

小峰熊蜂蜂王蛹期发育蛋白质组分析*

李继莲^{1,2**} 彩万志² 彭文君¹ 吴杰^{1***}

(1. 农业部授粉昆虫生物学重点实验室 中国农业科学院蜜蜂研究所 北京 100093;

2. 中国农业大学昆虫系 北京 100193)

摘要 为了探明小峰熊蜂 *Bombus hypocrita* 蜂王蛹期发育蛋白质表达调控方面的特点,揭示其发育的分子机理。采用双向电泳法对小峰熊蜂蜂王蛹期发育进行蛋白质组研究,结果在小峰熊蜂蜂王蛹期的白眼期(A期)、褐眼期(B期)和黑眼期(C期)分别检测到81、80和75个蛋白点,特有蛋白质分别为8个、7个和2个,共有蛋白质为61个,A期到B期有4个蛋白质显著上调,5个显著下调,B期到C期有7个蛋白质显著上调,1个显著下调,A期到C期有10个蛋白质显著上调,有4个显著下调。此外,3个蛋白质是在A、B期表达C期关闭,6个蛋白质A、C期表达,B期关闭,5个蛋白质A期关闭,而B、C期表达。初步表明小峰熊蜂蜂王从蛹期发育到成蜂过程中,不仅需要一些保守蛋白质来调控,而且还需要一些特异蛋白质。

关键词 小峰熊蜂, 蜂王, 蛹, 蛋白质组, 双向电泳

Proteome analysis of the pupae development of *Bombus hypocrita* queen

LI Ji-Lian^{1,2**} CAI Wan-Zhi² PENG Wen-Jun¹ WU Jie^{1***}

(1. Key Laboratory of Pollinating Insect Biology of the Ministry of Agriculture, Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100093, China;

2. Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract In order to understand the characteristics of protein expression and regulation in pupae of *Bombus hypocrite* queens and the molecular mechanism of their development, we investigated the proteome of pupae in different developmental stages using two-dimensional gel electrophoresis. The results show that 81, 80 and 75 proteins were detected in the white-eyed pupal stage (A), brown-eyed pupal stage (B) and dark-eyed pupal stage (C), respectively. 8, 7 and 2 proteins were specific to the A, B and C stages, respectively. Meanwhile, 61 proteins were present in all three stages, among which 4 were significantly up-expressed and 5 were significantly down-expressed from the A to B stage, 7 were significantly up-expressed and 1 was significantly down-expressed from the B to C stage, and 10 were significantly up-expressed and 4 significantly down-expressed from the B stage to C stage. In addition, 3 proteins were expressed in both A and B stages but not in C stage, 6 proteins were expressed in A stage, silenced in B stage and expressed in C stage, and 5 proteins were silenced in A stage but were expressed in both B and C stage. Our preliminary conclusion is that the development from pupae to adults of queens of *B. hypocrite* not only requires the usual regulatory proteins but also the action of special proteins.

Key words *Bombus hypocrite*, queen, pupae, proteome, two-dimensional gel electrophoresis

熊蜂属 (*Bombus* Latreille) 隶属于膜翅目蜜蜂总科熊蜂族 (Hymenoptera: Apidae, Bombini), 是一类重要的经济授粉昆虫。野生熊蜂经过人工饲

养, 利用其为温室蔬菜和果树授粉, 不仅可以提高产量、降低畸形果率, 而且可以改善果实品质, 避免激素处理造成的化学污染, 因此, 熊蜂授粉技术

* 资助项目: 国际科技合作项目 (2009DFA32600)、国家自然科学基金 (30972149) 和国家蜂产业技术体系建设专项 (CARS-45)。

** E-mail: bumblebeeljl@hotmail.com

*** 通讯作者, E-mail: apis@vip.sina.com

收稿日期: 2010-12-28, 接受日期: 2011-05-31

是设施农业实现优质、安全、高效生产的重要配套技术之一。目前,许多国家进行了熊蜂的人工饲养繁育技术 (Pridal and Hofbauer, 1998; Wu *et al.*, 2005) 与授粉应用研究 (Dogterom *et al.*, 1998; 安建东等, 2006), 已取得了很好的经济效益。

熊蜂由于具有重要的经济价值, 受到国内外研究者们的关注, 其授粉生物学 (Bingham and Orthner, 1998)、生理学和行为学 (Vogt *et al.*, 1994) 等方面的研究报道证实了熊蜂具有比蜜蜂更适合为温室授粉的生物学特性。熊蜂也作为一种模式昆虫被研究, 主要是熊蜂的学习行为和视觉 (Chittka, 1998; Lotto and Chittka, 2005), 寄主和寄生物之间生态关系和协同进化 (Schmid-Hempel, 2001), 免疫学 (Schmid-Hempel, 1998)、性别决定机制 (Zayed and Packer, 2005); 物种多样性 (Fitzpatrick *et al.*, 2007) 等方面。近年来, 熊蜂基因水平的研究报道也越来越多, 如不同熊蜂种的卵黄蛋白原基因序列的克隆与测序、熊蜂 *B. terrestris* BAC 文库的构建 (Wilfert *et al.*, 2009) 和 EST (cDNA) 文库的构建 (Choo *et al.*, 2007) 等相继完成, 但仍缺乏熊蜂蛋白质组方面的研究报道。

随着蛋白质组学逐渐成为后基因组时代的研究热点, 也被广泛应用于昆虫学研究领域, 目前国内外模式昆虫果蝇和蜜蜂的蛋白质组学研究比较多, 涉及到昆虫免疫调节、生理发育、昆虫行为活动等重要的生物学问题 (Biron *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008a; Tian *et al.*, 2009)。熊蜂作为一种重要的授粉经济昆虫和模式昆虫在蛋白质组方面的研究仍缺乏, 因此, 本研究采用双向电泳 (2-DE) 技术, 比较小峰熊蜂蜂王蛹期不同发育阶段蛋白质组成的特征, 初步探明蜂王蛹期发育的蛋白质表达调控方面的特点, 从而为进一步揭示蜂王蛹期发育的分子机理, 为熊蜂分子遗传育种的研究和工厂化熊蜂的繁育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

小峰熊蜂 *B. hypocrita* 蜂王来源于河北地区。首先将蜂王单只放在小型饲养箱 (15 cm × 10 cm × 8 cm) 中饲养, 第一批工蜂出房后, 将小蜂群转移到中型饲养箱 (20 cm × 20 cm × 15 cm)。饲养条件需要在暗室中, 温度 28 ~ 29℃, 相对湿度为

60% ~ 65%, 每天饲喂蜂群白糖水 (1:1, v/v) 和新鲜花粉团, 当蜂群开始出新蜂王时, 按照蛹期的复眼颜色和表皮着色 (表 1) 选取 3 个发育阶段的蜂王蛹 (Dallacqua *et al.*, 2007), 每个时期取样 10 只, 分别放入 1.5 mL Ep 管 (置冰浴中)。

表 1 小峰熊蜂蜂王蛹期发育的外部形态特征

Table 1 The morphological characteristics of pupal development of *Bombus hypocrita* queens

蛹期 Pupal stage	时间 Time (h)	眼的颜色 Eye coloration	身体表皮 Body cuticle
A	190	白色	无色
B	360	褐色	附节黑色; 胸部和腹部无色
C	520	黑色	全身表皮黑色

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白质提取 参照张兰等 (2007) 蛋白质的提取方法, 蜂王的每个蛹期选取 10 只, 取其腹部并称量, 加入液氮研磨, 按照每 1 mg 样品加入 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) 的比例加入磷酸缓冲液, 研磨 5 min, 超声 2 min 后于 4℃, 12 000 g, 离心 10 min; 然后于 4℃, 15 000 g, 再离心 10 min; 将上清液吸入一新的 Ep 管中; 在沉淀中加入上述的磷酸缓冲液 (每 1 mg 熊蜂蛹加入 2 μ L), 于 4℃, 15 000 g, 离心 10 min; 再次吸取上清与上步上清合并。沉淀中按每 1 mg 熊蜂蛹 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) 的比例加入蛋白裂解缓冲液, 冰浴研磨 10 min, 超声 2 min; 于 4℃, 15 000 g, 10 min, 离心 2 次。取上清, 弃沉淀, 将所得上清合并, 并加入 100% 的 TCA 使其终浓度达到 10%, 冰浴静置 10 min。然后在 4℃, 15 000 g, 10 min, 离心 2 次。弃上清, 在沉淀中按每 1 mg 熊蜂蛹加入 5 μ L 上述的蛋白裂解缓冲液, 超声 2 min, 用 2 mol · L⁻¹ 氢氧化钠调溶液 pH 至中性, 蛋白质溶液按照 Bradford (1976) 方法测定测定浓度后, 直接使用或 -70℃ 冷藏备用。

1.2.2 双向电泳 (2-DE) 分析 用蛋白裂解缓

冲液 ($8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫脲, 4% CHAPS, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris 碱, $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, 2% Bio-lyte pH 3~10) 稀释不同浓度的蛋白质溶液后与上样水化液 ($8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, 4% CHAPS, 0.001% 溴酚蓝, $65 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT, 0.2% Bio-lyte, pH 3~10) 按 1:4 的比例充分混合, 取 $140 \mu\text{L}$ 上样。用 7 cm IPG 线性胶条 (pH 3~10) 进行第一向等电聚焦, 结束后, 将 IPG 胶条分别用含 2% 的 DTT 和 2.5% 的碘乙酰胺的平衡缓冲液 ($6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素, $0.375 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 8.8, 20% 甘油, 2% SDS) 平衡各 15 min。然后将胶条转移到 1.0 mm 厚的 12% 聚丙烯酰胺分离胶上, 在酸性端进行第 2 向 SDS-PAGE 电泳。第 2 向电泳结束后, 凝胶在固定液中 (40% 乙醇, 10% 醋酸) 摇床固定 1 h 以上, 然后转入染色液 (CBB R-250 染色母液与甲醇 4:1 混合) 中染色 1 h 以上。

1.3 图像与统计分析

将 4 张染色后的凝胶扫描, 选择重复性好的 3 张用 PDQuest V 7.3.0 (Bio-Rad Hercules, CA, USA) 进行斑点检测和匹配分析后, 计算出每个蛋白质的相对表达量, 并用总密度方法进行标准化处理。表达量的差异性统计检验采用 SPSS 17.0 统计软件分析。

1.4 蛋白质质谱分析

用超纯水将已进行图像分析, 并需进一步做质谱分析用的凝胶在摇床上清洗 5 min/次 $\times 5$ 次。切胶笔切取蛋白质点, 放入 1.5 mL Ep 管中。每管加入 $100 \mu\text{L}$ 胶内酶切脱色液, 室温摇床 30 min, 吸去脱色液, 重复上述步骤 3~4 次, 脱色至胶块无色透明。每管中加入 $100 \mu\text{L}$ ACN, 室温摇床 10 min, 吸去 ACN, 抽真空离心干燥 30 min 左右胶块呈白色颗粒状, 干燥好的胶块送到北京华大蛋白质研发中心有限公司进行质谱分析鉴定。

2 结果与分析

2.1 小峰熊蜂蜂王蛹期蛋白质组图谱和蛹期蛋白质表达分析

蜂王蛹期的蛋白表达图谱显示出小峰熊蜂蜂王蛹期的 A 时期检测到的总蛋白点数为 81 个 (图 1:A), 分子量范围为 $24.43 \sim 243.21 \text{ ku}$, 等电点范围为 $4.98 \sim 8.20$, 蛋白表达量范围为 $2828.5 \sim 78802.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (图 2:A); B 时期的蜂王蛹总的蛋白点数为 80 个 (图 1:B), 分子量范围为 $27.10 \sim 243.21 \text{ ku}$, 等电点范围为 $4.98 \sim 8.08$, 蛋白表达量范围为 $2899.2 \sim 76363.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (图 2:B); 而 C 时期的蜂王蛹总的蛋白点数为 75 个 (图 1:C), 分子量范围为 $25.75 \sim 243.21 \text{ ku}$, 等

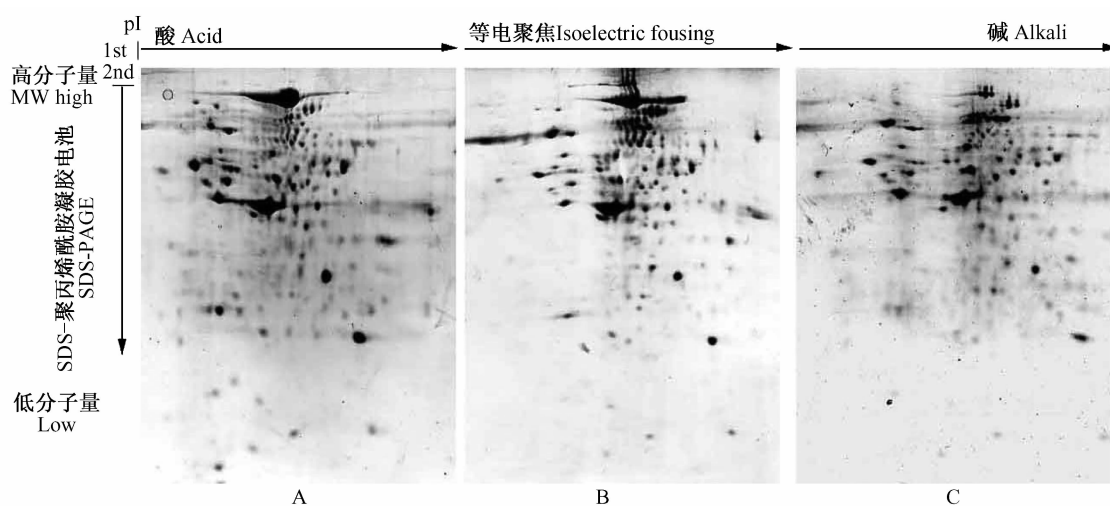


图 1 小峰熊蜂蜂王蛹期发育 2-DE 蛋白质表达图谱

Fig. 1 2-DE profile of the pupae development of *Bombus hypocyrtus* queen

A, B, C 分别表示小峰熊蜂蜂王蛹期的 A 期、B 期、C 期的蛋白图谱, 每个样品上样 $110 \mu\text{g}$, CBB R-250 染色。

A, B, C are the protein profiles corresponding to A, B and C stage, respectively. A $110 \mu\text{g}$ of each sample was subjected to 2-DE and stained by CBB R-250.

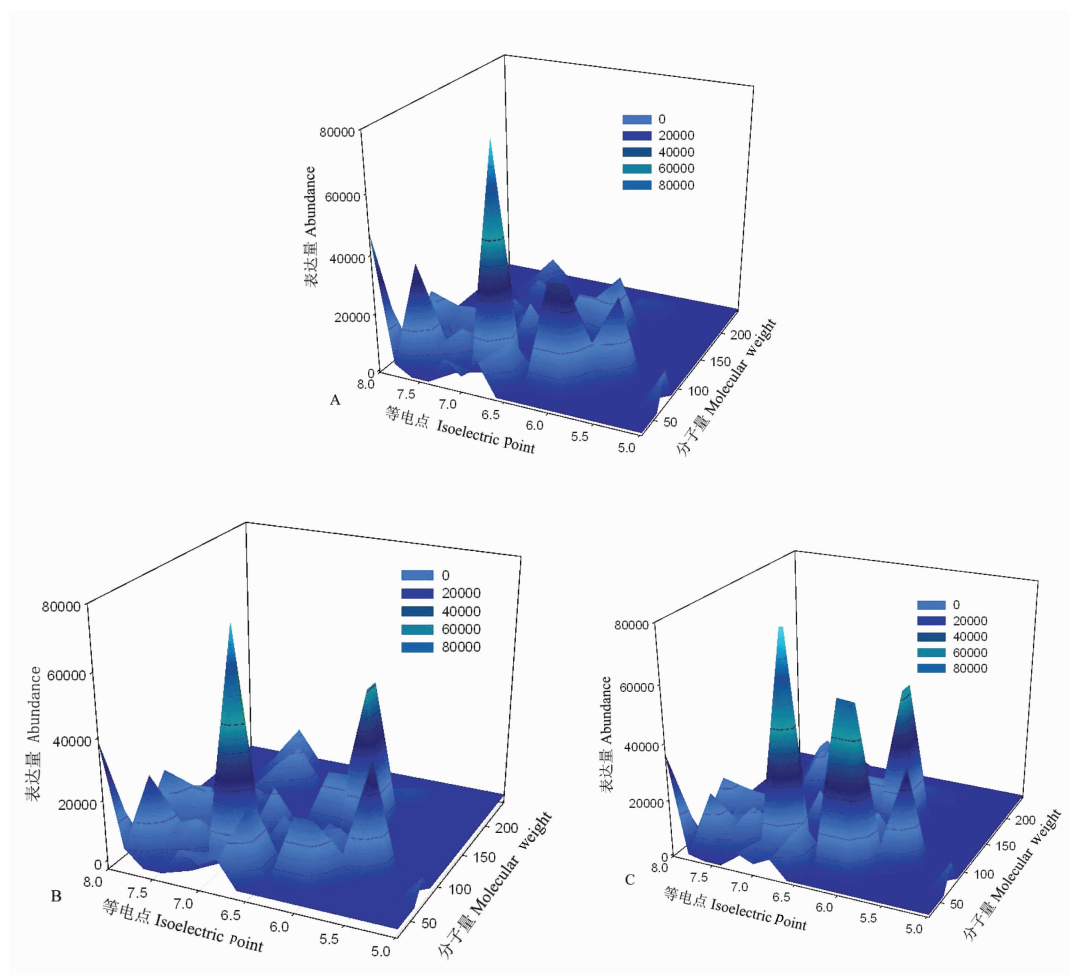


图2 小峰熊蜂蜂王蛹期发育2-DE蛋白质表达三维图谱

Fig. 2 Three dimensional views of protein expression of *Bombus hypocrite* queen pupae

A、B、C 分别代表蜂王 A 时期、B 时期、C 时期共有蛋白质的表达量。

A, B and C show molecular weight, isoelectric point and expressional volume of the proteins of the *Bombus hypocrite* queen pupae on different stages.

电点范围为 4.98 ~ 7.72, 蛋白表达量范围为 1 821.3 ~ 85 834.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (图 2:C)。蛹期的 3 个发育期表达的共有蛋白质数为 61 个(图 2), 分子量和等电点分别处于 27.09 ~ 209.3 ku 和 4.98 ~ 8.00 范围内, 其中表达量有差异的蛋白质数为 19 个, 其中 A 期到 B 期显著上调的有 4 个, 显著下调的蛋白质有 5 个, B 期到 C 期显著上调的有 7 个, 显著下调的有 1 个(图 2)。除了共有蛋白质外, 8 个蛋白质为蜂王蛹期的 A 期所特有, B 时期特有蛋白质数为 7 个, C 时期特有蛋白质数为 2 个。在蜂王蛹期的发育过程中, 有 3 个蛋白质是在 A 期和 B 期表达而在 C 期关闭, 在 A 期和 B 期表达的蛋白质中有一个蛋白质的表达量显著

下调; 有 6 个蛋白质是在 A 期表达, B 期关闭, 在 C 期又表达, 在 A 期和 C 期表达的蛋白质中有 3 个蛋白质的表达量显著上调(图 2), 有 5 个蛋白质是在 A 期关闭, 而在 B 期和 C 期表达。

2.2 小峰熊蜂蛹期发育蛋白质的功能鉴定

将小峰熊蜂蛹期 2-DE 电泳凝胶上切取蛋白点做胶内酶切和质谱分析, 所得数据在数据库中检索、比对、分析, 共鉴定出 22 个蛋白(表 3), 其中有 8 个蛋白在蜂王 3 个蛹期阶段的表达量差异显著(表 2)。这 22 个蛋白包括: 9 个能量代谢相关蛋白质(钙粘蛋白, 丝氨酸/苏氨酸受体蛋白激酶, 腺苷三磷酸酶, 肌球蛋白轻链激酶, CTP 合成酶 1, 多巴胺, N 乙酰转移酶, 核苷三磷酸水解酶, 磷酸

酪氨酸和磷酸肌醇,钙调蛋白),其中有一个蛋白质(钙粘蛋白)是显著下调;3个折叠蛋白质,其中有2个是显著上调的,均属于热激蛋白质类;1个抗氧化蛋白质(2-半光氨酸过氧化还原酶);3个骨架蛋白质(微管蛋白,似肌动蛋白,似微管蛋白),其中有1个蛋白质(似肌动蛋白)是先下调后上调,有一个蛋白质(似微管蛋白)是显著上调;2

个发育蛋白质(染色体分离蛋白,钙调蛋白依赖性磷酸酶),其中有一个蛋白质(钙调蛋白依赖性磷酸酶)在白眼蛹和褐眼蛹时期显著下调,但在黑眼蛹时期关闭;1个转运蛋白;2个转录翻译相关蛋白质,其中有一个蛋白质是先上调后下调;1个未知功能蛋白,先上调后下调(表2)。

表 2 小峰熊蜂蜂王蛹期发育过程中的差异蛋白质表达量

Table 2 The differential protein abundance in the pupal development of *Bombus hypocrite* queen

点编号 Spot number	分子量 Molecular weight(ku)	等电点 Isoelectric point	表达量 Protein abundance (mg · L ⁻¹) Mean ± SD		
			A	B	C
902	208.06	5.72	4 023.27 ± 948.29a	3201.07 ± 295.50ab	1 821.27 ± 1 583.90b
1302	55.33	6.08	36 618.93 ± 5 684.19a	21 091.50 ± 4 945.51b	60 292.23 ± 5 637.09c
1501	88.93	5.95	9 263.30 ± 1 203.98a	10 002.03 ± 1 656.70a	14 515.70 ± 2 630.42b
1601	105.23	6.12	6 092.57 ± 429.36a	7631.53 ± 2 361.30ab	10 598.70 ± 2 031.54b
1801	149.53	5.96	21 383.33 ± 3 636.01a	54 585.23 ± 1 219.48bc	50 693.03 ± 2 800.40c
2304	51.18	6.64	14 077.17 ± 4 257.62a	21 892.93 ± 4 794.52b	15 170.03 ± 1 567.23ab
4001	39.89	7.02	3 879.90 ± 726.32a	6 444.67 ± 1 095.59b	8 030.87 ± 1 636.17b
6407	65.62	7.40	6 144.63 ± 802.42a	3 013.70 ± 1 317.36b	—

注:同列中不同字母表示差异显著($P < 0.05$),置信区间的显著性水平为95%(Duncan, $\alpha = 0.05$)。
Dates in the same columns followed by the different letters indicate significant difference at 0.05 level by Duncan multiple range test, the confidence interval was calculated with a confidence level of 95%.

表 3 小峰熊蜂蜂王蛹期发育过程的鉴定蛋白质分类表

Table 3 The classification of the identified proteins in the pupal development of *Bombus hypocrite* queens

蛋白点 Spot number	等电点 Isoelectric point	分子量 Molecular weight(ku)	已匹配肽段 Matched peptides	得分 Score	蛋白质名称 Protein name	序列登陆号 Accession number
发育蛋白质 Development						
6702	7.27	96 715	10/17	89	染色体分离蛋白 Chromosome segregation protein SMC[<i>Anopheles gambiae</i>]	gi 118784105
6407	6.10	37 593	5/13	60	Ecdysteroid-phosphate phosphatase [<i>Bombyx mori</i>]	gi 112982782
能量代谢相关蛋白质 Metabolism						
902	4.92	349 028	12/19	64	钙粘蛋白 Cadherin-N, isoform H [<i>Drosophila melanogaster</i>]	gi 24584867
1008	8.38	54 601	7/30	78	丝氨酸/苏氨酸受体蛋白激酶 Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 4[<i>Salmo salar</i>]	gi 213515524
1901	5.18	89 467	19/51	107	腺苷三磷酸酶 Transitional endoplasmic reticulum ATPase [<i>Apis mellifera</i>]	gi 66534286
3604	5.88	501 664	18/39	80	肌球蛋白轻链激酶 Stretchin-Mlck, isoform C ([<i>Drosophila melanogaster</i>])	gi 24653968
5806	5.82	66 814	8/21	81	合成酶 1 CTP synthase 1 CTP[<i>Salmo salar</i>]	gi 223647756

续表 3

蛋白点 Spot number	等电点 Isoelectric point	分子量 Molecular weight(ku)	已匹配肽段 Matched peptides	得分 Score	蛋白质名称 Protein name	序列登陆号 Accession number
折叠蛋白质 Protein folding						
6505	5.19	31 355	6/29	75	多巴胺, N 乙酰转移酶 Dopamine N acetyltransferase, isoform B[<i>Drosophila melanogaster</i>]	gi 45552817
7101	6.21	81 618	7/11	82	核苷三磷酸水解酶 P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases[<i>Danio rerio</i>]	gi 189534908
7403	8.15	30 328	7/34	80	磷酸酪氨酸和磷酸肌醇 Dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides [<i>Hydra magnipapillata</i>].	gi 221118556
7901	5.58	994 114	29/41	86	钙调蛋白 Calponin homology domain [<i>Drosophila pseudoobscura</i>]	gi 198458189
1601	5.64	60 546	16/35	169	热激蛋白 60 ku heat shock protein[<i>Apis mellifera</i>]	gi 66547450
1801	5.29	72 878	24/46	240	热激蛋白 3 Heat shock protein cognate 3 [<i>Apis mellifera</i>]	gi 229892214
2801	5.43	71 383	9/23	51	热激蛋白 4 Heat shock protein cognate 4 [<i>Apis mellifera</i>]	gi 229892210
抗氧化蛋白质 Antioxidant system						
9001	6.90	21 918	12/33	151	2 - 半胱氨酸过氧化物还原酶 2 - cysteine peroxidoreductase [<i>Bombus ignitus</i>]	gi 227976948
骨架蛋白质 Protein folding						
505	4.75	50 599	33/96	198	微管蛋白 Similar to β -Tubulin at 56 u CG9277 - PB, isoform B[<i>Apis mellifera</i>]	gi 48095525
1302	5.57	42 121	29/94	249	肌动蛋白相似蛋白 Similar to Actin - 5C isoform 1 [<i>Apis mellifera</i>]	gi 48137684
1501	5.30	50 619	17/36	156	似微管蛋白 Similar to Tubulin alpha - 1 chain [<i>Apis mellifera</i>].	gi 66535209
转运蛋白 Transporter						
6102	5.33	44 365	8/31	78	调节子 NF-kappa-B essential modulator [<i>Drosophila melanogaster</i>]	gi 48428492
转录翻译相关蛋白质 Transcription/translation						
4001	9.48	98 332	8/15	79	GE13099 - RA 转录产物 GE13099 gene product from transcript [<i>Drosophila yakuba</i>]	gi 195472050
4702	5.37	51 745	8/31	77	CG5721 - RA 转录产物 CG5721 gene product from transcript [<i>Drosophila melanogaster</i>]	gi 19922518
未知功能蛋白 Unknown function						
2304	5.43	20 582	5/38	76	未知蛋白 Hypothetical protein IseW - ISCW008560 [<i>Ixodes scapularis</i>]	gi 241567009

3 讨论

目前,熊蜂在国外已经商品化,并进行大规模的工厂化繁育,我国也成功利用熊蜂为温室果菜授粉,并取得了显著效益,在熊蜂的繁育、病虫害

等方面也进行了大量的研究,发现不同种熊蜂的成群时间、工蜂数量和子代蜂王数量以及子代蜂王的交配率和产卵率都有明显差异,而且子代蜂王的交配成功率非常低(Li *et al.* ,2008b),这明显制约了商品化熊蜂的繁育。为此,本文采用双向

电泳(2-DE)方法能够得到较好的2-DE图,并分析、比较熊蜂蜂王蛹期不同发育阶段蛋白质组成的特征,由于采用了7 cm的胶条,所以检测到的蛋白质数只有80个左右,而一般昆虫蛹期检测到的蛋白质数有100~200左右,但已验证了双向电泳法适用于熊蜂蛋白质组的研究,并成功鉴定出22个蛋白质,在鉴定出的22个蛋白质中,8个在蛹期的3个发育阶段的表达量差异显著(表2),其中有与物质、能量代谢相关的蛋白质,热激蛋白家族(heat shock protein family),细胞骨架蛋白,与机体的抗氧化功能相关的蛋白、转运蛋白、转录翻译相关蛋白质及未知功能蛋白。

在蜂王蛹期发育的3个阶段共有蛋白质为61个(图2),这些蛋白可能是蛹期发育所必需的管家蛋白质,其中表达量有差异的蛋白质数为19个(表2),表明这些共有蛋白质通过表达量的变化来协同调节蛹期的发育,除此之外,3个时期特有蛋白质数分别为8、7和2个,而且有3个蛋白质是在A期和B期表达而在C期关闭;有6个蛋白质是在A期表达,B期关闭,在C期又表达,有5个蛋白质是在A期关闭,而在B期和C期表达(表2),这些特异蛋白质在不同时期的表达或关闭可能与蛹期的发育特点有关,因为蛹期主要是把内部器官加以改造和分化,逐渐呈现出成蜂的特征来,表明从蛹期向成蜂期转变过程中,需要一些特异蛋白来调控,那么这些蛋白质究竟与哪些生物学特征有关,还有待进一步研究。

目前国内外关于熊蜂蛋白质组的相关研究报道缺乏,本文仅是对小峰熊蜂蜂王蛹期发育的蛋白质组进行了初步研究。今后将利用质谱技术和生物信息学等分子生物学手段对小峰熊蜂蜂王蛹期蛋白质组将进行更深入研究,阐明熊蜂蛋白质合成、生长、发育调节、免疫和抗性、性别决定等重要生物性状的分子机理,将突破熊蜂繁育的蛋白质合成相关基因克隆和研究的瓶颈,为提高熊蜂的繁育能力等商品化繁育产业技术的研发奠定基础。

致谢:感谢李建科老师在实验过程中的帮助和论文写作方面的建议。感谢冯毛、陈文锋、房宇等的帮助。

参考文献 (References)

- Biron DG, Agnew P, Marche L, Renault L, Sidobre C, Michalakakis Y, 2005. Proteome of *Aedes aegypti* larvae in response to infection by the intracellular parasite *Vavraia culicis*. *Int. J. Parasitol.*, 35:1385—1397.
- Bingham RA, Orthner AR, 1998. Efficient pollination of alpine plants. *Nature*, 391:238—239.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(5):248—254.
- Chittka L, 1998. Sensorimotor learning in bumblebees: Long-term retention and reversal training. *J. Exp. Biol.*, 201:515—524.
- Choo YM, Lee KS, Yoon HJ, Lee SB, Kim JH, Sohn HD, Jin BR, 2007. A serine protease from the midgut of the bumblebee, *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae): cDNA cloning, gene structure, expression and enzyme activity. *Europ. J. Entomol.*, 104:1—7.
- Dallacqua RP, Simes ZLP, Bitondi MMG, 2007. Vitellogenin gene expression in stingless bee workers differing in egg-laying behavior. *Insec. Soc.*, 54:70—76.
- Dogterom MH, Matteoni JA, Plowright RC, 1998. Pollination of greenhouse tomatoes by the North American *Bombus vosnesenskii* (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, 91:71—75.
- Fitzpatrick U, Murray TE, Paxton RJ, Breen J, Cotton D, Santorum V, Brown MJF, 2007. Rarity and decline in bumblebees-A test of causes and correlates in the Irish fauna. *Biol. Conserv.*, 136:185—194.
- Li Jk, Feng M, Zhang ZH, Pan YH, 2008. Identification of the proteome complement of hypopharyngeal glands from two strains of honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 39:199—214.
- Li JL, Wu J, Cai WZ, Peng WJ, An JD, Huang JX, 2008. Comparison of the colony development of two native bumblebee species *Bombus ignites* and *Bombus lucorum* as candidates for commercial pollination in China. *J. Apic. Res. Bee World*, 47(1):22—26.
- Lotto RB, Chittka L, 2005. Seeing the light: Illumination as a contextual cue to color choice behavior in bumblebees. *PNAS*, 102:3852—3856.
- Pridal A, Hofbauer J, 1998. Activation of laboratory-reared bumblebee queens. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis (Brno)*, 46:79—83.
- Schmid-Hempel P, 1998. Parasites in Social Insects. Princeton University Press. 88—99.
- Schmid-Hempel P, 2001. On the evolutionary ecology of host-

- parasite interactions—addressing the questions with bumblebees and their parasites. *Naturwissenschaften*, 88: 147—158.
- Tian FF, Yang L, Lv FL, Zhou P, 2009. Predicting liquid chromatographic retention times of peptides from the *Drosophila melanogaster* proteome by machine learning approaches. *Anal. Chim. Acta*, 644 :10—16.
- Vogt FD, Heinrich B, Dabolt TO, McBath HL, 1994. Ovary development and colony founding in subarctic and temperate-zone bumblebee queens. *Can. J. Zool.*, 72: 1551—1556.
- Wilfert L, Torres MM, Reber-Funk C, Schmid-Hempel R, Tomkins J, Gadau J, Schmid-Hempel P, 2009. Construction and characterization of a BAC-library for a key pollinator, the bumblebee *Bombus terrestris* L. *Insect. Soc.*, 56:44—48.
- Wu J, Peng WJ, An JD, Guo ZB, Tong YM, Li JL, 2005. Techniques for year-round rearing of *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera, Apodidae) in China. *J. Apic. Sci.*, 49 (1):65—69.
- Zayed A, Packer L, 2005. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. *PANS*, 102:10742—10746.
- 安建东,彭文君,吴杰,国占宝,童越敏,李继莲,2006. 明亮熊蜂的生物学特性及其授粉应用. 昆虫知识, 43(1): 94—97.
- 张兰, 李建科, 吴黎明, 2007. 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, 40(6):1276—1287.