

## 两蜂种王浆蛋白质组分比较分析\*

国占宝, 房宇, 李建科\*\*

(中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093)

关键词: 王浆高产蜜蜂; 中华蜜蜂; 蜂王浆; 蛋白质组分

中图分类号: S188 文献标识码: A 文章编号: 1006-1304(2009)06-1119-02

### Analysis of Royal Jelly Proteome of *Apis mellifera* and *A. cerana cerana*

GUO Zhan-bao<sup>1</sup>, FANG Yu<sup>1,2</sup>, LI Jian-ke<sup>1\*\*</sup>

(Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China;

**Key words:** high royal jelly producing bees (*Apis mellifera*); Chinese honeybees (*Apis cerana cerana*); royal jelly; proteome.

王浆高产蜜蜂 (*Apis mellifera* L. 浆蜂) 是我国 20 世纪 90 年代从意大利蜜蜂培育成功的新蜂种, 产浆性能明显高于未经选育的意大利蜜蜂。中华蜜蜂 (*A. cerana cerana* F. 中蜂) 是我国土生土长的蜂种, 其蜂王浆产量低于以意大利蜜蜂为代表的西方蜜蜂。两蜂种所产蜂王浆的蛋白质组研究还未见报道, 本研究利用双向电泳技术对浆蜂和中蜂新鲜蜂王浆全蛋白质组进行分析比较, 为鉴定和判断蜂王浆的来源和蜂王浆功能成分的开发利用提供科学依据。

#### 1 材料和方法

##### 1.1 样品

浆蜂 (*Apis mellifera* L.) 蜂王浆样品取自中国农业科学院蜜蜂研究所实验蜂场。中蜂 (*A. cerana cerana* F.) 蜂王浆取自北京市房山区蒲洼乡义合村养蜂场。所有蜂王浆从台基中取出立即装入无菌 Ep 管中, 冷冻于 -70 °C 备用。

##### 1.2 蛋白提取及浓度测定

蛋白提取方法根据 Li *et al.* (2007) 报道的方法, 制成蛋白样品溶液, 直接使用或 -70 °C 冷藏备用。

采用 Bradford *et al.* (1976) 方法进行蛋白质浓度测定, 以标准牛血清白蛋白 (BSA) 为标准, 595 nm 波长处测定吸收值 (Beckman, spectrophotometer DU800)。

##### 1.3 双向电泳 (2-DE) 分析

第 1 向固相 pH 梯度等电聚焦: 用蛋白裂解缓冲液将一定量的蛋白提取液稀释至 100  $\mu$ L, 然后和 400  $\mu$ L 水化上样缓冲液 (含 8 mol/L 尿素, 2% CHAPS, 0.001% 溴酚蓝, 45 mmol/L DTT, 0.2% Bio-lyte pH 3~10) 充分混合。取此混合液

410  $\mu$ L (含蛋白质 200  $\mu$ g) 加入 IPG strip 聚胶槽, 将 IPG 胶条胶面朝下, 轻轻置入聚胶槽中, 覆盖一层矿物油盖好聚胶槽盖子, 置于 Bio-Rad 等电聚焦仪 (PROTEAN IEF Cell, Bio-Rad Hercules, CA, USA) 的电极板上, 在 18 °C 按以下程序进行第一向等电聚焦: 50 V, 主动水化 14 h; 250 V, 每次 30 min 共两次线性除盐; 1 000 V, 60 min 快速除盐; 9 000 V, 线性升压 5 h; 9 000 V, 60 000 V/h 聚焦。

第 2 向垂直板 SDS-PAGE 电泳: 第 1 向聚焦结束后, 取出 IPG 胶条分别用含 2% DTT 的平衡缓冲液 A 和 2.5% 碘乙酰胺的平衡缓冲液 B (平衡缓冲液 A 和 B 均含有 6 mol/L 尿素, 0.375 mol/L Tris-HCl (pH 8.8), 20% 甘油, 2% SDS) 平衡胶条各 15 min。平衡后将 IPG 胶条转移到 1.0 mm 厚的连续 12% 均匀聚丙烯酰胺分离胶上, 10  $\mu$ L 2-DE 蛋白分子量标准加在胶条的酸性端, 开始进行第 2 向 SDS-PAGE 电泳。第 2 向电泳采用 ROTEMAN II xi Cell (Bio-Rad Hercules, CA, USA) 进行 (恒流 25 mA/gel), 直至溴酚蓝到达胶底边缘, 结束 SDS-PAGE 电泳。

##### 1.5 考马斯亮蓝染色

电泳结束后对凝胶进行固定和用 CBB G-250 进行染色。其基本过程依次是: 40% 乙醇和 10% 冰醋酸的固定液中室温摇床固定 4 h; 0.1% CBB G-250、2% 磷酸、10% 硫酸铵和 25% 甲醇的染色液中室温摇床染色 14 h; 超纯水脱色至凝胶背景无色。

##### 1.6 图像分析及数据分析

使用透射模式进行扫描, 扫描结果直接导入计算机 (32 位, 300 dpi 分辨率, 全彩)。用 PDQuest 7.3.0 Build 059

\* 基金项目: 国家蜜蜂产业技术体系 (No. NYCYT-43) 和农业公益性行业科研专项 (No. nyhyzx07-041) 资助。

\*\* 通讯作者。Author for correspondence. 教授、博士生导师, 主要从事蜜蜂饲养与生物技术。Tel: 010-62591449; E-mail: <apislijk@126.com>.

收稿日期: 2008-03-26 接受日期: 2008-05-02

(Bio-Rad Hercules, CA, USA) 进行分析 (灵敏度 10.36, 尺寸比例 7), 对图像进行背景消减、斑点检测、匹配和获取斑点位置坐标等, 对每个蛋白质点进行匹配和丰度分析。

采用 ANOVA (Version 6.12, SAS Institute, Cary, N.C., USA) 的有参数(邓肯)法对每个蛋白的丰度进行统计检验。

## 2 结果和讨论

### 2.1 浆蜂和中蜂蜂王浆双向凝胶电泳图谱分析

图 1 表明, 浆蜂蜂王浆共检测到 93 个蛋白点, 显著高于中蜂蜂王浆的 70 个蛋白点, 其中只有 30 个蛋白点为共有点。浆蜂蜂王浆蛋白分子量为 23.30~96.17 kD, 而其等电点在 5.12~8.67 范围内。与已报道的(Li *et al.*, 2007) 浆蜂王浆的研究结果 (分子量 7.64~100.77 kD, 等电点 4.43~8.70) 基本一致; 中蜂蜂王浆蛋白分子量在 33.58~96.77 kD, 等电点范围为 4.38~9.15。两蜂种蜂王浆的蛋白质组成存在明显差异。

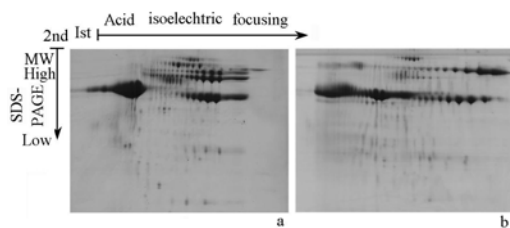


图 1. 王浆高产蜜蜂(a)和中华蜜蜂(b)蜂王浆的 2-DE 蛋白质组

Fig. 1. Profile of royal jelly proteome from high royal jelly producing bees (a) and Chinese honey bees (b)

蛋白质组分提供证据。

通过与已鉴定蜂王浆蛋白质图谱比较, 发现本研究的主要蛋白点为王浆主蛋白家族(major royal jelly protein, MRJP)中的 MRJP1 和 MRJP2, 且在不同的蜂种中呈现不同的异构体。本实验得到的浆蜂和中蜂蜂王浆的蛋白等电点与分子量, MRJP1: 分子量 53.87 kD, 等电点 5.33; MRJP2: 分子量 55.64 kD, 等电点 6.23, 与前人(Santos *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007) 研究结果(MRJP1: 分子量 48.81~60.00 kD, 等电点 4.23~5.50;

### 2.2 浆蜂和中蜂蜂王浆蛋白质的丰度分析

两蜂种蜂王浆的共有蛋白质点有 30 个(有 11 个丰度差异显著,  $p < 0.05$ ; 图 2, A, B), 分布在分子量 33.70~96.17 kD, 等电点 5.33~8.67 的范围内。浆蜂蜂王浆中特有的蛋白质点有 63 个(图 2, C), 分布在分子量 23.3~94.59 kD, 等电点 5.15~8.15 的范围内。而中蜂蜂王浆中特有的蛋白质点为 40 个(图 2, D), 分布在分子量 33.58~96.77 kD, 等电点 4.38~9.15 的范围内。

浆蜂和中蜂蜂王浆的蛋白组成不仅蛋白数量存在差异, 而且蛋白丰度也存在差异, 这对今后深入研究中蜂蜂王浆蛋

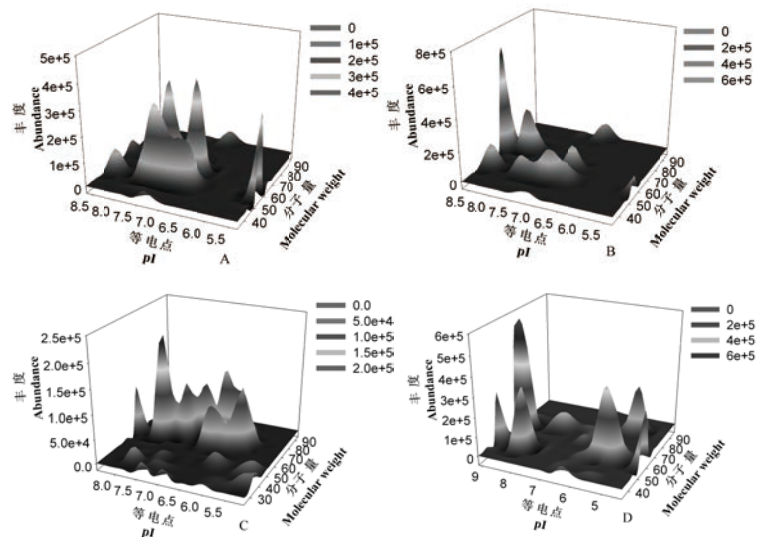


图 2. 浆蜂王浆(A, C)和中蜂王浆(B, D)的蛋白质共有点和特有点

Fig. 2. Coexistent proteins and the unique proteins from the high royal jelly producing bees royal jelly(A, C), Chinese honey bees royal jelly(B, D)

MRJP2: 分子量 50.67~60.00 kD, 等电点 4.92~7.02) 基本一致。

葡萄糖氧化酶在浆蜂、意大利蜜蜂王浆中检测到 3 种不同形式(Li *et al.*, 2007), 在非洲蜂王浆和哺育蜂咽下腺中发现 5 种和 1 种形式(Santos *et al.*, 2005), 本实验葡萄糖氧化酶在浆蜂与中蜂中相同, 分子量和等电点与前人报道基本一致。

## 参 考 文 献

- Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding(J). *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(5):248~254
- Li J K, Wang T, Zhang Z H and Pan Y H. Proteomic analysis of royal

- jelly from three strains of Western Honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Agriculture Food Chemtris*, 2007, 55 (21), 8411~8422
- Santos K S, Santos L D, dos Mendes M A, Souza B M, de Malaspina O and Palma M S. Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera* L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 35: 85~91