

意蜂(*Apis mellifera ligustica*)工蜂血淋巴遊離氨基酸分析

繆曉青* 梁全勝** 吳珍紅* 張其康* 李江紅* 付中民* 劑玉梅** 貢森*

(*福建農業大學蜂療研究所 福州 350002)

(**福建省畜牧局 福州 350002)

摘 要

用薄層層析法對意蜂3—8日齡工蜂幼蟲和前、中、後三期蛹的血淋巴中遊離氨基酸進行定性和定量測定，發現脯氨酸、亮氨酸、絲氨酸（還有未知X5、X2、X1）等，從五日齡以後，都有不同程度的下降趨勢，第八日齡左右下降到最低點，隨後又開始回升，十日齡後幾乎恢復到原來水平，使曲線呈現U形變化。正當多數氨基酸濃度下降時，精氨酸和未知氨基酸X3和X4卻反而上升。提示我們意蜂工蜂在預蛹期前後對大多數氨基酸有較大的消耗量，而對精氨酸等可能消耗量變化不大或有新的生產。

關鍵字：意蜂工蜂，血淋巴，遊離氨基酸。

Study of the dissociate amino acid in lymph of the larva

of *Apis mellifera ligustica*

Miao Xiaoqing Liang Quansheng** Wu Zhenhong Zhang qikang Li Jianghong

Liou Yumei** Gong sen**

(*Apitherapy Institute of Fujian Agricultural university)

(** Fujian farm bureau, 350002)

Abstract:

By analyzing the amino acid of in lymph of 3-8 days larva and the different stages of pupa of *Apis mellifera liguristica*, we found that the proline, ammonia, cypress and other three unknown amino acid were decreasing from 5 days ages to 8 days ages, then they increased and return to the original level in 10 days ages. The curve present 'U' type. the increasing of arginine and the unknown amino acid X3, X4 indicate the bees consume most kinds of amino acid while consume arginine littlely or it have others synthesize ways.

Key words: *Apis mellifera liguristica* lymph dissociate amino acid

關鍵字：意蜂工蜂，血淋巴，遊離氨基酸。

蜜蜂血淋巴具有同哺乳動物血液基本相同的功能，在物質迴圈和能量代謝中具有重要的作用，同時，也是作為具有複雜化學通訊功能的蜜蜂群體，個體進行激素調節的介質，在蜜蜂的蛻皮、變態、發育、器官芽形成以及吐絲作繭等各種生理活動都具有重要作用。血淋巴中含有多種遊離態氨基酸，其中某些種類尤為突出，有些氨基酸其含量甚高，往往是哺乳動物血漿中的數十倍。它們在蜜蜂正常的生命活動中主要用於組織器官的形成和能量代謝作用。近年來，昆蟲學家們在蜜蜂血淋巴隨季節、日齡以及溫度對的變化[1]，工蜂、雄蜂血淋巴中的氨基酸[2-4]及其代謝和有關氨基酸在蜜蜂飛行中的作用[5]進行研究。足見血淋巴中氨基酸在蜜蜂各種生命活動中意義，但對於蜜蜂在發育過程中，從幼蟲到蛹以及成蟲血淋巴中存在那種氨基酸及其含量的

變化等，並未進行系統性分析。而這些問題的解決，對於我們充分理解蜜蜂的生長發育、各種組織器官的形成中的營養需求以及維繫各種生命活動的物質基礎及其代謝具有重要的作用。為此我們針對其中幾種含量較高的幾種，在意蜂工蜂不同日齡幼蟲和蛹期進行粗定量測定分析，為今後研究蜜蜂生理和蜜蜂生物學研究提供參考。

1 材料與方法

供試意蜂(*Apis mellifera ligustica*)來自福建農業大學蜂療研究所試驗蜂場。選擇中等以上群勢，時間：5月下旬至理6月中旬。

主要儀器和用具：連續薄層層析展開儀一套，微量進樣器，喉頭噴霧器，65°C—300°C 恒溫箱，超速離心機，遊標卡尺，膠皮手套，燒杯，移液管，容量瓶，稱量瓶，膠頭滴管，分液漏斗。試劑：標準氨基酸；矽膠 G；0.2—0.3%羧甲基纖維素鈉溶液上清液；展開溶劑系統：1 相：正丁醇：乙酸：水（6；2；2V/V/V），2 相：酚：水（75；25V/V）；顯色劑：飽和茚三酮的正丁醇溶液；甲醇（分析純）；乙醚。

1.1 採樣及處理

將蜂群用隔王板隔成有王區和無王區。中午將優良巢脾插入有王區，令蜂王當天產卵。次日中午，將卵脾提入無王區並標記。從第七天開始，每天中午依次抽取第四、第五、第六、第七、第八、第九日齡幼蟲血淋巴各 0.5ml

意蜂血淋巴游離氨基酸

和蛹前期、蛹中期和蛹後期血淋巴各 0.5ml。將取到的血淋巴立即注射到提前予冷的小離心管中，並加幾粒苯基硫脲，以防黑化。

去除蛋白質：在小離心內加入等體積的甲醇，振蕩，立即在 8000r/min 離心 20min，吸取上清液。

去脂：在上清液中加入 0.3ml 氯仿，充分振蕩後，靜置 5min，取水相。

去鹽：將水相倒入處理好的離子交換柱內，用 50ml50% 乙醇通過交換柱，再用 2N 氨水洗脫，收集茛三酮陽性反應液體，在 65°C 下蒸幹，然後用 10% 正丙醇定容到血淋巴原體積 (0.5ml)，放入冰箱中保存待測。

1.2 血淋巴中氨基酸定性

樣中各種氨基酸的分離採用薄層層析法[6]，具體做法如下：

薄層：矽膠 G (溶劑為 0.3% 羧甲基纖維素溶液)；

展層液：1：酚：水 (75：25 V/V)；2：正丁醇：乙酸：水 (6：2：2 V/V /V)；

顯色劑：飽和茛三酮正丁醇溶液。

在薄板一角，用微量進樣器點樣 1ml，用紅外燈烘乾後，置於層析缸中用展層到距板頂 1 cm 時取出，在 65°C 下烘乾。再用第二種展層液進行第二相展層，取出後在 65°C 下烘乾，均勻地噴上一層顯色劑，放入 100—105°C 乾燥箱中烘乾顯色 3—5min，從而顯示分離後的氨基酸色點，如圖(-)。求出各個

分離色點的 Rf 值：

氨基酸定性分析

$$RF\ 1 = \frac{\text{氨基酸 1 在相展層走的距離}}{\text{展層液 1 走的距離}}$$

$$RF\ 2 = \frac{\text{氨基酸 2 在相展層走的距離}}{\text{展層液 2 走的距離}}$$

將已知標準氨基酸在兩種展層液分別進行展層，求出其 Rf1 和 Rf2。用樣品的氨基酸色點與標準氨基酸相對照，從而對號入座達到定性。因本試驗所選標準氨基酸種類有限尚有五種未知氨基酸無法定性，只好用 X1—X5 標定。

1.3 定量分析

標準工作曲線的繪製 將各種標準氨基酸精確配製成 200、400、600、800、1000、2000、3000、4000PPM 溶液。各濃度以 1 μ l 量點於薄板上，展層顯色後，測出各色點的面積。重複 3—5 次取面積的平均值，作出濃度—面積曲線，如圖(二)。

定量測定：將各日齡幼蟲和蛹的血淋巴處理樣，以 1 μ l 量點於薄板一角雙向層析後，測定各色點面積，依據面積在工作曲線上查得相應濃度，重

復 5 次，取濃度的平均值，列出表(一)。突出的五種未知氨基酸另列表(二)。

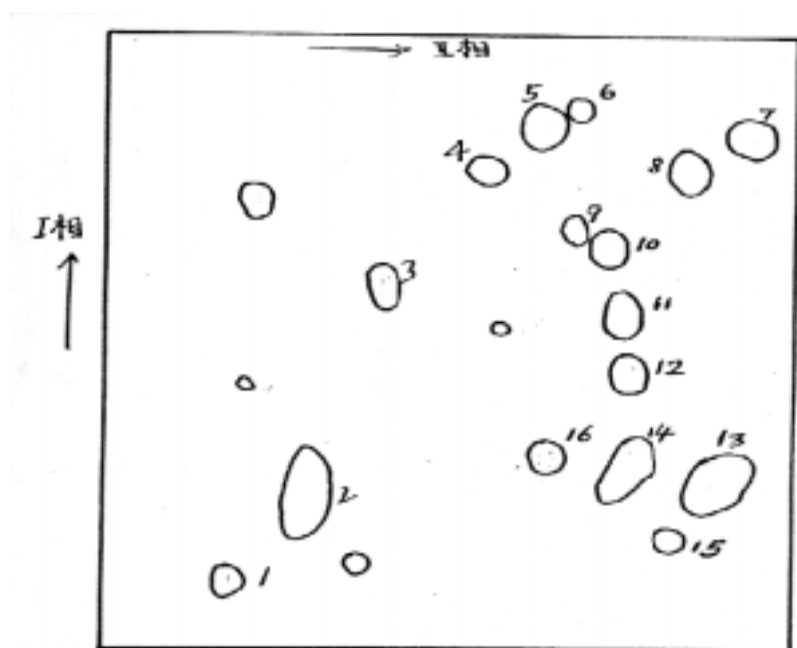
2 結果與討論

把各種定量的氨基酸作出濃度一日齡曲線，如圖(三)，可以看到脯氨酸、亮氨酸、絲氨酸（還有未知 X5、X2、X1）等，從五日齡以後，都有不同程度的下降趨勢，第八日齡左右下降到最低點，然後又開始回升，十日齡後幾乎恢復到原來水平，使曲線呈現 U 形變化。此時，正是蜜蜂前蛹期（亦是吐絲作繭的開始），生理變化最為激烈期，成蜂的器官芽也在這一階段開始組織形成，所以，需要大量的氨基酸合成蛋白質等物質。而在這之前，血淋巴中氨基酸主要來源於食物。如果憑食物經過消化分解吸收等幾個環節轉變成遊離氨基酸進入血淋巴，是不能滿足生理需要的，這樣，往往可能造成氨基酸貯量的下降。

由於血淋巴中游離氨基酸是高等昆蟲維持體內滲透壓的一個主要因素，這就更加迫切需要有新的氨基酸來源。這樣在第九日齡以後，也就可能迫使或是加速蜜蜂成熟幼蟲脂細胞破裂，向血淋巴中釋放大量蛋白質和脂肪等營養物，這可能是提示我們熟幼蟲脂細胞破裂的原因嗎？隨著組織合成與營養物的代謝分解等，遊離的氨基酸逐步得到補充，當蛹期生理活動趨於穩定後氨基酸也就幾乎維持一定的平穩。

如圖(三)(四)，正當多數氨基酸濃度下降時，精氨酸和未知氨基酸 X3 和 X4

卻反而上升。這是否提示這三種氨基酸與蛹期組織形成關係不大，或它有新的來源？它是否起補充維持體內滲透壓的作用？這有待進一步試驗研究。



- 2. 賴氨酸, 3. 精氨酸, 4. 未知 X(2), 5. 脯氨酸
- 6. 未知 X(5), 7. 亮氨酸, 8. 未知 X(1), 9. 未知 X(4)
- 10. 丙氨酸, 11. 未知 X(3), 12. 絲氨酸, 13. 谷氨酸,
- 15. 天冬氨酸

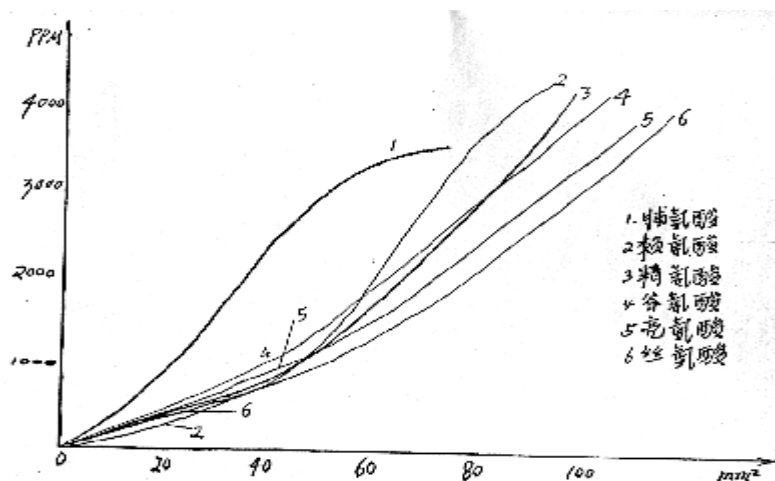
圖(一) 雙相層析

表一 幼蟲血淋巴氨基酸含量表

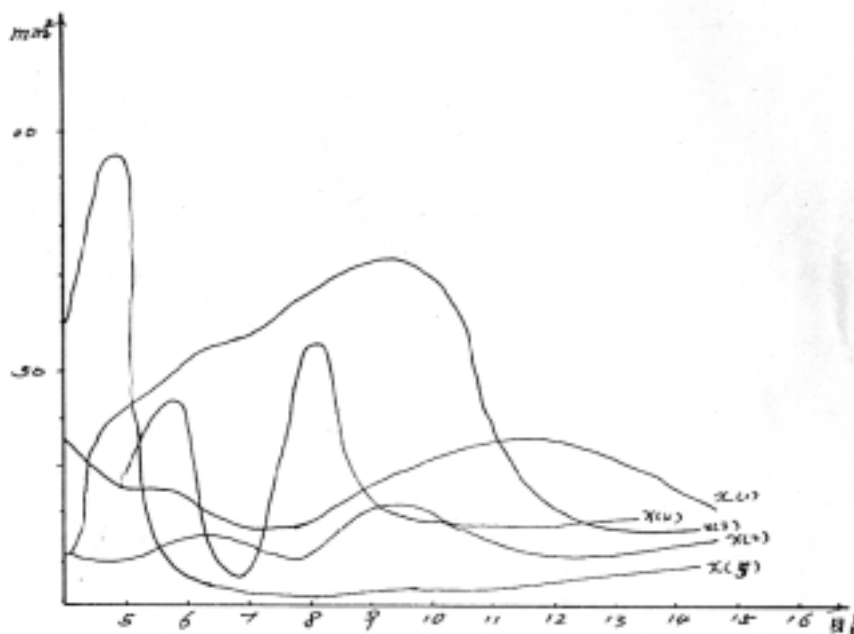
| 日齡 氨基酸 | | 四 | 五 | 六 | 七 | 八 | 九 | 蛹前 | 蛹中 | 蛹後 期 | 雄峰 | 雄峰 | 中蜂 |
|-----------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|
| 亮 氨酸 | X | 68.5 | 36.7 | 31.6 | 17.3 | 15.2 | 48.3 | 87.8 | 57.1 | 110.8 | 25.3 | 30.3 | 35.3 |
| | S _x | 5.05 | 4.01 | 1.95 | 4.69 | 1.35 | 5.33 | 8.35 | 4.84 | 3.83 | 2.22 | 2.04 | 3.86 |
| 谷 氨酸 | X | 94.2 | 119.0 | 130.4 | 97.5 | 75.0 | 83.9 | 80.1 | 95.5 | 113.5 | 112.5 | 196.3 | 151.1 |
| | S _x | 6.39 | 10.81 | 14.02 | 13.17 | 11.26 | 17.51 | 10.08 | 7.76 | 7.42 | 17.28 | 8.29 | 14.53 |
| 絲 氨酸 | X | 82.1 | 134.9 | 106.8 | 46.7 | 38.0 | 46.2 | 47.0 | 48.9 | 50.2 | 35.3 | 49.8 | 104.0 |
| | S _x | 6.14 | 15.39 | 6.80 | 4.89 | 5.67 | 4.36 | 11.39 | 4.42 | 4.00 | 2.63 | 5.38 | 9.49 |
| 脯 氨酸 | X | 144.2 | 242.3 | 238.1 | 204.0 | 181.5 | 184.9 | 200.2 | 210.0 | 220.0 | 290.4 | 256.9 | 328.5 |
| | S _x | 12.98 | 16.39 | 15.09 | 15.40 | 21.26 | 11.60 | 12.88 | 7.67 | 11.08 | 15.40 | 26.09 | 5.97 |
| 精 氨酸 | X | 33.0 | 39.2 | 36.9 | 30.4 | 34.5 | 32.0 | 33.8 | 29.9 | 39.7 | 39.1 | 27.6 | 35.8 |
| | S _x | 2.47 | 2.80 | 4.81 | 2.82 | 1.66 | 2.71 | 1.04 | 3.47 | 4.49 | 1.65 | 1.35 | 1.26 |
| 賴 氨酸 | X | 70.6 | 53.9 | 52.8 | 42.7 | 42.4 | 52.8 | 41.4 | 41.6 | 49.8 | 47.0 | 4538 | 45.4 |
| | S _x | 6.19 | 5.23 | 4.27 | 7.71 | 2.30 | 1.50 | 1.56 | 4.52 | 5.97 | 2.71 | 4.99 | 3.59 |

表二 未知氨基酸在義大利蜜蜂幼蟲血淋巴中的面積表

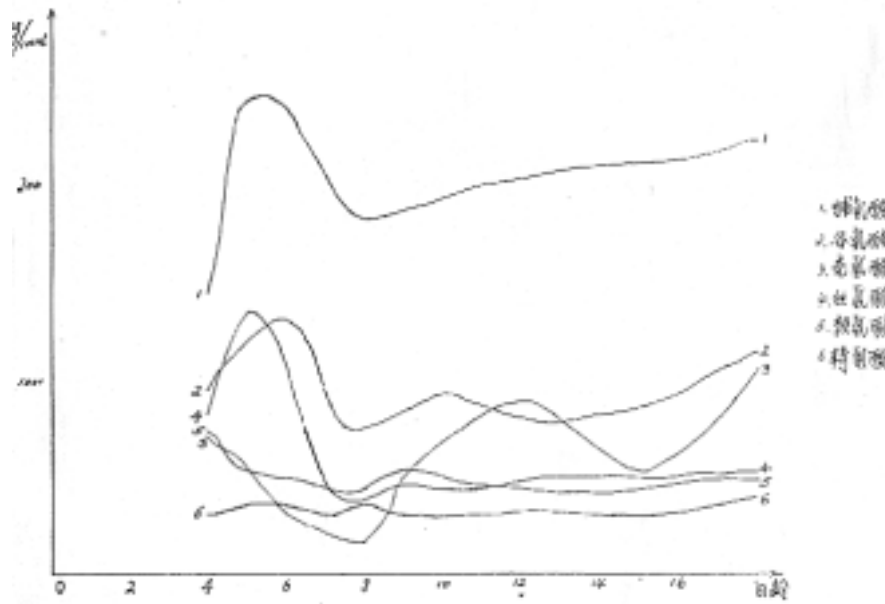
| 日齡 \ 氨基酸 | X(1) | X(2) | X(3) | X(4) | X(5) | 備註 |
|----------|------|------|------|------|------|----|
| 四 | 35.5 | 11.3 | | | 60.0 | |
| 五 | 26.4 | 9.6 | 42.7 | 27.9 | 94.5 | |
| 六 | 23.7 | 14.5 | 51.7 | 43.1 | 7.2 | |
| 七 | 15.9 | 18.1 | 55.2 | 6.4 | 3.5 | |
| 八 | 17.3 | 9.6 | 62.4 | 56.5 | 2.9 | |
| 九 | 24.6 | 22.9 | 70.6 | 22.3 | 3.4 | |
| 蛹前期 | 36.3 | 12.4 | 68.6 | 17.9 | 5.1 | |
| 蛹中期 | 20.4 | 15.9 | 29.3 | | 11.3 | |
| 蛹後期 | 25.5 | 27.2 | | | 16.9 | |



圖二



圖(四). 未知氨基酸在意蜂幼虫血淋巴中的变化曲线



圖(五). 几种氨基酸在意蜂血中的变化曲线

參考文獻

1. K. Crailsheim, 1985 Distribution of haemolymph in the honeybee (*Apis mellifica*) in relation to season, age and temperature. *Journal of Insect Physiology*, 31, 629-634
2. K. Crailsheim & B. Leonhard, 1997 Amino acids in honeybee worker Haemolymph *Amino Acids* 13: 141-153
3. B. Berger & K. Crailsheim and B. Leonhard, 1997 Proline, leucine and phenylalanine metabolism in adult honeybee drones (*Apis mellifica carnica* Pollmann) *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27: 587-593
4. B. Leonhard & K. Crailsheim, 1999 Amino acids and osmolarity in honeybee drone haemolymph *Amino Acids* 17: 195-205
5. S. Micheu, K. Crailsheim & B. Leonhard Importance of proline and other aminoacids during honeybee flight *Amino acids*
6. 張龍翔，張庭芳，李令媛 1981 生化實驗方法和技術。人民教育出版社 62-67。