

性成熟雄蜂与外勤工蜂触角差异蛋白质组分析

宋飞飞^{1,2}, 吴静¹, 房宇², 冯毛², 郑爱娟², 李建科²

(¹郑州大学生物工程系, 郑州 450001; ²中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093)

摘要:【目的】通过对性成熟雄蜂与外勤工蜂差异蛋白质组进行定量及定性的分析, 以期探明雄蜂与工蜂触角发挥生理功能的分子基础。【方法】将性成熟雄蜂与外勤工蜂的触角蛋白质进行双向凝胶电泳以获得蛋白质的分子量、等电点和表达量信息, 利用 MALDI-TOF 质谱以及 MASCOT 软件对部分表达量有差异的蛋白质进行鉴定, 并对其表达量的聚类分析。【结果】性成熟雄蜂和外勤工蜂的触角各表达了 484、479 个蛋白质, 其中共有蛋白质 416 个。在表达的蛋白质中, 有 102 个蛋白质在雄蜂触角中高表达, 有 80 个蛋白质在工蜂触角中高表达。9 个已鉴定的差异蛋白质在功能上主要参与转运、激素代谢和能量代谢。雄蜂触角中高表达的有气味结合蛋白质 14、脂肪酸结合蛋白质 (2 个)、保幼激素酯酶 (2 个)、酰基辅酶 A 脱氢酶、bellwether 异构体 1 以及 CG31974-PA; 在工蜂触角中高表达的仅有触角特异蛋白质 2。【结论】性成熟雄蜂与外勤工蜂表达的总蛋白质的数量没有明显的差异, 且大部分为共有蛋白质, 说明工蜂与雄蜂触角的分子进化过程是较为保守的。在雄蜂触角中高表达的参与转运以及代谢的蛋白质, 可能是为了使雄蜂婚飞过程中能够更灵敏的接受蜂王的性信息素, 准确发现并找到蜂王进行交尾; 而在工蜂触角中高表达的触角特异蛋白质 2, 可能在快速准确寻找蜜粉源、接受巢内外信息素以识别同伴的过程中起着重要作用。

关键词: 性成熟雄蜂; 外勤工蜂; 触角; 蛋白质组

Proteome Comparison Analysis of Sexually Matured Drone and Adult Worker Honeybee Antennae

SONG Fei-fei^{1,2}, WU Jing¹, FANG Yu², FENG Mao², ZHENG Ai-juan², LI Jian-ke²

(¹Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001; ²Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093)

Abstract: 【Objective】 The goal of this study is to gain better understanding in molecular basis between sexually matured drone and adult worker through differential proteome analysis of their antennae quality and quantity. 【Method】 Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) were run to identify the protein in drone and worker antennae with their molecular weight and pI and expression volume. Accordingly, several proteins with significant variations in their expression volume were identified by using MALDI-TOF/MS and MASCOT software. In addition, hierarchical cluster analysis of the identified proteins was conducted. 【Result】 In total, 484 and 479 protein spots were detected in adult drone and worker antennae, respectively, of which 416 expressed proteins were shared between drone and worker antennae. There were 102 and 80 proteins spots upregulated in drone and worker antennae, respectively. Nine proteins spots significantly altered their expression were identified and classified into transport, energy metabolism, hormone metabolism, and a unknown functional group. An odorant binding protein 14, fatty acid binding protein (couple), juvenile hormone esterase (couple), acyl-CoA dehydrogenase, bellwether isoform 1, CG31974-PA were expressed highly in the antennae of sexually matured drone. An antennal special protein 2 was expressed highly in the antennae of adult worker. 【Conclusion】 Most of the protein spots were commonly expressed in the antennae of the two castes, indicating both castes of

收稿日期: 2010-03-09; 接受日期: 2010-05-11

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重点项目 (2006BAD12B08-06)、国家自然科学基金 (30972148)、国家蜜蜂产业技术体系 (NYCYTX-43)、公益性行业科研专项 (nyhyzx07-041)

作者简介: 宋飞飞, 硕士研究生。Tel: 010-62591449; E-mail: feifeis123@126.com。通信作者李建科, 教授, 博士。Tel: 010-62591449; E-mail: apisljk@126.com

honeybees are conservative during molecular evolution through their antennae. Transport and metabolism related proteins were highly expressed in drone antennae indicating they are crucial in assisting the drones to discriminate sex pheromone and chase the queen to make successful mating exactly and swiftly. Antennal special protein 2 was expressed highly in worker antennae which is likely to help the foragers to search nectar resource quickly and recognize its nest mate through receiving colony pheromone.

Key words: mature drone; adult worker; antenna; proteome

0 引言

【研究意义】蜜蜂作为社会性模式昆虫的重要性已经越来越重要。在蜜蜂社会里,其成员有蜂王、工蜂和雄蜂3种级型,它们在蜂群内执行不同的功能。蜜蜂的活动很大程度上受各种环境刺激的影响,如嗅觉、味觉及各种触觉刺激等,而触角正是感受这些刺激的主要器官^[1]。蜂王负责繁殖后代,它通过分泌信息素影响着巢内各成员的发育和等级水平^[2-3];工蜂利用触角接受各种气味分子、信息素来调整蜂巢内的分工如哺育^[4]、蜜粉源的搜寻^[1]、蜂巢防御^[5]等活动,其触角尖端感受器还可以区分不同花瓣的结构^[6];雄蜂通过触角来识别蜂王信息素以准确追踪蜂王并与其进行交配^[7]。因此对雄蜂与工蜂触角的差异蛋白质组进行研究对深入认识蜜蜂生物学、了解触角在不同职能中发挥作用的分子机理具有重要意义。【前人研究进展】从形态学看,蜜蜂的触角由柄节、梗节、鞭节组成。与工蜂相比,雄蜂的触角更长,但雄蜂柄节相对较短而其鞭节较长^[1]。蜜蜂触角上分布的多种感受器与由脑发出的神经相连,这些感受器包括毛形感受器、锥形感受器、板形感受器等,而板型感受器是蜜蜂的主要嗅觉器官^[1],其在雄蜂中数目大约是工蜂的7倍^[8]。工蜂触角对于植物花的气味的反应比雄蜂更灵敏,蜂王信息素可以吸引蜂群中的工蜂聚集以及控制工蜂卵巢的发育,而雄蜂对蜂王信息素中的单一组分(9-ODA)更加灵敏,说明9-ODA是参与雄蜂婚飞过程的主要性别信息素^[9-11]。分子生物学研究表明,昆虫触角中参与气味结合的蛋白质主要有气味结合蛋白质(odorant binding proteins, OBP)和化学感受蛋白质,它们通过与气味受体共同作用来完成气味物质的检测^[12]。近年来对OBP研究较多,它为一种小的、水溶性的、丰度高的细胞外蛋白,包括两类普通气味结合蛋白质(general odorant binding proteins 1, GOBP1; general odorant binding proteins 2, GOBP2)、信息素结合蛋白质(pheromone binding proteins, PBPs)及触角结合蛋白X(antennal binding protein X, ABPX)^[13-16]。OBP参与对气味及信息素的选择/阻碍、携带过程^[17-19]。

与果蝇(50个)、冈比亚按蚊(>70个)相比蜜蜂的基因组编码较少的OBP的基因(21个),其中只有9个OBP特异的表达在触角中,其它的OBP中有一部分在身体各组织中都有分布,另外一些在特定器官或特定的发育时期内表达,因此OBP也可能具有更广泛的生理功能^[20-21]。【本研究切入点】尽管前人对蜜蜂触角的研究进行了大量有意义的工作,但还没有从蛋白质组水平上对触角功能机制进行系统的研究,本研究选择性成熟雄蜂与外勤工蜂的触角为材料,对其进行了差异蛋白质组学分析,以期从整体角度解释触角在工蜂进行群内分工、采集活动、蜂巢防御以及雄蜂婚飞时对蜂王信息素识别并与处女王进行交配的过程中所发挥作用的分子机理。【拟解决的关键问题】利用蛋白质组学方法对性成熟雄蜂和外勤工蜂的触角蛋白质表达谱进行比较,找到雄蜂与工蜂触角差异蛋白质,并试图分析功能蛋白质在工蜂精确搜寻蜜粉源、识别同伴、蜂群内信息传递以及雄蜂交配行为中发挥作用的分子基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

固相pH梯度(IPG)胶条(pH3—10,线性)、Bio-lyte(pH3—10)、矿物油、Flamingo荧光染料均购于伯乐公司。碘乙酰胺购自Appllichem公司。十二烷基硫酸钠(SDS)、甘氨酸、TEMED、甘油均购于Sigma公司。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、溴酚兰、Tris碱、过硫酸铵(AP)、考马斯亮兰(CBB)G-250、硫脲、尿素、CHAPS、DTT、牛血清白蛋白(BSA)购于Amresco公司。琼脂糖购自Solarbio公司。

1.2 取样

蜜蜂(*Apis mellifera* L.)样品取自中国农业科学院蜜蜂研究所实验蜂场。为保证能采集到外勤的工蜂和性成熟的雄蜂,每天下午14:00—16:00间提取蜂箱门口携带花粉飞回的工蜂以及婚飞返巢的雄蜂。从蜜蜂触角窝处将触角剪下,为保证外界花粉等物质不对以后的研究造成污染,取300只工蜂和150只雄蜂

的触角各约 50 mg 用 MilliQ 水洗涤, 并超声 15 s, 重复两次。用滤纸吸干后储存于 -70°C 以备后续实验使用。

1.3 蛋白提取、浓度测定及双向电泳

蛋白提取及双向电泳根据 Li 等^[22]报道的方法, 使用 BSA 做标准曲线, 测定 595 nm 波长下的光密度吸收值 (Beckman, spectrophotometer DU800)。凝胶利用荧光染料 Flamingo 染色 3 h 以上。

1.4 图像分析

利用 Bio-Rad 凝胶成像系统 (Pharos FX Plus Molecular Imager) 对每个样品的 3 个生物学重复的凝胶进行图像扫描, 利用 PDQuest V 8.1.0 (Bio-Rad Hercules, CA, USA) 并选定参数: 灵敏度 8.0、尺寸规模 11、检出点的总浓度方法 (total quantity in valid spots) 等进行蛋白点检测及分析。利用 SPSS 软件 (Version 13.0, SPSS Inc) 进行单因素方差分析 (one-way ANOVA) 及邓肯 (Duncan) 氏新复极差检验 (DMRT) 法, 得到 P 值并统计 $P < 0.05$ 的显著性差异。利用 Sigma plot 软件对总蛋白质点和差异蛋白质点进行等电点分子量分布以及总蛋白质表达量的火山分布分析, 并通过 Cluster 软件对表达量差异的蛋白质进行聚类分析。

1.5 质谱鉴定

为了方便胶内酶切时切取蛋白质点, 用考马斯亮蓝 G-250 将 Flamingo 染料染色的凝胶进行复染。参照 Li 等^[22]已报道的方法进行胶内酶切, 利用质谱仪 (Bruker Daltonics) 对得到的肽段进行 MALDI-TOF 质谱鉴定。根据得到的蛋白样品的肽质量指纹图, 通过本地化的 MASCOT 软件 (Version 2.2, Matrix Science) 在数据库 [NCBI nr 20100116] 中进行蛋白质检索。设定参数为: Max Missed Cleavages: 1; Fixed Modifications: Carboxymethyl (C); Variable Modifications: Oxidation (M); Mass values: MH+, Monoisotopic; Peptide Mass Tolerance: ± 0.2 Da。若鉴定结果得分大于 83 分 ($P < 0.05$), 说明搜索结果可信。

1.6 蛋白质分类和表达量的聚类分析

通过 UniProt 数据库 (<http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>), FLYBASE 数据库 (<http://flybase.org/>) 搜索已鉴定蛋白质的功能并进行分类。利用 Cluster 软件对已鉴定蛋白质进行表达量的聚类分析。

2 结果

2.1 性成熟雄蜂与外勤工蜂触角蛋白质组比较

为了鉴定性成熟雄蜂和外勤工蜂触角的差异蛋白质, 将提取的雄蜂与工蜂触角蛋白质进行双向凝胶电泳 (2-DE), 得到它们的蛋白质表达图谱 (图 1)。图像分析结果显示, 在性成熟雄蜂触角中检测到了 484 个蛋白质点 (分子量 12.57—105.18 kD, 等电点 3.5—9.25) (图 2-A); 在外勤工蜂触角中检测到了 479 个蛋白质点 (分子量 12.57—110.01 kD, 等电点 3.5—9.3) (图 2-B)。从图 2 中可以看出大部分蛋白质点分布在分子量 14—60 kD, 等电点 4—9 的范围内。

通过比较图 1 中的雄蜂与工蜂触角蛋白质的表达图谱, 发现它们之间存在 416 个共有蛋白质, 这些共有蛋白质占雄蜂触角表达的总蛋白质数的近 86%, 占工蜂触角表达的数目的近 87% (图 3)。对雄蜂与工蜂触角蛋白质表达量的比值进行以 2 为底的对数处理, 选择在 $|\log_2 \text{expression ratio}| \geq 1$ 、 $P < 0.05$ 条件下对雄蜂与工蜂触角蛋白质表达谱进行统计学分析, 共发现了 182 个差异蛋白质 (图 4)。在雄蜂触角中有 102 个蛋白质的表达量显著高于工蜂触角, 其中包括 68 个特有蛋白质。在工蜂触角中有 80 个蛋白质的表达量显著高于雄蜂触角, 其中包括 63 个特有蛋白质。

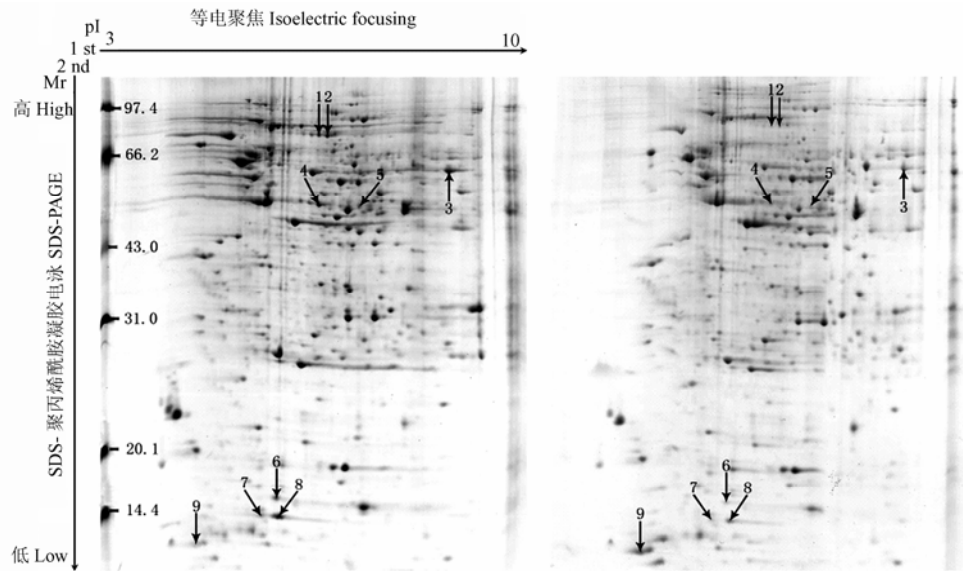
性成熟雄蜂触角中高表达的蛋白质分布范围为: 分子量 12.50—100.02 kD, 等电点 3.5—9.0; 外勤工蜂触角中高表达的蛋白质分布范围为: 分子量 12.80—110.01 kD, 等电点 4.3—9.3 (图 5)。从图中可以清晰的看出雄蜂触角中高表达的蛋白质点大部分分布在分子量 15—60 kD, 等电点 4—7 的范围内; 而工蜂触角中高表达的蛋白质点几乎在分子量 15—100 kD, 等电点 4—9 的范围内均匀分布。

2.2 差异蛋白质的表达量聚类分析

将性成熟雄蜂与外勤工蜂触角中的 204 个表达量有差异的蛋白质利用 Cluster 软件进行表达量聚类分析 (图 6), 这些差异蛋白质主要分为两大类, 一类是在雄蜂触角中相对于工蜂触角表达量上调的蛋白质, 另一类是在雄蜂触角中相对于工蜂触角表达量下调的蛋白质。

2.3 性成熟雄蜂与外勤工蜂触角中差异蛋白质的质谱鉴定

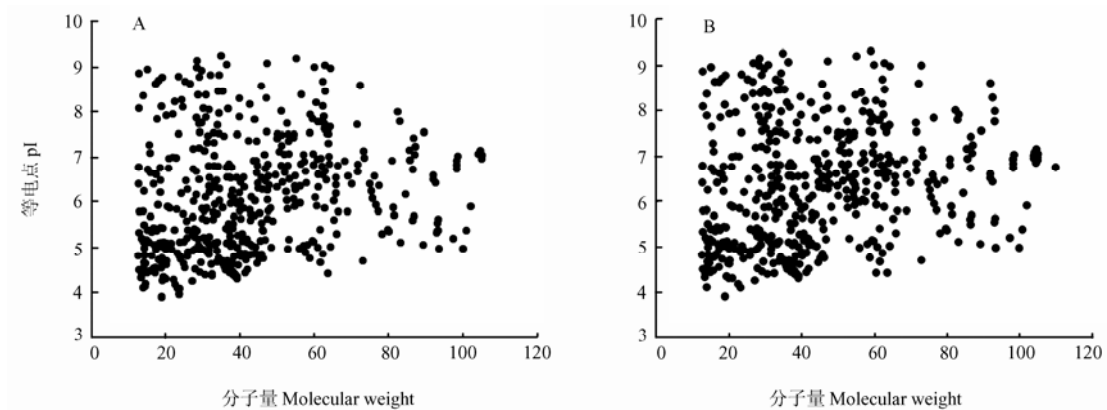
为进一步确定性成熟雄蜂与外勤工蜂触角中差异蛋白质的功能, 对表达量有差异的 9 个蛋白质进行了鉴定, 根据生物学功能将它们分为转运类、激素代谢类、能量代谢类及未知功能类蛋白质 (表)。



A、B 分别为性成熟雄蜂、外勤工蜂触角蛋白质图谱。每个样品上样量 550 μg ，Flamingo 染色，图中数字标记的蛋白质点为胰酶消化后用 MOLDI-TOF MS 鉴定出的蛋白质点
 A and B are antennae proteome profiles of the sexually matured drone and adult worker, respectively. A 550 μg of each sample were subjected to 2-DE and dyed by Flamingo. Number-labeled spots were cut out and subjected to tryptic digestion for mass spectrometry analysis

图 1 性成熟雄蜂与外勤工蜂触角 2-DE 蛋白质图谱

Fig. 1 2-DE antennae proteome profile of sexually matured drone and adult worker



A 和 B 分别代表性成熟雄蜂与外勤工蜂触角中表达的全部蛋白质等电点和分子量分布图。x、y 轴分别代表分子量和等电点
 A and B represent scatter plots of molecular weight and pI of all protein spots of sexually matured drone and adult worker antennae, respectively. X and Y axes refer to molecular weight and pI, respectively

图 2 性成熟雄蜂与外勤工蜂触角中表达的全部蛋白质等电点分子量分布图

Fig. 2 Scatter plots of molecular weight and pI of all protein spots of sexually matured drone and adult worker antennae

2.4 已鉴定蛋白质的表达量聚类分析

已鉴定的 9 个蛋白质聚为两类 (图 7)：一类是在工蜂触角中表达量上调的蛋白质，包括触角特异蛋白质 2 (Spot 9)，另一类是在雄蜂触角中表达量上调的蛋白质，分别是与转运相关的气味结合蛋白质 14

(Spot 6)、两类脂肪酸结合蛋白质 (Spot 7、Spot 8) 以及代谢相关的两类保幼激素酯酶 (Spot 1、Spot 2)、bellwether 异构体 1 (Spot 3)、乙酰辅酶 A 脱氢酶 (Spot 5) 还包括一种未知功能的蛋白质 CG31974-PA (Spot 4)。

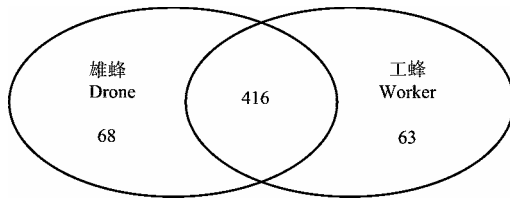


图 3 性成熟雄蜂与外勤工蜂触角表达的共有蛋白质点和特有蛋白质点文氏图

Fig. 3 Venn diagrams of shared proteins and unique proteins of sexually matured drone and adult worker antennae

3 讨论

本研究从蛋白质组水平上对性成熟雄蜂与外勤工蜂触角蛋白质表达特点进行了分析，结果发现雄蜂和工蜂触角的蛋白质表达谱十分相似（图 1），它们不仅在表达的蛋白质数量上差异不明显，而且这些蛋白质的分子性质如分子量、等电点的分布情况也相近，且共有蛋白质占雄蜂与工蜂触角所表达的总蛋白质数量的 85% 以上，这说明虽然雄蜂与工蜂触角在形态学上存在明显的差异，但它们在分子进化过程中还是相

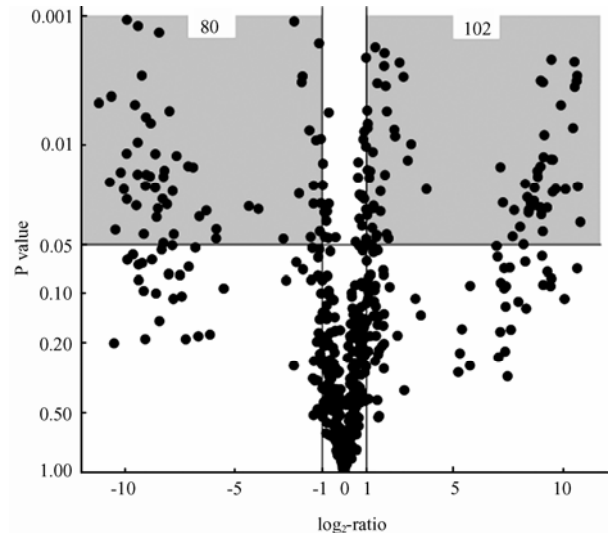
表 已鉴定蛋白质的功能分类表

Table Functional classification of the identified proteins

点编号 Spot number	等电点/分子 量理论值 Theoretical pI /Mr(kD)	等电点/分子 量实验值 Experimental pI /Mr(kD)	序列覆盖率 Sequence coverage	匹配率 Matched/ Searched	分数 Score	蛋白名称 Protein name	登录号 Accession number	上/下调表达 Up/Down expression
代谢类 Metabolism								
1	6.12/64.199	6.24/75.36	22%	11/14	117	保幼激素酯酶 Juvenile hormone esterase	gi 58585076	Up
2	6.12/64.199	6.4/74.91	22%	12/16	112	保幼激素酯酶 Juvenile hormone esterase	gi 58585076	Up
3	9.00/59.76	9.00/60	35%	17/24	191	ATP 合成酶 α 亚基异构体 1 Bellwether isoform 1	gi 48100966	Up
5	8.51/46.833	7.06/51.92	32%	12/19	125	乙酰辅酶 A 脱氢酶中链 Acyl-CoA dehydrogenase medium chain	gi 66499429	Up
转运类 Transporter								
6	5.71/15.59	5.35/16.24	42.00%	7/11	102	气味结合蛋白质 14 Odorant binding protein 14	gi 94158822	Up
7	5.46/15.54	5.12/15.14	54%	8/14	105	脂肪酸结合蛋白质 Fatty acid binding protein	gi 58585214	Up
8	5.46/15.54	5.39/15.08	68%	9/19	115	脂肪酸结合蛋白质 Fatty acid binding protein	gi 58585214	Up
9	4.44/14.034	4.32/13.35	51%	7/18	90	触角特异蛋白质 Aantennal-special protein A	gi 78100778	Down
未知功能 Unknown function								
4	5.37/43.859	6.23/52.38	36%	14/39	103	CG31974-PA	gi 110758754	Up

蛋白点编号 (Spot number) 代表在图中相对应点。分子量和等电点则是在 GenBank 列出的理论值以及实验得出的实验值。序列覆盖率 (Sequence coverage) 是指通过质谱鉴定的氨基酸序列占整个蛋白质理论氨基酸序列的比值。匹配上的肽段比例 (Matched/Searched) 是指与理论肽段相匹配的肽段数在实际得到的肽段中比例。蛋白分数 (Score) 大于 83 表示在 Mascot 蛋白数据库检索出的结果有效。蛋白登录号 (Accession number) 是与网络数据库 (例如 GenBank) 相对应的唯一编号。表达量上、下调 (Up/Down expression) 表示雄蜂触角蛋白质表达量相对于工蜂中的变化

Spot numbers were marked in accordance with the corresponding numbers on the gels, pI and molecular mass values were obtained either in theoretical and experimental outputs. Sequence coverage means the proportion of amino sequence identified in the entire theoretical amino sequence. Matched/Searched results indicate the proportion of peptides matched to the theoretical peptide in all the practice with the score more than 83. Accession number is the only serial number to GenBank and up or down expression means the quantity and quality of the protein expression in drone antennae and worker antennae

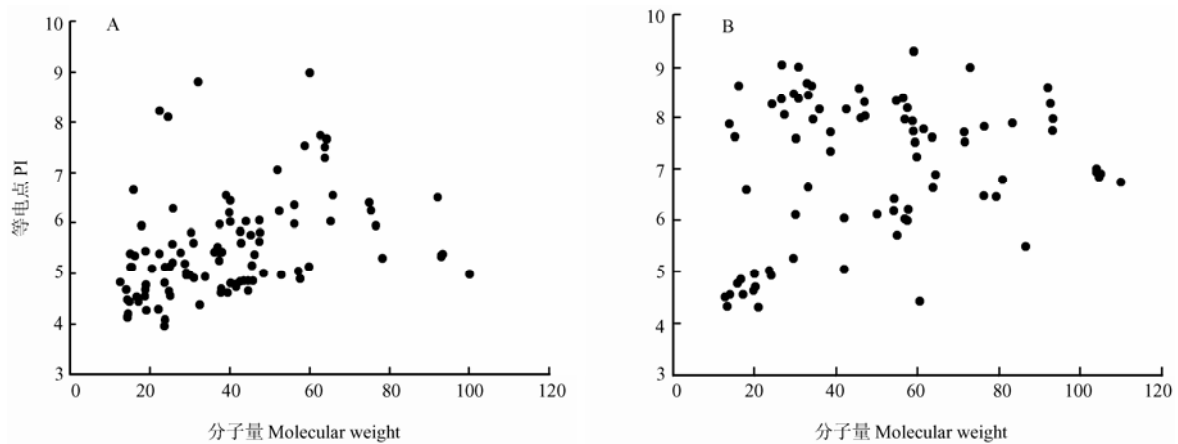


横坐标表示以 2 为底，雄蜂与工蜂触角蛋白质表达量的比值的对数，纵坐标表示 P 值。灰色区域表示在雄蜂与工蜂触角蛋白质表达量的差异大于 2 倍及 $P < 0.05$ 的条件下的差异蛋白质

Horizontal axis represents \log_2 expression ratio between drone and worker, vertical axis is P value. Protein spots in the gray area are those have significant expression volume with 2 fold change

图 4 性成熟雄蜂与外勤工蜂触角总蛋白质的差异表达量火山图

Fig. 4 Volcano plot of all protein spots between sexually matured drone and adult worker antennae



A 和 B 分别代表性成熟雄蜂与外勤工蜂触角中高表达蛋白质的等电点和分子量分布图。x、y 轴分别代表分子量和等电点
A and B represent scatter plots on molecular weight and pI of protein spots expressed highly of sexually matured drone and adult worker antennae, respectively. X and Y axes refer to molecular weight and pI, respectively

图 5 性成熟雄蜂与外勤工蜂触角中高表达蛋白质的等电点分子量分布图

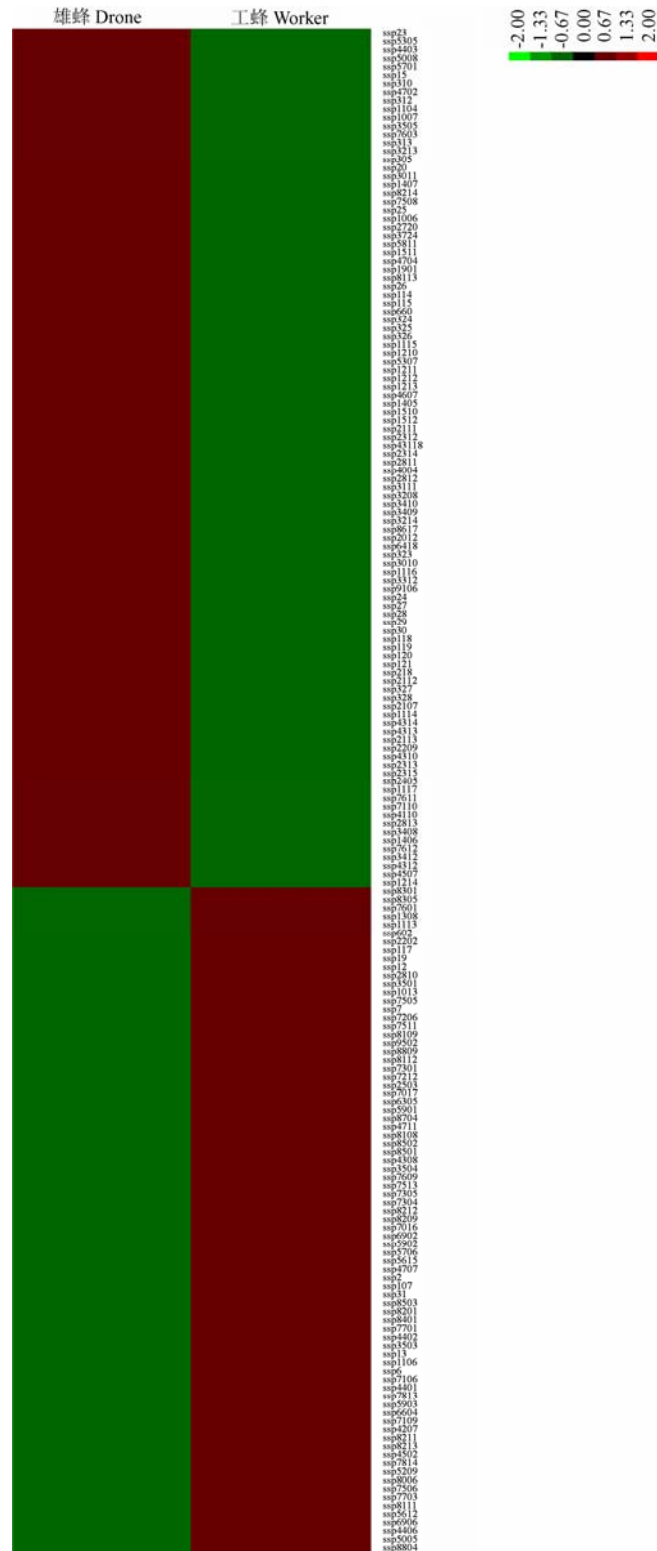
Fig. 5 Scatter plots of molecular weight and pI of protein spots expressed highly of sexually matured drone and adult worker antennae

对保守的。同时它们的蛋白质表达谱中仍有 182 个蛋白质表达量存在差异, 其中在雄蜂触角中有 68 个蛋白质特有表达, 在工蜂触角中有 63 个特有蛋白质表达 (图 3), 这些差异蛋白质包括特有蛋白质的表达可能是由于雄蜂和工蜂在蜂群中的社会性角色存在根本性的差异, 因此, 雄蜂触角中高表达的蛋白质可能有利于增强雄蜂在婚飞过程中对性信息素识别的敏感性, 以使其准确追踪蜂王并与其进行交配; 而在工蜂触角中高表达的蛋白质可能参与对蜜粉源的精确搜寻、返巢行为、识别同伴、以及接受蜂群内传递的信息等行为中。

鉴定 9 个差异的蛋白质中参与激素和能量代谢的蛋白质都在雄蜂触角中高表达。保幼激素酯酶 (Spot 1, Spot 2) 是一种雄蜂触角中高表达 B 类羧酸酯酶, 它可以水解蜜蜂体内保幼激素而使其失活^[23]。对雄性蛾小地老虎 *Agrotis ipsilon*^[24] 和雄性加勒比海果蝇 *Anastrepha suspense*^[25] 的研究发现, 保幼激素可以通过控制中枢嗅觉神经元的敏感性, 以增强对雌虫释放的性信息素信号的识别, 由此可以推测雄蜂触角中高表达的保幼激素酯酶是为了参与在触角发挥嗅觉作用中较多的保幼激素的代谢。参与能量代谢的蛋白质中, Bellwether 异构体 1 (Spot 3) 是线粒体膜上的 ATP 合酶 alpha 亚基, 可以进行 ATP 合成以及质子和核苷酸的转运; 酰基辅酶 A 脱氢酶 (Spot 5) 是一种参与脂

肪酸代谢过程中的氧化还原酶, 它们在雄蜂触角中高表达可能是由于雄蜂飞行以及嗅觉信号传导等生理过程需要更多的能量。

鉴定的 9 个差异蛋白质中包括 4 个转运蛋白质, 其中含有 2 个气味结合蛋白质和 2 个脂肪酸结合蛋白质。气味结合蛋白质 14 (Spot 6) 在工蜂与雄蜂刚孵化的幼虫期即有表达, 它可能是通过接受某些信息素的组分来对发育进行调控^[26], 其在雄蜂触角中表达量明显高于工蜂, 与从基因水平上证明其在成年雄蜂与工蜂中表达没有差异相矛盾^[21], 这可能是由于基因在翻译过程中发生了修饰导致了表达数量的差异。触角特异蛋白质 2 (Spot 9) 是一种只在成年蜜蜂中表达的普通气味结合蛋白质, 其在工蜂触角中表达量明显高于雄蜂 (图 7), 与前人得到的结果一致^[21,27], 这说明它在工蜂对普通气味物质而非性信息素的灵敏识别过程中发挥着重要的作用。事实上许多气味结合蛋白质不只是存在于触角中, 在昆虫的其他部位也有表达, 表明触角中的气味结合蛋白质除了可以结合和转运挥发性气味分子以外, 可能还具有其它功能, 但至今对其研究还不是很清楚。虽然在嗅觉反应中 OBPs 发挥着重要的功能, 但不能忽略其它蛋白质及未被鉴定的蛋白质在触角中发挥的作用。脂肪酸结合蛋白质 (Spot 7, Spot 8) 主要参与长链脂肪酸及其酰基辅酶 A 酯类的胞内转运, 在雄蜂触角中高表达说明其作用可能是



纵向代表雄蜂触角、工蜂触角中表达的蛋白质。横向代表不同的蛋白质。红色和绿色分别代表上调表达和下调表达蛋白质。下同
 The 2 columns represent proteins that were detected in drone and worker antennae respectively. The rows represent the individual protein. The up- or down-regulated proteins are indicated in red or green, respectively. The same as below

图 6 性成熟雄蜂与外勤工蜂触角差异蛋白质的聚类图谱

Fig. 6 Average-linkage clustering of differentially expressed proteins in sexually matured drone and adult worker antennae

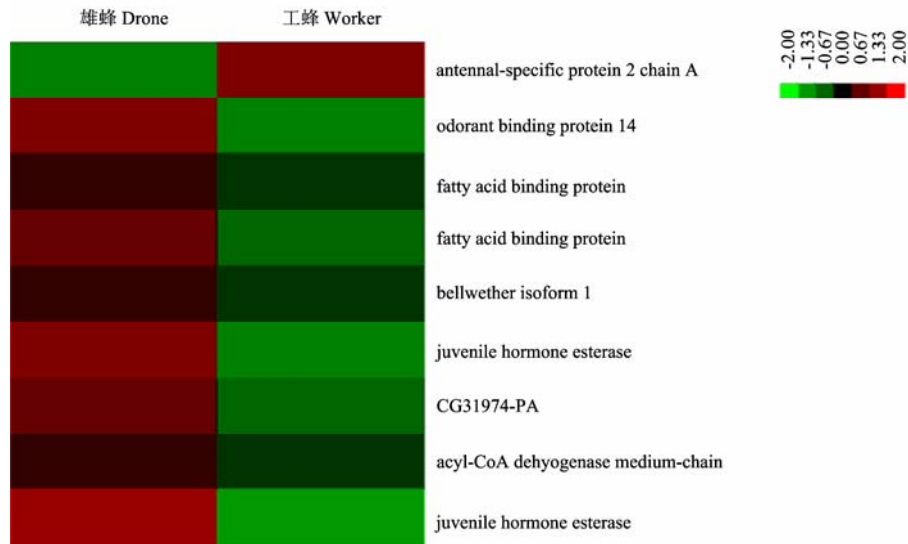


图7 性成熟雄蜂与外勤工蜂触角表达蛋白质中已鉴定的9个差异蛋白质聚类分析

Fig. 7 Hierarchical cluster analysis of 9 differentially expressed proteins of sexually matured drone and adult worker antennae

为了维持雄蜂飞行以及细胞分化中需要更高的能量^[28]。

尽管本研究首次对性成熟雄蜂与外勤工蜂触角的差异蛋白质组进行了分析,对了解触角在工蜂执行哺育、采集、防御等活动以及雄蜂进行交配过程中所发挥作用的分子机理有一定的帮助,但由于只鉴定了表达谱中的一部分蛋白质,因此需要进一步对雄蜂与工蜂触角中表达的未知差异蛋白质进行鉴定和分析,这对从分子水平上深入了解触角对雄蜂与工蜂在蜂群中完全不同的社会职能中发挥的作用具有重要意义。

4 结论

性成熟雄蜂与外勤工蜂触角表达的蛋白质的总数没有明显的差异,其中有大量的共有蛋白质,说明虽然在形态学上雄蜂与工蜂触角有较明显的差异而且各自行使不同的功能,但是它们在分子进化中还是相当保守的。雄蜂触角中高表达的蛋白质包括功能已鉴定的参与转运、激素及能量代谢的蛋白质可能在促进雄蜂在婚飞过程中对性信息素的敏感性中发挥作用,以使得雄蜂能够准确追踪蜂王并与其进行交配;工蜂触角中高表达的转运蛋白质可能在快速准确寻找蜜粉源、识别同伴、以及接受蜂群内信息传递过程中起着重要作用。

References

[1] 陈盛祿. 中国蜜蜂学. 北京: 中国农业出版社, 2001: 114-136.

Chen S L. *The Apicultural Science in China*. Beijing: China Agricultural Press, 2001: 114-136. (in Chinese)

- [2] Hoover S E R, Keeling C I, Winston M L, Slessor K N. The effect of queen pheromones on worker honey bee ovary development. *Naturwissenschaften*, 2003, 90: 477-480.
- [3] Pankiw T, Huang Z Y, Winston M L, Robinson G E. Queen mandibular gland pheromone influences worker honey bee (*Apis mellifera* L.) foraging ontogeny and juvenile hormone titers. *Journal of Insect Physiology*, 1998, 44: 685-692.
- [4] Le Conte Y, Arnold G, Trouiller J, Masson C. Identification of a brood pheromone in honeybees. *Naturwissenschaften*, 1990, 77: 334-336.
- [5] Boch R, Shearer D A, Stone B C. Identification of iso-amyl acetate as an active component in the sting pheromone of the honey bee. *Nature*, 1962, 195: 1018-1020.
- [6] Kevan P G, Lane M A. Flower petal microtexture is a tactile cue for bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985, 82: 4750-4752.
- [7] Butler C G, Calam D H, Callow R K. Attraction of *Apis mellifera* drones by the odours of the queens of two other species of honeybees. *Nature*, 1967, 213: 423-424.
- [8] Brockmann A, Brückner D. Structural differences in the drone olfactory system of two phylogenetically distant *Apis* species, *A. florea* and *A. mellifera*. *Naturwissenschaften*, 2001, 88: 78-81.
- [9] Vetter R S, Visscher P K. Influence of age on antennal response of

- male honey bees, *Apis mellifera*, to queen mandibular pheromone and alarm pheromone component. *Journal of Chemical Ecology*, 1997, 23(7): 1867-1880.
- [10] Slessor K N, Kaminski L A, King G G S, Borden J H, Winston M L. Semiochemical basis of the retinue response to queen honey bees. *Nature*, 1988, 332: 354-356.
- [11] Wanner K W, Nichols A S, Walden K K O, Brockmann A, Luetje C W, Robertson H M. A honey bee odorant receptor for the queen substance 9-oxo-2-decenoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(36): 14383-14388.
- [12] Sánchez-Gracia A, Vieira F G, Rozas J. Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. *Heredity*, 2009, 103: 208-216.
- [13] Löbel D, Jacob M, Völkner M, Breer H. Odorants of different chemical classes interact with distinct odorant binding protein subtypes. *Chemical Senses*, 2002, 27: 39-44.
- [14] Vogt R G, Prestwich G D, Lerner M R. Odorant-binding-protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. *Journal of Neurobiology*, 1991, 22(1): 74-84.
- [15] Vogt R G, Callahan F E, Rogers M E, Dickens J C. Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders, as indicated by LAP, an OBP-related protein of the true bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera). *Chemical Senses*, 1999, 24: 481-495.
- [16] Krieger J, von Nickisch-Roseneck E, Mameli M, Pelosi P, Breer H. Binding proteins from the antennae of *Bombyx mori*. *Insect Biochemical Molecular Biology*, 1996, 26: 297-307.
- [17] Ziegelberger G. The multiple role of the pheromone-binding protein in olfactory transduction. Chichester: Wiley and Sons, 1996, 200: 267-280.
- [18] Kaissling K E. Peripheral mechanisms of pheromone reception in moths. *Chemical Senses*, 1996, 21: 257-268.
- [19] Rospars J P, Krivan V, Lánský P. Perireceptor and receptor events in olfaction. Comparison of concentration and flux detectors: a modeling study. *Chemical Senses*, 2000, 25(3): 293-311.
- [20] The Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 2006, 443: 931-949.
- [21] Forêt S, Maleszka R. Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). *Genome Research*, 2006, 16: 1404-1413.
- [22] Li J K, Feng M, Zhang L, Zhang Z H, Pan Y H. Proteomics analysis of major royal jelly protein changes under different storage conditions. *Journal of Proteome Research*, 2008, 7(8): 3339-3353.
- [23] 颜伟玉, 许 标, 谢宪兵, 曾志将. 化学放射法测定蜜蜂保幼激素酯酶活性. 江西农业大学学报, 2004, 26(5): 785-786.
- Yan W Y, Xu B, Xie X B, Zeng Z J. Determination of activity of juvenile hormone esterase in honey bees. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2004, 26(5): 785-786. (in Chinese)
- [24] Anton S, Gadenne C. Effect of juvenile hormone on the central nervous processing of sex pheromone in an insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96: 5764-5767.
- [25] Teal P E A, Gomez-Simuta Y, Proveaux A T. Mating experience and juvenile hormone enhance sexual signaling and mating in male Caribbean fruit flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(7): 3708-3712.
- [26] Chan Q W T, Foster L J. Changes in protein expression during honey bee larval development. *Genome Biology*, 2008, 9(10): R156.
- [27] Danty E, Michard-Vanhée C, Huet J C, Genecque E, Pernollet J C, Masson C. Biochemical characterization, molecular cloning and localization of a putative odorant-binding protein in the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidea). *Federation of European Biochemical Societies*, 1997, 414(3): 595-598.
- [28] Esteves A, Ehrlich R. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part C*, 2006, 142: 262-274.

(责任编辑 岳 梅)