

# 意大利蜜蜂刚出房与性成熟雄蜂的蛋白质组差异分析

吴小波, 李淑云, 颜伟玉, 曾志将\*

(江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045)

**摘要:**【目的】对意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 刚出房雄蜂与性成熟雄蜂的蛋白质组进行比较, 探讨雄蜂在性成熟过程中蛋白质表达变化, 为进一步研究雄蜂发育生物学获得差异表达蛋白质方面的依据。【方法】采用双向电泳法建立意大利蜜蜂雄蜂发育过程中刚出房时与性成熟期的蛋白质表达谱, 通过质谱分析与数据库检索, 鉴定部分差异蛋白。【结果】在意大利蜜蜂刚出房雄蜂和性成熟雄蜂中分别检测到 2 490 和 2 317 个蛋白点, 其中差异表达蛋白点有 157 个。在刚出房雄蜂中高度表达的蛋白点有 102 个; 在性成熟雄蜂中高度表达的蛋白点有 55 个。对部分差异蛋白进行质谱分析, 共鉴定了 18 个蛋白点, 其中在刚出房雄蜂中上调表达的蛋白有肌钙蛋白、SEC13 蛋白、DJ 蛋白等, 在性成熟雄蜂中上调表达的蛋白有副肌球蛋白、精氨酸激酶、肌动蛋白解聚因子等。【结论】意大利蜜蜂雄蜂在性成熟发育过程中, 其体内大量蛋白表达发生了变化, 其差异表达的蛋白质可能与骨骼、飞行肌以及精子发育等机能有关。

**关键词:** 意大利蜜蜂; 雄蜂; 发育; 蛋白质组; 差异表达蛋白

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2015)03-0256-08

## Proteomic comparison between the newly emerged drones and the sexually mature drones of *Apis mellifera ligustica* (Hymenoptera: Apidae)

WU Xiao-Bo, LI Shu-Yun, YAN Wei-Yu, ZENG Zhi-Jiang\* (Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** 【Aim】 This study aims to investigate the differentially expressed proteins between the newly emerged drones and the sexually mature drones of *Apis mellifera ligustica* through comparing the proteome profilings of drones at these two different stages, so as to provide the basis for further studies on the drone developmental biology. 【Methods】 Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) was used to establish the proteomic map of the two kinds of drones, and part of differentially expressed proteins were identified by mass spectrometry analysis and database searching. 【Results】 The results showed that 2 490 and 2 317 proteins were detected in the newly emerged drones and the sexually mature drones of *A. mellifera ligustica*, respectively, of which 157 differentially expressed protein spots were found. Furthermore, 102 and 55 proteins were significantly up-expressed in the newly emerged drones and the sexually mature drones, respectively. Eighteen of the differentially expressed proteins were identified by mass spectrometry analysis. Among them, the Troponin, SEC13 protein homolog and DJ protein were up-expressed in the newly emerged drones while the paramyosin, arginine kinase and cofilin/actin-depolymerizing factor homolog were up-expressed in the sexually mature drones. 【Conclusion】 A large number of proteins in drones of *A. mellifera ligustica* show expression changes during maturing, which might be related to the development of cuticle, flight muscles and sperms.

**Key words:** *Apis mellifera ligustica*; drone; development; proteome; differentially expressed protein

蛋白质组学研究源于蛋白质与基因组学的组合, 是研究基因组所表达的全部蛋白质。每种生物

基因组在不同发育时期和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

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060327); 江西省科技支撑计划项目(20141BBF60033); 江西省教育厅科技计划项目(GJJ13280); 蜜蜂产业技术体系资助项目(CARS-45-kxj12)

作者简介: 吴小波, 男, 1983年生, 江西进贤人, 博士, 讲师, 主要从事养蜂学教学与研究, E-mail: wuxiaobo21@163.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: bees1965@sina.com

收稿日期 Received: 2014-11-13; 接受日期 Accepted: 2014-01-07

内在关系。蜜蜂是一种高度进化的社会性群体,是开展生物学的模式生物之一(郑火青和胡福良,2009)。不同蜂种以及同种蜜蜂不同发育时期的蛋白质组学正在被科研人员分析报道(李建科等,2011;宋飞飞,2011;Feng *et al.*,2011;Fang *et al.*,2012;Woltedji *et al.*,2012;李荣丽等,2013;周天娥等,2013)。雄蜂是蜂群繁育的父本,在蜂群繁育中仅与处女蜂王交配,维持蜂群的延续性。雄蜂与蜂王、工蜂的发育有着本质的区别,特别是刚出房的雄蜂,只能在蜂群中爬行。5-7 d后,雄蜂便可出巢飞翔,并具有无界性等特点,可以飞入他群,避免蜂群内部的近亲交配(曾志将,2009)。当雄蜂到达性成熟期时,会选择合适的机会与蜂王在空中进行交尾,说明雄蜂在发育过程中,其体内的生理状态发生了明显的变化。目前虽然已对雄蜂卵期以及雄蜂触角的蛋白质组进行分析(房宇和李建科,2008,2009;宋飞飞,2011;Feng *et al.*,2011;Fang *et al.*,2012;Woltedji *et al.*,2012;周天娥等,2013),但缺乏对雄蜂个体性成熟发育时期的蛋白质组的分析。鉴于此,本研究拟通过双向电泳的方法探索意大利蜜蜂 *A. mellifera ligustica* 刚出房雄蜂与性成熟雄蜂蛋白质组成特征及差异,以期为今后深入研究雄蜂性成熟发育的分子机理提供蛋白质表达谱的信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

实验蜂群为江西农业大学蜜蜂研究所饲养的意大利蜜蜂 *A. mellifera ligustica*,其蜂群各含有1头同批次且交尾成功的蜂王。蜂群进行自由采集。实验样品的双向电泳与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

实验正式开始的前1 d傍晚,向已开始产雄蜂卵的蜂群中加入雄蜂巢脾进行清理12 h。然后,控制蜂王在此巢脾中产卵,24 h之后,移出蜂王,并将巢脾放在无王区继续孵化发育。雄蜂子脾出房前1 d,将含有雄蜂子脾的巢脾放入恒温恒湿箱中(温度35℃,RH 95%,无光照)羽化,采集刚出房雄蜂(吴小波等,2014)。同时对部分刚出房雄蜂进行标记,介绍到一个平箱群,并对平箱群加一个继箱,有利于雄蜂飞翔排泄。为了避免工蜂对雄蜂的驱赶以及雄蜂出巢,在平箱群的巢门装置脱粉片,同时对蜂群进行奖励饲喂。17 d之后,采集17日龄的性成熟雄

蜂。用解剖剪从刚出房雄蜂和性成熟雄蜂侧面解剖并剔除雄蜂体内的消化道,每头雄蜂为一个样品,将每组4个样品送至双向电泳与质谱鉴定检测实验室,-80℃冰箱保存。

### 1.3 蛋白质提取与纯化

分别将意大利蜜蜂刚出房雄蜂和性成熟雄蜂样品置于研钵中,迅速加入液氮并研磨,直至组织变成粉末。在研钵中加入800 μL LB裂解液(20 mmol/L Tris碱,2 mol/L 硫脲,7 mol/L 尿素,2% CHAPS),充分溶解后转移至1.5 mL Eppendorf (EP)管中,4℃ 12 000 r/min离心20 min,收集上清液。对离心后的上清液进行超声处理,破碎核酸。每个EP管超声3次,4℃ 12 000 r/min离心20 min,收集上清液。将上清液分装成3管,每管250 μL,各加入1 mL 丙酮沉淀过夜。沉淀后的蛋白质于4℃ 12 000 r/min离心20 min,倒去上清液后,平放于干净的纸巾上自然干燥,即可得到处理后的蛋白质团块,-80℃保存备用。

### 1.4 蛋白质溶解

在干燥后的蛋白质团块中加入250 μL的RB(2 mol/L 硫脲,7 mol/L 尿素,4% CHAPS),用枪头将蛋白质团块戳小后反复吹打直至蛋白质完全溶解。4℃ 12 000 r/min离心20 min,吸出上清液,转移至新的EP管中备用。

### 1.5 蛋白质定量

取5,10,15,20,25,30和35 μg的牛血清白蛋白(BSA)制作标准曲线。根据定量所得的数据吸取蛋白质120 μg,加入RB至360 μL,然后称量55.2 μg二硫苏糖醇(DTT),加55.2 μL IPG Buffer,加18 μL 溴酚蓝,加RB至1.2 mL,混合均匀后每管加入100 μL,即可将体积调至460 μL。将样品溶液混合均匀后,4℃ 12 000 r/min,离心20 min,吸取上清液450 μL进行泡胀。

### 1.6 干胶条泡胀

取出水化盘,在底下铺上白色纸巾。从冰箱取出干胶条复温。吸取离心后的样品上清液加到水化盘中。取出胶条,使支持膜朝外,轻轻撕下覆盖膜。胶面朝下,酸性端朝顶端将胶条放入水化盘中。放好胶条后再加入1.2 mL覆盖油于支持膜上保湿,调节室内温度为20℃,让胶条泡胀过夜(10~12 h),记录下胶条的号码。

### 1.7 等电聚焦

取出电极板,在等电聚焦盘中加入覆盖油,同时取出泡胀后的胶条并吸干胶条上的覆盖油,胶面朝

上将胶条放入等电聚焦盘中。剪好纸垫片,每个垫片加入 75  $\mu\text{L}$  Milli Q 水进行润湿,将纸垫片放于胶面的两端,边缘与胶面边缘对齐,装上电极板,选择胶条数量后便可开始运行程序。

等电聚焦程序为: 300 V, 20 min; 700 V, 30 min 快速升压; 1 500 V, 1.5 h 线性升压; 9 000 V, 3 h 线性升压; 9 000 V, 4 h 快速升压聚焦。

### 1.8 胶条的保存

跑完等电聚焦以后,取出胶条,吸干表面的覆盖油,胶面朝上将胶条放入平衡管中,胶条应置于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.9 双向 SDS-PAGE

具体步骤参照房宇和李建科(2009),其双向电泳的程序为: S1: 2 W/gel, 45 min; S2: 17 W/gel, 4 h。将胶体放入固定液中进行固定,最后用 G-250 进行染色。

### 1.10 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,扫描结果导入计算机,分析刚出房雄蜂和性成熟雄蜂蛋白表达信息。在此基础上,比较分析刚出房雄蜂与性成熟雄蜂差异表达蛋白,确认分别在刚出房雄蜂和性成熟雄蜂显著高表达的蛋白点(灰度比值大于

2)。另外,从在刚出房雄蜂和性成熟雄蜂显著高表达的蛋白点中分别选择 10 个和 8 个蛋白点进行质谱鉴定。切割蛋白质点置于 EP 管中,进行蛋白酶溶解。所得的肽段通过 Brukerzhi 质谱仪进行分析,获取质量指纹图,并与 NCBI 数据库进行比对。

## 2 结果

### 2.1 意大利蜜蜂刚出房雄蜂与性成熟雄蜂蛋白质图谱分析

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,在意大利蜜蜂刚出房雄蜂和性成熟雄蜂中分别检测到 2 490 和 2 317 个蛋白点,其中两者之间存在 157 个差异表达蛋白点。对这些差异蛋白点进一步分析发现,在意大利蜜蜂刚出房雄蜂中高度表达的蛋白点有 102 个,其等电点介于 4.14 ~ 6.51 之间,分子量介于 11.27 ~ 105.20 kDa 之间(表 1);在意大利性成熟雄蜂中高度表达的蛋白点有 55 个,其对应的等电点介于 4.10 ~ 6.47 之间,分子量在 10.44 ~ 64.09 kDa 之间(表 2)。另外,在刚出房雄蜂和性成熟雄蜂中高表达蛋白比值为 1 000 000 的蛋白点分别有 24 和 27 个。

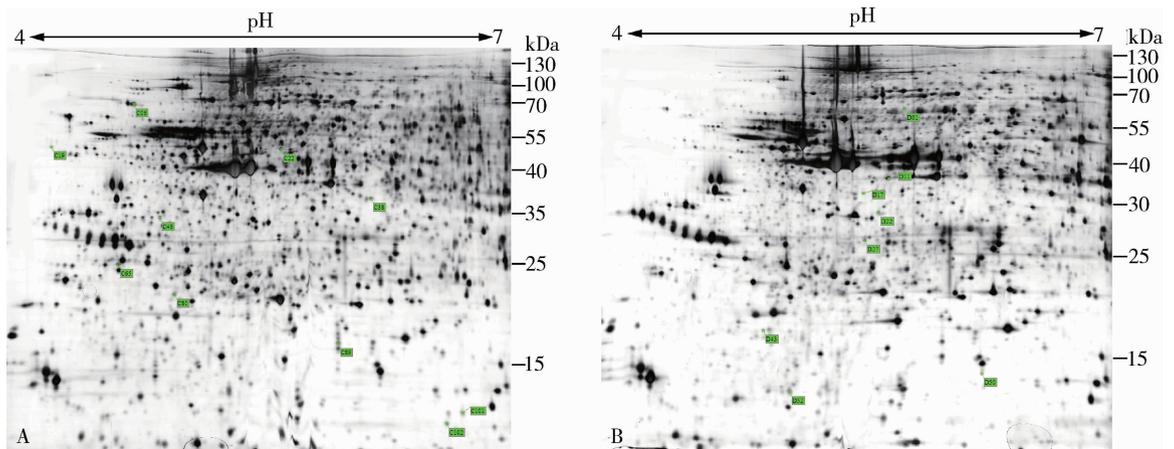


图 1 意大利蜜蜂刚出房雄蜂(A)和性成熟雄蜂(B)双向电泳蛋白质表达图谱

Fig. 1 2-DE analysis on protein expression in the newly emerged drones (A) and sexually mature drones (B) of *Apis mellifera ligustica*

图中标记的点为已鉴定的蛋白点。The marked spots are the protein spots subjected to functional identification.

### 2.2 意大利蜜蜂刚出房雄蜂与性成熟雄蜂差异蛋白质的质谱鉴定

通过对差异蛋白质进行质谱分析,18 个蛋白点进行鉴定(图 1),其中 10 个蛋白质在刚出房雄蜂中

高度表达,其主要蛋白为肌钙蛋白、SEC13 蛋白、延长因子和 DJ 蛋白等;另外 8 个蛋白质在性成熟雄蜂中高度表达,主要为副肌球蛋白、精氨酸激酶、转录激活蛋白和肌动蛋白解聚因子等(表 3)。

表 1 意大利蜜蜂刚出房雄蜂上调表达蛋白质  
Table 1 Up-expressed proteins in the newly emerged drones of *Apis mellifera ligustica*

| 编号  |           |      | 等电点 (Da) |     |           | 分子量 (Da) |        |       | 比值        |      |        | 等电点 (Da) |           |      | 分子量 (Da) |       |           | 比值   |        |       | 等电点 (Da) |    |     | 分子量 (Da) |    |    |
|-----|-----------|------|----------|-----|-----------|----------|--------|-------|-----------|------|--------|----------|-----------|------|----------|-------|-----------|------|--------|-------|----------|----|-----|----------|----|----|
| No. | Ratio     | pI   | MW       | No. | pI        | MW       | No.    | Ratio | pI        | MW   | No.    | Ratio    | pI        | MW   | No.      | Ratio | pI        | MW   | No.    | Ratio | pI       | MW | No. | Ratio    | pI | MW |
| C01 | 2.172 76  | 4.68 | 105 199  | C22 | 1.000 000 | 5.48     | 48 210 | C43   | 1.000 000 | 4.62 | 35 777 | C64      | 2.01250   | 4.49 | 25 827   | C85   | 1.000 000 | 5.79 | 17 599 |       |          |    |     |          |    |    |
| C02 | 6.280 84  | 4.70 | 104 886  | C23 | 2.42695   | 6.03     | 46 956 | C44   | 4.18222   | 4.29 | 35 495 | C65      | 4.86273   | 4.6  | 25 899   | C86   | 1.000 000 | 5.79 | 17 178 |       |          |    |     |          |    |    |
| C03 | 3.821 28  | 4.72 | 91 603   | C24 | 1.000 000 | 5.83     | 46 956 | C45   | 2.37077   | 4.83 | 35 309 | C66      | 4.08297   | 4.54 | 25 136   | C87   | 5.39653   | 4.85 | 17 055 |       |          |    |     |          |    |    |
| C04 | 3.648 26  | 4.70 | 92 140   | C25 | 5.46290   | 4.38     | 45 835 | C46   | 3.63168   | 4.26 | 35 154 | C67      | 3.58835   | 4.32 | 25 136   | C88   | 2.93610   | 4.79 | 17 055 |       |          |    |     |          |    |    |
| C05 | 23.4128   | 4.65 | 69 244   | C26 | 1.000 000 | 4.71     | 45 334 | C47   | 3.44330   | 4.80 | 35 216 | C68      | 2.62057   | 4.36 | 25 000   | C89   | 3.09515   | 5.79 | 16 742 |       |          |    |     |          |    |    |
| C06 | 1.000 000 | 4.68 | 68 742   | C27 | 2.41041   | 6.25     | 40 000 | C48   | 3.71349   | 4.81 | 34 128 | C69      | 1.000 000 | 4.97 | 25 045   | C90   | 3.18267   | 4.82 | 15 881 |       |          |    |     |          |    |    |
| C07 | 13.6715   | 4.55 | 62 251   | C28 | 2.67651   | 4.60     | 44 839 | C49   | 4.77106   | 4.69 | 34 373 | C70      | 2.02611   | 4.91 | 24 929   | C91   | 17.06210  | 4.60 | 15 261 |       |          |    |     |          |    |    |
| C08 | 3.40809   | 4.46 | 59 345   | C29 | 2.32075   | 6.33     | 42 912 | C50   | 2.93421   | 4.73 | 34 310 | C71      | 4.56915   | 6.49 | 23 714   | C92   | 2.12201   | 5.14 | 15 656 |       |          |    |     |          |    |    |
| C09 | 2.19660   | 6.33 | 57 693   | C30 | 2.14148   | 4.90     | 40 353 | C51   | 2.29674   | 4.56 | 33 031 | C72      | 3.45468   | 4.51 | 23 748   | C93   | 1.000 000 | 4.79 | 15 237 |       |          |    |     |          |    |    |
| C10 | 1.000 000 | 4.34 | 57 568   | C31 | 2.17291   | 4.73     | 38 960 | C52   | 2.21696   | 5.01 | 33 332 | C73      | 2.68268   | 6.23 | 23 512   | C94   | 1.000 000 | 4.79 | 14 920 |       |          |    |     |          |    |    |
| C11 | 1.000 000 | 4.55 | 56 330   | C32 | 1.000 000 | 4.67     | 38 755 | C53   | 7.60061   | 4.63 | 32 612 | C74      | 3.11856   | 4.87 | 23 445   | C95   | 1.000 000 | 4.79 | 14 526 |       |          |    |     |          |    |    |
| C12 | 1.000 000 | 4.34 | 55 601   | C33 | 2.20171   | 4.89     | 38 315 | C54   | 3.23779   | 4.86 | 32 972 | C75      | 1.000 000 | 6.17 | 23 080   | C96   | 21.31390  | 4.79 | 14 161 |       |          |    |     |          |    |    |
| C13 | 1.000 000 | 4.51 | 52 406   | C34 | 2.54072   | 5.05     | 38 080 | C55   | 6.54124   | 6.39 | 32 853 | C76      | 8.10325   | 6.51 | 23 466   | C97   | 2.66066   | 4.52 | 13 787 |       |          |    |     |          |    |    |
| C14 | 1.000 000 | 4.53 | 52 291   | C35 | 1.000 000 | 4.47     | 37 515 | C56   | 2.99809   | 4.96 | 32 793 | C77      | 2.25738   | 5.90 | 22 591   | C98   | 3.43973   | 4.14 | 13 622 |       |          |    |     |          |    |    |
| C15 | 3.47591   | 5.90 | 52 291   | C36 | 2.09451   | 5.91     | 37 122 | C57   | 4.04259   | 6.21 | 32 498 | C78      | 2.24464   | 5.72 | 22 431   | C990  | 2.24126   | 6.33 | 13 227 |       |          |    |     |          |    |    |
| C16 | 1.000 000 | 4.55 | 52 176   | C37 | 2.31776   | 4.92     | 36 959 | C58   | 2.40468   | 4.82 | 32 557 | C79      | 3.38491   | 5.04 | 22 113   | C100  | 4.87758   | 6.40 | 11 837 |       |          |    |     |          |    |    |
| C17 | 2.46374   | 4.70 | 49 280   | C38 | 1.000 000 | 5.97     | 36 862 | C59   | 2.17156   | 5.16 | 30 949 | C80      | 2.27320   | 4.89 | 21 583   | C101  | 2.46899   | 6.48 | 11 884 |       |          |    |     |          |    |    |
| C18 | 6.55246   | 4.38 | 49 172   | C39 | 5.31914   | 4.67     | 36 093 | C60   | 2.13819   | 4.76 | 30 726 | C81      | 6.91199   | 4.19 | 20 532   | C102  | 1.000 000 | 6.39 | 11 265 |       |          |    |     |          |    |    |
| C19 | 4.20687   | 4.24 | 50 197   | C40 | 5.76991   | 4.86     | 36 156 | C61   | 3.81435   | 4.62 | 30 394 | C82      | 8.58168   | 4.27 | 20 502   |       |           |      |        |       |          |    |     |          |    |    |
| C20 | 3.94999   | 4.44 | 48 635   | C41 | 2.66091   | 4.64     | 36 030 | C62   | 1.000 000 | 4.73 | 28 633 | C83      | 2.87864   | 5.75 | 20 270   |       |           |      |        |       |          |    |     |          |    |    |
| C21 | 6.45074   | 4.48 | 48 556   | C42 | 2.82275   | 5.65     | 35 652 | C63   | 2.23186   | 4.75 | 26 538 | C84      | 1.000 000 | 4.43 | 19 897   |       |           |      |        |       |          |    |     |          |    |    |

表中的比值为该蛋白在刚出房雄蜂与性成熟雄蜂中表达的灰度比。The ratio in the table is the gray ratio of the expressed protein in the newly emerged drones to that in the sexually mature drones.

表 2 意大利蜜蜂性成熟雄蜂上调表达蛋白质

Table 2 Up-expressed proteins in the sexually mature drones of *Apis mellifera ligustica*

| 编号<br>No. | 比值<br>Ratio | 等电点<br>pI | 分子量(Da)<br>MW | 编号<br>No. | 比值<br>Ratio | 等电点<br>pI | 分子量(Da)<br>MW | 编号<br>No. | 比值<br>Ratio | 等电点<br>pI | 分子量(Da)<br>MW |
|-----------|-------------|-----------|---------------|-----------|-------------|-----------|---------------|-----------|-------------|-----------|---------------|
| D01       | 1 000 000   | 5.59      | 64 085        | D20       | 8.74312     | 4.23      | 32 536        | D39       | 2.44603     | 6.46      | 18 756        |
| D02       | 1 000 000   | 6.07      | 57 051        | D21       | 1 000 000   | 4.10      | 34 206        | D40       | 4.23964     | 5.89      | 17 424        |
| D03       | 2.40794     | 5.93      | 52 985        | D22       | 3.70190     | 5.45      | 33 638        | D41       | 5.89136     | 5.94      | 17 234        |
| D04       | 2.34728     | 4.90      | 44 739        | D23       | 3.84508     | 4.28      | 33 112        | D42       | 1 000 000   | 4.88      | 17 276        |
| D05       | 1 000 000   | 4.84      | 44 850        | D24       | 2.07562     | 6.28      | 32 847        | D43       | 1 000 000   | 4.85      | 17 227        |
| D06       | 1 000 000   | 4.98      | 46 671        | D25       | 2.63336     | 6.47      | 31 386        | D44       | 1 000 000   | 4.99      | 17 129        |
| D07       | 1 000 000   | 5.99      | 44 627        | D26       | 1 000 000   | 5.06      | 30 149        | D45       | 1 000 000   | 4.89      | 16 838        |
| D08       | 1 000 000   | 6.36      | 40 400        | D27       | 1 000 000   | 5.38      | 28 200        | D46       | 1 000 000   | 4.66      | 15 237        |
| D09       | 3.03906     | 4.88      | 38 965        | D28       | 2.4267      | 5.50      | 27 772        | D47       | 8.46814     | 5.80      | 15 064        |
| D10       | 2.91332     | 4.98      | 38 521        | D29       | 2.90009     | 5.73      | 27 938        | D48       | 1 000 000   | 6.05      | 14 852        |
| D11       | 2.08525     | 5.50      | 38 288        | D30       | 2.79029     | 4.87      | 27 455        | D49       | 1 000 000   | 4.67      | 14 416        |
| D12       | 2.27183     | 5.43      | 38 363        | D31       | 2.01339     | 4.94      | 24 436        | D50       | 1 000 000   | 6.01      | 13 942        |
| D13       | 1 000 000   | 4.97      | 37 895        | D32       | 1 000 000   | 5.13      | 23 245        | D51       | 2.29554     | 5.01      | 13 267        |
| D14       | 2.99344     | 4.52      | 37 157        | D33       | 2.23636     | 5.12      | 21 893        | D52       | 1 000 000   | 4.98      | 13 119        |
| D15       | 4.86583     | 4.57      | 36 793        | D34       | 2.32432     | 6.08      | 21 126        | D53       | 2.19054     | 4.88      | 12 894        |
| D16       | 1 000 000   | 6.41      | 36 613        | D35       | 1 000 000   | 4.89      | 21 522        | D54       | 1 000 000   | 4.95      | 13 057        |
| D17       | 1 000 000   | 5.37      | 36 703        | D36       | 1 000 000   | 6.41      | 20 827        | D55       | 2.05675     | 4.51      | 10 444        |
| D18       | 2.18416     | 5.48      | 34 944        | D37       | 2.96717     | 4.93      | 20 679        |           |             |           |               |
| D19       | 1 000 000   | 4.18      | 32 795        | D38       | 1 000 000   | 6.17      | 19 840        |           |             |           |               |

表中的比值为该蛋白在性成熟雄蜂与刚出房雄蜂中表达的灰度比。The ratio in the table is the gray ratio of the expressed protein in the sexually mature drones to that in the newly emerged drones.

表 3 意大利蜜蜂雄蜂已鉴定的 18 个蛋白点基本信息

Table 3 Basic information of eighteen identified proteins from *Apis mellifera ligustica* drones

| 蛋白点编号<br>Spot no. | 蛋白名称<br>Protein name  | GenBank 登录号<br>GenBank accession no. | 蛋白质得分<br>Score | 覆盖率(%)<br>Sequence coverage |
|-------------------|---|--------------------------------------|----------------|-----------------------------|
| C06               | 肌钙蛋白 I<br>Troponin I isoform 6b1  | gi178101806                          | 384            | 39                          |
| C19               | 假设蛋白<br>Hypothetical protein LOC408772 isoform 1                                    | gi1328790061                         | 166            | 15                          |
| C22               | 肌钙蛋白 T<br>Troponin T isoform 5  | gi178101801                          | 178            | 23                          |
| C38               | 交换调整因子<br>Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchange regulatory cofactor NHE-RF2-like | gi148129806                          | 191            | 35                          |
| C48               | SEC13 蛋白<br>Protein SEC13 homolog   | gi1110756630                         | 199            | 20                          |
| C65               | 延长因子<br>Elongation factor 1-beta  | gi166565249                          | 194            | 31                          |
| C80               | 假设蛋白<br>Hypothetical protein LOC551742  | gi166524513                          | 575            | 51                          |
| C89               | DJ 蛋白<br>Protein DJ-1-like  | gi1328782818                         | 371            | 46                          |
| C101              | 核糖核酸酶<br>Ribonuclease UK114-like isoform 1  | gi1328793595                         | 72             | 37                          |
| C102              | 假设蛋白<br>Hypothetical protein LOC552685  | gi166514755                          | 148            | 42                          |
| D01               | 副肌球蛋白<br>Paramyosin, long form-like   | gi166510482                          | 253            | 30                          |
| D11               | 精氨酸激酶<br>Arginine kinase  | gi158585146                          | 381            | 35                          |

续表 3 Table 3 continued

| 蛋白点编号<br>Spot no. | 蛋白名称<br>Protein name  | GenBank 登录号<br>GenBank accession no. | 蛋白质得分<br>Score | 覆盖率 (%)<br>Sequence coverage |
|-------------------|---|--------------------------------------|----------------|------------------------------|
| D17               | 转录激活蛋白<br>Transcriptional activator protein Pur-alpha-like                | gi 328775950                         | 129            | 27                           |
| D22               | 丙酮酸脱氢酶<br>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial | gi 335892820                         | 199            | 27                           |
| D27               | 外被体亚基<br>Coatomer subunit epsilon   | gi 328787128                         | 189            | 31                           |
| D43               | 真核细胞转录起始因子<br>Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal  | gi 110756009                         | 142            | 38                           |
| D50               | 肌动蛋白解聚因子<br>Cofilin/actin-depolymerizing factor homolog                   | gi 328789760                         | 314            | 48                           |
| D52               | 表皮结构糖蛋白<br>Endocuticle structural glycoprotein SgAbd-1-like               | gi 328792982                         | 299            | 28                           |

### 3 讨论

本研究旨在分析意大利蜜蜂刚出房雄蜂与性成熟雄蜂表达差异蛋白,以期了解雄蜂性成熟时蛋白质组的特点。通过双向电泳检测发现,刚出房雄蜂表达蛋白数(2 490 个)高于性成熟雄蜂(2 317 个),可能是雄蜂刚出房时,其体质相对微弱,个体需要进一步发育,因而需要更多的不同蛋白表达,参与相应的功能。两个时期雄蜂的差异表达的蛋白点只有 157 个,其中 102 个蛋白点在刚出房雄蜂中上调表达,明显高于在性成熟雄蜂高表达的蛋白数(55 个),而在刚出房雄蜂中特异表达的蛋白点数低于性成熟雄蜂表达的特有蛋白(比值为 1 000 000),其主要原因可能是刚出房雄蜂需要进一步发育,使身体机能发育完全。雄蜂到达性成熟之后,其精巢得到充分发育,并且储存了成熟的精子、精液。另外飞行肌、嗅觉等得到充分发育,故其特有蛋白数相对较多,这有待于深入研究与分析。

对刚出房雄蜂中高表达的几种蛋白进行鉴定发现,肌钙蛋白、交换调整因子、SEC13 蛋白、延长因子 1 和 DJ-1 蛋白等在刚出房雄蜂高表达。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,而肌钙蛋白 I 可以抑制肌纤凝蛋白 ATPase 活性(Perry, 1999; 郭新军, 2010)。本研究结果中,这两种肌钙蛋白在刚出房的雄蜂中高度表达,可能与该阶段蜜蜂飞行肌需要进一步发育有关。另外,交换调整因子是一类支架蛋白,用于协助质膜蛋白连接肌动蛋白细胞骨架,调

控表皮蛋白基因表达,有利于刚出房蜜蜂外骨骼的发育。

SEC13 的功能一方面是与 SEC31 相互作用形成 COPII 复合体的外围复合物,参与内质网到高尔基体的蛋白转运,另一方面是与其他核孔蛋白相互作用,参与核孔复合物的形成从而调节核质转运和基因表达调控(Stagg *et al.*, 2006; 牛旭波, 2013)。延伸因子 1 是一种在细胞内普遍存在且大量表达的多聚体核糖体蛋白质,在基因表达、翻译过程中起着重要作用,包括识别 mRNA 上的密码子和 tRNA 上的密码子,具有催化剂的功能(庞建新等, 2007; 申萍香等, 2008),它能以非常高的亲和力结合肌动蛋白纤维,调节细胞骨架的运动性(周冰等, 2007)。本实验结果中,这两种蛋白均在刚出房雄蜂中高表达,可能是因为刚出房雄蜂在进行后期发育过程中,需要大量 SEC13 和延伸因子参与其相关基因表达、翻译等过程。

DJ-1 具有正调控雄激素受体,雄激素受体与 DJ-1 蛋白在核内的颗粒状分布共定位对雄激素受体的转录功能具有重要意义,而且 DJ-1 蛋白表达于精子的头部(杨鲲, 2010)。本结果中,刚出房雄蜂中的 DJ-1 蛋白显著表达,这可能与精子形成和发育成熟有关。

研究还发现,肌球蛋白、精氨酸激酶、转录激活蛋白和肌动蛋白解聚因子等在性成熟雄蜂中高表达。副肌球蛋白和肌球蛋白是粗肌丝中含量最高的蛋白,它能帮助粗肌丝进行组装,其含量影响着粗肌丝长度、直径以及肌肉收缩。副肌球蛋白编码基因的缺失,会导致肌细胞融合和肌原纤维组装存在缺陷,肌肉没有收缩性(杨璞等, 2005)。性成熟雄蜂

为了追逐蜂王进行婚飞,必须具有敏捷的飞行能力,需要高表达的副肌球蛋白参与飞行肌的组成与调节其肌肉的收缩性。

精氨酸激酶具有通过催化精氨酸与 ATP 之间的可逆性反应,将能量储存于磷酸精氨酸的高能磷酸键中,或分解磷酸精氨酸产生 ATP,而且精氨酸激酶与磷酸精氨酸起着暂时能量缓冲库的作用 (Platzer *et al.*, 1999; 张元臣等, 2011)。性成熟雄蜂在婚飞过程中,需要大量的能量用于飞行。因而在婚飞前,需要储存能量,精氨酸激酶蛋白大量表达可能起着至关重要的作用。

肌动蛋白解聚因子是一类肌动蛋白结合蛋白,通过切断肌动蛋白丝或增加肌动蛋白解聚作用来重塑细胞骨架等,这类蛋白存在于睾丸的支持细胞中,而且是肌动蛋白动力学的一个重要激发者,其 N-末端的 Ser-3 残基的磷酸化可以抑制其与肌动蛋白结合的活性(宇兴江等, 2007)。在性成熟雄蜂中高度表达,可能在维持精子活力或与蜂王交配过程中起着重要的生理作用。

转录因子激活蛋白是一类可以识别 DNA 序列上的特异核苷酸序列顺序并与其结合,进而激活或抑制基因表达的反式调控因子,而且与 DNA 的结合具有特异性 (Hope and Struhl, 1986; 郭春沅和计新, 1995)。本实验结果中,该蛋白在性成熟雄蜂中高度表达,可能与该时期特定表达基因有关,这也有待于进一步研究与证实。

## 参考文献 (References)

- Fang Y, Li JK, 2008. Analysis of developmental proteome at egg stage of drone honeybees (*A. m. ligustica*). *Scientia Agricultura Sinica*, 41 (11): 3793–3800. [房宇, 李建科, 2008. 意大利蜜蜂 (*A. m. ligustica*) 雄蜂卵期发育蛋白质组分析. 中国农业科学, 41 (11): 3793–3800]
- Fang Y, Li JK, 2009. Comparative analysis of proteome between drone eggs of high royal jelly producing bees (*Apis mellifera* L.) and native Italian bees (*Apis mellifera* L.). *Scientia Agricultura Sinica*, 42(7): 2552–2563. [房宇, 李建科, 2009. 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. 中国农业科学, 42 (7): 2552–2563]
- Fang Y, Song F, Zhang L, Aleku DW, Han B, Feng M, Li J, 2012. Differential antennal proteome comparison of adult honeybee drone, worker and queen (*Apis mellifera* L.). *Journal of Proteomics*, 75: 756–773
- Feng M, Song F, Aleku DW, Han B, Fang Y, Li J, 2011. Antennal proteome comparison of sexually mature drone and forager honeybees. *Journal of Proteome Research*, 10: 3246–3260
- Guo CY, Ji X, 1995. Structure and function of transcriptional activator proteins. *Bulletin of Biology*, 30(6): 13–15. [郭春沅, 计新, 1995. 转录激活蛋白的结构与功能. 生物学通报, 30(6): 13–15]
- Guo XJ, 2010. Molecular Cloning and Expression Analysis of TnI and MEF2 in the Ant *Polyrhachis viciva* (Hymenoptera: Formicidae). PhD Dissertation, Shaanxi Normal University, Xi'an. [郭新军, 2010. 拟黑多刺蚁肌细胞增强因子 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. 西安: 陕西师范大学博士学位论文]
- Hope IA, Struhl K, 1986. Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell*, 46(6): 885–894
- Li JK, Feng M, Zheng AJ, 2011. Advanced research on honeybee proteome. *Scientia Agricultura Sinica*, 44(17): 3649–3657. [李建科, 冯毛, 郑爱娟, 2011. 蜜蜂蛋白质组研究进展. 中国农业科学, 44(17): 3649–3657]
- Li RL, Zhang L, Han B, Fang Y, Feng M, Zhou TE, Li JK, 2013. Proteome comparison of honeybee (*Apis mellifera ligustica*) worker venom between collected from venom glands and electrical stimulated. *Scientia Agricultura Sinica*, 46(7): 1448–1462. [李荣丽, 张兰, 韩宾, 房宇, 冯毛, 周天娥, 李建科, 2013. 意大利蜜蜂工蜂毒腺内蜂毒与电取蜂毒蛋白质组比较. 中国农业科学, 46(7): 1448–1462]
- Niu XB, 2013. Functional Study of the Role of *sec13* in Organogenesis During Zebrafish Embryogenesis. PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. [牛旭波, 2013. 斑马鱼 *sec13* 基因在器官发育过程中的功能研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文]
- Pang JX, Huang J, Hu XC, Xu J, Yu XB, Bao HE, Lang SY, 2007. Screening of EF-1 gene, the functional gene of adult *Taenia asiatica* by bioinformatical method. *Journal of Tropical Medicine*, 7(6): 513–515. [庞建新, 黄江, 胡旭初, 徐劲, 余新炳, 包怀恩, 郎书源, 2007. 亚洲带绦虫成虫延伸因子-1 基因的克隆和分析. 热带医学杂志, 7(6): 513–515]
- Perry SV, 1999. Troponin I: inhibitor or facilitator. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 190: 9–32.
- Platzer EG, Wang W, Thompson SN, Borchardt DB, 1999. Arginine kinase and phosphoarginine, a functional phosphagen, in the rhabditoid nematode *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Parasitology*, 85(4): 603–607.
- Shen PX, Wu X, Huang J, Hu XC, Yu XB, Bao HE, Liao XJ, 2008. Prokaryotic expression of elongation factor 1 gene of *Taenia saginata asiatica* and analysis of purification and immunogenicity of the recombinant protein. *Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences)*, 29(4): 379–382. [申萍香, 吴璇, 黄江, 胡旭初, 余新炳, 包怀恩, 廖兴江, 2008. 亚洲牛带绦虫成虫延伸因子-1 基因的表达、纯化及免疫学分析. 西安交通大学学报(医学版), 29(4): 379–382]
- Song FF, 2011. Antennal Proteome Comparison of Drone and Worker between *Apis mellifera ligustica* and *A. cerana cerana*. MSc Thesis, Zhengzhou University, Zhengzhou. [宋飞飞, 2011. 意大利蜜蜂和中华蜜蜂雄蜂与工蜂触角差异蛋白质组分析. 郑州: 郑州大学硕士学位论文]

- Stagg SM, Gürkan C, Fowler DM, LaPointe P, Foss TR, Potter CS, Carragher B, Balch WE, 2006. Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature*, 439: 234 – 238.
- Wolstedji D, Song F, Zhang L, Gala A, Han B, Feng M, Fang Y, Li JK, 2012. Western honeybee drones and workers (*Apis mellifera ligustica*) have different olfactory mechanisms than eastern honeybees (*Apis cerana cerana*). *Journal of Proteome Research*, 11: 4526 – 4540.
- Wu XB, Wang ZL, Li SY, Gan HY, Liu H, Yan WY, Zeng ZJ, 2014. Transcriptomic analysis of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) queens and drones newly emerged and sexually matured. *Acta Entomologica Sinica*, 57(8): 905 – 913. [吴小波, 王子龙, 李淑云, 甘海燕, 刘浩, 颜伟玉, 曾志将, 2014. 羽化和性成熟时中华蜜蜂蜂王和雄蜂转录组分析. *昆虫学报*, 57(8): 905 – 913]
- Yang K, 2010. Advances in research on DJ-1 protein. *Journal of Xinxiang Medical College*, 27(2): 211 – 214. [杨鲲, 2010. DJ-1 蛋白研究进展. *新乡医学院学报*, 27(2): 211 – 214]
- Yang P, Yu HZ, Chen JA, Zhu ZR, 2005. The proteins in flight muscles of insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(6): 726 – 731. [杨璞, 余海忠, 程家安, 祝增荣, 2005. 昆虫飞行肌蛋白质. *昆虫知识*, 42(6): 726 – 731]
- Yu XJ, Liu HJ, Ni H, 2007. The role of actin depolymerizing factor in animal reproduction and embryonic development. *Progress in Physiological Sciences*, 38(4): 347 – 350. [宇兴江, 刘华杰, 倪华, 2007. 肌动蛋白解聚因子在动物生殖和胚胎发育中的作用. *生理科学进展*, 38(4): 347 – 350]
- Zeng ZJ, 2009. Apiculture. China Agriculture Press, Beijing. [曾志将, 2009. 养蜂学. 北京: 中国农业出版社]
- Zhang YC, An SH, Li WZ, Guo XR, Luo MH, Yuan GH, 2011. Cloning and mRNA expression analysis of arginine kinase from *Helicoverpa assulta* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(7): 754 – 761. [张元臣, 安世恒, 李为争, 郭线茹, 罗梅浩, 原国辉, 2011. 烟夜蛾精氨酸激酶基因的克隆及 mRNA 表达分析. *昆虫学报*, 54(7): 754 – 761]
- Zheng HQ, Hu FL, 2009. Honeybee: a newly emerged model organism. *Acta Entomologica Sinica*, 52(2): 210 – 215. [郑火青, 胡福良, 2009. 蜜蜂——新兴的模式生物. *昆虫学报*, 52(2): 210 – 215]
- Zhou B, Cao C, Liu CX, 2007. Advances in research on translation elongation factor 1 alpha. *Letters in Biotechnology*, 18(2): 281 – 284. [周冰, 曹诚, 刘传暄, 2007. 翻译延伸因子 1A 的研究进展. *生物技术通讯*, 18(2): 281 – 284]
- Zhou TE, Fang Y, Feng M, Han B, Zhang L, Li RL, Li JK, 2013. Comparative analysis of proteome and phosphoproteome of drone embryos between *Apis cerana cerana* and *A. mellifera ligustica*. *Scientia Agricultura Sinica*, 46(2): 394 – 408. [周天娥, 房宇, 冯毛, 韩宾, 张兰, 李荣丽, 李建科, 2013. 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. *中国农业科学*, 46(2): 394 – 408]

(责任编辑: 赵利辉)