

意大利蜜蜂工蜂毒腺内蜂毒与电取蜂毒蛋白质组比较

李荣丽, 张 兰, 韩 宾, 房 宇, 冯 毛, 周天娥, 李建科

(中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093)

摘要: 【目的】对意蜂工蜂毒腺蜂毒和电取蜂毒蛋白质组成的特点和差异进行探究, 为进一步了解蜂毒的化学组成和合理利用提供理论依据。【方法】采用凝胶电泳和非凝胶技术对直接从毒腺内获取蜂毒(毒腺蜂毒)和电取蜂毒的蛋白质组进行比较, 对差异蛋白进行质谱分析、功能鉴定和生物信息学分析。【结果】在毒腺蜂毒中, 一维凝胶电泳(1-DE)鉴定19种蛋白, 双向凝胶电泳(2-DE)鉴定11种蛋白, 非凝胶法鉴定14种蛋白, 3种方法在毒腺蜂毒中共鉴定30种非冗余蛋白质, 它们是蜂毒毒素成分(50%)和保护腺体细胞免受毒素损伤的抗氧化类蛋白和蛋白成熟加工相关的蛋白折叠、分子转运类等(50%)。在电取蜂毒中, 1-DE鉴定12种蛋白, 2-DE鉴定3种蛋白, 非凝胶法鉴定7种蛋白, 3种方法共鉴定14种非冗余蛋白质, 它们主要是蜂毒毒素成分(93%)。其中类磷脂酶A2在2种蜂毒中首次鉴定, 肽基辅氨酰顺反异构酶在毒腺蜂毒中首次发现。蜂毒明肽前蛋白原、镇静肽在毒腺蜂毒中的含量显著高于电取蜂毒。磷脂酶A-2、毒液二肽基肽酶IV前体、毒液过敏性酸性磷酸酶和肥大细胞脱粒肽在电取蜂毒中含量较高。【结论】毒腺蜂毒中蛋白种类丰富, 但电取蜂毒中主要毒素成分含量不低于毒腺蜂毒。由于蜂毒中的主要药物成分在毒素中, 因此, 电击取毒可有效利用蜂毒的功能成分。新发现的蜂毒蛋白对进一步认识蜂毒组成成分具有一定意义, 这为蜂毒合理利用提供理论依据和实践基础。

关键词: 意大利蜜蜂; 毒腺蜂毒; 电取蜂毒; 蛋白质组; 凝胶电泳; 非凝胶电泳

Proteome Comparison of Honeybee (*Apis mellifera ligustica*) Worker Venom Between Collected from Venom Glands and Electrical Stimulated

LI Rong-li, ZHANG Lan, HAN Bin, FANG Yu, FENG Mao, ZHOU Tian-e, LI Jian-ke

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

Abstract: 【Objective】The objective of this study is to investigate bee venom composition and difference by comparison of bee venom collected from venom glands and electrical stimulated of Italian bees (*Apis mellifera ligustica*), and to provide a theoretical basis for pharmaceutical application. 【Method】The proteome between bee venom collected directly from the venom glands and artificially electrical stimulation were compared using gel-based (one-dimensional gel electrophoresis, 1-DE, two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE) and gel-free proteomics approaches, mass spectrometry, and bioinformatics. 【Result】In the gland venom, 19, 11 and 14 proteins were identified by 1-DE, 2-DE and shotgun analysis, respectively, which correspond to 30 nonredundant proteins. They were mainly classified as bee venom toxins (50%), antioxidant systems, protein folding and molecular transporters (50%). In construct, in electrical stimulated venom, 12, 3 and 7 proteins were identified, respectively, by 1-DE, 2-DE and shotgun analysis. They were classified into 14 nonredundant proteins, which the major components were venom toxins (93%). Notably, phospholipase A2-like protein was identified for the first time in two forms of bee venom and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase was identified only in the gland venom for the first time. The abundance of apamin preproprotein and secapin in the gland venom were significantly

收稿日期: 2012-09-28; 接受日期: 2012-11-19

基金项目: 国家现代农业产业技术体系(蜜蜂)(CARS-45-KXJ13)、“十二五”国家科技支撑计划(2011BAD33B04)

联系方式: 李荣丽, Tel: 010-62591449; E-mail: lirongli87@126.com. 通信作者李建科, Tel: 010-62591449; E-mail: apisljk@126.com

higher than those in the electrical stimulated venom. However, phospholipase A-2, venom dipeptidyl peptidase IV precursor, venom allergen acid phosphatase and mast cell degranulating peptide had higher abundance in the electrical stimulated venom than those in the gland venom. 【Conclusion】 The venom collected from venom glands contains more protein species, but the abundance of the toxin proteins in electrical stimulated venom are no less than the venom collected from the glands. As the pharmacological components are mainly contained in the toxin proteins, the electrical stimulated venom is a convenient and effective way for utilization. The identified new proteins significantly extend the knowledge of bee venom composition. The result may provide a theoretical and practical basis for future rational use of the honeybee venom.

Key words: *Apis mellifera ligustica*; bee venom directly collected from venom glands; bee venom collected from electrical stimulated; proteome; gel-electrophoresis; gel-free

0 引言

【研究意义】意大利蜜蜂（意蜂，*Apis mellifera ligustica*）是世界上分布最广、饲养量最大的蜂种。蜂毒是蜜蜂自身和蜂群防卫的重要武器，它是一种成分复杂的动物毒素，含有多种药理成分，是天然药物开发利用的良好资源^[1-2]，已被广泛应用于关节炎、风湿病、神经痛、皮肤病、抗肿瘤等疾病的治疗^[3-5]。由毒腺直接获得的蜂毒与电刺激蜜蜂自主排出的蜂毒是获取蜂毒的 2 种方式^[6]，早期由于研究方法的局限，尚不能明确 2 种取毒方式获得的蜂毒具体差异成分。最近从蛋白质组水平上发现卡尼鄂拉蜜蜂毒腺蜂毒与电取蜂毒中的 44 种差异成分^[7-8]。因此，本研究利用蛋白质组学研究方法，探究意蜂工蜂毒腺蜂毒和电取蜂毒蛋白质组成的特点和差异，将对蜂毒的合理利用具有重要意义。【前人研究进展】蜂毒是工蜂毒腺与副腺分泌的一种成分复杂的透明液体^[9]，分泌后贮存在毒囊中，只有在蜇刺时才由蜇针排出^[10]。早在远古时代人们就发现蜂蜇可以治疗关节炎^[5]，目前以蜂毒为原料开发的生物药品已被用于治疗关节炎、风湿病、神经痛、皮肤病、抗肿瘤和抗辐射等^[3-5, 11-12]。但蜂毒中所含的溶血物质，会导致被蜇部位局部发痒、红肿，甚至临床上有过敏性水肿、过敏性休克等副作用^[13]。目前采用蛋白质凝胶过滤、离子交换色谱和毛细管电泳等技术已检测出西方蜜蜂（意蜂、卡蜂、欧洲黑蜂等）蜂毒中 6 种主要成分，蜂毒肽是最主要成分（干重 >50%），具有抗菌消炎的作用，其抗炎活性是氢化可的松的 100 倍^[14]，而且对肝癌细胞具有抑制作用^[15]。蜂毒明肽（占干重 2%），是一种强烈的神经毒素，具有强心、抗心律失常，调节免疫的作用^[16-17]。肥大细胞脱粒肽（占干重 2%—3%），在低浓度时引起肥大细胞脱颗粒和组胺的释放，引起炎症反应，在高浓度时具有抗炎活性^[18]。镇静肽（占干重 0.5%—2%），具有降压、镇静、降体温的生理活性^[19]。磷脂

酶 A-2（占干重 10%—12%），可以破坏细胞膜磷脂，使红细胞破裂产生溶血作用，是被蜇之后产生过敏反应的主要物质^[5]。磷脂酶 A-2 和磷脂酰肌醇-3,4-二磷酸协同作用可以诱导癌细胞凋亡，因此磷脂酶 A-2 具有抑制癌细胞分裂增殖的作用^[20]。透明质酸酶（占干重 1%—2%），可以水解连接组织间隙的黏多糖基质的主要成分——透明质酸，从而促进毒液在组织间隙的扩散，是次要过敏源^[21]，此外还有王浆蛋白 8、9，allergen Api m 6 和毒液过敏性酸性磷酸酶等 9 种过敏源物质^[22]。人类利用蜂毒主要有 2 种来源，毒腺直接提取蜂毒和电取蜂毒。毒腺蜂毒是蜜蜂非自主排毒，由人工从蜜蜂毒囊中直接获取新鲜液体蜂毒；电取蜂毒是蜜蜂自主排毒，采用电击法刺激蜜蜂产生蜇刺行为，将毒腺中的蜂毒排到玻璃板上干燥后获得蜂毒干粉^[23]。20 世纪 70 年代，已有研究报道膜翅目针尾部昆虫（如蜜蜂、胡蜂、大黄蜂和小黄蜂）的毒腺蜂毒与电取蜂毒成分存在差异^[6, 24]，但是由于研究方法的局限，未能给出 2 种取毒方式上毒素成分的具体差异。意蜂作为西方蜜蜂的一种，采用高效液相色谱的方法发现了意蜂电取蜂毒中的蜂毒肽、磷脂酶 A-2 和镇静肽^[25]。蛋白质组研究平台已成为当今鉴定复杂生物样品组成的主要工具^[26-27]，利用双向凝胶电泳技术已从卡蜂毒腺蜂毒中鉴定 39 种非冗余蛋白质^[28]，而采用非凝胶电泳技术在其电取蜂毒仅鉴定了蜂毒中 5 种组分^[8]。随着蛋白质组技术快速发展，凝胶与非凝胶蛋白质组技术结合，能很好地实现对复杂生物蛋白质组的鉴定，利用该技术蜂王浆中的 19 种新蛋白质已成功得到鉴定^[29]。而迄今为止利用这 2 种互补的蛋白质技术对意蜂蜂毒蛋白质组的分析还未见报道。【本研究切入点】意蜂在世界分布最广，是中国饲养最多的西方蜜蜂蜂种，利用互补的蛋白质组学研究方法深入分析毒腺蜂毒和电取蜂毒蛋白质组特点和差异，为蜂毒的合理利用奠定基础。【拟解决的关键问题】分析比较意蜂工蜂毒腺内蜂毒与电取蜂毒蛋白质组成特点和

差异,进一步认识 2 种取毒方式获得蜂毒的化学成份,为合理利用意蜂蜂毒提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

十二烷基硫酸钠 (SDS)、甘油、Tris 碱、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、溴酚兰、尿素、硫脲、琼脂糖、碳酸氢铵 (NH_4HCO_3)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺 (TEMED)、过硫酸铵 (AP)、3-[(3-胆酰胺基丙基) 二甲基铵基]-2-羟基-1-丙磺酸盐 (CHAPS)、牛血清白蛋白 (BSA)、甘氨酸均为 Sigma 公司产品 (St. Louis, MO, USA)。碘乙酰胺 (IAA)、二硫苏糖醇 (DTT) 购自 Merck 公司 (Darmstadt, Germany)。胰酶为 Roche 公司产品 (Mannheim, Germany)。固定化的 pH 梯度胶条 (pH 3—10, 线性)、两性电解液 (biolyte, 3—10)、矿物油均为 Bio-Rad 公司产品 (Hercules, CA, USA)。丙酮、乙腈、三氟乙酸 (TFA) 和甲酸为 J. T. Baker 公司产品 (Phillipsburg, NJ, USA)。硝酸银 (AgNO_3)、铁氰化钾 ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)、无水碳酸钠 (Na_2CO_3)、硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 和甲醛购自北京试剂公司。

1.2 取样

试验于 2011 年 7 月至 2012 年 3 月在中国农业科学院蜜蜂研究所完成。毒腺蜂毒取自中国农业科学院蜜蜂研究所蜂场的 5 群意蜂。采集蜂巢门口的守卫蜂,于 -20°C 使其麻醉,用手术镊子小心将蜜蜂的蛰刺及毒囊毒腺从蜜蜂腹部末端拔出,于滤纸上吸干外部液体,防止粘在毒囊外的淋巴液污染,置于 Eppendorf 管的盖子上,用毛细管吸取毒囊中的毒液,收集至 $150\ \mu\text{L}$ 裂解液中 ($8\ \text{mol}\ \text{L}^{-1}$ urea, $2\ \text{mol}\ \text{L}^{-1}$ thiourea, 4% CHAPS, $20\ \text{mmol}\ \text{L}^{-1}$ Tris-base, $30\ \text{mmol}\ \text{L}^{-1}$ DTT), 每管大约收集 100 只工蜂的毒液。

意蜂电取蜂毒采用副盖式电击取毒器 (专利号: ZL 2006 2 0092189.2) 收集。取毒器由脉冲器和电网组成,输出电压 3 V, 自动间歇。打开蜂箱大盖, 拿去覆盖和覆布, 把电网放在蜂箱上口, 有钢丝的一面朝下, 打开电源开关, 敲打蜂箱以激怒蜜蜂, 当蜜蜂身体触碰到任意两根金属丝时, 受到电流刺激而产生蛰刺行为, 蜜蜂蛰针透过丝网把蜂毒排在玻璃板上, 几十秒后蜂毒液体部分挥发后成为晶体状。选取同上 5 个意蜂蜂群进行采集, 待蜂毒干燥后从玻璃板上刮下收集。

毒腺蜂毒及电取蜂毒样品置于 -80°C 存放以供后

期试验所用。

1.3 蜂毒蛋白质提取

蜂毒蛋白质的提取参照 Zhang 等^[30]的方法进行。称取电取蜂毒 20 mg, 溶于 $150\ \mu\text{L}$ 的裂解液中, 冰浴上研磨直至看不到颗粒, 超声处理 2 min, 4°C , 12 000 g, 离心 15 min/次 $\times 2$ 次, 避开杂质取上清液放入另一新 Ep 管中, 按照 3—4 倍取上清液体积加入冷丙酮, 混合均匀后, 冰浴静置 30 min, 4°C , 12 000 g, 离心 15 min/次 $\times 2$ 次, 弃去上清, 带丙酮挥发后, 沉淀中按每 1 mg 蜂毒蛋白加入 $5\ \mu\text{L}$ LB, 冰浴研磨 5 min, 超声 2 min, 使蛋白充分溶解制成蛋白样品溶液。

毒腺蜂毒采用同上丙酮沉淀方法制备蜂毒蛋白样品溶液。

蛋白浓度测定按照 Bradford 介绍的方法^[31]。用 BSA 做标准曲线, 测定 595 nm 波长吸光度 (Beckman, spectrophotometer DU800)。

1.4 一维凝胶电泳和双向凝胶电泳

一维凝胶电泳过程参考 Han 等^[29]的方法。每孔中蜂毒蛋白上样量 $50\ \mu\text{g}$ ($7.5\ \mu\text{L}$), $4\times$ 蛋白上样缓冲液 $2.5\ \mu\text{L}$, 每个样品做 3 次重复。双向凝胶电泳参考张兰等^[32]的方法。一维与双向凝胶电泳结果均采用与质谱兼容的银染方法进行染色, 并对一维凝胶电泳的每个泳道切分成 12 份, 按顺序放入带有标记的无菌 Ep 管中。对双向凝胶电泳的差异蛋白进行手动切点, 放入有标记的无菌 Ep 管中。

1.5 蛋白质胶内和液内酶解

蛋白质胶内和液内酶解按 Han 等^[29]报道的方法进行。

1.6 质谱分析和蛋白质鉴定

参考 Zhang 等^[30]质谱分析和蛋白质鉴定方法。质谱数据利用 MassHunter 软件 (Agilent Technologies) 采集, 将这些数据转化成 .mgf 文件后, 通过本地 MASCOT (Version 2.3, Matrix Science) 进行搜库。数据库是 2012 年 4 月从 NCBI 下载, 包含有蜜蜂序列数据库、果蝇序列数据库、酵母序列数据库和常见污染物序列数据库共 72 672 个序列。搜库参数为: 未水解的酶切位点数 (max missed cleavages) 允许有 1 个不完全裂解位点, 固定修饰 (fixed modifications) 为 Carboxymethyl (C); 可变修饰 (variable modifications) 为 Oxidation (M); 离子选择 (mass values) 为 Monoisotopic; 肽片段质量数最大容许误差范围 (peptide mass tolerance) 为 $\pm 50\ \text{ppm}$; 二级质谱最大误差范围 (MS/MS tolerance) 为 $\pm 0.05\ \text{Da}$; 肽段

带电情况优先选择 2+、3+ 和 4+；被鉴定蛋白质至少需要目标蛋白得分大于 30，至少有 2 个肽段匹配 ($P < 0.05$) 或有一条肽段匹配 ($P < 0.001$)，才接受该蛋白得到鉴定。对已鉴定的蛋白质利用 UniProt 数据库 (<http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>) 进行分析并对其生物学功能进行分类。

1.7 蛋白丰度分析

采用非标记定量法对非凝胶电泳产生的质谱数据在 Mascot 搜库所鉴定蛋白进行定量，定量方法为蛋白指数改进丰度指标 (Exponentially modified protein abundance index, emPAI)，蛋白相对含量 (mol%) = $\text{emPAI} / \sum(\text{emPAI}) \times 100$ ，其中 $\sum(\text{emPAI})$ 代表所有鉴定到蛋白的 emPAI 总和^[33]。对毒腺蜂毒与电取蜂毒中经非凝胶技术鉴定到的蛋白质含量进行显著性分析 (SPSS17.0)，采用单因素方差分析，选用邓肯新复

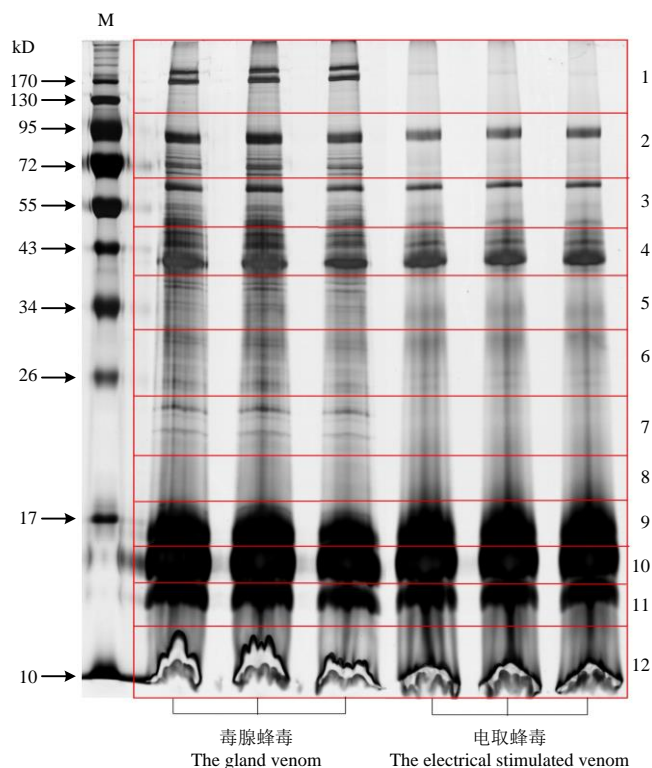
极差法进行比较， $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

采用 Progenesis SameSpot (Nonlinear Dynamic) 软件对毒腺蜂毒和电取蜂毒的 2-DE 胶图进行图像斑点检测和匹配，每个样品均选取 4 张胶图确保结果的重现性。对蛋白质表达量进行统计分析，当 $P < 0.05$ 且蛋白丰度差异变化大于 2 倍时才认为是差异表达蛋白质。

2 结果

2.1 毒腺蜂毒与电取蜂毒 1-DE 比较

毒腺蜂毒要比电取蜂毒蛋白种类丰富 (图 1)。对毒腺蜂毒和电取蜂毒的 12 个区带进行蛋白种类鉴定发现，毒腺蜂毒中鉴定到 19 种非冗余蛋白质，在电取蜂毒中鉴定到 12 种非冗余蛋白质 (表 1)，2 种蜂毒中共有蛋白质为 11 种，其中类磷脂酶 A2 在 2 种蜂



M 为标准蛋白 Marker。图中 2 个蜂毒样品分别做 3 次重复，每孔蛋白上样量为 50 μg ，采用与质谱兼容的银染方法对胶图染色。每个样品泳道被分成 12 个组分进行质谱鉴定

A 50 μg of protein sample subjected to each gel lane with three replications in each sample. The proteins were stained according to a mass spectrometry compatible silver-staining method and separated into 12 fractions (marked by boxes and labeled 1-12). The molecular weight markers (M) were indicated on the left. Proteins were identified by high-performance liquid chromatography chip quadruple time-of-flight tandem mass spectrometry

图 1 毒腺蜂毒与电取蜂毒蛋白一维电泳图谱

Fig. 1 Separation of bee venom directly collected from venom glands and electrical stimulated by one-dimensional gel electrophoresis

表 1-1-1-DE 法鉴定的毒腺蜂毒与电取蜂毒蛋白

蛋白登录号, Protein accession number,	蛋白名称, Protein name,	得分, Score,	分子量, M _r (kD),	pI,	匹配肽段数, Number of unique- peptides,	序列覆盖率, Sequence coverage (%),	组分编号, Gel fraction (Fig. 1),	期望值, E value,	毒腺蜂毒, The gland venom,	电取蜂毒, The electrical stimulated venom,
共有蛋白, Common existed proteins,	蜂毒肽 Melittin,	512,	8.57,	6.03,	1,	18,	1-12,	9.50E-09,	√,	√,
		561,	8.57,	6.03,	1,	19,	1,6,8-10,	1.30E-08,	√,	√,
	磷脂酶 A-2 Phospholipase A-2,	222,	19.05,	7.18,	4,	37,	1-12,	√,	√,	√,
		125,	19.05,	7.18,	2,	50,	1,6-12,	√,	√,	√,
	gl187281543, 毒液二肽基肽酶 IV 前体, Venom dipeptidylpeptidase 4 precursor,	390,	88.34,	5.72,	16,	33,	2,	√,	√,	√,
	gl67010041, 王浆蛋白 9 前体, Major royal jelly protein 9 precursor,	647,	88.34,	5.72,	6,	10,	2,	√,	√,	√,
	gl58585070, 王浆蛋白 8 前体, Major royal jelly protein 8 precursor,	86,	48.94,	8.7,	2,	15,	3,4,	√,	√,	√,
		1018,	48.94,	8.7,	7,	16,	4,	√,	√,	√,
	gl187281550, 毒液羧基酯酶 6 前体, Venom carboxylesterase-6 precursor,	199,	47.33,	6,	6,	19,	3,4,	√,	√,	√,
	gl66821891, 毒液过敏性酸性磷酸酶, Venom allergen acid phosphatase,	115,	47.33,	6,	3,	8,	4,	√,	√,	√,
		214,	63.94,	9.33,	7,	19,	3,	√,	√,	√,
	gl58585182, 透明质酸酶前体, Hyaluronidase precursor,	295,	63.94,	9.33,	10,	20,	3,	√,	√,	√,
		1798,	44.11,	5.63,	22,	67,	4,	√,	√,	√,
	gl110738297, 类磷脂酶 A2, Phospholipase A2-like,	2185,	44.11,	5.63,	15,	47,	4,	√,	√,	√,
	gl94400907, Allergen Api m 6 precursor,	1433,	44.46,	8.67,	29,	65,	4,5,	√,	√,	√,
		1890,	44.46,	8.67,	20,	38,	4,	√,	√,	√,
	gl58585166, 蜂毒明肽前蛋白原, Apamin preprotein,	49,	21.15,	8.81,	3,	17,	9,	√,	√,	√,
		81,	21.15,	8.81,	4,	21,	10,	√,	√,	√,
	gl328780884, Apolipophorin isoform 1, Apolipophorin-like,	134,	10.38,	9.83,	5,	47,	11,12,	√,	√,	√,
		120,	10.38,	9.83,	4,	28,	12,	√,	√,	√,
	gl328780886, Apolipophorin-like,	72,	5.51,	8.77,	1,	19,	12,	2.00E-06,	√,	√,
		54,	5.51,	8.77,	1,	19,	12,	2.00E-04,	√,	√,
特异蛋白, Specific proteins,	卵黄蛋白原 Vitellogenin,	688,	202.12,	6.29,	26,	34,	1,	√,	√,	√,
	gl149939403, 昆虫储存蛋白 Hexamerin, Venom serine carboxypeptidase precursor,	397,	202.12,	8.65,	15,	24,	1,	√,	√,	√,
		267,	85.16,	8.8,	6,	12,	2,	√,	√,	√,
		76,	81.55,	6.43,	5,	6,	2,	√,	√,	√,
		216,	53.78,	6.65,	2,	4,	3,	√,	√,	√,

续表 1 - Continued Table 1.

Protein accession number	蛋白质名称	得分	分子量	等电点	匹配肽段数	序列覆盖率	组分编号	期望值	毒腺蜂毒	电取蜂毒
Protein accession number	Protein name	Score	Mr (kD)	pI	Number of unique peptides	Sequence coverage (%)	Gel fraction (Fig. 1)	E value	The gland-venom	The electrical-stimulated-venom
gi58585116	毒液丝氨酸蛋白酶 34 前体	49	46.40	8.64	1	4	10	5.10E-05	√	√
	Venom serine protease 34 precursor									
gi335892796	肽基脯氨酸顺反异构酶	40	22.74	8.42	2	11	11		√	√
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor									
gi328783193	脱氢酶还原酶 SDR 家族成员	81	28.19	8.44	1	5	7	1.90E-07	√	√
	Dehydrogenase/reductase SDR family member-11-like									
gi1708948	肥大细胞脱粒肽	83	6.062	9.87	1	18	12	3.20E-06	√	√

蛋白登录号是与 NCBI 数据库相对应的唯一编号，蛋白名称是通过质谱所鉴定的蛋白，蛋白名称表示在 Mascot 蛋白数据库检索出的结果有效，分子量和等电点来源于 NCBI 数据库，匹配上的肽段数是指该蛋白所鉴定的非冗余肽段，序列覆盖率是指通过质谱鉴定的氨基酸序列占整个蛋白理论氨基酸序列的比例，组分编号是指鉴定到的蛋白来源于图 1 中的相应组分，如果一个蛋白在不同组分中均鉴定到，则选取得分最高，序列覆盖率最大或具有最多匹配肽段的进行列表，期望值是鉴定到的蛋白与数据库匹配的概率，如果鉴定到的蛋白只有一条肽段匹配，则要求期望值小于 0.001。Accession number was the unique number given to mark the entry of a protein in the database; NCBI: Protein name was given when proteins were identified by HPLC-Chip/ESI/TOF-MS. Score was search against the database; NCBI: Theoretical molecular weight (Mr) and isoelectric point (pI) of the identified proteins were retrieved from the protein database of NCBI. Number of unique peptides was the number of the unique peptide. Sequence coverage was the ratio of the number of amino acids in every peptide that matched with the mass spectrum divided by the total number of amino acids in the protein sequence. Gel fraction indicated from which fraction of the gel (Fig. 1) the protein was identified, and if one protein was identified from more than one fraction only the highest score and sequence coverage and the maximal number of unique peptides were given. E-value was the theoretical probability of obtaining false-positive protein identification, if the protein was identified on the basis of one peptide, this item was given and the figure should be less than 1 in 1000.

表 2 - 毒腺蜂毒和电取蜂毒 2-DE 中差异蛋白质鉴定

Table 2 - Identified differentially expressed proteins in bee venom directly collected from venom glands and electrical stimulated by 2-DE analysis

Spot number	蛋白登录号	蛋白名称	得分	分子量	等电点	匹配肽段数	序列覆盖率	期望值
Spot number	Protein accession number	Protein name	Score	Mr (kD)	pI	Number of unique peptides	Sequence coverage (%)	E value
1	gi187281543	毒液二肽基肽酶 IV 前体	420	88.34	5.72	10	22	
		Venom dipeptidyl peptidase IV precursor						
2, 3, 4	gi66821891	毒液过敏性酸性磷酸酶	432	44.11	5.63	3	38	
		Venom allergen acid phosphatase						
5, 6, 7	gi5627	磷脂酶 A-2	215	19.05	7.18	4	53	
		Phospholipase A-2						
8	gi110753367	Toil-like receptor 13-like isoform 1	97	76.63	6.09	1	7	6.90E-05
		Toil-like receptor 13-like isoform 1						
9	gi38585086	转铁蛋白 1 前体	425	80.03	6.77	13	39	
		Transferrin 1 precursor						
10	gi66514614	Chitinase-like protein Idgf4-like	127	50	8.06	5	32	
		Chitinase-like protein Idgf4-like						
11	gi38585146	精氨酸激酶	188	40.33	5.66	6	59	
		Arginine kinase						
12	gi380020933	类谷胱甘肽 S 转氨酶	460	23	5.49	9	57	
		Glutathione S-transferase-like isoform 1						
13	gi283436152	类过氧化物氧化还原蛋白	377	23.23	5.88	8	67	
		Peroxiredoxin-like protein						
14	gi328789531	Hypothetical protein LOC408666	77	37.2	7.3	1	22	5.20E-06
		Hypothetical protein LOC408666						
15	gi66535784	气味结合蛋白 21	122	15.54	4.76	3	27	
		Odorant binding protein 21 precursor						

蛋白点编号代表在图中相对点，蛋白登录号是与数据库相对应的唯一编号，蛋白名称表示在 Mascot 蛋白数据库检索出的结果有效，分子量和等电点来源于 NCBI 数据库，匹配上的肽段数是指该蛋白所鉴定的非冗余肽段，序列覆盖率是指通过质谱鉴定的氨基酸序列占整个蛋白理论氨基酸序列的比例，期望值是鉴定到的蛋白与数据库匹配的概率，如果鉴定到的蛋白只有一条肽段匹配，则要求期望值小于 0.001。Spot numbers were marked in accordance with the corresponding numbers on the gels. Accession number was the unique number given to mark the entry of a protein in the database; NCBI: Protein name was search against the database; NCBI: Theoretical molecular weight (Mr) and isoelectric point (pI) of the identified proteins were retrieved from the protein database of NCBI. Number of unique peptides was the number of the unique peptide. Sequence coverage was the ratio of the number of amino acids in every peptide that matched with the mass spectrum divided by the total number of amino acids in the protein sequence. E-value was the theoretical probability of obtaining false-positive protein identification, if the protein was identified on the basis of one peptide, this item was given and the figure should be less than 1 in 1000.

毒中首次鉴定, 肽基辅氨酰顺反异构酶在毒腺蜂毒中首次发现。毒腺蜂毒中特有蛋白为(在 1、2、3、7、10、11 这 6 个区带): 卵黄蛋白原、apolipoporphins isoform 1、apolipoporphins-like、昆虫储存蛋白、毒液丝氨酸羧肽酶前体、脱氢酶/氧化酶 SDR 家族成员 11、毒液丝氨酸蛋白酶 34 前体和肽基辅氨酰顺反异构酶 8 种, 而在电取蜂毒中特有蛋白为肥大细胞脱粒肽。

2.2 毒腺蜂毒与电取蜂毒 2-DE 比较

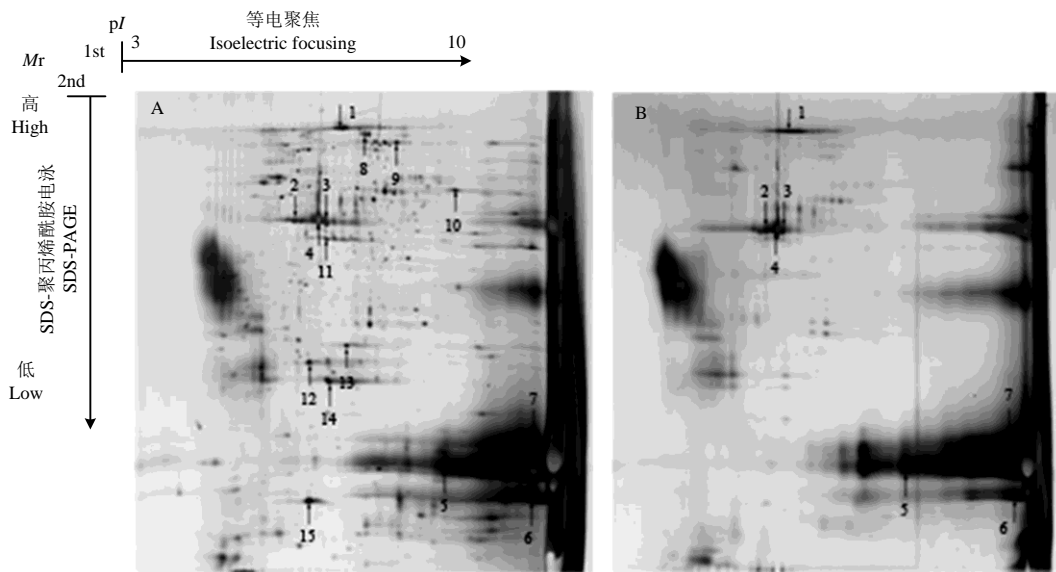
为了更好地分析毒腺蜂毒与电取蜂毒的差异蛋白质, 对毒腺蜂毒与电取蜂毒分别进行 2-DE 得到它们的蛋白质表达谱(图 2), 图中可以明显地看出毒腺蜂毒比电取蜂毒的蛋白点多, 毒腺蜂毒检测到 216 个蛋白点(分子量 15—88 kD, 等电点 4.5—8.67), 其中 76 个显著高于电取蜂毒; 电取蜂毒中检测到 104 个蛋白点(分子量 19—88 kD, 等电点从 4.5—8.67), 其中 40 个显著高于毒腺蜂毒。选取在电取蜂毒和毒腺蜂毒中的 7 个(1—7)和 8 个(8—15)差异蛋白质进行功能鉴定(表 2), 其中电取蜂毒中 7 个蛋白点鉴定为 3 种蛋白质, 均属于引起过敏反应的毒素主要组分, 其丰度在电取蜂毒较毒腺蜂毒高。在毒腺蜂毒中特有的 8 个蛋白点, 鉴定为 8 种蛋白质, 属于抗氧化

类和其它类蛋白。

2.3 毒腺蜂毒与电取蜂毒非凝胶结果比较

利用非凝胶蛋白组技术在毒腺蜂毒中共鉴定到 14 种非冗余蛋白质, 在电取蜂毒中共鉴定到 7 种非冗余蛋白质(表 3)。其中 5 种蛋白在 2 种蜂毒中共存在。毒腺蜂毒中特异鉴定到 9 种蛋白, 电取蜂毒中特异鉴定到 2 种蛋白。对毒腺蜂毒的 14 种蛋白质和电取蜂毒中的 7 种蛋白质丰度比较表明, 镇静肽、蜂毒明肽前蛋白原和 hypothetical protein LOC408666 在毒腺蜂毒中的含量要显著高于电取蜂毒, 而蜂毒肽和磷脂酶 A-2 在 2 种蜂毒中含量差异不显著(表 4)。

以上分析发现, 类磷脂酶 A2 和肽基辅氨酰顺反异构酶首次在蜂毒中鉴定。在毒腺蜂毒中, 1-DE 特异检测到 8 种蛋白, 2-DE 特异检测到 6 种蛋白, 非凝胶特异检测到 3 种蛋白, 共鉴定到 30 种非冗余蛋白, 其中毒素蛋白占总鉴定蛋白的 50%, 抗氧化类占 20%, 蛋白折叠和分子转运类占 16.67%, 其它类占 13.33%(表 5)。在电取蜂毒中, 1-DE 特异检测到 5 种蛋白, 2-DE 未能特异检测到蛋白, 非凝胶特异检测到 2 种蛋白, 共鉴定到 14 种非冗余蛋白, 毒素蛋白占总鉴定蛋白的 92.86%。毒腺蜂毒与电取蜂毒共存在 24 种差异



A、B 分别为毒腺蜂毒和电取蜂毒蛋白质图谱。每个样品上样量 500 μg , 采用与质谱兼容的银染染色, 图中数字标记的蛋白质点为胰酶消化后用质谱鉴定出结果的蛋白质点

A and B were proteome profiles of bee venom directly collected from venom glands and electrical stimulated, respectively. A 500 μg of each sample were subjected to 2-DE and the proteins were stained according to a mass spectrometry compatible silver-staining method. Number-labeled spots were cut out and subjected to tryptic digestion for mass spectrometry analysis

图 2 毒腺蜂毒和电取蜂毒 2-DE 蛋白质图谱

Fig. 2 2-DE protein profiles of bee venom directly collected from venom glands and electrical stimulated

表 3 非凝胶胶技术鉴定的毒腺蜂毒与电取蜂毒蛋白
Table 3 Total identified nonredundant proteins in bee venom directly collected from venom glands and electrical-stimulated by shotgun analysis¹⁾

蛋白登录号, Protein accession number,	蛋白名称, Protein name,	分子量, M _r , (kD),	等电点, pI,	总肽段, Peptide,	得分, Score,	序列覆盖率, Sequence coverage ⁺ (%),	匹配肽段数, Number of unique peptides,	期望值, E-value,	毒腺蜂毒, The gland venom,	电取蜂毒, The electrical- stimulated venom,
共有蛋白, Common existed proteins,										
gi 5627,	磷脂酶 A-2, Phospholipase A-2,	19.05,	7.18,	54,	1244,	69,	10,	,	,	,
gi 28201825,	蜂毒肽 Melittin,	8.57,	6.03,	13,	366,	18,	1,	4.20E-07,	,	,
gi 223850,	镇静肽 Secapin,	2.98,	9.84,	70,	1238,	32,	1,	1.20E-04,	,	,
gi 58585166,	蜂毒明肽前蛋白原, Apanin preproprotein,	5.51,	8.77,	8,	189,	19,	1,	9.20E-06,	,	,
gi 328789331,	Hypothetical protein LOC408666,	37.2,	7.3,	2,	109,	4,	1,	1.30E-07,	,	,
gi 335892796,	肽基脯氨酰顺反异构酶, Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor,	22.74,	8.42,	7,	247,	32,	6,	,	,	,
gi 67010041,	王浆蛋白 9 前体 Major royal jelly protein 9 precursor,	48.94,	8.7,	5,	122,	16,	4,	,	,	,
gi 58585182,	透明质酸酶前体 Hyaluronidase precursor,	44.46,	8.67,	10,	283,	22,	7,	,	,	,
gi 187281550,	毒液羧基酯酶 6 前体 Venom carboxylesterase-6 precursor,	63.94,	9.33,	7,	292,	13,	5,	,	,	,
gi 328782499,	多肽激活前体 Proactivator polypeptide isoform 1,	103.06,	5.32,	7,	177,	15,	5,	,	,	,
gi 94158822,	气味结合蛋白 14 Odorant binding protein 14,	15.59,	5.71,	1,	65,	9,	1,	1.70E-05,	,	,
gi 58585070,	王浆蛋白 8 前体 Major royal jelly protein 8 precursor,	47.33,	6,	4,	56,	6,	3,	,	,	,
gi 66507455,	毒液蛋白酶 Venom protease,	40.31,	6.39,	1,	74,	3,	1,	1.50E-07,	,	,
gi 58585116,	毒液丝氨酸蛋白酶 34 前体 Venom serine protease 34 precursor,	46.40,	8.64,	1,	69,	6,	1,	1.90E-06,	,	,
gi 94400907,	Allergen Api m 6 precursor,	10.38,	9.83,	33,	533,	47,	8,	,	,	,
gi 1708948,	肥大细胞脱颗粒肽 Mast cell degranulating peptide,	6.062,	9.87,	6,	112,	18,	1,	9.40E-05,	,	,

蛋白登录号是与数据库相对应的唯一编号，蛋白名称是通过质谱所鉴定的蛋白，蛋白分数表示在 Mascot 蛋白质数据库检索出的结果有效，分子量和等电点来源于 NCBInr 数据库，肽段数是质谱检测到的总肽段数，匹配上的肽段数是指该蛋白质所鉴定的非冗余肽段，序列覆盖率是指通过质谱鉴定的氨基酸序列占整个蛋白质理论氨基酸序列的比值，期望值是鉴定到的蛋白错误匹配的概率，如果鉴定到的蛋白只有一条肽段匹配，则要求期望值小于 0.001。
Peptide was the number of pairing an experimental fragmentation spectrum to a theoretical segment of protein. Accession number was the unique number given to mark the entry of a protein in the database NCBInr. Protein name was given when proteins were identified by HPLC-Chip ESI/TOF-MS. Score was searched against the database NCBInr. Theoretical molecular weight (M_r) and isoelectric point (pI) of the identified proteins were retrieved from the protein database of NCBInr. Number of unique peptides was the number of the unique peptide. Sequence coverage was the ratio of the number of amino acids in every peptide that matched with the mass spectrum divided by the total number of amino acids in the protein sequence. E-value was the theoretical probability of obtaining false-positive protein identification, if the protein was identified on the basis of one peptide; this item was given and the figure should be less than 1 in 1000.

蛋白,其中毒腺蜂毒中特有蛋白 17 种分别归类于毒液蛋白酶类(3种)、抗氧化类蛋白(6种)、蛋白折叠、分子转运类(5种)和其它类(3种)(表5),电取蜂毒中特有蛋白 1 种为毒素成分肥大细胞脱粒肽。结合 2-DE 中蛋白丰度比较与非凝胶技术鉴定的共有蛋

白含量综合分析发现,在毒腺蜂毒中,镇静肽、蜂毒明肽前蛋白原和 hypothetical protein LOC408666 的含量显著高于电取蜂毒。而在电取蜂毒中,磷脂酶 A-2、毒液二肽基肽酶 IV 前体、毒液过敏性酸性磷酸酶和肥大细胞脱粒肽的含量较毒腺蜂毒中高。

表 4 毒腺蜂毒与电取蜂毒中蛋白质含量表

Table 4 Proteins abundance of venom directly collected from venom glands and electrical stimulated by shotgun analysis

蛋白登录号 Protein accession number	蛋白名称 Protein name	毒腺蜂毒						电取蜂毒						P 值 P value
		Bee venom directly collected from venom glands						Bee venom directly collected from electrical stimulated venom						
		emPAI		蛋白含量 Protein content (mol%)				emPAI		蛋白含量 Protein content (mol%)				
gi 5627	磷脂酶 A-2 Phospholipase A-2	9.29	4.97	4.47	52.57	39.35	37.85	11.02	9.29	7.81	35.20	27.13	27.79	0.069
gi 223850	镇静肽 Secapin	1.22	1.22	1.22	6.9	9.66	10.33	1.22	1.22	1.22	3.90	3.56	4.34	0.009
gi 58585166	蜂毒明肽前蛋白原 Apamin preproprotein	0.62	0.62	0.62	3.51	4.91	5.25	0.62	0.62	0.62	1.98	1.81	2.21	0.009
gi 28201825	蜂毒肽 Melittin	2.75	2.75	2.75	15.56	21.77	23.29	1.69	6.25	2.75	5.40	18.25	9.79	0.112
gi 328789531	Hypothetical protein LOC408666	0.18	0.28	0.18	1.02	2.22	1.52	0.08	0.18	0.08	0.26	0.53	0.28	0.027
gi 335892796	肽基脯氨酸顺反异构酶 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor	1.2	0.93	0.93	6.79	7.36	7.87							
gi 67010041	王浆蛋白 9 前体 Major royal jelly protein 9 precursor	0.36	0.36	0.28	2.04	2.85	2.37							
gi 58585182	透明质酸酶前体 Hyaluronidase precursor	0.73	0.51	0.4	4.13	4.04	3.39							
gi 187281550	毒液羧基酯酶 6 前体 Venom carboxylesterase-6 precursor	0.27	0.4	0.33	1.53	3.17	2.79							
gi 328782499	多肽激活前体 Proactivator polypeptide isoform 1	0.16	0.09	0.2	0.91	0.71	1.69							
gi 94158822	气味结合蛋白 Odorant binding protein 14	0.53	0.21	0.21	3.00	1.66	1.78							
gi 58585070	王浆蛋白 8 前体 Major royal jelly protein 8 precursor	0.21	0.14	0.07	1.19	1.11	0.59							
gi 66507455	毒液蛋白酶 Venom protease	0.08	0.08	0.08	0.45	0.63	0.68							
gi 58585116	毒液丝氨酸蛋白酶 34 前体 Venom serine protease 34 precursor	0.07	0.07	0.07	0.40	0.55	0.59							
gi 1708948	肥大细胞脱粒肽 Mast cell degranulating peptide							1.44	1.44	0.56	4.60	4.21	1.99	
gi 94400907	allergen Api m 6 precursor							14.62	14.62	14.62	46.69	42.7	52.03	

蛋白登录号是与数据库相对应的唯一编号,蛋白名称是通过质谱所鉴定的蛋白。emPAI 是用来估计大规模质谱数据中蛋白丰度的统计量, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义

Accession number was the unique number given to mark the entry of a protein in the database NCBI. Protein name was given when proteins were identified by HPLC-Chip/ESI/TOF-MS. The emPAI Calc-for the estimation of protein abundance from large-scale identification data by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Differences were considered to be significant at the level of $P < 0.05$

表 5 凝胶电泳和非凝胶技术在毒腺蜂毒与电取蜂毒中鉴定蛋白

Table 5 Summary of identified nonredundant proteins in bee venom directly collected from venom glands and electrical stimulated by gel-based and shotgun analysis

	蛋白登录号 Protein accession number	蛋白名称 Protein name	功能分类 Functional category	一维凝 胶电泳 1-DE	二维凝 胶电泳 2-DE	非凝胶 技术 Gel-free	毒腺蜂毒 The gland venom	电取蜂毒 The electrical stimulated venom	
共有蛋白 Common existed proteins	gi 5627	磷脂酶 A-2 phospholipase A-2 (Api m 1)	蜂毒毒素成分 Bee venom toxins	√	√	√		√	
	gi 58585182	透明质酸酶前体 Hyaluronidase precursor (Api m 2)		√			√	√	
	gi 66821891	毒液过敏性酸性磷酸酶 Venom allergen acid phosphatase (Api m 3)		√	√			√	
	gi 28201825	蜂毒肽 Melittin (Api m 4)		√		√	√	√	
	gi 187281543	毒液二肽基肽酶 IV 前体 Venom dipeptidyl peptidase IV precursor (Api m 5)		√	√		√	√	
	gi 94400907	Allergen Api m 6 precursor (Api m 6)		√		√		√	
	gi 58585166	蜂毒明肽前蛋白原 Apamin preproprotein		√		√	√	√	
	gi 223850	镇静肽 Secapin				√	√	√	
	gi 67010041	王浆蛋白 9 前体 Major royal jelly protein 9 precursor		√			√	√	
	gi 58585070	王浆蛋白 8 前体 Major royal jelly protein 8 precursor		√		√	√	√	
	gi 110758297	类磷脂酶 A2 Phospholipase A2-like		√			√	√	
	gi 187281550	毒液羧酸酯酶 6 前体 Venom carboxylesterase-6 precursor (Api m 8)		√		√	√	√	
	特异蛋白 Specific proteins	gi 58585116	毒液丝氨酸蛋白酶 34 前体 Venom serine protease 34 precursor (Api m 7)		√		√	√	
		gi 226533687	毒液丝氨酸羧肽酶前体 Venom serine carboxypeptidase precursor (Api m 9)		√			√	
gi 66507455		毒液蛋白酶 venom protease				√	√		
gi 1708948		肥大细胞脱粒肽 Mast cell degranulating peptide		√		√		√	
gi 380020933		S-谷胱甘肽转移酶 Glutathione S-transferase-like isoform 1	抗氧化 系统类		√		√		
gi 58585086		转铁蛋白 Transferrin 1 precursor	Antioxidant systems		√		√		
gi 110755367		Toll-like receptor 13-like isoform 1			√		√		
gi 58585104		卵黄蛋白原 Vitellogenin		√			√		
gi 66514614	类几丁质酶蛋白 Chitinase-like protein Idgf4-like			√		√			
gi 283436152	过氧化物氧还蛋白 Peroxiredoxin-like protein			√		√			

续表 5 Continued Table 5

蛋白登录号 Protein accession number	蛋白名称 Protein name	功能分类 Functional category	一维凝 胶电泳 1-DE	二维凝 胶电泳 2-DE	非凝胶 技术 Gel-free	毒腺蜂毒 The gland venom	电取蜂毒 The electrical stimulated venom
gi 58585146	精氨酸激酶 Arginine kinase	蛋白折叠	√			√	
gi 335892796	肽基脯氨酰顺反异构酶 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor	转运类 Protein foldings and molecular transporters	√		√	√	
gi 328780884	Apolipoporphins isoform 1		√			√	
gi 328780886	Apolipoporphins-like		√			√	
gi 94158822	气味结合蛋白 Odorant binding protein 14			√	√	√	
gi 149939403	昆虫储存蛋白 Hexamerin	其它				√	
gi 328782499	多肽激活前体 Proactivator polypeptide isoform 1	Unknown				√	
gi 328783193	脱氢酶/氧化酶 SDR 家族成员 11 Dehydrogenase/reductase SDR family member 11-like					√	
共有蛋白 Common existed proteins	gi 328789531 Hypothetical protein LOC408666				√		√
				√	√	√	

基于凝胶和非凝胶方法鉴定到的所有非冗余蛋白都被归入相应的功能组中

All the nonredundant proteins identified by both gel based and shotgun techniques were classified into functional groups

3 讨论

本研究采用凝胶电泳和非凝胶电泳 2 种互补的蛋白质组学方法对意蜂工蜂毒腺蜂毒和电取蜂毒蛋白质组成特点和差异进行分析, 全面分析比较了 2 种蜂毒的化学组成, 毒腺蜂毒中共鉴定到 30 种蛋白, 电取蜂毒中共鉴定到 14 种蛋白, 毒腺蜂毒与电取蜂毒中共存在 24 种差异蛋白, 并对差异蛋白进行了定性和定量分析。2-DE 是研究蛋白质组学的传统技术, 但是对一些极性蛋白 ($pI < 4$ 或者 $pI > 10$, $Mr < 15$ kD 或者 $Mr > 200$ kD) 不能有效分离^[34]。由于蜂毒中含有的蜂毒明肽前蛋白原、蜂毒肽和镇静肽均为小分子蛋白 ($Mr < 10$ kD), 高丰度蛋白磷脂酶 A-2 具有多种亚型, 透明质酸酶前体和 allergen Api m 6 precursor 等电点接近 10, 在凝胶电泳碱性端连接成片, 不能有效分离单个蛋白点, 所以 2-DE 技术未能鉴定到以上蛋白质。1-DE 则根据分子量大小将蜂毒进行初步分离, 不受等电点限制, 所以在 2-DE 中受等电点影响的组分经 1-DE 得到了很好地鉴定。但是在对混合组分进行质谱分析, 高丰度肽段将掩盖低丰度肽段的信号^[29], 因此, 在 1-DE 和非凝胶电泳技术中未能鉴定到的低丰度肽段很可能受到蜂毒中含有的高丰度蜂毒肽和磷脂酶 A-2 所掩盖。2-DE 可以将复杂的蛋白样品根据分子量和等电点的不同使其在凝胶上分离为独立的蛋白点, 对单

个蛋白点进行质谱鉴定可以大大提高鉴定效率, 本研究选取毒腺蜂毒中的 15 蛋白点, 均得到很好鉴定 (分子量 15—88 kD, 等电点 4.76—8.06)。对分子量极大和极小的蛋白凝胶电泳技术仍无法得到鉴定, 此时结合使用非凝胶电泳技术, 鉴定到了镇静肽和多肽激活前体, 这体现了 2 种方法的互补性。本试验中结合应用凝胶电泳技术和非凝胶电泳技术的研究方法, 不但全面分析了 2 种蜂毒的蛋白差异, 而且首次在蜂毒鉴定了类磷脂酶 A2 和肽基辅氨酰顺反异构酶。这不但说明了该研究系统的先进性, 而且是对蜂毒蛋白质组的进一步补充和发展。

属于蜂毒毒素蛋白类中的透明质酸酶、毒液二肽基肽酶 IV、allergen Api m 6、毒液羧酸酯酶 6、蜂毒明肽和王浆蛋白 8、9 在毒腺蜂毒与电取蜂毒均得到鉴定, 在本试验中这些物质均是以前体形式存在。生物体中具有生物学活性的蛋白如酶类、调节或防御蛋白类、毒素类等均是以不活跃的前体形式存在, 在特定的酶催化下经过一系列成熟加工才能成为有活性的物质^[35]。这些前体物质在蜜蜂进行防御蜇刺时进入敌害细胞, 此后要经过一系列的翻译后修饰才能转化为具有活性的物质而行使防御功能。毒腺蜂毒与电取蜂毒中同时存在的磷脂酶 A-2 (Api m 1)、透明质酸酶 (Api m 2)、毒液过敏性酸性磷酸酶 (Api m 3)、二肽基肽酶 IV (Api m 5)、allergen Api m 6 (Api m 6)、

毒液羧酸酯酶 6 (Api m 8) 和王浆蛋白 8、9 (Api m 11) 均为引起人类过敏反应的过敏原^[36-37]。这为蜂毒脱敏实现商业化提供了明确目标蛋白。

本研究发现类磷脂酶 A2 属于磷脂酶 A2 家族, 参与磷脂代谢过程。磷脂酶 A2 不但具有溶血作用, 也可以抑制癌细胞分裂增殖, 具有抗癌作用^[20]。肽基脯氨酰顺反异构酶是细胞内普遍存在的参与蛋白折叠的酶^[38], 可能参与蜂毒蛋白的折叠而使其具有活性。因此, 类磷脂酶 A2 和肽基脯氨酰顺反异构酶的发现对进一步认识蜂毒化学组成及其潜在功能具有重要意义。

蜂毒作为蜜蜂的防御武器主要是通过毒素成分引起过敏反应而保护自己, 但对人类有益的药理成分也主要分布在毒素中, 如蜂毒肽、磷脂酶 A-2、allergen Api m 6、蜂毒明肽、镇静肽等在毒腺蜂毒与电取蜂毒中的共有蛋白。蜂毒肽和磷脂酶 A-2 可以破坏哺乳动物细胞膜, 产生溶血作用^[5, 18], allergen Api m 6 可引起严重过敏反应^[37]。当蜜蜂受到电刺激后, 进行蜇刺行为排出蜂毒, 因此电取蜂毒中具有较高含量的毒液过敏性酸性磷酸酶、肥大细胞脱粒肽和 allergen Api m 6 与蜜蜂进化过程中形成的高效自身防御和保护群体的机制相符合。同时, 蜂毒肽、蜂毒明肽、镇静肽和磷脂酶 A-2 也是蜂毒的主要活性成分, 其中蜂毒明肽和镇静肽具有神经节阻断、镇痛作用^[17, 19], 对神经系统疾病效果显著, 它们在毒腺蜂毒含量显著高于电取蜂毒, 而蜂毒肽和磷脂酶 A-2 均具有抑制癌细胞分裂增殖的作用, 是很好的抗癌药物^[15, 20], 已有研究证明毒液二肽基肽酶是蜂毒肽由非活性前蛋白转为活性蛋白的关键肽酶, 对蜂毒肽活性的发挥起重要作用^[39]。毒液二肽基肽酶 IV 前体和磷脂酶 A-2 在电取蜂毒中含量高, 电击取毒能更有效利用蜂毒中功能成分。由于电取蜂毒比毒腺内蜂毒获取容易, 可以进行商业化生产, 因此电击取蜂毒是进行蜂毒药物成分开发较为合理的方式。

毒腺蜂毒与电取蜂毒也存在各自特异的蛋白。毒腺蜂毒中特异存在的毒液丝氨酸蛋白酶在蜜蜂、群居黄蜂和点蜾蠃和黑腹蜾蠃毒液中均有报道^[40-42], 是引起人类过敏反应的过敏原之一, 但最近研究发现熊蜂毒液丝氨酸蛋白酶具有双重功能, 当其毒液作用到节肢动物时, 毒液丝氨酸蛋白酶可以激活节肢动物的酚氧化系统, 引发对方自身免疫反应, 造成过度黑化致死。当其毒液作用到哺乳动物时, 蜂毒丝氨酸蛋白酶具有类似蛇毒丝氨酸蛋白酶的性质, 具有溶解纤维蛋白原的活性和凝血酶活性, 可以改善血液流变^[43], 这

为开发具有凝血和治疗血栓作用的药物提供了可能。在电取蜂毒中特异存在的肥大细胞脱粒肽也具有双重作用, 在低浓度时, 引起肥大细胞脱颗粒和组胺等炎症物质释放, 在高浓度时, 具有抗炎效果, 所以肥大细胞脱粒肽可以作为研究炎症细胞如肥大细胞、嗜碱细胞和白细胞分泌机制的有效工具^[18]。对毒腺蜂毒与电取蜂毒中存在的特异蛋白, 可以根据其功效进行有选择的利用。

在毒腺蜂毒中存在一些非毒素蛋白如抗氧化、蛋白折叠、分子转运等蛋白, 它们与毒腺抗损伤机制、蜂毒蛋白的翻译后修饰及报警信息素的释放有重要关系。蜜蜂的毒腺和毒囊具有一系列形态上的适应来保护蜜蜂不受蜂毒中的有害物质损伤^[9], 在毒腺蜂毒中检测到的 S-谷胱甘肽转移酶、过氧化物还原酶和转铁蛋白, 已经证实可在卡蜂毒腺中可以清除由氧化应激带来的有害物质, 从而保护毒腺细胞不受损伤^[7]。几丁质酶是几丁质新陈代谢的重要催化剂^[44], 昆虫毒腺中存在由几丁质组成的具有韧性的柔软加厚的表皮, 这种特殊结构可以保护毒腺细胞免受氧化应激所产生的副产物的损伤^[7]。Toll-like receptor 13-like 是一种跨膜的信号转换蛋白, 它通过调控下游抗菌分子, 引起昆虫的体液免疫反应, 在蜜蜂的免疫和发育过程中具有重要作用^[45], 所以 Toll-like receptor 13-like 可能在毒腺抗损伤过程中具有重要作用。卵黄蛋白原不仅为胚胎发育提供营养物质, 同时也是蜂王体内的抗氧化剂, 通过减少氧化应激对蜂王的损伤提高蜂王寿命^[40], 所以在毒腺中存在的卵黄蛋白原可能是通过相同的机制来减少氧化应激对毒腺细胞的损伤。精氨酸激酶属于 ATP 肌基磷酸转移酶家族, 其主要参与蜂毒蛋白的磷酸化过程^[46]。肽基脯氨酰顺反异构酶作为催化蛋白质折叠反应重要的酶, 参与蛋白的折叠过程^[38], 因此肽基脯氨酰顺反异构酶可能在毒腺内对蛋白折叠过程中具有重要作用, 这与蜂毒中的蜂毒肽以四聚体形式存在^[47], 蜂毒明肽和磷脂酶 A-2 等中都存在二硫键^[48]等蛋白折叠结构相一致。Apolipoproteins 是一种载脂蛋白, 它还可以参与到信息素的运输^[49], 而气味结合蛋白是将疏水的气味物质运输到嗅觉感受器的转运类蛋白, 气味结合蛋白是多功能蛋白, 它不仅仅在嗅觉感受器表达, 也在蜜蜂的其它组织表达, 而且可以参与到信息素的运输^[50], 因此, 毒腺内的 Apolipoproteins 和气味结合蛋白可能参与信息素的运输, 这支持了蜜蜂发生蜇刺行为时释放大量的报警信息素^[51]。

同时在毒腺蜂毒中还检测到了 4 种功能未知蛋

白, 多肽激活前体、昆虫储存蛋白、脱氢酶/还原酶 SDR 家族成员和 hypothetical protein LOC408666, 其中多肽激活前体和昆虫储存蛋白在蜜蜂毒腺蜂毒中已有报道^[7,13], 对这些未知功能成分在蜂毒中的作用需进一步研究。

4 结论

本研究运用互补的蛋白质组学研究方法对意蜂毒腺蜂毒和电取蜂毒的蛋白质组进行了全面比较分析。它们的 24 种蛋白存在丰度差异, 尽管毒腺蜂毒所含蛋白种类丰富, 但其 50% 的蛋白种类是非蜂毒毒素蛋白, 而电取蜂毒中的 93% 为毒素蛋白, 且主要毒素成分含量不低于毒腺蜂毒。由于电取蜂毒易于商业化生产, 因此, 电击取毒是较有效利用蜂毒功能成分的途径。同时在蜂毒中首次发现了类磷脂酶 A2 和肽基脯氨酰顺反异构酶, 这对蜂毒合理利用和进一步认识蜂毒的化学组成提供了理论依据和实践意义。

References

- [1] Gauldie J, Hanson J M, Rumjanek F D, Shipolini R A, Vernon C A. The peptide components of bee venom. *European Journal of Biochemistry*, 1976, 61(2): 369-376.
- [2] Ratcliffe N A, Mello C B, Garcia E S, Butt T M, Azambuja P. Insect natural products and processes: New treatments for human disease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 41(5): 747-769.
- [3] Kokot Z J, Matysiak J. Simultaneous determination of major constituents of honeybee venom by LC-DAD. *Chromatographia*, 2009, 69(11): 1-5.
- [4] Son D J, Lee J W, Lee Y H, Song H S, Lee C K, Hong J T. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology & Therapeutics*, 2007, 115(2): 246-270.
- [5] Bogdanov S. Bee venom: composition, health, medicine: A review. *Bee Product Science*, 2012.
- [6] Hsiang H K, Elliott W B. Differences in honey bee (*Apis mellifera*) venom obtained by venom sac extraction and electrical milking. *Toxicon*, 1975, 13(2): 145-148.
- [7] Peiren N, De Graaf D C, Vanrobaeys F, Danneels E L, Devreese B, Van Beeumen J, Jacobs F J. Proteomic analysis of the honey bee worker venom gland focusing on the mechanisms of protection against tissue damage. *Toxicon*, 2008, 52(1): 72-83.
- [8] Matysiak J, Schmelzer C E H, Neubert R H H, Kokot Z J. Characterization of honeybee venom by MALDI-TOF and nanoESI-QqTOF mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011, 54(2): 273-278.
- [9] De Abreu R M M, Silva de Moraes R L M, Camargo-Mathias M I. Biochemical and cytochemical studies of the enzymatic activity of the venom glands of workers of honey bee *Apis mellifera* L.(Hymenoptera, Apidae). *Micron*, 2010, 41(2): 172-175.
- [10] 张巧利. 中华蜜蜂 (*Apis cerana*) 毒腺 cDNA 文库构建和表达序列标签 (EST) 分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2006. Zhang Q L. Construction of cDNA library from *Apis cerana* venom gland and analysis of Expressed Sequence Tag (EST) [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2006. (in Chinese)
- [11] Russell P J, Hewish D, Carter T, Sterling-Levis K, Ow K, Hattarki M, Doughty L, Guthrie R, Shapira D, Molloy P L, Werkmeister J A, Kortt A A. Cytotoxic properties of immunoconjugates containing melittin-like peptide 101 against prostate cancer: *in vitro* and *in vivo* studies. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2004, 53(5): 411-421.
- [12] Putz T, Ramoner R, Gander H, Rahm A, Bartsch G, Thumher M. Antitumor action and immune activation through cooperation of bee venom secretory phospholipase A2 and phosphatidylinositol-(3, 4)-bisphosphate. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2006, 55(11): 1374-1383.
- [13] Hoffman D R. Hymenoptera venom allergens. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 2006, 30(2): 109-128.
- [14] Fennell J F, Shipman W H, Cole L J. Antibacterial action of a bee venom fraction (melittin) against a penicillin-resistant staphylococcus and other microorganisms. DTIC Document, 1967.
- [15] Liu S, Yu M, He Y, Xiao L, Wang F, Song C, Sun S, Ling C, Xu Z. Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the Rac1-dependent pathway. *Hepatology*, 2008, 47(6): 1964-1973.
- [16] Vincent J P, Schweitz H, Lazdunski M. Structure-function relations and site of action of apamin, a neurotoxic polypeptide of bee venom with an action on the central nervous system. *Biochemistry*, 1975, 14(11): 2521-2525.
- [17] 浦升磊. 意大利蜜蜂蜂毒明肽相关基因 cDNA 克隆及表达研究[D]. 长春: 吉林大学, 2008. Pu S L. Cloning and expression of a cDNA encoding apamin from the venom of *Apis mellifera* [D]. Changchun: Jilin University, 2008. (in Chinese)
- [18] Buku A. Mast cell degranulating (MCD) peptide: a prototypic peptide in allergy and inflammation. *Peptides*, 1999, 20(3): 415-420.
- [19] 张素方, 施婉君, 张传溪, 程家安. 中华蜜蜂蜂毒镇静肽基因的 cDNA 克隆和表达. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, 19(3): 343-348.

- Zhang S F, Shi W J, Zhang C X, Cheng J A. Cloning and expression of a cDNA encoding secapin from the venom of *Apis cerana cerana*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 19(3): 343-348. (in Chinese)
- [20] Putz T, Ramoner R, Gander H, Rahm A, Bartsch G, Bernardo K, Ramsay S, Thurnher M. Bee venom secretory phospholipase A2 and phosphatidylinositol-homologues cooperatively disrupt membrane integrity, abrogate signal transduction and inhibit proliferation of renal cancer cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2007, 56(5): 627-640.
- [21] 于琨瑛, 杨慧. 蜂毒变应原及蜂毒免疫治疗. 生命的化学, 2006, 26(4): 358-360.
- Yu K Y, Yang H. Honeybee venom allergens and venom immune therapy. *Chemistry of Life*, 2006, 26(4): 358-360. (in Chinese)
- [22] Blank S, Bantleon F I, McIntyre M, Ollert M, Spillner E. The major royal jelly proteins 8 and 9 (Api m 11) are glycosylated components of *Apis mellifera* venom with allergenic potential beyond carbohydrate based reactivity. *Clinical & Experimental Allergy*, 2012, 42(6): 976-985.
- [23] 余茂耘, 韦传宝. 蜂毒生物制品及其临床应用价值. 中国临床康复, 2004, 8(5): 944-945.
- Yu M Y, Wei C B. Bee venom biological products and its clinical application value. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2004, 8(5): 944-945. (in Chinese)
- [24] Mueller U, Reisman R, Wypych J, Elliott W, Steger R, Walsh S, Arbesman C. Comparison of vespid venoms collected by electrostimulation and by venom sac extraction. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1981, 68(4): 254-261.
- [25] Rybak-Chmielewska H, Szczęśna T. HPLC study of chemical composition of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom. *Journal of Apicultural Science*, 2004, 48(2): 103-108.
- [26] John H, Walden M, Schäfer S, Genz S, Forssmann W G. Analytical procedures for quantification of peptides in pharmaceutical research by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378(4): 883-897.
- [27] 李建科, 冯毛, 郑爱娟. 蜜蜂蛋白质组研究进展. 中国农业科学, 2011, 44(17): 3649-3657.
- Li J K, Feng M, Zheng A J. Advanced research on honeybee proteome. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(17): 3649-3657. (in Chinese)
- [28] Peiren N, Vanrobaeys F, de Graaf D C, Devreese B, Van Beeumen J, Jacobs F J. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1752(1): 1-5.
- [29] Han B, Li C, Zhang L, Fang Y, Feng M, Li J. Novel royal jelly proteins identified by gel-based and gel-free proteomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59: 10346-10355.
- [30] Zhang L, Fang Y, Li R, Feng M, Han B, Zhou T, Li J. Towards posttranslational modification proteome of royal jelly. *Journal of Proteomics*, 2012, 75: 5327-5341.
- [31] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [32] 张兰, 李建科, 吴黎明. 王浆高产蜜蜂(*Apis mellifera* L.)卵期发育蛋白质组分析. 中国农业科学, 2007, 40(6): 1276-1287.
- Zhang L, Li J K, Wu L M. Profile analysis of the proteome of the eggs of the higher royal jelly producing bees (*Apis mellifera* L.). *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(6): 1276-1287. (in Chinese)
- [33] Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, Mann M. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2005, 4(9): 1265-1272.
- [34] Gärg A, Weiss W, Dunn M J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 2004, 4(12): 3665-3685.
- [35] Kozlov S A, Grishin E V. The universal algorithm of maturation for secretory and excretory protein precursors. *Toxicon*, 2007, 49(5): 721-726.
- [36] De Graaf D C, Aerts M, Danneels E, Devreese B. Bee, wasp and ant venomomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy. *Journal of Proteomics*, 2009, 72(2): 145-154.
- [37] Kettner A, Hughes G J, Frutiger S, Astori M, Roggero M, Spertini F, Corradin G. Api m 6: a new bee venom allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2001, 107(5): 914-920.
- [38] Gäthel S F, Marahiel M A. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1999, 55(3): 423-436.
- [39] Kreil G, Haiml L, Suchanek G. Stepwise cleavage of the pro part of promelittin by dipeptidylpeptidase IV. *European Journal of Biochemistry*, 1980, 111(1): 49-58.
- [40] Baek J H, Lee S H. Identification and characterization of venom proteins of two solitary wasps, *Eumenes pomiformis* and *Orancistrocerus drewseni*. *Toxicon*, 2010, 56(4): 554-562.
- [41] Winningham K M, Fitch C D, Schmidt M, Hoffman D R. Hymenoptera venom protease allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004, 114(4): 928-933.
- [42] Dos Santos L D, Santos K S, Pinto J R A, Dias N B, Souza B M, Dos

- Santos M F, Perales J, Domont G B, Castro F M, Kalil J E, Palam M S. Profiling the proteome of the venom from the social wasp *Polybia paulista*: a clue to understand the envenoming mechanism. *Journal of Proteome Research*, 2010, 9(8): 3867-3877.
- [43] Choo Y M, Lee K S, Yoon H J, Kim B Y, Sohn M R, Roh J Y, Je Y H, Kim N J, Kim I, Woo S D, Sohn H D, Jin B R. Dual function of a bee venom serine protease: prophenoloxidase-activating factor in Arthropods and Fibrin (ogen)olytic enzyme in mammals. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10393.
- [44] Krishnan A, Nair P N, Jones D. Isolation, cloning, and characterization of new chitinase stored in active form in chitin-lined venom reservoir. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(33): 20971-20976.
- [45] Evans J D, Aronstein K, Chen Y P, Hetru C, Imler J L, Jiang H, Kanost M, Thompson G J, Zou Z, Hultmark D. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 2006, 15(5): 645-656.
- [46] Kucharski R, Maleszka R. Arginine kinase is highly expressed in the compound eye of the honey-bee, *Apis mellifera*. *Gene*, 1998, 211(2): 343-349.
- [47] Weinberg M. *Applying Melittin's Structure to Inhibit the Proliferation of Tumor Cells*. 2011.
- [48] 柳涛, 藤田亚美, 熊本荣一. 蜂毒及其组成成分的生理作用机制及进展-致痛或镇痛. *神经解剖学杂志*, 2010, 25(6): 687-690.
- Liu T, Tsugumi Fujita, Eiiehi Kumamoto. Progress in physiological actions of bee venom and its components-noiception or antinociception. *Chinese Journal of Neuroanatomy*, 2009, 25(6): 687-690. (in Chinese)
- [49] Weers P M M, Ryan R O. Apolipoprotein III: role model apolipoprotein. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 36(4): 231-240.
- [50] Forêt S, Maleszka R. Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (*Apis mellifera*). *Genome Research*, 2006, 16(11): 1404-1413.
- [51] Boch R. Identification of iso-amyl acetate as an active component in the sting pheromone of the honey bee. *Nature*, 1962, 195: 1018-1020.

(责任编辑 岳梅)