

中华蜜蜂 *foraging* 基因 *Acfor* 的克隆与发育差异表达*

马卫华^{1,2**} 邵有全¹ 赵慧婷³ 孟 娇² 田嵩浩⁴ 杜亚丽² 姜玉锁^{2***}

(1. 山西农业科学院园艺研究所, 太原 030031; 2. 山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801;

3. 山西农业大学生命科学学院, 太谷 030801; 4. 山西医科大学汾阳医学院, 汾阳 032200)

摘 要 【目的】本研究克隆了中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* Fabricius *foraging* (*Acfor*) 基因, 并对其进行了序列和基因表达分析, 为研究该基因参与蜜蜂劳动分工的分子机理及蜜蜂采集行为调控奠定基础。

【方法】利用 RT-PCR 技术扩增和克隆获得 *Acfor* 的全长序列, 采用生物信息学软件对其蛋白进行结构特点分析; 采用 qRT-PCR 对 *Acfor* 基因的表达特性进行分析; 环鸟苷酸依赖的蛋白激酶 (PKG) 活性采用比色法检测。【结果】*Acfor* cDNA 全长为 3 029 bp (GenBank 登录号为, KP662686.1), ORF 序列长度为 2

169 bp, 编码 722 个氨基酸。预测该蛋白分子量为 81.80 ku, 理论等电点 (PI) 5.50, 为酸性、稳定的、亲水性蛋白, 无信号肽和跨膜结构, 存在 2 个糖基化位点和 38 个潜在磷酸化位点, 主要分布在细胞质中; 二级结构中, 有卷曲环、 α -螺旋和伸展链 3 种结构, 三者比例分别为 57.06%、28.12%和 14.82%; 系统发育树结果显示, 中华蜜蜂 *Acfor* 和其它膜翅目 *for* 组成了一个大的分支, 分支由 7 个亚支构成, *Acfor* 与 *Amfor* 分子距离最近。不同日龄工蜂 *Acfor* mRNA 的表达和 PKG 活性的趋势一致, 1~30 日龄均有表达和 PKG 活性, 1~10 日龄表达量和活性下降, 10 日龄后开始上升, 25 日龄表达量和活性最高, 然后随着日龄的增加而下降。【结论】可见, *Acfor* 基因表达和 PKG 活性水平影响中华蜜蜂与日龄有关的采集行为。

关键词 中华蜜蜂, *foraging*, 基因克隆, 发育表达模式, PKG 活性

Cloning and expression analysis of the foraging gene in the Chinese honeybee (*Apis cerana cerana* Fabricius)

MA Wei-Hua^{1,2**} SHAO You-Quan¹ ZHAO Hui-Ting³ MENG Jiao²
TIAN Song-Hao⁴ DU Ya-Li² JIANG Yu-Suo^{2***}

(1. Institute of Horticulture, Shanxi Academy of Agricultural Science, Taiyuan 030031, China; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 3. College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 4. Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China)

Abstract 【Objectives】To lay a foundation for studying the molecular mechanisms by which bee genes regulate the division of labor and foraging behavior. 【Methods】The cDNA sequence of *Acfor* from the brain of *Apis cerana cerana* Fabricius was cloned using the Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and its protein structure analyzed using bioinformatics software. A quantitative analysis of its expression in worker bees on successive days was conducted by the quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The activity of cGMP-dependent protein kinase (PKG) was quantified with the colorimetric method. 【Results】The results show that the full-length cDNA sequence of *Acfor* is 3 029 bp (GeneBank accession no.KP662686.1), including an open reading frame (ORF) of 2 169 bp that encodes 722 amino acids. The molecular weight and predicted isoelectric point of this protein are 81.80 ku and 5.50, respectively. The protein is water-soluble, acidic

*资助项目 Supported projects: 农业部公益性行业科研专项“蜜蜂授粉增产技术集成与示范”(201203080); 国家自然科学基金项目(31272513); 山西省科技攻关项目(20130311006-5); 农业技术试验示范(种植业)(2015-J179)

**第一作者 First author, E-mail: mawh1997@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: jiangys-001@163.com

收稿日期 Received: 2016-07-04, 接受日期 Accepted: 2016-08-09

and stable, has no signal peptide or transmembrane domain, and has 2 glycosylation sites and 39 phosphorylation sites that may be located in the cytoplasm. The predicted secondary structure shows that *Acfor* protein is comprised of 57.06% random coil, 28.12% alpha helix and 14.82% extended strand. Phylogenetic analysis indicates that *Acfor* of *A.c.cerana* is in the same clade as similar proteins of other Hymenopteran insects. This clade has seven sub-branches, and the protein with the closest molecular distance to *Acfor* is *Amfor*. *Acfor* transcript expression and PKG activity were detected in the heads of workers of different ages. Temporal trends of *Acfor* mRNA expression and PKG activity were similar. Gene expression and PKG activity decreased from day 1 to 10, and begin to rise after day 10, remaining at peak levels until day 25 after which they declined with increasing age. **[Conclusion]** *Acfor* expression and PKG activity levels affect *A. c. cerana* age-related foraging behavior.

Key words Chinese honeybee, *foraging gene*, cloning, development expression pattern, PKG activity

蜜蜂的采集行为是一个复杂的活动过程, 涉及到蜜蜂的学习记忆、信息传递、能量代谢等 (Robinson, 2002; Page *et al.*, 2006; 李莉等, 2012), 同时也是为植物传粉的过程, 因此研究蜜蜂采集行为的分子机制, 不仅利于蜜蜂的理论研究的发展, 还利于人类食物和生态系统的研究。采集基因是影响工蜂采集行为转变, 即工蜂由巢内活动转向巢外活动的遗传因素 (Ben-Shahar *et al.*, 2002, 2003; Robinson, 2002; Page *et al.*, 2006; Heylen *et al.*, 2008; 李莉等, 2012)。目前认为 *foraging* 基因 (*for*) 是与蜜蜂工蜂由内勤蜂转变到采集蜂关系密切的基因之一 (Whitfield *et al.*, 2003)。中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* Fabricius (简称中蜂) 作为重要传粉昆虫之一, 具有耐低温、采集勤奋、善于利用零星蜜源植物等优点, 对作物的授粉和野生植被的繁衍、生物多样性具有重要意义。*for* 基因最早是在果蝇的 “sitter” 和 “rover” 突变体中发现的, 编码 cGMP 依赖的蛋白激酶 (PKG), 影响果蝇的觅食行为 (Osborne *et al.*, 1997)。西方蜜蜂 *for* 基因 (*Amfor*) 与果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 *for* 基因 (*Dmfor*) 有同源性 (87%相似), 所不同的是, 蜜蜂的采集行为比较复杂, 蜂群中存在着劳动分工。Ben-Shahar 等发现蜜蜂社会分工是受 *Amfor* 调控 (Ben-Shahar *et al.*, 2002)。Hunt、Page、Ruppell 等采用 QTL 研究了蜜蜂不同的采集行为, 包括采集花蜜的浓度、带回花粉和花蜜数量、贮存花粉的功能基因和首次采集的日龄, 结果显示, 蜜蜂采集行为遗传体系的复杂性, 支持了 *pln1*、*pln2*、*pln3*, *Amfor* 这 4 个基因影响蜜蜂采集行为规律的假设 (Hunt *et al.*, 1995;

Page *et al.*, 2000; Ruppell *et al.*, 2004; Rueppell, 2009)。Heylen 等 (2008) 采用 qRT-PCR 技术对 *for* 基因在西方蜜蜂不同日龄的表达特性进行了研究, 发现 18~22 日龄蜜蜂的表达量最高。目前有关蜜蜂采集基因 *for* 的研究主要集中在西方蜜蜂上, 对中华蜜蜂 *for* 基因的研究尚未见报道。本文以中华蜜蜂工蜂为研究对象, 对中华蜜蜂 *for* cDNA 序列进行了克隆和序列分析, 并对不同发育阶段工蜂采集基因 *for* 的表达特性以及 PKG 活性进行比较分析, 以期为进一步研究该基因的功能奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试虫

供试中华蜜蜂样本采自山西农业大学动物科技学院实验蜂场。从健康无病、群势强壮、无自然分蜂倾向的蜂群中, 随机提取工蜂 20 只, 带回实验室, 用眼科镊子取下头部, 立即投入无水乙醇中, -80°C 保存, 用于序列的扩增。

选取 5 个壮群, 分别加入 1 张空脾, 于蜂王产卵、工蜂即将羽化出房的前一天取出, 放入恒温恒湿箱内, 待其羽化出房后, 用无毒无味的颜料进行标记, 标记完毕后再将其放回原巢中。从刚羽化出房的蜜蜂开始取样, 记为 1 日龄, 以后每隔 5 d 取一次样, 每次取 60 只, 直至看不到被标记的蜜蜂, 取样结束。每次将采样得到的活体蜜蜂立即带回实验室, 用眼科镊将其头部完整取下, 其中 15 只, 平均分成 3 份, 迅速投入液氮中, 在研钵中加液氮研磨至粉状, 加入装有 1 mL Trizol 的 EP 管中, -80°C 保存, 用于荧光定量

检测；另 45 只，平均分成 3 份，加液氮研磨，用于 PKG 活性检测。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 反转录合成 从 - 80 °C 冰箱中取出研磨好的样品，按照 Trizol 试剂盒 (Takara 公司) 说明书提取头部总 RNA，要求 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8~2.0 之间，测定浓度和纯度合格后进行反转录；按照 PrimeScript™ RT

Master Mix 试剂盒 (Takara 公司) 说明书进行反转录，得到 cDNA 模板，放入 - 20 °C 备用。其中随机抓取的工蜂 cDNA 模板用于 RT-PCR；不同日龄的 cDNA 模板用于 qRT-PCR。

1.2.2 引物的设计 根据 GenBank 中已公布的西方蜜蜂 *Amfor* (AF469010.1) 的 mRNA 序列，采用 Primer 3.0 plus 在线软件和 prime 5.0 软件，在两个基因的 CDS 区内和非编码区内设计引物，交由北京六合华大基因公司合成，引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primers used in this study

引物用途 Description	引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5'-3')
CDS 区的克隆 Cloning of coding sequence	f1	F:TTCGGGTTGAATGGACGAGGGTA R:TTGAACCAGCCGAGAAGGAACAG
	f2	F:GCTGCAGGAGTTGCTGCGTG R:GCCTGCCGTGAAAGGCCAGT
	f3	F:CCTGTTCTTCTCGGCTGGTT R:GGTATTGTCGCTCTATTCTCCC
	f4	F:GCAGAGGACAAGTCCGCGTCA R:TTCAGGCGTGCCGAGAAGG
	f5	F:TGGTGGCGAGATTGACCG R:ACTCGCGGCATFATCGGAGG
	5'	F:GTGATTCATTCTGCGAAACCG R:CTGATGGAAGCCTGTCTTGGT
实时荧光定量 PCR qRT-PCR	f6	F:TCACGGTCTATCACCAGGCAAC R:TCAGGACTCTAAGCAAGGGCGA
	18S rRNA	F:CCCGTAATCGGAATGAGTACACTTT R:ACGCTATTGGAGCTGGAATTACC

1.2.3 cDNA 片段扩增 RT-PCR 反应条件：RT 反应条件：50 °C 30 min，RTase 失活：94 °C 2 min。

PCR 扩增条件：94 °C 30 s，35 cycles，62 °C 30 s，延伸：72 °C 8 min。

反应结束后，取 PCR 产物 (5~10 μL) 进行琼脂糖凝胶电泳检测，按照胶回收试剂盒说明书的操作进行切胶回收，然后与 pGM-T 连接，转化到 DH5α 感受态细胞中，经蓝白斑筛选和菌液 PCR 检测后，挑取阳性克隆进行双向测序。

目的基因 cDNA 5'端 RACE 由自行设计的引物扩增获得，由北京六合华大基因公司测序、鉴定；3'端 RACE 的测序、鉴定由大连宝生物有限公司完成。

1.2.4 序列分析 利用 DNAMAN 软件对测序结果进行拼接，获得目的基因 cDNA 的全长序

列。采用 NCBI 中的 BLAST，将测序所得序列进行同源序列比对。通过 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 在线软件找到 cDNA 序列的起始与终止密码子。

采用 protparam 软件 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)、NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)、NetPhos2.0 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)、SignalP 4.1 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、Predictprotein (<https://www.predictprotein.org/home>) 和 DNAMAN (<https://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)、Target P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 和 PSORT II Prediction (<http://psort.hgc.jp/form.ht-ml>) 在线软件分别对目的蛋白的理化性质、信号肽、糖基化位点、磷酸化位点、跨

膜区、二级结构和亚细胞定位进行分析。

利用 DNAMAN 软件中的蛋白翻译程序得到编码的氨基酸序列。通过 BLAST 方法在 NCBI 中搜索同源序列, 然后利用 Megalign 软件中 Clustal W 进行氨基酸多重序列比较。利用 Mega 4.0 软件中的 Neighborjoining (NJ) 法构建系统发育树。

1.2.5 差异表达 参照 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒说明书, 对其反应条件进行优化, qRT-PCR 反应体系为 (20 μL): cDNA 模版 2 μL, SYBR Premix Ex Taq™ II (2×) 10 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各为 0.8 μL, ROX Reference Dye II (50×) 0.4 μL, ddH₂O 6 μL。qRT-PCR 扩增条件为: 95℃ 预变性 30 s; 循环条件 95℃ 5 s, 63℃ 25 s, 45 个循环反应。每个样本技术重复 3 次。

1.2.6 PKG 活性 PKG 活性测定严格按照激酶总活性检测试剂盒 (上海杰美基因医药科技有限公司, 产品编号 GMS50180.2) 说明书操作, 经研磨、蛋白提取、加酶促液、加样、孵育、加底物液显色后终止反应。在波长 340 nm 的酶标仪上读取各孔的 OD 值; 以 OD 值为纵坐标, 以标准品的浓度为横坐标, 绘制曲线图; 根据样品的 OD 值查找对应的浓度范围。

1.2.7 数据统计与分析 以 18s rRNA 为校正参数, 以 20 日龄工蜂 *Acfor* 的 ΔCT 均值作为各自相对定量的基准, 利用 MXPro-MX3000P 软件 (Stratagene, 美国), 根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分析法 (Livak and Schmittgen, 2001), 对实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 结果进行计算和分析。

利用 Graphpad Prism5 软件进行方差分析, 所有数据均以平均值±标准差 (Mean±SD) 表示, Turkey 进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 全长 cDNA 序列及氨基酸序列结构分析

利用 5 对设计的引物 (f1~f5) 分别对目的基因进行克隆、扩增 (图 1) 获得目的基因的 cDNA 全长序列, 通过与西方蜜蜂相应基因 (AF469010.1) 核苷酸序列比对, 一致性达 100%, 确定克隆得到的为中华蜜蜂 *Foraging* 基因的 cDNA 序列, 将该序列命名为 *Acfor*, GenBank 登

录号: KP662686.1。 *Acfor* 基因 cDNA 全长为 3 029 bp, 包含有 ORF 2 169 bp, 5'-UTR 37 bp 和 3'-UTR 823 bp (图 2), 编码区序列 (Coding sequence, CDS) 编码 722 个氨基酸。

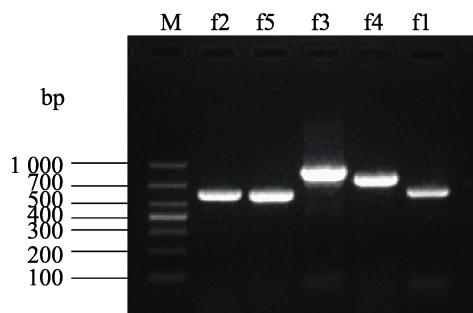


图 1 *Acfor* 基因 CDS 区扩增产物

Fig. 1 PCR products of CDS sequence of *Acfor* gene

M: DL1 000 marker. f1~f5: 为相应引物 f1~f5 的扩增产物。

M: DL1 000 marker. f1~f5: Amplified products with the corresponding primers f1~f5.

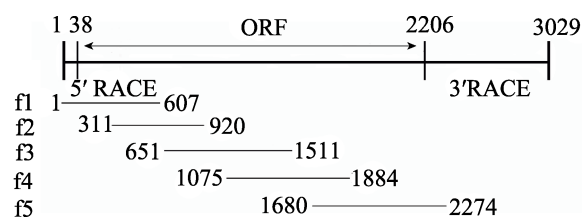


图 2 *Acfor* 基因的扩增产物拼接示意图

Fig. 2 Splicing schematic diagram of amplification products of *Acfor* gene

f1~f5: 分别代表相应引物的扩增片段在 *Acfor* cDNA 中的位置。

f1~f5: The position of amplification fragments of the corresponding primers in *Acfor* cDNA.

2.2 中华蜜蜂 *Acfor* 编码蛋白特性分析

2.2.1 蛋白的基本理化性质 *Acfor* 的蛋白质分子量为 81.80 ku, 理论等电点 (PI) 5.50; 在 20 种常见氨基酸中, 色氨酸 (Trp) 含量最低, 为 1.0%; 亮氨酸 (Leu) 含量最高, 为 10.0%, 未发现特殊的吡咯赖氨酸 (Pyl) 和硒代半胱氨酸 (Sec); 不稳定系数 40.16, 脂溶指数 87.40, 平均疏水系数 -0.345。 *Acfor* 蛋白的水性分析, 发现达 -2 以下的亲水峰有 11 处, 平均得分小于零, 表明该蛋白亲水性表现更强。

2.2.2 糖基化和磷酸化位点 通过对糖基化和

磷酸化位点的预测,结果显示 Acfor 存在 2 个糖基化位点,均属于 N-糖基化位点,分别在第 45 和 693 氨基酸;有 38 个磷酸化位点,分别为 14 个丝氨酸 (Ser^{24, 44, 91, 122, 139, 142, 337, 380, 381, 435, 459, 633, 707, 716}), 12 个苏氨酸 (Thr^{57, 107, 134, 232, 321, 327, 387, 478, 516, 568, 682, 698}) 和 12 个酪氨酸 (Tyr^{208, 264, 294, 299, 332, 484, 525, 533, 548, 575, 592, 656})。

2.2.3 结构分析 利用在线 SignalP4.0Server 软件分析发现 Acfor 蛋白不存在信号肽和跨膜结构。Target P 和 PSORT II Prediction 通过亚细胞定位预测,结果显示 Acfor 蛋白主要分布在细胞质上,在线粒体、细胞核、细胞外和过氧化物酶体中也有分布。

利用 DNAMAN 和 Predictprotein 软件分析,发现 Acfor 蛋白的二级结构中,卷曲环 (约 57.06%) 占主导地位,其次为 α -螺旋 (约 28.12%),伸展链的数量较少 (14.82%)。使用 SWISS-MODEL 在线工具预测 Acfor 蛋白三级结构,以 Plasmodium falciparum 恶性疟原虫 PKG 为模板,对 Acfor 进行同源模建,结果如图 3。

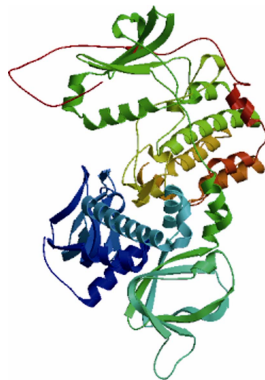


图 3 Acfor 蛋白的三级结构

Fig. 3 The tertiary structure of Acfor protein

2.3 Acfor 蛋白序列比对与进化分析

利用 Protein Blast 同源性搜索工具在 NCBI 数据库中分别找到与 Acfor 基因有同源性的膜翅目其它昆虫的氨基酸序列,在 Acfor 的氨基酸多序列比对结果基础上进行了两两序列间的相似性分析,结果显示 Acfor 基因与其它膜翅目昆虫 for 直向同源基因氨基酸序列有较高的相似度 (>84%),其中与西方蜜蜂的相似性最高,为

100%;与胡蜂的相似性最低,为 84%,与红光熊蜂、欧洲熊蜂、小蜜蜂、大蜜蜂、切叶蜂、蝇蛹金小蜂和大头蚁的相似度分别为 99%、99%、99%、92%、97%、86%和 87%。

为了进一步分析 Acfor 蛋白在不同物种之间的进化关系,利用 MEGA4 软件以果蝇 Dmfor (*Drosophila melanogaster* ACO44430.1)作为外群构建系统进化树。通过对克隆获得到的 Acfor 蛋白和下载的其它同源蛋白进行聚类 (图 4),结果发现,膜翅目组成了一个大的分支,分支由 7 个亚支构成。中华蜜蜂 Acfor 蛋白与西方蜜蜂 Amfor 聚在一起,分子距离最近,其次与红光熊蜂、短舌熊蜂和切叶蜂分子距离较近。

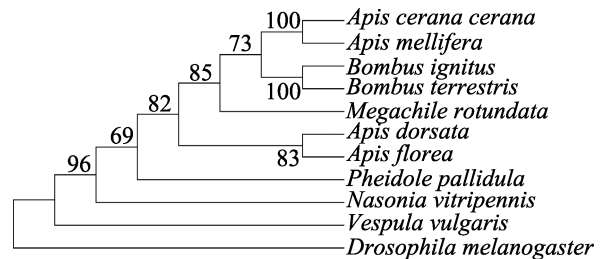


图 4 Acfor 及其它膜翅目昆虫同源蛋白的系统进化分析

Fig. 4 Phylogenetic evolutionary analyses of Acfor with their homologous proteins from other Hymenoptera species

Apis cerana cerana: 中华蜜蜂 (AKM12346.1); *Apis dorsata*: 大蜜蜂 (XP_006614548.1); *Apis florea*: 小蜜蜂 (XP_003694572.1); *Apis mellifera*: 西方蜜蜂 (AGT42008.1); *Bombus ignites*: 红光熊蜂 (BAH29963.1); *Bombus terrestris*: 欧洲熊蜂 (ACS36224.1); *Megachile rotundata*: 苜蓿切叶蜂 (XP_003704405.2); *Nasonia vitripennis*: 蝇蛹金小蜂 (XP_001603549.2); *Pheidole pallidula*: 大头蚁 (ABW22623.1); *Vespula vulgaris*: 胡蜂 (ABL74445.1); *Drosophila melanogaster*: 黑腹果蝇 (ACO44430.1)。

2.4 Acfor mRNA 定量表达

Acfor mRNA 在工蜂不同日龄中的表达结果见图 5, Acfor mRNA 在不同日龄中均有表达,但表达量有所不同。在工蜂 1 日龄表达丰度较高,随后下降,到 10 日龄达到最低点;然后上升,直到 25 日龄表达丰度达到最高峰,然后下

降。其中 25 日龄表达量、10 日龄分别与其它日龄的表达量存在显著差异 ($P \leq 0.05$)。

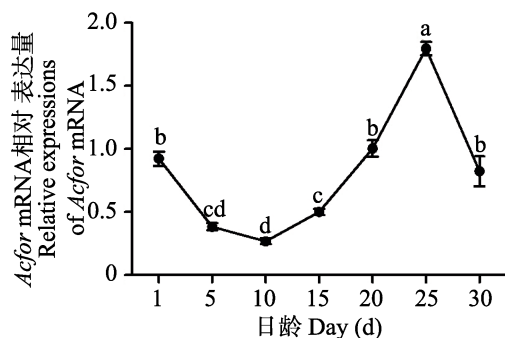


图 5 工蜂不同发育阶段 *Acfor* mRNA 的表达量
Fig. 5 Relative expressions of *Acfor* mRNA in different growth stages of worker

数据均以平均值±标准差表示。不同小写字母表示不同日龄在 0.05 水平差异显著。下图同。

Data are mean±SD, and followed by different lowercase letters indicate significantly different at 0.05 level. The same below.

2.5 PKG 活性

采用 PKG 激酶总活性测定试剂盒对不同日龄工蜂的 PKG 活性进行检测, 结果显示 1~30 日龄 PKG 均有活性, 1~10 日龄活性下降, 10 日龄活性最低, 10 日龄后开始上升, 25 日龄活性达到最高, 然后随着日龄的增加而下降 (图 6)。

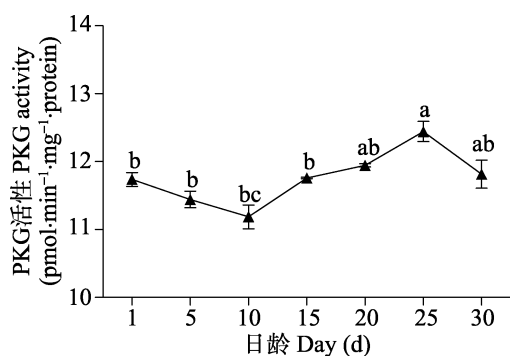


图 6 工蜂不同发育阶段的 PKG 活性
Fig. 6 PKG activity of different growth stages of worker

3 讨论

蜜蜂的采集行为对蜂群的生存和繁衍起着非常重要的作用, 同时在作物的授粉中也扮演者重要角色, 因此蜂群内从哺育蜂到采集蜂转变的这种

行为机制也成为了学者的研究热点 (Robinson, 1992; Hunt *et al.*, 1995; Fewell and Page, 2000; Page *et al.*, 2000, 2006; Ben-Shahar *et al.*, 2003; Ruppell *et al.*, 2004; Ben-Shahar, 2005; Chapman *et al.*, 2007; Heylen *et al.*, 2008; Lattorff and Moritz, 2013; 刘芳等, 2015)。Ben-Shahar 等 (2002) 提出采集基因 *for* 是工蜂采集行为转变的遗传因素, 并对西方蜜蜂采集基因进行了相关研究, 而东方蜜蜂的亚种中华蜜蜂的相关研究未见报道。本文通过克隆获得了中华蜜蜂工蜂 *Acfor* 基因的全长序列, 并对蛋白序列进行了生物信息学分析, 同时对不同日龄工蜂的差异表达进行分析, 从而为了解中华蜜蜂采集行为相关机制提供理论数据。

Acfor 蛋白信号肽、跨膜结构和亚细胞定位预测结果发现 *Acfor* 既不是膜蛋白也不是分泌蛋白, 主要分布在细胞质上, 在线粒体、细胞核、细胞外和过氧化物酶体中也有分布, 果蝇中 *for* 蛋白也是定位在细胞质上 (<http://www.sdbonline.org/sites/fly/hjmuller/foraging1.htm>)。此蛋白存在 38 个潜在的磷酸化位点, 在真核生物中, 磷酸化主要发生于酪氨酸、苏氨酸和丝氨酸等氨基酸残基, 这些磷酸化位点可能成为蛋白激酶和磷酸酶的修饰位点, 从而对 *Acfor* 基因进行调控。

序列同源比对和进化分析结果显示, *Acfor* 蛋白与其它膜翅目昆虫具有较高的相似性, 相似度大于 84%, 表明 *for* 在膜翅目昆虫中是保守的。另外与双翅目昆虫果蝇 *for* 的序列相似度为 75%, 表明 *for* 进化缓慢, 功能稳定 (Scheiner *et al.*, 2004)。采用 Mega 4.0 软件中的 Neighborjoining (NJ) 法构建的 *Acfor* 序列系统进化树, 发现 *Acfor* 与其它膜翅目昆虫组成了一个大的分支, 此分支由 7 个亚支构成; *Acfor* 和 *Amfor*、*Mrfor* 亲缘关系较近, 并与它们的直向同源基因组成了另一分支, 验证了 *for* 在跨物种间的高度保守性 (Smith *et al.*, 2008; Bloch and Grozinger, 2011)。

中华蜜蜂工蜂不同日龄 *Acfor* mRNA 表达量结果显示, *Acfor* mRNA 在采集阶段的 25 日龄表达量最高, 在 5~15 日龄表达量较低。Heylen 等 (2008)。对不同日龄西方蜜蜂进行了 qRT-PCR,

发现 18~22 日龄工蜂的表达量最高,并且发现 4 组高峰期不一致,认为可能是不同蜂群的需求不一样造成的。这也与本研究的结果存在差异,这可能与外界环境和蜂群需要有关。但与红光熊蜂、胡蜂的表达情况相反,内勤蜂的表达量高于采集蜂,这可能与红光熊蜂、胡蜂属于亚社会性的生活习性有关;此外,红光熊蜂的劳动分工还可能与其体长大小有关 (Tobback *et al.*, 2008; Kodaira *et al.*, 2009)。在蚂蚁中,蚂蚁的种类不同,觅食基因的表达也有所不同,甚至相反 (Ingram *et al.*, 2011)。这表明虽然行为相似和基因路径是保守的,但这些路径的调控是不一样的,也就造成了同一觅食基因在不同昆虫间的行为表现大不相同。本研究结果中,中华蜜蜂工蜂不同日龄采集基因 *Acfor* 的表达谱中 1 日龄的表达丰度高于 5 日龄、10 日龄,这可能由于蜜蜂出房前与出房后光线强度有很大的变化而造成表达的差异。有文献报道西方蜜蜂的采集行为与趋光性有关,认为趋光性正调控蜜蜂的采集行为, *for* 表达上调影响劳动分工,部分是有趋光性引起的 (Ben-Shahar *et al.*, 2003)。

for 基因编码 cGMP 依赖的蛋白激酶 G (Protein kinase G, PKG), 属于丝氨酸/苏氨酸激酶家属成员之一,具有调节血小板功能、精子细胞代谢、细胞分裂、核酸合成、一氧化氮反应等功能。本文采用 GENMED 组织 PKG 激酶总活性比色法定量检测 PKG 活性,这种方法是通过多肽底物受到 PKG 磷酸化后,由丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶连续循环反应系统,产生 ADP 过程中,伴随的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 的氧化反应,即采用比色法测定其氧化后峰值的变化,从而分析组织裂解样品中 PKG 总活性的权威而经典的技术方法,具有操作简捷,性能稳定,高度敏感的优点。本研究 PKG 活性检测结果显示,10 日龄后随日龄增加而活性增加,25 日龄达到高峰,然后下降,PKG 活性 1 日龄高于 5 日龄和 10 日龄,25 日龄活性最高,然后随着日龄的增加而下降,PKG 活性与 *Acfor* mRNA 表达量的趋势一致。这与 Ben-Shahar 等 (2003) 用 cGMP 处理,可以增加蜜蜂 PKG 活

性和提前采集,蜜蜂脑中 *Amfor* 表达量上调结果相吻合。果蝇和蜜蜂的觅食都与 *for* 有关,PKG 活性也在脊椎和无脊椎动物的摄食中扮演重要角色,这表明了 *for* 在系统进化过程中对蜜蜂觅食的调控上是保守的,这与上述对其序列同源比对和进化分析结果是一致的。

蜜蜂的采集行为是一个复杂的劳动过程,除了受到 *Acfor* 基因的调控,受到环境、蜂群需要、其它基因等多方面的影响,还需要更加深入的研究。

参考文献 (References)

- Ben-Shahar Y, Robichon A, Sokolowski MB, Robinson GE, 2002. Influence of gene action across different time scales on behavior. *Science*, 296 (5568): 741–744.
- Ben-Shahar Y, Leung HT, Pak WL, Sokolowski MB, Robinson GE, 2003. cGMP-dependent changes in phototaxis: a possible role for the foraging gene in honey bee division of labor. *J. Exp. Biol.*, 206 (14): 2507–2515.
- Ben-Shahar Y, 2005. The foraging gene, behavioral plasticity, and honeybee division of labor. *J. Comp. Physiol. A*, 191(11): 987–994.
- Bloch G, Grozinger CM, 2011. Social molecular pathways and the evolution of bee societies. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 366(1574): 2155–2170.
- Chapman NC, Oldroyd BP, Hughes WOH, 2007. Differential responses of honeybee (*Apis mellifera*) patrines to changes in stimuli for the generalist tasks of nursing and foraging. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 61(8): 1185–1194.
- Fewell J, Page JrRE, 2000. Colony-level selection effects on individual and colony foraging task performance in honeybees, *Apis mellifera* L. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 48(3): 173–181.
- Heylen K, Gobin B, Billen B, Hua TT, Arcsens L, Huybrechts R, 2008. *Amfor* expression in the honeybee brain: A trigger mechanism for nurse–forager transition. *J. Insect Physiol.*, 54 (10/11): 1400–1403.
- Hunt GJ, Page JrRE, Fondrk MK, Dullum CJ, 1995. Major quantitative trait loci affecting honeybee foraging behavior. *Genetics*, 141 (4): 1537–1545.
- Ingram KK, Kleeman L, Peteru S, 2011. Differential regulation of the foraging gene associated with task behaviors in harvester ants. *BMC Ecol.*, 11 (1): 19.
- Kodaira Y, Ohtsuki H, Yokoyama J, Kawata M, 2009. Size-dependent foraging gene expression and behavioral caste differentiation in *Bombus ignitus*. *BMC Res. Notes*, 2 (1): 184–189.
- Lattorff HMG, Moritz RFA, 2013. Genetic underpinnings of division of labor in the honeybee (*Apis mellifera*). *Trends Genet.*, 29(11):

- 641–648.
- Li L, Liu F, Li WF, Su SK, 2012. Characterization and mechanism of honeybee foraging behavior. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(5): 1354–1359. [李莉, 刘芳, 李文峰, 苏松坤, 2012. 蜜蜂采集及其信息传递的行为机制研究进展. 应用昆虫学报, 49(5): 1354–1359.]
- Liu F, Zong C, Yu LS, Su SK, 2015. Analysis of differentially expressed genes associated with the behavioral transition between nurses and foragers in *Apis mellifera ligustica*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(2): 300–307. [刘芳, 宗超, 余林生, 苏松坤, 2015. 意大利蜜蜂哺育蜂与采集蜂行为转变相关基因的表达差异研究. 应用昆虫学报, 52(2): 300–307.]
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Osborne KA, Robichon A, Burgess E, Butland S, Shaw RA, Coulthard A, 1997. Natural behavior polymorphism due to a cGMP-dependent protein kinase of *Drosophila*. *Science*, 277(5327): 834–836.
- Oldroyd B, Thompson G, 2006. Behavioural genetics of the honeybee, *Apis mellifera*. *Adv. Insect Physiol.*, 33 (1): 1–49.
- Page Jr RE, Fondrk MK, Hunt GJ, Guzman-Novoa E, Humphries MK, Nguyen K, Greene AS, 2000. Genetic dissection of honeybee (*Apis mellifera* L.) foraging behavior. *J. Hered.*, 91 (6): 474–479.
- Page Jr RE, Scheiner R, Erber J, Amdam GV, 2006. The development and evolution of division of labor and foraging specialization in a social insect (*Apis mellifera* L.). *Curr. Top. Dev. Biol.*, 74 (6): 253–286.
- Robinson GE, 1992. Regulation of division of labor in insect society. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 37 (1): 637–665.
- Robinson GE, 2002. Genomics and integrative analyses of division of labor in honeybee colonies. *Am. Nat.*, 160 (Suppl. 6): S160–S172.
- Ruppell O, Pankiw T, Page Jr RE, 2004. Pleiotropy, epistasis and new QTL: the genetic architecture of honey bee foraging behavior. *J. Hered.*, 95(6): 481–491.
- Rueppell O, 2009. Characterization of quantitative trait loci for the age of first foraging in honey bee workers. *Behav. Genet.*, 39 (5): 541–553.
- Scheiner R, Sokolowski RB, Erber J, 2004. Activity of cGMP-dependent protein kinase (PKG) affects sucrose responsiveness and habituation in *Drosophila melanogaster*. *Learn Memory*, 11 (3): 303–311.
- Smith CR, Toth AL, Suarez AW, Robinson GE, 2008. Genetic and genomic analyses of the division of labour in insect societies. *Genetics*, 9 (10): 735–748.
- Tobback J, Heylen K, Gobin B, Wenseleers T, Billen J, Arckens L, Huybrechts R, 2008. Cloning and expression of PKG, a candidate foraging regulating gene in *Vespula vulgaris*. *Anim. Biol.*, 58(11): 341–351.
- Whitfield CW, Cziko AM, Robinson GE, 2003. Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. *Science*, 302(5643): 296–299.