

中华蜜蜂采集蜂触角蛋白质的 质谱鉴定及分析*

黄钰彬** 李 颜 党晓群*** 周泽扬

(重庆师范大学生命科学学院, 重庆 401331)

摘 要 【目的】蜜蜂触角作为嗅觉器官在蜜蜂的采集、繁衍等方面发挥着极其重要的作用。本研究以中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* (简称中蜂) 采集蜂触角为材料, 通过蛋白质全谱分析鉴定中蜂采集蜂触角所含蛋白质, 为研究蜜蜂嗅觉感受机制奠定数据基础。【方法】使用 LC-MS/MS 对中蜂采集蜂触角总蛋白进行鉴定; 利用 OmicsBean 软件对中蜂采集蜂触角中鉴定的所有表达蛋白质进行 GO 分析和 KEGG 分析; 采用 qRT-PCR 方法对不同级型中蜂触角中的 NPC2 (Niemann-Pick proteins of type C2) 基因的转录情况进行检测。【结果】LC-MS/MS 鉴定结果显示, 中蜂采集蜂触角中共鉴定到 1 231 个蛋白, 其中包括 14 种与嗅觉相关的蛋白; GO 分析与 KEGG 分析显示, 分子功能分类中, 绑定分子功能类别和催化活性功能类别所占比例最多。参与碳代谢、氨基酸、三羧酸循环、脂代谢等代谢通路的蛋白有 297 个, 参与到环境信息加工和发育的有 43 个, 参与到遗传信息加工的有 67 个, 参与到小分子结合的约 12%; qRT-PCR 检测结果显示, NPC2 在雄蜂的触角内表达量最高。【结论】本研究所鉴定到的中蜂采集蜂触角蛋白质为触角的发育及其功能的发挥提供了物质基础与能量基础。此外, 嗅觉相关蛋白的分析也为后续深入研究中蜂对气味物质的识别和转运机制提供了分子数据支撑。

关键词 中蜂; 触角蛋白; 组学分析; NPC2

Identification and analysis of *Apis cerana cerana* forager antennae proteomics

HUANG Yu-Bin** LI Yan DANG Xiao-Qun*** ZHOU Ze-Yang

(College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract [Objectives] To investigate the role of the antennae in pollen collection and reproduction in bees and thereby provide a foundation for further study of the olfactory sensory mechanism of bees. [Methods] Antennae were collected from *Apis cerana cerana* foragers and full spectrum protein analysis used to identify the antennal proteins. LC-MS/MS was used to identify the total antennal proteins and GO and KEGG analysis was performed on all proteins identified with OmicsBean. Semi-quantitative qRT-PCR was used to detect the transcription of NPC2 (Niemann-Pick proteins of type C2). [Results] 1 231 proteins were identified, including 14 olfactory-related proteins. GO and KEGG analyses indicate that most proteins are involved in binding and catalytic activity. 297 proteins are involved in metabolic pathways such as carbon and amino acid metabolism, TCA cycle and lipid metabolism. 43 proteins are involved in processing developmental and environmental information, and 67 in processing genetic information. About 12% of the proteins identified are involved in small molecule binding. qRT-PCR indicates that NPC2 was most highly expressed in the antennae of drones. [Conclusion] The antennal proteins of foraging bees are mainly involved in antennal development and function. The results on the function of olfactory-related proteins provides support for further study of odorant recognition and the olfactory transport mechanism in *A. cerana*.

*资助项目 Supported projects: 重庆市自然科学基金面上项目 (cstc2019jcyj-msxmX0564); 国家自然科学基金面上项目 (31770160)

**第一作者 First author, E-mail: 1938426074@qq.com

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

收稿日期 Received: 2019-10-23; 接受日期 Accepted: 2020-01-09

Key words *Apis cerana cerana*; antenna protein; proteomic analysis; NPC2

蜜蜂作为研究社会性昆虫的典型模式生物之一, 为人类提供大量营养丰富的蜂产品的同时, 也作为生物媒介在农作物传花授粉和生态平衡中发挥着至关重要的作用 (Klein *et al.*, 2006; 郑火青和胡福良, 2009)。研究显示, 每年蜜蜂授粉给中国农业生产带来 3 042.20 亿元的收益, 相当于我国农业总产值的 12.30%; 给全球农业生产带来的价值则达 1 530 亿欧元, 相当于 2005 年全年世界人口食用农产品价值的 9.5% (刘朋飞等, 2011)。蜜蜂群体内部具有严格的品级分化, 由一个具有繁殖能力的蜂后、小部分的雄蜂以及数量庞大的不育的工蜂组成分工明确的群落 (宋飞飞等, 2010; 谭静, 2017)。1-3 日龄的工蜂负责清理巢室; 内勤蜂一般为 4-17 日龄工蜂, 主要负责修建巢脾、喂养幼虫和调节巢内温度等工作; 而 18 日龄以后的壮年蜂则开始飞出巢外, 进行花粉、花蜜的采集, 为蜂群寻找和收集食物, 称为采集蜂 (Forager)。中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*, 简称中蜂), 是中国本土的优良蜂种。由于近年来意大利蜜蜂 (*Apis mellifera*, 简称意蜂) 饲养规模的快速发展, 中蜂的分布范围和种群数量急剧下降 (杨冠煌, 2005)。中蜂抗寒、抗逆、适应性强, 可采集零星蜜粉源, 出巢早、归巢晚, 每天采蜜时间比意蜂平均多 2-3 个小时, 能在早春晚秋等低温下给开花植物传粉授粉, 为苹果授粉率比西方蜜蜂高 30%, 目前草莓等大棚植物授粉多采用中蜂 (宋心仿, 2014)。此外, 中蜂具有抗螨、病虫害发生较少和嗅觉敏锐等优点, 这均是意蜂无法比拟的 (谭静, 2017)。2006 年, 中华蜜蜂已被列入农业部国家级畜禽遗传资源保护品种, 研究中蜂的生物学特性尤其是嗅觉与访花授粉行为的相关性显得尤为重要。

昆虫的嗅觉器官主要为头部前端的触角, 其触角上分布着数量和种类众多的感受器, 而感受器中分布着多种的各种气味信息运输因子, 主要包括气味结合蛋白 (Odorant binding proteins, OBPs)、气味受体 (Odorant receptors, Ors)、化

学感受蛋白 (Chemosensory proteins, CSPs) 以及感觉神经元膜蛋白 (Sensory neuronmembrane proteins, SNMPs) 等 (Leal, 2013; 谢翠琴等, 2016; 莫建初等, 2019)。在蜜蜂中, 根据蛋白功能把 OBPs 分为 PBP、GOBPs、ASP (触角特异性蛋白 Antennal-specific protein, ASP) (宋飞飞, 2011; 王树杰, 2016)。目前, 关于 OBP、CSP 和 OR 已有大量的研究。其中, 姜玉锁教授领导的团队从分子水平上对中蜂嗅觉受体和气味结合蛋白的时空表达谱和功能进行了深入研究, 发现气味共受体基因 *AcerOr2* 在中蜂雄蜂的触角中大量表达, 且在性成熟后表达量达到高峰, 原位杂交结果显示, *AcerOr1*、*AcerOr2*、*AcerOr3* 分布于靠近触角边缘的板型感器和毛型感器的神经元细胞中 (赵慧婷, 2013)。*AcerOr57*、*AcerOr167* 在工蜂各组织中均有表达, 其中, 在触角中的表达量显著高于其他组织, *AcerOr139* 在工蜂各组织中均表达, 在 1、5、25 和 30 日龄时触角的表达量最高, 10、15 和 20 日龄时头部的表达量最高 (潘建芳, 2016); *AcerOBP12* 在各日龄中华蜜蜂触角中的表达量均显著高于其它组织, *AcerOBP13* 在各组织中的表达量总体上随日龄增加而呈下降趋势; *AcerOBP14* 高表达于触角中, *AcerOBP15* 高表达于触角和足中 (杜亚丽, 2016)。吴帆 (2016) 在中蜂触角转录组测序分析的基础上, 对 *AcerOBP10*、*AcerOBP12*、*AcerOBP14*、*AcerOBP21* 进行了原核表达, 荧光竞争实验结果显示 *AcerOBPs* 都能和多种信息素和外源植物挥发物结合, 其中对羟基苯甲酸甲酯 HOB 和 β -紫罗兰酮是它们普遍高亲和力结合的两种物质。谭静 (2017) 研究发现, 中蜂化学感受蛋白 CSP1 在板形感器的内部以及周围附属组织中均有表达, 且在周围附属组织中的表达多于感器内, CSP1、CSP2、CSP4 的重组蛋白对花香类物质 β -紫罗兰酮, 蜂王信息素对羟基苯甲酸甲酯 (HOB), 新烟碱类杀虫剂吡虫啉、啉虫脒均有较强结合。Zewdu (2018) 利用比较蛋白质组学的方法对不同日龄意蜂 (ITBs) 和浆蜂 (RJBs)

触角蛋白质组进行了比较,共鉴定到了 5 692 个触角蛋白。2018 年, Iovinella 等 (2018) 首次运用鸟枪蛋白质组学方法对意大利蜜蜂中蜂王、雄蜂、采集蜂、清理蜂、守卫蜂的触角蛋白质组进行了比较分析,发现 OBP3、OBP18 和 NPC2-1 在蜂王中相对较高, OBP15、OBP21、CSP1 和 CSP3 在工蜂触角中含量相对较高,而在不同分工的工蜂中,相较于采集蜂和守卫蜂, OBP14 在看护蜂中表达量更高。除了嗅觉相关蛋白在不同蜂型中的表达差异外,其它触角蛋白质组成分并不因蜜蜂年龄的变化而变化,而是随着蜜蜂分工的不同而有区别,比如卵黄原蛋白的表达量在守卫蜂和采集蜂中急剧降低。

综上,虽然中蜂的触角蛋白在基因、蛋白、分布等不同水平均有研究,但对中蜂触角蛋白组研究方面还未有详细报道。本研究以中华蜜蜂采集蜂触角为材料,通过全蛋白质组学方法鉴定和分析中蜂触角蛋白质,以期为中蜂嗅觉感受机制提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 中蜂的饲养和样品采集

本研究所用的中华蜜蜂采集蜂于 2019 年 3 月取材于重庆师范大学生命科学学院资源昆虫及其病原微生物学研究室实验蜂场。同一日于同一蜂箱出入口捕获 10 只体型一致且腿部均携带花粉球返巢的采集蜂,用 ddH₂O 洗净之后置于 95% 的酒精内浸泡 5 s,再用滤纸吸干残余的液体,使用灭菌后的镊子分别取下 10 只采集蜂的触角,液氮速冻后存于 -80 °C 以备后续实验使用。

1.2 触角总蛋白提取

取出 -80 °C 保存的 10 只采集蜂的触角,置于用液氮提前预冷的研钵内迅速研磨至粉末,再将粉末移至 1.5 mL 离心管中,加入 100 μ L 含有 6 mol·L⁻¹ 尿素的 Tris-Cl 缓冲液 (pH 7.4) 进行溶解,室温静置 15 min,于 4 °C 以 14 000 r/min 离心 30 min,收集上清液再加入 10 μ L 蛋白酶抑制剂 PMSF,即中蜂采集蜂触角总蛋白样品。使

用 NanoDrop Lite spectrophotometer (Thermo, USA) 仪器检测样品蛋白的浓度后,加入 3 $\times$ 上样缓冲液,于沸水中煮 10 min,以 12 000 r/min 离心 1 min 后取 10 μ L 上清液进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.3 LC-MS/MS 分析

1.3.1 肽段酶解 样品制备后冻干,加入 40 μ L Trypsin buffer, 37 °C 孵育 16-18 h。

1.3.2 色谱分离 液相所用的 A 液为 0.1% 甲酸水溶液, B 液为 0.1% 甲酸乙腈水溶液 (乙腈为 84%)。液相色谱柱 (0.15 mm $\times$ 150 mm, RP-C18, Column Technology Inc.) 以 95% 的 A 液进行平衡,样品由自动进样器上样到 Zorbax 300SB-C18 peptide traps (Agilent Technologies, Wilmington, DE),再经色谱柱分离,相关液相梯度设置如下: 0-50 min, B 液线性梯度从 4%-50%; 50-54 min, B 液线性梯度从 50%-100%; 54-60 min, B 液维持在 100%。

1.3.3 质谱鉴定 酶解产物经毛细管高效液相色谱分离后用 QExactive 质谱仪 (Thermo Fisher) 进行质谱分析,分析时长: 60 min。检测方式: 正离子。多肽和多肽的碎片的质量电荷比按照下列方法采集: 每次全扫描后采集 10 个碎片图谱。

1.4 蛋白质鉴定及生物信息功能分析

质谱测试原始文件用软件 Mascot 2.2 检索相应的数据库,最后得到蛋白质鉴定结果,再使用 OmicsBean 软件对鉴定的蛋白质进行 GO (Gene ontology) 分析和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 分析。

1.5 不同级型中华蜜蜂触角中 NPC2 转录谱分析

取雄蜂、出房子、采集蜂、守卫蜂、哺育蜂、清理蜂各 10 只,使用无菌镊子取下触角,采用 75% 的酒精中清洗后使用 Trizol 法提取各样品的总 RNA。使用 NanoDrop Lite spectrophotometer (Thermo, USA) 仪器检测 RNA 的浓度后,按照 Roche EvoScript Universal cDNA Master 试剂盒 (Roche, No. 07912455001) 的操作说明将获得的 RNA 反转录成相应的 cDNA。

分别以不同级型中蜂触角 cDNA 为模板,以 Actin (F: TGCCAACACTGTCTTTCTG; R: AGAATTGACCCACCAATCCA)为内参,以 NPC2 (F: CGGAATTCATGAGGGGAACCATCTCGT; R: CCCAAGCTTTCAATTGGTGATCTTCGCTG)为特异性引物进行荧光定量 PCR。具体步骤参照 FastStart Essential DNA Green 试剂盒 (Roche) 说明书。qRT-PCR 反应程序如下: 95 ℃预变性 5 min; 95 ℃变性 40 s, 55 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 50 s, 30 个循环; 72 ℃终延伸 10 min, 反应后进行溶解曲线分析。CFX96™ Touch 实时定量 PCR 系统进行数据记录分析。

2 结果与分析

2.1 中蜂采集蜂触角总蛋白的提取与检测

中蜂采集蜂触角总蛋白经尿素抽提后, SDS-PAGE 电泳检测结果显示 (图 1), 蛋白条带清晰可见, 大小 15 ku 到 150 ku 不等。该结果表明, 本实验所使用的蛋白提取方法获得的触角总蛋白样品丰度高, 经 NanoDrop 检测的蛋白浓度为 3.752 mg/mL 可以用来做后续的 LC-MS/MS 分析。

2.2 中蜂采集蜂触角总蛋白的质谱鉴定及分析

2.2.1 中蜂采集蜂触角总蛋白的质谱鉴定 蛋白质全谱一共鉴定到 1 231 种蛋白质。结果显示, 中蜂采集蜂触角总蛋白中气味结合蛋白约占

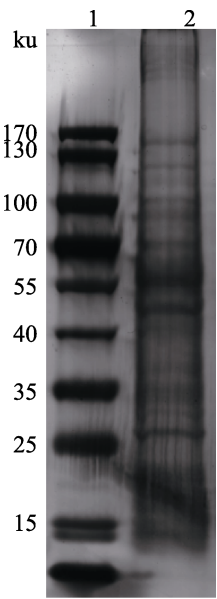


图 1 中蜂采集蜂触角总蛋白
Fig. 1 Antennae total protein in forager of *Apis cerana cerana*
1: Marker; 2: 中蜂采集蜂触角总蛋白。
1: Marker; 2: Antennae total protein in forager of *Apis cerana cerana*.

7.4%左右, 本实验共鉴定到 14 种与嗅觉相关的蛋白质, 包括 10 种气味结合蛋白 ASP1、ASP2、ASP4、OBP1、OBP4、OBP14、OBP16、OBP18、OBP19、OBP21, 1 种化学感受蛋白 CSP1, 2 种气味受体 Or2、Or67a, 以及 1 种化学信息素载体——尼曼匹克 C2 型蛋白 (Niemann-Pick proteins of type C2, NPC2)。表 1 中列出了覆盖度 ≥50% 的所有蛋白。

表 1 中蜂采集蜂触角总蛋白的质谱鉴定
Table 1 Proteins exclusively found in forger bees of *Apis cerana cerana*

蛋白质名称 Protein names	基因名称 Gene names	肽段数 PepCount	唯一肽段数 Unique peptides	肽段覆盖率 Sequence coverage (%)	分子量 Molecular weight (u)
气味结合蛋白 21 Odorant binding protein 21	ACCB14388	15	9	60.74%	15 165.35
气味结合蛋白 Odorant binding protein	APICC_01038	16	8	60.29%	15 671.93
未表征蛋白 Uncharacterized protein	Arp1	35	16	56.91%	41 805.33
超氧化物歧化酶[Cu-Zn] Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD ACCB11418	13	7	55.92%	15 647.37
未表征蛋白 Uncharacterized protein	Tpx-4	14	10	55.91%	25 133.41
未表征蛋白 Uncharacterized protein	N/A	42	16	53.61%	43 024.81

续表 1 (Table 1 continued)

蛋白质名称 Protein names	基因名称 Gene names	肽段数 PepCount	唯一肽段数 Unique peptides	肽段覆盖率 Sequence coverage (%)	分子量 Molecular weight (u)
α-生育酚转移样蛋白 Alpha-tocopherol transfer protein-like	ACCB13925	15	14	52.67%	34 854.95
未表征蛋白 Uncharacterized protein	LOC551176 LOC551369	39	16	52.39%	41 784.36
肌球蛋白 Tropomyosin	APICC_04038	22	19	52.28%	32 899.4
细胞色素 c Cytochrome c	cytC	5	5	51.85%	11 909.58
副肌球蛋白 Paramyosin	ACCB01188.1	40	35	51.41%	79 140.22
果糖二磷酸醛缩酶 Fructose-bisphosphate aldolase	ACCB01997.1 ACCB01997.2	23	18	51.23%	39 631.83
未表征蛋白 Uncharacterized protein	LOC551859	12	9	50.34%	16 810.40

2.2.2 中蜂采集蜂触角总蛋白的 GO 分类及 KEGG 分析

利用 OmicsBean 软件对中蜂采集蜂中鉴定的所有表达蛋白质进行功能富集分

析显示,从生物学过程 (Biological process) 富集分析结果来看,鉴定的蛋白质被明显的富集到 8 个主要功能组中 (图 2), 其中代谢过程

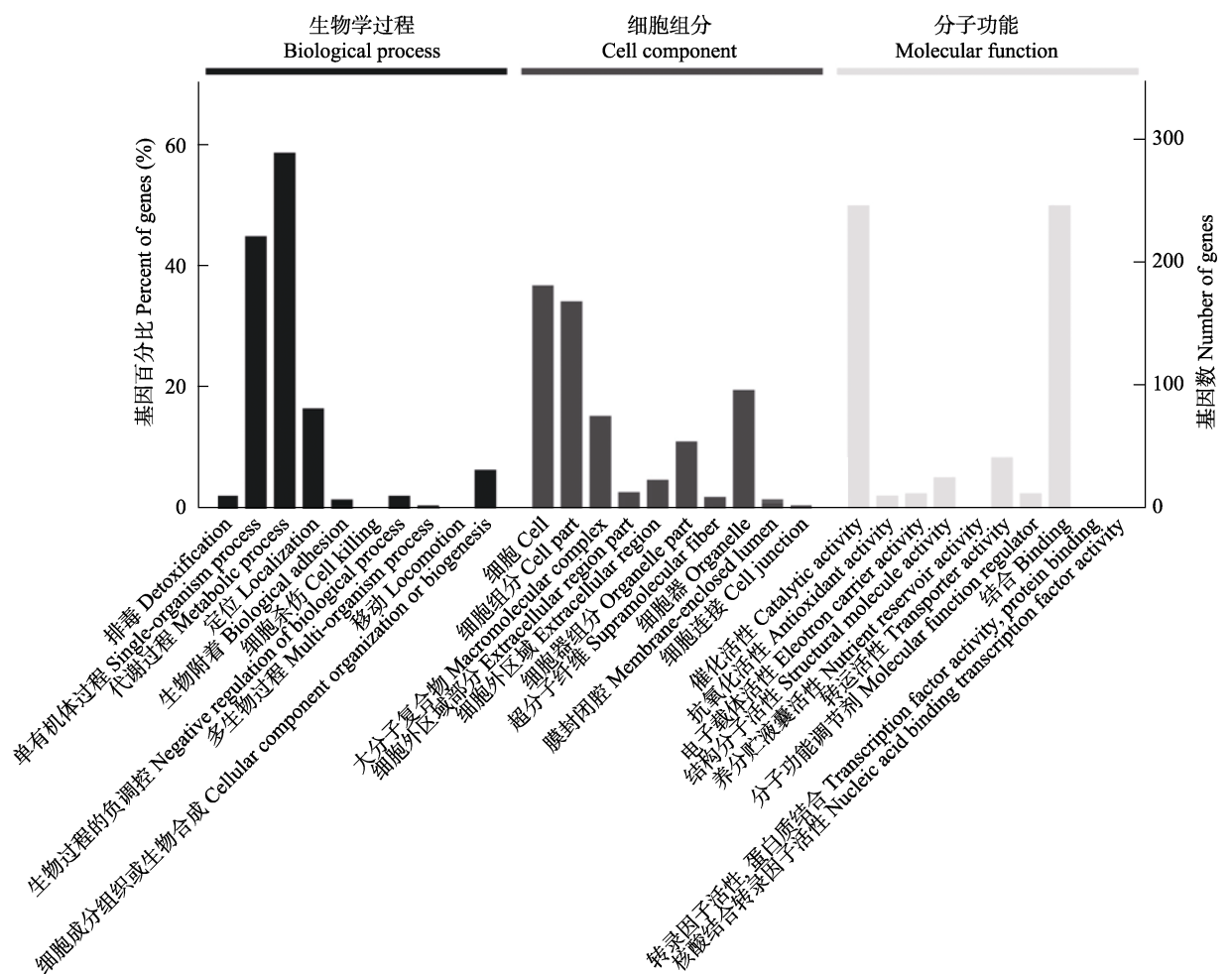


图 2 中蜂采集蜂触角蛋白质组 GO 分类注释

Fig. 2 GO classification annotation of antennae proteome in forager of *Apis cerana cerana*

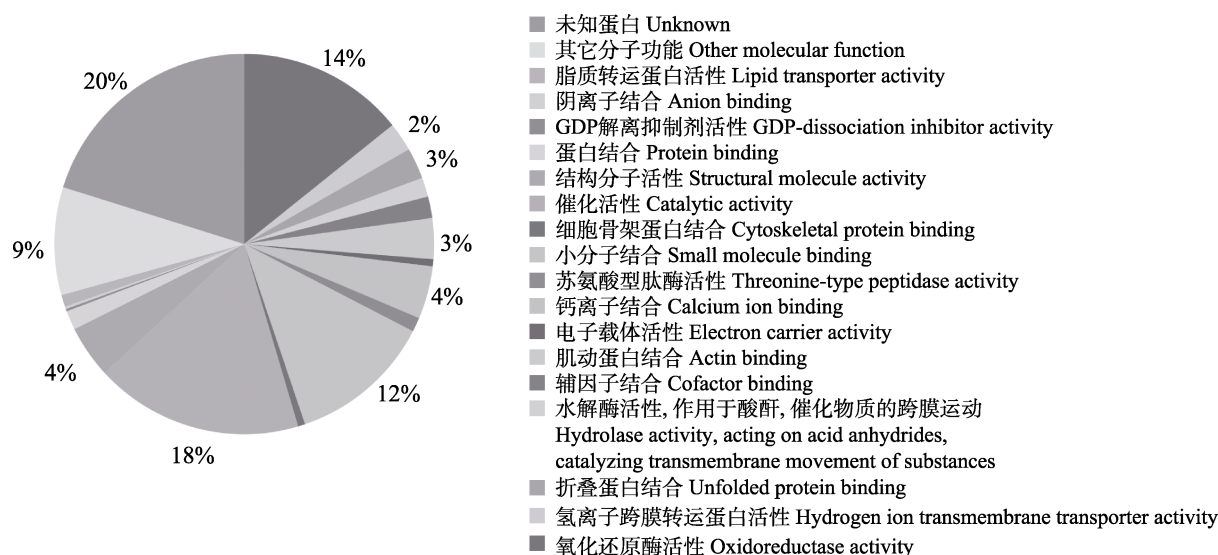


图3 中蜂采集蜂触角蛋白质组的分子功能富集分析

Fig. 3 The molecular functional enrichment analysis of the antennal proteome in forager of *Apis cerana cerana*

类占比最多, 其次是单有机体过程类。在细胞组分 (Cell component) 分类中, 细胞类别所占比例最多, 其次为细胞部分类别及细胞器类别。在分子功能 (Molecular function) 分类中, 绑定分子功能类别和催化活性功能类别所占比例最多。

KEGG 是连接已知分子间相互作用的信息网络, 如代谢通路、复合物、生化反应。KEGG 通路主要包括: 代谢、遗传信息处理、环境信息处

理、细胞过程等。表2列举了中蜂触角蛋白 KEGG 通路富集情况。 P 值越小 ($P < 0.05$), 统计学上 KEGG 通路富集越显著, 显著富集的 10 条通路如图4所示, 包括代谢通路、碳水化合物代谢、氧化磷酸化通路、氨基酸生物合成、三羧酸循环、糖酵解、脂肪酸代谢途径、内质网中蛋白加工过程、2-氧代环戊烷羧酸甲酯代谢、缬氨酸和亮氨酸降解途径。如图4 KEGG 通路富集结果所示, 仅有 615 个蛋白质被分别富集到 96 个通路中。

表2 中蜂触角蛋白质的 KEGG 代谢通路分析

Table 2 KEGG analysis of antenna protein in forager of *Apis cerana cerana*

通路名称 Pathway name		通路 ID Pathway ID	蛋白数量 Protein count	P 值 P value
代谢通路 Metabolic pathways	氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	ame00190	35	2.95×10^{-14}
	碳代谢 Carbon metabolism	ame01200	33	4.31×10^{-13}
	柠檬酸盐循环 (TCA 循环) Citrate cycle (TCA cycle)	ame00020	15	5.46×10^{-7}
	氨基酸的生物合成 Biosynthesis of amino acids	ame01230	17	2.52×10^{-6}
	2-氧代羧酸代谢 2-Oxocarboxylic acid metabolism	ame01210	8	2.86×10^{-6}
	糖酵解/糖异生 Glycolysis / Gluconeogenesis	ame00010	13	3.72×10^{-5}
	缬氨酸, 亮氨酸和异亮氨酸的降解 Valine, leucine and isoleucine degradation	ame00280	11	1.23×10^{-4}
	脂肪酸降解 Fatty acid degradation	ame00071	9	1.44×10^{-4}
	乙醛酸和二羧酸酯代谢 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ame00630	8	2.63×10^{-3}
	淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	ame00500	7	3.29×10^{-3}
	硫胺素代谢 Thiamine metabolism	ame00730	1	0.250

续表 2 (Table 2 continued)

	通路名称 Pathway name	通路 ID Pathway ID	蛋白数量 Protein count	P 值 P value
环境信息处理 Environmental information processing	ABC 转运蛋白 ABC transporters	ame02010	2	0.336
	细胞外基质受体作用 ECM-receptor interaction	ame04512	2	0.499
	Hippo 信号通路 Hippo signaling pathway - fly	ame04391	5	0.593
	TGF-beta 信号通路 TGF-beta signaling pathway	ame04350	2	0.758
	Jak-STAT 信号通路 Jak-STAT signaling pathway	ame04630	1	0.805
	Notch 信号通路 Notch signaling pathway	ame04330	1	0.854
	磷脂酰肌醇信号系统 Phosphatidylinositol signaling system	ame04070	2	0.938
	mTOR 信号通路 mTOR signaling pathway	ame04150	1	0.95
	Wnt 信号通路 Wnt signaling pathway	ame04310	2	0.975
	MAPK 信号通路 MAPK signaling pathway - fly	ame04013	3	0.976
	蛋白酶体 Proteasome	ame03050	10	1.56×10 ⁻³
	内质网中的蛋白质加工 Protein processing in endoplasmic reticulum	ame04141	18	0.020
遗传信息处理 Genetic information processing	硫中继系统 Sulfur relay system	ame04122	1	0.535
	RNA 降解 RNA degradation	ame03018	5	0.606
	核糖体 Ribosome	ame03010	10	0.680
	氨酰基-tRNA 生物合成 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	ame00970	2	0.893
	mRNA 监控通路 mRNA surveillance pathway	ame03015	3	0.933
	剪接体 Spliceosome	ame03040	6	0.933
	RNA 转运 RNA transport	ame03013	6	0.965
	DNA 复制 DNA replication	ame03030	1	0.969

综合 GO 分类及 KEGG 的富集结果发现, 参与碳代谢、氨基酸、三羧酸循环、脂代谢等代谢通路的有 297 个蛋白, 图 5 展示了氧化磷酸化通路, 深灰色标识的蛋白为本实验质谱鉴定的蛋白, 浅灰色的为西方蜜蜂中基因组注释的蛋白, 这些蛋白约占 24%, 为蜜蜂触角的功能提供了物质和能量来源。参与环境信息加工和发育的蛋白有 43 个, 而参与小分子结合的蛋白约为 12% (图 3), 表明这些蛋白对蜜蜂触角功能的发挥诸如气味物质的识别和转运蜜蜂嗅觉作用的发挥以及维持蜜蜂触角的发育提供了条件。参与遗传信息加工的蛋白有 67 个, 暗示这些蛋白维持着蜜蜂触角基本的基因转录翻译等活动。

2.2.3 不同级型中蜂触角内 NPC2 的转录谱分析 为了探究不同级型中蜂触角内 NPC2 的转录水平, 我们分别提取了雄蜂、出房子、采集蜂、守卫、哺育蜂以及清理蜂共 6 个级型的中蜂触角 RNA, 反转录成 cDNA 后进行了 qRT-PCR 检测, 结果如图 6 所示, 我们发现 NPC2 因级型不同而呈现出不同的表达特征, 其在雄蜂的触角内表达量最高, 其次是哺育蜂。

3 讨论

自 1896 年引进西方蜜蜂以来, 我国本土蜜蜂的生存状态受到各方面威胁, 西蜂的侵入不仅使中蜂分布区域缩小及其种群数量减少, 还因其在授粉方面的能力远不及中蜂而使山林植物授

Fig. 4 KEGG pathway enrichment results of antennal total protein in forager of *Apis cerana cerana*

The dark grey-labeled protein is identified by mass spectrometry and the light grey-labeled protein is a genome-annotated protein in *Apis mellifera*.

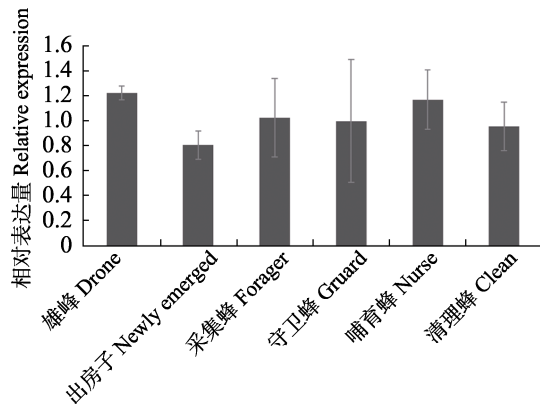


图 6 不同级型的中蜂触角内 NPC2 的转录情况
Fig. 6 The transcription of NPC2 in the antennae of different caste *Apis cerana cerana* bees

粉总量减少, 最终导致植物多样性的减少(杨冠煌, 2005)。蜜蜂授粉通过采集蜂采集花粉的过程来完成, 而触角作为蜜蜂的主要嗅觉器官在此过程发挥了至关重要的作用, 因此研究中蜂的嗅觉系统与其授粉行为之间的相关性是非常有必要的。

本实验以中华蜜蜂采集蜂的触角为研究对象, 通过蛋白质组学分析鉴定其所含蛋白质。LC-MS/MS 结果显示中蜂采集蜂触角中被鉴定到的蛋白共 1 231 个, 使用 OmicsBean 软件对鉴定的蛋白质进行 GO 和 KEGG 分析。GO 分析结果显示, 我们鉴定到的中蜂采集蜂触角蛋白被明显的富集到 8 个功能组中, 其中属代谢过程类别所占比例最多, 而在分子功能类别中, 富集到绑定分子功能和催化活性功能这两个类别的蛋白质最多。KEGG 分析结果则显示, 氧化磷酸化通路、三羧酸循环、糖酵解、脂肪酸代谢途径等 10 条与能量代谢相关的通路显著富集。综合以上两类分析的结果发现, 参与到碳代谢、氨基酸、三羧酸循环、脂代谢等代谢通路的蛋白共 297 个, 参与到环境信息加工和发育的共 43 个, 参与到遗传信息加工的共 67 个, 参与到小分子结合的约 12%。这些数据可以表明, 我们所鉴定到的蛋白质足够为中蜂采集蜂触角功能的发挥提供所需条件, 并保证蜜蜂机体生理活动的正常进行。

触角作为蜜蜂的主要嗅觉器官, 有必要对中蜂采集蜂触角蛋白中与嗅觉系统相关的蛋白进行鉴定分析。在我们所鉴定到的 1 231 个蛋白中

共包括 14 种与嗅觉系统相关的蛋白。其中 ASP1 属于 PBP, ASP2 属于 GOBP, 二者都在工蜂触角中高表达。殷玲等(2015a; 2015b)应用 RT-PCR 方法检测了 *OBP17* 和 *OBP18* 在具有不同抗螨性状的中华蜜蜂头部组织的相对表达量, 结果表明, *OBP17* 和 *OBP18* 的表达变化趋势与蜂螨感染过程相关, 对中华蜜蜂的抗螨特性的研究具有重要意义。郭丽娜(2018)对中蜂气味受体基因 *Or1* 和 *Or2* 的功能分析表明, *Or2* 蛋白质二级结构上包含有 CaM 结合位点和与离子通道相关的 Tyr 残基位点, 在工蜂触角发育的各个阶段都有表达, 且在所测试的气味化合物中, *AceOr2* 能增加 *AceOr1* 对气味物质反应的敏感性, 但是不改变对气味物质的特异性识别, 仅对蚊虫驱避剂 VUAA1 敏感。

值得注意的是 NPC2 蛋白, 它是一种小分子可溶性蛋白, pI 为 5.85, 属于 ML [MD-2 (myeloid differentiation factor 2)-related Lipid-recognition] 结构家族。Lee 等(2014)使用杆状病毒表达系统表达了中蜂 NPC2 的重组蛋白 AcNPC2a, 发现该重组蛋白与金芽孢杆菌、大肠杆菌和球孢杆菌均能结合, 由此推测 AcNPC2a 可能在中蜂的先天免疫反应中起着一定的作用。近年来还有一些研究则表明, NPC2 在一些节肢动物中可能发挥与 OBP 和 CSP 类似的化学信息素转运功能 (Xu et al., 2007; Subramanian and Balch, 2008)。Ishida 等(2014)发现日本弓背蚁 *Camponotus japonicus* 触角上锥形嗅觉感器内特异性表达的 NPC2 蛋白能够结合长链脂肪酸和芳樟醇等疏水分子, 推测其参与了日本弓背蚁的嗅觉通讯。郑瑶(2017)对中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 的 NPC2 进行了鉴定和分析, 发现 NPC2 在触角中高表达并定位于嗅觉感受器的淋巴腔中, NPC2 能特异性结合来自寄主植物的 7 种挥发物, 可能在感知植物挥发物的过程中起作用。我们对不同级型中蜂触角内 NPC2 的转录情况进行检测, 结果显示 NPC2 会因级型的不同而呈现出不同的表达水平并且在雄蜂的触角内表达量最高。

本研究从蛋白质组学的角度对中蜂触角蛋白质进行了阐述, 为后续丰富中蜂触角蛋白信

息、明确触角蛋白的功能、解析信息素的化学感受机制提供了数据支撑。

参考文献 (References)

- Du YL, 2016. Cloning and expression analysis of four odor binding protein genes from *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). Master dissertation. Shanxi: Shanxi Agricultural University. [杜亚丽, 2016. 中华蜜蜂 4 个气味结合蛋白基因 *AcerOBPs* 的克隆与表达分析. 硕士学位论文. 山西: 山西农业大学.]
- Guo LN, 2018. Functional analysis of odor receptor gene *Or1* and *Or2* in *Apis cerana cerana*. Doctoral dissertation. Shanxi: Shanxi Agricultural University. [郭丽娜, 2018. 中华蜜蜂气味受体基因 *Or1* 和 *Or2* 功能分析. 博士学位论文. 山西: 山西农业大学.]
- Iovinella I, Cappa F, Cini A, Petrocelli I, Cervo R, Turillazzi S, Dani FR, 2018. Antennal protein profile in honeybees: Caste and task matter more than age. *Frontiers in Physiology*, doi:10.3389/fphys.2018.00748.
- Ishida Y, Tsuchiya W, Fujii T, Fujimoto Z, Miyazawa M, Ishibashi J, Matsuyama S, Ishikawa Y, Yamazaki T, 2014. Niemann-Pick type C2 protein mediating chemical communication in the worker ant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(10): 3847–3852.
- Klein AM, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T, 2006. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B*, 274(1608): 303–313.
- Lee KS, Park HG, Deng YJ, Kim BY, Kyung SS, Yong SC, Yoon HJ, Li MS, Jin BR, 2014. Molecular characterization of a Niemann-Pick disease type C2 protein from the honeybee *Apis cerana*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17(3): 555–560.
- Leal WS, 2013. Odorant reception in insects: Roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annual Review of Entomology*, 58: 373–391.
- Liu PF, Wu J, Li HY, Lin SW, 2011. Economic values of bee pollination to China's agriculture. *Scientia Agricultura Sinica*, 44(24): 5117–5123. [刘朋飞, 吴杰, 李海燕, 林素文, 2011. 中国农业蜜蜂授粉的经济价值评估. 中国农业科学, 44(24): 5117–5123.]
- 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.]
- Pan JF, 2016. Cloning and expression analysis of odor receptor genes *Or57*, *Or139* and *Or167* in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*. Master dissertation. Shanxi: Shanxi Agricultural University. [潘建芳, 2016. 中华蜜蜂气味受体基因 *Or57*、*Or139* 和 *Or167* 的克隆与时空表达分析. 硕士学位论文. 山西: 山西农业大学.]
- Song FF, 2011. Antennae proteome comparison of drone and worker between *Apis mellifera ligustica* and *A. cerana cerana*. Master dissertation. Zhengzhou: Zhengzhou University. [宋飞飞, 2011. 意大利蜜蜂和中华蜜蜂雄蜂与工蜂触角差异蛋白质组分析. 硕士学位论文. 郑州: 郑州大学.]
- Song FF, Wu J, Fang Y, Feng M, Zheng AJ, Li JK, 2010. Proteome comparison analysis of sexually matured drone and adult worker honeybee antennae. *Scientia Agricultura Sinica*, 43(21): 4505–4513. [宋飞飞, 吴静, 房宇, 冯毛, 郑爱娟, 李建科, 2010. 性成熟雄蜂与外勤工蜂触角差异蛋白质组分析. 中国农业科学, 43(21): 4505–4513.]
- Song XF, 2014. Suggestions on strengthening the protection of *Apis cerana*. *Journal of Bee*, 34(10): 1–2. [宋心仿, 2014. 关于加强中华蜜蜂保护的建议. 蜜蜂杂志, 34(10): 1–2.]
- Subramanian K, Balch WE, 2008. NPC1/NPC2 function as a tag team duo to mobilize cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40): 15223–15224.
- Tan J, 2017. Molecular mechanisms of the interaction between antennal specific chemical communications protein CSP1, ASP2 and the chemical ligands of *Apis cerana cerana*. Master dissertation. Hangzhou: China Jiliang University. [谭静, 2017. 中华蜜蜂触角特异化学通讯蛋白 CSP1 及 ASP2 与化学配基相互作用的分子机制研究. 硕士学位论文. 杭州: 中国计量大学.]
- Wang SJ, 2016. Temporal and spatial differential expression analysis of four odorant receptor genes from *Apis cerana cerana*. Master dissertation. Shanxi: 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. 山西: 山西农业大学.]
- Wu F, 2016. Study binding characteristics of Chinese honeybee's (*Apis cerana cerana*) odorant binding proteins with ligands and binding mechanism of OBP12 with imidacloprid (Hymenoptera: Apidae). Master dissertation. Hangzhou: China Jiliang University. [吴帆, 2016. 中华蜜蜂气味结合蛋白配基结合特征和 OBP12 与吡虫啉结合机理研究. 硕士学位论文. 杭州: 中国计量大学.]
- Xie CQ, Nie HY, Su SK, 2016. Advances in research on honey

- bee olfactory. *Apiculture of China*, 67(7): 17–22. [谢翠琴, 聂红毅, 苏松坤, 2016. 蜜蜂嗅觉研究进展. 中国蜂业, 67(7): 17–22.]
- Xu SJ, Benoff B, Liou HL, Lobel P, Stock AM, 2007. Structural basis of sterol binding by NPC2, a lysosomal protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease. *Journal of Biological Chemistry*, 282(32): 23525–23531.
- Yang GH, 2005. Harm of introducing the western honeybee *Apis mellifera* L. to the Chinese honeybee *Apis cerana* F. and its ecological impact. *Acta Entomologica Sinica*, 48(3): 401–406. [杨冠煌, 2005. 引入西方蜜蜂对中蜂的危害及生态影响. 昆虫学报, 48(3): 401–406.]
- Yin L, Ji T, Li GH, Niu DF, 2015a. CDS Sequence of gene *OBP17* in *Apis cerana cerana* and the correlation between its expression and mite resistance. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 43(11): 45–48. [殷玲, 吉挺, 李冠华, 牛德芳, 2015. 中华蜜蜂 *OBP17* 基因 CDS 序列及其表达与抗螨性状的相关性. 江苏农业科学, 43(11): 45–48.]
- Yin L, Ji T, Li GH, Niu DF, 2015b. Sequence analysis of *OBP18* gene and its expression changes upon *Varroa destructor* resistance in Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 28(6): 2820–2824. [殷玲, 吉挺, 李冠华, 牛德芳, 2015. 中华蜜蜂 *OBP18* CDs 序列及表达与抗螨性状相关性分析. 西南农业学报, 28(6): 2820–2824.]
- Zewdu AH, 2018. Antennal proteome reveals deep-insight into molecular basis driving antennal function and royal jelly secretion. Doctoral dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [Zewdu Ararso Hora, 2018. 蜜蜂工蜂触角蛋白质组研究揭示触角功能和王浆分泌相关分子基础. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]
- Zhao HT, 2013. Molecular identification, expression and localization analysis of odorant receptor genes *Or1*, *Or2* and *Or3* from *Apis cerana cerana*. Doctoral dissertation. Shanxi: 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. 山西: 山西农业大学.]
- Zheng HQ, Hu FL, 2009. Honeybee: A newly emerged model organism. *Acta Entomologica Sinica*, 52(2): 210–215. [郑火青, 胡福良, 2009. 蜜蜂——新兴的模式生物. 昆虫学报, 52(2): 210–215.]
- Zheng Y, 2017. Functional characterization of a Niemann-Pick type C2 protein in the parasitoid wasp *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). Master dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [郑瑶, 2017. 中红侧沟茧蜂 NPC2 蛋白的功能特性. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]