



王琦, 刘川冬, 张智博, 等. 意大利蜜蜂血淋巴 HP19 蛋白的表达及功能 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39 (1): 85–92.

意大利蜜蜂血淋巴 HP19 蛋白的表达及功能

王 琦, 刘川冬, 张智博, 于 鹤, 郑彬悦, 李江红*

(福建农林大学蜂学学院, 福州 350002)

摘要: 昆虫血淋巴蛋白 HP19 主要参与蜕皮激素调控昆虫的变态及发育进程, 蜂群内的工蜂、蜂王和雄蜂具有不同的变态和发育历期, 为探究 *hp19* 在调控意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 三型蜂变态发育中的作用, 本研究利用实时荧光定量 PCR 技术对 *hp19* 在不同发育时期的工蜂、雄蜂和蜂王体内的转录水平进行检测。结果表明, 该基因在工蜂和雄蜂 3 龄幼虫体内表达量分别为参照基因的 10^4 和 10^5 倍, 在 5 龄幼虫体内的表达则分别降为参照的 10 和 10^2 倍, 蛹期表达量又都显著提高。*hp19* 在蜂王整个幼虫期的表达保持在参照的 10^2 倍, 封盖后逐渐上升, 至化蛹前达到参照的 10^5 倍。在成年工蜂体内的表达为参照的 10^4 倍, 而在新羽化蜂王和雄蜂体内表达水平为参照的 10^7 倍, 但在性成熟的产卵蜂王和雄蜂体内的表达显著降低至参照的 10^4 倍。*hp19* 在三型蜂体内这种不同的表达模式说明其不仅与三型蜂差异的变态发育历期有关, 还可能与雄蜂和蜂王的生殖有关, 具有多样的生物学功能。

关键词: 意大利蜜蜂; HP19; 荧光定量 PCR; 转录表达; 功能

中图分类号: Q963; S893.3

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2017) 01-0085-08

Expression of the 19 kDa Hemolymph Protein in honeybee *Apis mellifera ligustica*

WANG Qi, LIU Chuan-Dong, ZHANG Zhi-Bo, YU He, ZHENG Bin-Yue, LI Jiang-Hong* (College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Insect 19 kDa haemolymph protein mainly participate in regulation the metamorphosis development. There are three type of bees with different development duration in honeybee colony. To explore the role of *hp19* in regulation the metamorphosis development of honeybee *Apis mellifera ligustica*, its expression in different developing stage of worker, queen and drone were determined by using Real-time PCR technology. The results showed that the expression of *hp19* were 10^4 and 10^5 times of reference in 3rd instar larvae of worker and drone respectively, decreased to 10 and 10^2 times of reference in 5th instar larvae of worker and drone respectively, and both increased significantly in pupae stage. However, *hp19* was 10^2 times of reference expressed in whole larvae stage of queen, gradually increased in capped larvae, and reached to 10^5 times of reference in late pupae stage. While in adult bees, *hp19* was 10^4 times of reference expressed in worker bee, but significantly high expressed in new emerged queen or drone with an expression of 10^7 times of reference, then decreased to 10^4 times of reference in old drone or egg laying queen. Such a different expression of *hp19* suggest it not only related to the difference in metamorphosis development of three castes of honeybee, but also be associated with the reproductive of

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31472156)

作者简介: 王琦, 男, 1991 年生, 山东人, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂生物学, E-mail: 710828596@qq.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: leejh6972@126.com

收稿日期 Received: 2016-11-08; **接受日期** Accepted: 2016-11-25

drone and queen, and thus might have multiple biological function.

Key words: *Apis mellifera ligustica*; HP19; real-time PCR; transcription; function

变态是许多昆虫的发育方式,其幼虫和蛹在形态和生理方面差异明显,这其中涉及储存蛋白的作用 (Kramer *et al.*, 1980; Roberts and Brock, 1981; Miller and Silhacek, 1982; Telfer *et al.*, 1983; Wyatt, 1990; Daniel, 2003)。储存蛋白是由 6 个相同或相似亚基组成的六聚或多六聚蛋白质集合体,其亚基分子量在 72 – 90 kDa (Thorsten *et al.*, 1998; Yu, 2002; Marcia, 2006)。研究表明多聚体蛋白 hexamerin 是昆虫体内主要的储存蛋白,由幼虫期脂肪体合成并释放到血淋巴中,在末龄幼虫期含量达到最高峰。在蛹期由脂肪体细胞对这些蛋白进行重吸收,以满足化蛹过程中的物质和能量需求 (Ismail and Dutta, 1990; Wang and Haunerland, 1994)。此外,研究发现储存蛋白还参与昆虫飞行肌肌动蛋白、肌球蛋白的形成 (Levenbook and Bauer, 1984)。还在卵的发育 (Diana, 1996)、成虫的滞育 (Nagamanju, 2003) 以及脂质运输 (Lewis, 2002; Hahn, 2004) 等多种生物学进程中也起着重要作用,功能多样。

昆虫发育受到激素的调控,20-羟基蜕皮激素 (20E) 控制昆虫从幼虫到成虫的发育。在米蛾 *Corcyra cephalonica* 末龄幼虫,20E 刺激酪氨酸激酶磷酸化一个位于脂肪体细胞膜上的分子量为 120 kDa 的储存蛋白受体,只有磷酸化的受体才可以介导血淋巴内的储存蛋白通过内吞作用重吸收至细胞内,用于重构蛹的结构和组织 (Wang and Haunerland, 1993)。这一发育调节过程在丽蝇、麻蝇和果蝇等双翅目昆虫中都得到证实 (Ueno and Natori, 1984; Burmester *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 2002),是在昆虫体内普遍存在的一种变态发育调节机制。因此,储存蛋白受体磷酸化是昆虫能够完成从幼虫到蛹变态发育的先决条件。

溶酶体在真核生物体内负责旧组织的裂解与新组织的重构,酸性磷酸酶 (Acid phosphatase, ACP) 是一种在酸性条件下催化磷酸单酯水解生成无机磷酸的水解酶,是昆虫体内常用于研究溶酶体活性的标记酶。研究表明昆虫体内 ACP 活性受 20E 滴度正调控 (Verkuil, 1980),在幼虫组织器官发生裂解、化蛹前的末龄幼虫期活性达到峰值。但进一步的研究表明 ACP 的活性在 20E 单独作用下保持不变,还需要血淋巴内一分子量为 19 kDa

的蛋白因子 (HP19) 诱导。氨基酸序列分析表明 HP19 属于谷胱甘肽家族的 S-转移酶 (GST),但普通 GST 在 20E 的作用下没有增强 ACP 活性的能力。通过向米蛾幼虫体内注射亲和纯化的 HP19 多克隆抗体 (α HP19-IgG) 来抑制它的功能,发现脂肪体中的 ACP 活性下降,导致幼虫只能发育为幼虫与蛹或蛹与成虫的中间体,无法完成正常的发育 (Abul and Damodar, 2007)。这进一步说明 HP19 在昆虫变态期是通过与 20E 相互作用来提高酸性磷酸酶活性,影响储存蛋白受体磷酸化,进而影响和调控昆虫的变态发育过程。

研究显示 HP19 对储存蛋白受体的磷酸化有抑制作用 (Arif *et al.*, 2004)。在米蛾幼虫血淋巴中高含量的 HP19 及低蜕皮激素滴度抑制了酪氨酸激酶活性,从而降低了储存蛋白受体的磷酸化,使其不能吸收储存蛋白,昆虫保持在幼虫发育的阶段。而在幼虫末期,蜕皮激素滴度较高而 HP19 含量较低,刺激酪氨酸激酶活性,增强了储存蛋白受体的磷酸化,从而使储存蛋白得以吸收,迅速进入化蛹过程。HP19 与酪氨酸激酶抑制剂均可以抑制酪氨酸激酶活性与储存蛋白受体的磷酸化,且 HP19 的抑制作用十分快速、高效 (Tomaschko, 1999; Abul *et al.*, 2008)。但在缺少 20E 的条件下 HP19 对酪氨酸激酶活性的抑制作用明显降低,甚至无抑制作用。这些结果说明 HP19 通过抑制酪氨酸激酶活性影响储存蛋白受体的磷酸化,进而抑制了 20E 诱导的储存蛋白的吸收和后续的化蛹过程。所以,HP19 和 20E 的协同作用是储存蛋白受体磷酸化的关键,直接影响和调控昆虫的变态发育进程。

蜜蜂是社会性昆虫,也是研究社会性结构与功能相关生物学的模式生物。通过序列分析和比较,我们在蜜蜂基因组中找到与米蛾 *hp19* 同源性的基因。蜂群主要由工蜂、雄蜂和蜂王组成,它们的发育历期差别很大,但 HP19 在三型蜂之间差异化的变态发育中的具体作用不得而知。研究表明,与储存蛋白功能相近的卵黄原蛋白在蜜蜂的行为发育、生殖和寿命等多个方面具有重要的作用 (Antonio, 2008),而储存蛋白也直接与蜜蜂的生殖和寿命长短密切相关 (Cristino, 2010)。结合 HP19 在其他昆虫变态发育及寿命、产卵等生物学

进程中广泛且一致的作用,可以推测 *hp19* 在蜜蜂的级型发育、寿命和生殖等生物学过程中也有重要作用与功能。基因的功能与其在生物体内的时空表达特性密切相关。为系统研究蜜蜂体内 *hp19* 在调控三型蜂变态发育中的功能,我们通过荧光定量 PCR 技术测定并分析其在不同发育阶段意大利蜜蜂三型蜂体内的表达特性,也为进一步研究 *hp19* 在蜜蜂体内的其他生物学功能提供试验依据和参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

实验所用意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 采自福建农林大学蜂学学院教学蜂场;引物由上海生工生物工程有限公司合成;RNA 提取试剂盒 Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司;反转录试剂盒 GoScript™ Reverse Transcription System 购自 Promega 公司;荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR® Select Master Mix 购自 ABI 公司;实时荧光定量 PCR 仪 StepOne Plus™ 购自 Applied Biosystems 公司;三氯甲烷、异丙醇、乙醇等均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 样本制备

标记巢房幼虫区域,放回蜂群正常饲养。根据发育时间的不同分别采集三型蜂 3 龄幼虫、5 龄幼虫、封盖之后 1 d, 2 d, 和 3 d 的预蛹、全身白色的早期蛹和全身深色的后期蛹、新蜂(哺育工蜂,处女王,新出房雄蜂)以及老蜂(采集工蜂,产卵王,性成熟雄蜂)。

1.2.2 RNA 提取与 cDNA 合成

采集得到的样本置于 Trizol 中提取总 RNA。简要步骤如下:向样本中加入 1 mL Trizol 充分匀浆,随后加入 200 μL 三氯甲烷萃取 RNA,10000 g 离

心 10 min 取上清,加入 0.5 mL 异丙醇沉淀 RNA,最后加入 75% 乙醇洗涤所得 RNA,再用无水乙醇封存置于 -80℃ 备用。使用时除去无水乙醇,加入适量体积(20-100 μL)无核酸酶的去离子水溶解(李晓燕等,2016;李江红等,2014)。

按照试剂盒操作说明 Reverse Transcription System (Promega Inc) 反转录合成 cDNA。20 μL 反转录体系组成如下:GoScript™ 5 × Reaction buffer 4 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 4 μL, PCR Nucleotide mix 1 μL, Oligo (dT)₁₅ Primer 0.5 μL, Random Primers 0.5 μL, Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor 0.4 μL, GoScript™ Reverse Transcriptase 1 μL, RNA 模板 2 μL, Nuclease-Free Water 6.6 μL。充分混匀反应液并置于 42℃ 温育 15 min,然后 95℃ 热处理 5 min,所得 cDNA 于 -20℃ 保存备用。

1.2.3 标准曲线的绘制

选取 *hp19* 与 *β-actin* 表达均较高的样本,将其 cDNA 进行 5 倍梯度稀释 4 次,得到一组共 5 个浓度依次降低的 cDNA 标样。对该组样本进行荧光定量 PCR 检测分析,绘制得到 Ct 值与模板浓度间的标准曲线。并检测扩增产物的溶解曲线,判断产物是否为特异性片段。

1.2.4 荧光定量 PCR

以 *β-actin* 为参照基因,利用特异性引物(表 1)对各样本中目的基因的表达进行荧光定量测定。构建反应体系(20 μL):SYBR® Select Master Mix 10 μL, Nuclease-Free Water 8 μL, cDNA 模板 1 μL, forward and reverse primer 各 0.5 μL。反应液充分混匀后置于 ABI StepOne Plus™ Real-Time PCR 仪中扩增检测。扩增条件如下:95℃ 预变性 2 min, 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 1 min, 40 个循环。每个样本进行 3 次重复,每板反应设置 3 个阴性对照。

表 1 荧光定量 PCR 扩增引物
Table 1 Oligonucleotide primers used in Real-Time PCR

基因名称 Gene	引物序列 (5'-3') Primer sequences	退火温度 (°C) Annealing temperature	产物大小 (bp) Product size
<i>hp19</i>	F: CACAGATTAATGACAATGGCGAGTTAC	60	131
	R: GATGTTTCGCATAACTCATTCTTCGGA		
<i>β-actin</i>	F: TGCCAACACTGTCCTTTCTG	60	135
	R: AGAATTGACCCACCAATCCA		

1.2.5 数据处理

检测发现 *hp19* 和 β -*actin* 的扩增效率基本一致, 所以采用比较 Ct 法处理所得数据。利用 ABI Step One™ Software Version 2.2 和 Excel 完成扩增曲线, 标准曲线, 溶解曲线以及目的基因相对表达量柱形图的绘制。利用 SPSS 分析各组数据间的差异性, 并采用方差分析 LSD 的多重比较法进行各样本间的显著性差异检验 ($P < 0.05$)。

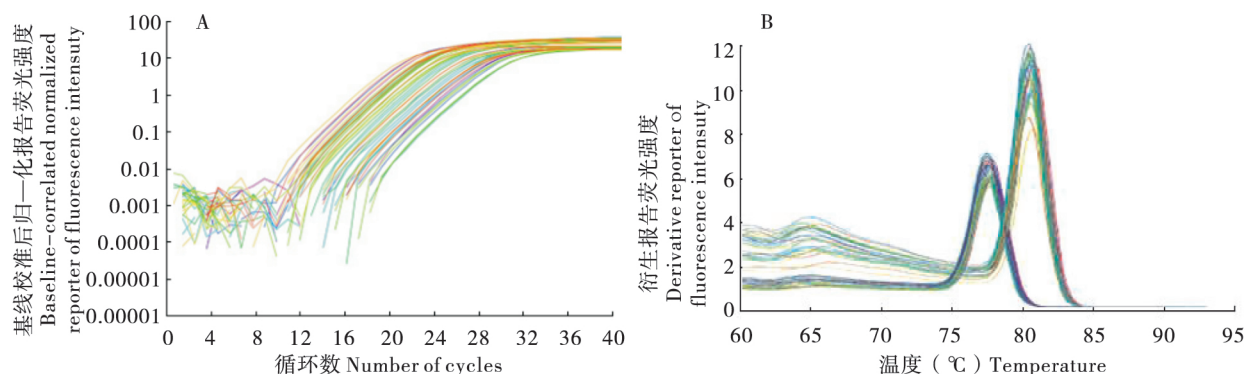


图1 *hp19* 和 β -*actin* 的荧光定量扩增曲线 (A) 和溶解曲线 (B)

Fig. 1 Amplification curves (A) and melting curves (B) of *hp19* and β -*actin* for qRT-PCR

对系列梯度稀释好的 *hp19* 和 β -*actin* 样本进行荧光定量 PCR 分析, 绘制模板浓度与扩增阈值之间的标准曲线。结果显示 *hp19* 和 β -*actin* 的标准曲线斜率分别为 -3.402 和 -3.3 , 线性相关系数分别为 0.999 和 1 , 扩增效率分别为 93.008 和 100.902 (图2)。*hp19* 和 β -*actin* 的扩增效率基本一致, 符合比较 C_T 法的适用条件, 因此在后续的定量分析中均采用该算法进行分析。

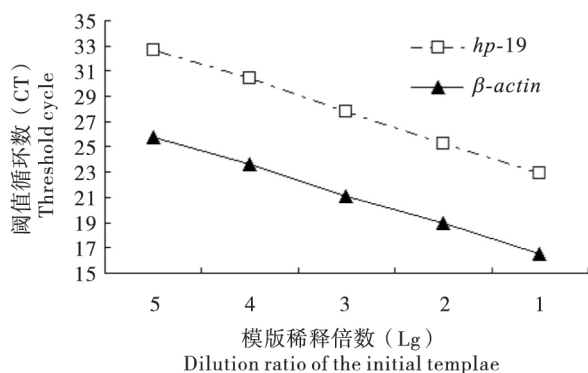


图2 *hp19* 和 β -*actin* 的荧光定量标准曲线

Fig. 2 The standard curve of *hp19* and β -*actin* for qRT-PCR

2 结果与分析

2.1 扩增效率及特异性

通过对目标基因和内参基因的 PCR 扩增曲线和溶解曲线进行分析, 结果表明 *hp19* 和 β -*actin* 的扩增曲线均出现了明显的指数增长和平台 (图1A), 扩增效果良好。同时溶解曲线也呈现出特异性单峰 (图1B), 扩增特异性强。

2.2 *hp19* 在意大利蜜蜂体内的表达

为探究 *hp19* 在意大利蜜蜂体内的时空表达特性, 采用荧光定量 PCR 的方法, 以 β -*actin* 为内参基因, 校正目的基因的表达量, 并以表达倍数的对数来表示相对表达量。

2.2.1 工蜂不同发育时期的表达

通过对不同发育时期工蜂体内 *hp19* 的表达进行检测, 发现该基因在 3 龄幼虫体内特异性高表达, 为参照的 $10^3 - 10^4$ 倍。在 5 龄幼虫体内显著降低至参照的 $10 - 10^2$ 倍, 化蛹前降至与参照基因同一水平。在早期蛹体内达到最高峰值, 为参照的 10^5 倍。羽化前降低至参照的 10^2 倍, 出房后其表达量再次升高到参照的 10^5 倍, 此后的整个成年蜂时期均保持在这一较高的表达水平 (图3)。由此可见, *hp19* 的表达与工蜂的发育时期密切相关。

2.2.2 雄蜂不同发育时期的表达

对雄蜂不同发育时期 *hp19* 的表达检测发现, 在 3 龄幼虫体内与工蜂的表达相同, 为参照基因的 $10^3 - 10^4$ 倍, 但随着日龄的增加表达量显著性升高为参照的 10^6 倍, 封盖后逐渐下降, 同样在化蛹前达到最低值, 此时仅为参照的 10^2 倍。进入蛹期后至新蜂羽化出房这一阶段表达量显著性升高, 为参照基因的 $10^6 - 10^7$, 性成熟后下降到 10^4 倍 (图4)。

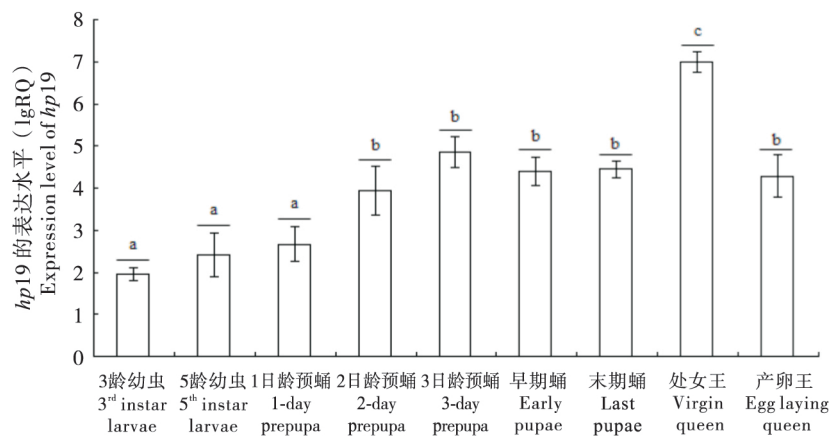


图 3 *hp19* 在不同发育时期工蜂体内的表达

Fig. 3 The expression level of *hp19* in different development stage of worker

注: 图中数据为平均值 $\pm$ 标准误; 柱上不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 下同。Note: Data are mean $\pm$ SE, and different lowercase letters above bars indicate significant difference at the 0.05 level ($P < 0.05$). The same below.

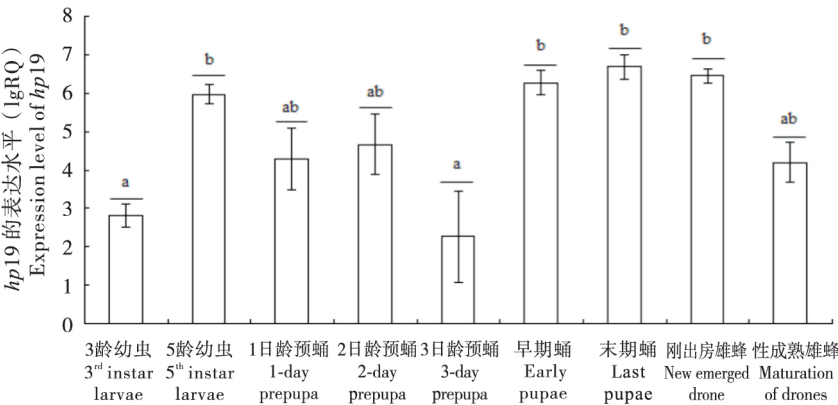


图 4 *hp19* 在不同发育时期雄蜂体内的表达

Fig. 4 The expression level of *hp19* in different development stage of drone

2. 2. 3 蜂王不同发育时期的表达

hp19 在蜂王整个幼虫阶段的表达较为稳定, 约为参照的 10^2 倍。封盖后次日逐渐增加至参照基因的 $10^4 - 10^5$ 倍, 整个蛹期也都基本维持在这一

表达水平, 没有明显的差异。处女王体内的表达量达到峰值, 为参照基因的 10^7 , 但在正常产卵蜂王体内降低至参照的 10^5 倍 (图 5)。

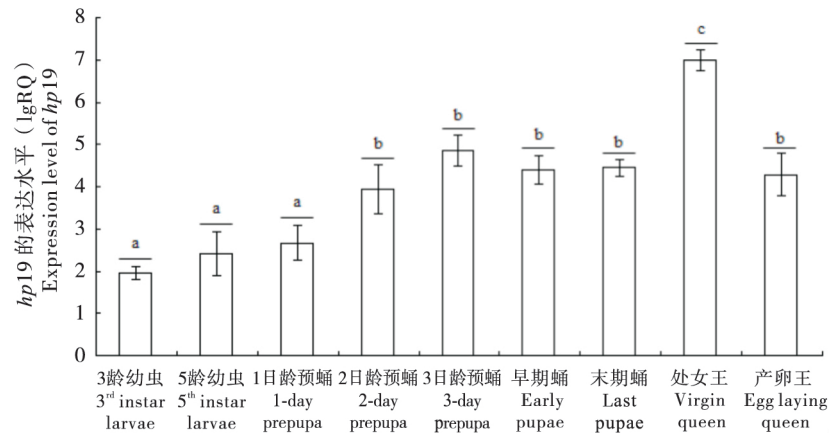


图 5 *hp19* 在不同发育时期蜂王体内的表达

Fig. 5 The expression level of *hp19* in different development stage of queen

2.2.4 *hp19* 在各级型间的表达差异

对三型蜂不同发育阶段 *hp19* 的表达进行分析,结果显示在雄蜂体内整体表达量最高,蜂王次之,工蜂最小。工蜂和雄蜂体内的表达随着发育时期的不同有明显的差异性,蜂王体内则没有明显的

差异性。在没有生殖能力的成年工蜂体内的表达没有变化,但成年雄蜂和蜂王的不同发育阶段表达差异明显(表2)。这说明该基因在不同级型蜜蜂体内以及不同生殖能力三型蜂之间的表达都有明显的差别。

表2 不同发育时期三型蜂 *hp19* 的表达差异分析
Table 2 *hp19* expression in three types of bee with different developmental stage

级型	3 龄幼虫	5 龄幼虫	1 日预蛹	2 日预蛹	3 日预蛹	早期蛹	末期蛹	幼蜂	老蜂
Caste	3 rd instar	5 th instar	1-day	2-day	3-day	Early	Late	Young	Old
	larvae	larvae	prepupa	prepupa	prepupa	pupae	pupae	bee	bee
工蜂 Worker	3.4289 a	1.3434 a	1.5240 a	0.8207 a	0.4079 a	4.7979 a	2.1829 a	4.7365 a	4.5809 a
雄蜂 Drone	2.8206 ab	5.9740 b	4.2878 b	4.6618 b	2.2666 a	6.2676 b	6.6807 b	6.4466 b	4.1892 a
蜂王 Queen	1.9531 b	2.4029 a	2.6688 ab	3.9332 b	4.8655 b	4.3980 a	4.4508 c	6.9975 b	4.2806 a

3 结论与讨论

昆虫的发育及其调控机制是昆虫学研究的重点领域之一,为害虫的防控和益虫的利用提供了理论基础。一般认为昆虫的发育受保幼激素和蜕皮激素的协同调控(Truman and Riddiford, 1999; Riddiford *et al.*, 2003; Dubrovsky, 2005)。然而,随着研究的深入,发现这种调控作用还受其它因子的调节和影响,本文提及的昆虫血淋巴蛋白 HP19,能够抑制蜕皮激素通过酪氨酸激酶磷酸化脂肪体细胞膜受体,阻碍了储存蛋白的吸收和蛹期的发育(Tomaschko, 1999; Wang and Haunerland, 1993; Arif *et al.*, 2004; Abul *et al.*, 2008)。该机制是昆虫变态发育调节和控制的普遍机制。蜜蜂是社会性昆虫,蜂群有工蜂、蜂王和雄蜂三种级型,它们的发育历期差别较大。本文通过荧光定量技术对不同发育时期的三种蜜蜂体内的 *hp19* 进行了测定,研究其与三型蜜蜂变态发育差异的关系,结果丰富了蜜蜂级型发育的相关理论,也补充了 *hp19* 调控昆虫变态发育的内容。

通过对不同发育时期三型蜂体内的 *hp19* 进行测定,发现 *hp19* 在工蜂 3 龄幼虫时期高表达,可以抑制储存蛋白受体的磷酸化,储存蛋白被大量合成并在血淋巴中累积。自末龄幼虫开始 *hp19* 表达量开始降低,至化蛹前降至最低(图3)。此时与高滴度的蜕皮激素联合作用提高了受体的磷酸化使储存蛋白得以被迅速吸收,为蛹的发育提供能量和物质来源。这样的表达模式与其在米蛾等

昆虫体内的表达模式基本一致,反映了 *hp19* 在变态发育中的基础功能和调控作用。至蛹后期 *hp19* 又显著性的升高,这一阶段的高表达可能与蜜蜂的羽化有关,需要酸性磷酸酶活性以构建成年蜜蜂的组织和器官。新羽化的工蜂乃至其后的整个成年蜜蜂时期,工蜂体内的 *hp19* 表达一直都保持在比较高的水平,这与一般昆虫体内高蜕皮激素滴度、低 *hp19* 表达量或者与之相反的作用模式一致。持续整个成年工蜂时期的相对高表达可能与成年蜜蜂的肌肉组织发育和蜜蜂高强度的飞行采集活动有关,因为储存蛋白还能够参与调控昆虫飞行肌肌动蛋白、肌球蛋白的合成(Levenbook and Bauer, 1984)。

在雄蜂体内 *hp19* 的表达也具有发育时期的特异性。幼虫时期高表达,化蛹前明显下降,使得储存蛋白受体的磷酸化过程顺利进行,储存蛋白被脂肪体细胞重吸收,化蛹后的表达量趋于平稳(图4)。这也与 *hp19* 对昆虫的发育调控模式基本一致。*hp19* 在工蜂 3 龄幼虫体内高表达,但自 5 龄幼虫开始至变态期结束,其表达量都保持在较低的水平(图3)。而在雄蜂体内, *hp19* 在预蛹期的前面 2 天都是在高水平表达,仅在化蛹前的最后一天突然降低,完成化蛹的过程。这种表达模式可能与雄蜂幼虫更大的体型需要更长的取食时间有关,即便在封盖的巢房内,其依然在取食,此阶段不能立即很快进入化蛹模式,需要维持高水平的 *hp19* 表达量抑制化蛹进程。此外,整个蛹期和羽化后早期雄蜂体内 *hp19* 表达量显著高于工蜂,这也与其体型较工蜂大、肌肉组织的发育需要更

高的 *hp19* 表达量有关。而发育至性成熟时期, *hp19* 的表达降低至与一般成年工蜂相同的水平, 能够维持自身的肌肉系统发育即可 (表 2)。所以, *hp19* 在雄蜂体内的表达模式与其发育和生物学特性密切相关, 表现出与工蜂表达模式不完全一致的现象。

蜂王体内, *hp19* 在整个幼虫期的表达量呈逐渐上升的趋势, 且并没有出现幼虫期高表达、化蛹前显著降低的情况。这种表达模式与工蜂和雄蜂幼虫的表达完全不同, 也与一般昆虫体内的 *hp19* 调节蜕皮激素对储存蛋白受体的磷酸化, 影响化蛹和变态发育的机制不一样。蜂王是蜂群内唯一的雌性器官发育完全的个体, 其个体远比工蜂大, 但其发育历期却极短, 只要 16 d 便完成个体的发育过程。这其中是否存在不同于普通昆虫的蜕皮激素和 HP19 调节化蛹和变态发育的独特机制还值得进一步的探究。另一个原因或许是因为蜂王幼虫的发育速度极快, 其对应的变态发育历期也很短, 若其少于一天时间, 则很可能在采样时没有将这一短暂状态的蜂王幼虫采集测定到, 从而导致现在这种结果的出现。无论何种原因, 都值得进一步深入研究。蜂王体内 *hp19* 的表达在蛹期一直维持在比幼虫期还高的水平 (图 5)。与雄蜂一样, 在羽化前后也没有出现于工蜂类似的低表达情况, 但其中的原因不明。新羽化的处女王体内表达量最高, 这与新羽化雄蜂一样, 与其进一步的发育和肌肉组织的成熟密切相关。至产卵期, 其表达量稍微回调, 但也维持在与工蜂和雄蜂对应阶段基本一致的水平 (表 2)。因此, *hp19* 在蜂王体内的表达模式与工蜂、雄蜂和一般的表达机制完全不同。

总体而言, 雄蜂和蜂王由于个体大、物质能量需求大于工蜂, *hp19* 的表达量也远高于工蜂。蜂王作为正常蜂群中唯一具有生殖能力的雌性个体, 专饲生殖, 而雄蜂仅承担着交配的任务, 并且雄蜂在后期蛹至羽化出房后不久生殖系统发育完全并产生生殖细胞, 蜂王在羽化后卵巢也开始膨大进一步发育, 与之对应的是 *hp19* 在雄蜂和蜂王体内及对应发育阶段的高表达, 这说明 *hp19* 也可能与蜜蜂的生殖调控有关。

蜂群内三种大小、重量、发育历期及生物学功能完全不同的工蜂、雄蜂和蜂王为发育及其调控机制的研究提供了很好的材料。本研究通过定量测定不同发育阶段的三型蜂体内 *hp19* 的表达水

平, 发现其在工蜂和雄蜂体内具有与其他昆虫基本一致的在幼虫高表达、在变态化蛹期低表达的普遍性表达模式。但在蜂王体内则具有完全不同于这一普遍性的表达和调控模式, 有其自身的特殊性。而在成年蜜蜂阶段, 三型蜂体内也表现出与生殖密切相关的表达模式。这些结果丰富了蜜蜂发育及其调控生物学研究内容, 也为下一步深入研究蜜蜂体内 *hp19* 的功能提供了理论基础和试验依据。

参考文献 (References)

- Abul A, Damara M, Damodar G. Regulation of hexamerin receptor phosphorylation by hemolymph protein HP19 and 20-hydroxyecdysone directs hexamerin uptake in the rice moth *Corcyra cephalonica* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 38 (3): 307–319.
- Abul A, Damodar G. Significance of the 19-kDa hemolymph protein HP19 for the development of the rice moth *Corcyra cephalonica*: Morphological and biochemical effects caused by antibody application [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2007, 66 (1): 32–44.
- Antonio DSM, Guidugu KR. RNAi-mediated silencing of vitellogenin gene function turns honeybee (*Apis mellifera*) workers into extremely precocious foragers [J]. *Naturwissenschaften*, 2008, 95 (10): 953–961.
- Arif A, Vasanthi P, Hansen IA. The insect haemolymph protein HP19 mediates the nongenomic effect of ecdysteroids on acid phosphatase activity [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279 (27): 28000–28008.
- Burmester T, Antoniewski C, Lepesant JA. Ecdysone-regulation of synthesis and processing of fat body protein 1, the larval serum protein receptor of *Drosophila melanogaster* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 262 (1): 49–55.
- Cristino AS, Nunes FMF, Barchuk AR. Organization, evolution and transcriptional profile of hexamerin genes of the parasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) [J]. *Insect Molecular Biology*, 2010, (Suppl. 1) 19: 137–146.
- Daniel AH. Presence of a single abundant storage hexamerin in both larvae and adults of the grasshopper, *Schistocerca americana* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2003, 49 (12): 1189–1197.
- Diana E. A role for storage proteins in autogenous reproduction in *Aedes atropalpus* [J]. *Journal of Insect Physiol.*, 1996, 42 (10): 961–966.
- Dubrovsky EB. Hormonal cross-talk in insect development [J]. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2005, 16 (1): 6–11.
- Hahn DA, Wheeler DE. Presence of a single abundant storage hexamerin both larvae and adults of the grasshopper, *Schistocerca americana* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2004, 49 (2): 1189–1197.
- Hansen IA, Meyer SR, Schafer I. Interaction of the anterior fat body protein with the hexamerin receptor in the blowfly *Calliphora vicina*

