

王浆高产蜜蜂和原种意大利蜜蜂雄蜂卵期发育蛋白质组分析

房宇, 李建科

(中国农业科学院蜜蜂研究所/农业部授粉昆虫重点开放实验室, 北京 100093)

摘要: 【目的】比较王浆高产蜜蜂 (*Apis mellifera* L. 浆蜂) 与原种意大利蜜蜂 (*Apis mellifera* L. 原意) 雄蜂卵期 3 d 发育阶段蛋白质组的特点。【方法】根据双向电泳所得表达谱, 对两个蜂种雄蜂卵期发育的蛋白质的种类、等电点、分子量和表达量进行分析。【结果】浆蜂雄蜂卵期所表达的蛋白数 (332、377 和 339) 显著的高于相应日龄原意雄蜂卵期 3 个日龄所表达的蛋白数 (283、305 和 293) ($P < 0.05$), 其中在两蜂种 3 个日龄共同表达的蛋白数为 254 个。通过雄蜂卵期 3 d 发育过程蛋白质表达谱的比较, 两个蜂种分别检测到 274、298 和 285 个共有蛋白。在这些共有蛋白中, 浆蜂雄蜂分别有 54、42 和 47 个蛋白的表达量显著高于 ($P < 0.05$) 原意, 18、75 和 61 个蛋白显著低于 ($P < 0.05$) 原意。同时, 浆蜂还检测到 58、79 和 54 个特异蛋白, 而原种意大利蜜蜂也分别检测到 9、7、8 个特异蛋白。【结论】浆蜂和原意雄蜂卵期发育的蛋白质组表达谱存在显著差异, 但都在 2 日龄蛋白表达最活跃; 两个蜂种雄蜂卵期发育所表达的共有蛋白可能是其发育所必须的管家蛋白, 但它们的表达模式存在较大差异, 不同日龄的特异蛋白表明雄蜂卵在不同的发育阶段需要不同的蛋白来调控; 浆蜂和原意雄蜂卵期表达的特异蛋白是否是王浆高产相关的功能蛋白, 有待进一步的研究。

关键词: 王浆高产蜜蜂 (*Apis mellifera* L.); 原种意大利蜜蜂 (*Apis mellifera* L.); 雄蜂卵; 双向电泳; 蛋白质组

Comparative Analysis of Proteome Between Drone Eggs of High Royal Jelly Producing Bees (*Apis mellifera* L.) and Native Italian Bees (*Apis mellifera* L.)

FANG Yu, LI Jian-ke

(Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Science/ Key Laboratory of Pollinating Insect Biology, Beijing 100093)

Abstract: 【Objective】 The objective of this study is to compare the protein complements of the high producing royal jelly bees (*Apis mellifera* L.) with the native Italian bees (*Apis mellifera* L.) during the three days of egg development of the drone bees. 【Method】 The pI, molecular weight, expression of the dedected protein were analyzed by the profile of two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) of the drone at different egg development phases from the two bee strains. 【Result】 332, 377 and 339 proteins were detected in the proteome profile of high royal jelly producing drone eggs on day 1, day 2 and day 3, respectively, which was significantly higher than those detected in native Italian drones, 283, 305 and 293 ($P < 0.05$), accordingly. Two hundred and fifty-four proteins were resolved at all the images within two bee strains. Meanwhile, 274, 298, 285 proteins presented on day 1, day 2 and day 3 between the two bee strains, respectively. Among them 54, 42 and 47 proteins in high royal jelly producing bees significant higher than those of native Italian bees in expressional volume ($P < 0.05$), respectively; while 18, 75, 61 proteins showed a reverse relations ($P < 0.05$). Furthermore, 58, 79, 54 proteins expressed specifically in high production royal jelly bees and 9, 7, 8 in native Italian bees. 【Conclusion】 Significant differences had been found in the drone egg proteome profile between the high royal jelly producing bees and the native Italian bees, while both the two strains express the most active at 2-day-old eggs; The protein

收稿日期: 2008-10-20; 接受日期: 2008-12-02

基金项目: 国家蜜蜂产业技术体系和公益性行业科研专项 (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。
通信作者李建科 (1962-), 男, 河南陕县人, 教授、研究方向为蜜蜂饲养与生物技术。Tel: 010-62591449; E-mail: apislij@126.com

expressed at all images suggests that it should be indispensable for drone egg development, but their expression pattern is different within two bee species. The proteins expressed at a specific egg time-point suggest that different developmental stages need specific proteins to be involved in; A further research will be needed to identify the function of the detected proteins and to investigate whether the specific proteins are related to high royal jelly production.

Key words: high royal jelly producing bee(*Apis mellifera* L.); native Italian bee(*Apis mellifera* L.); drone's egg; two-dimensional gel electrophoresis; proteome

0 引言

【研究意义】雄蜂是蜜蜂社会的三型蜂(蜂王、工蜂和雄蜂)之一,其发育经历卵、幼虫、蛹及成虫4个阶段,24 d发育历期^[1]。卵期发育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^[2]。雄蜂不承担巢内的任何工作,其主要职能是在空中与处女王交配。在短暂的婚飞交尾过程中,雄蜂为蜂王提供500~700万精子^[3-5]以保证其一产受精卵的需要,蜜蜂后代一半的遗传来自雄蜂,因此雄蜂与蜂群的遗传结构联系密切,直接影响到蜂群的增殖力、生产力、抗逆性等性状^[6]。王浆高产蜜蜂(*Apis mellifera* L.浆蜂),是中国从意大利蜜蜂中培育成功的世界上海产浆水平最高的蜂种^[7-8],但迄今为止,对其雄蜂卵期的发育机理还未开展。由于浆蜂和原种意大利蜜蜂(*Apis mellifera* L.原意)为同一亚种,同属意大利蜜蜂(*Apis mellifera* L.),除王浆产量不同外,在体形、体色、卵重、形态结构及蜂蜜产量等方面都具有相同的特性^[9-11],因此,用原意作对照研究雄蜂卵期发育的蛋白质组,通过比较浆蜂与原意雄蜂的卵期发育蛋白质组,有利于揭示雄蜂卵期发育的分子机理,为填补蜜蜂生物学的空白和揭示王浆高产的机理奠定基础,同时对优良蜜蜂种质资源的保护和合理开发利用,推动蜜蜂分子育种进程会起到积极的作用。【前人研究进展】由于雄蜂在蜂群中不参与任何采集活动^[6],不产生直接的经济价值^[12],因此是蜂群当中被忽视的性别^[13],对其研究不如雌性蜂充分。但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)^[14-15],其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^[16],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%^[14,17-18],并且有益性状在雄蜂的表达频率也高于蜂王和工蜂^[14],雄蜂在育种方面具有独特的优越性。目前,雄蜂研究的热点主要集中在视网膜信号转导^[19]以及生殖系统机理^[20-21]等方面,通过对雄蜂和工蜂从卵发育到成虫的不同阶段的形态、

生理和行为等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^[12];热学研究证明,雄蜂的物质和新陈代谢在发育的各个阶段都显著高于工蜂^[22]。蜂卵已证明是最适合基因操作的蜜蜂胚胎组织^[23],将一段dsRNA注入工蜂胚胎可以有效干涉卵黄蛋白原基因、*vasa*和*nanosRNA*的表达^[24-25],目前已经实现工蜂前肠期胚胎细胞的体外培养^[26]。雄蜂卵较工蜂卵的体积略大或相同^[27],在基因操作上与工蜂卵同样便利,卵内基因不存在显隐性关系,对研究蜜蜂的基因表达具有优越性,但对雄蜂卵期发育的分子机理和不同蜂种之间的比较研究目前还未见报道。浆蜂是中国独有的蜂种资源和基因资源,从其诞生至今,虽在表型性状^[28-29]、形态学^[30]、微卫星DNA分子标记^[31-32]、数量遗传学^[33-34]方面取得一些研究结果,但利用蛋白质组学方法研究比较雄蜂卵的发育特点,国内外还未见同类报道。蜜蜂基因组测序工作的完成^[35],为高通量开展蜜蜂蛋白质组的研究奠定了基础。【本研究切入点】通过双向电泳(2-DE)方法,分析、比较浆蜂和原意雄蜂卵期不同发育日龄蛋白质组的表达特征,揭示雄蜂卵期发育的分子机理,这是对蜜蜂生物学的补充和发展,也为揭示王浆高产的机理奠定基础。【拟解决的关键问题】了解浆蜂和原意雄蜂卵期不同发育阶段蛋白质表达调控的特点,通过两蜂种蛋白质组的差异比较,为阐明王浆高产的分子机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 取样

试验所用原意(*Apis mellifera* L.)和浆蜂(*Apis mellifera* L.)分别从意大利Pisa和中国浙江平湖引进,饲养于中国农业科学院蜜蜂研究所试验蜂场。

分别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)中,使蜂王在巢脾上产卵以供取样,5 h时将蜂王由控制器中提出,置于其它巢脾上。24 h

时从控制器中提出巢脾,用移虫针取 1 日龄雄蜂卵放入 1.5 ml Ep 管(置冰浴中)。已取过 1 日龄雄蜂卵的巢脾重新放回蜂王控制器,分别于 48 h、72 h 取 2 日龄、3 日龄雄蜂卵。每天两蜂种均取雄蜂卵 300 粒。

1.2 试验

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

1.3 蛋白提取

蛋白提取方法根据张兰等^[36]的方法。每 1 mg 雄蜂卵加入 10 μ l 磷酸缓冲液(pH 7.6, 含 32.5 mmol·L⁻¹ K₂HPO₄, 2.6 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, 400 mmol·L⁻¹ NaCl), 冰浴研磨 20 min, 超声 2 min。然后 4℃, 12 000×g, 离心 10 min; 4℃, 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 μ l 上述的磷酸缓冲液, 4℃, 15 000×g, 离心 10 min。取上清与上步所得上清合并, 作为磷酸易溶性蛋白溶液备用。沉淀中按每 1 mg 雄蜂卵加入 10 μ l 蛋白裂解缓冲液(8 mmol·L⁻¹ 尿素 2 mmol·L⁻¹ 硫脲, 4% CHAPS, 20 mmol·L⁻¹ Tris 碱, 30 mmol·L⁻¹ DTT, 2% Bio-lyte pH 3~10), 冰浴研磨 10 min, 超声 2 min。4℃, 15 000×g, 离心 10 min, 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份。将此混合液在 4℃, 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 μ 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⁻¹ 氢氧化钠调溶液 pH 至中性, 制成蛋白样品溶液, 直接使用或是一 70℃ 冷藏备用。

1.4 蛋白浓度测定

按照 Bradford^[37]介绍的方法进行测定。用 BSA 做标准曲线, 测定 595 nm 波长处的吸光度(Beckman, spectrophotometer DU800)。

1.5 双向电泳分析

将提取的蛋白样品用 LB 稀释后再与上样水化液(8 mol·L⁻¹ 尿素, 4% CHAPS, 0.001% 溴酚兰, 65

mmol·L⁻¹ DTT, 0.2% Bio-lyte pH 3~10) 按照 1:4 的比例充分混合, 取此混合液 420 μ l 上样, 使上样液中的蛋白含量均为 280 μ g。使用 17 cm IPG 胶条(pH 3~10, 线性), 在 18℃ 按以下程序进行第一向等电聚焦(Protean IEF Cell system, Bio-Rad Hercules, CA, USA): 50 V, 水化 14 h; 250 V, 30 min 除盐, 共重复 3 次; 1 000 V, 1 h 再次除盐; 9 000 V, 5 h 线性升压; 9 000 V, 最终累积增压达到 60 000 V·h, 完成等电聚焦。

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⁻¹ 尿素, 0.375 mol·L⁻¹ Tris-HCl pH 8.8, 20% 甘油, 2% SDS) 平衡胶条各 15 min。平衡完成后将胶条转移到聚丙烯酰胺分离胶上(1.0 mm 厚, 12% T), 15 μ l 2-DE 蛋白分子量标准加到上样滤纸片上后, 放在胶条的酸性端。用 PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad Hercules, CA, USA) 系统, 按 25 mA/gel 的条件开始进行第二向 SDS-PAGE 电泳, 直至溴酚蓝到达胶下缘时结束二向。后将凝胶浸泡入固定液中(40% 乙醇, 10% 醋酸)摇床固定 4 h, 接着将凝胶转入染色液(CBB G-250 染色母液与甲醇 4:1 混合)中进行染色 14 h。

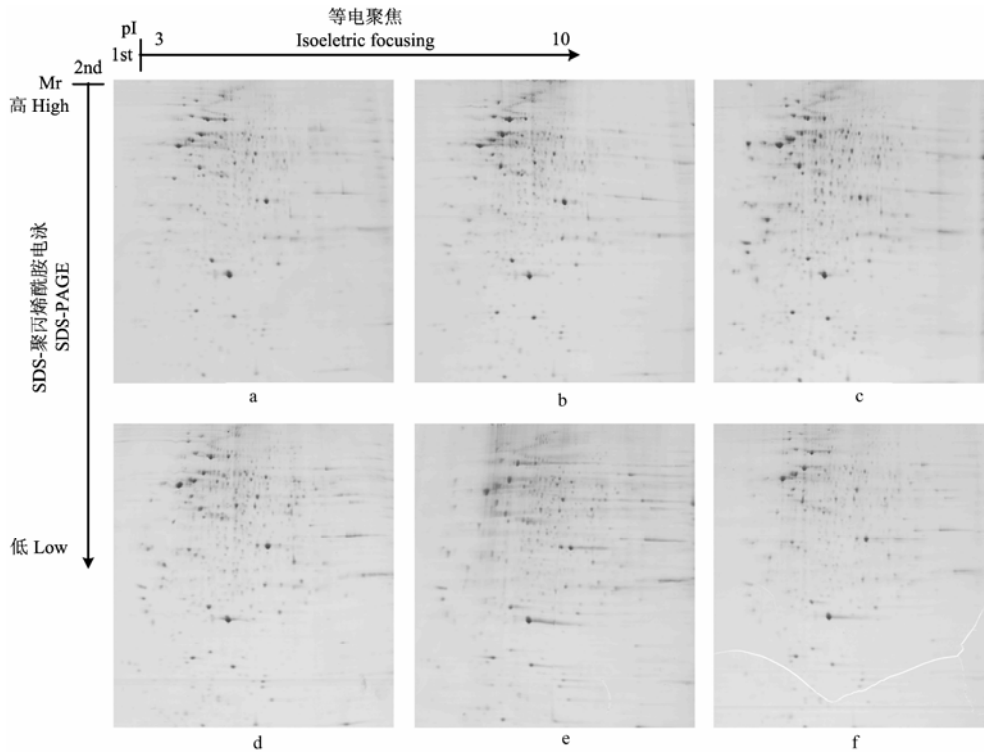
1.6 图像分析

染色后凝胶使用透射模式进行扫描, 扫描结果直接导入计算机(32 位, 300 dpi 分辨率, 全彩)。分别对两蜂种各个日龄的 5 张重复良好的凝胶图, 使用 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。采用管家蛋白总表达量的方法(total quantity in housekeeping protein Set) 标准化处理(normalization)。采用 ANOVA (Version 6.12, SAS Institute, Cary, N.C., USA) 的邓肯法对数据进行统计检验。

2 结果与分析

2.1 原意和浆蜂雄蜂卵期 1、2、3 日龄的蛋白质表达图谱分析

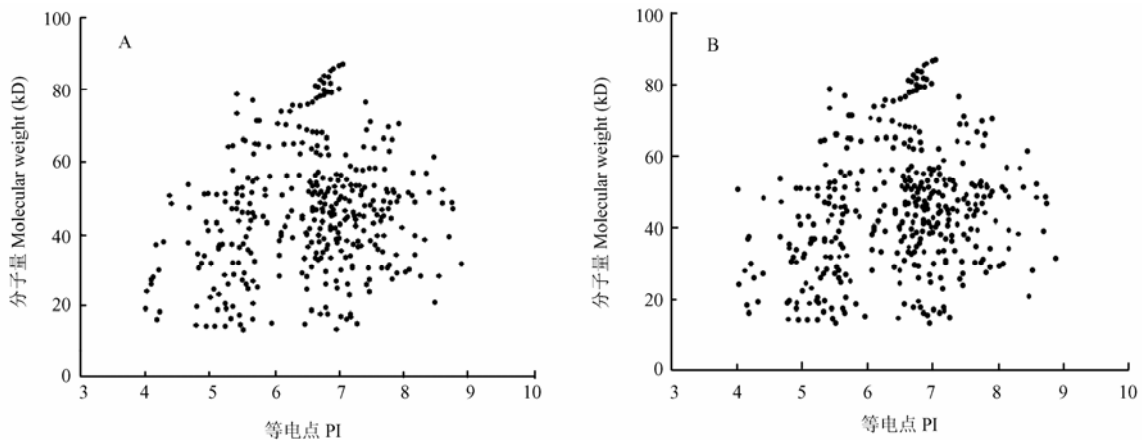
图 1 是 5 次具有很好重复性的原意和浆蜂雄蜂卵期发育蛋白代表图谱之一。图谱分析采用相同的参数(灵敏度 10.00, 尺寸比例 7, PDQuest 7.3.0, Bio-Rad Hercules, CA, USA)。原意雄蜂卵期 1 日龄表达蛋白 283 个, 2 日龄 305 个, 3 日龄 293 个, 这些蛋白的分子量范围为 13.20~87.04 kD, 等电点范围为 4.01~8.89 (图 2-A); 浆蜂雄蜂卵期 1 日龄表达蛋白



a、b、c 分别代表 1 日龄、2 日龄及 3 日龄原意雄蜂卵蛋白图谱；d、e、f 分别代表 1 日龄、2 日龄及 3 日龄浆蜂雄蜂卵蛋白图谱。每个样品上样量 280 μg，CBB G-250 染色
 A-f are protein profiles corresponding to day 1, day 2 and day 3 of two honeybee strains, 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 (*Apis mellifera* L.) 与王浆高产蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 雄蜂卵期发育 2-DE 蛋白图谱

Fig. 1 Profile of the 2-DE analysis of the drone eggs of native Italian bee (*Apis mellifera* L.) and high royal jelly producing honeybee (*Apis mellifera* L.) on the different development days



A、B 分别代表原意和浆蜂的雄蜂卵期蛋白分布
 A and B are protein distribution corresponding to native Italian bee and high royal jelly producing honeybee, respectively

图 2 原种意大利蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 与王浆高产蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 雄蜂卵期发育表达蛋白分布图

Fig. 2 The scatter plot of drone eggs expressed proteins of native Italian bee (*Apis mellifera* L.) and high royal jelly producing honeybee (*Apis mellifera* L.)

332 个, 2 日龄 377 个, 3 日龄 339 个, 这些蛋白的分子量范围为 13.20~87.04 kD, 等电点范围为 4.01~8.89 (图 2-B)。

2.2 原意和浆蜂雄蜂卵期 1、2、3 日龄蛋白质表达分析

2.2.1 原意雄蜂卵期 1、2、3 日龄蛋白表达分析

原意雄蜂 3 个日龄表达的共有蛋白数为 259 个, 其中有 15 个蛋白表达量随卵期发育呈显著的上调趋势, 6 个蛋白表达量则呈显著的下调趋势 ($P<0.05$) (表 1,

表 2)。

对原意雄蜂卵各日龄的特异性蛋白斑点比较分析 (图 3-A) 发现, 第 1 日龄有 10 个特异的蛋白斑点, 这些蛋白的分子量范围是 27.30~64.49 kD, 等电点范围是 5.29~8.32, 表达量范围是 3319.7~38 914.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 第 2 日龄特异表达 15 个蛋白斑点, 这些蛋白分子量大约在 22.21~62.25 kD 之间, 等电点在 4.81~8.08 范围之内, 表达量是 3 044.5~12 037.9 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 2); 第 3 日龄有 3 个特异的蛋白斑点, 这些蛋白分

表 1 原种意大利蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 雄蜂卵期发育过程中表达量呈显著上调的蛋白

Table 1 Significantly up-regulated expressed proteins during the development of the native Italian drone eggs

点编号(SSP) Spot No.	分子量 Mr (kD)	等电点 pI	表达量 Expressional volume ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		
			1 日龄 Day 1	2 日龄 Day 2	3 日龄 Day 3
103	23.91	4.03	8091±124c	14521±142b	27138±356a
201	29.89	4.21	8780±201c	18686±104b	54071±1780a
302	37.47	4.67	1303±101c	9797±187b	13653±199a
601	50.63	4.38	5186±98c	27583±211b	78874±237a
2101	28.47	5.37	6493±57c	9937±86b	14635±121a
2603	52.61	5.43	36437±1089c	58089±1128b	75899±2019a
2901	73.25	5.42	17670±457c	25077±595b	30384±623a
3301	38.12	6.07	6398±142c	12038±457b	20510±586a
3303	38.97	6.28	1690±75c	7075±241b	35570±680a
3909	73.78	6.10	2478±104c	5212±101b	7317±213a
4305	41.54	6.70	9081±308c	17782±414b	23740±598a
5906	83.51	6.83	1954±75c	3264±95b	4388±146a
6102	25.85	7.13	3927±78c	7144±115b	9723±187a
6205	36.29	7.29	4250±36c	6017±49b	7689±174a
6706	58.84	7.17	7528±210c	9242±351b	10006±840a

不同字母表示差异显著 ($P<0.05$), 置信度为 95%。下同

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

表 2 原种意大利蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 雄蜂卵期发育过程中表达量呈显著下调的蛋白

Table 2 Significantly down-regulated expressed proteins during the development of the native Italian drone eggs

点编号(SSP) Spot No.	分子量 Mr (kD)	等电点 pI	表达量 Expressional volume ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		
			1 日龄 Day 1	2 日龄 Day 2	3 日龄 Day 3
3802	64.87	5.75	44284±320a	36709±275b	28218±253c
5705	56.44	6.96	15161±102a	10694±132b	7812±99c
6905	87.04	7.05	3652±65a	2903±51b	1591±39c
7307	39.37	7.69	9493±89a	7044±97b	4076±50c
8604	50.46	8.12	17600±285a	11411±198b	7531±93c
8702	56.72	8.34	31078±118a	29664±340b	18201±103c

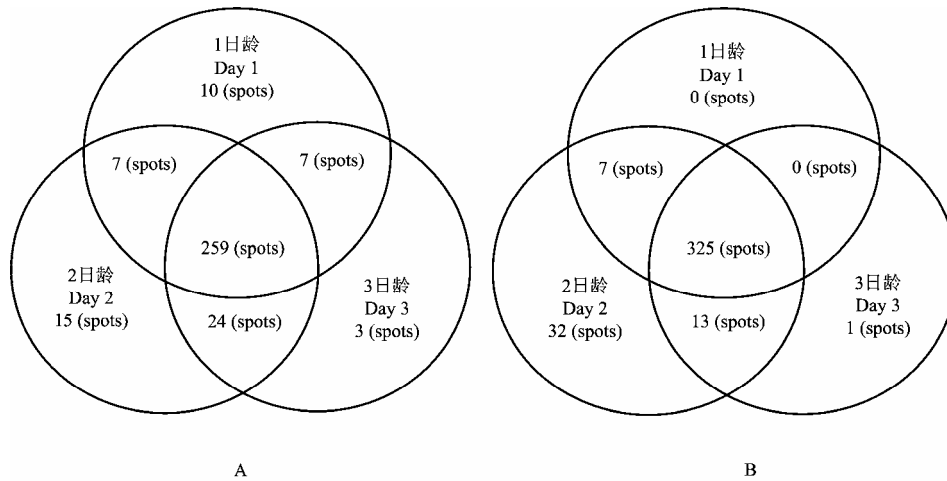


图 A 和 B 分别为原意和浆蜂雄蜂卵期 3 天发育表达蛋白数目比较

Venn diagrams show unique and commonly expressed proteins of the development days between the two strains

图 3 原种意大利蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 与王浆高产蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 雄蜂卵期发育表达的共有蛋白和特异蛋白数目文氏图

Fig. 3 Comparison of the protein number of the drone eggs of native Italian bee (*Apis mellifera* L. A) and high royal jelly producing honeybee (*Apis mellifera* L. B) on the different development days

子量 18.21~62.91 kD, 等电点 4.23~7.77, 表达量为 1 681.8~9 493.7 mg·L⁻¹。

除了这些共有点和特异点之外, 有 7 个蛋白 (分子量 39.40~56.92 kD, 等电点 6.10~8.39) 在第 1 日龄和第 2 日龄表达而在 3 日龄关闭; 有 24 个蛋白 (分子量 14.70~85.83 kD, 等电点 4.01~8.74) 在第 2 日龄和第 3 日龄表达而在第 1 日龄关闭; 另外, 有 7 个蛋白 (分子量 19.29~75.55 kD, 等电点 5.41~8.60) 在第 1 日龄和第 3 日龄表达而在第 2 日龄关闭。

2.2.2 浆蜂雄蜂卵期 1、2、3 日龄蛋白表达分析 浆蜂雄蜂 3 个日龄表达的共有蛋白数为 325 个, 分子量和等电点分别处于 13.20~87.04 kD 和 4.03~8.89 的范围内, 其中有 17 个蛋白表达量随卵期发育呈显著的上调趋势, 29 个蛋白表达量则呈显著的下调趋势 ($P < 0.05$) (表 3, 4)。

对浆蜂雄蜂卵各日龄的特异性蛋白斑点比较分析 (图 3-B) 发现, 第 1 日龄没有发现特异蛋白的表达, 第 2 日龄特异表达 32 个蛋白斑点, 这些蛋白分子量大约在 15.46~81.29 kD 之间, 等电点在 4.78~7.75 范围之内, 表达量是 932.2~9 780.9 mg·kg⁻¹; 第 3 日龄只有 1 个特异的蛋白斑点, 分子量 75.38 kD, 等电点 6.40, 表达量为 5 869.9 mg·L⁻¹。

除了这些共有点和特异点之外, 有 7 个蛋白 (分

子量 19.29~63.51 kD, 等电点 5.34~7.10) 在第 1 日龄和第 2 日龄表达而在 3 日龄关闭; 有 13 个蛋白 (分子量 14.370~61.89 kD, 等电点 4.01~7.74) 在第 2 日龄和第 3 日龄表达而在第 1 日龄关闭; 没有检测到在第 1 日龄和第 3 日龄表达而在第 2 日龄关闭的蛋白。

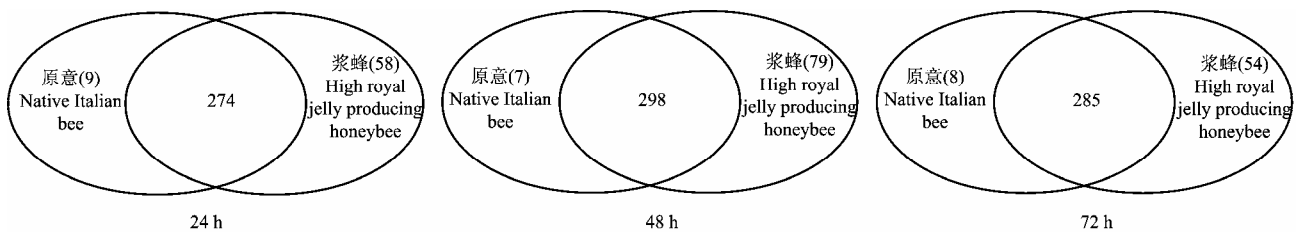
2.2.3 原意和浆蜂雄蜂卵期 1、2、3 日龄蛋白表达的比较 原意雄蜂卵期 3 个日龄所表达的蛋白数 (283、305 和 293 个) 均显著的低于 ($P < 0.05$) 相应日龄浆蜂雄蜂卵期所表达的蛋白数 (332、377 和 339 个) (图 3)。

原意和浆蜂雄蜂卵期 1 日龄共同表达的蛋白数为 274 个 (分子量 13.20~87.04 kD, 等电点 4.54~8.89) (图 4), 其中浆蜂 54 个蛋白点的表达量显著高于原意, 18 个蛋白点原意的表达量显著高于浆蜂 ($P < 0.05$), 原意特异表达的蛋白数为 9 个 (分子量 28.05~75.55 kD, 等电点 5.92~8.25) (图 6-A), 浆蜂为 58 个 (分子量 14.21~85.83 kD, 等电点 4.58~8.74) (图 6-D); 2 日龄雄蜂卵期共同表达的蛋白数为 298 个 (分子量 13.20~87.04 kD, 等电点 4.67~8.89) (图 4), 其中 42 个蛋白点浆蜂表达量显著高于原意, 75 个蛋白点原意表达量显著高于浆蜂 ($P < 0.05$), 原意特异表达的蛋白数为 7 个 (分子量 35.23~57.80

表 3 王浆高产蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 雄蜂卵期发育过程中表达量呈显著上调的蛋白

Table 3 Significantly up-regulated expressed proteins during the development of the high royal jelly producing drone eggs

点编号(SSP) Spot No.	分子量 Mr (kD)	等电点 pI	表达量 Expressional volume (mg·L ⁻¹)		
			1 日龄 Day 1	2 日龄 Day 2	3 日龄 Day 3
201	29.89	4.21	33055±579c	65938±843b	75443±221a
1006	16.28	5.33	8031±356c	13945±124b	29737±205a
1007	19.48	5.35	57292±209c	74794±418b	104456±398a
1205	31.88	5.36	4885±90c	7262±126b	12357±182a
2101	28.47	5.37	6770±76c	9605±87b	17908±115a
2103	29.01	5.53	1207±65c	4792±112b	6159±95a
2201	31.79	5.44	4061±92c	6441±110b	14736±326a
3001	16.18	5.66	3088±97c	14256±146b	21235±315a
3102	28.12	6.07	5366±92c	9755±129b	11328±247a
3606	50.64	6.12	5192±107c	7802±98b	10586±216a
3704	55.30	5.73	18764±890c	28579±579b	31662±381a
4102	27.92	6.50	5465±108c	9877±84b	11482±176a
4305	41.54	6.70	8722±78c	11217±107b	16425±145a
5007	17.55	6.82	4507±56c	5981±79b	6277±128a
6403	44.64	7.13	5813±76c	6974±98b	7551±200a
7105	30.26	7.65	5259±305c	12035±350b	21005±487a
8704	62.91	7.77	2664±30c	4112±72b	5457±79a

图 4 原种意大利蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 与王浆高产蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 雄蜂卵期发育表达共有蛋白和特异蛋白数目文氏图Fig. 4 Venn diagrams show the number of unique and proteins commonly expressed between drone eggs of native Italian bee (*Apis mellifera* L.) and high royal jelly producing honeybee (*Apis mellifera* L.) on the different development days

kD, 等电点 6.97~7.60) (图 6-B), 浆蜂为 79 个 (分子量 14.21~81.67kD, 等电点 4.60~8.60) (图 6-E); 雄蜂卵期 3 日龄共同表达的蛋白数为 285 个 (分子量 13.20~87.04 kD, 等电点 4.01~8.89) (图 4), 其中 47 个蛋白点浆蜂的表达量显著高于原意, 61 个蛋白点原意的表达量显著高于浆蜂 ($P<0.05$), 原意特异表达的蛋白数为 8 个 (分子量 19.29~75.55 kD, 等

电点 5.19~8.25) (图 6-C), 浆蜂为 54 个 (分子量 14.21~81.67 kD, 等电点 4.53~8.46) (图 6-F)。两蜂种在 3 个日龄均表达的蛋白数为 254 个 (分子量 13.20~87.04 kD, 等电点 4.03~8.89)。

3 讨论

本研究首次利用双向电泳技术对王浆高产蜜蜂

表 4 王浆高产蜜蜂 (*Apis mellifera* L. 浆蜂) 雄蜂卵期发育过程中表达量呈显著下调的蛋白

Table 4 Significantly down-regulated expressed proteins during the development of the high royal jelly producing drone eggs

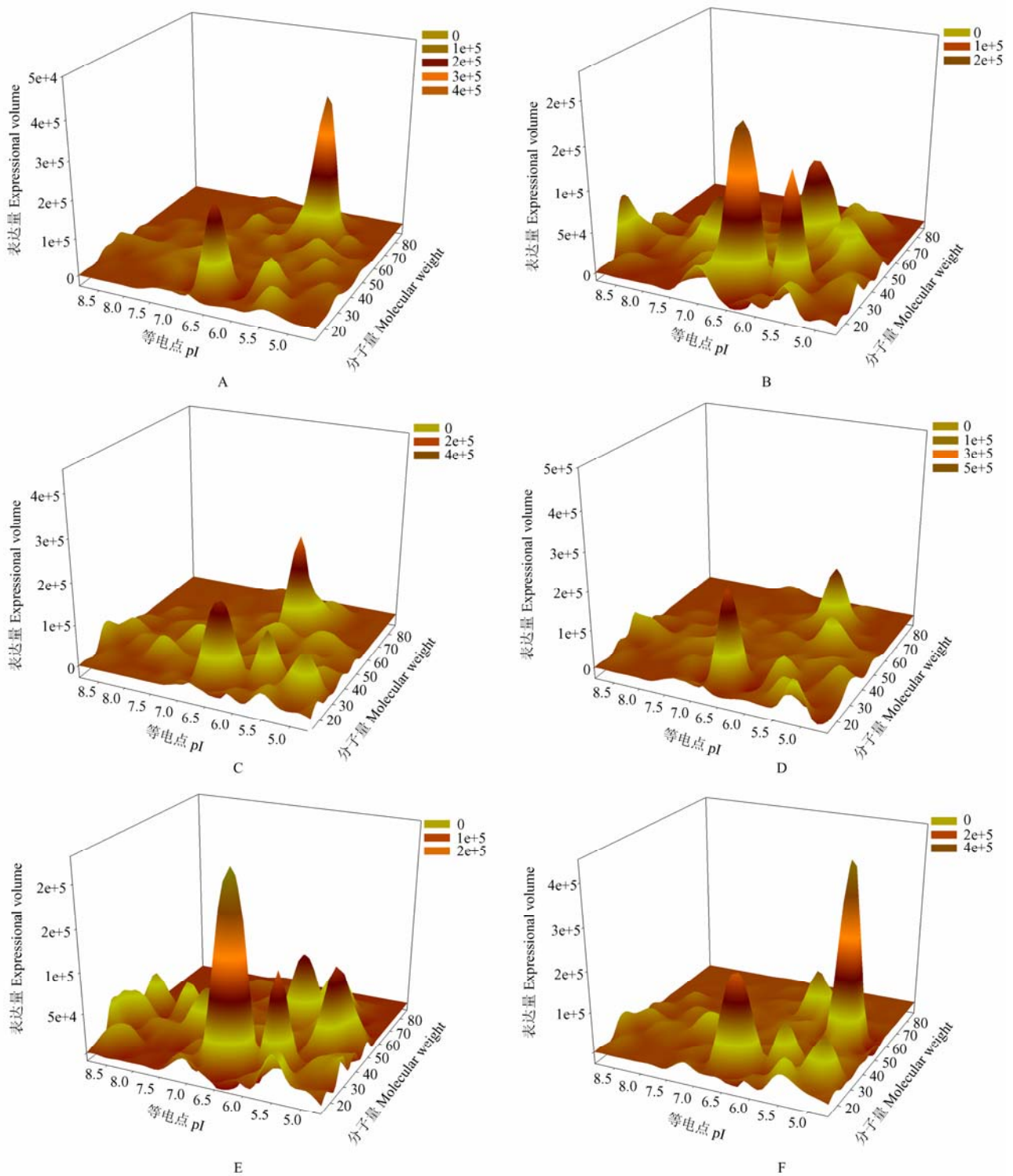
点编号(SSP) Spot No.	分子量 Mr (kD)	等电点 pI	表达量 Expressional volume (mg·L ⁻¹)		
			1 日龄 Day 1	2 日龄 Day 2	3 日龄 Day 3
204	36.82	4.17	34086±1022a	23166±850b	18587±746c
501	47.21	4.68	17579±205a	12240±158b	11981±75c
2604	52.78	5.50	89690±533a	42927±200b	30477±119c
4203	30.73	6.57	9690±162a	7575±120b	4968±90c
4210	33.17	6.63	8327±85a	3729±63b	1885±21c
4406	46.62	6.64	8213±78a	6965±92b	5108±49c
4502	46.92	6.74	47487±1320a	28793±912b	24524±320c
4603	51.66	6.62	18328±410a	17685±245b	11574±218c
4705	53.27	6.59	9906±190a	2897±53b	963±48c
4907	81.01	6.63	3241±40a	2047±41b	1814±25c
5005	13.42	6.96	24450±965a	18814±759b	6498±323c
5301	38.69	6.76	9156±170a	6759±158b	5480±80c
5306	40.37	6.98	6737±129a	4136±145b	3132±90c
5401	42.11	6.86	8929±84a	7277±97b	4502±68c
5403	42.63	7.01	16058±532a	11278±375b	8857±224c
5404	43.27	6.74	10836±189a	6314±82b	4890±40c
5505	48.19	6.95	7638±89a	6707±61b	4510±34c
5506	49.41	6.99	15603±320a	11405±102b	6930±86c
5801	66.61	6.80	14710±197a	11214±208b	10308±150c
6004	14.90	7.27	18321±231a	16117±144b	8623±99c
6207	33.20	6.87	6301±86a	4716±72b	3234±39c
6208	33.32	7.10	7480±61a	6888±49b	4004±37c
6407	44.77	6.88	9737±131a	6454±101b	2901±31c
6503	48.99	7.16	63894±885a	55263±256b	46032±210c
6905	87.04	7.05	5070±85a	3551±32b	2063±30c
8103	29.25	8.02	9732±140a	8046±108b	7910±134c
8305	39.10	8.70	55292±1006a	41115±289b	39848±376c
8306	43.39	7.64	5608±83a	4295±62b	3357±33c
8513	51.44	8.07	7816±78a	5488±85b	3521±29c

(*Apis mellifera* L.) 与原种意大利蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 雄蜂卵期发育阶段蛋白质组进行比较分析。迄今为止, 国内外有关蜜蜂胚胎发育期蛋白质组研究文献很少, 仅张兰等^[36]报道了浆蜂工蜂胚胎的发育蛋白质组特点, 本研究的两蜂种雄蜂卵期发育都在第 2 日龄最为活泼, 2、3 日龄表达特异蛋白较多, 这与浆蜂工蜂卵期蛋白发育的特点基本一致; 由于原意和浆蜂同属意大利蜜蜂 (*Apis mellifera* L.), 除王浆产量不同外, 在形态学和生理学特性等方面无明显差异^[9-11], 并且两蜂种雄蜂卵期表达蛋白的等电点和分子量分布相似 (图 2); 雄蜂卵第 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关键时期^[6], 故二者在第 2、3 日龄表达的蛋白总数和特异蛋白多 (图 3)。

浆蜂雄蜂卵期所表达的蛋白数 (332、377 和 339) 显著的高于相应日龄原意雄蜂卵期 3 个日龄所表达的蛋白数 (283、305 和 293) ($P<0.05$), 这说明浆蜂经多年选育后, 其雄蜂卵期的基因表达调控模式和蛋白质表达模式已与原意存在一些差异, 即浆蜂在雄蜂胚胎期有更多的基因参与表达, 这与浆蜂工蜂卵期蛋白质组的表达特点^[36]基本一致。

两蜂种在 3 个日龄共同表达的蛋白数为 254 个。

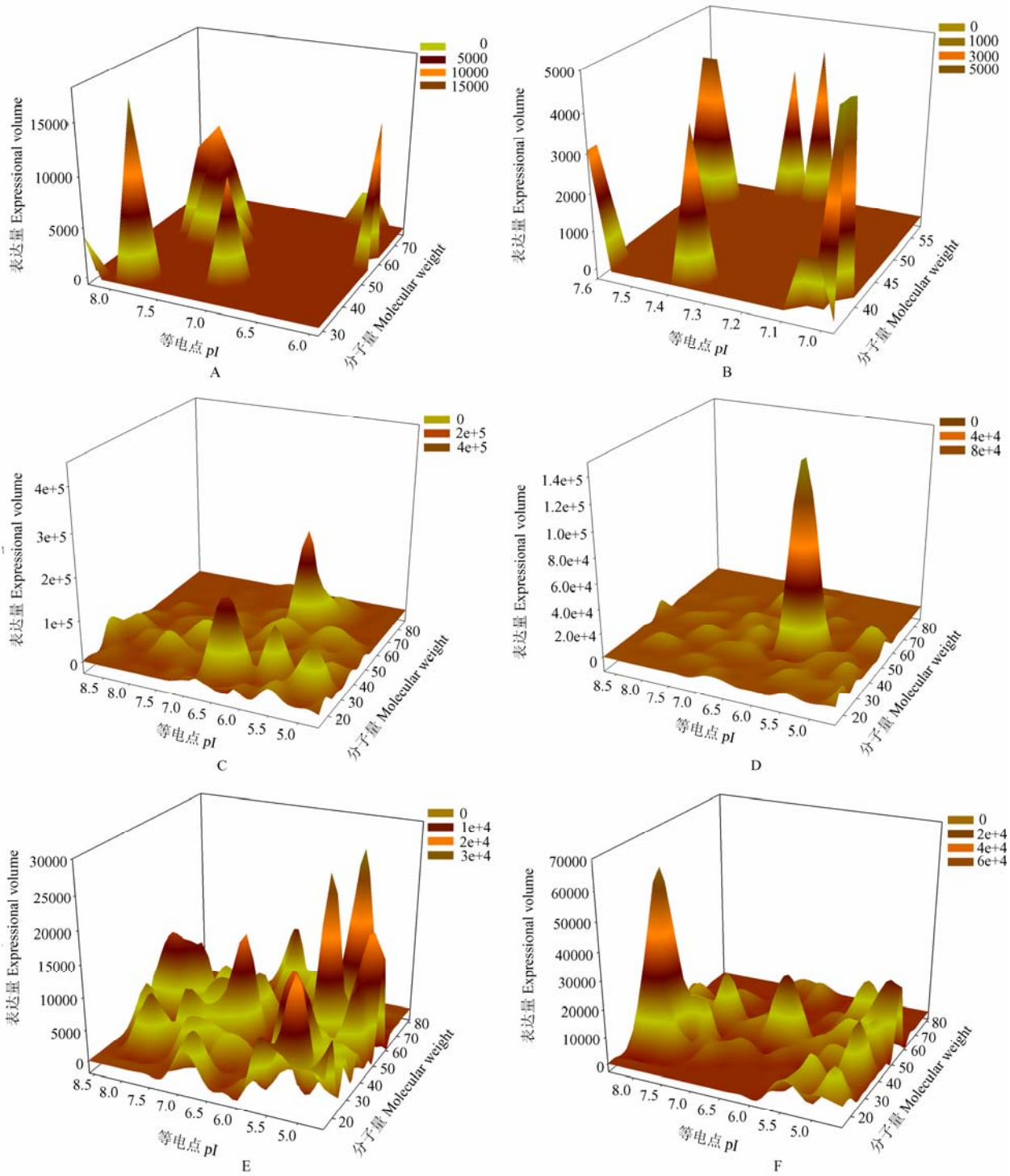


A、B、C 和 D、E、F 分别代表原意和浆蜂雄蜂卵期（1、2 和 3 日龄）共有蛋白三维图谱

A, B, C and D, E, F represent the proteins expression both in native Italian bee and high royal jelly producing bee on day 1, day 2 and day 3, respectively

图 5 原种意大利蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 与王浆高产蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 雄蜂卵期发育表达的蛋白质组三维图谱

Fig. 5 Three dimensional views on protein expression between drone eggs of the native Italian honeybee (*Apis mellifera* L.) and high royal jelly producing honeybee (*Apis mellifera* L.)



A、B、C 和 D、E、F 分别代表原意和浆蜂雄蜂卵期（1、2 和 3 日龄）特异蛋白三维图谱
 A、B、C and D、E、F represent the proteins specially expressed in native Italian bee and high royal jelly producing bee on day 1, day 2 and day 3, respectively

图 6 原种意大利蜜蜂 (*Apis mellifera* L. 原意) 与王浆高产蜜蜂 (*Apis mellifera* L. 浆蜂) 雄蜂卵期发育表达的蛋白质组三维图谱

Fig. 6 Three dimensional views on protein expression between drone eggs of the native Italian honeybee(*Apis mellifera* L.) and high royal jelly producing honeybee (*Apis mellifera* L.)

雄蜂卵期 3 d 发育过程中, 两个蜂种分别检测到 274、298 和 285 个共有的表达蛋白(图 4), 这些蛋白可能是这两个蜂种雄蜂卵期发育的必需蛋白。在各个日龄的共有蛋白中, 浆蜂雄蜂分别有 54、42 和 47 个蛋白的表达量显著高于 ($P < 0.05$) 原意, 另外有 18、75 和 61 个蛋白显著低于 ($P < 0.05$) 原意, 表明两蜂种的这些共有蛋白通过表达量的变化来协同调节卵期的发育。

在原意卵期 3 个日龄的 259 个共有蛋白中, 有 15 个表达量显著上调 ($P < 0.05$), 6 个显著下调 ($P < 0.05$, 表 1, 2); 而在浆蜂的 325 个共有蛋白中, 有 17 个呈显著上调 ($P < 0.05$) 趋势, 29 个呈显著下调 ($P < 0.05$, 表 3, 表 4) 趋势, 每个蜂种所表达的这些共有蛋白可能是它们各自卵期发育的保守蛋白, 但在蛋白表达数目和表达量方面存在较大差异。

此外, 在 3 个日龄的浆蜂中还依次检测到 58、79 和 54 个特异蛋白, 而原种意大利蜜蜂也分别检测到 9、7、8 个特异蛋白(图 4), 这些大多数为低丰度蛋白, 并且浆蜂雄蜂卵期表达的特异蛋白数显著大于 ($P < 0.05$) 原意, 但它们也是调控雄蜂卵期发育不可缺少的功能蛋白。

本研究通过对原意和浆蜂雄蜂卵期所表达的蛋白质数量、表达量等的初步分析, 揭示了浆蜂和原意雄蜂卵期的蛋白质表达谱存在较大差异, 这对蜜蜂生物学的发展和了解我国特有蜂种的生物学特点具有一定理论意义。但还未能对表达谱中所表达蛋白的功能进行鉴定和生物信息学分析, 尽管发现浆蜂和意蜂雄蜂卵期的一些差异表达蛋白, 但它们是否与王浆高产有关还需进一步进行研究。

4 结 论

结果初步表明浆蜂和原意雄蜂卵期发育的蛋白质组表达谱存在显著差异, 但都在第 2 日龄蛋白表达最活跃; 两个蜂种雄蜂卵期发育所表达的共有蛋白可能是其发育所必须的管家蛋白, 但它们的表达模式存在较大差异, 不同日龄的特异蛋白表明雄蜂卵在不同的发育阶段需要不同的蛋白来调控; 浆蜂和原意雄蜂卵期表达的特异蛋白是否是王浆高产相关的功能蛋白, 有待进一步研究。

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] Taber S I, Blum M S. Preservation of honey bee semen. *Science*, 1960, 131(3415): 1734-1735.

[4] Moritz R F A, Kryger P, Allsopp M H. Competition for royalty in bees. *Nature*, 1996, 384(6604): 31.

[5] 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.

[6] 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)

[7] 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.

[8] Li J K, Wang A P. Comprehensive technology for maximizing royal jelly production. *American Bee Journal*, 2005, 145(8): 661-664.

[9] 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)

[10] 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)

[11] 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)

[12] Hrassingg N, Crailsheim K. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 2005, 36(2): 255-277.

[13] Koeniger G. The neglected gender - males in bees. *Apidologie*, 2005, 36: 143-144.

[14] Havron A, Rosen D, Rossler Y, Hillel J. Selection on the male hemizygous genotype in arrhenotokous insects and mites. *Entomophaga*, 1987, 32: 261-268.

[15] 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.

- [16] 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.
- [17] Hartl D L. Some aspects of natural selection in arrhenotokous populations. *American Zoologist*, 1971, 11(2): 309-325.
- [18] Hartl D L. A fundamental theorem of natural selection for sex linkage or arrhenotoky. *American Naturalist*, 1972, 106: 516-524.
- [19] Coles J A, Orkand R K. Changes in sodium activity during light stimulation in photoreceptors, glia and extracellular space in drone retina. *The Journal of Physiology*, 1985, 362: 415-435.
- [20] Moors L, Spaas O, Koeniger G, Billen J. Morphological and ultrastructural changes in the mucus glands of *Apis mellifera* drones during pupal development and sexual maturation. *Apidologie*, 2005, 36: 245-254.
- [21] Gillot C. Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annual Review of Entomology*, 2003, 48: 163-84.
- [22] Schmolz E, Kosece F, Lamprecht I. Energetics of honeybee development Isoperibol and combustion calorimetric investigations. *Thermochimica Acta*, 2005, 437(1-2): 39-47.
- [23] DuPraw E J. *The Honeybee Embryo*. New York: Crowell, 1967: 183-217.
- [24] 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.
- [25] Peter K, Dearden. Germ cell development in the Honeybee (*Apis mellifera*): *Vasa* and *Nanos* expression. *BMC Developmental Biology*, 2006, 6: 6.
- [26] 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.
- [27] Loper G M, Wolf W W, Taylo O R. "Honey bee drone flyways and congregation areas, radar observations". *Journal of the Kansas Entomological Society*. 1992, 65: 223-230
- [28] 陈盛禄, 林雪珍, 胡福良, 苏松坤, 方章明. 浙农大 A 系意蜂王浆高产实验. *中国农业科学*, 1995, 28(5): 89-93.
Chen S L, Lin X Z, Hu F L, Su S K, Fang M Z. Experiment on the higher production royal jelly bee. *Scientia Agricultura Sinica*, 1995, 28(5): 89-93. (in Chinese)
- [29] 刘艳荷, 陈盛禄, 钟伯雄. 西方蜜蜂王浆产量与品质性状的配合力和杂种优势分析. *遗传学报*, 2001, 28(10): 926-932.
Liu Y H, Chen S L, Zhong B X. The combining ability and heterosis analysis of royal jelly yield and quality properties in western honeybees. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(10): 926-932. (in Chinese)
- [30] 苏松坤, 陈盛禄. 意蜂王浆生产性能形态学遗传标记的研究. *遗传*, 2003, 25(6): 677-680.
Su S K, Chen S L. Research on morphological genetic marker of honeybee (*Apis mellifera Ligustica*) in royal jelly production performance. *Hereditas*, 2003, 25(6): 677-680. (in Chinese)
- [31] 王尉平, 蒋滢, 张雅娟, 汪成富, 黄超群. 高产王浆西蜂 DNA 分子中的相关基因标志筛选及其鉴定. *中国生物化学与分子生物学报*, 2002, 18(2): 161-164.
Wang W P, Jiang Y, Zhang Y J, Wang C F, Huang C Q. Selection and checking of the gene marker related to the high royal jelly quantity trait of *Apis mellifera* Lin da uer. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 18(2): 161-164. (in Chinese)
- [32] Chen S L, Li J K, Zhong B X, Su S K. Microsatellite analysis of royal jelly producing traits of Italian honeybee (*Apis mellifera Ligustica*). *Acta Genetica Sinica*, 2005, 32(10): 1037-1044.
- [33] 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)
- [34] 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)
- [35] The honeybee genome sequencing consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 2006, 443(26): 931-949.
- [36] 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)
- [37] 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.

(责任编辑 毕京翠)