

中华蜜蜂化学感受蛋白cDNA克隆、定位及其表达

李红亮^① 楼兵干^② 程家安^① 高其康^{①③*}

(浙江大学^①昆虫科学研究所, ^② 生物技术研究所, ^③ 分析测试中心, 杭州 310029. * 联系人, E-mail: qkgao@zju.edu.cn)

摘要 化学感受蛋白被认为是化学通讯中广泛存在于感觉器官中的一种小分子蛋白。在中国本土蜜蜂中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 工蜂的触角中, 克隆并鉴定了一种化学感受蛋白, 命名为 Ac-ASP3。Ac-ASP3 全长 cDNA 由 2 个外显子组成, 可读框长 393 bp, 编码 130 个氨基酸。序列分析表明, 其具有保守的 4 个半胱氨酸, 并在 N 端具有 19 个氨基酸的信号肽。另外, Ac-ASP3 与其同一家族基因意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 的 Am-ASP3 具有较高的相似性, 而与其他物种相似性较低。免疫定位结果显示, Ac-ASP3 仅特异性地表达于机械感器, 如毛形感器 B 和锥形感器中; 而在嗅觉感器, 如板形感器中几乎无分布。实时定量 PCR 结果表明, Ac-ASP3 高丰度表达于翅和足中, 而在触角中表达量却相对较低。在时间表达上, Ac-ASP3 在蛹期及成虫第 1~6 日龄阶段大量表达, 这一时期中华蜜蜂正处于幼年期, 并在蜂巢进行日常清洁和哺育幼虫等活动。以上结果表明, Ac-ASP3 是具有种群特异性的, 不参与搜寻蜜粉源等嗅觉活动, 但可能参与蜂巢内个体信息识别以及触角的机械运动。

关键词 中华蜜蜂 ASP3 化学感受蛋白 分子克隆 免疫定位 基因表达

在昆虫触角感器中, 存在两类主要的酸性小分子可溶性蛋白, 即气味结合蛋白 (odorant-binding proteins, OBPs) 和化学感受蛋白 (chemosensory proteins, CSPs)。其中 OBPs 一般可以分为信息素结合蛋白 (pheromone-binding proteins, PBP) 和普通气味结合蛋白 (general odorant binding proteins, GOBP)。OBPs 分子量约为 16 kD, 含有 6 个保守的半胱氨酸 (组成 3 对二硫键)^[1,2], PBP 主要识别性信息素而 GOBP 一般识别普通气味分子^[3]。另一类小分子蛋白 (分子量约为 13 kD), 即 CSPs, 比 OBPs 略小, 包含 4 个保守的半胱氨酸 (组成两对二硫键), 在果蝇 *Drosophila melanogaster* 中被首次鉴定, 并命名为 OS-D 或 A-10^[4,5]。

昆虫 CSPs 在结构上与 PBP 及 GOBP 并没有相似性, 在进化上比后者更保守, 且在亲缘较近的物种中仅具有 50% 左右的一致性^[6]。从基因表达上的特异性来看, 相对于大多数 OBPs 为感器特异性表达不同的是, CSPs 在两种鳞翅目昆虫中广泛表达于触角、头、胸、腹以及足等缺乏嗅觉及味觉感器的器官中^[7], 蚜虫中的某些类 OS-D 基因主要表达于成虫中并在触角和足中呈高丰度表达^[8], 另外, CSPs 也被发现参与了蜜蜂胚胎体壁形成^[9]和蚜虫蜕皮^[10]等发育过程。尽管 CSPs 还没有直接被证明与嗅觉识别相关, 但是

目前通过组织特异定位以及配体结合实验, 均支持这样的假说, 即 CSPs 在化学感受过程中具有重要作用^[11,12]。

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* (以下简称中蜂) 是原产中国的重要的经济学昆虫, 在中国约有两百万群。中蜂具有典型的生物学特征, 如嗅觉灵敏、抗螨、适应能力强以及耐寒耐热等特征^[13,14]。其发达的化学感受系统是分辨外界环境分子重要的物质基础, 所以发现并鉴定其化学感受系统中的感受蛋白如 CSPs 显得十分必要。意大利蜜蜂 *Apis mellifera* (以下简称意蜂) 的一个化学感受蛋白 ASP (根据其 N 端序列的同源性将其列为化学感受蛋白家族成员^[15]), 为研究中蜂的 CSPs 提供了良好的基础。本研究首次克隆了一个编码中蜂化学感受蛋白的基因 Ac-ASP3, 并在大肠杆菌中表达。通过免疫细胞化学定位及实时定量 PCR, 初步鉴定了 Ac-ASP3 的表达特征并对其在中蜂工蜂触角内的生物学功能进行了推测。

1 材料与方法

(i) 蜜蜂。中蜂工蜂的幼虫、蛹以及成虫均采自浙江大学实验蜂场 (杭州)。通过对每日新生的幼蜂进行颜色标记, 再放回蜂巢, 待到一定日龄时将标记

2006-12-18 收稿, 2007-03-13 接受

国家自然科学基金资助项目 (批准号: 30270896)

颜色的已知确切日龄的蜜蜂进行抓取和收集。中蜂的发育分期通过标准的方法进行分类^[16,17]。

(ii) 编码 Ac-ASP3 的 cDNA 及其基因组 DNA 的克隆。取新鲜获取的中蜂工蜂触角 100 只, 通过 Trizol 法(Invitrogen)提取总 RNA, 并利用 Super-Script™ II Reverse Transcriptase System (Invitrogen) 反转录获得 cDNA, 根据意蜂的 ASP3 序列(GenBank 登录号为 XM_393460), 设计用于扩增 Ac-ASP3 的上游引物(5'-GTGGATCCATGAAGGTCTCAATA-3', 下划线为 BamH I 限制性酶切位点)以及下游引物(5'-CGCAAGCTTTTAAACATTAATGC-3', 下划线为 HindIII 限制性酶切位点)。扩增程序为: 94℃预变性 4 min; 94℃变性 45 s, 50℃退火 45 s 及 72℃延伸 1 min, 35 个循环; 72℃保温 10 min。扩增的 DNA 通过凝胶回收试剂盒(Qiagen)纯化后, 克隆至 pGEM-T 载体(Promega)并转化入 TG1 大肠杆菌感受态细胞中。经 BamH I 与 HindIII 双酶切鉴定获得阳性克隆, 并进行测序, 从而得到 Ac-ASP3 完整的可读框编码序列。工蜂基因组 DNA 的提取^[18], 目的序列的扩增、克隆以及测序方法均同上。

(iii) 重组 Ac-ASP3 蛋白的表达及纯化。质粒 pGEM-Ac-ASP3 经 BamH I 与 HindIII 双酶切后, 获得长 410 bp 的片段, 经凝胶回收试剂盒(Qiagen)纯化, 克隆至同样经双酶切鉴定的 pET-30a(+)载体(Novagen), 并转化入 BL21 (DE3)大肠杆菌感受态细胞中。挑取单克隆于 10 mL LB 培养基中(含 30 μg/mL 卡那霉素)过夜培养, 次日以 1:100 稀释继续 37℃培养, 当 A₆₀₀ 达到 0.4 后, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导目的蛋白的表达。28℃培养 4 h 后, 培养物经高速离心并用裂解液(50 mmol/L Tris/HCl, pH 8.0, 50 mmol/L NaCl, 0.5% TritonX-100, 2 mg/mL 溶菌酶)裂解细胞沉淀, 经超声及高速离心后, 上清液经过 Ni²⁺-NTA 柱(Qiagen)分离和纯化 Ac-ASP3 融合蛋白, 经透析、冷冻干燥并最终溶解于 PBS (pH 7.4)使其终浓度为 1 mg/mL, 并作为抗原免疫动物。

(iv) 抗血清制备。以纯化过的 Ac-ASP3 融合蛋白对成年雄性家兔进行皮下注射和肌肉注射免疫(每次 1 mg), 首次免疫和第 2 次免疫的间隔时间为 21 d, 以后免疫的间隔时间为 14 d。首次免疫注射前以完全福氏佐剂与抗原等体积充分乳化, 其他均以不完全福氏佐剂与抗原乳化。在末次免疫后第 10 天采集血清即可。

(v) Western blot 分析。纯化好的 Ac-ASP3 融合蛋白经 SDS-PAGE (浓度为 12.5%)电泳, 并经 Bio-Rad Transblot (Bio-Rad)转移至硝酸纤维素膜上, 将膜浸泡于 TBS (含有 3% BSA 和 0.05% Tween 20)中 4℃过夜, 然后转移至 Ac-ASP3 融合蛋白抗血清(1:400 稀释)进行孵育, 再以羊抗兔 IgG 辣根过氧化物酶 HRP (1:800 稀释)作为二抗。免疫反应条带最终在显色剂(2 mg DAB, 10 μL 30% H₂O₂, 10 mL TBS)中进行显色。

(vi) 扫描电子显微镜(SEM)观测。工蜂触角用 0.1 mol/L PBS (pH 7.4)清洗 3 次, 70%乙醇处理 30 min, 自然干燥后, 样品用 K500X sputter coater (Emitech, UK)喷金, 并固定在 XL30-ESEM (Philips, NL)下进行 SEM 超微结构观察。

(vii) 免疫定位。工蜂触角置于含有甲醛(2%)和戊二醇(1%)的 0.1 mol/L PBS (pH 7.4)中 4℃固定 2~3 h。乙醇浓度梯度脱水后, 以 K4M (Sigma)于-20℃UV 照射 72 h 包埋聚合。利用 Ultracut E Ultramicrotome (Reichert-Jung, AT)切割超薄切片(50~100 nm)。切片置于镍网上并在 Parafilm 上以如下步骤进行标记: ddH₂O 洗 1 次; BL (含有 1% BSA, 0.02% PEG2000, 10 mmol/L NaCl 及 1% NaN₃ 的 50 mmol/L PBS)洗 1 次; 一抗抗血清(用 BL 以 1:50 稀释); ddH₂O 两次; BL 洗 1 次; 二抗即交联 10 nm 胶体金 (AuroProbe EM, GAR G10, Amersham)的羊抗兔 IgG (用 BL 以 1:20 稀释); 最后 ddH₂O 洗涤 3~5 次。Ac-ASP3 免疫定位的最后结果在透射电子显微镜 JEM-1230 (JEOL, JP)下观察并拍照。

(viii) 基于 Real-time PCR 的 Ac-ASP3 表达谱分析。准备两组材料(50 头成年工蜂的触角、头、胸、腹、翅以及足; 7 日龄的幼虫、蛹和 1, 4, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 及 30 日龄的成虫的触角)分别用于 Ac-ASP3 的时空表达谱分析。总 RNA 提取及 cDNA 反转录过程均参照上述方法进行。Ac-ASP3 特异性引物见材料与方法部分, 以东方蜜蜂 *Apis cerana* 的 β-actin 序列 (GenBank 登录号为 AB072495)作阳性对照并设计引物(上游序列为 5'-TCCTGCTATGTATGTCGC-3', 下游序列为 5'-AGTTGCCATTTCCTGTTC-3'), 扩增片段长度为 301 bp。检测仪器为 iCycler iQ™ 实时 PCR detection system (Bio-Rad)。扩增体系为 20 μL, 包含 1 μL cDNA (约 20 ng), 10 μL iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), 10 μmol/L 引物各 1 μL。扩增程序为:

94°C预变性 5 min; 94°C变性 30 s, 50°C退火 30 s, 72°C延伸 30 s, 40 个循环. 每个反应重复 3 次, 并用标准的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[19]进行数据处理和计算.

2 结果

2.1 Ac-ASP3 序列分析

根据意蜂 ASP3 设计 Ac-ASP3 cDNA 的特异性引物, 扩增出预期的片段(图 1(a)), 克隆入 pGEM-T 载体后, 经双酶切鉴定(图 1(b))得到阳性克隆, 经测序获得了 393 bp 的 ORF 全长序列(图 2), 并已在 GenBank 中登录(登录号为 DQ449669). 通过序列分析, 推测出其编码 130 个氨基酸, N 端含有一个 19 个氨基酸的亲水性信号肽(SignalP 3.0 预测^[20], 图 2), 而经分析^[21]成熟蛋白区多呈疏水性(图 3). 通过与基因组 DNA 比较后得知, Ac-ASP3 含有一个长达 546 bp 的内含子. 通过 ExPASy^[22]计算, Ac-ASP3 成熟蛋白等电点和分子量分别为 5.94 和 13014.86 Da, 与其他报道的 CSPs 相似. Ac-ASP3 具有 4 个保守半胱氨酸

的典型 CSPs 家族标志, 除了与意蜂的 ASP 由于同属而相似性高达 98.5%~99.2%以外, 与其他昆虫的 CSPs 仅具有 48%~53.2%的相似性(图 4, 表 1), 而通过 Neighbor Joining 法构建系统进化树也得到类似的结果(图 5).

2.2 Ac-ASP3 融合蛋白诱导、纯化以及 Western blot

经 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切 pGEM-Ac-ASP3 重组质粒后, 将回收的 DNA 插入到 pET-30a(+)中, 并转化入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中, 经 IPTG 诱导产生 Ac-ASP3 融合蛋白. 细胞裂解液经 12.5% SDS-PAGE 后如图 6 所示, 融合蛋白 Ac-ASP3 主要在上清液中, 并在 18 kD 处有一明显的条带, 而在沉淀中几乎不产生. 经灰度扫描计算得知, 1 L 细胞培养物可以产生约 15 mg 的融合蛋白, 说明产率较高. 利用 pET-30a(+)载体上的 6 个组氨酸标签和 Ni^{2+} -NTA 琼脂糖柱, 将融合蛋白从细胞裂解液上清中分离出来(图 6, 泳道 7). 纯化的 Ac-ASP3 融合蛋白经冷冻干燥后重新溶解并按照上述方法免疫兔子制备多抗. 多抗效价通过琼脂双扩散测定为 1:16, 并通过 Western blot 来确定多抗的特异性(图 6, 泳道 9).

2.3 Ac-ASP3 在触角感器中的免疫定位

通过 SEM 观察, 中蜂成年工蜂触角上存在着至少 6 种化学感器: 板形感器(sensilla placodea, sp)、锥形感器(sensilla basiconica, sb)、钟形感器(sensilla campani form, scf)以及毛形感器 A, B, CD (sensilla trichoidea A, B, CD, st A, B, CD)^[23](图 7). 板形感器是中蜂工蜂触角上数量最多的感器, 与同属的蜜蜂一样是呈椭圆形的盘状结构^[24,25], 而且感器板周边稍微隆

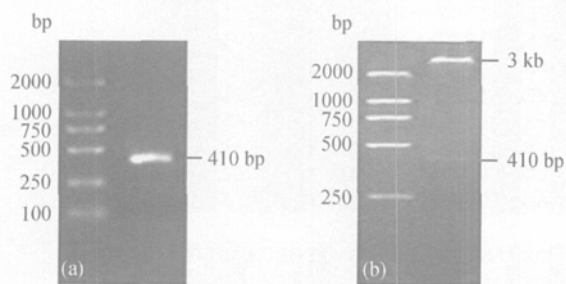


图 1

(a) 中蜂 Ac-ASP3 长约 410 bp 的 PCR 产物; (b) 通过 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切鉴定 pGEM-Ac-ASP3 重组质粒. 左侧分别为 DNA 分子量标准

```

ATGAAGGTCTCAATAATTTGTTTGGTCCTTATGGCGGCCATTGTCCTTGTGGCTGCTCGT
M K V S I I C L V L M A A I V L V A A R
CCAGACGAATCTTATACATCTAAATTTGACGATATTAATGTGGACGAAATCTGCATAGT
P D E S Y T S K F D D I N V D E I L H S
GATCGTTTGCTGAACAATTACTTCAAGTGTGATGGATGAAGGAAGATGCACAGCAGAA
D R L L N N Y F K (C) L M D E G R (C) T A E
GGAAATGAACCTCAAACGAGTCTTGCCTGACGCTCTGGCCACCGATTGCAAAAAATGCACT
G N E L K R V L P D A L A T D (C) K K (C) T
GACAAGCAACGAGAGGTGATCAAGAAAGTGATCAAGTTCTTGGTCGAGAATAAACAGAA
D K Q R E V I K K V I K F L V E N K P E
TTGTGGGATTCCCTTGCCAACAAATACGACCCAGACAAGAAGTACAGAGTCAAATTCGAG
L W D S L A N K Y D P D K K Y R V K F E
GAAGAAGCGAAGAAGCTCGGCATTAATGTTTAA
E E A K K L G I N V *
    
```

图 2 Ac-ASP3 的 ORF 全长 cDNA 序列

核苷酸序列下方为对应的氨基酸残基. 星号为终止密码子, 椭圆形标记为 4 个保守的半胱氨酸. N 端的 19 个氨基酸为 Ac-ASP3 的信号肽(下划线). 箭头处所示为 546 bp 的内含子

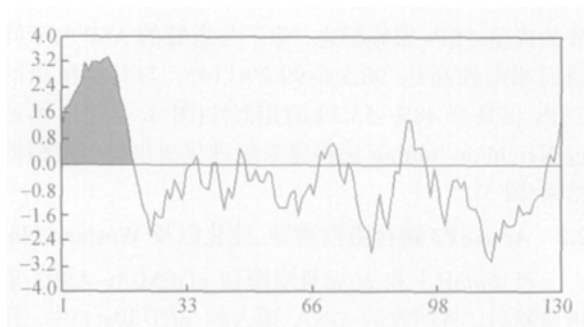


图3 Ac-ASP3 蛋白序列的疏水性预测

以 9 个氨基酸的窗口分析, 正值为亲水性, 负值为疏水性, 阴影部分显示预测的亲水性的信号肽, 而成熟肽段则多为疏水性

起且周围有裂缝(图 7, sp). 锥形感器是在雌性中唯一存在的^[24], 形状粗大且直立, 壁较薄且有较多的孔(图 7, sb); 毛形感器 B 较易区分, 它细而尖, 末端比较弯曲且弯向触角表面(图 7, stB).

利用制备的 Ac-ASP3 抗血清研究其在触角感器

中的定位. 在触角跗节中, 大量的金颗粒标记在作为触觉受体的毛形感器 B 及锥形感器, 而在作为嗅觉受体的板形感器(图 8)或毛形感器 A 和 CD (数据未显示)分布较少. 但毛形感器 B 不仅分布于没有神经元分布的外部淋巴液中, 而且在神经元周围的内部血淋巴中也有分布(图 9(a)和(b)). 不完全相同的是, 在锥形感器中, Ac-ASP3 不仅分布于神经元周围的神经鞘细胞淋巴, 而且也在包裹感器底部的毛原细胞的淋巴中分布. 但是在联系表皮外的感觉神经元的空白区的 K4M 包埋剂中并无标记(图 9(c)和(d)). 尽管大部分板形感器没有标记上, 但是在其表面周边的裂缝内的中间位置的浅沟中却发现显著标记(图 8).

2.4 Ac-ASP3 时空转录表达谱分析

利用 SYBR I 实时定量 PCR 方法及标准的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量方法^[19]来鉴定 Ac-ASP3 的时空转录表达谱, 并利用 β -actin 作为阳性参照(图 10). Ac-ASP3 在各器

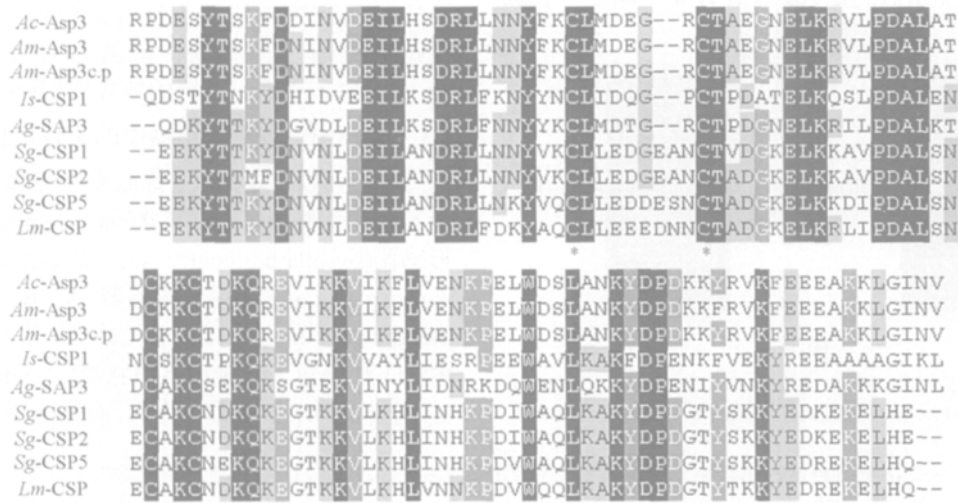


图4 成熟 Ac-ASP3 序列与其他昆虫 CSPs 的联配比对

氨基酸残基相同的部分为阴影显示, 4 个保守的半胱氨酸以星号标记. Ac, *Apis cerana cerana*; Am, *Apis mellifera*; Is, *Ixodes scapularis*; Ag, *Anopheles gambiae*; Sg, *Schistocerca gregaria*; Lm, *Locusta migratoria*

表1 成熟 Ac-ASP3 序列与其他昆虫的 CSPs 的相似性矩阵(各物种对应于图 4)

	Ac-ASP3	Am-ASP3	Am-ASP3c.p	Is-CSP1	Ag-SAP3	Sg-CSP1	Sg-CSP2	Sg-CSP5
Am-ASP3	98.5							
Am-ASP3c.p	99.2	99.2						
Is-CSP1	48	48.8	48					
Ag-SAP3	51.6	50.8	51.6	54				
Sg-CSP1	52.3	52.3	53.2	45	53.2			
Sg-CSP2	53.2	53.2	54.1	43.1	51.4	97.2		
Sg-CSP5	49.5	49.5	50.5	43.1	51.4	89.9	89	
Lm-CSP	52.3	52.3	53.2	42.2	51.4	81.7	80.7	87.2

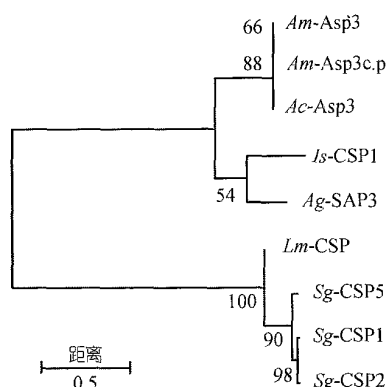


图 5 Neighbor Joining (NJ)法构建 *Ac*-ASP3 与其他昆虫 CSPs 的系统进化树
树枝长度代表序列遗传距离, 树枝上的数字代表 Bootstrap 为 1000 次时的支持度值

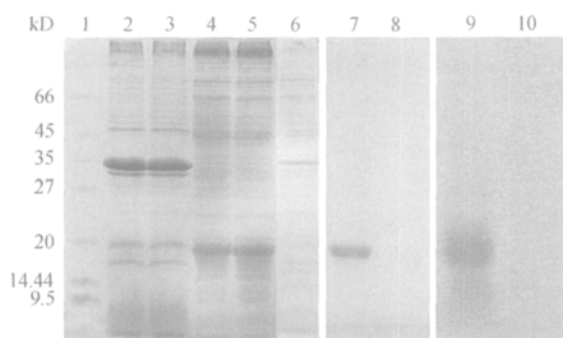


图 6 *Ac*-ASP3 融合蛋白提取、纯化及鉴定(12.5% SDS-PAGE)
上清(泳道 4, 5)18 kD 处的明显条带即为目的蛋白(而沉淀(泳道 2, 3)对应位置没有); 通过 Ni^{2+} -NTA 纯化后的唯一一条带即为融合蛋白(泳道 7). Western-blot 分析制备多抗的特异性(泳道 9). 所有的对照 CK 均位于各部分的最右侧泳道, 泳道 1 为蛋白分子量标准

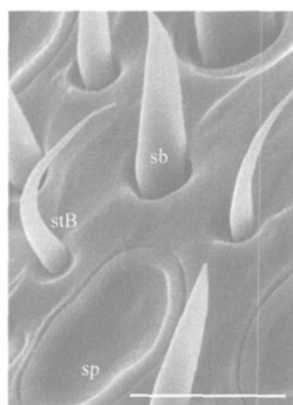


图 7 SEM 观察下中蜂 3 种不同类型的化学感器
显示板形感器(sp)、锥形感器(sb)及毛形感器 B(stB). 该 3 种感器均位于触角端部的背侧片段. 标尺为 10 μm

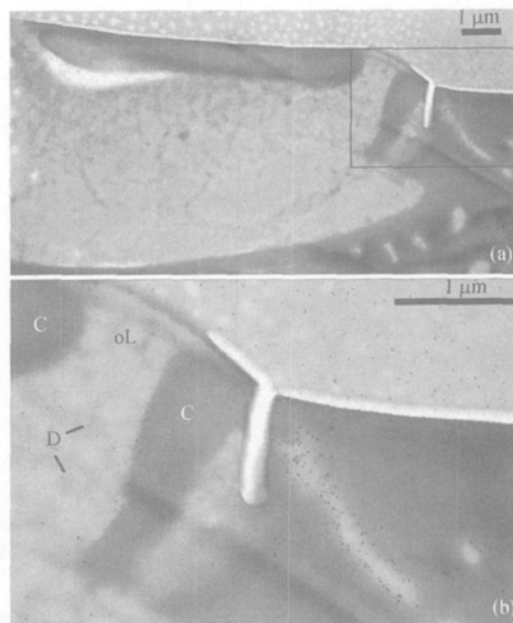


图 8 中蜂 CSPs 的触角感器中的免疫化学定位
在蜜蜂主要嗅觉感器板形感器中(a)*Ac*-ASP3 并没有分布, 但在其表面感器周围的裂缝中中部的浅沟中却发现标记. (b)是(a)方框区域的放大. D, 树突(dendrite); C, 角质层(cuticle); oL, 外部淋巴(out sensillum lymph)

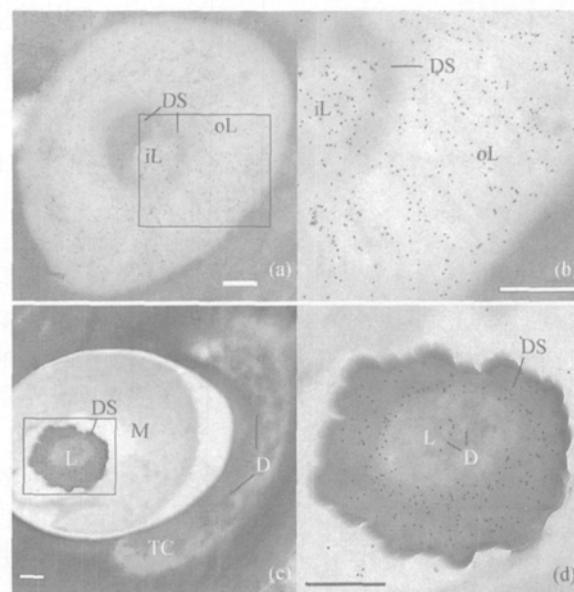


图 9 中蜂 CSPs 触角感器中的免疫化学定位
Ac-ASP3 特异地表达于毛形感器 B((a)及(b), 其中(b)是(a)方框区域的放大)以及锥形感器中((c)及(d), 其中(d)是(c)方框区域的放大). 不同的是, 锥形感器仅标记在神经元树突(D)周围的鞘细胞(dendrite sheath, DS)淋巴以及毛原细胞(trichogen cell, TC)淋巴内(值得一提的是, 表皮外的空白区(margin, M)的 K4M 包埋剂中并没有被标记), 然而在毛形感器 B 的外部淋巴(oL)和内部淋巴(inner sensillum lymph, iL)却均有标记. 标尺为 0.5 μm

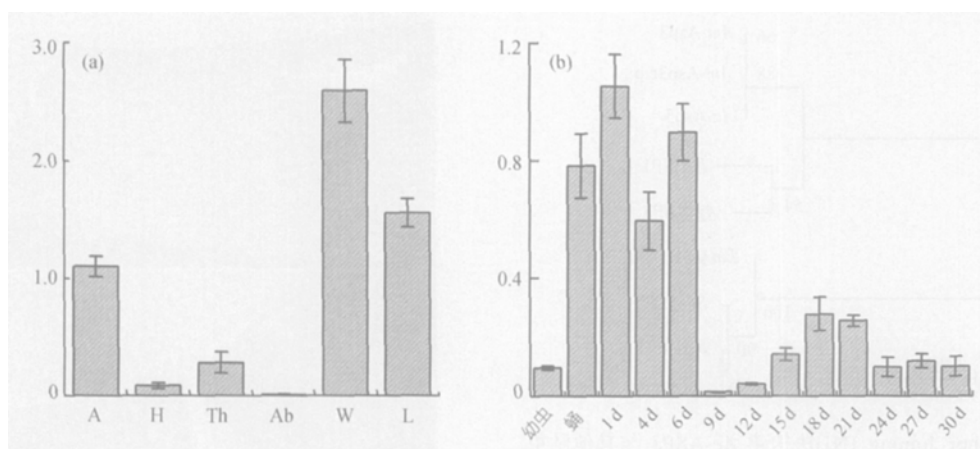


图 10 基于实时定量 PCR 的 *Ac-ASP3* 转录时空表达谱

(a) 触角(antenna, A)、头(head, H)、胸(thorax, Th)、腹(abdomen, Ab)、翅(wings, W)和足(legs, L)的空间表达; (b) 幼虫(larvae)、蛹(pupae)和成虫(1, 4, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 以及 30 日龄)的时间表达。表达丰度通过比较 *Ac-ASP3* 与 β -actin 阈值循环(Ct)的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量方法来确定

官中的表达丰度差别较大, 其中在翅、足中表达丰度最高, 其次为触角, 而在胸、头以及腹表达丰度最低(图 10(a)); 另一方面, *Ac-ASP3* 在不同发育历期的表达中, 具有两个表达丰度相对较高的时期: 一个为从蛹期到成虫的 1~6 日龄(以 4 日龄为最高), 另一个时期为 9~30 日龄(以 18 日龄为最高), 其中后者的平均表达丰度约为前者的三分之一(图 10(b)).

3 讨论

本研究首次鉴定了一个编码中蜂化学感受蛋白的基因 *Ac-ASP3*。该编码蛋白具有典型的 CSPs 特征, 并与其他 CSPs 在等电点及分子量等生化参数方面比较相似。与同属的意蜂 *ASP3*^[26]相比, 氨基酸序列相似性达到 98.5%~99.2%, 而与其他不同种类昆虫的相似性仅有 48%~53.2%。以上说明 *Ac-ASP3* 应该是在亲缘关系较近的物种中具有较高保守性及种群特异性的化学感受蛋白。

通过免疫细胞化学定位实验能够体现 CSPs 的诸多生理功能, 如美洲大蠊 *Periplaneta americana* 的 CSP p10 在足再生过程中的作用表明其与肢体再生相关^[27]; 在鳞翅目仙人掌螟蛾 *Cactoblastis cactorum* 中, CLP-1 位于唇瓣中并参与 CO₂ 检测^[28], 而相反的是在直翅目的沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 中, CSPs 被标记在跗节、下唇瓣以及触角等的接触感器上, 而不能与放射性标记的葡萄糖或重碳酸盐结合等, 证明 CSPs 与触觉化学感器相关^[29,30]。在中蜂中, 我们得到了与沙漠蝗相似的结果, *Ac-ASP3* 也参与接触化

学感器的功能, 因为它表达于毛形感器 B 和锥形感器中, 而这两种感器也已经在意蜂中被证明为触觉机械感器^[24,31]。然而对于其他几种类型的感器, 如板形感器, 它具有数量众多的受体神经元, 能对植物、花香及蜜蜂信息素都能产生反应^[32]。另外, 毛形感器 A 则具有嗅觉神经元的功能, 而毛形感器 CD 则主要有味觉受体功能^[33]。从免疫定位的结果来看, 几乎所有板形感器即嗅觉感器没有任何标记(但是发现板形感器周边的裂缝内的浅沟却被明显标记, 它是否执行化学信号的传导相关的过程还不得而知), 所以可以认为 *Ac-ASP3* 不直接参与嗅觉过程但是可能参与中蜂触角的机械运动过程中的触觉活动。

在已知的多种昆虫种类中, 一般认为 OBPs 特异地表达于触角而 CSPs 则表达于其他部位^[6]。本研究结果与之说法是一致的, 而且通过实时定量 PCR 的研究, 也证明 *Ac-ASP3* 在不同器官的表达是不均一的, 在翅和足中表达量最高, 其次是触角, 在胸、头和腹中表达量最低, 这也与意蜂 *ASP3*^[34]、烟芽夜蛾 *H. virescens* 的 HvirCSPs^[7]、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的 CSPHarm^[35]、沙漠蝗 *S. gregaria* 的 CSPs^[36]以及家蚕 *Bombyx mori* 的两种 CSPs (BmorCSP1 and BmorCSP2)^[37]以及从家蚕基因组上得到的 20 个候选 CSP 基因^[38]较为类似。但是对于近缘的膜翅目昆虫也有些例外, 如阿根廷蚁 *Linepithema humile* 的 LhumCSP, 仅在触角中特异表达而在非嗅觉器官(如足和胸)中不表达^[39], 在马蜂 *Polistes dominulus* 中, OBP 在成虫不同日龄中均一地表达于触角、翅以及

足中,而 CSPs 却表达于触角且在某些日龄中表达于足^[40]。在黄边胡蜂 *Vespa crabro* 中, CSP 也是触角特异表达的而 OBP 却表达于足和翅^[34]。

从发育历期来看,在 Ac-ASP3 的表达具有的两个高峰,第 1 个高峰期(即从 1 日龄到 6 日龄)是整个发育期最高的,这个时期工蜂处于幼年蜂,主要职责是作为持家蜂(house bees)负责蜂巢清洁及哺育蜂王和幼虫;第 2 个高峰(即 18 日龄左右)比第 1 个高峰低,这一时期工蜂处于从青年期向成熟期过渡的阶段,并开始出巢采蜜粉并作为守卫蜂来保护蜂巢^[41]。从上述现象我们可以推测, Ac-ASP3 在工蜂幼年时期,可能作为一种化学信息受体,对蜂巢内的化学物质,包括主要由脂肪烃组成的蜜蜂外壳表皮脂类物质产生识别作用^[42]。另外,作为 Ac-ASP3 同源物的意蜂 ASP3,已被证明只能特异结合大分子脂肪酸以及酯类衍生物,而不能结合普通气味分子、性(或非性)信息素物质^[43]。综上所述,可以判定 Ac-ASP3 在获得花蜜、花粉以及其他一般的气味分子的过程中不发挥重要的作用而在区别蜂巢内蜜蜂的表皮化学物质的活动中具有重要关联。

中华蜜蜂是中国的土著蜂种,由于生态环境的破坏导致它的野生资源在迅速减少^[44]。所以对于中蜂的保护性研究,特别是对其独特的化学感受系统的分子机制的研究,是非常必要的。最近,意蜂的基因组测序计划已经完成,意蜂在化学感受信号的转导方面的特性已经被鉴定,它只具有较少的味觉受体以及相对数量较多的嗅觉受体,这与其生态学及社会组织密切相关^[45]。从数量上来看,研究人员已经从意蜂基因组中得到 6 个 CSPs,而在中蜂仅有 Ac-ASP3,仍需要进一步寻找中蜂的 CSP;从时空转录表达谱上来看,意蜂的 6 个 CSPs 功能不尽相同且相互关联,如在不同细胞过程中参与胚胎发育及化学信号转导^[46],而中蜂的 Ac-ASP3 在本研究中认为是基本与嗅觉活动无关,但在蜂巢内个体信息识别以及触角机械运动的化学信号转导方面起到一定作用,其是否参与胚胎发育及中蜂 CSPs 家族其他成员的生理功能仍不清楚,还需进一步研究。但是意蜂的研究结果对研究中蜂这种更加敏捷和灵敏的蜜蜂的化学感受机理带来重要的启示。

致谢 衷心感谢浙江大学陈盛禄教授提供中华蜜蜂材料以及浙江大学洪健教授在电子显微镜观察方面的指导。

参 考 文 献

- 1 Leal W S, Nikonova L, Peng G. Disulfide structure of the pheromone binding protein from the silkworm moth, *Bombyx mori*. FEBS Lett, 1999, 464(1-2): 85—90
- 2 Scaloni A, Monti M, Angeli S, et al. Structural analysis and disulfide-bridge pairing of two odorant-binding proteins from *Bombyx mori*. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 266(2): 386—391
- 3 Pelosi P, Maida R. Odorant-binding proteins in insects. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 1995, 111(3): 503—514
- 4 McKenna M P, Hekmat-Scafe D S, Gaines P, et al. Putative *Drosophila* pheromone-binding proteins expressed in a subregion of the olfactory system. J Biol Chem, 1994, 269(23): 16340—16347
- 5 Pikielny C W, Hasan G, Rouyer F, et al. Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. Neuron, 1994, 12(1): 35—49
- 6 Jacquin-Joly E, Vogt R G, Francois M C, et al. Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae*. Chem Senses, 2001, 26(7): 833—844
- 7 Picimbon J F, Dietrich K, Krieger J, et al. Identity and expression pattern of chemosensory proteins in *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae). Insect Biochem Mol Biol, 2001, 31(12): 1173—1181
- 8 Jacobs S P, Liggins A P, Zhou J J, et al. OS-D-like genes and their expression in aphids (Hemiptera: Aphididae). Insect Mol Biol, 2005, 14(4): 423—432
- 9 Maleszka J, Foret S, Saint R, et al. RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*). Dev Genes Evol, 2007, 217(3): 189—196
- 10 Wanner K W, Isman M B, Feng Q, et al. Developmental expression patterns of four chemosensory protein genes from the Eastern spruce budworm, *Chroistoneura fumiferana*. Insect Mol Biol, 2005, 14(3): 289—300
- 11 Lartigue A, Campanacci V, Roussel A, et al. X-ray structure and ligand binding study of a moth chemosensory protein. J Biol Chem, 2002, 277(35): 32094—32098
- 12 Ban L, Scaloni A, Brandazza A, et al. Chemosensory proteins of *Locusta migratoria*. Insect Mol Biol, 2003, 12(2): 125—134
- 13 陈盛禄, 主编. 中国养蜂学. 北京: 中国农业出版社, 2001
- 14 Peng Y S, Fang Y Z, Xu S Y, et al. The resistance mechanism of the Asian honey bee *Apis cerana* Fabr., to an ectoparasitic mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans. J Invertebr Pathol, 1987, 49(1): 54—60
- 15 Danty E, Arnold G, Huet J C, et al. Separation, characterization and sexual heterogeneity of multiple putative odorant-binding proteins in the honeybee *Apis mellifera* L (Hymenoptera: Apidea). Chem Senses, 1998, 23(1): 83—91
- 16 Michelette E R F, Soares A E E. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). Apidologie, 1993, 24(1): 431—440

- 17 Rachinsky A, Strambi C, Strambi A, et al. Caste and metamorphosis: hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *Gen Comp Endocrinol*, 1990, 79(1): 31—38
- 18 Beye M, Raeder U. Rapid DNA preparation from bees and %GC fractionation. *Biotechniques*, 1993, 14(3): 372—374
- 19 Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402—408
- 20 Bendtsen J D, Nielsen H, von Heijne G, et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 2004, 340(4): 783—795
- 21 Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol*, 1982, 157(1): 105—132
- 22 Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, et al. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13): 3784—3788
- 23 杜芝兰. 中华蜜蜂工蜂触角感觉器的扫描电镜观察. *昆虫学报*, 1989, 32(2): 166—169
- 24 Ågren L. Flagellar sensilla of some Colletidae (Hymenoptera: Apoidea). *Int J Insect Morphol Embryol*, 1977, 6(3/4): 137—146
- 25 Ågren L. Flagellar sensilla of two species of *Andrena* (Hymenoptera: Andrenidae). *Int J Insect Morphol Embryol*, 1978, 7: 73—79
- 26 Danty E, Arnold G, Burmester T, et al. Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem Mol Biol*, 1998, 28(5-6): 387—397
- 27 Kitabayashi A N, Arai T, Kubo T, et al. Molecular cloning of cDNA for p10, a novel protein that increases in the regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). *Insect Biochem Mol Biol*, 1998, 28(10): 785—790
- 28 Maleszka R, Stange G. Molecular cloning, by a novel approach, of a cDNA encoding a putative olfactory protein in the labial palps of the moth *Cactoblastis cactorum*. *Gene*, 1997, 202(1-2): 39—43
- 29 Angeli S, Ceron F, Scaloni A, et al. Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *Eur J Biochem*, 1999, 262(3): 745—754
- 30 Pelosi P, Zhou J J, Ban L P, et al. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(14): 1658—1676
- 31 Esslen J, Kaissling K-E. Zahl und Verteilung antennaler Sensillen bei der Honigbiene (*Apis mellifera* L.). *Zoomorphologie*, 1976, 83: 227—251
- 32 Lachér V, Schneider D. Elektrophysiologischer Nachweis der Riechfunktion von Porenplatten (Sensilla Placodea) auf den Antennen der Drohne und der Arbeitsbiene (*Apis mellifica* L.). *J Comp Physiol A*, 1963, 47(3): 274—278
- 33 Yokohari F. The coelocapitular sensillum, an antennal hygro- and thermoreceptive sensillum of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Cell Tissue Res*, 1983, 233(2): 355—365
- 34 Calvello M, Brandazza A, Navarrini A, et al. Expression of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in some Hymenoptera. *Insect Biochem Mol Biol*, 2005, 35(4): 297—307
- 35 王桂荣, 吴孔明, 郭予元. 编码棉铃虫化学感受蛋白 cDNA 的克隆及序列分析. *中国农业科学*, 2005, 38(11): 2235—2239
- 36 Jin X, Brandazza A, Navarrini A, et al. Expression and immunolocalisation of odorant-binding and chemosensory proteins in locusts. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(10): 1156—1166
- 37 Picimbon J F, Dietrich K, Angeli S, et al. Purification and molecular cloning of chemosensory proteins from *Bombyx mori*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2000, 44(3): 120—129
- 38 Gong D P, Zhang H J, Zhao P, et al. Identification and expression pattern of the chemosensory protein gene family in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2007, 37(3): 266—277
- 39 Ishida Y, Chiang V, Leal W S. Protein that makes sense in the Argentine ant. *Naturwissenschaften*, 2002, 89(11): 505—507
- 40 Calvello M, Guerra N, Brandazza A, et al. Soluble proteins of chemical communication in the social wasp *Polistes dominulus*. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60(9): 1933—1943
- 41 杨朝环. 中蜂生物学基础(四)——雄蜂和工蜂的发育和生活. *蜜蜂杂志*, 1998, (8): 16—16
- 42 Dani F R, Jones G R, Corsi S, et al. Nestmate recognition cues in the honey bee: Differential importance of cuticular alkanes and alkenes. *Chem Senses*, 2005, 30(6): 477—489
- 43 Briand L, Swasdipan N, Nespoulous C, et al. Characterization of a chemosensory protein (ASP3c) from honeybee (*Apis mellifera* L.) as a brood pheromone carrier. *Eur J Biochem*, 2002, 269(18): 4586—4596
- 44 谭新民. 野生中华蜜蜂资源堪忧. *蜜蜂杂志*, 2006, (4): 16—16
- 45 The Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 2006, 443(7114): 931—949
- 46 Foret S, Wanner K W, Maleszka R. Chemosensory proteins in the honey bee: Insights from the annotated genome, comparative analyses and expressional profiling. *Insect Biochem Mol Biol*, 2007, 37(1): 19—28