

蜜蜂体内王浆主蛋白基因 *mrjp9* 的转录表达研究^{*}

李江红^{**} 刘 振 陈大福 梁 勤^{***}

(福建农林大学蜂学学院 福州 350002)

摘 要 蜜蜂体内有 9 种王浆蛋白基因 (major royal jelly protein, MRJPs1~9), 其中 MRJPs1~5 在蜂王浆中含量较高, 是蜂王浆生物学功能的基础。MRJPs6~9 在王浆中没有或含量极少, 且功能未知。为研究非王浆蛋白组分的 MRJP9 的生物学功能, 本研究用 RT-PCR 的方法对意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spinola 不同组织, 不同部位, 不同级型样本中 *mrjp9* 的转录水平进行检测和定量。结果发现 *mrjp9* 在蜜蜂的幼虫、蛹和成年蜜蜂的各组织部位均广泛转录表达, 但其在幼虫、蛹和刚出房的成年蜜蜂体内表达水平较低, 而在成年采集蜂体内表达水平则较高, 其表达与蜜蜂的发育时期有关。通过对在成年蜜蜂体内各组织部位的表达水平进行检测的结果显示该基因主要在蜜蜂的头、胸和王浆腺等组织部位的表达较高, 其他组织部位表达较少。此外, 该基因也在雄蜂和蜂王体内广泛表达, 不受蜜蜂性别和级型的影响。这些结果说明 *mrjp9* 是一与蜜蜂发育有关的基因, 可能与蜜蜂的行为发育和分工调控有关。

关键词 蜜蜂, *mrjp9*, 转录, 行为, 发育

Transcription analysis of *mrjp9* in the honeybee *Apis mellifera ligustica*

LI Jiang-Hong^{**} LIU Zhen CHEN Da-Fu LIANG Qin^{***}

(College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract Nine major royal jelly proteins (MRJPs1-9) were identified in the honeybee genome. Among these, MRJPs1-5 were the main components of royal jelly protein and the functional basis of royal jelly. MRJPs6-9 are either not present, or are less abundant, in royal jelly and their function remains unclear. To explore the possible function of MRJP9, Total RNA was isolated from different body parts of honeybees at different developmental stages, and the expression of *mrjp9* determined by RT-PCR. The results show that *mrjp9* was widely expressed in all parts of honeybee at all developmental stages. However, the level of *mrjp9* expression was relatively low in larvae, pupae and early emerged adults, but relatively high in foraging honeybees. Expression of *mrjp9* was therefore related to developmental stage. In foraging honeybees, expression of *mrjp9* was particularly high in the head, thorax and hypopharyngeal gland, but less in other body parts or tissues. Furthermore, *mrjp9* was also expressed in multiple tissues of drone and queen honeybees and was not related to sex or caste. The profile of *mrjp9* expression coincided with honeybee behavioral development; expression was high in the head and thorax which are the body parts directly related to foraging activity. Therefore, *mrjp9* may be involved in the behavioral development and division of labor in the honeybee.

Key words honeybee, *mrjp9*, transcription, behavior, development

蜂王浆是哺育蜂分泌的浆状物质, 供 3 日龄以内蜜蜂幼虫和蜂王食用, 具有重要的营养功能 (Lensky and Rakover, 1983; Knecht and Kaatz,

1990)。蜂王在其幼虫阶段只吃蜂王浆, 而遗传基础相同的工蜂幼虫只在发育的前 3 d 食用蜂王浆, 而后改食花粉和蜂蜜。蜂王浆的摄入量和摄取持

^{*} 资助项目: 国家蜂产业技术体系专项资金 (CARS-45-KXJ 7)。

^{**} E-mail: leejh6972@yahoo.com.cn

^{***} 通讯作者, E-mail: lq4z@163.com

收稿日期: 2012-01-29, 接受日期: 2012-04-11

续的时间决定了具有相同遗传物质基础的幼虫是向着蜂王还是工蜂的方向分化。蜂王浆对蜂王的营养和发育有着重要影响,在蜜蜂的级型分化中起决定性的作用(Brouwers *et al.*, 1987; Asencot and Lensky, 1988)。

王浆的生物学功能与其蛋白质含量和种类相关。蜂王浆中蛋白由水溶性蛋白(WSPs)和非水溶性蛋白组成,其中水溶性蛋白占总蛋白含量的46%~89%(Hanes and Simuth, 1992),为王浆蛋白的主要部分,称为王浆主蛋白(major royal jelly proteins, MRJPs)(Schmitzová *et al.*, 1998)。MRJPs 蛋白家族在西方蜜蜂体内至今已报道的编码基因共9个,即 *mrjps1*~9。此外,这个基因家族还包括一个编码一条不完整多肽的基因,名为 *mrjpf*(Drapeau *et al.*, 2006)。西方蜜蜂 *Apis mellifera* L. 的 *mrjps* 基因序列已完成全部测序,它们之间具有较高同源性(Klaudiny *et al.*, 1994; Albert *et al.*, 1996, 1999a, 1999b; Schmitzová *et al.*, 1998)。王浆主蛋白基因的结构与功能研究已成为当前蜂学研究的热点之一。

对王浆蛋白研究,多集中于 MRJPs1~5 等王浆中含量较高的蛋白,研究内容主要包括其在蜜蜂体内的表达情况(Kubo *et al.*, 1996; Kucharski and Maleszka, 2002; Malecová *et al.*, 2003; Albertová *et al.*, 2005; Peixoto *et al.*, 2009)、在蜜蜂体内的功能、在王浆中含量、还有其编码蛋白的大小、空间结构和多态性等等(Ohashi *et al.*, 1997; Meier-Ewert *et al.*, 1998; Albert *et al.*, 1999b; Li *et al.*, 2008; 陶挺等, 2008)。而对王浆中含量较少或者没有的王浆蛋白种类 MRJPs6~9 等则研究相对较少,关于它们在蜜蜂体内的功能和作用还没有工作涉及(Albert and Klaudiny, 2004; Furusawa *et al.*, 2008; Peiren *et al.*, 2008)。

王浆蛋白 MRJP9 是一种非王浆组分蛋白,是通过蜜蜂基因组序列的分析获得(Santos *et al.*, 2005)。随后的研究发现,该蛋白在蜜蜂的触角、毒腺中有表达(Peiren *et al.*, 2005)。作为一种王浆蛋白,该基因在王浆腺中极少表达,而在其他与蜂王浆功能无关的组织部位表达。那么该基因在蜜蜂体内到底扮演了什么样的功能?基因的功能与其表达时间和部位有关,为探究 *mrjp9* 在蜜蜂体内的时空表达情况,本研究从不同级型、不同日龄、不同组织部位的蜜蜂样本中检测该基因的转

录情况,发现该基因在蜜蜂体内有较为广泛的表达,没有组织的特异性,但其表达量与发育时期密切相关,在外出采集的蜜蜂体内表达较高。该结果说明 *mrjp9* 是一调控蜜蜂生长发育的因子,很可能参与到蜜蜂行为发育与分工的调控。该结果丰富了 MRJP9 及其他王浆蛋白家族的生物功能研究,有重要的生物学意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料

意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spinola 由福建农林大学蜂场采集;RNA 提取试剂盒 Trizol Reagent 为 invitrogen 公司产品;异丙醇,氯仿,乙醇购自国药集团化学试剂有限公司;DEPC,琼脂糖,购自上海生工生物工程有限公司;Taq 酶, dNTP, 2 000 bp Marker 购自 Takara;反转录试剂盒购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 样品制备 试验用蜜蜂来自于福建农林大学蜂学学院教学蜂场。采集蜜蜂的幼虫、蛹及3日龄、15日龄、30日龄的成年蜜蜂用于提取总RNA。成年工蜂根据组织部位的不同,进一步的划分为:头部、胸部、腹部(不包含中肠和毒腺)、中肠、毒腺等部位分别提取总RNA备用。另外,为了检测此基因在蜂王和雄蜂体内的表达情况,分别取了雄蜂和蜂王的样本,同样将它们进一步的划分为头部、胸部、腹部,蜂王的样本还包括受精囊,分别提取总RNA备用。

1.2.2 RNA 提取与 cDNA 合成 利用 RNA 提取试剂盒提取蜜蜂组织的 RNA,采集的蜜蜂样本直接置入 Trizol(购自 invitrogen 公司)试剂内,按照试剂盒的说明提取 RNA。用不含 Rnase 的 DnaseI 处理,以去除其中可能残余的基因组。然后用反转录试剂盒(购自 Promega 公司)对抽提的 RNA 进行反转录合成 cDNA, -20℃ 保存备用。

1.2.3 PCR 条件 通过 PCR 的方法检测样本中的目的基因的表达情况并做进一步的定量分析。具体做法:以反转录得到的 cDNA 为模板,利用下列特异性引物,按如下反应体系和 PCR 条件进行。扩增 *actin* 的引物为:R: 5'-AGTTGCCATTTCT-GTTC-3', F: 5'-TCCTGCTATGTATGTCGC-3'; 扩增 *mrjp9* 的引物为:R: 5'-GAAAGTGCTCGAAGTCAA-

3', F : 5'-TCAATCTGGCGAATACAA-3'。PCR 反应体系为 40 μL , 其组成如下: *Taq* 酶 (5.0 U/ μL) 0.25 μL 、10 $\times$ Buffer 4.0 μL 、dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 3.0 μL 、模板 cDNA 3.0 μL 、上下游引物各 0.75 μL 、ddH₂O 28.25 μL 。PCR 反应的条件为: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min, 然后 95 $^{\circ}\text{C}$, 45 s; 54 $^{\circ}\text{C}$, 50 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 90 s 共 35 个循环。在 PCR 过程中, 取样设置在每个循环的延伸阶段运行完毕时。然后用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

1.2.4 数据处理及定量方法 以任一反转录的蜜蜂 cDNA 为模板, PCR 扩增蜜蜂 *actin* 和 *mrjp9*, 取扩增产物 1.0 μL 进行琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果进行扫描成像, 利用软件与 DNA marker 的条带进行比对分析 (Sensicapture 凝胶图像分析系统, 上海培清), 确定 PCR 扩增产物 *actin* 和 *mrjp9* DNA 的含量。在此基础上, 将 PCR 产物以 10 倍的关系进行浓度梯度稀释, 然后再以这些不同稀释倍数的产物为模板再次进行 PCR, 从第 13 循环之后开始每隔 2 个循环取 3.0 μL PCR 产物, 直至 33 个循环为止, 每个样本做 3 个平行。将这些 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 检测每个样品开始出现条带时的循环数。从而得到不同模板量及其对应的最早扩增出目标条带的循环数。以模板量为横坐标, 以其开始出现条带时的循环数为纵坐标, 用 Excel 软件分别绘制 *actin* 和 *mrjp9* 的标准曲线。待测样品中 *actin* 和 *mrjp9* 用相同的方法进行 PCR 扩增, 同样从第 13 个循环开始每隔 2 个循环取 1 次 3.0 μL PCR 产物, 直至 33 个循环为止, 每个样本做 3 个平行。将这些 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 检测每个样品开始出现条带的循环数。利用得到的循环数, 在标准曲线上查找其相对应的模板含量。以样本中 *actin* 表达水平作内参, 计算各组织样本中 *mrjp9* 相当于 *actin* 表达水平的百分数。

2 结果与分析

2.1 标准曲线绘制

利用设计的 *actin* 和 *mrjp9* 的特异性引物, 可以从任一从蜜蜂样本内成功扩增到这 2 种基因 (图 1)。通过对电泳结果的扫描分析, 这 2 种 PCR 产物的含量分别约为 0.19 pmol/ μL 和 0.18 pmol/ μL , 选取该 PCR 产物作为标样, 并以 10 倍浓度梯度进行稀释。不同含量的模板与其重新进行 PCR

时开始出现目标条带的循环数之间的线性关系如图 2 所示。内参基因 *actin* 和目的基因 *mrjp9* 标准曲线的斜率分别为 2.6 和 3.2, 线性相关系数分别为 0.9826 和 0.9882, 出现条带的最早循环数与模板含量之间密切相关, 可以通过最早出现目标条带的循环数来计算反应体系内目标基因的含量。

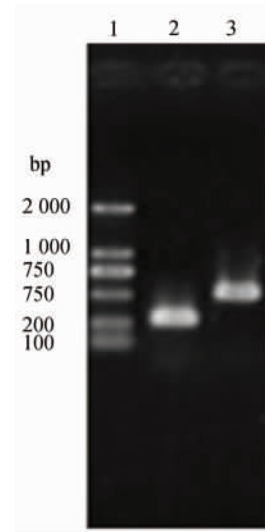


图 1 蜜蜂体内 RT-PCR 扩增 *actin* 和 *mrjp9* 的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplification of *actin* and *mrjp9* from honeybee sample

泳道 1 是 DNA marker; 泳道 2 是 *actin*;

泳道 3 是 *mrjp9*。

lane 1: DNA marker; lane 2: *actin*; lane 3: *mrjp9*.

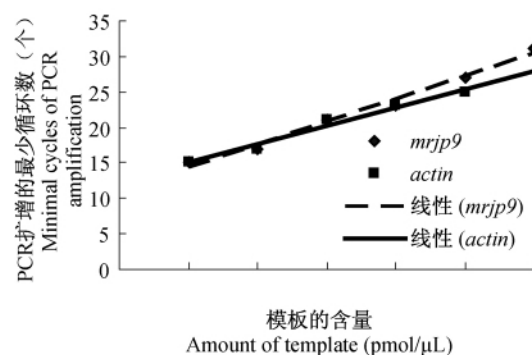


图 2 *mrjp9* 和 *actin* 模板浓度与最早成功扩增循环数之间的关系

Fig. 2 Linear relationship of *mrjp9* and *actin* with the earliest cycles of successful RT-PCR amplification

2.2 mrjp9 在蜜蜂体内的转录表达

以从三型蜂、不同发育阶段及不同组织部位提取合成的 cDNA 为模板,以 *actin* 和 *mrjp9* 的特异性引物,从各样品中同时 PCR 扩增这 2 个基因,从第 13 个循环开始每次取出 3.0 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,每个样本做 3 个平行,分别检

测它们最早成功扩增出来的循环数(图 3)。各样品 *actin* 和 *mrjp9* 最早扩增出目标片段的循环数见表 1,PCR 结果显示蜜蜂所有样品的 3 个重复之间首次出现条带的循环数都是一致的,说明这种方法是十分稳定的。

表 1 各样品中 *actin* 和 *mrjp9* 最早成功 PCR 扩增的循环数

Table 1 Earliest cycle number of successfully PCR amplification of *actin* and *mrjp9* from the honeybee samples

	工蜂 Worker		雄蜂 Drone			蜂王 Queen		蛹 Pupae			3 日龄 3-days adults			
	幼虫 Larvae	成蛹 Pupae	头 Head	胸 Thorax	腹 Abodomen	毒腺	受精囊	头 Head	胸 Thorax	腹 Abodomen	头 Head	胸 Thorax	腹 Abodomen	中肠 Midgut
						Venom gland	Spermatheca gland							
<i>actin</i>	21	19	21	21	19	21	19	23	21	23	23	21	19	19
<i>mrjp9</i>	31	27	27	27	25	21	19	31	29	31	31	29	29	31
3 日龄 3-days adults			15 日龄 15-days adults					30 日龄 30-days adults						
	毒腺 Venom gland	王浆腺 Hypoph- aryngeal gland	头 Head	胸 Thorax	腹 Abodo- men	中肠 Midgut	毒腺 Venom gland	王浆腺 Hypoph- aryngeal gland	头 Head	胸 Thorax	腹 Abodo- men	中肠 Midgut	毒腺 Venom gland	王浆腺 Hypoph- aryngeal gland
<i>actin</i>	19	21	21	23	21	25	21	21	23	23	21	19	23	23
<i>mrjp9</i>	27	29	21	23	23	27	23	21	25	23	23	21	27	25

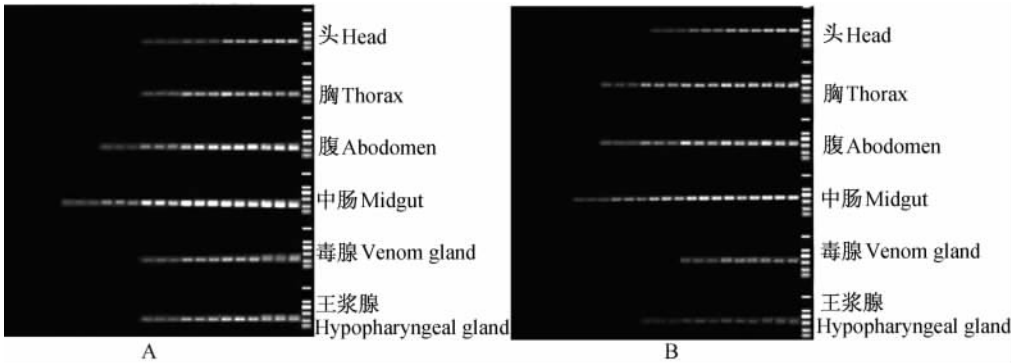


图 3 30 日龄蜜蜂各组织 *mrjp9* 和 *actin* 不同循环数 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of *mrjp9* and *actin* PCR amplification with different cycles from the 30 days adult honeybee body part

A : *actin* ; B : *mrjp9*。

2.3 不同发育时期工蜂 *mrjp9* 的表达

通过对不同发育时期的工蜂体内的 *mrjp9* 的转录水平进行检测,发现该基因在蜜蜂幼虫、蛹和成蜂各发育阶段均有不同程度的表达。其在幼

虫、蛹和 3 日龄成年蜜蜂体内的表达水平较低,约为 *actin* 表达量的 0.1% ~ 0.5%。而在 15 日龄及其之后的成年蜜蜂体内则表达量较高,是 *actin* 表达量的 70% ~ 120% (图 4)。因此, *mrjp9* 在工蜂

各虫态和组织中均有广泛表达,其表达量与蜜蜂的发育时期有关。

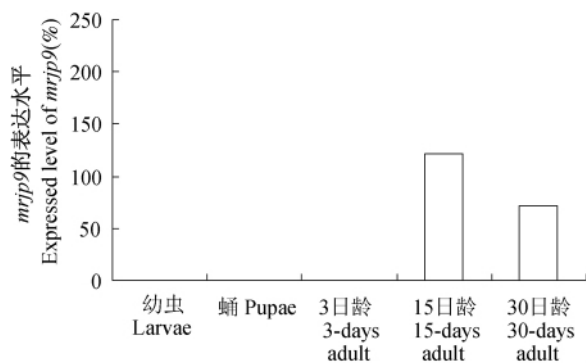


图 4 不同发育时期工蜂体内 *mrjp9* 的表达

Fig. 4 *mrjp9* expression in honeybee with different development stage

2.4 工蜂不同组织 *mrjp9* 的表达

通过对蛹、3 日龄工蜂、15 日龄工蜂和 30 日龄工蜂中不同的组织部位的 *mrjp9* 基因的表达进行检测,发现蛹期蜜蜂各部位中, *mrjp9* 在头、胸、腹的表达量约为 *actin* 的 0.5% ~ 0.7%, 各部位之间的差异不大(图 5:A);在 3 日龄成年蜜蜂的头、胸、腹、中肠、毒腺和王浆腺等各部位的表达量大致约为 *actin* 的 0.1% ~ 0.7%, 除了在中肠内的表达稍低之外,其他组织之间的表达差异也不明显(图 5:B)。而在 15 日龄和 30 日龄的成年蜜蜂体内,该基因在头、胸、腹、中肠、毒腺和王浆腺等各部位的表达量约为 *actin* 的 40% ~ 240%, 在蜜蜂头、胸和王浆腺等部位的表达量可达 *actin* 表达量的 150% 以上(图 5: C, D)。因此, *mrjp9* 在 15 日龄及之后蜜蜂体内各组织大量表达,其中在头、胸和王浆腺等部位表达量明显较高。

2.5 雄蜂和蜂王体内 *mrjp9* 的表达

通过对意蜂雄蜂和蜂王体内的检测发现, *mrjp9* 在雄蜂的头、胸、腹约有 *actin* 1% ~ 2% 的表达水平,各部位的表达水平基本一致,没有明显差异;在蜂王体内的毒腺,受精囊中表达水平较高,约为 *actin* 表达量的 120% ~ 170% (图 6)。因此, *mrjp9* 在雄蜂和蜂王各组织部位也有表达,其表达不受蜜蜂的性别和级型的影响,在蜂王相关组织中的表达量相对较高。

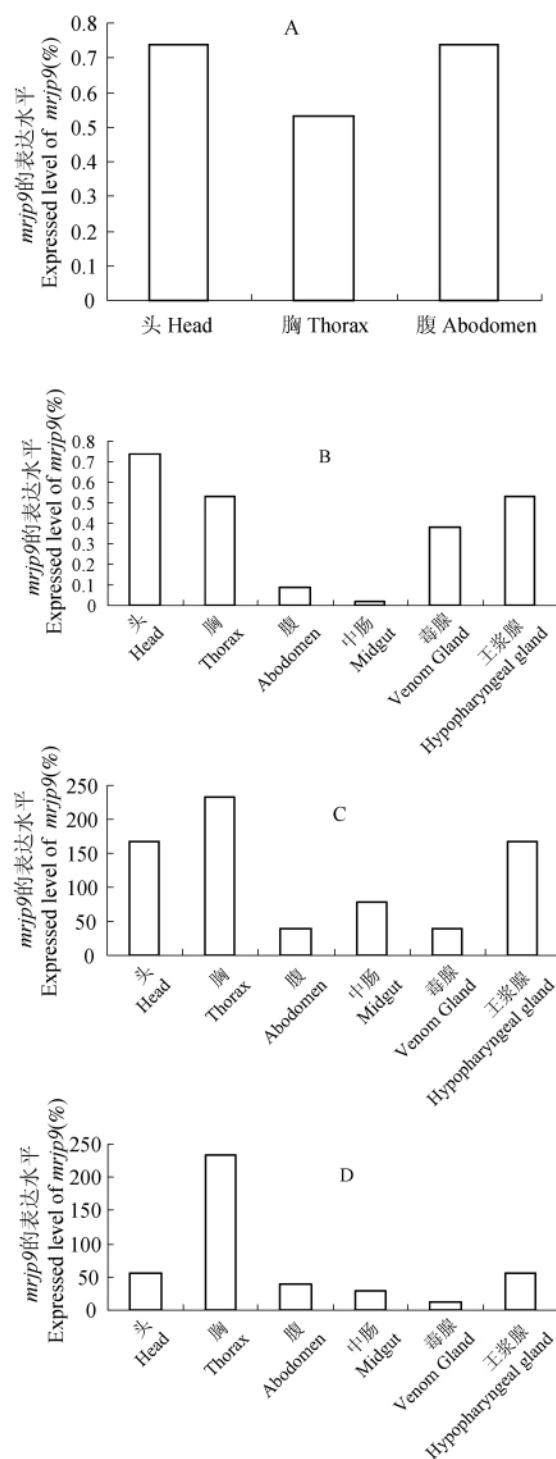
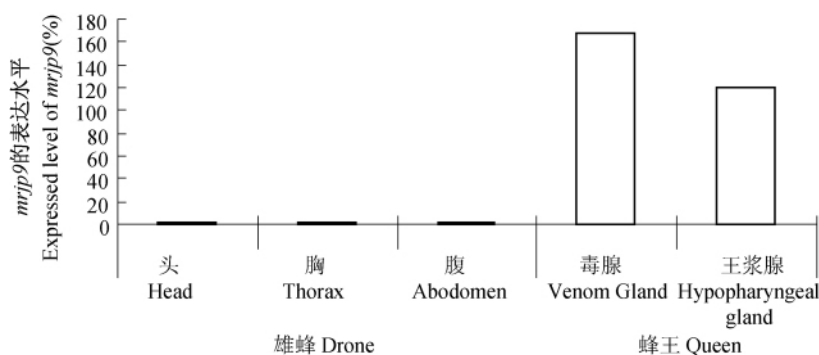


图 5 *mrjp9* 在工蜂各组织部位的表达

Fig. 5 *mrjp9* expression in different body part of honeybee

A: 蛹期各组织部位的表达情况; B: 3 日龄蜜蜂各组织部位的表达; C: 15 日龄蜜蜂各组织部位的表达; D: 30 日龄蜜蜂各组织部位的表达。

A. pupae; B. 3 days adult honeybee; C. 15 days adult honeybee; D. 30 days adult honeybee.

图6 雄蜂和蜂王部分组织中 *mrjp9* 的表达Fig. 6 *mrjp9* gene expression in drone and queen honeybee

3 讨论

MRJP9 是王浆蛋白家族中的最新发现一个成员,最早通过对蜜蜂基因组的测序结果分析得到,其后研究人员在做王浆腺和毒腺的蛋白组学分析时,进一步发现了其蛋白片段 (Santos *et al.*, 2005)。MRJP9 作为王浆蛋白家族中的一个成员,按理应当具有其他王浆主蛋白所具有的营养功能,但是已有的研究表明 MRJP9 蛋白组分在王浆中不存在或极少存在,同时它缺少其他王浆蛋白成员所具有的营养重复区 (Albert *et al.*, 1999b)。因此,MRJP9 难以具有其他王浆主蛋白类似的营养功能,其在蜜蜂体内的转录和表达很可能有其他方面的生物学意义。

至于 MRJP9 在蜜蜂体内的生理学功能,至今还没有一个明确的说法。由于其最早在蜜蜂的毒腺中检测到,一个假说就设想 MRJP9 可能与王浆中引起过敏反应的因子相类似,参与蜂毒对异物引发的过敏反应 (Albert and Klaudiny, 2007),是一过敏原和免疫原。但随后该基因也在蜜蜂的触角和王浆腺也发现有转录表达 (Santos *et al.*, 2005),这些组织部位与蜜蜂引起的过敏反应相关性不高,MRJP9 参与对其他生物的过敏反应之说就显得不够科学了。

为探究 MRJP9 在蜜蜂体内的生物学功能,本研究对不同级型、性别、发育时期和组织部位的蜜蜂材料内 *mrjp9* 的转录水平进行了检测。结果发现该基因在蜜蜂体内的表达范围很广,在工蜂、雄蜂和蜂王的不同发育时期的不同组织部位均有表达,不受蜜蜂的性别、级型和组织部位的影响。这说明 *mrjp9* 与蜜蜂的性别、级型无关,也与各组织

部位的具体功能无关。通过对表达量的检测发现,该基因的表达量只与蜜蜂的发育阶段有关,在幼虫、蛹和幼年蜜蜂体内的表达量较低,而在 15 日龄及之后的蜜蜂体内的表达量较高,特别是在蜜蜂的头部和胸部表达水平明显较高。联系到蜜蜂的行为发育和分工,刚出房的幼年蜜蜂不能外出参与采集活动,只能参与巢内的哺育和清理工作。约 2 个星期之后,蜜蜂参与外出采集活动 (Seeley, 1982)。伴随着这一生物学进程,蜜蜂体内的保幼激素的含量也是从比较低的水平逐渐增加,在老年采集蜂体内含量最高 (Rutz *et al.*, 1976);另一与蜜蜂行为发育的机制是节律基因 *period*,该基因在幼年成蜂体内含量较低,而采集蜂体内含量较高,通过控制 *period* 的表达可以控制蜜蜂的采集行为 (Toma *et al.*, 2000; Bloch *et al.*, 2004)。因此,*mrjp9* 的表达模式与其他 2 种控制蜜蜂行为发育的因素基本吻合,可能都与行为发育和分工有关。但 MRJP9 具体是否参与对蜜蜂行为发育与分工的调节及如何调节等生物学问题还需进行一步深入研究。

参考文献 (References)

- Albert S, Bhattacharya D, Klaudiny J, Schmitzova J, Simuth J, 1999a. The family of major royal jelly proteins and its evolution. *J. Mol. Evol.*, 49 (2): 290—297.
- Albert S, Klaudiny J, Simuth J, 1996. Newly discovered features of updated sequence of royal jelly protein RJ P5721; longer repetitive region on C-terminus and homology to *Drosophila melanogaster* yellow protein. *J. Apicult. Res.*, 35 (1): 63—68.
- Albert S, Klaudiny J, Simuth J, 1999b. Molecular

- characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29 (5):427—434.
- Albert S, Klaudiny J, 2004. The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: identification of new members in the EST library. *J. Insect Physiol.*, 50 (1):51—59.
- Albert S, Klaudiny J, 2007. MRJP9, an ancient protein of honeybee MRJP family with non-nutritional function. *J. Apicult. Res.*, 46 (2):99—104.
- Albertová V, Su S, Brockmann A, Gadau J, Albert S, 2005. Organization and potential function of the *mrjp3* locus in four honeybee species. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (20):8075—8081.
- Asencot M, Lensky Y, 1988. The effect of sugars in stored royal jelly on the differentiation of female honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae to queens. *Insect Biochem.*, 18 (2):127—133.
- Bloch G, Rubinstein CD, Robinson GE, 2004. period expression in the honey bee brain is developmentally regulated and not affected by light, flight experience, or colony type. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34 (9):879—891.
- Brouwers EWM, Ebert R, Beetsma J, 1987. Behavioral and physiological aspects of nurse bees in relation to the composition of larvae food during caste differentiation in the honeybee. *J. Apicult. Res.*, 26 (1):11—23.
- Drapeau MD, Albert S, Kucharski R, Prusko C, Maleszka R, 2006. Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. *Genome Res.*, 16 (11):1385—1394.
- Furusawa T, Rakwal R, Nam HW, Shibato J, Agrawal GK, Kim YS, Ogawa Y, Yoshida Y, Kouzuma Y, Masuo Y, Yonekura M, 2008. Comprehensive royal jelly (RJ) proteomics using one and two dimensional proteomics platforms reveals novel RJ proteins and potential phospho/glycoproteins. *J. Proteome Res.*, 7 (8):3194—3229.
- Hanes J, Simuth J, 1992. Identification and partial characterization of the major royal jelly protein of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *J. Apicult. Res.*, 31 (1):22—26.
- Klaudiny J, Hanes J, Kulifajova J, Albert S, Simuth J, 1994. Molecular cloning of two cDNAs from the head of the nurse honey bee (*Apis mellifera* L.) coding for related proteins of royal jelly. *J. Apicult. Res.*, 33 (2):105—111.
- Knecht D, Kaatz HH, 1990. Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. *Apidologie*, 21 (5):457—468.
- Kubo T, Sasaki M, Nakamura J, Sasagawa H, Ohashi K, Takeuchi H, Natori S, 1996. Change in the expression of hypopharyngeal-gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. *J. Biochem.*, 119:291—295.
- Kucharski R, Maleszka R, 2002. Evaluation of differential gene expression during behavioral development in the honeybee using microarrays and northern blots. *Genome Biol.*, 3 (2):RESEARCH0007.
- Lensky Y, Rakover Y, 1983. Separate protein body compartments of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 75 (4):607—615.
- Li JK, Feng M, Zhang L, Zhang ZH, Pan YH, 2008. Proteomics analysis of major royal jelly protein changes under different storage conditions. *J. Proteome Res.*, 7 (8):3339—3353.
- Malecová B, Ramser J, O'Brien JK, Janitz M, Jádová J, Lehrach H, Simuth J, 2003. Honeybee (*Apis mellifera* L.) *mrjp* gene family: computational analysis of putative promoters and genomic structure of *mrjp1*, the gene coding for the most abundant protein of larval food. *Gene*, 303:165—175.
- Meier-Ewert S, Lange J, Gerst H, Herwig R, Schmitt A, Freund J, Elge T, Mott R, Herrmann B, Lehrach H, 1998. Comparative gene expression profiling by oligonucleotide fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 26:2216—2223.
- Ohashi K, Natori S, Kubo T, 1997. Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L. *Eur. J. Biochem.*, 249:797—802.
- Peiren N, de Graaf DC, Vanrobaeys F, Danneels EL, Devreese B, Van Beeumen J, Jacobs FJ, 2008. Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage. *Toxicon*, 52 (1):72—83.
- Peiren N, Vanrobaeys F, de Graaf DC, Devreese B, Van Beeumen J, Jacobs FJ, 2005. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochim. Biophys. Acta*, 1752 (1):1—5.
- Peixoto LG, Calábria LK, Garcia L, Capparelli FE, Goulart LR, de Sousa MV, Espindola FS, 2009. Identification of major royal jelly proteins in the brain of the honeybee *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.*, 55 (8):671—677.
- Rutz W, Gerig L, Wille H, Lüscher M, 1976. The function of juvenile hormone in adult worker honeybees, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.*, 22 (11):1485—1491.

- Santos KS, dos Santos LD, Mendes MA, de Souza BM, Malaspina O, Palma MS, 2005. Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(1):85—91.
- Schmitzová J, Klaudiny J, Albert S, Schröder W, Schreckengost W, Hanes J, Júdová J, Simúth J, 1998. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell Mol. Life Sci.*, 54(9):1020—1030.
- Seeley TD, 1982. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 11:287—293.
- Toma DP, Bloch G, Moore D, Robinson GE, 2000. Changes in period mRNA levels in the brain and division of labor in honey bee colonies. *PNAS*, 97(12):6914—6919.
- 陶挺, 苏松坤, 陈盛禄, 杜宏沪, 2008. 蜂王浆蛋白生物学功能的研究. *昆虫知识*, 45(1):33—37.