



中华蜜蜂重要生物学特性相关功能基因研究进展*

孟 飞^{1**} 胥保华² 郭兴启^{1***}

(1. 山东农业大学生命科学学院 泰安 271018; 2. 山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

摘 要 中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* Fabricius 是一种重要的经济动物, 具有嗅觉敏锐, 抗寒耐热, 抗螨及采集能力强等特点。目前人们采用分子生物学的方法, 对中华蜜蜂的基因组成、基因表达调控及基因功能分析等方面开展研究, 揭示其特征行为的分子机理已成为该领域的研究热点之一。近年来, 中华蜜蜂重要生物学特征功能相关基因(即蜂王浆蛋白相关基因、化学通讯相关蛋白基因和抗逆相关基因)在基因克隆、表达特性及功能研究等方面取得了重大进展。本文重点对此进行综述。

关键词 中华蜜蜂, 重要生物学特征功能基因, 蜂王浆蛋白相关基因, 化学通讯相关蛋白基因, 抗逆相关基因

Progress in research on the genetic basis of important biological characteristics of *Apis cerana cerana*

MENG Fei^{1**} XU Bao-Hua² GUO Xing-Qi^{1***}

(1. College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China;

2. College of Animal Science, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract *Apis cerana cerana* Fabricius is an economically important insect with characteristics such as olfactory sensitivity, cold resistance, heat hardiness, disease resistance and foraging efficiency. Using molecular biology to reveal the genetic basis of these and other traits has become a focus of apicultural research. Recently, considerable progress has been made in identifying genes related to royal jelly proteins, chemical communication and stress resistance. This paper summarizes recent research on the cloning, expression pattern and function of these three types of genes.

Key words *Apis cerana cerana*, important biological characteristics genes, royal jelly proteins related gene, chemical communication related proteins gene, stress resistance related gene

蜜蜂作为一种重要的经济动物不仅给人类提供了营养丰富的蜂产品, 而且在农作物授粉中发挥了重要作用。蜜蜂在农作物授粉中的应用价值已远远超过了其自身的经济价值, 成为推动农业快速发展的经济饲养动物之一(Williams, 2000)。群居的社会性行为, 合理的等级分配制度, 精准的学习记忆导航体系也使蜜蜂成为生态学、社会行为学和生理学的重要研究对象(Denison and Raymond-Delpech, 2008)。2006年10月, 意大利蜜蜂全基因组测序的完成标志着蜜蜂分子生物学

研究取得了长足的进展。然而, 不同类型的蜜蜂种群在漫长的进化过程中逐渐形成了各自独特的生活习性。中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* Fabricius 属于东方蜜蜂 *Apis cerana* 属下最主要的亚种, 是我国特有的蜜蜂种质资源。与西方意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 相比, 中华蜜蜂嗅觉敏锐、抗螨能力强、对零星分散及低温高空蜜粉源的采集能力强, 并且具有抗寒耐热等较强的抗逆境能力(苏松坤等, 2005; Li *et al.*, 2008)。

目前借助分子生物学手段, 从基因组成、表达

* 资助项目: 现代农业蜂产业技术体系建设专项资金(NYCYTX-43)、公益性行业(农业)科研专项(200903006)和国家自然科学基金项目(31172275)。

** E-mail: jzf0428@126.com

*** 通讯作者: E-mail: xqguo@sdau.edu.cn

收稿日期: 2011-01-26, 接受日期: 2011-10-17

调控及功能分析等方面研究中华蜜蜂重要功能基因,揭示其特征行为的分子机理已成为该领域的热点之一。相对于意大利蜜蜂的研究而言,由于中华蜜蜂的基因组并未测序,目前对其研究仍然处于初级阶段,主要集中在功能基因的分离、表达特性的分析及多克隆抗体的制备等方面。近年来,蜂王浆蛋白相关基因、化学通讯相关蛋白基因及抗逆相关基因这三大类基因成为中华蜜蜂功能基因的研究热点。本文就近 5 年来它们在国内外研究进展作一综述。

1 蜂王浆蛋白相关基因

1.1 王浆主蛋白基因

蜂王浆是由工蜂咽下腺和上鄂腺所分泌的一种具有多种生物活性的物质,同时其营养调控功能也是决定蜜蜂级型分化的关键性因素(Tao *et al.*, 2008)。王浆主蛋白(major royal jelly proteins, MRJPs)是蜂王浆中的主要蛋白,占王浆总蛋白的 82%~90%(苏松坤等, 2005)。至今已发现 MRJPs 蛋白家族共有 9 个成员,它们彼此的分子进化关系也随着意大利蜜蜂基因组的释放而得到解析。由于蜂王浆所具有的抗疲劳、抗氧化等重要的生物学功能及医疗保健作用可能与王浆蛋白有关(沈飞英等, 2007),因此对于王浆主蛋白基因的克隆及功能研究成为蜜蜂学研究的重点。不同类型蜂群之间的蜂王浆蛋白的组成成分不尽相同(Takenaka and Takenaka, 1996),它们在蜜蜂中发挥的作用也不完全一致。

近几年,有关中华蜜蜂蜂王浆主蛋白基因的研究取得了较大进展。自 2004 年,中华蜜蜂 *MRJP1* 基因成功分离后(苏松坤等, 2004),*MRJP2*(沈飞英等, 2007)、*MRJP3*(苏松坤等, 2005)、*MRJP5*(Su *et al.*, 2005)、*MRJP7*(李艳等, 2008)4 种中华蜜蜂王浆主蛋白基因相继被克隆出来,并进行了相应的序列分析。随着分子生物学的发展,中华蜜蜂 MRJPs 基因的研究也逐渐深入到表达调控及功能探索方面。研究表明,中华蜜蜂 *MRJP1* 是王浆主蛋白中含量最丰富的糖蛋白,它能够刺激人体内淋巴细胞的生长,具有抗疲劳、抗氧化等作用(Fang *et al.*, 2010),因此利用细菌或酵母作为生物反应器来大规模生产 *MRJP1* 功能蛋白受到了国内外的重视。张璨文等(2010)从蜜

蜂脑部 cDNA 文库中筛选出 3 个中华蜜蜂 *MRJP1* (*AccMRJP1*) 克隆,并通过 PCR 鉴定确定了其中一个克隆能够获得编码 *AccMRJP1* 的基因全长,随后经原核表达诱导、聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及 Western blot 技术分析证明了 *AccMRJP1* 基因在大肠杆菌中的成功表达,从而为开展 *MRJP1* 的规模性发酵工程提供了技术基础。Tao 等(2008)在其克隆出的 *AccMRJP1* 的基础上,采用重组杆状病毒表达系统将 *MRJP1* 在家蚕中成功表达,从而实现了对中华蜜蜂基因真核表达产物的制备,为王浆主蛋白的研究提供了一种新的思路,同时也为王浆主蛋白的大规模生产奠定了基础。

在中华蜜蜂王浆主蛋白中,MRJP2 及 MRJP3 含量也较高。沈飞英等(2007)首次鉴定出中华蜜蜂 *MRJP2* 基因结构中存在串联重复片段长度多态性(variable numbers of tandem repeat, VNTR),并将该基因的 C-端重复序列与其他 5 种蜜蜂(西方蜜蜂、小蜜蜂、黑小蜜蜂、大蜜蜂、黑大蜜蜂)的 C-端进行比较,结果发现中华蜜蜂与其他蜂种相比存在显著的差异性,其他 5 种蜜蜂不存在 VNTR,这有力的证明了中华蜜蜂存在多态性和特殊性。苏松坤等(2005)同样发现了中华蜜蜂 *MRJP3* 基因存在一段重复区结构并与其他蜂种存在差异性;Albertová 等(2005)对蜜蜂 *MRJP3* 基因的重复区进行了较深入的研究,发现这种重复区的长度与王浆蛋白中的含氮量存在一定的联系,而这种含氮量的增加是由于摄入大量的营养物质所引起的。在王浆主蛋白结构上,中华蜜蜂与其他蜂种存在一定的差异,这意味着它们彼此之间可能具有不同的功能;在王浆主蛋白含量上,中华蜜蜂与其他蜂种相比也不完全一致。Fang 等(2010)利用蛋白质组学的方法对中华蜜蜂与意大利蜜蜂蜂王浆蛋白的产量、蛋白质特性及丰度进行了比较,结果发现中华蜜蜂 5 种主要王浆蛋白(MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4, MEJP5)的水平都要远远的低于意大利蜜蜂。这表明了在蜜蜂早期的营养摄入过程中,相对于中华蜜蜂而言,意大利蜜蜂需要更多的能量去促使幼虫及蜂王发育。当然中华蜜蜂中也存在含量很低的王浆主蛋白,比如 *MRJP7*。它们的含量几乎用蛋白质组学的方法都无法检测到(Fang *et al.*, 2010),但是这些微量的王浆主蛋白的作用同样值得研究。李艳等(2008)通过优化原核表达条件,在大肠杆菌中

成功表达出含量很低的 MRJP7, 同时制备了多克隆抗体, 为 MRJP7 的功能研究打下了基础。

1.2 Apisimin 基因

Apisimin 是王浆蛋白中的另一种成分, 它在蜜蜂整个发育历程中都高度表达, 并且在采集蜂和守卫蜂的头部也具有很高的表达量。因此 Apisimin 作为王浆蛋白的一种新型的丝氨酸和缬氨酸富集肽, 不仅参与到早期营养发育中, 而且还可能涉及到蜜蜂生理发育方面的一些功能 (Bíliková *et al.*, 2002)。有关 Apisimin 作用的功能机制并没有具体明确, 邢丽萍等 (2006) 利用蜜蜂工蜂头部 cDNA 文库筛选, 证明了在中华蜜蜂中 *Apisimin* 是一个高丰度转录基因, 同时成功表达了 *Apisimin* 基因, 为进一步研究中华蜜蜂 *Apisimin* 基因的功能机制奠定了基础。随着分子生物学技术的快速发展, 关于蜂王浆相关基因的研究会逐渐趋向于揭示它们功能的分子机理。

2 化学通讯相关蛋白基因

化学感受机制与昆虫的繁殖与生存行为密切相关。它们利用化学感受系统检测环境中的化学信息并通过嗅觉感器识别外界的气味分子, 从而采取适当的行为, 比如识别配偶或天敌所释放出的挥发性信息素 (Pelosi, 1996; Sánchez-Gracia *et al.*, 2009)。在化学感受机制中, 两类化学通讯蛋白在昆虫感受器外围发挥着重要的作用。其中一类称为气味结合蛋白 (odorant-binding proteins, OBPs), 另一类称为化学感受蛋白 (chemosensory proteins, CSPs), 两者存在于不同的化学感受器的淋巴液内, 执行着各自的生理功能 (Pelosi *et al.*, 2006)。中华蜜蜂与其它蜂种相比, 具有嗅觉灵敏, 善于采集零星的蜜源及抗螨能力强等特点。这种敏锐的嗅觉及特殊的抗螨排异性行为与其发达的化学感受系统密切相关。

2.1 气味结合蛋白类基因

OBP 是一类低分子量的球状水溶性蛋白, 存在于昆虫嗅觉感器内部胞外空间的淋巴液中, 主要在信息素及一般的气味分子的嗅觉识别中发挥着重要作用 (Pelosi *et al.*, 2006)。研究表明, OBP 可以根据其结合配体的类型分为信息素结合蛋白 (pheromone binding protein, PBP) 及普通气味结合蛋白 (general odorant binding protein, GOBP)。其

中 PBPs 主要参与性信息素的识别; 而 GOBP 在雌性昆虫的触角中含量丰富, 参与气味分子的识别 (Steinbrecht *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1998)。近几年, 中华蜜蜂气味结合蛋白类基因已经相继得到克隆, 并且该类基因在不同时空及组织中的分布也基本明确。李红亮等 (2008a, 2008b) 分别克隆了中华蜜蜂信息素结合蛋白基因 (*Ac-ASP1*) 和普通气味结合蛋白基因 (*Ac-ASP2*), 并进行了相应的生物学分析, 结果发现 2 种基因编码的蛋白都存在昆虫气味结合蛋白典型的 6 个保守的半胱氨酸残基特征。利用实时荧光定量 PCR 技术, 不仅发现 *Ac-ASP1* 基因在工蜂的触角中高表达, 还发现该基因存在 2 个高丰度表达时期: 一个是在幼虫、蛹及成虫早期; 另外一个是在成虫 21 日龄前后。同样, *Acer-ASP2* 基因也在触角中特异性表达; 免疫组织化学分析显示 *Acer-ASP2* 主要定位在嗅觉感器的淋巴液中, 比如板型感器和毛型感器上 (Li *et al.*, 2008)。这证明气味结合蛋白在中华蜜蜂内勤蜂及采集蜂的排异和觅食过程中可能发挥着重要作用。

2.2 化学感受蛋白类基因

CSP 是一类酸性小分子蛋白, 其分子量略小于 OBP, 但是它在结构组成、表达模式及功能效应上与 OBP 存在较大的差异。CSP 存在 4 个保守的半胱氨酸残基, 而且与 OBP 特异性表达不同的是, CSP 主要表达在缺乏嗅觉及味觉感器的器官中, 比如头部、胸部和足部等 (Jacqain-Joly *et al.*, 2001; Picimbon *et al.*, 2001)。目前关于 CSP 的功能及作用机制仍然是昆虫学界研究的热点问题。李红亮等 (2007) 从中华蜜蜂工蜂的触角中分离出一种化学感受蛋白, 并命名为 *Ac-ASP3*。免疫组织化学定位显示该类基因主要定位于机械感器如锥形感器中, 而在嗅觉感器中几乎检测不到。这种特殊的定位与 OBP 截然不同, 意味着化学感受蛋白可能不在嗅觉方面直接发挥作用而是参与到触角的机械运动。*Ac-ASP3* 基因在翅和足中的高含量、在触角感器中的低丰度以及在成虫幼年蜂中的高度表达表明了化学感受蛋白基因可能与蜜源的搜集等嗅觉活动无关, 而是参与到蜂巢内异常气味分子的识别和清理。最近, 中华蜜蜂化学感受蛋白 *Acer-CSPI* 基因的克隆及表达分析也证明了该类基因在中华蜜蜂排异及抗螨过程中的

调控及功能分析等方面研究中华蜜蜂重要功能基因,揭示其特征行为的分子机理已成为该领域的热点之一。相对于意大利蜜蜂的研究而言,由于中华蜜蜂的基因组并未测序,目前对其研究仍然处于初级阶段,主要集中在功能基因的分离、表达特性的分析及多克隆抗体的制备等方面。近年来,蜂王浆蛋白相关基因、化学通讯相关蛋白基因及抗逆相关基因这三大类基因成为中华蜜蜂功能基因的研究热点。本文就近 5 年来它们在国内外的研究进展作一综述。

1 蜂王浆蛋白相关基因

1.1 王浆主蛋白基因

蜂王浆是由工蜂咽下腺和上鄂腺所分泌的一种具有多种生物活性的物质,同时其营养调控功能也是决定蜜蜂级型分化的关键性因素(Tao *et al.*, 2008)。王浆主蛋白(major royal jelly proteins, MRJPs)是蜂王浆中的主要蛋白,占王浆总蛋白的 82%~90%(苏松坤等, 2005)。至今已发现 MRJPs 蛋白家族共有 9 个成员,它们彼此的分子进化关系也随着意大利蜜蜂基因组的释放而得到解析。由于蜂王浆所具有的抗疲劳、抗氧化等重要的生物学功能及医疗保健作用可能与王浆蛋白有关(沈飞英等, 2007),因此对于王浆主蛋白基因的克隆及功能研究成为蜜蜂学研究的重点。不同类型蜂群之间的蜂王浆蛋白的组成成分不尽相同(Takenaka and Takenaka, 1996),它们在蜜蜂中发挥的作用也不完全一致。

近几年,有关中华蜜蜂蜂王浆主蛋白基因的研究取得了较大进展。自 2004 年,中华蜜蜂 *MRJP1* 基因成功分离后(苏松坤等, 2004),*MRJP2*(沈飞英等, 2007)、*MRJP3*(苏松坤等, 2005)、*MRJP5*(Su *et al.*, 2005)、*MRJP7*(李艳等, 2008)4 种中华蜜蜂王浆主蛋白基因相继被克隆出来,并进行了相应的序列分析。随着分子生物学的发展,中华蜜蜂 MRJPs 基因的研究也逐渐深入到表达调控及功能探索方面。研究表明,中华蜜蜂 *MRJP1* 是王浆主蛋白中含量最丰富的糖蛋白,它能够刺激人体内淋巴细胞的生长,具有抗疲劳、抗氧化等作用(Fang *et al.*, 2010),因此利用细菌或酵母作为生物反应器来大规模生产 *MRJP1* 功能蛋白受到了国内外的重视。张璨文等(2010)从蜜

蜂脑部 cDNA 文库中筛选出 3 个中华蜜蜂 *MRJP1* (*AccMRJP1*) 克隆,并通过 PCR 鉴定确定了其中一个克隆能够获得编码 *AccMRJP1* 的基因全长,随后经原核表达诱导、聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及 Western blot 技术分析证明了 *AccMRJP1* 基因在大肠杆菌中的成功表达,从而为开展 *MRJP1* 的规模性发酵工程提供了技术基础。Tao 等(2008)在其克隆出的 *AccMRJP1* 的基础上,采用重组杆状病毒表达系统将 *MRJP1* 在家蚕中成功表达,从而实现了对中华蜜蜂基因真核表达产物的制备,为王浆主蛋白的研究提供了一种新的思路,同时也为王浆主蛋白的大规模生产奠定了基础。

在中华蜜蜂王浆主蛋白中,MRJP2 及 MRJP3 含量也较高。沈飞英等(2007)首次鉴定出中华蜜蜂 *MRJP2* 基因结构中存在串联重复片段长度多态性(variable numbers of tandem repeat, VNTR),并将该基因的 C-端重复序列与其他 5 种蜜蜂(西方蜜蜂、小蜜蜂、黑小蜜蜂、大蜜蜂、黑大蜜蜂)的 C-端进行比较,结果发现中华蜜蜂与其他蜂种相比存在显著的差异性,其他 5 种蜜蜂不存在 VNTR,这有力的证明了中华蜜蜂存在多态性和特殊性。苏松坤等(2005)同样发现了中华蜜蜂 *MRJP3* 基因存在一段重复区结构并与其他蜂种存在差异性;Albertová 等(2005)对蜜蜂 *MRJP3* 基因的重复区进行了较深入的研究,发现这种重复区的长度与王浆蛋白中的含氮量存在一定的联系,而这种含氮量的增加是由于摄入大量的营养物质所引起的。在王浆主蛋白结构上,中华蜜蜂与其他蜂种存在一定的差异,这意味着它们彼此之间可能具有不同的功能;在王浆主蛋白含量上,中华蜜蜂与其他蜂种相比也不完全一致。Fang 等(2010)利用蛋白质组学的方法对中华蜜蜂与意大利蜜蜂蜂王浆蛋白的产量、蛋白质特性及丰度进行了比较,结果发现中华蜜蜂 5 种主要王浆蛋白(MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4, MEJP5)的水平都要远远的低于意大利蜜蜂。这表明了在蜜蜂早期的营养摄入过程中,相对于中华蜜蜂而言,意大利蜜蜂需要更多的能量去促使幼虫及蜂王发育。当然中华蜜蜂中也存在含量很低的王浆主蛋白,比如 *MRJP7*。它们的含量几乎用蛋白质组学的方法都无法检测到(Fang *et al.*, 2010),但是这些微量的王浆主蛋白的作用同样值得研究。李艳等(2008)通过优化原核表达条件,在大肠杆菌中

成功表达出含量很低的 MRJP7, 同时制备了多克隆抗体, 为 MRJP7 的功能研究打下了基础。

1.2 Apisimin 基因

Apisimin 是王浆蛋白中的另一种成分, 它在蜜蜂整个发育历程中都高度表达, 并且在采集蜂和守卫蜂的头部也具有很高的表达量。因此 Apisimin 作为王浆蛋白的一种新型的丝氨酸和缬氨酸富集肽, 不仅参与到早期营养发育中, 而且还可能涉及到蜜蜂生理发育方面的一些功能 (Bíliková *et al.*, 2002)。有关 Apisimin 作用的功能机制并没有具体明确, 邢丽萍等 (2006) 利用蜜蜂工蜂头部 cDNA 文库筛选, 证明了在中华蜜蜂中 *Apisimin* 是一个高丰度转录基因, 同时成功表达了 *Apisimin* 基因, 为进一步研究中华蜜蜂 *Apisimin* 基因的功能机制奠定了基础。随着分子生物学技术的快速发展, 关于蜂王浆相关基因的研究会逐渐趋向于揭示它们功能的分子机理。

2 化学通讯相关蛋白基因

化学感受机制与昆虫的繁殖与生存行为密切相关。它们利用化学感受系统检测环境中的化学信息并通过嗅觉感器识别外界的气味分子, 从而采取适当的行为, 比如识别配偶或天敌所释放出的挥发性信息素 (Pelosi, 1996; Sánchez-Gracia *et al.*, 2009)。在化学感受机制中, 两类化学通讯蛋白在昆虫感受器外围发挥着重要的作用。其中一类称为气味结合蛋白 (odorant-binding proteins, OBPs), 另一类称为化学感受蛋白 (chemosensory proteins, CSPs), 两者存在于不同的化学感受器的淋巴液内, 执行着各自的生理功能 (Pelosi *et al.*, 2006)。中华蜜蜂与其它蜂种相比, 具有嗅觉灵敏, 善于采集零星的蜜源及抗螨能力强等特点。这种敏锐的嗅觉及特殊的抗螨排异性行为与其发达的化学感受系统密切相关。

2.1 气味结合蛋白类基因

OBP 是一类低分子量的球状水溶性蛋白, 存在于昆虫嗅觉感器内部胞外空间的淋巴液中, 主要在信息素及一般的气味分子的嗅觉识别中发挥着重要作用 (Pelosi *et al.*, 2006)。研究表明, OBP 可以根据其结合配体的类型分为信息素结合蛋白 (pheromone binding protein, PBP) 及普通气味结合蛋白 (general odorant binding protein, GOBP)。其

中 PBPs 主要参与性信息素的识别; 而 GOBP 在雌性昆虫的触角中含量丰富, 参与气味分子的识别 (Steinbrecht *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1998)。近几年, 中华蜜蜂气味结合蛋白类基因已经相继得到克隆, 并且该类基因在不同时空及组织中的分布也基本明确。李红亮等 (2008a, 2008b) 分别克隆了中华蜜蜂信息素结合蛋白基因 (*Ac-ASP1*) 和普通气味结合蛋白基因 (*Ac-ASP2*), 并进行了相应的生物学分析, 结果发现 2 种基因编码的蛋白都存在昆虫气味结合蛋白典型的 6 个保守的半胱氨酸残基特征。利用实时荧光定量 PCR 技术, 不仅发现 *Ac-ASP1* 基因在工蜂的触角中高表达, 还发现该基因存在 2 个高丰度表达时期: 一个是在幼虫、蛹及成虫早期; 另外一个是在成虫 21 日龄前后。同样, *Acer-ASP2* 基因也在触角中特异性表达; 免疫组织化学分析显示 *Acer-ASP2* 主要定位在嗅觉感器的淋巴液中, 比如板型感器和毛型感器上 (Li *et al.*, 2008)。这证明气味结合蛋白在中华蜜蜂内勤蜂及采集蜂的排异和觅食过程中可能发挥着重要作用。

2.2 化学感受蛋白类基因

CSP 是一类酸性小分子蛋白, 其分子量略小于 OBP, 但是它在结构组成、表达模式及功能效应上与 OBP 存在较大的差异。CSP 存在 4 个保守的半胱氨酸残基, 而且与 OBP 特异性表达不同的是, CSP 主要表达在缺乏嗅觉及味觉感器的器官中, 比如头部、胸部和足部等 (Jacqain-Joly *et al.*, 2001; Picimbon *et al.*, 2001)。目前关于 CSP 的功能及作用机制仍然是昆虫学界研究的热点问题。李红亮等 (2007) 从中华蜜蜂工蜂的触角中分离出一种化学感受蛋白, 并命名为 *Ac-ASP3*。免疫组织化学定位显示该类基因主要定位于机械感器如锥形感器中, 而在嗅觉感器中几乎检测不到。这种特殊的定位与 OBP 截然不同, 意味着化学感受蛋白可能不在嗅觉方面直接发挥作用而是参与到触角的机械运动。*Ac-ASP3* 基因在翅和足中的高含量、在触角感器中的低丰度以及在成虫幼年蜂中的高度表达表明了化学感受蛋白基因可能与蜜源的搜集等嗅觉活动无关, 而是参与到蜂巢内异常气味分子的识别和清理。最近, 中华蜜蜂化学感受蛋白 *Acer-CSPI* 基因的克隆及表达分析也证明了该类基因在中华蜜蜂排异及抗螨过程中的

重要性(李红亮等, 2010), 但是 *Acer-CSPI* 基因在触角中的表达量最高, 可能是由于不同化学感受蛋白的功能多样性引起的。

两类化学通讯蛋白在气味分子的感受及识别中发挥着重要作用, 尽管不同的 CSPs 功能各异, 但是它主要参与异味等化学刺激的感受; 而 OBPs 特异的表达在嗅觉感器中, 在气味分子及信息素的嗅觉识别中发挥着作用。2 种化学通讯蛋白基因 *Ac-ASP2* 和 *Ac-ASP3* 的时空表达分析与比较(李红亮等, 2009) 可以潜在的表明这种功能趋向。然而有关中华蜜蜂化学通讯相关蛋白基因仍然需要进行深入的研究, 意大利蜜蜂基因组中存在 21 个编码 OBPs 的基因(Forêt and Maleszka, 2006) 和 6 个编码 CSPs 的基因(Forêt *et al.*, 2007), 因此, 进一步寻找中华蜜蜂其他的 OBPs 和 CSPs 基因, 研究其各自的功能, 对于揭示中华蜜蜂优越的蜜源搜集能力及抗螨排异行为的分子机理具有重要的意义。

3 抗逆相关基因

蜜蜂在长期的进化过程中形成了一套独特的免疫系统并与血细胞一起建立一个完整的防御体系。然而全球温室效应、农药的过度使用、低温、病虫害等逆境条件严重抑制了蜜蜂的生长发育, 引起它们自身免疫系统的变化, 甚至个体死亡。中华蜜蜂具有抗寒耐热、抗螨性强等特点。因此, 开展中华蜜蜂抗逆性基因的研究对于蜜蜂寿命的延长, 提高蜜蜂抗逆能力及早期幼虫成活率具有重要的生物学意义。

3.1 抗氧化相关基因

活性氧(reactive oxygen species, ROS) 是需氧型生物体有氧代谢的一个有毒产物, 它们能够被其自身的抗氧化系统所降解, 也能够被外界环境胁迫所增强, 比如重金属污染、残余的农药及病菌的感染等(Narendra *et al.*, 2007)。过量的 ROS 不仅能够破坏生物体内生物分子的完整性, 比如 DNA 损伤、蛋白质失活及脂质过氧化, 而且能够形成氧化胁迫从而加速生物体的衰老和死亡(Fridell *et al.*, 2005)。研究表明, 机体抗氧化酶系统分为直接和间接抗氧化酶体系, 其中直接的抗氧化酶有 3 种类型: 超氧化物歧化酶(superoxide dismutases, SODs)、过氧化氢酶(catalase, CAT) 和

过氧化物还原酶(peroxidases, PER), 它们主要在清除体内超氧阴离子自由基、羟自由基及过氧化氢的过程中发挥关键作用。间接的抗氧化酶体系包括硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductases, TrxRs), 甲硫氨酸亚砜还原酶 A(methionine sulfoxide reductase A, MsrA) 和甲硫氨酸亚砜还原酶 B(methionine sulfoxide reductase B, MsrB), 它们能够在氧化胁迫下间接的分解 ROS, 减缓氧化胁迫的压力。另外, 昆虫抗氧化体系中除以上所述外还存在三大类编码抗氧化酶的基因家族: 硫氧还蛋白过氧化物酶(thioredoxin peroxidase, TPX)、磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶(phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, PHGTPX) 和谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferases, GXTs)(Corona and Robinson, 2006)。

目前中华蜜蜂抗氧化相关基因的研究主要集中在鉴定抗氧化基因的功能及表达特性方面。Yang 等(2010) 利用同源克隆的方法分离出中华蜜蜂硫氧还蛋白还原酶 1 基因(*AccTrxR1*), 并通过半定量 PCR 技术检测到该基因能够被外界环境胁迫(紫外线及高温) 所诱导, 证明了 TrxRs 类基因在抗氧化胁迫中的重要作用。Wang 等(2010) 克隆出 2 种中华蜜蜂磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶基因(*AccGtpx-1* 和 *AccGtpx-2*), 并比较了 2 种基因在分子结构及表达特性方面的差异。结果发现, *AccGtpx-1* 基因在蜜蜂整个生命过程中都有表达, 而 *AccGtpx-2* 基因只在成虫阶段被检测到; 同时, 研究还发现, *AccGtpx-1* 基因能够被多种非生物胁迫诱导, 比如过氧化氢、重金属、农药等, 而 *AccGtpx-2* 基因只有在紫外光照射下才被诱导。这表明 *AccGtpx-1* 基因在 PHGTPX 家族中对氧化胁迫响应的调节可能起主导作用。Yu 等(2011) 发现中华蜜蜂硫氧还蛋白过氧化物酶基因(*AccTpx*) 在保护蜜蜂免受氧化损伤和延长蜜蜂寿命方面发挥着一定的作用。除了抗氧化酶系统外, 其他基因也可能间接的参与到抗氧化防御中。Meng 等(2010) 发现中华蜜蜂核糖体蛋白 *LI7* 基因(*AccRPL17*) 不仅参与到营养发育中, 还涉及到一定的非生物胁迫响应中。抗氧化基因的活性和基因表达量的高低与蜜蜂的寿命及抗逆性有直接的联系, 进而影响到蜂群的生产性能。目前这类基因在中华蜜蜂的报道并不多见, 因此抗氧化基因的研究成为蜜蜂分子生物学研究的重点。

3.2 抗螨与抗病相关基因

蜂螨病主要包括雅氏瓦螨 (*Varroa jacobsoni* Oud.) 和亮热瓦螨 (*Tropilaelaps clareae*) 是蜜蜂的主要病害,传播性极强,对西方蜜蜂造成巨大的伤害,中华蜜蜂却具有较强的抗螨性。研究者普遍认为中华蜜蜂的高抗螨性主要与其自身的清理行为有关,而其蛹期体内的低含量铜元素及高含量保幼激素Ⅲ也能够使蛹房中的螨虫卵滞育。

当蜜蜂受到外界病原物侵害时,其自身会分泌一些抗生物物质来减缓病害的蔓延,比如蜂蜡和蜂王浆等;而当蜜蜂被病菌感染后,其体内的 4 类抗菌肽基因家族会迅速合成并调控机体的免疫系统。研究发现,东方蜜蜂比西方蜜蜂产生更多的抗菌肽来抵御病原物的侵害 (Xu *et al.*, 2009),这可能也是中华蜜蜂抗螨性强的表现。但是,目前关于抗螨及抗病基因的研究没有系统化,大部分研究者仍然是在蜂螨及营养配料上着手,而对于中华蜜蜂抗螨及抗病基因功能的研究很少。 α -葡萄糖苷酶 (α -glucosidase) 是蜜蜂体内的一种重要的代谢酶,蜜蜂的许多疾病都与它密切相关。樊少华等 (2008) 分离出中华蜜蜂 α -glucosidase 基因,为从分子生物学水平研究中华蜜蜂抗病基因的功能打下基础。蜂王浆菌素是蜂王浆中的一类抗菌肽,Shen 等 (2010a) 发现中华蜜蜂蜂王浆菌素基因 (*Acc-Royalisin*) 纯化后的溶解蛋白对 3 种革兰氏阳性菌都存在抗性。磷脂酶 A_2 (phospholipases A_2 , PLA_2) 是一种脂肪分解酶,在宿主防御中起到重要的作用,具有广泛的药理学功能。Li 等 (2005) 分离出中华蜜蜂 PLA_2 基因,并发现该基因在蛹期及成虫幼年期没有表达;Shen 等 (2010b) 发现重组后的中华蜜蜂 PLA_2 蛋白在 Tn-5B-4 细胞中也能够被糖基化,从而为制药工业中的大规模生产奠定了技术基础。抗逆相关基因的研究必定会成为中华蜜蜂功能基因研究的一大热点。它将与逐渐成熟的转基因技术相结合,从而实现蜜蜂抗逆育种上的重大突破。

4 展望

目前,中华蜜蜂重要生物学特征的功能相关基因相继被克隆出来,其功能也逐步被揭示。但是,与其他蜂种相比,特别是与意大利蜜蜂研究相比较,对中华蜜蜂特定功能基因的了解还十分有限。随着生物技术及分子生物学的日新月异,蜜

蜂转基因技术也进行了不断的更新。现阶段,将转基因技术与基因沉默技术相结合,不仅实现了基因的敲除而且还能将沉默后的性状遗传给下一代。同时,人工繁育技术的成熟也加大了转基因后物种的存活率。这 3 种技术的结合有利于更深入的了解中华蜜蜂重要生物学特征基因的功能及生理机制,特别是抗逆相关基因及发育相关基因的研究。因此,加强并完善中华蜜蜂重要生物学特征相关基因的深入研究,更好的阐明中华蜜蜂特征行为的分子机理,为中华蜜蜂种质遗传改良提供更多有利的功能基因,并结合转基因技术实现蜜蜂抗病育种、抗逆育种及高产育种的重大突破,是今后中华蜜蜂特定功能基因研究的关键。

参考文献 (References)

- 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.
- Břliková K, Hanes J, Nordhoff E, Saenger W, Klaudivny J, Simůth J, 2002. Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization. *FEBS. Lett.*, 528 (1/3) : 125—129.
- Corona M, Robinson GE, 2006. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Mol. Biol.*, 15 (5) :687—701.
- Denison R, Raymond-Delpech V, 2008. Insights into the molecular basis of social behaviour from studies on the honeybee, *Apis mellifera*. *Invert. Neurosci.*, 8 (1) :1—9.
- Fang Y, Feng M, Li JK, 2010. Royal Jelly proteome comparison between *A. mellifera ligustica* and *A. cerana cerana*. *J. Proteome. Res.*, 9 (5) :2207—2215.
- Forêt S, Maleszka R, 2006. Function and evolution of agene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). *Genome. Res.*, 16 (11) :1404—1413.
- Forêt S, Wanner KW, Maleszka R, 2007. Chemosensory proteins in the honey bee: Insights from the annotated genome, comparative analyses and expressional profiling. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37 (1) :19—28.
- Fridell YW, Sánchez-Blanco A, Silvia BA, Helfand SL, 2005. Targeted expression of the human uncoupling protein 2 (hUCP2) to adult neurons extends life span in the fly. *Cell Metab.*, 1 (2) :145—152.

- Jacquain-Joly E, Vogt RG, Francois MC, Naqnan-Le, Meillour P, 2001. Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae*. *Chem. Senses*, 26 (7):833—844.
- Kim MS, Repp A, Smith DP, 1998. LUSH odorant-binding protein mediates chemosensory responses to alcohols in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 150 (2):711—721.
- Li HL, Zhang YL, Gao QK, Cheng JA, Lou BG, 2008. Molecular identification of cDNA, immunolocalization, and expression of a putative odorant-binding protein from an Asian honey bee, *Apis cerana cerana*. *J. Chem. Ecol.*, 34 (12):1593—1601.
- Li JH, Zhang CX, Shen LR, Tang ZH, Cheng JA, 2005. Expression and regulation of phospholipase A2 in venom gland of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*. *Arch. Insect Biochem. physiol.*, 60 (1):1—12.
- Meng F, Zhang L, Kang MJ, Guo XQ, Xu BH, 2010. Molecular characterization, immunohistochemical localization and expression of a ribosomal protein L17 gene from *Apis cerana cerana*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 75 (2):121—138.
- Narendra M, Bhattacharyulu NC, Padmavathi P, Varadacharyulu NC, 2007. Prallethrin induced biochemical changes in erythrocyte membrane and red cell osmotic haemolysis in human volunteers. *Chemosphere*, 67 (6):1065—1071.
- Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvella M, 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cell Mol. Life Sci.*, 63 (14):1658—1676.
- Pelosi P, 1996. Perireceptor events in olfaction. *J. Neurobiol.*, 30 (1):3—19.
- Picimbon JF, Dietrich K, Krieger J, Breer H, 2001. Identity and expression pattern of chemosensory proteins in *Hetiothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31 (12):1173—1181.
- Sánchez-Gracia A, Vieira FG, Rozas J, 2009. Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. *Heredit (Edinb)*, 103 (3):208—216.
- Shen LR, Ding MH, Zhang LW, Jin F, Zhang WG, Li D, 2010a. Expression of Acc-Royalisin gene from royal jelly of Chinese honeybee in *Escherichia coli* and its antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.*, 58 (4):2266—2273.
- Shen LR, Ding MH, Zhang LW, Zhang WG, Liu L, Li D, 2010b. Expression of a bee venom phospholipase A2 from *Apis cerana cerana* in the baculovirus-insect cell. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*, 11 (5):342—349.
- Steinbrecht RA, Laue M, Ziegelberger G, 1995. Immunolocalization of pheromone-binding protein and general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silk moths *Antheraea* and *Bombyx*. *Cell Tissue Res.*, 282 (2):203—217.
- Su SK, Albert S, Chen SL, Zhong BX, 2005. Molecular cloning and analysis of four cDNAs from the heads of *Apis cerana cerana* nurse honeybees coding for major royal jelly proteins. *Apidologie*, 36 (3):389—401.
- Takenaka T, Takenaka Y, 1996. Royal jelly from *Apis cerana japonica* and *Apis mellifera*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60 (3):518—520.
- Tao T, Su SK, Miao YG, Yue WF, Du HH, Chen SL, Liu F, Zhan Y, 2008. Expression of apalbumin1 of *Apis cerana cerana* in the larvae of silkworm, *Bombyx mori*. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (20):9464—9468.
- Wang M, Kang MJ, Guo XQ, Xu BH, 2010. Identification and characterization of two phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase genes from *Apis cerana cerana*. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.*, 152 (1):75—83.
- Williams DL, 2000. A veterinary approach to the European honey bee (*Apis mellifera*). *Vet. J.*, 160 (1):61—73.
- Xu P, Shi M, Chen XX, 2009. Antimicrobial peptide evolution in the Asiatic honey bee *Apis cerana*. *PLoS ONE*, 4 (1):e4239.
- Yang HF, Kang MJ, Guo XQ, Xu BH, 2010. Cloning, structural features, and expression analysis of the gene encoding thioredoxin reductase 1 from *Apis cerana cerana*. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, 156 (3):229—236.
- Yu FF, Kang MJ, Meng F, Guo XQ, Xu BH, 2011. Molecular cloning and characterization of a thioredoxin peroxidase gene from *Apis cerana cerana*. *Insect Mol. Biol.*, 20 (3):367—378.
- 樊少华, 张子峰, 陆军, 吴冬梅, 单群, 胡斌, 郑元林, 缪晓青, 2008. 中华蜜蜂 α -葡萄糖苷酶基因片段的克隆与序列分析. *江苏农业科学*, (4):67—69.
- 李红亮, 高其康, 程家安, 2008a. 中华蜜蜂信息素结合蛋白 ASPI cDNA 的克隆及时空表达. *昆虫学报*, 51 (7):689—693.
- 李红亮, 楼兵干, 程家安, 高其康, 2007. 中华蜜蜂化学感受蛋白 cDNA 克隆、定位及其表达. *科学通报*, 52 (10):1355—1364.
- 李红亮, 倪翠侠, 姚瑞, 高其康, 商晗武, 2010. 中华蜜蜂化学感受蛋白基因 *Acer-CSPI* 克隆与表达特性分析. *昆虫学报*, 53 (9):962—968.

- 李红亮, 聂文敏, 高其康, 程家安, 2008b. 中华蜜蜂气味结合蛋白 ASP2 cDNA 的克隆及原核表达. 中国农业科学, 41(3):933—938.
- 李红亮, 王海燕, 高其康, 程家安, 2009. 中华蜜蜂两种化学通讯相关蛋白基因时空表达分析. 农业生物技术学报, 17(1):73—77.
- 李艳, 陈艳霞, 沈立荣, 张传溪, 2008. 中华蜜蜂 MRJP7 基因的原核表达及多克隆抗体的制备. 上海交通大学学报(农业科学版), 26(2):109—113.
- 沈飞英, Albert S, 苏松坤, 楼程富, 钟伯雄, 戎映君, 陈盛禄, 2007. 蜜蜂属六蜂种间 MRJP2 基因 C-端重复序列的比较分析. 昆虫学报, 50(10):1049—1056.
- 苏松坤, 陈盛禄, 钟伯雄, Albert S, 2004. 中华蜜蜂 *mrjp1* cDNA 的克隆及其序列分析. 遗传学报, 31(11):1248—1253.
- 苏松坤, 陈盛禄, 钟伯雄, 郑火青, Albert S, 2005. 中华蜜蜂 *mrjp3* 基因 cDNA 的克隆及序列分析. 中国农业科学, 38(3):612—618.
- 邢丽苹, 沈立荣, 乌晓云, 施婉君, 高其康, 程家安, 张传溪, 2006. 中华蜜蜂王浆多肽 *Apisimin* 基因转录、克隆与表达研究. 上海交通大学学报(农业科学版), 24(5):460—464.
- 张璨文, 丁美会, 张伟光, 金凤, 沈立荣, 2010. 中华蜜蜂 *AccMRJP1* 基因克隆及在大肠杆菌中的表达. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 36(2):119—124.