

中华蜜蜂气味受体基因 *AcerOR58* 的 序列与时空表达分析*

彭 竹** 黄 丽 王 雷 赵慧婷***

(山西农业大学生命科学院, 太谷 030801)

摘 要 【目的】通过分析中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 气味受体基因 *AcerOR58* 编码蛋白的理化性质、结构特征, 明确 *AcerOR58* 时空表达特性, 为该基因后续的功能研究奠定基础。【方法】利用多种生物信息学软件预测分析 *AcerOR58* 序列及其编码蛋白的结构特性, 采用邻接法构建系统进化树。利用实时荧光定量 PCR 技术分析 *AcerOR58* 在不同发育阶段工蜂触角及采集蜂不同组织的表达差异。【结果】*AcerOR58* 基因的开放阅读框 (ORF) 长 1 230 bp, 编码 409 个氨基酸, 成熟蛋白分子量为 47.147 ku, 理论等电点 8.46, 无信号肽, 含有 6 个跨膜结构且 N 端位于胞内, 31 个潜在的磷酸化位点, 在第 80-405 位氨基酸之间存在一个昆虫气味受体家族 7tm.6 superfamily 保守结构域。*AcerOR58* 与西方蜜蜂 *Apis mellifera* 的 *AmelOR58* 亲缘关系最近, 核苷酸序列一致性高达 96.67%, 氨基酸序列一致性高达 97.31%。*AcerOR58* 在采集蜂 (15-25 日龄) 阶段的表达量较高, 且在触角中的表达量极显著高于其他组织 ($P < 0.01$)。【结论】*AcerOR58* 具有昆虫气味受体的结构特征, 该基因特异性高表达于中华蜜蜂采集蜂触角中, 推测其功能与识别外界蜜粉源的花香气味物质有关。

关键词 中华蜜蜂; 气味受体; *AcerOR58*; 生物信息学分析; 时空表达

Sequencing and temporo-spatial expression of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*, odorant receptor gene *AcerOR58*

PENG Zhu** HUANG Li WANG Lei ZHAO Hui-Ting***

(College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract 【Objectives】To analyze the physicochemical properties and structural characteristics of the protein encoded by the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*, odorant receptor gene *AcerOR58*, clarify its temporal and spatial expression characteristics and thereby lay a foundation for functional research on this gene. 【Methods】Bioinformatics software was used to predict and analyze the structural characteristics of the *AcerOR58* nucleotide and encoded protein sequence. A Neighbor-Joining phylogenetic tree was constructed and real-time quantitative PCR used to analyze the expression profiles of *AcerOR58* in different tissues of foraging bees and in the antennae of workers of different developmental stages. 【Results】The *AcerOR58* open reading frame (ORF) was 1 230 bp long and encoded 409 amino acids. The molecular weight of the mature protein was 47.147 ku and the theoretical isoelectric point was 8.46. There were 6 transmembrane structures with an intracellular N-terminal and no signal peptide. There were 31 potential phosphorylation sites and an insect odor receptor family 7tm-6 superfamily conserved domain between amino acids 83-398. *AcerOR58* is closely related to the corresponding *AmelOR58* gene of the Western honeybee *A. mellifera*, with a nucleotide sequence identity of 96.67% and amino acid sequence identity of 97.31%. Real-time PCR showed that the expression level of *AcerOR58* was higher in the antennae of foraging bees (15-25 days old), and that expression in the antennae was significantly higher than in other tissues ($P < 0.01$). 【Conclusion】

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金青年项目 (31502021); 优秀博士来晋奖励 (K271899063)

**第一作者 First author, E-mail: pzhu66@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhaoting@126.com

收稿日期 Received: 2019-10-28; 接受日期 Accepted: 2020-07-17

AcerOR58 has the typical structural characteristics of an insect odorant receptor and is highly expressed in the antennae of forager bees. These results suggest that its main function is recognizing the scent of nectar and pollen sources.

Key words *Apis cerana cerana*; odorant receptor; *AcerOR58*; bioinformatics analysis; temporal-spatial expression

昆虫的行为往往可以从嗅觉生物学的角度来构建,嗅觉生物学介导了昆虫寻找寄主、交配、交流和躲避等多种行为活动 (Gadenneet *al.*, 2016)。嗅觉使昆虫能够识别和辨别环境中广泛的挥发性化学物质,这些化学物质来源于猎物、寄主植物和同种植物。这些嗅觉线索被嗅觉感觉神经元 (Olfactory sensory neurons, OSNs) 接收,它们将有关食物来源、产卵地点和配偶的信息传递给大脑,从而引发不同的气味诱发行为 (Fleischer *et al.*, 2018)。昆虫气味受体 (Odorant receptors, OR) 家族是从味觉受体 (Gustatory receptors, GRs) 谱系进化而来的,全面的分析表明,每个受体都包含一个独特的配体结合位点,其特异性各不相同,这些特异的 ORs 与嗅觉受体共受体 (Olfactory receptor co-receptor, Orco) 共同在嗅觉感觉神经元的细胞膜上形成异源聚体,对昆虫的行为活动发挥着重要作用 (Robertson *et al.*, 2003; Carraher *et al.*, 2015; Brand *et al.*, 2018; Butterwick *et al.*, 2018)。昆虫 ORs 一般由 300-400 个氨基酸组成, N-端没有信号肽,在嗅觉神经元树突膜上特异性表达,且含量非常低,含有 7 个 α -螺旋跨膜结构域,但不属于 G 蛋白偶联受体,其 N-末端在细胞膜内, C-末端在细胞膜外,呈反向拓扑结构。ORs 够识别气味分子,并将化学信号转变为电信号 (Benton, 2006; 莫建初等, 2019)。随着测序技术和生物信息学的发展,已从果蝇 *Drosophila sechellia*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、西方蜜蜂 *Apis mellifera*、家蚕 *Bombyx mori*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和蚜虫 *Acyrtosiphon pisum* 等多种昆虫中鉴定出 ORs, 且不同物种间的 ORs 序列一致性差异较大 (Gao and Chess, 1999; Hill, 2002; Robertson and Wanner, 2006; Wanner *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2019)。

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 是东方蜜蜂的

指名亚种,也是我国独有的蜜蜂当家品种,是传统农业的主要传粉昆虫,其躯体较小,头胸部呈黑色,腹部呈黄色,躯体上覆盖有黄褐色绒毛。中华蜜蜂具有飞行迅捷、嗅觉灵敏、抗逆抗病能力强和善于采集零星蜜粉源等优点,非常适合在我国的大部分山林地区定地饲养 (杨冠煌, 2009; 赵慧婷等, 2012, 2015; 杜亚丽等, 2019)。对中华蜜蜂 ORs 的研究,有助于明确其嗅觉识别机制,还能够为其科学饲养管理、病敌害防治提供理论指导。另外,已有研究发现中华蜜蜂对于气味的感知能力较意大利蜜蜂更强,是研究昆虫嗅觉机制的良好实验材料 (曾志将, 2009)。*AcerOR58* 是在课题组前期对中华蜜蜂触角转录组测序基础上获得的 (Zhao *et al.*, 2018),本研究通过生物信息学软件分析 *AcerOR58* 的氨基酸序列特征及理化性质、结构特征等,并利用 qRT-PCR 技术对 *AcerOR58* 基因在中华蜜蜂不同发育阶段触角和采集蜂不同组织的表达情况进行了相对定量分析,以期为进一步研究该基因的功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试中华蜜蜂于 2019 年 7-8 月采自山西农业大学动物科技学院实验蜂场。选择群势较强、健康无病的正常蜂群,将即将羽化出房的工蜂巢脾从蜂场带回实验室,置于温度为 $(34 \pm 1)^\circ\text{C}$, 湿度为 $75\% \pm 5\%$ 的恒温恒湿培养箱中继续发育。次日,待新蜂出房后,使用无毒、无味的记号笔标记蜜蜂 (>2000 头),随后将标记的蜜蜂随机放入 3 个蜂箱中。将工蜂刚羽化出房记为 1 日龄,并采集 1、5、10、15、20、25、30 日龄的触角样本,另外分离并收集采集蜂的头 (去除触角)、胸、腹、足、翅不同组织,立即投入装有液氮的研钵中,研磨至粉末状,加入装有 1 mL

Trizol 的 EP 管中, 置于 - 80 °C 保存备用。

1.2 主要试剂和仪器

总 RNA 提取试剂 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司; cDNA 第 1 链合成试剂盒 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、荧光定量试剂盒 SYBR PremixEx Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 和固相清除剂均购自宝生物工程(大连)有限公司; 无水乙醇、异丙醇、氯仿等分析纯试剂购自天津科密欧化学试剂有限公司。

5810R 高速冷冻离心机 (Eppendorf), 7500 型实时荧光定量仪 (ABI), Nanodrop 2000c 微量核酸蛋白测定仪 (ThermoFisher)。

1.3 引物设计

从中华蜜蜂触角转录组数据中得到 *AcerOR58* 的 ORF 序列 (GenBank 登录号为: XM_017054901.1), 利用 Primer 5.0 软件设计用于 qRT-PCR 的特异性引物。内参基因为 NCBI 上获得的 *AcerArp1* (登录号: HM640276.1)。

1.4 *AcerOR58* 序列的生物信息学分析

利用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 工具进行核酸序列的同源性分析; DNAMAN 软件预测编码的氨基酸序列; BLAST 进行氨基酸序列同源性分析; 使用 ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) 预测编码蛋白的分子量、等电点等理化性质; ProtScale (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>) 分析蛋白的亲疏水性; SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 预测信号肽序列; CpG 岛 (http://www.bio-software.net/sms/cpg_island.html) 预测该基因核苷酸

序列的 CpG 岛; NCBI Conserved Domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析 *AcerOR58* 编码蛋白的保守结构域; TMHMM-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析跨膜结构; SMART (<http://smart.emblheidelberg.de/>) 分析功能结构域; NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测该蛋白序列可能的磷酸化位点; PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)、Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) 分别进行蛋白二级结构和三级结构的预测; 采用 MEGA7.0 软件中的邻接法构建系统发育树, Bootstrap 为 1 000 次。

1.5 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

各组织样本总 RNA 的提取按照 RNA 提取试剂盒说明书进行。在测定浓度和纯度之后, 再利用试剂盒反转录合成 cDNA 第一链, - 20 °C 保存备用或直接进行下一步试验。其中, 7 个日龄触角和采集蜂不同组织的 cDNA 模板用于荧光定量 PCR 试验。

1.6 实时荧光定量 PCR

采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法确定基因相对表达水平, 检测 *AcerOR58* 基因在中华蜜蜂工蜂不同发育阶段触角和采集蜂不同组织中的表达量。按照实时荧光定量 PCR 试剂说明书进行操作。反应体系为 15 μ L, 其中 2 $\times$ SYBRPremix Ex Taq™ II 7.5 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol $\cdot$ L⁻¹) 各 0.6 μ L, ROX Reference Dye II (50 $\times$) 0.4 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 灭菌超纯水 5.9 μ L。反应程序为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 95 °C 15 s (42 个循环); 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。所有样品均设置 3 个技术重复。表 1 为引物详细信息。

表 1 荧光定量引物
Table 1 Primers for qRT-PCR

基因名称 Gene name	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')	退火温度 (°C) Annealing temperature
<i>AcerOR58</i> -F	ACCAATCAACCGCGAAATCTGA	60
<i>AcerOR58</i> -R	ACGGTTGGCCAAATACCGAT	60
<i>Arp1</i> -F	ACTACGGCCGAACGTGAAAT	60
<i>Arp1</i> -R	GGAAAAGAGCCTCGGGACAA	60

1.7 数据统计与分析

通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值比较 *AcerOR58* 基因在不同发育阶段工蜂触角和采集蜂不同组织中的相对表达量。以中华蜜蜂 *Arp1* 为校正参数, 分别以 1 日龄工蜂触角和采集蜂腹部组织的 *AcerOR58* 表达量为基准, 采用 SPSS 24.0 软件中的 ANOVA 法进行单因素方差分析, 并选用 Duncan's 法进行显著性差异分析 ($P < 0.01$ 表示差异极显著, $P > 0.05$ 表示差异不显著)。

2 结果与分析

2.1 *AcerOR58* 序列分析

DNAMAN 预测结果表明, *AcerOR58ORF*

编码的蛋白序列长度为 1 230 bp, 编码 409 个氨基酸 (图 1)。将其核苷酸序列及氨基酸序列分别进行 Blast 比对, 结果显示与西方蜜蜂 *AmelOR58* 的核苷酸序列一致性为 96.67%, 氨基酸序列一致性为 97.31%。

2.1.1 *AcerOR58* 蛋白的基本理化性质分析
ExPASy ProtParam 在线分析表明, *AcerOR58* 蛋白分子式为 $C_{2188}H_{3441}N_{527}O_{578}S_{24}$, 分子量大小为 47.147 ku, 理论等电点为 8.46, 属碱性蛋白。在组成 *AcerOR58* 蛋白的 20 种氨基酸中, 异亮氨酸 (Ile) 所占比例最高, 达 13.0%, 亮氨酸 (Leu) 其次, 达 12.7%; 色氨酸 (Trp) 所占比例最低, 为 1.5%; 带正、负电荷的氨基酸总数分别为 37 和 32。*AcerOR58* 蛋白的不稳定系数、脂溶指数、总平均亲水性系数、分别为 36.36、122.69、0.437,

```

1   ATGCACCTCTTTGTTTCGAGATCAAACCAATCAACCGCGAAATCTGAATTACGAGAAAGAC
1   M H L F V R D Q T N Q P R N L N Y E K D
61  ATCGTTTACGTGACCAAGCATAATAATGGATTTTGAATTCATCGGTATTGGCCAACC
21  I V Y V T K H N K W I L N S I G I W P T
121 GTATTTAAAGGCATCGACGAATATTACCAAAATGCAATTGCACTCAGTAATTTAGTG
41  V L K G I D E Y L P KMDI A I A L S N L V
181 TTATCCTTCACCGTGATTCAATGTGTTCTACACATATTATTAGAACAAAGGATCCGATA
61  L S F T V I Q C V L H I L L E Q K D PMDI
241 CTAAGACTGAAAATCCTCGGTTTAACTTTCTTTTCTTTTATCTCAITGATGAAGTACTGG
101 L R L K I L G L T F F S F I S L M K Y W
301 GTTTTAAACGATACGCAAAACCGAAATCAAACCTCTGTATAGAACAGATACAACACGATTGG
101 V L T I R K P K I K L C I E Q I Q H D W
361 AAACAGGTAGAAATTCGAAAGAGATCGAAAATTGATGTTAAAGTACGGGATAATAGGCCGA
121 K Q V E F E R D R K L M L K Y GMDI I G R
421 AATTGAGTATGTACAGTATTGTTTTATGTACAGCGGTGATAATTTATCACACGGTT
141 N L S M Y S I V F M Y S G G I I Y H T V
481 ATGCATTACAAGCTGGGATCATATATTGATGAATATAATCGTACGATTAAACTGCTGATA
161 M H Y K L G S Y I D E Y N R T I K L L I
541 TATCCTACATATAGTCGTTTTTACGACGTTCAAAAAAGTCCGTTTATGAATTAGTTTAT
181 Y P T Y S R F Y D V Q K S P V Y E LMDW Y
601 ATTCTCCAATGCATCTGTGGATATATGTTTCGATGCTGTAAACAGTTGGTGATGTGGCTTG
201 I L Q C I C G Y M F D A V T V G A C G L
661 GCTGCACTTTTTCGACGATATTTGTGGACAGATTGATATCGTTATGGCCAAATTAGAG
221 A A L F A T H I C G Q I D I V M A K L E
721 GATTAGTTGATGGAAAATTTTCGAAAGAAAATTCAAATCCGACGTACGACTGATAGAA
241 D L V D G K F S K E N S N P N V R L I E
781 ATTATTGAACATCACATAAAAATTTTAAAGATTTTCAGCAATGGTTGAGACAGTACTGCAA
261 I I E H H I K I L R F S A M V E T V L Q
841 GAAGTGTCTTTTATGAATTCATTGGTACCCTTTTGTAAATATGCTTGCTTGAATATTAT
281 EMDV C F L E F I G T T F V I C L L E Y Y
901 TGCATTACGGATTGGCAACAAAATAATACAATTGGTCTAACACATATTCGTTATTACTC
301 C I T D W Q Q N N T I G L T TMDS S L L L
961 ATATCTTTGACATTTAATATATTTTATTATGTTACATTGGTAATCTTTTGATAGAAAAG
321 I S L T F N I F L L C Y I G N L L I E K
1021 AGTACTAATATTGGAATAGTATGTTGCATGATCGATTGGTATCAATTACCAATCAAGACA
341 S T N I G I V C C M I D W Y Q L P I K T
1081 ATTCAAGGTCTCATCTTAATGATCGCCATGTCGAATAGTCCAGCGAAAATTAGCGCTGCT
361 I Q G L I L M I A M S N S P A K I S A A
1141 GGAATAGTTGATTTATCTTTACCCACTTTTGGAAAGTGTTTTAAAAACATCATTGTCATAT
381 G I V D L S L P T F G S V L K T S F A Y
1201 TTAATTTTCATCCGAATACCATCGTGTA
401 L N F I R T T I V *

```

图 1 中华蜜蜂 *AcerOR58* cDNA 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *AcerOR58* cDNA of *Apis cerana cerana*

TMD1-6: 跨膜结构域 1-6, 下划线表示跨膜区, “*” 标注终止密码子。

TMD1-6: The number of transmembrane region, the transmembrane regions are indicated by a line down the sequence, the stop codon is represented by an asterisk.

表明 *AcerOR58* 是一种稳定的脂溶性蛋白。

2.1.2 *AcerOR58* 蛋白结构预测分析 在线 NCBI 结构域分析表明, *AcerOR58* 编码的蛋白为不存在信号肽的疏水性蛋白, 无 CpG 岛, 其第 80-405 位氨基酸之间存在一个昆虫气味受体家族的保守结构区域 7tm-6 superfamily (图 2); 具有 6 个跨膜结构, 分别位于第 52-74, 80-102, 137-159, 199-221, 282-301 和 316-338 位氨基酸之间, 且 N 端位于胞内 (图 3); SMART 功能结构域预测结果与 TMHMM-2.0 预测结果一致; 该蛋白存在 31 个潜在的磷酸化位点; 二级结构预测结果显示, *AcerOR58* 编码的蛋白由 α -螺旋 (Helix)、 β -折叠 (Strand) 和卷曲环 (Coil) 构成, 其中 α -螺旋所占比例最高, 为 77.52%, 卷曲环其次, 占 19.31%, β -折叠占 3.17% (图 4); 图 5 为该蛋白三级结构预测图。

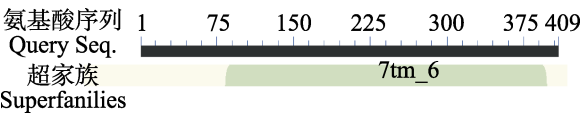


图 2 *AcerOR58* 的保守结构区域
Fig. 2 Conserved domain of *AcerOR58*

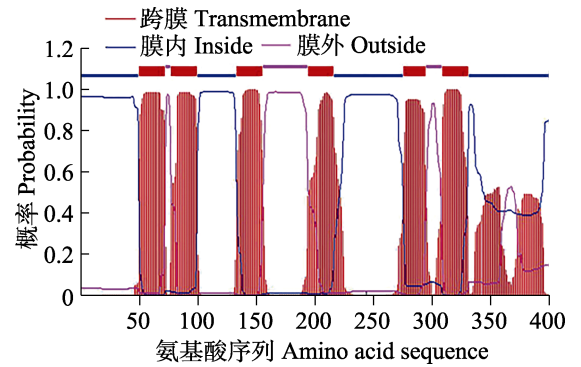


图 3 *AcerOR58* 蛋白跨膜结构的预测
Fig. 3 Prediction of transmembrane structure of *AcerOR58*

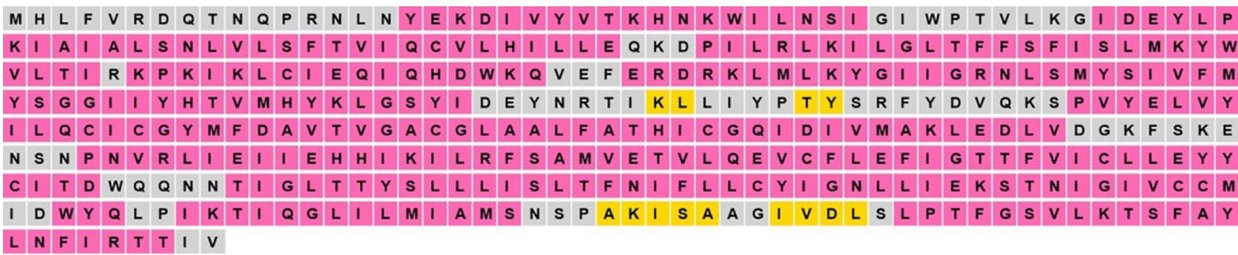


图 4 *AcerOR58* 蛋白的二级结构预测
Fig. 4 Prediction of secondary structure of *AcerOR58*

粉色: α -螺旋; 灰色: 卷曲环; 黄色: β -折叠。
Pink: α -helix; Gray: Coil; Yellow: β -strand.

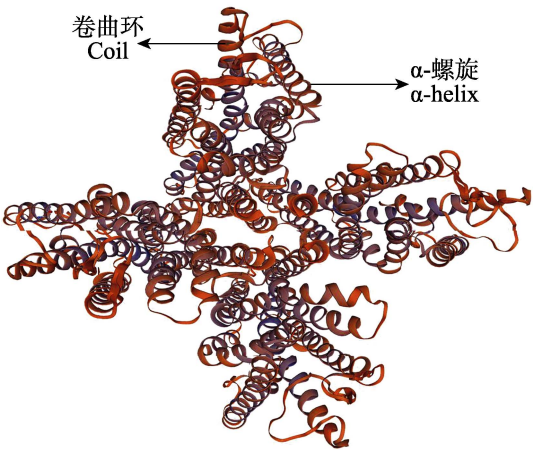


图 5 *AcerOR58* 蛋白的 3-D 结构预测模型
Fig. 5 Three-dimensional prediction structure of *AcerOR58* established by Swiss-Model

2.2 *AcerOR58* 系统进化树分析

利用 Blastp 搜索到与 *AcerOR58* 同源的氨基酸序列, 其中, *AcerOR58* 和西方蜜蜂 *AmelOR58* 的氨基酸序列一致性高达 97.31%, 与其它膜翅目昆虫的 ORs 氨基酸序列一致性差异较大, 在 51%-98% 之间。基于氨基酸序列构建膜翅目昆虫 ORs 的系统进化树, 从图 6 可以看出, 所有膜翅目昆虫的 ORs 分为两大分支: 蜜蜂科的中华蜜蜂 *AcerOR58*、西方蜜蜂 *AmelOR58*、大蜜蜂 *AdorOR85b-like*、小蜜蜂 *AfloOR4-like*、地熊蜂 *BterOR13a-like*、熊蜂 *BimpOR13a-like*、蜜蜂 *DnovOR4-like*、芦蜂 *CcalOR4-like*、麦蜂

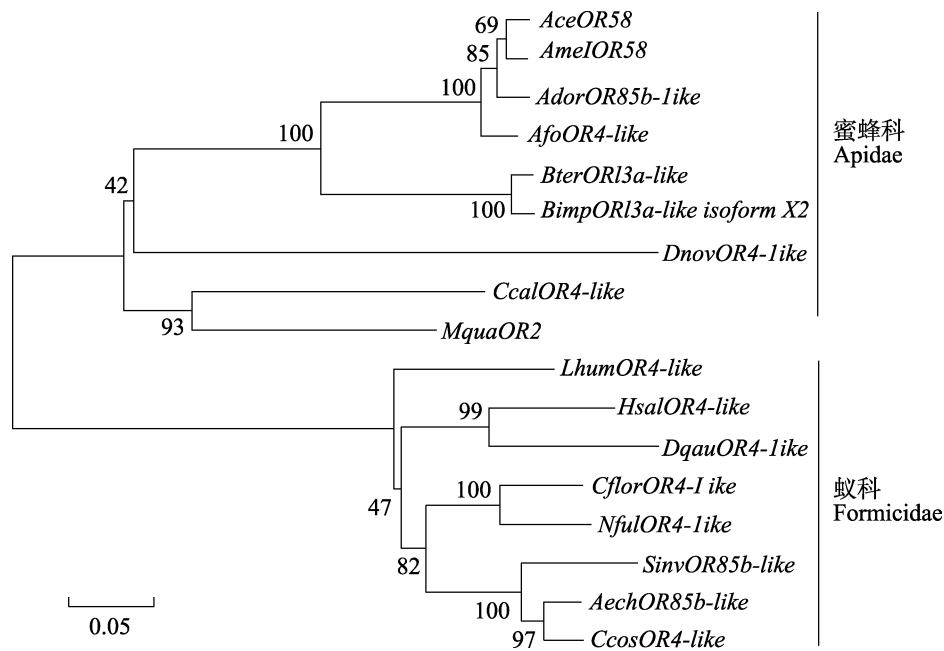


图 6 几种膜翅目昆虫 ORs 的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of ORs from several species of Hymenoptera insects

AcerOR58: 中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* (XP_016910390.1); *AmeIOR58*: 西方蜜蜂 *Apis mellifera* (NP_001229911.1); *AdorOR85b-like*: 大蜜蜂 *Apis dorsata* (XP_006615221.1); *AfoOR4-like*: 小蜜蜂 *Apis florea* (XP_012350983.1); *BterOR13a-like*: 地熊蜂 *Bombus terrestris* (XP_012175717.1); *BimpOR13a-like*: 熊蜂 *Bombus impatiens* (XP_012241390.1); *DnovOR4-like*: 蜜蜂 *Dufourea novaeangliae* (XP_015431184.1); *CcalOR4-like*: 芦蜂 *Ceratina calcarata* (XP_026669568.1); *MquaOR2*: 麦蜂 *Melipona quadrifasciata* (K0X73718.1); *LhumOR4-like*: 阿根廷蚁 *Linepithema humile* (XP_012214673.1); *HsalOR4-like*: 印度跳蚁 *Harpegnathos saltator* (XP_019699227.1); *DqauOR4-like*: 子弹蚁 *Dinoponera quadriceps* (XP_014476876.1); *CfloOR4-like*: 佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus* (XP_025265294.1); *NfulOR4-like*: 黄褐尼氏蚁 *Nylanderia fulva* (XP_029160845.1); *SinvOR85b-like*: 红火蚁 *Solenopsis invicta* (XP_025986699.1); *AechOR85b-like*: 切叶蚁 *Acromyrmex echinatio* (XP_011055205.1); *CcosOR4-like*: 育菌蚁 *Cyphomyrmex costatus* (XP_018406443.1)。

MquaOR2 聚为一大分支；蚁科的阿根廷蚁 *LhumOR4-like*、印度跳蚁 *HsalOR4-like*、子弹蚁 *DqauOR4-like*、佛罗里达弓背蚁 *CfloOR4-like*、黄褐尼氏蚁 *NfulOR4-like*、红火蚁 *SinvOR85b-like*、切叶蚁 *AechOR85b-like*、育菌蚁 *CcosOR4-like* 聚为另一大分支。

2.3 *AcerOR58* 时空表达谱分析

对 *AcerOR58* 在中华蜜蜂不同发育阶段触角中的表达量差异进行了分析。结果表明，*AcerOR58* 在工蜂各阶段均有表达，且表达量存在差异，15 日龄、20 日龄的表达量相对较高，极显著高于 1 日龄、10 日龄、30 日龄 ($P < 0.01$)，与 5 日龄、25 日龄的表达量差异不显著 ($P >$

0.05)，30 日龄时 *AcerOR58* 的相对表达量最低 (图 7)。

对 *AcerOR58* 在采集蜂不同组织的表达量差异进行分析。结果显示，*AcerOR58* 在采集蜂各组织中均有表达，但表达程度存在显著差异，其中触角中的表达量最高，极显著高于其他组织 ($P < 0.01$)；在其它组织中均呈微量表达，且表达量差异不显著 ($P > 0.05$) (图 8)。

3 讨论

气味受体 ORs 在昆虫嗅觉识别的生理过程中发挥着重要的作用。一般认为，昆虫 ORs 是位于嗅觉神经元树突上的膜蛋白，属于 G 蛋白

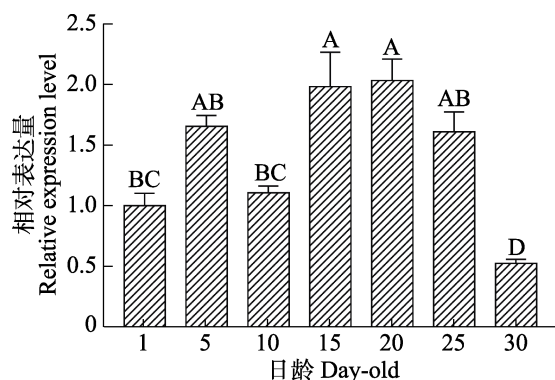


图 7 *AcerOR58* 在中华蜜蜂不同发育阶段触角中的表达量

Fig. 7 Expression profiles of *AcerOR58* in the antennae of different developmental stages of workers

柱上标有相同大写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 标有不同大写字母的表示差异极显著 ($P < 0.01$)。下图同。

Histograms with same letters indicate no significant difference ($P > 0.05$), and with different letters indicate extremely significant difference ($P < 0.01$). The same below.

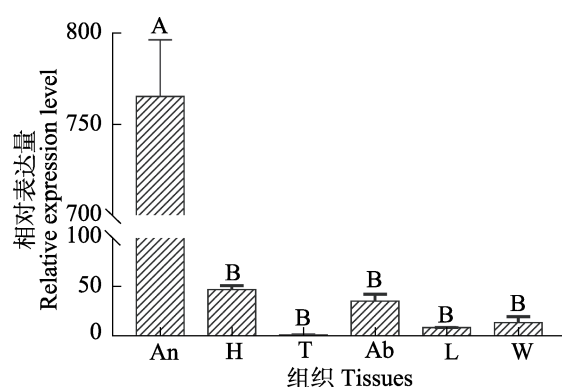


图 8 *AcerOR58* 在中华蜜蜂采集蜂不同组织中的表达量

Fig. 8 Expression profiles of *AcerOR58* in different tissues of foragers

An: 触角; H: 头 (去除触角); T: 胸 (去除翅); Ab: 腹; L: 足; W: 翅。

An: Antenna; H: Head without antenna; T: Thorax without wings; Ab: Abdomen; L: Legs; W: Wings.

偶联受体家族, 典型结构特征是具有 7 个跨膜结构域且其 N 末端位于细胞膜内 (Benton *et al.*, 2006)。氨基酸序列分析结果显示, 中华蜜蜂 *AcerOR58* 只含有 6 个跨膜结构, 这与 Bengtsson 等 (2012) 研究得到的在其它昆虫中传统 ORs 可能具有 4-8 个跨膜域的结论相一致, 对小菜蛾 *PxyLOR18* (孔畅仪等, 2014)、棉铃虫 *HarmOR9*

(刘宁灿等, 2014)、中华蜜蜂 *AcerOR113* (杜亚丽等, 2017b) 等气味受体的研究也表明昆虫的 ORs 不完全具有 7 次跨膜结构。因此, 推断 *AcerOR58* 符合昆虫气味受体的结构特征。

通过氨基酸序列比对发现, *AcerOR58* 与其他膜翅目蜜蜂科昆虫 ORs 序列有较高的一致性, 与西方蜜蜂 *AmelOR58* 的序列一致性达到 96.67%、97.31%, 它们可能是直系同源基因。*AcerOR58* 与膜翅目蚁科昆虫序列相似性较低, 与其它目类下的昆虫几乎找不到同源基因, 说明传统的气味受体在不同物种间具有高度的变异性。DNA 甲基化是一种表观遗传现象, 最常见的是甲基转移到 CpG 二核苷酸位点的胞嘧啶上。CpG 岛是富含 CpG 二核苷酸的一些区域, 有研究报道 CpG 岛甲基化异常模式与多种人类疾病有关, 包括多种类型的癌症以及人乳头瘤病毒 HPV 感染等 (Yang, 2013; Paska and Hudler, 2015; Verlaet *et al.*, 2018; 钟焱等, 2019; Al-Eitan *et al.*, 2019), *AcerOR58* 基因核苷酸序列不含 CpG 岛, 故推测该基因对中华蜜蜂疾病的调控未发挥作用或发挥作用较小。蛋白质磷酸化与信号转导、转录调控、细胞分裂和凋亡等多种生物学过程密切相关 (梁前进等, 2012), 本研究预测得到 *AcerOR58* 氨基酸序列含有 31 个潜在的磷酸化位点, 这些位点的存在可能与昆虫嗅觉识别中的信号转导过程相关。

触角是昆虫感受器分布最丰富的器官之一, 对昆虫的种间、种内的化学通信有着积极的作用, 在昆虫的觅食、择偶、选择产卵场所及躲避天敌等行为过程中至关重要 (李兆群, 2015; 杜立啸等, 2016; 张瑜等, 2016)。昆虫的生物学功能在一定程度上与基因的表达模式是相应的 (Hull *et al.*, 2013)。本研究 qRT-PCR 结果显示, *AcerOR58* mRNA 极显著高表达于采集蜂触角中, 表明 *AcerOR58* 主要在中华蜜蜂的嗅觉识别中发挥作用。课题组前期研究的中华蜜蜂 *AcerOrco*、*AcerOR1*、*AcerOR35*、*AcerOR96*、*AcerOR113* 和 *AcerOR167* 均在工蜂触角中特异性高表达 (赵慧婷, 2013; 王树杰, 2016; 杜亚丽等, 2017a, 2017b)。蜜蜂作为一种高度的社

会性昆虫,蜂群中的三型蜂各司其职,它们的生物学行为与其发育和外界环境的变化密切相关。例如工蜂随其日龄和外界蜜粉源的变化执行不同的工作,一般来说,从事巢内工作的工蜂称为内勤蜂,出巢采集花粉、花蜜、水和树胶等的工蜂称为采集蜂 (Graham, 2015)。通过试验观察发现,中华蜜蜂蜂群中有 12 日龄的工蜂即开始出巢采集 (待发表),因此,本研究结果得到 15-20 日龄中华蜜蜂触角中的 *AcerOR58* 的表达量较高,推测可能与该阶段蜜蜂出巢采集有关。1 日龄 *AcerOR58* 表达量最低,推测可能与该阶段蜜蜂刚刚出房,各项功能尚未健全有关。25 日龄开始 *AcerOR58* 表达量开始逐渐下降,可能与此阶段采集蜂在生理机能上逐渐退化,空间记忆、联想学习等能力开始衰退有关 (Behrends *et al.*, 2007; Scheiner and Amdam, 2009; Münch *et al.*, 2010)。目前对于 *AcerOR58* 的研究结果还不能完全阐释该基因具体执行的功能,以上推论还需要做进一步的 RNA 干扰、电生理及行为学研究等进行验证。通过对 *AcerOR58* 的深入研究有助于我们更进一步地了解中华蜜蜂的嗅觉机制,为有效利用经济昆虫打下坚实的理论基础。

参考文献 (References)

- Al-Eitan LN, Alghamdi MA, Tarkhan AH, Al-Qarqaz FA, 2019. Genome-wide CpG island methylation profiles of cutaneous skin with and without HPV infection. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(19): 1–12.
- Benton R, 2006. On the Origin of smell: Odorant receptors in insects. *Cellular & Molecular Life Sciences Cmls*, 63(14): 1579–1585.
- Benton R, Sachse S, Michnick SW, Vosshall LB, 2006. Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS Biol.*, 4(2): e20.
- Bengtsson JM, Trona F, Montagné N, Anfora G, Ignell R, Witzgall P, Jacquín-Joly E, 2012. Putative chemosensory receptors of the codling moth, *Cydia pomonella*, identified by antennal transcriptome analysis. *PLoS ONE*, 7(2): e31620.
- Behrends A, Scheiner R, Baker N, Amdam GV, 2007. Cognitive aging is linked to social role in honey bees (*Apis mellifera*). *Exp. Gerontol.*, 42(12): 1146–1153.
- Brand P, Robertson HM, Lin W, Pothula R, Klingeman WE, Jurat-Fuentes JL, Johnson BR, 2018. The origin of the odorant receptor gene family in insects. *Elife*, 31(7): e38340.
- Butterwick JA, Del Mármol J, Kim KH, Kahlson MA, Rogow JA, Walz T, Ruta V, 2018. Cryo-EM structure of the insect olfactory receptor Orco. *Nature*, 560(7719): 447–452.
- Carraher C, Dalziel J, Jordan MD, Christie DL, Newcomb RD, Kralicek AV, 2015. Towards an understanding of the structural basis for insect olfaction by odorant receptors. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 66(11): 31–41.
- Du LX, Liu Y, Wang GR, 2016. Molecular mechanisms of signal transduction in the peripheral olfactory system of insects. *Scientia Sinica Vitae*, 46(5): 573–583. [杜立啸, 刘杨, 王桂荣, 2016. 昆虫外周嗅觉系统信号转导机制研究进展. 中国科学: 生命科学, 46(5): 573–583.]
- Du YL, Feng YJ, Ma WH, Tai MM, Li XY, Su WT, Zhao HT, Jiang YS, 2019. Cloning and differential expression of the *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica* odorant binding protein gene *OBP12*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(3): 517–529. [杜亚丽, 冯宇佳, 马卫华, 邵苗苗, 李新宇, 苏文婷, 赵慧婷, 姜玉锁, 2019. 中华蜜蜂及意大利蜜蜂气味结合蛋白 OBP12 的基因克隆与差异表达分析. 应用昆虫学报, 56(3): 517–529.]
- Du YL, Pan JF, Wang SJ, Yang S, Zhao HT, Jiang YS, 2017a. Cloning and expression analysis of odorant receptor gene *AcerOr167* in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Environmental Entomology*, 39(1): 39–47. [杜亚丽, 潘建芳, 王树杰, 杨爽, 赵慧婷, 姜玉锁, 2017. 中华蜜蜂气味受体基因 *AcerOr167* 的克隆及表达分析. 环境昆虫学报, 39(1): 39–47.]
- Du YL, Wang SJ, Zhao HT, Pan JF, Yang S, Guo LN, Xu K, Jiang YS, 2017b. Cloning and temporal-spatial expression profiling of the odorant receptorgene *AcerOR 113* in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*. *Acta Entomologica Sinica*, 60(5): 533–543. [杜亚丽, 王树杰, 赵慧婷, 潘建芳, 杨爽, 郭丽娜, 徐凯, 姜玉锁, 2017. 中华蜜蜂气味受体基因 *AcerOR113* 的克隆与时空表达分析. 昆虫学报, 60(5): 533–543.]
- Fleischer J, Pregitzer P, Breer H, Krieger J, 2018. Access to the odor world: Olfactory receptors and their role for signal transduction in insects. *Cell. Mol. Life Sci.*, 75(3): 485–508.
- Gadenne C, Barrozo RB, Anton S, 2016. Plasticity in insect olfaction: To smell or not to smell? *Annu. Rev. Entomol.*, 61: 317–333.
- Gao Q, Chess A, 1999. Identification of candidate *Drosophila* olfactory receptors from genomic DNA sequence. *Genomics*, 60(1): 31–39.
- Graham JM, 2015. The Hive and the Honey Bee. Hamilton: DADANT and SONS, Inc. 78–87.
- Hill CA, 2002. G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science*, 298(5591): 176–178.
- Hull JJ, Perera OP, Snodgrass GL, 2013. Cloning and expression profiling of odorant-binding proteins in the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *Insect Mol. Biol.*, 23(1): 78–97.
- Kong CY, Wang GR, Liu Y, Yan SC, 2014. Gene cloning and expression analysis of three odorant receptors in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Scientia Agricultura Sinica*, 47(9): 1735–1742. [孔畅仪, 王桂荣, 刘杨, 严善春,

2014. 小菜蛾三个普通气味受体基因的克隆及表达谱. 中国农业科学, 47(9): 1735–1742.]
- Li ZQ, 2015. Molecular and functional characterization of olfactory genes in *Helicoverpa armigera*, *Chrysopa pallens* and *Chrysopa sinica*. Doctor dissertation. Nanjing: Nanjing Agricultural University. [李兆群, 2015. 棉铃虫及其天敌大草蛉虫和中华通草蛉嗅觉相关基因的克隆与功能研究. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学.]
- Liang QJ, Wang PC, Bai YR, 2012. Summarization on the progress in protein phosphorylation. *Science & Technology Review*, 30(31): 73–79. [梁前进, 王鹏程, 白燕荣, 2012. 蛋白质磷酸化修饰研究进展. 科技导报, 30(31): 73–79.]
- Liu NC, Zhang J, Wang GR, Liu Y, Yan SC, 2014. Cloning and tissue expression analysis of general odorant receptor genes *HarmOR9* and *HarmOR29* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(5): 522–529. [刘宁灿, 张进, 王桂荣, 刘杨, 严善春, 2014. 棉铃虫普通气味受体基因 *HarmOR9* 和 *HarmOR29* 的克隆和组织表达分析. 昆虫学报, 57(5): 522–529.]
- Liu Y, Gu S, Zhang Y, Guo Y, Wang G, 2012. Candidate olfaction genes identified within the *Helicoverpa armigera* antennal transcriptome. *PLoS ONE*, 7(10): e48260.
- Mo JC, Wang CP, Wei JQ, 2019. Advance in the research on insect peripheral olfactory system. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 41(1): 50–57. [莫建初, 王成盼, 尉吉乾, 2019. 昆虫外周嗅觉系统研究进展. 江西农业大学学报, 41(1): 50–57.]
- Münch D, Baker N, Kreibich CD, Brten AT, Amdam GV, 2010. In the laboratory and during free-flight: Old honey bees reveal learning and extinction deficits that mirror mammalian functional decline. *PLoS ONE*, 5(10): e13504.
- Paska AV, Hudler P, 2015. Aberrant methylation patterns in cancer: A clinical view. *Biochem. Med.*, 25(2): 161–176.
- Robertson HM, Wanner KW, 2006. The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: Expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. *Genome Research*, 16(11): 1395–1403.
- Robertson HM, Warr CG, Carlson JR, 2003. Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(2): 14537–14542.
- Scheiner R, Amdam GV, 2009. Impaired tactile learning is related to social role in honeybees. *J. Exp. Biol.*, 212(7): 994–1002.
- Verlaet W, Van Leeuwen RW, Novianti PW, Schuurin E, Meijer CJLM, Van Der Zee AGJ, 2018. Host-cell DNA methylation patterns during high-risk HPV-induced carcinogenesis reveal a heterogeneous nature of cervical pre-cancer. *Epigenetics*, 13(7): 769–778.
- Wang SJ, 2016. Temporal and spatial differential expression analysis of four odorant receptor genes from *Apis cerana cerana*. Master dissertation. Taigu: Shanxi Agricultural University. [王树杰, 2016. 中华蜜蜂4个气味受体基因 *AcerOrs* 的时空差异性表达分析. 硕士学位论文. 太谷: 山西农业大学.]
- Wanner KW, Anderson AR, Trowell SC, Theilmann DA, Robertson HM, Newcomb RD, 2007. Female-biased expression of odorant receptor genes in the adult antennae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, 16(1): 107–119.
- Yang GH, 2009. The role of *Apis cerana cerana* in my country's forest ecosystem. *Apiculture of China*, 60(4): 5–7, 10. [杨冠煌, 2009. 中华蜜蜂在我国森林生态系统中的作用. 中国蜂业, 60(4): 5–7, 10.]
- Yang HJ, 2013. Aberrant DNA methylation in cervical carcinogenesis. *Chinese Journal of Cancer*, 32(1): 42–48.
- Zeng ZJ, 2009. *Apicultural Science*. Beijing: China Agriculture Press. 28–45. [曾志将, 2009. 养蜂学. 北京: 中国农业出版社. 28–45.]
- Zhang RB, Liu Y, Yan SC, Wang GR, 2019. Identification and functional characterization of an odorant receptor in pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Sci.*, 26(1): 58–67.
- Zhang Y, Zhang SN, Zhang YY, Liu ZT, Sun ZH, Wen XJ, 2016. Advances in insect olfactory mechanism. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 31(5): 538–544. [张瑜, 张胜男, 张媛媛, 刘志韬, 孙朝辉, 温秀军, 2016. 昆虫嗅觉机制的研究进展. 福建农业学报, 31(5): 538–544.]
- Zhao HT, 2013. Molecular identification, expression and localization analysis of odorant receptor genes *Or1*, *Or2* and *Or3* from *Apis cerana cerana*. Doctor dissertation. Taigu: Shanxi Agricultural University. [赵慧婷, 2013. 中华蜜蜂气味受体基因 *Or1*、*Or2*、*Or3* 的鉴定、表达及定位分析. 博士学位论文. 太谷: 山西农业大学.]
- Zhao HT, Gao PF, Zhang GX, Tian SH, Yang SS, Meng J, Jiang YS, 2015. Expression and localization analysis of the odorant receptor gene *Orco* in drones antennae of *Apis cerana cerana*. *Scientia Agricultura Sinica*, 48(4): 796–803. [赵慧婷, 高鹏飞, 张桂贤, 田嵩浩, 杨珊珊, 孟娇, 姜玉锁, 2015. 气味受体基因 *Orco* 在中华蜜蜂雄蜂触角中的表达及定位分析. 中国农业科学, 48(4): 796–803.]
- Zhao HT, Gao PF, Zhang GX, Zhang CX, Ma WH, Jiang YS, 2012. Gene cloning and sequence analysis of *Or1* and *Or2* in *Apis cerana*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(5): 1117–1124. [赵慧婷, 高鹏飞, 张桂贤, 张春香, 马卫华, 姜玉锁, 2012. 东方蜜蜂气味受体基因 *Or1* 和 *Or2* 的克隆与序列分析. 应用昆虫学报, 49(5): 1117–1124.]
- Zhao HT, Peng Z, Du YL, Xu K, Guo L, Yang S, Ma W, Jiang Y, 2018. Comparative antennal transcriptome of *Apis cerana cerana* from four developmental stages. *Gene*, 660: 102–108.
- Zhong Y, Xu H, Peng FL, 2019. Significance and research progress of DNA methylation in gene expression regulation. *China Medical Herald*, 16(14): 33–36. [钟焱, 徐慧, 彭凤兰, 2019. DNA 甲基化在基因表达调控中的意义及研究进展. 中国医药导报, 16(14): 33–36.]