

吴小波,王子龙,李淑云,等.中华蜜蜂与意大利蜜蜂性成熟处女蜂王蛋白质组比较分析[J].江西农业大学学报,2015,37(6):1057-1062.

中华蜜蜂与意大利蜜蜂性成熟处女蜂王蛋白质组比较分析

吴小波,王子龙,李淑云,颜伟玉,曾志将*

(江西农业大学 蜜蜂研究所,江西 南昌 330045)

摘要: 为了比较分析中华蜜蜂和意大利蜜蜂两蜂种处女蜂王性成熟期蛋白表达差异。试验采用双向电泳法建立中华蜜蜂和意大利蜜蜂处女蜂王性成熟期蛋白质表达谱,通过质谱分析与数据库检索,鉴定部分差异蛋白。研究发现:在中华蜜蜂蜂王和意大利蜜蜂蜂王中分别检测到2 205、2 417个蛋白点,两者之间的差异表达蛋白点有168个。其中,在中华蜜蜂蜂王高度表达的蛋白点有90个;在意大利蜜蜂蜂王中高度表达的蛋白点有78个。对部分差异蛋白进行质谱分析,共鉴定了19个蛋白点,其中在中华蜜蜂性成熟处女蜂王中上调表达的蛋白有副肌球蛋白、肌钙蛋白T、ATP合成酶以及丙酮酸脱氢酶等;在意大利蜜蜂性成熟处女蜂王中上调表达的蛋白有NADH辅酶Q氧化还原酶、保幼激素酸甲基转移酶、肌钙蛋白以及气味结合蛋白19前体等。中华蜜蜂与意大利蜜蜂性成熟处女蜂王体内存在大量蛋白表达差异,这些差异表达的蛋白质可能与两蜂种蜜蜂行为生物学有关。

关键词: 中华蜜蜂; 意大利蜜蜂; 蜂王; 蛋白质组

中图分类号: S893.2; S893.3 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2015)06-1057-06

Proteomic Comparison of Sexual Matured Queen between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*

WU Xiao-bo, WANG Zi-long, LI Shu-yun, YAN Wei-yu, ZENG Zhi-jiang*

(Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: This study aims to investigate the differentially expressed proteins of sexual matured queens between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* by comparison of proteome profiles. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was used to establish the proteomic maps of the two species of sexual matured queens. Part of differentially expressed proteins were identified by mass spectrometry and database search. The results showed that 2 205 and 2 417 proteins spots were detected respectively in the sexual matured queens of *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*, and 168 differentially expressed protein spots were found. 90 proteins were significantly up-expressed in the sexual matured queens of *Apis cerana cerana* while 78 proteins were significantly up-expressed in the sexual matured queens of *Apis mellifera ligustica*. 19 differentially expressed proteins were identified by mass spectrometry. The Paramyosin, Actin, ATP synthase and Pyruvate dehydrogenase were up-expressed in the queens *Apis cerana cerana*, while the NADH-ubiquinone oxidoreductase, Juvenile

收稿日期: 2015-03-06 修回日期: 2015-05-06

基金项目: 国家蜂产业技术体系资助项目(No. CARS-45-kxj12)、国家自然科学基金项目(31060327)、江西省科技支撑计划项目(20141BBF60033)和江西省教育厅科技计划项目(GJJ13280)

作者简介: 吴小波(1983—),男,博士,主要从事养蜂学教学与研究工作, E-mail: wuxiaobo21@163.com; * 通信作者: 曾志将,教授, E-mail: bees1965@sina.com。

hormone acid methyltransferase, Troponin T and Odorant binding protein 19 precursor were up-expressed in the queens *Apis mellifera ligustica*. A large number of proteins in queens between *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* showed expression changes, which might be related to the difference in behaviour biology of the two kinds of queens.

Key words: *Apis cerana cerana*; *Apis mellifera ligustica*; queen; proteome

蜜蜂是一种资源共享、分工明确和相互交流的高度结构化的社会昆虫,并以 3 种级型存在,即蜂王、工蜂和雄蜂。蜂王和雄蜂是蜂群的繁育主体,雄蜂的主要职能是与处女蜂王交尾,保证蜂王能产双倍体的受精卵。蜂王为蜂群的母体,承担着繁育工作即产卵。为了提高蜜蜂种群适应性及避免近亲交配等,蜜蜂进化出有效的竞争交配机制,即蜜蜂的婚飞。处女蜂王羽化出房,到达性成熟以及婚飞时,其体内会发生明显的生理变化^[1-6]。中华蜜蜂和意大利蜜蜂是两个独立的蜂种,两蜂种在繁殖、种群消长中存在明显区别^[7-8]。中华蜜蜂是我国的宝贵蜂种资源,但自 1896 年中国引进西方蜜蜂 100 多年以来,西方蜜蜂已使中华蜜蜂分布区域缩小,种群数量急剧下降^[9]。后来研究发现,中华蜜蜂蜂王自然交配受到意大利蜜蜂的干扰^[10],并推测处女蜂王婚飞交尾时,中华蜜蜂性成熟蜂王不仅会吸引中华蜜蜂的雄蜂来交尾,而且同时吸引大量西方蜜蜂的雄蜂,这样西方蜜蜂雄蜂会严重干扰中华蜂王与中蜂雄蜂正常交配,从而使中蜂蜂王交尾成功率大幅度下降^[11]。后来研究也发现,两种蜂王性成熟期体表释放的主要信息素含量存在差异^[4]。蛋白质组学是研究基因组所表达的全部蛋白质,不同时期以及不同环境条件下表达的蛋白质与其特定发育时期和生境条件的遗传调控存在内在关系^[12]。本研究拟通过双向电泳的方法,比较分析中华蜜蜂与意大利蜜蜂性成熟期蜂王蛋白质组成的特征及差异,以期为深入研究蜂王干扰交尾机理提供一定理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

试验蜂群为江西农业大学蜜蜂研究所饲养的中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)和意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)。其蜂群各含有 1 只同批次且交尾成功的蜂王。蜂群进行自由采集。试验样品的双向电泳和质谱鉴定试验在武汉市洪山区言行生物产品经营部进行。

1.2 样品采集

按照标准的人工育王方法分别在中华蜜蜂和意大利蜜蜂蜂群中进行人工育王^[13],待处女蜂王出房后,囚入王笼并放入无王区。处女蜂王出房 12 d 后,分别采集性成熟的中华蜜蜂和意大利蜜蜂处女蜂王。为了避免蜂王腹部消化道食物对试验的影响,用解剖剪从蜂王侧面解剖并剔除蜂王体内的消化道,每只蜂王为一个样品,将每组 4 个样品送至双向电泳与质谱鉴定检测实验室,放入-80℃冰箱保存。

1.3 蛋白质提取与双向电泳

具体操作步骤参照参考文献[14]。即采集样品后,先进行蛋白提取与纯化,再进行蛋白质溶解与定量,最后进行等电聚焦仪(德国 ETTAN IPGPHOR3)聚焦和双向 SDS-PAGE 电泳(德国 ETTAN DALTSix)。其中,第一向等电聚焦程序为: S1 stp 300V 0:20Hr; S2 stp 700V 0:30Hr; S3 stp 1 500V 1:30Hr; S4 grd 9 000 V 3:00Hr; S5 stp 9 000V 4:00Hr。第二向电泳程序为: S1 2W/gel 45 min, S2 17W/gel 4 h。电泳结束后将胶体放入固定液中进行固定,最后进行 G-250 染色。

1.4 图谱扫描与质谱鉴定

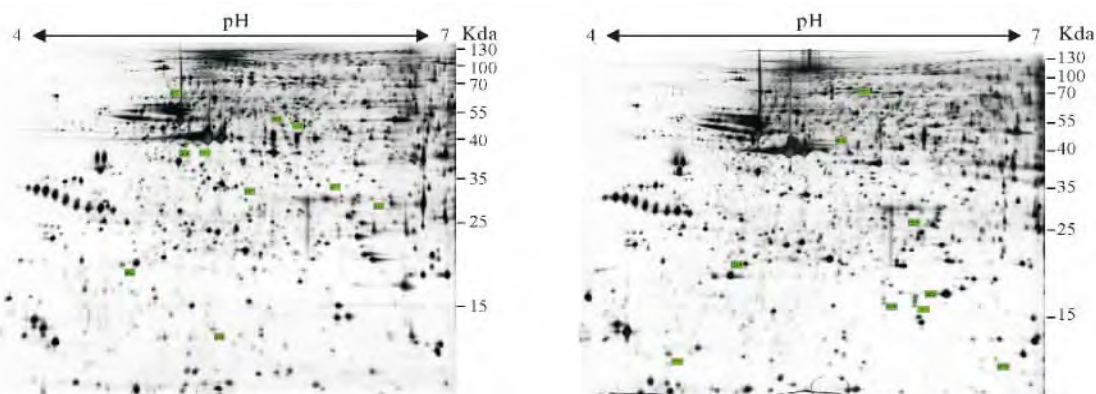
染色后的凝胶使用透射模式进行扫描(ArtixScan M2),扫描结果导入计算机,分析中华蜜蜂蜂王和意大利蜜蜂蜂王蛋白质点信息。在此基础上,利用凝胶差异斑点分析软件(ArtixScan M2)比较分析中华蜜蜂与意大利蜜蜂差异表达蛋白(灰度比值大于 2),确认分别在中华蜜蜂蜂王和意大利蜜蜂蜂王显著高表达的蛋白点。另外,从中华蜜蜂蜂王和意大利蜜蜂蜂王凝胶中分别选择 10 个和 9 个蛋白点进行质谱鉴定。利用德国布鲁克(Bruker Dalton) Ultraflex III TOF/TOF 质谱仪进行质谱分析。UV 波长为 355 nm,重复速率为 200 HZ,加速电压为 20 000 V,最优质量分辨率为 1 500 Da。扫描质量范围为 700~3 200 Da,收集信号。胰酶自切峰为内标校正质谱仪。所有实验样品的质谱图均以默认模式获得。

利用软件 flexAnalysis(Bruker Dalton) 过滤基线峰、识别信号峰。利用 BioTools(Bruker Dalton) 软件搜索 NCBI 数据库,寻找匹配的相关蛋白质,同时查询其功能,来明确鉴定的蛋白质为何种蛋白质。

2 试验结果与分析

2.1 中华蜜蜂与意大利蜜蜂性成熟处女蜂王蛋白质图谱分析

将染色后的凝胶进行扫描后导入计算机,结果如图 1 所示。对图谱进行分析发现,中华蜜蜂性成熟处女蜂王和意大利蜜蜂性成熟处女蜂王中分别有 2 205、2 417 个蛋白点,两者之间存在 168 个差异表达蛋白点。对这些差异蛋白点分析发现,在中华蜜蜂蜂王中高度表达的蛋白点有 90 个,其等电点介于 4.27~6.62,分子量介于 10.80~67.63 Kda(表 1);在意大利蜜蜂蜂王中高度表达的蛋白点有 78 个,其对应的等电点介于 4.21~6.70,分子量在 10.44~91.84 Kda(表 2)。另外,在中华蜜蜂蜂王和意大利蜜蜂蜂王中高表达蛋白比值为 1 000 000 的蛋白点分别有 51、59 个。



左: 中华蜜蜂蜂王 queens of *Apis cerana cerana*; 右: 意大利蜜蜂蜂王 queens of *Apis mellifera ligustica*; 图中标记的点为已鉴定的蛋白点 The spots of Fig are the protein spots subjected to functional identification

图 1 中华蜜蜂与意大利蜜蜂蜂王双向电泳蛋白质表达图谱

Fig.1 Profile of the 2-DE analysis of queens between *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*

表 1 中华蜜蜂性成熟处女蜂王上调表达蛋白质

Tab.1 The up-expressed proteins in sexual matured queens of *Apis cerana cerana*

编号 No	比值 Ratio	等电点 pI	分子量 MW	编号 No	比值 Ratio	等电点 pI	分子量 MW	编号 No	比值 Ratio	等电点 pI	分子量 MW	编号 No	比值 Ratio	等电点 pI	分子量 MW	编号 No	比值 Ratio	等电点 pI	分子量 MW
G01	4.159 81	4.98	67 629	G19	2.674 9	5.09	39 120	G37	2.718 28	5.46	33 638	G55	1 000 000	5.48	23 324	G73	1 000 000	5.62	15 337
G02	1 000 000	4.98	66 139	G20	2.805 38	5.07	39 090	G38	1 000 000	5.28	32 536	G56	1 000 000	5.90	22 435	G74	1 000 000	4.54	15 210
G03	2.914 84	6.14	58 804	G21	3.989 54	5.17	39 060	G39	1 000 000	5.37	32 639	G57	3.286 68	4.80	21 669	G75	1 000 000	4.54	14 893
G04	3.512 93	6.06	58 329	G22	1 000 000	5.06	38 465	G40	1 000 000	5.18	32 587	G58	1 000 000	5.57	21 311	G76	1 000 000	6.10	14 645
G05	1 000 000	5.21	56 583	G23	2.046 11	5.57	38 200	G41	2.742 22	6.16	31 122	G59	1 000 000	5.65	21 047	G77	1 000 000	4.54	14 576
G06	1 000 000	5.62	53 250	G24	1 000 000	5.57	37 763	G42	6.980 32	6.36	30 876	G60	2.485 26	4.30	20 502	G78	1 000 000	4.54	14 180
G07	1 000 000	5.51	52 200	G25	1 000 000	4.91	37 302	G43	1 000 000	6.24	30 389	G61	1 000 000	5.27	20 049	G79	1 000 000	5.26	13 680
G08	1 000 000	5.75	51 683	G26	1 000 000	6.00	36 903	G44	1 000 000	6.06	29 816	G62	1 000 000	4.73	19 882	G80	1 000 000	4.76	13 357
G09	2.013 35	5.50	50 791	G27	1 000 000	4.65	36 677	G45	1 000 000	6.34	28 250	G63	12.600 4	6.62	19 690	G81	3.657 34	4.96	13 119
G10	1 000 000	5.75	49 543	G28	2.003 48	5.84	36 415	G46	34.461 2	5.05	27 893	G64	26.034	6.56	18 730	G82	4.075 57	4.93	13 057
G11	4.618 44	4.76	47 021	G29	2.625 63	5.21	35 607	G47	1 000 000	5.8	27 194	G65	2.550 46	5.43	18 730	G83	12.810 2	4.35	12 825
G12	1 000 000	4.58	45 980	G30	2.428 96	6.07	35 843	G48	1 000 000	5.64	25 888	G66	2.516 49	4.53	18 518	G84	1 000 000	4.31	12 521
G13	1 000 000	5.70	43 531	G31	1 000 000	5.72	35 788	G49	2.257 28	4.27	25 400	G67	2.976 46	5.81	17 991	G85	1 000 000	6.00	12 255
G14	2.058 64	5.72	42 779	G32	1 000 000	4.71	35 541	G50	1 000 000	6.15	24 965	G68	6.451 12	4.52	17 402	G86	1 000 000	5.10	11 030
G15	2.821 44	5.81	42 041	G33	1 000 000	5.37	35 541	G51	2.373 28	6.33	24 621	G69	1 000 000	4.52	17 067	G87	1 000 000	5.75	11 030
G16	1 000 000	4.87	40 906	G34	6.306 99	5.79	35 081	G52	4.158 65	5.64	24 349	G70	4.051 04	4.63	16 925	G88	1 000 000	6.24	11 004
G17	4.633 96	5.39	39 573	G35	1 000 000	5.97	34 668	G53	2.716 93	4.78	24 214	G71	5.084 62	4.91	16 303	G89	1 000 000	5.67	10 939
G18	2.395 45	4.86	39 361	G36	2.537 72	6.16	34 285	G54	1 000 000	5.11	23 715	G72	1 000 000	4.88	15 681	G90	1 000 000	5.73	10 796

表 2 意大利蜜蜂性成熟处女蜂王上调表达蛋白质

Tab.2 The up-expressed proteins in sexual matured queens of *Apis mellifera ligustica*

编号 No	比值 Ratio	等电点 pI	分子量 MW	编号 No	比值 Ratio	等电点 pI	分子量 MW	编号 No	比值 Ratio	等电点 pI	分子量 MW	编号 No	比值 Ratio	等电点 pI	分子量 MW
H01	2.342 97	4.86	91 835	H21	1 000 000	5.14	38 281	H41	4.019 19	5.81	26 109	H61	1 000 000	5.99	16 428
H02	1 000 000	5.64	86 612	H22	1 000 000	5.43	38 018	H42	1 000 000	6.52	25 688	H62	1 000 000	5.80	16 286
H03	1 000 000	4.51	82 560	H23	1 000 000	5.14	37 985	H43	5.845 1	5.19	25 688	H63	1 000 000	5.99	16 006
H04	1 000 000	4.56	80 820	H24	1 000 000	6.26	37 887	H44	1 000 000	5.97	24 571	H64	2.158 01	4.92	15 573
H05	1 000 000	4.56	69 728	H25	1 000 000	5.07	38 080	H45	1 000 000	4.95	24 045	H65	1 000 000	4.92	15 240
H06	1 000 000	4.62	69 458	H26	1 000 000	6.00	36 862	H46	1 000 000	4.87	23 445	H66	1 000 000	5.80	15 064
H07	6.035 18	6.23	62 411	H27	1 000 000	4.93	36 959	H47	1 000 000	6.51	22 403	H67	1 000 000	4.28	15 043
H08	1 000 000	5.91	60 853	H28	1 000 000	5.15	36 730	H48	1 000 000	5.35	21 735	H68	1 000 000	6.70	14 865
H09	1 000 000	4.55	57 293	H29	1 000 000	4.64	36 030	H49	3.133 36	4.89	21 583	H69	3.271 93	4.97	14 298
H10	9.356 17	5.18	56 960	H30	1 000 000	5.79	35 700	H50	1 000 000	5.88	21 086	H70	1 000 000	5.11	14 059
H11	2.470 1	6.00	55 000	H31	1 000 000	4.81	35 216	H51	1 000 000	5.58	20 605	H71	2.284 55	4.96	13 968
H12	1 000 000	5.60	52 854	H32	1 000 000	4.41	35 121	H52	2.383 51	5.36	20 545	H72	1 000 000	5.00	13 267
H13	1 000 000	5.50	48 210	H33	4.106 89	5.11	34 310	H53	1 000 000	4.76	20 192	H73	1 000 000	6.44	13 229
H14	4.257 02	5.98	47 029	H34	3.579 55	5.69	32 972	H54	1 000 000	5.62	19 421	H74	1 000 000	4.70	12 659
H15	1 000 000	4.39	47 531	H35	1 000 000	6.02	32 031	H55	5.186 89	5.85	18 147	H75	1 000 000	4.53	12 240
H16	1 000 000	5.98	43 893	H36	3.668 59	4.76	30 726	H56	1 000 000	4.21	17 530	H76	1 000 000	6.46	11 884
H17	1 000 000	4.91	42 069	H37	4.610 68	6.27	32 339	H57	6.981 43	5.91	17 424	H77	2.241 7	5.48	11 419
H18	1 000 000	4.92	40 353	H38	1 000 000	5.48	29 527	H58	1 000 000	6.00	16 957	H78	1 000 000	4.52	10 444
H19	1 000 000	5.62	39 623	H39	1 000 000	5.94	28 685	H59	1 000 000	5.80	16 742				
H20	1 000 000	5.12	38 545	H40	1 000 000	6.1	28 018	H60	1 000 000	4.28	16 618				

2.2 中华蜜蜂与意大利蜜蜂性成熟处女蜂王蛋白质质谱鉴定

通过对差异蛋白质进行图谱分析,选择 19 个差异表达蛋白点进行质谱鉴定,其中 10 个蛋白在中华蜜蜂性成熟处女蜂王中高表达,其鉴定结果主要为副肌球蛋白、肌钙蛋白 T、ATP 合成酶以及丙酮酸脱氢酶等。另外 9 个蛋白质在意大利蜜蜂性成熟处女蜂王中高表达,主要为 NADH 辅酶 Q 氧化还原酶、保幼激素酸甲基转移酶、肌钙蛋白以及气味结合蛋白 19 前体等(表 3)。

3 结论与讨论

本研究旨在分析中华蜜蜂与意大利蜜蜂性成熟处女蜂王表达蛋白,以期了解两蜂种蜂王蛋白质组的差异。结果表明,中华蜜蜂和意大利蜜蜂性成熟处女蜂王中分别检测到了 2 205、2 417 个蛋白点,但差异蛋白点只有 168 个,可能与蜂王性成熟期的蛋白点相对比较保守有关,也可能是因为中华蜜蜂和意大利蜜蜂在蜜蜂属中亲缘关系最近的缘故。另外,也可能是因为两者表达的差异蛋白点太少,导致两种雄蜂很难辨别蜂王是中华蜜蜂蜂王还是意大利蜜蜂蜂王。对其显著差异表达的蛋白进行图谱分析,结果显示中华蜜蜂和意大利蜜蜂分别有 90、78 个上调表达蛋白。周天娥等^[15]研究发现,中华蜜蜂雄蜂卵期表达的蛋白点也高于意大利蜜蜂,可能是这 2 种蜜蜂在长期进化过程中形成了符合各自发育规律的蛋白表达模式。中华蜜蜂与意大利蜜蜂蜂王体内含有比值为 1 000 000 的蛋白点数的蛋白 51、59 个,而且中华蜜蜂工蜂触角和雄蜂触角间的差异表达蛋白点大部分在意大利蜜蜂中高表达^[16],这也可能是因为两蜂种之间在嗅觉功能、能量代谢、分子运输等方面还是存在较大差异。

对中华蜜蜂性成熟处女蜂王中高表达的几种蛋白进行质谱鉴定发现,ATP 合成酶、副肌球蛋白、肌动蛋白、丙酮酸脱氢酶以及蛋白酶体 a 亚基等在中华蜜蜂蜂王中高表达。副肌球蛋白是粗肌丝中含量最高的蛋白之一,它能帮助粗肌丝进行组装,并调节粗肌丝长度、直径以及肌肉收缩。副肌球蛋白编码基因的缺失,肌肉没有收缩性。肌动蛋白是微丝的结构蛋白,也具有收缩功能^[17]。ATP 合成酶和丙酮

酸脱氢酶均为调节、催化合成 ATP 的关键酶^[18-19]。这两种蛋白和酶在中华蜜蜂性成熟处女蜂王中高表达,可能与中华蜜蜂的特性有关,中华蜜蜂处女蜂王在巢房中活动速度相对较快,其体内的肌肉收缩、新陈代谢更加旺盛,从而需要这些蛋白和酶参与相应的物理和化学反应。

表 3 已鉴定的 19 个蛋白点基本信息

Tab.3 Basic information of nineteen identified proteins

点号 Spot Number	蛋白名称 Protein name	登录号 Accession number	蛋白质得分 Score	覆盖率/% Sequence coverage
G01	ATP 合成酶 β 亚基 ATP synthase subunit beta_mitochondrial	gi 328785025	142	22
G06	未知的蛋白 C6orf168 Uncharacterized protein C6orf168	gi 328784030	298	24
G10	副肌球蛋白 Paramyosin long form-like	gi 66510482	283	26
G19	肌动蛋白异形体 X2 Actin clone 205-like isoform X2	gi 328790800	313	40
G21	肌动蛋白异形体 2 Actin clone 205-like isoform 2	gi 328790806	108	17
G35	蛋白酶体 α 亚基 proteasome subunit alpha type-1-like	gi 66530404	420	31
G37	丙酮酸脱氢酶 E1 β 亚基 Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta_mitochondrial	gi 335892820	199	27
G43	羟酰谷胱甘肽水解酶 Hydroxyacylglutathione hydrolase_mitochondrial-like isoform 1	gi 328789071	184	35
G62	ATP 合成酶 δ 亚基 ATP synthase subunit d_mitochondrial isoform 4	gi 328785994	158	32
G79	v1g245604 蛋白 UPF0587 protein v1g245604-like	gi 328786499	259	46
H02	NADH-辅酶 Q 氧化还原酶 75 kDa 亚基 NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit_mitochondrial	gi 288872187	69	14
H13	肌钙蛋白 T 异形体 5 Troponin T isoform 5	gi 78101801	178	23
H39	保幼激素酸甲基转移酶 Juvenile hormone acid methyltransferase	gi 459655418	217	48
H49	假定的蛋白 LOC551742 Hypothetical protein LOC551742	gi 66524513	575	51
H58	表皮结构糖蛋白 SgAbd-1 Endocuticle structural glycoprotein SgAbd-1	gi 328792990	165	18
H59	DJ-1 蛋白 Protein DJ-1-like	gi 328782818	371	46
H61	表皮结构糖蛋白 SgAbd-1 Endocuticle structural glycoprotein SgAbd-1	gi 328792990	197	18
H75	气味结合蛋白 19 前体 Odorant binding protein 19 precursor	gi 194158731	161	45
H76	核糖核酸酶 UK114 异形体 1 Ribonuclease UK114-like isoform 1	gi 328793595	72	37

蛋白酶体是一类具有水解蛋白功能的大分子复合物,在蛋白质降解过程中起着重要作用。蛋白酶体含有几种不同的 α 亚基和 β 亚基,其中 α 亚基为结构性蛋白,而 β 亚基为功能性催化蛋白,两者相辅相成,蛋白酶体 β 亚基基因表达随机体新陈代谢、蛋白质代谢活动有关^[20]。研究发现,蛋白酶体 α 亚基在中华蜜蜂蜂王体内高表达,这可能与蜂王婚飞有关,中华蜜蜂处女蜂王在进行婚飞时,其飞行速度比意大利蜜蜂快,持续时间可能比意大利蜜蜂长,在婚飞过程中需要产生大量的 β 亚基,因此,蜂王在婚飞前表达大量的 α 亚基,为婚飞时集合蛋白酶体 β 亚基奠定基础。

研究还发现,NADH-辅酶 Q 氧化还原酶,肌钙蛋白,保幼激素酸甲基转移酶以及气味结合蛋白等在意大利蜜蜂性成熟处女蜂王中高表达。NADH 辅酶 Q 氧化还原酶是动物和植物体内呼吸链上参与传递电子的第一个功能酶,这些酶的表达会受外界环境、营养、杀螨剂等因素的影响,如昆虫采集了具有抗性的食物后,其体内的 NADH 辅酶 Q 氧化还原酶基因表达呈现明显的上升趋势^[21]。意大利蜜蜂相对于中华蜜蜂,更容易感染螨虫,而在日常饲养过程中,常常用螨扑等杀螨剂对意大利蜜蜂进行杀螨处理,从而也导致蜂群体内的 NADH 辅酶 Q 氧化还原酶基因表达上调。

保幼激素酸甲基转移酶是保幼激素合成过程中最重要的调控酶,它通过将自身的甲基转移到由法尼酸环氧化产生的保幼激素酸后形成保幼激素^[22]。保幼激素是导致蜂王发育的主要内源性信号,较高水平的保幼激素能阻止蜂王卵巢发生程序性细胞死亡,使卵巢得到充分发育,也能增加蜜蜂个体体重^[23]。本研究发现,保幼激素酸甲基转移酶在意大利蜜蜂蜂王中高表达,主要原因在于意大利蜜蜂处女蜂王个体、卵巢等比中华蜜蜂蜂王大,需要更多的保幼激素酸甲基转移酶参与保幼激素的合成。

肌钙蛋白是一类肌肉调节蛋白,与原肌球蛋白结合,直接参与钙所控制的肌肉收缩,肌钙蛋白 T 是抑制或激活肌凝蛋白活性所必须的^[24]。本研究发现,肌钙蛋白 T 在意大利蜜蜂处女蜂王中高表达,可能与生殖系统发育有关。意大利蜜蜂蜂王产卵能力比中华蜜蜂更旺盛,而且意大利蜜蜂卵巢也比中华蜜蜂大,卵巢形成卵子以及与精子相结合时,需要肌钙蛋白参与肌肉收缩,卵子和精子移动与结合等。

蜜蜂气味结合蛋白 19 的功能目前尚无报道,而且近期开展的蜜蜂相关转录组也未发现该蛋白基因在不同时期存在表达差异,可能是该蛋白功能相对比较保守。然而,本研究发现,该蛋白在意大利蜜蜂性成熟处女蜂王中高表达,这可能与蜂种有关,也可能与蜂王婚飞有关,意大利蜜蜂蜂王能够利用气味结合蛋白 19 行使辨别雄蜂集聚区,也可能具有其它特殊功能,具体功能有待于进一步研究与论证。

参考文献:

- [1] Wossler T C, Jones G E, Allsopp M H *et al.* Virgin queen mandibular gland signals of *Apis mellifera capensis* change with age and affect honeybee worker responses [J]. *Journal of Chemical Ecology* 2006, 32(5): 1043-1056.
- [2] 吴小波,王子龙,石元元,等.婚飞对中华蜜蜂性成熟处女蜂王 sRNAs 表达的影响 [J]. *中国农业科学* 2013, 46(17): 3721-3728.
- [3] 吴小波,王子龙,张飞,等.婚飞行为影响中华蜜蜂性成熟处女蜂王的基因表达 [J]. *昆虫学报* 2013, 56(5): 486-493.
- [4] 吴小波,田柳青.中华蜜蜂与意大利蜜蜂蜂王体表信息素含量比较 [J]. *应用昆虫学报* 2014, 51(6): 1561-1566.
- [5] 吴小波,王子龙,李淑云,等.羽化和性成熟时中华蜜蜂蜂王和雄蜂转录组分析 [J]. *昆虫学报* 2014, 57(8): 905-913.
- [6] Wu X B, Wang Z L, Zhang F, *et al.* Mating flight causes genome-wide transcriptional changes in sexually mature honeybee queens [J]. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 2014, 17(1): 37-43.
- [7] 余林生,孟祥金.安徽两种蜜蜂种群的春季繁殖及数量动态特征 [J]. *应用生态学报* 2002, 13(9): 1127-1130.
- [8] 余林生,邵运鼎.安徽省蜜蜂种群消长及其分布与自然环境的关系 [J]. *应用生态学报* 2006, 17(8): 1465-1468.
- [9] 杨冠煌.引入西方蜜蜂对中华蜂的危害及生态影响 [J]. *昆虫学报* 2005, 48(3): 401-406.
- [10] 余林生,韩胜明.栖息环境和种间竞争对中华蜜蜂群体分布的影响 [J]. *应用生态学报* 2003, 14(4): 553-556.
- [11] 王启发,李位三,张启明,等.中、西蜂间自然交尾干扰问题的观察 [J]. *昆虫知识* 2003, 40(2): 164-167.
- [12] 吴小波,李淑云,颜伟玉,等.意大利蜜蜂刚出房与性成熟雄蜂的蛋白质组差异分析 [J]. *昆虫学报* 2015, 58(3): 256-263.
- [13] 曾志将.养蜂学 [J]. 北京:中国农业出版社,2009: 101-104.
- [14] 房宇,李建科.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 [J]. *中国农业科学* 2009, 42(7): 2552-2563.
- [15] 周天娥,房宇,冯毛,等.中华蜜蜂与意大利蜜蜂雄蜂胚胎发育差异蛋白质组与磷酸化蛋白质组分析 [J]. *中国农业科学* 2013, 46(2): 394-408.

(下转第 1075 页)

3 结 论

本方法采用甲醇提取, HLB 固相萃取柱净化, 建立了水产品中微囊藻毒素的液相色谱-质谱/质谱检测方法, 方法的灵敏度高、特异性好、选择性强, 能满足水产品中微囊藻毒素的检测要求。

参考文献:

- [1] Carmichael W W. The toxins of cyanobacteria [J]. Scientific American, 1994, 270(1): 78-86.
- [2] 闫海, 潘纲, 张明明, 等. 微囊藻毒素研究进展 [J]. 生态学报, 2002, 22(11): 1968-1975.
- [3] 张维昊, 徐小清. 固相萃取高效液相色谱法测定水中痕量-微囊藻毒素 [J]. 分析化学, 2001, 29(5): 522-525.
- [4] 郭坚, 杨新磊, 叶明立, 等. 全自动在线固相萃取-高效液相色谱法测定水体中痕量微囊藻毒素 [J]. 分析化学, 2011, 39(8): 1256-1260.
- [5] Ueno Y, Nagata S, Tsutsumi T, et al. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay [J]. Carcinogenesis, 1996, 17(6): 1317-1321.
- [6] 国家认证认可监督管理委员会. 进出口淡水产品中微囊藻毒素的检测方法 SN/T 2678-2010 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [7] Harada Ki, Nakano T, Fujii K, et al. Comprehensive analysis system using liquid chromatography-mass spectrometry for the biosynthetic study of peptides produced by cyanobacteria [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1033: 107-113.
- [8] 李彦文, 黄献培, 吴小莲, 等. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定土壤中 3 种微囊藻毒素 [J]. 分析化学, 2013, 41(1): 88-92.
- [9] 沈坚, 张爱芝, 曹丽丽, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定田螺中 3 种微囊藻毒素 [J]. 理化检验-化学分册, 2014(5): 606-610.
- [10] 李兵, 刘伟, 范赛, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测螺旋藻保健品中 7 种微囊藻毒素 [J]. 色谱, 2012, 30(6): 584-589.

(上接第 1062 页)

- [16] Wolteji D, Song F, Zhang L, et al. Western honeybee drones and workers (*Apis mellifera ligustica*) have different olfactory mechanisms than eastern honeybees (*Apis cerana cerana*) [J]. Journal of proteome research, 2012, 11: 4526-4540.
- [17] 杨璞, 余海忠, 程家安, 等. 昆虫飞行肌蛋白质 [J]. 昆虫知识, 2005, 42(6): 726-731.
- [18] 倪张林, 魏家绵. ATP 合酶的结构与催化机理 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(5): 367-374.
- [19] 王更先, 司马杨虎, 周嫣娜, 等. 具有丙酮酸脱氢酶功能的家蚕 Bm-1(1) 基因的克隆及序列结构与表达研究 [J]. 蚕业科学, 2010, 36(5): 759-765.
- [20] 王更先, 司马杨虎, 张升祥, 等. 具有蛋白酶体 $\beta 7$ 亚基功能的棉铃虫 HaPro $\beta 7$ 基因的克隆与序列结构及表达研究 [J]. 北方园艺, 2010, 34(24): 138-142.
- [21] 杨之帆, 何光存. 褐飞虱 NADH 泛醌氧化还原酶 51kDa 亚基 cDNA 片段的克隆及表达分析 [J]. 武汉科技大学学报: 自然科学版, 2006, 29(6): 611-617.
- [22] 刘艳, 胜振涛, 蒋容静, 等. 保幼激素合成的研究进展 [J]. 昆虫学报, 2007, 50(12): 1285-1292.
- [23] 李文峰. 蜜蜂保幼激素终端合成相关酶基因分子克隆、鉴定及其在级型发育过程中的表达研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [24] 郭新军. 拟黑多刺蚊肌细胞增强因子 2 与肌钙蛋白 I 亚基基因的克隆及其在发育中的表达研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2010.