



# RNAi 沉默王浆主蛋白 1 (Mrjp1) 基因对意大利蜜蜂工蜂学习和记忆的影响

蔚添添<sup>#</sup>, 邱园妹<sup>#</sup>, 侯梦赏, 王天宝, 苏松坤<sup>\*</sup>, 李志国<sup>\*</sup>

(福建农林大学动物科学学院(蜂学学院), 福州 350002)

**摘要:**【目的】前期研究发现经吡虫啉处理的意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* (简称“意蜂”) 工蜂学习能力下降, 转录组学分析表明王浆主蛋白 1 (major royal jelly protein 1, MRJP1) 基因在吡虫啉处理的蜜蜂脑中显著下调, MRJP1 可能参与调控蜜蜂学习能力。本研究旨在采用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术将 *Mrjp1* 特异性沉默, 验证 MRJP1 在意蜂工蜂嗅觉学习中的关键作用。【方法】通过克隆技术获得 *Mrjp1* 基因 cDNA 序列, 经测序验证后, 设计引物, 合成用于 RNAi 干扰 *Mrjp1* 基因表达的 dsRNA。注射 ds*Mrjp1* 的意蜂工蜂作为处理组 (ds*Mrjp1* 注射组), 注射 ds*EGFP* 的意蜂工蜂作为对照组 (ds*EGFP* 注射组), 随后通过伸吻反应 (proboscis extension response, PER) 实验比较两组的嗅觉学习与记忆能力差异。最后采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测注射 ds*Mrjp1* 后意大利蜜蜂工蜂脑中 *Mrjp1* 的相对表达量。【结果】ds*Mrjp1* 注射组与 ds*EGFP* 注射组意蜂工蜂学习能力差异显著, ds*Mrjp1* 注射组意蜂工蜂的学习能力显著降低。学习后 2 h, 两组意蜂工蜂的记忆力无显著差异。qRT-PCR 结果显示 *Mrjp1* 的表达水平在 ds*Mrjp1* 注射组意蜂工蜂脑中显著低于 ds*EGFP* 注射组, 表明学习能力降低的处理组意蜂脑内对应的 *Mrjp1* 表达水平也降低。【结论】通过 RNAi 抑制意蜂工蜂 *Mrjp1* 基因的表达后, 其嗅觉学习能力受到显著性抑制, 但记忆力未受到显著影响, 提示 *Mrjp1* 可能是调控意蜂学习的重要基因之一。本研究结果有助于后续进一步研究蜜蜂嗅觉学习相关的分子机制。

**关键词:** 意大利蜜蜂; 王浆主蛋白; RNA 干扰; 嗅觉学习; 记忆; 伸吻反应

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2021)10-1145-08

## Effects of silencing of major royal jelly protein 1 (Mrjp1) gene by RNAi on learning and memory in worker bees of *Apis mellifera ligustica*

YU Tian-Tian<sup>#</sup>, QIU Yuan-Mei<sup>#</sup>, HOU Meng-Shang, WANG Tian-Bao, SU Song-Kun<sup>\*</sup>, LI Zhi-Guo<sup>\*</sup>  
(College of Animal Sciences (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:**【Aim】In the previous studies it was found that the learning ability of *Apis mellifera ligustica* worker bees treated with imidacloprid is decreased, and transcriptomic analyses showed that the expression of major royal jelly protein 1 gene *Mrjp1* is significantly down-regulated in the brains of bees treated with imidacloprid, suggesting that MRJP1 may be involved in olfactory learning in honeybees. This study aims to verify the crucial role of MRJP1 in olfactory learning in *A. mellifera ligustica* workers

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772684); 国家现代农业产业技术体系(蜜蜂)项目(CARS-44-KXJ4)

作者简介: 蔚添添, 女, 1993年10月生, 山西吕梁人, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂科学, E-mail: 18235444603@163.com; 邱园妹, 女, 1992年12月生, 江西赣州人, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂科学, E-mail: yuanmei.qiu@fafu.edu.cn

<sup>#</sup>共同第一作者 Authors with equal contribution

<sup>\*</sup> 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: zhiguo.li@fafu.edu.cn; susongkun@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2020-12-21; 接受日期 Accepted: 2021-03-23

through silencing *Mrjp1* by RNA interference (RNAi). 【Methods】 The cDNA sequence of *Mrjp1* was obtained by cloning technique and validated by sequencing, and then the sequence was used for designing primers for generating dsRNA for knockdown of *Mrjp1* by RNAi. The worker bees of *A. mellifera ligustica* injected with ds*Mrjp1* were assigned to the treatment group (ds*Mrjp1*-injected group), and those injected with ds*EGFP* were assigned to the control group (ds*EGFP*-injected group). Then, the olfactory learning and memory abilities of the two groups were compared based on the proboscis extension response (PER) assay. Finally, the relative expression level of *Mrjp1* in the brain of *A. mellifera ligustica* workers after injection of ds*Mrjp1* was detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). 【Results】 There was a significant difference in the learning ability of *A. mellifera ligustica* workers between the ds*Mrjp1*-injected group and the ds*EGFP*-injected group, with the learning ability of the ds*Mrjp1*-injected group significantly decreased. However, there was no significant difference in the faculty of memory of *A. mellifera ligustica* workers at 2 h after learning between the two groups. The qRT-PCR results showed that the expression level of *Mrjp1* in the brain of *A. mellifera ligustica* workers in the ds*Mrjp1*-injected group was significantly lower than that in the ds*EGFP*-injected group, indicating that *A. mellifera ligustica* workers with decreased learning ability correspondingly exhibit lower expression level of *Mrjp1*. 【Conclusion】 After knockdown of *Mrjp1* by RNAi, the olfactory learning performance of *A. mellifera ligustica* workers is significantly decreased, while their memory performance is not significantly affected, suggesting that *Mrjp1* is probably one of the key genes regulating learning in *A. mellifera ligustica*. The results of this study contribute to further understanding of the molecular mechanism related to olfactory learning in honey bees.

**Key words:** *Apis mellifera ligustica*; major royal jelly protein; RNA interference; olfactory learning; memory; proboscis extension response

蜜蜂作为典型的社会性昆虫,拥有与其他昆虫类似且相对简单的神经系统以及数量较少的神经元 (Pahl *et al.*, 2010)。蜜蜂脑体积小却拥有强大认知能力,因此成为多种研究领域的模式昆虫。蜜蜂工蜂存在依赖于日龄的劳动分工,工蜂在低日龄时主要从事一些巢内的工作,达到一定日龄时转而担任外界的采集任务 (Johnson, 2010),这种剧烈的内外环境变化以及职能的转变,导致不同日龄的工蜂感官能力不同,从而呈现出不同水平的认知能力 (Groh and Rössler, 2020)。认知能力是蜜蜂等社会性昆虫在野外赖以生存的基本能力,例如采集蜂依靠空间认知来寻找蜜源 (Zhang *et al.*, 2000),通过气味学习来识别花的气味 (Pahl *et al.*, 2010),以及联想记忆来记住花的颜色或形状 (Bitterman *et al.*, 1983; Hori *et al.*, 2006)等,甚至巢内的蜂群正常秩序也必须依靠蜜蜂识别各种调节信息素来维持 (Kucharski *et al.*, 1998)。在蜜蜂认知能力中,基于伸吻反应 (proboscis extension response, PER) 的蜜蜂嗅觉学习,已被广泛应用于研究与蜜蜂学习相关的神经生理机制及研究生物和非生物因子胁迫对蜜蜂嗅觉学习的影响 (Laloi *et al.*, 2001; Matsumoto *et*

*al.*, 2012; Wu *et al.*, 2017)。

蜂王浆是蜂王和蜜蜂幼虫的主要食物,分为水溶性蛋白和非水溶性蛋白 (Simúth, 2001)。蜂王浆由蜜蜂工蜂咽下腺与上颚腺所分泌,具有抗高血压,抗感染和抗氧化作用 (Kimura *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1998)。蜂王浆的主要营养成分为王浆主蛋白 (major royal jelly proteins, MRJPs), MRJPs 家族目前为止有 9 个成员 (MRJP1 ~ MRJP9)。MRJPs 是多功能蛋白,主要参与蜜蜂生理、发育和行为等的调控 (Buttstedt, *et al.*, 2014)。研究显示,蜂王浆可提高人体 U-937 细胞 (Watanabe *et al.*, 1998) 和小鼠肝细胞的增殖速率,也可促进小鼠肝细胞 DNA 的合成 (Kamakura *et al.*, 2001)。随后, Majtan 等 (2010) 证明 MRJP1 可以促进角质细胞的增殖,表明 MRJP1 可能是王浆中促进细胞增殖的主要作用因子。蜂王浆是促进幼虫发育成蜂王的主要食物,其中王浆中的 MRJP1 被证明是幼虫发育成蜂王的关键调控因子 (Kamakura, 2011)。王浆主蛋白 1 (major royal jelly protein 1, MRJP1) 占蜂王浆水溶性蛋白含量的 48% (Srisuparbh *et al.*, 2003),是蜂王浆的主要蛋白组分。研究表明,MRJP1 在蜜蜂体内

分布广泛,除在哺育蜂和外勤蜂的咽下腺中大量表达之外,在雄蜂和蜂王体内也检测到 *Mrjp1* 基因表达(Drapeau *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2012)。同时,MRJP1 也在蜜蜂脑细胞间隙中表达,说明 MRJP1 很可能以一种分泌蛋白的形式存在(Li *et al.*, 2019)。MRJP1 在蜜蜂脑部可能作为蛋白质合成的储备氨基酸,在哺育蜂向采集蜂发育过程和行为转变过程中合成王浆主蛋白发挥作用(Tamura *et al.*, 2009)。随着对 MRJP1 的深入研究发现,MRJP1 除了具有丰富的营养价值外,还具有多种生物学功能和保健功效(Tamura *et al.*, 2009),并可能参与调控蜜蜂行为。有研究表明,脱离蜂群饲养的蜜蜂学习能力低于蜂群中蜜蜂学习能力,检测发现脱离蜂群饲养的蜜蜂体内 *Mrjp1* 表达降低(Li *et al.*, 2019)。同时,前人研究发现 MRJP1 也在蜜蜂脑部的蘑菇体中高表达,蘑菇体正是涉及蜜蜂学习与记忆的神经中枢(Kucharski *et al.*, 1998)。受吡虫啉胁迫蜜蜂的嗅觉学习能力下降,同时,其大脑中的 *Mrjp1* 表达显著下调(Desneux *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2019)。

目前关于 MRJP1 在蜜蜂中的功能与作用研究已有一定进展,但是关于 MRJP1 表达在蜜蜂学习与记忆过程中起到的确切作用的研究却鲜有报道。利用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术将 *Mrjp1* 基因表达沉默后,研究 *Mrjp1* 基因表达与蜜蜂嗅觉学习之间的关系,进一步挖掘和验证 MRJP1 的潜在生物学功能,为蜜蜂学习的分子机制提供佐证。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* (简称“意蜂”)取自福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)实验蜂场。从蜂场 4 个不同蜂群分别取出 1 张健康封盖子脾,放入 4 个限王产卵器中,在恒温恒湿培养箱中培养(温度  $34 \pm 1^\circ\text{C}$ ,相对湿度  $40\% \pm 10\%$ ,黑暗),每天用不同颜色的油漆笔对刚出房的蜜蜂工蜂胸部进行标记,连续标记 4 d。标记后的蜜蜂放入蜂群中,待蜜蜂达到 12 日龄时从蜂群中取出,用于后续试验。

### 1.2 蜜蜂脑部总 RNA 提取

对 3 头蜜蜂样本进行解剖,获得完整、干净的脑。将 3 个脑置于 1.5 mL 离心管中,加入 700  $\mu\text{L}$  的 Trizol 试剂和两颗磁珠,于组织破碎仪中震荡研磨;研磨后继续加入 300  $\mu\text{L}$  的 Trizol 试剂,室温静

置 10 min;加入 200  $\mu\text{L}$  氯仿,于旋涡振荡器剧烈振荡数十秒,使两相彻底混匀,室温静置 3 min 后,  $4^\circ\text{C}$  12 000 g 离心 15 min;将上清液转移至 1.5 mL 离心管,加入 500  $\mu\text{L}$  异丙醇,室温静置 10 min 后,  $4^\circ\text{C}$  12 000 g 离心 10 min,弃上清;加入 1 mL 预冷 75% 乙醇[无水乙醇:DEPC = 3:1(v/v)配制],轻弹悬浮沉淀,上下颠倒充分洗涤,  $4^\circ\text{C}$  7 400 g 离心 5 min,弃上清,重复洗涤两次;将离心管置于超净工作台中风干 10 min,干燥沉淀;加入 30  $\mu\text{L}$  RNA 溶解水,反复吸打几次,  $55^\circ\text{C}$  金属浴中加热 5 min。利用 NanoDrop 2000 核酸浓度测定仪测定 RNA 的质量和浓度。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值在 1.9~2.1 之间的 RNA 为合格,并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 降解程度,置于  $-80^\circ\text{C}$  保存。

### 1.3 RNA 反转录为 cDNA

首先使用 TaKaRa PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒去除 RNA 中的基因组 DNA,按照说明书在冰上配制反应混合液,反应体系: 5  $\times$  gDNA Eraser Buffer 2  $\mu\text{L}$ , gDNA Eraser 1  $\mu\text{L}$ , 用移液枪吸取 3  $\mu\text{L}$ , RNA 1  $\mu\text{g}$ , 最后加入 RNase-Free dH<sub>2</sub>O 将反应体系补足至 10  $\mu\text{L}$ 。  $42^\circ\text{C}$  反应 2 min。随后往上述反应体系继续加入 PrimeScript RT Enzyme Mix I 1  $\mu\text{L}$ , RT Primer Mix 1  $\mu\text{L}$ , 5  $\times$  PrimeScript Buffer II 4  $\mu\text{L}$  和 RNase-Free dH<sub>2</sub>O 4  $\mu\text{L}$  混合均匀。  $37^\circ\text{C}$  反应 15 min,  $85^\circ\text{C}$  反应 5 s 后  $4^\circ\text{C}$  保存。

### 1.4 基因引物设计和扩增

通过 NCBI 确定 *Mrjp1* 基因的 CDS 区域,利用 Primer Premier 5.0 设计扩增该基因引物,经 RT-PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)扩增,获得基因序列长度为 654 bp。增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)基因与蜜蜂无同源基因,作为对照基因,扩增出的基因序列长度为 720 bp,序列片段位于 6 895 - 7 614 bp。引物序列信息见表 1。

### 1.5 dsRNA 合成与纯化

将 cDNA 进行 PCR 扩增,反应产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,随后通过 Wizard DNA Clean-up System (Promega) 试剂盒切胶回收纯化后,将扩增的 *Mrjp1* 基因片段克隆到质粒载体 pEASY-T3 中,并根据试剂盒说明书将重组质粒转化到 Trans1-T1 感受态细胞中。通过琼脂糖凝胶电泳分析和测序筛选出携带含有 *Mrjp1* 基因片段的重组质粒的阳性克隆。根据说明书使用 T7 RiboMAX™ Express RNAi 试

表 1 用于荧光实时定量 PCR 和 dsRNA 合成的引物序列

Table 1 Primers used for qRT-PCR and dsRNA synthesis

基因 Genes	GenBank 登录号 GenBank accession no.	引物序列(5' - 3') Primer sequences	参考文献 References	产物大小 Product size (bp)	引物用途 Use of primers
<i>actin</i>	GB44311	F: CCTAGCACCATCCACCATGAA R: GAAGCAAGAATTGACCCACCAA	Villar and Grozinger, 2017	87	看家基因扩增
<i>rp49</i>	GB47227	F: CGTCATATGTTGCCAACTGGT R: TTGAGCACGTTCAACAATGG	Lourenço <i>et al.</i> , 2008	150	Amplification of housekeeping genes
<i>Mrjp1</i>	GB14888	F: AAATGCGACAGATTGTGGGT R: ATCACTTTGAGCGACGGTAC		654	靶基因扩增 Amplification of target gene
<i>Mrjp1</i>	GB14888	F: CACAGCCCAAGATGGAATTT R: AAGAGGACGCCACTCTTTGA	Wu <i>et al.</i> , 2017	213	靶基因检测 Detection of target gene
<i>EGFP</i>	MN517551	F: ATGGTGAGCAAGGGCGAGG R: TTAATGACTACTATAGGGCGF	Lee <i>et al.</i> , 2013	720	对照基因扩增 Amplification of the control gene
<i>Mrjp1i77</i>	GB14888	F: TAATACGACTCACTATAGGGCGF AAAATGCGACAGATTGTGGGT R: TAATACGACTCACTATAGGGCGA ATCACTTTGAGCGACGGTAC		654	合成 <i>Mrjp1</i> dsRNA Synthesis of <i>Mrjp1</i> dsRNA
<i>EGFPi77</i>	MN517551	F: TAATACGACTCACTATAGGGCGAT GGTGAGCAAGGGCGAGG R: TAATACGACTCACTATAGGGCGTT ACTTGTACAGCTCGTCCATG	Lee <i>et al.</i> , 2013	720	合成对照基因 dsRNA Synthesis of control gene dsRNA

剂盒 (Promega) 将含有 *Mrjp1* 的重组质粒和 T7 启动子标签的 *Mrjp1* 引物用于 *Mrjp1* dsRNA 合成。使用相同的方法, 使用 pGFP 载体和 T7 启动子标签的 *EGFP* 引物合成 *EGFP* dsRNA。相关引物序列信息见表 1。合成后纯化 dsRNA: 沉淀 dsRNA, 向离心管中按照 dsRNA: NaAc = 10: 1 (v/v) 添加 4  $\mu$ L 3 mol/L NaAc (pH 5.2), 按照 dsRNA: 异丙醇 = 1: 1 的比例 (v/v) 添加 40  $\mu$ L 异丙醇, 混合均匀后在冰上放置 5 min, 在 NaAc 和异丙醇沉淀作用下出现混浊; 清洗沉淀, 微型离心机高速旋转 10 min, 在离心管底部可见白色沉淀, 弃上清, 向离心管中加入 0.5 mL 冰浴过的 70% 乙醇, 13 000 g 离心 5 min, 此步骤重复两遍; 干燥, 在通风橱中室温干燥 15 min, 除掉残余的乙醇; 溶解, 将 RNA 沉淀重新悬浮在 Nuclease-Free Water 中。用 1% 琼脂糖凝胶检查 dsRNA 的完整性, 然后用 Nuclease-Free Water 进一步稀释以获得最终浓度 5  $\mu$ g/ $\mu$ L, -80 $^{\circ}$ C 储存用于后续注射实验。

### 1.6 RNAi 干扰时效检测

抓取 12 日龄意蜂工蜂, 将蜜蜂单独装入小瓶中于冰上麻醉, 待蜜蜂一动不动后取出进行注射。利用拉针仪处理后的毛细管吸取 2  $\mu$ L dsRNA (5  $\mu$ g/ $\mu$ L) 从蜜蜂的第 4 - 5 腹节节间膜注入蜜蜂血淋巴中, 若被注射蜜蜂有血淋巴渗出, 则丢弃该蜜蜂。对

照组 ds*EGFP* 和处理组 ds*Mrjp1* 分别注射 60 头蜜蜂, 分别在 24 h 和 48 h 后液氮冻毙取样, 之后进行 qRT-PCR 检测对照组和处理组在两个时间点的 *Mrjp1* 相对表达量, 确定注射时效。反应体系: 2  $\times$  SYBR Premix Ex Taq II 5  $\mu$ L, PCR Primer (F + R) (10  $\mu$ mol/L) 0.8  $\mu$ L, cDNA 1  $\mu$ L, RNase-Free dH<sub>2</sub>O 3.2  $\mu$ L (引物信息见表 1)。qRT-PCR 程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 添加熔解曲线: 65 $^{\circ}$ C 5 s, 95 $^{\circ}$ C 0.5 s。

### 1.7 dsRNA 的注射

ds*EGFP* 和 ds*Mrjp1* 抓取 12 日龄工蜂, 每 25 头为一组, 处理组与对照组各设置 3 组重复。处理组注射 ds*Mrjp1*, 对照组注射 ds*EGFP*。将蜜蜂于冰上麻醉, 待蜜蜂冷冻麻醉后进行注射。利用拉针仪处理后的毛细管吸取 2  $\mu$ L dsRNA (5  $\mu$ g/ $\mu$ L) 从蜜蜂腹部背面第 4 - 5 腹节节间膜注入蜜蜂体内, 若被注射蜜蜂有血淋巴渗出, 则丢弃该蜜蜂。注射完成后, 在恒温恒湿培养箱中 (温度 30  $\pm$  1 $^{\circ}$ C, 相对湿度 40%  $\pm$  10%, 黑暗) 饲养 48 h 后做气味联想性学习实验。

### 1.8 联想性学习实验

**1.8.1 固定蜜蜂:** 将蜜蜂置于特制的固定装置前, 单头意蜂工蜂转移至小玻璃瓶中, 并冰上冷冻麻醉。

待蜜蜂冻晕后立即取出,将蜜蜂固定于特制铜管,只留其头部在管外,保证吻部能自由活动。为了减小冷冻和饱食对蜜蜂行为的影响,将固定好的蜜蜂重新放入恒温恒湿培养箱(温度  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ,相对湿度  $40\% \pm 10\%$ ,黑暗)中 2 h。

**1.8.2 气味联想性学习:**参考 Bitterman 等(1983)描述的方法对意蜂进行气味联想性学习实验。选择对 50% (w/v) 蔗糖溶液有伸吻反应的意蜂工蜂作为实验对象。实验过程中呈现 1-壬醇和己醇两种不同的气味,1-壬醇(条件刺激,CS)与糖水奖励(非条件刺激,US)配对训练(CS+),己醇作为对照气味,不与糖水奖励相配对(CS-),按照 ABABBABAAB 顺序对每头蜜蜂分别进行 5 次联想性学习和非联想性学习。首先将蜜蜂置于气流中适应 15 s,单独通入 1-壬醇 3 s,用 50% (w/v) 糖水触碰蜜蜂触角引发 PER 行为;与 1-壬醇联想训练 1 s 后,撤掉 1-壬醇,奖励蜜蜂 50% (w/v) 糖水 2 s,最后蜜蜂处于气流中 20 s,视为一次气味联想性学习。而非联想性学习则只提供己醇,蜜蜂不进行气味与糖水奖励配对训练。每头蜜蜂进行两种学习试验间隔为 10 min。在单独通入 1-壬醇或己醇的 2 s 时间内观察蜜蜂是否有伸吻反应,有 PER 行为的记为“+”,无 PER 行为的记为“-”,5 次联想性学习分别为 C1-C5。5 次学习后的蜜蜂立即用液氮冻毙,蜜蜂样本储存在  $-80^\circ\text{C}$  用于下一步分析。

**1.8.3 2 h 记忆测试:**意蜂工蜂 5 次学习完成后放入恒温恒湿培养箱(温度  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ,相对湿度  $40\% \pm 10\%$ ,黑暗)中,2 h 后测定蜜蜂记忆。记忆测试单独用 1-壬醇气味对每头蜜蜂进行刺激,记录伸吻状况。若对 1-壬醇气味刺激表现出伸吻反应,表明该蜜蜂对 1-壬醇气味表现出记忆,记为“+”;若对 1-壬醇气味刺激未表现出伸吻反应,表明该蜜蜂对 1-壬醇气味未表现出记忆,记为“-”。2 h 记忆测试完成后的蜜蜂立即用液氮冻毙,蜜蜂样本储存在  $-80^\circ\text{C}$  用于下一步分析。

### 1.9 RT-qPCR 验证

随机抽取 2 h 记忆测试后的 dsEGFP 组和 dsMrjp1 组样本 cDNA 各 5 个,利用 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (TaKaRa) 荧光定量 PCR 试剂盒检测样本脑部 Mrjp1 基因的相对表达量,内参基因为 actin 和 rp49。反应体系:  $2 \times$  SYBR Premix Ex Taq II  $5 \mu\text{L}$ , PCR Primer (F + R) ( $10 \mu\text{mol/L}$ )  $0.8 \mu\text{L}$ , cDNA  $1 \mu\text{L}$ (在初始 cDNA 基础上以 1:3 稀释), RNase-Free dH<sub>2</sub>O  $3.2 \mu\text{L}$ (引物信息见表 1)。程序:

$95^\circ\text{C}$  30 s;  $95^\circ\text{C}$  5 s,  $60^\circ\text{C}$  30 s, 40 个循环;添加溶解曲线:  $65^\circ\text{C}$  5 s,  $95^\circ\text{C}$  0.5 s。

### 1.10 数据分析

利用 SPSS19.0 软件进行数据处理。记录对照组和处理组蜜蜂在配对训练(CS+)与非配对训练(CS-)中伸吻数量,通过卡方检验分析处理组与对照组蜜蜂联想性学习与记忆差异。RT-qPCR 验证时选择 actin 和 rp49 作为内参基因,利用两者的几何平均值归一目标基因的 Ct 值(Lourenço *et al.*, 2008; Villar and Grozinger, 2017),计算  $\Delta\text{Ct}$ (测试样本) = Ct(目标) - Ct(内参),  $\Delta\text{Ct}$ (校准样本) = Ct(校准) - Ct(内参);用校准样本的  $\Delta\text{Ct}$  归一测试样本的  $\Delta\text{Ct}$  值,即  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{测试样本}) - \Delta\text{Ct}(\text{校准样本})$ ,相对表达量 =  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。利用独立样本 *t* 检验分析对照组与处理组之间基因相对表达量差异显著性。

## 2 结果

### 2.1 dsRNA 干扰时效

通过 qRT-PCR 检测 24 h 和 48 h 两个时间点的沉默效果。结果显示,注射 24 h 后 dsMrjp1 的干扰效果不明显,注射 48 h 后 dsMrjp1 在蜜蜂体内发挥作用,与 dsEGFP 注射组相比,dsMrjp1 注射组的 Mrjp1 相对表达量显著下调(图 1)。因此,选择注射后 48 h 作为 dsMrjp1 干扰效果最明显的时间点并进行后续行为实验。

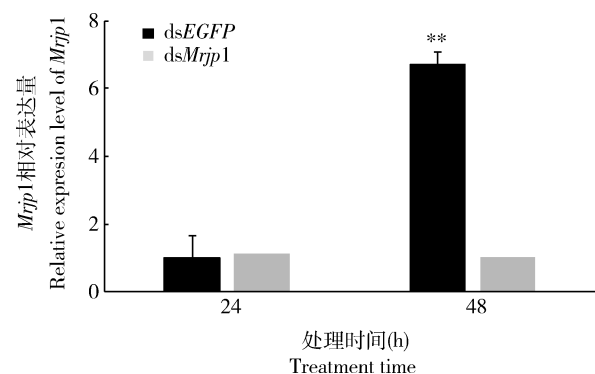


图 1 意大利蜜蜂工蜂体内 dsMrjp1 的 RNA 干扰时效

Fig. 1 Efficiency of RNA interference with dsMrjp1 in *Apis mellifera ligustica* workers over time

柱上双星号表示在同一处理时间点 dsMrjp1 注射组与 dsEGFP 注射组(CK)间 Mrjp1 的相对表达量经独立样本 *t* 检验差异极显著 ( $P < 0.01$ )。Double asterisk above bar indicates extremely significant difference in the relative expression level of Mrjp1 between the dsMrjp1-injected group and the dsEGFP-injected group (CK) at the same treatment time point by independent samples *t*-test ( $P < 0.01$ ).

## 2.2 RNAi 沉默 *Mrjp1* 对蜜蜂气味学习的影响

将蜂群中取出的 12 日龄蜜蜂注射 dsEGFP (对照组) 和 ds*Mrjp1* (处理组), 48 h 后检测蜜蜂学习能力, 在 5 次联想性学习训练后, 结果如图 2 所示。对照组和处理组蜜蜂在 5 次配对训练 (CS+) 中, 从第 2 次训练开始, 对照组蜜蜂的学习能力优于 ds*Mrjp1* 组蜜蜂, 随训练次数的增加, 两组蜜蜂的学习能力差异增大。在第 3-5 次训练 (C3-C5) 中, 对照组 (n=69) 伸吻反应率为 67%~70%, 处理组 (n=79) 伸吻反应率为 48%~50%, 两组学习结果存在显著性差异 (C3:  $\chi^2 = 4.441$ ,  $P < 0.05$ ; C4:  $\chi^2 = 5.369$ ,  $P < 0.05$ ; C5:  $\chi^2 = 5.244$ ,  $P < 0.05$ )。结果表明 RNAi 沉默 *Mrjp1* 对蜜蜂学习产生抑制影响。

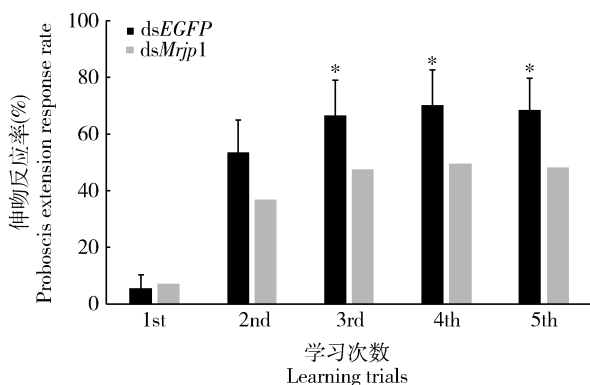


图 2 注射 48 h 后 ds*Mrjp1* 对意大利蜜蜂工蜂学习的影响

Fig. 2 Effects of ds*Mrjp1* on learning in *Apis mellifera ligustica* workers at 48 h after injection

星号表示在第 3-5 次学习实验中 ds*Mrjp1* 注射组与 dsEGFP 注射组 (CK) 伸吻反应率经  $\chi^2$  检验差异显著 ( $P < 0.05$ )。Single asterisk indicates that the proboscis extension response rates from the 3rd to the 5th learning experiments are significantly different by  $\chi^2$  test between the ds*Mrjp1*-injected group and the dsEGFP-injected group (CK).

## 2.3 RNAi 沉默 *Mrjp1* 对蜜蜂记忆的影响

RNAi 沉默 *Mrjp1* 对蜜蜂记忆的影响结果如图 3 所示, 学习 2 h 后, ds*Mrjp1* 注射组蜜蜂对条件刺激 (1-壬醇气味) 的伸吻反应率比 dsEGFP 注射组略低。ds*Mrjp1* 注射组 (n=66) 记忆比率为 55%, dsEGFP 注射组 (n=59) 记忆比率为 66%, ds*Mrjp1* 注射组 2 h 记忆结果低于 dsEGFP 注射组, 但两者之间差异不显著 ( $\chi^2 = 0.758$ ,  $P > 0.05$ ), 即 RNAi 沉默 *Mrjp1* 对蜜蜂记忆没有显著抑制影响。

## 2.4 RT-qPCR 验证蜜蜂脑部 *Mrjp1* 基因的表达水平

将学习后的蜜蜂液氮冻毙后, 对其脑中 *Mrjp1* 基因表达进行定量分析, 结果如图 4。结果表明 dsEGFP 注射组中 *Mrjp1* 基因的相对表达量显著性

高于 ds*Mrjp1* 注射组中 *Mrjp1* 基因相对表达量 ( $P < 0.05$ ), 进一步证明通过向蜜蜂体内注射 ds*Mrjp1* 后, 成功抑制了 *Mrjp1* 基因的表达, 降低了 *Mrjp1* 基因在蜜蜂脑中的相对表达量, 从而抑制蜜蜂学习。

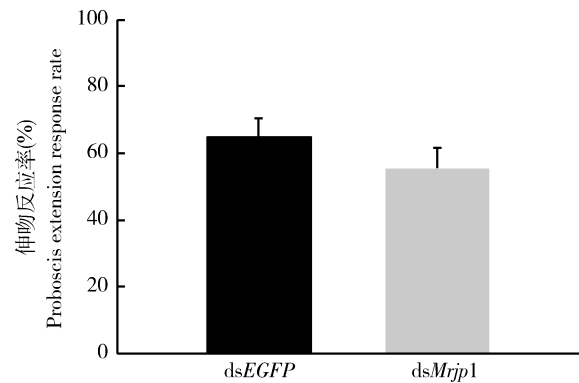


图 3 注射 ds*Mrjp1* 和 dsEGFP 48 h 后意大利蜜蜂工蜂 2 h 记忆的比较

Fig. 3 Comparison of 2 h memory in *Apis mellifera ligustica* workers at 48 h after injection with ds*Mrjp1* and dsEGFP

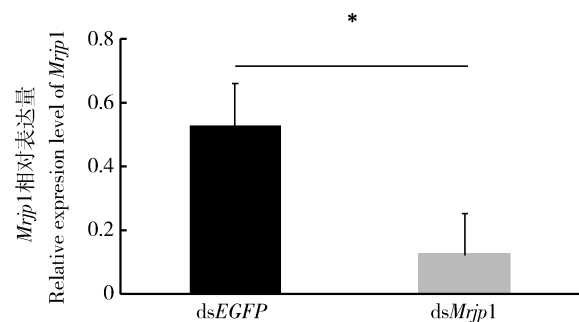


图 4 注射 ds*Mrjp1* 和 dsEGFP 48 h 后学习 2 h 的意大利蜜蜂工蜂脑中 *Mrjp1* 相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of *Mrjp1* in brains of *Apis mellifera ligustica* workers learning for 2 h at 48 h after injection with ds*Mrjp1* and dsEGFP

柱上星号表示 *Mrjp1* 的相对表达量在 dsEGFP 注射组 (CK) 和 ds*Mrjp1* 注射组间经独立性  $t$  检验有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。Single asterisk above bar indicates significant difference in the relative expression level of *Mrjp1* between the ds*Mrjp1*-injected group and the dsEGFP-injected group (CK) by independent samples  $t$ -test ( $P < 0.05$ ).

## 3 讨论

研究表明蜂王浆可影响大鼠的认知行为, 其空间记忆力可通过口服蜂王浆得到改善 (Pyrzanowska et al., 2014), 但是尚未揭示其主要活性成分。另外, 有研究发现脱离蜂群饲养的蜜蜂学习能力下降, 其蘑菇体内的 *Mrjp1* 表达水平也显著下调 (Hojo et al., 2010)。这些研究表明, MRJP1 除了具有营养功

能以外,与蜜蜂认知行为也存在一定的联系。前期研究发现,吡虫啉处理后的蜜蜂头部 *Mrjp1* 和 *Mrjp4* 基因表达受到抑制(Wu *et al.*, 2017),气味学习能力较弱,蜜蜂脑部表现出较低的 *Mrjp1* 基因表达水平(Hojo *et al.*, 2010)。本研究利用 RNAi 技术沉默 *Mrjp1* 基因后,发现蜜蜂嗅觉学习能力受损,记忆力则没有受到影响(图 3)。蜜蜂的学习机制复杂,可能受到多个基因联合调控,仅沉默 *Mrjp1* 只是降低蜜蜂学习能力(图 2),即处理组蜜蜂需要接受更多次数的训练才能达到与对照组相同学习结果。RNAi 后两组蜜蜂的 2 h 记忆无显著差异(图 3),这可能是由于基于 RNAi 的蜜蜂体内的 *Mrjp1* 干扰效果具有时效性。此外,本研究通过 RNAi 技术沉默 *Mrjp1*,结果表明蜜蜂脑部 *Mrjp1* 表达下调后(图 4),蜜蜂的嗅觉学习能力显著下降(图 2),进一步证明 MRJP1 参与调控蜜蜂嗅觉学习过程。

MRJP1 是王浆主蛋白中丰度最高的可溶性蛋白,在蜜蜂脑部不同区域均有不同程度的表达,其中在中间神经元的纤维和细胞周区域的表达丰度比其他区域更高(Peixoto *et al.*, 2009),因此推测 MRJP1 可能参与了蜜蜂神经系统的发育。此外,蜜蜂在脑部蘑菇体中高表达,其表达水平随着蜜蜂年龄的变化而变化(Kucharski and Maleszka, 1998)。蜜蜂蘑菇体的主要感觉输入区(花萼)较大,主要接受嗅觉和视觉感官的输入(Giurfa, 2013; Groh and Rössler, 2020)。蜜蜂的嗅觉联想性学习主要是通过整合蘑菇体中的感官信息建立的(Menzel, 1999; Giurfa, 2007)。研究表明,蜜蜂在职能转变的过程中,其蘑菇体结构发生显著的变化(Schulz and Robinson, 1999)。这种结构的变化同时伴随着 MRJP1 表达水平的变化,表明 MRJP1 可能参与调控蘑菇体的发育。蘑菇体是由密集排列的平行神经元组成,这些神经细胞构成了处理蜜蜂大脑中信息和记忆的大脑中心,称为 Kenyon 细胞(Peixoto *et al.*, 2009)。蜜蜂脑部大约有 368 000 个 Kenyon 细胞,占脑神经元总数的 40% 以上(Strausfeld, 2002)。MRJP1 可在 Kenyon 细胞内特定表达,但是其具体功能尚不清楚(Kucharski and Maleszka, 1998)。此外,蜜蜂在嗅觉学习过程中会涉及大脑的特定区域(Farooqui *et al.*, 2003),还需要进一步的研究来确定在蜜蜂嗅觉学习时 MRJP1 在脑部的高表达区域,从而进一步深入挖掘相关的调控通路,探索其调控分子机制。另外,当蜜蜂到达采集日龄时,除了嗅觉学习以外,蜜蜂的学习还包括食物定位、归巢导航、食物信息传递等。

因此,MRJP1 是否参与蜜蜂相对高级的学习过程,还需要进一步的探索。

## 参考文献 (References)

- Bitterman ME, Menzel R, Fietz A, Schäfer S, 1983. Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J. Comp. Psychol.*, 97(2): 107–119.
- Buttstedt A, Moritz RFA, Erler S, 2014. Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene family. *Biol. Rev.*, 89(2): 255–269.
- Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM, 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.*, 52: 81–106.
- Drapeau MD, Albert S, Kucharski R, Prusko C, Maleszka R, 2006. Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. *Genome Res.*, 16(11): 1385–1394.
- Farooqui T, Robinson K, Vaessin H, Smith BH, 2003. Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honeybee. *J. Neurosci.*, 23(12): 5370–5380.
- Giurfa M, 2007. Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. *J. Comp. Physiol. A*, 193(8): 801–824.
- Giurfa M, 2013. Cognition with few neurons: higher-order learning in insects. *Trends Neurosci.*, 36(5): 285–294.
- Groh C, Rössler W, 2020. Analysis of synaptic microcircuits in the mushroom bodies of the honeybee. *Insects*, 11(1): 43.
- Hojo M, Kagami T, Sasaki T, Nakamura J, Sasaki M, 2010. Reduced expression of major royal jelly protein 1 gene in the mushroom bodies of worker honeybees with reduced learning ability. *Apidologie*, 41(2): 194–202.
- Hori S, Takeuchi H, Arikawa K, Kinoshita M, Ichikawa N, Sasaki M, Kubo T, 2006. Associative visual learning, color discrimination, and chromatic adaptation in the harnessed honeybee *Apis mellifera* L. *J. Comp. Physiol. A*, 192(7): 691–700.
- Huang CY, Chi LL, Huang WJ, Chen YW, Chen WJ, Kuo YC, Yuan CM, Chen CN, 2012. Growth stimulating effect on queen bee larvae of histone deacetylase inhibitors. *J. Agric. Food Chem.*, 60(24): 6139–6149.
- Johnson BR, 2010. Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 64(3): 305–316.
- Kamakura M, 2011. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*, 473(7348): 478–483.
- Kamakura M, Suenobu N, Fukushima M, 2001. Fifty-seven-kDa protein in royal jelly enhances proliferation of primary cultured rat hepatocytes and increases albumin production in the absence of serum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282(4): 865–874.
- Kimura Y, Kajiyama Si, Kanaeda J, Izukawa T, Yonekura M, 1996. N-linked sugar chain of 55-kDa royal jelly glycoprotein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60(12): 2099–2102.

- Kucharski R, Maleszka R, Hayward DC, Ball EE, 1998. A royal jelly protein is expressed in a subset of Kenyon cells in the mushroom bodies of the honey bee brain. *Naturwissenschaften*, 85(7): 343 – 346.
- Laloi D, Gallois M, Roger B, Pham-Delègue MH, 2001. Changes with age in olfactory conditioning performance of worker honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 32(3): 231 – 242.
- Lee KW, Cho JG, Kim CM, Kang AY, Kim M, Ahn BY, Chung SS, Lim KH, Baek KH, Sung JH, Park KS, Park SG, 2013. Herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease (HAUSP) modulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) stability through its deubiquitinating activity. *J. Biol. Chem.*, 288(46): 32886 – 32896.
- Li ZG, Yu TT, Chen YP, Heerman M, He JF, Huang JN, Nie HY, Su SK, 2019. Brain transcriptome of honey bees (*Apis mellifera*) exhibiting impaired olfactory learning induced by a sublethal dose of imidacloprid. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 156: 36 – 43.
- Lourenço AP, Mackert A, Cristino ADS, Simões ZLP, 2008. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie*, 39(3): 372 – 385.
- Majtan J, Kumar P, Majtan T, Walls AF, Klaudiny J, 2010. Effect of honey and its major royal jelly protein 1 on cytokine and MMP-9 mRNA transcripts in human keratinocytes. *Exp. Dermatol.*, 19(8): e73 – e79.
- Matsumoto Y, Menzel R, Sandoz JC, Giurfa M, 2012. Revisiting olfactory classical conditioning of the proboscis extension response in honey bees: a step toward standardized procedures. *J. Neurosci. Methods*, 211(1): 159 – 167.
- Menzel R, 1999. Memory dynamics in the honeybee. *J. Comp. Physiol. A*, 185(4): 323 – 340.
- Pahl M, Tautz J, Zhang S, 2010. *Animal Behaviour: Evolution and Mechanisms*. Springer, Berlin, Heidelberg. 87 – 182.
- Peixoto LG, Calábria LK, Garcia L, Capparelli FE, Goulart LR, de Sousa MV, Espindola FS, 2009. Identification of major royal jelly proteins in the brain of the honeybee *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.*, 55(8): 671 – 677.
- Pyranowska J, Piechal A, Blecharz-Klin K, Joniec-Maciejak I, Graikou K, Chinou I, Widy-Tyszkiewicz E, 2014. Long-term administration of Greek Royal Jelly improves spatial memory and influences the concentration of brain neurotransmitters in naturally aged Wistar male rats. *J. Ethnopharmacol.*, 155(1): 343 – 351.
- Schulz DJ, Robinson GE, 1999. Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies: Behaviorally related changes in the antennal lobes and age-related changes in the mushroom bodies. *J. Comp. Physiol. A*, 184(5): 481 – 488.
- Simúth J, 2001. Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Apidologie*, 32: 69 – 80.
- Srisuparbh D, Klinbunga S, Wongsiri S, Sittipraneed S, 2003. Isolation and characterization of major royal jelly cDNAs and proteins of the honey bee (*Apis cerana*). *J. Biochem. Mol. Biol.*, 36(6): 572 – 579.
- Strausfeld NJ, 2002. Organization of the honey bee mushroom body: Representation of the calyx within the vertical and gamma lobes. *J. Comp. Neurol.*, 450(1): 4 – 33.
- Tamura S, Amano S, Kono T, Kondoh J, Yamaguchi K, Kobayashi S, Ayabe T, Moriyama T, 2009. Molecular characteristics and physiological functions of major royal jelly protein 1 oligomer. *Proteomics*, 9(24): 5534 – 5543.
- Villar G, Grozinger CM, 2017. Primer effects of the honeybee, *Apis mellifera*, queen pheromone 9-ODA on drones. *Anim. Behav.*, 127: 271 – 279.
- Watanabe K, Shinmoto H, Kobori M, Tsushida T, Shinohara K, Kanaeda J, Yonekura M, 1998. Stimulation of cell growth in the U-937 human myeloid cell line by honey royal jelly protein. *Cytotechnology*, 26: 23 – 27.
- Wu MC, Chang YW, Lu KH, Yang EC, 2017. Gene expression changes in honey bees induced by sublethal imidacloprid exposure during the larval stage. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 88: 12 – 20.
- Zhang SW, Mizutani A, Srinivasan MV, 2000. Maze navigation by honeybees: Learning path regularity. *Learn. Mem.*, 7(6): 363 – 374.

(责任编辑: 赵利辉)