

冯宇佳,杜亚丽,赵慧婷,等.中华蜜蜂离子型受体*AcerIR76b*、*AcerIR75f.1*生物信息学和差异表达分析[J].江西农业大学学报,2020,42(3):513-521.



# 中华蜜蜂离子型受体*AcerIR76b*、*AcerIR75f.1* 生物信息学和差异表达分析

冯宇佳<sup>1</sup>,杜亚丽<sup>1</sup>,赵慧婷<sup>3</sup>,马卫华<sup>2</sup>,刘晋佳<sup>1</sup>,  
马秀梅<sup>1</sup>,张宇昊<sup>1</sup>,姜玉锁<sup>1\*</sup>

(1.山西农业大学 动物科技学院,山西 太谷 030801;2.山西省农业科学院 园艺研究所,山西 太原 030031;3.山西农业大学 生命科学学院,山西 太谷 030801)

**摘要:**【目的】从中华蜜蜂*Apis cerana cerana*触角转录组测序结果中筛选获得中华蜜蜂离子型受体*IR76b*、*IR75f.1*的基因序列,对其进行蛋白结构预测和表达谱分析,为该基因的功能研究提供依据。【方法】利用多种生物信息学软件对其编码蛋白的理化特性进行分析;采用qRT-PCR技术对*AcerIR76b*、*AcerIR75f.1*在中蜂1日龄工蜂和采集蜂、1日龄雄蜂和性成熟雄蜂各部位(触角、头、胸、腹和足)中mRNA的表达情况进行比较分析。【结果】成功获得了*AcerIR76b*、*AcerIR75f.1*的完整开放阅读框ORF序列,全长分别为1 635 bp和1 686 bp,分别编码545、562个氨基酸。预测*AcerIR76b*分子量为63.09 ku,*AcerIR75f.1*分子量为62.28 ku,它们均具有3个跨膜结构。qRT-PCR结果显示,*AcerIR76b*在1日龄工蜂和采集蜂、1日龄雄蜂和性成熟雄蜂的各部位中均有表达,但在触角中的表达量极显著的高于其它部位( $P<0.01$ );*AcerIR75f.1*在1日龄工蜂和采集蜂中,均在触角中高表达,而在1日龄雄蜂和性成熟雄蜂中,均在足部高表达。【结论】*AcerIR76b*和*AcerIR75f.1*的编码产物均具有昆虫离子型受体的典型结构特征,2个离子型受体在中华蜜蜂工蜂和雄蜂各个部位均有表达,推测其不仅参与气味分子的识别过程,在味觉感知中也同样发挥着一定作用。

**关键词:**中华蜜蜂;离子型受体;*IR76b*;*IR75f.1*;生物信息学分析;mRNA表达

中图分类号:S893.2 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2020)03-0513-09

## Differential Expression and Bioinformatic Analysis of Ionotropic Receptor Gene *AcerIR76b* and *AcerIR75f.1* from *Apis cerana cerana*

FENG Yu-jia<sup>1</sup>, DU Ya-li<sup>1</sup>, ZHAO Hui-ting<sup>3</sup>, MA Wei-hua<sup>2</sup>,  
LIU Jin-jia<sup>1</sup>, ZHANG Yu-hao<sup>1</sup>, JIANG Yu-suo<sup>1\*</sup>

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

收稿日期:2019-11-17 修回日期:2020-01-20

基金项目:国家现代农业产业技术体系(蜜蜂)建设专项(CARS-44-KXJ23)和山西省农业科学院博士基金项目(YBSJJ1713)  
Project supported by the Modern Agricultural Industry Technology System Construction (Honey Bee) (CARS-44-KXJ23) and Doctor Fund of Shanxi Academy of Agricultural Sciences (YBSJJ1713)

作者简介:冯宇佳, orcid.org/0000-0002-4788-4267, 18404967705@163.com; \*通信作者:姜玉锁, 教授, 博士生导师, 主要从事蜜蜂生物学研究, orcid.org/0000-0003-2941-6563, jiangys-001@163.com。

**Abstract:** [Objective] The gene sequence of ionotropic receptor *IR76b* and *IR75f.1* was screened from the transcriptome sequencing results of *Apis cerana cerana*, and the protein structure prediction and expression profiling were analyzed so as to lay a foundation for the research on this gene, which provides a theoretical basis for further exploration of the physiological functions of these genes. [Method] The physicochemical properties of the encoded protein were analyzed by a variety of bioinformatics software. The method of qRT-PCR was used to detect the expression profiles of *AcerIR76b* and *AcerIR75f.1* mRNA in five parts (antennae, head, thorax, abdomen and legs) of 1-day-old workers and foragers, 1-day-old and sexually mature drones. [Result] The complete ORF of *AcerIR76b* and *AcerIR75f.1* were successfully obtained, which were 1635 bp and 1686 bp in length and encoded 545 and 562 amino acids. The molecular weight was predicted to be 63.09 kDa about *AcerIR76b*, and 62.28 ku about *AcerIR75f.1*, they had three transmembrane structures. The results of qRT-PCR showed that *AcerIR76b* was expressed in all parts of the workers and drones, but the expression in the antennae was significantly higher than that in other parts ( $P < 0.01$ ). In 1-day-old workers and foragers, *AcerIR75f.1* was highly expressed in the antennae, while in 1-day-old and sexually mature drones, this gene was highly expressed in the legs. [Conclusion] The coding products of *AcerIR76b* and *AcerIR75f.1* owned typical characteristics of insect ionotropic receptors. Two ionotropic receptors were expressed in all parts of workers and drones, implying that they not only participated in the recognition process of odor molecules but also played a role in taste perception.

**Keywords:** *Apis cerana cerana*; ionotropic receptor; *AcerIR76b*; *AcerIR75f.1*; bioinformatics analysis; mRNA expression

【研究意义】嗅觉在昆虫和环境之间起到关键的连接作用,昆虫可以利用嗅觉来检测刺激物,为其提供有关食物、捕食者和潜在配偶的信息<sup>[1-2]</sup>。研究在不同物种中编码气味受体蛋白的基因不仅可以了解这些生物之间的进化关系,还可以了解生物与环境之间的相互作用<sup>[3]</sup>。触角作为嗅觉识别系统的主要存在部位,当其感受到外界气味物质时,昆虫就会激活嗅觉感觉神经元(olfactory receptor neurons, ORNs)并将信号转化为神经冲动传递到大脑<sup>[4]</sup>。蜜蜂是一种高度社会性生活的昆虫,通过个体间合作,形成了有着完备通讯和社会分工合作的系统,以适应千变万化的自然环境,一方面能够为人类提供蜂王浆、蜂蜜、蜂花粉等高营养价值的蜂产品。另一方面,蜜蜂授粉可提高农作物产量,保护物种多样性,如经蜜蜂授粉的油菜产量是无蜂授粉区的1.4倍之多<sup>[5-6]</sup>。中华蜜蜂是我国特有的蜂种,以其灵敏的嗅觉机制、善于采集零星蜜粉源的特点及抗逆性强的优势,在山区生态平衡和生物多样性中起着重要作用<sup>[7-8]</sup>。因此,研究嗅觉相关的基因对于深入了解蜜蜂嗅觉机制有着重要作用。【前人研究进展】目前,已经在昆虫中发现了2个气味门控离子通道系列,即气味受体(olfactory receptor, OR)和离子型受体(ionotropic receptors, IRs),这些离子通道响应各种分子<sup>[9-11]</sup>。ORs是拥有7个跨膜结构的蛋白,通过与保守的共受体Orco<sup>[12-14]</sup>共表达,对信息素和一般气味产生响应。与ORs家族相比,属于离子型谷氨酸受体(iGluR)家族的IRs是拥有3个跨膜结构的受体,其不仅可以识别胺、醛、酮、酸、一般气味以及性信息素<sup>[15-19]</sup>,还涉及到味觉识别、热敏感和湿度感触<sup>[20-21]</sup>。IRs不仅可以单独进行表达,还可以与其它基因共同表达,即作为共表达受体(co-receptor),如黑腹果蝇中IR25a、IR8a、IR76b<sup>[22-23]</sup>。IRs与共受体在触角神经元的表达,类似于配体特异性的OR与它们共表达的受体ORco<sup>[24-27]</sup>。然而,有研究<sup>[28]</sup>表明,IRs的组合模式更复杂,或许跟iGluRs的四聚体模式相似。从Benton等<sup>[29]</sup>采用组织特异性RT-PCR、RNA原位杂交及转基因受体等方法,确定IR家族在黑腹果蝇中的表达开始,正式开启了IRs的研究。近些年来,离子型受体一直是昆虫化学生态学研究的热点,作为与嗅觉相关iGluRs中的一类基因<sup>[18,30]</sup>,在非ORs、GRs(gustatory receptor)表达的触角腔锥形神经元中被发现<sup>[26,31]</sup>,因此,将这类新发现的基因定义为新的化学感应受体,其作用是对自然环境中的挥发性化学物质进行检测以及对细胞间化学信号过程进行勘探<sup>[26]</sup>。IRs与离子型谷氨酸受体(iGluR)是同源的,其特征在于存在保守的配体离子通道结构域,它们与iGluR共享保守的跨膜结构域,但在配体结合结构域差异明显<sup>[11,30]</sup>。在果蝇中,IRs基于序列的特征被细分为两类:一类为比较保守的“触角型IRs”(A-IR),参与热敏感和嗅觉感知;另一类为具有物种特异性的“发散型IRs”(D-IR)<sup>[11,28-30,32]</sup>,可能引导味觉识别。

【本研究切入点】近年来,随着基因组学、转录组学的快速发展,越来越多的昆虫 IRs 被鉴定出来,如在鳞翅目昆虫棉铃虫<sup>[33]</sup>、棉贪夜蛾<sup>[16]</sup>、苹果小卷蛾<sup>[34]</sup>、印度谷螟<sup>[35]</sup>和仁扇舟蛾<sup>[36]</sup>等中分别鉴定出 12 个、17 个、15 个和 14 个 IRs;在膜翅目昆虫红侧沟茧蜂中鉴定出 19 个 IRs<sup>[17]</sup>;在鞘翅目昆虫大型黑色金龟子中发现 27 个 IRs<sup>[37]</sup>;在直翅目昆虫蝗虫中鉴定出 12 个 IRs<sup>[38]</sup>;在双翅目昆虫中华按蚊和桔小实蝇发现 35 和 30 个 IRs<sup>[39-40]</sup>,这些离子型受体主要位于细胞体和树突中,并且高度富集于树突状末端的顶端,将感觉信息传递到更高的大脑中心。这些理论基础为中华蜜蜂离子型受体的鉴定、进化 and 功能分析提供了条件。【拟解决的关键问题】课题组对中华蜜蜂触角(1、10、18 和 25 日龄)转录组测序结果进行分析,筛选出 10 个离子型受体,本研究选择其中 2 个离子型受体—*IR76b* 及 *IR75f.1*,对它们编码蛋白的理化性质进行预测,并利用 quantitative real-time PCR 技术对 2 个离子型受体在中蜂 1 日龄工蜂和采集蜂,1 日龄雄蜂和性成熟雄蜂各部位中的表达差异进行了比较分析,以期为该蛋白的生理功能及蜜蜂的嗅觉识别机制研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试蜜蜂

山西农业大学动物科技学院实验蜂场提供试验所用的所有中华蜜蜂。选取健康无病、群势强壮、无自然分蜂倾向的中华蜜蜂蜂群,从蜂巢中抽取一张成熟的封盖子脾(新蜂将要出房)置于 34 °C 人工培养箱中培养(RH:70%),待其羽化出房后采集 1 日龄样本;于 10:00 点左右(蜜蜂采集高峰期)在巢门前抓取携粉归来的工蜂(采集蜂);于 14:00—16:00 在巢门口抓取回巢的性成熟雄蜂。每个样本各采集 300 只,进行随机分组,分为 3 组,蜜蜂样品分为触角、头(去除触角)、胸(去除足与翅膀)、腹和足 5 个部位。将所取部位立即放入含有液氮的研钵中进行研磨,呈粉末状后倒入装有 1 mL Trizol 液体的 1.5 mL 离心管中,上下颠倒混匀,让 Trizol 与样品充分接触,放入超低温冰箱(-80 °C)中保存备用。在各个样本中,每 100 只蜜蜂各部位的混合样作为一个生物学重复。

### 1.2 主要试剂

Amp、IPTG、X-Gal 和 50×TAE Buffer 等购自北京依托华茂生物科技有限公司;异丙醇、氯仿、无水乙醇等常规分析纯购自北京索莱宝科技有限公司;反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser(perfect real time)、总 RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus、荧光定量试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)以及 DNA Marker DL 1000 等购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司;PCR 反应试剂 2×Es Taq MasterMix(含染料)购自北京康为世纪生物科技有限公司。

### 1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

按照 RNA 提取步骤进行各部位总 RNA 的提取,利用 ND-1000 核酸蛋白浓度测定仪测定其纯度和浓度后,根据反转录试剂盒合成 cDNA 第一链,反应所需 RNA 总量为 1 000 ng。将所获 cDNA 模板放置于-20 °C 冰箱保存备用。

### 1.4 引物设计

根据前期的中华蜜蜂触角转录组数据分析获得 *IR76b*、*IR75f.1* 基因序列(登录号为:SRR3180625)的开放阅读框 ORF 序列,利用 NCBI 在线程序(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)设计用于荧光定量的特异性引物。所用引物由北京华大基因科技有限公司合成,引物信息详见表 1。

表 1 本研究荧光定量 PCR 所用引物

Tab.1 Primers used in this study

基因名称 Gene name	引物序列(5'-3') Primers sequences	产物长度/bp Product size	退火温度/°C Annealing temperature
<i>AcerIR76b</i>	F:CTGCTGGTGTGCTGGCTATC R:GCGAGAGGGTATCAGACGAC	93	
<i>Arp1</i>	F:ACTACGGCCGAACGTGAAAT R:GGAAAAGAGCCTCGGGACAA	185	62
<i>AcerIR75f.1</i>	F:TGGCGTAGGTTCTACTGCAAG R:TGCAAGTGTGGTATCAAGTCGT	106	

## 1.5 荧光定量 PCR

根据前期设计特异性引物(表 1)对该基因在中华蜜蜂 1 日龄工蜂和雄蜂,采集蜂和性成熟雄蜂 5 个部位中 mRNA 的表达水平进行 qRT-PCR 分析。

qRT-PCR 反应总体系为 10  $\mu$ L,其中 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II(2 $\times$ )5  $\mu$ L,ROX Refence Dye II(50 $\times$ )0.2  $\mu$ L,上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.4  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 3  $\mu$ L,cDNA 模板 1  $\mu$ L。反应条件为:95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s,循环条件为 95  $^{\circ}$ C 5 s,62  $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环。每个样本进行 3 次技术重复。以各样品所对应的 *Arp1* 的 *Ct* 值为阳性对照,获得 *AcerIR76b* 和 *AcerIR75f.1* 基因在不同样本各部位的表达情况。

## 1.6 生物信息学分析

利用在线软件 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)查找序列的开放阅读框,使用 Lasergene 软件中的 EditSeq 工具预测其编码的氨基酸序列,并对其进行多种生物信息学分析。生物信息学分析所用在线软件或软件包的网址见表 2。

表 2 生物信息学分析所用网站

Tab.2 Websites used in bioinformatics analysis

生物信息学分析 Bioinformatics analysis	网站地址 Websites
氨基酸序列的同源性分析 Homology analysis of amino acid sequence	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
保守结构域分析 Analysis of the conserved domain	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi</a>
蛋白理化性质预测 Prediction of elementary physicochemical property of protein	<a href="http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam">http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam</a>
信号肽序列预测 Prediction of signal peptide of sequence	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a>
跨膜结构分析 Analysis of transmembrane structure	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a>
疏水性分析 Analysis of the hydrophobic	<a href="http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl">http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl</a>
亚细胞定位分析 Analysis of the subcellular localization	<a href="https://roslab.org/services/loctree3/">https://roslab.org/services/loctree3/</a>

## 2 结果与分析

### 2.1 *AcerIR76b* 和 *AcerIR75f.1* 的蛋白特性

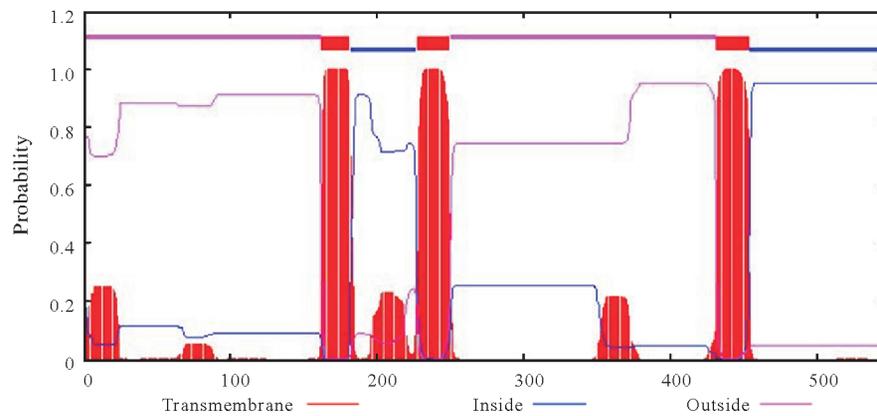
2.1.1 基本理化性质 运用 ProtParam 在线软件预测 *AcerIR76b* 和 *AcerIR75f.1* 的蛋白理化性质(表 3)。从表 3 可以看出,*AcerIR76b* 蛋白的分子式为 C<sub>2911</sub>H<sub>4543</sub>N<sub>733</sub>O<sub>792</sub>S<sub>19</sub>,在组成 *AcerIR76b* 蛋白的 20 种氨基酸中,含量最高为亮氨酸(Leu),所占比例为 12.1%;含量最低为色氨酸,所占比例为 1.5%。预测其蛋白质的分子量为 63.09 ku,理论等电点 pI 为 9.34,碱性蛋白;总平均疏水系数(GRAVY)为 0.003,属于疏水性蛋白;不稳定系数为 44.73,属于不稳定蛋白;脂溶系数为 102.31,大于 90,具有脂溶性。

*AcerIR76b* 蛋白的分子式为 C<sub>2911</sub>H<sub>4543</sub>N<sub>733</sub>O<sub>792</sub>S<sub>19</sub>,在组成 *AcerIR76b* 蛋白的 20 种氨基酸中,含量最高为亮氨酸(Leu),所占比例为 12.1%;含量最低为色氨酸,所占比例为 1.5%。预测其蛋白质的分子量为 63.09 ku,理论等电点 pI 为 9.34,为碱性蛋白;总平均疏水系数(GRAVY)为 0.003,属于疏水性蛋白;不稳定系数为 44.73,属于不稳定蛋白;脂溶系数为 102.31,大于 90,具有脂溶性。

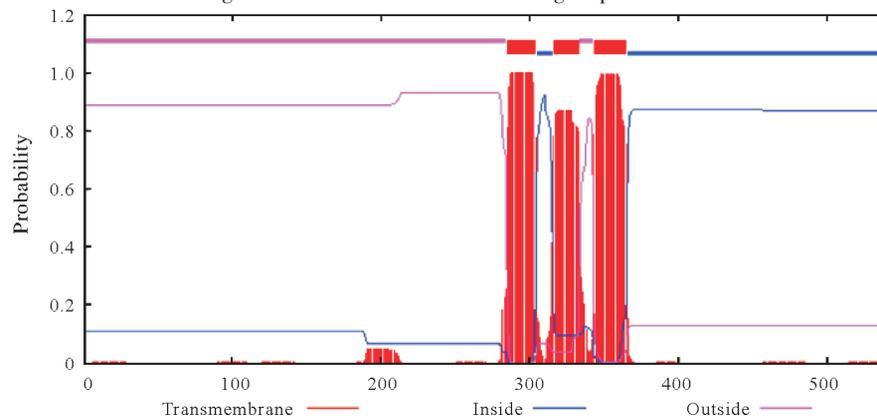
2.1.2 蛋白基本结构预测 在线 NCBI 结构域分析结果表明,*AcerIR76b* 存在两个保守的结构域,分别为 Type 2 periplasmic binding fold 超家族(53-265)以及 Lig\_chan 超家族(162-400)。该蛋白在运输和信号转导过程中起作用,同时也作为通道门控中的初始受体存在。*AcerIR76b* 蛋白没有信号肽,有 3 个跨膜结构(图 1),符合典型的离子型受体结构。疏水性分析结果显示,*AcerIR76b* 的氨基酸序列中,第 35 位氨基酸 Score 值最低为 -2.900,第 11 位氨基酸 Score 最高为 3.122;存在许多相对明显的疏水区域(Score 为正值的区域),推测其可能为疏水蛋白。亚细胞定位结果表明,*AcerIR76b* 蛋白可能存在于内质网(39.1%)、线粒体(13.0%)、质膜(30.4%)、高尔基体(4.3%)、空泡(4.3%)、胞外包括细胞壁(4.3%)和分泌系统的囊泡中(4.3%)中,表明该蛋白属于细胞质蛋白。

表 3 *AcerIR76b* 和 *AcerIR75f.1* 蛋白的理化性质分析

Tab.3 Physical and chemical properties of characteristics for <i>AcerIR76b</i> and <i>AcerIR7f.1</i>		IR76b	IR75f.1
蛋白特性 Protein characteristics			
蛋白分子式 Molecular formula		$C_{2911}H_{4543}N_{733}O_{792}S_{19}$	$C_{2852}H_{4466}N_{746}O_{765}S_{26}$
原子总数 Total number of atoms		8 998	8 855
蛋白分子量/ku Molecular weight		63.090 67	62.28
等电点 Isoelectric point (pI)		9.34	9.59
氨基酸组成 Amino acid constitute	最高 Maximum	Leu 12.1%(66)	Leu 11.2%(60)
	最低 Minimum	Trp 1.5%(8)	Trp 1.1%(6)
	未出现 Nonentity	Pyl 和 Sec	Pyl 和 Sec
带正电荷氨基酸残基总数 (Arg+Lys) Total number of positively charged residues		62	68
带负电荷氨基酸残基总数 (Asp+Glu) Total number of negatively charged residues		43	43
总平均疏水系数 Grand average of hydropathicity		0.003	-0.025
半衰期/h Half-life period		30	1.4
不稳定系数 Instability index		44.73	41.90
脂溶系数 Aliphatic index		102.31	98.75



Transmembrane: 跨膜结构域; inside: 膜内; outside: 膜外

图 1 *AcerIR76b* 跨膜区域预测图Fig.1 *AcerIR76b* transmembrane region prediction

Transmembrane: 跨膜结构域; inside: 膜内; outside: 膜外

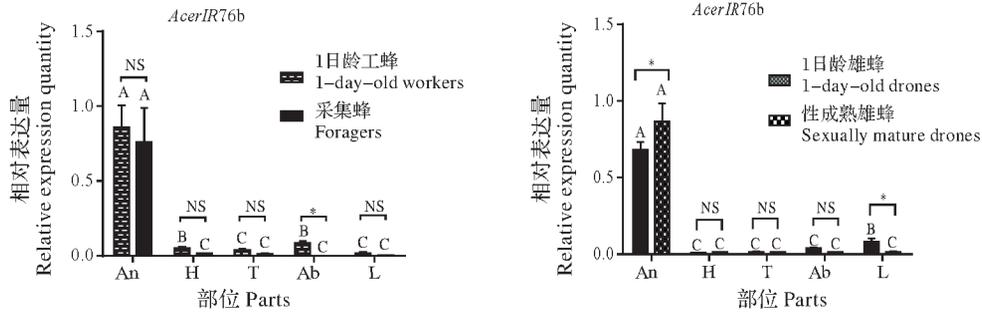
图 2 *AcerIR75f.1* 跨膜区域预测图Fig.2 *AcerIR75f.1* transmembrane region prediction

在线 NCBI 结构域分析结果表明, *AcerIR75f.1* 存在一个保守的结构域, 即 Type 2 periplasmic binding fold 超家族 (175-384)。该蛋白可作为运输, 信号转导和通道门控中的初始受体存在。 *AcerIR75f.1* 蛋白没有信号肽, 有 3 个跨膜结构 (图 2), 符合典型的离子型受体结构。疏水性分析显示, *AcerIR75f.1* 的氨基酸序

列中,第373位氨基酸Score值最低为-3.033,第352位氨基酸最高为3.078;存在多个比较明显的疏水区域(Score为正值的区域)。亚细胞定位结果表明,AcerIR75f.1蛋白可能存在于内质网(44.4%)、线粒体(22.2%)、质膜(22.2%)和分泌系统的囊泡中(11.1%),主要集中在分泌途径上,说明该蛋白属于细胞质蛋白。

### 2.2 AcerIR76b mRNA 组织表达分析

如图3所示,AcerIR76b的转录本在1日龄工蜂和采集蜂,1日龄雄蜂和性成熟雄蜂各部位中均有表达,在触角中的表达量远远高于其它部位,呈极显著差异( $P<0.01$ )。在其它部位中,1日龄工蜂腹部的表达量和采集蜂相比,呈显著差异( $P<0.05$ );1日龄雄蜂足部的表达量同性成熟雄蜂相比,同样呈显著差异( $P<0.05$ )。除此之外,AcerIR76b在剩余部位中均呈微量表达。



An:触角 Antenna;H:头(去除触角)Head without antenna;T:胸 Thorax;Ab:腹 Abdomen;L:足 Legs。1日龄工蜂和外勤蜂,1日龄雄蜂和性成熟雄蜂不同部位间表达量的差异显著性用大写英文字母表示,不同字母代表差异极显著( $P<0.01$ );\*\*, \*和NS分别表示不同性别同部位中IR76b的表达差异极显著( $P<0.01$ )、差异显著( $P<0.05$ )和无显著差异( $P>0.05$ )

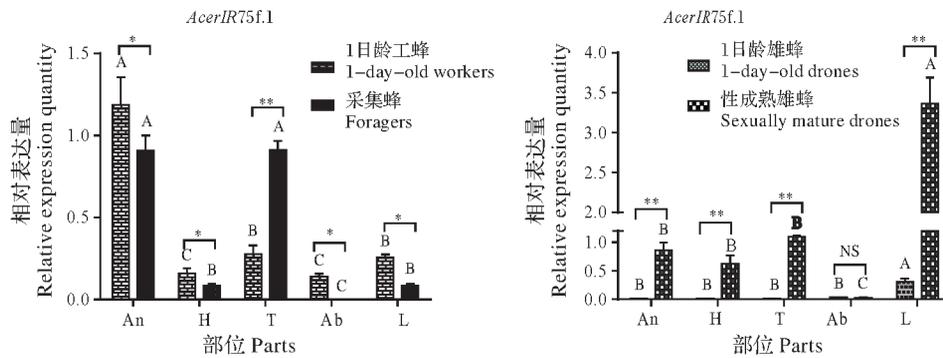
From 1-day-old workers and forager bees, 1 day and sexually mature drones, in different capital letters above bars indicate significant difference in expression level among different tissues ( $P<0.01$ ); \*\*, \* and NS indicated that the expression profiles of *IR76b* at the same developmental stage in the different organization between *Apis cerana cerana* had significant difference at the 0.01 level, significant difference at the 0.05 level and no difference at the 0.05 level respectively

图3 中华蜜蜂AcerIR76b在1日龄工蜂和采集蜂,1日龄雄蜂和性成熟雄蜂不同部位中的相对表达量

Fig.3 Relative expression level of *AcerIR76b* mRNA in different parts of 1-day-old workers and forager, 1 day and sexually mature drones of *Apis cerana cerana*

### 2.3 AcerIR75f.1 mRNA 组织表达分析

如图4所示,AcerIR75f.1的转录本在1日龄工蜂和采集蜂,1日龄雄蜂和性成熟雄蜂各部位中均有表达。在1日龄工蜂和采集蜂中,该基因均在触角中高表达,1日龄工蜂触角的表达量极显著高于其它部位( $P<0.01$ ),而在采集蜂中,触角和胸部的表达量差异不明显,但均极显著高于其它部位( $P<0.01$ )。



An:触角 Antenna;H:头(去除触角)Head without antenna;T:胸 Thorax;Ab:腹 Abdomen;L:足 Legs。1日龄工蜂和外勤蜂,1日龄雄蜂和性成熟雄蜂不同部位间表达量的差异显著性用大写英文字母表示,不同字母代表差异极显著( $P<0.01$ );\*\*, \*和NS分别表示不同性别同部位中IR76b的表达差异极显著( $P<0.01$ )、差异显著( $P<0.05$ )和无显著差异( $P>0.05$ )

From 1-day-old workers and forager bees, 1 day and sexually mature drones, in different capital letters above bars indicate significant difference in expression level among different tissues ( $P<0.01$ ); \*\*, \* and NS indicated that the expression profiles of *IR76b* at the same developmental stage in the different organization between *Apis cerana cerana* had significant difference at the 0.01 level, significant difference at the 0.05 level and no difference at the 0.05 level respectively

图4 中华蜜蜂AcerIR7f.1在1日龄工蜂和采集蜂,1日龄雄蜂和性成熟雄蜂不同部位中的相对表达量

Fig.4 Relative expression level of *AcerIR75f.1* mRNA in different parts of 1-day-old workers and forager, 1 day and sexually mature drones of *Apis cerana cerana*

在1日龄雄蜂和性成熟雄蜂中,除腹部外,性成熟雄蜂各部位的表达量均极显著高于1日龄雄蜂( $P<0.01$ ),其中,足部的表达量极显著地高于其它部位。1日龄雄蜂各部位的表达量均呈微量表达。

### 3 讨论与结论

蜜蜂是一种高度社会性生活的昆虫,通过个体间合作,形成了具有高度发达的通讯和社会分工的合作系统,能适应多变的环境条件。在本课题组前期中华蜜蜂触角转录组测序数据的基础上,成功从中获得了完整的 *AcerIR76b* 及 *AcerIR75f.1* 的 ORF 序列。生物信息学分析表明, *AcerIR76b* 全长为 1 635 个碱基,编码 545 个氨基酸,有 3 个跨膜结构; *AcerIR75f.1* 全长为 1 686 个碱基,编码 562 个氨基酸,同样有 3 个跨膜结构,这与意大利蜜蜂<sup>[41]</sup>、黑腹果蝇<sup>[11]</sup>等的预测结果相一致,属于典型的离子型受体结构,因此可以确定 *AcerIR76b* 与 *AcerIR75f.1* 均为中华蜜蜂的离子型受体基因。

本研究 qRT-PCR 结果显示, *AcerIR76b* 在工蜂和雄蜂触角中的表达量均极显著的高于呈微量表达的其它部位( $P<0.01$ ),与亚洲小车蝗 *Oedaleus asiaticus* 中的表达模式相同<sup>[42]</sup>,但其并非只在嗅觉器官——触角中表达,所以推测 *AcerIR76b* 属于“发散型 IR”。 *AcerIR75f.1* 在 1 日龄工蜂和采集蜂, 1 日龄雄蜂和性成熟雄蜂中的表达模式不同:在 1 日龄工蜂和采集蜂中,该基因在触角中高表达,同时也在采集蜂胸部高表达,呈极显著差异( $P<0.01$ ),而在 1 日龄雄蜂和性成熟雄蜂中,该基因在足部高水平表达,呈极显著差异( $P<0.01$ ),且性成熟雄蜂各个部位的表达量均极显著高于 1 日龄雄蜂(腹部除外),由此推测, *AcerIR75f.1* 同样属于“发散型 IR”。

有关离子型受体 IRs 的功能研究最初集中在黑腹果蝇上,且仅限于嗅觉,但最近的研究已扩展到了听觉,味觉,温度和湿度的感测,如:IR92a1 主要介导黑腹果蝇对氨气和胺的感知<sup>[38]</sup>;IR64a 主要介导果蝇嗅觉系统中酸性物质的检测<sup>[30]</sup>;IR21a 参与黑腹果蝇幼虫的遇冷趋避<sup>[20]</sup>;当 IR93a 与 IR21a 和 IR25a 结合时,同样介导幼虫的温度感知<sup>[20-21]</sup>;IR25a、IR93a、IR68a 和 IR40a 参与果蝇的湿度感应<sup>[20,43]</sup>。有关 IR76b 的功能研究发现,该受体单独存在时,其不仅可以感受咸味,还具有感受氨基酸的味觉功能;当 IR20a 与 IR76b 共表达时,具有甜味感觉功能;IR41a 与 IR76b 共表达时,主要介导对多胺的识别<sup>[44]</sup>;IR25a 和 IR76b 共表达时,介导雌性的酸味味觉受体神经元(GRNs)的活化<sup>[45]</sup>。由此可见,IR76b 不仅具有嗅觉功能,同时也具备味觉感知功能。但关于 *AcerIR75f.1* 功能的研究还尚未见报道,因此只能基于本研究 qRT-PCR 结果,推测该基因不仅在嗅觉上发挥一定作用,在雄蜂味觉感知中也占据着重要地位。

在一个蜂群里,工蜂的数量最多,担任了除产卵以外的所有工作,1日龄工蜂主要在巢内进行保温孵卵、清理产卵房的工作;而采集蜂作为壮年个体,主要在巢外进行采集花蜜、水、花粉、蜂胶及巢门防卫的工作<sup>[46]</sup>,因此,有更多机会外出飞行,接触不同类型的气味分子。雄蜂的唯一任务就是保证与处女王的交配,在交配季节,性成熟的雄蜂会自动聚集在某空域中,招引处女王<sup>[47]</sup>。本研究 qRT-PCR 结果显示, *AcerIR76b* 和 *AcerIR75f.1* 均在工蜂和雄蜂足部有表达,因此,推测该基因不仅起嗅觉识别功能,在味觉感知中也同样发挥着一定作用。

本研究通过对 *AcerIR76b* 和 *AcerIR75f.1* 基因的生物信息学分析,结果表明,2个基因均具有昆虫离子型受体的典型特征。荧光定量表达结果显示 *AcerIR76b* mRNA 在工蜂和雄蜂触角的表达极显著地高于其它部位( $P<0.01$ ),在其它部位仅微量表达; *AcerIR75f.1* mRNA 在工蜂触角中高表达,在雄蜂足部高表达,推测 2 个基因不仅起嗅觉识别功能,在味觉感知中也同样发挥着一定作用,具体功能还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Bruce T J, Wadhams L J, Woodcock C M. Insect host location: a volatile situation[J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(6): 269-274.
- [2] Song H G, Kwon J Y, Han H S, et al. First contact to odors: our current knowledge about odorant receptor[J]. Sensors, 2008, 8(10): 6303-6320.
- [3] Wu C, Jordan M D, Newcomb R D, et al. Analysis of the genome of the New Zealand giant collembolan (*Holacanthella duospinosa*) sheds light on hexapod evolution[J]. BMC genomics, 2017, 18(1): 795.

- [4] Liu Z, Smaghe G, Lei Z, et al. Identification of male-and female-specific olfaction genes in antennae of the oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*) [J]. Plos One, 2016, 11(2): e0147783.
- [5] 郭丽娜. 中华蜜蜂气味受体基因 Or1 和 Or2 功能分析[D]. 晋中: 山西农业大学, 2018.  
Guo L N. Functional analysis of Odorant Receptor *Or1* and *Or2* from *Apis cerana cerana* [D]. Jinzhong: Shanxi Agricultural University, 2018.
- [6] 石元元, 管翠, 曾志将, 等. 蜜蜂为油菜授粉增产效果及机理研究[J]. 江西农业大学学报, 2009, 31(6): 994-999.  
Shi Y Y, Guan C, Zeng Z J, et al. Yield-increasing effect and mechanism of honeybee on rape pollination [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2009, 31(6): 994-999.
- [7] 苏松坤, 陈盛禄, 钟伯雄, 等. 中华蜜蜂 mrjp3 基因 cDNA 的克隆及序列分析[J]. 中国农业科学, 2005, 38(3): 612-618.  
Su S K, Chen S L, Zhong B X, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding mrjp3 of *Apis cerana cerana* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38(3): 612-618.
- [8] Zhao H T, Zhao W M, Gao P F, et al. Sequence and expression characterization of an OBP1 gene in the Asian honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) [J]. Applied Entomology and Zoology, 2014, 49(1): 189-196.
- [9] Vosshall L B, Amrein H, Morozov P S, et al. A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna [J]. Cell, 1999, 96(5): 725-736.
- [10] Bohbot J., Pitts R J, Kwon H W, et al. Molecular characterization of the *Aedes aegypti* odorant receptor gene family [J]. Insect Molecular Biology, 2007, 16(5): 525-537.
- [11] Benton R, Vannice K S, Gomez-Diaz C, et al. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila* [J]. Cell, 2009, 136(1): 149-162.
- [12] Clyne P J, Warr C G, Freeman M R, et al. A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila* [J]. Neuron, 1999, 22: 327-338.
- [13] Chang H, Liu Y, Ai D, et al. A pheromone antagonist regulates optimal mating time in the moth *Helicoverpa armigera* [J]. Current biology, 2017, 27(11): 1610-1615.
- [14] De Fouchier A, Walker W B, Montagne N, et al. Functional evolution of *Lepidoptera* olfactory receptors revealed by deorphanization of a moth repertoire [J]. Nature Communications, 2017, 8: 15709.
- [15] Pitts R J, Derryberry S L, Zhang Z, et al. Variant ionotropic receptors in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* tuned to amines and carboxylic acids [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 40297.
- [16] Ai M, Min S, Grosjean Y, et al. Acid sensing by the *Drosophila* olfactory system [J]. Nature, 2010, 468(7324): 691-695.
- [17] Silbering A F, Rytz R, Grosjean Y, et al. Complementary function and integrated wiring of the evolutionarily distinct *Drosophila* olfactory subsystems [J]. Journal of Neuroscience, 2011, 31(38): 13357-13375.
- [18] Koh T W, He Z, Gorur-Shandilya S, et al. The *Drosophila* IR20a clade of ionotropic receptors are candidate taste and pheromone receptors [J]. Neuron, 2014, 83(4): 850-865.
- [19] Ai M, Blais S, Park J Y, et al. Ionotropic glutamate receptors IR64a and IR8a form a functional odorant receptor complex in vivo in *Drosophila* [J]. Journal of Neuroscience, 2013, 33(26): 10741-10749.
- [20] Knecht Z A, Silbering A F, Ni L, et al. Distinct combinations of variant ionotropic glutamate receptors mediate thermosensation and hyposensation in *Drosophila* [J]. eLife, 2016, 5: e17879.
- [21] Ni L, Klein M, Svec K V, et al. The ionotropic receptors IR21a and IR25a mediate cool sensing in *Drosophila* [J]. eLife, 2016, 5: 1-12.
- [22] Su C Y, Menzies K, Carlson J R. Olfactory perception: receptors, cells, and circuits [J]. Cell, 2009, 139(1): 45-59.
- [23] Vosshall L B, Stocker R F. Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila* [J]. Annual Review of Neuroscience, 2007, 30: 505-533.
- [24] Mayer M L. Emerging models of glutamate receptor ion channel structure and function [J]. Structure, 2011, 19(10): 1370-1380.
- [25] Bas van S, Chris D J, Adriana D B, et al. Genome-wide analysis of ionotropic receptors provides insight into their evolution in *Heliconius* butterflies [J]. BMC Genomics, 2016, 17: 254.
- [26] Rytz R, Croset V, Benton R. Ionotropic receptors (IRs): chemosensory glutamate receptors in *Drosophila* and beyond [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 43(9): 888-897.
- [27] Wanner K W, Robertson H M. The gustatory receptor family in the silkworm moth *Bombyx mori* is characterized by a large expansion of a single lineage of putative bitter receptors [J]. Insect Molecular Biology, 2008, 17(6): 621-629.

- [28] Tanaka K, Uda Y, Ono Y, et al. Highly selective tuning of a silkworm olfactory receptor to a key mulberry leaf volatile [J]. *Current Biology*, 2009, 19(11): 881-890.
- [29] Benton R, Sachse S, Michnick S W, et al. Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo [J]. *Plos Biology*, 2006, 4(2): 240-257.
- [30] Abuin L, Bargeton B, Ulbrich M H, et al. Functional architecture of olfactory ionotropic glutamate receptors [J]. *Neuron*, 2011, 69(1): 44-60.
- [31] Croset V, Rytz R, Cummins S F, et al. Ancient protostome origin of chemosensory ionotropic glutamate receptors and the evolution of insect taste and olfaction [J]. *Plos Genetics*, 2010, 6(8): e1001064.
- [32] Larsson M C, Domingos A I, Jones W D, et al. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction [J]. *Neuron*, 2004, 43(5): 703-714.
- [33] Liu Y, Gu S H, Zhang Y J, et al. Candidate olfaction genes identified within the *Helicoverpa armigera* antennal transcriptome [J]. *Plos One*, 2012, 7(10): e48260.
- [34] Grosjean Y, Rytz R, Farine J P, et al. An olfactory receptor for food-derived odours promotes male courtship in *Drosophila* [J]. *Nature*, 2011, 478(7368): 236-240.
- [35] Jia X J, Zhang X F, Liu H M, et al. Identification of chemosensory genes from the antennal transcriptome of Indian meal moth *Plodia interpunctella* [J]. *Plos One*, 2018, 13(1): e0189889.
- [36] Gu T Z, Huang K R, Tian S, et al. Antennal transcriptome analysis and expression profiles of odorant binding proteins in *Clostera restituta* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2019, 29: 211-220.
- [37] Yi J K, Yang S, Wang S, et al. Identification of candidate chemosensory receptors in the antennal transcriptome of the large black chafer *Holotrichia parallela* Motschulsky (Coleoptera: Scarabaeidae) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2018, 9(28): 63-71.
- [38] Min S, Ai M, Shin S A, et al. Dedicated olfactory neurons mediating attraction behavior to ammonia and amines in *Drosophila* [J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2013, 110(14): E1321-E1329.
- [39] Li J Y, Chen Q, Man Y H, et al. Variant ionotropic receptors are expressed in the antennae of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) [J]. *Biochemical Genetics*, 2019, 57(4): 571-582.
- [40] Wu Z Z, Kang C, Qu M Q, et al. Candidates for chemosensory genes identified in the Chinese citrus fly, *Bactrocera minax*, through a transcriptomic analysis [J]. *BMC genomics*. 2019, 20(1): 646.
- [41] Guillaume S B, Christina Z, Jürgen R, et al. Acetylcholine, GABA and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee, *Apis mellifera* [J]. *Journal of Comparative Physiology A*, 2005, 191(9): 823-836.
- [42] Zhou Y T, Li L, Zhou X R, et al. Identification and expression profiling of candidate chemosensory membrane proteins in the band-winged grasshopper, *Oedaleus asiaticus* [J]. *Comparative Biochemistry And Physiology. Part D, Genomics & Proteomics*, 2019, 30: 33-44.
- [43] Knecht Z A, Silbering A F, Cruz J, et al. Ionotropic receptor-dependent moist and dry cells control hygrosensation in *Drosophila* [J]. *eLife*, 2017, 6: e26654.
- [44] Hussain A., Zhang M., Uçunur , et al. Ionotropic chemosensory receptors mediate the taste and smell of polyamines [J]. *Plos Biol*, 2016, 14(6): e1002505.
- [45] Chen Y and Amrein H. Ionotropic receptors mediate *Drosophila* oviposition preference through sour gustatory receptor neurons [J]. *Current Biology*, 2017, 27(18): 2741-2750.
- [46] Zhao H X, Zeng X N, Liang Q, et al. Study of the *obp5* gene in *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana* [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(2): 6482-6494.
- [47] Rangel J, Keller J, Tarry D. The effects of honey bee (*Apis mellifera* L.) queen reproductive potential on colony growth [J]. *Insects Sociaux*, 2013, 60: 65-73.