3004	15.02	6.27	1413.1
4002	14.4	6.46	1381.5
5002	15.66	6.71	1027.1
5901	118.69	6.57	591.7
5903	136.48	6.58	303.9
7303	37.53	7.46	5599.5
7804	69.02	7.78	380.6

表 4 原种意大利蜜蜂雄蜂卵期仅在 1 日龄和 2 日龄表达而在 3 日龄关闭的蛋白分子量、等电点及表达量

Table 4 MW, pI and the expressional volume of the eggs of the native Italian drones expressed on both day 1 and day 2, but silenced on day 3

点编号	分子量	等电点	表达量	
			1 日龄 Day 1	2 日龄 Day 2
Spot No. (SSP)	MW (kD)	pI	Expressional volume (mg·ml <sup>-1</sup> )	
1805	66.09	5.45	3783.6a	584.2b
3406	43.69	6.28	1616.5b	3696a
3607	58.34	6.30	458.3a	635.7a
4102	30.62	6.53	819.2a	552.8a
4204	32.15	6.63	788.6a	693.2a
4408	45.79	6.54	604.2a	490.3a
4608	53.92	6.39	597.7a	897.9a
4705	76.49	6.48	1021.5a	1362.5a
5307	39.85	6.94	864.6a	378.6b
5504	48.98	6.89	622.4a	395.2a
5604	56.76	6.84	537.7b	932.7a
5605	53.92	6.72	1336.6a	563.1b
6408	44.2	6.80	1129.6a	978.4a
7308	39.75	7.75	1035.3a	729.7a
7407	43.22	7.56	899.8a	652.9a
7508	48.23	7.80	814.8a	919.7a
8706	61.58	8.15	1659.1a	659.8b

相同的小写字母表示差异不显著 ( $P>0.05$ ), 不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。下同

Numbers with same superscript means no significant difference ( $P>0.05$ ); numbers with different superscript means difference significantly ( $P<0.05$ ). The same as below

但这些管家蛋白的表达模式存在一定差异 (图 2)。与工蜂卵期发育蛋白质组的研究结果<sup>[22]</sup>相比, 雄蜂卵期发育的管家蛋白占表达总蛋白的比率在 3 个日龄分别为 82%、68%、70%, 显著大于工蜂的管家蛋白比率 (28%, 23%, 25%) ( $P<0.05$ ), 说明没有显隐性控制的单倍体雄蜂卵的基因能更充分的表达, 并且在这些管家蛋白中有 79 个在 3 个日龄的表达量无显著差异 ( $P>0.05$ , 图 2), 仅有 17 个蛋白在 3 个日龄的表达量差异显著 ( $P<0.05$ , 图 2), 这说明单倍体雄蜂在卵期的蛋白表达较二倍体工蜂保守。这 17 个表达差异显著的共有蛋白中, 7 个表达量随卵期发育呈显著上调 ( $P<0.05$ ) 趋势, 4 个呈显著下调 ( $P<0.05$ ) 趋势 (图 2), 表明这些共有蛋白通过表达量的变化来协同调节卵期的发育。除此之外, 3 个日龄分别有 11、18 和 18 个特异蛋白表达, 这些特异蛋白大多数为低丰度蛋白, 但它们也是调控雄蜂卵期发育不可缺

表 5 原种意大利蜜蜂雄蜂卵期仅在 2 日龄和 3 日龄表达而在 1 日龄关闭的蛋白分子量、等电点及表达量

Table 5 MW, pI and the expressional volume of the eggs of the native Italian drones expressed on both day 2 and day 3, but silenced on day 1

点编号 Spot No. (SSP)	分子量 MW (kD)	等电点 pI	表达量 Expressional volume (mg·ml <sup>-1</sup> )	
			2 日龄 Day 2	3 日龄 Day 3
4	23.63	4.88	2916.5a	1224.3b
9	22.14	5.31	380.1a	322.6a
601	53.71	4.67	7875.5a	2273.2b
901	169.6	4.73	954.7a	565.7a
1004	13.34	5.57	1251.7a	729.5a
1006	15.94	5.70	1610.6a	755.8b
1105	28.36	5.75	1456.3a	893.5a
1503	47.52	5.67	514.7a	486.5a
2602	56.2	5.96	750.9a	869.7a
3202	31.81	6.11	799a	670.3a
3204	33.44	6.30	585.5a	521.6a
3301	39.66	6.28	1083.8a	516.8ba
3805	96.5	6.14	615.7a	793a
3807	100.81	6.20	315.2a	177.4a
3809	100.12	6.26	276.1b	454.9a
3811	67.61	6.28	1195b	2260.7a
3813	104.08	6.32	561.8a	461.2a
4203	35.32	6.45	804.9a	697.8a
4302	39.74	6.44	1273.7a	1260.1a
4303	39.16	6.44	2362.9a	588.8b
4304	41.11	6.47	802.9a	697.5a
4404	45.81	6.49	807.5a	337.4b
4603	52.05	6.40	584.3a	428.7a
4607	56.64	6.52	944.5a	968.5a
4703	59.66	6.50	656.5a	606a
4803	106.66	6.38	469.6a	402.9a
4903	122.87	6.41	694a	913.4a
4904	109.92	6.47	472.3a	539.3a
4907	138.45	6.51	565.7b	1071.3a
5003	19.45	6.79	690.9a	593.7a
5102	29.6	6.78	989.7a	791.9a
5304	41.01	6.81	1121.5a	1399.9a
5602	52.74	6.66	688.1a	854a
5701	58.49	6.52	863.4a	823.6a
5704	64.28	6.70	541.9a	473.5a
5803	66.03	6.67	494b	1055.8a
6005	23.52	7.18	952.7a	260.9b
6404	45.29	7.23	428.7a	264.8b
6604	54.48	7.15	634.7a	485.8a
7703	57.07	7.76	725.3a	408.6a
8001	21.46	8.59	1080.1a	841.7a
8202	31.45	8.89	2745.7b	4884.9a
8703	61.19	8.40	1086.9b	2646.5a

表 6 原种意大利蜜蜂雄蜂卵期仅在 1 日龄和 3 日龄表达而在 2 日龄关闭的蛋白分子量、等电点及表达量

Table 6 MW, pI and the expressional volume of the eggs of the native Italian drones expressed on both day 1 and day 3, but silenced on day 2

点编号 Spot No. (SSP)	分子量 MW (kDa)	等电点 pI	表达量 Expressional volume (mg·ml <sup>-1</sup> )	
			1 日龄 Day 1	3 日龄 Day 3
606	53.26	5.23	1112.8a	766.9a
1602	56.1	5.44	408.1a	767.9a
2401	45.39	5.79	1931.9a	978.3b
3701	58.73	6.12	1046.3a	1454.6a
5401	42.7	6.66	514.5a	789.5a
6703	59.02	6.88	1729.1a	1176.4a
8105	28.27	7.88	848.4a	647.5a
8503	46.86	8.86	665.9a	762.5a

少的功能蛋白。

蜜蜂基因组测序完成<sup>[24]</sup>才刚刚 2 年多时间, 目前利用蛋白质组学技术对蜂毒<sup>[28]</sup>、蜂王浆<sup>[29]</sup>、淋巴液<sup>[30]</sup>、咽下腺<sup>[31]</sup>的蛋白质组进行了研究。本文试图从蛋白质表达方面对雄蜂卵的发育进行分子机理解释, 由于卵是蜜蜂基因工程研究中最理想的易于进行基因改造的组织<sup>[32]</sup>, 从试验结果看雄蜂卵较工蜂卵表达的保守蛋白多, 因此, 利用雄蜂卵进行蜜蜂基因改造将有更多的靶基因可供选择。通过进一步对卵期表达蛋白的基因调控机理进行研究, 将会为蜜蜂分子遗传学和蜜蜂的基因操作奠定一定基础。

目前国内关于雄蜂卵期蛋白质组的相关研究报道较少, 本文仅是对意蜂雄蜂卵期蛋白质组研究的一个初步报道。今后笔者将利用质谱技术和生物信息学手段对卵期发育的目的蛋白进行功能鉴定, 阐明其基因的调控机理, 深入阐述意蜂雄蜂卵期发育的分子机制。

## 4 结论

结果初步表明, 在意蜂雄蜂卵期发育过程中, 第 2 日龄蛋白表达最为活跃; 卵期 3 d 的共有表达蛋白, 可能是调控意蜂雄蜂卵期发育所必需的保守蛋白, 这些蛋白的表达模式存在一定的差异; 不同日龄表达的特异性蛋白, 表明不同发育阶段的卵需要不同的特异性蛋白来调控。同时也表明雄蜂卵期发育较工蜂卵表达的保守蛋白更多, 这将给蜜蜂的基因改良会带来便利。

## References

- [1] Graham J M. *The Hive and the Honey Bee*. Illinois: Dadant & Sons,

- INC, 1992: 73-101.
- [2] Fleig R, Sander K. Embryogenesis of the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidea): a SEM study. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 1986, 15(5-6): 449-462.
- [3] 陈盛禄. 中国蜜蜂学. 北京: 中国农业出版社, 2001: 143-159.  
Chen S L. *The Apicultural Science in China*. Beijing: China Agricultural Press, 2001: 143-159. (in Chinese)
- [4] Taber S I, Blum M S. Preservation of honey bee semen. *Science*, 1960, 131(3415): 1734-1735.
- [5] Moritz R F A, Kryger P, Allsopp M H. Competition for royalty in bees. *Nature*, 1996, 384(6604): 31.
- [6] Tarpy D R, Page R E. The curious promiscuity of queen honey bees (*Apis mellifera*): evolutionary and behavioral mechanisms. *Annales Zoologici Fennici*, 2001, 38: 255-265.
- [7] Havron A, Rosen D, Rossler Y, Hillel J. Selection on the male hemizygous genotype in arrhenotokous insects and mites. *Entomophaga*, 1987, 32: 261-268.
- [8] Moritz R, Jordan M. Selection of resistance against *Varroa jacobsoni* across caste and sex in the honeybee (*Apis mellifera* L., Hymenoptera: Apidae). *Experimental and Applied Acarology*, 1992, 16: 345-353.
- [9] Hartl D L. Some aspects of natural selection in arrhenotokous populations. *American Zoologist*, 1971, 11(2): 309-325.
- [10] Hartl D L. A fundamental theorem of natural selection for sex linkage or arrhenotoky. *American Naturalist*, 1972, 106: 516-524.
- [11] Sarah E J, Gard W O. The potential for using male selection in breeding honey bees resistant to *Varroa destructor*. *Bee World*, 2003, 84(4): 155-164.
- [12] Seeley T D. *The Wisdom of the Hive*. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1995.
- [13] Menzel R. *Neurobiology of Comparative Cognition*. Hillsdale, New Jersey: Lawrence Erlbaum Association, 1990: 237-292.
- [14] Page R E, Robinson G E. The genetics of division of labour in honey bee colonies. *Advances in Insect Physiology*, 1991, 23: 117-171.
- [15] Went D F, Krause G. Normal development of mechanically activated, unladen eggs of an endoparasitic Hymenopteran. *Nature*, 1973, 244: 454-455.
- [16] Sasaki K, Obara Y. Egg activation and timing of sperm acceptance by an egg in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux*, 2002, 49: 234-240.
- [17] Hrassingg N, Crailsheim K. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 2005, 36(2): 255-277.
- [18] Bergem M, Norberg K, Aamodt R M. Long-term maintenance of in vitro cultured honeybee (*Apis mellifera*) embryonic cells. *BMC Developmental Biology*, 2006, 6: 17.
- [19] Robinson K O, Ferguson H J, Cobey S, Vaessin H, Smith B H. Sperm-mediated transformation of the honey bee. *Apis mellifera Insect Molecular Biology*, 2000, 9(6): 625-634.
- [20] Amdam G V, Simões Z, Guidugli K R, Norberg K, Omholt S W. Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intraabdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Developmental Biology*, 2003, 3: 1.
- [21] Peter K, Dearden. Germ cell development in the honeybee (*Apis mellifera*): *Vasa* and *Nanos* expression. *BMC Developmental Biology*, 2006, 6: 6.
- [22] 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)
- [23] Collins A M, Caperna T J, Williams V, Garrett W M, Evans J D. Proteomic analyses of male contributions to honey bee sperm storage and mating. *Insect Molecular Biology*, 2006, 15(5): 541-549.
- [24] The Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 2006, 443(26): 931-949.
- [25] Omholt S W, Hagen A, Elmholdt O, Rishovd S. A laboratory hive for frequent collection of honeybee eggs. *Apidologie*, 1995, 26(4): 297-304.
- [26] Aase A, Amdam G V, Hagen A, Omholt S W. A new method for rearing genetically manipulated honeybee workers. *Apidologie*, 2005, 36(3): 293-299.
- [27] 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.
- [28] Peiren N, Vanrobaeys F, de Graaf D C, Devreese B, VanBeeumen J, Jacobs F J. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1752: 1-5.
- [29] 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.
- [30] Chan Q W, Howes C G, Foster L J. Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2006, 5: 2252-2262.
- [31] 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.
- [32] DuPraw E J. *The Honeybee Embryo*. New York: Crowell, 1967: 183-217.