

三种化学感受蛋白在意大利蜜蜂成年工蜂中的时空表达水平研究*

王宇飞^{1**} 施腾飞¹ 齐磊² 刘芳² 朱玉洁²
侯超² 余林生^{1,2,3***}

(1. 安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036;
3. 安徽省地方畜禽遗传与育种重点实验室, 合肥 230036)

摘 要 【目的】化学感受蛋白 (Chemosensory proteins, CSPs) 是一类可溶性小分子蛋白质, 广泛存在于昆虫的触角及其他感受器中, 参与昆虫的化学感受行为, 在昆虫化学感受系统中发挥重要的作用, 本文旨在探究 *Amel-CSP1*、*Amel-CSP2* 和 *Amel-CSP6* 在意大利蜜蜂成年工蜂中的时空表达水平及生理功能。

【方法】首先通过荧光定量 PCR 技术检测了 *Amel-CSP1*、*Amel-CSP2* 和 *Amel-CSP6* 在哺育蜂和采集蜂的触角、头部、胸部、腹部和腿的表达水平; 然后又对不同日龄工蜂 (1, 6, 12, 18, 28 日龄) 触角中 *Amel-CSP1*、*Amel-CSP2* 和 *Amel-CSP6* 的表达情况进行检测。【结果】(1) *Amel-CSP1* 在工蜂的触角和头部都有较高的表达水平, 其在工蜂触角中的表达水平显著高于其他部位 ($P < 0.05$); *Amel-CSP2* 在哺育蜂触角中表达水平最高, 显著高于其他部位 ($P < 0.05$), 而其在采集蜂头部的表达水平最高, 显著高于其他部位 ($P < 0.05$); *Amel-CSP6* 在哺育蜂和采集蜂的头部表达量最高, 其在触角、胸部也有较高表达水平。(2) *Amel-CSP1* 在工蜂触角中的表达水平随日龄的增长而增加, 其在 28 日龄的表达水平显著高于其他日龄 ($P < 0.05$); *Amel-CSP2* 在 1 日龄和 12 日龄工蜂触角的表达量最高, 显著高于其他日龄 ($P < 0.05$); *Amel-CSP6* 在 28 日龄工蜂触角中的表达水平最低, 显著低于其他日龄 ($P < 0.05$)。【结论】*Amel-CSP1*、*Amel-CSP2*、*Amel-CSP6* 在意大利蜜蜂成年工蜂中的表达具有明显的时空特异性, 这对进一步探测意大利蜜蜂 CSPs 家族的生理功能提供了研究方向和理论基础, 具有一定的生物学意义。

关键词 意大利蜜蜂, 工蜂, 化学感受蛋白, 时空表达, 荧光定量 PCR

Spatiotemporal expression levels of three chemosensory proteins in adult *Apis mellifera ligustica* workers

WANG Yu-Fei^{1**} SHI Teng-Fei¹ QI Lei² LIU Fang² ZHU Yu-Jie²
HOU Chao² YU Lin-Sheng^{1,2,3***}

(1. College of Plant Protection; Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. College of Animal Science & Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 3. Anhui Provincial Laboratory of Local Livestock and Poultry Genetic Resource Conservation and Breeding, Hefei 230036, China)

Abstract [Objectives] Chemosensory proteins (CSPs) are a kind of soluble small protein that is widespread in the antenna, and other chemical sensory organs, of insects. CSPs participate in the chemical behavior of insects and play a key role in chemoreception. We investigated the spatiotemporal expression levels, and explored the functions, of three CSPs; *Amel-CSP1*, *Amel-CSP2* and *Amel-CSP6*, in adult *Apis mellifera ligustica* workers. [Methods] Expression levels of *Amel-CSP1*, *Amel-CSP2* and *Amel-CSP6* in different parts of nurse and forager bees, and in the antennae of 1, 6, 12, 18 and 28-day-old workers, were quantified using RT-qPCR. [Results] (1) *Amel-CSP1* was expressed to a high degree in the antennae and

*资助项目 Supported projects: 国家蜂产业技术体系建设专项 (CARS-45-KXJ9)

**第一作者 First author, E-mail: 1395250884@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: yulinsheng@ahau.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-06-25, 接受日期 Accepted: 2017-07-18

heads of adult workers, and its expression in antennae was significantly higher than in others body parts ($P < 0.05$). *Amel-CSP2* was expressed more highly in the antennae of nurses ($P < 0.05$), whereas in foragers, expression of this gene was significantly higher in the head than in others organs ($P < 0.05$). *Amel-CSP6* was expressed most highly in the heads of nurses and foragers and also relatively highly in the antennae and thorax. (2) Expression of *Amel-CSP1* increased with age, being significantly more highly expressed in 28-day-old workers (foragers) than in young workers ($P < 0.05$). *Amel-CSP2* was significantly more highly expressed in 1 and 12-day-old workers than in those of other ages ($P < 0.05$). Expression of *Amel-CSP6* was significantly lower in 28-day-old workers than in those of other ages ($P < 0.05$). [Conclusion] The expression levels of *Amel-CSP1*, *Amel-CSP2* and *Amel-CSP6* all showed a high degree of spatiotemporal specificity in adult *Apis mellifera ligustica* workers. These results provide a theoretical basis for further exploration of the physiological functions of *Amel-CSP1*, *Amel-CSP2* and *Amel-CSP6*, in *A. m. ligustica*.

Key words *Apis mellifera ligustica*, worker, chemosensory protein, spatiotemporal expression, RT-qPCR

化学感受机制 (Chemoreception) 在昆虫的行为生理过程中发挥至关重要的作用, 如通过嗅觉来获取食物、配偶乃至天敌所释放的挥发信息物质, 而通过味觉来进一步识别其中的刺激物从而引起取食、趋避和交配等行为 (Sanchez-Gracia *et al.*, 2009)。昆虫的感受器包含两类水溶性蛋白: 化学感受蛋白 (Chemosensory proteins, CSPs) 和气味结合蛋白 (Odorant binding proteins, OBPs) (Pelosi, 1996; Mosbah *et al.*, 2003), 两种蛋白分子形成一个有机整体, 共同在昆虫化学感受系统中发挥作用。其中化学感受蛋白是一类具有四个保守的半胱氨酸位点, 呈弱酸性的小分子蛋白质 (Pelosi *et al.*, 2006), 它广泛分布与昆虫各种化学感受器, 感受传导外界化学因子刺激 (刘金香等, 2005)。

昆虫化学感受蛋白 (CSPs) 首次是在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中被发现, 由于其在果蝇触角中特异性表达而被称为可溶性嗅觉特异蛋白 (Olfactory specific-D, OD-S) (Mckenna *et al.*, 1994)。随着后来深入的研究, 愈来愈多的 CSPs 在许多昆虫中发现 (Sanchez-Gracia *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2014)。CSPs 及其相似基因不仅在主要的嗅觉器官触角中表达 (Zhang *et al.*, 2009), 而且在腿部 (Picimbon *et al.*, 2001)、吻部 (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2014)、翅膀 (Zhou *et al.*, 2008) 及身体其他部分皆有分布 (Gong *et al.*, 2007), 其可能在昆虫体内发挥着复杂多样的功能。在东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 中,

CSP3 对其群居型和散居型生理状态的转变发挥着重要的作用 (Guo *et al.*, 2011)。烟粉虱 *Bemisia tabaci* 和家蚕 *Bombyx mori* 体内的 CSPs 能够作为杀虫剂的清除剂, 在昆虫的抗药性中发挥作用 (Liu *et al.*, 2014; Xuan *et al.*, 2015)。

蜜蜂的化学感受蛋白首先是在意大利蜜蜂触角中被发现的, 命名为 ASP3, ASP3 又包含 3 个亚类——ASP3a, ASP3b, ASP3c, 其中 ASP3a 和 ASP3c 在工蜂和雄蜂的触角中都有发现, 而 ASP3c 只存在于雄蜂触角中 (Danty *et al.*, 1998)。意大利蜜蜂 (简称意蜂) 共有 6 种化学感受蛋白 *Amel-CSP1*-*Amel-CSP6* (Foret *et al.*, 2007)。已有研究表明 *Amel-CSP3* 在幼虫信息素运输中发挥重要作用 (Briand *et al.*, 2007), 而 *Amel-CSP5* 则特异性存在于卵中并参与胚胎的发育 (Maleszka *et al.*, 2007), 在蜂王的卵巢中也有表达 (Foret *et al.*, 2007)。但化学感受蛋白 *Amel-CSP1*-*Amel-CSP6* 的生理功能及作用机制等尚存在许多疑问。本研究主要运用了荧光定量 PCR 技术分别检测了 *Amel-CSP1*、*Amel-CSP2* 及 *Amel-CSP6* 在哺育蜂和采集蜂不同部位的表达水平, 同时又对不同日龄工蜂触角中的 *Amel-CSP1*、*Amel-CSP2* 及 *Amel-CSP6* 的表达水平进行定量分析。此研究为进一步探究 *Amel-CSP1*、*Amel-CSP2* 及 *Amel-CSP6* 的功能和作用机制提供了基础。

1 材料与方法

1.1 蜜蜂

实验所用意大利蜜蜂取自安徽农业大学蜂

业研究所实验蜂场。选取 3 个群势较强的蜂群, 在蜂箱巢门口采集后足携带花粉团的蜜蜂为采集蜂。将所选取蜂群的小幼虫移至产浆框, 并将产浆框放入各自的蜂群中, 2 d 后采集正在吐王浆的蜜蜂。再从这 3 个蜂群中选取即将出房的蜂盖子脾, 放入恒温恒湿培养箱中, 次日标记已出房的蜜蜂, 作为 1 日龄哺育蜂, 并将其放入对应的蜂群中, 此后再分别采集 6 日龄和 12 日龄哺育蜂、18 日龄试飞蜂和 28 日龄采集蜂。将所采集的蜜蜂样品都放入液氮中保存。

1.2 试剂

RNAiso plus、PrimeScript®RT reagent Kit (Perfect Real Time)、SYBR® Premix ExTaq™ (TilRNaseH plus) 均购于 TaKaRa 宝生物公司。

1.3 RNA 的提取及 cDNA 的合成

分别将 50 只蜜蜂触角、10 只蜜蜂头部、10 只蜜蜂腿部、5 只蜜蜂胸部和 5 只蜜蜂腹部放入液氮中研磨至粉末状, 在按照 RNAiso Plus 的方法分别提取各部位及各日龄触角 RNA。提取的总 RNA 用 NanoDrop2000 分光光度计测定, A260/A280: 1.8-2.2, 符合标准, 并记录其总 RNA 的浓度。

对总 RNA 进行稀释, 使最终的浓度为 300 ng/μL。反转录体系为 10 μL 体系: 5×Prime Script®Buffer (for Real Time) 2 μL; Prime Script®RT Enzyme Mix 1 0.5 μL; Oligo dT Primer (50 μmol/L) 0.5 μL; Random 6 mers (100 μmol/L 0.5 μL); Total RNA 1 μL; RNase FreedH₂O 5.5 μL。反转录反应条件: 37 °C 15 min (反转录反应), 85 °C 5 s (反转录酶的失活反应)。

1.4 引物设计

本次实验所选基因的正向和反向引物序列引自 Forêt 等 (2007), 引物由上海生工生物有限公司合成, 引物序列见表 1。

1.5 PCR

50 μL PCR 反应体系: Premix Taq (TaKaRa

Taq™ Version 2.0 plus dye) 25 μL, cDNA 1 μL, 上游引物 1 μL, 下游引物 1 μL, DEPC 水 22 μL。反应条件: 98 °C 10 s, 68 °C 40 s, 30 个循环。对得到的 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 并拍照记录。

表 1 本研究所用基因正向和反向引物序列
Table 1 Forward and reverse primer sequences of genes used in this study

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'-3')
<i>Amel-CSP1</i>	F: AACGTGGACATATGCTGAGGA R: TGAATCTTATGCGCCTTCGTC
<i>Amel-CPS2</i>	F: TTCGGCAATCAAGGCGTTG R: CTTCGGATAGGTCCGTTGAA
<i>Amel-CSP6</i>	F: TGCAGAATGGTCGTATCCTCA R: TGCAGAAAGCCGTTCCCAATC
<i>β-actin</i>	F: TGCCAACACTGTCCTTTCTG R: AGAATTGACCCACCAATCCA

1.6 实时荧光定量 PCR

以 *β-actin* 为管家基因检测目的基因相对表达量, 20 μL 反应体系: SYBR®Primix Ex Taq™ 10 μL; PCR Forward Primer (10 μmol/L) 0.4 μL; PCR Reverse Primer (10 μmol/L) 0.4 μL; ROX Referece Dye 0.4 μL; DNA 模板 2.0 μL; dH₂O (灭菌蒸馏水) 6.8 μL; 共计 20.0 μL。上述步骤均在冰上操作。每个样品设置 3 个重复, 相对应的基因设置阴性参照。反应条件为: 预变性反应: 95 °C 30 s; PCR 反应: 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环 溶解曲线 95 °C 15 s, 60 °C 1 min。

1.7 荧光定量 PCR 中基因的扩增效率

将哺育蜂触角的 cDNA 连续进行 4 次 10 倍稀释, 得到 5 个 cDNA 样本, 把原始 cDNA 量定义为 10⁴。以这 5 个 cDNA 样本为模板, 运用目的基因和管家基因的正向和反向引物进行荧光定量 PCR。并根据公式 $E=10^{(1/\text{slope})} - 1$ (Bustin *et al.*, 2009) 分别进行计算 *β-actin* 与目的基因的扩增效率。

1.8 数据分析

运用 SPSS Statistics 单因素方差分析

(ANOVA) 对各组数据的表达差异进行分析, 并运用 Duncan's 多重检验法进行显著性差异检验。基因表达线性图由 GraphPad Prism5 制作, β -actin 与目的基因标准曲线图由 WPS 表格制作。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取以及 PCR 扩增特异性

以意大利蜜蜂哺育蜂和采集蜂不同部位及不同日龄蜜蜂触角的 cDNA 为模板, 利用化学感受蛋白基因 *Amel-CSP1*、*Amel-CSP2* 和 *Amel-CSP6* 正向和反向引物, 进行 PCR 反应, 所得产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。所显示每个泳道只有一条条带, 无非特异性条带 (图 1, 图 2, 图 3), 说明不同日龄蜜蜂触角的总 RNA 提取和 PCR 扩增体系反应良好。目的基因与管家基因 β -actin 的溶解曲线均只有一个特异性单峰且溶解温度单一, 扩增曲线良好。这说明引物特异性强, 结果真实可靠。

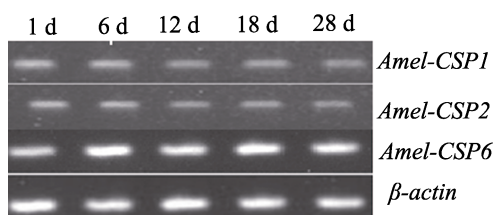


图 1 不同日龄工蜂触角中的 *Amel-CSP1*, *Amel-CSP2*, *Amel-CSP6* 和 β -actin 的 RT-PCR 结果
Fig. 1 RT-PCR of *Amel-CSP1*, *Amel-CSP2*, *Amel-CSP6* and β -actin in workers at different day old

1 d: 1 日龄; 6 d: 6 日龄; 12 d: 12 日龄;
18 d: 18 日龄; 28 d: 28 日龄。
1 d: 1 day-old; 6 d: 6 day-old; 12 d: day-old;
18 d: 18 day-old; 28 d: 28 day-old.

2.2 荧光定量 PCR 中基因扩增效率

将采集蜂触角的 cDNA 进行 4 次稀释, 得到 5 个 cDNA 样本, 一次为模板, 用 *Amel-CSP1*、*Amel-CSP2*、*Amel-CSP6* 和 β -actin 的引物进行实时荧光定量 PCR, 绘制 Ct 值与不同浓度对数 (lg) 之间的标准曲线。结果显示目的基因 *Amel-CSP1*、*Amel-CSP2*、*Amel-CSP6* 和管家基因 β -actin 的标

准曲线斜率分别是 -3.4, -3.223, -3.317 和 -3.428, 线性相关系数 R^2 分别为 0.9895, 0.9886, 0.9874 和 0.9902 (图 4)。通过公式可知目的基因和管家基因的扩增效率分别为 0.968, 1.042, 1.002 和 0.954, 符合比较 Ct 法的标准。

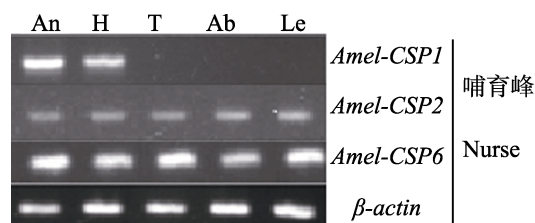


图 2 哺育蜂不同部位 *Amel-CSP1*, *Amel-CSP2*, *Amel-CSP6* 和 β -actin 的 RT-PCR 结果
Fig. 2 RT-PCR of *Amel-CSP1*, *Amel-CSP2*, *Amel-CSP6* and β -actin in different parts of nurse

An: 触角; H: 头部; T: 胸部; Ab: 腹部;
Le: 腿部。图 3 同。
An: Antenna; H: Head; T: Thorax; Ab: Abdomen;
Le: Leg. The same as Fig. 3.

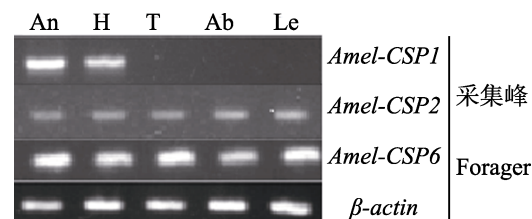


图 3 采集蜂不同部位 *Amel-CSP1*, *Amel-CSP2*, *Amel-CSP6* 和 β -actin 的 RT-PCR 结果
Fig. 3 RT-PCR of *Amel-CSP1*, *Amel-CSP2*, *Amel-CSP6* and β -actin in different parts of forager

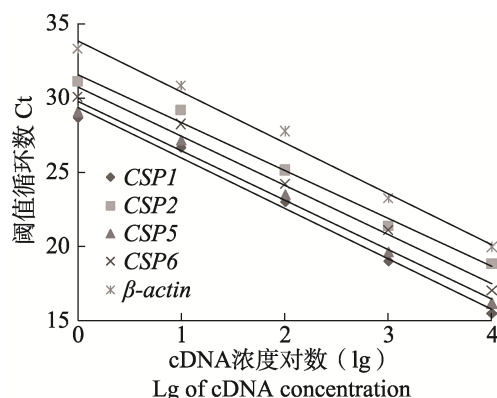


图 4 *Amel-CSP1*, *Amel-CSP2*, *Amel-CSP6* 和 β -actin 的标准曲线
Fig. 4 Standard curves of *Amel-CSP1*, *Amel-CSP2*, *Amel-CSP6* and β -actin

2.3 3 种化学感受蛋白在意大利蜜蜂工蜂中的空间表达水平

本次研究选取 β -actin 作为管家基因, 分别以哺育蜂和采集蜂的触角作为对照样本, 采用实时荧光定量 PCR 法分别检测了化学感受蛋白基因 *Amel-CSP1*、*Amel-CSP2* 及 *Amel-CSP6* 在工蜂(哺育蜂和采集蜂)不同部位的表达水平。

Amel-CSP1 在工蜂的触角和头部有较高的表达水平, 而在胸部, 腹部, 腿部的表达水平较低(图 2, 图 3)。*Amel-CSP1* 在工蜂触角中的表达显著高于其他部位 ($P < 0.05$), 其次高表达于头部, 在胸部, 腹部和腿部中表达量很低, 甚至不表达(图 5, 图 6)。*Amel-CSP2* 在哺育蜂和采集蜂的触角和头部中有所表达(图 2, 图 3)。*Amel-CSP2* 在工蜂哺育蜂中触角表达含量最高, 显著高于腿部 ($P < 0.05$), 腿部的表达量又显著高于其他部位(头部, 胸部和腹部) ($P < 0.05$)

(图 5)。*Amel-CSP2* 在采集蜂中头部的表达量最高, 显著高于触角, 腹部和腿部 ($P < 0.05$) (图 6)。*Amel-CSP6* 在工蜂各部位均有较高的表达水平(图 2, 图 3)。*Amel-CSP6* 在哺育蜂的头部表达量最高, 在腹部的表达量显著低于触角和头部 ($P < 0.05$) (图 5)。*Amel-CSP6* 在采集蜂中也是头部的表达水平最高, 其显著高于其他部位 ($P < 0.05$), 其他部位表达差异不显著 ($P > 0.05$) (图 6)。

2.4 3 种化学感受蛋白在意大利蜜蜂工蜂中的时间表达水平

本次研究选取 β -actin 作为管家基因, 分别以 1 日龄工蜂的触角作为对照样本, 采用实时荧光定量 PCR 法分别检测了 *Amel-CSP1*、*Amel-CSP2* 和 *Amel-CSP6* 在不同日龄工蜂中的相对表达水平。

Amel-CSP1 在工蜂触角中的表达水平随工蜂日龄的增加而逐渐升高, 其在 28 日龄(采集蜂)中的表达水平最高, 显著高于其在其他日龄工蜂触角中的表达水平 ($P < 0.05$) (图 7)。*Amel-CSP2* 在 1 日龄和 12 日龄均具有较高的表达水平, 在 1 日龄工蜂中的表达水平显著高于除

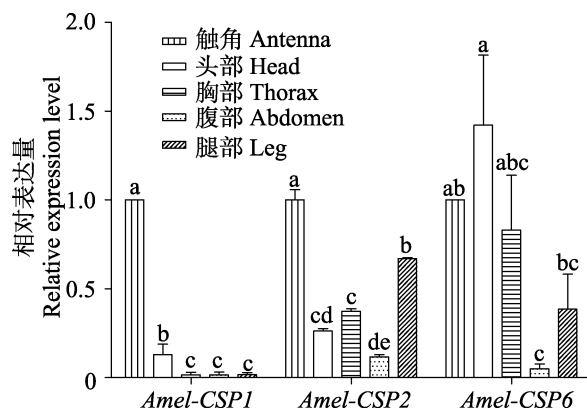


图 5 3 种化学感受蛋白在哺育蜂中的空间表达水平
Fig. 5 Spatial expression levels of three CSPs in nurse

图中数据为平均值±标准误; 柱上标有不同的字母表示差异显著 ($P < 0.05$) (Duncan's 新复极差检验)。图 6 同。
Data are mean $\pm$ SE. Histograms with different lowercase letters indicate significant difference at the 0.05 level by Duncan's multiple range test. The same as Fig. 6.

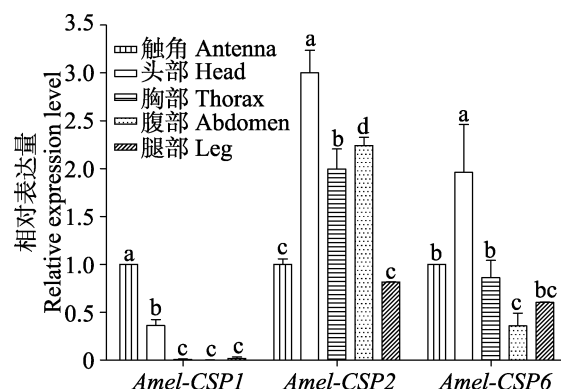


图 6 3 种化学感受蛋白在采集蜂中的空间表达水平
Fig. 6 Spatial expression levels of three CSPs in forager

12 日龄外其他日龄工蜂 ($P < 0.05$), 在 28 日龄工蜂触角中的表达水平最低(图 8)。*Amel-CSP6* 在 28 日龄采集蜂触角中的表达水平最低, 显著低于其在其他日龄工蜂触角中的表达水平 ($P < 0.05$), 在 1 日龄到 18 日龄工蜂触角中的表达水平相对稳定 ($P > 0.05$) (图 9)。

3 讨论

昆虫中化学感受蛋白不仅仅只在触角等感受器官, 同时在一些非感受器官中也有表达, 一些功能性实验也证明了这类蛋白不仅仅有化学感受功能, 也在昆虫发育过程中发挥着其他生理功能。化学感受蛋白的种类具有多样性, 其功能

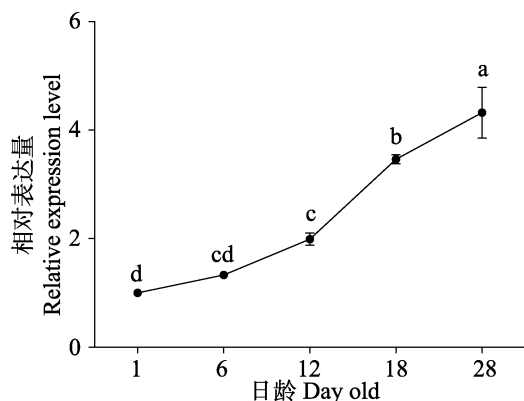


图 7 *Amel-CSP1* 在不同日龄工蜂触角中的表达水平
Fig. 7 Expression levels of *Amel-CSP1* in antenna of worker at different day old

图中数据为平均值±标准误；标有不同的字母表示差异显著 ($P < 0.05$) (Duncan's 新复极差检验)。下图同。

Data are mean±SE. Data with different lowercase letters indicate significant difference at the 0.05 level by Duncan's multiple range test. The same below.

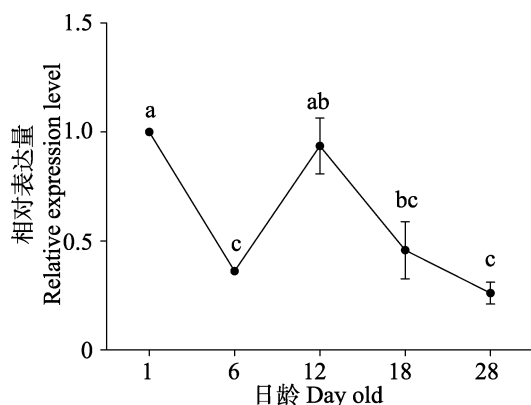


图 8 *Amel-CSP2* 在不同日龄工蜂触角中的表达水平
Fig. 8 Expression levels of *Amel-CSP2* in antenna of worker at different day old

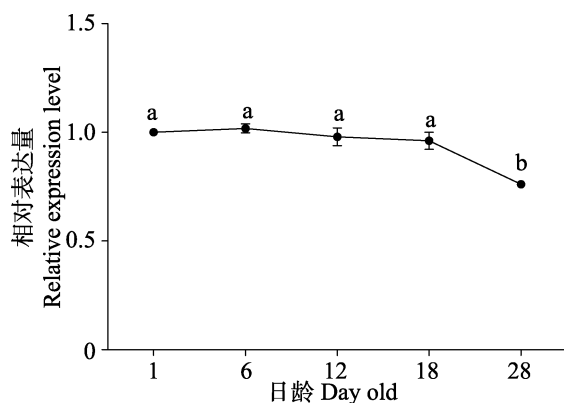


图 9 *Amel-CSP6* 在不同日龄工蜂触角中的表达水平
Fig. 9 Expression levels of *Amel-CSP6* in antenna of worker at different day old

也具有多样性, 急需深入的研究和探讨。本研究运用了荧光定量 PCR 技术首先检测了 3 种化学感受蛋白基因 (*Amel-CSP1*、*Amel-CSP2* 和 *Amel-CSP6*) 在哺育蜂和采集蜂的触角、头部、胸部、腹部和腿的表达水平进行检测, 以确定 3 种化学感受蛋白基因在意大利蜜蜂中的空间分布情况。结果显示, 3 个基因都在触角中有着较高的表达水平。触角是意大利蜜蜂重要的感觉器官, 蜜蜂能够通过触角鞭毛上的感觉结构行使嗅觉、味觉功能并能感受机械刺激 (Esslen and Kaissling, 1976)。这提示 3 个化学感受蛋白基因都有可能参与意蜂工蜂的嗅觉、味觉及其他一些化学感受功能。工蜂头部化学感受蛋白基因 *Amel-CSP1*、*Amel-CSP2* 和 *Amel-CSP6* 的表达量较高, 而其中 *Amel-CSP1* 和 *Amel-CSP2* 在哺育蜂头部中的表达量相对于触角中的表达量都比采集蜂的高, 只有 *Amel-CSP6* 的采集蜂头部的表达量相对于触角的表达量比哺育蜂高。这可能是因为 *Amel-CSP6* 促进了工蜂的头部某些导致采集行为的基因的表达, 从而影响工蜂的劳动行为从哺育行为向采集行为转变。已有研究表明, 化学感受蛋白增溶角质层的碳氢化合物, 从而使其能识别同伴 (Ozaki *et al.*, 2005)。我们的数据也表明 *Amel-CSP6* 在胸、腹部和腿也有较高的表达量, 而其他 3 种化学感受蛋白基因在胸、腹部和腿的表达量都较少。*Amel-CSP6* 在蜜蜂工蜂胸、腹部和腿的表达量高, 可以推测 *Amel-CSP6* 可能参与角质层疏水碳氢化合物的运输, 从而使工蜂能识别蜂群中的同伴。

其次本研究还通过荧光定量 PCR 技术检测了 3 种化学感受蛋白基因 *Amel-CSP1*、*Amel-CSP2* 和 *Amel-CSP6* 在不同日龄工蜂 (1, 6, 12, 18, 28 日龄) 触角中的表达情况, 结果表明 *Amel-CSP1*、*Amel-CSP2* 和 *Amel-CSP6* 均具有明显的时间特异性。其中 *Amel-CSP1* 在 28 日龄 (采集蜂) 中的表达水平最高, 显著高于其在其他日龄工蜂触角中的表达水平 ($P < 0.05$), *Amel-CSP1* 在工蜂触角中的表达水平随工蜂日龄的增长而提高, 在刚出房 (1 日龄) 的工蜂触角中含量最低; *Amel-CSP6* 在 28 日龄采集蜂触

角中的表达水平最低,显著低于其在其他日龄工蜂触角中的表达水平 ($P < 0.05$),在 1 日龄到 18 日龄工蜂触角中的表达水平相对稳定 ($P > 0.05$)。与其他社会性昆虫一样,蜜蜂有着年龄相关的劳动分工,其中最明显的就是哺育和采集行为。工蜂在 18 日龄左右会出巢试飞,从哺育行为转变为采集行为,这两个基因的显著变化,可能是导致意大利蜜蜂工蜂劳动分工行为转变的因素之一。而 *Amel-CSP2* 在刚出房 (1 日龄) 和 12 日龄的工蜂触角中表达量最高,在 28 日龄工蜂触角中的表达水平最低;这说明 *Amel-CSP2* 在工蜂羽化过程中可能发挥一定的作用。此外,已有研究表明 CSP2 在有些昆虫上具有识别化学信息素的功能 (Gu *et al.*, 2012),而 12 日龄正是工蜂分泌王浆的强盛时期,这表明 *Amel-CSP2* 可能在工蜂接收和感受小幼虫和蜂王信息素过程中发挥着重要的作用。本研究不仅能够更好地了解 and 预测 *Amel-CSP1-Amel-CSP6* 的功能,为进一步探 *Amel-CSP1-Amel-CSP6* 的功能提供了一定的方向和理论基础,具有一定的生物学意义,接下来可以就所得到的结果,人工培育蜜蜂工蜂幼虫,并饲喂抑制剂与类似物,进行行为学检验,以确定化学感受蛋白在工蜂中的具体作用。也可以横向研究化学感受蛋白在雄蜂和蜂王中的表达模式,并进行行为学检验,以明确化学感受蛋白在意大利蜜蜂中的作用。

参考文献 (References)

- Briand L, Swasdipan N, Nespoulous C, Bézirard V, Blon F, Huet JC, Ebert P, Penollet JC, 2002. Characterization of a chemosensory protein (ASP3c) from honeybee (*Apis mellifera* L.) as a brood pheromone carrier. *European Journal of Biochemistry*, 269(18): 4586–4596.
- Danty E, Arnold G, Huet JC, Huet D, Masson C, Pernollet JC, 1998. Separation characmon and sexual heterogeneity of multiple putative odorant-binding proteins in the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidea). *Chemical Senses*, 23(1): 83–91.
- Esslen J, Kaissling KE, 1976. Number and distribution of sensilla on antennal flagellum of honeybee (*Apis mellifera* L.). *Zoomorphologie*, 83(3): 227–251.
- Forêt S, Wanner KW, Maleszka R, 2007. Chemosensory proteins in the honey bee: insights from the annotated genome, comparative analyses and expressional profiling. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(1): 19–28.
- Gong DP, Zhang HJ, Zhao P, Lin Y, Xia QY, Xiang ZH, 2007. Identification and expression pattern of the chemosensory protein gene family in the silkworm, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(3): 266–277.
- Gu SH, Wang SY, Zhang XY, Ji P, Liu JT, Wang GR, Wu KM, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2012. Functional characterizations of chemosensory proteins of the alfalfa plant bug *Adelphocoris lineolatus* indicate their involvement in host recognition. *PLoS ONE*, 7(8): e42871.
- Guo W, Wang X, Ma Z, Xue L, Han J, Yu D, Kang L, 2011. CSP and takeout genes modulate the switchover between attraction and repulsion during behavioral phase change in the migratory locust. *PLoS Genetics*, 7(2): e1001291.
- Liu GX, Xuan N, Chu D, Xie HY, Fan ZX, Bi YP, Picimbon JF, Qin YC, Zhong ST, Li YF, Gao ZL, Pan WL, Wang GY, Rajashekar B, 2014. Biotype expression and insecticide response of *Bemisia tabaci* chemosensory protein-1. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 85(3): 137–151.
- Liu JX, Zhong GH, Xie JJ, Guan S, Hu MY, 2005. Recent advances in chemosensory proteins of insects. *Acta Entomologica Sinica*, 48(3): 418–426. [刘金香, 钟国华, 谢建军, 官珊, 胡美英, 2005. 昆虫化学感受蛋白研究进展. 昆虫学报, 48(3): 418–426.]
- Liu YL, Guo H, Huang LQ, Pelosi P, Wang CZ, 2014. Unique function of a chemosensory protein in the proboscis of two *Helicoverpa* species. *Journal of Experimental Biology*, 217(10): 1821–1826.
- Mosbah A, Campanacci V, Lartigue A, Tegoni M, Camnillau C, Darbon H, 2003. Solution structure of a chemosensory protein from the moth *Mamestra brassicae*. *Biochemical Journal*, 369(1): 39–44.
- Maleszka J, Forêt S, Saint R, Maleszka R, 2007. RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*). *Development Genes and Evolution*, 217(3): 189–196.
- McKenna MP, Hekmat-Scafe DS, Gaines P, Carlson JR, 1994. Putative *Drosophila* pheromone-binding proteins expressed in a subregion of the olfactory system. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(23): 16340–16347.
- Nagnan-Le Meillour P, Cain AH, Jacquin-Joly E, Francois MC,

- Ramachandran S, Maida R, Steinbrecht RA, 2000. Chemosensory proteins from the proboscis of *Mamestra brassicae*. *Chemical Senses*, 25(5): 541–553.
- Ozaki M, Wada-Katsumata A, Fujikawa K, Lwasaki M, Yokohari F, Satoji Y, Nisimura T, Yamaoka R, 2005. Ant nestmate and nonnestmate discrimination by a chemosensory sensillum. *Science*, 309(5732): 311–314.
- Picimbon JF, Dietrich K, Krieger J, Breer H, 2001. Identity and expression pattern of chemosensory proteins in *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(12): 1173–1181.
- Sanchez-Gracia A, Vieira FG, Rozas J, 2009. Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. *Heredity*, 103(3): 208–216.
- Pelosi P, 1996. Perireceptor events in olfaction. *Journal of Neurobiology*, 30(1): 3–19.
- Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvillo M, 2006 Soluble proteins in insect chemical communication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(14): 1658–1676.
- Xuan N, Guo X, Xie HY, Lou QN, Lu XB, Liu GX, Picimbon JF, 2015. Increased expression of CSP and CYP genes in adult silkworm females exposed to avermectins. *Insect Science*, 22(2): 203–219.
- Xu YL, He P, Zhang L, Fang SQ, Dong SL, Zhang YJ, 2009. Large-scale identification of odorant-binding proteins and chemosensory proteins from expressed sequence tags in insects. *BMC Genomic*, 10(1): 632.
- Yi X, Wang P, Wang Z, Cai J, Hu, M, Zhong G, 2014. Involvement of a specific chemosensory protein from *Bactrocera dorsalis* in perceiving host plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 40(3): 267–275 .
- Zhou SH, Zhang J, Zhang SG, Zhang L, 2008. Expression of chemosensory proteins in hairs on wings of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae), *Journal of Applied Entomology*, 132(6): 439–450.
- Zhang S, Zhang YJ, Su HH, Gao X, Guo YY, 2009. Identification and expression pattern of putative odorant-binding proteins and chemosensory proteins in antennae of the *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). *Chemical Senses*, 34(6): 504–512.